# Zellbiologische Untersuchung α-Mannosidase-defizienter und Enzym-behandelter Mäuse

# Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

"Doctor rerum naturalium"

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Markus Damme

aus Göttingen

Göttingen 2009

D7

Referent:Prof. Dr. T. PielerKorreferentin:Prof. Dr. F. Melchior

Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.09

1	EINI	LEITUNG	1
1.1	Ly	ysosomen	1
1.2	Ly	ysosomale Proteine	1
1.3	Sy	ynthese lysosomaler Enzyme	2
1.4	Tr	ransport lysosomaler Enzyme	5
1.5	M	PR-unabhängiger Transport	6
1.6	Re	eifung lysosomaler Enzyme	7
1.7	De	egradation im lysosomalen Lumen	7
1.8	Ly	ysosomale Speichererkrankungen	9
1.9	Tł	herapie lysosomaler Speichererkrankungen	10
1.10	Di	ie Glykoproteinosen	13
1.11	α-	-Mannosidose – Defizienz der lysosomalen α-Mannosidase	15
1.12	KI	linik der α-Mannosidose	17
1.13	; Ti	iermodelle der α-Mannosidose	19
1.14	Da	as α-Mannosidose <i>Knockout</i> -Mausmodell	20
1.15	Zi	ielstellung der Arbeit	21
2	ΜΑΊ	TERIAL UND METHODEN	22
2.1	Ма	aterialien	22
2.	1.1	Geräte	22
2.	1.2	Verbrauchsmaterialien	23
2.	1.3	Microarrays	23
2.	1.4	Substrate füt enzymatische Bestimmungen	24
2.	1.5	Oligonukleotide	24
2.	1.6	Chemikalien	24
2.	1.7	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	26

2.1.8	Enzyme zur Bearbeitung von RNA, DNA und Proteinen	27
2.1.9	Antikörper	27
2.1.10	Sekundär-Antikörper für Immunfluoreszenz	28
2.1.11	HRP-konjugierte Sekundär-Antikörper	28
2.1.12	Protein- und DNA-Standards	28
2.1.13	Häufig verwendete Puffer	28
2.1.14	EDV	29
2.2 N	Iolekularbiologische Methoden	30
2.2.1	Isolierung genomischer DNA	30
2.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA	30
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	31
2.2.4	Polymerasekettenreaktion	31
2.2.5	Genotypisierungs-PCR des Man2B1-Allels	32
2.2.6	Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen	32
2.2.7	Auftrennung von RNA in Agarose-Gelen	33
2.2.8	Auftrennung von RNA durch LabChip Micro-Gelelektrophorese	34
2.2.9	cDNA-Synthese	35
2.2.10	Microarray-Analyse	36
2.2.11	Realtime-PCR	39
2.3 F	Proteinbiochemische Methoden	41
2.3.1	Herstellung von Gewebe-Homogenaten	41
2.3.2	Proteinbestimmung mit "DC-Protein Assay"	42
2.3.3	Enzymatische Aktivitätsbestimmung von Cathepsin B	42
2.3.4	Enzymatische Aktivitätsbestimmung lysosomaler Glykosidasen	43
2.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	44
2.3.6	Coomassie-Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen	46
2.3.7	Differentielle 2-D Gelelektrophorese (DIGE)	46
2.3.8	MALDI-TOF-Analyse von Proteinen	49
2.3.9	Western Blot	50
2.3.10	PNGaseF-Behandlung von Glykoproteinen	52
2.3.11	Endoglykosidase H-Behandlung von Glykoproteinen	53
2.3.12	2 Tritosomen-Präparation	53
2.3.13	Percoll™-Dichtezentrifugation	56
2.4 H	listochemische Methoden	57
2.4.1	Anfertigung von freischwimmenden Semi-Dünnschnitten	57
2.4.2	Immunohistochemische (IHC) Färbung von Gewebeschnitten des Gehirns	57

2	2.4.3	Immunohistochemische (IHC) Färbung von Gewebeschnitten der Leber	.58
2	2.4.4	Immunfluoreszenz von freischwimmenden Gewebeschnitten	.58
2	2.4.5	Reduzierung von Autofluoreszenz an Schnitten des Gehirns	.59
2	2.4.6	Filipin-Färbung von Gewebeschnitten	.59
	_		
2.5	Ana	alytik von Oligosacchariden	.60
2	2.5.1	Extraktion neutraler Oligosaccharide aus Geweben	.60
2	2.5.2	Dünnschichtchromatographie von extrahierten Oligosacchariden	.60
2.6	Tie	rexperimentelle Methoden	.61
2	2.6.1	Tierhaltung	.61
2	2.6.2	Enzym-Ersatz-Therapie	.62
2	2.6.3	Blutabnahme, Gewinnung von Serum	.62
2	2.6.4	Tötung von Mäusen	.62
3	ERGE	EBNISSE	63
3.1	Enz	zym-Ersatz-Therapie (ERT)	.63
3	8.1.1	Speicherung von neutralen Oligosacchariden und Behandlung durch die ERT.	.64
3.2	Tra	nskriptomanalyse	.66
3	3.2.1	Transkriptomanalyse 10 Wochen alter Tiere Wildtyp vs. <i>knockout</i>	.68
3	5.2.2	Transkriptomanalyse 13 Wochen alter Tiere Wildtyp vs. <i>knockout</i>	.69
3	5.2.3	Transkriptomanalyse 58 Wochen alter Tiere Wildtyp vs. knockout vs.	
		knockout-ERT	.70
3	8.2.4	Vergleich differentiell exprimierter Gene der verschiedenen Altersgruppen	.73
3	3.2.5	Effekt der ERT auf die differentielle Genexpression 58 Wochen alter Tiere	.74
3	8.2.6	Verteilung differentiell exprimierter Gene im murinen Genom	.75
3	3.2.7	Validierung der differentiellen Genexpression durch realtime-PCR	.77
3	5.2.8	Immunohistochemische Färbung von Kupfferzellen der Leber	.78
3	9.2.9	Expression von Cathepsin D in Kupfferzellen der Leber	.80
3.3	Ein	fluss der lysosomalen Speicherung auf andere lysosomale Enzyme	.82
3	31	Bestimmung der spezifischen Aktivität und Expression anderer lysosomaler	
0		Fnzvme	82
3	32	Expressions analyse der lysosomalen Membrannroteine Lamp1 und Lamp2	. 92
3	3.3	Aufreinigung lysosomaler Fraktionen der Leber und 2-D Gelelektronhorese	
5		lysosomaler Fraktionen	88
		Hoodenhaler Fraktioner	.00

	Sp	eicherung	135
4.3	Ve	ränderungen anderer lysosomaler Proteine aufgrund der lysosomalen	
4	.2.2	Differentiell exprimierte Gene, die auf die ERT ansprechen	132
4	.2.1	Differentiell exprimierte Gene, die nicht auf die ERT ansprechen	129
4.2	Tra	anskriptomanalyse	128
4.1	En	zymersatztherapie	127
4	DISM	(USSION	127
		mTOR-Signalweges	125
3	.4.10	Western Blot Analyse des Autophagie-Markers Beclin 1 und von Proteinen	des
3	.4.9	Western Blot Analyse des Autophagie-Markers LC3	123
3	.4.8	Expression des Niemann-Pick 2 (NPC2) Proteins	122
3	.4.7	Sekundäre Speicherung von Cholesterin im ZNS	119
3	.4.6	Co-Lokalisation von Bergmann-Glia und Purkinjezellen	118
3	.4.5	Immunohistochemische Färbung des Astroglia-Markers GFAP	116
3	.4.4	Co-Lokalisation von aktivierten Mikroglia und autofluoreszentem Material	115
3	.4.3	Immunohistochemische Färbung von Mikroglia im ZNS	113
3	.4.2	Histologische Untersuchung des Cerebellum	111
3	.4.1	Laserscanmikroskopie von Gehirnpräparaten	108
3.4	Ne	uropathologie α-Mannosidase-defizienter Mäuse	108
3	.3.12	Bestimmung der spezifischen Dichte von Lysosomen	106
5		Mausmodell.	105
3	.3.11	Untersuchung der Glykosylierung von Cathepsin B im Sanfilippo-Syndrom-	
3	.3.10	Proteine	103
ა	.3.9 2 10	Western Blot Analyse and Clykooyliorungestatus weiterer hessereder	99
~	2.0	von Wildtyp und <i>knockout</i> -Tieren auf 2-D Gelen	98
3	.3.8	Präparative Auftrennung und Vergleich der molekularen Formen von Cathe	epsin B
		PNGaseF und EndoH	96
3	.3.7	Untersuchung der Glykosylierung von Cathepsin B mittels der Glykosidase	en
3	.3.6	Western Blot Expressions-Analyse von Cathepsin B	94
		Lektin	92
3	.3.5	Untersuchung von lysosomalen F2-Fraktionen der Leber mit dem Lens cul	inaris-
-		knockout-Tieren	91
3	.3.4	Differentielle 2-D Gel Analyse lysosomaler F2-Fraktionen zwischen Wildtyr	o- und

IV

1	2.1	Everaggion und anazifiagha Aktivität lugggomalar Enzuma	125
4.	.J. I	Chikasulianung van Osthannin Didan Lahan	130
4.	.3.2	Gives silerung von Cathepsin B der Leber	37
4.	.3.3	Dichte der Lysosomen1	40
4.4	Neu	ıropathologie1	40
4	.4.1	Histologische und immunohistologische Untersuchung des ZNS1	41
4	.4.2	Sekundäre Speicherung autofluoreszenten Materials in Mikroglia des ZNS1	43
4	.4.3	Sekundäre Speicherung von Cholesterin1	44
4	.4.4	Akkumulation von Autophagosomen im ZNS α-Mannosidase-defizienter	
		Mäuse	45
15	۸۰۰	shlick	146
4.5	Aus		
5	71194	MMENEASSUNG 1	10
5	2004		73
6			50
0			50
7		NG 1	60
1	ANDA	ANG	00
7.1	Nor	malisierte Genexpression der GeneChip-Analyse von Genen um das	
	Mar	12B1-Gen1	68
7.2	Rea	Itime-PCR Primer-Sequenzen1	69
ABI	KURZU	JNGSVERZEICHNISS 1	70
_			
8	LEBE	NSLAUF 1	73
_			
9	VERC	DFFENTLICHUNGEN 1	75
9.1	Orio	ninalartikel1	175
-	-		-
9.2	Pos	terbeiträge1	175
10	DANK	(SAGUNG 1	76

V

# 1 Einleitung

### 1.1 Lysosomen

Lysosomen sind Membran-Umschlossene Organellen, deren Hauptaufgabe in der enzymatischen Degradation der verschiedenen Makromolekül-Klassen wie Lipiden, Proteinen, Mucopolysacchariden, Glykanen und Nukleinsäuren zu ihren niedermolekularen Grundbausteinen liegt. Diese können der Zelle nach dem Export aus dem Lysosom wiederum zur Synthese neuer Makromoleküle oder der Energiegewinnung dienen.

Der Begriff "Lysosom" wurde 1955 von Christian de Duve eingeführt (De Duve et al. 1955). De Duve definierte Lysosomen als Vesikel, die bei differentieller Zentrifugation mit einer Reihe verschiedener saurer Hydrolasen sedimentieren.

Nach heutiger Definition werden Lysosomen als Organellen bezeichnet, die luminal einen sauren pH-Wert (pH 4,5 – 5) aufweisen, reich an sauren Hydrolasen sind und Lysosome associated membrane protein (Lamp)-positiv, sowie Mannose-6-Phosphat Rezeptor (MPR) negativ sind (Futter et al. 1996).

#### 1.2 Lysosomale Proteine

Da in Lysosomen eine Reihe verschiedener Makromoleküle degradiert werden, enthalten sie ein komplexes Gemisch von zum Teil hochspezifischen hydrolytischen Enzymen, die einen schrittweisen Abbau dieser Makromoleküle katalysieren. So sind zum Beispiel für die vollständige Degradation von Mucopolysacchariden zu ihren monomeren Zuckern elf verschiedene Enzyme notwendig (Futerman et al. 2004).

Derzeit sind etwa 60 lysosomale Matrixproteine mit teilweise unbekannter Funktion beschrieben (Lubke et al. 2008). Neben den hydrolytischen Enzymen umfasst das lysosomale Proteom Co-Faktoren, die beispielsweise die Substratbindung vermitteln (z.B. Saposine), oder Proteine, die Schutz-Funktionen (Cathepsin A / *protective protein*) übernehmen (Kishimoto et al. 1992; Hiraiwa 1999).

Von den löslichen Proteinen der Matrix werden die peripheren und intergralen Membranproteine unterschieden. Sie dienen u.a. der Erhaltung der lysosomalen Membranstruktur (Lamp1, Lamp2), dem Aufbau eines Protonengradienten (V-H<sup>+</sup>ATPase) und als Transporter dem Export von Abbau-Produkten (Eskelinen et al. 2003; Lubke et al. 2008). Sie können außerdem eine Rolle in der Vesikelfusion mit anderen Organellen übernehmen (Huynh et al. 2007).

#### 1.3 Synthese lysosomaler Enzyme

Lösliche lysosomale Enzyme werden als Proteine der sekretorischen Route an den Ribosomen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums (ER) synthetisiert. Sie tragen aminoterminale Signalsequenzen, die eine co-translationale Translokation in das Lumen des ER vermitteln. Im Lumen wird die Signalsequenz vom unreifen Protein abgespalten (Walter und Johnson 1994).

Alle bekannten lysosomalen Enzyme sind Glykoproteine und enthalten in der Regel mehrere Glykosylierungsmotive des Typs Asn-X-Ser/Thr. X bezeichnet dabei eine beliebige Aminosäure (AS) außer Prolin. Die Zuckerkette wird N-glykosidisch mit Asparagin verknüpft.

Die Synthese dieser so genannten N-Glykane findet an dem in der zytosolischen Seite verankerten Isoprenoid Dolichol statt (Snider et al. 1980) (Abb. 1.1). Ein N-Glykan bestehend aus zwei N-Acetylglucosamin-(GlcNAc) und fünf Mannosemonosacchariden wird durch die Übertragung der Monosaccharide von UDP-N-Acetylglucosamin und GDP-Mannose aufgebaut. Ein bislang nicht bekanntes Enzym lässt das an Dolichol gebundene Glykan in die luminale Seite des ER "flippen", an der weitere vier Mannose-Reste sowie drei Glukose-Reste angehängt werden. Diese aus 14 Monosacchariden bestehende Zuckerkette wird durch die Oligosaccharyltransferase *en-bloc* auf Asparagin übertragen.

Noch im ER werden durch die membrangebundenen Hydrolasen Glucosidase I und Glucosidase II sowie die  $\alpha$ -Mannosidase I die drei terminalen Glucose-Reste sowie ein Mannose-Rest abgespalten (Lemansky et al. 1984).



Abb. 1.1: Synthese von N-Glykanen im endoplasmatischen Retikulum. Die Synthese eines Glykans aus zwei GlcNAc- und fünf Mannose-Resten erfolgt im Zytosol an einem Dolichol. Das Dolichol mit dem unfertigen Glykan "flippt" in das ER Lumen, dort werden Glucose-Reste angehängt. Das Glykan wird an ein naszierendes Polypeptid übertragen und die Glucose-Reste sowie zwei Mannose-Reste werden wieder abgespalten.

Im Golgi-Apparat werden die N-Glykane nochmals durch das *"trimming"* verändert. Während des *"trimmings"* bleibt eine Grundstruktur aus zwei N-Acetylglukosaminen und drei Mannose-Resten des Glykans immer erhalten (*"Core"-Struktur*) (Kornfeld und Kornfeld 1985).

Je nach Zusammensetzung werden die fertigen N-Glykane in Mannose-reiche, Komplex- und Hybrid-Typ Glykane unterschieden (Abb 1.2). Mannose-reiche Glykane bestehen außer den zwei GlcNAc in der "*Core*"-Struktur ausschließlich aus Mannose-Resten. Glykane vom Komplex-Typ können eine Fucosylierung am ersten GlcNAc-Rest am reduzierenden Ende des Glykans tragen und beide Verzweigungen der "*Core*"-Struktur tragen neben weiteren Mannose- und GlcNAc-Resten zusätzlich Galactose- und geladene Sialinsäure-Reste. Hybrid-Typ Glykane tragen in einer Verzweigung der "Core"-Struktur nur Mannose-Reste, in der anderen Verzweigung dagegen Strukturen wie die Komplex-Typ Glykane.



Abb. 1.2: Komplex-, Hybrid-Typ und Mannose-reiche Glykane. Das "Core"-Glykan wird von einem schwarzen Rechteck begrenzt. Geschlossenen schwarze Pfeile symbolisieren weitere Verzweigungsmöglichkeiten.

Während sezernierte Proteine häufig Glykane vom Komplex- oder Hybrid-Typ tragen, erhalten lysosomale Enzyme zumeist Mannose-reiche N-Glykane. Viele lysosomale Enzyme tragen komplexe- als auch Mannose-reiche Glykane an verschiedenen Glykosylierungsstellen. Eine einzelne Glykosylierungsstelle kann jedoch auch von beiden Glykantypen besetzt sein, was als Mikroheterogenität bezeichnet wird (Michalski und Klein 1999). Die Glykosylierung von Proteinen kann innerhalb verschiedener Zelltypen oder Spezies stark variieren.

Im *cis*-Bereich des Golgi-Apparates erhalten lysosomale Proteine einen Mannose-6-Phosphat- (M6P-)Rest als lysosomales Sortierungssignal (Pohlmann et al. 1982). Dabei überträgt die Golgi-N-Acetylglukosamin-1-phosphotransferase einen GlcNAc-1-Phosphatrest (GNPT) von einem aktivierten UDP-N-Acetylglukosamin auf die C6-Hydroxylgruppen terminaler Mannose-Reste. Der entstandene GlcNAc-1-phospho-6-mannose-diester wird anschließend im trans-Golgi Apparat von der GlcNAc1-phosphodiester- $\alpha$ -N-Acetylglukosaminidase zu einem Phospho-6-mannose-monoester hydrolysiert. Mutationen der GNPT führen durch das Fehlen des Sortierungssignals zu einer teilweisen Fehlsortierung bestimmter lysosomaler Enzyme ("*I-cell*"-Erkrankung) (Reitman et al. 1981).

#### 1.4 Transport lysosomaler Enzyme

Der vesikuläre Transport löslicher lysosomaler Enzyme mit dem M6P vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zu den Lysosomen wird von zwei Mannose-6-Phosphat Rezeptoren vermittelt. Lysosomale Membranproteine folgen einem anderen, M6P-unabhängigen Transportweg. Der kleinere der beiden Rezeptoren (MPR46) hat ein apparentes Molekulargewicht von 46 kDa und seine Affinität zu bestimmten Liganden lässt sich durch Kationen erhöhen, deshalb auch *cation dependent*, CD-MPR (Hoflack und Kornfeld 1985). Der größere Rezeptor hat ein apparentes Molekulargewicht von 300 kDa (MPR300) und bindet seine Liganden Kationenunabhängig (*cation independent*, CI-MPR) (Willingham et al. 1981).

Beide MPRs sind integrale Membranglykoproteine, die zwischen TGN, frühen und späten Endosomen sowie zu einem kleineren Teil der Plasmamembran zirkulieren. Dabei binden sie ihre M6P-haltige-Liganden im TGN und verhindern damit deren Sekretion. Die Bindung der M6P-Liganden an beiden Rezeptoren ist pH-abhängig. Bei neutralem pH liegt der Rezeptor / Ligand-Komplex stabil vor. In dem Kontinuum von frühen zu späten Endosomen / Lysosomen sinkt der luminale pH bis auf pH 4,5. In diesem sauren Milieu dissoziieren die an die Rezeptoren gebundenen Proteine schließlich in späten Endosomen. Es ist bis heute unklar, ob die prälysosomalen Strukturen schrittweise zu sekundären Lysosomen reifen oder ob ihr löslicher Inhalt über Vesikel in späte Lysosomen transportiert wird (Griffiths und Simons 1986). Nach dem Rücktransport zum TGN stehen die MPRs dann einer neuen Runde des Transports zur Verfügung.

Da die Bindung der M6P-haltigen Liganden im TGN in der Regel nicht quantitativ ist, entgehen etwa 5 – 20 % der M6P-haltigen lysosomalen Enzyme der intrazellulären Transportroute und werden sezerniert (Tiede et al. 2005). Der MPR300 ist aufgrund eines breiteren pH-Optimums in der Lage auch diese extrazellulären M6P-Liganden zu binden und so wieder der intrazellulären Transportroute zum Lysosom zugänglich zu machen (Hoflack et al. 1987).



Abb. 1.3: MPR-vermittelter Transport lysosomaler Enzyme zum Lysosom. Beide MPRs zyklieren zwischen Golgi-Apparat und späten Endosomen. Im Golgi-Apparat werden lysosomale Enzyme über ihre M6P-Markierung gebunden und dissoziieren in späten Endosomen bei saurem pH-Wert. Der Rezeptor wird anschließend über Endosomen zurück zum Golgi-Apparat transportiert. Fehlsortierte M6P-haltige Enzyme können an der Plasmamembran vom MPR300 gebunden und über Endosomen zum Lysosom transportiert werden.

## 1.5 MPR-unabhängiger Transport

Untersuchungen an MPR-defizienten Mäuse sowie Zellen von *I-cell-disease*-Patienten haben gezeigt, dass die Aktivität einer Reihe verschiedener Enzyme im Lysosom drastisch verringert ist oder gänzlich fehlt, dies jedoch offensichtlich nicht für alle lysosomalen Proteine zutrifft. Dies legt einen von MPR-unabhängigen Transport einiger Enzyme nahe.

So konnte jüngst für die lysosomale β-Glukocerebrosidase gezeigt werden, dass sie an das lysosomale Membranprotein Limp2 bindet, mit diesem im Komplex über die Membranproteintransportroute zum Lysosom transportiert wird und dort bei saurem pH von seinem Interaktionspartner dissoziiert (Reczek et al. 2007). Für die beiden lysosomalen Proteasen Cathepsin D und H konnte ein Sortilin-vermittelter Transport gezeigt werden (Canuel et al. 2008). Darüber hinaus kommen der Mannose-Rezeptor und weitere Mannose-bindende C-type Lektine für einen MPR-unabhängigen Transport in Frage (Allavena et al. 2004).

#### 1.6 Reifung lysosomaler Enzyme

Alle löslichen lysosomalen Proteine werden als Vorläufer-Proteine synthetisiert (Präproprotein) und auf ihrem Weg zum Lysosom sowie im lysosomalen Lumen zu reifen Enzymen prozessiert. Die Proproteine werden proteolytisch auf der endosomalen Route sowie im Lysosom durch Proteasen oder Autoprozessierung gespalten, bis sie ihre reife Form erreicht haben. Präproproteine und Proproteine sind in der Regel enzymatisch inaktiv, um die Degradation ihrer Substrate in präendosomalen Kompartimenten zu verhindern.

Im Lysosom wird der M6P-Rest der Mannose-reichen Glykane durch die saure Phosphatase 5 abgespalten (Sun et al. 2008). Über das weitere Schicksal der löslichen Proteine im Lysosom ist wenig bekannt. Ihre Halbwertszeit variiert stark zwischen 14 und > 80 Stunden, ehe sie schließlich durch lysosomale Proteasen abgebaut werden (Kominami et al. 1987).

### 1.7 Degradation im lysosomalen Lumen

Das lysosomale Kompartiment dient der Degradation von extrazellulärem als auch intrazellulärem Material. Extrazelluläres Material gelangt durch Rezeptor-vermittelte Endozytose (*"receptor mediated endocytosis*", RME) und Pinozytose in das Lysosom. Bei der RME spielen eine Reihe verschiedener Rezeptoren, wie z.B. der Transferrin- oder der LDL-Rezeptor eine Rolle (Goldstein und Brown 1975).

Pinozytose bezeichnet die unselektive Aufnahme von Flüssigkeit und der in ihr gelösten Moleküle aus dem extrazellulären Raum. Kleine Vesikel schnüren sich mit eingeschlossener Flüssigkeit ab und werden zum Lysosom transportiert (Kielian et al. 1982).

Phagozytose (Makropinozytose) ist als Sonderweg der Pinozytose anzusehen. Er ist auf Zellen des Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten beschränkt und dient der Aufnahme großer Partikel über 0,2 µm Durchmesser wie Zelltrümmern oder bakteriellen Pathogenen (Simson und Spicer 1973). Phagozytierte Partikel können nach Opsonierung über den FC-Rezeptor oder spezifisch an weitere Rezeptoren wie z.B. den Mannose-Rezeptor gebunden werden.



Abb. 1.4: Transport zur Degradation bestimmter Makromoleküle in das Lysosom. Substrate können zur Degradation intrazellulär über Autophagie (I.), oder extrazellulär über RME (II.), Phagozytose (III.) und Pinozytose (IV.) zum Lysosom transportiert werden.

Der Prozess der Degradation zytosolischer Proteine sowie ganzer Organellen wie Mitochondrien oder Peroxisomen in den Lysosomen wird als Makroautophagie (im Weiteren als Autophagie) bezeichnet. Besonders Proteine mit langen Halbwertszeiten werden durch Autophagie abgebaut, kurzlebige Proteine dagegen meist im Proteasom.

Obgleich der Prozess der Autophagie seit der Beschreibung der Lysosomen durch de Duve 1955 bekannt ist, konnte seine funktionelle Charakterisierungen erst nach der Klonierung erster Autophagie-Gene (*autophagy related genes*, ATG) in Hefe (Tsukada und Ohsumi 1993; Thumm et al. 1994) stattfinden. Die meisten dieser Gene sind bis zu den Säugetieren stark konserviert.

#### Einleitung

Autophagie wird durch die Bildung einer Membran-Doppelschicht initiiert, die sich vermutlich vom ER abschnürt (Axe et al. 2008). Anschließend werden Teile des Zytosol invaginiert und ganze Organellen wie Mitochondrien oder Peroxisomen von der Membrandoppelschicht umschlossen. Schließlich fusionieren die Autophagosomen mit Endosomen und Lysosomen zu Autophagolysosomen.

In Hefen findet Autophagie konstitutiv auf einem niedrigen basal-Niveau statt und kann durch verschiedene Umweltbedingungen (z.B. Nahrungsmangel) induziert werden. In höheren Organismen scheint eine komplexere Regulation stattzufinden, die in Abhängigkeit von Zelltyp und äußeren Faktoren steht. So weisen besonders Stoffwechsel-aktive Zellen wie Hepatozyten der Leber und Neuronen des zentralen Nervensystem (ZNS) eine hohe autophagozytäre Aktivität auf. Insgesamt sind Regulation und Ablauf der Autophagie in höheren Lebewesen bislang nur lückenhaft verstanden. Autophagie-defiziente Mäuse leiden an Neurodegeneration und einer Leberdysfunktion. (Komatsu et al. 2005; Hara et al. 2006; Komatsu et al. 2006; Komatsu et al. 2007).

## 1.8 Lysosomale Speichererkrankungen

Die lysosomalen Speichererkrankungen (LSD) sind eine Gruppe von Erkrankungen, die durch die genetisch bedingte Akkumulation von nichtmetabolisierten Makromolekülen im Lysosom charakterisiert sind. Traditionell wird die große Gruppe der LSDs mit über 50 verschiedenen molekularen Defekten nach Art des akkumulierten Speichermaterials in weitere Untergruppen unterteilt: Lipidosen, Mucopolysaccharidosen, Glykogenosen, Glykoproteinosen, Mucolipidosen und Neuronale Ceroid Lipofuscinosen (NCL) (Walkley und Platt 2004). Zudem gibt es Erkrankungen, die in keine dieser Gruppen klassifiziert werden können. Modernere Klassifikationen unterteilen die LSDs nach der Art des defekten Proteins.

LSDs werden monogenetisch vererbt und folgen zumeist einem autosomal rezessiven Erbgang. Nur Morbus Fabry (Masson et al. 2004), die Mucopolysaccharidose II (Morbus Hunter) (Hopwood et al. 1993) sowie Morbus Danon (Danon et al. 1981) werden X-chromosomal rezessiv vererbt.

Obwohl jede LSD für sich relativ selten ist, stellen sie als Gruppe zusammengenommen mit 1:8000 Geburten eine der häufigsten genetisch bedingten metabolischen Erkrankungen dar (Meikle et al. 1999).

Innerhalb der verschiedenen LSDs findet sich ein breites symptomatisches Spektrum der klinischen Präsentation. So gibt es Erkrankungen bei denen Symptome erst in hohem Lebensalter auftreten, die meisten Erkrankungen manifestieren sich jedoch bereits im Kindes- oder Jugendalter. Für die meisten LSDs konnte bislang keine Genotyp-Phänotyp Korrelation beschrieben werden. Alle Erkrankungen haben einen progredienten Verlauf. Während einige LSDs nur periphere Organe betreffen, geht bei anderen teilweise eine massive Schädigung des ZNS mit fortschreitendem dem Krankheitsverlauf einher.

Trotz deutlicher Heterogenität innerhalb der LSDs präsentieren sich einige der wichtigsten Phänotypen in einem Symptomkontinuum. So zeigen Patienten vieler Erkrankungen eine abnorme Vergrößerung von Milz und Leber (Hepatosplenomegalie), Knochen-Deformationen (*Dysostosis multiplex*), Herz- und Nierenschäden sowie ein abgeschwächtes Immunsystem (Castaneda et al. 2008).

Häufig findet sich eine hohe Varianz der klinischen Präsentation innerhalb der einzelnen Erkrankungen. So können oft infantile, juvenile sowie adulte Formen unterschieden werden. Neben genetischen Unterschieden scheinen auch Umwelteinflüsse den Verlauf der Erkrankung zu beeinflussen, da Patienten mit gleichen Mutationen und ähnlichem genetischen Hintergrund teilweise deutlich unterschiedliche Krankheitsverläufe zeigen (Futerman und van Meer 2004).

### 1.9 Therapie lysosomaler Speichererkrankungen

Für fast alle LSDs werden symptomatische Therapie-Ansätze angewendet. So können beispielsweise Knochendeformationen operativ behandelt werden oder Immunsystem-unterstützende Maßnahmen bei Immunschwächen angewendet werden. Viele Patienten sind an den Rollstuhl gebunden.

Daneben gibt es für einige LSDs auch spezifische, kausative Behandlungsmethoden. Die Tatsache, dass der MPR300 auch an der Plasmamembran zu finden ist, dort extrazelluläre M6P-haltige Liganden zu binden vermag, ermöglicht es, die defizienten Proteine an ihren Wirkorten zu substituieren. Dabei können rekombinante, M6P-

#### Einleitung

haltige Proteine durch intravenöse Injektion verwendet werden (Enzymersatztherapie, *enzyme replacement therapy*, ERT). Alternativ werden Spenderzellen transplantiert, die das defiziente Protein sezernieren.

Erste Ansätze für die ERT wurden bereits 1980 für die Therapie von Morbus Fabry an zwei Patienten erfolgreich erprobt (Desnick et al. 1980). In der Studie von Desnick et. al wurde als therapeutisches Enzym partiell aufgereinigtes Protein aus humanem Gewebe verwendet. Die fortschreitenden molekularbiologischen Methoden ermöglicht die Klonierung aller lysosomalen Proteine. Durch die Expression der entsprechenden cDNAs in Säugerzellen können die gewünschten Proteine aus Zellkulturüberständen in hoher Reinheit und ausreichenden Mengen aufgereinigt werden (Martiniuk et al. 2000; Berg et al. 2001). Zudem können die Enzyme in transgenen Tieren (Bijvoet et al. 1999) oder pflanzlichen Zellen (Cramer et al. 1996; Shaaltiel et al. 2007; Du et al. 2008) produziert werden.

Die ERT ist mittlerweile für eine Reihe verschiedener LSDs in der klinischen Anwendung oder in späten Phasen klinischer Studien. So sind ERT-Protokolle für Morbus Fabry (Schiffmann et al. 2001; Beck et al. 2004) sowie für Morbus Gaucher (Poll et al. 2001) in Europa und den USA etabliert und klinisch zugelassen. Protokolle für Mucopolysaccharidose (MPS) I (Wraith 2004; Thomas et al. 2006), MPS II (Muenzer et al. 2006), MPS VI (Harmatz et al. 2005; Karageorgos et al. 2007) und Morbus Pompe (Van den Hout et al. 2004) befinden sich in späten Phasen klinischer Studien. Für weitere LSDs werden präklinische ERT-Studien an Versuchstieren durchgeführt, die Grundlage für die Entwicklung der ERT an Patienten sind (Sands et al. 1994; Roces et al. 2004; Matzner et al. 2005).

In den meisten bislang durchgeführten Studien konnte eine signifikante Verbesserung des Gesundheitszustandes der Patienten durch regelmäßige Enzym-Substitution erreicht werden. Dabei ist der Effekt auf verschiedene Symptome sehr unterschiedlich. In der Regel werden bereits nach wenigen Wochen keine Speichermetabolite mehr im Serum gefunden. Organomegalien normalisieren sich innerhalb von Monaten (Wraith 2004; Harmatz et al. 2005), wohingegen sich bereits manifestierte Störungen des Knochenbaus nur langsam verbessern (Grabowski et al. 1998; Harmatz et al. 2005). Bei einem Großteil der LSDs ist das ZNS teilweise massiv pathologisch betroffen. Die Blut-Hirn-Schranke verhindert einen effizienten Austausch fast aller Metabolite > 500 Dalton (Da) und folglich auch die Aufnahme therapeutischen Enzyms (Begley et al. 2008). Um das ZNS durch ERT zu therapieren, ist eine intrathekale Injektion notwendig (Dickson et al. 2007; Munoz-Rojas et al. 2008). Eine solche Behandlung birgt die Gefahr einer Infektion des ZNS sowie weiterer unabsehbarer Nebenwirkungen.

In verschiedenen Tiermodellen lysosomaler Speichererkrankungen konnte jüngst ein therapeutischer Effekt auf das ZNS bei sehr hohen Dosierungen der ERT gezeigt werden, dessen molekularen Ursachen bislang nicht hinreichend geklärt sind (Roces et al. 2004; Matzner et al. 2005; Crawley et al. 2006).

Ein Problem bei der ERT stellt häufig die Immunantwort auf die regelmäßigen Injektionen rekombinanten Enzyms dar (Brooks 1999). In ERT-Studien von Morbus-Gaucher Patienten entwickelten ca. 15 % der Patienten Antikörper gegen das rekombinante Enzym (Starzyk et al. 2007). Neben Hypersensibilitätsreaktionen des Immunsystems kann ein hoher Antikörpertiter im Serum auch das rekombinante Enzym binden und so dessen Aufnahme über MPR oder MR inhibieren (Ponder 2008). Eine transiente Immunosuppression während des Beginns der ERT könnte die Bildung dieser kompetetiven Antikörper verhindern (Dickson et al. 2008).

Bei der Knochenmarktransplantation (*bone marrow transplantation*, BMT) dienen Donorzellen eines gesunden Spenders als Quelle extrazellulären Enzyms für die Aufnahme über den MPR300 (Hobbs 1981). Knochenmarkszellen können offensichtlich bei einigen Patienten ausreichende Mengen des defizienten Enzyms sezernieren, um den Krankheitsverlauf zumindest teilweise zu stoppen oder zu verbessern (Gullingsrud et al. 1998; Sardon et al. 2005). In Ausnahmefällen konnte in Patienten und Tiermodellen auch eine Verbesserung der Neuropathologie beobachtet werden (Walkley et al. 1994). Die BMT birgt jedoch hohe Risiken für den Empfänger und häufig findet sich kein passender Spender.

Eine aktuelle detaillierte Übersicht über weitere Therapieverfahren (somatische Gentherapie, *"small molecules"*, Substratreduktionstherapie) von LSDs gibt der Übersichtsartikel von Beck, 2007.

#### 1.10 Die Glykoproteinosen

Glykane von Glykoproteinen werden im Lysosom durch bidirektionale, sequentielle Spaltung in ihre Monosaccharide degradiert (Michalski und Klein 1999). Dabei sind bei Komplex-Typ Glykanen bis zu neun verschiedene Hydrolasen an der Degradation beteiligt (Abb. 1.5 A). Mutationen in Genen dieser Enzyme, die einen Verlust oder eine stark eingeschränkte spezifische Aktivität verursachen, führen zu einer Glykoproteinose.

Tab. 1.1:Glykan-degradierende Enzyme und aus ihrer Defizienz resultierende Erkrankungen.‡Glykopeptide primäre Speicherprodukte; ±Glykane primäre Speicherprodukte; ±Glykane primäre Speicherprodukte; †Ganglioside primäre Speicherprodukte.

Enzym	Erkrankung	Chr.	OMIM
α-Fucosidase	Fucosidose <sup>‡</sup>	1p34	230000
Aspartyl-N-acetylglucosaminidase	Aspartylglucosaminurie <sup>‡</sup>	4q32-q33	208400
Endo-β-N-acetylglucosaminidase	?	17q25.3	-
Neuraminidase (Sialidase)	Sialidose (Mucolipidose I) $^{\pm}$	6p21.3	256550
β-Galactosidase	GM1-Gangliosidose <sup>†</sup>	3p21.33	230500
Protective protein / Cathepsin A	Galactosialidose <sup>†</sup>	20q13.1	256540
$\beta$ -Hexosaminidase A und B	Morbus Sandhoff <sup>†</sup>	5q13	268800
α-Mannosidase	$\alpha$ -Mannosidose <sup>±</sup>	19cen q12	248500
1,6 spez. α-Mannosidase	?	4p16.1	-
β-Mannosidase	β-Mannosidose <sup>±</sup>	4q22-q25	248510
α-N-Acetylgalactosaminidase	Morbus Schindler <sup>‡</sup>	22q11	609241

Die Degradation komplexer N-Glykane wird durch die Abspaltung von Fucoseresten nicht-reduzierenden Ende durch die α-Fucosidase eingeleitet. Die am Aspartyl-N-acetylglucosaminidase spattet anschließend das N-Glykan vom Peptid ab. Von dem nun freien Glykan wird dann durch die Endo-β-N-acetylglucosaminidase (Synonym "Lysosomale Chitobiase") ein GlcNAc-Rest abgespalten. Die lysosomale Chitobiase wird nicht ubiguitär in allen Säugern exprimiert. So wird das Enzym in Menschen, Affen und Nagern exprimiert, in Rindern und Raubtieren dagegen nicht oder kaum (Aronson und Kuranda 1989; Balducci et al. 2008). Bislang wurde keine Glykoproteinspeichererkrankung diagnostiziert, die mit einer Defizienz der Chitobiase einhergeht. Das murine Gen wurde erst jüngst kloniert (Balducci et al. 2008).

Die weitere Degradation findet vom nicht-reduzierenden Ende statt. Die Neuraminidase hydrolysiert Sialinsäurereste. Anschließend werden Galactose-Monosaccharide durch die  $\beta$ -Galactosidase abgetrennt. Beide Enzyme benötigen Cathepsin A / *protective protein* als Co-Faktor (D'Azzo et al. 1982).



Abb. 1.5: Degradation von N-Glykanen im Lysosom. Komplexe N-Glykane (A) werden bidirektional vom reduzierenden und nicht-reduzierenden Ende sequentiell durch eine Reihe saurer Hydrolasen degradiert. Mannose-reiche N-Glykane (B) werden nach der Degradation bis auf ein GlcNAc am reduzierenden Ende des Glykans durch die α-Mannosidase abgebaut. Die  $\beta$ -Hexosaminidase kann GlcNAc-Reste des Glykans degradieren. Sie besteht aus zwei Untereinheiten ( $\alpha$  und  $\beta$ ), die von unterschiedlichen Genen codiert werden (HEXA und HEXB) (Yamanaka et al. 1994). Die  $\beta$ -Hexosaminidase A ist ein Heterodimer aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, die  $\beta$ -Hexosaminidase B ein Homodimer der  $\beta$ -Untereinheit (Srivastava et al. 1975). Mutationen im HEXB-Gen führen zu einem Verlust beider Proteine. Primäre Speicherprodukte sind in beiden Fällen vor allem GM2-Ganglioside, deren terminalen GlcNAc-Reste des Glykan-Anteils nicht weiter degradiert werden können. Die beiden  $\alpha$ -1,3- und  $\alpha$ -1,6-Mannose-Reste der *Core*-Struktur des Glykans werden schließlich durch die  $\alpha$ -Mannosidase bis zum letzten, an das GlcNAc-gebundenen, Mannose-Rest hydrolysiert (al Daher et al. 1991). Dieses Disaccharid wird durch die  $\beta$ -Mannosidase gespalten.

Neben der lysosomalen  $\alpha$ -Mannosidase mit einer Spezifität für  $\alpha$ -1,3- sowie  $\alpha$ -1,6-glycosidische Bindungen existiert eine weitere lysosomale  $\alpha$ -Mannosidase, die ausschließlich in der Lage ist,  $\alpha$ -1,6 glykosidisch verknüpfte Mannose-Reste des Glykan-*core*'s zu hydrolysieren (*core*-spez.  $\alpha$ -1,6-Mannosidase) (Daniel 1992, De Gasperi 1992). Sie wird nur in Geweben und Spezies exprimiert, die auch die Chitobiase exprimieren, offensichtlich sind beide Enzyme funktionell miteinander verbunden (Daniel et al. 1994).

Mannose-reiche Glykane werden nach Abspaltung vom Peptidanteil und Hydrolyse eines GlcNAc-Rests am nicht-reduzierenden Ende durch die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Mannosidase zu Monosacchariden abgebaut (Abb. 1.5 B).

#### 1.11 α-Mannosidose – Defizienz der lysosomalen α-Mannosidase

Die humane lysosomale  $\alpha$ -Mannosidase (LAMAN, EC 3.2.1.24) wird vom codiert. Es liegt auf Chromosom 19 nahe dem Centromer Man2B1-Gen (19p13.2-q12) (Champion und Shows 1977; Wakamatsu et al. 1997). Es besteht aus 24 Exons und überspannt einen Abschnitt von 15 kb (Riise et al. 1997). Man2B1 wird ubiquitär exprimiert und seine Promotorregion hat die Charakteristika eines Housekeeping-Gens (Nilssen et al. 1997; Stinchi et al. 1998). Stark konservierte Orthologe finden sich in anderen Säugern, als auch Caenorhabditis elegans und Dictyostelium discoideum. Das murine Ortholog ist auf Chromosom 8 lokalisiert. ebenfalls Neben der LAMAN und der lysosomalen *core*-spezifischen α-1,6-Mannosidase (s.o.) gibt es eine Reihe weiterer Mannosidasen, die subzellulär in ER, Golgi-Apparat und dem Zytosol zu finden sind und pH-Optima im physiologischen Bereich aufweisen (siehe Übersichtsartikel Daniel et al. 1994).

Die cDNA des humanen Man2B1-Gens kodiert ein Polypeptid aus 988 AS, das 11 putative Glykosylierungsstellen sowie ein aminoterminales Signalpeptid hat (Nebes und Schmidt 1994; Liao et al. 1996; Nilssen et al. 1997). Das Enzym wurde aus humaner Plazenta aufgereinigt und weist unter denaturierenden Bedingungen Polypeptide mit apparenten Massen von 70, 43-39, 39, 33, 22, 20, 15 und 13 kDa auf. Eine Behandlung der Enzym-Präparation mit den Endoglykosidasen EndoH und PNGaseF konnte das apparente Molekulargewicht aller Peptide verringern, was für einen hohen Glykosylierungsgrad spricht (Nilssen et al. 1997). Durch biochemische Analysen konnte eine Prozessierung der LAMAN wie in Abb. 1.6 B schematisch dargestellt abgeleitet werden (Hansen et al. 2004). Darüber hinaus konnte anhand des bovinen Orthologs der lysosomalen α-Mannosidase ein neuer Mechanismus zur Aktivierung bei saurem pH-Wert vorgeschlagen werden. Das unter in vitro-Bedingungen als Präproprotein bereits aktive Enzym wird in vivo erst bei erreichen von sauren Kompartimenten durch Protonierung einiger saurer Aminosäuren hydrolytisch aktiv (Heikinheimo et al. 2003). Ebenfalls vom bovinen Ortholog konnte jüngst die vollständige Gykosylierungsstruktur beschrieben werden (Faid et al. 2006).



Abb. 1.6: Schematische Darstellung des prozessierten LAMAN-Proteins und des sezernierten Präproenzyms. A; Das humane 130 kDa Präproprotein wird in der Plazenta durch limitierte Proteolyse zu fünf Peptiden a – e prozessiert. Offene Kreise symbolisieren Mannose-reiche Glykane, geschlossene Kreise Komplex-Typ Glykane. Die Glykansstruktur des e-Peptids ist nicht bekannt (modifiziert nach Nilssen et al. 1997). B; Struktur des rekombinanten von CHO-Zellen sezernierten 130 kDa Präproproteins.

Das humane LAMAN wurde rekombinant in Säugerzellen exprimiert (Berg et al. 2001), wobei aufgrund der Sättigung der beiden MPRs das LAMAN als 130 kDa

#### Einleitung

Präproenzym in das Zellkulturmedium sezerniert wird (Abb. 1.6 B). Während der Aufreinigung wird es weiter zu Peptiden mit apparenten Molekulargewichten von 72 kDa und 55 kDa prozessiert.

## 1.12 Klinik der α-Mannosidose

Bislang wurden mehr als 50 verschiedene Mutationen im Man2B1-Gen beschrieben (Nilssen et al. 1997; Gotoda et al. 1998; Berg et al. 1999; Hansen et al. 2004). Die meisten dieser Genprodukte werden falsch gefaltet und verbleiben im ER, während einige Mutationen zu Aminosäureaustauschen im aktiven Zentrum führen und dadurch einen Verlust oder eine drastische Verminderung der enzymatischen Aktivität verursachen (Hansen et al. 2004). Dabei konnte bislang keine Genotyp-Phänotyp-Korrelation festgestellt werden. Auf etwa 500.000 Lebendgeburten kommt eine Geburt mit  $\alpha$ -Mannosidose-auslösender Man2B1-Mutation (Malm und Nilssen 2008).



Abb. 1.7: α-Mannosidose Patienten. A; 18 Monate alte Zwillinge mit vergrössertem Kopfumfang, verbreiterter Nase, kurzem Hals und hervorstehender Stirn B; 27 Jahre alter Mann mit hervorstehender Stirn, verbreiteter Nase und Hörhilfe. (Malm und Nilssen 2008)

Die Diagnose wird anhand von Leukozyten oder kultivierten Fibroblasten durch einen α-Mannosidase-Enzymaktivitäts-Nachweis gestellt. In Familien mit dem mutierten Allel kann zudem eine molekulargenetische Mutationsanalyse durchgeführt werden (Malm und Nilssen 2008). Die klinische Präsentation der α-Mannosidose ist wie bei den meisten LSDs äußerst variabel, die Erkrankung folgt dabei in allen Fällen einem progressiven Verlauf. Häufig wird die Erkrankung in drei Subtypen unterschieden: Bei Typ 1 (milde Form) beginnen sich mit etwa 10 Jahren erste klinische Anzeichen zu manifestieren, die sich sehr langsam verschlechtern. Diese Patienten zeigen weder Abnormalitäten des Skeletts, noch Myopathien. Typ 2 (moderate Form) manifestiert sich deutlich vor dem zehnten Lebensjahr. Die Patienten haben Veränderungen im Skelettbau (*Dysostosis multiplex*) und bekommen häufig Myopathien. Patienten des Typ 3 (schwere Form) weisen meist schwere Schädigungen des Skeletts auf und versterben innerhalb der ersten drei bis acht Lebensjahre an Schädigungen des ZNS, Myopathien oder Infektionen. Die meisten Patienten leiden an Typ 2 (Desnick et al. 1976; Malm und Nilssen 2008). Typ 2 und 3 werden in der Regel von einer Hepatosplenomegalie, facialer Dysmorphie sowie einer fortschreitenden mentalen Retardation begleitet. Patienten aller drei Subtypen leiden häufig an rekurrenten Infektionen, die auch Todesursache sein können (Desnick et al. 1976; Malm et al. 2000).

Neben den oben genannten Symptomen wird die Erkrankung häufig von einer Reihe weiterer sporadisch auftretender Symptome begleitet. Dazu gehören systemischer Lupus erythematosus (Urushihara et al. 2004), Leukoencephalopathie (Castelnovo et al. 2007), psychatrische Symptome (Malm et al. 2005; Seidl et al. 2005) oder Macrocephalie und intracraniale Hypertension (Grabb et al. 1995).

Typischerweise finden sich bei α-Mannosidose-Patienten Mannose-reiche N-Glykane im Serum (persönliche Mitteilung Jean-Claude Michalski) und Urin (Desnick et al. 1976; Sewell 1980). Eine detaillierte Analyse (Michalski und Klein 1999) (Abb. 1.8) hat gezeigt, dass neben metabolischen Intermediaten der Iysosomalen N-Glykan-Degradation auch Glykane aus anabolen Stoffwechselwegen der Glykosylierung im ER Speicherprodukte sind, die vermutlich aus dem Zytosol in das Lysosom gelangen (Moore 1999; Saint-Pol et al. 1999). Etwa 70 % der gespeicherten Glykane stammen von Komplex- und Hybrid-Typ Glykanen, 10 % von Mannose-reichen Glykanen und etwa 20 % von biosynthetischen Intermediaten (Winchester 2005).



Abb. 1.8: Oligosaccharide aus dem Urin von Patienten. Man2 – Man8 Oligosaccharide aus dem Urin von Patienten (Michalski und Klein 1999). Es gilt die Nomenklatur aus Abb. 1.2.

## 1.13 Tiermodelle der α-Mannosidose

Neben der humanen α-Mannosidose wurde die Erkrankung in Rindern (Hocking et al. 1972; Borland et al. 1984) und Katzen diagnostiziert (Burditt et al. 1980; Walkley et al. 1981).

Zuletzt wurde α-Mannosidose in einer Meerschweinchen-Haustierzucht festgestellt (Crawley et al. 1999). Die Erkrankung in diesem Tier-Modell wurde in den letzten Jahren intensiv in pathologischer und therapeutischer Hinsicht untersucht. Die Tiere zeigen neben Speichervakuolen in ZNS und peripheren Organen erhöhte Oligosaccharid-Ausscheidungen im Urin, erhöhte Enzymaktivitäten anderer lysosomaler Enzyme sowie leichte Abnormalitäten des Knochenbaus (Crawley et al. 1999). Durch Elektronenmikroskopie und histologische Verfahren wurde ein progressiver Verlauf mit einer zunehmenden Größe der Speicherlysosomen beschrieben (Auclair und Hopwood 2007). Die Tiere zeigen durch die neuronale Speicherung eine Reihe verschiedener Verhaltensabnormalitäten (Robinson et al. 2008). In einer detaillierten Studie wurde neben der Neuropathologie der Tiere auch der Effekt einer ERT untersucht (Crawley et al. 2006).

#### 1.14 Das α-Mannosidose *knockout*-Mausmodell

Neben den natürlich vorkommenden Tiermodellen wurde durch die gezielte Ausschaltung des Man2B1-Gens ein *knockout*-Mausmodell für die α-Mannosidose generiert (Stinchi et al. 1999). Homozygot α-Mannosidase-defiziente Mäuse zeigen eine deutlich erhöhte Ausscheidung von Mannose-reichen Oligosacchariden im Urin und akkumulieren N-Glykane im ZNS und peripheren Organen. Elektronen-mikroskopische Aufnahmen zeigen Speichervakuolen in allen betroffenen Organen.

Obwohl das Mausmodell der humanen Erkrankung in biochemischer und histopathologischer Hinsicht sehr ähnlich ist, zeigen die Mäuse in dieser Studie bis zum Alter von 12 Monaten keine offensichtlichen Krankheitssymptome und stellen somit ein Modell für einen milden Krankheitsverlauf dar (Stinchi et al. 1999). Mausmodelle anderer LSDs zeigen häufig im Vergleich mit den humanen Erkrankungen einen milden Phänotyp (Yamanaka et al. 1994; Evers et al. 1996; Hess et al. 1996).

Anhand des Maus-Modells wurde in Vorarbeiten in unserer Abteilung der Effekt der ERT untersucht (Roces et al. 2004). Intravenöse Injektionen mit der α-Mannosidase der Niere aus Rindern bzw. rekombinantem humanen LAMAN und muriner α-Mannosidase zeigten bereits nach einmaliger Dosierung von 50 mU/g Körpergewicht eine deutliche Reduktion gespeicherter Oligosaccharide in peripheren Organen, nicht jedoch im ZNS. Alle drei Enzym-Präparationen wiesen einen vergleichbaren therapeutischen Effekt auf, wobei die Leber besonders effektiv entspeichert wurde (80 - 95 % Reduktion von Oligosacchariden). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten zudem eine deutliche Reduktion von Speichervakuolen. Eine zweimalige Injektion von 250 mU/ g Körpergewicht führte zu einer fast vollständigen Reduktion der gespeicherten Oligosaccharide in Milz, Niere, Herz und Leber. Erstaunlicherweise zeigte sich auch im Gehirn bei dieser hohen Dosierung eine Reduktion der Speicherprodukte auf etwa ein Viertel verglichen mit unbehandelten α-Mannosidase-defizienten Mäusen (Roces et al. 2004).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass wiederholte Injektionen des rekombinanten Enzyms in den Mäusen zu einer Immunantwort führen und Antikörper gebildet werden (Roces 2005).

#### 1.15 Zielstellung der Arbeit

Obgleich die Defizienz lysosomaler Enzyme oder Proteine als primäre Ursache für lysosomale Speichererkrankungen seit Jahrzehnten bekannt ist, sind direkt oder indirekt durch die Erkrankung betroffene Stoffwechsel- oder Signalwege, die schließlich zur Manifestierung von Symptomen führen, bislang nur unzureichend beschrieben und verstanden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen Microarray-Genexpressionsanalyse des Leber-Transkriptoms und biochemische Untersuchungen Aufschluss über sekundären Veränderungen geben, die durch die lysosomale Speicherung bedingt sind. Zudem soll der Einfluss der ERT auf diese sekundären Veränderungen untersucht werden.

Veränderungen innerhalb der Lysosomen als direkt betroffene Organellen der Speicherung von undegradierten Makromolekülen konnten bereits für eine Reihe verschiedener LSDs gezeigt werden. Anhand des *knockout*-Mausmodells sollen im zweiten Teil der Arbeit durch Proteomanalyse Veränderungen innerhalb der  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Lysosomen untersucht werden.

Besonders deutlich zeigen sich Konsequenzen der lysosomalen Speicherung im ZNS vieler α-Mannosidose-Patienten. Um Aufschluss über die zellbiologische Ursache eingeschränkter neuronaler Funktion zu erhalten und gegebenenfalls neue Ansätze zu ihrer Therapie, soll die Neuropathologie der Mäuse untersucht werden.

# 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

### 2.1.1 Geräte

ABI Prism 7900HT

Acrylamidgel-Elektrophoresekammer Agarosegel-Elektrophoresekammer **Bio-Photometer** Branson Sonifier 450 Ettan IPGPhor II IE Einheit GeneChip Scanner 3000 GeneChip Hybridizatio Oven 640 Heizblock HTM 130 Kühlzentrifuge 5804R mit Rotor A-4-44 Immobiline DryStrip reswelling Tray LAS-1000 Gel Dokumentation System Laser Scan-Mikroskop Modell TCS Sp2 AOBS Linomat 5 DC-Sprüheinheit Mastercycler Gradient Mikrotom SM2000R Mikrotom HM 335 Netzgerät Consort E835 Pegasus Semi-Dry Western Blot Kammer Pipetman Mikroliterpipetten 20, 200, 1000 µl REFLEX III-Flugzeit Massenspektrometer Spectrophotometer Cary 50 Bio Tecan Microplate Reader Model Spectra II **Teflon Homogenisator** Tischzentrifuge Mikro 200R Tischzentrifuge 5415D Transilluminator Modell ETX 20 M Typhoon 9400 Scanner

Applied Biosystems, Framingham, USA Wissenschaftl. Werkstätten d. Fakultät Wissenschaftl. Werkstätten d. Fakultät Eppendorf, Hamburg Heinemann, Schwäbisch Gmünd GE Healthcare, München Affymetrix, Santa Clara, USA Affymetrix, Santa Clara, USA HLC, Bovenden Eppendorf, Hamburg GE Healthcare Fujifilm, Düsseldorf Leica, Heidelberg

Camag, Muttenz, Schweiz Eppendorf, Hamburg Leica, Heidelberg Microm, Volketswil, Schweiz Schütt, Göttingen Phase, Lübeck Gilson, Middleton, USA Bruker Daltonik, Bremen Varian, Darmstadt Tecan, SLT, Crailsheim Braun, Melsungen Hettich, Tuttlingen Eppendorf, Hamburg LTF Labortechnik, Wasserburg GE Healthcare, München

#### Material und Methoden

Ultrazentrifuge Optima L90K mit Rotoren SW40 und Ti75 UV-Handlampe (312 nm, 254 nm) Vakuumkonzentrator Modell Speed Vac SVC100H Beckmann Coulter, Krefeld

Bachofer, Reutlingen Bachofer, Reutlingen

# 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Einmalkanülen, -spritzen	Braun, Melsungen
Einmalpipetten 5, 10, 20 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Exchange resin AG 501-X8, 20-50 mesh	Bio-Rad, Hercules, USA
HPTLC-Platten	Merck, Darmstadt
Immobiline DryStrip, versch. pH-Werte	GE Healthcare, München
Mikrotomklingen	Thermo Scientific, Waltham, USA
Objektträger und Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm <sup>®</sup> M	American National, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Schütt, Göttingen
Präparierbesteck	Neolab, Heidelberg
Polyvinylidenfluorid (PVDF)	Whatman, Göttingen
Transfermembran	
Spritzenaufsatzfilter 0,2 µm und 0,45 µm	Heinemann, Duderstadt
Superfrost Plus Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckmann Coulter, Krefeld
UVetten <sup>®</sup>	Eppendorf, Hamburg
Whatman-Filterpapier	Whatman, Göttingen
Plastikreaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht

# 2.1.3 Microarrays

GeneChip Mouse 430 2.0

Affymetrix, Santa Clara, USA

# 2.1.4 Substrate füt enzymatische Bestimmungen

Z-Arg-Arg-AMC	Bachem, Weil am Rhein
p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranosid	Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide	Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenyl-β-D-glucuronid	Sigma, Deisenhofen
p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid	Sigma, Deisenhofen

# 2.1.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (*Primer*) wurden von der Firma Metabion, Planegg-Martinsried bezogen. Sequenzen der *Primer* siehe Anhang.

## 2.1.6 Chemikalien

Aceton	Roth, Karlsruhe
Acetonitril	Merck, Darmstadt
Acrylamid (Rotiphorese <sup>®</sup> Gel A)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/ Bisacrylamid-Lösung	Roth, Karlsruhe
(Rotiphorese <sup>®</sup> -Gel 30)	
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin (BSA, <i>bovine serum albumin</i> )	Serva, Heidelberg
ε-Aminocapronsäure	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bisacrylamid (Rotiphorese® Gel B)	Roth, Karlsruhe
Brij 35 (30 % (w/v) Lösung)	Sigman, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CHAPS	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G250	Merck, Darmstadt
DAB liquid substrate system	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe

### Material und Methoden

2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dinatriummethylendiaminotetraacetat (ED	TA) Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (1 % (w/v) Lösung)	Roth, Karlsruhe
Filipin III	Sigma, Deisenhofen
Formaldehydlösung (37 %)	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd (25 % (v/v) in $dH_2O$ )	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Serva, Heidelberg
Histoacryl	Braun, Melsungen
Histomount	Shandon, Frankfurt
IPG-Puffer, pH 4 – 7	GE Healthcare, München
IPG-Puffer, pH 3 – 10	GE Healthcare, München
Imidazol	Merck, Darmstadt
Iodacetamid	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumnatriumtartrat	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe

25

Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MO	PS) Serva, Heidelberg
NNN'N'-Tetramethylethylendiamin (TEME	D) Serva, Heidelberg
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma, Deisenhofen
Orcinol	Sigma, eisenhofen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Deisenhofen
Percoll™	GE Healthcare, München
Phosphorsäure (ortho-)	Roth, Karlsruhe
1-Propanol	Merck, Darmstadt
Saccharose (Sucrose)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (37 %)	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (konzentriert)	Merck, Darmstadt
Stimune Adjuvant	Cedi Diagnostic, Lelystad, Niederlande
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Tyloxapol (Triton WR-1339)	Sigma, Deisenhofen
Wasser, reinst	Baker, Deventer, Niederlande
Ziegenserum (normal goat serum)	Sigma, Deisenhofen

\_\_\_\_\_

# 2.1.7 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

2-D Quant Kit München	GE	Healthcare,
CyDye DIGE Fluor <i>minimal dye labeling Kit</i> München	GE	Healthcare,
DC Protein Assay	Bio-Rad, Mür	nchen
iScript cDNA-Kit	Bio-Rad, Mür	nchen
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad, Mür	nchen
MessageAmp™ II-Biotin <i>enhanced</i> Kit	Ambion, Aust	tin, USA
Supersignal Western Pico Chemilumiscent Substrate	Pierce, Rock	ford, USA
#### Material und Methoden

RNase *free* DNase-Set RNeasy<sup>®</sup> Midi Kit Taq-Polymerase-Kit ZytoChem HRP-DAB Kit Qiagen, Hilden Qiagen, Hilden Roche, Mannheim ZytoMed, Berlin

# 2.1.8 Enzyme zur Bearbeitung von RNA, DNA und Proteinen

Endoglycosidase Η 5 mU/ μl	Roche, Mannheim
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
PNGaseF, 1 U/ μl	Roche, Mannheim
Trypsin, modifiziert aus Rinderpankreas	Serva, Heidelberg

# 2.1.9 Antikörper

Antigen	Immunisierte Spezies	Verdünnung	Hersteller / Referenz
α-Akt	Kaninchen, polyklonal	WB 1:1000	Cell Signaling
α-Pi Akt	Kaninchen, polyklonal	WB 1:1000	Cell Signaling
α-Beclin 1	Kaninchen, polyklonal	WB 1:1000	Cell Signaling
α-Calbindin	Kaninchen, polyklonal	IF 1:500	Chemicon
α-Cathepsin B	Ziege, polyklonal	WB 1:1000	Neuromics
α-Cathepsin B	Kaninchen, polyklonal	WB 1:300	Santa Cruz
α-Cathepsin D	Kaninchen, polyklonal	WB 1:400	(Pohlmann et al. 1995)
α-Cathepsin E	Kaninchen, polyklonal	WB 1:400	Yoshinori Ohsumi
α-CD68	Ratte, monoklonal	IHC 1:500	Serotec
α-F4/80	Ratte, monoklonal	IF 1:10	(Austyn und Gordon
	Zellkulturüberstand		1981)
α-GAPDH	Kaninchen, polyklonal	1:400	Santa Cruz
α-GFAP	Maus, monoklonal	IF 1:400	Sigma
α-Lamp1	Ratte, monoklonal	WB 1:250	Hybridoma Bank
		IF 1:25	
α-LC3-GFP	Kaninchen, polyklonal	WB 1:1000	(Kominami et al. 1992)
α-mTOR	Kaninchen, polyklonal	WB 1:1000	Cell Signaling
α-Pi mTOR	Kaninchen, polyklonal	WB 1:1000	Cell Signaling
α-NPC2	Kaninchen, polyklonal	WB 1:400	(Ong et al. 2004)
α-Porin	Maus, monoklonal	WB 1:1000	Calbiochem

#### 2.1.10 Sekundär-Antikörper für Immunfluoreszenz

Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz wurden standardmäßig in einer Verdünnung von 1:400 eingesetzt.

Ziege anti Kaninchen, Alexa Fluor 488 nm konjugiert, Molecular Probes, Karlsruhe Ziege anti Ratte, Alexa Fluor 488 nm konjugiert, Molecular Probes, Karlsruhe Ziege anti Maus, Alexa Fluor 633 nm konjugiert, Molecular Probes, Karlsruhe

#### 2.1.11 HRP-konjugierte Sekundär-Antikörper

Sekundärantikörper für die Western Blot Analyse wurden standardmäßig in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

Sekundärantikörper für die Immunohistochemie wurden standardmäßig in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt.

Ziege anti Kaninchen, HRP konjugiert Dianova, Hamburg Ziege anti Maus, HRP konjugiert Dianova, Hamburg Ziege anti Ratte, HRP konjugiert Dianova, Hamburg

#### 2.1.12 Protein- und DNA-Standards

TrackIt 1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Prestained Precision Plus Protein Marker All Blue	Bio-Rad, München

#### 2.1.13 Häufig verwendete Puffer

$10 \times PBS$ :	80 g NaCl
	2 g KCl
	14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	mit dH <sub>2</sub> O auf 1 I auffüllen, pH 6,8
10 × TBS	100 mM Tris / HCl pH 7,4
	1,5 M NaCl

#### 2.1.14 EDV

#### 2.1.14.1 Software

Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems, San Jose, USA
GraphPad Prism 4.03	GraphPad Software Inc, San Diego, USA
Image Reader LAS	Fujifilm, Düsseldorf
Image J 1.37v	NIH, Washington, USA
Microsoft Office Standard Edition 2003	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft XP Professional Edition	Microsoft, Redmond, USA

#### 2.1.14.2 Online- Datenbanken

DAVID	http://david.abcc.ncifcrf.gov/
EBI Expression Profiler	http://www.ebi.ac.uk/expressionprofiler/
Ensembl	http://www.ensembl.org
EXPASY	http://www.expasy.ch/
MASCOT Search	http://www.matrixscience.com/
NetNGlyc	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/
NCBI Datenbanken	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Primer3	http://frodo.wi.mit.edu/

#### 2.1.14.3 Statistik

Soweit nicht anders angegeben, wurden statistische Berechnungen mit GraphPad Prism durchgeführt. Zur Einschätzung statistischer Signifikanz wurden ungepaarte t-Tests berechnet und der Fehler als Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) dargestellt.

#### 2.2 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1 Isolierung genomischer DNA

Mäusen wurden zur Genotypisierung Schwanzbiopsien entnommen. Dazu wurden drei Wochen alten Mäusen drei bis vier mm lange Stücke des Schwanzes mit einer scharfen Schere abgetrennt. Die Wunde wurde mit Histoacryl versiegelt. Die Schwanzspitzen wurden über Nacht in 500  $\mu$ l Lysispuffer und 50  $\mu$ l Proteinase K-Stocklösung (10 mg/ ml) bei starkem Schütteln bei 56 °C verdaut. Anschließend wurde der Ansatz für 5 Min. bei 13000 Upm zentrifugiert, um nicht-verdaute Bestandteile zu sedimentieren. Zum Überstand wurde 1 Vol. Isopropanol gegeben, um die genomische DNA auszufällen. Die Proben wurden dann mehrfach invertiert, die DNA fällt dabei aus. Dann wurden die Proben wieder 5 Min. bei 13000 Upm zentrifugiert um die DNA zu sedimentieren. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment mit 400  $\mu$ l 70 % EtOH gewaschen. Nach abermaligem Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes wurde die DNA bei 37 °C getrocknet und in 20  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O gelöst.

Lysispuffer:	100 mM Tris/HCl pH 8
	50 mM EDTA
	200mM NaCl
	0,5 % SDS
Proteinase K-Stocklösung:	2 mg/ ml Proteinase K in Lysispuffer

#### 2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Beim Arbeiten mit RNA wurde auf äußerste Sauberkeit geachtet. Alle Geräte und Materialien wurden zuvor mit 1 M NaOH gründlich gewaschen und mit DEPC-H<sub>2</sub>O gespült, um sie von RNasen zu säubern.

Gesamt-RNA wurde aus Geweben mit dem RNeasy Midi Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Es wurden standardmäßig ~ 50 mg Gewebe für die Isolation verwendet. Die Isolation erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll (RNeasy Handbook, 2001). Dem Standardkit wurde ein DNase I-Verdau hinzugefügt (RNase-free DNase Set, Qiagen). Dabei erfolgte der enzymatische Verdau genomischer DNA-Kontaminationen, während die RNA an der Silika-Gel-Säule gebunden war für 30 Min. bei RT. Anschließend wurde die Säule gewaschen und die RNA eluiert.

#### 2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde durch Messung der Absorption bei Anregung durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine optische Dichte (OD) von 1,0 entspricht dabei einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ ml bei doppelsträngiger DNA und 40 µg/ ml bei RNA. Die Messung erfolgte im Biophotometer (Eppendorf, Hamburg).

RNA für die Transkriptomanalyse wurde zusätzlich im sensitiveren NanoDrop-Photometer (PeqLab, Erlangen) vermessen. Dazu wurde 1 μl RNA-Lösung verwendet. Eine grafische Darstellung der Absorption von 220 – 350 nm erlaubt zudem eine Beurteilung der Verunreinigung der RNA-Präparation durch Proteine.

#### 2.2.4 Polymerasekettenreaktion

Das Polymerasekettenreaktions- (*"polymerase chain reaction"*, PCR) Verfahren erlaubt die Amplifikation von DNA *in vitro*. In diesem zyklischen Verfahren wird eine doppelsträngige DNA Matrize (*template*) durch Erhitzen in ihre beiden Einzelstränge geschmolzen (Denaturierung). Synthetisch hergestellte Oligonukleotide (*Primer*) können anschließend während einer Hybridisierungsphase bei Temperaturen die in etwa der Schmelztemperatur der Primer bzw. ihrer komplementäre DNA-Sequenz entspricht an die Einzelstränge binden (*Annealing*). Jeweils ein Primer bindet in der 3'-Region-, ein Primer in der 5'-Region der zu amplifizierenden Sequenz. Die DNA-Polymerase des Mikroorganismus *Thermophilus aquaticus* (Taq-Polymerase) kann die 3'-OH Enden der doppelsträngigen Primer/ DNA-Sequenz binden und verlängert diesen Strang mit dNTPs als Substrate (Elongation). Dieser Vorgang findet bei einer für die Taq-Polymerase optimalen Temperatur von 72 °C statt.

Jeder weitere neu entstehende Doppelstrang dient der Taq-Polymerase nun pro Zyklus als *template*. So wird die von beiden Primern flankierte DNA-Region der Ausgangsmatrize mit nahezu exponentieller Effizienz vermehrt. Nach einer Reihe von Zyklen wird die weitere Amplifikation durch fehlende dNTPs, Primer oder nachlassende Effizienz der Taq-Polymerase beendet.

## 2.2.5 Genotypisierungs-PCR des Man2B1-Allels

Das murine Man2B1-Allel wurde durch die folgende PCR amplifiziert, als template diente Mausschwanzbiopsie-DNA:

PCR-Ansatz:	38 µl dH₂O
	5 $\mu$ l 10 x PCR-Puffer (inkl. MgCl <sub>2</sub> ) (Roche)
	1 μl 10 μM dNTPs (Roche)
	1 μl Primer "α-Man <i>forward</i> " (10 pmol/ μl)
	1 μl Primer "α-Man <i>reverse</i> " (10 pmol/ μl)
	1 μl Taq-Polymerase (5 mU/ μl) (Roche)
	3 µl Template DNA

Tab. 2.1:	PCR-Bedingungen der	Man2B1-Genotypisierungs-PCR
	00	<i>J</i> 1 0

	Dauer	Temperatur
	5 Min.	95 °C
35 x	30 Sek.	95 °C
	45 Sek.	57 °C
	3 Min.	72 °C
	7 Min.	72 °C
		4 °C

Primer: α-Man *forward*: GCCAGGCAAGGGTTCTACCGCAG

α-Man *reverse*: GAACAGACGCGTGTTGAACATCA

# 2.2.6 Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen

Um die apparente Masse von PCR-Produkten zu Überprüfen wurde DNA elektrophoretisch aufgetrennt. Agarose wurde in der gewünschten Prozentigkeit (w/v) durch Aufkochen in der Mikrowelle in 1 x TAE-Puffer gelöst und anschließend unter fließendem Wasser auf ~ 50 °C abgekühlt. Danach wurde Ethidiumbromid (EtBr) zu

32

einer Endkonzentration von 0,5 µg/ ml hinzugegeben. Das Gel wurde dann in eine Gelkammer mit Taschenkämmen gegossen und nach dem Erstarren mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit dem Probenladepuffer vorbereitet. Um die Masse der aufgetrennten Fragmente bestimmen zu können, wurde ein DNA-Standard mit DNA-Fragmenten verschiedener Massen mit auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung von 50 – 120 V für 30 – 60 Min. durchgeführt. Die aufgetrennte DNA wurde unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 302 nm durch die Fluoreszenz des interkalierenden EtBr visualisiert.

- 50 x TAE-Puffer: 2 M Tris / Essigsäure pH 8,0 100 mM EDTA
- Probenladepuffer: 0,25 % Bromphenolblau (w/v) 40 % Sucrose (w/v) 1 x TAE

	-
Agarose Konzentration (Gewicht / Volumen)	Trennbereich (kb)
0,6	20 - 1
0,9	7 – 0,5
1,2	6 – 0,4
1,5	4 – 0,2
2	3 – 0,2

Tab. 2.2: Übersicht über Agarosekonzentration zur Auftrennung von DNA

# 2.2.7 Auftrennung von RNA in Agarose-Gelen

RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in Agarose-Gelen aufgetrennt, um ihre Qualität abzuschätzen. Beim Umgang mit RNA wurde mit höchster Sorgfalt auf RNase-freies Arbeiten geachtet (siehe 2.2.2).

# In dH<sub>2</sub>O, ü.N. rühren, autoklavieren

10 x MOPS Laufpuffer:	200 mM MOPS
	50 mM Natriumacetat
	10 mM EDTA
	auf pH 7,0 mit 1 M NaOH einstellen
5 x RNA-Ladepuffer:	16 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung in dH2O
	80 µl 800 mM EDTA
	720 µl 37 % Formaldehyd
	2 ml Glycerin
	3084 µl Formamid
	4 ml 90 x MOPS Laufpuffer
	add DEPC-dH <sub>2</sub> O 10 ml
RNA-Agarose-Gel:	9 Volumenteile DEPC- dH <sub>2</sub> O
	1 Volumenteil 10 x MOPS Laufpuffer
	0,6 % Agarose
	Aufkochen, auf ~ 65 °C abkühlen lassen
	0,6 % (v/v) 37 % Formaldehydlösung
	1 μg/ ml EtBr

## 2.2.8 Auftrennung von RNA durch LabChip Micro-Gelelektrophorese

RNA für Microarray und Realtime-PCR Analysen wurde einer Qualitätskontrolle durch eine LabChip-Micro-Gelelektrophorese in einem Bioanalyzer 2100 (Agilent,

#### Material und Methoden

Palo Alto, USA) unterzogen. In diesem System sind mikrofeine Kanäle in einer Chip-Struktur integriert. Eine Gel-Matrix wird in diese Kanäle gegossen und Proben (RNA, DNA oder Proteine) können im elektrischen Feld aufgetrennt werden. In dem Chip ist ein Detektor-System integriert, das (bei RNA und DNA Proben) die Fluoreszenz eines im Analyt interkalierendes Farbstoffes ausliest. Die Ergebnisse werden als Elektropherogramm dargestellt. Anhand der Verhältnisse von 18s zu 28s ribosomaler RNA sowie der Anwesenheit von Degradationsprodukten, lässt sich ein definierter Qualitätsindex der Probe mit Werten von 1 (schlechte Qualität) bis 10 (gute Qualität) erstellen (*RNA integrity number*, RIN) (Schroeder et al. 2006).

Beide Elektroden wurden mit RNaseZap dekontaminiert und mit RNase-freiem dH<sub>2</sub>O gespült. 550  $\mu$ I Gel-Matrix wurden in einer mitgelieferten Filter-Säule 10 Min. bei RT bei 1500 g zentrifugiert. 65  $\mu$ I der Gel-Matrix wurden dann mit 1  $\mu$ I Fluoreszenz-Farbstoff-Konzentrat vermischt und 5 Min. bei 13000 g zentrifugiert. Anschließend wurden mithilfe einer Spritze je 9  $\mu$ I Gel-Matrix in jede verwendete Kapillare eingespritzt. Pro Kapillare wurden dann 5  $\mu$ I eines internen Standards und anschließend je 1  $\mu$ I der zuvor für 2 Min. bei 70 °C denaturierten RNA-Probe bzw. des RNA-Standards aufgetragen. Schließlich wurde die Elektrophorese laut Herstellerprotokoll (*"eukaryote total RNA*", keine weiteren Angaben) durchgeführt.

#### 2.2.9 cDNA-Synthese

Um Transkripte in Gesamt-RNA nachzuweisen, wurde RNA mithilfe der Reversen Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben und anschließend durch *realtime*-PCR amplifiziert und quantifiziert (siehe 2.2.11).

Standardmäßig wurde 1 µg Gesamt-RNA für die RT-Reaktion eingesetzt. Für die Reaktion wurde das iScrip Kit (Bio-Rad) verwendet:

Reaktionsansatz:

1 µg Gesamt-RNA

4 µl iScript *reaction* Mix (Bio-Rad)

μl Reverse Transkriptase (BioRad)
add 20 μl dH<sub>2</sub>O
5 Min. 25 °C
30 Min. 42 °C
5 Min. 85 °C
abkühlen auf 4 °C

RT-Reaktion:

#### 2.2.10 Microarray-Analyse

Für die Markierung der RNA für die Microarray-Analyse wurde das "MessageAmp™ II-Biotin *enhanced* Kit" der Firma Ambion (Austin, USA) verwendet. RNA wird dabei durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben, durch DNA Polymerase und RNaseH zu doppelsträngiger cDNA (dsDNA) synthetisiert. Schließlich wird durch *in vitro*-Transkription unter Verwendung Biotin-konjugierter Nukleotide mit der dsDNA als Matrize zu Biotin-markierter aRNA amplifiziert (Abb. 2.1).



Abb. 2.1: Übersicht über RNA-Markierung für Microarray-Analyse. RNA wird in cDNA umgeschrieben (1), ein komplementärer Zweitstrang synthetisiert (doppelsträngige DNA) (2), die cDNA aufgereinigt (3) und durch den Einbau Biotin-konjugierter Nukleotide durch *in vitro* Transkription markiert (4). Schließlich wird die markierte aRNA aufgereinigt (5).

#### 2.2.10.1 Reverse Transkription

1000 ng Gesamt-RNA und 1  $\mu$ l T7 Oligo(dT) wurden in einem Gesamtvolumen von 12  $\mu$ l bei 70 °C für 10 Min. denaturiert.

Mastermix RT-Reaktion:

2 µl 10 x First Strand Buffer

4 µl dNTP Mix

1 µl RNase Inhibitor

1 µl ArrayScript Reverse Transkriptase

8 μl des Mastermix wurden zu den denaturierten RNA-Proben gegeben und für 2 Std. bei 42 °C inkubiert.

#### 2.2.10.2 Zweitstrang cDNA-Synthese

Zweitstrang-Synthese Mastermix:	63 µl Nuclease-freies Wasser	
	10 µl 10 x Second Strand Buffer	
	4 µl dNTP Mix	
	2 µl DNA Polymerase	
	1 µl RNase H	

Je 80 µl des Zweitstrang-Synthese Mastermix wurden zu 12 µl cDNA gegeben und bei 16 °C für 2 Std. inkubiert.

#### 2.2.10.3 cDNA Aufreinigung

250  $\mu$ l cDNA Bindepuffer wurden zu den 92  $\mu$ l Zweitstrang-cDNA gegeben und der Ansatz auf cDNA Filter-Säulen gegeben und anschließend 1 Min. bei 10000 Upm zentrifugiert. Nach dem waschen mit 500  $\mu$ l Waschpuffer wurde die cDNA mit zweimal 12  $\mu$ l 50 °C warmem dH<sub>2</sub>O eluiert.

#### 2.2.10.4 In vitro Transkription zur Synthese Biotin-markierter aRNA

Markierungs-Mastermix:	12 µl Biotin-NTP Mix
	4 µl T7 10 x Reaction Buffer
	4 µl T7 Enzyme Mix

20 µl der aufgereinigten cDNA wurden mit 20 µl des Biotin-Markierungs-Mastermix gemischt und bei 37 °C für 14 Std. inkubiert um Biotin-markierte Nukleotide in den

neusynthetisierten aRNA-Strang einzubauen. Die Reaktion wurde mit 60  $\mu$ l nukleasefreiem dH<sub>2</sub>O gestoppt.

#### 2.2.10.5 aRNA Aufreinigung

100 µl Biotin-markierter aRNA wurden mit 350 µl aRNA Binding Puffer gemischt, anschließend 100 µl 100 % EtOH hinzugefügt und der Ansatz sofort danach auf aRNA-Filter-Säulen gegeben und bei 10000 Upm zentrifugiert. Die Säulen wurden mir 650 µl Wasch-Puffer gewaschen und die aRNA schließlich durch Zentrifugation für 1 Min. bei 10000 Upm mit 100 µl 50 °C warmen dH<sub>2</sub>O eluiert.

#### 2.2.10.6 Hybridisierung, waschen und scannen der Microarrays

Hybridisierung und waschen der Microarrays wurde nach Angaben des "GeneChip® Expression Analysis"-Handbuchs durchgeführt.

#### 2.2.11 Realtime-PCR

Bei der klassischen RT-PCR wird cDNA als template eingesetzt und ein bestimmtes Transkript mit spezifischen Primern amplifiziert. Dabei wird eine Endpunktbestimmung Gelelektrophorese durch und Fluoreszenz des interkalierenden EtBr. nach Abschluss der PCR durchgeführt. Da in der Endphase der PCR keine exponentielle Amplifikation mehr stattfindet, ist eine solche Quantifizierung nur semi-quantitativ.

Um die Menge von Transkripten innerhalb mehrerer Proben quantitativ zu vergleichen, wurde das Verfahren der Realtime-PCR angewendet. Im Unterschied zur RT-PCR wird ein anderer interkalierender Fluorophor (SYBR-*green*) verwendet, und die relative Fluoreszenz wird während der PCR nach jedem Amplifikationszyklus durch einen Laser in Echtzeit bestimmt. Aus der Anzahl von Zyklen, die für das Erreichen eines bestimmten Fluoreszenz-Schwellenwerts benötigt werden, lässt sich so quantitativ auf die relative Menge eingesetzten Transkripts schließen.

Da in der vorliegenden Arbeit nur relative Mengen von Transkripten in verschiedenen Proben bestimmt werden sollten, wurde eine relative Quantifizierung nach Pfaffl (Pfaffl 2001) durchgeführt. Hierbei wird die Anzahl von Zyklen, die für das Erreichen einer relativen Fluoreszenz-Schwelle (*threshold cycle, CT*) bei dem zu untersuchenden Transkript (*gene of interest,* GOI) nötig sind, auf die Anzahl von Zyklen normalisiert, die notwendig sind um die relative Fluoreszenz-Schwelle eines internen Referenz-Standard-Transkripts (*housekeeping*-Gen) zu erreichen. Als Referenz-Transkript wurde GAPDH verwendet. Das Referenz-Gen sollte in allen Proben gleich exprimiert werden und nicht durch experimentelle Bedingungen induziert / reprimiert werden.

Die Berechnung der differentiellen Expression wurde wie folgt berechnet:

$$CT_{GOI} - CT_{GAPDH} = \Delta CT$$

Anschließend wird die Differenz aus beiden  $\triangle$ CT-Werten der zu vergleichenden Proben gebildet:

$$\Delta CT_{Probe1} - \Delta CT_{Probe2} = \Delta \Delta CT$$

 $\Delta\Delta$ CT gibt schließlich die differentielle Expression zwischen Probe 1 und Probe 2 an. In der Regel wurde die Expression von Transkripten in Tieren des Wildtyps auf 1 normalisiert und der Expressionsunterschied in x-fach angegeben.

Realtime PCRs wurden im ABI Prism 7900HT der Firma Applied Biosystems in 384-Lochplatten durchgeführt. Alle Messungen erfolgten in technischen Triplikaten. Es wurden 2 µl des zuvor 1:5 verdünnten 20 µl cDNA-Synthese Ansatzes pro Amplifikation eingesetzt (entsprechend 20 ng revers transkribierter RNA) (siehe 2.2.9).

Reaktionsansatz:

2 μl cDNA 1 μl Primer for (10 pmol/ μl) 1 μl Primer rev (10 pmol/ μl) 5 μl SYBR-green Mix (2x) 1 μl dH<sub>2</sub>O

#### Tab. 2.3: Realtime-PCR Protokoll

	Dauer	Temperatur
	3 Min.	50 °C
	10 Min.	95 °C
40 x	15 Sek	95 °C
	1 Min.	60 °C
Schmelzkurve	15 Sek.	95 °C
	15 Sek.	0° C

#### 2.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.3.1 Herstellung von Gewebe-Homogenaten

Mäuse wurden durch cervikale Dislokation getötet. Die Organe wurden entnommen, das Frischgewicht bestimmt und in 10 – 20 Vol. eiskaltem 1 x TBS mit Protease-Inhibitoren in einem Potter Elvejhem durch mehrere Hübe homogenisiert. Für Bestimmungen zusätzlich Triton X-100 in enzymatische wurde einer Endkonzentration von 1 % zugesetzt. Anschließend wurden die Homogenate in einem Ultraschall-Wasserbad dreimal 20 Sekunden beschallt. Zwischen den Beschallungen wurde jeweils auf Eis gekühlt. Nichtgelöste Proteine und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 4 °C für 15 Min. bei 14 000 Upm sedimentiert. Die Überstände wurden, wenn nicht anders angegeben, für Western-Blot Analysen und enzymatische Bestimmungen eingesetzt.

Protease-Inhibitoren:	Stock-Lösung	Endkonzentration
	200 mM PMSF (in DMSO)	1 mM
	500 mM lodacetamid (in $dH_2O$ )	5 mM
	200 mM EDTA (in $dH_2O$ )	1 mM

#### 2.3.2 Proteinbestimmung mit "DC-Protein Assay"

Der "DC-Protein Assay" basiert auf einer modifizierten Variante der Methode von Lowry (Lowry et al. 1951). Die Reaktion wird durch die Anwesenheit einer Reihe verschiedener Detergenzien in bestimmten Konzentrationen nicht beeinflusst. Triton X-100 wird bis zu einer Endkonzentration von 1 % toleriert. Die Bestimmung wurde nach Anweisung des Herstellers in einem Gesamtvolumen von 325  $\mu$ l in 96-Loch Mikrotiterplatten in Doppelwerten durchgeführt. Der lineare Messbereich liegt zwischen 2 und 20  $\mu$ g/  $\mu$ l. Als Standard-Protein wurde bovines Serum Albumin (BSA) verwendet.

Die zu bestimmenden Proben wurden auf 100  $\mu$ l verdünnt und in der Mikrotiterplatte vorgelegt. Parallel dazu wurde eine Standardreihe von 2 – 16  $\mu$ g BSA in je 100  $\mu$ l vorgelegt. Dann wurden 25  $\mu$ l Reagenz A' (50 Vol. Reagenz A + 1 Vol. Reagenz S) hinzugefügt, und sofort danach 200  $\mu$ l Reagenz B. Nach etwa 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 630 nm in einem Spectra II Mikrotiterplattenphotometer (Tecan, SLT, Crailsheim) gemessen. Anhand der Standardreihe wurde die Proteinkonzentration der Probe berechnet.

#### 2.3.3 Enzymatische Aktivitätsbestimmung von Cathepsin B

Die Bestimmung wurde nach Barrett durchgeführt (Barrett 1980). 10  $\mu$ g der Gewebehomogenate wurden auf ein Volumen von 100  $\mu$ l gebracht und 25  $\mu$ l einer 1 % Brij35-Lösung hinzugefügt. Anschließend wurden 75  $\mu$ l Reaktionspuffer hinzugegeben und 5 Min. bei 40 °C vorinkubiert. Als Substrat wurden 5  $\mu$ M Z-Arg-Arg-AMC hinzugegeben und für 10 Min. bei 40 °C schüttelnd inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion durch Zugabe von 300  $\mu$ l Stopp-Lösung abgestoppt, 200  $\mu$ l in 96-Lochplatten überführt und die Fluoreszenz bei einer Exzitation von 350 nm und einer Emission von 460 nm gemessen.

Reaktions-Puffer:

88 mM  $KH_2PO_4$ 12 mM  $Na_2HPO_4$ 1 mM  $Na_2$ -EDTA 2 mM L-Cystein (Frisch angesetzt) Stopp-Lösung:

pH 6,0 100 mM NaClAc 30 mM NaAc 70 mM Essigsäure pH 4,3

#### 2.3.4 Enzymatische Aktivitätsbestimmung lysosomaler Glykosidasen

Die Aktivität der lysosomalen Glykosidasen  $\alpha$ -Mannosidase,  $\beta$ -Hexosaminidase,  $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Galaktosidase und  $\beta$ -Glucuronidase in Gewebehomogenaten wurde unter sauren Bedingungen mit spezifischen artifiziellen o-Nitrophenolkonjugierten Substraten durchgeführt. Die Substrate werden hydrolytisch zu Saccharid-Monomer und dem farblosen p-Nitrophenol gespalten. p-Nitrophenol wird bei basischem pH über 6,8 zum chinoiden Nitrophenolatanion umgesetzt, welches ein Absorptionsmaximum bei 405 nm aufweist. Der molare Extinktionskoeffizient des p-Nitrophenolatanion beträgt bei 405 nm 18500 L / mol x cm.

Die enzymatische Reakton wurde in Doppelwerten in einem Gesamt-Volumen von 200  $\mu$ l durchgeführt. Je 10  $\mu$ l der Gewebehomogenate (siehe 2.3.1, entsprechend 10 – 200  $\mu$ g Gesamtprotein) wurden mit 0,9 % NaCl auf 100  $\mu$ l aufgefüllt und 100  $\mu$ l Substrat (10 mM) hinzugefügt. Die Reaktion wurde 1- 16 Std. bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 1 ml Stopp-Puffer abgestoppt und bei 405 nm photometrisch vermessen. Für jedes Homogenat wurde ein Enzymleerwert (Reaktion ohne Substrat) mitgeführt, sowie ein Substratleerwert (Reaktion ohne Homogenat). Für die Bestimmung der  $\alpha$ -Mannosidase wurden 50  $\mu$ l Substrat eingesetzt und 50  $\mu$ l Substratpuffer.

Substratpuffer:	0,1 M Natriumcitrat, pH 4,6
	0,2 % BSA
	0,04 % Natriumazid
Stopp-Puffer:	0,4 M Glycin / NaOH, pH 10,4

Die α-Mannosidase-Aktivität wurde bei einem pH-Wert von 4,2 bestimmt.

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

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

# Tab.2.4:ÜbersichtüberSubstrateundInkubationsdauerfürenzymatischeAktivitätsbestimmung lysosomaler Glykosidase

Enzym	Substrat	Inkubationsdauer
α-Mannosidase	p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid	180 Min.
β-Hexosaminidase	p-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide	60 Min. 1:10 verdünnt
β-Glucuronidase	p-Nitrophenyl-β-D-glucuronid	90 Min.
β-Glucosidase	p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranosid	120 Min.
β-Galactosidase	p-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid	120 Min.

#### 2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-PAGE nach Lämmli unter denaturierenden Bedingungen mit Gelen verschiedener Polyacrylamid-Konzentrationen (Laemmli 1970).

Proteine wurden in Lämmli-Puffer aufgenommen und zusätzlich durch Erhitzen für 5 Min. bei 95 °C denaturiert. Das anionische Detergenz SDS bindet an Polypeptide des denaturierten Proteins und vermittelt ihm negative Nettoladungen. Da die Menge an Ladungen proportional zum Molekulargewicht ist, lassen sich Proteine so ihrer Größe nach elektrophoretisch auftrennen (Shapiro et al. 1967).

Es wurden Trenngele von 10 – 15 % und Sammelgele von 4 % verwendet (siehe Tab. 2.5). Die Probenapplikation erfolgte mithilfe einer "Hamilton"-Spritze.

	Sammelgel	Trenngel		
	4 %	10 %	12,5 %	15 %
Acrylamidlsg.	2,6 ml	19,5 ml	24,4 ml	29,4 ml
Trenngelpuffer	-	15 ml	15 ml	15 ml
Sammelgelpuffer	5 ml	-	-	-
APS-Lsg.	200 µl	500 µl	500 µl	500 µl
Temed	20 µl	50 µl	50 µl	50 µl
dH <sub>2</sub> O	12,2 ml	24,9 ml	19,2 ml	15,4 ml

Tab. 2.5: Polyacrylamidgele für SDS-PAGE (Sammelgel 20 ml, Trenngel 60 ml)

Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 5 mA ü.N. bis zum Herauslaufen der Bromphenolblaulauffront. Als Elektrophoresepuffer diente ein Glycin-Puffersystem. Als Molekulargewichtsstandard wurde der *"precision plus molecular weight standard"* der Firma Bio-Rad (Hercules, USA) verwendet.

Lämmlipuffer:	150 mM Tris / HCl pH 6,8
	12 % SDS (w/v)
	30 % Glycerin
	0,3 % Bromphenolblau
	6 % β-Mercaptoethanol (v/v)
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris / HCl pH 8,8
	0,4 % SDS
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris / HCl pH 6,8
	0,4 % SDS
Acrylamidlösung:	30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid
	(Rotiphorese <sup>©</sup> Gel 30, Roth)
Ammoniumperoxodisulfat (APS) Lösung:	10 % APS in $dH_2O$
10 x Laufpuffer:	250 mM Tris
	1,92 M Glycine

1 % SDS (w/v)

#### 2.3.6 Coomassie-Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen

Gele wurden direkt nach der Elektrophorese für 1 Std. bei RT in Fixierlösung inkubiert. Nach dem Abschütten der Fixierlösung und spülen mit dH<sub>2</sub>O wurden die Gele dann mit kolloidaler Coomassie-Färbelösung ü.N. gefärbt. Nach der Färbung wurde mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und 5 Min. in Waschlösung anhaftender Coomasie-Farbstoff entfernt.

Fixierlösung:	79 ml dH₂O
	1 ml Ortho-Phosphorsäure (85 %)
	20 ml MetOH
Färbelösung:	60 ml dH <sub>2</sub> O
	20 ml MetOH
	RotiBlue <sup>©</sup> Coomassie Lsg. (Roth, Karlsruhe)
Waschlösung:	75 ml dH <sub>2</sub> O
	25 ml MetOH

#### 2.3.7 Differentielle 2-D Gelelektrophorese (DIGE)

Das DIGE-System erlaubt einen quantitativen Vergleich komplexer Proteingemische 2-D Gelelektrophorese. Dabei werden zwei Proben durch mit jeweils unterschiedlichen Fluororeszenz-Farbstoffen gekoppelt, eine Probe aus allen im Experiment verwendeten Proben wird als Referenz-Standard mit einem dritten Fluororeszenz-Farbstoff gekoppelt. Alle drei Proben werden dann vereint und auf einem einzelnen 2-D Gel aufgetrennt. Durch Auslesen der Emission der verschiedenen Fluorophore kann dann direkt in einem Gel der Expressionsunterschied eines Proteins in beiden Proben bestimmt werden.

#### 2.3.7.1 Markierung der Protein für DIGE-Analyse

Je 100 µg F2-Fraktion von Wildtyp- und *knockout* Tieren wurden mit eiskaltem Aceton gefällt und sorgfältig getrocknet. Die Proben wurden dann in 20 µl DIGE-Lysispuffer aufgenommen und die genaue Proteinkonzentration mit dem 2D-Quant-Kit bestimmt. Je 25 µg Gesamtprotein pro Genotyp wurden jeweils abgenommen und auf je 10 µl mit DIGE-Lysispuffer aufgefüllt. Die Markierung wurde durch Zugabe von je 0,5 µl Cy3 (für Wildtyp) bzw. Cy5 (für *knockout*) *working solution* (entsprechend je 200 pmol) gestartet und für 30 Min. auf Eis durchgeführt. Durch Zugabe von 1 µl 10 mM Lysin wurde die Reaktion gestoppt.

DIGE-Lysispuffer:	7 M Harnstoff
	2 M Thioharnstoff
	4 % CHAPS
	30 mM Tris
	in $dH_2O$
Cy3 bzw. Cy5 working solution:	400 pmol / µl in Dimethylformamid

#### 2.3.7.2 Proteinbestimmung mit 2D-Quant-Kit

Um unter stark denaturierenden Bedingungen zu arbeiten, enthält der Lysis-Puffer für die 2-D Gelelektrophorese hohe Konzentration Harnstoff und Thioharnstoff. Diese interferieren mit herkömmlichen Proteinbestimmungsreaktionen wie Bradford oder Lowry.

Bei der 2D-Quant-Methode werden Proteine erst gefällt, interferierende Substanzen bleiben in Lösung. Die sedimentierten Proteine werden dann in einer Kupfer-haltigen Lösung resuspendiert, in der das Kupfer-Ionen spezifisch an Proteine binden. Das gebundene Kupfer kann anschließend in einer colorimetrischen Reaktion bestimmt werden. Als Standard wurde BSA in aufsteigenden Konzentrationen verwendet. Der lineare Messbereich liegt bei 1 – 50 µg. Die zu bestimmende Probe wurde auf 50 µl in DIGE-Lysispuffer verdünnt. 125 µl Präzipitierungsreagenz wurden hinzugefügt und durch kräftiges vortexen gemischt. Nach zwei bis drei Min. Inkubation bei RT wurden 125 µl co-Präzipitierungsreagenz hinzugefügt, wieder kräftig gemischt anschließend bei 14000 Upm und RT für 5 Min. zentrifugiert. Die Überstände wurden zügig abgenommen und das Protein-Sediment in 25 µl Kupfer-Lösung aufgenommen.

Dann wurden 100  $\mu$ I dH<sub>2</sub>O hinzu gegeben, kräftig gemischt, und schließlich 250  $\mu$ I Kupfer-Nachweisreagenz (100 Vol. Reagenz A + 1 Vol. Reagenz B) hinzugegeben. Nach 20 Min. Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 480 nm in einem Spectra II Mikrotiterplattenphotometer (Tecan, SLT, Crailsheim) gemessen.

# 2.3.7.3 Separation von Proteinen nach ihrem isoelektischen Punkt

#### (1.Dimension)

Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurden fertige Gelstreifen mit immobilisierten pH Gradienten im pH-Bereich 4 - 7 (*immobilized pH gradient*, IPG *strips*) der Firma GE Healthcare verwendet. Die Applikation der Probe erfolgte durch passive Rehydrierung der Probe mit dem Gelstreifen.

300 µg Protein (für präparative Gele) bzw. 50 µg (für DIGE Gele) wurden in 125 µl DIGE-Probenpuffer verdünnt. Anschließend wurde 1 Vol. Rehydrationspuffer hinzugegeben und 5 Min. bei 14000 g zentrifugiert. Das gesamte Probevolumen wurde im *"reswelling tray"* (GE Healthcare) auf der Länge des IPG-Streifens vorgelegt, anschließend wurde die Schutzfolie von Streifen abgezogen und der Streifen mit der der Gelseite nach unten luftblasenfrei aufgelegt. Die Streifen wurden mit 1 ml Mineralöl bedeckt. Die Rehydrierung erfolgte über Nacht.

DIGE-Probenpuffer:	7 M Harnstoff
	2 M Thioharnstoff
	2 % CHAPS (w/v)
Rehydrationspuffer:	DIGE-Probenpuffer
	2 % DTT (w/v)
	20 µl/ ml IPG-Puffer

Die IEF erfolgte in einem "Ettan IPGPhor II"-System der Firma GE Healthcare. Die Streifen wurden in das Gerät eingelegt, anodischer und kathodischer Bereich mit 150 µl dH<sub>2</sub>O-getränkten Papierstreifen bedeckt und die Elektroden aufgelegt. Schließlich wurden die Streifen mit Mineralöl überschichtet. Die IEF wurde nach den folgenden Protokollen durchgeführt:

1 Std.	Gradient	1000 V
2 Std. 30 Min.	Gradient	6000 V
50 Min.	Konstant	6000 V

Umgehend nach der IEF wurden die Streifen entnommen, abgespült und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren oder sofort für die SDS-PAGE weiter bearbeitet.

#### 2.3.7.4 SDS-PAGE von IEF-Streifen (2. Dimension)

Vor der SDS-PAGE wurden die IPG-Streifen für 15 Min. in Äquilibrierungspuffer I (SDS-Äquilibrierungspuffer-Stock + 10 mg/ ml DTT) auf einer Wippe inkubiert, anschließend für weitere 15 Min. in Äquilibrierungspuffer II (SDS-Äquilibrierungspuffer-Stock + 25 mg/ ml Iodacetamid).

Die SDS-PAGE für 2-D Gele wurde für 11 cm lange Streifen in den gleichen Systemen durchgeführt wie für konventionelle SDS-PAGE, mit der Ausnahme, dass statt Taschenkämmen nur eine Tasche für Proteinstandard ausgespart wurde.

Nach der Äquilibrierung wurde 0,5 % Agarose in SDS-Laufpuffer auf die Oberfläche des Sammelgels gegossen und sofort der IPG-Streifen aufgelegt. Die Streifen wurde mit einer dünnen Schicht Agarose überschichtet um diese zu fixieren, anschließend wurde die Elektrophorese bei 25 mA durchgeführt.

SDS-Äquilibrierungspuffer-Stock:	6 M Harnstoff		
	75 mM Tris-HCl pH 8,8		
	29,3 % (v/v) Glycerol (87 % w/v)		
	2 % SDS (w/v)		
	0,002 % Bromphenolblau (w/v)		

#### 2.3.8 MALDI-TOF-Analyse von Proteinen

Proteine aus 2-D Gelen wurden über *peptide mass fingerprinting*-Analyse massenspektrometrisch identifiziert. Das Verfahren beruht auf der Identifizierung eines Proteins durch den In-Gel Verdau mit einer Protease (in diesem Fall Trypsin) und der Massen-Analyse der proteolytischen Peptide über *Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation – Time Of Flight*, MALDI-TOF. Jedes Protein zeigt dabei ein

charakteristisches Peptid-Muster verschiedener Massen, die in einer Datenbank (Mascot, Matrix Science, Boston, USA) abgeglichen werden können.

Kreisrunde Stücke Coomassie-gefärbter Gele von etwa 2 mm Durchmesser wurden aus dem Gel ausgestanzt und für 15 Min. bei 37 °C in 100 µl Waschlösung I, anschließend zweimal 30 Min. in Waschlösung II gewaschen und schließlich für 10 Min. in 100 µl Acetonitril inkubiert. Dann wurde das Gelstück für etwa 5 Min. Luftgetrocknet und die Proteine reduktiv in 10 µl DTT-Lösung für 1 Std. bei 56 °C carbamidomethyliert. Die Probe wurde auf Eis abgekühlt und der Überstand abgenommen. Das Gelstück wurde dann für 30 Min. bei RT in 10 µl lodacetamid inkubiert, um die Proteine zu alkylieren. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und noch vorhandenes überschüssiges Iodacetamid durch Inkubation bei 37 °C für 10 Min. in 10 µl DTT-Lösung abgefangen. Das Gelstück wurde erneut für 30 Min. bei 37 °C in 100 µl Waschlösung II, danach in 100 µl Acetonitril inkubiert und getrocknet. Das Gelstück wurde in 6 µl einer 20 ng Trypsin/ µl Waschlösung I auf Eis inkubiert, bis sich die Lösung vollständig in das Gelstück gesogen hatet. Dann wurde das Gelstück mit weitere Waschlösung I bedeckt und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde am Folgetag abgenommen und die Peptide mit 20 µl 1 % Trifluoressigsäure (TFA) bei 37 °C für 30 Min. aus dem Gel extrahiert. Die Lösung wurde in der speedvac eingeengt und nach Lyophilisierung in 10 µl 0,1 % TFA aufgenommen. 0.5 иI Peptid-Lösung der wurden mit 0.5 иI 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB)-Matrix gemischt und auf das MALDI-target aufgetragen. Die Massen wurden nach Co-Kristallisierung mit einem Reflex III (Bruker Daltonics) Massenspektrometer bestimmt und gegen den Mascot-Algorithmus mit der nichtredundanten NCBI Protendatenbank-Datenbank verglichen (Perkins et al. 1999).

#### 2.3.9 Western Blot

Zum spezifischen immunologischen Nachweis von Proteinen wurden über SDS-PAGE aufgetrennte Proben elektrophoretisch durch das "*semi dry*"-Verfahren auf Polyvinyliden-Difluorid (PVDF)-Membranen transferiert, dort mit Antikörpern (AK) detektiert und über *Horseradish Peroxidase* (HRP)-Sekundär-AK Konjugate visualisiert.

Drei Filterpapiere (Whatman, Dassel) in Größe des Gels wurden in Kathodenpuffer

getränkt und luftblasenfrei auf die Kathodenplatte aufgelegt. Dann wurde das PAGE-Gel, welches zuvor für 15 Min. in Kathodenpuffer äquilibriert wurde, auf die Filterpapier gelegt und eine zuvor mit MetOH aktivierte und ebenfalls in Kathodenpuffer äquilibrierte PVDF-Membran luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt. Schließlich wurden weitere drei in Anodenpuffer getränkte Filterpapiere auf die PVDF-Membran aufgelegt und der Deckel mit der Anodenplatte aufgesetzt. Der elektrophoretische Transfer wurde für 85 Min. bei 1,1 mA / cm<sup>2</sup> durchgeführt.

Kathodenpuffer:	40 mM ε-Aminocapronsäure
	20 mM Tris / HCl pH 9,0
	20 % MetOH
Anodenpuffer:	75 mM Tris / HCl pH 7,4
	20 % MetOH

Die PVDF-Membran wurde nach dem Transfer für 1 Std. bei RT auf einer Wippe mit PBST + 5 % Magermilchpulver (w/v) inkubiert um freie Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primär-AK verdünnt in PBST + 5 % Magermilchpulver oder PBST + 3 % BSA (w/v) ü.N. bei 4 °C auf einer Wippe. Am Folgetag wurde die PVDF-Membran dreimal für etwa 10 Min. bei RT in PBST gewaschen und für 1 Std. bei RT mit dem HRP-konjugierten, 1:5000 in PBST + 5 % Magermilchpulver verdünnten, Sekundär-AK auf der Wippe inkubiert und erneut mindesten dreimal 20 Min. in PBST gewaschen.

Die Detektion erfolgt durch Inkubation der PVDF-Membran für 5 Min. bei RT mit dem HRP-Substrat (Supersignal West Pico Chemiluminescent Detection Kits (Pierce, Rockford, USA)). Mithilfe einer CCD-Kamera (LAS-1000, Fujifilm, Tokyo, Japan) wurde die Lumineszenz dokumentiert. Die Exposition der Membranen erfolgte in der Regel für 10 – 300 Sek.

Um mehrere Antikörper auf einer PVDF-Membran nachzuweisen, wurde nach Abschluss der Dokumentation die Membran zweimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend zweimal auf der Wippe mit 0,2 M NaOH inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST und erneutem Blockieren wurden dann weitere AK mit der Membran inkubiert.

#### 2.3.10 PNGaseF-Behandlung von Glykoproteinen

N-Glykopeptid-N-Acetyl-β-D-glucosaminyl-L-Asparagin Amidohydrolase (PNGaseF) spaltet N-Glykane zwischen dem reduzierenden Ende (GlcNAc) des Glykans und Asparaginresten des Glykoproteins. Dabei werden sowohl Mannose-reiche, als auch Komplex-Typ- und Hybrid-Typ-Gykane abgespalten.

Bis zu 150  $\mu$ g Gesamtprotein wurden in 20  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O verdünnt und für den enzymatischen Verdau verwendet.

Reaktionsansatz:	20 µl Glykoproteinhomogenat
	5 µl 2 % SDS
	5 μl 1 M β-Mercaptoethanol
	5 Min. bei 95 °C denaturieren der Proteine
	5 µl 1 M Tris HCl pH 8,0/ 100 mM EDTA
	5 μl 10 mM PMSF
	5 μl 10 % CHAPS (w/v)
	2 μL PNGaseF (1 U/ μl) (Roche, Grenzach Wyhlen)
	Inkubation ü.N.
	5 Min. 100 °C

Nach der Hitzeinaktivierung des Enzyms wurden die Proben mit Lämmli-Puffer aufgefüllt und für die SDS-PAGE verwendet.

#### 2.3.11 Endoglykosidase H-Behandlung von Glykoproteinen

Endoglykosidase H spaltet Mannose-reiche (sowie einige Hybrid-Typ) N-Glykane zwischen den beiden terminalen GlcNAc-Resten am reduzierenden Ende des Glykans (Trimble und Maley 1984).

Bis zu 150  $\mu$ g Gesamtprotein wurden in 20  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O verdünnt und für den enzymatischen Verdau verwendet.

Reaktionsansatz:	20 µl Glykoproteinhomogenat
	6 µl 2 % SDS
	5 μl 1 M β-Mercaptoethanol
	5 Min. bei 95°C denaturieren der Proteine
	5 µl 0,5 M NaAc pH 5,5
	5 µl 10 mM PMSF
	5 µl 1 % CHAPS
	2 μl (5 mU/ μl)

Inkubation ü.N. 5 Min. 100 °C

Nach der Hitzeinaktivierung des Enzyms wurden die Proben mit Lämmli-Puffer versetzt und für die SDS-PAGE verwendet.

#### 2.3.12 Tritosomen-Präparation

Hochangereicherte Lysosomen wurden nach der Methode von Wattiaux (Wattiaux et al. 1963) und Leighton (Leighton et al. 1968) durch differentielle Dichte-Zentrifugation präpariert.

Da Lysosomen normalerweise eine vergleichbare Dichte wie Mitochondrien aufweisen, ist es kaum möglich diese durch klassische Dichte-Zentrifugation sauber voneinander zu trennen. Durch die Injektion von Tyloxapol (Triton WR-1339) wird die Lipopotein-Lipase des Plasmas inhibiert (Hayashi et al. 1981), dies führt zu einem starken Anstieg des LDL-Spiegels im Plasma und einer vermehrten Aufnahme von LDL-Partikeln in der Leber über den LDL-Rezeptor, der das gebundene LDL über RME zum Lysosom transportiert. Im Lysosom werden die LDL-Partikel durch lysosomale Hydrolasen abgebaut und der deutlich erhöhte Lipidanteil führt zu einer Verringerung der lysosomalen Dichte (Hayashi et al. 1982).

Mäusen wurde drei bis vier Tage vor Organentnahme 5 µl/ g Körpergewicht einer 17 % Triton WR-1339 (v/v) intravenös injiziert. Nach Tötung der Tiere wurden die Lebern entnommen (etwa 3 – 5 g) und in 2 Vol. des Frischgewichtes 0,25 M Sucrose im Potter Elvejhem mit sechs Hüben homogenisiert. Das Volumen wurde mit 0,25 M Sucrose auf 12 ml aufgefüllt und Zellkerne bei 4 °C für 10 Min bei 2300 Upm (Eppendorf 5804R Zentrifuge) sedimentiert. Das Kern-Sediment wurde in 5 ml aufgenommen und auf 12 ml aufgefüllt und erneut bei 4 °C für 10 Min. bei 2300 Upm sedimentiert (Kernsediment: N). Beide Überstände wurden vereint, auf zwei Ti75 Zentrifugen-Röhrchen verteilt und in einer Beckmann-Ultrazenrifuge (Ti75 Rotor) bei 4 °C für 3 Min. bei 13000 Upm zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und das Sediment erneut mit 10 ml 0,25 ml Sucrose gewaschen. Auch diese Überstände wurden mit denen der ersten Zentrifugation vereinigt. Das Sediment ist die mitochondriale Fraktion (M). Die Überstände wurden dann in neue Ti75 Röhrchen aufgeteilt und bei 4 °C für 7 Min. bei 25000 Upm zentrifugiert. Das Sediment wurde wieder mit 10 ml 0,25 M Sucrose gewaschen und abermals zentrifugiert. Dieses Sediment (light mitochondria und Lysosomen, L) wurde vorsichtig in 1 ml p 1,12 Sucrose resuspendiert und über einen diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten aufgetrennt. Die Überstände wurden vereint und 40 Min. bei 35000 Upm zentrifugiert, um Mikrosomen (Sediment) und zytosolische Bestandteile (Überstand) voneinander zu trennen.



Abb. 2.1: Übersicht über differentielle Zentrifugation und den diskontinuierlichen Sucrose-Gradient der Tritosomen-Präparation.

Für den diskontinuierliche Sucrose-Gradient wurde das resuspendierte Pellet L in SW40 Zentrifugen-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurden 3 ml Sucrose ρ 1,15, mit 3 ml Sucrose ρ 1,14 und 2 ml Sucrose ρ 1,06 vorsichtig darüber geschichtet. Durch eine Zentrifugation für 150 Min. bei 4 °C und 25000 Upm (SW40 Rotor) wurden Organellen ihrer Dichte nach aufgetrennt. Der Gradient besitzt nach der Zentrifugation drei Interphasen. Die Schicht über der Interphase 1 wurde als Fraktion F1 abgenommen, die Interphase 1 (F2) enthält die Tyloxapol-gefüllten Lysosomen. Die Interphase 2 wird als F3 abgenommen und die Interphase 3, sowie das Pellet ergeben die Fraktion F4.

Die Verteilung der β-Hexosaminidase-Aktivität in allen Fraktionen wurde als lysosomales Leitenzym bestimmt und die F2-Fraktionen für Western-Blot Analysen und 2-D Gelelektrophorese verwendet.

#### 2.3.13 Percoll<sup>™</sup>-Dichtezentrifugation

Um die Dichte von Lysosomen zu untersuchen, wurde eine Dichte-Zentrifugation mit Percoll<sup>™</sup> durchgeführt. Percoll<sup>™</sup> besteht aus 15 – 30 nm großen Polyvinlypyrrolidon beschichteten kolloidalen Silika-Partikeln. Die Probe wird mit Percoll<sup>™</sup> gemischt und durch die Zentrifugation stellt sich ein Dichtegradient im Zentrifugationsröhrchen ein. Die Verteilung verschiedener Organellen lässt sich durch typische Leitenzyme bestimmen.

Frische Gewebe wurden in 9 Vol. eiskaltem Puffer I im Potter Elvehjem mit 10 Hüben homogenisiert. Anschließend wurden Zellkerne bei 4 °C für 5 Min. bei 1000 g sedimentiert. Das Sediment wurde vorsichtig in 1 ml Puffer I aufgenommen und nochmal im Potter mit 5 Hüben homogenisiert. Das Homogenat wurde erneut bei 1000 g zentrifugiert. Die Überstande (*postnuclear supernatant*, PNS) beider Zentrifugationsschritte wurden vereint und vorsichtig gemischt. 1 ml des PNS wurden mit 5,5 ml Puffer P und 3,5 ml Puffer I gemischt und in ein Ti75 Zentrifugenröhrchen überführt. Schließlich wurde in einer Beckmann Ultrazentrifuge im Ti75 Rotor 90 Min. bei 30000 g und 4 °C zentrifugiert (Endkonzentration Percoll™: 50 %).

Der Gradient wurde von oben in 20 Fraktionen zu je 0,5 ml abgenommen. Die einzelnen Fraktionen wurden mit 3 x 20 Sek. Ultraschall behandelt und die Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase als lysosomales Leitenzym in jeder Fraktion bestimmt.

Die Brechungszahl der einzelnen Fraktionen wurde refraktometrisch bestimmt und in die Dichte umgerechnet.

Puffer I:	0,25 M Sucrose
	3 mM Imidazol pH 7,4
Puffer P:	90 % (v/v) Percoll™
	10 % (v/v) 2,5 M Sucrose
	30 mM Imidazol pH 7,4

#### 2.4 Histochemische Methoden

#### 2.4.1 Anfertigung von freischwimmenden Semi-Dünnschnitten

Mäuse wurden mit einer tödlichen Dosis Narkosemittel gespritzt. Bei Einsetzen der Schmerzunempfindlichkeit wurden das Abdomen und der Brustkorb geöffnet. Die Maus wurde dann periportal erst mit ~20 ml PBS und anschließend mit ~20 ml 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS (w/v) durch die linke Herzkammer perfundiert. Die Organe wurden entnommen und für weitere 2 Std. in 4 % PFA nachfixiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation bis zum Absinken der Organe in 30 % Sucrose (in PBS (w/v)) bei 8 °C.

Die Organe wurden auf eine dünne Schicht 5 % Sucrose (w/v) auf dem, mit Trockeneis vorgekühlten, Trägertisch des Cryo-Vibratoms (SM2000R, Leica, Heidelberg) festgefroren und mit 30 % Sucrose eingebettet. Schließlich wurden 40 µm dünne Schnitte angefertigt und mit einem dünnen Pinsel in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3 gefüllte Vertiefungen von 24-Lochplatten überführt.

# 2.4.2 Immunohistochemische (IHC) Färbung von Gewebeschnitten des Gehirns

Für die immunohistochemische Färbung von Schnitten des Gehirns wurde das ZytoChem HRP Kit (Zytomed Systems, Berlin) verwendet. Endogene Peroxidasen wurden für 10 Min. mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> blockiert. Nach 2 Min. waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungen durch 5 Min. Inkubation mit *Blocking Solution* blockiert. Anschließend wurde erneut für 2 Min. mit PBS gewaschen. Die Inkubation des Primärantikörpers (in PBS verdünnt) wurde ü.N. bei 4 °C durchgeführt. Nach dreimaligem waschen mit PBS wurden die Schnitte 15 Min. bei RT mit dem polyvalenten Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem dreimaligem waschen mit PBS wurde anschließend mit dem Streptavidin-HRP-Konjugat für 15 Min. inkubiert. Nach abschließendem Waschen mit PBS wurde mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Substratlösung bis zur gewünschten Intensität gefärbt. Schließlich wurden die Schnitte vorsichtig mit einem Pinsel abgenommen und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden in 50 µl Mowiol-Lösung eingebettet.

#### 2.4.3 Immunohistochemische (IHC) Färbung von Gewebeschnitten der Leber

Um unspezifische Bindungen abzusättigen, wurden die freischwimmenden Schnitte mit 4 % Ziegen-Serum blockiert. Dazu wurde der Puffer abgenommen und 300 µl Blockierungs-Lösung auf die Schnitte gegeben, dann wurden die Schnitte für 2 Std. bei RT auf einer Wippe inkubiert. Die Antikörperfärbung erfolgte in der jeweiligen Verdünnung in einem Volumen von 200 µl verdünnt in Blockierungs-Lösung über Nacht auf einer Wippe.

Am Folgetag wurden die Schnitte dreimal mit Waschlösung gewaschen, anschließend mit dem 1:500 verdünnten HRP-konjugierten Sekundär-AK (in Waschlösung) für 1 Std. bei RT inkubiert. Dann wurde wieder dreimal für etwa 10 Min. bei RT auf der Wippe gewaschen. Die Detektion erfolgte durch Inkubation der Schnitte in DAB-Substratlösung (DAB *enhanced liquid substrate system for* IHC, Sigma). Schließlich wurden die Schnitte vorsichtig mit einem Pinsel abgenommen und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden in 50 µl Mowiol-Lösung eingebettet.

Blockierungslösung:	0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4	
	4 % Ziegen-Serum	
	0,5 % Triton X-100	
Waschlösung:	0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4	
	0,25 % Triton X-100	
Mowiol-Lösung:	6 g Glycerin	
	2,4 g Mowiol 4-88	
	6 ml dH₂O	
	12 ml 0,2 M Tris / HCl pH 8,5	
	25 mg / ml DABCO	

#### 2.4.4 Immunfluoreszenz von freischwimmenden Gewebeschnitten

Die Färbung wurde bis zur Inkubation mit dem Sekundär-AK wie in 2.4.3 durchgeführt. Die Detektion mit dem 1:400 (in Waschlösung) verdünnten Fluorophor-

konjugierten Sekundär-AK erfolgte bei Dunkelheit für 2 Std. bei RT. Dann wurde wieder dreimal für etwa 10 Min. bei RT auf der Wippe gewaschen, ggf. während des zweiten Waschschrittes mit DAPI (DAPI-Stock 1:1000 in dH<sub>2</sub>O) in Waschlösung) für 10 Min. gefärbt. Schließlich wurden die Schnitte vorsichtig mit einem Pinsel abgenommen und auf Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden in 50 µl Mowiol-Lösung eingebettet.

DAPI-Stock:

1 mg / ml dH<sub>2</sub>O (w / v)

#### 2.4.5 Reduzierung von Autofluoreszenz an Schnitten des Gehirns

Um durch Lipofuscin verursachte Autofluoreszenz an Schnitten des Gehirns zu *quenchen*, wurden die Schnitte nach Immunfärbung nach dem letzten Waschschritt für 30 Min. bei RT in 200  $\mu$ M Kupfersulfat-Lösung inkubiert, nochmals kurz in dH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend aufgezogen (Schnell et al. 1999).

Kupfersulfat-Lösung:	200 $\mu M$ CuSO4 in 50 mM Ammoniumacetat,
	рН 5,0

#### 2.4.6 Filipin-Färbung von Gewebeschnitten

Filipin färbt spezifisch freies Cholesterin und fluoresziert stark unter UV-Licht (Geyer und Bornig 1975). Nach der Antikörper-Färbung wurden die freischwimmenden Schnitte für 2 Std. bei Dunkelheit in Filipin-Färbelösung bei RT auf einer Wippe inkubiert und anschließend für dreimal 20 Min. mit Phosphatpuffer gewaschen. Die Färbung wurde in 24-Lochplatten durchgeführt. Filipin wurde bei Anregung mit dem UV-Laser und einer Emission von 480 – 520 nm visualisiert.

Filipin-Färbelösung:	1 Kri	stall	Filipin in 50 µl D	MSO löser	ı
	450	μI	Phosphatpuffer	zugeben	(Lösung
	muse	s im	mer frisch angese	etzt werder	n!)

#### 2.5 Analytik von Oligosacchariden

#### 2.5.1 Extraktion neutraler Oligosaccharide aus Geweben

Frische oder bei -80 °C gelagerte Gewebe wurden in 10 Vol. des Frischgewichts in dH<sub>2</sub>O mithilfe eines Ultra-Turrax und durch dreimaliges beschallen mit Ultraschall für 20 Sek. homogenisiert. 600 µl des Homogenats wurden für die weitere Extraktion verwendet. 2,6 ml 100 % MetOH wurden zu dem Homogenat hinzugefügt und durch kräftiges vortexen gemischt, anschließend wurde für 5 Min. bei 4500 Upm bei 4 °C zentrifugiert. Dabei sedimentieren präzipitierte denaturierte Protein, wasserlösliche Oligosaccharide verbleiben im Überstand. Der Überstand wurde in neue Röhrchen überführt und das Sediment erneut mit 1,3 ml 80 % MetOH extrahiert, gemischt und bei 4500 Upm für 5 Min. abzentrifugiert. Beide Überstände wurden dann vereint.

Zu den etwa 4 ml der wässrigen Phase wurden 910  $\mu$ l CHCl<sub>3</sub> gegeben, durch vortexen kräftig gemischt und für 5 Min. bei 4 °C bei 3300 Upm zentrifugiert. Zu den Überständen wurde dann 2,73 ml dH<sub>2</sub>O gegeben, durch abermaliges vortexen gemischt und wieder für 10 Min. bei 4 °C und 4500 Upm zentrifugiert.

Um Salze aus der Oligosccharid-Lösung zu entfernen, wurden 250 mg des Anionen- / Kationen-Austauscher Gemischs "*exchange resin* AG 501-X8, 20-50 *mesh*" (Bio-Rad, Hercules, USA) hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert.

Die Überstände wurden schließlich lyophilisiert und die Oligosaccharide in  $1 \mu l dH_2O/mg$  des eingesetzten Frischgewichts aufgenommen.

#### 2.5.2 Dünnschichtchromatographie von extrahierten Oligosacchariden

Die Dünnschichtchromatographie (DC) extrahierter Oligosaccharide wurde auf HPTLC Kieselgel-Platten der Firma Merck im Format 20 x 20 cm durchgeführt. Die Platten wurden vor der Chromatographie durch Erhitzen auf 110 °C für 10 Min. vorbehandelt.

Die in Wasser gelösten Proben wurden in Volumina von 1 – 10 µl semi-automatisiert mithilfe eines Linomat 5 (Camag, Muttenz, Schweiz) in einer Hamilton-Sprltze in 0,5 cm breiten Streifen auf der HPTLC-Platte appliziert. Die Platten wurden dann getrocknet und ca. 16 Std. in Laufmittel I in einer mit Laufmittel-gesättigten

Atmosphäre in DC-Glastanks entwickelt. Nach Abtrocknen des Laufmittels bei RT für etwa 1 Std. wurden die DC-Platten für 5 Min. auf 110 °C erhitzt und anschließend für 4 Std. in Laufmittel II entwickelt. Nach abermaligem abtrocknen des Laufmittels bei RT wurde sie erneut für 5 Min. auf 110 °C erhitzt.

Um die chromatografisch aufgetrennten Oligosaccharide zu visualisieren, wurden die Platten mit Orcinol / 20 % Schwefelsäure-Lösung besprüht, getrocknet und anschließend bei 110 °C für 5 – 10 Min. bis zur Verkohlung der Glykane erhitzt.

Laufmittel I:	2 Vol. Butanol		
	1 Vol. Eisessig		
	1 Vol. dH <sub>2</sub> O		
Laufmittel II:	5 Vol. N-Propanol		
	4 Vol. Nitromethan		
	3 Vol. dH <sub>2</sub> O		
Orcinol / Schwefelsäure-Lösung:	50 mg Orcinol in 20 % $H_2SO_4$		

#### 2.6 Tierexperimentelle Methoden

Tierversuche wurden im Rahmen des von der Bezirksregierung Braunschweig genehmigten Versuchsantrags "Überprüfung der therapeutischen Wirksamkeit von Enzymsubstitution in  $\alpha$ -Mannosidose Mäuse", Aktenzeichen G 46.04 durchgeführt.

α-Mannosidase-defiziente Mäuse wurden von Stinchi et al. generiert (Stinchi et al. 1999) und in den C57BL/6-Hintergrund Rück-gezüchtet.

#### 2.6.1 Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte in der zentralen Tierstalleinrichtung (ZTE) des Universitätsklinikums Göttingen unter standardisierten Bedingungen. Die Raumtemperatur wurde konstant zwischen bei 21 °C ( $\pm$  5 °C), die Luftfeuchtigkeit bei 70 % ( $\pm$  10 %) gehalten. Hell-/ Dunkel-Phasen wurden in 12 stündigem Rhythmus gewechselt. Die Versuchstiere wurden, soweit möglich, in Gruppenhaltung gehalten und hatten Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*.

#### 2.6.2 Enzym-Ersatz-Therapie

Rekombinantes therapeutisches LAMAN-Enzym wurde ggf. mit 0,9 % NaCl verdünnt und durch intravenöse Injektion in eine der Schwanzvenen appliziert. Die behandelten Tiere wurden fixiert, der Schwanz in warmem Wasser erwärmt und mit der jeweiligen Dosis auf Körpertemperatur vorgewärmten Enzyms gespritzt.

#### 2.6.3 Blutabnahme, Gewinnung von Serum

Blut wurde mithilfe von EDTA-beschichteten Kapilare retroorbital entnommen. Die Koagulation von Vollblut erfolgte ü.N. bei 4 °C. Anschließend wurde bei 4500 Upm bei 4 °C für 30 Min. zentrifugiert und das Serum abgenommen.

#### 2.6.4 Tötung von Mäusen

Narkose von Mäusen erfolgte durch intraperitoneale Injektion einer tödlichen Dosis von 10  $\mu$ l/ g Körpergewicht einer 25 % Rompun/ 25 % Ketanest Lösung in 0,9 % NaCl.
### 3 Ergebnisse

### 3.1 Enzym-Ersatz-Therapie (ERT)

Rekombinantes humanes LAMAN für die ERT wurde durch die Firma Zymenex (Hillerød, Dänemark) zur Verfügung gestellt und α-Mannosidase-defizienten Mäusen verschiedenen Alters in den jeweils angegebenen Dosierungen i.v. injiziert.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das rekombinante humane LAMAN einen therapeutischen Effekt hat und es nach Injektion zu einer deutlichen Reduktion gespeicherter Oligosaccharide im α-Mannosidase *knockout*-Mausmodell führt. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass bei hohen Dosierungen (250 mU/ g Körpergewicht) bereits nach etwa zwei Wochen eine Immunantwort beginnt und Antikörper gegen das injizierte LAMAN gebildet werden (Roces 2004).



Abb. 3.1: Übersicht Enzym-Ersatz-Therapie Schema. Das Lebensalter der verwendeten Tiere ist jeweils als waagerechter Pfeile dargestellt. Senkrechte Pfeile symbolisieren die Frequenz der i.v. Injektionen mit der angegeben Dosis LAMAN. 60 Stunden nach der letzten Injektion erfolgte die Tötung der Tiere und die Entnahme der Organe.

Zur Untersuchung der Folgen der ERT wurden acht Wochen alten α-Mannosidasedefizienten Tieren daher geringere Dosen von viermal 100 mU/ g Körpergewicht in kurzen Intervallen von zwei Injektionen pro Woche gespritzt. Alternativ wurde die ERT bei acht Wochen alten Tieren in größeren Intervallen von einer Injektion pro Woche mit geringeren Dosierungen von 25 mU/ Kg Körpergewicht über einen Zeitraum von fünf Wochen durchgeführt.

Um auch den Effekt der ERT bei älteren Tieren und stärker manifestierter Speicherung abschätzen zu können, wurde die ERT an 54 Wochen alten Tieren ebenfalls mit 100 mU/ g Körpergewicht für zwei Wochen durchgeführt (siehe Abb. 3.1).

# 3.1.1 Speicherung von neutralen Oligosacchariden und Behandlung durch die ERT

Zur Überprüfung der Effizienz der verschiedenen ERT-Protokolle, akkumulierte Oligosaccharide im Lysosom abzubauen, wurde die Speicherung durch Dünnschichtchromatographie überprüft. In der Leber wird die Detektion der Speicherglykane aufgrund großer Mengen von Glykogen durch Dünnschichtchromatographie erschwert und ein längeres Hungern der Tiere kann zu unbeabsichtigten Nebeneffekten führen. Um solche Effekte zu umgehen, wurden die neutralen Oligosaccharide der Niere analysiert. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass Niere und Leber in gleichem Masse auf die ERT ansprechen (Roces et al. 2004).

Durch eine zweiwöchige ERT-Behandlung von α-Mannosidase *knockout*-Mäusen im Alter von acht Wochen bei zweimaliger Injektion von 100 mU/ g Körpergewicht pro Woche (Abb. 3.2) konnte eine fast vollständige Reduzierung neutraler Oligosaccharide erreicht werden. Während in der Niere der *knockout*-Tiere deutlich die gespeicherten Glykane mit zwei bis neun Mannose-Resten akkumulierten, waren in den behandelten Tieren nur noch geringste Mengen der Glykane mit zwei bzw. drei Mannose-Resten detektierbar. In Tieren des Wildtyps waren keine N-Glykane nachzuweisen.

+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/- EDT	-/- Ерт	-/- EDT	
	-9352		-	-	-				-
			1000	-					-
			1885			-	• •		-
									-
									-
				· Jan					111
1									

Abb. 3.2: Dünnschichtchromatografie neutraler Oligosaccharide der Niere je drei 10 Wochen alter Tiere, vier Injektionen mit 100 mU/ g Körpergewicht ERT. Neutrale Oligosaccharide wurden aus je 60 mg Gewebehomogenaten der Niere von jeweils drei Tieren pro Genotyp extrahiert und über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Oligosaccharide mit zwei bis neun Mannose-Resten sind mit Pfeilen markiert (M2 – M9).

Während auch bei acht Wochen alten *knockout*-Tieren deutlich die gespeicherten Oligosaccharide nachzuweisen waren (Abb. 3.3), konnte mit der geringen Dosierung von 25 mU/ g Körpergewicht nur eine leichte Reduzierung des Speichermaterials und damit ein geringer Effekt der ERT erreicht werden. In den fünf Wochen der ERT-Behandlung verstarben zwei von sechs Mäusen.

Die Speicherung neutraler Oligosaccharide in 56 Wochen alten Tieren wurde mit dem bereits erfolgreich für die acht Wochen alten *knockout*-Tiere etablierten ERT-Schema von vier Injektionen mit 100 mU/ g Körpergewicht in zwei Wochen (vergl. Abb. 3.2) therapiert (Daten nicht gezeigt).

+/+	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/- ERT	-/- ERT	-/- ERT	
- There				-		195620	and a second		
			-	-	-	See.	-546	1965	← м
			(SBE)	SHE			-	No.	← м
						the.	-		н
			-	-				1963	← м
			-1560	- HER	1997	1995		the .	← м
		•	(1)48	CERTER .	नमा		(TRISE)		← м
				-					
						and .			
			- Auto		- 165	199			
-	-		-		-	-	-	-	

Abb. 3.3: Dünnschichtchromatografie neutraler Oligosaccharide der Niere je drei 13 Wochen alter Tiere, fünf Injektionen mit 25 mU/ g Körpergewicht ERT. Neutrale Oligosaccharide wurden aus je 60 mg Gewebehomogenaten der Niere von jeweils drei Tieren pro Genotyp extrahiert und über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Oligosaccharide mit zwei bis neun Mannose-Resten sind mit Pfeilen markiert (M2 – M9).

#### 3.2 Transkriptomanalyse

Um den Effekt der lysosomalen Speicherung von Oligosacchariden in den α-Mannosidase-defizienten Mäusen auf deren Transkriptomprofil und den Therapie-Effekt durch die ERT abschätzen zu können, wurde RNA aus der Leber von Wildtypund *knockout*-Mäusen sowie ERT-behandelten *knockout*-Mäusen präpariert, in Biotin-markierte cRNA umgeschrieben und mit *"Mouse Genome* 430 2.0"-Oligonukleotid-Microarrays der Firma Affymetrix hybridisiert. Die Leber eignet sich besonders gut für eine solche Transkriptomanalyse, da sie von der Erkrankung durch Speicherung von Oligosacchariden stark betroffen ist (Stinchi et al. 1999), schnell auf die ERT anspricht (Roces et al. 2004; Roces 2005) und eine im Vergleich zu anderen Organen vergleichsweise homogene Zellpopulation aus Hepatozyten, Kupfferzellen und wenigen Endothel- und Itozellen aufweist. Da die verschiedenen Zelltypen ein

#### Ergebnisse

sehr unterschiedliches Genexpressionsprofil aufweisen, erleichtert diese relativ hohe Homogenität die Interpretation der Expressionsdaten und es müssen weniger Replikate angefertigt werden. Die Verwendung von Einfarb-Oligonukleotid-*Arrays* macht einen direkten Vergleich verschiedener Expressions-Analysen möglich, da im Gegensatz zu Zweifarb-Systemen die absolute Genexpression gemessen wird.

Für die Transkriptomanalyse wurden Tiere aus drei Altersgruppen (10 Wochen, 13 Wochen und 56 Wochen) eingesetzt. Dabei wurden jeweils drei Wildtyp- und drei *knockout*-Tiere verwendet. Für die 56 Wochen alten Tiere wurde an weiteren drei *knockout*-Tieren die ERT mit 100 mU/ g Körpergewicht angewandt (siehe 3.1). Die Transkriptomanalyse wurde in Kooperation mit Dr. Robert Häsler am Institut für klinische Chemie in Kiel durchgeführt.

Nach dem Auslesen der Fluoreszenz-Intensität wurden die Microarray-Daten anhand interner auf den Chips befindlicher Kontrollhybridisierungsproben normalisiert und in "Affymetrix-Data Suite"-Software annotiert. Als Maß der differentiellen der auf Genexpression wurde für jedes den Arravs befindliche Gen der Expressionsunterschied sowie der p-Wert einer t-Statistik (Student's t-Test) zwischen den verglichenen Gruppen berechnet. Gene mit einem p-Wert >0.05 und einem Expressionsunterschied über 1,5 fach wurden als differentiell exprimiert bezeichnet. Auf eine Korrektur der p-Werte auf multiples Testen musste aufgrund der geringen Zahl von Replikaten verzichtet werden.



Abb. 3.4: Verteilung differentiell exprimierter Gene im Vergleich 10, 13 und 58 Wochen alter Tiere. Die Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene (p < 0,05) mit einer 2 - 4 fachen differentiellen Expression, 4 – 6 fachen und über 6 facher differentieller Expression sind im Vergleich der einzelnen Altersgruppen dargestellt.

Ein Vergleich der differentiellen Genexpression der drei Altersgruppen (Abb. 3.4) zeigte, dass im Alter von 10 und 13 Wochen die Anzahl und das Maß der differentiellen Expression vergleichbar waren. Bei Tieren im Alter von 58 Wochen waren etwa zwei- bis viermal mehr Gene bei höheren Expressionsunterschieden differentiell exprimiert. Der progrediente Krankheitsverlauf führte zu zunehmenden Effekten auf das Transkriptom.

#### 3.2.1 Transkriptomanalyse 10 Wochen alter Tiere Wildtyp vs. knockout

Der Vergleich des Transkriptoms zwischen Wildtyp und *knockout*-Tieren im Alter von 10 Wochen wies eine differentielle Expression von 185 Genen auf, von denen 144 in den *knockout*-Tieren in ihrer Expression heraufreguliert und 41 in ihrer Expression reprimiert waren. Tab. 3.1 zeigt alle Gene mit einer > 2,5-fachen erhöhten differentiellen Expression, Tab. 3.2 alle Genen mit einer > 2,5-fach reprimierten Expression. Für das Transkript des Man2B1-Gens ließ sich dabei erwartungsgemäß die deutlichste Repression beobachten. Es zeigte sich im Vergleich der beiden Genotypen keine offensichtliche Anhäufung von differentiell exprimierten Genen eines Stoffwechselweges. Das Transkript der lysosomalen Protease Cathepsin B zeigte eine 2-fach erhöhte Expression.

Tab. 3.1: Differentielle Genexpression Wildtyp vs. knockout, Alter 10 Wochen; aktivierte Gene.Die Expressionsunterschiede in der Spalte "WT vs KO" sind als x-fache Expression in den<br/>knockout-Tieren im Vergleich zum Wildtyp angegeben.

Chip ID	Symbol	Gen Name	Chromosom	p-Wert	Wildtyp vs KO
1424794_at	Rnf186	ring finger protein 186	chr4 D3	0,0424	7,18
1457198_at	Nrp1	neuropilin 1	chr8 E 8	0,0011	4,10
1451780_at	Blnk	B-cell linker	chr19 C3 19	0,0263	3,12
1451755_a_at	Apobec1	apolipoprotein B editing complex 1	chr6 F1 6	0,0382	2,97
1423348_at	Fzd8	frizzled homolog 8 (Drosophila)	chr18 A1 18	0,0192	2,82
1423216_a_at	2510049I19Rik	RIKEN cDNA 2510049119 gene	chr8 B3.3	0,0035	2,74
1436530_at		CDNA clone MGC:107680 IMAGE:6766535		0,0130	2,74
1448162_at	Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1	chr3 G1 3	0,0064	2,60
1435455_at	C79267	expressed sequence C79267	chr4 D3	0,0205	2,59
1424007_at	Gdf10	growth differentiation factor 10	chr14 B 14	0,0271	2,58
1415971_at	Marcks	myristoylated alanine rich protein kinase C	chr10 B1 10	0,0458	2,57
1422284_at	Nkx2-9	NK2 transcription factor related, locus 9	chr12 C1	0,0166	2,54

Tab. 3.2:	Differentielle Genexpression Wildtyp vs. knockout, Alter 10 Wochen; reprimierte
	Gene. Die Expressionsunterschiede in der Spalte "WT vs KO" sind als x-fache Expression
	in den knockout-Tieren im Vergleich zum Wildtyp angegeben.

Chip ID	Symbol	Gen Name	Chromosom	p-Wert	WT vs KO
1416340_a_at	Man2b1	mannosidase 2, alpha B1	chr8 C2 8	0,0053	-25,95
1430979_a_at	Prdx2	peroxiredoxin 2	chr8 C3 8	0,0035	-10,58
1417496_at	Ср	ceruloplasmin	chr3 D	0,0418	-8,63
1450398_at	Kcnk5	potassium channel, subfamily K, member 5		0,0316	-5,39
1425243_at	Cd207	CD 207 antigen	chr6 D1-D2	0,0151	-5,27
1417619_at	Gadd45gip1	growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma interacting protein 1	chr8 C3	0,0434	-3,65
1416487_a_at	Yap1	yes-associated protein 1	chr9 A1	0,0065	-2,85
1450035_a_at	Prpf40a	PRP40 pre-mRNA processing factor 40 homolog A (yeast)	chr2 C1	0,0317	-2,82
1419898_s_at	Zc3h7a	zinc finger CCCH type containing 7 A	chr16 A1	0,0403	-2,68
1452001_at	Nfe2	nuclear factor, erythroid derived 2	chr15 F3 15	0,0314	-2,55
1426587_a_at	Stat3	signal transducer and activator of transcription 3	chr11 D 11	0,0316	-2,53
1423174_a_at	Pard6b	par-6 (partitioning defective 6) homolog beta (C. elegans)	chr2 H3	0,0320	-2,51

#### 3.2.2 Transkriptomanalyse 13 Wochen alter Tiere Wildtyp vs. knockout

Der Vergleich des Transkriptoms von 13 Wochen alten Tiere wies 285 differentiell exprimierte Gene zwischen Wildtyp- und  $\alpha$ -Mannosidase *knockout*-Tieren auf, von denen 88 Gene aktiviert und 197 Gene in ihrer Expression reprimiert waren. Tab. 3.3 zeigt alle aktivierten Gene mit einer Expression > 2,5-fach, Tab. 3.4 alle Genen mit einer stärkeren Repression als 2,5-fach. Wieder ließ sich für das Transkript des Man2B1-Gens die deutlichste Repression beobachten, das Prdx2-Transkript war, wie auch im Alter von 10 Wochen, das am zweitstärksten signifikant reprimierte Transkript. Im Alter von 13 Wochen waren Gene u.a. des Acyl-CoA Metabolismus statistisch signifikant in der Gruppe der differentiell exprimierten Gene überrepräsentiert (*gene ontology*-Kategorie "*Acyl-CoA metabolic process*", 27 fache Anreicherung, p = 1.3E-1).

Tab. 3.3: Differentielle Genexpression Wildtyp vs. knockout, Alter 13 Wochen; aktivierte Gene.Die Expressionsunterschiede in der Spalte "WT vs KO" sind als x-fache Expression in den<br/>knockout-Tieren im Vergleich zum Wildtyp angegeben.

Chip ID	Symbol	Gen Name	Chromosom	p-Wert	WT vs KO
1422925_s_at	Acot3	acyl-CoA thioesterase 3	chr12 D1	0,0256	4,60
1424853_s_at	Cyp4a10 /// BC013476	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 10	chr4 D1 4 /// chr4 D1	0,0037	4,18
1443866_at	Lrtm1	leucine-rich repeats and transmembrane domains 1	chr14 A3	0,0028	4,02
1455267_at	Esrrg	estrogen-related receptor gamma	chr1 H6	0,0003	2,85
1422997_s_at	Acot1 /// Acot2	acyl-CoA thioesterase 1 /// acyl-CoA thioesterase 2	chr12 D1 /// chr12 D3	0,0287	2,62

 Tab. 3.4:
 Differentielle Genexpression Wildtyp vs. knockout, Alter 13 Wochen; reprimierte Gene. Die Expressionsunterschiede in der Spalte "WT vs KO" sind als x-fache Expression in den knockout-Tieren im Vergleich zum Wildtyp angegeben.

Chip ID	Symbol	Gen Name	Chromosom	p-Wert	WT vs KO
1416340_a_at	Man2b1	mannosidase 2, alpha B1	chr8 C2 8	0,0000	-13,80
1430979_a_at	Prdx2	peroxiredoxin 2	chr8 C3 8	0,0001	-5,82
1427747_a_at	Lcn2	lipocalin 2	chr2 A3 2	0,0230	-3,82
1416022_at	Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal	chr3 A1-3	0,0099	-3,44
1451755_a_at	Apobec1	apolipoprotein B editing complex 1	chr6 F1 6	0,0403	-3,29
1418600_at	Klf1	Kruppel-like factor 1 (erythroid)	chr8 C3 8	0,0016	-3,26
1445534_at	Flnb	Filamin, beta	chr14 A1	0,0302	-2,97
1416021_a_at	Fabp5	fatty acid binding protein 5, epidermal	chr3 A1-3 /	0,0111	-2,94
1418507_s_at	Socs2	suppressor of cytokine signaling 2	chr10 C2 10	0,0357	-2,74
1429184_at	Gvin1	GTPase, very large interferon inducible 1	chr7 E3	0,0230	-2,72
1435588_at	Wdfy1	WD repeat and FYVE domain containing 1	chr1 C4	0,0475	-2,68
1436660_at	Rrbp1	ribosome binding protein 1	chr2 G1	0,0157	-2,66
1442593_at				0,0115	-2,65
1449109_at	Socs2	suppressor of cytokine signaling 2	chr10 C2 10	0,0348	-2,56

# 3.2.3 Transkriptomanalyse 58 Wochen alter Tiere Wildtyp vs. *knockout* vs. *knockout*-ERT

Im Alter von 58 Wochen konnte in einem Vergleich des Transkriptoms von Wildtyp und  $\alpha$ -Mannosidase-*knockout*-Tieren eine signifikante differentielle Expression von insgesamt 442 Genen (p < 0,05) festgestellt werden, von denen 257 Gene mehr als 1,5-fach aktiviert und 185 Gene mehr als 1,5-fach reprimiert waren. Im Vergleich zu

10 und 13 Wochen alten Tieren wiesen damit etwa dreimal mehr Gene eine differentielle Expression auf.

In Tab. 3.5 sind alle aktivierten Gene mit einer mindestens 3,5-fach stärkeren Expression als im Wildtyp dargestellt, in Tab. 3.6 alle in *knockout*-Tieren mindestens 2,5-fach reprimierten Gene. Unter den am stärksten aktivierten Genen fanden sich viele Gene für verschiedene Immunglobulinketten, inflammatorische Proteine wie die IgG FC-Rezeptoren II und III, der Komplement Rezeptor 3A und das bereits bei 10 Wochen alten *knockout*-Tieren differentiell exprimierte Adhäsionsmolekül Vcam1, das durch drei verschiedene Oligonukleotide auf dem *Chip* repräsentiert wird. Die drei Oligonukleotide wiesen eine 2,5 – 8-fache Aktivierung auf. Das Gen für einen der Vcam1-Rezeptoren, Integrin  $\alpha$ 9 (Taooka et al. 1999), war ebenfalls etwa 5-fach aktiviert. Zudem codieren einige unter den aktivierten Genen für Proteine, deren Expression sich auf Zellen der monozytären Reihe beschränkt wie z.B. Clec4n, CD68, Lysozym, oder das CD163-Gen. Clec4n (Synonym Dectin-2) ist ein Lektin mit Spezifität für Mannose-reiche Glykane (McGreal et al. 2006).

Neben dem Cathepsin B-Transkript mit einer 2-fach erhöhten Expression in *knockout*-Tieren wurden nur die beiden Gene der Untereinheiten der  $\beta$ -Hexosaminidase mit moderater jeweils 1,5-fach erhöhter Expression als lysosomale Proteine unter den differentiell exprimierten Genen detektiert.

Für den Großteil der Transkripte ließ sich nach der ERT eine Reduktion der Expression etwa um den Faktor zwei bis vier feststellen. Zwar wurde meist keine vollständige Reduktion auf das Wildtyp-Niveau erreicht, es ließ sich jedoch in der breite ein deutlicher Effekt durch die ERT feststellen.

Erwartungsgemäß ließ, sich wie bereits bei 10 und 13 Monate alten Tieren, für das Transkript der Man2B1 die deutlichste Repression feststellen. Prdx2 war ebenfalls wie bei den 10 und 13 Wochen alten Tieren mit einer 7,5-fachen differentiellen Expression das am zweitstärksten reprimierte Transkript in den *knockout*-Tieren. Der Effekt ließ sich durch die ERT jedoch nicht therapieren.

# Tab. 3.5:Differentielle Genexpression Wildtyp vs. knockout vs. knockout-ERT, Alter 58<br/>Wochen; aktivierte Gene. Die Expressionsunterschiede in der Spalte "WT vs KO" sind als<br/>x-fache Expression in den knockout-Tieren im Vergleich zum Wildtyp angegeben. Die<br/>Spalte "WT vs ERT" gibt die x-fache Expression von Genen ERT-behandelter Tiere zum<br/>Wildtyp an.

Chip ID	Symbol	Gen Name	Chromosom	p-Wert	WT vs KO	WT vs ERT
1425738_at	lgk-V21-12	immunoglobulin kappa chain variable 21 (V21)-12	chr6 C1	0,0286	13,85	7,9
1448162_at	Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1	chr3 G1 3	0,0230	8,20	1,8
1425951_a_at	Clec4n	C-type lectin domain family 4, member n	chr6 F3 6	0,0361	8,04	2,7
1415989_at	Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1	chr3 G1 3	0,0265	7,45	1,8
1427860_at	lgkv6-23 /// lgk- V19-14	immunoglobulin kappa chain variable 6-23	chr6 C1	0,0341	6,67	3,8
1449164_at	Cd68	CD68 antigen	chr11 B3 11	0,0396	6,54	2,1
1460285_at	Itga9	integrin alpha 9	chr9 F3 9	0,0401	5,06	3,2
1430700_a_at	Pla2g7	phospholipase A2, group VII (platelet- activating factor acetylhydrolase, plasma)	chr17 C	0,0344	4,89	2,3
1449846_at	Ear2	eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 2	chr14 B	0,0371	4,82	2,4
1452463_x_at		Immunoglobulin kappa chain complex		0,0203	4,79	3,4
1452557_a_at		Immunoglobulin kappa chain complex		0,0085	4,60	3,4
1439255_s_at	Gpr137b /// LOC664862	G protein-coupled receptor 137B	chr13 A1 13	0,0285	4,49	1,9
1422411_s_at	Ear1 /// Ear2 /// Ear3 /// Ear12	eosinophil-associated, ribonuclease A family, member 1	chr14 B	0,0303	4,48	2,5
1427455_x_at	lgk-V28 /// lgk- V8-16	immunoglobulin kappa chain variable 28 (V28)	chr6 C1 6	0,0076	4,45	3,5
1427329_a_at	lgh-6	immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	chr12 F1- 2 12	0,0206	4,43	3,2
1427351_s_at	lgh-6	immunoglobulin heavy chain 6 (heavy chain of IgM)	chr12 F1- 2 12	0,0286	4,42	3,1
1448620_at	Fcgr3	Fc receptor, IgG, low affinity III	chr1 H3 1	0,0476	4,40	1,7
1430523_s_at	lgl-V1	immunoglobulin lambda chain, variable 1	chr16 A3 16	0,0124	4,30	4,0
1424305_at	lgj	immunoglobulin joining chain	chr5 E1	0,0299	4,30	3,2
1449134_s_at	Spic	Spi-C transcription factor (Spi-1/PU.1)	chr10 C	0,0149	4,27	1,8
1450881_s_at	Gpr137b	G protein-coupled receptor 137B	chr13 A1 13	0,0169	4,18	1,7
1423547_at	Lyzs	lysozyme	chr10 D2 10	0,0092	4,16	2,3
1419144_at	Cd163	CD163 antigen	chr6 F2	0,0089	4,14	1,8
1449670_x_at	Gpr137b	G protein-coupled receptor 137B	chr13 A1 13	0,0361	4,04	1,2
1428719_at	2010309G21Rik /// LOC207685	RIKEN cDNA 2010309G21 gene /// hypothetical protein LOC207685	chr16 A1	0,0001	4,04	2,7
1428700_at	P2ry13	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 13	chr3 D	0,0225	4,00	2,0
1451651_at	Vsig4	V-set and immunoglobulin domain containing 4	chrX C3	0,0290	3,84	2,2

#### Ergebnisse

1416111_at	Cd83	CD83 antigen	chr13 A4- 5 13	0,0168	3,84	1,5
1431056_a_at	Lpl /// LOC669888	lipoprotein lipase /// similar to Lipoprotein lipase precursor (LPL)	chr8 B3.3 8	0,0441	3,74	4,4
1415904_at	Lpl	lipoprotein lipase	chr8 B3.3 8	0,0422	3,71	3,8
1428720_s_at	lgl-V1 /// 2010309G21Rik	immunoglobulin lambda chain, variable 1	chr16 A3 16	0,0001	3,70	2,3
1457753_at	Tlr13	toll-like receptor 13	chrX D	0,0448	3,64	1,8
1439256_x_at	Gpr137b /// LOC664862	G protein-coupled receptor 137B /// similar to transmembrane 7 superfamily member 1	chr13 A1 13	0,0303	3,60	1,6

Tab. 3.6: Differentielle Genexpression Wildtyp vs. *knockout* vs *knockout*-ERT, Alter 58 Wochen; reprimierte Gene. Die Expressionsunterschiede in der Spalte "WT vs KO" sind als x-fache Expression in den *knockout*-Tieren im Vergleich zum Wildtyp angegeben. Die Spalte "WT vs ERT" gibt die x-fache Expression von Genen ERT-behandelter Tiere zum Wildtyp an.

Chip ID	Symbol	Gen Name	Chromosom	p- Wert	WT vs KO	WT vs ERT
1416340_a_at	Man2b1	mannosidase 2, alpha B1	chr8 C2 8	0,0001	-12,32	-15,5
1430979_a_at	Prdx2	peroxiredoxin 2	chr8 C3 8	0,0025	-7,49	-7,5
1448092_x_at	Serpina4-ps1	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 4, pseudogene 1	chr12 E	0,0496	-3,63	-1,5
1418600_at	Klf1	Kruppel-like factor 1 (erythroid)	chr8 C3 8	0,0169	-3,58	-3,6
1431255_at	Calr3	calreticulin 3	chr8 C1	0,0058	-2,88	-2,4
1435579_at	Oprs1	Opioid receptor, sigma 1	chr4 A5-B2	0,0179	-2,84	-2,3
1431182_at	Hspa8	heat shock protein 8	chr9 A5.1 9	0,0456	-2,75	-1,3
1447939_a_at	4933409K07Rik	RIKEN cDNA 4933409K07 gene	chr4 A5	0,0361	-2,64	-2,3
1453596_at	ld2	inhibitor of DNA binding 2	chr12 B 12	0,0261	-2,51	-2,0
1457233_at	Dnaja2	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 2	chr8 C4	0,0001	-2,50	-2,6
1444622_at	Ptprd	Protein tyrosine phosphat. receptor type D	chr4 C3 4	0,0217	-2,50	-2,1

### 3.2.4 Vergleich differentiell exprimierter Gene der verschiedenen Altersgruppen

Zur Identifikation von Genen, die in allen drei verglichenen Altersgruppen zwischen Wildtyp- und *knockout*-Tieren differentiell exprimiert waren, wurden alle Gene mit einem p-Wert > 0,05 und mindestens 1,5 facher differentieller Expression der drei Altersgruppen verglichen (Abb. 3.5). Beim Vergleich der 10 und 13 Wochen alten Tiere konnten 11 Gene identifiziert werden, die in beiden Altersgruppen differentiell exprimiert waren. Zwischen Tieren der Altersgruppen 13 und 58 Wochen galt dies für 33 Gene und zwischen 10 und 58 Woche für zwölf Gene. Erstaunlicherweise zeigten nur sechs Gene in allen drei Altersgruppen eine differentielle Expression, von denen eines das für die α-Mannosidase codierende *knockout*-Gen Man2B1 war.



Abb. 3.5: VENN-Diagramm gemeinsamer differentiell exprimierter Gene in 10, 13 und 58 Wochen alten Tieren. Pro Altersgruppe sind jeweils alle Genen mit einem p-Wert > 0,05 und einer mindesten 1,5 fachen Expressionsunterschied dargestellt. In sich überschneidenden zwei Kreisen ist die Anzahl der beiden in den jeweiligen Altersgruppen gemeinsam regulierten Gene dargestellt. Die Überschneidung aller drei Kreise zeigt in allen drei Gruppen regulierte Gene. Gene, die redundant durch mehrere Oligonukleotide auf dem Chip präsent waren, wurden nur einmal in die Analyse miteinbezogen, unbenannte Gene wurden von der Analyse ausgeschlossen.

#### 3.2.5 Effekt der ERT auf die differentielle Genexpression 58 Wochen alter Tiere

Um den Gesamteffekt der ERT auf differentiell exprimierte Gene zu visualisieren, wurde mithilfe der Online-Software *"expression profiler"* eine Korrespondenzanalyse durchgeführt (Kapushesky et al. 2004). Bei der Korrespondenzanalyse werden die Daten einer Datenmatrix grafisch dargestellt. Die Variablen aus Spalten und Reihen werden dabei durch Punkte in einem Raum repräsentiert, dessen Koordinatenachsen durch die jeweiligen Merkmale gebildet werden (Fellenberg et al. 2001).

Für die Korrespondenz-Analyse wurden alle 442 Gene mit p < 0,05 und einem mindestens 1,5 fachen Expressionsunterschied zwischen 58 Wochen alten Wildtypund  $\alpha$ -Mannosidase-*knockout*-Tieren einbezogen (Abb. 3.6). Bei allen drei ERT-behandelten Tieren (vier LAMAN-Injektionen mit 100 mU/ g Körpergewicht, zwei Injektionen pro Woche) konnte eine teilweise Korrektur des Transkriptoms auf das Niveau der Wildtyp-Tiere festgestellt werden. Sie ließen sich zwischen den beiden Genotypen gruppieren. Obwohl ein offensichtlicher Effekt der Therapie festzustellen war, fand keine vollständige Korrektur des Transkriptoms statt. So wurde zwar die Expression vieler Gene teilweise oder annähernd vollständig normalisiert; gleichwohl zeigten besonders unter den reprimierten Genen einige keine Antwort (siehe auch Tab. 3.5 und 3.6).



Abb. 3.6: Korrespondenzanalyse der differentiell exprimierten Gene 58 Wochen alter Wildtyp-, *knockout*- und ER- behandelter *knockout*-Tiere. Gene mit einer differentiellen Expression > 1,5 fach und einem p-Wert < 0,05 wurden in die Analyse einbezogen. KO = *knockout*, WT = Wildtyp. Für jedes Individuum ist der Gesamteffekt der in der Analyse einbezogenen Gene als Kasten mit Nummer und Genotyp dargestellt. Die enge Gruppierung von Wildtyp- und *knockout*-Tieren ergibt sich durch die Wahl der Kriterien der differentiellen Expression. Die Ordinaten der Korrespondenzanalyse haben keine Dimension.

#### 3.2.6 Verteilung differentiell exprimierter Gene im murinen Genom

Die Annotation der Verteilung aller differentiell exprimierten Gene nach ihrer chromosomalen Lokalisation im murinen Genom zeigte eine Häufung differentiell exprimierter Gene auf einem etwa 1,2 MBp langen Abschnitt auf Chromosom 8 auf. Auf diesem Chromosomenabschnitt (Zytoband 8C2 bis 8C3) liegt auch das Man2B1-Gen, dass in den  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Mäusen durch ein mittels homologer Rekombination eingefügtes *knockout*-Konstrukt ausgeschaltet wurde.



Abb. 3.7: Häufung transkriptionell regulierter Gene um das knockout-Gen Man2B1 auf Chromosom 8. Das murine Chromosom 8 ist als Ideogramm dargestellt. Der chromosomale Abschnitt von Zytoband 8C2 bis 8C3 von 86.8 bis 88.1 Mbp ist vergrößert und die auf ihm kodierten Gene in ihrer strukturellen Organisation dargestellt. Differentiell exprimierte Gene sind hervorgehoben. Abwärts gerichtete Pfeile bedeuten reprimierte Expression in knockout-Mäusen, aufwärts gerichtete Pfeile erhöhte Expression in knockout-Mäusen.

Abb. 3.7 zeigt das Chromosom 8 als Ideogramm und die vergrößerte Darstellung der Region 8C2 bis 8C3 mit den auf ihr codierten Genen. Differentiell exprimierte Gene in diesem Abschnitt sind hervorgehoben. Bemerkenswerterweise ließ sich für keines dieser Gene ein therapeutischer Effekt durch die ERT feststellen. Zudem war die transkriptionelle Regulation dieser Gene unabhängig vom Alter der Tiere (siehe Anhang, Abb. 7.1). Drei der insgesamt sechs in allen drei Altersgruppen gemeinsam differentiell exprimierten Gene lagen in direkter Umgebung des Man2B1-Gens (siehe 3.2.4).

Um weitere Gene zu identifizieren, die in räumlicher Nähe des Man2B1-Gens eine differentielle Expression zeigten, wurde die differentielle Genexpression der neun Tiere des Wildtyps aller drei Altersgruppen im Vergleich mit den neun Tieren der drei Altersgruppen der *knockout*-Tiere analysiert. Eine solche Gruppierung war möglich, da der Effekt der differentiellen Genexpression offensichtlich unabhängig vom Alter der Tiere ist und so eine bessere statistische Einschätzung möglich war. Insgesamt waren sieben Gene in der näheren Umgebung des Man2B1 Gens transkriptionell reguliert und differentiell exprimiert (> 1,5-facher Unterschied), außer Cacna1a zeigten alle eine Repression in den *knockout*-Mäusen. Für die Gene Trmt1, BC056474 und Gpt2 konnte zwar ein signifikanter Expressions-Unterschied bei einem Vergleich aller neun *Chips* jeweils der drei Altersgruppen zwischen Wildtyp und *knockout* (Trmt1: p = 0,000626; BC056474: p = 0,00300; Gpt2: p = 0,00335) festgestellt werden, der Expressionsunterschied lag jedoch unter 1,5 fach.

#### 3.2.7 Validierung der differentiellen Genexpression durch realtime-PCR

Um die semi-quantitative Microarray-Genexpressionsanalyse zu validieren, wurde die Expression ausgewählter Transkripte der 58 Wochen alten Tiere durch *realtime*-PCR untersucht. Dabei wurden einerseits Transkripte ausgewählt, deren Expression durch die ERT beeinflusst wurde (CD68, Vcam1, Clec4n, Lysozym, Integrin α9) und andererseits Transkripte, die nahe dem Man2B1-Gen lagen, auf deren Expression kein Effekt durch die ERT zu beobachten war (Gadd45gip1, Prdx2, Klf1, Dnaja2). Die Expression der beiden Gene Gcdh und Asna1, die ebenfalls auf dem Chromosomenabschnitt 8C2 bis 8C3 nahe dem Man2B1-Gen lokalisiert sind und für die in der Microarray-Analyse keine differentielle Expression beobachtet wurde, wurde ebenfalls durch *realtime*-PCR untersucht.

Tab. 3.7:realtime-PCR zur Validierung differentiell exprimierter Gene. Die differentielle<br/>Expression ist als x-faches der Expression gegenüber dem Wildtyp dargestellt. Negatives<br/>Vorzeichen bedeutet reprimierte Expression. Für jedes Experiment wurde ein t-Test der<br/> $\Delta$ CT-Werte berechnet. Ns = nicht signifikant, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001</th>

Gen	Wildtyp vs <i>knockout</i>	p-Wert WT vs KO	Wildtyp vs <i>knockout</i> ERT	p-Wert WT vs KO ERT
Gadd45gip	-2,40	0,0001 ***	- 2,82	0,0003 ***
Prdx2	-13,1	0,0001 ***	-15,22	0,0001 ***
Klf1	- 4,1	0,0068 **	- 3,86	0,0012 **
Dnaja2	- 1,54	0,1027 ns	- 1,78	0,0253 *
Asna1	-1,21	0,2145 ns	- 1,05	0,7066 ns
Gcdh	- 1,15	0,3628 ns	-1,13	0,2446 ns
Vcam1	8,39	0,0026 **	1,52	0,2042 ns
CD68	3,36	0,0122 *	1,18	0,3962 ns
Clec4n	3,52	0,0406 *	1,28	0,5559 ns
Lysozym	3,26	0,0073 **	1,53	0,2205 ns
Integrin α9	2,55	0,0172 *	1,01	0,9758 ns

Für alle untersuchten Gene ließ sich der Trend der Expressionsänderung aus der Transkriptomanalyse der jeweiligen Gene verifizieren. Während Gadd45gip1, Prdx2, Klf1 und Dnaja2 in ihrer Expression reprimiert waren und sich durch die ERT keine Normalisierung auf Wildtyp-Niveau beobachten ließ, zeigte sich für die ebenfalls Man2B1-benachbarten Gene Gcdh und Asna1 keine differentielle Expression. Für Vcam1, CD68, Clec4n, Lysozym und Integrin α9 ließ sich die in der Microarray-Analyse gemessene, erhöhte Expression in den *knockout*-Tieren bestätigen. Für diese Gene konnte ein klarer Effekt der ERT beobachtet werden.

#### 3.2.8 Immunohistochemische Färbung von Kupfferzellen der Leber

In der Transkriptomanalyse 58 Wochen alter Mäuse wies in den *knockout*-Tieren eine Reihe von Genen eine signifikant erhöhte Transkriptionsrate auf, deren Expression laut Literatur auf monozytäre Zellen und Makrophagen beschränkt ist. Eines dieser Gene ist der häufig verwendete Makrophagen-Marker CD68 (Synonym Sialoadhäsin). CD68 ist ein lysosomales Membranprotein und wird in der Leber ausschließlich von Kupfferzellen exprimiert. Kupfferzellen sind die residenten

Gewebe-Makrophagen der Leber. Anhand immunohistochemischer Färbungen sollte die erhöhte CD68 Expression auf Proteinebene verifiziert werden.

In Abb. 3.8 ist die immunohistochemische Färbung von semi-Dünnschnitten der Leber dargestellt. In Wildtyp-Tieren konnte das intrazelluläre CD68-Antigen in moderater Expressionshöhe und typischer Verteilung für Kupfferzellen im Parenchym der Leber detektiert werden (Abb. 3.8 A). In *knockout*-Tieren konnte, bei ähnlicher Verteilung, eine deutlich stärkere Immunfärbung beobachtet werden, wobei Lysosomen mit deutlich größerem Volumen durch den Antikörper detektiert wurden (Abb. 3.8 B). Nach der ERT mit viermal 100 mU/ g Körpergewicht in zwei Wochen wurde CD68 in den *knockout*-Tieren in einer dem Wildtyp vergleichbaren Färbung nachgewiesen (Abb. 3.8 C).



Abb. 3.8: Immunohistochemische F\u00e4rbung der Leber von 58 Wochen alten Wildtyp-. knockoutund ERT-behandelten knockout-M\u00e4usen des Makrophagen-Markers CD68. Freischwimmende semi-D\u00fcnnschnitte der Leber von Wildtyp- (A, D), knockout- (B, E) und ERT-behandelten knockout-Tieren (C, F) (vier Injektionen \u00e4 100 mU/ g K\u00fcrpergewicht, zwei Injektionen pro Woche) wurden mit einem CD68-Antik\u00f6rper inkubiert und \u00fcber einen HRPkonjugierten Sekund\u00e4rantik\u00f6rper detektiert. Negativ-Kontrollen ohne Prim\u00e4r-Antik\u00f6rper zeigten keine F\u00e4rbung. (A, B, C) Balken = 100 µm, (D, E, F) Balken = 20 µm.

Um zu untersuchen, ob die Expansion des lysosomalen Systems auch zu einer Änderung der Morphologie der betroffenen Zellen führt, wurden Schnitte der Leber mit einem für Makrophagen spezifischen Antikörper gegen das Zellmembranständige F4/80 Antigen gefärbt und mittels konfokaler Laserscanmikroskopie analysiert (Abb. 3.9). Während Kupfferzellen der Wildtyp-Tiere mit einer schmalen, länglichen und verästelten Morphologie beobachtet werden konnten (Abb. 3.9 A), wiesen die Kupfferzellen der *knockout*-Tiere (Abb. 3.9 B) eine deutlich geschwollene Morphologie mit größerem Durchmesser als Kupfferzellen der Wildtyp-Tiere auf. Die Zellmembran fast aller angeschnittenen Kupfferzellen war als ringförmige Struktur zu erkennen. Nach der ERT konnte eine weitgehende Normalisierung der Kupfferzell-Morphologie beobachtet werden (Abb. 3.9 C).



Abb. 3.9: Immunfluoreszenz-Färbung des Kupfferzellmarkers F4/80. Semi-Dünnschnitte der Leber von Wildtyp- (A), *knockout*- (B) und ERT-behandelten *knockout*-Tieren (C) (vier Injektionen à 100 mU/ g Körpergewicht, zwei Injektionen pro Woche) wurden mit einem F4/80-Antikörper inkubiert und mit Fluorophor-konjugierten Sekundär-AK detektiert. Balken = 70 μm

#### 3.2.9 Expression von Cathepsin D in Kupfferzellen der Leber

Durch immunohistochemische Färbung von CD68 wurde eine Expansion des lysosomalen Systems der Kupfferzellen und durch Färbung von F4/80 eine veränderte Morphologie der Kupfferzellen nachgewiesen. Bereits in der initialen Beschreibung der  $\alpha$ -Mannosidase *knockout*-Maus wurde eine erhöhte Immunreaktivität gegen die lysosomale Protease Cathepsin D in der Leber beschrieben (Stinchi et al. 1999). Da Cathepsin D in der Leber vor allem in Kupfferzellen exprimiert wird, wurde überprüft, ob die erhöhte Menge Kupfferzell-Lysosomen für die stärkere Immundetektion gegen Cathepsin D ursächlich war.



Abb. 3.10: Immunfluoreszenzfärbung von Cathepsin D in der Leber. Semi-Dünnschnitte von 12 Monate alten Wildtyp (A, D), *knockout*- (B, E) und ERT behandelten *knockout*-Mäusen (C, F) wurden mit einem Cathepsin D-spezifischen Antiserum detektiert (grün), Zellkerne sind DAPIgefärbt (blau). Kupfferzellen (kleiner Pfeil, kleiner ovaler Zellkern) sind in der Leber von *knockout*-Tieren (B, E) deutlich stärker repräsentiert und wiesen im Gegensatz zu Hepatozyten (grosser Pfeil, großer kreisrunder Zellkern) deutlich stärkere Färbung auf. (A-C) Balken = 200 μm, (D – F) Balken = 15 μm.

In Hepatozyten des Wildtyps, die durch ihren typisch kreisrunden Zellkern von anderen Zelltypen der Leber unterschieden werden können, wurde Cathepsin D schwach in endo- / lysosomalen Strukturen detektiert (Abb. 3.10 A). In Kupfferzellen mit typischer schmaler Morphologie und kleinem, ovalem Zellkern wurde Cathepsin D deutlich stärker detektiert. In *knockout*-Tieren glich die Cathepsin D-Färbung in den Hepatozyten der des Wildtyps. In einigen Präparaten wurde Cathepsin D in Hepatozyen der  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Tiere sogar schwächer detektiert als in Wildtyp-Tieren. Dagegen konnte in Kupfferzellen der  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Tiere sogar Schwächer D beobachtet werden (Abb. 3.10 B). Die Kupfferzellen waren zudem, wie bereits durch CD68-Färbung gezeigt, untypisch geschwollen und die Cathepsin D-positiven Lysosomen füllten das Zytoplasma nahezu vollständig aus. In ERT behandelten *knockout*-Tieren war die Menge von Cathepsin D-positiven Zellen im Vergleich zu

den unbehandelten Tieren stark reduziert. Zudem wiesen die meisten Kupfferzellen wieder die typische schmale Morphologie der Wildtyp-Tiere auf (Abb. 3.10 C). Die erhöhte Immunreaktivität gegen Cathepsin D in der Leber ist demnach durch die Expansion des lysosomalen Systems der Kupfferzellen bedingt. Die Kupfferzellen reagieren auf die ERT mit einer Normalisierung der lysosomalen Strukturen auf Wildtyp-Niveau.

#### 3.3 Einfluss der lysosomalen Speicherung auf andere lysosomale Enzyme

### 3.3.1 Bestimmung der spezifischen Aktivität und Expression anderer lysosomaler Enzyme

Die Speicherung undegradierter Makromoleküle im Lysosom führt bei verschiedenen LSDs zu einer signifikanten Erhöhung der spezifischen Aktivität lysosomaler Hydrolasen (Van Hoof und Hers 1968; Sandhoff et al. 1971; Banerjee et al. 1984). Insbesondere für die Mucopolysaccharidosen wurde dieser Befund anhand verschiedener Mausmodelle gut dokumentiert (MPS IIIB (Li et al. 1999), MPS VII (Sands et al. 1994)).

In der Transkriptomanalyse wurde in der Leber der α-Mannosidase-defizienten Tiere eine im Vergleich zum Wildtyp etwa doppelte Transkriptmenge für Cathepsin B nachgewiesen. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität von Cathepsin B und anderen lysosomalen Hydrolasen sowie des Effekts der ERT auf andere lysosomale Hydrolasen, wurden enzymatische Aktivitätsbestimmungen mit entsprechenden artifiziellen Substraten an Gewebehomogenaten der Leber und des Gehirns durchgeführt.

Alle bestimmten Enzyme wiesen in der Leber als auch im Gehirn eine um den Faktor zwei bis drei deutlich erhöhte spezifische Aktivität auf. In der Leber wurde durch die ERT (vier Injektionen mit 100 mU/ g Körpergewicht bei zwei Injektionen pro Woche) eine vollständige Normalisierung erreicht. Im Gehirn, das bei der gewählten Dosierung aufgrund der Blut-Hirn-Schranke nicht therapiert werden kann, zeigte sich kein Effekt durch die Enzymsubstitution.

**Tab. 3.8:** Spezifische Aktivität lysosomaler Enzyme der Leber (A) und des Gehirns (B). Gewebehomogenate von je drei Tieren im Alter von 58 Wochen wurden analysiert. In der Spalte *"knockout"* ist der p-Wert eines t-Tests Wildtyp vs. *knockout* angegeben, in der Spalte *"knockout* ERT" der p-Wert eines t-Tests Wildtyp vs. *knockout* ERT. ns = nicht signifikant; \*\* = p < 0,001; \*\*\* = p < 0,001

#### A Leber Wildtyp knockout Enzym knockout ERT β-Glucuronidase 3,100 ± 0,10 mU/mg 5,60 ± 0,49 mU/mg \*\* $3,400 \pm 0,26$ mU/mg ns β-Galactosidase 0,276 ± 0,04 mU/mg 0,496 ± 0,02 mU/mg \* 0,246 ± 0,02 mU/mg ns β-Hexosaminidase 9,590 ± 0,42 mU/mg 17,67 ± 1,20 mU/mg \*\* 9,917 ± 0,58 mU/mg ns 0,730 ± 0,03 mU/mg \*\*\* β-Glucosidase 0,333 ± 0,02 mU/mg 0,366 ± 0,02 mU/mg ns Cathepsin B 102,34 ± 4,5 mU/mg 208,32 ± 10,4 mU/mg\*\*\* 106,42 ± 6,2 mU/mg ns

B Gehirn						
Enzym	Wildtyp	knockout	knockout ERT			
β-Glucuronidase	0,713 ± 0,04 mU/mg	2,137 ± 0,08 mU/mg ***	2,133 ± 0,12 mU/mg **			
β-Galactosidase	1,800 ± 0,11 mU/mg	3,717 ± 0,06 mU/mg ***	3,833 ± 0,03 mU/mg ***			
β-Hexosaminidase	35,00 ± 2,88 mU/mg	50,00 ± 1,73 mU/mg *	51,00 ± 2,08 mU/mg *			
β-Glucosidase	0,393 ± 0,01 mU/mg	0,786 ± 0,02 mU/mg ***	0,660 ± 0,04 mU/mg **			
Cathepsin B	291,1 ± 9,21 mU/mg	580,65 ± 11,3 mU/mg **	578,21 ± 8,32 mU/mg **			

Da für eine erhöhte spezifische Aktivität in Gewebehomogenaten eine erhöhte Transkription als auch posttranslationale Effekte wie eine längere Halbwertzeit verantwortlich sein könnten, wurde die Expression der lysosomalen Enzyme untersucht (Tab. 3.9), deren spezifische Aktivität bestimmt wurde. In der Transkriptomanalyse war nur für Cathepsin B und die beiden Untereinheiten der  $\beta$ -Hexosaminidase eine leicht erhöhte Transkription detektiert worden.

Während das Transkript von Cathepsin B in den *knockout*-Mäuse eine etwa 2,5-fach erhöhte Expression aufwies, ließen sich für die anderen untersuchten Proteine  $\beta$ -Glucuronidase,  $\beta$ -Galactosidase und  $\beta$ -Glucosidase keine signifikanten Unterschiede feststellen. Das Transkript der  $\beta$ -Untereinheit der  $\beta$ -Hexosaminidase wies eine gering, aber signifikant erhöhte Expression auf. Die Expression von Cathepsin B als auch der  $\beta$ -Hexosaminidase wurde durch die ERT auf Wildtyp-Niveau normalisiert.

Tab. 3.9:realtime-PCR zur Quantifizierung der Expression lysosomaler Enzyme in der Leber.<br/>Die differentielle Expression ist als x-faches der Expression im Wildtyp dargestellt.<br/>Negatives Vorzeichen bedeutet reprimierte Expression. Für jedes Experiment wurde ein<br/>t-Test der  $\Delta$ CT-Werte berechnet. ns = nicht signifikant, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01,</th>

Gen	Wildtyp vs knockout	p-Wert Wt vs ko	Wildtyp vs <i>knockout</i> ERT	p-Wert Wt vs KO ERT
β-Glucuronidase	1,12	0,1212 ns	1,42	0,0903 ns
β-Galactosidase	-1,17	0,3751 ns	1,03	0,8582 ns
β-Hexosaminidase (β-Untereinheit)	1,6	0,0077 **	1,23	0,235 ns
β-Glucosidase	1,32	0,1174 ns	1,19	0,2851 ns
Cathepsin B	2,38	0,045 *	1,43	0,232 ns

# 3.3.2 Expressionsanalyse der lysosomalen Membranproteine Lamp1 und Lamp2

Die lysosomalen Membranproteine Lamp1 und Lamp2 stellen einen Grossteil der gesamten lysosomalen Membranproteine und machen mit geschätzten 0,1 – 0,2 % einen erheblichen Teil des zellulären Gesamtproteins aus (Carlsson und Fukuda 1989). In Zellen mit lysosomaler Speicherung kann eine stark erhöhte Protein-Expression für beide Proteine festgestellt werden, die vermutlich durch einen drastisch erhöhten Volumenanteil der Lysosomen und somit der lysosomalen Membranen in der Zelle zu erklären ist (Meikle et al. 1997; Hua et al. 1998).

Um zu überprüfen, ob in der Leber der α-Mannosidase-defizienten Mäuse durch die lysosomale Speicherung ein signifikanter Unterschied der Menge der Lamp-Proteine detektierbar ist, und dieser ggf. durch die ERT reversibel ist, wurden Gewebehomogenate in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit Lamp-spezifischen Antikörpern analysiert.



Abb. 3.11: Expression der lysosomalen Membranprotein Lamp1 und Lamp2 in Lebergewebe.
A, C, Western Blot Analyse für Lamp1 und Lamp2 von Gewebehomogenaten 10 Wochen alter Wildtyp, *knockout* und ERT-behandelter *knockout*-Mäuse. In den *knockout*-Mäusen zeigte sich eine wesentlich höhere Protein-Detektion für beide Membranproteine, die nach ERT auf Wildtyp-Niveau normalisiert wurde. Auf den Membranen wurde GAPDH als Ladekontrolle detektiert. B, D, Densitometrische Quantifizierung der Signalstärke von je drei Tieren pro Genotyp / *knockout* ERT-behandelt und unbehandelt (Wildtyp vs *knockout* p < 0,05 = \*).</li>

Die Protein-Expression beider Lamp-Proteine war in den 10 Wochen alten *knockout*-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant erhöht (Lamp1: p = 0,032; Lamp2: p = 0,042, N = 3) (Abb. 3.11), wobei sich für beide Proteine eine etwa um den Faktor zwei höhere Protein-Expressionshöhe bestimmen ließ.

Nach der ERT mit 100 mU/ g Körpergewicht bei viermaliger Applikation innerhalb von zwei Wochen normalisierte sich die Expressionhöhe für Lamp1 als auch Lamp2 wieder vollständig auf das Niveau der Kontrolltiere. Offensichtlich führte die Degradation angespeicherter Oligosaccharide in den ERT behandelten  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Mäusen im lysosomalen Lumen durch das rekombinante Enzym auch zu einer Normalisierung des lysosomalen Volumens innerhalb der Zelle.

### 3.3.3 Aufreinigung lysosomaler Fraktionen der Leber und 2-D Gelelektrophorese lysosomaler Fraktionen

Im Western Blot wurde für alle untersuchten lysosomalen Hydrolasen eine erhöhte spezifische Aktivität bzw. für die Lamp-Membranproteine eine erhöhte Protein-Expression gezeigt. Da Lysosomen die primär betroffenen Organellen der LSDs sind, sollten die Auswirkungen der Speicherung auf sekundäre Veränderungen der Prozessierung, Glykosylierung und Expression anderer lysosomaler Proteine untersucht werden. Dazu wurden Lysosomen aufgereinigt. über 2-D Gelelektrophorese aufgetrennt und durch MALDI-TOF-Analyse charakterisiert. Um auch geringen Unterschiede in Molekulargewicht oder dem isoelektrischen Punkt zu detektieren, wurden lysosomale Fraktionen von Wildtyp- und α-Mannosidasedefizienten Mäusen über differentielle 2-D Gelelektrophorese (DIGE) aufgetrennt.

#### 3.3.3.1 Aufreinigung lysosomaler Fraktionen

Die Injektion von Triton WR1339 führt durch die Hemmung der Lipoproteinlipase des Plasmas zu einem Anstieg von LDL im Serum und nachfolgend zu einer stark erhöhter Endozytose von LDL in Lysosomen der Leber (Hayashi et al. 1981). Die Dichte der Lipid-gefüllten Lysosomen (Tritosomen) sinkt deutlich und sie lassen sich effizient durch differentielle Zentrifugation und anschließende diskontinuierliche Gradientenzentrifugation von anderen Organellen (insbesondere Mitochondrien) trennen (Leighton et al. 1968) (vergl. auch Abb. 2.1). Abb. 3.12 zeigt Western Blot Analysen der Lysosomen-Anreicherung mit den Fraktionen N – S der differentiellen Zentrifugation und den vier Fraktionen F1 – F4 (siehe auch 2.3.12) des Sucrose-Gradienten mit Antikörpern gegen das lysosomale Markerenzym Cathepsin B und die mitochondrialen Markerproteine HSP60 und Porin. Der überwiegende Teil der reifen Cathepsin B Formen wurde in Tritosomen-Präparationen von Wildtyp-Mäusen (Abb. 3.12 A) in der Fraktion 2 (F2) des Sucrosegradienten detektiert. Mitochondrien flottierten vor allem in den Fraktionen F3 und F4. In Tritosomen-Präparationen von knockout-Tieren (Abb. 3.12 B) ließ sich für die beiden Mitochondrien-Marker eine ähnliche Verteilung wie in Wildtyp-Mäusen beobachten. Interessanterweise konnte Cathepsin B nicht nur in der F2-Fraktion, sondern auch in äquivalenter Menge in der F3-Fraktion gefunden werden. Die reife *double chain*-Form des Cathepsin B wurde in der F2-Fraktion von Wildtyp-Tieren als Doppelbande detektiert; in F2 und F3Fraktionen der *knockout*-Mäuse als Einzelbande mit höheren apparenten Molekulargewichten (vergl. 3.3.6)



Abb. 3.12: Western Blot Analyse der Fraktionen einer Tritosomen-Präparation von Tieren des Wildtyps (A) und von α-Mannosidase-defizienten Mäusen (B). Je 200 µg Protein (Fraktion N – S) bzw. 50 µg (Fraktion F1 – F4) wurden über 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern gegen HSP-60, Porin und Cathepsin B detektiert.

#### 3.3.3.2 2-D Gelelektrophorese lysosomaler Fraktionen

300 µg Gesamtprotein der Lysosomen-angereicherten Fraktion F2 wurden über Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradient im Bereich vier bis sieben in der ersten Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt fokussiert. Anschließend wurden die Proteine auf 15 % SDS-PAGE Gelen in der zweiten Dimension ihrem Molekulargewicht nach aufgetrennt und schließlich Coomassie-gefärbt. Abb. 3.13 zeigt ein repräsentatives 2-D Gel des lysosomalen Sub-Proteoms.



**Abb. 3.13: 2-D Gelelektrophorese lysosomaler F2-Fraktionen der Leber.** 300 μg Protein der F2-Fraktion (Wildtyp) wurde für ein präparatives Gel des lysosomalen Sub-Proteoms der Leber in der ersten Dimension in einem pH-Bereich von vier bis sieben und in der zweiten Dimension über 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Anschließend wurden einzelne *Spots* über *peptide mass fingerprinting* durch MALDI-TOF Analyse identifiziert.

**Tab. 3.10: MALDI-TOF Analyse ausgewählter** *Spots* **lysosomaler F2-Fraktionen.** Nummern entsprechen der Nummerierung von Abb. 3.13. *Mowse-score* \* > 64 sind signifikant (p < 0,05)

Nr.	Protein	theoretisches Molekulargewicht (Dalton)	gene accession- Nr.	Mowse- Score <sup>*</sup>
1	palmithoyl-protein thioesterase 2 (PPT2)	34686	gi 9506985	71
2	legumain	49740	gi 7242487	156
3	legumain	49740	gi 7242487	267
4	cathepsin Z	34837	gi 11968166	175
5	cathepsin Z	34837	gi 11968166	255
6	cathepsin Z	34837	gi 11968166	275
7	cathepsin B	38282	gi 6681079	155
8	cathepsin B	38282	gi 6681079	282
9	cathepsin B	38282	gi 6681079	272
10	cathepsin B	38282	gi 6681079	390
11	cathepsin B	38282	gi 6681079	172
12	cathepsin B	38282	gi 6681079	141
13	cathepsin B	38282	gi 6681079	155
14	arylsulfatase B	63012	gi 148668607	196
15	cathepsin D	45381	gi 74220823	64
16	cathepsin D	45381	gi 74220823	73
17	cathepsin D	45381	gi 74220823	162
18	cathepsin H	37701	gi1705636	77
19	legumain	34837	gi 7242487	82
20	cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG)	24550	gi 6753520	143
21	cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG)	24550	gi 6753520	135
22	cathepsin C	53141	gi 74199074	73
23	ATP-Synthase, subunit d	15929	gi 159572410	168
24	cathepsin D	45381	gi 74220823	123
25	cathepsin D	45381	gi 74220823	162
26	cathepsin D	45381	gi 74220823	155
27	cathepsin D	45381	gi 74220823	135
28	cathepsin D	45381	gi 74220823	74
29	cathepsin H	37701	gi 1705636	128
30	cathepsin A / protective protein	54437	gi 84042525	106
31	cathepsin H	37701	gi 3929819	105

32	Cu/Zn superoxide dismutase	16104	gi 226471	162
33	GM2-ganglioside activator protein	21267	gi 6806917	95
34	Nicht identifiziert	-	-	-
35	lysosomal thiol reductase	28535	gi 11345388	38
36	cathepsin A /protective protein	54437	gi 84042523	86
37	tripeptidyl-peptidase I (TPP1)	59067	gi 3766471	63
38	tripeptidyl-peptidase I (TPP1)	59067	gi 3766471	67
39	tripeptidyl-peptidase I (TPP1)	59067	gi 3766471	54
40	cathepsin D	45381	gi 6753556	182
41	cathepsin D	45381	gi 6753556	182
42	lysosomal α-glucosidase	106921	gi 51338793	162
43	lysosomal α-glucosidase	106921	gi 51338793	180
44	albumin	70700	gi 26342396	366
45	di-N-acetyl-chitobiase	35912	gi 67460414	224
46	dipeptidyl-peptidase 2	56804	gi 13626390	169

Es waren etwa 100 einzelne Spots erkennbar. Häufig lagen Spots mit geringen Unterschieden im Molekulargewicht und unterschiedlichen isoelektrischen Punkten in engen horizontalen Reihen vor, die sich vor allem als Prozessierungsintermediate oder aufgrund einer Mikroheterogenität der N-Glykane erklären lassen.

Um die Cathepsin B zugeordneten Spots zu identifizieren, wurden die Protein-Spots der 2-D Gele über peptide mass fingerprinting durch MALDI-TOF analysiert (Tab. 3.10). Insgesamt wurden 46 Spots untersucht, von denen 45 identifiziert werden konnten. Für zwei weitere Proteine (Spot 35, "lysosomal thiol reductase" und Spot 38 "TPP1") war die Identifizierung nicht signifikant, aber der Vergleich der apparenten Molekulargewichte mit der vorhergesagten Molekulargewichte dem der Polypeptidkette sprach für eine korrekte Identifikation. Einige lysosomale Enzyme wurden nur als einzelne Spots identifiziert (z.B. PPT2), andere wie Cathepsin D als Reihe von mehreren Spots. Die meisten Proteine zeigten durch ihren hohen Glykosylierungsgrad ein leicht vom theoretischen Molekulargewicht des Peptidanteils abweichendes apparentes Molekulargewicht. Nur für drei der identifizierten Proteine (Albumin, Cu/Zn superoxide dismutase und mitochondriale ATP Synthase subunit D) ist keine lysosomale Lokalisation bekannt. Sie sind entweder Kontaminationen der subzellulären Fraktionierung (Albumin) oder könnten zur Degradation bestimmte,

autophagozytierte mitochondriale Proteine sein (Cu/ Zn superoxide dismutase und ATP Synthase subunit D). Cathepsin B wurde in mehreren Protein-*Spots* verschiedener Molekulargewichte von ~31 kDa bis 24 kDa und verschiedener isoelektrischer Punkte von etwa 4,5 bis 5 identifiziert (siehe Abb. 3.18).

## 3.3.4 Differentielle 2-D Gel Analyse lysosomaler F2-Fraktionen zwischen Wildtyp- und *knockout*-Tieren

Bei konventionellen 2-D Gelen ist es beim Vergleich zweier Gele technisch bedingt schwierig, geringfügige Unterschiede von wenigen kDa im Molekulargewicht und geringen Unterschieden in der Ladung eines Proteins reproduzierbar darzustellen. Bei der differentiellen 2-D Gelelektrophorese (DIGE)-Methode sind diese technischbedingten Varianzen nicht vorhanden, da die zu vergleichenden Protein-Proben nach Kopplung an Fluoreszenz-Farbstoffe als Mix zusammen auf einem Gel aufgetrennt werden. Um das lysosomale Sub-Proteom zu untersuchen, wurden 25 µg lysosomaler F2-Fraktionen von Wildtyp-Tieren mit dem Fluoreszenzfarbstoff "Cy3" und 25 µg F2-Fraktion von *knockout*-Tieren mit "Cy5" markiert, die Proben wurden gemischt und über 2-D Gelelektrophorese in einem pH-Bereich von vier bis sieben in der ersten Dimension und 15 % SDS-PAGE in der zweiten Dimension aufgetrennt. Abb. 3.14 zeigt eine Überlagerung der in beiden Emissionswellenlängen der Fluorophore eingescannten Gele in Falschfarben: F2-Fraktionen des Wildtyp sind in grün dargestellt, F2-Fraktionen der *knockout*-Tiere in rot.

Es ließen sich für kein Protein signifikante Unterschiede in den Ladungen der einzelnen molekularen Formen beobachten. Ladungsunterschiede würden sich in einer Verschiebung des isoelektrischen Punkts in der Auftrennung in der ersten Dimension zeigen. Für die Proteine, deren einzelnen molekularen Formen sich durch Prozessierung des Peptidanteils unterscheiden, findet also eine korrekte Reifung und Prozessierung statt.

Für eine Reihe von Proteinen konnte dagegen eine Verschiebung des apparenten Molekulargewichts zu molekularen Formen mit höherem Molekulargewicht in F2-Fraktionen der *knockout*-Tiere beobachtet werden. Besonders für verschiedene molekulare Formen von Cathepsin B ließen sich markante Unterschiede im Molekulargewicht ausmachen. Auch für weitere Proteine ließ sich ein vergleichbarer Effekt beobachten, darunter die reifen Formen von Cathepsin D (~33 kDa) und Cathepsin A, das GM2-ganglioside activator-Protein, CREG, Cathepsin C und Cathepsin Z.



Abb. 3.14: Differentielle 2-D Gelelektrophorese lysosomaler F2-Fraktionen. 25 μg lysosomaler F2-Fraktionen des Wildtyp wurden mit "Cy3" (grün), 25 μg F2-Fraktion von knockout-Tieren mit "Cy5" (rot) markiert, kombiniert und über 2-D Gelelektrophorese in einem pH-Bereich von vier bis sieben auf einem 15 % SDS-Page-Gel aufgetrennt. Proteine mit unterschiedlichem Molekulargewicht sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet.

# 3.3.5 Untersuchung von lysosomalen F2-Fraktionen der Leber mit dem *Lens culinaris*-Lektin

In *knockout*-Mäusen wurde für eine Reihe verschiedener Proteine ein erhöhtes apparentes Molekulargewicht beobachtet. Diese Beobachtung ließ die Frage aufkommen, ob es sich bei diesen geringen Unterschieden um unterschiedliche Glykosylierungsformen handelte. Um zu überprüfen, ob lysosomale Proteine stärker glykosyliert waren, wurden hochangereicherte lysosomale F2-Fraktionen über SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert, mit dem biotinylierten Lektin der *Lens culinaris* detektiert und über einen HRP-konjugierten Streptavidin-Komplex

#### Ergebnisse

nachgewiesen. Das *Lens culinaris*-Lektin bindet mit hoher Affinität Glykane mit terminalen  $\alpha$ -D-Mannose- und  $\alpha$ -D-Glucose-Resten, wobei  $\alpha$ -Fucose-Reste am GlcNAc des *Core*-Glykans die Affinität deutlich erhöhen (Kornfeld et al. 1981).



**Abb. 3.15:** *Lens culinaris* Western Blot Iysosomaler F2-Fraktionen der Leber. Je 30 μg von drei F2-Präparationen des Wildtyp und von *knockout*-Tieren wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und über Western Blot mit dem *Lens culinaris*-Lektin detektiert (links) oder Coomassie gefärbt (rechts). Schwarze Pfeile markieren in *knockout*-Mäusen signifikant erhöhte Reaktivität des Lektins gegen Glykoproteine.

In Abb. 3.15 ist die Auftrennung über SDS-PAGE von je drei F2-Präparationen mit je zwei bis drei Tieren pro Präparation von Tieren verschiedenen Alters beider Genotypen dargestellt. Als Ladekontrolle wurde ein Teil des Gels mit äquivalenten Mengen der verwendeten F2-Fraktionen Coomassie gefärbt (rechts). Daneben wurden die gleichen Fraktionen mit dem *Lens culinaris*-Lektin auf PVDF-Membran transferiert und im Western Blot detektiert (links). Während sich kaum signifikante Unterschiede in den Coomassie-gefärbten Spuren ausmachen ließen, zeigte sich in den F2-Präparationen der *knockout*-Tiere für eine Reihe verschiedener Proteine eine

signifikant stärkere Bindung des Lektins. Drei Glykoproteine bei ~36 kDa, 29 kDa und 27 kDa zeigten eine besonders starke Reaktivität mit dem Lektin. Weitere Proteine wiesen ebenfalls signifikant höhere *Lens culinaris*-Reaktivität auf und lassen damit auf einen generell erhöhten Glykosylierungsgrad lysosomaler Proteine schließen.

#### 3.3.6 Western Blot Expressions-Analyse von Cathepsin B

Um die Unterschiede im Molekulargewicht lysosomaler Proteine näher zu charakterisieren, wurde exemplarisch Cathepsin B weiter untersucht, da sich in der DIGE-Analyse bei Cathepsin B sich die Unterschiede besonders deutlich gezeigt hatten. Um auszuschließen, dass die subzelluläre Fraktionierung zu einer unterschiedlichen Anreicherung bestimmter molekularer Formen zwischen den beiden Genotypen führt und um den Effekt der ERT zu überprüfen, wurde Cathepsin B im Western Blot in Gewebehomogenaten der Leber untersucht.

Cathepsin B wird als unreifes Präproenzym von etwa 42 kDa synthetisiert und nach co-translationaler Abspaltung des Signalpeptids zu einem 37 - 38 kDa Proenzym prozessiert. Auf dem Weg über frühe und späte Endosomen zu den Lysosomen, wird es durch weitere limitierte proteolytische Spaltungen zu seinen reifen Polypeptiden prozessiert (Nishimura et al. 1988). Die weitere Prozessierung der reifen Formen ist abhängig von Gewebe- und Zelltyp. Im Gehirn sowie in Fibroblasten (Schmid et al. 1999; Liao et al. 2007) ist die Einzelketten-Form (*single chain,* sc) mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 31 kDa die stabile lysosomale Form, in der Leber wird die *single chain*.Form über weitere limitierte Proteolyse zu einer Doppelketten-Form (*double chain,* dc) mit apparenten Molekulargewichten von etwa 25 kDa und 5 kDa prozessiert (Ryan et al. 1995).



Abb. 3.16: Western-Blot Analyse von Cathepsin B in Gewebehomogenaten der Leber von Tieren des Wildtyps, *knockout* und ERT-behandelten *knockout*-Mäuse. 100  $\mu$ g Gesamtprotein wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Cathepsin B Antikörper detektiert (A). Als Ladekontrolle wurde die Membran mit einem GAPDH-AK gefärbt. (Pro CatB = Procathepsin B, sc CatB = *single chain* Cathepsin B, dc CatB = *double chain* Cathepsin B). Die Banden aller molekularen Spezies von Cathepsin B wurden in jeweils drei 10 Wochen alten Tieren pro Genotyp und drei ERT-behandelten *knockout*-Tieren densitometrisch quantifiziert (B). (\*\* = p < 0,01)

Die Western Blot Analyse mit Gewebehomogenaten der Leber zeigt die verschiedenen Prozessierungsformen von Cathepsin B (Abb. 3.16). GAPDH wurde als interne Ladekontrolle auf dem Blot dargestellt. Die Proform von Cathepsin B bei 38 kDa lag intrazellulär, bedingt durch schnelle Prozessierung in endo- / lysosomalen Kompartimenten, nur in geringen Mengen vor. Die reifen lysosomalen Cathepsin B-Formen wurden im Wildtyp bei etwa 30 - 31 kDa und 24 kDa detektiert. In Leberhomogenaten der knockout-Mäuse wiesen dagegen die single chain- als auch die double chain-Form eine Verschiebung um wenige kDa zu einem höheren apparenten Molekulargewicht auf. Die single chain-Form wurde knockout-Tieren nur als Einzelbande von ~31 kDa nachgewiesen. Noch deutlicher zeigte sich eine Verschiebung des Molekulargewichts für die *double chain*-Form, die bei etwa 26 kDa detektiert wurde. Die densitometrische Analyse der Cathepsin B-Signale wies dabei eine etwa um den Faktor zwei erhöhte Cathepsin B-Menge in der Leber der knockout-Mäuse gegenüber den Wildtyp-Tieren auf. In Gewebehomogenaten von ERT behandelten knockout-Mäusen nach viermaliger Injektion von 100 mU/ g Körpergewicht in zwei Wochen zeigte sich eine partielle Normalisierung der Cathepsin B-Signale. Während die single chain-Form auf das Molekulargewicht der

oberen Bande der Doppelbande des Wildtyps verringert wurde, wurde die double chain-Form als Doppelbande bei etwa 24 / 25 kDa detektiert. Durch die Therapie ließ somit einerseits eine teilweise Normalisierung Bezug sich in auf die Molekulargewichte und andererseits eine Normalisierung der Proteinmenge erreichen.

### 3.3.7 Untersuchung der Glykosylierung von Cathepsin B mittels der Glykosidasen PNGaseF und EndoH

Während der umfassenden Prozessierung von Cathepsin B werden sukzessiv Dipeptide vom N- und C-Terminus abgespalten (Rowan et al. 1992; Mach et al. 1994). Zudem hat das murine Cathepsin B drei putative N-Glykosylierungssequenzen des Motivs Asn-X-Ser/ Thr, wobei die N-terminal gelegene Glykosylierungsstelle im Propeptid liegt, so dass das reife lysosomale Protein nur zwei Glykosylierungsstellen aufweist. Um die Ursachen für die höheren apparenten Molekulargewichte der single chain- und double chain-Formen im Lysosom der knockout-Tiere zu klären, wurden Gewebehomogenate unter denaturierenden Bedingungen ü.N mit den Glykosidasen PNGaseF (Abb. 3.17 A) bzw. EndoH (Abb. 3.17 B) behandelt, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Cathepsin B Antikörper detektiert. EndoH spaltet Mannose-reiche Glykane zwischen den beiden terminalen GlcNAc-Resten des reduzierenden Endes, die mindestens vier Mannose-Resten tragen (Trimble und Maley 1984). PNGaseF spaltet vollständige Glykane des Komplex-, Hybrid- oder Mannose-reichen Typs am reduzierenden Ende des Glykans zwischen N-Acetylglucosamin und dem Asparagin der Polypeptidkette (Tarentino et al. 1985).



Abb. 3.17: Western Blot EndoH- und PNGaseF-verdauter Gewebehomogenate. Je 100 μg Gewebehomogenat der Leber wurden ü.N. mit den Endoglykosidasen PNGaseF (A) und EndoH (B) verdaut, über 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem Cathepsin B-Antikörper detektiert.

In Abb. 3.17 A sind jeweils PNGaseF-behandelte Gewebehomogenate neben unbehandelten Homogenaten von Tieren des Wildtyps, knockout- und ERTbehandelten knockout-Tieren im Western Blot dargestellt. In allen Fällen ließ sich die Proform mit einem apparenten Molekulargewicht von 39 kDa nach Verdau ü.N. um etwa 5 kDa auf ~34 kDa verringern. Für die single chain-Form ließ sich in Leberhomogenaten von Wildtyp-Tieren durch den PNGaseF-Verdau keine Verschiebung des Molekulargewichts beobachten, gleiches galt für Homogenate der ERT-behandelten knockout-Tiere. Das apparente Molekulargewicht der single chain-Form in Homogenaten der knockout-Tiere wies allerdings eine Verschiebung zu dem Molekulargewicht der Cathepsin B-Formen von Wildtyp- und ERT-behandelten Tieren auf. Noch deutlicher wurde der Effekt der Deglykosylierung bei Betrachtung der double chain-Form des Cathepsin B, bei der auch wieder für Wildtyp- und therapierte knockout-Tiere kein Effekt zu beobachten war. In knockout-Mäusen ohne Therapie zeigte sich jedoch eine drastische Reduktion des Molekulargewichts von etwa 26 kDa auf ~24 kDa und damit auf die Größe der Wildtyp-Form. Auch die Zwischenform der double chain-Form, die bei ERT-behandelten Tieren detektierbar war, ließ sich durch PNGaseF auf das apparente Molekulargewicht der Wildtypdouble chain Form normalisieren.

Bei dem Verdau mit der Glykosidase EndoH ü.N. konnte eine Reduzierung des apparenten Molekulargewichts der Proform um etwa 5 kDa (Abb. 3.17 B) detektiert werden. Weder die im Vergleich zum Wildtyp höhermolekulare *single chain*-Cathepsin B-Form, noch die *double chain*-Form aus Homogenaten der *knockout*-Tiere ließen sich jedoch unter den experimentellen Bedingungen weiter deglykosylieren und waren EndoH resistent.

Die Ergebnisse des Verdaus mit den beiden Glykosidasen zeigten, dass ein höherer Glykosylierungsgrad ursächlich für das höhere apparente Molekulargewicht der verschiedenen Formen von Cathepsin B in der Leber der *knockout*-Tiere war. Die Glykane müssen entweder vom Komplex-Typ bzw. Hybrid-Typ, oder Mannose-reiche Glykane mit weniger als vier Mannose-Resten sein.

# 3.3.8 Präparative Auftrennung und Vergleich der molekularen Formen von Cathepsin B von Wildtyp und *knockout*-Tieren auf 2-D Gelen

Die subzelluläre Fraktionierung und 2-D-Gelelektrophorese von lysosomalen F2-Fraktionen der Lebern wurde präparativ von Wildtyp- als auch *knockout*-Mäusen durchgeführt, um die Glykane von Cathepsin B weiter zu untersuchen. Abb. 3.18 zeigt den Gelbereich mit der Gruppe von *Spots* der verschiedenen molekularen Formen von Cathepsin B in Wildtyp- und *knockout*-Mäusen. Im Wildtyp lag die *single chain*-Form des Proteins in vier unterschiedlich geladenen Formen vor, die einzelnen Spezies ließen sich teilweise noch durch Glykosylierungs-bedingte (siehe Abb. 3.17) geringfügig unterschiedliche Molekulargewichte unterscheiden. Die molekulare Spezies mit dem am stärksten sauren isoelektrischen Punkt lag in drei verschiedenen Molekulargewichten in etwa äquivalenten Mengen vor.

Die *double chain*-Form von Cathepsin B lag im Wildtyp in zwei isoelektrischen Formen vor, die sich jeweils in drei weitere Formen mit unterschiedlichen Molekulargewichten unterteilen ließ. Das Protein mit dem geringsten Molekulargewicht war die am stärksten repräsentierte Form (siehe Abb. 3.18).


Abb. 3.18: Cathepsin B-Spots auf Coomassie-gefärbten 2-D Gelen lysosomaler F2-Fraktionen von Wildtyp- und knockout-Mäusen. 300 µg lysosomaler F2-Fraktionen wurden über 2-D Gelelektrophorese in einem pH-Bereich von vier bis sieben in der ersten Dimension und anschließend über 15 % SDS-PAGE in der zweiten Dimension aufgetrennt. Die Bereiche mit Spots korrespondierend zu single- und double chain Cathepsin B sind vergrößert.

In Lysosomen-angereicherten F2-Fraktionen der *knockout*-Mäuse ließen sich die *single chain-* als auch die *double chain*-Form von Cathepsin B ebenfalls in vier bzw. zwei Formen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten identifizieren. Im Unterschied zum Wildtyp lagen diese jedoch zum überwiegenden Teil als distinkte Einzelspots ohne unterschiedliche Molekulargewichten vor. Die niedermolekularen, schwach glykosylierten Formen, waren nur schwach detektierbar.

### 3.3.9 MALDI-TOF Analyse der N-Glykane von Cathepsin B

Um die genauen strukturellen Unterschiede der N-Glykane von Cathepsin B zwischen Wildtyp und α-Mannosidase-defizienten Mäuse zu charakterisieren, wurden die einzelnen *Spots* der Cathepsin B-Formen aus 2-D Gelen (siehe 3.3.8) ausgestanzt, im Gel mit PNGaseF verdaut und die Masse der N-Glykane über MALDI-TOF-Analyse bestimmt. Die MALDI-TOF-Analytik wurde in Kooperation mit Willy Morelle und Prof. Jean-Claude Michalski, Universität Lille, Frankreich, durchgeführt.



Abb. 3.19: MALDI-TOF Spektren der durch PNGaseF abgespaltenen N-Glykane aller reifen Formen von Cathepsin B in Wildtyp (A) und *knockout* (B) der Leber. 300 µg F2-Fraktion wurden über 2-D aufgetrennt und die *Spots* der verschiedenen Cathepsin B-Formen vereinigt. Anschließend wurden die N-Glykane durch Verdau mit PNGaseF abgespalten und ihre Masse durch MALDI-TOF bestimmt. Schwarze Rechtecke symbolisieren GlcNAc, schwarze Kreise symbolisieren Mannose-Reste. Fucose-Reste werden durch offene Dreiecke symbolisiert.

In Abb. 3.19 sind die MALDI-TOF-Spektren der Glykane aller *gepoolten* reifen lysosomalen Cathepsin B-Formen (*single chain* als auch *double chain*) in Wildtyp-(Abb. 3.19 A) und *knockout*-Mäusen (Abb. 3.19 B) dargestellt. Die Analyse ist semiquantitativ. In beiden Genotypen ließ sich eine hohe Mikroheterogenität der Glykane feststellen. Während im Wildtyp kleine Glykane des Typs Man<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub> mit 771 Da und Man<sub>2</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub> mit 917 Da die dominierenden Formen waren und nur in geringste Mengen mit weiteren Mannose-Resten bis zu Man<sub>4</sub>GlcNAc<sub>2</sub> verknüpfte Glykane detektiert wurden, wurde in α-Mannosidase-defizienten Tieren ein Glykan von 933 Da (Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) mit der höchsten Signalstärke detektiert. Weitere Mannose-reiche Glykane bis hin zu Formen mit sieben Mannose-Resten Glykane Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> und Man<sub>2</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub> des Wildtyps wurden hingegen nur in sehr geringen Mengen detektiert.



Abb. 3.20: MALDI-TOF Spektren der durch PNGaseF abgespaltenen N-Glykane der singlechain-Formen von Cathepsin B in Wildtyp (A) und knockout (B) der Leber. Schwarze Rechtecke symbolisieren GlcNAc, schwarze Kreise symbolisieren Mannose-Reste. Fucose-Reste werden durch offene Dreiecke symbolisiert.



Abb. 3.21: MALDI-TOF Spektren der durch PNGaseF abgespaltenen N-Glykane der *doublechain* Formen Cathepsin B in Wildtyp (A) und *knockout* (B) der Leber. Schwarze Rechtecke symbolisieren GlcNAc, schwarze Kreise symbolisieren Mannose-Reste. Fucose-Reste werden durch offene Dreiecke symbolisiert.

Eine Glykan-Analyse der einzelnen Cathepsin B-*Spots* der *single chain* von Wildtypund *knockout*-Tieren ist in Abb. 3.20 dargestellt. In der Form mit dem niedrigsten isoelektrischen Punkt ließ sich im Wildtyp kein Glykan nachweisen, in den drei weiteren *Spots* der *single chain* fanden sich vor allem Man<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub> und Man<sub>2</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. In *knockout*-Tieren wurden vorrangig Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> und Man<sub>3</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub> detektiert, in *Spot* Nr. 2 konnten auch in geringen Mengen höhermolekulare Mannose-reiche Glykane bis zu Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub> nachgewiesen werden.

Besonders deutlich wurde der Effekt einer Hyperglykosylierung bei Betrachtung der *double chain* Formen von Cathepsin B (Abb. 3.21). Die *Spots* 1 und 2 im 2-D Gel der F2-Fraktion des Wildtyps trugen, wie auch die Formen der *single chain*, Glykane vom Typ Man<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub> und Man<sub>2</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. In *Spot* 3 war kein Glykan detektierbar, obwohl größere Mengen Analyse-Material zur Verfügung standen. In  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Tieren dagegen waren ausschließlich in *Spot* 1 Glykane nachweisbar, deren überwiegender Teil (~85 %) die Struktur Man<sub>3</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub> und Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> aufwies. In den *double chain* Cathepsin B-*Spots* mit niedrigerem isoelektrischen Punkt waren keine N-Glykane detektierbar (nicht gezeigt).

# 3.3.10 Western Blot Analyse und Glykosylierungsstatus weiterer lysosomaler Proteine

Um den Glykosylierungsstatus weiterer lysosomaler und endosomaler Proteine zu untersuchen, wurden weitere Western Blot Analysen für die Proteasen Cathepsin E (Abb. 3.22 A) und Cathepsin D (Abb. 3.22 B) durchgeführt. Für beide Proteine zeigte sich in Gewebehomogenaten der *knockout*-Tiere für die reifen lysosomalen Formen eine stärke Signalintensität, sowie ein geringfügig erhöhter Unterschied des apparenten Molekulargewichts um wenige kDa.

Die Proform von Cathepsin E wurde in der Leber bei etwa 70 kDa detektiert (Abb. 3.22 A). für sie ließen sich im Vergleich zu knockout- und ERT-behandelten knockout-Tieren nach PNGaseF-Verdau sowie keine Unterschiede im Molekulargewicht beobachten. Die reife single chain-Form wurde in Tieren des Wildtyps als Einzelbande bei etwa 40 kDa nachgewiesen. Nach PNGaseF-Verdau ließ sich das Molekulargewicht um wenige kDa auf ~39 kDa reduzieren. Geringe Mengen der reifen double chain-Formen wurden als Einzelbande bei 26 kDa nachgewiesen. In den knockout-Tieren wurde die single chain-Form von Cathepsin E dagegen bei einem Molekulargewicht von etwa 43 kDa detektiert und konnte nach PNGaseF-Verdau, wie auch im Wildtyp, bei etwa 39 kDa beobachtet werden. Geringe Mengen lagen noch in Zwischenformen von 39 bis 43 kDa vor. Die double chain-Form wurde als Doppelbande bei ~26 und 27 kDa detektiert und es ließ sich durch PNGaseF-Behandlung keine weitere Reduzierung der Molekulargewichte beobachten. In den knockout-Tieren konnten zudem in den unbehandelten Leberhomogenaten signifikante Mengen der leichten Kette der double chain-Form bei etwa 13 und 15 kDa nachgewiesen werden, die nach PNGaseF-Inkubation vollständig auf die 13 kDa Form verringert wurden. Diese Form wurde in Wildtyp Cathepsin E-Formen kaum detektiert und war nur nach Überexposition nachweisbar. In ERT-behandelten knockout-Tieren ließ sich ein klarer Effekt der ERT beobachten und die double chain-Form wurde in einer Reihe von Banden von ~39 kDa bis ~43 Diese Formen ließen sich nach PNGaseF-Verdau auf kDa detektiert. ein Molekulargewicht von 39 kDa deglykosylieren.



Abb. 3.22: Western Blot Analyse von Leberhomogenaten für Cathepsin D und Cathepsin E. 100 μg Gesamtprotein von Wildtyp-, *knockout-* und ERT-behandelten *knockout*-Tiere wurden in Anwesenheit von PNGaseF bzw. ohne PNGaseF für 20 Std. inkubiert und über SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die Membranen mit Antiseren gegen Cathepsin E (A) und Cathepsin D (B) detektiert. \* in (B) markiert eine unspezifische Bande.

Cathepsin D ist hochgradig homolog zu Cathepsin E und wird in der Leber ähnlich wie Cathepsin E prozessiert (Abb. 3.22 B). Die Proform wurde in allen Proben bei etwa 50 kDa detektiert. Im Wildtyp wurde die intermediate Form mit dem Antikörper als Doppelbande bei etwa 39 - 40 kDa und die reife Form bei ~33 kDa nachgewiesen. Durch PNGaseF-Verdau ließ sich das Molekulargewicht der intermediaten Form teilweise um wenige kDa verringern, für die anderen molekularen Formen zeigte sich kein Effekt durch die PNGaseF-Behandlung. In den  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Tieren wurde die intermediate Form von Cathepsin D dagegen als Doppelbande bei ~40 – 41 kDa, und die intermediate Form als Doppelbande bei ~34 – 36 kDa detektiert. Zudem ließ sich deutlich die reife 15 kDa-Form nachweisen. Durch Behandlung mit PNGaseF ließ sich ein dem Wildytp vergleichbares Bandenmuster für die intermediate Form bei Molekulargewichten von ~35 – 40 kDa beobachten. Die Doppelbande der reifen Form wurde nach PNGaseF-Inkubation bei ~32 – 34 kDa detektiert. Für die reife 15 kDa Form ließ sich keine

weitere Reduzierung des Molekulargewichts beobachten. In ERT-behandelten Tieren war ein dem Wildtyp-vergleichbares Bandenmuster zu beobachten, mit der Ausnahme, dass die reife 15 kDa Form detektiert werden konnte.

Für beide untersuchten Proteine konnten in den α-Mannosidase-defizienten Tieren molekulare Formen mit höheren apparenten Molekulargewichten beobachtet werden. Nach PNGaseF-Inkubation der Gewebehomogenate wurden diese Unterschiede des Molekulargewichts im Fall von Cathepsin E fast vollständig eliminiert, im Fall von Cathepsin D teilweise. Durch die ERT ließ sich in beiden Fällen eine weitestgehende Normalisierung der Molekulargewichte erreichen.

# 3.3.11 Untersuchung der Glykosylierung von Cathepsin B im Sanfilippo-Syndrom-Mausmodell

Da die α-Mannosidase direkt am Abbau Mannose-reicher und Komplex-Typ N-Glykane beteiligt ist, sind zwei Mechanismen, die zu einer Hyperglykosylierung lysosomaler Proteine bei den *knockout*-Mäusen führen, vorstellbar:



Abb. 3.23: Western Blot Analyse von Cathepsin B an Gewebehomogenaten von Wildtyp, α-Mannosidose und MPS IIIB-Maus-Lebern. Je 150 μg Gesamtprotein der Leber wurden mit einem Cathepsin B-Antikörper detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle detektiert.

1. Die α-Mannosidase ist gegenüber Glykanen am nativen Peptidanteil von Proteinen hydrolytisch aktiv.

2. Durch die Speicherung von undegradierten Makromolekülen ist eine sekundäre Einschränkung in der Prozessierung der N-Glykane denkbar.

Um zu überprüfen, ob bei einem weiteren Mausmodell ebenfalls eine Veränderung der Glykosylierung lysosomaler Proteine vorliegt, wurden Leberhomogenate von MPS IIIB-Mäusen (Defizienz der N-Acetyl- $\alpha$ -D-Glukoseaminidase (NAGLU), Sanfilippo-Syndrom, (Li et al. 1999)) im Vergleich mit Homogenaten der  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Mäuse untersucht. Leber von MPS IIIB-Mäusen wurde freundlicherweise von Dr. Guglielmo Villani und Prof. Paola di Natale, Universität Neapel, Italien zur Verfügung gestellt. Wie auch in den  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Mäusen zeigte sich für die *single chain-* als auch für *double chain*-Formen von Cathepsin B in den Gewebehomogenaten des MPS IIIB-Mausmodells ein höheres apparentes Molekulargewicht, sowie eine erhöhte Protein-Menge. Diese Ergebnisse lassen auf einen generellen Effekt, bedingt durch eine lysosomale Speicherung, auf die Prozessierung von N-Glykanen lysosomaler Proteine schließen.

### 3.3.12 Bestimmung der spezifischen Dichte von Lysosomen

Um neben Veränderungen auf lysosomale Enzyme weitere Auswirkungen der lysosomalen Speicherung auf allgemeine Veränderungen der Lysosomen zu untersuchen, wurde die spezifische Dichte der Lysosomen über Percoll-Dichtezentrifugation bestimmt. Postnukleäre Überstände von Gewebehomogenaten der Leber und des Gehirns wurden auf eine Endkonzentration von 50 % Percoll gebracht und zentrifugiert. Von den einzelnen resultierenden Gradienten-Fraktionen wurde anschließend die Aktivität der  $\beta$ -Hexosaminidase als lysosomales Leitenzym bestimmt.



Abb. 3.24: Percoll-Dichtezentrifugation von Gehirn- und Leberhomogenaten. Postnukleäre Überstände der Leber (A; C) und des Gehirns (B; D) wurden über Percoll-Dichtezentrifugation aufgetrennt. Die β-Hexosaminidase-Aktivität wurde in jeder Fraktion bestimmt und in Prozent der Gesamtaktivität angegeben (N = 3) (A; B). Die Anteilige Verteilung des Gesamtproteins wurde ebenfalls in Prozent angegeben. Die spezifische Dichte jeder Fraktion wurde refraktometrisch bestimmt (C; D).

In beiden Geweben zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Gesamtaktivität innerhalb der Fraktionen des Gradienten. In der Leber (Abb. 3.24 A) wurde ein Großteil der  $\beta$ -Hexosaminidase-Gesamtaktivität in Wildtyp-Tieren in den Fraktionen 15 – 19 mit einer Dichte von 1,15 bis 1,245 gemessen. In *knockout*-Tieren wurde dagegen bereits in den Fraktionen 9 – 15 bei einer deutlich geringeren Dichte von 1,115 – 1,15 die höchste  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität bestimmt.

Im Gehirn (Abb. 3.24 B) zeigte sich eine signifikant andere Verteilung der  $\beta$ -Hexosaminidase-Aktivität als in der Leber. Ein Großteil der Aktivität ließ sich bei beiden Genotypen in rab5-positiven, endosomalen Fraktionen 2 – 6 bei einer Dichte von 1,025 – 1,075 nachweisen. Die Dichte der  $\beta$ -Hexosaminidase-positiven Endosomen wies keine signifikanten Unterschiede auf. Lysosomen ließen sich im Wildtyp in den Fraktionen 10 – 15 bei einer Dichte von etwa 1,08 – 1,125

nachweisen, in *knockout*-Tieren bereits in den Fraktionen 8 - 12 bei einer Dichte von 1,075 – 1,10.

Die lysosomale Speicherung von primärem Speichermaterial oder ggf. sekundären Speichermaterials führt somit in der Leber als auch im Gehirn zu veränderten physikalischen Eigenschaften und einer veränderten Morphologie der Lysosomen, die sich nicht nur in einer Expansion des lysosomalen Systems zeigt (vergl. 3.2.8), sondern auch in einer verringerten Dichte.

#### 3.4 Neuropathologie α-Mannosidase-defizienter Mäuse

Die humane α-Mannosidose-Erkrankung geht häufig mit einer Beteiligung des ZNS einher und führt bei den meisten Patienten zu einem progressiven Verlust mentaler Fähigkeiten (Malm 2008). Im α-Mannosidase-Mausmodell konnten in Neuronen und Gliazellen des Hippocampus sowie weiteren Regionen des ZNS Speichervakuolen nachgewiesen werden (Stinchi et al. 1999; Blanz et al. 2008). Die Krankheit manifestiert sich demzufolge in teilweise ausgeprägten Defiziten neurokognitiver Fähigkeiten der Mäuse (D'Hooge et al. 2005; Caeyenberghs et al. 2006). Im Folgenden wurde die Neuropathologie der defizienten Mäuse näher untersucht.

#### 3.4.1 Laserscanmikroskopie von Gehirnpräparaten

Paraformaldehyd-fixierte Gehirnpräparate wurden am Gefrier-Vibratom in 40 µm semi-Dünnschnitte geschnitten. Da in Geweben vor allem in postmitotischen Zellen wie Neuronen häufig endogenes, schwach bis moderat autofluoreszentes Material (Lipofuscin) als intrazelluläres Abbauprodukt zu finden ist (Schnell et al. 1999), als auch Hintergrundfluoreszenz durch das Fixativum (Paraformaldehyd) entsteht, wurden Negativkontrollen für die Bestimmung der Hintergrund- und Autofluoreszenz ohne weitere Antikörper-Färbung aufgezogen und unter dem Laserscanmikroskop analysiert. Dabei zeigten sich schon in den Negativkontrollen bei einer differentiellen Betrachtung an Schnitten von Tieren des Wildtyps und *knockout*-Tieren bei Extinktion mit einem Hochrot-Laser (633 nm) beträchtliche Unterschiede in der Intensität und Verteilung des autofluoreszenten Materials (Abb. 3.25).



Abb. 3.25: Autofluoreszenz im Cerebellum bei einer Anregung bei 633 nm 18 Monate alter Tiere. A; Im Cerebellum von Wildtyp-Tieren zeigt sich eine geringe Autofluoreszenz in der Purkinjezellschicht, während sich bei *knockout*-Tieren (B) granuläres autofluoreszentes Material in der molekularen Schicht zeigt. Balken = 500 μm

Beide Genotypen wiesen schwache, punktierte Autofluoreszenz in fast allen Bereichen des Gehirns auf. Im Cerebellum (Abb. 3.25 A und B) zeigte sich insbesondere in den *knockout*-Tieren eine drastisch erhöhte Akkumulation autofluoreszenten Materials. Mit dem progredienten Verlauf der Erkrankung und steigendem Lebensalter ließ sich vermehrt autofluoreszentes Material beobachten.

Im Cerebellum war autofluoreszentes Material in Tieren des Wildtyps ab einem Alter von etwa sechs Monaten zu finden und war dort im Wesentlichen auf die Schicht der Purkinjezellen zwischen Molekular- und Körnerschicht begrenzt. Nur wenige Zellen innerhalb der Körnerschicht wiesen eine ähnliche Autofluoreszenz auf. Im Cerebellum von *knockout*-Tieren dagegen zeigte sich eine deutliche Anhäufung autofluoreszenten Materials innerhalb der Molekularschicht. Insgesamt war die Autofluoreszenz wesentlich stärker und die autofluoreszierenden Strukturen wiesen eine deutlich veränderte Verteilung auf. Die verschiedenen Lobi des Cerebellums unterschieden sich dabei in der Intensität und im Volumen des Materials, wobei die Lobi X und XI deutlich weniger stark betroffen waren. Massive Speicherung autofluoreszenten Materials zeigte sich zudem im Bereich der zentralen Kleinhirnkerne.



Abb. 3.26: Autofluoreszenz in verschiedenen Extinktions-Kanälen. Semi-Dünnschnitte des Cerebellums eines 18 Monate alten *knockout*-Tieres wurden mit 488 nm (A), 543 nm (B) sowie (C) 633 nm angeregt und die Emission in einem 100 nm Intervall 50 nm über der Anregungswellenlänge ausgelesen. D zeigt eine Überlagerung der drei Einzelbilder. Balken = 500 μm

Um weiter zu charakterisieren, bei welchen Anregungswellenlängen eine Emission von Licht zu beobachten war und ob sich die autofluoreszenten Signale in allen Wellenlängen deckten, wurden Semi-Dünnschnitte jeweils mit einem UV-Laser, sowie Lasern mit Wellenlängen von 488 nm (Abb. 3.26 A), 546 nm (Abb. 3.26 B) sowie 633 nm (Abb. 3.26 C) angeregt und die Fluoreszenz wurde jeweils in einem 100 nm-Intervall 50 nm über der Anregungswellenlänge am Laserscanmikroskop ausgelesen. Abb. 3.26 D zeigt die Überlagerung der drei Emmissionsaufnahmen des autofluoreszenten Materials in den verschiedenen Anregungenswellenlängen. Bei allen Anregungswellenlängen ließ sich das autofluoreszente Material darstellen, bei 488 und 633 nm sowie im UV-Bereich (nicht gezeigt) ließ sich eine besonders starke Emission erreichen. Die Autofluoreszenz überlappte nur teilweise in allen Kanälen.

Durch Lipofuscin verursachte Autofluoreszenz kann durch eine Behandlung mit CuSO<sub>4</sub> oder Sudan Schwarz signifikant reduziert werden, der genaue Mechanismus

#### Ergebnisse

dieser Reaktion ist dabei bislang nicht geklärt (Schnell et al. 1999). Durch eine einstündige Behandlung der Schnitte mit 200 µM CuSO<sub>4</sub> konnte eine deutliche Reduktion der Autofluoreszenz in allen Kanälen erreicht werden (nicht gezeigt).

## 3.4.2 Histologische Untersuchung des Cerebellum

Um morphologische Veränderungen innerhalb des Cerebellum der α-Mannosidasedefizienten Tiere zu untersuchen, wurden je 12 und 16 Monate alte Wildtyp- und *knockout*-Tiere durch transkardiale Perfusion mit 3 % Glutaraldehyd fixiert, das ZNS in Kunststoff-Polymer eingebettet und 1 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden Toluidin-Blau gefärbt. Die Präparation der Schnitte und histologische Begutachtung der Präparate erfolgte durch Prof. Dr. Renate Lüllmann-Rauch, Anatomisches Institut der Universität Kiel.

Während in Wildtyp-Tieren die Purkinjezellreihe in allen Lobi weitgehend erhalten war, (Abb. 3.27 A) waren in α-Mannosidase-defizienten Tieren teilweise große Lücken in der Purkinjezellreihe erkennbar, in denen Purkinjezellen fehlten (Abb. 3.27 B). Besonders in Folie 4, 5 und 6 fehlten Purkinjezellen streckenweise fast vollständig. 16 Monate alte *knockout*-Tiere wiesen dabei generell weniger Purkinjezellen auf als 12 Monate alte Tiere.



Abb. 3.27: Histologische Untersuchung des Cerebellum. Glutaraldehyd-fixierte Gehirne von 12 Monate alten Wildtyp (A, C) und α-Mannosidase-defizienten Tieren (B, D, E, F) wurden in Kunststoff eingebettet. Mit einem Ultra-Mikrotom wurden dann 1 µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden anschließend Toluidin-Blau gefärbt. Ein weißer Stern markiert eine verbliebene Purkinjezelle mit lysosomalem Speichermaterial (B). Dicke weisse Pfeile weisen auf Makrophagen in der Molekularschicht (E, F). Der dünne weiße Pfeil weist auf Speicherlysosomen in einer Purkinjezelle. (A, B) Balken = 50 µm, (C - F) Balken = 20 µm.

#### Ergebnisse

In Bereichen mit fehlenden Purkinjezellen konnten in den *knockout*-Tieren Zellen in der Purkinjezellschicht beobachtet werden, die sich klar in ihrer Morphologie von Purkinjezellen unterschieden (Abb. 3.27 D). Es ist dabei anzumerken, dass auch in Wildtyp-Tieren teilweise Lücken in der Purkinjezellreihe zu beobachten waren, die auf ebenfalls fehlende Zellen oder Präparat-bedingte Anschnitte außerhalb des Zellkerns zurückzuführen sind.

Innerhalb der Molekularschicht des Cerebellums wurden in knockout-Tieren deutlich stark Toluidin-Blau-positive Zellen gefärbt, die ihrer Morphologie nach als phagozytierende Mikroglia bzw. Makrophagen identifiziert wurden. Nichtphagozytierende, ruhende Mikroglia, die auch im Cerebellum von Wildtyp-Tieren zu finden sind (siehe Abb. 3.28), werden durch Toluidin-Blau nicht angefärbt. Die phagozytierenden Makrophagen wurden häufig in direkter Nähe von Neuronen, insbesondere Purkinjezellen, oder aber perivasculär beobachtet. In vielen Purkinjezellen α-Mannosidase-defizienten der Mäuse konnten zudem Speicherlysosomen beobachtet werden, die in Wildtyp-Tieren nicht detektiert wurden.

### 3.4.3 Immunohistochemische Färbung von Mikroglia im ZNS

Da die histologische Untersuchung des Cerebellums der α-Mannosidase-defizienten Mäuse außergewöhnlich viele phagozytierende Makrophagen innerhalb der Molekularschicht gezeigt hatte, sollten Morphologie und Aktivierungsstatus der Mikroglia-Population im ZNS immunohistochemisch untersucht werden. Mikroglia finden sich im gesamten ZNS gesunder Tiere als stark verästelte, ruhende Zellen. Nach Verletzungen oder entzündlichen Reaktionen verändern sie sich hinsichtlich ihrer Morphologie zu buschigen, feiner verästelten, aktivierten Mikroglia und schließlich zu phagozytierenden Makrophagen mit abgerundeter (amöboider) Morphologie und wenigen Verästelungen (Ladeby et al. 2005).



Abb. 3.28: Immunohistochemische Färbung von Mikroglia im Cerebellum des Makrophagen-Marker F4/80. 40 μm Vibratom-Schnitte 12 Monate alter Wildtyp- (A, C, E) und *knockout*-Tiere (B, D, E, G) wurden mit einem Antikörper gegen den für Makrophagen-spezifischen Marker F4/80 gefärbt. A und B zeigen Lobus III und IV, C und D Lobus I/II. E = ruhende, verästelte Mikroglia aus der Molekularschicht eines Wildtyp-Tiers, F = buschige, aktivierte Mikrogliazelle und G phagozytierende Mikrogliazelle / Makrophage aus der Molekularschicht eines *knockout*-Tieres. (A, B) Balken = 50 μm, (C, D) Balken = 20 μm, (E, F, G) Balken = 4 μm

In 12 Monate alten Tieren des Wildtyps konnten in allen Bereichen des Cerebellums ruhende, verästelte Mikroglia beobachtet werden (Abb. 3.28 A, C, E). Sowohl in der molekularen, als auch in der granulären Zellschicht und im Bereich der zentralen Kleinhirnkerne befanden sich diese ruhenden Mikroglia. Im Gegensatz dazu konnten in der Molekularschicht des Cerebellums der α-Mannosidase-defizienten Mäuse

(Abb. 3.28 B, D) aktivierte Mikroglia in verschiedenen Stufen der Aktivierung von buschig und stark verästelt (Abb. 3.28 F), bis hin zu amöboiden, phagozytierenden Makrophagen detektiert werden (Abb. 3.28 G). In allen Lobi des Cerebellums ließen sich aktivierte / phagozytierende Mikroglia nachweisen, wobei die Lobi IX und X weniger stark betroffen waren. Auch im Bereich der zentralen Kleinhirnkerne fanden sich aktivierte Mikroglia. Innerhalb der granulären Zellschicht waren nur wenige Mikroglia aktiviert und es konnten keine amöboiden phagozytierenden Makrophagen beobachtet werden. Die lysosomale Speicherung innerhalb der Mikroglia führt somit entweder direkt zu der Aktivierung der Mikroglia-Population im Cerebellum und im speziellen in der Molekularschicht, oder wird durch die umgebenden Zellen im Gewebe und damit verbundener systemischer Entzündung des Cerebellums induziert. Auffällig war in diesem Zusammenhang auch die Verteilung der aktivierten Mikroglia innerhalb des Cerebellums, die stark der Verteilung des autofluoreszenten Materials ähnelte.

# 3.4.4 Co-Lokalisation von aktivierten Mikroglia und autofluoreszentem Material

Die fast identische Verteilung von autofluoreszentem Material und phagozytierenden Mikroglia innerhalb des Cerebellums der α-Mannosidase-defizienten Mäuse ließ die Vermutung aufkommen, dass das autofluoreszente Material innerhalb dieser Makrophagen akkumuliert. Um diese Annahme zu verifizieren, wurde eine Co-Lokalisierungsstudie des autofluoreszenten Materials und F4/80-positiven Mikroglia durchgeführt (Abb. 3.29). Durch die Immunfluoreszenzfärbung mit einem Antikörper gegen das F4/80-Antigen (Abb. 3.29 A, grün) wurde eine der DAB-Färbung (vergl. Abb. 3.28 B und D) entsprechende Färbung von Mikroglia erreicht. Autofluoreszenz wurde bei einer Anregung von 633 nm aufgenommen und beide Aufnahmen wurden übereinander gelegt. Fast alle autofluoreszenten Strukturen wurden von dem auf der Zellmembran lokalisierten F4/80-Antigen umschlossen und zeigten eine klare Lokalisation innerhalb von Mikrogliazellen. Vor allem im Bereich der Purkinjezellschicht, aber auch innerhalb der Molekularschicht, befanden sich autofluoreszenten Strukturen, die nicht Mikroglia zugeordnet werden konnten. Nicht alle Mikroglia akkumulierten autofluoreszentes Material, besonders für weniger stark gefärbte Zellen (vermutlich ruhende, verästelte Mikroglia) zeigte sich keine Co-Lokalisation mit autofluoreszentem Material. Die Akkumulation des autofluoreszenten Lipofuscins in der Molekularschicht des Cerebellum der α-Mannosidase-defizienten Tiere findet entsprechend fast ausschließlich in hochgradig aktivierten, phagozytierenden Makrophagen statt.



Abb. 3.29: Co-Lokalisation von autofluoreszentem Material und Mikroglia. 40 μm Vibratom-Schnitte wurden mit einem Antikörper gegen das F4/80-Antigen gefärbt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Sekundärantikörper bei Anregung von 488 nm detektiert (A). Autofluoreszenz wurde bei einer Anregung von 633 nm detektiert (B). C und D zeigen eine Überlagerung beider Aufnahmen. (A, B, C) Balken = 50 μm, (D) Balken = 15 μm.

## 3.4.5 Immunohistochemische Färbung des Astroglia-Markers GFAP

Neben einer Aktivierung von Mikroglia werden neurologischen Erkrankungen des ZNS häufig auch von einer reaktiven Astrogliose begleitet. Besonders der Untergang von Neuronen wird häufig von einer reaktiven Astrogliose begleitet (Eng und Ghirnikar 1994). Durch immunohistochemische Färbung des Astroglia-Markers GFAP (glial fibrilarry acidic protein) wurde daher das ZNS von 12 und 16 Monate alten  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Mäusen hinsichtlich einer Astrogliose untersucht.

#### Ergebnisse

Während im Großhirn keine signifikanten Unterschiede in Morphologie und Menge von Astroglia zu gleichaltrigen Wildtyp-Tieren zu beobachten war, ließ sich im Cerebellum eine Aktivierung von Bergmann-Glia, einer spezialisierten Astroglia-Subpopulation des Cerebellums in der Purkinjezellschicht, beobachten. In 12 als auch 18 Monate alten Wildtyp-Tieren konnten Bergmann-Glia mit dünnen Ausläufern in der Molekularschicht durchgehend in der Purkinjezellschicht identifiziert werden. In 12 Monate alten Tieren zeigte sich dagegen in kleinen, abgegrenzten Bereichen eine Aktivierung der Bergmann-Glia, die durch eine Hypertrophie der in die Molekularschicht hervorragenden Ausläufer sowie der Soma charakterisiert war. In 18 Monate alten *knockout*-Tieren konnte eine deutlich fortgeschrittenere, reaktive Gliose der Bergmann-Glia beobachtet werden.



Abb. 3.30: Immunohistochemische Färbung des Astroglia-Markers GFAP im Cerebellum. Vibratom-Schnitte von 12 Monate alten Wildytp (A, C) und α-Mannosidase-defizienten Tieren (B, D) wurden mit einem Antikörper gegen den Astroglia-Marker GFAP gefärbt. In der Purkinjezellschicht wurden in Wildtyp-Tieren vor allem Bergmann-Glia angefärbt (Lobus V/VI). In *knockout*-Tieren sind die Bergmann-Glia in einigen Abschnitten hypertrophisch verdickt und ihre Ausläufer reichen teilweise vollständig durch die Molekularschicht hindurch. (A, B) Balken = 100 µm (C, D) Balken = 20 µm.

In fast allen Lobi konnten Nester mit verdickten Bergmann-Glia entdeckt werden, wobei besonders Folie V stark von der reaktiven Gliose betroffen war. Die hypertrophen Bergmann-Glia wiesen auf eine Schädigung der neuronalen Zellpopulation in der Molekularschicht hin.

#### 3.4.6 Co-Lokalisation von Bergmann-Glia und Purkinjezellen

Der immunohistochemische Nachweis des Astroglia-Markers GFAP hatte eine reaktive Gliose von Bergmann-Glia in der Molekularschicht des Cerebellums α-Mannosidase-defizienter Mäuse gezeigt. Die histologische Beurteilung des Cerebellums hatte zudem bei Mäusen ab 12 Monaten den Verlust von Purkinjezellen offenbart. Da besonders Lobi des Cerebellums von der Astrogliose betroffen waren, in denen auch ein Verlust von Purkinjezellen beobachtet wurde, wurde die Co-Lokalisierung von Purkinjezellen und Astroglia im Cerebellum der *knockout*-Mäuse untersucht. Purkinjezellen wurden dabei mit einem Antikörper gegen den Marker Calbindin gefärbt, Astroglia mit einem Antikörper gegen den Marker

Zudem wurde autofluoreszentes Material im UV-Kanal detektiert. Durch die Calbindin-Färbung konnten Lücken in der Purkinjezellschicht mit fehlenden Purkinjezellen beobachtet werden, in denen weder Soma noch Dendriten gefärbt wurden. Durch Immunfluoreszenzfärbung von GFAP wurden, wie bei der immunhistochemischen Färbung (vergl. Abb. 3.30), hypertrophe Bergmann-Glia mit verdickten Soma und Ausläufern bis tief in die Molekularschicht detektiert. Eine Überlagerung von GFAP- und Calbindin-Färbung zeigte eine Lokalisation der reaktiven Astrogliose an denjenigen Stellen des Cerebellums, an denen Purkinjezellen fehlten. Zwischen Purkinjezelltod und lokaler, reaktiver Astrogliose im besteht somit offensichtlich ein funktioneller Zusammenhang. Cerebellum Autofluoreszentes Material, das vor allem in Mikroglia akkumulierte (vergl. 3.4.3), wurde innerhalb der Molekularschicht anliegend an Dendriten der Purkinjezellen sowie Ausläufern der Bergmann-Glia detektiert.



 Abb. 3.31: Immunfluoreszenz-Färbung von Calbindin und GFAP. Auf Vibratom-Schnitten des Gehirns einer 12 Monate alten α-Mannosidase-defizienten Maus wurde autofluoreszentes Material im UV-Bereich angeregt (A) sowie mit einem Antikörper gegen den Astrozyten-Marker GFAP (B) und einem Antikörper gegen den Purkinjezell-Marker Calbindin (C) gefärbt.
D zeigt eine Überlagerung der drei Fluoreszenzkanäle. Balken = 50 µm

### 3.4.7 Sekundäre Speicherung von Cholesterin im ZNS

Im ZNS wird Cholesterin für die Synthese neuer Membranen vor allem durch Neu-Synthese, oder durch retrograden Transport aus dem endo- / lysosomalen System zur Verfügung gestellt (Vance 2006). Lysosomales Cholesterin stammt dabei aus abgebauten Membranbestandteilen (Recycling-Weg). Für eine Reihe von Mausmodellen lysosomaler Speichererkrankungen konnte neben dem entsprechenden Hauptspeichermaterial eine sekundäre Speicherung von Cholesterin gezeigt werden (MPS I, MPS II, MPS IIIA, MPS IV, GM1 und GM2-Gangliosidose (McGlynn et al. 2004; Walkley et al. 2005)). Die Percoll-Dichtezentrifugation von Homogenaten der  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Mäuse (siehe 3.3.12) hatte eine signifikant verringerte Dichte der Lysosomen in Leber und ZNS gezeigt, die auf eine Speicherung von Lipiden zurückzuführen sein könnte. Daher wurden Semi-Dünnschnitte des ZNS und der Leber von 12 und 18 Monate alten Wildtyp- und *knockout*-Mäusen mit Filipin gefärbt, um Cholesterin nachzuweisen. Filipin bindet hochspezifisch freies Cholesterin und fluoresziert bei einer Anregung im UV-Bereich (Geyer und Bornig 1975). Im ZNS der *knockout*-Mäuse fand eine deutliche Akkumulation von Cholesterin innerhalb der molekularen Zellschicht in allen Lobi des Cerebellums statt (siehe Abb. 3.32). In Wildtyp-Tieren wurden nur geringste Mengen freien Cholesterins gefärbt. In anderen Bereichen des ZNS konnten keine signifikanten Unterschiede in der Speicherung von Cholesterin zwischen beiden Genotypen beobachtet werden. Die Speicherung von Cholesterin in den *knockout*-Mäusen verläuft progressiv und war insbesondere in alten Tieren (ab einem Alter von 12 Monaten) besonders deutlich ausgeprägt.

In der Leber konnte keine signifikante Speicherung von freiem Cholesterin mittels der Filipin-Färbung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die verringerte Dichte (siehe 3.3.12) der Lysosomen wird daher vermutlich nicht maßgeblich durch Cholesterin verursacht, auch wenn dies für das ZNS nicht auszuschließen ist.



Abb. 3.32: Speicherung von Cholesterin im Cerebellum α-Mannosidase-defizienter Mäuse. Gewebeschnitte des ZNS 18 Monate alter Wildtyp- (A) und *knockout*-Mäuse (B) wurden mit dem Cholesterin-bindenden Fluorophor Filipin gefärbt. Freies Cholesterin wird in der molekularen Schicht des Cerebellums gespeichert. MZ = Molekulare Zellschicht; PZ = Purkinjezellschicht; GZ = Granuläre Zellschicht. Balken = 200 µm

Da Cholesterin als auch Lipofuscin ausgeprägt in der Molekularschicht des Cerebellums gespeichert wurden, wurde untersucht, ob diese beiden sekundären Speichermaterialien in den gleichen Zellen oder in unterschiedlichen Zellen lokalisiert

#### Ergebnisse

waren. Abb. 3.32 zeigt einen Ausschnitt des Cerebellums mit dem besonders stark von der Akkumulation von Lipofuscin betroffenen Lobus VI. Cholesterin wurde durch Filipin angefärbt und im UV-Kanal angeregt, während das autofluoreszente Lipofuscin bei 488 nm detektiert wurde. Beide sekundären Speichermaterialien zeigten eine teilweise Co-Lokalisation in ähnlicher Verteilung wie die aktivierten Mikroglia, wobei sich Cholesterin in deutlich mehr Zellen darstellen ließ. In der Purkinjezellschicht fand im Gegensatz zu Lipofuscin keine Speicherung von freiem Cholesterin statt. Cholesterin stellt somit einen Teil des Lipofuscins dar, welches vorwiegend in Mikroglia akkumuliert, wird aber nicht ausschließlich bzw. nicht in allen Mikroglia gespeichert.



Abb. 3.33: Co-Lokalisation von Lipofuscin und Cholesterin im Cerebellum. Semi-Dünnschnitte wurden mit Filipin gefärbt und im UV-Kanal detektiert (A, D, rot). Lipofuscin wurde durch Anregung bei 488 nm detektiert (B, E, grün). C und F zeigen eine Überlagerung beider Bilder. Die Purkinjezellschicht ist in C durch eine gestrichelte weiße Linie gekennzeichnet. Der in D, E und F vergrößerte Bereich ist markiert. (A, B, C) Balken = 100 μm, (D, E, F) Balken = 15 μm

121

#### 3.4.8 Expression des Niemann-Pick 2 (NPC2) Proteins

Der genaue Mechanismus des Exports von Cholesterin aus Endo- und Lysosomen ist bis heute nicht vollständig geklärt (Infante et al. 2008; Pacheco und Lieberman 2008). Die beiden Proteine NPC1 und NPC2 spielen jedoch offensichtlich eine zentrale Rolle, da die Defizienz eines der beiden Proteine zu einer Niemann-Pick Typ C-(NPC) Erkrankung führt. NPC ist durch eine massive Speicherung von Cholesterin und Glykosphingolipiden in späten Endosomen und Lysosomen der Leber sowie des ZNS charakterisiert. Die Expression von NPC2 in der Leber und im ZNS wurde durch Western Blot Analysen untersucht (Abb. 3.34).



Abb. 3.34: Western Blot Analyse des NPC2-Proteins im ZNS und der Leber. Gehirnhomogenate von je zwei 12 Monate alten Wildtyp und α-Mannosidase-defizienten Mäusen (A) und Leberhomogenaten (B) von Wildtyp, α-Mannosidase-defizienten, ERT-behandelten α-Mannosidase-defizienten und MPS IIIB Mäusen. 150 µg Gesamtprotein wurden über 15 % SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und mit einem NPC2-Antiserum detektiert. GAPDH wurde als Ladekontrolle detektiert.

Während NPC2 im Gehirn von Wildtyp-Tieren in verschieden stark glykosylierten Formen mit apparenten Molekulargewichten von 16 und 18 kDa detektiert wurden (Abb. 3.34 A), konnte in Homogenaten der α-Mannosidase-defizienten Tiere fast ausschließlich die hochmolekulare 18 kDa-Form detektiert werden. In den *knockout*-Mäusen wurde das Protein zudem signifikant stärker detektiert. In der Leber (Abb. 3.34 B) wurde NPC2 im Wildtyp bei etwa 15 und 16 kDa detektiert. In  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Tieren zeigte sich eine zum Gehirn vergleichbare Protein-Expression mit einer erhöhten Signalintensität und Detektion bei 18 kDa. In ERT-behandelten Tieren lag das Protein in Zwischenformen von 16 – 18 kDa vor. In der Leber der MPS IIIB-Tiere wurde NPC2 bei etwa 17 kDa detektiert. Nach Inkubation von Gewebehomogenaten der Leber und des Gehirns mit PNGaseF ließ sich für die deglykosylierten Formen ein apparentes Molekulargewicht von ~14 kDa beobachten (nicht gezeigt).

Da NPC2 eine zentrale Rolle im intrazellulären Transport von Colesterin spielt, könnte zumindest in einigen Zelltypen die Interaktion des in α-Mannosidase- und NAGLU-defizienten Tieren deutlich stärker glykosylierten NPC2 mit Cholesterin zu einem gestörten Transport führen.

#### 3.4.9 Western Blot Analyse des Autophagie-Markers LC3

Zytosolische Proteine und ganze Organellen können über Autophagie und die Verschmelzung von Autophagosomen mit Lysosomen degradiert werden (Klionsky und Emr 2000). Eine verminderte Degradation im lysosomalen Lumen durch eine LSD könnte auch die Degradation autophagozytierten Materials beeinflussen. Jüngst konnte in einigen Mausmodellen für LSDs eine erhöhte Menge von Autophagosomen und eine Beeinträchtigung des autophagozytären Systems nachgewiesen werden (Cao et al. 2006; Liao et al. 2007; Settembre et al. 2008; Takamura et al. 2008).

Die Immundetektion des Atg8-Hefe-Orthologs LC3 ist als quantitativer Marker für Autophagosomen etabliert (Klionsky et al. 2008) und wurde als Nachweis für Autophagosomen im ZNS der  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Mäuse verwendet.

Die zytosolische Form des Proteins (LC3-I) mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 18 kDa wird während der Formation von Autophagosomen durch eine Konjugation an Phosphatidylethanolamin (PE) lipidiert und somit in die neu entstehende autophagosomale Membran integriert. Die lipidierte Form (LC3-II) wird in der SDS-PAGE bei einem apparentes Molekulargewicht von 16 kDa detektiert (Kabeya et al. 2000).



Abb. 3.35: Western Blot Analyse des Autophagie-Markers LC3. 100 μg Gesamtprotein des Gehirns von je zwei 2, 6 und 12 Monat alten Wildtyp- und *knockout*-Tiere wurden über 15 % SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem LC3-Antiserum detektiert. Die Signalstärke von LC3-I und LC3-II wurden densitometrisch quantifiziert und als Ratio dargestellt (N = 2). GAPDH wurde als Ladekontrolle detektiert.

Da das membrangebundene LC3-II in Autophagosomen nach der Fusion mit Lysosomen und/ oder Endosomen rasch durch lysosomale Proteasen degradiert wird und somit eine kurze Halbwertzeit hat (Tanida et al. 2005), ist seine Signalintensität proportional zu der Menge autophagosomaler Membranen. Während in Wildtyp-Tieren aller Altersstufen in Gehirnhomogenaten überwiegend die zytosolische LC3-I-Form detektierbar war (Ratio LC3-II/ LC3-I = ~0,6), lag in den *knockout*-Tieren ein signifikant höherer Anteil in der PE-lipidierten LC3-II-Form vor (Ratio LC3-II/ LC3-I = ~1,1) (Abb. 3.35). Darüber hinaus ließ sich feststellen, dass die Expression von LC3 mit steigendem Lebensalter zunahm.

Die signifikant stärkere Detektion von LC3-II spricht entweder für einen verminderten Abbau von Auotphagosomen oder für eine erhöhte Induktion von Autophagie.

# 3.4.10 Western Blot Analyse des Autophagie-Markers Beclin 1 und von Proteinen des mTOR-Signalweges

Autophagie wird entweder durch die Aktivierung des Beclin 1-Signalweges oder durch die Dephosphorylierung von mTOR (*mammalian target of rapamycin*) reguliert (Klionsky und Emr 2000). Die stark erhöhte Menge von Autophagosomen lässt sich entweder durch erhöhte Induktion von Autophagie oder durch den verminderten Abbau von Autophagosomen durch gestörte Fusion mit Lysosomen erklären. Beclin 1 (*S. cerevisiae*-Ortholog des Hefe-Proteins ATG6) ist Teil des Class III PI3K-Komplexes, der entscheidend in der Induktion der Formation von Autophagosomen am Trans-Golgi-Netzwerk beteiligt ist (Kihara et al. 2001). Abb. 3.36 A zeigt eine Western Blot Analyse für Beclin 1 mit Gehirnhomogenaten von Wildtyp- und *knockout*-Mäusen verschiedenen Alters. Für keine Altersstufe ließen sich signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und *knockout*-Mäusen in der Expression von Beclin 1 beobachten. Es liegt entsprechend keine Induktion von Autophagie durch den Beclin 1-abhängigen PI3K-Signalweg vor.



Abb. 3.36: Western Blot Analyse für Beclin 1 und Phosphorylierunsgs-spezifischen Antikörpern für mTOR und Akt. 100 µg Gesamtprotein des Gehirns wurden über 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern für Beclin 1 (A) sowie Phosphorylierungs-spezifischen Antikörpern gegen mTOR und Akt detektiert (B und C).

Um neben dem Beclin 1 / Class III PI3K-Signalweges eine Regulation durch Akt / mTOR zu überprüfen, wurden ihre Expression und Aktivierungsstatus durch Phosphorylierungs-spezifische Antikörper untersucht (Abb. 3.36). Akt und seinem Effektorprotein mTOR werden durch den Insulin-Rezeptor / Class I PI3K-Signalweg gesteuert, der inhibitorisch auf die Induktion von Autophagie wirkt (Corcelle et al. 2007; Maiuri et al. 2007). Phosphorylierung der beiden Signalproteine führt zu einer Aktivierung von Autophagie. Weder für Phospho-Akt noch für Phospho-mTOR (Abb. 3.36 C) zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Signalintensität zwischen knockout- und Wildtyp-Tieren der verschiedenen Altersstufen. Auch über den mTOR-Signalweg findet somit keine erhöhte Induktion von Autophagie in den α-Mannosidase-defizienten Mäusen statt. Da bei erhöhter Detektion von LC3-II weder über den Beclin 1, noch über Akt / mTOR eine Aktivierung von Autophagie stattfindet, scheint ein ein verminderter Abbau von Autophagosomen, bedingt durch die vorzuliegen Akkumulation lysosomale Speicherung, und die von Autophagosomen zu verursachen.

## 4 Diskussion

Die Defizienz einer lysosomalen Hydrolase führt zu einer Speicherung des Substrats des defizienten Enzyms im lysosomalen Lumen. Als Folge der lysosomalen manifestieren mit LSDs Speicherung sich bei Patienten zahlreiche Krankheitssymptome in verschiedenen Organsystemen. Häufig verlaufen die Erkrankungen progressiv. Die sekundären Wirkmechanismen, die zwischen der Speicherung zellulärer Metabolite in den Lysosomen und der Manifestierung der Erkrankung liegen, sind bislang nur sehr unzureichend verstanden (Walkley 2007; Walkley 2009) und wurden in der vorliegenden Arbeit anhand eines Mausmodells der α-Mannosidose untersucht.

Die ERT ist der derzeit häufigste Therapie-Ansatz bei LSDs und auch ein viel versprechender Ansatz zur kausalen Behandlung der α-Mannosidose (Roces et al. 2004). Es ist jedoch bislang nicht geklärt, ob durch die Behandlung auch ein therapeutischer Effekt der durch die lysosomale Speicherung bedingten Veränderungen in den betroffenen Organsystemen erreicht werden kann.

Im Rahmen der Arbeit konnten morphologische Veränderungen der Kupfferzellpopulation und biochemische Veränderungen lysosomaler Proteine aufgezeigt werden, sowie deren teilweise oder vollständige Normalisierung durch die ERT. Neue Erkenntnisse über neuropathologische Folgen der lysosomalen Speicherung können Ziele für die therapeutische Behandlung des ZNS aufzeigen, welches aufgrund der Blut-Hirn-Schranke derzeit nicht durch die ERT erreicht werden kann. Darüber hinaus konnten durch Microarray-Transkriptomanalysen regulatorische Effekte des knockout-Konstruktes auf die Expression von Genen gezeigt werden, die dem Man2B1-Gen benachbart sind. Diese Erkenntnisse erfordern einen kritischen Umgang mit knockout-Mausmodellen im Allgemeinen und im Speziellen mit dem hier untersuchten  $\alpha$ -Mannosidose-Mausmodell.

## 4.1 Enzymersatztherapie

Die ERT wurde bereits erfolgreich an den α-Mannosidase *knockout*-Mäusen durchgeführt (Roces et al. 2004; Blanz et al. 2008). Um die Entspeicherung der Speicherlysosomen der verwendeten LAMAN-Charge durch die angewandten ERT-Protokolle zu kontrollieren, wurden die Speicherglykane durch Dünnschichtchromatographie dargestellt. Bei 100 mU/ g Körpergewicht in Dosierungen von zwei Injektionen pro Woche und vier Injektionen insgesamt, konnte eine fast vollständige Reduzierung des Speichermaterials erreicht werden. Dies bestätigt die Ergebnisse von Roces et al. und Blanz et al. Um den Effekt der ERT über einen längeren Zeitraum zu untersuchen, wurde über fünf Wochen bei einmaliger Injektion pro Woche von 25 mU/ g Körpergewicht LAMAN injiziert. Eine Dosierung von 250 mU/ g Körpergewicht hatte gezeigt, dass bereits nach 14 Tagen Antikörper gebildet werden und die Injektionen zu einer hohen Mortalität unter den behandelten Tieren führt (Roces 2005). Obwohl Blanz et al. bereits nach zwei Injektionen mit 25 mU/ g Körpergewicht eine Reduzierung der Speicherglykane um 70 % zeigen konnten (Blanz et al. 2008), konnte in der vorliegenden Studie bei fünfwöchiger Therapie nur ein geringer Effekt auf die Speicherglykane erreicht werden. Ursache dafür könnten Unterschiede in Glykosylierung und M6P-Gehalt der verwendeten LAMAN-Chargen und damit deren unterschiedliche Endozytose über MPR und MR sein. Aber auch die Bildung kompetetiver Antikörper, die das Enzym binden und damit seine Aufnahme über die Rezeptoren blockieren können oder die enzymatische Aktivität beeinflussen (Starzyk et al. 2007; Ponder 2008), könnten ursächlich für die deutlich schlechtere Effizienz der 25 mU/ g Körpergewicht Dosierung gegenüber der Studie von Blanz et al. sein.

### 4.2 Transkriptomanalyse

Durch eine Microarray-Analyse des Leber-Transkriptoms von *knockout*-Tieren verschiedener Altersgruppen und Wildtyp-Tieren jeweils gleichen Alters sollten Gene identifiziert werden, deren Expression in Folge der lysosomalen Speicherung differentiell reguliert ist. In ähnlichen experimentellen Ansätzen für andere LSDs konnten wichtige pathogenetische Erkenntnisse über den Krankheitsverlauf gesammelt werden. Für die meisten Analysen wurde das Transkriptom des ZNS untersucht, um Erkenntnisse für die komplexen neuropathologischen Vorgänge zu gewinnen (Wada et al. 2000; Myerowitz et al. 2002; Brooks et al. 2003; Ohmi et al. 2003). Für das Mausmodell der Mucopolysaccharidose VII (Defizienz der  $\beta$ -Glucuronidase) wurde RNA der Leber verwendet und der Effekt der  $\beta$ -Glucuronidase-ERT auf die Genexpression bestimmt (Woloszynek et al. 2004).

In allen drei analysierten Altersgruppen konnte das Man2B1-Gen signifikant als das am stärksten direkt durch den *knockout* regulierte Gen im Vergleich von Wildtyp- ud *knockout*-Tieren identifiziert werden. Dies entsprach den Erwartungen und stellt eine gute technische Kontrolle des Experiments dar. In 58 Wochen alten Tieren zeigte sich erwartungsgemäß ein deutlich stärkerer Effekt differentieller Expression in den *knockout*-Tieren als in den 10 und 13 Wochen alten Tieren. Auffällig war zudem, dass eine Reihe von Genen keine Normalisierung durch die ERT zeigte, während die meisten Gene auf die ERT ansprachen und teilweise oder vollständig auf Wildtyp-Niveau normalisiert wurden. Die differentielle Expression ausgewählter Gene konnte durch quantitative *realtime*-PCR bestätigt werden.

## 4.2.1 Differentiell exprimierte Gene, die nicht auf die ERT ansprechen

Eine Analyse der chromosomalen Lokalisation der in allen Altersgruppen differentiell exprimierten Gene offenbarte eine signifikante Gruppierung auf einem etwa 1,3 Mbp langen Abschnitt auf Chromosom 8, auf dem auch das Man2B1-Gen lokalisiert ist. Für die Gene aus dieser Region zeigte sich keine Normalisierung der Expression auf Wildtyp-Niveau durch die ERT.

Die räumliche Nähe zu dem ausgeschalteten Man2B1-Gen, die Häufung von differentiell exprimierten Genen in dieser Region, sowie der ausbleibende Effekt der ERT sprechen für einen pleiotropen Effekt des *knockout*-Konstrukts auf die Expression dieser Gene. Die *knockout*-Genkassette wurde durch homologe Rekombination in Exon zwei des Man2B1-Gens eingefügt und besteht aus einem Neomycin-Phosphotransferase (NEO-NPT)-Resistenzgen, das unter der Kontrolle des Phosphoglycerat-Kinase (PGK)-Promotors steht (Stinchi et al. 1999).

Ein solcher Einfluss transkriptioneller Regulation benachbarter Gene durch NEO-NPT wurde bereits für andere *knockout*-Mausmodelle beschrieben (Fiering et al. 1995; Olson et al. 1996; Pham et al. 1996; DeJarnette et al. 1998; Ren et al. 2002). So konnten Fiering et al. einen regulatorischen Effekt von NEO-NPT auf die Expression der  $\beta$ -Globin-Multigen-Familie zeigen. Die  $\beta$ -Globin-Multigen-Familie besteht aus fünf  $\beta$ -Globin-Genen, die unter der transkriptionellen Regulation einer *locus control region* (LCR) stehen. Die  $\beta$ -Globin-LCR besteht aus fünf DNase I hypersensitiven Elementen (Levings und Bungert 2002). Die Insertion einer *knockout*-Kassette mit NEO-NPT als Resistenzgen in das 5'HS2-Element der murinen  $\beta$ -Globin-LCR verursacht eine starke Repression der Transkription der  $\beta$ -Globin-Gene *downstream* der NEO-NPT-Kassette. Die Deletion von NEO-NPT aus der knockout-Kassette normalisiert die Expression der β-Globine-Gene wieder. Offensichtlich stört die NEO-NPT-Kassette die Interaktion der LCR mit downstreamgelegenen cis-regulatorischen (Promotor-) Elementen. Die Autoren der Studie interpretieren die Ergebnisse durch konkurrierende Promotor-Regionen der NEO-NPT (PGK-Promotor) und der β-Globin-Gen-Promotorregionen um die LCR (Fiering et al. 1995). Neben dem β-Globin-Gen-Cluster konnten ähnliche Effekte der NEO-NPT auf die Genexpression in knockout-Mausmodellen für andere in Gen-Clustern arrangierte Gene gezeigt werden: So reprimiert die Insertion von NEO-NPT in das murine Granzym B-Gen die Expression anderer Granzyme in der Granzym-B-Multigen-Familie (Pham et al. 1996). Die Insertion einer NEO-NPT-knockout-Kassette in das MRF4 Gen, eines von vier myogenic regulatory factor-Genen, inhibiert die Expression des benachbarten MRF-Gens Myf5 (Olson et al. 1996). Die Insertion einer NEO-NPT-knockout-Kassette in die nicht-translatierte Region (UTR) des Hoxa2-Gens induziert die Expression von Hoxa2 und reprimiert die Expression von Hoxa1. Durch die Deletion von NEO-NPT lässt sich der regulatorische Effekt ausschalten (Ren et al. 2002). Schließlich konnte ein Effekt einer in das CD3ɛ-Gen eingefügten NEO-NPT-Kassette auf die benachbarten co-regulierten Gene CD3γ und CD36 gezeigt werden. Auch hier ist der regulatorische Effekt nach Entfernung der NEO-NPT durch cre-Rekombinase nichtmehr nachweisbar (DeJarnette et al. 1998).

In allen oben genannten Fällen einer gekoppelten transkriptionellen Regulation von Genen nahe einer NEO-NPT-knockout-Kassette, sind Gene aus Multigen-Familien betroffen, deren Expression durch gemeinsame regulatorische Elemente gesteuert wurden, und bei denen vermutlich der PGK-Promotor die Interaktion mit regulatorischen Elemente beeinflusst. Multigenfamilien entstehen durch die Duplikation von Genen bei der Meiose (De Grassi et al. 2008). In Eukaryonten sind solcher Multigen-Familien häufig funktionell verwandt oder werden Gene entwicklungsspezifisch exprimiert (Niehrs und Pollet 1999; Yanai et al. 2002; Pal und Hurst 2004; Michalak 2008). Die co-regulierten Gene um das Man2B1-Gen scheinen im Gegensatz dazu keine funktionelle Verknüpfung aufzuweisen. Es gibt bislang keine Hinweise auf ihre Co-Expression als Mitglied einer Multigenfamilie. Weder für Prdx2, Gadd45gip, Klf1, noch für eines der andere betroffene Gene, ist eine direkte Interaktion mit der lysosomalen  $\alpha$ -Mannosidase bekannt oder ein Stoffwechselweg, an dem diese Gene gemeinsam beteiligt wären. Die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der Genprodukte lässt zudem eine direkte Interaktion unwahrscheinlich erscheinen.



Abb. 4.1: Syntänie von Maus-Chromosom 8 und seinem homologen humanen chromosomalen Abschnitten.

Trotzdem kann eine Gruppierung dieser Gene in einem "Cluster" nicht ausgeschlossen werden. In Prokaryonten finden sich auch nicht-funktionell verknüpfte Gene häufig in Gen-Clustern (Pal und Hurst 2004). In Eukrayonten wie Drosophila melanogaster lassen sich 20 % aller Gene Co-exprimierten Gen-Clustern zuordnen (Spellman und Rubin 2002). In Eukarvonten sind besonders Housekeeping-Gene häufig in Clustern angeordnet (Lercher et al. 2002). Die Promotorregion des Man2B1-Gens weist mit GC-reichen Regionen, und damit Bindestellen für den Transkriptionsfaktor SP1, Eigenschaften eines Housekeeping-Gens auf (Stinchi et al. 1998). Das Man2B1-Gen wird zudem ubiquitär in allen Geweben der Maus exprimiert (Beccari et al. 1997). Cluster von co-exprimierten Genen sind vermutlich durch die natürliche Selektion konserviert (Singer et al. 2005). Der entsprechende Abschnitt des murinen Chromosoms 8 bei etwa 38 cM weist eine solche Konservierung auf, was sich durch eine starke Syntänie zu dem entsprechenden humanen Chromosomenabschnitt auf Chromosom 19 widerspiegelt (Abb. 4.1).

In einer 2008 veröffentlichten Microarray-Studie des ZNS der LSD-*knockout*-Mausmodelle für CLN1- und CLN5 (von Schantz et al. 2008) konnte, analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, eine signifikante Co-Regulation benachbarter Gene des CLN1-*knockout*-Gens Ppt1 festgestellt werden. Da jedoch dieselben Gene im ZNS der CLN5-*knockout*-Maus ebenfalls differentiell exprimiert waren, wurde von den Autoren ein Effekt des *knockout*-Konstrukts ausgeschlossen. CLN5 ist auf einem anderen Chromosom als CNL1 lokalisiert. Dabei ist anzumerken, dass die differentielle Expression dieser Gene in der CLN5-Maus nicht statistisch signifikant war. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen auch für das *knockout*-Mausmodell von CLN1 auf einen pleiotropen Effekt des NPT-NEO-Resistenzgens auf die Genexpression benachbarter Gene schließen.

Ein Großteil aller verwendeten Mausmodelle für lysosomale Speichererkrankungen wurde mithilfe der klassischen *knockout*-Strategie durch homologe Rekombination eines Vektor-*replacement*, zumeist mit NEO-NPT als Resistenzgen, in embryonale Stammzellen in ein Exon des Gens generiert (Evers et al. 1996; Saftig et al. 1997; Suzuki et al. 1998; Suzuki et al. 2003). Für alle diese Modelle sind somit Effekte durch die *knockout*-Kassette denkbar.

#### 4.2.2 Differentiell exprimierte Gene, die auf die ERT ansprechen

Neben den Genen um das Man2B1-Gen, bei denen kein Einfluss der ERT auf die Expression festgestellt werden konnte, konnten durch die Transkriptomanalyse eine Reihe von Genen identifiziert werden, deren differentielle Expression offenbar durch die lysosomale Speicherung und die aus ihr resultierenden Sekundäreffekte induziert wurde. Die meisten dieser Gene wurden durch die ERT teilweise auf Wildtyp-Niveau normalisiert, wobei der Effekt häufig nur unvollständig war. Grund dafür könnte eine nicht ausreichende Dauer der Therapie von nur zwei Wochen sein, die nur zu einer unvollständigen Entspeicherung von N-Glykanen im Lysosom führt. Durch die Dünnschichtchromatographie konnten noch geringe Mengen von Glykanen detektiert werden. Es ist jedoch auch denkbar, dass die Speicherung bereits irreversible Schädigungen und sekundäre Veränderungen der Leber verursacht, und diese Veränderungen nicht durch die ERT therapierbar sind. Auch in der Leber der MPS VII-Mäuse konnten nach zwei Wochen β-Glucuronidase-ERT nicht alle Gene vollständig auf Wildtyp-Niveau normalisiert werden (Woloszynek et al. 2004).

In 10 und 13 Wochen alten Tieren waren (im Vergleich zur Altersgruppe der 58 Wochen alten Tiere) nur wenige Gene stark differentiell exprimiert und es war keine klare Zuordnung zu einzelnen Stoffwechselwegen oder funktionellen Gruppen

#### Diskussion

möglich. Für viele Gene der 58 Wochen alten Tiere ließ sich dagegen ein deutlicher Effekt auf das Transkriptom feststellen. Obgleich in der Erstbeschreibung der α-Mannosidase-*knockout*-Maus bereits im Alter von acht Wochen eine Akkumulation von Mannose-haltigen Oligosacchariden nachgewiesen wurde und sich diese in abnormal großen Speicherlysosomen manifestierte, zeigten die α-Mannosidasedefizienten Mäuse bis zu einem Alter von 10 Monaten keine makroskopischen Unterschiede zu Wildtyp-Tieren gleichen Alters (Stinchi et al. 1999). Auch für Mausmodelle anderer LSDs konnte oft erst bei älteren Tieren ab dem 6. – 10. Monat deutliche morphologische Veränderungen festgestellt werden (Arylsulfatase B*knockout*, (Evers et al. 1996), Aspartylglucosaminidase-*knockout*, (Jalanko et al. 1998)). Zudem verläuft die Erkrankung auch bei einem Teil der α-Mannosidose-Patienten sehr milde. Die Patienten entwickeln bis zum jungen Erwachsenenalter kaum Symptome (Malm und Nilssen 2008). Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse unterstützen somit die Beobachtung, dass das Mausmodell einen milden Verlauf der humanen Erkrankung widerspiegelt.

In 58 Wochen alten Tieren konnten viele differentiell exprimierte Gene identifiziert werden, deren Expression auf Makrophagen beschränkt ist. So werden Lysozym, CD68, Dectin-2, und CD163 in der Leber laut Literatur nur von Kupfferzellen exprimiert. Zudem fand sich eine hohe Anzahl von Immunglobulin-Genen unter den differentiell exprimierten Genen, die durch eine erhöhte Zahl von Antikörperproduzierenden B-Zellen in der Leber erklärbar wäre.

Durch immunohistologische Färbung konnte in der Leber eine deutlich höhere Immunreaktivität gegen den Makrophagen-Marker CD68 nachgewiesen werden. Da CD68 ein lysosomales Membranprotein ist, ist diese erhöhte Immunreaktivität vermutlich durch die Speicherlysosomen zu erklären. Die Immunreaktivität gegen CD68 der ERT-behandelten Tiere war mit jener der Wildtyp-Tiere vergleichbar. Um zu untersuchen, ob die Speicherung auch Folgen auf die Morphologie der Kupfferzellen hat, wurde weiterhin überprüft, ob die generelle Morphologie der Kupfferzellen durch die Speicherung verändert ist. Durch Färbung des Zellmembranständigen F4/80-Antigens konnte eine deutlich veränderte, geschwollene Morphologie der Kupfferzellen dargestellt werden. Eine Quantifizierung der Kupfferzellzahl war nicht möglich, da eine klare Diskriminierung zwischen erhöhter Immunfärbung einzelner Zellen und erhöhter Gesamtkupfferzellzahl nur unzureichend möglich war. Die erhöhte Expression weiterer Makrophagen-Marker ist somit offensichtlich eine Adaption an die veränderte Morphologie der Kupfferzellen bzw. gegebenenfalls einen erhöhten Anteil der Kupfferzellmasse in der Leber der α-Mannosidase-defizienten Tiere.

Die genaue Herkunft von Kupfferzellen der Leber wird bis heute kontrovers diskutiert: So ist eine Proliferation der lokalen Kupfferzellpopulation denkbar (Naito et al. 2004; Hume 2006), oder die Infiltration zirkulierender monozytärer Zellen aus dem Blut, die anschließend in der Leber zu Kupfferzellen reifen (Diesselhoff-den Dulk et al. 1979; Kennedy und Abkowitz 1998). Bei zwei anderen Mausmodellen lysosomaler Speichererkrankungen konnte ein starker Anstieg der Kupfferzellpopulation in der Leber gezeigt werden. So ist bei den multiple Sulfatase-defizienten (MSD) Mäusen (Sumf1-knockout, (Settembre et al. 2007)) eine stark erhöhte Zahl von Kupfferzellen nachgewiesen worden, als auch im Mausmodell für die Gaucher-Erkrankung (Defizienz der Glucocerebrosidase, (Mizukami et al. 2002)). Die geschwollene amöboide Morphologie der Kupfferzellen der Gaucher-Maus gleicht stark der Morphologie der Kupfferzellen in der Leber der α-Mannosidase-defizienten Maus. In der Gaucher- als auch in der Sumf1-knockout-Maus sind Makrophagen der Zelltyp mit der stärksten lysosomalen Speicherung. In beiden Tiermodellen geht die erhöhte Zahl von Makrophagen in Geweben mit einer systemischen Inflammation einher und es konnte gezeigt werden, dass sich die Kupfferzellen in einem aktivierten Status befinden (Mizukami et al. 2002; Settembre et al. 2007). Eine ähnliche Aktivierung der Kupfferzellen wäre somit auch bei der α-Mannosidase-defizienten Maus denkbar.

In 10 Wochen als auch 58 Wochen alten Mäusen wurde eine signifikant erhöhte Expression des Adhäsionsmoleküls Vcam1 festgestellt. Die Vcam1-Expression wird bei entzündlichen Reaktionen induziert. Es wird vor allem von sinusoidalen Endothelzellen und in deutlich geringerem Maße von Kupfferzellen exprimiert. Vcam1 interagiert mit den Integrin-Rezeptoren von Leukozyten aus dem Blut, um diese an Entzündungsherde in der Leber zu führen (*"leukocyte rolling"*). Eine erhöhte Expression von Vcam1 wurde bereits in der Transkriptomanalyse der Leber der MPS VII-Mäuse beobachtet (Woloszynek et al. 2004). Vcam1 vermittelt unter anderem das Einwandern von Monozyten aus dem Blut in die Leber und seine erhöhte Expression könnte somit mit einer erhöhten Migration von Monozyten aus dem Blut und anschließender Reifung zu Kupfferzellen zusammenhängen. Auch eine
Adaption der Kupfferzellen an die veränderte Morphologie der Leber durch Expression von Vcam1 wäre möglich. Das Integrin  $\alpha$ 9, welches ebenfalls in den 58 Wochen alten Tieren in seiner Expression induziert war, ist ein Rezeptor für Vcam1 und wird von Leukozyten wie neutrophilen Granulozyten exprimiert. Taooka et al. konnten zeigen, dass Intergrin  $\alpha$ 9 durch Interaktion mit Vcam1 die Migration von Neutrophilen an Endothelzellen vermittelt (Taooka et al. 1999).

Schließlich konnte mit Clec4n (Synonym Dectin-2) ein weiteres in seiner Expression aktiviertes Gen identifiziert werden, dessen Expression sich in der Leber auf Kupfferzellen beschränkt. Seine Expression wird auf inflammatorischen Monozyten induziert. Dectin-2 ist ein C-Typ Lektin, dessen Liganden als Mannose-reiche Glykane vom Typ Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, und Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> identifiziert wurden (McGreal et al. 2006). Diese Liganden sind auch lysosomales Speichermaterial der  $\alpha$ -Mannosidose und finden sich in signifikant erhöhten Mengen im Serum der *knockout*-Mäuse (persönliche Mitteilung Jean Claude Michalski). Dectin-2 induziert als *"pattern recognition receptor"* nach Bindung an den Fc-Rezeptor  $\gamma$  die angeborene Immunantwort (Sato et al. 2006). Eine Aktivierung durch Mannose-reiche Glykane aus dem Serum wäre somit denkbar.

## 4.3 Veränderungen anderer lysosomaler Proteine aufgrund der lysosomalen Speicherung

### 4.3.1 Expression und spezifische Aktivität lysosomaler Enzyme

Die lysosomale Speicherung führt in einer Reihe von LSDs zur Veränderungen der spezifischen Aktivität, Prozessierung, Glykosylierung oder Expression anderer lysosomaler Proteine (Van Hoof und Hers 1968; Sandhoff et al. 1971; Swallow et al. 1984; Schmid et al. 1999; Suter 2000). In der Microarray-Analyse wurde für das Gen der lysosomalen Protease Cathepsin B in 10 und 58 Wochen alten *knockout*-Tieren eine etwa um den Faktor zwei erhöhte Expression gegenüber den Wildtyp-Tieren gemessen, die im Anschluss durch *realtime*-PCR bestätigt werden konnte.

Um sekundäre Veränderungen der α-Mannosidase-Defizienz auf die Aktivität anderer lysosomaler Enzyme zu untersuchen, wurde *in vitro* die spezifische Aktivität für fünf weitere lysosomale Enzyme in der Leber und im ZNS, sowie die Protein-Expression der lysosomalen Membranproteine Lamp1 und Lamp2 in der Leber bestimmt. In

beiden Organen konnte für alle untersuchten Enzyme eine signifikant erhöhte spezifische Aktivität bzw. für die Lamp-Proteine eine erhöhte Protein-Expression nachgewiesen werden. Eine erhöhte spezifische Aktivität lysosomaler Enzyme war dabei zu vermuten, da bereits bei einigen anderen LSDs ähnliche Resultate beschrieben wurden (MPS IIIB (Li et al. 1999), MPS VII (Sands et al. 1994)). Neben einer erhöhten spezifischen Aktivität ließ sich eine erhöhte Cathepsin B-Proteinmenge in der Leber der  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Tiere im Western Blot zeigen.

Außer dem Cathepsin B-Gen wiesen in der Transkriptomanalyse nur noch die Gene der beiden Untereinheiten der 
ß-Hexosaminidase HEXA und HEXB eine moderate Änderung der Expression etwa um den Faktor 1,5 auf. Durch realtime-PCR konnte die leicht erhöhte Expression bestätigt werden. Die Expression der anderen vier lysosomalen Enzyme war dagegen nur in geringem Maße oder gar nicht transkriptionell reguliert. Daher müssen vor allem posttranslationale Effekte, wie z.B. eine verlängerte Halbwertzeit der Proteine ursächlich für die höhere spezifische *in vitro*-Aktivität dieser lysosomalen Enzyme in den α-Mannosidase-defizienten Mäusen gegenüber den Wildtyp-Tieren sein. Auch in Mausmodellen der GM2-Gangliosidose sowie Prosaposin-defizienten Mäusen ließ sich trotz erhöhter spezifischer Aktivität einiger lysosomaler Enzyme keine signifikant erhöhte Expression jener Gene beobachten (Potratz et al. 2000). In der Transkriptomanalyse der Leber von MPS VII-Mäusen zeigten sich ebenfalls nur gering erhöhte Expressions unterschiede um den Faktor 1 - 2, obwohl für die  $\beta$ -Hexosaminidase, α-Galactosidase und N-Acetylglucosaminidase in vitro eine um den Faktor 3-4 erhöhte spezifische Aktivität bestimmt wurde (Woloszynek et al. 2004).

Durch die ERT konnte die spezifische Aktivität aller getesteten lysosomalen Hydrolasen als auch die Menge beider Lamp-Proteine in der Leber wieder vollständig auf Wildtyp-Niveau normalisiert werden.

In der differentiellen Proteomanalyse hoch angereicherter Lysosomen zeigte sich, dass eine Reihe verschiedener lysosomaler Proteine in Lysosomen der *knockout*-Mäuse kleine Unterschiede von wenigen 100 Da im Molekulargewicht aufwiesen. Besonders deutlich konnte dies bei den reifen lysosomalen Formen von Cathepsin B beobachtet werden. Eine Western Blot-Analyse lysosomaler F2-Fraktionen mit dem *Lens culinaris*-Lektin wies zudem deutlich stärkere Signale für eine Reihe verschiedener Glykoproteine auf und ließ vermuten, dass lysosomale Enzyme in  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Tieren stärker glykosyliert sein könnten.

#### 4.3.2 Glykosylierung von Cathepsin B der Leber

Da in der DIGE-Analyse besonders für Cathepsin B deutliche Unterschiede im Molekulargewicht der reifen molekularen Formen festgestellt wurden, wurde dessen Glykosylierung detaillierter untersucht. Im Western Blot konnten sich die Unterschiede im Molekulargewicht bestätigen lassen, es zeigte sich ein um etwa 2 kDa erhöhtes Molekulargewicht der reifen lysosomalen Formen in Gewebehomogenaten knockout-Tiere. enzymatischer der Ein Verdau der Gewebehomogenate mit Endoglykosidasen bestätigte die Vermutung, dass die Unterschiede im Molekulargewicht durch Glykosylierungen bedingt waren. Im Wildtyp als auch im knockout wurden die höhermolekularen Formen von single chain und double chain zu der Form mit dem jeweils geringsten Molekulargewicht verdaut. Die Glykane wurden durch PNGaseF vom Peptidanteil gespalten, waren jedoch resistent gegen EndoH. Da PNGaseF Glykane vom Mannose-reichen- als auch vom Komplexund Hybrid-Typ vom Peptid spaltet, EndoH jedoch nur Mannose-reiche- und einige Hybrid-Typ Glykane mit mehr als vier Mannose-Resten (Trimble und Maley 1984), mussten die Glykane vom Komplex-Typ oder Mannose-reiche bzw. Hybrid-Typ Glykane mit weniger als vier Mannose-Resten sein.

Durch präparative 2-D Gelelektrophorese konnten die einzelnen molekularen Formen von Cathepsin B isoliert werden und eine detaillierte Analyse ihrer Glykane durch MALDI-TOF-Analyse durchgeführt werden. Die Glykanstrukturen vom murinen bislang nicht beschrieben. In Wildtyp-Tieren wurden Cathepsin B sind an Cathepsin B fast ausschließlich Glykane vom Тур Man<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub> und Man<sub>2</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub> detektiert. Damit sind die Glykane identisch mit der Struktur der Cathepsin B-Glykane der Rattenleber, die als Man<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, Man<sub>2</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, und Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub> in einer molaren Ratio von 86 % : 11 % : 3 % beschrieben wurden (Taniguchi et al. 1985). Auch die (semiguantitativ) durch MALDI-TOF bestimmte molare Ratio der einzelnen Cathepsin B-Glykane in der Leber der Maus ähnelt der der Ratte. In der Niere des Schweins konnte am Cathepsin B ebenfalls ein Glykan vom Typ Man<sub>2</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub> als Hauptform nachgewiesen werden (Takahashi et al. 1984), die Struktur des Glykans scheint somit stark konserviert.

In der Leber der  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Tiere konnten im Gegensatz zum Wildtyp nur geringe Mengen der Man<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub>- und Man<sub>2</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Glykane nachgewiesen werden. Stattdessen dominierten N-Glykane vom Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>- und Man<sub>3</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Typ mit je einem zusätzlichen Mannose-Rest am reduzierenden Ende. Außerdem ließen sich in geringen Mengen Mannose-reiche Glykane mit bis zu sieben Mannose-Resten (Man<sub>7</sub>GlcNAc<sub>2</sub>) nachweisen.

Die Präsenz von Fucose-Resten an einigen Glykanen von Cathepsin B lässt darauf schließen, dass beide oder zumindest eines der beiden Glykane durch sequentielle Prozessierung am reifen Peptidanteil im lysosomalen Lumen aus einem Komplex-Typ Glykan prozessiert wird. Eine solche Prozessierung am reifen Peptid wurde bereits von Taniguchi et al. spekuliert, da das kurze N-Glykan Man<sub>2</sub>GlcNAc<sub>2</sub> von Cathepsin B der Rattenleber nur durch Degradation aus einem höhermolekularen Glykan von Komplex-, Hybrid oder Mannose-reichen-Typ entstehen kann (Taniguchi et al. 1985). Die These einer N-Glykan-Prozessierung am reifen Peptid lysosomaler Enzyme im lysosomalen Lumen wurde in einer Studie an Fibroblasten von GM1-Gangliosidose- (Defizienz der β-Galactosidase) und Sialidose-Patienten (Defizienz der Sialidase) untersucht. Dabei wurde durch Lektin-Bindestudien eine stark erhöhte Menge terminaler Sialinsäure-Reste bzw. Galactose-Reste an einer Reihe verschiedener lysosomaler Proteine nachgewiesen (Swallow et al. 1984). Beide Enzyme sind somit an der Prozessierung der Komplex-Typ N-Glykane lysosomaler Enzyme beteiligt. Auch durch die Defizienz der α-Mannosidase kann keine weitere Prozessierung des Glykans stattfinden, so dass die Man<sub>3</sub>GlcNAc<sub>2</sub>- und Man<sub>3</sub>Fuc<sub>1</sub>GlcNAc<sub>2</sub>-Struktur am Peptidanteil von Cathepsin B verbleibt. Die Glykosylierungsstellen von Cathepsin B werden vermutlich in geringem Maße von Mannose-reichen Glykanen besetzt (Mikroheterogenität), die am Cathepsin B von knockout-Mäuse nicht weiter prozessiert werden können und somit in der MALDI-TOF Analyse detektiert wurden. In Wildtyp-Tieren werden diese Glykane vermutlich schnell durch die  $\alpha$ -Mannosidase prozessiert.

Die *double chain*-Form von Cathepsin B ließ sich in Wildtyp-Tieren im Coomassie-Gel in drei distinkten *Spots* verschiedenen Molekulargewichts auftrennen. Das *double chain*-Peptid weist zwei putative Glykosylierungsstellen auf. Da in den beiden

höhermolekularen *Spots* jeweils beide verschiedenen Glykane detektiert wurden, lässt dies den Schluss zu, dass im *Spot* mit dem höchsten apparenten Molekulargewicht beide Glykosylierungsstellen genutzt werden, in dem mittleren *Spot* nur eine und die molekulare Form von Cathepsin B mit dem geringsten Molekulargewicht nur mit kleinsten Glykanstrukturen wie einzelnen GlcNAc-Resten glykosyliert ist, die durch MALDI-TOF nicht detektiert werden konnten. Eine vollständige Deglykosylierung kann ausgeschlossen werden, da sie zu einer Deamidierung des Asparagins zu Aspartat, und damit zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes des Proteins führen würde.

In *knockout*-Tieren sind somit, bedingt durch das Fehlen der α-Mannosidase, vollständig beide Glykosylierungsstellen der *double chain*-Form mit N-Glykanen besetzt, während in Wildtyp Tieren nur geringe Mengen glykosyliert sind.

Durch Western Blot-Analysen wurde gezeigt, dass auch in der Leber des MPS IIIB-Mausmodells eine veränderte Prozessierung der Glykane von Cathepsin B als auch von NPC2 stattfindet. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei dieser gestörten Prozessierung der Glykane um einen generellen Effekt lysosomaler Speicherung handelt, der durch eine Inhibierung lysosomaler Glykosidasen und der damit verbundenen eingeschränkten Prozessierung der Glykane erklärbar wäre.

In den α-Mannosidase-defizienten Mäusen konnte neben einer Hyperglykosylierung von Cathepsin B und NPC2 auch eine im Vergleich zu Wildtyp-Tieren stärkere Glykosylierung der reifen Formen von Cathepsin E und Cathepsin D im Western Blot gezeigt werden.

Offenbar werden nicht von allen lysosomalen Proteinen Glykanstrukturen durch lysosomale Glykosidase prozessiert, da nicht alle lysosomalen Enzyme Unterschiede im Molekulargewicht aufwiesen. Dies lässt darauf schließen, dass bestimmte strukturelle Eigenschaften des Peptidanteils (z.B. exponierte Lage der Glykosylierungsstelle zur Außenseite des Proteins) eine solche Prozessierung beeinflussen.

#### 4.3.3 Dichte der Lysosomen

Um das lysosomale Proteom von Wildtyp- und knockout-Mäusen vergleichen zu können, wurden durch Injektion des Lipoprotein-Lipase-Inhibitors Tyloxapol und anschließender subzellulärer Fraktionierung Lysosomen hoher in Reinheit angereichert. Dabei fiel auf, dass Lysosomen von  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Tieren, anders als in Tieren des Wildtyps, auch in einer Fraktion höherer Dichte flottierten. Im Gegensatz dazu wiesen Lysosomen der Leber von knockout-Tieren, die nicht mit Tyloxapol gespritzt wurden, eine geringere Dichte als Lysosomen der Leber von Wildtyp-Tieren auf. Die Unterschiede der Dichte zwischen Wildtyp- und knockout-Tieren ohne vorherige Tyloxapol-Injektion könnte auf eine sekundäre Speicherung von Lipiden in Lysosomen der knockout-Tiere zurückzuführen sein (Eskelinen et al. 2004). Nach Injektion von Tyloxapol reichern sich Lipide aus LDL-Partikeln in den Lysosomen an, die zu einer verringerten lysosomalen Dichte führen (Hayashi et al. 1982). Der verringerte Einfluß von Tyloxapol auf die lysosomale Dichte in den knockout-Tieren könnte eine, durch die lysosomale Speicherung bedingte, verringerte Aufnahme der LDL-Partikel über den LDL-Rezeptor als in Tieren des Wildtyps sein.

#### 4.4 Neuropathologie

Die meisten LSDs zeigen neben Schädigungen der visceralen Organe häufig eine massive progressive Neurodegeneration des ZNS (Jeyakumar et al. 2005). Während die visceralen Organe durch die ERT gut erreicht und therapiert werden können, verhindert die Blut-Hirn-Schranke den Eintritt des therapeutischen Enzyms in das Gehirn. Obgleich die verschiedenen LSDs durch die Defizienz unterschiedlicher Proteine verursacht werden, ähneln sich viele dieser Erkrankungen hinsichtlich ihrer Neuropathologie stark. Diese Ähnlichkeit lässt darauf schließen, dass in diesen Erkrankungen gemeinsame sekundäre Folgen ursächlich für Neurodegeneration und neurokognitive Veränderungen sein könnten (Walkley 2009).

Ein detailliertes Verständnis der pathologischen Vorgänge im ZNS ist daher von besonderer Bedeutung, um alternative oder modifizierte Verfahren zur Therapie sekundärer Folgen der Speicherung einsetzen zu können.

Für das Mausmodell der  $\alpha$ -Mannosidose konnte bereits gezeigt werden, dass eine massive Speicherung von Glykanen in Neuronen und Gliazellen des ZNS stattfindet (Stinchi et al. 1999; D'Hooge et al. 2005; Blanz et al. 2008). Die Mäuse zeigen zudem bereits im Alter von drei Monaten Abnormalitäten bei verschiedenen Verhaltenstests. Dabei weisen die  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Tiere signifikante Unterschiede in neurokognitiven Fähigkeiten wie dem Lernen und der Gedächtnisleistung auf, als auch Unterschiede in emotionalen und exploratorischen Fähigkeiten (D'Hooge et al. 2005; Caeyenberghs et al. 2006).

Da durch die Transkriptomanalyse der Leber gezeigt werden konnte, dass es durch die Insertion der NEO-NPT-*knockout*-Kassette auch weitere nahe dem Man2B1-Gen gelegene Gene in ihrer Transkription reguliert sind, kann bei dem hier untersuchten Mausmodell nicht ausgeschlossen werden, dass durch diese pleitropen Effekte auch neuropathologische Veränderungen beeinflusst oder verursacht werden.

### 4.4.1 Histologische und immunohistologische Untersuchung des ZNS

Durch histologische Untersuchungen konnten deutliche Veränderungen im Cerebellum der a-Mannosidose-defizienten Mäuse festgestellt werden. Besonders deutlich zeigten sich phagozytierende Makrophagen innerhalb der Molekularschicht, sowie das Fehlen von Purkinjezellen. Durch immunohistochemische Verfahren konnten diese Befunde verifiziert werden. Mikroglia innerhalb der Molekularschicht wiesen deutlich die Morphologie von aktivierten Mikroglia und phagozytierenden Makrophagen auf. Die Aktivierung von Mikroglia sowie systemische Entzündungen des ZNS konnten bereits für eine Reihe von LSDs mit neurologischer Beteiligung beobachtet werde. Im cerebralen Cortex von Patienten als auch im ZNS von Mausmodellen der Gangliosidose-Erkrankungen Morbus Sandhoff und Morbus Tay-Sachs wurden durch immunohistochemische Färbungen aktivierte Mikroglia nachgewiesen (Wada et al. 2000; Myerowitz et al. 2002; Jeyakumar et al. 2003). Ohmi et al. konnten in den beiden Mausmodellen der MPS I und der MPS IIIB ebenfalls eine Mikroglia-Aktivierung im Cortex und weiteren Regionen des ZNS zeigen (Ohmi et al. 2003). Ähnliche Phänotypen konnten in Mausmodellen von Niemann-Pick C, der multiplen Sulfatase-Defizienz und der metachromatischen Leukodystrophie sowie Cathepsin D-defizienten Mäusen beobachtet werden (Baudry et al. 2003; Gieselmann et al. 2003; Settembre et al. 2007; Yamasaki et al. 2007). In dem zweiten Kleinsäugermodell der  $\alpha$ -Mannosidose, dem  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Meerschweinchen, wurden ebenfalls aktivierte Makrophagen im ZNS identifiziert. Besonders offensichtlich war die Infiltration von Makrophagen in das Cerebellum der erkrankten Tiere. Im Gegensatz zum hier untersuchten zum Mausmodell, in dem die Makrophagen fast ausschließlich in der Molekularschicht beobachtet wurden, wurden aktivierte Mikroglia im Cerebellum der  $\alpha$ -Mannosidose-Meerschweinchen vor allem im Bereich der Myelinscheiden der Nervenfasern gefunden (Crawley und Walkley 2007).

Unklar bleibt bei diesen histologischen Untersuchungen in beiden Modellen der  $\alpha$ -Mannosidose, ob eine Aktivierung von Mikroglia beispielsweise durch umliegende untergehende Zellen stattfindet, oder durch die Akkumulation von Speichermaterial innerhalb der Mikroglia, welche besonders stark von der lysosomalen Speicherung betroffen sind. In der histologischen Untersuchung konnte das Fehlen von Purkinjezellen beobachtet werden, deren Dendriten tief in die Molekularschicht reichen. Der Verlust von Purkinjezellen ist, wie auch die Aktivierung von Makrophagen, eine häufige Folge der lysosomalen Speicherung im ZNS verschiedener LSDs und konnte auch im  $\alpha$ -Mannosidose-Meerschweinchen beobachtet werden (Higashi et al. 1993; Sleat et al. 2004; Crawley und Walkley 2007; Settembre et al. 2007). Da aktivierte Mikroglia häufig in direkter Nähe der Purkinjezellreihe beobachtet wurden, könnten sie durch sterbende Purkinjezellen aktiviert und zur Phagozytose dieser Zellen angeregt werden.

Neben der Aktivierung von Mikroglia konnte in der Purkinjezellschicht eine Hypertrophie der Bergmann-Glia-Population im Cerebellum beobachtet werden. Diese lokal begrenzte reaktive Gliose wurde in Bereichen beobachtet, in denen Lücken in der Purkinjezellreihe zu beobachten waren. Damit ähneln die neuropathologischen Befunde im Cerebellum stark jüngst veröffentlichten Studien von Mausmodellen der NCL-Erkrankungen, in denen ebenfalls in Bereichen untergegangener Purkinjezellen hypertrophe Bergmann-Glia detektiert wurden (Chang et al. 2008; Macauley et al. 2009; Weimer et al. 2009). Für die hypertrophen Bergmann-Glia der PPT1-defizienten Maus dabei konnte durch immunohistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen die Glutamatrezeptoren GLAST und GLT-1 eine Dysfunktion der betroffenen Glia gezeigt werden (Macauley et al. 2009). Da Bergmann-Glia funktionell eng mit den umliegenden Purkinjezellen interagieren und ein wichtige Rolle in der Regulation von Kalzium sowie im Glutamatstoffwechsel übernehmen (Bellamy 2006), könnte die Hypertrophie dieser speziellen Gliapopulation zu dem Verlust der Purkinjezellen führen. Allerdings wäre auch eine Induktion der Hypertrophie durch den Untergang der umgebenden Purkinjezellen denkbar.

# 4.4.2 Sekundäre Speicherung autofluoreszenten Materials in Mikroglia des ZNS

Das ZNS der α-Mannosidase-defizienten Tiere zeigte bereits nach sechs bis acht Monaten eine starke Akkumulation von Lipofuscin bzw. Ceroid (die Begriffe werden im Folgenden synonym verwendet) in der molekularen Schicht des Cerebellums. Der Großteil des autofluoreszenten Materials konnte in phagozytierenden Mikrogliazellen beobachtet werden.

Ceroid akkumuliert typischerweise in Lysosomen von Patienten, die an einer NCL-Erkrankung leiden. NCL-Erkrankungen resultieren häufig aus der Defizienz einer lysosomalen Protease (Jalanko und Braulke 2008). Die ventrikuläre Injektion von Protease-Inhibitoren in das ZNS von Ratten führt ebenfalls zu einer Akkumulation von Lipofuscin und einem NCL-ähnlichen Phänotyp (Ivy 1992). Analysen des Speichermaterials von Schafen mit der Ceroid Lipofuscinose 6 (OCL6) haben gezeigt, dass Lipofuscin ein äußerst heterogenes Material aus Proteinen, Lipiden, Oligosacchariden und Spuren von Metallen darstellt (Jolly et al. 2002). In Studien am Speichermaterial des ZNS humaner NCL-Patienten und am Speichermaterial aus konnten dem ZNS von NCL-Mausmodellen zudem Dolichol-gebundene Oligosaccharide im Lipofuscin nachgewiesen werden (Hall und Patrick 1988; Cho et al. 2005). Einen großen Anteil des Speichermaterials stellt häufig die stark hydrophobe Untereinheit c der mitochondrialen ATPase (Hall et al. 1991).

Da N-Glykane keine autofluoreszenten Eigenschaften aufweisen, scheint die Speicherung von Lipofuscin in den Mikroglia der  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Mäuse eine sekundäre Folge der lysosomalen Speicherung von N-Glykanen zu sein. Jüngst konnte im ZNS des Mausmodells der Mukolipidose Typ IV (Defizienz von Mucolipin 1) die sekundäre Speicherung autofluoreszenten Materials mit ähnlichem spektralen Charakter wie bei der  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Maus gezeigt werden, wobei allerdings eine neuronale Akkumulation vorliegt (Micsenyi et al. 2009). In den  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Maus gezeigt werden kein autofluoreszentes Material beobachtet (Crawley und Walkley 2007). Dazu ist anzumerken, dass in der Studie neben immunohistologischen Färbungen nur Filipin-Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt wurden, bei denen das autofluoreszente Material im UV-Kanal durch die Filipin-Färbung nicht mehr detektierbar wäre.

Ursächlich für die Akkumulation autofluoreszenten Materials könnte eine Inhibierung von Iysosomalen Proteasen wie Cathepsin D, Cathepsin B oder der Ppt1 in Mikrogliazellen durch das primäre Speichermaterial und einer damit verbundenen Speicherung von Proteinen wie der Untereinheit c der mitochondrialen ATPase sein. Da Lipofuscin in Makrophagen vor allem aus heterophagozytiertem Material besteht (Marzella et al. 1981) und Mikroglia hohe Konzentrationen Iysosomaler Proteasen aufweisen, könnte es sich bei dem autofluoreszenten Material auch um Lipofuscin aus phagozytierten Neuronen wie beispielsweise den Purkinjezellen handeln. In den aktivierten Mikroglia der Cathepsin D-defizienten Mäuse konnte, ähnlich wie in den  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Mäusen, eine starke Akkumulation von Lipofuscin nachgewiesen werden (Yamasaki et al. 2007).

Durch Verwendung des  $\alpha$ -Mannosidase-Inhibitors *Swainsonine* konnten Segal et al. zeigen, dass die lysosomale Degradation von Glykoproteinen bei inhibierter  $\alpha$ -Mannosidase-Aktivität signifikant langsamer verläuft und dass die Degradation der Glykane eine Vorraussetzung für einen schnellen proteolytischen Abbau im Lysosom ist (Winkler und Segal 1984; Winkler und Segal 1984). Somit wäre auch denkbar, dass neben N-Glykanen auch Glykoproteine in Lysosomen von Mikroglia der  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Mäusen akkumulieren und dies zu einer im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gesteigerten Bildung von Lipofuscin führt.

#### 4.4.3 Sekundäre Speicherung von Cholesterin

Neben dem autofluoreszenten Lipofuscin wurde durch die Filipin-Färbung eine Akkumulation von freiem Cholesterin im Cerebellum der α-Mannosidase defizienten Mäuse beobachtet. Sekundäre Speicherung von Cholesterin im ZNS ist ein weit verbreitetes Phänomen innerhalb der LSDs (Walkley und Vanier 2008), dessen Ursache noch weitgehend unbekannt ist. Auch im ZNS des α-Mannosidoseerkrankten Meerschweinchens wurde eine sekundäre Speicherung von Cholesterin beschrieben (Crawley und Walkley 2007). Im Gegensatz zu dieser Studie, in der die Akkumulation vor allem um die Purkinjezellen und in der granulären Zellschicht

beobachtet wurde, akkumulierte Cholesterin im Mausmodell in der molekularen Zellschicht. Ein Teil des Cholesterins konnte mit Lipofuscin in Mikroglia co-lokalisiert werden und stellt offenbar eine Komponente des Lipofuscin dar.

Im ZNS wird Cholesterin für die Synthese von Membranen durch Neu-Synthese oder durch lysosomales Recycling zur Verfügung gestellt (Vance 2006). Der Export freien Cholesterins aus den Lysosomen ist dabei noch unzureichend geklärt. Die Defizienz des NPC1 als auch des NPC2 Proteine führen zu einer Akkumulation von Cholesterin in Lysosomen und einer Niemann-Pick Typ C-Erkrankung (Mukherjee und Maxfield 2004). NPC1 ist ein lyso- / endosomales Membranprotein, NPC2 ein lösliches lysosomales Glykoprotein. In einer jüngst veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass NPC2 Cholesterin in Lysosomen bindet und als Cholesterin-Donor für NPC1 dient (Infante et al. 2008). Western Blot-Analysen des NPC2-Proteins des ZNS und der Leber der α-Mannosidase-defizienten Mäuse wiesen eine stark erhöhte Protein-Expression im Vergleich zu Wildtyp-Tieren auf, sowie ein vollständiges Fehlen der monoglykosylierten NPC2-Form. In der Leber der MPS IIIB-Maus waren ebenfalls sämtliche NPC2-Formen stärker glykosyliert. Cheruku et al. konnten zeigen, dass die monoglykosylierte NPC2-Form in einem in vitro-System eine um den Faktor drei bis vier höhere Cholesterin-Transferrate gegenüber Modell-Membranen (dem in der Studie verwendete NPC2-Cholesterin Akzeptor) aufweist als die diglykosylierte Form (Cheruku et al. 2006). Dies ließe die Spekulation zu, dass eine Speicherung von Cholesterin durch eine glykosylierungs-bedingte geringere Donoraktivität von NPC2 gebundenem Cholesterin an NPC1 und dadurch bedingten verzögerten Export stattfindet.

## 4.4.4 Akkumulation von Autophagosomen im ZNS α-Mannosidase-defizienter Mäuse

Aus der Gruppe der NCL-Erkrankungen konnte erstmals in Cathepsin D-defizienten Mäusen eine erhöhte Anzahl von Autophagosomen im ZNS eines Tiermodells einer lysosomalen Speichererkrankung nachgewiesen werden (Cao et al. 2006). In jüngster Zeit folgten ähnliche Beschreibungen bei Mausmodellen anderer LSDs wie Mucopolysaccharidose IIIA, Pompe-Erkrankung, Mucolipidose IV, Niemann-Pick C und multiple Sulfatase-Defizienz, bei denen durch Western Blot Analyse des Autophagie-Markers LC3 und Elektronenmikroskopie eine teilweise stark erhöhte Menge von Autophagosomen nachgewiesen werden konnte (Fukuda et al. 2006; Liao et al. 2007; Settembre et al. 2008; Vergarajauregui et al. 2008). Zwei Mechanismen können zu einer solchen Akkumulation von Autophagosomen führen: Einerseits scheint es zumindest bei einigen LSDs zu einem veränderten Umsatz von Autophagosomen z.B. durch eine eingeschränkte Fusion der Autophagosomen mit Lysosomen und dem damit vermindertem Abbau der Autophagosomen zu kommen (Cao et al. 2006; Liao et al. 2007; Settembre et al. 2008). Bei anderen LSDs wird offenbar Autophagie vermehrt induziert (Liao et al. 2007; Vergarajauregui et al. 2008). Dies könnte beispielsweise durch einen Mangel an Stoffwechselmetaboliten bedingt sein, die normalerweise nach der Degradation in den Lysosomen wieder für die Synthese neuer Makromoleküle zur Verfügung stehen. Die Induktion von Autophagie würde demnach als kompensatorischer Mechanismus fungieren.

Auch im ZNS der α-Mannosidase-defizienten Tiere konnten im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant mehr Autophagosomen durch Immundetektion von LC3 beobachtet werden. Autophagie kann über Beclin1 als auch den Akt / mTOR-Weg induziert werden (Pacheco und Lieberman 2008). Western Blot Analysen für Beclin1, Akt und mTOR sowie ihre phosphorylierten Formen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und *knockout*-Tieren. Offensichtlich akkumulieren daher im ZNS der *knockout*-Mäuse Autophagosomen durch verminderten Abbau bzw. verminderte Fusion mit Lysosomen, statt durch erhöhte Induktion.

#### 4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte durch eine Transkriptomanalyse gezeigt werden, dass durch die NEO-NPT *knockout*-Kassette pleiotrope Effekte auf die Genexpression dem Man2B1-Gen benachbarter Gene ausgeübt werden. Das verwendete Mausmodell eignet sich somit nur sehr bedingt für die weitere Untersuchung der α-Mannosidose, da Effekte dieser Gene nicht auszuschließen sind. Die Generierung eines neuen Mausmodells ist somit unerlässlich für weitere Studien. Die Verwendung eines *Cre-Lox*-Systems würde dabei die Entfernung des Selektionsgens aus der genomischen Sequenz erlauben und regulatorische Einflüsse auf benachbarte Gene verhindern.

In 58 Wochen alten Tieren konnte eine Reihe von Genen identifiziert werden, deren Expression offenbar als sekundärer Effekt der lysosomalen Speicherung reguliert ist.

Die Expression dieser Gene sprach zwar deutlich auf die ERT an, es kam jedoch zu keiner vollständigen Korrektur des Transkriptoms. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Therapiedauer von zwei Wochen nicht ausreichend war. Die vollständige Defizienz der α-Mannosidase führt nach der Injektion des rekombinanten humanen LAMAN zu einer starken Immunantwort (Roces 2005) und verhindert somit eine länger als zwei Wochen andauernde Therapie mit Dosierungen, die ausreichend sind, um die Speicherung von N-Glykanen zu korrigieren. Die Generierung eines für immuntoleranten das humane LAMAN Mausmodells würde eine solche Immunantwort verhindern. Dazu müsste ein knockin-Mausmodell mit einem MAN2B1-Gen mit einer Mutation konstruiert werden, in dem zwar ein stabiles LAMAN-Protein exprimiert wird, das jedoch keine enzymatische Aktivität aufweist, beispielsweise durch Mutation einer Aminosäure im aktiven Zentrum. Das Einkreuzen dieses knockin-Mausstamms in ein neu generiertes α-Mannosidasedefizientes Mausmodell würde zwar in homozygoten Tieren keine lysosomale α-Mannosidase-Aktivität aufweisen, jedoch durch die Expression des inaktiven LAMAN immuntolerant gegenüber dem rekombinanten Enzym sein. Durch eine solche Strategie konnten bereits in Mausmodellen der MPS VII, MPS IVA sowie der metachromatischen Leukodystrophie eine Immuntoleranz gegenüber den jeweiligen rekombinanten Enzymen erreicht werden (Sly et al. 2001; Tomatsu et al. 2005; Matzner et al. 2007).

Durch die Untersuchung des ZNS der α-Mannosidase-defizienten Mäusen konnte eine Akkumulation von Cholesterin und Lipofuscin in aktivierten Mikrogliazellen in der Molekularschicht des Cerebellum beobachtet werden. Zudem konnte durch den Autophagie-Marker LC3 eine stark erhöhte Menge von Autophagosomen detektiert werden. Roces et al. konnten durch die Injektion sehr hoher Dosen (zwei Injektionen mit 250 mU/ g Körpergewicht) des rekombinanten LAMAN überraschenderweise eine Reduzierung der Speicherglykane im ZNS feststellen (Roces et al. 2004). Blanz et al. konnten erst bei Injektion von vier Injektionen mit 500 mU/ g Körpergewicht einen korrektiven Effekt in Teilen des ZNS erreichen. Im stark betroffenen Hippocampus konnte eine besonders effiziente Entspeicherung gezeigt werden (Blanz et al. 2008). Auch im α-Mannosidose-Meerschweinchen konnte ein Effekt der ERT auf das ZNS beobachtet werden (Crawley et al. 2006). Wenn ausreichende Mengen des rekombinanten Enzyms zur Verfügung stehen, könnte anhand des neuen immuntoleranten α-Mannosidase Mausmodells überprüft werden, ob auch die Aktivierung von Mikroglia, die Speicherung von Lipofuscin und Cholesterin sowie die Akkumulation von Autophagosomen durch die ERT reversibel ist.

Die Präsenz von Lipofuscin in Mikrogliazellen des ZNS der knockout-Mäuse lässt die Frage nach dessen molekularer Zusammensetzung aufkommen. Besonders die mögliche Speicherung von Glykoproteinen als Ursache des autofluoreszenten Materials, die als Konsequenz der verminderten Degradation der Glykane am abzubauenden Peptidanteil resultieren könnte, gilt es im Weiteren zu untersuchen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Speichermaterials der Mikroglia wurden bereits begonnen und könnten erste Hinweise auf dessen Zusammensetzung geben.

Schließlich müssen weitere Experimente klären, welche Konsequenzen die hier aufgezeigte Hyperglykosylierung verschiedener lysosomaler Proteine auf ihre Funktion haben. Der hohe Glykosylierungsgrad des NPC2-Proteins könnte eine mögliche Ursache für die Akkumulation von Cholesterin im Cerebellum der  $\alpha$ -Mannosidase-defizienten Tiere sein, aber auch ggf. die Speicherung von Cholesterin in anderen LSDs erklären.

Die Tatsache, dass bereits durch eine vergleichsweise kurze ERT-Behandlung von zwei Wochen die untersuchten sekundären Auswirkungen der lysosomalen Speicherung fast vollständig korrigiert werden konnten, macht die ERT zu einem vielversprechenden Therapie-Ansatz für  $\alpha$ -Mannosidose-Patienten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen somit eine baldige Einführung der ERT für die Therapie der  $\alpha$ -Mannosidose.

## 5 Zusammenfassung

Die Defizienz der lysosomalen α-Mannosidase führt zu der lysosomalen Speichererkrankung α-Mannosidose. Ein möglicher Therapieansatz zur Behandlung der Erkrankung bietet die Substitution des Enzyms durch die intravenöse Injektion rekombinanten Enzyms. Ziel der Arbeit war es, sekundäre Folgen der lysosomalen Speicherung und den Effekt der Therapie auf diese Veränderungen zu untersuchen.

Anhand eines bereits etablierten *knockout*-Mausmodells der α-Mannosidose sollte mittels Microarray-Genexpressionsanalyse das Transkriptomprofil der Leber von *knockout* und Wildtyp-Mäusen, sowie mit rekombinantem Enzym behandelter *knockout*-Mäuse verglichen werden, um sekundäre Folgen der lysosomalen Speicherung und deren mögliche Therapierbarkeit durch das rekombinante Enzym abschätzen zu können. In 58 Wochen alten Tieren konnte die erhöhte Expression einer Reihe von Genen gezeigt werden, deren Expression auf Kupfferzellen beschränkt ist. Immunohistologisch konnte eine veränderte Morphologie der Kupfferzellen in der Leber nachgewiesen werden, die nach der Therapie wieder auf Wildtyp-Niveau normalisiert wurde. Weiterhin konnte durch die Transkriptomanalyse ein regulatorischer Effekt auf die Expression von Genen detektiert werden, die dem *knockout*-Gen Man2B1 auf Chromosom 8 benachbart sind.

Biochemische Untersuchungen zeigten, neben einer erhöhten spezifischen Aktivität, eine Hyperglykosylierung einiger lysosomaler Proteine. Während die spezifische Aktivität vollständig durch die Therapie normalisiert wurde, ließ sich für die Hyperglykosylierung im Rahmen der Therapiedauer eine partielle Korrektur feststellen.

Die Untersuchung des Gehirns älterer α-Mannosidase-defizienter Tiere offenbarte in der Molekularschicht des Cerebellum die Akkumulation von Cholesterin, eine Aktivierung von Mikrogliazellen, hypertrophen Bergmann-Glia und Lücken in der Purkinjezellschicht. Zudem konnte Lipofuscin in Mikroglia nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen neue sekundäre, durch die lysosomale Speicherung bedingte Veränderungen in der Leber auf, die durch die Enzym-Therapie teilweise therapierbar sind. Weitere Untersuchungen über pathogene Veränderungen im Gehirn könnten unter anderem Aufschluss über Zusammensetzung des autofluoreszenten Materials liefern.

## 6 Literatur

- al Daher, S., R. de Gasperi, et al. (1991). "The substrate-specificity of human lysosomal alpha-D-mannosidase in relation to genetic alpha-mannosidosis." <u>Biochem J</u> **277 (Pt 3)**: 743-51.
- Allavena, P., M. Chieppa, et al. (2004). "From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor." <u>Crit Rev Immunol</u> **24**(3): 179-92.
- Aronson, N. N., Jr. and M. J. Kuranda (1989). "Lysosomal degradation of Asn-linked glycoproteins." <u>Faseb J</u> **3**(14): 2615-22.
- Auclair, D. and J. J. Hopwood (2007). "Morphopathological features in tissues of alpha-mannosidosis guinea pigs at different gestational ages." <u>Neuropathol Appl Neurobiol</u> **33**(5): 572-85.
- Austyn, J. M. and S. Gordon (1981). "F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage." <u>Eur J Immunol</u> **11**(10): 805-15.
- Balducci, C., L. Bibi, et al. (2008). "Molecular cloning and structural organization of the gene encoding the mouse lysosomal di-N-acetylchitobiase (ctbs)." <u>Gene</u> **416**(1-2): 85-91.
- Banerjee, A., J. Burg, et al. (1984). "Enzyme-linked immunosorbent assay for the ganglioside GM2-activator protein. Screening of normal human tissues and body fluids, of tissues of GM2 gangliosidosis, and for its subcellular localization." <u>Hoppe Seylers Z Physiol Chem</u> **365**(3): 347-56.
- Barrett, A. J. (1980). "Fluorimetric assays for cathepsin B and cathepsin H with methylcoumarylamide substrates." <u>Biochem J</u> **187**(3): 909-12.
- Baudry, M., Y. Yao, et al. (2003). "Postnatal development of inflammation in a murine model of Niemann-Pick type C disease: immunohistochemical observations of microglia and astroglia." <u>Exp Neurol</u> **184**(2): 887-903.
- Beccari, T., M. G. Appolloni, et al. (1997). "Lysosomal alpha-mannosidases of mouse tissues: characteristics of the isoenzymes, and cloning and expression of a full-length cDNA." <u>Biochem J</u> **327 ( Pt 1)**: 45-9.
- Beck, M., R. Ricci, et al. (2004). "Fabry disease: overall effects of agalsidase alfa treatment." <u>Eur J Clin Invest</u> **34**(12): 838-44.
- Begley, D. J., C. C. Pontikis, et al. (2008). "Lysosomal storage diseases and the blood-brain barrier." <u>Curr Pharm Des</u> **14**(16): 1566-80.
- Bellamy, T. C. (2006). "Interactions between Purkinje neurones and Bergmann glia." <u>Cerebellum</u> **5**(2): 116-26.

- Berg, T., B. King, et al. (2001). "Purification and characterization of recombinant human lysosomal alpha-mannosidase." <u>Mol Genet Metab</u> **73**(1): 18-29.
- Berg, T., H. M. Riise, et al. (1999). "Spectrum of mutations in alpha-mannosidosis." <u>Am J Hum Genet</u> **64**(1): 77-88.
- Bijvoet, A. G., H. Van Hirtum, et al. (1999). "Human acid alpha-glucosidase from rabbit milk has therapeutic effect in mice with glycogen storage disease type II." <u>Hum Mol Genet</u> **8**(12): 2145-53.
- Blanz, J., S. Stroobants, et al. (2008). "Reversal of peripheral and central neural storage and ataxia after recombinant enzyme replacement therapy in alphamannosidosis mice." <u>Hum Mol Genet</u> **17**(22): 3437-45.
- Borland, N. A., I. V. Jerrett, et al. (1984). "Mannosidosis in aborted and stillborn Galloway calves." <u>Vet Rec</u> **114**(16): 403-4.
- Brooks, A. I., S. Chattopadhyay, et al. (2003). "Functional categorization of gene expression changes in the cerebellum of a Cln3-knockout mouse model for Batten disease." <u>Mol Genet Metab</u> **78**(1): 17-30.
- Brooks, D. A. (1999). "Immune response to enzyme replacement therapy in lysosomal storage disorder patients and animal models." <u>Mol Genet Metab</u> **68**(2): 268-75.
- Burditt, L. J., K. Chotai, et al. (1980). "Biochemical studies on a case of feline mannosidosis." <u>Biochem J</u> **189**(3): 467-73.
- Caeyenberghs, K., D. Balschun, et al. (2006). "Multivariate neurocognitive and emotional profile of a mannosidosis murine model for therapy assessment." <u>Neurobiol Dis</u> **23**(2): 422-32.
- Canuel, M., A. Korkidakis, et al. (2008). "Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **373**(2): 292-7.
- Cao, Y., J. A. Espinola, et al. (2006). "Autophagy is disrupted in a knock-in mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis." <u>J Biol Chem</u> 281(29): 20483-93.
- Carlsson, S. R. and M. Fukuda (1989). "Structure of human lysosomal membrane glycoprotein 1. Assignment of disulfide bonds and visualization of its domain arrangement." J Biol Chem **264**(34): 20526-31.
- Castaneda, J. A., M. J. Lim, et al. (2008). "Immune system irregularities in lysosomal storage disorders." <u>Acta Neuropathol</u> **115**(2): 159-74.
- Castelnovo, G., T. Levade, et al. (2007). "[Adult leukoencephalopathy caused by alpha-mannosidosis deficiency]." <u>Rev Neurol (Paris)</u> **163**(3): 359-61.

- Champion, M. J. and T. B. Shows (1977). "Mannosidosis: assignment of the lysosomal alpha-mannosidase B gene to chromosome 19 in man." <u>Proc Natl</u> <u>Acad Sci U S A</u> **74**(7): 2968-72.
- Chang, M., J. D. Cooper, et al. (2008). "Intraventricular enzyme replacement improves disease phenotypes in a mouse model of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis." <u>Mol Ther</u> **16**(4): 649-56.
- Cheruku, S. R., Z. Xu, et al. (2006). "Mechanism of cholesterol transfer from the Niemann-Pick type C2 protein to model membranes supports a role in lysosomal cholesterol transport." J Biol Chem **281**(42): 31594-604.
- Cho, S. K., N. Gao, et al. (2005). "Characterization of lipid-linked oligosaccharide accumulation in mouse models of Batten disease." <u>Glycobiology</u> **15**(6): 637-48.
- Corcelle, E., N. Djerbi, et al. (2007). "Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: lessons from environmental carcinogens." <u>Autophagy</u> **3**(1): 57-9.
- Cramer, C. L., D. L. Weissenborn, et al. (1996). "Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco." <u>Ann N Y Acad Sci</u> **792**: 62-71.
- Crawley, A. C., M. Z. Jones, et al. (1999). "Alpha-mannosidosis in the guinea pig: a new animal model for lysosomal storage disorders." <u>Pediatr Res</u> **46**(5): 501-9.
- Crawley, A. C., B. King, et al. (2006). "Enzyme replacement therapy in alphamannosidosis guinea-pigs." Mol Genet Metab **89**(1-2): 48-57.
- Crawley, A. C. and S. U. Walkley (2007). "Developmental analysis of CNS pathology in the lysosomal storage disease alpha-mannosidosis." <u>J Neuropathol Exp</u> <u>Neurol</u> **66**(8): 687-97.
- D'Azzo, A., A. Hoogeveen, et al. (1982). "Molecular defect in combined betagalactosidase and neuraminidase deficiency in man." <u>Proc Natl Acad Sci U S</u> <u>A</u> **79**(15): 4535-9.
- D'Hooge, R., R. Lullmann-Rauch, et al. (2005). "Neurocognitive and psychotiform behavioral alterations and enhanced hippocampal long-term potentiation in transgenic mice displaying neuropathological features of human alphamannosidosis." <u>J Neurosci</u> 25(28): 6539-49.
- Danon, M. J., S. J. Oh, et al. (1981). "Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase." <u>Neurology</u> **31**(1): 51-7.

- De Duve, C., B. C. Pressman, et al. (1955). "Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue." <u>Biochem J</u> **60**(4): 604-17.
- De Grassi, A., C. Lanave, et al. (2008). "Genome duplication and gene-family evolution: the case of three OXPHOS gene families." <u>Gene</u> **421**(1-2): 1-6.
- DeJarnette, J. B., C. L. Sommers, et al. (1998). "Specific requirement for CD3epsilon in T cell development." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **95**(25): 14909-14.
- Desnick, R. J., K. J. Dean, et al. (1980). "Enzyme therapy XVII: metabolic and immunologic evaluation of alpha- galactosidase A replacement in Fabry disease." <u>Birth Defects Orig Artic Ser</u> 16(1): 393-413.
- Desnick, R. J., H. L. Sharp, et al. (1976). "Mannosidosis: clinical, morphologic, immunologic, and biochemical studies." <u>Pediatr Res</u> **10**(12): 985-96.
- Dickson, P., M. McEntee, et al. (2007). "Intrathecal enzyme replacement therapy: successful treatment of brain disease via the cerebrospinal fluid." <u>Mol Genet</u> <u>Metab</u> **91**(1): 61-8.
- Dickson, P., M. Peinovich, et al. (2008). "Immune tolerance improves the efficacy of enzyme replacement therapy in canine mucopolysaccharidosis I." J Clin Invest **118**(8): 2868-76.
- Diesselhoff-den Dulk, M. M., R. W. Crofton, et al. (1979). "Origin and kinetics of Kupffer cells during an acute inflammatory response." Immunology **37**(1): 7-14.
- Du, H., T. L. Cameron, et al. (2008). "Wolman disease/cholesteryl ester storage disease: efficacy of plant-produced human lysosomal acid lipase in mice." J <u>Lipid Res</u> 49(8): 1646-57.
- Eng, L. F. and R. S. Ghirnikar (1994). "GFAP and astrogliosis." <u>Brain Pathol</u> **4**(3): 229-37.
- Eskelinen, E. L., C. K. Schmidt, et al. (2004). "Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts." <u>Mol Biol</u> <u>Cell</u> **15**(7): 3132-45.
- Eskelinen, E. L., Y. Tanaka, et al. (2003). "At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins." <u>Trends Cell Biol</u> **13**(3): 137-45.
- Evers, M., P. Saftig, et al. (1996). "Targeted disruption of the arylsulfatase B gene results in mice resembling the phenotype of mucopolysaccharidosis VI." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> **93**(16): 8214-9.
- Faid, V., G. Evjen, et al. (2006). "Site-specific glycosylation analysis of the bovine lysosomal alpha-mannosidase." <u>Glycobiology</u> **16**(5): 440-61.

- Fellenberg, K., N. C. Hauser, et al. (2001). "Correspondence analysis applied to microarray data." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10781-6.
- Fiering, S., E. Epner, et al. (1995). "Targeted deletion of 5'HS2 of the murine betaglobin LCR reveals that it is not essential for proper regulation of the betaglobin locus." <u>Genes Dev</u> **9**(18): 2203-13.
- Fukuda, T., A. Roberts, et al. (2006). "Autophagy and lysosomes in Pompe disease." <u>Autophagy</u> **2**(4): 318-20.
- Futerman, A. H. and G. van Meer (2004). "The cell biology of lysosomal storage disorders." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **5**(7): 554-65.
- Futter, C. E., A. Pearse, et al. (1996). "Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes." <u>J Cell Biol</u> **132**(6): 1011-23.
- Geyer, G. and H. Bornig (1975). "["Filipin"--a histochemical fluorochrome for cholesterol]." <u>Acta Histochem Suppl</u> **15**: 207-12.
- Gieselmann, V., S. Franken, et al. (2003). "Metachromatic leukodystrophy: consequences of sulphatide accumulation." <u>Acta Paediatr Suppl</u> **92**(443): 74-9; discussion 45.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1975). "Lipoprotein receptors, cholesterol metabolism, and atherosclerosis." <u>Arch Pathol</u> **99**(4): 181-4.
- Gotoda, Y., N. Wakamatsu, et al. (1998). "Missense and nonsense mutations in the lysosomal alpha-mannosidase gene (MANB) in severe and mild forms of alpha-mannosidosis." <u>Am J Hum Genet</u> **63**(4): 1015-24.
- Grabb, P. A., A. L. Albright, et al. (1995). "Multiple suture synostosis, macrocephaly, and intracranial hypertension in a child with alpha-D-mannosidase deficiency. Case report." <u>J Neurosurg</u> **82**(4): 647-9.
- Grabowski, G. A., N. Leslie, et al. (1998). "Enzyme therapy for Gaucher disease: the first 5 years." <u>Blood Rev</u> **12**(2): 115-33.
- Griffiths, G. and K. Simons (1986). "The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex." <u>Science</u> **234**(4775): 438-43.
- Gullingsrud, E. O., W. Krivit, et al. (1998). "Ocular abnormalities in the mucopolysaccharidoses after bone marrow transplantation. Longer follow-up." <u>Ophthalmology</u> **105**(6): 1099-105.
- Hall, N. A., B. D. Lake, et al. (1991). "Lysosomal storage of subunit c of mitochondrial ATP synthase in Batten's disease (ceroid-lipofuscinosis)." <u>Biochem J</u> 275 ( Pt 1): 269-72.

- Hall, N. A. and A. D. Patrick (1988). "Accumulation of dolichol-linked oligosaccharides in ceroid-lipofuscinosis (Batten disease)." <u>Am J Med Genet</u> <u>Suppl</u> 5: 221-32.
- Hansen, G., T. Berg, et al. (2004). "Intracellular transport of human lysosomal alphamannosidase and alpha-mannosidosis-related mutants." <u>Biochem J</u> **381**(Pt 2): 537-46.
- Hara, T., K. Nakamura, et al. (2006). "Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice." <u>Nature</u> **441**(7095): 885-9.
- Harmatz, P., D. Ketteridge, et al. (2005). "Direct comparison of measures of endurance, mobility, and joint function during enzyme-replacement therapy of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): results after 48 weeks in a phase 2 open-label clinical study of recombinant human Nacetylgalactosamine 4-sulfatase." <u>Pediatrics</u> 115(6): e681-9.
- Hayashi, H., S. Niinobe, et al. (1981). "Effects of Triton WR-1339 on lipoprotein lipolytic activity and lipid content of rat liver lysosomes." <u>J Biochem</u> 89(2): 573-9.
- Hayashi, H., M. Shitara, et al. (1982). "The origin of lipid accumulated in liver lysosomes after administration of triton WR-1339." <u>J Biochem</u> **92**(5): 1585-90.
- Heikinheimo, P., R. Helland, et al. (2003). "The structure of bovine lysosomal alphamannosidase suggests a novel mechanism for low-pH activation." <u>J Mol Biol</u> **327**(3): 631-44.
- Hess, B., P. Saftig, et al. (1996). "Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy." <u>Proc Natl Acad Sci U S</u> <u>A</u> 93(25): 14821-6.
- Higashi, Y., S. Murayama, et al. (1993). "Cerebellar degeneration in the Niemann-Pick type C mouse." <u>Acta Neuropathol</u> **85**(2): 175-84.
- Hiraiwa, M. (1999). "Cathepsin A/protective protein: an unusual lysosomal multifunctional protein." <u>Cell Mol Life Sci</u> **56**(11-12): 894-907.
- Hobbs, J. R. (1981). "Bone marrow transplantation for inborn errors." <u>Lancet</u> **2**(8249): 735-9.
- Hocking, J. D., R. D. Jolly, et al. (1972). "Deficiency of alpha-mannosidase in Angus cattle. An inherited lysosomal storage disease." <u>Biochem J</u> **128**(1): 69-78.
- Hoflack, B., K. Fujimoto, et al. (1987). "The interaction of phosphorylated oligosaccharides and lysosomal enzymes with bovine liver cation-dependent mannose 6-phosphate receptor." J Biol Chem **262**(1): 123-9.

- Hoflack, B. and S. Kornfeld (1985). "Purification and characterization of a cationdependent mannose 6-phosphate receptor from murine P388D1 macrophages and bovine liver." J Biol Chem **260**(22): 12008-14.
- Hopwood, J. J., S. Bunge, et al. (1993). "Molecular basis of mucopolysaccharidosis type II: mutations in the iduronate-2-sulphatase gene." <u>Hum Mutat</u> **2**(6): 435-42.
- Hua, C. T., J. J. Hopwood, et al. (1998). "Evaluation of the lysosome-associated membrane protein LAMP-2 as a marker for lysosomal storage disorders." <u>Clin</u> <u>Chem</u> 44(10): 2094-102.
- Hume, D. A. (2006). "The mononuclear phagocyte system." <u>Curr Opin Immunol</u> **18**(1): 49-53.
- Huynh, K. K., E. L. Eskelinen, et al. (2007). "LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes." <u>Embo J</u> **26**(2): 313-24.
- Infante, R. E., A. Radhakrishnan, et al. (2008). "Purified NPC1 protein: II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop." J Biol Chem **283**(2): 1064-75.
- Infante, R. E., M. L. Wang, et al. (2008). "NPC2 facilitates bidirectional transfer of cholesterol between NPC1 and lipid bilayers, a step in cholesterol egress from lysosomes." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **105**(40): 15287-92.
- Ivy, G. O. (1992). "Protease inhibitors as a model for NCL disease, with special emphasis on the infantile and adult forms." <u>Am J Med Genet</u> 42(4): 555-60.
- Jalanko, A. and T. Braulke (2008). "Neuronal ceroid lipofuscinoses." <u>Biochim Biophys</u> <u>Acta</u>.
- Jalanko, A., K. Tenhunen, et al. (1998). "Mice with an aspartylglucosaminuria mutation similar to humans replicate the pathophysiology in patients." <u>Hum</u> <u>Mol Genet</u> **7**(2): 265-72.
- Jeyakumar, M., R. A. Dwek, et al. (2005). "Storage solutions: treating lysosomal disorders of the brain." <u>Nat Rev Neurosci</u> **6**(9): 713-25.
- Jeyakumar, M., R. Thomas, et al. (2003). "Central nervous system inflammation is a hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis." <u>Brain</u> **126**(Pt 4): 974-87.
- Jolly, R. D., D. N. Palmer, et al. (2002). "The analytical approach to the nature of lipofuscin (age pigment)." <u>Arch Gerontol Geriatr</u> **34**(3): 205-17.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, et al. (2000). "LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing." <u>Embo J</u> **19**(21): 5720-8.

- Kapushesky, M., P. Kemmeren, et al. (2004). "Expression Profiler: next generation--an online platform for analysis of microarray data." <u>Nucleic Acids Res</u> 32(Web Server issue): W465-70.
- Karageorgos, L., D. A. Brooks, et al. (2007). "Mutational analysis of mucopolysaccharidosis type VI patients undergoing a phase II trial of enzyme replacement therapy." <u>Mol Genet Metab</u> **90**(2): 164-70.
- Kennedy, D. W. and J. L. Abkowitz (1998). "Mature monocytic cells enter tissues and engraft." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **95**(25): 14944-9.
- Kielian, M. C., R. M. Steinman, et al. (1982). "Intralysosomal accumulation of polyanions. I. Fusion of pinocytic and phagocytic vacuoles with secondary lysosomes." <u>J Cell Biol</u> **93**(3): 866-74.
- Kihara, A., Y. Kabeya, et al. (2001). "Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network." <u>EMBO Rep</u> **2**(4): 330-5.
- Kishimoto, Y., M. Hiraiwa, et al. (1992). "Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics." J Lipid Res **33**(9): 1255-67.
- Klionsky, D. J., H. Abeliovich, et al. (2008). "Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes." <u>Autophagy</u> **4**(2): 151-75.
- Klionsky, D. J. and S. D. Emr (2000). "Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation." <u>Science</u> **290**(5497): 1717-21.
- Komatsu, M., T. Ueno, et al. (2007). "Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons." <u>Cell Death Differ</u> **14**(5): 887-94.
- Komatsu, M., S. Waguri, et al. (2006). "Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice." <u>Nature</u> **441**(7095): 880-4.
- Komatsu, M., S. Waguri, et al. (2005). "Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice." <u>J Cell Biol</u> **169**(3): 425-34.
- Kominami, E., J. Ezaki, et al. (1992). "Specific storage of subunit c of mitochondrial ATP synthase in lysosomes of neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten's disease)." J Biochem **111**(2): 278-82.
- Kominami, E., T. Tsukahara, et al. (1987). "Autodegradation of lysosomal cysteine proteinases." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **144**(2): 749-56.
- Kornfeld, K., M. L. Reitman, et al. (1981). "The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins. Fucose is an important determinant." J Biol Chem **256**(13): 6633-40.
- Kornfeld, R. and S. Kornfeld (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." <u>Annu Rev Biochem</u> **54**: 631-64.

- Ladeby, R., M. Wirenfeldt, et al. (2005). "Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system." <u>Brain Res Brain Res Rev</u> **48**(2): 196-206.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." <u>Nature</u> **227**(5259): 680-5.
- Leighton, F., B. Poole, et al. (1968). "The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria, and lysosomes from the livers of rats injected with triton WR-1339. Improved isolation procedures, automated analysis, biochemical and morphological properties of fractions." <u>J Cell Biol</u> **37**(2): 482-513.
- Lemansky, P., V. Gieselmann, et al. (1984). "Cathepsin D and beta-hexosaminidase synthesized in the presence of 1-deoxynojirimycin accumulate in the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **259**(16): 10129-35.
- Lercher, M. J., A. O. Urrutia, et al. (2002). "Clustering of housekeeping genes provides a unified model of gene order in the human genome." <u>Nat Genet</u> **31**(2): 180-3.
- Levings, P. P. and J. Bungert (2002). "The human beta-globin locus control region." <u>Eur J Biochem</u> **269**(6): 1589-99.
- Li, H. H., W. H. Yu, et al. (1999). "Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding alpha-N-acetylglucosaminidase." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(25): 14505-10.
- Liao, G., Y. Yao, et al. (2007). "Cholesterol accumulation is associated with lysosomal dysfunction and autophagic stress in Npc1 -/- mouse brain." <u>Am J</u> <u>Pathol</u> **171**(3): 962-75.
- Liao, Y. F., A. Lal, et al. (1996). "Cloning, expression, purification, and characterization of the human broad specificity lysosomal acid alphamannosidase." J Biol Chem **271**(45): 28348-58.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-75.
- Lubke, T., P. Lobel, et al. (2008). "Proteomics of the lysosome." <u>Biochim Biophys</u> <u>Acta</u>.
- Macauley, S. L., D. F. Wozniak, et al. (2009). "Cerebellar pathology and motor deficits in the palmitoyl protein thioesterase 1-deficient mouse." <u>Exp Neurol</u> **217**(1): 124-35.
- Mach, L., J. S. Mort, et al. (1994). "Maturation of human procathepsin B. Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes." <u>J Biol Chem</u> 269(17): 13030-5.

- Maiuri, M. C., E. Zalckvar, et al. (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **8**(9): 741-52.
- Malm, D., D. S. Halvorsen, et al. (2000). "Immunodeficiency in alpha-mannosidosis: a matched case-control study on immunoglobulins, complement factors, receptor density, phagocytosis and intracellular killing in leucocytes." <u>Eur J</u> <u>Pediatr</u> **159**(9): 699-703.
- Malm, D. and O. Nilssen (2008). "Alpha-mannosidosis." Orphanet J Rare Dis 3: 21.
- Malm, D., J. Pantel, et al. (2005). "Psychiatric symptoms in alpha-mannosidosis." J Intellect Disabil Res **49**(Pt 11): 865-71.
- Martiniuk, F., A. Chen, et al. (2000). "Correction of glycogen storage disease type II by enzyme replacement with a recombinant human acid maltase produced by over-expression in a CHO-DHFR(neg) cell line." <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> 276(3): 917-23.
- Marzella, L., J. Ahlberg, et al. (1981). "Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation." <u>Virchows Arch B Cell</u> <u>Pathol Incl Mol Pathol</u> **36**(2-3): 219-34.
- Masson, C., I. Cisse, et al. (2004). "Fabry disease: a review." <u>Joint Bone Spine</u> **71**(5): 381-3.
- Matzner, U., E. Herbst, et al. (2005). "Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy." <u>Hum Mol Genet</u> **14**(9): 1139-52.
- Matzner, U., F. Matthes, et al. (2007). "Induction of tolerance to human arylsulfatase A in a mouse model of metachromatic leukodystrophy." <u>Mol Med</u> **13**(9-10): 471-9.
- McGlynn, R., K. Dobrenis, et al. (2004). "Differential subcellular localization of cholesterol, gangliosides, and glycosaminoglycans in murine models of mucopolysaccharide storage disorders." <u>J Comp Neurol</u> 480(4): 415-26.
- McGreal, E. P., M. Rosas, et al. (2006). "The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose." <u>Glycobiology</u> **16**(5): 422-30.
- Meikle, P. J., D. A. Brooks, et al. (1997). "Diagnosis of lysosomal storage disorders: evaluation of lysosome-associated membrane protein LAMP-1 as a diagnostic marker." <u>Clin Chem</u> 43(8 Pt 1): 1325-35.
- Meikle, P. J., J. J. Hopwood, et al. (1999). "Prevalence of lysosomal storage disorders." Jama 281(3): 249-54.
- Michalak, P. (2008). "Coexpression, coregulation, and cofunctionality of neighboring genes in eukaryotic genomes." <u>Genomics</u> **91**(3): 243-8.

- Michalski, J. C. and A. Klein (1999). "Glycoprotein lysosomal storage disorders: alpha- and beta-mannosidosis, fucosidosis and alpha-Nacetylgalactosaminidase deficiency." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1455**(2-3): 69-84.
- Micsenyi, M. C., K. Dobrenis, et al. (2009). "Neuropathology of the Mcoln1(-/-) knockout mouse model of mucolipidosis type IV." <u>J Neuropathol Exp Neurol</u> **68**(2): 125-35.
- Mizukami, H., Y. Mi, et al. (2002). "Systemic inflammation in glucocerebrosidasedeficient mice with minimal glucosylceramide storage." <u>J Clin Invest</u> **109**(9): 1215-21.
- Moore, S. E. (1999). "Oligosaccharide transport: pumping waste from the ER into lysosomes." <u>Trends Cell Biol</u> **9**(11): 441-6.
- Muenzer, J., J. E. Wraith, et al. (2006). "A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome)." <u>Genet Med</u> **8**(8): 465-73.
- Mukherjee, S. and F. R. Maxfield (2004). "Lipid and cholesterol trafficking in NPC." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1685**(1-3): 28-37.
- Munoz-Rojas, M. V., T. Vieira, et al. (2008). "Intrathecal enzyme replacement therapy in a patient with mucopolysaccharidosis type I and symptomatic spinal cord compression." <u>Am J Med Genet A</u> **146A**(19): 2538-44.
- Myerowitz, R., D. Lawson, et al. (2002). "Molecular pathophysiology in Tay-Sachs and Sandhoff diseases as revealed by gene expression profiling." <u>Hum Mol</u> <u>Genet</u> **11**(11): 1343-50.
- Naito, M., G. Hasegawa, et al. (2004). "Differentiation and function of Kupffer cells." <u>Med Electron Microsc</u> **37**(1): 16-28.
- Nebes, V. L. and M. C. Schmidt (1994). "Human lysosomal alpha-mannosidase: isolation and nucleotide sequence of the full-length cDNA." <u>Biochem Biophys</u> <u>Res Commun</u> **200**(1): 239-45.
- Niehrs, C. and N. Pollet (1999). "Synexpression groups in eukaryotes." <u>Nature</u> **402**(6761): 483-7.
- Nilssen, O., T. Berg, et al. (1997). "alpha-Mannosidosis: functional cloning of the lysosomal alpha-mannosidase cDNA and identification of a mutation in two affected siblings." <u>Hum Mol Genet</u> **6**(5): 717-26.
- Nishimura, Y., T. Kawabata, et al. (1988). "Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro." <u>Arch Biochem Biophys</u> **261**(1): 64-71.

- Ohmi, K., D. S. Greenberg, et al. (2003). "Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **100**(4): 1902-7.
- Olson, E. N., H. H. Arnold, et al. (1996). "Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene MRF4." <u>Cell</u> **85**(1): 1-4.
- Ong, W. Y., R. K. Sundaram, et al. (2004). "Neuronal localization and association of Niemann Pick C2 protein (HE1/NPC2) with the postsynaptic density." <u>Neuroscience</u> **128**(3): 561-70.
- Pacheco, C. D. and A. P. Lieberman (2008). "The pathogenesis of Niemann-Pick type C disease: a role for autophagy?" <u>Expert Rev Mol Med</u> **10**: e26.
- Pal, C. and L. D. Hurst (2004). "Evidence against the selfish operon theory." <u>Trends</u> <u>Genet</u> **20**(6): 232-4.
- Perkins, D. N., D. J. Pappin, et al. (1999). "Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data." <u>Electrophoresis</u> **20**(18): 3551-67.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in realtime RT-PCR." <u>Nucleic Acids Res</u> **29**(9): e45.
- Pham, C. T., D. M. Maclvor, et al. (1996). "Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **93**(23): 13090-5.
- Phaneuf, D., N. Wakamatsu, et al. (1996). "Dramatically different phenotypes in mouse models of human Tay-Sachs and Sandhoff diseases." <u>Hum Mol Genet</u> 5(1): 1-14.
- Pohlmann, R., M. W. Boeker, et al. (1995). "The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins." <u>J Biol Chem</u> **270**(45): 27311-8.
- Pohlmann, R., A. Waheed, et al. (1982). "Synthesis of phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes is located in the cis part of Golgi apparatus." J Biol Chem **257**(10): 5323-5.
- Poll, L. W., S. vom Dahl, et al. (2001). "[Gaucher disease: MR evaluation of bone marrow features during treatment with enzyme replacement]." <u>Rofo</u> 173(10): 931-7.
- Ponder, K. P. (2008). "Immune response hinders therapy for lysosomal storage diseases." J Clin Invest **118**(8): 2686-9.
- Potratz, A., S. Huttler, et al. (2000). "Quantification of mRNAs encoding proteins of the glycosphingolipid catabolism in mouse models of GM2 gangliosidoses and sphingolipid activator protein precursor (prosaposin) deficiency." <u>Biochim</u> <u>Biophys Acta</u> **1502**(3): 391-7.

- Reczek, D., M. Schwake, et al. (2007). "LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase." <u>Cell</u> **131**(4): 770-83.
- Reitman, M. L., A. Varki, et al. (1981). "Fibroblasts from patients with I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy are deficient in uridine 5'-diphosphate-Nacetylglucosamine: glycoprotein N-acetylglucosaminylphosphotransferase activity." J Clin Invest 67(5): 1574-9.
- Ren, S. Y., P. O. Angrand, et al. (2002). "Targeted insertion results in a rhombomere 2-specific Hoxa2 knockdown and ectopic activation of Hoxa1 expression." <u>Dev</u> <u>Dyn</u> **225**(3): 305-15.
- Riise, H. M., T. Berg, et al. (1997). "Genomic structure of the human lysosomal alpha-mannosidase gene (MANB)." <u>Genomics</u> **42**(2): 200-7.
- Robinson, A. J., A. C. Crawley, et al. (2008). "Behavioural characterisation of the alpha-mannosidosis guinea pig." <u>Behav Brain Res</u> **186**(2): 176-84.
- Roces (2005). Efficacy of enzyme replacement therapy in α-mannosidosis mice. <u>Biochemistry 2</u>. Göttingen, University Göttingen.
- Roces, D. P., R. Lullmann-Rauch, et al. (2004). "Efficacy of enzyme replacement therapy in alpha-mannosidosis mice: a preclinical animal study." <u>Hum Mol</u> <u>Genet</u> **13**(18): 1979-88.
- Rowan, A. D., P. Mason, et al. (1992). "Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form in vitro." J Biol Chem **267**(22): 15993-9.
- Ryan, R. E., B. F. Sloane, et al. (1995). "Microglial cathepsin B: an immunological examination of cellular and secreted species." <u>J Neurochem</u> **65**(3): 1035-45.
- Saftig, P., D. Hartmann, et al. (1997). "Mice deficient in lysosomal acid phosphatase develop lysosomal storage in the kidney and central nervous system." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **272**(30): 18628-35.
- Saint-Pol, A., P. Codogno, et al. (1999). "Cytosol-to-lysosome transport of free polymannose-type oligosaccharides. Kinetic and specificity studies using rat liver lysosomes." J Biol Chem 274(19): 13547-55.
- Sandhoff, K., K. Harzer, et al. (1971). "Enzyme alterations and lipid storage in three variants of Tay-Sachs disease." <u>J Neurochem</u> **18**(12): 2469-89.
- Sands, M. S., C. Vogler, et al. (1994). "Enzyme replacement therapy for murine mucopolysaccharidosis type VII." J Clin Invest **93**(6): 2324-31.
- Sardon, O., C. Garcia Pardos, et al. (2005). "[Outcome of two patients with Hurler's syndrome under enzyme replacement therapy with human recombinant alpha-L-iduronidase]." <u>An Pediatr (Barc)</u> **63**(1): 61-7.

- Sato, K., X. L. Yang, et al. (2006). "Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses." J Biol Chem 281(50): 38854-66.
- Schiffmann, R., J. B. Kopp, et al. (2001). "Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial." Jama **285**(21): 2743-9.
- Schmid, J. A., L. Mach, et al. (1999). "Accumulation of sialic acid in endocytic compartments interferes with the formation of mature lysosomes. Impaired proteolytic processing of cathepsin B in fibroblasts of patients with lysosomal sialic acid storage disease." J Biol Chem 274(27): 19063-71.
- Schnell, S. A., W. A. Staines, et al. (1999). "Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue." <u>J Histochem Cytochem</u> 47(6): 719-30.
- Schroeder, A., O. Mueller, et al. (2006). "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements." <u>BMC Mol Biol</u> **7**: 3.
- Seidl, U., F. L. Giesel, et al. (2005). "[Unusual course of alpha-mannosidosis with symptoms of paranoid-hallucinatory psychosis]." <u>Nervenarzt</u> **76**(3): 335-8.
- Settembre, C., I. Annunziata, et al. (2007). "Systemic inflammation and neurodegeneration in a mouse model of multiple sulfatase deficiency." <u>Proc</u> <u>Natl Acad Sci U S A</u> **104**(11): 4506-11.
- Settembre, C., A. Fraldi, et al. (2008). "Lysosomal storage diseases as disorders of autophagy." <u>Autophagy</u> **4**(1): 113-4.
- Sewell, A. C. (1980). "Urinary oligosaccharide excretion in disorders of glycolipid, glycoprotein and glycogen metabolism. A review of screening for differential diagnosis." <u>Eur J Pediatr</u> **134**(3): 183-94.
- Shaaltiel, Y., D. Bartfeld, et al. (2007). "Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system." <u>Plant Biotechnol J</u> **5**(5): 579-90.
- Shapiro, A. L., E. Vinuela, et al. (1967). "Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels." <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> 28(5): 815-20.
- Simson, J. V. and S. S. Spicer (1973). "Activities of specific cell constituents in phagocytosis (endocytosis)." Int Rev Exp Pathol **12**: 79-118.
- Singer, G. A., A. T. Lloyd, et al. (2005). "Clusters of co-expressed genes in mammalian genomes are conserved by natural selection." Mol Biol Evol **22**(3): 767-75.
- Sleat, D. E., J. A. Wiseman, et al. (2004). "A mouse model of classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis based on targeted disruption of the CLN2 gene

results in a loss of tripeptidyl-peptidase I activity and progressive neurodegeneration." <u>J Neurosci</u> **24**(41): 9117-26.

- Sly, W. S., C. Vogler, et al. (2001). "Active site mutant transgene confers tolerance to human beta-glucuronidase without affecting the phenotype of MPS VII mice." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 98(5): 2205-10.
- Snider, M. D., L. A. Sultzman, et al. (1980). "Transmembrane location of oligosaccharide-lipid synthesis in microsomal vesicles." <u>Cell</u> **21**(2): 385-92.
- Spellman, P. T. and G. M. Rubin (2002). "Evidence for large domains of similarly expressed genes in the Drosophila genome." <u>J Biol</u> **1**(1): 5.
- Srivastava, S. K., J. Wiktorowicz, et al. (1975). "Studies on beta-D-Nacetylhexosaminidase. Various isozymes in tissues of normal subjects and Sandhoff's disease patients." <u>Biochim Biophys Acta</u> **397**(2): 428-36.
- Starzyk, K., S. Richards, et al. (2007). "The long-term international safety experience of imiglucerase therapy for Gaucher disease." <u>Mol Genet Metab</u> **90**(2): 157-63.
- Stinchi, S., R. Lullmann-Rauch, et al. (1999). "Targeted disruption of the lysosomal alpha-mannosidase gene results in mice resembling a mild form of human alpha-mannosidosis." <u>Hum Mol Genet</u> **8**(8): 1365-72.
- Stinchi, S., A. Orlacchio, et al. (1998). "Promoter characterization and structure of the gene encoding mouse lysosomal alpha-d-mannosidase." <u>Mamm Genome</u> **9**(11): 869-73.
- Sun, P., D. E. Sleat, et al. (2008). "Acid phosphatase 5 is responsible for removing the mannose 6-phosphate recognition marker from lysosomal proteins." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **105**(43): 16590-5.
- Suter, A. (2000). Funktion lysosomaler saurer Phosphatasen. <u>Biochemistry 2,</u> Göttingen.
- Suzuki, K., T. Ezoe, et al. (2003). "Are animal models useful for understanding the pathophysiology of lysosomal storage disease?" <u>Acta Paediatr Suppl</u> **92**(443): 54-62; discussion 45.
- Suzuki, K., R. L. Proia, et al. (1998). "Mouse models of human lysosomal diseases." Brain Pathol 8(1): 195-215.
- Swallow, D. M., L. F. West, et al. (1984). "The role of lysosomal sialidase and betagalactosidase in processing the complex carbohydrate chains on lysosomal enzymes and possibly other glycoproteins." <u>Ann Hum Genet</u> **48**(Pt 3): 215-21.
- Takahashi, T., P. G. Schmidt, et al. (1984). "Novel carbohydrate structures of cathepsin B from porcine spleen." J Biol Chem **259**(10): 6059-62.

- Takamura, A., K. Higaki, et al. (2008). "Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G(M1)-gangliosidosis." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> 367(3): 616-22.
- Tanida, I., N. Minematsu-Ikeguchi, et al. (2005). "Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy." <u>Autophagy</u> 1(2): 84-91.
- Taniguchi, T., T. Mizuochi, et al. (1985). "Structural studies on the carbohydrate moieties of rat liver cathepsins B and H." <u>J Biochem</u> **97**(3): 973-6.
- Taooka, Y., J. Chen, et al. (1999). "The integrin alpha9beta1 mediates adhesion to activated endothelial cells and transendothelial neutrophil migration through interaction with vascular cell adhesion molecule-1." J Cell Biol **145**(2): 413-20.
- Tarentino, A. L., C. M. Gomez, et al. (1985). "Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide:N-glycosidase F." <u>Biochemistry</u> **24**(17): 4665-71.
- Thomas, J. A., S. Jacobs, et al. (2006). "Outcome after three years of laronidase enzyme replacement therapy in a patient with Hurler syndrome." <u>J Inherit</u> <u>Metab Dis</u> **29**(6): 762.
- Thumm, M., R. Egner, et al. (1994). "Isolation of autophagocytosis mutants of Saccharomyces cerevisiae." <u>FEBS Lett</u> **349**(2): 275-80.
- Tiede, S., S. Storch, et al. (2005). "Mucolipidosis II is caused by mutations in GNPTA encoding the alpha/beta GlcNAc-1-phosphotransferase." <u>Nat Med</u> **11**(10): 1109-12.
- Tomatsu, S., M. Gutierrez, et al. (2005). "Development of MPS IVA mouse (Galnstm(hC79S.mC76S)slu) tolerant to human N-acetylgalactosamine-6sulfate sulfatase." <u>Hum Mol Genet</u> **14**(22): 3321-35.
- Trimble, R. B. and F. Maley (1984). "Optimizing hydrolysis of N-linked high-mannose oligosaccharides by endo-beta-N-acetylglucosaminidase H." <u>Anal Biochem</u> 141(2): 515-22.
- Tsukada, M. and Y. Ohsumi (1993). "Isolation and characterization of autophagydefective mutants of Saccharomyces cerevisiae." <u>FEBS Lett</u> **333**(1-2): 169-74.
- Urushihara, M., S. Kagami, et al. (2004). "Sisters with alpha-mannosidosis and systemic lupus erythematosus." <u>Eur J Pediatr</u> **163**(4-5): 192-5.
- Van den Hout, J. M., J. H. Kamphoven, et al. (2004). "Long-term intravenous treatment of Pompe disease with recombinant human alpha-glucosidase from milk." <u>Pediatrics</u> 113(5): e448-57.
- Van Hoof, F. and H. G. Hers (1968). "The abnormalities of lysosomal enzymes in mucopolysacc- haridoses." <u>Eur J Biochem</u> **7**(1): 34-44.

- Vance, J. E. (2006). "Lipid imbalance in the neurological disorder, Niemann-Pick C disease." <u>FEBS Lett</u> **580**(23): 5518-24.
- Vergarajauregui, S., P. S. Connelly, et al. (2008). "Autophagic dysfunction in mucolipidosis type IV patients." <u>Hum Mol Genet</u> **17**(17): 2723-37.
- von Schantz, C., J. Saharinen, et al. (2008). "Brain gene expression profiles of Cln1 and Cln5 deficient mice unravels common molecular pathways underlying neuronal degeneration in NCL diseases." <u>BMC Genomics</u> **9**: 146.
- Wada, R., C. J. Tifft, et al. (2000). "Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **97**(20): 10954-9.
- Wakamatsu, N., Y. Gotoda, et al. (1997). "Characterization of the human MANB gene encoding lysosomal alpha-D-mannosidase." <u>Gene</u> **198**(1-2): 351-7.
- Walkley, S. U. (2007). "Pathogenic mechanisms in lysosomal disease: a reappraisal of the role of the lysosome." <u>Acta Paediatr Suppl</u> **96**(455): 26-32.
- Walkley, S. U. (2009). "Pathogenic cascades in lysosomal disease-Why so complex?" <u>J Inherit Metab Dis</u>.
- Walkley, S. U., W. F. Blakemore, et al. (1981). "Alterations in neuron morphology in feline mannosidosis. A Golgi study." <u>Acta Neuropathol</u> **53**(1): 75-9.
- Walkley, S. U. and F. M. Platt (2004). Lysosomal defects and storage. Lysosomal disorders of the brain. S. U. Walkley and F. M. Platt. Oxford, Oxford University Press: 32 47.
- Walkley, S. U., M. A. Thrall, et al. (1994). "Bone marrow transplantation corrects the enzyme defect in neurons of the central nervous system in a lysosomal storage disease." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **91**(8): 2970-4.
- Walkley, S. U., M. A. Thrall, et al. (2005). "Abnormal neuronal metabolism and storage in mucopolysaccharidosis type VI (Maroteaux-Lamy) disease." <u>Neuropathol Appl Neurobiol</u> **31**(5): 536-44.
- Walkley, S. U. and M. T. Vanier (2008). "Secondary lipid accumulation in lysosomal disease." <u>Biochim Biophys Acta</u>.
- Walter, P. and A. E. Johnson (1994). "Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane." <u>Annu Rev Cell Biol</u> **10**: 87-119.
- Wattiaux, R., M. Wibo, et al. (1963). "[Effect of the injection of Triton WR 1339 on the hepatic lysosomes of the rat.]." <u>Arch Int Physiol Biochim</u> **71**: 140-2.
- Weimer, J. M., J. W. Benedict, et al. (2009). "Cerebellar defects in a mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis." <u>Brain Res</u> **1266**: 93-107.

- Willingham, M. C., I. H. Pastan, et al. (1981). "Morphologic study of the internalization of a lysosomal enzyme by the mannose 6-phosphate receptor in cultured Chinese hamster ovary cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **78**(11): 6967-71.
- Winchester, B. (2005). "Lysosomal metabolism of glycoproteins." <u>Glycobiology</u> **15**(6): 1R-15R.
- Winkler, J. R. and H. L. Segal (1984). "Inhibition by swainsonine of the degradation of endocytosed glycoproteins in isolated rat liver parenchymal cells." <u>J Biol Chem</u> 259(3): 1958-62.
- Winkler, J. R. and H. L. Segal (1984). "Swainsonine inhibits glycoprotein degradation by isolated rat liver lysosomes." <u>J Biol Chem</u> **259**(24): 15369-72.
- Woloszynek, J. C., M. Roberts, et al. (2004). "Numerous transcriptional alterations in liver persist after short-term enzyme-replacement therapy in a murine model of mucopolysaccharidosis type VII." <u>Biochem J</u> 379(Pt 2): 461-9.
- Wraith, J. E. (2004). "The clinical presentation of lysosomal storage disorders." <u>Acta</u> <u>Neurol Taiwan</u> **13**(3): 101-6.
- Yamanaka, S., O. N. Johnson, et al. (1994). "Structure and expression of the mouse beta-hexosaminidase genes, Hexa and Hexb." <u>Genomics</u> **21**(3): 588-96.
- Yamasaki, R., J. Zhang, et al. (2007). "Involvement of lysosomal storage-induced p38 MAP kinase activation in the overproduction of nitric oxide by microglia in cathepsin D-deficient mice." <u>Mol Cell Neurosci</u> **35**(4): 573-84.
- Yanai, I., J. C. Mellor, et al. (2002). "Identifying functional links between genes using conserved chromosomal proximity." <u>Trends Genet</u> **18**(4): 176-9.

## 7 Anhang

# 7.1 Normalisierte Genexpression der GeneChip-Analyse von Genen um das Man2B1-Gen



Abb. 7.1: Expression differentiell exprimierter Gene auf Chromosom Zytoband 8C2 und 8C3 um das Man2B1-Gen (normalisierte Genexpression GeneChip-Analyse).

# 7.2 *Realtime*-PCR Primer-Sequenzen

GAPDH:	gagtcaacggatttggtcgt
	gacaagcttcccgttctcag
CD68:	cttctgctgtggaaatgcaa
	caatgatgagaggcagcaag
Clec4n:	cagtcaaaatgtcaggttctgg
	catttcgaaggattccagtaaa
Dnaja2:	gaccgtgtgcgagtaaaaca
	ccaagtatctctccccatgc
Lysozym:	ccctcgatttcccctctaag
	gggagactttgcacaacaca
Integrin 9a:	caggcaacagtgtcctttca
	ggcatcacaaaagtccaggt
Peroxiredoxin2:	tggcttgtgcaactgactc
	gtctcactgtgtcccacca
Klf1:	acactggacatcgtccctt
	tacggtccttggatccact
Gadd45gip1:	catgcactctgcgatacgct
	ggccgaggagcaagaatgg
Asna1:	aggaaccctgaacagacaa
	gctggttgacgatgatgttg
Gcdh:	tggaaaagccctggatattg
	gtgaatgcctgaatcccagt
Hexosaminidase B:	ctggtgtcgctagtgtcgc
	cagggccatgatgtctcttg
β-Glucuronidase:	ggctggtgacctactggattt
	ggcactgggaacctgaagt
β-Glucosidase:	gccaggctcatcggattcttc
	cacggggtcaagaggagtcac
β-Galactosidase:	cttcccactgaacactgaggc
	ttggcacgaacaaggtctttt
β-Glucocerebrosidase:	gccaggctcatcggattcttc
	cacggggtcaagagagtcac
Cathepsin B:	tttgatgcacgggaacaatgg
	tgtgaatgcaggttcggtcag

# Abkürzungsverzeichniss

Abb	Abbildung
ATG	autophagy related gene
AS	Aminosäuren
bp	Basenpaare
BMT	bone marrow transplantation
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
СНО	chinese hamster ovary
CA	Cornu Dentatus
DC	Dünnschichtchromatografie
2D-GE	2D-Gelelektrophorese
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DPO	Dolichol-Pyrophosphoryl-Oligosacharide
EndoH	Endoglykosyidase H
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERT	Enzymersatztheraphie
et al.	et alii (lat. und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FKS	fötales Kälberserum
Fuc	Fucose
ggf	gegebenenfalls
GIcNAc	N-Acetylglucosamin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ID	Identifikationsnummer
IEF	Isoelektrische Fokussierung
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramm
LCR	locus control region
----------	--
ko	knockout
LSD	Lysosomale Speichererkrankung
М	Molar
МΦ	Makrophagen
MALDI	Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung
Man	Mannose
mA	milli Ampere
MEF	Embryonale Mausfibroblasten
MetOH	Methanol
Min	Minute(n)
M6P	Mannose-6 Phosphat
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MR	Mannose Rezeptor
mRNA	messenger RNA
MS	Massenspektrometrie
mU	Milli-Units
MW	Molekulargewicht
NCL	Neuronale Ceroid Lipofuscinose
NPC	Niemann Pick Typ C
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PGK	Phosphoglycerat-Kinase
рН	negativer dekadischer Logarithmus der
	Protonen Konzentration
pl	Isoelektrischer Punkt
PNS	postnukleärer Überstand
RNA	Ribonukleinsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
So	siehe oben
Std	Stunde(n)

Tab.	Tabelle
Taq	Thermophilus aquaticus
TFA	Trifluoressigsäure
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TE	Tris-EDTA
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TOF	time of flight
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
UDP	Uridindiphosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute
USW.	und so weiter
UV	ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumenverhältnis
W	Wochen
wt	Wildtyp
w/v	Gewicht zu Volumen
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Die chemischen Elemente wurden mit den üblichen Symbolen abgekürzt. Für Fachbegriffe, für die in der deutschen Fachliteratur eine Übersetzung unüblich oder unzureichend ist, wurden die englischen Termini verwendet. Englische Begriffe sind kursiv hervorgehoben.

## 8 Lebenslauf

Markus Damme Geismar Landstrasse 28 37083 Göttingen

Telefon: 0551 3708123 Email: mdamme@gwdg.de Geburtsdatum: 22.03.1980 Geburtsort: Göttingen Familienstand: ledig Staatsangehörigkeit: deutsch

## PROMOTION

Seit 05/2006	Wissenschaftlicher Mitarbeiter
	EU-Projekt "HUE-Man: Towards The Development Of An Effective ERT for Human α-Mannosidosis"
	Promotion zum Thema: "Zellbiologische
	Untersuchung $\alpha$ -Mannosidase-defizienter- und
	Enzym behandelter Mäuse."

## STUDIUM

12/2005 Abschluss als Diplom-Biologe Gesamtnote: Sehr Gut Diplomarbeit zum Thema: "Veränderung des Transkriptoms von Mukopolysaccharidose Typ I (Morbus Hurler) Fibroblasten unter Enzymsubstitution." Erstreferent: Prof. Dr. K. v. Figura Koreferent: Prof. Dr. G. Braus Betreuer: Dr. Jobst Landgrebe

10/2000 - 11/2005	Biologiestudium, Georg August Universität
	Göttingen
	Hauptfach: Botanik
	Nebenfächer: Biochemie, Pflanzenzüchtung

## Praktika im Studium

01/2005 -12/2005	Studentische Hilfskraft (Abt. Biochemie II, Prof. Dr. K. v. Figura)	
10/2003 - 01/2004 und	Studentische Hilfskraft (Abt. Allgemeine und	
05/2004 - 07/2004	Entwicklungsphysiologie, Prof. Dr. Gatz)	
09/2003 -12/2003	Studentische Hilfskraft (Abt. Hämatologie / Onkologie, Prof. Dr. Trümper)	
12/2005 - 05/2006	Wissenschaftliche Hilfskraft (Abt. Biochemie II, Prof. Dr. v. Figura, AG Landgrebe)	
Berufspraxis neben dem Studium		
06/2001- 08/2002	Werksstudent Marienapotheke Göttingen	
ZIVILDIENST		

09/1999 - 08/2000	Zivildienst (Evluth. Bethlehem-Kirchengemeinde)

# Schulbildung

06/1999	Abitur (Felix-Klein-Gymnasium Göttingen)
1986 - 1999	Grundschule, Orientierungsstufe, Gymnasium

### 9 Veröffentlichungen

#### 9.1 Originalartikel

- Kollmann, K., <u>Damme</u>, M. et al. (2009). "Molecular characterization and gene disruption of mouse lysosomal putative serine carboxypeptidase 1." <u>Febs J</u> 276(5): 1356-69.
- Schieweck, O., <u>Damme, M.</u>, et al. (2009) "NCU-G1 is a highly glycosylated protein of the lysosomal membrane." <u>Biochem J</u>. **422**(1) 83-90.
- <u>Damme, M.</u>, Morelle, W., et al. "Hyperglycosylation of lysosomal proteins in a mouse model for α-mannosidosis." Manuskript in Vorbereitung.

#### 9.2 Posterbeiträge

Damme, M., Häsler, R., Lübke, T. (2007) "Transcriptome analysis of lysosomal α-D-mannosidase deficient mice" ESGLD-Meeting, Perugia.

#### 10 Danksagung

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. T. Pieler für die Übernahme des Referats und die Betreuung dieser Arbeit bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. F. Melchior möchte ich mich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats bedanken. Beiden gilt der Dank auch für die Diskussionen und Ratschläge während der *thesis committees*.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. P. Rehling für die Möglichkeit bedanken, diese Dr. Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Prof. Dr. P. Saftig (Universität Kiel, Biochemischs Institut) möchte ich stellvetretend für alle Mitglieder des EU-Projektes "HUE-Man: Towards The Development Of An Effective ERT for Human α-Mannosidosis" danken. Bei den zahlreichen Treffen sind stets interessante Diskussionen und Gespräche entstanden und ich konnte wichtige Kontakte knüpfen. Insbesondere Dr. J. Blanz (Universität Kiel, Biochemischs Institut) gilt mein Dank für die enge Zusammenarbeit und wertvolle Tipps.

Mein ganz besonderer Dank gilt all denen, die direkt an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren. W. Morelle und Prof. Dr. J.C. Michalski (Universität Lille) konnten durch ihre exzellente Expertise der MALDI-TOF-Analyse von Glykanen einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit leisten. Dr. B. Schmidt und Nicole Eiselt haben die MALDI-TOF-Identifizierung von Proteinen ermöglicht. Bei Dr. Robert Häsler (Universität Kiel, Klinische Molekularbiologie) möchte ich mich für die Hilfe bei der Durchführung der Microarray-Experimente bedanken.

Prof. Dr. R. Lüllmann-Rauch (Universität Kiel, Anatomisches Institut) möchte ich für die Durchführung und Begutachtung der histologischen Schnitte danken. Zudem möchte Danke sagen für ihre Diskussionsbereitschaft in Sachen Histologie und Anatomie.

Allen Mitglieder der AG Kube (Abtl. Hämatologie und Onkologie) und speziell Dr. N. Schoof möchte ich für die Möglichkeit danken, die realtime-PCR-Experimente am TaqMan durchführen zu können.

Ganz besonders wichtig waren für mich in den vergangenen drei Jahren jene, die mir im täglichen Labor-Alltag mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders erwähnen möchte ich dabei alle Mitglieder der "alten" AG Lübke. Dr. Katrin Kollmann,

#### Danksagung

Dr. Florian Deuschl und Ellen Eckermann-Felkl haben mir den Start in die Doktorarbeit erleichtert und waren stets mit Tipps sowie praktischer Hilfe für mich da. Neben dem Labor sind sie für mich auch zu guten Freunden geworden.

Ebenso möchte ich allen anderen Mitgliedern der "alten" Biochemie 2 danken. Dr. Jennifer Baltes und Dr. Tanja Benkert haben mich lange Zeit meiner Doktorarbeit begleitet und sind ebenso zu guten Freundinnen geworden. Zudem möchte ich mich bei allen anderen Kollegen der Biochemie2 für Diskussionen und Hilfe bedanken.

Allen meinen Freunden möchte ich für die Unterstützung während der letzten Jahre danken. Ihr seid immer für mich dagewesen und ihr habt mir besonders in Zeiten, wo es nicht so lief, den nötigen Rückhalt gegeben.

Den wohl größten Anteil am gelingen dieser Arbeit hatte mein Anleiter Jun. Prof. Dr. Torben Lübke, ihm gilt deshalb mein ganz besonderer Dank. Er hat mir stets ein hohes Vertrauen entgegen gebracht und mir die Freiheit gegeben, mich wissenschaftlich zu entfalten. Für die unzähligen Diskussionen, Hinweise und Hilfen möchte ich mich hiermit nochmals herzlichst bedanken.

Meiner Familie möchte ich dafür danken, dass sie mir diese Ausbildung ermöglicht und mich immer unterstützt hat. Auf euren Rückhalt konnte ich mich immer hundertprozentig verlassen, und ihr seid immer für mich da gewesen. Danke!

Schließlich hatte ich das Glück, während dieser Doktorarbeit neben einer guten Diplomandin auch meine liebe Freundin kennenzulernen. Liebe Ina, dir möchte ich ganz besonders danken. Besonders in der Endphase der Arbeit warst du mir eine riesiege Stütze und hast mich stets geduldig aufgebaut, abgelenkt und motiviert. Dir gilt mein ganz besonderer Dank!

Schließlich möchte ich allen anderen danken, die ich vergessen hab und die mir beim Gelingen der Arbeit geholfen haben.