

**Funktionelle Studien zur Arylsulfatase K (Arsk)
anhand eines Arsk-defizienten Mausmodells**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie
der Universität Bielefeld

vorgelegt von:
Christof Trabszo

Bielefeld im Juni 2018

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Dierks
Arbeitsgruppe Biochemie I
Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld

2. Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard
Arbeitsgruppe Biochemie III
Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld

Gedruckt auf alterungsbeständigem Papier nach DIN EN ISO 9706

Teile dieser Arbeit befinden sich im Publikationsprozess:

Manuskript

Trabszo C., Ramms B., Chopra P., Lüllmann-Rauch R., Sproß J., Jeschke A., Schinke T., Stroobants S., Boons G.J., Esko J.D., Lübke T., Dierks T. (2018): “*Arylsulfatase K inactivation causes mucopolysaccharidosis due to glucuronate 2-sulfatase deficiency*”: *in preparation*

Vortrag auf einer internationaler Fachkonferenz

Trabszo C., Ramms B., Lüllmann-Rauch R., Schinke T., Lübke T., Dierks T. (2017): “*Arylsulfatase K (Arsk) – The missing link in glycosaminoglycan degradation. Arsk-knockout-mouse characterization.*”
ESGLD-Konferenz 2017, Lyon, Frankreich.

Inhaltsverzeichnis

Summary

Zusammenfassung

1	Einleitung	7
1.1	Lysosomen	7
1.1.1	Transport lysosomaler Proteine	8
1.2	Lysosomale Sulfatasen	10
1.2.1	Das Formylglycin-generierende Enzym (FGE)	12
1.2.2	Arylsulfatase K	14
1.3	Glykosaminoglykane	16
1.3.1	Glykosaminoglykan-Funktion	18
1.3.2	Glykosaminoglykan-Synthese	19
1.3.3	Glykosaminoglykan-Abbau	20
1.4	Lysosomale Speichererkrankungen	22
1.4.1	Mukopolysaccharidosen	23
1.4.2	Maus als Modellorganismus für lysosomale Speichererkrankungen.	25
2	Zielsetzung der Arbeit	27
3	Material	29
3.1	Laboraausstattung	29
3.2	Verbrauchsmaterialien	32
3.3	Chemikalien	33
3.4	Saccharide	35
3.5	Enzyme	35
3.6	Kits	36
3.7	Antikörper	37
3.7.1	Primär-Antikörper	37
3.7.2	Sekundär-Antikörper (Western-Blot)	38

INHALTSVERZEICHNIS

3.7.3	Sekundär-Antikörper (Immunfluoreszenz)	38
3.8	Plasmide	38
3.9	Primer	39
3.10	Zelllinien	41
3.11	Puffer und Lösungen	41
3.12	DNA- und Protein-Größenstandard	43
3.13	Software & Online-Datenbanken	44
4	Methoden	45
4.1	Zellbiologische Methoden	45
4.1.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	45
4.1.2	Kryokonservierung von Zellen	45
4.1.3	Auftauen und Revitalisieren von Zellen	45
4.1.4	Zellzahl-Bestimmung	46
4.1.5	Zellyse durch Ultraschallbehandlung	46
4.1.6	Trypsinierung von Zellen	46
4.1.7	Transfektion von Säugerzellen mittels Polyethylenimin	47
4.1.8	Isolierung von Zellklonen nach stabiler Transfektion	47
4.2	Histochemische Methoden	47
4.2.1	Anfertigung von Kryo- und <i>free-floating</i> -Schnitten	47
4.2.2	Alcian-Blau Färbung von Gewebeschnitten	48
4.2.3	Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten	48
4.2.4	Aktive Perfusion mit Paraformaldehyd	49
4.2.5	Passive Perfusion mit Paraformaldehyd	50
4.2.6	Nachweis der lacZ-Insertionskassette	50
4.2.7	Vermeidung von Autofluoreszenz (<i>quenching</i>)	51
4.2.8	Filipin-Färbung von unverestertem Cholesterin	51
4.2.9	Dreipunkt-Biegetest von Knochen	51
4.3	Molekularbiologische-Methoden	52
4.3.1	Primer-Design	52
4.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	53
4.3.3	Mutagenese-PCR	54
4.3.4	Kolonie-PCR	55

4.3.5	Quantitative PCR	57
4.3.6	Agarose-Gelelektrophorese	58
4.3.7	Analyse von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau	58
4.3.8	Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen	59
4.3.9	Mini/Midi-Präparation von Plasmid-DNA	59
4.3.10	Sequenzierung von DNA	60
4.3.11	Ligation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten	60
4.3.12	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	61
4.3.13	RNA-Präparation aus Mausgeweben	61
4.3.14	cDNA Synthese	62
4.3.15	Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe	63
4.3.16	Konzentrationsbestimmung von DNA	63
4.3.17	Genotypisierung von Arsk-KO-Tieren	63
4.4	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	65
4.4.1	Präparation chemokompetenter <i>Escherichia coli</i>	65
4.4.2	Transformation chemokompetenter <i>Escherichia coli</i>	65
4.4.3	Anlegen von Kryokulturen in Glycerol	65
4.5	Biochemische Methoden	66
4.5.1	Herstellung von Gewebe- und Zellhomogenaten	66
4.5.2	Proteinbestimmung mit dem BioRad-DC-Protein-Assay	66
4.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	67
4.5.4	Western-Blot-Analyse (<i>semi-dry</i>)	69
4.5.5	Ponceau-S Färbung von Membranen	70
4.5.6	Strippen der PVDF-Membran	70
4.5.7	Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie	70
4.5.8	Färbung von Polyacrylamid-Gelen durch Silberlösung	71
4.5.9	Aktivitätsbestimmung lysosomaler Standardenzyme	72
4.5.10	Sulfataseaktivität gegenüber Pseudosubstraten	73
4.5.11	Tritosomen-Präparation	74
4.5.12	Ammoniumsulfat-Fällung	75
4.5.13	Aufreinigung von His-markierter ARSK aus Zellkulturüberständen	76
4.6	Glycobiologische Methoden	77

INHALTSVERZEICHNIS

4.6.1	DMMB (1,9-Dimethylmethylen-blau)-Assay	77
4.6.2	Glykosaminoglykan-Extraktion aus Mausgewebe	77
4.6.3	Glykosaminoglykan-Extraktion aus Mausgewebe für GRIL-LC/MS-Analysen	78
4.6.4	GRIL-LC/MS	79
4.6.5	Markierung von Disacchariden über 2-Aminoacridon	80
4.6.6	RP-HPLC AMAC-markierter Disaccharide	81
4.6.7	Verdau von AMAC-markierten Disacchariden	82
5	Ergebnisse	85
5.1	Generierung und Verifizierung der Arsk-KO-Maus	85
5.1.1	Generierung der Arsk-KO-Maus	85
5.1.2	Arsk-Expressionsmuster durch das lacZ-Reportergen	88
5.1.3	Arsk-KO-Nachweis auf Proteinebene	89
5.1.4	Makroskopische Befunde des Arsk-Mausmodells	90
5.1.5	Einfluss des Arsk-KOs auf die Transkription anderer lysosomaler Gene	91
5.2	Phänotypische Analyse des Arsk-Mausmodells	93
5.2.1	Einfluss des Arsk-KOs auf viszerale Organe	93
5.2.2	Neuronales System der Arsk-KO-Tiere	97
5.2.3	Sekundäre Speicherung	101
5.2.4	Verhaltenstests	102
5.2.5	Retina-Analyse in Arsk-KO-Mäusen	105
5.2.6	Ossifikation	107
5.3	Produktion und Aufreinigung humaner Arylsulfatase K	113
5.4	Glykosaminoglykan-Speicherung	115
5.4.1	Alcianblau-Färbung an Gewebeschnitten	115
5.4.2	DMMB-basierte Bestimmung der GAG-Speichermenge in Geweben	117
5.4.3	DMMB-basierte Bestimmung der GAG-Ausscheidung im Urin	118
5.4.4	GAG-Analyse über massenspektrometrische Verfahren	119

5.4.5	GRIL-LC/MS-Analyse der nicht-reduzierenden Enden (NREs) in GAGs	122
5.4.6	Enzymatischer Umsatz des Speichermaterials mit rekombinanter humaner ARSK	125
5.5	AMAC-basierte Zuckeranalyse	126
5.5.1	AMAC-Markierung von Disacchariden	127
5.5.2	Enzymatischer Umsatz AMAC-markierter Disaccharide mit rARSK	129
5.5.3	Umsatz der AMAC-Disaccharide mit Tritosomen	131
6	Diskussion	135
6.1	Charakterisierung des Arsk-Mausmodells	135
6.1.1	Generierung und Validierung des Arsk-KOs	135
6.1.2	Phänotypische Analyse des Arsk-Mausmodells	138
6.1.2.1	Einfluss der Arsk-Expression auf die Regulation anderer lysosomaler Enzyme	138
6.1.2.2	Neuropathologie, visuelles System und Verhalten der Arsk-Maus	140
6.1.2.3	Einfluss der Arylsulfatase K-Defizienz auf die Ossifikation	142
6.1.2.4	Speicherpathologie in der Arsk-Maus	145
6.1.3	Produktion und Aufreinigung rekombinanter humaner Arylsulfatase K	146
6.1.4	Glykosaminoglykan-Speicherung im Arsk-Mausmodell	146
6.1.4.1	DMMB-basierte GAG-Analyse	148
6.1.4.2	Massenspektrometrische Analyse der GAG-Speicherung	149
6.1.4.3	Analyse des nicht-reduzierenden Endes von GAGs im Arsk-Mausmodell	150
6.1.4.4	AMAC-basierter Arsk-Aktivitätsassay	152
6.1.5	Generierung von 2-O-Sulfatierungen an GAGs	154
6.1.6	Einordnung des Arsk-Mausmodells im Vergleich zu anderen Sulfatase-defizienten Mausmodellen	156

INHALTSVERZEICHNIS

7	Ausblick	159
8	Appendix	181
8.1	ESI-MS-Spektren der AMAC-markierten Disaccharide	181
8.2	Abkürzungsverzeichnis	186

Summary

Sulfatases belong to an enzyme class involved in the hydrolytic cleavage of sulfate esters in steroid hormones, glycolipids, and above all in the degradation of glycosaminoglycans (GAGs). Thus, sulfatases play an essential physiological role in the degradation of macromolecules, signal transduction and hormone regulation. The loss of lysosomal sulfatase activity is associated with the accumulation of sulfated storage material, which leads to the manifestation of a progressive and often fatal lysosomal storage disease.

Human arylsulfatase K (ARSK) was identified 2002 in a genome-wide screen searching for the highly conserved sulfatase signature sequence CXPSR. Based on its lysosomal sorting signal mannose-6-phosphate, the acidic pH-optimum as well as co-localization studies, the human ARSK was classified as a member of the lysosomal sulfatases. It was not until 2017 that the ARSK was assigned a glucuronate-2-O-sulfatase activity by demonstrating the turnover of synthetic 2-O-sulfated substrates and thus an involvement in lysosomal heparan sulfate (HS) and chondroitin sulfate (CS) degradation was suggested.

In the present study, the physiological significance in the HS and CS catabolism of Arsk was investigated by the means of an Arsk-deficient mouse model. A variety of histological, biochemical and mass spectrometric analyzes were performed on knockout mouse-derived material. The validation of Arsk deficiency was performed on mRNA level as well as by the expression of the knockout lacZ-reporter cassette. At the cellular level, the knockout mouse displayed a very mild phenotype. Histological analyzes revealed moderately enriched electron-dense material in the Henle's loop of the kidney, which did not match the typically expected storage pathology observed in many other mucopolysaccharidoses. Furthermore, no striking influence on the regulation of the endo-lysosomal system of Arsk-deficient animals was observed. Neurologically, the knockout mouse is largely unremarkable and did not exhibit detectable degenerative or inflammatory processes. However, in behavioral tests on twelve-month-old knockout mice, reduced anxiety and

delayed socializing were observed. Although an altered osteogenesis with an increased bone mineralization and a reduced number of osteoclasts was found experimentally, these results were not statistically significant due to large variances. Bone mineral density, however, was significantly decreased in 26 and 52 week old Arsk-deficient mice.

Glucuronate-2-O-sulfatase activity of Arsk is critical for the degradation of glycosaminoglycans. With a DMMB-based assay for determining the amount of GAGs, increased GAG storage in mouse kidney and an increased urinary GAG excretion in the Arsk-deficient mice were diagnosed, which correspond to the characteristics of many mucopolysaccharidoses. The previously postulated ARSK-specific 2-O-sulfoglucuronate substrate was confirmed after GAG isolation from mouse tissue by GRIL-LC/MS analyzes and the digestion of isolated 2-O-sulfate-containing storage material by human recombinant ARSK. This result verifies the glucuronate-2-sulfatase activity of ARSK and the involvement in HS and CS/DS degradation.

Finally an *in vitro* enzyme assay based on 2-aminoacridone-labeled disaccharides was established confirming not only the 2-O-glucuronate sulfate substrate but also the loss of glucuronate-2-O-sulfatase activity in Arsk-deficient mice. This assay demonstrated the sequential degradation of GAG-derived sulfated substrates by digestion with enriched lysosomal fractions (tritosomes) from wild-type mice. Tritosomes derived from Arsk-deficient mice were missing an GDS-activity and thus no substrate digestion was detectable.

The Arsk-deficient mouse model represents an essential contribution to the understanding of the GAG degradation process in general. In addition, the phenotypic and molecular findings should help to screen patients with lysosomal storage and unclear molecular etiology for ARSK-deficiency.

Zusammenfassung

Sulfatasen, zur Klasse der Hydrolasen gehörende Enzyme, sind an der hydrolytischen Spaltung von Sulfatestern in Steroidhormonen, Glykolipiden und dem Abbau von Glykosaminoglykanen (GAGs) beteiligt. Damit nehmen Sulfatasen eine essentielle physiologische Rolle in der Degradation von Makromolekülen, der Signalweiterleitung als auch der Hormonregulation ein. Der Verlust lysosomaler Sulfataseaktivität geht annähernd ausnahmslos mit der Ausprägung einer lysosomalen Speichererkrankung einher, in dessen Verlauf es zu einer Einlagerung des nur partiell abgebauten sulfatierten Materials in den Lysosomen kommt, infolgedessen ein progressiver und häufig tödlicher Krankheitsverlauf zu erwarten ist.

Die humane Arylsulfatase K (ARSK) wurde 2002 in einer genomweiten Analyse durch die hochkonservierte Sulfatase-Signatursequenz CXPSR identifiziert. Anhand des lysosomalen Sortierungssignals Mannose-6-Phosphat, des sauren pH-Optimums sowie durch Kollokalisationsstudien konnte die humane ARSK als weiteres Mitglied der lysosomalen Sulfatasen zugeordnet werden. Erst 2017 wurde der ARSK anhand synthetischer, sulfatierter Substrate eine Glucuronat-2-O-Sulfatase-Aktivität (GDS) zugewiesen, die auf eine Beteiligung am lysosomalen HS und CS/DS-Abbau schließen lässt.

In der hier vorliegenden Studie wurde die physiologische Bedeutung der Arylsulfatase K anhand eines Arsk-defizienten Mausmodells (Arsk-Maus) untersucht und dabei eine Vielzahl histologischer, biochemischer als auch massenspektrometrischer Analysen durchgeführt. Die Validierung der Arsk-Defizienz erfolgte sowohl auf mRNA-Level als auch durch die Expression einer *knock-out* lacZ-Reporterkassette mit deren Hilfe das Arsk-Gen ausgeschaltet wurde. Auf zellulärer Ebene war im Arsk-Mausmodell nur ein sehr milder Phänotyp zu beobachten. Histologische Analysen konnten angereichertes elektrodichtes Material in der Henle'schen Schleife der Niere nachweisen, welches jedoch nicht der für Mukopolysaccharidosen typischerweise erwarteten Speicherpathologie entsprach. Ferner konnte kein auffälliger Einfluss auf die Regulation des endo-lysosomalen Systems Arsk-defizienter Tiere beobachtet

werden. Auch neurologisch war die Arsk-Maus weitestgehend unauffällig und wies keine degenerativen oder entzündlichen Prozesse auf. In Verhaltenstests an zwölf Monate alten Arsk-Mäusen wurde jedoch verringertes Angstverhalten sowie die verzögerte Aufnahme sozialer Kontakte beobachtet. Eine Beeinträchtigung der Osteogenese war experimentell zwar durch die erhöhte Knochenmineralisierung sowie eine reduzierte Anzahl der Osteoclasten festzustellen, erreichte aufgrund großer experimenteller Varianzen jedoch keine statistische Signifikanz. Die Knochenmineraldichte in 26 und 52 Wochen alten Arsk-Mäusen hingegen wies eine signifikante Verringerung gegenüber dem Wildtyp auf.

Als Glucuronat-2-O-Sulfatase ist die Arsk am Abbau von Glykosaminoglykanen wie HS und CS/DS beteiligt. Anhand eines DMMB-Assays, der die Bestimmung der gespeicherten GAG-Menge in Geweben ermöglicht, wurden eine vermehrte GAG-Einlagerungen in der Niere sowie eine erhöhte GAG-Ausscheidung im Urin Arsk-defizienter Mäuse diagnostiziert. Das bereits postulierte ARSK-spezifische 2-O-Sulfoglucuronat-Substrat wurde nach GAG-Isolierung aus Geweben Arsk-defizienter Mäuse über GRIL-LC/MS-Analysen bestätigt und durch die Behandlung mit rekombinanter humaner ARSK nahezu vollständig abgebaut. Demnach ist die ARSK als Glucuronat-2-Sulfatase am Abbau von HS und auch CS/DS beteiligt. Die Etablierung eines weiteren *in vitro*-Enzymassays, der auf der Detektion von 2-Aminoacridon (AMAC)-markierten Disacchariden basierte, validierte das sulfatierte 2-O-Glucuronat-Substrat und ermöglichte ferner den Verlust der GDS-Aktivität im Arsk-Mausmodell nachzuweisen. Ergänzend konnte anhand des AMAC-Assays der sequenzielle Abbau der Disaccharid-Substrate mit angereicherten lysosomalen Fraktionen (Tritosomen) aus Wildtyp-Tieren dargestellt werden. Aufgrund fehlender GDS-Aktivität in Tritosomen aus Arsk-defizienten Tieren blieb ein entsprechender Umsatz der Arsk-spezifischen Substrate aus. Das Arsk-Mausmodell stellt einen essentiellen Beitrag zum Verständnis des GAG-Abbauprozesses dar. Weiterführend sollten die phänotypischen und molekularen Befunde dabei helfen, Patienten mit lysosomaler Speicherung und unklarer molekularer Etiologie hinsichtlich einer ARSK-Defizienz zu überprüfen.

1 Einleitung

1.1 Lysosomen

Anfang der 50er Jahre identifizierte Christian de Duve eine neue zelluläre Struktur, die er als „Lysosom“ bezeichnete (de Duve *et al.*, 1955). Diese spezialisierten, membranumhüllten Organellen übernehmen in eukaryotischen Zellen eine essentielle Rolle in der Degradation von Makromolekülen. Fast 60 Jahre nach der ersten Entdeckung ist bekannt, dass Lysosomen durch ihre Vielzahl saurer Hydrolasen nicht nur die terminale degradative Komponente darstellen (de Duve, 2005). Vielmehr werden Prozesse der Antigen-Präsentation (Geuze, 1998), des Energie-Metabolismus (Carmona-Gutierrez *et al.*, 2016) als auch der Ossifikation (Luzio *et al.*, 2007) dem endo-lysosomalen System zugeschrieben. In Proteomanalysen konnten bisher 60 lysosomale Matrixproteine und rund 100 lysosomale Membranproteine identifiziert werden (Lübke *et al.*, 2009, Schwake *et al.*, 2013). Den Hauptbestandteil löslicher Matrixproteine stellen Hydrolasen wie Sulfatasen, Proteasen, Nukleasen, Glykosidasen und Phospholipasen dar, deren pH-Optimum meist im sauren Bereich von pH 4.5-5 liegt (Okhuma und Poole, 1978). Das Lysosom selber weist im Lumen einen sauren pH-Wert von ~ 5 auf, welcher durch eine ATP-getriebene H^{\oplus} -Protonenpumpe und Chloridkanäle (CLC7) für den Cl^{\ominus} -Import als Gegenion aufrecht erhalten wird (Cupoletti *et al.*, 1987, Jentsch *et al.*, 2002). Mehr als 50 verschiedene lysosomale Speichererkrankungen sind bei Defizienz und Fehlregulation mit lysosomalen Proteinen assoziiert (Ballabio, 2015).

Viele lysosomale Gene gehören dem sog. CLEAR-Netzwerk (*Coordinated Lysosomal Expression And Regulation*) an und werden transkriptionell von dem Transkriptionsfaktor TFEB reguliert, der folglich auch als lysosomales Mastergen bezeichnet wird. Die zehn Basenpaar lange CLEAR-Sequenz, an die TFEB bindet, wurde in der Promotorregion einer Vielzahl lysosomaler Gene wie LAMP1, CLN3, NPC1 und der β -Galactosidase nachgewiesen. Im Hungerzustand oder bei lysosomalem Stress kommt es zu einer Dephosphorylierung von TFEB und dessen Translokation in den Nucleus, wo die

1. EINLEITUNG

Transkription von TFEB-Zielgenen aktiviert wird. Aktuelle Studien belegen, dass mTORC1-Signalwege (*rapamycin complex 1*) maßgeblich an der TFEB-Dephosphorylierung beteiligt sind und damit eine essentielle Rolle als Sensor für den Metabolismus und das Zellwachstum einnehmen (Laplanche und Sabatini, 2012; Nnah *et al.*, 2015; Settembre *et al.*, 2013; Ballabio *et al.*, 2015).

1.1.1 Transport lysosomaler Proteine

Der Transport neu-synthetisierter, löslicher lysosomaler Matrixproteine wird in den meisten Fällen durch einen Mannose-6-Phosphat(M6P)-abhängigen Mechanismus vermittelt (Abb. 1) Die Synthese dieses für lysosomale Matrixproteine spezifischen Signals erfolgt in einem zweistufigen Prozess. Zunächst wird im Golgi-Apparat ein N-Acetylglucosamin(GlcNAc)-1-Phosphat durch die UDP-N-Acetylglucosamin-Phosphotransferase (GNTP) auf eine C6-Position bestimmter mannosereicher Oligosaccharide übertragen (Pohlmann *et al.*, 1982). Im *trans*-Golgi folgt anschließend die Hydrolyse des N-Acetylglucosamins durch das UCE (*uncovering enzyme*), wodurch das terminale M6P freigelegt wird (Rohrer und Kornfeld, 2001). Die so entstandenen M6P-haltigen N-Glykane können durch weitere partielle Deglykosylierungen und Aktivität von Glykosyltransferasen von dem ursprünglichen Mannosereichen- zu einem Komplex- oder Hybrid-Typ N-Glykan modifiziert werden (Kornfeld und Kornfeld, 1985). Im *trans*-Golgi Kompartiment binden die M6P-markierten Proteine an membranständige M6P-Rezeptoren (MPR), von denen es einen 46 kDa großen Kationen-abhängigen MPR46 sowie einen 300 kDa großen Kationen-unabhängigen MPR300 gibt (Hille-Rehfeld, 1995). Beide Rezeptoren kommen in endosomalen Kompartimenten sowie dem Golgi-Apparat, nicht aber im Lysosom vor. Die MPR tragen zu dem Transport der M6P-markierten Proteine durch Clathrin-umhüllte Vesikel zu den späten Endosomen bei, wo es durch den sauren pH zu einer Dissoziation von MPR und M6P-haltigem Protein kommt (Stein *et al.*, 1987). Die freien M6P-Rezeptoren werden anschließend zur Wiederverwertung in das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) transportiert oder gelangen an die Zellmembran (Figura und Hasilik, 1989).

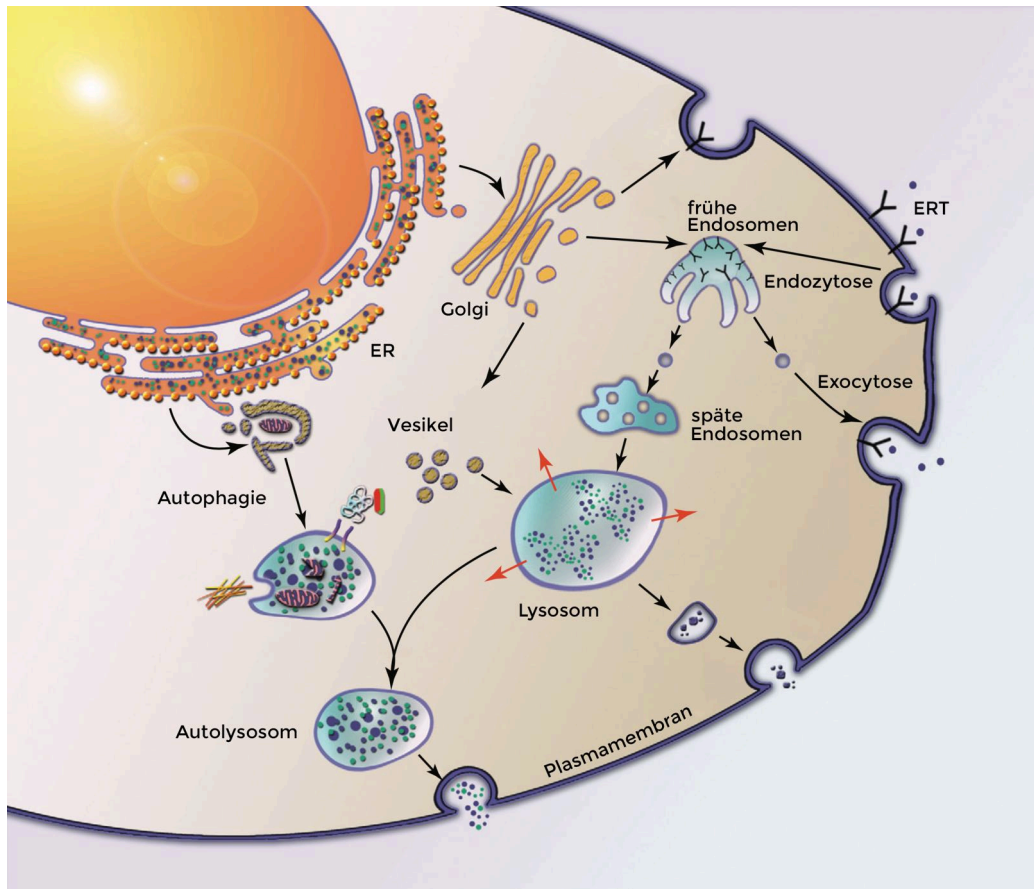


Abbildung 1: **Transportwege in eukaryotischen Zellen.** Lysosomale Proteine erreichen das Lysosom nach Synthese im endoplasmatischen Retikulum (ER) direkt, über das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) oder indirekt über die Plasmamembran. Proteine mit der spezifischen Mannose-6-Phosphat-Markierung (M6P) werden von M6P-Rezeptoren (MPR) erkannt und zu den späten Endosomen geleitet, wo pH-bedingt die Freisetzung erfolgt. MPR werden anschließend recycelt. Sekretierte M6P-markierte Proteine können teilweise durch an der Plasmamembran lokalisierte MPR erkannt und dem späten Endosom durch Endozytose zugeführt werden. Dieses stellt die Grundlage einer Enzyersatztherapie dar (mod. nach Davidson *et al.*, 2011).

Obwohl beide MPR an der Plasmamembran lokalisiert sind, ist nur MPR300 in der Lage, die Endozytose von extrazellulären, M6P-modifizierten Proteinen zu vermitteln (Braulke und Bonaficio 2009). Bis zu 20 % aller lysosomal bestimmten Enzyme werden zunächst fehlsortiert und nach Sekretion durch membranständige MPR300 erneut internalisiert (Markmann *et al.*, 2015).

Während des Transports zum Lysosom werden lysosomale Matrixproteine, die häufig als inaktives Proenzym vorliegen, um eine vorzeitige Degradation ihrer Substrate in präendosomalenen Kompartimenten zu verhindern, proteolytisch gespalten und so in die reife und aktive Form prozessiert (Hasilik, 1992). Diese teilweise autokatalytisch ablaufenden Fragmentierungsreaktionen können sowohl vom N- als auch vom C-Terminus erfolgen, wie es beispielhaft anhand der lysosomalen Protease Cathepsin D gezeigt wurde (Gieselmann *et al.*, 1985).

Neben dem M6P-abhängigen Transport wurde für einige Enzyme ein alternativer, M6P-unabhängiger Transportmechanismus beobachtet (Kasper *et al.*, 1996, Dittmer *et al.*, 1999). So wird die lysosomale Glucocerebrosidase ohne M6P-Beteiligung an das integrale Membranprotein LIMP2 gebunden zum Lysosom transportiert (Reczek, 2007). Weitere alternative MPR-unabhängige Transportwege werden diskutiert (Lefrancois *et al.*, 2003, Canuel *et al.*, 2008, Markmann *et al.*, 2015).

1.2 Lysosomale Sulfatasen

Sulfatasen (EC 3.1.6) stellen eine Gruppe hydrolytischer Enzyme dar, die spezifisch die Spaltung von Sulfateestern katalysieren und sowohl strukturell als auch mechanistisch in Prokaryoten und Eukaryoten stark konserviert sind (Hanson *et al.*, 2004). Die Sulfatasefamilie kann aufgrund verschiedener Reaktionsmechanismen in vier Subtypen unterteilt werden. Typ-I Sulfatasen sind von einer posttranslationalen Modifikation eines Serins oder Cysteins zu der ungewöhnlichen AS C α -Formylglycin (FGly) in ihrem aktiven Zentrum abgänglich (Dierks *et al.*, 1997). Neben der hohen sequenziellen Ähnlichkeit der katalytischen Domäne stimmen auch die dreidimensionale Strukturen aller bisher gelösten Molekülstrukturen stark miteinander überein. Diese Typ-I-Gruppe stellt hinsichtlich der Anzahl zugleich den größten Anteil aller bekannten Sulfatasen dar. Bei Typ-II Sulfatasen handelt es sich um Dioxygenasen mit einem Fe²⁺-Ion im aktiven Zentrum und α -Ketoglutarat als Co-Substrat (Müller *et al.*, 2004). Ebenso FGly-unabhängig sind Typ-III Sulfatasen, die sich durch ein Zn²⁺-Bindemotiv den Metallo- β -Lactamasen

zuordnen lassen (Hagelueken *et al.*, 2006). Erst kürzlich konnte eine neue Sulfatase im marinen Bakterium *Pseudoalteromonas carrageenovora* identifiziert werden, die an der Degradation von Carrageen, einem anionischen Hydrokolloid aus Rotalgen, beteiligt ist und der Familie von Amidohydrolasen angehört. Mechanistisch konnte dieses Enzym keinem der bisher bekannten Sulfatase-Typen zugeordnet werden (Genicot *et al.*, 2014).

Tabelle 1: Übersicht aller bisher bekannten humanen Sulfatasen. Neben dem physiologischen Substrat, sind die Lokalisierung sowie die bei einer Mutation auftretende Erbkrankheit aufgelistet (mod. nach Dierks *et al.*, 2009). ER = endoplasmatisches Retikulum; MLD = Metachromatische Leukodystrophie; XLI = X-chromosomale Ichthyose; CDPX = Chondrodysplasia punctata; GalNAc-4S = N-Acetyl-D-Galactosamin-4-O-Sulfat.

Sulfatase	Substrat	Lokalisierung	Erbkrankheit
Arylsulfatase A	Cerebrosid-3-O-Sulfat	Lysosomen	MLD
Arylsulfatase B	GalNAc-4S	Lysosomen	MPS-VI
Arylsulfatase C	3- β -Hydroxy-Steroidsulfat	ER	XLI
Arylsulfatase D	unbekannt	ER	unbekannt
Arylsulfatase E	unbekannt	Golgi	CDPX
Arylsulfatase F	unbekannt	ER	unbekannt
Arylsulfatase G	Heparansulfat	Lysosomen	MPS-IIIE
Arylsulfatase H	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Arylsulfatase I	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Arylsulfatase J	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Arylsulfatase K	Chondroitin-/Heparansulfat	Lysosomen	(diese Arbeit)
Galaktosamin-6-Sulfatase	Chondroitin-/Keratansulfat	Lysosomen	MPS-IVA
Glucosamin-6-Sulfatase	Keratan-/Heparansulfat	Lysosomen	MPS-IIID
Iduronsäure-2-Sulfatase	Dermatan-/Heparansulfat	Lysosomen	MPS-II
Sulf1	Heparansulfat	Zelloberfläche	unbekannt
Sulf2	Heparansulfat	Zelloberfläche	unbekannt
Sulfamidase	Heparansulfat	Lysosomen	MPS-IIIA

1. EINLEITUNG

Den Typ-I Sulfatasen konnten anhand der spezifischen Sulfatase-Signatursequenz CXPSR bisher 17 humane Sulfatasen zugeordnet werden. Jede dieser Sulfatasen weist eine hohe Spezifität gegenüber seinem jeweiligen physiologischen Substrat auf. Zu diesen Substraten gehören sulfatierte Steroidhormone, Glykolipide, aber vor allem sulfatierte Glykosaminoglykane. Sulfatasen mit einer lysosomalen Lokalisation stellen mit bislang acht Vertretern den größten Teil humaner Sulfatasen dar. Daneben ist eine Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum (Arylsulfatasen C, D und F), Golgi (Arylsulfatase E) und auf der Zelloberfläche (Sulf1, Sulf2) bekannt (Meyer *et al.*, 1979; Morimoto-Tomita *et al.*, 2002). Die Arylsulfatasen I und J konnten bisher keinem zellulären Kompartiment zugeordnet werden. Die subzelluläre Lokalisation ist dabei bislang streng an das pH-Aktivitätsoptimum der Sulfatasen gekoppelt. So weisen nicht-lysosomale Sulfatasen ein neutrales, die lysosomalen Vertreter hingegen ein saures pH-Optimum auf. Eine Übersicht aller bekannten humanen Sulfatasen kann Tab.1 entnommen werden.

1.2.1 Das Formylglycin-generierende Enzym (FGE)

Die enzymatische Aktivität von eukaryotischen Typ-1 Sulfatasen geht mit der co-translationalen Modifikation eines spezifischen Cysteins zu C α -Formylglycin (FGly) einher, wobei eine mehrstufige, O₂-abhängige Konvertierung durch das Formylglycin-generierende Enzym (FGE) erfolgt.

Bis vor Kurzem wurde dabei von einem Mechanismus ohne redoxaktives Metall ausgegangen (Dierks *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2015). Jedoch konnten aktuelle Ergebnisse zeigen, dass FGE als Co-Faktor Cu^(I) im aktiven Zentrum benötigt und damit als Metalloenzym klassifiziert werden muss (Knop *et al.*, 2017).

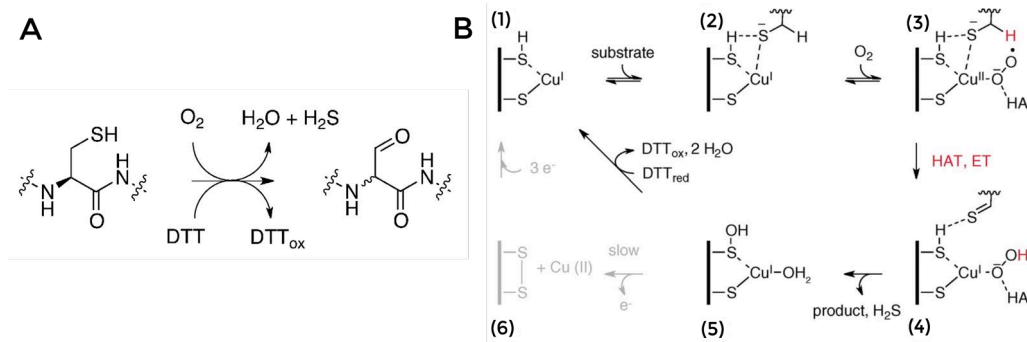


Abbildung 2: **FGE-Konvertierungsmodell.** (A) FGE katalysiert O_2 -abhängig die Konvertierung von Cystein zu Formylglycin mit einem Thiol (hier: DTT) als Reduktionsmittel (B) Postulierter Kupfer (Cu)-abhängiger Mechanismus der FGly-Generierung. Am Reaktionsbeginn liegt FGE in der $Cu^{(I)}$ -gebundenen Form vor (1). Nach Substratbindung (2) entsteht unter Einsatz von O_2 ein $Cu^{(II)}$ -Superoxo-Intermediat (3). Durch den Wasserstoff (HAT)- sowie Elektronentransfer (ET) vom Substrat auf Sauerstoff entsteht ein $Cu^{(I)}$ -Hydroperoxo-Komplex und das Substrat-Cystein wird zum Thioaldehyd oxidiert (4). Dieses hydrolysiert in der Folge unter Abspaltung von Schwefelwasserstoff zum gewünschten FGly-Produkt. Die oxidierte Form des FGEs (5) wird unter Einsatz eines Reduktionsmittels (*in vitro*: DTT) zum Ausgangszustand (1) zurückgeführt. In Abwesenheit eines Reduktionsmittels entsteht ein FGE-Intermediat ohne gebundenes Cu-Ion (6). Ein langsamer Drei-Elektronen-Prozess kann den reduzierten FGE-Cu-Komplex (1) wiederherstellen (Knop *et al.*, 2017).

FGE ist ein in seiner Struktur bislang einzigartiges Enzym, welches hochkonserviert in Pro- und Eukaryoten vorkommt. Die essentielle Rolle des FGEs für die Sulfatase-Aktivierung zeigt sich in Mutationen des für FGE-kodierenden SUMF1-Gens, wodurch es zu einem fast vollständigen Aktivitätsverlust aller FGly-abhängiger Sulfatasen kommt. Das ER-ständige FGE bindet die noch ungefaltete Sulfatase anhand der hochkonservierten Sulfatase-Signatur-Sequenz CXPXR. Der exakte Mechanismus ist weiterhin unbekannt, wobei jedoch die Bedeutung von zwei essentiellen Cysteinen (Cys336, Cys341) nahe des aktiven FGE-Zentrums von essentieller Bedeutung ist. Die durch FGE aktivierte Sulfatase kann ihrerseits in einem Transsulfatierungs-Eliminierungs-Mechanismus die Sulfatgruppe des Substrats angreifen und hydrolytisch abspalten (Abb. 3).

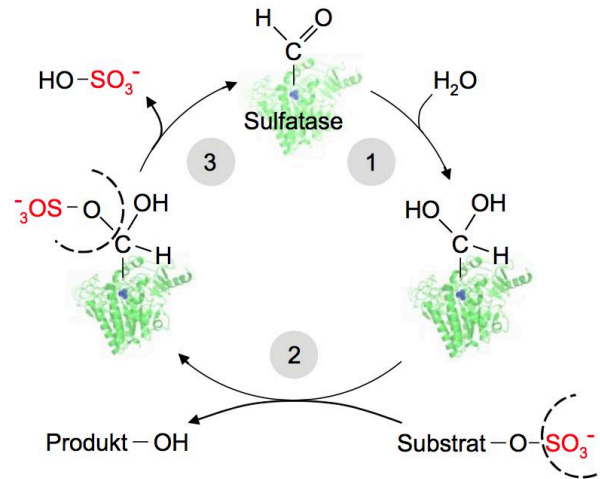


Abbildung 3: **Transulfatierungs-Eliminierungs-Mechanismus der Sulfatesterhydrolyse durch Sulfatasen.** In der Ausgangssituation liegt das FGly hydratisiert (1) als geminales Diol vor. Dadurch kann die Sulfatgruppe des Substrats nucleophil angegriffen und gebunden werden (2). Dabei erfolgt die Abspaltung des Alkohols und es kommt zur Transulfatierung. Durch intramolekulare Hydrolyse des Sulfatase-Sulfatesters durch die zweite Hydroxylgruppe (3) wird das HSO_4^- eliminiert und FGly regeneriert (Dierks *et al.*, 2009).

1.2.2 Arylsulfatase K

Die Arylsulfatase K (ARSK), früher auch als Sulf3 bzw. Telethon-Sulfatase bezeichnet, wurde in einer biochemischen Analyse des Genoms 2002 anhand der hochkonservierten Sulfatase-Signatursequenz CXPSR identifiziert. Das humane ARSK-Gen liegt auf Chromosom 5 (5q15) und besteht aus acht Exons, die das 536 Aminosäuren (AS) große ARSK-Protein mit einer 22 AS-langen Signalsequenz kodieren (Sardiello *et al.*, 2002). Trotz der relativ geringen Sequenzidentität von 18-22% zu anderen Sulfatasen konnte die ARSK anhand der vorhandenen CCPSR-Sulfatase-Signatursequenz an Position 80-84 den humanen Sulfatasen zugeordnet werden. Das für die Sulfataseaktivität essentielle FGly wird an Position 80 aus einem Cystein durch FGE modifiziert (Wiegmann *et al.*, 2013). Trotz geringer Homologie zu anderen Sulfatasen sind die Arsk-Orthologen anhand ihrer Sequenzidentität in Maus

(84%), Huhn (76%) und Zebrafisch (62%) zum humanen Protein stark konserviert. Die endogene ARSK-Expression konnte ubiquitär auf mRNA-Level humaner Gewebe gezeigt werden, wobei hohe Expressionslevel in Plazenta und Pankreas, jedoch vergleichsweise niedrige in Muskelgewebe vorzufinden sind. Im Promotorbereich der ARSK wurde die für viele lysosomale Proteine charakteristische CLEAR-Sequenz identifiziert (Palmieri *et al.*, 2011).

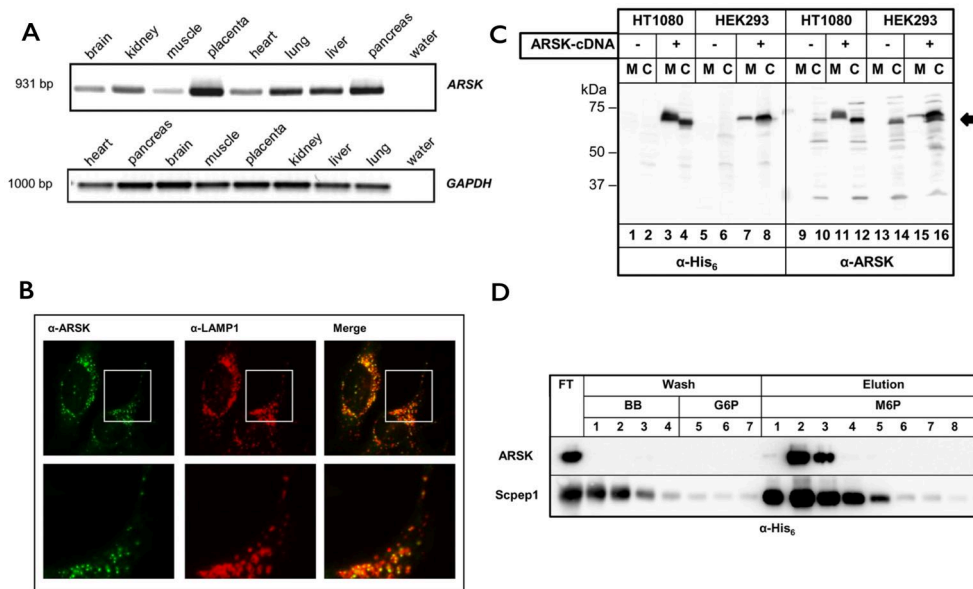


Abbildung 4: **Molekulare und zelluläre Charakterisierung der Arylsulfatase K.** (A) mRNA-Expression der ARSK in humanem Gewebe nach RT-PCR. Kontrolle und Normalisierung über GAPDH (B) Bestimmung der subzellulären ARSK-Lokalisation in murinen Fibroblasten nach zellulärer Aufnahme aufgereinigter ARSK-His₆. Gezeigt ist die Kolokalisation von ARSK zu LAMP1 (C) ARSK-Expression in HT1080- und HEK293-Zellen. Nachweis im Westernblot über α -His₆ und α -ARSK Antikörper weist ein 68-kDa großes ARSK-Protein auf (D) M6P-abhängige ARSK-Bindung an immobilisierte MPR und Nachweis mittels α -ARSK Antikörper (Wiegmann *et al.*, 2013)

Als lösliches Protein mit mehreren *N*-Glykosylierungsstellen besitzt die ARSK weder eine Transmembrandomäne, noch einen GPI-Anker (Wiegmann *et al.*, 2013). Die lysosomale Lokalisation der ARSK konnte anhand einer M6P-Modifizierung an Position 498 (Sleat *et al.*, 2006), die spezifische M6P-abhängige Bindung an immobilisierte MPR (Sleat *et al.*, 2008, Westendorf, 2010) sowie durch Kolokalisationsexperimente mit dem lysosomalen Markerpro-

tein LAMP1 (Wiegmann *et al.*, 2013) nachgewiesen werden (Abb. 4A-C). Eine humane His-markierte ARSK konnte in der aktiven, als auch inaktiven C/A-Form, bei der das für die Funktion essentielle Cystein 80 zu Alanin mutiert wurde, erfolgreich in HEK293- sowie HT1080-Zellen als 68 kDa großes Glykoprotein rekombinant exprimiert werden (Abb. 4D). Mit Hilfe des rekombinanten Enzyms konnte der enzymatische Umsatz der beiden artifiziellen Sulfatase-Pseudosubstrate *para*-Nitrocatecholsulfat (pNCS) und *para*-Nitrophenylsulfat (pNPS) bei einem pH-Optimum von 4.6 nachgewiesen werden, jedoch nicht mit der inaktiven C/A-Mutante (Wiegmann *et al.*, 2013). Wegen ihrer geringen Sulfataseaktivität gegenüber pNCS von ~ 1 U/mg wird die ARSK als sogenannte Nicht-Arylsulfatase klassifiziert. Andere zu den Arylsulfatasen zählende lysosomale Sulfatasen weisen hingegen eine Aktivität von 5-100 U/mg gegenüber den Pseudosubstraten auf (Hanson *et al.*, 2004).

In einer kürzlich erschienenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnte anhand synthetischer Disaccharide-Substrate gezeigt werden, dass ARSK selektiv die 2-O-Sulfatgruppe des 2-Sulfoglucuronats abspaltet (Dhamale *et al.*, 2017). Damit dürfte die ARSK an der Degradation derart sulfatierter Glykosaminoglykane beteiligt sein. Die weitere Beschreibung dieser Aktivität und der physiologischen Relevanz der Arsk ist Gegenstand der hier vorliegenden Arbeit.

1.3 Glykosaminoglykane

Glykosaminoglykane (GAGs) sind lineare, physiologisch-relevante Kohlenhydrate aufgebaut aus sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten. Diese bestehen aus einem Aminozucker (Galactosamin bzw. Glucosamin) und entweder einer Uronsäure (Glucuronsäure bzw. Iduronsäure) oder Galactose. Entsprechend ihrer Monosaccharid-Zusammensetzung wird dabei zwischen sechs GAG-Typen unterschieden. Neben den Glucuronat-haltigen GAGs Chondroitinsulfat (CS) und Heparansulfat (HS) kommen ferner Hyaluronsäure (HA), Keratansulfat (KS), Dermatansulfat (DS) und Heparin (HP) vor. Der molekulare GAG-Aufbau ist Abb.5 zu entnehmen.

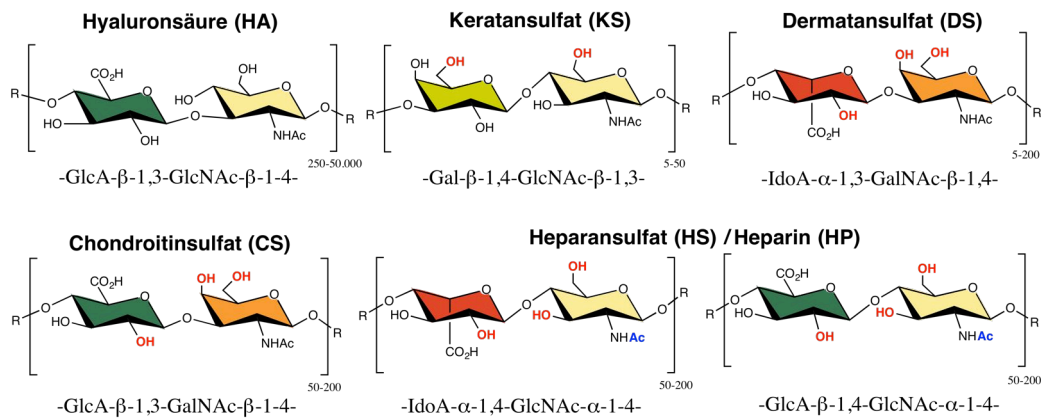


Abbildung 5: **Glykosaminoglykan-Struktur.** Chemische Struktur der sich wiederholenden Disaccharid-Einheiten verschiedener Glykosaminoglykane. Hydroxyl-Gruppen (rot) und *N*-Acetyl-Gruppen (blau) können sulfatiert vorliegen. GlcA = Glucuronsäuren, GlcNAc = *N*-Acetylglucosamin, Gal = Galactose, GalNAc = *N*-Acetylgalaktosamin, IdoA = Iduonsäure (Bülow and Hobert, 2006).

Mit Ausnahme der Hyaluronsäure, die durch die Hyaluron-Synthase in der Plasmamembran gebildet wird, werden alle weiteren GAGs als Bestandteile von Proteoglykanen im endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und im Golgi posttranslationalen Modifikationen unterzogen (Laurent *et al.*, 1996). CS und DS enthalten als einzige GAGs Galactosamin (GalNAc) als Aminozucker, wodurch diese als Galactosaminoglykane (GalAGs) klassifiziert werden. Alle weiteren GAGs enthalten Glucosamin (GlcNAc) als Aminozucker in ihrer Struktur, was sie als Glucosaminoglykane (GlcAGs) charakterisiert. Die Glucuronat-haltigen Glykosaminoglykane Chondroitinsulfat sowie Heparansulfat stehen, bedingt durch eine mögliche 2-O-Sulfatierung an ihrer Glucuronat-Einheit, als potentielle Arsk-Substrate im Fokus dieser Arbeit. CS aufgebaut aus $\beta 1 \rightarrow 3$ verknüpften GlcA- und GalNAc-Einheiten kann neben der C2-Position am GlcA an C4- oder C6-Position des GalNAc durch Sulfatierungsreaktionen weiter modifiziert werden, wodurch bisher insgesamt 24 verschiedene Disaccharid-GalAGs bekannt sind (Karamanos *et al.*, 1994). Heparin und Heparansulfat gehören zu den GlcAGs, wobei sie durch eine $\beta 1 \rightarrow 4$ glykosidische Bindung der Uronsäure mit GlcNAc verknüpft sind. Der GlcNAc-Aminozucker kann sowohl N-acetyliert, als auch N-sulfoniert vorlie-

gen was weitere strukturelle Modifikationen wie die Epimerisierung an C5- des GlcA und O-Sulfatierung an C2- des IdoA und C6-Position des Glucosamins ermöglicht (Salmivirta *et al.*, 1996). Seltener auftretende Modifikationen sind die O-Sulfatierungen an C2- des GlcA und an C3-Position der *N*-sulfonierten Glucosamine. Ferner müssen nicht alle vorhandenen Hydroxyl-Gruppen modifiziert vorliegen, was die strukturelle Diversität dieser GAGs nochmals erhöht (Gallagher, 1997).

Die GAGs HA, KS und DS werden hier aufgrund fehlender Arsk-spezifischer Relevanz nicht weiter beschrieben.

1.3.1 Glykosaminoglykan-Funktion

GAGs wurden historisch aufgrund ihrer viskosen Konsistenz häufig als Mucopolysaccharide beschrieben. Als kovalent gebundener Hauptbestandteil der sogenannten Proteoglykane (PG) übernimmt diese stark heterogene Proteinfamilie eine Vielzahl für den Organismus essentieller Funktionen, die anhand ihrer zellulären Lokalisation und des gebundenen Kern-Proteins klassifiziert werden. Durch Wechselwirkungen mit Chemokinen, Zytokinen, Wachstumsfaktoren und weiteren Enzymen nehmen GAGs eine wichtige Rolle als zelluläre Komponente ein. Zu den physiologischen Aufgaben zählen neben der formgebenden Funktion als Hauptbestandteil des Bindegewebes, die Vermittlung von Zell-Kontakten, Wasserspeicherung und Signalweiterleitung (Perri-mon und Bernfield, 2001). So führt der Defekt der EXT1-Polymerase, die an der HS-Synthese beteiligt ist, zu einem letalen Defekt der Gastrulation während der Embryogenese (Lin *et al.*, 2000). GAGs werden ferner als co-Rezeptoren bei Infektionsprozessen genutzt, wie am Beispiel der Adenoviren und Herpes simplex Viren gezeigt wurde. Dabei interagieren virale Hüllproteine mit GAGs, die an Zelloberflächen gebunden sind und ermöglichen so den initialen Kontakt und eine daraus folgende Infektion der Zelle (Cabri-ni *et al.*, 2001, Spear *et al.*, 1992). Aktuelle Forschungen diskutieren GAGs als mögliche Biomarker, die bei der Diagnose von Nierenkrebs herangezogen werden könnten (Ucakturk *et al.*, 2015). Die bereits beschriebenen GAG-Modifikationen führen zu einer großen strukturellen Variabilität innerhalb

dieser Polysaccharide und ermöglichen so eine Vielzahl von Interaktionen zwischen GAGs und anderen Molekülen (Tveit *et al.*, 2005).

1.3.2 Glykosaminoglykan-Synthese

Der bei der GAG-Synthese entstehende GAG-Typ wird von der enzymatischen Aktivität von Hexosamintransferasen bestimmt, wobei noch nicht bekannt ist wie die Selektion zwischen dem Einbau eines *N*-Acetylglucosamins oder *N*-Acetylgalaktosamins stattfindet (Lamari *et al.*, 2002).

Exemplarisch wird hier die Syntheseroute von CS und HS beschrieben. Die HS- bzw. CS-Synthese lässt sich in die Schritte Polymerisierung und Modifikation unterteilen, wobei die Synthese des sog. Tetrasaccharid-Linkers für beide GAG-Typen identisch verläuft. Das Linkermolekül, bestehend aus Xylose (Xyl), zwei Galaktosen (Gal) sowie Glukuronsäure (GlcA), wird an ein Serin oder Threonin innerhalb der Polypeptidkette des Trägerproteins gebunden (Esko und Zhang, 1996) (Abb. 6).

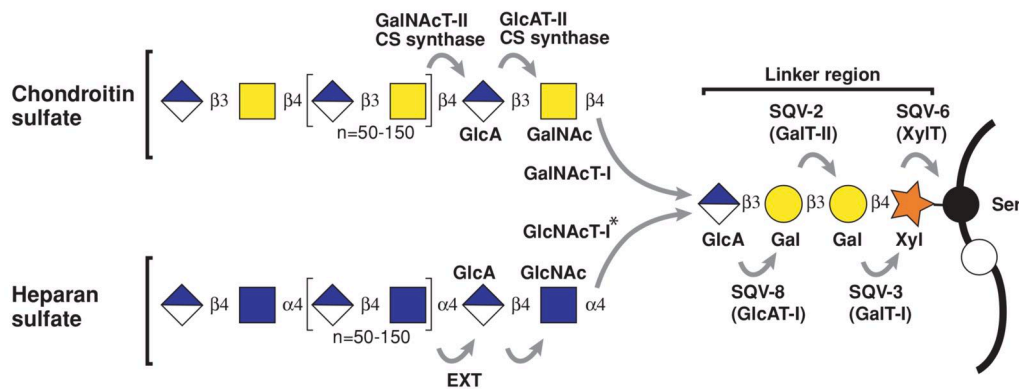


Abbildung 6: **Chondroitinsulfat- und Heparansulfat-Synthese.** CS, DS, und HS weisen den identischen Aufbau des Tetrasaccharid-Linkers auf, der die GAG-Einheiten an ein Ser/Thr von Proteinen bindet. Die Aktivität der Galaktosyltransferase (GalNAcT-I) oder Glucosaminyltransferase (GlcNAcT-I) überträgt den ersten Aminozucker-Rest und bestimmt damit den Aufbau des GAG. Die Polymerisation erfolgt durch die aufeinander folgende Aktivität diverser Enzyme (Bülow und Hobert, 2006).

1. EINLEITUNG

Die CS-Synthese erfolgt durch die aufeinanderfolgende Aktivität von drei Enzymen. Die Galaktosyltransferase (GalNAcT-I) katalysiert die Bindung des Galaktosamins an GlcA des Linkermoleküls. Die Chondroitinsynthasen (ChSy) mit GalNAcT-II- und GlcAT-II-Aktivität co-polymerisieren die Saccharidkette anschließend abwechselnd durch GlcA und N-Acetylgalaktosamin (GalNAc). Im Fall des HS wird nach Synthese des Linkermoleküls die co-Polymerisierung von N-Acetylglucosamin (GlcNAc) und GlcA durch die Glucosaminyltransferase (GlcNAcT-I) initiiert. Die weiteren Syntheseschritte werden durch die Proteinfamilie EXT (*exostosis family of proteins*) vermittelt. Nach Abschluss der Polymerisierung erfolgt die Modifizierung der Disaccharidketten durch eine Gruppe von N-Acetyl-Deacetylasen bzw. -Sulfotransferasen (NDST). Weitere Diversifikation wird durch die stellenweise Konversion der Glucuronsäuren zu dem Epimer Iduronsäure erreicht.

1.3.3 Glykosaminoglykan-Abbau

Mit Ausnahme der Hyaluronsäure beginnt der Abbau von Glykosaminoglykanen mit der proteolytischen Spaltung von Proteoglykanen in der extrazellulären Matrix. Diese Spaltung ermöglicht die Aufnahme der GAGs über frühe und späte Endosomen zum Lysosom, wo die finale Degradation erfolgt (Yanagishita und Hascall, 1992). Die Proteinkomponente wird im Fall von Heparansulfat-Proteoglykanen durch die β -D-Endo-Xylosidase und β -D-Endo-Galactosidase vom Saccharid getrennt (Takagaki *et al.*, 1988). Die eigentliche Heparansulfat-Kette wird weiter durch die Heparanase, die sowohl Glucuronidase-, als auch Acetylhexosaminidase-Aktivität aufweist zu zwei bis sechs langen Saccharid-Einheiten hydrolysiert (Fuller *et al.*, 2006). Am Abbau der nun vorliegenden Oligosaccharide sind mindestens neun weitere lysosomale Enzyme aufeinanderfolgend beteiligt (Abb. 7).

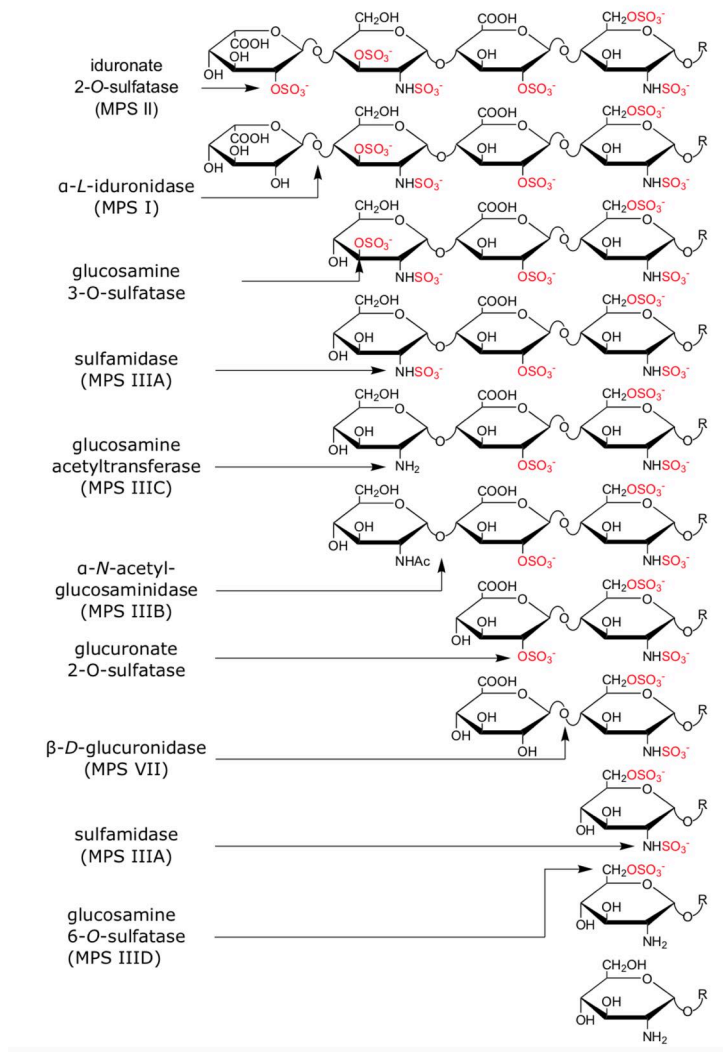


Abbildung 7: Glykosaminoglykan-Degradation am Beispiel des Heparansulfats. Der sequentielle Abbau des Heparansulfats erfordert die Aktivität von mindestens neun Enzymen (Dhamale *et al.*, 2017).

Durch die definierte Reihenfolge des Abbaus kommt es zu einer Blockade des gesamten Abbau-Prozesses, sobald ein vorheriger enzymatischer Schritt nicht durchgeführt werden kann. Eine Deglykosylierung erfolgt durch die drei Glykosidasen β -Glucuronidase, α -Iduronidase und α -N-Acetylglucosaminidase vom nicht-reduzierenden Ende (NRE) des Oligosaccharids. Die spezifische Desulfatierung der Saccharide übernehmen fünf Sulfatasen, wobei die phy-

siologischen Substrate drei dieser Sulfatasen, der Iduronat-2-Sulfatase, der *N*-Acetylglucosamin-6-Sulfatase und der Heparan-*N*-Sulfatase (Sulfamidase) bereits nachgewiesen wurden (Wilson *et al.*, 1990; Freeman *et al.*, 1989; Kresse *et al.*, 1973). Zuletzt konnte gezeigt werden, dass die Arylsulfatase G (ARSG) eine Glucosamin-3-O-Sulfatase-Aktivität und die hier beschriebene Arylsulfatase K eine Glucuronat-2-O-Sulfatase-Aktivität aufweisen (Kowalewski *et al.*, 2014; Dhamale *et al.*, 2017). Die Acetylierungsreaktion wird durch die Heparansulfat Acetyl-CoA: α -Glucosaminid-*N*-Acetyltransferase vermittelt und ist dahingehend eine Besonderheit im Lysosom, da es die bislang einzig bekannte anabole Reaktion in diesem Kompartiment darstellt (Durand *et al.*, 2010). Die nach dem Abbau vorliegenden monomeren Bestandteile des Heparansulfats in Form von desulfatierten Monosacchariden können Metabolismus als wichtige Bausteine für anabole oder katabole Prozesse zugeführt werden (Rome und Hill, 1986).

1.4 Lysosomale Speichererkrankungen

Lysosomale Speichererkrankungen (LSD) sind eine heterogene Gruppe von über 50 monogenetisch vererbaren Erkrankungen, bei denen durch eine Genmutation der Substratabbau im endo-lysosomalen Weg beeinträchtigt ist. Folglich akkumulieren mit der Zeit Substrate des defizienten Enzyms in den Lysosomen der betroffenen Zellen, was zu einem progressiven Krankheitsverlauf führt (Futerman *et al.*, 2010). Die Klassifizierung von LSDs erfolgt üblicherweise anhand des akkumulierenden Substrats, wobei es häufig zu einer sekundären Speicherung von Material kommen kann, die in keiner direkten Verbindung zum primären Enzymdefekt steht. Einzelne LSDs treten mit einer relativ geringen Wahrscheinlichkeit ($<1:250000$) auf, wobei die kumulative Betrachtung aller Variationen eine Wahrscheinlichkeit von 1:8000 bei Neugeborenen erreicht (Hopwood *et al.*, 2006). Das klinische Bild der Speichererkrankung kann sich viszeral, skelettal, hämatologisch, aber vor allem neurologisch manifestieren. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Vulnerabilität eines bestimmten Zelltyps gegenüber der auftretenden Substratakkumulation. Obwohl bei $\frac{2}{3}$ aller LSDs eine ZNS-Beteiligung vorliegt, fällt die

eingelagerte Speichermenge im Hirn verglichen mit anderen betroffenen Organen zumeist geringer aus (Sestito *et al.*, 2017). Pathologisch wird vielmehr eine Dysfunktion als der Verlust von neuronalen Zellen beobachtet, wobei der Zelltod die Endphase der Krankheit darstellt. Eine Ausnahme nimmt hierbei der Verlust von Purkinje-Zellen ein, der aufgrund von akkumulierendem Material im Kleinhirn beobachtet wird und in verschiedenen LDSs wie der Niemann–Pick-Krankheit, den neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen, MPS-IIIE oder Fucosidose auftritt (Bellettato *et al.*, 2010; Kowalewski *et al.*, 2012; Durand *et al.*, 1969). Mögliche Symptome von LDSs können sich bei raschem Verlauf bereits im Uterus bzw. der frühen Neugeborenen-Phase (früh infantil) oder auch im späteren Verlauf des Lebens als fortschreitend-infantile bis zur juvenil-adulten, der langsam fortschreitenden Form ausprägen. In einigen Fällen wie dem Hurler-Syndrom (MPS-I) lässt sich die Manifestation der Erkrankung anhand einer charakteristischen Gesichtsdysmorphie bereits im Säuglingsalter diagnostizieren. Mögliche weitere Symptome, die alleine oder in Kombination auftreten können, sind Tab.2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Mögliche Beteiligung und Symptome im Fall lysosomaler Speichererkrankungen.

Beteiligung	Symptome
viszeral	Hepatosplenomegalie, vergrößerte & gefüllte Vakuolen
skelettal	Knochendysplasie (Fehlbildung), Knochendichte, Osteonekrose
visuell	Hornhaut-, Linsen-Degeneration, retinale Dystrophie, Blindheit
neurologisch	Neurodegeneration, Epilepsie, psychische Beeinträchtigung
weitere	Herz (Kardiomegalie), Haut (Angiokeratoma), Niere

1.4.1 Mukopolysaccharidosen

Bei Mukopolysaccharidosen handelt es sich um eine große Untergruppe der LDSs die zugleich mit $\sim 30\%$ die häufigsten LSD-Diagnosen darstellen (Lowry *et al.*, 2000). MPS-Erkrankungen sind durch Mutationen in den Genen charakterisiert, welche in der Degradation von Glykosaminoglykanen beteiligt sind. Multiple Organe und Gewebe können bei den verschiedenen MPS-

1. EINLEITUNG

Erkrankungen betroffen sein, wobei häufig auch das ZNS mit der Zeit geschädigt wird. Die Stärke der Krankheitsausprägung sowie die Progressivität der LSD hängt mit dem spezifischen MPS-Typ und der Mutation zusammen. So leiden MPS-I, -II, -III und -VII Patienten an einem klassischen Phänotyp mit progressiver neuronaler Degeneration, während MPS-IV und -VI-Patienten überwiegend einen skelettalen Phänotyp aufweisen (Tab.3).

Tabelle 3: Übersicht aller bisher bekannter Gendefekte und den daraus resultierenden Mukopolysaccharidosen (mod. nach Muenzer, 2011).

MPS	Enzym	Gen	Zuordnung	Speichermaterial
MPS-I	α -L-Iduronidase	IDUA	viszeral	DS,HS
MPS-II	Iduronat-2-Sulfatase	IDS	viszeral	DS,HS
MPS-IIIA	Heparan-N-Sulfatase	SGSH	neuronal	HS
MPS-IIIB	α -N-Acetyl-Glucosaminidase	NAGLU	neuronal	HS
MPS-IIIC	Heparan- α -Glucosaminid N-Acetyltransferase	HGSNAT	neuronal	HS
MPS-IIID	N-Acetylglucosamin-6-Sulfatase	GNS	neuronal	HS, KS
MPS-IIIE	Arylsulfatase G	ARSG	neuronal	HS
MPS-IVA	Galactosamin-6-Sulfatase	GALNS	skelettal	CS, KS
MPS-IVB	β -Galactosidase	GLB1	skelettal	KS
MPS-VI	Arylsulfatase B	ARSB	viszeral	CS, DS, HS
MPS-VII	β -Glucuronidase	GUSB	viszeral	CS, DS, HS
MPS-IX	Hyaluronidase 1	HYA1	-	HA

Vor allem die Diagnose von Patienten einer langsam fortschreitenden MPS-Variante gestaltet sich schwierig und beginnt häufig mit der Analyse des Urins, der aufgrund nicht abgebauter Substrate häufig einen erhöhten oder pathologisch-auffällig zusammengesetzten GAG-Spiegel aufweist. Ferner stellen die DNA-Sequenzierung sowie spezifische enzymatische Aktivitätsassays weitere Diagnosemöglichkeiten dar (Lehman *et al.*, 2011). Durch den sequenziell ablaufenden Glykosaminoglykanabbau führt ein Defekt in einem der involvierten Enzyme häufig zu einer krankheitsspezifischen und unter nor-

malen Umständen nicht auftretenden Struktur am nicht-reduzierenden Ende (NRE) der GAG-Zuckerketten. Durch NRE-Analysen des Speichermaterials kann auf das defekte Enzym zurückgeschlossen werden (Fuller *et al.*, 2004; Lawrence *et al.*, 2012).

Zum derzeitigen Zeitpunkt ist eine Enzym-Ersatztherapie (ERT) für MPS-I, -II und -VI etabliert und reduziert dabei vorwiegend nicht-neurologische Symptome, da das zugeführte aktive Enzym aufgrund der Blut-Hirn-Schranke das ZNS nicht erreichen kann. Besonders die Gentherapie gilt als alternativer und hinsichtlich der ZNS-Erreichbarkeit vielversprechendster Therapieansatz der Zukunft. Dabei wird dem Patienten eine korrekte, kodierende (c)DNA-Sequenz des fehlenden oder defekten Enzyms über Adenovirus-assoziierte virale Vektoren (rAAV) injiziert (Bosch *et al.*, 2014). Neben hohen Behandlungskosten bringt die Gentherapie jedoch auch diverse Limitierungen und Gefahren mit sich, wie eine mögliche Immunreaktion des Patienten durch den Einsatz viraler Vektoren sowie den fehlerhaften Einbau der injizierten DNA, der zu einem zusätzlichen Gendefekt führen kann.

1.4.2 Maus als Modellorganismus für lysosomale Speichererkrankungen.

Tiermodelle tragen einen entscheidenden Anteil zum Verständnis und der Aufklärung vieler LSDs bei. Sowohl in natürlich auftretenden Tiermodellen (Hund, Katze, Schaf) als auch in induzierten Mausmodellen konnten erfolgreich Studien zur Pathogenese verschiedener LSD durchgeführt werden. Tiermodelle ermöglichen es, die physiologische Bedeutung eines Enzyms und ein durch den *knock-out* bedingtes Krankheitsbild sowie einen möglichen Krankheitsverlauf zu verstehen. Eine besondere Rolle nehmen dabei auch die Bewertung von Wirksamkeit und Sicherheitsaspekten bei der Therapie von LSDs ein. Tiermodelle stellen damit häufig die Grundlage einer zukünftigen erfolgreichen Therapie im Menschen dar (Ellinwood *et al.*, 2004).

So konnte durch reverse Genetik an dem MPS-IIID-Mausmodell viele Jahre vor der Identifikation der humanen Mutationen, das Ausschalten der *N*-Acetylglucosamin-6-Sulfatase (GNS) durchgeführt werden (Beesley *et al.*,

1. EINLEITUNG

2007). Erst hierdurch wurde der kausale Zusammenhang zwischen Gendefekt und der Sulfatasedefizienz geschlussfolgert. Durch eine induzierte Mutation der lysosomalen Arylsulfatase G (Arsg) konnte vom Phänotyp der Maus auf die enzymatische Funktion sowie deren physiologische Relevanz geschlossen werden. Für die Arsg konnte so der Einfluss auf das zentrale Nervensystem, Autophagie-Prozesse sowie die Retina-Degeneration durch die Identifikation des physiologischen 3-O-Substrats gezeigt werden (Kowalewski *et al.*, 2015). Auch dank des neu erlangten Wissens aus dem Mausmodell wurden kürzlich erstmals ARSG-defiziente Patienten diagnostiziert (Khateb *et al.*, 2017).

Allgemein eignen sich Mäuse durch ihren genetisch identischen und definierten Hintergrund, ihre vergleichsweise einfache Zucht, kurze Generationszeiten und daraus resultierende große mögliche Anzahl an Individuen hervorragend zur Verfolgung des gewünschten Forschungsziels. Große Kohorten ermöglichen auch den Einsatz von Individuen in Verhaltenstests um statistisch relevante Signifikanzen zu erreichen. Im Gegensatz zu großen Tiermodellen wie Hund oder Katze fallen ferner Zucht- und Therapiekosten im Mausmodell vergleichsweise gering aus. Trotz vieler Vorteile haben Tiermodelle aber auch ihre Limitierungen, wenn es um die Bewertung der entsprechenden Erkrankung im Menschen geht. Mehrere MPS-IVA Mausmodelle, in denen die GALNS-Funktionalität abhanden ist, konnten den humanen skelettalen Phänotyp nicht nachbilden. Vermutet werden hierbei Unterschiede in Synthese und der intrazellulären Verteilung des GAGs Keratansulfat zwischen den Spezies. Eine Arylsulfatase A (ARSA)-Defizienz führt im Menschen zu einer ausgeprägten Demyelinisierung des ZNS mit einhergehender Leukodystrophie, während die KO-Maus zwar Speichermaterial in Form von sulfatierten Glycolipiden, jedoch keine entsprechende Demyelinisierung des ZNS aufweist (Gieselmann *et al.*, 2001).

2 Zielsetzung der Arbeit

Die Arylsulfatase K (ARSK) wurde anhand der stark konservierten Sulfatase-Signatursequenz in einer genomweiten Suche 2002 als neue humane Sulfatase identifiziert. Vorarbeiten konnten die für Typ-1 Sulfatasen essentielle Formylglycin-Modifikation im aktiven Zentrum und die lysosomale Lokalisation bestätigen, wodurch die ARSK als weiteres Enzym-Mitglied der lysosomalen Sulfatasen zugeordnet werden konnte. Zuletzt konnte für die ARSK anhand synthetischer Disaccharid-Substrate eine Funktion als Glucuronat-2-Sulfatase nachgewiesen werden (Dhamale *et al.*, 2017). Mit der Etablierung und Charakterisierung des Arsk-Mausmodells soll nun die physiologische Relevanz des Enzyms geklärt werden.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit bestand in der Charakterisierung des Arsk-defizienten Mausmodells. Dabei sollte zunächst der Arsk-*knockout* durch diverse biochemische und molekularbiologische Methoden validiert und auf mögliche pathophysiologische Befunde, die auf eine fehlende Arsk-Aktivität zurückzuführen sind, analysiert werden. Dazu zählten neben der möglichen Einlagerung von Speichermaterial, der Einfluss auf das gesamte endolysosomale System durch sekundäre Effekte hervorgerufene Beeinträchtigungen des zentralen Nervensystems sowie Ossifikationsprozesse. Im Fokus stand dabei die Suche nach akkumuliertem Speichermaterial in sogenannten Speichervakuolen, wie sie für diverse lysosomale Speichererkrankungen beschrieben werden konnten. Diese Merkmale könnten in dem Fall des Arsk-Defekts zu einem neuen und bislang nicht identifizierten MPS-Typ führen.

Durch Isolierung des Speichermaterials aus murinem Gewebe und dem Verdau mit rekombinanter ARSK sollte die *in vivo* Funktion als Glucuronat-2-Sulfatase (GDS) bestätigt werden. Dies wäre ein wichtiger Beitrag zum Verständnis des sequenziellen Abbauprozesses der GAGs Heparansulfat und Chondroitinsulfat, die beide Glucuronat-2-Sulfat enthalten.

Nach der Validierung des Arsk-Substrats sollte in einem letzten Teil dieser Arbeit ein weiterer spezifischer Arsk-Aktivitätsassay unter Verwendung von angereicherten Lysosomen etabliert werden. Dieser sollte neben der Validie-

2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

rung einer fehlenden GDS-Aktivität im Arsk-Mausmodell als Ursache der Speicherbildung auch die Identifikation potentieller und bisher noch nicht identifizierter ARSK-defizienter Patienten deutlich erleichtern.

3 Material

3.1 Laborausstattung

Gerätename	Hersteller
ÄKTA Ettan LC system	GE Healthcare
ÄKTA Explorer system	GE Healthcare
Acrylamidgel-Elektrophoresekammer	Universität Bielefeld
Analysewaage Modell 1602 MP	Sartorius
Analysewaage Labsytel 3002	Mettler Toledo
Brutschrank HERACell	Thermo Electron
CO ₂ - Inkubationsschrank Heraeus	Heracell
Dampfsterilisator, Webeco Automat	Webeco
Dampfsterilisator, Laboklav 160 MSLV-FA	Steriltechnik AG
Drehinkubator, Stuart SB3	Stone, Staffordshire
Drehinkubator, Stuart SRT1	Stone, Staffordshire
Drehinkubator, Rotator RS-60	Biogenet, Jozefow
Drehrad für Eppendorfgefäße	Eigenbau
ECL-Kamera LAS-3000	Fuji Foto Film
Eismaschine Ziegra B-100	Ziegra-Eismaschinen
Elektrophoresegerät Power Pac 200	Biorad Laboratories
Elektrophoresegerät Power Pac 300	Biorad Laboratories
Elektrophoresegerät Power Pac 1000	Biorad Laboratories
Elektroporator, 2510	Eppendorf AG
Gelelektrophoresekammer f. Agarosegele	Universität Bielefeld
Gelelektrophoresekammer f. SDS-Gele	Universität Bielefeld
Gelelektrophoresekammer f. SDS-Gele	BioRad
Gefriertruhe -80 °C	SANYO Biomedical Co. Ltd.
Gefriertruhe -150 °C	SANYO Biomedical Co. Ltd.
Geltrockner Modell Gel Air Dryer	Biorad
Glasflaschen	Schott
Glasmesspipetten, 5/10/20 mL	Hirschmann EM Techcolor
Heizblock HTM 130	HLC

3. MATERIAL

Gerätename	Hersteller
Heizblock, Thermomixer 5436/compact	Eppendorf AG
Homogenisator Ultra-Turrax	IKA-Werke
Inkubationsschüttler, G25	New Brunswick Scientific
Inkubationsschüttler, Innova 42/4300	New Brunswick Scientific
Lichtmikroskop MZ75	Leica Microsystems
Magnetrührer, IKAMAG REO	IKA Labortechnik
Magnetrührer, MR 0/80/82	Heidolph Instruments
Magnetrührer, VMS C7	VWR International
Mikroliterpipetten	ABIMED Analysen Technik
Microscope, LSM700	Zeiss
Microscope, DM5000	Leica
Mikrotiter-Lesegerät, Tecan infinite M200	Tecan Deutschland
Microtome SM 2000R	Leica
Mikrowelle	LG Wavedom
Mili-Q Wasser-Reinigungsanlage	Milipore
Nano-drop ND 1000	Thermo Scientific
PCR- Cycler T personal	Biometra
PCR- Gerät Primus 96 advanced gradient	Peqlab
PCR-Gerät, PTC-200	Biozym Diagnostic
pH-Messgerät Seven Multi	Mettler Toledo
Photometer infinite M200	Tecan Group Ltd.
Pipetman Mikroliterpipetten	Gilson
Pipettierhilfe	Drummond Scientific
Sterilwerkbank, Heraeus HERAsafe	Thermo Electron
Schüttler Roto Shake Genie	New Brunswick Scientific
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments
Schüttler GFL 3005/3006	Gesellschaft für Labortechnik
Sterilwerkbank, Heraeus HERArSafe	Thermo Electron
Sterilwerkbank, CleanAir, DLF/BBS 6	C-Tec Cleanroom Technology
Thermomixer comfort	Eppendorf
ULTRA-TURRAX	IKA
Ultrazentrifuge Optima™ Max	Beckman Coulter

3. MATERIAL

Gerätename	Hersteller
Ultrazentrifuge Ultra Pro 80	Sorvall
Vortex-Gerät Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Thermoschüttler GFL 3005	HLC
Thermoschüttler HTM 130	HLC
TLA55 Festwinkelrotor (1,5 mL)	Beckman Coulter
TH-641 Ausschwingrotor Festwinkelrotor	Sorvall
T-880 Festwinkelrotor	Sorvall
Ultraschallgerät Sonorex	Heinemann
Ultrazentrifuge Optima Mac	Optima
UV-Handmonitor, VL 4.LC	Vilber Lourmat
Vortex Genie 2	Bender & Hobein
Zellzählgerät Cedex XS	Roche Diagnostics
Zentrifuge (kühlbar) Eppendorf 5417R	Sorvall
Zentrifuge (kühlbar) Eppendorf 5804R	Sorvall
Zentrifuge (kühlbar) Sorvall RC-5B	Sorvall
Zentrifuge Eppendorf centrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge Eppendorf centrifuge 5804R	Eppendorf

3. MATERIAL

3.2 Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Verbrauchsmaterialien von den folgenden Herstellern eingesetzt: Sarstedt AG, GE Healthcare.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
6-well- Platte f. Zellkultur Nunclon surface	Nunc
Pipettenspitzen 1 mL, 200 μ L, 10 μ L	Omnitip
Kryoröhrchen 1,6 mL f. Zellkultur	Sarstedt
Einmalkanülen, -Spritzen	Braun
Erlenmeyerflasche 125 mL mit Filterverschluss	Corning
Erlenmeyerflasche 250 mL mit Filterverschluss	Corning
Erlenmeyerflasche 500 mL mit Filterverschluss	Corning
Einmalpipetten 5/10/20 mL	Sarstedt
Kryoröhrchen	Nunc
PCR-Reaktionsgefäße 200	Biozym Scientific
Pipettenspitzen	Omnitip
Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran	Whatman
Reaktionsgefäße 1,5 mL und 2 mL	Sarstedt
Reaktionsgefäße 10 mL, 15 mL und 50 mL	Sarstedt
Whatman-Filterpapier	Whatman
Whatman GB002 Papier	GE Healthcare
Zellkulturflaschen T25, T75	Nunc
Zellkulturplatten 12/24 well	Nunc
Zellkulturschalen 14cm	Nunc

3.3 Chemikalien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien in analytischer Qualität (p.A) von den folgenden Herstellern eingesetzt: Merck KG, SIGMA, Carl Roth.

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Lonza
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Agarose	Carl Roth
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich Chemie
Bradford-Reagenz	BioRad Laboratories
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva
Dabco	Roth
DAPI	Sigma
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	Roche Diagnostics
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth
Digitonin	Sigma
DNA- Marker 100 bp & 1 kb	New England Biolabs
DMEM (4,5 g/L Glucose) Pulver	Invitrogen
Escherichia coli DH5a	Invitrogen
Ethidiumbromid	Carl Roth
Filipin III (Streptomyces filipinensis)	Sigma
Fötales Kälberserum (FKS)	Cambrex
G418	Calbiochem
Glutaraldehyd 25%	Carl Roth
Hydrogenperoxid	Sigma
L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen
Magermilchpulver	TSI
Mowiol	Roth
Nuclear Fast Red	Roth
OptiMEM Medium	Gibco, Invitrogen

3. MATERIAL

Chemikalie	Hersteller
para-Formaldehyd	Roth
para-Nitrophenyl- α - <i>N</i> -Acetyl-b- <i>D</i> -Glucosaminid	Roth
para-Nitrophenyl- α - <i>D</i> -Mannopyranosid	Sigma
para-Nitrophenyl- α - <i>L</i> -Fucopyranosid	Roth
Ponceau S	Merck
PEI (MW 40000)	Polyscience Europe
Pen. 10.000 UI/ml Strep. 10.000 UI/ml	Lonza
Protein Marker Precision Plus	BioRad
Proteinase Inhibitor-Mix	Sigma-Aldrich
Rotiphorese A 30% Acrylamid- Lösung	Roth
Rotiphorese B 2% Bisacryamid- Lösung	Roth
SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate	Pierce
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce
TEMED	Roth
β -Mercaptoethanol 99%	Sigma Aldrich
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth
Triton-X 100	Carl Roth
Trypanblaulösung (4x)	Sigma Aldrich Chemie
Trypsin-EDTA Lösung	Gibco, Invitrogen
Trypton	Carl Roth
Tween 100	Carl Roth
Tyloxapol (Triton WR-1339)	BioXtra
Ziegenserum	Gibco, Invitrogen

3.4 Saccharide

Die aufgeführten Zucker wurden synthetisiert von AG Boons, University of Georgia (USA).

Bezeichnung	Abkürzung
Glukuronsäure-2-Sulfat- β -1-4- <i>N</i> -Acetoglucosamin	G2A0
Glukuronsäure-2-Sulfat- β -1-4- <i>N</i> -Sulfoglucosamin	G2S0
Iduronsäure-2-Sulfat- β -1-4- <i>N</i> -Acetogalaktosamin-4-O-Sulfat	I2A4
Iduronsäure-2-Sulfat- β -1-4- <i>N</i> -Acetogalaktosamin-6-O-Sulfat	I2A6

3.5 Enzyme

Name	Hersteller
Antarctic Phosphatase, 5000 U/ml	New England Biolabs
BIOTAQ DNA Polymerase	Bioline
Chondroitinase ABC	Sigma-Aldrich
DNase I	Roche
DpnI restriction endonuclease, 20000 U/ml	New England Biolabs
Heparinase I	IBEX Enzymes
Heparinase II	Grampian Enzymes
Heparinase III	Grampian Enzymes
NheI-HF <i>restriction endonuclease</i> , 20000 U/ml	New England Biolabs
NotI-HF <i>restriction endonuclease</i> , 20000 U/ml	New England Biolabs
PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase	Agilent Technologies
Proteinase K	Roth
T4 DNA Ligase 400000 mU/ml	New England Biolabs
Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen
XhoI restriction endonuclease, 20000 U/ml	New England Biolabs

3. MATERIAL

3.6 Kits

Name	Hersteller
DC Protein Assay	BioRAD Laboratories
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche
iScript cDNA Synthesis Kit	Biorad
SuperSignal West Pico Chem. Substrate	Thermo Fischer
Mini Prep	Qiagen
Midi Prep	Qiagen
PCR Purification Kit	Qiagen
DNA-Extraction-Kit	Qiagen
KAPA HIFI Hot Start Ready Mix (2x)	Peqlab
KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit	Peqlab
KAPA SYBR Fast Universal Kit	Peqlab
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Quiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen
Quanta Perfecta SYBR Green Supermix	Quanta
Quantichrom Urea Assay (DIUR-100)	BioAssay Systems
Quantichrom Creatinin Assay (DICT-500)	BioAssay Systems
RNeasy Midi Kit	Qiagen
RNase-free DNase I Kit	Qiagen

3.7 Antikörper

3.7.1 Primär-Antikörper

Name	Herkunft	WB	IF	Hersteller
α -ARSK	Kaninchen	1:500	1:100	Biorbyt
α -ARSK	Ziege	1:750	-	Everest Biotech
α -Calbindin	Maus	-	1:500	Sigma
α -CD68 (FA-11)	Ratte	-	1:500	Sigma
α -Ctsb	Kaninchen	1:400	-	Santa Cruz
α -Ctsd K2S5	Ziege	1:400	-	Santa Cruz
α -Ctsd K2S9	Kaninchen	1:1500	1:100	Santa Cruz
α -F4/80	Ratte	-	1:100	Austyn & Gordon
α -GAPDH (FL-335)	Kaninchen	1:500	-	R&D Systems
α -GFAP (GA5)	Maus	1:2000	1:500	Sigma
α -mHSP70	Maus	1:1000	-	Biochemie III, Bielefeld
α -MBP	Ratte	1:1000	1:500	Millipore
α -NeuN (A60)	Maus	1:2000	f 1:100	Millipore
α -Plbd2 (G9)	Kaninchen	1:500	1:50	Millipore
α -NPC2	Kaninchen	1:500	-	Santa Cruz
α - β -Glukuronidase	Kaninchen	1:250	-	Santa Cruz
α -Limp2 (rabbit)	Kaninchen	1:250	1:250	Santa Cruz
α -Lamp (1D4B)	Ratte	1:750	-	Hybridoma Bank, Iowa
α -Lamp (H4A3)	Maus	1:400	-	Hybridoma Bank, Iowa
α -RGS-His ₆	Maus	1:3000	1:100	Quiagen

3. MATERIAL

3.7.2 Sekundär-Antikörper (Western-Blot)

Antikörper	Anwendung	Hersteller
Ziege- α -Maus-HRP	1:5000	Dianova
Affe- α -Ziege-HRP	1:5000	Dianova
Ziege- α -Kaninchen-HRP	1:5000	Dianova
Ziege- α -Ratte-HRP	1:5000	Dianova

3.7.3 Sekundär-Antikörper (Immunfluoreszenz)

Antikörper	Anwendung	Hersteller
Affe- α -Ziege-Alexa IgG Fluor® 555	1:500	Invitrogen
Ziege- α -Maus-Alexa IgG Fluor® 488	1:2000	Invitrogen
Ziege- α -Maus-Alexa IgM Fluor® 488	1:2000	Invitrogen
Ziege- α -Maus-HRP	1:2000	Dianova
Ziege- α -Kaninchen IgG Alexa Fluor® 488	1:2000	Invitrogen
Affe- α -Ratte IgG Alexa Fluor® 647	1:2000	Dianova

3.8 Plasmide

Folgende Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Expression rekombinanter Proteine eingesetzt:

Plasmid	Herkunft	Resistenzen	Größe
pGEM-T Easy	Promega	Amp	3 kB

3.9 Primer

Folgende Primer wurden im Rahmen dieser Arbeit für Klonierungen, Sequenzierungen und qPCR verwendet:

Genotypisierungsprimer		
Primer	T_M/°C	Sequenz 5' → 3'
Arsk-WT-F	67	GAAGGCCTATCCAGCCTACC
Arsk-WT-R	67	TGGCTGGTTTAGAGTCTGTGG
Arsk-KO-F	66	GCTACAGTCAACAGCAACTGA
Arsk-KO-F	66	GTGTTGCCTTGAGTGTCTG
Klonierungsprimer		
Primer	T_M/°C	Sequenz 5' → 3'
Arsb-EcoR1-F	72	CTGAATTCAGCCGGCCGCCCCACCTGGTC
Arsb-Not1-R-His	72	TAGCGGCCGCTCATCCAAGGGCCCCACACCCC
Ids-Not1-F	74	CTGCGGCCGCTCCGAAACGCAGGCCAACTCG
Ids-Not1-R-His	74	TAGCGGCCGCTAGGCATCAACAACCTGGAAAAGA
Arsk-Not1-F-SP	76	GAGCGGCCGCGAGCAGAGGCGGAGAGCAGCC
Arsk-Not1-R-His ₆	76	TAGCGGCCGCAAACCTGCTCTTGGATTCATAT
Arsk-Not1-R-St	76	TAGCGGCCGCTCAAACCTGCTCTTGGATTCATAT
Sequenzierprimer		
Primer	T_M/°C	Sequenz 5' → 3'
Arsb-Intern	60	GGCGAAGAAGTTGCAACAGG
Ids-intern	60	CTGTGGATGTGCTGGATGTTC
Ids-200	60	CGCGTTTCTTTCTCACTGGC
Ids-830	60	CATATTTGGATACACAGGTCG
Ids-1200	60	GAACCTTCTGAAGCATTTCG
Arsk-500	60	ACCATTTGTTATTTACTTGGG
T7	60	TAATACGACTCACTATAGGG
SP6	60	ATTTAGGTGACACTATAG

3. MATERIAL

qPCR-Primer	
Primer	Sequenz 5' → 3'
Arsk-E3-4-A-F	TGGAGAAGCATGGCTATCAGAC
Arsk-E3-4-A-R	ATGGGTCTGCCTTCTTGTGC
Arsk-E3-4-B-F	AGAAGCATGGCTATCAGACACA
Arsk-E3-4-B-R	TTGTTCGGAGCAAGAATGCAAC
Arsk-E5-6-F	GACAGATGCCATGCTAGGTGA
Arsk-E5-6-R	TAGGTTGGCCTTAATTCCTGGT
Arsk-E6-7-F	GATGGCTATGGAACACCGCC
mIDS-E2-4-F	TGCTCAGCAAGCAGTGTGC
mIDS-E2-4-R	CCAACCGACATGGTCACGTA
CD68-F	TGGATTCAAACAGGACCTACATC
CD68-R	TGAATGTCCACTGTGCTGC
CtsB-F	CTCTTGTTGGGCATTTGGG
CtsB-R	GTAGACTCCACCTGAAACCA
Gapdh-F	GCAGTGCCAGCCTCGTCCC
Gapdh-R	CAGGCGCCCAATACGGCCA
HexB-F	TTTCGGGACTTTCACCATC
HexB-R	GATAAGGGAAAGACTGGTTCG
Iba1-F	GGATCAACAAGCAATTCCTCG
Iba1-R	AACTCCATGTACTTCACCTTGA
Lamp1-F	CAGCATCTCCAACCATTAC
Lamp1-R	CACTCTTCCACAGACCCAAA
MBP-F	GTACAAGGACTCACACACGA
MBP-R	CTTGGGATGGAGGTGGTGT

3.10 Zelllinien

Zelllinie	Informationen
HEK293ft	immortalisierte, humane, embryonale Nierenzellen
HT1080	immortalisierte, humane Fibrosarcoma-Zelllinie

3.11 Puffer und Lösungen

Medium/Puffer	Menge	Inhaltsstoffe
Coomassie-Färbelsg.	0.2 % (w/v)	Coomassie G250
	45 % (v/v)	Ethanol
	10 %	Essigsäure
DEPC-H ₂ O	2 mL DEPC	in 1 L H ₂ O gelöst ü.N. rühren, autoklavieren
DMEM Medium	3,4g	NaHCO ₃
	13.38g	DMEM-Fertigpulver
	8 mL 1 M	HCl
	0.1g	Phenolrot
	2 mM	Glutamin
	0.1 U/mL	Penicilin
	0.1 mg/mL	Streptomycin
	10 % (v/v)	FCS auf 1 L mit H ₂ O
Einfriermedium	10 % (v/v)	DMSO in Medium (DMEM)
1x PBS	136 mM	NaCl
	2.5 mM	KCl
	8 mM	Na ₂ HPO ₄
	1.4 mM	KH ₂ PO ₄ , pH 7.4

3. MATERIAL

Medium/Puffer	Menge	Inhaltsstoffe
0.1% PBS-T	0.1% (w/v)	Tween-20 in PBS
DNA-Ladepuffer (6x)	6 mM 93 mL 0.3 g 0.3 g	EDTA Glycerin Bromphenolblau Xylen Cyanol FF auf 250 mL mit H ₂ O
DMEM-Expressionsmedium	2 mM 1% (v/v) 1% (v/v)	L-Glutamin FKS Penicillin / Streptomycin in DMEM
DMEM-Kultivierungsmedium	2 mM 10% (v/v) 1% (v/v)	L-Glutamin FKS Penicillin / Streptomycin in DMEM
Laemmli-Puffer (4x)	10g 40 mL 1M 50 mL 50 mg	SDS Tris HCl, pH 6.8 Glycerin 87% Bromphenolblau auf 125 mL mit H ₂ O
Batch-Bindepuffer	20 mM 500 mM 20 mM	Tris-HCl, pH 7.4 NaCl Imidazol
Batch-Elutionspuffer	20 mM 500 mM 500 mM	Tris-HCl, pH 7.4 NaCl Imidazol
Mowiol/Dabco	8 g 20 mL 20 mL 2.5 %	Mowiol 0.2 M Tris-HCl, pH 8.5 Glycin Dabco

Medium/Puffer	Menge	Inhaltsstoffe
SDS-PAGE Laufpuffer	0.5 M	Tris
	1.92 M	Glycin
	1%(w/v)	SDS
SOC-Medium	0,5 % (w/v)	Hefeextrakt
	2.0 % (w/v)	Trypton
	10 mM	NaCl
	2.5 mM	KCl
	10 mM	MgSO ₄
	2 mM	Glukose
TAE-Puffer (10x)	0.4 M	Tris
	20 mM	EDTA auf 1L mit H ₂ O pH 8.0 mit Essigsäure
TBS-Puffer (10x)	100 mM	Tris-HCl
	1.5 M	NaCl auf pH 7.4
Western Blot Anodenpuffer	75 mM	Tris, pH 7.5
	20% (v/v)	Methanol
Western Blot Kathodenpuffer	25 mM	Tris, pH 9.0
	20% (v/v)	Methanol
	40 mM	Aminocaprinsäure

3.12 DNA- und Protein-Größenstandard

Größenstandard	Hersteller
Protein Marker, Precision Plus Protein Standards	BioRad Laboratories
DNA Marker, 1 kb	New England Biolabs
DNA Marker, 100 bp	New England Biolabs

3. MATERIAL

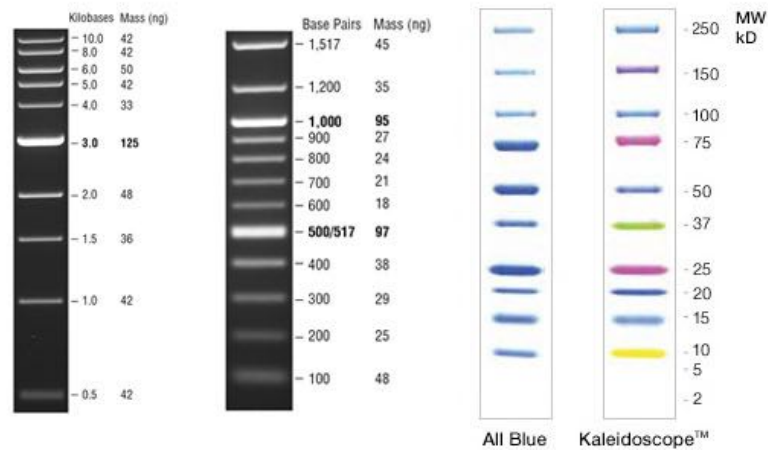


Abbildung 8: **Eingesetzte Größenstandards für die Elektrophorese** (Quelle: New England Biolabs).

3.13 Software & Online-Datenbanken

Bezeichnung	Hersteller / Webseite
Adobe Photoshop CC	Adobe Systems
Adobe Illustrator CC	Adobe Systems
BioGPS	http://biogps.org
AIDA Image analyzing software	Fujifilm
BIAevaluation (3.1)	GE Healthcare
Chemdraw	CambridgeSoft
E-Capture	Vilbert Lourmat
Image Reader LAS	Fujifilm, Düsseldorf
ImageJ	National Institute of Health
Keynote	Apple
Protein Data Bank	http://www.rcsb.org
PRISM	GraphPad PRISM
UNICORN 5.0	GE Healthcare
ZEN	Zeiss

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden im Brutschrank bei wassergesättigter Atmosphäre, 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert. Eingesetzte Medien und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, auf 37 °C temperiert. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Kultivierungsmedium (3.11).

4.1.2 Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen zunächst trypsiniert und in 7 mL Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 200xg und Raumtemperatur (RT) pelletiert und das Zellpellet nach Verwerfen des Überstandes in 5 mL Einfriermedium aufgenommen. Die Suspension wurde zu je 1.5 mL in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren. Der Zusatz von DMSO im Medium und der langsame Abkühlprozess verhindert eine Zerstörung der Zellen durch Eiskristallbildung in den Zellen. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in eine -150 °C Kühltruhe überführt, die eine Langzeitlagerung über mehrere Jahre ermöglicht. Für die Kryokonservierung suspensionsadaptierter Zellen wurde zunächst die Dichte der Kultur bestimmt und die Zellen anschließend durch Zentrifugation bei 250xg pelletiert. Je 10⁷ Zellen wurden in 1.5 mL serumfreiem Medium mit 10 % DMSO aufgenommen und in Kryoröhrchen nach kurzer Lagerung auf Eis bei -80 °C eingefroren. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen in eine -150 °C Kühltruhe überführt.

4.1.3 Auftauen und Revitalisieren von Zellen

Für das Auftauen wurde ein Kryoröhrchen mit den Zellen aus der -150 °C Kühltruhe entnommen, 1 min bei RT aufgetaut und bei 37 °C inkubiert, bis nur noch ein kleiner Eiskern zu sehen war. Die Zellsuspension wurde in 5 mL Normalmedium aufgenommen und 5 min bei 250xg zentrifugiert. Der Überstand

4. METHODEN

wurde verworfen und das Pellet in 5 mL Medium überführt. Am folgenden Tag wurde das Medium gewechselt und ggf. mit Selektionsantibiotikum versehen.

4.1.4 Zellzahl-Bestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer eingesetzt. Die zu untersuchende Zellsuspension (10 μ L) wurde 1:1 mit dem Farbstoff Trypanblau inkubiert. Bereits abgestorbene Zellen färbten sich blau, da der Farbstoff durch die Membran in das Zellinnere gelangen konnte. Um einen korrekten Mittelwert zu errechnen, wurden jeweils vier große Eckquadrate (4x4) gezählt. Durch Multiplikation mit dem Faktor 1000 errechnet sich die Zellzahl pro mL, wobei die Verdünnung durch Trypanblau zu beachten ist.

4.1.5 Zellyse durch Ultraschallbehandlung

Die geernteten Zellpellets wurden auf Eis in 200-500 μ L Lysepuffer mit einem 1:100 Proteinaseinhibitor-Mix resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch dreifache Sonifizierung zu je 10 s Sonifizierung bei 4°C (Stufe 9, kontinuierlich) im Ultraschallgerät. Die Zelltrümmer wurden bei 13000xg und 4°C abzentrifugiert. Für die Bradford-Proteinbestimmung wurden 5 μ L der geklärten Lysate 1:10-1:20 mit dH₂O verdünnt. Die Zellyse konnten anschließend in SDS-Probenpuffer aufgekocht und über SDS-PAGE (3.5.16) aufgetrennt werden.

4.1.6 Trypsinierung von Zellen

Bei Konfluenz wurden die Zellen mittels Trypsinierung ausgedünnt. Zunächst wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen von PBS wurden die Zellen 5 min mit 0.5 % (w/v) Trypsin-EDTA-Lösung (2 mL) bei 37 °C inkubiert. Die Trypsinierung wird nach erfolgter mikroskopischer Begutachtung durch Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt. Weiterhin bestehende Zusammenlagerungen von Zellen wurden durch mehrmaliges Pipettieren aufgebrochen. Überzählige Zellen

wurden verworfen und verbleibende Zellen in einem entsprechenden Gesamtvolumen von 5 mL (T-25 Flasche) bzw. 12 mL (T-75 Flasche) kultiviert.

4.1.7 Transfektion von Säugerzellen mittels Polyethylenimin

Die Transfektion von Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Polyethylenimin (PEI). Hierbei wurden 1×10^5 Zellen ü.N. in einem 6-Well mit 4 mL Nährmedium kultiviert. Um eine ausreichend hohe Effizienz zu ermöglichen, war eine Konfluenz von ca. 50 % notwendig. Nachfolgend wurden 2 μ g DNA in 100 μ L serumfreiem Zellmedium aufgenommen, die 3-6-fache Menge (w/w) PEI zugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Der Transfektionsmix wurde anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben und vorsichtig durchmischt. Die Zellernte erfolgte 24-48 h nach Transfektion.

4.1.8 Isolierung von Zellklonen nach stabiler Transfektion

Für die Herstellung stabil transfizierter Zellklone wurden die Zellen mit dem Transfektionsreagenz PEI transfiziert. Zur Selektion wurde das Medium 48 h nach Transfektion gegen Selektionsmedium mit Puromycin (1 μ g/mL) und G418 (500 μ g/mL) gewechselt. Unter Selektionsdruck wurden die Zellen mehrere Wochen kultiviert und die abgestorbenen Zellen regelmäßig mit PBS abgewaschen. Zellklone, die sich durch starkes Wachstum unter Selektionsdruck auszeichneten wurden mit einer Pipettenspitze aufgenommen, in 50 μ L Trypsin/EDTA vereinzelt und in einer 48 well-Schale ausplattiert. Bei ausreichender Konfluenz wurden die Einzelklone in Zellkulturflaschen überführt und expandiert. Zur Langzeitlagerung wurden Aliquots zur Kryokonservierung (4.1.2) angelegt.

4.2 Histochemische Methoden

4.2.1 Anfertigung von Kryo- und *free-floating*-Schnitten

Gewebeschnitte (35 μ m) wurden an dem Microtom SM 2000R (Leica) durchgeführt. Hierfür wurden murine Organe vorab mit 4 % Paraformaldehyd per-

4. METHODEN

fundiert und auf der Haltevorrichtung des Mikrotoms angebracht. Das Mikrotom wurde mit Trockeneis während des Vorgangs durchgehend gekühlt. Zu schneidende Organe wurden auf einer Schicht 5 % Sucrose in Phosphatpuffer (PB) angefroren und in 30 % Sucrose eingebettet. Die Schnitte ($35\ \mu\text{m}$) wurden mit einem Pinsel vorsichtig in eine 24-well Platte überführt und konnten mehrere Wochen bei 4°C in PB mit 0.02 % Na-Azid gelagert werden.

4.2.2 Alcian-Blau Färbung von Gewebeschnitten

Alcian-Blau färbt bei pH 1-2,5 selektiv sulfatierte Glykosaminoglykane wie Heparansulfat und Chondroitinsulfat. Durch Wasserlöslichkeit der GAGs wurde keine Perfusion der Tiere durchgeführt. Nach Organentnahme wurden diese sofort in Kryostat-Lösung eingebettet und in flüssigem Propan eingefroren. Die $5\ \mu\text{m}$ dicken Schnitte wurden auf einen Objektträger aufgezogen und sofort mit einem Fön getrocknet. Getrocknete Gewebe wurden 30 min bei RT in der Alcian-Blau-Lösung inkubiert. Für die Gegenfärbung von Cytoplasma und dem Zellkern wurden die Objektträger für 10 min bei RT in der Kernechtrot-Lösung inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe mittels einer Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 95%, 100%) für jeweils 30 min bei RT dehydriert. Ein Spülvorgang in Xylol entfernte den Alkohol. Abschließend konnte das *mounting* in DPX erfolgen und ü.N. bei RT getrocknet werden. Saure sulfatierte Komponenten der Zelle werden blau, Zellkerne pink-rot und das Cytoplasma hell-pink gefärbt.

Alcian-Blau-Lösung: 1% Alcian-Blau in 0.1M Salzsäure

Kernechtrot-Lösung: 0.1 g Kernechtrot, 5g $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$

auf 100 mL H_2O auffüllen

4.2.3 Immunfluoreszenz an Gewebeschnitten

Gewebeschnitte (4.2.1) wurden mittels eines Pinsels in eine 24-well Platte transferiert und dreifach mit PB gewaschen. Sowohl die Permeabilisierung, als auch Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, erfolgte durch Inkubation in Blocking-Lösung für 2 h bei RT. Anschließend wurden die Schnitte

mit Primärantikörper (3.7.1) in Blocking-Lösung ü.N. bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Schnitte dreifach in Wasch-Lösung gewaschen und mit einem AlexaTM Fluor-gekoppelten Sekundärantikörper (3.7.3, 1:2000 in Wasch-Lösung) für 2 h bei RT inkubiert. Die Schnitte wurden zweimal mit PBS gewaschen und zur Färbung der Zellkerne für 10 min in DAPI (1:1000) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS konnten die Gewebeschnitte auf einem Objektträger aufgetragen und mit Mowiol/Dabco fixiert werden.

Blocking-Lösung: 0.1 M Phosphatpuffer (PB), 0.5 % TX-100
4 % Ziegen-Serum

Wasch-Lösung: 0.1 M Phosphatpuffer (PB), 0.25 % TX-100

4.2.4 Aktive Perfusion mit Paraformaldehyd

Die Maus wurde mit einer Lösung aus 0.65 mg Ketamin, 0.13 mg Xylazin sowie 0.02 mg Acepromazin pro 10 g Körpergewicht unter Narkose gesetzt. Nach ca. 10 min ist die Maus Schmerz- und Reaktionsfrei. Der Thorax wurde geöffnet und eine Flügelkanüle in den linken Ventrikel des Herzens eingefügt. PB-haltiger Puffer mit 1 % Procain wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 mL/min mittels einer Pumpe injiziert. Sofort im Anschluss wurde der rechte Ventrikel mit einer Schere geöffnet. Nach ca. 5 min (50 mL) wurde die Waschlösung durch die 4 % PFA-Fixierlösung (in PB) oder 6 % Glutaraldehyd (in PB) gewechselt und für weitere 5 min (50 mL) gepumpt. Fixierte Organe (Hirn, Leber, Niere und Milz) konnten entnommen und ü.N. in der Perfusionslösung bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Organe in 30 % Sucrose überführt und für *free-floating*-Schnitte (4.2.1) bei 4 °C gelagert werden. Glutaraldehyd-fixierte Mäuse wurde im Ganzen in ein 50 mL Falcon überführt, mit der Perfusionslösung überschichtet und für Licht- und Elektronenmikroskop-Analysen an Prof. Dr. Renate Lüllmann-Rauch (Universität Kiel) verschickt.

4. METHODEN

4.2.5 Passive Perfusion mit Paraformaldehyd

Die Maus wurde mittels zervikaler Dislokation geopfert und analog zu 4.2.4 ausschließlich mit PB perfundiert. Die Organe wurden entnommen und in 4 % PFA in PBS ü.N. bei 4°C gelagert. Anschließend erfolgte die Inkubation in 30 % Sucrose bei 4°C bis die Organe zum Boden des Tubes gewandert sind.

4.2.6 Nachweis der lacZ-Insertionskassette

Die Detektion der inserierten lacZ-Kassette in Arsk-KO-Mäusen wurde über den Umsatz von 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) über die β -Galactosidase-Aktivität nachgewiesen. Dabei wurden 35 μ m dicke *free-floating* Gewebeschnitte an vorab mit PBS-perfundierten Tieren angefertigt. Die Präparate wurden für 10 min in Permeabilisierungslösung inkubiert. Anschließend ü.N bei 37°C in X-Gal Färbelösung entwickelt. Nach Erreichen der gewünschten Färbeintensität wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen mit PBS gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte durch Inkubation in Eosin-Färbelösung für 5 min und anschließendes Waschen in PBS. Die Schnitte konnten nun auf einem Objektträger aufgebracht und mit Eindeckmedium DPX fixiert werden.

Permeabilisierungslösung:	0.1 % Natriumdeoxycholat, 0.2 % Triton X-100 1 % Paraformaldehyd 0.2 % Glutaraldehyd in PBS
X-Gal Färbelösung:	2 mM MgCl ₂ , 5 mM K ₃ Fe(CN) ₆ 5 mM K ₄ Fe(CN) ₆ 1 mg/mL 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal) in PBS
Eosin Färbelösung:	0.2 % (w/v) Eosin in dH ₂ O

4.2.7 Vermeidung von Autofluoreszenz (*quenching*)

Autofluoreszenz in Gewebeschnitten kann durch Akkumulation von Lipofuscin auftreten. Hierdurch kommt es zu Problemen bei Immunfluoreszenz- und Filipin-Färbungen. Die Autofluoreszenz lässt sich durch Inkubation mit der Quenching-Lösung minimieren. Gewebeschnitte werden mit der Quenching-Lösung für 30 min bei RT inkubiert und anschließend dreifach mit Wasch-Lösung gewaschen. Anschließend können die Gewebeschnitte wie beschrieben (4.2.8) verarbeitet werden.

Quenching-Lösung: 1 % BSA, 0.15 % Glycin, 0.02 % Saponin in PBS

Wasch-Lösung: PB mit 0.1 % (v/v) Triton X-100

4.2.8 Filipin-Färbung von unverestertem Cholesterin

Filipin, ein Antibiotikum produziert durch *Streptomyces spp.*, bindet nicht verestertes Cholesterin und ermöglicht so dessen Nachweis auf Akkumulation. Die Filipin-Färbung wird 30 min bei RT auf permeabilisierten Gewebeschnitten (4.3.1), nach vorheriger Inkubation in Quenching-Lösung durchgeführt. Anschließend wurden die Schnitte dreifach mit PBS gewaschen und mittels Mowiol/Dabco am Objektträger fixiert. Die Analyse erfolgte am Leica DM5000B Mikroskop im DAPI Kanal (Filter BP340-380, dichromatischer Spiegel, LP425 Unterdrückungsfilter).

Filipin-Lösung: 1 Kristall Filipin in 50 μ L DMSO lösen
auf 500 μ L mit PB verdünnen

4.2.9 Dreipunkt-Biegetest von Knochen

Bei einem Dreipunkt-Biegetest wird der gesamte Knochen in einer Material-Prüfmaschine befestigt. Der Knochen wird punktuell belastet bis es zum Bruch kommt (Abb. 9A). Dabei handelt es sich um strukturmechanische Tests die mechanische Eigenschaften von Femurknochen oder anderen langen Knochen bestimmt. Zu Beginn des Tests ist befindet sich der Knochen

4. METHODEN

im entspannten Zustand (Nullpunktverschiebung). Der Belastungspunkt berührt den Knochen mit einer kleinen Vorbelastung (<1 N), um den Knochen an Ort und Stelle zu halten. Der Belastungspunkt bewegt sich anschließend progressiv nach unten mit zunehmender aufgebrachter Kraft (F) und Verschiebung (d). Last- und Verschiebungswerte werden während des Tests aufgezeichnet (Abb. 9B) Der Biegetest wird häufig in Kombination mit knochengeometrischen Eigenschaften nach μ CT (Kernspintomographie) durchgeführt.

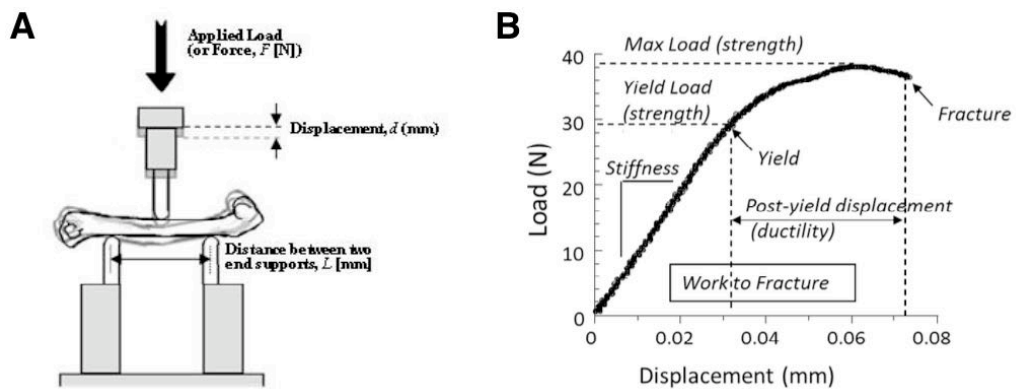


Abbildung 9: **Versuchsaufbau einer Dreipunkt-Biegetest Analyse.** (A) Der zu untersuchende Knochen wird in der Versuchsanordnung abgelegt und mit geringer Vorbelastung <1 N fixiert. Der Belastungspunkt bewegt sich anschließend progressiv nach unten mit zunehmender aufgebrachter Kraft (F) und Verschiebung (d) bis der Knochenbruch auftritt (B) Die Belastungskurve (schwarz) gibt Auskunft über den max. Kraftaufwand (F_{max}), die Flexibilität des Knochen sowie die totale durchgeführte Arbeit (*work to fracture*) bis es zum Knochenbruch kommt (Quelle: M. J. Silva, 2016).

4.3 Molekularbiologische-Methoden

4.3.1 Primer-Design

Die Erstellung von spezifischen Primern setzt die Kenntnis der kodierenden cDNA-Sequenz des Proteins voraus. Die Quelle hierfür stellt das National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) dar. Merkmale wie ausreichender GC-Gehalt, Verhinderung von Hairpin-Strukturen sowie Selbst-, oder Heterodimerisierungen wurden mit Hilfe des

online Tools Oligo Analyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) überprüft und optimiert.

Primer für die qPCR-Analyse (4.3.5) wurden anhand Empfehlungen des Hersteller-Kits (3.6) erstellt. Um eine effiziente und spezifische Amplifikation zu ermöglichen wurden PCR-Produkte mit einer Länge von 200-250 bp erzeugt. *Forward*- und *reverse*-Primer wurden mit einer Länge von 18-22 Nukleotiden und einer Hybridisierungstemperatur von 58-62 °C konzipiert. Die Primerbindung erfolgte Exon-überspannend. Nach durchgeführter qPCR wurde sowohl der Schmelzpunkt des Produkts, als auch das Auftreten nur eines spezifischen Produkts im Agarose-Gel überprüft. Zur Bestätigung wurden alle Produkte sequenziert.

4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, kurz: PCR) ist eine effektive gentechnologische Methode, bei welcher über enzymatische Amplifikation eines gesuchten Genabschnitts in aufeinander folgenden Zyklen eine große Kopienzahl amplifiziert werden kann (Mullis *et al.*, 1986). Hierbei kommt eine DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) zum Einsatz, welche ein Reaktionsoptimum bei 72 °C aufweist. Zudem werden zwei Primer benötigt, 15 bis 40 lange Nukleotide, welche mit flankierenden Sequenzen auf beiden Strängen hybridisieren.

Tabelle 4: Zusammensetzung des PCR-Reaktionstubes (Vol. 25 μL).

Zusammensetzung	Volumen (μL)
KAPA HiFi 2x	12.5
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
DMSO	1.25
Template	20 ng
H ₂ O	8.25

4. METHODEN

Tabelle 5: Programm zur Amplifikation eines DNA-Abschnitts im Thermocycler.

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
1	1	95°C	2 min
2	30	98°C	20 sec
		60-75°C	30 sec
		72°C	1 min/kb
3	-	72°C	4 min
4	-	8°C	∞

Der erste Schritt der PCR-Reaktion besteht im Erhitzen des Ansatzes auf 95°C, wodurch es zur Denaturierung der DNA-Stränge kommt. Der Reaktionsansatz wird auf 50-70°C abgekühlt, wobei die genaue Temperatur vom GC-Gehalt der Primer abhängt. Die Primer hybridisieren mit den komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge. Bei 72°C repliziert die Taq-Polymerase die entsprechenden Genabschnitte durch Hinzufügen von Nukleotidtriphosphaten (dNTPs) an das 3'-Ende der Primer, wobei der komplementäre DNA-Einzelstrang als Matrize dient. Durch Erhitzen auf 95°C wird die Dissoziation der Polymerase sowie eine erneute Denaturierung des Doppelstranges erreicht. Ein solcher Zyklus aus Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Neusynthese eines Doppelstranges wird 30-35 x wiederholt, wobei sich ab dem vierten Zyklus die Anzahl an Genkopien exponentiell erhöht.

4.3.3 Mutagenese-PCR

Bei der Mutagenese-PCR handelt es sich um eine effiziente Methode in einem Plasmid spezifisch Mutationen wie Punktmutationen, oder Deletionen einzuführen, ohne das aufwändige Klonierungsschritte notwendig sind. Dabei kommt die Pfu-Polymerase, eine DNA-Polymerase aus dem thermophilen *Archaeum pyrococcus furiosus* zum Einsatz, welche eine höhere Thermostabilität als die Taq-Polymerase aufweist und über eine besondere Korrekturfunktion verfügt. Für die Reaktion werden zwei Primer benötigt, die beide die gewünschte Mutation enthalten und mit derselben Sequenz der komplementären Stränge hybridisieren. Voraussetzung ist, dass die Primer zwischen

25 und 45 Basenpaare lang sind, die Mutation sich in der Mitte der Sequenz befindet und die Schmelztemperatur bei etwa 78°C liegt.

Die Verlängerung der Primer entlang der gesamten Plasmidsequenz produziert Tochterplasmide mit offenen Enden, welche die gewünschte Mutation enthalten. Nach etwa 25 Amplifikationszyklen wird das Reaktionsgemisch einem Verdau mit der Endonuklease Dpn1 (3.13) unterzogen. Dpn1 erkennt die Sequenz 5'-GATC-3' und ist spezifisch für methylierte und hemimethylierte DNA aus Bakterien. Somit werden nur die unveränderten Eltern-Plasmide verdaut. Für den Verdau mit Dpn1 wurden nach dem PCR-Lauf 1 μ L Dpn1 zum PCR-Ansatz gegeben und 1 h bei 37°C inkubiert.

Tabelle 6: Programm zur Amplifikation während einer Mutagenese.

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
1	1	95°C	2 min
2	30	98°C	20 sec
		60-75°C	30 sec
		72°C	1 min/kb
3	-	72°C	4 min
4	-	8°C	∞

4.3.4 Kolonie-PCR

Die Methode der Kolonie-PCR dient der schnellen Überprüfung des Klonierungserfolgs. Dabei wird eine Bakterien-Einzelkolonie aus der Agar-Platte entnommen und in einen fertig angesetzten PCR-Reaktionsansatz eingebracht. Es folgt die Amplifikation der enthaltenen DNA per PCR, ohne dass zuvor eine Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgt. Die in den Bakterienzellen enthaltene DNA wird während der initialen Erhitzung auf 95°C freigesetzt. Zunächst wird ein PCR-Mastermix mit einem Gesamtvolumen von 20 μ L vorbereitet. Mit einer sterilen Öse wird ein Teil einer Einzelkolonie von einer Agar-Platte entnommen und in den PCR-Ansatz ausgestrichen. Anschließend kann der Rest der Einzelkolonie zum Animpfen einer 5 mL ü.N. Kultur verwendet werden.

4. METHODEN

Tabelle 7: Zusammensetzung des PCR-Reaktionstubes (Vol. 25 μL).

Zusammensetzung	Volumen (μL)
KAPA HiFi 2x	12.5
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
DMSO	1.25
Template	20 ng
H ₂ O	8.25

Tabelle 8: Programm zur Amplifikation eines DNA-Abschnitts im Thermocycler.

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
1	1	95°C	2 min
2	30	98°C	20 sec
		60-75°C	30 sec
		72°C	1 min/kb
3	-	72°C	4 min
4	-	8°C	∞

4.3.5 Quantitative PCR

Für den quantitativen Nachweis von Transkripten wird die quantitative PCR (qPCR) verwendet. Diese Methode ermöglicht die direkte Detektion von PCR-Produkten in Echtzeit. Während der Log-linearen Phase der Reaktion lagern sich Fluoreszenzfarbstoffe an die Ziel-DNA. Das entstandene Signal korreliert quantitativ mit der Menge des eingesetzten cDNA-*templates* (Pfaffl, 2007). In den hier durchgeführten Experimenten wurde SYBR Green I verwendet. Dieser nicht gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff bindet an jede Art von doppelsträngiger DNA (dsDNA) und lagert sich während der Amplifikation an die dsDNA ein (Morrison *et al.*, 1998). Mit jedem verlaufenden PCR-Zyklus steigt die gemessene Fluoreszenzintensität, die gegen die Zyklenzahl dargestellt wird. Der Verlauf einer PCR ist in drei Phasen geteilt. Eine frühe Phase, eine exponentielle Phase (Log Phase) und eine Plateau-Phase. In den hier durchgeführten relativen Genexpressions-tests nach dem $\Delta\Delta$ -Verfahren, wird zur Normalisierung der Werte ein sog. *housekeeping-gen* eingesetzt. Hierbei handelt es sich um Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Für die qPCR-Reaktionen wurden Master-Mixe erstellt. Zu jedem Ansatz wurde 1 μL cDNA mit einer 1:10 Verdünnung eingesetzt. Die qPCR wurde mit einem Lightcycler der Firma Roche durchgeführt.

Tabelle 9: Zusammensetzung des Mastermix für qPCR (50 μL).

Zusammensetzung	Volumen (μL)
Template	4.5
Primer A (10 μM)	0.8
Primer B (10 μM)	0.8
SYBR-Green-Mix	25
H ₂ O	18.9

4.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die nach einer PCR-Reaktion oder einem Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente werden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Aufgrund ihrer negativen Ladung bewegt sich DNA im Spannungsfeld in Richtung der Anode. Beim Lauf durch das Gel werden größere Fragmente stärker zurückgehalten als kleinere, so dass sich eine größenabhängige Auftrennung der Fragmente ergibt (Lottspeich *et al.*, 2001). Die Lauflänge eines Fragmentes entspricht dem negativ dekadischen Logarithmus seines Molekulargewichts. Die Trennungseffizienz hängt weiterhin von dem Gehalt an Agarose ab, der typischerweise im Bereich von 0.5 %-2.5 % liegt. Hierdurch werden Gele mit unterschiedlicher Porengröße erhalten. Zunächst wurde Agarose in 1x TAE-Puffer mit einer Konzentration von 0.8 %-2 % (w/v) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Endkonzentration), welches in die DNA-Furche interkaliert, wird die Detektion der Fragmente im UV-Licht ermöglicht. Die flüssige Agaroselösung wurde in einen Gelschlitten gegeben und mittels eines Kammes Proben-taschen in das Gel manipuliert. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurden die DNA-Proben mit 6x DNA-Probenpuffer vermischt und in die Proben-taschen pipettiert. Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente wurde ein DNA-Größenstandard aufgetragen. Es wurde eine Spannung von 80 V für 45 min angelegt. Im UV-Licht zeigt Ethidiumbromid Fluoreszenz, so dass die DNA-Fragmente sichtbar werden. Für analytische Zwecke wurden 500 ng-1 μg DNA eingesetzt. Für präparative Gele wurden etwa 2.5 μg DNA aufgetragen. Zur Weiterverwendung für eine Klonierung oder Sequenzierung wurden die DNA-Banden mit einer UV-Handlampe sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Aus dem DNA-haltigen Agarose-Stück wurde mit Hilfe eines DNA-Extraktionskits (3.6) die DNA isoliert.

4.3.7 Analyse von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdau

Bakterielle Restriktionsendonukleasen des Typs II erkennen bestimmte, meist palindromische DNA-Sequenzen und spalten den DNA-Doppelstrang innerhalb der Erkennungssequenz. In Abhängigkeit des verwendeten Enzyms ent-

stehen glatte oder überhängende Enden. Ein analytischer Restriktionsverdau von Plasmiden wurde zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation von DNA-Fragmenten mit 0.5 μg Plasmid-DNA unter Einsatz von 0.5 μL der jeweiligen Restriktionsendonuklease während eines Klonierungsexperiments durchgeführt. Die Inkubationsdauer betrug gewöhnlich 60 min bei der für das Enzym angegebenen optimalen Reaktionstemperatur. Für den präparativen Restriktionsverdau im Rahmen eines Klonierungsexperiments wurden 2-3 μg Plasmid-DNA bzw. bis zu 35 μL eines PCR-Ansatzes zusammen mit je 1 μL der Restriktionsenzyme eingesetzt und der Ansatz ü.N. inkubiert. Wenn möglich, wurde ein Doppelveidau durchgeführt, bei dem den Ansätzen zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme zeitgleich zugesetzt wurden. Im Anschluss erfolgte eine Dephosphorylierung der 5'-PO₄-Gruppen durch Einsatz der antarktischen Phosphatase, um Religationsreaktionen der Plasmide zu verhindern. Gemäß Herstellerangaben wurde den Ansätzen bei Bedarf bovines Serumalbumin (BSA) zugegeben sowie die als 10 x Konzentrat mitgelieferten Pufferlösungen verwendet, um optimale Reaktionsbedingungen zu gewährleisten.

4.3.8 Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Aufreinigung von PCR-Produkten und Plasmid-DNA aus Agarosegelen nach vorangegangenem präparative Restriktionsverdau erfolgte mit einem Kit zur DNA-Aufreinigung, dem *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Qiagen) gemäß Herstelleranweisungen. Die DNA wurde durch Erhitzen der Agarose freigesetzt und nach Versetzen mit DNA-Bindpuffer auf eine Silica-Säule gegeben. Nach diversen Waschschrirten konnte die DNA mit 20-50 μL dH₂O eluiert werden.

4.3.9 Mini/Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab erfolgte aus 5 mL-Übernacht-Kulturen transformierter *E. coli* unter Verwendung eines Aufreinigungskits der Firma Qiagen bzw. Roche gemäß Herstellerangaben. Beide Kits machen sich das Prinzip der alkalischen Lyse zu Nutze, bei dem der Zellauf-

4. METHODEN

schluss mit NaOH/SDS erfolgt. Im Anschluss werden die Zelltrümmer und das Detergenz durch Zugabe von Kaliumacetat im Sauren ausgefällt, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt und anschließend über Silica-Säulen aufgereinigt werden kann. Für die Plasmid-Isolation im Midi-Maßstab wurde das Kit der Firma Qiagen gemäß Herstelleranweisung verwendet. Es wurden standardmäßig *E. coli* aus einer 100 mL Übernachtskultur eingesetzt.

4.3.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenz eines amplifizierten Zielgens wurde durch eine Sequenzierungsreaktion überprüft. Die Sequenzierungsreaktionen wurden in der *sequencing core facility* des CeBiTec der Universität Bielefeld nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger durchgeführt (Sanger, 1977). Die Sequenzierung eines Genes erfolgt durch die Herstellung unterschiedlich langer Fragmente, wobei das letzte Nukleotid eine spezifische Fluoreszenzmarkierung trägt. Für die Sequenzierung wird die Ziel-DNA mit einer DNA-Polymerase und passenden Primern zusammen gegeben. Dem Ansatz werden neben gewöhnlichen dNTPs weiterhin 2'3'-Dideoxy-NTPs beigefügt. Dideoxynukleotide besitzen kein 3'-OH-Ende, so dass die Synthese abbricht, sobald ein solches Nukleotid eingebaut wird. Hierdurch wird ein gezielter, statistisch verteilter Syntheseabbruch hervorgerufen. Die Dideoxynukleotide haben darüber hinaus eine Fluoreszenzmarkierung, mit der sich die vier Nukleobasen unterscheiden lassen, da jedes Nukleotid eine charakteristische Fluoreszenzfarbe besitzt. Das so erhaltene Gemisch mit unterschiedlich langen Fragmenten wird nachfolgend aufgereinigt und in einer Sequenziermaschine untersucht. Am Ende der größenabhängigen Auftrennung durch ein Polyacrylamidgel werden die Fragmente von einem Fluoreszenzdetektor erfasst und die Signale in eine Gensequenz übersetzt.

4.3.11 Ligation von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit einem linearisierten Plasmid wurde die T4-Ligase eingesetzt. Diese verknüpft die offenen Enden eines Plasmids mit den Enden eines DNA-Fragmentes in einer ATP-abhängigen Reaktion.

Als Voraussetzung muss das Plasmid und das zu ligierende DNA-Fragment mit identischen Restriktionsenzymen geschnitten worden sein. Dieses generiert zueinander kompatible Enden. Die aufgereinigte Vektor-DNA (10-50 ng) wurde mit dem 3-6-fachen molarem Überschuss an aufgereinigtem DNA-Fragment gemischt und 0.5 μL T4-Ligase zugesetzt. Die eingesetzte Menge an ATP-haltigem 10 x T4-Ligase-Puffer und die eingesetzte Menge H_2O richtete sich nach dem Verdünnungsgrad der eingesetzten DNA. Typischerweise betrug die Ansatzgröße 10-20 μL . Die Ansätze wurden ü.N. bei 16°C inkubiert.

4.3.12 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Durch Dephosphorylierung der DNA wird die Religation eines über Restriktionsenzyme geschnittenen DNA-Fragments verhindert. Hierbei wird mit Hilfe der antarktischen Phosphatase die Phosphatgruppe am 5'-Ende des DNA-Fragments entfernt. Diese ist essentiell für eine spontane Religation. Nach dem Restriktionsverdau wird 1 μL antarktische Phosphatase (NEB) sowie 1 μL des 10 x antarktische Phosphatase-Puffers zugegeben. Der Ansatz wird bei 37°C für 30 min inkubiert. Zur Inaktivierung der Phosphatase-Aktivität wird der Ansatz für 5 min bei 70°C erhitzt.

4.3.13 RNA-Präparation aus Mausgeweben

Die RNA-Präparation wurde nach Vorschrift des Herstellers Qiagen unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Der Hersteller gibt die Zusammensetzung der Puffer nicht bekannt. Bei dem RLT-Puffer handelt es sich um einen Lysepuffer und bei den Puffern RW1 und RPE handelt es sich um Waschpuffer. Es wurde ausschließlich RNase-freies Material verwendet, sowie alle Geräte ü.N. in 1 M NaOH eingelegt. Sowohl zum Spülen, als auch Ansetzen wurde DEPC- H_2O verwendet. Es wurden 50 mg Frischgewicht (Leber, Niere und Milz) oder 150 mg Gehirn (Groß- und Kleinhirn) eingesetzt. Die Homogenisierung erfolgte in 4 mL RLT-Puffer mit 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ β -Mercaptoethanol im Ultra Turrax (ca. 45 sek). Das Lysat wurde für 10 min bei 4000 x g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit

4. METHODEN

1 Vol. 70 % EtOH (in DEPC-H₂O) versetzt, durch Pipettieren vermischt und zur Aufreinigung auf eine RNeasy-Säule geladen. Die Säule wurde 5 min bei 4000 x g bei RT zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säule wurde mit 2 mL RW1 Puffer gewaschen und 5 min bei 4000 x g zentrifugiert. Für den DNase I Verdau wurden 20 μ L DNase I mit 140 μ L RDD Puffer vermischt, auf die Säule pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit 2 mL RW1 Puffer gewaschen, 5 min bei RT inkubiert und weitere 5 min bei 4000x g zentrifugiert. Zum Waschen der Säule wurden 2.5 mL RPE auf die Säule gegeben und 2 min bei 4000x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule erneut mit 2.5 mL RPE Puffer gewaschen. Die nun trockene Säule wurde auf ein neues Elutionstube gesetzt und 100 μ L RNase-freies H₂O auf die Säule gegeben. Nach 1 min Inkubation erfolgte die Elution der RNA durch Zentrifugation für 3 min bei 4000 x g. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

4.3.14 cDNA Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad) mit frisch isolierter RNA (4.3.13) eingesetzt. Zu 1 μ g RNA wurden 4 μ L 5x iScript-Mix, 1 μ L iScript reverse Transkriptase gegeben und mit Nuclease-freiem H₂O auf 20 μ L aufgefüllt. Die Proben wurden im PCR-*cycler* im vom Hersteller vorgeschriebenen Programm inkubiert (Tab.10). Die cDNA wurde bei -80°C gelagert.

Tabelle 10: cDNA-Synthese iScript Programm (BioRad).

Schritt	Temperatur	Dauer
1	37 °C	5 min
2	42 °C	30 min
3	85 °C	5 min
4	8 °C	∞

4.3.15 Isolierung genomischer DNA aus Mausgewebe

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte aus Biopsien des Ohrs einer Maus. Hierfür wurde das *KAPA Mouse Genotyping Hot Start Kit* (PeqLab) eingesetzt. Das zu extrahierende Material wurde entsprechend der Herstellerangaben dem Extraktionsmix (Tab.11) zugeführt.

Tabelle 11: Zusammensetzung des PCR-Reaktionstubes zur Extraktion genomischer DNA.

Zusammensetzung	Volumen (μL)
KAPA extraction enzyme	2
KAPA extraction buffer	10
H ₂ O	88

Die Proben wurden für 20 min bei 75 °C geschüttelt und anschließend für 5 min bei 95 °C inkubiert. Der Überstand (1 μL) konnte nun für die Genotypisierung (4.3.17) eingesetzt werden.

4.3.16 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA erfolgte spektrometrisch über den Nanodrop ND-1000. Nach der Reinigung wurde die Photozelle zunächst mit dem DNA-Elutionspuffer geeicht. Für die Messung wurden 1.5 μL aufgereinigtes Plasmid auf die Photozelle pipettiert. Aus der gemessenen Adsorption bei 260 nm und 280 nm konnte mit Hilfe der Software die DNA-Konzentration berechnet werden. Weiterhin wurde der Warburg-Quotient (A260/A280) angegeben, dessen Wert Aufschluss über den Grad an Proteinverunreinigungen gibt. Dieser sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

4.3.17 Genotypisierung von Arsk-KO-Tieren

Die Genotypisierung erfolgte nach Herstellerangaben zu dem *KAPA Genotyping Kit* der Firma KAPA-Biosystems. Hierfür wurde der Maus mittels eines Ohrstanzers ein Hautfragment entnommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß platziert. Es wurden 2 μL *KAPA express extract enzyme* und 10 μL 10x *KAPA extract buffer* zugegeben und auf ein Gesamtvolumen von

4. METHODEN

100 μL (H_2O) gebracht. Das Reaktionsgefäß wurde zunächst 10 min bei 75°C und anschließend 5 min bei 95°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe 4-5 sec gevortext und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die extrahierte DNA (1 μL) konnte ohne weitere Aufarbeitung zur Genotypisierung eingesetzt werden. Die Zusammensetzung des PCR-Reaktionstubes kann Tab. 12 entnommen werden.

Tabelle 12: Zusammensetzung de PCR zur Arsk-Genotypisierung.

Zusammensetzung	Volumen (μL)
KAPA 2G Genotyping Mix 2x	12.5
Forward Primer	1.25
Reverse Primer	1.25
DMSO	1.25
DNA-Extraktion	1
H_2O	8

Die Amplifikation der PCR-Fragmente erfolgte nach folgendem PCR-Programm:

Tabelle 13: Amplifikation der PCR-Produkte für die Arsk-Genotypisierung.

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
1	1	95°C	3 min
2		95°C	15 sec
	30	60°C	15 sec
		72°C	20 sec
3	-	72°C	8 min
4	-	8°C	∞

4.4 Arbeiten mit *Escherichia coli*

4.4.1 Präparation chemokompetenter *Escherichia coli*

Chemokompetente *Escherichia coli* DH5 α wurden anhand der CaCl₂ Methode nach Sambrook und Russell (2006) generiert. LB-Medium (250 mL) wurde ü.N. mit einer DH5 α -Kultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Die Bakterien wurden anschließend 10 min auf Eis gekühlt und bei 4000 x g (10 min, 4°C) geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 65 mL eiskaltem 100 mM MgCl₂ aufgenommen. Nach weiteren 5 min wurden die Zellen erneut zentrifugiert, das Zellpellet in 13 mL eiskaltem 100 mM CaCl₂ resuspendiert und 20 min auf Eis gekühlt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und die Zellen in 2.6 mL eiskaltem 85 mM CaCl₂ mit 15 % Glycerol (v/v) resuspendiert. Es wurden 50 μ L Aliquots angelegt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Langzeitlagerung erfolgte bei -80 °C.

4.4.2 Transformation chemokompetenter *Escherichia coli*

Zur chemischen Transformation wurden die chemokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Zu je 50 μ L Bakterien wurden 10-50 ng Plasmid-DNA oder Ligationsansatz gegeben. Es wurde vorsichtig gemischt und für 30 min (DH5 α) bzw. 5 min auf Eis inkubiert, so dass sich die DNA an die Bakterienzellen anlagert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 sec. Dabei bilden sich Poren in der Bakterienzellwand, durch welche die DNA in das Zellinnere gelangt. Die Bakterien wurden nach dem Hitzeschock für 2 min auf Eis inkubiert, es wurden 250 μ L SOC-Medium zugegeben und die Bakterien für 45 min bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien auf Agarplatten mit 100 μ g/mL Ampicilin ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Nach etwa 16 h sollten Einzelkolonien sichtbar sein.

4.4.3 Anlegen von Kryokulturen in Glycerol

Zur Langzeitlagerung wurden Glycerolkulturen von *Escherichia coli* nach Sambrook und Russel (2001) angelegt. Hierfür wurden 2 mL ü.N Kulturen

4. METHODEN

bei 10.000xg für 1 min pelletiert. 1.6 mL des Überstandes wurden entfernt und die Zellen im restlichen Überstand resuspendiert. Zu der Lösung wurden 100 μ L Glycerol (87%) zugegeben, um eine Endkonzentration von 17 % (v/v) zu erhalten. Die Kulturen wurden umgehend bei -80 °C gelagert.

4.5 Biochemische Methoden

4.5.1 Herstellung von Gewebe- und Zellhomogenaten

Lysepuffer: TBS, pH 7.4, 1 mM PMSF, 5 mM IAA, 1 mM EDTA
0.5 % (v/v) Triton X-100 (Gewebehomogenate)
oder 0.1 % (v/v) Triton X-100 (Zellhomogenate)

Gewebehomogenate wurden durch Zugabe der 20-fachen Menge des Lysepuffers hergestellt. Die Homogenisierung erfolgte mit Hilfe eines Potters bei 1400 rpm und sechs Hüben. Zelluläre Organellen wurden durch Ultraschall (40 % Intensität, 3x 20 sec, 4 °C) zerstört. Nach 30 min auf Eis wurden Zelltrümmer bei 18000xg und 4 °C für 15min pelletiert. Das Pellet wurde verworfen. Der Überstand wurde auf Proteinkonzentration bestimmt (4.5.2).

Zelllysate wurden nach dem Resuspendieren von aufgetauten Zellen in Lysepuffer angefertigt. Die Zellen wurden sonifiziert (40 % Intensität, dreifach 20 sec, 4 °C) und 30 min auf Eis gekühlt. Zelluläre Bestandteile wurden bei 18000xg und 4 °C für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden (4.5.2)

4.5.2 Proteinbestimmung mit dem BioRad-DC-Protein-Assay

Der DC-Protein-Assay (BioRad) ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Hierbei können Proben die Detergenzien Triton-X-100 und Tween-20 bis zu einer Konzentration von 1 % enthalten, bestimmt werden. In einer Mikrotiterplatte wurde eine Protein-Eichreihe 0-20 μ g BSA/100 μ L Ansatz in Doppelwerten pipettiert. 10 μ L der zu bestimmenden Proben wurden mit dH₂O auf 100 μ L aufgefüllt. Anschließend

wurde zu jeder Probe 25 μL Reagenz A' und 200 μL Reagenz B pipettiert. Nach 15 min Inkubationszeit bei RT wurde die Extinktion der Proben bei 750 nm im Microplate Reader Modell Spectra II (Tecan, SLT, Crailsheim) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Eichgerade bestimmt.

Reagenz A:	alkalische Kupfer-Tartat-Lösung
Reagenz B:	Folin-Reagenz
Reagenz S:	Zusammensetzung nicht bekannt
Reagenz A':	1 mL Reagenz A 20 μL Reagenz S

4.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Als analytische Methode wurde die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Hierbei wurde ein Trenngel (nach Tab. 14) zwischen zwei Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Isopropanol durch mehrmaliges Waschen mit Wasser entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nachdem das Sammelgel auspolymerisiert war, konnte der Kamm entfernt werden und das fertige Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt werden. Diese wurde zuvor mit SDS-Laufpuffer befüllt. Die zu untersuchenden Proben wurden mit Laemmli-puffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Ausgefallene Bestandteile wurden bei 13000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Elektrophorese erfolgte 2 h bei 20 mA und weitere 2 h bei 40 mA.

4. METHODEN

SDS-Laufpuffer:	50 mM Tris/HCL pH 8.6 380 mM Glycin 0.1% SDS in dH ₂ O
3 × Laemmli-Puffer:	150 mM Tris/HCl pH 6.8 6 % SDS 30 % Glycerin 0.3 % Bromphenolblau 3 % β-Mercaphtoethanol
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris/HCl 8.8 0.4 % SDS
Sammelgelpuffer:	0.5 M Tris/HCl pH 6.8 0.4 % SDS
Acrylamidlösung:	30 % Acrylamid / 0.8 % Bisacrylamid in dH ₂ O

Tabelle 14: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für SDS-PAGE.

Acrylamid-Konz.	Sammelgel (10 mL)	Trenngel (30 mL)		
	4 %	10%	12,5 %	15 %
Acrylamid-Lösung (mL)	1.3	9.8	12.7	14.7
Sammelgelpuffer (mL)	2.5	/	/	/
Trenngelpuffer (mL)	/	7.5	7.5	7.5
APS (μL)	100	250	250	250
TEMED (μL)	10	25	25	25
dH ₂ O (mL)	6.1	7.7	9.6	12.6

4.5.4 Western-Blot-Analyse (*semi-dry*)

Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurde das Trenngel entfernt und das Sammelgel über das *semi-dry* Western-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen. Dabei wurde die Membran zusammen mit dem Sammelgel im Kathodenpuffer inkubiert. Der Aufbau des Blots ist Abb.10 zu entnehmen. Die Übertragung der Proteine erfolgt im elektrischen Feld bei $1 \frac{mA}{cm^2}$ für 70 min.

Kathodenpuffer: 40 mM ϵ -Aminocapronsäure
20 mM TRIS/HCl pH 9.0
20 % Methanol

Anodenpuffer: 75 mM TRIS/HCl pH 7.4
20 % Methanol

Blotto: 5 % (w/v) Milchpulver
1 \times PBS
0.1 % Tween-20

PBST: 1 \times PBS
0.1 % Tween-20

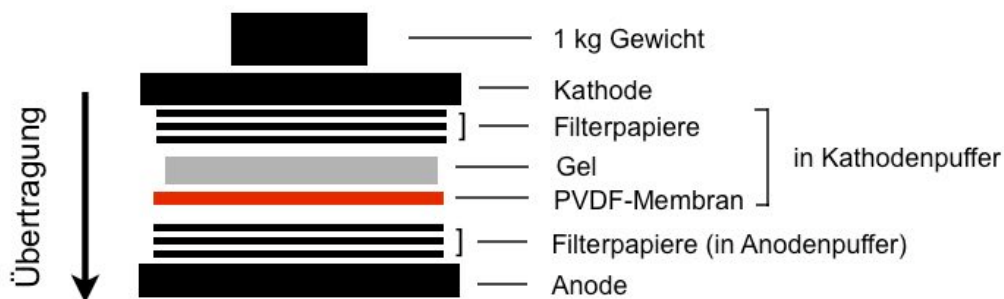


Abbildung 10: Schematischer Aufbau eines Western-Blots (*semi-dry*).

4.5.5 Ponceau-S Färbung von Membranen

Der erfolgreiche Proteintransfer nach Western-Blot lässt sich über eine Ponceau-S Färbung überprüfen. Der Farbstoff beeinflusst die Antikörperbindung nicht und kann mit dH₂O komplett ausgewaschen werden. Auf die Membran übertragene Proteine werden nach Ponceau-S Färbung in roten Banden sichtbar. Die Färbung muss vor der Blockierung freier Bindungsstellen mit Blotto durchgeführt werden.

Ponceau-S Lösung: 0.1% (w/v) Ponceau-S, 5% (v/v) Essigsäure

4.5.6 Strippen der PVDF-Membran

Zur Detektion weiterer Proteine kann die PVDF-Membran mehrmals mit Antikörpern (AK) inkubiert werden. Um den bereits gebundenen AK zu lösen, wurde die Membran dabei jeweils zweifach in dH₂O, 0.2 M NaOH-Lösung und abschließend in dH₂O gewaschen. Die so vorbereitete Membran konnte für eine erneute Dekoration mit einem AK verwendet werden.

4.5.7 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie

Nach abgeschlossener Elektrophorese erfolgte die Färbung der Gele mittels Coomassie-Färbelösung (Neuhoff mod. Candiano, 2004). Hierbei wurde das Gel zunächst 1 h bei RT in Fixierlösung inkubiert und dann zweimal für 10 min mit dH₂O gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung ü.N. in frisch angesetzter Coomassie-Färbelösung. Die gewünschte Farbintensität wurde durch abschließende Inkubation in der Entfärbelösung erreicht. Das erhaltene Gel wurde zur weiteren Analyse digitalisiert.

Fixierlösung:	40 % Ethanol 10 % Essigsäure in dH ₂ O
Coomassie-Stammlösung:	0.12 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue G250 10 % (v/v) Ortho-Phosphorsäure 10 % (w/v) Ammoniumsulfat
Coomassie-Färbelösung:	80 % (v/v) Coomassie-Stammlösung 20 % (v/v) Methanol
Entfärbelösung:	1 % (v/v) Essigsäure

4.5.8 Färbung von Polyacrylamid-Gelen durch Silberlösung

Die Silberfärbung (Heukeshoven & Dernick, 1988) erfolgte nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE. Das Gel wurde zunächst 1.5 h bei RT in Fixierlösung I und anschließend 2 h bei RT in Fixierlösung II inkubiert. Nachfolgend wurde das Gel dreimal für je 20 min mit dH₂O gewaschen und 1 h bei RT in Silber-Färbelösung inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift für 1 min in dH₂O erfolgte die Inkubation für 1 min in Entwicklerlösung. Die Lösung wurde anschließend verworfen und das Gel nochmals in Entwicklerlösung inkubiert, bis die gewünschte Färbung der Banden eingetreten ist. Der Färbeprozess wurde durch Zugabe einer Glycin-Lösung als Stopp-Lösung beendet. Abschließend wurde das Gel mehrmals mit dH₂O gewaschen, digitalisiert und getrocknet.

4. METHODEN

Fixierlösung I:	30 % Ethanol 10 % Essigsäure in dH ₂ O
Fixierlösung II:	0.5 M Natriumacetat 30 % Ethanol 0.5 % Glutaraldehyd 0.2 % Natriumthiosulfat-Pentahydrat in dH ₂ O
Silber-Färbelösung:	0.1 % Silbernitrat 0.02 % Formaldehyd in dH ₂ O
Entwickler-Lösung:	2.5 % Natriumcarbonat 0.01 % Formaldehyd in dH ₂ O
Stopp-Lösung:	0.05 M Glycin

4.5.9 Aktivitätsbestimmung lysosomaler Standardenzyme

Die Aktivität der lysosomalen β -Hexosaminidase wurde auf murinen Gewebehomogenaten durch die Umsetzung des artifiziellen Pseudosubstrats *para*-Nitrophenyl-*N*-Acetyl- β -D-Glucosaminid gemessen. Durch die Konvertierung zu *para*-Nitrophenol (pNP) konnte die Menge proportional bei 405 nm im Infinite 200 Tecan abgelesen werden. Der molare Koextinktionsfaktor von pNP beträgt bei 405 nm $\epsilon = 18500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Die Wegstrecke die das Licht durch eine 96-well Mikrotiterplatte durchdringen muss beträgt 0.85 cm. Alle Werte wurden in Doppelwerten bestimmt. Neben den Probenwerten wurden sowohl Enzym-, als auch Substrat-Leerwert bestimmt. Die Gewebehomogenate wurden 1:10 mit TBS verdünnt. 10 μL der Verdünnungen wurden zu 100 μL

Substrat gegeben. Die Proben wurden mit dH₂O auf 200 μ L aufgefüllt und im 37 °C Wasserbad für 2 h inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 mL Stop-Puffer beendet und die Extinktion der Proben bei 405 nm gemessen. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{V(\text{Ansatz}) \cdot \Delta E \cdot 1000}{18.5 \cdot V(\text{Enzym}) \cdot t(\text{min})} = \text{Aktivitaet} \frac{mU}{mL} \quad (1)$$

Substrat: 10 mM *p*-Nitrophenyl-2-Acetamido-2-Deoxy- β -D-Glucopyranosid

Stop-Puffer: 0.4 M Glycin / NaOH (pH 10.4)

Citrat-Puffer: 0.1 M Natrium-Citrat (pH 4.6)

0.08% NaN₃

600 mM NaCl

Protease-Inhibitor-Mix

4.5.10 Sulfataseaktivität gegenüber Pseudosubstraten

Für viele bereits charakterisierte Sulfatasen wurde eine Aktivität gegenüber sulfatierten Aromaten wie *p*-Nitrocatecholsulfat (pNCS), *p*-Nitrophenylsulfat (pNPS) und 4-Methylumbelliferylsulfat (4-MUS) nachgewiesen. Dazu wurden sowohl enzymhaltige Elutionsfraktionen nach Ni²⁺-Batch-Aufreinigung (4.5.13), als auch Rohzelllysate im Aktivitätstest eingesetzt. Im Allgemeinen betrug das Probenvolumen 30 μ L. Dieses wurde mit 150 μ L pNCS-Substratpuffer bzw. 4-MUS-Substratpuffer bei pH 5.5 oder pH 7.0 gemischt und für Zeiträume von 10 min bis 24 h bei 37 °C in 500 μ L-Röhrchen inkubiert. Durch Zugabe von 150 μ L 4-MUS bzw. pNCS-Stoppuffer wurde die Reaktion zu den festgelegten Zeitpunkten abgestoppt. Die Messung erfolgte abhängig von dem eingesetzten Substrat bei 515 nm (pNPS) bzw. 405 nm (pNCS).

4.5.11 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 eine zu Mitochondrien vergleichbare Dichte aufweisen, ist es kaum möglich, diese durch klassische Dichte-Zentrifugation sauber voneinander zu trennen. Durch die Injektion von Tyloxapol (Triton WR-1339) wird die Lipoprotein-Lipase des Plasmas inhibiert (Hayashi *et al.*, 1981), was zu einem starken Anstieg des LDL-Spiegels im Plasma und einer vermehrten Aufnahme von LDL-Partikeln in der Leber über den LDL-Rezeptor führt, der das gebundene LDL über rezeptorvermittelte Endozytose (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 4 $\mu\text{L/g}$ Körpergewicht einer 17 % Triton WR-1339 (v/v) intravenös injiziert. Nach Tötung wurde die Leber entnommen (etwa 3-5 g) und mit 4.5 mL eiskalter 0.25 M Sucrose im Potter Elvehjem bei 2300 rpm mit einem Hub homogenisiert und bei 4°C für 10 min bei 2300 rpm (Eppendorf 5804R Zentrifuge) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen (E1) und das Pellet in 3.5 mL eiskalter 0.25 M Sucrose rehomogenisiert. Das Homogenat wurde erneut bei 4°C für 10 min bei 2300 rpm sedimentiert, der Überstand (E2) abgenommen und mit E1 vereint (E1+E2 = MLPS). Die MLPS-Fraktion wurden in ein neues Ti75 Röhrchen gefüllt und bei 4°C für 7 min bei 25000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde erneut mit 10 ml 0.25 M Sucrose gewaschen und abermals zentrifugiert. Dieses Sediment (*light mitochondria* und Lysosomen, ML) wurde vorsichtig in 2.5 mL ρ 1.21 Sucrose resuspendiert und über einen diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten aufgetrennt.

Für den diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten wurde das resuspendierte Pellet ML in SW40 Zentrifugen-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurden 2.25 ml Sucrose ρ 1.15, mit 2.25 mL Sucrose ρ 1.14 und 1 mL Sucrose ρ 1.06 vorsichtig darüber geschichtet. Durch Zentrifugation für 150 min bei 4°C und 25000 rpm (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.

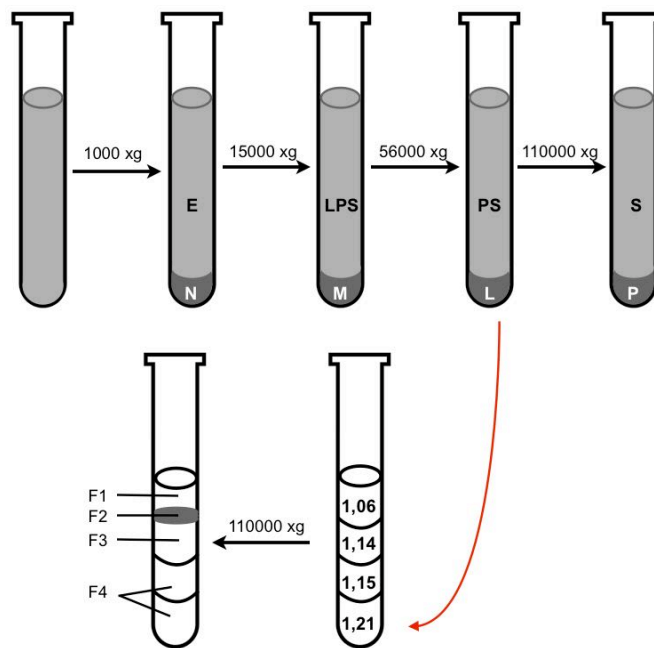


Abbildung 11: Übersicht der differentiellen Zentrifugation und des diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten der Tritosomen-Präparation.

Die Verteilung der β -Hexosaminidase-Aktivität in allen Fraktionen wurde als lysosomales Leitenzym bestimmt und die F2-Fraktionen für Western-Blot-Analysen und Substratverdau eingesetzt (Damme, Diss. 2009).

4.5.12 Ammoniumsulfat-Fällung

Konditioniertes Medium aus der ARSK-HEK293 Kultivierung wurde alle zwei Tage geerntet und bei 8000xg für 30 min bei 4°C zur Entfernung abgestorbener Zellen zentrifugiert. Dem Überstand wurde 50% (w/v) Ammoniumsulfat zugegeben und ü.N bei 4°C gerührt. Die anschließende Lagerung erfolgte ebenfalls bei 4°C.

4.5.13 Aufreinigung von His-markierter ARSK aus Zellkulturüberständen

Die aus Zellkulturüberständen gewonnene ARSK-His₆ wurde nach der Ammoniumsulfatfällung (4.5.12) für 30 min bei 8000x g und 4 °C präzipitiert. Das Pellet wurde in ca. 5 mL Batch-Bindepuffer aufgenommen und ü.N. gegen zweifach 2 L Batch-Bindepuffer dialysiert. Am folgenden Tag wurden ausgefallene Substanzen bei 18000x g für 30 min und 4 °C pelletiert.

Die Aufreinigung erfolgte mittels NiNTA²-Sephrose im Batch-Verfahren. Hierfür wurden 1 % (v/v) NiNTA²-Slush entnommen, bei 250x g für 5 min sedimentiert und in 10 mL Bindepuffer gewaschen. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Der Überstand wurde verworfen. Der ARSK-His₆-haltige Überstand wurde zu den NiNTA²-*beads* gegeben und ü.N. bei 4 °C gewälzt. Am folgenden Tag wurde der Überstand in einer selbst gepackten Mobicol-Säule von den *beads* abgetrennt und als Durchfluss (FT) aufgefangen. Hierdurch wurde sichergestellt, dass keine *beads* in die Eluate gelangen konnten. Die Ni-NTA-*beads* wurden zwei mal mit Waschpuffer (20 mM Imidazol) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Fraktionen (W1 und W2) wurden für weitere Analysen aufgefangen. Die Elution der ARSK erfolgte durch die zweistufige Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 250 mM und 500 mM. Die Säule wurde verschlossen, der Elutionspuffer hinzugegeben und für 5 min gewälzt. Die Elutionsfraktionen konnten durch Öffnen der Säule gewonnen werden. Der zweite Elutionsschritt erfolgte analog dazu. Zum Nachweis der Aufreinigung wurden alle gesammelten Fraktionen per SDS-PAGE (4.5.3) aufgetrennt, über Western-Blot (4.5.4) auf eine Membran übertragen und anschließend über den spezifischen ARSK-AK (Biorbyt) sowie RGS-HIS₆-AK nachgewiesen. Die Aktivitätsbestimmung (4.5.10) erfolgte gegenüber dem Sulfatase-Pseudosubstrat pNCS (4.5.10)

4.6 Glycobiologische Methoden

4.6.1 DMMB (1,9-Dimethylmethylen-blau)-Assay

Sulfatierte Glykosaminoglykane können über DMMB (de Jong *et al.*, 1989) nachgewiesen werden. Der polykationische Farbstoff bindet sowohl polyanionische GAGs, als weitere Polyanione wie DNA und RNA. Hierdurch ist die vorherige Isolierung und Aufreinigung der GAGs notwendig (4.6.2). Der DMMB-Assay ermöglicht einen GAG-Nachweis im Bereich von 0-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mit einer Sensitivität ab 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Der Nachweis mittels DMMB erfolgt durch Zugabe von 10 μL isolierter GAGs zu 200 μL DMMB-Lösung. Die zunächst blaue-Lösung färbt sich bei ansteigender GAG-Menge rosa. Die Absorption wurde bei 535 nm im TECAN-Reader gegen einen Nullwert (H_2O) bestimmt.

4.6.2 Glykosaminoglykan-Extraktion aus Mausegewebe

Die Maus wird mittels zervikaler Dislokation geopfert. Die Organe werden entnommen und 50 mg Gewebe in einem Potter mit 500 μL Extraktionspuffer homogenisiert. Die erhaltene Suspension wurde sonifiziert (40 % Intensität, 3 x, 20 sec) und bei 18000xg für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Proteine durch Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) für 4 h bei 55 °C inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurde die Probe bei 98 °C für 15 min aufgeköcht. Noch in der Probe enthaltene DNA wurde durch Zugabe einer Spatelspitze DNase I und Inkubation von 1 h bei 37 °C abgebaut. Lipide und weitere hydrophobe Proteine wurden anschließend durch Zugabe von 200 μL Chloroform separiert. Dafür wurde die Probe gevortext und bei 10000xg für 1 min zentrifugiert. Die wässrige Phase (oben) konnte durch die erhaltene Phasentrennung abgenommen und die organische Phase verworfen werden. Die wässrige Phase wurde über 250 μL G-25 in einer Mobicol-Säule filtriert und aufgefangen. Das erhaltene Filtrat konnte nun im DMMB-Assay (4.6.1) analysiert werden.

4. METHODEN

Extraktionspuffer: 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂
2 mM CaCl₂, pH 7.5

4.6.3 Glykosaminoglykan-Extraktion aus Mausgewebe für GRIL-LC/MS-Analysen

Die Maus wird mittels zervikaler Dislokation geopfert. Die Organe werden entnommen und mit fünf Hüben im Potter in 5 mL DEAE Waschpuffer homogenisiert. Nach Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 0.4 mg/mL) sowie 0.5 % (v/v) Triton X-100 wird die Probe bei 37 °C ü.N geschüttelt. Anschließend wurden die Homogenate bei 10000xg für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert (0.45 µL Filter) und auf 10 mL mittels DEAE-Waschpuffer aufgefüllt. Die GAGs wurden über DEAE-Sepharose gebunden. Hierfür wurden vorab DEAE-*beads* im 25-fachen Volumen DEAE-Vorwaschpuffer ü.N. äquilibriert. Für die Aufreinigung wurden 400 µL DEAE in eine Mobicol-Säule gegeben und mit 10 mL Waschpuffer gewaschen. Die Probe wurde über Schwerkraft geladen und mit dreifach mit 10 mL Waschpuffer gewaschen. Die GAGs wurden durch die erhöhte Salzkonzentration im DEAE-Elutionspuffer in 2.5 mL eluiert. Die Entsalzung erfolgte durch PD10-Säulen. Diese wurden vorab mit 30 mL 10% EtOH äquilibriert. Nach Beladen der Probe erfolgte die Elution mit 2.5 mL 10% EtOH. Das Eluat wurde bei -80 °C eingefroren und ü.N. lyophilisiert. Die getrocknete Probe wurde in 500 µL DNase I-Puffer resuspendiert und mit 20 kU/mL DNase I bei 37 °C ü.N. inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut getrocknet und mit 500 µL NaOH (0.4 M) ü.N. auf Eis inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Proben mit 0.4 M Essigsäure neutralisiert und auf 10 mL mit DEAE Waschpuffer aufgefüllt. Die abschließende Aufreinigung erfolgte durch erneute DEAE-Chromatographie und PD10-Entsalzung. Nach abschließender Trocknung der Proben in der Speedvac konnten die Proben zur GRIL-LC/MS oder anderen massenspektroskopischen Analysen eingesetzt werden.

DEAE-Vorwaschpuffer:	50 mM Natriumacetat, pH 6.0 200 mM Natriumchlorid, 0.5 % Triton X-100
DEAE-Waschpuffer:	50 mM Natriumacetat, pH 6.0 200 mM Natriumchlorid
DEAE-Elutionspuffer:	50 mM Natriumacetat, pH 6.0 1000 mM Natriumchlorid
DNase-I-Puffer:	50 mM TRIS, pH 8.0, 50 mM Natriumchlorid 2.5 mM MgCl ₂ , 0.5 mM CaCl ₂
Proteinase-K:	20 mg/mL Proteinase K, 75 mM CaCl ₂

4.6.4 GRIL-LC/MS

Bei der sogenannten *Glycan Reductive Isotope Labeling Liquid Chromatography Mass Spectroscopy* (GRIL-LC/MS) werden Glykosaminoglykane nach Extraktion enzymatisch depolymerisiert, wobei sie einzigartige Mono-, Di- oder Trisaccharide von den nicht-reduzierenden Enden der Ketten freisetzen. Da der lysosomale Abbau von GAGs sequenziell vom nicht-reduzierenden Ende (NRE) der GAG-Ketten erfolgt kann von der Zusammensetzung der freigesetzten Mono- und Oligosaccharide auf den Enzymdefekt geschlossen werden (Lawrence *et al.*, 2008). Die LC/MS-Analyse ermöglicht eine qualitative und quantitative Bewertung der Biomarker in biologischen Proben (Lawrence *et al.*, 2012). Dabei werden NRE-Standards benötigt, die über eine reduktive Aminierung mit [¹³C]-Anilin markiert werden. Die zu untersuchenden NREs des Probenmaterials werden mit [¹²C]-Anilin markiert und zusammen mit den NRE-Standards co-chromatographiert wodurch eine Zuordnung der Signale ermöglicht wird. Essentiell ist hierbei die Unterscheidung der NREs von den internen Disaccharid-Einheiten. Nach der Depolymerisierung unterscheiden sich die internen Disaccharid-Einheiten aufgrund einer ungesättigten Uronsäure um 18 Da von den NREs, die im Gegensatz zu den internen Einheiten aus einer gesättigten Uronsäure aufgebaut sind (Linhardt *et al.*, 2001; Lawrence *et al.*, 2012).

Extrahierte GAGs wurden zunächst mit bakteriellen Heparin-Lyasen bzw. Chondroitinasen zu Disaccharid-Einheiten depolymerisiert. Nach [¹²C]-Ani-

4. METHODEN

lin-Markierung wurden die NREs in der AG Esko (San Diego, USA) an einer LTQ Orbitrap Discovery mit Elektronenspray Spektrometer und einer C₁₈ RP-HPLC analysiert. Als Lösemittel wurde Acetonitril genutzt, dem das kationische Dibutylamin (DBA) als Additiv zur Ionenpaarbildung zugegeben wurde. Zusätzlich wurde ein Methanol-Gradient eingesetzt, um die Auftrennung ähnlich modifizierter Disaccharid-Einheiten zu verbessern.

4.6.5 Markierung von Disacchariden über 2-Aminoacridon

Die reduktive Aminierung wurde mod. nach Hitchcock *et al.* (2008) durchgeführt. Hierbei wird Zuckern in einem aziden Lösemittel eine Aminogruppe, die 2-Aminoacridon (AMAC) enthält, angefügt. Dabei kommt es zur Generierung einer Schiff'schen Base bzw. eines Imids. Die hierbei entstehende Verbindung ist in wässriger Lösung instabil. Das Gleichgewicht liegt in der geschlossenen Form und nicht in der des offenen Aldehyds. Die Reduktion der Schiff'schen Base durch ein mildes Reduktionsmittel führt zu einer irreversiblen Reduzierung der Imid-Bindung. Das erhaltene Produkt ist der gewünschte Fluorophor-markierte Zucker (Abb. 12)

Monosaccharid:	10 mM Monosaccharid in H ₂ O
AMAC-Lösung:	100 mM 2-Aminoacridon (AMAC) 15 % (v/v) Essigsäure in DMSO
NaBH ₃ CN-Lösung:	1 M Na-Cyanoborhydrid in H ₂ O

Die synthetisch generierten Saccharide G2A0 und G2S0 (3.4) wurden zur Markierung mit AMAC genutzt. Zu 100 nmol Saccharid wurden 5 μ L der AMAC-Lösung gegeben und 10 min bei RT im dunklen inkubiert um die Imid-Verbindung zu bilden. Anschließend wurden 5 μ L der Na-Cyanoborhydrid-Lösung zugegeben und für 4 h bei 45°C im dunklen inkubiert. Die so gelabelten Zuckern können für mehrere Wochen bzw. Monate bei -20°C gelagert werden. Zur chromatographischen Analyse wurden die Proben mit 300 μ L 50 % (v/v) DMSO in H₂O verdünnt.

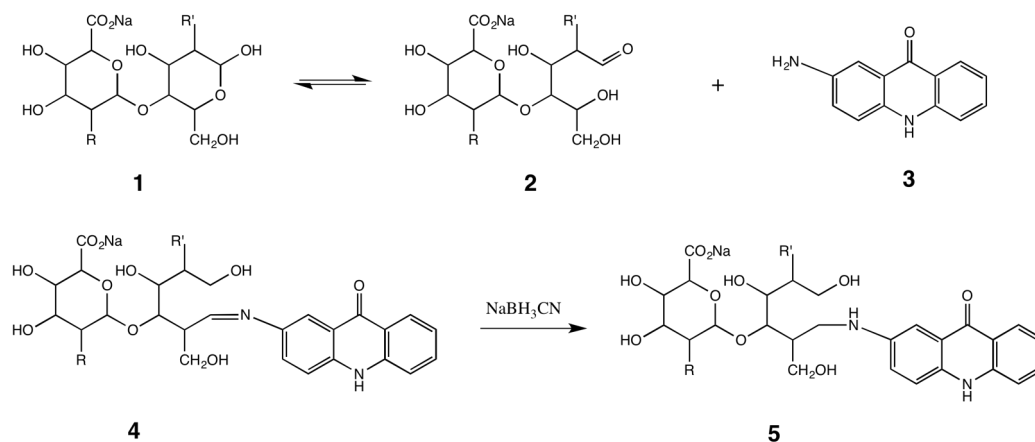


Abbildung 12: **Mechanismus der Saccharid-Markierung durch 2-Aminoacridon.** Ein Disaccharid befindet sich im Gleichgewicht in der offenen Form (1) und geschlossenen Form (2). Durch AMAC (3) reagiert die offene Form mit der Aminogruppe des AMACs und bildet eine Schiff'sche Base (4) aus. Durch Reduzierung der Imid-Bindung durch Na-Cyanoborhydrid wird eine irreversible, stabile Verbindung (5) erzeugt.

4.6.6 RP-HPLC AMAC-markierter Disaccharide

Die AMAC-markierten Disaccharide interagieren mit der Matrix einer C18 *reversed phase* (RP)-Säule durch den hydrophoben Charakter des angehängten Farbstoffs. Dieser Effekt wird zusätzlich durch funktionelle Gruppen der untersuchten Saccharide modifiziert. Angehängte Sulfatgruppen weisen starke hydrophile Eigenschaften auf, wodurch die Interaktion mit dem Säulenmaterial abnimmt. Das untersuchte Saccharid eluiert dadurch schneller und kann von anders substituierten Vertretern unterschieden werden.

Als Chromatographie-Apparatur wurde die Ettan LC (GE Healthcare) mit einer Jupiter C18 RP-Säule (300 μm , 4.6 mm Durchmesser, 3.2 mL Volumen) eingesetzt. Als Bindepuffer wurde 60 mM Ammoniumacetat pH 5.6 eingesetzt, um mögliche Sulfatgruppen zu deprotonieren. Durch Erhöhung der Ladungsunterschiede wird die mögliche Auflösung eingesetzter Saccharide verbessert. Die Elution gebundener Saccharide erfolgte durch aufsteigende Konzentration des Acetonitril Elutionspuffers. Nach AMAC-Markierung der

4. METHODEN

zu analysierenden Saccharide (4.6.5) wurden diese in einen 500 μL Loop geladen und nach Chromatographieprogramm Tab.15 aufgetrennt.

Tabelle 15: Chromatographieprogramm zur Auftrennung AMAC-markierter Saccharide.

Phase	Elutionspuffer	Volumen [mL]
Äquilibration	2%	16
Injektion	2%	2
Gradient A	2-4%	4
Gradient B	4-15%	28
Gradient C	15-60%	3
Waschen	60%	3

Die Aufreinigung erfolgt bei 1 mL/min. Zur Vorbereitung der C18-Säule wird diese mit 2% Puffer B äquilibriert, anschließend mit 60% Puffer B gewaschen um mögliche Verunreinigungen zu entfernen und erneut auf 2% Puffer B gesetzt. Die Probe wurde injiziert und in einem Gradienten aufgetrennt. Die Proben wurden zu je 500 μL fraktioniert. Die Säule wurde abschließend erneut in 60 % Puffer B gewaschen und zur Lagerung auf 20% Ethanol gesetzt. Markierte und eluierte Zucker werden durch UV-Absorption bei 255nm in der Ettan LC detektiert und zur Auswertung in einem Chromatogramm gespeichert.

4.6.7 Verdau von AMAC-markierten Disacchariden

Nach AMAC-Markierung der Saccharide kann ein enzymatischer Verdau mit rekombinanter Arsk oder angereicherten Tritosomen erfolgen. Durch den Umsatz einer Sulfatgruppe des markierten Saccharids verändert sich das Laufverhalten der potentiellen Substrate, was zu einem Shift des Elutionsvolumen führt. Dieser kann im Chromatogramm durch Vergleich mit dem unverdauten Saccharid bestätigt werden. Ferner erfolgt die Bestätigung der Struktur durch Elektronenspray-Ionisierung-MS Analysen (ESI-MS). Für den enzymatischen Umsatz wurden die angereicherten Tritosomen abgenommen, zu je 150 μg aliquotiert und für 30 min bei 40.000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die noch intakten Lysosomen eingefroren oder in 150 μL

250 mM Ammoniumacetat pH 4.6 resuspendiert. Der Membranaufschluss erfolgte durch dreifache Sonifizierung zu je 20 sec im Ultraschallgerät. Das Zelldebris wurde für 10 min bei 11800x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und über den DC-Protein-Assay quantifiziert. Die getrockneten AMAC-Saccharide wurden mit 50 μ g der aufgeschlossenen Tritosomen-Proteinmischung für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Entfernung von Proteinen erfolgte durch Einsatz einer 10 kDa *cut-off*-Membran. Die Lösung wurde für 30 min bei 11800x g abzentrifugiert. Abschließend wurde die Membran mit weiteren 300 μ L Laufpuffer mit 10% Acetonitril gewaschen. Der Durchfluß wurde an der Speedvac getrocknet. Die so vorbereitete Probe konnte über eine C18-RP-Säule aufgetrennt und analysiert werden.

5 Ergebnisse

5.1 Generierung und Verifizierung der Arsk-KO-Maus

Eine kürzlich erschienene Studie (Dhamale *et al.*, 2017) konnte der Arylsulfatase K (Arsk) die Funktion als Glukuronat-2-Sulfatase zuweisen. Damit nimmt die Arsk eine Rolle in der Degradationskaskade von Glykosaminoglykanen ein. Der Arsk-*knock-out* (Arsk-KO) kann mit einem MPS-ähnlichen Krankheitsverlauf einhergehen, der bereits für eine Vielzahl weiterer, am GAG-Abbau beteiligter Enzyme, gezeigt werden konnte. Das Arsk-KO-Mausmodell erlaubt es die zugrundeliegende Pathophysiologie zu erforschen und das dabei erlangte Wissen für die Identifikation und die Diagnose möglicher Arsk-defizienter Patienten einzusetzen.

5.1.1 Generierung der Arsk-KO-Maus

Heterozygote Arsk-KO-Mäuse wurden von *Jackson Laboratory* erworben. Mechanistisch handelte es sich um ein *knock-out-first* Modell, welches über das Cre/loxP-Rekombinationssystem generiert wurde. Die Cre-Rekombinase (*cyclization recombination*) zählt zu einer Enzymklasse, welche die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA katalysiert. Die Cre-Erkennungssequenz wird als loxP bzw. *flippase recognition target* (FRT) bezeichnet. Soll ein gewünschter DNA-Strang entfernt werden, wird gezielt vor und nach diesem Abschnitt eine loxP-Stelle gesetzt, die vom Cre-Enzym erkannt und gebunden wird. Befinden sich beide loxP-Sequenzen in selber Orientierung, wird die betroffene Sequenz daraufhin ausgeschnitten und intrazellulär abgebaut.

Bei der in dieser Arbeit vorliegenden Arsk-KO-Mauslinie wurde eine IRES-Kassette (*internal ribosome entry site*, L1L2-Pgk-P) in Position 76092262 *upstream* von Exon 3 in Chromosom 13 eingesetzt. Die Kassette enthielt neben der Erkennungssequenz FRT das Reportergen lacZ sowie loxP-Stellen. Die nachfolgende Neomycin-Kassette wird von einer Phosphoglycerat-Kinase (PGK) Promotorsequenz gesteuert, die eine weitere loxP-Stelle einführt.

5. ERGEBNISSE

Eine dritte loxP-Sequenz wurde nach Exon 3 eingefügt. Die so generierten Arsk-tm1b-Mäuse wurden von *Jackson Laboratory* mit Cre-Mäusen gekreuzt, um die Neomycin-Kassette sowie Exon 3 zu entfernen. Die Nachkommen wurden über drei weitere Generationen mit C57BL/6NJ-Mäusen gepaart, um das Cre-Transgen zu entfernen. Der schematische Aufbau des Konstrukts zur Generierung der Arsk-KO-Maus ist Abb. 13 zu entnehmen.

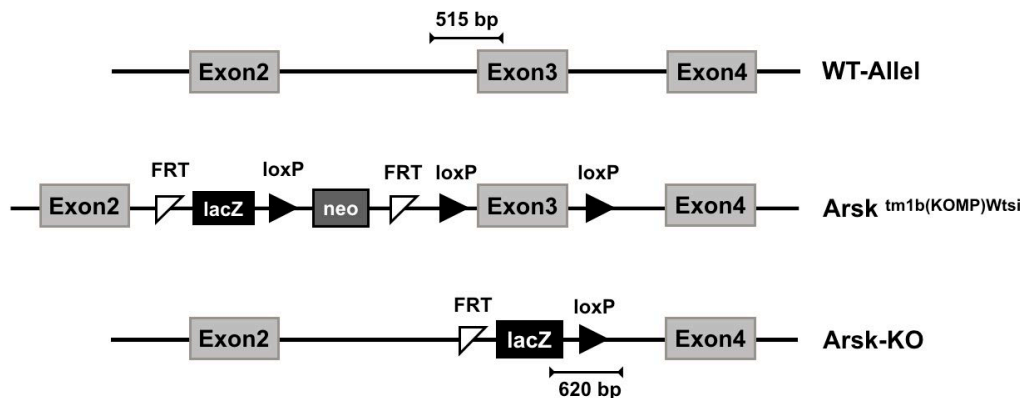


Abbildung 13: **Erzeugung des Arsk-Mausmodells.** Arsk-KO-Mäuse wurden über das *Knock-out-first*-Modell realisiert. Das Wildtyp-Allel sowie das generierte Arsk-KO-Allel sind schematisch dargestellt. In den Genloci wurde Exon 3 über loxP-Stellen flankiert und über weitere Verpaarungen durch das Cre/loxP-Rekombinationssystem deletiert. Die lacZ- und Neomycin-Kassetten dienen der Selektion auf homologe Rekombination. Produktgrößen nach Genotypisierungs-PCR zur Validierung sind mit 515 bzw. 620 Basenpaaren gekennzeichnet. Die heterozygote Elterngeneration P0 der Arsk-KO-Mäuse wurde bei Jackson Laboratories erworben.

Die Validierung des Arsk-KOs erfolgte zunächst auf muriner genomischer DNA. Hierfür wurde eine PCR-basierte Methode zur Verifizierung des Genotyps der Nachkommen etabliert. Die für die Genotypisierung verwendeten Wildtyp- und Arsk-KO-Primer erzeugten ein 515 bzw. 620 Basenpaar großes Produkt. Nach Optimierungsprozessen konnte die sogenannte Multiplex-Form der PCR durchgeführt werden, wobei sich *forward* und *reverse* Primer beider Genotypen in der Reaktionslösung befanden. Diese ermöglichte die Identifizierung der Genotypen in nur einem PCR-Ansatz (Abb. 14A).

Die Analyse des relativen Expressionsniveaus von Genen kann mit Hilfe der quantitativen PCR (qPCR) erfolgen (4.3.5). Nach Etablierung entsprechender qPCR-Primer konnte in den Geweben Hirn, Leber, Niere und Milz eine Reduzierung des Arsk-Transkripts in Arsk-KO-Gewebe gegenüber dem Wildtyp von 98.7 % - 99.9 % bestätigt werden (Abb. 14B).

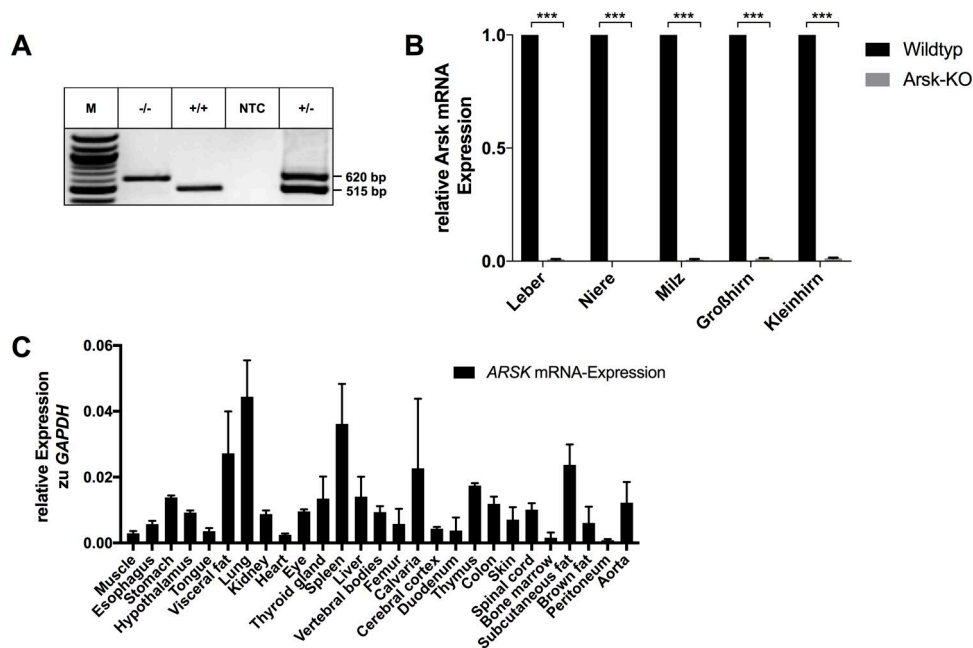


Abbildung 14: **Validierung des Arsk-KOs und Arsk-Expressionslevel.** (A) Ethidiumbromid gefärbte Agarose-Gele der PCR-Produkte nach Genotypisierungs-PCR auf muriner DNA. (B) Gewebespezifische Arsk-Genexpression nach qPCR. Analysiert wurde extrahierte mRNA drei Monate alter Wildtyp- und Arsk-KO-Mäuse nach Transkription zu cDNA. (C) Gewebespezifische ARSK-Expressionsanalyse auf humaner cDNA durchgeführt in Kooperation mit Prof. Dr. Pohl (Uniklinik Hamburg-Eppendorf).

In Kooperation mit Prof. Dr. Pohl (Uniklinik Hamburg-Eppendorf) wurde ein gewebespezifisches Expressionsmuster der ARSK mittels einer qPCR-Analyse auf humanem Gewebe erstellt. Die cDNA stammte aus einer eigens zusammengestellten humanen cDNA-Datenbank der Uniklinik Hamburg. Diese Daten bestätigten die ubiquitäre Expression der Arsk, die bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Wiegmann *et al.*, 2013) postuliert wurde.

5.1.2 Arsk-Expressionsmuster durch das lacZ-Reportergen

Für die Darstellung der Arsk-Expression wurden 12 Monate alte Mäuse passiv mit Phosphatpuffer (PB) perfundiert (4.2.5), die Organe entnommen und über Nacht in 4% PFA fixiert. Nach Anfertigung von *free-floating*-Schnitten (4.2.1), wurden diese ü.N. in X-Gal-Färbelösung inkubiert und mit Eosin gegengefärbt (4.2.6). Dargestellt ist ein Nieren-Querschnitt, der in den Arsk-KO-Tieren eine intensive blaue X-Gal-Färbung im Bereich der proximalen Tubuli aufwies (Abb. 15). Durch das in den Arsk-KO-Tieren vorhandene KO-Konstrukt ließ sich hier eine starke lacZ-Reporteraktivität feststellen. Ein Nachweis der Reporter-kassette in anderen Geweben war nicht möglich (hier nicht gezeigt).

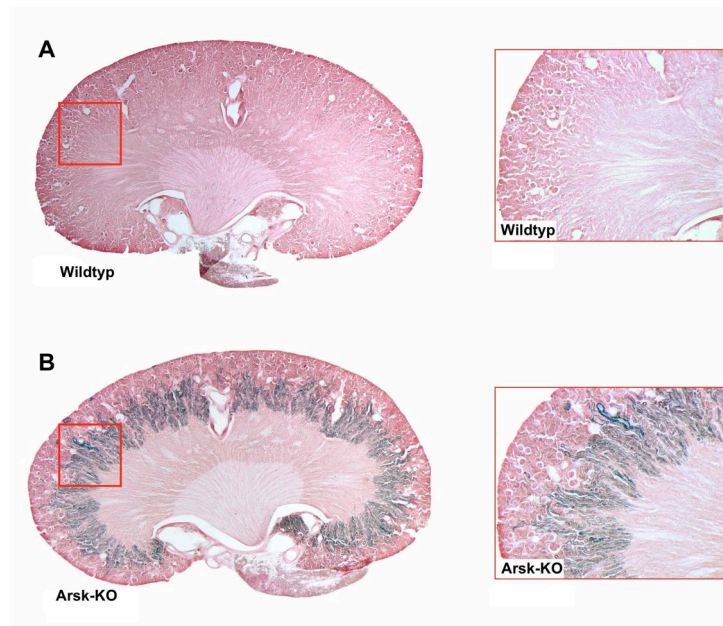


Abbildung 15: **LacZ-Reportergen-Nachweis zur Darstellung der Arsk-Expression.** Nach Betäubung der Tiere erfolgte die passive Perfusion mit PB und anschließender Fixierung über Nacht in 4% Paraformaldehyd (PFA). Zur Darstellung des Reportergens erfolgte die Inkubation von *free-floating*-Schnitten über Nacht in X-Gal-Färbelösung bei 37°C und Gegenfärbung mit Eosin. Dargestellt ist der Nieren-Querschnitt 12 Monate alter Wildtyp- und Arsk-KO-Tiere. Die intensive dunkelblaue Färbung im Bereich der proximalen Tubuli deutet auf eine hohe Reporter-genaktivität hin.

5.1.3 Arsk-KO-Nachweis auf Proteinebene

Neben der Bestimmung von Expression auf mRNA-Transkriptebene ist der Nachweis eines *Gen-knock-outs* auf Proteinlevel ein weiteres Indiz für die vollständige Abwesenheit des untersuchten Genprodukts. Hierfür wurden Homogenate (4.5.1) verschiedener Gewebe von Wildtyp- und Arsk-KO-Tieren angefertigt, in der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen (4.5.3). Die Blots wurden anschließend mit den kommerziell erhältlichen α -ARSK-AK (Everest Biotech; Biorbyt) dekoriert (Abb. 16).

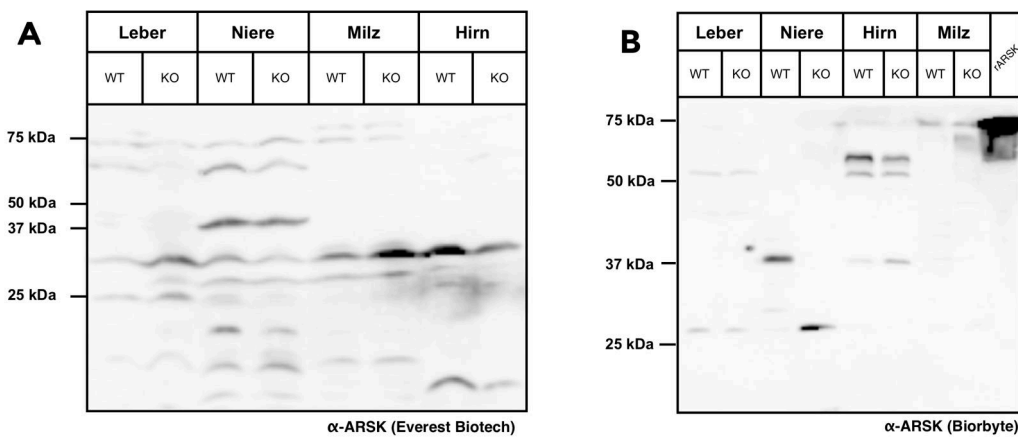


Abbildung 16: **Validierung des Arsk-KOs auf Gewebehomogenaten.**

Gewebehomogenate (100 μ g) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Dekoration der Membranen erfolgte mit (A) α -ARSK-AK (Everest Biotech) und (B) α -ARSK-AK (Biorbyt). Als Positivkontrolle wurde rekombinante humane ARSK (20 ng) aufgetragen.

Die zur Verfügung stehenden α -ARSK-Antikörper detektierten kein Genotypspezifisches Signal der murinen Arsk-Form. Als Positivkontrolle wurde die rekombinant hergestellte humane Form (rARSK) der Arsk eingesetzt und erfolgreich bei etwa 68-kDa nachgewiesen. Ferner wurden angereicherte lysosomale Fraktionen angefertigt, analog zu den Gewebehomogenaten auf eine PVDF-Membran übertragen und mit dem α -ARSK-AK (Biorbyt) sowie zur Kontrolle der lysosomalen Anreicherung mit einem α -Cathepsin D-AK dekoriert. Auf Tritosomen der Wildtyp-Tiere wurden Signale im Westernblot bei \sim 20 und \sim 30 kDa detektiert, die bei ausreichend langer Belichtungszeit

5. ERGEBNISSE

jedoch ebenfalls in den Arsk-defizienten Tieren, jedoch mit schwächerer Intensität nachweisbar sind (Abb. 17).

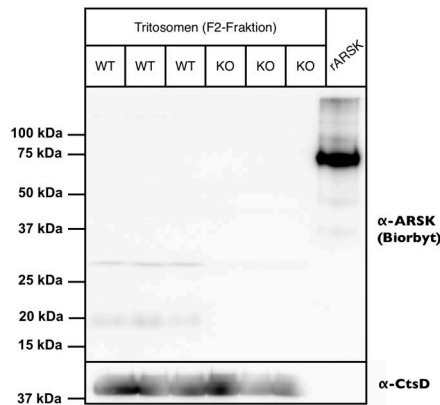


Abbildung 17: **Validierung des Arsk-KOs auf Tritosomen.** Aufgetragen wurden jeweils drei Tritosomen-Präparation (50 μ g) aus Wildtyp- und Arsk-KO-Tieren. Die Blots wurden mit α -ARSK (Biorbyt) und α -CtsD-AK dekoriert. Als Positivkontrolle wurde rekombinante humane ARSK (20 ng) aufgetragen. Die Proben wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen.

Ein für die Arsk spezifischer enzymatischer Aktivitätstest konnte zu diesem Zeitpunkt noch nicht durchgeführt werden. Dieser ist notwendig um den Kompletterverlust der GDS-Aktivität in Arsk-defizienten Tieren nachzuweisen. Ein entsprechender Assay wurde zu einem späteren Zeitpunkt etabliert (siehe 5.5.3).

5.1.4 Makroskopische Befunde des Arsk-Mausmodells

Die Arsk-KO-Mauslinie mit dem genetischen C57BL/6-Hintergrund wurde durch Inzucht fortgepflanzt und befand sich in der 10. Generation. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit wurden etwa 600 Mäuse mit einer geschlechtlichen Verteilung von 50.5% männlichen und 49.5% weiblichen Tieren gezüchtet. Die durchschnittliche Wurfgröße betrug 7.5 ± 1.8 . Eine homozygote Arsk-KO-Verpaarung lieferte fertile Nachkommen. Aufgrund geringer statistischer Abweichungen, kann eine Beteiligung des Arsk-KOs auf die Geschlechter- und Genotypverteilung ausgeschlossen werden. Alle aus der Arsk-KO-Mauslinie

hervorgebrachten Tiere wiesen tiefschwarzes Fell auf, was auf den genetischen C57BL/6-Hintergrund zurückzuführen ist. Bei der für diese Spezies üblichen Körpergröße und Gewicht wiesen Arsk-KO-Mäuse keine auffälligen phänotypischen Veränderungen auf. Eine Unterscheidung zu Wildtyp-Geschwistertieren war ohne vorherige Genotypisierung nicht möglich. Häufig zu beobachten war jedoch die großflächige Entfernung der Nackenbehaarung sowie eine unzureichende Fellpflege bei Arsk-KO-Tieren (Abb. 18A).

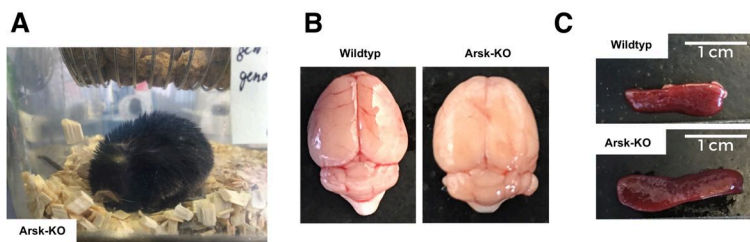


Abbildung 18: **Makroskopische Auffälligkeiten der Arsk-Zucht.** (A) Unzureichende Fellpflege mancher Arsk-KO-Tiere. (B) Hirn eines Arsk-KO-Tieres und (C) vergrößerte Milz einiger Arsk-KO-Mäuse.

In Einzelfällen konnten äußerliche strukturelle Veränderung im Hirn (Abb. 18B) oder eine vergrößerte Milz (Abb. 18C) festgestellt werden. Da diese Veränderungen jedoch nicht konstant auftraten, konnte eine spezifische Arsk-Beteiligung nicht nachgewiesen werden.

5.1.5 Einfluss des Arsk-KOs auf die Transkription anderer lysosomaler Gene

Durch das komplex verzweigte lysosomale Netzwerk kann die Dysfunktion eines lysosomalen Enzyms zu einer kaskadenartigen Reaktion führen, die Einfluss auf die Regulation anderer Gene haben kann. Mit Hilfe der quantitativen PCR (qPCR) lassen sich Aussagen über die relativen Expressionsniveaus von Genen auf mRNA-Ebene treffen und somit Expressionsunterschiede in Genotypen und Geweben feststellen.

Die am häufigsten betroffenen Gewebe stellen Hirn und Niere dar. In beiden Arsk-KO-Geweben konnte eine Erhöhung der β -Hexosaminidase (β -Hex) sowie von Lamp1 festgestellt werden, wobei die Veränderung im Hirn statisti-

5. ERGEBNISSE

sche Signifikanz erreichte. Die Iduronat-2-Sulfatase (Ids), das zur Arsk nächst verwandte Enzym, wies eine leicht reduzierte Expression auf, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. In weiteren Genen, die für Proteine des lysosomalen Systems kodieren, konnte keine Arsk-induzierte Veränderung der Expression festgestellt werden (Abb. 19).

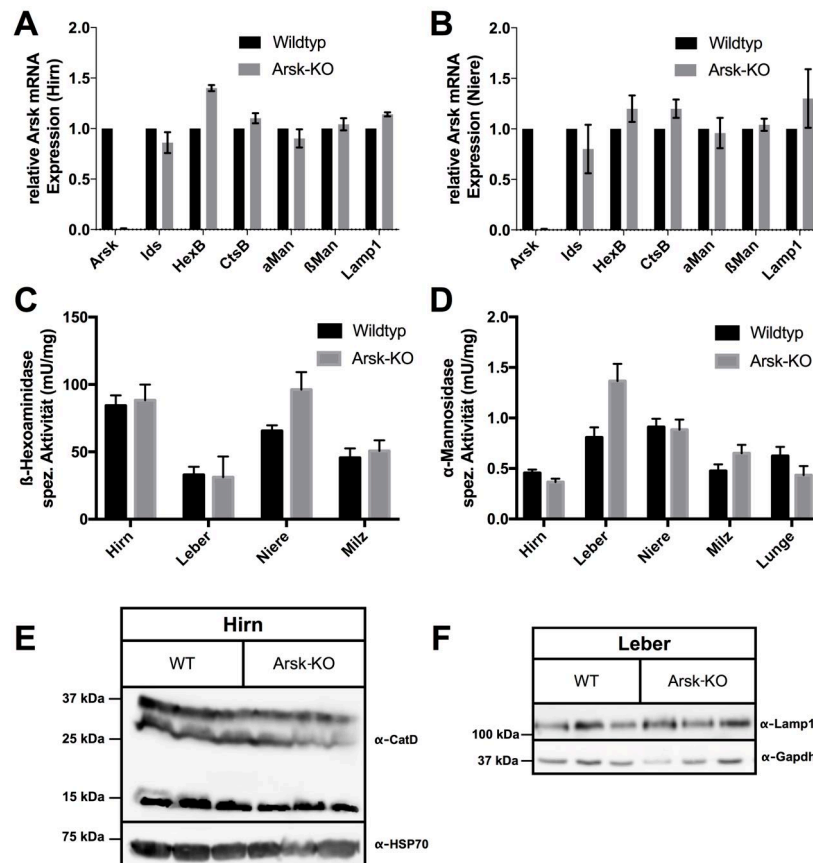


Abbildung 19: **Regulation und Aktivität lysosomaler Proteine in Arsk-KO-Mäusen.** (A/B) Expression lysosomaler Hydrolasen sowie des lysosomalen Membranproteins Lamp1 wurde mittels qPCR auf Hirn- und Niere-cDNA analysiert. Die mRNA wurde aus drei Monate alten Wildtyp- und Arsk-KO-Mäusen extrahiert und zu cDNA transkribiert. Zur Normierung der Expressionsraten wurde das *housekeeping-gen* GAPDH eingesetzt. (C/D) Enzymatische Aktivität der β -Hexosaminidase und α -Mannosidase wurden auf Gewebehomogenaten 12 Monate alter Mäuse bestimmt. (E/F) Cathepsin D und Lamp1 als lysosomale Markerproteine wurden im Westernblot nach SDS-PAGE auf Hirn- und Niere-Gewebehomogenaten 12 Monate alter Mäuse detektiert. Als Beladungskontrolle wurde HSP70 bzw. GAPDH eingesetzt.

In einem weiteren Ansatz wurde die spezifische Aktivität (4.5.9) der lysosomalen Enzyme β -Hexosaminidase (β -Hex) sowie α -Mannosidase (α -Man) untersucht (Abb. 19 C/D). Hierbei waren eine um 20% erhöhte β -Hex-Aktivität in der Arsk-KO-Niere sowie eine um 30% erhöhte α -Man-Aktivität in der Arsk-KO-Leber festzustellen. Die in diesem Versuch eingesetzten Gewebemogenate wurden ferner mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Auf Proteinebene konnte bei den lysosomalen Enzymen Cathepsin D im Hirn sowie Lamp1 in der Niere keine Abweichung zum Wildtyp festgestellt werden (Abb. 19 E/F).

5.2 Phänotypische Analyse des Arsk-Mausmodells

Lysosomale Speichererkrankungen weisen häufig eine Beteiligung der viszeralen Organe wie Niere, Leber oder Milz auf. Aus diesem Grund erfolgte die Untersuchung dieser Organe auf mögliche, durch den Arsk-KO bedingte, pathologische Befunde. Die histologische Analyse der viszeralen Organe erforderte die Perfusion der unter Narkose stehenden Tiere mit Glutaraldehyd (4.2.4). Die so vorbereiteten Organe wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Lüllmann-Rauch (Universität Kiel) untersucht.

5.2.1 Einfluss des Arsk-KOs auf viszeraler Organe

Die Niere übernimmt im Körper eine essentielle Filterfunktion von Körperflüssigkeiten und ist häufig von einer Akkumulation der partiell abgebauten Metabolite betroffen. Nierengewebe acht bis zwölf Monate alter Wildtyp- und Arsk-KO-Tiere wurde sowohl im Lichtmikroskop (LM), als auch Elektronenmikroskop (EM) auf mögliche pathologische Befunde untersucht (Abb. 20). In Zellen die eine sogenannte *thick ascending limb* der Henle'schen Schleife (TAL) bilden, waren in der Arsk-KO-Niere *dense bodies*, also elektronendichtes Material vorzufinden. Dieses punktuelle, kreisförmige und wasserunlösliche Material war in allen untersuchten Altersstufen zu beobachten. Ferner war dieses Material in den Profilen der Intermediärtubuli der Niere nachzuweisen (Abb. 20C). Leere und vorab mit Speichermaterial gefüllte Vakuolen,

5. ERGEBNISSE

wie sie für viele Mukopolysaccharidosen beschrieben werden, konnten im Nierengewebe nicht identifiziert werden.

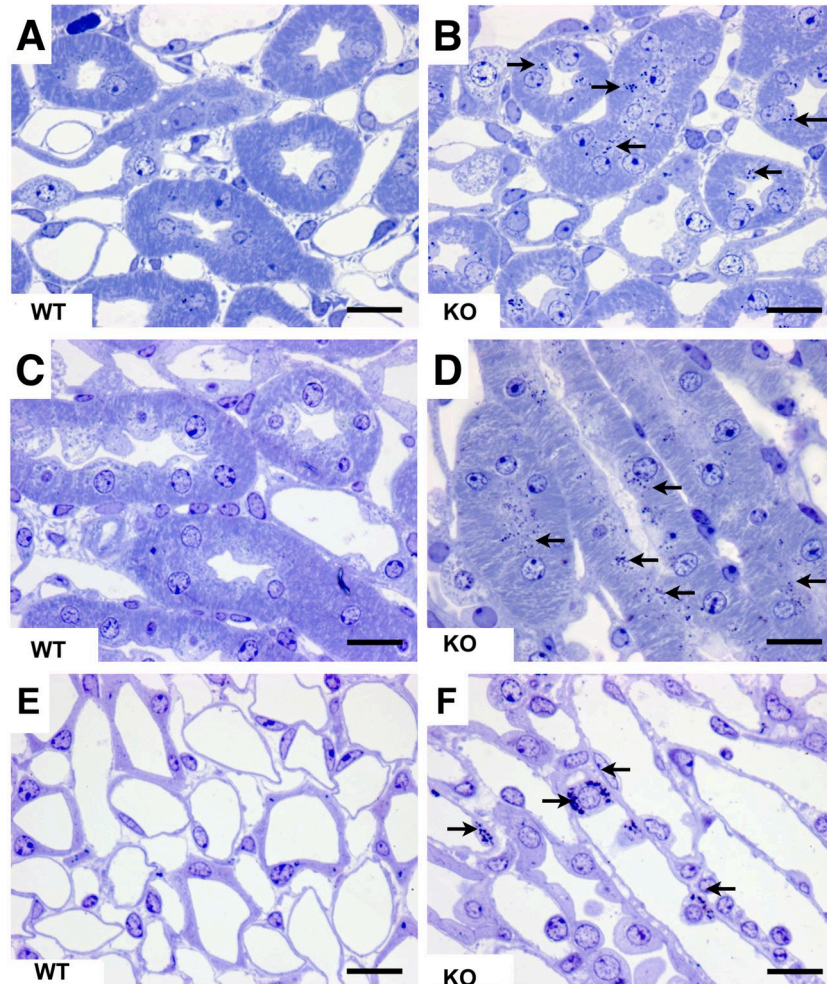


Abbildung 20: **Pathologische Befunde in der Arsk-KO-Niere (Lichtmikroskopie)**. Die Niere acht und zwölf Monate alter Arsk-KO-Mäuse wurde im Lichtmikroskop in Kooperation mit Prof. Dr. Lüllmann-Rauch (Universität Kiel) analysiert. Nach Betäubung der Maus wurde diese für 5 min mit Phosphatpuffer und anschließend für 7 min mit Glutaraldehyd-Lösung perfundiert. Die Organe wurde entnommen und ü.N. in Glutaraldehyd-Lösung (3%) gelagert. Abgebildet sind Gewebeschnitte nach Toluidinblau-Färbung unter basischen Bedingungen. **(A-D)** TAL-Profile (äußere Medulla) mit akkumuliertem Material in *dense bodies* im Alter von acht bis zwölf Monaten der Arsk-KO-Tiere. **(E-F)** *Dense bodies* einzelner Profile der Intermediärtubuli bei Arsk-KO-Tieren im Alter von zwölf Monaten. Maßstabsbalken entsprechen 20 μm .

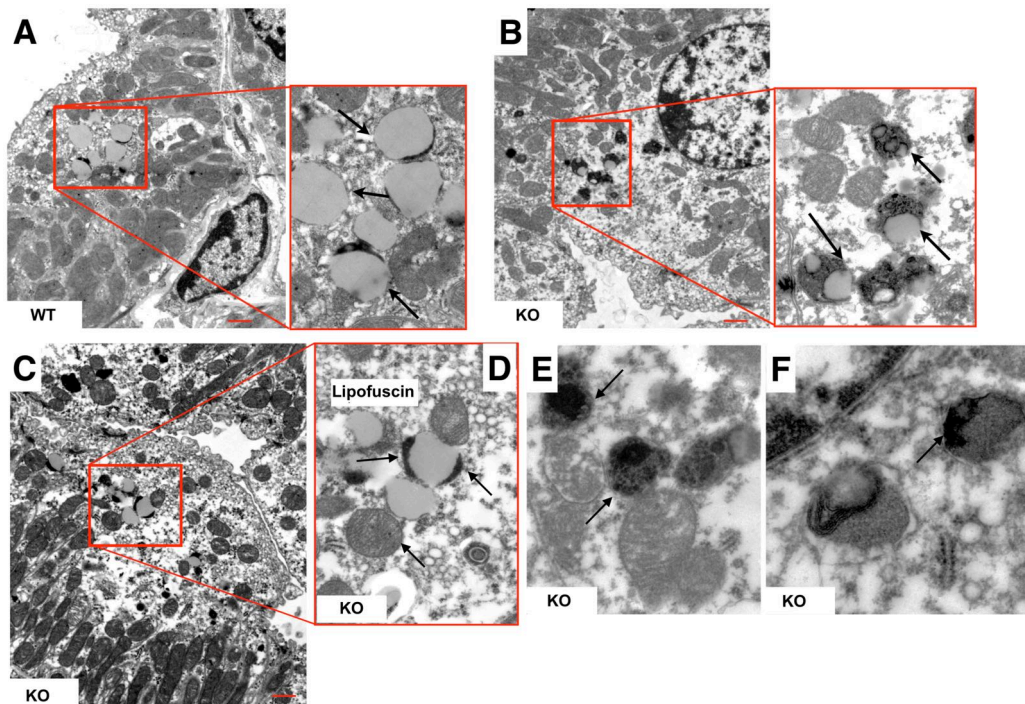


Abbildung 21: **Pathologische Befunde in Arsk-KO-Niere (Elektronenmikroskopie)**. Dargestellt sind Bereiche der Niere dreizehn Monate alter (A) Wildtyp- und (B) Arsk-KO-Tiere. Elektronendichtes Material, welches ein Korrelat zu *dense bodies* in LM-Aufnahmen darstellt, ist ebenso im EM zu finden. (C/D) Lipofuscin-Einlagerungen vermehrt in Arsk-KO-Tieren (Pfeile). (E/F) Weitere Befunde erhöhter Elektronendichte in Arsk-KO-Tieren. Maßstabsbalken entsprechen $5\ \mu\text{m}$.

Die nach histologischer Anfärbung unter dem Lichtmikroskop identifizierten *dense bodies* im Nierengewebe haben ihr Elektronenmikroskop-Korrelat in Form von elektronendichten Einschlüssen (Abb. 21, Pfeile).

Aufgrund möglicher Befunde von akkumulierendem Material wurden weitere immunologische Analysen an Nierengewebe der Arsk-KO-Tiere durchgeführt. Das endo-lysosomale System der 12 Monate alten Tiere wurde mit dem lysosomalen Marker Lamp1 sowie dem Makrophagenmarker F4/80 untersucht. Eine erhöhte Rekrutierung der Lysosomen konnte dabei jedoch nicht festgestellt werden. Ebenso konnte keine Immunantwort, die sich durch eine erhöhte Zahl an Makrophagen charakterisiert, in Arsk-KO-Tieren nachgewiesen werden (Abb. 22).

5. ERGEBNISSE

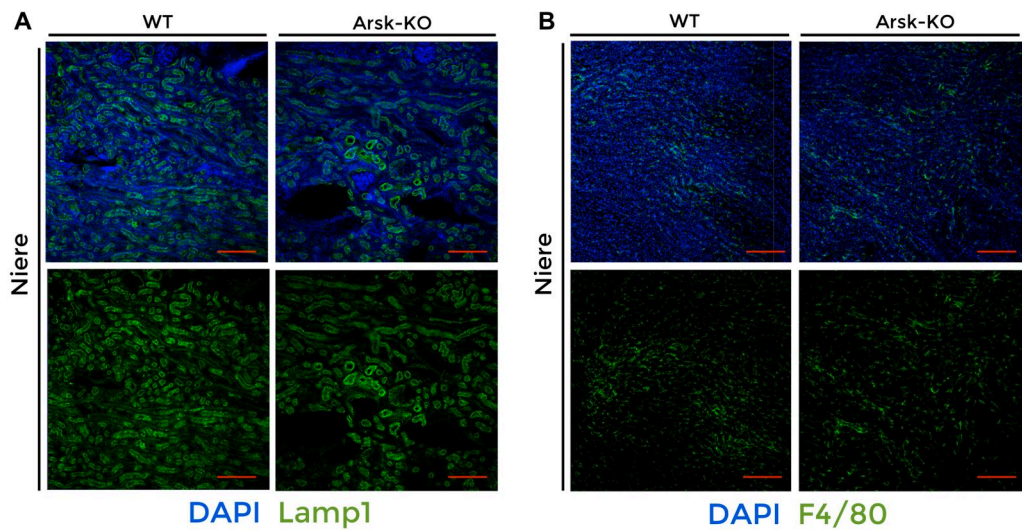


Abbildung 22: **Endo-lysosomales System in der Arsk-KO-Niere.** Dargestellt sind *free-floating*-Schnitte der Niere zwölf Monate alter Mäuse. Das Nierengewebe wurde mit **(A)** α -Lamp1-AK (lysosomaler Marker) sowie **(B)** α -F4/80-AK (Makrophagen-Marker) dekoriert. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstabsbalken entsprechen 200 μ m.

Analog erfolgte die Analyse von Lebersektionen drei und zwölf Monate alter Arsk-KO-Tiere auf eine mögliche Immunreaktion sowie Einflüsse auf das endo-lysosomale System. Dabei konnte in keiner der untersuchten Altersstufen eine verstärkte Rekrutierung von Lysosomen anhand des lysosomalen Markerproteins Lamp1 festgestellt werden. Die inflammatorischen Marker für Mikroglia (CD68) sowie Makrophagen (F4/80) geben ebenso keinen Hinweis auf die Aktivierung des Immunsystems Arsk-defizienter Tiere (Abb. 23).

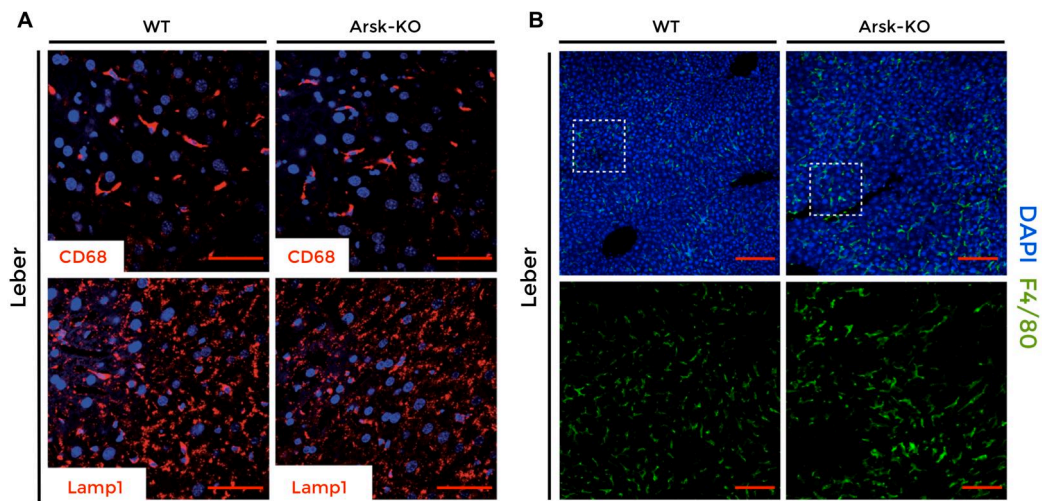


Abbildung 23: **Endo-lysosomales System in der Arsk-KO-Leber.** Dargestellt sind *free-floating*-Schnitte der Leber (**A**) drei und (**B**) zwölf Monate alter Mäuse. Die Schnitte wurden mit (**A**) α -CD68-AK (Mikroglia-Marker) und α -Lamp1-AK (lysosomaler Marker) sowie (**B**) α -F4/80-AK (Makrophagen-Marker) dekoriert. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstabsbalken entsprechen 200 μ m.

5.2.2 Neuronales System der Arsk-KO-Tiere

Viele lysosomale Speichererkrankungen zeigen eine Beteiligung des zentralen Nervensystems. Dies führt häufig zu einem neurologischen Phänotyp, der sich durch Neuroinflammation oder Degeneration der neuronalen Zellpopulationen äußert (Damme *et al.*, 2011). Der Verlauf dieser Erkrankungen ist meist progressiv und kann sowohl im jungen Alter, besonders aber im Verlauf der Lebenszeit, stark zunehmen. Die im folgenden Abschnitt entstandenen Aufnahmen stellen Hirnsektionen von drei bis 18 Monaten alten Wildtyp- und Arsk-KO-Tieren dar. Für die Analysen wurden die Mäuse zunächst unter Narkose gesetzt und mit Phosphatpuffer perfundiert (4.2.5). Die Gewebe wurden entnommen und zunächst für drei Tage in 30 % Sucrose gelagert, bis eine Anfertigung von *free-floating*-Schnitten und die Antikörper-Dekoration erfolgen konnte.

5. ERGEBNISSE

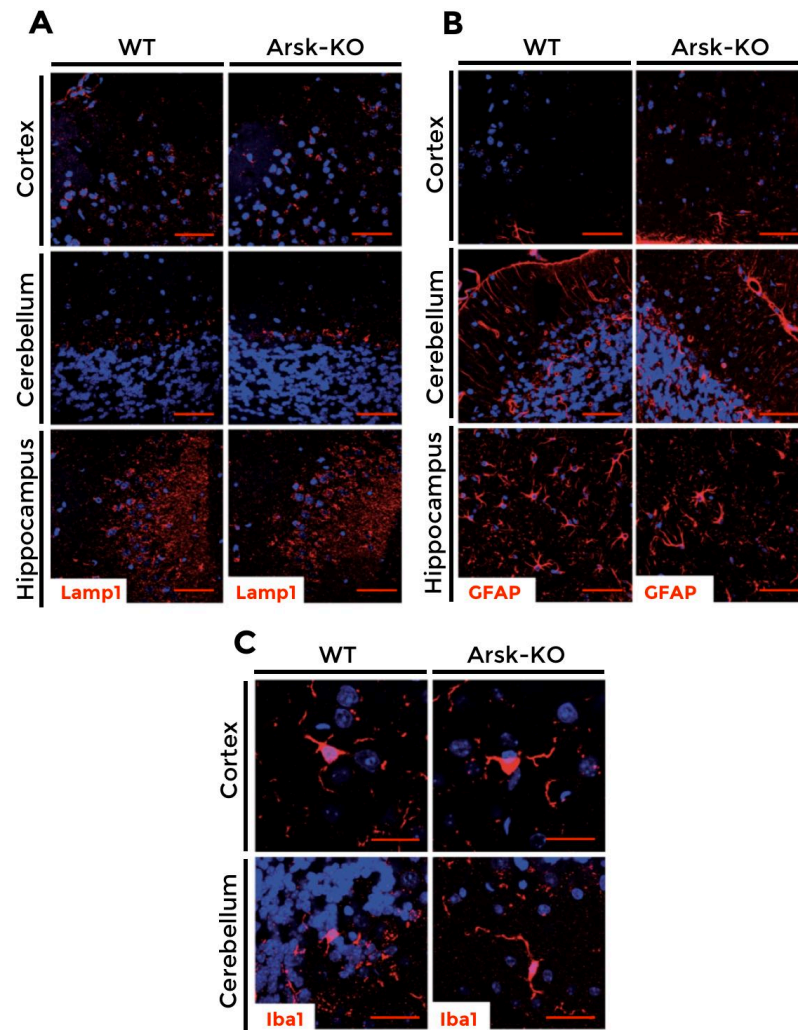


Abbildung 24: **Neuronales System im Arsk-Mausmodell (drei Monate)**. Dargestellt sind *free-floating*-Schnitte von Hirnsektionen drei Monate alter WT- und Arsk-KO-Tiere. Die Schnitte wurden mit (A) α -Lamp1-AK (lysosomaler Marker), (B) α -GFAP-AK (Astrozyten-Marker) und (C) α -Iba1-AK (Mikroglia-Marker) dekoriert. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Maßstabsbalken entsprechen 200 μ m.

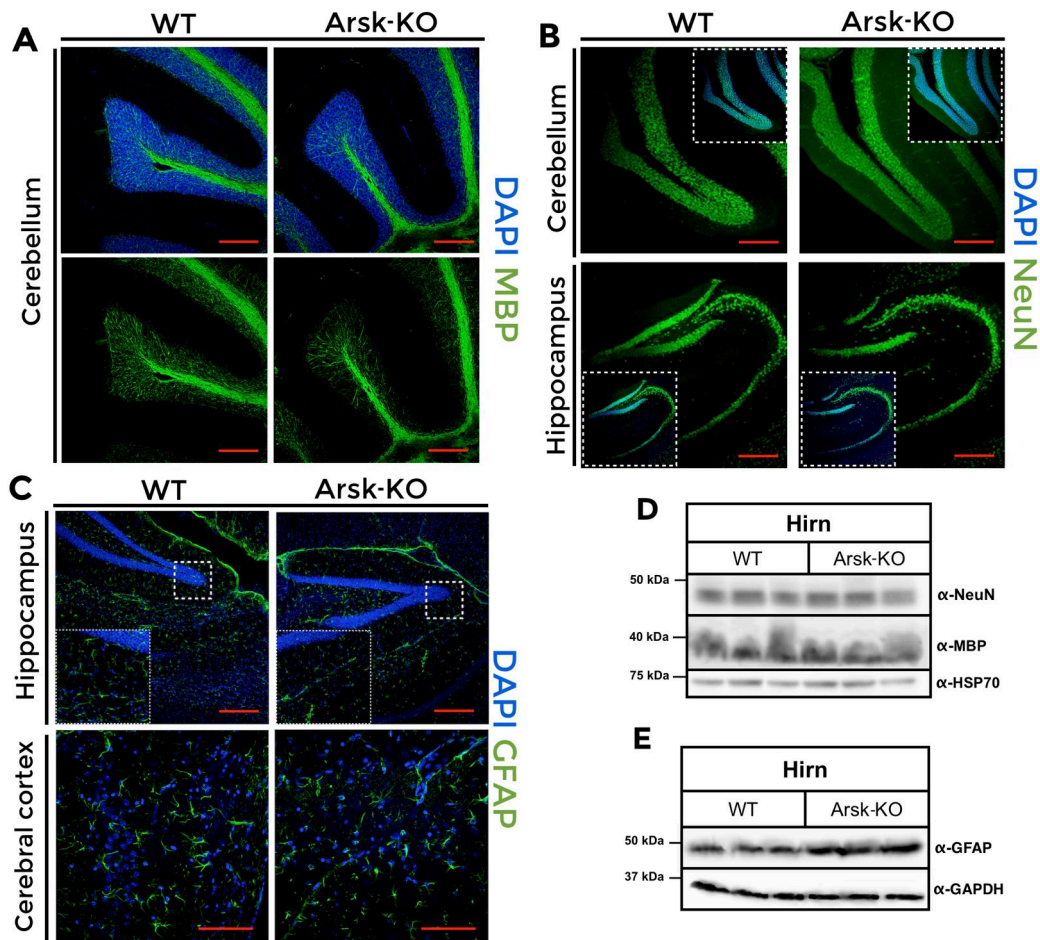


Abbildung 25: **Neuronales System im Arsk-Mausmodell (zwölf Monate)**. Dargestellt sind *free-floating*-Schnitte von Hirnsektionen zwölf Monate alter Wildtyp und Arsk-KO-Tiere. Die Gewebesektionen wurden mit (A) α -MBP-AK (Myelin-Marker), (B) α -NeuN-AK (Neuronen-Marker) und (C) α -GFAP-AK (Astrozyten-Marker) dekoriert. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. (D/E) Western-Blots nach SDS-PAGE von Hirn-Gewebehomogenaten dekoriert mit den angegebenen Antikörpern. Maßstabsbalken entsprechen 200 μ m.

Im Alter von drei Monaten erfolgte die Untersuchung des neuronalen Systems über die spezifischen Mikroglia-Marker Iba1 sowie den Astrozyten-Marker GFAP (*glial fibrillary acidic protein*). Mikroglia stellen einen Teil der neuronalen Zelltypen dar und agieren sehr sensibel auf potentielle pathologische Faktoren. Astrozyten bilden den Hauptteil der Gliazellen im Gehirn. Das lysosomale System wurde anhand des lysosomalen Membranproteins Lamp1

5. ERGEBNISSE

überprüft, wobei ein neuroinflammatorischer Zustand des Arsk-KO-Hirns nicht festgestellt werden konnte (Abb. 24). Im Alter von zwölf Monaten wurden weitere Analysen des ZNS durchgeführt. Hierfür wurde der Astrozyten-Marker GFAP sowie MBP (*myelin basic protein*) als Myelin-Marker gewählt. Auch in dieser Altersstufe konnten weder immunhistologisch, noch auf Proteinlevel, Unterschiede im Arsk-KO-Gewebe festgestellt werden, die Hinweise auf einen pathologischen Phänotyp geben (Abb. 25).

Purkinje-Zellen stellen den größten neuronalen Zelltyp dar und sind durch einen stark verästelten Dendritenbaum im Cerebellum charakterisiert. Die Zellkörper (Somata) sind im gesunden Zustand Perlenschnur-förmig in der Kleinhirnrinde angeordnet. Durch die hohe lysosomale Aktivität der Purkinje-Zellen sind diese besonders für lysosomale Speichererkrankungen anfällig (Platt *et al.*, 2012). Die Degeneration von Purkinje-Zellen sowie des Dendriten-Netzwerks ist eng mit dem Verlust neuronaler Prozesse verbunden, wie es in dem Fucosidase KO- und dem MPS-IIIE-Mausmodell gezeigt werden konnte (Wolf *et al.*, 2016, Kowalewski *et al.*, 2012). Arsk-KO-Gewebe wurde im Alter von zwölf und 18 Monaten hinsichtlich der Purkinje-Zellschicht untersucht (Abb. 26). Als Vergleichsprobe wurde MPS-IIIE-Gewebe eingesetzt, an dem die Degeneration von Purkinje-Zellen bereits gezeigt wurde (Kowalewski *et al.*, 2016). Die charakteristische, perlenförmige Anordnung der Purkinje-Zellen wurde sowohl im Arsk-KO-, als auch Wildtyp-Gewebe beobachtet, wobei ein Verlust dieser Zellpopulation nicht festzustellen war. Das Dendriten-Netzwerk in Gewebe achtzehn Monate alter Arsk-KO-Tiere wies geringfügige Lücken auf, die wahrscheinlich auf das hohe Alter der Tiere zurückzuführen waren. Das Cerebellum zwölf Monate alter MPS-IIIE-Tiere wies hingegen einen starken Verlust der Purkinje-Zellschicht sowie des daran angrenzenden Dendriten-Netzwerks auf.

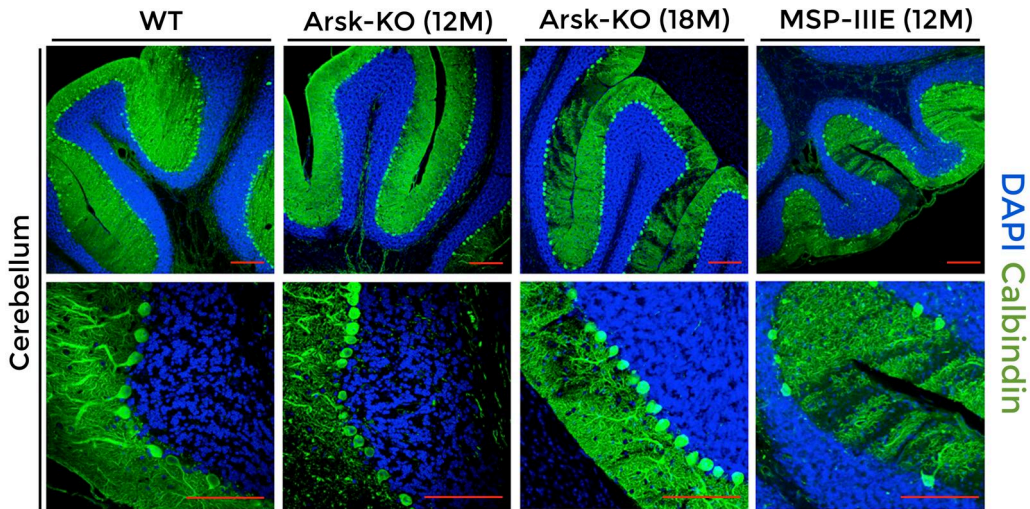


Abbildung 26: **Purkinje-Zellpopulation in Arsk-KO-Tieren.** Dargestellt sind *free-floating*-Schnitte des Hirns von Wildtyp-, Arsk-KO- und MPS-IIIIE-Tieren im Alter von 12-18 Monaten. Dekoriert wurden die Schnitte mit dem Purkinje-Zellen Marker Calbindin. Als Vergleichsprobe wurde MPS-IIIIE-Gewebe aufgrund des bereits nachgewiesenen Abbaus von Purkinje-Zellen gewählt. Zellkerne wurden über DAPI (blau) markiert. Maßstabsbalken entsprechen $200\ \mu\text{m}$.

5.2.3 Sekundäre Speicherung

Die Anhäufung von sekundärem Speichermaterial in Form von unverestertem Cholesterin ist häufig ein gemeinsames Merkmal vieler lysosomaler Speichererkrankungen, wie beispielsweise der α -Mannosidose (Damme *et al.*, 2011). Die Akkumulation des autofluoreszenten Materials lässt sich über die Markierung von Hirn-Sektionen mit einer Filipin-Färbung untersuchen.

Eine Einlagerung von punktförmigen Strukturen im Bereich des Cerebellums war im Arsk-KO-Gewebe feststellbar, wobei eine unvermeidbare basale Markierung von autofluoreszentem Material ebenso im Wildtyp vorlag (Abb. 27). Das Auftreten der Speicherung konnte an zwölf, aber nicht an drei Monate alten Arsk-KO-Tieren nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt).

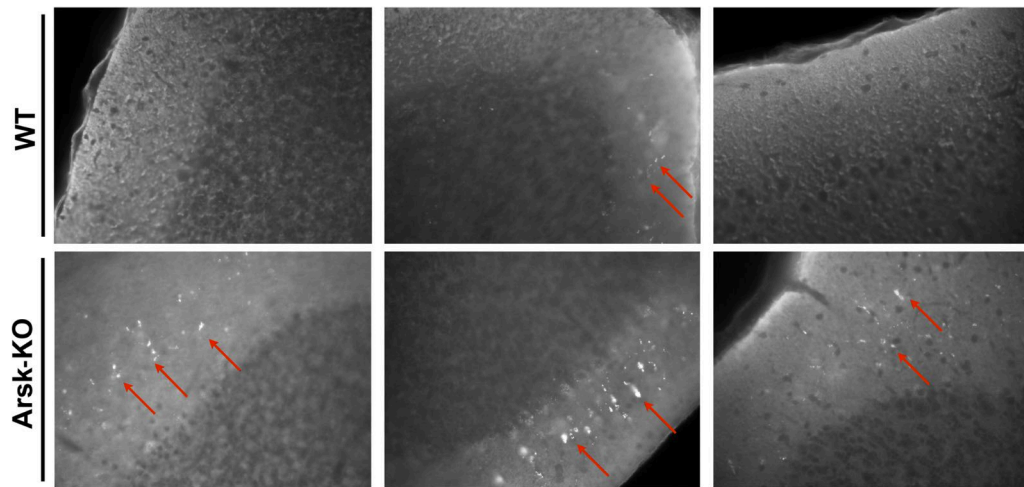


Abbildung 27: **Akkumulation von autofluoreszentem Material im Arsk-KO-Hirn.** Dargestellt sind *free-floating*-Schnitte des Hirns zwölf Monate alter Mäuse markiert mit Filipin. Die Schnitte wurden vorab mit Quenching-Lösung inkubiert, um Autofluoreszenz zu vermeiden. Autofluoreszierendes Material im DAPI-Kanal ist markiert (Pfeile).

5.2.4 Verhaltenstests

Neuropathologische Veränderungen gehen häufig mit Auffälligkeiten im Verhalten der Tiere einher, wobei besonders für Mäuse sehr spezielle Verhaltensmuster bekannt sind. Mögliche Abweichungen können in standardisierten Tests nachvollzogen werden (D’Hooge *et al.*, 2005). Die Verhaltensstudie des Arsk-Mausmodells wurde im Labor für Verhaltensphysiologie (Universität Leuven, Belgien) in Auftrag gegeben und unter Führung von Dr. Stijn Stroobrandts durchgeführt. Untersucht wurde eine weibliche Kohorte von $n=14$ Wildtyp- und $n=13$ Arsk-KO-Tieren im Alter von 12 Monaten.

Zunächst wurde neben dem Körpergewicht der Versuchstiere die motorische Leistung durch Greifkraft-Analysen untersucht. Anhand des sogenannten Rotarod-Tests, bei dem sich die Mäuse in mehreren Durchgängen auf einem rotierenden Balken halten müssen, wurden die koordinativen Fähigkeiten, als auch die Ausdauer getestet. Besondere Aktivitätsmuster wie eine erhöhte Verweildauer in den Käfig-Ecken, eine mögliche Hyperaktivität durch den häufigen Durchtritt der Käfig-Mitte sowie das über den Tag ver-

teilte Aktivitätsprofil wurde in durchsichtigen Käfigen unter Zuhilfenahme von Infrarot-Schranken dokumentiert (Abb. 28). Dabei wurde kein signifikanter Unterschied der Arsk-KO-Tiere zu ihren Wildtyp-Geschwistertieren festgestellt.

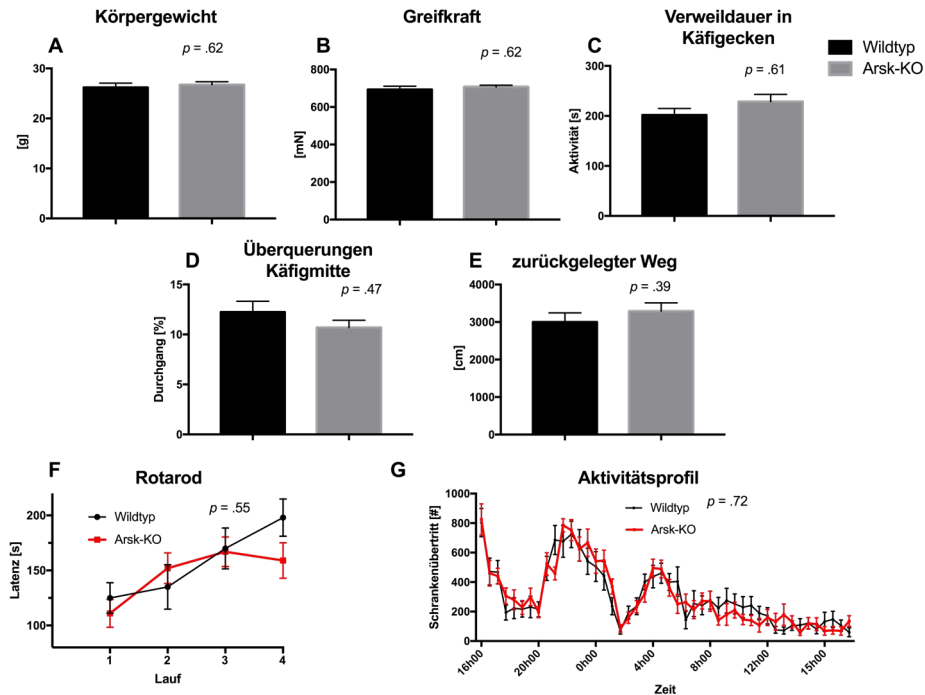


Abbildung 28: **Motorische Fähigkeiten und allgemeines Aktivitätsprofil.** Arsk-KO-Tiere im Alter von 12 Monaten zeigten keine auffälligen Merkmale während der durchgeführten Analysen (A) Gewicht ($\rho=.62$) und (B) Greifkraft ($\rho=.62$) (C) Verweildauer in den Ecken ($\rho=.61$) (D) Überquerungen der Käfigmitte ($\rho=.47$) (E) zurückgelegter Weg ($\rho=.39$) (F) Rotarod ($\rho=.55$) (G) allgemeines Aktivitätsprofil ($\rho=.72$).

Das Morris-Wasserlabyrinth (*Morris water maze*) untersucht das räumliche Denkvermögen. Dabei musste das Versuchstier nach erfolgter Konditionierungsphase eine unsichtbare Plattform in einem mit trübem Wasser gefüllten Becken erreichen. Beide Versuchsgruppen konnten sich die Plattform gleichermaßen einprägen und in einer vergleichbaren Zeit erreichen (Abb. 29A/B). Arsk-KO-Tiere schwammen etwas schneller (Abb. 29C), was sich möglicherweise durch die verlängerte Starre der Wildtyp-Tiere (Abb. 29D) erklären lässt. Im ersten Versuchsablauf erreichten Arsk-KO-Tiere den Ziel-

5. ERGEBNISSE

quadrant seltener und verweilten in diesem kürzer als der Wildtyp (Abb. 29E/F).

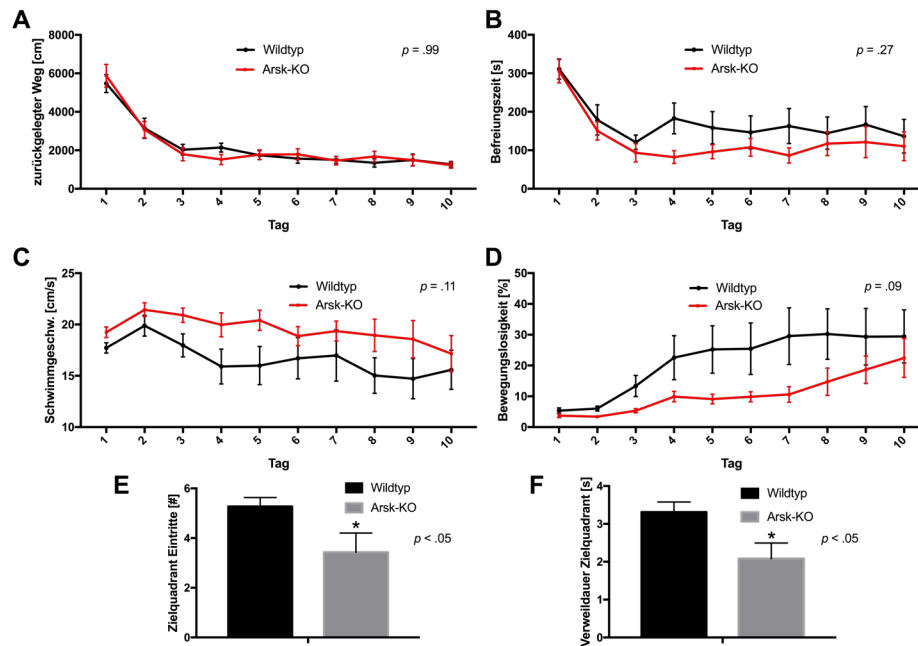


Abbildung 29: **Morris-Wasserlabyrinth.** (A/B) Versuchstiere beider Genotypen prägten sich im Laufe des Experiments den Weg zu der Plattform ähnlich schnell ein. (C) Arsk-KO-Tiere schwammen etwas schneller als Wildtyp-Tiere, was wahrscheinlich durch längere Phasen der Starre der Wildtyp-Tiere (D) zu erklären war. (E/F) Arsk-KO-Tiere erreichten den Zielquadrant in der ersten Durchführung seltener und verweilten dort kürzer als Wildtyp-Tiere.

In dem *passive avoidance* Test wurde das Kurz- und Langzeitgedächtnis untersucht (Abb. 30A). Dabei erhielten die Versuchstiere in der Konditionierungsphase einen leichten Stromschlag, sobald eine dunkle Fläche überquert wurde. Arsk-KO-Tiere wiesen dabei ein weniger stark ausgeprägtes Angstverhalten als der Wildtyp auf, ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen. In dem sogenannten *Sociability/Preference for social novelty* (SPSN) Test wurde das Verhalten beim Kontakt mit neuen und bisher unbekanntem Artgenossen untersucht. Dabei zeigten beide Genotypen ein ähnliches und mit der Zeit abnehmendes soziales Interesse (Abb. 30B). Besondere Auffälligkeiten sind während der ersten Testphase (0-2 min) zu beobachten, wobei

Arsk-KO-Tiere einen größeren Abstand zu den bewohnten Käfigen hielten und sich diesen erst im zweiten Intervall (2-4 min) annäherten, was für eine verzögerte Aufnahme sozialer Kontakte spricht (Abb. 30C/D).

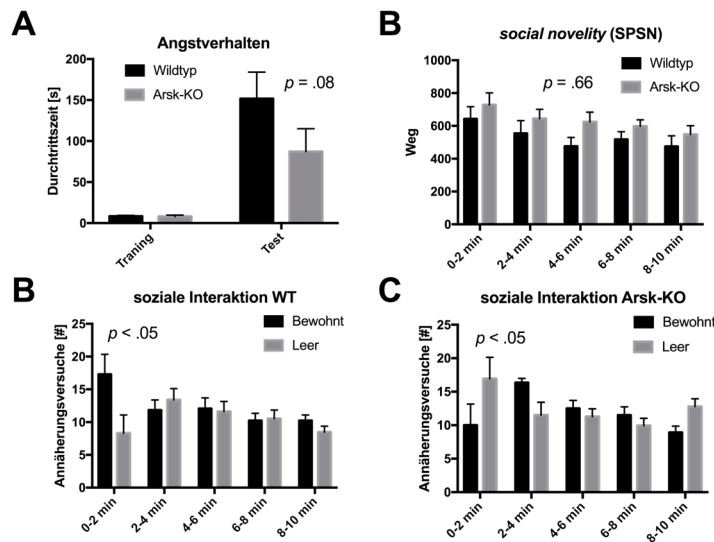


Abbildung 30: **Angstverhalten und soziale Interaktionen der Arsk-KO-Tiere.** (A) Beide Genotypen zeigten 24h nach der Trainingsphase eingprägtes Angstverhalten. Arsk-KO-Tiere betraten den dunklen Bereich etwas langsamer, jedoch ohne statistische Signifikanz. (B) Mit der Zeit abnehmendes soziales Interesse beider Genotypen. (C/D) Annäherungsversuche zu bewohnten bzw. leeren Käfigen. Während der ersten Testphase zeigten Arsk-KO-Tiere häufigere Annäherungsversuche und einen geringeren Abstand zu leeren Käfigen, während sich das Verhalten bei bewohnten Käfigen umkehrte.

Zusammenfassend konnten signifikante Änderungen im Verhaltensmuster der Arsk-KO-Tiere festgestellt werden, deren Ursache nicht zwingend einer bestimmten Hirnregion zugewiesen werden können (siehe Diskussion 6.1.1.2).

5.2.5 Retina-Analyse in Arsk-KO-Mäusen

Die retinale Degeneration ist ein häufiges Merkmal vieler lysosomaler Speichererkrankungen und besonders den Mukopolysaccharidosen, einschließlich der MPS-III. Patienten mit MPS-III zeigen typischerweise einen fortschreitenden Photorezeptorverlust, der dem bei *retinitis pigmentosa* sehr ähnlich ist, während die Ganglienzellen und der Sehnerv in der Regel nicht betrof-

5. ERGEBNISSE

fen sind (Bhaumik *et al.*, 1999; Ashworth *et al.*, 2006; Ferrari *et al.*, 2011). Aus Vorarbeiten zum MPS-III-E-Mausmodell war bekannt, dass unverdaute Heparansulfat-Fragmente in die extrazelluläre Matrix gelangen und mit dem äußeren Pigmentepithel interagieren können, wodurch ein progressiver Verlust von Photorezeptoren induziert wird (Kruszewski *et al.*, 2016). Um einen möglichen Einfluss des Arsk-KOs auf die Degeneration der Retina zu überprüfen, wurde die Retina 12 und 24 Monate alter Arsk-KO-Tiere und ihrer Wildtyp-Geschwistertiere untersucht. Die Retina wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Bartsch (Uniklinik Hamburg) präpariert und unter immunhistologischen Aspekten analysiert (Abb. 31).

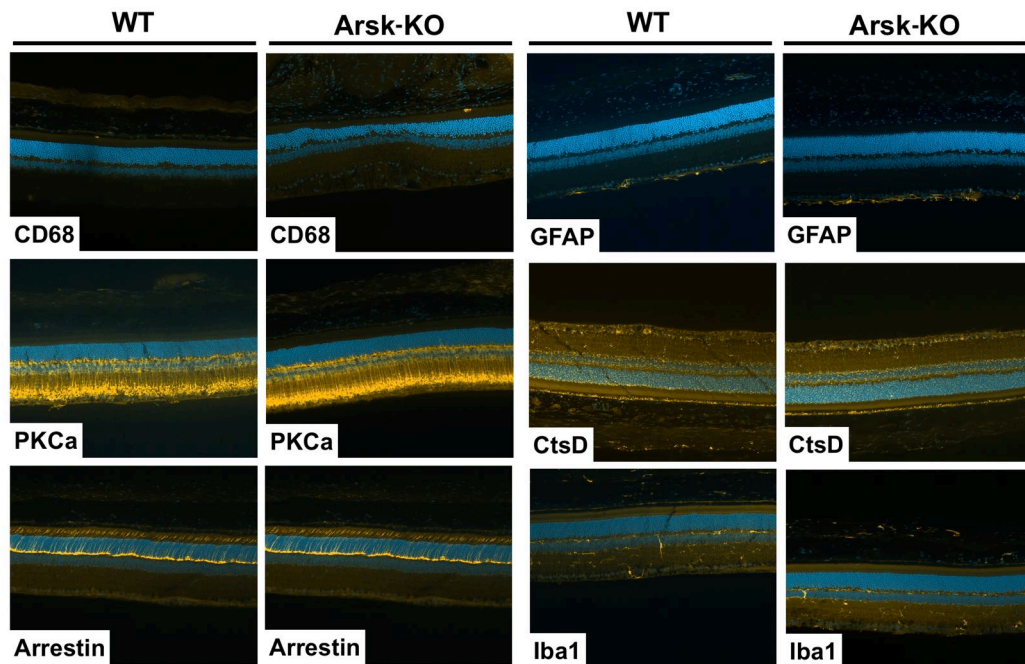


Abbildung 31: **Augenmorphologie des Arsk-Mausmodells.** Dargestellt sind $5\ \mu\text{m}$ -Stack-Aufnahmen präparierter Retina 24 Monate alter Wildtyp- sowie Arsk-KO-Tiere. Die Gewebeschnitte wurden mit den dargestellten Antikörpern dekoriert (gelb) und immunhistologisch ausgewertet. Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Die Aufnahmen entstanden in Kooperation mit Prof. Dr. Bartsch (Uniklinik Hamburg).

Die unter Abb. 31 dargestellten Aufnahmen wurden in Triplikaten angefertigt und zeigen die Retina 24 Monate alter Wildtyp- und Arsk-KO-Tiere. Die Analyse der Retina 12 Monate alter Arsk-KO-Tiere lieferte identische

Ergebnisse und wird hier nicht aufgeführt. Eine immunologische Antwort aufgrund des Arsk-KOs konnte anhand der inflammatorischen Marker CD68, PKC sowie Iba1 nicht nachgewiesen werden. Mit GFAP als Astrozytenmarker, konnte eine neuronale Beeinträchtigung des optischen Systems ausgeschlossen werden. Das lysosomale System, mit CtsD als Markerprotein, zeigt ebenso keinen Arsk-bedingten Einfluss.

5.2.6 Ossifikation

Die undekalzifizierte Knochenhistologie ermöglicht die Analyse der Mikroarchitektur des Skeletts. Da sowohl mineralisierte, als auch zelluläre Komponenten des Knochens analysiert werden, können der vitale Zustand, der Knochenumsatz sowie die Knochenbildung und -resorption beurteilt werden. In vielen lysosomalen Speichererkrankungen, wie den MPS-I, -II und -IV, wird eine zum Teil massive Veränderung der Knochenstruktur beobachtet (Oussoren *et al.*, 2011). Für die Untersuchungen wurde den Mäusen neun und zwei Tage vor dem Töten Calcein (3 mg/g Körpergewicht) intraperitoneal (IP) injiziert. Bei Calcein handelt es sich um einen fluoreszenten Farbstoff, der in der Forschung für fluorimetrische Bestimmungen von Calcium und Magnesium verwendet wird. Bei histomorphometrischen Analysen wird das Verhältnis des Knochenvolumens zum Gesamtvolumen (BV/TV, *Bone Volume over Total Volume*) gemessen. Die Knochendichte an den Wirbelkörpern L3 und L4 (Abb. 32A) zeigte eine um etwa 20% erhöhte Mineralisierung der Knochenstrukturen bei Arsk-KO-Tieren auf. Diese Beobachtung ließ sich in den Altersstufen sechs und zwölf Monate machen, wobei kein progressiver Verlauf vorlag. Untersuchungen am Schienbein zeigten keine Auffälligkeiten (Abb. 32B). Im Laufe der experimentellen Analysen sind starke Genotyp-unabhängige Inhomogenitäten aufgetreten, die zu dem derzeitigen Zeitpunkt nicht zu erklären waren.

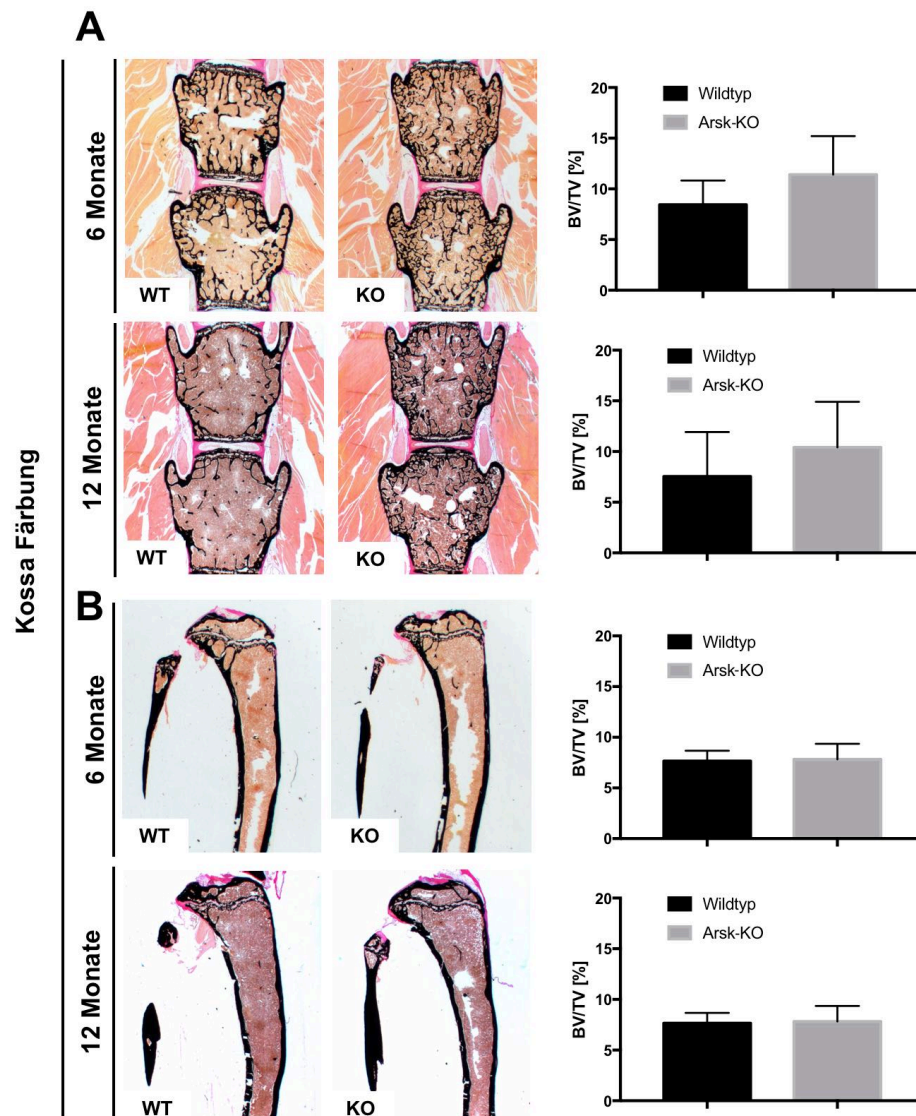


Abbildung 32: **Erhöhte trabekuläre Knochendichte im Arsk-Mausmodell.** Den Versuchstieren wurde Calcein intraperitoneal injiziert. Dargestellt ist die Kossa-Färbung von nicht entkalkten Wirbelkörpern sechs und zwölf Monate alter Mäuse. Die Knochenmatrix ist schwarz dargestellt. **(A)** Erhöhte Knochendichte der Wirbelkörper L3 und L4 in Arsk-KO-Tieren in beiden Altersstufen **(B)** Schienbein-Analysen zeigen keine Auffälligkeiten. Analysen erfolgten in Kooperation mit Prof. Schinke (Uniklinik Hamburg).

Aufgrund der Anzeichen einer erhöhten Knochenmineralisierung sowie ihrer essentiellen Bedeutung in Prozessen der Ossifikation wurde die Zellpopulation der Osteoblasten, Osteoclasten und Osteozyten untersucht und in Relation zur Knochenfläche ermittelt (Abb. 33).

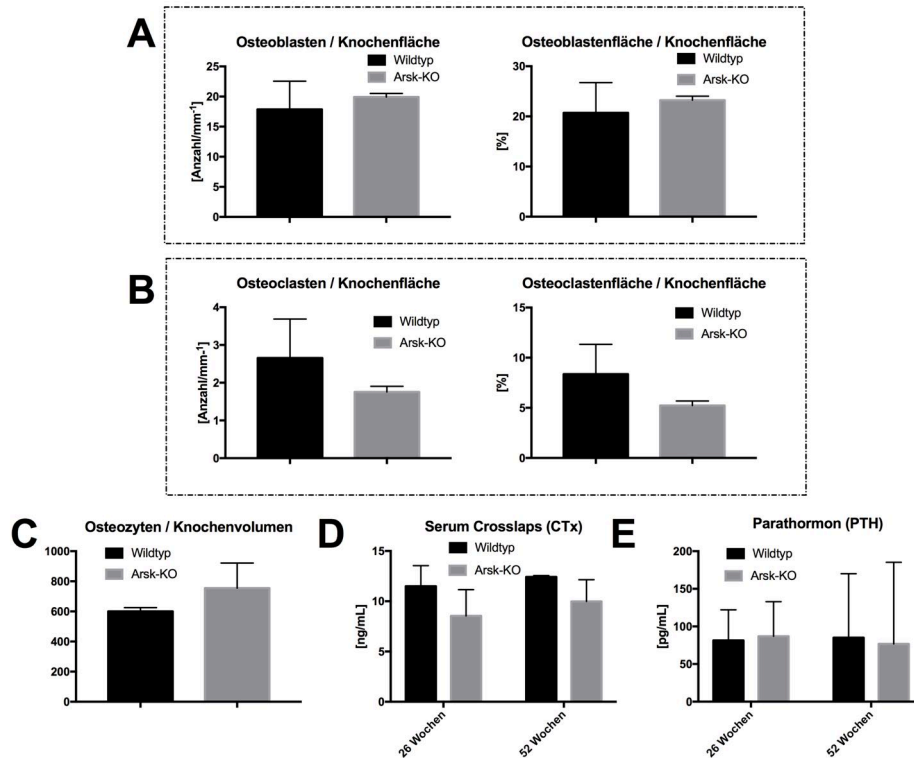


Abbildung 33: **Zelluläre Histomorphometrie in der Arsk-Maus.** Bestimmt wurde die (A) Osteoblasten- (B) Osteoclasten- (C) Osteozyten-Zahl sowie die Oberfläche dieser in Relation zum Knochen (D) Serum-Crosslaps und (E) Parathormon im Serum. Ergebnisse und Fehlerbalken setzen sich aus Messwerten von fünf Mäusen pro Genotyp zusammen. Analysen erfolgten in Kooperation mit Prof. Schinke (Uniklinik Hamburg).

Die Ergebnisse zeigen eine Beeinträchtigung der Osteoclasten-Zellpopulation. Im Arsk-KO liegt verglichen mit dem Wildtyp eine Reduzierung der Osteoclasten-Zahl sowie der Osteoclasten-Fläche in Relation zur Knochenfläche um etwa 20% vor. Über Serum-Crosslaps wurde der Knochenstoffwechsel ermittelt, der in Arsk-KO-Mäusen um 10-20% verringert ist, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Der Parathormon-Gehalt (PTH) im Serum regu-

5. ERGEBNISSE

liert die Calcium-Resorption zum Knochen. Bei der Parathormon-Messung 26 und 52 Wochen alter Arsk-KO-Tiere ist der PTH-Spiegel im Durchschnitt nicht verändert, weist jedoch eine hohe Varianz individueller Messwerte auf wodurch keine eindeutige Aussage möglich ist.

Mit Hilfe der Computertomographie (CT) wurde die Struktur und Beschaffenheit des Femurknochens an 26 und 52 Wochen alten Wildtyp- und Arsk-KO-Tieren analysiert (Abb. 34). In den Merkmalen Knochenlänge und *cortical thickness* konnten keine signifikanten Unterschiede in Arsk-KO-Tieren festgestellt werden. Die Analyse der Knochenmineraldichte (*bone mineral density*) zeigte jedoch eine signifikant verringerte Knochendichte im Femurknochen Arsk-KO-Tiere beider Altersstufen auf.

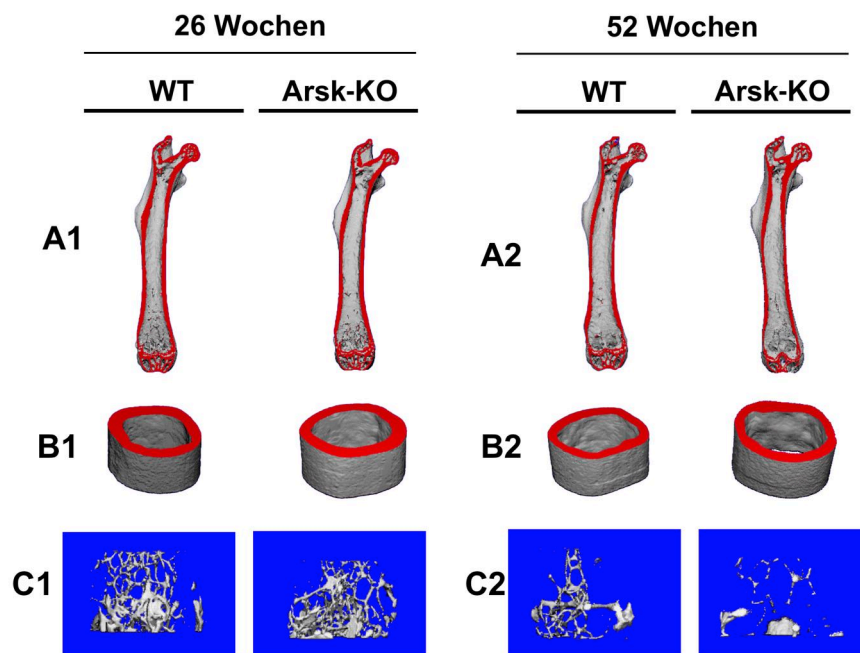


Abbildung 34: **Computertomographische-Analyse des Femurknochens im Arsk-Mausmodell.** (A) Übersicht der Femurknochen 26 und 52 Wochen alter Wildtyp- und Arsk-KO-Tiere (B) Femurknochen-*midshaft* (*cortical thickness*) (C) Knochendichte (*cortical porosity*). Analysen erfolgten in Kooperation mit Prof. Schinke (Uniklinik Hamburg).

Anhand der Toluidinblau-Färbung von Knochensektionen konnten Osteozyten im Lakunensystem dargestellt werden. Osteozyten entstehen im Zuge der Osteogenese aus Osteoblasten, sind nicht zur Zellteilung fähig und über-

dauern daher bis zu 25 Jahre im Menschen (Tate *et al.*, 2004). Neben der Beteiligung am Nährstofftransport steuert dieser Zelltyp einen Signalweg der Osteogenese.

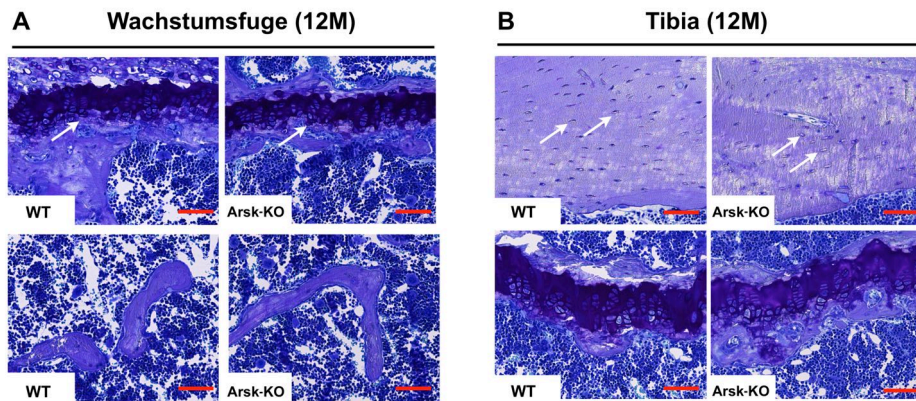


Abbildung 35: **Toluidinblau-Färbung der Knochenmatrix.** Dargestellt sind Toluidinfärbungen trabekulärer Knochen der (A) Epiphysenfuge und (B) des Schienbeins sechs Monate alter Wildtyp- und Arsk-KO-Mäuse. Wachstumsfuge (dunkelblau) und Chondrozyten (weiß) (B) leicht vergrößerte leere Osteozyten-Lacunae (weiße Pfeile). Analysen erfolgten in Kooperation mit Prof. Schinke (Uniklinik Hamburg).

Die Toluidinblau-Färbung ermöglichte ferner eine Darstellung der Wachstumsfuge, die bei Arsk-KO-Tieren im Alter von sechs Monaten keine Auffälligkeiten zeigte (Abb. 35A). In der Knochenmatrix des Schienbeins sind eingebettete Chondrozyten sichtbar, die im Arsk-KO leicht vergrößerte leere Vakuolen aufwiesen (Abb. 35B). Eine Beeinflussung der Osteozytenzahl, wie sie in den histomorphometrischen Analysen ermittelt wurde, konnte anhand der Präparationen nicht festgestellt (vgl. Abb. 33C).

Die Beeinträchtigung der Glykosaminoglykan-Degradation kann sich ferner auf die Bildung der Knorpelmasse auswirken. Die Knorpel bestehen weitestgehend aus Chondroblasten, Chondrozyten und Chondroclasten, wobei die Interzellulärsubstanz maßgeblich aus Proteoglykanen und Hyaluronsäure aufgebaut ist. Die analysierte Knorpelmasse zwölf Monate alter Arsk-KO-Tiere zeigte in jungen, peripher liegenden Chondrozyten kleine leere Vakuolen (Abb. 36).

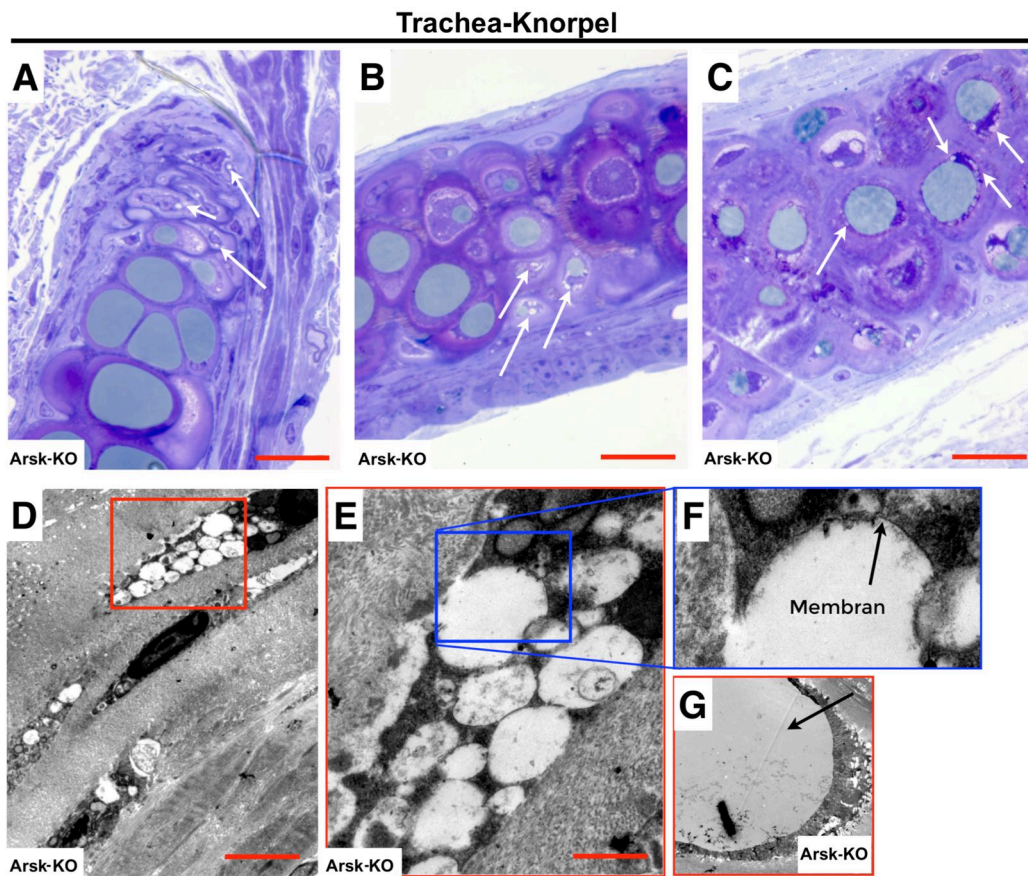


Abbildung 36: **Pathologische Befunde in der Knorpelmasse des Arsk-Mausmodells.** (A-C) Lichtmikroskopische Aufnahmen nach Toluidinblau-Färbung zeigten vermehrt kleine, leere Vakuolen in den Chondrozyten dreizehn Monate alter Arsk-KO-Mäuse. Maßstabsbalken entsprechen $20\ \mu\text{m}$. (D-F) Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten junge Chondrozyten ohne Anzeichen auf Speichermaterial. (G) Reifer Chondrozyt mit massivem Fetttropfen im Arsk-KO-Tier. Maßstabsbalken der EM-Aufnahmen entsprechen $5\ \mu\text{m}$.

Anhand von Belastungstests konnten die strukturellen und mechanischen Eigenschaften der Knochen erstellt werden. Bei dem hier angewandten Dreipunkt-Biegetest wurde der Femurknochen 24-Wochen alter Wildtyp- und Arsk-KO-Tiere untersucht (Abb. 37).

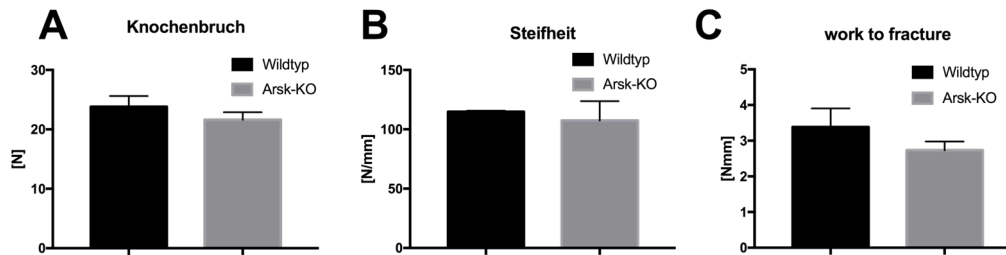


Abbildung 37: **Mechanische Knochenbelastung des Femurknochens.** Untersucht wurde der Femurknochen 24-Wochen alter Wildtyp- und Arsk-KO-Tiere. **(A)** Maximaler Kraftaufwand der zum vollständigen Knochenbruch führte **(B)** Steifheit des Knochen im linearen Belastungsbereich. **(C)** Aufgebrachte Arbeit (*work to fracture*) die zum Knochenbruch führte. Messungen erfolgten in Triplikaten und wurden in Kooperation mit Prof. Schinke (Uniklinik Hamburg) durchgeführt.

Die maximal angewandte Kraft, die zum Bruch des Femurknochens führte war bei Arsk-KO-Tieren mit 21.6 N um etwa 10 % gegenüber dem Wildtyp reduziert. Die Messung der Knochen-Elastizität erfolgte anhand des Widerstands, bis der Knochen nachgab und es zu einer Verformung kam. Ein robuster Knochen erfordert dabei mehr Arbeit. Die sogenannte *work to fracture*-Messung stellt die notwendige, aufgebrachte Arbeit dar, die zum Knochenbruch führte und bei Arsk-KO-Tieren mit 2.73 Nmm gegenüber dem Wildtyp um 20 % verringert war. Aufgrund größerer Abweichungen individueller Messwerte wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht.

5.3 Produktion und Aufreinigung humaner Arylsulfatase K

Für die in dieser Arbeit erfolgten Substratanalysen der Arsk wurde eine rekombinante humane ARSK-Form des Enzyms produziert. Hierfür wurde ein nach Wiegmann *et al.* (2013) etabliertes Arsk-Expressionssystem in HEK293-Zellen eingesetzt, wobei die stabil transfizierten Zellen eine humane ARSK mit angehängtem RGS-His₆-Tag in das Zellmedium sezernierten. Abweichend von Wiegmann *et al.* erfolgte die Aufreinigung des Enzyms aus dem Zellüberstand über das Batch-Verfahren.

5. ERGEBNISSE

Die adhärent wachsenden HEK293-Zellen wurden zunächst bis zu einer Konfluenz von 80 % in Normalmedium kultiviert und anschließend auf Produktionsmedium (0.5 % FKS) umgestellt. Die Ernte des Mediums erfolgte anschließend alle 48h bis die Viabilität der HEK293-Zellen kontinuierlich abnahm. Das so konditionierte Medium wurde sofort nach der Ernte abzentrifugiert, um tote Zellen zu entfernen, und in 50 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt. Es folgte die Dialyse über Nacht gegen Batch-Bindepuffer (3.11) und abschließend die Aufreinigung im Batch-Verfahren (4.5.13). Ein Nachweis der erfolgreichen Aufreinigung erfolgte im Western-Blot nach SDS-PAGE. Die rekombinante ARSK konnte sowohl über den His₆-Tag, als auch den spezifisch über einen α -ARSK-AK (Biorbyt) nachgewiesen werden (Abb. 38A). Die Dekoration lieferte mit beiden Antikörpern ein intensives Signal bei etwa 68 kDa. Die Elution der gebundenen ARSK wurde in zwei Imidazolstufen (250 mM und 500 mM) durchgeführt.

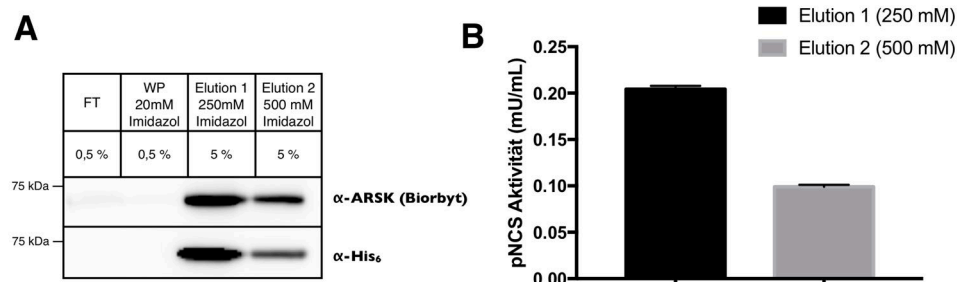


Abbildung 38: **ARSK-Produktion und pNCS-Aktivitätsassay.** Für die ARSK-Produktion wurden überexprimierende ARSK-His₆-HEK293 Zellen aus Vorarbeiten von Wiegmann *et al.* (2013) eingesetzt. Hierfür wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80% in 12-cm Schalen und 10% FKS-Vollmedium kultiviert. Für die Produktion wurden das Wachstumsmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und auf Produktionsmedium mit 0.5% FKS umgestellt. Die nach jeweils 48h gesammelten Zellüberstände wurden bei 250xg von Zelltrümmern befreit und mit 50% Ammoniumsulfat gefällt. Die Aufreinigung erfolgte über den His₆-Tag im Batch-Verfahren. Nach Inkubation der *beads* mit konditioniertem Medium wurden diese mehrmals gewaschen und abschließend in zwei aufsteigenden Imidazol-Konzentrationen eluiert und gesammelt (**A**) Dargestellt ist das Eluat nach Auftrennung per SDS-PAGE und Übertragung auf eine PVDF-Membran. Die Dekoration erfolgte über den α -ARSK-AK bzw. α -His₆-AK. (**B**) Aktivitätsnachweis der aufgereinigten ARSK durch den Umsatz des Arylsulfatase-Pseudosubstrats pNCS.

Der Aktivitätsnachweis der so aufgereinigten ARSK erfolgte im Anschluß durch den Umsatz von pNCS, eines für Arylsulfatasen bekannten Pseudosubstrats (siehe 4.5.10). Die daraus resultierende Aktivität betrug 0.2 mU/mL für den ersten 250 mM Imidazol Elutionsschritt und 0.1 mU/mL für die zweite 500 mM Imidazol Elution (Abb. 38B). Die nach Wiegmann beschriebene spezifische Aktivität von 0.12 mU/mL konnte demnach gesteigert werden. Der Produktions- und Aufreinigungsprozess wurde im Laufe dieser Arbeit mehrmals reproduzierbar wiederholt.

Die so produzierte ARSK konnte im Anschluss für den *in vitro*-Verdau des akkumulierten Speichermaterials aus Arsk-KO-Tieren eingesetzt werden.

5.4 Glykosaminoglykan-Speicherung

In Vorarbeiten konnte der Arylsulfatase K eine Funktion als 2-Sulfoglucuronat-Sulfatase zugeschrieben werden, was eine Beteiligung am Abbau von Glykosaminoglykanen (GAGs) nahelegt (Dhamale *et al.*, 2017). Die durch den Arsk-KO beeinflusste enzymatische degradative Kaskade kann durch den Nachweis von unvollständig abgebauten und akkumulierten GAGs verifiziert werden.

5.4.1 Alcianblau-Färbung an Gewebeschnitten

Bei Alcianblau (AB) handelt es sich um einen Farbstoff der bei pH 1 stark sulfatierte Substanzen, wie Glykosaminoglykane, selektiv bindet und so die Detektion von akkumulierten GAGs ermöglicht. Die Anwendung der AB-Färbung bei pH 2.5 bindet ferner auch schwach sulfatierte Substanzen. Vor Anwendung der AB-Färbung ist ein Wasserkontakt der Gewebeschnitte zu vermeiden, da die hier im Fokus stehenden wasserlöslichen Glykosaminoglykane möglicherweise entfernt werden.

Dargestellt sind Gewebesektionen von Hirn und Niere 12 Monate alter Wildtyp- und Arsk-KO-Tiere (Abb. 39). Die Hirnschnitte beider Gruppen wiesen eine ähnliche Verteilung stark sulfatierter Bereiche auf. Dabei wurden wei-

5. ERGEBNISSE

testgehend die Nervenbündel im gesamten Hirn angefärbt (Abb. 39A/B). In der Niere wurde vor allem das Interstitium der Nierenpapille (inneres Nierenmark), welches reich an GAGs ist, angefärbt (Abb. 39C/D). Durch natürliches Vorkommen der GAGs ist die Anfärbung dieses Bereichs zugleich die technische Positivkontrolle der Alcianblau-Färbung. Die Arsk-KO-Niere wies dabei eine stärkere und in den Bereichen des inneren Marks selektivere Anfärbung als der Wildtyp auf und stellt ein mögliches Anzeichen für die Anreicherung von akkumuliertem, stark sulfatierten Material dar.

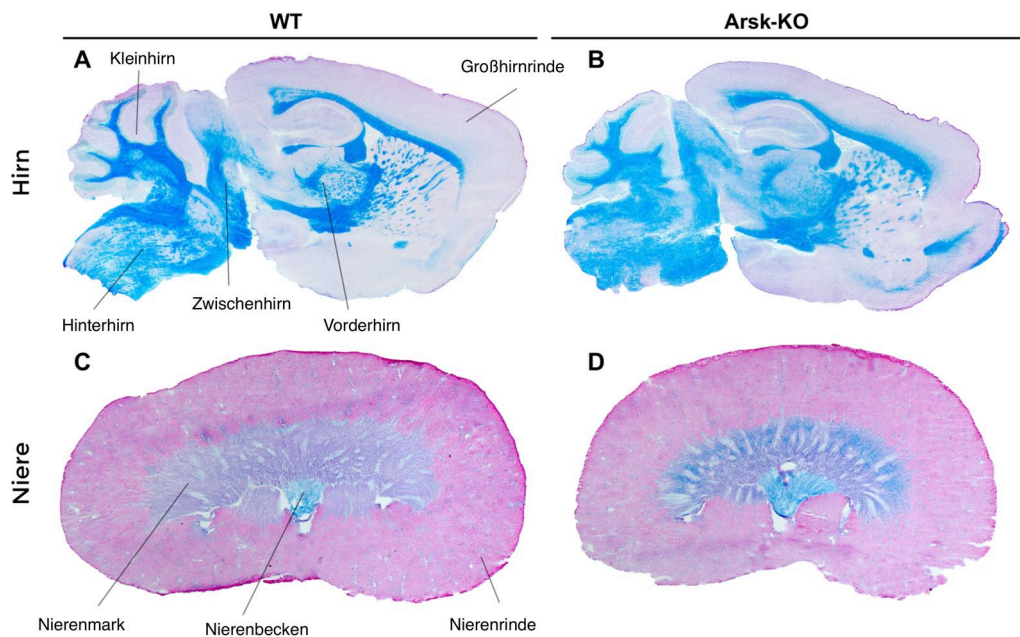


Abbildung 39: **Alcianblau-Färbung an Hirn und Niere.** Gewebeschnitte 12 Monate alter Wildtyp- (A/C) und Arsk-KO-Tiere (B/D). Intensive Färbung der Nervenbündel im Hirn (oben). Das innere Nierenmark reich an GAGs wird intensiv von Alcianblau gefärbt (unten). Durch Inkubation in pH 1 wurden stark sulfatierte Substanzen blau angefärbt. Aufnahmen erfolgten am Lichtmikroskop nach 30 min Inkubation in Alcianblau-Färbelösung und anschließender Gegenfärbung für 1 min in Eosin, wodurch Kerne pink und das Cytoplasma rosa gefärbt wurden. Die Schnittdicke betrug 25 μ m.

5.4.2 DMMB-basierte Bestimmung der GAG-Speichermenge in Geweben

Die an der Speicherung von GAGs beteiligten Organe sind häufig Hirn, Leber, Niere und Milz. Nach Extraktion der GAGs aus diesen Geweben erfolgte die Bestimmung der GAG-Gesamtmenge zunächst mittels eines DMMB-Assays (4.6.1). Die GAG-Quantifizierung wurde durch die Komplektierungsreaktion der negativ geladenen GAGs mit dem kationischen Farbstoff Dimethylmethyleneblau (DMMB) ermöglicht. Hierfür wurde vorab eine Eichreihe mit Heparansulfat als Standard durchgeführt, wodurch die Linearität des Assays bestimmt werden konnte (Abb. 40A).

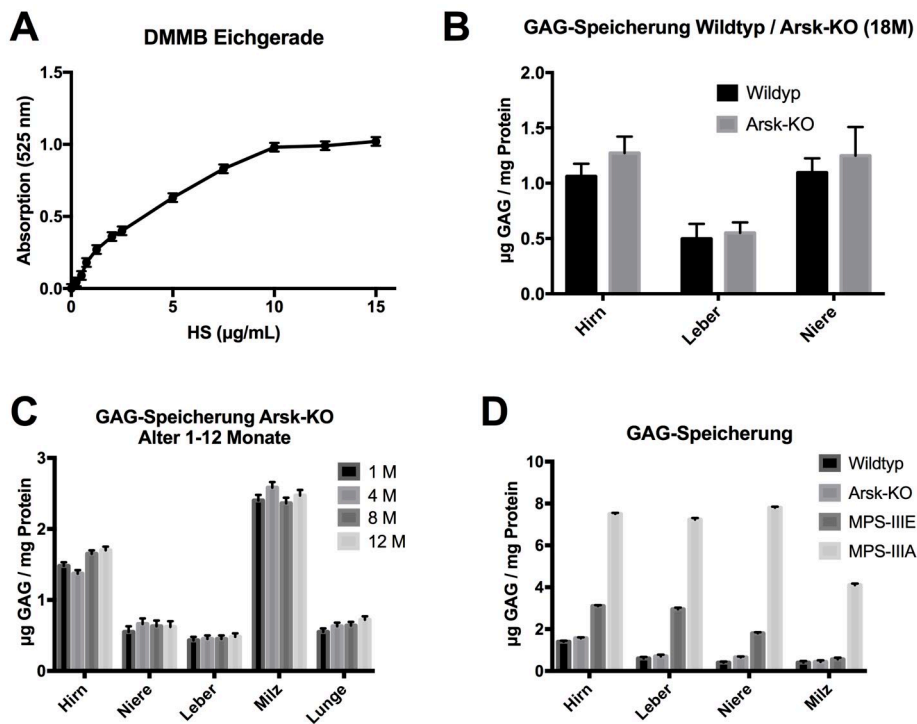


Abbildung 40: DMMB-Assay nach GAG-Extraktion aus Gewebekomponenten. (A) Standardkurve mit Heparansulfat (B) GAG-Gehalt nach Extraktion aus Wildtyp- und Arsk-KO-Gewebe (18 Monate) (C) Altersabhängige GAG-Speicher in Arsk-KO-Gewebe in den Altersstufen 1-12 Monate (D) Gegenüberstellung des GAG-Speichermaterials von Arsk-KO-, MPS-III-E- und MPS-III-A-Gewebe.

Die nach GAG-Extraktion aus Gewebehomogenaten ermittelte GAG-Menge in Hirn, Leber und Niere 18 Monate alter Arsk-KO-Tiere wies verglichen mit dem Wildtyp eine Erhöhung von 5-15% auf (Abb. 40B). Eine progressive und altersabhängige Erhöhung der GAG-Menge konnte in Arsk-KO-Mäusen im von Alter 1-12 Monaten nicht festgestellt werden (40C). Als Positivkontrolle wurden GAGs aus MPS-IIIA- sowie MPS-IIIE-Gewebeshomogenaten extrahiert und ebenfalls im DMMB-Assay analysiert (40D). Dabei wurde eine bis zu 8-fache GAG-Speichermenge in MPS-IIIA-Gewebe festgestellt, was auf die fehlende Sulfamidase-Aktivität zurückzuführen ist und bereits hinreichend beschrieben wurde (Bhaumik *et al.*, 1999). Die GAG-Speicherung in MPS-IIIE-Tieren ist verglichen mit dem Arsk-Mausmodell etwa 1.5 bis 2-fach erhöht und wird von den bereits publizierten Ergebnissen gestützt (Kowalewski *et al.*, 2012).

5.4.3 DMMB-basierte Bestimmung der GAG-Ausscheidung im Urin

Beeinträchtigungen im Glykosaminoglykan-Abbau haben nicht nur die Einlagerung von Speichermaterial zur Folge. Vielmehr versucht der Organismus die überschüssigen GAGs häufig über die Ausscheidung im Urin aus dem Körper zu entfernen. Obwohl der murine Urin zum selben Zeitpunkt entnommen wurde, ist eine Standardisierung der Messung durchzuführen. Hierfür wurde der Creatinin-Gehalt des Urins bestimmt und in Relation zu der GAG-Gesamtmenge gesetzt (4.6.1). Die Creatinin-Konzentration kann ferner Auskunft über eine vorhandene Niereninsuffizienz geben (Ruggenenti *et al.*, 1998). Insgesamt zehn männlichen Wildtyp- und Arsk-KO-Tieren in einem Alter von 8-12 Monaten wurde Urin entnommen (Abb. 41). Im Wildtyp-Vergleich ($77.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ Creatinin) wiesen Arsk-KO-Tiere eine erhöhte GAG-Ausscheidung ($116.9 \mu\text{g}/\text{mg}$ Creatinin) auf, die aufgrund individueller Varianzen innerhalb des Genotyps jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. Die ermittelten Creatinin-Werte wiesen keinen offensichtlichen und Arsk-spezifischen Einfluss auf (nicht gezeigt).

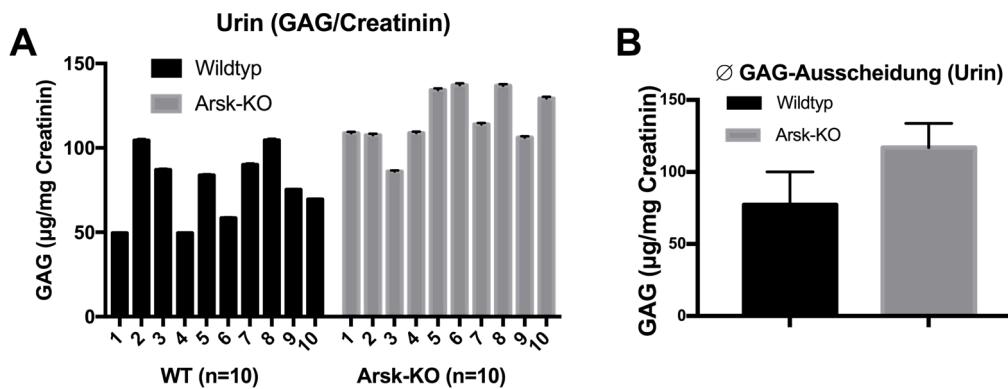


Abbildung 41: **GAG-Ausscheidung im Urin von Arsk-KO-Mäusen.** (A) Die GAG-Ausscheidung wurde im DMMB-Assays validiert. Die Urinentnahme erfolgte zur selben Tageszeit (10:00 Uhr). Alle Messwerte wurden über den Creatinin-Gehalt normalisiert. Insgesamt wurden 10 männliche Tiere je Versuchsgruppe untersucht (B) Zusammengefasste GAG-Ausscheidung im Urin von Wildtyp- und Arsk-KO-Tieren. Die Fehlerwerte einzelner Analysen wurden über beide Assays addiert und in Triplikaten bestimmt. Die Creatinin-Messung erfolgte über den Quantichrom Creatinin Assay (DICT-500).

5.4.4 GAG-Analyse über massenspektrometrische Verfahren

Flüssigchromatographische Verfahren mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS) ermöglichen eine spezifische und im Vergleich zum DMMB-Assay sensitivere Analyse der GAG-Menge. Neben der GAG-Gesamtmenge, der Unterteilung nach Heparansulfat und Chondroitinsulfat, konnte ferner das Sulfatierungsmuster der GAGs analysiert werden.

Nach LC/MS-Analyse der GAGs konnte eine signifikante und im Wildtyp-Vergleich bis zu 8-fache HS-Speichermenge in den Geweben Hirn, Niere und Milz Arsk-defizienter Tiere festgestellt werden (Abb. 42A). Ebenso wurde in den Arsk-KO-Geweben Hirn, Niere und Lunge eine bis zu 5-fache CS-Speichermenge beobachtet (Abb. 42B). Neben der GAG-Analyse aus Gewebehomogenaten wurden ebenfalls GAGs aus angereicherten lysosomalen Fraktionen (Tritosomen) isoliert und analysiert. Die untersuchten Arsk-KO-Proben wiesen eine 2,5-fach erhöhte HS-Speicherung (Abb. 42C) und 4-fach

5. ERGEBNISSE

erhöhte CS-Speicherung (Abb. 42D) verglichen mit dem Wildtyp auf.

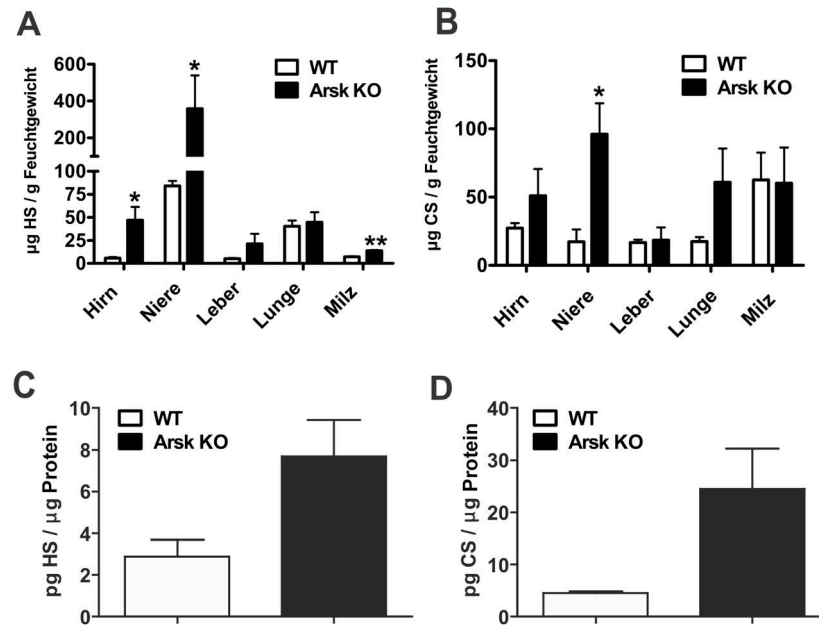


Abbildung 42: **LC/MS-Quantifizierung der GAG-Speichermenge in Arsk-KO-Gewebe.** Nach Isolierung der GAGs aus Gewebehomogenaten erfolgte die spezifische Bestimmung der (A) Heparansulfat- und (B) Chondroitinsulfat-Menge. (C/D) GAG-Extraktion aus angereicherten lysosomalen Fraktionen der Leber (Tritosomen) und anschließender Bestimmung der absoluten HS- und CS-Menge. * = $p \leq 0.05$ bzw. ** ≤ 0.01 . Die Analyse erfolgte in Kooperation mit Prof. Esko (San Diego, USA).

Die isolierten GAGs wurden mit bakteriellen Heparin-Lyase bzw. Chondroitinasen Disaccharid-Einheiten depolymerisiert, wodurch eine Analyse des Sulfatierungsmusters ermöglicht wurde (Abb. 43). Dabei konnte kein abweichender Anteil der 2-O-, 4-O- und 6-O-Sulfatierungen in den HS- und CS-Einheiten festgestellt werden. Auch die Analyse hinsichtlich abweichender Acetylierungen der GAG-Ketten konnte keine Abweichungen im Arsk-KO nachweisen.

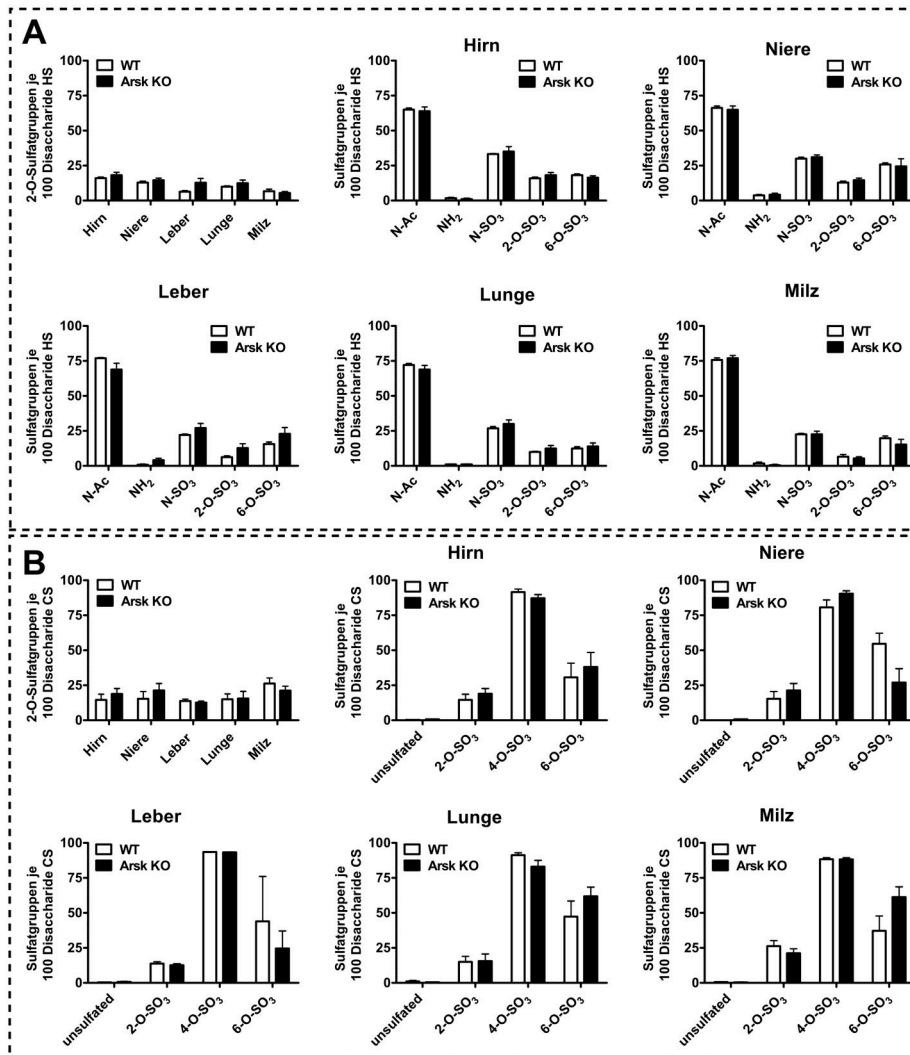


Abbildung 43: Sulfatierungsmuster isolierter GAGs im Arsk-Mausmodell. Bestimmt wurde die Anzahl der 2-O-, 4-O-, 6-O-Sulfatierungen an HS/CS sowie der N-Acetylierungen am HS. Die GAGs wurden vorab mit bakteriellen Heparin-Lyasen bzw. Chondroitinasen Disaccharid-Einheiten umgesetzt. (A) Heparansulfat- und (B) Chondroitinsulfat-Analyse. Die Analyse erfolgte in Kooperation mit Prof. Esko (San Diego, USA).

5.4.5 GRIL-LC/MS-Analyse der nicht-reduzierenden Enden (NREs) in GAGs

Der Glykosaminoglykanabbau verläuft sequenziell und setzt ein Zusammenspiel vieler darin involvierter Enzyme voraus. Kommt es zu einer Störung in einem der an den degradativen Prozessen beteiligten Enzyme entsteht häufig an dem nicht-reduzierenden Ende (NRE) der Zuckerkette eine spezifische und einzigartige Sulfat-Struktur. Die NRE-Analysen konnten bereits die spezifische Sulfatstruktur an den NREs des MPS-III-E-Mausmodells erfolgreich darstellen (Lawrence *et al.*, 2012, Kowalewski Diss. 2016). Bei der dabei eingesetzten Methode handelte es sich um das quantitative *glycan reductive isotope labeling* (GRIL) mit anschließender LC/MS-Analyse (4.6.4). Die Proben wurden über das LTQ Orbitrap Discovery Elektronenspray-Ionisierungs-Massenspektrometer (Thermo Scientific) quantifiziert. Dabei wurde das kationische Dibutylamin (DBA) als Additiv zur Ionenpaarbildung und ein Methanol-Gradient zur Optimierung der Auftrennung eingesetzt. Die reduktive Aminierung des isolierten Speichermaterials erfolgte über [¹²C₆]-Anilin vor der Zugabe der Standards. Für die quantitative GRIL-LC/MS-Analyse wurden 10–20 pmol der [¹³C₆]-Anilin Zuckerstandards co-chromatographiert. Bei den Zuckerstandards handelte es sich um die synthetisch hergestellten und von Heparansulfat-abgeleiteten 2-Sulfoglucuronat-*N*-Acetoglucosamin (G2A0) und 2-Sulfoglucuronat-*N*-Sulfoglucosamin (G2S0). Bedingt durch die unterschiedliche Substitution der Disaccharide und dem daraus resultierenden Laufverhalten ließen sich diese eindeutig identifizieren und voneinander unterscheiden. Die Retentionszeiten sowie das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (*m/z*) der Standards wurden vorab berechnet und sind Tab. 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Laufverhalten der Zuckerstandards.

	G2A0	G2S0
Retentionszeit [min]	55	59
<i>m/z</i> ¹³ C	559.15	597.09
<i>m/z</i> ¹² C	553.13	591.07

Zunächst erfolgte die Analyse der ^{12}C - sowie ^{13}C -markierten Standards mittels GRIL-LC/MS. Exemplarische Spektren der ^{13}C -Analysen sind Abb. 44 zu entnehmen. Die Durchführung der Messungen erfolgte durch Bastian Ramms in der Esko Arbeitsgruppe an der Universität in San Diego (USA).

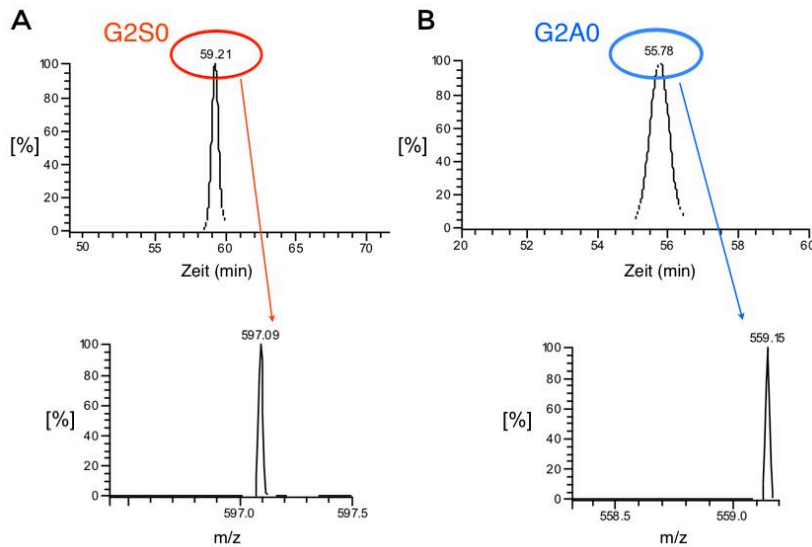


Abbildung 44: **GRIL-LC/MS-Analyse der Standards G2S0 und G2A0.**

TOF-Spektren (*time of flight*, oben) sowie das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) für (A) G2S0 sowie (B) G2A0. Die Analyse erfolgte in Kooperation mit Prof. Esko (San Diego, USA).

Der Retentionspeak des ^{13}C -G2S0 bei 59.21 min und m/z_{obs} 597.09 m/z entsprach dem vorab theoretisch bestimmten Wert (vgl. Tab. 16). Der ^{13}C -G2A0 Standard wies eine Retentionszeit von 55.78 min und m/z_{obs} 559.15 auf und entsprach ebenso den theoretisch berechneten Werten. Analog dazu erfolgte die Messung für ^{12}C -markierte Saccharidstandards (hier nicht gezeigt).

Nach erfolgreicher Verifizierung der Standards, wurden die isolierten GAGs aus Wildtyp- und Arsk-KO-Tieren auf potentiell angereicherte G2A0- und G2S0-NREs untersucht. Dargestellt ist exemplarisch die GRIL-LC/MS-Analyse isolierter GAGs aus Hirngewebe eines 12 Monate alten Arsk-KO-Tiers (Abb. 45).

5. ERGEBNISSE

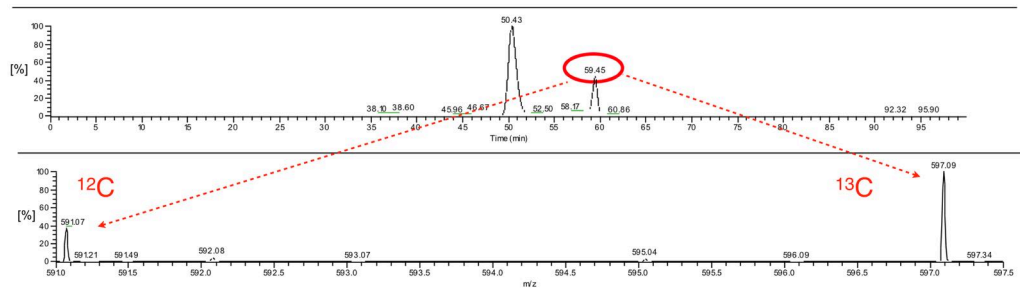


Abbildung 45: **NRE-Analyse isolierter GAGs aus Arsk-KO-Hirn.** Dargestellt ist eine exemplarische Messung (GRIL-LC/MS) der G2S0-NREs aus dem Hirn eines Arsk-KO-Tiers. Die GAGs wurden nach Extraktion mit bakteriellen Heparin-Lyasen und Chondroitinasen depolymerisiert.

Das LC-Spektrum wies zwei Retentionspeaks bei 50.43 min sowie 59.45 min auf. Die MS-Analyse des 59.45 min Peaks lies eindeutig den ^{12}C -Peak bei 591.07 m/z sowie ^{13}C -Peak bei 597.09 m/z erkennen (Abb. 45). Insgesamt wurden drei Tiere je Versuchsgruppe in einem Alter von zwölf Monaten untersucht.

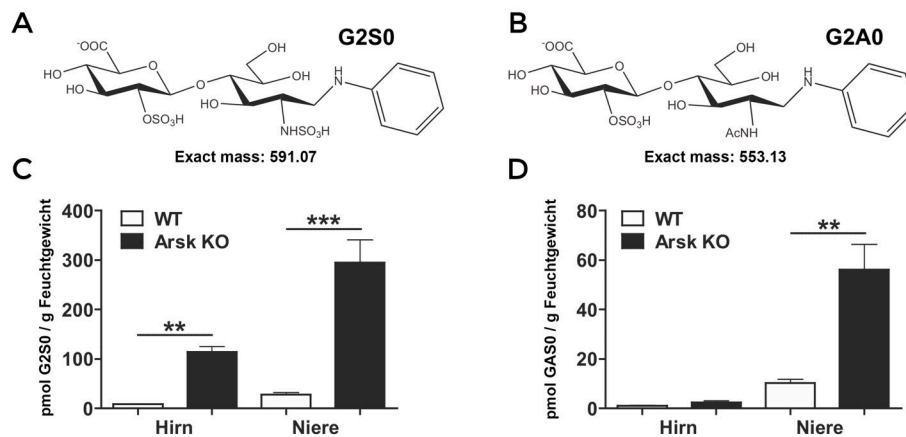


Abbildung 46: **NRE-Analyse isolierter GAGs aus Arsk-KO-Mäusen.** Molekularstruktur und exakte Masse der Anilin-markierten Disaccharid-Substrate (A) 2-Sulfoglucuronat-*N*-Sulfoglucosamin (G2S0) (B) 2-Sulfoglucuronat-*N*-Acetoglucosamin (G2A0). GRIL-LC/MS-Analyse der (C) G2S0-NREs und (D) G2A0-NREs in 12 Monate alten Wildtyp- und Arsk-KO-Tieren nach GAG-Extraktion und Depolymerisierung der GAGs bakteriellen Heparin-Lyasen und Chondroitinasen. ** = $p \leq 0.005$ bzw. *** ≤ 0.001 . Die Analyse erfolgte in Kooperation mit Prof. Esko (San Diego, USA).

Dabei wiesen Hirn (~ 100 pmol/g) und Niere (~ 330 pmol/g) der Arsk-KO-Mäuse verglichen mit Wildtyp-Geweben eine signifikant erhöhte G2S0-NRE-Menge auf. Es konnte keine Erhöhung der G2A0-NREs im Hirn, jedoch eine erhöhte Speicherung in der Arsk-KO-Niere (~ 50 pmol/g) detektiert werden (Abb. 46).

5.4.6 Enzymatischer Umsatz des Speichermaterials mit rekombinanter humaner ARSK

Das unter 5.4.5 identifizierte Speichermaterial wurde in einem weiteren Versuch mit rekombinanter humaner ARSK (rARSK) enzymatisch umgesetzt. Hierdurch sollte sichergestellt werden, dass akkumuliertes Speichermaterial nicht in Folge einer Sekundärspeicherung entstanden ist. Der Abbau des akkumulierten Materials würde ferner die spezifische Glucuronat-2-Sulfatase-Aktivität (GDS) der Arsk belegen. Für den Versuch wurden die aus der Niere extrahierten GAGs eingesetzt, welche erst nach dem rARSK-Verdau mit bakteriellen Heparin-Lyase und Chondroitinasen depolymerisiert wurden, da die am GAG-Abbau involvierten Enzyme eine höhere Affinität gegenüber langkettigen GAGs aufweisen, als gegen ihre kurzkettigen, prozessierten Vertreter (Kowalewski Diss. 2016). Zur Sicherstellung der Spezifität des Assays erfolgte die Inkubation des Speichermaterials parallel mit Laufpuffer ohne Arsk sowie unter Zugabe der Iduronat-2-sulfatase (IDS) als spezifische Negativkontrolle. Bei der IDS handelt es sich um das zur Arsk nächstverwandte Enzym, welches ausschließlich Iduronat-2-Sulfat, jedoch nicht das Glucuronat-2-Sulfat desulfatiert (Abb. 47).

Zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit lagen noch keine Daten zum Arsk-Verdau der unter 5.4.4 diagnostizierten CS-Speicherung (Abb. 42B) in Arsk-KO-Tieren vor. Nachfolgend wird das HS-Speichermaterial für den Umsatz mit rARSK eingesetzt.

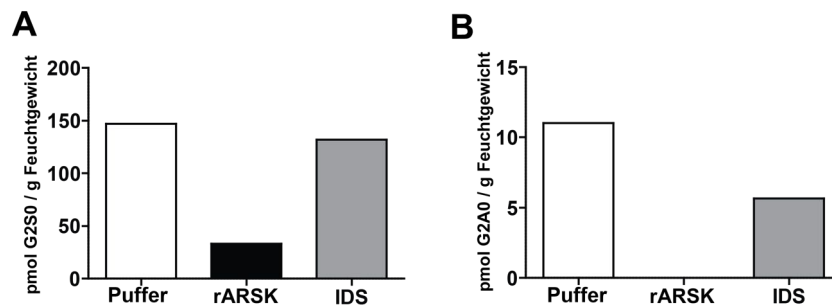


Abbildung 47: **Speichermaterial-Verdau mit rARSK.** Aus Arsk-KO-Mäusen gewonnene Glykosaminoglykane wurden isoliert und mittels GRIL-LC/MS analysiert. Die Proben wurden im Reaktionspuffer (Negativkontrolle), der rARSK (Positivkontrolle) und IDS (spezifische Negativkontrolle) inkubiert. Die Auswertung wurde durch ^{13}C -markierte (A) G2S0- und (B) G2A0-Standards ermöglicht.

Nach der Inkubation des G2S0-NRE-Speichermaterials (150 pmol) mit rARSK konnten 80 % der ursprünglichen Menge umgesetzt werden. Eine Reduzierung um $\sim 6\%$ wurde in der mit IDS behandelten Probe festgestellt. Das G2A0-NRE-Speichermaterial (12.5 pmol) wurde nach rARSK-Inkubation vollständig umgesetzt, wobei das mit der IDS inkubierte G2A0-NRE-Material ebenfalls zu etwa 60 % abgebaut wurde. Da eine GDS-Aktivität der IDS ausgeschlossen werden kann, kam es bei der Durchführung des Experiments höchstwahrscheinlich zu einem Recovery-Problem, das auch auf die geringe Menge des eingesetzten Probenmaterials zurückzuführen ist. Die Inkubation des NRE-Speichermaterials im Laufpuffer ließ keinen Umsatz erkennen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass es sich bei akkumulierenden GAGs in der Arsk-KO-Maus um eine Primärspeicherung handeln muss, welche mittels rARSK abgebaut werden konnte.

5.5 AMAC-basierte Zuckeranalyse

Die 2-Aminoacridon (AMAC)-basierte Zuckeranalyse stellt neben der GRIL-LC/MS-Analyse eine weitere Möglichkeit zur spezifischen Bestimmung der Arsk-Enzymaktivität dar. Hierfür sollte die nach Kowalewski (Diss. 2016) an Monosacchariden eingesetzte Methode für Disaccharide angepasst und eta-

bliert werden. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass der fluoreszierende Farbstoff AMAC nach vorheriger GAG-Depolymerisierung über eine reduktive Aminierung, unter Einsatz von Cyanoborhydrid, an Heparansulfat-abgeleitete Zucker kovalent gebunden werden kann (4.6.5). Die Erhöhung der Hydrophobizität des so markierten Saccharids ermöglichte die Auftrennung über C18 *reverse phase* Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) nach Deakin und Lyon (2008). Als mögliche Substrate wurden die synthetisch hergestellten und von HS-abgeleiteten sulfatierten Disaccharide G2A0 und G2S0 eingesetzt, die bereits in der GRIL-LC/MS-Analyse als Substrate zum Einsatz kamen.

5.5.1 AMAC-Markierung von Disacchariden

Zunächst wurde die AMAC-Markierung der Disaccharid-Substrate validiert und optimiert. Hierfür wurde AMAC ohne angehängte Zucker über RP-HPLC analysiert, welches bei einem intensiven Peak (2300 mAU) und 35.5 mL eluierte. Nachfolgend wurden 100 nmol der Disaccharide G2A0 und G2S0 mittels AMAC markiert (4.6.5) und über RP-HPLC aufgetrennt. Das Chromatogramm kann Abb. 48 entnommen werden.

Tabelle 17: Retentionsvolumen [mL] und UV-Absorption [mAU] AMAC-markierter Disaccharide G2A0/G2S0 (100 nmol) nach C18 RP-HPLC.

Substanz	Signalstärke [mAU]	Retentionsvolumen [mL]
AMAC	2200	35.5
G2A0-AMAC	388	25.6
G2S0-AMAC	322	17.7

Die eingesetzten Disaccharide konnten erfolgreich an AMAC gebunden und über RP-HPLC aufgetrennt werden. G2A0-AMAC eluiert mit einem Hauptpeak bei 25.6 mL und 322 mAU und einem schwachen Signal bei 29.9 mL und 40 mAU. G2S0-AMAC wird mit einem Hauptpeak bei 17.7 mL und 322 mAU detektiert. Ein Injektionspeak der Probe wurde bei ca. 5 mL gemessen. Aufgrund des gewählten HPLC-Programms eluierte freies AMAC-Label mit einem intensiven Signal von 2300 mAU bei ca. 36 mL. Dieses wird

5. ERGEBNISSE

durch die Erhöhung der Acetonitril-Konzentration auf 65% erreicht. Für die Markierung sowie Auftrennung wurden 100 nmol des jeweiligen Disaccharid eingesetzt. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden die Elutionspeaks eingengt und über Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) in Kooperation mit Dr. Jens Sproß (Uni Bielefeld) analysiert. Mit m/z_{obs} von 672.17 entspricht das erhaltene G2A0-AMAC-Signal dem vorab berechneten Wert m/z_{calc} von 672.17. Ebenso bestätigt wird das G2S0-Signal von m/z_{obs} 710.13, welches dem theoretisch berechneten Wert von m/z_{calc} 710.12 übereinstimmt (Abb. 48).

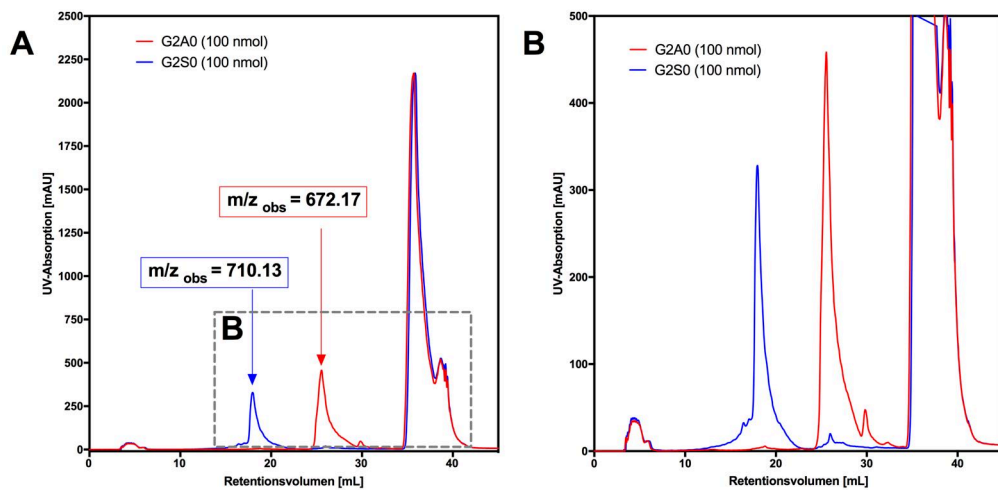


Abbildung 48: **RP-HPLC-Chromatogramm AMAC-markierter Disaccharide.** Nach AMAC-Markierung wurden 100 nmol der untersuchten Disaccharide aufgetragen. **(A)** G2A0-AMAC eluiert bei 25.6 mL und 388 mAU (rot). Die Analyse über ESI-MS lieferte m/z_{obs} von 672.17. G2S0-AMAC eluiert bei 17.7 mL und 322 mAU mit einer m/z_{obs} von 710.13 (blau). Freies ungebundenes AMAC aus der Markierungsreaktion eluiert bei 35.5 mL. **(B)** Ausschnittvergrößerung des Chromatogramms. Das UV-Signal bei 5 mL entspricht dem Injektionspeak. Die resultierenden Chromatogramme wurden nach Einzelläufen zusammengesetzt. Die UV-Absorption wurde bei 255 nm gemessen.

5.5.2 Enzymatischer Umsatz AMAC-markierter Disaccharide mit rARSK

Zur Etablierung eines AMAC-basierten Aktivitätsassays erfolgte der enzymatische Umsatz AMAC-markierter Disaccharide mit rekombinanter humaner ARSK (4.5.13). Die spezifische Aktivität der rARSK wurde mittels pNCS-Assay vor Durchführung des Versuchs überprüft. Nachfolgend wurden der rARSK beide AMAC-Disaccharide als Substrate angeboten. Hierfür wurden nach der AMAC-Markierungsreaktion und RP-HPLC die Hauptpeaks der AMAC-Disaccharide gesammelt und im Vakuum-Konzentrator getrocknet. Die Substrate wurden in 80 μL Puffer A (60 mM Natriumacetat, pH 5.8) unter Zugabe von 5% DMSO zur Optimierung der Löslichkeit resuspendiert. Dem Reaktionsansatz wurde rARSK (20 ng) zugegeben und für 24 h bei 37°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde die rARSK bei 95 °C für 5 min erhitzt und so irreversibel inaktiviert, was mit Hilfe des pNCS-Assays bestätigt wurde. Darüberhinaus wurde das AMAC-Substrat in Puffer A inkubiert um einen Einfluss des Versuchsaufbaus auszuschließen.

Dem Chromatogramm (Abb. 49A) lässt sich die enzymatische Aktivität der rARSK gegenüber dem angebotenen AMAC-markierten G2A0-Disaccharid entnehmen. Nach rARSK-Umsatz ist ein Doppelpeak mit dem zusätzlichen UV-Signal von 24.5 mAU vorzufinden. Die Signalverschiebung um etwa 1.8 mL entsprach dabei der Entfernung einer Sulfatgruppe. Das angebotene G2A0-Substrat wurde nicht vollständig durch die rARSK umgesetzt. Der Hauptpeak des unverdauten G2A0 bei 25.5 mL entsprach dem Elutionsvolumen des G2A0-Edukts nach AMAC-Markierung. Sowohl die hitzeinaktivierte rARSK (blau), als auch die Laufpuffer (grün) hatten keinen Einfluss auf das Laufverhalten des AMAC-markierten Substrats und setzen dieses somit nicht um. Die Elutionsfraktionen des umgesetzten Produkts wurden im Vakuum-Konzentrator eingengt und für die ESI-MS-Analyse eingesetzt. Das erhaltene Signal nach Umsatz mit rARSK von $m/z_{\text{obs}} 592.21$ ($m/z_{\text{calc}} 592.21$) entsprach einer Massendifferenz von etwa 80 m/z gegenüber dem G2A0-Edukt und konnte der Abspaltung einer Sulfatgruppe zugeordnet werden.

5. ERGEBNISSE

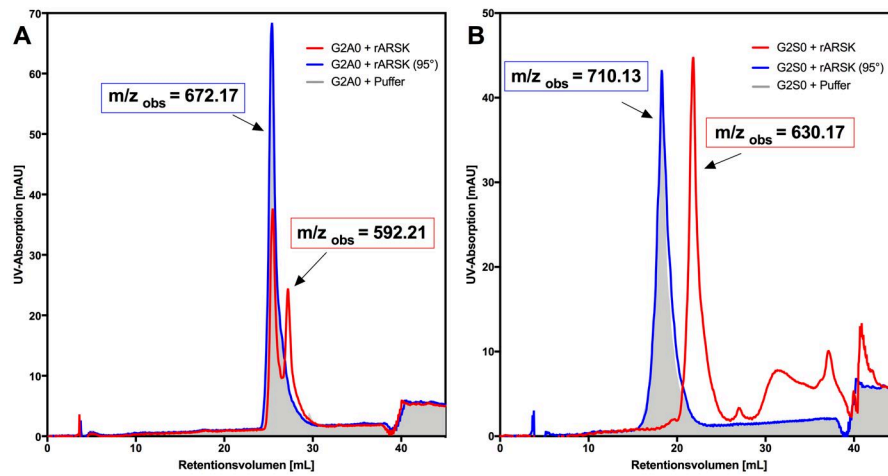


Abbildung 49: **RP-HPLC Chromatogramm nach rARSK-Umsatz der Disaccharide G2A0 und G2S0.** Die Substrate wurden mit rARSK (20 ng; rot), hitzeinaktivierter rARSK (20 ng; blau) sowie Puffer (grün) für 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend über RP-HPLC aufgetrennt. **(A)** Nach rARSK-Umsatz von G2A0 war ein Doppelpack mit einem zusätzlichen UV-Signal bei 24.5 mAU (rot) vorzufinden. Der enzymatische Umsatz mit rARSK führte zu einer partiellen Signalverschiebung von etwa 1.8 mL. Die ESI-MS-Analyse lieferte ein Signal von m/z_{obs} 592.22. **(B)** Umsatz des G2S0-Substrats mit einem UV-Signal bei 21.8 mL und 42 mAU. Die Signalverschiebung betrug etwa 3.5 mL. Die ESI-MS-Analyse lieferte ein Signal von m/z_{obs} 630.17. Die hitzeinaktivierte rARSK sowie der Laufpuffer haben keinen Einfluss auf das Elutionsverhalten der Substrate. Die UV-Absorption wurde bei 255 nm gemessen.

Analog dazu wurde das AMAC-markierte G2S0 als Substrat für den enzymatischen Umsatz mit rARSK angeboten. Erneut wurden als Negativkontrollen die hitzeinaktivierte rARSK sowie der Laufpuffer eingesetzt (Abb. 49B). Nach Umsatz des G2S0-Substrats kam es zu einer Signalverschiebung von etwa 3.5 mL. Das Substrat wurde dabei vollständig umgesetzt, was die Abwesenheit eines UV-Signals bei 17.7 mL bestätigte. Sowohl die hitzeinaktivierte rARSK (blau), als auch die Laufpuffer-Probe (grün) hatten keinen Einfluss auf das Laufverhalten des AMAC-markierten Substrats. Das umgesetzte Produkt wurde aufgefangen und eingengt. Die ESI-MS-Analyse der mit rARSK umgesetzten G2S0-Probe führte zu einem m/z_{obs} 630.17 (m/z_{calc} 630.16) und einer Massendifferenz von etwa 80 m/z gegenüber dem G2S0-Edukt was mit der Abspaltung einer Sulfatgruppe einhergeht.

5.5.3 Umsatz der AMAC-Disaccharide mit Tritosomen

In einem weiteren Ansatz wurden die AMAC-markierten Disaccharide mit angereicherten lysosomalen Fraktionen aus Wildtyp- und Arsk-KO-Tieren umgesetzt. Mit diesem *in vitro*-Ansatz kann die physiologische *in vivo* Funktion der Arsk als Glucuronat-2-Sulfatase bestätigt werden. Darüber hinaus würde ein ausbleibender Umsatz der AMAC-Substrate die Arsk-KO-Mauslinie durch die fehlende enzymatische Arsk-Aktivität validieren.

Vorab wurden Tritosomen aus Leberhomogenaten Tylaxapol-behandelter Mäuse (4.5.11) isoliert und aufgeschlossen. Die Saccharide (12.5 nmol) wurden mit Wildtyp- bzw. Arsk-KO-Tritosomen (50 μ g) für 24h bei 37 °C inkubiert. Die im Anschluss wiedergewonnenen AMAC-Substrate wurden erneut über RP-HPLC analysiert.

Der Umsatz des AMAC-markierten G2A0 mit aus Arsk-KO-Tieren gewonnenen Tritosomen führt zu einem unveränderten Laufverhalten der Probe, was sowohl in der RP-HPLC, als auch über die ESI-MS-Analyse (m/z_{obs} 672.17) bestätigt wurde (Abb. 50A). Die gleichzeitige Inkubation des G2A0 mit KO-Tritosomen und der rARSK führe zu drei Signalen in der RP-HPLC, die dem (1) nicht umgesetzten Edukt (m/z_{obs} 672.17), dem (2) desulfatierten Produkt (m/z_{obs} 592.21) sowie (3) einem N-Acetylglucosamin-AMAC Monosaccharid (m/z_{obs} 416.18) zugeordnet werden konnten (Abb. 50B). Das Signal des Monosaccharids wurde ebenfalls nach Umsatz des Edukts G2A0 mit Wildtyp-Tritosomen erhalten, was sowohl im Laufverhalten der RP-HPLC, als auch der ESI-MS-Analyse (m/z_{obs} 416.18) bestätigt wurde (Abb. 50C).

5. ERGEBNISSE

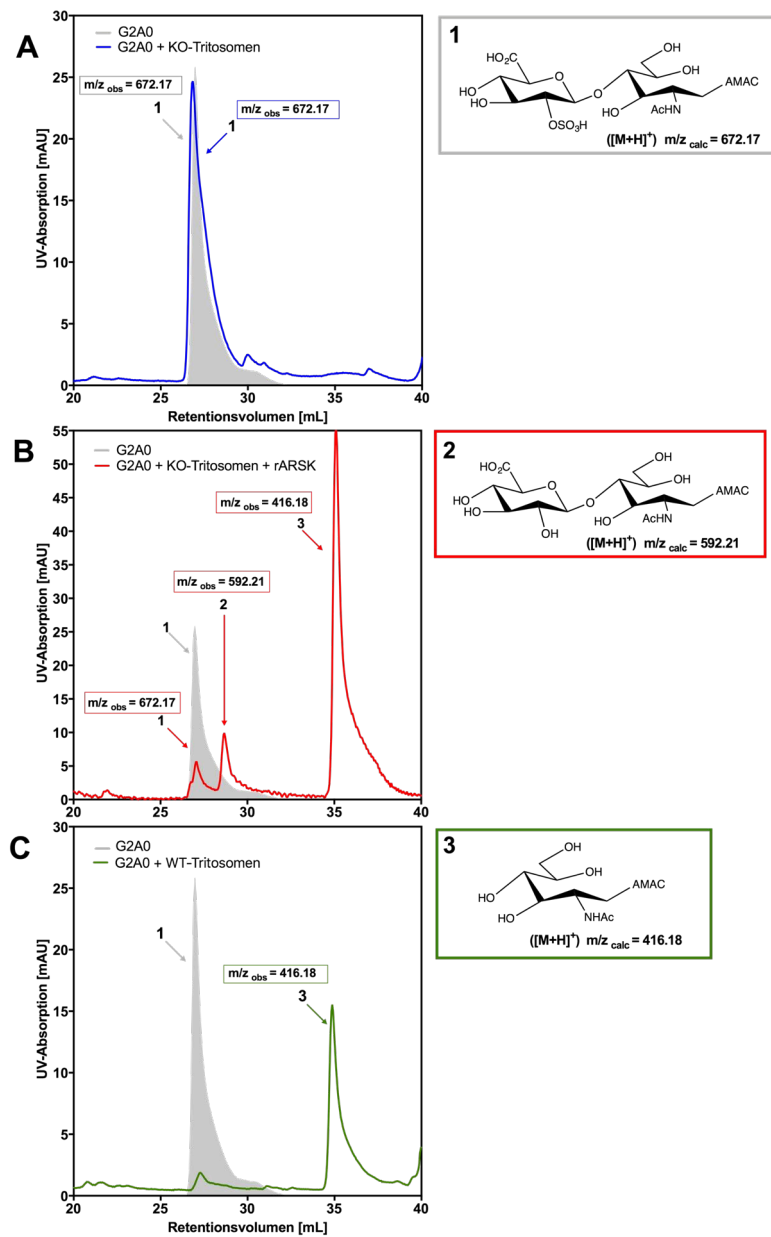


Abbildung 50: **Umsatz von AMAC-G2A0 mit Tritosomen.** Das angebotene G2A0-AMAC Substrat (12.5 nmol) wurde für 24h bei 37 °C mit **(A)** KO-Tritosomen (50 µg) **(B)** KO-Tritosomen und rARSK (20 ng) zugleich sowie **(C)** Wildtyp-Tritosomen (50 µg) (rot) inkubiert. Anschließend wurden Proteine über eine 10 kDa *cut-off*-Membran eliminiert und der Überstand über C18 RP-HPLC aufgetrennt. Die in der ESI-MS-Analyse erhaltenen Signale konnten eindeutigen Strukturen (1-3) zugeordnet werden.

Analog zur G2A0-AMAC-Analyse, wurde G2S0-AMAC als Substrat für den Umsatz mit isolierten Tritosomen eingesetzt (Abb. 51).

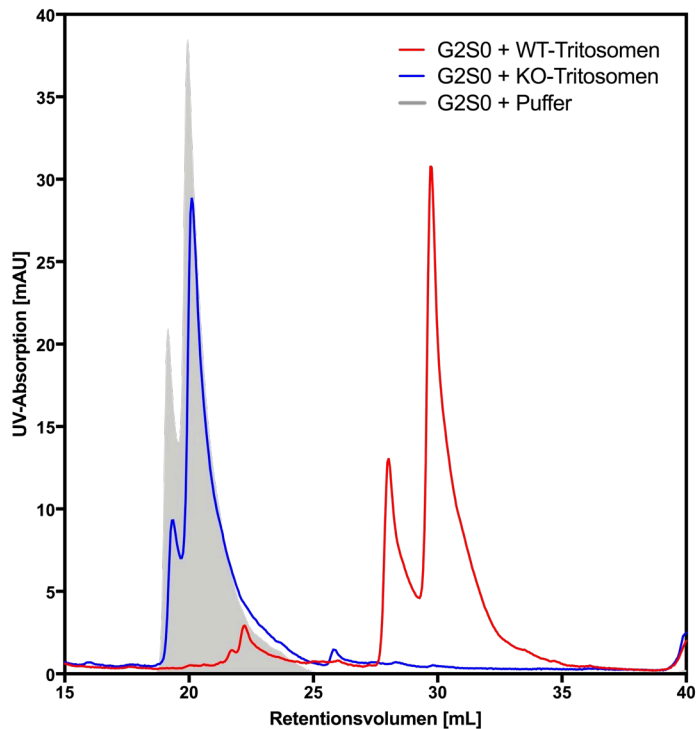


Abbildung 51: **Umsatz von G2S0-AMAC mit Tritosomen.** Das angebotene G2S0-AMAC Substrat (12.5 nmol, grün) wurde für 24h bei 37 °C mit Wildtyp- (rot) oder Arsk-KO-Tritosomen (blau) inkubiert (jeweils 50 μ g). Anschließend wurden Proteine über eine 10 kDa *cut-off*-Membran eliminiert und der Überstand über C18 RP-HPLC aufgetrennt. Das Substrat eluierte bei 20.1 mL mit einem Nebenpeak von 19.36 mL. Das mit KO-Tritosomen inkubierte Substrat wurde nicht umgesetzt. Nach Inkubation mit WT-Tritosomen eluierte das Substrat bei 28 mL sowie 29.8 mL.

Die Inkubation des G2S0-Substrats mit Wildtyp-Tritosomen führte zu einer Signalverschiebung (rot) des AMAC-G2S0 um 9.7 mL mit einem Doppelpick bei 28 mL und 29.8 mL. Der Umsatz mit Arsk-KO-Tritosomen (blau) führte zu einem Laufverhalten, welches dem des nicht umgesetzten G2S0-Edukts entsprach, wobei in beiden Fällen ein Doppelsignal in der RP-HPLC auftrat, das bei den AMAC-Markierungsreaktionen nicht vorhanden war. Die Signalverschiebung um 9.7 mL konnte nicht allein der Entfernung einer Sulfatgruppe, sondern der Degradation des AMAC-Substrats zum N-Acetylglucosamin-

5. ERGEBNISSE

AMAC Monosaccharid zugeschrieben werden. Die Signale der RP-HPLC Elutionsfraktionen nach Tritosomen-Umsatz konnten aufgrund technischer Schwierigkeiten bei der ESI-MS-Analyse nicht eindeutig zugeordnet werden.

Zusammenfassend konnte anhand des hier etablierten AMAC-basierten Assays sowohl die Glucuronat-2-Sulfatase-Aktivität (GDS) der Arsk belegt als auch ein vollständiger Verlust der GDS-Aktivität im Arsk-KO-Mausmodell validiert werden.

6 Diskussion

Die 2002 auf genomischer Ebene identifizierte Arylsulfatase K (Arsk) wurde bereits vorab in dieser Arbeitsgruppe unter biochemischen und zellbiologischen Aspekten charakterisiert (Wiegmann *et al.*, 2013), wobei für die rekombinante humane ARSK ein pH-Optimum von 4.6 gegen artifizielle Sulfatase-Pseudosubstrate, die Mannose-6-Phosphat(M6P)-Markierung als lysosomales Sortierungssignal sowie eine Kollokalisierung mit lysosomalen Markerproteinen mittels Immunfluoreszenz gezeigt werden konnte (Wiegmann *et al.*, 2013). In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung dieser Arbeitsgruppe konnte der ARSK zudem anhand synthetischer Disaccharid-Substrate eine Funktion als Glucuronat-2-O-Sulfatase zugewiesen werden, so dass eine Beteiligung der Arsk beim Abbau von Glykosaminoglykanen bestätigt wurde (Dhamale *et al.*, 2017).

6.1 Charakterisierung des Arsk-Mausmodells

6.1.1 Generierung und Validierung des Arsk-KOs

Knock-out-Mausmodelle sind zu einem wichtigen Werkzeug moderner Forschung geworden. Mittels *knock-out*-Strategien wie *gene-trap*, *gene-replacement* oder *gene-editing* (CRISPR-CAS) lassen sich spezifische Gene deaktivieren und somit Krankheitsmodelle entwickeln, die bei der Bestimmung der physiologischen Relevanz der ausgeschalteten Gene im Organismus von großer Bedeutung sein können (Skarnes, 2011). Nachdem bereits erste biochemische Erkenntnisse zur Arylsulfatase K vorlagen, die eine Funktion als neue lysosomale Sulfatase beschrieben, stand die Identifikation des physiologischen Substrats sowie die Suche nach pathophysiologischen Befunden, die durch den *Arsk-knock-out* (Arsk-KO) entstehen, im Fokus dieser Arbeit. Hierzu wurden heterozygote Arsk-KO-Mäuse bezogen (Jackson Laboratory). Der konstitutive Arsk-KO wurde dabei unter Zuhilfenahme einer lacZ-Insertionskassette durch das Cre/loxP-Rekombinationssystem in einem sogenannten *knock-out-first*-Modell erzeugt, wobei der Arsk-KO durch die

6. DISKUSSION

Entfernung von Exon 3 aus dem acht Exon umfassenden Arsk-Gen auf genomischer Ebene erstellt wurde. Das Arsk-KO-Allel konnte erfolgreich auf genomischer DNA mit einer PCR identifiziert und mittels Sanger-Sequenzierung verifiziert werden. Auf Transkriptlevel konnte durch qPCR-Analysen eine Reduktion des Arsk-Transkripts auf 0.01-1.3% in verschiedenen Geweben gezeigt werden. Eukaryotische Zellen besitzen einen Kontrollmechanismus zur Erkennung und Eliminierung von verkürzten, nicht-funktionellen mRNA-Sequenzen, der fehlerhaftes Spleißen, Fehler in der Transkription, *nonsense*-Mutationen oder, wie in diesem Fall, die Deletion eines Genabschnitts erkennt und fehlerhafte mRNA abbaut. Dieser als *Nonsense-mediated mRNA Decay* (NMD) bezeichnete Mechanismus reguliert die Aktivierung von 5'-3'-Exonucleasen, wobei die Degradation während der ersten Runde der Translation beginnt (Lewis *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 2007). Das Arsk-KO-Allel wird wohlmöglich transkribiert, jedoch sogleich durch den NMD-Mechanismus erkannt und degradiert, wobei häufig eine geringe Menge des abgebauten Transkripts nachzuweisen ist. Die qPCR-Ergebnisse zeigen daher, dass eine effiziente Cre-Rekombination im Arsk-Allel stattgefunden hat und es sich bei dem erzeugten Mausmodell um einen validen *knock-out* handelt, das im Folgenden als Arsk-Mausmodell bzw. Arsk-Maus bezeichnet wird.

Die Arsk wurde als ubiquitär-exprimiertes Enzym beschrieben (Wiegmann *et al.*, 2013). Gestützt wurden diese Daten durch die gewebespezifische Expressionsanalyse, die in Kooperation mit der AG Pohl (Uniklinik Hamburg) erstellt wurde und die höchste Arsk-Expression in Leber und Lunge aufzeigte (siehe 5.1.1). Nach Auswertung zusätzlicher bioinformatischer Daten aus BioGPS (Wu *et al.*, 2009) liegt die höchste Arsk-Expression in Niere, Plazenta und Retina vor. Dieser Widerspruch zeigt auf, dass ein Einsatz der über BioGPS zur Verfügung gestellten Daten hinterfragt und im Einzelfall experimentell überprüft werden muss.

Bei dem Arsk-Mausmodell handelte es sich um eine transgene lacZ-Reporter-Maus, die im Rahmen des *Knockout Mouse Project* (KOMP) erstellt wurde. Die lacZ-Reporter-kassette steht dabei unter der Kontrolle des endogenen Arsk-Promotors. Das bakterielle lacZ-Gen kodiert für die β -Galactosidase und setzt in einer Nachweisreaktion das zugeführte Galactosid X-Gal in ei-

nen blauen Farbstoff um (Mansour *et al.*, 1990). Der Nachweis der lacZ-Reporter-kassette zeigt auf Arsk-KO-Gewebe eine hohe Expression in der Niere, welche dort hauptsächlich in den geraden Teilen der proximalen Tubuli nachzuweisen war (siehe 5.1.2). Dieser Bereich befindet sich in den Außenstreifen des äußeren Marks (*outer stripe of outer medulla*) und reicht bis in die stark verzweigten Markstrahlen. Die primäre Aufgabe der proximalen Tubuli liegt in der Rückresorption von Elektrolyten wie Natrium, Kalium, Calcium aus dem gefilterten Primärharn. Dort ist auch vermehrt die Endozytose gefilterter Proteine zu beobachten. Ein Versuch die lacZ-Reporter-kassette in weiteren Geweben des Arsk-Mausmodells über eine X-Gal-Färbung nachzuweisen, schlug dabei fehl (Daten nicht gezeigt). In der Literatur ist zu finden, dass trotz vorhandener lacZ-Reporter-kassette bei etwa ~20% von 313 untersuchten lacZ-Mauslinien keine X-Gal-Färbung in Geweben möglich war und bei ~13% der Mauslinien nur einzelne Gewebe positiv auf eine lacZ-Färbung getestet werden konnten (West *et al.*, 2015). Begründen lässt sich diese Beobachtung neben der gewebeabhängigen Expressionsmenge des untersuchten Gens, die möglicherweise für eine X-Gal-Färbung nicht ausreichte, auch durch die vom Gewebe abhängige Durchlässigkeit der Substratlösung, was zum Teil zu falsch negativen Resultaten führen kann.

Das Arsk-Mausmodell sollte ferner auf Proteinebene an Gewebehomogenaten validiert werden. Die bisher kommerziell erhältlichen Arsk-Antikörper waren jedoch ausschließlich in der Lage, das humane ARSK-Protein zu detektieren. Der murinen Arsk konnte weder auf Gewebehomogenaten, noch auf angereicherten lysosomalen Fraktionen (Tritosomen) von Wildtyp-Tieren ein spezifisches Western-Blot-Signal zugewiesen werden. Die zur Kontrolle aufgetragene und im Rahmen dieser Arbeit produzierte rekombinante humane ARSK konnte als 68-kDa großes Protein detektiert werden, was frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe bestätigte (Wiegmann *et al.*, 2013). Ein Kompletterverlust der GDS-Aktivität in Arsk-defizienten Tieren konnte anhand eines hier etablierten spezifischen Aktivitätsassays gezeigt werden (siehe 5.5.3).

6.1.2 Phänotypische Analyse des Arsk-Mausmodells

Das Arsk-Mausmodell wurde zum Zeitpunkt der hier vorliegenden Arbeit in der 10. Inzuchtgeneration in der zentralen Tierhaltung der Universität Bielefeld gehalten. Sowohl die Geschlechterverteilung von männlichen (50.5%) und weiblichen (49.5%) Tieren als auch die durchschnittliche Wurfgröße von 7.5 Jungtieren entsprach den erwarteten Werten der C57BL/6-Mäuse (*The Jackson Laboratory, C57BL/6 Datenblatt*). Arsk-Tiere konnten bis zu einem hohen Alter von 28 Monaten gehalten werden was dem erwarteten Lebensalter der C57BL/6-Mäuse entsprach, ohne offensichtliche phänotypische Veränderungen gegenüber Wildtyp-Tieren aufzuweisen. Die homozygote Verpaarung führte zu fertilen Nachkommen, wodurch ein kritischer Einfluss der Arsk auf die Keimbahn ausgeschlossen werden konnte. Das Arsk-Mausmodell zeigte dabei in initialen Untersuchungen keinen offensichtlichen Phänotyp. Eine Besonderheit lag in der sporadisch ausbleibenden Fellpflege mancher Arsk-Individuen die zu einem verklebten und fettigen Fell führte. In Einzelfällen wurden Arsk-Mäuse mit vollständig entfernter Nackenbehaarung beobachtet, wobei jedoch ein konkreter Zusammenhang dieses Verhaltens mit der Arsk-defizienz nicht nachgewiesen werden konnte. Die GAGs Dermatan- und Keratansulfat, die vorwiegend im Bindegewebe der Haut auftreten, sollten in dem Zusammenhang weiter untersucht werden.

6.1.2.1 Einfluss der Arsk-Expression auf die Regulation anderer lysosomaler Enzyme

Die Arsk-Defizienz scheint zu einer transkriptionellen Fehlregulation anderer lysosomaler Enzyme zu führen, was häufig bei Mausmodellen anderer lysosomaler Speichererkrankungen (LSD) beobachtet wird (Kollmann *et al.*, 2012, Wolf *et al.*, 2016). Die physiologische Relevanz der Aktivierung und Reprimierung lysosomaler Gene ist noch nicht gänzlich verstanden. Zumindest für das lysosomale Membranprotein Lamp1 kann aber angenommen werden, dass bei entsprechender Speicherung und resultierender Ausweitung des endo-lysosomalen Membransystems zum Erhalt der strukturellen Integrität auch ein vermehrter Bedarf am integralen Membranprotein Lamp1 vorliegt.

Die zu der Arsk nächst-verwandte Sulfatase Iduronat-2-Sulfatase (Ids) wird im Arsk-Gewebe um ca. 20% in ihrer Expression reprimiert. Obwohl die Ids das Epimer des Arsk-Substrats umsetzt, kommt es im Arsk-Mausmodell nicht zu einer Kompensationsreaktion in Form einer erhöhten Expression der Ids. Begründen lässt sich das Ausbleiben einer solchen Reaktion durch die hohe Substratspezifität der Sulfatasen gegenüber ihren jeweiligen Substraten, was auch hier in spezifischen GRIL-LC/MS- sowie HPLC-Analysen gezeigt werden konnte. Demnach ist die Ids nicht in der Lage, den Abbau des Arsk 2-O-Substrats zu katalysieren. Da aufgrund von Expressionsanalysen keine Aussagen über tatsächliche Enzymaktivitäten gemacht werden sollten, könnte erst ein spezifischer Enzymassay Auskunft über die vorliegende Ids-Aktivität in den Geweben der Arsk-Maus geben. Drei weitere untersuchte lysosomale Gene, die nicht unmittelbar am GAG-Abbau beteiligt sind (Fucosidase, Lamp1 und β -Hexosaminidase), weisen hingegen in der qPCR eine erhöhte Expression auf. Der Arsk-KO führt zu einer Deregulation des lysosomalen Netzwerks, wodurch diese Gene in ihrer Expressionsmenge auf mRNA-Ebene um das 1.5-2.0-fache hochreguliert wurden. Auf Proteinebene der Arsk-Gewebe (Hirn, Leber, Niere und Milz) konnte anhand von Western-Blots dennoch keine Veränderungen in Form verstärkter oder verminderter Expression der lysosomalen Proteine Lamp1 und Cathepsin D gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden.

In Aktivitätsassays der lysosomalen Enzyme β -Hexosaminidase (β -Hex) und α -Mannosidase (α -Man) konnte auf Gewebehomogenaten der Arsk-Tiere eine um $\sim 20\%$ erhöhte β -Hex- in der Niere und eine um $\sim 35\%$ erhöhte α -Man-Aktivität in der Leber, verglichen mit dem Wildtyp, gemessen werden. Auch im MSP-III-E Mausmodell wurde eine erhöhte β -Hex-Aktivität in Niere (~ 4 -fach) und Cerebellum (~ 2 -fach) ermittelt, wobei die α -Man-Aktivität im Hirn reduziert gewesen ist (Kowalewski, 2016). In anderen Mausmodellen für lysosomale Enzyme, wie der α -Mannosidase- und der Fucosidase-Maus, konnte neben der erhöhten Expressionsrate in qPCR-Analysen auch der Einfluss auf Proteinebene, durch eine erhöhte Lamp1-Proteinmenge in Western-Blot-Analysen, gezeigt werden (Damme *et al.*, 2011, Wolf *et al.*, 2016).

6.1.2.2 Neuropathologie, visuelles System und Verhalten der Arsk-Maus

In vielen MPS-Mausmodellen führt der unvollständige GAG-Abbau besonders im neuronalen System zu einer häufig massiven Ausprägung verschiedener neurologischer Symptome wie dem Absterben von Neuronen oder generellen inflammatorischen Prozessen. Im Arsk-Mausmodell konnten hingegen immunhistologisch keine Befunde einer Beeinträchtigung des neuronalen Systems nachgewiesen werden. Die Purkinje-Zellen, mitverantwortlich für die motorische Koordination, wiesen im Anschnitt des Cerebellums eine natürliche, charakteristische Perlenschnur-ähnliche Anordnung auf und keine, wie die beispielhaft in Arylsulfatase G- und Fucosidase-defizienten Tieren gezeigte Degradation dieser Zellen, die mit verminderten motorischen Eigenschaften der Tiere einhergehen (Kowalewski *et al.*, 2012, Wolf *et al.*, 2016).

In Verhaltenstests an zwölf Monate alten Arsk-Mäusen konnten dennoch signifikante Unterschiede in der reduzierten räumlichen Wahrnehmung sowie dem reduzierterem Angstverhalten diagnostiziert werden. Ähnliche Beobachtungen wurden in einer kürzlich erschienenen Studie zum MPS-IIIC-Mausmodell gemacht, wo ebenfalls Defizite im räumlichen Denkvermögen sowie verringertes Angstverhalten detektiert wurden (Pshezhetsky, 2016). Die Arsk-Maus zeigte ferner eine verzögerte Aufnahme von neuen sozialen Kontakten. Dabei ist es schwierig, die genaue Ursache hinter den Verhaltensänderungen zu erklären, wobei eine gewisse Überlappung der involvierten Gehirnregionen wahrscheinlich ist. Das hippocampale CA1 und im geringeren Umfang auch der CA3-Bereich kommen in Bezug auf kognitive Beeinträchtigungen in den Fokus. Hier könnte auch der mediale präfrontale Cortex beteiligt sein, der als zentraler Regulator des Sozialverhaltens bezeichnet wird. Die *ventral tegmental area* (VTA) und der *nucleus accumbens*, sind Hirnregionen, die belohnende Aspekte des Sozialverhaltens vermitteln und dabei ebenfalls eine Rolle in den vorliegenden Verhaltensmustern aufweisen könnten (pers. Mitteilung Dr. Stroobants). Andere wohlmöglich relevante Regionen bezüglich der beobachteten Verhaltensänderungen umfassen die Amygdala, die für die emotionale Verarbeitung von sozialen Reizen zuständig ist und den *bulbus*

olfactorius (Riechkolben). Mäuse verlassen sich stark auf ihr olfaktorisches System, um ihr soziales Umfeld, ihre Nahrung als auch das eigene Revier zu beurteilen weshalb Veränderungen in diesen Hirnregionen einen Einfluss auf das Verhalten der Tiere haben können.

Zusammenfassend ist das neuronale System der Arsk-Maus aus biochemischer Sicht weitestgehend unauffällig, unterscheidet sich aufgrund der hier vorgestellten abweichenden Verhaltensmuster dennoch von dem Wildtyp.

Eine Degeneration der Retina ist ein typisches Merkmal vieler lysosomaler Speichererkrankungen. Besonders sind hierbei die Mukopolysaccharidosen sowie die Neuronale Ceroid-Lipofuszinose zu nennen (Jalanko, *et al.*, 2009, Bhaumik *et al.*, 1999). Das visuelle System von MPS-IIIA-Patienten wird durch einen progressiven Verlust von Photorezeptoren beschrieben, wobei Ganglienzellen sowie der Sehnerv nicht betroffen sind (Caruso *et al.*, 1986, Ferrari *et al.*, 2010). Erst kürzlich konnte anhand des MPS-IIIE-Mausmodells, in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Bartsch (Uniklinik Hamburg) der progressive Verlust von Photorezeptoren sowie eine massive Astro- und Mikrogliose beschrieben werden (Kruszewski *et al.*, 2016).

Die Retina der Arsk-Tiere wurde in einem Alter von 12 und 24 Monaten an der Uniklinik Hamburg, ebenfalls unter Führung von Prof. Dr. Bartsch, hinsichtlich möglicher inflammatorischer oder degenerativer Prozesse untersucht, wobei keine Beeinträchtigung der Retina festgestellt werden konnte. Damit konnten die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung eines Arsk-KO-Mausmodells des *International Mouse Phenotyping Consortium* (IMPC) nicht bestätigt werden. Beschrieben wurden dabei Auffälligkeiten der Retina-Pigmentierung Arsk-defizienter Mäuse. Das IMPC hat es sich zum Ziel gesetzt in standardisierten Hochdurchsatz-Untersuchungen verschiedene *knockout*-Mauslinien auf einen möglichen Phänotyp hin zu untersuchen, der in Folge des Gen-KOs auftreten könnte. Untersucht werden dabei unter anderem neuromuskuläre, kardiovaskuläre, metabolische, hämatologische und neurologische Parameter (Meehan *et al.*, 2017).

6.1.2.3 Einfluss der Arylsulfatase K-Defizienz auf die Ossifikation

Speziell MPS-Erkrankungen werden häufig mit verschiedenen skelettalen Defekten assoziiert, die zusammenfassend als Dysostose beschrieben werden (Clarke *et al.*, 2015). Eine Mutation in der α -L-Iduronidase, die an der Degradation von Dermatansulfat und Heparansulfat beteiligt ist, führt zu MPS-I und schweren neurologischen und skelettalen Symptomen (Scott *et al.*, 1993). Ein Defekt der Sulfamidase, die auch an der Heparansulfat-Degradation beteiligt ist, führt hingegen zu einem massiven neurologischen Phänotyp in MPS-IIIa-Patienten, ohne jedoch einen offensichtlichen skelettalen Einfluss zu besitzen (Gilkes und Heldermon, 2014). Bei der MPS-VI, die mit dem Defekt der Arylsulfatase B assoziiert ist, kommt es zu einer Beeinträchtigung der Chondroitinsulfat- und Dermatansulfat-Degradation, die hingegen primär einen skelettalen Phänotyp und keine neurologischen Symptome hervorruft (Vairo *et al.*, 2015).

Die Beteiligung der Arsk an der Knochenmodellierung wurde anhand verschiedener Analysen in Kooperation mit Prof. Schinke (Uniklinik Hamburg) durchgeführt. Dabei konnte an drei sowie zwölf Monate alten Arsk-KO-Tieren eine erhöhte, jedoch nicht statistisch signifikante trabekuläre Knochendichte (Abb. 32) beobachtet werden, die sich durch verstärkte Knochenmineralisierung äußerte und ebenfalls im MPS-I-Mausmodell, dort jedoch weitaus stärker ausgeprägt, vorliegt (Russell *et al.*, 1998). Mit Hilfe der zellulären Histomorphometrie an Arsk-Skeletten wurde eine verringerte Osteoclasten-Zahl festgestellt (Abb. 33B). Osteoclasten differenzieren sich aus hämatopoetischen Stammzellen und teilen sich damit die Vorgängerzellen mit Makrophagen, wohingegen Osteoblasten wie Stromazellen und Osteozyten aus mesenchymalen Stammzellen ausdifferenzieren (Martin *et al.*, 2005). Im gesunden Individuum besteht ein Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenbildung, was eine direkte Kommunikation zwischen Osteoblasten und Osteoclasten durch Zell-Zell-Kontakt, bzw. die Bildung von Gap-Junctions oder aber passiv über die Sekretion von parakrinen Faktoren wie Zytokinen, Chemokinen oder Wachstumsfaktoren umfasst (Pfeilschifter und Mundy, 1987). Im MPS-I-Mausmodell wird ein inhibitorischer Effekt auf

die Aktivität der Protease Cathepsin-K durch GAG-Akkumulation vermutet, was zu einer erhöhten Osteoclasten-Zahl sowie abnormen Osteoclasten-Aktivität führt und mitverantwortlich für den MPS-I-Konchenphänotyps ist (Wilson *et al.*, 2009). Die offensichtlichste klinische Manifestation in MPS-IV- und MPS-VI-Patienten stellt die Skelettdysplasie dar, die sich durch Kleinwuchs, progressive Skelettdeformation und Gesichtsdysmorphie äußert. Bei betroffenen Patienten wird eine pathologisch relevante Erhöhung der Osteoclasten-Aktivität beobachtet (Simonaro *et al.*, 2008, Clarke, 2011).

Mit Hilfe sogenannter Knochenumsatz-Marker können mögliche Anzeichen eines Defekts im skelettalen Modellierungsprozess untersucht werden. Mit nahezu 90% nimmt Kollagen Typ 1 den Großteil der organischen Knochenmatrix ein. Während der Resorption, also dem Knochenabbau, sekretieren Osteoclasten saure und neutrale Proteasen, die Kollagenfibrillen abbauen und dabei das C-terminale Telopeptid (CTx) erzeugen (Bonnet *et al.*, 2004). Im Laufe der Knochenalterung wird die α -Form in CTx zu der β -Form umgewandelt (β -CTx). Im Blutstrom dient β -CTx als spezifischer Marker für die Degradation von reifem Kollagen Typ 1 und ist bei erhöhten Werten ein Anzeichen für verstärkten Knochenabbau und ein erstes Anzeichen für Osteoporose (Christgau *et al.*, 2000). In einer klinischen Studie zu MPS-II-Patienten im Alter von 3.5-6 Jahren wurde in allen untersuchten Probanden ein um 30-150% erhöhter β -CTx-Spiegel im Serum festgestellt (Zuber *et al.*, 2014). In einer weiteren Analyse MPS-IIIA- und MPS-IIIB-betroffener Patienten konnte ebenfalls ein um 50-120% erhöhter β -CTx-Spiegel nachgewiesen werden (Rigante und Caradonna, 2004). Die hohe Varianz dieser Messwerte ist neben der geringen Anzahl untersuchter Patienten durch den individuellen Krankheitsverlauf zu erklären.

In Arsk-Mäusen hingegen konnte eine im Mittel um 10-15% verringerte β -CTx-Konzentration im Serum nachgewiesen werden, was ein Anzeichen für einen geringeren Knochenumsatz darstellt und damit die erhöhte Knochenmineralisierung erklären könnte (Abb. 33C). Parathormon (PTH), ein weiterer wichtiger Knochenumsatz-Marker im Serum, wird bei einem absinkenden Calcium-Spiegel freigesetzt und fördert damit die Calciumresorption im Knochen, wodurch der Knochenabbau angeregt wird und zu einer redu-

6. DISKUSSION

zierten Knochenmasse führt (Kurland *et al.*, 2000). Diese Beobachtung wurde in 60% der untersuchten MPS-II-Patienten gemacht, die eine um bis zu 100% erhöhte PTX-Konzentration im Serum aufwiesen (Zuber *et al.*, 2014). Ebenso konnte in MPS-IIIA-Patienten ein bis zu 30% erhöhter PTX-Wert im Serum diagnostiziert werden (Rigante und Caradonna, 2004). Im Arsk-Mausmodell konnte aufgrund einer hohen Varianz individueller Messwerte der PTX-Analyse im Durchschnitt keine Auffälligkeit im Arsk-Mausmodell belegt werden (Abb. 33D). Die mechanischen Eigenschaften des Femurknochens der Arsk-Maus wiesen im angewandten Biegetest keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp auf. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu der verringerten Knochenmineraldichte, die in μ CT-Analysen 26 und 52 Wochen alter Arsk-Tiere im Femurknochen detektiert wurde. Zu erwarten wäre dabei eine verringerte mechanische Stabilität aufgrund der schwächeren skelettalen Mikrostruktur in Arsk-Tieren.

Die Beeinflussung des GAG-Metabolismus kann sich ferner auf die Bildung der Knorpelmasse auswirken. Die Beeinträchtigung von Chondrozyten konnte im MPS-VI- und MPS-VII-Mausmodell gezeigt werden, wo es zu einer erhöhten Apoptose-Rate dieses Zelltyps kommt die zu einer abnormalen Knorpelmatrix-Zusammensetzung führt (Simonaro *et al.*, 2005, Aldenhoven *et al.*, 2009). In einer Analyse 13 Monate alter Arsk-Tiere wurden in den Chondrozyten, die einen Hauptbestandteil des Knorpels ausmachen, vereinzelte kleine leere Speichervakuolen identifiziert. Diese sind wahrscheinlich auf akkumulierendes Speichermaterial zurückzuführen, das sich im Zuge der Wachstumsphase gebildet haben und während der experimentellen Durchführung ausgewaschen wurden. Eine pathologische Relevanz im Arsk-Mausmodell konnte nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend kann auch aufgrund der zum Teil inkonsistenten Ergebnisse der skelettalen Analysen eine Beteiligung der Arylsulfatase K auf Modellierungsprozesse der Knochen nicht vollständig geklärt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt kann die molekulare Ursache der zugrundeliegenden Beobachtungen nicht geklärt werden und muss Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

6.1.2.4 Speicherpathologie in der Arsk-Maus

Das Arsk-Mausmodell zeigt auf anatomisch-histologischer Ebene einen sehr milden Speicherphänotyp, der sich weitestgehend auf die Niere in Form von wenigem, elektronendichtem und demnach wasserunlöslichem Material beschränkt. Maßgeblich betroffen sind dabei Bereiche der Henle'schen-Schleife sowie Profile der Intermediärtubuli, die jedoch in Bezug auf das Speichermaterial nicht den für Mukopolysaccharidosen erwarteten Speichertyp entsprechen. Für eine Vielzahl von MPS werden Glykosaminoglykane als wasserlösliches Speichermaterial identifiziert, welches sich nicht als elektronendichtes Material darstellen lässt, sondern während der experimentellen Durchführung ausgewaschen wird (Futerman und Van Meer, 2004). Die daraufhin leeren bzw. wenig elektronendichten Speichervakuolen sind in histologischen Analysen betroffener MPS-Gewebe sichtbar und beispielsweise in der MPS-II-Maus vorzufinden (Garcia *et al.*, 2007). Bei dem in der Arsk-Maus identifizierten granulärem Material handelt es sich möglicherweise um GAGs, die an ein Kernprotein gebunden vorliegen und aufgrund der Protein-Komponente nur schwer löslich sind.

Die ebenfalls in EM-Aufnahmen vorgefundenen elektronendichten Einschlüsse in der Niere von Arsk-Tieren finden ein Korrelat in einer Analyse der Mausmodelle MPS-I, -IIIA und -IIIB, wobei dort in EM-Aufnahmen von Hirnregionen lipidreiche Strukturen und lysosomales Speichermaterial nachgewiesen wurden (Wilkinson *et al.*, 2012). Auch im MPS-IIIC Mausmodell, welches eine massive Degeneration des neuronalen Systems aufweist, wurde neben der Vergrößerung des lysosomalen Systems elektronendichtes Material in den Lysosomen der Neuronen detektiert (Pshezhetsky, 2016).

Eine Akkumulation von sekundärem Speichermaterial, das in keiner direkten Verbindung zum Enzymdefekt steht, wird oft in LSDs beobachtet, kann aber auch aufgrund natürlicher Alterungsprozesse entstehen (Yin, 1996). In der neuronalen Ceroid-Lipofuszinose (NCL) werden als Primärmaterial autofluoreszierende, protein- und lipidreiche-Komponenten eingelagert, die weitestgehend aus Ubiquitin, einer Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase sowie den Saposinen A und D bestehen (Kyttälä *et al.*, 2006). Derartiges

6. DISKUSSION

autofluoreszentes Material im ZNS, welches als Lipofuscin bezeichnet wird, wurde ebenso in den Mausmodellen der α -Mannosidose (Damme *et al.*, 2011), der MPS-IIIIE (Kowalewski *et al.*, 2015) als auch der Fucosidose (Wolf *et al.*, 2017) in verschiedenen Bereichen des ZNS identifiziert. Auch in der Arsk-Maus wurden geringe Mengen eines autofluoreszenten Materials vor allem im Cerebellum, aber auch im Bereich der TAL (*thick ascending limb of Henle's loop*) der Niere nachgewiesen. Das bei der Arsk-Maus vorgefundene Material konnte jedoch zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht weiter charakterisiert werden und sollte Gegenstand weiterer Analysen sein.

6.1.3 Produktion und Aufreinigung rekombinanter humaner Arylsulfatase K

Die in dieser Arbeit produzierte rekombinante humane ARSK war ein essentieller Bestandteil dieser Arbeit und wurde für die Analysen im folgenden Abschnitt verwendet. In Vorarbeiten wurde eine HEK293-Zelllinie etabliert, die durch stabile Überexpression eine His₆-markierte humane Form der ARSK in das Medium sezernierte (Westendorf, 2010). Anders als nach Wiegmann *et al.* (2013) erfolgte die Aufreinigung der rekombinanten ARSK im Batch-Verfahren (Abb. 38A). Ein Nachweis der Aufreinigung erfolgte im Westernblot über eine α -His₆-AK bzw. einen α -ARSK-AK und resultierte in einem 68-kDa Signal, was vorherige Arbeiten der Arbeitsgruppe bestätigte (Wiegmann *et al.*, 2013). Durch den enzymatischen Umsatz des Sulfatase-Pseudosubstrats pNCS wurde die Sulfataseaktivität der rekombinanten ARSK nachgewiesen (Abb. 38B). Mit 0.20 mU/mL gegenüber den durch Wiegmann *et al.* (2013) beschriebenen Wert von 0.12 mU/mL konnte eine Steigerung der ARSK-Ausbeute erzielt werden. Das so aufgereinigte ARSK-Enzym wurde für die Analyse und den Umsatz des physiologischen Substrats der Arsk eingesetzt.

6.1.4 Glykosaminoglykan-Speicherung im Arsk-Mausmodell

Mit der Identifizierung einer Glucuronat-2-Sulfatase-Aktivität der ARSK durch Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe (Dhamale *et al.*, 2017) konnte von

einer Einlagerung von nur partiell abgebauten Glykosaminoglykanen ausgegangen werden. Für diverse MPS-Mausmodelle konnte eine Akkumulation von partiell abgebauten GAGs in Geweben (Niere, Leber, Hirn und Milz) sowie die erhöhte GAG-Ausscheidung im Urin gezeigt werden (Friso *et al.*, 2005). Häufig ist dabei die Niere betroffen. Besonders die Zellen des proximalen Tubulus besitzen eine hohe Lysosomen-Anzahl, da in diesen viele Proteine und Makromoleküle das glomerulären Filtrats endozytiert werden müssen. Andere Epithelien des Nephrons weisen weitaus weniger Lysosomen auf (Saftig, 2005). Bei einem Defekt der lysosomalen, intrazellulären GAG-Degradation wird eine pathologische Kaskade ausgelöst, die zu einer verstärkten Sekretion von partiell metabolisierten GAGs führt, die in den Lysosomen akkumulieren können. Im gesunden Individuum werden GAGs üblicherweise nicht in großen Mengen über den Urin ausgeschieden. Der im Urin natürlich vorkommende GAG-Anteil hat eine inhibitorische Wirkung auf die Bildung von Harnsteinen, die meist durch die Kristallisation von Calciumoxalat entstehen (Khan und Kok, 2004). Eine erhöhte GAG-Ausscheidung über den Urin ist pathophysiologisch bei MPS-Erkrankungen zu beobachten, da aus dem Gewebe viele, nur partiell degradierte GAGs ausgeschieden werden. Auf die Analytik des Urins von Arsk-Mäusen wird im Abschnitt 6.1.4.1 eingegangen.

Durch die Inkubation von Gewebeschnitten mit Alcianblau werden stark sulfatierte anionische Substanzen gefärbt, aber vor allem Glykosaminoglykane, die zu den am stärksten sulfatierten und somit am stärksten negativ geladenen Makromolekülen gehören. Anhand von Alcianblau-Färbungen konnte bereits an dem MPS-II- und MPS-IIIB-Mausmodell die Einlagerung von GAGs in Niere, Leber und Herz gezeigt werden (Muenzer *et al.*, 2002; Schiattarella *et al.*, 2015). In den Nieren der Arsk-Tiere wurde eine verstärkte GAG-Einlagerung im Bereich der *inner stripe of outer medulla* nachgewiesen (Abb. 39). Aus vorangegangenen Arbeiten des MPS-IIIE-Mausmodells ist bekannt, dass es durch den gestörten GAG-Abbau in den TAL der Niere (*thick ascending limb of Henle's loop*) ebenso zu einem Speicherphänotyp kommt, obwohl epitheliale Zellen dieser Segmente eine weitaus geringere ly-

sosomale Aktivität aufweisen als die proximalen Tubuli (Saftig, 2005). Die Tubuli der inneren Medula lassen sich anhand der Alcianblau-Färbung nicht beurteilen, da das Interstitium der Niere auch im Wildtyp Alcianblau-positiv ist, was zugleich die Positivkontrolle der Alcianblau-Färbemethode darstellt (pers. Mitteilung Prof. Dr. Lüllmann-Rauch). Die Alcianblau-Analyse am Hirn zeigte im Vergleich zum Wildtyp einen natürlich hohen Anteil sulfatierter Strukturen insbesondere die Nervenbündel im Hirn der Arsk-Mäuse und lässt anhand der Alcianblau-Färbemethode keine weiteren pathologisch relevanten Schlüsse zu (Abb. 39).

6.1.4.1 DMMB-basierte GAG-Analyse

Die Quantifizierung von GAGs in Gewebehomogenaten anhand des polykationischen Farbstoffs DMMB stellt eine vergleichsweise einfache Möglichkeit dar, die GAG-Akkumulation nachzuweisen und wurde bereits für die MPS-II-Maus durchgeführt (Muenzer *et al.*, 2002). Arsk-Mäuse im Alter von 18 Monaten wiesen eine im Mittel um 15% erhöhte GAG-Menge in Hirn und Niere verglichen mit dem Wildtyp auf, die jedoch aufgrund hoher Varianz individueller Werte keine statistische Signifikanz erreichte (Abb. 40B). Die Gegenüberstellung verschiedener Arsk-Altersstufen von einem bis zwölf Monaten zeigte keine progressive Entwicklung, wie sie bei der Akkumulation von partiell degradierten Substraten zu erwarten wäre (Abb. 40C). Der direkte Vergleich der gespeicherten GAG-Menge des Arsk-Mausmodells mit bereits beschriebenen MPS-IIIA- und MPS-IIIE-Mausmodellen, die nachweislich Einlagerungen von GAGs aufweisen, zeigte eine nur geringe Speichermenge im Arsk-Mausmodell auf (Abb. 40D). Die MPS-IIIE-Maus weist in Hirn, Leber und Niere ein um bis zu 3-fach erhöhte GAG-Menge, das MPS-IIIA-Mausmodell eine bis zu 8-fache Erhöhung der GAG-Speichermenge verglichen mit den Arsk-Daten auf. Diese Beobachtung stimmt mit der kürzlich erschienen Studie zur MPS-IIIA-Maus überein, die eine im Wildtyp-Vergleich bis zu 15-fache HS, 5-fache HA und 5-fache CS-Speichermenge nachweisen konnte (Maccari *et al.*, 2017).

Eine nicht-invasive Routineuntersuchung potentieller MPS-Patienten beginnt häufig mit der Analyse des Urins, wodurch MPS-I, -II, -IV und -VI-Patienten

anhand erhöhter GAG-Ausscheidung identifiziert werden können (Russell *et al.*, 1998, Gallegos-Arreola *et al.*, 2000). Der in Arsk-Mäusen ermittelte Wert von $117 \mu\text{g}/\text{mg}$ ist im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren mit $77 \mu\text{g}/\text{mg}$ GAG/Creatinin zwar im Mittel erhöht, erreicht aber aufgrund größerer Varianzen der individuellen Werte keine statistische Signifikanz (Abb. 41). Verglichen mit anderen MPS-Mausmodellen die eine GAG-Beteiligung zeigen, wie der MPS-II-Maus, bei der eine GAG-Konzentration von $300\text{-}600 \mu\text{g}/\text{mg}$ Creatinin gemessen wurde, weist die Arsk-Maus eine geringere GAG-Ausscheidung auf (Muenzer *et al.*, 2007). Auch in der MPS-III-E-Maus konnte ein signifikant erhöhter GAG-Wert im Urin von $120\text{-}340 \mu\text{g}/\text{mg}$ Creatinin ermittelt werden (Frese Diss., 2009), was etwa der doppelten GAG-Menge der Wildtyp-Mäuse entspricht. In klinischen Studien an MPS-Patienten wurden für MPS-I ($600\text{-}1400 \mu\text{g}/\text{mg}$), MPS-II ($538 \mu\text{g}/\text{mg}$), MPS-IV ($346 \mu\text{g}/\text{mg}$) und MPS-VI ($534 \mu\text{g}/\text{mg}$) ebenfalls massiv erhöhte GAG-Mengen im Urin diagnostiziert (Russell *et al.*, 1998). Bei den erst kürzlich identifizierten ARSG-defizienten Patienten war die GAG-Ausscheidung im Urin mit $3.5 \text{ mg}/\text{mmol}$ Creatinin gegenüber dem Normbereich bei >20 -Jährigen ($1.7\text{-}3.4 \text{ mg}/\text{mmol}$) nur leicht erhöht (Khateb *et al.*, 2017). Bei einem vermuteten Defekt des GAG-Abbaus sollte besonders das charakteristische Sulfatierungsmuster des nicht-reduzierenden Endes (NRE) der GAGs analysiert werden, um Aufschluss über das betroffene Enzym geben zu können. Auch die Analyse der GAGs im Urin ist im Arsk-Modell von Interesse und sollte in zukünftigen Studien erfolgen.

6.1.4.2 Massenspektrometrische Analyse der GAG-Speicherung

Die massenspektrometrische Analyse von GAGs ist eine gegenüber dem DMMB-basierten Verfahren weitaus sensitivere Methode, die es durch den Einsatz entsprechender Standards ermöglicht spezifische GAG-Typen zu unterscheiden. Die GAG-Analyse erfolgte an extrahierten GAGs verschiedener Gewebe (Hirn, Leber, Niere, Milz und Lunge) aus 12 Monate alten Arsk-Tieren. Dabei konnte eine signifikant erhöhte Heparansulfat-Speicherung primär in Niere und Hirn, aber auch in Leber und Milz festgestellt werden.

Besonders fällt die Speicherung im Hirn der Arsk-Maus auf, die zu einer 7-fachen Erhöhung der GAG-Menge gegenüber dem Wildtyp führt. In Niere und Leber von Arsk-Tieren konnte eine 4-fach erhöhte HS-Speichermenge festgestellt werden (Abb. 42A).

Eine signifikant erhöhte Speichermenge konnte ferner für Chondroitinsulfat in der Niere (~5-fach), Hirn (~2-fach) und Lunge (~3-fach) nachgewiesen werden (Abb. 42B). Die GAG-Speicherung in Niere korreliert dabei mit den Beobachtungen der erhöhten GAG-Ausscheidung im Urin der sowie dem Auftreten von elektronendichten Einlagerungen, die in licht- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 20/21). Die in den LC/MS-Analysen ermittelte GAG-Speicherung von Heparan- und Chondroitinsulfat im Hirn konnte hingegen keine immunhistologischen Reaktionen (Abb. 24-26) oder den Verlust neuronaler Zellpopulationen (Abb. 27) in der Maus auslösen, wenn auch Verhaltensveränderungen der Arsk-Tiere festgestellt wurden (vgl. Kap. 5.2.4). Das absolute Sulfatierungsmuster gespeicherter GAGs kann durch einen Defekt in der GAG-Degradationskaskade zu einer veränderten prozentualen Zusammensetzung von N-, 2-O- und 6-O-Sulfatierungen führen, wie sie für die Mausmodelle MPS-I, -IIA und -IIIB anhand des gespeicherten Heparansulfats gezeigt wurde (Wilkinson *et al.*, 2012). Im Arsk-Mausmodell konnten weder im Heparansulfat, noch im Chondroitinsulfat Abweichungen im absoluten Sulfatierungsmuster der GAGs festgestellt werden (Abb. 43). Ein Grund hierfür kann die vergleichsweise selten auftretende 2-O-Sulfatierung am Glucuronat der GAGs HS und CS sein, die nur geringen Beitrag zum absoluten Sulfatierungsmuster leistet und experimentell nicht festzustellen ist (Shaklee *et al.*, 1985).

6.1.4.3 Analyse des nicht-reduzierenden Endes von GAGs im Arsk-Mausmodell

Bei der durch Lawrence *et al.* (2008) vorgestellten GRIL-LC/MS-Methode handelt es sich um eine hochauflösende Messmethode zur Identifikation von spezifischen Oligosacchariden unter Einsatz von (synthetischen) Disaccharid-Substraten als Standards. Hierdurch kann neben einer Kompositionsanalyse im Allgemeinen (vgl. Kap. 6.1.4.2) speziell die charakteristische Struktur der

nicht-reduzierenden Enden (NRE) an Oligosacchariden untersucht werden. Dieses Analyseverfahren ermöglicht eine Diagnose von MPS-Patientenproben (Lawrence *et al.*, 2012). Mit Hilfe der GRIL-LC/MS konnte unsere Arbeitsgruppe die Glucuronat-2-Sulfatase-Aktivität (GDS) der ARSK sowie bei der Analyse des Arsg-Mausmodells die Glucosamin-3-O-Sulfatase-Aktivität der Arsg nachweisen (Dhamale *et al.*, 2017; Kowalewski *et al.*, 2012). Bei dieser Methode werden GAGs aus dem zu untersuchenden Material isoliert und mit bakteriellen Heparin-Lyasen und Chondroitinasen depolymerisiert, die anschließend mit [$^{12}\text{C}_6$]-Anilin über eine reduktive Aminierung markiert werden. Essentiell sind dabei die [$^{13}\text{C}_6$]-Anilin markierten Standards, die für die Quantifizierung sowie qualitative Aussage der GRIL-LC/MS-Analyse co-chromatographiert werden (vgl. 4.6.4.).

Nach Aufarbeitung der GAGs aus Arsk-defizienten Geweben konnten 3-fach mehr G2A0-NREs in der Niere der Arsk-Tiere nachgewiesen werden. Eine G2A0-Speicherung im Hirn konnte nicht detektiert werden. Ferner konnten G2S0-NREs im Arsk-Hirn mit einem 1.3-fachen Überschuss und in der Arsk-Niere im 8-fachen Überschuss verglichen mit dem Wildtyp detektiert werden (Abb. 46C/D). Wildtyp-Gewebe wies hinsichtlich der untersuchten NREs eine nahe dem Detektionslimit vorliegende Menge an 2-Sulfoglucuronat auf, die wahrscheinlich im gesunden Individuum eine selten auftretende NRE-Form darstellt.

Die Glucuronat-2-Sulfatase-Aktivität der Arsk konnte durch den Verdau des isolierten Speichermaterials Arsk-defizienter Mäuse mit rekombinanter humaner ARSK (rARSK) bestätigt werden. Nach Umsatz mit rARSK konnten die G2A0-NREs vollständig und die G2S0-NREs zu 80% abgebaut werden (Abb. 47). Der unvollständige Abbau der G2S0-NREs kann wahrscheinlich durch die in Relation zur rARSK eingesetzte G2S0-Menge, oder zu geringe Enzymaktivität der rARSK, welche vorab nach Aufreinigung über eine längere Zeit eingefroren und mehreren Auftauzyklen unterzogen war, erklärt werden. Der Umsatz von G2A0-NREs durch IDS, die aufgrund fehlender GDS-Aktivität gegenüber dem angebotenen Substrat inaktiv sein sollte, könnte aufgrund der geringen Menge an Speichermaterial auf ein Recovery-Problem

während der Aufarbeitung der Proben zurückzuführen sein (Dhamale *et al.*, 2017). Die hier ermittelten *in vitro*-Ergebnisse stützen Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe und bestätigen die spezifische Glucuronat-2-Sulfatase-Aktivität der Arsk.

6.1.4.4 AMAC-basierter Arsk-Aktivitätsassay

In einem weiteren experimentellen Ansatz zur Bestätigung der GDS-Aktivität der Arsk wurde ein 2-Aminoacridon(AMAC)-basierter Assay etabliert, der auch zur Analyse anderer GAG-abgeleiteter Saccharide eingesetzt wird (Hitchcock *et al.*, 2008). Die hier eingesetzte Markierung der Substrate über den fluoreszenten Farbstoff AMAC verlief über eine reduktive Aminierung (4.6.5). Anschließend konnten die markierten Substrate über eine C18 *reversed phase* (RP)-HPLC analysiert werden, was durch die hydrophoben Wechselwirkungen des AMAC mit dem Säulenmaterial ermöglicht wurde. Die Methode wurde zuvor für Heparansulfat-abgeleitete Disaccharide beschrieben und kürzlich erfolgreich für die Bestimmung der Arylsulfatase G-Aktivität gegenüber 3-O-sulfatierten Monosacchariden in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt (Deakin und Lyon, 2008; Kowalewski, 2016). Im Fall der Arsk führt die Entfernung der 2-O-Sulfatierung des angebotenen AMAC-markierten Glucuronats zu einer Erhöhung der Hydrophobizität und einer stärkeren Interaktion mit der RP-Matrix, wodurch desulfatierte Substrate zu einem späteren Zeitpunkt eluieren. Die AMAC-Markierungsreaktion sulfatierter Disaccharid-Substrate G2A0 und G2S0 wurde etabliert, wobei ungebundenes und überschüssiges AMAC als Einzelpeak abseits der Substratpeaks eluierte (Abb. 48). Eine Unterscheidung der eingesetzten Saccharide kann aufgrund unterschiedlicher Acetylierungen und Sulfatierungen und eines hierdurch abweichenden Laufverhaltens erfolgen. Der AMAC-Assay wies dabei eine hohe Reproduzierbarkeit auf und die beobachteten Signalintensitäten entsprachen der nach Kowalewski (2016) an Monosacchariden etablierten Methode.

Auch ein enzymatischer Umsatz der AMAC-markierten Disaccharide G2A0 und G2S0 mit rARSK konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden (Abb. 49). Der Verdau beider Substrate führte zu einer Entfernung der spezifischen Sulfatgruppe des 2-Sulfo-glucuronats, was mit einer Verschiebung des Elu-

tionsvolumens auf der RP-HPLC einherging. In der ESI-MS-Analyse wurde ein Verlust von ~ 80 m/z Einheiten gemessen, was der Entfernung einer Sulfatgruppe entsprach. Die ESI-MS-Analysen wiesen dabei eine methodenbedingte Abspaltung der Sulfatgruppe des Edukts in einem Verhältnis von 4:1 auf, die nach Optimierung des Messverfahrens zu einer Ratio von 1:1 verbessert werden konnte. Diese artifizielle Sulfatgruppen-Abspaltung lässt sich wahrscheinlich durch die applizierte Ionisierungsenergie des ESI-Massenspektrometers (Synapt G2Si) erklären, da diese Abspaltung bei der alternativen Analysemethode über GRIL-LC/MS mit Ionenfallen-Massenspektrometer (LTQ Orbitrap) nicht auftrat. Ferner konnten im G2A0-ESI-MS-Spektrum zwei und für das G2S0 drei Signale nachgewiesen werden, was den vorhandenen Sulfatgruppen der Disaccharid-Substrate entsprach (nicht gezeigt). Nach Umsatz des einfach sulfatierten G2A0-Disaccharids mit rARSK konnte im Massenspektrum ausschließlich das Signal der desulfatierten Form detektiert werden, was einzig auf die enzymatische Arsk-Aktivität zurückzuführen ist (Abb. 53; Appendix).

Nach Bestätigung des spezifischen 2-O-Umsatzes durch rARSK wurden die AMAC-markierten Disaccharide mit Lysosomen-angereicherten Fraktionen (Tritosomen) aus der Leber von Arsk-Tieren inkubiert und über RP-HPLC sowie ESI-MS analysiert. Trotz der komplexen enzymatischen Zusammensetzung der Tritosomen mit mehr als 60 bekannten lysosomalen Hydrolasen (Lübke *et al.*, 2009) konnte bei Arsk-Defizienz keine enzymatische Aktivität gegenüber der angebotenen Substrate nachgewiesen werden (Abb. 50A). Die Inkubation der Substrate mit Wildtyp-Tritosomen hingegen führte neben dem Signal des einfach-desulfatierten Substrats, wie es bereits nach der Inkubation mit rARSK gezeigt werden konnte, zu einem weiterführenden *in vitro* Abbau des Disaccharid-Substrats durch die Enzyme der lysosomalen Fraktionen bis zum N-Acetylglucosamin-AMAC Monosaccharid (Abb. 50B/C). Das Vorhandensein des desulfatierten Monosaccharids lässt sich mit dem sequenziellen Abbau am Heparansulfat erklären, der inhibiert wird sobald die Funktion eines am Abbau der GAG-Kette beteiligten Enzyms ausbleibt, wie es bei einer Vielzahl von MPS-Erkrankungen beobachtet werden kann (Clarke *et al.*, 1997, Garcia *et al.*, 2007, Tomatsu *et al.*, 2003, Kowalewski *et*

al., 2012). Bemerkenswerterweise kann der sequenzielle Abbau bis zum Monosaccharid durch Arsk-defiziente Tritosomen durch Zugabe von rARSK vollständig wiederhergestellt werden. Somit belegt der ausbleibende Umsatz der Disaccharide nach Inkubation mit Arsk-defizienten Tritosomen die hohe Substratspezifität und fehlende funktionelle Redundanz der vorliegenden Enzyme. Ferner enthielten die zum Verdau eingesetzten Tritosomen die Aktivität des Enzyms β -D-Glucuronidase wodurch der Umsatz bis zum Monosaccharid ermöglicht wurde. Sowohl die rekombinante humane ARSK als auch die in Wildtyp-Tritosomen vorhandene murine Arsk-Form war in der Lage das angebotene AMAC-markierte Disaccharid-Substrat enzymatisch umzusetzen, wobei der AMAC-Label keinen offensichtlichen störenden Einfluss ausübte. Diese Erkenntnisse bestätigen nicht nur die Funktion der Arsk als am GAG-Abbau beteiligte Glucuronat-2-Sulfatase, sondern ermöglicht methodisch einen neuen Ansatz zur spezifischen Analyse des GAG-Abbaus anhand der AMAC-Markierung ausgehend von Di- oder ggf. auch längeren Saccharid-Einheiten.

6.1.5 Generierung von 2-O-Sulfatierungen an GAGs

Die Sulfatierung von Glykosaminoglykanen ist für die Ausübung ihrer physiologischen Funktion essentiell. In Eukaryoten katalysieren etwa 10 membranassoziierte Sulfotransferasen die Sulfatierung von Glykosaminoglykanen (Chapman *et al.*, 2004). Mechanistisch katalysieren Sulfotransferasen den Transfer von Sulfat vom Donor 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS), welches im Cytosol aus ATP und anorganischem Sulfat erzeugt wird, auf das GAG-Akzeptorsubstrat (Venkatachalam, 2003; Bojarova und Williams, 2008). Es ist bekannt, dass während der GAG-Biosynthese 2-O-Sulfatierungen vor den finalen 3-O-Sulfatierungen eingeführt werden (Kusche *et al.*, 1988). Bisher wurden zwei Sulfotransferasen, die Heparansulfat-2-O-Sulfotransferase (HS2ST, oder 2OST) und die Uronyl-2-Sulfotransferase (UST) beschrieben, die eine für die Arsk spezifische 2-O-Sulfatierung von GAGs übernehmen könnte und zwischen Heparan- (HS) und Chondroitin- (CS) bzw. Dermatan-sulfat (DS) unterscheiden, wie nachstehend erläutert.

Die HS2ST katalysiert die Übertragung von Sulfatgruppen auf Glucuronsäure und Iduronsäure während der Heparansulfat-Biosynthese und wurde bisher in neun Organismen, darunter Mensch, Maus, Fruchtfliege und Fadenwurm, identifiziert. Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) mit HS als Hauptbestandteil umfassen eine Proteinfamilie der am häufigsten vorkommenden Proteine auf der Zelloberfläche und übernehmen durch Interaktion mit einer Vielzahl von Liganden wie Wachstumsfaktoren eine essentielle Rolle in der Entwicklung von Organismen. So wurde gezeigt, dass die Signalgebung über Mitglieder der Wingless-, Hedgehog- und Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF)-Familien von Molekülen in physiologischen Konzentrationen nicht nur von der Anwesenheit von HS-Ketten abhängt, sondern auch von bestimmten Strukturmodifikationen innerhalb der HS-Kette (Baege und Perrimon, 2000). Wie wichtig die 2-O-Sulfatierung am HS ist, zeigt auch das Hs2st-Mausmodell, bei dem durch eine bilaterale Nierenagenesie der Tod kurz nach der Geburt eintritt (Wilson *et al.*, 2003). Ferner konnten Skelette von Hs2st-defizienten Tieren von ihren Geschwistertieren bereits ab Tag 14.5 nach Befruchtung durch übermäßige Mineralisierung und Verkürzung der skelettalen Strukturen unterschieden werden (Merry *et al.*, 2001). Erwartungsgemäß führt die Überexpression von murinem Hs2st in HEK293-Zellen zu einem massiven Anstieg der GlcA-2-O-Sulfatierungen (Rong *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Erkenntnis könnte ein *knock-in*-Mausmodell mit gesteigerter 2-O-Sulfotransferasen-Aktivität ein zukünftiges Projekt darstellen um den im Arsk-Mausmodell beobachteten Phänotyp zu induzieren. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass HS2ST bevorzugt Iduronsäure modifiziert und nur eine begrenzte Aktivität gegenüber Glucuronsäure aufweist wodurch es höchstwahrscheinlich zu artifiziellen Befunden in diesem Ansatz kommen könnte (Liu *et al.*, 2014).

Bei der Uronyl-2-Sulfotransferase (UST) handelt es sich um ein weitestgehend unerforschtes Enzym, welches bisher nur in Mensch und Maus identifiziert wurde und für die Übertragung der 2-O-Sulfatierungen auf Glucuronat des Chondroitinsulfats sowie auf Iduronat des Dermatansulfats verantwortlich ist (Kobayashi *et al.*, 1999). Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPGs) sind vor allem im ZNS in Form von Aggrecan, Versican, Neurocan sowie weiteren

Proteinen zu finden, wo sie an der Bindung und Blockierung verschiedener Liganden und der Präsentation von Molekülen an der Zelloberfläche beteiligt sind (Laabs *et al.*, 2005). Während der Hirn-Entwicklung wird in der Phase der neuronalen Zellmigration anhand CS-reicher GAGs die Wanderungsrichtung vieler Zellen festgelegt (Kubota *et al.*, 1990). Mögliche weitere neurologische Funktionen von CSPGs liegen in der Plastizitätreifung diverser Hirnregionen sowie in der lokalen Rekrutierung von CSPGs zur Wundheilung nach einer Läsion des ZNS (Silver und Miller, 2004).

6.1.6 Einordnung des Arsk-Mausmodells im Vergleich zu anderen Sulfatase-defizienten Mausmodellen

Nach derzeitigem Kenntnisstand kann die Defizienz jeder der am GAG-Abbau beteiligten lysosomalen Sulfatasen einem spezifischen, durch die Akkumulation von nicht degradiertem Speichermaterial bestimmten Phänotyp zugeordnet werden, die hier bereits in Form verschiedener Mukopolysaccharidosen diskutiert wurden. Eine Ausnahme stellt die Arylsulfatase A (ARSA)-Defizienz dar, die mit Cerebrosid-3-Sulfat als Lipidsubstrat zu der Erkrankung metachromatische Leukodystrophie (MLD) führt, was sowohl im Mausmodell, als auch im Menschen gezeigt wurde (Hess *et al.*, 1996, Matzner *et al.*, 2005). Die Akkumulation von Speichermaterial führt häufig zu einer zellulären Gegenreaktion was anhand der Zunahme strukturell relevanter lysosomaler Membranproteine wie Lamp1 verfolgt werden kann. Infolge dessen kommt es zu einer Zunahme des Zellvolumens und einer pathologisch bedingten Vergrößerung der Organe (Organomegalie) endet (Coutinho *et al.*, 2012). Die als Mukopolysaccharidosen bezeichneten Krankheitsformen führen durch den Defekt eines der am GAG-Abbau beteiligten Enzyme zu einem auffälligen klinischen Phänotyp mit skelettaler und neurologischer Beteiligung (Neufeld and Muenzer, 2001). Faktoren wie die Art und Häufigkeit des primären Speichermaterials als auch die Restaktivität des defekten Enzyms beeinflussen die Ausprägung sowie den Verlauf der Krankheit maßgeblich. Beispielsweise führt ein Defekt der Heparan-*N*-Sulfatase (Sulfamidase) zu MPS-IIIA (Sanfilippo A-Syndrom), bei der es durch Akkumulation von

Heparansulfat zu einem massiven Speicherphänotyp kommt, der sich im Mausmodell bereits nach 7-10 Monaten letal auswirkt (Bhaumik *et al.*, 1999). Das aus MPS-IIIA-Geweben isolierte Heparansulfat konnte dabei anhand charakteristischer NRE-Strukturen identifiziert und mit rekombinanter humaner Sulfamidase degradiert werden. Andere, auch an der HS-Degradation beteiligten lysosomalen Hydrolasen wiesen dabei keine, oder nur schwach erhöhte Aktivitäten auf (Mason *et al.*, 2006).

Ein Defekt, der zur Arsk nächst-verwandten Iduronat-2-Sulfatase (Ids), die das epimere 2-O-Substrat umsetzt, führt durch die Akkumulation von partiell abgebautem Dermatan- und Heparansulfat zu MPS-II (Clarke *et al.*, 1997). Das Ids-Mausmodell zeigt dabei eine massiv erhöhte GAG-Ausscheidung im Urin, die Vergrößerung der viszeralen Organe sowie skelettale Fehlbildungen und konnte für die Etablierung von Enzymersatztherapien eingesetzt werden (Muenzer *et al.*, 2002, Garcia *et al.*, 2007).

Diese Beispiele zeigen, dass Mausmodelle mit Defizienzen einzelner lysosomaler Sulfatasen häufig einen schweren und progressiven Phänotyp aufweisen, der aufgrund fehlender enzymatischer Funktion beim Abbau eines spezifischen Substrats zu dem beobachtetem Phänotyp führt. Im Fall des Arsk-Mausmodells wurde, anders als ursprünglich angenommen, ein nur sehr milder Phänotyp diagnostiziert, der sich von allen bisher bekannten MPS-Typen unterscheidet und daher zukünftig als MPS-IIIF bezeichnet werden sollte. Auch die Tatsache, dass bereits vor über 30 Jahren Shaklee *et al.* (1985) anhand von Fibroblasten-Präparationen IDS-defizienter MPS-II Patienten eine spezifische Glucuronat-2-Sulfatase-Aktivität beschreiben konnte, aber erst unsere Arbeitsgruppe 2013 diese Aktivität der Arsk zuordnen konnte, spricht für einen sehr milden und bisher noch nicht beschriebenen Krankheitsverlauf. Shaklee *et al.* (1985) vermutete darüberhinaus, dass sich aufgrund der selten auftretenden 2-O-Sulfatierungen in den Glucuronsäuren (GlcA) am Heparan- und Chondroitinsulfat ein Defekt der GDS-Aktivität möglicherweise nicht durch pathophysiologische Symptome äußern wird. Ergebnisse dieser Arbeit konnten eine funktionelle Redundanz anderer lysosomaler Hydrolasen aus Tritosomen-Präparationen hinsichtlich der Aktivität gegenüber den untersuchten synthetischen Disaccharid-Substraten ausschließen. Auch

6. DISKUSSION

ein Vergleich der absoluten GAG-Speichermenge in der Arsk-Maus mit den MPS-IIIA- und MPS-IIIE-Mausmodellen, die eine 8-fach bzw. 3-fach höhere GAG-Speicherung aufweisen, macht deutlich, dass für die Arsk-Maus kein auffälliger Phänotyp zu erwarten ist.

Zum derzeitigen Zeitpunkt sind weder natürlich auftretende Tiermodelle, noch ARSK-defiziente Patienten bekannt. Denkbar ist auch eine erst sehr späte Manifestation im Menschen, die durch Symptome anderer, altersbedingter Erkrankungen überlagert wird und im Mausmodell aufgrund der vergleichsweise kurzen Lebenszeit nicht darzustellen ist. Durch den in dieser Arbeit erlangten Kenntnisstand könnte die Suche nach ARSK-defizienten Patienten jedoch deutlich erleichtert werden.

7 Ausblick

Die Charakterisierung des Arsk-Mausmodells lieferte wertvolle Einblicke in die physiologische Funktion der Arsk. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten die Glucuronat-2-Sulfatase-Aktivität (GDS) der Arsk bestätigen, was sich sowohl in der intrazellulären Akkumulation der GAGs Chondroitin- und Heparansulfat als auch anhand spezifischer gespeicherter NRE-Strukturen widerspiegelt.

Angesichts der Beteiligung der Arsk an der Degradation von GAGs und fehlender funktioneller Redundanz anderer Enzyme in Lysosomen-angereicherten Fraktionen (Tritosomen) fällt der vorgefundene Phänotyp der Arsk-Maus, verglichen mit Defekten anderer lysosomaler Sulfatasen, sehr mild aus. Möglicherweise sind bislang nicht untersuchte Gewebe und Zelltypen stärker betroffen und müssen Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Das im Arsk-Mausmodell auftretende elektronendichte Material, welches bislang vor allem in der Niere zu finden war, sollte ebenso weiterführenden Analysen unterzogen werden mit dem Ziel die molekulare Zusammensetzung des Materials aufzuklären.

Da kommerziell erhältliche ARSK-Antikörper die murine Arsk-Form nicht erkannten, könnte die Erzeugung eines für diese Arsk-Form spezifischen Antikörpers (AK) weitere immunhistochemische Analysen am Mausmodell ermöglichen. Hierfür müsste zunächst die murine Arsk-Form rekombinant hergestellt und durch Immunisierung von Kaninchen spezifische Seren gewonnen und getestet werden. Die Erzeugung von monoklonalen AK durch Immunisierung von Arsk-KO-Mäusen stellt eine weitere Möglichkeit dar Arsk-sensitive AK herzustellen.

Nach Aktivierung der Hs2st-Sulfotransferase könnte überprüft werden, ob trotz bevorzugter Hs2st-Aktivität gegenüber Iduronsäure, eine verstärkte 2-O-Sulfatierung auch der Glucuronsäure nachzuweisen ist. Angewandt auf ein transgenes Mausmodell könnte so bei gleichzeitigem Arsk-*knockout* die lysosomale Speicherpathologie als Folge einer GDS-Defizienz sensitiver und frühzeitiger erkannt werden, was für die Diagnostik von MPS-Patienten mit

7. AUSBLICK

adultem Krankheitsverlauf wichtig sein könnte.

Auch die Rolle der Arsk in Ossifikationsprozessen muss weiter hinterfragt werden. Besonders gilt es die hohe Genotyp-unabhängige experimentelle Varianz in den Knochen-Analysen zu verstehen.

Die Etablierung der hier vorgestellten AMAC- und GRIL-LC/MS-basierten Assays ermöglichen nun die spezifische Identifikation von ARSK-Defizienz und erleichtert damit die Suche nach potentiellen ARSK-defizienten Individuen. Die Zuordnung der GDS-Aktivität zur Arsk vervollständigt alle am Abbau von Heparansulfat und Chondroitinsulfat beteiligen lysosomalen Enzyme. Mit allen zur Verfügung stehenden Sulfatasen, Glykosidasen und der N-Acetyltransferase kann der postulierte konsekutive GAG-Abbau *in vitro* nachvollzogen werden. Nach Synthese spezifischer Substrate gilt es den experimentellen Ablauf und die Markierung der Substrate zu etablieren.

Literatur

- [1] Aldenhoven, M., Sakkers, R. J. B., Boelens, J., De Koning, T. J., Wulffraat, N. M. (2009). Musculoskeletal manifestations of lysosomal storage disorders. *Annals of the rheumatic diseases*, 68(11), 1659-1665.
- [2] Ashworth, J. L., Biswas, S., Wraith, E., Lloyd, I. C. (2006). Mucopolysaccharidoses and the eye. *Survey of ophthalmology*, 51(1), 1-17.
- [3] Axelsson, J., Xu, D., Kang, B. N., Nussbacher, J. K., Handel, T. M., Ley, K., Esko, J. D. (2012). Inactivation of heparan sulfate 2-O-sulfotransferase accentuates neutrophil infiltration during acute inflammation in mice. *Blood*, 120(8), 1742-1751.
- [4] Baeg, G. H., Perrimon, N. (2000). Functional binding of secreted molecules to heparan sulfate proteoglycans in *Drosophila*. *Current opinion in cell biology*, 12(5), 575-580.
- [5] Bailey, L. (2008). An overview of enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Online J. Issues Nurs*, 13(1).
- [6] Beesley, C. E., Concolino, D., Filocamo, M., Winchester, B. G., Strisciuglio, P. (2007). Identification and characterisation of an 8.7 kb deletion and a novel nonsense mutation in two Italian families with Sanfilippo syndrome type D (mucopolysaccharidosis IIID). *Molecular genetics and metabolism*, 90(1), 77-80.
- [7] Bellettato CM, Scarpa M. Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis* 2010; 33: 347–62.
- [8] Bhaumik M., Muller V.J. , Rozaklis T., Linda J. (1999): A mouse model for mucopolysaccharidosis type III A (Sanfilippo syndrome). *Glycobiology*, 9: 1389-1396.
- [9] Bonnet, R. (2004). Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(1), 1-14.
- [10] Bonten, E. J., Wang, D., Toy, J. N., Mann, L., Mignardot, A., Yogalingam, G., d'Azzo, A. (2004). Targeting macrophages with baculovirus-produced lysosomal enzymes: implications for enzyme replacement therapy of the glycoprotein storage disorder galactosialidosis. *The FASEB journal*, 18(9), 971-973.

LITERATUR

- [11] Bonten, E. J., Annunziata, I., d'Azzo, A. (2014). Lysosomal multienzyme complex: pros and cons of working together. *Cellular and molecular life sciences*, 71(11), 2017-2032.
- [12] Bojarova, P., Williams, S. J. (2008). Sulfotransferases, sulfatases and formylglycine-generating enzymes: a sulfation fascination. *Current opinion in chemical biology*, 12(5), 573-581.
- [13] Borges, F. T., Michelacci, Y. M., Aguiar, J. A., Dalboni, M. A., Garófalo, A. S., Schor, N. (2005). Characterization of glycosaminoglycans in tubular epithelial cells: calcium oxalate and oxalate ions effects. *Kidney international*, 68(4), 1630-1642.
- [14] Burn, S. F. (2012). Detection of β -galactosidase activity: X-gal staining. In *Kidney Development* (pp. 241-250). Humana Press, Totowa, NJ.
- [15] Caciotti, A., Garman, S. C., Rivera-Colón, Y., Procopio, E., Catarzi, S., Ferri, L., Battini, R. (2011). GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: an update on genetic alterations and clinical findings. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1812(7), 782-790.
- [16] Caciotti, A., Catarzi, S., Tonin, R., Lugli, L., Perez, C. R., Michelakakis, H., Morrone, A. (2013). Galactosialidosis: review and analysis of CTSA gene mutations. *Orphanet journal of rare diseases*, 8(1), 114.
- [17] Canuel, M., Korkidakis, A., Konnyu, K., Morales, C. R. (2008). Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H. *Biochemical and biophysical research communications*, 373(2), 292-297.
- [18] Caruso, R. C., Kaiser-Kupfer, M. I., Muenzer, J., Ludwig, I. H., Zasloff, M. A., Mercer, P. A. (1986). Electroretinographic findings in the mucopolysaccharidoses. *Ophthalmology*, 93(12), 1612-1616.
- [19] Casadaban, M. J., Chou, J., Cohen, S. N. (1980). In vitro gene fusions that join an enzymatically active beta-galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: Escherichia coli plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals. *Journal of bacteriology*, 143(2), 971-980.
- [20] Chapman, E., Best, M. D., Hanson, S. R., Wong, C. H. (2004). Sulfotransferases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angewandte Chemie International Edition*, 43(27), 3526-3548.

-
- [21] Christgau S, Bitsch-Jensen O, Hanover Bjarnason N, et al: Serum Cross-Laps for monitoring the response in individuals undergoing antiresorptive therapy. *Bone* 2000 May;26(5):505-511
- [22] Clarke, L. A. (2011). Pathogenesis of skeletal and connective tissue involvement in the mucopolysaccharidoses: glycosaminoglycan storage is merely the instigator. *Rheumatology*, v13-v18.
- [23] Clarke, L. A., Russell, C. S., Pownall, S., Warrington, C. L., Borowski, A., Dimmick, J. E., Jirik, F. R. (1997). Murine mucopolysaccharidosis type I: targeted disruption of the murine α -L-iduronidase gene. *Human Molecular Genetics*, 6(4), 503-511.
- [24] Clarke, L. A., Hollak, C. E. (2015). The clinical spectrum and pathophysiology of skeletal complications in lysosomal storage disorders. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29(2), 219-235.
- [25] Coutinho, M. F., Lacerda, L., Alves, S. (2012). Glycosaminoglycan storage disorders: a review. *Biochemistry research international*, 2012.
- [26] Cox, T., Lachmann, R., Hollak, C., Aerts, J., van Weely, S., Hrebíček, M., Gow, I. (2000). Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate biosynthesis. *The Lancet*, 355(9214), 1481-1485.
- [27] Cuervo, A. M., Mann, L., Bonten, E. J., d'Azzo, A., Dice, J. F. (2003). Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *The EMBO Journal*, 22(1), 47-59.
- [28] Cuervo, A. M., Dice, J. F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, 273(5274), 501-503.
- [29] Cuppoletti, J., Aures-Fischer, D., Sachs, G. (1987). The lysosomal H⁺ pump: 8-azido-ATP inhibition and the role of chloride in H⁺ transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 899(2), 276-284.
- [30] Dahms, N. M., Lobel, P., Breitmeyer, J., Chirgwin, J. M., Kornfeld, S. (1987). 46 kd mannose 6-phosphate receptor: cloning, expression, and homology to the 215 kd mannose 6-phosphate receptor. *Cell*, 50(2), 181-192.
- [31] Deakin, J. A., Lyon, M. (2008). A simplified and sensitive fluorescent method for disaccharide analysis of both heparan sulfate and chondroitin/dermatan sulfates from biological samples. *Glycobiology*, 18(6), 483-491.

- [32] Dehecchi, M. C., Melotti, P., Bonizzato, A., Santacatterina, M., Chilosi, M., Cabrini, G. (2001). Heparan sulfate glycosaminoglycans are receptors sufficient to mediate the initial binding of adenovirus types 2 and 5. *Journal of virology*, 75(18), 8772-8780.
- [33] Desnick, R. J., Schuchman, E. H. (2012). Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges. *Annual review of genomics and human genetics*, 13, 307-335.
- [34] D'Hooge, R., Lüllmann-Rauch, R., Beckers, T., Balschun, D., Schwake, M., Reiss, K., Saftig, P. (2005). Neurocognitive and psychotiform behavioral alterations and enhanced hippocampal long-term potentiation in transgenic mice displaying neuropathological features of human α -mannosidosis. *Journal of Neuroscience*, 25(28), 6539-6549.
- [35] d'Azzo, A., Hoogeveen, A., Reuser, A. J., Robinson, D., Galjaard, H. (1982). Molecular defect in combined beta-galactosidase and neuraminidase deficiency in man. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(15), 4535-4539.
- [36] De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochemical Journal*, 60, 604-17.
- [37] De Duve, C. (1969). The peroxisome: a new cytoplasmic organelle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 173(1030), 71-83.
- [38] Dittmer, F., Hafner, A., Ulbrich, E. J., Moritz, J. D., Schmidt, P., Schmahl, W., Figura, K. V. (1998). I-cell disease-like phenotype in mice deficient in mannose 6-phosphate receptors. *Transgenic research*, 7(6), 473-483.
- [39] Dierks, T., Dickmanns, A., Preusser-Kunze, A., Schmidt, B., Mariappan, M., von Figura, K., Rudolph, M. G. (2005). Molecular basis for multiple sulfatase deficiency and mechanism for formylglycine generation of the human formylglycine-generating enzyme. *Cell*, 121(4), 541-552.
- [40] Dierks, T., Lecca, M. R., Schlotterhose, P., Schmidt, B., von Figura, K. (1999). Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases. *The EMBO Journal*, 18(8), 2084-2091.

-
- [41] Dierks, T., Schmidt, B., von Figura, K. (1997). Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(22), 11963-11968.
- [42] Dierks, T., Schlotawa, L., Frese, M. A., Radhakrishnan, K., von Figura, K., Schmidt, B. (2009). Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolipidosis II/III and Niemann–Pick C1 disease—Lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793(4), 710-725.
- [43] Diez-Roux, G., Ballabio, A. (2005). Sulfatases and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 6, 355-379.
- [44] Dierks, T., Dickmanns, A., Preusser-Kunze, A., Schmidt, B., Mariappan, M., von Figura, K., Rudolph, M. G. (2005). Molecular basis for multiple sulfatase deficiency and mechanism for formylglycine generation of the human formylglycine-generating enzyme. *Cell*, 121(4), 541-552.
- [45] Durand, P., Borrone, C., Della Cella, G. (1969). Fucosidosis. *The Journal of pediatrics*, 75(4), 665-674.
- [46] Durand, S., Feldhammer, M., Bonneil, É., Thibault, P., Pshezhetsky, A. V. (2010). Analysis of the biogenesis of heparan sulfate acetyl-CoA: α -glucosaminide N-acetyltransferase provides insights into the mechanism underlying its complete deficiency in mucopolysaccharidosis IIIC. *Journal of biological chemistry*, 285(41), 31233-31242.
- [47] Elliot-Smith, E., Speak, A. O., Lloyd-Evans, E., Smith, D. A., van der Spoel, A. C., Jeyakumar, M., Platt, F. M. (2008). Beneficial effects of substrate reduction therapy in a mouse model of GM1 gangliosidosis. *Molecular genetics and metabolism*, 94(2), 204-211.
- [48] Eskelinen, E. L. (2006). Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular aspects of medicine*, 27(5-6), 495-502.
- [49] Evers, M., Saftig, P., Schmidt, P., Hafner, A., McLoghlin, D. B., Schmahl, W., Peters, C. (1996). Targeted disruption of the arylsulfatase B gene results in mice resembling the phenotype of mucopolysaccharidosis VI. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(16), 8214-8219.
- [50] Ferrari, S., Ponzin, D., Ashworth, J. L., Fahnehjelm, K. T., Summers, C. G., Harmatz, P. R., Scarpa, M. (2010). Diagnosis and management of ophthalmal-

- mological features in patients with mucopolysaccharidosis. *British Journal of Ophthalmology*, bjo-2010.
- [51] Fey, J., Balleininger, M., Borissenko, L. V., Schmidt, B., von Figura, K., Dierks, T. (2001). Characterization of posttranslational formylglycine formation by luminal components of the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 276(50), 47021-47028.
- [52] Flangea, C., Schiopu, C., Sisu, E., Serb, A., Przybylski, M., Seidler, D. G., Zamfir, A. D. (2009). Determination of sulfation pattern in brain glycosaminoglycans by chip-based electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(8), 2489.
- [53] Freeman, C., Hopwood, J. J. (1989). Sanfilippo D syndrome: estimation of N-acetylglucosamine-6-sulfatase activity with a radiolabeled monosulfated disaccharide substrate. *Analytical biochemistry*, 176(2), 244-248.
- [54] Friso, A., Tomanin, R., Alba, S., Gasparotto, N., Puicher, E. P., Fusco, M., Scarpa, M. (2005). Reduction of GAG storage in MPS II mouse model following implantation of encapsulated recombinant myoblasts. *The journal of gene medicine*, 7(11), 1482-1491.
- [55] Figura, K. V., Hasilik, A. (1986). Lysosomal enzymes and their receptors. *Annual review of biochemistry*, 55(1), 167-193.
- [56] Gallegos-Arreola, M. P., Machorro-Lazo, M. V., Flores-Martínez, S. E., Zúñiga-González, G. M., Figuera, L. E., González-Noriega, A., Sanchez-Corona, J. (2000). Urinary glycosaminoglycan excretion in healthy subjects and in patients with mucopolysaccharidoses. *Archives of medical research*, 31(5), 505-510.
- [57] Galjart, N. J., Gillemans, N., Harris, A., van der Horst, G. T., Verheijen, F. W., Galjaard, H., d'Azzo, A. (1988). Expression of cDNA encoding the human "protective protein associated with lysosomal β -galactosidase and neuraminidase: Homology to yeast proteases. *Cell*, 54(6), 755-764.
- [58] Galjart, N. J., Gillemans, N., Harris, A., van der Horst, G. T., Verheijen, F. W., Galjaard, H., d'Azzo, A. (1988). Expression of cDNA encoding the human "protective protein associated with lysosomal β -galactosidase and neuraminidase: Homology to yeast proteases. *Cell*, 54(6), 755-764.
- [59] Galjart, N. J., Gillemans, N., Harris, A., van der Horst, G. T., Verheijen, F. W., Galjaard, H., d'Azzo, A. (1988). Expression of cDNA encoding the

- human “protective protein associated with lysosomal β -galactosidase and neuraminidase: Homology to yeast proteases. *Cell*, 54(6), 755-764.
- [60] Genicot, S. M., Groisillier, A., Rogniaux, H., Meslet-Cladière, L., Barbeyron, T., Helbert, W. (2014). Discovery of a novel iota carrageenan sulfatase isolated from the marine bacterium *Pseudoalteromonas carrageenovora*. *Frontiers in chemistry*, 2, 67.
- [61] Gilkes, J. A., Heldermon, C. D. (2014). Mucopolysaccharidosis III (Sanfilippo Syndrome)-disease presentation and experimental therapies. *Pediatric endocrinology reviews: PER*, 12, 133-140.
- [62] Goldstein, J. L., Brown, M. S., Anderson, R. G., Russell, D. W., Schneider, W. J. (1985). Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. *Annual review of cell biology*, 1(1), 1-39.
- [63] Hagelueken, G., Adams, T. M., Wiehlmann, L., Widow, U., Kolmar, H., Tümmeler, B., Schubert, W. D. (2006). The crystal structure of SdsA1, an alkylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa*, defines a third class of sulfatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(20), 7631-7636.
- [64] Hanson, S. R., Best, M. D., Wong, C. H. (2004). Sulfatasen: Struktur, Mechanismus, biologische Aktivität, Inhibition, Anwendung in Synthesen. *Angewandte Chemie*, 116(43), 5858-5886.
- [65] Henriksen, K., Bollerslev, J., Everts, V., Karsdal, M. A. (2011). Osteoclast activity and subtypes as a function of physiology and pathology—implications for future treatments of osteoporosis. *Endocrine reviews*, 32(1), 31-63.
- [66] Hess, B., Saftig, P., Hartmann, D., Coenen, R., Lüllmann-Rauch, R., Gobel, H. H., De Deyn, P. (1996). Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14821-14826.
- [67] Heldin, P., Laurent, T. C., Heldin, C. H. (1989). Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochemical Journal*, 258(3), 919.
- [68] Hille-Rehfeld, A. (1995). Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, 1241(2), 177-194.

- [69] Hoflack, B., Fujimoto, K., Kornfeld, S. (1987). The interaction of phosphorylated oligosaccharides and lysosomal enzymes with bovine liver cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 262(1), 123-129.
- [70] Holley, R. J., Deligny, A., Wei, W., Watson, H. A., Niñonuevo, M. R., Daggäl, A., Merry, C. L. (2011). Mucopolysaccharidosis type I, unique structure of accumulated heparan sulfate and increased N-sulfotransferase activity in mice lacking α -l-Iduronidase. *Journal of Biological Chemistry*, 286(43), 37515-37524.
- [71] Jackman, H. L., Morris, P. W., Deddish, P. A., Skidgel, R. A., Erdös, E. G. (1992). Inactivation of endothelin I by deamidase (lysosomal protective protein). *Journal of Biological Chemistry*, 267(5), 2872-2875.
- [72] Ilaya, N. T., Evin, G., Masters, C. L., Culvenor, J. G. (2004). Nicastrin expression in mouse peripheral tissues is not co-ordinated with presenilin and is high in muscle. *Journal of neurochemistry*, 91(1), 230-237.
- [73] Jalanko, A., Braulke, T. (2009). Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793(4), 697-709.
- [74] Kakkis, E. D., Muenzer, J., Tiller, G. E., Waber, L., Belmont, J., Passage, M., Hoft, R. (2001). Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis I. *New England Journal of Medicine*, 344(3), 182-188.
- [75] Karamanos, N. K., Hjerpe, A., Tsegenidis, T., Engfeldt, B., Antonopoulos, C. A. (1988). Determination of iduronic acid and glucuronic acid in glycosaminoglycans after stoichiometric reduction and depolymerization using high-performance liquid chromatography and ultraviolet detection. *Analytical biochemistry*, 172(2), 410-419.
- [76] Kasper, D., Dittmer, F., Von Figura, K., Pohlmann, R. (1996). Neither type of mannose 6-phosphate receptor is sufficient for targeting of lysosomal enzymes along intracellular routes. *The Journal of cell biology*, 134(3), 615-623.
- [77] Kertesz, M. A. (2000). Riding the sulfur cycle—metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(2), 135-175.
- [78] Khan, S. R., Kok, D. J. (2004). Modulators of urinary stone formation. *Front Biosci*, 9(629), 1450-1482.

-
- [79] Knaust, A., Schmidt, B., Dierks, T., von Bülow, R., von Figura, K. (1998). Residues critical for formylglycine formation and/or catalytic activity of arylsulfatase A. *Biochemistry*, 37(40), 13941-13946.
- [80] Ko, D. C., Milenkovic, L., Beier, S. M., Manuel, H., Buchanan, J., Scott, M. P. (2005). Cell-autonomous death of cerebellar purkinje neurons with autophagy in Niemann-Pick type C disease. *PLoS genetics*, 1(1), e7.
- [81] Kobayashi, M., Sugumaran, G., Liu, J., Shworak, N. W., Silbert, J. E., Rosenberg, R. D. (1999). Molecular cloning and characterization of a human uronyl 2-sulfotransferase that sulfates iduronyl and glucuronyl residues in dermatan/chondroitin sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 274(15), 10474-10480.
- [82] Kollmann, K., Damme, M., Markmann, S., Morelle, W., Schweizer, M., Hermans-Borgmeyer, I., Käkälä, R. (2012). Lysosomal dysfunction causes neurodegeneration in mucopolipidosis II 'knock-in' mice. *Brain*, 135(9), 2661-2675.
- [83] Kornfeld, R., Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry*, 54(1), 631-664.
- [84] Kornfeld, S. (1992). Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulinlike growth factor II receptors. *Annual review of biochemistry*, 61(1), 307-330.
- [85] Korkotian, E., Schwarz, A., Pelled, D., Schwarzmann, G., Segal, M., Futerman, A. H. (1999). Elevation of intracellular glucosylceramide levels results in an increase in endoplasmic reticulum density and in functional calcium stores in cultured neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 274(31), 21673-21678.
- [86] Kost, T. A., Condreay, J. P., Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology*, 23(5), 567.
- [87] Kowalewski, B., Lamanna, W. C., Lawrence, R., Damme, M., Stroobants, S., Padva, M., D'Hooge, R. (2012). Arylsulfatase G inactivation causes loss of heparan sulfate 3-O-sulfatase activity and mucopolysaccharidosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(26), 10310-10315.

LITERATUR

- [88] Kresse, H. (1973). Mucopolysaccharidosis III A (Sanfilippo A disease): Deficiency of a heparin sulfamidase in skin fibroblasts and leucocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 54(3), 1111-1118.
- [89] Kubota, Y., Morita, T., Kusakabe, M., Sakakura, T., Ito, K. (1999). Spatial and temporal changes in chondroitin sulfate distribution in the sclerotome play an essential role in the formation of migration patterns of mouse neural crest cells. *Developmental dynamics*, 214(1), 55-65.
- [90] Landgrebe, J., Dierks, T., Schmidt, B., von Figura, K. (2003). The human SUMF1 gene, required for posttranslational sulfatase modification, defines a new gene family which is conserved from pro-to eukaryotes. *Gene*, 316, 47-56.
- [91] Lansmann, S., Schuette, C. G., Bartelsen, O., Hoernschemeyer, J., Linke, T., Weisgerber, J., Sandhoff, K. (2003). Human acid sphingomyelinase. *The FEBS Journal*, 270(6), 1076-1088.
- [92] Lamari, F. N., Militopoulou, M., Mitropoulou, T. N., Hjerpe, A., Karamanos, N. K. (2002). Analysis of glycosaminoglycan-derived disaccharides in biologic samples by capillary electrophoresis and protocol for sequencing glycosaminoglycans. *Biomedical Chromatography*, 16(2), 95-102.
- [93] Laplante, M., Sabatini, D. M. (2012). mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 149(2), 274-293.
- [94] Lau, A. A., Hemsley, K. M. (2017). Adeno-associated viral gene therapy for mucopolysaccharidoses exhibiting neurodegeneration. *Journal of Molecular Medicine*, 95(10), 1043-1052.
- [95] Lawrence, R., Olson, S. K., Steele, R. E., Wang, L., Warrior, R., Cummings, R. D., Esko, J. D. (2008). Evolutionary differences in glycosaminoglycan fine structure detected by quantitative glycan reductive isotope labeling. *Journal of Biological Chemistry*, 283(48), 33674-33684.
- [96] Lawrence, B. P., Brown, W. J. (1992). Autophagic vacuoles rapidly fuse with pre-existing lysosomes in cultured hepatocytes. *J Cell Sci*, 102(3), 515-526.
- [97] Lefrancois, S., Zeng, J., Hassan, A. J., Canuel, M., Morales, C. R. (2003). The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *The EMBO journal*, 22(24), 6430-6437.

-
- [98] Lewis, B. P., Green, R. E., Brenner, S. E. (2003). Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(1), 189-192.
- [99] Li, C. Y., Jepsen, K. J., Majeska, R. J., Zhang, J., Ni, R., Gelb, B. D., Schaffler, M. B. (2006). Mice lacking cathepsin K maintain bone remodeling but develop bone fragility despite high bone mass. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(6), 865-875.
- [100] Linhardt, R. J. (2001). Analysis of glycosaminoglycans with polysaccharide lyases. *Current protocols in molecular biology*, 17-13.
- [101] Liu, C., Sheng, J., Krahn, J. M., Perera, L., Xu, Y., Hsieh, P. H., Pedersen, L. C. (2014). Molecular mechanism of substrate specificity for heparan sulfate 2-O-sulfotransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 289(19), 13407-13418.
- [102] Lloyd-Evans, E., Platt, F. M. (2010). Lipids on trial: the search for the offending metabolite in Niemann-Pick type C disease. *Traffic*, 11(4), 419-428.
- [103] Luzio, J. P., Pryor, P. R., Bright, N. A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(8), 622.
- [104] Lübke, T., Lobel, P., Sleat, D. E. (2009). Proteomics of the lysosome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793(4), 625-635.
- [105] Maccari, F., Sorrentino, N. C., Mantovani, V., Galeotti, F., Fraldi, A., Volpi, N. (2017). Glycosaminoglycan levels and structure in a mucopolysaccharidosis IIIA mice and the effect of a highly secreted sulfamidase engineered to cross the blood-brain barrier. *Metabolic brain disease*, 32(1), 203-210.
- [106] Makrypidi, G., Damme, M., Müller-Loennies, S., Trusch, M., Schmidt, B., Schlüter, H. Bräulke, T. (2012). Mannose 6 dephosphorylation of lysosomal proteins mediated by acid phosphatases Acp2 and Acp5. *Molecular and cellular biology*, 32(4), 774-782.
- [107] Mansour, S. L., Thomas, K. R., Deng, C. X., Capecchi, M. R. (1990). Introduction of a lacZ reporter gene into the mouse int-2 locus by homologous recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(19), 7688-7692.

LITERATUR

- [108] Mason, K. E., Meikle, P. J., Hopwood, J. J., Fuller, M. (2006). Characterization of sulfated oligosaccharides in mucopolysaccharidosis type IIIA by electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 78(13), 4534-4542.
- [109] Martins, C., Hulkova, H., Dridi, L., Dormoy-Raclet, V., Grigoryeva, L., Choi, Y., Hamel, E. (2015). Neuroinflammation, mitochondrial defects and neurodegeneration in mucopolysaccharidosis III type C mouse model. *Brain*, 138(2), 336-355.
- [110] Matzner, U., Herbst, E., Hedayati, K. K., Lüllmann-Rauch, R., Wessig, C., Schröder, S., Gieselmann, V. (2005). Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Human molecular genetics*, 14(9), 1139-1152.
- [111] Matzner, U., Breiden, B., Schwarzmann, G., Yaghootfam, A., Fluharty, A. L., Hasilik, A., Gieselmann, V. (2009). Saposin B-dependent reconstitution of arylsulfatase A activity in vitro and in cell culture models of metachromatic leukodystrophy. *Journal of Biological Chemistry*, 284(14), 9372-9381.
- [112] Meehan, T. F., Conte, N., West, D. B., Jacobsen, J. O., Mason, J., Warren, J., Karp, N. (2017). Disease model discovery from 3,328 gene knockouts by The International Mouse Phenotyping Consortium. *Nature genetics*, 49(8), 1231.
- [113] Mehta, A., Beck, M., Sunder-Plassmann, G. (2006). Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview—Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS. *Oxford PharmaGenesis*.
- [114] Markmann, S., Thelen, M., Cornils, K., Schweizer, M., Brocke-Ahmadinejad, N., Willnow, T., Kollmann, K. (2015). Lrp1/LDL Receptor Play Critical Roles in Mannose 6-Phosphate-Independent Lysosomal Enzyme Targeting. *Traffic*, 16(7), 743-759.
- [115] Merry, C. L., Bullock, S. L., Swan, D. C., Backen, A. C., Lyon, M., Bedington, R. S., Gallagher, J. T. (2001). The Molecular Phenotype of Heparan Sulfate in the *Hs2st*^{-/-} Mutant Mouse. *Journal of Biological Chemistry*, 276(38), 35429-35434.
- [116] Martin, T. J., Sims, N. A. (2005). Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends in molecular medicine*, 11(2), 76-81.

-
- [117] Meyer, J. C., Weiss, H., Grundmann, H. P., Würsch, T. G., Schnyder, U. W. (1979). Deficiency of arylsulfatase C in cultured skin fibroblasts of X-linked ichthyosis. *Human genetics*, 53(1), 115-116.
- [118] Montfort, M., Garrido, E., Hopwood, J. J., Grinberg, D., Chabás, A., Vilageliu, L. (2004). Expression and functional characterization of human mutant sulfamidase in insect cells. *Molecular genetics and metabolism*, 83(3), 246-251.
- [119] Morimoto-Tomita, M., Uchimura, K., Werb, Z., Hemmerich, S., Rosen, S. D. (2002). Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49175-49185.
- [120] Müller, I., Kahnert, A., Pape, T., Sheldrick, G. M., Meyer-Klaucke, W., Dierks, T., Usón, I. (2004). Crystal structure of the alkylsulfatase AtsK: insights into the catalytic mechanism of the Fe (II) α -ketoglutarate-dependent dioxygenase superfamily. *Biochemistry*, 43(11), 3075-3088.
- [121] Muenzer, J., Lamsa, J. C., Garcia, A., Dacosta, J., Garcia, J., Treco, D. A. (2002). Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a preliminary report. *Acta paediatrica*, 91(s439), 98-99.
- [122] Nnah, I. C., Khayati, K., Dobrowolski, R. (2015). Cellular metabolism and lysosomal mTOR signaling. *Cell death in therapy*, 1(1).
- [123] Oussoren, E., Brands, M. M. M. G., Ruijter, G. J. G., van der Ploeg, A. T., Reuser, A. J. J. (2011). Bone, joint and tooth development in mucopolysaccharidoses: relevance to therapeutic options. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1812(11), 1542-1556.
- [124] Peng, J., Schmidt, B., von Figura, K., Dierks, T. (2003). Identification of formylglycine in sulfatases by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry*, 38(1), 80-86.
- [125] Peters, C., Schmidt, B., Rommerskirch, W., Rupp, K., Zühlendorf, M., Vingron, M., von Figura, K. (1990). Phylogenetic conservation of arylsulfatases. cDNA cloning and expression of human arylsulfatase B. *Journal of Biological Chemistry*, 265(6), 3374-3381.

LITERATUR

- [126] Patterson, M. C., Vecchio, D., Prady, H., Abel, L., Wraith, J. E. (2007). Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *The Lancet Neurology*, 6(9), 765-772.
- [127] Pelled, D., Trajkovic-Bodenec, S., Lloyd-Evans, E., Sidransky, E., Schiffmann, R., Futerman, A. H. (2005). Enhanced calcium release in the acute neuronopathic form of Gaucher disease. *Neurobiology of disease*, 18(1), 83-88.
- [128] Parenti, G., Moracci, M., Fecarotta, S., Andria, G. (2014). Pharmacological chaperone therapy for lysosomal storage diseases. *Future medicinal chemistry*, 6(9), 1031-1045.
- [129] Peng, J., Alam, S., Radhakrishnan, K., Mariappan, M., Rudolph, M. G., May, C., Schmidt, B. (2015). Eukaryotic formylglycine-generating enzyme catalyses a monooxygenase type of reaction. *The FEBS journal*, 282(17), 3262-3274.
- [130] Perrimon, N., Bernfield, M. (2001, April). Cellular functions of proteoglycans overview. In *Seminars in cell developmental biology* (Vol. 12, No. 2, pp. 65-67). Academic Press.
- [131] Pfeilschifter, J., Mundy, G. R. (1987). Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(7), 2024-2028.
- [132] Phan, T. C., Xu, J., Zheng, M. H. (2004). Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histology and histopathology*, 19(4), 1325-1344.
- [133] Platt, F. M., Boland, B., van der Spoel, A. C. (2012). Lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol*, 199(5), 723-734.
- [134] Pohlmann, R., Waheed, A., Hasilik, A., Von Figura, K. (1982). Synthesis of phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes is located in the cis part of Golgi apparatus. *Journal of Biological Chemistry*, 257(10), 5323-5325.
- [135] Pshezhetsky, A. V. (2016). Lysosomal storage of heparan sulfate causes mitochondrial defects, altered autophagy, and neuronal death in the mouse model of mucopolysaccharidosis III type C. *Autophagy*, 12(6), 1059-1060.

- [136] Recksiek, M., Selmer, T., Dierks, T., Schmidt, B., von Figura, K. (1998). Sulfatases, trapping of the sulfated enzyme intermediate by substituting the active site formylglycine. *Journal of Biological Chemistry*, 273(11), 6096-6103.
- [137] Reczek, D., Schwake, M., Schröder, J., Hughes, H., Blanz, J., Jin, X., Säftig, P. (2007). LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of β -glucocerebrosidase. *Cell*, 131(4), 770-783.
- [138] Roeser, D., Preusser-Kunze, A., Schmidt, B., Gasow, K., Wittmann, J. G., Dierks, T., Rudolph, M. G. (2006). A general binding mechanism for all human sulfatases by the formylglycine-generating enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(1), 81-86.
- [139] Rome, L. H., Hill, D. F. (1986). Lysosomal degradation of glycoproteins and glycosaminoglycans. Efflux and recycling of sulphate and N-acetylhexosamines. *Biochemical Journal*, 235(3), 707.
- [140] Rohrer, J., Kornfeld, R. (2001). Lysosomal hydrolase mannose 6-phosphate uncovering enzyme resides in the trans-Golgi network. *Molecular biology of the cell*, 12(6), 1623-1631.
- [141] Rong, J., Habuchi, H., Kimata, K., Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M. (2000). Expression of heparan sulphate L-iduronyl 2-O-sulphotransferase in human kidney 293 cells results in increased D-glucuronyl 2-O-sulphation. *Biochemical Journal*, 346(Pt 2), 463.
- [142] Rigante, D., Caradonna, P. (2004). Secondary skeletal involvement in Sanfilippo syndrome. *Qjm*, 97(4), 205-209.
- [143] Russell, C., Hendson, G., Jevon, G., Matlock, T., Yu, J., Aklujkar, M., Clarke, L. A. (1998). Murine MPS I: insights into the pathogenesis of Hurler syndrome. *Clinical genetics*, 53(5), 349-361.
- [144] Ruzo, A., Marcó, S., García, M., Villacampa, P., Ribera, A., Ayuso, E., Bosch, F. (2012). Correction of pathological accumulation of glycosaminoglycans in central nervous system and peripheral tissues of MPSIIIA mice through systemic AAV9 gene transfer. *Human gene therapy*, 23(12), 1237-1246.
- [145] Sarrazin, S., Lamanna, W. C., Esko, J. D. (2011). Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(7), a004952.

- [146] Schiattarella, G. G., Cerulo, G., De Pasquale, V., Cocchiario, P., Paciello, O., Avallone, L., Perrino, C. (2015). The murine model of mucopolysaccharidosis IIIB develops cardiopathies over time leading to heart failure. *PloS one*, 10(7), e0131662.
- [147] Schultz, M. L., Tecedor, L., Chang, M., Davidson, B. L. (2011). Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends in neurosciences*, 34(8), 401-410.
- [148] Scott, H. S., Litjens, T., Nelson, P. V., Thompson, P. R., Brooks, D. A., Hopwood, J. J., Morris, C. P. (1993). Identification of mutations in the alpha-L-iduronidase gene (IDUA) that cause Hurler and Scheie syndromes. *American journal of human genetics*, 53(5), 973.
- [149] Scriver, C. R. (Ed.). (2001). *The metabolic molecular bases of inherited disease* (Vol. 4). New York; Montreal: McGraw-Hill.
- [150] Sestito S, Ceravolo F, Falvo F, *et al.*, Pathobiological insights into the newly targeted therapies of lysosomal storage disorders. *J Pediatr Biochem* 2016; 6: 30–38.
- [151] Settembre, C., Fraldi, A., Jahreiss, L., Spampinato, C., Venturi, C., Medina, D., Ballabio, A. (2007). A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Human molecular genetics*, 17(1), 119-129.
- [152] Settembre, C., De Cegli, R., Mansueto, G., Saha, P. K., Vetrini, F., Viskis, O., Wollenberg, A. C. (2013). TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nature cell biology*, 15(6), 647.
- [153] Settembre, C., Zoncu, R., Medina, D. L., Vetrini, F., Erdin, S., Erdin, S., Facchinetti, V. (2012). A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO journal*, 31(5), 1095-1108.
- [154] Sardiello, M., Annunziata, I., Roma, G., Ballabio, A. (2005). Sulfatases and sulfatase modifying factors: an exclusive and promiscuous relationship. *Human Molecular Genetics*, 14(21), 3203-3217.
- [155] Sardiello, M., Ballabio, A. (2009). Lysosomal enhancement: a CLEAR answer to cellular degradative needs.
- [156] Schwake, M., Schröder, B., Saftig, P. (2013). Lysosomal membrane proteins and their central role in physiology. *Traffic*, 14(7), 739-748.

-
- [157] Silver, J., Miller, J. H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nature reviews neuroscience*, 5(2), 146.
- [158] Simonaro, C. M., D'Angelo, M., He, X., Eliyahu, E., Shtraizent, N., Haskins, M. E., Schuchman, E. H. (2008). Mechanism of glycosaminoglycan-mediated bone and joint disease: implications for the mucopolysaccharidoses and other connective tissue diseases. *The American journal of pathology*, 172(1), 112-122.
- [159] Simonaro, C. M., D'angelo, M., Haskins, M. E., Schuchman, E. H. (2005). Joint and bone disease in mucopolysaccharidoses VI and VII: identification of new therapeutic targets and biomarkers using animal models. *Pediatric research*, 57(5 Part 1), 701.
- [160] Sly, W. S., Fischer, H. D. (1982). The phosphomannosyl recognition system for intracellular and intercellular transport of lysosomal enzymes. *Journal of cellular biochemistry*, 18(1), 67-85.
- [161] Sleat, D. E., Zheng, H., Qian, M., Lobel, P. (2006). Identification of sites of mannose 6-phosphorylation on lysosomal proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(4), 686-701.
- [162] Sims, Natalie A., and T. John Martin. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit." *BoneKEy reports* 3 (2014).
- [163] Spear, P. G., Shieh, M. T., Herold, B. C., WuDunn, D., Koshy, T. I. (1992). Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus. In *Heparin and related polysaccharides* (pp. 341-353). Springer, Boston, MA.
- [164] Stein, M., Zijderhand-Bleekemolen, J. E., Geuze, H., Hasilik, A., Figura, K. V. (1987). Mr 46,000 mannose 6-phosphate specific receptor: its role in targeting of lysosomal enzymes. *The EMBO journal*, 6(9), 2677-2681.
- [165] Stromhaug, P. E., Klionsky, D. J. (2001). Approaching the molecular mechanism of autophagy. *Traffic*, 2(8), 524-531.
- [166] Strømhaug, P. E., Seglen, P. O. (1993). Evidence for acidity of prelysosomal autophagic/endocytic vacuoles (amphisomes). *Biochemical Journal*, 291(Pt 1), 115.

LITERATUR

- [167] Skarnes, W. C., Rosen, B., West, A. P., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., Jackson, D. (2011). A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*, 474(7351), 337.
- [168] Tate, M. L. K., Adamson, J. R., Tami, A. E., Bauer, T. W. (2004). The osteocyte. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(1), 1-8.
- [169] Tomatsu, S., Orii, K. O., Vogler, C., Nakayama, J., Levy, B., Grubb, J. H., Montano, A. M. (2003). Mouse model of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase deficiency (Galns^{-/-}) produced by targeted disruption of the gene defective in Morquio A disease. *Human molecular genetics*, 12(24), 3349-3358.
- [170] Toole, B. P., Hascall, V. C. (2002). Hyaluronan and tumor growth. *The American journal of pathology*, 161(3), 745-747.
- [171] Tveit, H., Dick, G., Skibeli, V., Prydz, K. (2005). A proteoglycan undergoes different modifications en route to the apical and basolateral surfaces of Madin-Darby canine kidney cells. *Journal of Biological Chemistry*, 280(33), 29596-29603.
- [172] Ucakturk, E., Akman, O., Sun, X., Baydar, D. E., Dolgun, A., Zhang, F., Linhardt, R. J. (2016). Changes in composition and sulfation patterns of glycoaminoglycans in renal cell carcinoma. *Glycoconjugate journal*, 33(1), 103-112.
- [173] Valenzano, K. J., Khanna, R., Powe Jr, A. C., Boyd, R., Lee, G., Flanagan, J. J., Benjamin, E. R. (2011). Identification and characterization of pharmacological chaperones to correct enzyme deficiencies in lysosomal storage disorders. *Assay and drug development technologies*, 9(3), 213-235.
- [174] Vairo, F., Federhen, A., Baldo, G., Riegel, M., Burin, M., Leistner-Segal, S., Giugliani, R. (2015). Diagnostic and treatment strategies in mucopolysaccharidosis VI. *The application of clinical genetics*, 8, 245.
- [175] Vasikaran, S., Eastell, R., Bruyère, O., Foldes, A. J., Garnero, P., Griesmacher, A., Wahl, D. A. (2011). Markers of bone turnover for the prediction of fracture risk and monitoring of osteoporosis treatment: a need for international reference standards. *Osteoporosis International*, 22(2), 391-420.

- [176] Venkatachalam, K. V. "Human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) Synthase: Biochemistry, Molecular Biology and Genetic Deficiency." *JUBMB life* 55.1 (2003): 1-11.
- [177] Verheijen, F., Brossmer, R., Galjaard, H. (1982). Purification of acid β -galactosidase and acid neuraminidase from bovine testis: evidence for an enzyme complex. *Biochemical and biophysical research communications*, 108(2), 868-875.
- [178] Vitner, E. B., Platt, F. M., Futerman, A. H. (2010). Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 285(27), 20423-20427.
- [179] Volpi, N., Galeotti, F., Yang, B., Linhardt, R. J. (2014). Analysis of glycosaminoglycan-derived, precolumn, 2-aminoacridone-labeled disaccharides with LC-fluorescence and LC-MS detection. *Nature protocols*, 9(3), 541.
- [180] Volpi, N. (2010). High-performance liquid chromatography and on-line mass spectrometry detection for the analysis of chondroitin sulfates/hyaluronan disaccharides derivatized with 2-aminoacridone. *Analytical biochemistry*, 397(1), 12-23.
- [181] Wachs, M. 2009. Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur Rolle der Cysteine des Formylglycin-generierenden Enzyms. Diplomarbeit, Universität Bielefeld.
- [182] Wagner, K. R. (2007). Enzyme replacement for infantile Pompe disease The first step toward a cure. *Neurology*, 68(2), 88-89.
- [183] Westendorf E. (2010): Biochemische und zellbiologische Charakterisierung der humanen Sulfatasen Arylsulfatase J und Arylsulfatase K. Doktorarbeit, Universität Bielefeld.
- [184] West, D. B., Pasumarthi, R. K., Baridon, B., Djan, E., Trainor, A., Griffey, S. M., Lloyd, K. K. (2015). A lacZ reporter gene expression atlas for 313 adult KOMP mutant mouse lines. *Genome research*, 25(4), 598-607.
- [185] Weisstein, J. S., Delgado, E., Steinbach, L. S., Hart, K., Packman, S. (2004). Musculoskeletal manifestations of Hurler syndrome: long-term follow-up after bone marrow transplantation. *Journal of Pediatric Orthopaedics*, 24(1), 97-101.

LITERATUR

- [186] Wiegmann E. M. (2014): Biochemische und funktionelle Charakterisierung der Arylsulfatasen I, J und K. Doktorarbeit, Universität Bielefeld
- [187] Wiegmann, E. M., Westendorf, E., Kalus, I., Pringle, T. H., Lübke, T., Dierks, T. (2013). Arylsulfatase K, a novel lysosomal sulfatase. *Journal of Biological Chemistry*, 288(42), 30019-30028.
- [188] Wilson, V. A., Gallagher, J. T., Merry, C. L. (2002). Heparan sulfate 2-O-sulfotransferase (Hs2st) and mouse development. *Glycoconjugate journal*, 19(4-5), 347-354.
- [189] Wilson, P. J., Morris, C. P., Anson, D. S., Occhiodoro, T., Bielicki, J., Clements, P. R., Hopwood, J. J. (1990). Hunter syndrome: isolation of an iduronate-2-sulfatase cDNA clone and analysis of patient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(21), 8531-8535.
- [190] Wilkinson, F. L., Holley, R. J., Langford-Smith, K. J., Badrinath, S., Liao, A., Langford-Smith, A., Merry, C. L. (2012). Neuropathology in mouse models of mucopolysaccharidosis type I, IIIA and IIIB. *PloS one*, 7(4), e35787.
- [191] Wilson, S., Hashamiyan, S., Clarke, L., Saftig, P., Mort, J., Dejica, V. M., Brömme, D. (2009). Glycosaminoglycan-mediated loss of cathepsin K collagenolytic activity in MPS I contributes to osteoclast and growth plate abnormalities. *The American journal of pathology*, 175(5), 2053-2062.
- [192] Wu, C., Orozco, C., Boyer, J., Leglise, M., Goodale, J., Batalov, S., Hodge, C.L., Haase, J., Janes, J., Huss, J.W., Su, A.I. (2009) BioGPS: An extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biology*. 10(11).
- [193] Yanagishita, M., Hascall, V. C. (1992). Cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol.*
- [194] Zaidi, M. (2007). Skeletal remodeling in health and disease. *Nature medicine*, 13(7), 791.
- [195] Zuber, Z., Jurecka, A., Krol-Zdechlikiewicz, A., Rozdzyńska-Swiatkowska, A., Tylki-Szymanska, A. (2014). Bone metabolism in patients with mucopolysaccharidosis type II. *Reumatologia*, 52(6), 354.

8 Appendix

8.1 ESI-MS-Spektren der AMAC-markierten Disaccharide

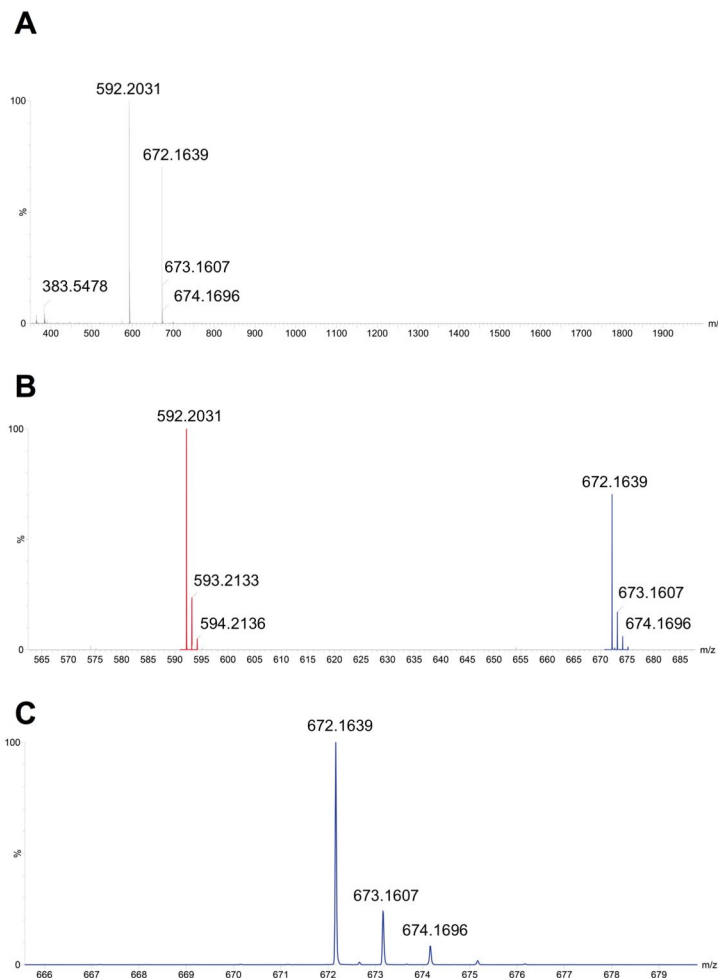


Abbildung 52: **ESI-MS-Spektren des G2A0-AMAC**. Dargestellt ist das Massenspektrum des AMAC-markierten G2A0-Edukts. **(A)** Gesamtspektrum, **(B)** Ausschnitt G2A0 (rot) und Methoden-bedingte Desulfatierung des G2A0 (blau). **(C)** Ausschnittvergrößerung Isotopenmuster G2A0.

8. APPENDIX

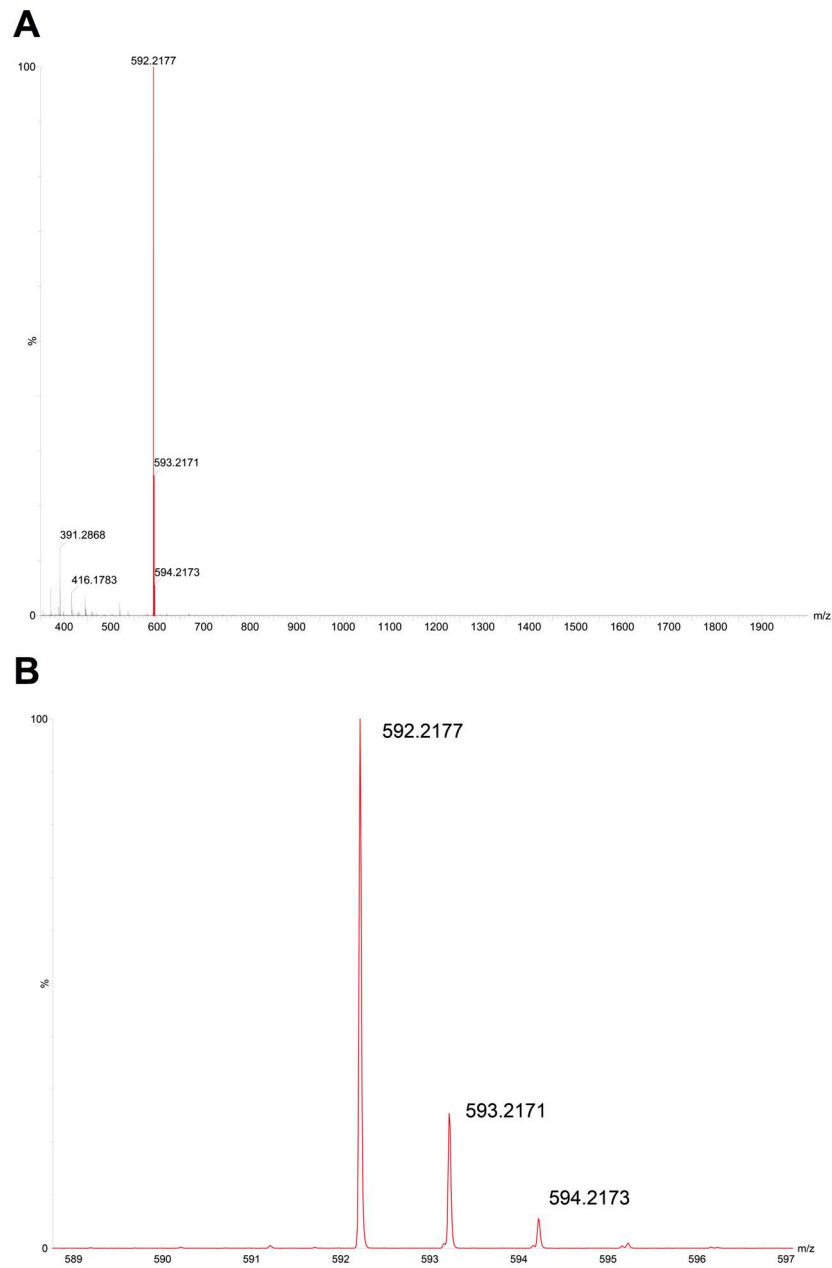


Abbildung 53: **ESI-MS-Spektrum G2A0 nach rArsk-Umsatz.** (A) Gesamtspektrum nach Umsatz des AMAC-markierten G2A0 mit rARSK. Vollständiger Umsatz des Edukts durch Eliminierung der 2-O-Sulfatgruppe. (B) Ausschnittvergrößerung.

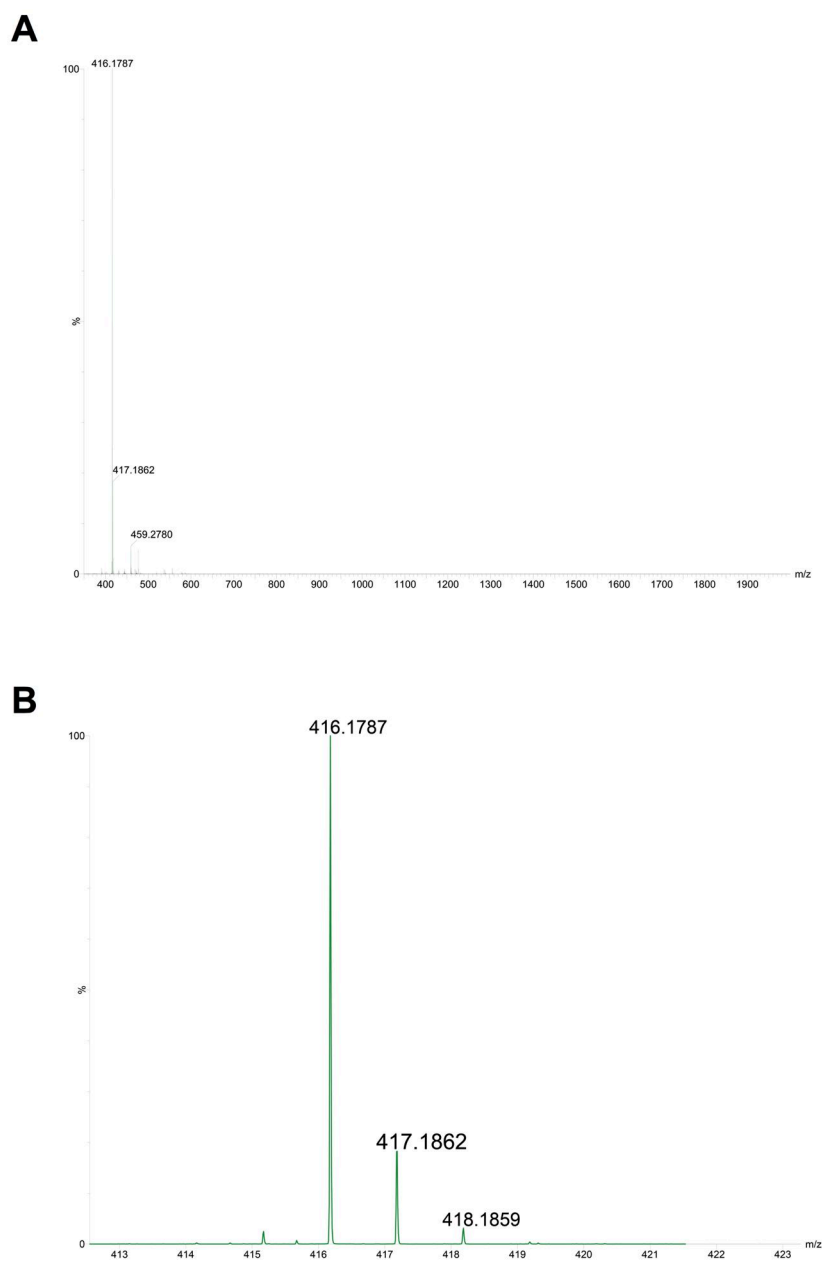


Abbildung 54: ESI-MS-Spektrum G2A0 nach Umsatz mit WT-Tritosomen. (A) Gesamtspektrum. (B) Ausschnittvergrößerung.

8. APPENDIX

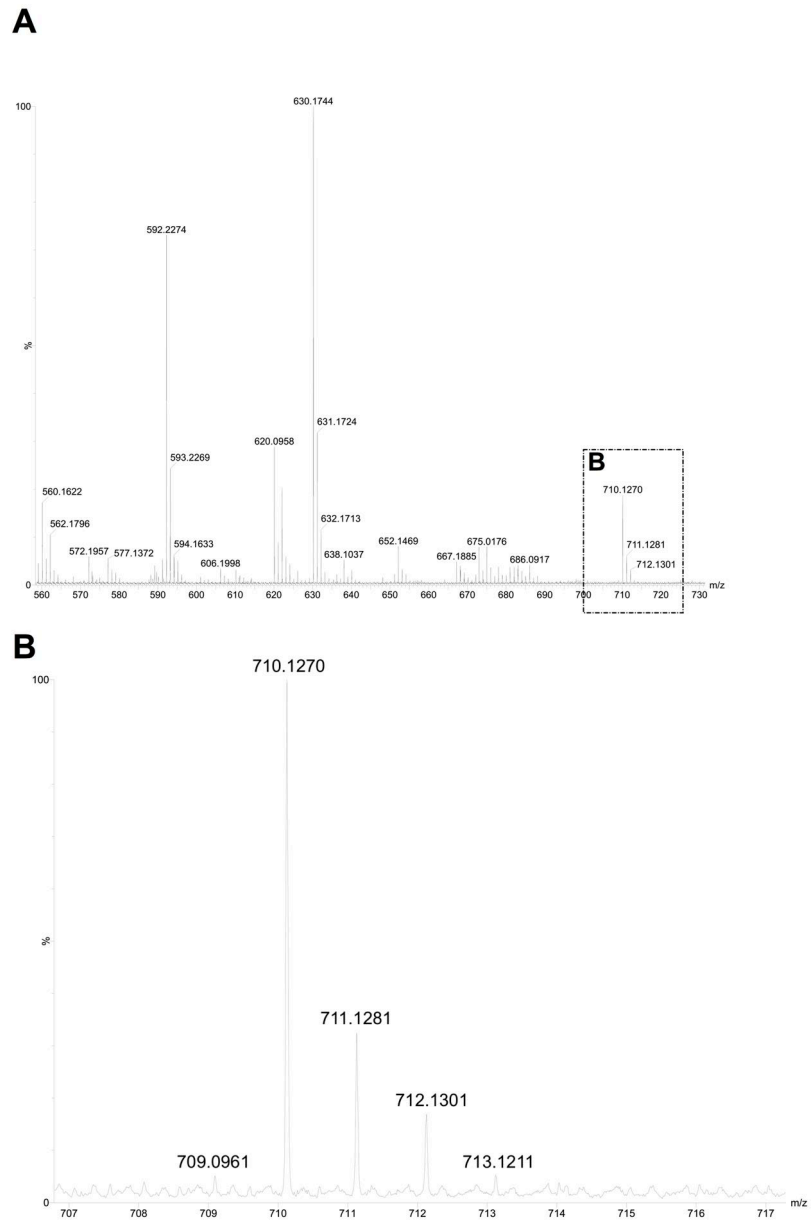


Abbildung 55: **ESI-MS-Spektrum des G2S0-AMAC.** (A) Gesamtspektrum des AMAC-markierten G2S0. (B) Ausschnittvergrößerung.

8.2 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AG	Arbeitsgruppe
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
c	centi
cDNA	copy DNA
dFKS	dialysiertes, hitzeinaktiviertes FKS
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ε	Extinktionskoeffizient (Epsilon)
EC	Enzymklasse (Enzyme Class)
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i> ,	und andere (et alii)
EtOAc	Ethylacetat
FKS	fötale Kelberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer
g	Gramm
Gal	Galaktose
ggf.	gegebenfalls
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-Ethansulfonsäure
His-Tag	Polyhistidin-Markierung eines Proteins
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRP	Horse Radish Peroxidase

H. sapiens	Homo sapiens
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LSD	Lysosomale Speichererkrankung
M	Molar
m	mili
MS	Massenspektroskopie
min	Minuten
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht (<i>Molecular Weight</i>)
μ	mikro
n	nano
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pfu	plaque forming units
pH	pondus Hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA- <i>interference</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
ρ	Dichte (rho)
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden

8. APPENDIX

SP	Signalpeptid
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-T etramethylethylendiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TRIS	TRIS-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen zu Volumen
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht zu Volumen
z.B.	zum Beispiel

Chemische Elemente wurden mit Buchstaben entsprechend dem Periodensystem abgekürzt. Die Aminosäuren wurden entweder im Drei- oder Einbuchstabencode angegeben. Bei einigen Begriffen wurden die englischen Fachtermini verwendet, weil auch in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung dieser Begriffe unüblich und unzureichend ist. Diese sind im Text kursiv hervorgehoben.

Abbildungsverzeichnis

1	Transportwege in eukaryotischen Zellen	9
2	FGE-Konvertierungsmodell	13
3	Transsulfatierungs-Eliminierungs-Mechanismus der Sulfatesterhydrolyse durch Sulfatasen	14
4	Molekulare und zelluläre Charakterisierung der Arylsulfatase K	15
5	Glykosaminoglykan-Struktur	17
6	Chondroitinsulfat- und Heparansulfat-Synthese	19
7	Heparansulfat-Degradation	21
8	Eingesetzte Größenstandards für die Elektrophorese	44
9	Versuchsaufbau einer Dreipunkt-Biegetest Analyse	52
10	Schematischer Aufbau eines Western-Blots	69
11	Tritosomen-Anreicherung	75
12	Mechanismus der Saccharid-Markierung durch 2-Aminoacridon	81
13	Erzeugung des Arsk-Mausmodells	86
14	Validierung des Arsk-KOs und Arsk-Expressionslevel	87
15	LacZ-Reportergen zur Darstellung der Arsk-Expression	88
16	Validierung des Arsk-KOs auf Gewebehomogenaten	89
17	Validierung des Arsk-KOs auf Tritosomen	90
18	Makroskopische Auffälligkeiten der Arsk-KO-Zucht	91
19	Regulation und Aktivität lysosomaler Proteine in Arsk-KO-Mäusen	92
20	Pathologische Befunde in der Arsk-KO-Niere (Lichtmikroskopie)	94
21	Pathologische Befunde in Arsk-KO-Niere (Elektronenmikroskopie)	95
22	Endo-lysosomales System in der Arsk-KO-Niere	96
23	Endo-lysosomales System in der Arsk-KO-Leber	97
24	Neuronales System im Arsk-Mausmodell (drei Monate)	98
25	Neuronales System im Arsk-Mausmodell (zwölf Monate)	99
26	Purkinje-Zellpopulation in Arsk-KO-Tieren	101

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

27	Akkumulation von autofluoreszentem Material im Arsk-KO-Hirn	102
28	Motorische Fähigkeiten und Aktivitätsprofil	103
29	Morris-Wasserlabyrinth	104
30	Angstverhalten und soziale Interaktionen der Arsk-KO-Tiere	105
31	Augenmorphologie des Arsk-Mausmodells	106
32	Erhöhte trabekuläre Knochendichte im Arsk-Mausmodell	108
33	Zelluläre Histomorphometrie in der Arsk-Maus	109
34	Computertomographische-Analyse des Femurknochens im Arsk-Mausmodell	110
35	Toluidinblau-Färbung der Knochenmatrix	111
36	Knorpelmasse des Arsk-Mausmodells	112
37	Mechanische Knochenbelastung des Femurknochens	113
38	ARSK-Produktion und pNCS-Aktivitätsassay	114
39	Alcianblau-Färbung an Hirn und Niere	116
40	DMMB-Assay nach GAG-Extraktion aus Gewebehomogenaten	117
41	GAG-Ausscheidung im Urin von Arsk-KO-Mäusen	119
42	LC/MS-Quantifizierung der GAG-Speichermenge in Arsk-KO-Gewebe	120
43	Sulfatierungsmuster isolierter GAGs im Arsk-Mausmodell	121
44	GRIL-LC/MS-Analyse der Standards G2S0 und G2A0	123
45	NRE-Analyse isolierter GAGs aus Arsk-KO-Hirn	124
46	NRE-Analyse isolierter GAGs aus Arsk-KO-Mäusen	124
47	Speichermaterial-Verdau mit rARSK	126
48	RP-HPLC-Chromatogramm AMAC-markierter Disaccharide	128
49	RP-HPLC Chromatogramm nach rARSK-Umsatz der Disaccharide G2A0 und G2S0	130
50	Umsatz von G2A0-AMAC mit Tritosomen	132
51	Umsatz von G2S0-AMAC mit Tritosomen	133
52	ESI-MS-Spektren des G2A0-AMAC	181
53	ESI-MS-Spektrum G2A0 nach rArsk-Umsatz	182
54	ESI-MS-Spektrum G2A0 nach Umsatz mit WT-Tritosomen	183
55	ESI-MS-Spektrum des G2S0-AMAC	184

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht aller bisher bekannten humanen Sulfatasen.	11
2	Mögliche Beteiligung und Symptome im Fall lysosomaler Speichererkrankungen.	23
3	Übersicht aller bisher bekannter Gendefekte und den daraus resultierenden Mukopolysaccharidosen (mod. nach Muenzer, 2011).	24
4	Zusammensetzung des PCR-Reaktionstubes (Vol. 25 μ L).	53
5	Programm zur Amplifikation eines DNA-Abschnitts im Thermocycler.	54
6	Programm zur Amplifikation während einer Mutagenese.	55
7	Zusammensetzung des PCR-Reaktionstubes (Vol. 25 μ L).	56
8	Programm zur Amplifikation eines DNA-Abschnitts im Thermocycler.	56
9	Zusammensetzung des Mastermix für qPCR (50 μ L).	57
10	cDNA-Synthese iScript Programm (BioRad).	62
11	Zusammensetzung des PCR-Reaktionstubes zur Extraktion genomischer DNA.	63
12	Zusammensetzung de PCR zur Arsk-Genotypisierung.	64
13	Amplifikation der PCR-Produkte für die Arsk-Genotypisierung.	64
14	Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für SDS-PAGE.	68
15	Chromatographieprogramm zur Auftrennung AMAC-markierter Saccharide.	82
16	Laufverhalten der Zuckerstandards.	122
17	Retentionsvolumen [mL] und UV-Absorption [mAU] AMAC-markierter Disaccharide G2A0/G2S0 (100 nmol) nach C18 RP-HPLC.	127

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Dierks bedanken. Er gab mir die Möglichkeit und das Vertrauen an dem spannenden wissenschaftlichen Projekt arbeiten zu können und meine Dissertation in der Arbeitsgruppe Biochemie I anzufertigen zu dürfen. Prof. Dr. Torben Lübke möchte ich neben der fachlichen Unterstützung, für die stetige Bereitschaft während meines gesamten Studiums und den (auch mal lauter werdenden) Diskussion danken. Frau Prof. Dr. Gabriele Fischer von Mollard danke ich herzlichst für die Übernahme des Zweitgutachtens. Meinen Bürokollegen/innen Björn Kowalewski, Arne Linhorst, Lennart Korf und Heike Wolf für die Geduld mit mir und das aufgebrachte Durchhaltevermögen! Ein besonders großer Dank geht an Christian Bollmann und Timo Meyer für alle "wissenschaftlich-relevanten" Gespräche während unserer Kaffeerunden. Mai-Britt und Kerstin als rechte Hand im Labor sowie der Landkarte im Kopf, wo was zu finden ist! Dr. Markus Damme für das offene Ohr sowie die schöne Zeit im Kieler Labor. Frau Prof. Dr. Lüllmann-Rauch für die Übernahme der licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Arsk-Maus sowie die fachliche Kompetenz bei der Einordnung der Ergebnisse. Bastian Ramms für die Durchführung essentieller Experimente während seines Aufenthalts in San Diego. Ohne diese fundamentalen Ergebnisse wäre die hier vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Dr. Pradeep Chopra für die Synthese der in dieser Arbeit eingesetzten Substrate. Dr. Stijn Stroobrandts für die Betreuung der Verhaltenstests. Prof. Dr. Thorsten Schinke und Dr. Anke Jeschke für die Durchführung der skelettalen Analysen an der Arsk-Maus. Prof. Dr. Udo Bartsch für die Analyse der Arsk-Retina. Den Mitarbeitern in der zentralen Tierhaltung der Universität Bielefeld, besonders Christiane Grebe und Marion Knufinke, für die Betreuung der Arsk-Mauszucht. Ein Dank ebenfalls an alle nicht persönlich genannten Kolleginnen und Kollegen der Biochemie I, III und IV.

Christina ♡ für deine Unterstützung und unsere gemeinsame Zeit.

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern Christine und Waldemar.

Selbstständigkeitserklärung

Erklärung gemäß §8 Abs. 1 der Rahmenpromotionsordnung der Universität Bielefeld

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Dezember 2014 bis Juni 2018 in der Arbeitsgruppe Biochemie I an der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. Thomas Dierks angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass mir die gegenwärtige Promotionsordnung der Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld vom 01.07.2011 bekannt ist.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Wörtlich oder dem Sinn nach aus Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen kenntlich gemacht.

Ich bestätige, dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Vermittlungstätigkeiten oder für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht und weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung bei einer anderen Hochschule als Dissertation vorgelegt.

Bielefeld, den

Christof Trabszo