

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen  
Kinderspital der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. C. Klein

Diagnostik der Mucopolysaccharidose IV – Morquio Syndrom: Nachweis und  
Charakterisierung der Enzymaktivität von N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase  
und  $\beta$ -Galactosidase mittels 4-Methylumbelliferyl und Detektion  
pathologischer Proben

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig – Maximilians – Universität zu München

vorgelegt von  
Johannes B. Kesenheimer

aus  
Wasserburg am Inn

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Yoon S. Shin

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Klaus G. Parhofer

Dekan: Prof. Dr.med. Dr. h.c. M. Reiser, FACP, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 02.02.2012

Diese Arbeit widme ich in liebevoller Dankbarkeit meinen Eltern und meiner  
Frau!

*„Der Herr ist der Arzt,  
ich bin nur sein Knecht,  
wenn er es will,  
heil ich Dich recht.“*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Extrazelluläre Matrix .....	1
1.1.1 Glykosaminoglykane.....	2
1.1.1.1 Einteilung.....	3
1.1.1.2 Funktion.....	6
1.1.1.3 Abbau .....	8
1.2 Mucopolysaccharidose IV-A und -B .....	10
1.2.1 GM1-Gangliosidose .....	10
1.2.2 Pathologie .....	11
1.2.3 Klinik und Krankheitsverlauf .....	13
1.2.4 Diagnostik .....	15
1.2.4.1 Molekulargenetik .....	15
1.2.4.2 Pränatal .....	16
1.2.4.3 Urin.....	16
1.2.4.4 Enzymatisch .....	17
1.2.4.5 Genetisch .....	17
1.2.5 Therapie.....	17
<b>2. Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>19</b>
<b>3. Material.....</b>	<b>19</b>
3.1 Untersuchungsmaterialien.....	19
3.2 Geräte.....	19
3.3 Chemikalien.....	20

<b>4. Methoden .....</b>	<b>22</b>
4.1 Probenvorbereitung .....	22
4.1.1 Leukozytenpräparation .....	22
4.1.2 Lymphozytenpräparation .....	23
4.1.3 Kultivierung von Fibroblasten .....	23
4.1.3.1 Anlegen einer Primärkultur .....	23
4.1.3.2 Subkultivierung .....	24
4.1.3.3 Gewinnung des Fibroblasten-Pellets .....	25
4.1.4 Amnionzellen .....	25
4.1.5 Präparation des Zell-Sonifikates .....	25
4.2 Proteinbestimmung nach Lowry .....	26
4.3 Bestimmung der Enzymaktivität der N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase .....	26
4.3.1 Testansatz .....	27
4.3.2 Berechnung der Aktivität .....	28
4.4 Bestimmung der Enzymaktivität der $\beta$ -Galactosidase .....	28
4.4.1 Testansatz .....	28
4.4.2 Berechnung der Aktivität .....	29
<b>5. Patienten .....</b>	<b>29</b>
5.1 Mucopolysaccharidose Typ IV A .....	29
5.2 Mucopolysaccharidose Typ IV B .....	30
<b>6. Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
6.1 Fluoreszenzphotometrische Bestimmung der N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivität .....	30
6.1.1 Inkubationszeitabhängigkeit .....	30
6.1.2 Proteinabhängigkeit .....	32
6.1.3 Stabilitätsmessungen .....	33
6.1.4 Enzymkinetik .....	35
6.1.5 N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivitätsbereich .....	37

6.1.6 Patientenergebnisse Morquio-A	38
6.2 Fluoreszenzphotometrische Bestimmung der $\beta$ -Galactosidase .....	39
6.2.1 Inkubationszeitabhängigkeit .....	39
6.2.2 Proteinabhängigkeit .....	41
6.2.3 Stabilität .....	42
6.2.4 Enzymkinetik .....	42
6.2.5 $\beta$ -Galactosidase-Aktivitätsbereich .....	44
6.2.6 Patientenergebnisse Morquio-B	45
<b>7. Diskussion .....</b>	<b>45</b>
7.1 Bestimmung der N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivität .....	45
7.2 Patientenergebnisse .....	47
7.3 Bestimmung der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität .....	48
7.4 Patientenergebnisse .....	49
<b>8. Zusammenfassung .....</b>	<b>50</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>XXXII</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>XXXIII</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Biosynthese der Glycosaminglycane .....	3
Abbildung 2: Biochemische Struktur der Hyaluronsäure .....	4
Abbildung 3: Biochemische Struktur des Chondroitinsulfates-4 .....	4
Abbildung 4: Biochemische Struktur des Chondroitinsulfates-6 .....	5
Abbildung 5: Biochemische Struktur des Dermatansulfates .....	5
Abbildung 6: Biochemische Struktur des Keratansulfates .....	6
Abbildung 7: Biochemische Struktur des Heparansulfates .....	6
Abbildung 8: Struktureller Aufbau der Proteoglycane .....	8
Abbildung 9: 10jähriger Junge mit MPS IV-A und Röntgenaufnahme der Hand des Jungen .....	14
Abbildung 10: Inkubationszeitabhängigkeit der N-acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivität in Leukozyten (gestrichelte Linie) und Lymphozyten (durchgezogene Linie) .....	31
Abbildung 11: Inkubationszeitabhängigkeit der N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivität in Fibroblasten (gestrichelte Linie) und Amnionzellen (durchgezogene Linie) .....	32
Abbildung 12: Proteinkonzentrationsabhängigkeit der N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivität in Leukozyten (gestrichelte Linie) und Lymphozyten (durchgezogene Linie) .....	33
Abbildung 13: Proteinkonzentrationsabhängigkeit der N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivität in Fibroblasten (gestrichelte Linie) und Amnionzellen (durchgezogene Linie) .....	33
Abbildung 14: Stabilität der N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase in Leukozyten (gestrichelte Linie) und Lymphozyten (durchgezogene Linie) ...	34
Abbildung 15: Stabilität der N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase in Fibroblasten	34

Abbildung 16: Enzymkinetik in Leukozyten, Km-Wert: 0,23 (mM) .....	35
Abbildung 17: Enzymkinetik in Lymphozyten, Km-Wert: 0,26 (mM) .....	36
Abbildung 18: Enzymkinetik in Fibroblasten, Km-Wert: 0,32 (mM) .....	36
Abbildung 19: Inkubationszeitabhängigkeit der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in Leukozyten (gestrichelte Linie) und Lymphozyten (durchgezogene Linie) .....	40
Abbildung 20: Inkubationszeitabhängigkeit der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in Fibroblasten gestrichelte Linie) und Amnionzellen (durchgezogene Linie) .....	40
Abbildung 21: Proteinkonzentrationsabhängigkeit der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in Leukozyten (gestrichelte Linie) und Lymphozyten (durchgezogene Linie) .....	41
Abbildung 22: Proteinkonzentrationsabhängigkeit der $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in Fibroblasten (gestrichelte Linie) und Amnionzellen (durchgezogene Linie) .....	41
Abbildung 23: Stabilität der $\beta$ -Galactosidase in Amnionzellen.....	42
Abbildung 24: Enzymkinetik in Fibroblasten, Km-Wert: 0,13 (mM) .....	43
Abbildung 25: Enzymkinetik in Amnionzellen, Km-Wert: 0,19 (mM) .....	43

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Normwerte für N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivität .....	37
Tabelle 2: N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase- Aktivität in Leukozyten von Patienten mit MPS IV-A und deren Eltern.....	38
Tabelle 3: N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivität in Amnionzellen .....	39
Tabelle 4: Normwerte für $\beta$ -Galactosidase-Aktivität.....	44
Tabelle 5: $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten in Leukozyten eines Patienten mit MPS IV-B und dessen Eltern .....	45
Tabelle 6: Zusammenfassung der eigenen und Literatur-Normwerte.....	47
Tabelle 7: Zusammenfassung der eigenen und Literatur-Normwerte.....	49

## Abkürzungsverzeichnis

### A

Abb.	Abbildung
ASO	Allelic-Specific-Oligohybridization

### C

cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat

### D

Δ	Delta
---	-------

### E

E	Extinktion
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat

### F

FGF	Fibroblast-Growth-Factors
-----	---------------------------

### G

g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykane
°C	Grad Celsius

### H

h	Stunden
H <sub>2</sub> O	Wasser

**K**

Kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
KM	Michaelis-Menten-Konstanten-Wert

**L**

l	Liter
LW	Leerwert

**M**

m=w	männlich = weiblich
m	Milli
M	Molar
min	Minuten
μ	Mikro
MPS	Mucopolysaccharidose
MUF	Methylumbelliferyl

**N**

n	Nano
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumkarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NaK-Tartrat	Natrium-Kalium-Tartrat

**P**

P	Probe
PAS	Periodic-Acid-Schiff-Reaction
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PCR	Polymerase-Chain-Reaction

Prot.	Protein
<b>S</b>	
S	Substrat
SSCP	Single-Strand-Conformation-Polymorphism
ST	Standard
<b>T</b>	
Tab.	Tabelle
<b>U</b>	
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Unit pro Milliliter
<b>V</b>	
V	Volumen
<b>Z</b>	
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

Die Mucopolysaccharidose Typ IV gehört zum Formenkreis der lysosomalen Speichererkrankungen. Ein autosomal-rezessiv vererbter Defekt der Genexpression führt zu einem mehr oder minder ausgeprägten Defizit an lysosomalem Enzym. Die resultierende Akkumulation der nicht gespaltenen hochmolekularen Mucopolysaccharide intra- als auch extrazellulär, führt zunächst zu Funktionsstörungen und schließlich zum Untergang der Zelle. Betroffene leiden vor allem unter skelettalen Veränderungen [10,14,71,117].

Für die synonyme Namensgebung verantwortlich zeichnet der Uruguayer Kinderarzt Luis Morquio, der diese Krankheit 1929 erstmals beschrieb [46]. Manche Autoren fügen den Namen James Brailsfords hinzu, ein englischer Radiologe, der sich massgeblich mit den skelettalen Symptomen der Erkrankung befasste [57]. Heute geht man von einer Inzidenz von 1/100000 (m=w) aus [5,69,71,86]. Man unterscheidet zwei Typen. Typ A beruht auf einem Defekt der N-Acetylgalaktosamin-6-Sulfatase. Der phänotypisch milder ausgeprägte Typ B basiert auf einem Defekt der  $\beta$ -Galaktosidase.

## 1.1 Extrazelluläre Matrix

Ein großer Teil des Volumens von Geweben wird nicht von Zellen beansprucht, der extrazelluläre Raum. Dieser besteht aus einem komplizierten Netzwerk von Makromolekülen, welche die extrazelluläre Matrix (ECM) bilden. Sie besteht aus einer Vielzahl von Proteinen und Polysacchariden, die sich je nach Gewebe in einer Fülle von Formen zusammensetzen können. Die Funktion der ECM beschränkt sich nicht nur auf das Stabilisieren der physikalischen Struktur von Geweben. Sie reguliert das Überleben, die Entwicklung, die Wanderung, die Proliferation, die Form und die Funktion der Zellen, die mit ihr in Kontakt stehen. In den meisten Bindegeweben werden die Matrixmoleküle von Fibroblasten sekretiert, im Knorpel von Chondroblasten und im Knochen von Osteoblasten [53,72].

Es existieren zwei Klassen von extrazellulären Makromolekülen:

- Polysaccharidketten der Glykosaminoglykane (GAG), die in Form von Proteoglycanen kovalent an Proteine gebunden sind.
- Faserproteine: Collagen, Elastin, Fibronectin und Laminin.

### **1.1.1 Glykosaminoglykane**

Die sauren Mucopolysaccharide werden auch als Glykosaminoglykane (GAG) bezeichnet. GAG bestehen aus Disaccharideinheiten, welche 1-4-glykosidisch zu linearen Polysacchariden verbunden sind. Die Disaccharideinheiten setzen sich zusammen aus Glucuronsäure (D-Glucuronat/ D-Iduronat) und Aminozuckern (D-Glucosamin/ D-Galaktosamin), die 1-3-glykosidisch verbunden sind. Darüberhinaus können die Disaccharidgruppen noch sulfatiert oder acetyliert sein [12,29]. Außer im Stütz- und Bindegewebe kommen GAG in Gerinnungs-, Blutgruppen- und Immunsubstanzen vor. Ihre Biosynthese im endoplasmatischen Retikulum wird durch Androgene und Wachstumshormon gesteigert und durch Glucocorticoide gehemmt.

GAG beanspruchen im Verhältnis zu ihrer Masse ein großes Volumen und besitzen eine gelartige Konsistenz. Wegen ihrer hohen negativen Ladungsdichte ziehen sie Kationen, v.a.  $\text{Na}^+$ , an und sind damit osmotisch aktiv. Dadurch wird Wasser in die Matrix eingelagert und ein Turgor entsteht. Dieser erlaubt es der ECM großen Druckkräften zu widerstehen [72]. Der histochemische Nachweis erfolgt mit Alzianblau-PAS (Periodic-Acid-Schiff-reaction) [53].

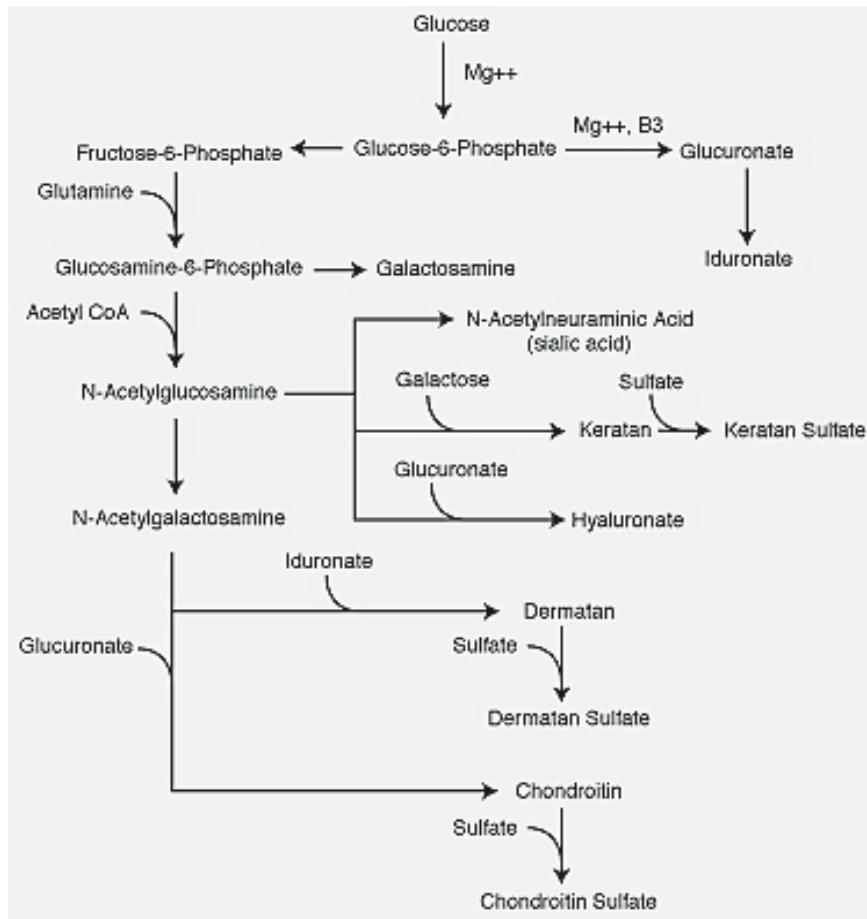


Abbildung 1: Biosynthese der Glycosamininglycane

### 1.1.1.1 Einteilung

Entsprechend der Zucker, der Bindungsart und der Anzahl und Position der Sulfatgruppen werden folgende vier Hauptgruppen unterschieden [72]:

#### Hyaluronsäure:

Auch Hyaluronan oder Hyaluronat genannt. Sie gilt nicht als typisches GAG, da sie keine Sulfatgruppen an den Zuckern und kein Core-Protein enthält. Im Gegensatz zu den übrigen GAG wird sie nicht innerhalb der Zelle, sondern direkt an der Zelloberfläche synthetisiert. Hyaluronsäure bildet langkettige und unverzweigte Moleküle aus bis zu 25 000 Disaccharideinheiten und gibt damit quasi den Führungsstrang vor an den sich die anderen GAG, verzweigt an ihrem jeweiligen Core-Protein gebunden, über Link-Proteine binden.

Hyaluronsäure kommt in großen Mengen im Bindegewebe, in der Synovialflüssigkeit, im Glaskörper des Auges sowie in der Nabelschnur vor.

Sie ist essentiell während der Wundheilung und reguliert mitunter den Wassergehalt und damit Turgor und Druckresistenz von Geweben.

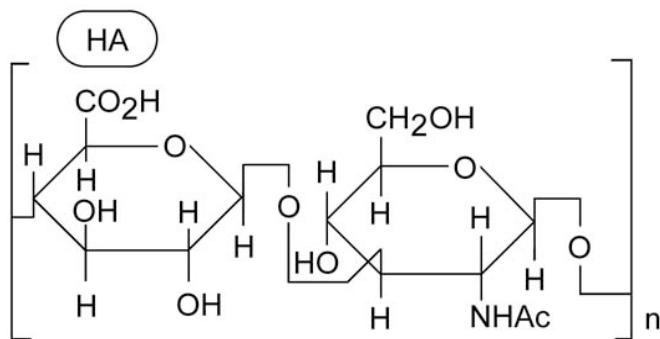


Abbildung 2: Biochemische Struktur der Hyaluronsäure

### Chondroitinsulfat:

Unterschieden werden Chondroitin-4- und Chondroitin-6-Sulfat. Sie bestehen aus N-Acetylgalaktosamin und D-Glucuronsäure mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 50 kDa. Chondroitinsulfate sind vor allem im Knorpel enthalten (bis zu 40 % des Trockengewichtes). Darüber hinaus im Bindegewebe, in der Haut und Hornhaut.

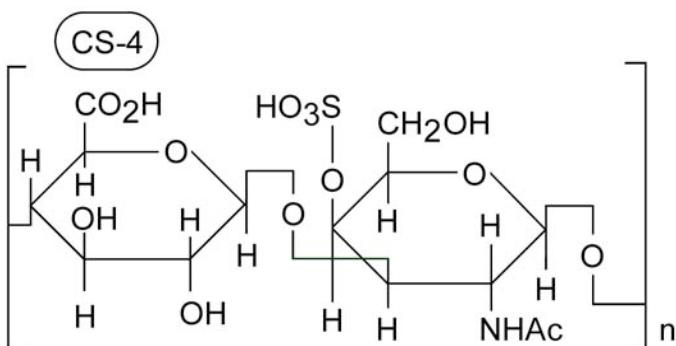


Abbildung 3: Biochemische Struktur des Chondroitinsulfates-4

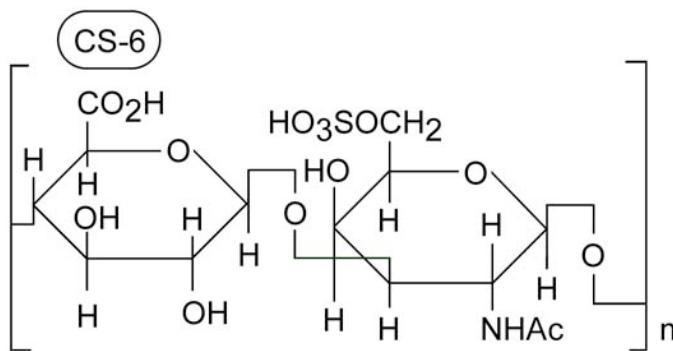


Abbildung 4: Biochemische Struktur des Chondroitinsulfates-6

### Dermatansulfat:

Das Dermatansulfat ist eine Abwandlung des Chondroitinsulfates. Charakteristisch ist eine L-Iduronsäure (10-20%), die in den anderen GAG nicht vorkommt. Dermatansulfat ist in der Haut, im Bindegewebe und in den Herzklappen enthalten.

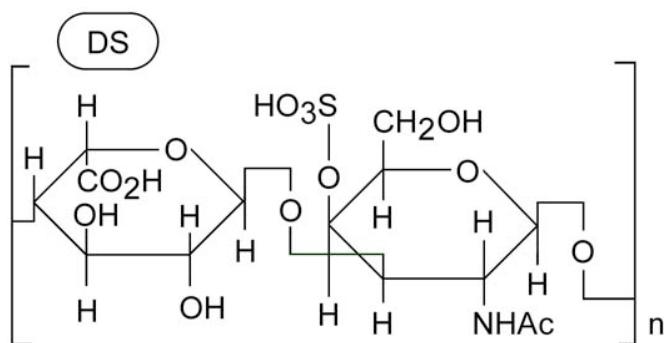


Abbildung 5: Biochemische Struktur des Dermatansulfates

### Keratansulfat:

Es enthält N-Acetylglucosamine und D-Galaktose, die 1-3- oder 1-4-glykosidisch verbunden sind. Auch Mannose, Fucose und Sialsäure können gebunden sein. Im Unterschied zu den übrigen GAG sind keine Uronsäuren enthalten. Keratansulfat kommt in der Cornea, im Knorpel und in der Zahnpulpa vor.

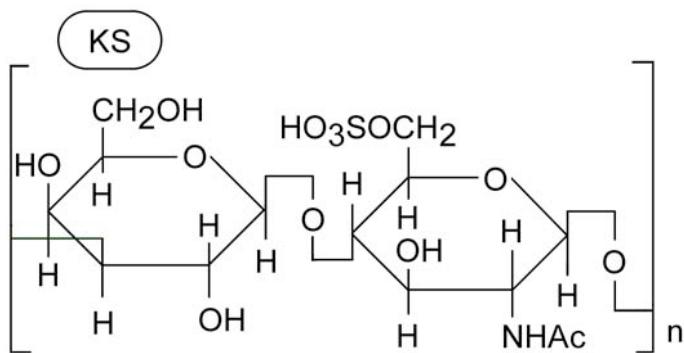


Abbildung 6: Biochemische Struktur des Keratansulfates

### Heparansulfat / Heparin:

Im Gegensatz zu den übrigen GAG sind die Disaccharide auch durch  $\alpha$ -glykosidische Bindungen verknüpft. Molekulargewicht zwischen 5 und 30 kDa. Heparin wirkt gerinnungshemmend und aktiviert die intravasale Lipoproteinhydrolyse.

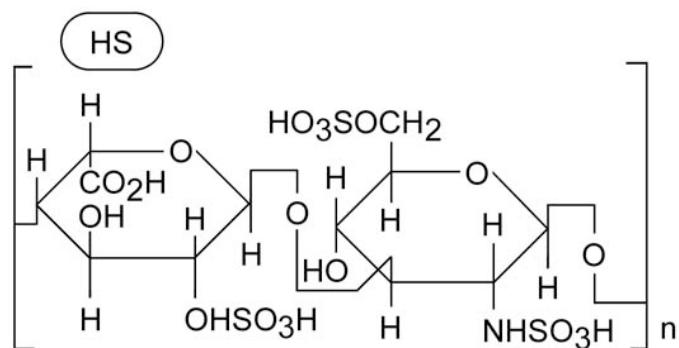


Abbildung 7: Biochemische Struktur des Heparansulfates

#### 1.1.1.2 Funktion

Die polymeren Disaccharideinheiten der GAG verbinden sich repetitiv 1,4-glykosidisch zu großen linearen Heteroglycanketten. Diese heften sich O-glykosidisch (über Serin) oder N-glykosidisch (über Asparagin) an meist einfach gebaute Core-Proteine.

Dadurch entstehen Proteoglycane, die durch einen großen Glykan-Anteil von 80-94 % und einen kleinen Proteinanteil von 6-20 % gekennzeichnet sind.

Proteoglycane sind am Aufbau der ECM beteiligt. Als Polyanionen besitzen sie ein hohes Wasserbindungsvermögen und regulieren damit den Turgor von Geweben. Sie geben Bindegewebe und Knorpel ihre Elastizität [12,29]. Ihre GAG-Ketten bilden Gels mit variierender Porengröße und können so Moleküle und Zellen entsprechend ihrer Größe und/oder Ladung selektieren. Ebenso binden Proteoglycane an verschiedene Signalmoleküle und können deren Aktivität erhöhen oder vermindern. Für diese Aktivitätskontrolle von Proteinen gibt es verschiedene Möglichkeiten [70,104]:

- Sterische Blockierung der Proteinaktivität.
- Temporäre Speicherung des Proteins für eine verzögerte Freisetzung.
- Schützen des Proteins vor proteolytischem Abbau.
- Verändern oder Konzentrieren des Proteins für eine effektivere Wirkung auf Rezeptoren.
- Immobilisieren des Proteins nahe dem Syntheseort und damit Einschränken des Wirkungsbereiches

Einige Proteoglycane sind Bestandteile von Plasmamembranen. Sie funktionieren als Co-Rezeptoren, indem sie die Zelle an die ECM binden und die Antwort von Zellen auf gewisse extrazelluläre Signalproteine auslösen [56,104,108]. Syndecane zum Beispiel findet man bei Fibroblasten in focal adhesions, wo sie die Funktion von Integrin modulieren. Sie binden auch an Fibroblast-Growth-Factors (FGF) und präsentieren sie den entsprechenden Rezeptoren auf derselben Zelle.

Werden spezifische Proteoglycane durch Mutation inaktiviert, kann dies zu schweren Entwicklungsstörungen führen.

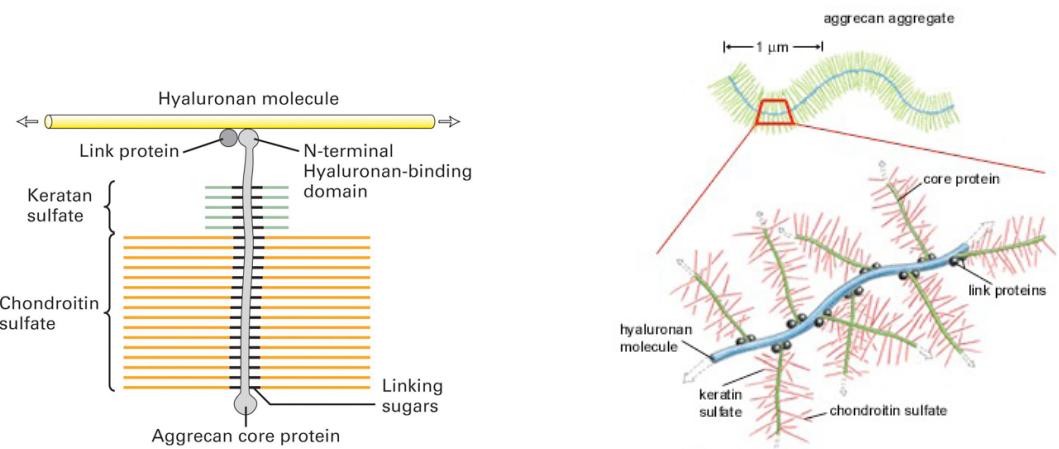


Abbildung 8: Struktureller Aufbau der Proteoglycane

### 1.1.1.3 Abbau

Der Abbau bzw. die Degradation der GAG erfolgt in den Lysosomen mit Hilfe saurer Hydrolasen (GALNS) [12,59,72]. Die N-Acetylgalaktosamin-6-Sulfatase hydrolysiert beim Chondroitinsulfat die Sulfatgruppen der N-Acetylgalaktosamin-6-Sulfatase-Einheiten und beim Keratansulfat die Sulfatgruppen der Galaktose-6-Sulfatase-Einheiten.

Die funktionale Enzymaktivität der  $\beta$ -Galactosidase ist abhängig von der Assoziation mit Neuraminidase und Cathepsin-A in einem lysosomalen Multienzymkomplex [104,109,126].

Folgende Übersicht zeigt die bisher untersuchten GALNS und die entsprechenden Erkrankungen [41]:

<b>Mucopoly-saccharidose</b>	<b>Eponym</b>	<b>Enzymdefekt</b>	<b>Genlokalisat ion</b>
MPS I	M. Hurler/ M.Scheie	A-L-Iduronidase	4p16
MPS II	M. Hunter	Iduronat-Sulfatase	Xq28
MPS III-A	M. Sanfilippo-A	Sulfamidase	17q21
MPS III-B	M. Sanfilippo-B	N-Acetyl-A-Glukosaminidase	17q21
MPS III-C	M. Sanfilippo-C	N-Acetyltransferase	---
MPS III-D	M. Sanfilippo-D	N-Acetylglukosamin-6-Sulfatase	12q14
MPS IV-A	M. Morquio-A	N-Acetylgalaktosamin-6-Sulfatase	16q24
MPS IV-B	M. Morquio-B	B-Galaktosidase	3p21.33
MPS VI	M. Maroteaux-Lamy	Arylsulfatase-B	5q13
MPS VII	M. Sly	B-Glucuronidase	7q21
MPS IX	---	Hyaluronidase	3p21.3

## 1.2 Mucopolysaccharidose IV-A und -B

Die Mucopolysaccharidose Typ IV (MPS IV) wird in zwei Subtypen, A und B, unterteilt. Beiden liegt eine verminderte Aktivität des jeweiligen Enzyms zugrunde. MPS IV-A bezeichnet einen Mangel an N-Acetylgalaktosamin-6-Sulfatase, die seltener vorkommende MPS IV-B den Mangel an  $\beta$ -Galactosidase. Beide Enzyme hydrolyseren in den Lysosomen Chondroitin- und Keratansulfat. Bei  $\beta$ -Galactosidase ist die funktionale Enzymaktivität zusätzlich abhängig von der Assoziation mit Neuraminidase und Cathepsin-A in einem Multienzymkomplex. Eine mangelhafte Integrität, bzw. Disintegration einer Komponente dieses Enzymkomplexes beruht meist auf genetischen Mutationen [11,25,61,108].

Die Enzymrestaktivität ist bei Typ-A- und B-Patienten ca. um den Faktor 100 deutlich geringer, als bei gesunden Referenzpersonen. Veränderungen des muskuloskeletalen Systems sind in der Regel die ersten klinischen Anzeichen und im weiteren Krankheitsverlauf die ausgeprägtesten Symptome. Der B-Typ fällt hierbei phänotypisch milder aus.

### 1.2.1 GM1- Gangliosidose

Da die GM1-Gangliosidose auf demselben Gen kodiert wie die  $\beta$ -Galactosidase, wenn auch mit anderer Mutation, sei sie an dieser Stelle kurz erwähnt. Es handelt sich hierbei um eine generalisierte neurosomatische Erkrankung. Das ursächliche Myelindefizit resultiert aus dem Untergang von Oligodendrozyten und einem abnormalen axoplasmatischen Transport, aufgrund der massiven neuronalen Akkumulation von GM1-Gangliosiden [47,49,76,110,112,146,158]. Eine extensive dermale Melanocytosis kann fakultativ auftreten. Drei Krankheitsformen werden unterschieden:

### Infantile GM1:

Beginn im Neugeborenenalter mit Trinkschwäche und mangelnder Gewichtszunahme. Patienten wirken apathisch. Im 1. Lebensjahr treten Hepatosplenomegalie, Skelettveränderungen, generalisierte Krampfanfälle und Tetraspastik auf.

### Juvenile GM1:

Auffallende Symptomatik im 2. und 3. Lebensjahr mit Hypotonie, Ataxie, mentaler Entwicklungsverzögerung, Krämpfen und Tetraspastik. Patienten versterben meist vor dem 10. Lebensjahr an schweren respiratorischen Infekten.

### Adulte GM1:

Beginn zwischen dem 3. und 30. Lebensjahr. Wenig beschriebenes Krankheitsbild mit Dysarthrie, Gangstörungen und Dystonie.

Für die laborchemische Diagnostik des Enzymdefektes werden Leukozyten, Fibroblasten und Organbiopsate verwendet. Eine kausale Therapie ist derzeit nicht möglich [6,7,35].

## **1.2.2 Pathologie**

Durch den Mangel an N-Acetylgalaktosamin-6-Sulfatase bzw.  $\beta$ -Galaktosidase werden die GAG nicht ausreichend abgebaut und sammeln sich in den Lysosomen an. Die Akkumulation dieser hochmolekularen Substanzen hat zunächst Funktionsstörungen und schließlich den Untergang der Zelle zur Folge.

### ZNS:

Das ZNS ist primär nicht betroffen. Durch progressive skelettale Deformierung und Instabilität, vor allem im Bereich der Halswirbelsäule, kann das Myelon mechanisch beeinträchtigt werden – mit neurologischen Folgeerscheinungen [34,42,80,111,120,150,152,154].

### Augen:

Eine Hornhauttrübung kann auftreten und Veränderungen des Trabekel-Netzwerkes fakultativ zu einem Glaukom führen [3,24,43,66].

### Zähne:

Die Zähne sind hypoplastisch. Der Zahnschmelz ist dünn, mit vermehrter Kariesneigung und frühzeitigem Zahnverlust. Kieferdeformitäten sind die Regel [27,37,63].

### HNO:

Typische Veränderungen sind Makroglossie, ein enger Kehlkopf, Tonsillenhyperplasie, sowie eine verdickte nasale Mucosa. Durch rezidivierende Mittelohrentzündungen kann ein früher Hörverlust eintreten [65,74,121].

### Kardiopulmonales System:

Am häufigsten beschrieben werden Veränderungen der Herzkappen, vor allem der Mitral- und Aortenklappe, in Form von Hypertrophie, Fibrosierung und chondraler Metaplasie. Die Folge sind Stenosen und Strömungsgeräusche, bzw. Regurgitationen. Konsekutiv entsteht häufig eine hypertrophe Kardiomyopathie [26,36,81].

Eine Obstruktion der oberen Atemwege kommt häufig vor. Bei etwa der Hälfte der Patienten fallen Veränderungen der Trachea (z.B. Tracheomalazie) und der Stimmbänder mit sternförmig oder elliptischer Form auf [101,123]. Eine

restriktive Lungenveränderung mit eingeschränkter Compliance ist meist Folge der progressiven kyphoskolistischen Brustwirbelsäulenveränderungen [32,124].

#### Abdominale Organe:

In der Milz sind vor allem Zellen des retikuloendothelialen und des sinusoidalen Systems betroffen. Bei zusätzlich veränderten Parenchymzellen der Leber, imponiert eine Hepatosplenomegalie. Vakuoläre Veränderungen beeinträchtigen auch die visceralen Epithelzellen der Nierenglomeruli. Die tubulären Epithelzellen der Niere erscheinen unverändert [23,117,141,142].

#### Muskuloskeletalles System:

Der kortikale Knochen zeigt histologisch und biochemisch keine pathologischen Veränderungen. Dagegen ist die ECM des Knorpels massiv verändert:

Die Expression von Kollagen Typ I mRNA ist erhöht und jene von Typ II Kollagen und Aggrecan mRNA reduziert. Die Kollagenfibrillen weisen Durchmesserschwankungen auf und sind generell verdickt. Die Anzahl von hydroxyliertem Lysyl und Pyridinolinen in der Triple Helix ist grenzwertig niedrig. Somit ist das Verhältnis Hydroxylysylpyridinoline zu Lysylpyridinoline reduziert. Histomorphologisch fällt eine unorganisierte Gewebestruktur auf mit inhomogen verteilten und an sich vergrößerten Chondrozyten, aufgrund der in Vakuolen intrazellulär akkumulierten Proteoglycane. Die Folge sind früh einsetzende Osteoarthritis und Gelenksdegeneration [8,28,55,106,162].

### **1.2.3 Klinik und Krankheitsverlauf**

Bei MPS IV-A und -B variiert die Klinik mit unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotypen. Wobei der B-Typ generell eine milder Verlaufsform zeigt. Der Krankheitsverlauf ist progressiv, mit einer Lebenserwartung von etwa 40 bis 50 Jahren. Die statomotorische und geistige Entwicklung bei beiden Typen ist im Gegensatz zu den meisten anderen MPS nicht beeinträchtigt.

Nach einer normalen Geburt und Postnatalperiode fällt ca. im 1. bis 3. Lebensjahr eine Wachstumsverzögerung auf, bei progressiven

Gelenkkontrakturen [5,23,69]. Typischerweise zeigen sich eine Makro- oder Skaphozephalie mit vergrößerten Gesichtszügen, eingesunkener Nasenwurzel und Makroglossie. Diese Konfiguration manifestiert sich bei den schweren Verlaufsformen in den ersten Lebensjahren, bei den verzögerten Formen langsamer oder gar nicht. Die typische Fazies ist auf gestörte Remodellingprozesse im orofazialen Schädelanteil zurückzuführen [71,145]. Es fällt ein dysproportionierter Minderwuchs mit kurzem Hals und Rumpf auf, bei einer Endgröße von 100 bis 120cm [85,97].

Typische radiologische Skelettveränderungen sind Platyspondylie mit zungenförmigem Vorstehen zentraler Anteile, weit ausladende Beckenschaufeln, hypoplastische Iliakalabschnitte und im valgus stehende Femurhälse. Darüber hinaus verkürzte Metakarpalia mit proximaler Zuspitzung und V-förmiger Deformierung der distalen Unterarmknochen. Die Rippen sind ruderblattartig verbreitert und stehen auffällig dicht. Durch die Verformung des Brustkorbes bei Kyphoskoliose mit pectus carinatum kann die kardiopulmonale Funktion etwa im 4./5. Lebensjahrzehnt massiv eingeschränkt sein.

Als häufige Komplikation tritt infolge einer Denshypoplasie und der allgemeinen Gelenks- und Bandschwäche eine atlanto- occipitale Instabilität auf. Die Folge ist eine Beeinträchtigung des Myelons, mit neurologischen Ausfällen bis hin zur Paraplegie [10,13,34,37,43,78,79,82,102,151].

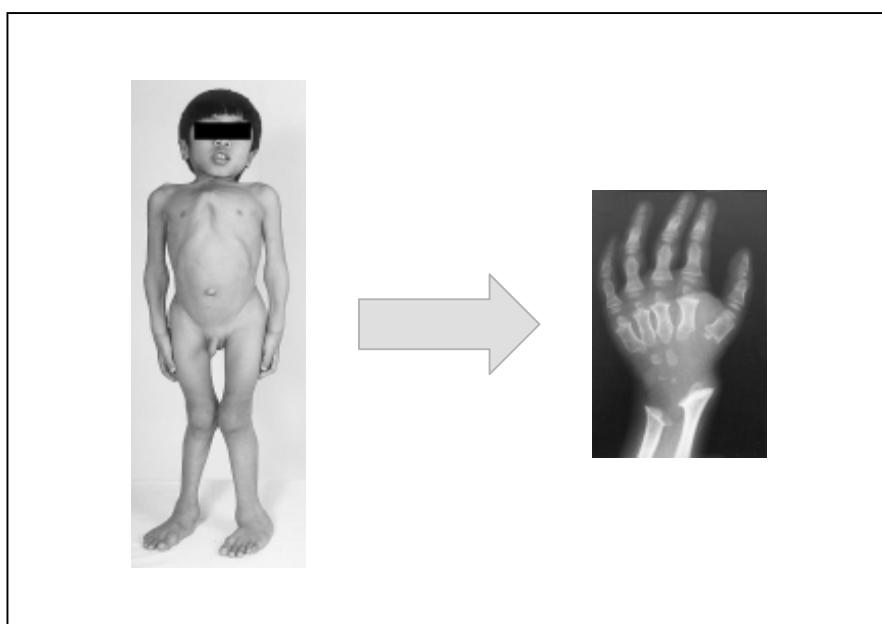


Abbildung 9: 10jähriger Junge mit MPS IV-A und Röntgenaufnahme der Hand des Jungen

## 1.2.4 Diagnostik

### 1.2.4.1 Molekulargenetik

Beide Erkrankungsformen werden autosomal-rezessiv vererbt. Zu einem Enzimmangel kommt es bei inadäquater Expression, bzw. Veränderungen aufgrund von Mutationen.

Beim A-Typ ist das verantwortliche Gen lokalisiert auf Chromosom 16q24.3. Es besitzt 14 Exone und ist 40kb lang. Der Promoter enthält keine TATA-Box, sondern GC-Box gleichende Sequenzen. Das Gen besitzt eine Alu-Wiederholung in Intron 5 und eine VNTR ähnliche Sequenz in Intron 6 [39,60,83,88,131,132,135].

Aktuell beschreibt die Fachliteratur etwa 148 Mutationen und 16 Polymorphismen [153,157,161]. Nachfolgend sind einige Beispiele aufgeführt:

- Bei 15 japanischen und 1 kaukasischen Patienten fand man 12 Missense-, 1 Nonsense-, 1 Frame-shift-(2 Basenpaare) und 1 Splice-site-Mutation [93].
- 35 europäische Patienten zeigten in einem nicht radioaktiven SSCP-Screening 23 Missense-, 2 Nonsense- und 3 Affecting-splicing- Mutationen. Darüber hinaus 6 kleine Deletionen (1-27 Basenpaare) sowie eine Insertion [15].
- Polnische Zwillinge waren heterozygot für eine R94G- und R259Q-Punktmutation, ihre Mutter homozygot in R259Q [43].
- Häufig findet sich eine „single mutation“ an Position 113 (I113F) [129,136, 156].
- Einig sind sich die meisten Autoren in der evidence for extensive allelic heterogeneity und der entscheidenden Relation zwischen Genotyp, Phänotyp und akkumulierter Keratansulfatkonzentration [20,21,64,84,127, 128,130].

Der B-Typ und die GM1-Gangliosidose kodieren beide im GLB1-Gen, lokalisiert auf Chromosom 3p21.33. Es besitzt 16 Exone und ist 62,5kb lang. Der Promoter enthält GC-Box gleichende Sequenzen und fünf potentielle SP1-Transkriptionselemente. Ein Mangel an  $\beta$ -Galactosidase kann somit, abhängig

vom Mutationsmuster, zu zwei unterschiedlichen Erkrankungen führen [18,77,87,104,159].

Die Fachliteratur verzeichnet mehr als 100 Mutationen für Morquio-B und GM1-Gangliosidose [50,51,109]:

- Häufigste Mutation mit ca. 79% ist eine 2-Basen-Substitution an Position 273 (W273L) [44,96,100,126,].
- Eine weitere Mutationsanfällige Sequenz umfasst die Positionen 400 bis 500 (v.a. 440, 482, 509, 521 und 532) und Position 83 (Y83C) [94,109,110,143]

#### **1.2.4.2 Pränatal**

Pränatale Diagnostik ist indiziert bei Familien mit bereits betroffenen Kindern und erneutem Kinderwunsch. Verwendet werden Amnionzellen und Chorionzotten, in nativem oder kultiviertem Zustand. Die Diagnose findet sich enzymatisch und/oder genetisch [16,22,105,118].

#### **1.2.4.3 Urin**

Durch den Mangel an GALNS werden Chondroitin- und Keratansulfat nicht ausreichend hydrolysiert. Sie akkumulieren im Gewebe und können vermehrt über den Urin ausgeschieden werden. Dies lässt sich durch den Berry-Test nachweisen, wobei ein Urintropfen mit Toluidinblau gefärbt wird. Für eine quantitative Beurteilung ist ein 24h-Urin notwendig. Bei einem positiven Ergebnis muss zur weiteren Differenzierung eine Elektrophorese erfolgen, da der Berry-Test keine spezifische Nachweismethode für GAG ist [41]. Da eine erhöhte GAG-Ausscheidung zwar häufig aber nicht obligat ist, gewährleistet der Urintest keine definitive Diagnose [102,103,140].

#### **1.2.4.4 Enzymatisch**

Für die enzymatische Diagnostik werden periphere Blutproben, sowie Haut- und pränatal-uterine Biopsien verwendet. Quantitativ am aussagekräftigsten sind Leukozyten und Fibroblasten [19,75,89,140,148,160]. Gemäß den Maßstäben in unserem Labor sind alle MPS im Blut nachweisbar. Die etablierte Methode bedient sich eines künstlichen Substrates: 4-Methylumbelliferyl (MUF), um fluorometrisch die Enzymkonzentration quantitativ zu bestimmen [147,155]. In Bezug zur Proteinkonzentration lässt sich damit die Enzymaktivität definieren.

#### **1.2.4.5 Genetisch**

Bei den genetischen Untersuchungstechniken entspricht das Zellmaterial dem des enzymatischen Verfahrens. Die Methoden umfassen unter anderem Polymerase-Chain-Reaction (PCR), Allelic-Specific-Oligohybridization (ASO), Single-Strand-Conformation-Polymorphism (SSCP) und Sequenzierung. Damit konnten bisher 148 Mutationen für MPS IV-A und über 100 Mutationen für MPS IV-B (mit GM1-Gangliosidose) definiert werden [15,20,30,58,62,99].

### **1.2.5 Therapie**

Derzeit existiert keine etablierte Methode zur restitutio ad integrum. Die Therapie erfolgt symptomatisch und multidisziplinär. Neben der medizinischen Behandlung ist eine frühzeitige Betreuung durch Physiotherapeuten, Logopäden, Pädaudiologen und Psychologen indiziert [41,95]. Ein Schwerpunkt sind chirurgisch-orthopädische Eingriffe. Häufig sind Karpal-Tunnel-Syndrom, oder „trigger digits“ erste Symptome der Erkrankung. Eine frühe handchirurgische Intervention gewährleistet eine maximale manuelle Funktionalität [144,149]. Endoprothetische Eingriffe vor allem an den unteren Extremitäten sind ebenfalls meist früh indiziert [1,4,67,125]. Aufgrund einer Denshypoplasie, bei allgemeiner Gelenks- und Bandschwäche, tritt vermehrt eine atlanto-occipitale Instabilität auf. Dies kann eine mechanisch-entzündliche Beeinträchtigung des Myelons mit neurologischen Ausfallscheinungen zur

Folge haben. Präventiv kann eine occipito-cervikale Fusion durchgeführt werden [40,68,80,92,154]. Veränderte anatomische Verhältnisse der Atemwege, wie Makroglossie, enger Kehlkopf und verdickte Schleimhäute, erschweren anästhesiologische Maßnahmen [113,119,124]. Das 2002 von Dullenkopf et al. entwickelte angulated-video-intubating-laryngoscope (AVIL) erleichtert die fiberoptische Intubation [32]. Im Herz infiltrieren die GAG-Ablagerungen bevorzugt die Herzklappen. Ein Klappenersatz ist daher der häufigste Herz-/ Gefäßchirurgische Eingriff [9,91,98].

Darüber hinaus gibt es grundsätzlich drei Therapieansätze bei lysosomalen Speichererkrankungen: Knochenmarktransplantation (KMT), Enzymersatz und Substratverminderung [31,33,48,52,90,139].

- Die KMT wirkt effektiv bei MPS I und ist für MPS II, III und VI in der Erprobung [114].
- Ein Enzymersatz ist lediglich bei MPS I, II und VI in Erprobung. Im Frühjahr 2009 startete eine Phase I/II- klinische Studie für N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase [17,38,54].
- Substratverminderer sind bisher nur für M. Gaucher, bei definierten Indikationen zugelassen, ansonsten experimentell [41].

Für die nahe Zukunft spielt die Optimierung der Screening-Methoden eine wichtige Rolle, um erkrankte Kinder zeitnah den multidisziplinären Therapieansätzen zuführen zu können. Darüber hinaus die Detektion weiterer, neuer Mutationen. Und vor allem die Erforschung von Gentransfer- und Rekombinationsverfahren für eine effiziente Enzymersatz-, oder Substratverminderungstherapie, die bereits in vitro, bzw. im Tiermodell erste Erfolge zeigen [2,45,107,115,116,133,134,137,138].

## **2. Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit ist der Nachweis und die Charakterisierung der Enzymaktivität von N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase und  $\beta$ -Galactosidase in Leukozyten, Lymphozyten, Fibroblasten und Amnionzellen. Vor allem die Abhängigkeit von der Protein- und Substratkonzentration, sowie die Stabilität und Haltbarkeit. Die bei gesunden Spenderzellen gewonnenen Werte sollen als Referenz dienen und pathologische Probenwerte als solche definieren.

## **3. Material**

### **3.1 Untersuchungsmaterialien**

Die für diese Arbeit verwendeten Blutproben zur Gewinnung von Leukozyten und Lymphozyten, sowie Hautbiopsien zur Kultivierung von Fibroblasten und Amnion- bzw. Chorionzottenproben stammen von Patienten der Dr. von Haunerschen Kinderklinik und korrespondierenden deutschen Kinderkliniken, sowie der Hacettepe Universitätsklinik Istanbul/ Türkei.

### **3.2 Geräte**

- Pipetten für bis zu 10, 100, 250, 1000, 2500  $\mu$ l und Multipipette (Eppendorf)
- Pipettenspitzen für bis zu 20, 200  $\mu$ l (Eppendorf)
- Multipipettenspitzen für bis zu 0.5, 1, 2, 2.5, 10, 12.5 ml (Eppendorf)
- Pipettenspitzen für bis zu 1000  $\mu$ l (Sarstedt)
- Feinwaage „Sartorius Basic“
- PH-Messgerät „PHM 82“ (Radiometer Copenhagen)
- Rührgerät „IKAMAG RCT“ (IKA-Labortechnik, Janke & Kunkel)
- Rührspatel (Sarstedt)
- Rüttler „VF2“ (IKA-Labortechnik, Janke & Kunkel)
- Heizblock „Thermostat 3401“ 37 °C (Eppendorf-Liebisch GmbH, Bielefeld)

- Zentrifugen „Mikro 22“ und „Universal 30 F“ (Hettich-Zentrifugen)
- Sonifikator „B-10“ (Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut)
- Spectrofluorophrometer „RF-5001 PC“ (Shimadzu) + PC (Magix)
- Präzisionsküvetten „QS 281 1000“ (Hellma)
- Photometer „Ultrospec 3100 pro“
- Drucker „DPU-414 Thermal Printer“ (Seiko-Instrument-Inc.)
- Küvetten (Hellma)
- Stripetten für bis zu 2, 5, 10 ml (Corning Incorporated, NY)
- Einmalskalpele (Feather Safety Razor Co.)
- Petrischalen (Nunc Brand Products, Denmark)
- Kulturflaschen 25 cm<sup>2</sup> (Corning Incorporated, NY)
- Kulturflaschen 75 cm<sup>2</sup> „Cellstar“ (Greiner bio-one GmbH)
- Zentrifugenröhrchen für bis zu 15 ml (Sarstedt)
- Uniflow „UV 1200“
- Gasbrenner „gasprofi 1“ (WLD-Tec)
- Pipettenboy „Pipetboy acu“ (Integra Biosciences)
- Zentrifuge „Rotanta/P“ (Hettich-Zentrifugen)
- Mikroskop „Diaphot“ (Nikon)
- Gefrierschrank – 20 °C (Linde)
- Kühlschrank + 4 °C (Linde)

### 3.3 Chemikalien

- Aqua bidest. (H. Kerndl GmbH)
- Entionisiertes Wasser
- Heparin flüssig (10000units/ml)
- Dextran (Sigma)
- NaCl (Sigma)
- Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (Sigma)
- Dulbecco's MEM (3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub> + 1 g/l D-Glucose + w/o L-Glutamin) (Biochrom AG)
- Fetal bovine serum (FBS 10 %) (Biochrom AG)
- Trypsin „Trypsin- EDTA- Solution“ (0,05 % - 0,02 % w/v) (Biochrom AG)

- L-Alanyl-L-Glutamin 200 nM (Biochrom AG)
- Antibio-/ Antimycoticum (10000 µg/ml Streptomycinsulfat + 25 µg/ml Amphotericin), (Gibco)
- Ficoll-Isopaque (Lymphotrennmedium “LSM 1077”) (PAA)
- Essigsäure (Merck)
- Natriumacetat (Merck)
- Methylumbelliferyl (Labor van Diggelen, Rotterdam)
- Folin Ciocalteus Phenolreagenz (Merck)
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck)
- CuSO<sub>4</sub> (Merck)
- Seignettensalz (Merck)

## 4. Methoden

### 4.1 Probenvorbereitung

#### 4.1.1 Leukozytenpräparation

Für die Präparation der Leukozyten aus venösem Blut werden mindestens 2 ml EDTA- bzw. Heparin-Blut benötigt. Das Blut wird mit Leukozytenlösung im Verhältnis 5:1 gut gemischt, blasenfrei in ein neues Reagenzgefäß abgefüllt und für 30-60 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis sich die Erythrozyten vollständig abgesetzt haben. Anschließend wird der wässrige Überstand abgehoben und bei 2000 U/min 5 Minuten zentrifugiert. Das Überstandsplasma wird abgehoben und verworfen. Zur Zerstörung verbliebener Erythrozyten wird das Leukozytensediment mit ca. 250 µl eiskaltem Wasser 20-30 Sekunden geschüttelt und mit 0,9 % NaCl-Lösung aufgefüllt, gut gemischt und zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt, das Sediment in 1 ml 0,9 % NaCl gelöst und in Eppendorf-Tubes überführt. Nach der Zentrifugation wird das NaCl vollständig abgehoben. Die Leukozyten- Pellets können bei –20 °C gelagert werden.

Die Leukozytenlösung enthält in 100 ml folgende Bestandteile:

Menge	Bestandteile
5 g	Dextran
78 ml	NaCl 0,9 %
1,3 ml	Heparin (5000 U/ml)
20,7 ml	H <sub>2</sub> O

#### **4.1.2 Lymphozytenpräparation**

EDTA- bzw. Heparin-Blut wird mit Phosphat-buffered-Saline (PBS, bzw. Hank'sche Lösung) im Verhältnis 1:2 gemischt. Auf zwei Reagenzgefäße werden jeweils 3 ml Ficoll-Lösung (Ficoll-Isopaque-D) verteilt und das PBS-Blut vorsichtig darüber geschichtet. Nach 20 Minuten Zentrifugation bei 2000 U/min setzt sich ein fadig schimmernder Lymphozytenring vom wässrigen Überstand ab. Der Überstand wird abgehoben und verworfen. Der Lymphozytenring wird in ein neues Eppendorf-Tube überführt mit 0,9% NaCl versetzt und 5 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und verworfen, Zugabe von 0,9% NaCl und Zentrifugation für 5 Minuten bei 2000 U/min. Dieser Vorgang wird noch einmal wiederholt und anschließend das NaCl vollständig abgehoben. Das Lymphozyten-Pellet kann bei –20 °C gelagert werden.

#### **4.1.3 Kultivierung von Fibroblasten**

Für die Kultivierung von Fibroblasten [116] benötigt man Trypsin, PBS und folgendes Nährmedium:

Dulbecco's MEM	10 % Fetal bovine serum (FBS)
400 mM Glutamin	Antibiotic- Antimycotic (1:100)

##### **4.1.3.1 Anlegen einer Primärkultur**

Eine aseptisch entnommene und in Medium transportierte Hautbiopsie sollte sofort verarbeitet werden. Zunächst werden vier Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) mit 5 ml Medium ausgespült, was die Verteilung der später eingebrachten Hautstückchen erleichtert. Der Boden einer sterilen Petrischale wird mit Medium bedeckt, die Hautbiopsie eingebracht und mittels zweier Skalpelle in möglichst kleine Stückchen geschnitten, sowie durch Abkratzen von Fett und Blutresten gesäubert. Gerupfte Hautstückchen sprossen langsamer Fibroblasten aus als geschnittene. Mindestens drei Hautstückchen werden in jede mit Medium

benetzte Kulturflasche überführt. Zu viel Medium in den Flaschen erschwert das Anwachsen der Hautstückchen. In der Regel beginnen nach vier Tagen Inkubation im Brutschrank bei 37°C neue Fibroblasten aus den angewachsenen Stückchen auszusprossen. Nun werden 2 ml Medium in jede Brutflasche pipettiert und diese vorsichtig geschwenkt. Das Medium wird dann alle drei bis vier Tage gewechselt. Hat sich ein Hof von mindestens 2 cm um die einzelnen Hautstückchen gebildet, können die Zellen subkultiviert werden.

#### **4.1.3.2 Subkultivierung**

Ist der Boden der Brutflasche vollständig eingenommen, wachsen die Fibroblasten nicht mehr weiter. Um eine stagnierende Proliferation bzw. ein Absterben der Kultur zu verhindern, müssen die Fibroblasten nach erreichter Maximaldichte unter Verdünnung von der alten Brutflasche in eine neue überführt werden. Dazu wird das alte Medium abgetragen und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 5 ml Trypsin für ca. 3 Minuten lösen sich die Fibroblasten vom Flaschenboden. Um eine weitere Zellschädigung zu vermeiden werden 5 ml Medium hinzugegeben, das Trypsin damit neutralisiert. Die Zellsuspension wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment mit 5 ml Medium resuspendiert, in zwei 75 cm<sup>2</sup> Brutflaschen verteilt und mit je 10 ml Medium aufgefüllt. Um einen ungehinderten Gasaustausch der Zellen bei CO<sub>2</sub>-Begasung zu gewährleisten, werden die Brutflaschen 30 Minuten lang im Brutschrank mit leicht geöffneten Schraubverschlüssen inkubiert. Danach werden die Deckel ganz verschlossen. Um das Anwachsen der Fibroblasten nicht zu erschweren, sollte jegliche Manipulation bzw. Mediumwechsel in den folgenden 48 Stunden unterbleiben.

#### **4.1.3.3 Gewinnung des Fibroblasten- Pellets**

Das Medium wird aus der Brutflasche abgetragen und diese zwei- bis dreimal mit 0,9% NaCl gewaschen. Nach Zugabe von 5 ml 0,9% NaCl werden die Zellen mit einem Gummischaber vorsichtig von der Unterlage abgeschabt und auf zwei Reagenzgefäße verteilt. Dieser Vorgang wird noch zwei- bis dreimal wiederholt. Die gewonnene Zellsuspension wird 5 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Sediment in 1 ml 0,9% NaCl aufgelöst und in ein Eppendorf- Tube überführt. Nach einer erneuten Zentrifugation wird der Überstand vollständig abgehoben. Das entstandene Pellet kann bei –20 °C gelagert werden.

#### **4.1.4 Amnionzellen**

Amnionzellen erhält man im Rahmen einer pränatalen Diagnostik. Die Kultivierung erfolgt ähnlich der von Fibroblasten. Die in dieser Arbeit verwendeten Amnionzellen waren bereits kultiviert, deshalb wird das genaue Procedere hier nicht weiter beschrieben.

#### **4.1.5 Präparation des Zell- Sonifikates**

Frische bzw. aufgetaute Zell- Pellets werden mit 0,9% NaCl versetzt und in ein wässriges Eisbad gestellt. Durch fraktioniertes Ultraschallen (vier- bis fünfmal 3-4 Sekunden lang) mittels eines Sonifiziers brechen die Zellen auf. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 5000 U/min wird der Überstand in ein neues Eppendorf- Tube überführt. Dieses Sonifikat kann ebenfalls bei –20 °C gelagert werden.

## 4.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Für die Proteinbestimmung [73] werden folgende Lösungen benötigt:

A:	2% $\text{Na}_2\text{CO}_3$ in n/ 10 NaOH
Ba:	5,5 g $\text{CuSO}_4$ / 100 ml
Bb:	1,35 g Seignettensalz/ 100ml NaK-Tartrat

Das Reaktionsgemisch C wird immer frisch hergestellt aus:

$$10 \mu\text{l} \text{ Ba} + 100 \mu\text{l} \text{ Bb} + 5 \text{ ml} \text{ A}$$

Als Standard dient Rinderalbuminlösung in den Konzentrationen:

0,03 mg/ml, 0,06 mg/ml,

0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml und 0,5 mg/ml.

20  $\mu\text{l}$  Standard bzw. verdünnte Probe wird mit 250  $\mu\text{l}$  Reaktionsgemisch C versetzt. Nach 5-10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden 25  $\mu\text{l}$  Folin- Ciocalteus- Phenol- Lösung (1:1 verdünnt mit 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) hinzugegeben und dieser Ansatz 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wird die Extinktion der Standards und Proben bei 734 nm Wellenlänge photometrisch gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wird an der Eichkurve abgelesen.

## 4.3 Bestimmung der Enzymaktivität der N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase

Die photometrische Bestimmung der N-Acetylgalactosamin-6- Sulfatase- Aktivität wurde nach einer von van Diggelen [147] etablierten Methode, mit dem fluoreszierenden künstlichen Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galactosid-6-Sulfat (MUF-1), in zwei Reaktionsschritten durchgeführt:

In der ersten Reaktion wird die Sulfatgruppe des MUF-1 durch die N-Acetylgalactosamin-6- Sulfatase abgespalten.

Für die zweite Inkubation wird künstlich standardisierte  $\beta$ -Galactosidase hinzugegeben. Das hierbei entstehende 4-Methylumbelliferon kann fluorometrisch gemessen werden.

#### 4.3.1 Testansatz

Das Reaktionsgemisch wird durch Zugabe von 2 mM MUF-1 in 0,1 M Natriumacetat- Puffer mit pH 4,3 hergestellt und kann bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Als Leerwert (LW) werden folgende Standards (ST) in aufsteigender Konzentration gerechnet:

0	Aqua bidest.
10	10 $\mu\text{l}$ MUF-1 + Aqua bidest.
25	25 $\mu\text{l}$ MUF-1 + Aqua bidest.
50	50 $\mu\text{l}$ MUF-1 + Aqua bidest.

Von Probe (P) und Standards werden jeweils 10  $\mu\text{l}$  mit 20  $\mu\text{l}$  Reaktionsgemisch versetzt und 17 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Reaktion wird nach Ablauf der Inkubationszeit durch Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  Phosphat-Puffer mit pH 4,3 gestoppt. Anschließend werden jeweils 10  $\mu\text{l}$  standardisierte  $\beta$ -Galactosidase, gelöst in aqua bidest., zugegeben und 2 Stunden bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Reaktion wird nach Ablauf der Inkubationszeit durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Natriumcarbonat-Puffer mit pH 10,7 gestoppt. Die Messung des fluoreszierenden 4-Methylumbelliferons erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 360 nm für die Exzitation und 448 nm für die Emission.

### 4.3.2 Berechnung der Aktivität

Die Berechnung der Aktivität wird folgendermaßen vorgenommen:

$$\frac{\text{Extinktion (P)} - \text{Extinktion (LW)}}{\text{Extinktion (ST 50)} - \text{Extinktion (ST 0)} \times \text{mg Protein}} \times 50 \mu\text{M}$$

Die Aktivität der N-Acetylgalactosamin-6- Sulfatase wird in nmol/17h/mg Protein angegeben.

### 4.4 Bestimmung der Enzymaktivität der $\beta$ -Galactosidase

Die photometrische Bestimmung der  $\beta$ -Galactosidase wurde nach einer von van Diggelen [147] etablierten Methode, mit dem fluoreszierenden, künstlichen Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (MUF-2) durchgeführt. In saurem Milieu hydrolysiert  $\beta$ -Galactosidase MUF-2, das hierbei entstehende 4-Methylumbelliferon kann photometrisch gemessen werden.

#### 4.4.1 Testansatz

Das Reaktionsgemisch wird durch Zugabe von 1,2 mM (MUF-2) in 0,1 M Acetat-Puffer mit pH 4,3 hergestellt und kann bei  $-20$  °C gelagert werden. Als Leerwert werden die Standards in aufsteigender Konzentration gerechnet:

0	reines Aqua bidest. ohne MUF-2-Zusatz
10	10 $\mu\text{l}$ MUF-2 + Aqua bidest.
25	25 $\mu\text{l}$ MUF-2 + Aqua bidest.

75  $\mu$ l Probe und Leerwert werden mit je 150  $\mu$ l Reaktionsgemisch versetzt und 75 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird nach Ablauf der Inkubationszeit durch Zugabe von 750  $\mu$ l Natriumcarbonat-Puffer, pH 10,7 gestoppt. Die Messung des 4-Methylumbelliferos erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 360 nm für die Exzitation und 448 nm für die Emission.

#### 4.4.2 Berechnung der Aktivität

Die Berechnung der Aktivität erfolgt gemäß:

$$\frac{\text{Extinktion (P)} - \text{Extinktion (LW)}}{\text{Extinktion (ST 25)} - \text{Extinktion (ST 0)} \times \text{min} \times \text{mg Protein}} \times 25 \mu\text{M}$$

Die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase wird in nmol/min/mg Protein angegeben.

### 5. Patienten

#### 5.1 Mucopolysaccharidose Typ IV A

##### Patient 1:

Bei dem Jungen türkischer Abstammung fiel im Alter von zwei Jahren ein verzögertes Wachstum auf. Als Referenz wurde eine Blutprobe der Mutter untersucht. Aufgrund einer erneuten Schwangerschaft und der nachgewiesenen MPS IV A des ersten Kindes wurde auch eine pränatale Diagnostik an Amnionzellen durchgeführt.

#### Patient 2:

Die Tochter konsanguiner türkischer Eltern wurde ab dem dritten Lebensjahr durch ein verlangsamtes Wachstum und auffällig vergröberte Gesichtszüge symptomatisch.

#### Patient 3:

Der Junge türkischer Abstammung zeigte mit sieben Jahren ein verzögertes Wachstum mit verkürztem Körperstamm und deutlich vergröberte Gesichtszüge. Darüber hinaus Kontrakturen der Finger und schlaffe Fußgelenke.

## **5.2 Mucopolysaccharidose Typ IV B**

#### Patient 4:

Bei dem Jungen konsanguiner türkischer Eltern fiel im zweiten Lebensjahr eine deutliche Wachstumsverzögerung auf.

## **6. Ergebnisse**

### **6.1 Fluoreszenzphotometrische Bestimmung der N-Acetylgalactosamin-6- Sulfatase- Aktivität**

#### **6.1.1 Inkubationszeitabhängigkeit**

Die folgende Untersuchung zeigt die Abhängigkeit der N-Acetylgalactosamin-6- Sulfatase- Aktivität von der Inkubationszeit in Leukozyten, Lymphozyten, Fibroblasten und Amnionzellen. Hierfür wurden Homogenate der jeweiligen Zellreihe hergestellt und unterschiedlich lang im jeweiligen Inkubationsschritt

(erste Inkubation: 5, 10, 15, 20 Stunden (h); zweite Inkubation: 1, 2, 3 h) inkubiert.

Die Abbildungen 10 und 11 zeigen einen stetigen, linearen Anstieg der Absorptionsänderung bei Zunahme der Inkubationsdauer. Für die Routine-Untersuchung wurde eine Inkubationszeit von 17 h für die erste Inkubation und 2h für die zweite Inkubation für alle Zellreihen festgelegt.

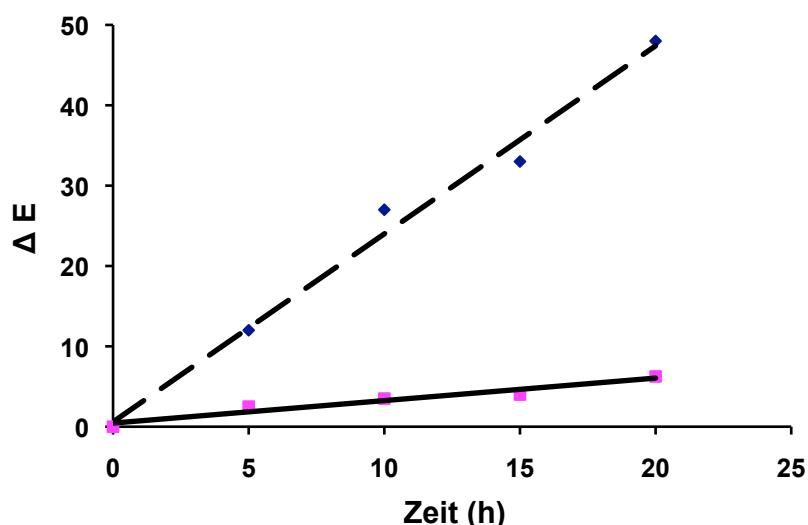


Abbildung 10: Inkubationszeitabhängigkeit der N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase- Aktivität in Leukozyten (gestrichelte Linie) und Lymphozyten (durchgezogene Linie)

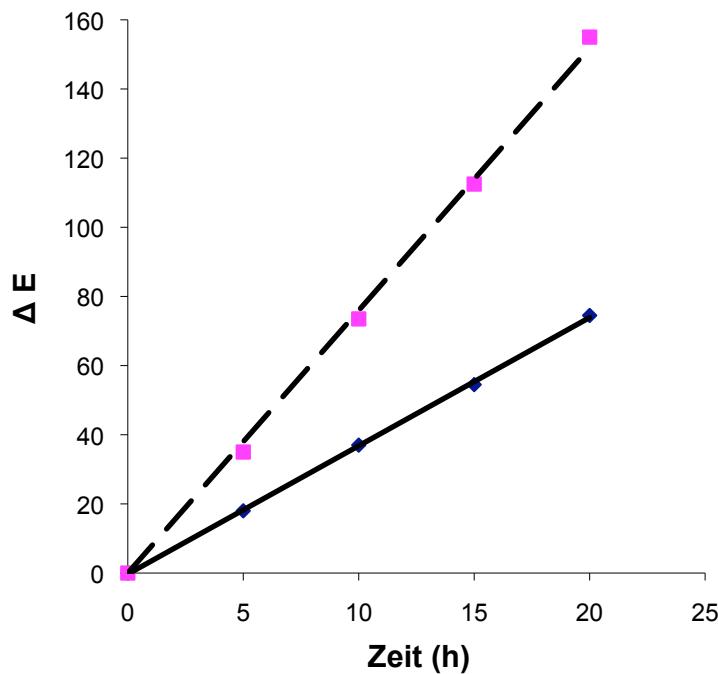


Abbildung 11: Inkubationszeitabhängigkeit der N-Acetylgalactosamin-6- Sulfatase- Aktivität in Fibroblasten (gestrichelte Linie) und Amnionzellen (durchgezogene Linie)

### 6.1.2 Proteinabhängigkeit

Aus frischem bzw. aufgetautem Zellsonifikat wurden mittels Aqua bidest. Probenlösungen mit unterschiedlicher Proteinkonzentration hergestellt und 19 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion im Fluoreszenzphotometer bei einer Wellenlänge von 734 nm.

In den Abbildungen 12 und 13 ist das direkt proportionale Verhalten der Extinktion zur Proteinkonzentration grafisch dargestellt. Für die Versuche wurde ein Proteingehalt von 0,12-1,2 mg/ml für Leukozyten und Lymphozyten und 0,25-1,8 mg/ml für Fibroblasten und Amnionzellen gewählt.

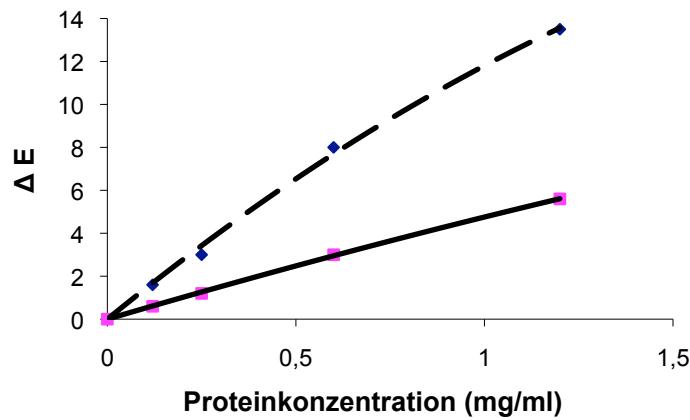


Abbildung 12: Proteinkonzentrationsabhängigkeit der N-Acetylgalactosamin-6- Sulfatase- Aktivität in Leukozyten (gestrichelte Linie) und Lymphozyten (durchgezogene Linie)

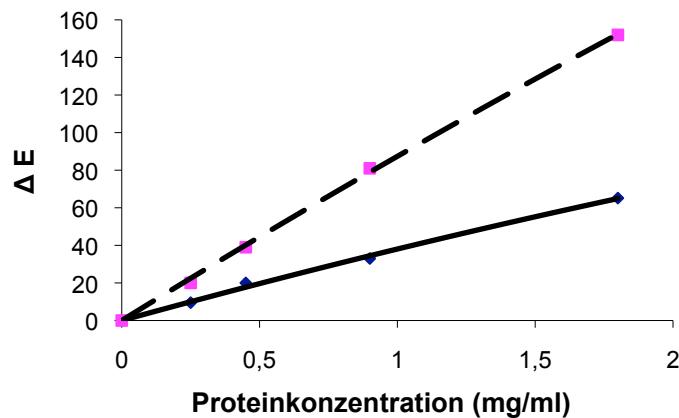


Abbildung 13: Proteinkonzentrationsabhängigkeit der N-Acetylgalactosamin-6- Sulfatase- Aktivität in Fibroblasten (gestrichelte Linie) und Amnionzellen (durchgezogene Linie)

### 6.1.3 Stabilitätsmessungen

Für diese Untersuchung wurden N-Acetylgalactosamin-6- Sulfatase- Aktivitäten in drei verschiedenen Zellreihen unmittelbar nach Sonifikation, bzw. mehrere Tage danach (6, 20, 210 Tage bei Leukozyten und Lymphozyten, 11, 36, 210 Tage bei Fibroblasten) bestimmt. Zwischenzeitlich wurden die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die Abbildungen 14 und 15 beschreiben nur eine geringfügige Aktivitätsminderung, aufgrund des wiederholten Einfrierens und Auftauens über einen längeren Zeitraum. Dies beweist eine große Stabilität des Enzyms.

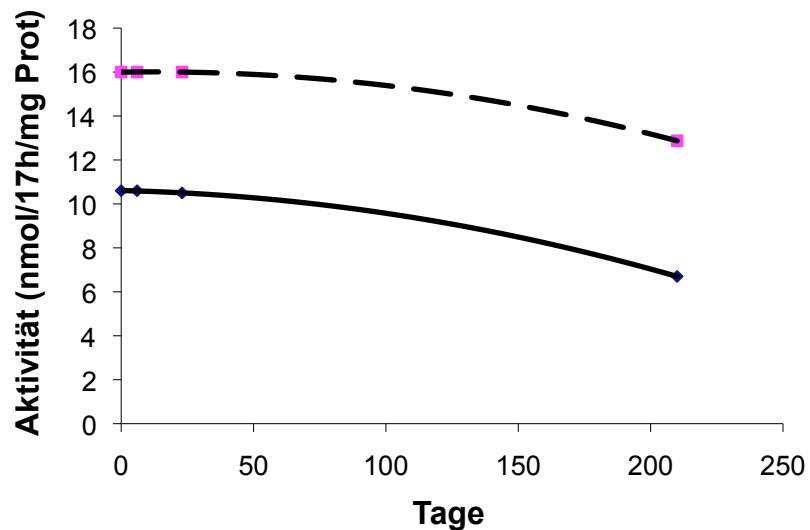


Abbildung 14: Stabilität der N-Acetylgalactosamin-6- Sulfatase in Leukozyten (gestrichelte Linie) und Lymphozyten (durchgezogene Linie)

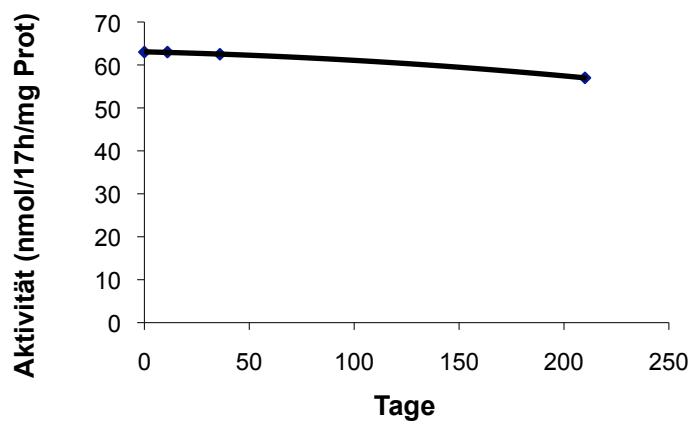


Abbildung 15: Stabilität der N-Acetylgalactosamin-6- Sulfatase in Fibroblasten

#### 6.1.4 Enzymkinetik

Zur Untersuchung der kinetischen Eigenschaft der N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase wurde die Reaktion mit jeweils unterschiedlicher Substratkonzentration (0,16 / 0,25 / 0,41 / 1,3 mM) in Leukozyten, Lymphozyten und Fibroblasten gestartet.

Die Aktivität wurde nach einer Inkubationsdauer von 19 Stunden fluorometrisch gemessen und wie in den Abbildungen 16-18 zu sehen, doppelreziprok nach Lineweaver- Burk linear dargestellt. Hieraus ergeben sich Michaelis- Menten-Konstanten (K<sub>m</sub>- Werte) von 0,23 mM für Leukozyten, 0,26 mM für Lymphozyten und 0,32 mM für Fibroblasten.

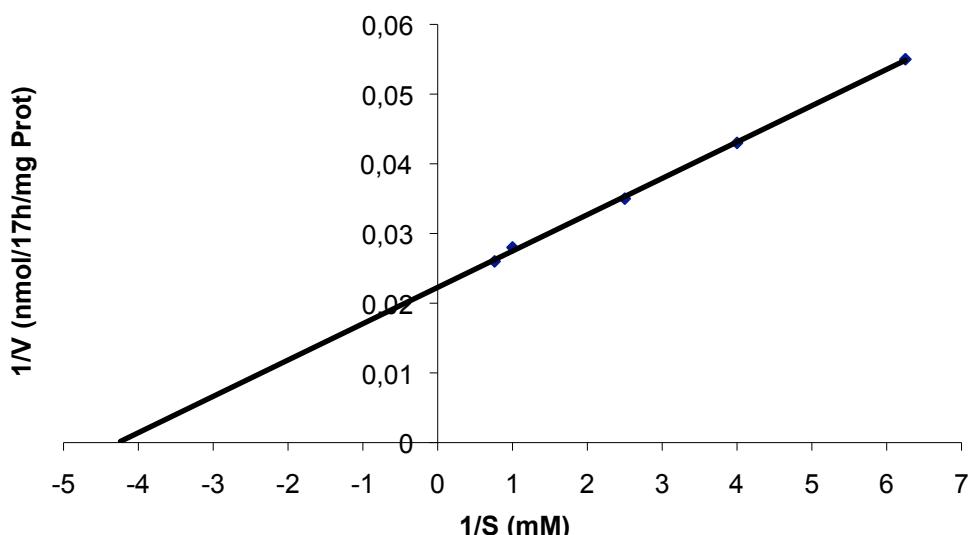


Abbildung 16: Enzymkinetik in Leukozyten, K<sub>m</sub>-Wert: 0,23 (mM)

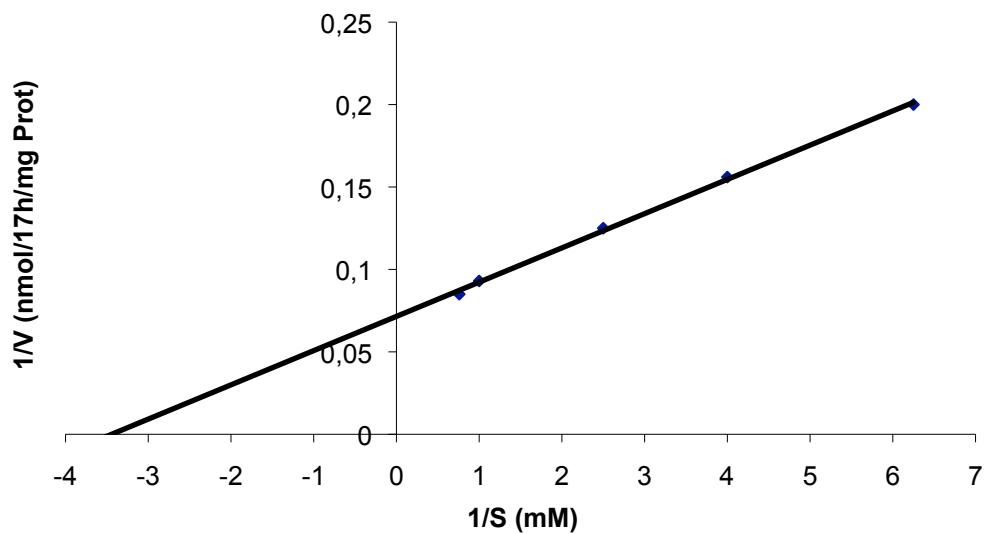


Abbildung 17: Enzymkinetik in Lymphozyten, Km-Wert: 0,26 (mM)

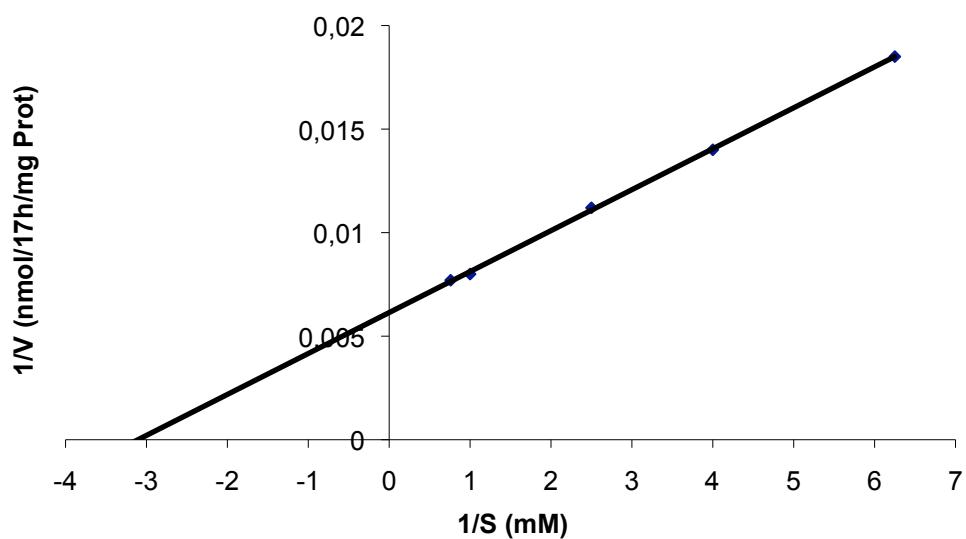


Abbildung 18: Enzymkinetik in Fibroblasten, Km-Wert: 0,32 (mM)

### 6.1.5 N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivitätsbereich

Die N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivität wurde in Leukozyten, Lymphozyten, Fibroblasten und Amnionzellen gesunder Probanden gemessen (Tabelle 1). In 15 Leukozytenproben beträgt die mittlere Enzymaktivität 49,4 nmol/17h/mg Protein, bei einer Standardabweichung von 9,9.

Die in 12 Fibroblastenkulturen bestimmte Aktivität beträgt im Mittel 203,4 nmol/17h/mg Protein, mit einer Standardabweichung von 30,2. Eine Amnionzellkultur zeigte eine Enzymaktivität von 71,2 nmol/17h/mg Protein. Von allen Zellarten war die mittlere Aktivität in Lymphozyten mit 23,1 nmol/17h/mg Protein am niedrigsten; bei einer Standardabweichung von 5,8.

Zellart	N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivität	(nmol/17h/mg Protein)
Leukozyten	Normbereich (n = 15):	13,2 - 116,5
	Mittelwert:	49,4
	Standardabweichung:	9,9
Lymphozyten	Normbereich (n = 17)	10,3 - 81,4
	Mittelwert	23,1
	Standardabweichung	5,8
Fibroblasten (kultiviert)	Normbereich (n = 12)	60,3 - 407,3
	Mittelwert	203,4
	Standardabweichung	30,2

Tabelle 1: Normwerte für N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase- Aktivität

## 6.1.6 Patientenergebnisse Morquio-A

Tabelle 2 zeigt die in Leukozyten gemessene Aktivität der N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase der drei an MPS IV-A erkrankten Patienten im Alter von 2,3 und 7 Jahren. Teilweise konnten elterliche Blutproben (Leukozyten) als Referenzwerte herangezogen werden. Bei den Eltern von Patient 1 und 2 liegt die N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivität im niedrigen Normbereich. Auffallend sind die signifikanten Aktivitätsunterschiede um mindestens den Faktor 100 zwischen den gesunden Eltern und den erkrankten Kindern.

<b>Patient / Elterliche Referenz</b>	<b>Aktivität</b>	<b>Normbereich</b>
	(nmol/17h/mgProtein)	
<b>Patient 1</b>	<b>0,06</b>	13,2 - 116,5
Mutter von Pat. 1	42,5	13,2 - 116,5
<b>Patient 2</b>	<b>0,2</b>	13,2 - 116,5
Mutter von Pat. 2	43,7	13,2 - 116,5
Vater von Pat. 2	35,9	13,2 - 116,5
<b>Patient 3</b>	<b>0,9</b>	13,2 - 116,5

**Tabelle 2: N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivität in Leukozyten von Patienten mit MPS IV-A und deren Eltern**

Zur pränatalen Diagnostik bei erneuter Schwangerschaft der Mutter von Patient 1 wurden darüber hinaus Amnionzellen getestet, mit unauffälligem Ergebnis (Tabelle 3).

Patient	Aktivität	Normbereich
(nmol/17h/mg Protein)		
Mutter von Pat. 1	79,5	71,2

Tabelle 3: N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivität in Amnionzellen

## 6.2 Fluoreszenzphotometrische Bestimmung der $\beta$ -Galactosidase

### 6.2.1 Inkubationszeitabhängigkeit

Diese Untersuchung zeigt die Abhängigkeit der  $\beta$ -Galactosidase- Aktivität von der Inkubationszeit in Leukozyten, Lymphozyten, Fibroblasten und Amnionzellen. Hierfür wurden Homogenate der jeweiligen Zellreihe hergestellt und unterschiedlich lang (30/ 60/ 90/ 120 min) inkubiert.

Die Abbildungen 19 und 20 zeigen für alle Zellarten einen stetigen, linearen Anstieg der Absorptionsänderung bei Zunahme der Inkubationsdauer. Für alle Versuche wurde daher eine Inkubationszeit von 75 Minuten festgelegt.

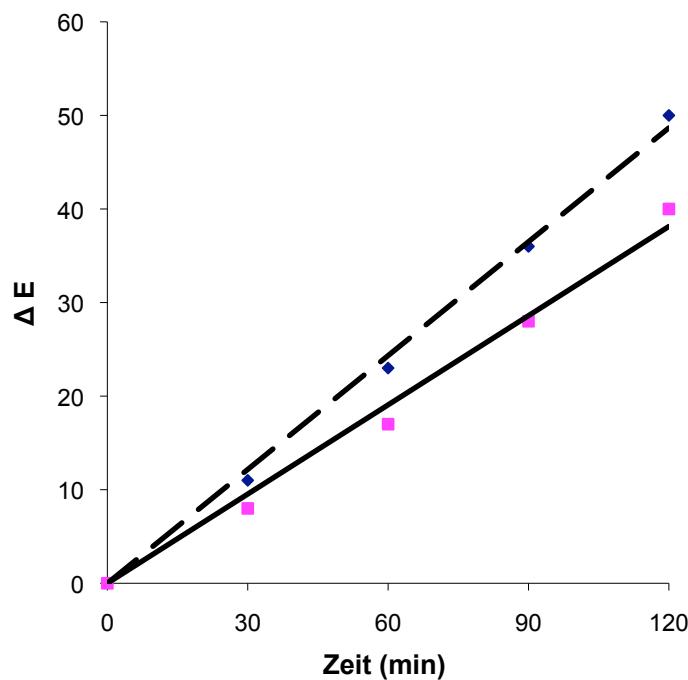


Abbildung 19: Inkubationszeitabhängigkeit der  $\beta$ -Galactosidase- Aktivität in Leukozyten (gestrichelte Linie) und Lymphozyten (durchgezogene Linie)

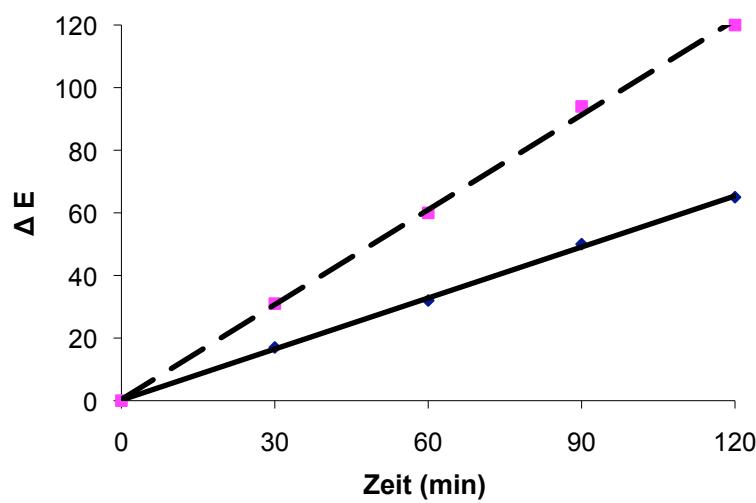


Abbildung 20: Inkubationszeitabhängigkeit der  $\beta$ -Galactosidase -Aktivität in Fibroblasten gestrichelte Linie) und Amnionzellen (durchgezogene Linie)

## 6.2.2 Proteinabhängigkeit

Aus frischem bzw. aufgetautem Zellsonifikat wurden mittels Aqua bidest. Probenlösungen mit unterschiedlicher Proteinkonzentration hergestellt und 75 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Extinktion im Fluoreszenzphotometer bei einer Wellenlänge von 734 nm.

In den Abbildungen 21 und 22 zeigt sich ein direkt proportionales Verhalten der Extinktion zur Proteinkonzentration. Für die Routineuntersuchung wurde ein Proteingehalt von 0,025-0,03 mg/ml für Leukozyten und Lymphozyten und 0,008-0,01 mg/ml für Fibroblasten und Amnionzellen gewählt.

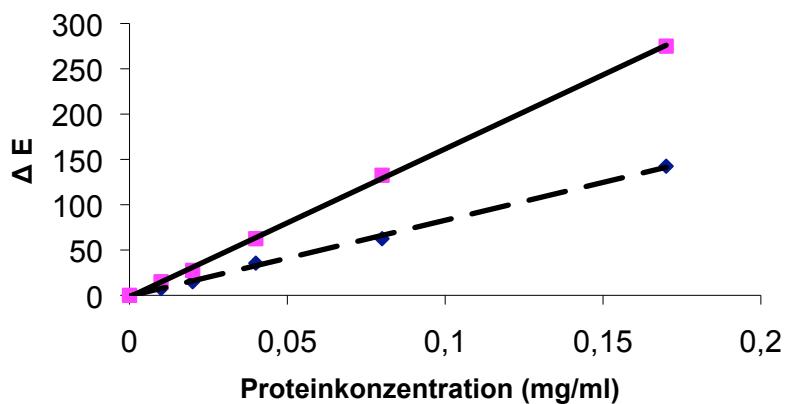


Abbildung 21: Proteinkonzentrationsabhängigkeit der  $\beta$ -Galactosidase- Aktivität in Leukozyten (gestrichelte Linie) und Lymphozyten (durchgezogene Linie)

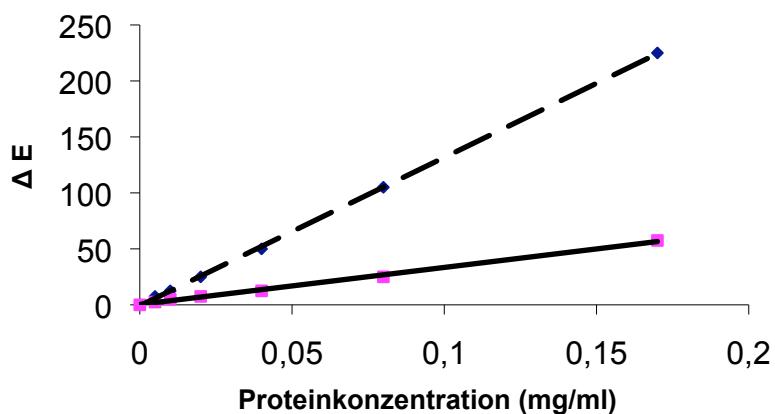


Abbildung 22: Proteinkonzentrationsabhängigkeit der  $\beta$ -Galactosidase- Aktivität in Fibroblasten (gestrichelte Linie) und Amnionzellen (durchgezogene Linie)

### 6.2.3 Stabilität

Für diese Untersuchung wurde die  $\beta$ -Galactosidase- Aktivität einer Amnionzellkultur unmittelbar nach Sonifikation, bzw. 4 und 34 Tage danach bestimmt. Zwischenzeitliche Aufbewahrung der Probe bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Abbildung 23 zeigt eine Aktivitätsminderung von 14% nach einem Monat. Das Enzym weist damit eine große Stabilität auf.

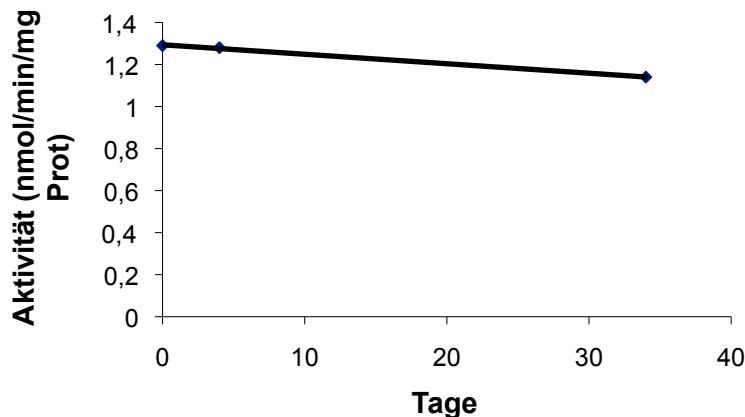


Abbildung 23: Stabilität der  $\beta$ -Galactosidase in Amnionzellen

### 6.2.4 Enzymkinetik

Für die Untersuchung der kinetischen Eigenschaften der  $\beta$ -Galactosidase wurde die Reaktion mit jeweils unterschiedlicher Substratkonzentration (0,16 / 0,25 / 0,41 / 1,3 mM) in Fibroblasten und Amnionzellen gestartet.

Die Aktivität wurde nach einer Inkubationsdauer von 75 Minuten fluorometrisch gemessen und wie in den Abbildungen 24 und 25 zu sehen, doppelreziprok nach Lineweaver-Burk linear dargestellt. Hieraus ergeben sich Michaelis-Menten- Konstanten ( $\text{Km}$ - Werte) von 0,13 mM für Fibroblasten und 0,19 mM für Amnionzellen.

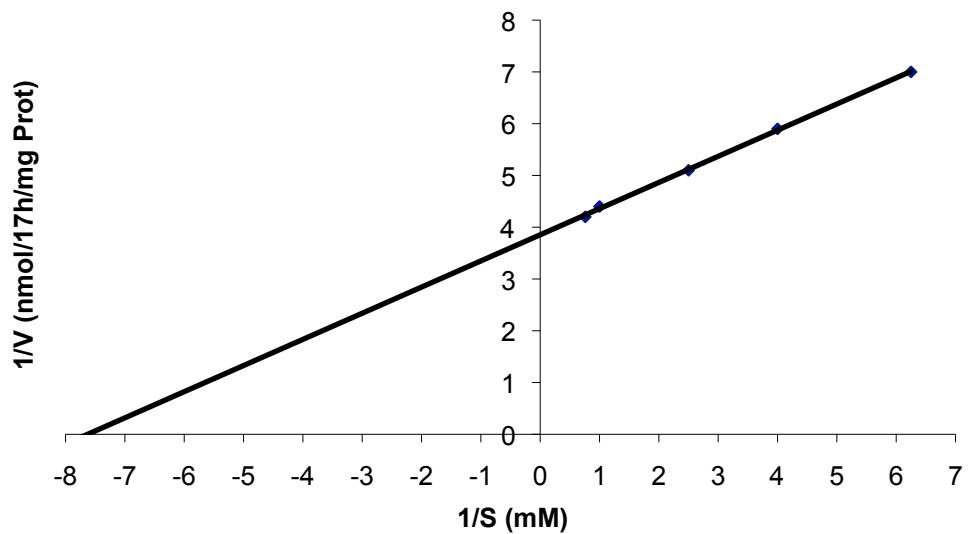


Abbildung 24: Enzymkinetik in Fibroblasten,  $K_m$ - Wert: 0,13 (mM)

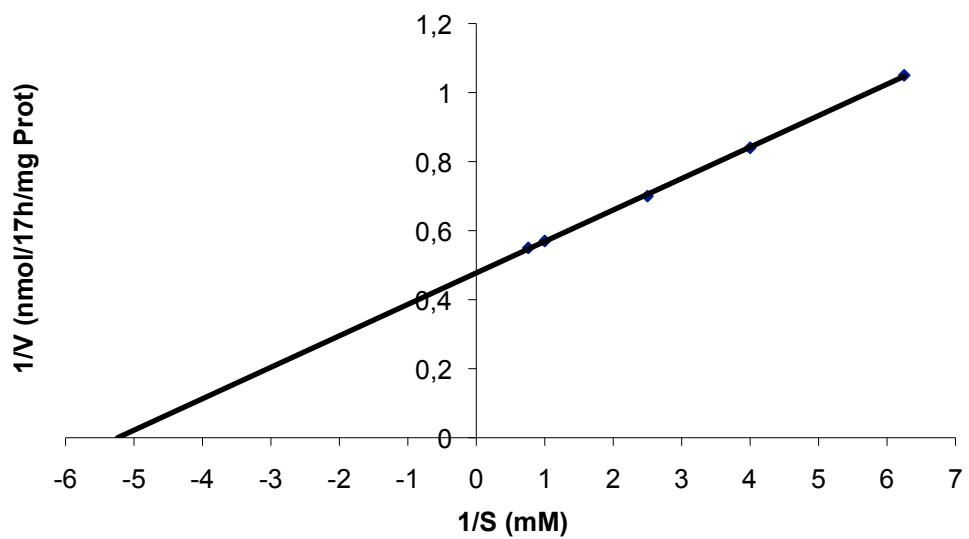


Abbildung 25: Enzymkinetik in Amnionzellen,  $K_m$ - Wert: 0,19 (mM)

## 6.2.5 $\beta$ -Galactosidase-Aktivitätsbereich

Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität wurde in Leukozyten, Lymphozyten, Fibroblasten und Amnionzellen gesunder Probanden gemessen (Tabelle 4). In 16 Leukozyten- und 15 Lymphozytenproben beträgt die mittlere Enzymaktivität 2,9 bzw. 2,3 nmol/min/mg Protein, bei einer Standardabweichung von jeweils 1,0. Die in 19 Fibroblastenkulturen bestimmte Aktivität beträgt im Mittel 4,2 nmol/min/mg Protein, mit einer Standardabweichung von 1,4. Von allen Zellarten war die mittlere Aktivität in 7 Amnionzellen mit 2,0 nmol/min/mg Protein am niedrigsten, bei einer Standardabweichung von 0,4.

Zellart	$\beta$ -Galactosidase-Aktivität	(nmol/min/mg Protein)
Leukozyten	Normbereich (n = 16):	1,2 - 6,4
	Mittelwert:	2,9
	Standardabweichung:	1,0
Lymphozyten	Normbereich (n = 15)	1,2 - 5,6
	Mittelwert	2,3
	Standardabweichung	1,0
Fibroblasten (kultiviert)	Normbereich (n = 12)	1,4 - 9,6
	Mittelwert	4,2
	Standardabweichung	1,4
Amnionzellen (kultiviert)	Normbereich (n = 7)	0,7 - 3,1
	Mittelwert	2,0
	Standardabweichung	0,4

Tabelle 4: Normwerte für  $\beta$ -Galactosidase- Aktivität

## 6.2.6 Patientenergebnisse Morquio-B

Tabelle 5 zeigt die in Leukozyten gemessene Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase des an MPS IV-B erkrankten Patienten im Alter von 2 Jahren, sowie dessen elterliche Referenzwerte. Die Eltern besitzen ebenfalls eine deutlich verminderte Enzymaktivität, beklagen aber keine Krankheitssymptome. Somit ist der Patient 4 der homozygote, an MPS IV-B erkrankte Sohn heterozygoter und phänotypisch unauffälliger Eltern.

Patient / Elterliche Referenz	Aktivität	Normbereich
	(nmol/min/mg Protein)	
<b>Patient 4</b>	<b>0,05</b>	1,2 – 6,4
Mutter von Pat. 4	0,60	1,2 – 6,4
Vater von Pat. 4	0,75	1,2 – 6,4

Tabelle 5:  $\beta$ -Galactosidase-Aktivitäten in Leukozyten eines Patienten mit MPS IV-B und dessen Eltern

## 7. Diskussion

### 7.1 Bestimmung der N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase-Aktivität

Die fluoreszenzphotometrische Bestimmung der N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase mit dem künstlichen Substrat 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galactosid-6-Sulfat (MUF-1) (2mM) beruht auf einer von van Diggelen et al. 1993 [147] erstmals beschriebenen Methode. In der Originalarbeit wurde die Charakterisierung des Enzyms nur an Leukozyten und Fibroblasten durchgeführt. Hierfür wurde ein Zellsonifikat verwendet, welches zuvor gegen

einen 10 mM Natriumacetat-Puffer mit pH 6 dialysiert worden war. Um die Untersuchung zu vereinfachen verzichteten wir auf diesen zeitaufwendigen Dialyseschritt, ohne signifikante Ergebnisveränderungen.

Der Test besteht aus zwei Inkubationsschritten. Während der ersten Inkubation spaltet die N-Acetylgalactosamin-6- Sulfatase die Sulfatgruppe des MUF-1-Substrates ab.

Im zweiten Inkubationsschritt entsteht unter Zugabe von künstlicher, standardisierter  $\beta$ -Galactosidase das fluoreszenzphotometrisch messbare 4-Methylumbelliferon.

Wir konnten eine lineare Abhängigkeit der Inkubationszeit zur Absorptionsänderung innerhalb der ersten 20 Stunden zeigen (Abbildung 10 und 11) und starteten alle Zellreihen routinemäßig mit 17 h für die erste und 2 h für die zweite Inkubation. Ebenfalls linear verläuft die Absorptionsveränderung zur Proteinkonzentration bei Fibroblasten und Amnionzellen (Abbildung 13).

Bei Leukozyten und Lymphozyten flacht die Kurve bei einer Konzentration von 1,2 mg/ml geringfügig ab (Abbildung 12).

Eine von uns durchgeführte Bestimmung erbrachte  $K_m$ - Werte von 0,23 mM in Leukozyten ( $n = 15$ ), 0,26 mM in Lymphozyten ( $n = 17$ ) und 0,32 mM in Fibroblasten ( $n = 12$ ). Der von van Diggelen et al. angegebene Normbereich in kultivierten Fibroblasten und Leukozyten korreliert mit unseren Werten (Tabelle 6). Darüber hinaus wurden Normbereiche für Lymphozyten und kultivierte Amnionzellen durch unsere Untersuchungen ermittelt (Tabelle 1). Die verwendeten Zellen und Sonifikate lassen sich problemlos bei  $-20^\circ$  lagern.

Gemäss Abbildung 14 und 15 liegt der Aktivitätsverlust der N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase bei einer Lagerungszeit von ca. zwei Monaten bei 10%.

→ Dies beweist die große Stabilität des Enzyms.

Normwerte	Eigene Werte	van Diggelen [147]
(nmol/17h/mg Protein)		
Leukozyten (n=15)	13,2 - 116,5	40 - 170
Lymphozyten (n=17)	10,3 - 81,4	---
Fibroblasten (n=12)	60,3 - 407,3	95 - 360
Amnionzellen (n=1)	71,2	---

Tabelle 6: Zusammenfassung der eigenen und Literatur- Normwerte

## 7.2 Patientenergebnisse

Gemäß Literatur muss bei einer Enzymaktivität kleiner 1,5 für Leukozyten und Lymphozyten, bzw. 4 für Fibroblasten und Amnionzellen von einer Morquio-A-Erkrankung ausgegangen werden [147].

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei drei Patienten die Diagnose Morquio A enzymatisch bestätigt werden. Die Kinder türkischer Abstammung im Alter von 2,3 und 7 Jahren fielen initial jeweils durch mehr oder minder stark ausgeprägte Wachstumsverzögerungen auf. Tabelle 2 zeigt eine Auflistung der pathologischen Enzymaktivitäten in den Leukozyten dieser Patienten. Die Enzymaktivitäten bei den Eltern von Patient 1 und 2 liegen im niedrigen Normbereich. Aufgrund der MPS-IV-A- Diagnose des ersten Kindes wurde bei der Mutter von Patient 1, bei erneuter Schwangerschaft eine pränatale Diagnostik an Amnionzellen durchgeführt; mit unauffälligem Ergebnis (siehe Tabelle 3). Bei Patient 3 beginnt die enzymatische Diagnostik im 7. Lebensjahr relativ spät. Bemerkenswert ist hierbei, dass die Restenzymaktivität (Tabelle 2) mit dem Alter der klinischen Manifestation korreliert. Dies entspricht der in der Fachliteratur viel zitierten entscheidenden Relation zwischen Genotyp, Phänotyp und akkumulierter Keratansulfatkonzentration [20,21,64,84,127,128,130].

Darüber hinaus verdeutlicht dies umso mehr, wie unspezifisch kindliche Wachstumsverzögerungen, je nach Ausprägung sein können. Entscheidend ist daher die Wahrnehmung dieser Verzögerungen durch das psychosoziale Umfeld der Kinder. Ist die Arbeitshypothese aufgrund der Klinik gegeben, lässt sich durch eine einfache Blutentnahme die Diagnose enzymatisch bestätigen. Wenn wie in unserem Fall das nächste Speziallabor weiter entfernt ist, kann eine Hautbiopsie fachgerecht versorgt, problemlos als Gewebeprobe verschickt werden. Das Zeitfenster bis zur Diagnose vergrößert sich hierbei, da die Fibroblasten zunächst subkultiviert werden müssen.

### **7.3 Bestimmung der $\beta$ -Galactosidase- Aktivität**

Die unter 7.1 beschriebene Untersuchung wurde durch uns modifiziert und erweitert, um auch einen Mangel an  $\beta$ -Galactosidase bestimmen zu können. Als künstliches Substrat wird 1,2 mM 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid (MUF-2) verwendet. In saurem Milieu hydrolysiert  $\beta$ -Galactosidase MUF-2 zu 4-Methylumbelliferon. Auf eine Dialyse des Zellsonifikates vor Testbeginn wurde wie beim MPS IV-A-Test verzichtet. Wir konnten eine lineare Abhängigkeit sowohl der Proteinkonzentration (Abbildungen 21 und 22), als auch der Inkubationszeit (Abbildungen 19 und 20) zur Absorptionsänderung innerhalb der ersten 120 Minuten nachweisen. Routinemäßig wurden alle Zellreihen mit 75 Minuten Inkubationszeit gestartet, bei einer Proteinkonzentration von 0,025-0,03 mg/ml für Leukozyten und Lymphozyten und 0,008-0,01 mg/ml für Fibroblasten und Amnionzellen. Eine von uns durchgeführte Bestimmung erbrachte Km-Werte von 0,13 mM in kultivierten Fibroblasten (n = 19) und 0,19 mM in kultivierten Amnionzellen (n = 7). In Tabelle 7 sind die Normwerte unserer Testreihen und die in der Literatur angegebenen Werte zusammengefasst, eine Korrelation ist gegeben.

Zur Stabilitätsmessung wurden Amnionzellen herangezogen. Abbildung 23 zeigt über einen Lagerungszeitraum von etwa einem Monat einen Aktivitätsverlust der  $\beta$ -Galactosidase- Aktivität von 14%. Es handelt sich somit ebenfalls um ein sehr stabiles Enzym, das problemlos bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden kann.

Normwerte	Eigene Werte	van Diggelen [147]
(nmol/min/mg Protein)		
Leukozyten (n=16)	1,2 - 6,4	1 - 6
Lymphozyten (n=15)	1,2 - 5,6	---
Fibroblasten (n=19)	1,4 - 9,6	1 - 6
Amnionzellen (n=7)	0,7 - 3,1	---

Tabelle 7: Zusammenfassung der eigenen und Literatur-Normwerte

## 7.4 Patientenergebnisse

Mit Hilfe der von uns modifizierten Untersuchung konnte der enzymatische Nachweis einer MPS IV-B- Erkrankung bei einem kleinen Jungen, Patient 4, mit auffälliger Wachstumsverzögerung im Alter von zwei Jahren erbracht werden. Der bei den Eltern durchgeföhrte Enzymtest zeigte ebenfalls deutlich erniedrigte Aktivitätswerte der  $\beta$ -Galactosidase bei jedoch unauffälligem Phänotyp. Dies entspricht einem heterozygoten Genotyp. Die Enzymaktivität des homozygoten Sohnes ist um den Faktor 10 niedriger als die der Eltern (Tabelle 5). Bei zwei anderen Familienmitgliedern mit MPS IV-B (1 deutsches, 1 türkisches) war die  $\beta$ -Gal- Aktivität in Leukozyten gut unterscheidbar zwischen Homozygote, Heterozygote und Kontrolle (persönliche Mitteilung von Prof. Shin). Im Vergleich zum homozygot Erkrankten haben heterozygote Überträger also einen intermediären Enzimmangel.

Mit dem in dieser Arbeit beschriebenen enzymatischen Testverfahren kann somit zwischen homozygoten und heterozygoten Merkmalsträgern, unabhängig von klinischen Symptomen unterschieden werden.

## 8. Zusammenfassung

Die von Luis Morquio 1929 erstmals beschriebene und nach ihm benannte Mucopolysaccharidose Typ IV gehört zum Formenkreis der lysosomalen Speichererkrankungen. Die seltene Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt. Man unterscheidet zwei Subtypen. Bei Typ A liegt ein Mangel an N-Acetylgalactosamin-6- Sulfatase vor. Das entsprechende Gen ist lokalisiert auf Chromosom 16q24. Der phänotypisch milder ausgeprägte und seltener Typ B beschreibt einen Mangel an  $\beta$ -Galactosidase, welche auf Chromosom 3p21.33 kodiert. Auf dem gleichen Gen (GLB1) kodiert auch die GM1-Gangliosidose. Somit ist ein Mangel an  $\beta$ -Galactosidase, entsprechend dem Mutationsmuster, ursächlich für zwei unterschiedliche Erkrankungen. N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase und  $\beta$ -Galactosidase katabolisieren endolysosomal die Glykosaminoglykane Keratan- und Chondroitin- Sulfat. Ist die Enzymaktivität vermindert akkumulieren diese hochmolekularen Glykosaminoglykane in intrazellulären Vakuolen. Dies führt zu Funktionsstörungen der einzelnen Zellen und damit zu einer Veränderung der extrazellulären Matrix, vor allem im Knorpelgewebe. Charakteristische Symptome sind vor allem muskuloskelettale Veränderungen, so fallen betroffene Kinder initial meist durch eine Wachstumsverzögerung und vergröberte Gesichtszüge auf.

Die enzymatische Untersuchung basiert auf der Verwendung von Methylumbelliferyl als künstliches Substrat. Das in der Reaktion mit N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase, bzw.  $\beta$ -Galactosidase anfallende Spaltprodukt Methylumbelliferon kann fluoreszenzphotometrisch gemessen und damit die Enzymaktivität berechnet werden. Wir konnten die in unserem Labor bereits durchgeführten Routineuntersuchungen mit Leukozyten und Fibroblasten erweitern und Aktivitäts-Normwerte für Lymphozyten und Amnionzellen hinzufügen. Darüber hinaus wurde die jeweilige Enzymabhängigkeit von

Proteingehalt, Inkubationszeit und Substratmenge, sowie die Enzymstabilität über verschieden lange Zeiträume untersucht. Durch eine Modifikation des Morquio-A- Testes gelang es uns auch eine Aktivitätsbestimmung der  $\beta$ -Galactosidase durchzuführen. Unsere Testergebnisse korrelieren mit in der Literatur angegeben Normwerten.

Es gelang uns insgesamt vier Verdachtsdiagnosen für Morquio A und B mittels enzymatischem Aktivitätsnachweis zu bestätigen. Bei Patient 1 und 2 ist die Enzymaktivität extrem niedrig, Patient 3 zeigt dagegen etwas Restaktivität. Bei letztgenanntem handelt es sich somit höchst wahrscheinlich um eine milde Variante von Morquio-A. Die Eltern von Patient 1 und 2 haben jeweils eine Aktivität im niedrigen Normbereich. Patient 4 (Morquio-B) zeigt eine deutlich erniedrigte  $\beta$ -Galactosidase- Aktivität. Seine Eltern haben trotz niedriger Enzymaktivitäten keine klinischen Symptome und damit einen heterozygoten Genotyp. Auffällig ist hierbei der intermediäre Enzymbefund des heterozygoten im Vergleich zum homozygoten Patienten mit dem Unterschied einer Zehnerpotenz. Die von uns erweiterten und modifizierten Enzymtests sind mit verhältnismäßig geringem Aufwand durchführbar. Zur Diagnosestellung reicht eine Hautbiopsie, bzw. eine venöse Blutentnahme aus.

## Literaturverzeichnis

1. Al Kaissi A, Klaushofer K, Grill F: Progressive acetabular dysplasia in a boy with mucopolysaccharidosis type IV A (Morquio syndrome): a case report. *Cases J.* 2008 Dec 22; 1(1): 410
2. Almeciga-Diaz CJ, Montano AM, Tomatsu S, Barrera LA: Adeno-associated virus gene transfer in Morquio A disease – effect of promoters and sulfatase-modifying factor 1. *FEBS J.* 2010 Sep;277(17): 3608-19
3. Ashworth JL, Biswas S, Wraith E, Lloyd IC: Mucopolysaccharidoses and the eye. *Surv Ophthalmol.* 2006 Jan-Feb; 51(1): 1-17.
4. Atinga M, Hamer AJ: Total knee replacements in a patient with the Morquio syndrome. *J Bone Joint Surg Br.* 2008 Dec ; 90(12): 1631-3
5. Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, Miebach E, Bajbouj M, Whybra C, Kohlschütter A, Kampmann C, Beck M: Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J Inherit Metab Dis.* 2005; 28(6): 1011-7
6. Baek RC, Broekman ML, Leroy SG, Tierney LA, Sandberg MA, d'Azzo A, Seyfried TN, Sena-Esteves M : AAV-mediated gene delivery in adult GM1-gangliosidosis mice corrects lysosomal storage in CNS and improves survival. *PLoS One.* 2010 Oct18 ;5(10) : e13468
7. Baiotto C, Sperb F, Matte U, da Silva CD, Sano R, Coelho JC, Giugliani R : Population analysis of the GLB1 gene in South Brazil. *Genet Mol Biol.* 2011 Jan ;34(1) : 45-8. Epub 2011 Mar 1.
8. Bank RA, Groener JE, van Gemund JJ, Maaswinkel PD, Hoeben KA, Schut HA, Everts V: Deficiency in N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase results in collagen perturbations in cartilage of Morquio syndrome A patients. *Mol Genet Metab.* 2009 Jul; 97(3): 196-201. Epub 2009 Mar 28.

9. Barry MO, Beardslee MA, Braverman AC: Morquio's syndrome: severe aortic regurgitation and late pulmonary autograft failure. *J Heart Valve Dis.* 2006 Nov; 15(6): 839-42
10. Beck M: Therapie lysosomaler Speicherkrankheiten. *Deutsches Ärzteblatt* 2001;98 Ausgabe 34 – 35
11. Bhattacharyya S, Kotlo K, Shukla S, Danziger RS, Tobacman JK: Distinct effects of N-acetylgalactosamine-4-sulfatase and galactose-6-sulfatase expression on chondroitin sulfates. *J Biol Chem.* 2008 Apr 11; 283(15): 9523-30. Epub 2008 Feb 18.
12. Biorama–Schweiz: Mucopolysaccharide 2004, [www.biorama.ch/biblio/b20gfach/b35bchem/b10kh/kh040.htm](http://www.biorama.ch/biblio/b20gfach/b35bchem/b10kh/kh040.htm)
13. Borowski A, Thacker MM, Meckenzie WG, Littleton AG, Grissom L: The use of computed tomography to assess acetabular morphology in Morquio-Brailsford syndrome. *J Pediatr Orthop.* 2007 Dec; 27(8): 893-7
14. Bouzidi H, Khedhiri S, Laradi S, Ferchichi S, Daudon M, Miled A: [Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A syndrome): clinical, biological and therapeutic aspects]. *Ann Biol Clin (Paris).* 2007 Jan-Feb; 65(1): 5-11
15. Bunge S, Kleijer WJ, Tylki-Szymanska A et al.: Identification of 31 novel mutations in the N-acetylgalactosamine-6-sulfatase gene reveals excessive allelic heterogeneity among patients with Morquio A syndrome. *Hum Mutat.* 1997;10(3): 223-32
16. Burin MG, Scholz AP, Gus R et al.: Investigation of lysosomal storage diseases in nonimmune hydrops fetalis. *Prenat Diagn.* 2004 Aug; 24(8): 653-7
17. Burrow TA, Hopkin RJ, Leslie ND, Tinkle BT, Grabowski GA: Enzyme reconstitution/replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Curr Opin Pediatr.* 2007 Dec; 19(6): 628-35

18. Caciotti A, Garman SC, Rivera-Colon Y, Procopio E, Catarzi S, Ferri L, Guido C, Martelli P, Parini R, Antuzzi D, Battini R, Sibilio M, Simonati A, Fontana E, Salviati A, Akinci G, Cereda C, Dionisi-Vici C, Deodato F, d'Amico A, d'Azzo A, Bertini E, Filocamo M, Scarpa M, di Rocco M, Tifft CJ, Ciani F, Gasperini S, Pasquini E, Guerrini R, Donati MA, Morrone A: GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: an update on genetic alterations and clinical findings. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jul;1812(7): 782-90. Epub 2011 Apr 7.
19. Camelier MV, Burin MG, De Mari J, Vieira TA, Marasca G, Giugliani R: Practical and reliable enzyme test for the detection of Mucopolysaccharidosis IVA (Morquio Syndrome type A) in dried blood samples. *Clin Chim Acta.* 2011 Sep 18;412(19-20): 1805-8. Epub 2011 Jun 12.
20. Carraresi L, Parini R, Filoni C, Caciotti A, Sersale G, Tomatsu S, Orlando C, Zammarchi E, Guerrini R, Donati MA, Morrone A: GALNS gene expression profiling in Morquio A patients` fibroblasts. *Clin Chim Acta.* 2008 Nov; 397(1-2): 72-6. Epub 2008 Jul 25.
21. Cole DE, Fukuda S, Gordon BA et al.: Heteroallelic missense mutations of the galactosamin-6-sulfate (GALNS) gene in a mild form of Morquio disease (MPS IV A). *Am J Med Genet.* 1996;63(4): 558-65
22. Colmant C, Picone O, Froissart R, la brune P, Senat MV: Second-trimester diagnosis of mucopolysaccharidosis type IV a presenting as hydrops fetalis. *Prenat Diagn.* 2006 Aug; 26(8): 750-2
23. Colville GA, Bax MA: Early presentation in the mucopolysaccharide disorders. *Child: care, health and development.* 1996 Vol. 22 Nr. 1
24. Couprie J, Denis P, Guffon N, Reynes N, Masset H, Beby F: [Ocular manifestations in patients affected by Morquio syndrome (MPS IV)]. *J Fr Ophtalmol.* 2010 Nov;33(9): 617-22. Epub 2010 Nov 3.

25. Coutinho M, Lacerda L, Macedo-Ribeiro S, Baptista E, Ribeiro H, Prata M, Alves S: Lysosomal multienzymatic complex-related diseases: a genetic study among Portuguese patients. *Clin Genet.* 2011 Jan 10.doi: 10.1111/j.1399-0004.2011.01625.x. [Epub ahead of print]
26. Dangel JH: Cardiovascular changes in children with mucopolysaccharide storage diseases and related disorders – clinical and echocardiographic findings in 64 patients. *European Journal of Pediatrics.* 1998 Jun; Vol. 157 Nr. 7
27. Defraia E, Marinelli A, Antonini A et al.: Abnormal mandibular growth after cranivertebral surgery in Morquio syndrome type A. *Angle Orthod.* 2005 May; 75(3): 461-4
28. De Franceschi L, Roseti L, Desando G, Facchini A, Grigolo B: A molecular and histological characterization of cartilage from patients with morquio syndrome. *Osteoarthritis Cartilage.* 2007 Nov; 15(11): 1311-7. Epub 2007 Jun 4.
29. Degussa Health & Nutrition Facts: Kohlenhydrate als Ausgangsstoffe für Biosynthese, Glycosaminoglycane und Proteoglycane. 2004 [www.degussa-foodingredients.de/foodingredients/html/d/health/ger/kh/c6.4.htm](http://www.degussa-foodingredients.de/foodingredients/html/d/health/ger/kh/c6.4.htm)
30. De Mello AS, Provin F, Michelin-Tireli K, Camelier MV, Coelho JC: Feasibility of using cryopreserved lymphoblastoid cells to diagnose some lysosomal storage diseases. *Cell Prolif.* 2010 Apr;43(2): 164-9
31. Duffey TA, Khalig T, Scott CR, Turecek F, Gelb MH: Design and synthesis of substrates for newborn screening of Maroteaux-Lamy and Morquio A syndromes. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010 Oct15;20(20): 5994-6
32. Dullenkopf A, Holzmann D, Feurer R et al.: Tracheal intubation in children with Morquio syndrome using the angulated video-intubation laryngoscope. *Canad J Anest.* 2002;49: 198-202

33. Dvorak-Ewell M, Wendt D, Hague C, Christianson T, Koppaka V, Crippen D, Kakkis E, Vellard M: Enzyme replacement in a human model of mucopolysaccharidosis IVA in vitro and its biodistribution in the cartilage of wild type mice. *PLoS One.* 2010 Aug 16;5(8): e12194
34. Ebara S, Kinoshita T, Yuzawa Y et al.: A case of mucopolysaccharidosis IV with lower leg paresis due to thoraco-lumbar kyphoscoliosis. *Clin Neurosci.* 2003 May; 10(3): 358-61
35. Fantur K, Hofer D, Schitter G, Steiner AJ, Pabst BM, Wrodnigg TM, Stütz AE, Paschke E: DLHex-DGJ, a novel derivate of 1-deoxygalactonojirimycin with pharmacological chaperone activity in human G(M1)-gangliosidosis fibroblasts. *Mol Genet Metab.* 2010 Jul;100(3): 262-8. Epub 2010 Mar 28
36. Fesslova V, Corti P, Sersale G, Rovelli A, Russo P, Mannarino S, Bufera G, Parini R: The natural course and the impact of therapies of cardiac involvement in the mucopolysaccharidoses. *Cardiol Young.* 2009 Apr; 19(2): 170-8., Epub 2009 Feb 6.
37. Fitzgerald J, Verveniotis SJ: Morquio's syndrome. A case report and review of clinical findings. *N Y State Dent J.* 1998;64(8): 48-50
38. Fouilhoux A, Guffon N: [Overview of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis]. *Presse Med.* 2007 Mar; 36 Spec No 1: 1S96-9
39. Fukuda S, Tomatsu S, Masue M et al.: Mucopolysaccharidosis type IV A. N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase exonic point mutations in classical Morquio and mild cases. *J Clin Invest.* 1992;90(3): 1049-53
40. Geetha L, Radhakrishnan M, Raghavendra BS, Rao GS, Indira Devi B: Anesthetic management for foramen magnum decompression in a patient with Morquio syndrome: a case report. *J Anesth.* 2010 Aug;24(4): 594-7

41. Gesellschaft für Mucopolysaccharidosen e.V. & Genzyme-Therapeutics: Einteilung der Mucopolysaccharidosen: [www.mps-ev.de](http://www.mps-ev.de)
42. Giussani C, Roux FE, Guerra P, Pirillo D, Grimaldi M, Citerio G, Sganzerla EP: Severely symptomatic cranivertebral junction abnormalities in children: long-term reliability of aggressive management. *Pediatr Neurosurg*. 2009; 45(1): 29-36. Epub 2009 Feb 17.
43. Gosele S, Dithmar S, Holz FG et al.: Late diagnosis of Morquio syndrome, Clinical histopathological findings in a rare mucopolysaccharidosis. *Klin Monatsbl Augenheilkd*. 2000;217(2): 114-7
44. Gucev ZS, Tasic V, Jancevska A, Zafirovski G, Kremensky I, Sinigerska I, Nanba E, Higaki K, Gucev F, Suzuki Y: Novel beta-galactosidase gene mutation p.W273R in a woman with mucopolysaccharidosis type IVB (Morquio B) and lack of response to in vitro chaperone treatment of her skin fibroblasts. *Am J Med Genet A*. 2008 Jul 1; 146A(13): 1736-40
45. Gutierrez MA, Garcia-Vallejo F, Tomatsu S, Ceron F, Almeciga-Diaz CJ, Dominguez MC, Barrera LA: [Construction of an adenoassociated, viral derived, expression vector to correct the genetic defect in Morquio A disease]. *Biomedica*. 2008 Sep; 28(3): 448-59
46. Haas LF: Luis Morquio ( 1867 – 1935 ). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002;72: 787
47. Hanson M, Lupski JR, Hicks J et al.: Association of dermal melanocytosis with lysosomal storage disease : clinical features and hypothesis regarding pathogenesis. *Arch Dermatol*. 2003;139(7): 916-20
48. Higaki K, Li L, Bahrudin U, Okuzawa S, Takamuram A, Yamamoto K, Adachi K, Paraquison RC, Takai T, Ikehata H, Tominaga L, Hisatome I, Iida M, Ogawa S, Matsuda J, Ninomiva H, Sakakibara Y, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E: Chemical chaperone therapy: chaperone effect on mutant

- enzyme and cellular pathophysiology in  $\beta$ -galactosidase deficiency. *Hum Mutat*. 2011 Jul;32(7): 843-52. doi: 10.1002/humu.21516.
49. Hinek A, Zhang S, Smith AC et al.: Impaired elastic-fiber assembly by fibroblasts from patients with either Morquio B disease or infantile GM1-gangliosidosis is linked to deficiency in the 67-kD spliced variant of beta-galactosidase. *Am J Hum Genet*. 2000;67(1): 4-7
50. Hofer D, Paul K, Fantur K, Beck M, Bürger F, Caillaud C, Fumic K, Ledvinova J, Lugowska A, Michelakakis H, Radeva B, Ramaswami U, Plecko B, Paschke E: GM1 gangliosidosis and Morquio B disease: expression analysis of missense mutations affecting the catalytic site of acid beta-galactosidase. *Hum Mutat*. 2009 Aug;30(8): 1214-21
51. Hofer D, Paul K, Fantur K, Beck M, Rouberge A, Vellodi A, Poorthuis BJ, Michelakakis H, Plecko B, Paschke E: Phenotype determining alleles in GM1 gangliosidosis patients bearing novel GLB1 mutations. *Clin Genet*. 2010 Feb 24. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01378.x. [Epub ahead of print]
52. Hoffmann B, Mayatepek E: Neurological manifestations in lysosomal storage disorders – from pathology to first therapeutic possibilities. *Neuropediatrics*. 2005 Oct; 36(5): 285-9.
53. Hoffmann-La Roche AG, Urban&Schwarzenberg (Hrsg.): Roche Lexikon Medizin (S. 1118), 3. Auflage 1993; Urban & Schwarzenberg Verlag
54. Iwasaki H, Watanabe H, Iida M, Ogawa S, Tabe M, Higaki K, Nanba E, Suzuki Y: Fibroblast screening for chaperone therapy in beta-galactosidosis. *Brain Dev*. 2006 Sep; 28(8): 482-6. Epub 2006 Apr 17.
55. Kalteis T, Schubert T, Caro WC, Schröder J, Lüring C, Grifka J: Arthroscopic and histologic findings in Morquio's syndrome. *Arthroscopy*. 2005 Feb; 21(2): 233-7.

56. Kaneider NC, Dunzendorfer S, Wiedermann CJ: Heparan sulfate proteoglycans are involved in opiate receptor-mediated cell migration. *Biochemistry*. 2004 Jan 13; 43(1): 237-44
57. Kapadia HM, Banerjee AK, Arnott RG: The life and work of the Birmingham Radiologist Dr. James Brailsford (1888-1961). *J Med Biogr*. 2004 Aug; 12(3): 128-35
58. Khaliq T, Sadilek M, Scott CR, Turecek F, Gelb MH: Tandem mass spectrometry for the direct assay of lysosomal enzymes in dried blood spots: application to screening newborns for mucopolysaccharidosis IVA. *Clin Chem*. 2011 Jan;57(1): 128-31
59. Khatiwada B, Pokharel A: Lysosomal storage disease. *JNMA J Nepal Med Assoc*. 2009 Jul-Sep;48(175): 242-5
60. Khedhiri S, Chkioua L, Ferchichi S, Bouzidi H, Haj Khelil A, Ben Mansour R, Kassab A, M'dallah S, Chaabouni M, Irad T, Ben Chibani, Miled A, Laradi S: [Clinical, biologic and molecular characteristics of two Tunisian MPS IV A patients]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2007 Jan-Feb;65(1): 59-63
61. Khedhiri S, Chkioua L, Ferchichi S, Miled A, Laradi S: Polymorphisms in Tunisian patients with N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene deficiency: implication in Morquio A disease. *Diagn Pathol*. 2011 Jan 20;6: 11
62. Korfali N, Srzen V, Waterfall M, Batrakou DG, Pekovic V, Hutchison CJ, Schirmer EC: A flow cytometry-based screen of nuclear envelope transmembrane proteins identifies NET4/Tmem53 as involved in stress-dependent cell cycle withdrawal. *PLoS One*. 2011 Apr 14;6(4): e18762
63. Kuratani T, Miyawaki S, Murakami T et al.: Early orthodontic treatment and long-term observation in a patient with Morquio syndrome. *Angle Orthod*. 2005 Sep; 75(5): 881-7

64. Laradi S, Tukel T, Khediri S, Shabbeer J, Erazo M, Chkioua L, Chaabouni M, Ferchichi S, Miled A, Desnick RJ: Mucopolysaccharidosis type IV: N-acetylgalactosamine-6-sulfatase mutations in Tunisian patients. *Mol Genet Metab.* 2006 Mar; 87(3): 213-8.
65. Leboulanger N, Louis B, Vialle R, Heron B, Fauroux B: Analysis of the upper airway by the acoustic reflection method in children with mucopolysaccharidosis. *Pediatr Pulmonol.* 2011 Jun;46(6):587-94
66. Leslie T, Siddiqui MA, Aitken DA, Kirkness CM, Lee WR: Morquio syndrome: electron microscopic findings. *Br J Ophthalmol.* 2005 July; 89(7): 925-926.
67. Lewis JR, Gibson PH: Bilateral hip replacement in three patients with lysosomal storage disease: Mucopolysaccharidosis type IV and Mucolipidosis type III. *J Bone Joint Surg Br.* 2010 Feb;92(2): 289-92
68. Li MF, Chiu PC, Weng MJ, Lai PH: Atlantoaxial instability and cervical cord compression in Morquio syndrome. *Arch Neurol.* 2010 Dec;67(12): 1530.
69. Lin HY, Lin SP, Chuang CK, Niu DM, Chen MR, Tsai FJ, Chao MC, Chiu PC, Lin SJ, Tsai LP, Hwu WL, Lin JL: Incidence of the mucopolysaccharidoses in Taiwan, 1984-2004. *Am J Med Genet A.* 2009 May; 149A(5): 960-4
70. Lindl, T.: *Zell- und Gewebekultur*, 4. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg, Berlin, 2000
71. Link B, Miebach E, Vetter T, Schmitt D, Beck M, Meurer A: Mukopolysaccharidosen. *Orthopäde.* 2008-37: 24-30
72. Löffler G, Petrides PE (Hrsg.): *Lehrbuch der Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag 1998; 6. Auflage S.744-745

73. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
74. Manwaring LP, Jamerson PA, Slaugh R: Lysosomal storage diseases. *RN.* 2008 Jul; 71(7): 33-7; quiz 38
75. Masaki K, Shin-Ichiro N, Yuan CL: Mechanism-based fluorescent labeling of beta-galactosidases: An efficient method in proteomics for glycoside hydrolases. *J. Biol. Chem.* 2004 Aug 12.
76. Matsuda J, Suzuki O, Oshima A et al.: Chemical chaperone therapy for brain pathology in GM1-gangliosidosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(26): 15912-15917
77. Mayer FQ, Pereira Fdos S, Fensom AH, Slade C, Matte U, Giugliani R: New GLB1 mutation in siblings with Morquio type B disease presenting with mental regression. *Mol Genet Metab.* 2009 Mar; 96(3): 148. Epub 2008 Dec 16.
78. Mc Kusick V.A.: Morquio Syndrome, nonkeratosulfate-excreting Type. *Online Mendelian Inheritance in Man.* 1986 Nr. 252300
79. Mc Kusick V.A.: Brachyrachia. *Online Mendelian Inheritance in Man.* 1986 Nr. 113500
80. Menezes AH, Vogel TW: Specific entities affecting the craniocervical region: syndromes affecting the craniocervical junction. *Childs Nerv Syst.* 2008 Oct; 24(10): 1155-63. Epub 2008 Mar 28.
81. Mettananda DS, Fernando AD: child with Morquio syndrome and mixed mitral valve disease. *Ceylon Med J.* 2008 Mar; 53(1): 24-5
82. Mikles M, Stanton RP : A review of Morquio syndrome. *Am J Orthop.* 1997;26(8): 533-40

83. Montano AM, Kaitila I, Sukegawa K et al.: Mucopolysaccharidosis IV A: characterization of a common mutation found in Finnish patients with attenuated phenotype. *Hum Genet.* 2003;113: 162-169
84. Montano AM, Sukegawa K, Kato Z, Carrozo R, Di Natale P, Christensen E, Orii KO, Orii T, Kondo N, Tomatsu S: Effect of 'attenuated' mutations in mucopolysaccharidosis IVA on molecular phenotypes of N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *J Inherit Metab Dis.* 2007 Oct; 30(5): 758-67. Epub 2007 Sep 17.
85. Montano AM, Tomatsu S, Brusius A, Smith M, Orii T: Growth charts for patients affected with Morquio A disease. *Am J Med Genet A.* 2008 May 15; 146A(10): 1286-95
86. Montano AM, Tomatsu S, Gottesman GS, Smith M, Orii T: International Morquio A Registry: clinical manifestation and natural course of Morquio A disease. *J Inherit Metab Dis.* 2007 Apr; 30(2): 165-74. Epub 2007 Mar 8.
87. Morita M, Saito S, Ikeda K, Ohno K, Sugawara K, Suzuki T, Togawa T, Sakuraba H: Structural bases of GM1 gangliosidosis and Morquio B disease. *J Hum Genet.* 2009 Sep;54(9): 510-5
88. Morris CP, Guo XH, Apostulou S et al. : Morquio A syndrome: cloning, sequence, and structure of the human N-acetylgalactosamine-6-sulfatase (GALNS) gene. *Genomics.* 1994;22(3): 652-4
89. Naqvi T, Lim A, Rouhani R, Singh R, Eglen RM: Beta galactosidase enzyme fragment complementation as a high-throughput screening protease technology. *J Biomol Screen.* 2004 Aug; 9(5): 398-408
90. Nathan DG, Orkin SH: Musings on genome medicine: enzyme-replacement therapy of the lysosomal storage diseases. *Genome Med.* 2009 Dec9;1(12): 114

91. Nicolini F, Corradi D, Bosio S, Gherli T: Aortic valve replacement in a patient with morquio syndrome. *Heart Surg Forum*. 2008; 11(2): E96-8
92. Northover H, Cowie RA, Wraith JE: Mucopolysaccharidosis type IV A (Morquio syndrome): a clinical review. *J Inherit Metab Dis*. 1996;19(3): 357-65
93. Ogawa T, Tomatsu S, Fukuda S et al. : Mucopolysaccharidosis IV A: screening and identification of mutations of the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene. *Hum Mol Genet*. 1995;4(3): 341-9
94. Okumiya T, Sakuraba H, Kase R et al.: Imbalanced substrate specificity of mutant beta-galactosidase in patients with Morquio B disease. *Mol Genet Metab*. 2003;78(1): 51-8
95. Oncag G, Ertan Erdinc AM, Cal E: Multidisciplinary treatment approach of Morquio syndrome (Mucopolysaccharidosis Type IVA). *Angle Orthod*. 2006 Mar; 76(2): 335-40
96. Oshima A, Yoshida K, Shimmoto M et al.: Human beta-galactosidase gene mutations in Morquio B disease. *Am J Hum Genet*. 1991;49(5): 1091-3
97. Oulahiane A, Elhaddad N, Ouleghzal H, Gaouzi A: [Moderated form of Morquio syndrome: An unknown cause of short stature (three case reports)]. *Arch Pediatr*. 2011 Sep;18(9): 979-82. Epub 2011 Aug 4.
98. Pagel PS, Almassi GH: Perioperative Implications of Morquio Syndrome in a 31-Year-Old Woman Undergoing Aortic Valve Replacement. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2009 Feb 6.
99. Parkinson-Lawrence EJ, Muller VJ, Hopwood JJ, Brooks DA: N-acetylgalactosamine-6-sulfatase protein detection in MPS IVA patient and unaffected control samples. *Clin Chim Acta*. 2007 Feb; 377(1-2): 88-91. Epub 2006 Sep 1.

100. Paschke E, Milos I, Kreimer-Erlacher H et al.: Mutation analyses in 17 patients with deficiency in acid beta-galactosidase: three novel point mutations and high correlation of mutation W273L with Morquio disease type B. *Hum Genet*. 2001;109(2): 159-66
101. Pelley CJ, Kwo J, Hess DR: Tracheomalacia in an adult with respiratory failure and Morquio syndrome. *Respir Care*. 2007 Mar; 52(3): 278-82
102. Pontz: Mucopolysaccharidose Typ IV ( M. Morquio ). Online Mendelian Inheritance in Man. 2000 Nr. 253000 u. 253010
103. Prat C, Lemaire O, Bret J, Zabraniecki L, Fournie B: Morquio syndrome: diagnosis in an adult. *Joint Bone Spine*. 2008 Jul; 75(4): 495-8. Epub 2008 May 5.
104. Pshezhetsky AV, Ashmarina M: Lysosomal multienzyme complex: biochemistry, genetics and molecular pathophysiology. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2001;69: 81-114
105. Qubbaj W, Al-Aqueel AI, Al-Hassnan Z, Al-Duraihim A, Awartani K, Al-Rejjal R, Coskun S: Preimplantation genetic diagnosis of Morquio disease. *Prenat Diagn*. 2008 Oct; 28(10): 900-3
106. Rigante D, Buonomo PS, Caradonna P: Early-onset osteoporosis with high bone turnover in children with Morquio-Brailev syndrome. *Rheumatology International*. 2006 Vol. 26, Nr 12
107. Rodriguez A, Espejo AJ, Hernandez A, Velasquez OL, Lizaraso LM, Cordoba HA, Sanchez OF, Almeida-Diaz CJ, Barrera LA: Enzyme replacement therapy for Morquio A: an active recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in *Escherichia coli* BL21. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2010 Nov;37(11): 1193-201

108. Ruivo R, Anne C, Sagne C, Gasnier B: Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Apr; 1793(4): 636-49. Epub 2008 Dec 24.
109. Santamaria R, Chabas A, Callahan JW, Grinberg D, Vilageliu L: Expression and characterization of 14 GLB 1 mutant alleles found in GM1-gangliosidosis and Morquio B patients. *J Lipid Res*. 2007 Oct; 48(10): 2275-82. Epub 2007 Jul 30.
110. Santamaria R, Chabas A, Coll MJ, Mirando CS, Vilageliu L, Grinberg D: Twenty-one novel mutations in the GLB1 gene identified in a large group of GM1-gangliosidosis and Morquio B patients: possibile common origin for the prevalent p.R59H mutation among gypsies. *Hum Mutat*. 2006 Oct; 27(10): 1060
111. Santillan Chapa CG, Martinez Coria E, Reyes Marin B, Garcia Gutierrez G: Congenital cervical vertebral dysmorphism, Syndromatic integration through radiological clinical correlation. *Acta Ortop Mex*. 2007 May-Jun; 21(3): 133-8
112. Satoh H, Yamato O, Asano T, Yamasaki M, Maede Y: Increased concentration of GM1-ganglioside in cerebrospinal fluid in dogs with GM1- and GM2-gangliosidoses and its clinical application for diagnosis. *J Vet Diagn Invest*. 2004 May; 16(3): 223-6
113. Savci S, Ozturk M, Inal-Ince D, Gultekin Z, Arikan H, Sivri HS: Inspiratory muscle training in Morquio's syndrome: a case study. *Pediatr Pulmonol*. 2006 Dec; 41(12): 1250-3
114. Schiffmann R, Brady RO: New prospects for the treatment of lysosomal storage diseases. *Drugs*. 2002; 62(5): 733-42
115. Schitter G, Scheucher E, Steiner AJ, Stütz AE, Thonhofer M, Tarling CA, Withers SG, Wicki J, Fantur K, Paschke E, Mahuran DJ, Rigat BA, Tropak M, Wrodnigg TM: Synthesis of lipophilic 1-deoxygalactonojirimycin

derivatives as D-galatosidase inhibitors. *Beilstein J Org Chem.* 2010 Mar 1; 6-21

116. Schitter G, Steiner AJ, Pototschnig G, Scheucher E, THonhofer M, Tarling CA, Withers SG, Fantur K, Paschke E, Mahuran DJ, Rigat BA, Tropak MB, Illaszewicz C, Saf R, Stütz AE, Wrodnigg TM: Fluorous iminoalditols: a new family of glycosidase inhibitors and pharmacological chaperones. *Chembiochem.* 2010 Sep24;11(14): 2026-33
117. Sheth J, Patel P, Sheth F et al.: Lysosomal Storage Disorders. *Indian J Pediatr.* 2003;41: 260-266
118. Sheth JJ, Sheth FJ, Bhattacharya R: Morquio-B syndrome (MPS-IV B) associated with beta-galactosidase deficiency in two siblings. *Indian J Pediatrics.* 2002;69: 109-11
119. Shinhari SY, Zablocki H, Madgy DN: Airway management in mucopolysaccharide storage disorders. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;130(2): 233-7
120. Shukla D, Arvind S, Devi BI: Myelopathy in a dwarf: a case of Morquio's syndrome without odontoid hypoplasia. *Neurol India.* 2011 Jan-Feb;59(1):126-7
121. Singh MN, Agrawal A, Tilak V, Singh NK: Mucopolysaccharidosis type IV (Morquio syndrome). *J Assoc Physicians India.* 2007 Jun; 55: 434
122. Sreeja VG, Leelamma S: Cassava diet – A cause for mucopolysaccharidosis. *Plant Foods for Human Nutrition.* 2002;57: 141-150
123. S. SL, L. YJ, L. SP et al.: Airway changes in children with Mucopolysaccharidoses. *Acta Radiologica.* 2002;43: 40-43

124. Steven Sims H, Kempiners JJ: Special airway concerns in patients with mucopolysaccharidoses. *Respir Med.* 2007 Aug; 101(8): 1779-82. Epub 2007 Apr 6.
125. Tassinari E, Boriani L, Traina F, Dallari D, Toni A, Giunti A: Bilateral total hip arthroplasty in Morquio-Braillsford's syndrome, a report of two cases. *Chir Organi Mov.* 2008 Sep; 92(2):123-6. Epub 2008 May 16.
126. Tatano Y, Takeuchi N, Kuwahara J, Sakuraba H, Takahashi T, Takada G, Itoh K: Elastogenesis in cultured dermal fibroblasts from patients with lysosomal beta-galactosidase, protective protein/cathepsin A and neuramidase-1 deficiencies. *J Med Invest.* 2006 Feb; 53(1-2): 103-12
127. Tomatsu S, Dieter T, Schwartz IV et al.: Identification of a common mutation in mucopolysaccharidosis IV A: correlation among genotype, phenotype and keratan sulfate. *J Hum Genet.* 2004 PMID: 15309681
128. Tomatsu S, Filocamo M, Orii KO, Sly WS, Gutierrez MA, Nishioka T, Serrato OP, Di Natale P, Montano AM, Yamaguchi S, Kondo N, Orii T, Noguchi A: Mucopolysaccharidosis IV A (Morquio A): identification of novel common mutations in the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase (GALNS) gene in Italian patients. *Hum Mutat.* 2004;24(2): 187-8
129. Tomatsu S, Fukuda S, Cooper A et al.: Mucopolysaccharidosis IV A: identification of a common missense mutation I113F in the N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase gene. *Am J Hum Genet.* 1995;57(3): 556-63
130. Tomatsu S, Fukuda S, Cooper A et al.: Fourteen novel mucopolysaccharidosis IV A producing mutations in GALNS gene. *Hum Mutat.* 1997;10(5): 368-75
131. Tomatsu S, Fukuda S, Masue M, Sukegawa K, Fukao T, Yamagishi A, Hori T, Iwata H, Ogawa T, Nakashima Y: Morquio disease: isolation, characterization and expression of full-length cDNA for human N-

- acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 181(2): 677-83
132. Tomatsu S, Fukuda S, Yamagishi A et al.: Mucopolysaccharidosis IV A: four new exonic mutations in patients with N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1996;58(5): 950-62
133. Tomatsu S, Gutierrez M, Nishioka T, Yamada M, Tosaka Y, Grubb JH, Montano AM, Vieira MB, Trandafirescu GG, Pena OM, Yamaguchi S, Orii KO, Orii T, Noguchi A, Laybauer L: Development of MPS IVA mouse (Galnstm (hC79S.mC76S) slu) tolerant to human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Hum Mol Genet.* 2005 Nov 15; 14(22): 3321-35. Epub 2005 Oct 11
134. Tomatsu S, Montano AM, Gutierrez MA, Grubb JH, Oikawa H, Dung VC, Ohashi A, Nishioka T, Yamada M, Yamada M, Tosaka Y, Trandafirescu GG, Orii T: Characterization and pharmacokinetic study of recombinant human N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase. *Mol Genet Metab.* 2007 May;91(1): 69-78. Epub 2007 Mar 2
135. Tomatsu S, Montano AM, Lopez P, Trandafirescu GG, Gutierrez MA, Oikawa H, Nishioka T, Vieira MB, Orii T, Noguchi A: Determinant factors of spectrum of missense variants in mucopolysaccharidosis IVA gene. *Mol Genet Metab.* 2006 Sep-Oct; 89 (1-2): 139-49. Epub 2006 Jul 11
136. Tomatsu S, Montano AM, Nishioka T, Gutierrez MA, Pena OM, Tranda Firescu GG, Lopez P, Yamaguchi S, Noguchi A Orii T: Mutation and polymorphism spectrum of the GALNS gene in mucopolysaccharidosis IVA (Morquio A). *Hum Mutat.* 2005 Dec; 26 (6): 500-12
137. Tomatsu S, Montano AM, Oguma T, Dung VC, Oikawa H, de Carvalho TG, Gutierrez ML, Yamaguchi S, Suzuki Y, Fukushi M, Kida K, Kubota M, Barrera L, Orii T: Validation of keratan sulfate level in mucopolysaccharidosis type IVA by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Inherit Metab Dis.* 2010 Jan 27

138. Tomatsu S, Montano AM, Ohashi A, Gutierrez MA, Oikawa H, Oguma T, Dung VC, Nishioka T, Orii T, Sly WS: Enzyme replacement therapy in a murine model of Morquio A syndrome. *Hum Mol Genet*. 2008 Mar 15; 17(6): 815-24. Epub 2007 Dec 3
139. Tomatsu S, Montano AM, Oikawa H, Smith M, Barrera L, Chinen Y, THacker MM, Mackenzie WG, Suzuki Y, Orii T: Mucopolysaccharidosis type IVA (Morquio A disease): clinical review and current treatment. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011 Jun 1;12(6):931-45
140. Tomatsu S, Okamura K, Taketani T, Orii KO, Nishioka T, Gutierrez MA, Velez-Castrillon S, Fachel AA, Grubb JH, Cooper A, Thornley J, Wraith E, Barrera LA, Giugliani R, Schwartz IV, Frenking GS, Kircher SG, Paschke E, Yamaguchi S, Ullrich K, Isogai K, Suzuki Y, Kondo N, Creer M, Noguchi A: Development and testing of new screening method for keratan-sulfate in mucopolysaccharidosis IV A. *Pediatr Res*. 2004 Apr; 55 (4): 592-7. Epub 2004 Jan 07
141. Tomatsu S, Orii KO, Vogler C et al.: Mouse model of N-acetyl-galactosamin-6-Sulfate sulfatase deficiency (Galns-/-) produced by targeted disruption of the gene defective in Morquio A disease. *Hum Mol Genet*. 2003 Dec 15; 12 (24): 3349-58
142. Tomatsu S, Vogler C, Montano AM, Gutierrez M, Oikawa H, Dung VC, Orii T, Noguchi A, Sly WS: Murine model (Galns(tm(C76S)slu)) of MPS IVA with missense mutation at the active site cysteine conserved among sulfatase proteins. *Mol Genet Metab*. 2007 Jul; 91 (3): 251-8. Epub 2007 May 10
143. Tominaga L, Ogawa Y, Taniguchi M, Ohno K, Matsuda J, Oshima A, Suzuki Y, Nanba E: Galactonojirimycin derivatives restore mutant human beta-galactosidase activities expressed in fibroblasts from enzyme-deficient knockout mouse. *Brain Dev*. 2001 Aug; 23 (5): 284-7

144. Tucci M, Freeland A, Mohamed A, Benguzzi H: The role of proteoglycans in idiopathic carpal tunnel syndrome. Biomedical sciences instrumentation. 2005 Vol 41; 141-6
145. Tylki-Szymanska A, Czartoryska B, Bunge S et al.: Clinical, biochemical and molecular findings in a two-generation Morquio A family. Clin Genet. 1998;53 (5): 369-74
146. van der Voorn JP, Kamphorst W, van der Knaap MS et al.: The leukoencephalopathy of infantile GM1 gangliosidosis: oligodendrocytic loss and axonal dysfunction. Acta Neuropathol (Berl). 2004;107(6): 539-45
147. van Diggelen OP, Zhao H, Kleijer WJ et. Al: A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A (MPS IV A). Clin Chim Acta. 1993;187: 131-140
148. van Dort ME, Lee KC, Hamilton CA, Rehemtulla A, Ross BD: Radiosynthesis and evaluation of 5-[125I]iodoindol-3yl-beta-D-galactopyranoside as a beta-galactosidase imaging radioligand. Mol Imaging. 2008 Jul-Aug; 7(4): 187-97
149. van Heest AE, House J, Krivit W et al.: Surgical treatment of carpal tunnel syndrome and trigger digits in children with mucopolysaccharide storage disorders. Hand Surg. 1998;23(2): 236-43
150. Vendolin L, Schwartz IV, Komlos M, Schuch A, Azevedo AC, Vieira T, Maeda FK, Marques da Silva AM, Giugliani R: Brain MRI in mucopolysaccharidosis: effect of aging and correlation with biochemical findings. Neurology. 2007 Aug 28; 69(9): 917-24
151. Vijayalakshmi AM: Mucopolysaccharidosis Types IV and VI. Indian Pediatrics. 2002;39: 594-595
152. Visocchi M, Di Rocco F, Meglio M: Craniocervical junction instability: instrumentation and fusion with titanium rods and sublaminar wires.

Effectiveness and failures in personal experience. *Acta Neurochir (Wien)*. 2003 Apr;145(4): 265-72; discussion 272

153. Wang Z, Zhang W, Wang Y, Meng Y, Su L, Shi H, Huang S: Mucopolysaccharidosis IVA mutations in Chinese patients: 16 novel mutations. *J Hum Genet*. 2010 Aug;55(8):534-40
154. White KK, Steinman S, Mubarak SJ: Cervical stenosis and spastic quadripareisis in Morquio disease (MPS IV). A case report with twenty-six-year follow-up. *J Bone Joint Surg Am*. 2009 Feb; 91 (2): 438-42
155. [www.sas-centre.com](http://www.sas-centre.com)
156. Yamada N, Fukada S, Tomatsu S et al.: Molecular heterogeneity in mucopolysaccharidosis IVA in Australia and Northern Ireland: nine novel mutations including T312S, a common allele that confers a mild phenotype. *Hum Mutat*. 1998;11(3): 202-8
157. Yan S, Wu G: Descriptively quantitative relationship between mutated N-acetylgalactosamine-6-sulfatase and mucopolysaccharidosis IVA. *Biopolymers*. 2009 Apr 16
158. Yoshida K, Oshima A, Sakuraba H, Nakano T, Yanagisawa N, Inui K, Okada S, Uyama E, Namba R, Kondo K, et al.: GM1 gangliosidosis in adults: clinical and molecular analysis of 16 Japanese patients. *Ann Neurol*. 1992 Mar; 31 (3): 328-32
159. Zhang S, Bagshaw R, Hilson W et al.: Characterization of beta-galactosidase mutations Asp332→Asn and Arg148→Ser, and a polymorphism, Ser532→Gly, in a case of GM1 gangliosidosis. *Biochem J*. 2000;3: 621-32
160. Zhang HW, Wang Y, Ye J, Qiu WJ, Han LS, Gao XL, Gu XF: [Enzymatic diagnosis of 47 cases with mucopolysaccharidosis]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2009 Apr; 47 (4): 276-80

161. Zhao Y, Menq YX, Guo YB, Du ML, Ai Y: [Identification of a novel mutation of GALNS gene from a Chinese pedigree with mucopolysaccharidosis type IV A]. Zhonghua YiXue Yi Chuan Xue Za Zhi. 2011 Jun;28(3): 241-6
162. Zustin J: Morquio disease: the role of cartilage canals in the pathogenesis of chondrogenic dwarfism. Med Hypotheses. 2010 Dec;75(6): 642-4

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gebührt Frau Prof. Dr. Yoon S. Shin für die Überlassung des interessanten Themas, für die kompetente und engagierte Betreuung und für die Anteilnahme an den Vorschritten dieser Arbeit.

Bei Herrn Jan Tausendfreund und Herrn Franz Jansen bedanke ich mich herzlich für die geduldige Einführung und Hilfestellung bezüglich des Methodenteils dieser Arbeit.

Ein herzliches Dankeschön an Frau Anja Glatzle für die tolle Unterstützung beim Layout dieser Arbeit und so manchem EDV-Problem.

Isen, Oktober 2011