

Aus der Abteilung für
Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Hochschule Hannover
Direktor: Prof. Dr. med. K. Welte

**Molekulare Untersuchungen zur Pathophysiologie der
kongenitalen Neutropenie bei AP-3 - und p14 - Defizienz**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
in der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von
Anna Lena Allroth
aus Hannover

Hannover 2007

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover
am 19.02.2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Prof. Dr. med. Dieter Bitter-Suermann

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. med. Christoph Klein

Referent: PD Dr. med. Christoph Reuter

Koreferentin: Prof. Dr. med. Eva Mischak-Weissinger

Tag der mündlichen Prüfung: 19.02.2008

Promotionsausschussmitglieder: Prof. Dr. med. Michael Peter Manns
Prof. Dr. med. Arnold Ganser
Prof. Dr. med. Marion Haubitz

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die kongenitale Neutropenie	1
1.1.1	Klinik	1
1.1.2	Therapie und Prognose	1
1.1.3	Genetik.....	2
1.2	Lysosomales Kompartiment und Albinismus	4
1.2.1	Sekretorische Lysosomen	4
1.2.2	Autosomal rezessive Syndrome mit Neutropenie und Albinismus.....	5
1.2.2.1	Griscelli Syndrom Typ 2.....	5
1.2.2.2	Chédiak-Higashi Syndrom	5
1.2.2.3	Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 2	5
1.3	Grundlagen des mRNA Metabolismus	8
1.3.1	Grundzüge der Prozessierung und des Aufbaus von messenger RNA.....	8
1.3.2	mRNA Turnover.....	11
1.3.3	Wichtige mRNA regulierende Mechanismen.....	12
1.3.4	Mechanismen der Qualitätskontrolle	14
1.3.5	Erkrankungsassoziierte 3'RR Varianten.....	15
1.4	Der MAP-Kinase Signaltransduktionsweg und das Protein p14	16
2	Ergebnisse	18
2.1	Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 2.....	18
2.1.1	Klinik der Familie Ö.	18
2.1.2	Experimentelle Daten	18
2.2	p14-Defizienz.....	20
2.2.1	Klinik der Familie R.	20
2.2.2	Experimentelle Daten	21
3	Diskussion... ..	24
4	Zusammenfassung	31
5	Literaturverzeichnis.....	33
6	Abkürzungsverzeichnis	38
7	Lebenslauf	40
8	Danksagung.....	41
9	Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 5 und 6 der PromO	42
10	Anhang Originalpublikationen.....	43

1 Einleitung

1.1 Die kongenitale Neutropenie

1.1.1 Klinik

Die schwere kongenitale Neutropenie (SCN) ist mit einer Inzidenz von 1:1 Million Neugeborene eine vergleichsweise seltene Erkrankung. Rezidivierende bakterielle Infektionen wie beispielsweise Otitiden, Pneumonien, Stomatitiden und Peridontitiden mit Zahnverlust bis hin zur Sepsis im frühen Kindesalter können zur Verdachtsdiagnose SCN führen.

Zur Diagnosesicherung werden absolute Neutrophilenzahlen von fortdauernd $< 500/\mu\text{l}$ (von einigen Autoren auch $< 200/\mu\text{l}$) im Differentialblutbild gefordert. Differentialdiagnostisch sind insbesondere die zyklische Neutropenie und die autoimmune Neutropenie im Kindesalter abzugrenzen.

Ein charakteristisches Merkmal bei schwerer kongenitaler Neutropenie ist ein sogenannter Reifungsstopp der myeloischen Differenzierung im Stadium der Promyelozyten. Allerdings gibt es auch Varianten, bei denen eine periphere Neutropenie mit einer regelrechten Ausreifung im Knochenmark einhergeht.

1.1.2 Therapie und Prognose

Eine Dauertherapie bei SCN erfolgt seit 1987 mit rekombinantem humanen G-CSF und vermag bei einem Großteil der Betroffenen die Neutrophilenzahlen auf ein Niveau anzuheben, auf dem die Inzidenz bakterieller Infektionen drastisch abnimmt, so dass Hospitalisierungszeiten deutlich vermindert und Überlebenszeiten erheblich verlängert werden können. G-CSF bewirkt eine verlängerte Lebensdauer durch verminderte Apoptose und eine vermehrte Produktion von neutrophilen Granulozyten (Rex et al., Transfusion 1995; Maianksi et al., Blood 2002). Als Nebenwirkung der G-CSF Therapie beobachtet man auch eine Osteoporose sowie eine Splenomegalie (Welte et al., Semin Hematol 2006).

Eine schwere Komplikation ist das Auftreten einer malignen hämatologischen Erkrankung. Etwa 21% der SCN Patienten entwickeln nach zehnjähriger G-CSF Therapie eine Akute Myeloische Leukämie (AML) oder ein Myelodysplastisches Syndrom (MDS). Es konnte jedoch noch nicht abschließend geklärt werden, ob dieses eine intrinsische Krankheitsfolge darstellt oder in einem kausalen Zusammenhang mit der G-CSF Therapie zu sehen ist. Die

Inzidenz einer AML bzw. eines MDS ist jedoch bei Patienten mit Hochdosis-G-CSF Therapie vergleichsweise erhöht (Rosenberg et al., Blood 2006).

Eine weitere Therapieoption bei Nichtansprechen auf G-CSF ist die allogene Knochenmarktransplantation.

1.1.3 Genetik

Kostmann beschrieb im Jahre 1956 erstmals eine autosomal rezessiv vererbte Neutropenie bei einer schwedischen Familie (Kostmann, Acta Paediatr 1956). Die angeborenen Neutropenien stellen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen dar, was bereits durch verschiedene Vererbungsmodi deutlich wird: es sind autosomal dominante, autosomal rezessive (Morbus Kostmann), X-chromosomal gekoppelte und sporadische Formen bekannt. Etliche kongenitale Neutropenien treten im Zusammenhang mit einem syndromalen Krankheitsbild auf, es gibt jedoch auch die isolierte, nicht-syndromale kongenitale Neutropenie.

In vielen Fällen sind die genetischen Ursachen weiterhin nicht geklärt. In den vergangenen Jahren konnten allerdings zwei wichtige Gendefekte identifiziert werden, die im Folgenden kurz dargestellt werden.

Neutropenien bei ELA2 Mutationen

Im Jahr 1999 konnten Horwitz et al. (Nat Genet, 1999) durch genetische Kopplungsanalysen Mutationen in *ELA2*, dem Gen der neutrophilen Elastase (NE), bei Patienten mit autosomal dominant vererbter zyklischer Neutropenie identifizieren. Bald darauf wurden *ELA2* Mutationen auch bei Patienten mit SCN beschrieben (Dale et al., Blood 2000). Insgesamt finden sich bei etwa 50-60% aller SCN-Patienten Mutationen in *ELA2*; die Vererbung erfolgt meist autosomal dominant, es sind aber auch sporadische Fälle bekannt. Der autosomal dominante Vererbungsmodus konnte kürzlich anhand einer interessanten Kasuistik bestätigt werden: 5 Kinder von vier verschiedenen Müttern, die den gleichen Samenspende zur Befruchtung gewählt hatten, leiden an schwerer kongenitaler Neutropenie und weisen eine identische heterozygote *ELA2* Mutation auf. Alle Mütter sind homozygot bezüglich des Wildtyp *ELA2* Allels. Es bleibt allerdings unklar, warum der biologische Vater nicht als erkrankt bekannt war. Möglicherweise liegt bei ihm die Mutation nur in einem Teil seiner Zellen vor (Keimzell-Mosaik) (Boxer et al., J Pediatr 2006).

Neutropenien bei HAX1 Mutationen

Die genetischen Ursachen der autosomal rezessiv vererbten Form der SCN blieben lange Zeit unklar. Erst im Jahre 2006 gelang es einer Arbeitsgruppe um C. Klein, die molekulare Ursache aufzuklären. Viele Patienten mit autosomal rezessiver SCN, darunter auch die von Kostmann erstmalig beschriebenen Patienten, zeigen Mutationen in *HAX1*. *HAX1* ist ein mitochondriales Protein, welches antiapoptotische Wirkungen hat (Klein et al., Nat Genet 2007).

Darüber hinaus gibt es jedoch auch Patienten mit SCN, die weder Mutationen in *ELA2* noch in *HAX1* zeigen. Bei einem Teil dieser Patienten ist das Krankheitsbild der SCN mit zusätzlichen Phänomenen assoziiert (s. Tabelle 1).

Tabelle 1

Übersicht über bekannte Gendefekte, die mit einer kongenitalen Neutropenie assoziiert sind

ERKRANKUNG	GENETIK	VERERBUNG	NEUTROPENIE PLUS...
Kongenitale Neutropenie mit <i>ELA2</i> Mutation	<i>ELA2</i>	aut. dom.	Präleukämisches Syndrom
Kongenitale Neutropenie mit <i>HAX1</i> Mutation	<i>HAX1</i>	aut. rez.	Präleukämisches Syndrom (?)
Kongenitale Neutropenie mit <i>GFI-1</i> Mutation	<i>GFI1</i>	aut.dom.	B-/T-Zell-Defizienz
Kongenitale Neutropenie mit <i>WAS</i> Mutation	<i>WAS</i>	X-chromosomal	Monozytose, Lymphopenie
Kongenitale Neutropenie mit <i>p14/MAPBPIP</i> Mutation	<i>p14/MAPBPIP</i>	aut. rez.	Partieller Albinismus, Kleinwuchs, Hypogammaglobulinämie
Shwachman-Diamond Syndrom	<i>SBDS</i>	aut. rez.	Exokrine Pankreasinsuffizienz
WHIM Syndrom	<i>CXCR4</i>	aut.dom.	Warzen, Hypogammaglobulinämie, Myelokathexis
Hyper IgM Syndrom	<i>CD40-L</i>	X-chromosomal	IgG-/IgA-/IgE-Defizienz
Barth Syndrom	<i>TAZ</i>	X-chromosomal	Dilatative Kardiomyopathie, Skelettmuskelmypopathie, Kleinwuchs
Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 2	<i>AP3B1</i>	aut. rez.	Partieller Albinismus, Kleinwuchs, Hypogammaglobulinämie, Thrombozytendysfunktion
Griscelli Syndrom Typ 2	<i>RAB27A</i>	aut. rez.	Partieller Albinismus, Hämophagozytose
Chédiak-Higashi Syndrom	<i>LYST</i>	aut. rez.	Partieller Albinismus, defekte Chemotaxis, defekte T- und NK- Zell-Zytotoxizität
Cohen Syndrom	<i>VPS13B</i>	aut. rez.	u.a. Adipositas, Hypotonie, mentale Retardierung, kraniofaziale Auffälligkeiten, Pigmentretinopathie
Pearson Syndrom	Mitochondriale Deletion	mitochondrial	Anämie, Thrombozytopenie, Pankreasinsuffizienz
Glykogenspeicherkrankheit Typ Ib	<i>SLC37A4</i>	aut. rez.	Hepatomegalie, Hypoglykämien, Laktazidose
Zyklische Neutropenie	<i>ELA2</i>	aut.dom.	
Kongenitale Neutropenie, unklassifiziert	unbekannt	rez./dom.	

Tabelle adaptiert aus Welte et al., Semin Hematol 2006.

Durch Identifizierung der den Syndromen zugrunde liegenden genetischen Defekte erschließt sich die Möglichkeit, über das Wissen um die pathophysiologischen Auswirkungen auch die physiologischen Funktionen einzelner Genprodukte aufzuklären. Die klinische und molekulare Charakterisierung seltener genetischer Aberrationen trägt somit dazu bei, molekulare Mechanismen der zellulären Differenzierung und Funktion zu erhellen.

Viele der in Tabelle 1 aufgeführten Syndrome zeigen außer der Neutropenie noch weitere, das jeweilige Syndrom spezifizierende Charakteristika. Einige Neutropeniesyndrome sind mit einem partiellen Albinismus assoziiert und lassen sich als Untergruppe klassifizieren. Hierzu gehören das Griscelli Syndrom Typ 2, das Chédiak-Higashi Syndrom, das Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 2 und die *de novo* identifizierte kongenitale Neutropenie bei p14-Defizienz, die in den folgenden Abschnitten näher charakterisiert werden.

1.2 Lysosomales Kompartiment und Albinismus

1.2.1 Sekretorische Lysosomen

Die membranbegrenzten Kompartimente der Zelle konstituieren ein sehr komplexes System, dessen Aufbau und Funktion von Zelltyp zu Zelltyp großen Variationen unterliegt. Es wurden von diversen Autoren Versuche unternommen, Zellkompartimente mit zwar nicht identischem, jedoch funktionell und/oder morphologisch ähnlichem Aufbau in übergeordneten „Einheiten“ zusammenzufassen. So zählen beispielsweise Li et al. (Bioessays 2004) unter anderem folgende Zellstrukturen zu den sogenannten „lysosome-related organelles“: Lysosomen, Melanosomen, elektronendichte Körperchen der Thrombozyten, Lamellarkörper der Alveolarzellen Typ II, lytische Granula von zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen sowie azurophile Granula von neutrophilen Granulozyten. Stinchcombe et al. (science 2004) grenzen die oben genannten spezifischen Granula mit dem Begriff „sekretorische Lysosomen“ von den herkömmlich als Lysosomen bezeichneten Strukturen ab. Sekretorische Lysosomen unterscheiden sich von herkömmlichen Lysosomen durch ihre Möglichkeit zur regulierten Sekretion (Blott et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2002).

Der enge Zusammenhang zwischen den genannten Organellen zeigt sich klinisch dadurch, dass bestimmte genetische Aberrationen einen Phänotyp präsentieren, der auf Defekte hinweist, die gleichzeitig mehrere der verwandten Kompartimente betreffen. Unter diesem Aspekt erscheint auch die oben vorgenommene Gruppierung der vier genannten

Neutropenie/Albinismus-Syndrome weniger willkürlich. Die Annahme, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen (unter anderem) Immundefizienz und Albinismus besteht, lässt vermuten, dass die den Syndromen zugrunde liegenden genetischen Mutationen unterschiedliche Angriffspunkte innerhalb eines funktionellen Systems ansteuern.

Alle bisher identifizierten Defekte, die die sekretorischen Lysosomen betreffen, werden autosomal rezessiv vererbt (Schäffer et Klein, *Curr Opin Allergy and Clin Immunol*, in press).

1.2.2 Autosomal rezessive Syndrome mit Neutropenie und Albinismus

1.2.2.1 Griscelli Syndrom Typ 2

Das Griscelli Syndrom Typ 2 (GS Typ 2) ist gekennzeichnet durch einen partiellen Albinismus, neurologische Auffälligkeiten, Hämophagozytose, intermittierende Neutropenie und Immundefizienz bei gestörter Funktion der zytotoxischen T-Lymphozyten. Die genetische Grundlage bilden Mutationen in *RAB27A*, einem Protein, welches für einen Teilschritt im Transportmechanismus von sekretorischen Lysosomen zur Plasmamembran, sowie für die Freisetzung von Myeloperoxidase aus azurophilen Granula von Bedeutung ist. Letzteres erklärt den bei Griscelli Syndrom Typ 2 bestehenden Defekt in der Bakterizidie der neutrophilen Granulozyten, nicht jedoch die Neutropenie (Munafó et al., *Biochem J* 2007).

1.2.2.2 Chédiak-Higashi Syndrom

Das Chédiak-Higashi Syndrom (CHS) ist gekennzeichnet durch Hypopigmentation, Blutungsstörungen und Immundefizienz aufgrund einer Neutropenie und defekter NKT-Zellen. In schweren Fällen können neurologische Beeinträchtigungen das Krankheitsbild ergänzen. Das in den meisten Fällen dem CHS zugrunde liegende mutierte *LYST* Gen führt zur Formation von morphologisch auffälligen, aber funktionell unbeeinträchtigten Lysosomen mit Einschlusskörperchen in neutrophilen Granulozyten und anderen Zellen mit sekretorischen Lysosomen. Es besteht jedoch auch hier ein die sekretorischen Lysosomen betreffender Exozytose-Defekt (Grenda et al., *Curr Top Dev Biol* 2006).

1.2.2.3 Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 2

Das Hermansky-Pudlak Syndrom (HPS) ist ein Symptomkomplex, der in der Literatur zurzeit in 8 Subgruppen gegliedert wird (HPS Typ 1-8). Gemeinsame Charakteristika aller HP-Syndrome sind der partielle, tyrosinasepositive (okulokutane) Albinismus sowie die

verlängerte Blutungszeit aufgrund von Thrombozytenfunktionsstörungen. Der Vererbungsmodus ist autosomal rezessiv.

Ausschließlich im Falle des HPS Typ 2 werden diese Charakteristika ergänzt durch eine kongenitale Neutropenie. Weltweit sind derzeit nur 8 Patienten mit HPS Typ 2 in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben. Fälle von Lungenfibrose und entzündlicher Darmerkrankung im Rahmen eines HPS Typ 2 sind bekannt, werden jedoch nicht zur Diagnosestellung gefordert.

Genetik des HPS Typ 2

Seine molekulare Abgrenzung erfährt das HPS Typ 2 durch Mutationen im *AP3B1* Gen, das auf Chromosom 5q14.1 lokalisiert ist und für die $\beta 3A$ Kette, eine der vier Untereinheiten des Adaptor Protein Komplexes 3 (AP-3), kodiert. Bislang wurden 6 unterschiedliche Mutationen im *AP3B1* Gen im Zusammenhang mit HPS Typ 2 beschrieben, die alle zu einem Fehlen bzw. einem Mangel an funktionstüchtiger $\beta 3A$ Kette führen. Diese Defizienz bewirkt, dass die Zusammensetzung des AP-3 Komplexes aus seinen 4 Untereinheiten ($\beta 3A$, $\delta 3$, $\mu 3A$, $\sigma 3A$) gestört ist, was zur Instabilität des Komplexes führt und auf Proteinebene die Degradation auch der übrigen Ketten bewirkt.

In neuronalem Gewebe werden Isoformen von drei der vier Ketten exprimiert, welche als $\beta 3B$, $\mu 3B$ und $\sigma 3B$ bezeichnet werden.

Funktion des AP-3 Komplexes

AP-3 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, das eine wichtige Rolle im Transportmechanismus für Transmembranproteine vom Trans-Golgi Netzwerk und vom endosomalen Kompartiment zu „lysosome-related organelles“ spielt. Die Entität der durch AP-3 gebundenen Proteine zeichnet sich durch ein Tyrosin- oder ein Di-Leucin-Bindungsmotiv aus (Bonifacino et Traub, Annu Rev Biochem 2003). Dazu gehören beispielsweise die Lysosomen-assoziierten Membranproteine LAMP1, LAMP2 und CD63, die für die Melaninsynthese notwendige Tyrosinase und gp75, sowie die neutrophile Elastase.

Im Falle einer AP-3-Defizienz ist eine erhöhte Konzentration von LAMP1, 2 und CD63 auf der Plasmamembran beschrieben (z.B. Rous et al., Mol Biol Cell 2002). Eine hypothetische Funktion von AP-3 besteht darin, diese und andere lysosomale Proteine aus einem Recyclingpfad über die Plasmamembran zu rekrutieren und zu den lysosomalen Strukturen zu

dirigieren. Mangel an funktionstüchtigem AP-3 würde so zu einer Akkumulation der AP-3-Bindungsproteine in Plasmamembran und Recyclingpfad führen.

In AP-3-defizienten Melanozyten zeigen Tyrosinase und andere melanogene Proteine eine atypische Verteilung in der Zelle, worauf sich der partielle Albinismus zurückführen lassen dürfte (Huizing et al., Mol Biol Cell 2001; Theos et al., Mol Biol Cell 2005).

Das ultrastrukturelle Korrelat der verlängerten Blutungszeit bei HPS Typ 2 findet sich wahrscheinlich in den fehlenden oder morphologisch auffälligen elektronendichten Körperchen der Thrombozyten, die mit Inhaltsstoffen wie Serotonin, Calcium und ADP für die Blutgerinnung von Bedeutung sind.

AP-3-Defizienz beeinträchtigt auch die Funktion der zytotoxischen T-Lymphozyten, indem die polarisierte Sekretion der sekretorischen Lysosomen an der immunologischen Synapse gestört ist (Clark et al., Nat Immunol 2003).

Benson et al. (Nat Genet 2003) konnten *AP3BI* Mutationen als genetische Ursache der zyklischen Neutropenie bei Collies identifizieren. Diese Hundekrankheit zeigt Ähnlichkeiten mit der zyklischen Neutropenie beim Menschen und geht darüber hinaus mit Hypopigmentation einher. Wie bereits erwähnt, konnten bei vielen Neutropeniepatienten Mutationen im für die neutrophile Elastase kodierenden Gen *ELA2* nachgewiesen werden. Benson et al. postulieren, dass NE mit AP-3 interagiert und AP-3 die subzelluläre Lokalisation der NE beeinflusst. Diese Beobachtungen bringen die Neutropenie im Rahmen eines HPS Typ 2 mit Neutropenien bei *ELA2* Mutationen in Zusammenhang.

Feng et al. (Hum Molec Genet 1999) beschrieben eine Spontanmutation im *Ap3b1* Gen in der hypopigmentierten Maus „Pearl“, welche seitdem als Mausmodell für das HPS Typ 2 genutzt wird. Interessanterweise besteht allerdings bei „Pearl“ keine Neutropenie.

p14-Defizienz

Neben Untersuchungen zu einer neuartigen HPS Typ 2 Mutation stand eine weitere Erkrankung im Mittelpunkt dieser Dissertation: auch die *de novo* identifizierte Mutation im *p14/MAPBPIP* Gen führt zu einem Phänotyp, der durch Albinismus und Neutropenie gekennzeichnet ist. Wir konnten zeigen, dass die Mutation in der 3' untranslatierten Region (3'UTR) von p14 zu einer Reduktion von p14-RNA führt; daher folgt zunächst eine Einführung in den RNA-Metabolismus.

1.3 Grundlagen des mRNA Metabolismus

1.3.1 Grundzüge der Prozessierung und des Aufbaus von messenger RNA

Auf dem Weg vom Gen zum Proteinprodukt ist die mRNA nicht nur Überträgerin genetischer Informationen. Vielmehr greifen auf der Ebene der RNA eine Vielzahl von Mechanismen regulierend und kontrollierend in den Zellstoffwechsel ein. Konstitutiv veränderte Expressionsniveaus oder pathologische Prozessierungen einzelner RNAs können schwerwiegende Auswirkungen auf den betroffenen Organismus haben.

Die zellkernständige RNA Polymerase II schreibt die Nucleotidfolge eines Gens in prä-mRNA um. Bevor ein Transkript aber den Zellkern verlassen kann, müssen (mit wenigen Ausnahmen) drei wichtige Modifikationen erfolgen: das Anfügen eines 7-N-Methylguanosi-Caps an das 5' Ende, das Herausschneiden der Introns („Splicen“) sowie das Anfügen eines „Poly(A) Tails“ an das 3' Ende der RNA. Diese Mechanismen erfolgen co-transkriptionell und stellen wichtige Voraussetzungen für effiziente Prozessierung, nukleären Export und Translation sowie zur Unterhaltung der Transkriptstabilität dar.

In den letzten Jahren hat sich herauskristallisiert, dass die Modifikationen auf dem Weg von der prä-mRNA zur reifen mRNA eigenständige Reaktionen darstellen, die jedoch eng miteinander verknüpft sind und einander beeinflussen können (Proudfoot et al., Cell 2002).

RNA Polymerase II

Dass die RNA Polymerase II nicht nur als Kopierenzym zur Übersetzung DNA → RNA dient, verdeutlichen Shatkin und Manley (Nat Struct Biol 2000), indem sie die RNA-Polymerase II als „Prozessierungs-Plattform“ für Capping, Splicing und Polyadenylierung bezeichnen. Die RNA-Polymerase II besteht aus zwölf Untereinheiten, zu denen auch die „C-terminal domain“ (CTD) gehört (Cramer et al., science 2001). Die CTD enthält eine Wiederholungssequenz, deren Serinreste phosphoryliert werden können. Die unphosphorylierte CTD spielt eine Rolle bei der Transkriptionsinitiation und dem Capping, die phosphorylierte Form bei der Elongation und dem Splicing. Auch Poly(A) Faktoren sind nachweislich mit der CTD assoziiert (Proudfoot et al., Cell 2002).

Capping

Das Anfügen des 5' 7-N-Methylguanyl-Caps stellt den ersten der Modifikationsschritte dar und erfolgt bereits, sobald die ersten 20 bis 30 Nukleotide der prä-mRNA synthetisiert wurden.

Die Cap-Struktur fungiert unter anderem als Bindungsstelle für diverse Proteinkomplexe (z.B. den nukleären „cap binding complex“) und scheint eine bedeutende Bastion der mRNA im Schutz vor 5'→3' Exonukleasen darzustellen. Auch die Splicingmaschinerie orientiert sich am 5'Cap zur Identifikation des 5'ständigen Introns.

Im Zytoplasma finden sich diverse Translationsinitiatoren wie beispielsweise eIF-4E als Bindungspartner der Cap-Struktur. Sie vermitteln unter anderem die Assoziation zwischen ribosomalen Untereinheiten und mRNA (Shatkin et Manley, Nat Struct Biol 2000). Der Präinitiationskomplex assoziiert am 5'Cap und „scantt“ die prä-mRNA in 3' Richtung bis zum Auffinden des AUG-Startcodons (Cazzola et Skoda, Blood 2000).

Die erwähnten Funktionen der Cap-Struktur verdeutlichen das co- und post-transkriptionelle Ineinandergreifen der unterschiedlichen mRNA-Strukturelemente mit dem Prozessierungsapparat.

Splicing

Die Anzahl von Nukleotiden in Introns innerhalb eines menschlichen Gens übersteigt die Anzahl der Nukleotide in Exons um das zehnfache (Faustino et al., Genes and Dev 2003). Mit hoher Präzision müssen die Introns aus der prä-mRNA entfernt werden, eine Veränderung des Splicing-Rasters sowie der Splicing-Maschinerie kann zu schwerwiegenden Folgen führen.

Ein Komplex aus unterschiedlichen Proteinen und „small nuclear RNAs“ (snRNAs) bildet das „Spliceosome“ und katalysiert das Herausschneiden der Introns aus der prä-mRNA. Bis dato wurde eine Vielzahl von cis- und trans-agierenden Elementen identifiziert, die regulatorisch und modifizierend in den Splicingprozess eingreifen. 60-80% der menschlichen Gene können physiologisch durch alternatives Splicing für unterschiedliche Genprodukte kodieren, was einen wichtigen Beitrag zur Diversität der Genprodukte leistet (Soller, Cell Mol Life Sci 2006).

Die 3' regulatorische Region

Die 3' regulatorische Region (3'RR) verfügt über eine große Anzahl an regulatorischen Elementen und spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Prozessierung des 3' Endes

der mRNA. Sie beeinflusst entscheidend Stabilität, nukleären Export, subzelluläre Lokalisation und Translation der mRNA (Chen et al., Hum Genet 2006).

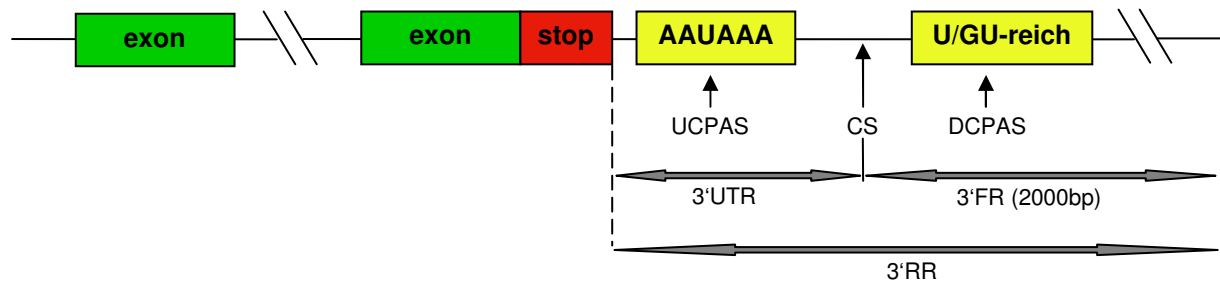


Abbildung 1: Schematische Darstellung der 3' regulatorischen Region (UCPAS = upstream core polyadenylation signal, DCPAS = downstream core polyadenylation signal, 3'FR = 3' flankierende Region, 3'RR = 3' regulatorische Region). Modifiziert nach Chen et al., Hum Genet 2006.

Die 3' RR besteht aus der 3'UTR und der 3' flankierenden Region (FR), zwischen denen sich die „Cleavage Site“ (CS) befindet, an die nach endonukleolytischer Spaltung der „Poly(A) Tail“ angehängt wird. Etwa 10-30 Nukleotide oberhalb der CS liegt das sogenannte „Upstream Core Polyadenylation Signal“ (UCPAS), in der Regel ein hochkonserviertes AAUAAA Hexamer. 10-30 Nukleotide unterhalb der CS befindet sich meist ein weniger konserviertes U/GU-reiches Element, das sogenannte „Downstream Core Polyadenylation Signal“ (DCPAS). Die Cleavage-Maschinerie scheint die Spaltung der mRNA hinter einem CA Dinukleotid zu bevorzugen, verlässliche Vorhersagen der tatsächlichen CS lassen sich jedoch bisher auf der Grundlage der Basensequenz noch nicht treffen.

„Poly(A) Tail“

Mit Ausnahme der meisten Histon-RNAs verfügen alle proteinkodierenden prozessierten mRNAs am 3' Ende über i.d.R. 150-250 Adenosinreste, die den sogenannten „Poly(A) Tail“ bilden (Proudfoot et al., Cell 2002). Diesem Element der mRNA werden wichtige Funktionen für die Regulation von mRNA-Stabilität, -Translation und -Transport zugeschrieben, wahrscheinlich durch Bereitstellung von potentiellen Bindungsstellen für Poly(A) Bindungsproteine und miRNAs sowie als Schutz vor 3'Exonukleasen (Coller et Parker, Annu Rev Biochem 2004; Kühn et Wahle, Biochim Biophys Acta 2004).

Der „Poly(A) Tail“ wird von der Poly(A)-Polymerase synthetisiert und nach endonukleolytischer Spaltung an das 3'Ende der mRNA angefügt.

Analog zur Möglichkeit des „alternativen Splicings“ verfügen mehr als 30% der menschlichen Gene über alternative Polyadenylierungsstellen. Der Gebrauch dieser

alternativen Polyadenylierungsstellen generiert diverse Genprodukte durch die mögliche Wahl alternativer terminaler Exons und beeinflusst außerdem das regulatorische Potential durch die Modifikation der 3'UTR-Länge (Soller, Cell Mol Life Sci 2006).

1.3.2 mRNA Turnover

Die Proteinexpression unterliegt einer Vielzahl von Regulationsmechanismen auf unterschiedlichen Ebenen: neben der Transkriptionsfrequenz und der Stabilität des Proteins verfügt die Zelle über Möglichkeiten, die Stabilität von mRNAs und deren Translationsfrequenz zu variieren. Abbauraten und damit die Halbwertszeiten von verschiedenen mRNAs variieren physiologischerweise und werden darüber hinaus durch äußere Faktoren beeinflusst.

Auch der Schutz der Zelle vor fehlerhaften Transkripten findet auf mRNA-Ebene statt: Stabilität und Translationsfrequenz werden durch Mutationen in kritischen Basensequenzen verändert.

Im Folgenden werden die wichtigsten Abbauwege der reifen mRNA kurz skizziert.

Deadenylierungsabhängiger mRNA-Abbau

Die Degradierung beginnt mit dem Abbau des „Poly(A) Tails“ durch den Deadenylase-Komplex, gefolgt von entweder dem 3'→5' exoribonukleolytischen Abbau durch das Exosom oder dem an die Deadenylierung anschließenden Decapping und einem 5'→3' exoribonukleolytischen Abbau durch die Exonuklease XRN1. Der „Poly(A) Tail“ inhibiert den mRNA Abbau durch Interaktion mit PABP (Poly(A) Binding Protein) (Wilusz et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2001). Evtl. bewirkt auch eine Zirkularisierung der mRNA während der Translation einen Schutz vor exoribonukleolytischem Abbau.

Endoribonukleolytischer Abbau

Insgesamt scheinen nur wenige mRNAs über diesen Weg abgebaut zu werden. Endoribonukleasen erkennen spezifische „endoribonuclease detection sites“ und erzeugen einen Bruch innerhalb des mRNA-Strangs, der nun an den entstandenen freien 3' und 5' Enden durch Exonukleasen abgebaut werden kann. Angriffsstellen für endoribonukleolytischen Abbau finden sich u.a. in 3'UTRs (Wilusz et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2001).

„P-Bodies“ - Orte des Abbaus und der Translationskontrolle

Eine mRNA, die sich nicht im Zustand der Translation befindet, kann im Komplex mit Proteinen Ribonuklein-Partikel (mRNPs) bilden, die wiederum in spezifischen zytoplasmatischen Granula, den sogenannten „P-Bodies“ („processing bodies“, PBs) akkumulieren. PBs enthalten eine Vielzahl von Enzymen, die am Abbau von mRNA beteiligt sind. Unter anderem konnten Deadenylase, „Decapping“-Enzyme und die Exoribonuklease XRN1 als Bestandteile der PBs identifiziert werden. Exosom-Komponenten wurden jedoch innerhalb der PBs bisher nicht lokalisiert, so dass PBs Orte des 5'→3' gerichteten Abbaus zu sein scheinen. Insbesondere für mRNAs die AREs enthalten könnte der PB den primären Abbauort darstellen (Stoecklin et Anderson, Genes Dev 2007). Nicht alle mRNAs, die sich innerhalb eines PBs befinden, werden dort auch abgebaut – im PB finden sich auch Proteine der Translations-suppression. Für einige mRNAs ist der PB lediglich eine Durchgangsstation: während des Aufenthaltes im PB findet keine Translation statt, die mRNA kann jedoch erneut zu den Polysomen und damit zum Ort der aktiven Translation zurückkehren. Insofern sind PBs nicht nur Orte des Abbaus, sondern auch Orte der Translationskontrolle.

Des Weiteren finden sich in PBs Proteine des miRNA Mechanismus (z.B. sogenannte Argonautenproteine), so dass PBs auch einen Ort des miRNA-gesteuerten Translationsrepressions-/ Abbaumechanismus darstellen. Auch NMD-assoziierte Proteine können unter bestimmten Bedingungen (z.B. Stress) in PBs nachgewiesen werden. Eine Übersicht über PB-Bestandteile findet sich in Parket et Sheth (Mol Cell 2007).

1.3.3 Wichtige mRNA regulierende Mechanismen

AU-reiche Elemente

AU-reiche Elemente (AREs) befinden sich insbesondere in den 3'UTRs von Zytokinen, Protooncogenen und Transkriptionsfaktoren. Sie stellen keinen obligaten Bestandteil einer mRNA dar. Charakterisiert werden sie durch das AUUUA Pentamer, sie sind in ihrer Funktion jedoch stark abhängig von flankierenden Sequenzen. Tristetraprolin ist ein ARE-mRNA bindendes Protein, das nach Bindung die mRNA dem Abbau innerhalb eines „P-Bodies“ zuführt, alternativ ist auch ein ARE regulierter 3'→5' Abbau möglich. Die Expression von etwa 5-8% aller mRNAs dürfte über ARE-vermittelten Abbau reguliert werden (Bakheet et al., Nucleic Acids Res 2006).

ARE-Bindungsproteine können sowohl negative als auch positive Auswirkungen auf Stabilität, Translation und sogar subzelluläre Verteilung von mRNAs haben (Wilusz et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2001).

miRNAs

Fire und Mello gelang vor wenigen Jahren (Nature 1998) die bahnbrechende Entdeckung, dass RNA-Moleküle die Expression von Genen beeinflussen können. Zu diesen RNA-Molekülen gehören unter anderem die miRNAs.

miRNAs (micro RNAs) sind 19 – 25 nt lange, nicht kodierende Einzelstrang-RNAs die endogen produziert werden und ein posttranskriptionelles „gene-silencing“ oder „RNA-Interferenz“ (RNAi) bewirken. Etwa ein Drittel des Genoms, so schätzen Jackson und Standart (Sci STKE 2007), könnte miRNA-abhängig reguliert werden. In Verbindung mit dem „RNA-induced silencing complex“ (RISC) bindet die miRNA an eine i.d.R. nicht vollständig komplementäre Region innerhalb einer 3'UTR und supprimiert die Translation der betroffenen mRNA. Bei kompletter Sequenzhomologie vermag die miRNA ähnlich wie siRNA die Ziel-mRNA zu schneiden und damit nicht nur zu reprimieren, sondern auch zu degradieren (Rana, Nat Rev Mol Cell Biol 2007). miRISC Komponenten konnten in „P-Bodies“ (s.o.) lokalisiert werden.

PUF-Proteine

PUF-Proteine („pumilio and fem-3 binding proteins“) sind ein Beispiel für eine Familie von 3'UTR regulatorischen Proteinen, die durch Bindung an Motive der 3'UTR die mRNA-Expression beeinflussen. Dieses geschieht entweder durch Translationsinhibition oder durch Abbau der Ziel-mRNA. Im Menschen sind bisher zwei PUF-Proteine identifiziert, jedoch noch nicht eingehend charakterisiert. Interessanterweise unterstützen PUF-Proteine in niederen Organismen wie *Drosophila melanogaster* oder *C. elegans* die mitotische Proliferation von Stammzellen (Wickens et al., Trends Genet 2002).

Subzelluläre Lokalisation

Nicht nur der Transport der mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma muss durch Transportsignale geregelt werden. Auch innerhalb des Zytoplasmas besteht eine ausgeprägte Polarisierung unterschiedlicher mRNAs, die durch Transportsignale (vergleichbar mit Postleitzahlen) vornehmlich in den untranslatierten Regionen der mRNA geschaffen und aufrecht erhalten wird. Die subzelluläre Lokalisation von mRNAs stellt einen effizienten

Mechanismus dar, entstehende Proteine „vor Ort“ zu synthetisieren (Jansen, Nat Rev Mol Cell Biol 2001). Eine asymmetrische Verteilung der mRNAs innerhalb der Zelle wird durch diverse Mechanismen ermöglicht: ortsgebundene Stabilisierung der mRNA; aktiver Transport; örtliches Festsetzen von frei diffundierter mRNA.

Bisher konnten noch keine allgemeingültigen spezifischen Strukturen für Lokalisations-determinierende Sequenzelemente bestimmt werden (Mignone et al., Genome Biol 2002).

Sekundärstrukturen

mRNAs weisen sequenzabhängige Sekundärstrukturen auf, die durch Basenpaarungen innerhalb des Einzelstranges entstehen. Charakteristisch sind die durch Basenpaarungen entstehenden „stem“ Strukturen, zwischen denen ungepaarte Basen „loops“ bilden. Es ist davon auszugehen, dass die Funktion eines regulatorischen Motivs sowohl von der Primär- als auch von der Sekundärstruktur abhängig ist (Mignone et al., Genome Biol 2002). Bis dato konnten noch keine generellen prädiktiven Regeln bezüglich des regulatorischen Potentials bestimmter Sekundärstrukturen etabliert werden (Chen et al., Hum Gen 2006).

1.3.4 Mechanismen der Qualitätskontrolle

Nukleärer Abbau

Obwohl die meisten Transkripte im Zytoplasma abgebaut werden, können Fehler in Transkription, mRNA-Export oder mRNA-Prozessierung zum Abbau der noch nukleären RNA führen. Sowohl 3'→5' als auch 5'→3' Abbauewege spielen dabei eine Rolle (Garneau et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2007).

Nonsense-Mediated Decay

mRNAs, die ein vorzeitiges Stopp-Signal enthalten, werden über den Weg des Nonsense-Mediated Decay (NMD) im Zytoplasma rasch abgebaut, wodurch die Synthese abnormer Proteine mit veränderten Funktionen vermindert wird. Ein Stopp-Codon wird von zellulären Mechanismen als „normal“ erkannt, wenn in den folgenden ca. 50 Nukleotiden kein Intron liegt. NMD wird ausgelöst durch ein Nonsense Codon gefolgt von einer „splicing junction“, d.h. der von der Splicingmaschinerie markierten Verbindung zwischen zwei Exons (Holbrook et al., Nat Genet 2004). Der NMD bietet der Zelle Schutz vor fehlerhaften, trunkierten Proteinen.

Non-Stop Decay

Über diesen Weg können mRNAs abgebaut werden, denen ein in-frame Stopp-Codon fehlt, so dass die Translation über den „Poly(A) Tail“ fortgesetzt wird (Vasudevan et al., BioEssays 2002).

No-Go Decay

Dies ist ein erst wenig charakterisierter mRNA-Abbaumechanismus. Wahrscheinlich können ausgeprägte Sekundärstrukturen zur Blockade von Ribosomen innerhalb des offenen Leserahmens führen, gefolgt von endonukleolytischem Abbau (Garneau et al., Nat Rev Mol Cell Biol 2007).

1.3.5 Erkrankungsassoziierte 3'RR Varianten

Chen et al. charakterisieren in ihren Übersichtsarbeiten „A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I / II“ auf umfassende Weise die bis dato in der Literatur beschriebenen krankheitsassoziierten 3'UTR Varianten.

Die Autoren analysierten 121 erkrankungsassoziierte 3'RR Varianten in 94 menschlichen Genen. Nicht alle in dem Artikel beschriebenen 3'RR Varianten sind krankheitsverursachend, etliche haben prädisponierenden Charakter oder modifizieren die Ausprägung einer Erkrankung. Zusammenfassend postulieren die Autoren, dass mit nur wenigen Ausnahmen 3'RR Varianten i.d.R. nicht zum kompletten Verlust der Expression des betroffenen Gens führen. Zu den ausgeprägtesten Auswirkungen auf die mRNA der zum Zeitpunkt der Publikation beschriebenen 3'RR Varianten führten UCPAS Mutationen, denen häufiger als anderen 3'Mutationen eine krankheitsverursachende Wirkung zugesprochen wird. Als klinisch bekanntes Beispiel für krankheitsverursachende 3'RR Mutationen sei an dieser Stelle die Mutation G20210A im Prothrombingen genannt, die die CS betrifft und im Sinne einer „gain of function“ Mutation durch eine effizientere CS Erkennung zu einer Erhöhung der Prothrombin-mRNA führt und als Thromboserisikofaktor gilt (Gehring et al., Nat Genet 2001; Danckwardt et al., Blood 2004). Als „loss of function“ Mutation sei beispielsweise eine UCPAS Mutation im *FOXP3* Gen genannt. Mutationen im *FOXP3* Gen führen zum „IPEX Syndrom“ („Immune Dysfunction, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked“). In einer betroffenen Familie ließ sich in der UCPAS 972 bp downstream des Stopp-Codons eine Punktmutation AATAAA→AATGAA nachweisen, die eine stark verminderte *FOXP3* Expression bewirkt (Bennett et al., Immunogenetics 2001). Bemerkenswert ist, dass die

Sequenz AATGAA in 1.6% der menschlichen Gene als normales Polyadenylierungssignal fungiert, was darauf hindeutet, dass die UCPAS Funktion in ausgeprägtem Maße kontextabhängig ist (Chen et al. I, Hum Genet 2006). Derartige Kontextabhängigkeiten dürften auch auf andere Domänen und Motive innerhalb der 3'RR zutreffen.

1.4 Der MAP-Kinase Signaltransduktionsweg und das Protein p14

MAP-Kinasen („Mitogen-Activated Protein Kinases“) umfassen eine große Gruppe von Enzymen, die nach Bindung spezifischer Faktoren durch Phosphorylierung aktiviert werden und so der Übertragung extrazellulärer Signale dienen. MAP-Kinase Aktivierungskaskaden nehmen Einfluß auf Apoptose, Zellwachstum und –differenzierung. Bis dato sind fünf unterschiedliche MAP-Kinase Signalwege in Säugetieren beschrieben, wozu die u.a. durch EGF („epidermal growth factor“) aktivierte RAS/RAF/MEK/ERK Kaskade zählt (Teis et al., Dev Cell 2002).

Schaeffer et al. (Science 1998) beschrieben erstmalig das Protein MP1 (MEK binding partner 1/ MAPBP), welches an MEK1 und ERK1 bindet und deren Aktivierung durch Phosphorylierung unterstützt.

Wunderlich et al. (J Cell Biol 2001) identifizierten bei ihrer Suche nach lysosomalen Proteinen ein 14 kD großes Protein, welches ubiquitär und hochkonserviert in Vertebraten sowie Invertebraten exprimiert wird. Die Autoren nannten dieses Protein p14 (MAPBPIP) und zeigten, dass p14 an der zytoplasmatischen Seite von späten endosomalen/lysosomalen Membranen lokalisiert ist und dort mit dem MAP-Kinase Ankerprotein MP1 interagiert. Somit dirigiert p14 die EGF-vermittelte Signaltransduktion an die Endosomen. Im Gegensatz dazu können EGF-vermittelte Signaltransduktionskaskaden auch über ein anderes Adaptormolekül (KSR) an die Zytoplasmamembran dirigiert werden. Je nach der subzellulären Lokalisation der Signalübermittlung ist die zelluläre Antwort verschieden. Diese Vorstellung einer räumlichen Segmentierung der Signalkaskaden hat die zellbiologische Forschung sehr bereichert, da es nun möglich ist, zu verstehen, warum ein und dasselbe Zytokin diverse zelluläre Reaktionen hervorrufen kann (Kolch, Nat Rev Mol Cell Biol 2005).

P14 spielt als Adaptormolekül eine entscheidende Rolle für die endosomale Aktivierung der ERK-Kaskade. Dies wurde in der Vergangenheit dadurch gezeigt, dass nach einem „knockdown“ von *p14/MAPBPIP* die Phosphorylierung von ERK1/2 deutlich eingeschränkt ist (Teis et al., Dev Cell 2002). Ähnliche Experimente wurden auch an embryonalen Fibroblasten durchgeführt, in denen *p14/Mapbpip* mittels Cre-Rekombinase deletiert wurde (Teis et al., J Cell Biol 2006). P14 ist für die embryonale Entwicklung von fundamentaler Bedeutung, da p14-defiziente Embryonen vor Tag 11 absterben (Teis et al., J Cell Biol 2006).

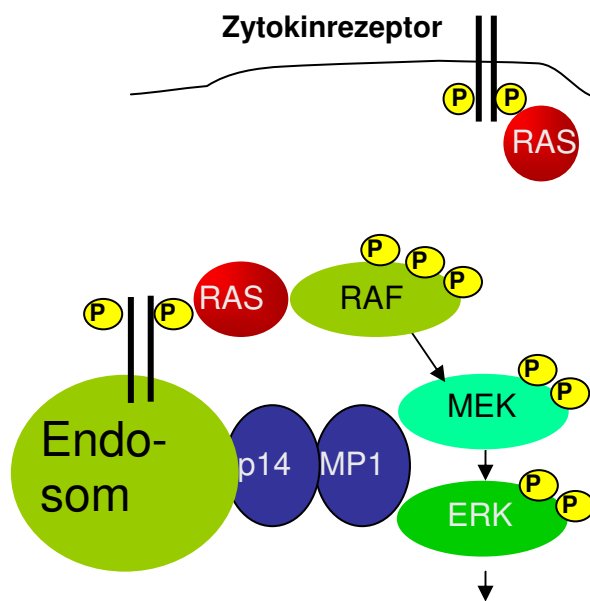


Abbildung 2: Der durch Zytokine wie EGF oder G-CSF induzierte MAP-Kinase

Signaltransduktionsweg.

(RAF = RAS-activated factor, MEK = MAPK/ERK-kinase, ERK = extracellular signal-regulated kinase, MP1 = MEK binding partner 1, P = phosphoryliert).

Abbildung modifiziert nach Teis et Huber, Cell Mol Life Sci 2003.

2 ERGEBNISSE

Das Ziel dieser wissenschaftlichen Untersuchung bestand darin, die molekularen und zellbiologischen Auffälligkeiten zu erhellen, die mit einer neuartigen Mutation im *AP3B1* Gen bei HPS Typ 2 und mit der *de novo* identifizierten *p14/MAPBPIP* Mutation eines neuartigen Neutropeniesyndroms in Zusammenhang stehen.

2.1 Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 2

2.1.1 Klinik der Familie Ö.

Im Zentrum unserer Untersuchungen stand eine türkische konsanguine Familie, in der zwei Mitglieder (Cousin und Cousine; Pt. 29 und Pt. 30) an kongenitaler Neutropenie mit Neutrophilenzahlen zwischen 0 – 500/ μ l, Hypopigmentation und leichter Entwicklungsretardierung leiden. Ferner besteht eine Thrombozytopenie (50.000 – 150.000/ μ l), eine Splenomegalie, Nystagmus, verminderte Sehschärfe, grobe Gesichtszüge, schlechter Zahnstatus und ausgeprägte Peridontitis. Es lagen keine Hinweise auf Gerinnungsstörungen vor und anamnestisch waren trotz der niedrigen Neutrophilenzahlen keine lebensbedrohlichen Infektionen eruierbar. Pt. 29 berichtete von 2 stattgehabten Pneumonien, Pt. 30 litt unter rezidivierenden Hautabszessen. Die Neutrophilenzahlen erreichten nach G-CSF Gabe Normalwerte, die Compliance der Patienten erwies sich jedoch als mangelhaft. Zum Zeitpunkt unserer Studien waren die Patienten 21 resp. 15 Jahre alt. Der Phänotyp der Patienten wurde erstmalig von Kotzot et al. (Am J Med Genet 1994) als fraglich neuartiges autosomal rezessives Syndrom beschrieben.

2.1.2 Experimentelle Daten

Durch genetische Kopplungsanalyse und Sequenzierung gelang es uns in Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern (Labor Grimbacher, ehemals Abteilung für Rheumatologie und Klinische Immunologie, Universität Freiburg) eine homozygote Deletion von Exon 15 in *AP3B1* zu identifizieren und die Diagnose Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 2 zu stellen. Im Unterschied zum bisher beschriebenen HPS Typ 2-Phänotyp zeigen unsere Patienten keine verlängerte Blutungszeit, jedoch eine Thrombozytopenie. Auch die Entwicklungsverzögerung und Splenomegalie gelten nicht als typisch für das HPS Typ 2, so

dass anzunehmen ist, dass die klinischen Ausprägungen des HPS Typ 2 einer größeren Variabilität unterliegen als bisher angenommen.

Nach Anlegen von Fibroblastenkulturen aus Hautbiopsien konnten wir via „Real-Time“ PCR („Lightcycler“) äquivalente mRNA Level für AP3B1 in Patienten- und Kontroll-Fibroblasten detektieren.

Um die Expression der einzelnen AP-3 Untereinheiten auf Proteinniveau zu beurteilen, extrahierten wir Gesamtprotein aus Fibroblasten und detektierten die vier AP-3 Ketten separat im Western Blot. Im Vergleich zum Normalspender zeigten sich die β 3A, δ 3 und die σ 3A – Ketten bei den Patienten drastisch reduziert. Die Western Blots zur Detektion der μ 3A-Kette erbrachten keinerlei Nachweis der Untereinheit in den Zellysaten der Patientenfibroblasten. In der Immunfluoreszenz zeigten die Patientenzellen eine deutlich verminderte, diffuse Färbung nach Inkubation mit anti- δ .

Wie bereits erwähnt, beschrieben Dell'Angelica et al. (Mol Cell 1999) eine verstärkte CD63-Expression auf AP-3-defizienten Fibroblasten. Dieses konnten wir mittels FACS-Analyse auch für unsere Patienten nachvollziehen.

Der Knochenmarksausstrich für Pt. 30 erbrachte normalen Zellgehalt bei vollständiger Ausreifung aller Zelltypen.

Im Elektronenmikroskop zeigten sich in den Thrombozyten unreife elektronendichte Körperchen. Die Keratinozyten in den basalen Hautschichten enthalten morphologisch auffällige Melanosomenstrukturen. Im Gegensatz zu Keratinozyten von gesunden Kontrollpersonen zeigt sich ein Agglomerat von unreifen Melanosomen in Phagolysosomen, was auf Störungen der Reifung in den Melanozyten hindeutet.

Auch die Granula der neutrophilen Granulozyten stellten sich elektronenmikroskopisch auffällig dar. Funktionell schienen die Zellen jedoch bezüglich ihrer Migrations- und Phagozytosefähigkeit sowie ihres lytischen Potentials unbeeinträchtigt, lediglich der Gehalt an NE und MMP9 bei normalem MPO und Proteinase-3 Level war reduziert.

Im peripheren Blut fiel eine Verminderung von CD3-CD56+ NK Zellen auf, auch die Subpopulation der NKT Zellen stellte sich reduziert dar. Ähnliches wurde von Elewaut et al. (J Exp Med 2003) bereits für die Maus-Mutante „Pearl“ beschrieben.

Die phänotypische Analyse von T- und B-Zellen erwies sich als unauffällig.

2.2 p14-Defizienz

2.2.1 Klinik der Familie R.

Vier von fünfzehn Kindern der wahrscheinlich konsanguinen Familie R., die der Religionsgemeinschaft der Mennoniten angehört, zeigen einen ungewöhnlichen Phänotyp, der klinisch durch folgende Charakteristika gekennzeichnet ist: Kleinwuchs unterhalb der altersadaptierten 3% Perzentile, Hypopigmentierung von Haut und Haaren, grobe Gesichtszüge und rezidivierende bronchopulmonale Pneumokokken-Infektionen. Laborchemisch bestanden kontinuierlich verminderte Neutrophilenzahlen unter 500/ μ l, die sich durch Verabreichung von G-CSF auf Normalwerte anheben ließen. Die T-Zell Zahl und Proliferationsfähigkeit war unauffällig. Das B-Zell Kompartiment zeigte eine erhöhte Zahl von unreifen B-Zellen, allerdings eine reduzierte Zahl klassen-gewechselter B-Zellen. Die Serumspiegel für IgM waren reduziert. Im Knochenmarkausstrich fiel eine myeloide Hyperplasie bei bestehender Ausreifung der neutrophilen Granulozyten auf.

Der älteste der vier Patienten wurde erstmalig im Alter von 12 Jahren in der Medizinischen Hochschule Hannover vorstellig, die G-CSF Therapie hob die Neutrophilenwerte auf Werte über 1000/ μ l an, weitere Pneumokokken-Pneumonien ließen sich jedoch nicht vermeiden. Im Alter von 19 Jahren verschlechterte sich sein gesundheitlicher Zustand: aufgrund ausgeprägter Kopf- und Knochenschmerzen wurde eine Schmerzbehandlung mit Morphinen notwendig, im MRT fanden sich vergrößerte Markräume sowohl in Röhrenknochen als auch in platten Knochen. Die G-CSF Therapie wurde ausgesetzt und nach vierwöchiger Pause eine Knochenmarkbiopsie durchgeführt, in der sich trotz weiterhin bestehender peripherer Neutropenie eine gesteigerte, aber morphologisch unauffällige Myelopoese fand. In Ermangelung geeigneter Therapiealternativen entschloss man sich zu einer allogenen Knochenmarktransplantation, als Spenderin wurde eine HLA-identische Schwester des Patienten gewählt. Die Transplantation führte zu einem 100 prozentigen Chimärismus und zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten. Die Genesung wurde jedoch unterbrochen von Episoden einer Graft-versus-Host Erkrankung, welche sich insbesondere an Haut und Darmschleimhaut manifestierte. Zunächst konnte die Erkrankung erfolgreich behandelt werden, nahm dann jedoch einen fatalen Verlauf, der am Tag 154 nach Transplantation zum

Tod des zwanzigjährigen Patienten führte. Seine drei betroffenen jüngeren Geschwister befinden sich in stabilem Zustand weiterhin in ärztlicher Betreuung.

Die Kombination aus Neutropenie und partiellem Albinismus findet sich unter anderem bei bekannten genetischen Erkrankungen wie dem CHS, HPS Typ 2 oder Griscelli Syndrom Typ 2 (s.o.). Untypisch für die genannten Syndrome ist jedoch der Minderwuchs, des Weiteren leiden die von uns beschriebenen Patienten nicht an der für das Griscelli Syndrom charakteristischen Hämophagozytose, elektronenmikroskopisch fehlen die für CHS typischen Einschlusskörperchen in neutrophilen Granulozyten. Abgrenzend zum HPS Typ 2 konnten wir T- und B-Zell-Defekte bei unseren Patienten nachweisen. All diese Argumente sprechen dafür, dass der Symptomenkomplex einer neuen klinischen Variante eines autosomal rezessiv vererbten primären Immundefektes zuzuordnen ist. Aus diesem Grunde wurde die Anstrengung unternommen, die molekulare Ursache zu identifizieren.

2.2.2 Experimentelle Daten

Durch die Kombination einer genomweiten genetischen Kopplungsanalyse mit einer Microarray-Analyse auf zellulärer RNA fand sich ein Transkript auf Chromosom 1q21 bei den Patienten im Gegensatz zu gesunden Familienangehörigen herabreguliert: p14, auch bekannt unter MP1-interacting Protein (MAPBPIP). Die Sequenzierung der p14 kodierenden Region zeigte eine Wildtypsequenz, es fand sich jedoch bei allen Patienten eine homozygote Punktmutation A → C an Position +23 nach dem Stopp-Codon. Die Eltern sowie weitere drei Geschwister sind heterozygot für die Mutation, in 100 Kontroll-DNAs unabhängiger Spender sowie bei 34 Mitgliedern der Mennonitischen Gemeinschaft konnte die Mutation nicht nachgewiesen werden.

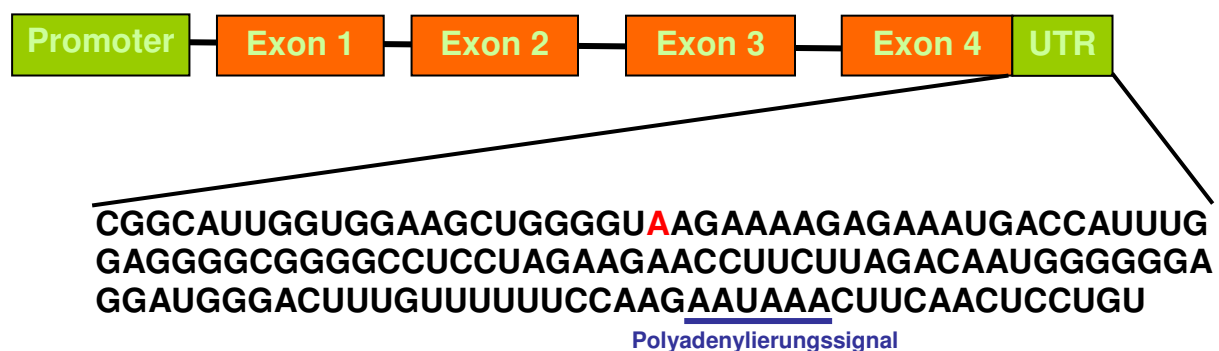


Abbildung 3: Schematische Darstellung von p14/MAPBPIP mit der Wildtyp 3' UTR Sequenz. In Rot: Position der A → C Mutation.

Charakterisierung der p14 Mutation auf zellulärer Ebene

P14 Expressionslevel

Unter anderem in B-Zellen und Hautfibroblasten ließen sich mittels „Real-Time“ PCR ein verminderter Gehalt an p14-RNA in den Patientenzellen nachweisen, im Western Blot detektierten wir eine stark reduzierte p14-Proteinexpression.

Beeinträchtigungen des lysosomalen Kompartimentes

Elektronenmikroskopische Studien erbrachten Auffälligkeiten von Melanosomen in Keratinozyten, die als pathomorphologisches Korrelat des partiellen Albinismus gelten dürften, sowie abnormale azurophile Granula in den neutrophilen Granulozyten. Die neutrophilen Granulozyten der Patienten verfügen über eine unauffällige Phagozytoseeigenschaft bei verminderter Lysefähigkeit. Auch zytotoxische T-Zellen haben eine im Vergleich zum Normalspender eingeschränkte Zytotoxizität.

Auswirkungen der 3'UTR Mutation auf die RNA

Die verminderte p14 Proteinexpression bei reduziertem p14-RNA Gehalt der Patientenzellen gab Anlass zu funktionellen Überlegungen bezüglich der Beeinträchtigung des RNA-Metabolismus durch die 3'UTR Mutation. Die Möglichkeit von alternativen Splicingprodukten konnte im Northern Blot ausgeschlossen werden.

Mittels eines „ligase-mediated poly(A) test“ (Sallés et al., Methods 1999) verglichen wir die Längen des „Poly(A) Tails“ von p14-mRNA in Abhängigkeit von der 3'UTR Mutation, konnten jedoch keine detektierbaren Längenunterschiede feststellen.

Um eine durch die Mutation bedingte Instabilität der p14-mRNA nachzuweisen, fertigten wir einen Expressionsvektor, welcher das Gen der „Firefly-Luciferase“ enthält, hinter das wir die mutierte bzw. die Wildtyp 3'UTR von *p14/MAPBPIP* klonierten. Das Konstrukt stellten wir unter die Kontrolle eines hitzeschockinduzierbaren HSP70-Promoters. Die Transfektion des „Firefly-Konstruktes“ wurde durch Co-Transfektion mit einem „Renilla-Luciferase“-haltigen Konstrukt normalisiert. Nach einstündiger hitzeschock-getriggert Induktion verglichen wir die normalisierte „Firefly-Luciferase“-Expression von Zellen, die mit der mutierten UTR transfiziert worden waren, mit der „Firefly-Luciferase“-Expression von den Zellen, die die Wildtyp-UTR enthielten. Hierbei zeigte sich eine signifikant verminderte Luciferaseexpression in den Zellen, die die mutierte 3'UTR enthielten.

Einfluss von p14 auf die G-CSF-Rezeptor vermittelte Signaltransduktion

P14 ermöglicht die regulierte Signaltransduktion des EGF-Rezeptors, indem es den MAP-Kinase Signaltransduktionsweg an das Endosom dirigiert. Der G-CSF-Rezeptor spielt eine Rolle bei der Bildung und Ausschwemmung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark (Semerad et al., Immunity 2002). Auch die Signale des G-CSF-Rezeptors werden über MAP-Kinasen vermittelt, zu denen beispielsweise auch ERK zählt. Wir konnten zeigen, dass in Abwesenheit von p14 die Phosphorylierung von ERK nach G-CSF-Rezeptor Aktivierung vermindert ist.

Einfluss von p14 auf die zytoplasmatische Verteilung der späten Endosomen

Die Annahme, dass p14 nicht nur Signalwege an das Endosom dirigiert, sondern auch die Verteilung von Endosomen in der Zelle beeinflusst, beruht auf einer Beobachtung, die wir im Rahmen eines „pulse-chase“ Experimentes in der Immunfluoreszenz machten. Im Mittel war die Distanz zwischen späten Endosomen und Zellkern in p14-defizienten Fibroblasten signifikant größer als in Fibroblasten von gesunden Spendern. Wir zeigen damit zum ersten Mal, dass p14 nicht nur für die Signaltransduktion des EGF-Rezeptors von Bedeutung ist, sondern eine allgemeine Funktion für die Verteilung der späten Endosomen in der Zelle hat.

3 Diskussion

Ziel der Arbeit war die molekulare Analyse zweier Familien mit der seltenen Kombination einer kongenitalen Neutropenie und eines partiellen, tyrosinasepositiven Albinismus. Darüber hinaus fanden sich bei allen Patienten diskrete faziale Auffälligkeiten im Sinne einer Vergrößerung der Gesichtszüge sowie eine Wachstumsretardierung. Trotz der peripheren Neutropenie zeigten Knochenmarkausstriche normalen bis erhöhten Zellgehalt mit vollständiger Ausreifung der neutrophilen Reihe. In weiteren klinischen und zellmorphologischen Aspekten bestanden jedoch ausgeprägte Unterschiede.

Aufgrund der gesicherten Konsanguinität der Eltern Ö. und des Kinderreichtums sowie der anzunehmenden Konsanguinität der Eltern R. stellten genetische Kopplungsanalysen eine ideale Möglichkeit dar, den chromosomalen Ort der genetischen Mutation auf eine überschaubare Anzahl an Kandidatengenen einzugrenzen, was in beiden Fällen letztendlich zielführend für die molekulare Charakterisierung war.

Als genetische Ursache des in der Familie Ö. aufgetretenen Phänotyps fand sich eine das Exon 15 umfassende, 8168 bp eliminierende Deletion innerhalb des *AP3BI* Gens, welches für die β -Kette des AP-3 Komplexes kodiert. Mutationen im *AP3BI* Gen bilden die molekulare Ursache des von Dell'Angelica et al. (Mol Cell 1999) erstmalig beschriebenen HPS Typ 2. Die Mutation im *AP3BI* Gen bewirkt bei normalen mRNA Spiegeln die Degradation aller an der Formation des AP-3 Komplexes beteiligten Ketten. AP-3 gilt als Shuttlemolekül für den Transport einiger lysosomaler Proteine vom Trans-Golgi Netzwerk zum lysosomalen Kompartiment, so dass Funktionsstörungen innerhalb des lysosomalen Kompartimentes durchaus naheliegend sind.

Im Gegensatz zum Phänotyp des in der wissenschaftlichen Literatur bereits beschriebenen HPS Typ 2 weisen die Patienten Ö. einige Unterschiede auf, die die klinische Zuordnung zu HPS Typ 2 komplizierten: der klinische Langzeitverlauf gestaltete sich trotz niedriger Neutrophilenzahlen eher gutartig ohne lebensbedrohliche Infektionen, auffällig war jedoch eine ausgeprägte Peridontitis und Karies. Abgrenzend zu anderen HPS Typ 2 Patienten fallen des Weiteren eine Wachstumsretardierung, Splenomegalie und Thrombozytopenie auf. Die Gründe für die unterschiedliche Klinik der HPS Typ 2 Patienten sind bisher noch fraglich. Um einen möglichen Zusammenhang mit einem gewissen Restbestand an AP-3 Komplex zu untersuchen, wäre es interessant, die Proteinexpression der AP-3 Untereinheiten im Western Blot für verschiedene HPS Typ 2 Mutationen zu vergleichen.

Auch p14 ist assoziiert mit dem lysosomalen Kompartiment: es dient u.a. als Adaptormolekül, das die subzelluläre Lokalisation von EGF-Rezeptor Signalen beeinflusst. Der MAP-Kinase Signalweg wird durch p14 an das späte Endosom dirigiert, das Fehlen von p14 bewirkt eine gestörte Signaltransduktion. MAP-Kinase Signalwege sind an der Übertragung einer Vielzahl von extrazellulären Signalen beteiligt, unter anderem auch an der zellulären Antwort bei Stimulation des G-CSF-Rezeptors, der eine bedeutende Rolle für die Neutrophilenfunktion spielt. Die Punktmutation, die wir in der 3'UTR von *p14/MAPBPIP* gefunden haben, führt zu einem stark verminderten p14-mRNA und -Proteingehalt bei den Patienten.

Bei den betroffenen Mitgliedern der Familie R. handelt es sich um die ersten beschriebenen Patienten mit p14-Defizienz.

Eine Hypopigmentierung kann Ausdruck einer Funktionsstörung sein, die die Melanozyten oder die von ihnen gebildeten Melanosomen betrifft. Melanosomen werden zur Gruppe der lysosomalen Zellorganellen gezählt und werden via Exozytose an die Zielzellen abgegeben.

Es ist bekannt, dass sich Tyrosinase in AP-3-defizienten Zellen in vakuolären und multivesikulären Endosomen ansammelt und die komplette Ausreifung der Melanosomen verhindert (Theos et al., Mol Biol Cell 2005; Huizing et al., Mol Biol Cell 2001). Unsere elektronenmikroskopischen Studien zeigen, dass morphologisch unreife Melanosomen der AP-3-defizienten Zellen in Phagolysosomen von Keratinozyten degradiert werden. Die elektronenmikroskopische Morphologie der p14-defizienten Zellen weist eine verblüffende Ähnlichkeit auf: auch hier scheint die Exozytose der noch unreifen Melanosomen zu funktionieren, diese werden jedoch wiederum sofort nach Aufnahme in ihren Zielzellen, den basalen Keratinozyten, phagolysosomal abgebaut. In diesem funktionell ungeklärten Phänomen dürfte die Ursache für den bestehenden partiellen Albinismus zu finden sein.

Auch in neutrophilen Granulozyten spielt das lysosomale Kompartiment eine herausragende Rolle: Die Funktion von neutrophilen Granulozyten besteht in der Phagozytose von Mikroorganismen und deren lysosomale Degradation. Neutrophile Granulozyten verfügen auch über die Möglichkeit der Exozytose lysosomaler Enzyme. Zu der Entität des lysosomalen Kompartimentes in neutrophilen Granulozyten werden unter anderem die azurophilen (= die primären) und die spezifischen (= die sekundären) Granula gezählt. In den primären Granula finden sich microbizide Peptide und Proteasen wie Kathepsine und auch neutrophile Elastase. Spezifische Granula enthalten unter anderem Lysozym und Lactoferrin

(e.g. Segal, Ann Rev Immunol 2005). AP-3-defiziente neutrophile Granulozyten besitzen einen hohen Anteil an im Zytoplasma verstreut liegenden, morphologisch auffälligen Granula, was jedoch sowohl bezüglich Phagozytose- und Lysefähigkeit, als auch bezüglich Chemotaxis in vitro keine nachweisbaren funktionellen Auswirkungen zeigte.

Die Morphologie der Granula in p14-defizienten neutrophilen Granulozyten ist, trotz unauffälliger Phagozytosefähigkeit, ebenfalls verändert. Die Lyse von phagozytierten Bakterien erfolgt verzögert bei normaler Fusion der Lysosomen mit den Phagosomen. Auffällig ist die aberrante Distribution der Endosomen in der Zelle: in p14-defizienten Zellen finden sich an Stelle der vorwiegend perinukleären Lokalisation im gesamten Zytoplasma verstreute späte Endosomen. Teis et al. (J Cell Biol 2006) kamen in *p14/MAPBPIP^{-/-}* MEF (mouse embryonic fibroblasts) Zellen zu ähnlichen Ergebnissen: auch in murinen p14-defizienten Fibroblasten ist die Verteilung von späten Endosomen sowie Lysosomen in die Peripherie verschoben. Diese aberrante Verteilung hat Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation zellulärer Signal- und Kommunikationswege.

Unsere Ergebnisse untermauern die Annahme, dass sowohl AP-3 als auch p14 wichtige Proteine des lysosomalen Kompartimentes darstellen, da die Abwesenheit der Proteine die Architektur des Kompartimentes empfindlich stört. Im Falle der p14-Defizienz scheint dieses direkte funktionelle Auswirkungen auf die neutrophilen Granulozyten zu haben. Inwiefern jedoch die morphologisch fassbaren Veränderungen im lysosomalen Kompartiment mit der Klinik der Patienten einhergehen, die vorwiegend durch die Neutropenie geprägt ist, bleibt weiterhin ungeklärt. Auch der Zusammenhang zwischen den Auswirkungen der Mutationen auf die Zellfunktion und der kongenitalen Neutropenie ist gegenwärtig noch nicht verstanden.

Gegen eine verminderte Bildung von neutrophilen Granulozyten insgesamt sprechen die normo- bis hyperzellulären Knochenmarkbefunde. Im Gegensatz zur „klassischen“ kongenitalen Neutropenie, dem Kostmann Syndrom (HAX1-Defekt), reifen bei unseren Patienten (sowohl bei p14- als auch bei AP-3-Defizienz) die neutrophilen Granulozyten im Knochenmark vollständig aus. Da diese jedoch nur ungenügend in der Peripherie aufzufinden sind, könnte man von einem gesteigerten Abbau in der Peripherie ausgehen (z.B. durch eine erhöhte Apoptoserate); erste Untersuchungen diesbezüglich waren jedoch negativ. Alternativ könnte für die aberrante Distribution eine gestörte Abgabe aus dem Knochenmark in das periphere Blut ursächlich sein. P14 ist Bestandteil der Signaltransduktionkaskade des G-CSF-Rezeptors. G-CSF beeinflusst sowohl die Bildung als auch die Abgabe der neutrophilen

Granulozyten aus dem Knochenmark (Semerad et al., Immunity 2002). Eine Hypothese zur Neutropenie bei p14-Defizienz könnte daher auf der Insuffizienz der G-CSF-Rezeptor Signaltransduktion beruhen, die Stärke des vermittelten Signals dürfte jedoch für die Differenzierung und Ausreifung der Zellen im Knochenmark noch ausreichend sein.

Genauso wie AP-3-Defizienz führen auch diverse Mutationen im für die neutrophile Elastase kodierenden Gen *ELA2* zu Neutropenie. Benson et al. (Nat Genet 2003) zeigten, dass AP-3 NE bindet und das Enzym an seinen Bestimmungsort, das lysosomale Kompartiment dirigiert. Mutationen in *ELA2* führen oft zur Mislokalisierung von NE. In Übereinstimmung mit Benson detektierten wir in den AP-3-defizienten neutrophilen Granulozyten einen verminderten Gehalt der Granula an NE, während die AP-3-unabhängigen Enzyme MPO und Proteinase 3 quantitativ nicht verändert waren.

Weitere Experimente zur ätiologischen Klärung der Neutropenie sowohl bei AP-3- als auch bei p14-Defizienz sind erforderlich. Vor allem bei den beiden in dieser Arbeit hauptsächlich beschriebenen Neutropenie-Syndromen, die sich durch ausgereifte neutrophile Granulozyten im Knochenmark auszeichnen, sollten detaillierte in vitro Migrationsstudien und Untersuchungen zur gerichteten Chemotaxis erfolgen.

Das Verständnis von übergeordneten pathophysiologischen Zusammenhängen ist notwendig, um betroffenen Patienten eine Differentialtherapie ihrer Erkrankung zu ermöglichen. Da es sich bei Neutropenien häufig um Erkrankungen handelt, die durch singuläre betroffene Gene verursacht werden, öffnet die Identifikation der zu Grunde liegenden Mutationen den Weg zu gentherapeutischen Ansätzen.

Ein komplizierender Faktor bei der Erforschung der humanen Erkrankungen mit Neutropenie ist die eingeschränkte Vergleichbarkeit der humanen Phänotypen mit Tiermodellen. Die Ursache dieser mangelhaften Vergleichbarkeit bleibt spekulativ. Beispielsweise haben sowohl *Ela2* knock-out Mäuse als auch heterozygote *Ela2*-Mutation knock-in Mäuse keine Neutropenie (Belaouaj et al., Nat Med 1998; Grenda et al., Blood 2002). Ebenfalls zeigt die Mausmutante „Ashen“ trotz einer homozygoten Null-Mutation in *Rab27a*, welche beim Menschen ein Griscelli Syndrom bedingt, zwar eine Pigmentstörung, jedoch keine Neutropenie (Wilson et al., Proc Natl Acad Sci USA 2000). Es existieren auch Mausmodelle mit Mutationen, die beim Menschen zum HPS Typ 2 führen, bei Mäusen kommt es trotz *Ap3b1* Null-Mutation der Mausmutante „Pearl“ nicht zu einer Neutropenie, wiederum aber zu einer veränderten Fellfarbe (Feng et al., Hum Molec Genet 1999).

Der Versuch, eine *p14/MAPBPIP* knock-out Maus zu generieren, führte zu einem Absterben der Embryonen vor dem 11. postkonzeptionellen Tag, so dass Teis et al. (J Cell Biol 2006) zunächst ein konditionelles *p14/MAPBPIP* knock-out der Haut fertigten. *P14/MAPBPIP^{Δep}* Mäuse zeigen tiefgreifende Störungen der epidermalen Architektur mit Verminderung der epidermalen Dicke auf maximal vier Zelllagen aufgrund einer Ausreifungsstörung. Die nahezu aufgehobene Barrierefunktion hat ein baldiges postpartales Absterben zur Folge. An einem konditionellen knock-out Mausmodell der Granulozyten wird momentan gearbeitet. Im Unterschied zu knock-out Mausmodellen ist bei allen von uns untersuchten p14-Defizienz Patienten das p14-Protein zwar drastisch vermindert, fehlt jedoch nicht komplett.

Diskussion der RNA Befunde

Bei der p14-Defizienz liegt eine Mutation in der 3'UTR vor. Damit haben wir eine weitere Erkrankung definiert, die durch Mutationen in regulatorischen und nicht in kodierenden Arealen der mRNA verursacht wird. Während bei dem untersuchten *AP3BI* Defekt normale mRNA Mengen vorliegen, sind diese in Abhängigkeit von der 3'UTR Mutation bei p14-Defizienz reduziert. Unsere Experimente deuten auf eine mutationsbedingte Instabilität der p14-mRNA hin, es gelang uns jedoch nicht, den die Instabilität verursachenden Mechanismus zu klären. Die eingehende Betrachtung der Funktionen der 3'RR wurde über lange Zeit vernachlässigt, so dass diese nicht kodierende Region erst seit wenigen Jahren die ihr gebührende Beachtung erfährt (Conne et al., Nat Med 2000). Es ist anzunehmen, dass sich innerhalb der 3'RR eine Fülle von größtenteils noch unbekanntem regulatorischen Motiven befindet, die auf zellulärer Ebene eine Vielzahl von Funktionen ausüben. Vielleicht bedarf es noch der Identifizierung weiterer derartiger Motive, um die Auswirkungen der *p14/MAPBPIP* Punktmutation zu klären. Im Folgenden möchte ich einige Überlegungen zu möglichen Ursachen der verminderten p14-mRNA erwähnen.

Im Nukleus erfolgen co-transkriptionell die Modifikationen, die aus der prä-mRNA die reife mRNA generieren. Diese muss daraufhin ihren Weg durch die Kernmembran in das Zytoplasma finden, was durch Interaktionen mit einer Vielzahl von Export-Proteinen erfolgt. Ein Ansatz zur Erklärung des verminderten p14-mRNA Gehaltes im Zytoplasma wäre ein reduzierter nukleärer Export mit nachfolgend erhöhter intranukleärer Abbaurate der RNA. Erste Versuche, in denen wir nukleäre und zytoplasmatische RNA getrennt aufreinigten um den p14-RNA Gehalt zu vergleichen, zeigten leider keine konsistenten Ergebnisse. Möglich erschienen auch mutationsbedingte Unterschiede im „Poly(A) Tail“, der einen wichtigen

stabilitätsdeterminierenden Faktor darstellt. Grobe Längenunterschiede konnten wir jedoch experimentell ausschließen.

Eine aus dem Zellkern ausgeschleuste mRNA hat in der Regel keine rein zufällige Verteilung im Zytoplasma: die mRNA Lokalisation ist ein bedeutender Mechanismus um eine lokale Proteinexpression zu ermöglichen. „Zip codes“, also eine Art Postleitzahlen, dirigieren die mRNA an ihren Bestimmungsort. Derartige „zip codes“ finden sich vorwiegend in den 3'UTRs und ihre Funktion wird durch mRNA-Bindungsproteine vermittelt. Aber nicht nur der gerichtete Transport ist eine Möglichkeit, mRNA an bestimmten zytoplasmatischen Orten anzureichern. Auch die örtliche Stabilisierung oder Destabilisierung trägt zur polarisierten mRNA Translation der Zelle bei. Könnte die Mutation in der 3'UTR von *p14/MAPBPIP* ein „zip code“ Motiv in Mitleidenschaft ziehen oder die lokale Stabilität der p14 mRNA durch veränderte Bindungsproteine beeinträchtigen? Dabei muss die Mutation eventuell nicht einmal direkt in dem beeinträchtigten Bindungsmotiv liegen – die Bedeutung der Kontextabhängigkeit von RNA Mutationen habe ich weiter oben bereits beispielhaft an dem *FOXP3* Gen dargestellt.

Eine weitere wichtige Gruppe von regulatorischen Faktoren haben ihre primären „Angriffspunkte“ (Bindungsmotive) innerhalb der 3'untranslatierten Region. Hierbei handelt es sich um miRNAs. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass die 3'UTR Mutation von *p14/MAPBPIP* eine neue Bindungsstelle für eine miRNA generieren könnte und es daher möglich wäre, dass bei den Patienten ein verstärkter Abbau der RNA durch miRNA erfolgt.

In-silico Berechnungen auf der Grundlage von Computeralgorithmen weisen auf eine tiefgreifende, mutationsbedingte Änderung der Sekundärstruktur im Vergleich zur Wildtyp p14-mRNA hin. Sekundärstrukturen gelten als ein stabilitätsdefinierendes Element: sowohl bezüglich der konformationsabhängigen „Angreifbarkeit“ der mRNA durch Faktoren der Abbaumaschinerie, als auch bedingt durch sekundärstrukturvermittelte Interaktionen mit Bindungsproteinen (z.B. Proteininteraktionen des „zip codes“). Veränderte Sekundärstrukturen führen auch zu dem noch wenig spezifizierten Phänomen des sogenannten „No-go decays“ (s.o.).



Abbildung 4: A: Wildtyp, B: Patient. Prädiktion der mRNA-Sekundärstruktur von p14 in Abhängigkeit der Punktmutation A → C an Position +23nt nach dem Stopp-Codon. Verwendeter Computeralgorithmus: „Vienna RNA Secondary Structure Package“ (<http://www.tbi.univie.ac.at/RNA/>). Der rote Pfeil zeigt auf die Position der Punktmutation.

Weitere Experimente zur ätiologischen Klärung der mutationsbedingten verminderten p14-mRNA Expression sind erforderlich. Vielversprechend dürfte die weitere Analyse eines miRNA getriggerten Abbauweges sein. Auch genauere Sekundärstrukturanalysen unter Verwendung weiterentwickelter Algorithmen scheinen sinnvoll. Einen wichtigen Stellenwert könnte auch der Analyse von evtl. bestehenden Unterschieden im Spektrum der Bindungsfaktoren an der mutierten vs. der Wildtyp mRNA zukommen. Besonderes Augenmerk wäre neben der Identifikation von destabilisierenden Faktoren beispielsweise auf eine Assoziation mit PB-Komponenten zu richten. Auch eine Klärung des Abbauweges (3'→5'/ 5'→3'/ Endonukleolytische Spaltung) könnte Rückschlüsse auf die vorausgegangenen Mechanismen zulassen.

4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation konnten zwei seltene monogene Krankheitsbilder, die mit einer Neutropenie und einem partiellen Albinismus einhergehen, auf molekularer Ebene untersucht werden. Beide Krankheiten betreffen die Biologie der Lysosomen.

Es handelt sich hierbei erstens um eine homozygote Deletion im *AP3BI* Gen, welche die Quantität des Shuttlemoleküls für Proteintransport, AP-3, in der Zelle nahezu vollständig reduziert und eine neuartige Mutation innerhalb des Formenkreises Hermansky-Pudlak Syndrom Typ 2 darstellt. Durch meine Experimente konnte ich die normale mRNA-Expression und die Verminderung der AP-3 Komplex Proteine im Western Blot und in der Immunfluoreszenz dokumentieren sowie die veränderte CD63 Expression der AP-3-defizienten Zellen belegen.

Zweitens erwies sich eine homozygote Punktmutation in der 3'UTR von *p14/MAPBPIP* als ursächlich für die verminderte p14-mRNA in einem weiteren, neuartigen Syndrom, welches in dieser Arbeit als „p14-Defizienz“ bezeichnet wird. P14 spielt eine Rolle in der MAP-Kinase vermittelten Signaltransduktion und scheint die räumliche Verteilung der späten Endosomen in der Zelle zu beeinflussen.

Da sich die Punktmutation innerhalb einer lange unterschätzten Region befindet, der aber ein enormes regulatorisches Potential zugeschrieben wird, gingen wir neben der Charakterisierung des klinischen und zellulären Phänotyps vor allem auch auf die mögliche Ätiologie der verminderten p14-mRNA Expression ein, die den Mangel an p14 Protein bedingt.

Ich konnte zeigen, dass die p14-RNA in unterschiedlichen Zelltypen der Patienten reduziert ist, so dass davon auszugehen ist, dass die Punktmutation zu einer Verminderung der Menge an mutationstragender RNA führt. Die Möglichkeit von alternativen Splicingprodukten konnte ich im Northern Blot ausschließen. Unsere Hypothese, dass die UTR Mutation eine Instabilität der RNA hervorruft, wurde durch meine Versuche in einem Luciferase-Expressionssystem unterstützt, eine mutationsbedingte Verminderung der Transkriptionsrate ist jedoch ebenfalls möglich. Ich habe versucht, einen möglichen instabilitätsverursachenden Mechanismus näher zu spezifizieren. Meine experimentellen Daten bezüglich einer Längendifferenz der „Poly(A) Tails“ zeigen jedoch keine signifikanten Längenunterschiede. Die Möglichkeit, dass die *p14/MAPBPIP* Mutation die Ausschleusung der mRNA aus dem

Kern vermindert, konnte ich aufgrund inkonsistenter Ergebnisse bisher nicht ausschließen. Immunfluoreszenzversuche halfen dabei, die durch die *p14/MAPBPIP* Mutation hervorgerufene veränderte Architektur des lysosomalen Kompartimentes aufzudecken.

Zusammenfassend tragen diese Ergebnisse dazu bei, die Heterogenität von humanen Neutropeniesyndromen zu verdeutlichen und die zugrunde liegenden Mechanismen zu erhellen. P14 und AP-3 spielen beide für die Biogenese von Lysosomen eine wichtige Rolle – insofern konnten anhand der Analyse von humanen Krankheitsbildern neue Einsichten in die Funktion von Endosomen gewonnen werden. Schließlich eröffnen diese Erkenntnisse auch die Möglichkeit von neuartigen Therapieverfahren in der Zukunft.

5 Literaturverzeichnis

Bakheet T, Williams BR, Khabar KS: ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34:D111-114.

Belaouaj A, McCarthy R, Baumann M, Gao Z, Ley TJ, Abraham SN, Shapiro SD: Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat Med*, 1998, 4:615-618.

Bennett CL, Brunkow ME, Ramsdell F, O'Briant KC, Zhu Q, Juleihan RL, Shigeoka AO, Ochs HD, Chance PF. A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA→AAUGAA) leads to the IPEX syndrome. *Immunogenetics*, 2001, 53:435-439.

Benson KF, Li FQ, Person RE, Albani D, Duan Z, Wechsler J, Meade-White K, Williams K, Acland GM, Niemeyer G, Lothrop CD, Horwitz M: Mutations associated with neutropenia in dogs and humans disrupt intracellular transport of neutrophil elastase. *Nat Genet*, 2003, 35:90-96.

Blott EJ, Griffiths GM: Secretory Lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3:122-131.

Bonifacino JS, Traub LM: Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem*, 2003, 72:395-447.

Boxer LA, Stein S, Buckley D, Bolyarde AA, Dale DC: Strong evidence for autosomal dominant inheritance of severe congenital neutropenia associated with ELA2 mutations. *J Pediatr*, 2006, 148:633-636.

Catling AD, Eblen ST, Collier LS, Krauss A, Weber MJ: MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science*, 1998, 281:1668-1671.

Cazzola M, Skoda RC: Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood*, 2000, 95:3280-3288.

Chen J-M, Fer c C, Cooper DN: A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Hum Genet*, 2006, 120:1-21.

Chen J-M, Fer c C, Cooper DN: A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes II: the importance of mRNA secondary structure in assessing the functionality of 3'UTR variants. *Hum Genet*, 2006, 120:301-333.

Clark RH, Stinchcombe JC, Day A, Blott E, Booth S, Bossi G, Hamblin T, Davies EG, Griffiths GM: Adaptor protein 3-dependent microtubule-mediated movement of lytic granules to the immunological synapse. *Nat Immunol*, 2003, 4:1111-1120.

Coller J, Parker R: Eukaryotic mRNA Decapping, *Annu Rev Biochem*, 2004, 73:861-890.

Conne B, Stutz A, Vassalli JD: The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nat Med*, 2000, 6:637-641.

Cramer P, Bushnell DA, Kornberg RD: Structural Basis of Transcription: RNA Polymerase II at 2.8 Ångstrom Resolution. *Science*, 2001, 292:1863-1876.

Dale DC, Person RE, Bolyard AA, Aprikyan AG, Bos C, Bonilla MA, Boxer LA, Kannourakis G, Zeidler C, Welte K, Benson KF, Horwitz M: Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood*, 2000, 96:2317-2322.

Danckwardt S, Gehring NH, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Pforsich M, Frede U, Hentze MW, Kulozik AE: The prothrombin 3' end formation signal reveals a unique architecture that is sensitive to thrombophilic gain-of-function mutations. *Blood*, 2004, 104:428-435.

Dell'Angelica EC, Shotelersuk V, Aguilar RC, Gahl WA, Bonifacino JS: Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the β 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell*, 1999, 3:11-21.

Elewaut D, Lawton AP, Nagarajan NA, Maverakis E, Khurana A, Höning S, Benedict CA, Sercarz E, Bakke O, Kronenberg M, Prigozy TI: The Adaptor Protein AP-3 is Required for CD1d-Mediated Antigen Presentation of Glycosphingolipids and Development of V α 14_I NKT Cells. *J Exp Med*, 2003, 198:1133-1146.

Faustino NA, Cooper TA: Pre-mRNA splicing and human disease. *Genes Dev*, 2003, 17:419-437.

Feng L, Seymour AB, Jian S, To A, Peden AA, Novak EK, Zhen L, Rusiniak ME, Eicher EM, Robinson MS, Gorin MB, Swank RT: The β 3A subunit gene (Ap3b1) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness. *Hum Molec Genet*, 1999, 8:323-330.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 1998, 391:806-811.

Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ: The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8:113-126.

Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Vetter B, Hentze MW, Kulozik AE: Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet*, 2001, 28:389-392.

Grenda DS, Johnson SE, Mayer JR, McLemore ML, Benson KF, Horwitz M, Link DC: Mice expressing a neutrophil elastase mutation derived from patients with severe congenital neutropenia have normal granulopoiesis. *Blood*, 2002, 100:3221-3228.

Grenda DS, Link DC: Mechanisms of Disordered Granulopoiesis in Congenital Neutropenia. *Curr Top Dev Bio*, 2006, 74:133-176.

Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE: Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nat Genet*, 2004, 36:801-808.

Horwitz M, Benson KF, Person RE, Aprikyan AG, Dale DC: Mutations in ELA2, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nat Genet*, 1999, 23:433-436.

- Huizing M, Sarangaraja R, Strovel E, Zhao Y, Gahl WA, Boissy RE: AP-3 mediates tyrosinase but not TRP-1 trafficking in human melanocytes. *Mol Biol Cell*, 2001, 12:2075-2085.
- Jackson RJ, Standart N: How do microRNAs regulate gene expression? *Sci STKE*, 2007, 367:re1.
- Jansen R-P: mRNA Localization: Message on the Move. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001,2:247-256.
- Klein C, Grudzien M, Appaswamy G, Germeshausen M, Sandrock I, Schäffer AA, Rathinam C, Boztug K, Zeidler C, Schwitzer B, Rezaei N, Bohn G, Melin M, Carlsson G, Fadeel B, Dahl N, Palmblad J, Henter J-I, Grimbacher B, Welte K: Deficiency of HAX1 causes autosomal recessive severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat Genet*, 2007, 39:86-92.
- Kolch W: Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6:827-837.
- Kostmann, R: Infantile genetic agranulocytosis (Agranulocytosis infantilis hereditaria): a new recessive lethal disease in man. *Acta Paediatr*, 1956, 45: Suppl 1-78.
- Kotzot D, Richter K, Gierth-Fiebig K: Oculocutaneous albinism, immunodeficiency, haematological disorders, and minor anomalies: a new autosomal recessive syndrome? *Am J Med Genet*, 1994, 50:224-227.
- Kühn U, Wahle E: Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1678:67-84.
- Li W, Rusiniak ME, Chintala S, Gautam R, Novak EK, Swank RT: Murine Hermansky-Pudlak syndrome genes: regulators of lysosome-related organelles. *Bioessays*, 2004, 26:616-628.
- Maianski NA, Mul FPJ, van Buul JD, Roos D, Kuijpers TW: Granulocyte colony-stimulating factor inhibits the mitochondria-dependent activation of caspase-3 in neutrophils. *Blood*, 2002, 99:672-679.
- Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G: Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol*, 2002, 3:REVIEWS0004.
- Munafó DB, Johnson JL, Ellis BA, Rutschmann S, Beutler B, Catz SD: Rab27a is a key component of the secretory machinery of azurophilic granules in granulocytes. *Biochem J*, 2007, 402:229-239.
- Parker R, Sheth U: P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Mol Cell*, 2007, 25:635-646.
- Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ: Integrating mRNA Processing with Transcription, *Cell*, 2002, 108:501-512.

Rana TM: Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8:23-36.

Rex JH, Bhalla SC, Cohen DM, Hester JP, Vartivarian SE, Anaissie EJ: Protection of human polymorphonuclear leukocyte function from the deleterious effects of isolation, irradiation, and storage by interferon- γ and granulocyte-colony stimulating factor. *Transfusion*, 1995, 35:605-611.

Rosenberg PSS, Alter BP, Bolyard AA, Bonilla MA, Boxer LA, Cham B, Fier C, Freedman M, Kannourakis G, Kinsey S, Schwinger B, Zeidler C, Welte K, Dale DC, for the Severe Chronic Neutropenia International Registry: The incidence of leukaemia and mortality from sepsis in patients with severe congenital neutropenia receiving longterm G-CSF therapy. *Blood*, 2006, 107:4628-4635.

Rous BA, Reaves JB, Ihrke G, Briggs JAG, Gray, SR, Stephens DJ, Bantin G, Luzio JP: Role of Adaptor Complex AP-3 in Targetin Wild-Type and Mutated CD63 to Lysosomes. *Mol Biol Cell*, 2002, 1071-1082.

Sallés FJ, Richards WG, Strickland S: Assaying the Polyadenylation State of mRNAs. *Methods*, 1999, 17:38-45.

Schäffer AA and Klein C: Genetic Heterogeneity in Severe Congenital Neutropenia: How Many Aberrant Pathways Can Kill a Neutrophil? *Curr Opin Allergy and Clin Immunol*, 2007, in press.

Schaeffer HJ, Catling AD, Eblen ST, Collier LS, Krauss A, Weber MJ: MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science*, 1998, 281:1625-1626.

Segal AW: How neutrophils kill microbes. *Ann Rev Immunol*, 2005, 23:197-223.

Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC: G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity*, 2002, 17:413-423.

Shatkin AJ, Manley JL: The ends of the affair: Capping and polyadenylation. *Nat Struct Biol*, 2000, 7:838-842.

Soller M: Pre-messenger RNA processing and its regulation: a genomic perspective. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63:798-819.

Stinchcombe J, Bossi G, Griffiths GM: Linking Albinism and Immunity: The Secrets of Secretory Lysosomes. *Science*, 2004, 305:55-59.

Stoecklin G, Anderson P: In a tight spot: ARE-mRNAs at processing bodies. *Genes Dev*, 2007, 21:627-631.

Teis D, Huber LA: The odd couple: signal transduction and endocytosis. *Cell Mol Life Sci*, 2003, 60:2020-2030.

- Teis D, Wunderlich W, Huber LA: Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev Cell*, 2002, 3:803-814.
- Teis D, Taub N, Kurzbauer R, Hilber D, de Araujo ME, Erlacher M, Offterdinger M, Villunger A, Geley S, Bohn G, Klein C, Hess MW, Huber LA: p14-MP1-MEK1 signaling regulates endosomal traffic and cellular proliferation during tissue homeostasis. *J Cell Biol*, 2006, 175:861-868.
- Theos AC, Tenza D, Martina JA, Hurbain I, Peden AA, Sviderskaya EV, Stewart A, Robinson MS, Bennett DC, Cutler DF, Bonifacino JS, Marks MS, Raposo G: Functions of Adaptor Protein (AP)-3 and AP-1 in Tyrosinase Sorting from Endosomes to Melanosomes. *Mol Biol Cell*, 2005, 16:5356-5372.
- Vasudevan S, Peltz SW, Wilusz CJ: Non-stop decay – a new mRNA surveillance pathway. *BioEssays*, 2002, 24:785-788.
- Welte K, Zeidler C, Dale DC: Severe congenital Neutropenia. *Semin Hematol*, 2006, 43:189-195.
- Wickens M, Bernstein DS, Kimble J, Parker R: A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet*, 2002, 18:150-157.
- Wilson SM, Yip R, Swing DA, O'Sullivan TN, Zhang Y, Novak EK, Swank RT, Russell LB, Copeland NG, Jenkins NA: A mutation in Rab27a causes the vesicle transport defects observed in ashen mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:7933-7938.
- Wilusz CJ, Wormington M, Peltz SW: The Cap-to-Tail Guide to mRNA Turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2:237-246.
- Wunderlich W, Fialka I, Teis D, Alpi A, Pfeifer A, Parton RG, Lottspeich F, Huber LA: A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold MP1 on late endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Biol*, 2001, 152:765-776.

6 Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute Myeloische Leukämie
AP-3	Adaptor Protein - 3
ARE	AU - reiche Elemente
bp	Basenpaare
CHS	Chédiak-Higashi Syndrom
CS	Cleavage Site
CTD	C-Terminal Domain
DCPAS	Downstream Core Polyadenylation Signal
EGF	Epidermal Growth Factor
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflusszytometrie
3'FR	3' flankierende Region
G-CSF	Granulocyte – Colony Stimulating Factor
GS	Griscelli Syndrom
HPS	Hermansky-Pudlak Syndrom
KSR	Kinase Suppressor of Ras
MAPBPIP	Mitogen-Activated Protein-Binding Protein-Interacting Protein
MAP-Kinase	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEF	Mouse Embryonic Fibroblasts
MEK	MAPK/ERK Kinase
miRNA	Micro RNA
MMP9	Matrix Metallopeptidase 9
MP1	MEK Binding Partner 1
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	Messenger RNA
mRNP	Messenger Ribonucleoprotein
NE	Neutrophile Elastase
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen
NMD	Nonsense Mediated Decay
nt	Nukleotide

PB	P-Body, Processing-Body
Pt	Patient
PUF-Protein	Pumilio and Fem3 Binding Protein
RAF	Ras-activated Factor
RISC	RNA Induced Silencing Complex
3'RR	3' regulatorische Region
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
SCN	Schwere Kongenitale Neutropenie
UCPAS	Upstream Core Polyadenylation Signal
UTR	Untranslatierte Region

7 Lebenslauf

Name: Allroth
Vorname: Anna Lena
Geboren: am 28.07.1981 in Hannover
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Schulische Bildung: 1987 – 2000, Abschluss Abitur
Berufliche Bildung: 2000 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Medizinischen Hochschule Hannover
2002 Physikum an der Medizinischen Hochschule Hannover
2003 1. Staatsexamen an der Medizinischen Hochschule
Hannover
2006 2. Staatsexamen an der Medizinischen Hochschule
Hannover
2006 – 2007 Praktisches Jahr
2007 3. Staatsexamen und Erhalt der Approbation als Ärztin
Stipendium: Studienstiftung des Deutschen Volkes

Hannover, den

.....
Anna Allroth

8 Danksagung

Ich danke Christoph Klein für die Möglichkeiten, die er mir eröffnete, indem er mich diese Arbeit in seinem Labor durchführen ließ. Meine tiefste Bewunderung gilt seiner beharrlichen Zuversicht, seinem unermesslichen Ideenreichtum und seinem Mut, Wege abseits von eingetretenen Pfaden zu gehen.

Dr. rer. nat. Chozhavendan Rathinam danke ich für ungezählte wertvolle Tipps und seine ständige Bereitschaft, sein enormes Wissen weiterzugeben. Unvergessen bleiben auch die vielen unterhaltsamen Stunden, die das alltägliche Laborleben bereicherten und über so manches misslungene Experiment hinweghalfen.

Inga Sandrock war eine hervorragende MTA und wird nach Abschluss ihres Studiums der Molekularen Medizin mit Sicherheit als erfolgreiche Wissenschaftlerin von sich hören lassen.

Insbesondere meinen „Mädels“ möchte ich dafür danken, dass sie mir meine zeitweilige arbeitsbedingte Vernachlässigung unserer Freundschaft nie dauerhaft nachgetragen haben. Ich schätze die Offenheit im Umgang miteinander und das nicht abreißende Interesse am Leben der anderen.

Meinem Dank an meine Eltern möchte ich Ausdruck verleihen, indem ich ihnen diese Arbeit widme.

9 Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 5 und 6 der PromO

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Molekulare Untersuchungen zur Pathophysiologie der kongenitalen Neutropenie bei AP-3- und p14-Defizienz

in der Abteilung für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. C. Klein ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Jung J*, Bohn G*, Allroth A*, Boztug K, Brandes G, Sandrock I, Schäffer AA, Rathinam C, Köllner I, Beger C, Schilke R, Welte K, Grimbacher B, Klein C: Identification of a homozygous deletion in the AP3B1 gene causing Hermansky-Pudlak syndrome, type 2. **Blood**, July 2006; Vol 108:362-369. * *contributed equally to the work*

Bohn G, Allroth A, Brandes G, Thiel J, Glocker E, Schäffer AA, Rathinam C, Taub N, Teis D, Zeidler C, Dewey RA, Geffers R, Buer J, Huber LA, Welte K, Grimbacher B, Klein C: A novel human primary immunodeficiency syndrome caused by deficiency of the endosomal adaptor protein p14. **Nature Medicine**, January 2007; Vol 13:38-45.

Hannover, den

.....

Anna Allroth

10 Anhang Originalpublikationen

Identification of a homozygous deletion in the *AP3B1* gene causing Hermansky-Pudlak syndrome, type 2

Johannes Jung, Georg Bohn, Anna Allroth, Kaan Boztug, Gudrun Brandes, Inga Sandrock, Alejandro A. Schäffer, Chozhavendan Rathinam, Inga Köllner, Carmela Beger, Reinhard Schilke, Karl Welte, Bodo Grimbacher, and Christoph Klein

We report on the molecular etiology of an unusual clinical phenotype associating congenital neutropenia, thrombocytopenia, developmental delay, and hypopigmentation. Using genetic linkage analysis and targeted gene sequencing, we defined a homozygous genomic deletion in *AP3B1*, the gene encoding the β chain of the adaptor protein-3 (AP-3) complex. The mutation leads to in-frame skipping of exon 15 and thus perturbs proper assembly of the heterotetrameric AP-3 com-

plex. Consequently, trafficking of transmembrane lysosomal proteins is aberrant, as shown for CD63. In basal keratinocytes, the incorporated immature melanosomes were rapidly degraded in large phagolysosomes. Despite distinct ultra-morphologic changes suggestive of aberrant vesicular maturation, no functional aberrations were detected in neutrophil granulocytes. However, a comprehensive immunologic assessment revealed that natural killer (NK) and NKT-cell numbers

were reduced in AP-3-deficient patients. Our findings extend the clinical and molecular phenotype of human AP-3 deficiency (also known as Hermansky-Pudlak syndrome, type 2) and provide further insights into the role of the AP-3 complex for the innate immune system. (Blood. 2006;108:362-369)

© 2006 by The American Society of Hematology

Introduction

Congenital neutropenia represents a heterogeneous group of disorders whose molecular etiology and pathophysiology remains enigmatic in most cases. Over the past few years, heterozygous mutations in the gene encoding neutrophil elastase have been associated with cyclic¹ and congenital² neutropenia, yet insights into the pathophysiology remain scarce. Aberrant vesicular trafficking of endosomes has been proposed as one potential mechanism accounting for decreased neutrophil numbers.³

Intracellular protein sorting and trafficking are controlled by means of coat proteins.⁴ The adaptor protein-3 (AP-3) complex facilitates trafficking of vesicles from the *trans* Golgi network and/or endosomal compartments.^{5,6} The AP-3 complex is a heterotetramer consisting of 2 big subunits, β 3A (140 kDa) and δ 3 (160 kDa), a medium subunit μ 3A (47 kDa), and a small σ 3A subunit. Three of the 4 subunits are also expressed as neuronal isoforms (β 3B, μ 3B, σ 3B). AP-3 belongs to the family of cytosolic adaptor complexes and is involved in intracellular protein sorting and vesiculation. Details of the function of AP-3 in mammalian cells are poorly understood. A study indicates that AP-3 is associated with budding profiles evolving from a tubular endosomal compartment.⁷

Various animal models confirm the significance of AP-3 in endosomal trafficking. Mutations in the fruit fly genes coding for the subunits of AP-3 result in defective pigmentation of the eyes.⁸ The autosomal recessive mouse mutation *pearl* shows abnormal platelet dense granules, hypopigmentation, and abnormal lysosomal secretion and is associated with mutations in the β 3A subunit gene (*Ap3b1*) of the AP-3 adaptor complex.⁹ Similar findings are seen in an engineered *Ap3b1* knockout mouse strain.¹⁰ Interestingly, in contrast to mice whose neutrophil counts appear to be normal, dogs with mutations in *AP3B1* have cyclic neutropenia.³ These animal models indicate that AP-3 deficiency results in increased surface expression of lysosomal proteins.

In humans, mutations in *AP3B1* cause a complex phenotype known as Hermansky-Pudlak syndrome¹¹ (HPS; Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>] OMIM catalog no. 203300) type 2 (HPS2), which was first demonstrated by Dell'Angelica et al.¹² To date, 4 human patients with HPS2 have been described in the literature.¹²⁻¹⁵

In general, patients with Hermansky-Pudlak syndrome have hemorrhagic diathesis as a result of prolonged bleeding time and

From the Division of Rheumatology and Clinical Immunology, Medical Center, Freiburg University Hospital, Germany; the Department of Pediatric Hematology/Oncology, Hannover Medical School, Germany; the Department of Cell Biology, Hannover Medical School, Germany; the Computational Biology Branch, National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Bethesda, MD; the Institute of Cell and Molecular Pathology, Hannover Medical School, Germany; and the Department of Conservative Dentistry and Periodontology, Hannover Medical School, Germany.

Submitted November 4, 2005; accepted February 22, 2006. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, March 14, 2006; DOI 10.1182/blood-2005-11-4377.

Supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grants KFO110 and GR1617/3), the Deutsche Jose-Carreras Stiftung, the Bundesministerium für Bildung und Forschung, and the Intramural Research Program at the National

Institutes of Health, National Library of Medicine.

J.J., G.B., A.A., B.G., and C.K. contributed equally to this study.

The online version of this article contains a data supplement.

Reprints: Christoph Klein, Department of Pediatric Hematology/Oncology, Medical School Hannover, Carl-Neuberg-Straße, 30625 Hannover, Germany; e-mail: klein.christoph@mh-hannover.de; and Bodo Grimbacher, Division of Rheumatology and Clinical Immunology, Medical Center, Freiburg University Hospital, Hugstetterstr 55, 79106 Freiburg, Germany; e-mail: grimbacher@medizin.ukl.uni-freiburg.de.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2006 by The American Society of Hematology

tyrosinase-positive oculocutaneous albinism. Congenital neutropenia appears to be a distinguishing feature of HPS2. Some patients develop lung fibrosis and inflammatory colitis over time, others show defects in CD8⁺ T-cell-mediated cytotoxicity.¹⁵ In all cases reported so far, HPS appears to be inherited as a monogenic, autosomal recessive disease. However, it is a genetically heterogeneous disorder caused by mutations in 8 known genes.^{12,16-21} For HPS type 1, which is by far the most common form of HPS in humans, there is also allelic heterogeneity leading to a variety of clinical manifestations.¹⁶ Like *AP3B1*, most of the HPS causative genes were identified with the aid of mouse models. Because at least 16 mouse mutants have been shown to mimic the phenotype of HPS,²² it is likely that some of their human orthologs will be found mutated in human patients with HPS in the future.

In this paper, we report on genetic investigations of a consanguineous pedigree first reported by Kotzot et al²³ in 1994. In this family, 2 cousins show a phenotype associating coarse facial features, hypopigmentation, mild mental retardation, splenomegaly, neutropenia, and thrombocytopenia.

In view of this unusual clinical presentation, we took a positionally unbiased approach and performed a genetic linkage study across the genome. We identified a homozygous genomic deletion in *AP3B1* and functionally characterized AP-3-deficient fibroblasts and neutrophils.

Patients, materials, and methods

Patients

Blood samples and skin biopsies were taken after informed consent. The study was approved by the Internal Review Boards at Hannover Medical School and the University of Freiburg.

Marker selection and genotyping

For the initial genome scan, 261 polymorphic markers (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) were genotyped on genomic DNA extracted from whole blood of 11 individuals according to the published conditions. Two additional polymorphic markers on chromosome 5 were later genotyped to better define the upper boundary of the linkage interval and to prove that the *AP3B1* gene is inside the linkage interval.

Polymerase chain reaction (PCR) products were analyzed on an ABI 377 sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) with the COLLECTION and ANALYSIS software packages (PE Applied Biosystems). Allele sizes were determined by using the program GENOTYPER (PE Applied Biosystems).

Genetic linkage analysis

Genetic linkage analysis computations were done with FASTLINK^{24,25} for 1 and 2 markers, and Superlink^{26,27} for more markers. A fully penetrant autosomal recessive inheritance model was used. The disease allele frequency was set to 0.001, and marker allele frequencies were set all equal because of the small number of individuals genotyped.

Mutation detection

The candidate gene *AP3B1* on chromosome 5q was analyzed by direct sequencing of genomic DNA. Results were confirmed by cDNA sequencing. The cDNA of the affected individual no. 30 was amplified with 8 primer sets. For cDNA amplification of exons 11 to 16, the forward primer (5'-AAAGAAAGGGGATGTTTGAACCT) and the reverse primer (5'-TTCGGAACAATAAGCTGCCTAATA) were used at an annealing temperature of 53°C. Sequencing was performed with the forward primer at an annealing temperature of 54°C.

Long-Range PCR was performed with the Takara LA PCR Kit (Takara Bio, Otsu, Japan) by using the forward primer (5'-AAAGCCCGCAAATGGACATC) and the reverse primer (5'-TTCACGGCAAACCAGCTACTCATC) at an annealing temperature of 68°C. Sequencing of the Long-Range PCR product of the patient was performed with the reverse primer (5'-GCAGGAAAGGCAGACAGAGAGGG) at an annealing temperature of 60°C.

DNA sequences were analyzed by using an ABI Prism 377 DNA Sequencer and the DNA Sequencing Analysis software version 3.4 (PE Applied Biosystems) and Sequencer version 3.4.1 software (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI).

FACS, Western blotting, and immunofluorescence

Immune assessment, including immunophenotyping of peripheral blood mononuclear cells, and T-cell proliferation studies followed standard procedures. Peripheral blood mononuclear cells were isolated by Ficoll Paque (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) density gradient from 2 AP-3-deficient patients, their healthy siblings, and unrelated healthy donors. For immunophenotyping and natural killer (NK) T-cell analysis, the following antibodies were used: anti-CD3-APC (clone UCHT1), anti-CD4-PerCP (clone SK3), anti-CD25-PE (clone M-A251), anti-CD56-PE (clone B159), anti-6B11-PE (all from BD Biosciences, Heidelberg, Germany); anti-CD8-PE (clone B9.11), anti-CD16-FITC (clone 3G8), anti-CD19-FITC (clone J4.119), anti-V α 24-FITC (clone C15), anti-V β 11-PE (clone C21; all from Beckman Coulter, Krefeld, Germany), and the respective isotype-matched controls. NKT cells were detected as V α 24⁺V β 11⁺CD3⁺ cells or as 6B11⁺CD3⁺ cells.

To detect CD63 at the plasma membrane, fibroblasts of the AP-3-deficient patient no. 30 and of 2 unrelated donors were incubated stained with FITC-conjugated anti-CD63 (clone H5C6) and a corresponding isotype control antibody (BD Biosciences).

Flow cytometry was performed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences). Subsequent data analysis was performed using WinMDI 2.8 software (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA).

For Western blotting and immunofluorescence studies, the following antibodies were used: anti- β 3A ("Marlene," 1:100; kind gift from Margaret Robinson, Cambridge, United Kingdom), polyclonal anti- δ 3A (1:1000; kindly provided by Andrew Peden, Genentech, San Francisco, CA), and anti- σ 3A (1:250; BD Biosciences). AP-3- δ and - β were detected on a 7% gel; AP-3- σ was detected on a 10% gel.

The following antibodies were used to detect neutrophil proteins: anti-MPO (1:1000; Abcam, Hiddenhausen, Germany), anti-PR3 (1:300; Santa Cruz, Heidelberg, Germany), anti-HNE (1:300; Merck Biosciences Calbiochem; Schwalbach/TS, Germany), anti-MMP9 (1:300; Acris, Hiddenhausen, Germany), and anti-GAPDH (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

Cell extracts were separated in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), blotted, and analyzed with Kodak Image-Station 440CF (Kodak, Rochester, NY). For immunofluorescence, fibroblasts were fixed with 4% paraformaldehyde (Fluka, Buchs, Switzerland) in phosphate-buffered saline (PBS) and permeabilized with 0.1% Triton-X100 (Sigma, St Louis, MO). The staining pattern was documented with an Axiovert 200 (Zeiss, Oberkochen, Germany) using a 63 \times /1.4 numeric aperture Plan Apochromat objective, and was computer analyzed using Axiovision 4.2.

Electron microscopy

Skin biopsies from patient no. 30 and from 2 unrelated healthy donors were fixed with 2.5% glutaraldehyde (Polysciences, Warrington, PA) in 0.1 M sodium cacodylate, pH 7.3 (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn, Germany), and postfixed with 2% osmium tetroxide (Polysciences, Eppelheim, Germany) in the same buffer. After dehydration the specimens were embedded in Epon resin. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate.

For electron microscopic studies of granulocytes, 1 \times 10⁶ neutrophils were incubated with 3 \times 10⁷ TB *Pseudomonas* bacteria (kind gift from B. Tümmeler, Department of Pediatric Pulmonology, Hannover Medical School,

Germany) and incubated for 0, 7.5, and 20 minutes at 37°C in RPMI 1640 (PAA Laboratories, Pasching, Austria) containing 10% human AB serum (PAA Laboratories) and 10 mM HEPES buffer pH 7.4 (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Germany), pelleted by centrifugation, and fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate, pH 7.3. In addition, primary granulocytes were analyzed directly after hypotonic erythrocyte lysis. Electron microscopy was performed using a Philips electron microscope 301 (Philips Electronic Instruments, Eindhoven, The Netherlands) at an acceleration voltage of 80 kV and an objective with a focal length of 1.6 mm and an aperture of 50 μm . Images on electron microscope film 4489 (Eastman Kodak, Rochester, NY) were scanned using Agfa Duoscan and the image acquisition software Agfa Fotolook PS 3.03 (Agfa-Gevaert, Mortsels, Germany). The images were then processed using Adobe Photoshop 5.0 (Adobe Systems, San Jose, CA).

Neutrophil studies

For neutrophil studies, freshly purified granulocytes from patient no. 30 and from 2 healthy individuals were used. In some experiments, granulocytes were differentiated in vitro from purified CD34⁺ cells in the presence of recombinant human G-CSF and GM-CSF (AMGEN, Thousand Oaks, CA), following a previously published protocol.²⁸ Primary granulocytes were purified by gradient centrifugation over Ficoll Paque and consecutive hypotonic erythrocyte lysis, yielding a purity of greater than 95%.

For chemotaxis experiments, neutrophils were first starved in RPMI 1640 supplemented with 1% BSA (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) at pH 7.0 for 4 hours. Chemotaxis was assessed in duplicates in fibronectin-coated 0.3- μm pore size transwell migration plates (Corning/Sigma-Aldrich, Munich, Germany) as previously described.²⁹ The number of migrated cells with respect to input cells was analyzed by flow cytometry after the addition of 50 000 uniform-dyed microspheres (Bangs Laboratories, Fishers, IN) to assure volume-independent acquisition. The inwells were flushed and controlled for the absence of residual adherent cells.

Phagocytosis was evaluated using FITC-labeled K12 *Escherichia coli* bacteria (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe, Germany). Neutrophils (5×10^5) were exposed to inactivated K12 *E coli* at a ratio of 1:50 in 100 μL RPMI 1640 supplemented with 10% FCS and 10 mM HEPES buffer pH 7.4 and cultured at a temperature of 37°C. Uptake of bacteria was analyzed by flow cytometry after quenching extracellularly attached bacteria with 0.4% trypan blue solution (Gibco/Invitrogen) at 4°C.

E coli lysis was assessed according to a previously described protocol.³⁰ In this assay, lysis of a mutant strain of *E coli* (*E coli* ML-35; kindly provided by Reinhard Seger, Children's Hospital Zürich, Switzerland) can be measured based on β -galactosidase activity. The *E coli* mutant has no lactose permease but expresses β -galactosidase. On perforation of the bacterial envelope, β -galactosidase cleaves the artificial substrate ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside.

Results

Clinical phenotype

We investigated the molecular etiology of congenital neutropenia in 2 patients (aged 15 and 21 years), offspring of a consanguineous Turkish family (Figure 1A). Their complex phenotype, associating congenital neutropenia, thrombocytopenia, mild developmental delay, coarse facial features, splenomegaly, and hypopigmentation have been reported previously.²³ Despite remarkably low neutrophil counts (ranging from 0 to $0.5 \times 10^9/\text{L}$ [0 to 500/ μL]), both patients had a relatively benign clinical course and did not have life-threatening infections. The most prominent finding was severe dental decay and aggressive periodontitis (Figure 1B). Microbiologic analysis revealed the presence of *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythensis*, and *Treponema denticola*, a microbial spectrum usually associated with severe periodontitis. Patient no. 29 had recurrent skin abscesses; patient no. 30 has had 2 episodes of pneumonia to date. Temporary administration of G-CSF enhanced the peripheral neutrophil counts to normal levels, an effect that was not sustained because of poor compliance.

There was no evidence of prolonged bleeding. Patient no. 30 tolerated circumcision without hemorrhagic complications. Both patients showed splenomegaly and thrombocytopenia ranging from 50 000 to 150 000 platelets/ μL . The ultrastructure of peripheral blood thrombocytes revealed immature dense granules (not shown). A bone marrow aspirate and biopsy on patient no. 30 revealed

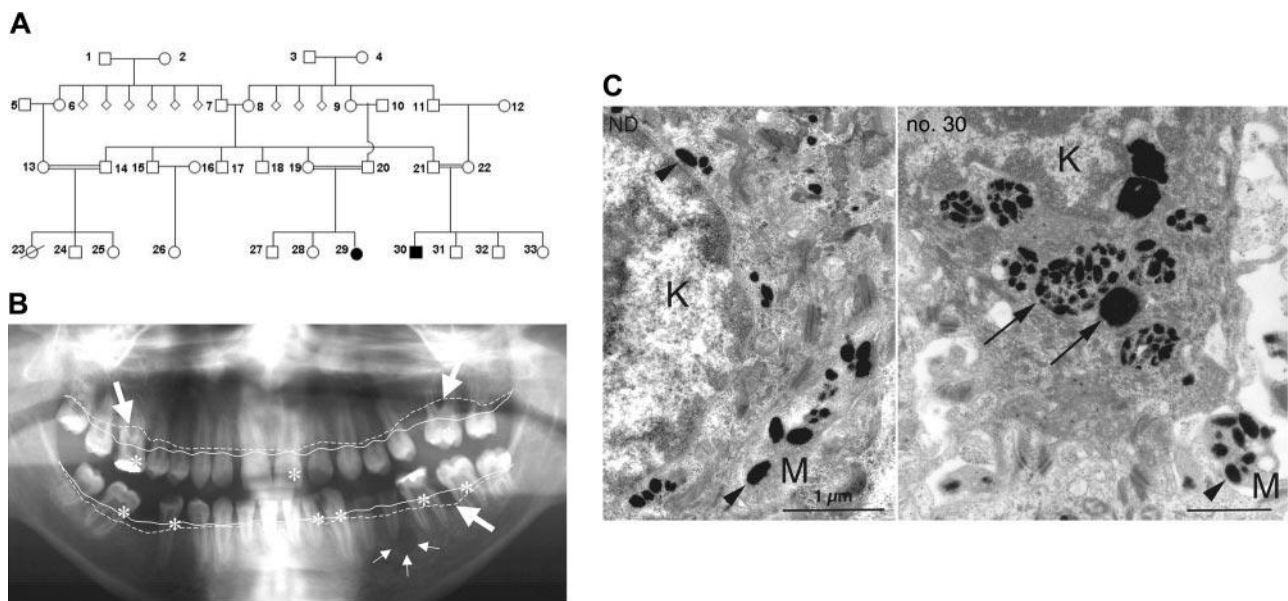


Figure 1. Pedigree and clinical manifestation. (A) Pedigree showing 2 affected individuals (no. 29 and no. 30). (B) Panoramic radiograph revealing aggressive periodontitis as clinical manifestation of congenital neutropenia in patient no. 30. Coronal carious decay is marked by asterisks; periradicular radiolucency around the apex of the second lower left premolar is indicated by small arrows. Bold arrows indicate generalized horizontal alveolar bone loss with vertical drop. Note the difference between expected alveolar bone level (continuous line) and actual alveolar bone margin (dotted line). (C) Transmission electron microscopy of the basal keratinocyte (K) and a melanocyte process (M) from a healthy individual (left) and from patient no. 30 (right). In a healthy individual, mature melanosomes (arrowheads) are translocated from melanocytes to keratinocytes. In AP-3 deficiency, keratinocytes contain large phagosomes of densely packed immature melanosomes (arrows).

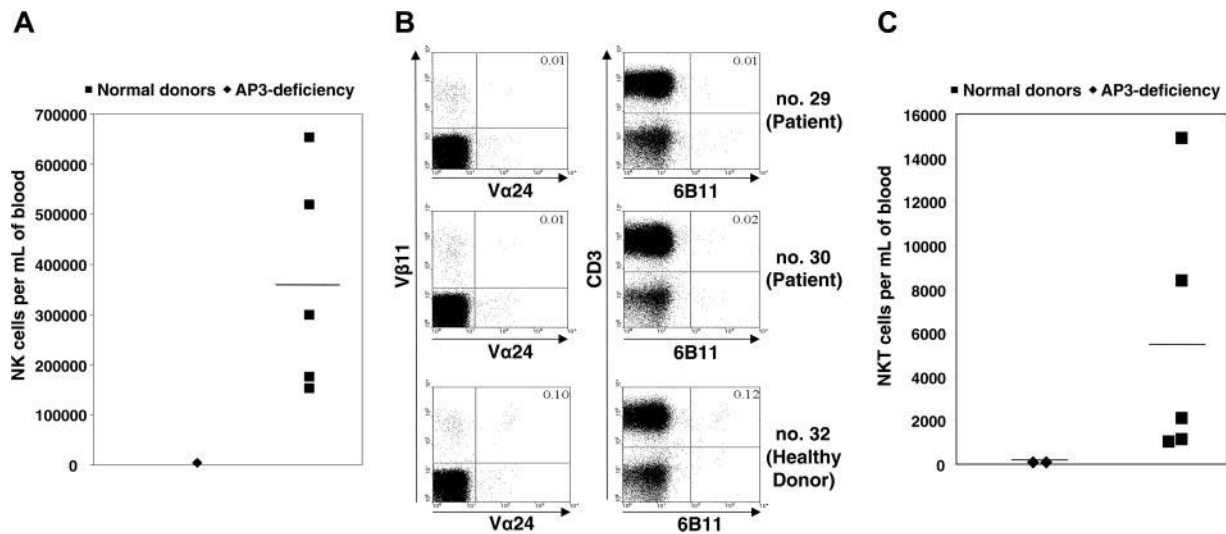


Figure 2. Immunophenotypic analysis. (A) Absolute numbers of peripheral blood CD3⁻CD56⁺ NK cells in patient no. 30, as compared with healthy family donors. (B) For fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of NKT cells, 100 000 events were recorded for each sample. NKT cells were detected as Vα24⁺Vβ11⁺CD3⁺ or 6b11⁺CD3⁺ cells. A marked reduction in the numbers of NKT cells was found in AP-3-deficient patients (no. 29 and no. 30) as compared with a homozygous healthy family donor (no. 32). (C) Absolute numbers of NKT cells in peripheral blood of AP-3-deficient patients as compared with healthy family donors (2-sided Student *t* test for unequal variances using logarithmic values, *P* < .002). (A, C) Horizontal bars indicate median values.

normal cellularity and complete maturation of all lineages without dysplastic changes (not shown).

Both patients showed decreased visual acuity, photophobia, and nystagmus associated with decreased pigmentation of the eye fundus (not shown). Because of aberrant melanosome maturation in melanocytes, immature melanosomes were transported to keratinocytes and completely degraded in large phagosomes inside the basal layer of the epidermis (Figure 1C), as was evidenced in transmission electron microscopy (TEM) studies.

Immunologic phenotype

Immunologic investigations revealed normal serum levels of IgG, IgM, and IgA. Both patients mounted specific antibodies in response to tetanus and polio vaccines but failed to generate antibodies against mumps and rubella. Immunophenotyping of peripheral blood cells showed normal numbers of B and T cells (Table S1, available on the *Blood* website; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). However, CD3⁻CD56⁺ NK cells were reduced in numbers (Figure 2A). The decrease in CD56⁺ cells prompted us to also assess the rare subpopulation of NKT cells. We stained lymphocytes from patients no. 29 and no. 30 with monoclonal antibodies against Vβ11 and Vα24 or CD3 and 6B11, respectively, and determined the absolute number of NKT cells in peripheral blood. Interestingly, compared

with healthy family members, the numbers of NKT cells were significantly reduced in patients no. 29 and no. 30 (Figure 2B-C).

Even though some clinical features such as hypopigmentation and congenital neutropenia raised the suspicion of AP-3 deficiency,¹³ other characteristics such as developmental delay, splenomegaly, and thrombocytopenia could not be easily reconciled with this diagnosis.²³

Genomewide linkage analysis

In light of the atypical clinical presentation of this family, we carried out a genomewide screen to localize the genetic cause. The only place in the genome where multiple adjacent markers had LOD scores greater than 1 was on chromosome 5q (see Table 1). The positively scoring markers from D5S1501 (at 78.5 Mb [megabase] from 5ptel) through D5S1505 (119.1 Mb from 5ptel) indicated a huge interval in which the affected individuals are homozygous and the markers segregate perfectly with the disease. However, *AP3B1* is located at approximately 77.3 Mb, which is between the unlinked marker D5S2500 and the first linked marker D5S1501 (Figure 3A). Therefore, we genotyped 2 additional markers, D5S424 (76.2 Mb) (Figure 3A) and D5S2041 (76.7 Mb) to show that *AP3B1* is positioned inside the interval of perfect segregation. The peak multipoint LOD score using the 6 positively scoring markers in Table 1 is 3.30.

Table 1. Markers in the linkage region on chromosome 5 and single-marker LOD scores under a fully penetrant recessive model

Marker	Genetic, cM	Sequence, Mb	Recombination fraction					
			0.00	0.01	0.03	0.05	0.10	0.15
D5S2500	69.2	58.7	∞	-2.83	-1.94	-1.53	-0.97	-0.66
D5S424*	82.0	76.2	2.41	2.35	2.24	2.13	1.85	1.57
D5S2041*	82.0	76.7	1.20	1.17	1.11	1.05	0.90	0.75
D5S1501	85.2	78.5	2.20	2.15	2.04	1.93	1.66	1.39
D5S644	104.8	95.8	2.27	2.23	2.15	2.06	1.83	1.60
D5S2501	117.0	110.0	1.57	1.54	1.47	1.41	1.24	1.07
D5S1505	129.8	119.1	1.32	1.29	1.22	1.16	1.00	0.84
D5S1480	147.5	144.1	∞	-3.66	-2.34	-1.73	-0.94	-0.54

The 6 rightmost column headings are recombination fractions between the putative disease gene and a marker. Genetic locations are from the Marshfield map.⁴¹ *Markers were genotyped to prove that *AP3B1* (at 77.3 Mb) lay inside the linkage interval.

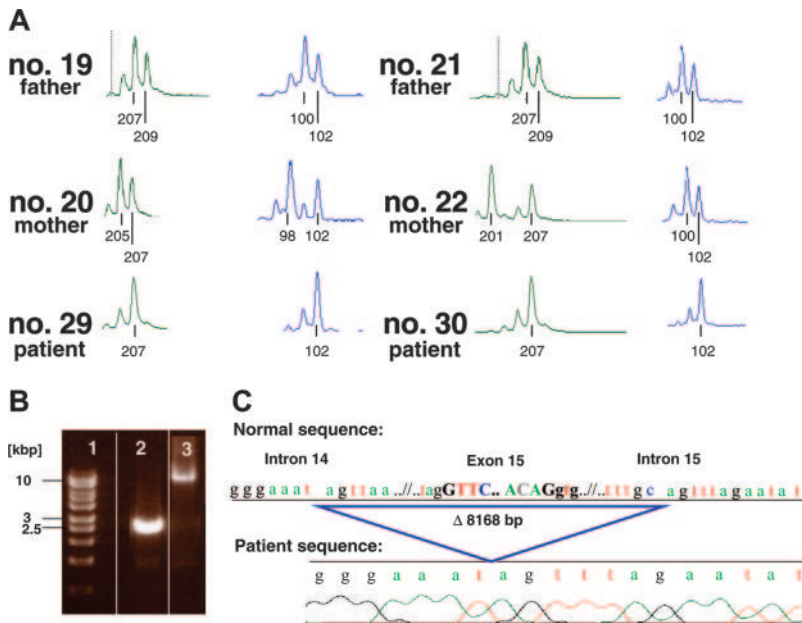


Figure 3. Molecular identification of *AP3B1* mutation. (A) Genotypes of the marker D5S424 (76.2 Mb) and D5S1501 (78.5 Mb) of the affected homozygous individuals (no. 29 and no. 30) and the heterozygous parents of the affected individuals (nos. 19-22). (B) Genomic Long-Range PCR of the affected individual no. 30 (lane 2) and the homozygous healthy cousin as a control (lane 3). The PCR product of lane 2 displays a length of only approximately 3000 bp (base pair) in contrast to the expected length of 11 018 bp (lane 3), suggesting a genomic deletion of approximately 8000 bp. Lane 1, size marker. (C) Sequence analysis of the Long-Range (LR) PCR product of the affected individual no. 30, revealing a deletion of 8168 bp.

Mutation detection and DNA analysis

We first sequenced the *AP3B1* cDNA with pairs of primers for several intervals. The PCR product representing exons 11 to 16 of the patient was shortened by approximately 150 bp when compared with the healthy control of the expected length of 664 bp (not shown). Exon by exon analysis of the patient's cDNA showed a complete deletion of exon 15. Exon skipping is usually caused either by a splice-site mutation or by a genomic deletion. To distinguish between these 2 possibilities, we carried out a genomic Long-Range PCR using DNA of patient no. 30 and DNA of his homozygous healthy cousin as a control. The healthy cousin's amplification product had the expected length of 11 018 bp. In contrast, the amplification product of the affected individual displayed a length of approximately 3000 bp (Figure 3B), suggesting a homozygous genomic deletion of approximately 8000 bp. To determine the exact length and boundaries of the deletion, the PCR product was sequenced. The deleted interval spanned 8168 bp, including a big part of intron 14, the complete exon 15, and a small part of intron 15 (Figure 3C). Loss of exon 15 results in the absence of the amino acids 491 to 550 while preserving the reading frame. Therefore, it is expected that an intact, albeit defective, AP3B1 protein is translated in the patient's cells.

Protein analysis

According to the GenBank annotation of AP3B1 (NP_003655), the functional adaptin domain, which is shared by multiple proteins in different adaptor complexes, spans amino acids 39 to 560, ending in exon 16. Therefore, sequence analysis suggests that skipping exon 15 at positions 491 to 550 is likely to have deleterious consequences.

To assess the biologic significance of an exon 15 deletion in *AP3B1*, we analyzed the expression of AP3B1 on the RNA and protein levels. Using quantitative Lightcycler reverse transcriptase (RT)-PCR analysis, we documented that the levels of *AP3B1* mRNA did not differ between patients and controls (not shown). However, intact assembly of the AP-3 complex was severely disturbed. Protein extracts from fibroblasts obtained from patient no. 30 showed decreased concentrations of the AP-3 β , δ , and σ subunits when compared with fibroblasts from a healthy donor

(Figure 4A). Furthermore, AP3B1-deficient fibroblasts did not react with anti- δ polyclonal antibodies in immunofluorescence studies (Figure 4B), suggesting that the deletion of *AP3B1* exon 15 prevents proper assembly of the AP-3 complex.

It has been previously shown that the AP-3 complex interacts with the tyrosine-based signals of the tetraspanin molecule CD63 and that in the absence of AP3B1 lysosomal missorting leads to increased cell-surface expression of CD63.¹² In line with previous studies, we documented that CD63 expression at the cell surface was enhanced (Figure 4C), thus strengthening the concept that a deletion of exon 15 of *AP3B1* functionally compromises the AP-3 complex. Taken together, these data suggest that exon 15

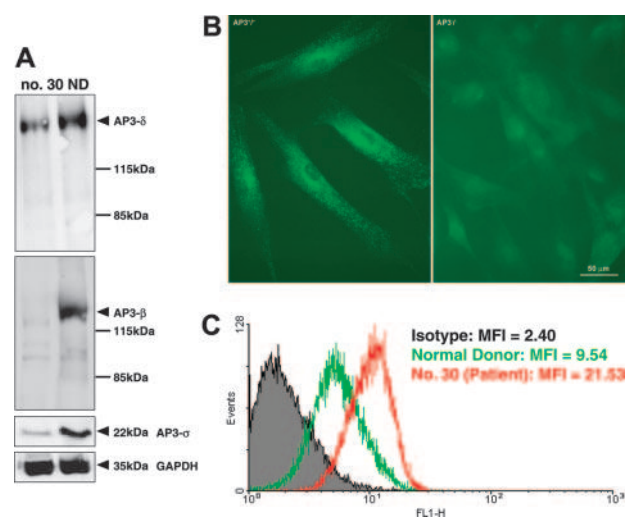


Figure 4. Deficient assembly and function of AP-3 complex. (A) Western blot analysis of fibroblast protein extracts showing decreased concentrations of AP-3 β , δ , and σ subunits. (B) Immunofluorescence analysis demonstrating deficiency of the δ subunit of the AP-3 complex in fibroblasts from patient no. 30 (right) compared with fibroblasts from a healthy control (left). (C) FACS analysis of fibroblasts stained for cell-surface expression of CD63 (LAMP3) revealed increased expression of CD63 on fibroblasts from patient no. 30 (red line) compared with control (green line). The mean fluorescence intensity (MFI) is indicated for the isotype control (gray), healthy donor, and patient no. 30.

of *AP3B1* is critically involved in the stabilization and function of the AP-3 complex.

Neutrophil function

We reasoned that a defective lysosomal compartment might contribute to neutropenia and potentially neutrophil dysfunction. We performed transmission electron microscopy on purified neutrophils from our patients and healthy donors. Compared with healthy donors, AP-3-deficient neutrophil granulocytes showed uniformly marked alterations in azurophilic and specific granules. In contrast to a distinct compartmentalization of specific and azurophilic granules in normal neutrophils, AP-3-deficient neutrophils showed a disorganized pattern characterized by distorted shapes and a less well-defined density spectrum of their granules (Figure 5A-B). To assess the function of neutrophil granulocytes, we focused our investigations on chemotaxis, phagocytosis, and killing of ingested bacteria. First, we isolated peripheral blood neutrophils from patient no. 30 and from 2 healthy control donors by gradient centrifugation and subjected the cells to a transwell migration assay. After 30 and 60 minutes of incubation time, cells in the lower well were harvested, and the percentage of cells migrating toward an fMLP gradient was determined by FACS. Although somewhat delayed, AP-3-deficient neutrophils migrated as efficiently toward the chemotactic stimulus as neutrophils obtained from the 2 healthy donors (Figure 5F).

Next, we evaluated the capacity to ingest bacteria. Neutrophil granulocytes from patient no. 30 and from 2 healthy control individuals were incubated with FITC-labeled Fc-conjugated *E coli* bacteria. Phagocytosis was measured after 20, 40, and 60 minutes

by FACS. As shown in Figure 5G, the patient's neutrophils showed similar phagocytic activity compared with the control cells, suggesting that the Fc-mediated phagocytosis is not perturbed in the absence of the AP-3 complex. To determine the killing activity of AP-3-deficient neutrophils, we used a fluorometric assay, allowing us to visualize β -galactosidase activity on fusion of the phagolysosome. However, AP-3-deficient neutrophils were as effective as control neutrophils in lysing *E coli* bacteria (Figure 5H). Similar results were seen when the phagolysosomes on ingestion of pathogenic *Pseudomonas* bacteria were compared between normal and AP-3-deficient neutrophils by means of electron microscopy (Figure 5C-D). Thus, despite marked alterations in the lysosomal organelles, no defective neutrophil function could be documented.

In neutropenic dogs, mutations in the *AP3B1* gene cause perturbed intracellular trafficking and reduced abundance of neutrophil elastase.³ To assess the global expression pattern of neutrophil granule contents, we performed a series of Western blots, comparing cell extracts from 1 patient (no. 30) and from 2 healthy controls, respectively. As shown in Figure 5E, the patient's cells showed comparable levels of myeloperoxidase and proteinase-3 levels, while abundance of neutrophil elastase and matrix metalloproteinase 9 (gelatinase) was reduced.

Discussion

We here describe 2 novel patients with HPS2 and determine, for the first time, a homozygous genomic exon deletion as the molecular

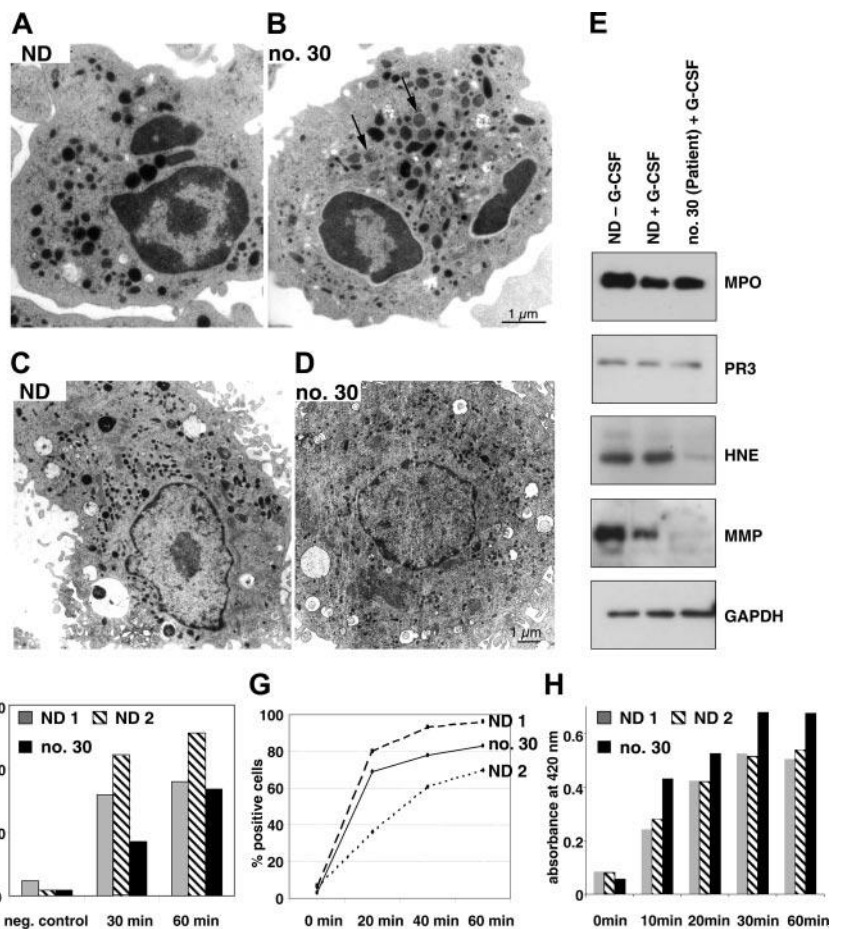


Figure 5. Ultrastructural and functional analysis of neutrophil granulocytes. (A-B) Transmission electron microscopy (TEM) of representative native neutrophil granulocytes from a healthy individual (ND; A) and patient no. 30 (B). The neutrophils of the patient (B) contained higher amounts of granules, demonstrating high degrees of variability in size, shape, and electron density. Immature granules are indicated by arrows. (C-D) TEM of in vitro-differentiated neutrophil granulocytes on exposure to *Pseudomonas* bacteria. No difference is seen in phagolysosome formation and bacterial degradation in granulocytes from the healthy individual (C) compared with patient (no. 30; D). (E) Western blot analysis of peripheral blood neutrophils obtained from 2 healthy control individuals with and without prior G-CSF treatment and patient no. 30. Complete blots are shown in Figure S1. (F) Chemotaxis assay of peripheral blood neutrophils from 2 healthy control donors (ND 1 and ND 2) and patient no. 30. Cells either migrated toward medium without chemoattractant (negative control) or toward medium supplemented with 10^{-7} M fMLP. (G) Uptake of FITC-labeled K12 *E coli* by in vitro-differentiated neutrophils from 2 healthy control donors and patient no. 30. (H) Killing of lactose permease-deficient *E coli* in peripheral blood neutrophils from 2 control donors (ND 1 and ND 2) and patient no. 30.

cause for this rare disorder. All previously reported human patients as well as the affected dogs have nonsense mutations. Furthermore, in contrast to the previously published 4 cases, our patients show novel clinical features such as splenomegaly, thrombocytopenia, and developmental delay, suggesting that the clinical spectrum of AP-3 deficiency might be more variable than previously described. Another interesting novel feature of our patients is the paucity of NK and NKT cells. Finally, we provide evidence that neutrophil function appears to be intact despite disorganized lysosomal compartments.

The deletion of exon 15 completely abrogates proper assembly and/or stability of the AP-3 complex. It has previously been shown in mice that complete deficiency of $\beta 3A$ results in complete lack of $\mu 3$, the AP-3 subunit to which $\beta 3A$ binds directly,⁵ and in reduced levels of the δ and σ subunits.¹⁰ Similarly, human patients with HPS2 characterized by compound heterozygous mutations resulting in residual AP3B1 expression or in complete $\beta 3A$ deficiency showed decreased levels of $\sigma 3$ and $\delta 3$,¹³ suggesting that normal $\beta 3A$ chain is critically important to stabilize the heterotetrameric AP-3 complex. Peden et al⁷ have recently undertaken a study to delineate functional domains controlling protein configurations in the AP-3 complex by using a complementation assay in $\beta 3A$ -deficient cells obtained from the *pearl* mouse. Whereas the adaptin domain is important for assembly into heterotetrameric complexes, the C-terminal hinge and ear domains mediate the function of AP-3.⁷

Therefore, the μ chain could not be detected by Western blotting, whereas the σ and δ subunits appeared reduced. Thus, our patients provide an "in vivo" model of an adaptin domain deletion rendering the AP-3 β chain incapable of forming the AP-3 complex.

AP-3 is critically involved in the biogenesis of specialized endosomal organelles referred to as lysosome-related organelles.^{31,32} Previous in vitro experiments have shown that in AP-3-deficient melanosomes, tyrosinase accumulates inappropriately in vacuolar and multivesicular endosomes, thus preventing the full maturation of melanosomes.^{33,34} Here, we provide evidence that the incomplete maturation of melanosomes is seen in humans in vivo. Immature melanosomes are degraded in large phagolysosomes of basal keratinocytes, resulting in hypopigmented skin and retina.

Neutrophil granulocytes represent a cellular compartment that contains a specialized lysosomal compartment. On engulfing exogenous particles, phagosomes are destined to fuse with lysosomes to degrade phagocytosed material. So far, the role of AP-3 in the formation of phagolysosomes has not been addressed. Interestingly, AP-3 deficiency leads to neutropenia in humans (congenital neutropenia)¹² and dogs (cyclic neutropenia)³ but not in mice.¹⁰ The reason for this species specificity remains unknown. Furthermore, the exact pathophysiology of neutropenia in AP-3 deficiency is only beginning to be unraveled. Benson³ has presented an elegant hypothesis that offers an interesting interpretation of the puzzling question of why AP-3-deficient individuals might have neutropenia. According to this model, neutrophil elastase is mis-

sorted to the plasma membrane, thereby mediating deleterious effects. Interestingly, analysis of the AP-3-deficient neutrophils revealed decreased abundance of neutrophil elastase and gelatinase, a protein usually found in specific granules, whereas other granule proteins such as proteinase 3 and MPO were unaffected. These findings suggest that distinct granule proteins might be involved in the pathogenesis of neutropenia in AP-3-deficient patients. Further studies are needed to characterize their role in greater detail.

Although we provide ultramorphologic evidence of disordered vesicular transport, we were unable to define unequivocally any functional compromise in the 2 lysosomal compartments in neutrophil granulocytes, using both in vitro-generated neutrophils and primary peripheral blood neutrophils. These observations are consistent with the relatively mild clinical course of our patients. In contrast to other groups of patients with (severe) congenital neutropenia, AP-3-deficient patients have not had life-threatening infections, suggesting that the function of residual neutrophils could partially compensate for innate immunity.

A surprising finding was the persistent paucity of NK and NKT cells in our patients. Studies in the mutant *pearl* mouse have shown that, as a consequence of AP-3 deficiency, the generation of NKT cells is severely affected.^{35,36} This can be explained by perturbed CD1d-mediated antigen presentation,³⁷ an immunologic mechanism evolved to present the universe of lipid antigens to T cells. In humans, however, AP-3 binds to CD1b³⁸ but does not bind to CD1d.³⁶ Thus, it is puzzling to explain deficient CD1d-dependent NKT-cell development. We propose that secondary mechanisms might account for decreased NKT-cell numbers in our patients. To date, the only other molecularly defined human disease in which NKT cells are missing is SAP deficiency,^{39,40} also known as X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP; OMIM catalog no. 308240). Both knockout mice and human patients with XLP have an almost complete absence of detectable NKT cells.^{39,40} Whereas SAP-deficient patients show a propensity to fatal EBV infections, the 4 previously published patients with HPS2 and the 2 novel cases in our study were not particularly prone to viral infections, suggesting that NKT cells may not play a critical role in antiviral immune defense.

In summary, our report extends the clinical and molecular phenotype of HPS2 and provides further insights into the role of the AP-3 complex for the innate immune system.

Acknowledgments

We thank Dr A. Jobke for outstanding support; Dr Martin Zimmermann for statistical advice; E. Mallon, A. Hundt, and G. Preiss for their technical support; and the family for their collaboration.

References

- Horwitz M, Benson KF, Person RE, Aprikyan AG, Dale DC. Mutations in *ELA2*, encoding neutrophil elastase, define a 21-day biological clock in cyclic haematopoiesis. *Nat Genet*. 1999;23:433-436.
- Dale DC, Person RE, Bolyard AA, et al. Mutations in the gene encoding neutrophil elastase in congenital and cyclic neutropenia. *Blood*. 2000;96:2317-2322.
- Benson KF, Li F-Q, Person RE, et al. Mutations associated with neutropenia in dogs and humans disrupt intracellular transport of neutrophil elastase. *Nat Genet*. 2003;35:90-96.
- Bonifacino JS, Lippincott-Schwartz J. Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:409-414.
- Simpson F, Peden AA, Christopoulou L, Robinson MS. Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J Cell Biol*. 1997;137:835-845.
- Dell'Angelica EC, Ooi CE, Bonifacino JS. Beta3A-adaptin, a subunit of the adaptor-like complex AP-3. *J Biol Chem*. 1997;272:15078-15084.
- Peden AA, Rudge RE, Liu WWY, Robinson MS. Assembly and function of AP-3 complexes in cells expressing mutant subunits. *J Cell Biol*. 2002;156:327-336.
- Ooi CE, Moreira JE, Dell'Angelica EC, Poy G, Wassarman DA, Bonifacino JS. Altered expression of a novel adaptin leads to defective pigment granule biogenesis in the *Drosophila* eye color mutant *gamet*. *EMBO J*. 1997;16:4508-4518.

9. Feng L, Seymour AB, Jiang S et al. The beta3A subunit gene (*Ap3b1*) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness. *Hum Molec Genet.* 1999;8:323-330.
10. Yang W, Li C, Ward DM, Kaplan J, Mansour SL. Defective organellar membrane protein trafficking in *Ap3b1*-deficient cells. *J Cell Sci.* 2000;113:4077-4086.
11. Hermansky F, Pudlak P. Albinism associated with hemorrhagic diathesis and unusual pigmented reticular cells in the bone marrow: report of two cases with histochemical studies. *Blood.* 1959;14:162-169.
12. Dell'Angelica EC, Shotelersuk V, Aguilar RC, Gahl WA, Bonifacino JS. Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell.* 1999;3:11-21.
13. Huizing M, Scher CD, Strovel E, et al. Nonsense mutations in *ADTB3A* cause complete deficiency of the beta3A subunit of adaptor complex-3 and severe Hermansky-Pudlak syndrome type 2. *Pediatr Res.* 2002;51:150-158.
14. Shotelersuk V, Dell'Angelica EC, Hartnell L, Bonifacino JS, Gahl WA. A new variant of Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in a gene responsible for vesicle formation. *Am J Med.* 2000;108:423-427.
15. Clark RH, Stinchcombe JC, Day A, et al. Adaptor protein 3-dependent microtubule-mediated movement of lytic granules to the immunological synapse. *Nat Immunol.* 2003;4:1111-1120.
16. Oh J, Bailin T, Fukai K, et al. Positional cloning of a gene for Hermansky-Pudlak syndrome, a disorder of cytoplasmic organelles. *Nat Genet.* 1996;14:300-306.
17. Anikster Y, Huizing M, White J, et al. Mutation of a new gene causes a unique form of Hermansky-Pudlak syndrome in a genetic isolate of central Puerto Rico. *Nat Genet.* 2001;28:376-380.
18. Suzuki T, Li W, Zhang Q, et al. Hermansky-Pudlak syndrome is caused by mutations in *HPS4*, the human homolog of the mouse light-ear gene. *Nat Genet.* 2002;30:321-324.
19. Zhang Q, Zhao B, Li W, et al. Ru2 and Ru encode mouse orthologs of the genes mutated in human Hermansky-Pudlak syndrome types 5 and 6. *Nat Genet.* 2003;33:145-153.
20. Li W, Zhang Q, Oiso N, et al. Hermansky-Pudlak syndrome type 7 (HPS-7) results from mutant dysbindin, a member of the biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 (BLOC-1). *Nat Genet.* 2003;35:84-89.
21. Morgan NV, Pasha S, Johnson CA, et al. A germline mutation in BLOC1S3/reduced pigmentation causes a novel variant of Hermansky-Pudlak syndrome (HPS8). *Am J Hum Genet.* 2006;78:160-166.
22. Li W, Rusiniak ME, Chintala S, Gautam R, Novak EK, Swank RT. Murine Hermansky-Pudlak syndrome genes: regulators of lysosome-related organelles. *Bioessays.* 2004;26:616-628.
23. Kotzot D, Richter K, Gierth-Fiebig K. Oculocutaneous albinism, immunodeficiency, hematological disorders, and minor anomalies: a new autosomal recessive syndrome? *Am J Med Genet.* 1994;50:224-227.
24. Cottingham RW Jr, Idury RM, Schäffer AA. Faster sequential genetic linkage computations. *Am J Hum Genet.* 1993;53:252-263.
25. Schäffer AA, Gupta SK, Shriram K, Cottingham RW Jr. Avoiding recomputation in linkage analysis. *Hum Hered.* 1994;44:225-237.
26. Fishelson M, Geiger D. Exact genetic linkage computations for general pedigrees. *Bioinformatics.* 2002;18:S189-198.
27. Fishelson M, Geiger D. Optimizing exact linkage computations. *J Comp Biol.* 2004;11:263-275.
28. Hino M, Suzuki K, Yamane T, et al. Ex vivo expansion of mature human neutrophils with normal functions from purified peripheral blood CD34⁺ haematopoietic progenitor cells. *Br J Haematol.* 2000;109:314-321.
29. Snapper SB, Meelu P, Nguyen D, et al. WASP deficiency leads to global defects of directed leukocyte migration in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol.* 2005;77:993-998.
30. Hamers MN, Bot AA, Weening RS, Sips HJ, Roos D. Kinetics and mechanism of the bactericidal action of human neutrophils against *Escherichia coli*. *Blood.* 1984;64:635-641.
31. Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS. Lysosome-related organelles. *FASEB J.* 2000;14:1265-1278.
32. Blott EJ, Griffiths GM. Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3:122-131.
33. Huizing M, Sarangarajan R, Strovel E, Zhao Y, Gahl WA, Boissy RE. AP-3 mediates tyrosinase but not TRP-1 trafficking in human melanocytes. *Mol Biol Cell.* 2001;12:2075-2085.
34. Theos AC, Tenza D, Martina JA, et al. Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Mol Biol Cell.* 2005;16:5356-5372.
35. Elewaut D, Lawton AP, Nagarajan NA, et al. The adaptor protein AP-3 is required for CD1d-mediated antigen presentation of glycosphingolipids and development of Valpha14i NKT cells. *J Exp Med.* 2003;198:1133-1146.
36. Cernadas M, Sugita M, van der Wel N, et al. Lysosomal localization of murine CD1d mediated by AP-3 is necessary for NK T cell development. *J Immunol.* 2003;171:4149-4155.
37. Sugita M, Peters PJ, Brenner MB. Pathways for lipid antigen presentation by CD1 molecules: nowhere for intracellular pathogens to hide. *Traffic.* 2000;1:295-300.
38. Sugita M, Cao X, Watts GFM, Rogers RA, Bonifacino JS, Brenner MB. Failure of trafficking and antigen presentation by CD1 in AP-3-deficient cells. *Immunity.* 2002;16:697-706.
39. Pasquier B, Yin L, Fondaneche MC, et al. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med.* 2005;201:695-701.
40. Nichols KE, Hom J, Gong SY, et al. Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat Med.* 2005;11:340-345.
41. Broman KW, Murray JC, Sheffield VC, White RL, Weber JL. Comprehensive human genetic maps: individual and sex-specific variation in recombination. *Am J Hum Genet.* 1998;63:861-869.

A novel human primary immunodeficiency syndrome caused by deficiency of the endosomal adaptor protein p14

Georg Bohn¹, Anna Allroth¹, Gudrun Brandes², Jens Thiel³, Erik Glocker³, Alejandro A Schäffer⁴, Chozhavadan Rathinam¹, Nicole Taub⁵, David Teis⁵, Cornelia Zeidler¹, Ricardo A Dewey¹, Robert Geffers⁶, Jan Buer⁶, Lukas A Huber⁵, Karl Welte¹, Bodo Grimbacher^{3,7,8} & Christoph Klein^{1,8}

Lysosome-related organelles have versatile functions, including protein and lipid degradation, signal transduction and protein secretion. The molecular elucidation of rare congenital diseases affecting endosomal-lysosomal biogenesis has given insights into physiological functions of the innate and adaptive immune system. Here, we describe a previously unknown human primary immunodeficiency disorder and provide evidence that the endosomal adaptor protein p14, previously characterized as confining mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling to late endosomes, is crucial for the function of neutrophils, B cells, cytotoxic T cells and melanocytes. Combining genetic linkage studies and transcriptional profiling analysis, we identified a homozygous point mutation in the 3' untranslated region (UTR) of *p14* (also known as *MAPPBPIP*), resulting in decreased protein expression. In p14-deficient cells, the distribution of late endosomes was severely perturbed, suggesting a previously unknown role for p14 in endosomal biogenesis. These findings have implications for understanding endosomal membrane dynamics, compartmentalization of cell signal cascades, and their role in immunity.

The study of human primary immunodeficiency disorders has advanced our understanding of basic host defense¹. In particular, the molecular analysis of a group of human diseases giving rise to defects in both pigmentation and immune function has provided insights into the biology of secretory lysosomes, specialized organelles containing proteins that can be released upon external stimulation². Chédiak-Higashi syndrome^{3,4}, Griscelli syndrome type 2 (refs. 5,6) and Hermansky-Pudlak syndrome type 2 (refs. 7,8) are caused by defects in proteins controlling lysosomal secretion in immune cells and melanocytes. Individual components governing the fate of lysosomal organelles are emerging, yet a comprehensive understanding of the versatile functions of endosomes and lysosomes remains elusive. Although distinct routes of membrane trafficking have been identified in the biogenesis of lysosomal organelles^{9–13}, their physiological significance remains controversial. Furthermore, an important role for lysosomes in the spatiotemporal control of cell-surface receptor-mediated signal transduction is increasingly being recognized^{14,15}.

Here we describe a previously unknown primary immunodeficiency syndrome comprising congenital neutropenia, partial albinism, short stature and B-cell and cytotoxic T-cell deficiency. We provide evidence

that the disease is caused by deficiency of the late endosomal-lysosomal MEK binding partner 1 (MP1)-interacting protein (also known as p14, HSPC003 and MAPPBPIP), an adaptor molecule orchestrating the subcellular anatomy of MAP kinase signaling^{16–18}. Furthermore, we define a previously unknown role for p14 in the biogenesis of endosomes.

RESULTS

Clinical and pathological phenotype

Four out of 15 offspring of a white Mennonite index family showed a characteristic clinical phenotype associating short stature, hypopigmented skin, coarse facial features and recurrent bronchopulmonary infections by *Streptococcus pneumoniae* (Fig. 1a–c). All participants had constantly low peripheral neutrophil counts (absolute neutrophil count (ANC) < 500/μl), although neutrophil maturation in the bone marrow was intact (Fig. 1d,e). Low-dose granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) therapy reconstituted normal peripheral neutrophil levels (Fig. 1e). T cells were present in normal numbers and responded adequately to mitogens and recall antigens (Supplementary Table 1 online). The total number of CD19⁺ B cells was increased in all subjects

¹Department of Pediatric Hematology/Oncology and ²Department of Cell Biology, Hannover Medical School, Carl Neuberg Strasse 1, D-30625 Hannover, Germany. ³Division of Rheumatology and Clinical Immunology, University Hospital Freiburg, Hugstetterstrasse 55, D-79106 Freiburg, Germany. ⁴National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, 8600 Rockville Pike, Bethesda, Maryland 20894, USA. ⁵Biocenter, Division of Cell Biology, Medical University of Innsbruck, Fritz-Pregl Strasse 3, A-6020 Innsbruck, Austria. ⁶Helmholtz Centre for Infection Research (HCI), Array Facility and Mucosal Immunity, Inhoffenstrasse 7, D-38124 Braunschweig, Germany. ⁷Present address: Department of Immunology and Molecular Pathology, Royal Free Hospital, University College London, Pond Street, London NW3 2QG, UK. ⁸These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to C.K. (klein.christoph@mh-hannover.de).

Received 10 July; accepted 23 November; published online 31 December 2006; doi:10.1038/nm1528

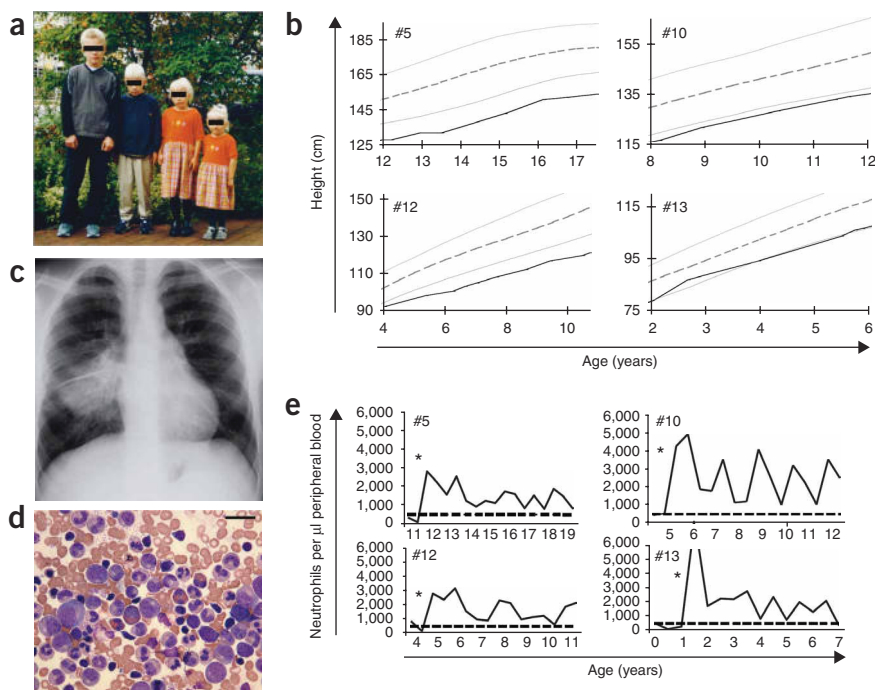


Figure 1 Clinical presentation. (a) Phenotype of subjects, with hypopigmentation of hair and skin. (b) Growth profiles of subjects (black curves). 97th, 50th and 3rd percentiles are shown as gray lines. (c) Chest radiograph of subject #5 suffering from *Streptococcus pneumoniae* infection. (d) Representative bone marrow smear prior to initiation of G-CSF therapy. There is a predominance of myeloid cells and the presence of neutrophils. Scale bar, 5 μm . (e) Peripheral blood neutrophil counts over time. All subjects suffered from severe congenital neutropenia (dotted line, 500 neutrophils/ μl) which was responsive to administration of G-CSF. Asterisk indicates start of G-CSF therapy.

subjects developed low IgG levels in their adolescence (**Supplementary Table 1**).

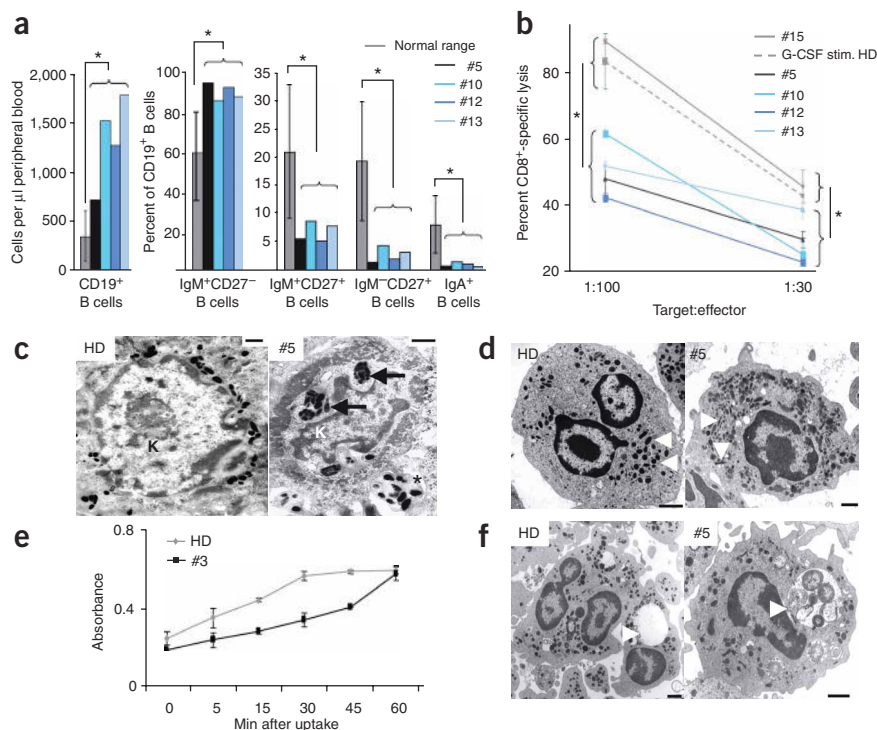
The clinical phenotype associating immunodeficiency and hypopigmentation is reminiscent of genetic diseases caused by defects in secretory lysosomes², such as Chédiak-Higashi syndrome^{3,4}, Hermansky-Pudlak syndrome (HPS) type 2 (refs. 7,8) or Griscelli syndrome type 2 (refs. 5,6). But the combination

of clinical features could not easily be reconciled with any of these disorders. For example, none of these three syndromes has been reported to include short stature as part of the phenotype. In an attempt to better delineate this disorder, we undertook further studies to elucidate the function of cells containing specialized

(Fig. 2a). Although the percentage of naive $\text{IgD}^+\text{IgM}^+\text{CD27}^-$ B cells was increased, the percentages of $\text{IgD}^+\text{IgM}^+\text{CD27}^+$ memory B cells and $\text{IgD}^-\text{IgM}^-\text{CD27}^+$ class-switched memory B cells were reduced in all subjects (Fig. 2a and **Supplementary Table 1**). Furthermore, all subjects showed consistently reduced serum IgM levels, and two

Figure 2 Phenotype of immune cells and melanocytes. (a) Immunophenotype of peripheral blood B cells. Left, absolute numbers of CD19^+ B cells. Right, percentage of naive $\text{IgD}^+\text{IgM}^+\text{CD27}^-$ B cells ($\text{IgM}^+\text{CD27}^-$), $\text{IgD}^+\text{IgM}^+\text{CD27}^+$ memory B cells ($\text{IgM}^+\text{CD27}^+$), $\text{IgD}^-\text{IgM}^-\text{CD27}^+$ class-switched memory B cells ($\text{IgM}^-\text{CD27}^+$) and IgA^+ B cells. * $P < 0.05$.

(b) Cytotoxic T-cell (CTL) function assessed by ^{51}Cr release assay. CTLs from a healthy sibling (#15) and a healthy donor (HD) treated with G-CSF served as controls. * $P < 0.05$. (c) TEM of skin keratinocytes. Left, normal distribution of mature melanosomes in a skin keratinocyte (K) of a healthy donor (HD). Single mature melanosomes are grouped separately around the nucleus. Right, abnormal melanosome distribution in skin keratinocyte (K) of subject #5. There is agglomeration of immature melanosomes in large phagosomes (arrows). Asterisks indicate melanocyte process with normal melanosomes at various maturation stages. Scale bar, 0.5 μm . (d) TEM of neutrophil granulocytes. Left, healthy donor (HD). Right, subject #5. Note the abnormal elongated shape of azurophilic granules in the subject's granulocyte (arrows). Similar changes were seen in all four subjects (see **Supplementary Fig. 1**). Scale bar, 1 μm . (e) Intracellular lysis of *E. coli*. Purified neutrophils were exposed to *E. coli* and lysis of the bacterial membrane was measured by fluorimetric $\beta\text{-Gal}$ assay (absorbance at 420 nm). (f) TEM of neutrophils upon phagocytosis of *P. aeruginosa*. Phagosomes of the subject's neutrophils are filled with undigested debris (arrow, right panel), whereas bacteria in healthy control neutrophils (HD) were almost completely digested (arrow, left panel). Scale bar, 1 μm .



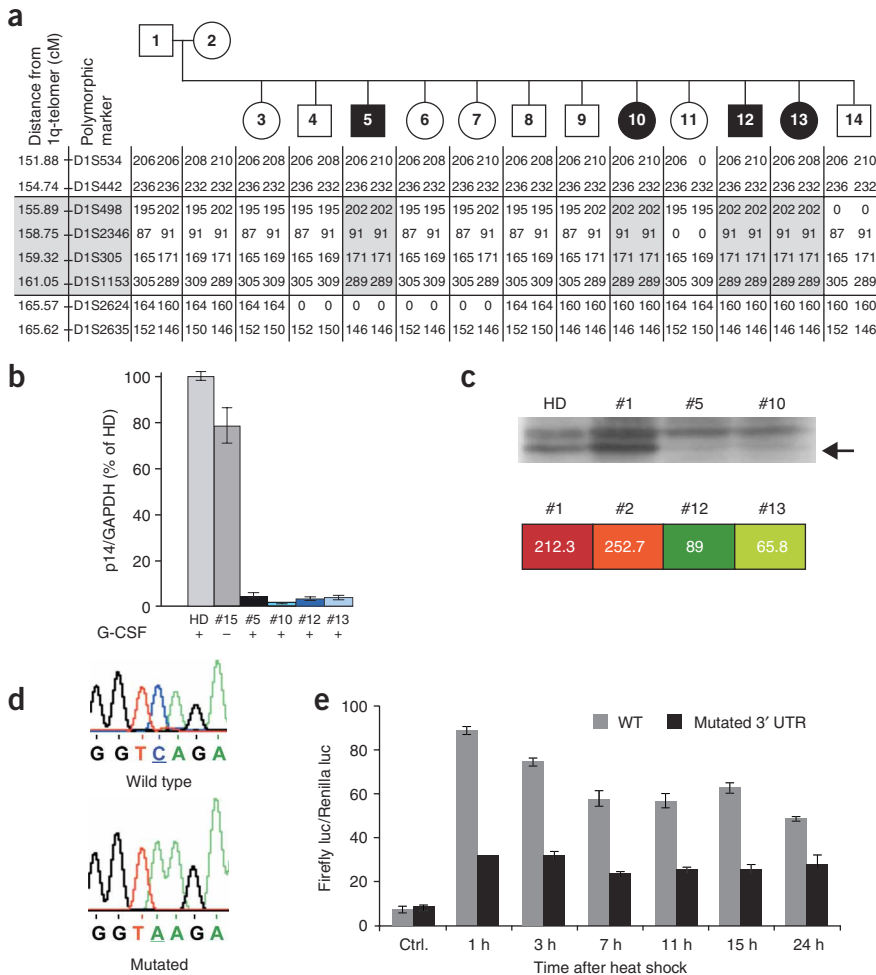


Figure 3 Haplotypes, mutational analysis and determination of RNA instability. **(a)** Allele distribution in subjects (black) and healthy family members (white). The homozygous linkage interval on chromosome 1q21 including the *p14* gene is shown in gray. For details, see **Supplementary Methods**. **(b)** mRNA quantification of *p14* in neutrophils by RT-PCR analysis in healthy control individuals (G-CSF-treated HD and healthy sibling #15). **(c)** Upper panel, western blot analysis of p14 in EBV-transformed B-cell lines from healthy control (HD), unaffected family member #1 and two subjects (#5, 10). Arrow indicates p14-specific band corresponding to 25 kDa protein. Lower panel, expression intensities of transcripts in EBV-transformed B-cell lines derived from parents (#1, 2) compared to subjects (#12, 13). For a complete list of differentially regulated genes, see **Supplementary Table 3** online. **(d)** Sequencing of *p14* 3' UTR showing a single base change (C → A). **(e)** Luciferase assay showing decreased enzymatic activity in the presence of the mutated 3' UTR. Wild-type (WT) and mutated 3' UTR sequences were cloned into heat shock-inducible luciferase reporter constructs as described in **Supplementary Methods**. Upon transient transfection of the reporter constructs, transcription was induced by heat shock for 1 h and luciferase activity was determined at indicated time points ($P < 0.001$ at all time points).

was disrupted (**Fig. 2c**). On a cellular level, these findings provide an explanation for the hypopigmented phenotype.

Neutrophil granulocytes contain lysosome-like organelles called azurophilic granules, which fuse with phagosomes and thus facilitate degradation of phagocytosed particles. We used TEM studies to characterize density

lysosome-related organelles such as cytotoxic T cells (CTLs), melanocytes and neutrophil granulocytes.

CTLs kill target cells by a mechanism requiring a coordinated release of prestored cytotoxic granules upon cellular stimulation and activation of death receptors^{19,20}. To functionally characterize CTLs, we determined their cytotoxic activity against the Fas-insensitive target cell line L1210. Compared to cells of healthy siblings, CD8⁺ CTLs from all participants had decreased cytotoxic activity (**Fig. 2b**), suggesting that assembly and/or release of granules containing cytotoxic proteins might be disturbed. We did not, however, detect any defect in docking, fusion and secretion of secretory lysosomes (**Supplementary Fig. 1** online), indicating that the vectorial movement and focused secretion of cytotoxic protein granules remained intact. Accordingly, the release of granzyme B was unaffected (**Supplementary Fig. 1**). Furthermore, perforin and its unprocessed precursor forms were detectable in CTLs as shown by immunofluorescence and western blotting (**Supplementary Fig. 1**).

Melanocytes are a nonhematopoietic cell type characterized by the presence of secretory granules destined to produce melanin. Using transmission electron microscopy (TEM), we analyzed the pigment pattern in participants' epidermal skin. In contrast to samples from healthy individuals, participants' immature melanosomes were accumulated and immediately degraded upon transfer into basal keratinocytes, suggesting that the coordinated maturation of melanosomes

and shape of granules in neutrophils. In contrast to normal control neutrophils, azurophilic granules in the subjects' neutrophils formed electrodense slender tubules. The overall density of granules appeared normal (**Fig. 2d** and **Supplementary Fig. 2** online). In view of the structural abnormalities in the lysosomal compartment of neutrophils, we next performed a series of functional studies. Phagocytosis of bacteria was unaffected in the subjects' neutrophils, as assessed by uptake of fluorescence-labeled *Escherichia coli* and subsequent FACS analysis (data not shown). To monitor lysis of ingested bacteria in phagosomes, we made use of a particular strain of *E. coli* (ML-35, *lacI⁻z⁺y⁻*)^{8,21}. Upon engulfment of *E. coli* ML-35 by neutrophils, the bacterial wall is perforated in the phagosomes and releases β -galactosidase (β -Gal), whose enzymatic activity can be measured by a photometric assay. *In vitro*-generated neutrophils from a healthy control donor showed effective lysis of ML-35 cells, whereas neutrophils from subject #5 showed markedly delayed lytic activity (**Fig. 2e**). We confirmed these data using TEM studies of mature neutrophils exposed to pathogenic *Pseudomonas aeruginosa* particles. The fusion of lysosomes and phagosomes appeared intact, but the bacteria were eliminated less efficiently in the phagosomes from subjects compared to neutrophils from healthy control individuals (**Fig. 2f**). Finally, we undertook electron microscopy studies to analyze platelet dense granules, a lysosome-related organelle typically defective in HPS. We did not see any abnormality,

however (data not shown). Together, the clinical and pathological phenotype of this novel immunodeficiency syndrome seemed to be associated with an abnormal maturation and function of specialized lysosomes in cytotoxic T cells, melanocytes and neutrophil granulocytes.

Linkage analysis and mutational analysis

To identify the genetic basis of this syndrome, we carried out a genome-wide genetic linkage study. As the family belongs to a religious isolate, we expected that the disease would be associated with a homozygous mutation in a single gene. We performed the genome scan on the parents and 12 siblings, 4 affected and 8 of the 11 unaffected siblings (Fig. 3a). After we had genotyped 188 markers spread among all 22 autosomes, we examined the data for promising regions. No marker among these segregated perfectly, but we found nine markers with a logarithm of odds (LOD) score > 1 in model 1 (assuming no consanguinity) and five markers with a LOD score > 1 in model 2 (assuming consanguinity). Three of these high-scoring markers, all on chromosome 1, were common to the two sets. Marker D1S1679 had scores of +1.49 in model 1 and +1.22 in model 2 partly because the adjacent marker D1S1589 also had positive scores (Supplementary Table 2 online). It should be noted that marker D1S1589 achieves its peak scores at $\theta = 0$ partly because it is not fully informative in this pedigree. Multipoint analysis suggested that the disease gene was likely to lie above D1S1679, not at D1S1589 or between the two markers. Multipoint linkage analysis gave a peak score of +2.80 for model 1 and a peak score of +4.39 for model 2; the curves are absolutely flat within 0.05 of the peak score for any placement of the putative disease gene between D1S498 and D1S1553 (Supplementary Table 2). If one adds in the subsequently obtained information that the three unaffected siblings not used in the genome scan are also not homozygous in the linkage region, then the LOD score for model 1 rises to 3.17. As model 1 assumes no consanguinity, our claim of linkage to chromosome 1 does not rest on this unproven assumption.

We identified four perfectly segregating markers on chromosome 1: D1S498, D1S2346, D1S305 and D1S1153 (Fig. 3a and Supplementary Table 2). Within the maximal possible linkage region, there were 192 genes or predicted genes, including *p14*.

As our initial efforts to find mutations in a series of potential candidate genes (Supplementary Table 2) were not successful, we next performed a genome-wide transcriptional profiling screen in EBV-transformed B-cell lines using high-density Affymetrix microarray analysis. Combining the results of the linkage analysis with the transcriptional profiling approach, only one gene located within the crucial region on chromosome 1q21 was underexpressed by a factor of > 2 in the subjects, namely *p14* (Fig. 3c and Supplementary Table 3 online). This finding was confirmed by RT-PCR analysis using cDNA from multiple tissues such as primary granulocytes (Fig. 3b,c), EBV-transformed B-cell lines and fibroblasts (data not shown). As expected, western blot analysis showed substantially reduced *p14* protein expression levels in B cells from subjects compared to control B cells (Fig. 3c). No mutation in the coding regions of *p14* could be detected. All affected family members (#5, 10, 12 and 13; Fig. 3a), however, had a homozygous mutation in the 3' untranslated region (UTR) in exon 4. At position +23 from the lower exon boundary, the nucleotide adenosine was replaced by cytidine (Fig. 3d). Sequencing results from the parents and phenotypically healthy family members showed a heterozygous mutation at this locus in the parents and family members 7, 9 and 14, whereas in the wild-type sequence was present in the other family members.

Screening of 100 control alleles ruled out that the detected change is a polymorphism. Moreover, we ruled out that this genomic change is characteristic for the Mennonite population by sequencing 34 alleles from healthy Mennonites, which were all identical to the wild-type sequence.

Implications of the 3' UTR point mutation on RNA levels

We reasoned that the point mutation in the 3' UTR might either create an alternative splice site or affect proper polyadenylation of the mRNA. We saw no alternative transcripts in northern blot analysis, however, and the length of the poly-A tail was not altered in the presence of the 3' UTR point mutation (data not shown). To directly assess whether the point mutation in the subjects' 3' UTR leads to decreased RNA stability, we generated luciferase expression constructs driven by heat

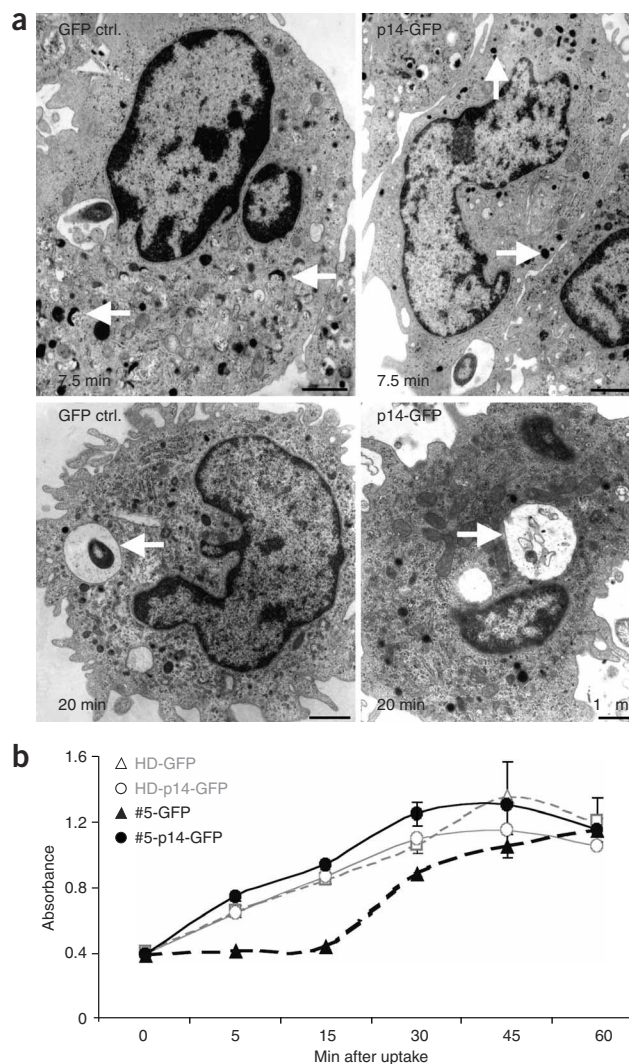


Figure 4 Reconstitution of lysosome-related organelles in neutrophils upon retroviral *p14* gene transfer. (a) TEM of *in vitro*-generated neutrophil granulocytes after ingestion of *P. aeruginosa* (for details, see Supplementary Methods). Azurophilic granules are indicated by arrows in upper panels (7.5 min), phagosomes are indicated by arrows in lower panels (20 min). Left, control transduced cells. Right, *p14*-transduced cells. (b) Intracellular lysis of *E. coli* in *in vitro*-generated retrovirus-transduced neutrophils from subject #5 and a healthy donor (HD). For statistical analysis, see Supplementary Figure 2.

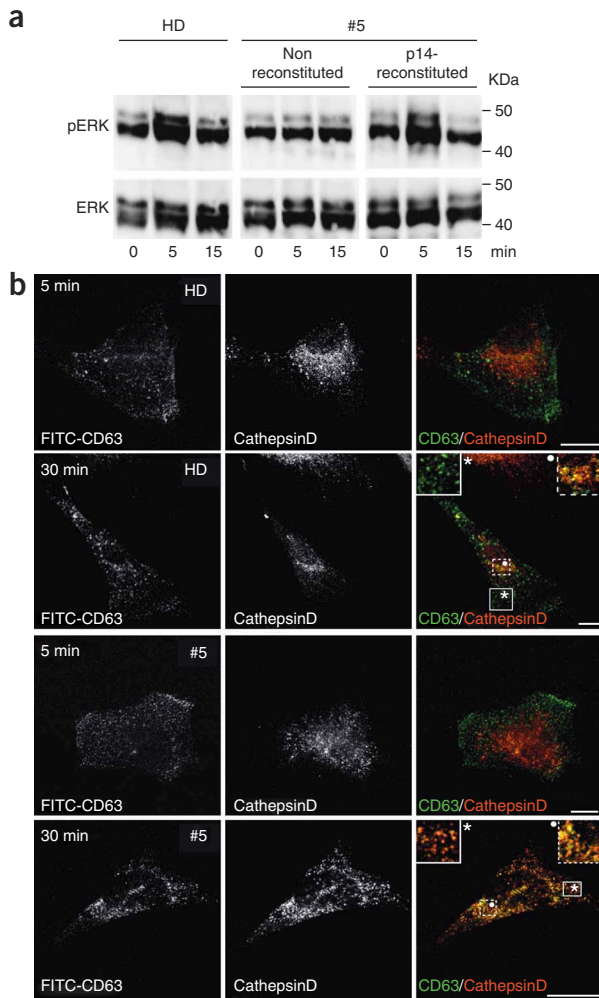


Figure 5 Defective signal transduction and late endosomal distribution in p14-deficient fibroblasts. **(a)** Western blot analysis showing G-CSF-induced ERK phosphorylation in G-CSFR-expressing fibroblasts. Serum-starved cells from a healthy donor (HD) and a subject (#5) were stimulated with recombinant human G-CSF and harvested at the indicated time points for detection of pERK (upper) and ERK (lower). p14 reconstitution status of cells as indicated. **(b)** Immunofluorescence study showing subcellular distribution of late endosomes in control (HD) and p14-deficient (#5) fibroblasts (original magnification, $\times 63$). Cells were continuously chased for the indicated time with FITC-conjugated CD63 (LAMP3)-specific monoclonal antibodies (green fluorescence) and costained with cathepsin D-specific antibodies (red fluorescence) to visualize late endosomes. Left panels show green fluorescence signals, middle panels show red fluorescence signals and right panels show colocalization of red and green signals. Insets show enlarged peripheral and perinuclear area, respectively. Scale bar, 10 μ m.

rant configuration of azurophilic granules and a deficiency in clearing the bacteria in phagosomes. In contrast, p14-reconstituted neutrophils showed a normal granule pattern and an increased lytic capacity of phagosomes (Fig. 4a). More importantly, we also showed reconstitution of defective *E. coli* lysis upon p14 gene transfer in a fluorometric assay (Fig. 4b). Thus, p14 is directly responsible for the neutrophil dysfunction in these subjects.

Functional effects of decreased p14 levels

p14 represents an adaptor molecule previously thought to be involved in the localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes^{16,17}. Scaffold and adaptor molecules diversify the signaling cascades by assembling specific signaling complexes to distinct subcellular locations. For example, the extracellular signal-regulated (ERK) protein cascade is specified by two known scaffold proteins. The kinase suppressor of RAS (KSR1) enhances ERK activation at the plasma membrane, and MEK1 partner (MP1) orchestrates ERK signaling at the endosome as a result of its interaction with p14. Subcellular compartmentalization through adaptor molecules such as p14 may not only control the dynamics of receptor downregulation and degradation but also distinct cellular responses to cell-surface receptor signaling^{14,15}. Intrigued by the phenotype of congenital neutropenia in our subjects, we hypothesized that the granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSFR) signal, most relevant for the generation²³ and release²⁴ of mature neutrophil granulocytes, might be affected in p14-deficient cells. To assess the G-CSFR signal cascade in p14-deficient cells, we made use of fibroblasts transduced with retroviral vectors encoding a G-CSFR-GFP fusion construct²⁵ (for further characterization of cells see **Supplementary Fig. 3** online). We stimulated the cells with recombinant G-CSF, and assessed the downstream MAPK signal cascade by western blot analysis of ERK phosphorylation. ERK phosphorylation was reduced in the absence of p14 and was reconstituted upon retroviral p14 gene transfer (Fig. 5a), suggesting that the intracellular G-CSFR-dependent signal transduction is partly controlled by p14.

In view of the characteristic cellular deficiency in cells with specialized lysosomal compartments, we hypothesized that p14 might have a previously unrecognized role in the biogenesis of lysosomes.

Two distinct pathways of lysosomal biogenesis have been recognized. In the 'direct' pathway, membranes bud from the trans-Golgi network and fuse with endosomes. Alternatively, membrane constituents can be shuttled into endosomes through the plasma membrane following the 'indirect' pathway^{9,10}. The limiting membrane of lysosomes contains lysosome-associated membrane proteins (LAMPs), targeted to lysosomes by virtue of adaptor-protein complexes.

shock-inducible promoters. Firefly luciferase was stabilized either by participant or wild-type 3' UTR, respectively. Upon cotransfection of the firefly and Renilla luciferase into Chinese hamster ovary (CHO) cells and subsequent promoter induction, we lysed the cells and determined the luciferase activity by luminometry. Luciferase activity was consistently reduced in cells transfected with constructs containing the mutated p14 3' UTR, suggesting that the point mutation destabilized the RNA (Fig. 3e). These experiments suggest that decreased p14 protein expression is due to decreased RNA stability, but further studies are necessary to document the molecular pathophysiology in greater detail. p14 deficiency thus represents an additional example of genetic diseases associated with 3' UTR mutations²².

Functional reconstitution upon p14 gene transfer

To provide definitive proof that p14 is the causative gene accounting for the clinical phenotype of these subjects, we attempted to functionally reconstitute the abnormal azurophilic granules in neutrophils by retroviral gene transfer. We purified CD34⁺ hematopoietic progenitor cells from participants and healthy donors and transduced them with retroviral vectors encoding p14 and green fluorescent protein (GFP) in a bicistronic construct, or GFP alone, respectively. Upon *in vitro* differentiation into mature neutrophils, we exposed the cells to *P. aeruginosa* and analyzed them by TEM at various time points. As expected, control-transduced neutrophils showed an aber-

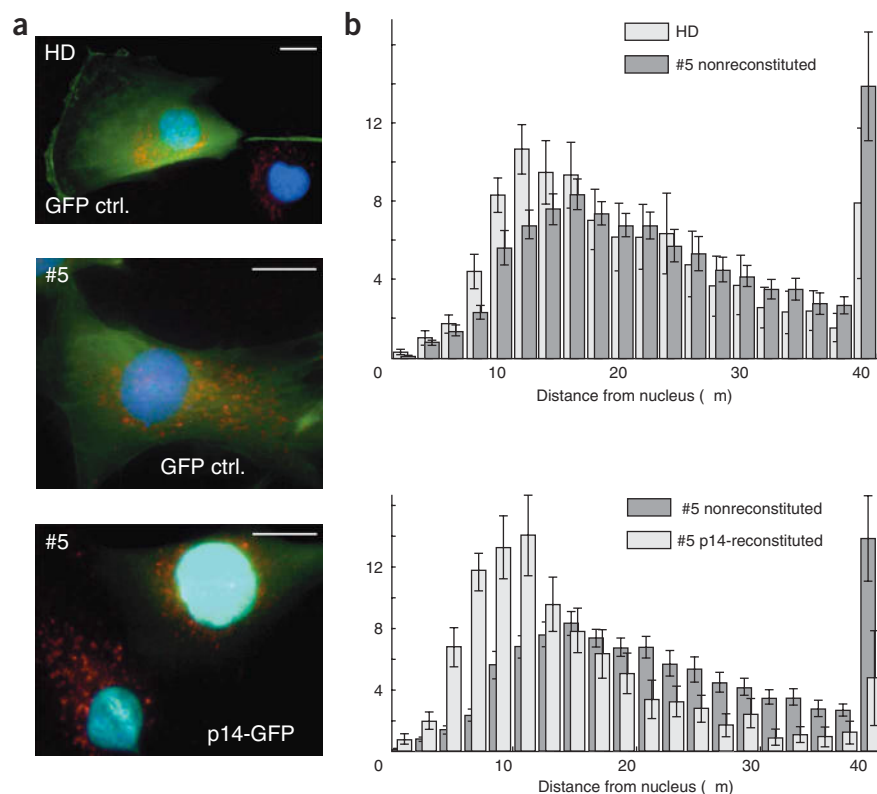


Figure 6 Aberrant subcellular distribution of late endosomes in p14-deficient fibroblasts and reconstitution upon retroviral gene transfer. **(a)** Immunofluorescence analysis showing subcellular distribution of late endosomes. Control fibroblasts (HD) were GFP control transduced (GFP ctrl., upper panel), subject's fibroblasts (#5) were transduced either with GFP (GFP ctrl., middle) or with p14-GFP-encoding retroviral constructs (lower panel). Late endosomes are stained with cathepsin D-specific antibodies (red signal). Scale bar, 10 μm. **(b)** Semiquantitative analysis measuring the frequency distribution of late endosomes (y axis) in defined distances to the nucleus (x axis, $n = 15$ cells). Details are described in **Supplementary Methods**. A chi-square independence test was performed on the original data (sum of all endosomes per bin) for HD versus #5 nonreconstituted (upper), for #5 nonreconstituted versus #5 reconstituted (lower), and for HD versus #5 reconstituted (data not shown). Endosome distance distributions were found to be different at the $P < 0.001$ level for all three cases, normal (GFP ctrl.) versus participant (GFP ctrl.) cells, participant (GFP ctrl.) versus rescue (patient, GFP-p14) and normal (GFP ctrl.) versus rescue (patient, GFP-p14).

To visualize trafficking of LAMPs to late endosomes through the indirect pathway, we chased p14-deficient and control fibroblasts using FITC-conjugated LAMP3 (CD63)-specific antibodies and analyzed them using fluorescence microscopy. We took images 5 and 30 min after exposure to CD63-specific antibodies, respectively, and identified late endosomes by costaining them with cathepsin D-specific antibodies. At 5 min, both control fibroblasts and p14-deficient fibroblasts showed uptake of FITC-conjugated CD63-specific antibodies in the early endosomal compartment, located in the periphery of the cells (Fig. 5b). At 30 min, we observed colocalization of CD63-specific and cathepsin D-specific antibodies both in control and in p14-deficient fibroblasts, suggesting that the late endosomal compartment was reached independently of the abundance of p14. However, although control fibroblasts showed a predominantly perinuclear accumulation of late endosomes (Fig. 5b), p14-deficient cells showed a wide distribution of late endosomes throughout the cytoplasm. A semiquantitative analysis of the nuclear-endosomal distance (Supplementary Fig. 4 online) suggests that the subcellular architecture of the late endosomal compartment is perturbed in the absence of p14. To unequivocally prove that this effect is specifically dependent on p14, we also performed retroviral gene transfer studies and analyzed the distribution of cathepsin D-positive late endosomes in p14- and control-transduced fibroblasts. p14-deficient control-transduced fibroblasts showed a scattered distribution pattern of cathepsin D-positive late endosomes, which could be reverted to the typical perinuclear wildtype pattern upon retroviral p14 gene transfer (Fig. 6; $P < 0.001$, see Supplementary Methods online). These findings indicate that p14 controls the configuration of the late endosomal compartment.

DISCUSSION

We identified a novel complex primary immunodeficiency syndrome caused by a homozygous point mutation in the 3' UTR of p14, leading

to decreased RNA stability, decreased protein levels and aberrant lysosomal function. p14 deficiency resembles known lysosomal diseases associating partial albinism and immunodeficiency, such as Chédiak-Higashi syndrome (LYST deficiency)^{3,4}, Griscelli syndrome type 2 (RAB27A deficiency)^{5,6} or Hermansky-Pudlak syndrome type 2 (HPS2, AP3B1 deficiency)^{7,8}. The clinical phenotype can easily be distinguished, however, as short stature is not typically seen in any of these disorders. A pathognomonic feature of Chédiak-Higashi syndrome is the presence of characteristic inclusion bodies in neutrophils, which were not seen in p14-deficient participants. People with Griscelli syndrome type 2 typically present with hemophagocytic lymphohistiocytosis resulting from characteristic defects in cytotoxic granule exocytosis⁶, which could not be seen in p14-deficient CTLs. In contrast to p14 deficiency, HPS2 is not associated with defects in B and T cells. Thus, clinical and immunological features allow a nosological discrimination of p14 deficiency.

Our study is the first to describe the phenotype of a hypomorphic 'p14 knockdown' and thus provides further insights in the biological function of p14. Mice with a targeted deletion of p14 are not viable²⁶, suggesting that p14 is of crucial importance in early embryonal development. Previously, p14 has been shown to be crucial for epidermal growth factor receptor (EGFR)-mediated signaling and the spatiotemporal control of ERK1/2 phosphorylation¹⁷. Our analysis of reduced G-CSF-mediated ERK1/2 phosphorylation in p14-deficient cells extends this finding and suggests that cytokine receptor signaling in general may depend on p14-dependent proper subcellular localization of endosomes. The abnormal distribution pattern of late endosomes in p14-deficient cells is very similar to findings in mouse p14-deficient embryonic fibroblasts²⁶ and thus documents a role for p14 in the biogenesis of late endosomes.

Despite our conclusive evidence of a p14-specific cellular phenotype, several issues require further studies. For example, we cannot

easily explain why people with a p14 deficiency are neutropenic. G-CSF-mediated signals, including ERK1/2 phosphorylation, are crucial to release mature neutrophils^{24,27}, but at this time there is no definitive proof that deficient G-CSFR signaling accounts for the neutropenia. In contrast to neutrophils from individuals with severe congenital neutropenia^{28–31}, we detected no increased susceptibility to apoptosis (data not shown). Furthermore, the underlying mechanisms of defective B and CTL function remain obscure. In contrast to defective exocytosis in *LYST*^{32,33} and *Rab27A* deficiency^{6,34,35}, we could not show any defect in granule release in p14-deficient CTLs. A possible hypothesis to explain this phenomenon may be that defective lysosomal maturation of secretory lysosomes is responsible for defective CTL function in p14-deficient individuals. We expect that further mechanistic insights into the defective function of hematopoietic cells will be gained by analysis of conditional p14-deficient mice²⁶.

In conclusion, we here describe a novel immunodeficiency disease associated with aberrant lysosomal function. Our studies will have important implications for the understanding of disease-associated 3' UTR-mediated RNA processing, lysosomal membrane dynamics and endosomal signal transduction.

METHODS

Participants. We took blood samples and skin biopsies with informed consent. The study was approved by the Institutional Review Boards at Hannover Medical School and the University of Freiburg.

Genotyping and linkage analysis. We genotyped an initial set of microsatellite markers and an additional set of markers for fine mapping (**Supplementary Table 2**) on DNA extracted from whole blood (Gentra Systems) with the published PCR conditions (UCSC genome browser, <http://genome.ucsc.edu>), run on an ABI377 sequencer and analyzed with Genotyper software (Applied Biosystems). We checked genotype data for incompatibilities using the program PedCheck³⁶. We computed LOD scores with the software package FASTLINK^{37–39} using the pedigree as a nuclear family with no ancestors or inbreeding (Model 1) and alternatively, assuming that the parents are second cousins (Model 2). More information is available in **Supplementary Methods**.

Cells, antibodies and flow cytometry. A complete list and details of FACS analysis are available in **Supplementary Methods**.

Functional neutrophil studies. We purified primary granulocytes by gradient centrifugation over Ficoll Paque (Amersham Biosciences) and consecutive hypotonic erythrocyte lysis, yielding a purity of >95%, as assessed by Giemsa-stained cytospin preparations. In some experiments, we differentiated neutrophils from purified CD34⁺ cells following previously published protocols⁴⁰. We determined lysis of *E. coli* lysis using a lactose permease-deficient mutant strain of *E. coli* according to previously published protocols²¹. For electron microscopic studies, we incubated 10⁶ neutrophils with 3 × 10⁷ *P. aeruginosa* (gift from B. Tümmler, Hannover Medical School, Hannover, Germany), pelleted them and fixed them with 2.5% glutaraldehyde (Polysciences) in 0.1 M sodium cacodylate, pH 7.3 (Merck Schuchardt). Further details are in **Supplementary Methods**.

Cell lines, sequencing, western blotting, RNA and microarray studies. Cell lines, sequencing, western blotting, RNA and microarray studies are described in **Supplementary Methods**.

Immunofluorescence. We grew fibroblasts on glass cover slips (Menzel Gläser), fixed them in 4% paraformaldehyde in 1× cytoskeletal buffer (CB) (2× CB: 20 mM PIPES (pH 6.8), 300 mM NaCl, 10 mM EGTA, 10 mM glucose, 10 mM MgCl₂) permeabilized them with 0.2% Triton X-100, and incubated them with mouse antibody to human cathepsin D (clone M1G8, Schering; 400 ng/ml in gelatine blocking buffer). We washed cells and incubated them with secondary Alexa-568 goat anti-mouse antibody (Molecular Probes/Invitrogen), followed by 100 ng/ml DAPI solution (Molecular Probes/Invitrogen) and mounted them in Mowiol (Carl Roth). Assessment of

endosome-nucleus distances is described in **Supplementary Methods**. For the CD63 chase experiment, we labeled fibroblasts with FITC-conjugated CD63-specific antibody (clone H5C6, BD Pharmingen) in a 1:10 dilution in medium containing 0.1% BSA, and then continuously chased at 37 °C and 5% CO₂. At indicated time points, we washed the cells, fixed them with 4% paraformaldehyde and stained them for cathepsin D as described above. We performed fluorescence microscopy with an LSM 510 Meta Axiovert 200 (Zeiss) and analyzed data using the corresponding software.

Luciferase assay. We modified the pGL3 basic vector (Promega GmbH) to drive luciferase transcription from a human HSP70 promoter. The SV40 poly-A signal was replaced by the p14 3' UTR sequence from participants (containing the point mutation) or healthy controls, respectively. An HSP70-driven renilla luciferase expression vector served as transfection control. We cotransfected plasmids at a ratio of 1:50 into CHO cells using Lipofectamine reagent (Invitrogen). We heated cells at 42 °C for 1 h. We measured firefly and renilla luciferase activity in protein lysates using a commercially available kit system (Promega).

Retroviral gene transfer experiments. We cloned human p14 cDNA into the bicistronic retroviral vector MMP⁴¹ containing either GFP or mCD24 as a marker gene. We generated gibbon ape leukemia virus (GALV) envelope-pseudotyped retroviruses by tripartite transient transfection of MMP-based transfer vectors together with the envelope plasmid K83.pHCMV-GALVenv (gift from C. Baum, Hannover Medical School, Hannover, Germany) and the packaging plasmid pMD.old.gag/pol into the cell line 293T. In some experiments, we generated VSV-G-pseudotyped retroviruses using transient transfection into the packaging cell line 293GPG as previously described⁴². We transduced purified CD34⁺ cells as described in **Supplementary Methods**. A retroviral transfer vector encoding G-CSFR was obtained from I. Touw, Rotterdam, The Netherlands²⁵.

Statistical analysis. We compared participant and reference values using Student *t*-test, and computed nonparametric 95% confidence intervals for the median for these parameters. We performed computations using SAS (Statistical Analysis System Version 9.1, SAS Institute Inc). For details, see **Supplementary Methods**.

Accession codes. GenBank accession code: p14, NM_01417.

Note: Supplementary information is available on the Nature Medicine website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank M. Schlesier (University of Freiburg) for the B-cell phenotyping, I. Sandrock, G. Köhne, F. Noyan, K. Boztug and M. Ballmaier for laboratory support, C. Roifman (Hospital for Sick Children) and R. Gatti (University of California at Los Angeles) for providing control samples on Mennonite families, and E. Ungewickell, C. Baum, J. Bohne, C. Kardinal and H. Holtmann for critical discussions. We thank B. Tümmler (Hannover Medical School), C. Baum (Hannover Medical School) and I. Touw (Erasmus University Medical Center) for reagents, M. Zimmermann for help in statistical evaluations and M. Offerdinger for help in determining subcellular distribution of endosomes. This research was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft grants KFO110 and GR1617/3, BMBF, the Elternverein Krebskranke Kinder Hannover, the Austrian Proteomics Platform (APP, GEN-AU), the Special Research Program "Cell Proliferation and Cell Death in Tumors" (SFB021, Austrian Science Fund) and in part by the intramural research program of the US National Institutes of Health, National Library of Medicine (NLM).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

A.A., G. Brandes and J.T. contributed equally to this work. G. Bohn sequenced candidate genes and performed most molecular and cellular functional studies. A.A. characterized the 3' UTR mutation by assessing RNA metabolism and functional reporter assays. G. Brandes performed electron microscopy and immunofluorescence studies. J.T. performed fine-mapping, screened candidate genes and helped to edit the manuscript. E.G. performed the genome-wide scan. A.A.S. carried out the genetic linkage analysis computations, chose the markers for genetic linkage fine mapping and wrote parts of the manuscript. C.R. performed *E. coli* lysis assays. N.T. and D.T. did immunofluorescence studies on endosomes. C.Z. cared for patients, and collected and curated data in SCN patient registry. R.A.D. assisted Bohn, A.A. and C.R. R.G. and J.B. performed

microarray experiments. L.A.H. gave advice on endosome biology, and educated and supervised N.T. and D.T. K.W. provided laboratory resources, resources for SCN registry and significant help to initiate and carry out the study. B.G. initiated the project together with C.K., educated and supervised J.T. and E.G., assisted A.A.S. in linkage analysis, provided grant and laboratory resources and edited the manuscript. C.K. designed and directed the study, obtained clinical samples, taught and supervised Bohn, A.A., C.R. and R.A.D., provided laboratory and financial resources and wrote the manuscript.

COMPETING INTERESTS STATEMENT

The authors declare that they have no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/naturemedicine>

Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

- Fischer, A. Human primary immunodeficiency diseases: a perspective. *Nat. Immunol.* **5**, 23–30 (2004).
- Stinchcombe, J., Bossi, G. & Griffiths, G.M. Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. *Science* **305**, 55–59 (2004).
- Barbosa, M.D.F.S. *et al.* Identification of the homologous *beige* and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature* **382**, 262–265 (1996).
- Nagle, D.L. *et al.* Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome. *Nat. Genet.* **14**, 307–311 (1996).
- Klein, C. *et al.* Partial albinism with immunodeficiency (Griscelli syndrome). *J. Pediatr.* **125**, 886–895 (1994).
- Ménasché, G. *et al.* Mutations in *RAB27A* cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat. Genet.* **25**, 173–176 (2000).
- Dell'Angelica, E.C., Shotelersuk, V., Aguilar, R.C., Gahl, W.A. & Bonifacio, J.S. Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the β 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol. Cell* **3**, 11–21 (1999).
- Jung, J. *et al.* Identification of a homozygous deletion in the *AP3B1* gene causing Hermansky-Pudlak syndrome, type 2. *Blood* **108**, 362–369 (2006).
- Kornfeld, S. & Mellman, I. The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **5**, 483–525 (1989).
- Janvier, K. & Bonifacio, J.S. Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4231–4242 (2005).
- Bonifacio, J.S. & Glick, B.S. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153–166 (2004).
- Ghosh, P., Dahms, N.M. & Kornfeld, S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 202–212 (2003).
- Gruenberg, J. & Stenmark, H. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 317–323 (2004).
- Mor, A. & Philips, M.R. Compartmentalized Ras/MAPK signalling. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 771–800 (2006).
- Kolch, W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 827–837 (2005).
- Wunderlich, W. *et al.* A novel 14-kilodalton protein interacts with the mitogen-activated protein kinase scaffold mp1 on a late endosomal/lysosomal compartment. *J. Cell Biol.* **152**, 765–776 (2001).
- Teis, D., Wunderlich, W. & Huber, L.A. Localization of the MP1-MAPK scaffold complex to endosomes is mediated by p14 and required for signal transduction. *Dev. Cell* **3**, 803–814 (2002).
- Kurzbaue, R. *et al.* Crystal structure of the p14/MP1 scaffolding complex: how a twin couple attaches mitogen-activated protein kinase signaling to late endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 10984–10989 (2004).
- Russell, J.H. & Ley, T.J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 323–370 (2002).
- Trambas, C.M. & Griffiths, G.M. Delivering the kiss of death. *Nat. Immunol.* **4**, 399–403 (2003).
- Hamers, M.N., Bot, A.A., Weening, R.S., Sips, H.J. & Roos, D. Kinetics and mechanism of the bactericidal action of human neutrophils against *Escherichia coli*. *Blood* **64**, 635–641 (1984).
- Chen, J.-M., Férec, C. & Cooper, D.N. A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes I: general principles and overview. *Hum. Genet.* **120**, 1–21 (2006).
- Souza, L.M. *et al.* Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* **232**, 61–65 (1986).
- Semerad, C.L., Liu, F., Gregory, A.D., Stumpf, K. & Link, D.C. G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* **17**, 413–423 (2002).
- Aarts, L.H.J., Roovers, O., Ward, A.C. & Touw, I.P. Receptor activation and 2 distinct COOH-terminal motifs control G-CSF receptor distribution and internalization kinetics. *Blood* **103**, 571–579 (2004).
- Teis, D. *et al.* p14-MP1-MEK1 signaling regulates endosomal traffic and cellular proliferation during tissue homeostasis. *J. Cell Biol.* (in the press).
- Price, T.H., Chatta, G.S. & Dale, D.C. Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and elderly humans. *Blood* **88**, 335–340 (1996).
- Carlsson, G. *et al.* Kostmann syndrome: severe congenital neutropenia associated with defective expression of Bcl-2, constitutive mitochondrial release of cytochrome c, and excessive apoptosis of myeloid progenitor cells. *Blood* **103**, 3355–3361 (2004).
- Klein, C. *et al.* Deficiency of HAX1 causes severe congenital neutropenia (Kostmann disease). *Nat. Genet.* (in the press).
- Köllner, I. *et al.* Mutations in neutrophil elastase causing congenital neutropenia lead to cytoplasmic protein accumulation and induction of the unfolded protein response. *Blood* **108**, 493–500 (2006).
- Zhuang, D., Qiu, Y., Kogan, S.C. & Dong, F. Increased CCAAT enhancer-binding protein epsilon (C/EBPepsilon) expression and premature apoptosis in myeloid cells expressing Gfi-1 N382S mutant associated with severe congenital neutropenia. *J. Biol. Chem.* **281**, 10745–10751 (2006).
- Huynh, C., Roth, D., Ward, D.M., Kaplan, J. & Andrews, N.W. Defective lysosomal exocytosis and plasma membrane repair in Chediak-Higashi/beige cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 16795–16800 (2004).
- Baetz, K., Isaatz, S. & Griffiths, G.M. Loss of cytotoxic T lymphocyte function in Chediak-Higashi syndrome arises from a secretory defect that prevents lytic granule exocytosis. *J. Immunol.* **154**, 6122–6131 (1995).
- Haddad, E.K., Wu, X., Hammer, J.A., III, & Henkart, P.A. Defective granule exocytosis in Rab27a-deficient lymphocytes from *ashen* mice. *J. Cell Biol.* **152**, 835–842 (2001).
- Stinchcombe, J. *et al.* Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J. Cell Biol.* **152**, 825–834 (2001).
- O'Connell, J.R. & Weeks, D.E. PedCheck: A program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **63**, 259–266 (1998).
- Lathrop, G.M. & Lalouel, J.-M. Easy calculations of LOD scores and genetic risks on small computers. *Am. J. Hum. Genet.* **36**, 460–465 (1984).
- Cottingham, R.W., Idury, R.M., Jr. & Schäffer, A.A. Faster sequential genetic linkage computations. *Am. J. Hum. Genet.* **53**, 252–263 (1993).
- Schäffer, A.A., Gupta, S.K., Shriram, K. & Cottingham, R.W., Jr. Avoiding recomputation in linkage analysis. *Hum. Hered.* **44**, 225–237 (1994).
- Hino, M. *et al.* *Ex vivo* expansion of mature human neutrophils with normal functions from purified peripheral blood CD34⁺ haematopoietic progenitor cells. *Br. J. Haematol.* **109**, 314–321 (2000).
- Klein, C., Bueeler, H. & Mulligan, R.C. Comparative analysis of genetically modified dendritic cells and cytokine transduced tumor cells as therapeutic cancer vaccines. *J. Exp. Med.* **191**, 1699–1708 (2000).
- Ory, D.S., Neugeboren, B.A. & Mulligan, R.C. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 11400–11406 (1996).