

Klinik und Poliklinik
für Kinder- und Jugendmedizin
Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf
Prof. Dr. med. K. Ullrich

**Untersuchungen zur Aufnahme und zum Zell-Zell-Transfer der lysosomalen
Arylsulfatase A**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von
Nicole Muschol
aus Hamburg

Hamburg 2001

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 5. Juni 2001

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent: Prof. Dr. K. Ullrich

Korreferent: Prof. Dr. V. Gieselmann

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Lysosomale Speichererkrankungen	1
1.1.1.	β -Hexosaminidase-Defizienz	2
1.1.1.1.	Morbus Tay-Sachs	3
1.1.1.2.	Morbus Sandhoff	3
1.1.1.3.	G _{M2} -Aktivator-Protein-Defekte	4
1.1.2.	Arylsulfatase A-Defizienz	5
1.1.3.	β -Galaktosidase-Defizienz	5
1.1.3.1.	G _{M1} -Gangliosidose	5
1.1.3.2.	Morbus Morquio B	6
1.1.3.3.	Defizienz des protektiven Proteins	6
1.2.	Therapiemöglichkeiten	7
1.2.1.	Enzymersatztherapie	7
1.2.2.	Substratdeprivation	8
1.2.3.	Knochenmarktransplantation	8
1.2.4.	Gentherapie mittels retroviraler Vektoren	9
1.2.5.	Spezifischer Gentransfer ins ZNS	10
1.3.	Transport löslicher lysosomaler Enzyme	12
2.	Zielsetzung der Arbeit	14
3.	Material und Methoden	15
3.1.	Material	15
3.1.1.	Geräte	15
3.1.2.	Gebrauchsmaterialien	16
3.1.3.	Enzyme	16
3.1.4.	Antikörper	17
3.1.5.	Radioaktive Substanzen	17
3.1.6.	Chemikalien	17
3.1.7.	Zelllinien	18
3.1.8.	Medien und Lösungen für die Zellkultur	18
3.1.9.	Puffer und Standardlösungen	19
3.2.	Methoden	20
3.2.1.	Zellbiologische Methoden	20
3.2.1.1.	Isolation von mononukleären Zellen durch Ficoll-Dichtezentrifugation	20

3.2.1.2.	Elutriationszentrifugation zur Anreicherung von Monozyten	20
3.2.1.3.	Durchflußzytometrie (FACScan)	21
3.2.1.4.	Kultivierung von Makrophagen auf Primaria-Zellkulturschalen	22
3.2.1.5.	Kultivierung von	
	▪ Glia C6-Zellen (Ratte; ATCC CCL-107) und humanen neuronalen SY5Y-Zellen (DSMZ, Braunschweig)	22
	▪ Gemischten Cortexkulturen	22
	▪ Humanen Hautfibroblasten	22
3.2.1.6.	Isolation von Hautfibroblasten aus Wildtyp- und Arylsulfatase A (ASA)-defizienten Mäusen	22
3.2.1.7.	Trypsinieren kultivierter Zellen	23
3.2.1.8.	Herstellung konditionierter Medien kultivierter Zellen	23
3.2.1.9.	Herstellung von Zellhomogenaten	23
3.2.2.	Biochemische Methoden	24
3.2.2.1.	Bestimmung von lysosomalen Enzymaktivitäten	24
3.2.2.1.1.	Messung mit 4-Methyl-Umbelliferyl-Substraten	24
3.2.2.1.2.	Messung der Arylsulfatase A (ASA)-Aktivität	25
3.2.2.2.	Proteinbestimmung nach Lowry	25
3.2.2.3.	Proteinbestimmung nach Bradford	26
3.2.2.4.	Metabolische Markierung von Makrophagen mit [³⁵ S]-Methionin	26
3.2.2.5.	Endozytose mit [¹²⁵ I]-ASA	27
3.2.2.6.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli	27
3.2.2.7.	Methoden der Weiterverarbeitung von SDS-Gelen	29
3.2.2.7.1.	Autoradiographie	29
3.2.2.7.2.	Fluorographie	29
3.2.2.7.3.	Quantifizierung von Gelbanden	29
3.2.2.8.	Elektrotransfer von Proteinen (Western-Blot)	29
3.2.2.9.	TCA-Fällung	30
3.2.2.10.	Ammoniumsulfatfällung	30
3.2.2.11.	Immunpräzipitation	31
3.2.2.12.	Coomassie-Färbung	32
4.	Resultate	33
4.1.	Aufreinigung und Kultivierung von Makrophagen aus humanen Buffy coats	33
4.2.	Charakterisierung der zellulären Verteilung lysosomaler Enzyme	34
4.2.1.	Optimierung der verwendeten Methodik zur Bestimmung von lysosomalen Enzymaktivitäten	34

4.2.2.	Verteilung lysosomaler Enzyme nach Stimulation der Sekretion durch NH_4Cl und Zymosan	37
4.2.3.	Abhängigkeit der basalen und stimulierten Enzymsekretion von der Kultivierungsdauer der Makrophagen	39
4.2.4.	Nachweis von ASA in Medien von humanen Makrophagen durch Western-Blot-Analyse	42
4.2.5.	Nachweis neusynthetisierter ASA in Medien von Makrophagen	42
4.2.6.	Aufnahme von [^{35}S]-ASA in humane Fibroblasten aus Medien NH_4Cl -stimulierter Makrophagen	43
4.2.7.	Mannose-6-Phosphat abhängige Aufnahme von Proteinen in Fibroblasten	44
4.2.8.	Kinetik der Endozytose [^{125}J]-markierter ASA durch Makrophagen	45
4.2.9.	Kinetik der Endozytose [^{125}J]-markierter ASA in Glia C6-Zellen und neuronale SY5Y-Zellen	46
4.2.10.	Nachweis des Abbaus endozytierter [^{125}J]-markierter ASA in Glia C6 und neuronalen SY5Y-Zellen	47
4.2.11.	Nachweis des Abbaus und der intrazellulären Lokalisation von [^{125}J]-ASA in Glia C6-Zellen	48
4.2.12.	Kinetik der Endozytose [^{125}J]-markierter ASA in gemischte Cortexkulturen	49
4.2.13.	Kinetik der Endozytose [^{125}J]-markierter ASA in Wildtyp- und ASA-defiziente Mausfibroblasten	50
4.2.14.	Hemmung der [^{125}J]-ASA-Aufnahme durch Sekrete NH_4Cl -stimulierter Makrophagen	51
4.2.15.	Cokultur ASA-defizienter Mäuse-Astroglia mit humanen Makrophagen	52
4.2.16.	Cokultur ASA-überexprimierender BHK-Zellen mit ASA -/- Astroglia	53
4.2.17.	Phosphorylierung von sezernierten lysosomalen Enzymen aus Makrophagen	53
5.	Diskussion	54
5.1.	Charakterisierung humaner Makrophagen als Quelle sezernierter lysosomaler Enzyme	54
5.2.	Nachweisverfahren für ausgewählte lysosomale Enzyme	56
5.3.	Untersuchungen zur Rezeptor-vermittelten Endozytose von Arylsulfatase A in verschiedene Akzeptorzellen	56
5.4.	Konditionierte Makrophagensekrete als mögliche Quelle lysosomaler Enzyme	58
5.5.	Cokulturexperimente als Modelle für einen möglichen Enzymtransfer	59
5.6.	Perspektiven	60
5.6.1.	Technische Verfahrensweisen für die Gentherapie bei lysosomalen Speichererkrankungen	60

6.	Zusammenfassung	63
7.	Literaturverzeichnis	65
8.	Abkürzungsverzeichnis	73
	Danksagungen	76
	Curriculum vitae	77
	Erklärung	78

1. Einleitung

1.1. Lysosomale Speicherkrankheiten

Lysosomen sind 0,25-0,5 µm große, membranumschlossene Zellorganellen, die mit zahlreichen sauren Hydrolasen angefüllt sind und dem Abbau zelleigener und zellfremder Makromoleküle dienen. Die lysosomalen Enzyme weisen ein saures pH-Optimum auf, das in den Lysosomen durch Protonenpumpen (H^+ -ATPasen) aufrecht erhalten wird. Nach Hydrolyse von in die Lysosomen aufgenommenen Makromolekülen in ihre Grundbausteine, werden diese über spezifische Transporter entlang eines Konzentrationsgradienten in das Zytosol abgegeben.

Die physiologische Bedeutung der Lysosomen, ihrer Membranbausteine, Transporter und Enzyme spiegelt sich in der Vielzahl der Stoffwechselerkrankungen wider, die durch Störungen der Biosynthese, Stabilität oder des Transportes lysosomaler Hydrolasen bzw. des in das Zytosol gerichteten Transportes zustande kommen. Da der Abbau von Makromolekülen sequentiell durch verschiedene lysosomale Hydrolasen katalysiert wird, die für die Konformation (z.B. α - oder β -glykosidisch), die beteiligten Grundbausteine (z.B. Mannose oder Fucose) und die umgebende Sequenz (z.B. ...MK↓VNG; ...RA↓YLL...; ↓Spaltstellen von lysosomalen Proteasen) der zu spaltenden Verbindung spezifisch sind, bleiben bei Ausfall eines Enzyms die nachfolgenden Reaktionen aus, und es kommt zur Speicherung von nicht abgebautem Material. Deshalb werden diese Erkrankungen unter der Bezeichnung lysosomale Speichererkrankungen zusammengefaßt (Gieselmann, 1995).

Die Gruppe der lysosomalen Speichererkrankungen umfaßt mehr als 50 Krankheiten, die zur Zeit nach betroffenem Abbauweg und Art der sich anhäufenden Substanzen in Mucopolysaccharidosen, Glykogenosen, Lipidosen und neuronale Ceroidlipofuscinosen (NCL) unterteilt werden. Außerdem sind zwei weitere lysosomale Speichererkrankungen entdeckt worden, die auf Defekte lysosomaler Proteasen zurückzuführen sind (NCL Typ 2, Sleat et al., 1997; Pycnodysostose, Gelb et al., 1996), sowie eine Speichererkrankung, die auf einem Membrandefekt beruht (Danon disease, Tanaka et al., 2000; Nishino et al. 2000), wohingegen Speichererkrankungen, die den Nucleinsäureabbau betreffen, bisher nicht beschrieben worden sind.

Lysosomale Speichererkrankungen können theoretisch durch eine Vielzahl genetischer Defekte zustande kommen, die a) das m-RNA-Processing, b) die katalytische Aktivität des Enzyms, c) die Aktivatorproteine, d) die Synthese bzw. den frühzeitigen Abbau des Enzyms im ER, e) die fehlende Ausbildung von Mannose-6-Phosphatresten (Phosphotransferasedefizienz: I-cell disease), f) Defekte im Mannose-6-Phosphatrezeptor (bei der Maus letal), g) eine ungenügende Azidifizierung im endosomalen Kompartiment und h) Defekte in Proteinen der vesikulären Transportmaschinerie (z.B. Defekt der β -Untereinheit des Adapterprotein 3 Komplexes; Hermansky-Pudlak-Syndrom (Dell Angelica, 1999)) betreffen. Die Defizienz für die Arylsulfatase A und zwei weitere lysosomale Enzyme, die u.a. in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden und

Erkrankungen aus der Gruppe der Lipidosen verursachen, soll im Folgenden beispielhaft dargestellt werden.

1.1.1. β -Hexosaminidase-Defizienz

Diese Gruppe von Erkrankungen wird autosomal rezessiv vererbt und ist durch eine Speicherung von G_{M2} -Gangliosiden aufgrund fehlender β -Hexosaminidase-Aktivität charakterisiert. β -Hexosaminidase-Dimere treten je nach Zusammensetzung ihrer Untereinheiten in drei Isoenzymformen auf ($\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$), die als β -Hexosaminidase S, A und B bezeichnet werden (Gieselmann, 1995). Das Isoenzym A bedarf der Anwesenheit eines assoziierten G_{M2} -Aktivator-Proteins, das eine Interaktion des Substrates mit dem Enzym erst ermöglicht. Eine Speicherung von G_{M2} -Gangliosiden kann daher durch Mutationen in drei verschiedenen Genen zustande kommen: 1) im Gen der α -Untereinheit (MG des Precursors: 67 kDa, reife Form: 54 kDa; Little et al., 1988), das den klassischen Morbus Tay-Sachs oder die „late-onset“ G_{M2} -Gangliosidose verursacht; 2) im Gen der β -Untereinheit (MG des Precursors: 63 kDa, reife Form: zwei nicht identische Ketten von 28 und 27 kDa), das den „early- oder late-onset“ Morbus Sandhoff verursacht, und 3) am G_{M2} -Aktivator Protein (MG des Precursors: 24 kDa, reife Form: 21-22,5 kDa, Sandhoff et al., 1995).

Die β -Hexosaminidase A ($\alpha\beta$) hat die größte Substratspezifität und kann terminale N-Acetylglucosamin- und N-Acetylgalaktosaminreste aus Glykopeptiden, Glykosaminoglykanen und Glykolipiden freisetzen. Das Isoenzym B ($\beta\beta$) hat eine ähnliche Substratspezifität mit der Ausnahme, daß es keine G_{M2} -Ganglioside hydrolysieren kann. Das Isoenzym S ($\alpha\alpha$), das vorwiegend im Serum gefunden wird, hat eingeschränkte katalytische Aktivitäten und wird schnell abgebaut. Daher kann ein Aktivitätsverlust des Isoenzym A (Morbus Tay-Sachs) aufgrund einer Mutation des Gens der α - oder β -Untereinheit bzw. des G_{M2} -Aktivator-Proteins nicht durch die Isoenzyme B oder S ersetzt werden und es erfolgt eine G_{M2} -Gangliosid-Speicherung in den Lysosomen, die zu einer Schädigung des Nervensystems führt, da Glykolipide einen wichtigen Bestandteil von Plasmamembranen darstellen und dort einem stetigen „turn over“ unterliegen. Somit ist das Isoenzym A absolut essentiell für neuronale Funktionen. Es gibt aber auch Varianten mit einem Aktivitätsverlust der Isoenzyme A und B (Morbus Sandhoff), bei denen neben G_{M2} -Gangliosiden zusätzlich wasserlösliches N-Acetylglucosamin und N-Acetylgalaktosamin gespeichert werden. Da aber die Folgen der G_{M2} -Gangliosid-Speicherung im Gehirn denen der Speicherung wasserlöslichen Materials in anderen Geweben überwiegen, ist der klinische Verlauf ähnlich. Die Speicherung nicht abbaubarer Substrate erfolgt hauptsächlich in Neuronen, die anschwellen und Meganeuriten ausbilden. Durch massive Akkumulation von G_{M2} -Gangliosiden entstehen charakteristische Einschlüsse, die als „membranous cytoplasmic bodies“ bezeichnet werden (Gravel et al., 1995).

Auch synthetische Substrate können durch β -Hexosaminidasen hydrolysiert werden. 4-Methyl-Umbelliferyl-N-Acetyl- β -Glucosaminid (4MUG) ist ein sensitives fluorogenes Substrat, das bei der

Diagnostik der G_{M2} -Gangliosidosen zur Anwendung kommt. Es wird sowohl durch das Isoenzym A als auch B erkannt, wobei die Anwesenheit des G_{M2} -Aktivator-Proteins zu seiner Hydrolyse nicht erforderlich ist. Eine ähnliche Verbindung, das 4-Methyl-Umbelliferyl-N-Acetyl- β -Glucosaminid-6-Sulfat (4MUGS), wird dagegen ausschließlich durch die β -Hexosaminidase A gespalten.

Daß auch Individuen, die zwar eine Hexosaminidase-Defizienz aufweisen, aber klinisch gesund sind, durch die Messungen mit synthetischen Substraten erfaßt werden, stellt insbesondere bei der pränatalen Diagnostik ein schwerwiegendes Problem dar. Solche Pseudodefizienzen sind auf einen Defekt in der α -Untereinheit zurückzuführen, der zwar zu einer mangelnden Hydrolyse von 4MUG und 4MUGS, aber ausreichenden Spaltung von G_{M2} -Gangliosiden führt.

1.1.1.1. Morbus Tay-Sachs

Der klassische Morbus Tay-Sachs (Hexosaminidase A-Defizienz, Chromosom 15) ist durch eine schnelle, progrediente neurologische Degeneration gekennzeichnet und beginnt im Alter von 3-6 Monaten mit einer zunehmenden muskulären Hypotonie und allgemeinen Hyperirritabilität (Gieselmann, 1995). Es zeigt sich eine Stagnation in der Entwicklung bzw. der Verlust erlernter Fähigkeiten. Bei allen Patienten findet sich ein kirschröter Makulafleck. Das Fortschreiten der neurologischen Symptomatik führt zu Krampfanfällen, Blindheit, Verlust aller intellektuellen und kognitiven Fähigkeiten und zum Tod vor Erreichen des 4. Lebensjahres. Die juvenile Form tritt später auf und zeigt eine langsamere Progredienz. Die adulte G_{M2} -Gangliosidose ist die mildeste Form dieser Erkrankung und beginnt in der 2. bis 3. Lebensdekade mit neurologischen und psychiatrischen Symptomen. Bei einer chronischen Variante, die zwischen dem 2. und 5. Lebensjahr auftritt, erreichen die Patienten das Erwachsenenalter.

Der Morbus Tay-Sachs ist besonders bei Ashkenazi-Juden vorzufinden (Inzidenz: 1:3600; Chavany et al., 1998; Carrier-Frequenz: 1:30), wobei 3 Mutationen im Gen der β -Hexosaminidase α -Untereinheiten für 93 % aller mutanten Allele verantwortlich sind: 1) 4bp Insertion in Exon 11; 2) Mutation der Spleißerkennungsstelle in Intron 12; 3) Gly-296 > Ser Substitution in Exon 7.

1.1.1.2. Morbus Sandhoff

Die β -Untereinheit der β -Hexosaminidase ist Teil zweier Isoenzyme, was bei einem Defekt einen Verlust der Aktivität der Isoenzyme A (Chromosom 15) und B (Chromosom 5) zur Folge hat und klinisch der Defizienz der α -Untereinheit ähnelt. Es handelt sich bei dem Morbus Sandhoff um eine seltene Erkrankung, die aber in bestimmten Regionen wie Cordoba in Argentinien mit einer erhöhten Häufigkeit vorkommt. Der häufigste Defekt im β -Ketten Gen ist eine 16 kb Deletion, die den Promotor und die Exons 1-5 betrifft. Homozygotie für dieses Allel verursacht die schwere spätinfantile Form der Erkrankung. Mildere Formen gehen mit Mutationen einher, die zu Rest-enzymaktivität führen.

Das klinische Bild ähnelt dem des Morbus Tay-Sachs, wobei zusätzlich auch viszerale Organe (besonders Herzmuskel) beteiligt sind (Gieselmann, 1995).

1.1.1.3. G_{M2} -Aktivator-Protein-Defekte

Viele Enzyme, die für den Abbau von Sphingolipiden verantwortlich sind, benötigen die Anwesenheit der Sphingolipid Aktivator Proteine (SAPosine). Nur zwei Gene codieren für die bisher bekannten fünf Saposine: Das erste ist auf Chromosom 5 lokalisiert und trägt die genetische Information für das G_{M2} -Aktivator-Protein und das zweite ist auf Chromosom 10 lokalisiert und codiert für die anderen vier Saposine (A, B, C und D), die aus einem gemeinsamen Precursor-Polypeptid (Prosaposin, MG: 70 kDa) synthetisiert werden, aus dem durch proteolytische Spaltung in den Lysosomen vier unabhängige aber strukturell ähnliche Proteine entstehen (Sandhoff et al, 1995).

Saposin B (Homodimer mit MG: 20-22 kDa) stimuliert die Hydrolyse von etwa 20 Glykolipiden durch verschiedene Enzyme und solubilisiert Sulfatide, um eine Angreifbarkeit durch die Arylsulfatase A zu erreichen. Mutationen des Saposin B verursachen verschiedene Krankheitsbilder, die weitgehend der metachromatischen Leukodystrophie ähnlich sind. Saposin C (Homodimer mit MG: 20 kDa) ist essentiell für den Abbau von Glucosylceramiden und führt bei einer Defizienz zu einer juvenilen Variante des Morbus Gaucher mit einer Akkumulation von Glucosylceramiden im retikuloendothelialen System (RES). Saposin A (MG: 10 kDa) aktiviert die β -D-Glucosylcerebrosidase und β -D-Galaktocerebrosidase und Saposin D (MG: 10 kDa) dient *in vitro* als Sphingomyelinase-Aktivator, *in vivo* ist seine Funktion allerdings unklar. Eine isolierte Defizienz der Saposine A und D ist zwar theoretisch möglich, die genaue Funktion dieser Aktivatoren bleibt aber weiterhin unklar und ein spezifisches Krankheitsbild ist nicht bekannt.

G_{M2} -Aktivator-Protein-Defekte sind selten und verursachen ein dem Morbus Tay-Sachs ähnliches Krankheitsbild. Die wasserlösliche β -Hexosaminidase A kann aufgrund sterischer Hinderung der Membranoberfläche die membrangebundenen G_{M2} -Ganglioside nicht abbauen, sondern benötigt dazu das G_{M2} -Aktivator-Protein. Dieses hebt die Ganglioside aus der Membranoberfläche und präsentiert sie dem Enzym als wasserlöslichen G_{M2} - G_{M2} -Aktivator-Komplex.

Zur Diagnostik dieser Enzymdefekte erfolgt eine Bestimmung des G_{M2} -Aktivator-Proteins in Geweben, Fibroblastenkulturen oder Körperflüssigkeiten mittels ELISA in Kombination mit einer Aktivitätsbestimmung der β -Hexosaminidase A.

1.1.2. Arylsulfatase A-Defizienz

Die Defizienz der Arylsulfatase A (MG des Precursors: 62 kDa, reife Form: 54-57 kDa, Gieselmann et al., 1990) bzw. des Arylsulfatase A Aktivator-Proteins (Saposin B, s.1.1.1.3.) führt zur autosomal rezessiv vererbten metachromatischen Leukodystrophie (MLD; Inzidenz 1:40.000, Polten et al., 1991), die durch Akkumulation von Cerebrosid-3-Sulfat in den Myelinscheiden des zentralen und peripheren Nervensystems gekennzeichnet ist (Gieselmann, 1995). Die Sulfatid-Speicherung führt zu einer progressiven Demyelinisierung und dem Verlust von weißer Substanz. Klinisch zeigen sich neurologische Symptome, wie Schwäche, Ataxie, progressive spastische Tetraparese, Optikusatrophie und Demenz. Bei der mildereren „late-onset“ Form überwiegen initial psychiatrische Symptome. Aufgrund des Manifestationalters lassen sich vier Formen unterscheiden: eine kongenitale, eine spätinfantile (Typ Greenfield; 1-2 J.), eine juvenile (Typ Scholz; 3-16 J.) und eine adulte Form (Typ Austin; >16 J.). Die spätinfantile ist die häufigste Form (60 % aller Fälle) und führt innerhalb weniger Jahre zum Tode, wohingegen die juvenile und adulte Form einen protrahierten Verlauf aufweisen. Es gibt zwei mutante Allele, die bei kaukasischen Patienten häufig sind und dort je 25 % der mutanten Allele ausmachen. Dabei hat eines der Allele eine Mutation der Spleißerkennungsstelle an der Exon/Intron 2 Grenze und verursacht einen kompletten Verlust der Arylsulfatase A mRNA. Die andere Mutation bedingt eine Pro-426> Leu Substitution, die eine normale Synthese von katalytisch aktivem Enzym ermöglicht, das aber hochgradig instabil ist. Eine Homozygotie für die Mutation der Spleißerkennungsstelle führt zur schweren spätinfantilen Form dieser Erkrankung, während die Heterozygotie für beide Mutationen zu mildereren Symptomen und Ausbildung der juvenilen Form führt. Eine Homozygotie für das Pro-426> Leu Allel, das mit einer niedrigen Restenzymaktivität einhergeht, wird meist bei der milden adulten Form vorgefunden.

Während die meisten charakterisierten Allele bisher nur bei einem oder wenigen Patienten nachgewiesen werden konnten, fand sich bei Australiern und Libanesen eine Häufung des Thr-274> Met Allels.

1.1.3. β -Galaktosidase-Defizienz

Die β -Galaktosidase (MG des Precursors: 85 kDa, reife Form: 64 kDa) hydrolysiert β -glykosidisch gebundene terminale Galaktosereste verschiedener Substrate. Somit kann ihre Defizienz zu einer Vielzahl klinischer Phänotypen führen, die auf die Speicherung der entsprechenden Substrate zurückzuführen ist.

1.1.3.1. G_{M1} -Gangliosidose

Die autosomal rezessiv vererbte G_{M1} -Gangliosidose ist eine der Erkrankungen, die als Folge einer β -Galaktosidase-Defizienz auftreten kann und zeigt klinisch eine neurologische Symptomatik, die auf die Speicherung von G_{M1} -Gangliosiden in Neuronen zurückzuführen ist und als schwere rasch

fortschreitende infantile Form auftreten kann, die bereits in den ersten Lebenswochen beginnt. Das klinische Bild ist durch neurologische Symptome, Skelettdeformitäten und Gesichtsdysmorphien geprägt, außerdem bestehen Hepatosplenomegalie und Ödeme. Die Patienten versterben im 2. Lebensjahr. Die adulte Form zeigt einen milden, verlangsamten Verlauf mit neurologischen Symptomen wie Dysarthrie, Ataxie und verhältnismäßig geringer Skelettbeteiligung. Auch Zwischenformen kommen vor. Bisher wurde eine Vielzahl von Mutationen gefunden von denen keine mit besonderer Häufigkeit auftrat.

1.1.3.2. Morbus Morquio B

Eine weitere Erkrankung, die als Folge einer β -Galaktosidase-Defizienz auftreten kann, ist der Morbus Morquio B. Er gehört in die Gruppe der Mukopolysaccharidosen und führt zu einer Speicherung von Keratansulfat mit der Folge von Hepatosplenomegalie und schweren Knochen- deformitäten. Da der G_{M1} -Gangliosid-Stoffwechsel bei dieser Erkrankung nicht betroffen ist, weisen die Patienten keine neurologische Beteiligung auf. Die Klinik wird durch die progressive Skelettdysplasie mit Minderwuchs bestimmt.

1.1.3.3. Defizienz des protektiven Proteins

Diese Erkrankung, die als Galaktosialidose bezeichnet wird, ist durch die kombinierte Defizienz der β -D-Galaktosidase und N-Acetyl- α -Neuraminidase aufgrund der Defizienz eines protektiven Proteins (MG: 85 kDa, Zhou et al., 1991) charakterisiert, das mit diesen beiden Enzymen einen hochmolekularen Komplex (>600 kDa, Gieselmann, 1995) bildet. Diese Komplex-Formation bewirkt eine Stabilisierung der β -D-Galaktosidase und eine Aktivierung der Neuraminidase. Während die Neuraminidase α -glykosidisch gebundene Neuraminsäuren hydrolysiert, werden durch die β -Galaktosidase β -glykosidisch gebundene terminale Galaktosereste abgespalten. Somit finden sich in den Nervengeweben dieser Patienten eine Vielzahl von Lipiden, die Neuraminsäure und Galaktose im Speicherungsmaterial enthalten.

Klinisch zeigen Patienten mit der infantilen Form dieser Erkrankung eine verschiedengradige Beteiligung des Nervensystems, Viszeromegalie, Ödeme, Aszites und Skelettdeformitäten. Die Phänotypen variieren zwischen schweren Formen (Geburt) und spätinfantilen, juvenilen und adulten Formen. Bei den „late onset“ Formen weisen die Patienten neben einer langsamen Progredienz neurologischer Symptome, Dysmorphien und Skelettdysplasien auf und können das Erwachsenenalter erreichen. Die meisten bisher beschriebenen Fälle sind in Japan aufgetreten, wobei es sich zumeist um die „late-onset“ Formen handelte.

Das protektive Protein hat Serinesterase-, Deamidase- und Carboxypeptidaseaktivität mit verschiedenen pH-Optima (Itoh et al., 1993). Die Deamidase-Aktivität ist bei neutralem pH-Wert optimal und die Carboxypeptidase-Aktivität bei saurem pH-Wert. Außerdem wurde festgestellt,

daß das protektive Protein höchstwahrscheinlich mit dem lysosomalen Enzym Cathepsin A identisch ist (Jackmann et al., 1990).

1.2. Therapiemöglichkeiten

1.2.1. Enzymersatztherapie

Die Substitution des fehlenden Enzyms ist das Prinzip der Enzymersatztherapie. Für eine adäquate Therapie lysosomaler Speichererkrankungen ist es notwendig, 1) daß signifikante Mengen katalytisch aktiven Enzyms das Zielorgan erreichen, und 2) daß eine Entspeicherung der betroffenen Zellen durch Aufnahme der lysosomalen Enzyme aus dem umgebenden Medium mit nachfolgendem Transport in die Lysosomen stattfindet.

Die erste lysosomale Speichererkrankung, für die eine Enzymersatztherapie möglich war, ist der Morbus Gaucher Typ I (nicht neuronopathische Form). Bei dieser Erkrankung ist die Lipidspeicherung auf die Makrophagen beschränkt, die Mannose-Rezeptoren exprimieren und darüber Polypeptide mit terminalen Mannose-Resten endozytieren und zu den Lysosomen transportieren können (Gieselmann, 1995). Das defiziente Enzym, die β -D-Glucocerebrosidase, kann enzymatisch modifiziert werden, so daß sich die Anzahl der terminale Mannose-Reste an den Oligosaccharidseitenketten erhöht. Das so modifizierte Enzym (aufgereinigt aus humaner Plazenta) erreicht die Makrophagen 40-70 x mehr als die unmodifizierte Variante. Die Enzymersatztherapie führt zu einer deutlichen Besserung des Allgemeinzustandes, zu einem Anstieg des Hb-Gehaltes und der Zahl der Thrombozyten. Nach einer Therapiedauer von 6-12 Monaten ist eine deutliche Rückbildung der Hepatosplenomegalie feststellbar. Die Skelettveränderungen schreiten nicht weiter voran und bilden sich zum Teil sogar zurück (Barton, 1991; Beck, 1994; Holderer, 1994).

Wegen der mangelnden Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke wird die Enzymersatztherapie z.Z. vorwiegend zur Behandlung von Speichererkrankungen ohne neurologische Beteiligung eingesetzt. Neben der Enzymersatztherapie beim Morbus Gaucher befindet sich die Behandlung von Morbus Pompe- (Glykogenose Typ II) und Morbus Fabry-Patienten (Lipidose) mit α -Glucosidase bzw. α -Galaktosidase zur Zeit in der klinischen Erprobung (von der Ploeg et al., 1999; Desnick et al., 1999). Ein weiteres Problem der Enzymersatztherapie stellt die Tatsache dar, daß die Enzyme nach intravenöser Applikation von der Leber aufgenommen und abgebaut werden.

Zur Überwindung der oben genannten Schwierigkeiten kommen folgende Möglichkeiten in Betracht: 1) kovalente Bindung des Enzyms an ein Trägermolekül, das den proteolytischen Abbau des Enzyms verhindert, ohne seine Enzymaktivität zu beeinflussen und zu einer vermehrten neuronalen Aufnahme führt, 2) intrathekale Applikation oder 3) Durchlässigkeitssteigerung der Blut-Hirn-Schranke, um eine vermehrte Penetration des Enzyms zu erreichen. Die verschiedenen Ansätze werden bereits im Tiermodell erprobt.

1.2.2. Substratdeprivation

Bei dieser Methode wird bei Speichererkrankungen, die den Glykolipidstoffwechsel betreffen, ein spezifischer Inhibitor der Glykolipid-Biosynthese eingesetzt, um eine Reduktion neusynthetisierten Substrats zu erreichen. Vorausgesetzt, daß eine Enzymrestaktivität vorhanden ist, können somit die neusynthetisierten Substrate vollständig abgebaut werden (Chavany & Jendoubi, 1998).

Platt et al. (1997) erprobten die Wirkung von Glykolipid-Biosynthese Inhibitoren durch orale Zufuhr von N-Butyldeoxynojirimycin an Hexosaminidase A k.o.- Mäusen, was zu einer Reduktion der Glykolipidspeicherung in vielen Organen führte. Gleichzeitig wurde eine Substratakkumulation im Gehirn verhindert und die Anzahl der speichernden Neurone ebenso wie die Menge an gespeichertem Material pro Einzelzelle reduziert. Klinische Versuche an Menschen stehen noch aus.

1.2.3. Knochenmarktransplantation

Das Prinzip der Knochenmarktransplantation (KMT) basiert auf einer Substitution mit Zellen, durch die Enzyme aus hämatopoetischen Zellen eines Spenders auf die defizienten Zellen eines Empfängers übertragen werden können (Chavany & Jendoubi, 1998). Die KMT scheint besonders für lysosomale Speichererkrankungen geeignet zu sein, bei denen die Substratakkumulation vorwiegend auf die inneren Organe beschränkt ist, wie z.B. Morbus Gaucher Typ I (Kaye, 1995), da es zu einer Entspeicherung mit z.B. Abnahme der Hepatosplenomegalie kommt.

Zur Behandlung von lysosomalen Speichererkrankungen mit neurologischer Beteiligung wird der Nutzen der KMT aber weiterhin kontrovers diskutiert, weil zirkulierende Enzyme die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren können. Da jedoch Makrophagen aus Knochenmarktransplantationen in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und sich als Teil der perivaskulären Mikroglia anzusiedeln, könnten sie somit einen geeigneten Vektor für den Enzymtransport ins Gehirn darstellen.

Im Tiermodell für die lysosomale Speichererkrankung Mannosidose konnte ein durch KMT bedingter Rückgang neurologischer Symptome und z.T. auch eine Reduktion der Nervenschädigungen gezeigt werden (Gieselmann, 1995; Kaye, 1995). So wurde bei Katzen mit Mannosidose nach KMT eine beachtliche Mannosidase-Aktivität im ZNS nachgewiesen. Während nicht-transplantierte Kontrolltiere nach 6 Monaten verstarben, wiesen die KMT-behandelten Tiere für einen Zeitraum bis zu 6 Jahren kaum neurologische Symptome auf. Histologisch zeigte sich, daß es sowohl zu keiner weiteren Akkumulation von Speichermaterial als auch zur Verminderung bereits gespeicherter Substrate in Neuronen kam.

Dagegen zeigte sich, daß KMT's bei Menschen und Tieren mit G_{M1}-Gangliosidose, sowie bei Mäusen mit Galactocerebrosidase-Defizienz keine effektive Behandlung darstellten (Kaye, 1995). Auch bei Fucosidose-Hunden fand sich eine Besserung der neurologischen Symptomatik nach

KMT, wobei erhöhte Enzymaktivitäten im Gehirn erst 6 Monate nach der KMT nachweisbar waren, was auf eine langsame Infiltration des Gehirns zurückgeführt wird (Gieselmann, 1995).

Worauf die Unterschiede in der Effektivität der KMT bei Erkrankungen mit Beteiligung des Nervensystems zurückzuführen sind, ist unklar.

Auch beim Menschen wurde die KMT zur Behandlung verschiedener lysosomaler Speichererkrankungen mit neurologischer Beteiligung durchgeführt. So zeigte sich bei Patienten mit metachromatischer Leukodystrophie keine eindeutige klinische Besserung bzw. ein langsames Fortschreiten der Erkrankung (Kapaun et al., 1998). Bei Patienten mit MPS I zeigte sich eine Rückbildung viszeraler Merkmale (Hepatomegalie, Gesichtsdysmorphien, Obstruktion der oberen Luftwege), die typischen Knochenveränderungen wiesen aber eine deutliche Verschlechterung auf (Guffon et al. 1998). Auch scheint eine frühzeitige KMT mit einer Verlangsamung des intellektuellen Abbaus einherzugehen. Beim subakutem neuronopathischem Typ des Morbus Gaucher wurde sogar ein Stillstand der progressiven neurologischen Verschlechterung nach KMT beobachtet (Tsai et al., 1992). Der Zeitpunkt der KMT scheint von immenser Bedeutung zu sein und es wird vermutet, daß eine KMT vor Auftreten neurologischer Symptome den Erkrankungsverlauf eher beeinflussen könnte (Krivit et al., 1990). Obwohl in einigen Fällen der Krankheitsverlauf nach KMT mit ebenfalls betroffenen, aber nicht transplantierten Geschwistern verglichen werden konnte, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Effekte auf intrafamiliäre Phänotypvariationen und nicht auf die KMT zurückzuführen sind. Weiterhin beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate nach KMT bei Patienten mit Hurler-Syndrom 64% und macht eine sorgfältige Nutzen-/Risikoabwägung erforderlich (Peters et al., 1998).

1.2.4. Gentherapie mittels retroviraler Vektoren

Der geringe Erfolg der KMT's hat zu einer Suche nach gentherapeutischen Lösungsmöglichkeiten geführt. Hierzu sind retrovirale Vektoren, wie z.B. des murinen Leukämie-Virus, besonders geeignet, weil die rekombinanten retroviralen Vektoren eine stabile Integration der therapeutischen Gene in die Wirtszell-DNA und damit eine langanhaltende Expression der transferrierten Gene ermöglichen, ohne eine Immunantwort zu verursachen (Chavany & Jendoubi, 1998).

Eine Kombination von Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen und nachfolgende autologe KMT stellt somit eine neue Möglichkeit zur Behandlung lysosomaler Speichererkrankungen dar. Autologe KMT's mit retroviral modifizierten Zellen wurden an β -D-Glucuronidase-defizienten Mäusen (Mucopolysaccharidose Typ VII) durchgeführt, die durch Insertion des rekombinanten Retrovirus verschiedene Mengen an Enzym exprimierten. Verglichen mit gesunden Tieren fanden sich 2, 6 und 26 % der β -Glucuronidase in Leber, Milz bzw. Knochenmark der transplantierten Mäuse. Es bestand eine Korrelation zwischen der Menge an exprimierter β -Glucuronidase der einzelnen Tiere und einer Reduktion von Speichermaterial mit abnehmender Speicherung von

Glykosaminoglykanen bei ansteigenden Enzymmengen. Eine Korrektur von Skelett- oder Nervenschädigungen konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Wolfe et al., 1992).

Bei einem anderen Vergleichsansatz wurde in Glucuronidase-defiziente Fibroblasten retroviral die cDNA der β -D-Glucuronidase übertragen und die Fibroblasten (eingebettet in ein Kollagengel) in die Peritonealhöhle der mutanten Tiere replantiert. Die danach nachweisbare Enzymaktivität in Milz, Leber, Lunge und anderen Organen lag zwischen 0,5 und 6 % gegenüber gesunden Artgenossen, wobei besonders Leber und Milz einen drastischen Rückgang des Speichermaterials zeigten. Keine Verbesserung zeigte sich dagegen an Knochen und Gehirn. In einem weiteren Ansatz wurden die β -Glucuronidase überexprimierenden Fibroblasten direkt ins Gehirn der mutanten Mäuse injiziert und führten zu einer Reduktion von Speichersubstanzen, die sich allerdings auf die unmittelbare Nähe des Injektionsortes beschränkte. Außerdem ging die Transgenexpression mit der Zeit verloren (Taylor & Wolfe, 1997; Sly & Vogler, 1997). Zur Therapie lysosomaler Speichererkrankungen mit primärer Beteiligung des ZNS sind offensichtlich spezifische Systeme erforderlich, die einen direkten Gentransfer ins ZNS ermöglichen.

1.2.5. Spezifischer Gentransfer ins ZNS

Eine Möglichkeit die Blut-Hirn-Schranke zu umgehen könnte einerseits durch virale Vektoren, die direkt neuronale Zellen zum Ziel haben wie z.B. Herpes simplex Viren (HSV) und Adenoviren (AV) erreicht werden oder durch cerebrale Implantation genetisch modifizierter Zellen, die die therapeutischen Gene überexprimieren (Chavany & Jendoubi, 1998).

AV und HSV ermöglichen eine transiente Genexpression in der Wirtszelle ohne ins Genom integriert zu werden und haben besonders nicht proliferierende Zellen, wie Neurone, zum Ziel. So wurde ein β -Glucuronidase exprimierendes, rekombinantes Herpesvirus in die Cornea von MPS II Mäusen eingepflanzt und führte nach vier Monaten zur Enzymexpression im Bereich der trigeminalen Ganglien und des Hirnstammes. Dies zeigt, daß der Vektor die Fähigkeit besaß sich transsynaptisch im Nervensystem auszubreiten (Chavany & Jendoubi, 1998).

Trotzdem konnte bisher mit keiner Methode eine Korrektur der Nervenläsionen des ZNS bei lysosomalen Speichererkrankungen erreicht werden. Außerdem ist die Anwendung von HSV und AV nur eingeschränkt möglich, da nur eine begrenzte und vorübergehende Expression der Transgene am Infektionsort möglich ist und Immunreaktionen gegen virale Proteine auslöst werden.

Ein neues Vektorsystem stammt vom „human immune deficiency virus“ (HIV), das bereits als Vektor für β -Galaktosidase an adulten Ratten getestet wurde. Hierzu wurde rekombinanter HIV-Vektor intrazerebral injiziert, was zu einer Expression des Transgens für drei Monate ohne Entstehen einer Immunantwort führte. Für lysosomale Speichererkrankungen mit ZNS-Beteiligung ist dies aber bisher nicht erprobt worden.

Als eine Alternative zur Korrektur lysosomaler Speicherungen im ZNS wird die Implantation genetisch modifizierter Zellen mittels viraler Vektoren angesehen. Hierbei werden enzymdefiziente Fibroblasten mit z.B. rekombinanten Adenoviren infiziert, die die cDNA des defizienten Enzyms enthalten und intrathekal oder per intracerebraler Injektion implantiert. Ein Erfolg konnte in verschiedenen Tiermodellen verzeichnet werden, der aber lokal beschränkt ist (Akli et al., 1996).

Um Speichererkrankungen mit bevorzugter Beteiligung des ZNS zu behandeln stellen neuronale Zellen z.Z. das geeigneteste Spendermaterial dar, wobei bevorzugt primäre fetale Neurone verwendet werden. Dazu müssen folgende Faktoren in Betracht gezogen werden: 1) Es besteht eine eingeschränkte Verfügbarkeit passenden gesunden Materials, 2) die Transplantatüberlebensrate ist uneinheitlich, 3) es bestehen Schwierigkeiten die Zellen genetisch zu manipulieren, 4) es besteht eine eingeschränkte und lokal begrenzte Integration der Spenderzellen in das Empfängerhirn. Somit ist nicht anzunehmen, daß diese Therapieform die ausgedehnten ZNS-Schädigungen von lysosomalen Speichererkrankungen korrigieren könnte.

Ein neuer Ansatz zur Therapie besteht im direkten Transport eines Genproduktes zum ZNS durch Transplantation neuronaler Vorläuferzellen, die ins ZNS integriert werden können. Multipotente neuronale Vorläuferzellen können sich in Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten differenzieren. Nach Migration und Integration ins ZNS ist somit ein weitgehender Enzymersatz möglich.

Die meisten Experimente dieser Art wurden an neugeborenen Mäusen oder Mäusefeten durchgeführt, aber ähnliche Verfahren scheinen auch an adulten Tieren möglich zu sein, denen man die neuronalen Vorläuferzellen ins Ventrikelsystem injizierte. Der Vorteil der Transplantation neuronaler Vorläuferzellen gegenüber Fibroblasten besteht in der Integration ins ZNS, die eine langanhaltende Enzymexpression möglich erscheinen läßt und somit auch zur Therapie für lysosomale Speichererkrankungen mit ZNS-Beteiligung geeignet wäre. Ob auch die Enzymdefizienz anderer Organe korrigiert wird ist bisher unklar (Chavany & Jendoubi, 1998).

1.3. Transport löslicher lysosomaler Enzyme

Lösliche lysosomale Enzyme werden in Form höhermolekularer Vorstufen an den Ribosomen synthetisiert und mittels N-terminaler Signalsequenzen in das Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulums (ER) transloziert. Nach Abspaltung des Signalpeptids werden die Polypeptidketten mit Zuckerseitenketten versehen, die durch N-glykosidische Bindung mit Asparaginseitenketten (Konsensussequenz: N X T/S, wobei X jede andere Aminosäure außer P oder D sein kann) verknüpft sind und aus drei Glucose-, neun Mannose- und zwei N-Acetylglucosaminresten bestehen. Nach sequentieller Abspaltung der drei terminalen Glucose-Reste und eines Mannose-Restes gelangen die lysosomalen Enzyme über vesikulären Transport zum Golgi-Apparat, wo eine weitere Prozessierung der Zuckerseitenketten vom mannosereichen zum komplexen Typ stattfindet (Braulke, 1996).

Während der Passage durch den Golgi-Apparat werden einige Mannose-Reste in C₆-Stellung durch das Enzym N-Acetyl-Glucosamin-1-Phosphotransferase zu Mannose-6-Phosphat (M6P) phosphoryliert. Die Phosphotransferase überträgt einen N-Acetylglucosamin-1-phosphatrest von UDP-N-Acetylglucosamin auf die C-6 Hydroxylgruppe ausgewählter Mannose-Reste in mannosereichen Oligosacchariden. Anschließend werden die N-Acetylglucosaminreste aus der Phosphodiesterbindung durch eine N-Acetylglucosaminidase abgespalten, wobei Mannose-6-Phosphat-Reste entstehen. Ein lysosomales Enzym wird zumeist an mehr als einem Oligosaccharid phosphoryliert und ein Oligosaccharid kann bis zu zwei Phosphatgruppen tragen.

Die M6P-Reste ermöglichen die Bindung an M6P-spezifische Rezeptoren (MPR's) im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN). Es gibt zwei Typen von MPR's, die aufgrund ihrer molaren Masse von 46 kDa und 300 kDa als MPR 46 und MPR 300 bezeichnet werden. Das Vorhandensein beider Rezeptoren in jeder Zelle ist für einen effizienten Transport lysosomaler Enzymvorstufen zu den Lysosomen notwendig.

Im TGN erfolgt eine Konzentrierung der Rezeptor-Ligand-Komplexe in Membranabschnitte, von denen sich anschließend clathrinbeschichtete Vesikel abschnüren. An diesem Vorgang sind zytosolische Faktoren (z.B. Adapterkomplex) und Signalstrukturen innerhalb der zytoplasmatischen Domänen der MPR's beteiligt. Nach Verlust der Clathrinhülle fusionieren die Vesikel mit den Endosomen, die in frühe, intermediäre und späte Endosomen unterteilt werden. Durch den niedrigen pH-Wert in den Endosomen (pH 6,8-5,6) kommt es zu einer Dissoziation der Rezeptor-Ligand-Komplexe. Die lysosomalen Hydrolasen werden luminal sortiert und gelangen über noch weitgehend unklare Transportschritte in die Lysosomen. Während des Transportes werden die meisten Precursorformen lysosomaler Enzyme einer proteolytischen Prozessierung unterworfen, wobei die Oligosaccharide auch in unterschiedlichem Maße dephosphoryliert werden können (Sloane et al., 1994; Braulke, 1996).

Die MPR's kehren zum Golgi-Apparat zurück und stehen für eine erneute Transportrunde zur Verfügung. Ca. 5-20 % der neusynthetisierten lysosomalen Enzyme entgehen im TGN der Bindung an die MPR's und werden sezerniert.

Die MPR's sind zu 40-60 % in endosomalen Membranen und zu 20-40 % im TGN lokalisiert, während in den Lysosomen keine MPR's nachgewiesen werden konnten. Etwa 10-20 % der MPR's befinden sich an der Plasmamembran, die fehlsortierte, neusynthetisierte M6P-haltige Vorstufen oder sezernierte lysosomale Enzyme durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufnehmen und zu den Lysosomen transportieren können. Die Endozytose der Plasmamembranrezeptoren kann unabhängig von einer Ligandenbindung konstitutiv über clathrinumhüllte Vesikel erfolgen. Die Aufnahme M6P-haltiger Liganden an der Zelloberfläche erfolgt aber nur über den MPR 300, während der MPR 46 zwar über die Zelloberfläche zirkuliert, aber aufgrund seines pH-Optimums zur Bindung von Liganden und möglicherweise aufgrund seines Oligomerisierungsgrades nicht an der Endozytose lysosomaler Enzyme beteiligt ist (Kornfeld, 1992; Hille, 1995; Braulke, 1996). Untersuchungen an MPR 46 überexprimierenden Zellen lassen vermuten, daß der MPR 46 möglicherweise für die Sekretion von lysosomalen Enzymen aus den endosomalen Kompartimenten heraus verantwortlich ist. Studien an Zellen von Patienten mit Phosphotransferasedefizienz (I-cell disease/MLP II) oder an MPR 46/MPR 300-defizienten Mäusen haben gezeigt, daß lösliche lysosomale Enzyme potentiell auch über MPR-unabhängigen Transport zu den Lysosomen gelangen können (Kornfeld & Sly, 1995; Dittmer et al., 1999).

Der Transport lysosomaler Enzyme kann *in vitro* durch verschiedene Agenzien gestört werden. In Anwesenheit schwacher Basen, wie NH_4Cl , Primaquin und Chloroquin, sowie Ionophoren wie Monensin kommt es zu einem Anstieg des pH-Werts in intrazellulären, sauren Kompartimenten, wodurch eine Dissoziation von lysosomalen Enzymvorstufen und MPR's verhindert wird. Da die MPR's maßgeblich für den Transport lysosomaler Enzyme von Bedeutung sind, kommt es dadurch zu einer verminderten proteolytischen Reifung neusynthetisierter lysosomaler Enzyme, Stimulation der Sekretion lysosomaler Enzymvorstufen und Inhibition der rezeptorvermittelten Endozytose (Braulke et al., 1987 a). Das Ausmaß der Beeinflussung durch die verschiedenen Substanzen variiert in Abhängigkeit vom Zelltyp. So kann durch schwache Basen in humanen Fibroblasten eine Stimulation der Cathepsin D-Sekretion bis zu 80 % erreicht werden, wohingegen die Sekretion von Cathepsin D in U 937-Zellen (humane Monozytenzelllinie) bei gleicher basaler Sekretionsrate von ca. 10 %, nur auf 50 % gesteigert werden kann. Außerdem wird in Abhängigkeit von der Art der verwendeten Substanz, z.B. durch Chloroquin, eine ausgeprägte Hemmung der proteolytischen Prozessierung von Cathepsin D erreicht, wohingegen Monensin nur geringgradig wirksam ist. Eine weitere Substanz, die eine Prozessierung lysosomaler Enzyme und damit die Bildung reifer Enzyme hemmt ist Zymosan, ein Polysaccharid aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae*. Diese Hemmung könnte Folge einer stimulierten Freisetzung oder eines gestörten Transportes lysosomaler Enzyme sein (Imort et al., 1983).

2. Zielsetzung der Arbeit

KMT's wurden in den vergangenen Jahren vor allem zur Behandlung von lysosomalen Speichererkrankungen aufgrund der Defizienz von Arylsulfatase A (MLD) und B (Maroteaux-Lamy/MPS VI), α -Iduronidase (Hurler-Syndrom/MPS IH), Glucocerebrosidase (M.Gaucher), Galctocerebrosidase (Globoidzell-Leukodystrophie), Adrenoleukodystrophieprotein und anderen lysosomalen und peroxisomalen Enzymen eingesetzt (Koc et al., 1999). Je nach Alter des Empfängers zum Zeitpunkt der KMT, der Herkunft der Spenderzellen und der Beteiligung des ZNS, zeigten sich unterschiedliche Erfolge. Neuere Untersuchungen zur Therapie lysosomaler Speichererkrankungen wurden an Mausmodellen vorgenommen, denen einzelne Gene lysosomaler Enzyme (z.B. β -Glucuronidase) ausgeschaltet wurden, und deren Phänotyp dem menschlichen Krankheitsbild (z.B. ASA-Defizienz, MPS VII) ähnelt. Hier zeigte sich für diese Tiermodelle, daß selbst die Transplantation gentechnisch veränderter KM-Vorläuferzellen, die die ASA bzw. β -Glucuronidase überexprimieren, nur einige periphere Speicherphänomene (Leber, Milz, Niere) verbesserten, während die Defekte des ZNS und des Skelettsystems nicht verbessert wurden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zunächst die Bedingungen für einen experimentellen Therapieansatz zu erarbeiten, der auf dem Transfer von lysosomalen Enzymen aus Makrophagen in Hirnzellen beruht. Als Donorzellen sollten humane Makrophagen dienen, deren Isolation aus humanen „Buffy coats“ standardisiert und der Zeitpunkt maximaler Enzymsekretion kultivierter Zellen optimiert wurde. Aus der Vielzahl lysosomaler Enzyme sollten sechs Enzyme (α -Mannosidase, α -Fucosidase, β -Glucosidase, β -Galaktosidase, β -Hexosaminidase und Arylsulfatase A) in die Untersuchung eingeschlossen werden, die auch für gentherapeutische Ansätze von Interesse sind. Aufgrund hoher Sekretionsraten und der Zugänglichkeit von Antikörpern, rekombinanten Proteinen und eines Gen-k.o.-Mausmodells wurde anschließend die Aufnahme und Detektierbarkeit der Arylsulfatase A (ASA) in verschiedene Akzeptorzellen getestet und optimiert. Verschiedene primäre (gemischte Cortezzelllinien der Ratte, humane Fibroblasten und Makrophagen), als auch kultivierte Zelllinien (humane SY5Y Neuroblastoma Zellen, C6-Glioma-Zellen der Ratte und Fibroblasten von Wildtyp- und ASA-defizienten Mäusen) wurden als geeignete Akzeptorzellen zur lysosomalen Enzymaufnahme untersucht. Schließlich wurde in Cokultivierungsversuchen von humanen Makrophagen bzw. ASA-überexprimierenden Zellen mit ASA-defizienten Astrozytenkulturen der direkte Zell-Zell-Transfer der ASA untersucht, der damit *in vitro* den KMT-Bedingungen bei lysosomalen Krankheiten ähnelt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

- Absaugungsgerät Miniport SMT (Servox, Köln)
- CCD-Camera, Diana II (raytest, Straubenhardt)
- Digitales pH-Meter, Multical pH 526 WTW (Schütt, Göttingen)
- Drehrad für Eppendorfgelgefäße (Eigenbau)
- Eismaschine, Modell AF 10 (Scotsman, Vernon Hills, Illinois, USA)
- Elektrophoresekammer SE 200 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
- Elektrophoresekammer SE 600 (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
- Elektrophoresekammer TE 62X (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
- Elutriationszentrifuge Typ JE6-B (Beckman, München)
- FACScan-Analysegerät (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Filmentwicklungsmaschine Gevomatic 60 (AGFA-Gevaert)
- Fluorometer, Modell 111 (Turner)
- Flüssigkeitsszintillationszähler (β -Counter) Modell LS 1800 (Beckman, München)
- Gamma-Counter, Modell 1470 Wizard (Wallac, Hannover)
- Gel Trockner, Gel Air Dryer (Bio-Rad, München)
- Heizblock, Blockthermostat BT 100 (Kleinfeld Labortechnik)
- Kühlzentrifuge, Eppendorf Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg)
- Kühlzentrifuge, Labofuge 400R (Heraeus instruments)
- Kühlzentrifuge, Sorvall RC 5C Plus (Dupont, Dreieich)
- Laser Densitometer, Ultrascan XL (LKB, Bromma, Schweden)
- Lyophilisator, Modell Beta (Christ, Osterode)
- Magnetrührer MAG-E (Gerhardt, Bonn)
- Mikroskop Modell Axiovert 25, Axiovert S 100 (Zeiss, Oberkochen)
- Phosphorimager, CycloneTM (Packard, Frankfurt/M.)
- Photometer, Eppendorf BioPhotometer (Eppendorf, Hamburg)
- Photometer, SP8-100 UV/VIS Spectrophotometer (Pye UNICAM)
- Pipetten (Eppendorf, Hamburg)
- Spannungsgerät, Electrophoresis Power-Supply EPS 1001 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg)
- Sterile Werkbank, Lamin Air (Heraeus, Hanau)
- Tischzentrifuge, Biofuge A (Heraeus Christ)
- Tischzentrifuge, Centrifuge 5415D (Eppendorf, Hamburg)
- Ultraschall, Sonopuls GM 70 (Bandelin, Berlin)
- Vortex-2 Genie (Scientific Industries, Bohemia, USA)

- Waage, Modell AC 100 (Mettler, Gießen)
- Waage, Modell BP 2100 S (Sartorius, Göttingen)
- Wärmeschrank, B5060 EC-CO₂ (Heraeus, Hanau)
- Wärmeschrank, Gasboy C 20 A (Labotect, Göttingen)
- Wasserkühlung, Thermomix UM/Frigomix U1 (Braun, Melsungen)
- Zentrifuge, Minifuge GL (Heraeus Christ)

3.1.2. Gebrauchsmaterialien

- Dialyseschläuche Spectra/Por (Spectrum medical industries, Houston, USA)
- Einmalspritzen (Braun, Melsungen)
- Eppendorfgefäße (Sarstedt, Nümbrecht)
- Gewebekulturschalen (Greiner, Nürtingen)
- Glas-Pasteurpipetten (Schütt, Göttingen)
- Küvetten (Sarstedt, Nümbrecht)
- LeucoSep-Röhrchen (Greiner, Nürtingen)
- Nitrocellulose (Sartorius, Göttingen)
- Phosphorimaging-Screens, Typ SR und MP (Packard, Frankfurt/M.)
- Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg)
- Plastik-Pipetten (Falcon, Becton Dickinson)
- Primaria Gewebekulturschalen (Falcon, Becton Dickinson)
- PVDF-Membran, Westran 0,2 µm (Schleicher und Schüll, Dassel)
- Röntgenfilme Xomat AR (Kodak, Stuttgart)
- Sterilfilter 0,2 und 0,45 µm (Sartorius, Göttingen)
- Sterilfilter (Millipore, Eschborn)
- Verstärkerfolien, Cronex Lightning Plus (Dupont, Dreieich)
- Whatman 3 MM Papier (Schleicher und Schüll, Dassel)
- Zentrifugenröhrchen 10 ml, 50 ml (Falcon, Becton Dickinson)

3.1.3. Enzyme

- Arylsulfatase A, rekombinante (Dr. T. Diercks, Universität Göttingen)
- Collagenase III (Seromed, Berlin)
- Dispase (Boehringer, Mannheim)
- Phosphatase, alkalische (Boehringer, Mannheim)

3.1.4. Antikörper

- Präimmunserum (Laborbestände)
- Primärantikörper: anti humane ASA aus Kaninchen (Laborbestände)
- Sekundärantikörper: Ziege anti Kaninchen IgG, HRP-konjugiert (Dianova, Hamburg)

3.1.5. Radioaktive Substanzen

- L-[³⁵S]-Methionin, 100 Ci/mmol (Amersham)
- [¹²⁵I]-Natriumjodid, 100 Ci/ml (Amersham)
- [³²P] ortho-Phosphat (Amersham Buchler)

3.1.6. Chemikalien

- 4-Methyl-Umbelliferyl-Substrate (Sigma)
- Acrylamid/Bisacrylamid (Roth)
- Agarose (Gibco BRL)
- Ammoniumchlorid (Sigma)
- Ammoniumsulfat: (NH₄)₂SO₄ (Merck)
- Amplify (Amersham Pharmacia)
- APS: Ammonium-Peroxodisulfat (Bio-Rad)
- Bradford-Reagenz (Bio-Rad)
- Bromphenolblau (Bio-Rad)
- Chemiluminescent-Substrate, Super Signal (Pierce)
- Coomassie, Serva BlueR (Serva)
- DTT: Dithiothreitol, ultrarein (Serva)
- EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (Merck)
- Essigsäure (Merck)
- Ethanol (Merck)
- Glucose (Merck)
- Glycerin (Merck)
- Histopaque-1077 (Sigma)
- KCl (Merck)
- Mannose-6-Phosphat (Sigma)
- Methanol (Merck)
- Milchpulver (Nähr-Engel)
- Na Deoxycholat (Merck)
- Na₂CO₃: Natriumcarbonat (Merck)
- NaAc: Natriumacetat (Merck)
- NaCl: Natriumchlorid (Merck)

- NaH_2PO_4 : Natriumhydrogenphosphat (Merck)
- NaOH: Natronlauge (Merck)
- Natriumcitrat (Merck)
- NP 40 (Calbiochem)
- Pansorbin (Calbiochem)
- p-Nitrocatechol (Sigma)
- Protease-Inhibitoren (Pharmingen)
- SDS: Sodiumdodecylsulfat (Sigma)
- TEMED: N'N'N'N'-Tetramethylethyldiamin (Sigma)
- Trichloressigsäure (Merck)
- Tris-Base (Merck)
- Triton-X-100 (Serva)
- Tween 20 (Merck)
- Zymosan (Sigma)

3.1.7. Zelllinien

- ASA-defiziente Mäuse-Astroglia (Prof. Gieselmann, Universität Bonn)
- ASA-defiziente und WT-Mäuse (Prof. Gieselmann, Universität Bonn)
- ASA-überexprimierende BHK-Zellen (Prof. Gieselmann, Universität Bonn)
- „Buffy-Coats“ (Zellseparation der Blutbank des UKE, Hamburg)
- Gemischte Cortexkulturen aus Rattenhirnen (Frau Dr. Schweizer, ZMNH, Hamburg)
- Glioma C6-Zellen (ATCC CCL-107, Ratte)
- Humane Hautfibroblasten (Prof. Kohlschütter, Kinderklinik des UKE, Hamburg)
- Neuronale SY5Y-Zellen (DSMZ, Braunschweig)

3.1.8. Medien und Lösungen für die Zellkultur

- Anheftungsmedium für Makrophagen: RPMI-Medium/10 % FKS
- Antibiotika-Lösung: Penicillin G 100 U/ml, Streptomycinsulfat 100 µg/ml, Amphotericin B 0,25 µg/ml (Gibco BRL)
- BSA (Serva)
- DMEM: Dulbeccos Minimal Essential Medium, (Gibco BRL)
- DMEM, methioninfrei (INC Biomedicals Inc.)
- Fötales Kälberserum: FKS (Gibco BRL)
- PBS: Phosphatgepufferte Salzlösung (Gibco BRL)
- Plating Medium für gemischte Ratten-Cortexkulturen: MEM (Gibco BRL)/0,6 % Glucose/10 % Pferdeserum (Biother)

- Neuronenmedium für gemischte Ratten-Cortexkulturen: 480 ml MEM (Gibco BRL) + 3 g Glucose + 100 µl/ml Transferrin (Sigma) + 5 µg/ml Insulin (Sigma) + 20 nM Progesteron + 100 µM Putrescin (Sigma) + 30 nM Selendioxid (Sigma) + 1 mM Na-Pyruvat (Sigma) + 0,1 % Ovalbumin (Sigma) + 5 µM Cytosin-β-D-Arabinofuranosid-HCl (AraC-C, Sigma)
- RPMI 1640-Medium: Roswell Park Memorial Institute (Gibco BRL)
- TBS-Puffer: 150 mM NaCl, 10 mM TRIS/HCl, pH 7,4
- Trypsin/EDTA (Gibco BRL)

3.1.9. Puffer und Standardlösungen

- Acrylamidlösung (3.2.2.6.)
- Anoden- und Kathodenpuffer für SDS-PAGE (3.2.2.6.)
- Blotto für Western-Blot (3.2.2.8.)
- Elutiationspuffer: PBS, 2 mM EDTA, 5 mM Glucose, pH 7,4
- IMM, IMM/CD, IMM/2 M KCl (3.2.2.11.)
- Lysispuffer für Cath. D (3.2.2.11.)
- 4-Methyl-Umbelliferon Standard (Sigma, 3.2.2.1.1.)
- Neufeld-Puffer (3.2.2.11.)
- Probenpuffer für SDS-PAGE (3.2.2.6.)
- Rainbow™ coloured protein Molekulargewicht-Standard (Amersham international)
- Stop-Puffer für Messung mit MU-Substraten (3.2.2.1.1.)
- Trenngel- und Sammelgelpuffer für SDS-PAGE (3.2.2.6.)

3.2. Methoden

3.2.1. Zellbiologische Methoden

3.2.1.1. Isolation von mononukleären Zellen durch Ficoll-Dichtezentrifugation

Bei der Ficoll-Dichtezentrifugation werden aus antikoaguliertem Blut beim Zentrifugieren die Erythrozyten und Granulozyten durch Polysaccharose (Histopaque-1077 von Sigma) aggregiert und rasch sedimentiert, während Lymphozyten und andere mononukleäre Zellen (MNZ) in der Plasma-Interphase verbleiben und somit isoliert werden können. Die Thrombozyten werden durch langsames Zentrifugieren und mehrmaliges Waschen entfernt.

Durchführung:

Das zur Isolation von mononukleären Zellen verwendete Buffy-Coat-Material wurde von der Abteilung für Zellseparation der Blutbank des UKE zur Verfügung gestellt.

15 ml einer auf Raumtemperatur (RT) erwärmten Histopaque-1077-Lösung (Sigma) wurden in ein LeucoSep-Röhrchen (Greiner) gegeben und 30 s bei 1000 x g zentrifugiert. Die Lösung befand sich nun unterhalb der Filterscheibe. 15-30 ml des Buffy-Coat-Blutes wurden zugegeben und es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 1000 x g bei RT.

Nach dem Zentrifugieren ergab sich von oben nach unten folgende Schichtung:

Plasma – MNZ – Histopaque-Lösung – Filterscheibe – Histopaque-Lösung – Erythrozyten

Das Plasma wurde abgenommen und verworfen, und die MNZ wurden durch Ausgießen in ein Zentrifugenröhrchen transferriert, in 10 mM phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) mittels Pipette resuspendiert und 10 min bei 250 x g bei RT zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde 2 x wiederholt und das Zellpellet aus zwei Buffy-Coats in 12 ml Elutriationspuffer aufgenommen und durch Elutriation weiter aufgereinigt.

3.2.1.2. Elutriationszentrifugation zur Anreicherung von Monozyten (Mason et al., 1985)

In der Separationskammer der Elutriationszentrifuge sind die Zellen zwei einander entgegenwirkenden Kräften ausgeliefert: der Zentrifugalkraft durch den sich drehenden Rotor und der Kraft, der die Separationskammer durchströmenden Flüssigkeit mit ihrer zentripetalen Ausrichtung.

Die langsam in ein außerhalb der Zentrifuge liegendes Reservoirgefäß injizierten Zellen wandern innerhalb der Separationskammer entsprechend ihrer Größe zu dem Ort, an dem ein Gleichgewicht zwischen diesen beiden Kräften besteht (Abb.1a-c).

Durch Erhöhung der Durchflußgeschwindigkeit oder Verminderung der Rotorgeschwindigkeit können Zellen gleicher Größe aus der Kammer ausgewaschen und fraktioniert werden, was eine Auftrennung der Leukozyten in Lymphozyten und Monozyten erlaubt.

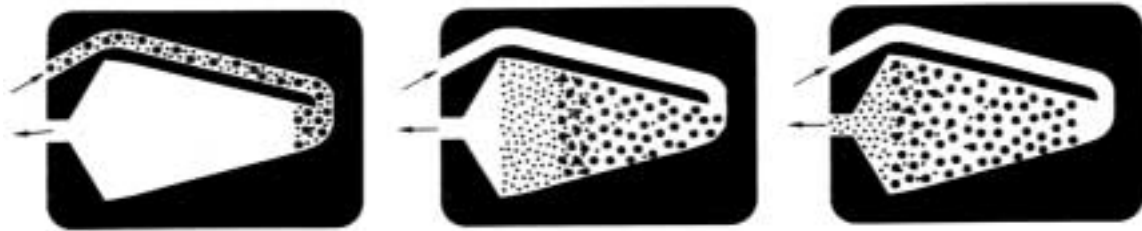


Abb.1a-c: Auftrennung der Zellen in der Separationskammer

Die in das Elutriationssystem injizierten Zellen wandern langsam in die Separationskammer (Abb.1a), ordnen sich entsprechend ihrer Größe an (Abb.1b) und werden durch zunehmende Durchflußgeschwindigkeit und abnehmende Zentrifugalkraft aus der Kammer ausgewaschen (Abb.1c).

Durchführung:

Der Zellansatz nach der Ficoll-Auftrennung enthielt $1-2 \times 10^8$ Zellen in 12 ml Elutriationspuffer (PBS, 2 mM EDTA, 5 mM Glucose, pH 7,4), die bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 7,2 ml/min (Pumpstufe 4) bei 8° C langsam in das mit Elutriationspuffer gefüllte System der Beckman Elutriationszentrifuge Typ JE6-B (Separationsvolumen ca. 500 ml) injiziert wurden.

Nach 7 min bei konstanter Rotordrehzahl von 3.000 rpm wurde die Anordnung der Zellen in der Separationskammer im Stroboskop festgestellt (Abb.1b). Danach erfolgte eine Erhöhung der Durchflußgeschwindigkeit um jeweils eine Stufe pro min (7,2 - 9,0 - 10,8 - 12,5 - 14,3 - 16,1 - 17,9 - 19,7 - 21,5) auf 21,5 ml/min. Während dieser Zeit wurden zwei Fraktionen á 50 ml (Fraktion 1 und 2) und nach Erreichen einer Durchflußgeschwindigkeit von 21,5 ml/min nochmals 50 ml gesammelt (Fraktion 3).

Anschließend wurde die Rotorgeschwindigkeit schrittweise reduziert: 2.500, 2.000 und 1.500 rpm und dabei nochmals jeweils Fraktionen á 50 ml gesammelt (Fraktion 4, 5 und 6). Nachdem der Rotor gestoppt wurde, wurden nochmals 50 ml gesammelt (Fraktion 7) und das System nachgespült.

Die Fraktionen mit dem höchsten Monozytengehalt wurden durch FACScan-Analyse ermittelt.

3.2.1.3. Durchflußzytometrie (FACScan)

Die Durchflußzytometrie dient der Analyse von Einzelzellen in Suspensionen auf der Grundlage von Fluoreszenz und Streulichteigenschaften. Die Identifizierung von Zellen erfolgt über die Bindung fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper, sowie über die Lichtstreuung, die vorwiegend durch die Zellgröße und intrazelluläre Granularität und in geringerem Maße durch Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile beeinflusst wird.

Die durch Elutriationszentrifugation fraktionierten Zellen wurden nach Zentrifugation bei 3.000 rpm bei RT (Minifuge GL von Heraeus Christ) 2 x mit Elutriationspuffer gewaschen und anschließend von Frau Grabowski in der onkologischen Abteilung der Kinderklinik des UKE auf

verschiedene Oberflächenmarker untersucht (CD3, CD14, CD19 und CD45). Die Identifizierung der Monozyten/Makrophagen erfolgte über die Oberflächenantigene CD14 und CD45.

Unter Standardbedingungen wurden die Fraktionen 4-6 vereinigt, zentrifugiert und in 50 ml Anheftungsmedium (RPMI 1640 Medium (Gibco)/10 % FKS, 100 U/ml Penicillin G, 100 µg/ml Streptomycinsulfat und 0,25 µg/ml Amphotericin B (Gibco BRL)) aufgenommen.

3.2.1.4. Kultivierung von Makrophagen auf Primaria-Zellkulturschalen

Nach der Aufreinigung über Ficoll und Elutriation wurden die Zellen auf 6er MultiWell-Platten (Primaria, Falcon) und 100 mm Primaria-Schalen (Falcon) in einer Dichte von $2-3,5 \times 10^6$ Zellen/ml Anheftungsmedium ausgesät. Die Primaria-Platten besitzen eine wachstumsfördernde, positiv geladene Oberfläche, die die Anheftung von Monozyten besonders fördert.

Nach einer Anheftungsphase von 24 h in RPMI-Medium/10 % FKS erfolgte ein Mediumwechsel zu DMEM-Medium/10 % FKS/Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B. Alle 2 Tage wurde das Medium gewechselt und die Zellen bis zu 6 Wochen bei 5 % CO₂ und 37° C kultiviert.

3.2.1.5. Kultivierung von

- **Glia C6-Zellen (Ratte; ATCC CCL-107) und humanen neuronalen SY5Y-Zellen (DSMZ, Braunschweig)**

Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium mit 10 % FKS. Alle 2-3 Tage wurde im Verhältnis 1:3 - 1:5 ausgedünnt.

- **Gemischten Cortexkulturen**

Die gemischten Cortexkulturen, die aus Gehirnen 18 Tage alter Rattenembryonen gewonnen und für 3-6 Tage in Neuronenwachstums-Medium kultiviert wurden, wurden freundlicherweise von Frau Dr. Schweizer (ZMNH, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

- **Humanen Hautfibroblasten**

Die Zellen wurden von Herrn Prof. Kohlschütter aus dem diagnostischen Zellkultur-Labor der Kinderklinik des UKE Hamburg zur Verfügung gestellt.

3.2.1.6. Isolation von Hautfibroblasten aus Wildtyp- und Arylsulfatase A (ASA)-defizienten Mäusen

ASA-defiziente Mäuse wurden durch Herrn Prof. V. Gieselmann (Bonn) zur Verfügung gestellt. Die Mäuse wurden unter CO₂-Narkose getötet und die zerkleinerten Hautstückchen wurden für 2,5 h bei 37° C in 10 ml PBS mit 0,2 % Collagenase III (Seromed, Berlin) und 2 U/ml Dispase (Boehringer, Mannheim) im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Suspension wurde bei 500 x g für 5 min zentrifugiert, das Sediment in 10 ml DMEM/10 % FKS resuspendiert und auf 10 cm Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Nur die Fibroblasten wuchsen an und erreichten nach 5-7 Tagen Konfluenz.

Der Zellrasen wurde mit PBS gespült, um inhibierende Einflüsse von Serumbestandteilen auf die Trypsinaktivität zu verhindern. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellen ca. 5 min mit Trypsin/EDTA bei 37° C inkubiert und danach durch Klopfen von der Kulturschale gelöst. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Trypsin-Aktivität wurde durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt, die Zellen durch mehrfaches Aufsaugen in der Pipette vereinzelt und die Zellen in 1:3 Verdünnung erneut ausgesät. Nach einer Kulturdauer von mehr als zwei Wochen war ein erneutes Trypsinieren der Zellen nicht mehr möglich, da sie sich nicht mehr ablösen ließen.

Nach Absaugen des Mediums wurden vier Wochen alte Makrophagen, die auf 10 cm Schalen kultiviert wurden, mit PBS gewaschen und mit 10 ml DMEM-Medium/0,05 % BSA mit/ohne 30 mM NH_4Cl für ca. 24 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Medien abgenommen, 5 min bei 2.000 - 3.000 rpm (Minifuge GL, Heraeus Christ) zentrifugiert und der Überstand für ca. 24 h gegen 3 x 50 ml DMEM/0,05 % BSA dialysiert.

Zur Bestimmung der lysosomalen Enzymaktivitäten wurden Makrophagen, die für 7-14 Tage kultiviert worden waren, für 24 h mit frischem DMEM-Medium/10 % FKS versetzt. Nach Abnehmen des Mediums wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und in 0,5-5 ml TBS-Puffer abgeschabt und mittels Ultraschall homogenisiert. Alternativ wurden die Zellen in PBS + 0,1 % Triton X-100 abgeschabt.

3.2.2. Biochemische Methoden

3.2.2.1. Bestimmung von lysosomalen Enzymaktivitäten

3.2.2.1.1. Messung mit 4-Methyl-Umbelliferyl-Substraten

Folgende Substrate wurden zur Bestimmung der Enzymaktivitäten verwendet:

- α -Mannosidase 1 mM 4-Methyl-Umbelliferyl- α -D-mannopyranosid (Sigma #M-7138)
in 0,05 M Citratphosphatpuffer pH 5,05
- α -Fucosidase 1 mM 4-Methyl-Umbelliferyl- α -L-fucopyranosid (Sigma #M-8527)
in 0,1 M Na-Citratpuffer pH 5,5
- β -Galactosidase 0,5 mM 4-Methyl-Umbelliferyl- β -gal-pyranosid (Sigma #M-1633)
in 0,05 M Citratphosphatpuffer pH 4,35 + 0,1 M NaCl
- β -Glucosidase 5 mM 4-Methyl-Umbelliferyl- β -D-glucopyranosid (Sigma #M-9002)
in 0,05 M Citratphosphatpuffer pH 4,08
- β -Hexosaminidase 1 mM 4-Methyl-Umbelliferyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid
(Sigma #M-2133)
in 0,05 M Citratphosphatpuffer pH 4,4

Standard-Lösung: 0,05 mM 4-Methyl-Umbelliferon (Sigma M-1381) in
0,17 M Glycin-Carbonatpuffer, pH 10,5
(20 μ l = 1 nmol)

Stop-Puffer: 0,17 M Glycin-Carbonatpuffer, pH 10,5

Zur Bestimmung der Aktivität der Enzyme wurden folgende Ansätze gewählt:

Enzym	Zellhomogenat	Medium	Inkubationszeit	Substratmenge
α -Mannosidase	50 μ l	50 μ l	60 min, 37° C	50 μ l
α -Fucosidase	50 μ l	50 μ l	30 min, 37° C	50 μ l
β -Galactosidase	50 μ l	50 μ l	60 min, 37° C	50 μ l
β -Glucosidase	50 μ l	50 μ l	60 min, 37° C	50 μ l
β -Hexosaminidase	5 μ l	5 μ l	30 min, 37° C	5 μ l

Die Proben wurden mit der jeweiligen Substratmenge versetzt und bei 37° C im Wasserbad für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Reaktion wurde mit jeweils 1 ml Stop-Puffer abgestoppt. Die

Messung erfolgte im Fluorometer (Turner Model 111) bei einer Filtereinstellung von 11 % (Anregungswellenlänge 365 nm, Emissionswellenlänge 440 nm).

Durch Vergleich mit der Standardlösung wurden die Enzymaktivitäten (Substratumsatz in nmol /min = mU) errechnet und auf 1 mg Zellprotein bzw. 1 ml kultiviertes Medium in 24 h bezogen.

3.2.2.1.2. Messung der Arylsulfatase A (ASA)-Aktivität

Substrat: 10 mM p-Nitrocatecholsulfat (Sigma N-7251)

in 0,5 M Natriumacetatpuffer, pH 5,0

0,05 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (Natriumpyrophosphat)

10 % NaCl

Jeweils 100-200 μl der konditionierten Medien bzw. der Zellhomogenate wurden mit 200 μl Substratlösung versetzt und für 30 min bei 37° C inkubiert.

Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 600 μl 1 M NaOH abgestoppt und die Extinktion des freigesetzten Nitrocatechols im Photometer (SP8-100 UV/VIS Spectrophotometer, PYE UNICAM) bei 515 nm gegen den Leerwert gemessen.

3.2.2.2. Proteinbestimmung nach Lowry

Das Prinzip beruht auf der Bildung eines Kupfer-Protein-Komplexes in alkalischer Lösung und dessen Oxidation durch ein Folin-Reagenz. Dadurch entsteht eine Blaufärbung, die photometrisch bestimmt werden kann.

Lösungen:

Lösung A: 100 Teile 3 % Na_2CO_3 (w/v) in 0,1 N NaOH

1 Teil 4 % Kalium-Natrium-Tartrat x 4 H_2O (w/v)

1 Teil 2 % CuSO_4 x 5 H_2O (w/v)

Lösung B: 1 Teil 33 % Folin Reagenz (v/v)

2 Teile Aqua bidest

Durchführung:

Beide Lösungen wurden erst kurz vor Gebrauch aus den Stammlösungen angesetzt. Als Standard wurde eine BSA-Lösung (1 mg/ml in 0,25 M Tris/HCl pH 7,5) verwendet. Hiervon wurden 0, 5, 10, 15 und 20 μl und Aliquots der zu messenden Proben mit Aqua bidest auf 100 μl aufgefüllt, mit 1 ml Lösung A versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Danach wurden 100 μl Lösung B zugegeben, gemischt und erneut 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Proben bei λ

= 660 nm gemessen. Die Proteinkonzentration der unbekannten Proben wurde mittels einer Eichgeraden bestimmt (Lowry et al., 1951).

3.2.2.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 kommt in drei verschiedenen Zuständen vor, die jeweils bei verschiedenen Wellenlängen absorbieren (kationisch: 470 nm, neutral: 650 nm, anionisch: 595 nm). Durch Bindung an ein Protein wird der Farbstoff vom kationischen in den anionischen Zustand überführt und die Absorption kann bei 595 nm gemessen werden. Da Coomassie Brilliant Blue-G250 hauptsächlich an anionische Aminosäuren bindet, absorbieren verschiedene Proteine verschieden stark. Die Absorptionsmessungen werden deshalb auf eine Eichgerade mit BSA bezogen.

Durchführung:

Die Ansätze des Eichproteins (0,1 mg/ml) in einem Volumen von 10, 25, 50, 100 und 150 µl und die zu messenden Proben wurden mit Aqua bidest auf 800 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay, dye reagent concentrate) wurden die Ansätze gemischt, nach 5 bis 30 min Inkubation bei RT die Absorption gegen den Nullwert gemessen und über eine Eichgerade die Proteinmengen der Proben bestimmt.

3.2.2.4. Metabolische Markierung von Makrophagen mit [³⁵S]-Methionin

Hungermedium: methioninfreies Medium

Markierungsmedium: methioninfreies DMEM

2,5 % dialysiertes und hitzeinaktiviertes (2 h bei 56° C) FKS

ca. 50-100 µCi [³⁵S]-Methionin/ml Medium

Zur Markierung wurden 9-20 Tage alte Makrophagen verwendet. Nach Absaugen der Medien wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und für 30 min mit Hungermedium bei 37° C inkubiert. Danach wurde das Hungermedium gegen Markierungsmedium ausgetauscht. Für eine 10 cm Schale wurden 10 ml Medium verwendet. Es erfolgte eine Inkubation bei 37° C und 5 % CO₂ über Nacht (12-16 h). Parallel wurden Zellen in Gegenwart von 30 mM Ammoniumchlorid oder 50 µg/ml Zymosan (Sigma) inkubiert. Wenn angegeben, folgte der Markierung ein Chase (d.h. Abnahme des radioaktiven Mediums, Waschen der Zellen und erneute Inkubation in DMEM/BSA, das 0,25 mg/ml Methionin enthielt, für 5-12 h bei 37° C. Nach Markierung oder Chase wurde das Medium abgenommen und in Reaktionsgefäße überführt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in PBS abgeschabt. Die Zellen und die Medien wurden bei 2.000-3.000 rpm zentrifugiert. Die Medien wurden dialysiert und die sedimentierten Zellen in geeignetem

Homogenisationspuffer aufgenommen. Die Proben wurden zur TCA-Fällung, Ammoniumsulfat-Fällung und Immunpräzipitation eingesetzt (Lemansky et al., 1985).

3.2.2.5. Endozytose mit [125 J]-ASA

Die Endozytose-Experimente mit [125 J]-ASA wurden mit verschiedenen Zelltypen durchgeführt: Ratten-Glia-C6 oder Neuroblastoma-Zellen, humanen Makrophagen und Hautfibroblasten, sowie Hautfibroblasten von ASA-defizienten- und Wildtypmäusen. Die [125 J]-markierte ASA wurde von der Abteilung Biochemie der Kinderklinik zur Verfügung gestellt. Nach Mediumwechsel wurden die Zellen mit DMEM/0,05 % BSA, das 200.000-600.000 cpm/ml [125 J]-ASA enthielt für 2-20 h bei 37° C in An- und Abwesenheit von 10 mM Mannose-6-Phosphat (M6P) inkubiert. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen 5 x mit kaltem PBS auf Eis gewaschen, in 1 ml PBS abgeschabt, 5 min bei 6.000 rpm bei 4° C zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus Instruments) und die abgesetzten Zellen in je 100 µl reduzierendem Solubilizer aufgenommen. Nach Kochen der Proben bei 95° C (Blockthermostat BT 100, Kleinfeld Labortechnik) für 5 min und erneuter Zentrifugation (5 min bei 14.000 rpm) wurden die Überstände im Gamma-Zähler (Wallac Wizard) gezählt und auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen.

3.2.2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli

Reagenzien: Acrylamidlösung: 30 % (w/v) Acrylamid

0,8 % (w/v) Bisacrylamid

Trispuffer I: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

(Trenngelpuffer) 0,4 % (w/v) SDS

Trispuffer II: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

(Sammelgelpuffer) 0,4 % (w/v) SDS

APS-Lösung: 10 % (w/v) rekristallisiertes Ammonium-
Peroxydisulfat in H₂O (Bio-Rad)

TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (Bio-Rad)

Probenpuffer (2 x): 250 mM Tris/HCl pH 6,8

2 % (w/v) SDS

20 % (w/v) Glycerin

20 mM DTT

Anodenpuffer:	192 mM Glycin 50 mM Tris/HCl pH 8,6
Kathodenpuffer:	192 mM Glycin 50 mM Tris/HCl pH 8,6 0,1 % SDS 0,001 % Bromphenolblau (w/v)

Das anionische Detergenz SDS besetzt alle hydrophoben Gruppen eines Proteins und zerstört dadurch Sekundärstrukturen. Die linearisierte Polypeptidkette wird durch das SDS einheitlich negativ geladen. In SDS-Polyacrylamidgelen trennen sich deshalb Proteine ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht (Weber und Osborn, 1969). In der Modifikation nach Laemmli (1970) wird zusätzlich ein diskontinuierliches Puffersystem zur besseren Trennung der Proteinbanden eingesetzt.

Das Gel besteht aus einem Sammelgel (4 % Acrylamid; 0,125 M Tris/HCl pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,33 % APS; 0,1 % TEMED) und dem eigentlichen Trenngel (5-15 % Acrylamid; 0,375 M Tris/HCl pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,8 % APS; 0,08 % TEMED).

Durchführung:

Zunächst wurde die Lösung für das Trenngel zwischen zwei Glasplatten (180 x 140 mm) gegossen, die durch 1,5 mm dicke Abstandhalter getrennt und durch Einspannen in eine geeignete Gießvorrichtung seitlich und unten gut abgedichtet waren. Überschichtet mit Aqua bidest polymerisierte das Gel für mindestens 30 min bei RT. Nach Abgießen des Wassers über dem Trenngel wurde das Sammelgel gegossen und der Probenkamm eingesteckt. Nach weiteren 30 min Polymerisation konnten die in Probenpuffer solubilisierten Proben (5 min, 95° C) aufgetragen und mit Kathodenpuffer vorsichtig überschichtet werden. Die Auftrennung erfolgte in einer mit Anodenpuffer gefüllten Kammer (Hoefer SE 600) bei 4° C und 25 mA/Gel für 12 h (Laemmli, 1970).

3.2.2.7. Methoden der Weiterverarbeitung von SDS-Gelen

3.2.2.7.1. Autoradiographie

Zur Sichtbarmachung von [^{125}J]-ASA-markierten Proteinen nach SDS-PAGE wurde das Gel in 50 % Methanol, das 10 % Essigsäure enthielt, für 30 min bei RT fixiert. Anschließend wurde das Gel für 2 x 20 min gewässert und in einem Umluft-Geltrockner (GelAir Dryer, Bio-Rad) für 2 h getrocknet. Das trockene Gel wurde in einer Filmkassette mit Kodak X-omat AR Filmen zwischen Cronex Verstärkerfolien (Cronex Lightening Plus, Dupont) bei -80°C für 1-5 Tage exponiert. Alternativ wurde das [^{125}J]-Gel über das Phosphorimaging-System ausgewertet.

3.2.2.7.2. Fluorographie

Nach der elektrophoretischen Auftrennung [^{35}S]-Methionin-markierter Proteine durch SDS-PAGE wurde das Gel für 30 min bei RT fixiert (3.2.2.7.1.), für weitere 30 min in Amplify-Lösung (Amersham Pharmacia) inkubiert und anschließend im Umluft-Geltrockner (Gel Air Dryer, Bio-Rad) für 2 h getrocknet. Das getrocknete Gel wurde wiederum in einer Filmkassette mit Kodak X-omat AR Filmen bei -80°C exponiert oder alternativ mit dem Phosphorimaging-System ausgewertet.

3.2.2.7.3. Quantifizierung von Gelbanden

Die Quantifizierung der Bandenstärke auf den Röntgenfilmen erfolgte durch Auflegen des markierten Gels auf den belichteten Röntgenfilm, Ausschneiden der [^{125}J]-ASA-Banden aus dem Gel und Zählen im Gammastrahlenzähler (Modell 1740 Wizard, Wallac, Hannover) oder durch Laserscandensitometrie (Scanjet 4c/T, Hewlett Packard).

3.2.2.8. Elektrotransfer von Proteinen (Western-Blot)

Die mit Blotpuffer (25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) benetzte Nitrocellulose-Membran wurde luftblasenfrei auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgelegt und zwischen 3 Lagen 3MM Whatpapier, Schwämmen und Blotgitter eingespannt. Dieses Blotsandwich wurde in eine mit Blotpuffer gefüllte Naßblotkammer eingesetzt. Der Elektrotransfer erfolgte in der großen Kammer (TE62X TransphorII, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) mit 900 mA für 90 min bei 4°C (für Proteine bis ca. 70 kDA molarer Masse), oder bei 400 mA für eine Stunde in der Minikammer (SE200, Hoefer).

Lösungen:

Blotto:	10 mM PBS
	0,05 % Tween-20
	5 % fettfreies Milchpulver

Waschlösung 1: 10 mM PBS

Waschlösung 2: 10 mM PBS
0,05 % Tween-20

Nach dem Blot der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran wurde diese zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen für 3 h bei RT in Blotto inkubiert. Nach Absaugen des Blotto wurde die Nitrocellulose (NC) mit dem Primärantikörper (anti humane ASA aus Kaninchen 1:500 in Blotto verdünnt) über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach Abnahme der Lösung des Primärantikörpers wurde die NC 2 x 10 min in Waschlösung 1; 2 x 10 min in Waschlösung 2 und 1 x 10 min in Waschlösung 1 gewaschen, bevor sie mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Ziege anti-Kaninchen, Horseradish-Peroxidase (HRP) konjugiert 1:15.000 in Waschlösung 2 für 1 h bei RT inkubiert wurde. Nach gleichem Waschprotokoll wie nach dem Erstantikörper erfolgt der Nachweis über das ECL-System von Pierce (Supersignal). Dieses Verfahren beruht auf der Oxidation von Luminol durch die Peroxidaseaktivität des HRP-Konjugates, wobei Licht emittiert wird und dadurch Röntgenfilme belichtet werden können, bzw. die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer gekühlten CCD-Kamera (Diana II digital cooled CCD-Camera, raytest) (Towbin et al., 1979).

3.2.2.9. TCA-Fällung

Die Trichloressigsäure-Fällung von Proteinen diente der Bestimmung der proteingebundenen Radioaktivität. Hierzu wurden je 200 µl der [³⁵S]-markierten Probe mit jeweils 200 µl 20 % TCA versetzt und 5 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 14.000 rpm und 4° C zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Pellets mit je 1 ml 5 % TCA und 1 ml Aqua dest gewaschen. Danach wurden 50 µl 2 M Tris-Base und 50 µl reduzierender Solubilizer zugegeben, 5 min bei 95° C gekocht und die Proben auf ein 10 % SDS-Gel aufgetragen.

3.2.2.10. Ammoniumsulfatfällung

((NH₄)₂SO₄) führt zur Proteinaggregation durch Zusammenlagerung hydrophober Oberflächen. Hierzu wurden 10 ml Makrophagenmedium (mit/ohne Stimulation durch NH₄Cl) mit Ammoniumsulfat (0,5 g/ml) versetzt, 2 h auf Eis inkubiert und schließlich für 30 min bei 20.000 rpm im SS-34 Rotor (Sorvall RC 5C Plus, Dupont) bei 4° C zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem Zehntel des Ausgangsvolumens in PBS aufgenommen, über Nacht bei 4° C gegen 2 x 50 ml DMEM-Medium dialysiert und anschließend einer Immunpräzipitation zugeführt.

3.2.2.11. Immunpräzipitation

Bei dieser Methode werden radioaktiv markierte Proteine von Antikörpern spezifisch erkannt und gebunden.

Lösungen :

Lysispuffer für Cath. D: 5 Teile 10 mM PBS pH 7,4
 4 Teile IMM/CD

IMM/CD: 1 % Triton X-100
 0,5 % Na-Deoxycholat
 0,5 % SDS
 2 % BSA

50 x Protease-Inhibitoren-Cocktail (Pharmingen # 21426Z)

Immunomix IMM: 1 % Triton X-100
 0,5 % Na-Deoxycholat in PBS

Neufeld-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8,5
 0,6 M NaCl
 0,1 % SDS
 0,05 % NP-40

IMM/2M KCl: 1 % Triton X-100
 0,5 % Na-Deoxycholat in PBS
 2 M KCl

Pansorbin: Staphylococcus aureus-Suspension

Aufarbeitung der Zellen und Immunpräzipitation:

Nach Endozytose [¹²⁵J]- bzw. [³⁵S]-markierter Proteine in verschiedene Zelltypen (3.2.2.5.) wurden die Medien abgenommen und verworfen. Die Zellen wurden 3 x mit kaltem PBS gewaschen und in je 700-1000 µl Lysispuffer für Cathepsin D abgeschabt. Anschließend wurden die Proben mit 50 x konzentriertem Inhibitor-Cocktail versetzt und 10 min auf Eis belassen. Danach wurden die Proben 10 min bei 14.000 rpm und 4° C zentrifugiert, die Überstände abgenommen und mit 2 µl anti-human ASA Antiserum versetzt, und über Nacht bei 4° C auf einem Drehrad inkubiert.

Am folgenden Tag wurden je 40 µl Pansorbin (Calbiochem) zugegeben, die Proben 1 h bei 4° C auf dem Drehrad gedreht und schließlich für 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R). Die Pellets wurden nacheinander in 800 µl Neufeld-Puffer, 800 µl IMM, 800 µl IMM/2M KCl, und 2 x 800 µl 1 mM PBS gewaschen. Bei jedem Waschschrift wurde das Pellet mit Hilfe eines Vortex-Gerätes (Vortex-2 Genie, Scientific industries) resuspendiert, 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach der letzten Resuspendierung des Pansorbin-Pellets in PBS wurde die Suspension in ein neues 1,5 ml Probengefäß überführt und zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 100 µl reduzierendem Solubilizer resuspendiert und 5 min bei 95° C gekocht. Das Pansorbin wurde durch Zentrifugation von den Antigenen und IgG-Molekülen im Überstand abgetrennt. Anschließend erfolgte eine Auftrennung des Überstandes durch SDS-PAGE (10 % Acrylamid-Gel).

3.2.2.12. Coomassie-Färbung

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine können durch eine Coomassie-Färbung detektiert werden. Dazu wurde das Gel zunächst in 50 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,25 % Coomassie blue R250 für 30 min fixiert und gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in 50 % Methanol, 10 % Essigsäure. Anschließend wurde das Gel gewässert und getrocknet.

4. Resultate

4.1. Aufreinigung und Kultivierung von Makrophagen aus humanen Buffy coats

Nach Aufreinigung der Buffy coats durch Ficoll-Dichtezentrifugation und Elutriationszentrifugation wurden die erhaltenen sieben Fraktionen durch FACScan-Analyse untersucht. Diese Methode ermöglicht eine Unterscheidung zwischen den Leukozytensubpopulationen Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten aufgrund von physikalischen und immunologischen Eigenschaften. Daher erfolgte die Identifizierung der Leukozytenlysate einerseits anhand einer korrelierten Darstellung ihrer Granularität (Seitwärtsstreulicht) und Größe (Vorwärtsstreulicht) (Abb.2a), andererseits anhand der Präsenz typischer Oberflächenmarker (Abb.2b). Die Analyse ergab, daß die Fraktionen 4, 5 und 6 den höchsten Anteil an Monozyten enthielten, was an dem hohen Gehalt der für Monozyten/Makrophagen typischen Oberflächenmarker CD 14 und CD 45 zu erkennen ist. Diese Fraktionen wurden bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 21,5 ml/min und einer Rotorgeschwindigkeit zwischen 2.500 und 1.500 rpm gewonnen. Alle weiteren Versuche wurden mit Makrophagenpräparationen durchgeführt, die unter diesen Bedingungen isoliert wurden.

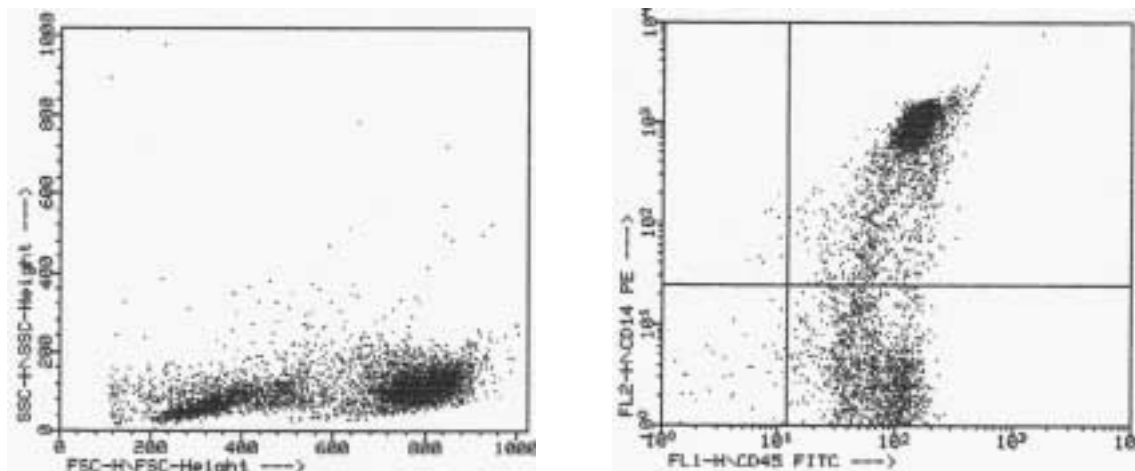


Abb.2a und b: FACScan-Analyse verschiedener Fraktionen nach Aufreinigung von MNZ durch Elutriationszentrifugation

Nach Elutriationszentrifugation wurden die erhaltenen sieben Fraktionen durch FACScan-Analyse untersucht. Die Identifizierung der Zellen erfolgte aufgrund physikalischer Eigenschaften (Granularität und Zellgröße, Abb.2a) und der Verteilung von Oberflächenmarkern (Abb.2b). Die Fraktionen 4, 5 und 6 wiesen einen Anteil von 70-80 % an Monozyten auf, die aufgrund ihres hohen Gehaltes an CD 14 und CD 45 im rechten oberen Quadranten der Abbildung 2b zur Darstellung kommen.

4.2. Charakterisierung der zellulären Verteilung lysosomaler Enzyme

4.2.1. Optimierung der verwendeten Methodik zur Bestimmung von lysosomalen Enzymaktivitäten

Da die hier verwendeten Bedingungen zur Bestimmung von Enzymaktivitäten lysosomaler Enzyme ursprünglich für Fibroblasten und humane Blutseren beschrieben worden waren (O'Brien et al., 1970; Brandt et al., 1975), wurde zunächst getestet, ob die gleichen Bedingungen auch für Makrophagenlysate zutreffen. Die Enzymaktivitätsmessungen für α -Mannosidase, α -Fucosidase, β -Galaktosidase, β -Glucosidase und β -Hexosaminidase wurden in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (15-120 min) bestimmt. Als Enzymquelle dienten Makrophagen, die 14 Tage kultiviert waren. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen für weitere 24 h inkubiert und anschließend die Bestimmungen der Enzymaktivitäten in Medien und Zellextrakten durchgeführt. Es zeigte sich für α -Mannosidase, α -Fucosidase und β -Galaktosidase bis zu einer Inkubationszeit von 2 h, und für die β -Hexosaminidase bis zu einer Inkubationszeit von 1 h eine annähernd lineare Zunahme der Enzymaktivitäten (Abb.3a-d).

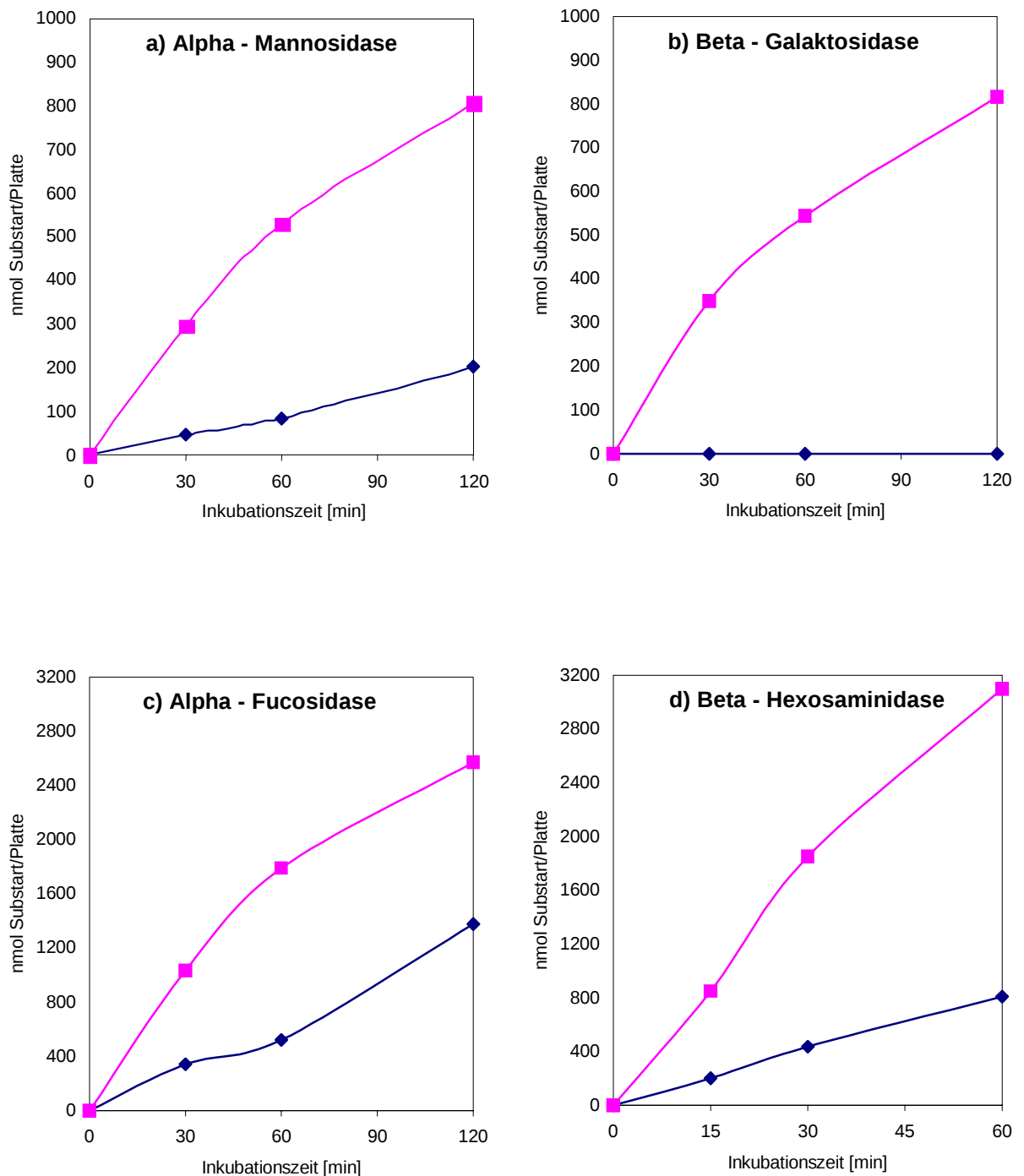


Abb.3a-d: Bestimmung lysosomaler Enzymaktivitäten in Medien und Zell-Lysaten von Makrophagen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer

In Makrophagen-Zell-extrakten (---■---) und Medien (---◆---), die nach einer Kultivierungsdauer von 14 Tagen und nach einer Inkubationszeit von 24 h nach Mediumwechsel gewonnen wurden, wurde die Aktivität der α -Mannosidase (a), β -Galaktosidase (b), α -Fucosidase (c) und β -Hexosaminidase (d) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit bestimmt.

Alle folgenden Enzymaktivitätsbestimmungen wurden für α -Fucosidase und β -Hexosaminidase bei einer Inkubationszeit von 30 min und für α -Mannosidase und β -Galaktosidase bei einer Inkubationszeit von 60 min durchgeführt, die Arylsulfatase A-Aktivität wurde nach Inkubationszeiten zwischen 90 und 180 min bestimmt.

Da für die β -Glucosidase unter diesen Bedingungen keine relevanten Enzymaktivitäten gemessen werden konnten, wurde sie in folgenden Untersuchungen nicht weiter bestimmt.

Aus diesen Daten läßt sich zusätzlich bestimmen, wie hoch die Sekretionsrate der für 14 Tage kultivierten Makrophagen für die einzelnen lysosomalen Enzyme ist (Tab.1). Humane Makrophagen sezernieren ca. 2,5-fach mehr β -Hexosaminidase als α -Fucosidase und ca. 17,4-fach mehr β -Hexosaminidase als α -Mannosidase. α -Fucosidase wurde ca. 7-fach mehr als α -Mannosidase sezerniert. Da die Messung der Aktivität der Arylsulfatase A mit einem anderen Verfahren durchgeführt wurde, ist deren Sekretionsrate nicht mit der der anderen Enzyme vergleichbar.

Bei Zugrundelegung der Gesamt-Enzymaktivität (in Zellen und Medien), ergibt sich, daß für α -Mannosidase 15,3 %, α -Fucosidase 26,9 %, β -Galaktosidase 1,4 %, β -Hexosaminidase 31,8 % und Arylsulfatase A 10,4 % der Gesamt-Enzymaktivität im Medium zu finden war (Abb.4).

Tab.1: Basale Sekretion verschiedener lysosomaler Enzyme durch Makrophagen

Enzym	mU/mg Zellprotein/24 h
α -Mannosidase	1,4
α -Fucosidase	9,8
β -Galaktosidase	0,1
β -Hexosaminidase	24,4
Arylsulfatase A	0,2

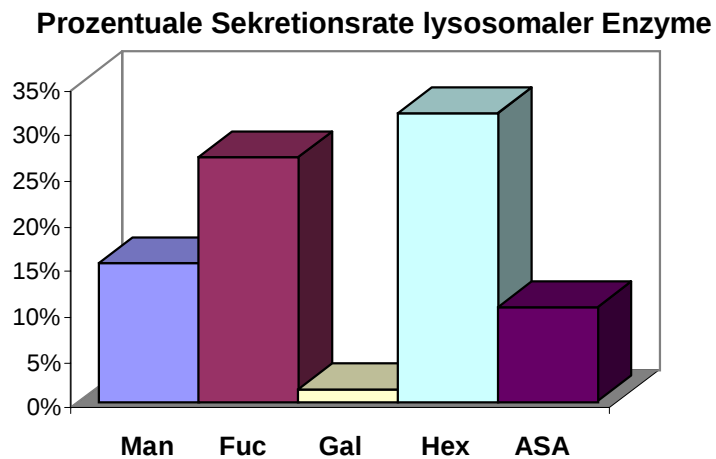


Abb.4: Sekretion lysosomaler Enzyme durch humane Makrophagen

Die sezernierten Mengen an verschiedenen lysosomalen Enzymen, ausgedrückt als mU/mg Zellprotein in 24 h, wurden als prozentualer Anteil der Gesamtzymaktivität in Medium und Zellen berechnet und dargestellt.

4.2.2. Verteilung lysosomaler Enzyme nach Stimulation der Sekretion durch NH_4Cl und Zymosan

Frühere Arbeiten hatten gezeigt (Ohkuma & Poole, 1978; Braulke et al., 1987 b), daß die Inkubation kultivierter Zellen mit Ammoniumchlorid zu einer Hypersekretion von lysosomalen Enzymen führt, da NH_4Cl als schwache Base wirkt und intrazelluläre, saure Kompartimente (TGN, Endosomen und Lysosomen) neutralisiert. Als Folge wird der Transport neusynthetisierter lysosomaler Enzyme gehemmt (fehlende Dissoziation der Enzyme vom Mannose-6-Phosphat-Rezeptor im Endosom mit der Folge, daß intrazellulär keine freien Rezeptoren mehr zur Verfügung stehen).

Wenn Makrophagen, die für 8 Tage in Kultur waren, für 24 h mit 5 mM, 10 mM oder 30 mM NH_4Cl inkubiert wurden, war eine konzentrationsabhängige Steigerung der Sekretion nachweisbar (Abb.5), die ca. 1,5-2-fach über der basalen Sekretion der α -Fucosidase und ca. 2-2,7-fach über der basalen Sekretion der β -Hexosaminidase lag (Abb.5). Die Sekretion der ASA wurde bereits bei Zusatz von 5 mM NH_4Cl maximal um 13 % gegenüber der Basalsekretion gesteigert.

Außerdem zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen der basalen und stimulierten Sekretion lysosomaler Enzyme in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer (4.2.3.).

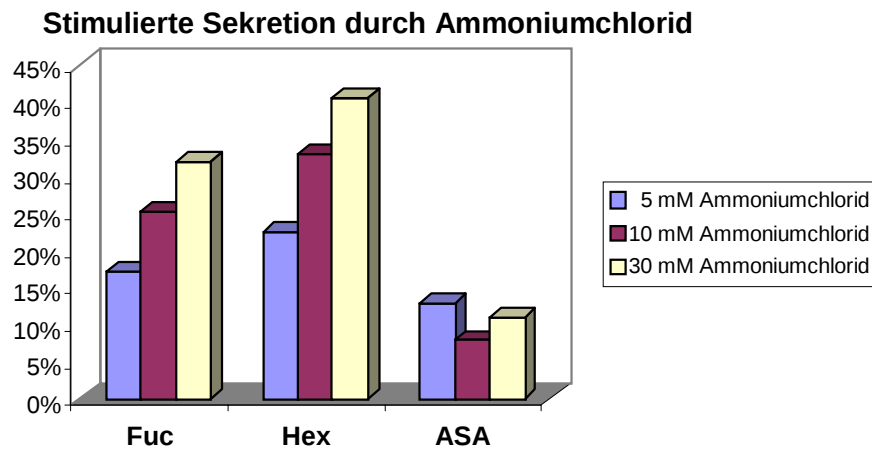


Abb. 5.: Effekt der NH_4Cl -Konzentration auf die Sekretionsrate lysosomaler Enzyme

Makrophagen, die für 8 Tage kultiviert waren, wurden für 24 h in An- und Abwesenheit der angegebenen NH_4Cl -Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der α -Fucosidase, β -Hexosaminidase und Arylsulfatase A im Medium bestimmt und als prozentualer Anteil der Gesamtaktivität (Zellen und Medium) über der basalen Stimulation ausgedrückt. Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes.

Zymosan ist ein Polysaccharid, das aus der Zellwand von *Saccharomyces cerevisiae* gewonnen wird und die Freisetzung sowohl von reifen als auch von Precursor-Formen lysosomaler Enzyme stimuliert (Imort et al. 1983).

Auch durch Zymosan konnte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Enzymsekretion gezeigt werden (Abb.6). Dafür wurden Makrophagen, die für 8 Tage in Kultur waren, für 24 h mit 12,5 und 50 μl Zymosan/ml Medium inkubiert. Es zeigte sich, daß für die α -Fucosidase eine ca. 1,3-1,5-fache, für die β -Hexosaminidase eine ca. 1,8-1,9-fache und für die ASA ca. 1,1-fache Steigerung der Enzymsekretion zu erreichen war.

Auch für eine Stimulation der Enzymsekretion durch Zymosan zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer (4.2.3.).

Um eine möglichst maximale Stimulation der Sekretion lysosomaler Enzyme zu erreichen wurden die nachfolgenden Experimente mit einer Endkonzentration von 30 mM NH_4Cl bzw. 50 μl Zymosan/ml Medium durchgeführt.

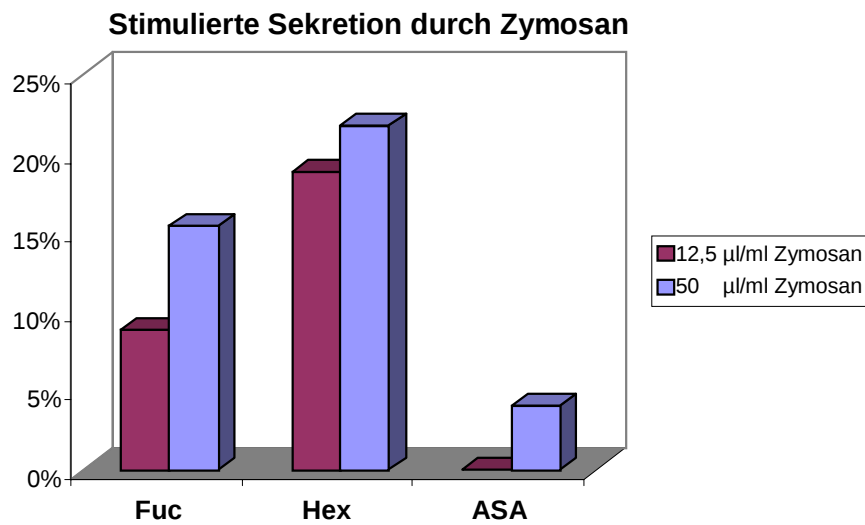


Abb.6: Effekt der Zymosan-Konzentration auf die Sekretion lysosomaler Enzyme

Makrophagen, die für 8 Tage kultiviert waren, wurden für 24 h in An- und Abwesenheit der angegebenen Konzentrationen von Zymosan inkubiert. Danach wurden die Enzymaktivitäten der α -Fucosidase, β -Hexosaminidase und ASA gemessen und als prozentualer Anteil über der basalen Sekretionsrate angegeben. Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experiments.

4.2.3. Abhängigkeit der basalen und stimulierten Enzymsekretion von der Kultivierungsdauer der Makrophagen.

Die obengenannten Versuche wurden mit Makrophagen durchgeführt, die für 8-14 Tage in Kultur waren. Um zu testen, welche Kulturdauer mindestens notwendig ist, um eine ausreichende basale und stimulierte Enzymsekretion zu erreichen bzw. ob die Sekretion lysosomaler Enzyme mit zunehmender Kulturdauer wieder abnimmt, wurden die Sekretionsraten lysosomaler Enzyme durch Makrophagen nach einer Kultivierungsdauer von 7-14 Tagen gemessen (Tab.2).

Tab.2: Effekte der Kultivierungsdauer auf die basale und stimulierte Sekretion lysosomaler Enzyme durch Makrophagen

Sekretionsrate [mU/mg Zellprotein/24 h]						
Kulturdauer [Tage]	7	8	9	10	12	14
Fucosidase						
basal	0,3	2,3	2,4	1,6	4,7	9,8
+NH ₄ Cl	1,1	4,1	5,1	3,9	5,4	32,1
+Zymosan	0,4	2,6	3,1	2,6	11,6	39,5
Hexosa-minidase						
basal	14,4	12,1	23,8	25,3	24,6	24,4
+NH ₄ Cl	36,5	41,6	49,1	47,2	51,1	29,9
+Zymosan	26,7	27,8	19,4	41,7	76,1	23,2
ASA						
basal	0,4	1,0	0,6	0,4	0,5	0,2
+NH ₄ Cl	0,7	1,0	0,2	0,7	0,7	0,6
+Zymosan	0,6	0,7	0,0	0,7	0,9	1,1

Unter Berücksichtigung der Gesamtenzymaktivität lassen sich hieraus die prozentualen Sekretionsraten im zeitlichen Verlauf graphisch darstellen (Abb.7a-c).

Danach war die basale α -Fucosidase Sekretion bei einer Kulturdauer von 12 Tagen am höchsten, und ließ sich am Anfang (8.Tag) und am Ende (14.Tag) des Beobachtungszeitraumes deutlich durch NH₄Cl und Zymosan stimulieren.

Die relative basale β -Hexosaminidase Sekretion blieb über den Kultivierungszeitraum etwa gleich. Die stimulierende Wirkung von NH₄Cl und Zymosan auf die relative Sekretionsrate der β -Hexosaminidase war, mit geringen Abweichungen an Tag 8 und 9, über den Untersuchungszeitraum deutlich erkennbar, wobei sich ein Maximum am 8. Kultivierungstag der Makrophagen fand. Für die Arylsulfatase A hingegen zeigte sich eine deutliche Abnahme der basalen und stimulierten Enzymsekretion ab einer Kultivierungsdauer von 10 Tagen. Für nachfolgende Experimente zur Bestimmung lysosomaler Enzyme wurden deshalb Makrophagen mit einer Kultivierungsdauer zwischen 8 und 10 Tagen gewählt.

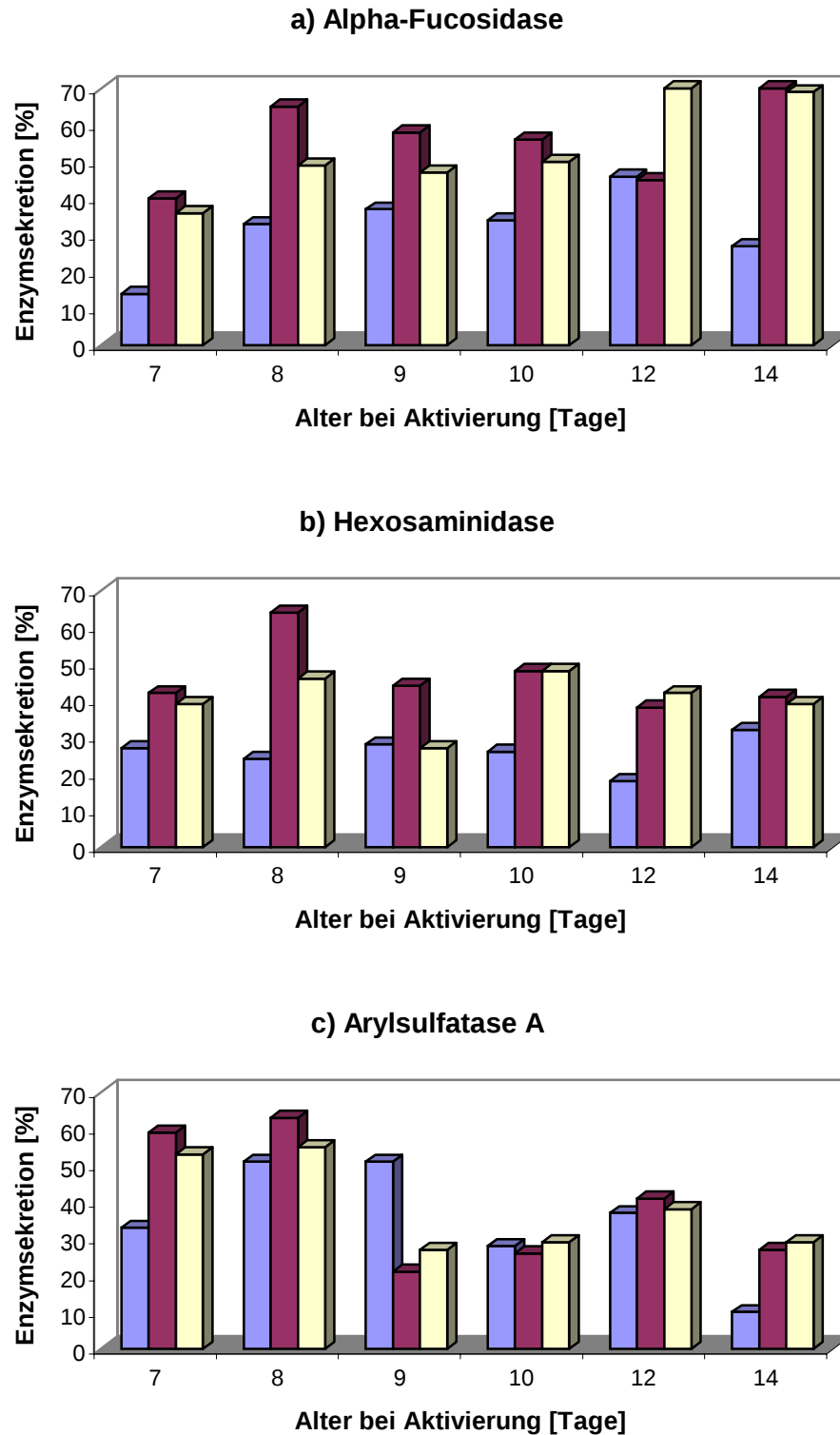


Abb.7a-c: Relative basale und stimulierte Sekretion lysosomaler Enzyme durch Makrophagen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer

Makrophagen, die für 7-14 Tage kultiviert waren, wurden 24 h ohne Zusatz (■) oder in Anwesenheit von 30 mM Ammoniumchlorid (■) und 50 µl Zymosan/ml Medium (■) inkubiert und die Aktivitäten der α -Fucosidase, β -Hexosaminidase und ASA in Medium und Zellextrakten bestimmt. Der Anteil des in das Medium sezernierten Enzyms wurde in Bezug zur Gesamtaktivität (Medium und Zellen) als prozentuale Sekretion angegeben.

4.2.4. Nachweis von ASA in Medien von humanen Makrophagen durch Western-Blot-Analyse

Neben den enzymatischen Bestimmungen lysosomaler Enzyme wurde der Gehalt der Arylsulfatase A in Medien von Makrophagen, die 14 Tage in Kultur waren und für 24 h in An- und Abwesenheit von 30 mM Ammoniumchlorid bzw. 50 µl/ml Zymosan (Endkonzentration 2,5 mg/ml Medium) inkubiert wurden, durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen (Abb.8). Der Western-Blot bestätigt die Enzymaktivitätsbestimmungen (4.2.2.) und zeigt ein ähnliches Signal in den Medien stimulierter Zellen im Vergleich zu Kontrollmedien.

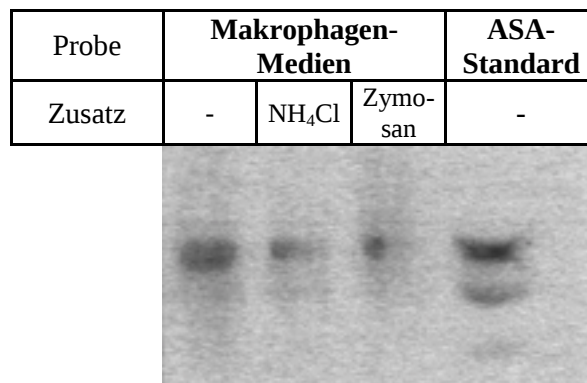


Abb.8: Western-Blot-Analyse von Makrophagenmedien

Medien von Makrophagen, die für 14 Tage in Kultur waren und für weitere 24 h in An- und Abwesenheit von Ammoniumchlorid (30 mM) und Zymosan (50 µl/ml) inkubiert wurden, dienten der Bestimmung des Arylsulfatase A-Gehaltes durch Western-Blot. Als ASA-Standard diente rekombinante humane ASA.

4.2.5. Nachweis neusynthetisierter ASA in Medien von Makrophagen

Makrophagen, die für 9 Tage in Kultur waren, wurden für weitere 24 h mit [³⁵S]-Methionin-haltigem Medium in An- und Abwesenheit von 30 mM NH₄Cl inkubiert. Das Medium wurde von den Zellen abgenommen, dialysiert und anschließend für die Immunopräzipitation der ASA verwendet (Abb.9). Nur aus den Medien nach NH₄Cl-Stimulation war radioaktiv markierte ASA präzipitierbar und nachweisbar.

Diese Daten lassen vermuten, daß die Diskrepanz zwischen der Enzymaktivitätsbestimmung und den Western-Blots, die keine großen Unterschiede zwischen dialysierten und Kontrollmedien hinsichtlich des ASA-Proteins aufwiesen, auf Sekretion neusynthetisierter lysosomaler ASA zurückzuführen ist, deren Anteil an der Gesamtmenge sezernierter ASA aber äußerst gering ist.

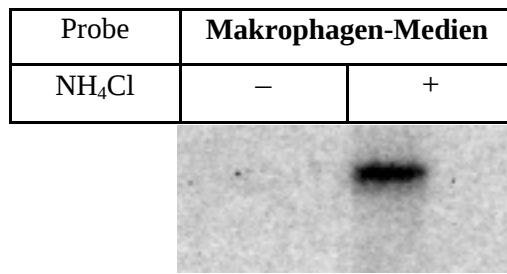


Abb.9: Sekretion neusynthetisierter ASA durch humane Makrophagen

Makrophagen, die für 9 Tage in Kultur waren, wurden nach metabolischer Markierung mit [³⁵S]-Methionin in An- und Abwesenheit von 30 mM Ammoniumchlorid und nach Dialyse zur Immunopräzipitation der ASA verwendet. Nach SDS-PAGE wurde die radioaktive ASA durch Fluorographie sichtbar gemacht.

4.2.6. Aufnahme von [³⁵S]-ASA in humane Fibroblasten aus Medien NH₄Cl-stimulierter Makrophagen

Um zu erfahren, ob Unterschiede in der Aufnahmekapazität von [³⁵S]-ASA in humane Fibroblasten in Abhängigkeit von der Dauer der Kultivierung der Makrophagen bestehen und ob Makrophagenmedien zur Enzymendozytose geeignet sind, wurden Medien von Makrophagen verwendet, die für 9 und 20 Tage in Kultur waren. Nach metabolischer Markierung mit [³⁵S]-Methionin in An- und Abwesenheit von Ammoniumchlorid wurden die anschließend dialysierten Medien als Quelle von Enzymen eingesetzt, deren Aufnahme bestimmt werden sollte. Die Endozytose erfolgte für eine Inkubationsdauer von 27 h, an die sich die Immunpräzipitation der ASA anschloß. Aus den Zellextrakten konnte die erwartete 62 kDa ASA-Form nicht präzipitiert werden (Abb.10), dagegen aber eine schwache Bande von etwa 47 kDa (→). Die 47 kDa-Bande war auch aus den Medien präzipitierbar.

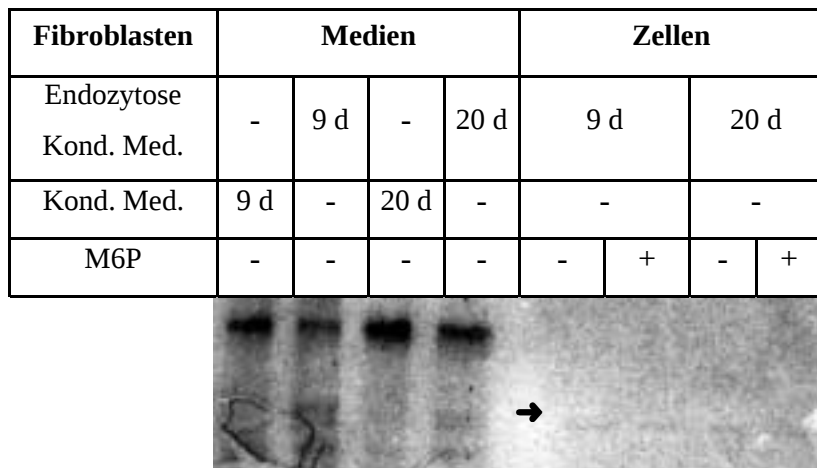


Abb.10: Aufnahme von ASA aus Medien von Makrophagen in humane Fibroblasten in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer der Makrophagen

[³⁵S]-markierte, dialysierte Medien von Makrophagen (nach Stimulation durch NH₄Cl), die für 9 und 20 Tage in Kultur waren, wurden als Quelle von Enzymen eingesetzt (konditioniertes Medium), deren Aufnahme bestimmt werden sollte. Nach 27-stündiger Inkubation in An- und Abwesenheit von M6P wurde die ASA aus Zellextrakten und Medien immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE und Fluorographie sichtbar gemacht.

4.2.7. Mannose-6-Phosphat abhängige Aufnahme von Proteinen in Fibroblasten

Um eine Aussage über die Spezifität gegenüber der Aufnahme der von Makrophagen sezernierten Proteine in Fibroblasten zu erhalten, wurden durch NH₄Cl-Stimulation gewonnene Makrophagen-Medien dialysiert, lyophilisiert und anschließend jodiert. Dies sollte eine schnelle Zuordnung der M6P-abhängig aufgenommenen Proteine ermöglichen und zum Verschwinden entsprechender Proteinbanden bzw. der Vorläuferformen aus den Medien führen. Unklarerweise war die Jodierung dieser Makrophagensekrete auch nach Dialyse und Gelfiltration in 3 verschiedenen Ansätzen nicht möglich.

4.2.8. Kinetik der Endozytose [¹²⁵J]-markierter ASA durch Makrophagen

Um einen schnellen, empfindlichen und spezifischen Nachweis über die Aufnahme eines lysosomalen Enzyms in Zellen unter verschiedenen Bedingungen führen zu können, wurde rekombinante, gereinigte humane ASA jodiert und den Zellen im Medium für verschiedene Zeiträume (2-6 h) angeboten. Die Zellen wurden nach der Inkubation solubilisiert und die aufgenommene ASA durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert und dargestellt. Parallel wurden Zellen einer nicht radioaktiven Kontrollinkubation zur Bestimmung der Zellzahl bzw. des Proteingehaltes aufgearbeitet.

Die ASA-Endozytose in Makrophagen, die für 5 Wochen in Kultur waren, wurde in Abhängigkeit von einer Inkubationszeit zwischen 2 und 6 h untersucht. Die densitometrische Auswertung der Autoradiogramme zeigte eine annähernd lineare Zunahme des aufgenommenen Enzyms mit zunehmender Inkubationszeit (Abb.11): Nach einer Inkubationszeit von 4 h kam es zur Aufnahme der 2,2-fachen, nach 6 h der 3-fachen Enzymmenge gegenüber der Aufnahme nach 2 h. Die Aufnahme der ASA war bis zu 6 h zu 95-97,5 % durch Mannose-6-Phosphat (M6P) hemmbar.

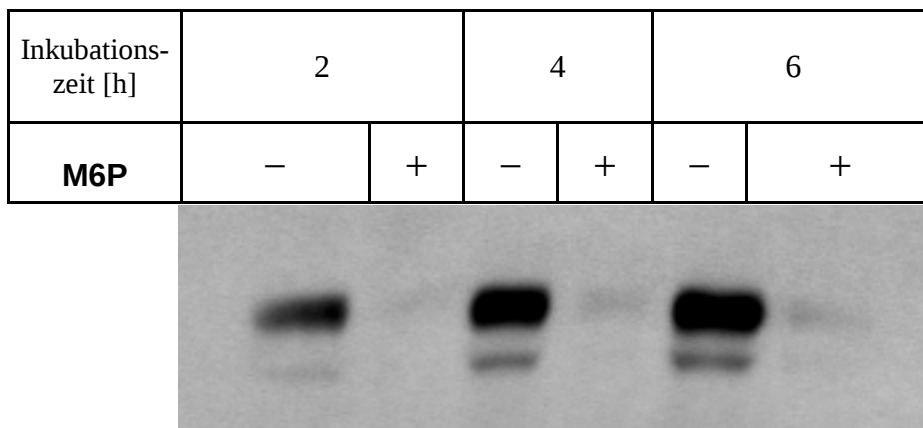


Abb.11: ASA-Aufnahme in Makrophagen

Fünf Wochen alte Makrophagen wurden für 2, 4 und 6 h in An- und Abwesenheit von 10 mM M6P mit [¹²⁵J]-markierter ASA inkubiert. Die Zellen wurden anschließend solubilisiert und die aufgenommene ASA durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert und dargestellt.

4.2.9. Kinetik der Endozytose [125 J]-markierter ASA in Glia C6-Zellen und neuronale SY5Y-Zellen

Die ASA-Aufnahme in Glia C6-Zellen wurde für eine Inkubationsdauer von 2-6 h, in neuronale Zellen für eine Inkubationsdauer von 4 h in An- und Abwesenheit von M6P untersucht. Es zeigte sich für beide Zellarten eine nahezu komplette Hemmbarkeit der Endozytose durch M6P (Abb.12). Nach densitometrischer Quantifizierung der ASA-Bande zeigte sich interessanterweise für die Glia C6-Zellen, nach einer geringfügigen Zunahme der endozytierten ASA zwischen 2 und 4 h Inkubationszeit (4 %), daß nach einer Inkubationszeit von 6 h 15 % weniger [125 J]-ASA als nach 2 h intrazellulär nachweisbar war (Abb.12). Dies ist am ehesten auf einen intrazellulären Enzymabbau zurückzuführen. Im Vergleich nahmen die Glia C6-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 h deutlich mehr ASA (42 %) auf als neuronale SY5Y-Zellen.

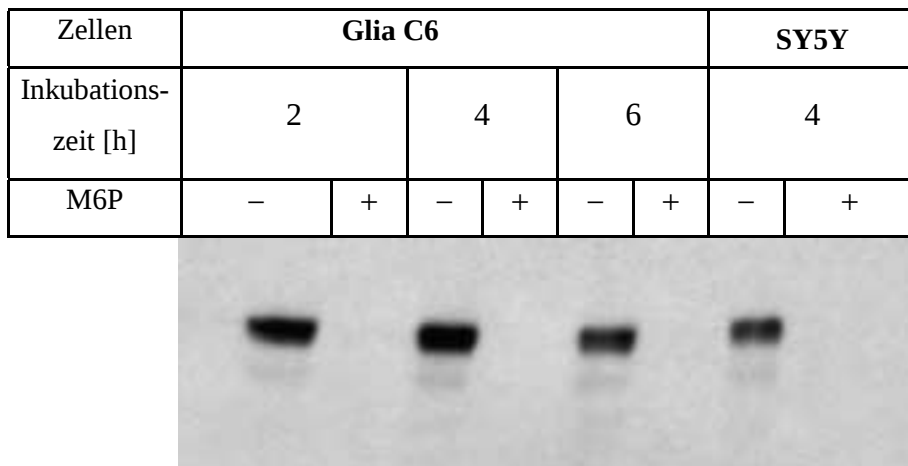


Abb.12: ASA-Aufnahme in Glia C6- und neuronale SY5Y-Zellen

Glia C6-Zellen wurden für 2, 4 und 6 h und neuronale SY5Y-Zellen für 4 h in An- und Abwesenheit von 10 mM M6P mit [125 J]-markierter ASA inkubiert. Die Zellen wurden anschließend solubilisiert und die aufgenommene ASA durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert und dargestellt.

4.2.10. Nachweis des Abbaus endozytierter [^{125}J]-markierter ASA in Glia C6 und neuronalen SY5Y-Zellen

Um zu bestimmen, ob die endozytierte [^{125}J]-ASA in Glia C6-Zellen abgebaut wird, wurden die Zellen in 5 parallelen Ansätzen zunächst für 2 h mit [^{125}J]-ASA bei 37°C inkubiert (Pulse). Die Zellen einer Kulturschale wurden anschließend direkt aufgearbeitet (t=0), während andere Schalen nach Entfernen des radioaktiven Mediums für 2-22 h in frischem, nicht radioaktivem Medium weiter inkubiert wurden (Chase). Die densitometrische Quantifizierung der ASA-Banden ergab für die Glia C6-Zellen, daß bereits nach 2 h Chase die Menge der [^{125}J]-ASA um 39 % und nach 22 h um 83 % der ASA-Menge zum Zeitpunkt t=0 abgenommen hatte (Abb.13). Auch für die neuronalen SY5Y-Zellen zeigte sich eine deutliche Verminderung des intrazellulären Enzymgehaltes um 96 % nach einem Chase von 22 h.

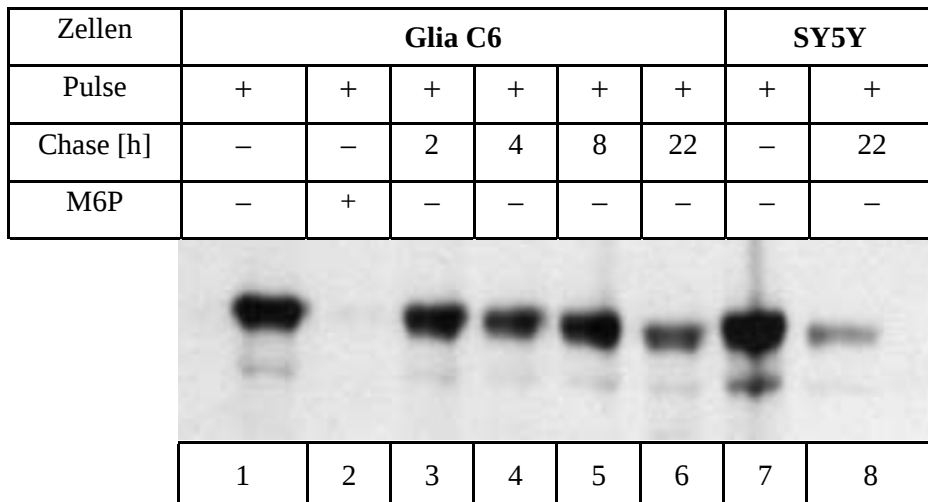


Abb.13: Nachweis des Abbaus endozytierter ASA in Glia C6- und neuronalen SY5Y-Zellen

Glia C6- (Bahn 1-6) und Neuroblastoma SY5Y-Zellen (Bahn 7 und 8) wurden für 2 h bei 37° C mit [^{125}J]-ASA in An- und Abwesenheit von 10 mM M6P (Bahn 2) inkubiert. Danach wurde ein Teil der Zellen direkt abgeerntet (Bahn 1 und 7) oder für die angegebenen Zeiten mit frischem, nicht radioaktivem Medium inkubiert. Die Zellen wurden anschließend solubilisiert und durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert und dargestellt.

4.2.11. Nachweis des Abbaus und der intrazellulären Lokalisation von [125 J]-ASA in Glia C6-Zellen

Um zu unterscheiden, ob es sich bei der ASA, die nach 2-6 h Inkubation bei 37° C darstellbar war (Abb.11-13), um intrazelluläre oder zelloberflächengebundene ASA handelt, wurden Zellen nach 2 h Inkubation mit [125 J]-ASA bei 37° C auf 4° C abgekühlt, kalt gewaschen und anschließend für 2 x 10 min mit 5 mM M6P bei 4° C inkubiert. Oberflächengebundene ASA wird nach dieser Prozedur abgelöst, wobei intrazelluläre ASA die gleiche Bandenintensität nach SDS-PAGE und Autoradiographie aufweisen sollte wie die sofort abgeerntete Kontrolle (Abb.14).

Ein anderer Teil der Zellen wurde nach einer Inkubationsdauer von 2 h mit [125 J]-ASA (Pulse) für weitere 22 h mit frischem, nicht radioaktivem Medium in An- und Abwesenheit von Proteaseinhibitoren inkubiert (Chase). Nach densitometrischer Quantifizierung zeigte sich, eine annähernd gleiche Bandenintensität der nach ASA-Endozytose bei 4° C mit M6P inkubierten Probe, wie bei der entsprechenden Kontrolle (Bahn 3 vs Bahn 1). Die Endozytose war fast vollständig durch M6P hemmbar (Bahn 2). Nach einem Chase von 22 h fand sich eine Minderung der intrazellulär nachweisbaren Enzym-Menge um 7 % (Bahn 4), sowie in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren um 16 % (Bahn 5).

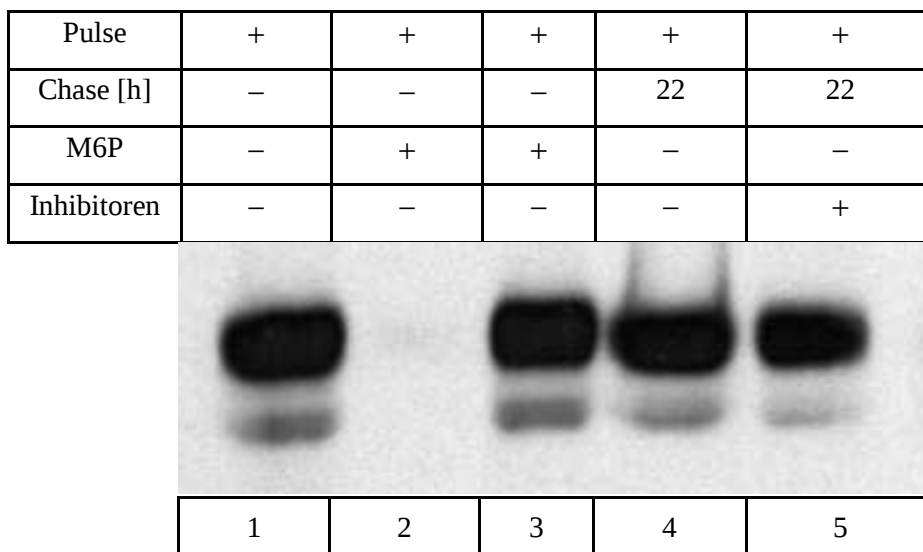


Abb.14: Pulse-Chase-Experiment zur Bestimmung der intrazellulären Stabilität endozytierter ASA

Glia C6-Zellen wurden für 2 h bei 37° C mit [125 J]-ASA in An- und Abwesenheit von 10 mM M6P (Bahn 2) inkubiert. Danach wurden die Zellen auf einem Teil der Platten direkt abgeerntet (Bahn 1 und 2), ein anderer Teil 2 x 10 min mit 5 mM M6P auf Eis inkubiert (Bahn 3) und ein dritter Teil für weitere 22 h mit frischem, nicht radioaktivem Medium in An- und Abwesenheit von Proteaseinhibitoren (Bahn 4 und 5) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen solubilisiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert und dargestellt.

4.2.12. Kinetik der Endozytose [125 J]-markierter ASA in gemischte Cortexkulturen

Die ASA-Aufnahme in gemischte Cortexkulturen aus Rattenhirnen, die am 18. Embryonaltag präpariert und anschließend für einen Zeitraum von 3 oder 6 Tagen kultiviert wurden, wurde in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bestimmt (Abb.15). Die Aufnahme war bis zu 6 h unter beiden Kulturbedingungen nahezu komplett durch M6P hemmbar. Es zeigte sich außerdem für die nur 3 Tage kultivierten Zellen eine nur geringe Zunahme der Enzymendozytose mit der Zeit. Nach einer Inkubationsdauer von 6 h lagen die Mengen nachweisbarer ASA nur 1,8-fach über dem Wert nach 2 h Endozytose. Die Aufnahme der ASA in 6 Tage kultivierte Zellen zeigte dagegen 3-fach höhere ASA-Mengen nach 6 h Endozytose gegenüber 2 h Endozytose. Bezogen auf die Proteinmengen ergibt sich, daß die für 6 Tage in Kultur gehaltenen Zellen nach einer Endozytosedauer von 2 h 20 % weniger Enzym aufgenommen haben als die 3 Tage kultivierten Zellen, nach einer Endozytosezeit von 6 h allerdings zeigten die 6 Tage kultivierten Zellen eine um 36 % höhere ASA-Aufnahme.

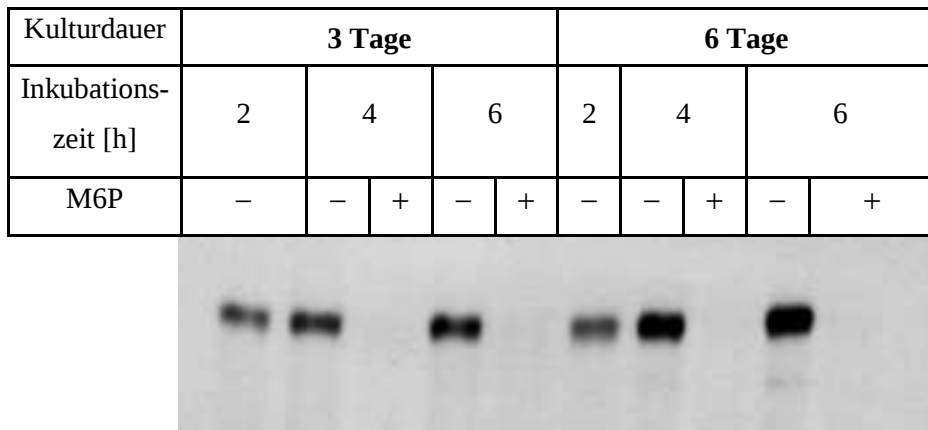


Abb.15: ASA-Aufnahme in gemischte Cortexkulturen aus Rattenhirnen

Gemischte Cortexzellen, die für 3 und 6 Tage in Kultur waren, wurden für 2, 4 und 6 h in An- und Abwesenheit von 10 mM M6P mit [125 J]-ASA inkubiert. Die Zellen wurden anschließend solubilisiert und die aufgenommene ASA durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert und dargestellt.

4.2.13. Kinetik der Endozytose [125 J]-markierter ASA in Wildtyp- und ASA-defiziente Mausfibroblasten

Um den möglichen Einfluß endogener ASA auf die Endozytose der [125 J]-ASA in den verwendeten Zelllinien oder primären humanen und Rattenzellen auszuschließen, wurden aus Wildtyp und ASA-defizienten Mäusen Fibroblasten der Haut präpariert, kultiviert und die ASA-Endozytose in Abhängigkeit von der Inkubationszeit sowie in An- und Abwesenheit von M6P und konditionierten Makrophagensekreten analysiert und dargestellt (Abb.16). Insgesamt ist die ASA-Aufnahme in ASA-defiziente Fibroblasten 1,5-fach geringer als in Wildtypfibroblasten. Bei beiden Zelltypen wurde die Aufnahme zu 75-89 % durch M6P gehemmt. Eine Inkubation in Anwesenheit von konditionierten Makrophagensekreten (Makrophagen nach 4 Wochen Kultivierung; 24 h Konditionierung +/- NH_4Cl) führte zu einer Verminderung der [125 J]-ASA-Aufnahme um ca. 40 %.

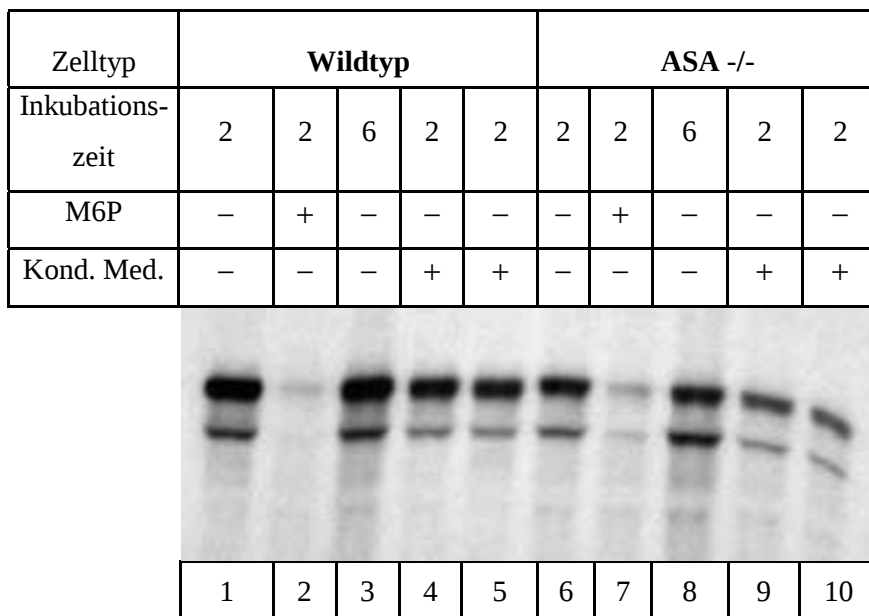


Abb.16: ASA-Aufnahme in Wildtyp und ASA-defiziente Mausfibroblasten

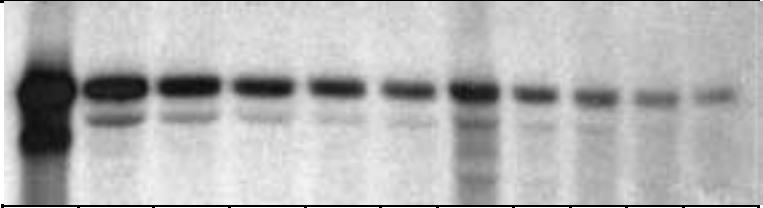
Wildtyp (Bahn 1-5) und ASA-defiziente (Bahn 6-10) Mausfibroblasten wurden für 2 und 6 h in An- und Abwesenheit von 10 mM M6P (Bahn 2 und 7) und konditionierten Makrophagensekreten (kond. Med.) mit (Bahn 5 und 10) und ohne (Bahn 4 und 9) NH_4Cl -Stimulation bei 37° C mit [125 J]-ASA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen solubilisiert und die ASA durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert und dargestellt.

4.2.14. Hemmung der [¹²⁵J]-ASA-Aufnahme durch Sekrete NH₄Cl-stimulierter Makrophagen

Um herauszufinden, ob die Aufnahme von [¹²⁵J]-ASA durch die Anwesenheit von dialysierten Sekreten NH₄Cl-stimulierter Makrophagen (30 mM), die 1,75 mU/ml/24 h ASA bzw. 16,2 mU/ml/24 h β-Hexosaminidase enthalten, gesenkt wird, wurden Wildtyp und ASA-defiziente Mausfibroblasten mit ansteigenden Mengen NH₄Cl-stimulierter Makrophagensekrete für 2 h bei 37° C mit [¹²⁵J]-ASA inkubiert (Abb.17).

Insgesamt nahmen die ASA-defizienten Fibroblasten 3,3-fach weniger Enzym auf (siehe auch 4.2.13.), als die Wildtypzellen (vergleiche Bahn 2 und 7 bzw. 3 und 8). Die aufgenommene ASA-Menge war in beiden Zelltypen direkt von der angebotenen Enzymmenge abhängig: die Verdoppelung der Menge von ASA im Medium (60 bzw. 120 µl Zusatz pro Platte) führte zu 2-fach höherer ASA-Ausbeute in den Zellen. Bei einer durchschnittlichen spezifischen Radioaktivität der ASA von 23 µCi/µg ASA wurden den Zellen ca. 2,6 ng [¹²⁵J]-ASA (in 60 µl) angeboten. Durch Zugabe NH₄Cl-stimulierter Makrophagensekrete (1,74 mU ASA/ml, d.h. 17,4 ng ASA/ml) war eine Hemmung der Endozytose bis zu maximal 51 % (bei Zusatz von 2 ml konditioniertem Medium) zu erreichen. Unterschiede zwischen Wildtyp und ASA-defizienten Zellen waren hinsichtlich der Hemmung nicht signifikant.

Zelltyp	Med	Wildtyp					ASA -/-				
[¹²⁵ J]-ASA [µl]	60	120	60	60	60	60	120	60	60	60	60
Kond. Med. [ml]	-	-	-	½	1	2	-	-	½	1	2



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
% Inhibition	-	-	-	23	40	51	-	-	-	23	28

Abb.17: Hemmung der ASA-Endozytose durch NH₄Cl-stimulierte Makrophagensekrete

ASA-defiziente (Bahn 7-11) und Wildtypfibroblasten (Bahn 2-6) wurden für 2 h mit den angegebenen Mengen von [¹²⁵J]-ASA (162.000 cpm/60 µl) und NH₄Cl-stimulierten Makrophagensekreten (1,74 mU ASA/ml bzw. 16,2 mU β-Hexosaminidase/ml) bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen solubilisiert und die ASA durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert und dargestellt. In Bahn 1 ist die den Zellen angebotene, immunpräzipitierte [¹²⁵J]-ASA dargestellt.

4.2.15. Cokultur ASA-defizienter Mäuse-Astroglia mit humanen Makrophagen

Um zu testen, ob von humanen Makrophagen sezernierte, [³⁵S]-markierte Arylsulfatase A von ASA-defizienter Mäuse-Astroglia aufgenommen wird, wurden auf Zellkulturschalen wachsende Makrophagen (14 d Kultivierungszeit) mit auf Filtern wachsenden Mäuse-Astrogliazellen für 24 h in Anwesenheit von [³⁵S]-Methionin (40 µCi/ml) kokultiviert (Abb.17). Die immortalisierte Astroglia kultur wurde durch SV 40 large-T-antigen Transformation ASA-defizienter Maus-Astroglia gewonnen (U. Matzner, Universität Bonn). Anschließend wurde die ASA durch ein für humane ASA spezifisches Antiserum präzipitiert und durch Phosphorimaging sichtbar gemacht. Es zeigte sich, daß ASA aus kokultivierten Makrophagen (Bahn 7 und 8) zwar in das Medium sezerniert wurde (Bahn 1 und 2), aber nicht in den ASA -/- Astrogliazellen (Bahn 4 und 5) nachweisbar war. Die in kokultivierten ASA -/- Gliazellen nachweisbaren Banden (*) stellen unspezifische Präzipitate dar, was sich durch Vergleich mit separat kultivierten Astrogliazellen (Bahn 3 und 6) zeigte, die exakt dieselben Banden aufwiesen.

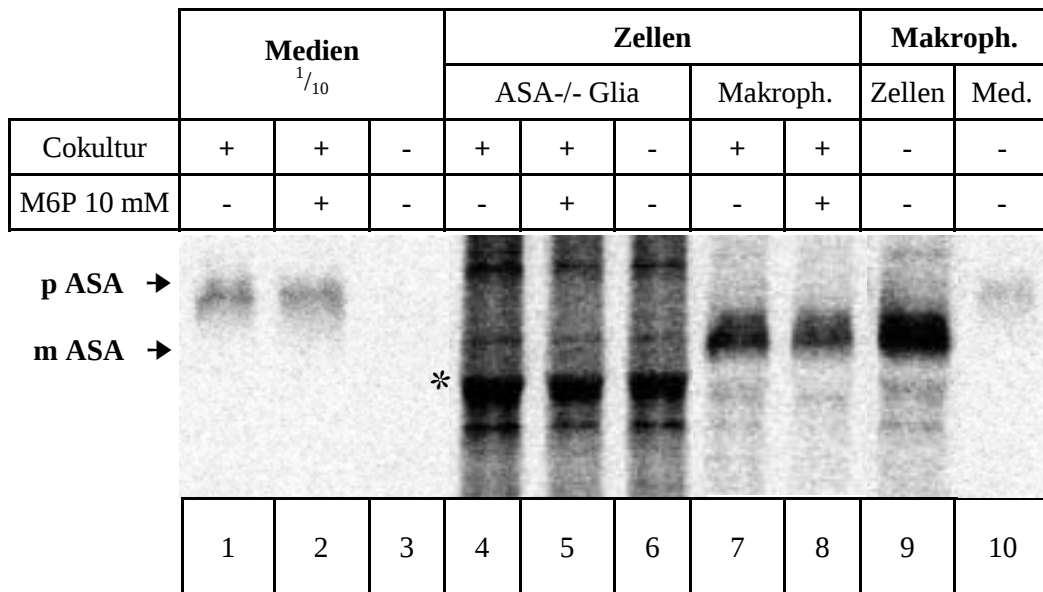


Abb.18: Cokultur humaner Makrophagen mit ASA-defizienter Mäuse-Astroglia

Humane Makrophagen und ASA-defiziente Maus-Astroglia wurden für 24 h mit [³⁵S]-Methionin und in An- und Abwesenheit von 10 mM M6P kokultiviert. Die humane ASA wurde anschließend aus Zellextrakten der Glia (Bahn 4 und 5) und der entsprechenden Makrophagen (Bahn 7 und 8) sowie aus jeweils ^{1/10} der Medien (Bahn 1 und 2) immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE durch Phosphorimaging sichtbar gemacht.

Als Kontrolle wurden unter gleichen Bedingungen entweder Gliazellen (Bahn 3 und 6) oder Makrophagen (Bahn 9 und 10) allein markiert und kultiviert. (p ASA: 62 kDa Precursor; m ASA: 54-57 kDa reife Form)

4.2.16. Cokultur ASA-überexprimierender BHK-Zellen mit ASA -/- Astroglia

Um sicherzustellen, daß die in den Vorexperimenten festgestellte fehlende Endozytose von ASA aus Sekreten humaner Makrophagen auf ein zu geringes Enzymangebot oder eine mangelnde Phosphorylierung der sezernierten humanen ASA zurückzuführen ist, wurde in einem nächsten Schritt eine Cokultur von ASA-überexprimierenden BHK-Zellen, von denen bekannt ist, daß sie M6P-haltige ASA sezernieren, mit ASA-defizienter Astroglia für 24 h durchgeführt (Abb.18). Hier zeigte sich, daß die durch ASA-überexprimierende Zellen (Bahn 7 und 8) sezernierte ASA (Bahn 1 und 2) nicht in ASA -/- Astrogliazellen (Bahn 4 und 5) nachgewiesen werden konnte.

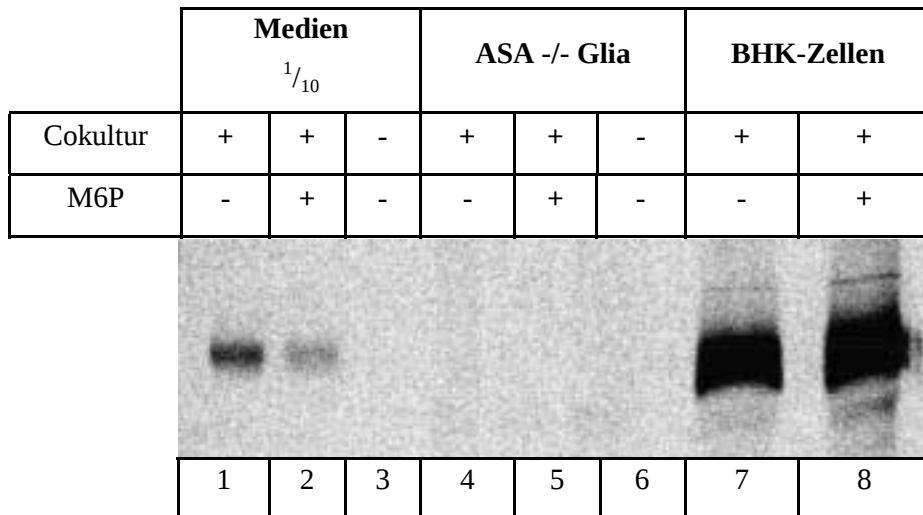


Abb.19: Cokultur ASA-überexprimierender BHK-Zellen mit ASA-/- Astroglia

Auf Zellkulturschalen wachsende ASA-überexprimierende BHK-Zellen (Bahn 7 und 8) wurden mit [^{35}S]-Methionin markiert und für 24 h mit auf Filtern wachsenden ASA -/- Astrogliazellen (Bahn 4 und 5) in An- und Abwesenheit von 10 mM M6P kokultiviert. Zum Vergleich wurde ASA -/- Astrogliazellen allein kultiviert (Bahn 3 und 6). Anschließend wurde die [^{35}S]-markierte humane ASA aus Zellextrakten und $\frac{1}{10}$ der Medien immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE durch Phosphorimaging sichtbar gemacht.

4.2.17. Phosphorylierung von sezernierten lysosomalen Enzymen aus Makrophagen

In einem vorläufigen, orientierenden Experiment wurden humane Makrophagen, die für 14 Tage kultiviert wurden, für 24 h in An- und Abwesenheit von NH_4Cl mit jeweils 0,8 mCi [^{32}P] ortho-Phosphat markiert. Anschließend wurden aus den Medien und Zellextrakten ASA und Cathepsin D immunpräzipitiert, die aber nicht [^{32}P]-markiert waren.

5. Diskussion

5.1. Charakterisierung humaner Makrophagen als Quelle sezernierter lysosomaler Enzyme

Der Transfer von lysosomalen Enzymen aus Makrophagen in Hirnzellen wurde als Ausgangspunkt gewählt, um geeignete Bedingungen für einen experimentellen Therapieansatz für lysosomale Speichererkrankungen mit Beteiligung des ZNS zu etablieren. Dazu wurde zunächst die Isolation humaner Makrophagen aus Buffy Coats mittels Ficoll-Dichtezentrifugation zur Abtrennung von Leukozyten und nachfolgender Elutriationszentrifugation nach Mason et al. (1985) zur Anreicherung der Makrophagen entsprechend der zur Verfügung stehenden Möglichkeiten modifiziert. Die Fraktionen mit dem höchsten Makrophagenanteil wurden mittels der für Makrophagen typischen Oberflächenmarker CD14 und CD45 durch FACScan-Analyse ermittelt. Aufgrund der Häufigkeit der Defizienz lysosomaler Enzyme und deren Meßbarkeit durch konventionelle Aktivitätstests, Verfügbarkeit von Antikörpern und rekombinanten Enzymen wurden sechs lysosomale Enzyme für die Vorversuche ausgewählt: β -Hexosaminidase, α -Fucosidase, α -Mannosidase, β -Galaktosidase, β -Glucosidase und Arylsulfatase A. Für diese sechs lysosomalen Enzyme wurde die basale Sekretionsrate bestimmt und getestet, ob eine Stimulation der Sekretion möglich war. Es zeigte sich, daß die β -Hexosaminidase und α -Fucosidase mit 32 und 27 % der Gesamtaktivität die höchsten basalen Sekretionsraten aufwiesen und auch für die Arylsulfatase A und α -Mannosidase noch Sekretionsraten zwischen 10 und 15 % zu finden waren. Die Sekretionsrate der β -Galaktosidase betrug dagegen nur 2 %. Im Vergleich hierzu betrug die basale Enzymsekretionsrate für Mäusemakrophagen zwischen 5 (β -Galaktosidase) und 10 % (β -Glucuronidase) und für U937 Zellen bis zu 15 % an neusynthetisiertem Cathepsin D (Brown et al., 1985; Braulke et al., 1987 b). Nach diesen Ergebnissen wurden in die nachfolgenden Experimente nur noch β -Hexosaminidase, α -Fucosidase und Arylsulfatase A einbezogen.

Die oben genannten Experimente zur Bestimmung der Basalsekretionsraten wurden mit Makrophagen, die für 14 Tage kultiviert wurden, durchgeführt. Um zu testen, ob die basale und stimulierte Sekretion lysosomaler Enzyme sich mit der Kultivierungsdauer ändert, wurden lysosomale Enzymaktivitäten täglich nach 7-10 sowie 12 und 14 Tagen Kultivierung der Makrophagen bestimmt. Es ließ sich jedoch kein optimaler Zeitpunkt ermitteln an dem alle untersuchten Enzyme maximale Sekretionsraten aufwiesen. So war die α -Fucosidase-Sekretion am 12. Kulturtag maximal, während die Sekretionsrate für die Arylsulfatase A nach einer Kultivierungsdauer von 8-9 Tagen am höchsten war und danach wieder deutlich abnahm. Ähnlich verhielt es sich mit der Stimulation der Sekretion durch NH_4Cl .

Um eine mögliche *in vivo* Aktivierung der Makrophagen imitieren zu können und deren Potential zur höchstmöglichen Sekretion endogener Enzyme zu ermitteln, erfolgten zusätzlich Untersuchungen zur Stimulierbarkeit der Sekretion lysosomaler Enzyme durch NH_4Cl und Zymosan. Schwache Basen, wie NH_4Cl , erhöhen den pH-Wert in sauren, intrazellulären

Kompartimenten wie TGN, Endosomen und Lysosomen. Die schwachen Basen diffundieren in ihrer nichtprotonierten Form durch Membranen und werden in sauren Organellen protoniert. Der Ausstrom der protonierten Basen aus diesen Organellen ist im Vergleich zum Einstrom der nichtprotonierten Formen stark erschwert. Die Aktivität der Protonenpumpe hält den Konzentrationsgradienten für die nichtprotonierten Basen aufrecht, so daß es neben der Erhöhung des pH-Wertes zu einer steigenden Akkumulation der Basen in diesen Organellen kommt. Diese Akkumulation wird von einer fortschreitenden Schwellung dieser Organellen aufgrund des osmotischen Einstroms von Wasser begleitet (Poole & Ohkuma, 1981). Aufgrund des pH-Anstiegs ist die pH-abhängige Dissoziation von Rezeptor-Ligand-Komplexen blockiert. Die Zahl freier, für Transportvorgänge nutzbarer Rezeptoren nimmt ab und ligandbeladene Rezeptoren akkumulieren. Dies hat zur Folge, daß kaum noch Rezeptoren für den Transport neusynthetisierter lysosomaler Enzyme zur Verfügung stehen und es somit zu einer Sekretion dieser Enzyme kommt (Gonzalez-Noriega et al., 1980; Braulke et al., 1987 b).

Es zeigte sich, daß auch die stimulierte Sekretion für die verschiedenen lysosomalen Enzyme Unterschiede aufwies, da sich die β -Hexosaminidase und α -Fucosidase durch NH_4Cl und Zymosan deutlich stimulieren ließen, wohingegen die Arylsulfatase A-Sekretion kaum stimulierbar war.

Pulse-Chase-Experimente mit [^{35}S]-markierten Makrophagen in An- und Abwesenheit von NH_4Cl und anschließender Immunpräzipitation von ASA aus den Medien zeigten, daß NH_4Cl zur Freisetzung lysosomaler Enzymvorstufen führt (Abb.9). Zymosan dagegen bewirkt zusätzlich eine Freisetzung reifer lysosomaler Enzyme aus den Lysosomen. Es wird angenommen, daß aufgrund erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen (1-5 μM) Lysosomen in verschiedenen Zelllinien der Exozytose und Fusion mit der Plasmamembran unterliegen (Rodriguez et al., 1997). Kürzlich wurde auch ein hochaffiner Ca^{2+} -Sensor, Synaptotagmin VII, in lysosomalen Membranen nachgewiesen, der die Ca^{2+} induzierte Exozytose von Lysosomen vermittelt (Martinez et al., 2000). Wie hoch genau der mögliche Anteil der freigesetzten lysosomalen Enzyme aus den Lysosomen humaner Makrophagen unter Zymosanbehandlung ist, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt.

Da lysosomale Enzyme in späten endosomalen Kompartimenten bzw. in den Lysosomen durch die M6Pase dephosphoryliert werden (Bresciani et al., 1992), stellt sich die Frage, ob auch diese reifen, dephosphorylierten lysosomalen Enzyme nach ihrer Sekretion aus den Lysosomen in Akzeptorzellen aufgenommen werden können, obwohl ihnen der M6P-Marker fehlt. Die Aufnahme von [^{125}J]-ASA in Wildtyp und ASA-defiziente Mausfibroblasten wird in Gegenwart von Medien stimulierter Makrophagen nur wenig inhibiert. Bei einem Angebot von Makrophagensekreten, die 1,74 mU ASA/ml bzw. 16,2 mU β -Hexosaminidase/ml enthalten, herrscht ein 13,4-facher Überschuß an ASA aus Makrophagensekreten gegenüber der [^{125}J]-ASA vor. Zusätzlich enthalten diese Makrophagensekrete noch weitere lysosomale Enzyme, die mit der [^{125}J]-ASA um eine Aufnahme durch den M6P-Rezeptor konkurrieren. Trotzdem wird die [^{125}J]-ASA Aufnahme nur zu

maximal 51 % gehemmt (Abb. 17). Dies läßt vermuten, daß der Großteil der lysosomalen Enzyme in NH_4Cl -stimulierten Sekreten von Makrophagen im dephosphorylierten Zustand vorliegt und somit die M6P-abhängige Aufnahme der [^{125}J]-ASA in Maus-Fibroblasten nicht hemmbar ist.

5.2. Nachweisverfahren für ausgewählte lysosomale Enzyme

Es wurden verschiedene Verfahren ausgewählt, um die Aufnahme lysosomaler Enzyme in verschiedene Zellsysteme nachzuweisen. Zuerst erfolgte der Nachweis über enzymatische Enzymaktivitätsbestimmungen, wobei aber Endozytosezeiten von mindestens 24 h notwendig waren, um einen relevanten Zuwachs der Enzymaktivitäten zu erhalten. Deshalb erfolgte als nächstes Verfahren eine metabolische Markierung von Makrophagen mit [^{35}S]-Methionin und Nutzung der markierten Sekrete als Quelle für lysosomale Enzyme zur Endozytose in Akzeptorzellen, aus denen nachfolgend die Immunpräzipitation einzelner Enzyme und ihre Darstellung über Fluorographie erfolgte. Hierbei zeigte sich, daß sehr lange Expositionszeiten notwendig waren um eine Endozytose nachweisen zu können und daher erschien auch diese Methode nicht für alle Versuchsansätze geeignet. Eine exogene Markierung von sezernierten Makrophagenproteinen mit [^{125}J] war nicht möglich, was auf (unbekannte) Quencheffekte zurückzuführen ist. Deshalb erfolgte der Endozytosenachweis schließlich über [^{125}J]-markierte ASA mit/ohne Immunpräzipitation und nachfolgender Autoradiographie, wobei bereits nach kurzen Endozytose- und Expositionszeiten eine Aufnahme nachgewiesen werden konnte.

5.3. Untersuchungen zur Rezeptor-vermittelten Endozytose von Arylsulfatase A in verschiedene Akzeptorzellen

Um die Fähigkeit verschiedener Zellen zur rezeptorvermittelten Aufnahme von ASA zu bestimmen, wurden Zellen mit rekombinanter, jodierter humaner ASA in An- und Abwesenheit von 10 mM M6P für verschiedene Zeiträume inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen solubilisiert und die aufgenommene ASA durch SDS-PAGE und Autoradiographie dargestellt und densitometrisch analysiert. Der Vergleich der ASA Banden aus Zellen, die direkt nach der Inkubation abgeerntet und solubilisiert wurden und solchen, die nach der Inkubation auf 4° C abgekühlt und mit M6P von an Zelloberflächen gebundener ASA befreit wurden, ergab keinen Unterschied (Abb.14). Das bedeutet, daß die dargestellte ASA intrazellulär lokalisiert ist.

In allen untersuchten Zellen (humane Fibroblasten, humane Makrophagen, Glia C6-Zellen, neuronale SY5Y-Zellen, gemischte Cortexkulturen aus Rattenhirnen, ASA -/- und Wiltyp-Mausfibroblasten) war die Aufnahme von ASA M6P-abhängig (Abb.11-16). Die Aufnahme erfolgte nahezu linear mit zunehmender Inkubationszeit bis zu 6 h in humane Makrophagen (Abb.11) und in 6 Tage kultivierte gemischte Cortexkulturen aus Rattenhirnen (Abb.15).

Ullrich et al. (1979 b) haben die Aufnahme von gereinigter N-acetylglucuronidase aus humanem Urin, α -Mannosidase aus Schweinenieren und β -N-acetylglucosaminidase aus humanen

Hautfibroblasten in kultivierte nicht-parenchymale Rattenleberzellen gemessen. Die Inhibitionsstudien ließen vermuten, daß hauptsächlich Mannose- und N-acetylglucosamin-spezifische Rezeptoren für die Aufnahme verantwortlich sind. Die Präsenz von Mannose-6-Phosphatresten in den gereinigten Enzymen wurde allerdings nicht nachgewiesen und möglicherweise wurden die Reste während der Aufreinigung dephosphoryliert. Die verwendete β -Hexosaminidase, die aus Hautfibroblasten isoliert wurde, dürfte keine oder kaum noch Mannose-6-Phosphatreste enthalten, da dieses Enzym lysosomalen Ursprungs ist, und spätestens dort durch die Mannose-6-Phosphatasen dephosphoryliert wurde (Bresciani et al., 1992). Die in dieser Arbeit verwendete rekombinante Arylsulfatase A enthält M6P-Reste (Bräulke et al., 1990) und wird in humanen Makrophagen und wie bereits früher gezeigt, auch in isolierten Kupferzellen aus der Rattenleber, M6P-abhängig über den 300 kDa Mannose-6-Phosphat-Rezeptor aufgenommen (Schmitz et al., 1995). Außerdem wurde gezeigt, daß die aus menschlichem Urin gereinigte α -N-acetylglucosaminidase verschiedene Enzymformen enthält, die durch Rezeptoren unterschiedlicher Spezifität erkannt werden können (Ullrich et al., 1978; Ullrich, 1979 a).

Interessanterweise war in Glia C6-Zellen nach einer anfänglichen Zunahme der endozytierten ASA zwischen 2-4 h, nach einer Endozytosezeit von 6 h ca. 15 % weniger Enzym als nach 2 h intrazellulär nachweisbar (Abb.12). Um zu untersuchen, ob die aufgenommene ASA abgebaut wird, wurden Glia C6- und Neuroblastoma SY5Y-Zellen nach einer Endozytosezeit von 2 h (Pulse) mit frischem nicht radioaktivem Medium versehen und für unterschiedliche Zeiträume zwischen 2 und 22 h inkubiert (Chase). Hierbei zeigte sich für die Glia C6 Zellen eine Abnahme der intrazellulär nachweisbaren Enzymmenge bereits nach einem Chase von 2 h und nach 22 h eine deutliche Abnahme zwischen 83 % (Glia C6-Zellen) und 96 % (SY5Y-Zellen) gegenüber dem Ausgangswert (Abb.13).

Die Ursache für den erhöhten Abbau von [125 J]-ASA in Glia C6 und neuronalen SY5Y-Zellen ist unklar. Möglicherweise „erkennen“ die heterologen Akzeptorzellen (Glia C6-Zellen) die humane ASA und bauen diese vermehrt ab. Dagegen spricht, daß in neuronalen SY5Y-Zellen ebenfalls ein Abbau stattfindet, obwohl es sich hierbei um Zellen humanen Ursprungs handelt und daß bei der Endozytose humaner ASA in 6 d kultivierte gemischte Cortexkulturen aus Rattenhirnen durchaus eine Zunahme der aufgenommenen ASA nach einem Zeitraum von bis zu 6 h nachweisbar war. Andererseits könnte die Kinetik des Abbaus von Zellsystem zu Zellsystem unterschiedlich sein. Denkbar ist auch, daß 1) während der Affinitätschromatographischen Reinigung der für die Aufnahmeexperimente benutzten ASA ein „Cofaktor“ verloren geht, der bei gleichzeitiger Aufnahme zur Stabilität beiträgt, 2) die Jodierung an einzelnen oder mehreren Tyrosinresten der ASA (Y 33, 39, 63, 88, 116, 149, 201, 222, 223, 230, 306, 429, 439) die Stabilität beeinflusst. Dazu könnte auch ein verändertes Verhalten bei der pH-abhängigen Dimerisierung der ASA beitragen (Waheed et al., 1979).

5.4. Konditionierte Makrophagensekrete als mögliche Quelle lysosomaler Enzyme

Ob konditionierte Makrophagenmedien, die nach metabolischer Markierung mit [³⁵S]-Methionin und Inkubation für 24 h in An- und Abwesenheit von 30 mM Ammoniumchlorid gewonnen und anschließend dialysiert wurden eine geeignete Quelle für lysosomale Enzyme darstellen könnten, war eine der entscheidenden Fragen, nachdem gezeigt werden konnte, daß eine Aufnahme von ASA durch verschiedene Akzeptorzellen möglich war. Überraschenderweise konnte aber nach einer Inkubationsdauer von 27 h mit konditionierten Medien von Makrophagen, die für 9 oder 20 Tage in Kultur waren keine ASA in humanen Fibroblasten nachgewiesen werden. Lediglich eine schwache Bande von 47 kDa war nachweisbar, die sich auch in den Medien fand. Ob diese Bande auf unspezifische Präzipitate oder einen intrazellulären Abbau von Arylsulfatase A zurückzuführen ist, bleibt unklar.

Im Gegensatz hierzu konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, daß die Inkubation ASA-angereicherter konditionierter Medien von retroviral transduzierten C2C12-Myoblasten nach 48 h zu einer Aufnahme von ASA in primäre Oligodendrozytenkulturen ASA-defizienter, neugeborener Mäuse führte (Consiglio et al., 1999).

Um festzustellen, ob die Anwesenheit endogener ASA einen Einfluß auf die Endozytose von ASA hat, wurde ASA-defizienten und Wildtyp Mausfibroblasten (als Kontrolle) rekombinante, jodierte ASA in Gegenwart konditionierter Makrophagensekrete mit/ohne Stimulation durch NH₄Cl zur Endozytose angeboten. Es zeigte sich eine Hemmbarkeit der ASA-Aufnahme von ca. 40 % (Abb.16). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei einer Inkubation von Wildtyp und ASA-defizienten Mausfibroblasten mit jodierter ASA und ansteigenden Mengen konditionierter Makrophagensekrete, bei der nur eine Hemmung von maximal 51 % zu erreichen war, was angesichts eines Überschusses von sezernierter ASA gegenüber jodierter ASA äußerst gering ist.

Die Ursache dieser geringen Inhibierbarkeit könnte ein Fehlen der M6P-Reste und somit mangelnde Konkurrenz am M6P-Rezeptor sein oder auf ein mangelhaftes „uncovering“ des M6P-Restes (d.h. Abspaltung des N-acetylglucosaminrestes durch eine N-acetylglucosamin-1-phosphodiester α N-acetylglucosaminidase) zurückzuführen sein.

In U937-Zellen und Fibroblasten fand sich z.B. ein nahezu komplettes „uncovering“ in intermediären und reifen Formen von Cathepsin D, wohingegen die M6P-Reste von intrazellulären und sezernierten Precursor-Formen weniger freigelegt wurden. Das „uncovering“ von M6P-Resten ist in Gegenwart von NH₄Cl vermindert (Isidoro et al., 1990 und 1991). Um zu klären, ob sezernierte lysosomale Enzyme in humanen Makrophagen freie M6P-Reste tragen, wurden Makrophagen mit [³²P] metabolisch markiert und Cathepsin D und ASA anschließend immunpräzipitiert. Die Analyse der Immunpräzipitate nach und ohne Behandlung mit alkalischer Phosphatase ergab in einem ersten Experiment kein autoradiographisch auswertbares Resultat. Diese Experimente müssen wiederholt und mit entsprechenden Kontrollen verifiziert werden.

5.5. Cokultorexperimente als Modelle für einen möglichen Enzymtransfer

Um den Transfer lysosomaler Enzyme von Makrophagen auf enzymdefiziente Hirnzellen nach Knochenmarktransplantationen imitieren zu können, wurden als *in vitro* Modell humane Makrophagen mit auf Filtern wachsenden ASA -/- Astrogliazellen kokultiviert. Es zeigte sich allerdings, daß nach einer Cokulturdauer von 24 h keine ASA in den defizienten Hirnzellen nachweisbar war (Abb.19). Um auszuschließen, daß die fehlende Aufnahme von ASA auf zu geringe Mengen der zur Endozytose angebotenen ASA oder mangelnde/fehlende M6P-Reste bzw. fehlendes Aufdecken von M6P-Resten („uncovering“) der ASA zurückzuführen ist, wurden in einem weiteren Cokultorexperiment humane ASA-überexprimierende BHK-Zellen, deren sezernierte ASA freie M6P-Reste enthalten, (Bräulke et al., 1990) mit ASA -/- Maus-Astroglia kokultiviert. Jedoch war auch in diesem Experiment nach einer Cokulturdauer von 24 h kein Enzymtransfer nachweisbar.

Die Ursache hierfür könnte durch eine geringe Zahl/geringe Recycling-Kinetik des zur Aufnahme notwendigen M6P-Rezeptors auf der Plasmamembran der ASA-defizienten Astroglia-Zellen oder durch einen Abbau der aufgenommenen ASA nach der Endozytose erklärt werden. In den humanen Colonadenocarcinom-Zelllinien SW 948, SW 1116 und SW 1222 wird die fehlende Aufnahme von Cathepsin B, ASA und β -Hexosaminidase auf eine geringe Recycling-Rate des 300 kDa M6P-Rezeptors zurückgeführt (Bräulke et al., 1992).

Eine weitere theoretische Möglichkeit für einen fehlenden Enzymtransfer besteht in einem veränderten Phosphorylierungsgrad der sezernierten lysosomalen Enzyme in Abhängigkeit vom Differenzierungs-/Aktivierungszustand der Makrophagen/Mikroglia.

In vivo Experimente zeigten, daß mit retroviralen Vektoren transduzierte Knochenmarkstammzellen ASA-defizienter Mäuse, die die cDNA für ASA enthielten und ASA-defizienten Mäusen transplantiert wurden, zu einer z.T. über Monate nachweisbaren ASA Expression und auch zu erhöhten Gewebskonzentrationen führten. Als Folge kam es zu einer Entspeicherung peripherer Organe. Eine Entspeicherung im ZNS war, obwohl 27 % der normalen ASA Aktivität im ZNS gefunden wurde nur gering ausgeprägt (Matzner et al., 1999).

Neueste Untersuchungen an Mäusen, denen das Gen für die β -Untereinheit der β -Hexosaminidase ausgeschaltet wurde und die als Modell für die Sandhoff'sche Krankheit dienen, die mit Knochenmark aus Wildtyp-Mäusen transplantiert wurden, zeigten folgende, z.T. überraschenden Ergebnisse:

1. Viele β -Hexosaminidase-positive Zellen wurden in der Milz und nur wenige in der Leber oder Niere nachgewiesen.
2. Im ZNS dieser Mäuse sind β -Hexosaminidase-positive Zellen in den Leptomeningen und im Plexus choroideus nachzuweisen, und nur wenige in den perivaskulären Regionen des ZNS (posteriorer Thalamus, Hirnstamm und Rückenmark).

3. Einige der β -Hexosaminidase-positiven Zellen sind gleichzeitig immunreaktiv für Marker von Makrophagen/Mikroglia, während keine Neurone β -Hexosaminidase-positiv sind (Oya et al., 2000).
4. Aktivierte Mikroglia-Zellen mit einem erhöhtem Genexpressionsmuster für inflammatorische Antworten sind in den gleichen Regionen (Thalamus, Hirnstamm und Rückenmark) der Sandhoff-Maus zu finden, die einen hohen Prozentsatz an Zelltod aufweisen.
5. Die Verbesserung der neurologischen Symptome und die verlängerte Lebenserwartung nach KMT wird auf die Infiltration β -Hexosaminidase-positiver Mikroglia in die oben genannten Regionen mit dem höchsten Grad an neuronalem Zelltod und die Suppression der Mikroglia-Aktivierung zurückgeführt.
6. KMT reduziert die neuronalen GM₂-Gangliosid Ablagerungen nicht (Wada et al., 2000).

Basierend auf diesen Daten wird folgender pathogenetischer Mechanismus vorgeschlagen: Die Glykolipid-Akkumulation führt zu neuronaler Dysfunktion und Zerstörung von Neuronen, die durch die Mikroglia erkannt und durch Phagozytose entfernt werden. Aufgrund ihres eigenen Enzymdefekts kann die Mikroglia die phagozytierten Glykolipide jedoch nicht abbauen, wird aktiviert und rekrutiert weitere hämatogene Mikroglia-Vorstufen. Außerdem kommt es zur Expression potentiell neurotoxischer Cytokine und Substanzen wie TNF α , Proteasen und Oxyradikalen, die den Zelltod der schon komprimierten Neurone herbeiführen. Durch die KMT infiltriert enzymkompetente Mikroglia das ZNS und entfernt zerstörte Speicherneurone. Dies supprimiert den expansiven Anstieg der aktivierten Mikroglia, der zu einer Verlangsamung des neurodegenerativen Prozesses bei diesen Patienten führt.

Daher erscheint eine kombinierte Therapie zur Reduktion von Speichermaterial und Suppression der inflammatorischer Antwort sinnvoll.

5.6. Perspektiven

5.6.1. Technische Verfahrensweisen für die Gentherapie bei lysosomalen Speichererkrankungen

Eine erfolgreiche Behandlung lysosomaler Speichererkrankungen ist bis auf wenige Ausnahmen (Cystinose, Morbus Gaucher Typ1, α -Glucuronidase, Morbus Pompe) zur Zeit noch nicht möglich. Besonders schwierig ist die Behandlung von Speichererkrankungen mit Beteiligung des ZNS, da die substituierten Enzyme die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können. Therapeutische Ansätze zielen u.a. auf die Durchführung von Knochenmarkstransplantationen, wobei sich der Nutzen von KMT's bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen bisher nicht eindeutig beweisen ließ. Eine metabolische Korrektur von Enzymdefekten durch rezeptor-vermittelte Endozytose des fehlenden Enzyms in die enzymdefizienten Empfängerzellen nach

seiner Sekretion durch (gentechnisch veränderte) Spenderzellen wie z.B. Makrophagen könnte einen möglichen Mechanismus für Erfolge bei der KMT darstellen.

Gentherapeutische Ansätze zur Behandlung lysosomaler Speichererkrankungen sind für verschiedene Enzymdefekte erprobt worden. Die meisten Untersuchungen wurden aber bisher für die β -Glucuronidasedefizienz durchgeführt, da das MPS VII Mäusemodell (Genausschaltung der β -Glucuronidase) sehr starke Ähnlichkeiten mit der humanen Erkrankung aufweist.

So wurden z.B. autologe KMT's mit retroviral modifizierten Zellen an MPS VII-Mäusen durchgeführt, die dadurch in der Lage waren, unterschiedliche Mengen an β -Glucuronidase zu exprimieren. Dadurch kam es zu einer Reduktion von Speichermaterial in Leber, Milz und Knochenmark, wohingegen eine Korrektur von Skelett- und Nervenschädigungen nicht möglich war (Wolfe et al., 1992). Bei einem anderen Modell wurden β -Glucuronidase-überexprimierende Fibroblasten, eingebettet in ein Kollagengel, in die Peritonealhöhle β -Glucuronidase-defizienter Tiere implantiert, was zu einer Zunahme der Enzymaktivitäten und Rückgang des Speicher-materials besonders in Leber und Milz führte, aber wiederum keine Korrektur von Nerven- und Skelettschäden bewirkte. Auch die direkte intrazerebrale Injektion β -Glucuronidase-überexprimierender Fibroblasten ins Gehirn β -Glucuronidase-defizienter Mäuse zeigte, daß eine Entspeicherung nur in unmittelbarer Nähe des Injektionsortes stattfand (Taylor & Wolfe, 1997; Sly & Vogler, 1997). Trotzdem beweisen diese Modelle, daß ein Transfer lysosomaler Enzyme von einer überexprimierenden Spenderzelle auf eine Akzeptorzelle grundsätzlich möglich ist.

In einem neueren Modell erfolgte die intravenöse Injektion von infektiösen rekombinanten Adeno-assoziierten Viren (AAV), die die cDNA für humane β -Glucuronidase enthielten in neugeborene MPS VII Mäuse. Hier zeigte sich eine über den Beobachtungszeitraum von 16 Wochen anhaltende Enzymexpression in verschiedenen Organen, wobei diese interessanterweise auch das ZNS betraf. Dies könnte einerseits an der noch mangelhaft ausgebildeten Blut-Hirn-Schranke der neugeborenen Tiere liegen oder andererseits an der hohen Virusdosis bezogen auf das Körpergewicht, da es bei adulten Tieren und ähnlichen Experimenten nicht zu solchen Erfolgen kam (Daly et al., 1999).

Auch in anderen Ansätzen zeigte sich, daß rekombinante Adeno-assoziierte Viren geeignete Vektoren für einen Enzymtransfer darstellen könnten. So exprimierten Mäuse- und Patienten-Fibroblasten, die durch AAV-Vektoren infiziert wurden große Mengen an Glucocerebrosidase (15-fach) und Arylsulfatase A (500-fach) in Zellen von Patienten mit Morbus Gaucher bzw. metachromatischer Leukodystrophie (Wei et al., 1994).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Makrophagen als Enzymlieferanten zur metabolischen Korrektur der Arylsulfatase A-Defizienz bei der metachromatischen Leukodystrophie geeignet sein könnten. Die vorliegenden Ergebnisse, im Context mit den ersten gentherapeutisch-experimentellen Ansätzen bei ASA-defizienten Mäusen (Matzner et al., 1999) und an KMT-Sandhoff-Mäusen (Wada et al., 2000) sprechen gegen einen effizienten Transfer der

ASA aus Makrophagen auf andere Zellen, besonders von Hirnzellen *in vitro*. Um auszuschließen, daß die aus dem Blut isolierten und kultivierten Makrophagen eventuell nicht die Verhältnisse der bei KMT vermittelten Ersatztherapie entsprechen, sollten einige der hier aufgeführten Basisexperimente mit a) isolierten Makrophagenzellen aus Knochenmarksmaterial bzw. b) isolierten Mikrogliazellen (Dobrenis, 1998; de Groot et al., 1999), die als Differenzierungsprodukte der KMT-Makrophagen im Gehirn angesehen werden, wiederholt werden.

6. Zusammenfassung

Mit der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob der Nachweis eines effizienten Transfers lysosomaler Enzyme von humanen Makrophagen auf Hirnzellen *in vitro* möglich ist, der der Zielsetzung zur Therapie lysosomaler Speichererkrankungen mit Beteiligung des ZNS durch Knochenmarkstransplantationen entspricht.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Die basale und stimulierte Sekretion lysosomaler Enzyme durch kultivierte, humane Makrophagen aus Blut weist erhebliche Unterschiede für die verschiedenen lysosomalen Enzyme auf. Während für die α -Fucosidase und β -Hexosaminidase eine Sekretionsrate von 27 und 32 % ermittelt wurde, wiesen α -Mannosidase und Arylsulfatase A (ASA) Sekretionsraten zwischen 10 und 15 % auf und die β -Galaktosidase wurde kaum sezerniert. Die Sekretion von β -Hexosaminidase und α -Fucosidase ließ sich durch die schwache Base NH_4Cl und das Polysaccharid Zymosan deutlich stimulieren, während die ASA-Sekretion kaum stimulierbar war.
2. Die basale und stimulierte Enzymsekretion humaner Makrophagen hängt von der Kultivierungsdauer der Makrophagen ab und weist unterschiedliche Sekretionsmaxima für die verschiedenen lysosomalen Enzyme auf. Die α -Fucosidase-Sekretion war z.B. am 12. Kulturtag maximal, während höchste Sekretionsraten für die ASA am 8. Kultivierungstag gemessen wurden.
3. Um optimale Bedingungen für die rezeptorabhängige Aufnahme eines lysosomalen Enzyms zu etablieren, führte der Nachweis endozytierter, rekombinanter [^{125}J]-markierter ASA zu den besten Ergebnissen. In allen untersuchten primären Zellkulturen und Zelllinien war die Aufnahme absolut M6P-abhängig und z.B. für humane Makrophagen und 6 Tage kultivierte gemischte Cortexkulturen aus Rattenhirnen bis zu einer Inkubationszeit von 6 h nahezu linear, während sich für Glia C6- und neuronale SY5Y-Zellen nach einer Endozytosezeit von > 4 h eine Abnahme der intrazellulär nachweisbaren Enzymmenge fand, die wahrscheinlich auf intrazellulären Abbau zurückzuführen ist.
4. Die Inkubation von humanen Fibroblasten mit konditionierten z.T. metabolisch markierten oder stimulierten Makrophagensekreten führte dagegen auch nach einer Endozytosezeit von 27 h nicht zu einer nachweisbaren Aufnahme von ASA. Außerdem konnte die Aufnahme von [^{125}J]-ASA in Wildtyp- und ASA-defiziente Mausfibroblasten durch ansteigende Mengen konditionierter Makrophagensekrete nur geringfügig inhibiert werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß entweder a) die Gesamtmenge aller von Makrophagen sezernierten M6P-haltigen Enzymvorläuferformen zu gering ist, oder b) die M6P-Reste nicht durch eine entsprechende Phosphodiesterase-Aktivität freigelegt wurden, um die Aufnahme der Tracer-ASA zu kompetitieren.

5. Cokulturrexperimente mit humanen Makrophagen bzw. ASA-überexprimierenden BHK-Zellen führten nicht zu einem nachweisbaren Transfer von ASA in ASA -/- Astrogliazellen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß ein effizienter Transfer von Arylsulfatase A von humanen, kultivierten Makrophagen auf (ASA-defiziente) Hirnzellen *in vitro* nicht möglich ist. Es ist zu vermuten, daß die konventionelle KMT keinen geeigneten Ansatz zur cerebralen Enzymsubstitution bei metachromatischer Leukodystrophie (ASA-Defizienz) darstellt.

7. Literaturverzeichnis

- Akli, S. et al. (1996):
Restoration of hexosaminidase A activity in human Tay-Sachs fibroblasts via adenoviral vector-mediated gene transfer
Gene Ther. **3**: 769-774
- Barton, N.W.; Brady, R.O.; Dambrosia, J.M.; Bisceglie, A.M.; Doppelt, S.H.; Hill, S.C.; Mankin, H.J.; Murray, G.J.; Parker, R.I.; Argoff, C.E.; Grewal, R.P.; Yu, K.-T. and collaborators (1991):
Replacement therapy for inherited enzyme deficiency - macrophage-targeted glucosyl-cerebrosidase for Gaucher's disease
N. Engl. J. Med. **324**: 1464-1470
- Bartsch, O. (1994):
Die Enzymersatztherapie bei Morbus Gaucher: Ein neuer therapeutischer Ansatz zur Behandlung lysosomaler Speicherkrankheiten
Jahrbuch der Gastroenterologie 1994: 161-165
- Beck, M. (1994):
Morbus Gaucher: Molekularbiologie und therapeutische Perspektiven
Med. Genetik **6**: 325-327
- Bradford (1976):
A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding
Anal. Biochem. **72**: 248-254
- Brandt, E.J.; Elliott, R.W.; Swank, R.T. (1975):
Defective lysosomal enzyme secretion in kidneys of Chediak-Higashi (beige) mice
J. Cell Biol. **67**: 774-788
- Braulke, T. (1996):
Origin of lysosomal proteins
in Lloyd J.B., Mason, R.W., (eds)
Subcellular Biochemistry: Biology of the lysosome
Vol. 27, Plenum Press, New York, 15-49
- Braulke, T.; Garton, C.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1987 a):
Is movement of mannose 6-phosphate-specific receptor triggered by binding of lysosomal enzymes?
J. Cell Biol. **104**: 1735-1742
- Braulke, T.; Geuze, H.J.; Slot, J.W.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1987 b):
On the effects of weak bases and monensin on sorting and processing of lysosomal enzymes in human cells
Eur. J. Cell Biol. **43**: 316-321
- Braulke, T.; Tippmer, S.; Chao, H.J.; von Figura, K. (1990):
Insulin-like growth factor I and II stimulate endocytosis but do not affect sorting of lysosomal enzymes in human fibroblasts
J. Biol. Chem. **265**: 6650-6655

- Braulke, T.; Mach, L.; Hoflack, B.; Glössl, J. (1992):
Biosynthesis and endocytosis of lysosomal enzymes in human colon carcinoma SW 1116 cells: impaired internalization of plasma membrane-associated cation-independent mannose 6-phosphate receptor
Arch. Biochem. Biophys. **298**: 176-181
- Bresciani, R.; Peters, C.; von Figura, K. (1992):
Lysosomal acid phosphatase is not involved in the dephosphorylation of mannose 6-phosphate containing lysosomal proteins
Eur. J. Cell Biol. **58**: 57-61
- Brown, J.A.; Novak, E.K.; Swank, R.T. (1985):
Effects of ammonia on processing and secretion of precursor and mature lysosomal enzyme from macrophages of normal and pale ear mice: Evidence for two distinct pathways
J. Cell. Biol. **100**: 1894-1904
- Chavany, C.; Jendoubi, M. (1998):
Biology and potential strategies for the treatment of G_{M2} Gangliosidoses
Mol. Med. Today **4**: 158-165
- Consiglio, A.; Martino, S.; Giuliana, B.; Cusella, G.; Dolcetta, D.; Trojani, A.; Severini, G.M.; Gieselmann, V.; Marchesini, S.; Bordinon, C. (1999):
Uptake and sorting of arylsulfatase A (ASA) followed by correction of metabolic dysfunction in ASA ^{-/-} oligodendrocytes through enriched transduced myoblast conditioned medium
Abstract 79 of 12th Europ. Study Group on Lysosomal Diseases, Vidago, Portugal 1999
- Daly, T.M.; Vogler, C.; Levy, B.; Haskins, M.E.; Sands, M.S. (1999):
Neonatal gene transfer leads to widespread correction of pathology in a murine model of lysosomal storage disease
Medical sciences **96**: 2296-2300
- de Groot, C.J.A.; Montagne, L.; Janssen, I.; Ravid, R.; van der Valk, P.; Veerhuis, R. (2000):
Isolation and characterization of adult microglial cells and oligodendrocytes derived from postmortem human brain tissue
Brain Res. Brain Res. Protoc. **5**: 85-94
- Dell Angelica (1999):
Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor
Mol. Cell **3**: 11-21
- Desnick, R.J.; Ioannou, Y.A.; Eng, C.M. (1999):
Fabry disease: preclinical & clinical studies of α -galactosidase a replacement therapie
Abstract 42 of 12th Europ. Study Group on Lysosomal Diseases, Vidago, Portugal 1999
- Dittmer, F.; Ulbrich, E.J.; Hafner, A.; Schmahl, W.; Meister, T.; Pohlmann, R.; von Figura, K. (1999):
Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific
J. Cell Sci. **112**: 1591-1597

- Dobrenis, K. (1998):
Microglia in cell culture and in transplantation therapy for central nervous system disease
Methods **16**: 320-344

- Gelb, B.D.; Shi, G.-P.; Chapman, H.A.; Desnick, R.J. (1996):
Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency
Science **273**: 1236-1238

- Gieselmann, V. (1995):
Lysosomal storage diseases
Biochim. Biophys. Acta **1270**: 103-136

- Gieselmann, V.; von Figura, K. (1990):
Advances in the molecular genetics of metachromatic leukodystrophy
J. Inher. Metab. **13**: 560-571

- Goldberg, D.I.; Khoo, J.C. (1988):
Secretion of the lysosomal acid triacylglycerol hydrolase precursor by J774 macrophages
Biochim. Biophys. Acta **960**: 200-209

- Gonzalez-Noriega, A.; Grubb, J.H.; Talkad, V.; Sly, W.S. (1980):
Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling
J. Cell Biol. **85**: 839-852

- Gravel, R.A.; Clarke, J.T.R.; Kaback, M.M.; Mahuran, D.; Sandhoff, K.; Suzuki, K. (1995):
The G_{M2} Gangliosidoses
in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol. II
(C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle eds.), pp. 2839-2879,
McGraw-Hill, Inc., New York

- Guffon, N.; Souillet, G.; Maire, I.; Straczek, J.; Guibaud, P. (1998):
Follow-up of nine patients with Hurler syndrome after bone marrow transplantation
J. Pediatr. **133**: 119-125

- Hille-Rehfeld, A. (1995):
Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes
Biochim. Biophys. Acta **1241**: 177-194

- Holderer, A.; Niederau, C.; Ehlen, C.; Teintges, T.; Strohmeyer, G. (1994):
Fortschritte in der Behandlung des Morbus Gaucher
Jahrbuch der Gastroenterologie 1994: 79-88

- Imort, M.; Zühlendorf, M.; Feige, U.; Hasilik, A.; von Figura, K. (1983):
Biosynthesis and transport of lysosomal enzymes in human monocytes and macrophages. Effects of ammonium chlorid, zymosan and tunicamycin.
Biochem. J. **214**: 671-678

- Isidoro, C.; Radons, J.; Baccino, F.; Hasilik, A. (1990):
Suppression of the uncovering of mannose-6-phosphate residues in lysosomal enzymes in the presence of NH₄Cl
Eur. J. Biochem. **191**: 591-597

- Isidoro, C.; Grässel, S.; Baccino, F.; Hasilik, A. (1991):
Determination of the phosphorylation, uncovering of mannose 6-phosphate groups and targeting of lysosomal enzymes
Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **29**: 165-171

- Itoh, K.; Takiyama, N.; Kase, R.; Kondoh, K.; Sano, A.; Pshima, A.; Sakuraba, H.; Suzuki, Y. (1993):
Purification and characterization of human lysosomal protective protein expressed in stably transformed Chinese hamster ovary cells
J. Biol. Chem. **268**: 1180-1186

- Jackman, H.L.; Tan, F.; Tamei, H.; Beurling-Harburg, C.; Li, X.Y.; Skidgel, R.A.; Erdös, E.G. (1990):
A peptidase in human platelets that deamidates tachykinins. Probable identity with the lysosomal "protective protein".
J. Biol. Chem. **265**: 11265-11272

- Kapaun, P.; Dittmann, R.W.; Granitzny, B.; Eickhoff, W.; Wulbrand, H.; Neumaier-Probst, E.; Zander, A.; Kohlschütter, A. (1998):
Slow progression of juvenile metachromatic leukodystrophy 6 years after bone marrow transplantation
J. Child Neurol. **14**: 222-228

- Kaye, E.M. (1995):
Therapeutic approaches to lysosomal storage diseases
Curr. Opin. Pediatr. **7**: 650-654

- Koc, O.N.; Peters, C.; Aubourg, P.; Raghavan, P.; Dyshouse, S.; DeGasperi, S.; Kolodny, E.H.; Yoseph, Y.B.; Gerson, S.L.; Lazarus, H.M.; Caplan, A.I.; Watkins, P.A.; Krivit, W. (1999):
Bone marrow-derived mesenchymal stem cells remain host derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases
Exp. Hematol. **27**: 1675-1681

- Kornfeld, S. (1992):
Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptors
Annu. Rev. Biochem. **61**: 307-330

- Kornfeld, S.; Sly, W.S. (1995):
I-cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy: Disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localisation
in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol. II
(C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle eds.), pp. 2495-2508,
McGraw-Hill, Inc., New York

- Krivit, W.; Shapiro, E.; Kennedy, W.; Lipton, M.; Lockman, L.; Smith, S.; Summers, C.G.; Wenger, D.A.; Tsai, M.Y.; Ramsey, N.K.C.; Kersey, J.H.; Yao, J.K.; Kaye, E. (1990):
Treatment of late infantile metachromatic leukodystrophy by bone marrow transplantation
N. Engl. J. Med. **322**: 28-32

- Laemmli, U.K. (1970):
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature **227**: 680-685

- Lemansky, P.; Gieselmann V.; Hasilik, A.; von Figura, K.(1985):
Synthesis and transport of lysosomal acid phosphatase in normal and I-cell fibroblasts
J. Biol. Chem. **260**: 9023-9030

- Little, L.E.; Lau, M.M.; Quon, D.V.; Fowler, A.V.; Neufeld, E.F. (1988):
Proteolytic processing of the alpha-chain of lysosomal enzyme, beta-hexosaminidase, in normal human fibroblasts
J. Biol. Chem. **263**: 4288-4292

- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951):
Protein measurements with the folin phenol reagent
J. Biol. Chem. **193**: 265-275

- Martinez, I.; Chakrabati, S.; Hellevik, T.; Morehead, J.; Fowler, K.; Andrews, N.W. (2000):
Synaptotagmin VII regulates Ca^{2+} -dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts
J. Cell Biol. **148**: 1141-1149

- Mason, R.R.; Weiner, R.S. (1985):
Application of the Beckman JE6-B Elutriator System[®] in the isolation of human monocyte subpopulations
Scand. J. Haematol. **34**: 5-8

- Matzner, U.; Harzer, K.; Mansson, J.-E.; Lüllmann-Rauch, R.; Hartmann, D.; Learish, R.; Barranger, J.; Gieselmann, V. (1999):
Long term expression and efficient brain transfer of arylsulfatase A in arylsulfatase A-deficient mice treated by stem cell gene therapy
Abstract 72 of 12th Europ. Study Group on Lysosomal Diseases, Vidago, Portugal 1999

- Neufeld, E.F. (1989):
Natural history and inherited disorders of lysosomal enzyme, β -hexosaminidase
J. Biol. Chem. **264**: 10927-10930

- Nishino, I.; Fu, J.; Tanji, K.; Yamada, T.; Shimojo, S., Koori, T.; Mora, M.; Riggs, J.E.; Oh, S.J.; Koga, Y.; Sue, C.M.; Yamamoto, A.; Murakami, N.; Shanske, S.; Byrne, E.; Bonilla, E.; Nonaka, I.; DiMauro, S.; Hirano, M.(2000):
Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease).
Nature **406**: 906-910

- O'Brien, J.S.; Okada, S.; Chen, A.; Fillerup, D.L. (1970):
Tay Sachs Disease
Detection of heterozygotes and homozygotes by serum hexosaminidase assay
N. Engl. J. Med. **283**: 15-20

- Ohkuma, S.; Poole, B. (1978):
Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**: 3327-3331

- Oya, Y.; Proia, R.L.; Norflus, F.; Tifft, C.J.; Langaman, C.; Suzuki, K. (2000):
Distribution of enzyme-bearing cells in GM₂-Gangliosidosis mice: regionally specific pattern of cellular infiltration following bone marrow transplantation
Acta Neuropathol. **99**: 161-168

- Peters, C.; Shapiro, E.G.; Anderson, J.; Henslee-Downey, P.J.; Klemperer, M.R.; Cowan, M.J.; Saunders, E.F.; deAlarcon, P.A.; Twist, C.; Nachman, J.B.; Hale, G.A.; Harris, R.E.; Rozans, M.K.; Kurtzberg, J.; Grayson, G.H.; Williams T.E.; Lenarsky, C.; Wagner, J.E.; Krivit, W. (1998):
Hurler syndrome: II. outcome of HLA-genotypically identical siblings and HLA-haploidentical related donor bone marrow transplantation in fifty-four children
Blood **91**: 2601-2608
- Platt, F.M. *et al.* (1997):
Prevention of lysosomal storage in Tay-Sachs mice treated with N-butyl-deoxynojirimycin
Science **276**: 428-431
- Polten, A.; Fluharty, A.L.; Fluharty, C.B.; Kappler, J.; von Figura, K.; Gieselmann, V. (1991):
Molecular basis of different forms of metachromatic leukodystrophy
N. Engl. J. Med. **324**: 18-22
- Poole and Ohkuma (1981):
Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages
J. Cell Biol. **90**: 665-669
- Rodriguez, A.; Webster, P.; Ortego, J.; Andrews, N.W.; (1997):
Lysosomes behave as Ca^{2+} -regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells
J. Cell Biol. **137**: 93-104
- Sandhoff, K.; Harzer, K.; Fürst, W. (1995):
Sphingolipid Activator Proteins
in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Vol. II
(C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle eds.), pp. 2427-2441,
McGraw-Hill, Inc., New York
- Schmitz, F.; Bresciani, R.; Hartmann, H.; Bräulke, T. (1995):
Effect of insulin-like growth factor II on uptake of arylsulfatase A by cultured rat hepatocytes and Kupffer cells
J. Hepatol. **22**: 356-363
- Sleat, D.E.; Donnelly, R.J.; Lackland, H.; Liu, C.-G.; Sohar, I.; Pullarkat, R.K.; Lobel, P. (1997):
Association of mutations in a lysosomal protein with classic late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis
Science **277**: 1802-1805
- Sloane, B.F.; Moin, K.; Lah, T.T. (1994):
Regulation of lysosomal endopeptidases in malignant neoplasia
in *Biochemical and Molecular Aspects of Selected Cancers*, Vol. 2
(T.G. Pretlow, and T.P. Pretlow, eds.), pp. 411-466
Academic Press, San Diego
- Sly, W.S.; Vogler, C. (1997):
Gene therapy for lysosomal storage disease: A no-brainer?
Transplants of fibroblasts secreting high levels of β -glucuronidase decrease lesions in the brains of mice with sly syndrome, a lysosomal storage disease (771-774).
Nature Med. **3**: 719-720

- Taylor, R.M.; Wolfe, H. (1997):
Decreased lysosomal storage in the adult MPS VII mouse brain in the vicinity of
grafts of retroviral vector-corrected fibroblasts secreting high levels of β -
glucuronidase
Nature Med. **3**: 771-774

- Tanaka, J.; Guhde, G.; Suter, A.; Eskelinen, E.L.; Hartmann, D.; Lullmann-Rauch, R.; Janssen, P.M.; Blanz, J.; von Figura, K.; Saftig, P. (2000):
Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2 deficient mice
Nature **406**: 902-906

- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979):
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:
Procedure and some applications
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 4350-4354

- Tsai, P.; Lipton, M.; Sahdev, I.; Najfeld, V.; Rankin, L.R.; Slyper, A.H.; Ludman, M.; Grabowski, G.A. (1992):
Allogeneic bone marrow transplantation in severe Gaucher disease
Pediatr. Res. **31**: 503-507

- Ullrich, K.; Mersmann, G.; Fleischer, M.; von Figura, K. (1978):
Epithelial rat liver cells have cell surface receptors recognizing a phosphorylated
carbohydrate on lysosomal enzymes
Biol. Chem. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **359**: 1591-1598

- Ullrich, K.; Basner, R.; Gieselmann, V.; von Figura, K. (1979 a):
Recognition of human urine N-acetylglucosaminidase by rat hepatocytes.
Involvement of receptors specific for galactose, mannose 6-phosphat, and mannose.
Biochem. J. **180**: 413-419

- Ullrich, K.; Gieselmann, V.; Mersmann, G.; von Figura, K. (1979 b):
Endocytosis of lysosomal enzymes by non-parenchymal rat liver cells
Biochem. J. **182**: 329-335

- van der Ploeg, A.T.; van der Hout, H.; Reuser, A.; Bijvoet, A.; van Hirtum, H.; Kroos, M. (1999):
A phase II clinical trial of enzyme replacement therapy for glycogen storage disease
type II
Abstract 41 of 12th Europ. Study Group on Lysosomal Diseases, Vidago, Portugal
1999

- Wada, R.; Tifft, C.J.; Proia, R.L. (2000):
Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is
suppressed by bone marrow transplantation
PNAS **97**: 10954-10959

- Waheed, A.; van Etten, R.L. (1979):
The monomer – dimer association of rabbit liver arylsulfatase A and its relationship to
the anomalous kinetics
Arch. Biochem. Biophys. **194**: 215-225

- Weber, K.; Osborn, M. (1969):
The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide
gel electrophoresis
J. Biol. Chem. **244**: 4406-4412

- Wei, J.-F.; Wie, F.-S., Samulski, R.J.; Barranger, J.A. (1994):
Expression of the human glucocerebrosidase and arylsulfatase A genes in murine and patient primary fibroblasts transduced by an adeno-associated virus vector
Gene Ther. **1**: 261-268
- Wolfe, J.H.; Sands, M.S.; Barker, J.E.; Gwynn, B.; Rowe, L.B.; Vagler, C.A.; Birkenmeier, E.H. (1992):
Reversal of pathology in murine mucopolysaccharidosis type VII by somatic cell gene transfer
Nature **360**: 749-753
- Zhou, X.Y.; Galjart, N.J.; Willemsen, R.; Gillemans, N.; Galjaard, H. and d' Azzo, A. (1991):
A mutation in a mild form of galactosialidosis impairs dimerization of the protective protein and renders it unstable
EMBO J. **10**: 4041-4048

8. Abkürzungsverzeichnis

AAV	adeno-assoziierte Viren
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASA	Arylsulfatase A
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Adenoviren
BHK	Baby-Hamster-Kidney
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
° C	Temperatur in Grad Celsius
CCD	charge-coupled device
CD	Cathepsin D
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie (Aktivität einer radioaktiven Substanz)
cm	Zentimeter
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	electro-generated chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay (heterologer Enzym-Immunassay)
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii (lat.: und andere)
FACScan	Fluorescence-activated cell sorter (Durchflußzytometer)
FKS	fötales Kälberserum
Fuc	Fucosidase
g	Gramm
Gal	Galaktosidase
h	Stunden
Hex	Hexosaminidase
HIV	human immune deficiency virus

HRP	Horseradish-Peroxidase
HSV	Herpes simplex Virus
Ig	Immunglobulin
IMM	Immunomix
J	Jahre
kb	Kilo Basen
kDA	Molare Masse in Kilodalton
KMT	Knochenmarktransplantation
k.o.	knock out
kond.	konditioniert
M	Molar
mA	Milliampere
Man	Mannosidase
Med.	Medium
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
MLP	Mukopolidose
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MNZ	mononukleäre Zellen
M6P	Mannose-6-Phosphat
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MPS	Mucopolysaccharidose
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
mU	Milliunit
MUG	Methyl-Umbelliferyl N-Acetyl β -Glucosaminid
MUGS	Methyl-Umbelliferyl N-Acetyl β -Glucosaminid-6-Sulfat
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
NC	Nitrocellulose
NCL	neuronale Ceroidlipofuscinose
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

nmol	Nanomol
NP-40	Nonidet-40
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SAP	Sphingolipid Aktivator Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std	Standard
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	<i>trans</i> -Golgi Netzwerk
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100
U	Unit
u.a.	unter anderem
UKE	Universitätskrankenhaus Eppendorf
v	Volumen
vs	versus
w	Gewicht
WT	Wildtyp
xg	-fache Erdbeschleunigung
ZMNH	Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil
z.Z.	zur Zeit

Bei einigen Begriffen wurden die englischen Fachtermini verwendet, da auch in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung dieser Begriffe unüblich ist.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. K. Ullrich danke ich für die Vergabe des Themas, die Aufnahme in seine Abteilung und die Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. T. Braulke gilt mein besonderer Dank für die sehr gute und engagierte Betreuung und seine stetige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. V. Gieselmann und Herrn Dr. U. Matzner danke ich für die zur Verfügungstellung ASA-defizienter Mäuse und Astroglia.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. rer. nat. Bernd Kübler, danke ich für die nette Zusammenarbeit, Hilfestellungen und die vielen wertvollen Tips.

Volker Haferkorn danke ich für seine Geduld und Unterstützung bei der Lösung zahlreicher „Computerprobleme“.

Curriculum vitae

Am 9. Juni 1969 wurde ich, Nicole Maria Muschol, in Hamburg geboren. Nach der Grundschulzeit von 1975-1979, besuchte ich das Alexander von Humboldt Gymnasium in Hamburg und legte 1988 das Abitur ab.

In der Zeit von 1988-1991 absolvierte ich eine Ausbildung zur Kinderkrankenschwester im Altonaer Kinderkrankenhaus in Hamburg. Die nachfolgenden zwei Jahre war ich als Kinderkrankenschwester auf einer internen Kinderstation sowie der interdisziplinären Kinderintensivstation des Altonaer Kinderkrankenhauses tätig.

Von 1993-2000 studierte ich Humanmedizin an der Universität Hamburg. Seit Juli 2000 bin ich als Ärztin im Praktikum in der Kinderklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf beschäftigt.

Die vorliegende Dissertation mit dem Titel: „Untersuchungen zur Aufnahme und zum Zell-Zell-Transfer der lysosomalen Arylsulfatase A“ fertigte ich unter Leitung von Prof. Dr. med. K. Ullrich und Prof. Dr. rer. nat. T. Braulke in der Abteilung für Biochemie der Kinderklinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf.

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und daß ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.