

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. Cokultorexperimente 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.