

Aus dem Institut für Physiologische Chemie der Philipps-Universität Marburg.

Direktor: Prof. Dr. A. Hasilik

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Untersuchung lysosomaler Membranproteine mit dem Schwerpunkt der
Charakterisierung der Acetyl-Coenzym A: α -Glucosaminid N-Acetyltransferase
aus lysosomalen Membranpräparationen aus humaner Plazenta

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Kristin Irene Wätzig aus Marburg

Marburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
am 21.08.2007.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: Prof. Dr. Hasilik

Korreferent: Prof. Dr. Renz

2. Korreferent: Prof. Dr. Elsässer

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	3
2	Einleitung	8
2.1	Lysosom – Geschichte und Definition	8
2.2	Einführung in die Biologie der Lysosomen	11
2.3	Lysosomale Proteine	14
2.3.1	Lysosomale Membranproteine	14
2.3.2	Luminale Proteine	18
2.3.3	Biosynthese und intrazellulärer Transport	21
2.4	Lysosomale Speicherkrankheiten	29
2.5	Mukopolysaccharidosen	30
2.6	Mukopolysaccharidose Typ IIIC/ Sanfilippo C (OMIM 252930) – Heparansulfatabbau	34
3	Zielsetzung	37
4	Material und Methoden	38
4.1	Geräte und Zubehör	38
4.2	Chemikalien, Standardlösungen und Radiochemikalien	39
4.3	Enzymaktivitäts- und Proteinbestimmung	40
4.3.1	Bestimmung der β -Hexosaminidase-Aktivität (EC 3.2.1.52) nach von Figura (1977)	40
4.3.2	Bestimmung der sauren β -Glucosidase-Aktivität (EC 3.2.1.45) nach Gatt (1969)	41
4.3.3	Bestimmung der Acetyl-Coenzym A: α -Glucosaminid N-Acetyltransferase-Aktivität (EC 2.3.1.3) modifiziert nach Meikle <i>et al.</i> (1995)	41

4.3.4	Bestimmung der Acetyl-Coenzym A: α -Glucosaminid N-Acetyltransferase-Aktivität (EC 2.3.1.3) modifiziert nach Voznyi <i>et al.</i> (1993) (fluorimetrisch)	43
4.3.5	Bestimmung der Alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1)	43
4.3.6	Proteinbestimmung nach Bradford (1976)	43
4.4	Präparation von Lysosomen aus humaner Plazenta	44
4.4.1	Herstellung des Organellenkonzentrats	44
4.4.2	Fraktionierung des Organellenkonzentrats	46
4.4.3	Charakterisierung des Organellenkonzentrats	46
4.5	Proteinaseinhibitoren	46
4.6	Membranpräparation durch Ultrazentrifugation	47
4.7	Membranpräparation durch Immunoabsorption (nach Dietrich <i>et al.</i> 1996)	47
4.8	FPLC-Trennung	48
4.8.1	Gelfiltration (Superdex 200 von Amersham Pharmacia Biotech, HR 10/30, Säulenvolumen 24 mL, Gelbett-Höhe 30-31- cm)	48
4.8.2	Ionenaustauscher (UnoQ von Biorad und MonoQ-Säule HR 5/5 von Pharmacia, Säulenvolumen 1,3 mL)	49
4.9	Optiprep TM -Trennung	49
4.10	Hydroxylapatit-Chromatographie	50
4.11	Trennung mit Hilfe der eindimensionalen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
4.11.1	Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele	51
4.11.2	Probenvorbereitung	52
4.11.3	Gelelektrophorese	53
4.12	Trennung durch zweidimensionale Elektrophorese	53

4.12.1	Röhrchengele mit Trägerampholyten	53
4.12.2	Immobilisierte pH-Gradienten	57
4.13	Färbung der Gele	59
4.13.1	Silberfärbung	59
4.13.2	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung	61
4.13.3	Kolloidale Coomassie-Färbung	63
4.14	Western Blot	63
4.15	Immundetektion nach Western-Blotting von LAMP-2	64
4.16	Behandlung mit Lipidzusammensetzung verändernden Substanzen	66
4.16.1	Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD)	66
4.16.2	Deoxycholat	66
4.17	Markierung mit [3 H]Acetyl-Coenzym-A	67
4.18	Fluorographie von radioaktiv markierten Verbindungen in Elektrophoresegelelen	67
4.19	Probenkonzentration mit Filtrationseinheit	68
4.20	Acetonfällung von Proteinen	69
4.21	Phenol-Ether-Extraktion	69
4.22	Analyse von Protein-Banden mittels MALDI-TOF	70
5	Ergebnisse	71
5.1	Charakterisierung der Enzymaktivitätsverteilung während der Präparationsschritte	71
5.2	Besonderheiten der Fraktionierung in der FPLC	76
5.2.1	Gelfiltration (Superdex 200, Pharmacia)	76
5.2.2	Ionenaustauscher (Uno Q und MonoQ-Säulen)	89
5.3	Aktivität in Optiprep [®] - Fraktionen	93

5.4	Aktivitätsveränderung durch Behandlung mit Lipidzusammensetzung verändernden Substanzen	94
5.4.1	Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD)-Behandlung	94
5.4.2	Deoxycholat	95
5.5	Hydroxylapatit-Chromatographie	96
5.6	Markierung mit [^3H]Acetyl-Coenzym-A	96
5.6.1	Abhängigkeit der Markierung von der Inkubationszeit	97
5.6.2	Abhängigkeit der Markierung von pH-Wert	98
5.6.3	Abhängigkeit der Markierung von der Enzymaktivität	99
5.6.4	Hemmbarkeit der Markierung durch Acetyl-Coenzym A und Glucosamin	100
5.6.5	Analyse von Protein-Banden	101
5.6.6	Markierung von affinitätsgereinigten Membranen und konzentrierten GF-Fractionen	103
6	Diskussion	105
6.1	Isolierung von Lysosomen aus humaner Plazenta und Anreicherung der membranständigen Acetyltransferase	105
6.1.1	Charakterisierung der Enzymaktivitätsverteilung während der Präparationsschritte (Ergebnisse in Kapitel 5.1)	105
6.1.2	Besonderheiten der Fraktionierung in der FPLC (Ergebnisse in Kapitel 5.2)	105
6.2	Markierung mit [^3H]Acetyl-Coenzym-A (Ergebnisse in Kapitel 5.6)	107
6.3	Assoziierung mit den <i>rafts</i>	109
6.3.1	Aktivitätsveränderung durch Behandlung mit Cholesterol-bindenden Substanzen	110
6.4	Ausblick	114
7	Zusammenfassung	115

1	Inhaltsverzeichnis	7
8	Literatur	117
9	Anhang	138
10	Lebenslauf	140
11	Verzeichnis der akademischen Lehrer	142
12	Danksagung	143

2 Einleitung

2.1 Lysosom – Geschichte und Definition

Der lysosomale Apparat ist als ein Teil des vakuolären Systems der Zelle zu verstehen und in vielfältige Transport- und Regulierungswege eingebunden.

Der Entdeckung der Lysosomen als Organellen ging die Beschreibung lysosomaler Erkrankungen voraus. Die ersten Mukopolysaccharid-Speicherkrankheiten wurden Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben (Berkhan 1907, Hunter 1917), jedoch der Begriff „lysosomale Erkrankung“ erst nach 1960 geprägt (Hers 1963), nachdem De Duve und Mitarbeiter 1955 erstmals Lysosomen als sedimentierbare osmotisch labile eine Reihe saurer Hydrolasen enthaltende Organellen beschrieben hatten. Die Entwicklung des Konzepts intrazellulärer Organellen und Untersuchungen zur Endozytose führten schließlich Mitte der sechziger Jahre zur Erkennung des vakuolären Systems der Zelle.

Der sekretorische und die autophago- sowie endozytotischen Pfade eukaryoter Zellen sind in mehreren funktionell abgegrenzten membran-gebundenen tubulovesikulären Kompartimenten organisiert, welche durch Fusion/ Fission über vesikulären Transport verbunden sind (Le Borgne *et al.* 1998).

Eine Definition der Lysosomen beruht auf der Beschreibung von Storrie (1988) und enthält folgende Kriterien.

- Es ist ein Organellen-Kompartiment (Membran-gebundene Vakuolen)
- Der vesikuläre Matrixraum ist schwach sauer
- Die Ansäuerung erfolgt durch eine Protonenpumpe, die vakuoläre ATPase (v-ATPase) (Arai *et al.* 1993)
- Die Organelle muß einen großen Anteil an reifen beschriebenen lysosomalen Proteinen enthalten – verschiedene saure Hydrolasen (z.B. Proteinasen und Glykosidasen)

- Das Lysosom ist das terminale Kompartiment des endozytotischen Wegs (festgestellt durch *uptake* Studien) und lässt sich vom prälysosomalen Kompartiment unterscheiden – dieses enthält Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR) während die MPR in Lysosomen fehlen
- Ein Lysosom muss sich in Fraktionierungsexperimenten als *high density* Organelle verhalten

Jedoch wurde in jüngerer Zeit die Ansicht bezüglich des terminalen Kompartiments als Sackgasse und Abfallbehälter in Frage gestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass Lysosomen dynamische Organellen sind, die entlang des Zytoskeletts wandern und mit anderen zellulären Komponenten interagieren (Castino *et al.* 2003).

Es ist mittlerweile gut dokumentiert, dass das saure vakuoläre Kompartiment in allen eukaryoten Zellen an verschiedensten zellulären Prozessen teilnimmt (Sun-Wada *et al.* 2003).

Dazu gehören teilweise oder vollständige Degradation unterschiedlicher Substrate, Transport und Recycling von Molekülen innerhalb interner Organellen sowie zu und von der Plasmamembran, posttranslationale Modifikation und Abbau sekretorischer Produkte (sogenannte Crinophagie), Lagerung unverdauten Materials, Autophagozytose sowie Exozytose und Membranreparatur (Andrews 2002).

Während einige dieser Funktionen nur in spezialisierten Zelltypen stattfinden (Crinophagie in endokrinen Zellen, Phagolysosomenbildung nur in phagozytischen Zellen), ist die Hauptaufgabe der Lysosomen in allen Zellen der Abbau autophagozytierten und internalisierten Materials einschließlich ausgewählter Plasmamembranbestandteile.

Eine normale lysosomale Funktion scheint zudem für einen der Apoptosewege notwendig zu sein, wie Untersuchungen an Zelllinien mit etablierten Zelltod-Modellen zeigen (Tardy *et al.* 2003). Eine normale lysosomale Funktion scheint ebenso eine Rolle in der Tumorprogression zu spielen, was Optionen für

Krebstherapiealternativen eröffnet (Fehrenbacher/Jäätelä 2005, Cirman *et al.* 2004).

In Zellen des Immunsystems leistet das saure Kompartiment weitere spezialisierte Funktionen wie Prozessierung und Präsentation exogener Antigene (Riese/Chapman 2000).

Darüber hinaus sind einige Lysosomen-ähnliche Organellen bekannt (Raposo *et al.* 2002). Die meisten wurden in Blutzellen und Thrombozyten gefunden und zu ihnen gehören die Ó-Granula der Thrombozyten, azurophile und andere Granula der Neutrophilen, lytische Granula zytotoxischer T-Lymphozyten und NK-Zellen, MHC Klasse II-Kompartimente in antigen-präsentierenden Zellen und Mastzellgranula. Sie besitzen alle ein saures Lumen und enthalten einige Hydrolasen sowie lysosomale Membranproteine, oft werden sie auch als sekretorische Lysosomen bezeichnet (Blott/Griffiths 2002).

Hinzu kommen Osteoklasten, welche lysosomale Membranproteine, darunter die v-ATPase in die Bürstensaummembran translozieren und lysosomale Enzyme (z.B. das Cathepsin K) an der Knochenresorptionsstelle sezernieren (Mostow/Werb 1997).

Weitere Beispiele kommen in nicht hämatopoetischen Zellen vor wie Melanosomen in Melanozyten der Haut und des retinalen Pigmentepithels (Marks/Seabra 2001) oder die lysosomen-verwandten lamellaren Körper in Typ II Alveolarmakrophagen (Ashino *et al.* 2000) sowie die Weibel-Palade Körperchen als die regulierten sekretorischen Granula in Endothelzellen. Die letzteren setzen Weibel-Palade Körperchen und von Willebrand-Faktor nach Aktivierung durch inflammatorische Marker wie Thrombin oder Histamin frei.

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass eine gestörte lysosomale Funktion nicht nur in den *early onset*-Erkrankungen (lysosomale Speicherkrankheiten) mit Krankheitszeichen im Kindes- und Jugendalter eine Rolle spielt, sondern auch in der frühen Pathogenese von *late-onset age-related* Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, M. Huntington, Prionenerkrankungen und altersbedingte Makuladegeneration (Bahr/Bendiske 2002, Bergmann *et al.* 2004).

2.2 Einführung in die Biologie der Lysosomen

Das saure vakuoläre System besteht aus membran-umschlossenen Organellen, welche über das Zytoplasma verteilt vorliegen und durch Transportvesikel sowohl mit dem Äußeren der Zelle sowie mit dem *trans*-Golgi Netzwerk und sekretorischen Vesikeln verbunden sind. Die Verbindung von *trans*-Golgi Netzwerk und den Lysosomen wird in Kap. 2.3.3 beschrieben.

Auf dem Weg von der Plasmamembran können mindestens drei verschiedene Stadien unterschieden werden: frühe Endosomen mit einem intraluminalen pH von 6,0 – 6,5, späte Endosomen mit einem etwas saureren pH (etwa pH 5), und Lysosomen mit dem sauersten Kompartiment (pH um 4,5).

Frühe und späte endosomale Kompartimente sind pleomorph und bilden ein vielgestaltiges Netzwerk aus tubulären und vesikulären Elementen, während Lysosomen zirkuläre Organellen von cirka 0.5 µm Durchmesser sind (Castino *et al.* 2003).

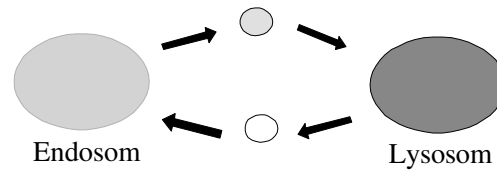
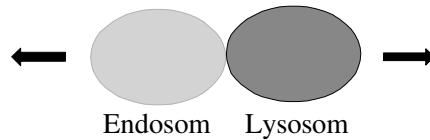
Die frühen Endosomen sind die erste Station für den Inhalt endozytotischer Vesikel von der Plasmamembran kommend. Diese Vesikel verschmelzen (homotypisch) untereinander sowie mit den frühen Endosomen.

Sowohl frühe als auch späte Endosomen erhalten neu synthetisierte saure Hydrolasen über Mannose-6-Phosphat Rezeptor (MPR) vermittelten oder – unabhängigen Transport (Kornfeld/Mellman 1989).

In diesen Organellen werden Rezeptoren sortiert und nach säureabhängiger Dissoziation der Liganden über sogenannte *recycling* Endosomen zurück zur Plasmamembran oder dem *trans*-Golgi- Netzwerk (TGN) transportiert.

Für den Transport vom späten Endosom zum Lysosom gibt es mehrere Hypothesen: (1) durch Transportvesikel (für diesen Pfad besteht jedoch kein Nachweis), (2) durch transiente und limitierte Fusion zwischen den beiden Organellen (*kiss and run*- Hypothese) oder (3) durch Fusion der beiden Organellen unter Bildung einer Hybrid-Organelle, aus welcher ein Lysosom und ein kleineres Endosom hervorgehen (Luzio *et al.* 2000). Siehe Abbildung 2.1.

(1) Vesikulärer Transport

(2) *Kiss and run*

(3) Direkte Fusion mit Bildung einer Hybridorganelle

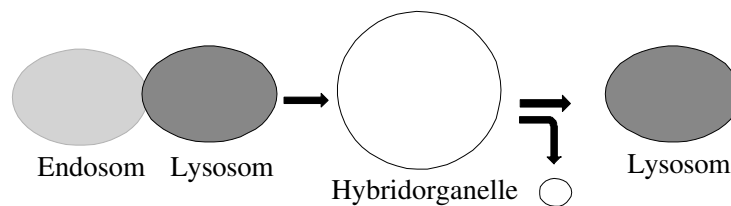


Abbildung 2.1: Hypothesen für den Transport von Endosom zu Lysosom (Abbildung modifiziert nach Luzio *et al.* 2000)

Der endozytotische und exozytotische Membrantransport ist über mehrere Signalgeber reguliert: Protein- und Lipidkinasen, mono- und heterotrimere G-Proteine, Calcium-Ionen, und wird durch Interaktion heterooligomerisierender Proteine auf Vesikel und Zielorganelle spezifiziert (SNARE Hypothese) (Castino *et al.* 2003).

Frühe Endosomen, späte Endosomen und Lysosomen können auf Basis der relativen Anwesenheit oder Abwesenheit integraler oder membran-assoziiierter Proteine wie EEA1, LAMP-1, LAMP-2, MPR300, MPR46 und Mitgliedern der rab-Familie unterschieden werden (Dunster *et al.* 2002).

Diese Organellen unterscheiden sich auch in ihrem Hydrolase-Gehalt und höchst wahrscheinlich in ihrer Funktion. Während zum Beispiel Cathepsine in Endosomen nur eine limitierte Hydrolyse ausüben, die in einer Aktivierung

inaktiver Vorstufen resultiert, erreichen die gleichen Proteinase im Lysosom eine ausgeprägte Degradation der enthaltenen luminalen Proteine (Berg *et al.* 1995).

Substrate können das Lysosom über drei Pfade erreichen (siehe auch *Abbildung 2.2*); mögliche weitere sind bei Hefe-Vakuolen, dem Lysosomen-Äquivalent bei Hefen, beschrieben (Majeski/Dice 2004).

- Mikroautophagie, kleine Teile des Zytoplasma werden direkt über Invagination der lysosomalen Membran umschlossen (Dunn 1994).
- *Chaperone-mediated* Autophagie (CMA). Ein hsc70 Chaperon (mit Hilfe von Cochaperonen) -vermittelter Mechanismus, der das lysosomale Membranprotein LAMP-2a als Rezeptor nutzt, um Proteine, welche das KFERQ Pentapeptid Motiv besitzen zu translozieren. (Cuervo/Dice 1998, Cuervo *et al.* 2003). Dieser wird durch physiologische Stressoren, z.B. Hungern aktiviert. (Erläuterung des *single letter code* der Aminosäuren im Anhang).
- Makroautophagie, bei der ganze Organellen mit einem Teil des Zytoplasma aufgenommen werden, dabei entstehen Autophagosomen (Kim/Klionsky 2000).

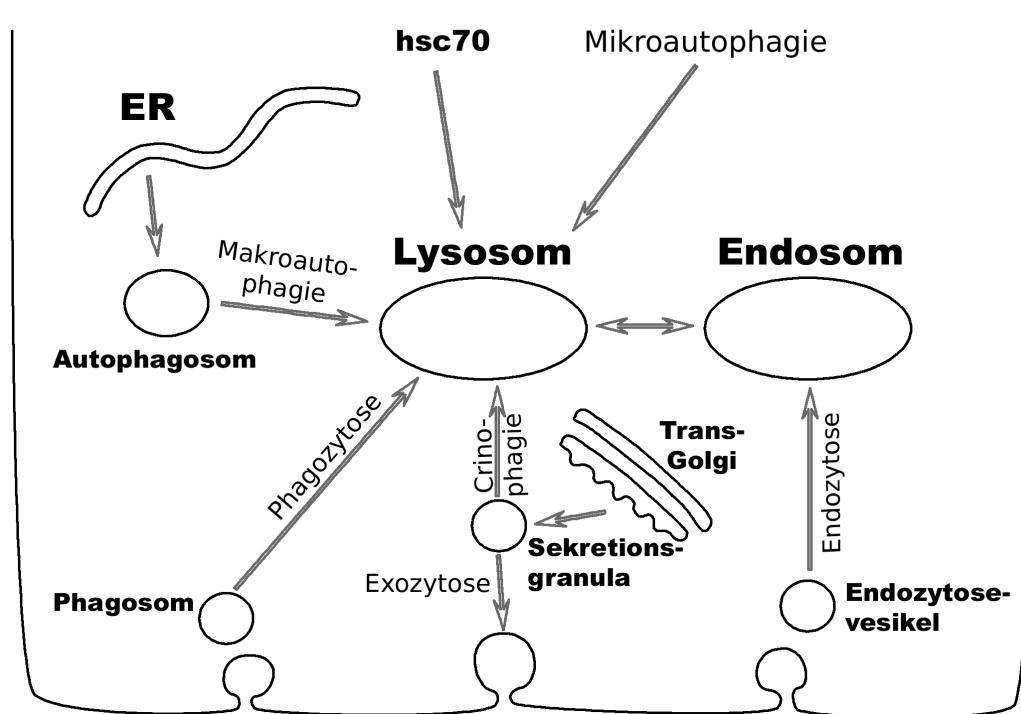


Abbildung 2.2: Die zentrale Rolle von Lysosomen bei verschiedenen abbauenden Vorgängen.
Abbildung modifiziert nach Castino et al. 2003

2.3 Lysosomale Proteine

2.3.1 Lysosomale Membranproteine

Zu den lysosomalen Proteinen zählen Membranproteine, deren Zusammensetzung die Funktion der Lysosomen als saures, Substrat-abbauendes Kompartiment widerspiegeln. Diese Funktion beinhaltet die Ansäuerung auf ca. pH 5, also einer 100-fachen H^+ -Ionenkonzentration im Vergleich zum Zytosol. Transportproteine übernehmen den Export von Abbauprodukten, es gibt Ionenkanäle, strukturelle Membranproteine, Moleküle, die am Organellentransport und Fusionsprozessen beteiligt sind, Moleküle, die den Abbauprozessen widerstehen und die Begrenzung der degradierenden Enzyme auf das Kompartiment sicherstellen und schließlich Proteine, die mit dem Zytosol interagieren und an Abbauprozessen oder der Regulation lysosomaler Funktionen beteiligt sind. In Betracht kommen weiterhin Verbindungen zur Signaltransduktion und Apoptose.

Storrie (1988) konnte in SDS-PAGE-Gelen von lysosomalen angereicherten Fraktionen 20-30 grössere Polypeptide im Bereich zwischen 15 und 200 kDa nachweisen. Relativ wenige davon sind gereinigt und sequenziert (siehe Tabelle 2.1), diese jedoch sind hochglykosyliert und Storrie postulierte davon ausgehend, dass alle lysosomalen Membranproteine Glykoproteine seien.

Tabelle 2.1: Sequenzierte und genetisch identifizierte lysosomale Membranproteine

Protein	Ketten-Länge	Glykosylierungsstellen	% Glykosylierung	Membranproteintyp	Referenz
LAMP-1 (LEP100, lgp120, LGP107, LIMP III, CD 107a)	389	17-20	50-70	Typ I	Applegarth (1997)
LAMP-2 (lgp110, LGP96, LIMP IV, CD 107b))	380	16-17	50-70	Typ I	Applegarth (1997)
LAMP-3 (LIMP I, CD 63, ME491)	237	3	25-50	Typ II	Applegarth (1997)
LGP 85 (LIMP II, verwandt zu CD36)	477	10-11	20-45	Typ III	Mancini (2000)
H ⁺ -ATPase	-			Typ IV	Forgac 1999
Sialinsäuretransporter Sialin	495	6 mögliche		ACS family 12 TM	Verheijen 1999
Cystin-Transporter Cystinosin	367	hoch		7 TM	Town 1998
Nicastrin (Teil des γ -Sekretase Komplexes)	709 (ORF)	Ja		Typ I	Bagshaw 2003
ABCB9 Verm. Lys. ABC-Trans.	723			7 TM	Zhang 2000
ABCA2 Verm. Lys. ABC-Trans					Vulevic 2001
NRAMP2	561			12 TM	Tabuchi 2000

Eisentransporter			
NPC-1	1278	13 TM	Simons 2000
CLN3	438	11 TM	Jarvela 1999
Lysosomales pH-Sensing, synaptischer Vesikeltransport			
Mucolipin	580	5 TM	Kiselyov 2005, Soyombo 2005
N-Acetyltransferase (GNAT) *	656	Postuliert 12 TM	Fan 2006, OMIM

Vermutete Funktionen der sogenannten Strukturproteine der lysosomalen Membran (Eskelinen *et al.* 2003):

LAMP-1: lysosomale Stabilität und Integrität. Knockout-Mäuse zeigen eine milde Astroglieose und normale lysosomale Funktion, überlappende Funktionen mit LAMP-2.

LAMP-2: Lysosomale Stabilität und Integrität, Chaperon-vermittelte Autophagie, Knockout-Mäuse zeigen eine Kardiomyopathie und Myopathie wie bei der Danon-Krankheit. LAMP-2 spielt zusammen mit hsc 70 eine Rolle in der lysosomalen Biogenese und Autophagozytose, überlappende Funktionen mit LAMP-1.

LIMP-1: Zell-Aktivierung, Beteiligung an Membranfusion von sekretorischen Organellen.

LIMP-2: Beteiligt an der Biogenese und Erhaltung von Endosomen/ Lysosomen, Interaktion mit der Vesikelfusionsmaschinerie. *Knockout*-Mäuse zeigen eine Obstruktion des Urogenitaltrakts, Taubheit und periphere Neuropathie.

Tabelle 2.2: Lysosomale Membranproteine, die durch ihre Funktion als Transporter identifiziert wurden (nach Mancini 2000)

System	Substrat	Transport Typ	Referenz
Aminosäuren			
(c) kationische	L-Lys, Arg	sekundär aktiv?	Pisoni et al. (1985, 1987)
(d) anionische	L-Glu, Asp	passiv	Collarini et al. (1989)
(e) kleine neutrale	L-Ala, Ser, Thr	passiv	Pisoni et al. (1987)
(f) kleine neutrale	L-Pro, Ala	passiv	Pisoni et al. (1987)
(p) kleine neutrale	L-Pro, 3,4-dehydro-L-Prolin	passiv	Pisoni et al. (1987)
(h) große neutrale	L-Tyr, Leu, Ileu, Trp, Phe, His, Val, Met	passiv	Bernar et al. (1 sekundär aktiv 986), Andersson et al. (1990)
(l) bulky dipolar	L-Leu, Val	passiv	Stewart et al. (1989)
(t) aromatische	L-Trp, Phe	passiv	Stewart et al. (1989)
neutrale (LYAAT-1)	L-Pro	sekundär aktiv (H+-Symport)	
Cystin	L-Cystin, selenocystin	passiv ?	Gahl et al. (1982), Jonas et al. (1982)
Cystein	L-Cystein	sekundär aktiv ?	Pisoni et al. (1990), Pisoni/Velilla (1995)
Cysteamin	Cysteamin	sekundär aktiv ?	Pisoni et al. (1995)
Taurin	Taurin	sekundär aktiv ?	Vadgama et al. (1991)
Dipeptide	Gly-Gln	sekundär aktiv ?	Thamotharan et al. (1997), Bird/Lloyd (1990)
Zucker			
Saure Zucker	Neu5Ac, GlcA	sekundär aktiv	Mancini et al. (1989, 1991)
Neutrale Monohexosen	D-Glucose	passiv	Mancini et al. (1990, 1991), Jonas et al. (1990)
N-acetylierte Hexosen	N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalaktosamin	passiv	Jonas et al. (1989)
Nucleoside			
	Purin, Pyrimidin	passiv	Pisoni/Thoene (1989)
Anorganische Ionen			
H ⁺ pump/ATPase	Protonen	primär aktiv	Schneider (1981)
Chlorid Kanal	Cl ⁻	Kanal	Tilly et al. (1992)
Phosphat Ion	HPO ₄ ²⁻	passiv	Pisoni et al. (1991)
Sulphat Ion	SO ₄ ²⁻	sekundär aktiv ?	Jonas/Jobe (1990)
Calcium Ion	Ca ²⁺	passiv	Lemons/Thoene (1991)
Schwermetallionen	Ag ⁺	primär aktiv	Havelaar et al. (1998)
Vitamine			
Folylpolyglutamat		passiv	Barrueco/Sirotnak (1991)
Cobalamin (B12)	Cyanocobalamin	sekundär aktiv ?	Idriss/Jonas (1991)
Unbekannter Mechanismus			
Cholesterol			
Eisen Ion			

2.3.2 Luminale Proteine

Die luminalen lysosomalen Proteine können membran-assoziiert oder löslich sein. Es handelt sich um saure Hydrolasen, einschließlich Proteinasen, Glykosidasen, Sulfatasen, Sulfamidasen, Phosphatasen, Lipasen, DNAsen, RNAsen, welche vielfach durch die Erforschung von Stoffwechseldefekten charakterisiert wurden (siehe Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3: *Luminale lysosomale Proteine (sequenziert) nach Applegarth et al. 1997*

Enzym/ Protein	Proteinklasse	Kettenlänge	Mögliche Glykosylierung	Referenz
Sapopin A, B, C, D	Aktivator	83 (A), 80 (B), 81 (C), 82 (D)	5	Rorman (1992)
Sphingolipid Protein Aktivator	Aktivator	162	1	Klima (1991), Heng (1993)
Nicht-sekretorische Ribonuklease	Zytotoxin	134	5	
Di-N-Acetylchitobiose	Glykosidase	347	4	
α -Galaktosidase A	Glykosidase	398	4	Kornreich (1989)
α -Galaktosidase B	Glykosidase	341	5	Wang und Desnick (1991)
α -Glucosidase	Glykosidase	883	7	Hoefsloot (1990)
α -L-Fucosidase	Glykosidase	439	3	Kretz (1992)
α -L-Iduronidase	Glykosidase	626	6	Scott (1992)
α -Mannosidase	Glykosidase	961		Nebes und Schmidt (1994)
α -N-acetylglucosaminidase	Glykosidase	720	7	Weber (1996), Zhao (1996)
Aspartylglucosaminidase	Glykosidase	323	2	Park (1991)
β -Galactosidase	Glykosidase	649	7	Morreau (1991)

<i>Enzym/ Protein</i>	<i>Proteinklasse</i>	<i>Kettenlänge</i>	<i>Mögliche Glykosylierung</i>	<i>Referenz</i>
β -Glucocerebrosidase	Glykosidase	497	5	
β -Glucuronidase	Glykosidase	629	4	Miller (1990)
β -Glucosidase	Glykosidase	500	5	Horowitz (1989)
β -Hexosaminidase A	Glykosidase	421	3	Proia (1988)
β -Hexosaminidase B	Glykosidase	435	3	Proia (1988)
β -Mannosidase	Glykosidase			Chen (1995)
α_1 -Mikroglobulin	Inhibitor	333	5	
Saure Lipase	Lipase	378	6	Aslanidis (1994), Anderson (1994)
Sphingomyelin Phosphodiesterase		583	6	Schuchmann (1992)
Saure Phosphatase	Phosphatase	393	8	Pohlmann (1988)
Saure Phosphatase (Tartrat resistent)	Phosphatase	302	2	
Cathepsin D	Proteinase (aspartyl)	348	2	Faust (1985)
Cathepsin B	Proteinase (thiol)	254	1	Chan (1986)
Cathepsin S	Proteinase (thiol)	217	1	Shi (1992)
Cathepsin L	Proteinase (thiol)	220	2	Joseph (1988)
Cathepsin H	Proteinase (thiol)	220	1	Deussing (1997)
Cathepsin K	Proteinase (thiol)	215	1	Gelb (1996), Rood (1997)
Lysosomales protektives Protein/ Cathepsin A	Protektor/ Serin-Carboxypeptidase	453	2	Galjart (1988)
Sulfamidase	Sulfamidase	481	5	Scott (1995)
Iduronat-2-sulfatase	Sulfatase	525	7	Wilson (1993) Flomen (1993)

<i>Enzym/ Protein</i>	<i>Proteinklasse</i>	<i>Kettenlänge</i>	<i>Mögliche Glykosylierung</i>	<i>Referenz</i>
N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase	Sulfatase	496	2	Nakashima (1994)
N-Acetylglucosamin-6-Sulfatase	Sulfatase	516	3	Robertson (1988)
Galactose-3-sulfatase (Arylsulfatase A)	Sulfatase	489	3	Kreysing (1990)
N-Acetylglactosamin-4-sulfatase	Sulfatase	497	6	Modaressi (1993)
Palmitoyl-protein thioesterase (PPT)	Thioesterase	281	3	Vesa (1995)

2.3.3 Biosynthese und intrazellulärer Transport

Synthese und frühe Prozessierung der Proteine

Eine Translokation des entstehenden Peptidstrangs in das Endoplasmatische Retikulum ist der erste Schritt der Synthese integraler Membranproteine und luminaler Proteine für ER, Golgi, endosomales Netzwerk und Lysosomen sowie sekretorischer Proteine.

Die messenger-RNA (mRNA) eines Teils dieser Proteine kodiert eine ca. 20 Aminosäuren lange hydrophobe Signalsequenz. Sobald diese Sequenz translatiert ist, binden ein *signal recognition particle* (SRP) und eine kleine zytosolische RNA (7SL RNA) das Peptid und verhindern eine weitere Translation bis der gesamte Komplex zum rauhen ER transloziert ist. Dort wird SRP durch den SRP-Rezeptor gebunden und dissoziiert in der Folge von GTP-Hydrolyse vom Ribosom und der Signalsequenz (Shan/Walter 2005). Das Ribosom bindet an einen Translokationskomplex (Sec 61 Protein, Translocon, bestehend aus drei Transmembranproteinen) und die Signalsequenz wird in den Membrankanal inseriert. Im ER findet die Abspaltung der Signalsequenz statt, evtl. eine N-Glykosylierung sowie die Faltung.

Membranproteine werden mittels Transmembransegmenten um das Translocon in die RER-Membrans inseriert und müssen nicht eine N-terminale Signalsequenz enthalten.

Membranproteine werden für die weitere Modifikation durch das vakuoläre Netzwerk als Membrankomponenten transportiert. Jedoch bestehen erhebliche Unterschiede in welcher Art Membranproteine in der Membran verankert werden, z.B. bei einem oder mehreren Transmembransegmenten und unterschiedlicher Orientierung der N-terminalen oder C-terminalen Domäne zum Zytosol. Die Topologie der Proteine in Bezug auf spätere zytosolische Orientierung bleibt auch beim Transport im vakuolären System erhalten.

Der direkteste Weg besteht für sogenannte *single-pass*-Proteine mit zytosolischem C-Terminus. Diese haben eine normale N-terminale Signalsequenz, welche während der Translokation abgespalten wird. Anschließend werden sie in der

Membran durch eine zweite membranständige α -Helix verankert, welche *stop-transfer*-Sequenz genannt wird. Sie vermittelt das Schließen des Translocons, bzw. wird von diesem lateral an die umliegende Membran abgegeben und die restliche Peptidkette wird ins Zytosol translatiert.

Proteine können jedoch auch direkt durch interne als Signal wirkende Transmembransegmente in der ER-Membran verankert werden, die nicht abgespalten werden. Sie verlassen das Translocon und können je nach Orientierung den amino- oder carboxyterminalen Anteil exponieren.

Bei multiplen Transmembransegmenten alterniert die Orientierung der vom Translocon an die Membran abgegebenen Segmente. Sie wirken als Stop Transfer Sequenzen. Die zwischen den Transmembransegmenten synthetisierten Sequenzen bilden Schleifen, die alternierend in die luminalen und zytosolischen Domänen eingebaut werden.

Einige Proteine ohne interne *stop-transfer*-Segmente werden aufgrund eines C-Terminus-nahen Sequenzsignals an einer (als ω bezeichneten) Stelle aufgespalten und gleichzeitig auf ein Glycosylphosphatidylinositol- (GPI) Lipid übertragen (durch eine Transamidierung). Die GPI-Verankerung ermöglicht einen späteren Einbau in Detergens-resistente Mikrodomänen. Ein Beispiel ist die alkalische Phosphatase (Siehe Bild 2.1).

Faltung und Multimerisierung werden durch luminale ER Proteine erleichtert, zu ihnen gehören die Lektin-Chaperone Calnexin und Calreticulin sowie die Chaperone der hsp70 Familie wie BiP (Kleizen /Braakman 2004).

Die Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb der Moleküle wird durch das oxidative Milieu des ER und eine Reihe Oxidoreduktasen wie die Proteindisulfidisomerase erreicht. Desweiteren finden auch die ersten Schritte der Glykosylierung im ER statt.

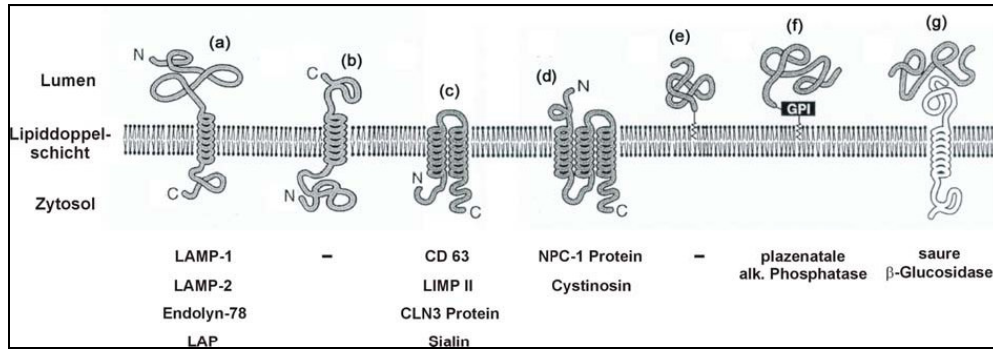


Bild 2.1: Schematische Darstellung von Membranproteinen: (a) Typ I Transmembranprotein, (b) Typ II Transmembranprotein, (c) Typ III Transmembranprotein: Membranprotein mit mehreren Transmembransegmenten (multipass) und N- und C-Terminus im Zytosol, (d) Membranprotein mit mehreren Transmembransegmenten (multipass), sowie dem N-Terminus im Lumen und dem C-Terminus im Zytosol, (e) Membranprotein mit Lipidanker, (f) Membranprotein mit GPI-Anker und (g) peripheres Membranprotein (modifiziert nach Chou und Elrod (1999) und Wickner und Lodish (1985)). Die Aminosäuresequenz und Topologie der entsprechenden Proteine wurde beschrieben: LAMP-1 und LAMP-2 (Fukuda et al., 1988), Endolyn-78 (Ihrke et al., 2000), LAP (Pohlmann et al., 1988; Waheed et al., 1988), CD63 (Metzelaar et al., 1991; Peters und Figura 1994), LIMP II (Fujita et al., 1992; Fukuda, 1991), CLN3 Protein (The International Batten Disease Consortium, 1995; Janes et al., 1996), Sialin (Verheijen et al., 1999), NPC-1 Protein (Carstea et al., 1997; Davies und Ioannou 2000), Cystinosin (Town et al., 1998; Cherqui et al., 2001), plazentale alkalische Phosphatase (Snyders et al., 1999; Millan, 1986), saure β-Glucosidase (Sorge et al., 1985)

Die meisten Proteine verlassen das ER, um weiter im Golgi prozessiert zu werden. Es gibt jedoch auch Retentionssignale für Proteine, die ER-resident sind: die c-terminale KDEL-Sequenz und bei einigen Proteinen ein KKXX-Sequenz (X steht für eine beliebige Aminosäure). Diese Sequenzen schließen den vesikulären Weitertransport nicht vollständig aus, ermöglichen aber einen vesikulären Rücktransport.

Golgi

Der Transport vom Golgi-Netzwerk an die Zielorte kann über drei Arten geschehen

1. konstitutive Sekretion - Inkorporation neuer Proteine und Lipide zur Plasmamembran, kontinuierliche Sekretion
2. regulierte Sekretion
3. spezifischer Transport zu intrazellulären Zielen, z.B. Lysosomen

Alle im Golgi zurückgehaltenen Proteine sind membranverankert, ihre Signalsequenzen wurden in den Transmembrandomänen sowie im zytoplasmatischen Ende lokalisiert.

Transport lysosomaler Proteine

Am besten charakterisiert ist das *targeting*, die „Adressierung“ der Proteine für den lysosomalen Pfad.

Luminale Proteine erhalten einen Mannose-6-Phosphatrest auf einem N-terminalen Oligosaccharid kurz nach Eintritt ins Golgi-System. Dieser wird von einem spezifischen Rezeptor im *trans*-Golgi-Netzwerk erkannt, der die Verpackung in Transportvesikel initiiert.

Es wurde auch Mannose-6-Phosphatrest-unabhängiges *targeting* für lysosomale Proteine beschrieben. Beispielweise wird in weißen Blutzellen ein Teil des Lysozyms mittels Komplexen mit Serglycin in Lysosomen transportiert (Lemansky et al. 2003).

Lysosomale Membranproteine können auf einem direkten und einem indirekten Weg zu den Lysosomen transportiert werden. Der direkte Weg führt vom TGN über die frühen Endosomen (durch das Adaptorprotein AP-1 vermittelt) und/oder (durch das Adaptorprotein AP-3 vermittelt) die späten Endosomen letztendlich zu den Lysosomen. Beim indirekten Transport gelangen die Proteine auf einem Umweg über die Plasmamembran zu den Lysosomen. Vom *trans*-Golgi-Netzwerk werden die Proteine zunächst zur Plasmamembran transportiert und gelangen erst nach einer durch das Adaptorprotein AP-2 vermittelten Endozytose in die Endosomen und schließlich zu den Lysosomen.

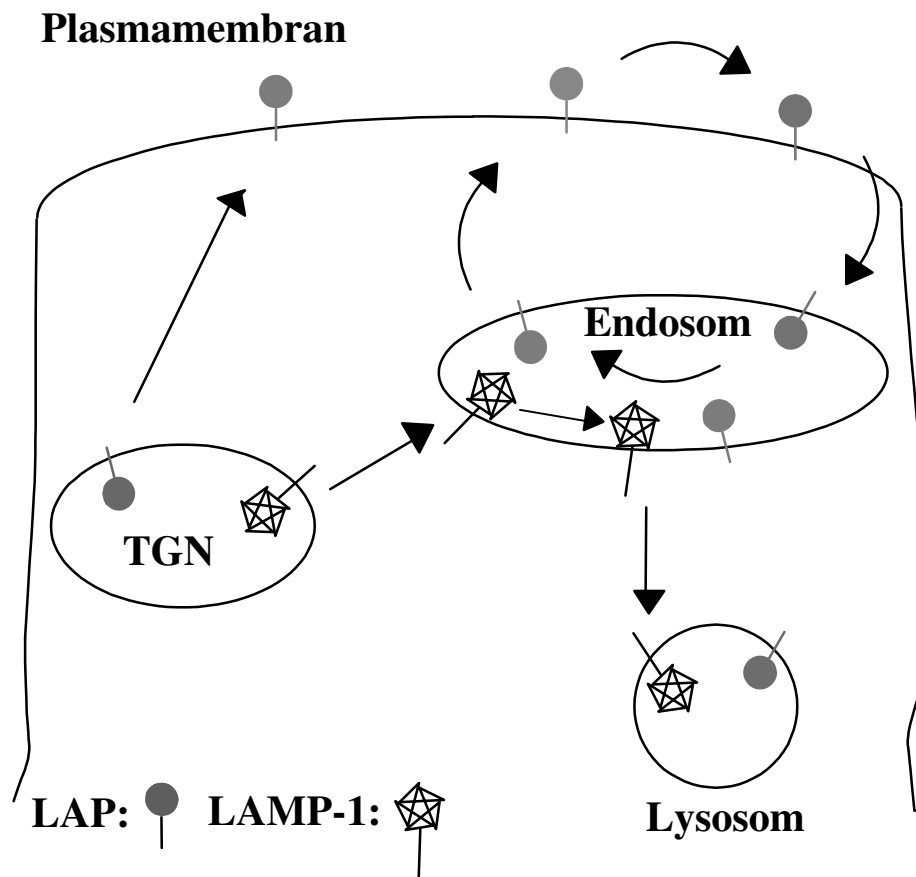


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des direkten und indirekten Transportes lysosomaler Membranproteine. Der direkte lysosomale Transport von z.B. LAMP-1 (lysosomal associated membrane protein 1), der indirekte LAP-Transport (LAP: lysosomal acid phosphatase), der über die Plasmamembran führt. Die einzelnen Kompartimente, die auf den Transportwegen passiert werden, erklären sich aus der Zeichnung. (TGN steht für trans-Golgi-Netzwerk)

Das Sorting von Transmembranproteinen zu Endosomen und Lysosomen wird durch Signale in der zytosolischen Domäne der Proteine vermittelt. Die meisten Signale bestehen aus kurzen, linearen Sequenzen von Aminosäuren.

Einige werden als Tyrosin-basierte Sorting Signale bezeichnet und bilden ein NPXY oder YXXØ Konsensusmotiv (Erläuterung des single letter code der Aminosäuren im Anhang). Andere Signale, die als Dileucin-basiert bekannt sind besitzen ein [D/E]XXXL[L/I] oder DXXLL Konsensusmotiv. Alle diese Signale werden von Komponenten eines Vesikularisierungs-Proteingerüsts (des Protein

coats, bzw. der Proteinbeschichtung) erkannt, welche peripher mit der zytosolischen Seite der Membran assoziiert sind und von Ummantelungsproteinen gebunden werden (Bonifacino 2003). YXXØ und [D/E]XXXL[L/I] Signale werden mit charakteristischer Spezifität von den Adaptorprotein-Komplexen AP-1, AP-2, AP-3, and AP-4 erkannt (Review Robinson 2001), wohingegen DXXLL Signale von einer anderen Familie von Adaptormolekülen erkannt werden, den GGAs (Golgi-localized γ -ear-containing ARF-binding proteins, gespr. „gigas“).

Einige Proteine, Clathrin, AP-2, and Dab2 eingeschlossen, wurden als Kandidaten für die Erkennung der NPXY Signale vorgeschlagen.

LAMP-1 und LAMP-2 werden z.B. durch ein Tyrosin-basiertes Motiv erkannt, während LAP durch ein Di-Leucin-Motiv erkannt wird. Die Signalerkennung wird durch Phosphorylierung reguliert

Zusätzlich zu den Peptidmotiven, dient die Mono-Ubiquitinierung von zytosolischen Lysinresten als Endozytosesignal für den Abbau von Plasmamembranproteinen (Hicke 2001).

Diese komplexe Mischung an Signalen und Erkennungsproteinen stellt die dynamische aber akkurate Verteilung der Transmembranproteine an die verschiedenen Kompartimente des endosomal-lysosomalen Systems sicher (Bonifacino/Traub 2003).

Mechanismen vesikulären Transports

Vesikulärer Transport vollzieht sich über verschiedene *coat*-Proteine, die bei unterschiedlichen Vesikeln eine Rolle spielen. Siehe Abbildung 2.4.

1. *Clathrin – coated vesicles*: vermitteln Endozytose und den Transport von *trans*-Golgi und der Plasmamembran zu Endosomen
2. COP II (COP = *coat protein*): Transport von ER zu Golgi, (Vorwärtstransport)
3. COP I: Rückführungsvesikel (z.B. KDEL, KKXX Signale)

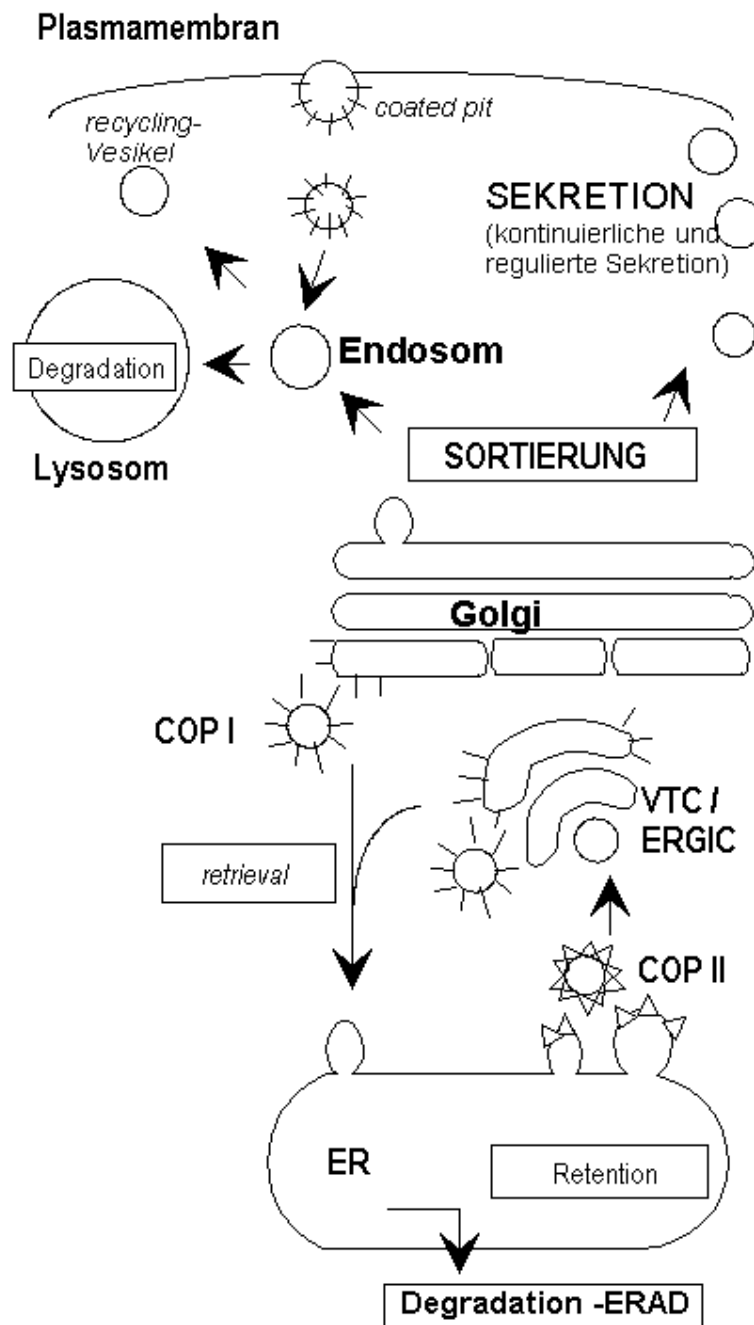


Abbildung 2.4: Schema über Mechanismen vesikulären Transports (modifiziert nach Ellgaard et al. 1999) Im ER (Endoplasmatisches Retikulum) werden die meisten Proteine zurückgehalten bis sie korrekt gefaltet und zusammengesetzt sind. Missgefaltete Proteine werden ins Zytosol retransloziert und durch das Proteasom abgebaut. Richtig gefaltete Proteine verlassen das ER und wandern in so genannte ER exit sites. Hier assoziieren Komponenten des COPII Mantels mit der zytosolischen Oberfläche der Membran. Sie sind für das Knospen der Vesikel und tubulärer Elemente zum Export in den Golgi-Komplex verantwortlich. Einschluß der Proteine in COPII Vesikel ist selektiv und trägt zur Qualitätskontrolle bei. Wenn die COPII Vesikel das ER verlassen haben und VTC

(*vesicotubular clusters*) gebildet haben, werden Rücktransportvesikel mit einem COPI Mantel gebildet. COPI Vesikel vermitteln die Formation von Rücktransport-Vesikeln, welche einiges der Membran und Inhalte zurück zum ER bringen. Weil die Aufnahme in die retrograden Vesikel ebenfalls selektiv ist, dienen die VTC und der cis-Golgi Komplex ebenfalls als zusätzliche Stellen für Qualitätskontrolle. Schließlich dient das trans-Golgi Netzwerk, von wo aus Material zur Plasmamembran und durch Endosomen zu Lysosomen transportiert wird, als Ort zum Rerouting einiger fehlgefalteter Proteine, die abgebaut werden sollen.

VTC: vesicotubular cluster, auch ERGIC: ER-Golgi intermediate compartment, ERAD: ER-associated degradation

Clathrin fungiert als strukturelles Element der am TGN und der Plasmamembran zu bildenden Vesikel und als stabilisierender Mantel für die Komponenten der *sorting*-Maschinerie, die *sorting*-Signale bindende Adaptorproteine in die Clathrin-coated Vesikel konzentrieren (Mousavi *et al.* 2003). Somit interagiert Clathrin mit verschiedenen Adaptor-Komplexen, welche die transportierten Moleküle selektieren.

AP-1 bindet den zytosolischen Teil des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors im TGN und führt damit lysosomale Proteine in Clathrin-coated vesicles des TGN. AP-2 übt eine ähnliche Funktion an der Plasmamembran aus (Owen *et al.* 2004).

Der Aufbau eines Vesikel-coats benötigt GTP-bindende Proteine, welche die Bindung der coat-Proteine an die Membran zu regulieren scheinen: Das *budding* (Knospen) von Clathrin-coated und COPI-coated Vesikeln aus dem Golgi-Komplex erfordert ein ARF (*ADP-ribosylation-factor*), während das *budding* von COP II-coated Vesikeln vom ER das GTP-bindende Protein Sar 1 benötigt (Cooper 2000).

Vesikelfusion

Der Prozess der Vesikelfusion verläuft in mehreren Stufen, zunächst Erkennung der Zielmembran und anschließende Fusion.

Analyse involvierter Proteine führte zur Entwicklung der SNARE Hypothese durch Rothman *et al.* (1992), bei der die Vesikelfunktion vermittelt wird durch spezifische Proteinpaaire integraler Membranproteine (SNAREs=*SNAP receptor*, SNAP= *soluble NSF attachment protein*) auf der Vesikel- und Zielmembran

(*target*) (v-SNARE und t-SNARE). Der genaue Fusionsmechanismus ist noch nicht geklärt (Sollner 1993).

Zusätzlich zu den erwähnten SNAREs werden für die Vesikelfunktion mindestens zwei andere Arten Proteine benötigt. Zum einen Mitglieder der Rab-Familie (kleine GTP-bindende Proteine verwandt mit Ras), welche an verschiedenen Schritten des vesikulären Transports eingreifen. Zum anderen der NSF/SNAP Komplex, der nach der SNARE Komplexbildung an die Membran rekrutiert wird und nach der Fusion die Auflösung des SNARE Komplexes vermittelt.

2.4 Lysosomale Speicherkrankheiten

Lysosomale Speicherkrankheiten bilden eine Gruppe von über 40 verschiedenen Erkrankungen (Gieselmann 1995). Ihre Gemeinsamkeit besteht in einem Defekt eines lysosomalen Substrat-abbauenden Proteins und der Speicherung der nicht abbaubaren Stoffe. Dies kann zum einen eine Hydrolase sein oder ein Kofaktor, der am Abbau von Makromolekülen beteiligt ist. Weitere Defekte betreffen Transporter, die Produkte intralysosomaler Hydrolyse ans Zytosol abgeben. Die vorkommenden Defekte betreffen nicht nur die Synthese von funktionsfähigen Proteinen, sondern ebenso die regelrechte ER- und Golgi-Prozessierung sowie das *targeting*.

Die meisten lysosomalen Glykosidasen sind Exohydrolasen. Substrate werden durch sie in einem schrittweisen Abbau der endständigen Anteile abgebaut.

Daher kann die Funktionseinschränkung eines Enzyms die Blockade eines ganzen Stoffwechselweges nach sich ziehen.

Die lysosomalen Speicherkrankheiten lassen sich anhand des betroffenen Stoffwechselweges und des akkumulierten Substrats unterteilen.

Es sind 11 verschiedene Enzymdefekte bekannt, die den Abbau von Mukopolysacchariden betreffen, die 7 distinkte Mukopolysaccharidosen verursachen (Neufeld in Scriver 2001). Sechs Defekte sind für den Abbau von Glykoproteinen bekannt, zwei für die Speicherung von Glykogen (Glykogenose II sowie Danon-Krankheit) und zehn Defekte betreffen den Abbau von Sphingolipiden (Lipidosen), sowie drei weitere andere Lipide, 4 multiple Enzyme,

z.B. die multiple Sulfatase Defizienz, bei der ein für die posttranslationale Modifizierung und Aktivierung von Sulfatasen zuständiges Protein defekt ist (Rommerskirch *et al.* 1992) und 2 lysosomale Membranproteine (Danon Krankheit bei Defekten von LAMP-2) (Vellodi 2005). Zu den (teilweise) aufgeklärten Transportdefekten zählen die Salla-Erkrankung (Sialin-Defekte), Cystinose (Cystinosin-Defekte), Mucopolidose IV (Mucopolipin-Defekte) und die Typ I und Typ II Niemann-Pick Erkrankung (NPC-1 bzw. NPC-2 Defekte). Die molekulare Aufklärung des lysosomalen Vit. B12-Transports sowie anderer lysosomaler Transportsysteme stehen noch aus.

2.5 Mukopolysaccharidosen

Die Mukopolysaccharidosen (MPS) sind seltene bis sehr sehr seltene Krankheiten und die epidemiologischen Daten rar. Die kumulative Häufigkeit liegt jedoch bei ca. 1:50 bis 1:200.

Schon 1835 beschreibt W. Irving, ein nordamerikanischer Schriftsteller in einem Reisebericht erstmals einen Patienten mit einer Mukopolysaccharidose (M. Hunter) (Miebach/Bajbouj 2003).

Mukopolysaccharidosen sind meist nach ihren Erstbeschreibern benannt, die das typische klinische Bild anhand einer Fallbeobachtung beschrieben (siehe Tabelle 2.4) (Neufeld, Muenzer in Scriver 2001).

Tabelle 2.4: Enzymdefekte der Mukopolysaccharidosen, Eigennamen der Erstbeschreiber

Syndrom	Eponym	Enzymdefekt	Chromosomen-locus
MPS I H	M. Hurler	Alpha-L-Iduronidase	4p16.3
MPS I S	M. Scheie		
MPS I H/S	Hurler/Scheie		
MPS II A	M. Hunter (schwer)	Iduronat-Sulfatase	Xq28
MPS II B	M. Hunter (leicht)		
MPS III A	M. Sanfilippo A	Sulfamidase	17q25.3
MPS III B	M. Sanfilippo B	Alpha-N-Acetyl-Glucosaminidase	17q21
MPS III C	M. Sanfilippo C	Acetyl-CoA:alpha-Glucosaminid N-Acetyl-Transferase	8p11.1 aktualisiert nach Fan <i>et al</i> (2006)
MPS III D	M. Sanfilippo D	N-Acetylglucosamin-6-Sulfatase	12q14
MPS IV A	M. Morquio A	N-Acetylgalactosamin-6-sulfat-Sulfatase	16q24.3
MPS IV B	M. Morquio B	β -Galactosidase	3p21.33
MPS VI	M. Maroteaux-Lamy	Arylsulfatase B	5q13-q14
MPS VII	M. Sly	β -Glucuronidase	7q21.11
MPS IX	-	Hyaluronidase	3p21.2-p21.3

Mukopolysaccharide, lange aus sulfatierten und acetylierten Aminoazuckern und Uronsäuren oder Galaktoseresten bestehende Polysaccharidketten, sind im Gewebe als Proteoglykane an Proteine gebunden und bilden als Glukosaminoglykane und Hyaluronsäure die Grundsubstanz der extrazellulären Matrix. Weitere Proteoglykane kommen als integrale und GPI-verankerte Plasmamembranbestandteile vor.

Sie unterliegen einem ständigen Stoffumsatz, das heißt neben der Neusynthese findet ein enzymatisch gesteuerter Abbau statt. Dieser vollzieht sich mittels einer Fragmentierung, Endozytose sowie Hydrolyse in den Lysosomen.

Durch genetische Defekte kommt es zu Aktivitätsverlust, Mangel oder Fehlen der lysosomalen Enzyme, die nicht abbaubaren Substrate akkumulieren in den Lysosomen, wodurch es anfangs zu Funktionsstörungen und letztlich zum Untergang der Zelle und Ausfallerscheinungen bestimmter Organe kommt.

Die klinische Manifestation der verschiedenen Gendefekte hängt von der Art der gespeicherten Substrate ab, deren Vorkommen in verschiedenen Geweben unterschiedlich ist. Dabei sind manche Enzyme auch für den Abbau mehrerer Substrate verantwortlich. Zusätzlich richtet sich die klinische Manifestation nach der noch vorhandenen Restaktivität des Enzyms (Conzelmann/Sandhoff 1983). Eine sichere Korrelation zwischen der noch vorhandenen Restaktivität und der klinischen Schwere der Erkrankung konnte jedoch bisher nicht festgestellt werden.

Grundsätzlich kann jedes Organsystem befallen sein. Fast allen Mukopolysaccharidosen gemeinsam sind progrediente Skelett- und Gelenkdeformitäten, eine typisch vergrößerte Fazies, Kontrakturen und eine Hepatosplenomegalie. Abhängig vom Typ findet sich eine fortschreitende psychomotorische Retardierung.

Die Mukopolysaccharidosen haben bis auf den Typ II (M. Hunter), der X-chromosomal vererbt wird, einen autosomal-rezessiven Erbgang.

Es konnten darüber hinaus für alle Mukopolysaccharidosen bis auf MPS IIIC die Enzyme gereinigt und anhand der Aminosäuresequenz der Genort des Defekts lokalisiert werden. Neue Daten weisen auf eine Lokalisation auf Chromosom 8

hin (Ausseil 2004). In der Folge konnte dies durch weitere Experimente von Fan *et al.* (2006) und Hrebicek *et al.* (2006) bestätigt werden.

Die Prävalenzen werden für verschiedene Länder und Zeiträume sehr unterschiedlich beschrieben. Siehe Tabelle 2.5.

Tabelle 2.5: Prävalenzen der Mukopolysaccharidosen. Die Daten für Deutschland beziehen sich auf die Bundesrepublik Deutschland für den Zeitraum 1980-1995. Sie wurden ermittelt im Rahmen einer wissenschaftlichen Arbeit von C. Schmiedeskamp und wurden 2000 auf dem 6th International Symposium on Mucopolysaccharidosis & Related Diseases in Minneapolis erstmals vorgestellt (Gesellschaft für Mukopolysaccharidosen e.V. 2003 – Miebach/ Bajbouj), Niederlande (Poorthuis et al. 1999), die Daten beziehen sich auf den Zeitraum 1970-1996, Australien 1969-1996 (Nelson et al. 2003), Nordirland 1958-1985 (Nelson et al. 1997)

Syndrom	Eponym	Prävalenzen		West-	
		Deutschland	Niederlande	Australien	Nordirland
MPS I H	M. Hurler			1: 107 000	1: 76 000
MPS I S	M. Scheie	1: 145 000	1:84 000	-	1: 280 000
MPS I H/S	M. Hurler/Scheie			-	< 1: 840 000
MPS II A	M. Hunter (schwer)	1: 156 000	1: 149 000	1: 320 000	1: 140 000
MPS II B	M. Hunter (leicht)				
MPS III A	M. Sanfilippo A				
MPS III B	M. Sanfilippo B	1: 63 600	1: 52 900	1: 58 000	1: 280 000
MPS III C	M. Sanfilippo C				
MPS III D	M. Sanfilippo D				
MPS IV A	M. Morquio A	1: 263 000	1: 500 000	1: 641 000	1: 76 000
MPS IV B	M. Morquio B			-	-
MPS VI	M. Maroteaux-Lamy	1: 433 000	1: 666 000	1: 320 000	-
MPS VII	M. Sly	unbekannt	1: 417 000	-	1: 840 000 (Hydrops fetalis)

Das seltene Auftreten von MPS VII mag an der häufigen fetalen oder neonatalen Letalität liegen. Für einige Studien sind Korrekturfaktoren für inkorrekte

Einstufung verwendet worden oder nur das Vorkommen einzelner Erkrankungen untersucht worden. Die wahre Inzidenz wird sicher erst bekannt werden, wenn Therapiefortschritte ein frühes Screening erstrebenswert machen.

2.6 Mukopolysaccharidose Typ IIIC/ Sanfilippo C (OMIM 252930) – Heparansulfatabbau

Das Enzym dessen Defekte den Subtyp Sanfilippo C der Mukopolysaccharidosen hervorrufen, soll in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden.

Die Gruppe der Mukopolysaccharidosen Typ III, der Sanfilippo-Erkrankungen betrifft den Heparansulfatabbau. Die Patienten setzen sich aus einer biochemisch unterschiedlichen aber klinisch ähnlichen Gruppe zusammen.

Das Syndrom wird durch schwere neurologische Systemdegeneration charakterisiert mit nur milder somatischer Erscheinung. Diese dysproportionierte Beteiligung des zentralen Nervensystems ist einzigartig unter den MPS. Der Beginn der klinischen Symptome tritt meist zwischen dem 2. und 6. Lebensjahr ein, bei Kindern, die sich zunächst normal entwickelten.

Die präsentierten Symptome beinhalten Hyperaktivität mit aggressivem Verhalten, strohiges Haar, Hirsutismus, Schlafstörungen und milde Hepatosplenomegalie.

Für die Untersuchung der Sanfilippo C-Erkrankung auf Proteinebene stehen molekulare Werkzeuge noch aus. Die Entdeckung einer 14;21 Robertsonischen Translokation bei zwei Geschwistern mit MPS III und einem normalen Karyotyp bei ihrem gesunden Geschwisterkind führte zu der Vermutung, die Chromosomen 14 oder 21 kodierten für die Acetyltransferase (Zaremba *et al.* 1992). Dies stellte sich jedoch in der Folge als Zufallsbefund heraus. 2004 schlugen Ausseil *et al.* nach einer genetischen Analyse von 27 erkrankten Personen, sowie gesunden Verwandten vor, das Gen für MPS IIIC sei auf der perizentromerische Region von Chromosom 8 lokalisiert. Dieser Befund konnte nach dem Abschluß des experimentellen Teils meiner Arbeit durch Transfer von humanem Chromosom 8 in Zellen von Mukopolysaccharidose Typ IIIC Patienten mit Wiederherstellung der defizienten N-Acetyltransferase-Aktivität funktionell bestätigt werden

(Seyran-tepe *et al.* 2006) und führte zu wesentlichen molekulargenetischen Fortschritten der Aufklärung der Sanfilippo C Erkrankung: Identifizierung eines bisher als TMEM76 bekannten Gens als Gen, welches das Enzym kodiert, welches bei MPS III C defizient ist und Identifizierung erster krankheitsbedingender Mutationen (Fan *et al.* 2006, Hrebicek *et al.* 2006).

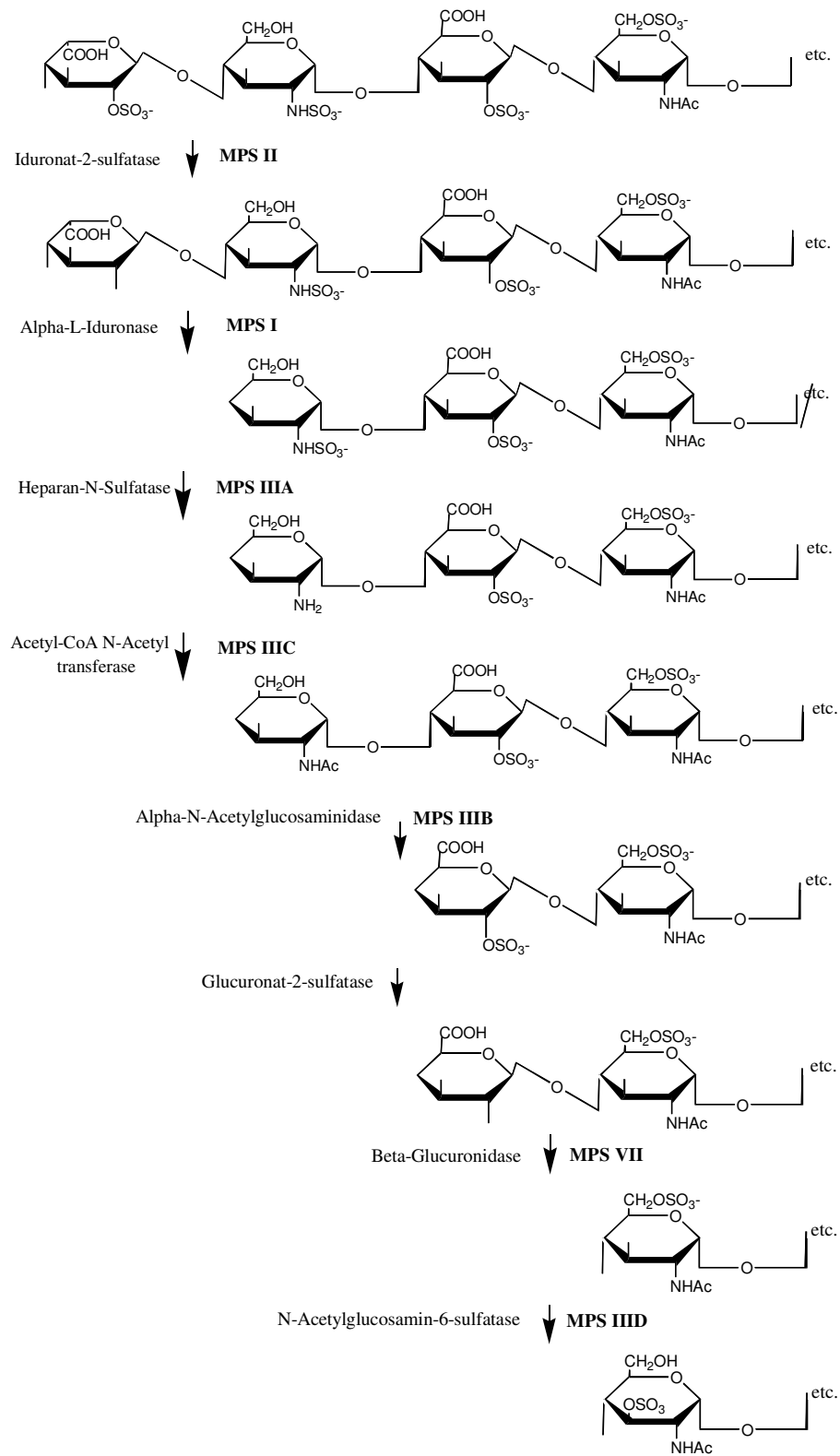


Abbildung 2.5: Lysosomaler Heparansulfatabbau findet schrittweise statt. Die beteiligten Enzyme sind eingezeichnet, sowie der entstehende Stoffwechseldefekt bei Enzymdefizienz.

3 Zielsetzung

Nach der Erforschung des humanen Genoms durch das *Human Genome Projekt* und der weitgehenden Verfügbarkeit von Sequenzdaten stellt sich in verstärktem Maß die Frage nach Funktion und Distribution der translatierten Genprodukte, der Proteine, die sich aus Sequenzdaten nur zum Teil errahnen lässt.

So wird deutlich, wie wichtig Proteinuntersuchungen im Rahmen von Proteomics-Projekten sind, die allein in der Lage sind, auch posttranslationale Modifikationen zu beschreiben. Nicht zuletzt wegen dieser Modifikationen ist auch die Verarbeitung nativer Proteine aus humanem Material weiterhin nicht überholt, da noch keine der verfügbaren *in vitro* Expressionssysteme oder häufig genutzten bakteriellen sowie eukaryoten Fremdorganismen (Hefen¹, Insektenzellen) in der Lage sind, aufgrund der inklinierten Sequenz die natürlich vorkommenden posttranslationalen Modifikationen abzubilden.

Gerade die Untersuchung von Membranproteinen bereitet technische Probleme bezüglich Solubilisierung und Reinigung.

Die Basis für die vorliegende Arbeit bildeten unter anderem in der Arbeitsgruppe Hasilik von Dietrich (1996) und Simons-Klenke (2002) durchgeführten Untersuchungen. In diesen ist es gelungen aus humaner Plazenta isolierte lysosomale Membranen anzureichern und durch Elektrophorese zu charakterisieren. Durch Bodammer (unveröffentlicht) wurde eine [³H]Acetyl-Coenzym A-markierbare Proteinbande als mögliches Kandidatenprotein für die Acetyltransferase vorgeschlagen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Assoziationen der lysosomalen Membranproteine, sowohl untereinander als auch mit anderen Faktoren wie Lipiden. Ein weiterer Schwerpunkt bestand in der präparativen Anreicherung der humanen Acetyltransferase aus humaner Plazenta.

¹ Für einige Spezialanwendungen gibt es inzwischen einige *glycoengineered* Hefestämme (Li *et al.* 2006)

4 Material und Methoden

4.1 Geräte und Zubehör

Elektrophoresekammern	Eigenbau der Institutswerkstatt
FPLC-Anlage	Pharmacia
Isoelektrische Fokussierung: Elektrodenstreifen	Pharmacia
Isoelektrischen Fokussierung: Wanne	Eigenbau der Institutswerkstatt
Kühlzentrifuge MR 1822 Jouan	Jouan GmbH, Unterhaching
Massenspektrometer im Institut für Physiologische Chemie in Bochum	Reflex III Massenspektrometer mit einer Scout 384 Ionen-Quelle von Bruker Daltonik, Bremen
Mikrotiterplattenlesegerät	Dynatech, Denkendorf
Szintillationszähler	Packard 1600 TR Packard-Canberra, Dreieich
Ultraschallbad	Laboratory Supplies C., Inc., Typ G112SP1T, Hicksville (USA)
Ultrathurrax T 45	Jahnke und Kunkel GmbH, Staufen i. Br.
Ultrazentrifugation: Centrifugal Filter Device –Ultrafree –0.5	Millipore Corporation, U.S:
Ultrazentrifuge	Beckman Instruments GmbH, Frankfurt

4.2 Chemikalien, Standardlösungen und Radiochemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „pro analysi“ (p.a.) und wurden – sofern nicht anders angegeben – von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), ICN (Meckenheim), Merck (Darmstadt), Riedel-De Haën (Hannover), Roth (Karlsruhe), SERVA (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Percoll[®] (Dichte 1.13) von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Rinderserumalbumin (BSA), Fraktion V von SERVA, Heidelberg

Triton X-100 von SERVA, Heidelberg

Ultima Gold XR (Szintillations-Cocktail) von Packard Instrument Company

Beim verwendeten Wasser handelte es sich ausschließlich um zweifach deionisiertes und sterilfiltriertes Wasser (Milli Q UF-Anlage der Firma Millipore, Erkrath).

Radioaktives D-Glucosamin [$6\text{-}^3\text{H}$] wurde von (1) ICN Pharmaceuticals, Radiochemicals Division, Irvine, California USA: 25,6 Ci/mmol, 1 mCi/ml (MW 215,6); radioaktives Acetyl-CoenzymA [Acetyl- ^3H]-von (1) ICN Pharmaceuticals, Radiochemicals Division, Irvine, California USA: 12 Ci/mmol, 1 mCi/mL (2) ARC American Radiolabeled Chemicals, St Louis, MO USA: 20 Ci/mmol, 1 mCi/mL, (3) Moravek Biochemicals, Brea, California USA: 20 Ci/ mmol, 1 mCi/mL)bezogen.

Die Gelfiltrationssäulen wurden von Amersham Biosciences (ehem. Pharmacia, Schweden)(UnoQ, Superdex 200) und BioRad, USA (MonoQ) bezogen.

4.3 Enzymaktivitäts- und Proteinbestimmung

4.3.1 Bestimmung der β -Hexosaminidase-Aktivität (EC 3.2.1.52) nach von Figura (1977)

Als Substrat wurde p-Nitrophenyl-2-acetamid-2-desoxy- β -D-Glucopyranosid (Sigma, Deisenhofen) verwendet.

Substratlösung: 100 mM Zitronensäure

0.2 % [w/v] Rinderserumalbumin (BSA)

0.2 % [v/v] Triton X-100

0.04 % [w/v] Natriumacid

Einstellen des pH auf 4.6 mit NaOH

10mM p-Nitrophenyl-2-acetamid-2-desoxy- β -D-Glucopyranosid

Stopplösung: 0.4 M Glycin/ NaOH, pH 10.4

Der Enzymtest wurde in Mikrotiterplatten oder Reaktionsgefäßen (Zwischenschritt Zentrifugation möglich: 5 Minuten, 10 000 \times g) durchgeführt. Es wurden 25 μ L mit 0.9 % [w/v] Natriumchlorid verdünnte Proben eingesetzt (dichter Pool: 1:100 bis 1:400, ultrazentrifugierte Membranen: 1:200 bis 1:400), mit dem gleichen Volumen Substrat gemischt und für 30 bis 60 Minuten bei 37° C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 250 μ L (respektive 500 μ l bei Reaktionsgefäßen) Stopplösung beendet, und die Absorption des entstandenen p-Nitrophenol bei 405 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen bei einer Schichtdicke der Lösung von 1 cm.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Enzymaktivität}(U/ml) = \frac{\text{Gesamtvolumen}(ml) \times \text{Absorption}(\Delta E_{405nm})}{\text{Absorptionskoeffizient}(= 18,5) \times \text{Probenvolumen}(ml) \times \text{Zeit}(min) \times \text{Schichtdicke}(cm)} \quad (4.1)$$

1 U entspricht der Menge Enzym, die 1 μ mol p-Nitrophenol/ min hydrolysiert.

4.3.2 Bestimmung der sauren β -Glucosidase-Aktivität (EC 3.2.1.45) nach Gatt (1969)

Als Substrat wurde p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid (Sigma, Deisenhofen) verwendet, aus diesem entsteht durch die Enzymreaktion analog zur Bestimmung der β -Hexosaminidase-Aktivität p-Nitrophenol, dessen Absorption bei 405 nm gemessen wird.

Substratlösung: 100 mM NaAc-HAc, pH 5.0
0.2 % [w/v] Triton X-100
0.2 % [w/v] Na-Taurocholat
4 mM p-Nitrophenyl- β -D-Glucopyranosid

Stopplösung: 0.4 M Glycin/ NaOH, pH 10.4

Der Enzymtest wurde in Mikrotiterplatten oder Reaktionsgefäßen, mit der Möglichkeit der Zentrifugation (5 Minuten, 10 000 \times g), durchgeführt. Es wurden 25 μ L von mit 0.9 % [w/v] Natriumchlorid verdünnten Proben eingesetzt (dichter Pool: 1:10 bis 1:50, ultrazentrifugierte Membranen: 1:50 bis 1:500), mit dem gleichen Volumen Substrat gemischt und für 30 bis 60 Minuten bei 37° C inkubiert.

Weitere Durchführung und Berechnung analog der Bestimmung der Aktivität der β -Hexosaminidase in 4.3.1.

4.3.3 Bestimmung der Acetyl-Coenzym A: α -Glucosaminid N-Acetyltransferase-Aktivität (EC 2.3.1.3) modifiziert nach Meikle *et al.* (1995)

In diesem Assay dient [³H]D-Glucosamin als Akzeptor der Acetylgruppe, unmarkiertes Acetyl-CoenzymA als Donor. Das acetylierte Produkt wird chromatographisch über einen Kationenaustauscher vom unveränderten Substrat getrennt und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

Gesamtvolumen des Assay: 20 μl

Maximales Probenvolumen: 10 μl

Reaktionsgemisch je 10 μL Probe:

0,25 μl [^3H]GlcN (säulengereinigt)(abhängig von Charge ca. 0,25 μCi)

0,2 μl AcetylCoenzym A (100 mM)

9,55 μl Mc Ilvaine's Puffer (100 mM Phospat/ 100 mM Tartrat, pH 6,8)

Vorbereitung der Ionenaustauschersäulen:

Anpressen eines Stücks silanisierter Glaswolle in eine Pasteurpipette und Zugabe einer wässrigen Suspension des Kationenaustauschers Dowex, 50W x 8, H^+ -Form, Korngröße (mesh) 50-100 bis zu einem Bettvolumen von 250 μl .

Für den Enzymtest wurde das Reaktionsgemisch zu 10 μL Probe pipettiert, gemischt und in einem 37 $^{\circ}\text{C}$ – Wasserbad für 30 - 60 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μl kaltem (4 $^{\circ}\text{C}$) Wasser gestoppt und der gesamte Ansatz (520 μL) auf Ionenaustauschersäulen gegeben und sechs Mal mit 250 μL Wasser gewaschen.

Bei mehr als 18 Reaktionsgefäßen wurden die Proben bis zum Säulenauftrag bei 4 $^{\circ}\text{C}$ (Kühlschrank Isotopenlabor) gelagert.

Der Durchfluß und die vereinigten Eluate wurden in Szintillationsröhrchen aufgefangen, mit 2 mL Szintillationscocktail (Ultima Gold XR von Packard, Dreieich) versetzt und im 1600 TR Flüssigkeitsszintillationszähler (Canberra Packard, Dreieich) im ^3H -Kanal für fünf Minuten gemessen. Daraus wurde später die Aktivität berechnet.

Die erste Waschung der Säulen mit 2 mL HCl (1M) zur Lösung des unveränderten [^3H]Glucosamin wurde zur Überprüfung der Funktion der Säulen ebenfalls gezählt. Vor dem Auftrag einer weiteren Probe wurden die Säulen mit einem weiteren mL HCl (1M) und 4 mL H_2O gewaschen, um die Säule wieder zu neutralisieren.

Die Auswertung der Aktivität erfolgte nach cpm (counts per minute) / μl Probe/ min gegenüber einem mitgeführten Leerwert.

4.3.4 Bestimmung der Acetyl-Coenzym A: α -Glucosaminid N-Acetyltransferase-Aktivität (EC 2.3.1.3) modifiziert nach Voznyi *et al.* (1993) (fluorimetrisch)

Für die fluorimetrische Bestimmung wurde 4-Methylumbelliferyl-D-glucosaminid als Substrat für die Acetyltransferase eingesetzt. Die enzymatische Freisetzung des Fluorochroms bedarf der sequentiellen Aktion von Acetyltransferase und β -Hexosaminidase.

Die Reaktion wurde wie die radioaktive Methode in McIlvains Puffer angesetzt, die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 M Natriumcarbonatlösung gestoppt (pH 10,7) und die Fluoreszenz von 4-Methylumbelliferon gemessen.

4.3.5 Bestimmung der Alkalischen Phosphatase (EC 3.1.3.1)

Als Substrat für die Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase wurde p-Nitrophenylphosphat (Sigma, Deisenhofen) eingesetzt. Als Produkt der Enzymreaktion entsteht bei 450 nm messbares p-Nitrophenol.

Substrat: 5 mM p-Nitrophenylphosphat
 0.25 M Saccharose
 5 mM Magnesiumchlorid
 50 mM Tris/HCl, pH 9.0
 0.1 % (v/v) Triton X-100

Der Test wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Zu 5 μ L Probe wurden 300 μ L Substrat zugesetzt. Bei Bestimmung des Percoll-Gradienten wurden die Fraktionen 9-16 zehnfach bis hundertfach verdünnt eingesetzt.

Der Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 405 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Die Schichtdicke der Lösung betrug 1 cm. Die Enzymaktivität wurde nach der in Kapitel 4.3.1 beschriebenen Formel berechnet.

4.3.6 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford (1976) unter Verwendung von Rinderserumalbumin (BSA) als Standardprotein (0-140 μ g/mL) durchgeführt.

Die Quantifizierung des Proteins erfolgte in Mikrotiterplatten. Zu 20 μL einer Probe wurden 300 μL des Reaktionsgemisches (1:5 verdünntes Fertigreagenz von BioRad, München) pipettiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmt.

Zur Bestimmung der Proteinmenge in Percoll-haltigen Lösungen wurden die Proben vor der Inkubation mit dem Reagenz mit Detergens und Lauge versetzt (0.25 M NaOH/ 0.025 % (v/v) Triton X-100) um störendes Percoll, welches im alkalischen Milieu präzipitiert, durch Zentrifugation abzutrennen. Die Zugabe des Triton X-100 diente der Solubilisierung der Membranproteine.

4.4 Präparation von Lysosomen aus humaner Plazenta

Die Isolierung von Lysosomen aus humaner Plazenta wurde nach Diettrich *et al.* (1996) durchgeführt. Frische humane Plazenta wurde aus den umliegenden Frauenkliniken bezogen und möglichst schnell bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gekühlt.

Sämtliche Arbeitsschritte erfolgten unsteril und mit Eiskühlung oder bei 4°C im Kühlraum mit gekühlten Puffern und Geräten.

Die Zentrifugation erfolgte stets bei 4°C und ungebremstem Auslauf des Rotors.

4.4.1 Herstellung des Organellenkonzentrats

Homogenisierungs-Puffer: 250 mM Saccharose
10 mM Triethanolamin
10 mM Essigsäure
10 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

65 % [w/v] Saccharose in Homogenisierungspuffer

Percoll[®] der Dichte 1.075 in Homogenisierungspuffer:

50 mL: 18.87 g Percoll[®] (Dichte 1.13) in
 250 mM Saccharose
 10 mM Essigsäure
 10 mM EDTA

Percoll[®] der Dichte 1.095 in Homogenisierungspuffer:

50 mL: 27.56 g Percoll[®] (Dichte 1.13) in
 250 mM Saccharose
 10 mM Essigsäure
 10 mM EDTA

Das Trophoblastengewebe wurde von Gefäßen und fibrösem Gewebe befreit und mit einem Messer grob zerkleinert. Anschließend wurde das Gewebe dreimal mit 500 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und durch einen haushaltsüblichen Fleischwolf zerkleinert.

Das Gewicht betrug jetzt ca. 250 – 300 g. Hierzu wurde 250 ml Puffer H gegeben und das Gemisch vier mal 5 Sekunden mit einem Ultrathurrax homogenisiert.

Das Homogenat wurde für 10 Minuten bei 4 000 rpm in einem GSA-Rotor von Sorvall (3 000 g) zentrifugiert, um so postnukleären Überstand (P.N.Ü.) zu gewinnen. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand (ca. 300 ml) auf 10 Beckman SS 34-Röhrchen verteilt und mit 2,4 ml Percoll (d=1.075) in Puffer H unterschichtet. Die Zentrifugation erfolgte anschließend für 15 Minuten bei 20000 rpm im SS 34 Rotor von Sorvall (32 000 x g). Der Überstand wurde vorsichtig über das Pellet abgegossen und verworfen. Das Pellet stellte das Organellenkonzentrat dar, welches anschließend auf ein Volumen von 40 ml mit Puffer H ergänzt wurde und in einem Potter Homogenisator mit 3 Stößen homogenisiert wurde.

4.4.2 Fraktionierung des Organellenkonzentrats

Die Fraktionierung mit dem Ziel der Abtrennung der schweren lysosomalen Partikel wurde mit Hilfe eines gestuften Percoll-Dichtegradienten nach Wolff und Pertoft (1972), modifiziert durch Rome *et al.* (1979) durchgeführt.

In vier TV 860 Zentrifugenröhrchen wurde jeweils der folgende Gradient durch vorsichtiges Überschichten aufgebaut.

- 10 ml Organellenkonzentrat
- 14 ml Percoll (d=1.075) in Puffer H
- 8 ml Percoll (d=1.095) in Puffer H
- 3 ml 65% Saccharose in Puffer H
- Auffüllen auf 40 ml mit Puffer H

Die Gradienten wurden 30 min bei 21 000 rpm (34 000 x g) in einem TV-860 Rotor zentrifugiert, wobei der Bremsvorgang nur bis 800 rpm erfolgte, danach lief der Rotor bremsfrei aus. Mit Hilfe eines Fraktioniergeräts wurde von oben flüssiges Paraffin in die Röhrchen gedrückt und von unten 20 Fraktionen à 2 ml abgenommen.

Die Fraktionen, welche dem typischen Verteilungsmuster des dichten Pools entsprachen, wurden vereinigt und durch Tropfen in flüssigen Stickstoff perlenförmig schockgefroren und bei -80°C gelagert.

4.4.3 Charakterisierung des Organellenkonzentrats

Zur Charakterisierung des Organellenkonzentrats wurden Proteinmengen und Enzymaktivitätsbestimmungen durchgeführt, die ein typisches Bild mit zwei Gipfeln lysosomaler Enzymaktivität ergaben.

4.5 Proteinaseinhibitoren

Leupeptin (5mM)	1,5 μM	später : 12 μM
Pepstatin (1mM)	3 μM	später : 12 μM
ZFF (1mM)	1,5 μM	später : 1,2 μM

PMSF (0,2 M)	1,5 mM	später : 1,2 mM
JAA (0,5 M)	7,5 mM	später : 0,6 mM

4.6 Membranpräparation durch Ultrazentrifugation

35 mL gefrorener *dense pool*-Perlen, entsprechend ca. 20 ml Flüssigkeit wurden mit dem oben beschriebenen Proteinaseinhibitoren-Gemisch während des Auftauens versetzt. Anschließend erfolgte die Verdünnung des *dense pool*-Inhibitorengemischs im Verhältnis 1:10 mit 10mM TRIS-HCl, pH 6,8.

Nach Verteilung auf 8 Ti 60 Röhrchen wurde im Ti 60 Rotor über 2 Stunden bei 4°C, 45000 U in der Sorvall Ultraspeed Zentrifuge (150 000 g_{max}) zentrifugiert.

Das entstandene gelbliche Membranpellet auf einem Percoll-Kissen wurde mittels Pasteurpipette aufgenommen, in 10 mM TRIS-HCl, pH 6,8 resuspendiert und einer zweiten Zentrifugation mit den gleichen Parametern zugeführt.

Die dabei entstandenen Membranpellets wurden vereinigt und aliquotiert eingefroren, um nach Protein- und Enzymaktivitätsanalyse weiterverwendet zu werden.

4.7 Membranpräparation durch Immunoadsorption (nach Diettrich *et al.* 1996)

Für die Immunoadsorption stand in der Arbeitsgruppe Hasilik ein bereits früher charakterisierter monoklonaler Maus-Antikörper gegen LAMP-2 (Lysosomal associated membrane protein 2) 2D5 (Radons *et al.* 1990) zur Verfügung. Von diesem wurden 0,6 mg an 200 mg Eupergit C1Z gekoppelt (eine poröse Kieselgelmatrix, Röhm Pharma GmbH, Weiterstadt) (Grassel *et al.* 1988) und anschließend bei -80°C gelagert.

Zur Präparation immunoaffinitätsgereinigter Membranen wurden 0,5 mL des dichten Pools mit den Proteinaseinhibitoren Iodacetamid, Leupeptin, Pepstatin A,

Phenylmethylsulfonylfluorid und Z-Phe-Phe-diazomethylketon gemischt (Endkonzentration siehe 4.5). Zu diesem Ansatz wurden 50 μL einer 2D5-C1Z-Suspension pipettiert, 5 Sekunden im Ultraschallbad behandelt und für 4 oder 20 Stunden bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 mL kaltem (4°C) TBS und anschließendem Mischen wurde 30 Sekunden bei 14 000 Umdrehungen pro Minute ($18\,500 \cdot g_{\text{max}}$), 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das 2D5-C1Z-Pellet mit 1.0 mL kaltem (4°C) TBS gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand wieder verworfen und das Pellet bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

4.8 FPLC-Trennung

4.8.1 Gelfiltration (Superdex 200 von Amersham Pharmacia Biotech, HR 10/30, Säulenvolumen 24 mL, Gelbett-Höhe 30-31- cm)

Probenvorbereitung:

Die erforderliche Menge ultrazentrifugierter oder affinitätsgereinigter Membran wurde mit 5-fach Extraktions-Puffer (5% CHAPS, 750 mM NaCl, 50mM NaPi, pH 6,8) versetzt, 20 Minuten auf einem Vortex-Schüttler bei Raumtemperatur geschüttelt und 5 Minuten in einer Eppendorf-Tischzentrifuge bei ca. 10 000 g_{max} zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf Eis gestellt, während das verbleibende Pellet in einer zweiten Extraktion mit 1-fach Extraktions-Puffer über 10 min auf dem Vortex-Schüttler gemischt und für 5 Minuten bei ca. 10 000 g_{max} zentrifugiert wurde.

Die beiden Überstände wurden vereint und 200 μl dieser Probe auf die Gelfiltrationssäule gegeben, ein Teil wurde zur Analyse zurückbehalten.

Laufbedingungen während des Säulenlaufs:

Puffer: 10 mM NaPi, pH 6,8 + 150 mM NaCl + 1% CHAPS, respektive Triton X-100 in der angegebenen Konzentration.

Flussrate: 0,3 mL/ min

Fraktionen: 250 μl (1-52)

Beginn der Fraktionssammlung: bei 6 mL Fluss nach Probenauftrag

4.8.2 Ionenaustauscher (UnoQ von Biorad und MonoQ-Säule HR 5/5 von Pharmacia, Säulenvolumen 1,3 mL)

2-fach Extraktionspuffer: 300 mM NaCl
6 % Triton X-100, reduziert (geringere Absorption bei 280 nm)
20 mM Tris/

Probenvorbereitung:

Ultrazentrifugations- oder affinitätsgereinigte Membran wurde mit 2-fach Extraktionspuffer versetzt und für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei g_{\max} 10 000 zentrifugiert. Der Überstand wurde nach Entnahme einer Probe für Aktivitätsassay und SDS-PAGE auf die Ionenaustauschersäule aufgetragen.

Laufbedingungen:

Fluß: 0,5 mL/ min, Fraktionsgröße 1 mL, 27 Fraktionen

Puffer A: 10 mM Tris/HCl pH 7,0, 0,1 % - 1 % Triton X-100

Puffer B: A + 0,5 M NaCl

4.9 OptiprepTM-Trennung

TNE-Puffer (2-fach konzentriert): 100 mM TRIS/ HCl
300 mM NaCl
10 mM EDTA
pH 7,4

Probenvorbereitung für 460 µl Probe: 50 mM TRIS/ HCl, pH 7,4
150 mM NaCl

5 mM EDTA
1% Triton X-100
Leupeptin
Pepstatin
ZFF
PMSF
500 µg Protein

Die Probe mit 1% Triton X-100 wurde 30 Minuten auf Eis extrahiert, anschließend 5 Minuten bei 4°C und 14 000 rpm zentrifugiert und der Überstand auf den Optiprep®-Gradienten aufgetragen.

Gradient (von oben nach unten):

350 µl: 0 % Optiprep: TNE + 0,1 % Triton X-100
2100 µl: 30 % Optiprep: ½ TNE + 0,05 Triton X-100 + Optiprep
1350 µl: 40 % Optiprep: 450 µl Probe + Optiprep
500 µl: 65% Saccharose

Anschließend wurde der Gradient für zwei Stunden bei 4°C in einem SW 60 Ti-Rotor (Beckman) bei 300 000 g (52 000 rpm) zentrifugiert.

Es wurden sechs Fraktionen zu 600 µl von oben entnommen und weitergehend untersucht.

4.10 Hydroxylapatit-Chromatographie

Zur präparativen Aufreinigung einiger Membranproteine (Kolbe *et al.* 1984) und saurer Proteine (Gorbunoff 1984) ist die Verwendung von Hydroxylapatit-Säulen-Chromatographie beschrieben.

Hydroxylapatit ist ein Calciumphosphatmineral mit der Zusammensetzung $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Es bindet Proteine über zwei Mechanismen: Basische Proteine binden über ihre Aminogruppen an die negative Oberflächenladung des Minerals, also über elektrostatische Wechselwirkungen. Saure Proteine bilden über ihre

Carboxylgruppen Komplexbindungen mit dem Ca^{2+} des Minerals (Gorbunoff 1984).

Material:

Silanisierte Glaswolle

Hydroxylapatit (Biogel HTP)

Bindungspuffer (10 mM NaP_i , pH 6,8)

Elutionspuffer (150 – 750 mM NaP_i , pH 6,8 in steigender Konzentration)

Durchführung:

In einer Pasteurpipette wurde unter Verwendung von silanisierter Glaswolle und in Aqua bidest. suspendiertem Biogel HTP eine Hydroxylapatit-Säule gegossen (Bettvolumen 50 μL). Diese wurde mit Bindungspuffer equilibriert und anschließend zwei mal 50 μL Gelfiltrationsfraktionen aufgetragen. Der Durchbruch wurde aufgefangen und die Säule mit fünf Säulenvolumina Bindungspuffer gewaschen. Eluiert wurde in fünf Schritten mit stufenförmig ansteigender Salzkonzentration von 150 mM bis 750 mM Phosphat.

4.11 Trennung mit Hilfe der eindimensionalen

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach Laemmli (1970) mit Modifikationen von Hasilik/Neufeld (1980) durchgeführt.

Als Standards wurden Myosin (200 kDa), β -Galaktosidase (116 kDa), Phosphorylase b (97.4 kDa), Rinderserumalbumin (69 kDa), Ovalbumin (46 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (21 kDa), Lysozym (14.4 kDa) und Aprotinin (6.5 kDa) eingesetzt (Biorad).

4.11.1 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele

Es wurden generell 1 mm dicke Gele verwendet. Eine Ausnahme bildeten jedoch

Gele für radioaktive Proben, die 1,5 mm stark waren. Die Gele für ein- und zweidimensionale Trennung unterschieden sich in der Länge des Sammelgels, welches bei eindimensionalen Gelen 9,5 cm und bei zweidimensionalen 11 cm betrug. Das Sammelgel von ca. 1,5 cm Länge entfiel bei der zweidimensionalen Trennung, da sich die Probe bereits in einer Gelmatrix befand.

Die Pipettierschemata zur Herstellung der verwendeten ein- oder zweidimensionalen Gele unterschiedlicher Acrylamidkonzentration werden im Anhang dargestellt.

4.11.2 Probenvorbereitung

Probenpuffer

1.43-fach Sol 100 – SH:	0.36 M Tris-HCl pH 6.8 28.6 % (v/v) Glycerin 2.86 % (w/v) SDS
1.43-fach Sol 100 + SH:	0.36 M Tris-HCl pH 6.8 28.6 % (v/v) Glycerin 2.86 % (w/v) SDS 28.6 mM DTT
SOL 100 – SH	0.25 M Tris-HCl pH 6.8 20 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS
SOL 100 + SH	0.25 M Tris-HCl pH 6.8 20 % (v/v) Glycerin 2 % (w/v) SDS 20 mM DTT

Proben, die je nach Versuchsansatz unterschiedliche Volumina hatten, wurden mit Probenpuffer so verdünnt, dass sie abhängig von der Proteinkonzentration folgende Endkonzentration aufwiesen und ein gewisses Endvolumen (15 µL bei Gelen mit 33 Taschen und 45 µL bei Gelen mit 22 Taschen) nicht überschritten.

Endkonzentration der Probe:	0.125 mM	Tris-HCl pH 6.8
	20 % (v/v)	Glycerin
	2 % (w/v)	SDS
	10 mM	DTT

Alle Proben wurden nach Solubilisation für fünf Minuten auf 95°C erhitzt.

Um Artefakte, so genannte Schattenbanden, bei einer an die Elektrophorese anschließenden Silberfärbung zu vermeiden, wurde zu den betreffenden Proben 0.5 M Jodacetamid in einer Endkonzentration von min. 25 mM hinzugefügt und eine 10 minütige Inkubation bei 37°C angeschlossen.

Vor dem Probenauftrag wurden die Proben für fünf Minuten bei 14 000 Umdrehungen pro Minute (18 500 g_{\max}) zentrifugiert.

4.11.3 Gelelektrophorese

Anodenpuffer: 384 mM Glycin
23 mM Tris
Es stellt sich ein pH-Wert von 8.3 ein.

Kathodenpuffer: 384 mM Glycin
23 mM Tris
0.1 % [w/v] SDS
0.8 ppm [w/v] Bromphenolblau

Für die Elektrophorese wurden 5 L gekühlter Anodenpuffer (4 °C) und 250 mL gekühlter Kathodenpuffer (4 °C) benötigt. Im Sammelgelbereich wurde eine Stromstärke von 15 mA und im Trenngelbereich von 30 mA angelegt. Die Elektrophorese wurde etwa 4 mm vor Auslaufen der Bromphenolblaubande beendet und der Nachweis mittels Silberfärbung direkt angeschlossen.

4.12 Trennung durch zweidimensionale Elektrophorese

4.12.1 Röhrchengele mit Trägerampholyten

Lösungen für die isoelektrische Fokussierung

IEF- Acrylamidstammlösung: 28.4 % [w/v] Acrylamid
1.6 % [w/v] N,N'-Methylenbisacrylamid

Die IEF- Acrylamidstammlösung wurde zum Binden von Acrylsäure mit Amberlite AG Typ MB-1 der Korngröße 20-50 (mesh) eine Stunde entionisiert, anschließend filtriert, aliquotiert und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Probenüberschichtung:

0.8 % [v/v] einer 40 % [w/v] Trägerampholytlösung pH 4-7 (Serva, Heidelberg)

0.2 % [v/v] einer 40 % [w/v] Trägerampholytlösung pH 3-10 (Serva, Heidelberg)

7 M Harnstoff

Gelüberschichtung: 6.5 M Harnstoff

Lysis-Puffer: 9 M Harnstoff

4 % [w/v] CHAPS

2 % [v/v] einer 40 % [w/v] Trägerampholytlösung pH 4-7

0.5 % [v/v] einer 40 % [w/v] Trägerampholytlösung pH 3-10

10 mM Dithiotreitol (DTT)

Probenüberschichtung, Gelüberschichtung und Lysis-Puffer wurden aliquotiert und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Anodenelektrolyt: 0.01 M H_3PO_4

Kathodenelektrolyt: 0.02 M NaOH

Gießen der IEF- Röhrengelle

Lösung für 5 IEF-Röhrengelle:

2.25 g Harnstoff

500 μL einer 40 % [w/v] Trägerampholytlösung pH 4-7

125 μL einer 40 % [w/v] Trägerampholytlösung pH 3-10

665 μL IEF- Acrylamidstammlösung

500 μL 20 % [w/v] CHAPS

1670 μL Wasser

Die Glasröhrchen (16 cm lang, mit einem inneren Durchmesser von 3.1 mm werden bei 12.5 cm markiert (spätere Gelhöhe), an einer Seite mit Parafilm dicht verschlossen und senkrecht in einen Ständer gestellt.

Die Lösung für die IEF-Röhrchengele wird 15 Minuten entgast, nach Zugabe von 2 μL N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) und 40 μL 10 % [w/v] Ammoniumpersulfat (APS) mit Hilfe einer Pasteurpipette bis zur Markierung in die Glasröhrchen gefüllt und mit 130 μL 6.5 M Harnstoff (Gelüberschichtung) vorsichtig überschichtet. Die Röhrchengele sind nach etwa 4 Stunden vollständig auspolymerisiert und können bis zum Einsatz mehrere Tage bei 4 °C gelagert werden.

Vorbereitung der Proben für die isoelektrische Fokussierung

Das Ausgangsmaterial mit einem maximalen Probenvolumen von 25 μL wurde in 100 μL Lysis-Puffer solubilisiert

Isoelektrische Fokussierung

Etwa zwei Stunden vor Beginn der isoelektrischen Fokussierung wurde die Gelüberschichtung der Röhrchengele durch 100 μL Lysis-Puffer ersetzt und dieseer vorsichtig bis zum Ende des Glasröhrchens mit Wasser überschichtet. Nach dem vertikalen Einsetzen der Glasröhrchen in die vorbereitete Protean[®] II xi 2-D Cell (IEF-Kammer von BioRad, München) wurde die Überschichtung (Lysis-Puffer und Wasser) der Röhrchengele entfernt. Das der Anode zugewandte Ende des Glasröhrchens wurde mit einem 2 cm^2 großen, in Anodenpuffer angefeuchteten Stück Dialyseschlauch – mit einem Gummiring fixiert – verschlossen.

Unmittelbar vor dem Auftrag wurden die Proben für 10 Minuten bei 14 000 Umdrehungen pro Minute (18 500 g_{max}) und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend luftblasenfrei auf die entsprechenden Röhrchen pipettiert und mit 20 μL Probenüberschichtung und abschließend Kathodenelektrolyt überschichtet bis die Röhrchen komplett gefüllt waren.

In den unteren Puffertank der Protean[®] II xi 2-D Cell (BioRad, München) wurden nun 2.5 L des Anodenelektrolyts (0.01 M H_3PO_4) und in das obere Pufferreservoir 0.5 L des entgasten Kathodenelektrolyts (0.02 M NaOH) gegeben. Die

anschließende über 20.7 Stunden andauernde isoelektrische Fokussierung wurde bei 4 °C mit den anschließend beschriebenen Spannungsstufen durchgeführt.

Stufe 1	30 Minuten	200 Volt
Stufe 2	18.2 Stunden	500 Volt
Stufe 3	1 Stunde	800 Volt
Stufe 4	1 Stunde	1 000 Volt

SDS-PAGE im Anschluss an die vertikale isoelektrische Fokussierung

Equilibrierungspuffer I: 0.05 M Tris/ HCl pH 6.8
0.25 % (w/v) DTT
4 % (w/v) SDS
15 % (v/v) Glycerin

Equilibrierungspuffer II: 0.05 M Tris/ HCl pH 6.8
25 mM Iodacetamid
4 % (w/v) SDS
30 % (v/v) Glycerin
6 M Harnstoff

0.5 % (w/v) Agarose (LM) in Sammelgelpuffer: 125 mM Tris/ HCl pH 6.8

0.5 % (w/v) Agarose (LM) in Toppuffer: 384 mM Glycin
23 mM Tris
0.1 % (w/v) SDS
0.8 ppm Bromphenolblau

Im Anschluss an die isoelektrischen Fokussierung wurden die Glasröhrchen aus der IEF-Kammer genommen, der Überstand entfernt und die Röhrchengele mit Hilfe einer mit Wasser gefüllten 5 mL-Einwegspritze vorsichtig aus dem Glasröhrchen in eine Kunststoffschale gepresst. Das alkalische Ende de Gels wurde mit einer Bromphenolblaulösung markiert. Hierauf folgte unter sanftem Schütteln eine 20-minütige Equilibrierung der Gele in je 25 mL

Equilibrierungspuffer I bei 37°C. Anschließend wurde diese Lösung verworfen und unter gleichen Bedingungen mit Equilibrierungspuffer II inkubiert.

Die Überschichtungslösung der SDS-Polyacrylamidgele wurde abgesaugt, etwa 500 µL Agarose (70°C) (NUSIEVE GTG Agarose der Firma Biozym, Hess. Oldendorf) in Sammelgelpuffer wurde zwischen die Glasplatten pipettiert und die Röhrengelle luftblasenfrei mit dem alkalischen Ende auf der dem Molekulargewichtsstandard gegenüberliegenden Seite auf das SDS-Polyacrylamidgel gelegt. Abschließend wurden die Röhrengelle mit etwa 750 µL Agarose in Trenngelpuffer fixiert.

Die Elektrophorese verlief nach den unter 4.11.3 beschriebenen Bedingungen.

4.12.2 Immobilisierte pH-Gradienten

Für den Versuch zur Bestimmung des isoelektrischen Punkts der Acetyltransferase wurden Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradienten verwendet.

Probenvorbereitung:

Lysis-Puffer: 9 M Harnstoff

0,55 % (w/v) TritonX-100

4 % (w/v) CHAPS

1 % (v/v) einer 40 % (w/v) Trägerampholytlösung pH 4-7

10 mM DTT

Die Probe, deren Volumen 15 µL und eine Salzkonzentration von 150 mM nicht überschreiten sollte, wurde mit Lysis-Puffer auf ein Volumen von 150 µL gebracht, 5 Minuten bei 37°C inkubiert und 5 Minuten in einer Eppendorfschleuder bei 14 000 Umdrehungen pro Minute (g_{\max} 18 500) zentrifugiert. Wenn die Ablösung von Antikörpern von den C1Z-Perlen verhindert werden sollte, wurde die DTT-Konzentration erst anschließend auf 10 mM eingestellt und erneut für 5 Minuten bei 37°C inkubiert.

Der trockene Immobilinstreifen ph 4-7 (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurde über Nacht mit der solubiliserten Probe in einem horizontal liegenden Reagenzglas bei Raumtemperatur inkubiert, das mit Parafilm verschlossen wurde.

Isoelektrische Fokussierung

Für die Fokussierung wurden die Streifen entnommen und in die mit Paraffin gefüllte raumtemperierte Fokussierungswanne mit entsprechenden Vertiefungen eingebracht. Zwei angefeuchtete Elektrodenstreifen (Electrode wicks extra size, 300 mm x 6 mm x 3 mm) wurden unter Paraffinöl auf die Enden der Immobilinstreifen gelegt. Ihre Länge richtete sich nach der Anzahl der Gele. Abschließend wurde die Vorrichtung mit den Platinelektroden auf die Elektrodenstreifen gelegt und beschwert.

Die isoelektrische Fokussierung wurde bei Raumtemperatur mit den nachfolgenden Spannungsstufen durchgeführt:

Stufe 1	2 Stunden	300 Volt
Stufe 2	2 Stunden	1 000 Volt
Stufe 3	18 Stunden	3 000 Volt

Wenn eine Enzymbestimmung aus den Gelstreifen durchgeführt wurde, geschah dies direkt nach der Fokussierung und ohne denaturierende Zusätze in der Probenaufbereitung. Der Gelstreifen wurde in 5 mm große Stücke zerteilt und in 1,5 mL Reaktionsgefäße gegeben, wo sie mit Assay-Puffer zerstoßen wurden.

SDS-PAGE im Anschluss an die horizontale isoelektrische Fokussierung

Equilibrierungspuffer I:	30 % (w/v)	Glycerin
	2 % (w/v)	SDS
	0,25 % (w/v)	Dithiothreitol
	50 mM	Tris/ HCl pH 6,8
Equilibrierungspuffer II:	30 % (v/v)	Glycerin
	2 % (w/v)	SDS
	6 M	Harnstoff

50 mM Tris/ HCl pH 6,8

Im Anschluss an die isoelektrische Fokussierung wurden die Immobilstreifen aus der mit Paraffinöl gefüllten Wanne genommen, überschüssiges Paraffinöl entfernt und die Streifen nacheinander für jeweils 15 Minuten in Equilibrierungspuffer I und II bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Überschichtungslösung der SDS-Polyacrylamidgele wurde abgesaugt, etwa 2 mL Toppuffer zwischen die Glasplatten pipettiert und die Immobilstreifen luftblasenfrei mit dem alkalischen Ende auf der dem Molekulargewichtsstandard gegenüberliegenden Seite auf das SDS-Polyacrylamidgel gelegt. Abschließend wurde der Toppuffer abgesaugt und die Streifengele mit 500 µL Agarose in Trenngelpuffer fixiert.

Die Elektrophorese verlief nach den unter 4.11.3 beschriebenen Bedingungen.

4.13 Färbung der Gele

4.13.1 Silberfärbung

Es wurden zwei verschiedene Versionen der Silberfärbung angewandt. Für die eindimensionalen Gele eine modifizierte eigene Färbung und für die zweidimensionalen Gele die Färbung nach Heukeshoven und Dernick (1986).

4.13.1.1 Silberfärbung für eindimensionale Gele

Fixierlösung:

30 % (v/v) Ethanol
10 % (v/v) Essigsäure
in Wasser

Fixierung des Gels für 30 Minuten.

Inkubation:

Natriumacetatpuffer pH 6,0

(0,1 M Natriumacetat, 600 mL entionisiertes Wasser, 300 mL Ethanol (96%), pH 6 mit Essigsäure einstellen und auf 1 Liter einstellen)

100 mg Natriumthiosulfat in 100 mL Puffer für 1 Gel lösen

Inkubation 30 Minuten in Thiosulfatlösung.

Anschließend 3x 10 Minuten wässern (in entionisiertem Wasser).

Silbernitratlösung:

0,1 % (w/v) Silbernitrat in Wasser

0,01 % (v/v) Formaldehyd

25 Minuten in Silbernitrat inkubieren.

Kurz in Wasser überschüssiges Silbernitrat abspülen.

Entwicklerlösung:

2,5 % (w/v) Natriumcarbonat

0,02 % (v/v) Formaldehyd

Zweimal kurz in Entwickler spülen , und anschließend bis zur gewünschten Färbung entwickeln. Reaktion durch Zugabe von 1-2 mL Essigsäure stoppen.

Anschließend 3x 5 Minuten in Wasser spülen.

4.13.1.2 Silberfärbung für zweidimensionale Gele (nach Heukeshoven und Dernick (1986))

Fixierung:

30 % (v/v) Ethanol

10 % (v/v) Essigsäure

in Wasser

Die Gele werden drei mal eine Stunde in je 125 mL Fixierer inkubiert.

Inkubation: (kann über Nacht andauern)

0,5 M Natriumacetat

30 % (v/v) Ethanol

0,5 % (w/v) Glutardialdehyd

0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat-Pentahydrat

Die Gele werden zwei mal eine Stunde in je 125 mL Natriumthiosulfatlösung inkubiert.

Wässern: Die Gele werden drei mal eine halbe Stunde gründlich gewässert.

Silberfärbung:

0,1 % (w/v) Silbernitrat
0,02 % (w/w) Formaldehyd
in Wasser

Die Gele werden eine Stunde in Silbernitratlösung inkubiert.

Entwicklung:

2,5 % (w/v) Natriumcarbonat
in Wasser, mit Natriumhydrogencarbonat pH 11,3 einstellen
0,01 % (w/w) Formaldehyd

Die Gele werden in zwei Schritten mit je 125 mL Lösung entwickelt. Beim ersten Schritt reagieren die freien Silbermoleküle ab (Lösung verfärbt sich schwarzbraun). Sobald die gewünschte Färbung erreicht ist, wird die Silberlösung abgesaugt und die Reaktion sofort gestoppt.

Stoppen: Die Reaktion wird durch zehnmütiges inkubieren mit 125 mL einer 0,05 M Glycinlösung gestoppt.

Wässern: Die Gele werden nun mehrmals gründlich gewässert.

Behandlung der Gele vor dem Trocknen:

Kurzes Schrumpfen und Äquilibrieren in „Gelfix“ (125 mL je Gel)
50 % (v/v) Ethanol
2 % (v/v) Glycerin
in Wasser

4.13.2 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung

Präparative Acrylamidgele wurden mit Coomassie-Brilliant-Blau, einem Triphenylmethanfarbstoff, gefärbt.

Färbelösung: 0.1 % (w/v) SERVA blue R (SERVA, Heidelberg)
 40 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure
 in Wasser

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die SDS-Polyacrylamidgele über Nacht bei Raumtemperatur in 150 mL Färbelösung inkubiert.

Entfärber I: 50 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure
 in Wasser

Entfärber II: 30 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure
 in Wasser

Entfärber III: 10 % (v/v) Methanol
 10 % (v/v) Essigsäure
 in Wasser

Am folgenden Tag wurde die Lösung abgesaugt, das Gel kurz gewässert und so lange in 150 mL Entfärber I inkubiert bis das Gel und der Entfärber dieselbe Intensität der Blaufärbung zeigten. Diese Lösung wurde verworfen und das Gel so lange in 150 mL Entfärber II inkubiert bis sich wieder ein Farbgleichgewicht zwischen der Lösung und dem Gel einstellte.

Der letzte Entfärbeschritt – mit 150 mL Entfärber III – wurde bis zur maximal möglichen Reduktion der unspezifischen Hintergrundfärbung durchgeführt.

Nach mehrstündigem Wässern und einer 30-minütigen Inkubation in 2 % (v/v) Glycerin wurden die Gele zwischen Cellophan (Pütz Folien, Taunusstein) bei Raumtemperatur getrocknet.

4.13.3 Kolloidale Coomassie-Färbung

Die präparativen Gele für die Massenspektrometrie wurden mit „Colloidal Blue Stain“ (NOVEX Electrophoresis GmbH, Frankfurt am Main) nach Anleitung des Herstellers gefärbt.

Der enthaltene Farbstoff ist Coomassie G-250, durch das von Neuhoff *et al.* (1988) entwickelte Protokoll können jedoch im Vergleich zur herkömmlichen Coomassie-Färbung 5-fach geringere Mengen Protein im ng-Bereich detektiert werden und es entfallen Entfärbungsschritte mit Methanol.

4.14 Western Blot

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine mit Hilfe des Semidry-Blotting auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF-Membran) (Hybond P; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) transferiert.

Waschpuffer: 23 mM Tris
 384 mM Glycin

Anodenpuffer: 40 mM α Aminocapronsäure
 25 mM Glycin
 Es stellt sich ein pH-Wert von 8,7 ein.

Kathodenpuffer: 25 mM Tris
 192 mM Glycin
 Es stellt sich ein pH-Wert von 8,3 ein.

Es wurden je 250 mL Anoden- und Kathodenpuffer angesetzt und 30 Minuten entgast.

Das Gel wurde nach der Elektrophorese zur Entfernung von SDS 20 Minuten in Waschpuffer inkubiert.

Auf die Anode der Semidry-Blotting-Apparatur (cti, Idstein/Taunus) wurden zwei Lagen in Anodenpuffer getränkte GB 004-Filterpapiere (Schleicher & Schüll, Dassel) gelegt. Hierauf folgte die nach Anleitung des Herstellers vorbehandelte

0,1 mL 5 % (w/v) BCIP

Der im Anschluss an die Inkubation des zweiten Antikörpers bereits mit PBS und PBS-T behandelte Western Blot wurde noch zwei Mal kurz mit TBS und APP gewaschen bevor die PVDF-Membran im frisch angesetzten Substrat der alkalischen Phosphatase bis zur gewünschten Färbung – etwa 10 Minuten – inkubierte. Die Reaktion wurde mit Wasser gestoppt, der Western Blot gewässert und abschließend auf einem saugfähigen Papiertuch getrocknet.

4.16 Behandlung mit Lipidzusammensetzung verändernden Substanzen

4.16.1 Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD)

Jeweils eine Probe verdünnter ultrazentrifugierter Membran wurde mit Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD) versetzt und entweder auf Eis oder bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der Acetyltransferase bestimmt.

4.16.2 Deoxycholat

Deoxycholat ist ein anionisches Detergens und bewirkt eine Disruption der Membranstruktur.

Als Ausgangsmaterial diente ultrazentrifugierte Membran, welche unter 20-minütigem Schütteln einerseits mit CHAPS- haltigen Puffer (1% CHAPS, 10 mM TRIS; 150 mM NaCl, pH 7,4) und andererseits Triton X-100- haltigen Puffer (1% Triton X-100, 10 mM TRIS, 150 mM NaCl, pH 7,4) extrahiert wurde.

Dieser Extrakt wurde mit steigenden Konzentrationen (0,25%, 0,5%, 1%) Deoxycholat behandelt und anschließend die Acetyltransferaseaktivität bestimmt.

4.17 Markierung mit [³H]Acetyl-Coenzym-A

Die Markierungsversuche wurden bis auf eine Ausnahme mit immunaffinitätsgereinigter Membran durchgeführt, die sich durch die vorhandene Bindung an C1Z Perlen leicht zentrifugieren ließ, um ungebundene Radioaktivität zu entfernen.

Der Reaktionsansatz betrug 50 µL, 10 µL Membransuspension, 10 µL Wasser, 10 µL phosphatgepufferte Natriumchloridlösung (PBS: 150 mM NaCl, 10 mM Natriumphosphat, pH 7,4) – wenn nicht anders beschrieben – und 10 µL [³H]Acetyl-Coenzym-A. Dieses stammte von verschiedenen Herstellern, da die gewünschte hohe Spezifität nur schwer erhältlich war. ((1) ICN Pharmaceuticals, Radiochemicals Division, Irvine, California USA: 12 mCi/mmol, 1 mCi/mL, (2) ARC American Radiolabeled Chemicals, St Louis, MO USA: 20 Ci/mmol, 1 mCi/mL, (3) Moravek Biochemicals, Brea, California USA: 20 Ci/ mmol, 1 mCi/mL)

Der Reaktionsansatz wurde für verschiedene Zeiträume zwischen 15 Sekunden und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, danach 1 Minute (g_{\max} 10 000) in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und die Reaktion endgültig mit 4°C kaltem Tris-gepuffertem Natriumchlorid (TBS: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 7.4) gestoppt.

Nach erneuter Zentrifugation wurde das gewaschene Pellet sofort wie üblich in Solubilisierungslösung für die Analyse mittels SDS-PAGE aufgenommen und denaturiert, um eine Dissoziation möglicher Reaktionspartner durch fortschreitende Enzymreaktion zu verhindern.

4.18 Fluorographie von radioaktiv markierten Verbindungen in Elektrophoresegelen

Bei der Verwendung Tritium-markierter Substanzen ist für die Autoradiographie die Verwendung eines Szintillators notwendig, während energiereiche Strahler

wie ^{14}C , ^{35}S und ^{32}P und eventuell ^{125}I direkt exponiert werden können, wobei auch diese Signale durch Szintillatoren deutlich verstärkt werden können.

Besonders schwache Signale können durch eine unterschwellige Vorbelichtung des Röntgenfilms mittels eines durch optische Filter stark abgeschwächten elektronischen Blitzes (*pre-flash*) sichtbar gemacht werden (Holtzhauer 1997, Laskey/Mills 1975).

Das Gel wurde nach der SDS-PAGE an der rechten unteren Ecke markiert und mit entionisiertem Wasser abgespült, um anschließend in 3 Bädern mit Dimethylsulfoxid (DMSO, Roth- zur Synthese 99,3%) mindestens je 20 Minuten entwässert zu werden.

Nach der Entwässerung wurde das Gel in einem 2,5 Diphenyloxazol- Bad (139 g DPO (Roth) + 440 ml DMSO) mindestens 2 h, meist über Nacht inkubiert.

Rehydriert wurde es in entionisiertem Wasser für ca. 30 Minuten bei 37 °C.

Nach Einschluss in Folie und Trocknen des Gels im Vakuumtrockner wurde es auf zwei vorbelichteten Filme (Kodak, X-omat) gelegt und bis zum Ende der Expositionszeit bei -80° C aufbewahrt.

Vor Entnahme der belichteten Filme wurde eine Auftauzeit von 30 Minuten eingehalten, um Kondenswasser-Flecken zu vermeiden.

Es wurden zwei Filme verwendet, um unterschiedliche Expositionszeiten ohne zusätzlichen Zeitverlust zu ermöglichen, da teilweise die Signale so schwach waren, dass mehrere Wochen exponiert werden musste.

Die Entwicklung wurde unter standardisierten Bedingungen in einem automatischen Entwickler der radiologischen Abteilung im Klinikum Marburg durchgeführt.

4.19 Probenkonzentration mit Filtrationseinheit

Besonders bei der Verwendung gepoolter Aktivitätsfraktionen trat das Problem eines großen Probenvolumens auf. Um die Denaturierung der Proteine bei Präzipitation und den damit verbundenen Aktivitätsverlust zu verhindern,

verwendeten wir Millipore Filtrationseinheiten mit einem Ausschlussgewicht von 50 000 kDa.

Die Konzentration erfolgte in einer Jouan Kühlzentrifuge unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen.

4.20 Acetonfällung von Proteinen

Zur Konzentrierung von Proteinen aus Fraktionen der Hydroxylapatit-Säulenchromatographie, zum Teil nach Gelfiltration zur Volumenreduktion und zur Entfernung hoher Salz- und Detergenzienkonzentrationen wurde eine Präzipitation mit Aceton durchgeführt.

In einem Reaktionsgefäß wurden zu dem Volumen der Probe das vierfache Volumen eiskaltes Aceton gegeben, auf einem Vortex-Schüttler durchmischt und bei -20°C über Nacht inkubiert. Die Probe wurde danach bei 4°C und $12000 \times g$ 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei hoher Konzentration störender Substanzen durch Zugabe von vier Volumina eiskaltem 80 % (v/v) Aceton gewaschen und erneut zentrifugiert.

Für eine anschließende Gelelektrophorese wurde das Pellet direkt in Probenpuffer aufgenommen.

4.21 Phenol-Ether-Extraktion

100 μL Probe wurden mit der gleichen Menge wassergesättigtem Phenol versetzt, 20 Sekunden mit einem Vortex-Schüttler vermischt und anschließend für 5 Minuten bei g_{max} 10 000 in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.

Die Oberphase wurde verworfen. Zu der Phenolphase wurden 200 μL Ether gegeben, wiederum gut durchmischt und zentrifugiert.

Erneut wurde die Oberphase verworfen. Zu der wässrigen Phase wurden nochmals 200 μL Ether gegeben, gut durchmischt und zentrifugiert.

Die Oberphase wurde verworfen und die verbleibende Unterphase in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet.

4.22 Analyse von Protein-Banden mittels MALDI-TOF

Um die Zusammensetzung der auffälligen Gelfiltrationsfraktionen zu analysieren und die Identität der Banden, speziell im markierbaren Bereich festzustellen wurden 35 Fraktionen à 200 µL, insgesamt 7 mL Probe mit einer Aktivität der Acetyltransferase von 64000 cpm/mL/min vereinigt und konzentriert (siehe 4.19).

Das Endvolumen der Probe betrug ca. 100 µl.

Um Fokussierungsstörungen, die in Vorversuchen aufgefallen waren und die auf durch die Konzentrierung verursachte erhöhte Salz- und Detergenzkonzentrationen zurückzuführen sind, zu entgegenen, wurde das Konzentrat anschließend dialysiert. Nach Behandlung der Probe mit SDS-haltigem Puffer wurde über Nacht bei 4°C in einem PIERCE 10 000 MW Co Slide A-lyzer gegen 200 ml SOL 100/2 (10 mM DTT, 1% (w/v) SDS (Sigma L-5750), 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% (v/v) Glycerin) dialysiert.

Anschließend wurde eine präparative SDS-PAGE mit einem 10% SDS, 1,5 mm dicken Gel durchgeführt und nach Coomassie, modifiziert nach Sarnighausen gefärbt. (0,02 % Coomassie R, 20% Methanol, 5% Essigsäure; 30 min färben, mit 30% Methanol entfärben bis Banden sichtbar werden, 2 mal austauschen, um Essigsäure zu entfernen).

Die Banden 4 und 5 des in Abbildung 5.31 gezeigten präparativen SDS-PAGE-Gels wurden ausgeschnitten und mittels Trypsin-Spaltung und MALDI Massenspektrometrie im Institut für Physiologische Chemie, Bochum (Dr. C. Lohaus) analysiert.

Die Interpretation erfolgte mit ProFound (<http://prowl.rockefeller.edu/cgi-bin/ProFound>).

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der Enzymaktivitätsverteilung während der Präparationsschritte

Zur Präparation lysosomaler Membranen aus humaner Plazenta wurde wie unter 4.4 beschrieben das gereinigte Trophoblastengewebe homogenisiert und das Homogenat von Zellkernen befreit. Nach Konzentration der Organellen aus dem postnukleären Überstand (PNÜ) wurden diese, wie bei Rome *et al.* (1979) beschrieben, in einem selbstformenden Percoll-Dichtegradienten fraktioniert. In Proben der einzelnen Reinigungsstufen sowie der Fraktionen des Dichtegradienten wurde die Enzymaktivität der β -Hexosaminidase (EC 3.2.1.52), β -Glucosidase (EC 3.2.1.45), Acetyl-Coenzym A: α -Glucosaminid N-Acetyltransferase (EC 2.3.1.3), alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) (nur teilweise) sowie die Proteinkonzentration gemessen. Abbildung 5.1 verdeutlicht die schrittweise Vorgehensweise.

Abbildung 5.2 zeigt die Aktivitätsverteilung der Enzyme und die Proteinverteilung im Percoll-Gradienten einer Präparation. Die Aktivität des lysosomalen Marker-Enzyms β -Hexosaminidase zeigt eine zweigipflige Verteilung in der Präparation. Analog zu den Ergebnissen von Rome *et al.* (1979) mit Fibroblasten enthielt der erste Aktivitätspeak mit hoher Dichte (Fraktionen 2-5) eine geringe Proteinmenge und ebenso ein Aktivitätsmaximum der membranständigen β -Glucosidase und der Acetyltransferase. Die Organellen dieser Fraktionen repräsentierten zumeist *dense body* Lysosomen (Rome *et al.* 1979).

Ein zweiter Peak der Enzymaktivität befindet sich in den Fraktionen des Gradienten mit geringerer Dichte (Fraktion 8-13), die die Hauptmenge des Gesamtproteins enthalten. Die Organellen dieser Fraktionen werden als *lower buoyant density* tubuläre und tubulovesikuläre Lysosomen und Endosomen beschrieben (Rome *et al.* 1979) und sind teilweise von *peaks* anderer

Organellenmarker (nicht gezeigt) z.B. des Plasmamembran-Markerenzym alkalische Phosphatase getrennt (siehe Abbildung 5.1 A).

Die dichten Lysosomen, die als reifes lysosomales Kompartiment gelten, konzentrieren sich in den Fraktionen 2-5. Sie enthalten das Maximum der spezifischen Aktivität lysosomaler Markerenzyme. Die vereinigten Lysosomen dieser Fraktionen werden im folgenden als *dense pool*-Lysosomen bezeichnet.

Der geringe Anteil lysosomaler Enzymaktivität in den oberen Fraktionen (Auftragsbereich) zeigt, dass wenig Markerenzym (β -Hexosaminidase) durch die Aufarbeitung freigesetzt wurde und sich fast ausschließlich in intakten Organellen befindet. Dies bestätigt eine schonende Präparation.

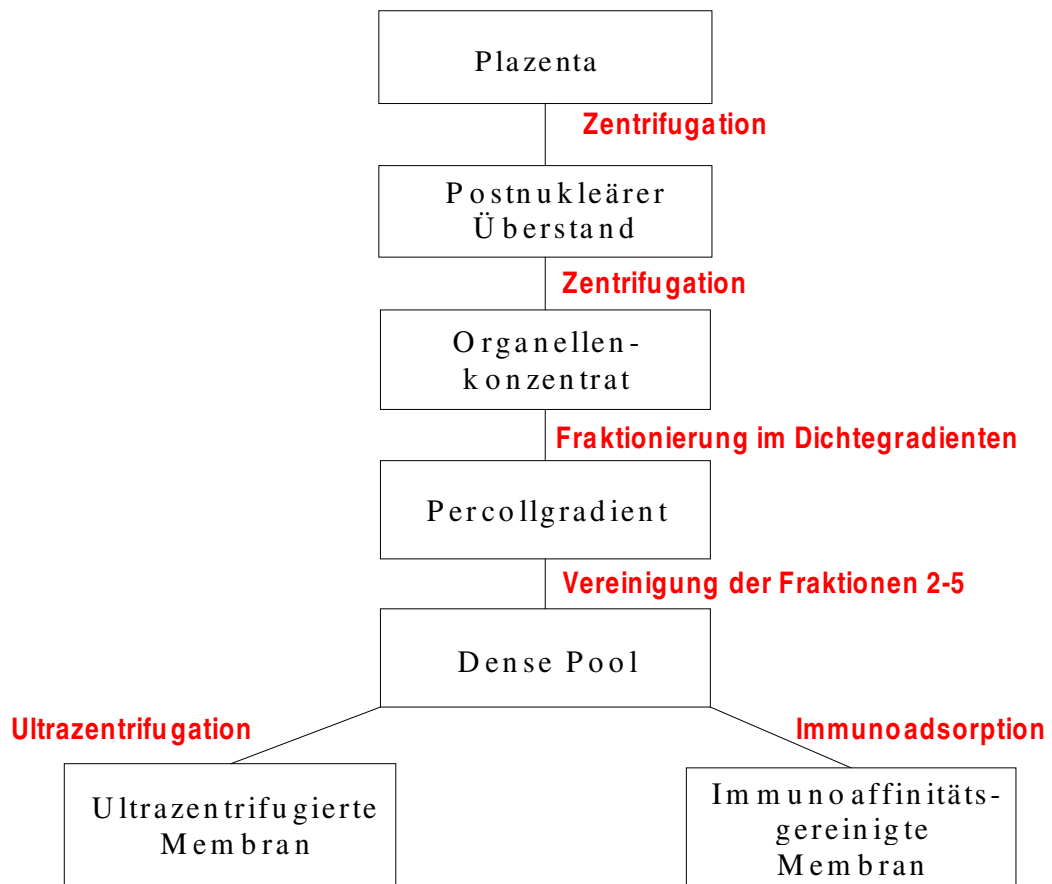


Abbildung 5.1: Graphische Darstellung der Aufreinigungsschritte vom Ausgangsmaterial Plazenta bis zu den verschiedenen Membranpräparationen.

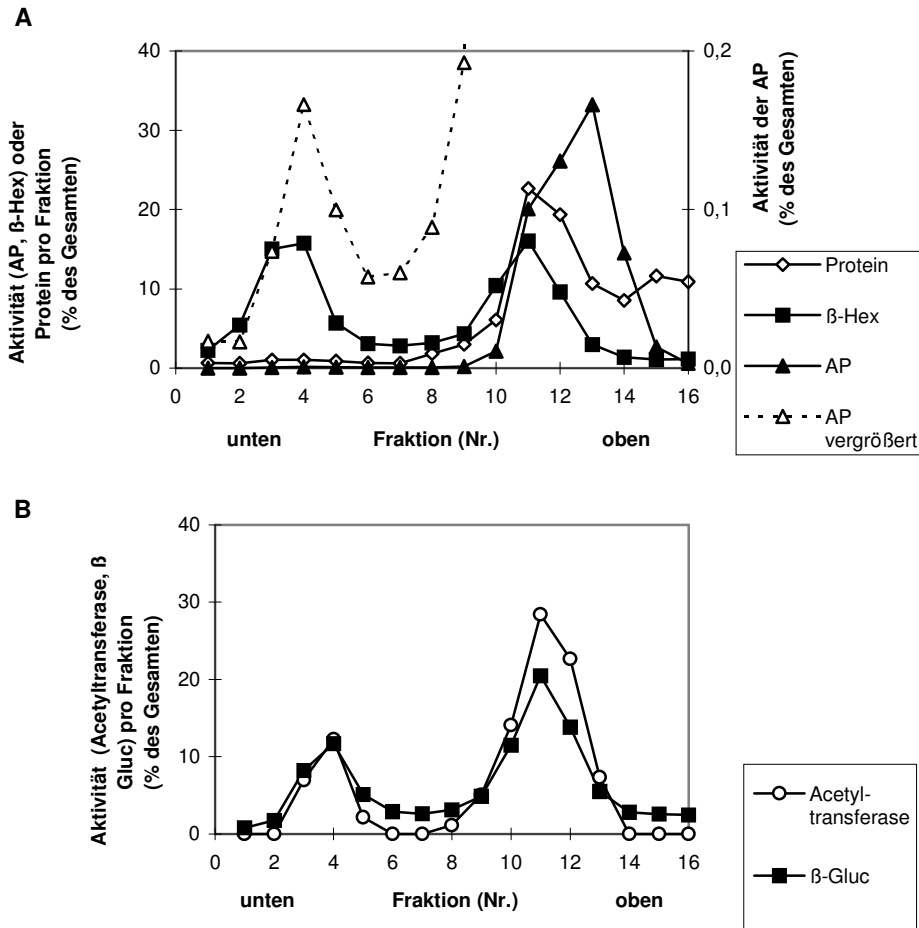


Abbildung 5.2: Aktivitätsverteilung und Proteinverteilung des Organellenkonzentrats nach Percoll-Dichtegradientenzentrifugation. Es werden 16 Fraktionen dargestellt, beginnend von der größten Dichte, das heißt dem Boden des Zentrifugationsröhrchens. A zeigt die Verteilung der Alkalischen Phosphatase (AP), der β -Hexosaminidase (β -Hex) und die Proteinmenge. Zusätzlich ist der erste Peak der Alkalischen Phosphatase zur Verdeutlichung vergrößert dargestellt. B zeigt die Aktivitätsverteilung der Acetyltransferase und der sauren β -Glucosidase (β -Gluc). Die Fraktionen 2 bis 5 wurden zum dense pool der Lysosomen vereinigt.

Tabelle 5.1: Reinigung von *dense pool*-Lysosomen aus humaner Plazenta.

	Protein		β -Hexosaminidase		
	Gesamt [mg/l]	Ausbeute [%]	Ausbeute [%]	spezifische Aktivität [U/mg]	Reinigungs- faktor
Homogenat	17 418	100.0	100.0	0.02	1.0
postnukleärer Überstand	8 414	48.3	45.9	0.02	1.0
Organellen-Konzentrat	1 151	6.6	24.9	0.07	3.8
<i>dense pool</i> -Lysosomen	29	0.2	8.3	1.00	50.1

Die gezeigten Daten entsprechen den Durchschnittswerten aus 10 Plazenta-Aufarbeitungen

Tabelle 5.1 zeigt die durchschnittliche Anreicherung des lysosomalen Markerenzym β -Hexosaminidase aus 10 repräsentativen Plazenta-Aufarbeitungen durch den in 4.4 beschriebenen Percoll-Gradienten. Der Anreicherungsfaktor der β -Hexosaminidase-Aktivität betrug durchschnittlich 50 ± 24 bei einer Ausbeute von 8 % der Ausgangsaktivität.

Zur Präparation lysosomaler Membranproteine wurden *dense pool*-Lysosomen, wie unter (4.6 und 4.7) beschrieben, in Gegenwart von Proteinase-Inhibitoren aufgetaut und die Membranen durch Ultrazentrifugation oder Immunoaffinitätsreinigung isoliert.

1. Ultrazentrifugation:

dense pool-Lysosomen wurden hypoton lysiert und die Membranen durch Ultrazentrifugation pelletiert. Als Interphase über einem Percoll-Kissen wurden die Membranen abpipettiert und gewaschen. Nach wiederholter Ultrazentrifugation war das bräunliche Pellet weitgehend frei von Percoll.

2. Immunoaffinitätsreinigung:

dense pool-Lysosomen wurden durch Ultraschall lysiert und nach Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper 2D5 (anti-human-LAMP-2), der an Polyacrylharzperlen (Eupergit C1Z) gekoppelt war, inkubiert. Nach Abzentrifugieren der an den Perlen gebundenen Membranen wurden diese unter isotonen Bedingungen gewaschen und wiederholt abzentrifugiert.

Die sedimentierten Membranen wurden jeweils in wenig TBS resuspendiert und die spezifischen Aktivitäten der Markerenzyme β -Hexosaminidase, β -Glucosidase und Acetyltransferase bestimmt.

In Tabelle 5.2 werden die Anreicherungsfaktoren bezogen auf *dense pool* und spezifische Aktivitäten dargestellt. Der durchschnittliche Anreicherungsfaktor (n = 6) für die membranassoziierte β -Glucosidase-Aktivität betrug bei Immunoaffinitätsreinigung 2.57 ausgehend von *dense pool*-Lysosomen. Bei ultrazentrifugierten Membranen erhöhte sich dagegen diese spezifische Aktivität im Mittel um den Faktor 1.58 (n = 6). Dem entgegen zeigte sich bei der Betrachtung der Acetyltransferase ein höherer Anreicherungsfaktor bei der Ultrazentrifugation 23.4 (n = 6), der jedoch unter anderem Assay-bedingt und durch Instabilität der Aktivität hohen Schwankungen unterliegt. Bei der Immunoaffinitätsreinigung betrug er 14.1 (n = 6).

Als besonderer Vorteil der Affinitätsreinigung zeigte sich, daß luminale Bestandteile, angezeigt durch die β -Hexosaminidase-Aktivität, besser von den Membranen abgetrennt werden konnten. Die spezifische Aktivität der β -Hexosaminidase wurde bezogen auf *dense pool*-Lysosomen auf 9 % reduziert. Bei Ultrazentrifugationspräparationen erfolgte die Reduktion der spezifischen Aktivität lediglich auf 16 %.

Tabelle 5.2: Anreicherungs-faktoren und spezifische Enzymaktivitäten der Markerenzyme β -Glucosidase, β -Hexosaminidase und Acetyltransferase nach Ultrazentrifugation bzw. Immunoaffinitätsreinigung aus *dense pool*-Lysosomen.

	Anreicherung aus <i>dense pool</i> -Lysosomen durch			
	Ultrazentrifugation		Immunoaffinitätsreinigung	
	Anreicherungs- faktor*	spezifische Aktivität [U/mg] oder [cpm/mg/min]	Anreicherungs- faktor*	spezifische Aktivität [U/mg] oder [cpm/mg/min]
β -Glucosidase	1.58	0.038	2.57	0.061
β -Hexosaminidase	0.16	0.276	0.09	0.127
Acetyltransferase	23.4	0.709	14.1	0.500

Die gezeigte Daten sind Durchschnittswerte aus jeweils mindestens sechs Präparationen.

* Bezogen auf Aktivität in *dense pool*-Lysosomen.

5.2 Besonderheiten der Fraktionierung in der FPLC

5.2.1 Gelfiltration (Superdex 200, Pharmacia)

5.2.1.1 UZ-Membran mit 0,1 % und 1% CHAPS

Es wurden Proben von ultrazentrifugierter Membran (UZ-Membran) mit CHAPS 1% (Endkonzentration) extrahiert (2-fach Puffer, 15 min RT, 10 min 4°C) und in Laufpuffer mit 0,1% und 1% CHAPS auf einer Superdex 200 Gelfiltrationssäule von Pharmacia filtriert (siehe Kap 4.8.1).

Bei einer CHAPS Konzentration von 0,1% konnte gezeigt werden, dass sich eine Reihe von Proteinen, exemplarisch LAMP-2 (nachgewiesen durch Western-Blot (Abbildung 5.3) hauptsächlich in den vorderen Fraktionen befand und in einem großen Bereich streute. Bei der höheren CHAPS-Konzentration von 1% fokussierten die typischen LAMP-1 und LAMP-2 Banden, optisch durch einen goldenen Schimmer im Silbergel und unscharf begrenzte Banden auffällig, bei Fraktion 12-16 (LAMP-2 nachgewiesen im Western-Blot, Abbildung 5.3) und konnten somit aus dem vorderen hochmolekularen Bereich entfernt werden.

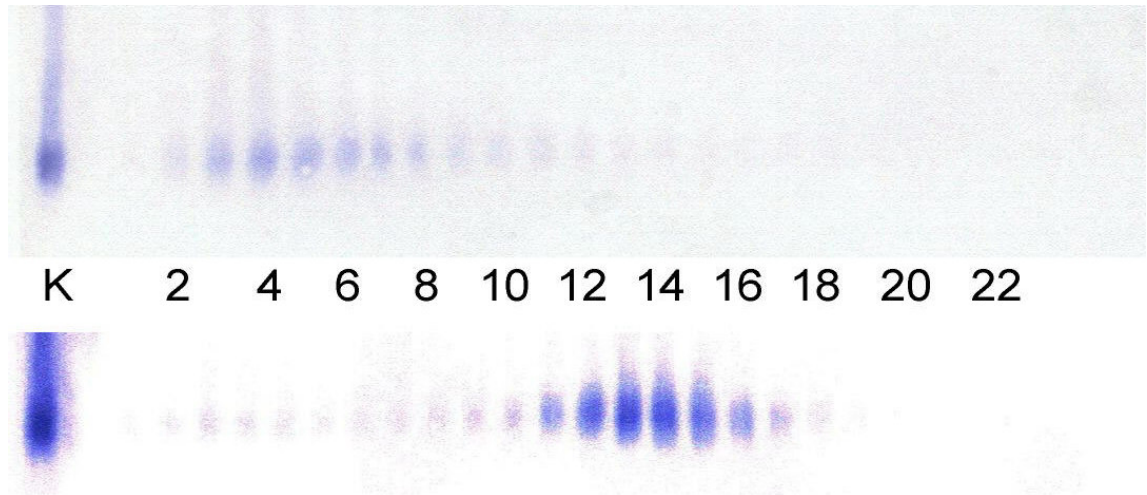


Abbildung 5.3: Untersuchung der Solubilisierung von LAMP-2 durch Gelfiltration und Western blotting. Dargestellt werden Western-Blots der Gelfiltrationsläufe mit 0,1% CHAPS (oben) und 1% CHAPS (unten) mit 2D5-anti LAMP-2 (entwickelt über alkalische Phosphatase., K: Positivkontrolle, die Zahlen geben die Nr. der Fraktion an.

Die Aktivität der Acetyltransferase betreffend zeigte sich ebenfalls ein unterschiedliches Bild für die verschiedenen Detergenzien-Konzentrationen.

Es wurden für beide dargestellten Läufe gleiche Proteinmengen der selben Präparation verwandt. Es wurde 600 µg Protein mit der gleichen Methode für beide Läufe in der gleichen Menge des Membransuspensionsvolumen doppelt konzentrierten Extraktionspuffer (Endkonzentration 10 mM NaPi, 150 mM NaCl, 1% CHAPS) extrahiert und der Extrakt (entsprechend 250 µg Protein) auf die Gelfiltrationssäulen mit Laufpuffer unterschiedlicher Detergentienkonzentration aufgetragen. Während im Silbergel die Herauslösung einiger Proteine aus dem vorderen Bereich auffällt, verbleibt die Hauptaktivität der Acetyltransferase in den ersten Fraktionen und ein kleiner Aktivitätsgipfel in Fraktion 7, der bei CHAPS 0,1% auftritt, verschwindet bei 1%. Siehe Abbildung 5.4.

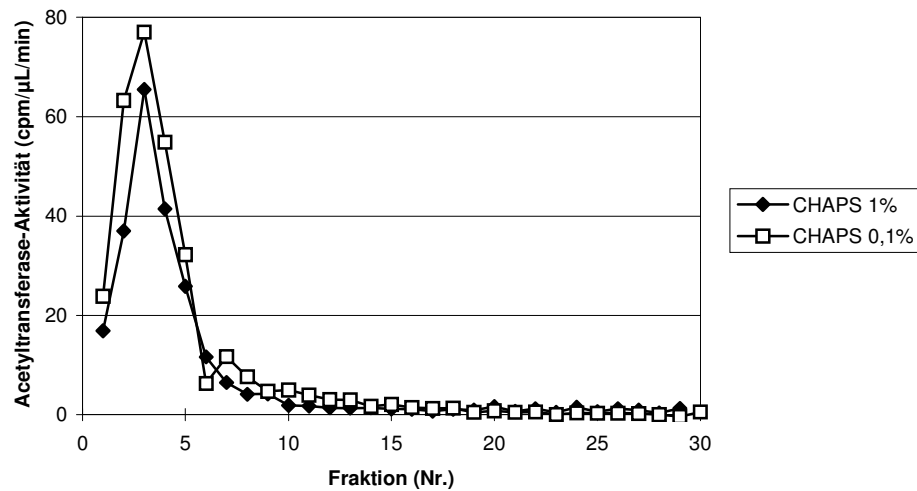


Abbildung 5.4: Aktivität der Acetyltransferase in Gelfiltrationsfraktionen (Superdex 200, Pharmacia) eines Laufs mit ultrazentrifugierter Membran mit unterschiedlicher CHAPS Konzentration (0,1% CHAPS, 1% CHAPS), Extraktion unter den gleichen Bedingungen (2-fach Puffer, 15 min RT, 10 min 4°C Zentrifugation)

In einem Lauf mit 1% CHAPS zeigt sich die Hauptaktivität der Acetyltransferase und ein großer Anteil der alkalischen Phosphatase in den vorderen Fraktionen (Abbildung 5.5A), jedoch eluierte die Hauptmenge der Proteine, LAMP-2 und β -Glucosidase in späteren Fraktionen (Abbildung 5.5 B).

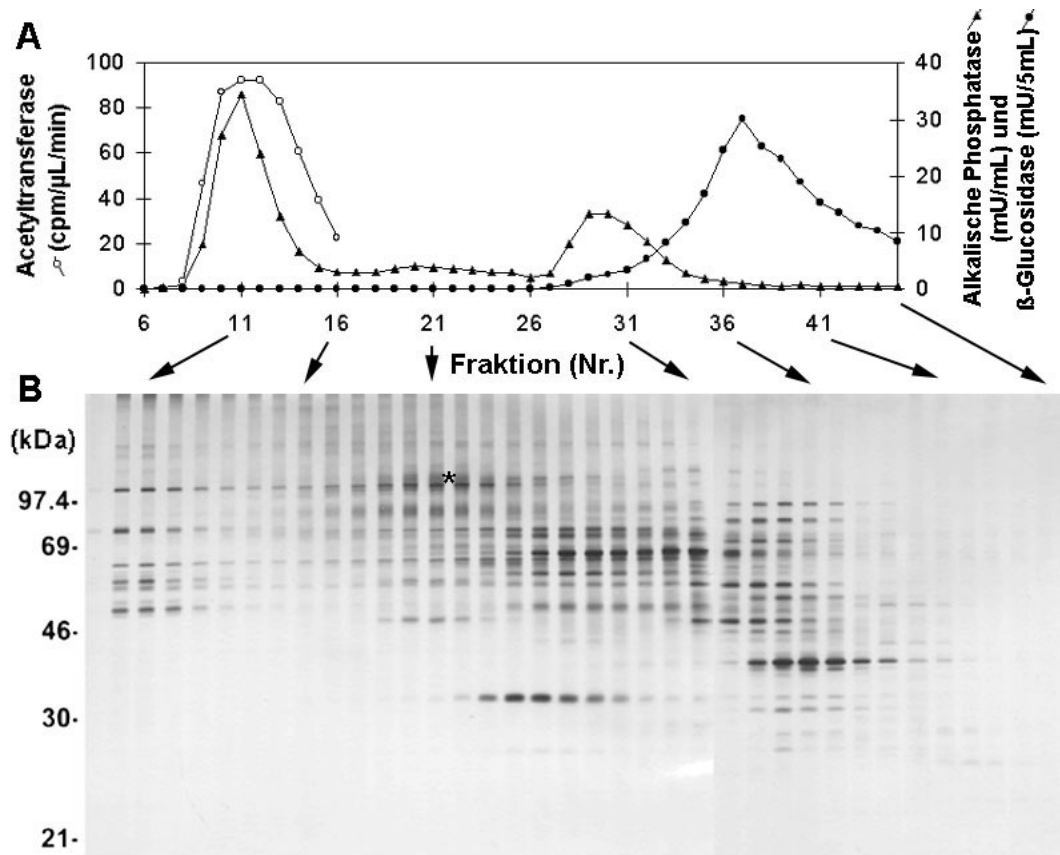


Abbildung 5.5: Gelfiltrationslauf mit 1% CHAPS. A Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase, β -Glucosidase und Acetyltransferase (diese nur bestimmt bis Fraktion 16, da in früheren Experimenten keine später fraktionierende Aktivität gefunden wurde). B Die Trennung der Proteine wurde in einem silbergefärbten SDS-PAGE Gel untersucht. Das Sternchen markiert die maximale Intensität von LAMP-2.

Unter veränderten Extraktionsbedingungen, längere Extraktion (30 min statt für 15 min) und höherer Temperatur während des Laufs, kommt es zu einer weiteren Verschiebung des Enzymaktivitätsgipfels, dargestellt in Abbildung 5.6. Dort ist zu sehen, dass die Aktivitätsverteilung der alkalischen Phosphatase im Vergleich zum vorigen Bild mit einem hohen ersten Gipfel deutlich differiert und die Aktivität zum größten Teil in den zweiten Gipfel gewandert ist. Die Profile der β -Glucosidase und der Acetyltransferase sind vergleichbar. Die unterschiedlichen Zahlen der Fraktionsbeschriftung ergeben sich durch unterschiedlichen Beginn der Fraktionssammlung, die Aktivitätsmaxima sind jedoch in Bezug auf das Laufvolumen identisch.

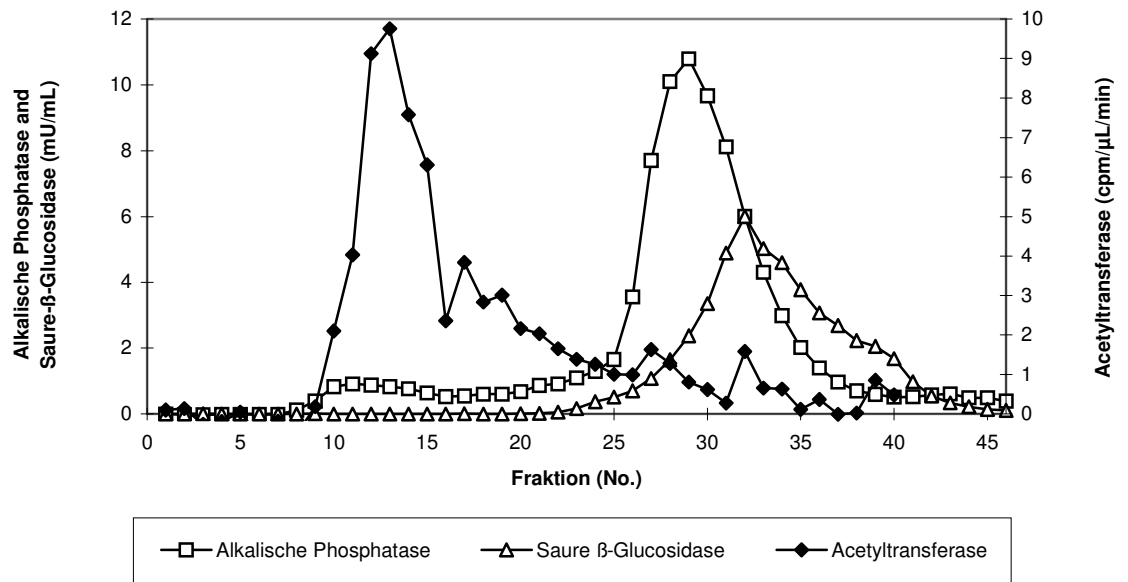


Abbildung 5.6: Enzymaktivitätsverteilung eines Gelfiltrationslaufs mit ultrazentrifugierter Membran mit 1% CHAPS nach längerer Extraktion (30 min RT, Pellet 10 min RT nachinkubiert, höhere Temperatur während Lauf, Laufvolumen identisch), korrespondierendes Silbergel in Abbildung 5.7

Abbildung 5.7 zeigt das korrespondierende Silbergel zu dem oben dargestellten Aktivitätsprofil. Hier zeigt sich trotz der Verschiebung der alkalischen Phosphatase in den späteren Aktivitätsgipfel noch ein heterogenes Proteingemisch im vorderen Bereich, das möglicherweise zu einem Protein-Lipid-Komplex gehört.

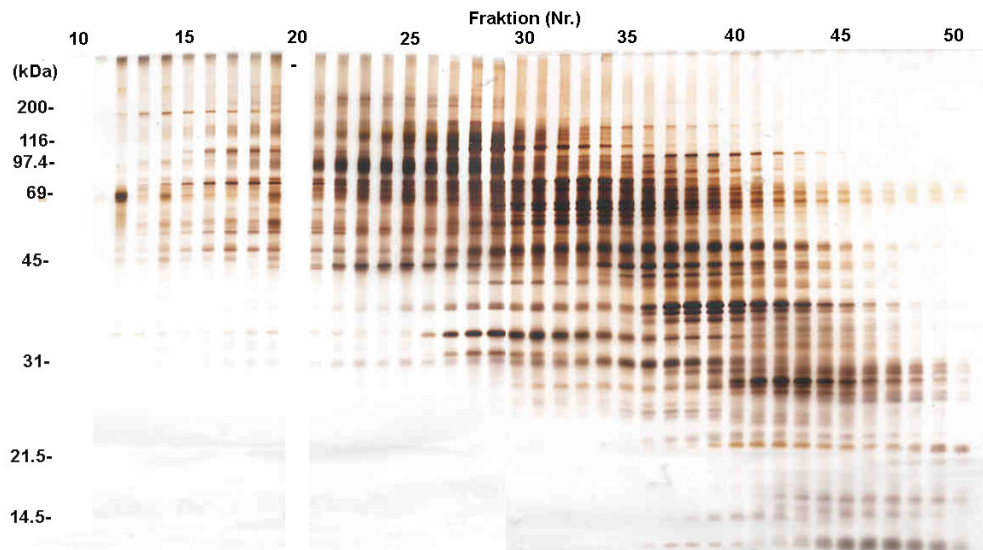


Abbildung 5.7: Silbergefärbtes SDS-PAGE Gel eines Gelfiltrationslaufs mit ultrazentrifugierter Membran mit 1% CHAPS nach längerer Extraktion, korrespondierende Enzymaktivität in Abbildung 5.6

5.2.1.2 Affinitätsgereinigte Membran mit CHAPS 1%

Nach den Ergebnissen der Gelfiltrationstrennung der UZ-Membran mit deutlichem Aktivitätsgipfel der Acetyltransferase in den vorderen Fraktionen wurde untersucht, ob sich diese Ergebnisse auch mit der immunaffinitätsgereinigten Membran reproduzieren ließen.

Die Extraktion erfolgte mit 5-fach Extraktionspuffer (5% CHAPS, 750 mM NaCl, 50 mM NaPi, pH 6,9, d.h. Endkonzentration 1% CHAPS, 150 mM NaCl, 10 mM NaPi) für 25 Minuten bei Raumtemperatur. Der FPLC-Lauf erfolgte mit 1-fach Puffer. Es wurden 200 μ l solubilisierter Membranextrakt aufgetragen, entsprechend 660 μ g Protein.

In der Analyse zeigte sich eine deutlich reduzierte Signaldichte in der Silberfärbung (Abbildung 5.9), die Hauptaktivität der Acetyltransferase fand sich mit einer Spitze in Fraktion 8 (Abbildung 5.8).

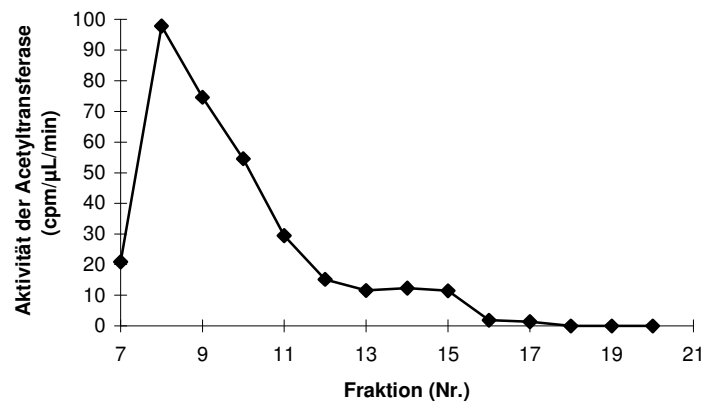


Abbildung 5.8: Aktivität der Acetyltransferase in einem Gelfiltrationslauf mit affinitätsgereinigter Membran (Aktivität im Ausgangsmaterial: 270 000 cpm/min), extrahiert 25 min bei RT mit CHAPS 1%

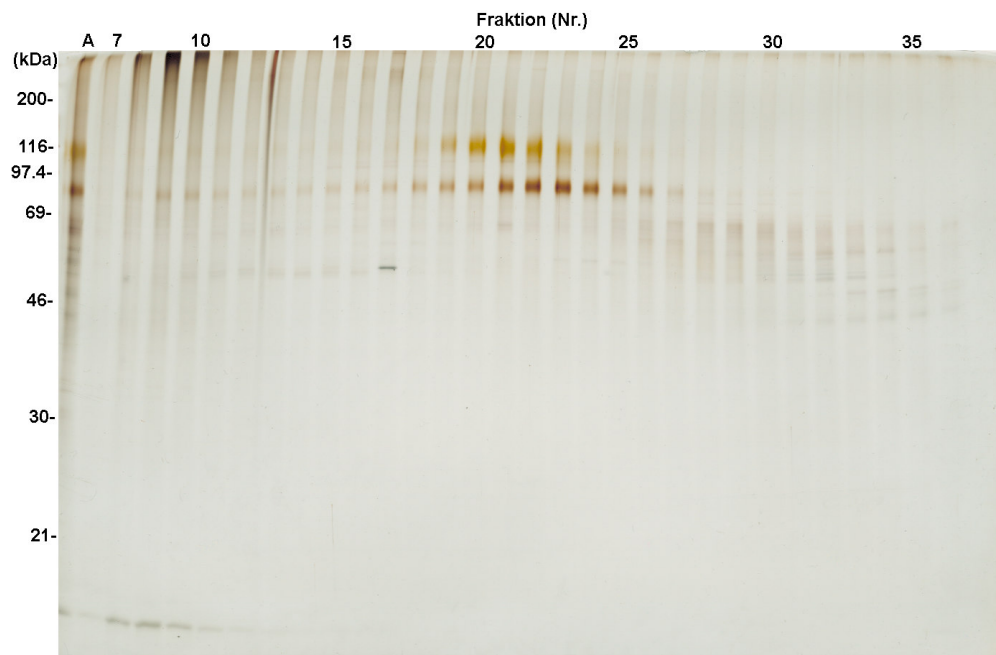


Abbildung 5.9: Silbergefärbtes SDS-PAGE Gel des in Abbildung 5.8 gezeigten Gelfiltrationslaufs mit affinitätsgereinigter Membran (A entspricht Probe des Säulenauftrags mit einer Aktivität von 1300 cpm/μL/min)

Der direkte Vergleich von zwei Präparationen aus derselben Plazenta unter Verwendung gleicher Aktivitätsmengen der Acetyltransferase-Aktivität zeigt die Unterschiede. In der Immunaффinitätsaufreinigung ist die LAMP-2-Menge im Silbergel erwartungsgemäß höher, während andere Banden, die in der UZ-Präparation zu sehen sind, nicht nachweisbar sind (Abbildung 5.11). Dabei ist anzumerken, dass die prominenten Banden um 50 kDa von Fraktion 30-36 wahrscheinlich von den C1Z-Perlen abgelösten IgG-Schwerketten entsprechen. Die Aktivitätsspitzen und absolute Aktivität sind vergleichbar (Abbildung 5.10).

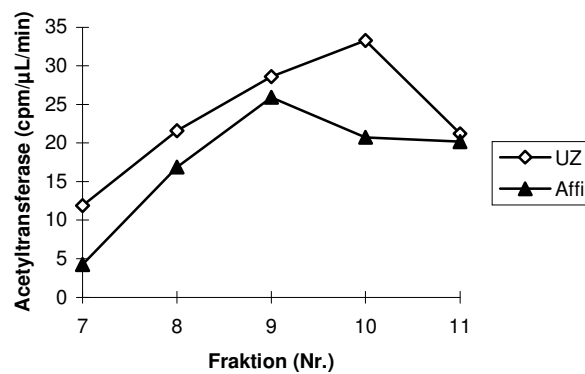


Abbildung 5.10: Aktivität der Acetyltransferase in zwei Gelfiltrationsläufen mit 1% CHAPS aus Membranpräparationen der gleichen Plazenta, eine ultrazentrifugierte Membranpräparation und eine immunaффinitätsgereinigte Membranpräparation, Extraktion jeweils für 30 Minuten bei RT und anschließend 5 Minuten Inkubation des Pellets

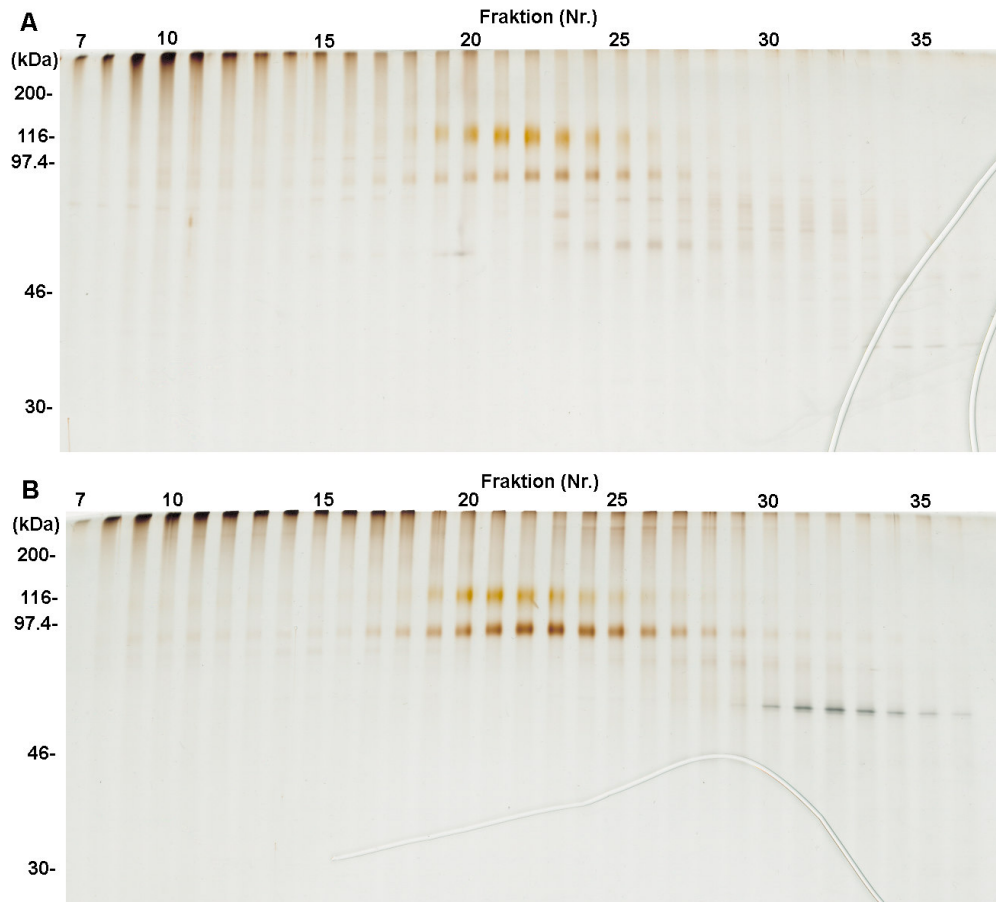


Abbildung 5.11: Vergleich silbergefärbter SDS-PAGE Gele von Gelfiltrationsläufen aus unterschiedlich präparierten Membranen der gleichen Plazenta, eine ultrazentrifugierte Membranpräparation und eine immunaffinitätsgereinigte Membranpräparation, Extraktion jeweils für 30 Minuten bei RT und anschließend 5 Minuten Inkubation des Pellets. A entspricht ultrazentrifugierter Membran und B affinitätsgereinigter Membran

5.2.1.3 2D-SDS-PAGE

Um das in den Gelfiltrationsfraktionen vorkommende Proteingemisch weiter aufzutrennen, wurde die von Sarnighausen und Simons in unserem Labor weiterentwickelte Methode für 2D-SDS-PAGE auf Gelfiltrationsfraktionen mit hoher Aktivität der Acetyltransferase angewandt.

Dabei wurde deutlich, wie reich an unterschiedlichen Proteinen die Gelfiltrationsfraktionen noch sind (Abbildung 5.12).



Abbildung 5.12: 2D-SDS-PAGE-Gel von Fraktion 8+9 (nach Acetonfällung) eines Gelfiltrationslaufs mit 1% CHAPS aus affinitätsgereinigter Membran (Aktivität des Ausgangsmaterials 170 000 cpm/min)

Ein Problem der Methode der 2D SDS PAGE besteht darin, dass einige Proteine nicht in die erste Dimension hinein oder aus der ersten Dimension auswandern und darunter auch die gesuchte Acetyltransferase sein könnte.

Es wurde über die Markierung mit [^3H]Acetyl-Coenzym A untersucht, ob die markierten Banden in die zweite Dimension auswanderten. Dabei bestand jedoch das Problem der Stabilität der Markierung, weil die Art der Bindung nicht bekannt war. Es bestehen zwei Theorien, Bame und Rome postulierten 1986 einen „ping pong“-Mechanismus mit zytosolischer Bindung des Acetyl-CoA und Translokation ins Lysosom, wo es auf das Substrat abgegeben wird. Durch kinetische Analysen beschrieben Meikle *et al.* 1995 einen *random-order ternary-complex* Mechanismus, bei dem kein acetyliertes Enzym vorkommt.

Bei einem Versuch mit Immobiline-Streifen konnte kein markierter *spot* in der zweiten Dimension nachgewiesen werden, jedoch auch nicht im verbleibenden Streifen, was auf einen Verlust der Markierung hindeutet.

In einer Untersuchung eines Immobiline-Streifens, der den üblichen Fokussierungsbedingungen ausgesetzt war, konnte nach Stückelung des Streifens in 22 Abschnitte von 5 mm Länge und Enzymaktivitätsmessung ebenfalls kaum Aktivität nachgewiesen werden, welche zudem nicht in einem Peak lokalisiert war, der eine Eingrenzung des isoelektrischen Punkts (IEP) ermöglicht hätte. Es zeigte sich jedoch eine leichte wellenförmige reproduzierbare Aktivitätserhöhung in Abschnitt 5 und Abschnitt 16. Dies führte zu der Vermutung, dass es sich um Untereinheiten oder Kofaktoren mit unterschiedlichem IEP handeln könnte, was durch einfache Kombinationsversuche entsprechender Abschnitte jedoch nicht bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

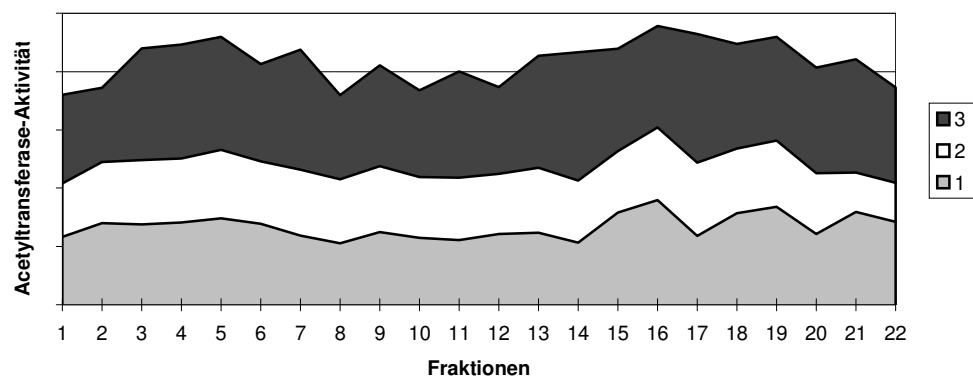


Abbildung 5.13: Acetyltransferase-Aktivität in 5 mm-Abschnitten von drei Immobiline-Gelstreifens mit unterschiedlichen Mengen affinitätsgereinigter Membran (1 und 2: 15 µg, 3: 30 µg) und nach isoelektrischer Fokussierung über 1800 bis 9200 Vh.

5.2.1.4 Triton X 100

Eine Extraktion mit Triton X-100 erwies sich gegenüber einer Extraktion mit CHAPS deutlich überlegen. Hierbei wurde die gleiche Menge ultrazentrifugierte Membran aus der gleichen Plazenta mit den verschiedenen Detergentien extrahiert und der Gelfiltration zugeführt. Die Läufe wurden anschließend durch Enzymtests und SDS-PAGE charakterisiert.

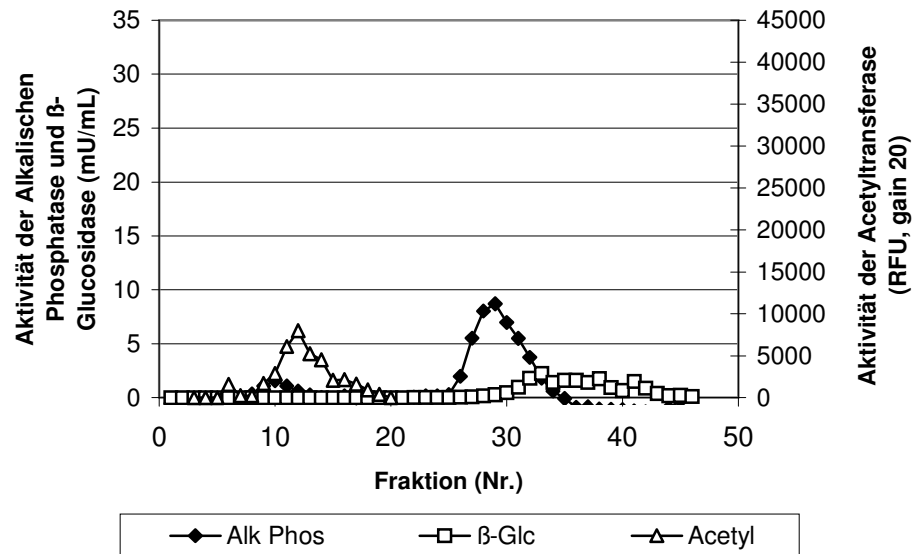


Abbildung 5.14: Aktivitätsprofil eines Gelfiltrationslaufs mit 1% CHAPS, Extraktion 15 min mit 5-fach-Puffer (5%CHAPS, 750 mM NaCl, 50 mM NaPi) bei RT und anschließende Inkubation des Pellets mit 1-fach Puffer, Zentrifugation 10 min bei 4°C
Alk Phos: alkalische Phosphatase, β-Gluc: β-Glucosidase

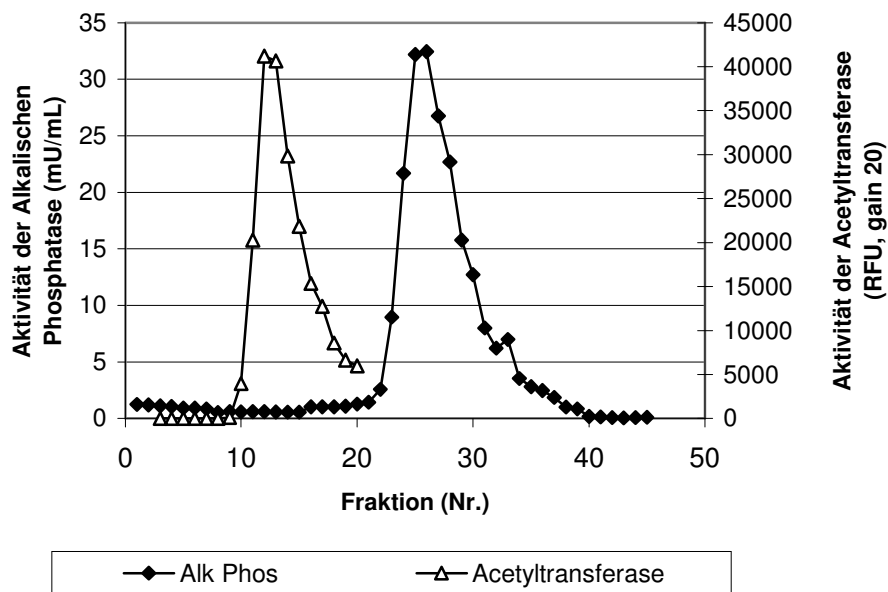


Abbildung 5.15: Aktivitätsprofil eines Gelfiltrationslaufs mit 0,5% Triton X-100 im Laufpuffer + 3% Triton X-100 Säulenvorlauf. Extraktion mit 1,5% Triton bei 37°C für 15 min, Inkubation des Pellets mit 0,5% Triton bei 37°C, Zentrifugation 10 min bei 4°C
Alk Phos: alkalische Phosphatase

Im Vergleich der silbergefärbten SDS-PAGE Gele von zwei Gelfiltrationsläufen nach Triton X-100 Extraktion, jeweils mit 0,1 % und 1% Triton X-100 (Abbildung 5.16 und Abbildung 5.17), zeigen sich kleine Unterschiede. Die Banden im vorderen Bereich scheinen etwas schwächer und die stark schmierenden Banden zwischen 46 und 69 kDa etwas später zu fraktionieren. In Bezug auf die auffälligen Banden von LAMP-2 und LAMP-1 zeigt sich mit der höheren Triton X-100 Konzentration eine stärkere Fokussierung und weniger ausgeprägte Schmierbanden im vorderen Bereich.

In Bezug auf Enzymaktivität waren Unterschiede evident, die gemessenen Enzymaktivitäten von alkalischer Phosphatase und Acetyltransferase im 1% Triton X-100 Lauf waren 3-4-fach höher und die Peak-Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde in den linken Bereich verlagert.

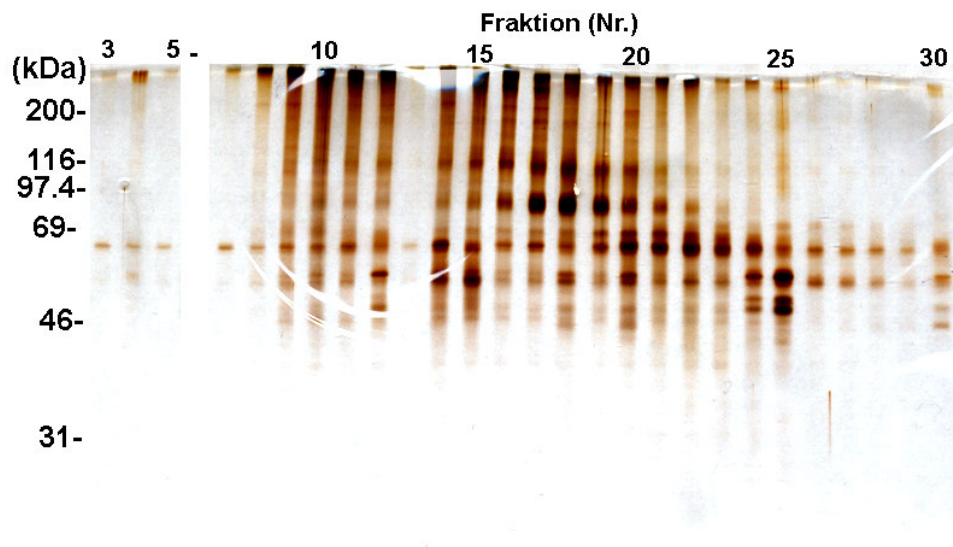


Abbildung 5.16: Silbergefärbtes SDS-PAGE Gel eines Gelfiltrationslaufs mit 0,1% Triton X-100, Extraktion mit Extraktionspuffer (20 mM Tris, 300 mM NaCl, 6% TritonX-100 red, pH 6,8) bei RT.

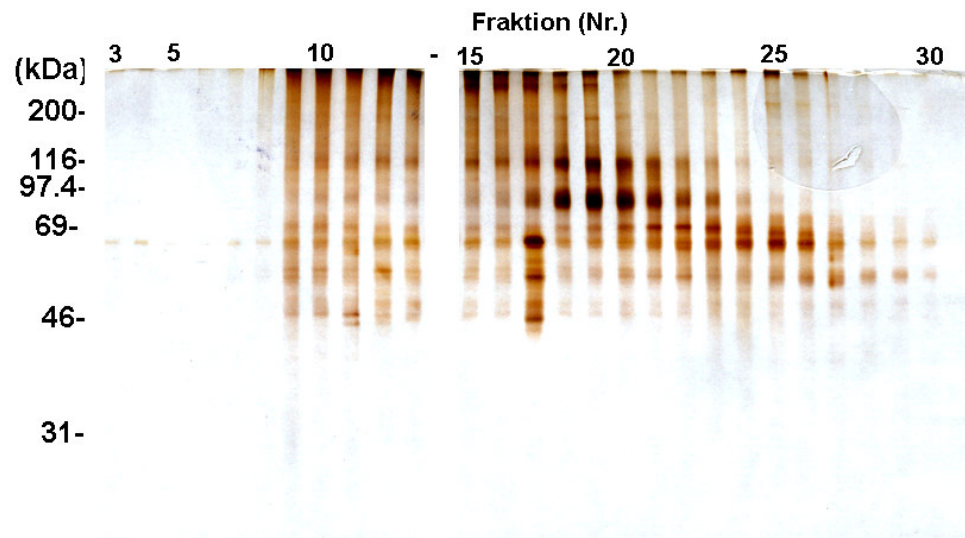


Abbildung 5.17: Silbergefärbtes SDS-PAGE Gel eines Gelfiltrationslaufs mit 1% Triton X-100, Extraktion mit Extraktionspuffer (20 mM Tris, 300 mM NaCl, 6% Triton X-100 red, pH 6,8) bei RT.

5.2.2 Ionenaustauscher (Uno Q und MonoQ-Säulen)

Eine weitere Auftrennung des Proteingemischs der präparierten Membranextrakte konnte mittels FPLC-Ionenaustauscherchromatographie erreicht werden.

Die Ionenaustauschersäulenläufe wurden ausschließlich mit Triton X-100 extrahierten Membranpräparationen durchgeführt.

Dabei fand sich der Acetyltransferase- Aktivitäts- Peak in Fraktion 14 (Abbildung 5.18), das silbergefärbte SDS-PAGE Gel lieferte jedoch keine charakteristische Bande in dieser Fraktion, sondern zeigte ein massenheterogenes Gemisch an Proteinen (Abbildung 5.19).

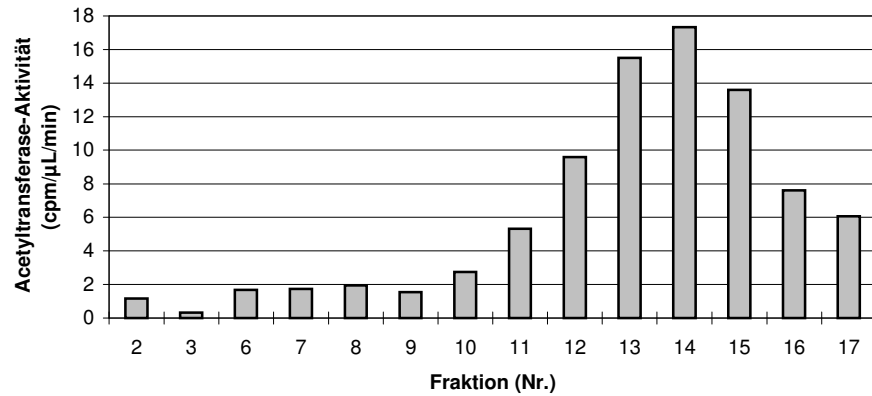


Abbildung 5.18: Acetyltransferase-Aktivität in einem UnoQ- Ionenaustauscher-Lauf aus ultrazentrifugierter Membran (280 µg Protein, 350 000 cpm/min), Laufpuffer: 10 mM Tris, 0,1% Triton X-100, Extraktion mit Puffer (3% TritonX-100, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7) 30 min bei RT, 30 min auf Eis, Lauf mit einem NaCl-Gradient bis 0,5 M

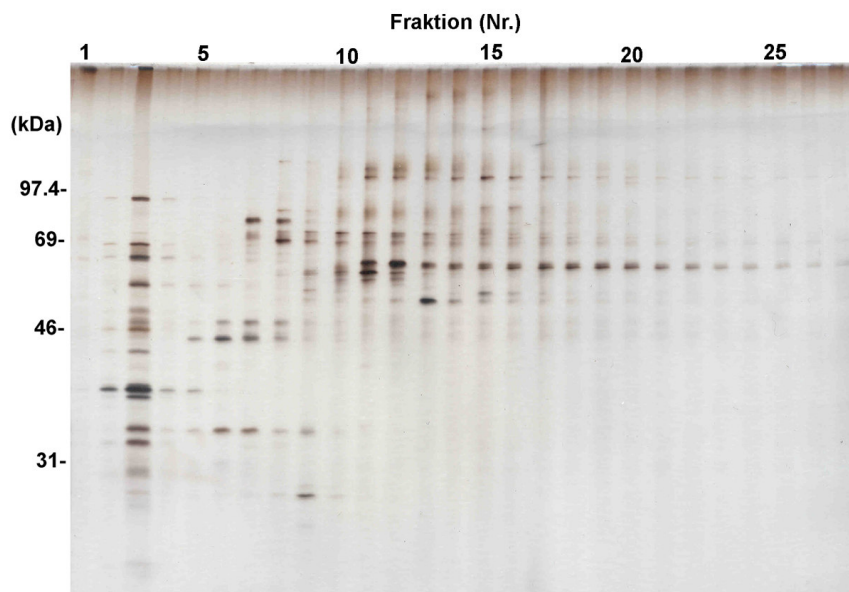


Abbildung 5.19: Silbergefärbtes SDS-PAGE Gel eines UnoQ- Ionenaustauschersäulenlaufs mit ultrazentrifugierter Membran, Laufpuffer: 10 mM Tris, 0,1% Triton X-100 Extraktion mit Puffer (3% TritonX-100, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7) 30 min bei RT, 30 min auf Eis, NaCl-Gradient bis 0,5 M

Ein vereinfachtes Bild mit weniger Proteinbanden und hoher Enzymaktivität im Acetyltransferase-Assay ließ sich in einem MonoQ-Lauf mit affinitätsgereinigter Membran erreichen. Die unterschiedlichen Ziffern sind durch unterschiedlichen Fraktionierungsbeginn zu erklären, von der Lokalisation im Lauf jedoch identisch.

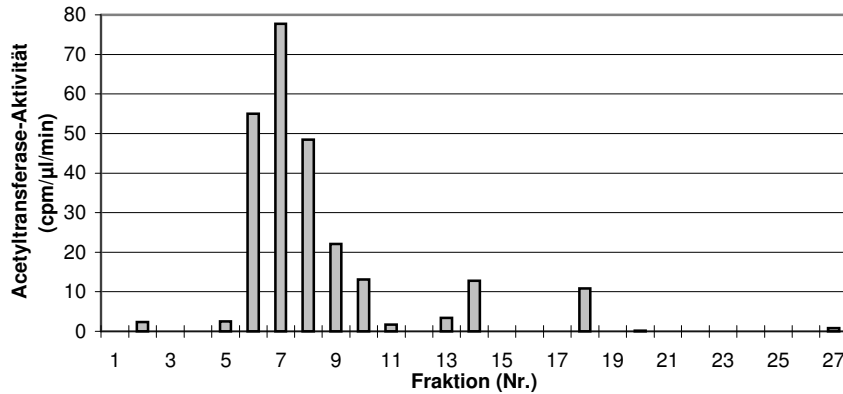


Abbildung 5.20: Acetyltransferase-Aktivität in einem MonoQ- Ionenaustauscher-Lauf mit affinitätsgereinigter Membran (Auftragsprobe 213000 cpm/min) Laufpuffer: 10mM Tris, 0,1% TritonX-100, Extraktion mit Puffer (3% TritonX-100, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7) 30 min bei RT, 30 min auf Eis, NaCl-Gradient bis 0,5 M

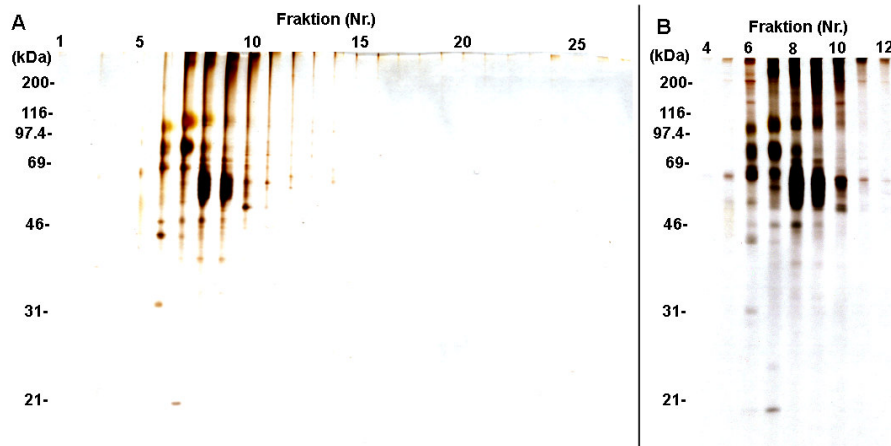


Abbildung 5.21: Silbergefärbte SDS-PAGE Gele des in Abbildung 5.20 gezeigten MonoQ- Ionenaustauscher-Laufs mit affinitätsgereinigter Membran. Laufpuffer: 10 mM Tris, 0,1% Triton X-100, A: Abbildung der gesamten Fraktionen. B: Auftrag einer größeren Proteinmenge aus den Aktivitätsspeak-Fraktionen, Extraktion mit Puffer (3% TritonX-100, 150 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7) 30 min bei RT, 30 min auf Eis

5.2.2.1 2D-SDS-PAGE

Um auch bei dieser Auftrennung die Proteinzusammensetzung der Acetyltransferase-haltigen Fraktionen zu untersuchen, wurde von den *peak*-Fraktionen der Ionenaustauschersäulen ein 2D-SDS-PAGE-Gel angefertigt. (Abbildung 5.22).



Abbildung 5.22: 2D-SDS-PAGE-Gel aus Fraktion 7 eines Ionenaustauschersäulenlaufs (*MonoQ*) aus affinitätsgereinigter Membran (Acetyltransferase-Aktivität des aufgetragenen Materials 11000 cpm/min), Extraktion mit Puffer (6% TritonX-100, 300 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 6,8), Laufpuffer: 10 mM Tris, pH 7, 0,1% Triton X-100, Elution A+1M NaCl

Darauf zeigen sich die typischen LAMP-1 und LAMP-2 Streifen und ein großer Anteil weiterer *spots*, die in 2D-Gelen von Membranpräparationen von Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe untersucht wurden (B. Simons, B. Kösters, B. Lankat-Buttgereit). Wegen des beschriebenen Aktivitätsverlusts wurde eine Markierung mit diesem Material nicht durchgeführt.

5.3 Aktivität in Optiprep® - Fraktionen

Um die in 5.2.1.1 erwähnte Organisation der Acetyltransferase in Lipidkomplexen oder *rafts*, die nach der auffälligen Lokalisation in den vorderen Gelfiltrationsfraktionen möglich war, näher zu untersuchen, wurde die Aktivität in Fraktionen von Optiprep®-Gradienten, einer anerkannten Methode zur Untersuchung von *floating* –also aufschwimmenden- Membranbestandteilen wie *rafts*, in Zusammenarbeit mit A. Taute bestimmt. Die aufgetragene Probe von UZ-Membran enthielt 500 µg Protein und wurde auf Eis mit 1 % Triton X-100 extrahiert.

Es zeigte sich, dass sich die Aktivität der Acetyltransferase zu 45 % bis 69 % in den beiden ersten Fraktionen lokalisierte, für die das Vorkommen *raft*-assoziiierter Proteine beschrieben ist. Zudem konnte eine Co-Lokalisation mit alkalischer Phosphatase demonstriert werden, für die aufgrund ihrer Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Verankerung eine *raft*-Assoziation beschrieben ist und die erwartungsgemäß überwiegend in den beiden ersten Fraktionen lokalisierte (Abbildung 5.23).

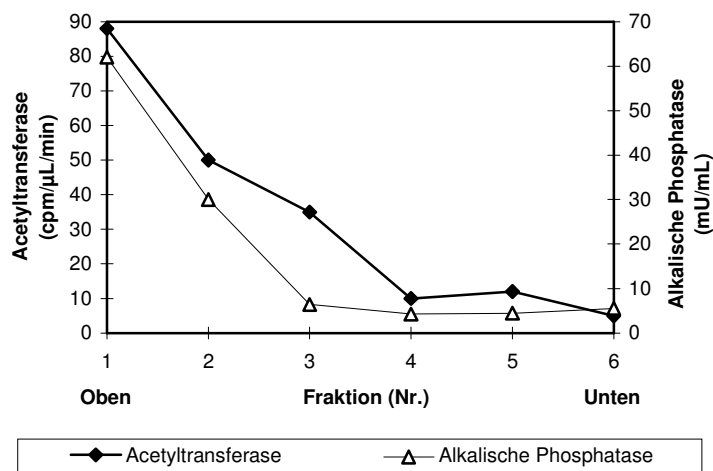


Abbildung 5.23: Darstellung der Enzymaktivität von Alkalischer Phosphatase und Acetyltransferase“ im Optiprep-Gradienten

Durch MALDI-Massenspektrometrie eines SDS-PAGE Gels eines Optiprep-Gradienten (A.Taute) konnte plazentale alkalische Phosphatase (E.C. 3.1.3.1) in einer Bande mit einer Wahrscheinlichkeit von 0.99 nachgewiesen werden.

Eine Verunreinigung mit Zellmembranbestandteilen, für die alkalische Phosphatase als Markerenzym gilt, konnte nicht ausgeschlossen werden, jedoch zeigte sich bei Untersuchung des Reinigungsfaktors durch Immunitätsreinigung mittels 2D5- anti-LAMP-2-Antikörper eine 1,2 -fache Anreicherung bei einer 3-fachen Anreicherung der sauren β -Glucosidase, also weder eine signifikante An- noch Abreicherung.

5.4 Aktivitätsveränderung durch Behandlung mit Lipid-zusammensetzung verändernden Substanzen

5.4.1 Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD)-Behandlung

Um den Zusammenhang der Acetyltransferase mit Lipidstrukturen näher zu beleuchten, wurden Versuche zur Veränderung der Lipidzusammensetzung/Cholesterol-Depletion durchgeführt.

Jeweils eine Probe verdünnter ultrazentrifugierter Membran wurde mit Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD) versetzt und entweder auf Eis oder bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Aktivität der Acetyltransferase bestimmt.

Es zeigte sich in der Analyse der Enzymaktivität nur bei MBCD- Behandlung bei 37°C eine Beeinflussung, bei Behandlung auf Eis blieb die Aktivität erhalten, während eine 20-minütige Inkubation bei 37°C zu einem Aktivitätsverlust um ca. 16% führte. Der Effekt war für die getesteten Konzentrationen von 2,5 mM, 10 mM und 20 mM MBCD gleich (Abbildung 5.24).

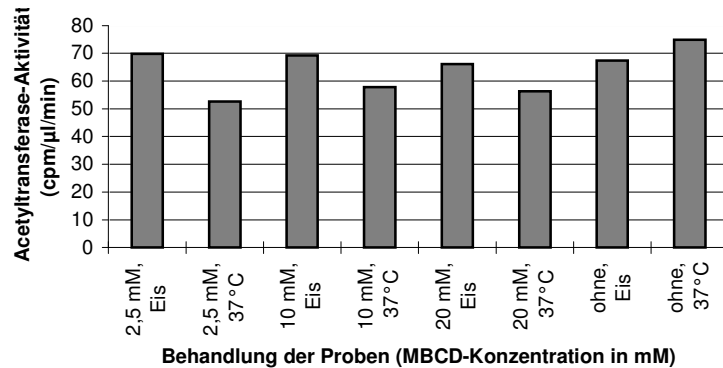


Abbildung 5.24: Aktivitätsbeeinflussung der Acetyltransferase-Aktivität durch Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD)-Behandlung: verschiedene Konzentrationen (2,5 mM, 5 mM, 10 mM MBCD) und Temperatur (4°C, 37°C)

5.4.2 Deoxycholat

Um Aktivitätsveränderung bei Deoxycholatzugabe zu untersuchen, wurden nicht nur die Konzentrationen variiert, sondern auch die verwendeten Detergenzien zur Lösung der Probe.

Es zeigte sich im Acetyltransferase- Assay ein deutlicher Aktivitätsverlust um über 50% mit steigender Deoxycholat-Konzentration (Abbildung 5.25).

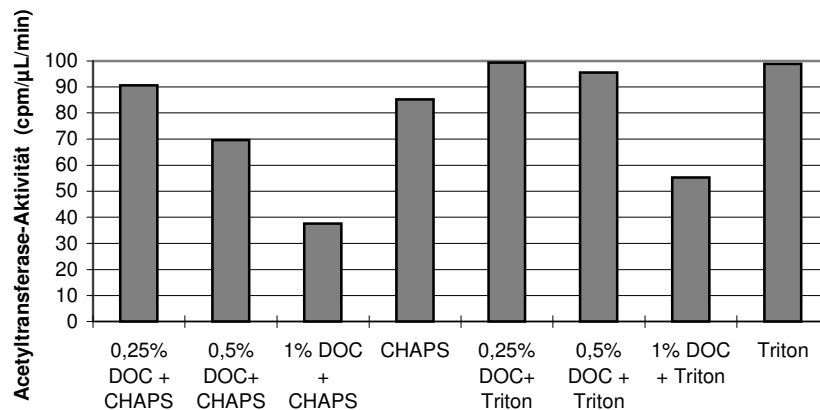


Abbildung 5.25: Aktivitätsveränderung durch Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Deoxycholat- (0,25%, 0,5%, 1%) in Anwesenheit von 1% CHAPS oder von 1% Triton X-100, Extraktion 20 min bei RT (Puffer ohne Detergenzien 10mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4). DOC: Deoxycholat, Triton: Triton X-100

5.5 Hydroxylapatit-Chromatographie

Da für einige Proteine eine gute Aufreinigung mittels Hydroxylapatit-Säulen erzielt wurde, wurde diese Methode auf bereits vorher durch Gelfiltration getrennte ultrazentrifugierte Membran angewandt.

Dabei zeigte sich jedoch ein Aktivitätsverlust von über 80%, wobei die höchste Aktivität im Durchbruch gefunden wurde, also nicht an die Säule gebunden hatte und im silbergefärbten SDS-PAGE Gel eine fast gleichmäßige Verteilung der sichtbaren Banden erschien (beides nicht gezeigt).

Diese Methode als Zwischenreinigungsschritt wurde verworfen, da der hohe Aktivitätsverlust weitere Kontrollen der Reinigung unmöglich machte und die Aktivität nicht in einer der eluierten Fraktionen auftrat, sondern nur im Durchbruch.

Der Verdacht, ein für die Aktivität wichtiger Co-Faktor des Enzyms sei durch Bindung an die Säule und eventuelle spätere Elution vom Enzym getrennt worden, ließ sich durch Kombinationen der verschiedenen Fraktionen mit Aktivitätsbestimmung nicht bestätigen. Dadurch ließ sich jedoch ein eventuell nicht rekonstituierbarer Verlust eines Co-Faktors oder eine irreversible Konformationsänderung nicht ausschließen.

5.6 Markierung mit [³H]Acetyl-Coenzym-A

Es konnte bereits 1997 von B. Bodammer (unveröffentlicht) die Markierung eines Proteins in einer lysosomalen Präparation von ca. 70 kDa Größe mit Tritium-markiertem Acetyl-Coenzym A gezeigt werden.

Da für die Acetyl-Coenzym A: α -Glucosaminid N-Acetyltransferase eine zumindest temporäre Bindung mit Acetyl-Coenzym A zur Übernahme der Acetylgruppe beschrieben ist (Bame *et al.* 1986), wurden die Markierungsbedingungen näher auf Zeichen einer enzymatischen Beeinflussung untersucht, da der Verdacht nahe lag, es könne sich bei der markierbaren Bande um die Acetyltransferase handeln.

5.6.1 Abhängigkeit der Markierung von der Inkubationszeit

Die Abhängigkeit der Markierung von der Inkubationszeit konnte mit Inkubationszeiten von 15 Sekunden, einer Minute und fünf Minuten demonstriert werden. Dazu wurden jeweils 10 μL affinitätsgereinigte Membran (Acetyltransferase-Aktivität 900 cpm/ $\mu\text{L}/\text{min}$) für die entsprechende Zeitdauer bei 37°C inkubiert, anschließend die Reaktion mit 1 mL kaltem TBS-Puffer gestoppt, zentrifugiert und erneut mit kaltem TBS-Puffer gewaschen.

Jeweils direkt nach der Markierung erfolgte die Probenvorbereitung für das SDS-Gel durch Aufkochen des Pellets durch Zugabe von 15 μL Probenpuffer (10 mM Dithiothreitol, 1 % (w/v) SDS (Sigma L-5750), 125 mM Tris/ HCl pH 6,8, 10% (v/v) Glycerin).

Durch Fluorographie konnte die Menge gebundener Radioaktivität sichtbar gemacht werden. Es zeigten sich drei Banden: eine Bande um 70 kDa und zwei Banden um 55 kDa Größe, wobei die untere der beiden meist erst bei längeren Belichtungszeiten deutlich sichtbar wurde. Weiterhin fiel auf, dass bei Inkubationszeiten über einer Minute die Bandenintensität der 70 kDa Bande wieder abnahm, während die beiden unteren etwas verstärkt wurden. Siehe Abbildung 5.26

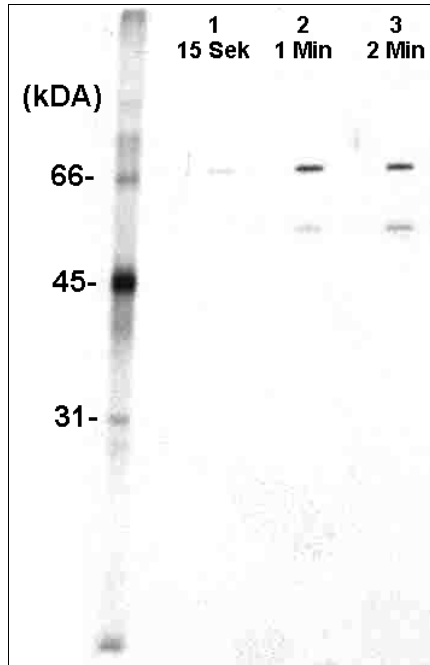


Abbildung 5.26: Zeitabhängigkeit der [^3H]Acetyl-Coenzym A-Markierung von affinitätsgereinigten Membranen. Inkubation von 10 μl affinitätsgereinigter Membran (Acetyltransferase-Aktivität 900 cpm/ $\mu\text{l}/\text{min}$) für 15 s, 1 min oder 2 min bei 37°C.

5.6.2 Abhängigkeit der Markierung von pH-Wert

Zur Demonstration der pH- Abhängigkeit wurde der pH-Wert während der Inkubation mit [^3H]Acetyl-Coenzym A zwischen pH 7, pH 7,3, pH 7,8 und pH 8,2 variiert.

Es wurden jeweils 30 μL affinitätsgereinigte Membran der gleichen Präparation (Acetyltransferase-Aktivität 900 cpm/ $\mu\text{L}/\text{min}$) in Phosphatpuffer des jeweiligen pH-Werts mit [^3H]Acetyl-Coenzym A für zwei Minuten inkubiert.

Dabei zeigte sich die stärkste Markierung bei pH 7,3, wobei besonders die Intensität der kleineren Banden bei höherem pH deutlich abnahm. Siehe Abbildung 5.27

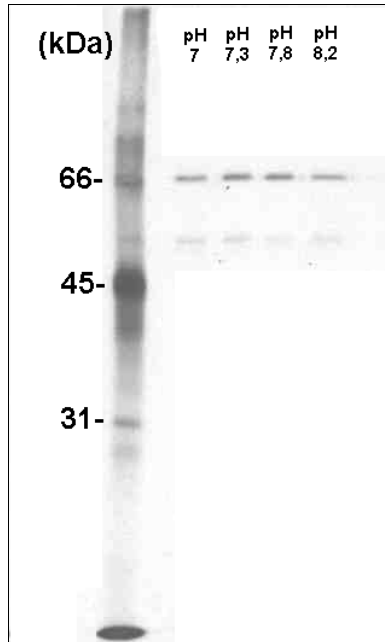


Abbildung 5.27: *pH*- Abhängigkeit der Markierung von affinitätsgereinigter Membran bei *pH* 7, *pH* 7,3, *pH* 7,8, *pH* 8,2. Inkubation für 2 min bei 37°C.

5.6.3 Abhängigkeit der Markierung von der Enzymaktivität

Zur Demonstration der Abhängigkeit der Markierung von der Enzymaktivität wurde die Intensität der Bande nach der Markierung von 30 μL affinitätsgereinigter Membran (Acetyltransferase-Aktivität von 11400 cpm/min) und 60 μL affinitätsgereinigter Membran (Acetyltransferase-Aktivität von 22800 cpm/min) verglichen. Dabei zeigte die Probe mit der doppelten Enzymaktivität eine stärkere Bandenfärbung. Siehe Abbildung 5.28.

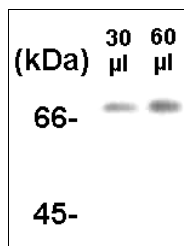


Abbildung 5.28: Abhängigkeit der Markierung von Proteinmenge oder Enzymaktivität. Markierung von 30 μl und 60 μl affinitätsgereinigter Membran, Inkubation für 2 min bei 37°C.

5.6.4 Hemmbarkeit der Markierung durch Acetyl-Coenzym A und Glucosamin

Um zu überprüfen, ob die Markierung spezifisch für Acetyl-Coenzym A und nicht durch Zusatzstoffe der radioaktiven Lösung bedingt war, wurde untersucht, ob die Reaktion durch nicht radioaktives Acetyl-Coenzym A oder zusätzliches Glucosamin als Akzeptorsubstanz hemmbar ist, siehe Abbildung 5.29.

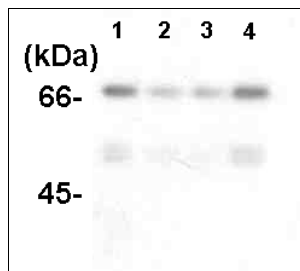


Abbildung 5.29: Markierungsverminderung in den zusätzlich mit nicht-radioaktivem Acetyl-Coenzym A versetzten Proben 2 und 3. Inkubation für 2 min bei 37°C mit radioaktivem Acetyl-CoA, (1) direkt gestoppt, (2) Nachbehandlung mit nicht-radioaktivem Acetyl-CoA für 20 s, (3) Nachbehandlung mit nicht-radioaktivem Acetyl-CoA für 4 min, (4) Nachinkubation ohne Zusatz von Acetyl-CoA

Eine Suspension affinitätsgereinigter Membranen (80 μ L mit einer Acetyltransferase-Aktivität von 30400 cpm/min) wurde für zwei Minuten mit [3 H]Acetyl-Coenzym A inkubiert. Die Probe wurde auf 4 Reaktionsgefäße verteilt und die Reaktion wurde entweder sofort mit kaltem TBS gestoppt (1) oder vorher mit 5 mM (entsprechend 250-fachen Überschusses) nicht radioaktivem Acetyl-Coenzym A für 20 Sekunden bei 37°C (2), mit 5 mM nicht radioaktivem Acetyl-Coenzym A für 4 Minuten bei 37°C (3), oder ohne weitere Zugabe für 4 Minuten bei 37°C (4) inkubiert.

Die weitere Probenaufbereitung erfolgte wie üblich. Die proteingebundene Radioaktivität in den Proben wurde durch SDS-PAGE und Fluorographie untersucht.

Hierbei zeigten beide mit nicht-radioaktivem Acetyl-Coenzym A nachbehandelten Proben eine Markierungsminderung im Vergleich zu den Kontrollen. Die Markierungsminderung wurde durch längere Inkubation nicht verstärkt, jedoch zeigte sich bei längerer Inkubation eine stärkere Schwächung der unteren Bande.

Um zu untersuchen, ob die Markierung durch eine eventuelle Übertragung der Acetylgruppe auf das Substrat Glucosamin vermindert wird, wurde eine Suspension affinitätsgereinigter Membranen (40 μ L, Acetyltransferase-Aktivität 15200 cpm/ μ L) wiederum zwei Minuten mit [3 H]Acetyl-Coenzym A inkubiert und auf zwei Reaktionsgefäße verteilt. Diese wurden nach Zentrifugation und entfernen des Überstands mit 20 mM Glucosamin in Puffer (50 mM NaPi/ 140 mM NaCl, pH 5,3) oder Puffer ohne Zusatz vermischt und 6 Minuten bei 37°C inkubiert.

Danach zeigte sich eine Markierungsverminderung in der ersten mit Glucosamin versetzten Probe. Siehe Abbildung 5.30.

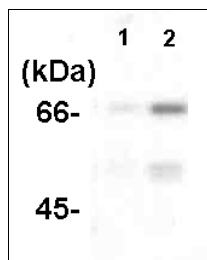


Abbildung 5.30: Markierungsverminderung nach Inkubation mit möglichem Substrat Glucosamin in Probe 1 (20 mM Glucosamin in Puffer (50 mM NaPi/ 140 mM NaCl, pH 5,3) Probe 2 ohne Glucosamin (Puffer ohne Zusatz), Markierung 2 min bei 37°C, Nachinkubation 6 min bei 37°C.

5.6.5 Analyse von Protein-Banden

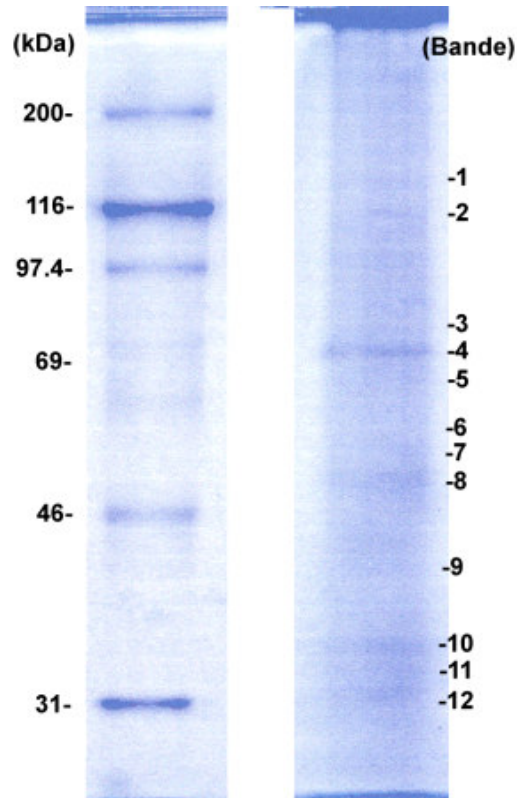


Abbildung 5.31: Präparatives Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE Gel der gepoolten, konzentrierten Gelfiltrationsfraktionen

Die Banden 4 und 5 des in Abbildung 5.31 gezeigten SDS-PAGE-Gels wurden ausgeschnitten und mittels MALDI Massenspektrometrie analysiert.

Dabei ergab die MS-Fingerprint-Analyse der Bande 4 als hauptsächliches Protein die alkalische Phosphatase Typ I (EC 3.1.3.1, SwissProt Nr. P05187). Drei weitere nicht der Phosphatase zugeordneten Peptide wurden mittels PSD weiteruntersucht, die Sequest-Suche gegen die humane NCBI- und EST-Datenbank ergab jedoch keine signifikanten Ergebnisse.

Bei der Analyse für Bande 5 konnte die weiterführende PSD-Analyse aufgrund geringer Proteinmenge nicht durchgeführt werden, es ergab sich kein Protein-Treffer mit ausreichend hoher Wahrscheinlichkeit.

5.6.6 Markierung von affinitätsgereinigten Membranen und konzentrierten GF-Fraktionen

Nach dem Nachweis der alkalischen Phosphatase anstelle der vermeintlichen Acetyltransferase im präparativen Gel war es nötig, weitere Kontrollen durchzuführen. Vieles spricht für eine nicht-spezifische Markierung der alkalischen Phosphatase an der Stelle der markierbaren Bande. Aus einer Skepsis heraus wurden Versuche verschiedene Proteine zu markieren durchgeführt.

Nach der Markierung von affinitätsgereinigten Membranen sollte untersucht werden, ob die Markierungsbande auch in konzentrierten Gelfiltrationsfraktionen reproduzierbar ist.

Hierfür wurden jeweils 20 μL konzentrierte Probe aus einem Gelfiltrationslauf mit ultrazentrifugierter Membran für zwei Minuten mit [^3H]Acetyl-Coenzym A inkubiert und nach Stoppen mit kaltem TBS-Puffer acetongefällt.

Die Konzentration der Proben erfolgte mittels Millipore Filter-Units (Ultrafree – 0,5 Centrifugal Filter Device 30000 NMWL Biomax 30) von 800 μL gepoolter Fraktionen auf ca. 30 μL Konzentrat. Siehe Abbildung 5.32.

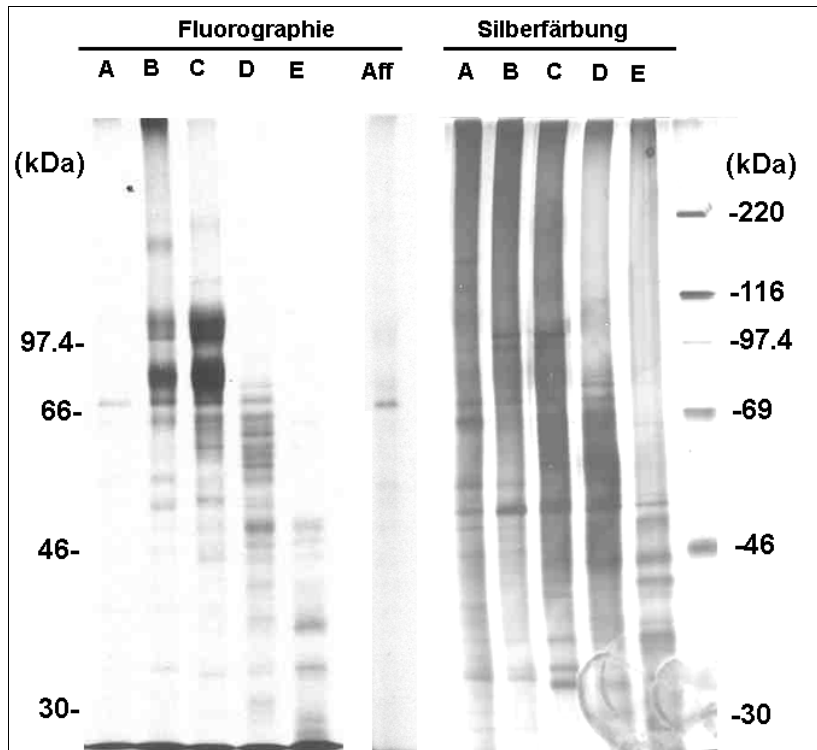


Abbildung 5.32: SDS-PAGE mit Darstellung der Markierung durch Fluorographie und dem korrespondierenden Silber-gefärbten Gel. A: Fraktion 8-11, B: Fraktion 14-17, C: Fraktion 21-24, D: Fraktion 28-31, E: Fraktion 35-38, Aff: Affinitätsgereinigte Membran mit Markierung.

Es konnte gezeigt werden, dass die Markierung auch mit konzentrierten Gelfiltrationsfraktionen möglich ist. Jedoch wurden in dieser Versuchsanordnung auch andere Banden zum Teil entsprechend dem Proteinprofil markiert. Als Beispiel dafür sind die beiden sehr deutlichen Banden über und unter dem 97,4 kDa Marker zu nennen, die nach dem Silber-gefärbten Bild LAMP-2 und LAMP-1 entsprechen. Eventuell liegt dieser Markierungsbesonderheit die besondere Beschaffenheit der konzentrierten Probe mit entsprechend ebenfalls konzentrierten Detergenzien und Lipiden zugrunde.

Im Vergleich zum Silbergel zeigt sich jedoch eine deutliche Markierung der bekannten Bande um 70 kDa, die nicht mit einer entsprechenden silbergefärbten Bande zu korrelieren ist.

6 Diskussion

6.1 Isolierung von Lysosomen aus humaner Plazenta und Anreicherung der membranständigen Acetyltransferase

6.1.1 Charakterisierung der Enzymaktivitätsverteilung während der Präparationsschritte (Ergebnisse in Kapitel 5.1)

Die Qualität der Aufreinigung konnte anhand der Abnahme der spezifischen β -Hexosaminidase-Aktivität (als Marker für lösliche lysosomale Proteine) gezeigt werden, welche ca. halbiert wurde.

Das Auftreten eines Peaks von 0,18% der Gesamtaktivität der alkalischen Phosphatase im Bereich der *dense body* Lysosomen (Abbildung 5.2) konnte als eine Kontamination interpretiert werden, da dieses Glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI)-verankerte Enzym nach der Synthese im Golgi-Apparat in Detergens-resistente Membranen (DRMs) eingebaut wird und dann in die Plasmamembran transferiert wird (Brown/Rose 1992, Cerneus *et al.* 1993). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der alkalischen Phosphatase, die zwecks Abbau endozytiert wird, nicht sofort abgebaut wird und in Lysosomen nachgewiesen werden kann. Die Bedeutung des Auftretens der alkalischen Phosphatase-Aktivität in den lysosomalen Fraktionen wird im Hinblick auf Lipidkomplexe in Kap. 6.2 näher ausgeführt.

6.1.2 Besonderheiten der Fraktionierung in der FPLC (Ergebnisse in Kapitel 5.2)

Mit 1% CHAPS in der Gelfiltration von ultrazentrifugierten Membranpräparationen zeigt sich die Hauptaktivität der Acetyltransferase und ein großer Anteil der alkalischen Phosphatase in den vorderen Fraktionen, jedoch eluiert die Hauptmenge der Proteine, LAMP-2 und β -Glucosidase in späteren Fraktionen.

Das Verhalten der extrahierten Membranpräparationen ist von außerordentlichem Interesse, denn die untersuchten Proteine repräsentieren verschiedene Klassen von Proteinfunktionen und Membranassoziationen.

Die Acetyltransferase ist wahrscheinlich ein polytopes Transmembranprotein, Bame und Rome postulierten 1986 einen *ping-pong*-Mechanismus, wonach die Acetyltransferase mit einem der Substrate, Acetyl-CoA, an der zytosolischen und dem anderen, Heparansulfat, an der luminalen Seite der Membran reagiere (Bame/Rome 1985, Bame/Rome 1986). Meikle *et al.* postulierten nach ausführlichen kinetischen Untersuchungen einen „*random-order ternary-complex* Mechanismus ohne eine intermediäre kovalente Bindung der Acetylgruppe an das Enzym (Meikle *et al.* 1995).

LAMP-2 ist ein Typ I Membranprotein mit einem einzigen Transmembransegment (Fukuda *et al.* 1988).

β -Glucosidase ist an die luminalen Seite der lysosomalen Membran gebunden ohne Transmembransegmente zu besitzen. Über den Mechanismus der Membranhängigkeit ist bis auf die Unabhängigkeit von der Glykosylierung wenig bekannt (Leonova *et al.* 2000).

Die alkalische Phosphatase wird durch einen C-terminalen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker im Golgi-Apparat in Detergens-resistente-Membrandomänen (DRMs) integriert bevor sie zur Plasmamembran wandert (Brown/Rose 1992, Cerneus *et al.* 1993).

Die Anwesenheit von Acetyltransferase und eines Teils der alkalischen Phosphatase unter den Proteinen, die in der Gelfiltration von der Gelmatrix ausgeschlossen wurden, wiesen auf eine Partizipation bei homo- oder heteromeren Komplexen mit Proteinen oder Lipiden hin und ist mit einem Vorkommen beider Enzyme in DRMs kompatibel (Kapitel 5.3.).

Einen weiteren Hinweis auf das mögliche Vorliegen eines Komplexes, der funktionelle Bedeutung für die enzymatische Aktivität hat, liefern die Versuche zur Hydroxylapatit-Chromatographie und zur isoelektrischen Fokussierung. Der

Verlust der enzymatischen Aktivität in diesen Versuchen kann eventuell, jedoch nicht zwingend, durch eine Trennung von Untereinheiten erklärt werden.

Das nicht-ionische Detergens TritonX-100 zeigte sich im Verlauf der Untersuchungen als überlegen für die Extraktion der Acetyltransferase-Aktivität im Vergleich zum zwitterionischen CHAPS, da es mehr Enzymaktivität aus gleicher Membranproteinmenge solubilisieren konnte. Wie in Kapitel 5.2.1.4, Abbildung 5.14 und Abbildung 5.15 im direkten Vergleich zu sehen ist wird eine höhere Menge Enzymaktivität solubilisiert. Ebenso bewirkte es eine verbesserte Fokussierung anderer lysosomaler Membranproteine in der Gelfiltration mit nachfolgender SDS-PAGE – Analyse der Fraktionen.

Eventuell ist die unterschiedliche Aktivität der Acetyltransferase aber auch durch eine unterschiedliche Änderung des Membranlipidgehalts verschiedener Detergenzien zu erklären. Für Chapso und CHAPS sind Änderungen im Cholesterol/Phosphatidylinostol-Verhältnis von 1,5-1,7 beschrieben (Klein *et al.* 1995).

Für das Vorliegen eines Komplexes sprechen ebenfalls neuere Daten von Ausseil *et al.* (2006), die Acetyltransferaseaktivität eluierte dort als einzelner Peak im Bereich von 240 kDa in der Gelfiltration von bereits durch Ionenaustauschchromatographie aufgereinigten Proteinfractionen aus humaner Plazenta.

Die höchste Ausbeute an Gesamtzymaktivität in den *peak*-Fraktionen wurden mit Gelfiltrationsläufen erhalten (max 69% der Auftragsaktivität) von UZ-Membran mit einem Mittel von 46% Ausbeute. Im Vergleich dazu UnoQ-Läufe mit max 52% der Auftragsaktivität und einem Mittel von 43%, ebenfalls mit UZ-Membran.

6.2 Markierung mit [³H]Acetyl-Coenzym-A (Ergebnisse in Kapitel 5.6)

Es konnte eine Markierung des lysosomalen Membranextraktes mit [³H]Acetyl-Coenzym-A von 3 Banden gezeigt werden, eine in der Höhe von 70 kDa und zwei in der Höhe von 55 kDa.

Diese Markierung zeigte sich abhängig von der Inkubationszeit, abhängig von pH-Wert, abhängig von Proteinmenge/Enzymaktivität und die Markierung war durch Zugabe eines konkurrierenden Substrats (nicht-radioaktives Acetyl-Coenzym A) und Zugabe eines Akzeptors der Acetylgruppe (nicht-radioaktives Glucosamin) hemmbar.

Die Markierung mit einer radioaktiven Acetylgruppe stellt zwar eine selektive Proteinmodifikation dar, ist jedoch von einer für das gesuchte Enzym zu erwartenden Spezifität weit entfernt. Daher scheint die Markierung nicht zur Identifizierung der Acetyltransferase geeignet zu sein.

Neu publizierte Daten von Ausseil *et al.* (2006) zeigen ebenfalls eine Acetylierung einer Proteinfraction aus humaner Plazenta, sowie Rattenleber und Fibroblasten von Sanfilippo C-erkrankten Patienten und gesunden Kontrollpersonen.

Ausseil *et al.* konnten die Acetylierung eines 120 kDa Proteins in Extrakten verschiedener Ausgangsmaterialien zeigen. In Fibroblastenpräparationen zeigten sich 10 radioaktiv markierte Banden von 120, 95, 80, 65, 37, 25, 25 und 9 kDa. Bei den Fibroblastenpräparationen der Sanfillipo C-erkrankten Patienten fehlte die 120 kDa –Bande, was zur Vermutung führte es handele sich um eine katalytische Untereinheit eines größeren Komplexes. Die von Ausseil beschriebenen Banden unterscheiden sich von den hier beschriebenen deutlich. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit ist von Ausseil *et al.* nur die gereinigte Fraktion untersucht worden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Acetyltransferase in verschiedenen Geweben in unterschiedlichen Formen vorliegt.

Ausseil *et al.* versuchten ebenfalls die markierten Banden nach tryptischem Verdau mit massenspektrometrischen Methoden (2D-LC-MS/MS) zu charakterisieren. Es wurden viele lysosomale Proteine detektiert, sowie Proteine, welche sowohl in der Plasmamembran als auch der lysosomalen Membran gefunden werden.

Zudem wurden anhand der EST (*Expressed Sequence Tag*) oder ORF (*Open Reading Frame*) sechs neue Proteine detektiert, jedoch alle ohne Homologie zu GNAT (Glucosamin-N-Acetyltransferasen) oder NAT (N-Acetyltransferasen).

Eine durchgeführte bioinformatische Analyse der Peptidmassen in Bezug auf die in Frage kommende Genregion auf Chromosom 8 (Ausseil 2004) konnte ebenfalls keine Übereinstimmungen finden.

Dies führte die Autoren zu der Vermutung, dass entweder die Proteinmenge unterhalb der massenspektrometrischen Detektionsgrenze lag, das Gen in den Lücken der bekannten DNA-Sequenz im Bereich von Chromosom 8 liege oder eventuell der genetische Defekt, der der Mukopolysaccharidose zu Grunde liegt die Expression, posttranslationale Modifikation oder den Transport der Acetyltransferase betreffe. Dies ist z.B. bei der Multiplen Sulfatase Defizienz der Fall, wo ein Defekt der des Sulfatase-modifying factor 1 (SUMF) eine Modifikation (eine Konversion von Cystein zu C-alpha-formylglycin) zur Defizienz mehrerer Sulfatasen führt (Dierks *et al.* 2003, Roeser *et al.* 2006).

6.3 Assoziierung mit den rafts

Die alkalische Phosphatase kolokalisierte mit 65 % der Gesamtaktivität mit ca. 50% der Gesamtaktivität der Acetyltransferase im Optiprep-Gradienten nach Membranextraktion mit 1% TritonX-100 bei 4°C.

Es ist möglich, jedoch unbewiesen, dass alkalische Phosphatase in der lysosomalen Membran anwesend ist, und eine Fraktion repräsentiert, die zum Abbau in die Lysosomen transportiert wurde. Eine ähnliche Beobachtung ist von Tanaka *et al.* (1989) über die 5'-Nucleotidase in Rattenleber-Tritosomen beschrieben worden.

Tritosomen sind ein gut untersuchtes Modell von *late stage*-Rattenleber-Lysosomen, die sich von frühen und späten Endosomen und Phagosomen unterscheiden, was durch Enzymassays, Elektronenmikroskopie, Western Blots von Markerproteinen und Phagosomen-Fusionsassays bereits früher gezeigt werden konnte (Leighton 1968, Khan 1981, Burnside 1982, Wattiaux 1996). Die Methode wurde von de Duve entwickelt, um das Problem überlappender Dichte zwischen Lysosomen und anderen Organellen bei der Fraktionierung im Dichtegradienten zu überwinden, denn die Tyloxapol (Triton WR1339)

angereicherten Lysosomen werden in der Dichte vermindert. Dabei wird ausgenutzt, dass von Zellen endozytiertes Material im Lysosom angereichert wird.

Nach Behandlung der Ratten mit Triton WR 1339 wurde das GPI-verankerte plasmalemmale Enzym 5'-Nucleotidase in membran-assoziiierter und löslicher Form in Lysosomen gefunden, welche Triton WR 1339 angereichert hatten. Dieser Bericht indizierte, dass 5'-Nucleotidase in ein lysosomales Kompartiment eintritt, um dort von der Membran abgetrennt und völlig abgebaut zu werden.

Aktuell werden endosomale *multivesicular bodies* als membranabbauendes Kompartiment gesehen (Simons *et al.* 2000; Kobayashi *et al.* 2001).

6.3.1 Aktivitätsveränderung durch Behandlung mit Cholesterol-bindenden Substanzen

Um den Zusammenhang der Acetyltransferase mit Lipidstrukturen näher zu beleuchten, wurden Versuche Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD) zur Veränderung der Lipidzusammensetzung/ Cholesterol-Depletion durchgeführt.

Häufig angewandte Methoden zur Änderung der Lipidkonzentration in isolierten Plasmamembranen oder lebenden Zellen sind (Klein *et al.* 1995)

1. die Inkubation mit Liposomen definierter Komposition
2. die Anwendung unspezifischer Lipid-Transfer-Proteine
3. die Präparation hoch verdünnter wässriger Cholesterol-Mischungen
4. oder die Anwendung spezifischer Enzyme, die selektiv einiger der Membranlipide verdauen

Bei diesen Methoden ist es schwierig, die Lipidzusammensetzung auf eine definierte Weise zu verändern und Dosis-abhängige Experimente durchzuführen, des weiteren erfordern sie die Reinigung spezifischer Enzyme oder die Präparation von Liposomen. Zudem entfernt eine lipolytische Behandlung nicht nur eine bestimmte Lipidklasse sondern generiert auch neue Produkte (freie Fettsäuren, Lysolipide und Diacylglycerol) und verändert damit die Membranlipidzusammensetzung, was zu Veränderungen der verbleibenden Protein-Lipid interaktionen führen kann.

So bietet es sich an, Cyclodextrine zur Änderung der Lipidzusammensetzung zu verwenden. Cyclodextrine bilden Einschlusskomplexe mit unpolaren Substanzen, indem sie diese in ihre hydrophobe Kavität einschließen. Dadurch erhöhen sie deren Löslichkeit.

Cyclodextrine sind cyclische Oligosaccharide, die aus 6, 7 oder 8 Glucopyranose-Einheiten bestehen, welche über $\alpha(1-4)$ Bindungen verknüpft sind. Sie nehmen eine „Torus“-Form an und sind in der Lage kleine Gast-Moleküle geringerer Wasser-Löslichkeit in ihrer hydrophoben Kavität zu binden und einen wasserlöslichen Gast-Cyclodextrin-Einschlusskomplex zu bilden (Rawlyer/Siegenthaler 1996) (Siehe Abbildung 6.1).

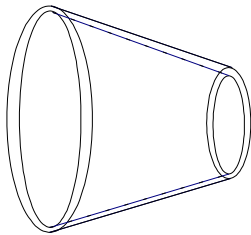


Abbildung 6.1: Die Torus-Form des β -Cyclodextrin. (Leung et al.2000)

Es sind große Moleküle (>1 kDa), die nicht die Membranen penetrieren und kaum oberflächenaktiv wirken (Ohvo et al. 1997). Für β -Cyclodextrin konnte gezeigt werden, dass es bevorzugt Cholesterole der Plasmamembran (Ohtani et al. 1989) oder anderen Membranen entzieht, z.B. Zymogengranula mit 85 % Cholesteroldepletion (Hodel et al. 2001).

Cholesterole sind eine essentielle Komponente von Zellmembranen mit struktureller und regulatorischer Funktion. Die Verteilung von Cholesterole zwischen den Zellorganellen ist sehr unterschiedlich, die Hauptmenge findet sich in der Plasmamembran (Ohvo et al. 1997, Slotte et al. 1989), aber auch in lysosomalen Membran sind ca. 14% Cholesterole vorhanden (Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1: Lipidzusammensetzung einer Rattenleberzelle

	Chol	PC	PE	PS	PI	PG	CL	SM
Plasmamembran	30	18	11	9	4	0	0	14
Golgi	8	40	15	4	6	0	0	10
SER	10	50	21	3	7	0	2	12
RER	6	55	16	3	8	0	0	3
Kernmembran	10	55	20	0	7	0	0	3
Lysosomale Membran	14	25	13	-	7	0	5	24
Mitochondriale Membran								
Innere	3	45	24	1	6	2	18	3
Äußere	5	45	23	2	13	3	4	5

Abkürzungen: Chol: Cholesterol, PC: Phosphatidylcholin, PE: Phosphatidylethanolamin, PS: Phosphatidylserin, PI: Phosphatidylinositol, PG: Phosphatidylglycerol, CL: Cardiolipin, SM: Sphingomyelin.

Klein *et al.* (1995) konnten zeigen, dass eine Reduktion des Cholesterol-Gehalts durch Methyl- β -Cyclodextrin (MBCD) in präparierter myometrialer Plasmamembran zu einer Änderung der Bindungskapazität des Oxytocin-Rezeptors führt. Die Dissoziationskonstante erhöhte sich auf das 87-fache. Diese Reduktion der Affinität war bei Rekonstitution des Cholesterolgehalts mit einem Cholesterol-MBCD-Komplex wieder reversibel.

GPI-verankerte Proteine zeigen deutliche Veränderungen ihrer Eigenschaften durch Senkung des zellulären Cholesterolgehalts. GPI-verankerte Proteine sind in Sphingolipid-Mikrodomänen angereichert. Diese werden nach Ilangumaran/Hoessli (1998) als Ergebnis der Organisation von Plasmamembran Sphingolipiden und Cholesterol in einer *liquid ordered phase* angesehen.

Die Veränderungen nach Cholesterolentzug beinhalten die Dispersion auf der Zelloberfläche, ihre Abtrennung als Membranvesikel, eine Verminderung ihrer

Zelloberflächenexpression, eine vermehrte Löslichkeit in nicht-ionischen Detergenzien und eine Verminderung ihrer Eigenschaft als Signalgeber.

Diese Effekte werden durch zwei extreme Konzepte in Bezug auf die mechanistische Basis der lipid-induzierten Modulation erklärt: Modulation durch Mengeneigenschaften oder durch spezifische Interaktion. Die Mengeneigenschaften beziehen sich hauptsächlich auf die Membranfluidität, die bei steigendem Cholesterolgehalt vermindert wird (Bastiaanse *et al.* 1997).

Es konnte eine Abhängigkeit der Cholesteroldepletion von der sonstigen Membranzusammensetzung, insbesondere dem Gehalt an Sphingomyelin und Phosphatidylcholin gezeigt werden (Ohvo *et al.* 1997) mit stabilisierender Wirkung des Sphingomyelins.

In meinem Versuchsansatz zeigte sich in der Analyse der Enzymaktivität der Acetyltransferase bei MBCD-Behandlung bei 37°C eine Minderung; bei Inkubation auf Eis blieb die Aktivität erhalten. Eine 20-minütige Inkubation bei 37°C führte zu einem Aktivitätsverlust um ca. 16%, während die Kontrollen ihre Aktivität beibehielten, ein schlichter Zerfall des Enzyms ist also unwahrscheinlich. Der Effekt ließ sich durch die getesteten Konzentrationen von 2,5 mM, 10 mM und 20 mM MBCD nicht steigern. Konzentrationen von 0 bis 50 mM sind von verschiedenen Autoren für diverse biologische Systeme angewandt worden (Rawlyer/Siegenthaler 1996, Ohvo *et al.* 1997, Ilangumaran/Hoessli 1998).

Es scheint als würde eine Konzentration von 2,5 mM MBCD genügen, um eine vorhandene Organisation des Enzyms mit Cholesterol oder anderen Lipiden zu verändern und eine Aktivitätsminderung zu bewirken.

Das ionische Detergens Deoxycholat interagiert mit Cholesterol in Membranen und induziert Bildung von Poren. Eine Behandlung mit Deoxycholat nach erfolgter Membransolubilisation mit CHAPS (zwitterionisch) oder TritonX-100 (nicht-ionisch) zeigte eine Aktivitätsminderung (5.4.2). Eventuell ist dies durch einen weiteren Entzug von Membrankomponenten zu erklären. Für den Benzodiazepinrezeptor ist jedoch ein unerklärter Verlust, a.e. durch Proteinalteration, der Bindungsaktivität bei Deoxycholatkonzentrationen > 10

mg/mL beschrieben, der auch für die Acetyltransferase zutreffen könnte (Viel 1996).

6.4 Ausblick

Wie bereits in Kap. 2.4 beschrieben wurde nach Abschluß meiner experimentellen Arbeit das kodierende Gen für die Acetyltransferase identifiziert (Fan *et al.* 2006, Hrebicek *et al.* 2006). Eine Reinigung des Membranproteins ist jedoch weiterhin von Interesse, beispielsweise für Untersuchungen des Katalysemechanismus.

Die selektive Extrahierbarkeit und die Verwendung von CHAPS und TritonX-100 nacheinander sowie von verschiedenen Chromatographiesäulen, z.B. Gelfiltration und Ionenaustauschersäule (nicht Hydroxylapatit, da diese Trennung zu einem Aktivitätsverlust führte) können wichtige Teilschritte künftiger Reinigungen werden. Diese Bedingungen müssten jedoch im Hinblick auf Ausbeute optimiert werden. Die aktuellen Ergebnisse deuten eine Anreicherung des Enzyms an, die jedoch ineffektiv bleibt, weil gleichzeitig ein großer Teil der Aktivität verloren geht.

Die Charakterisierung der Acetyltransferase hat nicht nur akademische Bedeutung sondern ist klinisch im Hinblick auf die Entwicklung von Therapien bedeutsam. Ein wichtiges Thema bei der Untersuchung dieses Membranproteins ist seine Wechselwirkung mit Lipiden. Der Befund dieser Arbeit, dass Acetyltransferase in Cholesterol-haltigen DRMs (*detergent resistant membranes*) vorliegt und durch Entfernen von Cholesterol teilweise gehemmt wird, wird von Bedeutung sein für alle Applikationen, bei denen das Enzym solubilisiert und in Liposomen eingebettet werden muss.

7 Zusammenfassung

Die Acetyl-CoA-Glucosaminid-N-Acetyltransferase ist ein lysosomales Protein, dessen Ausfall das Sanfilippo C-Syndrom (Mukopolysaccharidose Typ IIIC, OMIM 252930) bedingt. Dabei handelt es sich um eine von elf durch distinkte Enzymdefekte bedingten Mukopolysaccharidosen. Durch den Ausfall der lysosomalen Acetyltransferase kommt es zu einer Störung des Heparansulfatabbaus mit einer Ansammlung von Stoffwechselprodukten im Lysosom. Die zugrunde liegende Gensequenz wurde 2006 von Fan *et al.* und Hrebicek *et al.* beschrieben.

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war eine Anreicherung und Solubilisierung der lysosomalen Acetyltransferase. Das Enzym wurde aus humaner Plazenta gewonnen. Nach einer Anreicherung lysosomaler Membranproteine durch Immunaффinitätsabsorption wurden die Membranen mit Detergentien solubilisiert und die extrahierten Membranproteine durch verschiedene Verfahren fraktioniert. Hierzu wurden die Extraktionsbedingungen optimiert sowie Gelfiltration und Ionenaustauscherchromatographie verwendet. In den so gewonnenen Fraktionen wurde die Aktivität von Acetyltransferase bestimmt und die Fraktionen höchster Aktivität durch SDS-PAGE und 2D-Elektrofokussierung/SDS-PAGE weiter charakterisiert.

Eine Isolierung markierter Acetyltransferase konnte wegen eines im Rahmen der zweidimensionalen Trennung aufgetretenen Verlusts des markierten Proteins nicht erreicht werden. Es zeigte sich jedoch, dass die Markierung wenig spezifisch war.

Nach eindimensionaler Trennung wurde in dem als wahrscheinlich für die Acetyltransferase geltenden Molekulargewichtsbereichen die alkalische Phosphatase identifiziert. Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse erscheint die Hypothese von Bame und Rome (1986) über Bildung eines acetylierten Enzymintermediats als wenig wahrscheinlich.

Durch uns konnte erstmals die Assoziation der Acetyltransferase zu *rafts* gezeigt werden.

Versuche mit β -Cyclodextrin zeigten, dass die optimale Aktivität der Acetyltransferase von der Anwesenheit von Cholesterin, einem typischen Bestandteil von DRMs (*detergent resistant membranes*) abhängig ist.

Die hier beschriebenen Trennmethoden und Solubilisierung und die erstbeschriebene Bedeutung von Cholesterin für die Aktivität der Acetyltransferase können eine Grundlage künftiger Isolierung und Rekonstitution des Membranproteins in Liposomen werden.

8 Literatur

Anderson, R. A., Byrum R. S., Coates, P. M., Sando, G. N. (1994): Mutations at the lysosomal acid cholesteryl ester hydrolase gene locus in Wolman disease. *Proc. Natl Acad. Sci USA* 91: 2718-2722

Andersson, H.C., Kohn, L.D., Bernardini, I., Blom, H.J., Tietze, F., Gahl, W.A. (1990): Characterization of lysosomal monoiodothyrosine transport in rat thyroid cells. Evidence for transport by system h. *J. Biol. Chem.* 265: 10950-10954

Andrews, N.W. (2002): Lysosomes and the plasma membrane: trypanosomes reveal a secret relationship. *J. Cell. Biol.* 158: 389-394

Applegarth, D.A., Dimmick, J.E., Hall, J.G. (1997): *Organelle Diseases*, Chapman & Hall, London

Arai, K., Shimaya A., Hiratani, N., Ohkuma S. (1993) Purification and characterization of lysosomal H(+)-ATPase. An anion- sensitive v-type H(+)-ATPase from rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* 268: 5649 - 5660 .

Ashino , Y., Ying, X., Dobbs, L.G., Bhattacharya (2000): $[Ca^{2+}]_i$ oscillations regulate type II cell exocytosis in the pulmonary alveolus. *Am J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279: L5-L13

Aslanidis, C., Klima, H., Lackner, K.J., Schmitz, G. (1994): Genomic organization of the human lysosomal acid lipase gene (LIPA). *Genomics.* 20(2):329-31

Ausseil, J., Laundry, k., Seyrantepe, V., Trudel, S., Mazur, A., Lapointe, F., Pshezhetsky, A.V. (2006): An acetylated 120-kDa lysosomal transmembrane protein is absent from mucopolysaccharidosis IIIC fibroblasts: A candidate molecule for MPS IIIC. *Molecular Genetics and Metabolism* 87: 22-31

Ausseil, J., Loredó-Osti, J.C., Verner, A., Darmond-Zwaig, C., Maire, I., Poorthuis, B., Van Diggelen, O.P., Hudson, T.J., Fujiwara, T.M., Morgan, K., Pshezhetsky, A.V. (2004): Localisation of a gene for mucopolysaccharidosis IIIC

- to the pericentromeric region of chromosome 8. *J. Med. Genetics* 41:941-944
- Bagshaw, R.D., Pasternak, S.H., Mahuran, D.J., Callahan, J.W. (2003): Nicastrin is a resident lysosomal membrane protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300: 615-618
- Bahr, B.A., Bendiske, J. (2002): The neuropathogenic contributions of lysosomal dysfunction. *Journal of Neurochemistry* 83: 481-489
- Bame, K.J., Rome, L.H. (1985): Acetyl coenzyme A: alpha-glucosaminide N-acetyltransferase. Evidence for a transmembrane acetylation mechanism. *J Biol Chem.* 260:11293-11299
- Bame, K.J., Rome, L.H. (1986): Genetic evidence for transmembrane acetylation by lysosomes. *Science* 233:1087-1089
- Barrueco, J.R., Sirotnak, F.M. (1991): Evidence for the facilitated transport of methotrexate polyglutamates into lysosomes derived from S180 cells. Basic properties and specificity for polyglutamate chain length. *J. Biol. Chem.* 266: 11732-11737
- Bastiaanse, E.M.L., Höld, K.M., Van der Laarse, A. (1997): The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. *Cardiovascular Research* 33: 272-283
- Berg, T., Gjøen, T., Bakke, O. (1995): Physiological functions of endosomal proteolysis (Review) *Biochem J.* 307: 313-326
- Bergmann, M., Schütt, F., Holz, F.G., Kopitz, J. (2004): Inhibition of the ATP-driven proton pump in RPE lysosomes by the major lipofuscin fluorophore A2-E may contribute to the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB Journal* 28 (3): 562-564
- Berkhan, O. (1907): Zwei Fälle von Skaphokephalie. *Arch. Anthrop.* 34: 8
- Bernar, J., Tietze, F., Kohn, L.D., Bernardini, I., Harper, G.S., Grollman, E.F., Gahl, W.A. (1986): Characteristics of a lysosomal membrane transport system for tyrosine and other neutral amino acids in rat thyroid cells. *J. Biol. Chem.* 261: 17107-17112

- Bird, S.J., Lloyd, J.B. (1990): Evidence for a dipeptide porter in the lysosomal membrane. *Biochim Biophys. Acta* 1024: 267-270
- Blott, E.J., Griffiths, G.M. (2002): Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3(2):122-31
- Bonifacino, J.S., Traub, L.M. (2003): Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 395-447
- Bradford, M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Brown, D.A, Rose, J.K. (1992): Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface, *Cell* 68: 533-544
- Burnside, J., Schneider, D.L.(1982): Characterization of the membrane proteins of rat liver lysosomes. Composition, enzyme activities and turnover. *Biochem. J.* 204: 525-534
- Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., Zhang, D., Cummings, C., Gu, J., Rosenfeld, M.A., Pawan, W.J., Krizman, D.B., Nagle, J., Polymeropoulos, M.H., Sturley, S.L., Ioannou, Y.A., Higgins, M.E., Comly, M., Cooney, A., Brown, A., Kaneski, C.R., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Neufeld, E.B., Chang, T.Y., Liscum, L., Strauss III, E.F., Ohno, K., Zeigler, M., Carmi, R., Sokol, J., Markie, D., O'Neil, R.R., Diggelen van, O.P., Elleder, M., Patterson, M.C., Brady, R.O., Vanier, M.T., Pentchev, P.G., Tagle, D.A. (1997): Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 227: 228-231
- Castino, R., Démoz, M., Isidoro, C. (2003): Destination 'Lysosome': a target organelle for tumour cell killing? *J. Mol. Recognit.* 16: 337-348
- Cerneus, D.P., Ueffing, E., Posthuma, G., Strous, G.J., van der Ende, A.(1993): Detergent insolubility of alkaline phosphatase during biosynthetic transport and endocytosis. Role of cholesterol. *J Biol Chem.* 268:3150-3155

Chan, S. J.; San Segundo, B.; McCormick, M. B.; Steiner, D. F. (1986): Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNAs. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 83: 7721-7725

Chen, H., Leipprandt, J.R., Traviss, C.E., Sopher, B.L., Jones, M.Z., Cavanagh, K.T., Friderici, K.H. (1995): Molecular cloning and characterization of bovine beta-mannosidase.

J Biol Chem. 270(8):3841-8

Cherqui, S., Kalatzis, V., Trugnan, G., Anignac, C. (2001): The targeting of cystinosin to the lysosomal membrane requires a tyrosine-based signal and a novel sorting motif. *J. Biol. Chem.* 276: 13314-13321

Chou, K.C., Elrod, D.W. (1999): Prediction of membrane protein types and subcellular locations. *Proteins* 34: 137-153

Čirman, T., Orešič, K., Mazovec, G.D., Turk, V., Reed, J.C., Myers, R.M., Salvesen, G., Turk, B. (2004): Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *Journal of Biological Chemistry* 279: 3578-3587

Collarini, E.J., Pisoni, R.L., Christensen H.N. (1989): Characterization of a transport system for anionic amino acids in human fibroblast lysosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 987: 139-144

Conzelmann, E., Sandhoff, K. (1983): Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological order. *Dev. Neurosci.* 6: 58-71

Cooper, G.M. (2000): *The cell – a molecular approach*, 2nd Ed., Sinauer Associates Inc. @ www.ncbi.nlm.nih.gov/books

Cuervo, A.M., Dice, J.F. (1998): Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and Proteinases. *J. Mol. Med.* 76: 6-12

Cuervo, A.M., Mann, L., Bonten, E., d'Azzo, A., Dice J.F. (2003): Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *The EMBO Journal* 22: 47-59

Davies, J.P., Ioannou, Y.A. (2000): Topological analysis of Niemann-Pick C1

protein reveals that the membrane orientation of the putative sterol-sensing domain is identical to those of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and sterol regulatory element binding protein cleavage-activation protein. *J. Biol. Chem.* 275: 24367-24374

De Duve, C. Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R., Appelmans, F. (1955): Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J.* 60:604-617

Deussing, J.; Roth, W.; Rommerskirch, W.; Wiederanders, B.; von Figura, K.; Peters, C. (1997): The genes of the lysosomal cysteine proteinases cathepsin B, H, L, and S map to different mouse chromosomes. *Mammalian Genome* 8: 241-245

Dierks, T., Schmidt, B., Borissenko, L.V., Peng, J., Preusser, A., Mariappan, M., von Figura, K. (2003): Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C-alpha-formylglycine generating enzyme. *Cell* 113: 435-444

Dietrich, O. (1996): Reinigung lysosomaler Membranproteine und Untersuchung eines Sialinsäure-bindenden Protein. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

Dietrich, O., Gallert, F., Hasilik, A. (1996): Purification of lysosomal membrane proteins from human placenta. *Eur J Cell Biol* 1996; 69: 99-106

Dunn, WA Jr. (1994): Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* 4:139-143

Dunster, K., Toh, B.H., SENTRY, J.W (2002): Early endosomes, late endosomes, and lysosomes display distinct partitioning strategies of inheritance with similarities to Golgi-derived membranes. *Eur J Cell Biol.* 81:117-124.

Eisenberg, R.C.(1971): Restoration of Deoxycholate-disrupted membrane oxidases of *Micrococcus lysodeikticus*. *Journal of Bacteriology* 108: 964-972

Ellgaard, L., Molinari, M., Helenius, A. (1999): Setting the standards: Quality control in the secretory pathway. *Science* 286, 1882-1888

Eskelinen, E.L., Tanaka, Y., Saftig, P. (2003): At the acidic edge: emerging

- functions for lysosomal membrane proteins. *Trends in Cell Biology* 13: 137-145
- Faust, P. L.; Kornfeld, S.; Chirgwin, J. M. (1985): Cloning and sequence analysis of cDNA for human cathepsin D. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 82: 4910-4914
- Fan, X., Zhang, H., Zhang, S., Bagshaw, R.D., Tropak, M.B., Callahan, J.W., Mahuran, D.J. (2006): Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo disease type C). *Am. J. Hum Genet.* 79: 738-44
- Fehrenbacher, N., Jäätelä, M. (2005): Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res* 65: 2993-2995
- Figura, K. von (1977): Human α -N-acetylglucosaminidase. 1. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 80, 525-533
- Flomen, R.H., Green, E.P., Green, P.M., Bentley, D.R., Giannelli, F. (1993): Determination of the organisation of coding sequences within the iduronate sulphate sulphatase (IDS) gene. *Hum Mol Genet.* 2(1):5-10.
- Forgac, M.F. (1999): Structure and properties of the vacuolar (H^+)-ATPases. *Journal of Biological Chemistry* 274: 12951-12954
- Fujita, H., Takata, Y. Kono, A., Tanaka, Y., Takahashi, T., Himeno, M., Kato, K. (1992): Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding the 85 kDa human lysosomal sialoglycoprotein (hLGP85) in human metastatic pancreas islet tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 604-611
- Fukuda, M. (1991): Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* 266: 21327-21330
- Fukuda, M., Viitala, J., Matteson, J., Carlsson, S.R. (1988): Cloning of cDNAs encoding human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. Comparison of their deduced amino acid sequences. *Journal of Biological Chemistry* 263: 18920-18928
- Gahl, W.A., Bashan, N., Tietze, F., Bernardini, I., Schulman, J.D. (1982): Cystine transport is defective in isolated leukocyte lysosomes from patients with

cystinosis. *Science* 217: 1263-1265

Galjart, N.J., Gillemans, N., Harris, A., van der Horst, G.T., Verheijen, F.W., Galjaard, H., d' Azzo, A. (1988): Expression of cDNA encoding the human "protective protein" associated with lysosomal beta-galactosidase and neuraminidase: homology to yeast proteases.

Cell. 54(6):755-64

Gatt, S. (1969): Thermal lability of beta galactosidase from pink salmon liver. *Science*. 164:1422-1423

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

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

Gorbunoff, M. (1984): The interaction of proteins with hydroxyapatite; I. Role of protein charge and structure. *Anal. Biochem.* 136, 425-432

Hasilik, A., Neufeld, E.F. (1980): Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Phosphorylation of mannose residues. *J Biol Chem.* 255:4946-4950

Havelaar, A.C., de Gast, I.L., Snijders, S., Beerens, C.E.M.T., Mancini, G.M.S., Verheijen, F.W. (1998): Characterization of a heavy metal ion transporter in the lysosomal membrane. *FEBS Letters* 436: 223-227

Heng, H.H., Xie, B., Shi, X.M., Tsui, L.C., Mahuran, D.J. (1993): Refined mapping of the GM2 activator protein (GM2A) locus to 5q31.3-q33.1, distal to the spinal muscular atrophy locus. *Genomics.* 18(2):429-31

Hers, H.G. (1963): Alpha-glucosidase deficiency in generalized glycogen-storage disease (Pompe's disease) *Biochem J.* 86: 11

Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1986): Neue Ergebnisse zum Mechanismus der Silberfärbung. *Elektrophoreseforum` 86- München 6. Diskussionstagung-, 27-29*

Heukeshoven, J., Dernick, R. (1988): Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate

gels. Electrophoresis. 9:28-32.

Hicke, L. (2001): Protein regulation by monoubiquitin (Review) *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 195-201

Hodel, A., An, S.J., Hansen, N.J., Lawrence, J., Wäsle, B., Schrader, M., Edwardson, J.M. (2001): Cholesterol-dependent interaction of syncollin with the membrane of the pancreatic zymogen granule. *Biochem. J.* 356: 843-850

Hoefsloot, L.H., Hoogeveen-Westerveld, M., Reuser, A.J., Oostra, B.A. (1990): Characterization of the human lysosomal alpha-glucosidase gene. *Biochem J.* 272(2):493-7

Holtzhauer, M. (1997): *Biochemische Labormethoden*, Berlin, Springer, S.83 f.

Horowitz, M., Wilder, S., Horowitz, Z., Reiner, O., Gelbart, T., Beutler, E. (1989): The human glucocerebrosidase gene and pseudogene: structure and evolution. *Genomics.* 1989 Jan;4(1):87-96

Hrebicek, M., Mrazova, L., Seyrantepe, V., Durand, S., Roslin, N.M., Noskova, L., Hartmannova, H., Ivanek, R., Cizkova, A., Poupetova, H., Sikora, J., Urinovska, J., Stranecky, V., Zeman, J., Lepage, P., Roquis, D., Verner, A., Ausseil, J., Beesley, C.E., Maire, I., Poorthuis, B.J., van de Kamp, J., van Diggelen, O.P., Wevers, R.A., Hudson, T.J., Fujiwara, T.M., Majewski, J., Morgan, K., Knoch, S., Pshezhetsky, A.V. (2006): Mutations in TMEM76 Cause Mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo C Syndrome). *Am J Hum Genet.* 79:807

Hunter, C. (1917): A rare disease in two brothers: Evaluation of scapula, limitation of movement of joints and other abnormalities. *Proc. R. Soc. Med.* 10 : 104-116

Idriss, J.-M., Jonas, A.J. (1991): Vitamin B₁₂ transport by rat liver lysosomal membrane vesicles. *J. Biol. Chem* 266: 9438-9441

Ihrke, G., Gray, S.R., Luzio, J.P. (2000): Endolyn is a mucin-like type I membrane protein targeted to lysosomes by its cytosolic tail. *Biochem. J.* 345: 287-296

Ilangumaran, S., Hoessli, D.C. (1998): Effects of cholesterol depletion by

cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem J.* 335: 433-440

Janes, R.W., Munroe, P.B., Mitchison, H.M., Gardiner, R.M., Mole, S.E., Wallace, B.A., (1996): A model for Batten disease protein CLN3: functional implications from homology and mutations. *FEBS Lett.* 399: 75-77

Jarvela, I., Lehtovirta, M., Tikkanen, R., Kyttala, A., Jalanko, A.(1999):Defective intracellular transport of CLN3 is the molecular basis of Batten disease (INCL). *Human molecular Genetics* 8: 1091-1098.

Jonas, A.J., Smith, M.L., Schneider, J.A. (1982): ATP-dependent lysosomal cystine efflux is defective in cystinosis. *J. Biol. Chem.* 257: 13185-13188

Jonas, A.J., Speller, R.J., Conrad, P.J., Dubinsky, W.P. (1989): Transport of N-acetyl-D-glucosamine and N-acetyl-D-galactosamine by rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem* 264: 4953-4956

Jonas, A.J., Conrad, P., Jobe, H. (1990): Neutral-sugar transport by rat liver lysosomes. *Biochem. J.* 272:323-326

Jonas, A.J., Jobe, H. (1990): Sulfate transport by rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem* 265: 17545-17549

Joseph, L. J.; Chang, L. C.; Stamenkovich, D.; Sukhatme, V. P. (1988): Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of human and murine preprocathepsin L: an abundant transcript induced by transformation of fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 81: 1621-1629

Khan, M.N., Posner, B.I., Verma, A.K., Khan, R.J., Bergerron, J.J.(1981): Intracellular hormone receptors: evidence for insulin and lactogen receptors in a unique vesicle sedimenting in lysosome fractions of rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4980-4984

Kim, J, Klionsky, D.J. (2000): Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 69: 303-34

Kiselyov, K., Chen, J., Rbaibi, Y., Oberdick, D., Tjon-Kon-Sang, S.,

Shcheynikov, N., Muallem, S., Soyombo, A. (2005): TRP-ML1 is a lysosomal monovalent cation channel that undergoes proteolytic cleavage. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 43218-43223

Klein, U., Gimpl, G., Fahrenholz, F. (1995): Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with β -cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor. *Biochemistry* 34: 13784-13793

Kleizen, B., Braakman, I. (2004): Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Cell Biology* 16: 343-349

Klima, H., Tanaka, A., Schnabel, D., Nakano, T., Schroder, M., Suzuki, K., Sandhoff, K. (1991): Characterization of full-length cDNAs and the gene coding for the human GM2 activator protein. *FEBS Lett.* 289(2):260-4

Kobayashi, T., Yamaji-Hasegawa, A., Kiyokawa, E. (2001): Lipid domains in the endocytic pathway. *Cell Developm. Biol.* 12: 173-182

Kolbe, H.V.; Costello, D.; Wong, A.; Lu, R.C.; Wohlrab, H.(1984): Mitochondrial phosphate transport. Large scale isolation and characterization of the phosphate transport protein from beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 259, 9115-20

Kornfeld, S., Mellman, I. (1989): The biogenesis of lysosomes. *A. Rev. Cell. Biol.* 5: 483-525

Kornreich, R., Desnick, R.J., Bishop, D.F. (1989): Nucleotide sequence of the human alpha-galactosidase A gene. *Nucleic Acids Res.* 17(8):3301-2

Kretz, K.A., Cripe, D., Carson, G.S., Fukushima, H., O' Brien, J.S. (1992) Structure and sequence of the human alpha-L-fucosidase gene and pseudogene. *Genomics.* 12(2):276-80

Kreysing, J., von Figura, K., Gieselmann, V. (1990): Structure of the arylsulfatase A gene.

Eur J Biochem. 191(3):627-31

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

- Laskey, R.; Mills, A.(1975): Quantitative film detection of ^3H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.* 56, 335
- Le Borgne, R., Alcondana, A., Bauer, U., Hoflack, B. (1998): The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins.; *Journal of Biological Chemistry* 45:29451-29461
- Leighton, F., Poole, B., Beaufay, H.; Baudhuin, P., Coffey, J.W., Fowler, S., De Duve, C. (1968) : The large-scale separation of peroxisomes, mitochondria, and lysosomes from the livers of rats injected with Triton WR-1339. Improved isolation procedures, automated analysis, biochemical and morphological properties of fractions. *J. Cell Biol.* 37: 482-513c
- Lemansky, P., Gerecitano-Schmidek, M., Das, R.C., Schmidt, B., Hasilik, A. (2003): Targeting myeloperoxidase to azurophilic granules in HL-60 cells. *J. Leukoc Biol.* 74 (7): 542-550
- Lemons, R.M., Thoene, J.G. (1991): Mediated calcium transport by isolated human fibroblast lysosomes. *J. Biol. Chem.* 266: 14378-14382
- Leonova, T., Grabowski, G.A. (2000): Fate and sorting of acid β -glucosidase in transgenic mammalian cells. *Molecular Genetics and Metabolism* 70: 281-294
- Leung, D.K, Yang, Z., Breslow, R. (2000): Selective disruption of protein aggregation by cyclodextrin dimers. *PNAS* 97: 5050-5053
- Li H., Sethuraman, N., Stadheim, T.A., Zha, D., Prinz, B., Ballew, N., Bobrowicz, P., Choi, B.K., Cook W.J., Cukan, M., Houston-Cummings, N.R., Davidson, R., Gong, B., Hamilton, S.R., Hoopes, J.P., Jiang, Y., Kim, N., Mansfield R., Nett, J.H., Rios, S., Strawbridge, R., Wildt, S., Gerngross, T.U. (2006): Optimization of humanized IgGs in glycoengineered *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology* 24: 210-115
- Luzio, J.P., Rous, B.A., Bright, N.A., Pryor, P.R., Mullock, B.M., Piper R.C. (2000): Lysosome-endosome fusion and lysosome biogenesis. *J. Cell. Sci.* 113: 1515-1524
- Majeski, A.M., Dice, J.F. (2004): Mechanisms of chaperone-mediated autophagy

- (Review) *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 2435-2444
- Mancini, G.M.S., de Jonge, H.R., Galjaard, H., Verheijen, F.W. (1989): Characterization of a proton-driven carrier for sialic acid in the lysosomal membrane. Evidence for a group-specific transport system for acidic monosaccharides. *J. Biol. Chem.* 164: 15247-15254
- Mancini, G.M.S., Beerens, C.E.M.T., Verheijen, F.W. (1990): Glucose transport in lysosomal membrane vesicles. Kinetic demonstration of a carrier for neutral hexoses. *J. Biol. Chem* 165: 12380-12387
- Mancini, G.M.S., Havelaar, A.C., Verheijen, F.W. (2000): Lysosomal transport disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23: 278-292
- Mancini, G.M.S., Beerens, C.E.M.T., Aula, P.P., Verheijen, F.W. (1991): Sialic acid storage diseases. A multiple lysosomal transport defect for acidic monosaccharides. *J. Clin Invest.* 87: 1329-1335
- Marks, M.S., Seabra, M.C. (2001): The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 738-748
- Meikle P.J., Whittle, A.M., Hopwood, J.J (1995): Human acetyl-coenzyme A:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase. Kinetic characterization and mechanistic interpretation. *Biochem J.* 1995; 308: 327-33.
- Metzelaar, M.J., Wijngaard, P.L.J., Peters, P.J., Sixma, J.J., Nieuwenhuis, H.K., Clevers, H.C. (1991): CD63 Antigen. *J. Biol. Chem.* 266: 3239-3245
- Miebach, E., Bajbouj, M. Gesellschaft für Mukopolysaccharidosen e.V. (2003)(Informationsschrift): MPS-eine fast unbekannte Krankheit; Rupert Mayer Straße 13, 63741 Aschaffenburg; www.mps-ev.de
- Millan, J.L. (1986) : Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* 261: 3115-3115
- Miller, R.D., Hoffmann, J.W., Powell, P.P., Kyle, J.W., Shipley, J.M., Bachinsky, D.R., Sly, W.S. (1990): Cloning and characterization of the human beta-glucuronidase gene. *Genomics.* 7(2):280-3

Modaressi, S., Rupp, K., von Figura, K., Peters, C. (1993): Structure of the human arylsulfatase B gene. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 374(5):327-35

Morreau, H., Bonten, E., Zhou, X.Y., D' Azzo, A. (1991): Organization of the gene encoding human lysosomal beta-galactosidase. *DNA Cell Biol*. 10(7):495-504

Mostow, K., Werb, Z. (1997): Journey across the osteoclast. *Science*. 276: 219-220

Mousavi, S.A, Malerød, L., Berg, T., Kjekken, R (2004).: Clathrin-dependent endocytosis. *Biochem J*. 377:1-16. (Review)

Nakashima, Y., Tomatsu, S., Hori, T., Fukuda, S., Sukegawa, K., Kondo, N., Suzuki, Y., Shimosawa, N., Orii, T. (1994): Mucopolysaccharidosis IV A: molecular cloning of the human N-acetylgalactosamine-6-sulfatase gene (GALNS) and analysis of the 5'-flanking region. *Genomics*. 20(1):99-104.

Nebes, V.L., Schmidt, M.C. (1994): Human lysosomal alpha-mannosidase: isolation and nucleotide sequence of the full-length cDNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 200(1):239-45

Nelson, J. (1997): Incidence of the mucopolysaccharidoses in Northern Ireland. *Hum Genet* 101: 355-358

Nelson, J., Crowhurst, J., Carey, B., Greed, L. (2003): Incidence of the mucopolysaccharidoses in Western Australia. *American Journal of Medical Genetics* 123A: 310-313

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9:255-262

Niwa, K., Tanaka, R., Murase, H., Ishikawa, T., Fujita, H., Himeno, M., Tanaka, Y. (2003): Two lysosomal membrane proteins, LGP85 and LGP107, are delivered to late endosomes/lysosomes through different intracellular routes after exiting from the trans-Golgi network. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 301: 833-840

- Ohtani, Y., Irie, T., Uekama, K., Fukunaga, K., Pitha, J. (1989): Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 186: 17-22
- Ohvo, H., Olsio, C., Slotte, J.P. (1997): Effects of sphingomyelin and phosphatidylcholine degradation on cyclodextrin-mediated cholesterol efflux in cultured fibroblasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1349: 131-141
- Owen, D.J., Collins, B.M., Evans, P.R. (2004): Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:153-191
- Park, H., Fisher, K.J., Aronson, N.N. Jr. (1991): Genomic structure of human lysosomal glycosylasparaginase. *FEBS Lett.* 288(1-2):168-72
- Peters, C., Figura, K von (1994): Biogenesis of lysosomal membranes. *FEBS Lett.* 346: 108-114
- Pisoni, R.L., Thoene, J.G., Christensen, H.N. (1985): Detection and characterization of carrier-mediated cationic amino acid transport in lysosomes of normal and cystinotic human fibroblasts. Role in therapeutic cystine removal? *J. Biol. Chem.* 260: 4791-4798
- Pisoni, R.L., Thoene, J.G., Lemons, R.M., Christensen, H.N. (1987a): Important differences in cationic amino acid transport by lysosomal system c and system γ^+ of the human fibroblast. *J. Biol Chem* 262: 15011-15018
- Pisoni, R.L., Flickinger, K.S., Thoene, J.G., Christensen H.N. (1987b): Characterization of carrier-mediated transport systems for small neutral amino acids in human fibroblast lysosomes. *J. Biol. Chem.* 262: 6010-6017
- Pisoni, R.L., Thoene, J.G. (1989): Detection and characterization of a nucleoside transport system in human fibroblast lysosomes. *J. Biol. Chem* 264: 4850-4856
- Pisoni, R.L., Acker, T.L., Lisowski, K.M., Lemons, R.M., Thoene, J.G. (1990): A cysteine-specific lysosomal transport system provides a major route for the delivery of thiol to human fibroblast lysosomes: possible role in supporting lysosomal proteolysis. *J. Cell Biol.* 110: 327-335
- Pisoni, R.L. (1991): Characterization of a phosphate transport system in human

fibroblast lysosomes. *J. Biol. Chem.* 266: 979-985

Pisoni, R.L., Velilla, V.Q. (1995): Evidence for an essential histidine residue located in the binding site of the cysteine-specific lysosomal transport protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1236:23-30

Pisoni, R.L., Park, G.Y., Velilla, G.Q., Thoene, J.G. (1995): Detection and characterization of a transport system mediating cysteamine entry into human fibroblast lysosomes: specificity for aminoethylthiol and aminoethylsulfide derivatives. *J. Biol. Chem.* 270: 1179-1184

Pohlmann, R., Krentler, C., Schmidt, B., Schröder, W., Lorkowski, G., Culley, J., Mersmann, G., Geier, C., Waheed, A., Gottschalk, S., Grzeschik, K.-H., Hasilik, A., Figura, K. von (1988): Human lysosomal acid Phosphatase: cloning, expression and chromosomal assignment. *EMBO J.* 7: 2343-2350

Poorthuis, B.J.H.M., Wevers, R.A., Kleijer, W.J., Groener, J.E.M., de Jong, J.G.N., van Weely, S., Niezen-Koning, K.E., van Diggelen, O.P.(1999): The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Hum. Genet* 105: 151-156

Proia, R.L. (1988): Gene encoding the human beta-hexosaminidase beta chain: extensive homology of intron placement in the alpha- and beta-chain genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(6):1883-7

Radons, J., Isidoro, C., Hasilik, A. (1990): Brefeldin A prevents uncovering but not phosphorylation of the recognition marker in Cathepsin D. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 371: 567-573

Raposo, G., Fevrier, B., Stoorvogel, W., Marks, M.S. (2002): Lysosome-related organelles: a view from immunity and pigmentation. *Cell Structure and Function* 2002, 27: 443-456

Rawyler, A., Siegenthaler, P.A. (1996): Cyclodextrins: a new tool for the controlled lipid depletion of thylakoid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1278: 89-97

Riese, R.J., Chapman, H.A. (2000): Cathepsins and compartmentalization in

antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 12: 107-113

Robertson, D. A.; Callen, D. F.; Baker, E. G.; Morris, C. P.; Hopwood, J. J. (1988): Chromosomal localization of the gene for human glucosamine-6-sulphatase to 12q14. *Hum. Genet.* 79: 175-178

Robinson, M.S., Bonifacino, J.S., (2001): Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* 13: 444-453

Roeser, D., Preusser-Kunze, A., Schmidt, B., Gasow, K., Wittmann, J.G., Dierks, T., von Figura, K., Rudolph, M.G. (2006): A general binding mechanism for all human sulfatases by the formylglycine-generating enzyme. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 81-86

Rome, L.H., Garvin, A.J., Allietta, M.M., Neufeld, E.F. (1979): Two species of lysosomal organelles in cultured human fibroblasts. *Cell* 17: 143-153

Rommerskirch, W., von Figura, K. (1992): Multiple sulfatase deficiency: catalytically inactive sulfatases are expressed from retrovirally introduced sulfatase cDNAs. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 2561-2565

Rood, J. A.; Van Horn, S.; Drake, F. H.; Gowen, M.; Debouck, C. (1997):

Genomic organization and chromosome localization of the human cathepsin K gene (CTSK). *Genomics* 41: 169-176

Rorman, E.G., Scheinker, V., Grabowski, G.A. (1992): Structure and evolution of the human prosaposin chromosomal gene. *Genomics.* 13(2):312-8

Rothman, J.E., Orci, L. (1992): Molecular dissection of the secretory pathway.

Nature. 355(6359):409-15. Review.

Rouillé, Y., Rohn, W., Hoflack, B. (2000): Targeting of lysosomal proteins. *Cell & Developmental Biology* 11: 165-171

Schneider, D.L. (1981): ATP-dependant acidification of intact and disrupted lysosomes. Evidence for an ATP-driven proton pump. *J. Biol. Chem.* 256:3858-3864

Schuchman, E.H., Levran, O., Pereira, L. V., Desnick, R. J. (1992): Structural

organization and complete nucleotide sequence of the gene encoding human acid sphingomyelinase. *Genomics* 12: 197-205

Scott, H.S., Blanch, L., Guo, X.H., Freeman, C., Orsborn, A., Baker, E., Sutherland, G.R., Morris, C.P., Hopwood, J.J. (1995): Cloning of the sulphamidase gene and identification of mutations in Sanfilippo A syndrome. *Nat Genet.* 1995 Dec;11(4):465-7.

Scott, H.S., Guo, X.H., Hopwood, J.J., Morris, C.P. (1992): Structure and sequence of the human alpha-L-iduronidase gene. *Genomics.* 13(4):1311-3

Scriver: The molecular basis of Inherited disease, 8th Ed. Jahr 2001 Mc Graw Hill

Seyrantepe, V., Tihy, F., Pshezhetsky, A.V. (2006): The microcell-mediated transfer of human chromosome 8 restores the deficient N-acetyltransferase activity in skin fibroblasts of mucopolysaccharidosis type IIIC patients. *Human Genetics* 120: 293-296

Shan, S., Walter, P. (2005): Co-translational protein targeting by the signal recognition particle. *FEBS* 579: 921-926

Shi, G.-P.; Munger, J. S.; Meara, J. P.; Rich, D. H.; Chapman, H. A. (1992): Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *J. Biol. Chem.* 267: 7258-7262

Simons-Klenke, B. (2002): Untersuchungen zum Proteom humaner lysosomaler Membranproteine sowie zum Niemann-Pick Typ C-1 Protein, Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen

Simons, K., Gruenberg, J. (2000): Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases. *Trends in Cell Biology* 10: 459-462

Slotte, J.P., Hedstrom, G., Bierman, E.L. (1989): Intracellular transport of cholesterol in type C Niemann-Pick fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1005: 303-309

Snyders, L., Umlauf, E., Prohaska, R. (1999): Association of stomatin with lipid-protein complexes in the plasma membrane and the endocytic compartment. *Eur. J. Cell Biol.* 78: 802-812

Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., Rothman, J.E. (1993): SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*. 362:318-324

Sorge, J., West, C., Westwood, B., Beutler, E. (1985): Molecular cloning and nucleotide sequence of human glucocerebrosidase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7289-7293

Soyombo, A.A., Tjon-Kon-Sang, S., Rbaibi, Y., Bashllari, E., Bisceglia, J., Muallem, S., Kiselyov, K. (2005): TRP-ML1 regulates lysosomal pH and acidic lysosomal lipid hydrolytic activity. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 7294-7301

Stewart, B.H., Collarini, E.J., Pisoni, R.L., Christensen H.N. (1989): Separate and shared lysosomal transport of branched and aromatic dipolar amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* 987: 145-153

Storrie, B. (1988): Assembly of lysosomes: perspectives from comparative molecular cell biology. *Int. Rev. Cytol.*, 111: 53-105

Sun-Wada, G.H., Wada, Y., Futai, M. (2003): Lysosome and lysosome-related organelles responsible for specialized functions in higher organisms, with special emphasis on vacuolar-type proton ATPase. *Cell Structure and Function* 2003, 28: 455-463

Tabuchi, M., Yoshimori, T., Yamaguchi, K., Yoshida, T., Kishi, F. (2000): Human NRAMP2/DMT1, which mediates iron transport across endosomal membranes, is localized to late endosomes and lysosomes in HEp-2 cells. *Journal of Biological Chemistry* 275: 22220-22228

Tanaka, Y., Himeno, M., Taguchi, R., Ikezawa, H., Kato, K. (1989): 5'Nucleotidase in rat liver lysosomal membranes is anchored via glycosyl-phosphatidylinositol. *Cell Structure and Function* 14 (5): 597-603

Tardy, C., Tyynela, J., Hasilik, A., Levade, T., Andrieu-Abadie, N. (2003): Stress-induced apoptosis is impaired in cells with a lysosomal targeting defect but is not affected in cells synthesizing a catalytically inactive cathepsin D. *Cell Death*

Differ. 10: 1090-1100

Taute, A., Wätzig, K., Simons, B., Lohaus, C., Meyer, H.E., Hasilik, A. (2002): Presence of detergent-resistant microdomains in lysosomal membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 198: 5-9

Thamotharan, M., Lombardo, Y.B., Zare Bawani, S., Adibi, S. (1997): An active mechanism for completion of the final stage of protein degradation in the liver, lysosomal transport of dipeptides. *J. Biol. Chem.* 272:11786-11790

Tilly, B.C., Mancini, B.M.S., Bijman, J., et al. (1992): Nucleoside-activated chloride channels in lysosomal membranes. *Biochim. Biophys. Res. Communications* 187: 254-260.

Town, M., Jean, G., Cherqui, S., Attard, M., Forestier, L., Whitmore, S.A., Callen, D.F., Gribouval, O., Broyer, M., Bates, G.P., van' t Hoff, W., Antignac, C. (1998) A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nature Genetics* 18: 319-324

Vadgama, J.V., Chang, K., Kopple, J.D., Idriss, J.M., Jonas, A.J. (1991): Characteristics of taurine transport in rat liver lysosomes. *J. Cell Physiol.* 147: 447-454

Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Marth, J. (Eds) (1999): *Essentials in Glycobiology*; Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California @ www.ncbi.nlm.nih.gov/books

Vellodi A. (2005): Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol.* 128(4):413-31

Verheijen, F.W., Verbeek, E., Aula, N., Beerens, C.E., Havelaar, A.C., Joosse, M., Peltonen, L., Aula, P., Galjaard, H., van der Spek, P.J., Mancini, G.M.(1999): A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nature Genetics* 23: 462-465

Vesa, J., Hellsten, E., Verkruyse, L.A., Camp, L.A., Rapola, J., Santavuori, P., Hofmann, S.L., Peltonen, L. (1995): Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nature.* 376(6541):584-7

- Von Figura, K. (1977): Human alpha-N-acetylglucosaminidase. 1. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 80, 523-33
- Voznyi, Y.V., Karpova, E.A., Dudukina, T.V., Tsvetkova, I.V., Boer, A.M., Janse, H.C., van Diggelen, O.P.(1993) A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo Disease C (MPS III C). *J. Inher. Metab. Dis.* 16: 165-172
- Vulevic, B., Chen, Z., Boyd, J.T., Davis, W. Jr, Walsh, E.S., Belinsky, M.G., Tew, K.D.(2001): Cloning and characterization of human adenosine 5'-triphosphate-binding-cassette, subfamily A, transporter 2 (ABCA2). *Cancer Research* 61: 3339-3347
- Waheed, A., Gottschalk, S., Hille, A., Krentler, C., Pohlmann, R., Braulke, T., Hauser, H., Geuze, H, Figura, K. von (1988): Human lysosomal acid phosphatase is transported as a transmembrane protein to lysosomes in transfected baby hamster kidney cells. *EMBO J.* 7: 2351-2358
- Wang, A.M., Desnick, R.J. (1991): Structural organization and complete sequence of the human alpha-N-acetylgalactosaminidase gene: homology with the alpha-galactosidase A gene provides evidence for evolution from a common ancestral gene. *Genomics.* 10(1):133-42
- Wattiaux, R., Jadot, M., Dubois, F., Wattiaux-De Coninck, S.(1996): Phagocytosis by rat liver: relationships between phagosomes and lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 220: 569-574
- Weber, B., Blanch, L., Clements, P.R., Scott, H.S., Hopwood, J.J. (1996): Cloning and expression of the gene involved in Sanfilippo B syndrome (mucopolysaccharidosis III B). *Hum Mol Genet.* 5(6):771-7
- Wickner, W.T., Lodish, H.F. (1985): Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. *Science* 230: 400-407
- Wilson, P.J., Meaney, C.A., Hopwood, J.J., Morris, C.P. (1993): Sequence of the human iduronate 2-sulfatase (IDS) gene. *Genomics.* 17(3):773-5.
- Wolff, D.A., Pertoft, H. (1972): The purification of lysosomes from HeLa cells by

centrifugation in colloidal silica density gradients. *Biochim. Biophys. Acta* 286: 197-204

Zaremba, J., Kleijer, W.J., Huijmans, J.G., Poorthuis, B., Fidzianska, E., Glogowska, I. (1992): Chromosomes 14 and 21 as possible candidates for mapping the gene for Sanfilippo disease type IIIC. *J. Med. Genetics* 29: 514

Zhang, F., Zhang, W., Liu, L., Fisher, C.L., Hui, D., Childs, S., Dorovini-Zis, K., Ling, V. (2000): Characterization of ABCB9, an ATP-binding cassette protein associated with lysosomes. *Journal of Biological Chemistry* 275: 23287-23294

Zhao, H.G., Li, H.H., Bach, G., Schmidtchen, A., Neufeld, E.F. (1996): The molecular basis of Sanfilippo syndrome type B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(12):6101-5

9 Anhang

Aminosäuren-single letter code:

Die Aminosäurereste werden im „single letter code“ wie folgt bezeichnet: A, Alanin; C, Cystein; D, Aspartat; E, Glutamat ; F, Phenylalanin; G, Glycin; H, Histidin; I, Isoleucin; K, Lysin; L, Leucin; M, Methionin; N, Asparagin; P, Prolin; Q, Glutamin; R, Arginin; S, Serin; T, Threonin; V, Valin; W, Tryptophan, and Y, Tyrosin. X steht für eine beliebige Aminosäure und Ø steht für einen Aminosäurerest mit einer hydrophoben Seitenkette.

SDS-Polyacrylamidgel-Pipettierschema:

Trenngel:

	15 %	8 %
30 % Acrylamid	7,50 mL	4 mL
1 % Bisacrylamid	2,35 mL	1,235 mL
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	3,75 mL	3,75 mL
Entionisiertes Wasser	1,20 mL	5,79 mL
10% SDS	0,150 mL	0,150 mL
Temed	12,5 µL	15 µL
2 % APS	50 µL	60 µL

Sammelgel (2,5 mL):

	5 %
30 % Acrylamid	0,400 mL

1 % Bisacrylamid	0,275 mL
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	0,625 mL
Entionisiertes Wasser	1,175 mL
10% SDS	25 μ L
Temed	2,5 μ L
2 % APS	10 μ L

10 Lebenslauf

Kristin Wätzig

Englerthstr. 44
52249 Eschweiler
Tel: 02403-7494959
e-mail: Kwaetzig@web.de

Persönliche Angaben:

Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum: 12.07.1976
Geburtsort: Marburg

Ausbildung

Schulbildung

1982 bis 1986 Grundschule Habichtswald
1986 bis 1992 Elisabeth-Selbert-Schule in Zierenberg
1992 bis 1995 Jacob-Grimm-Schule in Kassel
1995 Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,3)

Studium

1995 bis 2002 Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
09/ 1997 Ärztliche Vorprüfung
09/ 1998 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/ 2001 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
bis 2002 Praktisches Jahr im Klinikum Kassel , Queen´s Medical Centre Nottingham (GB) und Kantonales Spital Sursee-Wolhusen (CH)
06/ 2002 3. Teil der Ärztlichen Prüfung (Note 2)

Dissertation

Seit 03/1999 Experimentelle Arbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Hasilik über das Sanfilippo C Syndrom im Institut für Physiologische Chemie in Marburg. Präparation lysosomaler Membranproteine und Studien von Solubilisierung und Fraktionierung integraler Membranproteine. Erlernen einer Anzahl biochemischer Techniken wie Ultrazentrifugation, SDS-PAGE, FPLC, Proteinbestimmung, chromogene und radioaktive Enzymassays, Protein-Crosslinking und radioaktive Markierung sowie Nachweis durch Fluorographie.

Praktische Ausbildung in Famulaturen und Praktischem Jahr

1998 Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Wolfhagen, 1 Monat
1999 Pädiatrie, Kinderkrankenhaus Park Schönfeld, 1 Monat
1999 Gynäkologie und Geburtshilfe, Klinikum Kassel, 1 Monat
2000 Kinderchirurgie, Queen´s Medical Centre Nottingham, GB, 1 Monat
2000 Gesundheitswesen, Gesundheitsamt Marburg-Biedenkopf, 1 Monat
2001 Kinderheilkunde, Klinikum Kassel, 4 Monate

2001 Unfallchirurgie, Klinikum Kassel, 2 Monate
2001 Kinderchirurgie, Queen´ s Medical Centre Nottingham, GB, 1 Monat
2001 Viszeralchirurgie, Queen´ s Medical Centre Nottingham, GB, 1 Monat
2001-2002 Innere Medizin, Kantonales Spital Sursee-Wolhusen, CH, 4 Monate

Berufliche Tätigkeit

Von 11/2002 bis 03/2007 zunächst ÄiP, dann Assistenzärztin in der Inneren Medizin I (Klink für Hämatologie/Onkologie) der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg
Ab 04/2007 Assistenzärztin im St. Antonius Hospital in Eschweiler in der Abteilung Hämatologie/ Onkologie

Publikationen

Taute, A., Wätzig, K., Simons, B., Lohaus, C., Meyer, H.E., Hasilik, A.: Presence of detergent-resistant microdomains in lysosomal membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002 198: 5-9

Mischo A, Wadle A, Watzig K, Jager D, Stockert E, Santiago D, Ritter G, Regitz E, Jager E, Knuth A, Old L, Pfreundschuh M, Renner C. : Recombinant antigen expression on yeast surface (RAYS) for the detection of serological immune responses in cancer patients. *Cancer Immun.* 2003 Jun 27;3:5.

Wadle A, Mischo A, Imig J, Wullner B, Hensel D, Watzig K, Neumann F, Kubuschok B, Schmidt W, Old LJ, Pfreundschuh M, Renner C. :Serological identification of breast cancer-related antigens from a *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Int J Cancer.* 2005 Oct 20;117(1):104-13.

Wadle A, Kubuschok B, Imig J, Wuellner B, Wittig C, Zwick C, Mischo A, Waetzig K, Romeike BF, Lindemann W, Schilling M, Pfreundschuh M, Renner C. : Serological immune response to cancer testis antigens in patients with pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2006 Jul 1;119(1):117-25.

11 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Prof. Dr. med. R. Arnold, Prof. Dr. med. G. Aumüller, PD Dr. med. P. Barth, Prof. Dr. phil. Dr. med. habil. H.-D. Basler, Prof. Dr. med. E. Baum, Prof. Dr. med. H. Bertalanffy, Prof. Dr. med. S. Bien, Prof. Dr. med. Y. Cetin, Prof. Dr. F. Czubayko, Prof. Dr. med. Dr. phil. J. Daut, Prof. Dr. med. M. Doss, Prof. Dr. med. H. Fruhstorfer, Prof. Dr. med. D. Gemsa, Prof. Dr. med. H. Gerdes, Prof. Dr. rer. nat. A. Geus, Prof. Dr. med. C. Görg, Dr. med. K. Görg, Prof. Dr. med. L. Gotzen, Prof. Dr. med. P. Griss, Prof. Dr. med. H.-J. Gröne, PD Dr. med. M. Grond, Prof. Dr. rer. nat. A. Habermehl, Prof. Dr. med. R. Happle, Prof. Dr. rer. nat. A. Hasilik, PD Dr. med. A. Hellinger, Prof. Dr. med. R. Hesterberg, PD Dr. med. F. Heubel, Prof. Dr. med. R. Hofmann, Prof. Dr. med. K. Joseph, Prof. Dr. med. H. F. Kern, Prof. Dr. med. H.-D. Klenk, Prof. Dr. med. K. J. Klose, Prof. Dr. rer. nat. J. Koolman, Prof. Dr. med. W. Krause, Prof. Dr. med. V. Kretschmer, Prof. Dr. med. J.-C. Krieg, Prof. Dr. med. Kroll, Prof. Dr. med. R. E. Lang, Prof. Dr. med. H. Lange, Prof. Dr. med. H. H. Lauer, Prof. Dr. med. H. Lennartz, Prof. Dr. med. W. Lorenz, Prof. Dr. med. B. Maisch, Prof. Dr. med. H.-D. Mennel, Prof. Dr. med. R. Moll, Prof. Dr. med. R. Moosdorf, Prof. Dr. med. Dr. phil. U. Müller, Prof. Dr. med. A. Neubauer, Prof. Dr. med. W. H. Oertel, Prof. Dr. C. Reichardt, Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Remschmidt, Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Röhm, Prof. Dr. med. M. Rothmund, Prof. Dr. med. D. Schachtschabel, Prof. Dr. rer. nat. H. Schäfer, Dr. med. M. K.-H. Schäfer, PD Dr. med. J. Schlegel, Prof. Dr. med. S. Schmidt, Prof. Dr. med. W. Schüffel, Prof. Dr. med. K.-D. Schulz, Prof. Dr. rer. nat. R. T. Schwarz, Prof. Dr. rer. nat. J. Seitz, Prof. Dr. med. H. Seyberth, Prof. Dr. med. W. Slenczka, Prof. Dr. med. B. Steiniger, Prof. Dr. med. K. Voigt, Prof. Dr. med. H. Wehinger, Prof. Dr. med. E. Weihe, Prof. Dr. med. J.A. Werner, HD Dr. rer. nat. R. Westermann, Prof. Dr. med. P. v. Wichert

12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Andrej Hasilik für die Aufgabenstellung, die Möglichkeit, diese Dissertation an seinem Institut anzufertigen, sowie für seine wertvollen Anregungen und stete Diskussionsbereitschaft.

Meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe Hasilik am Institut für Physiologische Chemie, insbesondere Traudel Jarosch für die FPLC-Unterstützung, Brigitte Simons für die Unterstützung bei den Western Blot-Untersuchungen, Bernd Kösters für die Free Flow Elektrophorese-Lektionen und die ersten Plazenta-Präparationen und Eric Sarnighausen möchte ich danken für jede Form der Unterstützung und Hilfe bei wissenschaftlichen und anderen Fragen und für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Ich danke ganz herzlich meinen Eltern für ihre geistige und finanzielle Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion sowie meinem Lebensgefährten Bernhard Lehnert für die Unterstützung während der schriftlichen Erstellung der Arbeit.