

VERÄNDERTE PROZESSIERUNG VON KATHEPSIN B
IN FIBROBLASTEN VON PATIENTEN MIT
SIALINSÄURE-SPEICHERKRANKHEIT

DIPLOMARBEIT

durchgeführt am Zentrum für Angewandte Genetik
der Universität für Bodenkultur

eingereicht

von

Johannes Schmid

Wien, April 1990

Diese Arbeit wurde am Zentrum für Angewandte Genetik der Universität für Bodenkultur unter der Betreuung von Herrn Univ. Doz. Dr. Josef Glössl durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Zentrums für Angewandte Genetik und des Instituts für Chemie für die tatkräftige Unterstützung, die zahlreichen praktischen Ratschläge und die freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken.

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS:

1. Einleitung
 - 1.1. Lysosomen
 - 1.2. Lysosomale Enzyme
 - 1.2.1. Kathepsine
 - 1.2.2. Kathepsin B
 - 1.2.2.1. Strukturen und physikalische Eigenschaften
 - 1.2.2.2. Substrate, Aktivatoren und Inhibitoren
 - 1.2.2.3. Kathepsin B in Physiologie und Pathologie
 - 1.3. Biosynthese lysosomaler Enzyme
 - 1.3.1. Translation und Prozessierung im ER-Lumen
 - 1.3.2. Transport vom ER zum Golgi und Phosphorylierung
 - 1.3.3. Prozessierung im Golgi-Apparat
 - 1.3.4. Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPR)
 - 1.3.5. Transport vom Golgi-Apparat zu den Lysosomen
 - 1.3.6. Mannose-6-Phosphat-unabhängiger Transport
 - 1.4. Biosynthese von Kathepsin B
 - 1.5. Endozytose lysosomaler Enzyme
 - 1.6. Lysosomale Speicherkrankheiten
 - 1.6.1. Lysosomale Enzymdefekte
 - 1.6.2. Lysosomale Transportdefekte
 - 1.6.3. Sialinsäure-Speicherkrankheit
2. Problemstellung
3. Material und Methoden
 - 3.1. Zellkultur
 - 3.1.1. Zelllinien
 - 3.1.2. Kulturbedingungen und Transplantierung
 - 3.1.3. Metabolische Markierung
 - 3.1.4. Stimulierung der Sekretion durch Ammonchlorid
 - 3.1.5. Endozytoseversuche
 - 3.1.6. Anwendung von Temperaturblocks
 - 3.1.7. Blockierung durch Monensin oder CCCP

- 3.1.8. Metabolische Beladung mit Sialinsäure
- 3.2. Herstellung von Zell- und Medienextrakten
- 3.3. Immunpräzipitation von Kathepsin B
 - 3.3.1. Lösungen
 - 3.3.2. Kopplung der Immunglobuline an Protein A-Sepharose
 - 3.3.3. Durchführung der Immunpräzipitation
- 3.4. Elektrophoretische Methoden
 - 3.4.1. SDS-PAGE (Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
 - 3.4.1.1. Lösungen
 - 3.4.1.2. Elektrophorese-Gele
 - 3.4.1.3. Durchführung der SDS-PAGE
 - 3.4.2. Isoelektrische Fokussierung (IEF)
- 3.5. Fluorographie
- 3.6. Subzelluläre Fraktionierung
 - 3.6.1. Vorbereitung der Dichtegradientenzentrifugation
 - 3.6.2. Präparation des Zellhomogenats
 - 3.6.3. Dichtegradienten-Zentrifugation
- 3.7. Enzymaktivitätsbestimmungen
 - 3.7.1. Aktivität der β -N-Acetylhexosaminidase
 - 3.7.2. Aktivitätsbestimmung von Kathepsin B
 - 3.7.3. Aktivitätsbestimmung der Galaktosyltransferase
- 3.8. Enzymatische Methoden
 - 3.8.1. Abbau mit Peptid:N-Glykanase F (PNGase F)
- 3.9. Proteinbestimmungen
 - 3.9.1. Proteinbestimmung nach Lowry
 - 3.9.2. Bestimmung von radioaktiv-markiertem Protein
- 3.10. Bestimmung von Sialinsäure
 - 3.10.1. Sialinsäurebestimmung homogenisierter Zellen
 - 3.10.2. Sialinsäurebestimmung subzellulärer Fraktionen
- 3.11. Immunfluoreszenz-Mikroskopie
 - 3.11.1. Vorbereitung und Fixierung der Zellen
 - 3.11.2. Antikörper-Markierung
 - 3.11.3. Mikroskopie und photographische Dokumentation

4. Ergebnisse
- 4.1.1. Molekulargewichtsformen von Kathepsin B in SASD-Fibroblasten
- 4.1.2. Molekulargewichtsformen von Kathepsin B nach Abbau mit Peptid:N-Glykanase F
- 4.2. Biosynthese von Kathepsin B
- 4.2.1. Proform von Kathepsin B nach Kurzzeitmarkierung
- 4.2.2. Proform von Kathepsin B zwischen ER und Golgi
- 4.2.3. Proform von Kathepsin B im mid-Golgi-Bereich
- 4.2.4. Proform von Kathepsin B im trans-Golgi
- 4.3. Endozytose von Prokathepsin B
- 4.3.1. Endozytose über 20 h
- 4.3.2. Endozytose bei 19°C und 37°C über 48 h
- 4.4. Kreuzendozytose
- 4.5. Prozessierungskinetik
- 4.5.1. Prozessierungskinetik bei der Biosynthese
- 4.5.2. Prozessierungskinetik nach Endozytose
- 4.6. Metabolische Sialinsäure-Beladung
- 4.7. Isoelektrische Fokussierung von Prokathepsin B
- 4.8. Sialinsäure-Bestimmung
- 4.9. Subzelluläre Fraktionierung
- 4.10. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

5. Diskussion
- 5.1. Subzelluläre Lokalisation der Molekulargewichtsformen von Kathepsin B
- 5.2. Kreuzendozytose
- 5.3. Prozessierungskinetik
- 5.4. Beladung mit Sialinsäure und mit Saccharose

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis
Abkürzungen

1. EINLEITUNG:

1.1. Lysosomen:

Lysosomen sind vesikuläre Zellorganellen, die funktionell als terminale Abbau-Kompartimente der Zelle definiert werden können. Ihre Größe schwankt im Bereich von etwa 0,1 - 2 μm . Aufgrund morphologischer und funktioneller Heterogenität unterscheidet man zwischen primären Lysosomen, die nur neusynthetisierte lysosomale Enzyme aber noch keine Abbauprodukte enthalten, und sekundären Lysosomen, die durch Fusion aus primären Lysosomen mit Endosomen oder Autophagosomen entstehen. In den sekundären Lysosomen laufen die Abbau-Prozesse endozytierter Verbindungen oder zelleigener Strukturen (Autophagie) ab, wobei bei einem unvollständigen Abbau Residualkörper zurückbleiben, die im Elektronenmikroskop sichtbar sind. Die Unterscheidung in primäre und sekundäre Lysosomen ist aber etwas willkürlich, da sie biochemisch und in ihrem Enzymgehalt keine Unterschiede aufweisen. Bis heute sind etwa 60 lysosomale Enzyme bekannt, die hauptsächlich zu den Proteinasen, Glykosidasen, Lipasen und Nukleasen zählen. Durch ihre gemeinsame Wirkung können fast alle höhermolekularen Verbindungen hydrolysiert werden.

Die niedermolekularen Abbauprodukte werden durch die lysosomale Membran hindurch ins Cytosol transportiert, wo sie wieder als Bausteine für anabolische Reaktionen verwendet werden können. Die Lysosomen-Membran dürfte verschiedene Transportproteine enthalten, die relativ spezifisch niedermolekulare Verbindungen, wie etwa Aminosäuren, Zucker und Nukleoside ausschleusen (Pfeifer, 1987; Jonas et al., 1989; Pisoni & Thoene, 1989). Außerdem enthält die Membran eine große Zahl an stark glykosylierten Membranproteinen, deren Funktion noch unbekannt ist. Eine bedeutende Eigenschaft der Lysosomen ist, daß sie einen sauren pH-Wert (ca. 5,0) aufweisen, der durch eine Protonenpumpe (H^+ -ATPase) aufgebaut wird. Dementsprechend ist das pH-Optimum der meisten lysosomalen Enzyme im sauren

Bereich (Pfeifer, 1987).

1.2. Lysosomale Enzyme:

Da die primäre Aufgabe von Lysosomen der kontrollierte Abbau höhermolekularer Verbindungen ist, enthalten sie eine große Anzahl aktiver Hydrolasen, darunter vor allem Glykosidasen und Proteasen. Die Aktivierung der Proteasen findet oft erst in den Lysosomen selbst oder unmittelbar davor in einem prälysosomalen Kompartiment statt. Dadurch ist die Zelle vor unerwünschten und unkontrollierten Abbaureaktionen geschützt (Neurath, 1984). In den Lysosomen sind die Enzyme relativ stabil. Es ist jedoch noch weitgehend ungeklärt, wodurch ein rascher gegenseitiger Abbau der intralysosomalen Enzyme verhindert wird. In einem Fall konnte gezeigt werden, daß eine Aggregation in Verbindung mit einem Stabilisatorprotein das Enzym vor einem Angriff durch andere Hydrolasen schützt (D'Azzo et al., 1982).

1.2.1. Kathepsine:

Als Kathepsine werden intrazelluläre Gewebsproteasen bezeichnet, die in ihrer aktiven Form hauptsächlich in den Lysosomen lokalisiert sind. Die meisten der bisher gefundenen Kathepsine zählen zu den Aspartat- oder Thiolproteasen und haben somit eine Carb-oxylgruppe oder einen Cysteinrest im aktivem Zentrum. Bei einigen findet man einen relativ hohen Grad an struktureller und funktioneller Verwandtschaft. Sehr deutlich sind die Ähnlichkeiten bei den Kathepsinen B, H und L. So wurde z.B. zwischen Hühner-kathepsin L und Rattenkathepsin H eine Aminosäuresequenz-homologie von 51% gefunden und zwischen den Kathepsinen L und B, bzw. B und H, eine Homologie von 32%. Besonders auffällig ist auch die Verwandtschaft mit den pflanzlichen Proteasen Papain und Actinidin. Ihr Homologiegrad zu den Kathepsinen B, H und L liegt zwischen 30% und 47% (Dufour, 1988; Takio et al., 1983). Alle 5 angeführten Enzyme zählen zu den Thiolproteasen. Der hohe Konservierungsgrad läßt darauf schließen, daß sie aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind und sich im Verlauf der Evolution an unterschiedliche funktionelle Anforderungen adaptierten

(Ritonja et al., 1985).

1.2.2. Kathepsin B (EC 3.4.22.1.):

1.2.2.1. Strukturen und physikochemische Eigenschaften:

Die reife Form von Kathepsin B aus humaner Leber zeigt bei gelchromatographischer Bestimmung ein Molekulargewicht von 27,5 kDa; bei Bestimmung durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen erhält man 2 Untereinheiten mit 25 kDa und 5 kDa, die in vivo durch eine Disulfidbrücke verbunden sein dürften (Barrett & Kirschke, 1981).

Eine Sequenzierung von humanem Leberkathepsin B ergab 252 Aminosäuren und ein Molekulargewicht von 27,61 kDa.

Zwischen dem Enzym aus humaner Leber und dem aus Rattenleber besteht eine Sequenzhomologie von 83,7% (Ritonja et al., 1985).

Die Sequenzierung von cDNA-Klonen bestätigte, daß die Kathepsin B - Formen von Mensch, Ratte und Maus, sowohl auf Protein-, als auch auf DNA-Ebene hoch konserviert und mit anderen Thiolprotein-asen tierischer oder pflanzlicher Herkunft verwandt sind (San Segundo et al., 1985; Fong et al., 1986; Chan et al., 1986).

Bei humanen Hautfibroblasten liegt Kathepsin B in zwei reifen Formen vor, und zwar mit 33 kDa und 27 kDa in einem Verhältnis von 3:1. Die kleinere Form entsteht durch proteolytische Prozessierung aus der größeren (Hanewinkel et al., 1987).

Reifes Kathepsin B trägt entgegen früheren Postulaten zumindest eine Kohlenhydratseitenkette, die an den Asparaginrest-111 gebunden ist. Dieses N-Glykan ist relativ kurz; für das Enzym aus Rattenleber wurde angegeben, daß es zu 86% folgende Struktur aufweist (Taniguchi et al., 1985):

Man α 1-6 Man β 1-4 GlcNAc β 1-4 GlcNAc - Asn

Für Kathepsin B aus Schweinemilz wurde angegeben, daß es zu 73% einen einzigen N-Acetylglukosaminrest trägt (Takahashi et al., 1984).

Die physikalischen Eigenschaften von Kathepsin B zeigen keine auffälligen Besonderheiten. Für das Enzym aus Rindermilz wurde ein pH-Optimum von 6,9 und ein Temperaturoptimum von 42°C ermittelt. Die Stabilität nimmt oberhalb von pH 7,5 und ab 40°C signifikant ab (Khan et al., 1986).

1.2.2.2. Substrate, Aktivatoren und Inhibitoren:

Kathepsin B unterscheidet sich in der Spezifität nur kaum von den beiden verwandten Thiolproteasen Kathepsin H und L. Die derzeit spezifischsten Substrate sind die Verbindungen Benz-yloxy-carbonyl-Arginyl-Arginin-2-Naphthylamid (Cbz-Arg-Arg-NNap) und das entsprechende Methylcumaryl-Derivat Cbz-Arg-Arg-Mec. Diese synthetischen Peptide werden von Kathepsin B weitaus rascher umgesetzt als von den beiden anderen Proteasen (Kirschke et al., 1980).

Bei den meisten natürlichen Substraten, wie z.B. Fibrinogen, Insulin, verschiedenen Kollagentypen, Myosin und Actin spaltet Kathepsin B als Endoproteinase; bei Glukagon und Fruktose-1,6-bisphosphataldolase verhält es sich wie eine Carboxydipeptidase (Aronson & Barrett, 1978; Bond & Barrett, 1980).

Als Aktivatoren wirken vor allem Verbindungen, die die SH-Gruppe des aktiven Zentrums stabilisieren, wie z.B. Cystein oder Dithioerythrit.

Unspezifische Inhibitoren von Kathepsin B sind SH-Gruppen-Blocker wie Jodacetamid, N-Ethylmaleinimid und verschiedene zweiwertige Kationen, sowie die Thiolproteasehemmer Chymostatin, Leupeptin und Antipain.

Spezifische Inhibitoren sind die Epoxysuccinylverbindung E-64 (Hanada et al., 1978) und das synthetische Peptid Benzyloxy-carbonyl-Phenylalanin-Alanin-Diazomethan (Cbz-Phe-Ala-CHN₂), (Shaw & Dean, 1980), sowie das entsprechende Chloromethylketon

(Cbz-Phe-Ala-CMK).

Für die letztere Verbindung wurde eine Strukturanalyse des Komplexes mit Kathepsin B durchgeführt (Akahane & Umeyama, 1986).

Dabei wurde ein dreidimensionales Modell von Kathepsin B unter Verwendung der von Takio et al. ermittelten Aminosäuresequenz konstruiert, wobei die kristallographisch bestimmten Strukturdaten der nahe verwandten pflanzlichen Thiolprotease Actinidin als Vergleich herangezogen wurden (siehe Abb. 1.1.).

Abb. 1.1.: Stereoansicht von Kathepsin B aus Rattenleber (rote Linien) mit dem Inhibitor Cbz-Phe-Ala-Chloromethylketon (weiße Linien) kovalent im aktiven Zentrum (an Cys-29) gebunden (Akahane & Umeyama, 1986).

Natürliche Inhibitoren von Kathepsin B und anderen Thiolproteasen sind die sogenannten Stefine und Cystatine. Das sind relativ kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 11 - 16 kDa, die bereits aus den verschiedensten Geweben isoliert wurden (Katunuma & Kominami, 1985).

Ein allgemein wirkender extrazellulärer Proteaseinhibitor ist das α_2 - Makroglobulin aus humanem Serum. Es hemmt nur aktive Proteasen, und zwar indem es bei einem proteolytischen Angriff die Konformation ändert und das Enzym bindet (Sottrup-Jensen,

1989). Seine inhibitorische Wirkung wurde auch für Kathepsin B beschrieben und es konnte gezeigt werden, daß dabei Kathepsin B als Endoprotease wirkt (Mason, 1989).

1.2.2.3. Bedeutung von Kathepsin B in Physiologie und Pathologie:

Die physiologische Hauptfunktion von Kathepsin B ist, wie bei den meisten anderen lysosomalen Proteasen, der unspezifische Abbau von intrazellulären oder endozytierten Proteinen. Von einigen Autoren wurde auch angenommen, daß es an der posttranslationalen proteolytischen Prozessierung sekretorischer Proteine oder Hormone, wie z.B. Albumin, Apolipoprotein A-II und Insulin, beteiligt ist (Matsuda et al., 1986; Gordon et al., 1985; Docherty et al., 1984). Inzwischen wurde jedoch für den Fall des Insulins gezeigt, daß die Prozessierung durch andere Proteasen erfolgt (Docherty et al., 1989). Außerdem dürfte die Aktivierung von Kathepsin B erst nach der Abzweigung vom sekretorischen Weg stattfinden (siehe Kap. 5.).

Einige pathologische Erscheinungen scheinen in direktem Zusammenhang mit erhöhter Aktivität oder veränderter Lokalisierung von Kathepsin B zu stehen. Signifikant ist dies vor allem bei einigen Entzündungserscheinungen, wie z.B. der rheumatischen Arthritis (Burnett et al., 1983).

Es konnte auch gezeigt werden, daß erhöhte Kathepsin B - ähnliche Aktivitäten in alveolaren Makrophagen und Lungenflüssigkeit von Rauchern auftreten (Chang et al., 1986; Gairola et al., 1989).

Eine besondere Bedeutung könnte das Enzym auch bei der Ausbildung von Metastasen bei verschiedenen Tumoren haben. So wurde z.B. in der Aszitesflüssigkeit von Frauen mit Ovarkarzinomen eine Kathepsin B - ähnliche Aktivität gefunden, die im Serum nicht detektierbar war (Mort et al., 1983).

In einer Arbeit mit B16-Mausmelanomazellen unterschiedlichen Metastasierungspotentials wurde eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Metastasenbildung und der Kathepsin B - Aktivität beobachtet (Sloane et al., 1982). Es wurde vermutet, daß Kathepsin B nicht direkt zur Ablösung der Zellen vom Primärtumor führt, sondern eine Prokollagenase proteolytisch

aktiviert (Sloane et al., 1984). Außerdem konnte festgestellt werden, daß es bei einigen Tumorzellen in einem erhöhten Maß an die Plasma-membran assoziiert ist (Sloane et al., 1986).

1.3. Biosynthese lysosomaler Enzyme:

1.3.1. Translation und Prozessierung im ER-Lumen:

Am Beginn der Biosynthese lysosomaler Enzyme wie auch sekretorischer Proteine steht die Translation der entsprechenden mRNA.

Dieser Prozeß beginnt mit der Komplexierung der mRNA mit den beiden Untereinheiten eines Ribosoms frei im Cytoplasma.

Nach der Synthese einer Signalsequenz aus 20 - 30 hauptsächlich hydrophoben Aminosäuren kommt es zur Anlagerung eines sogenannten "Signal Recognition Particles (SRP)" und damit zum Aussetzen der Translation, und zwar bis der gesamte Komplex an einen SRP-Rezeptor der ER-Membran gebunden ist.

Dann erst kann die Signalsequenz vom SRP abdissoziieren, die Translation wird fortgesetzt und die Aminosäurekette gleichzeitig durch die Membran ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums transportiert (cotranslationale Translokation). Dort wird die Signalsequenz im Normalfall sofort wieder abgespalten (Walter & Lingappa, 1986).

Ein weiterer cotranslationaler Schritt ist die enzymatische Ankopplung von Oligosaccharidketten an Asparaginreste des Proteins (N-Glykosylierung).

Das Erkennungssignal für diese Übertragung ist die Sequenz:

Asn - X - Ser/Thr.

Als Donor für das Oligosaccharid fungiert eine Dolicholpyrophosphatverbindung, die mit dem hydrophoben Polyprenolrest in der ER-Membran verankert ist.

Die Synthese des Dolichol-gebundenen Saccharidkomplexes erfolgt über nukleotid- und dolicholaktivierte Zuckerreste.

Auf das Protein wird schließlich ein Tetrakaidekasaccharid aus 2 N-Acetylglukosamin-, 9 Mannose- und 3 Glukoseresten übertragen, wobei die 3 endständigen Glukosereste und meistens auch ein Mannose-Rest noch während des Aufenthalts im ER-Lumen

wieder abgespalten werden (siehe Abb. 1.2.).

Abb. 1.2.: Schema der Synthese von N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharidseitenketten an der ER-Membran.
Inhibitoren: 1: Tunicamycin, 2: Castanospermin,
3: Deoxynojirimycin (nach Kleinig & Sitte, 1986).

Während der Translation erfolgt auch bereits die Faltung des Proteins, wobei das cotranslational übertragene N-Glykan die Raumstruktur der Aminosäurekette beeinflussen kann.

Von großer Bedeutung für die Faltung sind auch verschiedene lösliche ER-spezifische Proteine, wie z.B. die Protein-Disulfidisomerase, die die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken katalysiert, oder die sogenannten "Binding Proteins (BiP)", die an neusynthetisierte Proteine binden und deren Aggregation verhindern.

Es konnte gezeigt werden, daß diese ER-spezifischen Proteine am C-Terminus ein Retentionssignal aufweisen, und zwar in den meisten Fällen das Tetrapeptid Lys-Asp-Glu-Leu (kurz KDEL), in manchen Fällen stark verwandte Sequenzen wie HDEL, RDEL oder KEEL (Pelham, 1989 b).

Dieses Faktum ist ein weiterer Hinweis für die Hypothese, daß die Sekretion an sich ein unspezifischer Prozeß ist, der Verbleib verschiedener Proteine im Bereich des Sekretionsweges allerdings spezifische Retentionssignale erfordert (Wieland et al., 1987). 1.3.2. Transport vom ER zum Golgi und

Phosphorylierung:

Nach dem Passieren des endoplasmatischen Retikulums werden die sekretorischen und die lysosomalen Proteine über Vesikel zum Golgi-Apparat transportiert.

Aufgrund jüngerer Ergebnisse wurde postuliert, daß ein intermediäres Kompartiment zwischen ER und Golgi existiert, das unter anderem der Rezyklierung löslicher ER-Proteine dient. Die Tetrapeptidsequenz am C-Terminus dürfte dabei von einem Membran-integrierten Rezeptor erkannt werden und über einen Vesikel-Rückfluß zum ER den weiteren Transport der ER-Proteine zum Golgi verhindern (Pelham, 1989 a,b).

Es konnte bereits ein 72 kDa-Membranprotein identifiziert werden, das die KDEL-Sequenz erkennt und bindet, und wahrscheinlich den Rezeptor für das Retentionssignal darstellt (Vaux et al., 1989).

Eine weitere Eigenschaft des intermediären Kompartiments zwischen ER und Golgi ist, daß bei einer Temperatur von 15°C oder bei einer Inkubation in Gegenwart von CCCP die Transportprozesse zum Golgi blockiert sind, nicht aber der Protein-Zufluß vom ER (bei Fibroblasten, BHK-, Makrophagen- und COS-Zellen; Pelham, 1989a,b; Braulke et al., 1988).

Eines der wichtigsten Charakteristika löslicher lysosomaler Enzyme ist das Auftreten von Mannose-6-Phosphatresten an N-Glykanseitenketten, die als Erkennungssignale für entsprechende Rezeptoren dienen und die Segregation der lysosomalen Proteine von den sekretorischen Proteinen ermöglichen (von Figura & Hasilik, 1986).

Die Phosphorylierung erfolgt dabei in zwei Schritten und beginnt kurz nach Verlassen des ER.

Zuerst wird ein N-Acetylglukosamin-1-Phosphatrest von UDP-GlcNAc auf einen Mannoserest des lysosomalen Enzyms übertragen und es entsteht ein Phosphodiester - Intermediat.

Die Phosphotransferase (EC 2.7.8.17), die diesen Schritt katalysiert, erkennt spezifisch lysosomale Enzyme.

Das Erkennungsmerkmal dafür dürfte in der dreidimensionalen Raumstruktur und eventuell in einem bestimmten Lysin-Muster der lysosomalen Proteine liegen.

Der zweite Schritt der Phosphorylierung ist die Abspaltung eines N-Acetylglukosaminrestes durch eine N-Acetylglukosamin-1-Phospho-diester- α -N-Acetylglukosaminidase (EC 3.1.4.45), wodurch der eigentlich aktive Phosphomonoester entsteht.

Der erste Phosphorylierungsschritt, also die Ausbildung des Phosphodiesters, dürfte im intermediären Kompartiment zwischen ER und Golgi stattfinden, die Bildung des Monoesters erst im cis-Golgi. Argumente dafür sind, daß bei einer Blockierung des Transports zum Golgi durch niedrigere Temperatur oder durch das Reagens CCCP die Phosphodiester-Verbindung gefunden wird, nicht aber der Monoester; andererseits können aber die Phosphotransferase-assoziierten Membranen von den Markern der ER-Membran abgetrennt werden (Kornfeld & Mellman, 1989).

Ein weiterer Hinweis für die These, daß die Phosphotransferase im intermediären Kompartiment lokalisiert ist und die N-Acetylglukosaminidase erst im Golgi, ist ein Experiment, bei dem das lysosomale Enzym Kathepsin D mit dem ER-Retentionssignal KDEL versehen wurde. Das KDEL-Kathepsin D wurde dabei zur Phosphodiester-Verbindung phosphoryliert, konnte aber nicht in den Monoester umgewandelt werden und akkumulierte im Prä-Golgi-Bereich (Pelham, 1988).

Die Bedeutung des Mannose-6-Phosphatsignals für den korrekten intrazellulären Transport der lysosomalen Enzyme und deren Abtrennung vom Sekretionsweg zeigt sich auch bei der genetisch bedingten Stoffwechselkrankheit Mucopolysaccharidose II (I-Cell-Disease). Bei dieser Krankheit ist die Phosphotransferase defekt, wodurch es zur Sekretion der lysosomalen Enzyme bzw. ihrer Pro-formen kommt (Hasilik et al., 1981; Creek & Sly, 1984).

1.3.3. Prozessierung im Golgi-Apparat:

Der Golgi-Apparat ist funktionell in 3 Abschnitte gegliedert, die von den sekretorischen und lysosomalen Proteinen nur in einer Richtung durchlaufen werden. Der sogenannte cis-Golgi-Bereich ist dem ER bzw. dem intermediären Kompartiment zugewandt, danach folgen mid- und trans-Golgi.

Während des gerichteten Transports erfolgen verschiedene Prozessierungsschritte. Der wichtigste Vorgang dürfte dabei die Prozessierung des N-Glykan-Anteils sein (siehe Abb. 1.3.). Bei der Synthese eines komplexen Kohlenhydrats agieren nacheinander mehrere Mannosidasen und Monosaccharidtransferasen in genau definierter Reihenfolge. Der geordnete Ablauf der einzelnen Enzymreaktionen wird durch eine sehr hohe Substratspezifität und teilweise durch eine räumliche Trennung der Enzyme in den 3 Golgi-Regionen erreicht. Neben dem komplexen N-Glykan-Typus existiert auch ein Mannose-reicher und ein hybrider Typ, bei denen die Prozessierung nur in einem geringeren Ausmaß erfolgt. Die Prozessierungsvorgänge unterliegen auch einer bestimmten Mikroheterogenität, die von den prozessierenden Enzymen, dem glykosylierten Protein selbst und der Zelllinie abhängig ist. (Roth, 1987; Kornfeld & Kornfeld, 1985).

Abb. 1.3.: N-Glykan-Prozessierung im Golgi-Apparat am Beispiel eines komplexen Kohlenhydrats. (nach Kleinig & Sitte, 1986).

Neben der Prozessierung der N-Glykane erfolgen auch die O-Glykosylierung und die Sulfatierung von Glykan- oder Tyrosinresten im Bereich des Golgi-Apparates.

1.3.4. Mannose-6-Phosphat-spezifische Rezeptoren (MPR):

Es konnten bisher zwei verschiedene Rezeptoren gefunden werden, die das Mannose-6-Phosphatsignal lysosomaler Enzyme erkennen und binden. Beide sind glykosylierte Membranproteine,

unterscheiden sich jedoch durch ihr Molekulargewicht und ihre Abhängigkeit von zweiwertigen Kationen. Der eine Rezeptor hat ein Molekulargewicht von mehr als 215 kDa (mit dem N-Glykan-Anteil bis zu 300 kDa) und ist Kationen-unabhängig. Der andere hat eine Größe von 46 kDa, dürfte in der Membran als Dimer auftreten und gilt als Kationen-abhängig (obwohl auch er bestimmte Liganden in Abwesenheit von Kationen binden kann). Beide Rezeptoren bestehen in ihrer reifen Form aus 3 Domänen: einer extracytoplasmatischen Domäne, einer einzelnen kurzen Transmembranregion und einer carboxyterminalen cytoplasmatischen Domäne. Das primäre Translationsprodukt weist noch eine aminoterminaler Signalsequenz zur Einschleusung in das ER-Lumen auf. Die extracytoplasmatische Domäne des 215 kDa-MPR setzt sich aus 15 Wiederholungseinheiten unterschiedlicher Homologie zusammen (Kornfeld & Mellman, 1989; siehe Abb. 1.4.).

Abb. 1.4.: Schematische Darstellung der Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren: ausgefüllte Kreise zeigen N-Glykanreste an, offene stehen für potentielle Glykosylierungsstellen (nach Kornfeld & Mellman, 1989).

Für den kleinen MPR konnte gezeigt werden, daß die N-Glykosylierung, die Ausbildung von Disulfidbrücken und eine Konformationsänderung nach der Synthese notwendig sind, um die Liganden ausreichend binden zu können (Hille et al., 1989). Die Liganden-Bindungsstelle liegt auf der extracytoplasmatischen Domäne des Rezeptors. Die cytoplasmatische

Domäne und die Transmembranregion scheinen für die intrazelluläre Retention verantwortlich zu sein.

Die Synthese eines Rezeptors, bei dem vor der Transmembranregion ein Stopcodon eingebaut wird, führt zur Sekretion des veränderten Rezeptors, wobei die Bindungsfähigkeit an Mannose-6-Phosphat erhalten bleibt (Wendland et al., 1989).

Der Kationen-abhängige 46 kDa-MPR hat in seiner funktionellen Einheit als Dimer 2 Mannose-6-Phosphat-Bindungsstellen, die so nahe aneinander liegen, daß sie von einem Oligosaccharid mit 2 Mannose-6-Phosphatresten besetzt werden können.

Der Kationen-unabhängige Rezeptor kann als Monomer ebenfalls 2 Mannose-6-Phosphatreste binden.

Ein einzelner Mannose-6-Phosphatrest wird von beiden Rezeptoren mit derselben Affinität gebunden ($7-8 \times 10^{-6}$ M), ein diphosphoryliertes Oligosaccharid wird jedoch vom 215 kDa-MPR mit viel höherer Affinität (2×10^{-9} M) gebunden als vom 46 kDa-MPR (2×10^{-7} M).

Von den beiden Rezeptoren dürfte der Kationen-unabhängige MPR der dominierende sein, da er bei einer Blockierung des 46 kDa-MPR dessen Funktion übernimmt, dieser jedoch bei Ausfall des 215 kDa-Rezeptors nur 30-40% der neusynthetisierten Enzyme zu den Lysosomen dirigieren kann.

Ein wesentlicher Unterschied ist auch, daß der 46 kDa-MPR nicht zur Rezeptor-vermittelten Endozytose lysosomaler Enzyme befähigt ist; diese Funktion kann nur vom großen MPR erfüllt werden (Kornfeld & Mellman, 1989).

Eine besondere Eigenschaft des 215 kDa-MPR ist auch, daß er identisch ist mit dem Rezeptor für den "Insulin-Like-Growth-Factor II (IGF II)". Für beide Liganden existiert eine eigene Bindungsstelle und sie können unter Umständen zugleich gebunden werden (z.B. Pentamannose-6-Phosphat-BSA und IGF II).

Die Bindung eines gesamten lysosomalen Enzyms kann jedoch (vermutlich durch sterische Hinderung) die zusätzliche Bindung von IGF II hemmen (Waheed et al., 1988; Kiess et al., 1989).

Die biologische Bedeutung der Tatsache, daß dieser Rezeptor sowohl lysosomale Enzyme als auch IGF II binden kann, ist noch ungeklärt.

Die subzelluläre Lokalisation der beiden MPR ist oft vom

Zelltypus abhängig, sie können im Bereich des Golgi-Apparates, an der Zelloberfläche, in Endosomen und in prälysosomalen Kompartimenten in unterschiedlicher Menge gefunden werden, nicht aber in Lysosomen selbst. Es steht jedenfalls fest, daß die Rezeptoren der verschiedenen subzellulären Bereiche miteinander in einem Fließgleichgewicht stehen und einen gemeinsamen Pool bilden (Griffiths et al., 1988; Kornfeld & Mellman, 1989).

1.3.5. Transport vom Golgi-Apparat zu den Lysosomen:

Im Verlauf des Biosyntheseweges werden die lysosomalen Enzyme im Golgi-Apparat von den Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren gebunden. Die Sortierung und Abtrennung von den sekretorischen Proteinen erfolgt im trans-Golgi-Bereich, und zwar wahrscheinlich im trans-Golgi-Retikulum (trans-Golgi-network, TGN). Dort kommt es zur Bildung Clathrin-ummantelter Ausstülpungen der Membran, in denen sich die die MPR mit ihren Liganden anreichern.

Dieser Prozeß wird von sogenannten HA I-Adaptoren vermittelt, das sind Proteine, die einerseits mit dem cytoplasmatischen Teil der Rezeptoren, andererseits mit den Protein-Einheiten des Clathrins in Wechselwirkung treten; sie liegen also in einer Schicht zwischen dem Lipid-Bilayer und dem Clathrin-Mantel. HA I-Adaptoren bestehen aus 4 Untereinheiten:

2 unterschiedlichen 100 kDa-Einheiten, einem 47 kDa- und einem 19 kDa-Polypeptid. Bis jetzt ist jedoch noch nicht bekannt welches Signal am cytoplasmatischen Teil der Rezeptoren für die Interaktion mit den HA I-Adaptoren verantwortlich ist (Glickman et al., 1989; Morris et al., 1989).

Die Clathrin-umhüllten Bereiche schnüren sich vom TGN ab und bilden Vesikel mit einem Protein-Mantel ("Coated Vesicles"), die als Transportvektoren dienen.

Die Ausschleusung der lysosomalen Enzyme aus dem TGN kann jedoch durch Inkubation bei einer Temperatur unter 20°C stark inhibiert werden, und es kommt zu einer Akkumulierung der

Proteine im trans-Golgi-Bereich (und zwar bei verschiedenen Zelllinien, unter anderem auch bei Fibroblasten; Braulke et al., 1988).

Die starke Hemmung des intrazellulären Transports zwischen Golgi-Apparat und Lysosomen bei Temperaturen unter 20°C scheint aber nur lösliche Proteine zu betreffen; lysosomale Membranproteine werden auch noch bei diesen Bedingungen zu den Lysosomen transportiert, allerdings etwas langsamer (Morales et al., 1989). Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß der Transport- und Sortierungsmechanismus von Membranproteinen anders abläuft als der von löslichen Proteinen. Von den letzteren ist jedenfalls bekannt, daß sie an ihre Rezeptoren gebunden vom trans-Golgi-Retikulum über Clathrin-umhüllte Transportvesikel zu einem prälysosomalen Kompartiment befördert werden, mit dem die Vesikel nach Ablösung des Clathrin-Mantels fusionieren. Im Lumen dieses Kompartiments kommt es durch ein saures Milieu (pH = ca. 5,5) zu einer Dissoziation der lysosomalen Enzyme von ihren Rezeptoren.

Das prälysosomale Kompartiment kann also funktionell mit dem als CURL (= Compartment of Uncoupling of Receptor and Ligand) bezeichneten Kompartiment gleichgesetzt werden.

Es ist auch wahrscheinlich der Kreuzungspunkt von Biosynthese- und Endozytoseweg. Charakteristisch für dieses Kompartiment sind seine komplexe tubulo-retikuläre Struktur und die Tatsache, daß es sowohl MPR als auch lysosomale, glykosylierte Membranproteine (lgp's) in höherer Konzentration enthält. Diese Eigenschaft dient auch zur Unterscheidung gegenüber Lysosomen, die biochemisch als lgp-positive/MPR-negative Kompartimente definiert werden können. Die MPR gelangen vom prälysosomalen Kompartiment zum TGN zurück, die löslichen lysosomalen Proteine und lgp's werden zu den Lysosomen weitertransportiert, wobei aber noch nicht bekannt ist, wie dieser Vorgang gesteuert wird (Griffiths et al., 1989; Huttner & Tooze, 1989).

Die Dissoziation des Rezeptor-Liganden-Komplexes kann jedoch durch Inkubation der Zellen in Gegenwart von Ammonchlorid verhindert werden. Dabei diffundiert NH_3 durch die Membran, wird durch das saure Milieu protoniert und Membran-impermeabel. Als Folge steigt der pH-Wert, die Rezeptoren bleiben an die

Liganden gebunden und sind nicht mehr für weitere Liganden verfügbar. Dadurch kommt es zu einer starken Erhöhung der Sekretionsrate lysosomaler Enzyme (von Figura & Hasilik, 1986).

1.3.6. Mannose-6-Phosphat-unabhängige Transportmechanismen:

Lysosomale Membranproteine weisen kein Mannose-6-Phosphat-Signal auf; es ist jedoch noch nicht geklärt, welche Strukturelemente für den gerichteten Transport verantwortlich sind. Man vermutet, daß die dafür notwendige Information auf der cytoplasmatischen Seite liegt. Vor kurzem konnte durch Mutationen am lysosomalen Membranprotein h-lamp-1 gezeigt werden, daß ein Tyrosinrest im cytoplasmatischen Bereich für den korrekten Transport notwendig ist (Williams & Fukuda, 1989). Diesem Signal wird auch eine große Bedeutung für die Endozytose zugeschrieben (siehe 1.5.).

Möglicherweise ist auch eine Glycin-Tyrosin-Sequenz ein wesentlicher Bestandteil des Zielsignals. Dieselbe Sequenz findet man auch bei der lysosomalen sauren Phosphatase, einem Enzym, das als Membranprotein synthetisiert und unabhängig von Mannose-Phosphat-Resten in die Lysosomen transportiert wird. Es wird als Membranprotein vom trans-Golgi zur Zelloberfläche und von dort durch Endozytose zu den Endosomen transportiert und gelangt nach einigen Kreisläufen zwischen Zelloberfläche und Endosomen in die Lysosomen. Erst dort wird die Transmembranregion abgespalten, und das Enzym in ein lösliches Protein umgewandelt (Braun et al., 1989; Gottschalk et al., 1989).

Doch auch bei den löslichen lysosomalen Enzymen muß es Transport-mechanismen geben, die vom Mannose-6-Phosphat-Signal unabhängig sind. So findet man z.B. bei Patienten mit Mucopolysaccharidose II, also einem Defekt der Mannose-Phosphorylierung, in einigen Zelllinien eine normale Lokalisation und Aktivität der lysosomalen Enzyme (Kornfeld & Mellman, 1989).

1.4. Biosynthese von Kathepsin B:

In humanen Hautfibroblasten erscheint Kathepsin B nach einer

Markierung mit ^{35}S -Methionin über 10 min als Precursor mit einem apparenten Molekulargewicht von 44,5 kDa. Innerhalb von 80 min werden ca. 50% davon in eine 46 kDa-Proform umgewandelt, die im Verlauf einer proteolytischen Prozessierung und einer partiellen Deglykosylierung zu einer 33 kDa- und später zu einer 27 kDa-Form abgebaut wird. Beide Formen sind proteolytisch aktiv, sie treten in Fibroblasten in einem Verhältnis von 3 : 1 auf.

Das 33 kDa-Enzym scheint die Hauptform zu sein und hat eine Halbwertszeit von etwa 12 Stunden. Der Prozessierungsschritt zur 27 kDa-Form läßt sich durch Leupeptin und Cbz-Phe-Ala-CHN₂ hemmen, er dürfte also durch eine Thiolprotease, möglicherweise Kathepsin B selbst, katalysiert werden.

Es konnte gezeigt werden, daß die Proform phosphorylierte N-Glykanreste enthält, und daß der intrazelluläre Transport von Kathepsin B durch einen Mannose-6-Phosphat-abhängigen Mechanismus gesteuert wird. Ein Abbau der Kohlenhydratreste der 46 kDa-Proform durch Peptid:N-Glykanase F führt zu einem apparenten Molekulargewicht von 39 kDa, ein N-Glykan-Abbau der 33 kDa-Form zeigt keine signifikante Verringerung des Molekulargewichts.

Bei Fibroblasten werden etwa 5% der Proform ins Medium sezerniert, diese Rate kann aber durch Inkubation in Gegenwart von 10 mM NH₄Cl auf ca. 95% erhöht werden (Hanewinkel et al., 1987).

Bei humanen Hepatomzellen werden ähnliche Molekulargewichts-Formen gefunden, wobei aber das 27 kDa-Enzym die Hauptform ist. Die Prozessierung in die 33 kDa-Form erfolgt prälysosomal, der Schritt zur 27 kDa-Form wahrscheinlich in den Lysosomen.

Bei den Hepatomzellen werden bis zu 20% der Proform ins Medium sezerniert, diese latente Vorstufe kann in vitro durch Pepsin proteolytisch aktiviert werden.

Die Molekulargewichtsform, die dabei entsteht ist mit 37,5 kDa allerdings etwas größer als das natürlich auftretende Enzym (Hagen, 1988; Mort & Recklies, 1986).

1.5. Endozytose lysosomaler Enzyme:

Lysosomale Enzyme können nicht nur auf dem Biosyntheseweg,

sondern auch durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Lysosomen gelangen.

Als Rezeptor dient dabei der große, Kationen-unabhängige MPR, während der kleinere MPR bei der Endozytose nicht funktionsfähig zu sein scheint.

Die phosphorylierten Proformen der lysosomalen Enzyme werden durch die Rezeptoren, die an der Zelloberfläche sitzen, gebunden und reichern sich in Clathrin-umhüllten Membraneinstülpungen (so-geannten "coated pits") an. Die Clathrin-Anlagerung wird von HA II-Adaptoren vermittelt, die wie die HA I-Adaptoren der "Golgi-coated pits" aus 4 Untereinheiten bestehen (zwei 100 kDa-eine 50 kDa- und eine 16 kDa-Einheit). Eines der beiden 100 kDa-Polypeptide, ein sogenanntes β -Adaptin weist eine große Ähnlichkeit zu einer 100 kDa-Einheit (β') des HA I-Adaptors auf und dürfte für die Bindung mit dem Clathrin-Mantel verantwortlich sein (Ahle & Ungewickell, 1989).

Für die Interaktion des HA II-Adaptors mit dem Rezeptor ist ein Signal aus ein oder mehreren Tyrosinresten auf der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors notwendig.

Dies konnte bereits für verschiedene Rezeptoren, unter anderem auch für den großen MPR gezeigt werden (Glickman et al., 1989). Die Clathrin-assoziierten Bereiche der Cytoplasmamembran schnüren sich ab und bilden Transportvesikel (Coated Vesicles), die nach Ablösung des Clathrins miteinander oder mit bereits existierenden endosomalen Kompartimenten im peripheren Zellraum fusionieren. In den Membranen dieser Kompartimente, die als "frühe Endosomen" bezeichnet werden, befinden sich H^+ -translozierende ATPasen, die den pH-Wert im Lumen auf 6,0 - 6,2 senken.

Außer den H^+ -ATPasen findet man aber auch Na^+/K^+ -ATPasen in der Membran früher Endosomen. Durch ihre Aktivität wird das Membran-potential (mit positiver Ladung auf der Innenseite) so verstärkt, daß es den H^+ -ATPasen entgegenwirkt und eine weitere Absenkung des pH-Werts verhindert. Bei Blockierung der Na^+/K^+ -ATPasen durch Ouabain, einem spezifischen Inhibitor, sinkt der pH-Wert auf ca. 5,3 ab. Dieser Wert wird normalerweise erst in späten Endosomen erreicht, bei denen man keine Na^+/K^+ -ATPasen in der Membran finden kann. Die Ansäuerung während des

Endozytoseverlaufes ist also ein biphasischer Prozeß, der sich aufgrund von zwei unterschiedlichen Endozytosekompartimenten ergibt. Viele Rezeptoren werden schon beim pH-Wert der frühen Endosomen von den Liganden abgelöst, und können dadurch rasch wieder zur Zelloberfläche zurückkehren (z.B. LDL-, Asialoglykoprotein- oder Transferrin-Rezeptor), andere Rezeptoren, die einen niedrigeren pH-Wert zur Dissoziation benötigen, wie der MPR, gelangen bis in die späten Endosomen (oder prälysosomale Kompartimente), und können daher in den Kreislauf zum TGN gelenkt werden (Fuchs et al., 1989 a,b; Cain et al., 1989). Zwischen den frühen und späten Endosomen findet ein aktiver Transport statt, und zwar vom peripheren Zellbereich in den perinuklearen Raum. Dieser Transportprozeß scheint mit Hilfe von Mikrotubuli abzulaufen und kann bei einer Temperatur von etwa 16°C stark inhibiert werden (Gruenberg & Howell, 1989; Hubbard, 1989). Es wird auch angenommen, daß Endozytoseweg und Biosyntheseweg lysosomaler Enzyme bei den späten Endosomen (oder prälysosomalen Kompartimenten) zusammentreffen (Griffiths et al., 1988; Kornfeld & Mellman, 1989). Die ursprüngliche Meinung, daß nur Lysosomen hydrolytische Aktivitäten aufweisen hat sich nicht bestätigt, da einige aktive Hydrolasen in Endosomen nachgewiesen werden konnten, unter anderem auch Kathepsin B und D (Roederer et al., 1987; Diment & Stahl, 1985; Gruenberg et al., 1989). Von den späten Endosomen aus gelangen endozytierte Moleküle und lysosomale Enzyme in die Lysosomen, wobei auch dieser Schritt temperaturabhängig ist und unterhalb von 20°C inhibiert wird (wie bei Makrophagen und Fibroblasten gezeigt wurde; Tomoda et al., 1989; Braulke et al., 1988). Der 20°-Temperaturblock liegt jedoch noch vor dem von Griffiths (1988) beschriebenen prälysosomalen Kompartiment (in NRK-Zellen). Dies würde bedeuten, daß sie nicht mit den späten Endosomen völlig gleichgesetzt werden können (auch wenn sie sich funktionell und biochemisch gleich verhalten), und daß sie zwischen diesen und den Lysosomen liegen. Bei in vitro - Versuchen können Fusionsvorgänge auf der Stufe der frühen Endosomen induziert werden, die durch N-Ethylmaleimid (NEM) blockierbar sind (ähnlich wie bei Fusionen im Bereich von ER oder Golgi) und

NEM-insensitive Transfer-Vorgänge zwischen späten Endosomen und Lysosomen. Diese Daten sprechen eher gegen ein Reifungsmodell bei Lysosomen und unterstützen ein Vesikel-Shuttle-Modell der Endozytose (Gruenberg & Howell, 1989; Mullock et al., 1989).

Abb. 1.5.: Arbeitsmodell für Biosynthese- und Endozytose-Vorgänge: RER = rauhes endoplasmatisches Retikulum, IK = intermediäres Kompartiment, TGN = trans-Golgi-Network, MPR = Mannose-6-Phosphat-Rezeptor, LGP = lysosomale Glykoproteine, H^+ -ATPase, Na^+/K^+ -ATPase

1.6. Lysosomale Speicherkrankheiten:

1.6.1. Lysosomale Enzymdefekte:

Es existiert eine große Zahl genetisch bedingter Stoffwechselkrankheiten, die auf fehlender oder verringerter Aktivität lyso-somaler Enzyme beruhen. Sie führen meistens dazu, daß endo-zytierte oder zelleigene für den Abbau bestimmte Verbindungen nicht vollständig hydrolysiert werden können und als Intermediate in den Lysosomen akkumulieren, da nur niedermolekulare Metabolite die Lysosomen-Membran passieren können.

Zu diesen Krankheiten zählen z.B. die Mucopolysaccharidosen, bei denen der Abbau von Glykosaminoglykanen (Mucopolysacchariden) an verschiedenen Stellen inhibiert oder blockiert sein kann (Neufeld & Muenzer, 1989). Ebenso gibt es Stoffwechseldefekte, die durch unvollständigen Abbau der Glykanreste von Glykoproteinen hervorgerufen werden, und die zur intralysosomalen Anreicherung von Oligosacchariden führen (z.B. Mannosidose, Fucosidose und Sialidose; Beaudet & Thomas, 1989).

Fehlende oder verringerte Aktivität von Enzymen des Lipidstoffwechsels verursachen verschiedene Ausprägungen von Lipidosen, bei denen es zur Akkumulierung von Fettsäure-Cholesterinestern, Ceramiden oder Sphingomyelinen kommt. In Fällen des Glykolipid-Katabolismus, bei denen der Enzymdefekt die Abspaltung von Glykan-Einheiten betrifft, wird der Abbau bereits auf der Ebene von Gangliosiden, Glykosphingolipiden oder Cerebrosiden gehemmt (Scriver et al., "The Metabolic Basis of Inherited Disease", 1989). Die klinischen Erscheinungsformen der verschiedenen lyso-somalen Speicherkrankheiten können sehr unterschiedlich sein; sie umfassen körperliche und mentale Entwicklungsstörungen, Veränderungen des gesamten Habitus, des Knochenbaus und der Gelenke, verschiedene Organschädigungen und Organomegalien, Störungen des Seh- und Hörvermögens, Schädigungen des Nervensystems und zahlreiche andere pathologische Erscheinungen. Der Schweregrad der Defekte kann ebenfalls stark variieren; in vielen Fällen sterben jedoch die Patienten bereits im Kindes- oder Jugendalter.

1.6.2. Lysosomale Transportdefekte:

Die intralysosomale Akkumulierung von Abbauprodukten kann im Prinzip nicht nur durch Defekte lysosomaler Enzyme hervorgerufen werden, sondern auch durch fehlerhafte Transportmechanismen der Lysosomen-Membran, die für die Ausschleusung der Metabolite ins Cytosol verantwortlich sind. Bis jetzt sind nur drei derartige Transportdefekte bekannt, die die Verbindungen Cystin, Cobalamin und freie Sialinsäure betreffen. Es wären aber auch andere Speicherkrankheiten denkbar, die auf Funktionsbeeinträchtigungen von Transportproteinen zurückzuführen sind, da wahrscheinlich viele lysosomale Abbauprodukte wie Monosaccharide, Aminosäuren und Nukleoside durch Membranproteine ins Cytosol transportiert werden.

Bei der sogenannten Cystinose akkumuliert freies Cystin in der 10 - 100-fachen Menge des Normalwertes und bildet in den Lysosomen Kristalle. Der Transportmechanismus, der bei dieser Stoffwechselerkrankung defekt ist, wird normalerweise durch den pH-Unterschied zwischen Cytosol und Lysosomen, bzw. das lysosomale Membranpotential reguliert. Eine Zunahme des pH-Gradienten oder eine Abnahme des Membranpotentials (negative Ladung auf der Innenseite der Lysosomen) stimuliert dabei den Cystin-Ausfluß. Bei Cystinose-Zellen, die eine sehr geringe Cystin-Austritts-rate aufweisen, funktioniert aber dieses Regulationssystem nicht, und es kommt zu keiner Erhöhung des Cystin-Transports (Smith et al., 1987; Gahl et al., 1989). Der Transportdefekt von Cobalamin, der zu einer intralysosomalen Anreicherung von Vitamin B₁₂ führt, wurde erst vor kurzer Zeit nachgewiesen und ist noch nicht näher charakterisiert (Rosenblatt, 1989).

1.6.3. Sialinsäure-Speicherkrankheit

Es gibt einige genetisch bedingte Stoffwechseldefekte, die mit einer Erhöhung der Sialinsäure-Konzentration verbunden sind aber unterschiedliche Ursachen aufweisen.

Bei einer dieser Krankheiten, der Sialuria, ist erwiesen, daß sie nicht mit lysosomalen Prozessen in Zusammenhang steht, sondern durch das Fehlen einer Rückkopplungshemmung in der Sialinsäure-Synthese verursacht wird (Weiss et al., 1989). Bei der Sialidose hingegen liegt die Ursache im intralysosomalen Sialinsäure-

Katabolismus; durch einen Enzymdefekt kann die Sialinsäure nicht von den Oligosacchariden der Glykoproteine abgespalten werden und akkumuliert in gebundener Form in den Lysosomen (Beaudet & Thomas, 1989).

1979 wurde eine Krankheit entdeckt, bei der sich freie Sialinsäure in den Lysosomen anreichert. Nach der Region in Finnland, in der sie gefunden wurde, erhielt sie den Namen "Salla" (Aula et al., 1979). Die klinischen Symptome dieses autosomal-rezessiv vererbten Defektes sind Ataxia im ersten Lebensjahr, Verlangsamung der psychomotorischen Entwicklung und Veränderungen der Gesichtszüge. Ein Drittel der Patienten leidet an spastischen Krämpfen und lernt nie gehen, die anderen lernen es erst im Alter von 2 - 12 Jahren. Der Intelligenzquotient liegt etwa im Bereich von 20. 1982 wurde dann erstmals eine akute Variante dieser Krankheit beschrieben, bei der die Symptome schwerwiegender auftreten und die noch zusätzlich Hepatosplenomegalie hervorruft (Tondeur et al., 1982). Beide Varianten werden unter dem Begriff "Sialinsäure-Speicherkrankheit (Sialic Acid Storage Disease, SASD)" zusammengefaßt. Die akute Erscheinungsform führt schon im Kindesalter zum Tod der Patienten und wird deshalb als infantile Sialinsäure-Speicherkrankheit (Infantile Sialic Acid Storage Disease, ISSD) bezeichnet. Der intrazelluläre Anreicherungsfaktor von Sialinsäure ist bei Salla-Patienten etwa 10, bei ISSD-Patienten im Bereich von 100. Die Konzentration im Urin ist ebenfalls stark erhöht. In der granulären Fraktion, die die Lysosomen enthält, findet man bei ISSD-Zellen sogar eine Anreicherung um den Faktor 1000. Es wird geschätzt, daß die intralysosomale Sialinsäure-Konzentration in den ISSD-Zellen etwa 40 mM beträgt. Als Folge der Sialinsäure-Akkumulierung verringert sich die Dichte der Lysosomen von ca. 1,1 auf ungefähr 1,045; möglicherweise durch vermehrten Einfluß von Wasser aufgrund des hohen osmotischen Drucks.

Die Tatsache, daß es sich bei diesen Speicherkrankheiten um einen lysosomalen Transportdefekt handelt, wurde durch Beladungsversuche mit metabolischen Vorstufen, ^3H -markierter Sialinsäure und genaue Transport-Studien nachgewiesen (Renlund et al., 1986; Paschke et al., 1986; Mendla et al., 1988; Tietze et al., 1989; Gahl et al., 1989). Dabei konnte gezeigt werden, daß der Sialinsäure-Transport in Normalzellen mit zunehmender Konzentration und Temperatur deutlich ansteigt und einen Temperatur-Koeffizienten Q_{10} von 2,4 aufweist, was charakteristisch ist für einen Carrier-vermittelten Transport. Bei ISSD-Zellen ist die Transportgeschwindigkeit auch bei starker Sialinsäure-Beladung vernachlässigbar; bei Salla-Zellen dürfte eine, wenn auch nur geringe, Resttransportkapazität vorhanden sein (Tietze et al., 1989). Eine genaue Studie des Transportsystems hat ergeben, daß es von einem pH-Gradient, wie er zwischen Cytosol und Lysosomen auftritt (ca. 2 pH-Einheiten), angetrieben wird, und zwar über den Gleichgewichtszustand hinaus. Die Gegenwart eines pH-Gradienten von 7,4/5,5 erhöht die maximale Transportgeschwindigkeit und verringert die Michaeliskonstante signifikant ($K_m = 0,24 \text{ mM}$; ohne pH-Unterschied: $K_m = 0,7 \text{ mM}$). Die initiale Transportgeschwindigkeit liegt sogar auf dem neunfachen Wert. Na^+ - oder K^+ -Ionen haben keinen Einfluß auf die Transportrate, ATP und GTP führen jedoch zu einer Verdopplung. Da diese Stimulierung nicht durch Protonophoren verhindert werden kann, erfolgt sie nicht über die H^+ -ATPase (und damit über die pH-Veränderung), sondern über einen noch nicht bekannten Nukleosid-Regulationsmechanismus. Eine Analyse des Transportes durch Scatchard-Diagramm und Hill-Gleichung läßt darauf schließen, daß die Sialinsäure von einem einzelnen Membranprotein transportiert wird, das mit je einem H^+ -oder einem OH^- -Ion interagiert, wobei noch nicht feststeht, ob es sich um einen H^+ -Symporter oder einen OH^- -Antiporter handelt. Studien über die Substratspezifität zeigen, daß die negativ geladene Carboxylgruppe und die OH-Gruppe am C2-Atom wesentliche Erkennungssignale für das Transportprotein sind (siehe Abb. 1.6.). Starke kompetitive Inhibitoren sind Monosaccharide mit einer Carboxylgruppe und einem vergleichbaren pK-Wert (von ca. 2), wie z.B. Glucuronsäure.

Abb. 1.6.: Strukturformel der N-Acetylneuraminsäure
(Sialinsäure) Der Teil, der für die Interaktion mit
dem Transport- protein der Lysosomen-Membran
wesentlich sein dürfte,
ist umrahmt.

Ein besonders auffallender Aspekt der Sialinsäure-Speicherkrankheit ist, daß die proteolytische Prozessierung bestimmter lyso-somaler Enzyme gestört ist. In kultivierten Fibroblasten von Patienten ist z.B. die reife Form der α -Kette von N-Acetyl- β -Hexosaminidase um 1,5 - 2 kDa größer als bei Normalzellen. Der Molekulargewichtsunterschied bleibt auch nach enzymatischer Abspaltung des Glykananteils durch Endoglykosidase H oder F bestehen und ändert sich auch nicht bei sehr langen Prozessierungsstudien (200 h -Chase). Die Enzymaktivität scheint dadurch jedoch nicht deutlich verändert zu werden. Da bei Normalzellen eine intermediäre Form des Enzyms etwa das gleiche Molekulargewicht wie die reife Form bei SASD-Zellen aufweist, wäre es möglich, daß ein terminaler Prozessierungsschritt inhibiert ist.

Bei einem anderen Enzym, der α -Fukosidase findet man ebenfalls eine Erhöhung des Molekulargewichts der reifen Form (Hancock et al., 1988).

2. PROBLEMSTELLUNG:

Wie in der Einleitung beschrieben wurde, kommt es in den Zellen von Patienten mit lysosomaler Sialinsäure-Speicherkrankheit zu einer Störung der Reifung bestimmter lysosomaler Enzyme. Diese Ergebnisse lassen es möglich erscheinen, daß mehrere lyso-somale Enzyme einem gemeinsamen Reifungsmechanismus unterliegen, der bei den Sialinsäure-Speicherzellen inhibiert ist. Es stellt sich jedoch die Frage, ob der Unterschied in der Prozessierung ein Sekundäreffekt der Sialinsäure-Akkumulierung und der damit verbundenen Änderung des lysosomalen Milieus ist, oder ob eine generelle Fehlfunktion in der Reifung lysosomaler Proteine (und auch des Transportproteins für Sialinsäure) den Primärdefekt darstellt und dadurch die Speicherkrankheit verursacht.

Bei der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Änderungen der Prozessierung auch bei Kathepsin B auftreten, einem Enzym, das ähnlichen intrazellulären Transport- und Reifungsmechanismen unterliegt wie andere lysosomale Proteine und selbst als Prozessierungsprotease wirken könnte.

Um die einzelnen Molekulargewichtsformen bzw. die entsprechenden Prozessierungsschritte subzellulär lokalisieren zu können, sollte der intrazelluläre Transport und die Reifung durch verschiedene chemische Agenzien oder physikalische Parameter (z.B. niedrige Inkubationstemperaturen) inhibiert werden.

Das Hauptinteresse galt vor allem der Frage, ob Anormalitäten bereits vor den Lysosomen oder erst intralysosomal als Sekundär-effekt der hohen Sialinsäure-Konzentration vorkommen. Ebenso war die Kinetik der Reifung näher zu untersuchen.

Durch Kreuzendozytose-Versuche sollte aufgezeigt werden, ob die Ursache für eine veränderte Reifung von Kathepsin B in der Pro-form selbst oder im Vorgang der Prozessierung liegt.

Eine zusätzliche Zielsetzung war die Untersuchung der Morphologie und der intrazellulären Verteilung der Lysosomen durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie.

3. MATERIAL UND METHODEN:

3.1. ZELLKULTUR

3.1.1. Zelllinien:

Salla-Fibroblasten: - GM 8496

- F 8471

ISSD-Fibroblasten: - GM 5520

- Patient B.B.

Kontrollzellen: - GM 5521 (von der Mutter des Patienten GM 5520)

- GM 5522 (vom Vater des Patienten GM 5520)

- Kontrollpatient Kl.

- Kontrollpatient Ko.

Die Zelllinien GM 5520, GM 5521, GM 5522 und GM 8496 wurden vom "Human Genetic Mutant Cell Repository" in Camden, New Jersey bezogen; die Zelllinie F 8471 und die Fibroblasten der Patienten B.B., Kl. und Ko. wurden von Dr. Paschke (Universitätskinderklinik, Landeskrankenhaus Graz) zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Kulturbedingungen:

Es wurden 25 bzw. 80 cm²-Zellkulturflaschen der Firma Nunc verwendet; als Basismedium diente MEM nach Earle (Gibco).

Diesem wurden 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugesetzt. Zur Komplettierung des Mediums wurden FKS (Endkonzentration: 10% (v/v)) und Glutamin (2 mM) zugegeben, sowie nicht-essentielle Aminosäuren (Cantz et al., 1972; Hagen, 1988).

Einmal wöchentlich wurden die Zellkulturen mit 5 ml bzw. 15 ml frischem Medium versorgt. Die Kultivierung erfolgte

normalerweise bei 37°C in einem Inkubator unter 5% CO₂-Atmosphäre.

Alle Zellkultur-Arbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt.

3.1.2. Transplantierung:

HANKS, 0,1% Trypsin (Boehringer, Mannheim) in PBS und Medium wurden auf 37°C temperiert. Konfluente Zellkulturen wurden mit 5 ml HANKS pro kleiner Flasche bzw. 15 ml pro großer Flasche gewaschen, mit 5 ml bzw. 15 ml 0,1% Trypsin gespült und nach Absaugen der überschüssigen Trypsinlösung 10 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 15 ml (45 ml) Medium suspendiert und in eine entsprechende Anzahl frischer Zellkulturflaschen überführt (Cantz et al., 1972).

3.1.3. Metabolische Markierung:

Konfluente Zellkulturen wurden zweimal mit 5 ml (15 ml) HANKS gewaschen und anschließend mit 1,7 ml (5 ml) methioninfreiem Waymouth MAB 87/3-Medium (Zusammensetzung: im Gibco-Katalog beschrieben; + 4% FKS, das gegen 0,15 M NaCl dialysiert wurde) pro 25 cm² (80 cm²)-Flasche eine Stunde bei 37°C vorinkubiert. Die Markierung (= Pulse) erfolgte nach Absaugen des Vorinkubationsmediums mit 1,7 ml (5 ml) Medium derselben Zusammensetzung, jedoch unter Zugabe von ³⁵S-Methionin (spezifische Aktivität: 1100 Ci/mmol, Firma New England Nuclear). Die Endkonzentration an radioaktivem Methionin betrug je nach Versuchsbedingungen 20 - 100 µCi/ml, die Dauer der Markierung 10 min - 24 Stunden. Zur Verfolgung der Prozessierung des neusynthetisierten Proteins wurde ein Überschuß an nicht-radioaktivem Methionin (Endkonzentration: 0,2 mg/ml) zugesetzt und die Inkubation für die gewünschte Zeitspanne fortgeführt (= Chase); (Hanewinkel et al., 1987; Hagen, 1988).

3.1.4. Stimulierung der Sekretion durch Ammonchlorid:

Die Vorinkubation und die Markierung wurden nach den unter 3.1.3. beschriebenen Methoden, jedoch in Gegenwart von 10 mM

NH₄Cl für 24 h durchgeführt (Hanewinkel et al., 1987).

3.1.5. Endozytoseversuche:

Zur Untersuchung der Rezeptor-medierten Endozytose und Prozessierung von Kathepsin B wurde eine entsprechende Anzahl von Zellkulturflaschen der Donorzellen (etwa eine 80 cm²-Flasche für zwei 25 cm²-Flaschen der Rezipienten-Zellen) durch Inkubation in Gegenwart von 10 mM Ammonchlorid und 20 µCi/ml radioaktivem Methionin zur Sekretion von markierten lysosomalen Proenzymen an-geregt. Die Dauer der Markierung und Sekretion betrug 24 Stunden. Danach wurde das Medium abgehoben und die darin enthaltenen Proteine durch Ammonsulfat gefällt (70% Ammonsulfatsättigung, mindestens eine Stunde bei 4°C). Die Proteine wurden durch Zentrifugation bei 30000 g und 25 min bei 4°C pelletiert, der Überstand abgehoben und das Präzipitat in 1,5 ml A.bi. gelöst. Diese Lösung wurde über Nacht gegen 100 ml MEM (ohne FKS) und danach nochmals 3 Stunden gegen 100 ml frisches Medium dialysiert (ebenfalls bei 4°C). Das Retentat wurde mit MEM auf das für die Endozytose notwendige Volumen aufgefüllt und mit FKS (hitze-inaktiviert, bei 56°C, 30 min) komplettiert (FKS-Anteil: 5%) 10 µl des Endozytosemediums wurden mit 2 ml Szintillator (Ready Solve, Beckmann) gemischt und die Radioaktivität mit einem Szintillationszähler quantifiziert (Liquid Szintillation Ana-lyzer, 1900 CA Tri-Carb, Firma Packard).

Für die Endozytose sollte das Medium mindestens 2×10^6 cpm/ml enthalten. Anschließend wurden die Akzeptorzellen mit 2 ml sterilfiltriertem Endozytosemedium pro kleiner Flasche versehen und je nach Versuchsparametern 20 - 48 Stunden inkubiert.

3.1.6. Anwendung von Temperaturblocks:

Um bestimmte intrazelluläre Transportvorgänge oder Prozessierungsschritte zu hemmen, wurden einige Biosynthese- und Endozytoseversuche bei reduzierten Temperaturen durchgeführt. Bei den Biosynthese-Experimenten erfolgte die Vorinkubation mit methioninfreiem Medium und die Markierung mit ³⁵S-Met noch bei

37°C. Die Markierungsdauer betrug dabei in der Regel 20 min bis 1 Stunde; in dieser Zeitspanne ist ein Transport bis zu den Lysosomen unwahrscheinlich. Um einen ausreichenden Einbau von ³⁵S-Met in die neusynthetisierten Proteine zu erzielen, wurde die Konzentration an radioaktivem Methionin auf 40-100 µCi/ml Medium eingestellt. Nach der Zugabe von unmarkiertem Methionin wurde so rasch wie möglich abgekühlt, und die Zellen wurden für den Chase 5 - 24 Stunden bei einer Temperatur von 19°C oder 23°C inkubiert. Bei den Endozytoseversuchen wurde nur der 19°C - Temperaturblock angewendet. Die Gewinnung von markiertem Prokathepsin B durch Ammonchlorid-stimulierte Sekretion und die Herstellung des Endozytosemediums erfolgte so, wie unter 3.1.5. beschrieben wurde. Die Endozytose selbst wurde für 20 - 48 h bei 19°C durchgeführt.

3.1.7. Blockierung durch Monensin oder CCCP:

Um die intrazellulären Transport- und Prozessierungsvorgänge an bestimmten definierten Stellen inhibieren zu können, wurden einige Markierungsexperimente in Gegenwart der Verbindungen Monensin und Carboxylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon (CCCP) durchgeführt. Monensin wirkt als Na⁺/H⁺-Ionophor und führt zu einer Prozessierungshemmung vor dem trans-Golgi-Bereich; CCCP wirkt als H⁺-Ionophor und verursacht eine Transportblockierung zwischen ER und Golgi (Tartakoff, 1983; Pohlmann et al., 1984; Braulke et al., 1987; Pelham, 1989 b). Bei entsprechenden Inhibierungsversuchen erfolgte die Markierung in Anwesenheit von 1 µmol/l Monensin oder 50 µmol/l CCCP, wobei die Inhibitoren sowohl während der Vorinkubation als auch beim Pulse und Chase im Medium waren.

Stammlösungen: 100 µM Monensin in DMSO, 10 mM CCCP in Ethanol

3.1.8. Metabolische Beladung mit Sialinsäure:

Um die intrazelluläre Sialinsäurekonzentration zu erhöhen, wurden einige Zelllinien in Gegenwart von 100 mM N-Acetylmannosamin, einem Stoffwechselvorläufer der Sialinsäure,

kultiviert. Dazu wurden die Zellen zuerst 4 Tage mit normalem Medium in Gegenwart von N-Acetylmannosamin vorinkubiert, um sie ausreichend mit Sialinsäure zu beladen. Dann wurde eine metabolische Markierung mit ^{35}S -Methionin durchgeführt, wobei bei allen Verfahrensschritten ebenfalls 100 mM N-Acetylmannosamin im Medium war (Tietze et al., 1989). Als Beladungskontrolle wurde eine Inkubation in Gegenwart von 100 mM Saccharose durchgeführt.

3.2. HERSTELLUNG VON ZELL- UND MEDIUMEXTRAKTEN:

Extraktionslösung: 0,125 M Tris/HCl, pH 6,8
1% (w/v) SDS, 10 mM DTE
1 mM PMSF
2 mM EDTA
1 μM Leupeptin
10 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin

Medien:

Nach der Inkubation der Zellen wurde das Medium abgehoben und eventuell abgestorbene Zellen, bzw. Zellreste bei 400 g, 5 min abzentrifugiert. Die im Medium enthaltenen Proteine wurden daraufhin in Ultrazentrifugationsröhrchen mit 0,5 g Ammonsulfat pro ml Medium (= 70% Ammonsulfatsättigung) mindestens 1 Stunde gefällt. Das Präzipitat wurde 20 min bei ca. 100000 g (im 50 Ti-Rotor bei 4°C) zentrifugiert, der Überstand abgehoben und das Präzipitat in 200 μl Extraktionslösung gelöst.

Zellen:

Die Zellen wurden nach dem Abheben des Mediums zweimal mit je 5 ml 4°C - kaltem HANKS oder PBS gewaschen.

Nach Absaugen der Waschlösung wurden die Flaschen für 2 min aufgestellt, damit die überschüssige Lösung abfließen kann und der Rest nochmals gründlich abgesaugt. Dann wurden je 200 μl Extraktionslösung zugegeben und die Flaschen bis zur vollständigen Lyse der Zellen geschwenkt. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen nochmals für 10 min aufgestellt und der Zellextrakt in 1,5 ml - Kunststoffhütchen überführt.

Zell- und Medienextrakte wurden entweder sofort aufgearbeitet,

oder bei -20°C gelagert.

3.3. IMMUNPRÄZIPITATION VON KATHEPSIN B:

3.3.1. Lösungen:

Verdünnungspuffer für Zell- und Medienextrakte:

- 50 mM Tris/HCl, pH 8,3 ; 0,15 M NaCl (aus 3x-Stammlösung)
- 1% (w/v) Triton X-100,
1% Natriumdesoxycholat (aus 3x-Stammlösung)
- 0,25% SDS (aus 50x-Stammlösung)
- 1 mM PMSF (aus 100x-Stammlösung)
- 2 mM EDTA (aus 100x-Stammlösung)
- 10 µg/ml Aprotinin (aus 100x-Stammlösung)
- 5 mg/ml BSA

Kopplungspuffer (= zweifach konzentrierter PTO-Puffer):

- 40 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7,2
- 1% (w/v) Tween 20
- 0,2% (w/v) Ovalbumin
- 0,04 % (w/v) NaN₃

3.3.2. Kopplung der Immunglobuline an Protein A-Sepharose:

Es wurden 2 verschiedene Immunglobulin - Protein A-Sepharose-Komplexe verwendet, und zwar einer mit Kaninchen-Gammaglobulinen aus Präimmunserum (PASKo = Protein A-Sepharose-Kontrollimmun-globuline) und einer mit Kaninchen-Anti-Kathepsin B - Immun-globulinen (PASA).

Der Anti-Kathepsin B - Antikörper wurde von Doz. Dr. J. Glössl zur Verfügung gestellt.

Der Immunkomplex PASKo diente zur Vorreinigung der Extrakte vor der eigentlichen Immunpräzipitation von Kathepsin B.

Präparation:

PASKo: Für 200 μ l Zell- oder Medienextrakt wurden folgende Mengen verwendet:

- 4 mg Protein A-Sepharose (Pharmacia)
- 80 μ l zweifach konzentrierter PTO-Puffer
- 60 μ l A.bi.
- 20 μ l Kontrollimmunglobuline

Nach dem Mischen wurde mindestens 2 Stunden bei 4°C langsam über Kopf rotiert, um die Immunglobuline an das Protein A-Sepharosegel zu koppeln. Danach wurde 3 min bei ca. 15000 g zentrifugiert und der Überstand mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgehoben. Das Pellet wurde dreimal mit einfach konzentriertem PTO-Puffer gewaschen und beim letzten Waschschrift auf die entsprechende Anzahl an PASKo-Portionen aufgeteilt. Nach dem Abheben des Überstands wurden die Pellets bei 4°C bis zur Verwendung aufbewahrt (maximal 3 Tage).

PASA: Für 200 μ l Zell- oder Medienextrakt:

- 12 mg Protein A-Sepharose
- 240 μ l zweifach-konzentrierter PTO-Puffer
- 220 μ l A.bi.
- 20 μ l Anti-Kathepsin B-Immunglobuline

Die Kopplung der Immunglobuline an das Protein A-Sepharosegel und das Waschen des Immunkomplexes erfolgte wie beim PASKo-Komplex.

3.3.3. Durchführung der Immunpräzipitation:

Die 200 μ l Zell- und Medienextrakte wurden 5 min auf 95°C im Thermoblock erhitzt, im Eisbad abgekühlt und mit 5 μ l 1,04 M Jodacetamid (Endkonzentration 26 mM) versetzt, um die Thiolgruppen von Cysteinproteinasen zu blockieren. Die Extrakte wurden mit Verdünnungspuffer 1:10 verdünnt. Bei den meisten Versuchen wurde nur eine Hälfte davon für die Immunpräzipitation verwendet und die zweite für etwaige

Folgeversuche bei -20°C aufbewahrt.

In Fällen, bei denen eine sehr geringe Menge an markiertem Kathepsin B zu erwarten war, wurde mitunter der gesamte Extrakt verwendet.

Die verdünnten Extrakte wurden 10 min bei 15000 g zur Abtrennung störender Zellfragmente zentrifugiert und der Überstand auf PASKo überführt.

Zur Vorreinigung wurden die Zell- und Medienextrakte 3 Stunden bei 4°C mit PASKo rotiert, das Gel bei 15000 g 3 min abzentrifugiert, der Überstand auf ein frisches PASKo-Gel überführt und nochmals 3 Stunden rotiert.

Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand zur eigentlichen Immunpräzipitation von Kathepsin B auf PASA überführt und über Nacht rotiert.

Danach wurde das PASA-Gel bei 15000 g 3 min abzentrifugiert, der Überstand bei -20°C aufbewahrt und das Pellet mit folgenden Waschpuffern gründlich gereinigt:

- 3 x 1 ml Verdünnungspuffer (ohne BSA)
- 2 x 1 ml 50 mM Tris/HCl (pH 8,3); 1,5 M NaCl
- 2 x 1 ml 10 mM Tris/HCl (pH 6,8)

Dazwischen wurde jeweils 2 min bei 15000 g zentrifugiert.

Wenn nach der Immunpräzipitation eine SDS-PAGE durchgeführt werden sollte, wurden die Pellets mit 70 µl 1,25-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt und 6 min auf 95°C erhitzt, um das Kathepsin B vom Protein A-Sepharosekomplex abzulösen und unter reduzierenden Bedingungen zu denaturieren.

Nach einer Zentrifugation von 3 min bei 15000 g wurden die Überstände abgehoben, 5 µl zur Auswertung im Szintillationszähler und der Rest für die SDS-PAGE verwendet. Für eine isoelektrische Fokussierung wurde das Kathepsin B mit 70 µl 1% SDS/ 0,1 M Mercaptoethanol abgelöst (6 min bei 95°C), der Zentrifugationsüberstand im Speed-Vac-Konzentrator eingengt, zweimal mit je 1 ml Methanol und einmal mit 1 ml Aceton gewaschen und in ca. 15 µl IEF-Probenpuffer aufgenommen.

3.4. ELEKTROPHORETISCHE METHODEN:

3.4.1. SDS-PAGE

(Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese):

(nach Laemmli, 1970; modifiziert nach Hasilik & Neufeld, 1980)

3.4.1.1. Lösungen:

- SDS-Probenpuffer: 10% (w/v) Glyzerin, 1% (w/v) SDS, 10 mM DTE
in 0,125 M Tris/HCl (pH 6,8)
- Anodenpuffer: 0,05 M Tris
0,4 M Glycin
- Kathodenpuffer: wie Anodenpuffer, jedoch mit 1% (w/v) SDS
und Bromphenolblau als Indikator.
- Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
- Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl (pH 6,8)
- 30% (w/v) Acrylamid in A.bi.
- 1% (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid (Bis)

3.4.1.2. Elektrophoresegele:

Trenngel: 12,5% (14%) Acrylamid
0,13% (0,144%) Bisacrylamid
0,375 M Tris/HCl (pH 8,8)
0,1% SDS

Die Reagenzien wurden im Wasserstrahlvakuum entgast; dann wurden TEMED und Ammoniumpersulfat auf eine Endkonzentration von 0,06% zugegeben, das Gel in 1,5 mm Dicke gegossen und mit Isopropanol für die Dauer der Polymerisation (30 min) überschichtet.

Sammelgel: 5,7% Acrylamid
0,13% Bisacrylamid
(Vernetzungsgrad: 2,23%)
0,125 M Tris/HCl (pH 6,8)
0,1% SDS

Die Reagenzien wurden ebenfalls entgast, mit TEMED und Ammoniumpersulfat versetzt und auf das Trenngel gegossen. Der Probenkamm wurde gleich darauf ins Sammelgel eingeschoben und dieses 30 min polymerisiert. Die Wanderungsstrecke der Proben im Sammelgel betrug 8 - 10 mm.

3.4.1.3. Durchführung der SDS-PAGE:

Als Elektrophoreseapparatur wurde eine "Dual Vertical Slab Gel Electrophoresis Cell" (Protean 16 cm, Firma Biorad) verwendet. Der Anodenpuffer wurde auf 8°C gekühlt.

Die in SDS-Probenpuffer gelösten, reduzierten Proben (65µl) wurden in die Probenaschen pipettiert und vorsichtig mit Kathodenpuffer überschichtet.

Auf beiden Seiten der Proben wurden folgende ¹⁴C-markierte Standardproteine aufgetragen:

Myosin	200	kDa
Phosphorylase b	92,5	
BSA	69	
Ovalbumin	46	
Carboanhydratase ...	30	
Lysozym	14,3	

Nach Zusammensetzen der Elektrophoresekammer wurden die Proteine bei 25 mA gesammelt und anschließend bei 30 mA aufgetrennt (Biorad Power Supply, Model 500/200).

3.4.2. Isoelektrische Fokussierung: (Ballaun, 1989)

Nach Ablösung der Proben vom Protein A-Sepharosekomplex und Entsalzung (wie unter 3.3.3. beschrieben) wurden sie in 15 µl IEF-Probenpuffer (8 M Harnstoff, 10 mM DTE, 2% Ampholine) aufgenommen.

Gel (0,3 mm): 6,31 g Harnstoff (Endkonzentration: 8 M)

3,64 ml 30% (w/v) Acrylamid (7,28%)
3,38 ml 1% (w/v) Bisacrylamid (0,225%)
0,375 ml Ampholine pH 3-10 (2,5%; Biorad)
0,375 ml Ampholine pH 4-6,5 (2,5%)
A.bi. ad 15 ml

Die Reagenzien wurden gemischt, unter Wasserstrahlvakuum entgast und mit 45 μ l 10% Ammoniumpersulfat (0,03%) und 5 μ l TEMED (0,03%) versetzt. Dann wurde das Gel unter Verwendung einer Scha-blone (0,3 mm) auf die hydrophile Seite eines Gelbond-Filmes (1850-211, LKB) gegossen, eine silanisierte Glasplatte luft-blasenfrei darübergeschoben und das Gel 2 Stunden polymerisiert. Die Elektrophoreseapparatur (2117 Multiphor II Electrophoresis Unit, LKB) wurde auf 15°C gekühlt. Als Anodenpuffer wurde 0,1 M H₃PO₄, als Kathodenpuffer 0,1 M NaOH verwendet.

Zwei Elektrodenstreifen aus Filterpapier wurden in den entsprechenden Puffern getränkt und auf das vorbereitete Gel exakt parallel aufgelegt.

Am Netzgerät (2197 Power Supply, LKB) wurde eine konstante Leistung von 8 Watt eingestellt und 2500 V, bzw. 25 mA als Maximalwerte.

Nach einer Vorfokussierung von 30 min wurden die Proben mittels Schablone aufgetragen und bei 15°C mit 8 Watt aufgetrennt. Nach ca. 30 min wurde die Schablone wieder entfernt und der Lauf bis zur Stromkonstanz fortgesetzt (insgesamt ca. 2 Stunden).

Der pH-Gradient wurde durch Extraktion von 1 cm²-großen Gelstücken in 20 mM KCl und Messung des pH-Werts bestimmt und durch die Wanderungsstrecke von Standardproteinen überprüft.

3.5. FLUOROGRAPHIE:

Zum Nachweis der radioaktiv markierten Proteine nach einer SDS-PAGE wurde eine Fluorographie nach Bronner & Laskey (1974) durchgeführt. Dabei wurden die Gele (1,5 mm) dreimal 20 min in je 300 ml DMSO entwässert, 150 min in 20% (w/v) PPO in DMSO äquilibriert und 30 min unter fließendem Wasser gewaschen.

Dann wurden sie etwa 2,5 Stunden zwischen 2 Cellophanfolien bei ca. 65°C unter Vakuum getrocknet (Slab Gel Dryer ME 1160, Hoefer). Zur Detektion der radioaktiven Probenbanden wurden vorbelichtete Röntgenfilme (X-O-MAT AR5, Kodak) verwendet. Die Gele wurden dabei zwischen je zwei Filme gelegt und für die gewünschte Zeit bei -70°C exponiert.

Danach wurden die Filme mit den entsprechenden Lösungen (Dental X-Ray, Kodak) laut Firmenvorschrift entwickelt und fixiert.

Zum Nachweis der markierten Proteine nach einer isoelektrischen Fokussierung wurde das Gel (0,3 mm) samt Gelbond-Film ohne vorherige Entwässerung 30 min in Szintillatorflüssigkeit (Amplify, Amersham) imprägniert, luftgetrocknet und ebenfalls mit vorbelichtetem Röntgenfilm bei -70°C exponiert.

Falls die Proteinmengen der einzelnen Probenbanden in ihrer Relation untereinander verglichen werden sollten, wurden die entwickelten Filme mit einem Laser-Densitometer (Ultroscan XL, LKB) ausgewertet.

Dabei wurde die Extinktion der Filmschwärzung entlang der Elektrophoresebahn gemessen, und die relative Peakfläche der einzelnen Banden ermittelt.

3.6. SUBZELLULÄRE FRAKTIONIERUNG:

3.6.1. Vorbereitung der Dichtegradienten-Zentrifugation:

Als Medium für die Dichtegradienten-Zentrifugation wurde eine isotone Percoll-Lösung eingesetzt, die aus folgenden Lösungen bereitet wurde: (für 10 ml)

Ausgangsdichte (g/ml):	1,055	1,065	1,075
Percoll-Stammlösung (d=1,13)	1,8 ml	2,57 ml	3,34 ml
2,5 M Saccharose (d=1,316)	1 ml	1 ml	1 ml
A.bi.	7,2 ml	6,43 ml	5,66 ml

Berechnungsformel:

$$x = V (D - 1,0316)/(d - 1)$$

x ... ml Percoll-Stammlösung (Pharmacia, Dichte d = 1,13)

V ... gewünschtes Endvolumen (ml)

D ... gewünschte Ausgangsdichte für die Zentrifugation

Das Zentrifugationsfluid wurde in 15 ml - Zentrifugationsröhrchen (1 x 1,5 in. Quick Seal Tubes, Beckman) abgefüllt.

3.6.2. Präparation des Zellhomogenats:

Als Ausgangsmaterial für die subzelluläre Fraktionierung wurden konfluente Fibroblastenkulturen aus 80 cm²- Zellkulturflaschen verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS (pH 7,4) und einmal mit 0,25 M Saccharose/1 mM EDTA-Lösung gewaschen. Anschließend wurde der Zellrasen abgeschabt und in 700 µl kalter 0,25 M Saccharose/3 mM Imidazol-Lösung suspendiert. Die Zellsuspension wurde im Eisbad durch 10 - 12 Stöße homogenisiert (tight-fitting Dounce-Homogenisator). Kerne und nicht aufgebrochene Zellen wurden durch Zentrifugation bei 400 g für 5 min entfernt (Gieselmann et al., 1983). Der Überstand wurde vorsichtig auf die vorbereitete Percoll-Lösung überschichtet, das Röhrchen exakt austariert und nach Firmenvorschrift zugeschmolzen.

3.6.3. Dichtegradienten-Zentrifugation:

Die Zentrifugation wurde mit einem Vetrikalrotor (VAC 50, Beckman) in einer Ultrazentrifuge (L8-80M, Beckman) mit 20000 rpm bei 4°C im ²t-Modus durchgeführt, wobei als Zentrifugationsziel 1,38 x 10¹⁰ rad²/s eingestellt wurden.

Zur Minimierung von Perturbationen des Gradienten wurde die niedrigste Bremsstufe (Deceleration Step 9) gewählt, bei der der Rotor von 500 rpm in 6 min bis zum Stillstand abgebremst wird. Dadurch ergaben sich insgesamt 1,41 x 10¹⁰ rad²/s.

Zur Fraktionierung des Gradienten wurden die Röhrchen an der Spitze aufgeschnitten, und die Percoll-Lösung mit der Kapillare

einer Pasteurpipette vom Boden aus mit Hilfe einer Peristaltikpumpe abgesaugt und in Kunststoffhütchen getropft.

Die Dichte der einzelnen Fraktionen wurde durch Wägung von 300 μl in einer Konstriktionspipette und Vergleich mit dem Wasserwert bestimmt. Nach der Ermittlung des Dichtegradienten wurde Triton X-100 (10%, Endkonzentration 0,2%) zugegeben, um die Membranen der Zellorganellen aufzubrechen.

Zur Lokalisierung der Organellen wurden die Aktivitäten verschiedener Leitenzyme gemessen.

3.7. ENZYMAKTIVITÄTSBESTIMMUNGEN:

3.7.1. Aktivität der β -N-Acetylhexosaminidase:

Die Messung der Aktivität dieses Enzyms diente zur Lokalisierung der Lysosomenfraktion (von Figura, 1977).

Lösungen:

- Inkubationspuffer: 0,1 M Na-Citrat, pH 4,6; 0,04 % NaN_3 ,
0,2 % BSA
- Substrat-Puffergemisch: 10 mM p-Nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid (Sigma) in Inkubationspuffer.
- Stoppreagens: 0,4 M Glycin/NaOH, pH 10,4

Von jeder Fraktion wurden je 30 μl mit 70 μl NaCl-Lösung (0,9%) verdünnt, mit 100 μl Substrat-Puffergemisch versetzt und 60 min bei 37°C inkubiert. Der Abbau wurde mit je 1 ml Stoppreagens beendet und die Extinktion bei 405 nm gegen einen Reagenzienleerwert gemessen. Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach Subtraktion des Substrat- und des Enzymleerwertes mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes:

$$\text{mU/ml} = (E \cdot V \cdot 1000) / (\epsilon \cdot d \cdot v \cdot t)$$

V ... Gesamtvolumen (1,2 ml); ϵ ... 18,1
(Extinktionskoeff.)

v ... Volumen der Enzymlösung (0,03 ml)

t ... Inkubationszeit in min; d ... Küvettendicke in cm

3.7.2. Aktivitätsbestimmung von Kathepsin B:

(Barrett & Kirschke, 1981)

Lösungen:

1. EDTA-Phosphatpuffer: 88 mM KH_2PO_4 , 12 mM Na_2HPO_4 ,
1,33 mM Na_2 -EDTA, pH 6,0
2. Aktivatorlösung: 2,7 mM Cystein in EDTA-Phosphatpuffer
3. Substratlösung: 20 mM Cbz-Arg-Arg-NNap in A.bi. (von Dr. Kosma zur Verfügung gestellt).
4. Farbreagens-Stammlösung: 225 mg 4-Amino-2,3-dimethylazobenzol (Fast Garnet Base) in 50 ml Ethanol wurden unter Rühren mit 30 ml 1 M HCl versetzt und mit A.bi. auf 100 ml aufgefüllt.
5. Mersalyl-Brij-Reagens: 2,43 g Mersalylsäure (2-(3-Hydroxymercuri-)-2-Methoxypropyl)-Carbamoylphenoxyessigsäure) wurden unter Rühren in 60 ml 0,5 M NaOH gelöst. Nach Zugabe von 0,3 g EDTA wurde mit A.bi. auf 450 ml aufgefüllt, mit 1 M HCl auf pH 4,0 eingestellt und mit A.bi. auf 500 ml ergänzt. Diese Lösung wurde mit 500 ml 4% Brij-35 (Sigma) gemischt.
6. Farbreagens: 0,1 ml Farbreagens-Stammlösung wurden in Eis gekühlt, mit 10 μl frischer 0,2 M NaNO_2 -Lösung gemischt und nach frühestens 5 min mit Mersalyl-Brij-Reagens auf 10 ml aufgefüllt. (Alle Gebrauchslösungen wurden in Eis gekühlt.)

Durchführung:

75 μl Enzymlösung (eventuell mit EDTA-Phosphatpuffer mit 4 mg/ml BSA verdünnt) wurden 5 min mit 225 μl Aktivatorlösung bei 40°C aktiviert und nach Zugabe von 7,5 μl Substrat 60 min bei 40°C weiterinkubiert.

Die Reaktion wurde mit 300 μl Farbreagens abgestoppt und die Extinktion bei 520 nm frühestens nach 10 min gemessen.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach Abzug des Enzymleerwertes mit dem Extinktionskoeffizient von α -Naphthylamin ($27 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$).

3.7.3. Aktivitätsbestimmung der Galaktosyltransferase:

Die Messung der Aktivität dieses Enzyms wurde zur Lokalisierung des Golgi-Apparates nach der subzellulären Fraktionierung verwendet.

Lösungen:

1. Ovalbumin-Pufferlösung: 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4;
0,04 M MnCl₂, 1% Triton X-100,
4 mM ATP, 14 mg/ml Ovalbumin
2. UDP-³H-Galaktoselösung: 220 000 dpm/5 µl
in 2 mM Tris/HCl, pH 7,4
3. 12,5% (w/v) Trichloressigsäure

Durchführung:

25 µl Ovalbumin-Pufferlösung wurden mit 20 µl Enzymlösung (eventuell mit 0,05 M Tris/HCl, pH 7,4 verdünnt) und 5 µl UDP-³H-Galaktoselösung durch kurze Zentrifugation vereinigt und 60 min bei 37°C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eiskalter Trichloressigsäure (12,5%) abgestoppt und die Reaktionsgefäße 10 min im Eis gekühlt. (Bei den Leewerten wurde die Ovalbumin-Pufferlösung erst nach dem Reaktionsstop zugegeben.)

Der Niederschlag wurde 5 min bei etwa 15000 g abzentrifugiert und dreimal gründlich mit kalter Trichloressigsäure (5%) gewaschen.

Das Präzipitat wurde in 50 µl 10% NaOH 10 min im Ultraschallbad gelockert und anschließend 5 - 10 min bei 95°C gelöst.

Die Lösung wurde in ein Szintillationsröhrchen überführt, das Reaktionsgefäß mit 450 µl A.bi. gespült und das Waschwasser mit der Proteinlösung vereinigt. Danach wurden 4 ml Szintillationscocktail (Ready-Solve, Beckman) zugegeben.

Für den 100%-Wert wurden 5 µl UDP-³H-Galaktoselösung mit 50 µl 10% NaOH, 450 µl A.bi. und 4 ml Szintillationscocktail gemischt.

Die Messung erfolgte in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard CA 1900) mit einem Tritium-dpm-Zählprogramm.

3.8. ENZYMATISCHE METHODEN:

3.8.1. Abbau mit Peptid:N-Glykosidase F (PNGase F):

Kathepsin B - Formen, deren N-Glykan-Anteil vor der Elektrophorese (SDS-PAGE oder IEF) abgespalten werden sollte, wurden nach der Immunpräzipitation (3.3.) mit je 70 μ l 1% SDS/0,1 M Mercaptoethanol durch Inkubation bei 95°C für 5 min vom Protein A-Sepharose-Immunkomplex abgelöst.

Nach einer Zentrifugation (15000 g, 3 min) wurde der Überstand abgehoben und anschließend in einem Speed-Vac-Konzentrator eingeeengt.

Der Rückstand wurde einmal mit 1 ml Methanol und nach einer Zentrifugation bei 15000 g für 10 min einmal mit 1 ml Aceton gewaschen.

Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der Überstand abgehoben und das Proteinpräzipitat luftgetrocknet. Danach wurde es in etwa 20 μ l 0,5% SDS/0,05 M Mercaptoethanol 5 min bei 95°C gelöst.

Die Hälfte dieser Proteinlösung wurde als Negativkontrolle des PNGase-Abbaus eingefroren und vor der SDS-PAGE mit einfachem SDS-Probenpuffer auf 65 μ l aufgefüllt.

Für den Enzymansatz wurden folgende Lösungen gemischt und bei 30°C inkubiert:

- 10 μ l Probe
- 10 μ l Puffer (0,3 M Na-Phosphat/15 mM EDTA, pH 7,2)
- 5 μ l Nonidet P-40 (7,5%)
- 2,5 μ l PNGase F (Boehringer, 1 Einheit/5 μ l)

Nach einer Inkubation über Nacht wurden nochmals:

- 2,5 μ l PNGase F zugegeben und weitere 3 Stunden inkubiert.

Danach wurden die Lösungen im Speed-Vac-Konzentrator eingeeengt, einmal mit 1 ml Methanol und einmal mit 1 ml Aceton gewaschen (für eine IEF wurde ein zusätzlicher Waschschrift mit Methanol durchgeführt).

Nach dem Trocknen der Proben wurden sie in einfachem SDS-Probenpuffer (3 min bei 95°C) oder in IEF-Probenpuffer gelöst.

3.9. PROTEINBESTIMMUNGEN:

3.9.1. Proteinbestimmung nach Lowry:

Lösungen: - alkalische Kupfersulfatlösung: zu 100 Volumsteilen einer 3% (w/v) Na₂CO₃-Lösung wurde zuerst ein Teil einer 4% (w/v) Kaliumnatriumtartratlösung und

dann

ein Teil einer 2% (w/v) Kupfersulfatlösung zugemischt (die Lösung muß klar sein).

- Folinreagens (nach Folin-Ciocalteus, 1:3 verdünnt)

Durchführung:

200 µl Proteinlösung (20 - 80 µg Protein/ml) wurden mit 1 ml alkalischer Kupfersulfatlösung versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur wurden 100 µl Folinreagens zugegeben und sofort gemischt. Nach weiteren 10 min wurde die Extinktion bei 660 nm gegen einen Reagenzienleerwert gemessen und mit einer aus BSA-Standards (10-100 µg/ml) ermittelten Eichkurve ausgewertet.

3.9.2. Bestimmung von radioaktiv markiertem Protein:

Zum Vergleich des Einbaus von ³⁵S-Methionin bei verschiedenen Proben wurden die Proteine mit Trichloressigsäure gefällt:

10 µl Zell- oder Medienextrakt (bzw. 10 µl Markierungsmedium als Leerwert) wurden mit 500 µl kalter Trichloressigsäure (10%) versetzt und mindestens 30 min im Eisbad gekühlt.

Die gefällten Proteine wurden 10 min bei 15000 g abzentrifugiert und das Präzipitat zweimal mit je 1 ml Trichloressigsäure (5%), sowie einmal mit 1 ml Aceton gewaschen. Die Proteine wurden etwa 5 min bei 95°C in 50 µl NaOH (10%) gelöst und die Lösung in ein Szintillationsvial überführt. Das Reaktionsgefäß wurde mit 450 µl A.bi.

nachgespült und die Waschlösung mit der Proteinlösung vereinigt. Nach Zugabe von 4 ml Szintillatorflüssigkeit (Ready Solve, Beckman) wurde die Radioaktivität in einem Szintillations-zähler (Packard CA 1900) gemessen.

3.10. BESTIMMUNG VON SIALINSÄURE:

3.10.1. Sialinsäurebestimmung aus Zellen oder Zellextrakten:

Vorbereitung:

Die Zellen wurden durch Trypsinisierung abgeerntet, in HANKS suspendiert und 3 min bei 400 g abzentrifugiert. Zum Waschen wurden sie je dreimal mit HANKS suspendiert und wieder zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und das Pellet in 500 μ l HANKS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen durch 14 Stöße mit dem "tight-fitting"-Dounce Homogenisator aufgebrochen; die Kerne wurden durch Zentrifugation bei 400 g für 5 min abgetrennt. Der Überstand wurde abgehoben und mit 10% (w/v) Triton X-100 auf eine Endkonzentration von 0,2% eingestellt.

Von dieser Probe wurden zweimal 190 μ l für eine Doppelbestimmung des Sialinsäuregehaltes entnommen.

In einigen Fällen wurde auch ein nach 3.2. hergestellter Zell-extrakt in entsprechender Verdünnung für die Analyse verwendet. Als Standard wurde reine N-Acetylneuraminsäure in einer Konzentration von 1 - 50 μ g/ml eingesetzt.

Durchführung:

190 μ l Probe wurden mit 10 μ l 1 M H_2SO_4 (0,05 M Endkonzentration) angesäuert.

Falls nicht nur die freie Sialinsäure bestimmt werden sollte, wurden die Proben zur Hydrolyse der gebundenen Form 60 min im Thermoblock auf 80°C erhitzt und anschließend wieder gekühlt.

Dann wurden die Proben mit 50 μ l 25 mM HJO_4 in 62,5 mM Schwefelsäure 30 min bei 37°C oxidiert.

Zum Abstoppen der Oxidation wurden 50 μ l frische $NaAsO_2$ -Lösung (2%) in 0,5 M HCl zugemischt.

Nach dem Verschwinden der Gelbfärbung wurden 100 μl Thiobarbituratlösung (6%, pH 9) zugegeben und das Chromophor 8 min bei 95°C im Thermoblock entwickelt.

Nach dem Abkühlen wurde zur Intensivierung des Farbstoffs Dimethylsulfoxid (400 μl) zugesetzt, die Proben im Fall einer Trübung 7 min bei 15000 g zentrifugiert, und die Extinktion bei 552 nm gemessen. Die Sialinsäure wurde mit Hilfe der aus den Standards ermittelten Eichkurve bestimmt.

Bei einer höheren Kontamination mit DNA wurde die Messung auch bei 532 nm und bei 549 nm durchgeführt, und der Sialinsäuregehalt mit einer Korrekturformel (nach Warren, 1959) errechnet:

$$\mu\text{mol N-Acetylneuraminsäure} = 0,09 \text{ Ext}_{549} - 0,033 \text{ Ext}_{532}$$

(der erhaltene Wert wurde mit der Eichkurve verglichen).

3.10.2. Sialinsäurebestimmung von subzellulären Fraktionen:

Da das bei der subzellulären Fraktionierung durch Dichtegradientenzentrifugation eingesetzte Percoll mit der normalen Sialinsäurebestimmung interferiert, mußte in solchen Fällen die Sialinsäure von den Fraktionen abgetrennt werden.

Dies wurde mit einem Ionenaustauscher (Dowex 1X8, 200-400 mesh) erreicht.

Dazu wurde das Ionenaustauscherharz von der Cl^- in die Acetatform überführt (durch wiederholtes Suspendieren in 1 M Na-Acetat) bis kein Chlorid mehr nachzuweisen war, in eine etwa 1 x 6 cm - Säule gegossen und anschließend gespült bis der pH-Wert annähernd neutral war.

Die Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation wurden entsprechend zusammengefaßt, auf die Austauschersäule aufgetragen und mit A.bi. gewaschen. Die Sialinsäure wurde mit 18 ml Essigsäure (10%) eluiert, die ersten 5 ml verworfen und die folgenden 13 ml gesammelt. Die Eluate wurden mit einem Rotavapor bis zur Trockene eingengt und in je 0,6 ml A.bi. aufgenommen.

Die Sialinsäurebestimmung wurde dann wie unter 3.10.1. beschrieben durchgeführt.

Die erhaltenen Werte wurden auf mg Protein bezogen, um die einzelnen Proben untereinander vergleichen zu können.

3.11. IMMUNFLUORESZENZ-MIKROSKOPIE:

3.11.1. Vorbereitung und Fixierung der Zellen:

Die Zellen wurden ein oder zwei Tage vor der Fixierung trypsinisiert, von der Zellkulturflasche abgeerntet und auf sterilen Deckgläschen in Petrischalen angezüchtet.

Methanol-Aceton-Fixierung:

Die Deckgläschen mit den Zellen wurden mehrmals mit PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Die Fixierung erfolgte durch Inkubation der Deckgläser in Methanol (auf -20°C vorgekühlt) für 5 min (im Eisbad) und Überführen in -20°C-kalte Acetonlösung für 2 min.

Danach wurden die Zellen sofort mit PBS (4°C) mehrmals gespült (und eventuell bei 4°C gelagert).

3.11.2. Antikörper - Markierung:

1. Block: Inkubation der fixierten Zellen in 1% BSA oder 1% Serum, bei Raumtemperatur für 30 min.
2. Waschen in PBS: mindestens 5 min.
3. Inkubation mit dem 1. Antikörper: auf jedes Deckglas wurden 30 µl einer affinitätsgereinigten Anti-Kathepsin B - Antikörper - Lösung aus Kaninchen (Charge FR., ELISA-Titer: 1:500, 1:5 verdünnt) aufgetragen.
Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 min.
Als Kontrolle wurde statt dem 1. Antikörper ein Präimmunserum aufgetragen.
4. Waschen: dreimal 20 min mit PBS bei Raumtemperatur
5. Inkubation mit dem 2. Antikörper: Fluorescein-

Isothiocyanat- (FITC-) markierter Schwein-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:20 verdünnte Stammlösung von G. Seiffert). Die Deckgläser wurden ebenfalls 30 min bei 37°C mit 30 μ l der Antikörperlösung inkubiert.

6. Waschen: dreimal 20 min mit PBS bei Raumtemperatur
einige Male mit A.bi.
7. Lufttrocknen
8. Die Deckgläser wurden mit 7 μ l Glycerin/PBS (9:1, pH 8) oder 7 μ l Moviol benetzt und auf Objektträger fixiert.

3.11.3. Mikroskopie und photographische Dokumentation:

Die Mikroskopie wurde mit einem ZEISS Axiovert 35 - Gerät durch-geführt. Die Proben wurden dabei entweder im Durchlicht (Phasen-kontrast 2) oder unter Fluoreszenzauflicht (Filterkombination: 450-490 / FT 510 / LP 520) mit einer 400-fachen oder 1000-fachen Vergrößerung mikroskopiert.

Die Photos wurden mit einer CONTAX 167 MT - Kamera aufgenommen, wobei ein hochempfindlicher Film (Ilford, HP 5, 400 ASA) verwendet wurde.

Die Kamera wurde auf flächenbetonte Belichtungsmessung eingestellt, bei der Photographie der Zellen im Phasenkontrast wurde um eine Einheit unterbelichtet (Av -1), bei Aufnahmen unter Fluoreszenzauflicht wurde entweder die Belichtungskorrektur um eine Einheit erhöht (Av +1) oder mit manuellem Belichtungsmodus ca. doppelt so lange als von der Kamera angegeben belichtet.

Der Film wurde mit einer Ilford Microphen-Stammlösung etwa 8 - 11 min entwickelt und die Filmempfindlichkeit damit auf 800 bis 1600 ASA erhöht. Die Fixierung erfolgte wie von der Erzeugungsfirma angegeben.

4. ERGEBNISSE:

4.1.1. Molekulargewichtsformen von Kathepsin B in SASD-Fibroblasten:

Die verschiedenen Molekulargewichtsformen von Kathepsin B wurden durch metabolische Markierung der Fibroblasten mit ³⁵S-Methionin, Immunpräzipitation und SDS-PAGE mit anschließender Fluorographie ermittelt (Abb. 4.1.).

Bei Bedingungen, die dazu geeignet waren das Enzym auch in seiner terminalen Prozessierungsform zu erfassen (6 h Pulse, 20 - 40 h Chase), konnte man im Medium eine sezernierte Proform von 44 - 46 kDa finden und in den Zellen zwei proteolytisch prozessierte reife Formen. Die größere hatte ein apparentes Molekulargewicht von 33 - 34 kDa, die kleinere Form erschien bei den Kontroll-zellen mit 27 kDa, bei den SASD-Fibroblasten mit 28 kDa.

Dieser Molekulargewichtsunterschied war eindeutig reproduzierbar.

Zum Teil konnten auch leichte Unterschiede bei der 33 kDa-Form detektiert werden, wobei die größere Form wiederum bei den SASD-Zellen beobachtet wurde. Auch bei der Proform, die ins Medium geschleust wird, waren manchmal geringe Molekulargewichts-differenzen zu erkennen, die Abweichungen waren jedoch nicht signifikant und traten auch nur bei einigen Versuchen auf.

Abb. 4.1. Molekulargewichtsformen von Kathepsin B: Die Zellen wurden 6 h mit 20 μ Ci/ml 35 S-Methionin markiert; Chase: 20 h (a), bzw. 40 h (b).
SASD-Zellen: GM 5520 (ISSD), GM 8496 (Salla)
Kontrollzellen: Co 1 (GM 5521), Co 2 (GM 5522)

4.1.2. Molekulargewichtsformen von Kathepsin B nach Abbau mit Peptid:N-Glykanase F:

Um zu überprüfen, ob Molekulargewichtsunterschiede zwischen verschiedenen Kathepsin B - Formen von SASD- und Kontrollzelllinien auf den Protein-Anteil zurückzuführen sind, wurden die N-Glykan-Seitenketten der Proteine nach der Immunpräzipitation durch eine Inkubation mit Peptid:N-Glykanase F abgespalten. Das Molekulargewicht der Proform von Kathepsin B, die ins Medium ausgeschleust wird, bzw. der Form, die bei Kultivierung in Gegenwart von CCCP zwischen ER und Golgi-Apparat intrazellulär akkumuliert, wurde dadurch auf 39 kDa reduziert. Leichte Molekulargewichtsdifferenzen wurden dabei eindeutig eliminiert; sie sind also bei der Proform nur durch die Heterogenität des Kohlenhydratanteils bestimmt (siehe Abb. 4.2.).

Abb. 4.2.:

Glykosylierte und unglykosylierte Proformen von Kathepsin B:

Die Zellen wurden 1 h mit 40 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -Methionin markiert.

Vorinkubation (1 h), Pulse und Chase (2 h) erfolgten in Gegenwart (oberer Bildteil) oder Abwesenheit (unterer Bildteil) von 50 μM CCCP. Die Kathepsin B-Proformen wurden aus den Zell- bzw. Medium-extrakten immunpräzipitiert, 16 h in Gegenwart oder Abwesenheit von PNGase F bei 30°C inkubiert und durch SDS-PAGE (12,5% Poly-acrylamid) getrennt.

ISSD-Zelllinien: GM 5520, B.B.; Salla-Zelllinien: GM 8496, F 8471

Kontrollzellen: GM 5521, GM 5522

Die 33 kDa-Form von Kathepsin B scheint nur wenig glykosyliert zu sein. Eine Inkubation mit PNGase F veränderte das elektro-

phoretisch ermittelte Molekulargewicht nicht merklich, und es waren auch keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien vorhanden.

Bei der kleineren reifen Kathepsin B - Form verringerte sich das Molekulargewicht durch den PNGase F - Abbau jedoch um ca. 1 kDa. Die Differenz zwischen SASD- und Kontrollzellen blieb dabei aufrecht; die 27 kDa-Form der Normalzellen wurde auf 26 kDa reduziert, die 28 kDa-Form der SASD-Zellen auf etwa 27 kDa.

Der Unterschied in der terminalen Prozessierungsform liegt also (zumindest zum Teil) auf der Protein-Ebene.

Ein Problem war jedoch, daß diese Formen nur in sehr geringem Ausmaß gebildet wurden und die Molekulargewichtsunterschiede relativ gering sind (Abb. 4.3.).

Abb. 4.3.:

Reife Formen von Kathepsin B nach PNGase F - Abbau:

Markierung: 7 h Pulse mit 20 μ Ci/ml 35 S-Methionin; Chase: 48 h

Nach der Immunpräzipitation wurden die Proteine 16 h mit PNGase F (+) oder nur mit Puffer (-) bei 30°C inkubiert, durch SDS-PAGE (14% T) aufgetrennt und mittels Fluorographie detektiert.

Kontrollen: Co 1 (GM 5521) und Co 2 (GM 5522)

ISSD: Zelllinie GM 5520; Salla: GM 8496

4.2. Biosynthese von Kathepsin B:

Um den Prozessierungsverlauf und die verschiedenen Molekulargewichtsformen von Kathepsin B den einzelnen subzellulären Bereichen zuordnen zu können, wurden einige metabolische Markierungsversuche unter Bedingungen durchgeführt, die die Prozessierung oder den intrazellulären Transport an bestimmten Stellen hemmen.

Der Biosyntheseweg von Kathepsin B läuft ebenso wie bei anderen löslichen lysosomalen Enzymen vom ER über ein intermediäres Kompartiment zum Golgi-Apparat, wo es von den sekretorischen Proteinen abgetrennt wird. Ein geringer Anteil (bei

Fibroblasten etwa 5%) wird jedoch als Proform ebenfalls vom trans-Golgi aus ins Medium ausgeschleust. Der Großteil gelangt vom TGN über Clathrin-umhüllte Vesikel in ein prälysosomales Kompartiment und von dort zu den Lysosomen. Zwischen diesen verschiedenen intra-zellulären Ebenen gibt es mehrere Stellen, an denen der Transport durch verschiedene physikalische Parameter oder chemische Verbindungen blockiert werden kann.

4.2.1. Proform von Kathepsin B nach Kurzzeitmarkierung:

Zur Erfassung der Proform, wie sie unmittelbar nach der Translation im endoplasmatischen Retikulum vorkommt, wurde die Markierung bei einer höheren ^{35}S -Methionin-Konzentration (130 $\mu\text{Ci/ml}$) für exakt 10 Minuten durchgeführt, wobei das Markierungsmedium jeweils von einer Zellkulturflasche auf die nächste übertragen wurde.

Die Zellen wurden sofort nach der Markierung mit eiskaltem PBS zweimal gewaschen, um die intrazellulären Prozessierungsvorgänge so rasch wie möglich zu inhibieren, und gleich darauf abgeerntet. Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Fluorographie erfolgten nach den bereits beschriebenen Arbeitsvorschriften.

Nach dieser Kurzzeitmarkierung wurde ein apparentes Molekulargewicht von 44 kDa ermittelt, und es traten keine Unterschiede zwischen SASD- und Kontrollfibroblasten auf (siehe Abb. 4.4.).

Abb. 4.4.: Kathepsin B-Proformen nach Kurzzeitmarkierung:
Pulse: 10 min mit 130 μ Ci/ml 35 S-Methionin.
Kontrollzellen: GM 5521, GM 5522 und Control (Kl.)
ISSD-Zellen: GM 5520 und B.B.
Salla-Zellen: GM 8496 und F 8471

4.2.2. Proform von Kathepsin B zwischen ER und Golgi:

Wie unter 1.3.2. aufgezeigt wurde, blockiert die Verbindung CCCP durch seine Wirkung als Protonophor den intrazellulären Trans-*port* nach dem ER, zwischen dem von Pelham (1989 b) beschriebenen intermediären Kompartiment und dem Golgi-Apparat. Es sollte da-durch eine Proform akkumulieren, die bereits phosphoryliert ist und als Phosphorsäure-Diester auftritt.

Unter diesen Bedingungen trat Kathepsin B mit einem Molekulargewicht von 44 - 46 kDa auf, wobei manchmal Heterogenitäten zwischen den unterschiedlichen Zelllinien beobachtet wurden. Diese Unterschiede verschwanden aber nach einem Abbau des Kohlenhydratanteils durch PNGase F (Abb. 4.2.; Abb. 4.5.).

Im post-ER, prä-Golgi-Bereich konnten also keine Abweichungen in der proteolytischen Prozessierung zwischen SASD- und Kontroll-zellen detektiert werden.

4.2.3. Proform von Kathepsin B im mid-Golgi-Bereich:

Die Ionophorverbindung Monensin hemmt die Prozessierung lysosomaler und sekretorischer Proteine noch vor dem trans-Golgi, wodurch die Ausbildung komplexer N-Glykane inhibiert wird (siehe 1.3.2.).

Um die Molekulargewichtsform von Kathepsin B und etwaige Unterschiede zwischen SASD- und Kontrollzelllinien in diesem Bereich aufzuzeigen, wurde die Markierung und die Prozessierung in Gegenwart von 1 μ mol/l Monensin durchgeführt. Kathepsin B erschien dabei mit einem Molekulargewicht von 44 - 46 kDa und es war kein Unterschied zu der Form, die nach dem CCCP-Block gefunden wurde, erkennbar; ebensowenig konnten Differenzen zwischen Sialinsäure-Speicherzellen und Normalfibroblasten beobachtet werden (siehe Abb. 4.5.).

Abb. 4.5.: Molekulargewichtsformen von Kathepsin B nach Hemmung der Prozessierung durch CCCP oder Monensin:
Vorinkubation: 1 h, Pulse: 1 h mit 40 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -Methionin, Chase: 5 h; Vorinkubation, Pulse und Chase erfolgten jeweils in Gegenwart von 50 $\mu\text{mol/l}$ CCCP oder 1 $\mu\text{mol/l}$ Monensin, bzw. ohne Zusätze (-).
Salla: Zelllinie F 8471,
Control: Kontrollzelllinie Kl.

4.2.4. Proformen von Kathepsin B im trans-Golgi-Retikulum:

Zur Untersuchung der Kathepsin B - Form, die im trans-Golgi-Bereich vorkommt, wurden die intrazellulären Transport- und Prozessierungsvorgänge in dieser Region durch eine Inkubation der Zellen bei einer Temperatur von 19°C inhibiert.

Die metabolische Markierung mit ^{35}S -Methionin erfolgte noch bei 37°C , jedoch nur für eine Stunde, um einen über das trans-Golgi-Retikulum hinausgehenden Transport während der Markierung zu vermeiden. Danach wurden die Zellen rasch abgekühlt und die Inkubation bei 19°C fortgesetzt.

Unter diesen Bedingungen akkumulierte eine Proform mit ca. 44 - 46 kDa, die nicht von den Molekulargewichtsformen, die aus den CCCP- und Monensin-Blockierungsversuchen resultierten, unterscheidbar war. Dieselbe Form wurde auch ins Medium sezerniert, wobei die Sekretion bei 19°C zwar verlangsamt war, aber keineswegs blockiert.

Die Ergebnisse der verschiedenen Blockierungsexperimente deuten darauf hin, daß zwischen ER (bzw. intermediärem Kompartiment) und trans-Golgi-Retikulum keine nennenswerten Molekulargewichtsänderungen und somit keine proteolytischen Prozessierungsschritte auftreten. Die Umwandlung der 44 - 46 kDa-Form in die 33 kDa- und die 27 kDa-Form läuft also nach dem Golgi-Apparat ab.

Bis zum trans-Golgi-Retikulum waren auch keine signifikanten Unterschiede zwischen Sialinsäure-Speicherzellen und Kontrollzellen erkennbar (siehe Abb. 4.6.), geringe Heterogenitäten, die vor allem bei den ins Medium ausgeschleusten Formen zu bemerken waren, wurden bei einem Abbau des N-Glykans mit PNGase F eindeutig eliminiert (siehe Abb. 4.2.).

Abb. 4.6.: Hemmung der Prozessierung von Kathepsin B durch
Inkubation bei 19°C (Blockierung im TGN):
Pulse: 1 h mit 40 μ Ci/ml 35 S-Met bei 37°C,
Chase: 7 h bei 19°C oder 37°C
Zelllinien: a = GM 5521 (Kontrolle), b = GM 5520
(ISSD)
c = GM 5522 (Kontrolle), d = GM 8496
(Salla)

4.3. Endozytose von Prokathepsin B:

4.3.1. Endozytose über 20 h:

Zur Untersuchung der Reifungsprozesse während des Endozytose-
Weges wurden Normalzellen durch Kultivierung in Gegenwart von
Ammonchlorid und 35 S-Methionin zur Sekretion von radioaktiv
markierten lysosomalen Proenzymen angeregt. Diese wurden aus
dem Medium durch Ammonsulfatfällung gewonnen und gegen MEM dia-
lysiert. Die Proformen (und damit auch Prokathepsin B) wurden
anschließend den verschiedenen Zelllinien für 20 h bei 37°C zur
Endozytose angeboten. Bei den Normalfibroblasten als
Rezipienten wurde das Prokathepsin B in die Hauptform mit 33
kDa umgewandelt, bei den SASD-Zellen in eine um ca. 0,5 kDa
größere Form, wobei der Unterschied aber innerhalb des
Genauigkeitsbereichs der elektrophoretischen
Molekulargewichtsbestimmung lag.

Auffallend war jedoch, daß bei den Normalzellen die 27 kDa-Form bereits deutlich vorhanden war, bei den SASD-Zellen hingegen noch nicht die entsprechende prozessierte reife Form mit 28 kDa (siehe Abb. 4.7.). Bei den Sialinsäure-Speicherzellen dürfte also die intralysosomale Prozessierung von der 33 kDa-Form in die kleinere aktive Form verlangsamt sein (siehe auch Kapitel 4.5.).

Abb. 4.7.: Endozytose und Prozessierung von Kathepsin B über 20 h: Donor-Zelllinie: GM 5522 (normal): Markierung und Sekretion: 24 h mit 20 μ Ci/ml 35 S-Methionin in Gegenwart von 10 mM NH_4Cl .
Rezipienten: Kontrollzellen: Co 1 = GM 5521,
Co 2 = GM 5522, Co 3 = M2, Co 4 = Zelllinie Koch
SASD-Zellen: ISSD 1 = GM 5520, ISSD 2 = Patient B.B.
Salla 1 = GM 8496, Salla 2 = F 8471

4.3.2. Endozytose bei 19°C und 37°C über 48 h:

Als Donorzellen für die Bildung des Prokathepsin B wurden ebenfalls Normalfibroblasten verwendet. Markierung und Sekretion erfolgten wie unter 3.1.6. angegeben. Die Proform wurde den

verschiedenen Rezipienten-Zelllinien jeweils bei 19°C und bei 37°C zur Endozytose angeboten. Die Dauer der Endozytose war mit 48 h so gewählt, daß bei allen Zelllinien, die bei 37°C inkubiert wurden, eine ausreichende Prozessierung der 33 kDa-Form in die kleinere reife Form gegeben war, wobei aber auch in diesem Fall bei den SASD-Zellen die 28 kDa-Form in geringerem Ausmaß gebildet wurde als das entsprechende 27 kDa-Enzym der Kontrollzellen.

Sowohl bei der 37°C- als auch bei der 19°C-Inkubation erschien das endozytierte Kathepsin B hauptsächlich mit einem Molekulargewicht von etwa 33 kDa. Bei dieser Form waren im Gegensatz zu den Anzeichen der 20 h - Endozytose keine Molekulargewichtsdifferenzen zwischen SASD- und Normalzellen vorhanden. Es ist denkbar, daß der bei der kürzeren Endozytose beobachtete Unterschied durch eine geringfügige Modifikation dieser Form bei längerer Inkubation wieder verschwindet. Dieser Effekt konnte bisher nicht weiter untersucht werden.

Die 27 kDa-Form (bzw. die 28 kDa-Form der SASD-Fibroblasten) wurde nur von den Zellen gebildet, die bei 37°C inkubiert wurden. Jene Zellen, bei denen die Endozytose bei 19°C erfolgte, wiesen stattdessen zusätzlich zur 33 kDa-Form eine 43-44 kDa-Molekulargewichtsform auf, bei der es sich entweder um die endozytierte Proform selbst, oder um eine geringfügig prozessierte Form handeln dürfte (siehe Abb. 4.8.).

Ein interessanter Aspekt ist, daß derselbe physikalische Blockierungsparameter, nämlich die Inkubation bei 19°C, die Prozessierung von Kathepsin B beim Endozytose-Weg auf einer anderen Stufe inhibiert als beim Biosynthese-Weg, und zwar im ersten Fall bei der reifen Form mit 33 kDa und im zweiten Fall bei der Proform mit 44 - 46 kDa.

Abb. 4.8.: Endozytose bei 19°C und bei 37°C über 48 h:

Donorzelllinie: GM 5522 (normal), Markierung und
Sekretion: 24 h mit 20 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -Met, in Gegenwart
von 10 mM NH_4Cl .

Rezipienten: Kontrollzelllinien: Co 1 = GM 5521,
Co 2 = GM 5522, Co 3 = Zelllinie Ko.

SASD-Zellen: ISSD 1 = GM 5520, ISSD 2 = Patient

B.B.,

Salla 1 = GM 8496, Salla 2 = F 8471

Da die Transportblockierung, die bei der Endozytose bei 19 -
20°C auftritt, nach den Aussagen mehrerer Autoren vor den
Lysosomen, nach G. Griffiths (1988) noch vor dem von ihm
beschriebenen prä-lysosomalen Kompartiment liegt, kann
postuliert werden, daß die proteolytische Prozessierung von
Prokathepsin B in die aktive
33 kDa-Form ein prälysosomaler Schritt ist, der für den Fall
der Endozytose im Bereich der Endosomen und beim Biosynthese-
Weg nach dem trans-Golgi-Retikulum abläuft. Die Prozessierung
der 33 kDa-in die 27 kDa- (bzw. 28 kDa-) Form dürfte demnach
intralysosomal erfolgen oder eventuell im prälysosomalen
Kompartiment.

4.4. Kreuzendozytose:

Das Ziel der Kreuzendozytose-Versuche war, zu klären, ob die Ursache für den Prozessierungsunterschied zwischen SASD- und Kontrollzellen in der Proform selbst oder im Vorgang der Prozessierung der betreffenden Zelllinien liegt.

Dazu wurden sowohl SASD-Fibroblasten als auch Kontrollzellen durch Ammonchlorid zur Sekretion von markierten lysosomalen Pro-enzymen angeregt und die Sekrete beider Zelllinien wiederum SASD- und Kontrollzelllinien zur Endozytose angeboten. Dadurch war ein System gegeben, durch das man die Prozessierung einer endozytierten Proform aus Normalfibroblasten in unterschiedlichen SASD-Zellen untersuchen konnte und umgekehrt (Abb. 4.9. und 4.10.).

Bei einer Kreuzendozytose über 48 Stunden zeigte sich, daß die normale 44 kDa-Proform von den SASD-Zellen über eine 33 kDa-Form in die für sie charakteristische 28 kDa-SASD-Form umgewandelt wurde, und andererseits die 44 kDa-SASD-Proform von den Kontrollzelllinien in das normale 27 kDa-Enzym.

ISSD		Donorzelllinien		Normal	
44 kDa		Sekretion		44 kDa	
		Proform			
		Endozytose			
33,5	33	33,5	33,5	33	33,5
28	27	28	28	27	28
ISSD	Normal	Salla	ISSD	Normal	Salla
Rezipienten-Zelllinien					

Abb. 4.9.: Schema der 48 h - Kreuzendozytose: ISSD = Patient B.B.

Salla = F 8471, Kontrolle = Zelllinie Kl.

Abb. 4.10.: 48 h - Kreuzendozytose:

Donorzellen: ISSD = Patient B.B., Normal = Kl.

Markierung und Sekretion: 24 h mit 20 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -
Met,

in Gegenwart von 10 mM NH_4Cl ;

Rezipienten: ISSD = Patient B.B., Normal = Kl.,
Salla = F 8471

4.5. Prozessierungskinetik:

4.5.1. Prozessierungskinetik bei der Biosynthese:

Es war nachweisbar, daß der terminale Prozessierungsschritt bei der Biosynthese von Kathepsin B, also die (wahrscheinlich) intra-lysosomale, partielle Proteolyse der 33 kDa-Form, bei den Sialin-säure-Speicherzellen verzögert ist.

Nach einer 6-stündigen Markierung und einem Chase über 24 h (bei 37°C) war bei den SASD-Zellen die 28 kDa-Form kaum

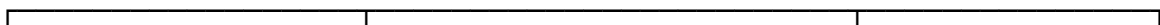
detektierbar, während bei den Kontrollzellen bereits etwa 10% der 33 kDa-Form zum 27 kDa-Enzym abgebaut waren.

Bei einer Verfolgung der Prozessierung über 40 Stunden unter denselben Bedingungen war das Verhältnis 27 kDa : 33 kDa bei den normalen Zellen schon bei etwa 17 : 83, bei den SASD-Zellen aber erst bei ca. 9 : 91 (Abb. 4.1.). Der Grund für diese verlangsamte Prozessierung könnte vielleicht bei der erhöhten Sialinsäure-Konzentration in den SASD-Lysosomen liegen. Dieser Aspekt wurde durch eine metabolische Beladung von normalen Fibroblasten mit Sialinsäure über die Vorstufe N-Acetylmannosamin näher untersucht (siehe Kapitel 4.6.).

Bei einer Analyse der Biosynthese-Vorgänge nach einer kurzen Markierung bei 37°C (25 min mit 70 μ Ci/ml) und anschließender Inkubation bei verringerter Temperatur (23°C, 15 Stunden) konnte gezeigt werden, daß auch schon der Prozessierungsschritt von der 44 kDa-Proform in die 33 kDa-Form bei den SASD-Zellen deutlich langsamer abläuft (siehe Tab. 4.1. und Abb. 4.11.). Bemerkenswert ist diese Beobachtung vor allem im Hinblick auf die Tatsache, daß dieser Prozessierungsschritt in einem subzellulärem Bereich stattfindet, in dem die Sialinsäure-Konzentration noch nicht erhöht ist.

Es war außerdem auffällig, daß bei der 37°C-Kontrollinkubation beim kürzeren Chase (5 h) die aktive Form der ISSD-Zelllinie mit 34 kDa größer war als die Kontrollform mit 33 kDa und dieser Molekulargewichtsunterschied nach der 15 h - Inkubation bei 37°C wieder verschwunden war.

44 kDa : 33 kDa



Kontrollzellen:		GM 5521	55 : 45
		GM 5522	50 : 50
SASD-Zellen:	ISSD :	GM 5520	70 : 30
	Salla:	GM 8496	80 : 20

Tab. 4.1.: Biosynthese bei 23°C: relative Verteilung von 44 kDa-
Proform zur 33 kDa-Form nach 15 h Chase.

Abb. 4.11.: Biosynthese von Kathepsin B bei 23°C und 37°C:

Pulse: 25 min bei 37°C mit 70 μ Ci/ml 35 S-

Methionin,

Chase: 5 h und 15 h bei 23°C und 37°C;

Kontrollzellen: Co 1 = GM 5521, Co 2 = GM 5522,

SASD-Zellen: ISSD = GM 5520, Salla = GM 8496

4.5.2. Prozessierungskinetik von Kathepsin B nach Endozytose:

Bei einer Endozytose von Prokathepsin B über 20 Stunden war die prozessierte reife Form bei normalen Fibroblasten bereits deutlich zu sehen, die entsprechende Form bei den Sialinsäure-Speicherzellen hingegen noch nicht vorhanden oder kaum detektierbar. Die Auswertung mit Hilfe des Laser-Densitometers ergab, daß bei den Kontrollzellen die 27 kDa-Form im Durchschnitt in einem Ausmaß von 11% der beiden reifen Formen auftrat, bei den SASD-Zellen war der Anteil der 28 kDa-Form in den meisten Fällen nicht meßbar und nur bei einer Zelllinie erreichte er 5% (siehe Abb. 4.7 und Tab. 4.2.).

27 (28) kDa
(%)

Kontrollzellen:		GM 5521	9%
		GM 5522	11%
		M 2	13%
		Ko.	10%
SASD-Zellen:	ISSD:	GM 5520	n.d.
		Patient B.B.	5%
	Salla:	GM 8496	n.d.
		F 8471	n.d.

Tab. 4.2.: Relativer Anteil der 27 kDa- (bzw. 28 kDa-) Form am gesamten reifen Kathepsin B (33 kDa + 27 kDa/28 kDa)

nach einer Endozytose über 20 h (bei 37°C);

n.d. = nicht detektierbar.

Die Verzögerung des terminalen Prozessierungsschrittes bei den SASD-Zelllinien konnte auch bei einer Endozytose über 48 h eindeutig verifiziert werden. Der relative Anteil der 28 kDa-Form an den beiden aktiven Kathepsin B - Formen betrug unter diesen Bedingungen bei den Sialinsäure-Speicherzellen im Durchschnitt 9%, bei den Kontrollzellen lag der Mittelwert des Anteils der kleineren reifen Form bei 20% (siehe Tab. 4.3.).

27 (28) kDa
(%)

Kontrollzellen:		GM 5521	20%
		GM 5522	25%
		Ko.	16%
SASD-Zellen:	ISSD:	GM 5520	10%
	Salla:	GM 8496	9%
		F 8471	8%

Tab. 4.3.: Relativer Anteil der 27 kDa- (bzw. 28 kDa-) Form am gesamten reifen Kathepsin B nach einer Endozytose über 48 Stunden (bei 37°C).

4.6. Metabolische Sialinsäure-Beladung:

Der Einfluß einer erhöhten Sialinsäure-Konzentration auf die Prozessierung von Kathepsin B wurde durch eine metabolische Beladung von normalen Fibroblasten mit Sialinsäure untersucht. Die Zellen wurden dazu in Gegenwart von 100 mM N-Acetylmannosamin (ManNAc), der direkten Vorstufe im Anabolismus von Sialinsäure, kultiviert.

Zuerst wurde eine Vorinkubation über 4 Tage durchgeführt, danach erfolgte eine Markierung mit ³⁵S-Methionin über 6 h und eine Fortsetzung der Inkubation nach Zugabe von unmarkiertem Methionin über 40 Stunden, jeweils in Gegenwart von N-Acetylmannosamin.

Die Auswertung des Versuches ergab bei den ManNAc-beladenen Normalzelllinien eine Sialinsäure-Konzentration von etwa 28 µg/mg Protein, und damit einen Wert, der noch über dem der unbeladenen Salla-Zellen lag.

Die elektrophoretische Molekulargewichtsbestimmung zeigte keinen durch die Sialinsäure-Beladung verursachten Unterschied. Die terminale Prozessierungsform erschien bei den Kontrollzellen weiterhin mit 27 kDa, bei den SASD-Zellen mit 28 kDa. Deutlich erkennbar war jedoch eine Änderung der Prozessierungskinetik. Interessanterweise führte die Beladung mit Sialinsäure, entgegen den Ergebnissen der Biosynthese-Versuche bei den Sialinsäure-Speicherzellen (siehe 4.5.), zu einer Beschleunigung der Prozessierung (siehe Abb. 4.12., Tab. 4.4.).

		ManNAc:		-	+
Kontrollzellen:		GM 5521		0%	7%
		GM 5522		7%	20%
SASD-Zellen:	ISSD:	GM 5520		2%	6%
	Salla:	GM 8496		4%	13%
		Mittelwert		3,3%	11,5%

Tab. 4.4.: Relativer Anteil der 27 kDa- (bzw. 28 kDa-) Form am gesamten reifen Kathepsin B nach Kultivierung in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (-) von ManNAc.

Abb. 4.12.: Metabolische Sialinsäure-Beladung:

Vorinkubation: 4 Tage in Gegenwart (+) oder Abwesenheit (-) von 100 mM N-Acetylmannosamin;

Pulse: 6 h

mit 20 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S -Met, Chase: 40 h (+/- ManNAC)
 Kontrollzellen: Co 1 = GM 5521, Co 2 = GM 5522;
 SASD-Zellen: ISSD = GM 5520, Salla = GM 8496

Um zu untersuchen, ob der durch die Kultivierung in Gegenwart von 100 mM ManNAC um 35% erhöhte osmotische Druck einen Einfluß auf die Prozessierungskinetik hatte, wurde ein weiterer Versuch mit 100 mM Saccharose als Beladungskontrolle durchgeführt.

Bei diesem Versuch war das Ergebnis im Hinblick auf die Kinetik nicht eindeutig; bei 3 ManNAC-beladenen Zelllinien wurde, ebenso wie bei Abb. 4.12., ein erhöhter Anteil der terminalen Prozessierungsform, also eine Beschleunigung der Prozessierung beobachtet, die Unterschiede waren aber nicht so signifikant. Bei einer Zelllinie war jedoch eine gewisse Verzögerung der Prozessierung zu bemerken. Eine deutliche Verzögerung war bei beiden in Gegenwart von Saccharose kultivierten Zelllinien zu erkennen.

Ein besonders interessantes Ergebnis zeigte sich bei den Zellen, die in Gegenwart von 100 mM Saccharose kultiviert wurden. Bei den Normalfibroblasten war eine deutliche Erhöhung des Molekulargewichts der terminalen Prozessierungsform zu erkennen, und zwar auf den SASD-charakteristischen Wert. Die Saccharose führt also in dieser relativ hohen Konzentration zu einer Prozessierungsänderung, die mit der Auswirkung der Sialinsäure-Speicherkrankheit vergleichbar ist (Abb. 4.13., Tab. 4.5.)

		-		+		+	
		ManNAC		ManNAC		Sacch.	
Kontrolle :	GM 5521	33	33	-			
		27	27	-			
GM 5522		33	33	34			
		27	27	28,5			
SASD:	ISSD: GM 5520	33	33,5	33,5			
		28	28,5	28,5			

Salla:	GM 8496	33	33	-
	28	28	-	

Tab. 4.5.: Molekulargewichtsformen in kDa nach Beladung mit ManNAc oder Saccharose (jeweils 100 mM).

Abb. 4.13.: Metabolische Sialinsäure-Beladung und Beladung mit Saccharose: Vorinkubation: 4 Tage in Gegenwart von

100 mM ManNAc oder 100 mM Saccharose bzw. ohne Zusätze; Pulse: 6 h mit 20 μ Ci/ml 35 S-Met; Chase: 40 h (jeweils +/- ManNAc/Sacch.)
 Kontrollzellen: Co 1 = GM 5521, Co 2 = GM 5522;
 SASD-Zellen: ISSD = GM 5520, Salla = GM 8496

4.7. Isoelektrische Fokussierung von Prokathepsin B:

Da bei der elektrophoretischen Molekulargewichtsbestimmung durch SDS-PAGE manchmal leichte Unterschiede bei den Proformen der verschiedenen Zelllinien zu beobachten waren, wurde als weiteres Kriterium eine isoelektrische Fokussierung durchgeführt. Verwendet wurden die Proformen, die ins Medium sezerniert werden, und jene, die sich bei Inkubation in Gegenwart von CCCP intrazellulär anreichern. Nach der Immunpräzipitation wurde jeweils die Hälfte der Proben mit PNGase F abgebaut, um die N-Glykan-freie Proform zu erhalten; anschließend wurden die Proben gewaschen und in IEF-Puffer aufgenommen. Die isoelektrische Fokussierung zeigte keinen

Unterschied zwischen Normal- und SASD-Zellen und auch keine Differenzen zwischen den CCCP- und den Medienformen. Es waren etwa 7 Isoformen zwischen pH 5,8 und pH 6,4 zu erkennen; bei den mit PNGase F abgebauten Proben fehlten ca. 3 Banden des basischen Bereiches (Tab. 4.6., Abb. 4.14.).

	- PNGase F	+ PNGase F
Proformen:	5,8	5,8
	5,9	5,9
(SASD- und Kontrollzellen)	6,0	6,0
	6,05	6,05
	6,15	
	6,25	
	6,35	

Tab. 4.6.: Isoelektrische Punkte von Prokathepsin B

Abb. 4.14.: Isoelektrische Fokussierung von Prokathepsin B: Es wurden dieselben Proben wie bei Abb. 4.2. verwendet. Pulse: 1 h (40 μ Ci/ml 35 S-Met), Chase: 2 h (+/- 50 μ M CCCP),

+/- PNGase F (16 h bei 30°C); SASD-Zellen: ISSD 1 = GM 5520, ISSD 2 = B.B., Salla 1 = GM 8496, Salla 2 = F 8471; Kontrollen: Co 1 = GM 5521, Co 2 = GM 5522.

4.8. Sialinsäure-Bestimmung:

Zur Abschätzung der Sialinsäure-Konzentration in normalen Fibroblasten und Sialinsäure-Speicherzellen wurde die Menge an intra-zellulärer, freier Sialinsäure nach der Thiobarbitursäure-Methode (siehe 3.10.) bestimmt und auf mg Zellprotein bezogen.

Bei den Kontrollzellen war die Konzentration kaum meßbar und lag bei etwa 0 - 1 µg N-Acetylneuraminsäure pro mg Protein, bei der Salla-Variante der Sialinsäure-Speicherkrankheit wurde ein Wert von ca. 5 µg/mg Eiweiß und bei der infantilen Variante ein Wert von ungefähr 20 µg/mg Eiweiß gemessen. Bei einer Bestimmung der Sialinsäure nach einer subzellulären Fraktionierung durch Dichte-gradientenzentrifugation ergab sich für die Lysosomenfraktion der ISSD-Zelllinie eine Konzentration von etwa 200 µg/mg Protein. Diese Ergebnisse sind mit den von Tietze et al. (1989) angegebenen Werten vergleichbar.

4.9. Subzelluläre Fraktionierung:

Normale Fibroblasten, Salla- und ISSD-Zellen wurden (nach Homogenisierung und Abtrennung der Zellkerne) durch Zentrifugation in einem Percoll-Dichtegradient subzellulär fraktioniert, um die Dichte der Lysosomen und des Golgi-Apparates bestimmen zu können. Dazu wurde die Aktivität von Kathepsin B und β -N-Acetylhexosaminidase (als Leitenzyme für die Lysosomen), sowie die Aktivität der Galaktosyltransferase (zur Markierung des Golgi) gemessen.

Das Aktivitätsmaximum des Golgi-Enzyms lag bei allen Zelllinien im Bereich von 1,045 g/ml, das Maximum der Lysosomen-Enzyme differierte hingegen bei den verschiedenen Zelllinien recht deutlich. Bei den Kontrollzellen lag die Lysosomendichte über 1,10 g/ml, bei der Salla-Variante der Sialinsäure-

Speicherzellen wurde ein Wert von ca. 1,06 g/ml und bei den ISSD-Zellen eine Dichte von 1,04 - 1,05 g/ml ermittelt (siehe Abb. 4.15.).

Abb. 4.15.: Subzelluläre Fraktionierung von Normalzellen, Salla- und ISSD-Zellen: Lysosomen: β -N-Acetylhexosaminidase, Kathepsin B; Golgi-Enzym: Galaktosyltransferase

Die Methodik der subzellulären Fraktionierung wurde auch eingesetzt, um die Feststellung zu überprüfen, daß der intrazelluläre Transport während der Biosynthese lysosomaler Enzyme bei 19°C nach dem trans-Golgi-Bereich blockiert wird. Die Zellen wurden dafür 10 min mit ^{35}S -Methionin (bei 37°C) markiert und die Inkubation für 5 Stunden bei 19°C fortgesetzt. Nach Abernten und Homogenisieren der Zellen, sowie anschließender Dichtegradientenzentrifugation, wurden die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen und die Enzymaktivitäten von Kathepsin B und Galaktosyltransferase bestimmt und mit der 37°C-Kontrolle verglichen. Es konnte festgestellt werden, daß die ^{35}S -markierten Proteine bei 19°C im Golgi-Bereich akkumulieren (Abb. 4.16.).

Abb. 4.16.: Subzelluläre Fraktionierung von Normalzellen nach Inkubation bei 19°C und 37°C.

4.10. Immunfluoreszenz-Mikroskopie:

Mit den unter 3.11. angegebenen Arbeitsmethoden war es möglich humane Fibroblasten mit einem affinitätsgereinigten Kaninchen-Anti-Kathepsin B-Antikörper in Verbindung mit FITC-gekoppelten Anti-Kaninchen-Immunglobulinen zu markieren.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte deutlich fluoreszierende, vesikuläre Strukturen, die hauptsächlich im perinuklearen Bereich, manchmal auch über die Zelle verteilt auftraten. Die Hintergrund-Fluoreszenz war sehr gering, ebenso die Fluoreszenz bei den mit Präimmunserum inkubierten Kontrollzellen.

Bei den mikroskopisch sichtbaren Kathepsin B-hältigen Strukturen dürfte es sich ziemlich eindeutig um Lysosomen handeln. In der Morphologie und der Anzahl dieser Strukturen scheinen Unterschiede zwischen den normalen Fibroblasten und den Sialinsäure-Speicherzellen zu existieren.

Entgegen den Vermutungen von Thomas et al. (1983), der für die SASD-Zellen eine Vergrößerung der Lysosomen aufgrund der Sialinsäurespeicherung postulierte, erschienen sie in den meisten Fällen eher kleiner als die Lysosomen der Normalzellen oder zumindest gleich groß. Andererseits entstand bei der Mikroskopie der Eindruck, daß die SASD-Fibroblasten durchschnittlich mehr Lysosomen pro Zelle aufweisen als die Normalzellen.

Auch in der Struktur schienen Unterschiede aufzutreten. Während bei den Kontrollzelllinien die Lysosomen meist sehr klar abgegrenzte, isolierte Vesikel waren, hoben sie sich bei der Salla-Variante der Sialinsäure-Speicherzellen nur relativ undeutlich vom Hintergrund ab und es waren zum Teil keine vesikulären Strukturen erkennbar (siehe Abb. 4.17. und 4.18.).

ISSD:

Kontrollzelle:

Abb. 4.17.: Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf Kathepsin B:

ISSD = GM 5520, Kontrollzelllinie = GM 5522

Salla:

Kontrollzelllinie:

Abb. 4.18.: Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf Kathepsin B:

Salla = GM 8496, Kontrollzellelinie = GM 5521

5. DISKUSSION:

5.1. Subzelluläre Lokalisation der Molekulargewichtsformen von Kathepsin B:

Ziel der Arbeit war es, die proteolytische Reifung von Kathepsin B in Fibroblasten von Patienten mit Sialinsäure-Speicherkrankheit zu untersuchen.

Bei dieser genetisch bedingten Krankheit kommt es aufgrund eines Transportdefektes zu einer intralysosomalen Akkumulierung von freier Sialinsäure (Renlund et al., 1986; Paschke et al., 1986; Tietze et al., 1989), aber auch zu einer Veränderung der Prozessierung bestimmter lysosomaler Enzyme.

Die Arbeiten von Hancock et al. (1988) zeigten eine Molekulargewichtserhöhung bei den reifen Formen der Enzyme α -Fukosidase und β -N-Acetylhexosaminidase. Es stellte sich damit die Frage, ob diese Abweichungen bei der Enzymreifung ein Sekundäreffekt der erhöhten Sialinsäure-Konzentration sind, oder ob eine Fehlfunktion in der Prozessierung lysosomaler Proteine (und auch des Transportproteins für Sialinsäure) die Speicherkrankheit verursacht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Prozessierung von Kathepsin B, einem lysosomalen Enzym, das selbst eine potentielle Prozessierungsprotease darstellt, in verschiedenen SASD-Zelllinien untersucht werden. Auftretende Unterschiede zur Reifung in Normalzellen sollten näher charakterisiert werden mit dem Ziel, den Ursache-Wirkungszusammenhang zwischen Sialinsäure-Speicherung und Prozessierungsänderung so weit als möglich zu klären.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, daß zumindest eine Molekulargewichtsform, und zwar die terminale Prozessierungsform verändert ist. Sowohl bei der Salla- als auch bei der ISSD-Variante der Krankheit erschien diese Form mit einem apparenten Molekulargewicht von 28 kDa, bei den Normalzellen hingegen mit 27 kDa.

Es wurde in der Folge versucht festzustellen, ob Unterschiede bereits in einem früheren Stadium der Biosynthese auftreten, und in welchem subzellulären Bereich sie lokalisiert sind. Bei der Proform, die durch Abernten markierter Zellen innerhalb von 10 min nach Beginn der Markierung erhalten wurde, konnten keine Molekulargewichtsdifferenzen zwischen SASD- und Kontrollfibroblasten beobachtet werden; ebensowenig bei einer Blockierung des Transports zum Golgi-Apparat durch das Reagens CCCP.

Jene 44 - 46 kDa-Proformen, die aufgrund einer Prozessierungshemmung durch die ionophoretische Substanz Monensin in ihrem mid-Golgi-Stadium blockiert wurden, und jene, die durch Inkubation bei 19°C im trans-Golgi-Retikulum akkumulierten, zeigten ebenfalls keine Molekulargewichtsunterschiede.

Bei den ins Medium ausgeschleusten Proformen traten zwar gewisse Heterogenitäten im apparenten Molekulargewicht auf, diese wurden aber durch einen Abbau der N-Glykanreste mit PNGase F eindeutig eliminiert und waren somit nicht auf den Proteinanteil zurückzuführen.

Bis zum trans-Golgi-Retikulum waren also keine Prozessierungsunterschiede zwischen Sialinsäure-Speicherzellen und Normalzellen zu beobachten.

Die frühesten Abweichungen lagen bei der 33 kDa-Form, die bei den SASD-Fibroblasten etwas größer war als bei den Kontrollzellen. Der Unterschied war jedoch innerhalb des Genauigkeitsbereiches der elektrophoretischen Molekulargewichtsbestimmung und trat außerdem nur bei kürzeren Chase-Zeiten (im Bereich von 5 h) auf. Die 33 kDa-Form erschien auch unter Bedingungen, bei denen der Transport zu den Lysosomen blockiert ist (nämlich bei einer Endozytose von Prokathepsin B bei 19°C). Daraus konnte geschlossen werden, daß der Prozessierungsschritt von der Proform in die 33 kDa-Form nach dem trans-Golgi-Retikulum, aber noch vor den Lysosomen abläuft und zumindest im Fall der Endozytose noch vor dem von Griffiths (1988) beschriebenen prälysosomalen Kompartiment. Da unter den angegebenen Blockierungsbedingungen keine 27 kDa- oder 28 kDa-Form detektiert werden konnte, kann angenommen

werden, daß der Reifungsschritt von der 33 kDa-Form in die terminale Prozessierungsform in den Lysosomen oder in den prä-lysosomalen Kompartimenten stattfindet.

Ein deutlicher Molekulargewichtsunterschied von Kathepsin B zwischen Sialinsäure-Speicherzellen und Normalfibroblasten tritt folglich erst in den Lysosomen oder unmittelbar davor auf.

Neueren Hypothesen zufolge (Griffiths, 1990) könnten die Lysosomen auch durch Abschnürung bestimmter Regionen des komplex aufgebauten prälysosomalen Kompartiments entstehen, womit diese Bereiche unter Umständen funktionell nicht von den Lysosomen unterscheidbar wären.

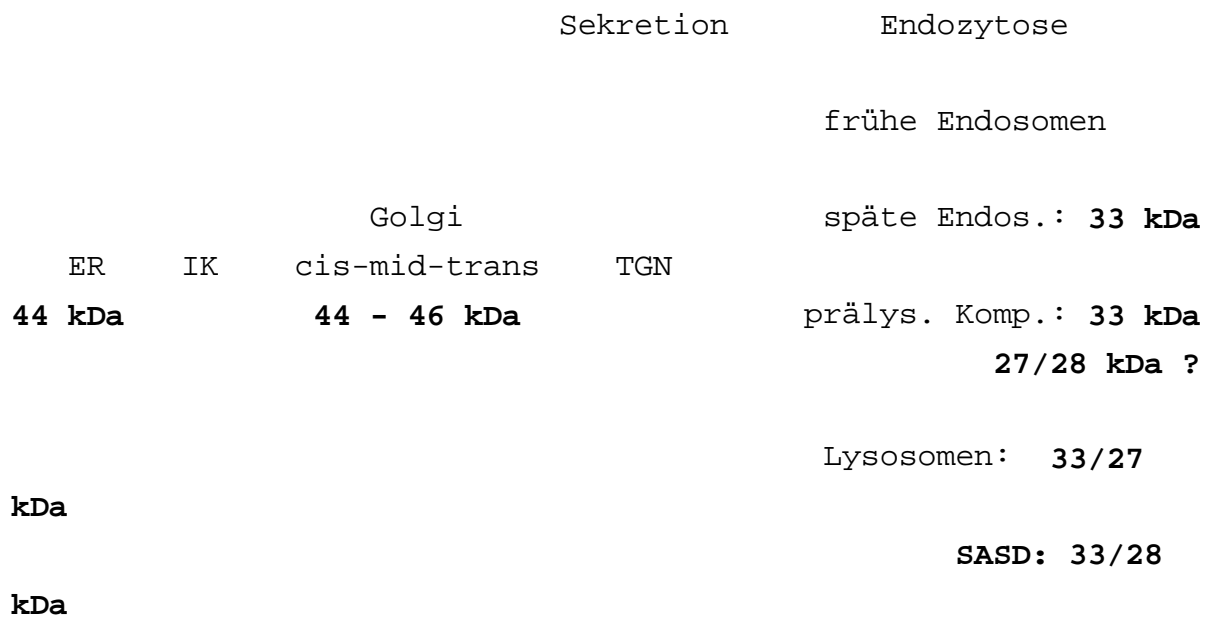


Abb. 5.1.: Subzelluläre Lokalisation der Molekulargewichtsformen

von Kathepsin B; schematische Darstellung:

ER = Endoplasmatisches Retikulum, IK =

Intermediäres

Kompartiment, TGN = Trans-Golgi-Network (-

Retikulum),

prälys. Komp. = prälysosomales Kompartiment.

5.2. Kreuzendozytose:

Durch die Methodik der Kreuzendozytose, bei der Sekrete von SASD-Zellen Normalzellen zur Endozytose angeboten wurden und vice versa, konnte beobachtet werden, daß die Rezipientenzellen die aufgenommenen Proformen unabhängig von ihrer Herkunft in ihre jeweilige zelltypische reife Form prozessieren. Damit wurde eindeutig festgestellt, daß die Ursache für die Prozessierungsabweichung nicht in der Proform selbst liegt, sondern im Vorgang der Prozessierung.

Der Grund für diesen Effekt könnte in einer genetischen Mutation der prozessierenden Enzyme liegen, ebenso aber auch in einer Änderung der Raumstruktur der Enzyme oder von Kathepsin B selbst aufgrund eines abnormalen lysosomalen Milieus, bedingt durch die hohe Konzentration an freier Sialinsäure.

5.3. Prozessierungskinetik:

Eine quantitative Auswertung der Elektrophorese-Banden einzelner Biosynthese- und Endozytose-Versuche durch Laser-Densitometrie zeigte deutlich, daß bei den Sialinsäure-Speicherzellen eine Verlangsamung der Reifung von Kathepsin B auftritt. Beide proteolytischen Prozessierungsschritte erschienen verzögert, also sowohl die (wahrscheinlich) intralysosomale Umwandlung der 33 kDa-Form in die 27 kDa- (bzw. 28 kDa-) Form als auch die Reifung der Proform. Die letztere Tatsache ist vor allem deshalb interessant, weil die Prozessierung der Proform ein prälysosomales Ereignis ist, und damit auch bei den Sialinsäure-Speicherzellen nicht unter erhöhter Sialinsäurekonzentration ablaufen dürfte.

5.4. Beladung mit Sialinsäure und mit Saccharose:

Durch eine Kultivierung normaler Fibroblasten in Gegenwart von 100 mM N-Acetylmannosamin, einer metabolischen Vorstufe von Sialinsäure, konnte (nach Tietze et al., 1989) in den Zellen eine Sialinsäure-Konzentration aufgebaut werden, wie sie in der Salla-Variante der Sialinsäure-Speicherkrankheit vorliegt. Dadurch war dieses System dazu geeignet die Frage zu beantworten, ob die Prozessierungsänderung von Kathepsin B auf den Einfluß der erhöhten Sialinsäure-Konzentration zurückgeführt werden kann.

Es konnte nachgewiesen werden, daß die höhere Sialinsäurekonzentration nicht die unmittelbare Ursache für die Änderung der Reifung ist. Bei den Sialinsäure-beladenen Normalzellen war keine Molekulargewichtsabweichung der terminalen Prozessierungsform wie bei den SASD-Zellen zu beobachten. Auch die Prozessierungskinetik wurde durch die Sialinsäure-Beladung nicht wie bei den SASD-Fibroblasten verzögert, sondern eher noch beschleunigt.

Die Erscheinungen der Prozessierungsänderungen von Kathepsin B können also nicht einem Sekundäreffekt der Sialinsäure-Anreicherung zugeschrieben werden.

In einem Kontrollversuch wurde durch Zugabe von Saccharose derselbe osmotische Druck im Kulturmedium eingestellt wie während der Beladung mit N-Acetylmannosamin. Diese Bedingungen bewirkten bei den Normalzellen genau den Effekt, der für die SASD-Zellen charakteristisch ist, nämlich die Erhöhung des Molekulargewichts der terminalen Prozessierungsform von 27 kDa auf 28 kDa. Bei den Sialinsäure-Speicherzellen war hingegen keine signifikante Molekulargewichtserhöhung erkennbar. Der Grund für dieses Phänomen ist noch weitgehend unbekannt. Möglicherweise beeinflußt die Saccharose, die in den Zellen nicht weiter metabolisiert werden kann, in dieser hohen Konzentration die Raumstruktur von Kathepsin B oder von den prozessierenden Enzymen.

In diesem Sinne sei auch auf die Ergebnisse von Okada et al. (1987) hingewiesen, der in einigen Zelllinien von Mucopolysaccharidose II-Patienten eine Regenerierung der Phosphotransferase-Aktivität bei Inkubation der Zellen in Gegenwart von 88 mM Saccharose feststellen konnte.

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß durch die Saccharose bestimmte intrazelluläre Transportvorgänge gehemmt werden. Es wurde z.B. gezeigt, daß die Galaktosylrezeptor-vermittelte Endozytose bei einer Konzentration von 200 mM Saccharose nahezu vollständig inhibiert wird und die Zahl der "Coated Pits" signifikant abnimmt (Oka et al., 1989).

Es wäre auch denkbar, daß die Saccharose über eine Hemmung der Lysosomenreifung die Akkumulierung einer normalerweise nicht detektierbaren Übergangsform von Kathepsin B verursacht.

Es könnte etwa die von Griffiths (1990) postulierte Abschnürung der Lysosomen von den prälysosomalen Kompartimenten inhibiert werden.

Falls der Effekt von Saccharose eine direkte Analogie zum Primär-defekt bei der lysosomalen Sialinsäure-Speicherkrankheit darstellt, könnte also ein Defekt im Reifungsprozeß der Lysosomen an der Pathogenese dieser Krankheit beteiligt sein.

6. ZUSAMMENFASSUNG:

Das Ziel der Arbeit war die Untersuchung der Prozessierung von Kathepsin B in Fibroblasten von Patienten mit lysosomaler Sialin-säure-Speicherkrankheit. Es konnte eine deutliche Abweichung im Vergleich zur Reifung in Normalzellen festgestellt werden.

Eine signifikante Molekulargewichtserhöhung war bei der intralysosomal auftretenden terminalen Prozessierungsform erkennbar. Sie erschien bei den SASD-Zellen mit einem apparenten Molekulargewicht von 28 kDa und war damit um etwa 1 kDa größer als die Normalform.

Die Reifungskinetik war bei beiden proteolytischen Prozessierungsschritten verlangsamt, sowohl bei der prälysosomalen Umwandlung der Proform in die 33 kDa-Form, als auch bei der (wahrscheinlich) intralysosomalen partiellen Proteolyse in die 28 kDa-Form.

Eine Simulation der erhöhten lysosomalen Sialinsäurekonzentration durch Beladung mit der metabolischen Vorstufe N-Acetylmannosamin führte in Normalzellen nicht zu den bei den Sialinsäure-Speicherzellen beobachteten Prozessierungsänderungen, also weder zu einer Molekulargewichtserhöhung der terminalen Erscheinungsform von Kathepsin B, noch zu einer Verzögerung der Reifung.

Die erhöhte Sialinsäure-Konzentration in den Lysosomen der SASD-Zellen kann somit nicht als Ursache für die Prozessierungsabweichungen angesehen werden.

Eine Kultivierung der Kontrollzellen in Gegenwart von 100 mM Saccharose führte hingegen zu einer SASD-analogen Molekulargewichtsänderung.

Ob diesem Effekt ein dem Primärdefekt der Sialinsäure-Speicherkrankheit vergleichbarer Wirkmechanismus zugrunde liegt, wäre das Ziel zukünftiger Untersuchungen.

7. LITERATURVERZEICHNIS:

- Ahle**, S. & Ungewickell, E.; *J. Cell Biol.* 109 (4), Part 2, 204a, 1104 (1989)
- Akahane**, K. & Umeyama, H.; *Enzyme* 36, 141-149 (1986)
- Aronson**, N.N. & Barrett, A.J.; *Biochem. J.* 171, 759-765 (1978)
- Aula**, P.; Autio, S.; Raivio, K.O.; Rapola, J.; Thoden, C.J.; Koskela, S.L. & Yamashina, I.; *Arch. Neurol.* 36, 88-94 (1979)
- Balloun**, C.; Diplomarbeit an der Univ. f. Bodenkultur (1988)
- Beaudet**, A.L. & Thomas, G.H.; in "The Metabolic Basis Of Inherited Disease", Vol. II, 1603-1621 (Hrsg.: Scriver, Beaudet, Sly & Valle), McGraw-Hill (1989)
- Bond**, J.S. & Barrett, A.J.; *Biochem. J.* 189, 17-25 (1980)
- Braulke**, T.; Geuze, H.J.; Slot, J.W.; Hasilik, A. & von Figura, K.; *Eur. J. Cell Biol.* 43, 316-321 (1987)
- Braulke**, T.; Hasilik, A. & von Figura, K.; *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369, 441-449 (1988)
- Braun**, M.; Waheed, A. & von Figura, K.; *EMBO J.* 8, 3633-3640 (1989)
- Breitfeld**, P.P.; Casanova, J.E.; Simister, N.E.; Ross, S.A.; McKinnon, W.C. & Mostov, K.E.; *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 617-623 (1989)
- Bronner**, W.M. & Laskey, R.A.; *Eur. J. Biochem.* 46, 83-88 (1974)
- Burnett**, D.; Crocker, J. & Vaughan, A.; *J. Cell. Physiol.* 115, 249-254 (1983)
- Cain**, C.C.; Sipe, D.M. & Murphy, R.F.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 544-548 (1989)
- Cantz**, M.; Kresse, H.; Barton, R.W. & Neufeld, E.F.; *Meth. Enzymol.* 28, 884-897 (1972)
- Chan**, S.J.; San Segundo, B.; McCormick, M.B. & Steiner, D.F.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7721-7725 (1986)
- Chang**, J.C.; Lesser, M.; Yoo, O.H. & Orłowski, M.; *Amer. Rev. Resp. Dis.* 134, 538-541 (1986)
- Chang**, P.L.; Ameen, M.; Yu, C.Z. & Kelly, B.M.; *Exp. Cell Res.*

- 176, 258-267 (1988)
- Creek**, K.E. & Sly, W.S.; *Lysosomes in Biology and Pathology* 7, 63-82, Elsevier Scientific Publishing (1984)
- D'Azzo**, A.; Hoogeveen, A.; Reuser, A.D.J.; Robinson, D. & Galjaard, H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 4535 (1982)
- Diment**, S. & Stahl, P.; *J. Biol. Chem.* 260, 15311-15317 (1985)
- Docherty**, K.; Hutton, J.C. & Steiner, D.F.; *J. Biol. Chem.* 259, 6041-6044 (1984)
- Docherty**, K.; Rhodes, C.J.; Taylor, N.A.; Shennan, K.I.J. & Hutton, J.C.; *J. Biol. Chem.* 264, 18335-18339 (1989)
- Dufour**, E.; *Biochimie* 70, 1335-1342 (1988)
- Fong**, D., Calhoun, D.; Hsieh, W.-T.; Lee, B. & Wells, R.D.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2909-2913 (1986)
- Fuchs**, R.; Male, P. & Mellman, I.; *J. Biol. Chem.* 264, 2212-2220 (1989 a)
- Fuchs**, R.; Schmid, S. & Mellman, I.; *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 539-543 (1989 b)
- Gahl**, W.A.; Renlund, M. & Thoene, J.G.; *The Metabolic Basis Of Inherited Disease*, Vol. II, 2619-2647 (Scriver, Beaudet, Sly & Valle), McGraw-Hill (1989)
- Gairola**, C.G.; Galichi, N.I.; Cardozo, C.; Lai, Y.L. & Lesser, M.J. *Laboratory and Clinical Med.* 114 (4), 419-426 (1989)
- Gieselmann**, V.; Pohlmann, R.; Hasilik, A. & von Figura, K.; *J. Cell Biol.* 97, 1-5 (1983)
- Glickman**, J.N.; Conibear, E. & Pearse, B.M.F.; *EMBO J.* 8, 1041-1047 (1989)
- Gordon**, J.I.; Sims, H.F.; Edelstein, C.; Scanu, A.M. & Strauss, A.W.; *J. Biol. Chem.* 260, 14824-14831 (1985)
- Gottschalk**, S.; Waheed, A.; Schmidt, B.; Laidler, P. & von Figura, K.; *EMBO J.* 8, 3215-3219 (1989)
- Griffiths**, G.; Hoflack, B.; Simons, K.; Mellman, I. & Kornfeld, S.; *Cell* 52, 329-341 (1988)
- Griffiths**, G.; *J. Cell Sci. Suppl.* 11, 139-147 (1989)
- Griffiths**, G.; persönliche Mitteilung (1990)
- Gruenberg**, J. & Howell, K.E.; *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 453-481 (1989)

- Gruenberg**, J.; Griffiths, G. & Howell, K.E.; *J. Cell Biol.* 108, 1301-1316 (1989)
- Hagen**, A.; Diplomarbeit an der Univ. für Bodenkultur (1988)
- Hanada**, K.; Tamai, M.; Yanagishi, M.; Ohmura, S.; Sawada, J.; Seki, T. & Tanaka, J.; *Agric. Biol. Chem.* 42, 529 (1978)
- Hancock**, L.W.; Ricketts, J.P. & Hildreth, J.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 152, 83-92 (1988)
- Hanewinkel**, H.; Glössl, J. & Kresse, H.; *J. Biol. Chem.* 262, 12351-12355 (1987)
- Hasilik**, A. & Neufeld, E.F.; *J. Biol. Chem.* 255, 4937-4945 (1980)
- Hasilik**, A.; Waheed, A. & von Figura, K.; *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 98, 761-767 (1981)
- Hille**, A.; Waheed, A. & von Figura, K.; *J. Biol. Chem.* 264, 13460-13467 (1989)
- Hubbard**, A.L.; *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 675-683 (1989)
- Huttner**, W.B. & Tooze, S.A.; *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 648-654 (1989)
- Jonas**, A.J.; Speller, R.J.; Konrad, P.B. & Dubinsky, W.P.; *J. Biol. Chem.* 264, 4953-4956 (1989)
- Katunuma**, N. & Kominami, E.; *Curr. Top. Cell. Regul.* 27, 345-360 (1985)
- Khan**, M.Y.; Ahmad, S. & Agarwal, S.K.; *IRCS Medical Science* 14, 1141-1142 (1986)
- Kiess**, W.; Thomas, C.L.; Greenstein, L.A.; Lee, L.; Sklar, M.M.; *J. Biol. Chem.* 264, 4710-4714 (1989)
- Kirschke**, H.; Langner, J.; Riemann, B.; Wiederanders, B.; An-sorge, S. & Bohley R.; *Ciba Found. Symp.* 75, 15-35 (1980)
- Kleinig**, H. & Sitte, P.; *Zellbiologie*, 2. Auflage, G. Fischer-Verlag, 268 (1986)
- Kornfeld**, R. & Kornfeld, S.; *Annu. Rev. Biochem.* 54, 631-664 (1985)
- Kornfeld**, S. & Mellman, I.; *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 483-525, (1989)
- Laemmli**, U.K.; *Nature* 227, 680-685 (1970)
- Lowry**, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J.; *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
- Mach**, L.; Diplomarbeit an der Univ. für Bodenkultur (1988)

- Mancini**, G.M.S.; De Jonge, H.R.; Galjaard, H. & Verheijen, F.W.; *J. Biol. Chem.* 264, 15247-15254 (1989)
- Mason**, R.W.; *Arch. Biochem. Biophys.* 273 (2), 367 (1989)
- Matsuda**, Y.; Ogushi, F.; Ogawa, K. & Katunuma, N.; *J. Biochem.* 100, 375-379 (1986)
- Mayorga**, L.S.; Diaz, R. & Stahl, P.D.; *J. Biol. Chem.* 264, 5392-5399 (1989)
- Mendla**, K.; Baumkötter, J.; Rosenau, C.; Ulrich-Bott, B. & Cantz, M.; *Biochem. J.* 250, 261-267 (1988)
- Morales**, P.G.; Barriocanal, J.G. & Sandoval, I.V.; *Eur. J. Biochem.* 183, 407-412 (1989)
- Morris**, S.A.; Ahle, S. & Ungewickell, E.; *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 684-690 (1989)
- Mort**, J.S. & Recklies, A.D.; *Biochem. J.* 233, 57-63 (1986)
- Mort**, J.S.; Leduc, M.; & Recklies, A.D.; *Biochim. Biophys. Acta* 765, 369-375 (1983)
- Mullock**, B.; Branch, W.J.; van Schaik, M.; Gilbert, L.K. & Luzio, J.P.; *J. Cell Biol.* 108, 2093-2099 (1989)
- Nanba**, E.; Tsuji, A.; Omura, K. & Suzuki, Y.; *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 152, 794-800 (1988)
- Neufeld**, E.F. & Muenzer, J.; in "The Metabolic Basis of Inherited Disease", Vol. II, S. 1565-1589 (Hrsg.: Scriver, Beaudet, Sly & Valle); McGraw-Hill (1989)
- Neurath**, H.; *Science* 224, 350-357 (1984)
- Oka**, J.A.; Christensen, M.D. & Weigel, P.H.; *J. Biol. Chem.* 264, 12016-12024 (1989)
- Okada**, S.; Inui, K.; Furukawa, M.; Midorikawa, M. & Nishimoto, J.; *Enzyme* 38, 267-272 (1987)
- Paschke**, E.; Höfler, G. & Roscher, A.; *Pediatr. Res.* 20, p 773 (1986)
- Pelham**, H.R.B.; *EMBO J.* 7, 913-918 (1988)
- Pelham**, H.R.B.; *EMBO J.* 8 (11), 3171-3176 (1989b)
- Pelham**, H.R.B.; *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 1-23 (1989a)
- Pfeifer**, U.; *Lysosomes: Their Role in Protein Breakdown*, 3-59; Glaumann, H. & Ballard, F.J.; Academic Press, (1987)
- Pisoni**, R.L. & Thoene, J.G.; *J. Biol. Chem.* 264, 4850-4856 (1989)

- Pohlmann**, R.; Krüger, S.; Hasilik, A. & von Figura, K.;
Biochem. J. 217, 649-658 (1984)
- Renlund**, M.; Tietze, F. & Gahl, W.A.; Science 232, 759-762
(1986)
- Ritonja**, A.; Popovic, T.; Turk, V.; Wiedenmann, K. &
Machleidt, W.; FEBS Lett. 181, 169-172 (1985)
- Roederer**, M.; Bowser, R. & Murphy, R.F.; J. Cell. Physiol.
131, 200-209 (1987)
- Rosenblatt**; Amer. J. Med. Genet. 33 (4), 555 (1989)
- Roth**, J.; Biochim. Biophys. Acta 906, 405-436 (1987)
- Salzmann**, N.H. & Maxfield, F.R.; J. Cell Biol. 109,
2097-2104 (1989)
- San Segundo**, B.; Chan, S.J. & Steiner, D.F.; Proc. Natl. Acad.
Sci. USA 82, 2320-2324 (1985)
- Scriver**, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S. & Valle, D.;
"The Metabolic Basis of Inherited Disease", Vol. II,
Kap. 64-72, S. 1623-1843, McGraw-Hill (1989)
- Shaw**, E. & Dean, R.T.; Biochem. J. 186, 385-390 (1980)
- Sloane**, B.F.; Honn, K.V.; Sadler, J.G.; Turner, W.A.; Kimpson,
J.J. & Taylor, J.D.; Cancer Res. 42, 980-986 (1982)
- Sloane**, B.F. & Honn, K.V.; Cancer Metastasis Rev. 3, 249-263
(1984)
- Sloane**, B.F.; Rozhin, J.; Johnson, K.; Taylor, H.; Crissman,
J.D. & Honn, K.V.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83,
2483-2487 (1986)
- Smith**, M.L.; Greene, A.A.; Potashnik, R.; Mendoza, S.A. &
Schneider, J.A.; J. Biol. Chem. 262, 1244-1253 (1987)
- Sottrup-Jensen**, L.; J. Biol. Chem. 264, 11539-11542 (1989)
- Stein**, M.; Braulke, T.; Krentler, C.; Hasilik, A. & von
Figura, K.; Biol. Chem. Hoppe-Seyler 368, 937-947 (1987a)
- Stein**, M.; Zijderhand-Bleekemolen, J.E.; Geuze, H.; Hasilik,
A. & von Figura, K.; EMBO J. 6, 2677-2681 (1987b)
- Takahashi**, T.; Dehdarani, A.H.; Schmidt, P.G. & Tang, J.;
J. Biol. Chem. 259, 9874-9882 (1984)
- Takio**, K.; Towatari, T.; Katunuma, N.; Teller, D. & Titani, K.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3666-3670 (1983)
- Taniguchi**, T.; Mizuochi, T.; Towatari, T.; Katunuma, N. &

- Kobata, A.; *J. Biochem.* 97, 973-976 (1985)
- Tartakoff**, A.M.; *Methods Enzymol.* 98, 47-59 (1983)
- Thomas**, G.H.; Scocca, J.; Libert, J.; Vamos, E.; Miller, C.S.; Reynolds, L.W.; *Pediatr. Res.* 17, 307-312 (1983)
- Tietze**, F.; Seppala, R.; Renlund, M.; Hopwood, J.J.; Harper, G.S.; Thomas, G.H. & Gahl, W.A.; *J. Biol. Chem.* 264, 15316-15322 (1989)
- Tomoda**, H.; Kishimoto, Y. & Lee, Y.C.; *J. Biol. Chem.* 264, 15445-15450 (1989)
- Tondeur**, M.; Libert, J.; Vamos, E.; Van Hoof, F.; Thomas, G.H. & Strecker, G.; *Eur. J. Pediatr.* 82, 142-147 (1982)
- van Pelt**, J.; Kamerling, J.P.; Vliegenthart, J.F.G.; Hoogeveen, A.T. & Galjaard, H.; *Clin. Chim. Acta* 174, 325-336 (1988)
- Vaux**, D.; Tooze, J. & Fuller, S.; *J. Cell Biol.* 109 (4), Part 2 (Abstracts), 99a, 524 (1989)
- von Figura**, K.; *Eur. J. Biochem.* 80, 525-533 (1977)
- von Figura**, K. & Hasilik, A.; *Annu. Rev. Biochem.* 55, 167-193 (1986)
- Waheed**, A.; Braulke, T.; Junghans, U. & von Figura, K.; *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 152, 1248-1254 (1988)
- Walter**, P. & Lingappa, V.R.; *Annu. Rev. Cell Biol.* 2, 499-516 (1986)
- Weiss**, P.; Tietze, F.; Gahl, W.A.; Seppala, R. & Ashwell, G.; *J. Biol. Chem.* 264, 17635-17636 (1989)
- Wendland**, M.; Hille, A.; Nagel, G.; Waheed, A.; von Figura, K. & Pohlmann, R.; *Biochem. J.* 260, 201-206 (1989)
- Wieland**, F.T.; Gleason, M.L.; Serafini, T.A. & Rothman, J.E.; *Cell* 50, 289-300 (1987)
- Williams**, M.A. & Fukuda, M.; *J. Cell Biol.* 109 (4), Part 2, 114a, 609 (1989)
- Wilschut**, J.; *Curr. Opin. Cell Biol.* 1, 639-647 (1989)

Abkürzungen:

A.bi.	Aqua bidestillata, doppelt destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintri-phosphat
BHK	Baby-Hamster-Kidney-Zellen
BSA	Bovum-Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Cbz-Phe-Ala..	Benzyloxycarbonyl-Phenylalanyl-Alanin-Verbindung
Cbz-Arg-Arg..	Benzyloxycarbonyl-Arginyl-Arginin-Verbindung
CCCP	Carboxylcyanid-m-Chlorophenylhydrazon
cpm	counts per minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	decays per minute
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
GTP	Guanosintri-phosphat
h	Stunden
HANKS	Hanks' balanced salt solution
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IP	isoelektrischer Punkt
ISSD	Infantile Sialic Acid Storage Disease (Infantile Sialinsäure-Speicherkrankheit)
kDa	Kilodalton
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minuten
ManNAc	N-Acetylmannosamin
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
NANA	N-Acetylneuraminic Acid (N-Acetylneuraminsäure)
NEM	N-Ethylmaleinimid
NNap	N-Naphthylamin
NRK	Normal Rat Kidney-Zellen

PASA Protein A-Sepharose-Anti-Kathepsin B-Antikörper
PASKo Protein A-Sepharose-Kontrollimmungglobuline
PBS Phosphate buffered saline solution
PMSF Phenylmethylsulfonylfluorid
PNGase F Peptid:N-Glykanase F
PPO 2,5-Diphenyloxazol
SASD Sialic Acid Storage Disease
 (Sialinsäure-Speicherkrankheit)
SDS Sodium-Dodecylsulfat (Natrium-Dodecylsulfat)
SDS-PAGE Na-Dodecylsulfat-Polyacrylamidelektrophorese
Tab. Tabelle
TCA Trichloressigsäure
TEMED N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TGN Trans-Golgi-Network (trans-Golgi-Reticulum)
Tris Trishydroxymethylaminomethan
UDP Uridindiphosphat