

**Aus der Universitätsklinik für
Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde III mit Poliklinik
Ärztliche Direktorin: Professor Dr. I. Krägeloh-Mann**

**Untersuchungen zur Aktivität und Spezifität der
rekombinanten humanen Arylsulfatase A
mit Hilfe der analytischen Isotachophorese**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Sandra Maria Pajarola

aus

Chur/Schweiz

2011

**Aus der Universitätsklinik für
Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde III mit Poliklinik
Ärztliche Direktorin: Professor Dr. I. Krägeloh-Mann**

**Untersuchungen zur Aktivität und Spezifität der
rekombinanten humanen Arylsulfatase A
mit Hilfe der analytischen Isotachophorese**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Sandra Maria Pajarola

aus

Chur/Schweiz

2011

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Bruchelt

2. Berichterstatter:

Professor Dr. K. Harzer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	10
1 Einleitung.....	12
1.1 Einführung.....	12
1.2 Stoffwechsel der Sphingolipide	14
1.2.1 Funktion der Sphingolipide	14
1.2.2 Biosynthese der Sphingolipide	15
1.2.3 Abbau der Sphingolipide	18
1.2.4 Sulfatasen.....	22
1.3 Lysosomale Speicherkrankheiten.....	25
1.3.1 Metachromatische Leukodystrophie (MLD).....	28
1.3.2 Mucopolysaccharidosen	35
1.3.3 Multipler Sulfatase-Mangel	39
1.3.4 Diagnostik der Sphingolipidosen	41
1.4 Aufgabenstellung.....	46
1.4.1 Photometrische Messungen des Substratumsatzes	46
1.4.2 Verfolgung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebroside zu Galactocerebroside mittels Dünnschichtchromatographie	47
1.4.3 Untersuchungen mit der Isotachophorese.....	47
2 Material und Methoden	48
2.1 Material.....	48
2.1.1 Chemikalien und Substanzen.....	48
2.1.2 Lösungen, Puffer und Medien	49
2.1.2.1 Lösungen zur Zellextraktion.....	49
2.1.2.2 Photometrie.....	50
2.1.2.2.1 Proteinbestimmung.....	51
2.1.2.3 Dünnschichtchromatographie	52
2.1.2.4 Isotachophorese	54
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	54
2.1.4 Geräte.....	55
2.2 Methoden	56
2.2.1 Zellzahlbestimmung mit dem ADVIA 120.....	56
2.2.2 Isolierung von Leukozyten mittels Dextran sedimentation	59

Inhaltsverzeichnis

2.2.3	Granulozyten-Isolierung	60
2.2.4	Photometrische Messungen	61
2.2.4.1	Prinzip der Photometrie (s. Abb. 9).....	61
2.2.4.2	Photometrische Bestimmung der rhASA-Aktivität	62
2.2.4.3	Photometrische Bestimmung der Aktivität von ASA-Zellextrakten.....	62
2.2.4.4	Adaptation an die Isotachophorese	63
2.2.4.5	Proteinbestimmung nach Lowry	64
2.2.5	Dünnschichtchromatographie.....	65
2.2.5.1	Sulfatid und Galactocerebroside gelöst in CHCl ₃ /CH ₃ OH (2:1).....	65
2.2.5.2	Galactocerebroside und/ oder Sulfatid gelöst in Na-acetatpuffer 25 mmol/l, pH 5 und CHCl ₃ /CH ₃ OH (2:1).....	66
2.2.5.3	Na-acetatpuffer 25 mmol/l und CHCl ₃ /CH ₃ OH (2:1) mit oder ohne Zugabe von Taurocholat 1%, Taurocholat 1% und Sulfatid oder Taurocholat 1% und Galactocerebroside.....	66
2.2.5.4	Messung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebroside zu Galactocerebroside durch rhASA (1,48 U/ml oder 14,8 U/ml) nach 4-stündiger Inkubation bei 37 °C in Taurocholat- und Albumin-/ Na-acetatpufferlösung	67
2.2.5.5	Messung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebroside zu Galactocerebroside durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C in Taurocholat- und Na-acetatpuffer- oder Taurocholat- und Albumin-/ Na-acetatpufferlösung	67
2.2.5.6	Messung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebroside zu Galactocerebroside durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C in Na-acetatpuffer- oder Albumin-/ Na-acetatpufferlösung.....	68
2.2.5.7	Messung des Umsatzes von 350 µmol/l Sulfatid gelöst in 25 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5,0, 5 mmol/l MgCl ₂ und 0,3% Taurocholat durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C	69
2.2.5.8	Messung des Umsatzes von 350 µmol/l Sulfatid mit 5 mmol/l MgCl ₂ und Taurocholat sowie Na-acetatpuffer pH 5 verschiedener Konzentrationen durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C	69
2.2.5.9	Messung des Umsatzes von Sulfatid gelöst in Taurocholat 0,3% (rein oder unrein), MgCl ₂ 5 mmol/l und Na-acetatpuffer 25 mmol/l durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C	70
2.2.6	Isotachophorese	70
2.2.6.1	Grundlagen	70
2.2.6.2	Untersuchungen mit der ITP.....	82
2.2.6.2.1	Abbau von pNCS oder Ascorbilsulfat durch rhASA.....	84
2.2.6.2.2	Isotachogramme von Ascorbilsulfat und Ascorbat	84

Inhaltsverzeichnis

2.2.6.2.3	Stabilität von Ascorbylsulfat, Ascorbat und Ascorbylphosphat bei pH 5,0 und pH 7,4 oder in 100% FCS.....	85
2.2.6.2.4	Abbau von Ascorbylsulfat (4,76 mmol/l) durch a) rhASA oder b) Leukozytenextrakte	86
2.2.6.2.5	Abbau einer Mischung von pNCS und Ascorbylsulfat durch rhASA	86
2.2.6.2.6	Abbau einer Mischung von pNCS, Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat durch a) rhASA oder b) Leukozytenextrakte	86
2.2.6.2.7	Abbau von pNCS durch Leukozytenextrakte	88
2.2.6.2.8	Abbau einer Mischung von pNCS und Galactose-6-sulfat durch Leukozytenextrakte	88
2.2.6.2.9	Gemeinsame Inkubation von Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat mit Leukozyten- oder Granulozyten-Extrakten.....	89
3	Ergebnisse.....	91
3.1	Charakterisierung der Bezugssysteme	93
3.1.1	Vergleich der Siemens ADVIA 120-Blutbilder im Vollblut und nach Dextranedimentation.....	93
3.1.2	Eichkurve der Standardlösungen für die Proteinbestimmung	96
3.1.3	Proteinbestimmung der isolierten Leukozyten nach Dextranedimentation	97
3.2	Charakterisierung der ASA aus Extrakten von isolierten Leukozyten im Vergleich zur rhASA mittels Photometrie	98
3.2.1	Eichkurve für das Reaktionsprodukt p-Nitrocatechol	98
3.2.2	Zeitabhängiger Abbau von pNCS durch Leukozytenextrakte bei 4 °C und 37 °C und verschieden langen Inkubationszeiten	99
3.2.3	Umrechnung der Extinktionsdifferenz in Mole Umsatz von pNCS/Zeit/Zellzahl..	100
3.2.4	Abbau von pNCS durch rhASA	101
3.3	Einfluss der rhASA-Enzymkonzentration auf den Umsatz von pNCS unter verschiedenen Inkubationsbedingungen: Optimierung der Testbedingungen	104
3.3.1	Inkubation bei 4 °C für 48 Stunden unter verschiedenen Inkubationsbedingungen	105
3.3.1.1	Umsatz von pNCS durch rhASA unter Zugabe von Aqua bidest	105
3.3.1.2	Umsatz von pNCS durch rhASA unter Zugabe von Enzymextrakt aus Leukozyten.....	108
3.3.1.3	Umsatz von pNCS durch rhASA unter Zugabe von humanem Serumalbumin ..	110

Inhaltsverzeichnis

3.3.2	Inkubation von pNCS mit rhASA bei 37°C für 0-240 Minuten im Serum und Plasma.....	111
3.3.2.1	Umsatz von pNCS durch rhASA unter Zugabe von 50%igem Serum bei 37°C.	112
3.3.2.2	Umsatz von pNCS durch rhASA unter Zugabe von 50%igem Heparinplasma bei 37°C	113
3.4	Umsatz von pNCS durch rhASA 14,8 U/ml und 5,92 U/ml bei 37°C für 0-120 Minuten	115
3.5	Verfolgung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebroside zu Galactocerebroside durch rhASA mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie	117
3.5.1	Sulfatid und Galactocerebroside gelöst in CHCl ₃ /CH ₃ OH (2:1)	117
3.5.2	Galactocerebroside und/ oder Sulfatid gelöst in Na-acetatpuffer 25 mmol/l, pH 5 und CHCl ₃ /CH ₃ OH (2:1)	118
3.5.3	Na-acetatpuffer 25 mmol/l und CHCl ₃ /CH ₃ OH (2:1) mit oder ohne Zugabe von Taurocholat 1%, Taurocholat 1% und Sulfatid oder Taurocholat 1% und Galactocerebroside	119
3.5.4	Messung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebroside zu Galactocerebroside durch rhASA (1,48 U/ml oder 14,8 U/ml) nach 4 Stunden bei 37°C in Taurocholat- und Albumin-/ Na-acetatpufferlösung.....	120
3.5.5	Messung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebroside zu Galactocerebroside durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C in Taurocholat- und Na-acetatpuffer- oder Taurocholat- und Albumin-/ Na-acetatpufferlösung .	121
3.5.6	Messung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebroside zu Galactocerebroside durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C in Na-acetatpuffer- oder Albumin-/ Na-acetatpufferlösung.....	122
3.5.7	Messung des Umsatzes von 350 µmol/l Sulfatid gelöst in 25 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5,0, 5 mmol/l MgCl ₂ und 0,3% Taurocholat durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C.....	123
3.5.8	Messung des Umsatzes von 350 µmol/l Sulfatid mit 5 mmol/l MgCl ₂ und Taurocholat sowie Na-acetatpuffer pH 5 verschiedener Konzentrationen durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C.....	124
3.5.9	Messung des Umsatzes von Sulfatid gelöst in Taurocholat 0,3% (rein oder unrein), MgCl ₂ 5 mmol/l und Na-acetatpuffer 25 mmol/l durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C	125
3.6	Untersuchungen mit der Isotachophorese	126
3.6.1	Adaptation der Reaktionsansätze im Hinblick auf die anschließende Messung mit der ITP	126

Inhaltsverzeichnis

3.6.2	Untersuchungen des Abbaus verschiedener Substrate (Sulfate) durch rhASA.	130
3.6.2.1	Abbau von pNCS durch rhASA.....	130
3.6.2.2	Abbau von Ascorbylsulfat durch rhASA.....	134
3.6.2.2.1	Isotachophorese von Ascorbylsulfat und Ascorbat	134
3.6.2.2.2	Stabilität von Ascorbylsulfat, Ascorbylphosphat und Ascorbinsäure.....	136
3.6.2.2.3	Kinetik des Abbaus von Ascorbylsulfat durch rhASA.....	140
3.6.2.3	Abbau einer Mischung von pNCS und Ascorbylsulfat durch rhASA (14,8 U/ml) bei 37°C	145
3.6.2.4	Abbau einer Mischung von pNCS, Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat durch rhASA (14,8 U/ml) bei 37°C.....	147
3.6.3	Untersuchungen des Abbaus verschiedener Substrate (Sulfate) durch Leukozytenextrakte	150
3.6.3.1	Abbau von pNCS durch Leukozytenextrakte.....	150
3.6.3.2	Abbau von Ascorbylsulfat durch Leukozytenextrakte.....	151
3.6.3.3	Abbau einer Mischung von pNCS und Galactose-6-sulfat durch Leukozytenextrakte.....	152
3.6.3.4	Abbau einer Mischung aus Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat durch Leukozytenextrakte und Granulozytenextrakte	154
3.6.3.5	Abbau einer Mischung aus pNCS, Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat durch Leukozytenextrakte.....	157
4	Diskussion	160
4.1	Photometrische Untersuchungen der ASA (Leukozytenextrakte und rhASA)	160
4.2	Verfolgung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebrosid zu Galactocerebrosid durch rhASA mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie	161
4.3	Untersuchungen mit der Isotachophorese	163
5	Zusammenfassung.....	168
6	Literaturverzeichnis	169
	Danksagung	
	Lebenslauf	

Abkürzungen

Abkürzungen

ASA	Arylsulfatase A
ASB	Arylsulfatase B
ASC	Arylsulfatase C
BMT	Stammzelltransplantation
BSA	Bovines Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CT	Computer-Tomographie
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E	Extinktion
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERT	Enzymersatztherapie
g	relative Zentrifugalbeschleunigung (RZB)
FCS	Fetales Kälberserum
FGE	C _α -Formylglycin-generierendes Enzym
FGly	C _α -Formylglycin
GAG	Glykosaminoglykan
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HPTLC	hochauflösende Dünnschichtchromatographie
ITP	Isotachophorese
konz.	konzentriert
Ld	Leitelektrolyt
LSD	lysosomale Speicherkrankheit
LUC	Grosse lymphatisch veränderte Zellen
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
MNBC	Mononukleäre Blutzellen
MPS	Mucopolysaccharidose
MRT	Magnetresonanztomogramm
MSD	Multipler Sulfatase-Mangel
4MUS	4-Methylumbelliferonsulfat

Abkürzungen

NaCl	Kochsalz
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pNCS	p-Nitrocatecholsulfat
pNS	peripheres Nervensystem
rhASA	rekombinante humane Arylsulfatase
SAP	Sphingolipidaktivatorprotein
Sulfatid	3-Sulfo-Galactocerebrosid
SUMF	sulfatase modifying factor
Tm	Endelektrolyt
U	Units
z. A.	zur Analyse
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine lysosomale Speicherkrankheit (LSD), die autosomal-rezessiv vererbt wird und bei der es durch den Funktionsverlust des Enzyms Arylsulfatase A (ASA) zu einer Anreicherung von 3-Sulfo-Galactocerebroside (Sulfatid) in den Geweben kommt. Der klinische Verdacht auf MLD wird mittels biochemischer Verfahren, in der Regel durch Messung der Enzymaktivität in Zellen des Patienten, bestätigt, wofür verschiedene Substrate zur Verfügung stehen. Durch Untersuchung des jeweiligen Substratumsatzes kann auf diese Weise das defekte Enzym identifiziert werden. Zur Behandlung der MLD wird, neben der Stammzelltransplantation, versuchsweise auch die Enzymersatztherapie mit der rekombinanten humanen Arylsulfatase A (rhASA) eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der analytischen Isotachophorese (ITP), die eine Trennung ionischer Substanzen erlaubt, die Substratspezifität und Aktivität von Sulfatasen in Leukozytenextrakten, die mittels Dextranedimentation aus EDTA-Vollblut gewonnen wurden, und der rhASA miteinander zu vergleichen. Durch Auswahl von Substanzen, die Substrate verschiedener Sulfatasen darstellen, sollte eine Versuchsanordnung entwickelt werden, die es erlaubt, die ITP zur Diagnose von Krankheiten mit einem Sulfatase-Defekt zu verwenden.

Zunächst wurde die Aktivität der rhASA bei verschiedenen Umgebungsbedingungen anhand des Umsatzes von p-Nitrocatecholsulfat (pNCS), das ein künstliches Substrat der ASA darstellt, mit Hilfe der Photometrie bestimmt und der Versuchsansatz an die Bedingungen der ITP adaptiert. Mittels Dünnschichtchromatographie wurde danach die Spaltung des natürlichen Substrats 3-Sulfo-Galactocerebroside durch rhASA in Galactocerebroside und Sulfat untersucht. Schliesslich wurde der Umsatz

Einleitung

verschiedener Substrate durch rhASA und Leukozytenextrakte mit Hilfe der ITP untersucht und miteinander verglichen.

Im Folgenden wird ein Überblick über den Stoffwechsel der Sphingolipide gegeben. Anschliessend werden die durch einen Sulfatase-Defekt verursachten Krankheiten beschrieben und verschiedene Diagnose-Methoden, die bei lysosomalen Speicherkrankheiten verwendet werden, erläutert.

1.2 Stoffwechsel der Sphingolipide

1.2.1 Funktion der Sphingolipide

Sphingolipide gehören zusammen mit den Glyceroglykolipiden und den Isoprenol-Glykolipiden zu der Gruppe der Glykolipide (Verbindungen von Oligosacchariden mit Lipiden). Als amphiphile Moleküle sind sie Bestandteile der Glykokalix, einer kohlenhydratreichen Zone an der äusseren Oberfläche der Plasmamembran. Mit dem hydrophoben Ceramid(N-Acylsphingosin)-Rest sind sie in der Zellmembran verankert, der hydrophile Anteil ragt in den Extrazellulärraum. Oligosaccharide, die an die Sphingolipide gekoppelt sind und mit diesen zusammen die sogenannten Glykosphingolipide bilden, bedecken teilweise die Zelloberfläche [Sandhoff et Quintern, 1988]. Die Zusammensetzung der Oligosaccharide in der Glykokalix ist, bedingt durch unterschiedliche Verknüpfung der Monosaccharide zu Oligosacchariden, sehr vielfältig und zellspezifisch.

Zu den Aufgaben der Glykokalix, die auch innerhalb einer Zelle regional variieren und eine Zellpolarität schaffen kann, gehört die Zellerkennung, mit deren Hilfe Zellverbände bzw. Gewebe gebildet werden. Sie dient als Antigen, gegen das bei Eintritt in einen fremden Organismus Antikörper gebildet werden, und verleiht den Zellen die Blutgruppeneigenschaften [Schiebler, Schmidt, Zilles, 1999]. Ausserdem bildet sie Bindungsstellen für Toxine [Walton et al., 1988], Viren [Markwell et al., 1981] und Bakterien [Karlsson, 1989]. Cerebrosulfatide erfüllen die meisten strukturellen Anforderungen eines Opiatrezeptors, und Antikörper gegen Sulfatid können die Effekte von Morphin und β -Endorphin antagonisieren [Loh et al., 1978; Craves et al., 1980].

Das Glykosphingolipid 3-Sulfo-Galactocerebroside (Sulfatid), ein natürliches Substrat der ASA, kommt in besonders hohem Ausmass im Nervensystem vor, wo es bis zu 4-6% der Lipide der Myelinscheide ausmacht [Norton et Cammer, 1984; Taylor et al., 2004] und auf der Membranoberfläche liegt [Arvanitis et al., 1992]. Es befindet sich dort vor allem in Oligodendrozyten und Schwann-Zellen, kommt aber auch in Astrozyten und anderen Nervenzellen vor [Berntson et al., 1998; Pernber et al., 2002] und ist an der Regulierung des Zellwachstums, dem

Proteintransport, der Signaltransduktion sowie der neuronalen Plastizität und der Zell-Morphogenese beteiligt [Vos et al., 1994; Ishizuka, 1997; Merrill et al., 1997]. Sphingolipide spielen ausserdem eine Rolle bei der Regulierung des Immunsystems [Cinque et al., 2003].

1.2.2 Biosynthese der Sphingolipide

Als Grundbaustein für die Synthese der Sphingolipide (Sphingomyelin und Glykosphingolipide) dient Ceramid, das durch eine Amidbindung von Sphingosin (Aminodialkohol bestehend aus Palmitoyl-CoA und Serin) mit einer Fettsäure im glatten endoplasmatischen Reticulum [Mandon et al., 1992] entsteht (s. Abb. 1). Am häufigsten werden dabei für Sphingomyelin Palmitin- oder Stearinsäure, etwas seltener Nervon- oder Behensäure, für Cerebroside und Sulfatide Lignocerinsäure, Hydroxylignocerinsäure oder Nervonsäure (Fettsäuren mit 24 C-Atomen) verwendet.

Sphingomyelin

Wird die vom Serin abstammende Hydroxylgruppe von Ceramid mit Phosphorylcholin verestert, entsteht das Phospholipid Sphingomyelin. Die Synthese von Sphingomyelin aus Ceramid kann auf zwei Wegen erreicht werden:

1. Bildung von Sphingomyelin und Diacylglycerin nach einer Austauschreaktion von Ceramid mit Phosphatidylcholin
2. Bindung von Phosphorylcholin als CDP-Cholin an Ceramid unter CMP-Abspaltung

Glykosphingolipide

Zur Gruppe der Glykosphingolipide gehören Cerebroside, Sulfatide, Ganglioside und Globoside.

Reagiert die Hydroxylgruppe von Ceramid mit einer UDP-Hexose (meist UDP-Galactose), entsteht unter UDP-Abspaltung ein mit einer Hexose substituiertes Sphingolipid, ein Cerebrosid, vor allem 1- β -Galactocerebrosid (s. Abb. 2). Wird an das Galactocerebrosid zusätzlich ein Sulfatrest, meist an das C-Atom 3 der Galactose, angehängt, entsteht aus dem Cerebrosid ein Sulfatid (Galactocerebrosid-3-sulfat, s. Abb. 3). Für diese Reaktion, die im Golgi-Apparat stattfindet, wird das aktive Sulfat 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat benötigt.

Für die Gangliosid- und Globosidbiosynthese werden Uridinnucleotid-aktivierte Hexosen unter Katalyse spezifischer Transferasen schrittweise an ein Glucocerebrosid angeheftet, so dass ein an Ceramid gebundener Oligosaccharidanteil entsteht. Dazu werden wie bei den Heteropolysacchariden Uridinnucleotid-aktivierte Zucker als Bausteine verwendet.

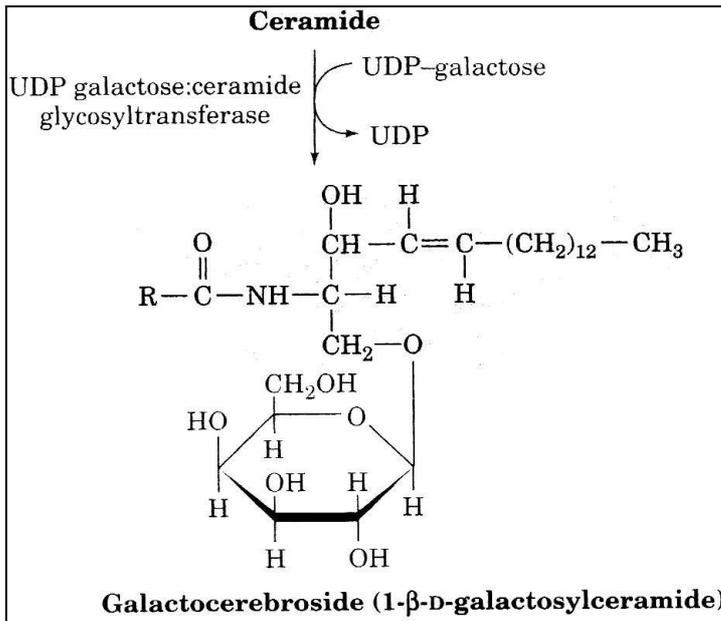


Abbildung 2: Synthese von Galactocerebroside aus Ceramid und UDP-Galactose (aus: Voet et Voet, 2004)

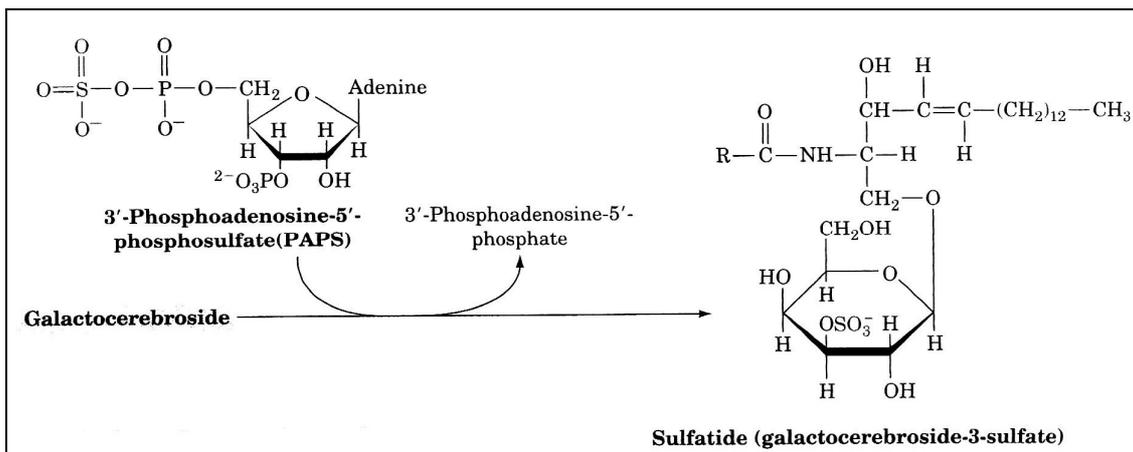


Abbildung 3: Synthese von Sulfatid aus Galactocerebroside (aus: Voet et Voet, 2004)

1.2.3 Abbau der Sphingolipide

Für den Abbau der Sphingolipide, die sehr schnell umgesetzt werden, sind lysosomale Hydrolasen verantwortlich. Der Abbau findet in den Lysosomen statt, wobei Tempesta et al. [1994] in durch Epstein-Barr-Virus transformierten lymphoblastischen Zelllinien den Abbau von Cerebroside-sulfat, jedoch nicht von Sphingomyelin, ausserhalb der Lysosomen nachweisen konnten. Abbildung 4 zeigt zwei Modelle des Abbaus der Sphingolipide.

Einleitung

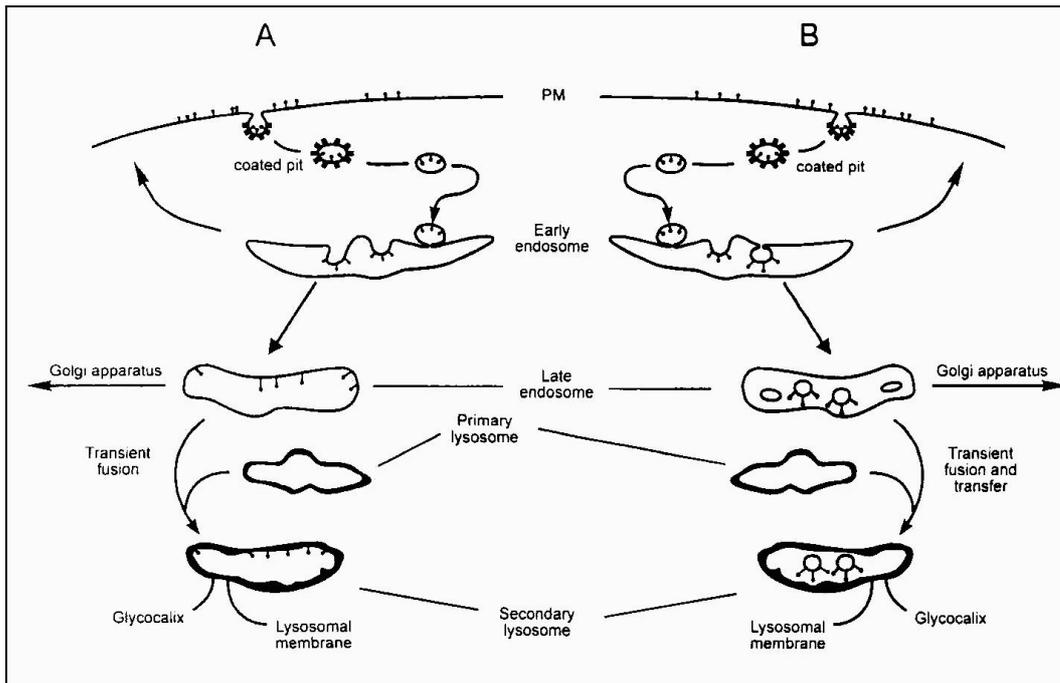


Abbildung 4: Zwei Modelle der räumlichen Struktur der Endozytose und lysosomalen Verdauung von Glykosphingolipiden der Plasmamembran (aus: Sandhoff et Kolter, 1996). Membranmoleküle unterliegen einem Auswahlverfahren und werden entweder ins Lysosom, in den Golgi-Apparat oder zurück in die Plasmamembran geleitet. Endozytotische Vesikel entstehen durch Abschnürung der Glykosphingolipide als Stachelsaumgrübchen (coated pits).

A: Endozytotische Vesikel mit Glykosphingolipiden verschmelzen mit frühen Endosomen und werden Bestandteile der lysosomalen Membran, in der die Glykosphingolipide abgebaut werden.

B: Während der Endozytose werden die Glykosphingolipide von intraendosomalen Vesikeln (multivesikulären Vesikeln) aufgenommen und auf diese Weise zu den Lysosomen transportiert, wo die späten Endosomen mit den primären Lysosomen fusionieren. Die Glykosphingolipide befinden sich innerhalb der Lysosomen, in denen sie abgebaut werden.

● = Glykosphingolipid

Sphingomyelin wird durch eine spezifische Sphingomyelinase, die den Phosphorylcholinrest abspaltet, in Phosphorylcholin und Ceramid, das Ceramid in seine Bestandteile, den Aminodialkohol Sphingosin und eine Fettsäure, zerlegt.

Einleitung

Cerebroside, Ganglioside und Globoside werden ausgehend von der Kohlenhydratkette abgebaut: durch β -Galactosidasen werden die Galactosylreste, durch Hexosaminidasen die acetylierten Galactosaminreste und durch Neuraminidasen die Neuraminsäurereste abgespalten.

Der Sulfatrest der Sulfatide wird durch spezifische Sulfatidasen abgespalten. In Abbildung 5 ist die Spaltung von Sulfatestern durch Sulfatasen ersichtlich.

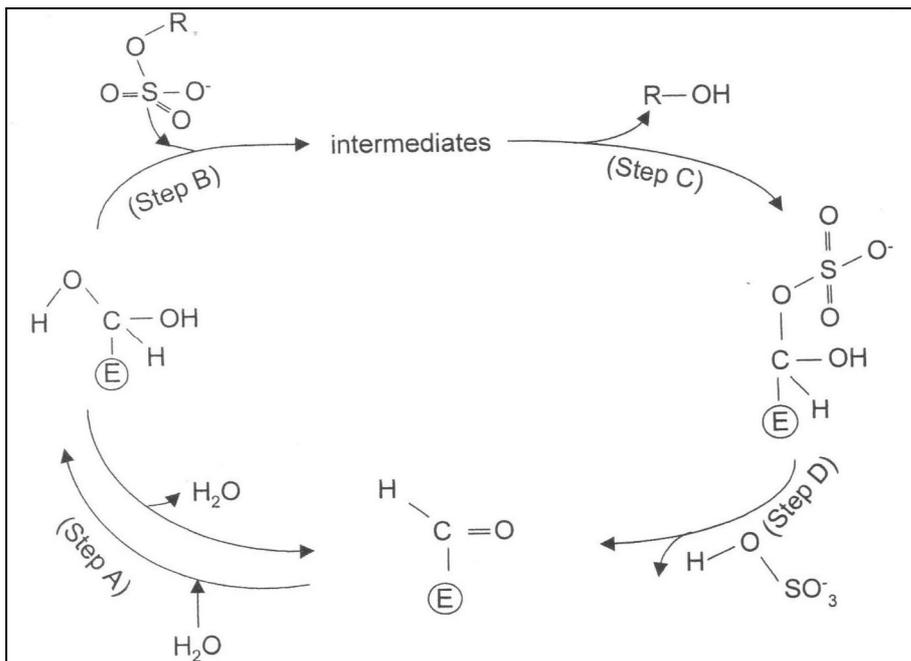


Abbildung 5: Propagierter Abspaltungsvorgang von Sulfaten in Sulfatiden durch Sulfatasen (aus: Hopwood et Ballabio, 2001). Step A: Bildung eines Aldehydhydrats beim α -Formylglycin-Rest der Sulfatase. Step B: Die Hydroxylgruppe des Aldehydhydrats attackiert die Sulfatgruppe des Sulfatesters, so dass sich ein Enzym-Sulfatester-Komplex bildet. Step C: Ein nucleophiler Angriff der Hydroxylgruppe des Aldehydhydrats führt vermutlich zur Freisetzung eines Alkohols ($\text{R}-\text{OH}$). Zwischen Schritt B und C sind verschiedene Zwischenprodukte möglich. Step D: Abspaltung des Sulfats.

Um die wasserlöslichen Enzyme mit den Sphingolipiden, die sich in den Membranen und Membranvesikeln befinden, in Kontakt zu bringen, werden Glykoproteine, sogenannte Sphingolipidaktivatorproteine (SAP's), benötigt, welche die abzubauenen Sphingolipide binden. Abbildung 6 zeigt ein Übersichtsschema des Sphingolipidabbaus und der bei Defekten spezifischer Enzyme entstehenden lysosomalen Speicherkrankheiten.

Einleitung

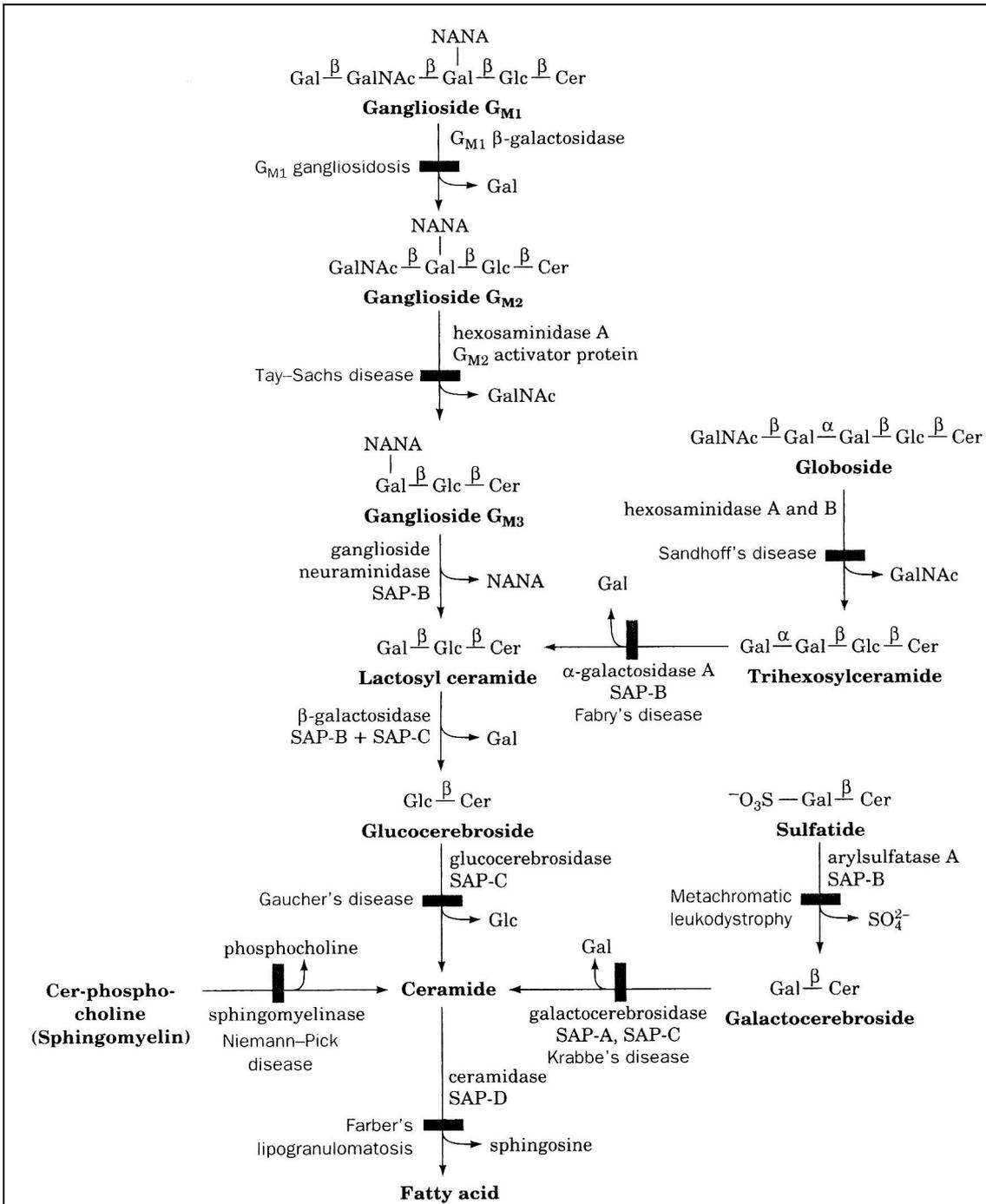


Abbildung 6: Übersichtsschema des Sphingolipidabbaus und der bei Defekten spezifischer Enzyme entstehenden Speicherkrankheiten (aus: Voet et Voet, 2004)

1.2.4 Sulfatasen

Sulfatasen sind Proteine, welche die Hydrolyse von Sulfatestern katalysieren und damit Sulfat von verschiedenen Substraten abspalten. Folgende Eigenschaften sind allen Sulfatasen gemeinsam [Diez-Roux et Ballabio, 2005, Hanson et al., 2004]:

- Grösse zwischen 500-800 Aminosäuren
- Extensive Glykosylierung vor dem Transport in andere Kompartimente (z.B. extrazelluläre Matrix, endoplasmatisches Reticulum, Golgi-Apparat, Lysosomen)
- 20-60-prozentige Sequenzhomologie über die gesamte Länge des Proteins
- Hoch konservierte N-terminale Region
- Posttranslational im endoplasmatischen Reticulum eingeführter α -Formylglycin-Rest (Aldehyd) im aktiven Zentrum

Die bisher bekannten Sulfatasen lassen sich in zwei Gruppen einteilen [Diez-Roux et Ballabio, 2005]:

1. Lysosomale Sulfatasen mit katabolen Eigenschaften

- wasserlöslich
- Lokalisation in den Lysosomen
- Aktivität im sauren pH-Bereich
- Defekt einer Sulfatase verursacht eine lysosomale Speicherkrankheit (s. Tab. 1)

2. Nicht-lysosomale Sulfatasen

- Lokalisation in nicht-lysosomalen Kompartimenten, z.B. Golgi-Apparat, Endoplasmatisches Reticulum (membrangebunden), extrazellulär (wasserlöslich)
- Aktivität im neutralen pH-Bereich
- Funktion oft nicht bekannt

Ausserdem wurden zwei Sulfatasen (SULF1 und SULF2) entdeckt, die sich sehr ähnlich und etwas grösser als die bisher bekannten Sulfatasen sind und sich auf der Zelloberfläche befinden. Die Genexpression dieser Sulfatasen wird durch Wachstum reguliert, was darauf hindeutet, dass diese Sulfatasen an Zellsignalen und der embryonalen Entwicklung beteiligt sind [Dhoot et al., 2001; Morimoto-Tomita et al., 2002; Ohto et al., 2002]. Tabelle 1 zeigt die Merkmale der bisher bekannten Sulfatasen.

Einleitung

Tabelle 1: Übersicht und Merkmale der bisher bekannten Sulfatasen (aus: Diez-Roux et Ballabio, 2005)

Gene	Chromosomal localization	Enzyme	Subcellular localization	Human disorder
<i>ARSA</i>	22q13	Arylsulfatase A	Lysosomal	Metachromatic leukodystrophy (MLD)
<i>ARSB</i>	5q13	Arylsulfatase B	Lysosomal	Maroteaux-Lamy syndrome (MPSVI)
<i>IDS</i>	Xq27-28	Iduronate Sulfatase	Lysosomal	Hunter syndrome (MPSII)
<i>SGSH</i>	17q25.3	Sulfamidase	Lysosomal	Sanfilippo A syndrome (MPSIIIA)
<i>G6S</i>	12q14	Glucosamine-6-Sulfatase	Lysosomal	Sanfilippo D syndrome (MPSIIID)
<i>GAL6S</i>	16q24	Galactose-6-Sulfatase	Lysosomal	Morquio A syndrome (MPSIVA)
<i>ARSC/STS</i>	Xp22.3	Arylsulfatase C/Steroid sulfatase	Microsomal	X-linked Ichthyosis (XLI)
<i>ARSD</i>	Xp22.3	Arylsulfatase D	ER	NI
<i>ARSE</i>	Xp22.3	Arylsulfatase E	Golgi	Chondrodysplasia Punctata 1 (CDPX1)
<i>ARSF</i>	Xp22.3	Arylsulfatase F	ER	NI
<i>ARSH^a</i>	Xp22.3	Arylsulfatase H	ND	NI
<i>HSULF1</i>	8q13.2-13.3	Hsulf1	Cell surface	NI
<i>HSULF2</i>	20q13.12	Hsulf2	Cell surface	NI
<i>ARSG</i>	17q23-24	Arylsulfatase G	ER	NI
<i>ARSJ^b</i>	4q26	Arylsulfatase J	ER	NI
<i>ARK^b</i>	5q32	Arylsulfatase K	ER	NI
<i>TSULF^a</i>	5q15	T. Sulfatase	ND	NI

^aM. Sardiello & A. Ballabio, unpublished results.

^bI. Annunziata & A. Ballabio, unpublished results.

ER, endoplasmatic reticulum; ND, not determined; NI, not identified.

Arylsulfatasen

Sulfatasen, die einen heterozyklischen Benzen-Ring, eine sogenannte Arylgruppe, tragen, werden Arylsulfatasen genannt.

Die Kristallstrukturen der Arylsulfatase A (ASA), Arylsulfatase B (ASB) und Arylsulfatase C (ASC), die sich sehr ähnlich sind, wurden unabhängig voneinander mittels Röntgenstrahlbeugung untersucht [Bond et al., 1997; Hernandez-Guzman et al., 2003; Lukatela et al., 1998]: Die Proteine erscheinen als globuläre Monomere, die in zwei Domänen geteilt sind. Die N-terminale Domäne, die auch die enzymatisch aktive Seite, die derjenigen der alkalischen

Phosphatasen ähnlich ist, umfasst, ist grösser und besteht aus α -Helices und einem grossen zentral gelegenen β -Faltblatt. Die C-terminale Domäne beinhaltet ein kleines antiparalleles β -Faltblatt mit einer langen α -Helix. ASC hat zusätzlich eine transmembrane Domäne mit zwei hydrophoben Helices [Hernandez-Guzman et al., 2003]. Die aktive Seite enthält ein zweiwertiges Metallion in der Substrat-bindenden Tasche und einen Cystein-Rest, der in allen Sulfatasen posttranslational verändert wird und für die enzymatische Aktivität essentiell ist [Bond et al., 1997; Lukatela et al., 1998]. Das Fehlen dieser posttranslationalen Modifikation verursacht die lysosomale Speicherkrankheit Multipler Sulfatase-Mangel.

1.3 Lysosomale Speicherkrankheiten

Es sind bisher mehr als 41 genetisch bedingte lysosomale Speicherkrankheiten (LSD) bekannt. Die Gesamtprävalenz der LSD ist in verschiedenen Ländern ähnlich: in Tschechien wurden von Poupetova et al. [2010] ca. 12 Patienten pro 100.000 Einwohner berechnet, in Australien beträgt die Erkrankungsrate etwa 13 pro 100.000 Einwohner [Meikle et al., 1999], in den Niederlanden 14 und in Italien 12 Patienten pro 100.000 Einwohner [Poorthuis et al., 1999; Dionisi-Vici et al., 2002], wobei die häufigste LSD in Tschechien, Australien und Italien Morbus Gaucher, in den Niederlanden Morbus Pompe ist. Die höher gemessene Gesamtprävalenz in Portugal (25 Patienten pro 100.000 Einwohner) könnte auf die relativ isolierte geographische Lage Portugals zurückzuführen sein [Pinto et al., 2004].

Bei allen lysosomalen Speicherkrankheiten führt der Defekt einer oder mehrerer spezifischer lysosomaler Hydrolasen zu einer übermässigen Anhäufung der dadurch nicht mehr abbaubaren Substrate in den Lysosomen. Die Speicherung dieser physiologischen Substanzen führt zu einer Vergrösserung der Lysosomen (mikroskopisch als Vakuolen sichtbar), zu einer Zellschwellung und Zellvermehrung und schliesslich zu Funktionsstörungen der Zellen, z.B. des intrazellulären Transports. Davon betroffen sind vor allem das Nervensystem, mesenchymatöse (Haut, Knorpel, Knochen) und parenchymatöse (Leber, Milz) Organe.

Einleitung

Settembre et al. [2008; 2009] haben nachgewiesen, dass bei verschiedenen lysosomalen Speicherkrankheiten die Anhäufung der Substrate die Fusion von Lysosomen und Autophagosomen behindert, was die weitere Speicherung von Protein-Aggregaten und von dysfunktionellen Mitochondrien zur Folge hat.

Mit Ausnahme des Morbus Hunter (Mucopolysaccharidose Typ II) und des Morbus Fabry (Sphingolipidose), die X-chromosomal vererbt werden, werden alle lysosomalen Speicherkrankheiten autosomal-rezessiv vererbt.

Betroffene Neugeborene entwickeln sich in der Regel zunächst unauffällig. Allerdings sollte bei einem nichtimmunologischen Hydrops fetalis oder einer Kardiomegalie im Säuglingsalter an eine lysosomale Speicherkrankheit gedacht werden. Die Symptome, die in jedem Alter auftreten können, entwickeln sich langsam progredient ohne akute metabolische Entgleisungen.

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der bekanntesten lysosomalen Speicherkrankheiten.

Tabelle 2: Übersicht der bekanntesten lysosomalen Speicherkrankheiten (aus: Voet et Voet, 2004)

Disease	Enzyme Deficiency	Principal Storage Substance	Major Symptoms
G _{M1} Gangliosidosis	G _{M1} β-galactosidase	Ganglioside G _{M1}	Mental retardation, liver enlargement, skeletal involvement, death by age 2
Tay–Sachs disease	Hexosaminidase A	Ganglioside G _{M2}	Mental retardation, blindness, death by age 3
Fabry's disease	α-Galactosidase A	Trihexosylceramide	Skin rash, kidney failure, pain in lower extremities
Sandhoff's disease	Hexosaminidases A and B	Ganglioside G _{M2} and globoside	Similar to Tay–Sachs disease but more rapidly progressing
Gaucher's disease	Glucocerebrosidase	Glucocerebroside	Liver and spleen enlargement, erosion of long bones, mental retardation in infantile form only
Niemann–Pick disease	Sphingomyelinase	Sphingomyelin	Liver and spleen enlargement, mental retardation
Farber's lipogranulomatosis	Ceramidase	Ceramide	Painful and progressively deformed joints, skin nodules, death within a few years
Krabbe's disease	Galactocerebrosidase	Deacylated galactocerebroside	Loss of myelin, mental retardation, death by age 2
Metachromatic leukodystrophy (Sulfatide lipidosis)	Arylsulfatase A	Sulfatide	Mental retardation, death in first decade

Da in der vorliegenden Arbeit die rekombinante humane Arylsulfatase A näher untersucht und mit Sulfatasen in Leukozytenextrakten verglichen wurde, sollen hier nur diejenigen Speicherkrankheiten näher erläutert werden, bei denen eine oder mehrere Sulfatasen defekt sind (s. Tab. 3):

Einleitung

- Metachromatische Leukodystrophie (Defekt der Arylsulfatase A)
- Morbus Hunter (Mucopolysaccharidose Typ II, Defekt der Iduronat-2-sulfatase)
- Morbus Sanfilippo Typ A (Mucopolysaccharidose Typ IIIA, Defekt der Heparan N-sulfatase = Sulfamidase)
- Morbus Sanfilippo Typ D (Mucopolysaccharidose Typ IIID, Defekt der N-Acetyl-glucosamin-6-sulfatase)
- Morbus Morquio Typ A (Mucopolysaccharidose Typ IVA, Defekt der Galactose-6-sulfatase = N-Acetyl-galactosamin-6-sulfatase)
- Morbus Maroteaux-Lamy (Mucopolysaccharidose Typ VI, Defekt der N-Acetyl-galactosamin-4-sulfatase = Arylsulfatase B)
- Multipler Sulfatase-Mangel (Defekt aller Sulfatasen)

Einleitung

Tabelle 3: Durch den Defekt einer einzelnen Sulfatase verursachte Krankheiten (aus: Diez-Roux et Ballabio, 2005)

Name	Abbreviation	Inheritance pattern	Enzyme deficiency	Main disease manifestations
Metachromatic leukodystrophy	MLD	Autosomal recessive	Arylsulfatase A	Demyelination of central and peripheral nervous system
Hunter syndrome	MPSII	X-linked recessive	Iduronate sulfatase	Dysostosis multiplex Organomegaly Mild to severe mental retardation
Sanfilippo A syndrome	MPSIIIA	Autosomal recessive	<i>Sulfamidase</i>	} Hyperactivity Mild somatic features Severe neurological manifestations
Sanfilippo D syndrome	MPSIIID	Autosomal recessive	N-acetylglucosamine-6-sulfatase	
Morquio A syndrome	MPSIV	Autosomal recessive	Galactose 6-sulfatase	
Maroteaux-Lamy syndrome	MPSVI	Autosomal recessive	Arylsulfatase B	Dysostosis multiplex Corneal clouding
X-linked ichthyosis	XLI	X-linked recessive	Arylsulfatase C/Steroid sulfatase deficiency	Dark scaly skin Mild corneal opacities
Chondrodysplasia Punctata I	CDPX1	X-linked recessive	Arylsulfatase E	Aberrant bone mineralization Nasal hypoplasia Short stature Distal phalangeal hypoplasia

1.3.1 Metachromatische Leukodystrophie (MLD)

Bereits 1910 wurden von Alzheimer [1910] metachromatische Ablagerungen und eine Demyelinisierung der weissen Substanz des ZNS bei Patienten mit progredienter Demenz und motorischer Verschlechterung beschrieben. Amaducci et al. [1991] vermuten, dass es sich dabei um Patienten mit der adulten Form einer Metachromatischen Leukodystrophie handeln könnte.

Unabhängig davon beschrieb Witte [1921] einen Patienten mit metachromatischen Ablagerungen nicht nur im Gehirn, sondern auch in der Leber, in den Nieren und Hoden. Die Erkrankung war früher unter dem Namen

Einleitung

„Diffuse Gehirn-Sklerose“ bekannt, bevor sie 1938 von Einarson und Neel in „Metachromatische Leukodystrophie“ (MLD) umbenannt wurde [Einarson et Neel, 1938].

Bei der MLD kommt es durch einen genetisch verursachten Defekt des Enzyms Arylsulfatase A zu einer Speicherung des Sulfatids 3-Sulfo-Galactocerebrosid. Seltener ist ein Defekt des Sphingolipidaktivatorproteins Saposin B Ursache der MLD.

MLD kann in jedem Alter manifest werden, das Krankheitsbild unterscheidet sich jedoch je nach Auftrittsalter. Man unterteilt die MLD deshalb in 3 klinische Formen (spätinfantile, juvenile und adulte Form), die in der Tabelle 4 zusammengefasst sind.

Tabelle 4: Formen und Charakteristika verschiedener MLD-Formen (aus: von Figura et al., 2001)

Type	Age at onset (years)	Main clinical manifestations	Spinal fluid protein	Nerve conduction velocity	Urinary sulfatide excretion
Infantile	0.5–4	Gait disturbance, decreased tendon reflexes, mental regression, loss of speech, optic atrophy, ataxia, progressive spastic quadriparesis	Elevated	Slowed	Elevated
Early juvenile	4–6	Gait and postural abnormalities, emotional and behavioral disturbances, optic atrophy, progressive spastic quadriparesis	Elevated	Slowed	Elevated
Late juvenile	6–16	Behavioral abnormalities, poor school performance, language regression, gait disturbance, slowly progressive spastic tetraparesis	Elevated	Slowed	Elevated
Adult	> 16	Mental regression, psychiatric symptoms, incontinence, slowly progressive spastic tetraparesis	Normal or elevated	Normal or slowed	Elevated

Spätinfantile MLD

Die spätinfantile Form der MLD beginnt bei Kindern im Alter zwischen 6 Monaten und 4 Jahren. Hagberg [1963] hat den klinischen Verlauf in 4 Stadien mit folgenden Merkmalen eingeteilt:

Einleitung

Stadium 1

- Beginn meistens mit Hypotonie der unteren oder aller Extremitäten
- Gangunsicherheit
- Muskeleigenreflexe durch Polyneuropathie abgeschwächt oder nicht vorhanden
- Dauer wenige Monate bis > 1 Jahr

Stadium 2

- Ataxie, Stehen nicht mehr möglich
- Geistige Retardierung
- Dysarthrie und Aphasie mit Sprachverschlechterung
- Ev. Nystagmus, optische Atrophie, gräuliche Makula-Verfärbung
- Neuropathie ev. schmerzhaft
- Erhöhter Muskeltonus in den unteren Extremitäten
- Dauer wenige Monate

Stadium 3

- Allmähliche Entwicklung einer spastischen Tetraplegie mit pathologischen Reflexen (Beteiligung der Pyramidenbahnen), Bettlägerigkeit
- (Pseudo-)Bulbärparalyse mit Atemwegobstruktion und Ernährungsproblemen
- Ev. Krampfanfälle

Stadium 4

- Dezerebrierungsstadium mit ungezielten Bewegungen
- Blindheit
- Ernährungshilfe notwendig, z.B. Perkutane endoskopische Gastrostomie (PEG)
- Dauer bis mehrere Jahre möglich

Die meisten Patienten mit spätinfantiler MLD versterben etwa 5 Jahre nach Beginn der Symptome [Hagberg, 1963].

Juvenile MLD

Bei Patienten mit juveniler MLD treten die ersten Symptome im Alter von 4 bis 16 Jahren auf. Erste Anzeichen sind oft Schulprobleme. Es treten Inkontinenz, eine verwaschene Sprache und Gangunsicherheit auf. Häufig zeigen betroffene Patienten auch Verhaltensauffälligkeiten. Die juvenile MLD kann in eine frühe Form, die klinisch der spätinfantilen MLD ähnelt, und in eine späte Form, bei der zuerst Verhaltensauffälligkeiten, Schul- und Sprachprobleme und erst später Gangunsicherheit auftreten [Balslev et al., 1997], unterteilt werden (s. Tab. 4). Im Gegensatz zur spätinfantilen Form sind die Muskeleigenreflexe bei der juvenilen MLD in der Regel erhöht [von Figura et al., 2001]. Selten fallen Patienten zuerst mit akuter Cholezystitis [Clarke et al., 1989] oder Pankreatitis [Deeg et al., 1986] auf. Meistens sterben Erkrankte vor dem 20. Lebensjahr.

Adulte MLD

Die adulte Form der MLD tritt ab dem Alter von 16 Jahren auf. Die Symptome äussern sich vor allem in einer Abnahme intellektueller Fähigkeiten: Leistungsabnahme in der Schule oder bei der Arbeit und psychische Labilität. Nicht selten treten auch psychiatrische Symptome wie z.B. Halluzinationen, Illusionen, Psychosen oder Schizophrenien auf [Hyde et al., 1992; Shapiro et al., 1994]. Weitere Krankheitszeichen sind Inkontinenz und die Entwicklung einer spastischen Tetraparese mit gesteigerten Muskeleigenreflexen. Ataxie und Extrapiramidalsymptome sowie optische Atrophie können vorkommen, Krampfanfälle sind selten. Zuletzt erreichen die Patienten einen vegetativen Zustand. Die Erkrankungsdauer reicht von wenigen Jahren bis mehreren Jahrzehnten [von Figura et al., 2001].

In der Computer-Tomographie (CT) von MLD-Patienten zeigt sich eine symmetrische Abnahme der Abschwächung der weissen Substanz, die eine Folge des graduellen Myelinverlusts und des gestiegenen Wassergehalts in

Einleitung

den verbleibenden Strukturen ist. Diese geringe Dichte ist sehr früh im Krankheitsverlauf, bei adulter MLD teilweise bereits vor Ausbruch der Krankheit, sichtbar und schreitet v.a. bei der spätinfantilen und juvenilen Form der MLD schnell fort. Im weiteren Verlauf beobachteten Schipper und Seidel [1984] eine Erweiterung der Ventrikel und eine erhebliche kortikale Atrophie bei adulter MLD. Das Magnetresonanztomogramm (MRT) zeigt in der T₂-Wichtung ein diffuses hyperintenses Signal sowohl der periventrikulären als auch der subkortikalen weissen Substanz [Demaerel et al., 1991] und in der T₁-Wichtung ein schwaches hypointenses Signal der Läsionen der weissen Substanz. Durch Kontrastmittelgabe werden diese Signale nicht verstärkt.

Histopathologisch fallen bei MLD vor allem eine Demyelinisierung und metachromatische Ablagerungen auf, deren Sulfatidgehalt ca. 39% ihres Gesamtlipidgehalts ausmacht. Die anderen Lipidkomponenten sind Cholesterol und Phosphatide [Suzuki et Chen, 1967]. Im zentralen Nervensystem (ZNS) ist ein moderater bis schwerer Verlust von Myelinscheiden sowie eine verringerte Anzahl intrafaszikulärer Oligodendrozyten sichtbar [Greenfield, 1933]. Im peripheren Nervensystem (pNS) kommt es in den Schwann-Zellen zu einer segmentalen Demyelinisierung mit metachromatischen Granula, die sich auch in endoneuralen Makrophagen finden [Martin et al., 1985]. Die metachromatischen Ablagerungen sind sichtbar, bevor die Nervenleitungsgeschwindigkeit abnimmt [Alves et al., 1986]. Sulfatidablagerungen finden sich auch in viszeralen Geweben, z.B. in den Nieren [Eto et al., 1982], Gallenblase [Malde et al., 1997] und Leber [Resibois, 1971]. Die Sulfatidkonzentration im Urin ist erhöht [Nishio et al., 1985].

Der Defekt der Arylsulfatase A (ASA), deren Struktur bereits im Kapitel 1.2.4 (Sulfatasen) beschrieben ist, wurde in mehreren Zellen, z.B. in Leukozyten [Dubois et al., 1980; Percy et Brady, 1968], kultivierten Lymphozyten [Beratis et al., 1975] und Hautfibroblasten [Percy et Brady, 1968] nachgewiesen. Hultberg [1979] sowie Thomas et Howell [1972] konnten den Defekt der ASA auch im Urin feststellen. Urin wird gelegentlich als Probematerial zur Messung der ASA-

Einleitung

Aktivität verwendet, meist wird die Aktivität aber in peripheren Blutzellen und – seltener - kultivierten Fibroblasten gemessen. Als künstliches Substrat wird dafür meistens die chromogene Substanz p-Nitrocatecholsulfat (pNCS), teilweise auch 4-Methylumbelliferonsulfat (4MUS), gebraucht, die allerdings beide nicht nur durch ASA, sondern auch durch andere Sulfatasen, vor allem durch die Arylsulfatase B (ASB) umgesetzt werden. Baum et al. [1950] haben deshalb ein Verfahren entwickelt, mit dem ASB gehemmt werden kann. Andere Substrate der ASA sind Lactosylsulfatid [Harzer et Benz, 1974], Seminolipid [Gadella et al., 1992] und Psychosinsulfat [Fischer et al., 1978].

Neben dem Defekt der ASA verursacht selten ein defektes Cerebrosid-Aktivator-Protein, das nicht-enzymatische Glykoprotein Saposin B, die metachromatische Leukodystrophie. Dieses Protein ist an der Extraktion von Sulfatiden und anderer Sphingolipide aus der Plasmamembran beteiligt und wird für deren Abbau durch lysosomale Enzyme benötigt [Vogel et al., 1991].

Nicht zu verwechseln mit der metachromatischen Leukodystrophie ist die Pseudodesuffizienz der Arylsulfatase A, bei der die ASA zwar nur noch 5-15% der normalen ASA-Aktivität beträgt, die betroffenen Personen jedoch keine klinischen Symptome und keine Anzeichen einer pathologischen Sulfatidspeicherung oder -ausscheidung haben [Dubois et al, 1975; Dubois et al., 1977]. Das für die Pseudodesuffizienz verantwortliche Gen ist ein Allel des ASA-Gens [Chang et Davidson, 1983], so dass diese meist durch 2 homozygote Allele, die durch einen Polymorphismus nur wenig Enzym-Aktivität codieren, verursacht wird. Sie ist selten die Folge einer Compound-Heterozygotie für ein Pseudodesuffizienz- und ein MLD-Allel [Penzien et al., 1993]. In Europa sind etwa 1-2% der Bevölkerung von der ASA-Pseudodesuffizienz betroffen [von Figura et al., 2001].

Therapie

Bisher gibt es keine kurative Therapie für die metachromatische Leukodystrophie. Die Spastizität und die Ataxie können durch den GABA-

Inhibitor Vigabatin reduziert werden, der gleichzeitig antiepileptisch wirkt [Kurlemann et Palm, 1991].

In den letzten Jahren haben einige Patienten eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (BMT) erhalten. Das Prinzip dieser Therapie basiert darauf, dass neu synthetisierte lysosomale Enzyme zu ca. 10-30% sekretiert und über Bindung an Mannose-6-phosphat-Rezeptoren auf der Plasmamembran von benachbarten Zellen wieder aufgenommen werden können. Auf diese Weise sind gesunde Zellen in der Lage, lysosomale Enzyme an eine defekte Zelle weiterzugeben [von Figura et al., 2001]. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die BMT nur bei Patienten mit juveniler oder adulter MLD in einem frühen Stadium, d.h. bevor offensichtliche kognitive oder motorische Defizite auftreten, sinnvoll ist und das Fortschreiten der Krankheit verlangsamen kann [Gorg et al., 2007; Kidd et al., 1998]. Sind bereits neurologische Defizite vorhanden, wird die BMT nicht empfohlen [Gieselmann et Krägeloh-Mann, 2010]. Patienten mit spätinfantiler MLD haben wegen der schnellen Progression der Krankheit keinen Nutzen von einer BMT, selbst wenn sie vor Symptombeginn durchgeführt wird [Bredius et al., 2007; Malm et al., 1996]. Versuche mit intravenöser Enzymersatztherapie (ERT) befinden sich bereits in den klinischen Studienphasen, nachdem Behandlungs-Versuche mit rhASA an ASA-defizienten Mäusen die Sulfatidablagerungen in viszeralen Organen, im pNS und im ZNS verringert und auch funktionelle Verbesserungen erzielt hatten [Matzner et al., 2005; Matzner et al., 2009]. Matzner et al. [2007; 2008] berichteten, dass Mäuse ohne ASA-Gen nach Zugabe von rhASA Anti-rhASA-Antikörper bildeten. Wurde vor der ERT ein inaktives ASA-Gen eingeschleust und exprimiert, konnte die Antikörperbildung verhindert werden. Die Ergebnisse der ERT bei Patienten mit MLD müssen noch abgewartet werden. Bisher wurden zwei Strategien der Gentherapie an Mäusen getestet [Gieselmann et Krägeloh-Mann, 2010]: Transplantation autologer hämatopoetischer Stammzellen nach ex vivo retro- oder lentiviral-vektor-basierter Modifikation zur ASA-Überexpression, die darauf basiert, dass Blut-Monozyten im ZNS zu Mikroglia differenzieren und dort das Enzym an benachbarte Zellen abgeben [Biffi et al., 2006; Biffi et al., 2004; Matzner et al.,

2002], und Injektion viraler Vektoren, welche die cDNA des fehlenden Enzyms direkt in die Zielzellen bringen, so dass sie dort eingebaut und exprimiert wird [Kurai et al., 2007; Sevin et al., 2006; Sevin et al, 2007]. Die meisten dieser Versuche verbesserten die Krankheitszeichen signifikant, so dass bald klinische Studien am Menschen zu erwarten sind.

1.3.2 Mucopolysaccharidosen

Mucopolysaccharidosen (MPS) sind eine Gruppe lysosomaler Speicherkrankheiten, die durch einen Defekt von Enzymen, die beim Abbau von Glykosaminoglykanen (Mucopolysacchariden) beteiligt sind, verursacht und mit Ausnahme der MPS Typ II (Morbus Hunter), die einen X-chromosomal-rezessiven Erbgang hat, autosomal-rezessiv vererbt werden. Die klinische Erscheinungsform der Mucopolysaccharidosen zeigt viele Gemeinsamkeiten, die Ausprägung kann jedoch sehr variabel sein. Alle Mucopolysaccharidosen verlaufen chronisch progressiv und zeigen Organomegalien, Dysostosis multiplex und vergrößerte Gesichtszüge. Augen- und Hörprobleme, Beeinträchtigung der Atemwege und des kardiovaskulären Systems sowie eine eingeschränkte Mobilität der Gelenke können vorkommen [Neufeld et Muenzer, 2001]. Tabelle 5 zeigt die Klassifikation und Charakteristika aller Mucopolysaccharidosen. Im Folgenden werden die MPS mit einem spezifischen Sulfatase-Defekt näher erläutert:

- Morbus Hunter
- Morbus Sanfilippo
- Morbus Morquio
- Morbus Maroteaux-Lamy

Einleitung

Tabelle 5: Klassifikation der Mucopolysaccharidosen (aus: Neufeld et Muenzer, 2001)

Number	Eponym	MIM number	Chromosome locus	Major clinical manifestations	Enzyme deficiency	Glycosaminoglycan affected
MPS IH	Hurler	252800	4p16.3	Corneal clouding, dysostosis multiplex, organomegaly, heart disease, mental retardation, death in childhood	α -L-Iduronidase	Dermatan sulfate, heparan sulfate
MPS IS	Scheie	252800	4p16.3	Corneal clouding, stiff joints, normal intelligence and life span	α -L-Iduronidase	Dermatan sulfate, heparan sulfate
MPS IH/S	Hurler-Scheie	252800	4p16.3	Phenotype intermediate between IH and IS	α -L-Iduronidase	Dermatan sulfate, heparan sulfate
MPS II (severe)	Hunter (severe)	309900	Xq28	Dysostosis multiplex, organomegaly, no corneal clouding, mental retardation, death before 15 years	Iduronate sulfatase	Dermatan sulfate, heparan sulfate
MPS II (mild)	Hunter (mild)	309900	Xq28	Normal intelligence, short stature, survival to adulthood and often longer	Iduronate sulfatase	Dermatan sulfate, heparan sulfate
MPS IIIA	Sanfilippo A	252900	17q25.3	Profound mental deterioration, hyperactivity, relatively mild somatic manifestations; milder forms known to exist	Heparan N-sulfatase (sulfamidase)	Heparan sulfate
MPS IIIB	Sanfilippo B	252920	17q21	Phenotype similar to IIIA	α -N-Acetylglucosaminidase	Heparan sulfate
MPS IIIC	Sanfilippo C	252930	Not Known	Phenotype similar to IIIA	Acetyl-CoA: α -glucosaminide acetyltransferase	Heparan sulfate
MPS IIID	Sanfilippo D	252940	12q14	Phenotype similar to IIIA	N-Acetylglucosamine 6-Sulfatase	Heparan sulfate
MPS IVA	Morquio A	253000	16q24.3	Distinctive skeletal abnormalities, corneal clouding, odontoid hypoplasia; milder forms known to exist	Galactose 6-sulfatase (N-acetylgalactosamine 6-sulfatase)	Keratan sulfate, chondroitin 6-sulfate
MPS IVB	Morquio B	253010	3p21.33	Spectrum of severity as in IVA	β -Galactosidase	Keratan sulfate
MPS V	No longer used	—	—	—	—	—
MPS VI	Maroteaux-Lamy	253200	5q13-q14	Dysostosis multiplex, corneal clouding, normal intelligence; survival to teens in severe form; milder forms exist	N-Acetylgalactosamine 4-sulfatase (arylsulfatase B)	Dermatan sulfate
MPS VII	Sly	253220	7q21.11	Dysostosis multiplex, hepatosplenomegaly; wide spectrum of severity, including fetal and neonatal form	β -Glucuronidase	Dermatan sulfate, heparan sulfate, chondroitin 4-, 6-sulfates
MPS VIII	No longer used	—	—	—	—	—
MPS IX	—	601492	3p21.2-p21.3	Periarticular soft tissue masses; short stature	Hyaluronidase	Hyaluronan

Morbus Hunter (Mucopolysaccharidose Typ II)

Der Morbus Hunter (MPS II) wird durch einen Defekt des Enzyms Iduronat-2-sulfatase, das beim Abbau von Dermatansulfat und Heparansulfat beteiligt ist, verursacht.

Es gibt eine schwere und eine milde Form des Morbus Hunter, die allerdings nur zwei Extreme der grossen klinischen Variabilität darstellen. Die wichtigsten Symptome beider Varianten sind in der Tabelle 5 zusammengefasst, wobei das Auftreten einer knötchenförmigen, elfenbeinfarbenen Hautläsion am Rücken, an den Oberarmen und Oberschenkeln für Morbus Hunter spezifisch ist. Durch den X-chromosomalen Erbgang sind praktisch nur Jungen von dieser Krankheit betroffen. Dennoch gibt es auch betroffene Mädchen, die dann meist die milde Form entwickeln und heterozygot für das entsprechende Allel sind, wobei genetisch bedingt die Expression des normalen Allels nicht stattfindet [Neufeld et Muenzer, 2001].

In den letzten Jahren haben einige Patienten mit MPS II eine hämatopoetische Stammzelltransplantation erhalten. Die Langzeit-Ergebnisse waren jedoch insgesamt unbefriedigend [Vellodi et al., 1999]. Seit 2006/ 2007 ist eine intravenöse Therapie mit rekombinanter humaner Iduronat-2-sulfatase (Idursulfase, Elaprase[®]) erhältlich, wobei eine Verbesserung der ZNS-Symptome nur eingeschränkt möglich ist [Burrow et Leslie, 2008; Wraith et al., 2008]. Versuche zur Einführung der entsprechenden cDNA in enzym-defiziente Zellen mittels eines retroviralen Vektors waren erfolgreich [Braun et al., 1993].

Morbus Sanfilippo (Mucopolysaccharidose Typ III)

Der Morbus Sanfilippo (MPS III) ist in 4 Typen mit ähnlichem klinischem Erscheinungsbild unterteilt, wovon die zwei Typen A und D durch einen spezifischen Sulfatase-Mangel (Heparan N-sulfatase = Sulfamidase beim Typ A, N-Acetyl-glucosamin-6-sulfatase beim Typ D) verursacht werden. Dadurch kommt es zu einer übermässigen Speicherung von Heparansulfat. MPS III ist durch eine schwere Beeinträchtigung des ZNS und im Vergleich dazu relativ milde somatische Symptome gekennzeichnet (s. Tab. 5). Die Erkrankung tritt meist zwischen dem 2. und 6. Lebensjahr auf. Die Diagnose der MPS III ist

wegen der oft gering ausgeprägten somatischen und röntgenologisch erkennbaren Krankheitszeichen nicht einfach. Ausserdem zeigt der Screening-Test, der die Glykosaminoglykan-Ausscheidung im Urin misst, teilweise ein falsch negatives Ergebnis, und nicht selten wird deswegen ein Morbus Sanfilippo erst relativ spät erkannt. Die klinische Unterscheidung der 4 Typen der MPS III ist aufgrund der klinischen Heterogenität der Typen sehr schwierig. Insgesamt ist die Krankheit bei der MPS IIIA am schwersten ausgeprägt mit früherem Erkrankungsalter, schnellerer Progression der Symptome und kürzerer Lebenserwartung, während Patienten mit MPS IIIB in der Regel schwächere Krankheitszeichen aufweisen [Neufeld et Muenzer, 2001; van de Kamp et al., 1981].

Bei mehreren Patienten wurde eine Knochenmarktransplantation durchgeführt, mit der biochemisch eine Korrektur des Enzymmangels erreicht werden konnte, wobei die Verbesserung der ZNS-Symptome nicht wie erwünscht eintrat [Cleary et Wraith, 1993; Hoogerbrugge et al., 1991]. Versuche zur genetischen Korrektur des Enzymdefekts bei MPS IIIA-Fibroblasten zeigten die Expression des Enzyms nach Transduktion der cDNA durch einen retroviralen Vektor [Bielicki et al., 1996]. Eine Enzyersatztherapie gibt es bisher für den Morbus Sanfilippo nicht.

Morbus Morquio (Mucopolysaccharidose Typ IV)

Es gibt zwei Gruppen der MPS IV (Morbus Morquio), wovon der Typ A durch einen Mangel des Enzyms Galactose-6-sulfatase (N-Acetyl-galactosamin-6-sulfatase) bedingt ist. Bei beiden Typen kann Keratansulfat nicht mehr abgebaut werden, bei der MPS IVA kommt es zusätzlich auch zu einer Speicherung von Chondroitin-6-sulfat. Beide Typen des Morbus Morquio sind durch einen kurzen Rumpf, feine korneale Ablagerungen, eine spondyloepiphyseale Dysplasie der Knochen, die sich von der Dysplasie bei anderen Mucopolysaccharidosen unterscheidet, und eine normale Intelligenz gekennzeichnet (s. Tab. 5). Die ersten Symptome treten oft zwischen dem 1. und 4. Lebensjahr auf, die Diagnose der MPS IV wird jedoch nicht selten erst viel später gestellt [Holzgreve et al., 1981]. Durch die grosse klinische

Variabilität mit unterschiedlich stark beteiligten Organen variiert die Lebenserwartung stark zwischen ca. 20 bis 30 Jahre bei schweren Formen und praktisch normaler Lebenserwartung bei milden Formen der MPS IV [Neufeld et Muenzer, 2001].

Bisher gibt es keine Behandlung des Morbus Morquio. Für die Therapie der MPS IVA wurden Versuche zur Herstellung eines rekombinanten Enzyms [Rodriguez et al., 2010] und zur Enzymersatztherapie bei Mäusen [Tomatsu et al., 2010; Tomatsu et al., 2008] durchgeführt, Versuche zum Einsatz am Menschen müssen jedoch abgewartet werden.

Morbus Maroteaux-Lamy (Mucopolysaccharidose Typ VI)

Ein Defekt der Arylsulfatase B (N-Acetylgalactosamin-4-sulfatase, ASB), die am Abbau von Dermatansulfat beteiligt ist, verursacht den Morbus Maroteaux-Lamy (MPS VI). Das Krankheitsbild ist dem des Morbus Hurler (MPS I, s. Tab. 5) ähnlich, wobei die Intelligenz der Patienten nicht beeinträchtigt und nur die Ausscheidung von Dermatansulfat, nicht jedoch von Heparansulfat, erhöht ist [Neufeld et Muenzer, 2001].

Einige Patienten mit MPS VI haben eine hämatopoetische Stammzelltransplantation erhalten [Krivit et al., 1984; Valayannopopoulos et al., 2010]. Seit wenigen Jahren ist eine intravenöse Enzymersatztherapie mit Galsulfase (Naglazyme®) erhältlich [El Dib et Pastores, 2009; Valayannopopoulos et al., 2010]. In-vitro Versuche zur genetischen Korrektur des Enzymdefekts mittels retroviral eingebrachter cDNA in verschiedene Zellen waren erfolgreich, müssen jedoch noch weiter erforscht werden [Fillat et al., 1996].

1.3.3 Multipler Sulfatase-Mangel

Der multiple Sulfatase-Mangel (MSD), auch unter den Namen Mucosulfatidose oder Austin-Krankheit bekannt, ist eine seltene lysosomale Speicherkrankheit mit einer Prävalenz von ca. 1 pro 1,4 Millionen Geburten. Die Ursache ist ein Defekt des C_α-Formylglycin (FGly)-generierenden Enzyms (FGE), das in den Sulfatasen posttranslational einen Cystein-Rest zu FGly umwandelt und durch das Sulfatase-verändernde-Faktor-1-Gen (sulfatase modifying factor 1 gene,

SUMF1) codiert wird. Dadurch kommt es zu einer verminderten Aktivität und Stabilität aller bekannten Sulfatasen [Dierks et al., 2003; Landgrebe et al., 2003; Schmidt et al., 1995; von Figura et al., 1998]. Das klinische Erscheinungsbild des MSD ist sehr variabel und beinhaltet Merkmale der metachromatischen Leukodystrophie, der Mucopolysaccharidosen sowie der X-chromosomalen Ichthyose und der Chondrodysplasia punctata. Es wurden bisher eine neonatale, eine früh-infantile („Saudi-Variante“), eine infantile und eine juvenile Form des multiplen Sulfatase Mangels beschrieben.

Die infantile Form des MSD, die klinische Zeichen der spätinfantilen Form der metachromatischen Leukodystrophie und einer milden Mucopolysaccharidose zeigt, ist die klassische Variante. Die Entwicklung des Säuglings kann zunächst unauffällig verlaufen, und meist lernen die Kinder, ohne Hilfe zu stehen und wenige Worte zu sprechen. Während des zweiten Lebensjahres verlernen sie bereits erworbene Fähigkeiten. Es entwickeln sich Absencen, Spastik, Blindheit, Hörverlust, Schluckprobleme, Krämpfe und Demenz. Eine Ichthyose tritt meist ab dem zweiten oder dritten Lebensjahr auf. Anzeichen einer Mucopolysaccharidose wie gröber werdende Gesichtszüge, steife Gelenke, Wachstumsverzögerung und Skelettabnormalitäten oder Hepatosplenomegalie können in unterschiedlichen Stadien eines MSD vorkommen. Ein Hydrocephalus, optische Atrophie, retinale Degeneration und ein kirschroter Makulafleck wurden schon beobachtet, eine Korneatrübung ist hingegen selten. Die Patienten sterben meist zwischen dem 10. und 18. Lebensjahr [von Figura et al., 2001].

Die Saudi-Variante (früh-infantile Form) des MSD, die während des 1. Lebensjahres auftritt, beinhaltet Kleinwuchs, schwere Dysostosis multiplex, faciale Dysmorphien, craniale Synostosen und eine Kompression des cervicalen Rückenmarks. Ein Hydrocephalus tritt bei der Saudi-Variante selten auf [Al-Moutaery et al., 1994], und in der Regel kommt es zu keiner oder nur gering ausgeprägter Demenz. Ichthyose, Schwerhörigkeit und retinale Degeneration wurden bei ihr nicht beobachtet [von Figura et al., 2001].

Bisher gibt es wenige Berichte einer neonatalen Form des MSD mit schweren Mucopolysaccharidose-ähnlichen Symptomen bereits bei der Geburt, die

innerhalb des 1. Lebensjahres zum Tod der Säuglinge führt, und einen Bericht eines Patienten mit juvenilem MSD [von Figura et al., 2001].

Das Magnetresonanztomogramm (MRT) bei Patienten mit MSD kann das Bild einer metachromatischen Leukodystrophie und einer Erweiterung der Ventrikel zeigen. Zusätzlich sind eine frontotemporale und olivopontocerebelläre Atrophie und arachnoidale retrocerebelläre Zysten möglich [Blanco-Aguirre et al., 2001; Zafeiriou et al., 2008].

Eine Therapie des multiplen Sulfatase-Mangels ist bisher nicht bekannt.

1.3.4 Diagnostik der Sphingolipidosen

Lysosomale Speicherkrankheiten können grundsätzlich auf drei Arten diagnostiziert werden: klinisch, biochemisch und molekular, wobei hier vor allem die biochemische Diagnostik näher erläutert werden soll. Die klinische Diagnostik ist zwar wichtig bei Verdacht auf eine lysosomale Speicherkrankheit, soll hier jedoch nicht besprochen werden. Klinische Charakteristika der durch einen Sulfatase-Mangel bedingten Speicherkrankheiten werden in den Kapiteln 1.3 (Lysosomale Speicherkrankheiten), 1.3.1 (Metachromatische Leukodystrophie), 1.3.2 (Mucopolysaccharidosen) und 1.3.3 (Multipler Sulfatase-Mangel) beschrieben.

Biochemische Diagnostik

Liegt der klinische Verdacht auf eine lysosomale Speicherkrankheit vor, muss dieser mit Hilfe biochemischer Nachweisverfahren bestätigt werden. Dies ist auf drei Arten möglich:

1. Biochemische Analyse gespeicherter Substanzen
2. Messung der Enzymaktivitäten
3. Untersuchung des Metabolismus verschiedener Substrate

Biochemische Analyse gespeicherter Substanzen

Dieses Nachweisverfahren wurde früher oft benutzt, wobei dafür vor allem die Gewebe oder Körperflüssigkeiten geeignet sind, die besonders viel Material anreichern.

Die höchste Konzentration an Sulfatiden befindet sich im zentralen und peripheren Nervensystem (als Bestandteil des Myelins) sowie in den Nieren [Kikkawa et al., 1991; von Figura et al., 2001]. Ausserdem können Sulfatide in anderen Geweben, besonders in solchen mit sekretorischen Eigenschaften wie z.B. in respiratorischem Epithel [Krivan et al., 1989], Magenmucosa [Natomi et al., 1990] oder im Endometrium [Takamatsu, 1992] sowie in Körperflüssigkeiten wie Serum [Zhu et al., 1991], Urin [Molzer et al., 1992] oder Liquor [Kaye et al., 1992] nachgewiesen und auf diese Weise der Verdacht einer metachromatischen Leukodystrophie bestätigt werden.

Der Nachweis einer erhöhten Glykosaminoglykan- (Mucopolysaccharid-, GAG-) Ausscheidung im Urin war die erste Methode, die zur Diagnostik der Mucopolysaccharidosen vorhanden war. Dabei ist zu beachten, dass auf diese Weise zwar die einzelnen MPS voneinander unterschieden werden können, diese Methode jedoch keine Differenzierung verschiedener Typen derselben MPS erlaubt [Neufeld et Muenzer, 2001]. Ausserdem werden mit der Messung der quantitativen GAG-Ausscheidung diejenigen Patienten, die zwar keine erhöhte Ausscheidung, jedoch ein pathologisches Verteilungsmuster der Glykosaminoglykane aufweisen, nicht erfasst [Piraud et al., 1993].

Meikle et al. [1997; 2006] haben Screening-Tests auf lysosomale Speicherkrankheiten entwickelt, die auf dem Nachweis verschiedener lysosomaler Proteine, unter anderem von LAMP-1, einem in der Membran von Lysosomen vorkommenden Protein, basieren. Diese Tests können mit der Probe auf der Guthrie-Karte Neugeborener durchgeführt werden.

Messung der Enzymaktivitäten

Die Aktivitätsbestimmung bestimmter Enzyme durch Messung von artifiziell oder radioaktiv-markiertem Substratumsatz ist zur Zeit die gängigste Methode zum Nachweis einer lysosomalen Speicherkrankheit und ist immer bei Verdacht

Einleitung

auf eine LSD indiziert. Am häufigsten werden dafür kultivierte Fibroblasten, Leukozyten oder Serum verwendet, wobei auch andere Gewebe und Körperflüssigkeiten benutzt werden können [Beratis et al., 1973; Dubois et al., 1980; Neufeld et Muenzer, 2001; Porter et al., 1969].

Als diagnostischer Marker zum Nachweis einer metachromatischen Leukodystrophie dient der Defekt der Arylsulfatase A, deren Aktivität in Leukozyten und kultivierten Fibroblasten anhand der künstlichen Substrate p-Nitrocatecholsulfat oder 4-Methylumbelliferonsulfat gemessen wird. Ergänzend werden zur Diagnose eines Saposin B-Defekts Untersuchungen des Abbaus von radioaktiv-markiertem Sulfatid durch Zellen des Patienten (s. Kap. „Untersuchung des Metabolismus verschiedener Substrate“) und der Nachweis erhöhter Sulfatid-Ausscheidung im Urin (s. Kap. „Biochemische Analyse gespeicherter Substanzen“) eingesetzt. Als Material zur Pränataldiagnose eignen sich kultivierte Zellen der Amnionflüssigkeit oder Chorionzotten. Obwohl ASA im Urin vorhanden ist, ist die Enzym-Aktivität im Urin weniger zuverlässig zur Diagnose, da die im Urin vorhandene Enzymmenge sehr variabel ist [Hultberg, 1979; Thomas et Howell, 1972; von Figura et al., 2001].

Für den Nachweis einer Mucopolysaccharidose stehen verschiedene Enzymuntersuchungen zur Verfügung. Defekte von Glycosidasen können mit Hilfe chromogener (p-Nitrophenyl) oder fluoreszierender (4-Methylumbelliferon) Substrate, Defekte von Sulfatasen oder der N-Acetyltransferase anhand des Umsatzes fluoreszierender oder radioaktiv-markierter Substrate diagnostiziert werden. Für die Pränataldiagnose einer MPS werden kultivierte Zellen von Amnionflüssigkeit oder einer Chorionzottenbiopsie benutzt, zusätzlich wird bei grenzwertigen Ergebnissen eine Bestätigung der Diagnose durch kultivierte Zellen empfohlen [Neufeld et Muenzer, 2001].

Die Diagnose des multiplen Sulfatase-Mangels wird durch Messung der Enzymaktivitäten in Leukozyten, Plasma und kultivierten Fibroblasten von Patienten gesichert, bei der in der Regel die Arylsulfatasen A, B und C sowie die Heparan N-sulfatase (Sulfamidase) und die Iduronat-2-sulfatase erniedrigt sind. Je niedriger die Enzymaktivitäten in kultivierten Fibroblasten sind, desto schwerwiegender ist in der Regel der klinische Phänotyp, d.h. die Erkrankung

eines Patienten. Die Pränataldiagnose eines MSD ist mittels Amniozentese durch Messung reduzierter Enzymaktivitäten in kultivierten Amnionzellen möglich, wobei dies die Erkennung der Krankheit erst im späten 2. Trimenon erlaubt [Hopwood et Ballabio, 2001]. Patrick et al. [1988] konnten die Diagnose eines MSD im 1. Trimenon der Schwangerschaft durch Nachweis reduzierter Arylsulfatasen- und Sulfamidase-Aktivitäten in Chorionzotten, die durch Analyse von Zellkulturen fetaler Fibroblasten und Chorionzotten bestätigt wurden, stellen.

Probleme bei der Diagnostik einer lysosomalen Speicherkrankheit ergeben sich daraus, dass die verwendeten Substrate nicht nur durch ein spezifisches Enzym, sondern auch durch andere Enzyme abgebaut werden und dass diese Enzyme teilweise kompensatorisch erhöht sind. So werden die für die Diagnostik der MLD verwendeten künstlichen Substrate pNCS und 4MUS nicht nur durch ASA, sondern auch durch andere Sulfatasen, vor allem durch die Arylsulfatase B, abgebaut. Deshalb ist es notwendig, den Substratumsatz durch andere Enzyme zu inhibieren oder die Enzyme vor der Messung zu trennen, wofür folgende Verfahren entwickelt wurden [Baum et al., 1950; Chang et al., 1984; Christomanou et Sandhoff, 1977; Humbel, 1976; Lee-Vaupel et Conzelmann, 1987; Li et al., 1992]:

1. Inhibition anderer Enzyme:
 - Hemmung der ASB durch hohe NaCl-Konzentrationen
 - Hemmung der ASA durch Zugabe von Ag^+ : Messung des Substratumsatzes mit und ohne Zugabe von Ag^+ -Ionen und Berechnung der ASA-Aktivität anhand der Differenz
 - Inhibition der ASB durch niedrige Temperaturen

2. Trennung der Enzyme:
 - Ionenaustausch-Chromatographie
 - Elektrophorese
 - Isoelektrische Auftrennung

Untersuchung des Metabolismus verschiedener Substrate

Da die künstlichen Substrate, die zur Messung der Enzymaktivitäten verwendet werden, wasserlöslich sind und deswegen kein Aktivator-Protein für den Abbau nötig ist, können mit diesen Untersuchungen diejenigen Speicherkrankheiten, die durch einen Aktivator-Protein-Defekt verursacht werden, nicht diagnostiziert werden. Deshalb wird bei Verdacht auf eine LSD und unauffälligen Enzymaktivitäten der Umsatz des natürlichen und zuvor radioaktiv-markierten Substrats in kultivierten Zellen untersucht, für dessen Abbau ein Aktivator-Protein benötigt wird [von Figura et al., 2001].

Menschen mit einer Pseudodesuffizienz der Arylsulfatase A zeigen zwar eine verminderte Aktivität der ASA, sind jedoch gesund. Um eine MLD von einer ASA-Pseudodesuffizienz zu unterscheiden, wird der Sulfatid-Belastungs-Test durchgeführt: Sulfatide werden kultivierten Zellen zugegeben, von diesen aufgenommen und die Sulfatid-Zunahme und –Verstoffwechslung in den Zellen untersucht. Eine verminderte Enzymaktivität mit regulärem Sulfatid-Abbau spricht für eine ASA-Pseudodesuffizienz, bei einer MLD kann das Sulfatid nicht abgebaut werden und akkumuliert. Eine Unterscheidung zwischen compound-heterozygoten Trägern eines Pseudodesuffizienz- und eines MLD-Allels und Trägern der adulten Form der MLD ist jedoch auch mit diesem Test nicht sicher möglich [Bach et al., 1987; Hreidarsson et al., 1983; Leinekugel et al., 1992].

Molekulare Nachweisverfahren und genetische Diagnostik

Es sind viele Gen-Mutationen bekannt, die eine lysosomale Speicherkrankheit verursachen. Deshalb muss bei einer unbekanntem Mutation meist das ganze Gen sequenziert werden, was sehr zeit- und arbeitsintensiv ist. Genetische Untersuchungen werden deshalb nicht routinemässig durchgeführt. Ist die Krankheit-verursachende Mutation bei einem Patienten bekannt, kann mit Hilfe molekularer Techniken (DNA-Amplifikation, Oligonukleotid-Hybridisierung, Restriktionsanalyse) der Träger-Status anderer Familienmitglieder bestimmt werden [Neufeld et Muenzer, 2001; Polten et al., 1991; von Figura et al., 2001].

Durch die Bestimmung der Enzymaktivität allein ist es nicht möglich, heterozygote Träger für ein defektes Enzym zu identifizieren. Bei der MLD ist es zudem sehr schwierig, auf diese Weise heterozygote Träger eines MLD-Allels von Trägern eines Pseudodesuffizienz-Allels zu unterscheiden, da der Sulfatid-Belastungs-Test und die Sulfatid-Ausscheidung bei beiden Gruppen innerhalb der Norm sind. Deshalb ist der direkte Nachweis eines Polymorphismus des Pseudodesuffizienz-Allels die einzige Möglichkeit, Träger eines MLD-Allels und Träger eines Pseudodesuffizienz-Allels auseinanderzuhalten, wobei zu beachten ist, dass ein MLD-Allel, das zusätzlich den Pseudodesuffizienz-Polymorphismus trägt, durch die üblichen genetischen Untersuchungen nicht von einem Pseudodesuffizienz-Allel unterschieden werden kann. Es ist also möglich, dass eine Person, bei der auf diese Weise ein Pseudodesuffizienz-Allel erkannt wurde, in Wirklichkeit Träger eines MLD-Allels ist [von Figura et al., 2001].

1.4 Aufgabenstellung

1.4.1 Photometrische Messungen des Substratumsatzes

Die Bestimmung der ASA-Aktivität durch Messung des Umsatzes des künstlichen Substrats pNCS mit Hilfe der Photometrie ist ein Standardverfahren bei der Diagnostik der MLD. In der vorliegenden Arbeit wurde der Umsatz von pNCS durch rhASA und Leukozytenextrakte, die mittels Dextran sedimentation gewonnen wurden, unter verschiedenen Inkubationsbedingungen miteinander verglichen. Dazu wurde eine Eichkurve für das Reaktionsprodukt p-Nitrocatechol erstellt, die als Grundlage für die Berechnung der Enzymaktivität diente. Ausserdem wurde die Versuchsanordnung im Hinblick auf die Untersuchungen mit der Isotachophorese adaptiert und untersucht, ob pNCS auch unter den Inkubationsbedingungen der Versuche an der ITP durch rhASA und Leukozytenextrakte umgesetzt wird.

1.4.2 Verfolgung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebroside zu Galactocerebroside mittels Dünnschichtchromatographie

Es gibt kein photometrisches Verfahren, das den Abbau des natürlichen Substrats der ASA, 3-Sulfo-Galactocerebroside (Sulfatid), durch rhASA messen kann. Deshalb wurden zuerst Sulfatid und Galactocerebroside ohne vorherige Inkubation auf eine HPTLC-Platte aufgetragen, um beide Substanzen einer Bande zuordnen zu können, und danach der Sulfatid-Umsatz unter verschiedenen Umgebungsbedingungen untersucht.

1.4.3 Untersuchungen mit der Isotachophorese

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, den Umsatz verschiedener Substanzen durch rhASA sowie Sulfatasen aus Leukozytenextrakten mit Hilfe der analytischen Isotachophorese zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Dabei sollte die Anwendung der Isotachophorese für Versuche mit der rhASA etabliert und durch Verwendung von Substanzen, die Substrate verschiedener Sulfatasen darstellen, die Eignung der Isotachophorese als Methode zur Diagnose lysosomaler Speicherkrankheiten, die durch einen Sulfatase-Defekt verursacht werden, geprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Substanzen

Aqua bidest	Ampuwa
Ascorbylsulfat	Sigma
Ascorbat, L-Ascorbinsäure (Vitamin C)	Merck
Ascorbylphosphat	Sigma
β-Alanin	Sigma
Bovine Serum Albumin (BSA, Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich
Capronsäure	Sigma
Chloroform (CHCl ₃ , Trichlormethan)	Roth
Dextran T 250	Roth
D-PBS ²⁺ (mit CaCl ₂ , MgCl ₂)	
Dulbeccos phosphatgepufferte Kochsalzlg	Gibco
Essigsäure (CH ₃ COOH, Eisessig)	Merck
Färbemittel für Dünnschichtchromatographie (s. Kap. 2.1.2.3)	Merck
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Folin konz.	Merck
Galactocerebrosid	Sigma
Galactose-6-sulfat	Sigma
Hämoglobin (Hb)	Sigma
HCl	Merck
Heparin-Natriumsalz	Roth
K-Na-Tartrat	Merck
Kupfersulfat-5-hydrat (CuSO ₄ ·5 H ₂ O)	Merck
Lysepuffer (s. Kap. 2.1.2.1)	Universitätsapotheke Tübingen
Methanol (CH ₃ OH)	Merck
Methyl-Cellulose	Sigma

Material und Methoden

MgCl ₂ (wasserfrei)	Merck-Schuchardt
Na-acetat (wasserfrei)	Roth
Na-Carbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma
NaCl (Kochsalz)	Merck
NaCl-Lösung 0,9%	Fresenius Kabi
Natriumpyrophosphat (Na ₄ P ₂ O ₇ · 10 H ₂ O)	Fluka
Natronlauge (NaOH)	Merck
p-Nitrocatechol	Sigma
p-Nitrocatecholsulfat (pNCS)	Sigma
Rekombinante humane Arylsulfatase A (rhASA, 148 U/ml)	Zymenex
Serumalbumin	Sigma
3-Sulfo-Galactocerebrosid (Sulfatid)	Sigma
Taurocholat = Na-Taurocholat -unrein („technisch“) -rein	Fluka

2.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

2.1.2.1 Lösungen zur Zellextraktherstellung

Dextran sedimentation-Lösung

2,5 g Dextran 250000 Dalton

0,35 g NaCl

25 mg Heparin-Natriumsalz

50 ml Aqua bidest

Lysepuffer

8,29 g Ammoniumchlorid z. A.

1,00 g Kaliumhydrogencarbonat z. A.

37 mg Na₂-EDTA-2H₂O z. A.

1000 ml Aqua bidest

2.1.2.2 Photometrie

Na-acetatpuffer 0,5 mol/l

1 Teil 0,5 mol/l Essigsäure

3 Teile 0,5 mol/l Na-acetat

Titration bis pH 5,0

Verdünnungslösung zur Bestimmung des quantitativen Umsatzes von pNCS

1 Teil Aqua bidest

4 Teile Na-acetatpuffer 0,5 mol/l

Substratlösung mit p-NCS 0,01 mol/l, 0,5 mmol/l Natriumpyrophosphat und 10% NaCl gelöst in Na-acetatpuffer 0,5 mol/l

311 mg p-Nitrocatecholsulfat

22,3 mg Natriumpyrophosphat

10 g Kochsalz

80 ml Na-acetatpuffer 0,5 mol/l

Titration bis pH 5,0

Na-acetatpuffer 0,5 mol/l, pH 5,0 auf 100 ml auffüllen

Produktlösung mit p-Nitrocatechol 0,01 mol/l, Natrium-pyrophosphat 0,5 mmol/l und 10% NaCl gelöst in Na-acetatpuffer 0,5 mol/l

155 mg p-Nitrocatechol

22,3 mg Natriumpyrophosphat

10 g Kochsalz

80 ml Na-acetatpuffer 0,5 mol/l

Titration bis pH 5,0

Na-acetatpuffer 0,5 mol/l, pH 5,0 auf 100 ml auffüllen

Enzymextrakt

0,2 ml Leukozytenextrakt ($19,46 \times 10^6$ Leukozyten)

0,3 ml Aqua bidest

Humane Serumalbumin-Lösung 0,2%

2 mg Serumalbumin

1,0 ml Aqua bidest

Serumalbumin-Lösung 0,1%

1 Teil Serumalbumin (2 mg/ml Aqua bidest)

1 Teil D-PBS²⁺

Heparinplasma 1:1 verdünnt

1 Teil Heparinplasma

1 Teil D-PBS²⁺

2.1.2.2.1 Proteinbestimmung

Lösung A

2 g Na-Carbonat

20 mg K-Na-Tartrat

100 ml 0,1 mol/l NaOH

Lösung B

750 mg Kupfersulfat-5-hydrat

100 ml Aqua bidest

Lösung C

10 ml Lösung A

0,2 ml Lösung B

BSA-Lösungen

Tabelle 6: Herstellung der BSA-Lösungen zur Proteinbestimmung

Lösung	Endkonzentration (μg BSA / 20 μl Aqua bidest)	Zugabe von BSA	Zugabe von Aqua bidest
Lösung a	50	2,5 mg	1 ml
Lösung b	40	4 mg	2 ml
Lösung c	20	0,75 ml Lösung b	0,75 ml
Lösung d	10	0,5 ml Lösung c	0,5 ml

Hb-Lösungen

Tabelle 7: Herstellung der Hb-Lösungen zur Proteinbestimmung

Lösung	Endkonzentration (μg Hb / 20 μl Aqua bidest)	Zugabe von Hb	Zugabe von Aqua bidest
Lösung 1	50	2,5 mg	1 ml
Lösung 2	40	4 mg	2 ml
Lösung 3	20	0,75 ml Lösung 2	0,75 ml
Lösung 4	10	0,5 ml Lösung 3	0,5 ml

2.1.2.3 Dünnschichtchromatographie

Laufmittel 1

0,5 ml Aqua bidest

3 ml Methanol

7 ml Chloroform

Laufmittel 2

4,7 ml Chloroform

0,2 ml Eisessig

0,1 ml Methanol

Mischsystem

50 µl Methanol

2,5 ml Laufmittel 1

2,5 ml Laufmittel 2

Färbemittel

0,6 ml 4-Methoxybenzaldehyd

98 ml Eisessig

2 ml konz. H₂SO₄

Verdünnungslösung

2 Teile Chloroform

1 Teil Methanol

Stammlösung (1,2 mmol/l Sulfatid bzw. 10 mmol/l Galactocerebrosid)

1 mg Sulfatid oder Galactocerebrosid

1 ml Verdünnungslösung

Na-acetatpuffer 25 mmol/l

162,5 mg Na-acetat

100 ml Aqua bidest

Titration mit Essigsäure bis pH 5,0

Taurocholat 0,3% gelöst in Na-acetatpuffer 25 mmol/l mit MgCl₂ 5 mmol/l

300 mg Taurocholat

47,5 mg MgCl₂

100 ml Na-acetatpuffer 25 mmol/l

350 µmol/l Sulfatid

1,45 mg Sulfatid

5 ml (Taurocholat 0,3% gelöst in Na-acetatpuffer 25 mmol/l mit MgCl₂ 5 mmol/l)

2.1.2.4 Isotachophorese

Leitelektrolyt 10 mmol/l HCl

10 ml 1 mol/l HCl

990 ml Aqua bidest

β -Alanin bis pH zwischen 3,3-3,4 in fester Form zugeben

1 g (0,1%) Methyl-Cellulose

Endelektrolyt 10 mmol/l Capronsäure

1,16 g Capronsäure

1 l Aqua bidest

Na-acetat-Stocklösung 500 mmol/l

4,1 g Na-acetat

100 ml H₂O

Titration mit Essigsäure bis pH 5

Puffer pH 5 mit Na-acetat 10 mmol/l und NaCl 8 mmol/l

1 ml Na-acetat-Stocklösung 500 mmol/l

49 ml Aqua bidest

250 μ l 0,1%ige NaCl-Lösung

MgCl₂ 500 mmol/l

475 mg MgCl₂

10 ml Aqua bidest

Puffer pH 5 mit Na-acetat 10 mmol/l, NaCl 8 mmol/l, MgCl₂ 5 mmol/l

990 μ l (Puffer pH 5 mit Na-acetat 10 mmol/l und NaCl 8 mmol/l)

10 μ l MgCl₂ 500 mmol/l

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Eppendorfcups 1,5 und 2 ml

Eppendorf

Material und Methoden

Faltenfilter (Durchmesser 24 cm)	Ederol
HPTLC-Platte 10x10 und 10x20 cm (mit Kieselgel)	Merck
Luer-Spritzen 1ml	Plastipak
Luer-Spritzen 20 ml	Braun
Milipore-Röhrchen	Milipore
Kanülen 0,3x13 mm	BD Microlance (Becton Dickinson)
Pipette 0,5-10 µl, 10-100 µl, 0,1-1 ml, 0,2-1 ml	Eppendorf
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1 ml	Eppendorf
pH-Indikatorstäbchen nicht blutend, Acilit, pH 0-6	Merck
Parafilm	Serva
Schraubdeckelröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner
Sarstedt Cuvetten 10x4x45 mm	Sarstedt
Sterile Einmalspritzen 10, 20 und 50 ml	Braun

2.1.4 Geräte

Absaugpumpe 4151	Eppendorf
Abzug	Waldner
ADVIA 120	Siemens
Eppendorfszentrifuge Centrifuge 5415 C	Eppendorf
Hettich-Zentrifuge	Hettich
Itachrom EA 101 (ITP)	Merck
Magnetrührer MR 2002	Heidolph
Spektralphotometer	Beckman
pH-Meter (Microprocessor pH-Meter)	WTW-Weilheim
Moltronic Spiramix	Dr. Molter GmbH
Ultraschallgerät Sonifier B-12 Cell Disrupter	Branson Sonic Power
Vortex VF2	Janke + Klunke
	IKA Labortechnik
Wasserbad	Memmert
Waage MC1 Analytic AC 210S	Sartorius

2.2 Methoden

2.2.1 Zellzahlbestimmung mit dem ADVIA 120

Der Siemens ADVIA 120 ist ein Blutanalysegerät, das in der hämatologischen Routinediagnostik eingesetzt wird. Aus einer EDTA-Vollblutprobe werden ca. 155 µl Blut aufgenommen. In den vier Kanälen des Gerätes (Erythrozyten-/Thrombozytenkanal, Hämoglobinkanal, Peroxidasekanal und Basophilenkanal) werden die Blutzellen anschliessend zuerst vorbereitet und danach nach dem Prinzip der Durchflusszytometrie (d.h. jede Zelle wird einzeln untersucht und bewertet) auf die verschiedenen Parameter untersucht.

Für die vorliegende Arbeit war besonders die Gesamt-Leukozytenzahl, die mittels Peroxidase- und Basophilenkanal bestimmt wird, von Bedeutung. Daher wird im Folgenden näher auf diese Messsysteme eingegangen.

Peroxidasekanal

In diesem Kanal (s. Abb. 7) werden die Leukozyten anhand ihrer unterschiedlichen Aktivität an intrazellulärer Peroxidase und ihrer Grösse bzw. Granularität differenziert.

Nach Aufnahme der Zellen in die Reaktionskammer werden zuerst die Erythrozyten durch das ADVIA 120 Perox 1 Reagens und die hohe Temperatur in der Reaktionskammer lysiert. Anschliessend werden die Leukozyten durch ADVIA 120 Perox 1 Reagens fixiert und mit ADVIA 120 Perox 2 und ADVIA 120 Perox 3 Reagens gefärbt.

Das ADVIA 120 Perox 2 Reagens enthält 4-Chlor-1-naphthol, welches mit dem Wasserstoffperoxid im ADVIA 120 Perox 3 Reagens ein dunkles Präzipitat bildet. An den Stellen der Leukozytengranula, die eine Peroxidaseaktivität aufweisen, findet folgende Reaktion statt:

Material und Methoden

$\text{H}_2\text{O}_2 + 4\text{-Chlor-1-naphthol} + \text{zelluläre Peroxidase} \rightarrow \text{dunkles Präzipitat in den Zellen}$

Die Klassifizierung der Leukozyten erfolgt anhand ihrer Grösse und der unterschiedlichen Intensität der Färbung, die proportional zur Peroxidaseaktivität der Zellen verläuft. Neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Monozyten färben sich entsprechend ihrer Peroxidaseaktivität an, wohingegen Lymphozyten, basophile Granulozyten und grosse lymphatisch veränderte Zellen (LUC) keine Peroxidase enthalten und sich deswegen nicht verfärben.

Da sowohl 4-Chlor-1-naphthol als auch H_2O_2 im Überschuss zugegeben werden, ist die Menge des gebildeten Präzipitats von der Peroxidaseaktivität in den Zellen abhängig.

Nach einer festgelegten Reaktionszeit wird ein Teil des Reaktionsgemisches zur Messküvette weitergeleitet.

Messküvette

Pro Probe werden hier mit Hilfe der Durchflusszytometrie ca. 10000 Leukozyten untersucht. Anhand eines Streulichtsignals zur Bestimmung der Grösse bzw. Granularität einer Zelle und eines Absorptionssignals zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität erfolgt die Differenzierung der Zellen.

Die Zellen werden in einem X-Y-Diagramm angeordnet, wobei die steigende Peroxidaseaktivität auf der X-Achse und die steigende Streulichtintensität (Grösse der Zelle) auf der Y-Achse aufgetragen sind.

Der ADVIA 120 fasst Punktwolken mittels Cluster-Analyse zusammen, was die Differenzierung der Zellen in Kombination mit dem Basophilenkanal ermöglicht.

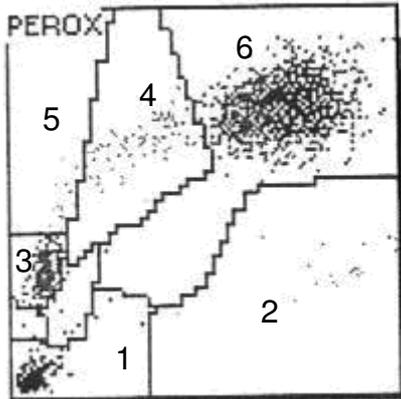


Abbildung 7: ADVIA 120 Bild
einer Vollblutprobe;
Peroxidasekanal

1 = Rauschen (lysierte Erythrozyten, Thrombozyten); 2 = eosinophile Granulozyten (stark peroxidasepositiv); 3 = Lymphozyten und basophile Granulozyten (klein, peroxidasenegativ); 4 = Monozyten (gross, schwach peroxidasepositiv); 5 = LUC (gross, peroxidasenegativ, u.a. Blasten und Plasmazellen); 6 = neutrophile Granulozyten (peroxidasepositiv)

Basophilenkanal

In diesem Kanal (s. Abb. 8) werden die Leukozyten in mononukleäre Blutzellen (Monozyten und Lymphozyten), polymorphkernige Leukozyten (eosinophile und neutrophile Granulozyten) und basophile Granulozyten differenziert.

Nach Aufnahme der Zellen in die Reaktionskammer werden zuerst die Erythrozyten und Thrombozyten durch ADVIA 120 Baso-Reagens, das Phthalsäure sowie ein Surfactant zur Lyse der Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten (mit Ausnahme der basophilen Granulozyten) enthält, lysiert. Danach wird durch das ADVIA 120 Baso-Reagens und die erhöhte Temperatur in der Reaktionskammer von allen Leukozyten ausser den basophilen Granulozyten das Zytoplasma entfernt. Ein Teil des Reaktionsgemisches, bestehend aus Zellkernen der Leukozyten und intakten basophilen Granulozyten, wird zur Messküvette weitergeleitet.

Messküvette

Mit Hilfe der Doppelwinkel-Laserstreulicht-Messtechnologie werden hier die Zellen nach der Morphologie ihrer Zellkerne, die eine unterschiedliche Streuung des Lichts bewirkt, in mononukleäre Zellen, polymorphkernige und basophile Granulozyten separiert.

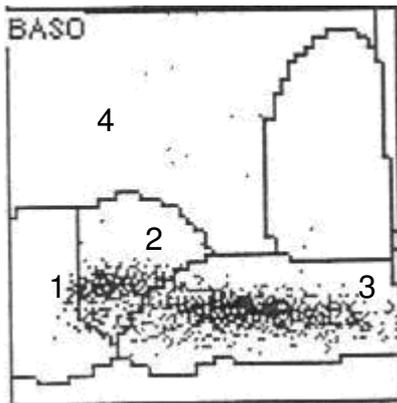


Abbildung 8: ADVIA 120 Bild

einer Vollblutprobe;

Basophilenkanal

1 = Blasten; 2 = Zellkerne von mononukleären Blutzellen (MNBC); 3 = Zellkerne von polymorphkernigen Blutzellen (PMBC); 4 = Basophile Granulozyten (ganze Zellen)

2.2.2 Isolierung von Leukozyten mittels Dextransedimentation

Von gesunden Probanden wurde eine grössere Menge venöses Blut mit EDTA-enthaltenden Monovetten abgenommen und ein Differentialblutbild am ADVIA 120 angefertigt. Anschliessend wurde zu je 5 ml EDTA-Vollblut 1 ml Dextransedimentationslösung dazugegeben, gut gemischt und eine Stunde zur Sedimentation der Erythrozyten stehengelassen.

Der Überstand wurde vorsichtig in ein frisches Spitzröhrchen abpipettiert und 10 Minuten bei 1359 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde restlos abgekippt und auf einem Papierhandtuch ausgeklopft. Auf die verbleibenden Zellpellets wurden 1-2 ml 0,9%ige NaCl-Lösung aufpipettiert und mit der Pipette

ohne Schaumbildung die Pellets resuspendiert. Anschliessend wurden alle Zellsuspensionen wieder vereinigt und am ADVIA 120 die Zellzahl bestimmt.

Für die photometrischen Enzym-Messungen wurde die Zellsuspension danach in Portionen von je $5-10 \times 10^6$ Leukozyten aufgeteilt und bei 1359 g 10 Minuten zentrifugiert. Auf die verbleibenden Zellpellets wurden 0,2 ml Aqua bidest gegeben und die Proben anschliessend bei -20°C eingefroren.

Für die Versuche an der Isotachophorese wurde die Zellsuspension nach der Messung am ADVIA 120 ohne Portionierung 10 Minuten bei 1359 g zentrifugiert und anschliessend das Zellpellet ohne Zugabe von Aqua bidest bei -20°C eingefroren.

2.2.3 Granulozyten-Isolierung

300 ml eines Granulozyten-Konzentrates aus der Transfusionsmedizin in Ulm wurden in sechs Portionen von je 50 ml verteilt und 10 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgesaugt. Anschliessend wurden die Granulozyten einer Portion in 25 ml Lysepuffer resuspendiert und danach zur nächsten Granulozyten-Portion dazugegeben, die nach Zusatz von 5 ml Lysepuffer ebenfalls resuspendiert wurden. Ebenso wurde mit je 2 der verbliebenen 4 Portionen verfahren, so dass am Schluss insgesamt 3 Portionen verblieben, die 15 Minuten im Kühlraum bei 4°C auf dem Moltronic Spiromix aufbewahrt wurden.

Anschliessend wurden die Proben 10 Minuten bei 400 g und 4°C zentrifugiert und danach der Überstand (= Lysepuffer) abgesaugt.

Zu zwei Pellets wurden je 30 ml bei 4°C gekühlte D-PBS²⁺ zugegeben und resuspendiert, zum 3. Pellet wurden 20 ml gekühlte D-PBS²⁺ zugegeben, resuspendiert und dieses anschliessend auf die ersten beiden Pellets verteilt, so dass danach 2 Portionen verblieben, die 10 Minuten bei 400 g und 4°C zentrifugiert wurden. Danach wurde die D-PBS²⁺ abgesaugt und nochmals je 40 ml D-PBS²⁺ zu jeder Portion gegeben und die Zellpellets resuspendiert. Von beiden Proben wurde dann am ADVIA 120 die Zellzahl bestimmt. Schliesslich wurden beide Portionen nochmals 10 Minuten bei 400 g und 4°C zentrifugiert,

der Überstand (= D-PBS²⁺ und lysierte Erythrozyten) abgesaugt und die verbliebenen Zellpellets, bestehend aus >98% Granulozyten, bei -20°C eingefroren.

2.2.4 Photometrische Messungen

2.2.4.1 Prinzip der Photometrie (s. Abb. 9)

Ein Teil des durch eine Küvette durchtretenden Lichts wird vom gelösten Stoff geschwächt, wobei die Absorption von der Wellenlänge des Lichts, der Konzentration der Probe und der Schichtdicke der Küvette abhängig ist.

Ein Photometer misst die Lichtabsorption von Molekülen im sichtbaren oder ultravioletten Spektralbereich nach dem Lambert-Beer-Gesetz:

$$E = \log I/I_0 = \epsilon \cdot c \cdot d$$

I_0 : Anfangsintensität des Lichts

I : Lichtintensität nach Absorption

E : Extinktion

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient

c : Konzentration des gelösten Stoffes

d : durchstrahlte Schichtdicke

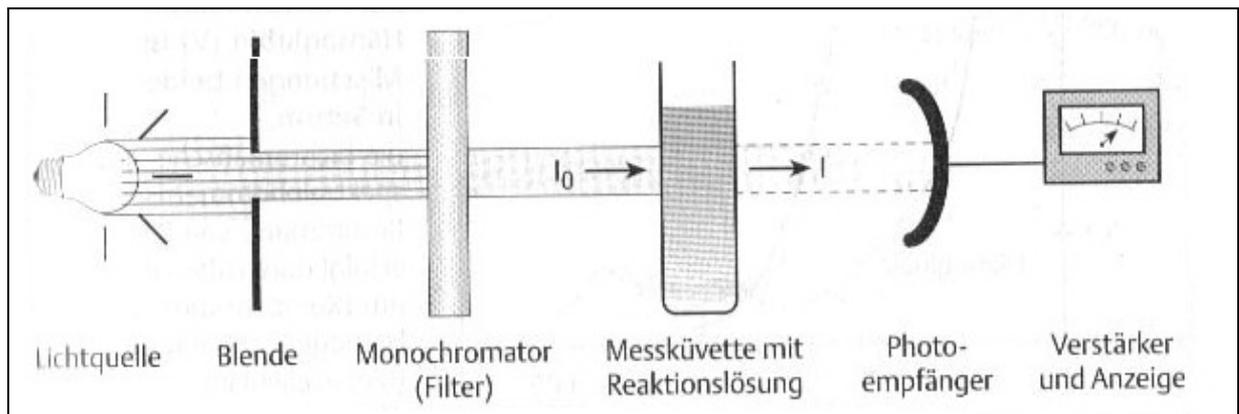


Abbildung 9: Aufbau eines Photometers (aus: Dörner, 2003)

2.2.4.2 Photometrische Bestimmung der rhASA-Aktivität

Ansetzen der Probe:

200 µl Substratlösung (s. Kap. 2.1.2.2)

+ 10 µl rhASA verschiedener Konzentrationen

+ 50 µl Aqua bidest, Enzymextrakt, humane Serumalbumin-Lösung 0,2%,
Serumalbumin-Lösung 0,1% oder Heparinplasma 1:1 verdünnt

Ansetzen des Leerwertes:

200 µl Substratlösung

+ 10 µl Aqua bidest

+ 50 µl Aqua bidest, Enzymextrakt, humane Serumalbumin-Lösung 0,2%,
Serumalbumin-Lösung 0,1% oder Heparinplasma 1:1 verdünnt

+ 250 µl Natronlauge 0,5 mol/l

Sowohl die Proben als auch der Leerwert wurden gut vermischt und eine vorgegebene Zeit im Kühlschrank bei 4°C oder im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden die Proben in Trockeneis getaucht und bis zur Messung bei -20°C gelagert, wobei die Reaktion gestoppt wurde.

Vor der photometrischen Bestimmung wurden die Proben aufgetaut, und es wurden jeder Probe 250 µl Natronlauge 0,5 mol/l zugegeben, um das Reaktionsprodukt vom Hydrochinon in das Chinon zu überführen. Danach wurde am Photometer die Extinktion bei 514 nm gegen Wasser gemessen.

Ergebnis: Extinktion Probenansatz – Extinktion Leerwert

2.2.4.3 Photometrische Bestimmung der Aktivität von ASA-Zellextrakten

Die mittels Dextran sedimentation isolierten Leukozyten (s. Kap. 2.2.2) wurden aufgetaut, und es wurden 1,8 ml Aqua bidest zu einem Zellpellet (Zellzahl: $19,46 \times 10^6$ Leukozyten) dazugegeben, die Probe mit einer Pipette gut homogenisiert und danach 3 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Versuche verwendet.

Ansetzen der Probe:

50 µl Überstand
+ 200 µl Substratlösung

Ansetzen des Leerwertes:

50 µl Überstand
+ 200 µl Substratlösung
+ 250 µl NaOH 0,5 mol/l

Proben und Leerwert wurden während einer oder drei Stunden bei 37°C oder 48 Stunden bei 4°C inkubiert und danach bei -20°C eingefroren. Vor der photometrischen Bestimmung wurden die Proben aufgetaut, je 250 µl Natronlauge 0,5 mol/l zugefügt und schliesslich die Extinktion bei 514 nm gegen Wasser gemessen.

Ergebnis: Extinktion Probenansatz – Extinktion Leerwert

2.2.4.4 Adaptation an die Isotachophorese

Für die ITP-Messungen war es nötig, die Molarität der Pufferlösung zu reduzieren. Daher wurde in diesem photometrischen Bestimmungsansatz überprüft, ob eine Reduktion der Molarität des Inkubationspuffers zu einer Veränderung der pNCS-Umsatzrate führt.

Der ASA-enhaltende Überstand wurde, wie in Kapitel 2.2.4.3 beschrieben, aus den mittels Dextranedimentation isolierten Leukozyten (s. Kap. 2.2.2) gewonnen.

Ansetzen des Na-acetatpuffers mit pNCS 10 mmol/l:

311 mg pNCS
+ 100 ml Na-acetatpuffer unverdünnt, 1:10 oder 1:50 verdünnt mit Aqua bidest

Ansetzen der Probe:

- 200 µl Na-acetatpuffer mit pNCS 10 mmol/l unverdünnt, 1:10 oder 1:50 verdünnt mit Aqua bidest
- + 50 µl Überstand
- + 10 µl Aqua bidest oder rhASA verschiedener Konzentrationen

Ansetzen des Leerwertes:

- 200 µl Na-acetatpuffer mit pNCS 10 mmol/l unverdünnt, 1:10 oder 1:50 verdünnt mit Aqua bidest
- + 50 µl Überstand
- + 10 µl Aqua bidest oder rhASA verschiedener Konzentrationen
- + 250 µl NaOH 0,5 mol/l

Proben und Leerwert wurden jeweils 15 Minuten, 1 oder 12 Stunden lang im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden die Ansätze in Trockeneis gelegt und bei -20°C eingefroren. Für die Extinktionsmessung wurden die Proben aufgetaut und je 250 µl Natronlauge 0,5 mol/l zugegeben. Bei hohen photometrischen Werten wurde der Reaktionsansatz sofort nach der Messung mit einer Verdünnungslösung bestehend aus 200 µl der jeweiligen Substratlösung, 50 µl Aqua bidest und 250 µl Natronlauge 0,5 mol/l verdünnt, wobei der Reaktionsansatz bei Messwerten zwischen 2 und 2,5 1:1, bei Messwerten zwischen 2,5 und 3,0 1:4 und bei Messwerten über 3,0 jeweils 1:10 verdünnt wurde.

Ergebnis: Extinktion Probenansatz – Extinktion Leerwert

2.2.4.5 Proteinbestimmung nach Lowry

500 µl Lösung C (s. Kap. 2.1.2.2.1) wurden mit je 0,01 ml einer Probe (=separierte Leukozyten, s. Kap. 2.2.2) oder mit 20 µl einer der Standardproben (Rinderserumalbumin bzw. Hämoglobin) vermischt und danach 5 Minuten stehengelassen. Anschliessend wurden je 20 µl Folin konz. dazugegeben, mit dem Vortex gut gemischt und nach 20 Minuten mit dem Spektralphotometer die Extinktion bei 500 nm gemessen.

2.2.5 Dünnschichtchromatographie

Prinzip

Die Dünnschichtchromatographie beruht auf der Trennung der Bestandteile einer Probe durch unterschiedliche Adsorption der Bestandteile an einer stationären Phase und durch unterschiedliche Löslichkeit der Bestandteile in der mobilen Phase. Stoffe, die stark von der stationären Phase adsorbiert werden oder die sich schlecht in der mobilen Phase lösen, wandern langsamer als Stoffe, die schlecht adsorbiert werden oder gut löslich sind.

Durchführung

Eine HPTLC-Platte (10x10 oder 10x20 cm) mit Kieselgel als stationäre Phase wurde 5 Minuten bei 100°C aktiviert. Auf die abgekühlte Platte wurden je 5 µl der Proben punktförmig aufgetragen und die Platte danach gefönt.

Anschliessend wurde die Platte zuerst in eine Kammer mit Lösungsmittel 1 (s. Kap. 2.1.2.3) als mobile Phase und danach in eine Kammer mit Mischsystem als mobile Phase gestellt, wobei die Platte mit dem Fön getrocknet wurde, nachdem das Lösungsmittel 1 4 cm gewandert war. Sobald das Mischsystem 7 cm gewandert war, wurde die Platte herausgenommen und getrocknet, bevor sie mit dem Färbemittel gleichmässig besprüht wurde. Die trockene Platte wurde 10 Minuten im 120°C vorgeheizten Ofen inkubiert, um die einzelnen Banden sichtbar zu machen.

2.2.5.1 Sulfatid und Galactocerebroxid gelöst in CHCl₃/CH₃OH (2:1)

Probenansatz:

10 µl Stammlösung (Sulfatid oder Galactocerebroxid, s. Kap. 2.1.2.3) oder je 5 µl Sulfatid- und Galactocerebroxid-Stammlösung
+ 90 µl Verdünnungslösung (CHCl₃/CH₃OH (2:1), s. Kap. 2.1.2.3)

Von den Probenansätzen wurden entweder 5 µl (Sulfatid oder Galactocerebroxid) oder 10 µl (Sulfatid und Galactocerebroxid) aufgetragen.

2.2.5.2 Galactocerebrosid und/ oder Sulfatid gelöst in Na-acetatpuffer 25 mmol/l, pH 5 und CHCl₃/CH₃OH (2:1)

Probenansätze:

50 µl Na-acetatpuffer 25 mmol/l

+ 50 µl Verdünnungslösung (CHCl₃/CH₃OH (2:1), s. Kap. 2.1.2.3)

+ 10 µl Stammlösung (Sulfatid oder Galactocerebrosid, s. Kap. 2.1.2.3) oder je 5 µl Sulfatid- und Galactocerebrosid-Stammlösung

Die Ansätze wurden gut gemischt und von der unteren lipophilen Phase je 5 µl (Sulfatid oder Galactocerebrosid) oder 10 µl (Sulfatid und Galactocerebrosid) aufgetragen.

2.2.5.3 Na-acetatpuffer 25 mmol/l und CHCl₃/CH₃OH (2:1) mit oder ohne Zugabe von Taurocholat 1%, Taurocholat 1% und Sulfatid oder Taurocholat 1% und Galactocerebrosid

Probenansätze:

50 µl Na-acetatpuffer 25 mmol/l

+ 50 µl Verdünnungslösung (CHCl₃/CH₃OH (2:1), s. Kap. 2.1.2.3)

± 100 µl Taurocholat 1% gelöst in Verdünnungslösung

± 5 µl Galactocerebrosid- oder Sulfatid-Stammlösung

Es wurden alle Ansätze mit dem Vortex gut gemischt. Die obere hydrophile Phase wurde verworfen, von der unteren lipophilen Phase je 5 µl aufgetragen.

2.2.5.4 Messung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebroside zu Galactocerebroside durch rhASA (1,48 U/ml oder 14,8 U/ml) nach 4-stündiger Inkubation bei 37 °C in Taurocholat- und Albumin-/ Na-acetatpufferlösung

Probenansätze:

100 µl Taurocholat 1% gelöst in Verdünnungslösung

+ 5 µl Sulfatid-Stammlösung (s. Kap. 2.1.2.3)

→ unter Abzug fönen, bis Ansätze eingedampft sind
anschliessend Zugabe von:

25 µl Serumalbuminlösung 0,2%

+ 25 µl Na-acetatpuffer 25 mmol/l

+ 5 µl Aqua bidest oder rhASA verschiedener Konzentrationen

Alle Ansätze wurden vier Stunden im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und danach je 5 µl auf die Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen.

2.2.5.5 Messung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebroside zu Galactocerebroside durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C in Taurocholat- und Na-acetatpuffer- oder Taurocholat- und Albumin-/ Na-acetatpufferlösung

Probenansätze:

100 µl Taurocholat 1% gelöst in Verdünnungslösung

+ 5 µl Sulfatid-Stammlösung (s. Kap. 2.1.2.3)

→ unter Abzug fönen, bis Ansätze eingedampft sind
anschliessend Zugabe von:

+ 50 µl Na-acetatpuffer 25 mmol/l + 5 µl Aqua bidest (Ansatz 1)

+ 50 µl Na-acetatpuffer 25 mmol/l + 5 µl rhASA 14,8 U/ml (Ansatz 2)

+ 25 µl Na-acetatpuffer 25 mmol/l + 25 µl Serumalbuminlösung 0,2% + 5 µl
rhASA 14,8 U/ml (Ansatz 3)

Alle Ansätze wurden zwei Stunden im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Danach wurde jeder Probe 55 µl Verdünnungslösung zugegeben. Die Proben wurden auf dem Vortex gut gemischt und die obere, hydrophile Phase verworfen. Von der unteren Phase jeder Probe wurden je 5 µl auf die Platte aufgetragen.

2.2.5.6 Messung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebroside zu Galactocerebroside durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C in Na-acetatpuffer- oder Albumin-/ Na-acetatpufferlösung

Referenzansatz:

5 µl Sulfatid-Stammlösung (s. Kap. 2.1.2.3)
+ 5 µl Galactocerebroside-Stammlösung
+ 5 µl Aqua bidest
+ 50 µl Na-acetatpuffer 25 mmol/l

Probenansätze:

10 µl Sulfatid-Stammlösung
+ 5 µl rhASA 14,8 U/ml oder 5 µl Aqua bidest
+ 50 µl Na-acetatpuffer oder je 25 µl Na-acetatpuffer und Serumalbuminlösung

Nach der Zugabe von Sulfatid bzw. Sulfatid und Galactocerebroside wurden die Ansätze eingedampft. Danach wurden Aqua bidest bzw. rhASA 14,8 U/ml und Na-acetatpuffer bzw. Na-acetatpuffer und Serumalbuminlösung 0,2% zugegeben. Alle Ansätze wurden zwei Stunden bei 37°C inkubiert, wobei sie alle 30 Minuten mit dem Vortex gemischt wurden. Anschliessend wurde jedem Ansatz 55 µl Verdünnungslösung zugegeben. Die Ansätze wurden nochmals mit dem Vortex gut gemischt und sowohl von der oberen, hydrophilen als auch von der unteren, lipophilen Phase je 5 µl auf die Platte aufgetragen.

2.2.5.7 Messung des Umsatzes von 350 $\mu\text{mol/l}$ Sulfatid gelöst in 25 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5,0, 5 mmol/l MgCl_2 und 0,3% Taurocholat durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C

Probenansätze:

200 μl Na-acetatpuffer 25 mmol/l, MgCl_2 5 mmol/l und 0,3% Taurocholat
± 350 $\mu\text{mol/l}$ Sulfatid (s. Kap. 2.1.2.3)
+ 10 μl Aqua bidest oder rhASA 14,8 U/ml

Jeder Ansatz wurde zweimal angesetzt. Alle Ansätze wurden zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Vor dem Auftragen von je 10 μl wurde den Proben entweder Methanol (stoppt Reaktion) oder Verdünnungslösung zugegeben. Von den Proben mit der Verdünnungslösung wurde jeweils die obere Phase verworfen und nur die untere lipophile Phase aufgetragen.

2.2.5.8 Messung des Umsatzes von 350 $\mu\text{mol/l}$ Sulfatid mit 5 mmol/l MgCl_2 und Taurocholat sowie Na-acetatpuffer pH 5 verschiedener Konzentrationen durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C

Probenansätze:

100 μl Sulfatid 350 $\mu\text{mol/l}$ (s. Kap. 2.1.2.3)
+ 100 μl Na-acetatpuffer 25 mmol/l mit MgCl_2 5 mmol/l und Taurocholat 0,3%
(Ansatz 1)
+ 100 μl Aqua bidest mit MgCl_2 5 mmol/l und Taurocholat 0,3% (Ansatz 2)
+ 100 μl Aqua bidest mit MgCl_2 5 mmol/l (Ansatz 3)
± 10 μl rhASA 14,8 U/ml

Alle Ansätze wurden zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und von jedem Ansatz der pH-Wert gemessen. Anschliessend wurde jeder Probe 200 μl Verdünnungslösung (s. Kap. 2.1.2.3) zugegeben und je 20 μl der unteren (lipophilen) Phase aufgetragen.

2.2.5.9 Messung des Umsatzes von Sulfatid gelöst in Taurocholat 0,3% (rein oder unrein), MgCl_2 5 mmol/l und Na-acetatpuffer 25 mmol/l durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C

Probenansätze:

100 μl Taurocholat 0,3% rein oder unrein gelöst in Na-acetatpuffer 25 mmol/l mit MgCl_2 5 mmol/l

\pm 100 μl Sulfatid 350 $\mu\text{mol/l}$ (s. Kap. 2.1.2.3)

+ 10 μl Aqua bidest oder rhASA 14,8 U/ml

Die Ansätze wurden zwei Stunden bei 37°C inkubiert, und nach Zugabe von 200 μl Verdünnungslösung (s. Kap. 2.1.2.3) wurden je 20 μl von jedem Ansatz aufgetragen.

2.2.6 Isotachophorese

2.2.6.1 Grundlagen

Die Isotachophorese (ITP, s. Abb. 10) ist eine Methode, die speziell für die Trennung niedermolekularer ionischer Substanzen geeignet ist. Dabei wird die elektrophoretische Mobilität der Substanzen unter der Wirkung eines elektrischen Feldes genutzt. In der Regel werden dabei Kapillaren mit Innendurchmessern von 200-300 μm verwendet, um die durch den Stromfluss erzeugte Joulsche Wärme zu minimieren und dadurch eine möglichst gute Trenneffizienz zu erzielen.

Charakteristisch für die ITP ist die Verwendung eines diskontinuierlichen Elektrolyt-Systems, das aus zwei wässrigen Elektrolyten, dem sog. Leitelektrolyt (Ld, leading elektrolyte) und dem sog. Endelektrolyt (Tm, terminating elektrolyte), besteht.

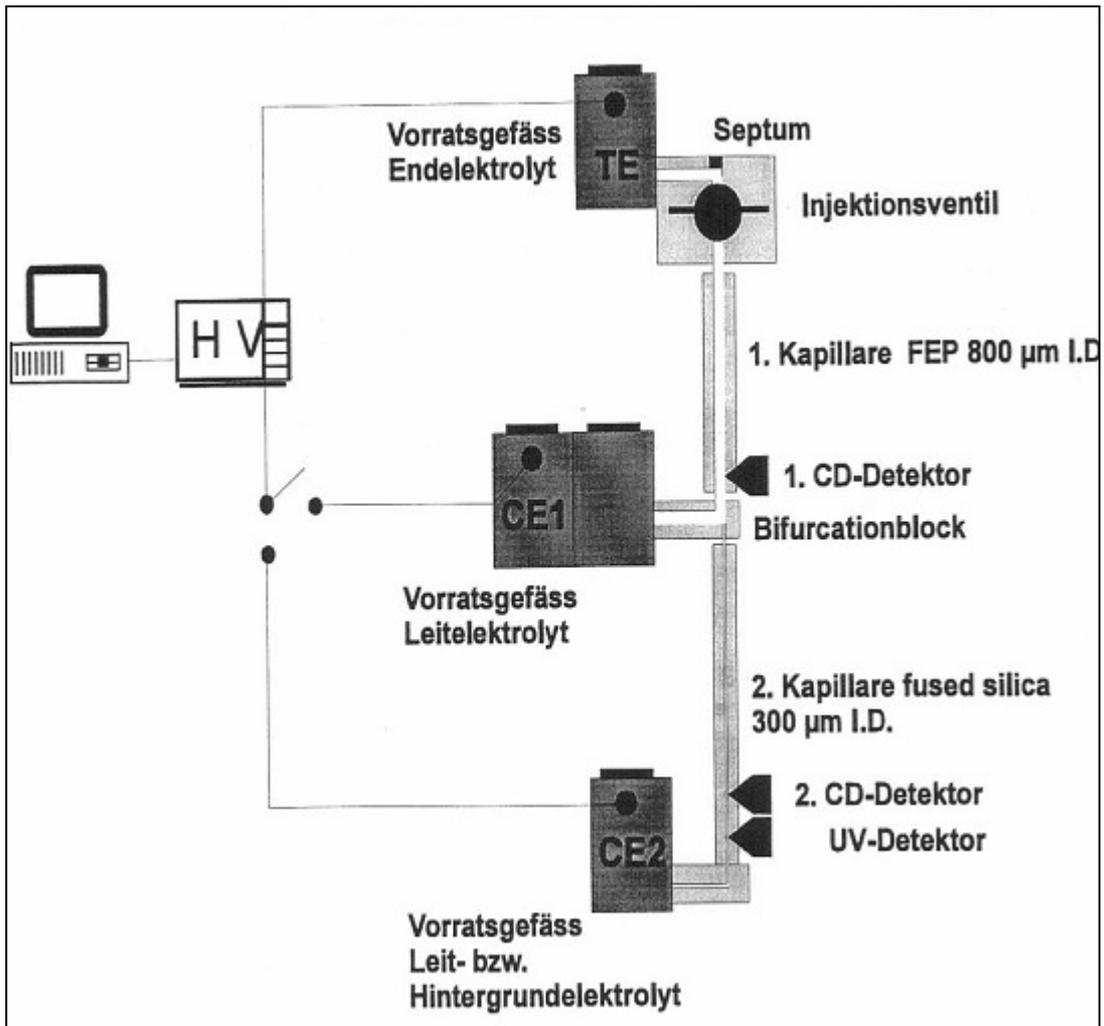


Abbildung 10: Schematische Darstellung des ItaChrom II (manuelle Version) (aus: Hins, 2003)

Konzept der Mobilität

Die Kraft f_1 , welche in einem elektrischen Feld auf ein Teilchen wirkt, ist proportional zur Ladung (e) des Teilchens und zur Stärke des elektrischen Feldes (E).

$$f_1 = z \cdot e \cdot E$$

z : Ladungszahl des Ions (1)

e : Elementarladung

E : Elektrische Feldstärke

Material und Methoden

Dieser Kraft f_1 entgegengesetzt ist die Reibungskraft F_R , die nach Stokes für ein kugelförmiges Teilchen in einer Flüssigkeit durch die Gleichung 2 beschrieben wird.

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad \eta: \text{Viskosität} \quad (2)$$

r : Radius des kugelförmigen Teilchens
 v : Geschwindigkeit der ungestörten
Strömung = Geschwindigkeit des Teilchens

Im Gleichgewicht entspricht die Kraft f_1 der Reibungskraft F_R . Das Teilchen bewegt sich somit mit der Geschwindigkeit v durch die Lösung.

$$v = \frac{z \cdot e \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (3)$$

Die Mobilität (μ) ist eine von apparativen Bedingungen unabhängige Größe und wird durch die Eliminierung der elektrischen Feldstärke in Gleichung 3 berechnet.

$$\mu = \frac{z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} = \frac{v}{E} \quad \mu: \text{Mobilität} \quad (4)$$

Wie aus Gleichung 4 ersichtlich ist, besitzt jede Ionenart eine spezifische Mobilität, die eine charakteristische physikalische Größe des Ions darstellt. Eine Trennung von Ionen ist nur möglich, wenn unter bestimmten Bedingungen die Ionen unterschiedliche Mobilitäten besitzen.

Die absolute Mobilität (μ_0) kennzeichnet ein isoliertes Ion und gibt die Mobilität für ein bestimmtes Ion wieder, wenn keine Wechselwirkung mit anderen Ionen vorhanden ist. Sie wird aus den Äquivalentleitfähigkeiten bei unendlicher Verdünnung (Λ_0) nach Gleichung 5 berechnet.

$$\mu_0 = \frac{\Lambda_0}{F} \quad F: \text{Faradaykonstante} \quad (5)$$

Aktuelle Mobilität

In Wirklichkeit besteht eine Elektrolytlösung jedoch aus einer endlichen Konzentration, und ein geladenes Teilchen wird in einer wässrigen Lösung von einer Hydrathülle und einer diffusen Ionenwolke aus Ionen mit entgegengesetzter Ladung umgeben. Weil das Teilchen durch die Ionenwolke des Gegenions des Elektrolyten abgeschirmt wird, wird die Bewegung im elektrischen Feld erniedrigt. Ausserdem wandert dieses Teilchen entgegengesetzt zur Wanderungsrichtung der Gegenionen und wird durch diesen sog. elektrophoretischen Effekt zusätzlich gebremst. Beide Effekte verstärken sich bei zunehmender Konzentration des Elektrolyten.

Mathematisch wurde der Einfluss auf die Mobilität eines Ions durch die Ionenstärke (J) eines Elektrolyten von Debye und Hückel beschrieben.

$$J = \frac{1}{2} \sum c_E \cdot z_E^2 \quad \begin{array}{l} c_E: \text{Konzentration des Elektrolyten} \\ z_E: \text{Ladungszahl des Elektrolyten} \end{array} \quad (6)$$

Neuere Untersuchungen führen einen experimentell verifizierten Faktor zur Berechnung der aktuellen Mobilität (μ_{act}) ein.

$$\mu_{\text{act}} = k \cdot \mu_0 \quad k: \text{Korrekturfaktor} \quad (7)$$

Das Ausmass der Ionisierung wird bei schwachen Elektrolyten durch den Dissoziationsgrad (α) der Verbindung determiniert, der vom vorgegebenen pH-Wert und vom pK_s -Wert der Verbindung abhängig ist.

$$\alpha = \frac{1}{1 + 10^{pK_s - pH}} \quad (8)$$

Das Produkt aus Dissoziationsgrad und aktueller Mobilität führt zur effektiven Mobilität (μ_{eff}).

$$\mu_{\text{eff}} = \alpha \cdot \mu_{\text{act}} \quad (9)$$

Die effektive Mobilität einer Substanz kann somit aus der absoluten Mobilität und dem pK_s -Wert der Verbindung berechnet werden.

$$\mu_{\text{eff}} = \alpha \cdot k \cdot \mu_0 \quad (10)$$

Bei starken Säuren entspricht die effektive Mobilität der aktuellen Mobilität, da deren Dissoziation praktisch nicht durch den pH-Wert beeinflussbar ist.

Trennprinzip der Isotachophorese (s. Abb. 11)

Nach der Injektion befinden sich die Ionen zwischen einem Leitelektrolyten mit der höchsten Mobilität im Gesamtsystem und einem Endelektrolyten mit der geringsten Mobilität. Bei angelegter Spannung wandern die Leitionen schneller als die Analytionen und die Endionen. Da aber an allen Stellen des Systems der gleiche Stromtransport besteht (das Gerät arbeitet bei eingestellter, konstanter Stromstärke), kann keine Ionenlücke entstehen. Dies kann nur dadurch erreicht werden, dass auf Ionen mit unterschiedlicher Mobilität verschiedene Feldstärken einwirken. Deshalb trennen sich die Analytionen in homogene, diskrete Zonen, die unmittelbar hintereinander mit uniformer Geschwindigkeit folgen. Das Gegenion der beiden Elektrolyte puffert das System auf den gewünschten pH-Wert und gewährleistet die Elektroneutralität.

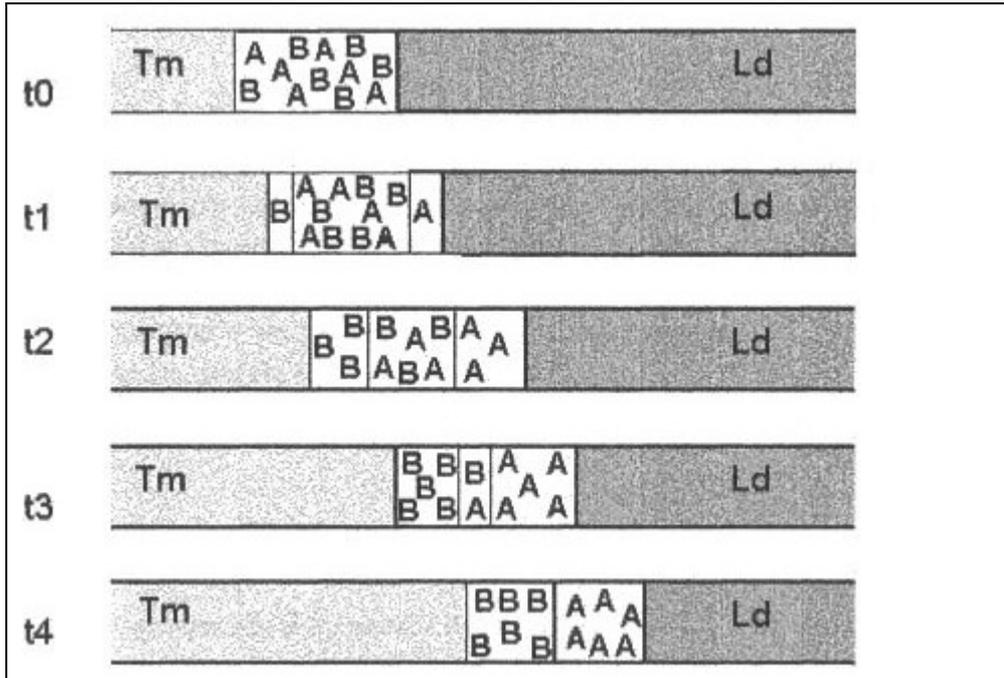


Abbildung 11: Isotachophoretischer Trennprozess; Ld = Leitelektrolyt; Tm = Endelektrolyt; A und B = Analytionen (aus: Meissner, 1998)

Voraussetzungen für die Trennung in Abbildung 11:

- Konstanter Kapillarinne Durchmesser
- Gleiche Stromstärke und Temperatur an allen Stellen des Systems
- Die Mobilität von A ist grösser als die von B

Leit- und Folgelektrolyt

Da nur Substanzen, die zwischen dem Leit- und dem Endelektrolyt wandern, getrennt werden können, müssen die Analytionen eine effektive Mobilität besitzen, die kleiner als die des Leitelektrolyten, aber grösser als die des Endelektrolyten ist, um getrennt werden zu können. Beide Elektrolyte und die Analytionen müssen in die gleiche Richtung wandern, wodurch sich ein anionisches bzw. kationisches ITP-System ergibt. Ausserdem sollte der Leitelektrolyt ein pufferndes Gegenion enthalten, welches in die entgegengesetzte Richtung wandert und dadurch die Elektroneutralität der Zonen sowie die pH-Stabilität gewährleistet. Die beiden Elektrolyte dürfen nicht mit Probenbestandteilen reagieren und nicht im angelegten elektrischen Feld zersetzt werden.

Isotachophoretische Zonen (s. Abb. 12)

Im Gleichgewichtszustand wandern alle Zonen mit derselben Geschwindigkeit und sind voneinander durch sehr scharfe Grenzflächen getrennt, wobei sich die physikalischen Eigenschaften der Zonen an den Grenzflächen sprunghaft ändern. Die Wanderungsgeschwindigkeit (v_{iso}) aller Zonen ist konstant.

$$v_{iso} = \mu_L \cdot E_L = \mu_A \cdot E_A = \mu_B \cdot E_B = \mu_T \cdot E_T \quad (11)$$

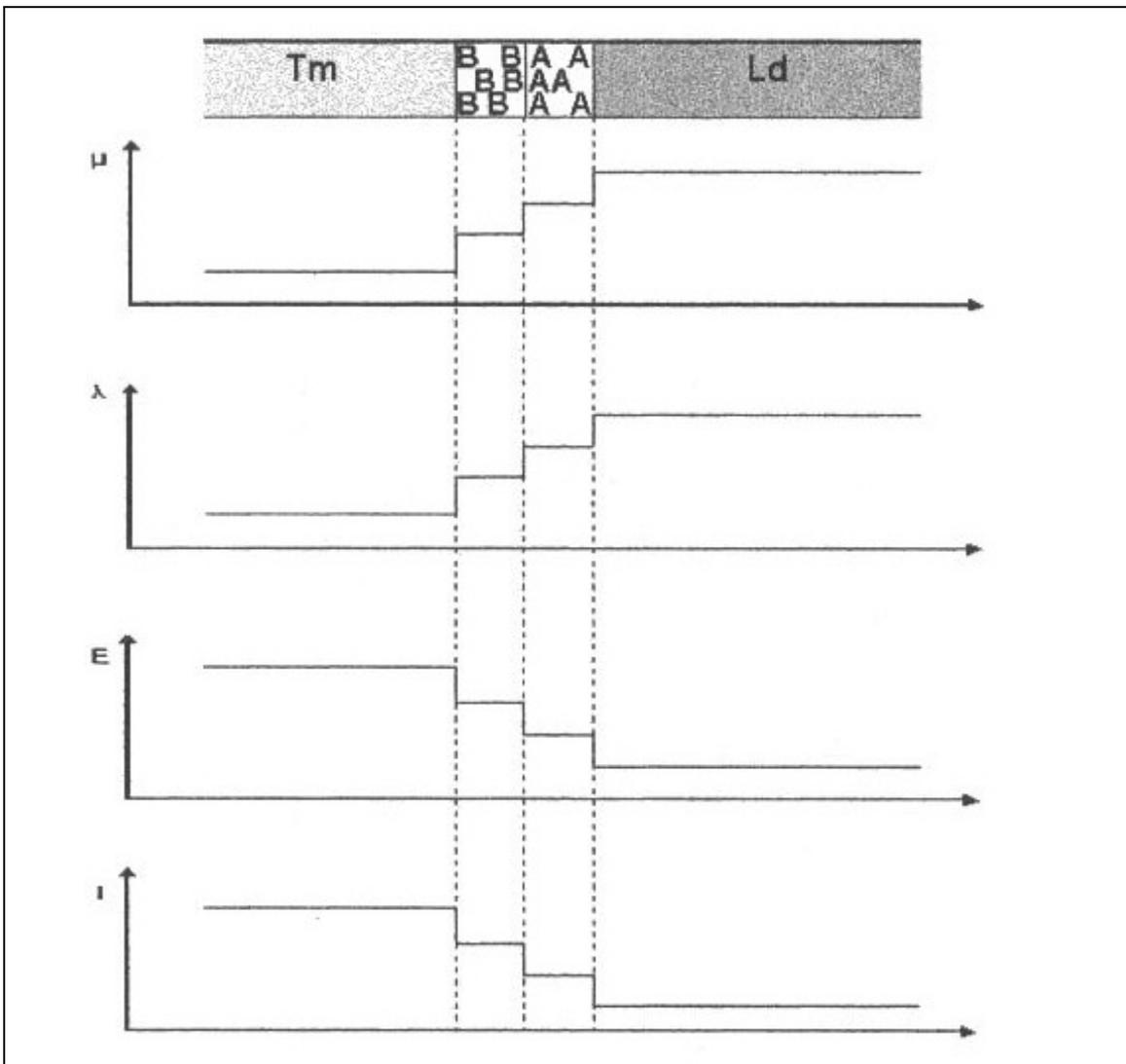


Abbildung 12: Physikalische Eigenschaften isotachophoretischer Zonen; μ = Mobilität; λ = Leitfähigkeit; E = Elektrische Feldstärke; I = Temperatur (aus: Meissner, 1998)

Da die Mobilitäten der beteiligten Ionen unterschiedlich sind und das System bei konstanter Stromstärke arbeitet, hat die elektrische Feldstärke (E) in jeder Zone einen eigenen Wert, der treppenartig vom Leitelektrolyt über die Analytzone bis zum grössten Wert in der Zone des Endelektrolyten ansteigt. Bei konstanter Stromstärke (I) verläuft die Leitfähigkeit (Π) der einzelnen Zonen umgekehrt proportional zum elektrischen Feld.

$$\Pi = \frac{I}{E} \quad (12)$$

Zonenschärfungseffekt (s. Abb. 13)

Im stationären Zustand existiert ein Potentialgradient (Diskontinuität der Feldstärke), der aufgrund der kleineren Mobilität des Endelektrolyten in dieser Zone grösser ist als in der Zone des Leitelektrolyten. Dadurch wird eine durch Diffusion oder Konvektion auftretende Vermischung in den Zonengrenzbereichen verhindert.

Gelangt ein Ion (L) des Leitelektrolyten in die Zone des Endelektrolyten (T_m), kommt es hier unter den Einfluß eines stärkeren elektrischen Feldes. Es wird von seiner ursprünglichen Geschwindigkeit $v_1 = \mu_L \cdot E_L$ auf $v_2 = \mu_L \cdot E_T$ beschleunigt, wodurch es seine eigene Zone des Leitelektrolyten (L_d) wieder einholt. Ebenso wird ein Ion (T) des Endelektrolyten von $v_2 = \mu_T \cdot E_T$ auf $v_1 = \mu_T \cdot E_L$ gebremst, bis es von seiner ursprünglichen Zone T_m wieder eingeholt wird.

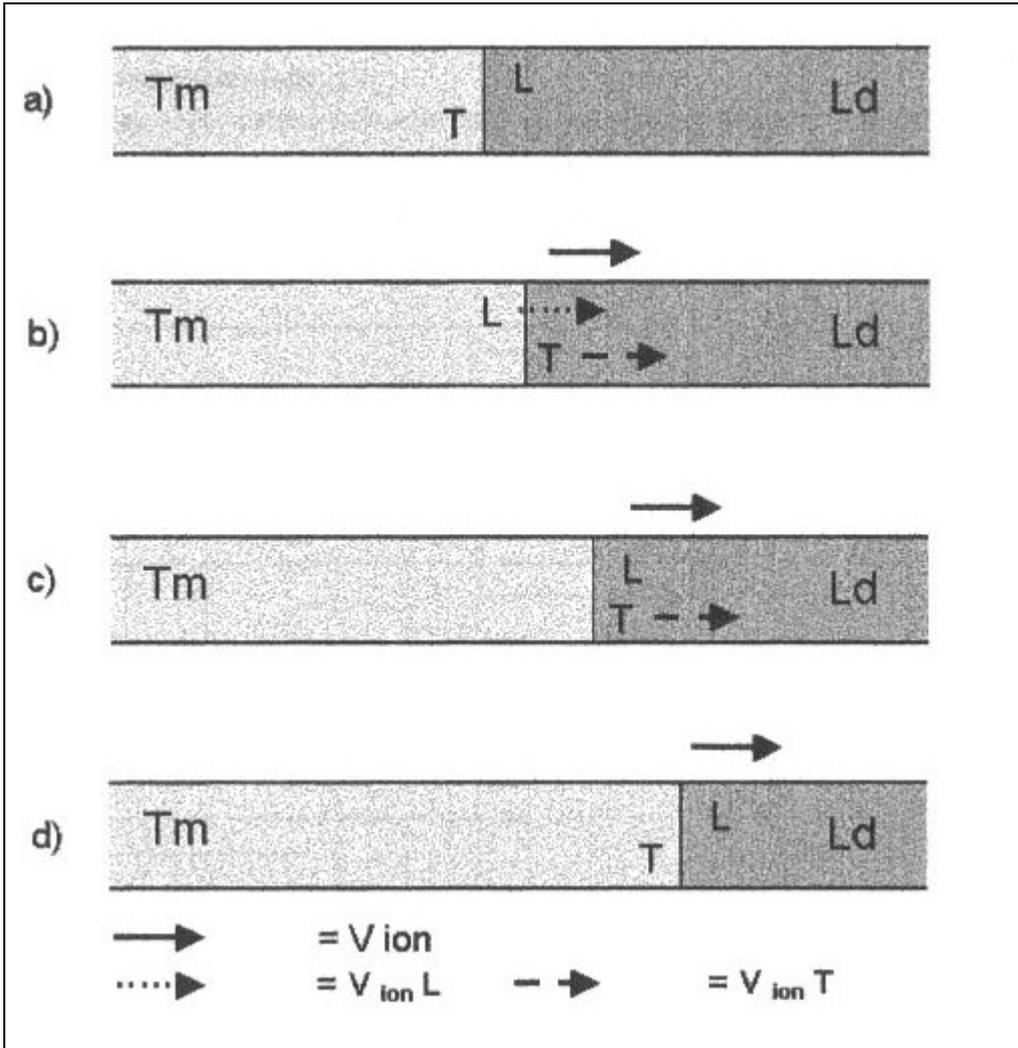


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Zonenschärfungseffektes (aus: Meissner, 1998)

Leitfähigkeitsdetektion

Da die Leitfähigkeit einer isotachophoretischen Zone proportional zur Mobilität des entsprechenden Ions ist (Gleichung 5), hat die Leitfähigkeit in jeder Zone einen individuellen Wert.

Die Leitfähigkeit (Λ) einer isotachophoretischen Zone, die aus einem Analyt (A) und einem Gegenion (R) besteht, ergibt sich für starke, monovalente Analyte aus Gleichung 13.

$$\Lambda = c \cdot F \cdot (\mu_A + \mu_R) \quad c: \text{Konzentration} \quad (13)$$

Für einen mehrwertigen Analyten wird die Leitfähigkeit (Λ) mit Hilfe der Gleichung 14 berechnet.

$$\Lambda = c \cdot z \cdot F \cdot (\mu_A + \mu_R) \quad z: \text{Ladungszahl} \quad (14)$$

Die Leitfähigkeitsdetektion wird normalerweise zwischen zwei Messelektroden in den Kapillarwänden, d.h. on-column mit einer Messzelle, realisiert.

UV/VIS-Detektion

Die UV-Detektion wird ebenso wie die Leitfähigkeitsdetektion mit Hilfe der Kapillare als Messzelle durchgeführt. Wie bei der Photometrie erfolgt die Messung mit Hilfe des Lambert-Beer-Gesetzes (s. Kap. 2.2.4.1).

UV-Detektoren können als spezifische Detektoren nur dort die Grenzen UV-absorbierender Stoffe erkennen, wo diese an nichtabsorbierende oder Stoffe mit anderen absorptiven Eigenschaften angrenzen.

Mathematisches Modell der ITP

1897 entwickelte Kohlrausch die „beharrliche Funktion“ (ω) zur mathematischen Beschreibung elektrophoretischer Prozesse. Diese Funktion basiert auf dem Prinzip der Elektroneutralität und der Annahme konstanter Mobilitäten und wurde als zeitunabhängige Lösung zur Beschreibung der Migration starker Elektrolyte abgeleitet.

$$\omega = \sum_i c_i \mu_i = \text{konst.} \quad (15)$$

C_i : Konzentrationen aller Komponenten

μ_i : Mobilitäten aller Komponenten

Material und Methoden

Das vereinfachte Modell der ITP ist eine Erweiterung der „beharrlichen Funktion“ und basiert auf folgenden Annahmen:

- Die Mobilität des Ions A ist grösser als die des Ions B ($\mu_A > \mu_B$)
- Das Gegenion R ist in allen Zonen gleich und hat die Mobilität μ_R
- Alle Ionen sind monovalent und vollständig dissoziiert
- Die Stromstärke ist konstant

Die Anzahl der positiven und negativen Ionen ist nach dem Prinzip der Elektroneutralität in allen Zonen identisch. Ebenso haben alle Zonen entsprechend der isotachophoretischen Bedingungen die gleiche Geschwindigkeit.

Da die Stromstärke überall konstant ist, folgt aus dem Ohm'schen Gesetz:

$$I = \text{konst.} = E_1 \cdot \Pi_1 = E_2 \cdot \Pi_2 \quad (16)$$

Die „erweiterte beharrliche Funktion“ ergibt sich aus den Gleichungen 13 und 16:

$$c_{B,2} = c_{A,1} \cdot \left(\frac{\mu_B \cdot (\mu_A + \mu_R)}{\mu_A \cdot (\mu_B + \mu_R)} \right) \quad (17)$$

Die Konzentration aller Zonen wird also durch die Konzentration des Leitelektrolyten (Ion A in der Zone 1) bestimmt und hängt nur von den Mobilitäten der beteiligten Ionen ab.

Da jeweils die Konzentration der vorauswandernden Zone die Konzentration der nachfolgenden Zone bestimmt, sind die Konzentrationen für ein gegebenes System konstant und werden zum Folgeion hin immer geringer. Daher sind die Konzentrationen der einzelnen Zonen unabhängig von der ursprünglichen Zusammensetzung der Probe.

Konzentrationsadaption

Eine isotachophoretische Analyse wird mit einem Leitelektrolyten mit konstant vorgegebener Konzentration durchgeführt, und gemäss Gleichung 17 werden die Konzentrationen der Probenbestandteile unabhängig von ihrer Ursprungskonzentration an einen konstanten Wert angeglichen. Proben mit einer geringeren Konzentration als der des Leitelektrolyten werden demnach aufkonzentriert, Proben mit einer grösseren Konzentration verdünnt. Das Zonenvolumen der Probenbestandteile kann daher zur Quantifizierung herangezogen werden.

Qualitative und quantitative Information (s. Abb. 14, Abb. 15)

Isotachophoretische Zonen unterscheiden sich nach der Trennung in ihren physikalischen Eigenschaften und können so identifiziert werden.

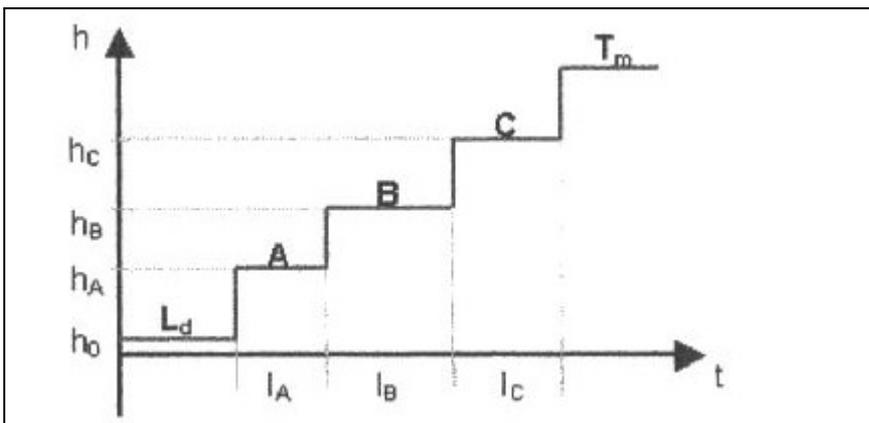


Abbildung 14: Ideales Isotachopherogramm eines Leitfähigkeitsdetektors; h = individuelle charakteristische Messgrösse (Leitfähigkeit, Potential oder Temperatur) der Zonen des Analyten, dient als qualitatives Maß zur Identifizierung der Substanzen; h_0 = Signalthöhe des Leitelektrolyten (L_d), dient als Referenzlinie; t = Zonenlänge, entspricht der Zeit, dient als quantitatives Maß (Substanzmenge) (aus: Meissner, 1998)

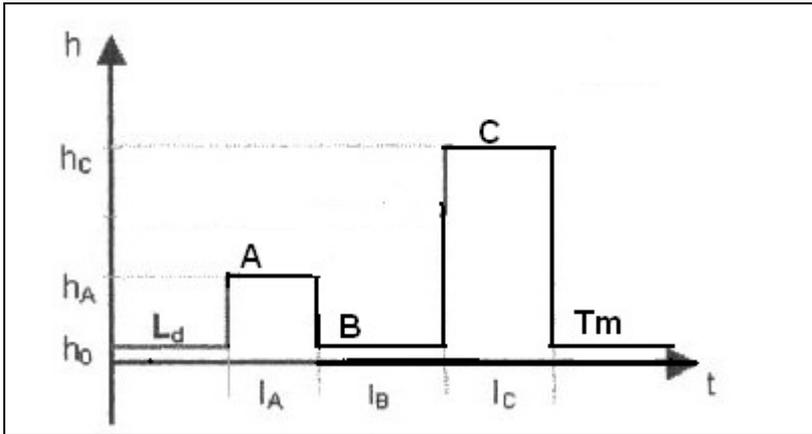


Abbildung 15: Ideales Isotachopherogramm eines UV/VIS-Detektors
 h = individuelle charakteristische Messgröße (Absorption) der Zonen des Analyten; h_0 = Absorption des Leitelektrolyten (L_d) und Endelektrolyten (T_m), dient als Referenzlinie; t = Zonenlänge, entspricht der Zeit; A und C = absorbieren das Licht bei der gewählten Wellenlänge λ ; B = absorbiert kein Licht bei der gewählten Wellenlänge λ

Da die Konzentrationen der Analyte nach Erreichen des stationären Zustandes konstant sind (s. Konzentrationsadaptation), ändert sich die Zonenlänge eines Analyten bei einer Mengenänderung desselben. Deshalb können die Analytionen durch Aufzeichnung der Zonenlänge quantifiziert werden.

2.2.6.2 Untersuchungen mit der ITP

Durchführung der enzymatischen Versuche:

Alle Proben der enzymatischen Versuche wurden für die Messung an der ITP 1:5 mit Aqua bidest (1 Teil Probe, 4 Teile Aqua bidest) verdünnt. Die Proben wurden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, wobei die Ansätze jeweils 30 Minuten vor Beginn der Inkubation (Zeitpunkt 0) und vor Zugabe von rhASA oder der Leukozyten- bzw. Granulozytenextrakte ins Wasserbad gestellt wurden. RhASA wurde jeweils erst nach Entnahme der Probe zum Zeitpunkt 0 zugegeben. Bis zur Messung wurden die Proben bei -20 °C eingefroren.

Material und Methoden

Ausser den unten genannten Versuchen wurden die Ansätze mit folgenden Messeinstellungen gemessen:

Step 1	150 Sekunden	100 μ A
Step 2	150 Sekunden	200 μ A
Step 3	140 Sekunden	200 μ A
Step 4	330 Sekunden	50 μ A
Step 5		50 μ A

Messeinstellungen für Kapitel 2.2.6.2.8 (Abbau einer Mischung von pNCS und Galactose-6-sulfat durch Leukozytenextrakte):

0-h-Wert:	Step 1	150 Sekunden	100 μ A
	Step 2	150 Sekunden	75 μ A
	Step 3	140 Sekunden	75 μ A
	Step 4	500 Sekunden	75 μ A
	Step 5		50 μ A

20-h-Wert:	Step 1	150 Sekunden	75 μ A
	Step 2	150 Sekunden	75 μ A
	Step 3	140 Sekunden	75 μ A
	Step 4	500 Sekunden	75 μ A
	Step 5		50 μ A

Bearbeitung der separierten Leukozyten für die Versuche an der ITP:

Ein Pellet (enthält ca. 54 Mio. Leukozyten) der mittels Dextransedimentation (s. Kap. 2.2.2) isolierten Leukozyten wurde in 250 μ l Aqua bidest resuspendiert und danach mit dem Ultraschallgerät 5 Sekunden behandelt. Anschliessend wurde das Pellet in zwei Portionen aufgeteilt, wovon eine zuerst in Trockeneis und danach bei -20°C eingefroren, die andere für die Reaktionsansätze verwendet wurde.

Nach Zugabe der Leukozytenextrakte wurden die Ansätze vor der Entnahme der Proben mit dem Vortex gut gemischt.

Vor der Messung wurden die Proben aufgetaut und je 400 µl Aqua bidest zu 100 µl Probe zugegeben. Anschliessend wurden die nun 1:5 verdünnten Ansätze 5 Minuten bei 10000 g zentrifugiert und der so entstandene Überstand jedes Ansatzes in Milipore-Röhrchen ultrafiltriert (Ausschlussgrösse: 5 kDa), d.h. 10-15 Minuten bei 10000 g in der Eppendorffzentrifuge behandelt. Das so entstandene Ultrafiltrat wurde bis zur Messung bei -20°C gelagert.

2.2.6.2.1 Abbau von pNCS oder Ascorbylsulfat durch rhASA

Ansatz mit 200 mmol/l pNCS bzw. 200 mmol/l Ascorbylsulfat:

62,2 mg pNCS (Ansatz 1) oder 66,4 mg Ascorbylsulfat (Ansatz 2)
+ 1 ml Aqua bidest

Reaktionsansätze mit 10 mmol/l pNCS bzw. 10 mmol/l Ascorbylsulfat

50 µl pNCS oder Ascorbylsulfat 200 mmol/l
+ 1 ml Na-acetatpuffer pH 5 10 mmol/l, NaCl 8 mmol/l, MgCl₂ 5 mmol/l
+ 10 µl rhASA 14,8 U/ml oder 1,48 U/ml

Die Ansätze wurden bei 37°C inkubiert und je 200 µl pro gemessenem Zeitpunkt (0-24 Stunden) entnommen, wobei rhASA erst nach der Entnahme der Probe zum Zeitpunkt 0 zugegeben wurde.

2.2.6.2.2 Isotachogramme von Ascorbylsulfat und Ascorbat

Ascorbylsulfat 2 mmol/l:

3,32 mg Ascorbylsulfat
+ 5 ml Aqua bidest

Ascorbat 2 mmol/l:

3,52 mg Ascorbat
+ 10 ml Aqua bidest

Für die Eichkurve wurden diese sowie die folgenden Ansätze jeweils 1:1 mit Aqua bidest verdünnt.

2.2.6.2.3 Stabilität von Ascorbylsulfat, Ascorbat und Ascorbylphosphat bei pH 5,0 und pH 7,4 oder in 100% FCS

1 ml (Na-acetatpuffer 10 mmol/l, NaCl 8 mmol/l) wurde mit CH_3COOH bis pH 5,0 bzw. NaOH bis pH 7,4 titriert.

Ascorbylsulfat 50 mmol/l:

8,3 mg Ascorbylsulfat
+ 500 μl Aqua bidest

Ascorbat 50 mmol/l:

8,8 mg Ascorbat
+ 1 ml Aqua bidest

Ascorbylphosphat 50 mmol/l:

500 μl Ascorbylphosphat 100 mmol/l
+ 500 μl Aqua bidest

Ansätze mit je 1 mmol/l Substraten:

940 μl Na-acetatpuffer pH 5,08 oder pH 7,12 oder FCS
+ 20 μl Ascorbylsulfat 50 mmol/l
+ 20 μl Ascorbat 50 mmol/l
+ 20 μl Ascorbylphosphat 50 mmol/l

Alle Ansätze wurden bei 37°C inkubiert und zu den Zeitpunkten 0, 4 und 24 Stunden je 100 μl (Ansatz mit FCS) bzw. 250 μl (Ansätze mit Na-acetatpuffer) für die Messung entnommen. Vor der Messung wurden die Ansätze mit FCS ultrafiltriert.

2.2.6.2.4 Abbau von Ascorbylsulfat (4,76 mmol/l) durch a) rhASA oder b) Leukozytenextrakte

Reaktionsansatz mit 4,76 mmol/l Ascorbylsulfat:

495 µl Na-acetatpuffer pH 5 10 mmol/l, NaCl 8 mmol/l

+ 5 µl MgCl₂ 500 mmol/l

+ 12,5 µl Ascorbylsulfat 200 mmol/l

+ 20 µl rhASA 14,8 U/ml oder + 50 µl Leukozytenextrakt

(Extrakt aus $9,02 \times 10^6$ Leukozyten)

Zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 4 und 20 Stunden wurden je 50 µl vom Ansatz mit rhASA oder zu den Zeitpunkten 0, 4 und 20 Stunden je 100 µl vom Ansatz mit Leukozytenextrakt entnommen.

2.2.6.2.5 Abbau einer Mischung von pNCS und Ascorbylsulfat durch rhASA

Reaktionsansatz mit je 4,76 mmol/l pNCS und Ascorbylsulfat

495 µl Na-acetatpuffer pH 5 10 mmol/l, NaCl 8 mmol/l

+ 5 µl MgCl₂ 500 mmol/l

+ 12,5 µl pNCS 200 mmol/l

+ 12,5 µl Ascorbylsulfat 200 mmol/l

+ 20 µl rhASA 14,8 U/ml

Der Ansatz wurde bei 37°C inkubiert, und zu den Zeiten 0, 30 Minuten, 1, 2, 3, 4 und 20 Stunden wurden je 50 µl des Reaktionsansatzes entnommen.

2.2.6.2.6 Abbau einer Mischung von pNCS, Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat durch a) rhASA oder b) Leukozytenextrakte

Galactose-6-sulfat 200 mmol/l:

28,2 mg Galactose-6-sulfat

+ 500 µl Aqua bidest

Material und Methoden

Reaktionsansatz für die Inkubation mit rhASA und je 1 mmol/l an Substraten:

- 495 µl Na-acetatpuffer pH 5 10 mmol/l, NaCl 8 mmol/l
- + 5 µl MgCl₂ 500 mmol/l
- + 2,5 µl pNCS 200 mmol/l
- + 2,5 µl Ascorbylsulfat 200 mmol/l
- + 2,5 µl Galactose-6-sulfat 200 mmol/l
- + 20 µl rhASA 14,8 U/ml

Der Ansatz wurde bei 37°C inkubiert. Zum Zeitpunkt 0 wurden 50 µl, zu den Zeiten 2, 4 und 24 Stunden 100 µl vom Ansatz entnommen.

Reaktionsansatz für die Inkubation mit Leukozytenextrakt und je 0,77 mmol/l an Substraten:

- 495 µl Na-acetatpuffer pH 5 10 mmol/l, NaCl 8 mmol/l
- + 5 µl MgCl₂ 500 mmol/l
- + 2,5 µl pNCS 200 mmol/l
- + 2,5 µl Ascorbylsulfat 200 mmol/l
- + 2,5 µl Galactose-6-sulfat 200 mmol/l
- + 150 µl Leukozytenextrakt (aus $32,81 \times 10^6$ Leukozyten)

Das Pellet der separierten Leukozytenextrakte mit $54,68 \times 10^6$ Leukozyten wurde für den Reaktionsansatz wie bei den vorhergehenden Versuchen in 250 µl Aqua bidest resuspendiert und im Ultraschallgerät behandelt. Vor der Zentrifugation mit 10000 g in der Eppendorf-Zentrifuge wurde es jedoch zusätzlich kurz eingefroren und wieder aufgetaut und der Überstand ohne Ultrazentrifugation für den Reaktionsansatz verwendet. Der nicht für diesen Versuch benutzte Überstand wurde wieder bei -20°C eingefroren.

Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4 und 24 Stunden wurden je 100 µl vom Ansatz entnommen.

2.2.6.2.7 Abbau von pNCS durch Leukozytenextrakte

Reaktionsansatz mit 4,76 mmol/l pNCS:

495 μ l Na-acetatpuffer pH 5 10 mmol/l, NaCl 8 mmol/l

+ 5 μ l MgCl₂ 500 mmol/l

+ 12,5 μ l pNCS 200 mmol/l

+ 50 μ l Leukozytenextrakt (aus $10,94 \times 10^6$ Leukozyten)

Der Ansatz wurde bei 37°C inkubiert und je 100 μ l vom Ansatz zu den Zeiten 0, 4 und 20 Stunden entnommen.

Reaktionsansatz mit 500 μ mol/l oder 1 mmol/l pNCS:

198 μ l Na-acetatpuffer pH 5 10 mmol/l, NaCl 8 mmol/l

+ 2 μ l MgCl₂ 500 mmol/l

+ 75 μ l Leukozytenextrakt (aus $16,40 \times 10^6$ Leukozyten)

+ 0,7 oder + 1,4 μ l pNCS 200 mmol/l

Der pH im Reaktionsansatz mit 500 μ mol/l pNCS wurde vor Inkubationsbeginn mit pH-Indikatorstäbchen gemessen (pH ca. 5,5). Zu den Zeitpunkten 0 und 24 Stunden wurden je 100 μ l entnommen.

2.2.6.2.8 Abbau einer Mischung von pNCS und Galactose-6-sulfat durch Leukozytenextrakte

Ansatz für Leukozytenextrakt-Lösung:

1 Teil Na-acetatpuffer pH 5 10 mmol/l, NaCl 8 mmol/l

1 Teil Aqua bidest

→ pH messen: pH sollte zwischen 4,5 und 5 sein; bei pH >5 Pipettenspitze mit HCl 1 mol/l benetzen und danach in Ansatz (pH mit pH-Meter: 4,83)

Anschliessend wurde das Zell-Pellet mit isolierten Leukozytenextrakten (aus ca. 269 Mio. Leukozyten) in 300 μ l des Ansatzes für Leukozytenextrakt-Lösung resuspendiert, mit dem Vortex gut gemischt und mit dem Ultraschallgerät

behandelt. Das so vorbereitete Pellet wurde auf Eis gestellt und in drei Portionen aufgeteilt. Eine Portion wurde fünf Minuten bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand für den Ansatz verwendet.

Reaktionsansatz mit je 2 mmol/l pNCS und Galactose-6-sulfat:

148,5 µl Na-acetatpuffer pH 5 10 mmol/l, NaCl 8 mmol/l
+ 1,5 µl MgCl₂ 500 mmol/l
+ 2 µl pNCS 200 mmol/l
+ 2 µl Galactose-6-sulfat 200 mmol/l
+ 50 µl Überstand (aus $44,9 \times 10^6$ Leukozyten)

Der Ansatz wurde bei 37°C inkubiert und zum Zeitpunkt 0 100 µl entnommen. Der übrige Ansatz (ca. 65 µl) wurde nach 20 Stunden ebenfalls eingefroren.

2.2.6.2.9 Gemeinsame Inkubation von Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat mit Leukozyten- oder Granulozyten-Extrakten

Bearbeitung der Granulozyten:

1. Zugabe von 2,5 ml Aqua bidest zum Pellet mit $102,16 \times 10^8$ Granulozyten (s. Kap. 2.2.3)
2. Zweimal je 5 Sekunden mit Ultraschallgerät behandeln
3. Zugabe von 1,5 ml Puffer pH 5 mit Na-acetat 10 mmol/l, NaCl 8 mmol/l, MgCl₂ 5 mmol/l (s. Kap. 2.1.2.4)
4. Mit HCl 1 mol/l auf pH 5 einstellen, mit Puffer auf insgesamt 5 ml auffüllen
5. 1 Teil der Granulozytenextrakte für Versuch verwenden, Rest in 3 Portionen aufteilen und einfrieren bei -20°C

Material und Methoden

Bearbeitung der separierten Leukozyten:

1. Zugabe von 140 µl Aqua bidest zum Pellet mit $289,74 \times 10^6$ Leukozyten (s. Kap. 2.2.2)
2. Zweimal je 5 Sekunden mit Ultraschall behandeln
3. Zugabe von 100 µl Puffer pH 5 mit Na-acetat 10 mmol/l, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l (s. Kap. 2.1.2.4)
4. Mit HCl 1 mol/l auf pH 5 einstellen, mit Puffer auf insgesamt 420 µl auffüllen
5. 1 Teil der Leukozytenextrakte für Versuch verwenden, Rest in 1 Portion einfrieren bei $-20^\circ C$

Je 117 µl der so bearbeiteten Pellets wurden für den Versuch verwendet.

Ansätze mit je 2 mmol/l Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat:

350 µl Puffer pH 5 mit Na-acetat 10 mmol/l, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l
+ 117 µl Granulozyten- oder Leukozyten-Extrakt
+ 5 µl Ascorbylsulfat 200 mmol/l
+ 5 µl Galactose-6-sulfat 200 mmol/l

Vor Entnahme der Proben wurden die Ansätze mit dem Vortex gut gemischt. Zu den Zeiten 0, 90 und 180 Minuten wurden je 100 µl entnommen. Vor der Messung wurden alle Proben ultrazentrifugiert (s. Kap. 2.2.6.2).

Der pH zum Zeitpunkt 0 betrug in beiden Ansätzen ca. 5 (pH-Papier).

3 Ergebnisse

Einführung

Aufgabe dieser Doktorarbeit war es, die Aktivitäten der Arylsulfatase A (ASA) aus Leukozytenextrakten und der rekombinanten humanen ASA (rhASA) zu messen und miteinander zu vergleichen.

Zur Messung der ASA aus Leukozytenextrakten sind zwei Bezugssysteme möglich, nämlich:

- a) Umsatz bezogen auf die Leukozytenzahl
- b) Umsatz bezogen auf die Proteinmenge

Als Standardsubstrat diente dabei pNCS.

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Messungen drei Methoden verwendet:

- a) Photometrie (pNCS)
- b) Dünnschichtchromatographie (Sulfatid)
- c) Isotachophorese (pNCS, Ascorbilsulfat, Galactose-6-sulfat, Ascorbylphosphat)

Die Abbildungen 16-19 zeigen die biochemischen Reaktionen, die dabei stattfinden.

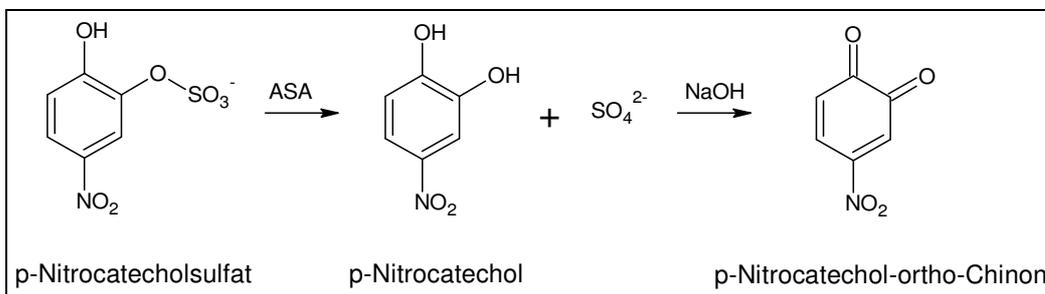


Abbildung 16: Umsatz von p-Nitrocatecholsulfat (pNCS) zu p-Nitrocatechol durch (rh)ASA oder Leukozytenextrakt und durch NaOH zu p-Nitrocatechol-ortho-Chinon. Im Gegensatz zu p-Nitrocatechol-ortho-Chinon, das photometrisch bei 514 nm messbar ist, kann pNCS nicht mittels Photometrie bei dieser Wellenlänge bestimmt werden. Es ist jedoch in der Isotachophorese nachweisbar.

Ergebnisse

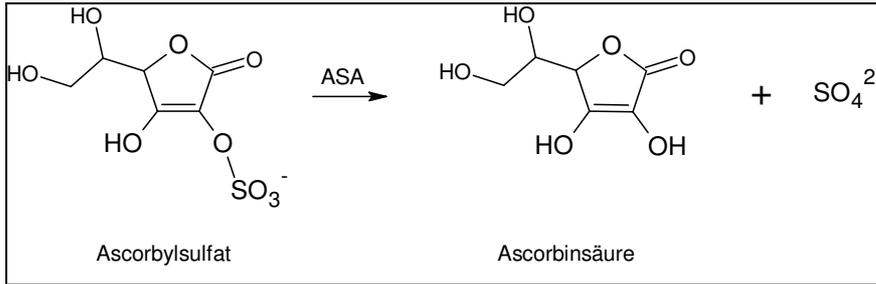


Abbildung 17: Umsatz von Ascorbylsulfat zu Ascorbinsäure und Sulfat. Sowohl Ascorbylsulfat als auch Ascorbinsäure und Sulfat können in der Isotachophorese im Leitfähigkeits- und UV-Detektor (254 nm) nachgewiesen werden.

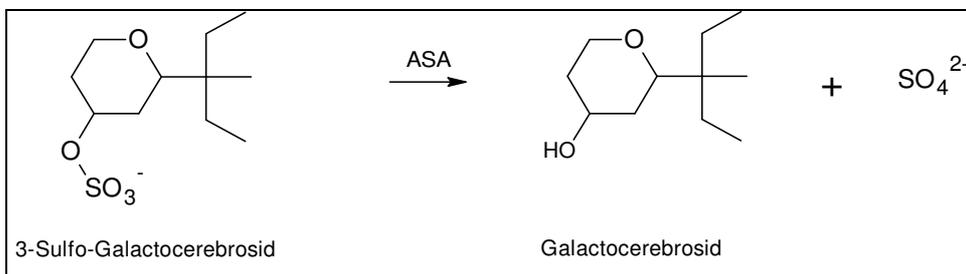


Abbildung 18: Sulfatabspaltung aus 3-Sulfogalactocerebroside (Sulfatid) durch (rh)ASA. Diese Reaktion wird bei den Untersuchungen mittels Dünnschichtchromatographie sichtbar gemacht (genaue Sulfatid-Formel: s. Abb. 3).

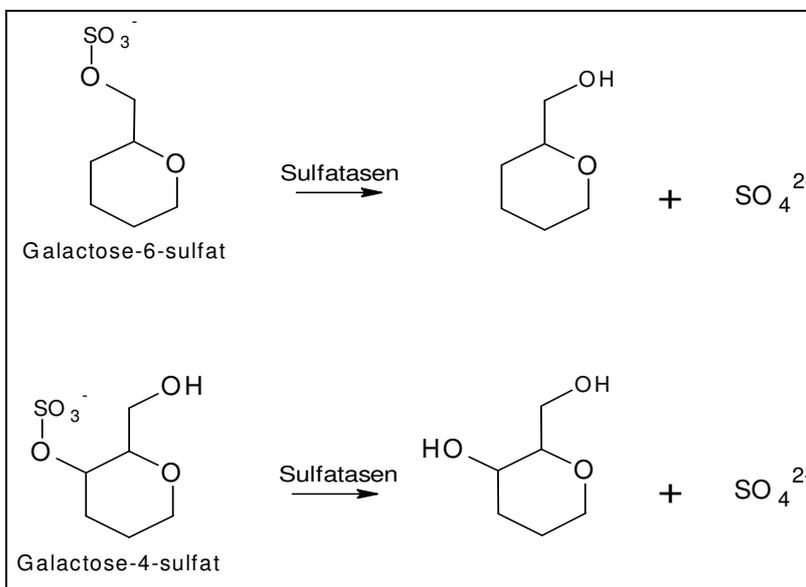


Abbildung 19: Sulfatabspaltung aus Galactose-6-sulfat und Galactose-4-sulfat durch Sulfatasen in Leukozyten. Als Substrat für die Messung an der ITP wurde Galactose-6-sulfat verwendet (genaue Galactose-Formel: s. Abb. 2).

3.1 Charakterisierung der Bezugssysteme

3.1.1 Vergleich der Siemens ADVIA 120-Blutbilder im Vollblut und nach Dextransedimentation

Hintergrund

Eine Aufgabe dieser Arbeit war der Vergleich der Umsetzung verschiedener Substrate durch die rhASA sowie durch Leukozytenextrakte, die, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, mittels Dextransedimentation gewonnen wurden. Als Bezugssystem der Leukozytenextrakte diente die Gesamtleukozytenzahl der isolierten Leukozyten. Es ist daher von Interesse, das bei dieser Arbeit erhaltene Differentialblutbild des Siemens ADVIA 120 genauer zu beschreiben.

Der Siemens ADVIA 120 ist für die Analyse von Vollblut entwickelt worden, was bei der Interpretation der Mess-Ergebnisse nach Dextransedimentation berücksichtigt werden muss. Wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, wird im Peroxidasekanal des ADVIA 120 die steigende Peroxidaseaktivität (X-Achse) gegen die steigende Streulichtintensität (Y-Achse), die der Granulierung der Zellen entspricht und proportional zu der Zellgrösse ist, aufgetragen. Im Differentialblutbild von Vollblut zeigen sich Monozyten als grosse, schwach peroxidasepositive Zellen und Lymphozyten als kleine peroxidasenegative Zellen. Neutrophile Granulozyten lassen sich von diesen durch eine höhere Peroxidase- und Streulichtaktivität abgrenzen. Die Abbildungen 20a und 21a zeigen die Siemens ADVIA 120-Bilder des Peroxidase- und Basophilenkanals der Blutprobe, die für die Messungen der Zellextrakte verwendet wurde, vor (= Vollblut) und die Abbildungen 20b und 21b nach Dextransedimentation (= isolierte Leukozyten). Tabelle 8 zeigt die prozentuale Verteilung der Zellen des Blutbildes im Vollblut und nach Dextransedimentation.

Ergebnisse

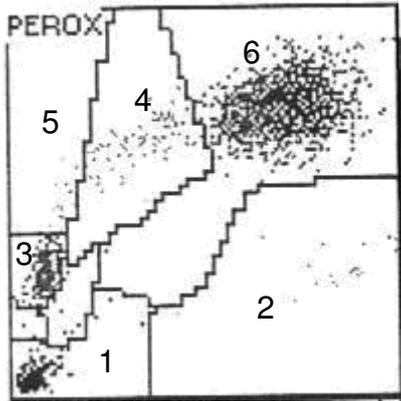


Abbildung 20a: ADVIA 120 Bild einer Vollblutprobe; Peroxidasekanal

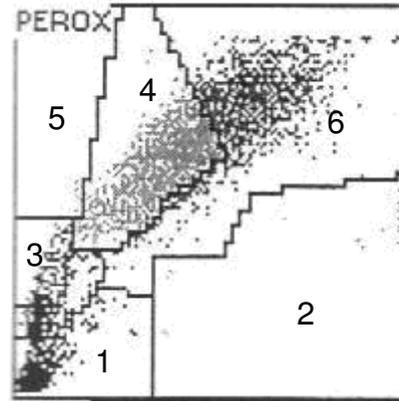


Abbildung 20b: ADVIA 120 Bild einer Blutprobe nach Dextran sedimentation; Peroxidasekanal; die Zellen haben durch den mechanischen Stress einen Teil der Myeloperoxidase in den Granula verloren, weshalb eine Verschiebung in den Monozytenbereich (4) stattfindet. Die numerischen Angaben im Ausdruck sind deshalb falsch.

1 = Rauschen (lysierte Erythrozyten, Thrombozyten); 2 = eosinophile Granulozyten (höchste Peroxidase-Aktivität); 3 = Lymphozyten und basophile Granulozyten (klein, peroxidase-negativ); 4 = Monozyten (gross, schwach peroxidasepositiv); 5 = LUC (gross, peroxidase-negativ, u.a. Blasten und Plasmazellen); 6 = neutrophile Granulozyten (peroxidasepositiv)

Ergebnisse

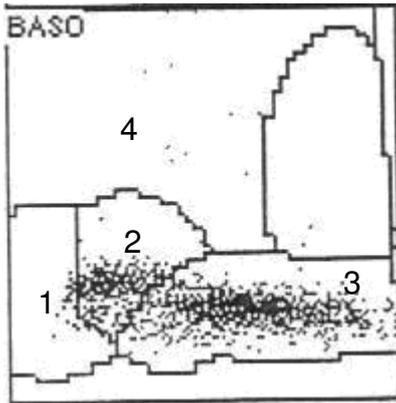


Abbildung 21a: ADVIA 120 Bild einer Vollblutprobe; Basophilenkanal

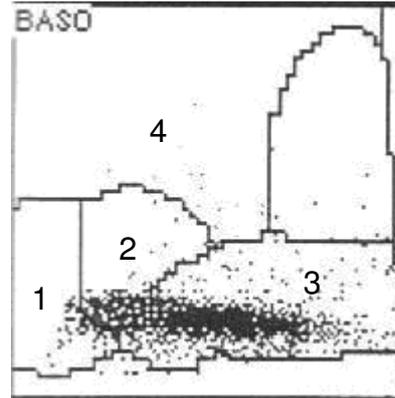


Abbildung 21b: ADVIA 120 Bild ei einer Blutprobe nach Dextran sedimentation; Basophilenkanal; Man sieht hier, dass ein Grossteil der Zellen Granulozyten (3) sind: da die Zellkerne der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten (3) sowie der Lymphozyten und Monozyten (2) gemessen werden, ist hier die Zuordnung der Zellen im Gegensatz zum Peroxidasekanal eindeutig.

1 = Blasten; 2 = Mononukleäre Blutzellen (MNBC); 3 = Polymorphkernige Blutzellen (PMBC); 4 = Basophile Granulozyten

Tabelle 8: Angaben des ADVIA 120 zur prozentualen Verteilung der Zellen des Blutbildes im Vollblut und nach Dextran sedimentation

	Vollblut (insgesamt 50 ml)	Nach Dextran sedimentation (insgesamt 11,4 ml)
Leukozyten insgesamt ($10^3/\mu\text{l}$)	8,95	19,46
Neutrophile Granulozyten (%)	73,7	42,7
Eosinophile Granulozyten (%)	0,7	0,5
Basophile Granulozyten (%)	0,4	0,3
Lymphozyten (%)	20,4	7,1
Monozyten (%)	3,8	49,2
Erythrozyten ($10^3/\mu\text{l}$)	4760	50
Thrombozyten ($10^3/\mu\text{l}$)	235	728

Ergebnisse

Ergebnis

Durch die Dextranedimentation erhielt man die gesamte Leukozytenpopulation, d.h. Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten, sowie eine Kontamination durch Erythrozyten. Weil auch nach der Dextranedimentation ca. 2,5x so viele Erythrozyten wie Leukozyten (50×10^3 Erythrozyten/ μl vs. $19,46 \times 10^3$ Leukozyten/ μl) in der Probe vorhanden sind (s. Tab. 8), sind als Bezugssystem bei der Messung die Proteine Hämoglobin (Hb) und Rinderserumalbumin (BSA) wichtig (s. Kap. 3.1.2 und 3.1.3).

Da die Granulozyten während der Aufarbeitung einen Teil ihrer Granulainhalte, darunter auch die Myeloperoxidase, in die Umgebung ausschütten, werden sie im Peroxidasekanal teilweise in das Monozytenfenster verschoben und lassen sich nicht mehr von der Monozytenwolke trennen. Der numerische Monozytenwert des Siemens ADVIA 120 ist dadurch fälschlicherweise erhöht und kann nicht als Bezugssystem verwendet werden. Im Basophilenkanal lässt sich jedoch nachweisen, dass es sich zum Grossteil um Granulozyten (Polymorphkernige Blutzellen) handelt. Eine genaue prozentuale Verteilungsermittlung der Zellen ist allerdings nur mikroskopisch möglich.

3.1.2 Eichkurve der Standardlösungen für die Proteinbestimmung

Dieser Versuch diente dazu, die Extinktion definierter Mengen von BSA und Hämoglobin zu vergleichen. Dazu wurden BSA- und Hämoglobin-Standardlösungen hergestellt (s. Kap. 2.1.2.2.1), die als Ausgangslösung zur Herstellung der Verdünnungslösungen für die Eichkurve verwendet wurden. Dabei zeigte sich, dass Hb bei gleicher Proteinmenge eine höhere Extinktion als BSA aufweist (s. Abb. 22).

Ergebnisse

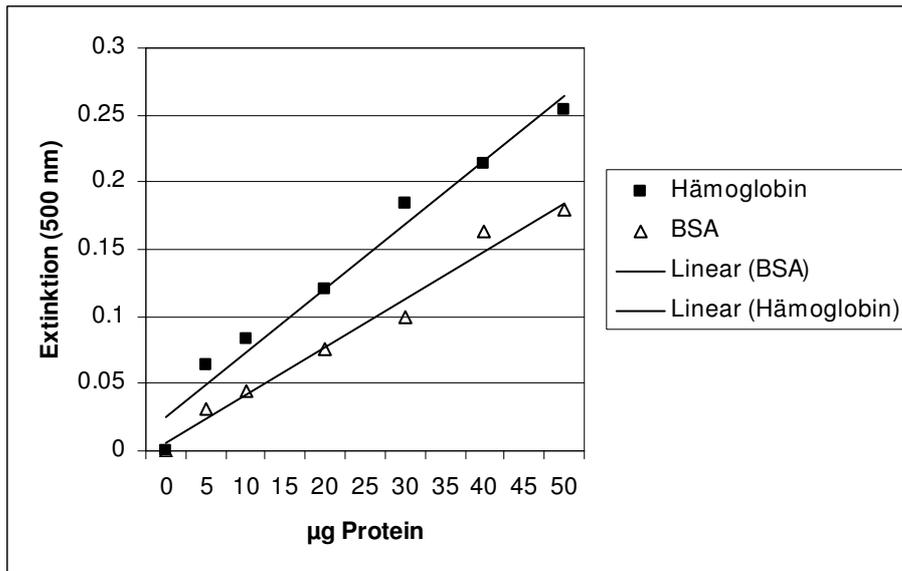


Abbildung 22: Proteinkurven unter Verwendung von BSA und Hämoglobin als Standard

3.1.3 Proteinbestimmung der isolierten Leukozyten nach Dextranedimentation

Für diesen Versuch wurden die Leukozyten wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben isoliert und mit dem ADVIA 120 die Zellzahl bestimmt (s. Kap. 2.2.1).

Da nach der Leukozytenisolierung mittels Dextranedimentation eine gewisse Kontamination mit Erythrozyten in den Proben vorhanden war (s. Kap. 3.1.1, Tab. 8), wurden sowohl Rinderserumalbumin als auch Hämoglobin, das in den Erythrozyten vorhanden ist, als Bezugsprotein bei der Erstellung der Proteinkurve verwendet. Zur Proteinmessung wurden die Leukozytenextrakte aufgetaut und je 0,8 ml Aqua bidest zugegeben, gut homogenisiert, anschliessend gemessen (s. Kap. 2.2.4.5) und die Extinktion in Bezug zur BSA- bzw. Hämoglobin-Konzentration gesetzt. Tabelle 9 zeigt das Ergebnis.

Ergebnisse

Tabelle 9: Proteingehalt von Leukozytenextrakten unter Verwendung von BSA und Hämoglobin (Hb) als Bezugsprotein

	Probe
Leukozyten/ml	$19,5 \times 10^6$
Erythrozyten/ml	50×10^6
BSA ($\mu\text{g}/20\mu\text{l}$)	32,5
BSA ($\mu\text{g}/10^6$ Leukozyten)	83,6
Hb ($\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$)	28,2
Hb ($\mu\text{g}/10^6$ Leukozyten)	72,4

Ergebnis

Die Proben mit einer definierten Menge an Hämoglobin zeigen bei gleicher Proteinmenge eine etwas höhere Extinktion an als die Proben mit einer vorgegebenen Menge an BSA. Unabhängig vom Bezugsprotein (Hb oder BSA) errechnet sich jedoch fast die gleiche Menge an Proteinen in den Proben (s. Tab. 9).

3.2 Charakterisierung der ASA aus Extrakten von isolierten Leukozyten im Vergleich zur rhASA mittels Photometrie

3.2.1 Eichkurve für das Reaktionsprodukt p-Nitrocatechol

Der Umsatz von p-Nitrocatecholsulfat (pNCS) zu p-Nitrocatechol wird mit Hilfe der Messung der Extinktion bei 514 nm bestimmt. Dazu wird das gebildete p-Nitrocatechol durch Zugabe von NaOH zuvor in p-Nitrocatechol-Chinon überführt, das dann bei 514 nm gemessen wird. Als Ausgangslösung für die Verdünnungsreihe diente die Produktlösung p-Nitrocatechol (s. Kap. 2.1.2.2), die jeweils mit Na-acetatpuffer 0,5 mol/l weiter verdünnt und zur Erstellung einer Eichkurve (s. Abb. 23) zuvor mit NaOH behandelt wurde. Die Verdünnungslösungen der Leerwerte wurden ebenso hergestellt, wobei anstatt der Produktlösung Substratlösung (s. Kap. 2.1.2.2) verwendet wurde.

Ergebnisse

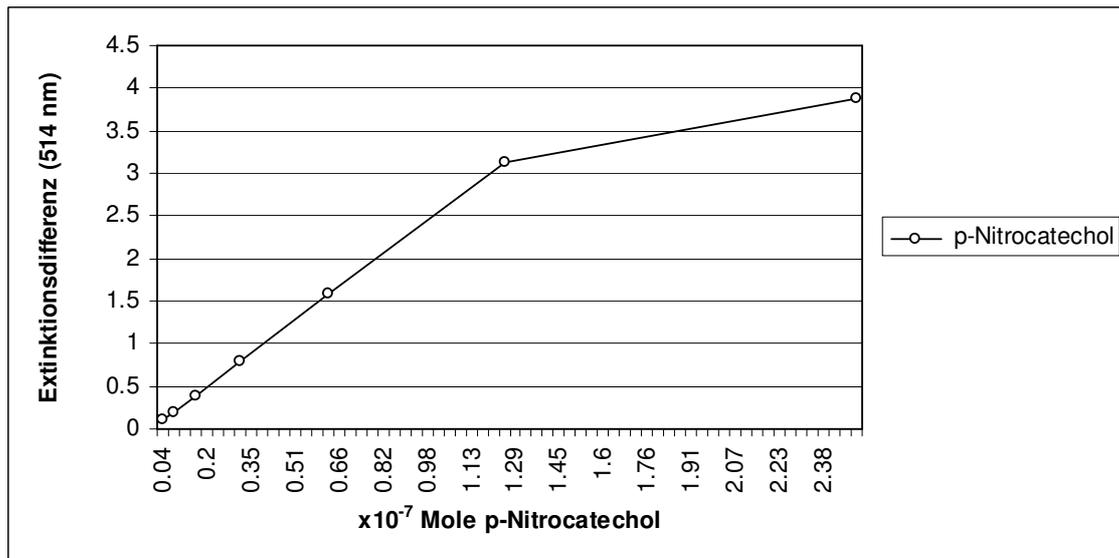


Abbildung 23: Eichkurve für p-Nitrocatechol nach Überführung zu p-Nitrocatechol-ortho-Chinon mit NaOH

Ergebnis

Die Menge an p-Nitrocatechol-ortho-Chinon verläuft bis zu einer Extinktionsdifferenz von etwa 3, was ca. $1,2 \times 10^{-7}$ Molen p-Nitrocatechol entspricht, linear und ist direkt am Diagramm ablesbar (s. Abb. 23).

3.2.2 Zeitabhängiger Abbau von pNCS durch Leukozytenextrakte bei 4°C und 37°C und verschieden langen Inkubationszeiten

Bei diesen Versuchen wurde die ASA-Aktivität in isolierten Leukozytenextrakten bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen bestimmt und verglichen.

Dazu wurden die Leukozyten mittels Dextranedimentation isoliert (s. Kap. 2.2.2) und die Enzymextrakte bei 37°C im Wasserbad oder 4°C im Kühlschrank inkubiert und die ASA-Aktivität gemessen (s. Kap. 2.2.4.3).

Erwartungsgemäss stieg der Umsatz mit zunehmender Inkubationszeit an (s. Abb. 24).

Ergebnisse

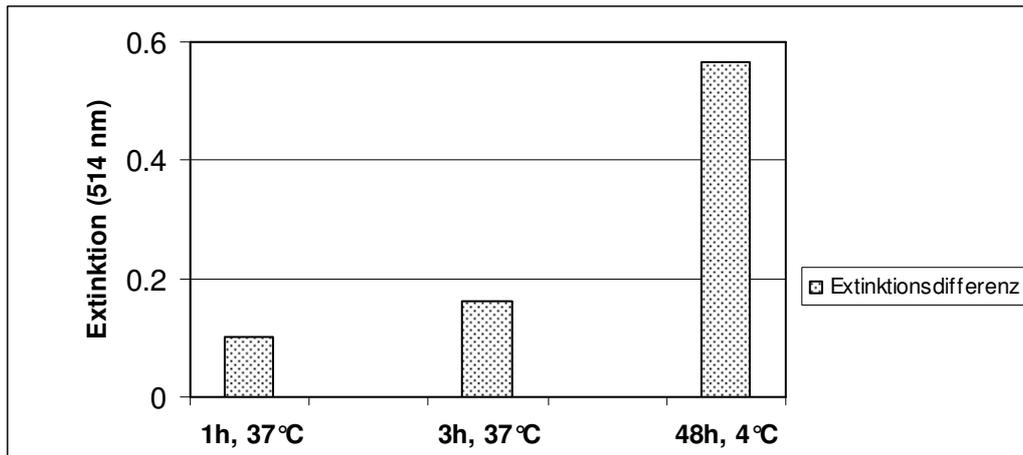


Abbildung 24: Abbau von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (8 mmol/l) durch ASA (Extrakt aus 49×10^4 Leukozyten/250 μ l Testansatz) bei verschiedenen Temperaturen und mit verschieden langen Inkubationszeiten

3.2.3 Umrechnung der Extinktionsdifferenz in Mole Umsatz von pNCS/Zeit/Zellzahl

Zur Berechnung des Umsatzes von pNCS durch Leukozytenextrakte dienen die Eichkurve für das Reaktionsprodukt p-Nitrocatechol (s. Kap. 3.2.1, Abb. 23) sowie der vorherige Versuch (zeitabhängiger Abbau von pNCS durch Leukozytenextrakte bei 4°C und 37°C, Kap. 3.2.2). Dabei wurde, ausgehend von der Eichkurve, mit Hilfe der Extinktionsdifferenz bei 1- und 3-stündiger Inkubation mit ASA bei 37°C sowie bei 48-stündiger Inkubation mit ASA bei 4°C der Umsatz von pNCS bzw. die Bildung von p-Nitrocatechol-ortho-Chinon berechnet. Tabelle 10 zeigt das Ergebnis.

Tabelle 10: Umsatz von pNCS/Zeit/Zellzahl

Zeit, Temperatur	Extinktionsdifferenz	Umsatz ($\times 10^{-7}$ Mole)	% Umsatz	Anzahl Leukozyten
1h, 37°C	0,1026	0,0413	0,21	49×10^4
3h, 37°C	0,1619	0,0652	0,33	49×10^4
48h, 4°C	0,5657	0,2267	1,13	49×10^4

Ergebnis

Nach 1-stündiger Inkubation bei 37°C sind 4,13 nMole pNCS umgesetzt worden, in den folgenden 2 Stunden weitere 2,39 nMole (s. Tab. 10), was einem Umsatz von insgesamt 0,33% der im Testansatz vorhandenen Menge an pNCS entspricht. Der Umsatz von pNCS nimmt demnach bei 37°C mit zunehmender Inkubationszeit ab. Nach 48-stündiger Inkubation bei 4°C wurden insgesamt 22,67 nMole pNCS (1,13% der Ausgangsmenge an pNCS) umgesetzt.

3.2.4 Abbau von pNCS durch rhASA

Ziel dieses Versuches war es, die Wirksamkeit der rhASA zu bestimmen. Die Versuche wurden wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass statt 50 µl Aqua bidest nur 40 µl Aqua bidest zugefügt wurden. Es wurden die Extinktionen bzw. der Umsatz von pNCS bei Zugabe von 10 µl verschiedener Enzymkonzentrationen (rhASA 1,48 U/ml; 0,296 U/ml; 0,148 U/ml; 5,92 U/ml; 2,96 U/ml, s. Abb. 25a und 25b, Tab. 11a-c) bestimmt. Um einen optimal messbaren Extinktionsbereich, der im linearen Bereich der Eichkurve (s. Kap. 3.2.1, Abb. 23) liegt, zu ermitteln, wurden die Ansätze dieser Enzymkonzentrationen nach der Inkubation jeweils weiter verdünnt (1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 verdünnt) und gemessen, wobei jeweils zwei unverdünnte Ansätze inkubiert wurden, von denen einer unverdünnt gemessen, der andere zur Herstellung und Messung der weiteren Verdünnungen verwendet wurde. Dabei wurden die Ansätze zuerst mit der Verdünnungslösung (s. Kap. 2.1.2.2) verdünnt und erst danach 250 µl Natronlauge zu je 250 µl verdünntem Ansatz zugegeben.

Die Berechnung des Umsatzes erfolgte mit Hilfe der Eichkurve (s. Kap. 3.2.1, Abb. 23) und unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 25a und 25b sowie in den Tabellen 11a, 11b und 11c gezeigt.

Ergebnisse

Ergebnisse

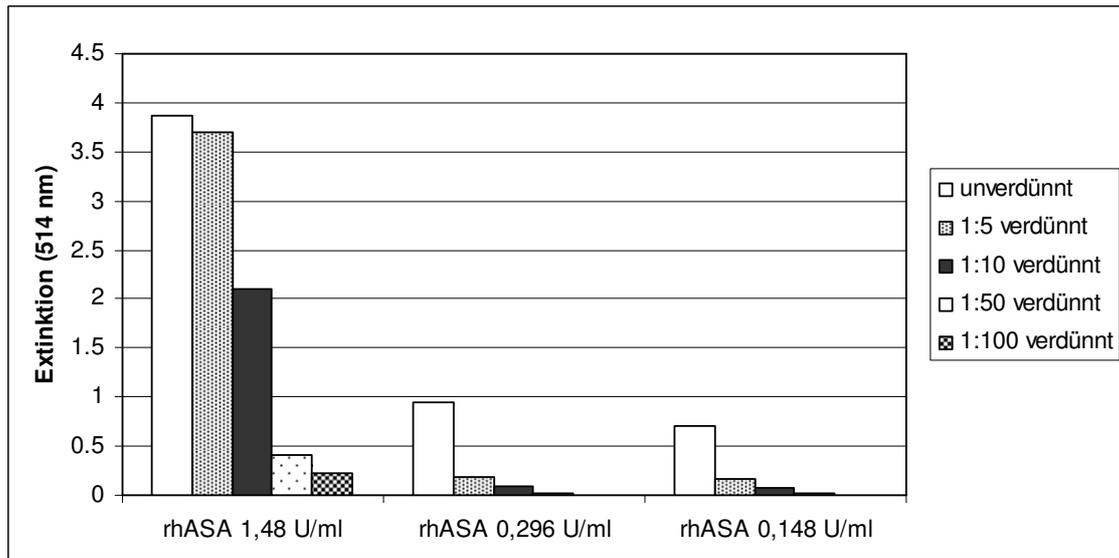


Abbildung 25a: Umsatz von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (8 mmol/l) bei verschiedenen rhASA-Konzentrationen (10 μ l rhASA/250 μ l Testansatz) nach 1-stündiger Inkubation bei 37°C; Messung der unverdünnten Probe sowie nach weiterer Verdünnung (1:5, 1:10, 1:50, 1:100 verdünnt) der Probe zur Ermittlung des optimal messbaren Extinktionsbereiches

Tabelle 11a: Berechnung des Umsatzes von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (8 mmol/l) bei verschiedenen rhASA-Konzentrationen (10 μ l rhASA/250 μ l Testansatz) nach 1-stündiger Inkubation bei 37°C

	rhASA 1,48 U/ml		rhASA 0,296 U/ml		rhASA 0,148 U/ml	
Verdünnung	% Umsatz	Umsatz ($\times 10^{-7}$ Mole)	% Umsatz	Umsatz ($\times 10^{-7}$ Mole)	% Umsatz	Umsatz ($\times 10^{-7}$ Mole)
unverdünnt			1,87	0,37	1,40	0,28
1:5			1,80	0,36	1,57	0,32
1:10	41,80	8,36	1,71	0,34	1,52	0,30
1:50	41,75	8,35	1,74	0,35	1,57	0,31
1:100	43,70	8,74	1,67	0,33	0,04	0,01

Wie erwartet zeigte die grösste rhASA-Konzentration (1,48 U/ml) mit 42,42% Umsatz ($8,48 \times 10^{-7}$ Mole) den höchsten Abbau von pNCS (s. Abb. 25a, Tab. 11a), wobei die Extinktionen der unverdünnten und 1:5 verdünnten Proben nicht mehr im linearen Bereich lagen und deshalb nicht für die Umsatzberechnung verwendet werden konnten. Mit der rhASA 0,296 U/ml wurde ein Umsatz von

Ergebnisse

1,76% ($0,35 \times 10^{-7}$ Mole), mit der rhASA 0,148 U/ml ein noch geringerer Umsatz von ca. 1,22% ($0,24 \times 10^{-7}$ Mole) erreicht.

Abbildung 25b und die Tabellen 11b und 11c zeigen den Umsatz von pNCS durch höhere rhASA-Konzentrationen (5,92 U/ml; 2,96 U/ml) nach 1- und 2-stündiger Inkubation bei 37°C.

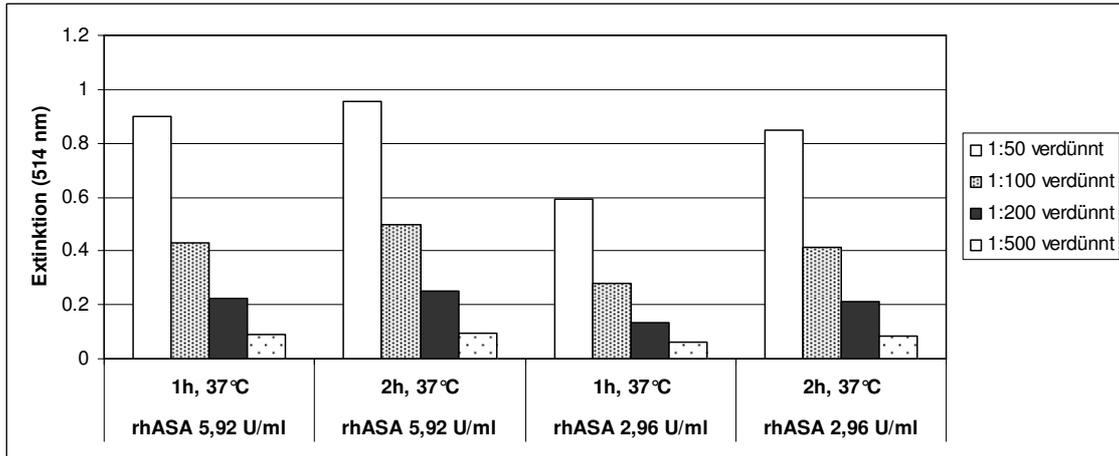


Abbildung 25b: Umsatz von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (8 mmol/l) bei verschiedenen rhASA-Konzentrationen (10 µl rhASA/250 µl Testansatz) nach 1- und 2-stündiger Inkubation bei 37°C; Messung der Proben nach weiterer Verdünnung (1:50, 1:100, 1:200, 1:500 verdünnt)

Tabelle 11b: Berechnung des Umsatzes von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (8 mmol/l) durch rhASA 5,92 U/ml (10 µl rhASA/250 µl Testansatz) nach 1- und 2-stündiger Inkubation bei 37°C

rhASA 5,92 U/ml				
Inkubation	1h, 37°C		2h, 37°C	
Verdünnung	% Umsatz	Umsatz ($\times 10^{-7}$ Mole)	% Umsatz	Umsatz ($\times 10^{-7}$ Mole)
1:50	88,80	17,76	94,25	18,85
1:100	85,05	17,01	97,55	19,51
1:200	87,50	17,50	99,91	19,98
1:500	88,38	17,68	95,77	19,15

Ergebnisse

Tabelle 11c: Berechnung des Umsatzes von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (8 mmol/l) durch rhASA 2,96 U/ml (10 μ l rhASA/250 μ l Testansatz) nach 1- und 2-stündiger Inkubation bei 37°C

rhASA 2,96 U/ml				
Inkubation	1h, 37°C		2h, 37°C	
Verdünnung	% Umsatz	Umsatz ($\times 10^{-7}$ Mole)	% Umsatz	Umsatz ($\times 10^{-7}$ Mole)
1:50	58,11	11,62	83,81	16,76
1:100	55,18	11,04	81,37	16,27
1:200	51,99	10,40	84,30	16,86
1:500	58,72	11,75	85,03	17,01

Mit der rhASA 5,92 U/ml wurde bei 37°C ein grösserer Umsatz von pNCS 8 mmol/l, nämlich 87,43% ($17,49 \times 10^{-7}$ Mole) nach 1 Stunde Inkubation und 96,87% ($19,37 \times 10^{-7}$ Mole) nach 2 Stunden Inkubation, erreicht als mit rhASA 2,96 U/ml, wo der Umsatz nach 1 Stunde mit $11,20 \times 10^{-7}$ Molen 56,00% und nach 2 Stunden 83,63% ($16,73 \times 10^{-7}$ Mole) betrug (s. Abb. 25b, Tab. 11b und 11c). Bei längerer Inkubation stieg die Extinktion und damit der Umsatz von pNCS, wobei mit der rhASA 2,96 U/ml der Umsatz von pNCS auch nach 2 Stunden nur knapp den Umsatz der rhASA 5,92 U/ml nach 1 Stunde erreichte, d.h. mit der doppelt so grossen Konzentration von rhASA wurde bereits nach ca. 1 Stunde soviel umgesetzt wie mit der geringeren Konzentration nach 2 Stunden.

Im Vergleich zum Untersuch mit rhASA 0,296 U/ml, wo nach 1 Stunde 1,76% ($0,35 \times 10^{-7}$ Mole) der Ausgangsmenge an pNCS umgesetzt wurden, zeigte sich im Ansatz mit rhASA 2,96 U/ml mit einem Abbau von $11,20 \times 10^{-7}$ Molen pNCS (56,00%) ein ca. 32x höherer Umsatz in derselben Zeit.

3.3 Einfluss der rhASA-Enzymkonzentration auf den Umsatz von pNCS unter verschiedenen Inkubationsbedingungen: Optimierung der Testbedingungen

Hintergrund

Bisher wurde der Umsatz von pNCS bei Inkubation in einem gleich bleibenden Medium, nämlich in Puffer \pm Aqua bidest, untersucht. Bei den folgenden Untersuchungen ging es darum, den Umsatz von pNCS durch rhASA unter

Ergebnisse

Zugabe verschiedener Medien (Aqua bidest, Enzymextrakt aus Leukozyten, humanes Serumalbumin, 50%iges Serum, 50%iges Heparinplasma) sowie unterschiedlicher rhASA-Konzentrationen zu untersuchen und zu optimieren, wobei die Aktivität der zugrunde liegenden rhASA-Lösung 148 U/ml betrug. Die Versuche wurden wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben durchgeführt.

Eine Extinktion von 1,0 entspricht dabei jeweils einem Umsatz von $0,39 \times 10^{-7}$ Molen pNCS (s. Kap. 3.2.1, Abb. 23).

3.3.1 Inkubation bei 4 °C für 48 Stunden unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

Bei den folgenden Untersuchungen wurden die Reaktionsansätze mit verschiedenen rhASA-Konzentrationen und Zugabe folgender Inkubationszusätze gemischt:

- a) 50 µl Aqua bidest + 10 µl rhASA
- b) 50 µl Enzymextrakt aus Leukozyten + 10 µl rhASA
- c) 50 µl humanes Serumalbumin + 10 µl rhASA

3.3.1.1 Umsatz von pNCS durch rhASA unter Zugabe von Aqua bidest

Beim folgenden Versuch wurde der Umsatz von pNCS durch rhASA unter Zugabe von Aqua bidest untersucht. Es wurde zuerst eine Versuchsreihe mit zwischen 1:10 und 1:1000 verdünnter rhASA, danach eine Versuchsreihe mit Verdünnungen der rhASA zwischen 1:500 und 1:10000 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 26a-c gezeigt.

Ergebnisse

Ergebnisse

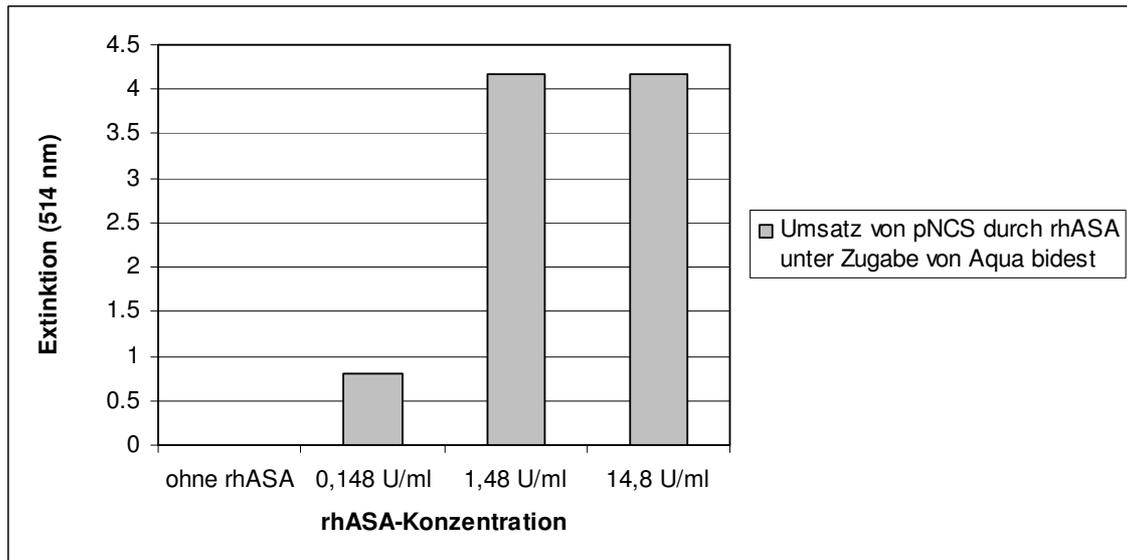


Abbildung 26a: Inkubation von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (7,7 mmol/l) mit verschiedenen rhASA-Konzentrationen (10 μ l rhASA/260 μ l Testansatz) unter **Zusatz von Aqua bidest** für 48 Stunden bei 4°C. Für rhASA 1,48 U/ml und rhASA 14,8 U/ml ist keine genaue Umsatz-Berechnung möglich, da die Extinktionen >3 und damit nicht mehr im linearen Bereich waren.

Mit der rhASA 0,148 U/ml wurde mit ca. $0,33 \times 10^{-7}$ Molen pNCS, was ca. 1,65% der Ausgangsmenge entspricht, nur ein geringer Umsatz von pNCS erreicht, ohne rhASA wurde wie erwartet kein pNCS umgesetzt (s. Abb. 26a). Die höheren rhASA-Konzentrationen (1,48 U/ml bzw. 14,8 U/ml) zeigten hier scheinbar denselben Umsatz an, wobei die Extinktionen >3 und damit im nicht-linearen Bereich lagen (s. Kap. 3.2.1, Abb. 23). Deshalb kann nur sicher angegeben werden, dass der Umsatz $\gg 1,2 \times 10^{-7}$ Mole (entspricht dem Umsatz bei einer Extinktion von 3, s. Abb. 23) betrug. Es kann jedoch keine genaue Aussage über den tatsächlichen Umsatz von pNCS gemacht werden.

Um den Abbau von pNCS durch rhASA unter denselben Bedingungen genauer zu bestimmen, wurden Ansätze mit niedrigeren rhASA-Konzentrationen (0,0148 U/ml bis 0,296 U/ml) durchgeführt. In den Abbildungen 26b und 26c sind die Ergebnisse ersichtlich.

Ergebnisse

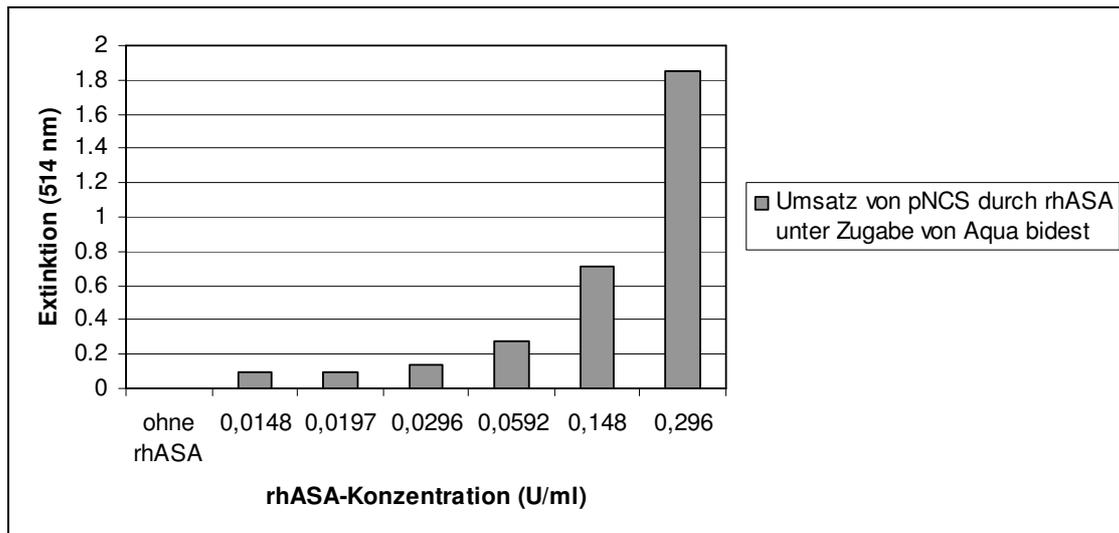


Abbildung 26b: Inkubation von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (7,7 mmol/l) mit verschiedenen rhASA-Konzentrationen (10 μ l rhASA/260 μ l Testansatz) unter **Zusatz von Aqua bidest** für 48 Stunden bei 4 °C

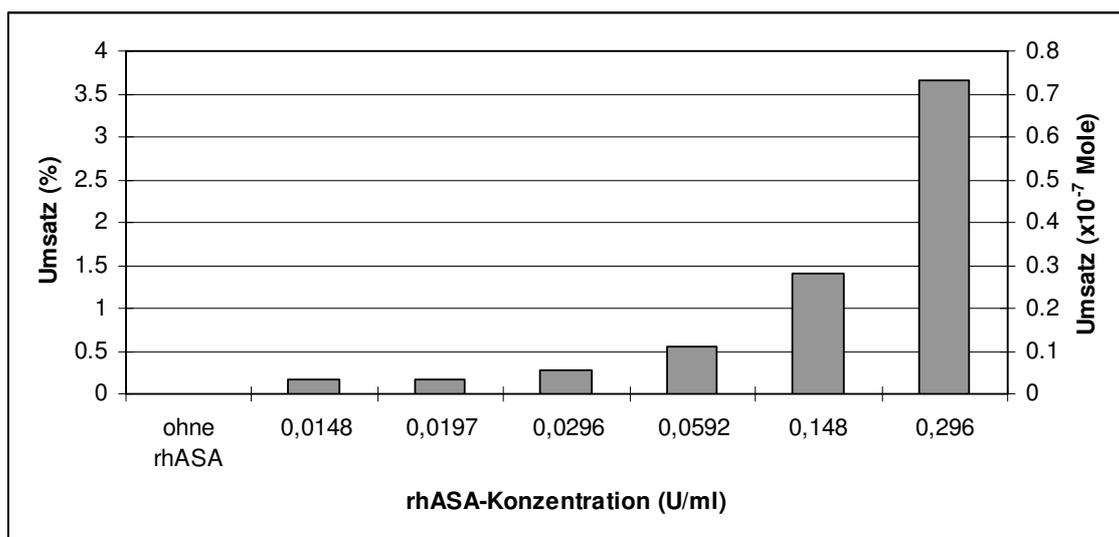


Abbildung 26c: Inkubation von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (7,7 mmol/l) mit verschiedenen rhASA-Konzentrationen (10 μ l rhASA/260 μ l Testansatz) unter **Zusatz von Aqua bidest** für 48 Stunden bei 4 °C

Der Umsatz stieg wie erwartet, je höher die Konzentration von rhASA war (s. Abb. 26c). Bei sehr geringen Konzentrationen von rhASA ($\leq 0,148$ U/ml) wurde fast nichts umgesetzt, wobei auch mit der höchsten bei diesem Versuch benutzten rhASA-Konzentration (0,296 U/ml) nur ein geringer Umsatz von 3,65% ($0,73 \times 10^{-7}$ Mole) erreicht wurde (s. Abb. 26b, 26c).

Ergebnisse

3.3.1.2 Umsatz von pNCS durch rhASA unter Zugabe von Enzymextrakt aus Leukozyten

In diesem Ansatz wurde rhASA zu einem Leukozytenextrakt gegeben, um festzustellen, ob durch die Gegenwart anderer Faktoren, z.B. von Aktivatorproteinen, die Aktivität des Enzyms (rhASA) in irgendeiner Form modifiziert wird. Wie bei den Versuchen unter Zugabe von Aqua bidest (s. Kap. 3.3.1.1) wurden wieder zwei Versuchsreihen mit rhASA-Konzentrationen von 0,148 U/ml bis 14,8 U/ml und 0,0148 U/ml bis 0,296 U/ml durchgeführt (s. Abb. 27a, 27b).

Ergebnisse

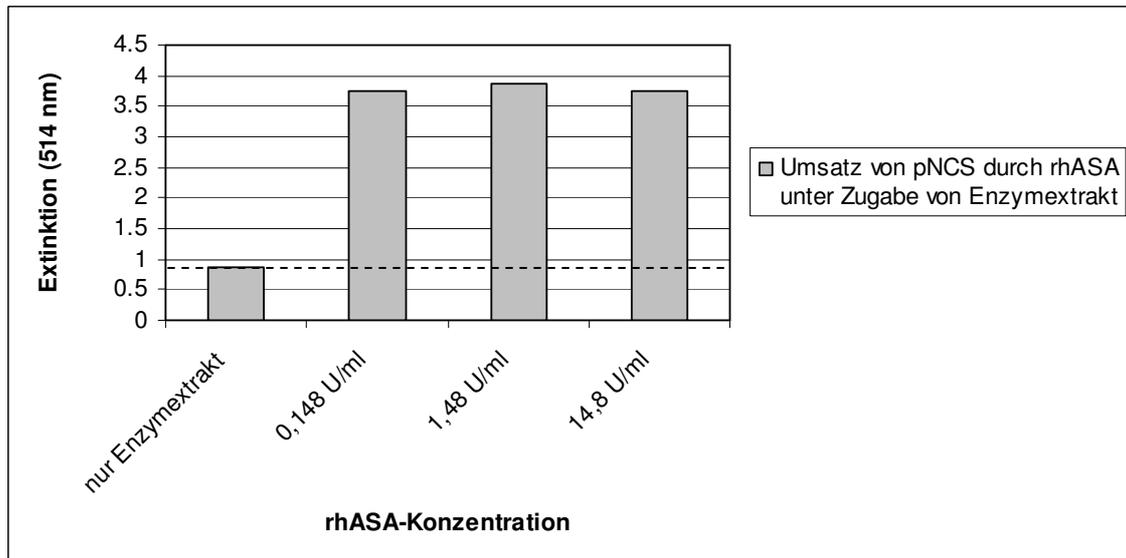


Abbildung 27a: Inkubation von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (7,7 mmol/l) mit verschiedenen rhASA-Konzentrationen (10 μ l rhASA/260 μ l Testansatz) unter **Zugabe von Enzymextrakt (Extrakt aus 5×10^6 Leukozyten)** für 48 Stunden bei 4°C

Bereits der Enzymextrakt alleine ohne Zugabe von rhASA zeigte einen Substratumsatz, nämlich ca. $0,34 \times 10^{-7}$ Mole, was einer Extinktion von 0,87 und einem Umsatz von ca. 1,70% entspricht (s. Abb. 27a). Unter Zugabe von rhASA bereits in der geringsten Konzentration lag die Extinktion im nicht-linearen Bereich (s. Kap. 3.2.1, Abb. 23), und der Umsatz von pNCS unter Zugabe von Enzymextrakt und verschiedenen rhASA-Konzentrationen konnte deshalb in diesem Versuch nicht verglichen werden.

Ergebnisse

Abbildung 27b zeigt die Ergebnisse der Versuchsreihe mit rhASA-Konzentrationen von 0,0148 U/ml bis 0,296 U/ml, wobei der Umsatz nur im linearen Bereich (Extinktion bis 3) berücksichtigt wurde.

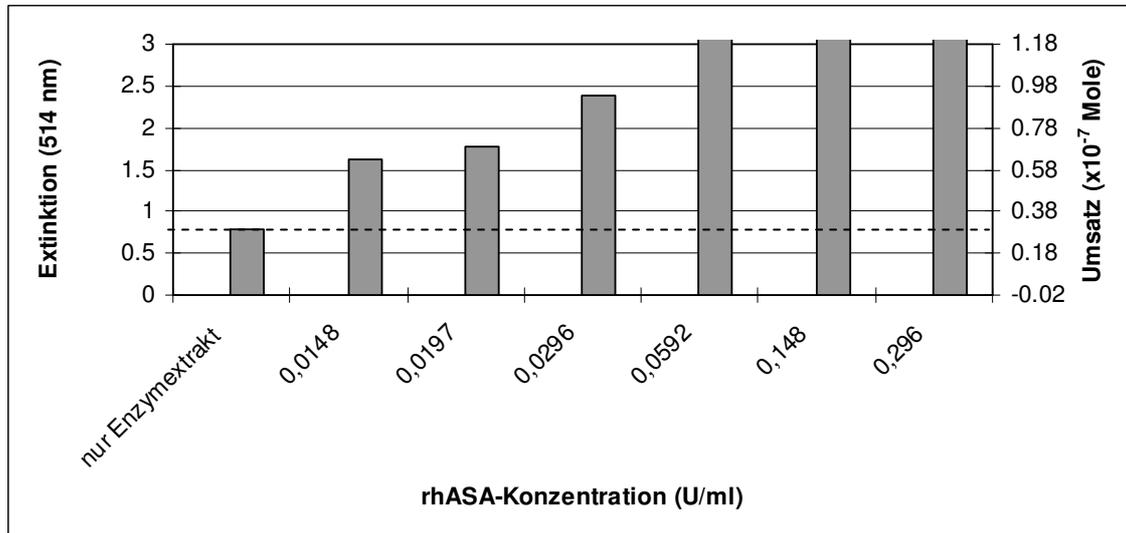


Abbildung 27b: Inkubation von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (7,7 mmol/l) mit verschiedenen rhASA-Konzentrationen (10 μ l rhASA/260 μ l Testansatz) unter **Zugabe von Enzymextrakt (Extrakt aus 5×10^6 Leukozyten)** für 48 Stunden bei 4°C; Extinktionsergebnisse bei 514 nm mit Berechnung des entsprechenden Umsatzes von pNCS, wobei nur Werte im linearen Bereich berücksichtigt wurden

Wie bei der vorherigen Versuchsreihe (s. Abb. 27a) wurden hier im Gegensatz zum Umsatz von pNCS durch rhASA unter Zugabe von Aqua bidest bereits ohne Zugabe von rhASA ca. $0,31 \times 10^{-7}$ Mole p-Nitrocatechol-ortho-Chinon gebildet (s. Abb. 27b), was daran liegt, dass durch den Enzymextrakt, der Sulfatasen (ASA und andere) enthält, bereits Substrat umgesetzt wird. Bei einer Konzentration der rhASA $\geq 0,0592$ U/ml war der Umsatz $\gg 1,20 \times 10^{-7}$ Mole (entspricht dem Umsatz bei einer Extinktion von 3, s. Kap. 3.2.1, Abb. 23). Im Vergleich zu den Ansätzen unter Zugabe von Aqua bidest (s. Kap. 3.3.1.1, Abb. 26a-c) kam es zu einer deutlichen Steigerung des Umsatzes der rhASA. Beim Ansatz mit rhASA 0,0296 U/ml wurde unter Zugabe von Leukozytenextrakt mit ca. 4,70%, was etwa $0,94 \times 10^{-7}$ Molen entspricht, rund 16x mehr pNCS umgesetzt als unter Zusatz von Aqua bidest, wo mit ca. $0,06 \times 10^{-7}$ Molen nur ca. 0,30% pNCS umgesetzt wurde.

Ergebnisse

3.3.1.3 Umsatz von pNCS durch rhASA unter Zugabe von humanem Serumalbumin

In diesem Ansatz wurde untersucht, inwiefern sich die Aktivität von rhASA unter Zugabe von humanem Serumalbumin im Vergleich zur Aktivität unter Zugabe von Enzymextrakt oder der Aktivität von rhASA unter Zusatz von Aqua bidest unterscheidet. Im Gegensatz zu den Untersuchungen unter Zugabe von Aqua bidest oder Enzymextrakt (s. Kap. 3.3.1.1, 3.3.1.2) wurde nur eine Versuchsreihe mit rhASA-Konzentrationen von 0,0148 U/ml bis 0,296 U/ml angesetzt (s. Abb. 28).

Ergebnis

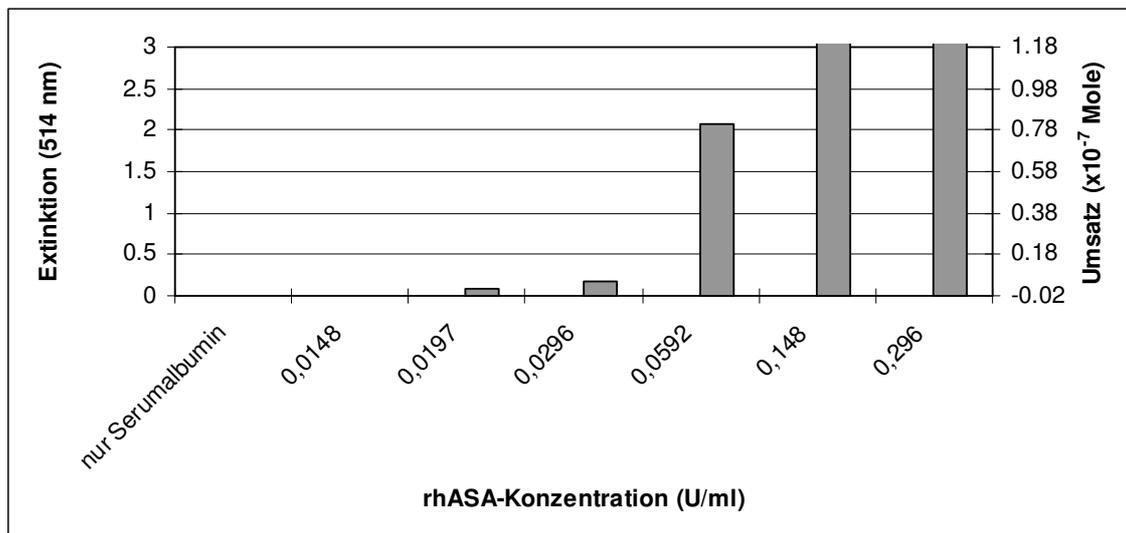


Abbildung 28: Inkubation von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (7,7 mmol/l) mit verschiedenen rhASA-Konzentrationen (10 μ l rhASA/260 μ l Testansatz) unter **Zugabe von humanem Serumalbumin** für 48 Stunden bei 4 °C; Extinktionsergebnisse bei 514 nm mit Berechnung des entsprechenden Umsatzes von pNCS, wobei nur Werte im linearen Bereich berücksichtigt wurden

Bei sehr geringen rhASA-Konzentrationen ($\leq 0,0296$ U/ml) wurde mit $0,07 \times 10^{-7}$ Molen (0,35%) praktisch dieselbe Menge an pNCS umgesetzt wie beim Ansatz von rhASA 0,0296 U/ml unter Zugabe von Aqua bidest ($0,06 \times 10^{-7}$ Mole; 0,30%). Allerdings stieg die Aktivität der rhASA bereits bei geringeren Konzentrationen an (humanes Serumalbumin: ab ca. 0,0296 U/ml) als unter Zugabe von Aqua bidest (ab ca. 0,0592 U/ml). Mit der rhASA 0,0592 U/ml wurde unter Zusatz von

Ergebnisse

humanem Serumalbumin mit ca. $0,82 \times 10^{-7}$ Molen (4,10%) rund 7,5x mehr pNCS umgesetzt als unter Zugabe von Aqua bidest, wo ca. $0,11 \times 10^{-7}$ Mole (0,55%) pNCS abgebaut wurden.

Zusammenfassung

Wie erwartet war der Umsatz von pNCS durch rhASA unter Zugabe von Enzymextrakt am grössten, da hier zusätzlich zur rhASA pNCS auch durch im Enzymextrakt vorhandene Sulfatasen (ASA und andere) abgebaut wird. Aber auch wenn diese Aktivität abgezogen wird, war der Umsatz grösser als bei den entsprechenden Ansätzen unter Zugabe von Aqua bidest oder humanem Serumalbumin.

Durch rhASA unter Zugabe von Aqua bidest wurde am wenigsten pNCS, durch den Enzymextrakt alleine (ohne rhASA) bereits mehr pNCS umgesetzt als mit der rhASA 0,148 U/ml unter Zusatz von Aqua bidest ($0,34 \times 10^{-7}$ Mole vs. $0,28 \times 10^{-7}$ Mole). Unter Zugabe von humanem Serumalbumin ohne rhASA fand kein Umsatz von pNCS statt, die Aktivität der rhASA war jedoch grösser als unter Zusatz von Aqua bidest.

3.3.2 Inkubation von pNCS mit rhASA bei 37°C für 0-240 Minuten im Serum und Plasma

Für die folgenden Untersuchungen wurde die rhASA ebenso wie bei den in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Ansätzen in verschiedenen Konzentrationen mit Aqua bidest verdünnt und die Enzym-Aktivität unter Zugabe folgender Medien untersucht:

- a) 50 µl 50%iges Serum + 10 µl rhASA
- b) 50 µl 50%iges Heparinplasma + 10 µl rhASA

Ergebnisse

3.3.2.1 Umsatz von pNCS durch rhASA unter Zugabe von 50%igem Serum bei 37°C

In diesem Ansatz (Ergebnisse s. Abb. 29a, 29b) wurde untersucht, ob der Umsatz von pNCS in Serum, das zusätzlich verschiedene Enzyme enthält, grösser ist als unter anderen Umgebungsbedingungen wie z.B. Heparinplasma.

Ergebnisse

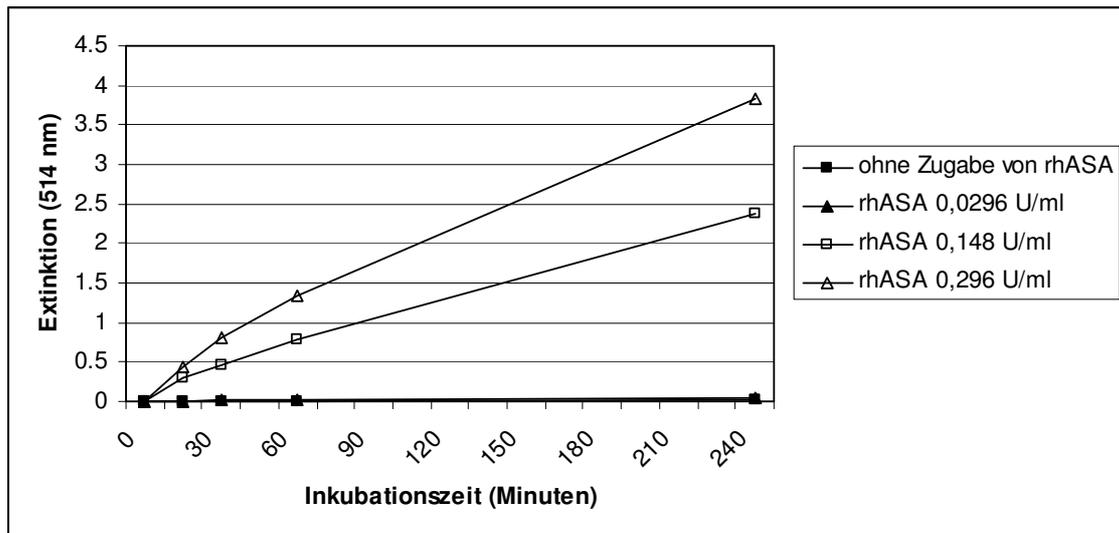


Abbildung 29a: Zeitabhängigkeit des Umsatzes von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (7,7 mmol/l) mit verschiedenen rhASA-Konzentrationen (10 μ l rhASA/260 μ l Testansatz) unter **Zugabe von 50%igem Serum** bei 37°C

Ergebnisse

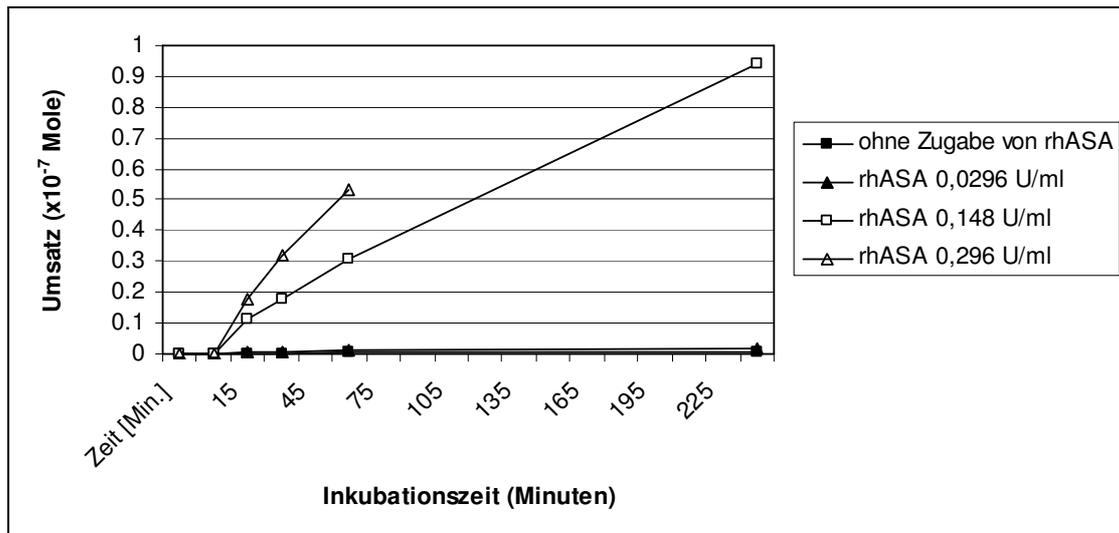


Abbildung 29b: Zeitabhängigkeit des Umsatzes von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (7,7 mmol/l) mit verschiedenen rhASA-Konzentrationen (10 μ l rhASA/260 μ l Testansatz) unter **Zugabe von 50%igem Serum** bei 37°C; Berechnung des Umsatzes von pNCS im linearen Bereich (s. Kap. 3.2.1, Abb. 23)

Wie in den Abbildungen 29a und 29b zu sehen ist, fand ohne Zugabe von rhASA und mit Zugabe von rhASA 0,0296 U/ml kein sichtbarer Umsatz statt. Erst ab einer Zugabe von rhASA in einer Konzentration $\geq 0,148$ U/ml wurde p-Nitrocatechol-ortho-Chinon im messbaren Bereich gebildet.

Der Umsatz von pNCS durch rhASA 0,296 U/ml nach 4 Stunden lag im nicht-linearen Bereich der Eichkurve von p-Nitrocatechol (s. Kap. 3.2.1, Abb. 23) und war $\gg 1,2 \times 10^{-7}$ Mole. Er konnte deshalb hier nicht genau berechnet werden.

3.3.2.2 Umsatz von pNCS durch rhASA unter Zugabe von 50%igem Heparinplasma bei 37°C

Heparin hat viele Sulfate gebunden. Beim folgenden Versuchsansatz wurde deshalb untersucht, ob diese gebundenen Sulfate die Aktivität der rhASA bzw. den Umsatz von pNCS beeinflussen (s. Abb. 30a, 30b).

Ergebnisse

Ergebnisse

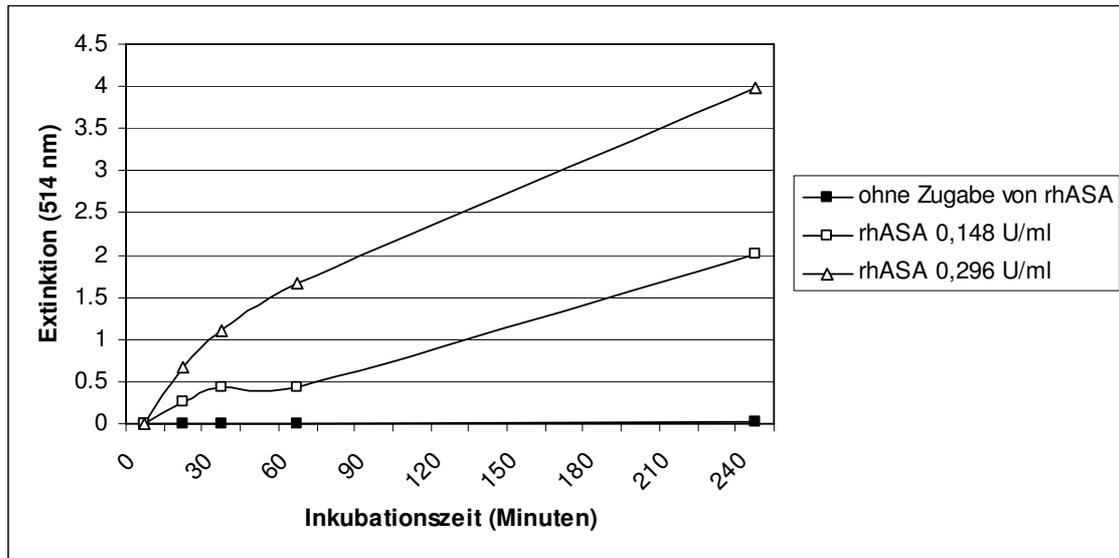


Abbildung 30a: Zeitabhängigkeit des Umsatzes von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (7,7 mmol/l) mit verschiedenen rhASA-Konzentrationen (10 μ l rhASA/260 μ l Testansatz) unter **Zugabe von 50%igem Heparinplasma** bei 37°

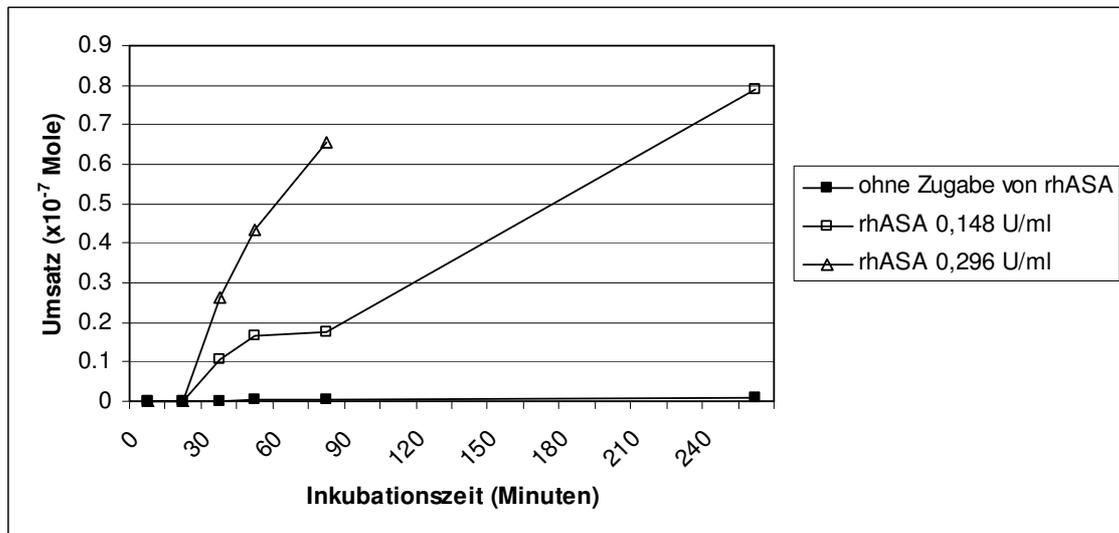


Abbildung 30b: Zeitabhängigkeit des Umsatzes von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (7,7 mmol/l) mit verschiedenen rhASA-Konzentrationen (10 μ l rhASA/260 μ l Testansatz) unter **Zugabe von 50%igem Heparinplasma** bei 37°C; Berechnung des Umsatzes von pNCS im linearen Bereich (s. Abb. 23, Kap. 3.2.1)

Wie erwartet fand ohne Zugabe von rhASA im Heparinplasma kein Umsatz statt (s. Abb. 30a und 30b), das Ergebnis ist ähnlich zu den Untersuchungen von rhASA unter Zugabe von 50%igem Serum (s. Abb. 29a, 29b, Kap. 3.3.2.1).

Ergebnisse

Unter Zugabe von rhASA 0,296 U/ml war der Umsatz von pNCS im Heparinplasma insgesamt höher, unter Zusatz von rhASA 0,148 U/ml jedoch geringer als im Serum. Insgesamt wurde also pNCS sowohl in 50%igem Serum als auch in 50%igem Heparinplasma ungefähr gleich gut abgebaut.

3.4 Umsatz von pNCS durch rhASA 14,8 U/ml und 5,92 U/ml bei 37°C für 0-120 Minuten

Dieser Versuch wurde wie in Kapitel 2.2.4.2 beschrieben durchgeführt, wobei statt 50 µl Aqua bidest nur 40 µl zugefügt wurden. Es kamen dabei zwei Verdünnungen der rhASA mit Aqua bidest, nämlich 14,8 U/ml und 5,92 U/ml, zur Anwendung. Die Ansätze wurden bei 37°C inkubiert und vor der Messung und vor Zugabe von NaOH nochmals 1:50 mit Verdünnungslösung (s. Kap. 2.1.2.2) verdünnt. Abbildung 31 und Tabelle 12 zeigen das Ergebnis, wobei die Berechnung des Umsatzes mit Hilfe der Eichkurve für p-Nitrocatechol (s. Kap. 3.2.1, Abb. 23) berechnet und dabei der Verdünnungsfaktor berücksichtigt wurde.

Ergebnisse

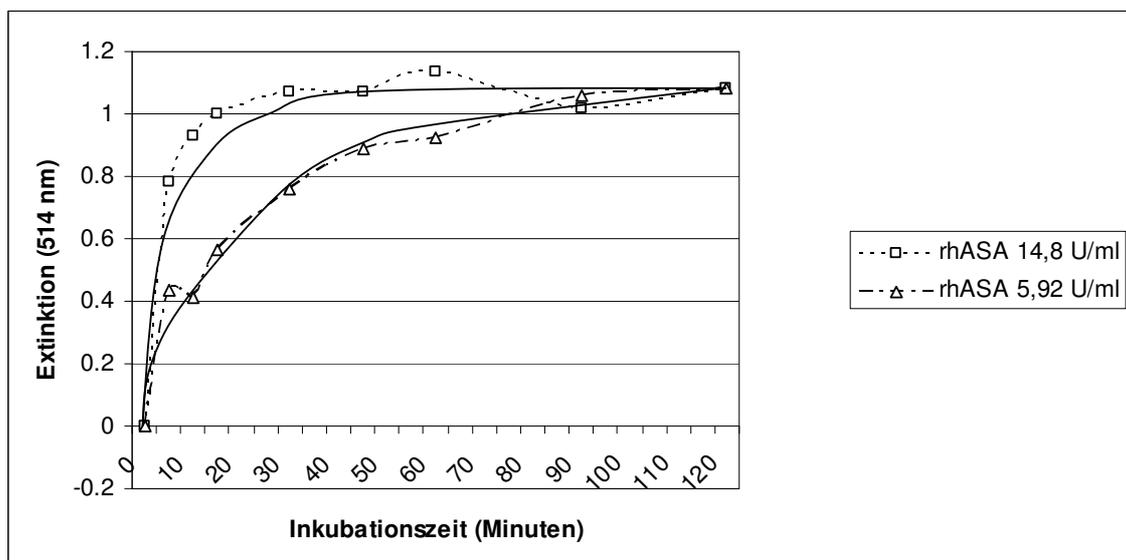


Abbildung 31: Umsatz von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (8 mmol/l) durch rhASA 14,8 U/ml und 5,92 U/ml (10 µl/250 µl Ansatz) bei 37°C für 0-120 Minuten. Die Messung erfolgte mit 1:50 verdünnten Proben.

Ergebnisse

Tabelle 12: Umsatz von 2×10^{-6} Molen/Test pNCS (8 mmol/l) durch rhASA 14,8 U/ml und 5,92 U/ml bei 37°C für 0-120 Minuten. Numerische Berechnung des Umsatzes von p-Nitrocatecholsulfat. Die gemessenen Extinktionswerte wurden dafür mit 50 multipliziert (Verdünnungsfaktor) und unter der Annahme $E_{1,0} = 0,39 \times 10^{-7}$ Mole (s. Kap. 3.2.1, Abb. 23) hochgerechnet. Somit ergab eine Extinktion von $E=1,0$ einen Umsatz von $19,68 \times 10^{-7}$ Molen pNCS.

Zeit (Minuten)	rhASA 14,8 U/ml			rhASA 5,92 U/ml		
	Extinktion	Umsatz ($\times 10^{-7}$ Mole)	Umsatz (%)	Extinktion	Umsatz ($\times 10^{-7}$ Mole)	Umsatz (%)
0	-0,0021	0,04	0,21	-0,0027	0,05	0,27
5	0,7815	15,38	76,91	0,4334	8,53	42,65
10	0,9284	18,27	91,37	0,4119	8,11	40,54
15	0,9974	19,68	98,41	0,5634	11,09	55,45
30	1,0684	21,03	105,14	0,7568	14,90	74,48
45	1,0684	21,03	105,14	0,8894	17,51	87,53
60	1,1341	22,32	111,61	0,9229	18,17	90,83
90	1,0174	20,03	100,13	1,0587	20,84	104,19
120	1,0815	21,29	106,43	1,0808	21,27	106,37

Mit der rhASA 14,8 U/ml wurde bereits nach 15 Minuten ein nahezu 100%iger Umsatz von pNCS erreicht, mit der rhASA 5,92 U/ml nach 90 Minuten (s. Abb. 31, Tab. 12).

Nach 5 Minuten wurde unter Zugabe von rhASA 14,8 U/ml fast die doppelte Menge an pNCS umgesetzt als mit rhASA 5,92 U/ml, nach 10 Minuten mehr als doppelt soviel. Danach nimmt die Differenz des Umsatzes beider rhASA-Konzentrationen immer mehr ab, wobei mit rhASA 14,8 U/ml nach 15 Minuten bereits 98% pNCS abgebaut wurden, mit rhASA 5,92 U/ml nach 60 Minuten rund 90%. Nach 90 und 120 Minuten Inkubationszeit ist insgesamt in beiden Probenansätzen praktisch gleich viel Substrat, nämlich rund 100%, umgesetzt worden bzw. p-Nitrocatechol entstanden.

3.5 Verfolgung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebrosid zu Galactocerebrosid durch rhASA mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie

Hintergrund

Bei den photometrischen Bestimmungen der Aktivität der rhASA wurde pNCS als Substrat verwendet, das ein künstliches Substrat der rhASA darstellt und dessen Umsatz anhand der Extinktion gemessen werden kann. Es gibt allerdings kein photometrisches Verfahren, das den Abbau des natürlichen Substrats der ASA, 3-Sulfo-Galactocerebrosid (Sulfatid), messen kann. Um auch den Umsatz von 3-Sulfo-Galactocerebrosid untersuchen zu können, wurden deshalb Versuche mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (s. Kap. 2.2.5) durchgeführt.

3.5.1 Sulfatid und Galactocerebrosid gelöst in $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1)

Der folgende Ansatz wurde wie in Kapitel 2.2.5.1 beschrieben durchgeführt, wobei es die Aufgabe war, die sichtbaren Banden Sulfatid oder Galactocerebrosid zuzuordnen und so zu identifizieren. Abbildung 32 zeigt das Ergebnis.

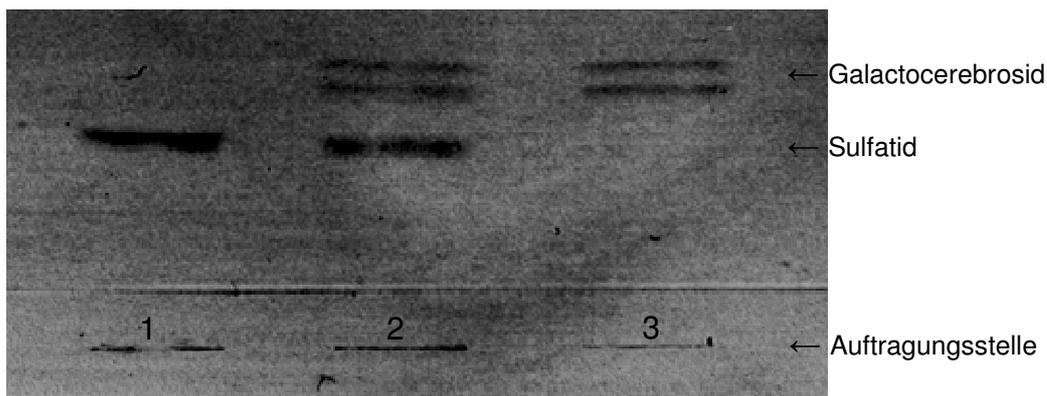


Abbildung 32: Dünnschichtchromatogramm von Sulfatid 0,12 mmol/l (1); Sulfatid 0,06 mmol/l, Galactocerebrosid 0,5 mmol/l (2); Galactocerebrosid 1 mmol/l (3) gelöst in $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1). Es wurden entweder 10 μl Sulfatid und Galactocerebrosid (2) oder 5 μl Sulfatid (1) bzw. 5 μl Galactocerebrosid (3) aufgetragen.

Ergebnisse

Ergebnis

Man sieht in den jeweiligen Ansätzen die Banden von Sulfatid und Galactocerebroside (s. Abb. 32), die sich sehr gut voneinander abgrenzen und identifizieren lassen.

3.5.2 Galactocerebroside und/ oder Sulfatid gelöst in Na-acetatpuffer 25 mmol/l, pH 5 und CHCl₃/CH₃OH (2:1)

Ziel dieses Versuchs war es, herauszufinden, ob sich Galactocerebroside und Sulfatid unter Zugabe von Na-acetatpuffer anders verhalten bzw. wie sie sich in der lipophilen Phase, die aufgetragen wurde, lösen (s. Abb. 33).

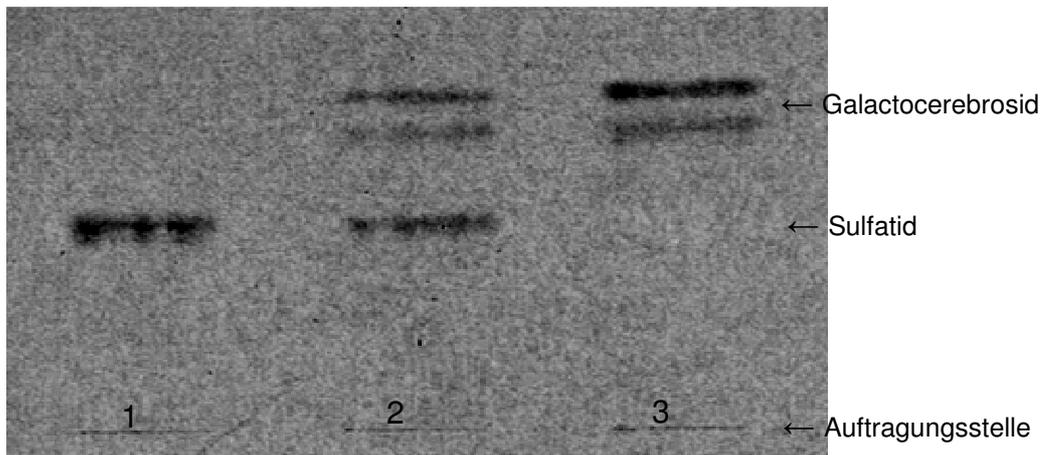


Abbildung 33: Dünnschichtchromatogramm von Sulfatid 0,11 mmol/l (1); Sulfatid 0,06 mmol/l, Galactocerebroside 0,46 mmol/l (2); Galactocerebroside 0,91 mmol/l (3) gelöst in Na-acetatpuffer 25 mmol/l, pH5 und CHCl₃/CH₃OH (2:1). Es wurden entweder 10 µl Sulfatid und Galactocerebroside (2) oder 5 µl Sulfatid (1) oder 5 µl Galactocerebroside (3) aufgetragen.

Ergebnis

Bei diesem Versuch lassen sich sowohl Galactocerebroside als auch Sulfatid gut voneinander abgrenzen (s. Abb. 33) und lösen sich auch im Beisein von Na-acetatpuffer 25 mmol/l gut in der lipophilen Phase.

Ergebnisse

3.5.3 Na-acetatpuffer 25 mmol/l und $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1) mit oder ohne Zugabe von Taurocholat 1%, Taurocholat 1% und Sulfatid oder Taurocholat 1% und Galactocerebrosid

Mit den folgenden Ansätzen, die wie in Kapitel 2.2.5.3 beschrieben durchgeführt wurden, wurde untersucht, wie sich Taurocholat 1% in 25 mmol/l Na-acetatpuffer und $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1) (Verdünnungslösung) verhält und ob Galactocerebrosid und Sulfatid unter Zugabe von Taurocholat immer noch identifizierbar sind. Das Ergebnis ist in Abbildung 34 gezeigt.

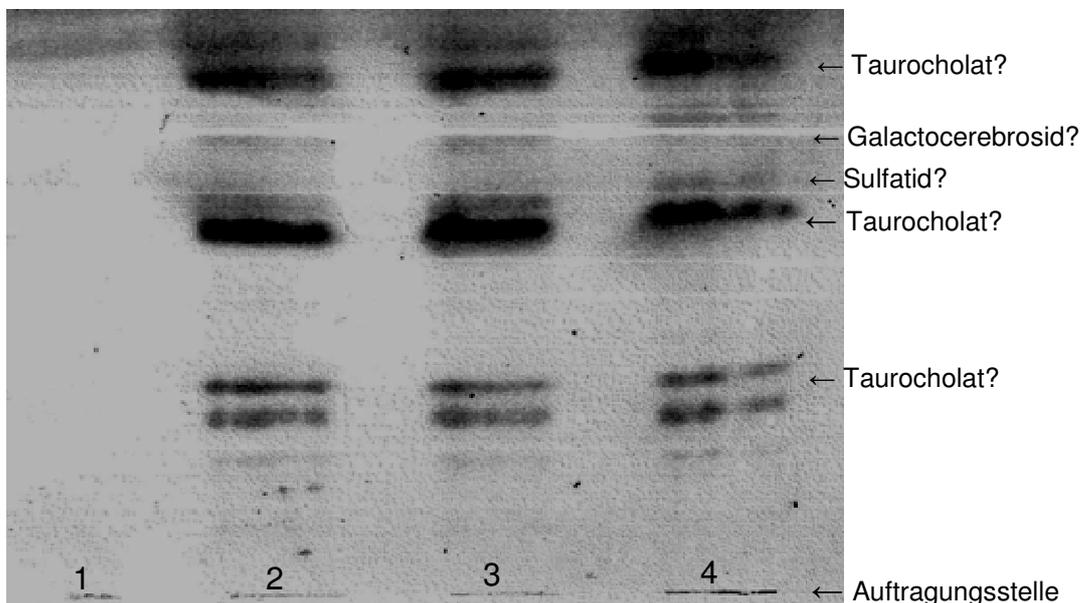


Abbildung 34: Dünnschichtchromatogramm von Na-acetatpuffer 25 mmol/l und $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1) mit oder ohne Zugabe von Taurocholat 1%, Taurocholat 1% und Sulfatid 0,03 mmol/l oder Taurocholat 1% und Galactocerebrosid 0,24 mmol/l. Es wurden jeweils 5 μl pro Probe aufgetragen.

1 = Puffer und $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1); 2 = Taurocholat, Puffer und $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1); 3 = Taurocholat, Galactocerebrosid, Puffer und $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1); 4 = Taurocholat, Sulfatid, Puffer und $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1)

Ergebnis

Unter Zugabe von Taurocholat sind weder Galactocerebrosid noch Sulfatid einer bestimmten Bande zuzuordnen (s. Abb. 34). Es ist anzunehmen, dass

Ergebnisse

hier Taurocholat in seine Bestandteile aufgetrennt wird und diese in der Dünnschichtchromatographie sichtbar werden.

3.5.4 Messung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebrosid zu Galactocerebrosid durch rhASA (1,48 U/ml oder 14,8 U/ml) nach 4 Stunden bei 37°C in Taurocholat- und Albumin-/ Na-acetatpufferlösung

Der folgende Versuch wurde wie in Kapitel 2.2.5.4 beschrieben durchgeführt. Es wurde dabei untersucht, ob das natürliche Substrat der ASA, 3-Sulfo-Galactocerebrosid, von der rhASA auch messbar umgesetzt wird (s. Abb. 35).

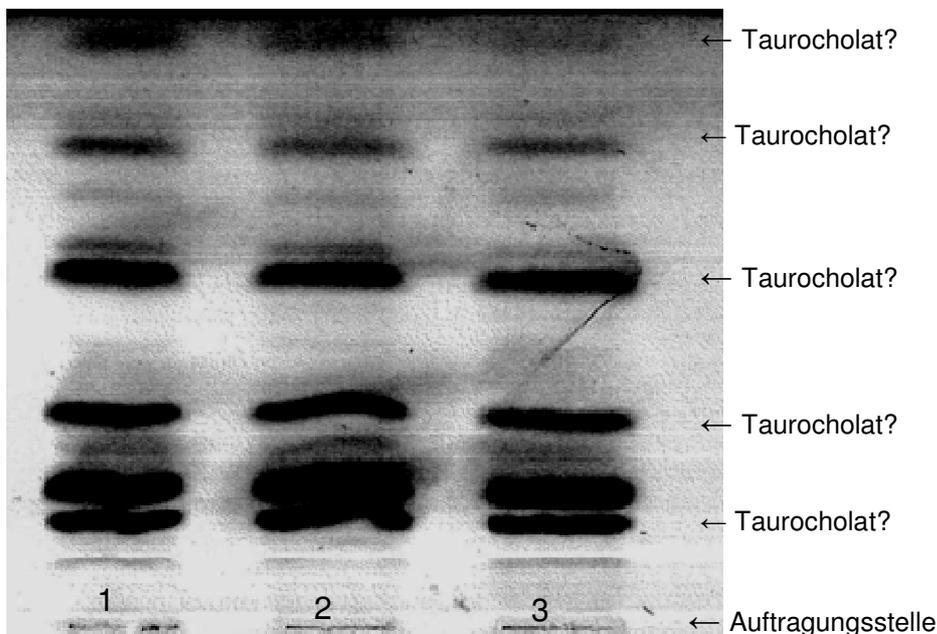


Abbildung 35: Dünnschichtchromatogramm von Sulfatid 0,1 mmol/l und Taurocholat 1% nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C gelöst in Na-acetatpuffer und Serumalbumin ohne Zugabe von rhASA (1) oder mit Zugabe von rhASA 1,48 U/ml (2) oder rhASA 14,8 U/ml (3). Es wurden je 5 μ l aufgetragen.

Ergebnis

Es sind in jedem Ansatz dieselben Banden sichtbar (s. Abb. 35), so dass nicht erkannt werden kann, ob Sulfatid von der rhASA umgesetzt wurde oder nicht.

3.5.5 Messung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebroside zu Galactocerebroside durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C in Taurocholat- und Na-acetatpuffer- oder Taurocholat- und Albumin-/ Na-acetatpufferlösung

Bei den folgenden Ansätzen wurde untersucht, ob Sulfatid durch rhASA umgesetzt wird und ob es in Na-acetatpuffer 25 mmol/l gleich gut abgebaut wird wie in Albumin-/ Na-acetatpufferlösung. Die Proben wurden wie in Kapitel 2.2.5.5 beschrieben angesetzt, das Ergebnis wird in Abbildung 36 gezeigt.

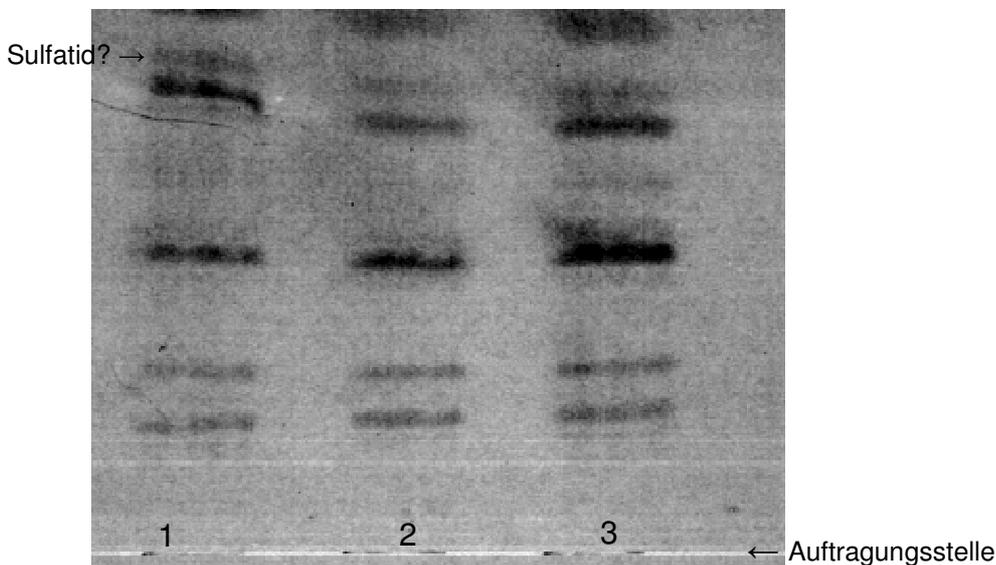


Abbildung 36: Dünnschichtchromatogramm von Sulfatid 0,1 mmol/l und Taurocholat 1% gelöst in Na-acetatpuffer und Aqua bidest (1), Na-acetatpuffer und rhASA 14,8 U/ml (2) oder Na-acetatpuffer/Albumin und rhASA 14,8 U/ml (3) nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C. Es wurden jeweils 5 µl aufgetragen.

Ergebnis

Im Ansatz 1 lässt sich ev. 3-Sulfo-Galactocerebroside (Sulfatid) abgrenzen (s. Abb. 36). Galactocerebroside ist in den Ansätzen 2 und 3 nicht mit Sicherheit bestimmbar, so dass unsicher ist, ob Sulfatid umgesetzt wurde.

3.5.6 Messung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebrosid zu Galactocerebrosid durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C in Na-acetatpuffer- oder Albumin-/ Na-acetatpufferlösung

Beim folgenden Versuch wurde der Umsatz von Sulfatid durch rhASA bei verschiedenen Umgebungsbedingungen (Na-acetatpuffer oder Albumin-/ Na-acetatpuffer) näher untersucht. Da Sulfatid sowohl hydrophile als auch lipophile Anteile besitzt, wurden die lipophile und hydrophile Phase aufgetragen, um zu sehen, ob es unter diesen Versuchsbedingungen in der hydro- oder lipophilen Phase sichtbar ist. Der Versuch wurde wie in Kapitel 2.2.5.6 beschrieben durchgeführt. Abbildung 37 zeigt das Ergebnis.

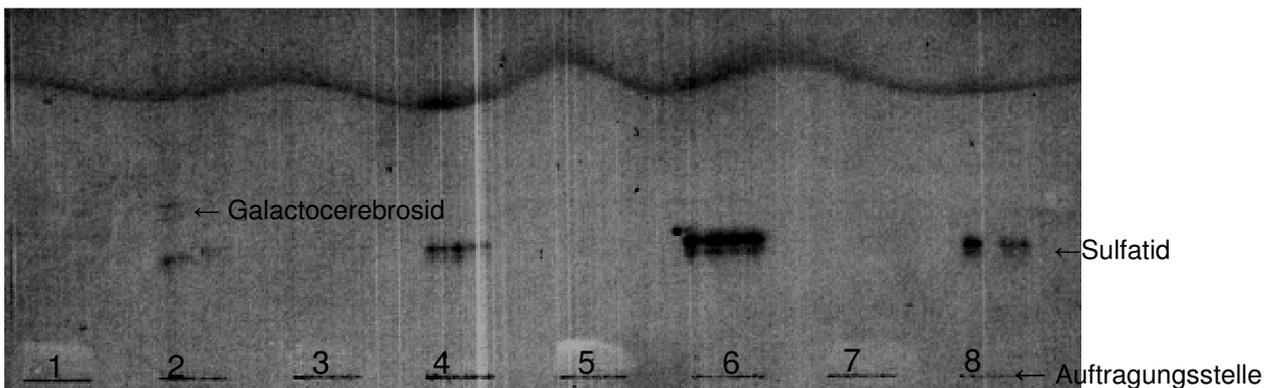


Abbildung 37: Dünnschichtchromatogramm von Sulfatid 0,2 mmol/l gelöst in Na-acetatpuffer oder Na-acetatpuffer/Albumin nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C mit 5 µl Aqua bidest oder 5 µl rhASA 14,8 U/ml. Es wurden jeweils 5 µl aufgetragen. 1+2 = Referenzansatz (Sulfatid 0,11 mmol/l, Galactocerebrosid 0,91 mmol/l): hydrophile (1) und lipophile (2) Phase; 3+4 = Puffer/Albumin und rhASA 14,8 U/ml: hydrophile (3) und lipophile (4) Phase; 5+6 = Puffer und rhASA 14,8 U/ml: hydrophile (5) und lipophile (6) Phase; 7+8 = Puffer/Albumin und Aqua bidest: hydrophile (7) und lipophile (8) Phase

Ergebnis

In den hydrophilen Phasen ist bei allen Ansätzen weder Galactocerebrosid noch Sulfatid zu sehen, da sich beide Substanzen in der lipophilen Phase lösen (s. Abb. 37). Galactocerebrosid ist nur im Test-Ansatz (Ansätze 1+2) und dort auch nur in der lipophilen Phase (2) sichtbar, Sulfatid, das in der lipophilen

Ergebnisse

Phase aller Ansätze sichtbar ist, wird somit in dieser Versuchsanordnung von der rhASA nicht abgebaut.

3.5.7 Messung des Umsatzes von 350 $\mu\text{mol/l}$ Sulfatid gelöst in 25 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5,0, 5 mmol/l MgCl_2 und 0,3% Taurocholat durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C

Dieser Versuch wurde wie in Kapitel 2.2.5.7 beschrieben durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob Sulfatid von der rhASA abgebaut wird, wenn es in Na-acetatpuffer gelöst ist (s. Abb. 38).

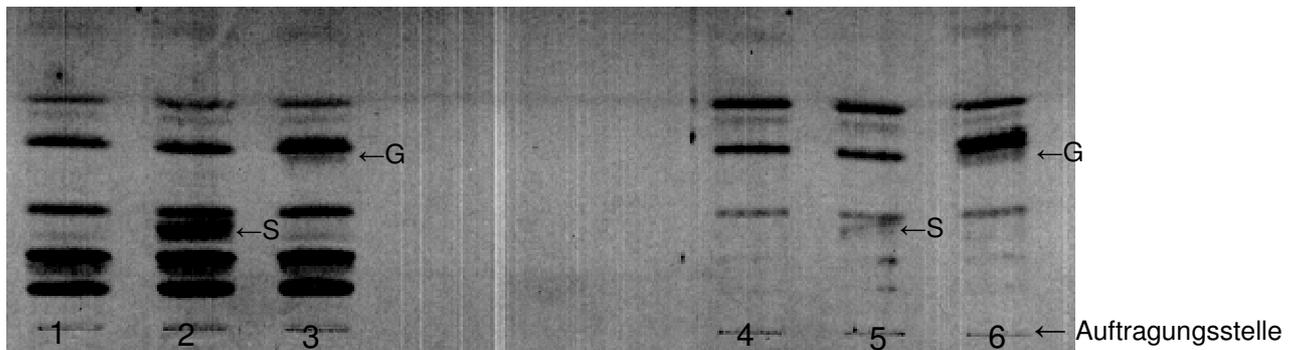


Abbildung 38: Dünnschichtchromatogramm von 350 $\mu\text{mol/l}$ Sulfatid oder Aqua bidest gelöst in 25 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5,0, 5 mmol/l MgCl_2 und 0,3% Taurocholat nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C mit rhASA 14,8 U/ml. Es wurden je 10 μl der Ansätze 1-3 und je 10 μl der lipophilen Phase der Ansätze 4-6 aufgetragen.

1-3 = Zugabe von Methanol; 4-6 = Zugabe von $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1); 1+4 = Taurocholat und Puffer ohne Sulfatid; 2+5 = Reaktionsansatz (mit Sulfatid) und Aqua bidest; 3+6 = Reaktionsansatz (mit Sulfatid) und rhASA 14,8 U/ml; S = Sulfatid; G = Galactocerebrosid

Ergebnis

Im Reaktionsansatz ohne rhASA (2+5) ist Sulfatid (S) sichtbar (s. Abb. 38). Davon unterscheidet sich der Reaktionsansatz nach Inkubation mit rhASA (3+6), in dem kein Sulfatid, dafür Galactocerebrosid (G) sichtbar ist, was den Abbau des Substrats durch rhASA beweist.

Ergebnisse

3.5.8 Messung des Umsatzes von 350 $\mu\text{mol/l}$ Sulfatid mit 5 mmol/l MgCl_2 und Taurocholol sowie Na-acetatpuffer pH 5 verschiedener Konzentrationen durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37 °C

Ziel der folgenden Ansätze, die wie in Kapitel 2.2.5.8 beschrieben durchgeführt wurden, war es zu untersuchen, ob unterschiedliche Konzentrationen an Na-acetatpuffer und Taurocholol den Umsatz von Sulfatid durch rhASA beeinflussen. Das Ergebnis ist in Abbildung 39 gezeigt.

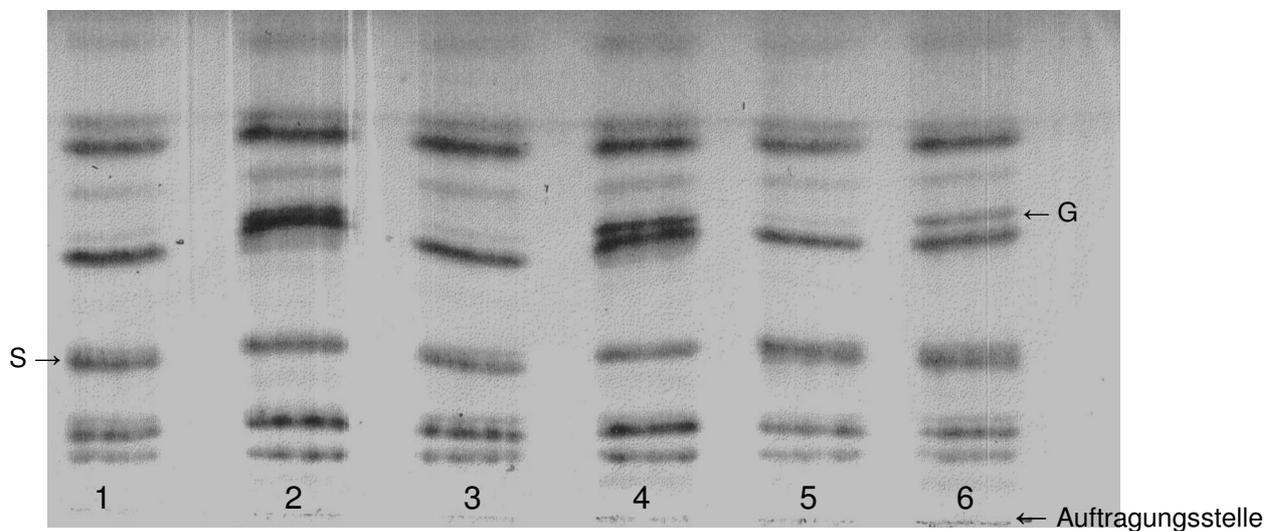


Abbildung 39: Dünnschichtchromatogramm von 350 $\mu\text{mol/l}$ Sulfatid (70 nMole) gelöst in Na-acetatpuffer und Taurocholol verschiedener Konzentrationen und 5 mmol/l MgCl_2 nach 2-stündiger Inkubation mit 10 μl rhASA 14,8 U/ml

1+2 = **25 mmol/l Na-acetatpuffer**, 5 mmol/l MgCl_2 , **0,3% Taurocholol**, pH bei 37 °C:
5,11; 1 = ohne rhASA, 2 = Zugabe von rhASA 14,8 U/ml;

3+4 = **12,5 mmol/l Na-acetatpuffer**, 5 mmol/l MgCl_2 , **0,3% Taurocholol**, pH bei 37 °C:
5,22; 3 = ohne rhASA, 4 = Zugabe von rhASA 14,8 U/ml

5+6 = **12,5 mmol/l Na-acetatpuffer**, 5 mmol/l MgCl_2 , **0,15% Taurocholol**, pH bei 37 °C:
5,11; 5 = ohne rhASA, 6 = Zugabe von rhASA 14,8 U/ml

S = Sulfatid; G = Galactocerebroside; es wurden je 20 μl der lipophilen Phase aufgetragen.

Ergebnis

Sulfatid (S) wird zwar zu Galactocerebroside (G) umgesetzt (s. Abb. 39), allerdings nicht so gut wie beim vorausgehenden Versuch (s. Kap. 3.5.7, Abb. 38), bei dem die Na-acetatpuffer-Konzentration mit 25 mmol/l konstant war. Es

Ergebnisse

stellt sich jetzt die Frage, ob auch Taurocholat von der rhASA umgesetzt wird durch Abspaltung von Sulfat und somit in Konkurrenz zu Sulfatid tritt.

3.5.9 Messung des Umsatzes von Sulfatid gelöst in Taurocholat 0,3% (rein oder unrein), $MgCl_2$ 5 mmol/l und Na-acetatpuffer 25 mmol/l durch rhASA (14,8 U/ml) nach 2-stündiger Inkubation bei 37°C

Die bisherigen Versuche wurden jeweils mit Taurocholat in unreiner Form durchgeführt. Um zu untersuchen, ob rhASA auch die dadurch in den Proben vorhandenen Verunreinigungen von Taurocholat umsetzt, indem Sulfat abgespalten wird, wurden die in Abbildung 40 gezeigten Ansätze wie in Kapitel 2.2.5.9 beschrieben angesetzt und aufgetragen. Dabei sollten die Proben mit Taurocholat in unreiner und reiner Form miteinander verglichen werden.

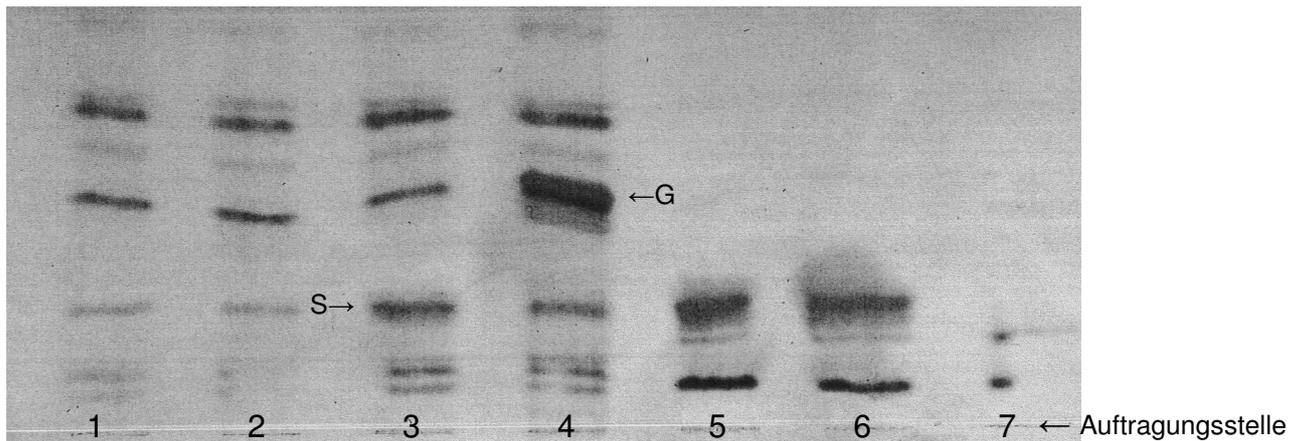


Abbildung 40: Dünnschichtchromatogramm von 0,3% Taurocholat rein oder unrein mit oder ohne 350 $\mu\text{mol/l}$ Sulfatid oder rhASA 14,8 U/ml. Es wurden je 20 μl der lipophilen Phase aufgetragen.

1 = Taurocholat unrein mit Aqua bidest; 2 = Taurocholat unrein mit rhASA; 3 = Taurocholat unrein und Sulfatid mit Aqua bidest; 4 = Taurocholat unrein und Sulfatid mit rhASA; 5 = Taurocholat rein und Sulfatid mit Aqua bidest; 6 = Taurocholat rein und Sulfatid mit rhASA; 7 = Taurocholat rein; S = Sulfatid; G = Galactocerebrosid

Ergebnis

Sulfatid (S) ist nur in den Ansätzen sichtbar, denen es tatsächlich zugefügt wurde (s. Abb. 40). Im Ansatz 4 könnte Galactocerebroside (G) sichtbar sein, was darauf hindeuten würde, dass Sulfatid in diesem Ansatz tatsächlich

abgebaut wurde, wobei in den Ansätzen mit reinem Taurocholat kein Galactocerebroside zu erkennen ist.

Zusammenfassung

In der Dünnschichtchromatographie ist sowohl 3-Sulfo-Galactocerebroside (Sulfatid), das natürliche Substrat der ASA, als auch Galactocerebroside, das durch Sulfat-Abspaltung aus Sulfatid entsteht, sichtbar. Es kann mit dieser Methode der Abbau von Sulfatid durch rhASA nachgewiesen werden, wobei in den Versuchen mit Taurocholat als Zusatz die Bildung von Galactocerebroside nicht mit Sicherheit festzustellen ist, da sich die verschiedenen Substanzen dann in den Dünnschichtchromatogrammen nicht mehr unterscheiden lassen.

3.6 Untersuchungen mit der Isotachophorese

Aufgabe der folgenden Untersuchungen war es, den Umsatz verschiedener Substanzen durch rhASA sowie Sulfatasen aus Leukozyten- und Granulozytenextrakt mit Hilfe der analytischen Isotachophorese (ITP) zu untersuchen. Dabei sollte die Anwendung der Isotachophorese für Versuche mit der rhASA etabliert und der Umsatz verschiedener Substanzen durch rhASA bzw. Leukozytenextrakte miteinander verglichen werden.

Mit Ausnahme des Versuchs zur Adaptation der Reaktionsansätze im Hinblick auf die anschließende Messung mit der ITP (s. Kap. 3.6.1), der mit Hilfe der Photometrie (s. Kap. 2.2.4) durchgeführt wurde, wurden alle folgenden Versuche wie im Kapitel zur Isotachophorese beschrieben durchgeführt (s. Kap. 2.2.6).

3.6.1 Adaptation der Reaktionsansätze im Hinblick auf die anschließende Messung mit der ITP

Hintergrund

Der für die ITP verwendete Leitelektrolyt enthält 10 mmol/l HCl, der Endelektrolyt 10 mmol/l Capronsäure (s. Kap. 2.1.2.4). Die zu analysierende Komponente sollte nach Möglichkeit in einem Konzentrationsbereich von 0,1

Ergebnisse

mmol/l bis ca. 5 mmol/l vorliegen. Aus diesem Grund sollten auch die anderen ionischen Komponenten des Reaktionsansatzes nicht viel höher als 5 mmol/l sein. Die Konzentrationen von Na-acetat und NaCl im Inkubationspuffer für die standardmässig durchgeführten photometrischen Bestimmungen mit pNCS sind jedoch höher, so dass diese Konzentrationen für die ITP drastisch reduziert werden müssen. Bei diesem Versuch wurde untersucht, ob der Umsatz von pNCS auch bei veränderten Konzentrationen von Na-acetatpuffer in einem vergleichbaren Ausmaß abläuft, und es sollten die Bedingungen im Hinblick auf ein geeignetes Testsystem für die ITP optimiert werden.

In den Versuchsansätzen, die wie in Kapitel 2.2.4.4 beschrieben angesetzt wurden, befanden sich folgende Konzentrationen: NaCl 8 mmol/l, Natriumpyrophosphat 5 mmol/l und p-Nitrocatecholsulfat 10 mmol/l.

Die Abbildungen 41a-c sowie Tabelle 13 zeigen das Ergebnis.

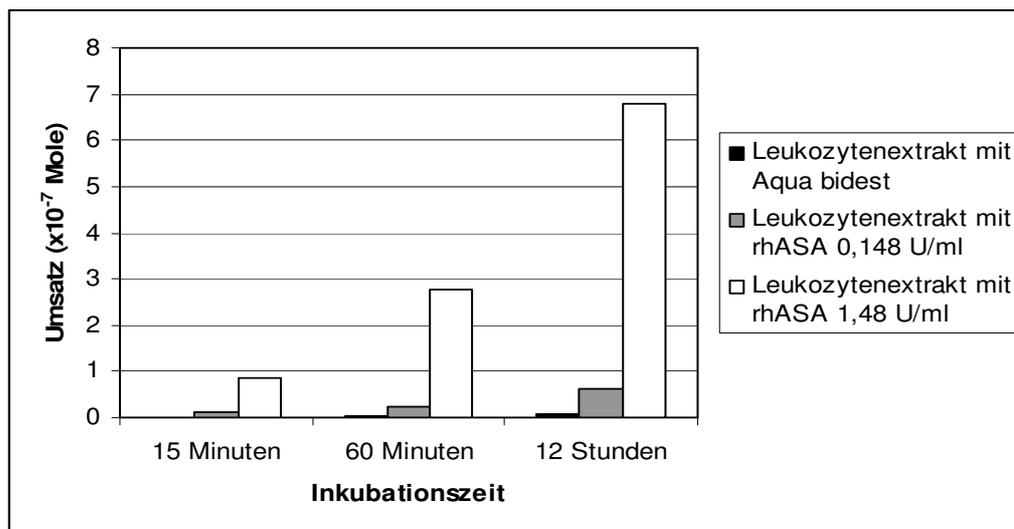


Abbildung 41a: Photometrische Messung des Umsatzes von 2 μ Molen/Ansatz pNCS (7,69 mmol/l) durch Leukozytenextrakt (Extrakt aus 49×10^4 Leukozyten/Test) und rhASA (10 μ l/260 μ l Ansatz) gelöst in verschieden hoch konzentrierten Acetatpuffern bei 37°C-

Essigsäure und Na-acetat je 500 mmol/l: Berechnung des Umsatzes von pNCS. Der Umsatz wurde mit Hilfe der Eichkurve (s. Kap. 3.2.1, Abb. 23) berechnet und bei den Ansätzen unter Zugabe von rhASA 0,148 U/ml und 1,48 U/ml mit 10 (Verdünnungsfaktor) multipliziert.

Ergebnisse

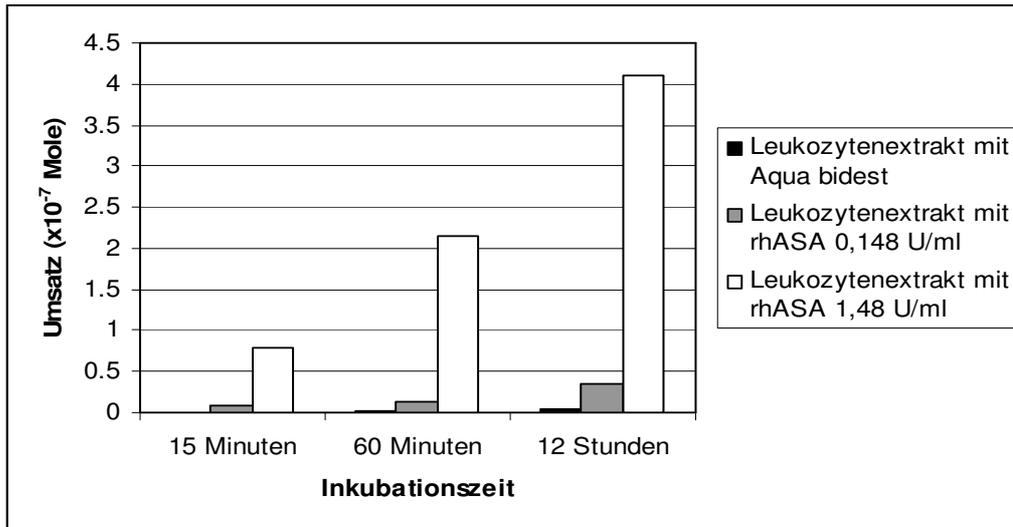


Abbildung 41b: Photometrische Messung des Umsatzes von 2 μ Molen/Ansatz pNCS (7,69 mmol/l) durch Leukozytenextrakt (Extrakt aus 49×10^4 Leukozyten/Test) und rhASA (10 μ l/260 μ l Ansatz) gelöst in verschieden hoch konzentrierten Acetatpuffern bei 37°C.

Essigsäure und Na-acetat je 50 mmol/l: Berechnung des Umsatzes von pNCS. Der Umsatz wurde mit Hilfe der Eichkurve (s. Kap. 3.2.1, Abb. 23) berechnet und bei den Ansätzen unter Zugabe von rhASA 1,48 U/ml mit 10 (Verdünnungsfaktor) multipliziert.

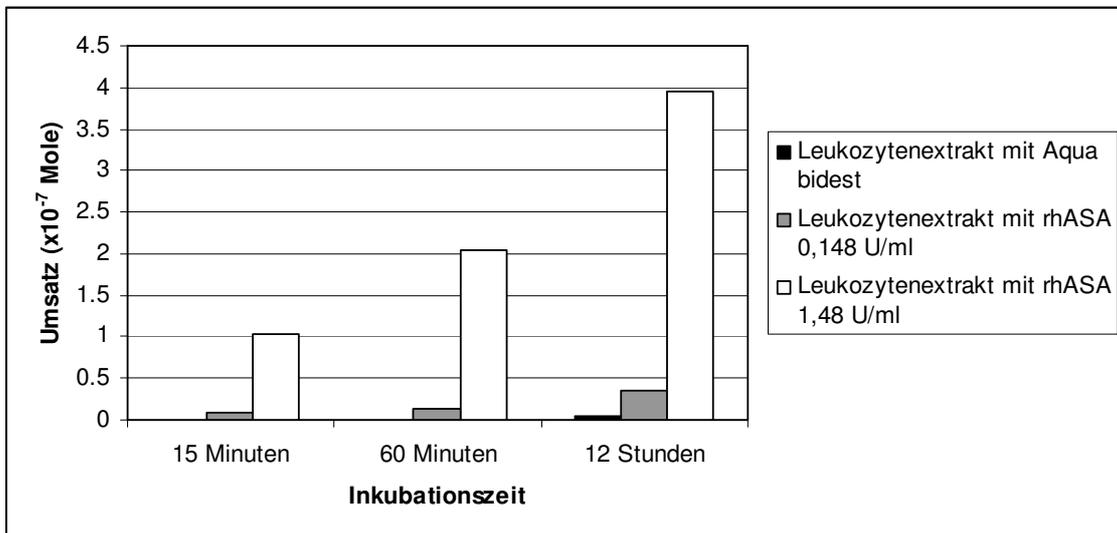


Abbildung 41c: Photometrische Messung des Umsatzes von 2 μ Molen/Ansatz pNCS (7,69 mmol/l) durch Leukozytenextrakt (Extrakt aus 49×10^4 Leukozyten/Test) und rhASA (10 μ l/260 μ l Ansatz) gelöst in verschieden hoch konzentrierten Acetatpuffern bei 37°C.

Essigsäure und Na-acetat je 10 mmol/l: Berechnung des Umsatzes von pNCS. Der Umsatz wurde mit Hilfe der Eichkurve (s. Kap. 3.2.1, Abb. 23) berechnet und bei den Ansätzen unter Zugabe von rhASA 1,48 U/ml mit 10 (Verdünnungsfaktor) multipliziert.

Ergebnisse

Tabelle 13: Abhängigkeit des Umsatzes von 2 μ Molen/Ansatz pNCS (7,69 mmol/l) durch Leukozytenextrakt (Extrakt aus 49×10^4 Leukozyten/Test) und rhASA (10 μ l/260 μ l Ansatz) gelöst in verschieden hoch konzentrierten Na-acetatpuffern bei 37°C (Umsatz $\times 10^{-7}$ Mole gebildetes p-Nitrocatechol)

	Aqua bidest		rhASA 0,148 U/ml		rhASA 1,48 U/ml		
Inkubationszeit	Umsatz ($\times 10^{-7}$ Mole)	Umsatz (%)	Umsatz ($\times 10^{-7}$ Mole)	Umsatz (%)	Umsatz ($\times 10^{-7}$ Mole)	Umsatz (%)	Essigsäure-, Na-acetatpuffer-Konzentration
15 Minuten	0,004	0,02	0,10	0,50	0,87	4,35	500 mmol/l
	0,007	0,035	0,08	0,40	0,79	3,95	50 mmol/l
	0,006	0,03	0,08	0,40	1,04	5,20	10 mmol/l
60 Minuten	0,020	0,10	0,25	1,25	2,78	13,90	500 mmol/l
	0,013	0,07	0,14	0,70	2,16	10,80	50 mmol/l
	0,006	0,03	0,13	0,65	2,05	10,25	10 mmol/l
12 Stunden	0,076	0,38	0,62	3,10	6,79	33,95	500 mmol/l
	0,041	0,21	0,35	1,75	4,11	20,55	50 mmol/l
	0,048	0,24	0,34	1,70	3,96	19,80	10 mmol/l

Ergebnis

Die Ansätze mit Leukozytenextrakt und Aqua bidest (ohne rhASA) zeigten erwartungsgemäss den geringsten Umsatz, die Ansätze mit Leukozytenextrakt und rhASA 1,48 U/ml den grössten Abbau von pNCS (s. Abb. 41a-c, Tab. 13). Insgesamt wurde in den Ansätzen mit 500 mmol/l Na-acetatpuffer am meisten pNCS umgesetzt (ca 34% nach 12 Stunden), wobei auch in den anderen Na-acetatpuffer-Konzentrationen ein Abbau von pNCS bzw. die Entstehung von p-Nitrocatechol nachweisbar war. Daraus folgt, dass auch bei einer Na-acetatpuffer-Konzentration von 10 mmol/l der Umsatz von pNCS genügend hoch ist und dieser Reaktionsansatz für die ITP geeignet wäre.

3.6.2 Untersuchungen des Abbaus verschiedener Substrate (Sulfate) durch rhASA

Hintergrund

Aufgabe der folgenden Untersuchungen, die wie in den Kapiteln 2.2.6.2.1-2.2.6.2.6 beschrieben durchgeführt wurden, war es, den Abbau verschiedener Substrate durch rhASA mit Hilfe der Isotachophorese nachzuweisen.

3.6.2.1 Abbau von pNCS durch rhASA

Ziel dieser Versuche, die wie in Kapitel 2.2.6.2.1 beschrieben durchgeführt wurden, war es, den Abbau von pNCS durch rhASA mit Hilfe der ITP nachzuweisen und mit den photometrischen Versuchen unter denselben Bedingungen (s. Kap. 3.6.1) zu vergleichen. Dazu wurden 2 Reaktionsansätze, nämlich mit rhASA 1,48 U/ml und rhASA 14,8 U/ml, angesetzt und der Abbau nach 0, 2 und 20 Stunden (rhASA 1,48 U/ml) bzw. nach 0, 1, 2, 4 und 24 Stunden (rhASA 14,8 U/ml) untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 42a und 42b, die Isotachogramme nach 0, 4 und 24 Stunden Inkubationszeit in den Abbildungen 43a-f gezeigt.

Ergebnisse

Ergebnisse der Inkubation mit rhASA 1,48 U/ml

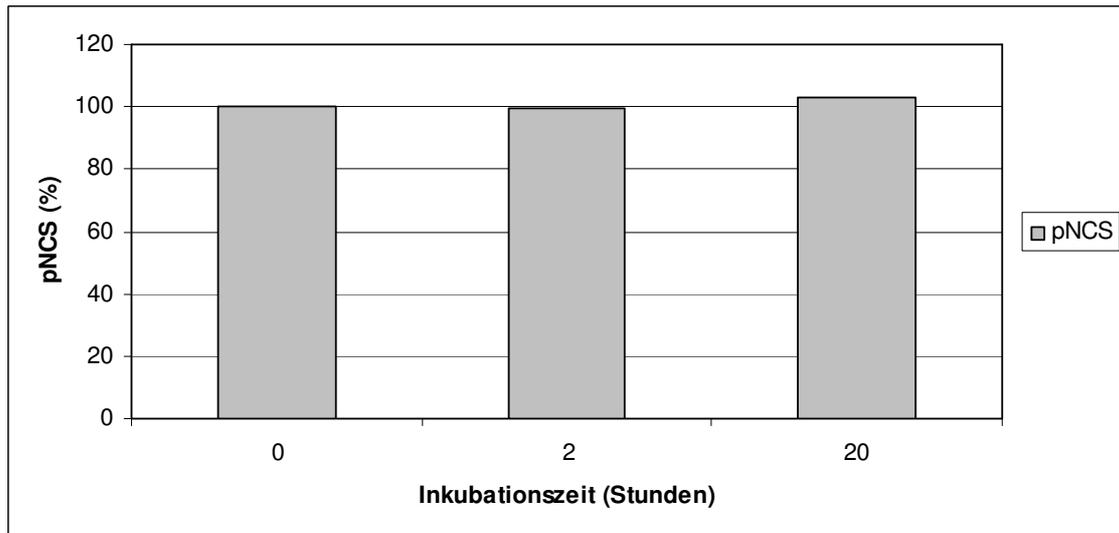


Abbildung 42a: Inkubation von 10^{-5} Molen/Ansatz pNCS (10 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l mit 10 μ l rhASA 1,48 U/ml bei 37°C. Zum Zeitpunkt 0 wurden 200 μ l (von insgesamt 1050 μ l Ansatz) entnommen und 10 μ l rhASA 1,48 U/ml zugefügt. Für die Messung mit der Isotachophorese wurden jeweils 30 μ l der Proben mit 120 μ l Aqua bidest verdünnt. Mess-Ergebnisse des UV-Detektors (254 nm).

Mit der ITP liess sich kein Abbau von pNCS durch rhASA 1,48 U/ml nachweisen. Auch nach 20 Stunden Inkubation zeigte sich hier, im Gegensatz zu den photometrischen Untersuchungen unter den gleichen Bedingungen (s. Kap. 3.6.1), wo ein Abbau von pNCS von ca. 20% festgestellt wurde, kein Umsatz von pNCS (s. Abb. 42a).

Ergebnisse

Ergebnisse der Inkubation mit rhASA 14,8 U/ml

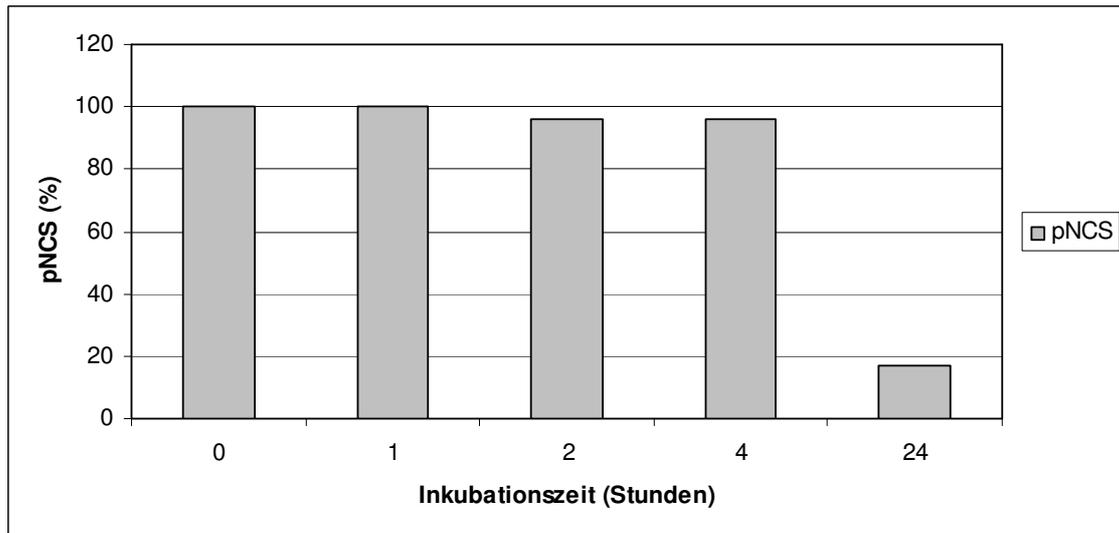


Abbildung 42b: Inkubation von 10^{-5} Molen/Ansatz pNCS (10 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l mit 10 μ l rhASA 14,8 U/ml bei 37°C. Zum Zeitpunkt 0 wurden 200 μ l (von insgesamt 1050 μ l Ansatz) entnommen und 10 μ l rhASA 14,8 U/ml zugefügt. Entnahme weiterer 200 μ l zu den Zeitpunkten 1, 2, 4 und 24 Stunden. Für die Messung mit der Isotachophorese wurden jeweils 30 μ l der Proben mit 120 μ l Aqua bidest verdünnt. Mess-Ergebnisse des UV-Detektors (254 nm). Die Isotachogramme nach 0, 4 und 24 Stunden Inkubation sind in den Abbildungen 43a-f gezeigt.

Ergebnisse

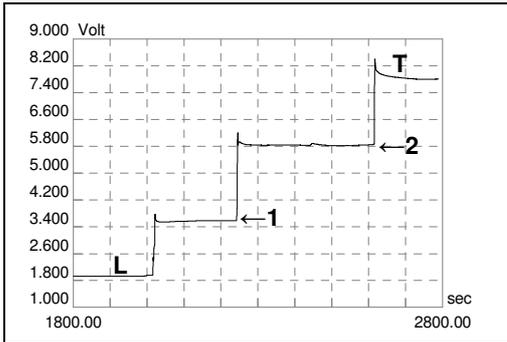


Abbildung 43a: Leitfähigkeitssignal nach 0 Stunden Inkubation

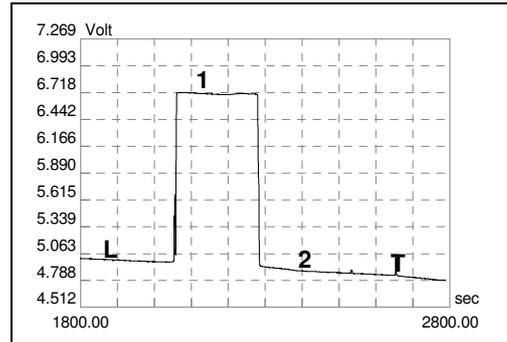


Abbildung 43b: UV-Signal (254 nm) nach 0 Stunden Inkubation

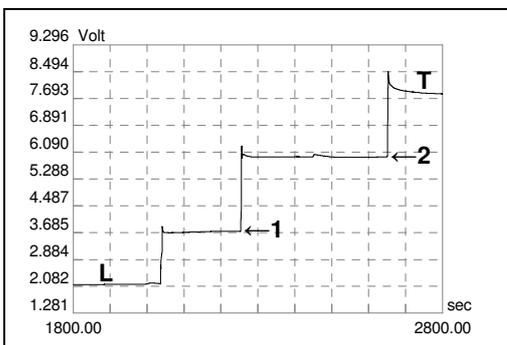


Abbildung 43c: Leitfähigkeitssignal nach 4 Stunden Inkubation

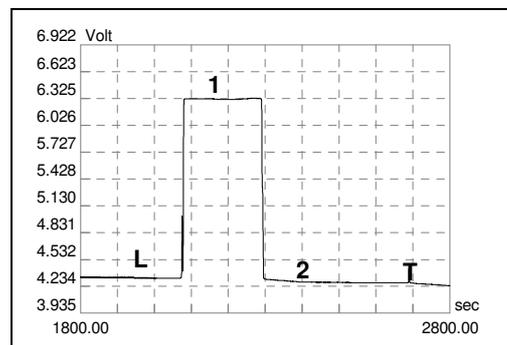


Abbildung 43d: UV-Signal (254 nm) nach 4 Stunden Inkubation

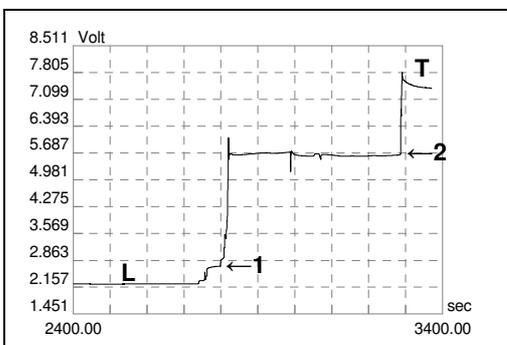


Abbildung 43e: Leitfähigkeitssignal nach 24 Stunden Inkubation

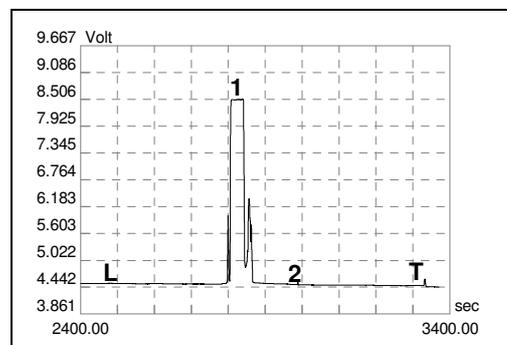


Abbildung 43f: UV-Signal (254 nm) nach 24 Stunden Inkubation

Abbildungen 43a-f: Isotachogramme des Umsatzes von 10^{-5} Molen/Ansatz pNCS (10 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l mit rhASA 14,8 U/ml bei 37°C nach 0, 4 und 24 Stunden. Zum Zeitpunkt 0 wurden 200 μ l (von insgesamt 1050 μ l Ansatz) entnommen und 10 μ l rhASA 14,8 U/ml zugefügt. Entnahme weiterer 200 μ l zu den Zeitpunkten 1, 2, 4 und 24 Stunden. Für die Messung mit der Isotachophorese wurden jeweils 30 μ l der Proben mit 120 μ l Aqua bidest verdünnt.

L = Leitelektrolyt; T = Endelektrolyt; 1 = pNCS; 2 = Na-acetatpuffer

Ergebnisse

Durch Inkubation mit rhASA 14,8 U/ml zeigte sich nach 24 Stunden eine Abnahme von pNCS auf 16,75% (von 10×10^{-6} Molen auf ca. $1,7 \times 10^{-6}$ Mole), es wurden also rund 83% des Substrates abgebaut (s. Abb. 42b, 43a-f). Im Vergleich zu den photometrischen Untersuchungen unter denselben Bedingungen (s. Kap. 3.6.1) ist eine höhere pNCS-Abnahme nötig (ca. >5%), um den Umsatz von pNCS durch rhASA mittels ITP nachzuweisen, was vermutlich daran liegt, dass zwar pNCS, nicht jedoch das Produkt p-Nitrocatechol in der ITP messbar ist und dass SO_4^{2-} eine sehr ähnliche Mobilität zu Cl^- hat und deshalb schlecht detektierbar ist.

3.6.2.2 Abbau von Ascorbylsulfat durch rhASA

Bei den folgenden Versuchen wurde die Stabilität von Ascorbylsulfat, Ascorbat und Ascorbylphosphat sowie der Abbau von Ascorbylsulfat durch rhASA mittels ITP untersucht.

3.6.2.2.1 Isotachophorese von Ascorbylsulfat und Ascorbat

Hintergrund

RhASA kann Ascorbylsulfat zu Ascorbat und Sulfat (SO_4^{2-}) umsetzen. Grundsätzlich sind alle 3 Komponenten mit Hilfe der ITP messbar.

Aufgabe des folgenden Versuches war es, die Nachweisbarkeit von Ascorbylsulfat und Ascorbat mit Hilfe der ITP zu zeigen sowie die Stabilität beider Substanzen zu untersuchen und eine Eichkurve zu erstellen. Dafür wurden die Versuchsansätze wie in Kapitel 2.2.6.2.2 beschrieben angesetzt, wobei die Ansätze vor der Messung nicht verdünnt wurden. Die Abbildungen 44a-d zeigen exemplarisch die Isotachogramme der Ansätze mit Ascorbat und Ascorbylsulfat je 0,5 mmol/l und 0,25 mmol/l und Abbildung 45 die Eichkurve.

Ergebnisse

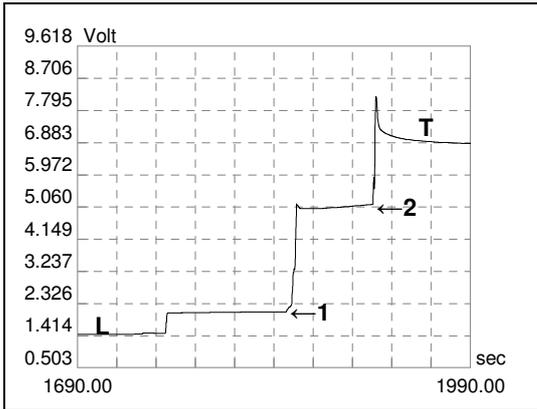


Abbildung 44a: Ascorbat und Ascorbylsulfat je 0,5 mmol/l; Leitfähigkeitssignal

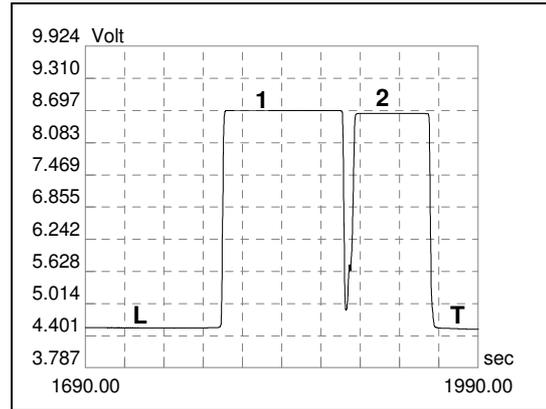


Abbildung 44b: Ascorbat und Ascorbylsulfat je 0,5 mmol/l; UV-Signal (254 nm)

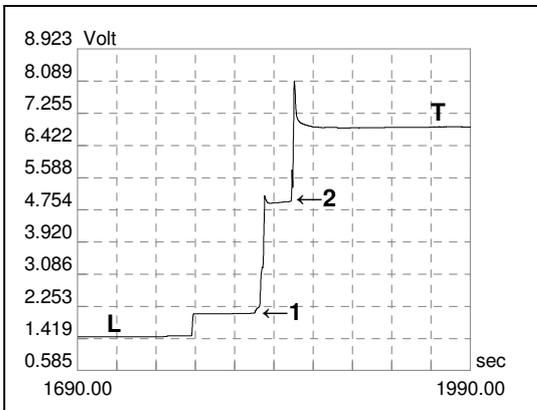


Abbildung 44c: Ascorbat und Ascorbylsulfat je 0,25 mmol/l; Leitfähigkeitssignal

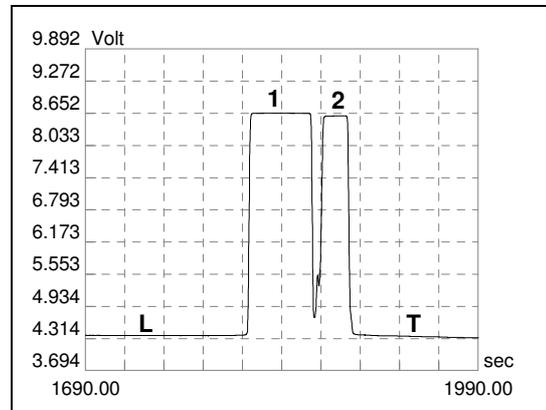


Abbildung 44d: Ascorbat und Ascorbylsulfat je 0,25 mmol/l; UV-Signal (254 nm)

Abbildungen 44a-d: Isotachogramme einer Mischung von Ascorbat und Ascorbylsulfat gelöst in Aqua bidest; L = Leitelektrolyt; T = Endelektrolyt; 1 = Ascorbylsulfat; 2 = Ascorbat

Ergebnisse

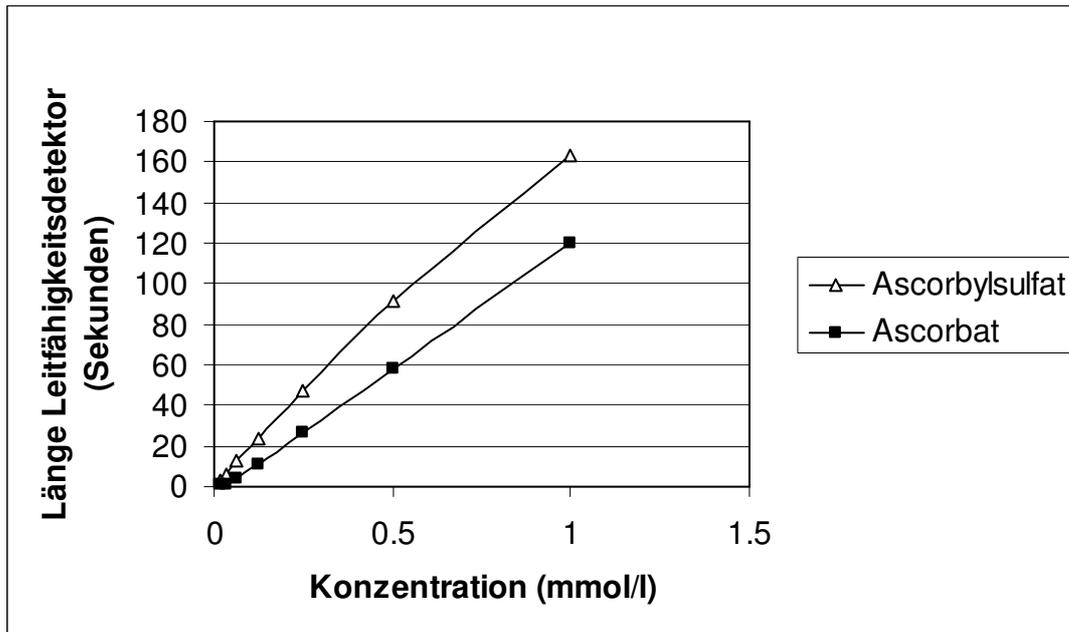


Abbildung 45: Eichkurve einer Mischung von Ascorbat und Ascorbylsulfat gelöst in Aqua bidest. Messergebnisse an der ITP (Leitfähigkeitsdetektor, Länge in Sekunden).

Ergebnis

Die Eichkurven von Ascorbat und Ascorbylsulfat verlaufen beide linear, wobei die Länge von Ascorbat bei gleicher Konzentration etwas kürzer als diejenige von Ascorbylsulfat ist (s. Abb. 45). In den exemplarisch dargestellten Isotachogrammen von Ascorbat und Ascorbylsulfat ist deutlich die Längenabnahme beider Substanzen sichtbar, die sich auf ca. die Hälfte verkürzt bei einer Halbierung der Konzentration beider Substanzen von 0,5 mmol/l auf 0,25 mmol/l (s. Abb. 44a-d).

3.6.2.2.2 Stabilität von Ascorbylsulfat, Ascorbylphosphat und Ascorbinsäure

Hintergrund

Für die Untersuchungen des Abbaus von Ascorbylsulfat durch rhASA mit Hilfe der Isotachophorese kann einerseits die Abnahme des Substrats (Ascorbylsulfat), andererseits aber auch die Bildung der Reaktionsprodukte Ascorbat und Sulfat herangezogen werden. Während die Messung von Ascorbylsulfat problemlos ist, kann es aber bei der Messung der beiden

Ergebnisse

Produkte zu Problemen kommen: bei den gewählten Leit- und Endelektrolytsystemen (Chlorid/Caprionsäure) unterscheidet sich die Mobilität des Sulfates nur unwesentlich von der des Chlorides, wodurch eine eindeutige Signalzuordnung sehr erschwert ist. Andererseits muss berücksichtigt werden, dass das freie Ascorbat sehr leicht autoxydiert und daher, insbesondere bei längeren Inkubationszeiten, teilweise abgebaut wird, bevor die Messung mit Hilfe der Isotachophorese stattfindet. In diesem Versuchsblock wurde deshalb die Stabilität von Ascorbat, Ascorbylsulfat und im Vergleich dazu auch von Ascorbylphosphat unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Die Proben wurden dafür wie in Kapitel 2.2.6.2.3 beschrieben angesetzt. Die Abbildungen 46a-c zeigen die Ergebnisse, in den Abbildungen 47a-f sind die dazugehörigen Isotachogramme der Inkubation von Ascorbat, Ascorbylsulfat und Ascorbylphosphat gelöst in Na-acetatpuffer pH 7,12 bei 37 °C abgebildet.

Ergebnisse

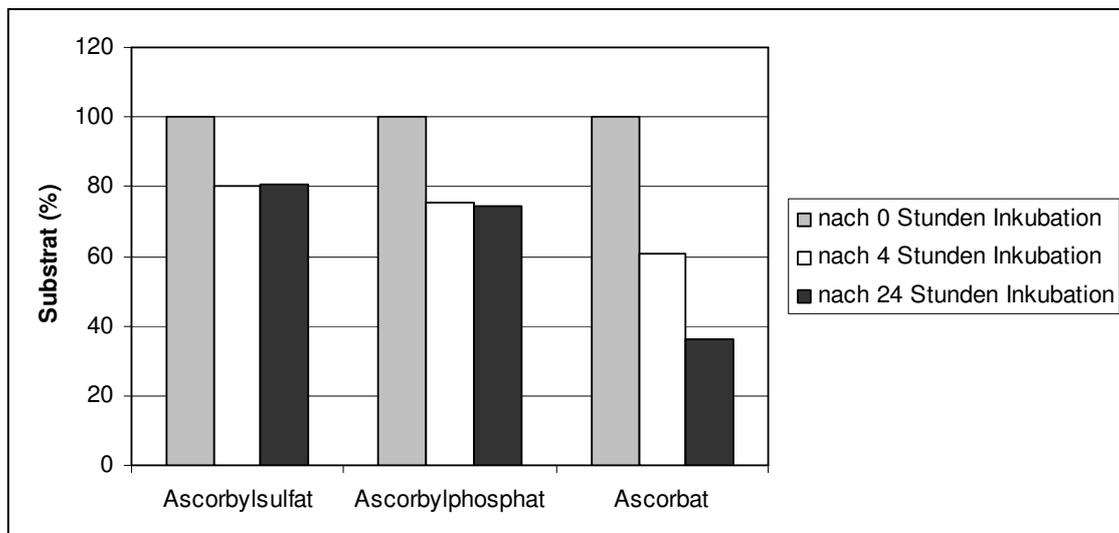


Abbildung 46a: Abbau von 10^{-6} Molen/Ansatz Ascorbylsulfat, Ascorbylphosphat und Ascorbat (je 1 mmol/l) gelöst in **Na-acetatpuffer pH 5,08** nach Inkubation bei 37 °C. Entnahme von je 250 μ l (von insgesamt 1000 μ l Reaktionsansatz) zu den Zeitpunkten 0, 4 und 24 Stunden. Es wurden die Messwerte des UV-Detektors (254 nm) zur Auswertung benutzt. Vor der Messung wurden die Ansätze jeweils 1:5 mit Aqua bidest verdünnt.

Ergebnisse

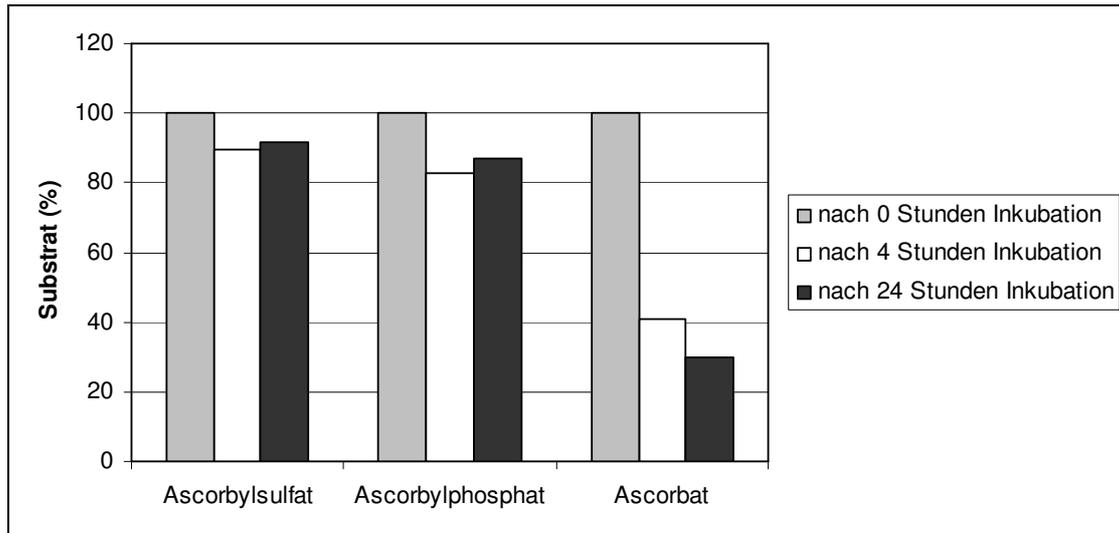


Abbildung 46b: Abbau von 10^{-6} Molen/Ansatz Ascorbylsulfat, Ascorbylphosphat und Ascorbat (je 1 mmol/l) gelöst in **Na-acetatpuffer pH 7,12** nach Inkubation bei 37°C. Entnahme von je 250 μ l (von insgesamt 1000 μ l Reaktionsansatz) zu den Zeitpunkten 0, 4 und 24 Stunden. Es wurden die Messwerte des UV-Detektors (254 nm) zur Auswertung benutzt. Vor der Messung wurden die Ansätze jeweils 1:5 mit Aqua bidest verdünnt.

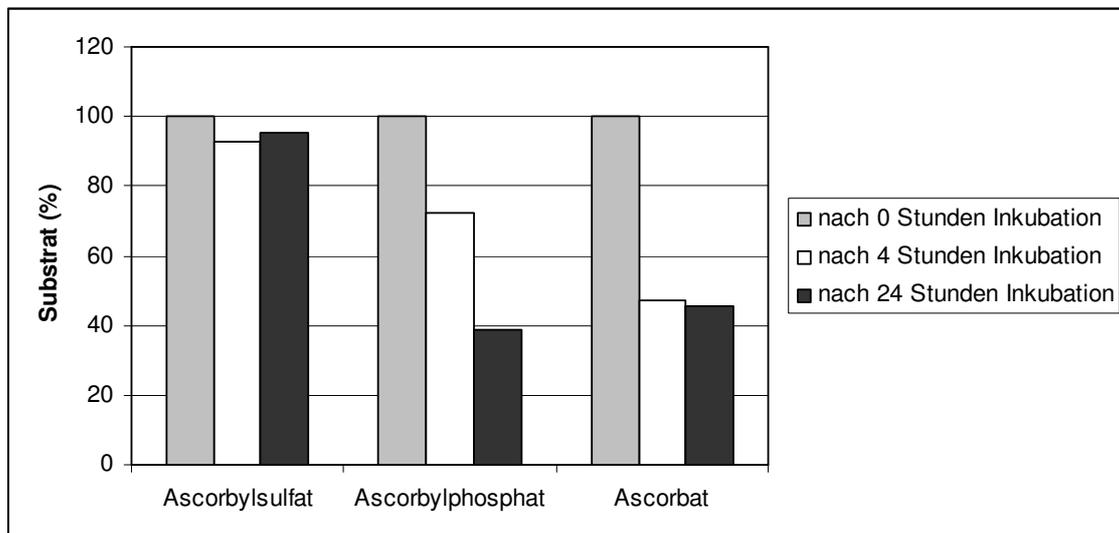


Abbildung 46c: Abbau von 10^{-6} Molen/Ansatz Ascorbylsulfat, Ascorbylphosphat und Ascorbat (je 1 mmol/l) gelöst in **FCS** nach Inkubation bei 37°C. Entnahme von je 100 μ l (von insgesamt 1000 μ l Reaktionsansatz) zu den Zeitpunkten 0, 4 und 24 Stunden. Es wurden die Messwerte des UV-Detektors (254 nm) zur Auswertung benutzt. Vor der Messung wurden die Ansätze jeweils 1:5 mit Aqua bidest verdünnt und ultrafiltriert.

Ergebnisse

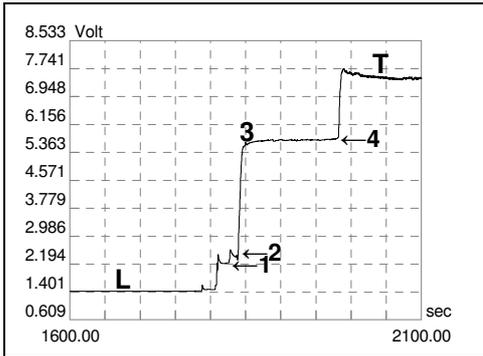


Abbildung 47a: Leitfähigkeitssignal nach 0 Stunden Inkubation

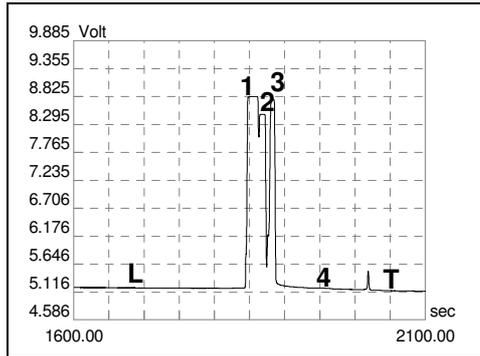


Abbildung 47b: UV-Signal (254 nm) nach 0 Stunden Inkubation

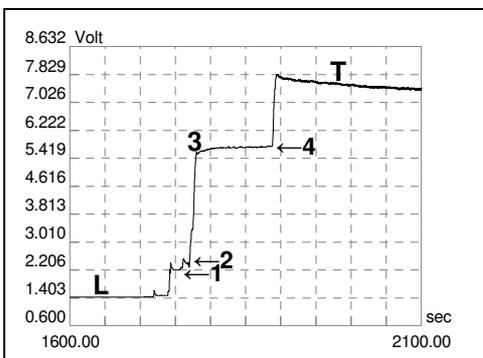


Abbildung 47c: Leitfähigkeitssignal nach 4 Stunden Inkubation

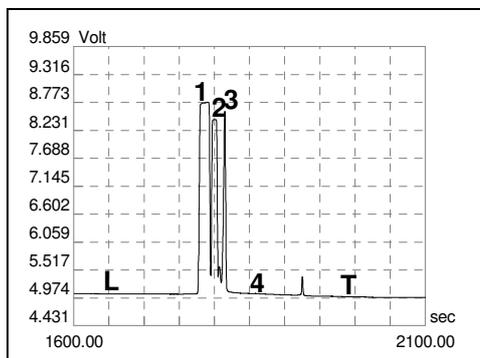


Abbildung 47d: UV-Signal (254 nm) nach 4 Stunden Inkubation

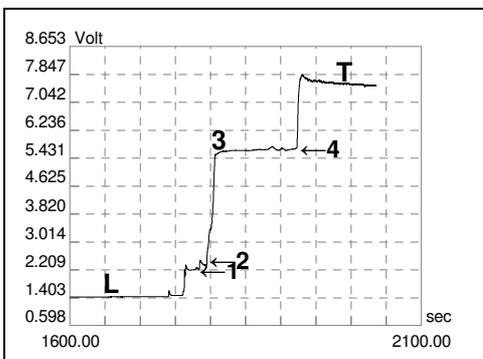


Abbildung 47e: Leitfähigkeitssignal nach 24 Stunden Inkubation

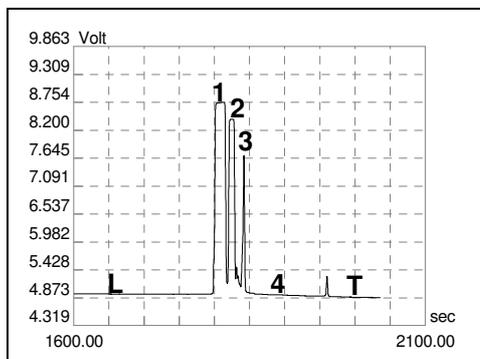


Abbildung 47f: UV-Signal (254 nm) nach 24 Stunden Inkubation

Abbildung 47a-f: Abbau von 10^{-6} Molen/Ansatz Ascorbylsulfat, Ascorbylphosphat und Ascorbat (je 1 mmol/l) gelöst in **Na-acetatpuffer pH 7,12** nach Inkubation bei 37 °C. Entnahme von je 250 μ l (von insgesamt 1000 μ l Reaktionsansatz) zu den Zeitpunkten 0, 4 und 24 Stunden. Vor der Messung wurden die Ansätze jeweils 1:5 mit Aqua bidest verdünnt.

L = Leitelektrolyt; T = Endelektrolyt; 1 = Ascorbylsulfat; 2 = Ascorbylphosphat; 3 = Ascorbat; 4 = Na-acetatpuffer

Ergebnisse

Unter allen drei Bedingungen sieht man eine starke Abnahme der Ascorbatkonzentration mit zunehmender Inkubationszeit (s. Abb. 46a-c, 47a-f). Im Gegensatz dazu sind die Ascorbylsulfatwerte sehr stabil, lediglich im sauren Bereich kommt es zu einer gewissen Abnahme (ca. 20%; leichte saure Hydrolyse?). Das gleiche gilt für Ascorbylphosphat, wobei man hier zusätzlich noch einen relativ starken Abbau bei Inkubation in FCS feststellen kann. Das ist wahrscheinlich auf die Gegenwart verschiedener Phosphatasen im Serum zurückzuführen.

3.6.2.2.3 Kinetik des Abbaus von Ascorbylsulfat durch rhASA

Aufgabe der folgenden Untersuchungen, die wie in den Kapiteln 2.2.6.2.1 und 2.2.6.2.4 beschrieben durchgeführt wurden, war es, den Abbau von Ascorbylsulfat durch rhASA und die Bildung von Ascorbat, das dabei entsteht, mittels ITP nachzuweisen. Dazu wurden 2 Reaktionsansätze, nämlich mit rhASA 1,48 U/ml und rhASA 14,8 U/ml, angesetzt und der Abbau nach 0, 2 und 20 Stunden (rhASA 1,48 U/ml) bzw. nach 0, 0,5, 1, 2, 3, 4 und 20 Stunden (rhASA 14,8 U/ml) untersucht. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 48a und 48b gezeigt.

Ergebnisse

Ergebnisse der Inkubation mit rhASA 1,48 U/ml

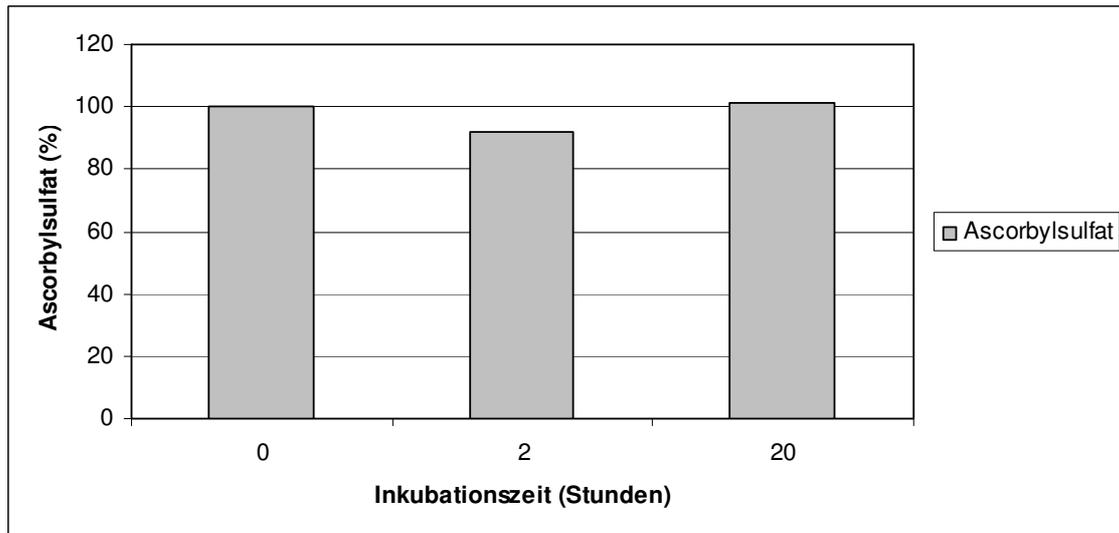


Abbildung 48a: Abbau von 10^{-5} Molen/Ansatz Ascorbylsulfat (10 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l mit **rhASA 1,48 U/ml** bei 37°C nach 0-20-stündiger Inkubation. Zum Zeitpunkt 0 wurden 200 μ l (von insgesamt 1050 μ l Reaktionsansatz) entnommen und 10 μ l rhASA 1,48 U/ml zugefügt. Entnahme von je 200 μ l nach weiteren 2 und 20 Stunden. Für die Messung mit der Isotachophorese wurden jeweils 30 μ l der Proben mit 120 μ l Aqua bidest verdünnt. Mess-Ergebnisse des UV-Detektors (254 nm).

Wie bei den Untersuchungen zum Abbau von pNCS durch rhASA 1,48 U/ml (s. Kap. 3.6.2.1, Abb. 42a) lässt sich auch hier kein Umsatz des Substrates (Ascorbylsulfat) durch rhASA 1,48 U/ml nachweisen (s. Abb. 48a).

Ergebnisse

Ergebnisse der Inkubation mit rhASA 14,8 U/ml

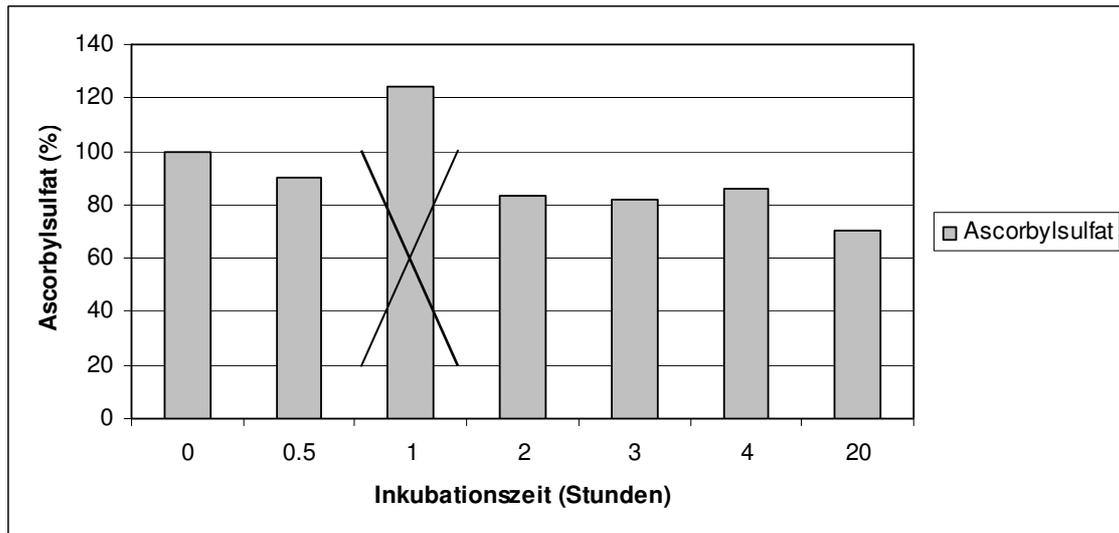


Abbildung 48b: Abbau von 10^{-5} Molen/Ansatz Ascorbylsulfat (10 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l mit 10 μ l **rhASA 14,8 U/ml** bei 37°C nach 0-20-stündiger Inkubation. Zum Zeitpunkt 0 wurden 200 μ l (von insgesamt 1050 μ l Reaktionsansatz) entnommen und 10 μ l rhASA 14,8 U/ml zugefügt. Für die Messung mit der Isotachophorese wurden jeweils 30 μ l der Proben mit 120 μ l Aqua bidest verdünnt. Mess-Ergebnisse des UV-Detektors (254 nm)

X = Messfehler

Abbildung 48b zeigt, dass bei Verwendung von rhASA 14,8 U/ml eine Abnahme der Ascorbylsulfatkonzentration auf ca. 70,3% ($7,03 \times 10^{-6}$ Mole) gemessen werden konnte.

Die dazu erhaltenen Isotachogramme sind exemplarisch für die Zeitpunkte nach 0 und 20 Stunden Inkubation in den Abbildungen 49a-d gezeigt.

Ergebnisse

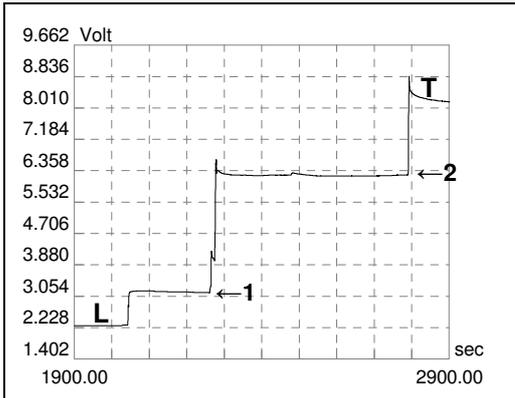


Abbildung 49a: Isotachogramm der Inkubation von Ascorbysulfat mit rhASA 14,8 U/ml bei 37 °C; Leitfähigkeitssignal nach 0 Stunden Inkubation

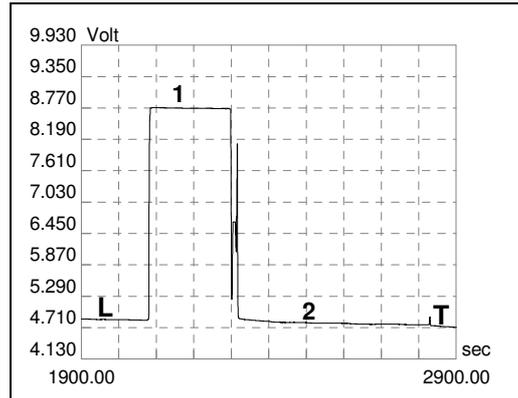


Abbildung 49b: Isotachogramm der Inkubation von Ascorbysulfat mit rhASA 14,8 U/ml bei 37 °C; UV-Signal (254 nm) nach 0 Stunden Inkubation

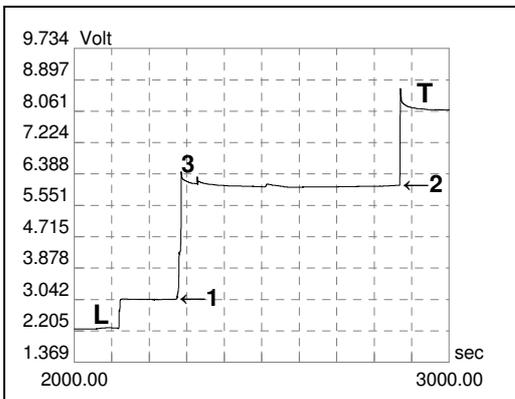


Abbildung 49c: Isotachogramm der Inkubation von Ascorbysulfat mit rhASA 14,8 U/ml bei 37 °C; Leitfähigkeitssignal nach 20 Stunden Inkubation

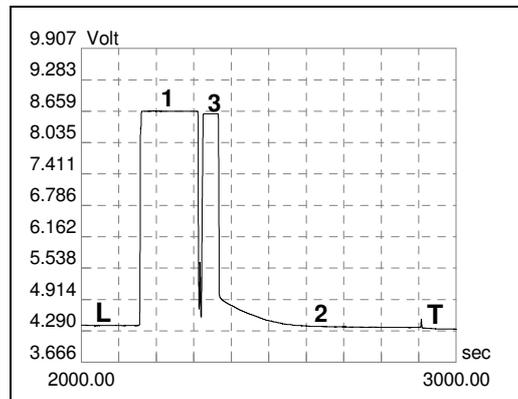


Abbildung 49d: Isotachogramm der Inkubation von Ascorbysulfat mit rhASA 14,8 U/ml bei 37 °C; UV-Signal (254 nm) nach 20 Stunden Inkubation

Abbildungen 49a-d: Abbau von 10^{-5} Molen/Ansatz Ascorbysulfat (10 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, MgCl₂ 5 mmol/l mit 10 µl rhASA 14,8 U/ml nach 0-20 Stunden Inkubation bei 37 °C. Zum Zeitpunkt 0 wurden 200 µl (von insgesamt 1050 µl Reaktionsansatz) entnommen und 10 µl rhASA 14,8 U/ml zugefügt. Für die Messung mit der Isotachophorese wurden jeweils 30 µl der Proben mit 120 µl Aqua bidest verdünnt. Isotachogramme nach der Messung mit dem Leitfähigkeitsdetektor und UV-Detektor nach 0 und 20 Stunden Inkubation.

L = Leitelektrolyt; T = Endelektrolyt; 1 = Ascorbysulfat; 2 = Na-acetatpuffer; 3 = Ascorbat

Ergebnisse

Wie aus den Abbildungen 48b und 49a-d zu entnehmen ist, kam es im Gegensatz zum Ansatz mit rhASA 1,48 U/ml (s. Abb. 48a), wo wie bei den Untersuchungen zum Abbau von pNCS durch rhASA 1,48 U/ml kein Umsatz nachweisbar war (s. Kap. 3.6.2.1, Abb. 42a), durch die 20-stündige Inkubation mit rhASA 14,8 U/ml zu einer Abnahme von Ascorbylsulfat auf 70,3%, wodurch 29,7% Ascorbat (2,97 mmol/l) entstanden. Der tatsächliche Ascorbatwert beträgt hier aber nur 18,5% (1,85 mmol/l, s. Kap. 3.6.2.2.1, Abb. 45), woraus geschlossen werden kann, dass das gebildete Ascorbat teilweise bereits oxidierte und daher nicht mehr mit Hilfe der ITP erfasst werden konnte.

Um den Abbau von Ascorbylsulfat durch rhASA optimal mittels Isotachophorese nachweisen zu können, wurde nochmals Ascorbylsulfat in einer anderen Konzentration, nämlich 4,76 mmol/l, mit der doppelten Menge an rhASA (20 μ l rhASA 14,8 U/ml, s. Kap. 2.2.6.2.4) bei 37°C inkubiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 50 gezeigt.

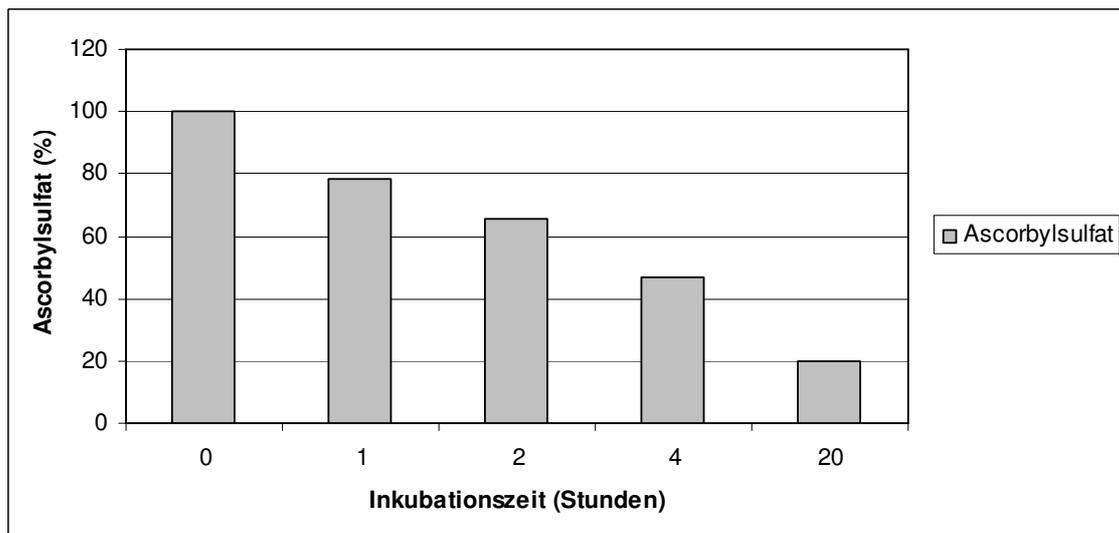


Abbildung 50: Abbau von $2,5 \times 10^{-6}$ Molen/Ansatz Ascorbylsulfat (4,76 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l mit 20 μ l **rhASA 14,8 U/ml** bei 37°C. Zum Zeitpunkt 0 wurden 50 μ l (von insgesamt 512,5 μ l Reaktionsansatz) entnommen und 20 μ l rhASA 14,8 U/ml zugefügt. Für die Messung mit der Isotachophorese wurden jeweils 30 μ l der Proben mit 120 μ l Aqua bidest verdünnt. Mess-Ergebnisse des UV-Detektors (254 nm).

Ergebnisse

Bereits nach 1 Stunde zeigte sich eine Abnahme von Ascorbylsulfat auf 78,4% (s. Abb. 50), nach 2 Stunden auf 65,8%, und nach 4 Stunden auf 47,1%. Nach 20 Stunden Inkubation bei 37°C waren nur noch 19,8% der im Reaktionsansatz zum Zeitpunkt 0 vorhandenen Menge an Ascorbylsulfat nachweisbar. Insgesamt wurden somit innerhalb von 20 Stunden rund $2,0 \times 10^{-6}$ Mole Ascorbylsulfat abgebaut.

3.6.2.3 Abbau einer Mischung von pNCS und Ascorbylsulfat durch rhASA (14,8 U/ml) bei 37°C

Ziel dieses Versuchs war es, den Abbau einer Mischung von pNCS und Ascorbylsulfat durch rhASA 14,8 U/ml bei 37°C zu untersuchen und zu vergleichen. Die Versuche wurden wie in Kapitel 2.2.6.2.5 beschrieben durchgeführt. Abbildung 51 zeigt das Ergebnis, die Abbildungen 52a-d die dazugehörigen Isotachogramme nach 0 und 20 Stunden Inkubationszeit.

Ergebnisse

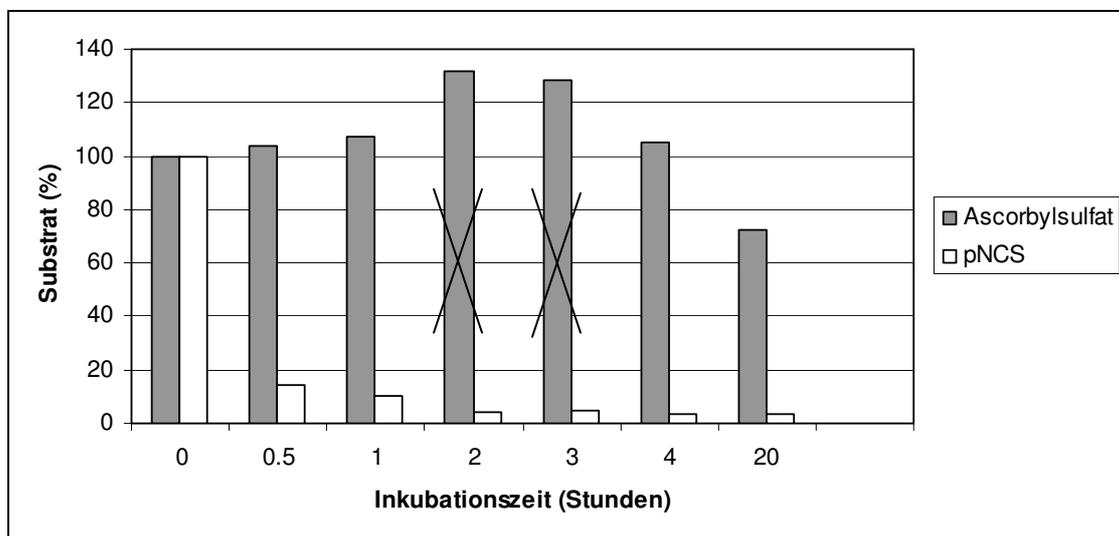


Abbildung 51: Zeitlicher Verlauf des Abbaus einer Mischung von je $2,5 \times 10^{-6}$ Molen/Ansatz pNCS und Ascorbylsulfat (je 4,76 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, MgCl₂ 5 mmol/l mit 20 µl rhASA 14,8 U/ml bei 37°C. Zum Zeitpunkt 0 wurden 50 µl (von insgesamt 525 µl Reaktionsansatz) entnommen und 20 µl rhASA 14,8 U/ml zugefügt. Für die Messung mit der Isotachophorese wurden jeweils 30 µl der Proben mit 120 µl Aqua bidest verdünnt. Mess-Ergebnisse des UV-Detektors (254 nm). X = Messfehler

Ergebnisse

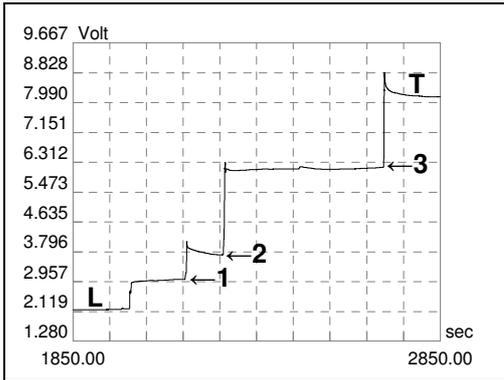


Abbildung 52a: Leitfähigkeitssignal der Inkubation von pNCS und Ascorbylsulfat mit rhASA 14,8 U/ml nach 0 Stunden

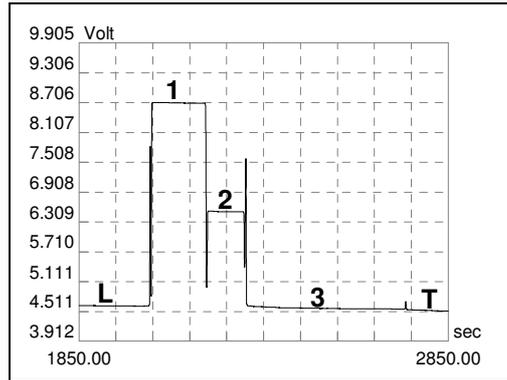


Abbildung 52b: UV-Signal (254 nm) der Inkubation von pNCS und Ascorbylsulfat mit rhASA 14,8 U/ml nach 0 Stunden

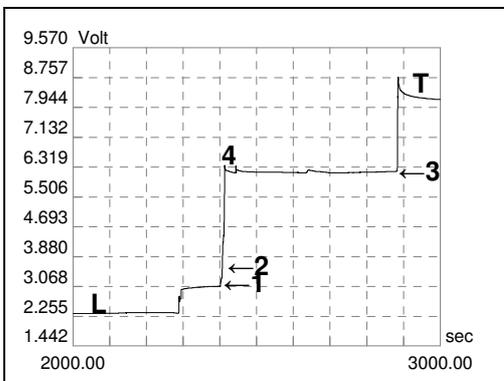


Abbildung 52c: Leitfähigkeitssignal der Inkubation von pNCS und Ascorbylsulfat mit rhASA 14,8 U/ml nach 20 Stunden

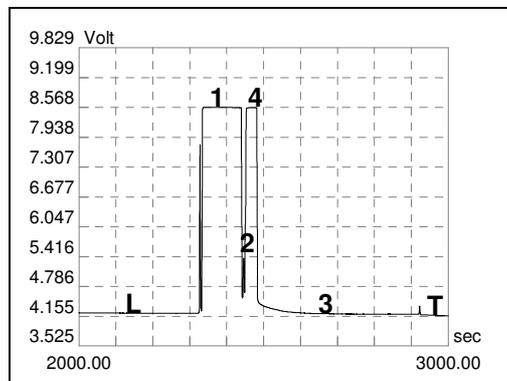


Abbildung 52d: UV-Signal (254 nm) der Inkubation von pNCS und Ascorbylsulfat mit rhASA 14,8 U/ml nach 20 Stunden

Abbildungen 52a-d: Isotachogramme des Abbaus einer Mischung von $2,5 \times 10^{-6}$ Molen/Ansatz pNCS und Ascorbylsulfat (je 4,76 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, MgCl₂ 5 mmol/l mit 20 µl rhASA 14,8 U/ml bei 37°C. Zum Zeitpunkt 0 wurden 50 µl (von insgesamt 525 µl Reaktionsansatz) entnommen und 20 µl rhASA 14,8 U/ml zugefügt. Für die Messung mit der Isotachophorese wurden jeweils 30 µl der Proben mit 120 µl Aqua bidest verdünnt. Isotachogramme nach 0 und 20 Stunden Inkubation.

L = Leitelektrolyt; T = Endelektrolyt; 1 = Ascorbylsulfat; 2 = pNCS; 3 = Na-acetatpuffer; 4 = Ascorbat

Abbildung 51 zeigt deutlich, dass pNCS weitaus schneller als Ascorbylsulfat durch rhASA abgebaut wird. Bereits nach 30 Minuten sind ca. 85,87% pNCS abgebaut worden, während in derselben Zeit scheinbar kein Ascorbylsulfat umgesetzt wurde. Erst nach 20 Stunden konnte auch für Ascorbylsulfat eine

Ergebnisse

Abnahme auf ca. 72,5% ($1,81 \times 10^{-6}$ Mole) nachgewiesen werden, von pNCS waren nach derselben Inkubationszeit nur noch rund 3,2% ($0,08 \times 10^{-6}$ Mole) vorhanden. In den Isotachogrammen der Proben nach 0 und 20 Stunden Inkubation sieht man die Konzentrationsabnahme von Ascorbylsulfat und pNCS sowie die Bildung von Ascorbat, wovon ca. 27,1% (von 27,5%) mittels ITP nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 52a-d).

3.6.2.4 Abbau einer Mischung von pNCS, Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat durch rhASA (14,8 U/ml) bei 37 °C

Hintergrund

In Weiterführung der in Kapitel 3.6.2.3 gezeigten Versuche mit einer Mischung aus pNCS und Ascorbylsulfat, die beide Substrate der rhASA sind, wurde in diesem Versuchsblock, der wie in Kapitel 2.2.6.2.6 beschrieben durchgeführt wurde, zu der Mischung noch Galactose-6-sulfat zugegeben. Aus der Literatur war bekannt, dass Galactose-6-sulfat kein Substrat der ASA ist. Es wurde daher erwartet, dass Galactose-6-sulfat im Gegensatz zu pNCS und Ascorbylsulfat nicht von der rhASA abgebaut wird. Wie aus den Abbildungen 53 und 54a-h ersichtlich, konnte das bestätigt werden.

Ergebnisse

Ergebnisse

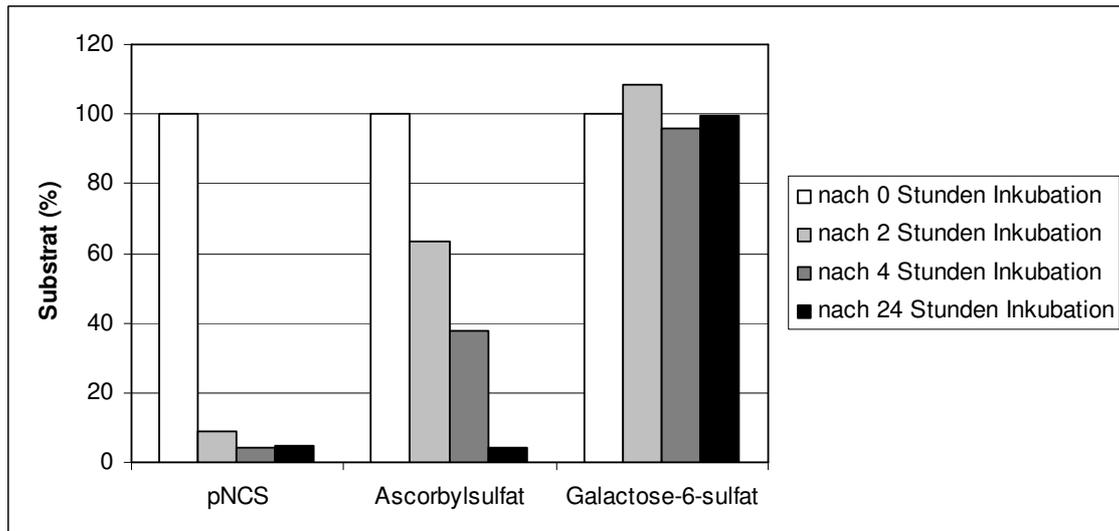


Abbildung 53: Abbau von je $0,5 \times 10^{-6}$ Molen/Ansatz pNCS, Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat (je 1 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l nach Inkubation mit 20 μ l rhASA 14,8 U/ml bei 37°C. Zum Zeitpunkt 0 wurden 50 μ l (von insgesamt 507,5 μ l Reaktionsansatz) entnommen und 20 μ l rhASA 14,8 U/ml zugefügt. Entnahme von je 100 μ l nach 2, 4 und 24 Stunden Inkubation. Für die Messung mit der Isotachophorese wurden jeweils 30 μ l der Proben mit 120 μ l Aqua bidest verdünnt. Mess-Ergebnisse des Leitfähigkeitsdetektors.

Abbildung 53 zeigt wie erwartet den Abbau von pNCS und Ascorbylsulfat durch rhASA 14,8 U/ml, wobei pNCS schneller abgebaut wurde als Ascorbylsulfat und nach 20 Stunden von beiden Substanzen nur noch rund 4% im Reaktionsansatz vorhanden waren. Ein Umsatz von Galactose-6-sulfat konnte nicht nachgewiesen werden.

Die dazugehörigen Isotachogramme sind in den Abbildungen 54a-h gezeigt.

Ergebnisse

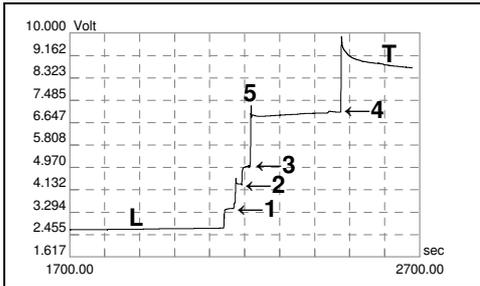


Abbildung 54a: nach 0 Stunden Inkubation

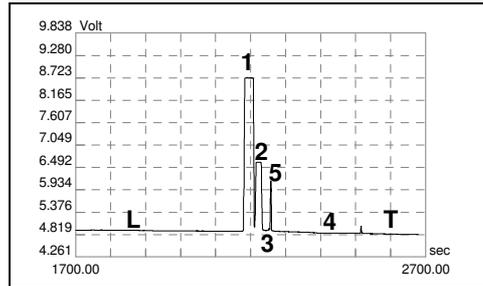


Abbildung 54b: nach 0 Stunden Inkubation

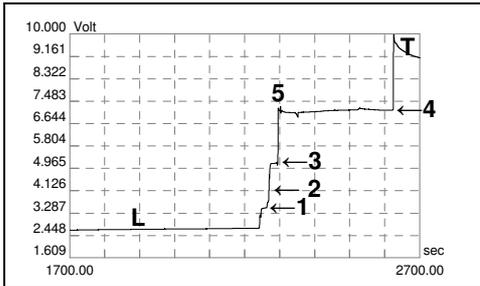


Abbildung 54c: nach 2 Stunden Inkubation

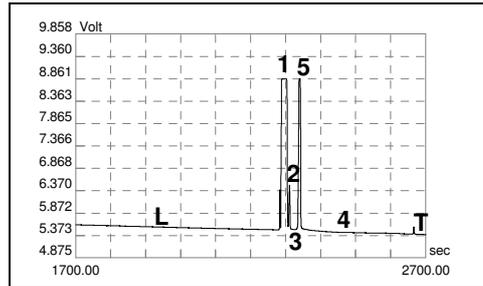


Abbildung 54d: nach 2 Stunden Inkubation

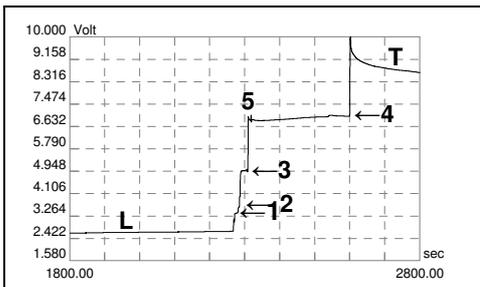


Abbildung 54e: nach 4 Stunden Inkubation

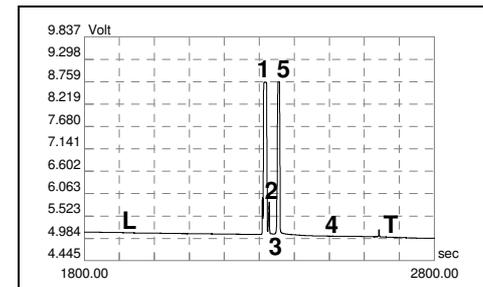


Abbildung 54f: nach 4 Stunden Inkubation

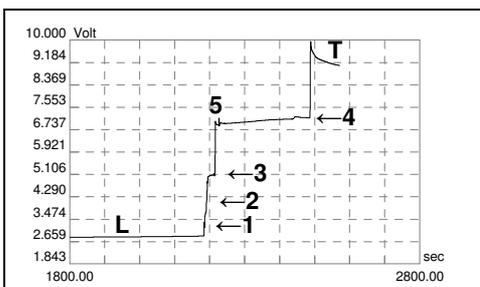


Abbildung 54g: nach 24 Stunden Inkubation

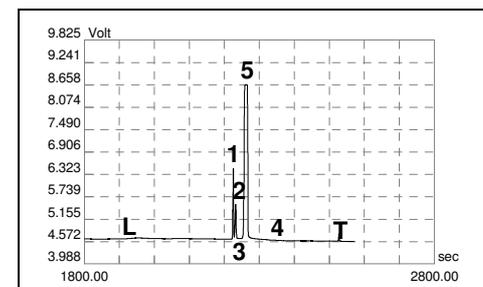


Abbildung 54h: nach 24 Stunden Inkubation

Abbildung 54a-h: Isotachogramme des Abbaus von je $0,5 \times 10^{-6}$ Molen/Ansatz Ascorbilsulfat, pNCS und Galactose-6-sulfat (je 1 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l nach Inkubation mit **rhASA 14,8 U/ml** bei 37 °C.

Abbildungen 54a,c,e,g = Leitfähigkeitssignal; **Abbildungen 54b,d,f,h** = UV-Signal (254 nm)
L = Leitelektrolyt; T = Endelektrolyt; 1 = Ascorbilsulfat; 2 = pNCS; 3 = Galactose-6-sulfat; 4 = Na-acetatpuffer; 5 = Ascorbat

3.6.3 Untersuchungen des Abbaus verschiedener Substrate (Sulfate) durch Leukozytenextrakte

In der Routinediagnostik zur Bestimmung der MLD werden Leukozytenextrakte verwendet. Nachdem im Kapitel 3.6.2. die Wirkung von rhASA auf verschiedene Sulfate (pNCS, Ascorbylsulfat, Galactose-6-sulfat) untersucht wurde, war das Ziel dieser Versuchsreihe, die Wirkung der in den Leukozytenextrakten vorhandenen Sulfatasen (in ihrer Gesamtheit) auf die verschiedenen Sulfate zu charakterisieren. Dabei wurden in den entsprechenden Versuchsreihen immer unterschiedliche Mengen an Extrakten eingesetzt, um die Menge der Leukozytenextrakte herauszufinden, die eingesetzt werden muss, um einen vernünftig messbaren Umsatz zu erzielen. Die hier dargestellten Ergebnisse haben also primär zum Ziel, die qualitativen Unterschiede in Hinblick auf die Substratspezifitäten zwischen der rhASA (positiv für pNCS und Ascorbylsulfat, negativ für Galactose-6-sulfat) und der Sulfatasenmischung in den Leukozytenextrakten zu zeigen.

3.6.3.1 Abbau von pNCS durch Leukozytenextrakte

Von pNCS wurde der Umsatz durch Leukozytenextrakte bereits mittels Photometrie bewiesen (s. Kap. 3.2.2 und 3.2.3). Ziel dieses Versuchs, der wie in Kapitel 2.2.6.2.7 beschrieben durchgeführt wurde, war es nun, die Versuchsbedingungen, d.h. die Konzentration und Menge des Substrates sowie des Leukozytenextrakts, zu optimieren, um auch mit der ITP den Abbau von pNCS durch Leukozytenextrakte nachweisen zu können. Aus diesem Grund wurden 2 Reaktionsansätze mit unterschiedlichen pNCS-Konzentrationen (500 $\mu\text{mol/l}$ und 1 mmol/l) mit derselben Menge an Leukozytenextrakten bei 37°C inkubiert. Abbildung 55 zeigt das Ergebnis.

Ergebnisse

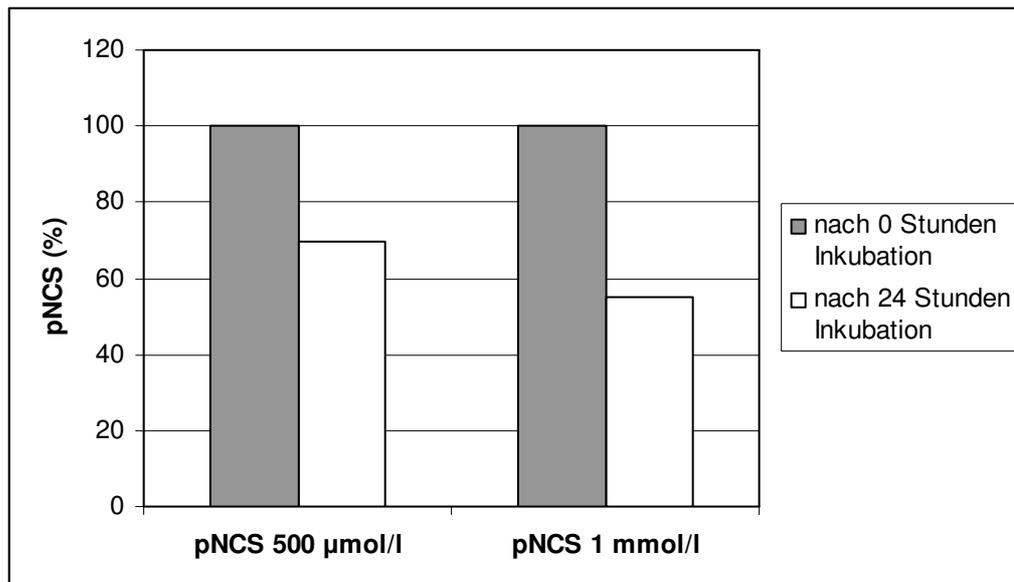


Abbildung 55: Abbau von $0,14 \times 10^{-6}$ Molen/Ansatz pNCS (500 µmol/l) oder $0,28 \times 10^{-6}$ Molen/Ansatz pNCS (1 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, MgCl₂ 5 mmol/l nach Inkubation mit 75 µl Leukozytenextrakt (aus $16,23 \times 10^6$ Leukozyten/75 µl) bei 37°C. Zum Zeitpunkt 0 wurden 100 µl (von insgesamt 200 µl Reaktionsansatz) entnommen. Mess-Ergebnisse des UV-Detektors (254 nm).

Ergebnis

In beiden Reaktionsansätzen (pNCS 500 µmol/l und 1 mmol/l) ist nach 24 Stunden eine Abnahme von pNCS auf $0,10 \times 10^{-6}$ Mole (69,4% beim Ansatz mit pNCS 500 µmol/l) bzw. auf $0,15 \times 10^{-6}$ Mole (54,8% beim Ansatz mit pNCS 1 mmol/l) sichtbar (s. Abb. 55). Die Menge der Leukozytenextrakte ($16,23 \times 10^6$ Leukozyten) reicht demnach aus, um genügend pNCS abzubauen und dessen Umsatz mittels ITP nachzuweisen.

3.6.3.2 Abbau von Ascorbylsulfat durch Leukozytenextrakte

Wie aus der Literatur bekannt ist Ascorbylsulfat ein Substrat der rhASA. Mit dem folgenden Reaktionsansatz, der wie in Kapitel 2.2.6.2.4 beschrieben durchgeführt wurde, sollte der Abbau von Ascorbylsulfat durch Leukozytenextrakte näher untersucht werden. Abbildung 56 zeigt das Ergebnis.

Ergebnisse

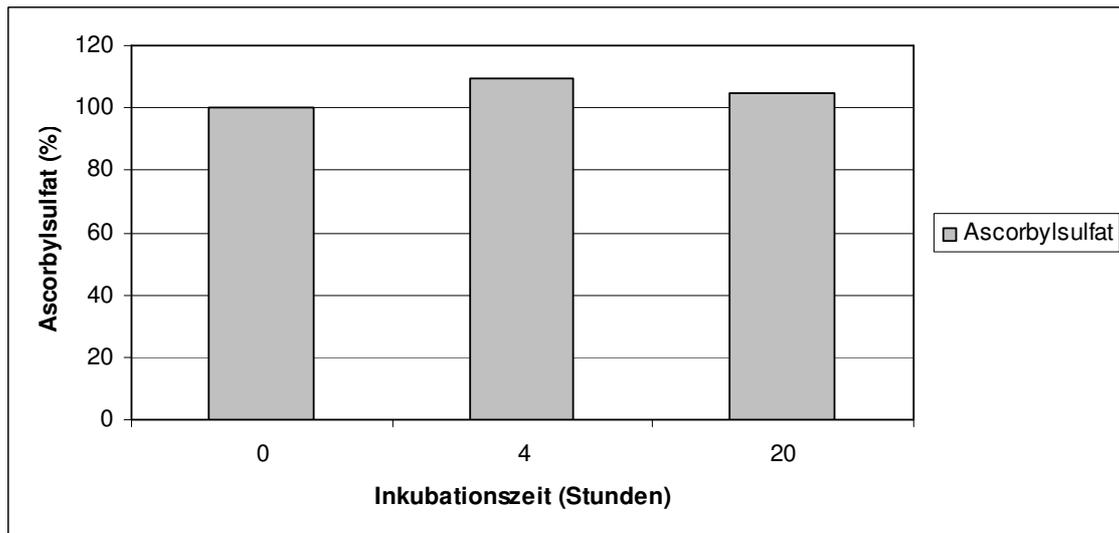


Abbildung 56: Abbau von $2,5 \times 10^{-6}$ Molen/Ansatz Ascorbylsulfat (4,76 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l nach Inkubation mit 50 μ l Leukozytenextrakt (aus $9,02 \times 10^6$ Leukozyten/50 μ l) bei 37°C. Zum Zeitpunkt 0 wurden 100 μ l entnommen (von insgesamt 512,5 μ l Reaktionsansatz). Für die Messung wurden die Proben 1:5 mit Aqua bidest verdünnt. Mess-Ergebnisse des UV-Detektors (254 nm).

Ergebnis

Unter den gewählten Reaktionsbedingungen ist auch nach 20 Stunden kein Abbau von Ascorbylsulfat mit Hilfe der Isotachophorese sichtbar (s. Abb. 56). Es ist anzunehmen, dass der Umsatz mit dieser Leukozytenanzahl ($9,02 \times 10^6$ Leukozyten) nicht ausreicht, um in der Isotachophorese gemessen werden zu können.

3.6.3.3 Abbau einer Mischung von pNCS und Galactose-6-sulfat durch Leukozytenextrakte

Wie bereits bekannt ist, wird Galactose-6-sulfat nicht von der rhASA umgesetzt (s. Kap. 3.6.2.4). Mit diesem Versuch wurde der Abbau einer Mischung von pNCS und Galactose-6-sulfat durch Leukozytenextrakte untersucht. Der Reaktionsansatz wurde dabei wie in Kapitel 2.2.6.2.8 beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis ist in den Abbildungen 57 und 58a-d zu sehen.

Ergebnisse

Ergebnisse

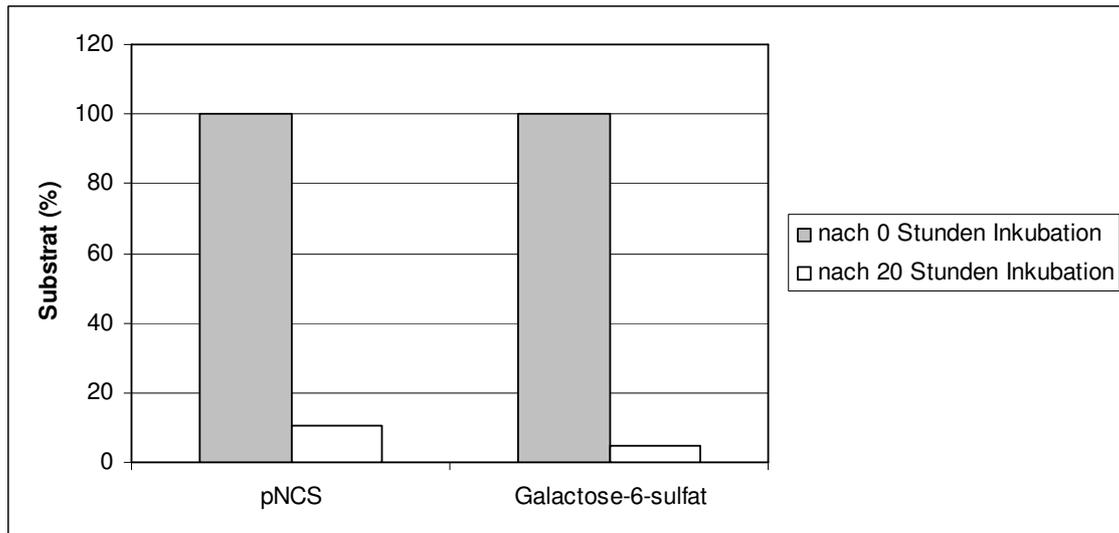


Abbildung 57: Abbau von je $0,4 \times 10^{-6}$ Molen/Ansatz pNCS und Galactose-6-sulfat (je 2 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l nach Inkubation mit Leukozytenextrakt (aus $44,9 \times 10^6$ Leukozyten/50 μ l) bei 37°C. Zum Zeitpunkt 0 wurden 100 μ l (von insgesamt 194 μ l Reaktionsansatz) entnommen. Für die Messung wurden die Proben 1:5 mit Aqua bidest verdünnt. Mess-Ergebnisse des Leitfähigkeitsdetektors.

Im Gegensatz zur rhASA, die spezifisch nur bestimmte Substrate umsetzt, sind in Leukozytenextrakten viele andere zusätzliche Sulfatasen, die auch Galactose-6-sulfat abbauen, vorhanden.

Wie erwartet wurden deshalb in diesem Reaktionsansatz sowohl pNCS als auch Galactose-6-sulfat durch Leukozytenextrakte umgesetzt (s. Abb. 57). Nach 20 Stunden waren im Ansatz lediglich 10,3% pNCS ($0,04 \times 10^{-6}$ Mole) und 5,0% Galactose-6-sulfat ($0,02 \times 10^{-6}$ Mole) nachweisbar. In den dazugehörigen Isotachogrammen (s. Abb. 58a-d) ist nach 20 Stunden die Abnahme der Streckenlänge sowohl von pNCS als auch von Galactose-6-sulfat, was den Abbau beider Substrate durch Leukozytenextrakte beweist, sichtbar.

Ergebnisse

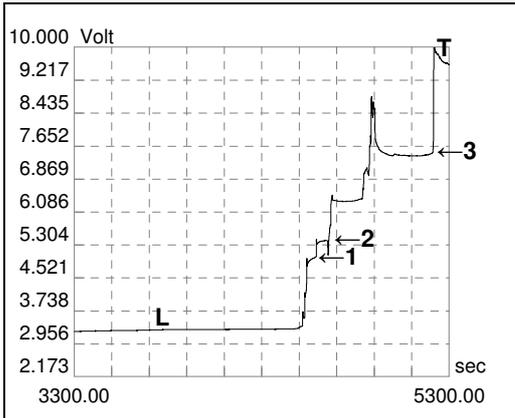


Abbildung 58a: Leitfähigkeitssignal nach 0 Stunden Inkubation

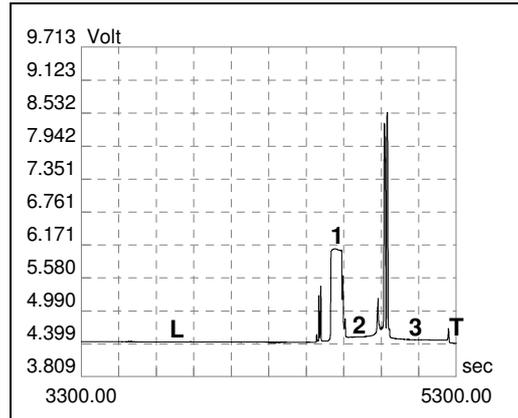


Abbildung 58b: UV-Signal (254 nm) nach 0 Stunden Inkubation

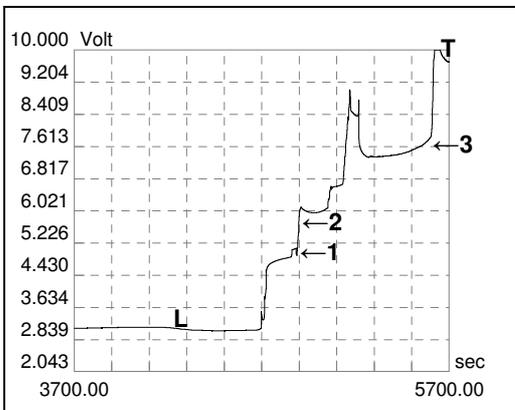


Abbildung 58c: Leitfähigkeitssignal nach 20 Stunden Inkubation

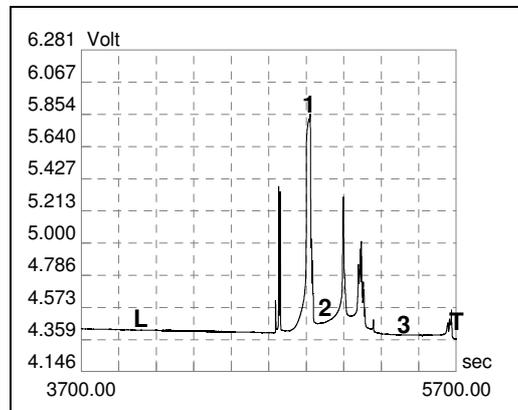


Abbildung 58d: UV-Signal (254 nm) nach 20 Stunden Inkubation

Abbildungen 58a-d: Isotachogramme des Abbaus von je $0,4 \times 10^{-6}$ Molen/Ansatz pNCS und Galactose-6-sulfat (je 2 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l nach 0-20-stündiger Inkubation mit Leukozytenextrakt (aus $44,9 \times 10^6$ Leukozyten/50 μ l) bei 37°C. Zum Zeitpunkt 0 wurden 100 μ l (von insgesamt 194 μ l Reaktionsansatz) entnommen.

L = Leitelektrolyt; T = Endelektrolyt; 1 = pNCS; 2 = Galactose-6-sulfat; 3 = Na-acetatpuffer

3.6.3.4 Abbau einer Mischung aus Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat durch Leukozytenextrakte und Granulozytenextrakte

In den bisherigen Versuchsansätzen wurde der Abbau verschiedener Substrate durch rhASA oder Leukozytenextrakte untersucht. Mit dem folgenden Reaktionsansatz wurde der Umsatz einer Mischung aus Ascorbylsulfat und

Ergebnisse

Galactose-6-sulfat durch Leukozytenextrakte oder Granulozytenextrakte miteinander verglichen. Die Versuche wurden wie in Kapitel 2.2.6.2.9 beschrieben durchgeführt.

Abbildung 59 zeigt das Ergebnis der Inkubation mit Leukozytenextrakten, Abbildung 60 das Ergebnis der Inkubation mit Granulozytenextrakten.

Ergebnisse

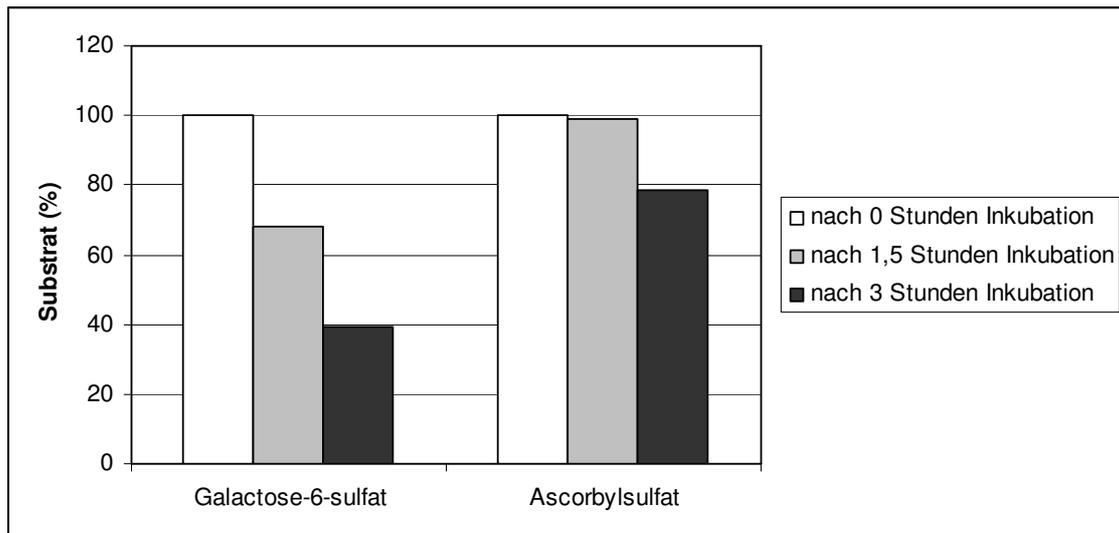


Abbildung 59: Abbau von je 10^{-6} Molen/Ansatz Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat (je 2 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l nach Inkubation mit Leukozytenextrakt (aus $80,71 \times 10^6$ Leukozyten/117 μ l) bei 37°C. Zu den Zeitpunkten 0, 1,5 und 3 Stunden wurden je 100 μ l (von insgesamt 477 μ l Reaktionsansatz) entnommen. Für die Messung wurden die Proben 1:5 mit Aqua bidest verdünnt und zur Berechnung des Umsatzes die Messergebnisse des Leitfähigkeitsdetektors benutzt.

Ergebnisse

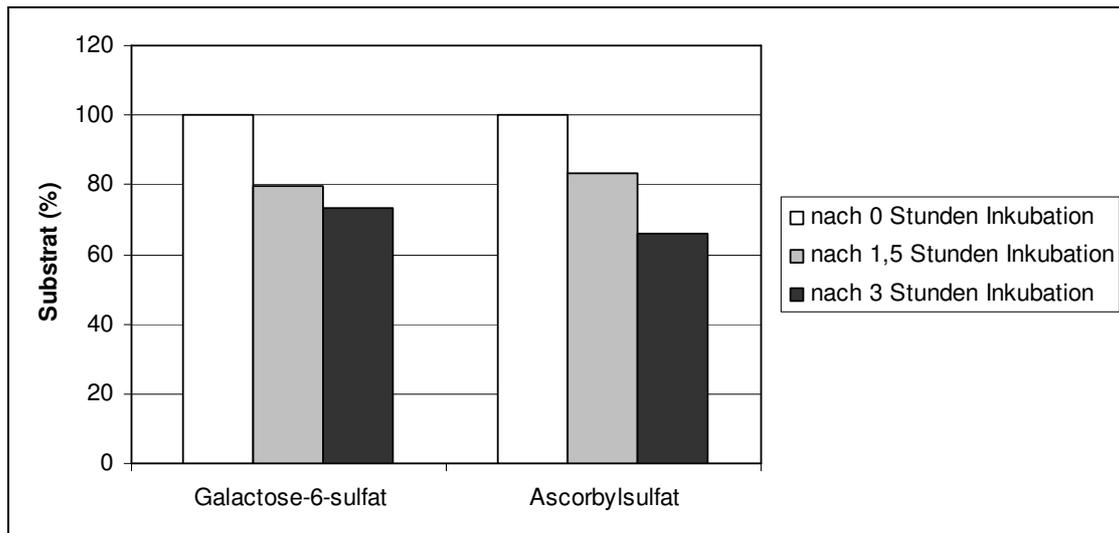


Abbildung 60: Abbau von von je 10^{-6} Molen/Ansatz Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat (je 2 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l nach Inkubation mit Granulozytenextrakt (aus $2,39 \times 10^8$ Granulozyten/117 μ l) bei 37°C. Zu den Zeitpunkten 0, 1,5 und 3 Stunden wurden je 100 μ l (von insgesamt 477 μ l Reaktionsansatz) entnommen. Für die Messung wurden die Proben 1:5 mit Aqua bidest verdünnt und zur Berechnung des Umsatzes die Messergebnisse des Leitfähigkeitsdetektors benutzt.

Sowohl durch Leukozyten- als auch durch Granulozytenextrakte ist ein Abbau beider Substrate sichtbar (s. Abb. 59, 60).

Durch Leukozytenextrakte zeigt sich eine Abnahme von Galactose-6-sulfat auf 68,0% nach 1,5 Stunden und 39,3% nach 3 Stunden Inkubation und von Ascorbylsulfat auf 78,5% nach 3 Stunden (99,2% nach 1,5 Stunden). Demgegenüber wird Galactose-6-sulfat durch Granulozytenextrakte in derselben Zeit weniger gut abgebaut (79,4% nach 1,5 Stunden bzw. 73,2% nach 3 Stunden), wobei der Umsatz von Ascorbylsulfat durch Granulozytenextrakte besser ist (83,6% nach 1,5 Stunden, 66,0% nach 3 Stunden).

3.6.3.5 Abbau einer Mischung aus pNCS, Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat durch Leukozytenextrakte

Wie bekannt wird sowohl pNCS als auch Ascorbylsulfat von der rhASA abgebaut. Galactose-6-sulfat ist demgegenüber kein Substrat der ASA und wird auch durch rhASA nicht umgesetzt.

Im folgenden Reaktionsansatz wurde der Abbau einer Mischung von pNCS, Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat durch Leukozytenextrakte, die viele andere, zusätzliche Sulfatasen nebst ASA enthalten, untersucht. Die Versuche wurden dabei wie in Kapitel 2.2.6.2.6 beschrieben durchgeführt.

Abbildung 61 zeigt das Ergebnis, die Abbildungen 62a-h die dazugehörigen Isotachogramme.

Ergebnisse

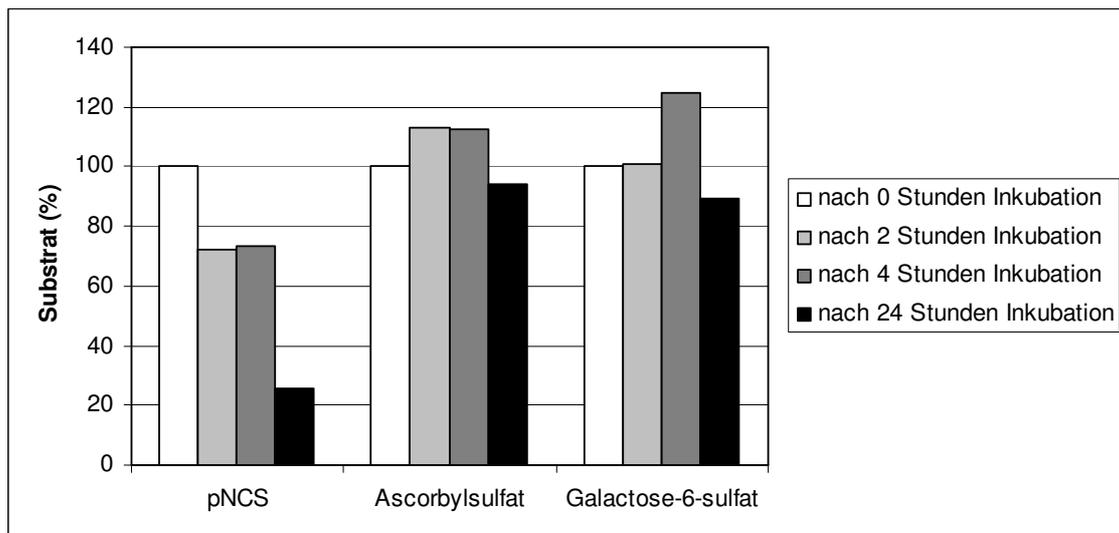


Abbildung 61: Abbau von je $0,5 \times 10^{-6}$ Molen/Ansatz pNCS, Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat (je 0,77 mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5, NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l nach Inkubation mit Leukozytenextrakt (aus $32,46 \times 10^6$ Leukozyten/150 μ l) bei 37°C. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4 und 24 Stunden wurden 100 μ l (von insgesamt 657,5 μ l Reaktionsansatz) entnommen. Für die Messung wurden die Proben 1:5 mit Aqua bidest verdünnt. Umsatzberechnung anhand der Messergebnisse des Leitfähigkeitsdetektors.

Ergebnisse

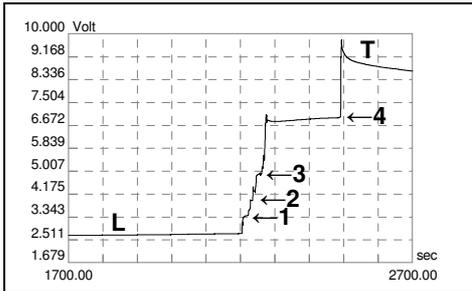


Abbildung 62a: nach 0 Stunden Inkubation

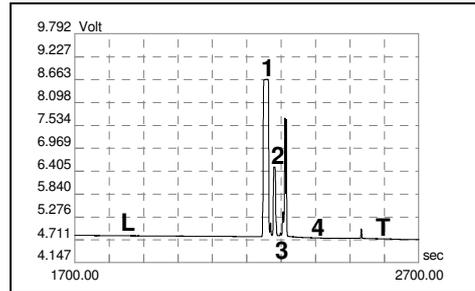


Abbildung 62b: nach 0 Stunden Inkubation

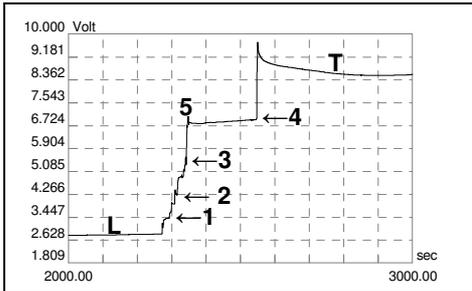


Abbildung 62c: nach 2 Stunden Inkubation

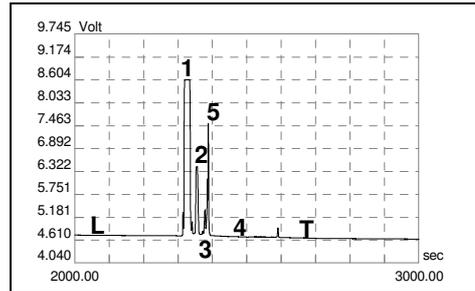


Abbildung 62d: nach 2 Stunden Inkubation

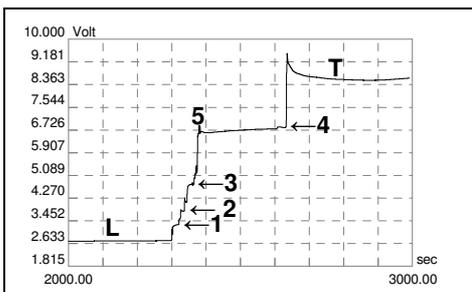


Abbildung 62e: nach 4 Stunden Inkubation

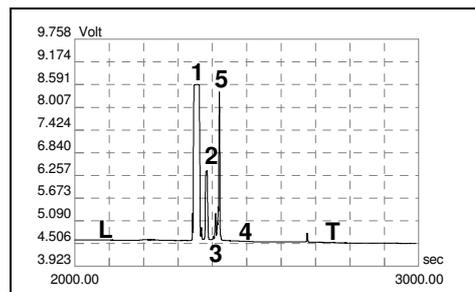


Abbildung 62f: nach 4 Stunden Inkubation

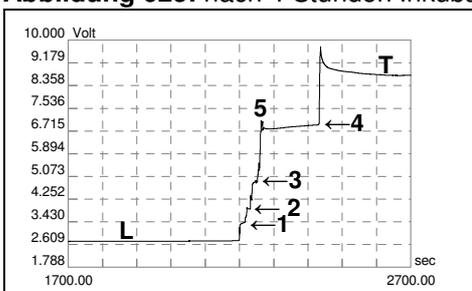


Abbildung 62g: nach 24 Stunden Inkubation

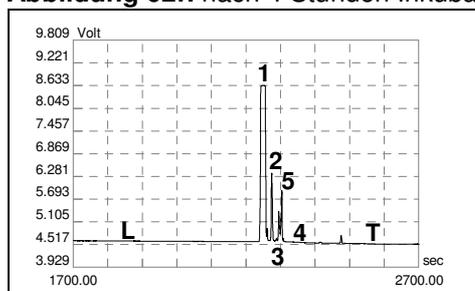


Abbildung 62h: nach 24 Stunden Inkubation

Abbildung 62a-h: Isotachogramme der Inkubation von je $0,5 \times 10^{-6}$ Molen/Ansatz pNCS, Ascorbilsulfat und Galactose-6-sulfat (je $0,77$ mmol/l) gelöst in 10 mmol/l Na-acetatpuffer pH 5 , NaCl 8 mmol/l, $MgCl_2$ 5 mmol/l mit Leukozytenextrakt (aus $32,46 \times 10^6$ Leukozyten/150 μ l) bei $37^\circ C$. Zum Zeitpunkt 0 wurden 100 μ l (von insgesamt $657,5$ μ l Reaktionsansatz) entnommen. Für die Messung wurden die Proben $1:5$ mit Aqua bidest verdünnt.

Abbildungen 62a,c,e,g = Leitfähigkeitssignal; **Abbildungen 62b,d,f,h** = UV-Signal (254 nm); L = Leitelektrolyt; T = Endelektrolyt; 1 = Ascorbilsulfat; 2 = pNCS; 3 = Galactose-6-sulfat; 4 = Na-acetatpuffer; 5 = Ascorbat

Ergebnisse

Es konnte sowohl der Abbau aller drei Substrate (pNCS, Ascorbylsulfat, Galactose-6-sulfat) nachgewiesen (s. Abb. 61) als auch die Bildung von Ascorbat (durch den Umsatz von Ascorbylsulfat) beobachtet werden, wobei bis 4 Stunden nach Inkubationsbeginn ein Konzentrationsanstieg von Ascorbat sichtbar war (s. Abb. 62a-h). Wie bisher beobachtet wurde pNCS am besten abgebaut: nach 24 Stunden konnten nur noch 25,8% ($0,13 \times 10^{-6}$ Mole) pNCS mittels ITP nachgewiesen werden, während Galactose-6-sulfat noch zu 89,3% ($0,45 \times 10^{-6}$ Mole), Ascorbylsulfat zu 94,4% ($0,47 \times 10^{-6}$ Mole) in der Probe vorhanden waren.

4 Diskussion

4.1 Photometrische Untersuchungen der ASA (Leukozytenextrakte und rhASA)

Die Messung der ASA-Aktivität mit Hilfe photometrischer Verfahren gehört zu den Standarduntersuchungen in der Diagnostik der MLD. Bei der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode benutzt, um die rhASA näher zu charakterisieren, d.h. ihre Aktivität anhand des Umsatzes des künstlichen Substrats pNCS unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen (Enzymkonzentration, Inkubationstemperatur, -zeit und -zusätze) zu untersuchen und mit der Aktivität der Sulfatasen in Leukozytenextrakten zu vergleichen. Dazu wurde eine Eichkurve für das Reaktionsprodukt p-Nitrocatechol angefertigt (s. Kap. 3.2.1, Abb. 23), mit deren Hilfe der Substrat-Umsatz im linearen Bereich, d.h. bei 514 nm bis zu einer Extinktion von ca. 3, berechnet werden konnte, was der Bildung von etwa $1,2 \times 10^{-7}$ Molen p-Nitrocatechol entspricht. Der Substrat-Umsatz durch Leukozytenextrakte kann entweder auf die Leukozytenzahl oder auf die Proteinmenge bezogen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Substrat-Abbau auf die in der Probe vorhandene Leukozytenzahl bezogen. Die Proteinbestimmung von Rinderserumalbumin und Hämoglobin der mittels Dextran sedimentation isolierten Leukozyten zeigte jedoch, dass trotz der Kontamination mit Erythrozyten (s. Kap. 3.1.1) sich unabhängig vom Bezugsprotein fast die gleiche Menge an Proteinen errechnet (s. Kap. 3.1.3), so dass hier die Berechnung des Substrat-Umsatzes bezogen auf die Proteinmenge auch möglich wäre.

Wie erwartet stieg der Substrat-Umsatz mit zunehmender Inkubationszeit an, wobei der Abbau gleichzeitig an Geschwindigkeit (Umsatz pro Zeit) abnahm. Dabei wurde bei Verwendung von 0,148 U/ml rhASA nach 1-stündiger Inkubation bei 37°C etwa der Umsatz erzielt, der einer ASA-Aktivität eines Extraktes von 49×10^4 Leukozyten nach 48-stündiger Inkubation bei 4°C entspricht ($0,24 \times 10^{-7}$ Mole vs. $0,23 \times 10^{-7}$ Mole, s. Kap. 3.2.1-3.2.4).

Bei den Ansätzen, die mit rhASA und verschiedenen Zusätzen (Aqua bidest, Enzymextrakt aus Leukozyten, humanes Serumalbumin, Serum bzw. Plasma) inkubiert wurden, wurde der höchste Umsatz in der Probe mit Zugabe von Enzymextrakt aus Leukozyten – nach Abzug der endogenen Aktivität - beobachtet. Die Steigerung der rhASA-Aktivität ist wahrscheinlich durch verschiedene Cofaktoren bedingt, die in Leukozytenextrakten vorhanden sind. Unter Zugabe von humanem Serumalbumin war die rhASA-Aktivität grösser als unter Zusatz von Aqua bidest, was darauf deutet, dass Serumalbumin ebenfalls den pNCS-Abbau durch rhASA begünstigt (s. Kap. 3.3.1.1-3.3.1.3). Ohne rhASA fand kein Abbau von pNCS statt, was belegt, dass im verwendeten Serumalbumin keine Kontaminationen mit Sulfatasen vorhanden waren. Der Einfluss von Serum bzw. Heparinplasma führte zu einer ähnlichen Steigerung der rhASA-Aktivität im Vergleich zu den Ansätzen mit nur Aqua bidest (s. Kap. 3.3.2.1 und 3.3.2.2).

4.2 Verfolgung des Umsatzes von 3-Sulfo-Galactocerebroside zu Galactocerebroside durch rhASA mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie

Raghavan et al. [1981] entwickelten ein dünnschichtchromatographisches Verfahren, um den Abbau des natürlichen Substrats der ASA, 3-Sulfo-Galactocerebroside, in Leukozyten zu messen und mit dem sie sowohl Patienten mit MLD als auch heterozygote Träger eines MLD-Allels und gesunde Probanden unterscheiden konnten. Sie inkubierten dazu 90-120 µg Protein von mittels Dextranedimentation isolierten Leukozyten mit 70 nmol radioaktiv-markiertem Sulfatid gelöst in 200 µl 25 mmol/l Na-acetatpuffer, pH 5,0, 5 mmol/l MnCl₂ und 0,3% Na-Taurodeoxycholat während 2 Stunden und stoppten dann die Reaktion durch 1 ml Methanol. Dabei zeigten sich folgende Reaktionseigenschaften:

Diskussion

- pH-Optimum bei 5,0
- Abbau von Sulfatid nur möglich unter Zugabe von Na-Taurodeoxycholat; maximale Hydrolyse bei einer Endkonzentration von 0,3% Na-Taurodeoxycholat
- Gesteigerte Hydrolyse unter Zugabe von Metall-Ionen; grösster Effekt bei MnCl_2 5 mmol/l

Um den Umsatz von nicht-radioaktiv-markiertem Sulfatid durch rhASA mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie zu untersuchen, wurden die Inkubationsbedingungen von Raghavan et al. [1981] etwas modifiziert übernommen. Im Dünnschichtchromatogramm liessen sich Sulfatid und Galactocerebrosid gut unterscheiden, und es konnte sichergestellt werden, dass sich sowohl Sulfatid als auch Galactocerebrosid, die beide amphiphil sind, in der lipophilen Phase, die jeweils aufgetragen wurde, lösen.

Der Abbau von Sulfatid durch rhASA kann mit dieser Methode nachgewiesen werden, wobei allerdings keine genaue quantitative Berechnung des Substrat-Umsatzes möglich ist. Bei den durchgeführten Versuchen konnte – semi-quantitativ – der höchste Umsatz bei einer Na-acetatpuffer-Konzentration von 25 mmol/l und 0,3% „technischem“ (= nicht hoch gereinigtem) Taurocholat erreicht werden, was mit den Ergebnissen von Raghavan et al. [1981] übereinstimmt. Unter Zugabe von Albuminlösung zusätzlich zum Na-acetatpuffer und Taurocholat konnte der Abbau von Sulfatid ebenso wie unter Zugabe von reinem Taurocholat nicht sicher nachgewiesen werden (s. Kap. 3.5.5, 3.5.6, Abb. 36, 37 und Kap. 3.5.9, Abb. 40).

Es fiel auf, dass sich die verschiedenen Substanzen unter Zugabe von unreinem Taurocholat nur schwer unterscheiden lassen und die Bildung von Galactocerebrosid deshalb zum Teil nur schwer festzustellen ist (s. Kap. 3.5.3-3.5.5, Abb. 34-36). Dies könnte daran liegen, dass Taurocholat in seine Bestandteile aufgetrennt wird und diese dann im Dünnschichtchromatogramm sichtbar sind.

4.3 Untersuchungen mit der Isotachophorese

Die analytische Isotachophorese (ITP) erlaubt die Trennung vor allem niedermolekularer ionischer Substanzen. Aus diesem Grund wurde diese Methode in der vorliegenden Arbeit dazu verwendet, den Abbau verschiedener Substrate (pNCS, Ascorbylsulfat, Galactose-6-sulfat) durch rhASA oder Leukozytenextrakte nachzuweisen bzw. die Substratspezifität von rhASA und Leukozytenextrakten zu bestimmen und dadurch verschiedene Enzymdefekte zu unterscheiden. Ausserdem wurde der Abbau von Galactose-6-sulfat und Ascorbylsulfat durch Leukozyten- und Granulozytenextrakte miteinander verglichen. Mittels Photometrie konnte sichergestellt werden, dass pNCS durch rhASA und Leukozytenextrakte auch unter den Inkubationsbedingungen, die für die Messung an der ITP nötig sind, abgebaut wird (s. Kap. 3.6.1). Es zeigte sich allerdings, dass für die Untersuchung an der ITP eine Mindestmenge an Substrat (ca. >5%) umgesetzt werden muss, um den Abbau sicher detektieren zu können (s. Kap. 3.6.2.1 und 3.6.2.2.3). Dies ist darauf zurückzuführen, dass in dem gewählten ITP-System die Substrate, nicht jedoch die entstehenden Produkte nachgewiesen werden: Galactose und p-Nitrocatechol sind in den Isotachogrammen als ungeladene Moleküle nicht bestimmbar, Ascorbat autoxydiert sehr leicht und eignet sich wegen der dadurch bedingten Konzentrationsabnahme nicht gut zum Umsatz-Nachweis mittels ITP (s. Kap. 3.6.2.2.2). Das durch die Sulfatasen abgespaltene Sulfat ist zwar in der ITP nachweisbar, wegen seiner Mobilität, die sich nur unwesentlich von der des Chlorides im Leitelektrolyt unterscheidet, ist die Signalzuordnung jedoch sehr erschwert. Um Sulfat mit Hilfe der ITP gut messen zu können, müsste deshalb ein anderes Leit-, Endelektrolytssystem als das hier verwendete (Chlorid/Caprionsäure) gewählt werden. Das System Chlorid/Citrat ist z.B. dazu in der Lage.

Um die Spezifität und Aktivität der rhASA mit Hilfe der ITP zu untersuchen und mit derjenigen von Sulfatasen in Leukozytenextrakten zu vergleichen, müssen Substanzen gewählt werden, die eindeutig einem Signal zugeordnet werden können. So zeigte sich z.B., dass es durch Zugabe von Chondroitindisaccharidsulfat oder Sulfatase aus *Helix pomatia* sehr schwierig

ist, die einzelnen Substrate vor allem mittels Leitfähigkeitsdetektor voneinander zu unterscheiden, weshalb Untersuchungen mit diesen Substanzen nicht weitergeführt wurden. Es wurden schliesslich pNCS, Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat verwendet, um die rhASA näher zu charakterisieren und mit Leukozytenextrakten zu vergleichen. Alle 3 Substrate sind in den Isotachogrammen gut bestimmbar und eignen sich daher für Untersuchungen an der ITP, wobei Galactose-6-sulfat im Gegensatz zu pNCS und Ascorbylsulfat bei 254 nm kein UV-Signal zeigt und deshalb der Abbau mittels Leitfähigkeitsdetektor nachgewiesen werden muss. PNCS wurde sowohl durch rhASA als auch durch Leukozytenextrakte schneller abgebaut als Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat (s. Kap. 3.6.2.3, 3.6.2.4, 3.6.3.3 und 3.6.3.5), durch Leukozytenextrakte wurde Galactose-6-sulfat jedoch etwas besser umgesetzt als Ascorbylsulfat (s. Kap. 3.6.3.4 und 3.6.3.5). Im Vergleich zur Inkubation mit Granulozytenextrakt wurde Galactose-6-sulfat durch Gesamt-Leukozytenextrakt besser, Ascorbylsulfat hingegen weniger gut abgebaut (s. Kap. 3.6.3.4), was dadurch erklärt werden könnte, dass die Aktivität der Sulfatasen nicht in allen Leukozytenfraktionen gleich hoch ist. Die Aussage, dass die Verteilung bestimmter lysosomaler Enzyme (Hexosaminidase, α - und β -Glucosidase, α -Mannosidase, β -Galactosidase, ASA) in den Leukozyten unterschiedlich ist, stimmt mit den Ergebnissen von Nakagawa et. al [1978; 1980] und Strobel [2005] überein.

Wie erwartet wurden pNCS und Ascorbylsulfat durch rhASA und Leukozytenextrakte, Galactose-6-sulfat durch Leukozytenextrakte, aber nicht durch rhASA abgebaut, da in Leukozytenextrakten nebst ASA viele andere Sulfatasen vorhanden sind (s. Kap. 3.6.2.4 und 3.6.3.5). Die Resultate zeigen auch, dass die rhASA die gleiche Substratspezifität wie die natürliche Form aufweist. Die ITP eignet sich also, um Enzymdefekte nachzuweisen. Durch Kombination von in der ITP gut bestimmbar Substraten ist es dabei möglich, verschiedene Sulfatase-Defekte, insbesondere auch den Multiplen Sulfatase-Mangel, schnell zu erkennen. Tabelle 14 zeigt zusammenfassend die in dieser Arbeit verwendeten Substrate und die durch den fehlenden Abbau bedingten Krankheiten.

Diskussion

Tabelle 14: Ausgewählte Substrate von Sulfatasen und durch fehlenden Abbau bedingte Krankheiten

	MLD	MPS IVA	MSD
pNCS	-	+	-
Ascorbylsulfat	-	+	-
Galactose-6-sulfat	+	-	-

+ = Abbau findet statt

- = kein Abbau

MLD = Metachromatische Leukodystrophie (Defekt der ASA)

MPS IVA = Mucopolysaccharidose IVA = Morbus Morquio IVA
(Defekt der Galactose-6-sulfatase)

MSD = Multipler Sulfatase-Mangel (Defekt aller Sulfatasen)

Ein Vorteil der ITP im Vergleich zu anderen Methoden wie z.B. der Photometrie besteht also in der Möglichkeit, den Abbau mehrerer Substrate simultan in einem Reaktionsansatz nachzuweisen und so mehrere Enzymdefekte mit derselben Probe und Messung erkennen zu können. So ist mit den 3 Substraten pNCS, Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat – wie in Tabelle 14 gezeigt - bereits eine Unterscheidung der metachromatischen Leukodystrophie, dem Morbus Morquio IVA und dem multiplen Sulfatase-Mangel möglich. Die Messung weiterer Sulfatase-Aktivitäten mittels der ITP ist möglich, sofern die zu verwendenden Substrate geladene Moleküle (Anionen) mit hydrophilem Charakter sind. In Tabelle 15 sind verschiedene Sulfatasen mit ihren möglichen Substraten zusammengefasst, wobei diejenigen, die grundsätzlich für isotachophoretische Bestimmungen geeignet sind, markiert hervorgehoben wurden.

Diskussion

Tabelle 15: Übersicht der verschiedenen Sulfatasen, ihrer Substrate und der durch einen Defekt verursachten Krankheiten (modifiziert nach: Hanson et al., 2004; Buono et Cosma, 2010)

Sulfatase	Lokalisation	Sekretion	Substrat	Krankheit
Arylsulfatase A (ASA)	Lysosomal	Ja	4MUS* pNCS* Ascorbinsäure-2-sulfat Cerebrosid-3-sulfat Seminolipid-3-sulfat Psychosin-3-sulfat Tyrosin-sulfat	MLD
Arylsulfatase B (ASB) = N-Acetyl-galactosamin-4-sulfatase	Lysosomal	Ja	4MUS* GalN4S-(CS/DS) Tyrosin-sulfat	MPS VI
Arylsulfatase C (ASC), Isoenzym S (Steroid-Sulfatase)	Mikrosomal	Nein	4MUS* pNPS* Östron-sulfat Pregnenolon-sulfat Cholesterin-sulfat DHEA-sulfat Testosteron-sulfat Vitamin D3-sulfat	X-chromosomale Ichthyose
Arylsulfatase D (ASD)	ER	k. D.	4MUS*	
Arylsulfatase E (ASE)	Golgi Apparat	k. D.	4MUS*	Chondrodysplasia punctata
Arylsulfatase F (ASF)	ER	k. D.	4MUS*	
Arylsulfatase G (ASG)	ER	ja	4MUS*	
Arylsulfatase H (ASH)	k. D.	k. D.	4MUS*	
Arylsulfatase I (ASI)	ER	k. D.	4MUS*	
Arylsulfatase J (ASJ)	ER	k. D.	4MUS*	
Arylsulfatase K (ASK)	k. D.	k. D.	4MUS*	
N-Acetyl-Galactosamin-6-sulfat-sulfatase = Galactose-6-sulfatase	Lysosomal	Ja	4MUS* GalNAc6S-(CS) Gal6S-(KS)	MPS IVA
N-Acetyl-Glucosamin-6-sulfatase	Lysosomal	Ja	4MUS* GlcNAc6S-(HS) GlcNAc6S-(KS) GlcNAc6S	MPS IIID
Iduronat-2-sulfatase	Lysosomal	Ja	4MUS* IdoA2S-(HS)	MPS II
Heparan N-sulfatase = Sulfamidase = N-sulfoglucosamin-sulfohydrolase (SGSH)	Lysosomal	Ja	4MUS* GalNS (HS) GalNS-IdoA2S GalNS	MPS IIIA
Sulfatase 1 (SULF 1)	Zelloberfläche	Ja	4MUS* GlcN6S (endo)	
Sulfatase 2 (SULF 2)	Zelloberfläche	Ja	4MUS* GlcN6S (endo)	

Abkürzungen, Begriffserklärungen: siehe nächste Seite

Diskussion

CS = Chondroitinsulfat
HS = Heparansulfat
KS = Keratansulfat
DHEA = Dehydroepiandrosteron
GalNAc6S = N-acetylgalactosamin-6-sulfat
GalNS = N-Galactosaminsulfat
GalNS = N-Galactosaminsulfat
Gal6S = Galactose-6-sulfat
GlcNAc6S = N-Acetylglucosamin-6-sulfat
GlcN6S = α -N-Glucosamin-6-sulfat
IdoA2S = Iduronsäure-2-sulfat
4MUS = 4-Methylumbelliferonsulfat
pNCS = p-Nitrocatecholsulfat
pNPS = p-Nitrophenolsulfat
MLD = Metachromatische Leukodystrophie
MPS = Mucopolysaccharidose
ER = Endoplasmatisches Reticulum
endo = endosomal
fett markiert = als ITP-Substrate geeignet
* = synthetische Substrate
k. D. = keine Daten vorhanden

Die ITP ist eine exzellente kapillarelektrophoretische Trennmethode, die aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit und der simultanen Messung mehrerer Substanzen eine ideale Methode zur Trennung und Quantifizierung niedermolekularer Ionen darstellt. Der Nachteil der ITP liegt in den relativ langen Analysezeiten (ca. 40 Minuten). Ausserdem sind für die ITP bisher keine automatischen Auftragesysteme im Angebot, so dass die Proben einzeln in das Gerät injiziert werden müssen. Aus diesem Grund wird die ITP relativ selten eingesetzt, obwohl sie sich – wie schon erwähnt - ideal zur Messung niedermolekularer Substanzen und damit auch zum Nachweis von Sulfatase-Defekten und insbesondere zur Unterscheidung verschiedener Sulfatase-Mangelkrankheiten eignet.

5 Zusammenfassung

Die metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine lysosomale Speicherkrankheit, die durch den Funktionsverlust des Enzyms Arylsulfatase A verursacht wird und zur Anreicherung von 3-Sulfo-Galactocerebroside (Sulfatid) in den Geweben, insbesondere in Oligodendrozyten und Schwann-Zellen, führt. Als Therapie der MLD wird neben der Stammzelltransplantation versuchsweise auch die Enzyersatztherapie mit der rekombinanten humanen Arylsulfatase A (rhASA) eingesetzt. Aufgabe dieser Arbeit war es, die Aktivität und Spezifität der rhASA mit Hilfe der analytischen Isotachophorese (ITP) zu untersuchen und mit derjenigen von Sulfatasen in Leukozytenextrakten, die mittels Dextranedimentation gewonnen wurden, zu vergleichen. Dazu wurden zuerst Untersuchungen zum Abbau des künstlichen Substrats p-Nitrocatecholsulfat (pNCS) durch rhASA unter verschiedenen Inkubationsbedingungen mit Hilfe der Photometrie, einem Standardverfahren zur Diagnose von Speicherkrankheiten, durchgeführt und danach der Abbau von Sulfatid durch rhASA anhand der Dünnschichtchromatographie nachgewiesen. Schliesslich wurde der Umsatz verschiedener Substrate durch rhASA und Leukozytenextrakte mit Hilfe der ITP miteinander verglichen und so die Spezifität der rhASA untersucht.

Mit Hilfe der ITP wurde der Umsatz der 3 Substrate pNCS, Ascorbylsulfat und Galactose-6-sulfat durch rhASA und Leukozytenextrakte untersucht. Mit dieser Methode konnte nachgewiesen werden, dass pNCS und Ascorbylsulfat sowohl durch rhASA als auch durch Leukozytenextrakte, Galactose-6-sulfat jedoch nur durch Leukozytenextrakte abgebaut wird, was darauf zurückzuführen ist, dass Galactose-6-sulfat kein Substrat der Arylsulfatase A ist, von anderen Sulfatasen, die in den Leukozytenextrakten vorhanden sind, jedoch sehr wohl umgesetzt wird. Die ITP erlaubt also durch die Auswahl geeigneter Substrate (Sulfate) die Charakterisierung der Aktivität verschiedener Sulfatasen und kann so z.B. durch Verwendung der oben angeführten Substrate in einem einzigen Analysenlauf eine Differenzierung zwischen metachromatischer Leukodystrophie (MLD) und multiplem Sulfatase-Mangel (MSD) ermöglichen, da mit ihr der Abbau mehrerer Substrate simultan verfolgt werden kann.

6 Literaturverzeichnis

Al-Moutaery, K. R.; Choudhury, A. R.; Hassanen, M. O. (1994)
Cervical cord compression and severe hydrocephalus in a child with Saudi
variant of multiple sulfatase deficiency. Report of case
Acta Neurochir. (Wien), 131, 160-163

Alves, D.; Pires, M. M.; Guimaraes, A.; Miranda, M. C. (1986)
Four cases of late onset metachromatic leucodystrophy in a family: clinical,
biochemical and neuropathological studies
J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry, 49, 1417-1422

Alzheimer, A. (1910) ^{*3)}
Beiträge zur Kenntnis der pathologischen Neuroglia und ihrer Beziehungen zu
den Abbauvorgängen im Nervengewebe
Nissl-Alzheimer's Histol. Histopathol. Arb., 3, 401

Amaducci, L.; Sorbi, S.; Piacentini, S.; Bick, K. L. (1991) ^{*3)}
The first Alzheimer disease case: a metachromatic leukodystrophy?
Dev. Neurosci., 13, 186-187

Arvanitis, D.; Dumas, M.; Szuchet, S. (1992)
Myelin palingenesis. 2. Immunocytochemical localization of
myelin/oligodendrocyte glycolipids in multilamellar structures
Dev. Neurosci., 14, 328-335

Bach, G.; Dagan, A.; Herz, B.; Gatt, S. (1987)
Diagnosis of arylsulfatase A deficiency in intact cultured cells using a
fluorescent derivative of cerebroside sulphate
Clin. Genet., 31, 211-217

Balslev, T.; Cortez, M. A.; Blaser, S. I.; Haslam, R. H. (1997) ^{*3)}
Recurrent seizures in metachromatic leukodystrophy
Pediatr. Neurol., 17, 150-154

Baum, H.; Dodgson, K. S.; Spencer, B. (1950)
The assay of arylsulphatases A and B in humane urine
Clin. Chim. Acta, 4, 453

Beratis, N. G.; Aaron, A. M.; Hirschhorn, K. (1973)
Metachromatic leukodystrophy: detection in serum
J. Pediatr., 83, 824-827

Beratis, N. G.; Danesino, C.; Hirschhorn, K. (1975)
Detection of homozygotes and heterozygotes for metachromatic leukodystrophy
in lymphoid cell lines and peripheral leukocytes
Ann. Hum. Genet., 38, 485-493

Literaturverzeichnis

- Berntson, Z. ; Hansson, E. ; Rönnbäck, L. ; Fredman, P. (1998) ^{*1)}
Intracellular sulfatide expression in a subpopulation of astrocytes in primary cultures
J. Neurosci. Res., 52, 559-568
- Bielicki, J.; Hopwood, J. J.; Anson, D. S. (1996)
Correction of Sanfilippo A skin fibroblasts by retroviral vector-mediated gene transfer
Hum. Gene Ther., 7, 1965-1970
- Biffi, A.; Capotondo, A.; Fasano, S.; del Carro, U.; Marchesini, S.; Azuma, H.; Malaguti, M. C.; Amadio, S.; Brambilla, R.; Grompe, M.; Bordignon, C.; Quattrini, A.; Naldini, L. (2006)
Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice
J. Clin. Invest., 116, 3070-3082
- Biffi, A.; De Palma, M.; Quattrini, A.; Del Carro, U.; Amadio, S.; Visigalli, I.; Sessa, M.; Fasano, S.; Brambilla, R.; Marchesini, S.; Bordignon, C.; Naldini, L. (2004)
Correction of metachromatic leukodystrophy in the mouse model by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells
J. Clin. Invest., 113, 1118-1129
- Blanco-Aguirre, M. E.; Kofman-Alfaro, S. H.; Rivera-Vega, M. R.; Medina, C.; Valdes-Flores, M.; Rizzo, W. B.; Cuevas-Covarrubias, S. A. (2001)
Unusual clinical presentation in two cases of multiple sulfatase deficiency
Pediatr. Dermatol., 18, 388-392
- Bond, C. S.; Clements, P. R.; Ashby, S. J.; Collyer, C. A.; Harrop, S. J.; Hopwood, J. J.; Guss, J. M. (1997)
Structure of a human lysosomal sulfatase
Structure, 5, 277-289
- Braun, S. E.; Aronovich, E. L.; Anderson, R. A.; Crotty, P. L.; McIvor, R. S.; Whitley, C. B. (1993)
Metabolic correction and cross-correction of mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome) by retroviral-mediated gene transfer and expression of human iduronate-2-sulfatase
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 11830-11834
- Bredius, R. G.; Laan, L. A.; Lankester, A. C.; Poorthuis, B. J.; van Tol, M. J.; Egeler, R. M.; Arts, W. F. (2007)
Early marrow transplantation in a pre-symptomatic neonate with late infantile metachromatic leukodystrophy does not halt disease progression
Bone Marrow Transplant., 39, 309-310

- Buono, M.; Cosma, M. P. (2010)
Sulfatase activities towards the regulation of cell metabolism and signaling in mammals
Cell. Mol. Life Sci., 67, 769-780
- Burrow, T. A.; Leslie, N. D. (2008)
Review of the use of idursulfase in the treatment of mucopolysaccharidosis II
Biologics, 2, 311-320
- Chang, P. L.; Davidson, R. G. (1983)
Pseudo arylsulfatase-A deficiency in healthy individuals: genetic and biochemical relationship to metachromatic leukodystrophy
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7323-7327
- Chang, P. L.; Rosa, N. E.; Varey, P. A.; Kihara, H.; Kolodny, E. H.; Davidson, R. G. (1984)
Diagnosis of pseudo-arylsulfatase A deficiency with electrophoretic techniques
Pediatr. Res., 18, 1042-1045
- Christomanou, H.; Sandhoff, K. (1977)
A sensitive fluorescence assay for the simultaneous and separate determination of arylsulphatases A and B
Clin. Chim. Acta, 79, 527-531
- Cinque, B.; Di Marzio, L.; Centi, C.; Di Rocco, C.; Riccardi, C.; Cifone, M. G. (2003)
Sphingolipids and the immune system
Pharmacol. Res., 47, 421-437
- Clarke, J. T.; Skomorowski, M. A.; Chang, P. L. (1989)
Marked clinical difference between two sibs affected with juvenile metachromatic leukodystrophy
Am. J. Med. Genet., 33, 10-13
- Cleary, M. A.; Wraith, J. E. (1993)
Management of mucopolysaccharidosis type III
Arch. Dis. Child., 69, 403-406
- Craves, F. B.; Zalc, B.; Leybin, L.; Baumann, N.; and Loh, H. H. (1980)
Antibodies to cerebroside sulfate inhibit the effects of morphine and beta-endorphin
Science, 207, 75-76
- Deeg, K. H.; Reif, R.; Stehr, K.; Hummer, K. P.; Harzer, K. (1986)
Chronic hemorrhagic pancreatitis in gallbladder polyposis as an initial symptom of metachromatic leukodystrophy
Monatsschr. Kinderheilkd., 134, 272-275

Literaturverzeichnis

- Demaerel, P.; Faubert, C.; Wilms, G.; Casaer, P.; Piepgras, U.; Baert, A. L. (1991)
MR findings in leukodystrophy
Neuroradiology, 33, 368-371
- Dhoot, G. K.; Gustafsson, M. K.; Ai, X.; Sun, W.; Standiford, D. M.; Emerson, C. P., Jr. (2001)
Regulation of Wnt signaling and embryo patterning by an extracellular sulfatase
Science, 293, 1663-1666
- Dierks, T.; Schmidt, B.; Borissenko, L. V.; Peng, J.; Preusser, A.; Mariappan, M.; von Figura, K. (2003)
Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme
Cell, 113, 435-444
- Diez-Roux, G.; Ballabio, A. (2005)
Sulfatases and human disease
Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 6, 355-379
- Dionisi-Vici, C.; Rizzo, C.; Burlina, A. B.; Caruso, U.; Sabetta, G.; Uziel, G.; Abeni, D. (2002)
Inborn errors of metabolism in the Italian pediatric population: a national retrospective survey
J. Pediatr., 140, 321-327
- Dörner, K. (2003)
Klinische Chemie und Hämatologie
Thieme-Verlag, 5. Auflage
- Dubois, G.; Harzer, K.; Baumann, N. (1977)
Very low arylsulfatase A and cerebroside sulfatase activities in leukocytes of healthy members of metachromatic leukodystrophy family
Am. J. Hum. Genet., 29, 191-194
- Dubois, G.; Turpin, J. C.; and Baumann, N. (1975) ^{*3)}
Letter: Absence of ASA activity in healthy father of a patient with metachromatic leukodystrophy
N. Engl. J. Med., 293, 302
- Dubois, G.; Turpin, J. C.; Georges, M. C.; Baumann, N. (1980)
Arylsulfatases A and B in leukocytes: a comparative statistical study of late infantile and juvenile forms of metachromatic leukodystrophy and controls
Biomedicine, 33, 2-4
- Eckhardt, M. (2008)
The role and metabolism of sulfatide in the nervous system
Mol. Neurobiol., 37, 93-103

- Einarson, L.; Neel, A. V. (1938) ^{*3)}
Beitrag zur Kenntniss sklerosierender Entmarkungsprozesse im Gehirn mit besonderer Berücksichtigung der diffusen Sklerose
Acta Jutlandica, 10, 1
- El Dib, R. P.; Pastores, G. M. (2009)
A systematic review of new advances in the management of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): focus on galsulfase
Biologics, 3, 459-468
- Eto, Y.; Tahara, T.; Koda, N.; Yamaguchi, S.; Ito, F.; Okuno, A. (1982)
Prenatal diagnosis of metachromatic leukodystrophy: a diagnosis by amniotic fluid and its confirmation
Arch. Neurol., 39, 29-32
- Fillat, C.; Simonaro, C. M.; Yeyati, P. L.; Abkowitz, J. L.; Haskins, M. E.; Schuchman, E. H. (1996)
Arylsulfatase B activities and glycosaminoglycan levels in retrovirally transduced mucopolysaccharidosis type VI cells. Prospects for gene therapy
J. Clin. Invest., 98, 497-502
- Fischer, G.; Reiter, S.; Jatzkewitz, H. (1978) ^{*3)}
Enzymic hydrolysis of sulphosphingolipids and sulphoglycerolipids by sulphatase A in the presence and absence of activator protein
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., 359, 863-866
- Gadella, B. M.; Colenbrander, B.; van Golde, L. M.; Lopes-Cardozo, M. (1992) ^{*3)}
Characterization of three arylsulfatases in semen: seminolipid sulfohydrolase activity is present in seminal plasma
Biochim. Biophys. Acta, 1128, 155-162
- Gieselmann, V.; Krägeloh-Mann, I. (2010)
Metachromatic leukodystrophy--an update
Neuropediatrics, 41, 1-6
- Gorg, M.; Wilck, W.; Granitzny, B.; Suerken, A.; Lukacs, Z.; Ding, X.; Schulte-Markwort, M.; Kohlschütter, A. (2007)
Stabilization of juvenile metachromatic leukodystrophy after bone marrow transplantation: a 13-year follow-up
J. Child Neurol., 22, 1139-1142
- Greenfield, J. G. (1933)
A form of progressive cerebral sclerosis in infants associated with primary degeneration of the interfascicular glia
J. Neurol. Psychopathol., 13, 289

Literaturverzeichnis

- Hagberg, B. (1963) ^{*3)}
Clinical symptoms, signs and tests in metachromatic leukodystrophy
In: Folch-Pi, J.; Bauer, H.: „Brain Lipids and Lipoproteins and the Leukodystrophies“, Amsterdam, Elsevier, p 134
- Han, X.; Holtzmann, D. M.; McKeel, D. W. Jr.; Kelley, J.; Morris, J. C. (2002)
Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis
J. Neurochem., 82, 809-818
- Hanson, S. R.; Best, M. D.; Wong, C. H. (2004)
Sulfatasen: Struktur, Mechanismus, biologische Aktivität, Inhibition, Anwendung in Synthesen
Angew. Chem., 116, 5858-5886
- Harzer, K.; Benz, H. U. (1974) ^{*3)}
Deficiency of lactosyl sulfatide sulfatase in metachromatic leucodystrophy (sulfatidosis)
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., 355, 744-748
- Hernandez-Guzman, F. G.; Higashiyama, T.; Pangborn, W.; Osawa, Y.; Ghosh, D. (2003)
Structure of human estrone sulfatase suggests functional roles of membrane association
J. Biol. Chem., 278, 22989-22997
- Hins, J. (2003)
Methodenentwicklung in der Isotachophorese und Kapillarzonenelektrophorese
Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, Fachhochschule Aalen
- Holzgreve, W.; Grobe, H.; von Figura, K.; Kresse, H.; Beck, H.; Mattei, J. F. (1981)
Morquio syndrome: clinical findings in 11 patients with MPS IVA and 2 patients with MPS IVB
Hum. Genet., 57, 360-365
- Hoogerbrugge, P. M.; Brouwer, O. F.; Fischer, A. (1991)
Bone marrow transplantation for metabolic diseases with severe neurological symptoms
Bone Marrow Transplant., 7 Suppl 2, 71
- Hopwood, J. J.; Ballabio, A. (2001)
Multiple sulfatase deficiency and the nature of the sulfatase family
In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D.: “The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease” Chapter 149, McGraw Hill, Volume 3, pp 3725-3732

Literaturverzeichnis

- Hreidarsson, S. J.; Thomas, G. H.; Kihara, H.; Fluharty, A. L.; Kolodny, E. H.; Moser, H. W.; Reynolds, L. W. (1983)
Impaired cerebroside sulfate hydrolysis in fibroblasts of sibs with "pseudo" arylsulfatase A deficiency without metachromatic leukodystrophy
Pediatr. Res., 17, 701-704
- Hultberg, B. (1979)
Fluorometric assay of the arylsulphatases in human urine
J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 17, 795-797
- Humbel, R. (1976)
Rapid method for measuring arylsulfatase A and B in leucocytes as a diagnosis for sulfatidosis, mucosulfatidosis and mucopolysaccharidosis VI
Clin. Chim. Acta, 68, 339-341
- Hyde, T. M.; Ziegler, J. C.; Weinberger, D. R. (1992)
Psychiatric disturbances in metachromatic leukodystrophy. Insights into the neurobiology of psychosis
Arch. Neurol., 49, 401-406
- Ishizuka, I. (1997) ^{*2)}
Chemistry and functional distribution of sulfoglycolipids
Prog. Lipid Res., 36, 245-319
- Karlsson, K. A. (1989)
Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria
Annu. Rev. Biochem., 58, 309-350
- Kaye, E. M.; Ullman, M. D.; Kolodny, E. H.; Krivit, W.; Rischert, J. C. (1992)
Possible use of CSF glycosphingolipids for the diagnosis and therapeutic monitoring of lysosomal storage diseases
Neurology, 42, 2290-2294
- Kidd, D.; Nelson, J.; Jones, F.; Dusoir, H.; Wallace, I.; McKinstry, S.; Patterson, V. (1998)
Long-term stabilization after bone marrow transplantation in juvenile metachromatic leukodystrophy
Arch. Neurol., 55, 98-99
- Kikkawa, Y.; Mimura, A.; Inage, Z. (1991)
Regional distribution of sulfatide in human kidney, and anti-sulfatide antibodies in sera from patients with nephritis detected by TLC immunostaining
Nippon Jinzo. Gakkai. Shi., 33, 635-642
- Krivan, H. C.; Olson, L. D.; Barile, M. F.; Ginsburg, V.; Roberts, D. D. (1989)
Adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to sulfated glycolipids and inhibition by dextran sulphate
J. Biol. Chem., 264, 9283-9288

- Krivit, W.; Pierpont, M. E.; Ayaz, K.; Tsai, M.; Ramsay, N. K.; Kersey, J. H.; Weisdorf, S.; Sibley, R.; Snover, D.; McGovern, M. M.; Schwartz, M. F.; Desnick, R. J. (1984)
Bone-marrow transplantation in the Maroteaux-Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis type VI). Biochemical and clinical status 24 months after transplantation
N. Engl. J. Med., 311, 1606-1611
- Kurai, T.; Hisayasu, S.; Kitagawa, R.; Migita, M.; Suzuki, H.; Hirai, Y.; Shimada, T. (2007)
AAV1 mediated co-expression of formylglycine-generating enzyme and arylsulfatase efficiently corrects sulfatide storage in a mouse model of metachromatic leukodystrophy
Mol. Ther., 15, 38-43
- Kurlemann, G.; Palm, D. G. (1991) ^{*3)}
Vigabatrin in metachromatic leukodystrophy; positive influence on spasticity
Dev. Med. Child Neurol., 33, 182
- Landgrebe, J.; Dierks, T.; Schmidt, B.; von Figura, K. (2003)
The human SUMF1 gene, required for posttranslational sulfatase modification, defines a new gene family which is conserved from pro- to eukaryotes
Gene, 316, 47-56
- Lee-Vaupel, M.; Conzelmann, E. (1987)
A simple chromogenic assay for arylsulfatase A
Clin. Chim. Acta, 164, 171-180
- Leinekugel, P.; Michel, S.; Conzelmann, E.; Sandhoff, K. (1992)
Quantitative correlation between the residual activity of beta-hexosaminidase A and arylsulfatase A and the severity of the resulting lysosomal storage disease
Hum. Genet., 88, 513-523
- Li, Z. G.; Waye, J. S.; Chang, P. L. (1992)
Diagnosis of arylsulfatase A deficiency
Am. J. Med. Genet., 43, 976-982
- Löffler, G.; Petrides, P. E. (1998)
Biochemie und Pathobiochemie
Springer Verlag, 6. Auflage
- Loh, H. H.; Law, P. Y.; Ostwald, T.; Cho, T. M.; Way, E. L. (1978)
Possible involvement of cerebroside sulfate in opiate receptor binding
Fed. Proc., 37, 147-152

Literaturverzeichnis

Lukatela, G.; Krauss, N.; Theis, K.; Selmer, T.; Gieselmann, V.; von Figura, K.; Saenger, W. (1998)

Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis
Biochemistry, 37, 3654-3664

Malde, A. D.; Naik, L. D.; Pantvaidya, S. H.; Oak, S. N. (1997)

An unusual presentation in a patient with metachromatic leukodystrophy
Anaesthesia, 52, 690

Malm, G.; Ringden, O.; Winiarski, J.; Grondahl, E.; Uyebrant, P.; Eriksson, U.; Hakansson, H.; Skjeldal, O.; Mansson, J. E. (1996)

Clinical outcome in four children with metachromatic leukodystrophy treated by bone marrow transplantation
Bone Marrow Transplant., 17, 1003-1008

Mandon, E. C.; Ehses, I.; Rother, J.; van Echten, G.; Sandhoff, K. (1992)

Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver
J. Biol. Chem., 267, 11144-11148

Markwell, M. A.; Svennerholm, L.; and Paulson, J. C. (1981)

Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus
Proc. Natl Acad. Sci. USA, 78, 5406-5410

Martin, J. J.; Ceuterick, C.; Mercelis, R.; Joris, C. (1985)

Pathology of peripheral nerves in metachromatic leukodystrophy. A comparative study of ten cases.
J. Neurol. Sci., 53, 95

Matzner, U.; Hartmann, D.; Lullmann-Rauch, R.; Coenen, R.; Rothert, F.; Mansson, J. E.; Fredman, P.; D'Hooze, R.; De Deyn, P. P.; Gieselmann, V. (2002)

Bone marrow stem cell-based gene transfer in a mouse model for metachromatic leukodystrophy: effects on visceral and nervous system disease manifestations
Gene Ther., 9, 53-63

Matzner, U.; Herbst, E.; Hedayati, K. K.; Lullmann-Rauch, R.; Wessig, C.; Schroder, S.; Eistrup, C.; Moller, C.; Fogh, J.; Gieselmann, V. (2005)

Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy
Hum. Mol. Genet., 14, 1139-1152

Literaturverzeichnis

Matzner, U.; Lullmann-Rauch, R.; Stroobants, S.; Andersson, C.; Weigelt, C.; Eistrup, C.; Fogh, J.; D'Hooge, R.; Gieselmann, V. (2009)
Enzyme replacement improves ataxic gait and central nervous system histopathology in a mouse model of metachromatic leukodystrophy
Mol. Ther., 17, 600-606

Matzner, U.; Matthes, F.; Herbst, E.; Lullmann-Rauch, R.; Callaerts-Vegh, Z.; D'Hooge, R.; Weigelt, C.; Eistrup, C.; Fogh, J.; Gieselmann, V. (2007)
Induction of tolerance to human arylsulfatase A in a mouse model of metachromatic leukodystrophy
Mol. Med., 13, 471-479

Matzner, U.; Matthes, F.; Weigelt, C.; Andersson, C.; Eistrup, C.; Fogh, J.; Gieselmann, V. (2008)
Non-inhibitory antibodies impede lysosomal storage reduction during enzyme replacement therapy of a lysosomal storage disease
J. Mol. Med., 86, 433-442

Meikle, P. J.; Brooks, D. A.; Ravenscroft, E. M.; Yan, M.; Williams, R. E.; Jaunzems, A. E.; Chataway, T. K.; Karageorgos, L. E.; Davey, R. C.; Boulter, C. D.; Carlsson, S. R.; Hopwood, J. J. (1997)
Diagnosis of lysosomal storage disorders: evaluation of lysosome-associated membrane protein LAMP-1 as a diagnostic marker
Clin. Chem., 43, 1325-1335

Meikle, P. J.; Grasby, D. J.; Dean, C. J.; Lang, D. L.; Bockmann, M.; Whittle, A. M.; Fietz, M. J.; Simonsen, H.; Fuller, M.; Brooks, D. A.; Hopwood, J. J. (2006)
Newborn screening for lysosomal storage disorders
Mol. Genet. Metab., 88, 307-314

Meikle, P. J.; Hopwood, J. J.; Clague, A. E.; Carey, W. F. (1999)
Prevalence of lysosomal storage disorders
JAMA, 281, 249-254

Meissner, T. (1998)
Isotachophorese Theorie Auszüge aus: Meissner, T.: „Isotachophorese, Zonenelektrophorese, Grundlagen und Anwendungsmöglichkeiten, Kompendium“
J&M Analytische Mess- und Regeltechnik, Aalen

Merrill, A. H. Jr.; Schmelz, E. M.; Dillehay, D. L.; Spiegel, S.; Shayman, J. A.; Schroeder, J. J.; Riley, R. T.; Voss, K. A.; Wang, E. (1997) ^{*)2)}
Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology
Toxicol. Appl. Pharmacol., 142, 208-225

Literaturverzeichnis

- Molzer, B.; Sundt-Heller, R.; Kainz-Korschinsky, M.; Zobel, M. (1992)
Elevated sulfatide excretion in heterozygotes of metachromatic leukodystrophy: dependence on reduction of arylsulfatase A activity
Am. J. Med. Genet., 44, 523-526
- Morimoto-Tomita, M.; Uchimura, K.; Werb, Z.; Hemmerich, S.; Rosen, S. D. (2002)
Cloning and characterization of two extracellular heparin-degrading endosulfatases in mice and humans
J. Biol. Chem., 277, 49175-49185
- Nakagawa, S.; Kumin, S.; Fox, D.; Nitowsky, H. M. (1978)
Human hexosaminidase isozymes. III. Distribution and activity of isozymes in peripheral blood leukocytes and platelets
J. Lab. Clin. Med., 91, 922-928
- Nakagawa, S.; Kumin, S.; Nitowsky, H. M. (1980)
Studies on the activities and properties of lysosomal hydrolases in fractionated populations of human peripheral blood cells
Clin. Chim. Acta, 101, 33-44
- Natomi, H.; Sugano, K.; Takaku, F.; Iwamori, M. (1990)
Glycosphingolipid composition of the gastric mucosa. A role of sulfatides in gastrointestinal mucosal defense?
J. Clin. Gastroenterol., 12 Suppl 1, S52-57
- Neufeld, E. F.; Muenzer, J. (2001)
The Mucopolysaccharidoses
In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D.: "The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease" Chapter 136, McGraw Hill, Volume 3, pp 3421-3452
- Nishio, H.; Kodama, S.; Matsuo, T. (1985)
Analysis of fatty acids and sphingosines from urinary sulfatides in a patient with metachromatic leukodystrophy by gas chromatography-mass spectrometry
Brain Dev., 7, 614-621
- Norton, W.T.; Cammer, W. (1984) ^{*1)}
Isolation and characterization of myelin
In: Morrell, P.: "Myelin" Plenum, New York, NY, pp 147-195
- Ohto, T.; Uchida, H.; Yamazaki, H.; Keino-Masu, K.; Matsui, A.; Masu, M. (2002)
Identification of a novel nonlysosomal sulphatase expressed in the floor plate, choroid plexus and cartilage
Genes Cells, 7, 173-185

Literaturverzeichnis

- Patrick, A. D.; Young, E.; Ellis, C.; Rodeck, C. H. (1988)
Multiple sulphatase deficiency: prenatal diagnosis using chorionic villi
Prenat. Diagn., 8, 303-306
- Penzien, J. M.; Kappler, J.; Herschkowitz, N.; Schuknecht, B.; Leinekugel, P.; Propping, P.; Tonnesen, T.; Lou, H.; Moser, H.; Zierz, S.; et al. (1993)
Compound heterozygosity for metachromatic leukodystrophy and arylsulfatase A pseudodeficiency alleles is not associated with progressive neurological disease
Am. J. Hum. Genet., 52, 557-564
- Percy, A. K.; Brady, R. O. (1968)
Metachromatic leukodystrophy: diagnosis with samples of venous blood
Science, 161, 594-595
- Pernber, Z.; Molander-Melin, M.; Berthold, C. H.; Hansson, E.; Fredman, P. (2002)^{*1)}
Expression of the myelin and oligodendrocyte progenitor marker sulfatide in neurons and astrocytes of adult rat brain
J. Neurosci. Res., 69, 86-93
- Pinto, R.; Caseiro, C.; Lemos, M.; Lopes, L.; Fontes, A.; Ribeiro, H.; Pinto, E.; Silva, E.; Rocha, S.; Marcao, A.; Ribeiro, I.; Lacerda, L.; Ribeiro, G.; Amaral, O.; Sa Miranda, M. C. (2004)
Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal
Eur. J. Hum. Genet., 12, 87-92
- Piraud, M.; Boyer, S.; Mathieu, M.; Maire, I. (1993)
Diagnosis of mucopolysaccharidoses in a clinically selected population by urinary glycosaminoglycan analysis: a study of 2,000 urine samples
Clin. Chim. Acta, 221, 171-181
- Polten, A.; Fluharty, A. L.; Fluharty, C. B.; Kappler, J.; von Figura, K.; Gieselmann, V. (1991)
Molecular basis of different forms of metachromatic leukodystrophy
N. Engl. J. Med., 324, 18-22
- Poorthuis, B. J.; Wevers, R. A.; Kleijer, W. J.; Groener, J. E.; de Jong, J. G.; van Weely, S.; Niezen-Koning, K. E.; van Diggelen, O. P. (1999)
The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands
Hum. Genet., 105, 151-156
- Porter, M. T.; Fluharty, A. L.; Kihara, H. (1969)
Metachromatic leukodystrophy: arylsulfatase-A deficiency in skin fibroblast cultures
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 62, 887-891

Poupetova, H.; Ledvinova, J.; Berna, L.; Dvorakova, L.; Kozich, V.; Elleder, M. (2010)

The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic: comparison with data in different populations
J. Inherit. Metab. Dis., 33, 387-396

Raghavan, S. S.; Gajewski, A.; Kolodny, E. H. (1981)

Leukocyte sulfatidase for the reliable diagnosis of metachromatic leukodystrophy
J. Neurochem., 36, 724-731

Resibois, A. (1971)

Electron microscopic studies of metachromatic leucodystrophy. IV. Liver and kidney alterations
Pathol. Eur., 6, 278-298

Rodriguez, A.; Espejo, A. J.; Hernandez, A.; Velasquez, O. L.; Lizaraso, L. M.; Cordoba, H. A.; Sanchez, O. F.; Almeciga-Diaz, C. J.; Barrera, L. A. (2010)

Enzyme replacement therapy for Morquio A: an active recombinant N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase produced in Escherichia coli BL21
J. Ind. Microbiol. Biotechnol., June 2010

Sandhoff, K.; Kolter, T. (1996) ^{*4)}

Topology of glycosphingolipid degradation
Trends Cell. Biol., 6, 98-103

Sandhoff, K.; Kolter, T.; Harzer, K. (2001)

Sphingolipid Activator Proteins

In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D.: "The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease" Chapter 134, McGraw Hill, Volume 3, pp 3371-3388

Sandhoff, K.; Quintern, L. (1988)

Sphingolipid storage diseases of the central nervous system: bases of biochemical and clinical heterogeneity
Naturwissenschaften, 75, 123-131

Schiebler, T. H.; Schmidt, W.; Zilles, K. (1999)

Anatomie

Springer Verlag, 8. Auflage

Schipper, H. I.; Seidel, D. (1984)

Computed tomography in late-onset metachromatic leucodystrophy
Neuroradiology, 26, 39-44

Schmidt, B.; Selmer, T.; Ingendoh, A.; von Figura, K. (1995)

A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency
Cell, 82, 271-278

Literaturverzeichnis

- Settembre, C.; Arteaga-Solis, E.; Ballabio, A.; Karsenty, G. (2009)
Self-eating in skeletal development: implications for lysosomal storage disorders
Autophagy, 5, 228-229
- Settembre, C.; Fraldi, A.; Jahreiss, L.; Spampinato, C.; Venturi, C.; Medina, D.; de Pablo, R.; Tacchetti, C.; Rubinsztein, D. C.; Ballabio, A. (2008)
A block of autophagy in lysosomal storage disorders
Hum. Mol. Genet., 17, 119-129
- Sevin, C.; Benraiss, A.; Van Dam, D.; Bonnin, D.; Nagels, G.; Verot, L.; Laurendeau, I.; Vidaud, M.; Gieselmann, V.; Vanier, M.; De Deyn, P. P.; Aubourg, P.; Cartier, N. (2006)
Intracerebral adeno-associated virus-mediated gene transfer in rapidly progressive forms of metachromatic leukodystrophy
Hum. Mol. Genet., 15, 53-64
- Sevin, C.; Verot, L.; Benraiss, A.; Van Dam, D.; Bonnin, D.; Nagels, G.; Fouquet, F.; Gieselmann, V.; Vanier, M. T.; De Deyn, P. P.; Aubourg, P.; Cartier, N. (2007)
Partial cure of established disease in an animal model of metachromatic leukodystrophy after intracerebral adeno-associated virus-mediated gene transfer
Gene Ther., 14, 405-414
- Shapiro, E. G.; Lockman, L. A.; Knopman, D.; Krivit, W. (1994)
Characteristics of the dementia in late-onset metachromatic leukodystrophy
Neurology, 44, 662-665
- Speer, C. P.; Gahr, M. (2009)
Pädiatrie
Springer Verlag, 3. Auflage
- Strobel, S. G. C. (2005)
Bestimmung von sphingolipidabbauenden Enzymen in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zur Optimierung der Labordiagnostik bei Sphingolipid-Speichererkrankungen
Inaugural-Dissertation, Medizinische Fakultät der Universität Tübingen
- Suzuki, K.; Chen, G. C. (1967)
Isolation and chemical characterization of metachromatic granules from a brain with metachromatic leukodystrophy
J. Neuropathol. Exp. Neurol., 26, 537-550

- Takamatsu, K. (1992)
Phytosphingosine-containing neutral glycosphingolipids and sulfatides in the human female genital tract: their association in the cervical epithelium and the uterine endometrium and their dissociation in the mucosa of fallopian tube with the menstrual cycle
Keio J. Med., 41, 161-167
- Taylor, C.M.; Marta, C.B.; Bansal, R.; Pfeiffer, S.E. (2004) ^{*1)}
The transport, assembly, and function of myelin lipids
In: Lazzarini R.A.: "Myelin biology and disorders", Academic, New York, NY, Volume 1, pp 57-88
- Tempesta, M. C.; Salvayre, R.; Levade, T. (1994)
Functional compartments of sulphatide metabolism in cultured living cells: evidence for the involvement of a novel sulphatide-degrading pathway
Biochem. J., 297, 479-489
- Thomas, G. H.; Howell, R. R. (1972)
Arylsulfatase A activity in human urine: quantitative studies on patients with lysosomal disorders including metachromatic leukodystrophy
Clin. Chim. Acta, 36, 99-103
- Tomatsu, S.; Montano, A. M.; Dung, V. C.; Ohashi, A.; Oikawa, H.; Oguma, T.; Orii, T.; Barrera, L.; Sly, W. S. (2010)
Enhancement of drug delivery: enzyme-replacement therapy for murine Morquio A syndrome
Mol. Ther., 18, 1094-1102
- Tomatsu, S.; Montano, A. M.; Ohashi, A.; Gutierrez, M. A.; Oikawa, H.; Oguma, T.; Dung, V. C.; Nishioka, T.; Orii, T.; Sly, W. S. (2008)
Enzyme replacement therapy in a murine model of Morquio A syndrome
Hum. Mol. Genet., 17, 815-824
- Valayannopoulos, V.; Nicely, H.; Harmatz, P.; Turbeville, S. (2010)
Mucopolysaccharidosis VI
Orphanet J. Rare Dis., 5, 5
- van de Kamp, J. J.; Niermeijer, M. F.; von Figura, K.; Giesberts, M. A. (1981)
Genetic heterogeneity and clinical variability in the Sanfilippo syndrome (types A, B, and C)
Clin. Genet., 20, 152-160
- Vellodi, A.; Young, E.; Cooper, A.; Lidchi, V.; Winchester, B.; Wraith, J. E. (1999)
Long-term follow-up following bone marrow transplantation for Hunter disease
J. Inherit. Metab. Dis., 22, 638-648

Literaturverzeichnis

Voet, D.; Voet, J. G. (2004)
Biochemistry, 3rd edition
John Wiley & Sons, Inc.

Vogel, A.; Schwarzmann, G.; Sandhoff, K. (1991) ^{*4)}
Glycosphingolipid specificity of the human sulfatide activator protein
Eur. J. Biochem., 200, 591-597

von Figura, K.; Gieselmann, V.; Jaeken, J. (2001)
Metachromatic Leukodystrophy
In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D.: "The Metabolic &
Molecular Bases of Inherited Disease", Chapter 148, McGraw Hill, Volume 3, pp
3695-3724

von Figura, K.; Schmidt, B.; Selmer, T.; Dierks, T. (1998)
A novel protein modification generating an aldehyde group in sulfatases: its role
in catalysis and disease
Bioessays, 20, 505-510

Vos, J. P.; Lopes-Cardozo, M.; Gadella, B. M. (1994) ^{*2)}
Metabolic and functional aspects of sulfogalactolipids
Biochim. Biophys. Acta, 1211, 125-149

Walton, K. M.; Sandberg, K.; Rogers, T. B.; Schnaar, R. L. (1988)
Complex ganglioside expression and tetanus toxin binding by PC12
pheochromocytoma cells
J. Biol. Chem., 263, 2055-2063

Witte, F. (1921) ^{*3)}
Über pathologische Abbauvorgänge im Zentralnervensystem
Münch. Med. Wochenschr., 68, 69

Wraith, J. E.; Scarpa, M.; Beck, M.; Bodamer, O. A.; De Meirleir, L.; Guffon, N.;
Meldgaard Lund, A.; Malm, G.; Van der Ploeg, A. T.; Zeman, J. (2008)
Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and
recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy
Eur. J. Pediatr., 167, 267-277

Zafeiriou, D. I.; Vargiami, E.; Papadopoulou, K.; Dimitriou, E.; Mavridou, I.;
Santamaria, R.; Canals, I.; Michelakakis, H. (2008)
Serial magnetic resonance imaging and neurophysiological studies in multiple
sulphatase deficiency
Eur. J. Paediatr. Neurol., 12, 190-194

Zhu, X. H.; Hara, A.; Taketomi, T. (1991)
The existence of galactosylceramide I3-sulfate in serums of various mammals
and its anticoagulant activity
J. Biochem., 110, 241-245

Literaturverzeichnis

*1) = Literaturangabe übernommen aus: Eckhardt, M. (2008)
The role and metabolism of sulfatide in the nervous system
Mol. Neurobiol., 37, 93-103

*2) = Literaturangabe übernommen aus: Han, X.; Holtzmann, D. M.; McKeel, D. W. Jr.; Kelley, J.; Morris, J. C. (2002)
Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis
J. Neurochem., 82, 809-818

*3) = Literaturangabe übernommen aus: von Figura, K.; Gieselmann, V.; Jaeken, J. (2001)
Metachromatic Leukodystrophy
In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D.: "The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease" Chapter 149, McGraw Hill, Volume 3, pp 3695-3724

*4) = Literaturangabe übernommen aus: Sandhoff, K.; Kolter, T.; Harzer, K. (2001)
Sphingolipid Activator Proteins
In: Scriver, C. R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D.: "The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease" Chapter 134, McGraw Hill, Volume 3, pp 3371-3388

Danksagung

Herrn Professor Dr. rer. nat. G. Bruchelt möchte ich für die Überlassung dieses interessanten Themas sowie die hervorragende Betreuung während der Laborarbeit und des Schreibens der Dissertation herzlich danken. Bei aufkommenden Fragen oder Problemen war er stets erreichbar und hat mich nicht zuletzt dank seiner grossen Erfahrung sehr unterstützt.

Ein herzlicher Dank geht auch an Herrn Professor Dr. med. K. Harzer für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des neurometabolischen Labors, insbesondere Frau Dr. rer. nat. B. Kustermann und Frau J. Backes, die mich in die Laborarbeit einführten, danke ich für die freundschaftliche, kollegiale Zusammenarbeit.

Ein Teil der photometrischen und dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurde in Zusammenarbeit mit Christine Weißenberg durchgeführt, und ich möchte ihr dafür herzlich danken.

Ein spezieller Dank geht an meinen Bruder Rico für seine Hilfe bei der Endformatierung dieser Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Pajarola
Vornamen	Sandra Maria
Geburtsdatum	23.02.1979
Geburtsort	Chur GR, Schweiz

Schulbildung

04 / 1986 – 07 / 1992	Primarschule, Rüslikon, Schweiz
08 / 1992 – 01 / 1999	Gymnasium Kantonsschule Wiedikon, Zürich, Schweiz
01 / 1999	Matura Typus B, Kantonsschule Wiedikon, Zürich, Schweiz

Hochschulbildung

09 / 1999 – 02 / 2002	Studium der Humanmedizin, Universität Zürich, Schweiz
10 / 2004 – 05 / 2009	Studium der Humanmedizin, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Deutschland
07 / 2000	Erste Vorprüfung für Ärzte, Universität Zürich, Schweiz
03 / 2005	Physikum, Universität Tübingen, Deutschland
02 – 12 / 2008	Praktisches Jahr, Universitätsklinik Tübingen, Deutschland (Radioonkologie, Chirurgie, Innere Medizin)
14 / 05 / 2009	2. Ärztliche Prüfung, Universität Tübingen, Deutschland

Beruf

03 / 2002 - 09 / 2004	Angestellte als angelernte Dentalassistentin in Kinderzahnarztpraxis, Zürich, Schweiz
11 / 2009 – 04 / 2010	Assistenzärztin Innere Medizin, Rheinfelden, Deutschland
03 / 2007 – 11 / 2010	Erstellen der Dissertation in der Pädiatrie der Universitätsklinik Tübingen unter der Anleitung von Prof. Dr. rer. nat. G. Bruchelt mit dem Thema „Untersuchungen zur Aktivität und Spezifität der rekombinanten humanen Arylsulfatase A mit Hilfe der analytischen Isotachophorese“