

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

**Bestimmung von sphingolipidabbauenden Enzymen
in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zur
Optimierung der Labordiagnostik bei
Sphingolipid-Speichererkrankungen**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
SEBASTIAN GEORG CHRISTOPHER STROBEL
aus Burlington/USA**

2005

Dekan:

Professor Dr. med. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Professor Dr. rer. nat. G. Bruchelt

2. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. rer. nat. H. Schmid

Für meine Eltern und Geschwister

Inhalt	Seite
1. Einleitung	8
1.1. Einführung	8
1.2. Lysosomale Speicherkrankheiten	10
1.2.1. Stoffwechsel der Sphingolipide	10
1.2.1.1. Funktion der Sphingolipide	10
1.2.1.2. Biosynthese der Sphingolipide	11
1.2.1.3. Abbau der Sphingolipide	14
1.2.1.4. Störungen im lysosomalen Sphingolipidabbau: Lipidspeicherkrankheiten	15
1.2.1.5. Synthese und Reifung lysosomaler Enzyme	17
1.2.1.6. Speicherung und Freisetzung der lysosomalen Enzyme	19
1.2.2. Erkrankungen durch Störungen des Sphingolipidabbaus	20
1.2.2.1. Metachromatische Leukodystrophie (MLD)	23
1.2.2.2. β -Galaktosidase-Mangel (G_{M1} Gangliosidose, Morquio B)	27
1.2.2.3. G_{M2} Gangliosidosen	35
1.2.3. Diagnostik der Sphingolipidosen	40
1.2.3.1. Biochemische Diagnostik	40
1.2.3.1.1. Analyse der gespeicherten Materialien aus Biopsien	40
1.2.3.1.2. Enzymatische Nachweisverfahren	41
1.2.3.1.3. Metabolische Untersuchungen	43
1.2.3.2. Molekulare Nachweisverfahren und genetische Diagnostik	44
1.2.3.3. Pränatale Diagnostik	44
1.2.4. Probleme der enzymatischen Nachweisverfahren	45
1.3. Aufgabenstellung	47

1.3.1.	Trennung der Leukozyten in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten mit Messung des jeweiligen Anteils an der Gesamtenzymaktivität	47
1.3.2.	Versuche zur Degranulation der Enzyme aus den Granulozyten und Bestimmung der Enzyme im Überstand und Zellpellet	47
1.3.3.	Vergleich der Ausschüttung von Myeloperoxidase und den sphingolipidabbauenden Enzymen nach Stimulation der Granulozyten	48
2.	Material und Methoden	49
2.1.	Material	49
2.1.1.	Chemikalien und Substanzen	49
2.1.2.	Lösungen, Puffer und Medien	50
2.1.3.	Verbrauchsmaterialien	54
2.1.4.	Geräte	54
2.2.	Methoden	55
2.2.1.	Bestimmung des Differentialblutbildes und des MPXI-Wertes mit Hilfe des Bayer ADVIA 120	55
2.2.2.	Leukozytenisolierung aus Vollblut mittels Dextransedimentation	60
2.2.3.	Isolation der Granulozyten und mononukleären Blutzellen aus Vollblut	61
2.2.4.	Auftrennung der mononukleären Blutzellen mittels MACS in Monozyten und Lymphozyten	62
2.2.5.	Anfertigung, Färbung und Auszählung von Zytospinpräparaten	66
2.2.6.	Übersicht über die Funktionsteste (Degranulation, Enzymaktivitätsbestimmung)	67
2.2.7.	Degranulationsuntersuchungen an Granulozyten	68
2.2.8.	MPO-ELISA	72
2.2.9.	Degranulationsuntersuchungen an Monozyten	75

2.2.10	Messung der enzymkatalysierten Hydrolasereaktionen	77
3.	Ergebnisse	81
3.1.	Erstellung eines Differentialblutbildes mittels Bayer ADVIA 120	81
3.1.1.	Vergleich der Bayer ADVIA 120 Ergebnisse im Vollblut, nach Dextrasedimentation und nach Histopaque-Isolierung	81
3.2.	Bestimmung der sphingolipidabbauenden Enzymaktivität bei Gesamtleukozyten (Dextrasedimentation), isolierten Granulozyten (Histopaque-Technik) und mononukleären Blutzellen (Histopaque-Technik)	87
3.3.	Bestimmung der Aktivität sphingolipidabbauender Enzyme bei Monozyten und Lymphozyten im Vergleich zu Granulozyten	90
3.3.1.	Reinheit der isolierten Zellfraktionen nach MACS-Isolierung	91
3.3.2.	Messung der sphingolipidabbauenden Enzymaktivität bei den einzelnen Zellfraktionen	93
3.4.	Degranulationsversuche an Granulozyten	100
3.4.1.	Einfluss des Isolationsverfahrens auf das Degranulationsverhalten der Granulozyten	101
3.4.2.	Degranulation von Granulozyten vor und nach Behandlung mit GM-CSF, Cytochalasin B und N-fMLP	103
3.4.2.1.	Ergebnisse der ADVIA 120 Messungen	105
3.4.2.2.	Bestimmung der aus Granulozyten freigesetzten MPO mit Hilfe des MPO-ELISA	110
3.4.3.	Messung der sphingolipidabbauenden Enzymaktivitäten im Überstand und Zellpellet der degranulierten Granulozyten	114
3.4.4.	Korrelation MPO-ELISA – sphingolipidabbauende Enzyme in Granulozyten	121

3.5.	Einfluss von Zytokinen und Chemotaktika auf das Degranulationsverhalten von Monozyten	125
3.5.1.	Isolierung der Monozyten aus Vollblut	127
3.5.2.	Degranulation der Monozyten unter dem Einfluß von Cyt-B bzw. N-fMLP	128
3.5.3.	Messung der Gesamthexosaminidase im Überstand und Zellpellet der degranulierten Monozyten	129
4.	Diskussion	131
4.1.	Einleitung	131
4.2.	Interpretation der Ergebnisse	132
4.2.1.	Verteilung der Enzymaktivität in den einzelnen Leukozytenfraktionen	132
4.2.1.1.	Beurteilung des Differentialblutbildes der Leukozytenfraktion am Bayer ADVIA 120	132
4.2.1.2.	Verteilung der sphingolipidabbauenden Enzyme innerhalb der Leukozytenfraktionen	135
4.2.2.	Degranulationsversuche an Granulozyten und Monozyten	140
4.2.2.1.	Degranulation von sphingolipidabbauenden Enzymen bei Granulozyten/Monozyten nach Inkubation mit bekannten Stimuli	141
5.	Zusammenfassung	145
6.	Abkürzungen	147
7.	Literaturverzeichnis	149

1 EINLEITUNG

1.1 Einführung

In dieser Arbeit sollten Bestimmungsverfahren für Sphingolipidosen bezüglich der Bezugssysteme optimiert werden. Spingolipidosen sind Lipidspeicherkrankheiten, die in den meisten Fällen mit dem Tod enden. Ursachen sind vielfältige genetische Defekte, die dazu führen, dass verschiedene, sonst am Abbau der Sphingolipide beteiligte Enzyme, in einer nicht funktionsfähigen Form vorliegen. Über die Bestimmung dieser Enzymaktivitäten aus Extrakten von Leukozyten oder nach Erhalt von Hautbiopsien, aus denen Fibroblastenkulturen angelegt werden können, werden die verschiedenen Sphingolipidosen charakterisiert.

Für die Enzymmessungen werden Leukozyten mittels einer Dextranedimentation aus Vollblut gewonnen. Die EDTA-Blutproben werden teilweise auf dem Postweg versandt, sodass diese längere Zeit unterwegs sind. Aus den Zellextrakten - und nicht wie sonst in der Labormedizin oft üblich aus Serum oder Plasma - werden die Enzymaktivitäten meist über photometrische Verfahren bestimmt, wozu vielfach nicht die normalen Sphingolipide verwendet werden, sondern „künstliche“, analoge Verbindungen. Als Ergebnis wird der Extinktionswert bezogen auf 10^5 Zellen angegeben. Ist kein Defekt vorhanden, erhält man einen Messwert, der sich deutlich vom Leerwert unterscheidet.

Folgende Probleme zeigen sich bei diesem Testverfahren in der täglichen Anwendung:

1. Der lange Transportweg wirkt als „Stress“ auf die Blutzellen, v.a. auf die Granulozyten, die mit einer Abgabe von Teilen ihres Enzymgehaltes in das Plasma reagieren. Im nachfolgenden Test können somit eventuell falsch-niedrige Enzymaktivitäten in den Zellen gemessen werden.

2. Die verschiedenen Fraktionen der Leukozyten (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) besitzen unterschiedlich starke Enzymaktivitäten. Daher kann z.B. bei gleicher Qualität der Blutzellen bei von einander differierender Leukozytenzusammensetzung eine unterschiedliche Enzymaktivität (bezogen auf Gesamtleukozyten) gemessen werden.

Ziel der Arbeit war es daher auf diese Probleme einzugehen, die v.a. bei Grenzwerten („Restaktivitäten“) an Bedeutung gewinnen. Es sollte untersucht werden, welchen Anteil die einzelnen Leukozytenfraktionen an der Gesamtzymaktivität besitzen und wie dieselben auf „Stress“ reagieren. Die Hauptfraktion der isolierten Leukozyten stellen neutrophile Granulozyten dar, die als Markerenzym Myeloperoxidase (MPO) besitzen. Daher sollte ein Zusammenhang zwischen der Degranulation der MPO während der Aufarbeitung und der für den Sphingolipidabbau verantwortlichen Enzyme hergestellt werden, da sich diese wahrscheinlich in den gleichen Granula befinden. Dank dieses Zusammenhangs ließe sich dann ein Rückschluss auf den Enzymverlust ziehen, da mittels des Blutanalysegerätes Bayer ADVIA 120 die Myeloperoxidaseaktivität in den neutrophilen Granulozyten und Monozyten bestimmt werden kann.

Zunächst soll auf die Krankheiten, die mittels dieser Testverfahren untersucht werden, näher eingegangen werden. Im Anschluss daran folgt eine genauere Beschreibung der Testverfahren.

1.2 Lysosomale Speicherkrankheiten

1.2.1 Stoffwechsel der Sphingolipide

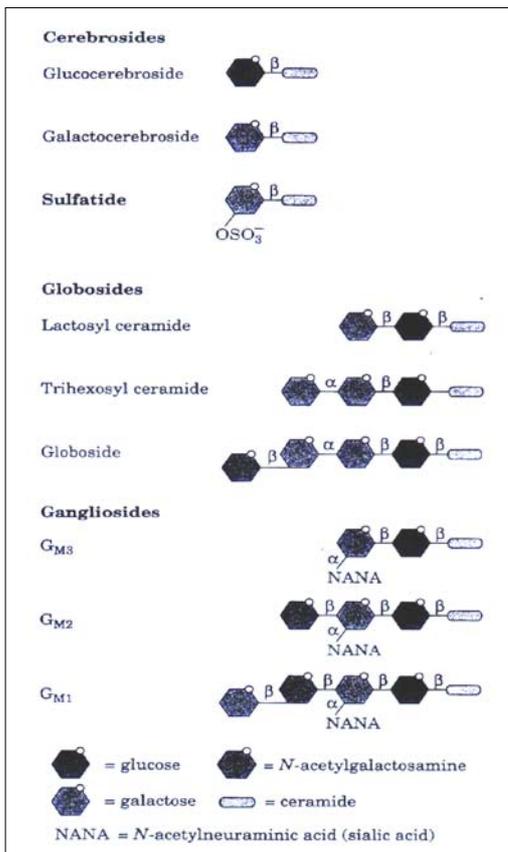
1.2.1.1 Funktion der Sphingolipide

Sphingolipide sind Bestandteile der Glykokalix tierischer Zellen, d.h. zusammen mit Glykoproteinen und Glykosaminglykanen bilden sie die Oberfläche der Plasmamembran einer Zelle. Sphingolipide besitzen einen bipolaren Aufbau: einerseits einen hydrophoben Ceramid(N-Acylsphingosin)-Rest, mit dem sie in der Zellmembran verankert sind, und andererseits einen hydrophilen Anteil, der nach außen in den Extrazellulärraum ragt. Die an die Sphingolipide gekoppelten Oligosaccharide, die zusammen die sogenannten Glykosphingolipide bilden, decken die Zelloberfläche teilweise ab [Sandhoff et Quintern, 1988]. Das Oligosaccharidmuster der Glykokalix einer Zelle ist sehr vielfältig und für diese spezifisch. Aufgrund der unterschiedlichen Verknüpfung der Monosaccharide zu Oligosacchariden entsteht die enorme Vielfalt. Die Glykokalix einer Zelle besitzt viele Aufgaben, darunter die gegenseitige Erkennung gleicher Zellen, die dadurch in die Lage versetzt werden, Zellverbände zu bilden. Sie bildet auch Bindungsstellen für Toxine [Walton et al., 1988; Hansson et al., 1977] (z.B. bindet Cholera toxin an Gangliosid G_{M1}), Viren [Markwell et al., 1981] und Bakterien [Svennerholm, 1984; Karlsson, 1989]. Cerebrosulfatide erfüllen die strukturellen Anforderungen eines Opiatrezeptors, sodass Antikörper gegen Sulfatid die Effekte von Morphin und β -Endorphin antagonisieren können [Loh et al., 1978; Craves et al., 1980]. Auch die Glykokalix innerhalb einer einzigen Zelle kann regional unterschiedlich sein, z.B. apikal anders als basal, wodurch eine Zellpolarität geschaffen wird. Gleichzeitig dient sie als Antigen. So werden beispielsweise bei Eintritt körperfremder Zellen in einen Organismus gegen die Glykokalix dieser Zellen Antikörper gebildet. Das bekannteste Beispiel dafür ist das ABO Blutgruppensystem, bei dem die Blutgruppensubstanzen an die Glykolipide der Erythrozytenmembran gebunden sind [Schiebler et Junquera, 1996, p. 52].

Bei den Neuronen überwiegen die Ganglioside (saure, Sialinsäure enthaltende Ceramidoligosaccharide), deren genaue Funktion ungeklärt ist. Den höchsten Gangliosidanteil besitzt die graue Substanz [Sweeley et Siddiqui, 1977]. Der Gangliosidgehalt und das –muster unterscheiden sich stark in den verschiedenen Abschnitten des Gehirns [Kracun et al., 1984]. Auf Membranebene zeigen Ganglioside eine breite Fähigkeit zu Interaktionen [Sonnino et al., 1986]. Ihnen wird ebenfalls eine Rolle bei der Zellerkennung, Differenzierung und Ontogenese zugeschrieben. Während der Ontogenese verändern sie sich signifikant [Vanier et al., 1971; Seyfried et al., 1983].

1.2.1.2 Biosynthese der Spingolipide

Alle Spingolipide enthalten den Aminodialkohol Spingosin. Wird dieser



Alkohol an seiner Aminogruppe mit einer Fettsäure, v.a. Lignocerinsäure oder Nervonsäure, über eine Säureamidbindung verknüpft, entsteht Ceramid. Syntheseort hierfür ist das endoplasmatische Retikulum [Mandon et al., 1992]. Ceramid (N-Acylsphingosin) ist Ausgangspunkt für alle weiteren Spingolipide. Hier sollen die zwei Gruppen näher beschrieben werden: Die Spingophospholipide und die Spingoglycolipide, die die Speichersubstanzen bei Spingolipidosen darstellen.

Abbildung 1-1: Übersicht Spingolipide [Voet et Voet, 1995, p.718]

Sphingophospholipide

Diese Gruppe gehört zu den Phospholipiden, wobei der hydrophobe Schwanz das oben genannte Ceramid ist, an welches Phosphorylcholin als CDP-Cholin unter CMP-Abspaltung angeheftet wird oder alternativ Ceramid in einer Austauschreaktion mit Phosphatidylcholin reagiert, wobei Sphingomyelin und Diacylglycerin entstehen [Löffler et Petrides, 1998]. Sphingomyelin (N-Acylsphingosin-phosphocholin) ist ein wichtiges Strukturlipid der Membranen von Nervenzellen. Fehlt das abbauende Enzym, die saure Sphingomyelinase, kommt es zur Niemann-Pick Erkrankung.

Sphingoglycolipide

Diese Gruppe stellt den Hauptteil der Sphingolipide dar. Abbildung 1-1 zeigt eine Übersicht. Diesen zu den Glykolipiden gehörenden Verbindungen ist gemeinsam, dass sie einen Lipid- und Kohlenhydratanteil besitzen. Der Lipidanteil ist hier das oben genannte Ceramid. Sphingoglycolipide lassen sich je nach angeheftetem Zuckeranteil in vier Hauptklassen unterteilen:

- Cerebroside (Ceramidmonosaccharide)
- Sulfatide (siehe Abb. 1-2) (Ceramidmonosaccharidsulfate)
- Globoside (neutrale Ceramidoligosaccharide)
- Ganglioside (saure, Sialinsäure enthaltende Ceramidoligosaccharide)

Ausgangspunkt ist immer das Ceramid, an das der jeweilige Kohlenhydratrest über eine glykosidische Bindung mit der C(1)-OH-Gruppe von Ceramid verknüpft wird. Hier eine kleine Übersicht:

Cerebroside/Sulfatide: Als einfachste neutrale Glykosingolipide sind sie im Gehirn v.a. mit Galaktose als Kohlenhydrat, in parenchymatösen Organen mit Glukose gekoppelt. Als Cerebroside (Sulfatide) sind sie ein wichtiger Bestandteil der Myelinscheiden [Norton et Poduslo, 1973] und liegen auf der Oberfläche dieser Membran [Arvantis et al., 1992], wahrscheinlich an das Myelinbasisprotein gebunden [London et Vossenber, 1973]. Bei mangelndem Abbau entstehen die Krankheitsbilder M. Krabbe (Galakto-Cerebroside), M.

Gaucher (Gluco-Cerebrosid) und Metachromatische Leukodystrophie (MLD) (Galacto-cerebrosid-3-sulfat).

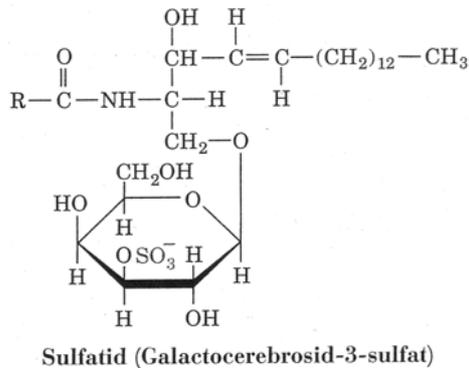


Abbildung 1-2: Strukturformel des Galactocerebrosid-3-sulfat [Voet et Voet, 1995, p.719]

Globoside und Ganglioside benötigen für ihre Synthese eine Reihe von membranständigen Glykosyltransferasen, die die aktivierten Zucker in einem sequentiellen Prozess an die wachsende Zuckerkette knüpfen [Kishimoto et al., 1983]. Dies geschieht im Lumen des Golgi-Komplexes [Trinchera et al., 1991]. Ganglioside finden sich v.a. in der grauen Substanz des ZNS, aber auch in anderen Organen, dort hauptsächlich auf den Zelloberflächen.

Vom Ort der Synthese, dem Lumen des Golgi-Komplexes, gelangen die Sphingoglykolipide über Membranflussmechanismen zur Plasmamembran.

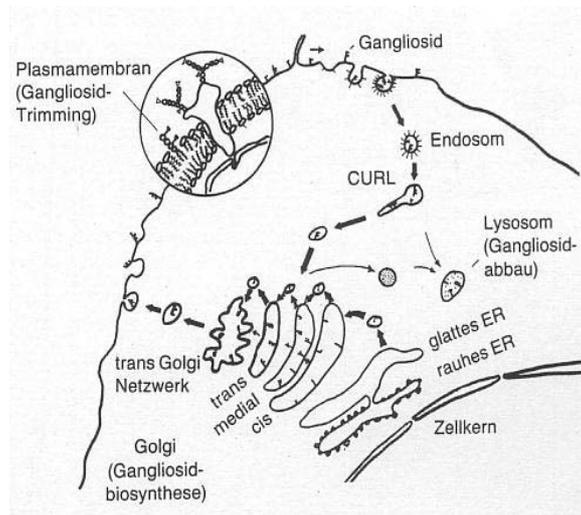


Abbildung 1-3: Möglicher Abbauweg der Sphingolipide [Sandhoff et al., 1988]

1.2.1.3 Abbau der Sphingolipide

Für den Abbauweg (vgl. Abb. 1-3) der membranintegrierten Sphingolipide wird vermutet, dass diese über endozytotische Vesikel zu den Lysosomen transportiert werden, in denen dann der Abbau stattfindet. In-vitro-Studien haben gezeigt, dass Oligosialoganglioside durch eine plasmamembranständige Sialidase zu Monosialogangliosiden, Sphingomyelin durch die ebenfalls plasmamembranständige neutrale Sphingomyelinase zu Ceramid abgebaut

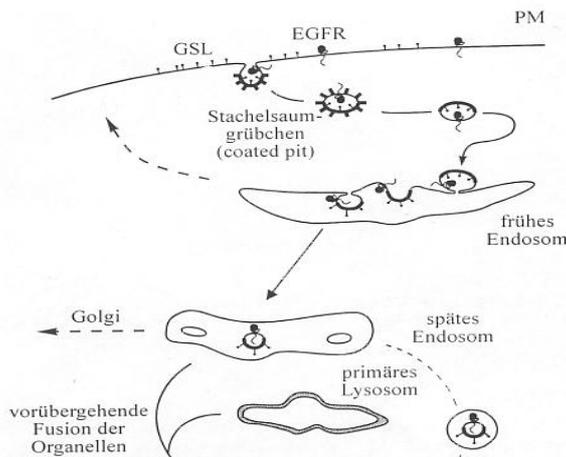


Abbildung 1-4: Alternativer Abbauweg der Sphingolipide [Fürst et Sandhoff, 1992]

werden kann [Sandhoff, K., Pallmann, B., 1978; Pellkofer, R., Sandhoff, K., 1980]. Die endozytotischen Vesikel entstehen dieser Theorie zur Folge durch Abschnürung von Teilen der Plasmamembran als Stachelsaumgrübchen (coated pits). Diese Vesikel verschmelzen mit frühen Endosomen, was bedeutet, dass ihre Membranen Bestandteile der endosomalen Membranen werden,

d.h. Teile der Plasmamembran sind später Teile der Membran des Lysosoms. Damit beim späteren Abbau im Lysosom dessen Membran intakt bleibt, was für das Überleben der Zelle essentiell ist, müsste ein selektiver Abbau der Membranteile des Lysosoms erfolgen, die aus der Plasmamembran im vorherigen Fusionschritt eingebaut wurden. Da diese Selektivität eher unwahrscheinlich ist, haben Fürst und Sandhoff [Fürst et Sandhoff, 1992] einen alternativen Weg beschrieben, bei dem sich Teile der Plasmamembran ebenfalls als Stachelsaumgrübchen (coated pits) abschnüren, diese jedoch nicht mit dem frühen Endosom verschmelzen. Abbildung 1-4 zeigt diesen alternativen Abbauweg. Stattdessen werden sie von diesem als intraendosomales Vesikel, z.B. durch Einstülpung (budding in) aufgenommen und sind auch im Lysosom als intralysosomale Vesikel zu finden. Diese intralysosomalen Vesikel sind dann innerhalb des Lysosoms den

Verdauungsproteinen ausgesetzt, wobei an diesem Punkt, dem weiteren Abbau, beide Theorien wieder zusammenkommen.

In den Lysosomen erfolgt dann der schrittweise Abbau mittels Exohydrolasen und Sphingolipid-Aktivatorproteinen. Der Defekt einer dieser Exohydrolasen führt damit zur Blockade des Abbaus und letztendlich zur Anhäufung der jeweiligen Substanz in der Zelle. Die Zuckerreste werden vom nichtreduzierenden Ende her in einem sequentiellen Prozess abgespalten [Brady et al., 1983]. Diese Deglykosilierung wird durch lysosomale Exoglykosidasen katalysiert, von denen einige sogenannte Sphingolipid-Aktivator-Proteine [Fürst et Sandhoff, 1992], Lipidbindungsproteine, benötigen. Der Grundbaustein, das Ceramid, wird ebenfalls in seine Bestandteile, eine Fettsäure und den Aminodialkohol Sphingosin, zerlegt. Die so gewonnenen Bausteine (Monosaccharide, Fettsäuren und Sphingosin) verlassen das Lysosom und stehen der Zelle für neue Syntheseschritte oder für die Energiegewinnung zur Verfügung.

1.2.1.4 Störungen im lysosomalen Spingolipidabbau: Lipidspeicherkrankheiten

Als Ursache für die Anhäufung eines Sphingolipids innerhalb einer Zelle werden Störungen im Abbau und nicht Störungen in der Synthese dieser Zellbausteine verantwortlich gemacht. Der Abbauweg ist in Abb. 1-5 dargestellt. Der angeborene Mangel eines für den Abbau verantwortlichen Enzyms führt zur lysosomalen Speicherung dieser nicht mehr abbaubaren Lipidsubstrate. Den meisten Lipidosen liegen genetische Defekte lysosomaler, mitochondrialer oder peroxisomaler Enzyme des Lipidabbaus zugrunde. Ausnahmen stellen die Variante AB bei der G_{M2} -Gangliosidose sowie eine Form der metachromatischen Leukodystrophie (MLD) dar, bei denen auch die Aktivatorproteine [Li et Li, 1984] für den Abbau des Gangliosids G_{M2} durch die Hexosaminidase-A [Conzelmann et Sandhoff, 1978] bzw. für den Sulfatidabbau durch die Arylsulfatase A [Stevens et al., 1981] betroffen sind. Für beinahe alle

Abbauschritte sind beim Menschen Defekte bekannt, wobei der Ausfall der α -Untereinheit der Hexosaminidase-A beim Menschen (Tay-Sachs-Krankheit) am häufigsten vorkommt. Dieser autosomal-rezessiv vererbte Defekt bewirkt eine Akkumulation von G_{M2} in Neuronen. Die Nuclei und Nissl-Substanzen sind in Richtung Peripherie verschoben [Sandhoff et al., 1989].

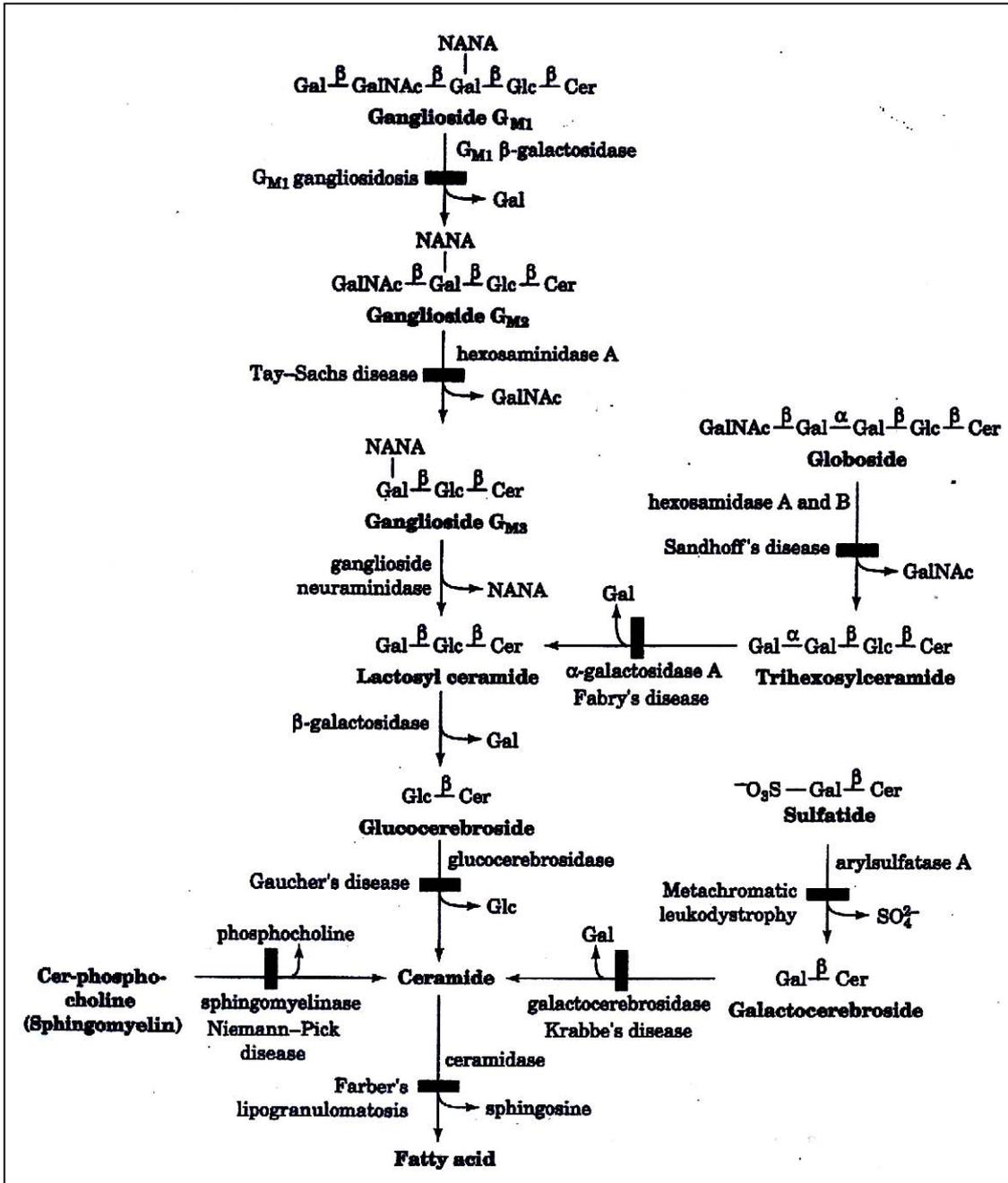


Abbildung 1-5: Übersichtsschema des Sphinglipidabbaus und den aus Defekten resultierenden Krankheiten [Voet et Voet, 1995, p.721]

Der entsprechende Enzymdefekt ist überall im Körper nachweisbar, zur Anhäufung des jeweiligen Substrates kommt es aber v.a. im Gewebe in Zellen oder Körperflüssigkeiten, in denen es unter physiologischen Bedingungen gebildet oder metabolisiert wird [Sandhoff, 1994]. So wirken sich die Defekte im Sphingolipidabbau v.a. auf das Nervensystem aus, welches einen hohen Anteil an Sphingolipiden (Ganglioside, Sulfatide, Galaktocerebroside) besitzt, andere Organsysteme können jedoch mitbetroffen sein, wie beim Morbus Sandhoff [Dolman et al., 1973; Hadfield et al., 1977; Snyder et al., 1972].

1.2.1.5 Synthese und Reifung lysosomaler Enzyme

Durch Studien an Fibroblasten zeigte sich, dass die Vorstufen der Exohydrolasen, ähnlich wie sekretorische oder membranständige Proteine, von den Ribosomen am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) gebildet werden. Von dort gelangen sie mittels einer N-terminalen Signalsequenz aus 10-15 hydrophoben Aminosäuren zur weiteren Modifikation in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums [Dingle et al., 1984]. Hier erfolgt die Abspaltung der Signalsequenz und an einige Asparaginreste werden Mannose-haltige Oligosaccharidstrukturen geheftet. Vom ER werden die Enzymvorstufen in den Golgi-Apparat transportiert. Dort erfolgt durch spezifische Glykosidasen und Glykosyltransferasen eine Modifikation der Kohlenhydratketten der Enzyme. Diese Oligosaccharide werden schließlich an einem oder mehreren Mannose-Resten phosphoryliert. Solche Mannose-6-Phosphat-Gruppen werden an spezifischen Rezeptoren der Golgi-Membran-Innenseite gebunden. Dort werden spezifische Vesikel mit Mannose-6-Phosphat-gebundenen lysosomalen Proteinen gebildet und finden durch endozytoseähnliche Schritte ihren Weg ins Lysosom, wo z.T. eine proteolytische Verkürzung der Polypeptidkette erfolgt, die zum ausgereiften Enzym führt [Sandhoff et Quintern, 1988].

Es wird deutlich, dass auf diesem komplexen Syntheseweg verschiedene Defekte auftreten können. Eine Mutation im Strukturgen einer Exohydrolase kann verschiedene Folgen haben. Sie könnte zur Bildung einer falschen mRNA

führen, die wiederum unbrauchbare oder veränderte Proteine hervorrufen würde. Diese veränderten Enzyme könnten eine unterschiedliche Struktur, Spezifität oder Stabilität aufweisen. Ebenfalls könnten die so veränderten Vorstufen der Exohydrolasen von den zur weiteren Modifikation benötigten Enzymen nicht mehr erkannt werden und so nicht weiterverarbeitet werden. Auch kann eine Veränderung der Signalsequenz den Transport der Vorstufen der Exohydrolasen innerhalb der Zelle (rER → Lumen ER → Golgi-Apparat etc.) blockieren oder verfälschen, sodass der Wirkungsort erst gar nicht erreicht wird. Daneben können natürlich auch die für Synthese, Transport und Modifikation erforderlichen Strukturen verändert sein. Dies resultiert ebenfalls in einem Enzymdefekt [Waheed et al., 1982; Hasilik et al., 1982].

Durch strukturelle Veränderungen des Enzyms oder durch Ausfall eines stabilisierenden Protein-Kofaktors, wie z.B. dem „protective protein“ bei dem kombinierten β -Galaktosidase/ α -Neuraminidase-Mangel [Galjart et al., 1988; Galjaard et al., 1987], kann das Enzym innerhalb des Lysosoms weniger stabil gegenüber Proteinase sein und somit selbst abgebaut werden [v. Figura et al., 1983; D’Azzo et al., 1982].

1.2.1.6 Speicherung und Freisetzung der lysosomalen Enzyme

Der Speicherort für eines dieser lysosomalen Enzyme, der sauren Arylsulfatase A, ist bei polymorphkernigen Leukozyten von Kaninchen untersucht worden [Shannon et al., 1983]. Shannon et al. [1983] stellten eine Aktivität in allen Granulasubtypen (Primäre oder azurophile Granula, sekundäre oder spezifische Granula und tertiäre oder sog. C-Partikel) fest, wobei der pH-Wert bei der Inkubation eine große Rolle dafür spielte, welche Granula auf das Nachweisverfahren reagierten. So reagierten bei pH 7,2 nur kleine periphere Granula, bei pH 4,2 oder 5,5 hingegen zeigten alle Größen eine Reaktion. Die Einteilung der Granula bei PMN bereitet große Probleme und auch die grobe

Komponenten-typen	Azurophile Granula	Spezifische Granula	Kleine Speicherorganellen**
Mikrobizide Enzyme	Myeloperoxidase Lysozym	Lysozym	
Neutrale Proteinasen	Elastase Kathepsin G Proteinase 3	Kollagenase	Gelatinase Plasminogen-Aktivator (?)
Saure Hydrolasen	N-Acetyl-β-Glucosaminidase Kathepsin B Kathepsin D β-Glucuronidase β-Glycero-phosphatase α-Mannosidase		N-Acetyl-β-Glucosaminidase Kathepsin B Kathepsin D β-Glucuronidase β-Glycero-phosphatase α-Mannosidase (?)
Andere		Lactoferrin Vitamin-B ₁₂ -Bindungsprotein	

Einteilung in die oben genannten drei Hauptklassen wird von Studien, die eine große Heterogenität der Granula belegen, in Frage gestellt [Rice et al., 1986]. Dennoch ist anzunehmen, dass bei Granulozyten der Hauptteil der sauren Exohydrolasen in den azurophilen Granula zu finden ist, dem gleichen Ort, an dem auch die für die zelluläre Abwehr

Abbildung 1-6: Subpopulationen der Granula bei neutrophilen Granulozyten und ihre Inhalte [Baggiolini, 1982]

wichtige Myeloperoxidase gespeichert ist (vg. Abb. 1-6). Dafür spricht auch, dass die meisten Enzyme, die sich in den azurophilen Granula befinden, ihr pH-Optimum im sauren Bereich haben - was bei den hier untersuchten sauren Exohydrolasen der Fall ist - diejenigen der spezifischen jedoch im neutralen bzw. basischen pH-Bereich [Bainton et al., 1973]. Dieses gemeinsame Vorkommen von Myeloperoxidase und sauren Exohydrolasen in den gleichen Granula ist von großem Vorteil, da der Zustand der Myeloperoxidaseaktivität in

den Granula mittels des Blutanalysegerätes Bayer ADVIA 120 untersucht werden kann. Baggiolini [1982] beschreibt jedoch auch in den sog. kleinen Speicherorganellen (vgl. Abb. 1-6) saure Hydrolasen. Es bleibt Gegenstand weiterer Forschung, den genauen Ort der für den Sphingolipidabbau verantwortlichen Exohydrolasen auszumachen, der Hauptanteil ist jedoch mit Sicherheit in den azurophilen Granula zu finden.

1.2.2 Erkrankungen durch Störungen des Sphingolipidabbaus

Aus der Vielzahl der bekannten, durch eine Störung des katabolen Stoffwechselweges der Sphingolipide verursachten Krankheiten, sollen hier Metachromatische Leukodystrophie (MLD), G_{M1} -Gangliosidose, M. Tay-Sachs und M. Sandhoff näher erläutert werden.

Es ist allen lysosomalen Sphingolipidspeicherkrankheiten gemeinsam, dass es sich um Erkrankungen mit genetischer Ursache handelt, bei denen die Mutation einer Lipidhydrolase oder eines Aktivatorproteins den Abbau der Sphingolipide blockiert und sich diese in den Lysosomen anhäufen. Obwohl es sich bei den gespeicherten Substanzen um physiologische Substanzen handelt, kommt es durch diese massive Akkumulation zu Störungen bestimmter Zellvorgänge, z.B. dem intrazellulären Transport. Bei Patienten mit der Diagnose G_{M2} -Gangliosidose konnten Purpura und Suzuki [1976] die Bildung von Meganeuriten und einen enormen Zuwachs der Synapsenhügel von Neuronen feststellen. Es besteht daher der Verdacht auf Fehlverbindungen im Gehirn [Walkley et al., 1981; Walkley et al., 1982; Goodman et al., 1991; Walkley et al., 1988]. Bis auf eine Makrophagen-markierte Glukocerebrosidase-Therapie [Barton et al., 1993] beim Morbus Gaucher, bei dem die Glukocerebrosidase defekt ist, und beim Morbus Fabry, gibt es bisher für den Menschen keine effektiven Therapien. Sphingolipidosen zeigen sich in sehr unterschiedlichen klinischen Bildern, wie Demenz, Psychosen, Organversagen, Skelettschäden oder geistige Retardierung. Es hängt daher in erster Linie von der klinischen

Erfahrung des behandelnden Arztes ab, ob die Verdachtsdiagnose einer Sphingolipidose gestellt wird und die notwendigen enzymatischen, biochemischen oder genetischen Tests veranlasst werden. Bisher sind mindestens 41 genetisch bedingte lysosomale Speicherkrankheiten (LSD) bekannt, ihre Zahl wächst jedoch mit neuen biochemischen und genetischen Nachweismethoden. Die meisten der LSD folgen einem autosomal-rezessiven Erbgang, Morbus Fabry (Ausfall der α -Galactosidase A) und die Mukopolysaccharidose (MPS) Typ II zeigen einen X-chromosomalen Erbgang. Meikle et al. [1999] haben die Prävalenz und Inzidenz von lysosomalen Speicherkrankheiten in Australien untersucht. Die Abbildung 1-7 zeigt ihre

Disorder	Protein Deficiency	No. of Diagnoses†			Incidence in Thousands‡	Prevalence in Thousands§	Carrier Frequency
		Postnatal	Prenatal	Total			
Aspartylglucosaminuria	Aspartylglucosaminidase	2	0	2	2111	2111	726
Cystinosis	Cystine transporter	15	7	22	281	192	219
Fabry disease	α -Galactosidase	36	0	36	117	117	117 000¶
Gaucher disease	β -Glucocereamidase	71	3	74	59	57	119
G _{M1} gangliosidosis	β -Galactosidase	10	1	11	422	384	310
Krabbe disease	Galactocereamidase	21	9	30	201	141	188
α -Mannosidosis	α -Mannosidase	4	0	4	1056	1056	514
Metachromatic leukodystrophy	Galactose-3-sulfatase	35	11	46	121	92	152
MPS type I (Hurler-Scheie)	α -Iduronidase	38	10	48	111	88	148
MPS type II (Hunter)	Iduronate-2-sulfatase	26	5	31	162	136	136 000¶
MPS type III-A (Sanfilippo A)	Glucosamine-N-sulfatase	33	4	37	128	114	169
MPS type III-B (Sanfilippo B)	α -N-Acetylglucosaminidase	18	2	20	235	211	230
MPS type III-C (Sanfilippo C)	Acetylcoenzyme A: α -glucosaminide-N-acetyltransferase	3	0	3	1407	1407	593
MPS type III-D (Sanfilippo D)	N-Acetylglucosamine-6-sulfatase	4	0	4	1056	1056	514
MPS type IV-A (Morquio A)	N-Acetylgalactosamine-6-sulfatase	21	4	25	201	169	206
MPS type VI (Maroteaux-Lamy)	N-Acetylgalactosamine-4-sulfatase	17	1	18	248	235	242
MPS type VII (Sly)	β -Glucuronidase	2	0	2	2111	2111	726
Mucopolipidosis type II/III	Phosphotransferase	10	3	13	422	325	285
Multiple sulfatase deficiency	Multiple sulfatase factor, all sulfatasen	3	0	3	1407	1407	593
Niemann-Pick disease type A/B	Shingomyelinase	16	1	17	264	248	249
Niemann-Pick disease type C	NPC1	20	0	20	211	211	230
Pompe disease	α -Glucosidase	21	8	29	201	146	191
Sandhoff disease	β -Hexosaminidase, β subunit	10	1	11	422	384	310
Sialic acid storage disease	Sialic acid transporter	7	1	8	603	528	363
Sialidosis	Neuraminidase	1	0	1	4222	4222	1027
Tay-Sachs disease	β -Hexosaminidase, α subunit	19	2	21	222	201	224
Wolman disease	Acid lipase	6	2	8	704	528	363
Total/Combined		470	75	545	9.0	7.7	47

*MPS indicates mucopolysaccharidosis.
 †Data are number of diagnoses made in Australia during 1980-1996.
 ‡Incidence was calculated by dividing the number of postnatal diagnoses by the number of births during the study period.
 §Prevalence was calculated by dividing the number of postnatal plus prenatal diagnoses by the number of births during the study period.
 ¶Carrier frequency was calculated by dividing the prevalence value by 4 and finding the square root.
 ||Carrier frequency for X-linked disorders was assumed to be equal to the prevalence values because the incidence of carrier births should equal the prevalence of affected births for these disorders.

Abbildung 1-7: Prävalenz und Inzidenz lysosomaler Speicherkrankheiten in Australien [Meikle et al.. 1999]

Ergebnisse:

Es fällt auf, dass lysosomale Speicherkrankheiten eine eher seltene Gruppe von Stoffwechselstörungen darstellen, insgesamt ergab sich jedoch eine Prävalenz von 1 auf 7700 Lebendgeburten. Morbus Gaucher stellt dabei mit einer Prävalenz von 1 auf 57 000 Geburten den häufigsten Subtyp dar. Nach Meikle et al. [1999] besteht auch eine enge Korrelation zwischen dem Alter bei Diagnosestellung, dem Schweregrad der Erkrankung und der Lebenserwartung. So liegt der Altersmedian der Diagnosestellung bei 2,7 Jahren, der Mittelwert jedoch bei 9,7 Jahren. Diese Zahlen sprechen dafür, dass es kaum erwachsene Patienten mit einer normalen Lebenserwartung gibt. Die Studie von Meikle et al. [1999] wurde in Australien durchgeführt, dessen Bevölkerung mit den meisten anglokeltischen Bevölkerungen vergleichbar ist, so z.B. der weißen, nicht-hispanischen Bevölkerung der USA, Kanadas und Großbritanniens. Die lysosomalen Speicherkrankheiten stellen einen großen Kostenfaktor dar. So belaufen sich die jährlichen Kosten für eine schwere MPS Typ I auf 56.000 US\$, die Enzymersatztherapie beim Morbus Gaucher auf 98.000 – 175.000 US\$ pro Jahr (Stand 1999). Die frühe Diagnosestellung und Therapieeinleitung sind daher von entscheidender Bedeutung, auch vor dem Hintergrund, dass bei Meikle et al. [1999] in 39 Familien mehr als ein Kind betroffen war und bei den meisten Familien erst zwei erkrankte Kinder geboren waren, bevor das erste mit einer lysosomalen Speicherkrankheit diagnostiziert wurde. Die nachfolgende Abbildung 1-8 gibt eine Übersicht über die bekanntesten Erkrankungen.

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
Sulfatide lipodosis	Arylsulfatase A	Sulfatide	Mental retardation, death in first decade

Abbildung 1-8: Übersicht über die bekanntesten Sphingolipidspeicherkrankheiten, dem dazugehörigen Enzymdefekt, Speichermaterial sowie Symptomen [Voet et Voet, 1995]

1.2.2.1 Metachromatische Leukodystrophie (MLD)

Metachromatische Anfärbungen des Nervensystems wurden erstmals 1910 in zwei verschiedenen Berichten von Perusini [1910] und Alzheimer [Alzheimer, 1910; Amaducci et al., 1991] bei Erwachsenen mit progressiver geistiger und motorischer Verschlechterung beschrieben.

MLD ist eine erbliche Störung des Myelinmetabolismus, charakterisiert durch Ansammlung von Galaktosylsulfatiden (Cerbrosidsulfatiden) in der weißen Substanz des ZNS und im peripheren Nervensystem (PNS).

Die Krankheit kann in jedem Alter auftreten, die folgende Abbildung 1-9 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Formen:

Type	Age at Onset, Years	Main Clinical Manifestations	Spinal Fluid Protein	Nerve Conduction Velocity	Urinary Sulfatide Excretion	Arylsulfatase A Activity	Other
Congenital	Birth	Apnea, cyanosis, seizures, generalized weakness	Unknown	Unknown	Unknown		
Late infantile	1-2	Developmental delay, ataxia, weakness, loss of speech, optic atrophy, progressive spastic quadriparesis	Elevated	Slowed	Elevated	Deficient	
Early juvenile	4-6	Mental confusion, ataxia, clumsiness, postural abnormalities, optic atrophy, progressive spastic quadriparesis	Elevated	Slowed	Elevated	Deficient	
Late juvenile	6-12	Cognitive difficulties preceding gait disturbance, pyramidal and extrapyramidal signs, slow progression	Elevated	Slowed	Elevated	Deficient	
Adult	Puberty	Dementia, psychotic thinking, incontinence, ataxia, progressive spastic quadriparesis	Normal or elevated	Normal or slowed	Elevated	Deficient	
Multiple sulfatase deficiency	<1	Signs of late infantile MLD plus coarse facial features, deafness, ichthyosis, hepatosplenomegaly, skeletal anomalies	Elevated	Slowed	Elevated	Deficient	Excess urine mucopolysaccharide, Alder-Reilly granules in white blood cells, multiple sulfatases deficient
Cerebroside sulfate sulfatase activator deficiency	4-6 Birth*	Signs of juvenile MLD Severe developmental delay	Elevated	Slowed	Elevated	Normal or mildly reduced	Deficiency of cerebroside sulfate sulfatase activator factor

*One case reported with onset at birth²¹⁶

Abbildung 1-9: Formen und Charakteristika der verschiedenen MLD-Formen [Kolodny et al., 1995]

Klinisch beobachtet man bei allen Formen als erste Anzeichen Gangstörungen, geistige Retardierung und Harninkontinenz [Kolodny et al., 1995]. Das Computertomogramm von MLD-Patienten zeigt eine symmetrische Abnahme der Abschwächung der weißen Substanz, die nicht durch Kontrastmittelgabe verstärkt wird. Diese Veränderungen resultieren vom graduellen Myelinverlust und dem gestiegenen Wassergehalt der verbleibenden Struktur. Das Magnetresonanzcomputertomogramm (MRT) [Demaerel et al., 1991] auf T₂-gewichteten Bildern zeigt sowohl in der periventrikulären als auch der subkortikalen weißen Substanz ein diffuses hyperdenses Signal. Bei der adulten Form fallen Persönlichkeitsveränderungen und Demenz als Hauptzeichen auf.

In einer Untersuchung mit 192 Fällen von adoleszenter und früheinsetzender MLD fielen folgende psychiatrische Symptome auf [Hyde et al., 1992]:

- Bei 18% akustische Halluzinationen
- Bei 27% Illusionen
- Bei 53% Psychosen
- Bei 35% Schizophrenien

Die adulte Form kann in jedem Alter zwischen 14 [Kappler et al., 1992] und 62 [Bosch et Hart, 1978] Jahren auftreten, es handelt sich also nicht wie bei den übrigen Sphingolipidosen ausschließlich um Erkrankungen im Kindesalter.

Die Hauptspeichersubstanz, das Cerebrosidsulfat, wird normalerweise mittels Hydrolyse der 3-O-Sulfat-Bindung durch die hitzelabile Arylsulfatase-A und einem hitzestabilen enzymatischen Aktivatorprotein, Saposin B, in Galaktocerebrosid abgebaut. Die Arylsulfatase-A kommt in allen Geweben des Körpers vor, sie katalysiert sowohl die Spaltung von p-Nitrocatecholsulfat als auch von Cerebrosidsulfat. Daneben hydrolysiert sie Lactosylsulfatid [Harzer et Benz, 1974], Seminolipid [Gadella et al., 1992] und Psychosinsulfat [Fischer et al., 1978]. Die Arylsulfatase-A, untersucht in menschlicher Leber, Plazenta und Fibroblasten, besteht aus zwei geringfügig unterschiedlich großen Untereinheiten zwischen 55-64 kDa [Draper et al., 1976; Waheed et al., 1982; Fujii et al., 1992]. Der Cerebrosid-Sulfatase-Aktivator, Saposin B, ist ein nicht-enzymatisches Glykoprotein und besteht aus 79-80 Aminosäuren und einer N-verknüpften Kohlenhydratkette [Fürst et al., 1990; Hiraiwa et al., 1993]. Saposin B beteiligt sich an der Extraktion von Sulfatiden und anderen Sphingolipiden aus der Membran für die Modifikation durch die lysosomalen Enzyme und hat damit Teil an der Lipidtranslokation [Vogel et al., 1991; Louis et Fluharty, 1991]. Das gleiche Protein fördert die Hydrolyse von G_{M1}-Gangliosiden [Li et al., 1983] und Globotriaosylceramiden [Gärtner et al., 1983] sowie anderen Glykolipiden zusammen mit den für diese Lipide speziellen Hydrolasen [Li et al., 1988].

Eine Sonderform ist der Multiple-Sulfatase-Defekt (MSD). Neben dem Arylsulfatase-A-Defekt besteht darüber hinaus ein Verlust der Aktivität der Arylsulfatase-B und -C sowie vier weiterer Sulfatasen, die helfen, Mukopolysaccharide abzubauen [Basner et al., 1979; Tamaka et al., 1983]. Aus

diesem Grund können im frühen Verlauf dieser Krankheitsform Mukopolysaccharidose-ähnliche Symptome wie gröber werdende Gesichtszüge, Hepatosplenomegalie und Skelettabnormalitäten, auftreten [Burk et al., 1984].

Bei einer kleinen Anzahl von Individuen wird ein selektiver Defekt des Saposin B berichtet, d.h. trotz normaler Arylsulfatase-A Aktivität akkumulieren die Myelinsphingolipide. Rafi et al. [1992] haben eine Gensersatztherapie für diesen Saposin-B-Defekt in Zellkulturen entwickelt. Die Zellen zeigten daraufhin einen normalen Metabolismus für exogen zugeführtes Cerebrosidsulfat.

Histopathologisch findet man bei der MLD metachromatische Ablagerungen, bei deren Analyse ein Sulfatgehalt von $\geq 39\%$ bezogen auf den Gesamtlipidgehalt auffiel, die anderen Lipidkomponenten waren Cholesterol und Phosphatide [Suzuki et al., 1967]. Im ZNS beobachtet man einen moderaten bis schweren Verlust von Myelinscheiden sowie eine verringerte Anzahl intrafasikulärer Oligodendrozyten. Im peripheren Nervensystem kommt es zur Ansammlung metachromatischen Materials in Schwann-Zellen, die Nervenleitung ist jedoch normal [Jatzkewitz et Mehl, 1969]. Desweiteren beobachtet man mikroskopisch dichte Kollagenablagerungen, die Cluster von myelinisierten und unmyelinisierten Axonen in kleinen, zwiebelschalenartigen Formationen umgeben [Alves et al., 1986].

Der **Defekt der Arylsulfatase-A** wurde in mehreren unterschiedlichen Geweben nachgewiesen, so z.B. in Leukozyten [DuBois et al., 1980; Percy et Brady, 1968; Kihara et al., 1973], kultivierten Lymphozyten [Beratis et al., 1975], Hautfibroblasten [Percy et Brady, 1968] und im Urin [Thomas et Howell, 1972; Hultberg, 1979]. Die am häufigsten verwendete Methode zur Messung der Aktivität der Arylsulfatase-A wurde für die Verwendung von menschlichem Urin als Probematerial entwickelt. Verwendet wird die chromogene Substanz p-Nitrocatecholsulfat als künstliches Substrat. Da auch das Isoenzym Arylsulfatase-B diese Substanz umsetzt, werden die Reaktionsbedingungen des Arylsulfatase-A Assays so gewählt, dass der Beitrag der Arylsulfatase-B minimiert wird.

Therapie

Es gibt bisher nur wenige kausale Behandlungsmöglichkeiten der MLD. Eine Möglichkeit stellt die Gensatztherapie dar, bei der mittels eines viralen Vektors die cDNA für das fehlende Enzym in die Zielzellen gebracht, dort eingebaut und exprimiert wird. Dieses Verfahren wurde bereits erfolgreich in Gewebekulturen [Rommerskirch et al., 1991] angewandt, bis zum Einsatz am Menschen bedarf es allerdings noch weiterer Untersuchungen. Eine weitere Möglichkeit bietet die Knochenmarkstransplantation (KMT), welche bei bisher über 20 Patienten mit MLD angewandt wurde [Joss et al., 1982; Bayever et al., 1985; Krivit et al., 1992]. Diese Therapieoption scheint das Fortschreiten der Symptome zu verlangsamen, Ergebnisse sieht man allerdings erst nach mehreren Monaten. Die einzelnen Untergruppen der MLD reagieren jedoch sehr verschieden auf diese, mit doch erheblichen Nebenwirkungen einhergehende Therapie. Daher haben Krivit et al. [1991, 1992] von der Anwendung einer KMT bei spät-infantilen Patienten mit klinischer Symptomatik und bei Patienten mit anhaltender und schneller Entwicklung der klinischen Zeichen und Symptome abgeraten. Patienten im Anfangsstadium ihrer Krankheit und langsamer Progredienz profitieren dagegen von der KMT. Die Frühdiagnostik ist folglich besonders wichtig.

1.2.2.2 β -Galaktosidase-Mangel (G_{M1} Gangliosidose, Morquio B)

Bei diesem ebenfalls autosomal-rezessiv vererbten Mangel des sauren lysosomalen Enzyms β -Galaktosidase kommt es zu zwei unterschiedlichen Krankheitsbildern:

- I. G_{M1} -Galaktosidose = neurodegenerative Erkrankung mit viszeraler Beteiligung
- II. Morquio B Krankheit = generalisierte Knochenerkrankung ohne Beteiligung des ZNS

Der β -Galaktosidase-Mangel wurde erstmals von Okada und O'Brien beschrieben [1968].

I. G_{M1}-Gangliosidose

Die G_{M1}-Gangliosidose ist eine neurosomatische Krankheit, die v.a. in der frühen Kindheit (infantile Form; Typ 1) auftritt. Die Inzidenz der Krankheit ist unbekannt; die infantile Form wird am häufigsten beschrieben [Suzuki et al., 1995]. Anhand ihres Verlaufs und des Eintrittsalters unterscheidet man drei Formen der G_{M1}-Gangliosidosen:

- Infantile Form oder Typ 1
- Spätinfantile/juvenile Form oder Typ 2
- Adulte/chronische Form oder Typ 3

Einen Überblick gibt Abbildung 1-10. In typischen Fällen tritt die Krankheit in der frühen Kindheit, wenige Monate oder direkt nach der Geburt, mit einem Entwicklungsstopp ein [Seringe et al., 1968; Scott et al., 1967; O'Brien, 1969; Suzuki et al., 1971; Nihei et al., 1972; Fricker et al., 1976]. Im Anschluss daran folgt eine progressive neurologische Verschlechterung und eine generalisierte

	G _{M1} Gangliosidosis			
	Infantile (Type 1)	Late Infantile/ Juvenile (Type 2)	Chronic/ Adult (Type 3)	Morquio B Disease
Onset	0–6 mo	7m–3 yr	3–30 yr	5–10 yr
Course	<2 yr	1–5 yr	10–30 yr	>30 yr
Central nervous system	Generalized	Generalized	Localized	–
Mental	+++	++	+ or –	–
Major motor	Pyramidal	Pyramidal	Extrapyramidal	–
Peripheral nervous system	–	–	–	–
Muscle	–	–	+ or –	–
Cherry-red spots	+	+ or –	–	–
Hepatosplenomegaly	+	+ or –	–	–
Dysmorphism	+ or –	+ or –	–	–
Skeletal system	Generalized	Localized	Localized	Generalized
Storage				
Ganglioside G _{M1}	+++	++	+	–
Oligosaccharides	+++	++	+	+
Keratan sulfate	+	+	ND	+++
β-Galactosidase	Deficient	Deficient	Deficient	Deficient
Gene mutation	Heterogeneous (Japanese)	R201C (Japanese)	151T (Japanese)	W273L (Caucasian)

ND = not described.

Abbildung 1-10: Einteilung der verschiedenen G_{M1}-Gangliosidoseformen und ihre Charakteristika [Suzuki et al., 1995]

Rigospastizität mit sensomotorischen und psychointellektuellen Fehlfunktionen. Patienten zeigen, insbesondere bei der infantilen Form, Schreckreaktionen auf Töne [O'Brien, 1969; Hooft et al., 1969; Feldges et al., 1973], einen pathognomonischen kirschroten Fleck in der Retina, Hornhauttrübungen, Hepatosplenomegalie, Dysmorphien [O'Brien, 1989; O'Brien, 1969] und generalisierte Skelettdysplasien [Fricker et al., 1976]. Viele dieser Kennzeichen können bei der infantilen und adult/chronischen Form weniger ausgeprägt sein oder sogar fehlen. Bei der adulten Form sind die Dystonien die neurologische Hauptmanifestation. Allgemein orientiert sich der klinische Verlauf am Manifestationsalter, wobei sich die Zeichen und Symptome des ZNS bei Fällen mit frühem Beginn sehr rasch entwickeln, der klinische Verlauf bei späterem Beginn ist dagegen verlängert. Der Tod tritt bei der juvenilen Form innerhalb weniger Jahre nach Beginn der Krankheit ein, bei den anderen zwei Formen variiert das Sterbealter [Suzuki et al., 1995].

II. Morquio B

Dieses sehr seltene Krankheitsbild wurde klinisch als eine erbliche generalisierte Skelettdysplasie mit Hornhauttrübung definiert [McKusick, 1972]. Bis 1993 wurden lediglich 15 Fälle in 9 Familien bekannt [O'Brien et al., 1976; Arbisser et al., 1977; Groebe et al., 1980; Trojak et al., 1980; Pronicka et al., 1981; van Gemund et al., 1983; Giugliani et al., 1987; Beck et al., 1987]. Es stellt eine milde Form der Morquio A-Krankheit, einer Mukopolysaccharidspeicherkrankheit, dar. Kennzeichen der Morquio B-Krankheit ist eine fehlende Beteiligung des ZNS, dafür aber eine generalisierte Skelettdysplasie, die mit Minderwuchs, Pectus carinatum, Kyphoskoliose und Platyspondylie (=generalisierte Flachwirbelbildung) endet. Die radiologischen Veränderungen mit den oben genannten Anomalitäten sind pathognomonisch, daneben kommt es noch zu der ebenfalls typischen exzessiven Ausscheidung von Keratansulfat im Urin [Trojak et al., 1980; Giugliani et al., 1987].

Das ganze Spektrum dieser verschiedenen Manifestationen kann in einer Gruppe mit dem Namen „ β -Galaktosidasen“ zusammengefasst werden. Z.Zt.

gibt es keine klare Grenze zwischen der G_{M1}-Gangliosidose und der Morquio B-Krankheit. Biochemische Analysen lassen vermuten, dass es eine Überschneidung bei den gespeicherten Materialien gibt [Suzuki et al., 1995].

Pathologie

Die Pathologie der β -Galaktosidasen ist gut in Berichten von Landing et al. [1964], Gonatas et Gonatas [1965] und Suzuki et al. [1968] dokumentiert.

Die graue Substanz des Groß- und Kleinhirns ist atrophisch, was besonders eindrucksvoll bei der infantilen Form zu sehen ist. Die kortikale Architektur ist verzerrt und die Neuronenanzahl reduziert [O'Brien et al., 1972]. Das Zytoplasma der Neuronen und Gliazellen enthält fein granuliertes Material, welches sich im elektronenmikroskopischen Bild als mehrere, konzentrisch angeordnete Einschlusskörper (MCB = membranous cytoplasmatic bodies), wie bei der Tay-Sachs-Krankheit [Terry et Weiss, 1963], darstellt. Aber auch in den peripheren Nerven [Mihatsch et al., 1973] und Astrogliazellen [Roels, 1970] kommt es zur Speicherung. Eine Degeneration des Myelins mit und ohne begleitende axonale Degeneration wird ebenfalls beobachtet [Suzuki et al., 1968].

Histiozyten mit geschwollenem Zytoplasma, angefüllt mit feinem granuliertem Material, sieht man in Leber, Milz, Lymphknoten, Thymus, Lunge, GI-Trakt, Pankreas und Knochenmark [Landing et al., 1964; Gonatas et Gonatas, 1965; Suzuki et al., 1968]. Bei den spät-einsetzenden Formen sind die histologischen Veränderungen im Allgemeinen weniger deutlich, bzw. es besteht bei den Patienten kein Hinweis auf eine viszerale Beteiligung [Patel et al., 1974].

Speichermaterial

Das β -Galaktosidase-Enzym besitzt katalytische Aktivität gegenüber Glykokonjugaten die eine terminale β -galaktosidische Bindung enthalten. Es wurden drei Hauptgruppen von Komponenten in den Zellen von Patienten mit β -Galaktosidase – Mangel gefunden:

- I. G_{M1} -Ganglioside
- II. G_{A1} , ein glykoproteinverwandtes Oligosaccharid des G_{M1} -Gangliosid
- III. Keratansulfat

G_{M1} ist das Hauptgangliosid im Gehirn von Wirbeltieren [Suzuki et al., 1995]. Die Speicherung von G_{M1} -Gangliosiden war die offensichtlichste Beobachtung für G_{M1} -Gangliosidosen seit den ersten Berichten von Jatzkewitz und Sandhoff [1963], Jatzkewitz et al. [1965] und O'Brien et al. [1965]. Ausführliche analytische Studien wurden anschließend von Suzuki et al. [1968; 1969] durchgeführt. Die Gesamtmenge von Gangliosiden in der grauen Substanz des Großhirns ist 3-5fach erhöht. G_{M1} -Gangliosid stellt dabei mit 75-80 % der Gesamtgangliosidmenge den Hauptanteil gegenüber 15-20 % bei den Kontrollwerten. Der Gesamtzuwachs von G_{A1} beträgt den vierfachen bis 20fachen Wert für die graue Substanz. Auch die viszerale Organe zeigen einen abnormen Zuwachs an G_{M1} -Gangliosid [Suzuki et al., 1971; Suzuki et al., 1969]. Daneben wurde Keratansulfat in großen Mengen in Leber und Milz von G_{M1} -Gangliosidose-Patienten entdeckt [Suzuki et al., 1969; Suzuki, 1968]. Die Keratansulfatausscheidung im Urin ist bei Patienten mit Morquio B-Krankheit deutlich erhöht [O'Brien et al., 1976].

Das Ausmaß der G_{M1} -Gangliosid-Speicherung korreliert jedoch nicht mit dem Eintrittsalter oder dem Schweregrad des Phänotyps, zumindest nicht bei der infantilen und spät-infantilen Form [Okada et O'Brien, 1968; Suzuki et al., 1971; Suzuki et al., 1969].

Enzymdefekt

Zwei lysosomale Enzyme für die Hydrolyse von terminalen, β -gebundenen Galaktosen in verschiedenen Glykokonjugaten bei saurem pH sind bekannt:

- I. *G_{M1}- β -Galaktosidase*, die folgende Substrate katabolisiert:
 - *G_{M1}-Gangliosid*
 - *G_{A1}*
 - *Laktosylceramid*
 - *Keratansulfat*
 - *Galaktoseenthaltende Oligosaccharide*

- II. *Galaktosylceramidase (Galaktocerebrosidase)*, die folgende Substrate umsetzt:
 - *Galaktosylceramide*
 - *Galaktosylsphingosine*
 - *Laktosylceramide*
 - *Monogalaktosyl-Diglyceride*

Ein erblicher Defekt des letztgenannten Enzyms führt zum Krankheitsbild der globoidzelligen Leukodystrophie (Morbus Krabbe).

Das einzige bekannte Substrat, welches von beiden Enzymen umgesetzt wird, ist Laktosylceramid [Tanaka et al., 1975; Tanaka et Suzuki, 1976].

Für **Enzymassays** werden künstliche Substrate eingesetzt:

- 4-Methylumbelliferyl β -D-Galaktopyranoside (fluoreszierend)
- p-Nitrophenyl β -D-Galaktopyranoside (chromogen)

Die Enzymaktivität der β -Galaktosidase ist in den systemischen Organen, z.B. Fibroblasten und Lymphozyten, höher als im ZNS. Der optimale pH-Wert für die β -Galaktosidase liegt bei pH 4,5. Über den Aufbau der β -Galaktosidase ist bekannt, dass es sich um ein multimeres Aggregat aus mehreren Monomeren handelt [O'Brien, 1975], die zur Aggregation in vivo ein Glykoprotein, das sog. „protective protein“ [Hoogeveen et al., 1983; D'Azzo et al., 1982], benötigen.

Dieses „protective protein“ ist ein mit der β -Galaktosidase und der Neuraminidase im Lysosom assoziiertes Glykoprotein, welches die β -Galaktosidase stabilisiert und die Neuraminidase aktiviert [Hoogeveen et al., 1983; D'Azzo et al., 1982; Verheijen et al., 1985; Verheijen et al., 1987]. Ein genetischer Defekt des „protective protein“ resultiert in einem kombinierten Mangel an β -Galaktosidase und Neuraminidase [Suzuki et al., 1985; Galjaard et al., 1987].

Daneben wird ein weiteres Protein, das sog. Sphingolipid-Aktivator-Protein SAP-I oder Saposin B, zur Spaltung von G_{M1} -Gangliosiden und anderen Sphingolipiden benötigt [Li et Li, 1976; Wenger et Inui, 1984; Mehl et Jatzkewitz, 1964; Mehl et Jatzkewitz, 1968; Jatzkewitz et Stinshoff, 1973; Gartner et al., 1983].

Bei Patienten mit G_{M1} -Gangliosidose wurden z.T. **Restenzymaktivitäten** der β -Galaktosidase von 1-5 % der Kontrollwerte in Leber und Gehirn [Norden et O'Brien, 1973] gefunden. In Leukozyten und Fibroblasten wurde ein fast vollständiger Aktivitätsverlust festgestellt [Yoshida et al., 1991; Raghavan et al., 1977; Galjaard et Reuser, 1977]. Bei Patienten mit der adulten Form der Krankheit wurden höhere Restenzymaktivitäten der β -Galaktosidase festgestellt, z.T. 5-10 % der Kontrollwerte [Yoshida et al., 1991; Suzuki et al., 1979; Yoshida et al., 1992]. Die Restenzymaktivität gegenüber künstlichen Substraten oder G_{M1} -Gangliosid war bei der infantilen, spät-infantilen und juvenilen Form nicht eindeutig mit dem Schweregrad der klinischen Manifestationen korreliert [Lowden et al., 1974; Suzuki et al., 1971; Singer et Schafer, 1972]. Es scheint sogar, dass die Menge an Restenzymaktivität eine gegensätzliche Korrelation zum Eintrittsalter oder klinischen Schweregrad besitzt.

Die **Genloci** für das Strukturgen der β -Galaktosidase und für das protective protein wurden identifiziert:

- Strukturgen β -Galaktosidase: 3p21-3q21 [Naylor et al., 1982] und 3cen-3pter [Jones et al., 1984]
- Protective protein: Chromosom 20

Beide werden für einen Abbau der o.g. Substrate benötigt.

Pathogenese

Auch wenn diese bisher recht unklar ist, deuten Daten aus Tiermodellen daraufhin, dass die Speicherung des G_{M1} -Gangliosids eng mit einer abnormalen Synaptogenese verbunden ist [Purpura et Baker, 1978; Purpura et al., 1978]. Des weiteren werden die ektopische Dendrogenese [Purpura, 1978] und die Bildung von Meganeuriten, d.h. große neurale Ausstülpungen an kortikalen Neuronen, bei mehreren lysosomalen Speicherkrankheiten beschrieben (G_{M2} -Gangliosidose, Morbus Hurler und neuronale Ceroidlipofuszinose) [Purpura et Suzuki, 1976].

Therapie

Bei kultivierten Zellen von Katzen mit G_{M1} -Gangliosidose wurde eine Enzymersatztherapie mit in Liposomen verpackten Enzymen durchgeführt, woraufhin die Speicherung von Glykolipiden abnahm [Reynolds et al., 1978]. Beim Menschen kam bisher nur eine konservative Therapie zur Anwendung. Dystonien, die hauptsächlich bei der adulten/chronischen Form auftreten, besserten sich durch eine orale Verabreichung von Trihexylphenidyl [Ushiyama et al., 1986]. Eine Knochenmarkstransplantation zeigte bisher im Tiermodell keinen Erfolg [O'Brien et al., 1990].

Der β -Galaktosidase Mangel wurde in der gleichen Form bei mehreren Tierarten beobachtet, so bei Katzen [Baker et al., 1971; Barnes et al., 1981], Hunden [Read et al., 1976; Saunders et al., 1988], Schafen [Ahern-Rindell et al., 1988] und Kälbern [Donnelly et al., 1973; Donnelly et Kelly, 1977]. Die

betroffenen Tiere zeigen nahezu die gleichen Symptome wie die betroffenen Menschen.

1.2.2.3 **G_{M2}-Gangliosidosen**

Diese Gruppe beschreibt eine autosomal-rezessiv vererbte Krankheit, bei der es zur massiven Akkumulation der Ganglioside G_{M2} und des Glykolipids G_{A2} im Nervengewebe des betroffenen Patienten kommt [Neufeld et al., 1975; Sandhoff et Christomanou, 1979; O'Brien, 1983; Sandhoff et Conzelmann, 1984]. Am lysosomalen Abbau des G_{M2}-Gangliosids sind drei Proteine beteiligt: Die wasserlösliche Hexosaminidase-A, die ebenfalls wasserlösliche Hexosaminidase-B, sowie das G_{M2}-Aktivatorprotein, ein lysosomales Glykolipidbindungsprotein. Die lysosomale Hydrolyse wird in allen Geweben des Körpers, mit Ausnahme der Erythrozyten, gefunden [Gravel et al., 1995]. Die Hexosaminidase-A besteht aus den zwei nicht-identischen Untereinheiten α und β , die beide ein aktives Zentrum besitzen [Kytzia et Sandhoff, 1985]. Die α - und β -Untereinheiten stimmen zu 57 % in ihren Sequenzen überein [Korneluk et al., 1986]. Die Hexosaminidase-B besteht aus zwei β -Untereinheiten, daneben existiert noch eine weitere Hexosaminidase-S, die aus zwei α -Untereinheiten besteht [Ikonne et al., 1975; Beutler et al., 1975; Geiger et al., 1977]. Damit jedoch das sich in der Membran des Lysosoms befindliche G_{M2}-Gangliosid von der Hexosaminidase-A abgebaut werden kann, muss es in eine wasserlösliche Form überführt werden, denn nur so kann es von der Hexosaminidase-A verarbeitet werden. Dies gelingt dadurch, dass lange Zuckerketten des G_{M2}-Gangliosids in den wässrigen Raum ragen, sodass sie vom Enzym erreicht werden können, ohne dass eine sterische Hinderung durch benachbarte Phospholipide entsteht [Schröder et al., 1993]. Eine zweite Möglichkeit ist, dass das G_{M2} Aktivatorprotein in seiner Funktion als Liftase das G_{M2}-Gangliosid aus der Membran als wasserlöslichen Protein-Lipid-Komplex herauslöst [Conzelmann et al., 1982] und der Hexosaminidase-A zuführt, die dieses dann im aktiven Zentrum binden kann. Nach hydrolytischer Abspaltung des

terminalen N-Acetylgalaktosamins vom Gangliosid G_{M2} dissoziiert das entstandene G_{M3} -Gangliosid wegen geringerer Affinität vom aktiven Zentrum der Hexosaminidase-A (Hex-A) ab. Die β -Untereinheit der Hex-A ist notwendig für das Binden des G_{M2}/G_{M2} -Aktivatorkomplexes, die α -Untereinheit stellt den aktiven Ort der G_{M2} -Hydrolyse dar [Gravel et al., 1995].

Zu einer Störung des G_{M2} -Gangliosidabbaus kann es durch Mutationen in allen drei Polypeptiden (α - und β -Untereinheit sowie G_{M2} -Aktivatorprotein) kommen:

- I. Mutationen der α -Untereinheit, das verantwortliche Gen wird mit HEXA bezeichnet, auf Chromosom 15q23→q24 [Takeda et al., 1990] führen zur Tay-Sachs-Krankheit oder auch als Variante B der G_{M2} -Gangliosidosen bezeichnet, da hierbei nur noch die Hexosaminidase-B ($\beta\beta$) Aktivität zeigt.
- II. Mutationen in der β -Untereinheit (codiert auf Chromosom 5q13 [Fox et al., 1984]) führen zur Sandhoff'schen Krankheit oder auch als Variante O bezeichnet, da sowohl Hex-A ($\alpha\beta$) als auch Hex-B ($\beta\beta$) ausfallen.
- III. Bei der seltenen AB-Variante fehlt das G_{M2} -Aktivatorprotein [Conzelmann et Sandhoff, 1978], dessen Gen GM2A auf Chromosom 5q32-33 [Burg et al., 1985; Heng et al., 1993; Swallow et al., 1993] liegt, wohingegen Hex-A ($\alpha\beta$) und -B ($\beta\beta$) unverändert sind. Nach Zugabe von gereinigtem G_{M2} -Aktivatorprotein wird der Katabolismus des G_{M2} -Gangliosids auch wieder normalisiert [Sonderfeld et al., 1985].

Nomenklatur: 1971 führten Sandhoff et al. [1971] eine Klassifikation ein, die sich an dem im Gewebe des Patienten verbleibenden Isoenzym orientierte:

Variante B	Hex-A ist defekt
Variante O	Hex-A und Hex-B sind defekt
Variante AB	G_{M2} -Aktivatorprotein ist defekt

Es empfiehlt sich jedoch ebenfalls eine klinische Einteilung:

- I. Tay-Sachs-Erkrankung u.a. aufgrund einer HEXA Mutation
- II. Sandhoff'sche Erkrankung u.a. aufgrund einer HEXB Mutation
- III. G_{M2} -Aktivatorproteindefekt u.a. aufgrund einer GM2A Mutation

G_{M2} -Gangliosidose Variante B (Morbus Tay-Sachs)

Bei diesem erstmals 1887 von Sachs und ophthalmologisch 1881 von Tay beschriebenen Symptomkomplex handelt es sich um einen Defekt der α -Untereinheit der Hex-A [Bartholomew et Rattazzi, 1974; Carroll et Robinson, 1973; Geiger et al., 1975; Srivastava et Beutler, 1974], die die Abspaltung von N-Acetylgalactosamin von G_{M2} katalysiert [Conzelmann et Sandhoff, 1979]. Fehlt diese Hex-A, kommt es zur massiven Akkumulation der Ganglioside G_{M2} und der Glykolipide G_{A2} im Nervengewebe, bis die Zellen zugrunde gehen [Neufeld et al., 1975; Sandhoff et Christomanou, 1979; O'Brien, 1983; Sandhoff et Conzelmann, 1984; Riede et Schaefer, 1999]. Es liegen normale bis leicht erhöhte Hex-B($\beta\beta$)-Werte vor [Okada et O'Brien, 1969; Sandhoff, 1969; Sandhoff et al., 1971]. Die Zellen des retikulohistiozytären Systems sind nicht beteiligt [Riede et Schaefer, 1999, p. 105]. Die Tay-Sachs-Krankheit gilt als die häufigste Krankheit unter den Sphingolipidosen, mit einer besonderen Häufigkeit unter den Ashkenazi-Juden, die bei 1 pro 3900 liegt [Petersen et al., 1983].

G_{M2} -Gangliosidose Variante AB (Morbus Sandhoff)

Sandhoff [Sandhoff et al., 1968] zeigte, dass bei einigen, nicht-jüdischen Patienten, beide Hexosaminidasen, A und B, fehlten. Bei diesen Patienten liegt also ein Defekt in beiden Isoenzym-Aktivitäten vor. Die neurologischen Symptome sind klinisch nicht von denen der Tay-Sachs-Erkrankung zu

unterscheiden, lediglich Jugendliche mit schwerem Verlauf der Sandhoff'schen Erkrankung zeigen einen Miteinbezug nicht-neuronalen Gewebes: Hepatosplenomegalie, Dysostosis multiplex, d.h. ähnliche Symptome wie bei der infantilen G_{M1} -Gangliosidose. Bei einigen können N-Acetylglucosamin enthaltende Oligosaccharide im Urin [Strecker et al., 1977] vorkommen, was zur Differenzierung Sandhoff \leftarrow \rightarrow Tay-Sachs dienen kann.

Variante AB, G_{M2} -Aktivatorproteindefekt

Diese Krankheit wird durch einen Defekt des G_{M2} -Aktivatorproteins verursacht [Conzelmann et Sandhoff, 1978; Hechtmann et al., 1982; Hirabayashi et al., 1983; Xie et al., 1992; Schröder et al., 1993]. Klinisch ist diese Form ebenfalls nicht von den beiden vorher genannten zu unterscheiden. Die Hexosaminidase-A und -B sind nicht betroffen [Sandhoff et al., 1971; Conzelmann et Sandhoff, 1978].

Klinische Phänotypen

Einteilung nach dem Alter bei Einsetzen der Symptome:

1. Infantile akute G_{M2} -Gangliosidose (Tay-Sachs und Sandhoff)

Kinder zeigen bei Geburt keine Symptome, das erste Anzeichen ist eine leichte motorische Schwäche, beginnend im Alter von 3-5 Monaten. Zur gleichen Zeit bemerken die Eltern eine Überreaktion auf schrille Töne, die sich in plötzlichen Streckungen der Extremitäten äußert (Hyperakusis). Durch die Anhäufung des G_{M2} -Gangliosids in den Glia- und Ganglienzellen kommt es im Alter von ca. einem Jahr zu neurologischen Funktionsausfällen. Kennzeichnend, wenn auch nicht pathognomonisch für die Tay-Sachs-Krankheit, ist ein „kirschroter Fleck“ der Macula, der durch den Untergang der Neurone im Bereich der Retina und folgender Verdünnung mit Durchschimmern der Choroidea hervorgerufen wird. Im weiteren Krankheitsverlauf wird das Kind zunehmend schwächer, lethargisch, retardiert, bewegt sich kaum noch, greift nicht nach Gegenständen und spricht kaum. Es können spastische Lähmungen und Anfälle, v.a. Lachanfalle, auftreten. Eine Makrozephalie kann mit 18 Monaten auftreten. Der

Tod tritt meist nach Auftreten von Makrozephalie, kortikaler Blindheit, heftigen Krämpfen und vegetativen Störungen im Alter von 2-4 Jahren infolge einer Bronchopneumonie, verursacht durch Aspiration, ein [Kracun et al., 1984].

II. Subakute G_{M2} -Gangliosidose

Der Krankheitsbeginn kündigt sich durch Ataxien und mangelnde Koordination im Alter zwischen 2 und 10 Jahren an. Regression und Demenz, v.a. der Sprache und Lebensfertigkeiten, zusammen mit einer psychomotorischen Retardierung, treten auf [Gravel et al., 1995]. Es kommt zu Anfällen und erhöhter Spastizität am Ende der ersten Lebensdekade [Brett et al., 1973; MacLeod et al., 1977; Menkes et al., 1971; Suzuki et al., 1970; Suzuki et Vanier, 1991]. Kinder fallen im Alter von 10 bis 15 Jahren in einen vegetativen Zustand und sterben bald an Infektionen.

III. Chronische G_{M2} -Gangliosidose

Auch hier ist die Unterscheidung zwischen einem Hex-A oder Hex-B - Defekt klinisch nicht möglich, HEX-A-Mutationen kommen jedoch bei dieser Form der Gangliosidose sehr viel häufiger vor [Gravel et al., 1995]. Es kommt zur progressiven Dystonie und auch andere extrapyramidalmotorische Störungen sind häufig. Daneben treten spinocerebelläre Degenerationen mit Dysarthrie, Ataxie und Abnormalitäten der Entwicklung zwischen zwei und zehn Jahren auf [Johnson et al., 1977; Rapin et al., 1976; Willner et al., 1981]. Die mentale und verbale Intelligenz bleiben normal. Psychische Abnormalitäten wie Schizophrenie mit Denkstörungen, Illusionen, Halluzinationen oder Depressionen treten bei 40% der Patienten auf [Gravel et al., 1995].

Pathologie

Diese ist bei allen drei Formen annähernd gleich, nur beim Morbus Sandhoff kann es zu der oben genannten Mitbeteiligung viszeraler Organe, wie endokardiale Fibrose oder Hepatosplenomegalie, kommen [Dolman et al., 1973; Hadfield et al., 1977; Snyder et al., 1972]. Histopathologisch finden sich

geschwollene Neurone mit Speichermaterial, die Nuclei und Nissl-Substanzen sind in Richtung Peripherie verschoben [Sandhoff et al., 1989].

Therapie

Diese ist auf supportive Maßnahmen beschränkt, es existiert bis heute keine spezifische Therapie, auch wenn Knochenmarkstransplantationen [Krivit et Paul, 1986] Erfolge bei Speicherkrankheiten zeigen, die die peripheren Organe betreffen.

1.2.3 Diagnostik der Sphingolipidosen

Bei den Diagnoseverfahren zum Nachweis von Sphingolipidosen kann man drei Hauptgruppen unterscheiden: Die klinische, biochemische und molekulare Diagnostik, wobei die erstere zwar Voraussetzung für die Verdachtsdiagnose einer Sphingolipidspeicherkrankheit ist, in diesem Rahmen jedoch nicht besprochen werden soll, da sich die vorliegende Arbeit v.a. auf die biochemische Diagnostik konzentriert.

1.2.3.1 Biochemische Diagnostik

1.2.3.1.1 Analyse der gespeicherten Materialien aus Biopsien

Dieses Nachweisverfahren wurde früher hauptsächlich genutzt und konnte bei allen vier Formen angewandt werden. So wurde der Nachweis der metachromatischen Leukodystrophie mittels einer Biopsie des Nervus suralis erbracht [Kolodny et al., 1995], weniger invasive Methoden verwendeten Biopsien der Konjunktiva [Libert et al., 1979], der Haut [Gebhart et al., 1978] oder aus Urinsedimentzellen [Read, 1967]. Auch die G_{M1} -Gangliosidose konnte mittels Rektalbiopsie [Ushiyama et al., 1985; Ikeda et al., 1986] histopathologisch nachgewiesen werden. Das Problem besteht jedoch darin,

dass nicht-neuronales Gewebe, z.B. nur sehr wenig G_{M1} - bzw. G_{M2} -Gangliosid speichert. Daher sind die Lipidanalysen auf Nervengewebe post mortem oder Aborte beschränkt. Hier sieht man allerdings eindrucksvoll die enorme Speicherung der jeweiligen Sphingolipide, die bei der G_{M1} -Gangliosidose in der weißen Substanz bis zu 10fach [Suzuki et al., 1969] erhöht ist. Bei einem 18-20 Wochen alten Föten wurde eine 4-5fache G_{M2} -Gangliosid-Akkumulation [Hoffman et al., 1977; Conzelmann et al., 1985] festgestellt. Die Bestimmung der G_{M1} -Ansammlung im Gehirngewebe erfolgte dann durch Dünnschicht-Chromatographie [Berra et al., 1977] zwar zufriedenstellend, blieb jedoch wie oben erwähnt auf post mortem-Präparate beschränkt.

Auch die Urinanalyse kann bei der Diagnostik hilfreich sein. So akkumulieren beim M. Sandhoff N-Acetylglucosamin-Oligosaccharide in fast allen Geweben und werden daher auch im Urin mitausgeschieden, weshalb sie zur Diagnostik verwendet werden können [Warner et al., 1986]. Bei der G_{M1} -Gangliosidose korreliert die Konzentration der Urin-Oligosaccharide sogar mit der Schwere der Krankheit [Yamashita et al., 1981; Warner et al., 1983].

Kürzlich wurde der Nachweis von LAMP-1, einem in der Membran von Lysosomen vorkommenden Protein, zum Screening von Neugeborenen auf Lipidspeicherkrankheiten vorgestellt [Meikle et al., 1997]. Dieser Nachweis kann mit der Probe auf der Guthrie-Karte vorgenommen werden.

1.2.3.1.2 Enzymatische Nachweisverfahren

Diese Verfahren stellen die heute gängigsten dar. Dabei wird die Aktivität des jeweiligen Enzyms in Probematerialien wie peripheren Leukozyten, kultivierten Hautfibroblasten, Serum oder Plasma gemessen [Gravel et al., 1995; Suzuki et al., 1995; Kolodny et al., 1995]. Die Messung der jeweiligen Aktivität im Urin gilt allgemein als eher unzuverlässig [Austin et al., 1965; Thomas et Howell, 1972; Hultberg, 1979].

Das Grundprinzip besteht darin, ein künstliches Substrat zur Messung der Enzymaktivität zu verwenden. Hier eine kurze Übersicht über die am meisten verwendeten Substrate [Gravel et al., 1995; Suzuki et al., 1995; Kolodny et al., 1995]:

G_{M1} -Gangliosidose mit Enzym β -Galaktosidase :	4-Methylumbelliferyl β -Galaktopyranoside oder p-Nitrophenyl β -Galaktopyranoside
G_{M2} -Gangliosidosen mit Enzym Hexosaminidase-A:	p-Nitrophenyl-6-sulfo-2-acetamido-2 deoxy-y-D-Glucopyranoside
MLD mit Enzym Arylsulfatase-A:	p-Nitrocatecholsulfat

Aus diesen Reaktionen hervorgehende Stoffwechselprodukte werden dann gemessen und so Rückschlüsse auf die Enzymaktivität gezogen. Probleme ergeben sich daraus, dass die verwendeten Substrate z.T. auch von anderen Isoenzymen umgesetzt werden, die bei manchen dieser Krankheitsformen auch noch erhöht sind, so z.B. die Galaktosylceramidase bei der G_{M1} -Gangliosidose oder die Arylsulfatase-B bei der MLD [Suzuki et al., 1995; Kolodny et al., 1995]. Dieses Problem kann durch Ausschaltung des jeweiligen Isoenzym behoben werden. Dazu stehen mehrere Verfahren zur Verfügung. Zum einen können vor der Enzymmessung die Isoenzyme voneinander getrennt werden, wozu sich folgende Möglichkeiten ergeben:

- I. Ionenaustausch-Chromatographie
- II. Elektrophorese
- III. Isoelektrische Auftrennung

Nach dieser Auftrennung kann dann eine Messung der einzelnen Enzymaktivität vorgenommen werden. Die andere Möglichkeit besteht darin, während des Mess- oder Inkubationsvorganges eines der beiden Enzyme

auszuschalten. Dies macht man sich z.B. bei der Messung der Hexosaminidase-A-Aktivität zu Nutzen. Bei einem pH-Wert von 4,4 ist die Hexosaminidase-B bis zu einer Temperatur von 55°C einigermaßen stabil, wohingegen die Hexosaminidase-A bei 50°C mit einer Halbwertszeit von zehn Minuten [Conzelmann et al., 1978; Geiger et al., 1977] bzw. bei 55°C von drei Minuten [Conzelmann et al., 1978] zerfällt. Die Gesamtaktivität wird vor und nach der selektiven Zerstörung der Hexosaminidase-A gemessen und aus der Differenz wird die Aktivität der Hexosaminidase-A berechnet. Bei der Messung der Aktivität der Arylsulfatase-A zur Bestimmung einer MLD kann fluoreszierendes Substrat (4-Methylumbelliferylsulfat) in Kombination mit Ag^+ -Ionen benutzt werden, wodurch die Arylsulfatase-A spezifisch gehemmt wird [Christomanou et Sandhoff, 1977]. Hier wird die Enzymaktivität in Ab- und Anwesenheit von Ag^+ -Ionen durchgeführt und aus dem Unterschied die Aktivität der Arylsulfatase-A berechnet. Ein anderes Verfahren nach Lee-Vaupel und Conzelmann [1987] macht sich den Effekt der Temperatur auf die Sulfatasereaktion für die Arylsulfatase-A über Nacht zu Nutzen. Bereitet die Verwendung von künstlichem Substrat Schwierigkeiten, z.B. in Form von doppel- oder mehrdeutigen Ergebnissen, wird die Verwendung des natürlichen Substrates, welches dann z.B. bei der G_{M1} -Gangliosidose radiomarkiertes [Raghavan et al., 1977] G_{M1} oder G_{A1} ist, empfohlen.

1.2.3.1.3 Metabolische Untersuchungen

Hierbei wird nach Zugabe von exogenem radioaktiv markiertem Substrat der Stoffwechsel in kultivierten Zellen beobachtet [Stevens et al., 1981; Kolodny et Raghavan, 1983; Raghavan et al., 1985]. Dieses Verfahren zeigt Vorteile bei der Diagnose der sogenannten Aktivatorproteinddefekte, bei denen die Enzymaktivität normal ist, die natürlichen Sphingolipide in vivo jedoch nicht den Enzymen zur Verfügung gestellt werden können.

1.2.3.2 Molekulare Nachweisverfahren und genetische Diagnostik

Prinzipiell ist die direkte Sequenzierung einer für eine Sphingolipidose verantwortlichen Gen-Mutation möglich, sie ist jedoch sehr zeit- und arbeitsintensiv und für die klinische Anwendung z.Zt. nicht praktikabel. Ist eine Mutation innerhalb einer Familie bekannt, können die Familienmitglieder auf diese mittels Restriktionsanalyse, Oligonukleotid-Hybridisierung oder Amplifikationsverfahren untersucht werden [Suzuki et al., 1995]. Allein für die G_{M2} -Gangliosidosen sind bis heute 54 spezifische Mutationen der α -Untereinheit bekannt. Bei der G_{M1} -Gangliosidose hingegen wurde für die Gen-Diagnostik eine Bsu361-Restriktionsanalyse an 14 Patienten von zehn verschiedenen japanischen Familien mit einer adult-chronischen Form durchgeführt [Yoshida et al., 1992]. Es zeigte sich, dass alle 14 unterschiedliche Patienten einen gemeinsamen Ein-Basenaustausch von I51T hatten. Nützlich ist der genetische Nachweis für die sogenannte Heterozygoten-Bestimmung, die enzymatisch oft Probleme bereitet. Bis jedoch alle möglichen Gen-Mutationen charakterisiert sind, ist für ein Screeningverfahren der enzymatische Nachweis vorzuziehen, da dieser das gesamte Spektrum abdeckt. Daher basiert das Screeningverfahren an der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen ebenfalls auf diesen enzymatischen Nachweisverfahren.

1.2.3.3 Pränatale Diagnostik (PND)

Als sehr erfolgreich und zuverlässig hat sich hier der Nachweis der jeweiligen Enzymaktivität in kultivierten Zellen aus Fruchtwasser oder besser noch einer Biopsie der Chorionzotten erwiesen [Lowden et al., 1973; Booth et al., 1973; Kaback et al., 1973; Kleijer et al., 1976; Kudoh et al., 1978; Ida et al., 1989; Müller et al., 1969; Eto et al., 1982; Porter et al., 1971; Percy et al., 1972]. Anhand der PND der MLD sei jedoch auf mögliche Fehlerquellen hingewiesen. So ist die Aktivität der Arylsulfatase-A in den kultivierten Zellen während der

log-Phase des Zellwachstums meist gering. Erst nachdem die kultivierten Zellen die Plateauphase erreicht haben, sieht man eine signifikante Enzymaktivität. Daher muss der Zeitpunkt der Messung sehr genau berücksichtigt werden. Die direkte Enzymaktivitätsmessung im Fruchtwasser existiert ebenfalls, ist jedoch weitaus unzuverlässiger als die in Zellkulturmedien. Zuverlässiger ist die Analyse von Stoffwechselprodukten im Fruchtwasser, so z.B. von Galaktosyl-Oligosacchariden [Warner et al., 1983] bei der G_{M1} -Gangliosidose.

1.2.4 Probleme der enzymatischen Nachweisverfahren

Leukozyten haben nach bisherigen Erkenntnissen keine funktionelle Bedeutung für den Sphingolipidabbau. Periphere Leukozyten sind aber ein leicht zugängliches Probenmaterial um die Aktivität mehrerer lysosomaler Hydrolasen zu testen und repräsentieren die Aktivität der am Sphingolipidabbau beteiligten Zellen (z.B. Oligodendrozyten, Schwann-Zellen bei Arylsulfatase etc.). Normalerweise werden gemischte Leukozytenpräparate verwendet und die Differenzierung in die einzelnen Leukozytenfraktionen wird nicht berücksichtigt. Es gibt jedoch Untersuchungen, die zeigen, dass lysosomale Enzyme innerhalb der Leukozytenfraktionen unterschiedlich verteilt sind. Nakagawa et al. [1978] zeigten anhand der β -N-Acetyl-Hexosaminidase die unterschiedliche Verteilung innerhalb der verschiedenen Zelltypen und eine unterschiedliche Verteilung der verschiedenen Isoenzyme der Hexosaminidase innerhalb dieser Zellen. Beutler et al. [1976] berichteten von einer beachtlichen Variabilität der spezifischen Aktivität verschiedener saurer lysosomaler Hydrolasen in gereinigten menschlichen neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten. In einer anderen Arbeit untersuchten Nakagawa et al. [1980] drei weitere Enzyme: α -Mannosidase, α -Glucosidase und β -Glucosidase. Auch hier zeigten sich wieder verschiedene Verteilungsmuster innerhalb der Leukozytenfraktionen. Es ist daher anzunehmen, dass auch die Enzyme Arylsulfatase-A, β -Galaktosidase, Hexosaminidase-A und B innerhalb der

Leukozytenfraktion unterschiedlich aufgeteilt sind, was in dieser Arbeit untersucht wurde.

Die Blutproben für die Enzymaktivitätsbestimmungen sind z.T. mehrere Tage mit der Post unterwegs. Die Aktivitätsmessung erfolgt in den Zellen und nicht im Serum oder Plasma, welches verworfen wird. Der Transport sowie die Aufarbeitung stellen für die Leukozyten „Stress“ dar, auf den sie mit einer Degranulation ihrer Speichergranula reagieren. Ob von dieser Degranulation auch die Granula mit den lysosomalen Enzymen des Sphingolipidabbaus betroffen sind und inwieweit diese Ausschüttung parallel zu derjenigen an Myeloperoxidase verläuft, war ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit. Die Inhalte eines Teils der Granula befinden sich dann im Serum oder Plasma und stehen nicht mehr für die Messung innerhalb der Zellen zur Verfügung. Bei den Messungen ergeben sich folglich falsch-niedrige Aktivitäten.

Diese genauere Betrachtung der Messergebnisse ist insofern von Bedeutung, als Enzymrestaktivitäten zwischen 10-20% mit einem normalen Leben vereinbar sein können. Conzelmann et al. [1983] entwickelten ein kinetisches Modell, welches die Enzymaktivität in Bezug zum Substratumsatz setzt. Es zeigt, dass 10-15% Restaktivität der Hexosaminidase-A zum Überleben ausreichen und einen normalen Katabolismus der G_{M2} -Ganglioside ermöglichen. Dann allerdings reichen kleine Schwankungen von 5% aus, den klinischen Verlauf drastisch zu verändern. Der Grenzwert wird erreicht, wenn V_{max} des restlichen katabolen Systems dem Einstrom des Glykolipidsubstrates in das Lysosom entspricht. Auch für die Identifizierung von Heterozygoten ist eine sehr genaue und differenzierte Betrachtung der enzymatischen Aktivität von Nöten, da hier die Grenze zwischen „normal“ und „pathologisch“ sehr eng ist.

1.3 Aufgabenstellung

1.3.1 Trennung der Leukozyten in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten mit Messung des jeweiligen Anteils an der Gesamtenzymaktivität

Im Routinebetrieb werden die Gesamtleukozyten ohne Berücksichtigung der Zusammensetzung der einzelnen Leukozytenfraktionen auf ihre Enzymaktivität hin getestet. Untersuchungen an Leukozyten zeigten jedoch, dass bestimmte lysosomale Enzyme verschieden auf die einzelnen Zellfraktionen verteilt sind [Beutler et al., 1976; Nakagawa et al., 1978; Schmidt et al., 1977; Nakagawa et al., 1980]. Ob dies auch für die bei diesem Screeningverfahren untersuchten Enzyme gilt, sollte Ziel der vorliegenden Arbeit sein. Dazu wurden die Leukozyten mittels Dichtegradienten und MACS-Methode in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten aufgetrennt und die Enzymaktivität der einzelnen Fraktionen gemessen.

1.3.2 Versuche zur Degranulation der Enzyme aus den Granulozyten und Bestimmung der Enzyme im Überstand und Zellpellet

Viele Blutproben kommen von auswärts und sind 1-3 Tage unterwegs. Daher kann die Qualität der Blutzellen reduziert sein, was zu niedrigeren Messwerten führt, da speziell Granulozyten auf Stress mit einer Degranulation reagieren und dabei einen Teil ihrer Inhaltsstoffe abgeben. Ob sich unter diesen Inhaltsstoffen auch die lysosomalen Enzyme Arylsulfatase-A, β -Galaktosidase und Hexosaminidase-A und -B befinden, sollte untersucht werden. Dazu wurden Granulozyten mittels Dichtegradienten isoliert und mit verschiedenen bekannten Stimuli zur Degranulation angeregt. Im Anschluss daran wurde die Enzymaktivität sowohl im Überstand als auch im Zellpellet gemessen.

1.3.3 Vergleich der Ausschüttung von Myeloperoxidase und den lysosomalen Enzymen nach Stimulation der Granulozyten

Das Blutanalysegerät Bayer ADVIA 120 ermöglicht die Messung der Myeloperoxidaseaktivität in den Leukozyten. Dieses Enzym wird durch physiologische Aktivierung bzw. unter „Stress“ von den Granulozyten an ihre Umgebung abgegeben, am Bayer ADVIA 120 zeigt sich dies in einer Abnahme der Myeloperoxidaseaktivität in den Granulozyten. Würde der Verlust an Myeloperoxidase unter „Stress“ mit dem Verlust an Aktivität der vier lysosomalen Enzyme korrelieren, könnte man über die Myeloperoxidaseaktivität des Bayer ADVIA 120 vor und nach Isolierung der Zellen aus dem Vollblut Rückschlüsse auf den Verlust der vier lysosomalen Enzyme ziehen. Um dies zu untersuchen, wurde die Menge an Myeloperoxidase, die mit der Aktivität am Bayer ADVIA 120 Bild korreliert, im Überstand und Zellpellet zuvor mit bekannten Stimuli behandelter Granulozyten mittels ELISA gemessen und mit der Enzymaktivität, ebenfalls in Überstand und Zellpellet der gleichen Proben gemessen, verglichen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Substanzen

Bovine Serum Albumin (BSA)	Gibco
Cytochalasin B	Sigma
Citronensäure	Roth
Dextran T 250	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (Na-EDTA)	Sigma
Glucose	Sigma
Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF, Neupogen)	Amgen
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec
Hapten-Antibody Cocktail	Miltenyi Biotec
Heparin Natriumsalz	Roth
Histopaque 1119 und 1077	Sigma
MACS Anti-Hapten MicroBeads	Miltenyi Biotec
May-Grünwald-Giemsa-Färbelösung	Hämatolo- gisches Labor, Univ.- klinik Tübingen
NaCl	Merck
NaOH	Merck
Natriumacetat	Merck

Natriumpyrophosphat	Fluka
N-formyl-Meth-Leu-Phe (N-fMLP)	Sigma
Phosphate Buffered Saline (PBS)	
- mit Ca^{2+} und Mg^{2+}	Biochrom
- ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}	Gibco
p-Nitrocatecholsulfat	Sigma
p-Nitrophenyl β -D-Galaktopyranosid	Sigma
p-Nitrophenyl-6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy- γ -D-glucopyranosid	Sigma
p-Nitrophenyl N-Acetyl- β -D-Glucosaminid	Sigma
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)	Gibco

2.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Dextransedimentation-Lösung

5 g	Dextran 250 000 Dalton
0,7 g	NaCl
50 mg	Na-Heparin
100 ml	Aqua Bidest.

β -Galaktosidase-Bestimmung

Puffer 1 (pH 4,5)

0,25 M	Na-acetat
0,5 M	NaCl
	Essigsäure
	Aqua Bidest.

Puffer 2 (pH 4,5)

0,25 M	Na-acetat
	Essigsäure
	Aqua Bidest.

Substratlösung

6 mg	p-Nitrophenyl β -D-Galaktopyranosid
10 ml	Puffer 1

 β -Hexosaminidase-A-BestimmungCitratpuffer (pH 4,0)

0,1 M	Citronensäure
0,2 M	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Substratlösung

100 mg	p-Nitrophenyl-6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosid
	Aqua Bidest.

Gesamt-Hexosaminidase-BestimmungCitratpuffer (pH 4,5)

0,1 M	Citronensäure
1 M	NaOH

Substratlösung

7 mg	p-Nitrophenyl N-Acetyl- β -D-Glucosaminid
10 ml	Citratpuffer

Arylsulfatase A

Na-acetatpuffer (pH 5,0)

1 Teil	0,5 M Essigsäure
3 Teile	0,5 M Na-acetat

Substratlösung

0,01 M	p-Nitrocatecholsulfat
0,005 M	Natriumpyrophosphat
10 %	NaCl
	Na-acetatpuffer
	Aquabidest

MACS-Auftrennung

Herstellung des MACS-Puffers:

373 mg EDTA Dinatrium ad 33,3 ml BSA 7.5 % ad 500 ml PBS w/o
Ca⁺⁺, Mg⁺⁺

Degranulationsversuche

PBS mit Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ und Glucose:

100 mg Glucose ad 100 ml PBS mit Ca⁺⁺, Mg⁺⁺

Cytochalasin B-Lösung:

1 mg Cytochalasin B wurde in 0,4 ml DMSO gelöst (2,5 mg/ml) und
als Aliquote zu je 20 µl bei -70°C eingefroren und gelagert

Herstellen der N-fMLP-Lösung:

5 mg N-fMLP wurden in 1,14 ml DMSO gelöst (10⁻² M) und als
Aliquote zu je 10 µl bei -70°C eingefroren und gelagert

Myeloperoxidase ELISA KitMPO ELISA KIT:

Calbiochem

- Sample diluting buffer 20 mM phosphate buffer, pH 7,4, enthält 2 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 0.1 % Tween 20 und 0,2% sodium azide
- MPO Standard: gereinigtes MPO in lyophilisierter Form
- Waschpuffer: 1 M Tris-HCl Puffer, pH 7,8, enthält 3 M NaCl, 2 % Tween 20 und 0,1 % Natriumazid
- Anti-MPO Lösung: biotinylierte Ziegen-anti-MPO in 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, enthält 150 mM NaCl, 2 mg/ml BSA und 25 % Glycerol
- Avidin-alkalische Phosphatase Lösung
- Verdünnungspuffer: 20 mM Phosphatpuffer, pH 7,4, enthält 150 mM NaCl, 20 mg/ml BSA und 0,2 % Natriumazid
- pNPP (p-Nitrophenylphosphat) Verdünnungspuffer: 1 M Diethanolaminpuffer, pH 9,8, enthält 0.5 mM MgCl₂ und 0,1% Natriumazid
- Stopplösung: 1 M NaOH enthält 100 mM EDTA
- pNPP Tabletten: pro Tablette 5 mg pNPP

PBS w/o Ca⁺⁺, Mg⁺⁺

Gibco

Tween 20

Sigma

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Eppendorfcups 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf
Halb-Mikroküvetten	Greiner
Parafilm	Serva
Pasteurpipetten	Fortuna
Pipettenspitzen	Eppendorf
Sterile Einmalspritzen 20 und 50 ml	Braun
Sterilfilter	Falcon
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml	Falcon

2.1.4 Geräte

ADVIA 120	Bayer- Technicon
Brutschrank Hera Cell	Heraeus
ELISA-Reader Milenia Kinetic Analyzer	DPC
Hettich-Zentrifuge	Hettich
Magnetrührer MR 2002	Heidolph
Mikroskop	Zeiss
Mini MACS	Miltenyi Biotec
pH-Meter	WTW- Weilheim
Spektralphotometer	Beckmann
Sterile Werkbank	Heraeus
Ultraschallgerät, Sonifier B-12 Cell	
Disrupter	Branson Sonic Power
Vortex VRZ	IKA-

Wasserbad
Waage MC1

Labortechnik
Memmert
Sartorius

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung des Differentialblutbildes und des MPXI-Wertes mit Hilfe des Bayer ADVIA 120

Definition

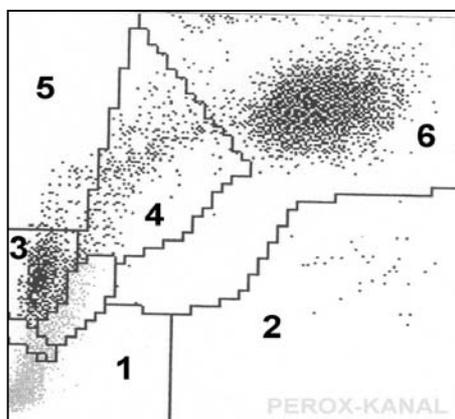


Abbildung 2-1: ADVIA 120 Bild einer Vollblutprobe; Leukozytendifferenzierung

Im Peroxidasekanal/“Baso“-Kanal;
1=Rauschen (lysierte Erythrozyten, Thrombozyten); 2=eosinophile Granulozyten (stark peroxidasepositive Zellen); 3=Lymphozyten (kleine, peroxidasenegative Zellen) und basophile Granulozyten; 4= Monozyten (große, schwach peroxidasepositive Zellen); 5=LUC (große, peroxidasenegative Zellen, u.a. Blasten oder Plasmazellen); 6= neutrophile Granulozyten (Hauptmenge der peroxidasepositiven Zellen).

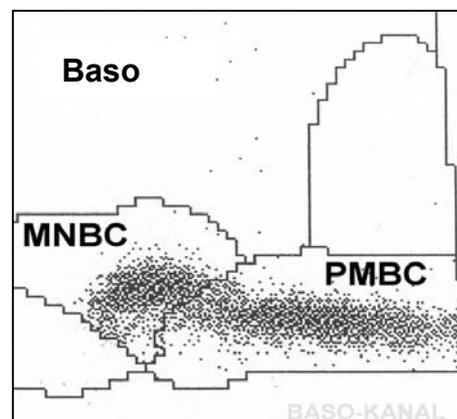


Abbildung 2-2: ADVIA 120 Bild einer Vollblutprobe; Baso-Kanal;

MNBC= mononukleäre Zellen (rundkernige Zellen); PMBC= polymorphkernige Zellen

Der Bayer ADVIA 120 ist ein Blutanalysegerät, das in der hämatologischen Routinediagnostik der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen eingesetzt wird. Aus einer EDTA-Vollblutprobe werden ca. 130 µl aufgenommen und in den vier Kanälen des Gerätes (Erythrozyten/Thrombozytenkanal, Hämoglobinkanal, Peroxidasekanal und Basophilenkanal) werden die Blutzellen vorbereitet und anschließend nach dem Prinzip der Durchflußzytometrie (d.h. jede Zelle wird einzeln untersucht und bewertet) auf die unterschiedlichen Parameter untersucht (s. Abb. 2-1 bis 2-3).

Für die vorliegende Arbeit war v.a. die Differenzierung zwischen Monozyten und Granulozyten, die mittels des Peroxidase- und Basophilenkanals erfolgt, sowie die Bestimmung der zellulären Myeloperoxidaseaktivität von entscheidender Bedeutung. Daher soll im Folgenden näher auf diese drei Systeme eingegangen werden.

Peroxidasekanal

In diesem Kanal (s. Abb. 2-1) werden die Zellen über die unterschiedliche Aktivität an intrazellulärer Peroxidase und der unterschiedlichen Größe bzw. Granularität differenziert.

Nach Aufnahme der Zellen in die Kammer läuft die zytochemische Peroxidase-reaktion in drei Schritten ab:

Schritt I : Lyse der Erythrozyten durch ADVIA 120 Perox 1 Reagenz und die hohe Temperatur in der Reaktionskammer

Schritt II: Fixierung der Leukozyten durch ADVIA 120 Perox 1 Reagenz. Aufgrund der hypertonen Umgebungsbedingungen kommt es zur Schrumpfung und Einkerbung der Leukozyten, wodurch sich der Brechungsindex der Zellen erhöht. Dies trägt zur besseren Abgrenzung der Lymphozyten vom Hintergrunddrauschen bei.

Schritt III: Färbung der Leukozyten mit ADVIA 120 Perox 2 Reagenz und ADVIA 120 Perox 3 Reagenz

Das in ADVIA 120 Perox 2 Reagens enthaltene 4-Chlor-1-naphthol dient als Substrat, das mit dem in ADVIA Perox 3 Reagens enthaltenen

Wasserstoffperoxid ein dunkles Präzipitat bildet. Dies erfolgt an den Stellen im Inneren der Leukozytengranula, die eine Peroxidaseaktivität aufweisen, entsprechend folgender Reaktion:

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

Die Klassifizierung der Leukozyten erfolgt anhand ihrer Größe und der unterschiedlichen Intensität der Peroxidasereaktion (Färbung). Neutrophile, Eosinophile und Monozyten färben sich entsprechend ihrer Peroxidaseaktivität. Da Lymphozyten, Basophile und große ungefärbte Zellen keine Peroxidase enthalten, nehmen diese Zelltypen keine Färbung an.

Beide Substrate werden im Überschuß zugegeben, daher ist die Menge des gebildeten Präzipitats von der Enzymaktivität der zellulären Peroxidase abhängig. In neutrophilen Granulozyten und Monozyten liegt die Peroxidase als Myeloperoxidase, in eosinophilen Granulozyten als eosinophile Peroxidase vor. Nach einer festgelegten Reaktionszeit wird ein Teil des Reaktionsgemisches als feiner Probenstrom zur Messküvette weitergeleitet.

Messküvette:

Nach dem Verfahren der Durchflußzytometrie wird hier jede einzelne Zelle untersucht.

In der Messküvette erzeugt die Zelle zwei Signale: Ein Streulichtsignal zur Bestimmung der Größe bzw. der Granularität und ein Absorptionssignal zur Bestimmung der Peroxidaseaktivität. Mit Hilfe dieser beiden Parameter kann letztendlich eine Differenzierung der Zellen erfolgen. Der Probenumfang beträgt in der Regel ca. 10.000 Leukozyten. Nach erfolgter Messung werden die Zellen in einem X-Y-Diagramm (s. Abb. 2-1) angeordnet, wobei auf der X-Achse die steigende Peroxidaseaktivität, auf der Y-Achse die steigende Streulichtintensität aufgetragen ist. Der Bayer ADVIA 120 faßt zusätzlich Punktwolken mittels geräteeigener Cluster-Analyse zusammen, was letztendlich die Differenzierung der Zellen im Zusammenspiel mit dem Baso-Kanal ermöglicht.

Zur weiteren Differenzierung stehen noch der Basophilenkanal (s. Abb. 2-2), der Research-Kanal und die Angabe des Myeloperoxidaseindex (MPXI) zur Verfügung.

Research-Kanal

Hier werden Histogramme der X-Achse (Peroxidaseaktivität) und der Y-Achse (Streulichtintensität) im Bezug zur Zellzahl erstellt. Dadurch erhält man eine graphische Häufigkeitsverteilung der X- und Y-Werte auf die Zellen.

Basophilen-Kanal

Mittels dieses Kanals erfolgt eine Trennung der Leukozyten in drei Zellseparationen:

Mononukleäre Blutzellen (Monozyten und Lymphozyten), polymorphkernige Leukozyten (eosinophile und neutrophile Granulozyten) sowie basophile Granulozyten.

Reaktionskammer

Die zytochemischen Reaktionen der Basophilen-/Lobularitätsmethode laufen in zwei Schritten ab:

Schritt I: Lyse der Erythrozyten und Thrombozyten durch ADVIA 120 Baso-Reagens, welches Phthalsäure sowie ein Surfactant zur Lyse der Erythrozyten, Thrombozyten und der Zellmembran aller Subklassen der weißen Zellreihe, mit Ausnahme der Basophilen, enthält.

Schritt II: Entfernen des Zytoplasmas von allen Leukozyten (Zytoplasma-Stripping), mit Ausnahme der Basophilen, durch das ADVIA 120 Baso-Reagenz und der erhöhten Temperatur in der Reaktionskammer.

Es bleiben nur die Zellkerne der Leukozyten und intakte Basophile übrig. Ein Teil dieses Reaktionsgemisches wird in die Messküvette weitergeleitet.

Messküvette

Im Kanal werden die Zellen nun über ein Zweiwinkel-Laser-Streulicht nach der Morphologie ihrer Zellkerne, die eine unterschiedliche Streuung des Lichts bewirkt, getrennt. Diese Streuung wird über entsprechende Dunkelfeldblenden von Groß- und Kleinwinkeldetektoren registriert. Die intakten Basophilen ergeben ein von den anderen polymorphkernigen Zellen unterschiedliches Streulichtsignal.

Werden die Streulichtsignale des kleinen Winkelbereiches (Y-Achse) über denen des großen Winkelbereiches (X-Achse) aufgetragen, ergibt sich das Nukleogramm.

Der Basophilenkanal wurde bei dieser Arbeit vor allem zur Differenzierung zwischen polymorphkernigen Granulozyten und Monozyten herangezogen.

MPXI-Wert

Definition:

Die mittlere Myeloperoxidaseaktivität der neutrophilen Granulozyten wird in Form eines Index – dem MPXI-Wert – vom Gerät errechnet und angegeben.

Bestimmung des MPXI-Wertes:

Aus der Neutrophilenwolke wird mittels komplizierter Algorithmen, in die unter anderem die Zellzahl pro Peroxidasewert (siehe Researchkanal) eingeht, ein Mittelwert bestimmt wird, der auf die X-Achse projiziert den Wert X ergibt. Auf Grund von Untersuchungen bei mehreren tausend gesunden Patienten hat man einen mittleren Wert X von 28,5 ermittelt. Diesem wurde dann ein MPXI-Wert von 0 zugeordnet. Zur Bestimmung des MPXI-Wertes einer unbekannt Probe wird der errechnete Wert X der Probe mit dem Standardwert von 28,5 verglichen und der MPXI nach folgender Rechnung ermittelt:

$$\text{MPXI} = [(X-28,5)/28,5] \times 100.$$

Der Wert schwankt bei 90% aller gesunden Probanden zwischen –10 und +10.

Der MPXI-Wert ist ein Maß für die Aktivität der Myeloperoxidase, da auf der X-Achse die Peroxidaseaktivität und nicht die Peroxidase menge aufgetragen ist.

Der MPXI-Wert wurde in dieser Arbeit als Maß für die Degranulation der

Leukozyten und den damit verbundenen Verlust an lysosomalen Enzymen verwendet.

2.2.2 Leukozytenisolierung aus Vollblut mittels Dextransedimentation

Von gesunden Probanden wurde 5 ml venöses Blut abgenommen, in EDTA enthaltenden Monovetten gelagert und ein Differentialblutbild am Bayer ADVIA 120 angefertigt.

Zu 4 ml dieses EDTA Blutes wurden je 2 ml Dextransedimentationslösung gegeben. Danach wurde die Probe gut gemischt und eine Stunde bei Zimmertemperatur zur Sedimentation stehen gelassen. Der Überstand wurde abpipettiert und für 10 min bei 1360 x g zentrifugiert. Anschließend wurde dieser Überstand restlos abgenommen und das verbleibende Zellpellet bestehend aus Leukozyten und nicht sedimentierten Erythrozyten (=“Verunreinigung“) mit 4 ml 0,9% NaCl resuspendiert. Von dieser Lösung wurde ein Differentialblutbild am Bayer ADVIA 120 angefertigt. Nach erneuter Zentrifugation der restlichen Lösung (10 min, 1360 x g) wurde der Überstand erneut abgenommen, 200 µl dest. H₂O auf das Zellpellet gegeben und die Probe bis zur späteren Verarbeitung bei -70°C eingefroren.

2.2.3 Isolation der Granulozyten und mononukleären Blutzellen aus Vollblut

Prinzip:

Mittels Dichtegradienten werden polymorphkernige Leukozyten von den mononukleären Zellen abgetrennt, gereinigt und in Puffer resuspendiert.

Durchführung:

In 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 15 ml Histopaque 1119 gegeben und mit 15 ml Histopaque 1077 überschichtet (siehe Abb. 2-3). Beide Dichtegradientlösungen wurden vor der Verwendung auf Zimmertemperatur gebracht.

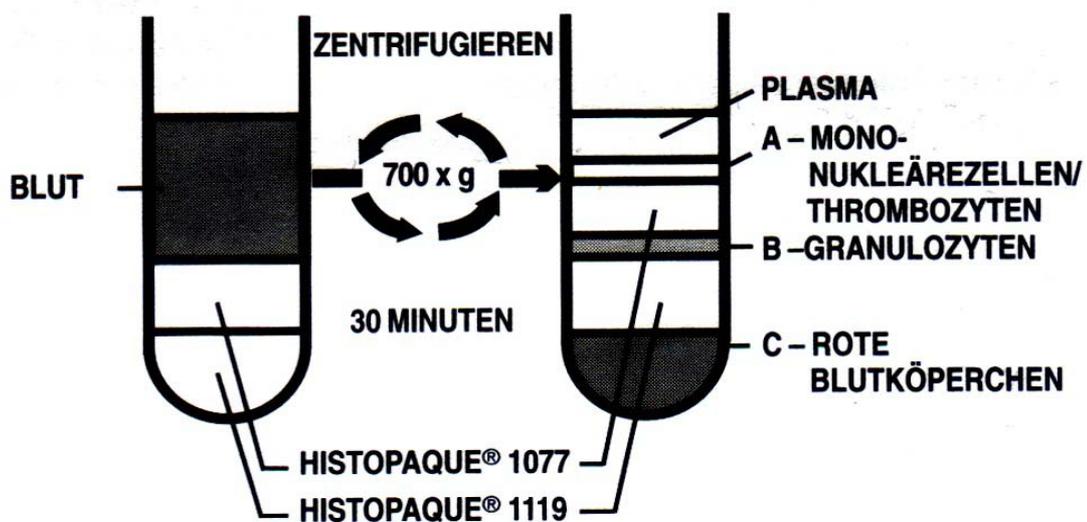


Abbildung 2-3: Blutprobenaufarbeitung mittels Histopaque [aus: Firmenheft SIGMA Diagnostics, INC.]

Auf diesen Dichtegradienten wurde 20 ml heparinisiertes Vollblut [100 I.U./ml] (unverdünnt) geschichtet und zentrifugiert (633 x g, 25 Minuten, 18°C).

Anschließend wurde die oberste Schicht, die aus Plasma bestand, vorsichtig abgesaugt. Die darunterliegende Schicht enthielt die mononukleären Zellen. Diese wurden abgenommen, in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 50 ml PBS spezial aufgefüllt. Die in der unteren Dichtelösung angereicherten

Granulozyten wurden ebenfalls vorsichtig abgenommen - ohne die darunterliegende Erythrozytenschicht aufzuwirbeln - in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 50 ml PBS spezial aufgefüllt. Beide Zellsuspensionen wurden zweimal bei 462 x g 15 Minuten bei 15°C gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Pellet der mononukleären Zellen in 10 ml MACS-Puffer resuspendiert und bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung mittels MACS (s. Kap. 2.2.4) am darauffolgenden Tag gelagert. Ein Teil wurde erneut zentrifugiert (462 x g 15 Minuten 15°C), der Überstand abgenommen und das Zellpellet für Enzymbestimmungen bei -70°C eingefroren. Das Granulozytenpellet wurde ebenfalls in 10 ml PBS spezial resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde ein Differentialblutbild am Bayer ADVIA 120 angefertigt. Nach erneuter Zentrifugation (462 x g 15 Minuten 15°C) und Abnahme des Überstandes wurde das verbleibende Zellpellet für Enzymbestimmungen bei -70°C eingefroren bzw. teilweise in 2500 µl PBS mit Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ und Glucose zur weiteren Verwendung in Degranulationsversuchen resuspendiert.

2.2.4 Auftrennung der mononukleären Blutzellen mittels MACS in Monozyten und Lymphozyten

Prinzip:

Der verwendete Monozyten-Isolationskit beruht auf einem indirekten magnetischen Kennzeichnungssystem. Ein Antikörpercocktail aus CD3, CD7, CD19, CD45RA, CD56 und anti-IgE Antikörpern wird für die magnetische Markierung der Nicht-Monozytenfraktion benutzt. An diese Antikörper sind Eisenpartikel gekoppelt, wodurch die markierten Zellen in einem magnetischen Feld zurückgehalten werden, während die unmarkierten Zellen dieses passieren können. Durch diese magnetische Depletion von T-Lymphozyten, NK (Natural Killer)-Lymphozyten, B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und basophilen Zellen verbleiben die Monozyten als Negativfraktion.

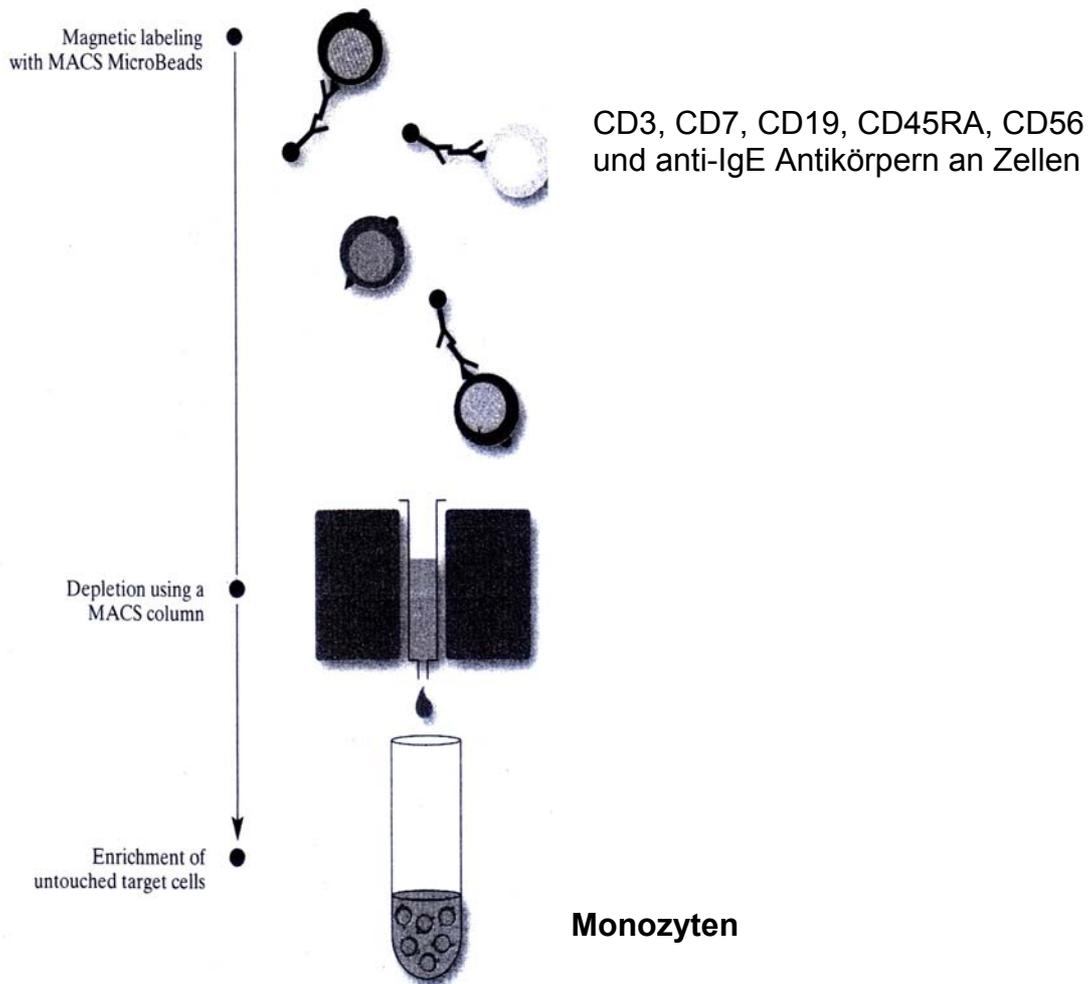


Abbildung 2-4a: MACS-Trennung der MNBC; im ersten Schritt passieren die unmarkierten Zellen das Magnetfeld, die markierten bleiben darin haften. [aus: Firmenheft Miltenyi Biotec]

Durchführung:

Von der durch die Histopaque-Trennung gewonnenen mononukleären Blutzellfraktion wurde ein Differentialblutbild am Bayer ADVIA 120 angefertigt. Um eventuell vorhandene Klumpen zu entfernen, wurde die Zellsuspension mittels eines 30 µm Nylonsiebes gefiltert. Die in 10 ml MACS-Pufferlösung suspendierten Zellen wurden danach bei 300 x g und 6°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Für die Resuspendierung des verbleibenden Zellpellets wurden 60 µl MACS-Pufferlösung pro 10^7 Zellen verwendet. Anschließend wurden 20 µl FcR

Blocking Reagent und 20 μl Hapten-Antibody Cocktail pro 10^7 Zellen zugegeben, gut gemischt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension mit 15facher Menge der für die Resuspendierung verwendeten MACS-Pufferlösung zweimal bei 300 x g und 6°C für 10 Minuten gewaschen. Erneut wurde das Zellpellet mit 60 μl MACS-Pufferlösung pro 10^7 Zellen resuspendiert, jeweils 20 μl FcR Blocking Reagent, 20 μl MACS Anti-Hapten MicroBeads pro 10^7 Zellen zugegeben, gut gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit der 15fachen Menge der für die Resuspendierung verwendeten MACS-Pufferlösung bei 300 x g und 6°C für 10 Minuten wurde das Zellpellet in 500 μl MACS-Pufferlösung pro 10^8 Zellen suspendiert, bei weniger als 10^8 Zellen ebenfalls in 500 μl MACS-Pufferlösung. Die verwendete MS Separationssäule wurde in das Magnetfeld des MiniMACS Separators eingesetzt und mit 500 μl MACS-Pufferlösung vorgewaschen. Anschließend wurde die Zellsuspension über die Säule gegeben (s. Abb. 2-4a) und die Negativfraktion mit den Monozyten aufgefangen. Die Säule wurde danach dreimal mit 500 μl MACS-Puffer gewaschen und diese Lösung zusammen mit der Negativfraktion aufgefangen. Nach Herausnahme der MS Separationssäule aus dem Magnetfeld (s. Abb. 2-4b) wurde diese mit 2 x 1000 μl MACS-Pufferlösung unter Verwendung eines Stempels zur Beschleunigung der Durchlaufzeit und Erhöhung des Drucks gespült. Die so gewonnene Lösung wurde als Positivfraktion, die „Nicht-Monozytenfraktion“ enthaltend, aufgefangen. Dieser magnetische Trennvorgang wurde mit einer neuen MS Separations-Säule unter den gleichen Bedingungen wiederholt.

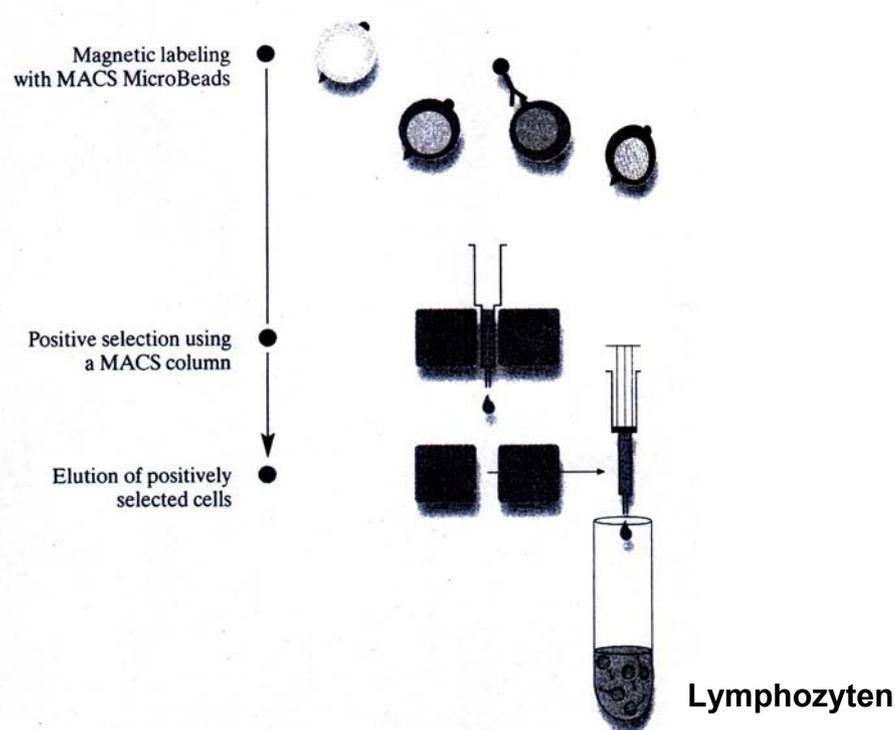


Abbildung 2-4b: MACS-Auftrennung der MNBC; im zweiten Schritt wird die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die markierten Zellen werden herausgespült und aufgefangen. [aus: Firmenheft Miltenyi Biotec]

Anschließend wurden die Zellsuspensionen annäherungsweise auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen pro 1 ml eingestellt, um möglichst wenige Zellen bei der folgenden Bayer ADVIA 120 Messung zu verlieren. Von den beiden Zellfraktionen, Monozyten und Nicht-Monozyten, wurden je 100 μ l entnommen, mit je 300 μ l MACS-Pufferlösung verdünnt und am Bayer ADVIA 120 eine Zellzählung mit Differentialblutbild vorgenommen. Die Zellsuspensionen wurden währenddessen erneut bei 300 x g und 6°C für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Zellpellet mit 1000 μ l MACS-Pufferlösung resuspendiert und erneut bei 300 x g und 6°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen zur Enzymbestimmung bei -70°C eingefroren.

2.2.5 Anfertigung, Färbung und Auszählung von Zytospin-Präparaten

Um eine genauere Aussage über die Reinheit der durch die MACS Trennung gewonnenen Zellfraktionen machen zu können, wurde von beiden Zellfraktionen ein Zytospin-Präparat angefertigt.

Prinzip:

Die Zytospin-Methode wird im Alltag zur Anfertigung von Zellpräparaten z.B. aus Liquor verwendet, um möglichst viele Zellen auf ein Gesichtsfeld konzentrieren zu können. Durch Zentrifugation werden die Zellen auf einer Stelle des Objektträgers fixiert, während die Flüssigkeit vom umgebenden Papier aufgenommen wird. Dadurch erhält man eine hohe Zellzahlkonzentration im vorgegebenen Bereich des Objektträgers (s. Abb. 2-6).

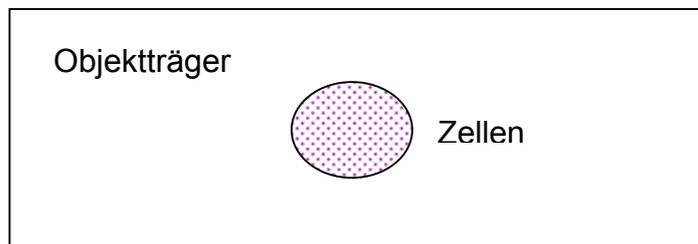


Abbildung 2-6: Zytospinpräparat einer Zellprobe

Durchführung:

Die restliche Lösung der 400 µl ADVIA Probe der Monozyten- bzw. nicht Monozytenfraktion (s. Kap. 2.2.4 Auftrennung der mononukleären Blutzellen mittels MACS), ca. 100 µl, wurde mit jeweils 700 µl MACS-Pufferlösung verdünnt. Von dieser Suspension wurden je 500 µl entnommen und an der Zytospinzentrifuge ein Ausstrich angefertigt (Zentrifugation bei 1000 U/m für 10 min), der anschließend nach Pappenheim gefärbt und mit Xylol auf dem Objektträger zur späteren Zellzählung fixiert wurde. Die Anfertigung des

Differentialblutbildes wurde am Mikroskop bei einer Vergrößerung von 1:1250 durchgeführt, wobei jeweils 100 Zellen ausgezählt und die einzelnen Fraktionen prozentual angegeben wurden.

2.2.6 Übersicht über die Funktionstests (Degranulation, Enzymaktivitätsbestimmungen)

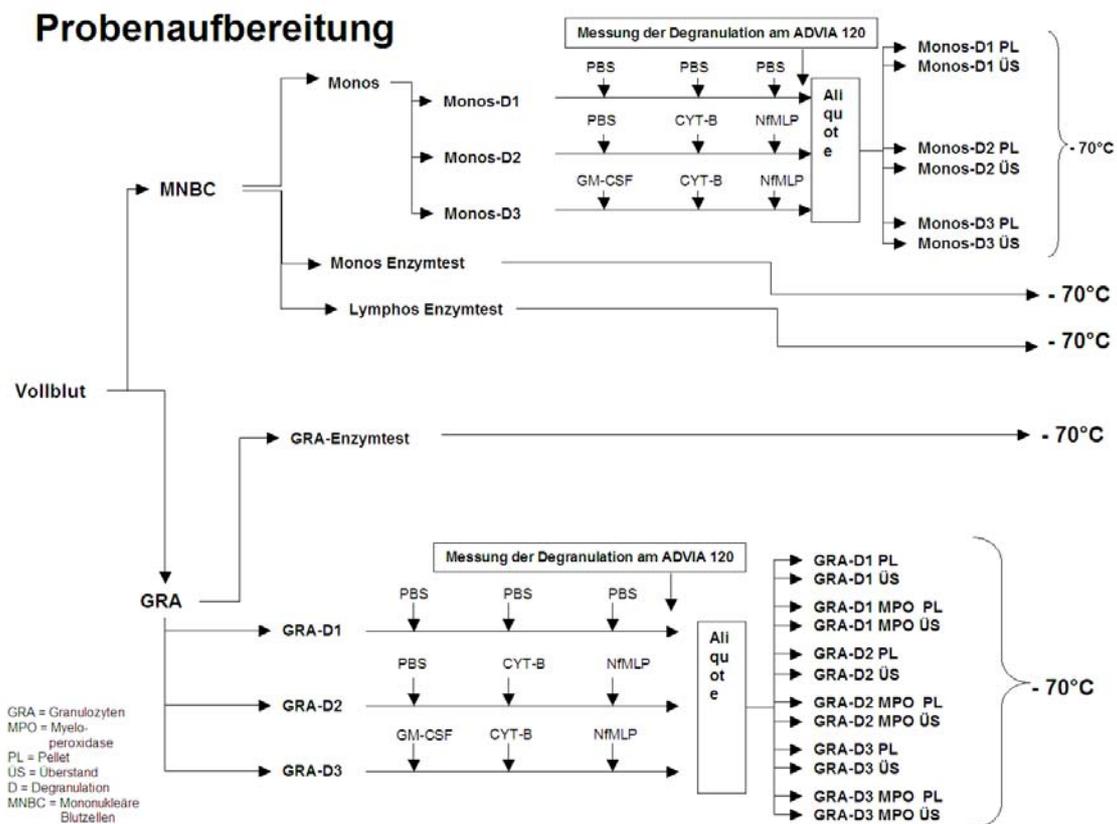


Abbildung 2-7: Probenaufbereitung der Blutproben

-70°C=bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert; MNBC= mononukleäre Zellen (Monozyten und Lymphozyten); GRA= Granulozyten; Lymphos= Lymphozyten; D1= Versuchsreihe 1; D2= Versuchsreihe 2; D3= Versuchsreihe 3; PL= Zellpellet; ÜS= Überstand;

2.2.7 Degranulationsuntersuchungen an Granulozyten

Die über die Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen Granulozyten wurden in 2500 µl PBS mit Glucose, Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl abgenommen, mit 300 µl PBS spez. verdünnt und ein Differentialblutbild am Bayer ADVIA 120 angefertigt. Weiter wurden 3 x 500 µl (Proben P17, 18 und 19 jeweils 600 µl) in Eppendorfcups für die folgenden Degranulationsversuche gegeben. Der Rest wurde in ein Eppendorfcup pipettiert, bei 300 x g und 15°C für 10 Minuten zentrifugiert, anschliessend der Überstand abgenommen und das verbleibende Zellpellet für weitere Enzymbestimmungen bei -70°C eingefroren.

An den in den 3 x 500 µl (Proben P17, 18 und 19 jeweils 600 µl) enthaltenden Granulozyten, im folgenden Probe 1, 2 und 3, wurde die Degranulation mit Cytochalasin B/f-NMLP mit und ohne Vorbehandlung mit GM-CSF durchgeführt (s. Abb. 2-8)

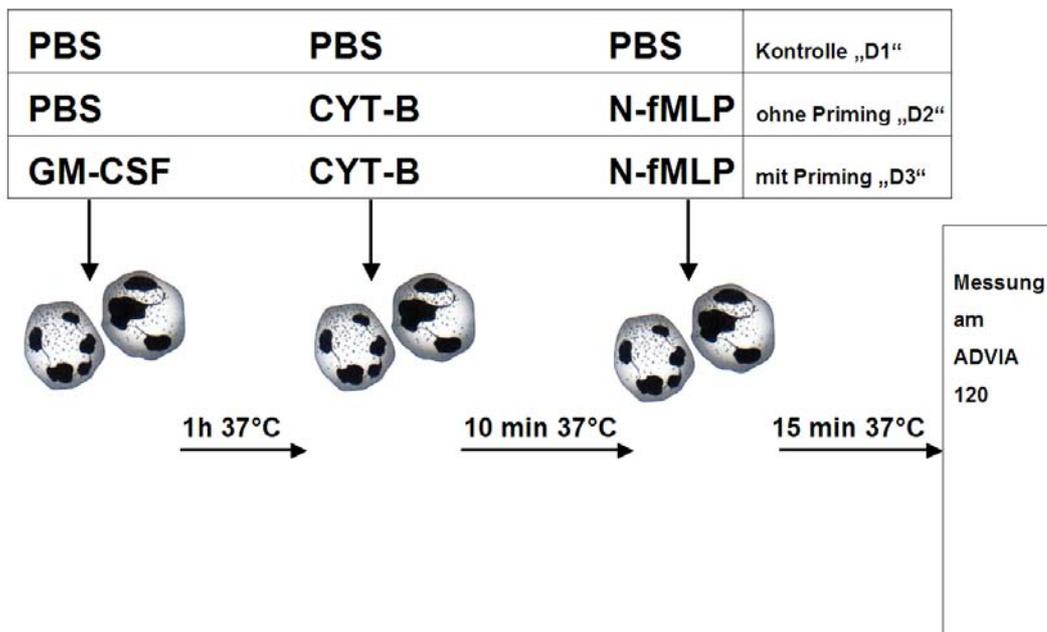


Abbildung 2-8: Degranulationsversuche an Granulozyten

Vorbehandlung der Granulozyten mit GM-CSF („Priming“)

Prinzip:

Zytokinen wie dem Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierenden-Faktor (GM-CSF) werden in ihrem Einfluß auf reife neutrophile Granulozyten sogenannte „Priming“-Eigenschaften zugeschrieben. Dies bedeutet, dass sie in der Lage sind, die Reaktionsbereitschaft der Zellen auf Chemotaktika und andere Substanzen zu verstärken. Es sollte untersucht werden, ob die Zellen nach Vorbehandlung mit GM-CSF vermehrt lysosomale Enzyme bzw. MPO abgeben und ob sie auf Stimulation durch N-fMLP/Cytochalasin B ebenfalls in Hinsicht auf die Abgabe der lysosomalen Enzyme bzw. MPO anders als die unbehandelten Zellen reagieren.

Durchführung:

500 µl Granulozytensuspension (s.o.) wurden mit 10 µl (Probe P17, 18 und 19 jeweils 12 µl) einer GM-CSF Lösung versetzt, was ca. 500 Units GM-CSF entspricht, und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert (s. Abb. 2-8).

Stimulation der Granulozyten durch Cytochalasin B

Prinzip:

Cytochalasin B ist ein Pilz-Alkaloid, unter dessen Einfluss es zu einer verstärkten Freisetzung der Granulainhalte nach chemotaktischer Reizung kommt.

Verfahren:

Aliquotiertes und bei -70°C eingefrorenes, in DMSO gelöstes Cytochalasin B [2,5 mg/ml] wurde bei Zimmertemperatur aufgetaut und mit PBS speziell im Verhältnis 1:10 verdünnt. Je 500 µl der Granulozytenlösung (s. Abb. 2-8) wurden mit 10 µl (Proben P17, 18 und 19 jeweils 12 µl) dieser Cytochalasinlösung versehen und für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Stimulation der Granulozyten durch N-fMLP

Prinzip:

Durch Zugabe von N-fMLP, einem in der Forschung vielverwendeten Chemotaktikum, werden die neutrophilen Granulozyten aktiviert und zum Ausschütten ihrer Granula veranlasst. Ein Prozess, der mit Hilfe des Bayer ADVIA 120 nachvollzogen werden kann.

Durchführung:

In reinem DMSO gelöstes und bei -70°C gelagertes N-fMLP [10^{-2} M] wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und 10 μl dieser Lösung mit PBS spezial 1:2000 verdünnt. So erhielt man eine 5×10^{-6} molare Lösung. Die mit Cytochalasin B vorinkubierten Granulozyten wurden mit 10 μl (Proben P17, 18 und 19 jeweils 12 μl) dieser 5×10^{-6} molaren Lösung versehen und für 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Aufbau der Probenreihe

Jedes der drei Eppendorfcups mit je 500 μl Granulozytenlösung wurde auf die oben beschriebenen unterschiedlichen Weisen stimuliert, um das verschiedene Degranulationsverhalten zu untersuchen (s. Abb. 2-7).

1. Probe (GRA-D1, „Kontrolle“): PBS \rightarrow PBS \rightarrow PBS

Für die Inkubation der Probe 1 (siehe D1 in Abb. 2-8) wurde ausschließlich PBS spezial verwendet und diente als Kontrollprobe, sodass keine spezifische Degranulation zu erwarten war.

Probe 1 wurde in einem ersten Schritt mit 10 μl (Proben P17, 18 und 19 jeweils 12 μl) PBS versetzt und für zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Als zweiter Schritt wurden danach erneut 10 μl (Proben P17, 18 und 19 jeweils 12 μl) PBS zugegeben und die Probe für weitere zehn Minuten bei 37°C inkubiert. Im letzten Schritt erfolgte, als Kontrolle zu N-fMLP, die Zugabe von 10 μl

(Proben P17, 18 und 19 jeweils 12 µl) PBS spezial mit anschließender 15-minütiger Inkubation im Wasserbad bei 37°C.

2. Probe (GRA-D2, „ohne Priming“): PBS → Cytochalasin B → N-fMLP

Anders als bei der dritten Probe wurde hier auf GM-CSF verzichtet und stattdessen reines PBS spezial verwendet. Diese Probe sollte eine *mittlere* Degranulation erreichen.

Bei Probe 2 (siehe D2 in Abb. 2-8) wurden 500 µl der Granulozytenlösung zunächst mit 10 µl PBS spezial (Proben P17, 18 und 19 jeweils 12 µl) versetzt und für zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Stimulation mittels Cytochalasin B vorgenommen. Zum Schluss erfolgte die Stimulation mit N-fMLP.

3. Probe (GRA-D3, „mit Priming“): GM-CSF → Cytochalasin B → N-fMLP

Bei dieser Probe bestand das Ziel darin, eine *maximale* Degranulation zu erreichen. Aus diesem Grund wurden drei verschiedene Stimulantien nacheinander angewendet.

Die Probe (siehe D3 in Abb. 2-8) wurde, wie oben beschrieben, mit GM-CSF inkubiert. Anschließend erfolgte die weitere Inkubation mit Cytochalasin B. Zum Schluss wurde die Probe noch mit N-fMLP versehen.

Bei allen Proben erfolgte im Anschluss an den letzten Inkubationsschritt eine Bayer ADVIA 120 Untersuchung zur Messung der Degranulation. Dazu wurden jeweils 80 µl der Granulozytenlösung entnommen, mit 300 µl PBS (Glucose, Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺ enthaltend) verdünnt und am Bayer ADVIA 120 ein Differentialblutbild angefertigt.

Bei den Proben P17, 18 und 19 (s. Abb. 2-3) wurden für die spätere MPO-ELISA-Messung (s. Kap. 2.2.8) jeweils 150 µl Lösung abgenommen und in separate Eppendorfcups gegeben.

Alle Proben wurden bei 500 x g und 20°C für 10 Minuten zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Die so entstandenen Aliquote aus Überstand und

Zellpellet wurden separat zur späteren Enzymbestimmung bei -70°C eingefroren.

2.2.8 MPO-ELISA

Um einen Zusammenhang zwischen dem Verlust von sphingolipidabbauenden Enzymen und MPO bei der Degranulation von Granulozyten nachweisen zu können, wurde die quantitative Messung der ausgeschütteten Myeloperoxidase sowohl in den Zellpellets als auch in den abgenommenen Überständen benötigt. Dazu wurden bei den Degranulationsversuchen mit GM-CSF, Cytochalasin B und N-fMLP am Schluss dieser Versuche 150 μl Zellsuspension der jeweiligen Versuchsreihe abgenommen (s. Abb. 2-7), zentrifugiert (500 x g und 20°C für 10 Minuten) und Zellpellet sowie Überstand getrennt bei -70°C gelagert. Die MPO-Konzentration in den wiederaufgetauten Zellpellets und Überständen wurde dann mittels eines MPO-ELISA bestimmt. In einem Vorversuch wurde die nötige Verdünnung der jeweiligen Proben ermittelt, um nicht außerhalb der Standardkurve der MPO-Messung zu liegen. Hierzu wurden verschiedene Verdünnungen sowohl der Zellpellets als auch der Überstände gewählt und die jeweils am besten geeignete Verdünnung später auch im Hauptversuch angewendet.

Prinzip

Der MPO-Assay von Calbiochem beruht auf dem Prinzip der „enzyme linked immuno-sorbent assays“, einer enzymatischen Kettenreaktion. Spezifische, gegen MPO gerichtete monoklonale Antikörper, werden an eine Mikrotiterplatte gebunden. Nach Inkubation mit der Probe bilden sich Immunkomplexe zwischen dem Antikörper und MPO aus. Ein mit Biotin beladener zweiter polyklonaler Antikörper gegen MPO wird zugegeben. Avidin, welches mit alkalischer Phosphatase bestückt ist, wird zugegeben und bindet an das Biotin. Nach Zugabe von pNPP (para-Nitrophenolphosphat), einem Substrat der alkalischen Phosphatase, wird pNPP durch diese unter Abspaltung eines

Phosphatrestes in einen gelben Farbstoff umgesetzt. Am ELISA-Reader kann dessen Extinktion bei 405 nm gemessen werden.

Durchführung

1. Vorbereiten der Proben: Zellpellets

Eingefroren waren die Zellpellets dreier Probereihen (s. Kap. 2.2.7):

- I. Pellets der nur mit PBS behandelten Zellen (GRA-D1 PL in Abb. 2-7)
- II. Pellets der mit PBS, Cytochalasin B und N-fMLP behandelten Zellen (GRA-D2 PL in Abb. 2-7)
- III. Pellets der mit GM-CSF, Cytochalasin B und N-fMLP behandelten Zellen (GRA-D3 PL in Abb. 2-7)

Die bei -70°C gelagerten Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Zellpellets wurden daraufhin mit PBS 0,1% Tween auf eine Zellzahlkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und durch die verwendete Lösung gleichzeitig lysiert. Von dieser neuen Zellsuspension wurden 1000 μl abgenommen und in ein Eppendorfcup gegeben. Anschließend erfolgten drei Zyklen von Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen im Wasserbad bei 37°C , um die Zellen vollständig zu lysieren. Im Anschluss daran wurden die Proben bei $12000 \times g$ und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Diese Überstände wurden danach zum Messen der MPO-Konzentration mit Sample Diluting Puffer 1:100 verdünnt.

2. Vorbereiten der Proben: Überstände

Eingefroren waren die Überstände dreier Probereihen (s. Kap. 2.2.6):

- I. Überstand der nur mit PBS behandelten Zellen (GRA-D1 ÜS in Abb. 2-7)
- II. Überstand der mit PBS, Cytochalasin B und N-fMLP behandelten Zellen (GRA-D2 ÜS in Abb. 2-7)
- III. Überstand der mit GM-CSF, Cytochalasin B und N-fMLP behandelten Zellen (GRA-D3 ÜS PL in Abb. 2-7)

Nach Auftauen der Proben bei Zimmertemperatur erfolgte eine Verdünnung (im Vorversuch ermittelt) mit Sample Diluting Puffer. Aus den aufgetauten Überstandsproben, die je ein Volumen von 150 µl umfassten, wurden jeweils 50 µl abgenommen und in einem ersten Schritt pro Probe mit 150 µl Sample Diluting Puffer 1:4 verdünnt. Bei den Überständen II und III, bei denen eine hohe MPO-Konzentration erwartet wurde, erfolgte in einem zweiten Schritt die 1:200 Verdünnung mit Sample Diluting Puffer, indem 5 µl der 1:200 Verdünnung mit 995 µl Sample Diluting Puffer aufgefüllt wurden. Insgesamt war also eine Verdünnung von 1:800 erfolgt. Überstand I wurde wegen der eher niedrig erwarteten MPO-Konzentration nicht weiter verdünnt, hier blieb es bei der 1:4 Verdünnung. Während der gesamten Verarbeitung wurden die Proben auf Eis gelagert.

3. Herstellen der MPO-Eichkurve

Um die in den Proben gemessenen Extinktionen einer MPO-Konzentration zuweisen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe mit bekanntem MPO-Gehalt pro Loch erstellt. Hierzu wurden in Reihe 1 der Mikrotiterplatte in das erste Loch, Loch A1, 200 µl MPO Standard [100 ng/ml], in die restlichen 7 Löcher (B1-H1) jeweils 100 µl Sample Diluting Puffer vorgegeben. Zum Erstellen der Verdünnungsreihe wurden nun, beginnend mit Loch A1, in dem sich 200 µl des MPO Standards befanden, jeweils 100 µl aus einem Loch in das nachfolgende transferiert. Aus dem vorletzten Loch, Loch Nummer G1, wurden ebenso 100 µl entnommen, diese jedoch verworfen, da das letzte Loch, H1, als Leerwert diente. Durch diese Verdünnungsreihe wurde die MPO Konzentration jeweils halbiert und es entstand eine Konzentrationsreihe von 100 ng/ml in Loch A1 bis 1,6 ng/ml MPO Standard in Loch G1. Nach jedem Transfer wurde die Lösung vorsichtig unter Vermeidung von Schaumbildung gemischt. Es wurde jeweils eine frische Pipettenspitze benutzt.

4. Beschicken der Mikrotiterplatte

Nachdem die Platte mit Proben und Standards in den entsprechenden Verdünnungsreihen versehen worden war, erfolgte die Inkubation der Mikrotiterplatte für zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank. Im Anschluss daran erfolgte ein mehrmaliges Waschen der Löcher mit dem dafür vorgesehenen Waschpuffer. Nach diesem Waschschritt wurde in jedes der Löcher 100 µl Lösung des zweiten, mit Biotin markierten MPO-Antikörpers zugegeben und die Platte erneut bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Nach einem erneuten Wasch- und Reinigungsschritt erfolgte die Zugabe von 100 µl des Avidins mit gebundener alkalischer Phosphatase. Erneute Inkubation bei 37°C für eine Stunde. Anschließend wurde dann nach erneutem Waschen 100 µl pNPP (para-Nitrophenolphosphat) als Substrat der alkalischen Phosphatase zugegeben und die Mikrotiterplatte abermals für 25 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl der Stopplösung (1M NaOH) erfolgte anschließend die Bestimmung der Extinktion bei 405 nm mittels ELISA-Reader.

4. Auswertung

Mittels der MPO-Standardreihe wurde eine Eichkurve erstellt, anhand derer man den MPO-Gehalt der jeweiligen Proben ermitteln konnte.

2.2.9 Degranulationsversuche an Monozyten

Die mittels MACS gewonnene Monozytenfraktion (MPO-positiv) wurde in diesem Verfahren ebenfalls auf die Empfindlichkeit gegenüber Stimulantien untersucht. Die hierzu verwendeten Substanzen entsprachen denen aus dem Granulozytenversuch, d.h. GM-CSF, Cytochalasin B und N-fMLP (s. Abb. 2-8).

Schritt 1: Präparation der Monozytenfraktion

Pro Versuchsreihe wurden 3×10^6 Zellen auf drei Eppendorfcups (Monos D1-D3) gleichmäßig verteilt, bei $300 \times g$ und 6°C für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen und verworfen. Die Zellpellets wurden in je $500 \mu\text{l}$ PBS mit Glucose, Ca^{++} und Mg^{++} resuspendiert.

Schritt 2 : Vorbehandlung mit GM-CSF

Eine Probe, Probe 3 (Monos D3 in Abb. 2-4), wurde anschließend mit $10 \mu\text{l}$ einer GM-CSF Lösung versetzt, was ungefähr 500 Units GM-CSF entspricht. Zu den beiden anderen Proben (Proben 1 und 2 bzw Monos D1 und D2 in Abb. 2-7) wurde zu Kontrollzwecken je $10 \mu\text{l}$ PBS gegeben und alle drei Proben wurden für zwei Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Schritt 3: Stimulation mit Cytochalasin B

Das ebenfalls bei Granulozyten verwendete, in DMSO gelöste und bei -70°C gelagerte Cytochalasin B [$2,5 \text{ mg/ml}$] wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und die Aliquote mit PBS spezial 1:10 verdünnt. Zu den Proben 2 und 3 wurden jeweils $10 \mu\text{l}$ dieser Lösung, zu Probe 1 $10 \mu\text{l}$ PBS spezial gegeben. Alle Proben wurden erneut im Wasserbad für 10 Minuten bei 37°C inkubiert.

Schritt 4: Stimulation mit N-fMLP

$10 \mu\text{l}$ einer aliquotierten und bei -70°C gelagerten 10^{-2} M N-fMLP Lösung wurden mit 20 ml PBS spezial verdünnt, was einer Verdünnung von 1:2000 entspricht. Die Proben 2 und 3 (Monos D2 und D3 in Abb. 2-4) wurden mit $10 \mu\text{l}$ dieser Lösung stimuliert, während zu Probe 1 (Monos D1 in Abb. 2-4) wieder nur $10 \mu\text{l}$ PBS spezial gegeben wurden. Nach Inkubation für weitere 15 Minuten bei 37°C im Wasserbad wurden pro Probe je $100 \mu\text{l}$ Lösung abgenommen, mit $300 \mu\text{l}$ PBS (Glucose, Ca^{++} und Mg^{++}) verdünnt und hiervon eine Messung am Bayer ADVIA 120 gemacht.

Schritt 5: Weitere Verarbeitung der Proben

Die Reste der 500 µl Proben wurden bei 500 x g und 20°C für 10 Minuten zentrifugiert, die Überstände abgenommen und die Zellpellets sowie die Überstände separat bei -70°C eingefroren.

2.2.10 Messung der enzymkatalysierten Hydrolasereaktionen

Prinzip

Bei diesen Messungen wird ein künstliches Substrat der jeweiligen Enzyme eingesetzt, das ein Hydrolyseprodukt ergibt, dessen Extinktion mittels eines Photometers gemessen wird.

Die vier folgenden Enzyme wurden untersucht:

- Gesamt-Hexosaminidase
- Hexosaminidase A
- β-Galaktosidase
- Arylsulfatase A

Durchführung

Schritt 1: Für alle Enzyme

Die bei -70°C gelagerten Zellpellets sowie die dazugehörigen Überstände wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut. In einem darauffolgenden Schritt wurden die Zellen durch Zugabe von Aqua bidest auf eine Zellzahlkonzentration von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt und gleichzeitig eine Minute lang unter Verwendung einer Pipette ohne Schaumbildung lysiert. Zellüberstände, z.B. aus Degranulationsversuchen, wurden unverdünnt angewendet.

Schritt 2: Nur für Arylsulfatase

Aus dieser Zellsuspension mit 1×10^7 Zellen/ml wurden 150 µl entfernt, in ein separates Eppendorfcup gegeben und bei 500 x g und 16°C für 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Abnahme des Überstandes und Aufbewahrung in einem Eppendorfcup zur weiteren Verarbeitung.

Gesamt-HexosaminidaseAnsetzen der Probe

30 µl Zellsuspension (Homogenat)

+ 250 µl Gesamt-Hexosaminidase-Substratlösung (p-Nitrophenyl N-Acetyl-β-D-Glucosaminid in Citratpuffer pH 4,5)

+ 50 µl Citratpuffer pH 4,5

Der Ansatz wurde gut gemischt und bei 37°C im Wasserbad für 45 Minuten inkubiert. Anschließend Stoppen der Reaktion mit 250 µl 0,5 M NaOH. Nach Überführen der Probe in eine Halbmikroküvette erfolgte am Photometer die Extinktionsmessung bei 405 nm gegen Wasser.

Ergebnis: Probenansatz – Leerwert

Ansetzen des Leerwertes

30 µl Zellsuspension (Homogenat)

+ 50 µl Citratpuffer pH 4,5

+ 250 µl 0,5 M NaOH

wurden vermischt und bei 37°C im Wasserbad für 45 Minuten inkubiert. Parallel dazu wurden 250 µl Gesamt-Hexosaminidase-Substratlösung im Wasserbad bei 37°C für 45 Minuten getrennt inkubiert. Leerwertansatz und Substratlösung wurden nach der Inkubation vereinigt, in eine Halb-Mikroküvette gegeben und die Extinktion bei 405 nm gegen Wasser am Photometer gemessen.

Hexosaminidase A (β-Hexosaminidase-A)Ansetzen der Probe

30 µl Zellsuspension (Homogenat)

+ 75 µl Hexosaminidase-Substratlösung (p-Nitrophenyl-6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranoside+Aqua Bidest)

+ 225 µl Puffer pH 4,0

Diese Lösung wurde gut vermischt und bei 37°C im Wasserbad für eine Stunde 40 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 µl 0,5 M NaOH gestoppt und die Extinktion am Photometer bei 405 nm gegen Wasser gemessen.

Ergebnis: Probenansatz – Leerwert

Ansetzen des Leerwertes

30 µl Zellsuspension (Homogenat)

+ 225 µl Puffer pH 4,0

+ 250 µl 0,5 M NaOH

wurden vermischt und bei 37°C im Wasserbad für eine Stunde 40 Minuten inkubiert. Parallel dazu wurden 75 µl Hexosaminidase-Substratlösung (p-Nitrophenyl-6-sulfo-2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranoside+Aqua Bidest) im Wasserbad bei 37°C für eine Stunde 40 Minuten getrennt inkubiert. Leerwertansatz und Substratlösung wurden nach der Inkubation vereinigt, in eine Halb-Mikroküvette gegeben und die Extinktion bei 405 nm gegen Wasser am Photometer gemessen.

β-Galaktosidase

Ansetzen der Probe

40 µl Zellsuspension (Homogenat)

+ 150 µl β-Galaktosidase-Substratlösung (p-Nitrophenyl β-D-Galaktopyranoside+Puffer 1)

+ 100 µl Puffer 2 pH 4,5

Nach Mischen des Ansatzes erfolgte die Inkubation im Wasserbad bei 37°C für zwei Stunden. Im Anschluss daran wurde die Reaktion durch Zusetzen von 250 µl 0,5 M NaOH gestoppt. Messen der Probe bei 405 nm gegen Wasser.

Ergebnis: Probenansatz – Leerwert

Ansetzen des Leerwertes

40 µl der Zellsuspension (Homogenat)

+ 100 µl Puffer 2 pH 4,5

+ 250 µl 0,5 M NaOH

wurden vermischt und bei 37°C im Wasserbad für zwei Stunden inkubiert. 150 µl β-Galaktosidase-Substratlösung wurden getrennt bei 37°C im Wasserbad für zwei Stunden inkubiert und vor dem Messen mit dem restlichen Leerwertansatz vereinigt. Die Messung erfolgte bei 405 nm gegen Wasser.

Arylsulfatase AAnsetzen der Probe

50 µl des Zellüberstandes

+ 200 µl Arylsulfatase-Substratlösung (p-Nitrocatecholsulfat)

wurden gut gemischt und anschließend bei 8°C für 48 Stunden inkubiert. Vor der Messung bei 514 nm gegen Wasser erfolgte die Zugabe von 250 µl 0,5 M NaOH zum Stoppen der Reaktion.

Ergebnis: Probenansatz – Leerwert

Ansetzen des Leerwertes

50 µl des Zellüberstandes

+ 200 µl Arylsulfatase-Substratlösung (p-Nitrocatecholsulfat)

+ 250 µl 0,5 M NaOH

Der Ansatz wurde vermischt, wie der Probenansatz bei 8°C für 48 Stunden inkubiert und im Anschluss daran bei 514 nm gegen Wasser gemessen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Erstellung eines Differentialblutbildes mittels Bayer ADVIA 120

3.1.1 Vergleich der Bayer ADVIA 120-Ergebnisse im Vollblut, nach Dextransedimentation und nach Histopaque-Isolierung

Hintergrund

Eine Fragestellung dieser Arbeit war die unterschiedliche Verteilung der Enzymaktivitäten der sauren Hydrolasen innerhalb der verschiedenen Blutzellfraktionen. Daher ist es von besonderer Bedeutung, das in der Routine und bei dieser Arbeit verwendete Differentialblutbild des Bayer ADVIA 120 genauer zu untersuchen.

Der Bayer ADVIA 120 ist auf die Analyse von Vollblut ausgerichtet, die Verwendung von isolierten Zellen als Ausgang für ein Differentialblutbild muss daher in der Interpretation der Ergebnisse besonders berücksichtigt werden. Wie in Kapitel 2.2.1 erläutert, sind im Peroxidasekanal des Bayer ADVIA 120 steigende Peroxidaseaktivität (X-Achse) gegen steigende Streulichtintensität (Y-Achse), die die Granulierung widerspiegelt, aufgetragen. Monozyten fallen im Differentialblutbild von Vollblut als große, schwach peroxidasepositive Zellen auf. Neutrophile Granulozyten grenzen sich von diesen durch eine durchschnittlich höhere Peroxidase- und Streulichtaktivität ab. Abbildungen 3-1 bis 3-3 zeigen die verschiedenen Zellpopulationen der Bayer ADVIA 120-Bilder.

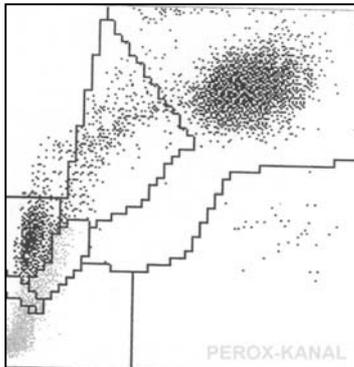
Vollblut

Abbildung 3-4a: ADVIA 120-Bild einer Vollblutprobe; Perox-Kanal;

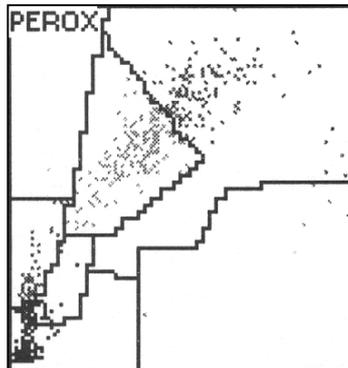
Dextran

Abbildung 3-5a: ADVIA 120-Bild nach Dextransedimentation; Perox-Kanal; Leukozytenfraktion;

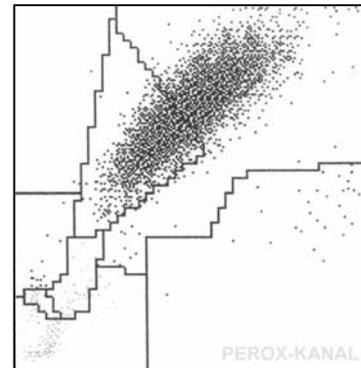
Histopaque

Abbildung 3-6a: ADVIA 120-Bild nach Histopaque; Perox-Kanal; Granulozytenfraktion;

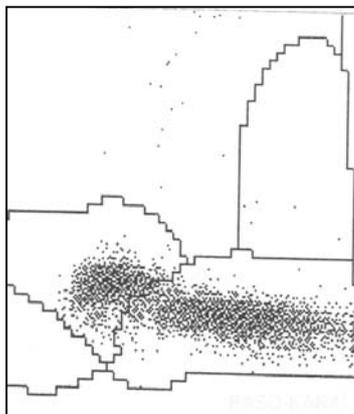


Abbildung 3-4b: ADVIA 120-Bild einer Vollblutprobe; Baso-Kanal;

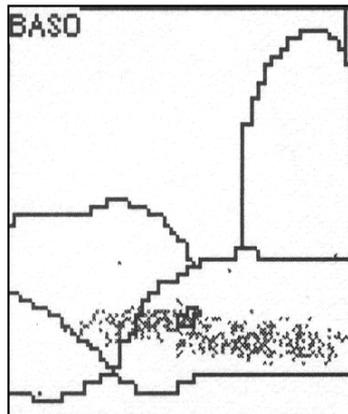


Abbildung 3-5b: ADVIA 120-Bild nach Dextransedimentation; Baso-Kanal; Leukozytenfraktion;

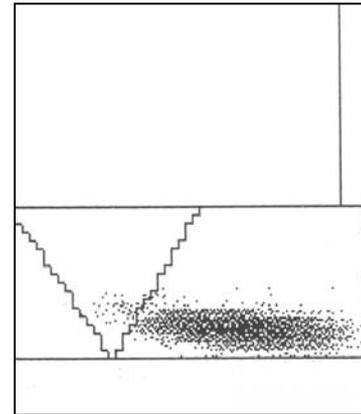


Abbildung 3-6b: ADVIA 120-Bild nach Histopaque; Baso-Kanal; Granulozytenfraktion

Fragestellung und Ergebnisse

Nach den zwei unterschiedlichen Zelltrennungsv erfahren, Dextransedimentation bzw. Histopaque-Isolierung, erhielt man die in Kapitel 2.2 gezeigten Ergebnisse. Durch die Dextransedimentation bekam man die gesamte Leukozytenfraktion und eine leichte Kontamination durch Erythrozyten.

Durch das Histopaquerverfahren erhielt man zwei Populationen, zum einen die mononukleären Blutzellen MNBC (bestehend aus Monozyten und Lymphozyten) und zum anderen die Granulozytenfraktion. Die Erythrozyten sammelten sich in einem Pellet am Boden des Gefäßes.

Die Bayer ADVIA 120 Bilder nach der Dextransedimentation zeigen das Vorhandensein der gesamten Leukozytenfraktion, d.h. Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten (s. Abb. 3-5a und 3-5b). Im Gegensatz zum Peroxidasekanal bei der Vollblutprobe (s. Abb. 3-4a), ist die Granulozytenwolke nicht mehr so schön getrennt von der Monozytenwolke, was daran liegt, dass Granulozyten während des Aufarbeitungsvorgangs einen Teil ihrer Granulainhalte in die Umgebung ausschütten, darunter eben auch die Myeloperoxidase, wodurch Granulozyten teilweise in das Monozytenfenster verschoben werden. Anhand des Basokanalbildes (s. Abb. 3-6a) kann man erkennen, dass es sich zum Großteil um Granulozyten (Polymorphkernige) handelt. Anders ist die Situation nach der Histopaque Trennung. Die isolierte Granulozytenfraktion besteht fast ausschließlich aus Granulozyten, was mikroskopische Bilder belegen. Aber auch hier verlieren die Granulozyten während des Isolationsvorganges einen Teil ihrer Myeloperoxidase und wandern daher ins Monozytenfeld des Peroxkanals (s. Abb. 3-6a). Der Bayer ADVIA 120 ordnet diese degranulierten Granulozyten dann fälschlicherweise den Monozyten zu, wodurch sich der numerische Bayer ADVIA 120 Monozytenwert erhöht. Abbildung 3-6a zeigt schön die Verschiebung der Granulozytenwolke aus dem Granulozytenfenster in das Monozytenfenster. Dass es sich nicht um Monozyten handelt, zeigt das dazugehörige Basokanalbild, Abbildung 3-6b, in dem das Feld der mononukleären Zellen fast leer ist, das Feld der polymorphkernigen Zellen hingegen deutlich die Anwesenheit von Zellen zeigt.

Um die annähernde Gesamtzahl der Granulozyten bei der Fraktion der isolierten Granulozyten zu ermitteln, muss man, wenn man keine Mikroskopie macht, zu dem angezeigten Granulozytenanteil den Monozytenanteil addieren,

da der vom Bayer ADVIA 120 angegebene Granulozytenanteil bei den isolierten Granulozyten, wie oben erläutert, als zu niedrig angesehen werden muss (s. Abb. 4-4a und b). Der Bayer ADVIA 120 liefert aufgrund seiner Messungen folgende, bei den Granulozyten als falsch zu betrachtende Werte (Tabelle 3-1). Der tatsächliche Granulozytenanteil ergibt sich in etwa durch Addition der „Monozytenwerte“ (Monozyten befinden sich nur in sehr geringen Mengen in der Granulozytenfraktion, s. Abb. 3-6b).

Tabelle 3-1: Ausbeute an isolierten Granulozyten aus Vollblut nach Histopaque-Isolierung (numerische Anzeige am ADVIA 120)

Anteil/Proben ID (n=15)	Vollblut	Isolierte Granulozyten
Neutrophile [%]	60,69 ± 6,27	54,92 ± 17,4
Lymphozyten [%]	29,49 ± 5,23	1,51 ± 2,09
Monozyten [%]	5,13 ± 1,42	42,71 ± 17,88
Eosinophile [%]	2,03 ± 1,51	0,76 ± 0,5
Basophile [%]	0,63 ± 0,25	0,02 ± 0,04
Tatsächl. Granulozytenanteil [%]	60,7 + 2 % ≈ 63 %	~ 98,3

Messergebnisse des Bayer ADVIA 120

Die Histopaque Trennung des Vollblutes ergibt neben der Granulozytenfraktion noch eine weitere, davon gut abgetrennte Fraktion mit mononukleären Zellen (MNBC). Diese sich aus Monozyten und Lymphozyten zusammensetzende Gruppe wurde weiter mittels der MACS-Methode aufgetrennt und es wurden jeweils Bayer ADVIA 120-Messungen angefertigt. Abbildung 3-7 bis 3-9 zeigen exemplarisch die Ergebnisse.

**Vor MACS-Trennung
(MNBC)**

**Nach MACS-
Trennung
(Monozyten)**

**Nach MACS-
Trennung
(Lymphozyten)**

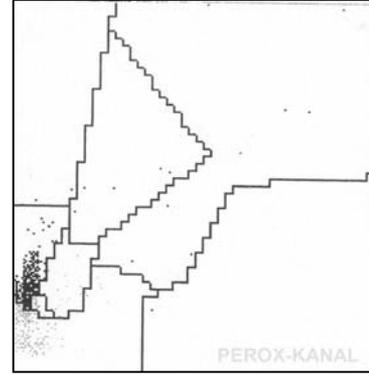
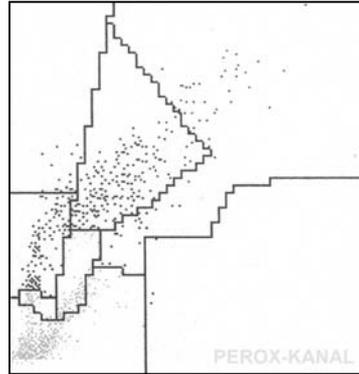
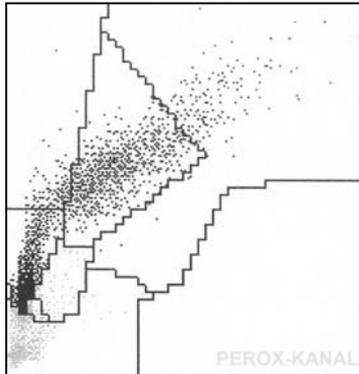


Abbildung 3-7a: ADVIA 120-Bild nach Histopaque; Perox-Kanal; mononukleäre Blutzellen-Fraktion

Abbildung 3-8a: ADVIA 120-Bild nach Histopaque und MACS; Perox-Kanal; AK-freie Fraktion=Negativ-Fraktion≈Monozyten-fraktion

Abbildung 3-9a: ADVIA 120-Bild nach Histopaque und MACS; Perox-Kanal; AK-beladene Fraktion≈Lymphozyten

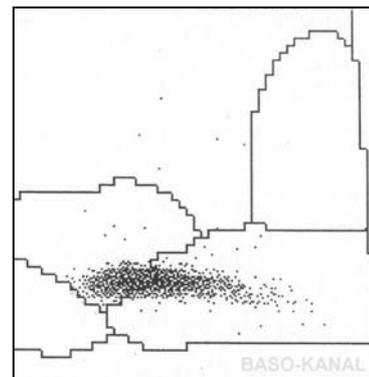
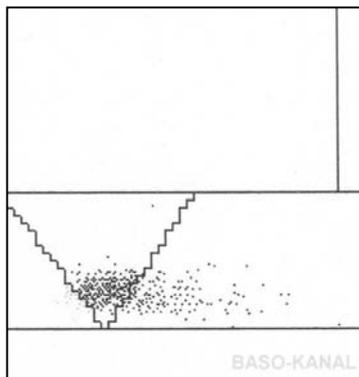
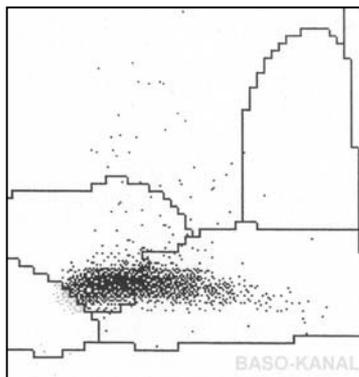


Abbildung 3-7b: ADVIA 120-Bild nach Histopaque; Baso-Kanal; mononukleäre Blutzellen

Abbildung 3-8b: ADVIA 120-Bild nach Histopaque und MACS; Baso-Kanal; AK-freie Fraktion = Negativ-Fraktion ≈ Monozytenfraktion

Abbildung 3-9b: ADVIA 120-Bild nach Histopaque und MACS; Baso-Kanal; AK-beladene Fraktion≈Lymphozyten

Die gleiche differenzierte Betrachtung muss bei der Analyse der Bayer ADVIA 120-Bilder von den mononukleären Blutzellen und ihren einzelnen Fraktionen erfolgen. Abbildung 3-7a und 3-7b zeigen das Ergebnis der Analyse der MNBC-Fraktion nach der Auftrennung mittels Dichtegradienten. Durch die Aufarbeitung und den damit verbundenen mechanischen Stress scheinen sich die Zellkerne der mononukleären Zellen zu verformen und werden dadurch vom ADVIA 120 wie im Baso-Kanal (s. Abb. 3-9b) zu erkennen, in das polymorphkernige Feld verschoben. Der Perox-Kanal (s. Abb. 3-9a) zeigt jedoch, dass es sich um mononukleäre Zellen handelt, hier ist das Granulozytenfeld frei. Das Monozyten- und Lymphozytenfeld im Peroxidasekanal zeigt deutliche Aktivität und die Mikroskopie bestätigt, dass es sich quantitativ hauptsächlich um Lymphozyten und Monozyten handelt.

Diese MNBC-Fraktion wurde anschließend durch das magnetische Trennverfahren MACS in Monozyten und Lymphozyten weiter aufgetrennt. Auch hier stimmten die Ergebnisse der Bayer ADVIA 120-Messungen mit denen der Mikroskopie überein, es lagen jeweils nur geringe Verunreinigungen durch Granulozyten [Monozyten $22,78 \pm 11,82$ bzw. Lymphozyten $71,86 \pm 13,64$] (s. Tab. 3-2) vor. Daher konnte man bei der Messung der drei letztgenannten Blutzellfraktionen (MNBC, Monozyten, Lymphozyten) die Ergebnisse des Bayer ADVIA 120 verwenden. Die Tabelle 3–2 zeigt die Zusammensetzung an isolierten mononukleären Blutzellen nach Isolation aus Vollblut.

Tabelle 3-2: Ausbeute an isolierten mononukleären Blutzellen aus Vollblut mit Hilfe der Histopaque-Technik und vor MACS-Trennung

Anteil/Proben ID (n=15)	Vollblut	Isolierte mononukleäre Blutzellen
Neutrophile [%]	$60,69 \pm 6,27$	$2,88 \pm 1,31$
Lymphozyten [%]	$29,49 \pm 5,23$	$71,86 \pm 13,64$
Monozyten [%]	$5,13 \pm 1,42$	$22,78 \pm 11,82$
Eosinophile [%]	$2,03 \pm 1,51$	$0,52 \pm 0,71$
Basophile [%]	$0,63 \pm 0,25$	$0,43 \pm 0,29$

Messergebnisse des ADVIA 120

3.2 Bestimmung der sphingolipidabbauenden Enzymaktivität bei Gesamtleukozyten (Dextrasedimentation), isolierten Granulozyten (Histopaque-Technik) und mononukleären Blutzellen (Histopaque-Technik)

Hintergrund

Bei diesem ersten vororientierenden Versuch wurde die Enzymaktivität der vier lysosomalen Enzyme (Gesamt-Hexosaminidase, Hexosaminidase-A, β -Galaktosidase und Arylsulfatase A) an drei Gruppen gemessen:

1. mittels Dextrasedimentation isolierten Gesamtleukozyten
2. durch Histopaque gewonnenen Granulozyten
3. durch Histopaque gewonnenen mononukleären Blutzellen (Monozyten und Lymphozyten).

Die höchste Aktivität wurde in absteigender Reihenfolge bei den Monozyten, Granulozyten und zum Schluss Lymphozyten erwartet, wobei Monozyten und Lymphozyten bei diesem Versuch vorerst nur zusammen als mononukleäre Blutzellfraktion gemessen wurden. Die Leukozytenfraktion nach Dextrasedimentation ergab durchschnittlich 46% neutrophile, 2% eosinophile und 0,24% basophile Granulozyten sowie 16% Lymphozyten und 35% Monozyten. Die Fraktion der mononukleären Blutzellen setzte sich durchschnittlich aus ca. 66% ($\pm 8,94$, n=5) Lymphozyten und 28,9% ($\pm 7,51$, n=5) Monozyten zusammen.

Ergebnisse

I. *Gesamthexosaminidase (M. Sandhoff)*

Wie Abbildung 3-10 zeigt, ist die höchste Aktivität für das Enzym Gesamthexosaminidase bei den MNBC mit 0,3 Extinktion/10⁵ Zellen ($\pm 0,04$; n=6) zu finden. Die Unterschiede sind allerdings gering.

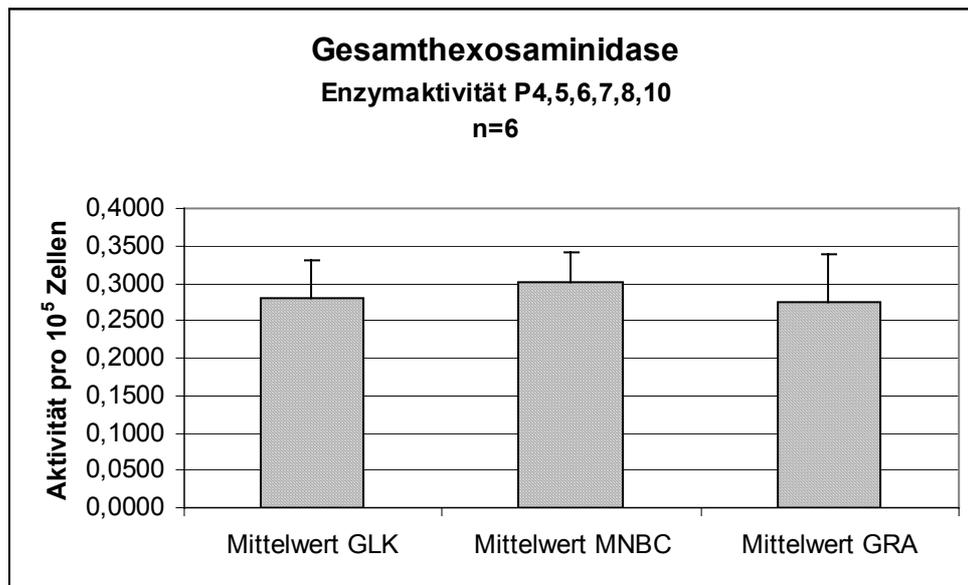


Abbildung 3-10 Enzymaktivität (Absorption) der Gesamthexosaminidase im Vergleich zwischen GLK=Gesamtleukozyten, MNBC= mononukleäre Blutzellen (Monozyten und Lymphozyten) und GRA=Granulozyten. Aktivität bezogen auf 10⁵ Zellen.

II. *Hexosaminidase-A (M. Tay-Sachs)*

Bei der Hexosaminidase-A zeigen die Granulozyten mit 0,069 ($\pm 0,017$; n=6) die höchste Aktivität pro 10⁵ Zellen, der Unterschied zu den Gesamtleukozyten ist, wie in Abbildung 3-11 zu erkennen, mit 0,0596 ($\pm 0,007$; n=6) gering. Die MNBC weisen mit 0,043 ($\pm 0,003$; n=6) die geringste Aktivität pro 10⁵ Zellen auf.

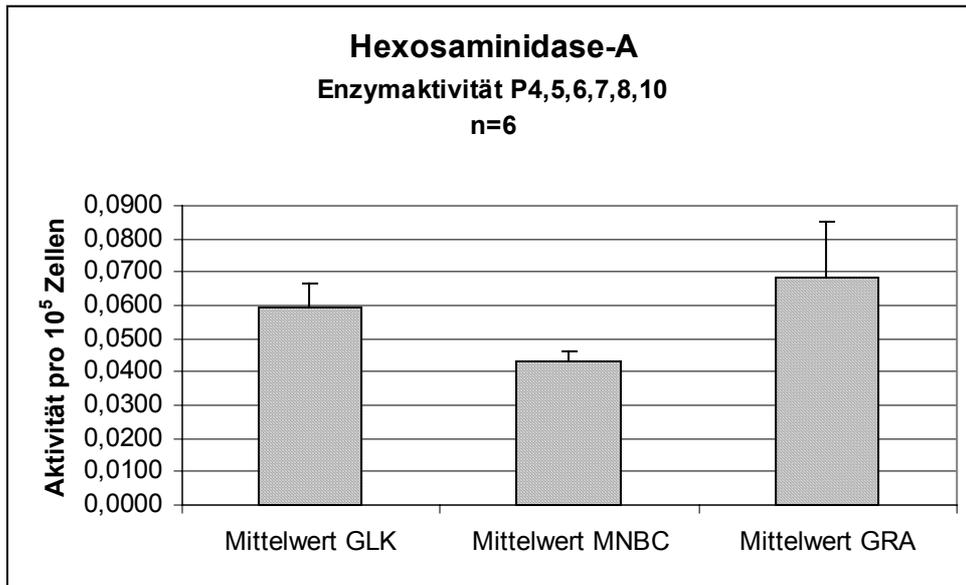


Abbildung 3-11 Enzymaktivität (Absorption) der Hexosaminidase A im Vergleich zwischen GLK=Gesamtleukozyten, MNBC= mononukleäre Blutzellen (Monozyten und Lymphozyten) und GRA=Granulozyten. Aktivität bezogen auf 10^5 Zellen

III. *β -Galaktosidase (G_{M1} Gangliosidose bzw. Morquio B)*

Abbildung 3-12 zeigt die unterschiedliche Aktivität von Gesamtleukozyten mit 0,13 ($\pm 0,015$; n=6), mononukleäre Blutzellen mit 0,08 ($\pm 0,03$; n=6) und Granulozyten mit 0,05 ($\pm 0,2$; n=6).

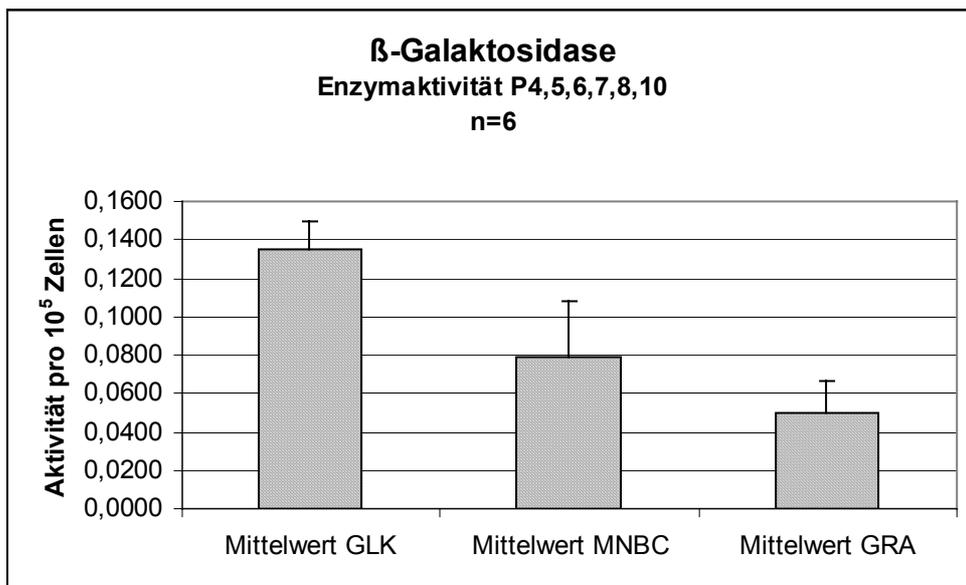


Abbildung 3-12 Enzymaktivität (Absorption) der β -Galaktosidase im Vergleich zwischen GLK=Gesamtleukozyten, MNBC= mononukleäre Blutzellen (Monozyten und Lymphozyten) und GRA=Granulozyten. Aktivität bezogen auf 10^5 Zellen

IV. Arylsulfatase-A (Metachromatische Leukodystrophie)

Bei der Untersuchung der Arylsulfatase-A fiel ein ähnliches Muster wie bei der oben erwähnten β -Galaktosidase auf. Wie aus Abbildung 3-13 ersichtlich, ist der Unterschied zwischen Gesamtleukozyten und den beiden anderen Fraktionen, mononukleäre Blutzellen und Granulozyten, am deutlichsten.

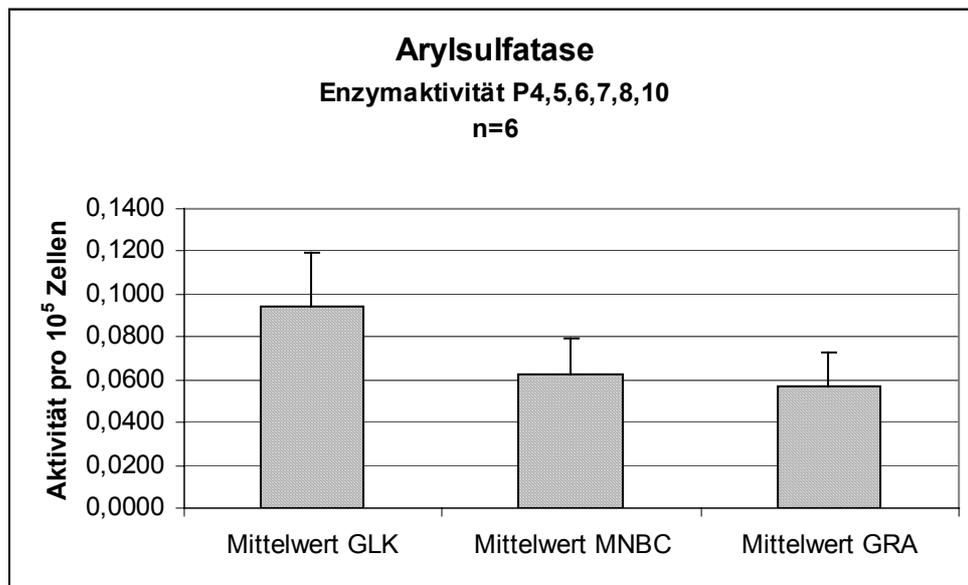


Abbildung 3-13 Enzymaktivität (Absorption) der Arylsulfatase A im Vergleich zwischen GLK=Gesamtleukozyten, MNBC= mononukleäre Blutzellen (Monozyten und Lymphozyten) und GRA=Granulozyten. Aktivität bezogen auf 10^5 Zellen

3.3 Bestimmung der Aktivität sphingolipidabbauender Enzyme bei Monozyten und Lymphozyten im Vergleich zu Granulozyten

Hintergrund

Die Ergebnisse des ersten orientierenden Versuches (s. Kapitel 3.2) hatten auf einer gemeinsamen Messung der Aktivität von Monozyten und Lymphozyten beruht. In einem weiteren Versuch sollten die Enzymaktivitäten getrennt in Monozyten und Lymphozyten untersucht werden.

3.3.1 Reinheit der isolierten Zellfraktionen nach MACS-Isolierung

Wie in Kapitel 2.2.4 und 2.2.5 beschrieben, wurde nach der Isolierung mittels MACS von der Monozytenfraktion und der Lymphozytenfraktion ein Zytospinpräparat erstellt. Die Ausstriche wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt (100 Zellen pro Präparat) und mit den gleichzeitig angefertigten Bayer ADVIA 120 Differentialblutbildern verglichen, um einerseits die Übereinstimmung zwischen den beiden Messtechniken zu überprüfen und andererseits die Reinheit der jeweiligen Zellfraktion zu untersuchen. Die Ergebnisse der Gesichtsfeldauszählung mittels Mikroskop wurden als die exaktere Methode festgelegt.

Ergebnisse

In Tabelle 3-3 sind die Ergebnisse der Messung einer die negativ-Fraktion (entspricht der Monozytenfraktion) enthaltenden Zellsuspension und einer die AK-beladene Fraktion (entspricht der Lymphozytenfraktion) enthaltenden Zellsuspension nach MACS-Trennung am Bayer ADVIA 120 und der mikroskopischen Gesichtsfeldauszählung eines Zytospinpräparates derselben Probe gegenübergestellt.

Tabelle 3-4a und b zeigt zusammengefasst die Ergebnisse der Bayer ADVIA 120 Auszählung und der mikroskopischen Auszählung für die MACS-isolierten Lymphozyten und Monozyten.

Die Lymphozytenfraktion ist sehr sauber (>90%) und zeigt eine gute Übereinstimmung bei beiden Messverfahren ($f=0,97$).

Bei der Monozytenfraktion sieht man deutlich höhere Werte bei der Betrachtung des mikroskopischen Bildes (~82%) im Vergleich zum ADVIA (~60%). Das resultiert offensichtlich daher, dass durch die mechanischen Belastungen während der Isolierung die Monozyten teilweise degranulieren (=Verlust an MPO) und daher im Perox-Kanal nach links in das Lymphozytenfeld rutschen. Daher ist es sinnvoll, die am Bayer ADVIA 120 gemessenen Monozytenwerte mit dem Faktor 1,37 zu multiplizieren, um die „wahren“ Monozytenwerte zu

erhalten. Auffällig ist die relativ hohe Kontamination an Granulozyten (~15%) sowohl am ADVIA als auch bei der mikroskopischen Analyse.

Tabelle 3-3: Gegenüberstellung der ADVIA 120-Auswertung und der mikroskopischen Gesichtsfeldauszählung von Zytospinpräparaten der isolierten Lymphozyten- und Monozytenfraktion nach MACS-Trennung der MNBC von 5 Probanden (Hauptfraktionen grau unterlegt)

	ADVIA [%]	Zytospin [%]	ADVIA [%]	Zytospin [%]	ADVIA [%]	Zytospin [%]
MACS isolierte	Lymphos	Lymphos	Monos	Monos	Gra	Gra
Lymphozyten (grau) + Verunreinigungen						
P12 Lymphos	91,30%	86,00%	5,30%	8,00%	2,10%	6,00%
P13 Lymphos	92,00%	95,00%	4,40%	3,00%	3,50%	2,00%
P14 Lymphos	96,20%	90,00%	2,20%	8,00%	1,10%	2,00%
P15 Lymphos	89,40%	88,00%	2,90%	6,00%	6,20%	6,00%
P16 Lymphos	96,10%	93,00%	2,70%	4,00%	0,50%	3,00%
Mittelwert	93,00%	90,40%	3,50%	5,80%	2,68%	3,80%
Standardabw.	2,71%	3,26%	1,16%	2,04%	2,03%	1,83%
MACS isolierte Monozyten (grau) + Verunreinigungen						
P12 Monos	15,50%	12,00%	56,10%	79,00%	20,60%	9,00%
P13 Monos	23,80%	1,00%	58,30%	72,00%	16,20%	27,00%
P14 Monos	27,80%	0,00%	61,00%	87,00%	9,50%	13,00%
P15 Monos	17,40%	0,00%	66,60%	86,00%	12,30%	14,00%
P16 Monos	30,70%	1,00%	55,30%	81,00%	12,30%	18,00%
Mittelwert	23,04%	2,80%	59,46%	81,00%	14,18%	16,20%
Standardabw.	5,84%	4,62%	4,08%	5,40%	3,85%	6,11%

Tabelle 3-4a und b: Vergleich ADVIA 120-Messergebnisse einer Zellsuspension und mikroskopische Auszählung von Zytospinpräparaten der Differentialblutbilder mononukleärer Blutzellen nach MACS-Trennung; Umrechnungsfaktor

a: Lymphozytenfraktion

	ADVIA [%]	Zytospin [%]	Faktor ADVIA/Zytospin
Lymphozyten	93±2,71	90,4±3,3	0,97±0,03
Monozyten	3,5±1,2	5,8±2	
Granulozyten	2,7±2	3,8±1,83	
Σ	99,2	100,00	

b: Monozytenfraktion

	ADVIA [%]	Zytospin [%]	Faktor ADVIA/Zytospin
Monozyten	59,5±4	81±5,4	1,37±0,01
Lymphozyten	23,0±3,8	2,8±4,6	
Granulozyten	14,2±3,9	16,2±6	
Σ	96,7	100,00	

Bedeutung

Vor diesem Hintergrund müssen die Messungen des Bayer ADVIA 120 bei der Berechnung der Enzymaktivität pro Zellfraktion umgerechnet werden, um nicht falsche Ergebnisse zu erhalten.

3.3.2 Messung der sphingolipidabbauenden Enzymaktivität bei den einzelnen Zellfraktionen

Einführung

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, gibt es fundierte Hinweise darauf, dass die Monozyten die größte Enzymaktivität pro Zelle besitzen, gefolgt von den Granulozyten und Lymphozyten. Um diese Hypothese zu überprüfen, sollten in dieser zweiten Versuchsreihe neben den Granulozyten jetzt die mit Hilfe der MACS-Technik aus der MNBC-Fraktion isolierten Monozyten und Lymphozyten getestet werden.

Bei den drei Zellfraktionen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) wurde die Enzymaktivität gemessen und unter Berücksichtigung der Zytospinpräparate (d.h. die Messwerte der Monozyten am Bayer ADVIA 120 wurden mit dem Faktor 1,37 multipliziert) die Aktivität (=Extinktion) pro 10⁵ Zellen errechnet. Dazu wurden Vollblutproben von 9 gesunden erwachsenen Probanden verwendet, von denen die einzelnen Zellfraktionen mittels Dichtegradienten- und MACS-Verfahren isoliert wurden. Im Anschluss daran erfolgte die Messung der einzelnen Enzyme an diesen Zellfraktionen und die Aktivität (=Extinktion) wurde auf 10⁵ Zellen bezogen.

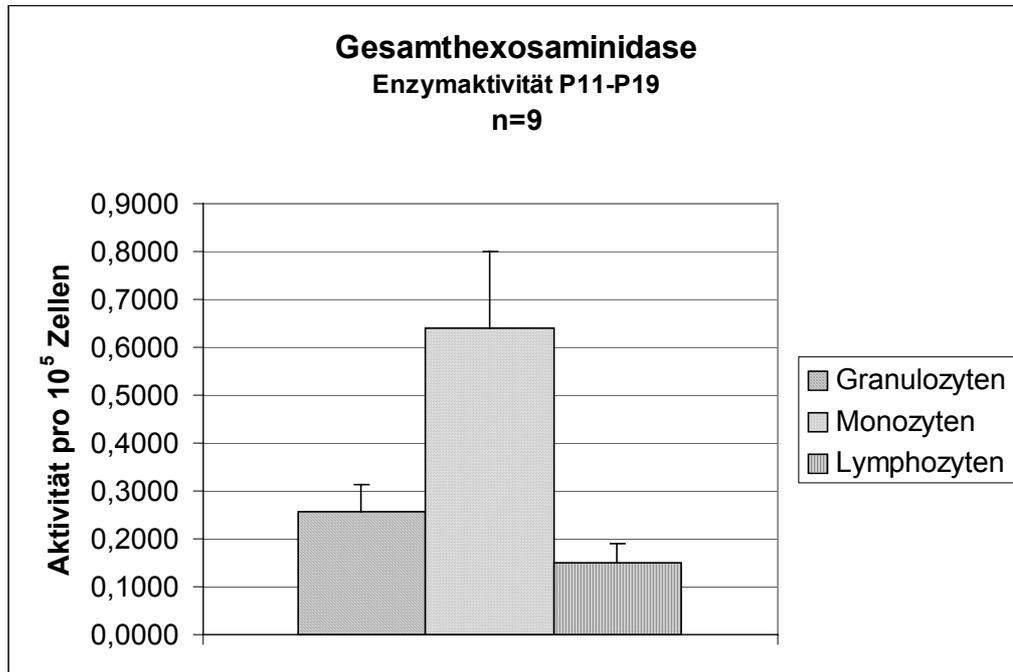
Ergebnisse

Abbildung 3-14 Enzymaktivität (Absorption) der Gesamthexosaminidase im Vergleich zwischen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Aktivität bezogen auf 10^5 Zellen. Probenumfang n=9

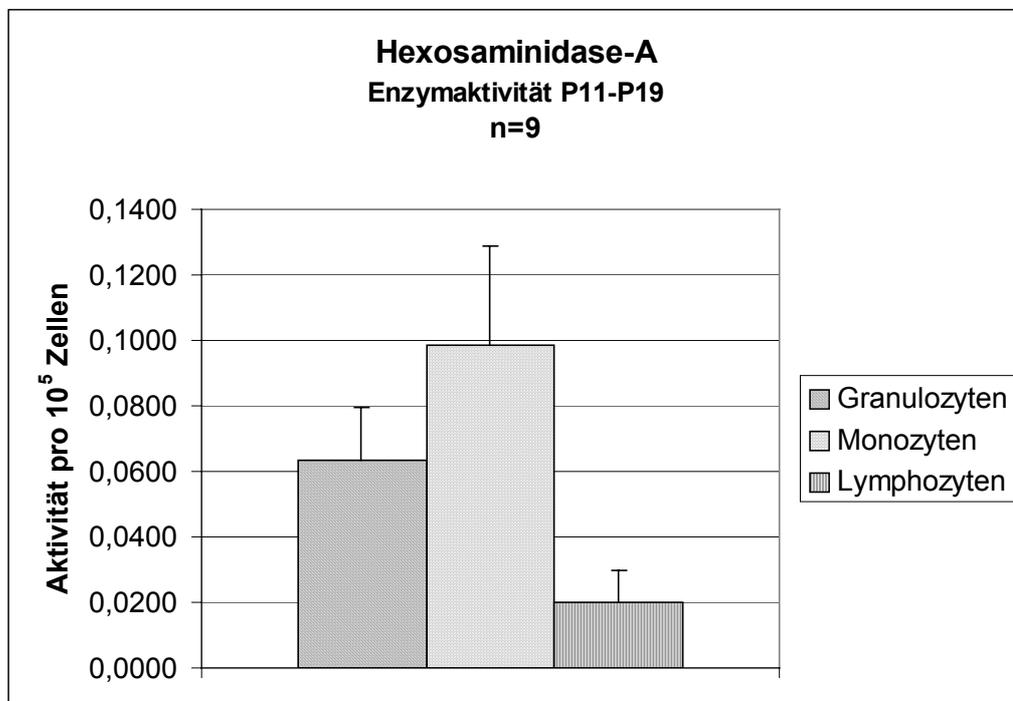


Abbildung 3-15 Enzymaktivität (Absorption) der Hexosaminidase-A im Vergleich zwischen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Aktivität bezogen auf 10^5 Zellen. Probenumfang n=9.

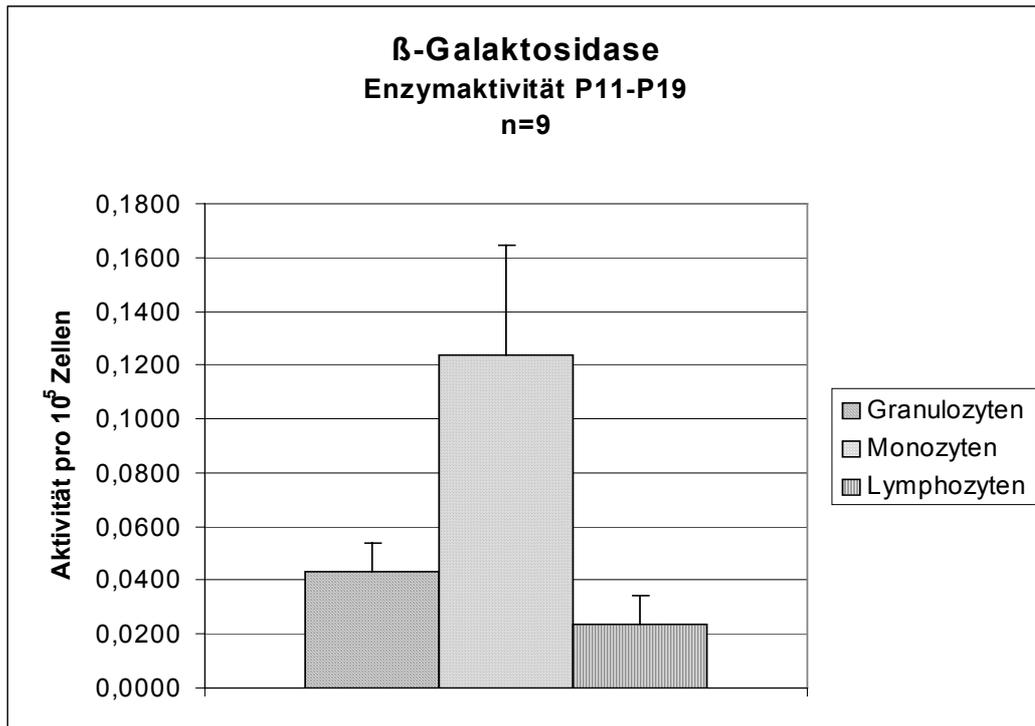


Abbildung 3-16 Enzymaktivität (Absorption) der β-Galaktosidase im Vergleich zwischen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Aktivität bezogen auf 10⁵ Zellen. Probenumfang n=9.

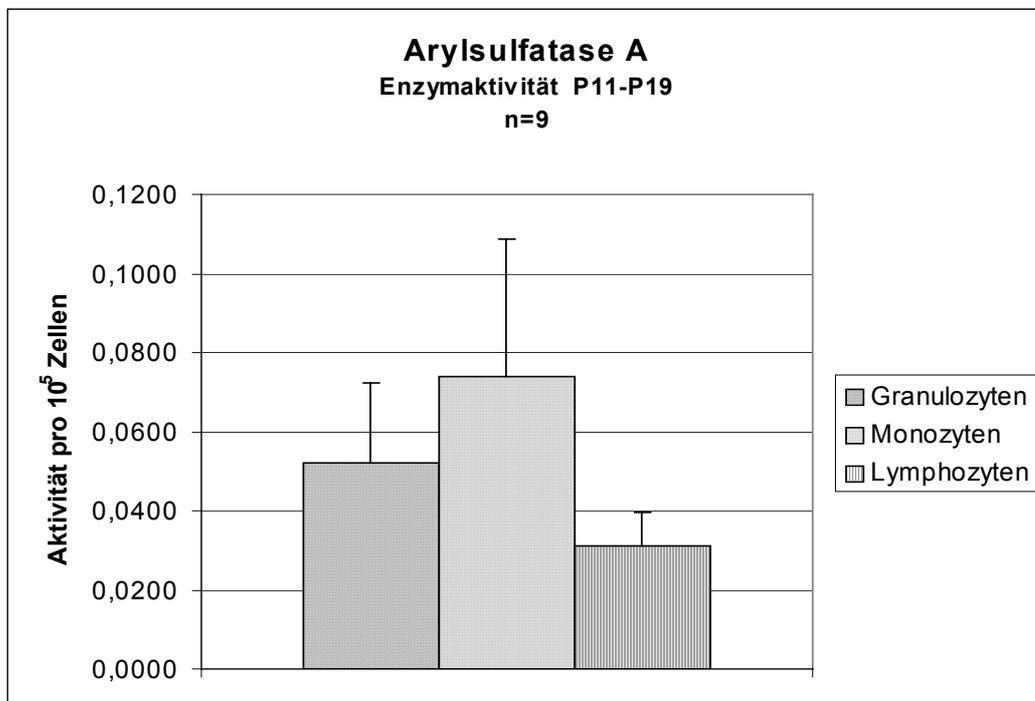


Abbildung 3-17 Enzymaktivität (Absorption) der Arylsulfatase A im Vergleich zwischen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Aktivität bezogen auf 10⁵ Zellen. Probenumfang n=9.

Wie aus den Abbildungen 3-14 bis 3-17 ersichtlich, zeigt sich bei allen vier Enzymmessungen die höchste Aktivität in der Monozytenfraktion. Am größten waren die Unterschiede bei den Enzymen Gesamthexosaminidase und β -Galaktosidase. Das Verteilungsmuster war jedoch bei allen gleich. Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass den Monozyten die höchste Aktivität pro Zelle zuzuschreiben ist. Nachfolgende Tabelle 3-5 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse dieser Versuchsreihe.

Tabelle 3-5: Verteilungsmuster der Enzymaktivität innerhalb der Leukozyten

Zellfraktion/Enzym	Ges-Hex	Hex-A	β -Gal	Arylsulfatase A
Granulozyten [~98%]	0,2570 \pm 0,0578	0,0633 \pm 0,0160	0,0433 \pm 0,0106	0,0520 \pm 0,0204
Monozyten [~81%]	0,6391 \pm 0,1605	0,0985 \pm 0,0301	0,1238 \pm 0,0409	0,0738 \pm 0,0347
Lymphozyten [~90%]	0,1500 \pm 0,0480	0,0201 \pm 0,0097	0,0239 \pm 0,0104	0,0311 \pm 0,0085

Ges-Hex= Gesamthexosaminidase; Hex-A= Hexosaminidase A; β -Gal= β -Galaktosidase; Alle Angaben bezogen auf (relative) Enzymaktivität pro 10^5 Zellen, in Klammer der Reinheitsgrad der Zellfraktionen in Prozent (n=9).

Faktorenberechnung

Um eine Gewichtung zwischen den einzelnen Zellfraktionen zu ermöglichen, wurde die Aktivität der Lymphozyten (pro 10^5 Zellen) willkürlich gleich 1 festgelegt und die Aktivität der Mono- und Granulozyten dazu ins Verhältnis gesetzt. Dafür wurde die Aktivität der Granulozyten bzw. Monozyten durch diejenige der Lymphozyten geteilt und der so erhaltene Wert mit dem der Lymphozyten verglichen.

Dabei ergaben sich für alle vier Enzyme deutlich höhere Werte bei der Monozytenfraktion, die, wie aus Tabelle 3-6 ersichtlich, in etwa viermal so hoch waren wie die der Lymphozyten. Granulozyten zeigten eine etwa doppelt so hohe Aktivität wie Lymphozyten.

Tabelle 3-6: Faktoren im Bezug auf das Verteilungsmuster der Enzymaktivität innerhalb der Leukozytenfraktionen

Enzym/Zellfraktion	Lymphozyten	Monozyten	Granulozyten
Gesamthexosaminidase n=9	1,00	4,36 ±1,05	1,81±0,56
Hexosaminidase-A n=8	1,00	4,57±1,59	2,81±0,73
β-Galaktosidase n=8	1,00	4,47±1,00	1,64±0,41
Arylsulfatase n=9	1,00	2,31±0,68	1,64±0,38

Lymphozyten wurden willkürlich als Faktor 1 festgelegt und die restlichen Blutzellen dazu in Relation gesetzt.

Die praktische Bedeutung dieser Faktorenberechnung soll im Diskussionsteil näher erläutert werden. Vorwegnehmend kann gesagt werden, dass diese Faktoren in der Routine zur differenzierten Betrachtung von grenzwertigen Messergebnissen benutzt werden können, um den unterschiedlichen Blutbildzusammensetzungen der Patienten gerecht zu werden. Abbildungen 3-18 bis 3-21 zeigen graphisch die Verteilung der Faktoren innerhalb der einzelnen Leukozytenfraktionen:

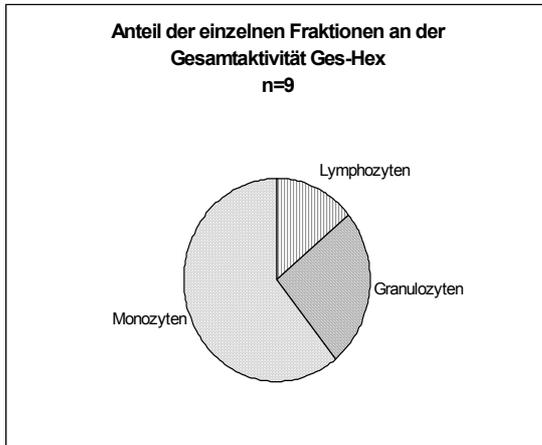


Abbildung 3-18: Anteil der einzelnen Fraktionen sphingolipidabbauender Enzyme an der Gesamtaktivität der Gesamthexosaminidase bei einem Probenumfang von neun (n=9).

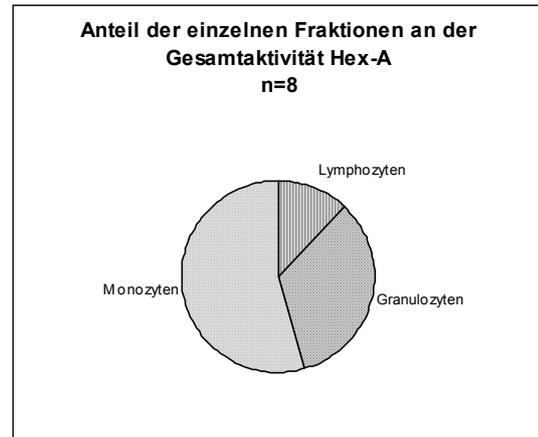


Abbildung 3-19: Anteil der einzelnen Fraktionen sphingolipidabbauender Enzyme an der Gesamtaktivität der Hexosaminidase-A bei einem Probenumfang von acht (n=8).

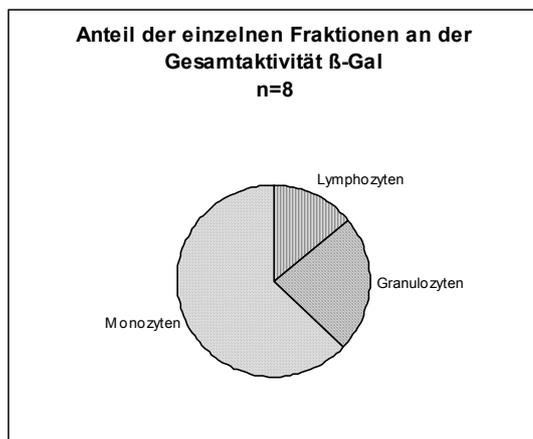


Abbildung 3-20: Anteil der einzelnen Fraktionen sphingolipidabbauender Enzyme an der Gesamtaktivität der β -Galaktosidase bei einem Probenumfang von acht (n=8).



Abbildung 3-21: Anteil der einzelnen Fraktionen sphingolipidabbauender Enzyme an der Gesamtaktivität der Arylsulfatase A bei einem Probenumfang von neun (n=9).

Bewertung

Die vorläufigen Ergebnisse wurden auf Grundlage reiner Zellfraktionen berechnet. Wie die Auswertung mittels Zytospin zeigte (s. Tabelle 3-3), muss jedoch von einer Kontamination mit anderen Zellfraktionen ausgegangen werden, d.h. die einzelnen Faktoren sind nur Näherungswerte.

Auch soll bereits an dieser Stelle angeführt werden, dass diese Faktoren einer zusätzlichen Nachkorrektur bedürfen: Insbesondere Granulozyten, aber auch Monozyten, werden durch den mechanischen Stress während der Zellaufarbeitung teilweise degranuliert, sodass es zu einem Verlust der lysosomalen Enzyme kommt. D.h. der „eigentliche“ (ursprüngliche) Wert der Zellen im Vollblut ist dementsprechend höher. Auf diesen Aspekt wird ab Kapitel 3.4 näher eingegangen.

I. Monozytenfraktion

Monozyten wiesen eine Kontamination mit Granulozyten ($16,2 \pm 6,11$ %) auf. Die Verunreinigung mit Lymphozyten betrug lediglich $2,80 \pm 4,62\%$. Da bei den Granulozyten (und Lymphozyten) von einer geringeren Aktivität pro Zelle ausgegangen wird, wäre den Monozyten eine noch höhere Aktivität pro 10^5 Zellen zuzuschreiben als bei diesem Versuch ermittelt wurde. Ob Monozyten auf äußeren Stress mit einer Entleerung ihrer Speichergranula reagieren und dadurch zusätzlich Enzym verloren geht, sollte in weiteren Versuchen getestet werden (s. Kap. 3.5).

II. Lymphozytenfraktion

Diese Fraktion war relativ wenig kontaminiert mit einem Monozytenanteil von nur $5,80 \pm 2,04\%$ und einem Granulozytenanteil von $3,80 \pm 1,83\%$. Den Lymphozyten wäre also eine etwas geringere Aktivität pro Zelle zuzuweisen, und aus der Literatur war bei diesen Zellen auch nicht mit einer Degranulation während des Isolierungsvorganges zu rechnen.

III. Granulozytenfraktion

Granulozyten sind nur geringfügig mit Monozyten und Lymphozyten kontaminiert. Aber nach bisherigen Erkenntnissen reagieren Granulozyten auf „Stresssituationen“, wie z.B. den Isolierungsvorgang, mit einer massiven Degranulation, d.h. Entleerung ihrer Granula und damit der in diesen enthaltenen Enzymen. Unter Berücksichtigung dieses Verhaltens muss auch bei dieser Fraktion der in diesem Versuch ermittelte Wert vorerst als Näherungswert betrachtet werden, da ein wahrscheinlich nicht unerheblicher Teil der Enzyme beim Aufarbeitungsprozess verlorengegangen ist. Die tatsächliche Aktivität pro 10^5 Zellen ist daher – ohne vorherige „Stresssituationen“ – wahrscheinlich deutlich höher. Um diesen Faktor besser abschätzen zu können, wurde systematisch das Degranulationsverhalten untersucht, was im Folgenden dargestellt wird (s. Kap. 3.4).

3.4 Degranulationsversuche an Granulozyten

Wie schon erwähnt, stellte man bei anderen Versuchen fest, dass Granulozyten auf bestimmte Stimuli, z.B. Isolationsverfahren etc., mit einer teilweisen Entleerung ihrer Speichergranula reagieren, in denen höchstwahrscheinlich auch die für den Abbau der Sphingolipide verantwortlichen Enzyme zu finden sind. Diesen Umstand berücksichtigend würden die Enzymmessungen, denen ein aufwendiges Isolationsverfahren vorausgeht, eine zu niedrige Aktivität pro Zelle (Granulozyt, ev. Monozyt) anzeigen. Zur Untersuchung des Degranulationsverhaltens der Granulozyten bzw. Monozyten wurden diese (wie im Kap. 3.4 für Granulozyten und in Kap. 3.5 für Monozyten gezeigt werden wird) mit den bekannten Stimuli GM-CSF, N-fMLP und Cytochalasin B behandelt. Als Messsystem wurden zwei verschiedene Bezugssysteme gewählt: zum einen die Aktivität der vier lysosomalen Enzyme sowohl im Überstand als auch im Pellet der behandelten Proben, zum anderen die Menge an Myeloperoxidase, ebenfalls im Überstand und Pellet der Proben. Die Myeloperoxidasemenge wurde ausgewählt, da diese in Form des MPXI-Wertes,

der die Myeloperoxidaseaktivität angibt und mit der intrazellulären Menge an Myeloperoxidase korreliert [Gerber, 1995], am Bayer ADVIA 120 gemessen werden und somit im Routinebetrieb Verwendung finden kann. Würden der Verlust an Myeloperoxidase und lysosomalen Enzymen unter Stimulation korrelieren, könnten die Messergebnisse der Enzyme bei den Routineproben, die ja ebenfalls „Stress“ ausgesetzt sind, nach Messung des MPXI-Wertes am Bayer ADVIA 120, auf den ursprünglichen Wert korrigiert werden. Auf dies soll später noch genauer eingegangen werden.

3.4.1 Einfluss des Isolationsverfahrens auf das Degranulationsverhalten der Granulozyten

Für diese Untersuchung wurde die Messung der Vollblutprobe im Vergleich zu den während des Aufarbeitungsvorganges angefertigten Messungen der isolierten Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten am Bayer ADVIA 120 verwendet. Dabei wurde die Linksverschiebung der entsprechenden „Zellwolken“ durch Ausschüttung der MPO als Parameter herangezogen. Nachfolgend sind eine Auswahl an Bayer ADVIA 120-Diagrammen abgebildet, an denen zu erkennen ist, wie sich Teile der Granulozytenwolke aus Abbildung 3-22a während des ersten Schrittes des Isolationsvorganges, der Dichtegradiententrennung, in Abbildung 3-23a nach links in das Monozytenfenster verschieben. Dass es sich hierbei nicht um Monozyten handelt, kann mittels des Baso-Kanals in Abbildung 3-23b gezeigt werden, da im mononukleären Feld kaum Zellen zu sehen sind, obwohl die numerischen Werte am Bayer ADVIA 120 dies anzeigen. Ein Teil der Granulozyten verliert also Myeloperoxidase. Dies ist eine unvermeidliche Begleiterscheinung während der Leukozytenisolierung, die nahe legt, dass die ursprüngliche Enzymaktivität der Granulozyten im Vollblut höher ist. Ob eine stärkere Stimulation mittels Zytokinen und Chemotaktika zu einer weiteren Ausschüttung der Granulainhalte führt, sollte unter anderem in den nun folgenden Tests untersucht werden. Desweiteren wurde in dieser Versuchsreihe untersucht, ob

eine mögliche Korrelation zwischen Myeloperoxidaseverlust und Verlust an sphingolipidabbauenden Enzymen besteht, da eine Ko-Lokalisation beider Enzymfraktionen sehr wahrscheinlich ist.

Vollblut

(s. Abb. 2-1
und 2-2)

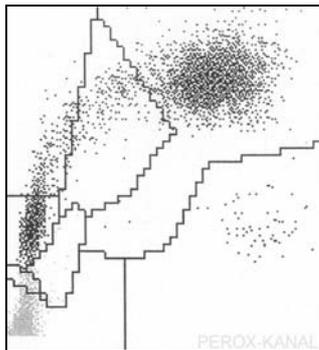


Abbildung 3-22a: ADVIA 120 Peroxidasekanalbild einer Vollblutprobe. Rechts oben ist die Granulozytenwolke zu erkennen.

Nach Histopaque-Trennung

(s. Abb. 2-3)

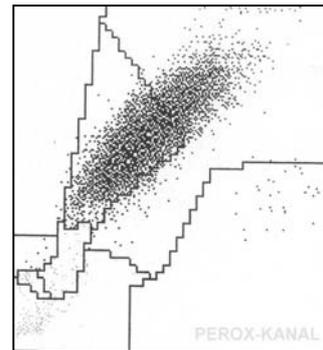


Abbildung 3-23a: ADVIA 120 Peroxidasekanalbild der Granulozyten nach Isolation mittels Histopaque-Methode. Verschiebung von Teilen der Wolke in das Monozytenfenster

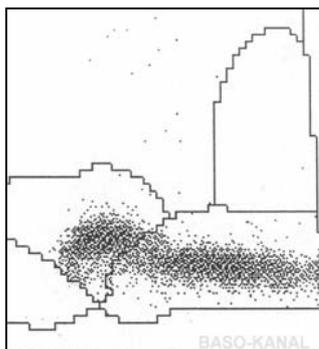


Abbildung 3-22b: :
ADVIA 120
Basokanalbild der
gleichen Vollblutprobe.

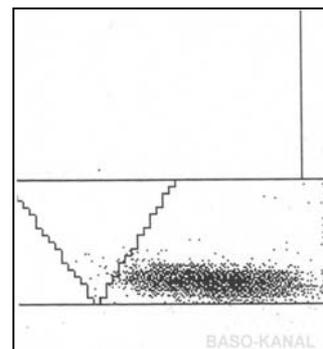


Abbildung 3-23b: ADVIA 120 Basokanalbild der mittels Histopaque-Methode isolierten Granulozyten. Das Fenster der mononukleären Blutzellen (Lymphozyten und Monozyten) ist leer, das Fenster der polymorphkernigen Zellen zeigt Signale.

3.4.2 Degranulation von Granulozyten vor und nach Behandlung mit GM-CSF, Cytochalasin B und N-fMLP

Einführung

Das Ausmaß der Degranulation von Granulozyten lässt sich leicht durch Routinemessungen am Bayer ADVIA 120 bestimmen. Um eine mögliche Korrelation zwischen dem Verlust der Myeloperoxidaseaktivität und der Aktivität der sphingolipidabbauenden Enzyme festzustellen, wurden die Granulozyten zunächst isoliert und danach unterschiedlich stark zur Degranulation angeregt, wozu aus der Literatur bekannte Stimuli Verwendung fanden (GM-CSF, Cytochalasin-B und N-fMLP). Der Prozess der Degranulation (d.h. die Verschiebung der Granulozytenwolke nach links) wurde mit Hilfe des Bayer ADVIA 120 verfolgt. Die Zellsuspension wurde danach in Überstand und Pellet aufgetrennt und in beiden sowohl die Menge der Myeloperoxidase mit Hilfe eines ELISA als auch die der bei dieser Arbeit untersuchten vier sphingolipidabbauenden Enzyme bestimmt.

Aufarbeitung der Proben

Von neun gesunden Probanden wurde heparinisieretes Vollblut mittels Dichtegradientenverfahren (Histopaque-Methode) in Granulozyten und mononukleäre Blutzellen aufgetrennt. Danach wurde aus den Granulozyten insgesamt drei Versuchsreihen pro Probe angesetzt. Die erste Versuchsreihe diente als Kontrollreihe und wurde nur mit PBS behandelt, die zweite mit PBS, Cytochalasin B und N-fMLP und die dritte wurde nacheinander mit GM-CSF, Cytochalasin B und N-fMLP stimuliert. Diese unterschiedlich starke Stimulation wurde verwendet, um den Zusammenhang zwischen den beiden Bezugssystemen (Myeloperoxidase und sphingolipidabbauenden Enzymen) bei verschieden starker Degranulation zu untersuchen. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und der Überstand und das Zellpellet getrennt auf die Aktivität der lysosomalen Enzyme hin untersucht. Bei drei Probenreihen wurde auch die Myeloperoxidase mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Bayer ADVIA 120 Messungen wurden insgesamt dreimal durchgeführt: Die erste am frisch gewonnenen Vollblut (Nr. 1), die zweite nach der Isolation der Granulozyten

mittels Dichtegradientenverfahren (Nr. 2) und die letzte nach den Degranulationsversuchen (Nr. 3). Abbildung 3-24 zeigt die Probenaufarbeitung in der Übersicht.

Schema der Aufarbeitung

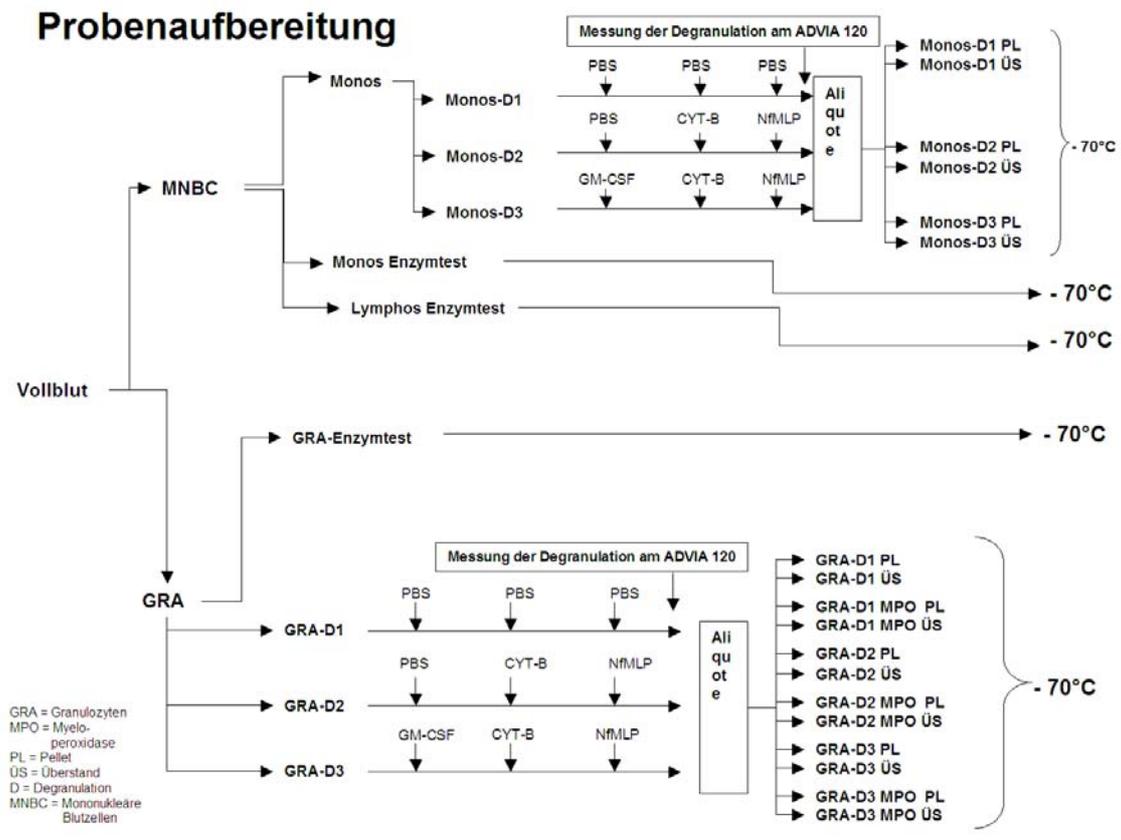


Abbildung 3-24: Probenaufbereitung der Blutproben

-70°C=bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert; MNBC= mononukleäre Zellen (Monozyten und Lymphozyten); GRA= Granulozyten; Lymphos= Lymphozyten; D1= Versuchsreihe 1; D2= Versuchsreihe 2; D3= Versuchsreihe 3; PL= Zellpellet; ÜS= Überstand;

3.4.2.1 Ergebnisse der ADVIA 120-Messungen

Nachfolgend werden die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen aufgeführt. In Klammern finden sich die verwendeten Stimuli und die jeweiligen Inkubationszeiten.

Probe I, Kontrolle (PBS, PBS, PBS)

Diese als Kontrolle laufende Versuchsreihe zeigte kaum einen Unterschied zwischen den Bayer ADVIA 120-Bildern die unmittelbar nach (s. Abb. 3-25a) der Dichtegradientenisolation angefertigt wurden und denen nach der Behandlung mit PBS für 2 Stunden, 15 Minuten und weitere 10 Minuten (s. Abb. 3-26a). Auch im Researchkanal des Bayer ADVIA 120 zeigten die beiden Histogramme (s. Abb. 3-25b und 3-26b) daher kaum eine Verschiebung des Peaks (X-Achse: Peroxidaseaktivität der Granulozyten; Y-Achse: Häufigkeitsverteilung der Granulozyten mit einer bestimmten Peroxidaseaktivität). Wie schon oben beschrieben (s. Kap. 3.4.1) scheinen einige Granulozyten auf „Stress“ mit einer Degranulation zu reagieren, wohingegen andere recht stabil sind. Auch hier bedeutete eine Linksverschiebung bei Teilen der Granulozytenwolke im Peroxidasekanal einen Verlust an Myeloperoxidase, was zu einer „fälschlichen“ Einordnung in das Monozytenfeld führte. Dass es sich aber nicht um Monozyten handelte, kann durch die Messergebnisse im Baso-Kanal und repräsentativ durch mikroskopische Untersuchung ausgeschlossen werden (s. Abb. 3-23b). Dieses Ergebnis zeigt, dass vermutlich weniger die Zeit der Aufarbeitung als vielmehr der mechanische Stress das Degranulationsverhalten der Granulozyten zu beeinflussen scheinen. Es blieb abzuwarten, ob die sphingolipidabbauenden Enzyme bei dieser Versuchsreihe gleich der Myeloperoxidaseaktivität verstärkt im Zellpellet, anstatt wie bei Probe II und III im Überstand, zu finden seien.

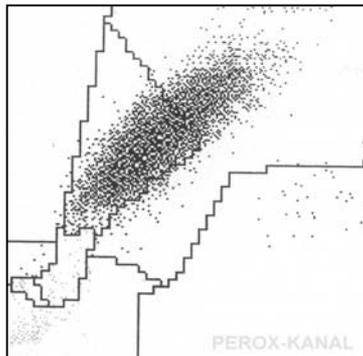
Probe I

Abbildung 3-25a: ADVIA 120 Peroxidasekanalbild von Granulozyten nach Isolation mittels Histopaque-Methode.

PBS, PBS, PBS

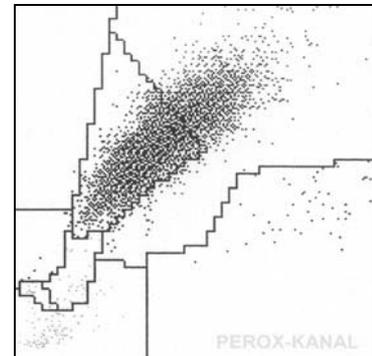


Abbildung 3-26a: ADVIA 120 Peroxidasekanalbild von Granulozyten die nur mit PBS stimuliert wurden. Kontrollreihe. Versuchsreihe D1

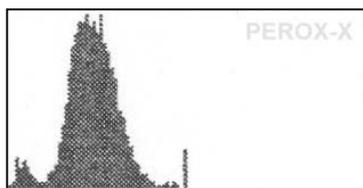


Abbildung 3-25b: ADVIA 120 Researchkanalbild von Granulozyten nach Isolation mittels Histopaque-Methode

PBS, PBS, PBS

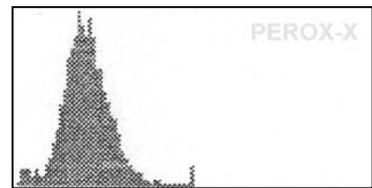


Abbildung 3-26b: ADVIA 120 Researchkanalbild von Granulozyten, die nur mit PBS stimuliert wurden. Kontrollreihe. Versuchsreihe D1.

Probe II (PBS 2 Stunden → Cytochalasin B 10 Minuten → N-fMLP 15 Minuten)

Bei dieser Probe wurden die bekannten Degranulationsstimuli CYT-B und N-fMLP verwendet. Hier zeigte sich im angefertigten Bayer ADVIA 120 Bild (s. Abb. 3-28a) eine zu erkennende Linksverschiebung der Granulozytenwolke in das „Monozyten-/Lymphozytenfeld“ im Peroxidasekanal, verglichen mit den unbehandelten Granulozyten vor der Stimulation (s. Abb. 3-27a). Entsprechend

sieht man auch im Research-Kanal (s. Abb. 3-28b) eine deutliche Verschiebung der Granulozytenwolke nach links (d.h. weniger MPO-Aktivität pro Granulozyt). Von den Granulozyten, die im Lymphozytenfeld „gelandet“ sind, kann angenommen werden, dass sie praktisch vollständig degranulierten.

Probe II

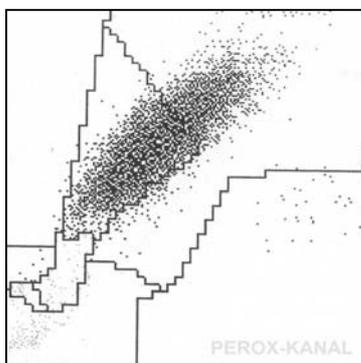


Abbildung 3-27a: ADVIA 120 Peroxidasekanalbild von Granulozyten nach Isolation mittels Histopaque Methode.

PBS, CYT-B und N-fMLP

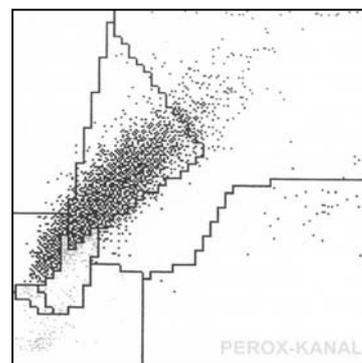


Abbildung 3-28a: ADVIA 120 Peroxidasekanalbild von Granulozyten nach Stimulation mit PBS, Cyt-B und N-fMLP. Versuchsreihe D2

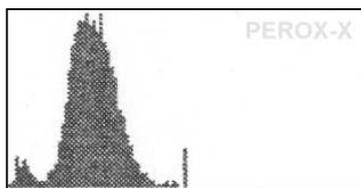


Abbildung 3-27b: ADVIA 120 Researchkanalbild von Granulozyten nach Isolation mittels Histopaque Methode.

PBS, CYT-B und N-fMLP



Abbildung 3-28b: ADVIA 120 Researchkanalbild von Granulozyten nach Stimulation mit PBS, Cyt-B und N-fMLP. Versuchsreihe D2

Probe III (GM-CSF 2 Stunden → Cytochalasin B 10 Minuten → N-fMLP 15 Minuten)

Bei dieser Probe sollte eine maximale Degranulation erreicht werden. Dazu wurde zusätzlich zu den bei Probe II verwendeten Substanzen die Substanz GM-CSF verwendet, die bekannte „priming“ Eigenschaften besitzt. Hier kann man im Peroxidasekanal auf der Abbildung 3-29a und 3-30a des Bayer ADVIA 120 sehr schön die Verschiebung der Wolke von rechts bei den noch unbehandelten Granulozyten (s. Abb. 3-29a) nach links (s. Abb. 3-30a), d.h. zum Ort niedrigerer Peroxidaseaktivität, erkennen. Auch in den abgebildeten Histogrammen, Abbildungen 3-29b und 3-30b, des Researchkanals sieht man nach Zugabe von GM-CSF, Cytochalasin B und N-fMLP deutlich die Verschiebung des Peroxidaseaktivitätssignals nach links zum Ort niedriger Peroxidaseaktivität. Diese Verschiebungen zeigen den Verlust an intrazellulärer Myeloperoxidaseaktivität. Ob dieser stärkere Verlust an Myeloperoxidaseaktivität sich auch in einem größeren Aktivitätsverlust der sphingolipidabbauenden Enzyme widerspiegeln würde, wurde in nachfolgenden Versuchen untersucht.

Probe III

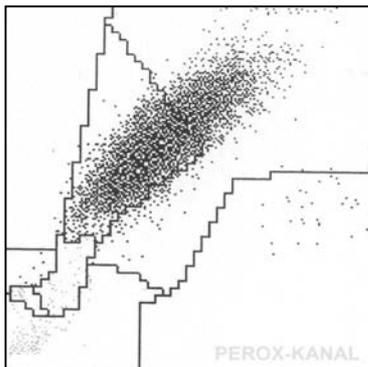


Abbildung 3-29a: ADVIA 120 Peroxidasekanalbild von Granulozyten nach Isolation mittels Histopaque-Methode.

**GM-CSF, CYT-B
und N-fMLP**

→

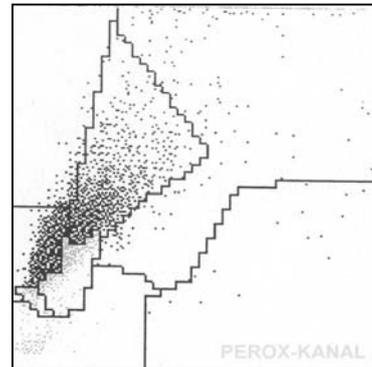


Abbildung 3-30a: ADVIA 120 Peroxidasekanalbild von Granulozyten nach Stimulation mit GM-CSF, Cyt-B und N-fMLP. Versuchsreihe D3

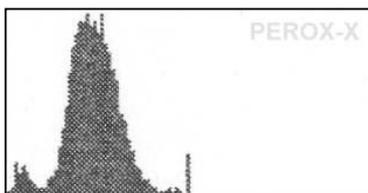


Abbildung 3-29b: ADVIA 120 Researchkanalbild von Granulozyten nach Isolation mittels Histopaque-Methode.

**GM-CSF, CYT-B
und N-fMLP**

→



Abbildung 3-30b: ADVIA 120 Researchkanalbild von Granulozyten nach Stimulation mit GM-CSF, Cyt-B und N-fMLP. Versuchsreihe D3

Zusammenfassung:

Entsprechend den Erwartungen reagierten die Granulozyten auf die unterschiedlichen Stimuli mit verschieden starken Verschiebungen ihrer Wolken im Peroxidasekanal des Bayer ADVIA 120, was einem Verlust an Myeloperoxidase gleichbedeutend ist [Gerber, 1995]. Die Kontrollreihe zeigte keine Zunahme der Degranulation zwischen der Messung nach dem Dichtegradientenverfahren und nach ca. 2,5 stündiger Inkubation mit PBS Behandlung.

3.4.2.2 Bestimmung der aus Granulozyten freigesetzten MPO mit Hilfe des MPO-ELISA

Um eine mögliche Korrelation zwischen dem Verlust an sphingolipidabbauenden Enzymen und dem an Myeloperoxidase nachzuweisen, war es nötig, beide Parameter sowohl im Überstand als auch im Zellpellet der mit Zytokinen und Chemotaktika behandelten Granulozyten nachzuweisen und quantitativ zu bestimmen. Da zudem in anderen Arbeiten [Gerber, 1995] der Zusammenhang zwischen dem MPXI-Wert am Bayer ADVIA 120, der die Myeloperoxidaseaktivität angibt, und der wirklichen Menge MPO der Zellen nachgewiesen wurde, könnte man am Schluss aus der MPXI-Messung am Bayer ADVIA 120 ohne zusätzlichen Aufwand (der MPXI-Wert wird bei der Routinemessung des Blutbildes automatisch als Parameter angegeben) Rückschlüsse auf den Verlust an sphingolipidabbauenden Enzymen ziehen.

Vorgehen

Bei diesem Versuch wurde aus der Zellsuspension der für die Degranulationsverfahren isolierten und stimulierten Granulozyten (s. Kap. 3.4) nach der letzten Inkubation eine bestimmte Menge abgenommen, ebenfalls zentrifugiert und im Überstand und Zellpellet der MPO-Gehalt bestimmt. Somit erhielt man einerseits den Gehalt an sphingolipidabbauenden Enzymen im Überstand und Zellpellet, andererseits aber auch den Gehalt an MPO in denselben Proben, sodass man eine Korrelation zwischen beiden Parametern herstellen konnte.

Bei den drei Vollblutproben gesunder Probanden wurden die Granulozyten isoliert, auf drei Versuchsreihen aufgeteilt und folgendermaßen stimuliert:

- Probe I : PBS 2 Stunden, PBS 15 Minuten und PBS 10 Minuten
 (Kontrolle)
- Probe II: PBS 2 Stunden, N-fMLP 15 Minuten und Cytochalasin B 10
 Minuten
- Probe III: GM-CSF 2 Stunden, N-fMLP 15 Minuten und Cytochalasin B 10
 Minuten

Von dieser Zellsuspension wurden 150 µl abgenommen, zentrifugiert und der MPO-Gehalt im Überstand und Zellpellet mittels MPO-ELISA getrennt bestimmt.

Anhand einer zuvor erstellten Standarddeichkurve konnte der MPO Gehalt pro Probe ermittelt werden.

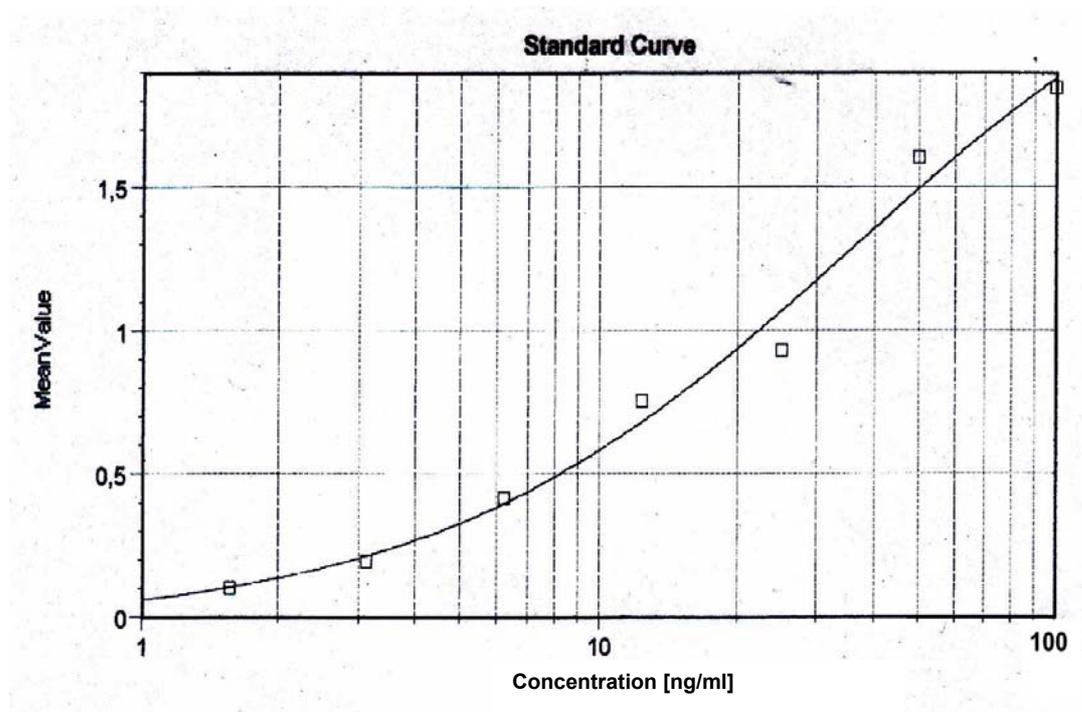


Abbildung 3-31: Standarddeichkurve der MPO-Messung, aus der die Menge an MPO ermittelt wurde

Unter Verwendung des MPO-Gehaltes im Überstand und Zellpellet wurde die prozentuale Verteilung zwischen beiden errechnet und zwischen den drei Proben verglichen. Dabei ergaben sich für die einzelnen Versuche P17 bis P19 (s. Abb. 3-32 bis 3-34) folgende Ergebnisse:

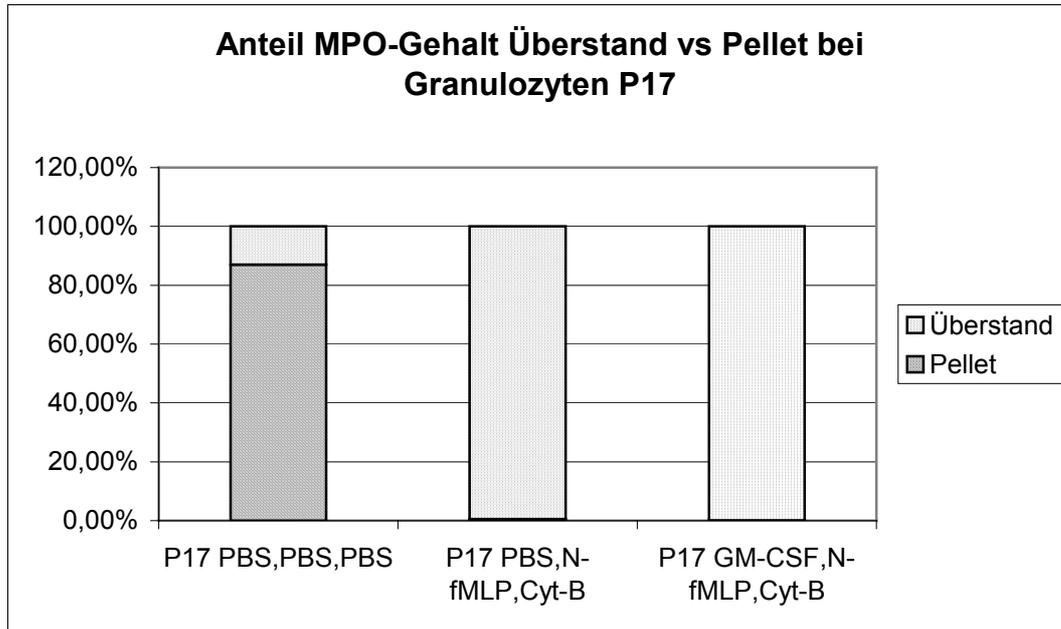


Abbildung 3-32: Verteilung der Menge an Myeloperoxidase zwischen Überstand und Zellpellet bei Granulozyten. Ergebnisse der MPO-ELISA-Messung bei Probe P17.

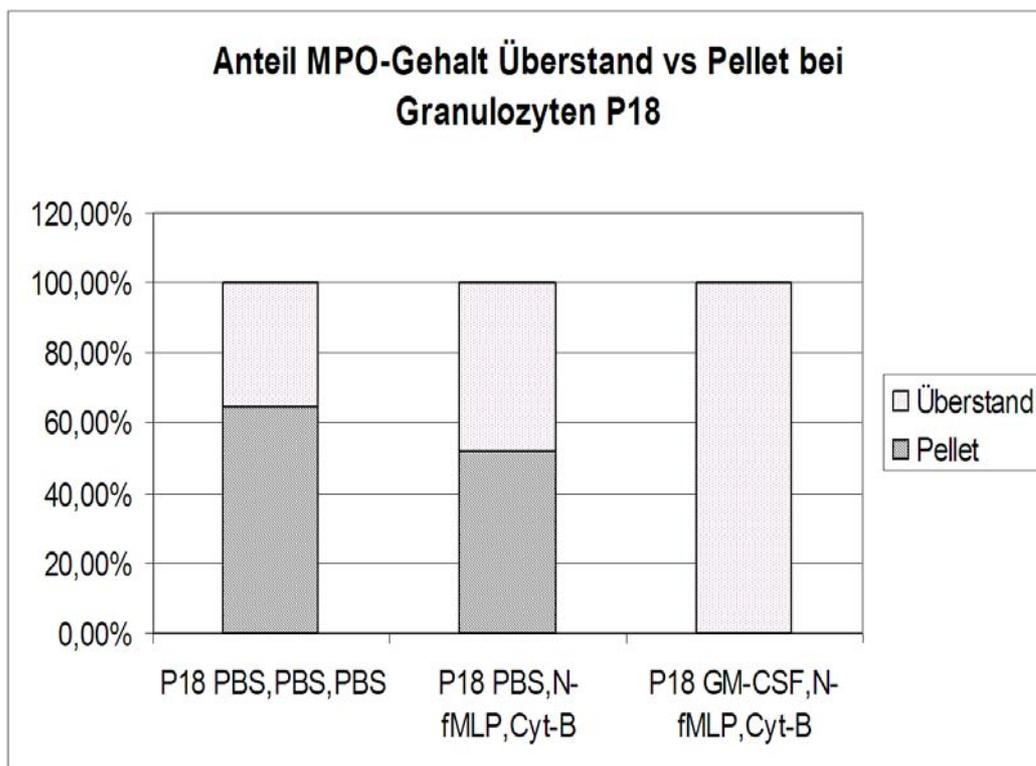


Abbildung 3-33: Verteilung der Menge an Myeloperoxidase zwischen Überstand und Zellpellet bei Granulozyten. Ergebnisse der MPO-ELISA-Messung bei Probe P18.

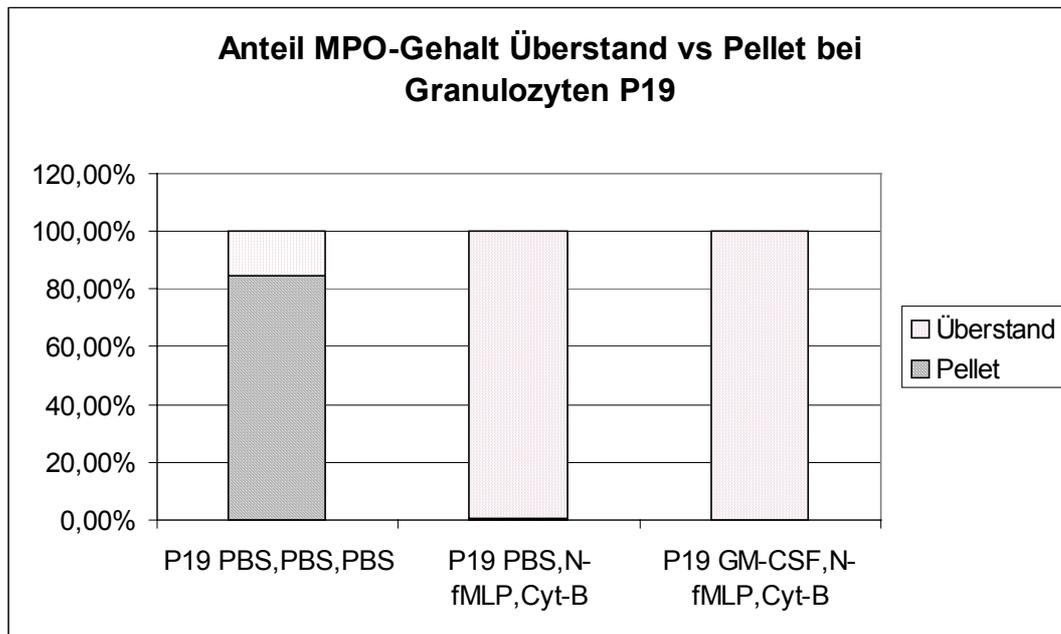


Abbildung 3-34: Verteilung der Menge an Myeloperoxidase zwischen Überstand und Zellpellet bei Granulozyten. Ergebnisse der MPO-ELISA-Messung bei Probe P19.

Die Ergebnisse zeigen, wie nach den Ergebnissen am Bayer ADVIA 120 zu erwarten war, eine deutliche Reaktion der Granulozyten auf die Stimuli. Bei den Versuchen, bei denen die Proben mit GM-CSF, Cytochalasin B und N-fMLP inkubiert wurden, befindet sich praktisch die Gesamtmenge an Myeloperoxidase, gemessen mittels des MPO-ELISA, im Überstand der Zellen, im Pellet ist kaum MPO nachzuweisen. Auch bei der Degranulation ohne GM-CSF-Vorbehandlung zeigt sich die Hauptmenge der Myeloperoxidase im Überstand. Es ergab sich bei zwei Proben ein ähnliches Verteilungsmuster wie bei Probe III, nur eine Probe (s. Abb. 3-33) zeigte eine Aufteilung von beinahe zur Hälfte auf Überstand und Zellpellet. Lediglich bei der Kontrollversuchsreihe (erste Säule in Abb. 3-32 bis 3-34), bei der ausschließlich PBS verwendet wurde, befand sich der Hauptteil der Myeloperoxidase noch im Zellpellet. Im Überstand waren nur geringe Mengen des Enzyms MPO nachzuweisen. Bei dieser ersten Versuchsreihe zeigte sich bei allen drei Proben ein Anteil des MPO-Gehaltes im Pellet von 78,85 % ($\pm 9,96\%$) und dementsprechend im Überstand von 21,15 % ($\pm 9,96\%$). Wie in Kapitel 3.4.3 gezeigt werden wird,

entspricht dies auch in etwa den Ergebnissen bei der Bestimmung der sphingolipidabbauenden Enzyme derselben Proben. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 3-7 gezeigt.

Tabelle 3-7: Abgegebene Menge an MPO nach ~ 2,5h Inkubation mit 1. PBS/PBS/PBS, 2. PBS/Cyt-B/N-fMLP und 3. GM-CSF/Cyt-B/N-fMLP, (n=3)

	% MPO im Überstand	% MPO im Zellpellet
1.PBS/PBS/PBS	21,15	78,85
2.PBS/Cyt-B/N-fMLP	82,46	17,54
3.GM-CSF/Cyt-B/N-fMLP	99,89	0,11

3.4.3 Messung der sphingolipidabbauenden Enzymaktivitäten im Überstand und Zellpellet der degranulierten Granulozyten

Einführung

Bei diesem Versuch sollte untersucht werden, ob eine mittels Zytokinen und Chemotaktika durchgeführte Degranulation neben dem in den vorherigen Versuchen gezeigten Verlust an Myeloperoxidase auch in gleicher Weise einen Verlust an sphingolipidabbauenden Enzymen bewirkt, ob also eine Korrelation zwischen dem Rückgang der Myeloperoxidaseaktivität der degranulierten Zellen und dem Verlust an sphingolipidabbauenden Enzymen besteht. Dies würde dafür sprechen, dass sich diese in den gleichen Granula befänden oder verschiedene Granula auf Stimuli gleich reagieren. Auf jeden Fall könnte man bei einer Korrelation aus dem Bayer ADVIA 120 MPXI-Wert aus der Differenz der MPXI-Werte im Vollblut und nach Isolierung der Granulozyten auf das Ausmaß des Verlustes an sphingolipidabbauenden Enzymen schließen, also auf die „ursprünglich“ im Vollblut vorhandenen Aktivitäten.

Durchführung und Berechnung

Von den drei Versuchsreihen aus der vorangegangenen Untersuchung (s. Kap. 3.4.2.1) wurden die Überstände und Zellpellets getrennt auf die Enzymaktivität der bei dieser Arbeit getesteten vier sphingolipidabbauenden Enzyme (Gesamthexosaminidase, Hexosaminidase-A, β -Galaktosidase und Arylsulfatase A) hin untersucht. Ursprünglich wurden 9 Vollblutproben verwendet, aus denen die Granulozyten auf 3 Versuchsreihen aufgeteilt wurden, von denen wiederum jeweils Überstand und Zellpellet untersucht wurden, sodass sich eine Gesamtmenge von 54 Proben ergab (s. Probenaufarbeitungsschema Abb. 2-2). Bei diesen 54 Proben wurde jeweils die Aktivität der vier Enzyme gemessen, was einen Gesamtumfang von 216 Messungen ergab. Von den einzelnen Proben wurden die Werte für die Enzymaktivität im Überstand und Zellpellet addiert und danach der Anteil von Überstand und Zellpellet an dieser Gesamtaktivität in Prozent angegeben. Diese Prozentangaben wurden für alle Proben und Enzyme berechnet und aus diesen für jedes Enzym der Mittelwert für alle Proben errechnet. Die nachfolgenden Abbildungen (s. Abb. 3-39 bis 3-42) zeigen die Verteilung zwischen Zellen und Überstand graphisch, die Tabellen 3-8 bis 3-10 prozentual.

Ergebnisse

Die nachfolgenden vier Abbildungen 3-39 bis 3-42 zeigen die Ergebnisse der Versuche. Jedes Schaubild steht für eine lysosomale Enzymaktivitätsmessung. Im einzelnen Schaubild steht die erste Säule für die Kontrollreihe D1, bei der ausschließlich PBS verwendet wurde. Säule zwei zeigt den Versuch D2, bei dem PBS, CYT-B und N-fMLP verwendet wurden. Die dritte Säule steht für den Versuch D3, bei dem die Probe mit GM-CSF vorinkubiert wurde, anschließend mit CYT-B inkubiert und zum Schluß mit N-fMLP stimuliert wurde.

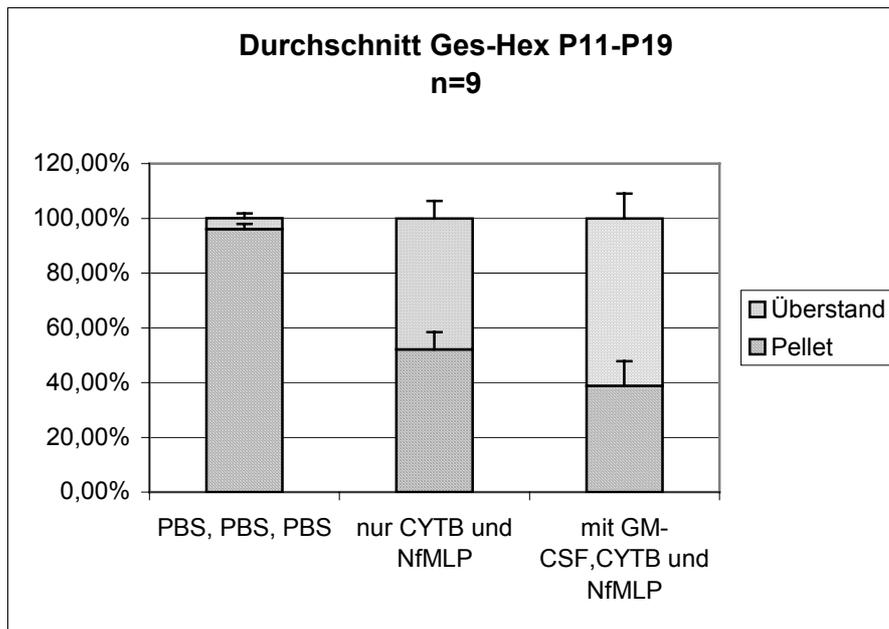


Abbildung 3-39: Verteilungsmuster der Enzymaktivität Gesamthexosaminidase bei neun Proben zwischen Überstand und Pellet von Granulozyten. Granulozyten wurden auf drei Reihen aufgeteilt und unterschiedlich stimuliert. Probenumfang n=9. Standardabweichung nicht auf 100% bezogen, sondern auf einzelne Prozentblocks

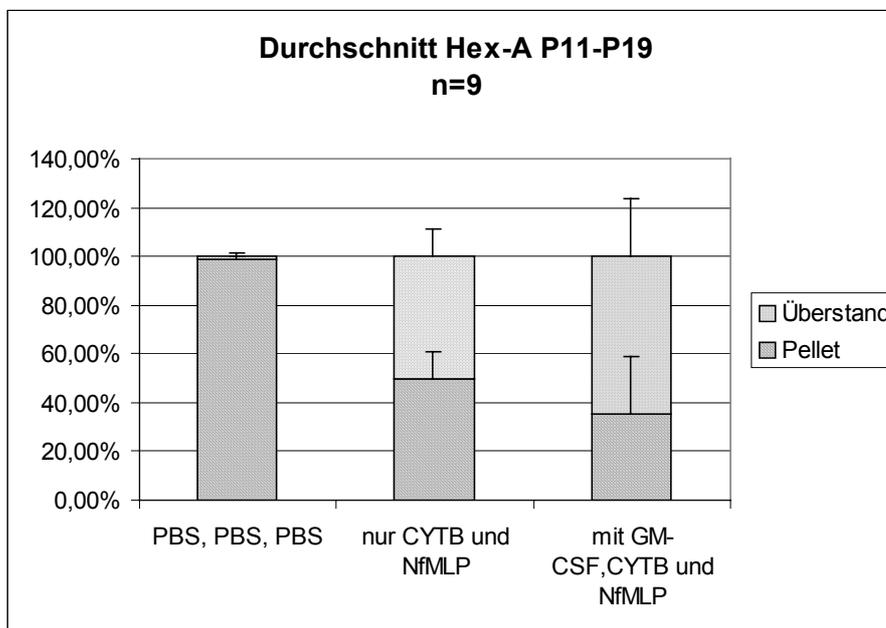


Abbildung 3-40: Verteilungsmuster der Enzymaktivität Hexosaminidase-A bei neun Proben zwischen Überstand und Pellet von Granulozyten. Granulozyten wurden auf drei Reihen aufgeteilt und unterschiedlich stimuliert. Probenumfang n=9. Standardabweichung nicht auf 100% bezogen, sondern auf einzelne Prozentblocks

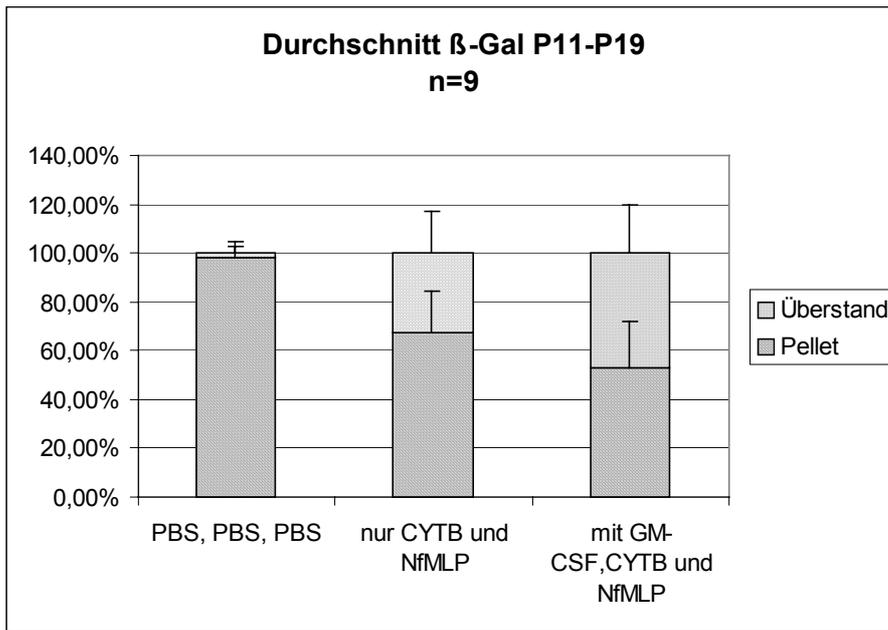


Abbildung 3-41: Verteilungsmuster der Enzymaktivität β -Galaktosidase bei neun Proben zwischen Überstand und Pellet von Granulozyten. Granulozyten wurden auf drei Reihen aufgeteilt und unterschiedlich stimuliert. Probenumfang n=9. Standardabweichung nicht auf 100% bezogen, sondern auf einzelne Prozentblocks

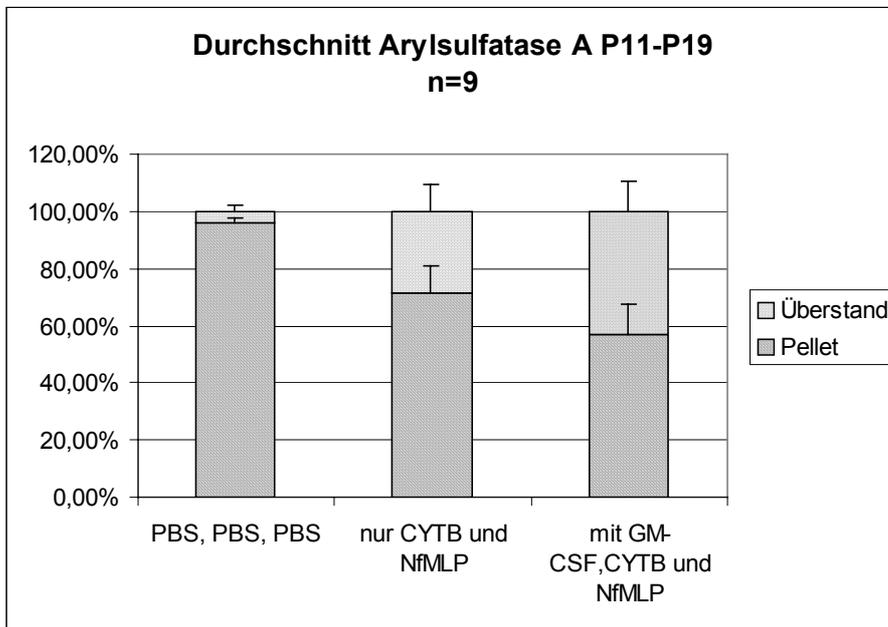


Abbildung 3-42: Verteilungsmuster der Enzymaktivität Arylsulfatase A bei neun Proben zwischen Überstand und Pellet von Granulozyten. Granulozyten wurden auf drei Reihen aufgeteilt und unterschiedlich stimuliert. Probenumfang n=9. Standardabweichung nicht auf 100% bezogen, sondern auf einzelne Prozentblocks

Probe I, Kontrolle (PBS 2 Stunden → PBS 10 Minuten → PBS 15 Minuten)

Die Ergebnisse waren bei allen Enzymen (vgl. Tabelle 3-8) ungefähr gleich, d.h. die vier Enzyme reagierten gleich auf die Stimuli. Wie erwartet war in etwa die gesamte Aktivität im Zellpellet zu messen, wohingegen sich dementsprechend im Überstand kaum Enzymaktivität nachweisen ließ. Dies entsprach den Beobachtungen am Bayer ADVIA 120-Peroxidasekanal, bei dem sich während des Stimulationsvorganges keine Änderung der Lage der Granulozytenwolke (d.h. keine Freisetzung der MPO) im Vergleich zur Messung vor den Stimulationsversuchen zeigte.

Tabelle 3-8: Verteilungsmuster der Aktivität sphingolipidabbauender Enzyme in Überstand und Pellet von Granulozyten nach Inkubation mit PBS, PBS und PBS (Kontrolle)

Enzymaktivität (n=9)	Pellet D1	Überstand D1
Gesamthexosaminidase	96,10 ± 1,83 %	3,90 ± 1,83 %
Hexosaminidase-A	98,72 ± 1,54 %	1,28 ± 1,54 %
β-Galaktosidase	98,26 ± 4,48	1,74 ± 4,48
Arylsulfatase A	95,90 ± 1,95 %	4,10 ± 1,95 %

Ergebnisse der Kontrollreihe mit ausschließlicher Verwendung von PBS. Probenumfang n=9.

Probe II (PBS 2 Stunden → Cytochalasin B 10 Minuten → N-fMLP 15 Minuten)

Hier zeigte sich (Tabelle 3-9) erwartungsgemäß bei allen vier Enzymen ein im Vergleich zur Kontrollprobe höherer Anteil der Aktivität im Überstand. Im Durchschnitt 39,91 % (±9,23%) für den Überstand und 60,09 % (±9,23%) im Zellpellet. Im Vergleich zur Kontrollprobe: 2,76 % (± 1,26%) im Überstand und 97,25 % (±1,26%) im Zellpellet. Die Messergebnisse korrelierten mit dem Bayer ADVIA 120 Bild des Peroxidasekanals (Verschiebung der Granulozytenwolke nach links) im Vergleich zur Kontrollprobe.

Tabelle 3-9: Verteilungsmuster der Aktivität sphingolipidabbauender Enzyme in Überstand und Pellet von Granulozyten nach Inkubation mit PBS, Cyt-B und N-fMLP

Enzymaktivität (n=9)	Pellet D2	Überstand D2
Gesamthexosaminidase	52,08 ± 6,33 %	47,92 ± 6,33 %
Hexosaminidase-A	49,95 ± 10,89 %	50,05 ± 10,89
β-Galaktosidase	67,08 ± 17,33 %	32,92 ± 17,33 %
Arylsulfatase A	71,26 ± 9,58 %	28,74 ± 9,58 %

Ergebnisse der Versuchsreihe mit Stimulation durch PBS, Cyt-B und N-fMLP. Probenumfang n=9.

Probe III (GM-CSF 2 Stunden → Cytochalasin B 10 Minuten → N-fMLP 15 Minuten)

Durch die Priming-Eigenschaften des GM-CSF kam es bei allen vier Enzymen zu einer weiteren Steigerung der Degranulation (s. Tab. 3-10). Dies entspricht dem Bild im Peroxidasekanal, bei dem ebenfalls eine deutliche Linksverschiebung zum Ort niedriger zellulärer Myeloperoxidaseaktivität durch die Vorbehandlung mit GM-CSF zu erkennen war (s. Abb. 3-30a).

Tabelle 3-10: Verteilungsmuster der Aktivität sphingolipidabbauender Enzyme in Überstand und Pellet von Granulozyten nach Inkubation mit GM-CSF, Cyt-B und N-fMLP

Enzymaktivität (n=9)	Pellet D3	Überstand D3
Gesamthexosaminidase	38,81 ± 9 %	61,18 ± 9 %
Hexosaminidase-A	35,35 ± 23,52 %	64,65 ± 23,52 %
β-Galaktosidase	52,82 ± 19,44 %	47,18 ± 19,44 %
Arylsulfatase A	57,17 ± 10,24 %	42,83 ± 10,42 %

Ergebnisse der Versuchsreihe mit Stimulation durch GM-CSF, Cyt-B und N-fMLP. Probenumfang n=9.

Zusammenfassung

Errechnet man den Durchschnitt aller vier untersuchten Enzyme bezogen auf die unterschiedliche Stimulation, ergeben sich überschlagsmäßig folgende Werte [Anmerkung: Dieses „grobe“ Verfahren wurde unter der Annahme gemacht, dass alle vier Enzyme durchschnittlich in vergleichbarer Weise verteilt in den Lysosomen vorhanden sind] (s. Tabelle 3-11):

Tabelle 3-11: Verteilungsmuster der Aktivität sphingolipidabbauender Enzyme in Überstand von Granulozyten

Verwendete Stimuli	Aktivitätsanteil im Überstand
PBS, PBS und PBS (Kontrolle)	2,76±1,26 %
PBS, Cytochalasin B und N-fMLP	39,91±9,23 %
GM-CSF, Cytochalasin B und N-fMLP	53,96±9,17 %

Ergebnisse von insgesamt neun Proben (n=9), die unterschiedlich stimuliert wurden.

Die Versuche haben gezeigt, dass der Verlust an Myeloperoxidaseaktivität, der ja routinemäßig bei Messung am Bayer ADVIA 120 bzw. im MPO-ELISA, beobachtet werden kann, und der Verlust an sphingolipidabbauender Enzymaktivität, der durch diese Messung ermittelt wurde, einen deutlichen, wenn auch bisher nur optisch erfassbaren Zusammenhang zeigen. Diese Korrelation sollte in weiteren Versuchen noch besser gezeigt werden.

3.4.4 Korrelation MPO-ELISA – sphingolipidabbauende Enzyme in Granulozyten

Ein Zusammenhang zwischen der Verschiebung der Granulozytenwolke nach links durch verschiedene Degranulationsstimuli (am Bayer ADVIA 120) und der Ausschüttung der sphingolipidabbauenden Enzyme unter denselben Bedingungen kann qualitativ leicht festgestellt werden. Hier sollte ein Zusammenhang zwischen der Ausschüttung des Enzyms Myeloperoxidase, mittels ELISA, und der am Sphingolipidabbau beteiligten Enzyme nachgewiesen werden.

Aus den Einzelergebnissen der verschiedenen Versuchsreihen (Probe I-III) bei den drei Proben wurden dazu die Mittelwerte errechnet.

Die Ergebnisse der MPO-ELISA-Messung wurden nun mit denen der sphingolipidabbauenden Enzyme verglichen, wobei sich nachfolgende Abbildungen (s. Abb. 3-35 bis 3-37) ergaben. Da in beiden Fällen, sowohl bei der Bestimmung der sphingolipidabbauenden Enzymen als auch bei Messung des MPO-Gehaltes, die prozentuale Aufteilung zwischen Zellpellet und Überstand ermittelt wurde, konnten nun diese beiden Mittelwerte verglichen werden. Die erste Abbildung 3-35 zeigt die Ergebnisse bei der Kontrollreihe, bei der nur PBS verwendet wurde. Beinahe identische Ergebnisse für MPO und sphingolipidabbauende Enzyme zeigten sich hier. Sowohl bei der MPO-ELISA als auch bei den sphingolipidabbauenden Enzymen war der Hauptanteil im Pellet zu finden, was damit den Erwartungen entsprach. Im Überstand fanden sich in beiden Fällen nur etwa 1/5 der Gesamtmenge.

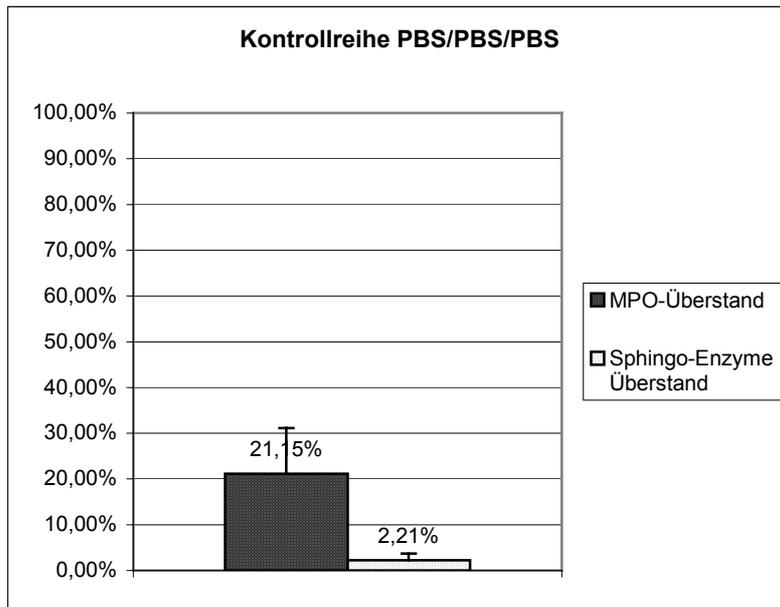


Abbildung 3-35: Vergleich der Verteilung von MPO und denen am Sphingolipidabbau beteiligten Enzymen im Überstand von nur mit PBS behandelten Granulozyten (n=3). MPO=Myeloperoxidase; Sphingo-Enzyme= sphingolipidabbauende Enzyme

Abbildung 3-36 zeigt die Ergebnisse nach Stimulation der Granulozyten mit PBS (als Kontrolle zu GM-CSF), Cytochalasin B und N-fMLP. Bei dieser Probenreihe ergab sich eine Verteilung der MPO-Menge von 82,46 % und 35,44 % im Überstand bei den sphingolipidabbauenden Enzymen. Die MPO-Messung zeigt höhere Werte im Überstand als die sphingolipidabbauenden Enzyme. Im Vergleich zur Vorinkubation mit GM-CSF (s. Abb. 3-37) zeigen jedoch MPO und sphingolipidabbauende Enzyme die gleichen Veränderungen im Degranulationsverhalten, d.h. sie geben weniger Enzym aus ihren Granula in die Umgebung ab.

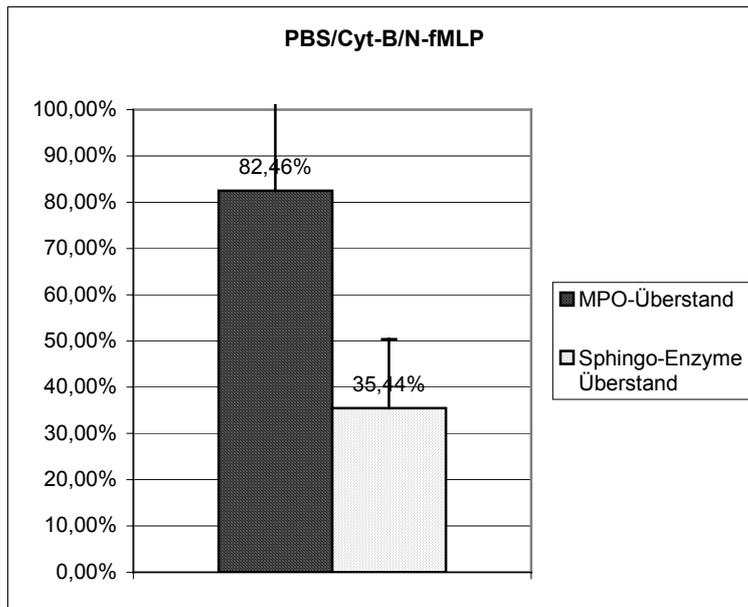


Abbildung 3-36: Vergleich der Verteilung von MPO und denen am Sphingolipidabbau beteiligten Enzymen im Überstand von mit PBS, CYT-B und N-fMLP stimulierten Granulozyten (n=3). MPO=Myeloperoxidase; Sphingo-Enzyme= sphingolipidabbauende Enzyme

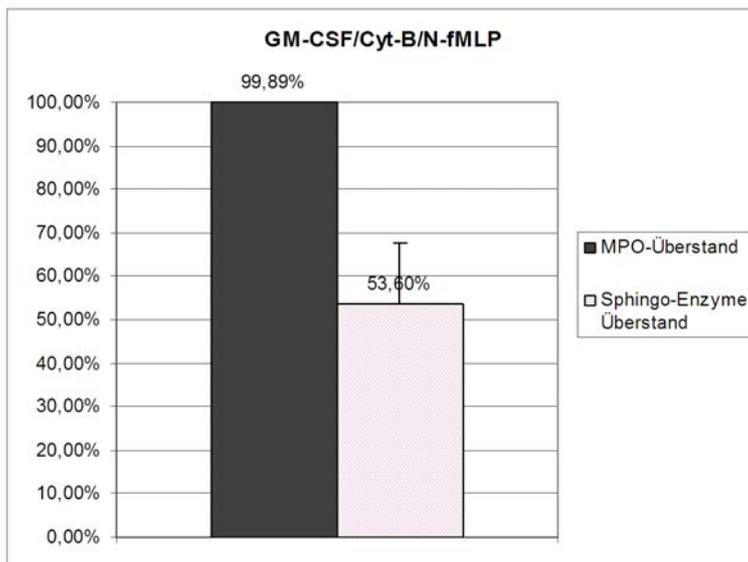


Abbildung 3-37: Vergleich der Verteilung von MPO und denen am Sphingolipidabbau beteiligten Enzymen im Überstand von mit GM-CSF, CYT-B und N-fMLP stimulierten Granulozyten (n=3). MPO=Myeloperoxidase; Sphing.-Enz.= sphingolipidabbauende Enzyme

Abbildung 3-37 zeigt den Vergleich bei Behandlung der Granulozyten mit GM-CSF, Cytochalasin B und N-fMLP. Nach dieser Behandlung findet sich beinahe die gesamte Menge MPO im Überstand. Bei Betrachtung der Grafik (s. Abb. 3-38), in der die beiden Verteilungsmuster für MPO-Aktivität und sphingolipidabbauenden Enzymen korreliert wurden, zeigt sich, dass die Granulozyten nach Stimulation ein ähnliches Degranulationsmuster bezüglich der Myeloperoxidase und der sphingolipidabbauenden Enzyme zeigen. Darauf soll im Diskussionsteil noch näher eingegangen werden.

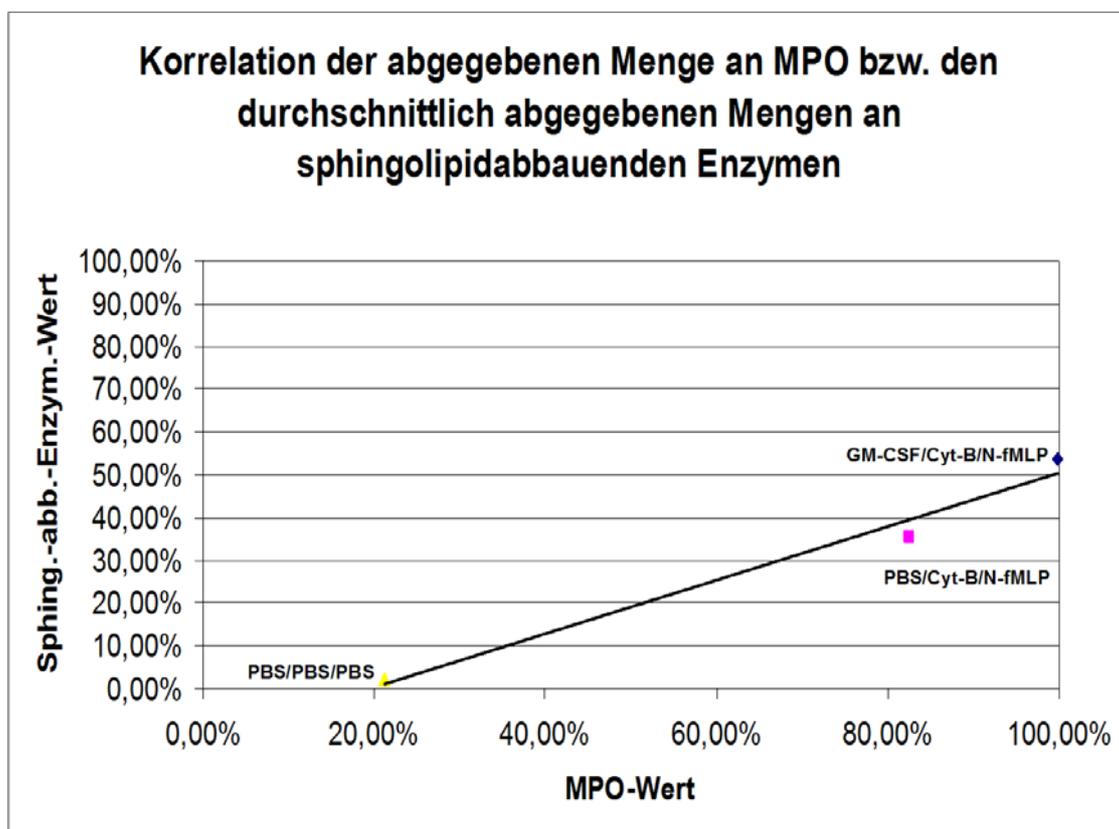


Abbildung 3-38: Korrelation der abgegebenen Menge an MPO bzw. der durchschnittlich abgegebenen Menge an sphingolipidabbauenden Enzymen nach ca. 2,5 stündiger Inkubation mit PBS/PBS/PBS; PBS/Cyt-B/N-fMLP; GM-CSF/Cyt-B/N-fMLP; Mittelwerte aus drei Proben (n=3).

Zusammenfassung

Verglich man Myeloperoxidase bzw. sphingolipidabbauende Enzyme unter den verschiedenen Stimulationsverfahren, so war der Trend bei allen gleich. Je stärker die Stimulation, desto weniger MPO bzw. Enzym im Pellet und desto mehr im Überstand. Bei ausschließlicher Verwendung von PBS fand sich der Hauptteil beider Parameter hingegen im Pellet. Wurde GM-CSF als Primer weggelassen, ergab sich ein Verteilungsmuster, das zwischen den beiden anderen (Probe I und III) lag. Insgesamt lässt sich aber erkennen, dass die Ausschüttung der MPO leichter erfolgt als die der sphingolipidabbauenden Enzyme.

3.5 Einfluss von Zytokinen und Chemotaktika auf das Degranulationsverhalten von Monozyten

Einführung

Den Monozyten wird die höchste Enzymaktivität im Bezug auf die bei dieser Arbeit untersuchten sphingolipidabbauenden Enzyme zugeschrieben. Granulozyten zeigten in den bisherigen Versuchen ein starkes Degranulationsverhalten, sowohl bei mechanischem Stress durch die Dichtegradiententrennung als auch bei chemischem Stress mittels Zytokinen und Chemotaktika. Es war daher interessant zu wissen, ob Monozyten auf dieselben Stimuli ebenfalls mit einer Entleerung ihrer Granula reagieren oder ob sie stabiler auf solche äußeren Reize antworten.

Durchführung

Von 3 Proben wurden zu diesem Zweck Monozyten (s. Abb. 3-43), die mit Hilfe der MACS-Methode isoliert worden waren, wie bei Versuch 3.4.2 auf drei Versuchsreihen aufgeteilt und mittels des Zytokins GM-CSF, Cytochalasin B und dem Chemotaktikum N-fMLP bzw. bei der Kontrollreihe nur mit PBS stimuliert. Die Monozytenwolke wurde durch Messungen am Bayer ADVIA 120 untersucht. Anschließend wurde in einem Folgeversuch exemplarisch die

Enzymaktivität der Gesamthexosaminidase sowohl im Zellpellet als auch im Überstand bestimmt.

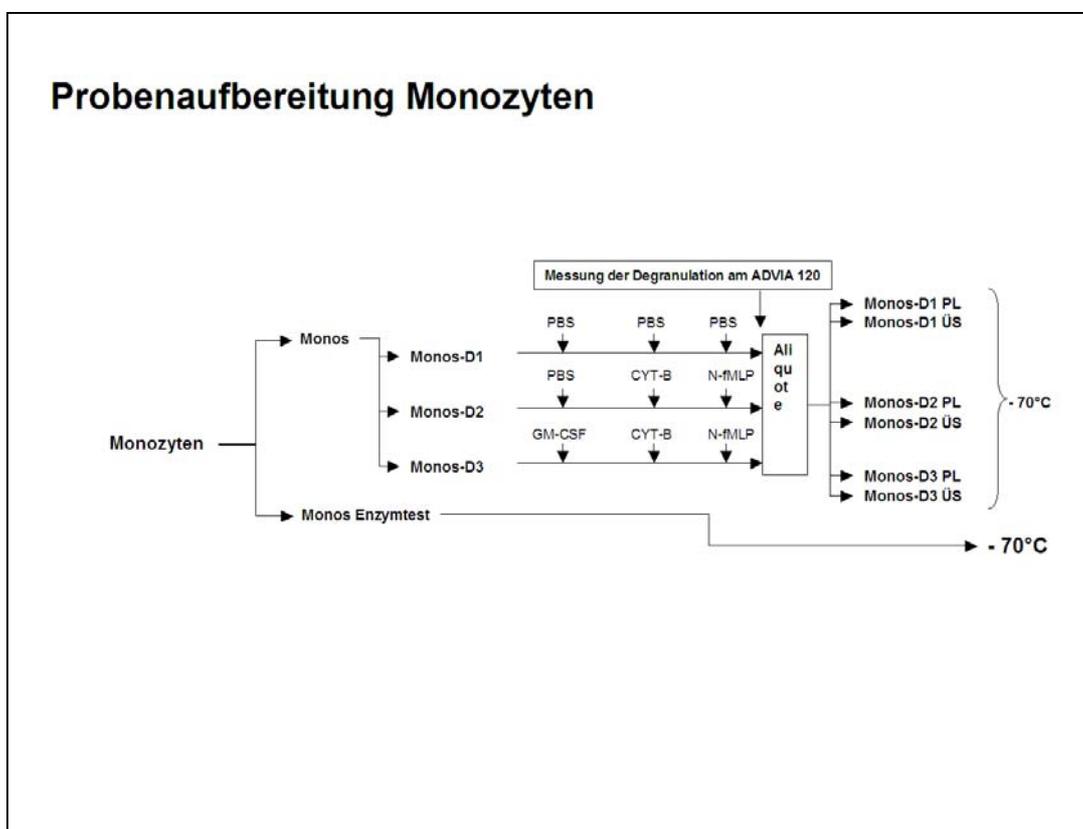


Abbildung 3-43: Stimulation der Monozyten;

-70°C= bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert; D1= Versuchsreihe 1; D2=Versuchsreihe 2; D3= Versuchsreihe 3; PL=Zellpellet; ÜS=Überstand

3.5.1 Isolierung der Monozyten aus Vollblut

Abb. 3-44a bis 3-44c zeigen die Lage der Monozyten im Vollblut (a), nach Isolierung der MNBC-Fraktion (b) und schließlich daraus nach MACS-Isolierung (c). Der relativ große Anteil an Zellen im Lymphozytenbereich (c) ist nicht nur auf kontaminierende Lymphozyten zurückzuführen (vgl. Tabelle 3-4), sondern beinhaltet auch Monozyten, die auf Grund des mechanischen Stresses während der Zellisolierung degranulierten (→ Verlust an MPO, daher Verschiebung nach links).

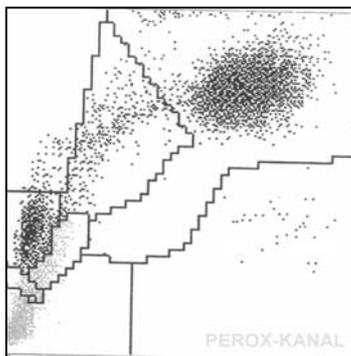


Abbildung 3-44a: ADVIA 120 Peroxidasekanalbild. Vollblutprobe

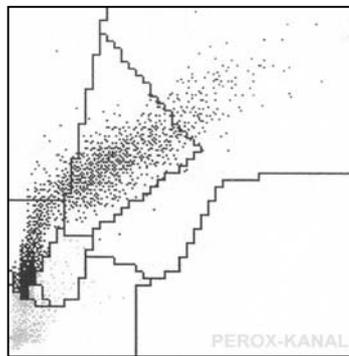


Abbildung 3-44b: ADVIA 120 Peroxidasekanalbild. MNBC vor MACS-Isolierung

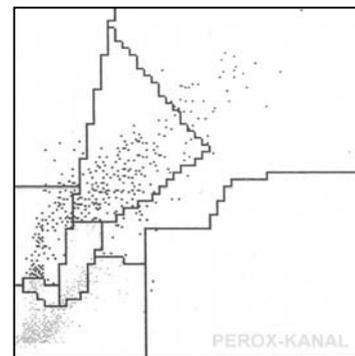


Abbildung 3-44c: ADVIA 120 Peroxidasekanalbild. Monozyten nach MACS-Isolation

3.5.2 Degranulation der Monozyten unter dem Einfluß von CYT-B bzw. N-fMLP

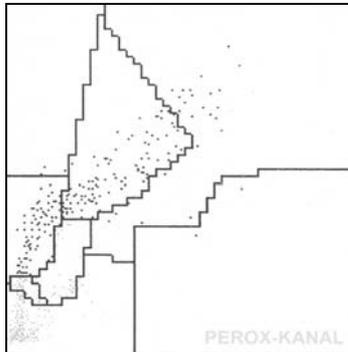


Abbildung 3-45a: ADVIA 120 Peroxidasekanalbild von nur mit PBS behandelten Monozyten (Probe D1, Kontrolle)

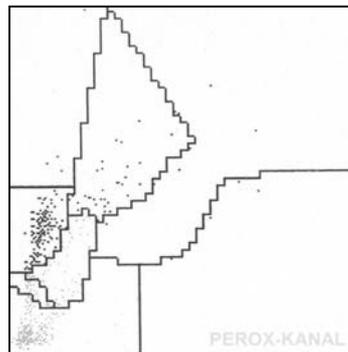


Abbildung 3-45b: ADVIA 120 Peroxidasekanalbild von mit PBS, CYT-B und N-fMLP behandelten Monozyten (Probe D2)

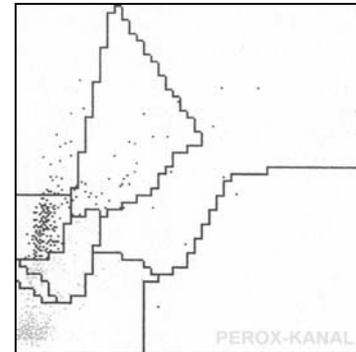


Abbildung 3-45c: ADVIA 120 Peroxidasekanalbild von mit GM-CSF, CYT-B und N-fMLP behandelten Monozyten (Probe D3)

Probe D1, Kontrolle (PBS 2 Stunden → PBS 10 Minuten → PBS 15 Minuten)

Bei der Kontrollprobe (s. Abb. 3-45a) zeigte sich im Vergleich zu den Monozyten direkt nach MACS-Trennung (s. Abb. 3-44c) kaum eine Linksverschiebung bzw. Degranulation. Die Histogramme des Researchkanals geben wegen der geringen Zellzahl kaum Informationen.

Probe D2 (PBS 2 Stunden → Cytochalasin B 10 Minuten → N-fMLP 15 Minuten)

Unter dem Einfluß von CYT-B/N-fMLP kam es zu einer deutlichen Linksverschiebung der Monozytenwolke in den Lymphozytenkanal, d.h. zu einer Degranulation der MPO (s. Abb. 3-45b).

Probe D3 (GM-CSF 2 Stunden → Cytochalasin B 10 Minuten → N-fMLP 15 Minuten)

Im Vergleich zur Kontrollprobe (s. Abb. 3-45a) kam es auch unter diesen Bedingungen zu einer Verschiebung der Monozytenwolke nach links (s. Abb. 3-45c), allerdings ist kaum ein Unterschied zu der nicht mit GM-CSF vorbehandelten Probe (s. Abb. 3-45b) zu erkennen.

Diese Ergebnisse belegen, dass auch Monozyten auf Zytokine und Chemotaktika mit einer Ausschüttung von Myeloperoxidase reagieren. Ob dies auch für die sphingolipidabbauenden Enzyme gilt, sollte nachfolgend gezeigt werden.

3.5.3 Messung der Gesamthexosaminidase im Überstand und Zellpellet der degranulierten Monozyten

Einführung

In diesem Versuch sollte überprüft werden, ob in ähnlicher Weise wie MPO durch Stimulation der Monozyten mit CYT-B/N-fMLP sphingolipidabbauende Enzyme freigesetzt werden können. Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Zellzahl wurde exemplarisch nur das Enzym Gesamthexosaminidase gemessen.

Die Monozyten der drei Versuchsreihen wurden nach den Degranulationsversuchen (Inkubationszeit: insgesamt 2h 25min) zentrifugiert und der Überstand und das Zellpellet getrennt auf ihre Enzymaktivität für Gesamthexosaminidase untersucht. Dies wurde mit MACS-isolierten Monozyten von 3 Probanden durchgeführt. Wie bei den Granulozyten (s. Kap. 3.4.3) erfolgte die Berechnung auf Grundlage des prozentualen Anteils der Aktivität im Überstand und Zellpellet der einzelnen Proben, woraus dann der Mittelwert errechnet wurde.

Die Enzymmessung wurde wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben durchgeführt.

Ergebnisse**Tabelle 3-12:** Verteilungsmuster der Enzymaktivität Gesamthexosaminidase in Überstand und Zellpellet zuvor mit Stimuli behandelte Monozyten (n=3).

Enzymaktivität (n=3)	Pellet	Überstand
Probe I, Kontrolle (nur PBS)	74,14 ± 4,00 %	25,86 ± 4,00 %
Probe II (PBS, Cytochalasin B und N-fMLP)	52,27 ± 7,55 %	47,73 ± 7,55 %
Probe III (GM-CSF, Cytochalasin B und N-fMLP)	50,22 ± 10,32 %	49,78 ± 10,32 %

Anhand der Tabelle 3-12 kann man sehr deutlich erkennen, dass durch die Behandlung der Monozyten mit Zytokinen und/oder Chemotaktika ein Teil der Enzymaktivität in den Überstand abgegeben wird. Auffällig im Vergleich zu den Degranulationsversuchen mit Granulozyten (s. Kap. 3.4.3) ist, dass das Priming mit GM-CSF keine zusätzliche Steigerung der Degranulation hervorruft. Allerdings ist dieser Befund ähnlich wie die Ergebnisse am Bayer ADVIA 120, bei denen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Freisetzung der MPO zwischen GM-CSF vorbehandelten und nicht vorbehandelten Monozyten beobachtet werden konnten (s. Abb. 3-45b und 3-45c).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch bei Monozyten ein ähnliches Verhalten der Freisetzung der MPO und des sphingolipidabbauenden Enzyms Gesamthexosaminidase beobachtet werden kann.

4 DISKUSSION

4.1 Einleitung

Wie Sandhoff et al. [1994] in ihrem enzymkinetischen Modell beschrieben haben, muss ein Proband mit einer 10%igen Restaktivität der sphingolipid-abbauenden Enzyme nicht erkranken. Sie stellten die Vermutung an, dass unter Normalbedingungen die Kapazität V_{\max} des abbauenden System die jeweilige Einstromrate (v_i) des Substrats in das lysosomale Kompartiment um ein Vielfaches übersteigt. Daher hat ein Absinken des maximalen katabolen Enzymaktivitätsspiegels (V_{\max}), z.B. auf Werte hinunter bis zu 20% der Norm, wie es bei vielen Überträgern von rezessiv vererbten Krankheiten auftritt, keinen Einfluss auf die Umsatzrate v , da das Verhältnis v/v_i konstant bleibt. Die Verminderung der maximalen katabolen Enzymaktivität (V_{\max}^{mut}) wird durch einen Anstieg des Substratspiegels (S_{eq}) und damit durch eine erhöhte Substratsättigung des katabolen Systems ausgeglichen. Dieser Kompensationsmechanismus hält den enzymatischen Substratumsatz auch dann konstant, wenn die maximale katabole Aktivität V_{\max}^{mut} auf den Wert der Substrateinstromrate (v_i) in das Lysosom abgesunken ist. An diesem Schwellenwert arbeitet das katabole Enzymsystem mit maximaler Auslastung, ein weiteres Absinken der maximalen katabolen Enzymaktivität (V_{\max}^{mut}) führt dann zur Speicherung des jeweiligen Lipidsubstrates. Dieses Modell wurde durch Substratfluss- und Enzymaktivitätsmessungen an kultivierten Hautzellen von verschiedenen Patienten mit G_{M2} -Gangliosidose überprüft [Leinekugel et al., 1992].

Diese Einleitung soll deutlich machen, wie eng der Bereich der Messung sein kann, in dem man sich bei z.B. Heterozygoten bewegt. Interpretationsprobleme bei den Routineuntersuchungen können sich bei folgenden Situationen/Grenzwerten ergeben:

- I. Es liegt ein wirklicher Grenzwert vor, d.h. der Proband bewegt sich genau an dem o.g. Schwellenwert.

- II. Dem Grenzwert liegen Artefakte zu Grunde. Diese können sowohl eine spezielle Zusammensetzung der Leukozytenfraktion, als auch der Einfluss des Transportes (Einsendelabor) oder der Aufarbeitung auf die Probe, d.h. die „Qualität“ der Blutprobe, sein.

Punkt I lässt sich nur durch Ausschluss der möglichen Artefakte unter Punkt II sicher diagnostizieren, daher war es Ziel dieser Arbeit, die unter II aufgeführten Einflüsse auf die Messergebnisse genauer zu untersuchen. Die Aktivität der sphingolipidabbauenden Enzyme in den Leukozyten (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) hat nach bisherigen Erkenntnissen keine funktionelle Bedeutung, da Sphingolipide v.a. von ortständigen Zellen wie z.B. Oligodendrozyten und Schwann-Zellen abgebaut werden. Zur Untersuchung, ob ein Defekt im Sphingolipidstoffwechsel vorliegt, eignen sie sich jedoch sehr gut, da ihre sphingolipidabbauende Enzymaktivität repräsentativ für die anderen am Sphingolipid-Stoffwechsel beteiligten Zellen ist und sie relativ leicht mittels Vollblutgewinnung zugänglich sind.

4.2 Interpretation der Ergebnisse

4.2.1 Verteilung der Enzymaktivität in den einzelnen Leukozytenfraktionen

4.2.1.1 Beurteilung des Differentialblutbildes der Leukozytenfraktion am Bayer ADVIA 120

Im Routinebetrieb werden die ankommenden Vollblutproben am Bayer ADVIA 120 gemessen, mittels der Dextran sedimentation in Leukozyten und Erythrozyten/Plasma getrennt und anschließend wird von der Leukozytenfraktion wieder am Bayer ADVIA 120 ein Differentialblutbild angefertigt. Ein normales Differentialblutbild der Leukozyten reicht von 42% bis 81% Granulozyten, 2% bis 10% Monozyten und 20% bis 45% Lymphozyten.

Wie die Ergebnisse in Kapitel 3.1.1 zeigen, besteht ein großer Unterschied bei der Verteilung der Aktivität der lysosomalen Enzyme innerhalb der Leukozytenfraktionen (Monozyten > Granulozyten > Lymphozyten). Bei Grenzwerten sollte daher eine differenzierte Betrachtung der Messergebnisse unter Berücksichtigung der jeweiligen Konstellation der Leukozyten erfolgen. Verwendete man allerdings die numerischen Messergebnisse des Bayer ADVIA 120 nach Dextranedimentation, erhielt man falsche Werte. Wie die Ergebnisse in Kapitel 3.1.1 zeigen, stimmen die numerischen Messergebnisse des Bayer ADVIA 120 nicht mit denen der mikroskopischen Gesichtsfeldauszählung überein, speziell was die Unterscheidung Granulozyten ↔ Monozyten betrifft (s. Abb. 4-1a und b). Dieses Problem wird durch die Degranulation, bedingt durch den „Stress“ auf die Granulozyten durch den Isolierungsprozess und die damit einhergehende Ausschüttung des Enzyms Myeloperoxidase (MPO) aus den Granula der Blutzellen, verursacht. Dessen intrazelluläre Aktivität (MPO Aktivität) wird durch den Bayer ADVIA 120 gemessen und die Zelle wird anhand der intrazellulären Myeloperoxidaseaktivität im Peroxidasekanal der Granulozyten- oder Monozytenfraktion zugeordnet. Der Basis-Kanal, der ja eine Unterscheidung der Zellen aufgrund ihrer Kernform vornimmt und deshalb unbeeinflusst davon ist, ob die Granulozyten MPO durch Degranulation verloren haben oder nicht, zeigt deshalb wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben keine der im Peroxidasekanal entsprechend angezeigten Menge an Signalen im Monozytenfenster, sodass insgesamt von einem niedrigeren Monozytenanteil in der Leukozytenfraktion als numerisch angezeigt ausgegangen werden muss (s. Abb. 4-1). Dies konnte durch die parallel durchgeführten mikroskopischen Auszählungen bestätigt werden (Kapitel 3.3.1). In ähnlicher Weise kommt es durch Stimulation auch zu einer Degranulation der MPO-enthaltenden Monozyten, wodurch diese teilweise in das Lymphozytenfeld rutschen (s. Abb. 4-1b).

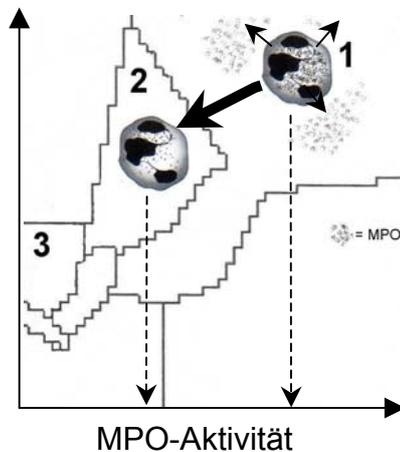


Abb. 4-1a: Exemplarische Darstellung eines neutrophilen Granulozyten im ADVIA 120 Perox-Kanal Bild a) vor b) nach Degranulation. Durch die Abgabe der MPO verschiebt sich der Granulozyt in das Monozytenfeld (←). Der gestrichelte Pfeil zeigt auf die MPO-Aktivität auf der x-Achse.

Im Peroxidasekanal;
1=Neutrophile Granulozyten-Feld

2=Monozyten-Feld
3=Lymphozyten-Feld

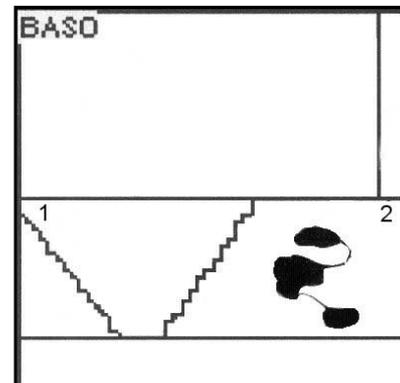


Abb. 4-1b: Exemplarische Darstellung eines neutrophilen Granulozytenkernes (ADVIA 120 Baso-Kanalbild) im Feld der polymorphkernigen Zellen
1= Mononukleäre Zellen; 2= polymorphkernige Zellen. Da hier nur die Zellkernform registriert wird, hat die MPO-Abgabe keinen Einfluss auf die Lage der Wolke.

Um die genaue Verteilung der Leukozytenfraktion zu bestimmen, sollte daher für die weiteren Berechnungen entweder eine mikroskopische Auszählung erfolgen oder - im Falle der Granulozyten - die Messergebnisse des Baso-Kanals mitberücksichtigt werden. Die Untersuchungen dieser Arbeit haben gezeigt, dass durch die Degranulation der granulozytären Lysosomen neben der MPO auch die sphingolipidabbauenden Enzyme mitbetroffen sind und deren „ursprüngliche“ quantitative Menge in den Granulozyten vor Isolation deshalb höher ist.

Diese Tatsache könnte eine „semiquantitative“ Nachkorrektur der „eigentlichen“ Enzymaktivität der Ausgangszellen erlauben, indem man das Ausmaß der Degranulierung durch den Vergleich der Granulozytenwolke im Vollblut und nach Dextranedimentation oder Histopaque-Methode bestimmt, bzw. abschätzt (s. Abb. 4-4a und b).

4.2.1.2 Verteilung der sphingolipidabbauenden Enzyme innerhalb der Leukozytenfraktionen

Bereits Nakagawa et al. [1978] untersuchten die unterschiedliche Verteilung des sphingolipidabbauenden Enzyms Hexosaminidase innerhalb der verschiedenen Leukozytenfraktionen in peripherem Blut und fanden dabei erhebliche Unterschiede.

Sie stellten fest, dass innerhalb der Leukozyten der Anteil der Hexosaminidaseaktivität an der Gesamthexosaminidaseaktivität unterschiedlich verteilt war (s. Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Aktivität der Hexosaminidase in verschiedenen Zelltypen von gesunden Probanden [Nakagawa et al., 1978]

<i>Cell type</i>	<i>Hexosaminidase activity (nmol 4MU released/hr/mg protein)</i>		<i>% hex A</i>
	<i>Total</i>	<i>Hex A</i>	
Granulocytes (9)*	2032.5 ± 473.3†	1777.5 ± 369.8	88 ± 5.7
Mononuclear cells (7)	1900.5 ± 333.0	1001.3 ± 126.8	52 ± 6.0
Monocytes (2)	1578.8	789.0	51
Lymphocytes (2)	615.0	441.0	67
Platelets (4)	564.0 ± 184.5	393.8 ± 185.3	68 ± 8.3

*Number of subjects.

†Mean ± S.D.

Dabei zeigte sich, dass beinahe die gesamte Hexosaminidaseaktivität in Granulozyten aus Hexosaminidase-A bestand, wohingegen in Monozyten nur 50 % der Gesamtaktivität auf die Hexosaminidase-A entfiel.

Daneben stellten sie fest, dass dieses Verteilungsmuster auch bei Heterozygoten der Tay-Sachs Krankheit zutrifft (s. Abb. 4-2). Daher können die an Gesunden gewonnenen Daten auf heterozygote Träger angewandt werden. Lediglich die Gesamtaktivität verringert sich bei Heterozygoten, nicht jedoch das typische Verteilungsmuster.

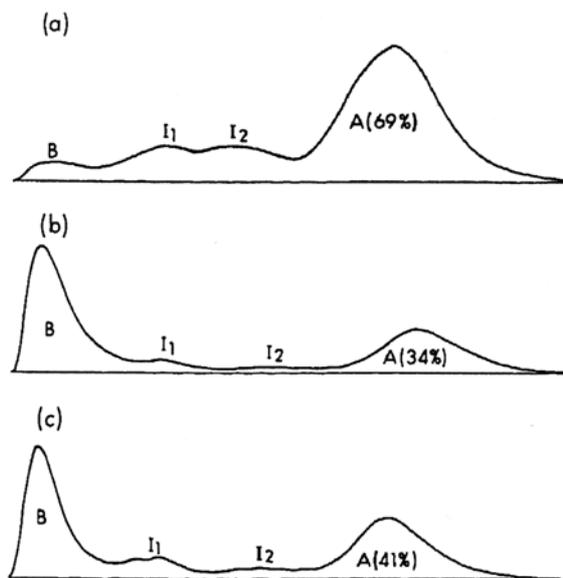


Abbildung 4-2: DEAE-Zellulose Profil der Hexosaminidase Isoenzyme in Granulozyten (a), Mononukleären Zellen (b) und Thrombozyten (c) bei Trägern des Tay-Sachs Gens [Nakagawa et al., 1978]

In einer zweiten Arbeit von 1980 untersuchten sie die Verteilung anderer lysosomaler Enzyme (β -Glukosidase, α -Mannosidase und α -Glukosidase) in den einzelnen Leukozytenfraktionen, konzentrierten sich jedoch auf das pH-Optimum der Enzyme und stellten eine unterschiedliche Aktivität der Isoenzyme innerhalb der einzelnen Fraktionen fest [Nakagawa et al., 1980]. Bei der neutralen α -Glukosidase-

aktivität konnten sie eine höhere spezifische Aktivität in Granulozyten und Monozyten feststellen als in Lymphozyten und Thrombozyten. Obwohl α -Glukosidase kein sphingolipidabbauendes Enzym darstellt, zeigten die Ergebnisse, die in der vorliegenden Arbeit erhalten wurden, ähnliche Ergebnisse (s. Kap. 3.2). Hier wurde die Aktivität sphingolipidabbauender Enzyme bei den mittels Dextran sedimentation isolierten Gesamtleukozyten sowie bei durch Histopaque isolierten Granulozyten und mononukleäre Blutzellen untersucht. Bei den anschließend durchgeführten Untersuchungen an den drei Zellfraktionen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten (s. Kap. 3.3.2) konnte für alle vier gemessenen Enzyme (Gesamthexosaminidase,

Hexosaminidase-A, β -Galaktosidase und Arylsulfatase A) eine deutlich höhere Aktivität innerhalb der Monozytenfraktion gegenüber den Granulozyten festgestellt werden. Lymphozyten zeigten die geringste Aktivität (s. Tabelle 4.2).

Tabelle 4-2: Faktoren im Bezug auf das Verteilungsmuster der Enzymaktivität innerhalb der Leukozytenfraktionen

Enzym/Zellfraktion	Lymphozyten	Monozyten	Granulozyten
Gesamthexosaminidase n=9	1,00	4,36 \pm 1,05	1,81 \pm 0,56
Hexosaminidase-A n=8	1,00	4,57 \pm 1,59	2,81 \pm 0,73
β -Galaktosidase n=8	1,00	4,47 \pm 1,00	1,64 \pm 0,41
Arylsulfatase A n=9	1,00	2,31 \pm 0,68	1,64 \pm 0,38

Lymphozyten wurden willkürlich als Faktor 1 festgelegt und die restlichen Blutzellen dazu in Relation gesetzt.

Bei diesen Ergebnissen muss jedoch zusätzlich berücksichtigt werden, dass speziell die Granulozytenfraktion eine hohe Tendenz zur Degranulation alleine durch den mechanischen Stress während der Probenaufarbeitung zeigt, weshalb in Wirklichkeit von einer höheren Aktivität der Granulozyten im Vollblut ausgegangen werden muss. Wenn man die Aktivität der Lymphozyten willkürlich gleich eins setzte, ergab sich im Gesamten betrachtet eine ca. vierfach höhere Aktivität bei den isolierten Monozyten und eine ca. doppelt so hohe bei den isolierten Granulozyten (vgl. Tabelle 4-2). Nakagawa et al. [1978] fanden für Granulozyten eine gegenüber den Lymphozyten um mindestens vierfach höhere Aktivität an Hexosaminidase-A heraus. Dies entspricht in etwa den Daten dieser Arbeit, bei der eine um 2,8fach höhere Aktivität festgestellt wurde (s. Kap. 3.3.2). In Wirklichkeit sind die Werte der Granulozyten noch höher, da ja, wie eben erwähnt, ein Teil der lysosomalen Enzyme, unter denen sich die MPO und die sphingolipidabbauenden Enzyme befinden, speziell bei Granulozyten während der Aufarbeitung durch Degranulation verloren geht.

Daneben ergaben sich, wie oben erwähnt (s. Tabelle 4-1), für die einzelnen Zellfraktionen unterschiedliche Zusammensetzungen für die Isoenzyme der Hexosaminidase. Dies würde erklären, warum in der vorliegenden Arbeit bei der Messung der Gesamthexosaminidase ein Faktor der Granulozyten von 1,81 (bei Lymphozyten=1) gegenüber einem Faktor von 2,81 bei der Hexosaminidase-A vorlag (s. Tabelle 4-2). Bei der Hexosaminidase-A haben die Granulozyten mit einem Anteil von 88% an der Hexosaminidaseaktivität innerhalb der Zelle natürlich einen viel größeren Anteil an der Gesamtaktivität als die Monozyten mit 51% [Nakagawa et al., 1978].

Es stellt sich nun die Frage, ob es sinnvoll ist, bei grenzwertigen Ergebnissen (Bezugssystem: Gesamtleukozyten) die prozentuale Zusammensetzung der Leukozyten bei der jeweiligen Probandenprobe mitzuberücksichtigen, um zu einer exakteren Beurteilung zu gelangen. Das soll an einem praktischen Beispiel erläutert werden:

Zwei Blutproben zeigen nach Dextran sedimentation das gleich grenzwertige Messergebnis (hier 0,2/pro 10^5 Gesamtleukozyten), haben aber eine unterschiedliche prozentuale Leukozytenzusammensetzung:

Tabelle 4-3: Exemplarisches Rechenbeispiel der Aktivitätsmessung der Hexosaminidase-A bei verschiedenen zusammengesetzten Gesamtleukozytenproben

Proben Nr./ Messung	Enzymaktivität Hex- A	Lymphozyten Faktor: 1	Monozyten Faktor: 4,57	Granulozyten Faktor: 2,81
1	0,2	10%	20%	70%
2	0,2	60%	10%	30%

Wie aus Tabelle 4-3 zu entnehmen, zeigen beide Proben dieselbe Enzymaktivität (0,2), d.h. beide Proben würden unter Außerachtlassung der Blutzusammensetzung gleich beurteilt werden. Berücksichtigt man jedoch den Anteil der einzelnen Leukozyten und ihre unterschiedliche Enzymaktivität

differenziert (s. Tab. 4-2), so könnte unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Aktivitäten in den einzelnen Leukozytenfraktionen folgende Korrektur (Einführung eines Korrekturfaktors) vorgenommen werden:

Messung 1: Faktor: $0,10 \times 1 + 0,20 \times 4,57 + 0,70 \times 2,81 = 2,98$

Messung 2: Faktor: $0,6 \times 1 + 0,10 \times 4,57 + 0,30 \times 2,81 = 1,90$

Daraus könnten folgende „korrigierte Messwerte“ ermittelt werden, die sich deutlich voneinander unterscheiden:

$$1) 0,2 : 2,98 = \underline{\underline{0,067}}$$

$$2) 0,2 : 1,9 = \underline{\underline{0,105}}$$

Es ergeben sich also signifikante Unterschiede zwischen den beiden Proben, die ohne Berücksichtigung der Leukozytenzusammensetzung so nicht zu Tage treten. Dieser Unterschied ist für die Fälle mit normaler Aktivität irrelevant, kann aber zur Beurteilung von Grenzfällen (grenzwertigen Ergebnissen) von Bedeutung sein und sollte deshalb in diesen Fällen mitberücksichtigt werden. So wissen wir aus dem o.g. kinetischen Modell von Sandhoff et al. [1994], dass bereits kleinste Unterschiede darüber entscheiden, ob bei einem Probanden die Krankheit ausbricht oder nicht.

Im konkreten Fall kann man davon ausgehen, dass die Restenzymaktivität pro Einzelzelle (Granulozyt/Monozyt/Lymphozyt) bei Proband 1 geringer ist als bei Proband 2, da in beiden Fällen der auf die Gesamtleukozyten bezogene Wert (0,2) gleich ist, aber bei Proband 1 weitaus mehr Granulozyten/Monozyten vorhanden sind. D.h. die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Grenzwert (0,2) tatsächlich auf einen pathologischen Enzymdefekt hinweist, scheint primär bei Proband 1 größer zu sein als bei Proband 2.

Zusätzlich muss man berücksichtigen, dass ein Teil der tatsächlichen („ursprünglichen“) Enzymaktivität in den Granulozyten durch den mechanischen Stress während der Aufarbeitung verloren gegangen ist. D.h. die „ungestressten“ Zellen haben eine höhere Enzymaktivität. So konkurrieren zwei

Effekte, und es ist nicht einfach, dies quantitativ gegeneinander abzuschätzen. Allerdings werden die unteren Grenzwerte der sphingolipidabbauenden Enzyme aus Gesamtleukozytenpräparationen, die immer nach dem gleichen Schema aufbereitet werden, ermittelt, sodass bei den erhaltenen Werten das Phänomen der Degranulation während der Aufarbeitung bereits mitberücksichtigt ist. Problematisch kann es nur werden, wenn relativ alte Proben (z.B. zwei Tage Postweg) mit frisch gewonnenen Blutproben verglichen werden müssen. Ältere Proben neigen zu vermehrter Degranulation.

4.2.2 Degranulationsversuche an Granulozyten und Monozyten

Die Bestimmung der sphingolipidabbauenden Enzyme erfolgt nur in dafür spezialisierten Labors, sodass die meisten Proben (Vollblut) über den Postweg einige Zeit unterwegs sind, bevor die eigentliche Testung stattfindet. Es wäre daher besser, nicht Vollblut, sondern durch nach Degranulation im Vollblut und Abzentrifugation gewonnenes Serum (Plasma) zu versenden. Versuche, Granulozyten im Vollblut vollständig zu degranulieren waren jedoch bisher erfolglos. Um die Degranulation zu untersuchen, mussten die Granulozyten/Monozyten daher zuerst isoliert werden, was mittels Histopaque-Isolation und MACS-Trennung erfolgte. Diese Versuche wurden unter drei Fragestellungen durchgeführt. Zum einen sollte herausgefunden werden, ob die behandelten Zellen auf Stimuli neben der bekannten Ausschüttung von Myeloperoxidase auch mit einer Entleerung der Granula, in denen sich die sphingolipidabbauenden Enzyme befinden, reagieren würden. Zum anderen sollte untersucht werden, ob das Ausmaß an Myeloperoxidaseverlust mit dem Verlust der sphingolipid-abbauenden Enzyme korreliert. Auf diese Weise hätte man durch Bayer ADVIA-120 Messungen (Vollblut : isolierte Zellen) bereits einen guten Überblick über den Verlust der Enzyme vor Bestimmung in den Zellextrakten. Die dritte Frage richtete sich an die Monozyten. Es sollte herausgefunden werden, ob diese ebenfalls auf Stimuli mit einer Degranulation reagieren würden, was im Hinblick auf ihren hohen Gehalt an

sphingolipidabbauenden Enzymen für die Beurteilung der Messergebnisse von großer Relevanz wäre.

4.2.2.1 Degranulation von sphingolipidabbauenden Enzymen bei Granulozyten/Monozyten nach Inkubation mit bekannten Stimuli

Die Degranulation der Granulozyten ließ sich durch eine Linksverschiebung der Neutrophilenwolke im Perox-Kanalbild am Bayer ADVIA 120 sehr gut verfolgen. Es konnte gezeigt werden, dass bereits das Isolationsverfahren bei Granulozyten zur Degranulation führt (s. Kap. 3.4.1). Steigerte man zusätzlich den „Stress“ auf die Zellen durch Inkubation mit den wirksamen Stimuli-Kombinationen GM-CSF, Cytochalasin B und N-fMLP, so zeigte sich in den Zellen (Granulozyten) eine deutliche Abnahme der Enzymaktivitäten (MPO und sphingolipidabbauende Enzyme), korrespondierend mit sehr hohen Aktivitäten im Überstand der Zellen. Dies belegte die Abgabe der sphingolipidabbauenden Enzyme an die Umgebung durch Degranulation. Zellen der Kontrollreihe, die nur mit PBS behandelt wurden, zeigten gegenüber den Zellen direkt nach der Histopaque-Auftrennung keine zusätzliche Verschiebung im Peroxidasekanalbild. Die Monozyten zeigten ein ähnliches Verhalten (s. Kap. 3.5.2).

Die Verwendung wirksamer Degranulationsstimuli bei den Versuchen, die eine stärkere Degranulation bewirken als rein „mechanischer“ Stress, sollte den parallelen Verlust der Granulozyten/Monozyten von lysosomalen Enzymen (MPO und sphingolipidabbauenden Enzymen) verdeutlichen. Die Messergebnisse der Enzyme bei Leukozyten (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten), die zuvor ggf. auf dem Postweg transportiert und anschließend per Dextranedimentation isoliert wurden, was „mechanischen Stress“ und damit Degranulation bedeutet, zeigen somit falsch-niedrige Werte an. Um das Ausmaß der Degranulation feststellen zu können, eignet sich im Routinebetrieb

die Messung der Myeloperoxidaseaktivität am Bayer ADVIA 120. Diese korreliert mit der intrazellulären Menge an Myeloperoxidase [Gerber, 1995]. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Verlust an Myeloperoxidase mit dem Verlust an sphingolipidabbauenden Enzymen korreliert (s. Kap. 3.4.4). Es lässt sich folgende semiquantitative Aussage treffen: je stärker die Verschiebung der Myeloperoxidaseaktivität am Bayer ADVIA 120 nach links, desto höher auch der Verlust der Granulozyten an sphingolipidabbauenden Enzymen. Diese Tatsache kann man sich zunutze machen, um anhand des Peroxidasekanalbildes der Probe vor (im Vollblut) und nach der Isolierung durch Dextransedimentation auf das Ausmaß der Degranulation zu schließen. Trägt man die prozentualen Verteilungen zwischen Pellet und Überstand von Myeloperoxidase und die durchschnittliche Verteilung der vier untersuchten sphingolipidabbauenden Enzyme gegeneinander auf, ergeben sich die Verläufe, die in Abbildung 3-38 dargestellt sind.

An der Abbildung 3-38 kann man erkennen, dass Myeloperoxidase und sphingolipidabbauende Enzyme auf gemeinsame Stimuli in ähnlicher Weise von den Zellen freigesetzt werden. Die prozentuale Angabe bedeutet die Ausschüttung der Enzyme (MPO oder sphingolipidabbauende Enzyme) in den Überstand bei den unterschiedlichen Versuchen. Auf der X-Achse ist die prozentuale Verteilung der MPO-Aktivität angegeben, auf der Y-Achse die der sphingolipidabbauenden Enzyme. Die Kurve zeigt eine Korrelation zwischen MPO-Aktivität und der Aktivität sphingolipidabbauender Enzyme bei den verschiedenen Versuchen zur Degranulation der Granulozyten, sodass wie oben besprochen die Ergebnisse der MPO-Messung am Bayer ADVIA 120 ebenso Auskunft über die Ausschüttung sphingolipidabbauender Enzyme aus den Granulozyten liefern und damit einen Anhaltspunkt über die ursprüngliche Enzymaktivität in den Granulozyten geben können. Offensichtlich erfolgt die Ausschüttung der MPO aber vollständiger und leichter als die der sphingolipidabbauenden Enzyme.

Anhang 1

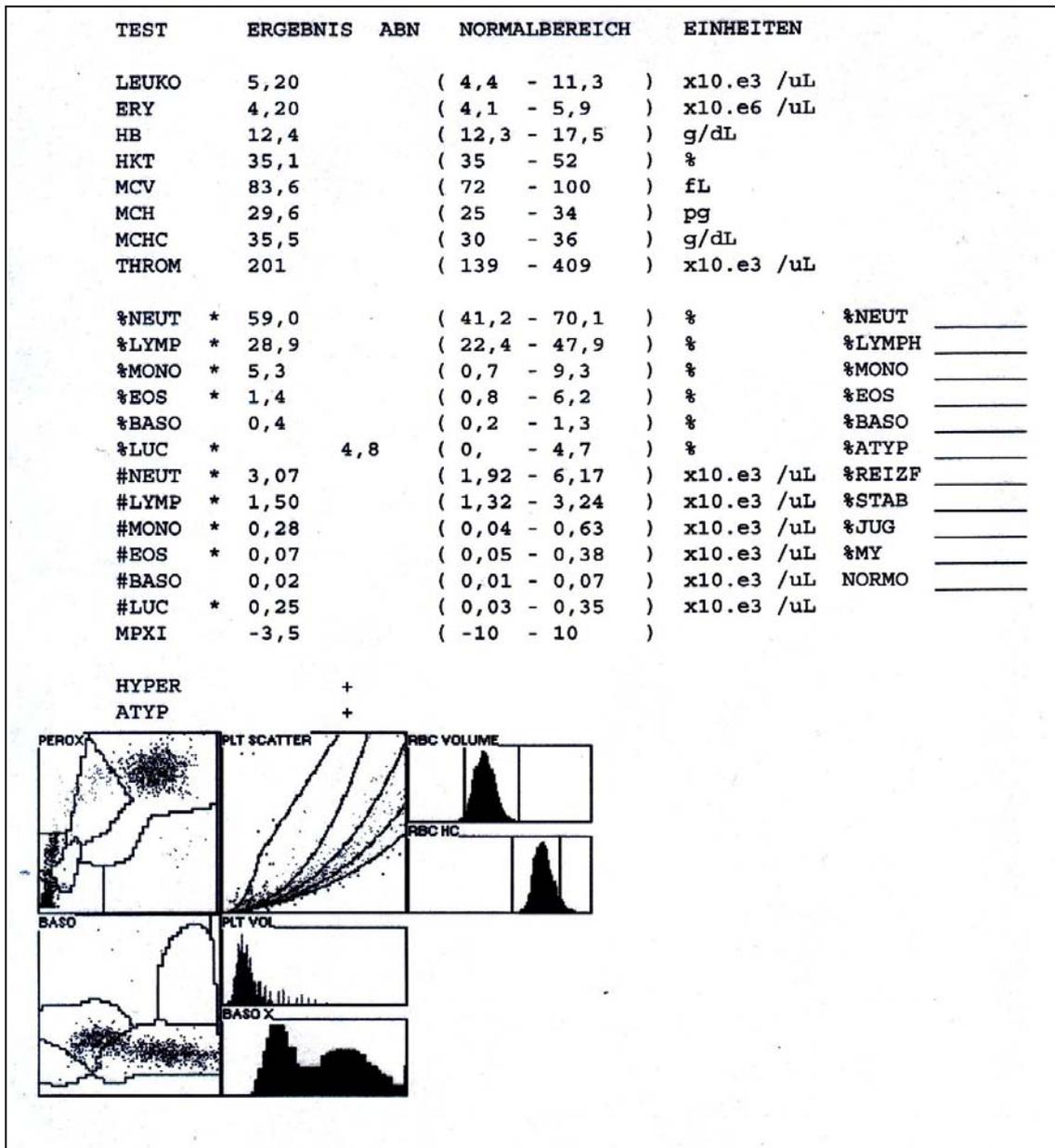


Abbildung 4-4a: Originalausdruck Bayer ADVIA-120 Messung einer Vollblutprobe. Im Peroxkanalbild ist die Granulozytenwolke deutlich zu erkennen

Anhang 2

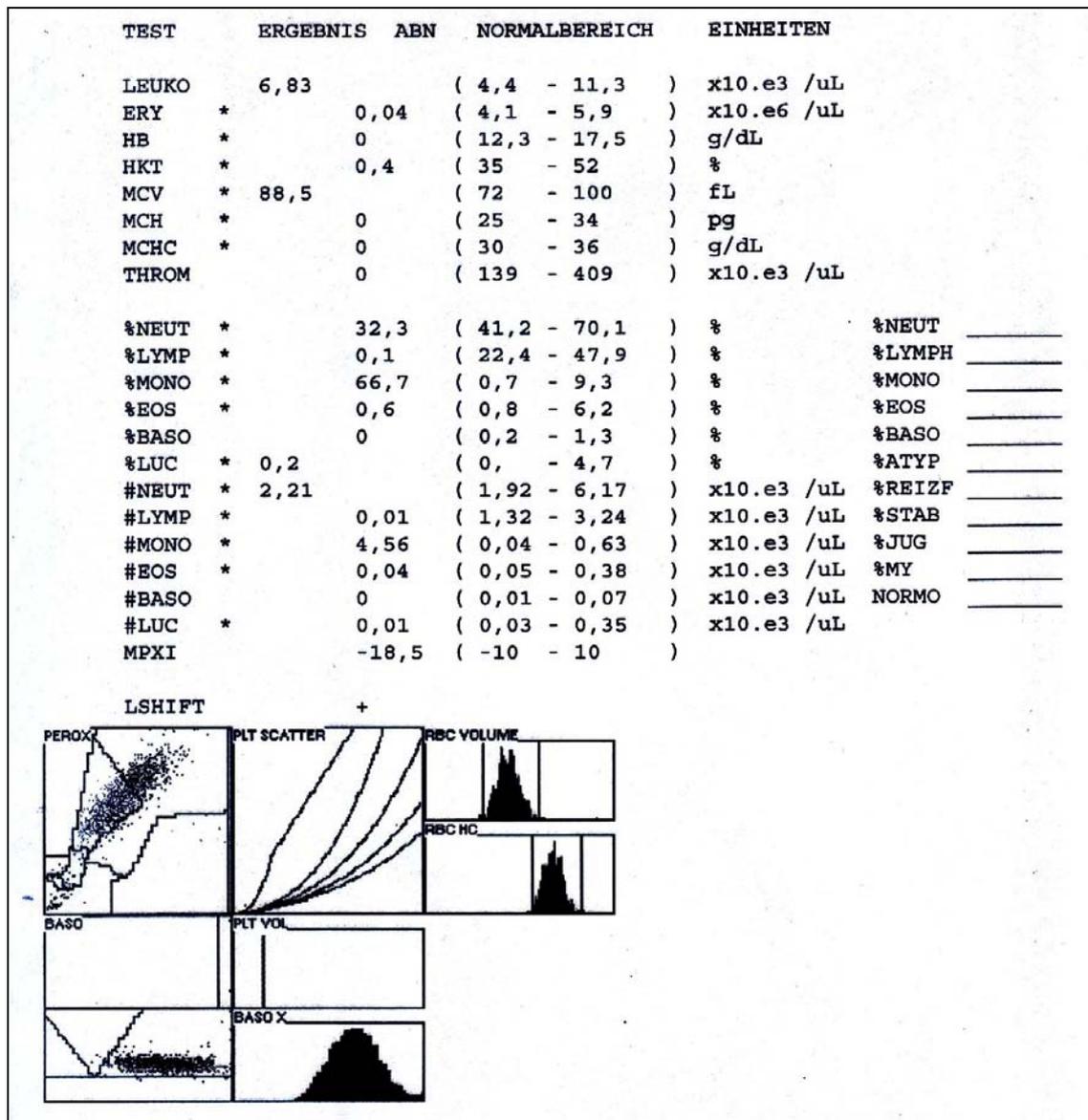


Abbildung 4-4b: Originalausdruck Bayer ADVIA 120-Messung einer Probe mit Granulozyten nach Trennung mittels Histopaque-Technik. Im Peroxkanalbild ist die Verschiebung der Granulozytenwolke in das Monozytenfeld zu erkennen

5. ZUSAMMENFASSUNG

Sphingolipidosen sind Lipidspeichererkrankungen mit häufig letalem Ausgang. Die Diagnose dieser Erkrankungen kann mit Hilfe von enzymatischen Bestimmungen in Extrakten aus Leukozyten erfolgen, wobei die Enzymaktivität pro Zellzahl als Messparameter verwendet wird. Ausgangsmaterial für routinemäßige Bestimmungen sind Leukozyten, die aus Vollblut mittels Dextran sedimentation gewonnen werden. Aus einem Kollektiv gesunder Probanden werden Referenzbereiche ermittelt, deren Unterschreiten Hinweise auf eine Sphingolipidose ergeben. Diagnostische Probleme können in unteren Grenzbereichen auftreten. Um diesen unteren Grenzbereich exakter bestimmen zu können, wurden in dieser Arbeit zwei Ansätze verfolgt: Erstens wurde untersucht, zu welchen Anteilen die betreffenden Enzyme in den unterschiedlichen Leukozytenfraktionen (getrennt über Dichtegradientenzentrifugation und anschließender MACS-Separation) vorhanden sind, um anstelle der Gesamtleukozyten als Bezugssystem die Zusammensetzung der isolierten Leukozyten über Gewichtungsfaktoren mitberücksichtigen zu können. Dabei zeigte sich, dass im Durchschnitt nach der Zellisolierung in den Monozyten ca. 4-5mal, in den Granulozyten ca. 2mal höhere Enzymaktivitäten enthalten sind als in Lymphozyten. Ein weiteres Problem in diesen Grenzbereichen kann sich dadurch ergeben, dass die häufig per Post versandten Blutproben bei der Untersuchung nicht ganz frisch sind und dadurch bereits vor der Zellisolierung, oder vermehrt bei der Zellisolierung durch Degranulation, einen Teil ihrer Enzyme verlieren, was zu falsch erniedrigten Werten führt. Deshalb wurde der Einfluss der Degranulation genauer untersucht. Hier war es v.a. hilfreich, dass die Blutzellbestimmung mit Hilfe des Bayer ADVIA 120 routinemäßig durchgeführt wurde, da dieses Gerät Granulozyten und Monozyten von den übrigen Leukozyten über deren Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität unterscheidet: Kommt es zu einer Degranulation, also u.a. zu einem Verlust der MPO, so ist das an einer Linksverschiebung der Granulozyten- und Monozytenwolken erkennbar (X-Achse: MPO-Aktivität). Degranulationsprozesse wurden sowohl bei der

Zellisolierung (mechanischer Stress) als auch durch spezielle Faktoren (Cytochalasin B und N-fMLP) analysiert. Neben diesen Messungen am Bayer ADVIA 120 wurde parallel die Ausschüttung der MPO aus den Granulozyten/Monozyten mit Hilfe eines ELISAs bestimmt sowie die von vier sphingolipidabbauenden Enzymen (β -Galaktosidase-Defekt bei GM1-Gangliosidose, Morquio B; Arylsulfatase-A-Defekt bei metachromatischer Leukodystrophie; Hexosaminidase-A-Defekt bei Morbus Tay-Sachs; Gesamthexosaminidase-Defekt bei Morbus Sandhoff). Die Ergebnisse zeigten eine gleiche Tendenz hinsichtlich des Degranulationsverhaltens der MPO und der sphingolipidabbauenden Enzyme, wodurch aus den Bayer ADVIA 120-Grafiken im Rahmen der routinemäßigen Blutbilderstellung Rückschlüsse über das Ausmaß der Degranulation gezogen werden können. Aufgrund dieser beiden erarbeiteten Fakten (relative Enzymaktivitäten in den einzelnen Zellfraktionen der Leukozyten und der Registrierung des Ausmaßes der jeweiligen Degranulation der Probe durch Messung am Bayer ADVIA 120) ist es möglich, durch entsprechende Gewichtungsfaktoren die Aktivitäten von sphingolipidabbauenden Enzymen in den unteren Grenzbereichen genauer und eindeutiger feststellen zu können.

6. ABKÜRZUNGEN

BSA	Bovines Serum Albumin
CYT-B	Cytochalasin B
D 1-3	Bezeichnung der Versuchsreihe
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	relative Zentrifugalbeschleunigung (RZB)
GLK	Gesamtleukozyten
GM-CSF	Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor
Hex-A	Hexosaminidase-A
Hex-B	Hexosaminidase-B
IU	Internationale Einheit
KMT	Knochenmarkstransplantation
LSD	Lipid storage disease
LUC	Large Unstained Cells
MACS	Magnetic Activated Cell Sorter
MCB	Membranous Cytoplasmatic Bodies
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
MNBC	Mononuclear Blood Cells
MPO	Myeloperoxidase
MPS	Mukopolysaccharidose
MPXI	Index der mittleren Peroxidase-Aktivität
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSD	multiple Sulfatasen Defekt
n	Anzahl der Versuche, Merkmale bzw. Merkmalspaare
Na-EDTA	Natrium-Ethylen-Diamin-Tetraacetat
N-fMLP	N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
PBS	Phosphate Buffered Saline

PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PND	Pränataldiagnostik
pNPP	Para-Nitrophenolphosphat
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
PL	Pellet
SAP-I	Sphingosin Aktivator Protein
SD	Standard Deviation
ÜS	Überstand
V_{\max}	maximale Geschwindigkeit
ZNS	Zentrales Nervensystem

7. LITERATURVERZEICHNIS

Ahern-Rindell, A.J. ; Murnane, R.D.; Prieur, D.J (1988)
 β -Galactosidase activity in fibroblasts and tissues from sheep with a lysosomal storage disease
Biochem. Genet., 26, 733-46

Alves, D.; Pires, M.M.; Guimares, A.; Miranda, M.C. (1986) ^{*2)}
Four cases of late onset metachromatic leukodystrophy in a family: Clinical, biochemical and neuropathological studies
Neurosurg. Psychiatry, 49, 1423-22

Alzheimer, A. (1910) ^{*2)}
Beiträge zur Kenntnis der pathologischen Neuroglia und ihrer Beziehung zu den Abbauvorgängen im Nervengewebe
Nissl-Alzheimer's Histol. Histopathol. Arb., 3, 493

Amaducci, L.; Sorbi, S.; Piacentini, S.; Bick, K.L. (1991) ^{*2)}
The first Alzheimer's disease case: a metachromatic leukodystrophy ?
Dev. Neurosci., 13, 186-7

Arbisser, A.I.; Donnelly, K.A.; Scott, C.I.; Di Ferrante, N.; Singh, J.; Stevenson, R.E.; Aylesworth, A.S., Howell, R.R.; (1977) ^{*1)}
Morquio-like syndrome with β -galactosidase deficiency and normal glucosamine sulfatase activity: Mucopolysaccharidosis IVB
Am. J. Hum. Genet., 1, 195-05

Arvanitis, D.; Dumas, M.; Szuchet, S. (1992) ^{*2)}
Myelin paligenesis.2. Immunocytochemical localization of myelin/oligodendrocyte glycolipids in multilamellar structures
Dev. Neurosci., 14, 328-35

Austin, J. ; McAfee, D. ; Shearer, L. (1965) ^{*2)}
Metachromatic form of diffuse cerebral sclerosis. IV. Low sulfatase activity in the urine of nine living patients with metachromatic leukodystrophy (MLD)
Arch Neurol., 12, 447-55

Baggiolini, M. (1982)
Phagozyten und Phagozytose hundert Jahre nach Metschnikoff
Schweiz. Med. Wschr., 112, 1403-11

Bainton, D.F. (1973)
Sequential Degranulation of the Two Types of Polymorphonuclear Leukocyte Granules During Phagocytosis of Microorganisms
J. Cell. Biol., 58, 249-64

- Baker, H.J.J.; Lindsey, J.R.; McKhann, G.M.; Farrell, D.F. (1971) ^{*1)}
Neuronal G_{M1}-gangliosidosis in Siamese cat with β -galactosidase deficiency
Science, 174, 838-9
- Barnes, I.C.; Kelly, D.F.; Pennock, C.A.; Randell, J.A. (1981) ^{*1)}
Hepatic β -galactosidase and feline G_{M1}-gangliosidosis
Neuropatho., Appl. Neurobiol., 7, 463-76
- Bartholomew, W.; Rattazzi, M. (1974) ^{*3)}
Immunochemical characterization of human β -D-N-acetylhexosaminidase from
normal individuals and patients with Tay- Sachs disease
Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 46, 512-24
- Barton, N.W.; Brady, R.O.; Dambrosia, J.M.; Di Bisceglie, A.M.; Doppelt, S.H.;
Hill, S.C.; Mankin, H.J.; Murray, G.J.; Parker, R.I.; Argoff, C.E.; Grewal, R.P.;
Kian-Ti, Y. (1993)
Replacement therapy for inherited enzyme deficiency: Macrophage-targeted
glucocerebrosidase for Gaucher's disease
New Engl. J. Med., 324, 1464-70
- Basner, R.; Von Figura, K.; Glossi, J.; Klein, U.; Kresse, H.; Mlekusch, W.
(1979)
Multiple deficiency of mucopolysaccharide sulfatases in mucosulfatidosis
Pediatr. Res., 13, 1316-8
- Bayever, E.; Ladisch, S.; Philippart, M.; Brill, N.; Nuwer, M.; Sparkes, R.S.;
Feig, S.A. (1985)
Bone-marrow transplantation for metachromatic leukodystrophy
Lancet, 2, 471-3
- Beck, M.; Peterson, E.M.; Spranger, J.; Beighton, P. (1987) ^{*1)}
Morquio's disease type B (β -galactosidase deficiency) in three siblings
S. Afr. Med. J.; 72, 704-7
- 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, 485-93
- Berra, B.; di Palma, S.; Primi, D.A. (1977)
High performance thin layer chromatography of neutral and acidic glycolipids:
Application to the chemical diagnosis of lipid storage diseases
Biochem. Exp. Biol., 13, 79-83
- Beutler, E.; Kuhl, W.; Comings, D. (1975) ^{*3)}
Hexosaminidase isoenzyme in type O GM2-gangliosidosis
Am. J. Hum. Genet., 27, 628-38

- Beutler, E.; Kuhl, W.; Matsumoto, F.; Pangalis, G. (1976)
Acid hydrolases in leukocytes and platelets of normal subjects and in patients with Gaucher's and Fabry's disease.
J. Exp. Med., 143(4), 975-80
- Booth, C.W.; Gerbie, A.B.; Nadler, H.L. (1973) ^{*1)}
Intrauterine detection of G_{M1}-gangliosidosis, type 2
Pediatrics, 52, 521
- Bosch, E.P.; Hart, M.N. (1978) ^{*2)}
Late adult-onset metachromatic leukodystrophy: Dementia and polyneuropathy in a 63-year-old man
Arch. Neurol., 35, 475-7
- Brady, R.O. (1983)
The Enzymes
Academic Press, 16, 409
- Brett, E.M.; Ellis, R.B.; Haas, L.; Ikonne, J.U.; Lake, B.D.; Patrick, A.D.; Stephens, R. (1973) ^{*3)}
Late onset GM2 gangliosidosis: clinical, pathological and biochemical studies on eight patients
Arch. Dis. Child, 48, 775-85
- Burg, J. ; Conzelmann, E. ; Sandhoff, K.; Solomon, E.; Swallow, D.M. (1985) ^{*3)}
Mapping of the gene coding for the human GM2 activator protein to chromosome 5
Ann. Hum. Genet., 49, 41-5
- Burk, R.D.; Valle, D.; Thomas, G.H.; Miller, C.; Moser, A.; Moser, H.; Rosenbaum, K.N. (1984)
Early manifestations of sulfatase deficiency
J. Pediatr., 104, 574-8
- Carroll, M.; Robinson, D. (1973) ^{*3)}
Immunological properties of *N*-acetyl- β -D-glucosaminidase of normal human liver and of GM2 gangliosidosis liver
Biochem. J., 131, 91-6
- Christomanou, H.; Sandhoff, K. (1977) ^{*2)}
A sensitive fluorescence assay for the simultaneous and separate determination of arylsulfatase A and B
Clin. Chim. Acta, 79, 527-31

Conzelmann, E.; Nehr Korn, H.; Kytzia, H.J.; Sandhoff, K.; Macek, M.; Lehovsky, M.; Elleder, Jirasek, A.; Konilkoca, J. (1985)

Prenatal diagnosis of G_{M2} gangliosidosis with high residual hexosaminidase A activity (variant B1; pseudo AB variant)

Pediatr. Res., 19, 1220-4

Conzelmann, E.; Sandhoff, K. (1983)

Partial enzyme deficiencies: Residual activities and the development of neurological disorders

Dev. Neurosci., 6, 58-71

Conzelmann, E.; Sandhoff, K. (1978)

AB variant of infantile G_{M2} gangliosidosis: Deficiency of a factor necessary for stimulation of hexosaminidase A-catalyzed degradation of ganglioside G_{M2} and glycolipid G_{A2}

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3979-83

Conzelmann, E.; Sandhoff, K. (1979)

Purification and Characterization of an activator protein for the degradation of glycolipids GM2 and GA2 by hexosaminidase A

Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem., 360, 1837-49

Conzelmann, E.; Sandhoff, K.; Nehr Korn, H.; Geiger, B.; Arnon, R. (1978)

Purification, biochemical and immunological characterization of hexosaminidase A from variant AB of infantile G_{M2} gangliosidosis

Eur. J. Biochem., 84, 27-33

Conzelmann, E.; Burg J.; Stephan G.; Sandhoff K. (1982)

Complexing of glycolipids and their transfer between membranes by the activator protein for degradation of lysosomal ganglioside GM2.

Eur. J. Biochem., 123(2), 455-64.

Craves, F.B.; Zalc, B.; Leybin, L.; Baumann, N.; Loh, H.H. (1980) *2)

Antibodies to cerebroside sulfate inhibit the effects of morphine and β -endorphin

Science, 207, 75-6

D`Azzo, A.; Hoogeveen, A.; Reuser, A.J.; Robinson, D.; Galjaard, H. (1982)

Molecular defect in combined β -galactosidase and neuraminidase deficiency in man

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 4535-9

Demaerel, P.; Faubert, C.; Wilms, G.; Casaer, P.; Piepgras, U.; Baert, A.L. (1991)

MR findings in leukodystrophy

Neuroradiology, 33, 368-71

- Dingle, J.T.; Dean, R.T.; Sly, W. (1984)
Lysosomes in Biology and Pathology
Elsevier/North-Holland Biomed. Press, 7, p.3
- Dolman, C.L.; Chang, E.; Duke, R.J. (1973) ^{*3)}
Pathologic findings in Sandhoff disease
Arch. Pathol., 96, 272-5
- Donnelly, W.J.; Kelly, M. (1977)
Leukocyte β -galactosidase activity in the diagnosis of bovine G_{M1}-gangliosidosis
Vet. Rec., 100, 318-9
- Donnelly, W.J.; Sheahan, B.J.; Kelly, M. (1973) ^{*1)}
 β -Galactosidase deficiency in G_{M1}-gangliosidosis of Friesian calves
Vres. Vet. Sci., 15, 139-41
- Donnelly, W.J.; Sheahan, B.J.; Rogers, T.A. (1973) ^{*1)}
G_{M1}-gangliosidosis in Friesian calves
J. Pathol., 111, 173-9
- Draper, R.K.; Fiskum, G.M.; Edmond, J. (1976) ^{*2)}
Purification, molecular weight, amino acid, and subunit composition of
arylsulfatase A from human liver
Arch. Biochem. Biophys., 177, 525-38
- Du Bois, G.; Turpin, J.C.; Georges, M.C.; Baumann, N. (1980)
Arylsulfatase A and B in leukocytes: A comparative statistical study of late
infantile and juvenile forms of metachromatic leukodystrophy and controls
Biomedicine, 33, 2-4
- Eto, Y.; Tahara, T.; Koda, N.; Yamaguchi, S.; Ito, F.; Okuno, A. (1982) ^{*2)}
Prenatal diagnosis of metachromatic leukodystrophy. A diagnosis by amniotic
fluid and its confirmation
Arch. Neurol., 39, 29-32
- Feldges, A.; Muller, H.J.; Buhler, E.; Stalder, G. (1973) ^{*1)}
G_{M1}-gangliosidosis. I. clinical aspects and biochemistry
Helv. Paediatr. Acta, 28, 11-9
- Fischer, G.; Reiter, S.; Jatzkewitz, H. (1978) ^{*2)}
Enzymic hydrolysis of sulphosphingolipids and sulphoglycerolipids by
sulphatase A in the presence and absence of activator protein
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 359, 863-6
- Fox, M.F.; Du Toit, D.L.; Warnich, L.; Retief, A.E. (1984) ^{*3)}
Regional localization of alpha-galactosidase (GLA) to Xpter-q22,
hexosaminidase B (HEXB) to 5q13-qter, and arylsulfatase B (ARSB)
Cytogenet. Cell Genet., 38, 45-9

Fricker, H.; O'Brien, J.S.; Vassella, F.; Gugler, E.; Muhlethaler, J.P.; Spycher, M.; Wiesmann, U.N.; Herschkowitz, N. (1976)^{*1)}

Generalized gangliosidosis: Acid β -galactosidase deficiency with early onset, rapid mental deterioration and minimal bone dysplasia
J. Neurol., 213, 273-81

Fürst, W.; Sandhoff, K. (1992)

Activator proteins and topology of lysosomal sphingolipid catabolism
Review Biochim. Biophys. Acta, 1126, 1-16

Fürst, W.; Schubert, J.; Machleidt, W.; Meyer, H.E.; Sandhoff, K. (1990)

The complete amino-acid sequences of human ganglioside G_{M2} activator protein and cerebroside sulfate
Eur. J. Biochem., 192, 709-14

Fujii, T.; Kobayashi, T.; Honke, K.; Gasa, S.; Ishikawa, M.; Shimizu, T.; Makita, A. (1992)

Proteolytic processing of human lysosomal arylsulfatase A
Biochim. Biophys. Acta, 1122, 93-8

Gadella, B.M.; Colenbrander, B.; Van Golde, I.M.G.; Lopes-Cardozo, M. (1992)^{*2)}

Characterization of three arylsulfatases in semen: Seminolipid sulfohydrolase activity is present in seminal plasma
Biochim. Biophys. Acta, 1128, 155-62

Gärtner, S.; Conzelmann, E.; Sandhoff, K. (1983)

Activator protein for the degradation of globotriaosylceramide by human α -galactosidase
J. Biol. Chem., 258, 12378-85

Galjaard, H.; Reuser, A.J.J. (1977)^{*1)}

Clinical, biochemical and genetic heterogeneity in gangliosidoses
In: Harkness, R.A.; Cockburn, F.: Inborn errors of metabolism: the cultured cell, St. Leonardgate, UK, MTP, p139

Galjaard, H.; Willemsen, R.; Hoogeveen, A.T.; Mancini, G.M.; Palmeri, S.; Verheijen, F.W., D'Azzo, A. (1987)^{*1)}

Molecular heterogeneity in human β -galactosidase and neuraminidase deficiency
Enzyme, 38, 132-43

Galjart, N.J.; Gillemans, N.; Harris, A.; van der Horst, G.G.T.; Verheijen, F.W.; Galjaard, H.; d'Azzo, A. (1988)^{*1)}

Expression of cDNA encoding the human protective protein associated with lysosomal β -galactosidase and neuraminidase: Homology to yeast proteases
Cell, 53, 755-64

- Garnter, S.; Conzelmann, E.; Sandhoff, K. (1983)
Activator protein for the degradation of globotriaosylceramide by human α -galactosidase
J. Biol. Chem., 258, 12378-85
- Gebhart, W.; Lassmann, H.; Niebauer, G. (1978) ^{*2)}
Demonstration of specific storage material within cutaneous nerves in metachromatic leukodystrophy
J. Cutan. Pahtol., 5, 5-14
- Geiger, B.; Arnon, R.; Sandhoff, K. (1977)
Immunological and biochemical investigation of hexosaminidase S
Am. J. Hum. Genet., 29, 508-22
- Geiger, B.; Navon, R.; Ben-Yoseph, Y.; Arnon, R. (1975) ^{*3)}
Specific determination of *N*-acetyl- β -D-hexosaminidase isoenzymes A and B by radioimmunoassay and radial immunodiffusion
J. Biochem., 56, 311-8
- Gerber, C. (1995)
Der oxidative Stoffwechsel aktivierter Granulozyten von gesunden Personen im Vergleich zu Personen mit einem Myeloperoxidasemangel
Diplomarbeit, Fakultät für Biologie der Universität Tübingen
- Giugliani, R.; Jackson, M.; Skinner, S.J.; Vimal, C.M.; Fenson, A.H.; Fahmy, N.; Sjovall, A.; Benson, P.F. (1987) ^{*1)}
Progressive mental regression in siblings with Morquio disease type B (mucopolysaccharidoses IV B)
Clin. Genet., 32, 313-25
- Gonatas, N.K.; Gonatas, J. (1965) ^{*1)}
Ultrastructural and biochemical observations on a case of systemic late infantile lipidosis and its relationship to Tay Sachs disease and gargoylism
Neuropathol. Exp. Neurol., 24, 318-40
- Goodman, L.; Livingston, P.O.; Walkley, S.U. (1991)
Ectopic dendrites occur only on cortical pyramidal cells containing elevated GM2 ganglioside in α mannosidosis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 11330-4
- Gravel, R. A.; Clarke, J. T. R.; Kaback, M. M.; Mahuran, D.; Sandhoff, K.; Suzuki, K. (1995)
The G_{M2} Gangliosidosis
In: Scriver(eds.), C.R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D.: "The Metabolic and molecular bases of inherited disease" Chapter 92, McGraw-Hill, Inc., Volume 11, 2839-79

Groebe, H.; Krins, M.; Schmidberger, H.; von Figura, K.; Harzer K.; Kresse, H.; Paschke, E.; Sewell, A.; Ullrich, K. (1980)

Morquio syndrome (mucopolysaccharidosis IV B) associated with β -galactosidase deficiency. Report of two cases.
Am. J. Hum. Genet., 32, 258-72

Hadfield, M.G.; Mamunes, P.; David, R.B. (1977)

The pathology of Sandhoff's disease
J. Pathol., 123, 137-44

Hansson, H.A.; Holmgren, J.; Svennerholm, L. (1977)

Ultrastructural localization of cell membrane GM1 ganglioside by cholera toxin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3782-6

Harzer, K.; Benz, H.U. (1974) ^{*2)}

Deficiency of lactosyl sulfatase in metachromatic leukodystrophy (sulfatidosis)
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 355, 744-8

Hasilik, A.; von Figura K.; Conzelmann E.; Nehr Korn H.; Sandhoff K. (1982)

Lysosomal enzyme precursors in human fibroblasts. Activation of cathepsin D precursor in vitro and activity of beta-hexosaminidase A precursor towards ganglioside GM2.
Eur J Biochem., 125(2), 317-21.

Hechtman, P.; Gordon, B.A.; Ng Ying Kin, N.M. (1982) ^{*3)}

Deficiency of the hexosaminidase A activator protein in a case of G_{M2} gangliosidosis; variant AB
Pediatr. Res., 16, 217-22

Heng, H.H. Q.; Xie, B.; Shi, X.-M.; Tsui, L.-C.; Mahuran, D.J. (1993) ^{*3)}

Refined mapping of the GM2 activator protein (GM2A) locus to 5q31.3-33.1, distal to the spinal muscular atrophy locus
Genomics, 18, 429-31

Hirabayashi, Y.; Li, Y.T.; Li, S.C. (1983) ^{*3)}

The protein activator specific for the enzymic hydrolysis of G_{M2} gangliosidosis in normal human brain of three types of G_{M2} gangliosidosis
J. Neurochem., 40, 168-75

Hiraiwa, M.; O'Brien, J.S.; Kishimoto, Y.; Galdzicka, M.; Fluharty, A.L.; Ginns, E.I.; Martin, B.M. (1993)

Isolation, characterization, and proteolysis of human prosaposin, the precursor of saposins (sphingolipid activator protein)
Arch. Biochem. Biophys., 304, 110-6

- Hoffman, L.M.; Amsterdam, D.; Brooks, S.E.; Schneck, L. (1977) ^{*3)}
Glycosphingolipids in fetal Tay-Sachs disease brain and lung cultures
J. Neurochem., 29, 551-9
- Hoogeveen, A.T.; Verheijen, F.W.; Galjaard, H. (1983)
The relation between human lysosomal β -galactosidase and its protective protein
J. Biol. Chem., 258, 12143-6
- Hooft, C.; Senesael, L.; Delbeke, M.J.; Kint, J.; Dacremont, G. (1969) ^{*1)}
The G_{M1} -gangliosidosis (Landing disease)
Eur. Neurol., 2, 225-41
- Hultberg, B. (1979)
Fluorometric assay of the arylsulphatases in human urine
J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 17, 795-7
- Hyde, T.M.; Ziegler, J.C.; Weinberger, D.R. (1992) ^{*2)}
Psychiatric disturbances in metachromatic leukodystrophy. Insights into the neurobiology of psychosis
Arch. Neurol., 49, 401-6
- Ida, H.; Eeto, Y.; Maekawa, K. (1989) ^{*1)}
Fetal G_{M1} -gangliosidosis: Morphological and biochemical studies
Brain Dev., 11, 394-8
- Ikonne, J.U.; Rattazzi, M.C.; Desnick, R.J. (1975)
Characterization of hex-S, the major residual of β -hexosaminidase activity in type O GM2-gangliosidosis
Am. J. Hum. Genet., 27, 639-50
- Ikeda, S.; Ushiyama, M.; Nakano, T.; Kikkawa, T.; Kondo, K.; Yanagisawa, N. (1986) ^{*1)}
Ultrastructural findings of rectal and skin biopsies in adult G_{M1} -gangliosidosis
Acta Pathol. Jpn., 36, 1823-31
- Jatzkewitz, H.; Mehl, E. (1969) ^{*2)}
Cerebroside-sulphatase and arylsulfatase A deficiency in metachromatic leukodystrophy (ML)
J. Neurochem., 16, 19-28
- Jatzkewitz, H.; Pilz, H.; Sandhoff, K. (1965)
Quantitative Bestimmungen von Gangliosiden und ihren neuraminsäurefreien Derivaten bei infantilen, juvenilen und adulten Formen der amaurotischen Idiotie und einer spätinfantilen biochemischen Sonderform
J. Neurochem., 12, 135-44

- Jatzkewitz, H.; Sandhoff, K. (1963) ^{*1)}
On a biochemically special form of infantile amaurotic idiocy
Biochim. Biophys. Acta, 70, 354-6
- Jatzkewitz, H.; Stinshoff, K. (1973) ^{*1)}
An activator protein of cerebrosid sulfatase in human normal liver and in cases
of congenital metachromatic leucodystrophy
FEBS. Lett., 32, 129-31
- Johnson, W.G.; Chutorian, A.; Miranda, A. (1977) ^{*3)}
A new juvenile hexosaminidase deficiency disease presenting as cerebellar
ataxia. Clinical and biochemical studies.
Neurology, 27, 1012-8
- Jones, C.; Miller, Y.E.; Palmer, D.; Morse, H. ; Kiry, M. ; Patterson, D. (1984) ^{*1)}
Regional mapping of human chromosome 3
Cytogenet. Cell. Genet., 37, 500
- Joss, V.; Rogers, T.R.; Hugh-Jones, K.; Beilby, B.; Joshi, R.; Williamson, S.;
Foroozanfar, N.; Riches, P.; Turner, M.; Benson, P.D.; Hobbs, J.R. (1982) ^{*2)}
A bone marrow transplant for metachromatic leukodystrophy
Exp. Hematol., 10, 52
- Junqueira, L. C.; Carneiro, J. (1996)
Histologie
Springer Verlag, 4. Auflage
- Kaback, M.M.; Sloan, H.R.; Sonneborn, M.; Herndon, R.M. (1973) ^{*1)}
G_{M1}-gangliosidosis type I: in utero detection and fetal manifestations
Pediatrics, 82, 1037-41
- Kappler, J.; von Figura, K.; Gieselmann, V. (1992) ^{*2)}
Late-onset metachromatic leukodystrophy: Molecular pathology in two siblings
Ann. Neurol., 31, 256-61
- Karlsson, K.A. (1989)
Animal glycosphingolipids as membrane attachment sites for bacteria
Ann. Rev. Biochem., 58, 309-50
- Kihara, H.; Porter, M.T.; Fluharty, A.L.; Scott, M.L.; De La Flor, S.D.; Trammell,
J.L.; Nakamura, R.N. (1973) ^{*2)}
Metachromatic leukodystrophy: Ambiguity of heterozygote identification
Am. J. Ment. Defic., 77, 389-94
- Kishimoto, Y. (1983)
The Enzymes
Academic Press., 16, 357

- Kleijer, W.J.; Van der Veer, E.; Niermeijer, M.F. (1976)
Rapid prenatal diagnosis of G_{M1}-gangliosidosis using microchemical methods
Hum. Genet., 33, 299-305
- Kolodny, E.H.; Fluharty, A.L. (1995)
Metachromatic Leukodystrophy and Multiple Sulfatase Deficiency: Sulfatide
Lipidosis
In: Scriver(eds.), C.R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D.: "The Metabolic and
molecular bases of inherited disease" Chapter 88, McGraw-Hill, Inc., Volume
11, p. 2693-2739
- Kolodny, E.; Raghavan, S. (1983) ^{*3)}
G_{M2} gangliosidosis. hexosaminidase mutations not of the Tay-Sachs type
produce unusual clinical variants
Trends Neurosci., 6, 16
- Korneluk, R.G.; Mahuran, D.J.; Neote, K.; Klavins, M.H.; O`Dowd, B.F.; Tropak,
M.; Willard, H.F.; Anderson, M.J.; Lowden, J.A.; Gravel, R.A. (1986)
Isolation of cDNA clones coding for the alpha-subunit of human beta-
hexosaminidase. Extensive homology between the alpha- and beta-subunits
and studies on Tay-Sachs disease
J. Biol. Chem., 261, 8407-13
- Kracun, I.; Rösner, H.; Cosovic, C.; Stavljenic, A. (1984)
Topographical atlas of the gangliosides of the adult human brain
Neurochem., 43, 979-89
- Krivit, W.; Paul., N. (1986) ^{*3)}
Bone marrow transplantation for treatment of lysosomal storage disorder
Birth Defects, 22, 1
- Krivit, W.; Shapiro, E. G. (1991) ^{*2)}
Bone marrow transplantation for storage diseases
In: Desnick, R.J.: Treatment of Genetic Disease, Churchill Livingstone, New
York, p. 203
- Krivit, W.; Shapiro, E. G.; Lockman, L.; Kennedy, W.; Dhuna, A.; Ringden, O.;
Henslee-Downey, J.; Yeager, A.; Wenger, D.; Bayever, E. (1992) ^{*2)}
Recommendations for treatment of metachromatic leukodystrophy by bone
marrow transplantation based on a review of seven patients who have been
engrafted for at least 1 year
Cogent I, in Hobbs Jr.: Correction of certain genetic diseases by
Transplantation , London Westminster Medical School Press, p.57

Kudoh, T.; Kikuchi, K.; Nakamura, F.; Yokoyama, S.; Karube, K.; Tsaguwa, S.; Minami, R.; Nakao, T. (1978) ^{*1)}

Prenatal diagnosis of G_{M1}-gangliosidosis: Biochemical manifestation in fetal tissues

Hum. Genet., 44, 287-93

Kytzia, H.-J.; Sandhoff, K. (1985)

Evidence for two different active sites on human beta-hexosaminidase A.

Interaction of GM2 activator protein with beta-hexosaminidase A.

J. Biol. Chem., 260(12), 7568-72.

Landing, B.H.; Solveman, F.N.; Craig, J.M.; Jacoby, M.D.; Lahey, M.E.; Chadwick, D.L. (1964) ^{*1)}

Familial neurovisceral lipidosis

Am. J. Dis. Child, 108, 503-22

Lee-Vaupel, M.; Conzelmann, E (1987) ^{*2)}

A simple chromogenic assay for arylsulfatase A

Clin. Chim. Acta, 164, 171-80

Leinekugel, P.; Michel, S.; Conzelmann, E.; Sandhoff, K. (1992)

Quantitative correlation between the residual activity of β -hexosaminidase A and arylsulfatase A and the severity of the resulting lysosomal storage disease

Hum. Genet., 88, 513-23

Li, S.C.; Li, Y.T. (1976) ^{*1)}

An activator stimulating the enzymic hydrolysis of sphingoglycolipids

J. J. Biol. Chem., 251, 1159-63

Li, S.-C.; Sonnino, S.; Tettamanti, G., Li, Y.-T. (1988)

Characterization of a nonspecific activator protein for the enzymatic hydrolysis of glycolipids

J. Biol. Chem., 263, 6588-91

Li, Y.-T.; Li, S.-C. (1984)

Activator proteins related to the hydrolysis of glycosphingolipids catalyzed by lysosomal glycosidases

In: Dingle, J.T.; Dean, R.T.; Sly, W.: Lysosomes ii biology and pathology.

Elsevier Science Publ. B.V., 99-117

Li, Y.-T.; Muhivdeen, I.A., de Gasperi, R.; Hirabayashi, Y.; Li, S.-C (1983) ^{*2)}

Presence of activator proteins for the enzymatic hydrolysis of GM1 and GM2 gangliosides in normal human urine

Am. J. Hum. Genet., 35, 629-34

Libert J.; Vanhoff, F.; Toussaint, D.; Roozitalab, H.; Kenyon, K.R.; Green, W.R. (1979) ^{*2)}

Ocular findings in metachromatic leukodystrophy: An electron microscopic and enzyme study in different clinical and genetic variants
Arch Ophthalmol., 97, 1495-504

Loh, H.H.; Law, P.Y.; Ostwald, T.; Cho, T.M.; Way, E.L. (1978) ^{*2)}

Possible Involvement of cerebroside sulfate in opiate receptor binding
Fed. Proc., 37, 147-52

London, Y.; Vossenberg, F.G.A. (1973) ^{*2)}

Specific interaction of central nervous system myelin basic protein with lipid
Biochim. Biophys. Acta, 487, 478-90

Louis, A.I.; Fluharty, A.L. (1991)

Activator-dependent hydrolysis of myelin cerebroside by arylsulfatase A
Dev. Neurosci., 13, 41-6

Lowden, J.A.; Callahan, J.W.; Norman, M.G. (1974) ^{*1)}

Juvenile G_{M1}-gangliosidosis. Occurrence with absence of two β -galactosidase components
Arch. Neurol., 31, 200-3

Lowden, J.A.; Cutz, E.; Conen, P.E.; Rudd, N.; Doran, T.A. (1973) ^{*1)}

Prenatal diagnosis of G_{M1}-gangliosidosis
N. Engl. J. Med., 288, 225-8

Löffler, G.; Petrides, P. (1998)

Biochemie und Pathobiochemie
Springer Verlag, 6. Auflage

MacLeod, P.M.; Wood, S.; Jan, J.E.; Applegarth, D.A.; Dolman, C.L. (1977)

Progressive cerebellar ataxia, spasticity, psychomotor retardation, and hexosaminidase deficiency in a 10-year-old child: Juvenile Sandhoff's disease
Neurology, 27, 571-3

Mandon, E.; Ehses, I.; Rother, J.; van Echten, G.; Sandhoff, K.; (1992) ^{*3)}

Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver

J. Biol. Chem., 267, 11144-8

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

Specific gangliosides function as host cell receptor for Sendai virus
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 5606-10

McKusick, V.A. (1972) ^{*1)}

Heritable disorders of Connective Tissue
4th edition St. Louis, Mosby

Mehl, E.; Jatzkewitz, H. (1964) ^{*1)}

Eine Cerebrosidsulfatase aus Schweineniere
Hoppe Seyler Z. Physiol. Chem., 339, 260-76

Mehl, E.; Jatzkewitz, H. (1968) ^{*1)}

Cerebroside-3-sulfate as a physiological substrat of arylsulfatase A
Biochim. Biophys. Acta, 151, 619-27

Meikle, P.J.; Hopwood, J.J.; Clague, W.F.; Carey, W.F. (1999)

Prevalence of Lysosomal Storage Disorders
JAMA, 281, 249-254

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-I as a diagnostic marker
Clinical Chemistry, 43(8), 1325-35

Menkes, J.H.; O'Brien, J.S.; Okada, S.; Grippo, J.; Andrews, J.M.; Cancilla,
P.A. (1971) ^{*3)}

Juvenile G_{M2} gangliosidosis. Biochemical and ultrastructural studies in a new
variant of Tay-Sachs disease
Arch Neurol., 25, 14-22

Mihatsch, M.J.; Ohnacker, H.; Riede, U.N.; Remagen, W.; von Bassewitz, D.B.;
Schuppler, J.; Meier-Ruge, W. (1973) ^{*1)}

G_{M1}-gangliosidosis. II. ;Morphological aspects and review of the literature
Helv. Paediatr. Acta, 28, 251-42

Müller, D.; Pilz, H.; Muelen, V.T. (1969) ^{*2)}

Studies on adult metachromatic leukodystrophy. Part1. Clinical, morphological
and histochemical observations in two cases
J. Neurol. Sci., 9, 567-84

Nakagawa, S.; Kumin, S.; Fox, D.; Notowsky, H.M. (1978)

Human hexosaminidase isozymes. III. Distribution and activity of isozymes in
peripheral blood leukocytes and platelets.
J. Lab. Clin. Med., 91(6), 922-8.

Nakagawa, S.; Kumin, S.; Notowsky, 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

- Naylor., S.L.; Elliott, R.W.; Brown, J.A.; Shows, T.B. (1982) ^{*1)}
Mapping of amino-acylase-1 and β -galactosidase-A to homologous regions of human chromosome 3 and mouse chromosome 9 suggests location of additional genes
Am. J. Hum. Genet., 34, 235-44
- Neufeld, E.F.; Lim, T.W.; Shapiro, L.J. (1975)
Inherited disorders of lysosomal metabolism
Ann. Rev. Biochem., 44, 357-76
- Nihei, K.; Abe, T.; Kamashita, S.; Suzuki, M. (1972) ^{*1)}
An autopsy case of generalized gangliosidosis
Clin. Neurol., 12, 329-38
- Norden, A.G.W.; O'Brien, J.S. (1973) ^{*1)}
Ganglioside G_{M1}- β -galactosidase: Studies in human liver and brain
Arch. Biochem. Biophys., 159, 383-92
- Norton, W.T.; Poduslo, S.E. (1973) ^{*2)}
Myelination in rat brains: Changes in myelin composition during brain maturation
J. Neurochem., 21, 759-73
- O'Brien, J.S. (1969) ^{*1)}
Generalized gangliosidosis
J. Pediatr., 75, 167-86
- O'Brien, J.S. (1975) ^{*1)}
Molecular genetics of G_{M1}- β -gangliosidase.
Clin. Genet., 8, 303-13
- O'Brien, J.S. (1989) ^{*1)}
 β -Galactosidase deficiency (β -Galactosialidosis, and Morquio syndrome Type B); ganglioside sialidase deficiency (mucopolipidosis IV)
In: Scriver C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D.: The Metabolic Basis of Inherited Disease, 6th ed. New York, McGraw-Hill, vol.2, p.1797
- O'Brien, J.S (1983)
The gangliosidosis
In: Stanbury, J.S.; Wyngaarden, J.B.; Fredrickson, D.S.; Goldstein, J.L.; Brown, M.S. (eds): The Metabolic Basis of Inherited Disease, 5th ed. McGraw Hill, New York, 945-69
- O'Brien, J.S.; Gugler, E.; Giedion, A.; Wiessmann, U.; Herschkowitz, N.; Meier, C.; Leroy, J. (1976) ^{*1)}
Spondyloepiphyseal dysplasia, corneal clouding, normal intelligence and acid β -galactosidase deficiency
Clin. Genet., 9, 495-504

- O'Brien, J.S.; Ho, M.W.; Veath, M.L.; Wilson, J.F.; Myers, G.; Opitz, J.M.; Zu Rhein, G.M.; Spranger, J.W.; Hartmann, H.A.; Haneberg, B.; Grosse, F.R. (1972) ^{*1)}
Juvenile G_{M1}-gangliosidosis: Clinical, pathological, chemical and enzymatic studies
Clin. Genet., 3, 411-34
- O'Brien, J.S.; Stern, M.B.; Landing, B.H., O'Brien, J.K., Donell, G.N. (1965) ^{*1)}
Generalized gangliosidosis. Another inborn error of metabolism ?
Am. J. Dis. Child., 109, 338-46
- O'Brien, J.S.; Storb, R.; Raff, R.F., Harding, J.; Appelbaum, A.; Morimoto, S.; Kishimoto, Y.; Graham, T.; Ahern Rindell, A.; O'Brien, S.L. (1990)
Bone marrow transplantation in canine G_{M1}-gangliosidosis
Clin. Genet., 38, 274-80
- Okada, S.; O'Brien, J.S. (1968) ^{*1)}
Generalized gangliosidosis: β -galactosidase deficiency
Science, 160, 1002-4
- Okada, S.; O'Brien, J.S. (1969) ^{*3)}
Tay-Sachs disease: generalized absence of a beta-D-N-acetylhexosaminidase component
Science, 165, 698-700
- Patel, V.; Goebel, H.H.; Watanabe, I.; Zeman, W. (1974) ^{*1)}
Studies in G_{M1}-gangliosidosis, type II.
Acta Neuropathol. (Berl.), 30, 155-73
- Pellkofer, R.; Sandhoff, K. (1980)
Halothane increases membrane fluidity and stimulates sphingomyelin degradation by membrane-bound neutral sphingomyelinase of synaptosomal plasma membranes from calf brain already at clinical concentrations.
J. Neurochem., 34, 988-92
- Percy, A.K.; Brady, R.O. (1968) ^{*2)}
Metachromatic leukodystrophy: Diagnosis with samples of venous blood
Science, 161, 594-5
- Percy, A.K.; Farrell, D.F.; Kaback, M.M. (1972) ^{*2)}
Cerebroside sulphate (sulphatide) sulphohydrolase: An improved assay method
J. Neurochem., 19, 233-6
- Perusini, G. (1910) ^{*2)}
Über klinisch und histologisch eigenartige psychische Erkrankungen des späteren Lebensalters
Nissl-Alzheimer's Histol. Histopathol. Arb., 3, 297

Petersen G.M.; Rotter J.I.; Cantor R.M.; Field L.L.; Greenwald S.; Lim J.S.; Roy C.; Schoenfeld V.; Lowden J.A.; Kaback M.M. (1983)
The Tay-Sachs disease gene in North American Jewish populations:
geographic variations and origin
Am. J. Hum. Genet., 35, 1258-69

Porter, M.T.; Fluharty, A.; Trammell, J.; Kihara, H. (1971) ^{*2)}
A correlation of intracellular cerebrosid sulfatase activity in fibroblasts with
latency in metachromatic leukodystrophy
Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 660-6

Pronicka, E.; Tylki, A.; Czartoryska, B.; Gorska, D. (1981) ^{*1)}
Three cases of β -galactosidase deficiency
Klin. Padiatr., 193, 343-6

Purpura, D.P. (1978) ^{*1)}
Ectopic dendritic growth in mature pyramidal neurones in human ganglioside
storage disease
Nature, 276, 520-1

Purpura, D.P.; Baker, H.J. (1978) ^{*1)}
Meganeurites and other aberrant processes of neurons in feline G_{M1}-
gangliosidosis: A Golgi study
Brain Res., 143, 13-26

Purpura, D.P.; Pappas, G.D.; Baker, H.J. (1978) ^{*1)}
Fine structure of meganeurites and secondary growth processes in feline G_{M1}-
gangliosidosis
Brain Res., 143, 1-12

Purpura, D.P.; Suzuki, K. (1976) ^{*3)}
Distortion of neuronal geometry and formation of aberrant synapses in neuronal
storage disease
Brain Res., 116, 1-21

Rafi, M.A.; Amini, S.; Zhang, X.-L.; Wenger, D.A. (1992)
Correction of sulfatide metabolism after transfer of prosaposin cDNA to cultured
cells from a patient with SAP-1 deficiency
Am. J. Hum. Genet., 50, 1252-8

Raghavan, S.A.; Gajewski, A.; Kolodny, E.H. (1977)
G_{M1}-ganglioside β -galactosidase in leukocytes and cultured fibroblasts
Clin. Chim. Acta, 81, 47-56

Raghavan, S.; Krusell, A.; Lyster, T.A.; Bremer, E.G.; Kolodny, E.H. (1985)
G_{M2} gangliosidosis metabolism in cultured human skin fibroblasts: Unambiguous
diagnosis of G_{M2} gangliosidosis
Biochim. Biophys. Acta, 834, 238-48

- Rapin, I.; Suzuki, K.; Suzuki, K.; Valsamis, M.P. (1976) ^{*3)}
Adult (chronic) G_{M2} gangliosidosis – A typical spinocerebellar degeneration in a Jewish sibship
Arch. Neurol., 33, 120-30
- Read, C.R. (1967) ^{*2)}
Screening for metachromatic leukodystrophy
J. Clin. Pathol., 20, 301-2
- Read, D.H.; Harrington, D.D.; Keenana, T.W.; Hinsman, E.J. (1976) ^{*1)}
Neuronal-visceral G_{M1}-gangliosidosis in a dog with β-galactosidase deficiency
Science, 194, 442-5
- Reynolds, G.C.; Baker, H.J.; Reynolds, R.H. (1978)
Enzyme replacement using liposome carriers in feline G_{M1}-gangliosidosis fibroblasts
Nature, 275, 754-5
- Rice, W.G.; Kinkade, J.M.; Parmley, R.T. (1986)
High Resolution of Heterogeneity Among Human Neutrophil Granules: Physical, Biochemical, and Ultrastructural Properties of Isolated Fractions
Blood, 68, 541-55
- Riede, U.-N.; Schaefer, H.-E. (1999)
Allgemeine und spezielle Pathologie
Georg Thieme Verlag, 4. aktualisierte Auflage
- Roels, H (1970) ^{*1)}
Generalized G_{M1}-gangliosidosis: An electron-microscopic study of the brain
Arch. Dis. Child, 45, 150
- Rommerskirch, W.; Fluharty, A.L.; Peters, C.; Von Figura, K.; Gieselmann, V. (1991)
Restoration of arylsulfatase A activity in human metachromatic leukodystrophy fibroblasts via retroviral-vector-mediated gene transfer
Biochem. J., 280, 459-61
- Sandhoff, K. (1969) ^{*3)}
Variation of beta-D-N-acetylhexosaminidase-pattern in Tay-Sachs disease
FEBS lett., 4, 351-54
- Sandhoff, K. (1994)
Glykolipide der Zelloberfläche und Pathobiochemie der Zelle
Konrad Sandhoff-Opladen, Westdt. Verlag

- Sandhoff, K.; Andreae, U.; Jatzkewitz, H. (1968) ^{*3)}
Deficient hexosaminidase activity in an exceptional case of Tay-Sachs disease with additional storage of kidney globoside in visceral organs
Pathol. Eur., 3, 278-85
- Sandhoff, K.; Christomanou, H. (1979)
Biochemistry and genetics of gangliosidoses
Hum. Genet., 50, 107-43
- Sandhoff, K.; Conzelmann, E. (1984)
The biochemical basis of gangliosidoses
Neuropediatrics, 15 (suppl), 85-92
- Sandhoff, K.; Conzelmann, E.; Neufeld, E.F.; Kanack, M.M.; Suzuki, K. (1989)
The GM2 gangliosidoses
In: Scriver, C.R.; Beaudet, A.L.; Sly, W.S.; Valle, D.: The Metabolic Basis of Inherited disease
New York, McGraw- Hill, p.1807
- Sandhoff, K.; Harzer, K.; Wässle, W.; Jatzkewitz, H. (1971)
Enzyme alterations and lipid storage in three variants of Tay-Sachs disease
J. Neurochem., 18, 2469-89
- Sandhoff, K.; Pallmann, B. (1987)
Membrane-bound neuraminidase from calf brain: regulation of oligosialoganglioside degradation by membrane fluidity and membrane components.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 122-6
- Sandhoff, K.; Quintern, L. (1988)
Zentralnervöse Sphingolipid-Speicherkrankheiten
Naturwissenschaften, 75, 123-31
- Saunders, G.K.; Wood, P.A.; Myers, R.K.; Shell, L.G.; Carithers, R. (1988) ^{*1)}
GM₁-Gangliosidosis in Portuguese water dogs: Pathologic and biochemical findings
Vet. Pathol., 25, 265-9
- Scott, R.C.; Lagunoff, D.; Trump, B.F. (1967) ^{*1)}
Familial neurovisceral lipidosis
J. Pediatr., 71, 357-66
- Seyfried, T.N.; Miyazawa, N.; Yu, R.K. (1983) ^{*3)}
Cellular localization of gangliosides in the developing mouse cerebellum: Analysis using the weaver mutant
J. Neurochem., 41, 491-505

- Schmidt, R.; Von Figura, K.; Paschka, E.; Kresse, H. (1977)
Sanfilippo's disease type A: sulfamidase activity in peripheral leukocytes of normal, heterozygous and homozygous individuals.
Clin. Chim. Acta, 80, 7-15
- Schröder, M.; Schnabel, D.; Hunoitz, R.; Young, E.; Suzuki, K.; Sandhoff, K. (1993)
Molecular genetics of G_{M2} gangliosidosis AB variant: A novel mutation and expression in BHK cells
Human. Genet., 92, 437-40
- Seringe, P.; Plainfosse, B.; Lautmann, F.; Lorilloux, J.; Galamy, G.; Berry, J.P.; Watchi, J-M. (1968) ^{*1)}
Gangliosidose généralisée, du type Normann-Landing, à G_{M1}
Ann. Pediatr. (Paris), 15, 165-84
- Shannon, W.A.; Zellmer, D.M. (1983)
Arylsulphatase-containing granules in rabbit polymorphonuclear leukocytes
Histochemical Journal, 15, 201-9
- Singer, H.S.; Schafer, I.A. (1972) ^{*1)}
Clinical and enzymatic variations in G_{M1} generalized gangliosidosis
Am. J. Hum. Genet., 24, 454-63
- Snyder, P.D.; Krivit, W.; Sweeley, C.C. (1972)
Generalized accumulation of neutral glycosphingolipids with G_{M2} ganglioside accumulation in the brain
J. Lipid Res., 13, 128-36
- Sonderfeld, S.; Conzelmann E.; Schwarzmann G.; Burg J.; Hinrichs U.; Sandhoff K. (1985)
Incorporation and metabolism of ganglioside GM2 in skin fibroblasts from normal and GM2 gangliosidosis subjects.
Eur. J. Biochim., 149, 247-55
- Sonnino, S.; Acquotti, D.; Riboni, L.; Giuliani, A.; Kirschner, G.; Tettamanti, G. (1986)
New chemical trend in ganglioside research
Chem. Phys. Lipids, 42, 3-26
- Srivastava, S.; Beutler, E. (1974)
Studies on human β -D-N-acetyl-hexosaminidases. III. Biochemical genetics of Tay-Sachs and Sandhoff's disease
J. Biol. Chem., 249, 2054-7

Stevens, R.L.; Fluharty, A.L.; Kihara, H.; Kaback, M.M.; Shapiro, L.J.; Marsh, B.; Sandhoff, K.; Fischer, G. (1981)

Cerebroside sulfatase activator deficiency induced metachromatic leukodystrophy

Am. J. Hum. Genet., 33, 900-6

Strecker, G.; Herlant-Peers, M.-C.; Fournet, B.; Montreuil, J.; Dorland, L.; Haverkamp, J.; Vliegthart, J.F.G. (1977) ^{*3)}

Structure of seven oligosaccharides excreted in the urine of a patient with Sandhoff's disease (GM2 gangliosidosis-variant O)

Eur. J. Biochem., 81, 165-71

Suzuki, K. (1968)

Cerebral GM₁-gangliosidosis: Chemical pathology of visceral organs

Science, 159, 1471-2

Suzuki, K.; Chen, G.H. (1967) ^{*2)}

Isolation and chemical characterization of metachromatic granules from a brain with metachromatic leukodystrophy

J. Neuropathol. Exp. Neurol., 26, 537-50

Suzuki, K.; Chen, G.H. (1968) ^{*1)}

GM₁-gangliosidosis (generalized gangliosidosis). Morphology and chemical pathology.

Pathol. Eur., 3, 389-408

Suzuki, K.; Chen, G.H. (1968) ^{*1)}

Morphological, histochemical and biochemical studies on a case of systemic late infantile lipidosis (generalized gangliosidosis)

J. Neuropathol. Exp. Neurol., 27, 15-38

Suzuki, K.; Kamoshita, S. (1969) ^{*1)}

Chemical pathology of GM₁-gangliosidosis (generalized gangliosidosis)

J. Neuropathol. Exp. Neurol., 28, 25-73

Suzuki, K.; Rapin, I.; Suzuki, Y.; Ishii, N. (1970) ^{*3)}

Juvenile GM₂ gangliosidosis: Clinical variant of Tay-Sachs disease or a new disease

Neurology, 20, 190-204

Suzuki, Y.; Crocker, A.C.; Suzuki, K. (1971) ^{*1)}

GM₁-gangliosidosis. Correlation and clinical and biochemical data

Arch. Neurol., 24, 58-64

Suzuki, Y.; Furukawa, T.; Hoogeveen, A.T.; Verheijen, F.; Galjaard, H. (1979) ^{*1)}

Adult type GM₁-gangliosidosis: A complementation study on somatic cell hybrids

Brain. Dev., 1, 83-6

- Suzuki, Y.; Sakuraba, H.; Oshima, A. (1995)
β-Galactosidase Deficiency (β-Galactosidosis): G_{M1} Gangliosidoses and Morquio B Disease
In: Scriver(eds.), C.R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D.: "The Metabolic and molecular bases of inherited disease" Chapter 90, McGraw-Hill, Inc., Volume 11, p. 2785-2823
- Suzuki, Y.; Sakuraba, H.; Yamanaka, T.; Ko, Y.-M.; Iimori, Y.; Okamura, Y.; Hoogeveen, A.T. (1985)^{*1)}
Galactosialidosis: A comparative study of clinical and biochemical data on 22 patients
In: Arima, M.; Suzuki, Y.; Yabuuchi, H.: The developing Brain and Its Disorders, Basel, Karger, p.161
- Suzuki, K.; Vanier, M.T. (1991)^{*3)}
Biochemical and molecular aspects of late-onset G_{M2} gangliosidosis: B1 variant as a prototype
Dev. Neurosci., 13, 288-94
- Svennerholm, L. (1984)
Biological significans of gangliosides
In: Dreyfus, H.; Massarelli, R.; Freysz, L.; Rebel, G.: Cellular and Pathological Aspects of Glycoconjugate Metabolism; 126, p.21, Inserm, France
- Swallow, D.M.; Islam, I.; Fox, M.F.; Povey, S.; Klima, H.; Schepers, U.; Sandhoff, K. (1993)^{*3)}
Regional localization of the gene coding for the GM2 activator protein (GM2A) to chromosome 5q32-33 and confirmation of the assignement of GM2AP to chromosome 3
Ann. Hum. Genet., 57, 187-93
- Sweeley, C.C.; Siddiqui, B. (1991)^{*3)}
Chemistry of mammalian glycolipids
In: Pigman, W.; Horowitz, M.F.: The Glycoconjugates
New York, Academic, p.459
- Takeda, K.; Nakai, H.; Hagiwara, H.; Tada, K.; Shows, T.B.; Byers, M.G.; Myerowitz, R. (1990)^{*3)}
Fine assignement of beta-hexosaminidase A alpha-subunit on 15q23-q24 by high resolution in situ hybridisation
Tohoku J. Exp. Med., 160, 203-11
- Tanaka, A.; Higami, S.; Isshiki, G.; Matsumoto, T.; Furusawa, M. (1983)
Immunofluorescence staining, and immunololgical studies of arylsulfatase deficiency (MSD) and metachromatic leukodystrophy (MLD) fibroblasts
J. Inherit. Metab. Dis., 6, 21-6

- Tanaka, H.; Meisler, M.; Suzuki, K. (1975) ^{*1)}
Activity of human hepatic β -galactosidase toward natural glycosphingolipid substrates
Biochim. Biophys. Acta, 398, 452-63
- Tanaka, H.; Suzuki, K. (1976) ^{*1)}
Specificities of the two genetically distinct β -galactosidases in human sphingolipidoses
Arch. Biochem. Biophys., 175, 332-40
- Terry, R.D.; Weiss, M. (1963) ^{*1)}
Studies in Tay-Sachs disease. II. Ultrastructure of the cerebrum
J. Neuropathol. Exp. Neurol., 22, 18-55
- Thomas, G.H.; Howell, R.R. (1972) ^{*2)}
Arylsulfatase A activity in human urine: Quantitative studies in patients with lysosomal disorder including metachromatic leukodystrophy
Clin. Chim. Acta, 36, 99-103
- Trinchera, M.; Fabbri, M.; Ghidoni, R. (1991)
Topography of glycosyltransferases involved in the initial glycosylations of gangliosides
J. Biol. Chem., 266, 20907-12
- Trojak, J.E.; Ho, C.K.; Roesel, R.A.; Levin, L.S.; Kopits, S.E.; Thomas, G.H.; Toma, S. (1980) ^{*1)}
Morquio like syndrome (MPS IVB) associated with deficiency of a β -galactosidase
John Hopkins med. J., 146, 75-9
- Ushiyama, M.; Hanyu, N.; Ikeda, S.; Yanagisawa, N. (1986) ^{*1)}
A case of type III (adult) G_{M1} -gangliosidosis that improved markedly with trihexyphenidyl
Clin. Neurol., 26, 221-7
- Ushiyama, M.; Ikeda, S.; Nakayama, J.; Yanagisawa, N.; Hanyu, N.; Katsuyama, T. (1985) ^{*1)}
Type III (chronic) G_{M1} -gangliosidosis. Histochemical and ultrastructural studies of rectal biopsy
J. Neurol. Sci., 71, 209-23
- Van Gemund, J.J.; Giesberts, M.A.; Eerdams, R.F.; Blom, W.; Kleijer, W.J. (1983) ^{*1)}
Morquio-B disease, spondyloepiphyseal dysplasia associated with acid β -galactosidase deficiency. Report of three cases in one family
Hum. Genet., 64, 50-4

- Vanier, M.T.; Holm, M.; Ohman, R.; Svennerholm, L. (1971) ^{*3)}
Developmental profiles of gangliosides in human and rat brain
J. Neurochem., 18, 581-92
- Verheijen, F.; Palmeri, S.; Galjaard, H. (1987)
Purification and partial characterization of lysosomal neuraminidase from
human placenta
Eur. J. Biochem., 162, 63-7
- Verheijen, F.; Palmeri, S.; Hoogeveen, A.T.; Galjaard, H. (1985) ^{*1)}
Human placental neuraminidase. Activation, stabilization and association with
beta-galactosidase and its protective protein
Eur. J. Biochem., 149, 315-21
- Voet, D.; Voet, J. G. (1995)
Biochemistry, 2nd edition
John Wiley&Sons, Inc.
- Von Figura, K.; Steckel, F.; Hasilik, A. (1983)
Juvenile and adult metachromatic leukodystrophy: partial restoration of
arylsulfatase A (cerebrosidase) activity by inhibitors of thiol proteinases.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 6066-70
- Vogel, A.; Schwarzmann, G.; Sandhoff, K. (1991) ^{*2)}
Glycosphingolipid specificity of the human sulfatide activator protein
Eur. J. Biochem., 200, 591-7
- Waheed, A.; Hasilik, A.; Von Figura, K. (1982) ^{*2)}
Synthesis and processing of arylsulfatase A in human skin fibroblasts
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 363, 425-30
- Waheed, A.; Pohlmann R.; Hasilik A.; von Figura K.; van Elsen A.; Leroy JG.
(1982)
Deficiency of UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-
acetylglucosamine-1-phosphotransferase in organs of I-cell patients.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 105, 1052-8
- Walkley, S.; Blakemore, W.; Purpura, D. (1981) ^{*3)}
Alterations in neuron morphology in feline mannosidosis: A golgi study
Acta Neuropathol. Exp., 53, 75-9
- Walkley, S.; Haskins, M. (1982) ^{*3)}
Aberrant neurite and meganeurite development in a feline model of
mucopolysaccharidosis (MPS) type 1 as revealed by the Golgi method
Soc. Neurosci., Abstr.8, 1009

- Walkley, S.U. (1988) ^{*3)}
Pathobiology of neuronal storage disease
Int. Rev. Neurobiol., 29, 191-244
- Walton, K.M.; Sandberg, K.; Rodgers, T.B.; Schnaar, R.L. (1988)
Complex ganglioside expression and tetanus toxin binding by PC12 pheochromozytoma cells
J. Biol. Chem., 263, 2055-63
- Warner, T.G.; De Kremer, R.D.; Applegarth, D.; Mock, A.K. (1986)
Diagnosis and characterization of G_{M2} gangliosidosis type II (Sandhoff's disease) by analysis of the accumulating N-acetyl-glucosaminyl oligosaccharides with high performance liquid chromatography
Clin. Chim. Acta, 154, 151-64
- Warner, T.G.; Robertson, A.D.; Mock, A.K.; Johnson, W.G.; O'Brien, J.S. (1983)
Prenatal diagnosis of G_{M1}-gangliosidosis by detection of galactosyloligosaccharides in amniotic fluid with high-performance liquid chromatography
Am. J. Hum. Genet., 35, 1034-41
- Willner, J.P.; Grabowski, G.A.; Gordon, R.E.; Bender, A.N.; Desnick, R.J. (1981) ^{*3)}
Chronic G_{M2} gangliosidosis masquerading as atypical Friedreich ataxia: Clinical, morphologic and biochemical studies of nine cases
Neurology, 31, 787-98
- Wenger, D.A.; Inui, K. (1984) ^{*1)}
Studies on the sphingolipid activator protein for the enzymatic hydrolysis of G_{M1}-ganglioside and sulfatide
In: Barranger, J.A.; Brady, R.O.: Molecular Basis of Lysosomal Storage Disorders. New York, Academic, p.61
- Xie, B.; Wang, W.; Mahuran, D.J. (1992) ^{*3)}
A Cys₁₃₈ to Arg substitution in the G_{M2} activator protein is associated with the AB variant form of G_{M2} gangliosidosis
Am. J. Hum. Genet., 50, 1046-52
- Yamashita, K.; Ohkura, T.; Okada, S; Yabuuchi, H.; Kobata, A. (1981) ^{*1)}
Urinary oligosaccharides of G_{M1}-gangliosidosis. Different excretion patterns of oligo-saccharides in the urine of type I and type 2 subgroups
J. Biol. Chem., 256, 4789-98

Yoshida, K; Oshima, A.; Sakuraba, H.; Nakano, T.; Yanagisawa, N.; Inui, K.; Okada, S.; Uyama, E.; Namba, E.; Kondo, K.; Iwasaki, S.; Takamiya, K.; Suzuki, Y. (1992) ^{*1)}

G_{M1}-gangliosidosis in adults: Clinical and molecular analysis of 16 Japanese patients

Ann. Neurol., 31, 328-32

Yoshida, K; Oshima, A.; Shimmoto, M.; Fukuhara, Y.; Sakuraba, H.; Yanagisawa, N.; Suzuki, Y. (1991) ^{*1)}

Human β -galactosidase gene mutations in G_{M1}-gangliosidosis: A common mutation among Japanese adult/chronic cases

Am. J. Hum. Genet., 49, 435-42

*1) = Literaturangabe übernommen aus: Suzuki, Y.; Sakuraba, H.; Oshima, A. (1995)
 β -Galactosidase Deficiency (β -Galactosidosis): G_{M1} Gangliosidosis and Morquio B Disease
In: Scriver(eds.), C.R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D.: "The Metabolic and molecular bases of inherited disease" Chapter 90, McGraw-Hill, Inc., Volume 11, p. 2785-2823

*2) = Literaturangabe übernommen aus: Kolodny, E.H.; Fluharty, A.L. (1995)
Metachromatic Leukodystrophy and Multiple Sulfatase Deficiency: Sulfatide Lipidosis
In: Scriver(eds.), C.R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D.: "The Metabolic and molecular bases of inherited disease" Chapter 88, McGraw-Hill, Inc., Volume 11, p. 2693-2739

*3) = Literaturangabe übernommen aus: Gravel, R. A.; Clarke, J. T. R.; Kaback, M. M.; Mahuran, D.; Sandhoff, K.; Suzuki, K. (1995)
The G_{M2} Gangliosidosis
In: Scriver(eds.), C.R.; Beaudet, A. L.; Sly, W. S.; Valle, D.: "The Metabolic and molecular bases of inherited disease" Chapter 92, McGraw-Hill, Inc., Volume 11, p. 2839-2879

LEBENS LAUF

Name	Sebastian Georg Christopher Strobel
Geburtstag	28. Mai 1977
Geburtsort	Burlington, Vermont, USA
Eltern	Ingrid Strobel, Lehrerin (GHS) Gerhard Strobel, Dipl.-Ing., Wirtsch.-Ing.
Geschwister	Katrin Hable, geb. Strobel, Studienrätin Stefanie Strobel, Studienrätin

SCHULAU SBILDUNG

1983 – 1987	Spitalschule Leonberg
1987 – 1996	Albert-Schweitzer-Gymnasium, Leonberg
1996	Abitur

ZIVILD IENST

08/1996 – 09/1997	Rettungsdienst des Deutschen Roten Kreuzes
09/1997	Ausbildung zum Rettungssanitäter

STUDIUM

seit 04/1998	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
03/2000	Ärztliche Vorprüfung in Tübingen
03/2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen
08/2001	Step 1 USMLE (United States Medical Licensing Examination) in München
08/2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in Tübingen
09/2003	Wechsel an die Ludwig-Maximilians-Universität München für das Praktische Jahr
10/2003 bis 10/2004	Praktisches Jahr in San Antonio (USA), Burlington (USA), München-Harlaching und Schwyz (Schweiz)
16/11/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in München

BERUF

seit 02/05	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin am Katharinenhospital Stuttgart
------------	---

DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. G. Bruchelt für die Überlassung des Themas und die Korrektur der vorliegenden Arbeit. Ganz herzlich danken möchte ich ihm insbesondere für die große Unterstützung sowohl in praktischen als auch theoretischen Fragen. Er betreute mich umfassend im Labor und beim „Zusammenschreiben der Arbeit“. Stets hatte er ein offenes Ohr für alle aufkommenden Fragen und Sorgen.

Mein Dank gilt des Weiteren auch Frau Dr. Kuçi und Frau Dr. Gerber, denen ich für die freundliche Zusammenarbeit und auch ihre Bereitschaft, mir bei allen anfallenden Problemen und Herausforderungen des Laboralltags mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, danken möchte.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Backes bedanken, die mich in die Nachweisverfahren der Sphingolipidosen einführte. Sie war ebenso wie die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Hämatologischen Labors jederzeit sehr hilfsbereit und freundlich. Vielen Dank für die Unterstützung !

Meinen Eltern und Geschwistern möchte ich dafür danken, dass sie mir das Studium ermöglicht und mich immer liebevoll unterstützt haben.