

Präparative zweidimensionale Trennung von Membranproteinen am Beispiel des humanen lysosomalen Proteoms

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Bernd Kösters

aus
Gronau/Westfalen

Marburg/Lahn 2001

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
03.12.2001 angenommen.

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. M. Marahiel

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. A. Hasilik

Tag der Disputation am 04.12.2001

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....IV

1 ZUSAMMENFASSUNG 1

2 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG 1

2.1 EINLEITUNG..... 1

2.1.1 Lysosomen 1

2.1.2 Aufbau und Entstehung der Lysosomen 3

2.1.3 Die Proteine der lysosomalen Membran 7

2.1.4 Transportsysteme der lysosomalen Membran..... 9

2.1.5 Genetische Defekte des lysosomalen Membrantransports..... 17

2.1.6 Membranproteine in der Proteom-Forschung 20

2.2 AUFGABENSTELLUNG 23

3 MATERIAL UND METHODEN 24

3.1 MATERIAL 24

3.1.1 Chemikalien 24

3.1.2 Enzyme und Antikörper..... 26

3.1.3 Geräte 26

3.1.4 Sonstige Materialien..... 27

3.2 METHODEN..... 28

3.2.1 Präparation von Lysosomen aus humaner Plazenta 28

3.2.1.1 Isolierung des Organellenkonzentrats 28

3.2.1.2 Dichtegradientenzentrifugation des Organellenkonzentrats 29

3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford..... 30

3.2.3 Aktivitätsbestimmung von Markerenzymen 31

3.2.3.1 Aktivitätsbestimmung der β -N-Acetylhexosaminidase 31

3.2.3.2 Aktivitätsbestimmung der β -Glucocerebrosidase 32

3.2.4 Kopplung von MAB-2D5 an Eupergit-C1Z-Perlen 32

3.2.5 Präparation von Membranproteinen aus „dense pool“-Lysosomen..... 33

3.2.5.1 Membranpräparation durch Ultrazentrifugation 34

3.2.5.2 Membranpräparation durch Immunoaffinitätsreinigung..... 34

3.2.6 Proteintrennung durch Elektrophorese..... 35

3.2.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)..... 35

3.2.6.2	Zweidimensionale-Gelelektrophorese.....	37
3.2.6.3	Präparative IEF mittels Durchflußelektrophorese.....	39
3.2.6.3.1	Das OCTOPUS-Gerät	39
3.2.6.3.2	Das Verfahren der kontinuierlichen isoelektrischen Fokussierung.....	41
3.2.6.3.3	Trennung lysosomaler Membranproteine durch Free-Flow- Elektrophorese.....	42
3.2.7	Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	45
3.2.7.1	Silberfärbung.....	45
3.2.7.2	Coomassie-Blau-Färbung.....	46
3.2.7.3	Kolloidale Coomassie-Blau-Färbung.....	46
3.2.8	Hydroxylapatit-Säulenchromatographie	47
3.2.9	Acetonfällung von Proteinen.....	47
3.2.10	Modifizierung von Proteinen mit Phenylglyoxal	48
3.2.11	Deglykosylierung von Proteinen mit N-Glykosidase F (NGF-Spaltung)	49
3.2.12	Anthron-Nachweis	50
4	ERGEBNISSE	51
4.1	PRÄPARATION LYSOSOMALER MEMBRANPROTEINE AUS HUMANER PLAZENTA.....	51
4.1.1	Charakterisierung von „dense pool“-Lysosomen aus humaner Plazenta.....	51
4.1.2	Präparation von Membranproteinen aus “dense pool“-Lysosomen.....	53
4.2	CHARAKTERISIERUNG EINES SIALINSÄUREBINDENDEN LYSOSOMALEN MEMBRANPROTEINS MIT HILFE ZWEIDIMENSIONALER GELELEKTROPHORESE	54
4.2.1	Auftrennung lysosomaler Membranproteine durch Immobiline-2D- Gelelektrophorese	55
4.2.2	Einfluß von Liganden des sialinsäurebindenden, lysosomalen Membranproteins auf eine Modifizierung durch Phenylglyoxal	57
4.3	PRÄPARATIVE TRENNUNG LYSOSOMALER MEMBRANPROTEINE.....	61
4.3.1	Präparative Trennung lysosomaler Membranproteine durch Immobiline-2D- Gelelektrophorese	61
4.3.2	Präparative Trennung lysosomaler Membranproteine durch trägerfreie isoelektrische Fokussierung im OCTOPUS.....	65
4.3.3	Hydroxylapatit-Säulenchromatographie ausgewählter Fraktionen nach isoelektrischer Fokussierung im OCTOPUS	78

4.4	CHARAKTERISIERUNG LYSOSOMALER MEMBRANPROTEINE NACH ISOELEKTRISCHER FOKUSSIERUNG IM OCTOPUS	80
4.4.1	Nachweis von N-Glykanen an lysosomalen Membranproteinen ausgewählter OCTOPUS-Fraktionen	80
4.4.2	Präparative Trennung lysosomaler Membranproteine nach OCTOPUS-IEF durch SDS-PAGE.....	82
4.4.3	Massenspektroskopische Analysen immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine nach präparativer zweidimensionaler Trennung.....	84
5	DISKUSSION	87
5.1	PRÄPARATION LYSOSOMALER MEMBRANPROTEINE AUS HUMANER PLAZENTA.....	87
5.2	LIGANDENABHÄNGIGE MODIFIZIERUNG EINES SIALINSÄUREBINDENDEN LYSOSOMALEN MEMBRANPROTEINS.....	89
5.3	PRÄPARATIVE IMMOBILINE-2D-GELELEKTROPHORESE.....	91
5.4	PRÄPARATIVE TRÄGERFREIE ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG (OCTOPUS-IEF)	92
5.5	HYDROXYLAPATIT-SÄULENCHROMATOGRAPHIE VON OCTOPUS-FRAKTIONEN.....	96
5.6	NACHWEIS VON N-GLYKANEN AN LYSOSOMALEN MEMBRANPROTEINEN.....	97
5.7	PRÄPARATIVE SDS-PAGE VON LYSOSOMALEN MEMBRANPROTEINEN NACH IEF IM OCTOPUS	100
5.8	CHARAKTERISIERUNG LYSOSOMALER MEMBRANPROTEINE DURCH MASSENSPEKTROSKOPIE	100
6	LITERATURVERZEICHNIS	117
	DANKSAGUNG	134

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest.	Aqua bidestillata (lat.): bidestilliertes Wasser
Ac	Acetat
AP	Adapter-Komplex
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure/n
BLAST	engl: Basic Local Alignment Search Tool
BSA	bovine serum albumine (engl.): Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	engl.: copy-DNA
CD63	cell differentiation antigen (engl.): Zelldifferenzierungsantigen CD63
CF	Counterflow (engl.): Gegenstrom
CHAPS	Cholamidopropyldiethyl-ammoniopropan-sulfonat
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
2D	zweidimensional
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC	Enzym Commission
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
ER	endoplasmatisches Retikulum
ES	electrospray (engl.): Elektronenspray
EST	expressed sequence tags (engl.): teilsequenzierte DNA
<i>et al.</i>	et aliter (lat.): und andere
etc.	et cetera (lat.): und das übrige
Fa.	Firma
FFE	free-flow-electrophoresis (engl.): Durchflußelektrophorese
β -Gluc	β -Glucocerebrosidase
g	Gramm
gr.	griechisch
h	Stunden
β -Hex	β -N-Acetylhexosaminidase

HPMC	Hydroxypropylmethylcellulose
IEF	isoelektrische Fokussierung
konz.	konzentriert
K_i	Bindungskonstante der inhibitorischen Reaktion
K_m	Michaelis Konstante
kVh	Kilovoltstunden
lamp	lysosomal assoziiertes Membranprotein
lat.	lateinisch
LIMP	lysosomales integrales Membranprotein
M	molar
mA	Milliampere
MALDI	engl.: matrix-assisted laser desorption/ionisation
MDCK	engl.: Madine Darby Canine Kidney
mg	Milligramm
min	Minuten
mitochondr.	mitochondrial
ml	Milliliter
mm	Millimeter
M-6-P	Mannose-6-Phosphat
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl der Präparationen
μ l	Mikroliter
μ S	Mikrosiemens
NANA	N-Acetylneuraminsäure
NCBI	engl.: National Center for Biotechnology Information
NGF	N Glykopeptidase F
nm	Nanometer
nrdp	engl.: non-redundant data base
<i>p. a.</i>	per analysis (lat.): zur Analyse
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline (engl.): phosphatgepufferte Salzlösung
PG	Phenylglyoxal
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroxoniumionen
pI	isoelektrischer Punkt
Δ pI	Differenz der isoelektrischen Punkte
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNÜ	postnukleärer Überstand
RNA	Ribonukleinsäure

RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SDS	sodium dodecylsulfat (engl.): Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline (engl.): Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloroacetic acid (engl.): Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Trennmedium
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit (engl.): Einheit der Enzymaktivität
Upm	Umdrehung pro Minute
u. a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vit.	Vitamin
v/v	volume/volume (engl.): Volumen/Volumen
W	Watt
w/v	weight/volume (engl.): Gewicht/Volumen
× g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (g_{av} entspricht Mittelwert (average))
z. B.	zum Beispiel
Z-F-F	Carbobenzoxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-phenylalanyl-D-diazomethan

1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden lysosomale Membranproteine humaner Plazenta durch Immunoaffinitätsreinigung etwa 200fach angereichert und mit Hilfe zweidimensionaler Trennungen charakterisiert.

Eine Methode zur Charakterisierung von Proteinen, wurde durch ligandenspezifische Modifizierung mit seitenkettenspezifischen Reagenzien auf der Basis zweidimensionaler Proteintrennung (Immobiline-2D-Trennung) entwickelt. Durch die ligandenspezifische Modifizierung eines 33 kDa-Polypeptids mit Phenylglyoxal konnte eine Affinität dieses Proteins zu Glucuronsäure gezeigt werden. Dieser Befund erhärtet die von O. Diettrich (Dissertation 1996) für ein sialinsäurebindendes 33 kDa-Protein beschriebene Assoziation mit dem Sialinsäure-Transporter der lysosomalen Membran.

Eine Methode zur trägerfreien isoelektrischen Fokussierung lysosomaler Membranproteine wurde mit Hilfe des OCTOPUS-Gerätes entwickelt, bei der im linearen Gradienten pH 3-10 Polypeptide mit einem ΔpI von ± 1 in guten Ausbeuten auch präparativ getrennt werden konnten. Die Analyse der Fraktionen durch SDS-PAGE zeigte eine gute Korrelation zu dem Proteinmuster analytischer Immobiline-2D-Trennungen und ließ darüberhinaus Membranproteine im 100 kDa-Bereich (pH 5-6) detektieren, die mit der Immobiline-2D-Technik nicht nachweisbar waren.

Durch Hydroxylapatit-Säulenchromatographie konnten Proben nach OCTOPUS-IEF konzentriert und auch präparativ durch SDS-PAGE getrennt werden. Die Elution der Polypeptide in Gegenwart von isopropanolhaltigem Phosphatpuffer (pH 9.3) zeigte eine Konzentrierung der Polypeptide (Faktor 3-4) und Ausbeuten von über 80 %. Die Proteinmuster der lysosomalen Membranproteine (nach OCTOPUS-IEF) wiesen nach analytischer (Silberfärbung) und präparativer SDS-PAGE (kolloidale Coomassie-Färbung) eine hohe Übereinstimmung auf, wie sie bei präparativer Immobiline-2D-Trennung nicht erzielt werden konnte.

Spaltungen der immunoaffinitätsgereinigten, lysosomalen Membranproteine nach OCTOPUS-IEF mit N-Glykopeptidase F, ließen nur wenige N-Glykan-tragende Polypeptidbanden detektieren. Die entsprechenden massenspektroskopischen Daten wiesen diese als die lysosomalen Enzyme β -Glucocerebrosidase und Tripeptidylpeptidase 1 sowie den zur Reinigung eingesetzten monoklonalen Antikörper aus.

An durch OCTOPUS-IEF und SDS-PAGE präparativ getrennten Teilfraktionen der lysosomalen Membranproteine konnten massenspektroskopische Analysen durchgeführt werden. In 14 coomassiegefärbten Polypeptidbanden konnten insgesamt 22 Proteine identifiziert werden, von denen sechs Transportproteine bzw. deren Untereinheiten repräsentieren. Neben vier bekannten lysosomalen Proteinen (β -Glucocerebrosidase, Tripeptidylpeptidase 1, H^+ -ATPase Untereinheit B2 und E) wurden Proteine mitochondrialen Ursprungs in den Membranpräparationen nachgewiesen, deren apparente Molekulargewichte auf eine partielle Degradation schließen lassen. Durch die Identifizierung eines neuartigen Tricarboxylat-Transporters, mit hoher Homologie zu Sideroflexin 3 der Maus, konnte gezeigt werden, daß mit diesem Verfahren auch bisher unbekannte Transportproteine des lysosomalen Membranproteoms identifizierbar sind.

2 Einleitung und Aufgabenstellung

2.1 Einleitung

2.1.1 Lysosomen

Die Lysosomen sind Teil des intrazellulären Verdauungssystems, mit dessen Hilfe Makromoleküle wie Proteine, Nukleinsäuren, Lipide und Kohlenhydrate abgebaut werden. Der Abbau erfolgt durch zahlreiche Hydrolasen, die, durch eine Membran vom Cytoplasma abgetrennt, in einem sauren Milieu ($\text{pH} \leq 5$) aktiv sind. Die Entdeckung der Lysosomen geht auf C.R. De Duve zurück, der 1949 die saure unspezifische Phosphatase aus Rattenleber untersuchte. Ein Großteil der Aktivität dieses Enzyms konnte erst durch Detergenzien, Gefrierbruch oder hypotonen Aufschluß meßbar gemacht werden. Dieses Phänomen, das als „Latenz“ bezeichnete wird, wurde auf das Eingeschlossensein des Enzyms in einem membranumgebenen Kompartiment zurückgeführt. Erst der schonende isotonische Aufschluß und durch Etablierung einer neuen Technik, der differentiellen Fraktionierung durch Ultrazentrifugation, gelang es De Duve, die Phosphatase in einer „granulären“ Fraktion zu isolieren (De Duve, 1955). Wenig später gelang es A. Novikoff diese Vesikel anhand der enthaltenen sauren Hydrolasen spezifisch anzufärben und in EM-Aufnahmen auch morphologisch sichtbar zu machen (Novikoff, 1956).

Die von De Duve (1955) als Lysosomen (gr.: lysierende Partikel) bezeichneten Vesikel weisen eine sehr heterogene Morphologie auf. Sie können anhand ihres Enzymbestandes und des zu verdauenden Inhaltes als primäre Lysosomen (Endosomen), sekundäre und tertiäre Lysosomen (Residualkörper) sowie intermediäre Formen, wie multivesikuläre Körperchen, unterschieden werden. Ursache dafür ist die spezielle Biogenese dieses Organells: Lysosomale Proteine werden am Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und vom Golgi-Apparat aus zu den lysosomalen Kompartimenten geleitet. Die Weitergabe der Proteine erfolgt über spezielle Transportvesikel, die mit Lysosomen fusionieren können. Für lösliche und membranständige lysosomale Proteine existieren jedoch verschiedene Transportwege (siehe Abb. 1).

Die löslichen Proteine erhalten Zuckerseitenketten mit terminalen Mannose-6-Phosphat-Gruppen (M-6-P-Gruppen), wodurch sie von zwei speziellen M-6-P-Rezeptoren gebunden werden können (siehe Review: von Figura, 1991; Kornfeld, 1992). An diese wiederum bindet ein Adapter-Komplex (AP-1), wodurch die löslichen lysosomalen Proteine in beschichtete Vesikel verpackt zu den Endosomen gelangen. Die Membranproteine können hingegen über Vesikel zur Plasmamembran transportiert werden, von wo aus sie durch AP-2 vermittelt, mit der Aufnahme von extrazellulärem Material zu den Lysosomen gelangen können (Endocytose).

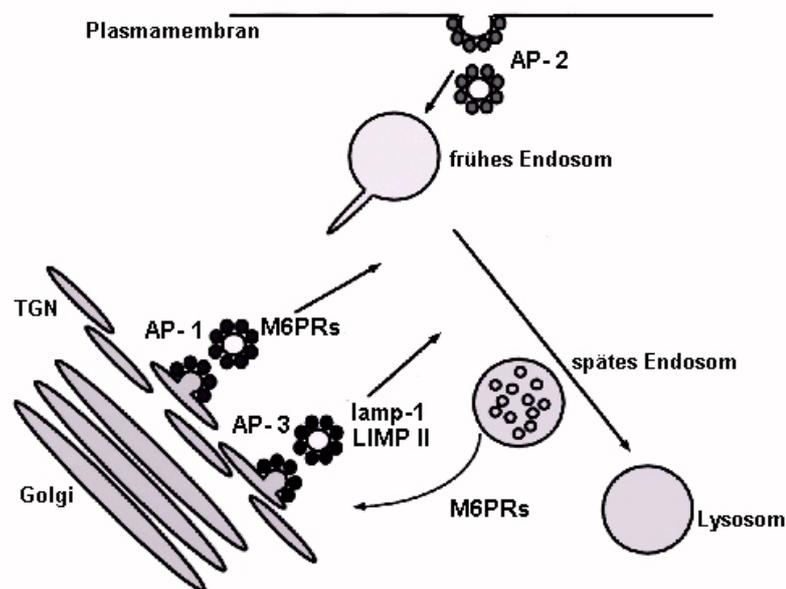


Abbildung 1: Transportwege lysosomaler Proteine. Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (M6PRs) und luminal saure Hydrolasen werden über den Adapterkomplex 1 (AP-1)-vermittelten Weg dem Endosomalen/Lysosomal-System zugeführt. Lysosomale Membranproteine (lamp-2, LIMP II) werden durch AP-3 vermittelt. Die Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren gelangen von späten Endosomen zurück zum TGN (verändert aus Rouillé *et al.*, 2000).

Da der Vorläufer der Sauren Phosphatase, ein Membranprotein, erst durch das saure Milieu der Lysosomen zu einer aktiven, dann löslichen Hydrolase gespalten wird, werden Endosomen als Saure Phosphatase-negativ bezeichnet. Andererseits führt die Ansäuerung von Endosomen zur Entkopplung der gebundenen Proteine vom M-6-P-Rezeptor und zum Recycling der Rezeptoren in beschichteten Transportvesikeln (siehe Review: Schmid, 1997), so daß sich (sekundäre) Lysosomen als M-6-P-Rezeptor-negativ erweisen. Während die primären Lysosomen noch frei von abzubauenem Material sind, entstehen daraus durch Fusion mit Substratvesikeln, Phagolysosomen. Handelt es sich dabei um den Abbau zelleigener Materialien,

ist von Autophagie die Rede, während extrazelluläres Material bei der Heterophagie lysiert wird.

Die beim Abbau freigesetzten Moleküle können die lysosomale Membran zum Teil durch Diffusion passieren. Bei geladenen Spezies, wie anorganischen Ionen, sauren oder basischen Aminosäuren bzw. Zuckern, muß der Transport durch die Membran unterstützt werden. Dazu ist die lysosomale Membran mit mehr als 20 Transportsystemen ausgestattet, deren Exportaktivität durch den pH-Gradienten zwischen Lysosomen und Cytoplasma angetrieben sein kann. Anderenfalls kommt es zur Anreicherung des Produktes in den Lysosomen, wie es bei einer Reihe von Stoffwechselkrankheiten zu beobachten ist, die als lysosomale Speicherkrankheiten klassifiziert werden. Die Ursache für derartige Akkumulationen ist jedoch nicht ausschließlich auf die Anomalie eines Transportsystems beschränkt. Ebenso kann der Defekt eines an der Hydrolyse beteiligten luminalen Proteins die Speicherung eines Zwischenproduktes zur Folge haben, sofern keines der lysosomalen Transportsysteme für dieses eine Affinität aufweist. Heute werden etwa 30 lysosomale Speicherkrankheiten auf Defekte luminaler Proteine zurückgeführt, die weitgehend identifiziert und sequenziert sind. Im Gegensatz dazu ist die Vielzahl der lysosomalen Transportsysteme weitestgehend durch ihre meßbare Funktion beschrieben. Bei mindestens 4 Systemen ist die fehlerhafte Transportfunktion als Ursache für lysosomale Speicherkrankheiten belegt (Applegarth, 1997). Da in den wenigsten Fällen die Sequenzen bekannt sind, und die Isolierung aktiver Transportproteine zum Studium möglicher Defekte noch aussteht, gilt dieser Proteingruppe besonderes Interesse.

2.1.2 **Aufbau und Entstehung der Lysosomen**

Bei morphologischen Untersuchungen ließ sich die Saure Phosphatase sowohl in lysosomalen, als auch in retikulären Strukturen, die Golgi-Markerproteine enthielten, nachweisen. A. Novikoff entwickelte daraus das Biogenese-Konzept der Lysosomen, das GERL: Golgi-verwandte Struktur, die Teil des ER und Ursprung der Lysosomen ist (Novikoff, 1964). Dieser Bereich des Golgi-Apparates, so zeigten Studien der Prozessierung von Glykoproteinen, dient der Sortierung selbiger Proteine. Aus dem inzwischen als trans-Golgi-Netzwerk (TGN) bezeichneten Subkompartiment schnüren sich unter anderem die Vesikel für den endosomalen Bereich ab (Griffith & Simons, 1986).

Eine Vielzahl von Beobachtungen spricht dafür, daß aus den Endosomen alle weiteren lysosomalen Strukturen (multivesikuläre Körperchen, sekundäre Lysosomen und Residualkörper) in einem Reifungsprozeß hervorgehen (Kominami *et al.*, 1983; Mellmann, 1996; Morales *et al.*, 1999). Dieser Reifungsprozeß erfordert die Versorgung mit den löslichen und den membranständigen lysosomalen Proteinen sowie die Ansäuerung des lysosomalen Milieus.

Lysosomale Proteine werden in einer Vorläuferform am rauhen ER synthetisiert und werden für ihren Weg zu den Lysosomen einer Prozessierung unterzogen. Zunächst gelangen sie aufgrund einer N-terminalen Signalsequenz, welche noch kotranslational abgesplattet wird, ins Lumen des ERs (Gorlich & Rapoport, 1993; Rapoport *et al.*, 1992). Danach werden sie mit einem Oligosaccharid verknüpft, welches auf Asparagin-Reste in der Konsensus-Sequenz Asn-X-Ser/Thr übertragen wird, wobei X eine beliebige Aminosäure mit Ausnahme von Prolin sein kann (Shakin-Eshleman *et al.*, 1996). Für die löslichen lysosomalen Proteine generiert sich daraus in weiteren Prozessierungsschritten, sowohl im ER als auch im Golgi-Apparat, das Mannose-6-Phosphat-Signal für den weiteren Transport zu den Lysosomen (siehe Reviews: Kornfeld & Kornfeld, 1985; Hasilik, 1992). Auch die strukturell bekannten, lysosomalen Membranproteine tragen asparagingebundene Oligosaccharide. Die Prozessierung führt in diesen Fällen jedoch zu anderen Zuckerstrukturen, die für den Transport zu den Lysosomen keine Rolle spielen (Barriocanal, 1986).

Der Transport zu den Endosomen geht vom TGN aus, wo sich auch die Hauptmenge der beiden M-6-P-Rezeptoren immunhistochemisch nachweisen läßt. Der hochmolekulare 300 kDa-Rezeptor (Kationen-unabhängiger M-6-P-Rezeptor oder Insulin-artiger-Wachstumsfaktor-Typ II-Rezeptor, Griffiths *et al.* 1988) und der 46 kDa-Rezeptor (Kationen-abhängiger M-6-P-Rezeptor, Dahms *et al.* 1987; Dahms *et al.* 1989) sind vornehmlich an der Versorgung der Lysosomen mit neusynthetisierten lysosomalen Proteinen beteiligt (Griffiths *et al.* 1988; Lobel *et al.* 1989, Watanabe *et al.*, 1990). Beide Rezeptoren werden aber auch an der Plasmamembran nachgewiesen, wo sie unterschiedliche Funktionen ausüben. Der 46 kDa-M-6-P-Rezeptor scheint lysosomale Enzyme für den Export an die Plasmamembran zu bringen (Segregation), während der 300 kDa-Rezeptor an der rezeptorvermittelten Endocytose von Liganden beteiligt zu sein scheint (Chao *et al.* 1990, Hille-Rehfeld, 1995). Werden im trans-Golgi-Bereich M-6-P-markierte, lysosomale Proteine an einen der Rezeptoren gebunden, bindet auf der cytoplasmatischen Seite ein heterotrimerer Adapter-Komplex (AP-1). Dieser vermittelt die Abschnürung vom trans-Golgi-Kompartiment und die Beschichtung des abknospenden Vesikels mit Clathrin (ter Haar, *et al.* 2000). Zu den Endosomen gelangt, verschmel-

zen die Transportvesikel mit der endosomalen Membran, von wo sie nach Abgabe der Liganden wieder zum trans-Golgi zurückwandern. Dies ist aber erst in einer späteren endosomalen Phase, durch Absenkung des endosomalen pH-Werts, möglich. Dadurch reichern sich die Rezeptoren in der Membran der späten Endosomen zunächst an, bis die gebundenen lysosomalen Enzyme abdissoziieren. Wird dies unter Einwirkung schwacher Basen (Ammoniumchlorid oder Amine) verhindert, weil sich der pH-Wert in den lysosomalen Kompartimenten erhöht, kommt der Proteinverdau zum Erliegen und die Substrate reichern sich in multivesikulären Körperchen an. Die Bedeutung des M-6-P-Transportweges zeigt sich im Falle der I-Zell-Krankheit, bei der durch einen Enzymdefekt die M-6-P-Markierung im Golgi-Apparat unterbleibt. In Patienten-Fibroblasten werden dadurch die löslichen Hydrolasen fehlgeleitet und vermehrt an der Zelloberfläche freigesetzt. In den Lysosomen verbleiben die unverdauten Makromoleküle, was zur Bildung von Residualkörpern (engl.: inclusion bodies) führt. Interessanterweise findet sich in der Membran dieser tertiären Lysosomen ein nahezu normaler Gehalt an Membranproteinen, was auf einen unabhängigen Sortierungsmechanismus schließen läßt. Bei einigen anderen Zelltypen dieser Patienten (Hepatozyten, Histiocyten) konnten in den Lysosomen sogar lösliche Hydrolasen ohne M-6-P-Markierung nachgewiesen werden, was zudem auf alternative Transportwege hinweist (Glickman & Kornfeld, 1993).

An dem Transport der lysosomaler Membranproteine sind die Adapter-Komplexe AP-2 und AP-3 beteiligt, deren Route von der Plasmamembran (AP-2) bzw. vom TGN direkt zu den Lysosomen (AP-3) führt (Schmid, 1997; Odorizzi *et al.* 1998, Le Borgne & Hoflack 1998). Ein weiterer Komplex, AP-4, ist in seiner Funktion noch nicht charakterisiert (Rouillé, *et al.* 2000). Der alternative Transport der löslichen lysosomalen Proteine wurde für nicht glykosyliertes Cathepsin D in Lymphoblasten beschrieben (Glickmann & Kornfeld, 1993). Für teilweise-glykosyliertes Cathepsin D wurde in humanen Hepatoma-Zellen (HepG2) eine ebenfalls M-6-P-unabhängige Lokalisierung in Lysosomen nachgewiesen, wobei sich während des Transports Membranassoziation zeigte (Rijnboutt *et al.*, 1991). Möglicherweise existiert ein Co-Transport von Procathepsin D und Prosaposin in einem Komplex, wie Vernetzungsversuche und Assoziationsstudien in HepG2-Zellen nahelegen (Grässel & Hasilik, 1992, Zhu & Conner, 1994).

Die Morphologie der frühen Endosomen lies tubuläre Strukturen, Zisternen und vesikuläre Domänen erkennen, als die Aufnahme von markiertem Transferrin durch Endocytose studiert wurde (Hopkins *et al.* 1990). Die frühen Endosomen, die nahe an der Zelloberfläche lokalisiert sind, scheinen Vorläufer der multivesikulären Körperchen zu sein. Unter dem Einsatz

von (zum Beispiel) Leupeptin, einem Inhibitor der Cystein-Proteinasen, reichert sich das markierte Transferrin unverdaut in solchen multivesikulären Strukturen an (Morales *et al.*, 1999). Von diesem Bereich gehen endosomale Transportvesikel aus, die nach Durchqueren des Cytoplasmas mit prälysosomalen, ebenfalls tubulo-retikulären Strukturen, den späten Endosomen, in Zellkernnähe fusionieren (Griffith & Gruenberg, 1991). Das endosomal-lysosomale Netzwerk ist daher gekennzeichnet von einem ständigen Fluß und vesikulärem Transport. Letzterer wird dadurch erweitert, daß auch die Substrate für den lysosomalen Abbau durch Vesikeltransport zu den Endosomen gelangen. Extrazelluläres Material kann dabei von der Zelle durch Einstülpfen und Abschnüren der Plasmamembran internalisiert werden (Endocytose). Bei der rezeptorvermittelten Endocytose wird dieser Vorgang durch Bindung des Materials, wie z. B. Wachstumsfaktoren oder Hormone, an die Zelloberfläche ausgelöst, kann aber auch weniger selektiv erfolgen (Pinocytose). Im Sonderfall der Makrophagocytose umschließt die Zellmembran externe Partikel oder Zellen (Bakterien, Erythrocyten) die in den Lysosomen verdaut werden. Dieser immunologisch wichtige Vorgang scheint aber spezialisierten Zellen wie Makrophagen und Granulozyten vorbehalten zu sein. Bei der Verschmelzung von Sekretgranula mit Lysosomen, wie sie im endokrinen Pankreas oder in der Hypophyse beobachtet wurde, wird die Beseitigung überschüssiger Hormone bereits intrazellulär, durch Crinophagocytose bewerkstelligt (Marzella & Glaumann, 1987). Dies ist ein Spezialfall des Abbaus zelleigener Substanzen, welcher ansonsten unter dem Begriff der Heterophagie zusammen gefaßt wird. Bei der Autophagocytose werden im Vergleich dazu cytoplasmatische Areale von einer Doppelmembranen des GERL-Komplexes umschlossen und können dabei auch Zellorganelle wie Mitochondrien und Peroxisomen einschließen. Nach der Verschmelzung der primären Lysosomen mit der äußeren Membran dieses Autophagosoms wird der Inhalt des reifenden Autophagolysosoms abgebaut. Dieser im Gewebe wie in Zellkultur zu beobachtende Prozeß kann durch Streßfaktoren wie Aminosäuremangel oder Glucagonzugabe vervielfacht werden (Review: Dunn 1990a).

Können die in den Lysosomen verbleibenden Materialien nicht weiter verdaut werden, entstehen tertiäre Lysosomen, die entweder als Residualkörper (Telolysosomen) in der Zelle verbleiben oder in den Extrazellulärraum abgegeben werden können (bei sezernierenden Zellen wie Nierenepithelien und Hepatozyten).

2.1.3 Die Proteine der lysosomalen Membran

Die „inclusion bodies“ in Fibroblasten von Patienten der I-Zell-Krankheit wiesen einen normalen Gehalt an lysosomalen Membranproteinen auf. Dies legte nahe, daß M-6-P-unabhängige Transportwege existieren für die neue Sortierungsmotive zu erwarten waren. Nachdem ein korrekter Transport der Membranproteine auch unter Inhibition der N-Glykan-Bildung erfolgte wurden solche Motive in der Polypeptidkette vermutet (Barriocanal, *et al.* 1986).

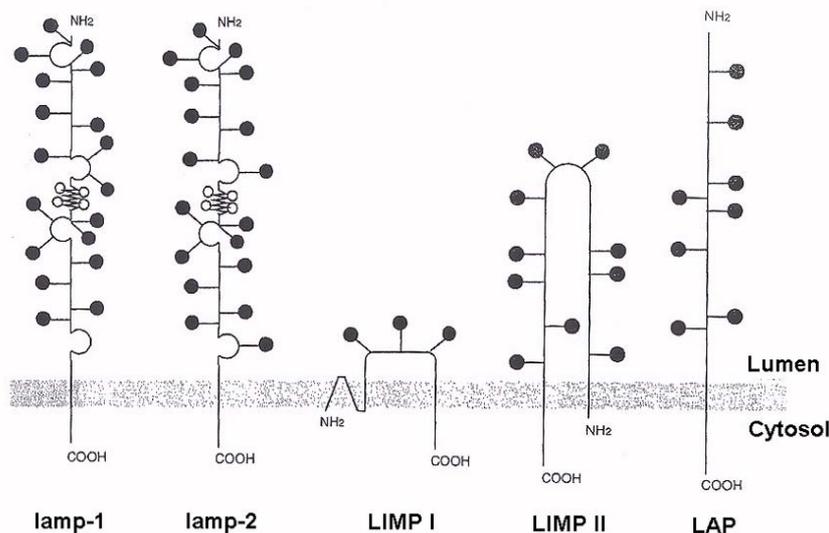


Abbildung 2: Mögliche Struktur und Membranorientierung lysosomaler Membranproteine. Disulfid-verknüpfte Schleifen und O-Glykane (offene Kreise) sind nur für lamp-1 und lamp-2 beschrieben. Gefüllte Kreise stellen asparaginebundene Polylaktosaminoglykane und komplexe N-Glykane dar (entnommen aus Hunziker & Geuze, 1996).

Die beiden am besten charakterisierten lysosomalen Membranproteine sind lamp-1 und lamp-2 (lysosomal-assoziiertes-Membranprotein, auch Igp-A und Igp-B genannt). Ihre Sequenzen sind bereits aus den Spezies Mensch (Carlsson *et al.*, 1988; Fukuda *et al.*, 1988; Viitala *et al.*, 1988), Maus (Cha *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1988), Ratte (Granger *et al.*, 1990; Himeno *et al.*, 1989; Howe *et al.*, 1988) und Huhn (Fambrough *et al.*, 1988; Hatem *et al.*, 1995) bekannt und zeigen deutlich strukturelle Ähnlichkeiten sowie Sequenzhomologien (35 %). Beides sind Typ-1 Membranproteine mit einer großen luminalen Domäne, an die sich eine Transmembranregion und ein kurzer cytoplasmatischer Schwanz, als C-Terminus, anschließen (siehe Abb. 2). Die luminalen Domäne besteht aus zwei strukturgleichen Abschnitten, die durch eine kurze Verbindungsregion verknüpft sind. Beide Membranproteine sind stark glykosyliert wodurch sich das apparente Molekulargewicht der Polypeptide von etwa 40 kDa auf 90-120 kDa erhöht (Carlsson *et al.*, 1988). Neben 18 bzw. 16 N-Glykanen, wurden in der Verbindungsre-

gion (AS 169-183 in h-lamp-1, AS 167-185 in h-lamp-2) auch O-Glykane nachgewiesen (Carlsson *et al.*, 1988; Carlsson *et al.*, 1993). Ein Teil der Glykane ist vom Polylaktosamin-Typ, der durch ein sich wiederholendes, verzweigtes Trisaccharid besonders komplex werden kann (Carlsson *et al.*, 1988; Howe *et al.*, 1988). Desweiteren finden sich an den Glykanen terminale Sialinsäuren, die den stark erniedrigten pI-Wert von 2-4 bewirken (Granger *et al.*, 1990).

Der cytoplasmatisch lokalisierte C-Terminus von lamp-1 und lamp-2, bestehend aus 11 Aminosäuren, ist stark konserviert zwischen den beiden Proteinen und bezüglich lamp-1 sogar identisch unter den genannten Spezies. Im Falle von lamp-2 werden hingegen für die Spezies Maus und Huhn Spleißvarianten beschrieben, die sich im C-Terminus und in der Transmembranregion unterscheiden (Gough *et al.*, 1995; Hatem *et al.*, 1995). Der Gesamtvergleich läßt auf ein Tyrosin-Motiv mit einer Konsensussequenz ---Gly-Tyr-X-X-Z schließen (wobei X für eine beliebige und Z für eine große hydrophobe Aminosäure steht), die sich in einem bestimmtem Abstand zur Transmembranregion befinden sollte (Hunziker & Geuze, 1996; Karlsson & Carlsson, 1998).

Als weiteres lysosomales Membranprotein ist LIMP I (lysosomales-integrales-Membranprotein-I, auch lamp-3 genannt) aus Mensch (Metzelaar, 1991), Maus (Miyamoto *et al.*, 1994) und Ratte (Nishikata *et al.*, 1992) bekannt, das identisch zu CD63- und ME491-Antigen ist (Metzelaar *et al.*, 1991). Aufgrund seines hydrophoben C-Terminus gehört es zu den Typ-III Membranproteinen, das durch genutzte, luminal gelegene Glykosylierungsstellen ein apparentes Molekulargewicht von 30-54 kDa aufweist. In der 11 Aminosäuren umfassenden cytoplasmatischen Domäne findet sich die Konsensussequenz ---Gly-Tyr-X-X-Met.

Ein weiteres Typ-III Membranprotein der Lysosomen ist LIMP II (auch LGP85 genannt), das bisher aus der Ratte bekannt ist (Fujita *et al.*, 1991 ; Vega *et al.*, 1991). LIMP II weist eine große luminale Domäne auf, deren 11 N-Glykosylierungsstellen überwiegend genutzt sind. Das apparente Molekulargewicht liegt bei 74-85 kDa. Der cytoplasmatische Teil (20 AS) trägt ein ---Leu-Ile-Motiv, das in ähnlicher Weise wie die Dileucinmotive in M-6-P-Rezeptor, T-Zell-Rezeptor und Glucosetransporter für die Endocytose an der Zelloberfläche notwendig ist (Ogata & Fukuda, 1994; Sandoval *et al.*, 1994).

Die lysosomale Saure Phosphatase LAP (engl. lysosomal acid phosphatase) wird als membranständiger Vorläufer synthetisiert, der durch limitierte Proteinolyse zu einer löslich aktiven

Form heranreift (Gottschalk, S. *et al.* 1989). Die LAP-Homologe aus Mensch (Pohlmann *et al.*, 1988) und Ratte (Himeno *et al.*, 1989) charakterisieren ein integrales Membranprotein (Typ-I), mit einem transportrelevanten Tyrosin-Motiv, das ungewöhnlicherweise am Anfang der cytoplasmatischen Domäne (19 AS) liegt (Peters, *et al.* 1990). Der luminal Teil weist acht potentielle Glykosylierungsstellen auf, die alle genutzt sind und teilweise Sialinsäuren tragen, was zu einem apparenten Molekulargewicht von 63 kDa führt.

Abgesehen von der Sauren Phosphatase ist über die Funktion der oben genannten glykosylierten Membranproteine wenig bekannt. Die lamp-Proteine weisen unter allen zellulären Glykoproteinen den stärksten Bezuckerungsgrad auf (> 55 % ihrer Gesamtmasse) und sind die Hauptspezies der polylaktosamin-tragenden Glykoproteine der meisten Zellen. Es konnte gezeigt werden, daß für beide lamp-Proteine sowohl das Tragen von N-Glykanen an sich als auch der Gehalt an Polylaktosaminen die Lebensdauer verlängert (Fukuda, 1991; Lee, *et al.* 1990). Aufgrund ihrer starken Präsenz in der lysosomalen Membran wird angenommen, daß sie durch Ausbildung einer luminalen Glykokalix die Struktur der Lysosomen stabilisieren. Desweiteren wird lamp-2 eine Funktion bei der direkten Internalisierung cytoplasmatischer Proteine zugesprochen. J. F. Dice beobachtete in Zellkultur wie in gereinigten Lysosomen eine selektive Aufnahme von Proteinen mit dem Sequenzmotiv KFERQ (Chiang & Dice, 1988; Terlecky & Dice, 1993). Die direkte Aufnahme dieser Proteine aus dem Cytoplasma erfolgte unter der Beteiligung des Hitzeschock-Proteins hsc73 (Terlecky *et al.*, 1992) und lamp-2 (Cuervo & Dice, 1996).

Die Existenz weiterer Membranproteine läßt sich aufgrund von Studien an Fusionsprozessen der lysosomalen Kompartimente vermuten, an denen membranassoziierte GTPasen, wie Rab7, beteiligt sind (Review: Luzio *et al.*, 2000). Eine besondere Gruppe von lysosomalen Membranproteinen bilden die Transportproteine, zu der auch die in allen eukaryontischen Zellen vorkommende vakuolären H⁺-ATPase gehört. Als Protonenpumpe sorgt sie für die Absenkung des lysosomalen pH-Wertes und ermöglicht sowohl den endosomal-lysosomalen Reinigungsprozeß als auch den aktiven Transport einiger lysosomaler Transportsysteme.

2.1.4 Transportsysteme der lysosomalen Membran

Für das Funktionieren der Stoffwechselforgänge, an denen die Lysosomen beteiligt sind, ist der Stoffaustausch mit der Zelle von zentraler Bedeutung. Ermöglicht die lysosomale Membran einerseits die Ausbildung eines sauren Milieus, stellt sie andererseits eine Barriere für alle

geladenen und hydrophilen Stoffwechselprodukte dar, die beim Abbau freigesetzt werden. Da die Membran semipermeabel ist, ist es von besonderer Bedeutung, das osmotische Gleichgewicht durch einen gerichteten Transport dieser Substanzen aufrechtzuerhalten. Der Export von Aminosäuren konnte an isolierten Lysosomen erstmals durch die von Reeves eingeführte Technik der Methylesterbeladung nachgewiesen werden. Dabei wurde die Membrangängigkeit der radioaktiv markierten Aminosäure-Methylester genutzt, welche in den Lysosomen zu den freien Aminosäuren gespalten werden (Reeves, 1979). Zu Beginn der 80er Jahre gelang es mit dieser Methode erstmals Transportprozesse in der lysosomalen Membran nachzuweisen (Gahl *et al.*, 1982) und kinetische Parameter zu bestimmen. Neben den Konstanten für die Michaelis-Menten-Kinetik (K_m -Wert) wurden auch Temperaturabhängigkeit (Q_{10} -Werte: < 2 sprechen für einen diffusionsgesteuerten Mechanismus), sowie der Einfluß eines pH-Gradienten untersucht.

Mechanistisch werden die Transportsysteme über die verschiedensten Membranen, unterteilt in Kanalproteine und Transportproteine (Mitchell, 1967; Saier, 1998). Die Kanalproteine bilden Membranporen, durch die meist anorganische Ionen mit hohen Transportraten (10^8 Ionen/sec) entlang eines Konzentrationsgradienten diffundieren. Der Kanal wird dabei entweder spannungs- oder liganden-abhängig geöffnet. Bei Transportproteinen hingegen bewirkt eine Konformationsänderung die Beförderung, was sowohl durch aktiven (gegen ein Konzentrationsgefälle) als auch durch passiven Transport erfolgen kann. Zu den primär-aktiven Transportsystemen, bei denen Nukleotidtriphosphate (ATP u.a.) als Energielieferanten dienen, zählt die vesikuläre H^+ -ATPase. Sekundär-aktive Transporter sind hingegen an ein solches System gekoppelt, in dem sie entlang dieses Gradienten einen Kotransport betreiben. Dabei kann das Substrat sowohl in gleiche Richtung (Symporter) als auch in die Gegenrichtung (Antiporter) bewegt werden. Zu den passiven Transportern zählen Uniporter, welche die Diffusion lediglich erleichtern. Als typische Strukturmodule finden sich in allen bekannten Transportproteinen β -barrel- (Porenproteine) (Cowan *et al.*, 1992; Mannella, 1992; Nikaido, 1992) und α -Helix-Motive, mit denen die Membran mehrfach durchspannt wird (Saier, 1998; Paulsen, 1998). Die meisten Membrantransporter weisen als Grundbaustein sechs Transmembrandomänen (α -Helices) auf, die dupliziert oder, wie im Falle der spannungsabhängigen Ionenkanäle (bis zu 24 Transmembranhelices), quadrupliziert vorkommen können (Saier 1994).

Tabelle 1: Transportsysteme der lysosomalen Membran.

Transportsystem	Substrate	Transport-Typ	Referenz
Anorganische Ionen			
H ⁺ -ATPase	Protonen	primär-aktiv	Schneider, 1981
Sulfat	SO ₄ ²⁻ , Molybdat	sekundär-aktiv	Jonas & Jobe, 1990
Phosphat	HPO ₄ ²⁻ , Ascorbat	passiv	Pisoni, 1991
Calcium	Ca ²⁺ , Cd ²⁺ , Hg ²⁺ , Zn ²⁺ , Mg ²⁺	passiv	Lemons & Thoene, 1991
Chlorid	Cl ⁻	Kanalprotein	Tilly, 1992
Schwermetalle	Ag ⁺ , Cu ²⁺ , Cd ²⁺	primär-aktiv	Havelaar <i>et al.</i> , 1998
Aminosäuren			
kationsche	L-Lys, L-Arg, Cysteamin-Cystein	sekundär-aktiv	Pisoni <i>et al.</i> , 1985 & 1987a
anionische	L-Glu, L-Asp	passiv	Collarini <i>et al.</i> , 1989
neutrale	L-Ala, L-Ser, L-Thr	passiv	Pisoni <i>et al.</i> , 1987b
verzweigt-kettige und aromatische	L-Leu, L-Val L-Trp, L-Phe	passiv	Stewart <i>et al.</i> , 1989
Prolin	L-Pro	passiv	Pisoni <i>et al.</i> , 1987b
Cystin	L-Cystin, Selenocystin	sekundär-aktiv	Gahl <i>et al.</i> , 1982; Jonas <i>et al.</i> , 1982
Cystein	L-Cystein	sekundär-aktiv	Pisoni <i>et al.</i> , 1990; Pisoni & Vellila, 1995
Cysteamin	Aminothiole, Aminosulfide	sekundär-aktiv	Pisoni <i>et al.</i> , 1995
Taurin	Taurin	sekundär-aktiv	Vadgamma <i>et al.</i> , 1991
Dipeptide	Gly-Gln, Tripeptide	sekundär-aktiv	Thamotharan <i>et al.</i> , 1997
Zucker			
saure	N-Acetylneuraminsäure Glucuronsäure	sekundär-aktiv	Mancini <i>et al.</i> 1989 & 1991
neutrale Monohexosen	D-Glucose, D-Galactose D-Mannose	passiv	Mancini <i>et al.</i> , 1990
N-acetylierte Hexosamine	N-Acetylglucosamin N-Acetylgalactosamin	passiv	Jonas <i>et al.</i> , 1989
Nucleoside	Ribose-Purine, -Pyrimidine	passiv	Pisoni & Thoene, 1989
Vitamine			
Folylpolyglutamat	Methotrexatpolyglutamat	passiv	Barrueco & Sirotnak, 1991
Cobalamin (Vit.B ₁₂)	Cyanocobalamin	aktiv	Idriss & Jonas, 1991
Sonstige Transportsysteme			
N-Acetyl-Gruppen	Acetyl-CoA	Transferase	Rome & Bame, 1985
Cholesterol	Cholesterol	?	Pentchev <i>et al.</i> , 1997

Anorganische Ionen

Zu den prominentesten lysosomalen Ionen-Transportern zählt die Mg^{2+} - und ATP-abhängige Protonenpumpe (H^+ -ATPase). Sie bewirkt den sauren lysosomalen pH-Wert (Schneider, 1981; Ohkuma *et al.*, 1982), welcher in Makrophagen bei pH 4 liegen kann. Zur gleichen Familie der Pyrophosphat-hydrolysierenden aktiven Transporter, gehören die mitochondrialen und chloroplastären F_1F_0 -ATP-Synthasen. Diese bestehen ebenfalls aus zwei Sektoren, einer katalytisch aktiven F_1 - und dem membranständigen F_0 -Sektor, welche jeweils aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt sind. Ähnliche Protonenpumpen, die als vakuoläre H^+ -ATPasen (V_1V_0 -Typ) bezeichnet werden finden sich in zahlreichen Membranen anderer Organellen (Chromaffine Granula, Endosomen, Golgi-Vesikel) und in der Plasmamembran. Ihnen gemeinsam ist ihr struktureller Aufbau aus mehreren Untereinheiten (bei der Ratte 7 bis 8 Untereinheiten im Bereich von 16-110 kDa; Arai *et al.*, 1993) und ein vergleichbares Inhibitor-Spektrum, das sie als NEM-sensitiv ausweist und sie von den ATP-Synthasen unterscheidet.

Der Export von Sulfat durch ein spezifisches lysosomales Transportsystem wurde erstmals von Jonas und Jobe (1990) beschrieben. Der Anionen-Transporter weist die höchste Affinität zu Sulfat auf ($K_m = 155 \mu M$) und exportiert, möglicherweise auch Molybdat, durch einen pH-abhängigen, aktiven Transport. Aufgrund von Inhibitionsstudien wird eine strukturelle Verwandtschaft zum Bande 3-Anionentransporter der Erythrozyten vermutet. Der für den Sulfat-Transporter einzigartige, inhibitorische Effekt von Kupfer-Ionen wies hingegen auf bedeutende Histidine oder Cysteine hin (Koettters *et al.*, 1995a), von denen Sulfhydryl-Gruppen als essentielle Strukturmerkmale nachgewiesen werden konnten (Chou *et al.*, 1998). Die Rekonstitution des Sulfat-Transportsystem in Proteoliposomen gelang 1995 (Koettters *et al.*, 1995b).

Für den Transport von Phosphat wurde bislang nur ein Importprozeß ($K_m = 5 \mu M$) beschrieben (Pisoni, 1991), bei dem ein Teil des Phosphats in den Lysosomen rasch zu einem TCA-präzipitierbaren Produkt umgesetzt wurde. Die Temperaturabhängigkeit der Phosphataufnahme wies, mit einem Q_{10} -Wert von 1.8, auf einen passiven Transportmechanismus hin. Bei zeitabhängigen Versuchen konnte ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Abgabe gezeigt werden, die den Export von Phosphat nahelegen. Unklar bleibt dennoch, wie das durch Hydrolyse von RNA freiwerdende Phosphat den Hauptabbauort, die Lysosomen, verläßt.

Den Transport von Calcium-Ionen in die Lysosomen von humanen Fibroblasten konnten Lemons und Thoene (1992) zeigen. Sie ermittelten einen K_m -Wert von 6 mM und hohe Ca^{2+} -Konzentrationen in den Lysosomen. Untersuchungen an MDCK-Zellen (Haller *et al.*, 1996) lassen einen Zusammenhang zwischen der Speicherung von Calcium-Ionen in Lysosomen und den intrazellulären Ca^{2+} -abhängigen Signalkaskaden erkennen.

Der Chlorid-Transport erfolgt nach Studien von Tilly *et al.* (1992) durch einen substratspezifischen Anionenkanal. Dieser wird als ATP-abhängig und als nicht von Proteinkinasen reguliert beschrieben.

Schwermetalle wie Kupfer, Silber und Cadmium sind Bestandteile einiger Enzymkomplexe, wirken aber aufgrund der niedrigen Redoxpotentiale in höheren Konzentrationen toxisch. So wird überschüssiges Kupfer in der Leber, durch Exocytose, mit der Galle ausgeschieden (Gross *et al.*, 1989). Für die Aufnahme dieser Schwermetall-Ionen in die Lysosomen von Hepatozyten scheint eine P-Typ ATPase verantwortlich zu sein, die sowohl monovalentes Ag^+ ($K_m = 16 \mu M$) als auch divalentes Cu^{2+} ($K_m = 17 \mu M$) und Cd^{2+} ($K_m = 28 \mu M$) transportiert (Havelaar *et al.*, 1998).

Aminosäuren

Unter Anwendung der Methylester-Methode gelang es Pisoni *et al.* (1985) ein Transportsystem für die kationischen Aminosäuren L-Arg und L-Lys in der lysosomalen Membran humaner Fibroblasten nachzuweisen. Dieses weist eine nicht eindeutige pH-Abhängigkeit auf und wird von strukturell ähnlichen, gemischten Disulfiden wie 2-Aminoethyl-L-cystein kompetitiv inhibiert.

Anionische Aminosäuren wie L-Glu und L-Asp werden durch ein hochaffines ($K_m = 12 \mu M$) Transportsystem aus den Lysosomen befördert (Collinari *et al.*, 1989). Die Freisetzung von L-Glu aus den Lysosomen erfolgt sehr rasch (Halbwertszeit = 5-7 min, bei pH 7.0 und 37 °C) und mit linearer pH-Abhängigkeit des Systems.

Für den Transport kleiner neutraler Aminosäuren werden drei verschiedene Transportsysteme beschrieben (Pisoni *et al.*, 1987b). Ein System zeigt hohe ($K_m = 10 \mu M$), ein niedriges ($K_m = 70 \mu M$) und ein weiteres zeigt keine Affinität zu L-Pro. Dabei wurde beobachtet, daß das hoch affine System etwa 70 % des gesamten Prolin-Umsatzes transportiert und durch L-Ala kompetitiv inhibiert werden kann. Der niedrigaffine Prolin-Transporter hingegen erkennt

keine weitere Aminosäure, sodaß die kleinen neutralen Aminosäuren L-Ala, L-Ser und L-Thr vornehmlich von dem dritten Transportsystem freigesetzt werden.

In Ratten-Thyroidzellen konnte, durch Transportstudien mit [3H]Tyrosin, ein Transportsystem für große neutrale Aminosäuren nachgewiesen werden (Bernar *et al.*, 1986). Zu dessen Substraten zählen L-Ile, L-Leu, L-Thr, L-Tyr, L-Phe und L-His, deren Transport nicht an einen pH-Gradienten gekoppelt ist, jedoch durch Thyreotropin stimuliert werden kann (Harper *et al.*, 1988). Dieses schilddrüsenstimulierende Hormon bewirkt die Ausschüttung von Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) nach Abbau deren Speicherkolloide, via Endocytose, in den Lysosomen. Als Nebenprodukt entstehendes Monoiodtyrosin wird ebenfalls von diesem Transportsystem aus den Lysosomen freigesetzt (Andersson *et al.*, 1990).

Der Transport von verzweigtkettigen neutralen (L-Leu, L-Val) und aromatischen Aminosäuren (L-Phe, L-Trp), so berichten Stewart *et al.* (1989), wird von zwei unterschiedlichen Transportsystemen bewerkstelligt. Dabei erwies sich der Transport als ATPase-unabhängig, aber mit deutlichen Unterschieden im Inhibitorspektrum.

Eines der ersten untersuchten Transportsysteme ist der Cystin-Transport, den Gahl *et al.* (1982) und Jonas *et al.* (1982) an Leukozyten-Lysosomen studierten. Mit der Methylester-Methode konnte gezeigt werden, daß die lysosomale Membran über ein spezielles Transportsystem verfügt, welches bei Lysosomen von Patienten mit einer Cystin-Speicherkrankheit (Cystinosis) inaktiv ist. Spätere Studien machten deutlich, daß das System an die ATPase-Aktivität gekoppelt ist und zudem für andere Disulfide wie Cysteamin-Cystein bzw. Cystamin zugänglich ist (Smith *et al.*, 1987).

Die Aufnahme von Cystein aus dem Cytosol wurde bereits 1982 beobachtet (Gahl *et al.*, 1982, Jonas *et al.*, 1982) und als wichtiger Prozeß für die Reduktion disulfidhaltiger Proteine bei der Proteinolyse angesehen (Lloyd, 1986). Ein spezifisches Importsystem wurde erstmals von Pisoni *et al.* (1990) mit einem K_m von 50 μ M beschrieben. Für dieses lysosomale Transportsystem, welches von Cysteamin inhibiert wird, wurde ein sehr hoher Q_{10} -Wert (3.2) ermittelt und eine starke pH-Abhängigkeit festgestellt.

Bereits 1976 konnte von Thoene *et al.* (1976) gezeigt werden, daß in Cysteamin kultivierte Cystinose-Fibroblasten keine Akkumulation von Cystin aufwiesen. Die Cysteamin-Aufnahme in die Lysosomen konnte durch Pisoni *et al.* (1995) erst lange nach der therapeutische Anwendung von Cysteamin zur Behandlung von Cystinose, geklärt werden. Dieser sekundär-

aktive Transporter weist für Cysteamin einen K_m -Wert von 0.88 mM auf und transportiert eine Reihe von Substraten deren Aminogruppe und ein Schwefelatom durch eine C2-Kette verknüpft sind. Der Import von Cysteamin ermöglicht die Bildung von Cysteamin-Cystein-Disulfid, das, als Lysin-Analoga, durch den Transporter für kationische Aminosäuren auch bei Cystinose-Zellen entfernt werden kann (Pisoni *et al.*, 1987a).

Der Transport der nicht proteinogenen Aminosäure Taurin wurde von Vadgama *et al.* (1991) an Rattenleber untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß ein Transportsystem mit hohem K_m -Wert existiert, das abhängig von einem K^+ -Gradienten arbeitet.

Als weiteres Transportsystem wurde ein Dipeptid-Transporter beschrieben, der für den Transport von Di- und Tripeptiden verantwortlich ist (Thamotharan *et al.*, 1997). Dieser niedrigaffine Transporter (K_m von 4.7 mM für L-Gly-Gln) ist an den Transport von Protonen gekoppelt und zeigte im Westernblot Homologie zu Pept-1, einem Oligopeptid-Transporter aus dem Darm (Zhou *et al.*, 2000).

Zucker

Zu den früh untersuchten lysosomalen Transportsystemen zählt auch der Sialinsäure-Transport, dessen Defekt als Ursache für die Speicherkrankheiten Salla Disease und Infantile Sialinsäure Speicherkrankheit (ISSD) angesehen wurde (Renlund *et al.*, 1986). Mancini *et al.* gelang es 1989 ein solches Transportsystem in Rattenleber-Lysosomen nachzuweisen, das Monocarbonsäuren, wie auch Glucuronsäure und Laktat, ATPase-abhängig transportieren kann (Mancini *et al.*, 1992; Havelaar *et al.*, 1998). Später gelang es diese Transportaktivität in Proteoliposomen zu rekonstituieren (Mancini *et al.*, 1992) und ein 57-kDa Protein der Membran zu reinigen, mit dem die Aktivität korrelierte (Havelaar *et al.* 1998).

Ein Glucose-Transporter der lysosomalen Membran wurde 1990 charakterisiert (Mancini *et al.*, 1990). Dieser zeigte eine pH-unabhängige, niedrige Affinität ($K_m = 75$ mM) und ein Substratspektrum, das sowohl neutrale Hexosen wie Pentosen umfaßt.

Ein hoch spezifisches Transportsystem für N-acetylierte Hexosamine, wie N-Acetylgalactosamin und -glucosamin wurde von Jonas und Jobe (Jonas & Jobe, 1990) beschrieben. Der Transport erfolgte im Sättigungsbereich von 1.3 - 4.4 mM in einem ATPase-gekoppelten Mechanismus.

Nukleinsäuren werden in Lysosomen zu Phosphat und den einzelnen Nucleosiden gespalten, deren Zuckerrest erhalten bleibt. Der Transport der Pyrimidin- und Purin-Nucleoside erfolgt scheinbar über ein gemeinsames Transportsystem (Pisoni & Thoene, 1989), das pH-unabhängig und mit einem hohen K_m -Wert (K_m für Adenosin = 9 mM) ausgezeichnet ist.

Vitamine

Folypolyglutamat (FPG) ist die im Cytoplasma vorkommende Form der Folsäure (Vitamin B₂), das durch Bindung von Glutamyl-Resten an das terminale Folsäure-Glutamat entsteht. Der Import von FPG in die Lysosomen, in denen Folsäure wieder freigesetzt werden kann, wurde anhand des Analogon Methotrexat-Polyglutamat (MTXPG) untersucht (Barrueco & Sirotnak, 1991). Dabei wurde ein Transportsystem charakterisiert, das eine mit zunehmender Zahl der Glutamyl-Reste (1-7) steigende Affinität ($K_m \approx 40-350 \mu\text{M}$) zeigt und durch Kalium- und Magnesium-Ionen stimuliert wird.

Vitamin B₁₂ (Cobalamin) ist Kofaktor zahlreicher Enzyme und wird nach Endocytose und lysosomalem Abbau ins Cytosol freigesetzt (Youngdahl-Turner *et al.*, 1978). Transportstudien mit [⁵⁷Co]Cobalamin konnten in lysosomalen Vesikeln aus Rattenleber ein spezifisches Transportsystem mit einer Sättigung von $K_m = 3.5 \mu\text{M}$ ermitteln (Idriss & Jonas, 1991).

Sonstige Transportsysteme

Der Abbau von Heparansulfat in den Lysosomen erfordert als Zwischenschritt die Übertragung einer Acetyl-Gruppe auf ein endständiges D-Glucosamin. Das Fehlen dieser Transferase-Aktivität wurde in Fibroblasten von Patienten mit Sanfillipo C-Syndrom beobachtet, bei denen sich das sulfatierte Polysaccharid in den Lysosomen anreichert. Der Transport erfolgt aus dem Cytosol durch Übertragung von Acetyl-Reste des N-Acetyl-CoA auf die membranständige Transferase und deren intralysosomale Weitergabe (Rome & Bame, 1985). Das als Acetyl-CoA:α-glucosaminid-N-acetyltransferase bezeichnete Enzym zeigt hohe Affinität sowohl zu Acetyl-CoA ($K_m = 0.55 \text{ mM}$) als auch zu Glucosamin ($K_m = 0.3 \text{ mM}$).

Der Defekt eines möglicherweise weiteren Transportsystems führt in Patientenzellen der Niemann-Pick Typ C-Krankheit zur Speicherung von Cholesterol in Lysosomen (Liscum *et al.*, 1989). Dabei scheint im wesentlichen die Umverteilung des Cholesterol betroffen zu sein, daß sich durch die Proteinolyse von endozytiertem LDL generiert (Pentchev *et al.*, 1997). Durch Positionsklonierung konnte ein mutiertes Gen, NPC-1, aus Mensch (Carstea *et al.*,

1997) und Maus kloniert werden, das für ein Protein mit 1278 Aminosäuren (142 kDa), 13 - 16 möglichen Transmembrandomänen und einem Sterol-Bindungsmotiv codiert (Watari *et al.*, 1999). Zudem finden sich im C-Terminus ein LIMP II-artiges Dileucin-Motiv, das für die lysosomale Lokalisation essentiell ist. Immunhistochemische Untersuchungen deuten allerdings daraufhin das NPC-1-Protein in der Membran später Endosomen lokalisiert ist.

Ein Transportprotein mit noch unbekanntem Substrat ist der mit lamp-1 und lamp-2 ko-lokalisierende ABCB9-Transporter, der aus Maus kloniert wurde (Zhang *et al.*, 2000). Dabei handelt es sich um einen Halbtransporter mit einer ATP-Bindungskassette und 10 möglichen Transmembrandomänen. Als mögliche Sortierungsmotive weist ABCB9-Protein sowohl ein Tyrosin- als auch ein Dileucin-Motiv auf, deren Bedeutung noch nicht geklärt ist.

2.1.5 Genetische Defekte des lysosomalen Membrantransports

Lysosomale Speicherkrankheiten sind seltene Stoffwechselkrankheiten, die durch die Speicherung von Abbauprodukten in den Lysosomen charakterisiert sind. Bei den meisten Fällen führt ein einzelner Proteindefekt zum Abbruch eines einzigen lysosomalen Stoffwechselschrittes, der jedoch Ursache für einen sehr komplexen Krankheitsverlauf sein kann. Alle lysosomalen Speicherkrankheiten weisen klinische Variabilität auf, die bedingt ist durch den Zeitpunkt des Ausbruchs und das Fortschreiten der Erkrankung. Trotz fließender Übergänge lassen sich meist drei Varianten unterscheiden: Schwere infantile, mittelschwere juvenile und milde adulte Formen. Mit der Entdeckung der Lysosomen als Zellorganell begann die Klassifizierung von jahrzehntelang bekannten Krankheitsbildern, durch den Nachweis von Speichermaterial in den Lysosomen. Seitdem wurden über 30 dieser Krankheiten mit dem Gendefekt luminaler Proteine (Enzyme und Cofaktoren) der Lysosomen erklärbar. Weitere 5 Speicherkrankheiten werden auf den Defekt eines Transportsystems zurückgeführt und befinden sich am Beginn des molekularen Verständnisses.

Die **Cystinose** tritt zu 95 % in der infantilen Form auf, die auch als nephropatische Cystinose bezeichnet wird. Bei ihr finden sich große Mengen von Cystin in den Lysosomen, das aufgrund der geringen Löslichkeit zur Kristallbildung neigt. Besonders betroffen sind dabei die Nierenzellen der proximalen Tubuli, bei denen die Resorptionseigenschaften verloren gehen und bereits in jungen Jahren zu einem renalen Faconi-Syndrom führen kann. Weitere Symptome sind Wachstumsstörungen, Nierenversagen, sowie, bedingt durch Cystin-Kristallbildung im Auge, Lichtempfindlichkeit und Netzhautablösungen (Gahl *et al.*, 1995). Patienten der

infantilen Form erreichen ohne Transplantation oder Dialysebehandlung ein Alter von bis zu 10 Jahren (Gretz *et al.*, 1983). Mildere Ausprägungen werden bei der adoleszenten und der adulten Form beobachtet, wobei letztere keine Beeinträchtigung der Nierenfunktion aufweist.

Viele Studien zeigten, daß der Verbleib von Cystin in den Lysosomen durch einen Defekt des Cystin-Exportsystems bedingt ist, welches biochemisch charakterisiert wurde (siehe 2.1.4). Da die Gabe von Cysteamin (β -Mercaptoethylamin) zum vermehrten Ausstrom von lysosomalem Cystin in Cystinose-Fibroblasten führte (Thoene *et al.*, 1976), wurde schon bald eine Therapie durch orale Behandlung mit Cystagon™ (Bitartratsalz des Cystamins) entwickelt. Eine frühe Behandlung mit hohen Dosen ermöglichte dabei eine Verlangsamung der Nierenschädigung, begleitet von stärkerem Wachstum (Gahl *et al.*, 1995). Die Aufnahme von Cysteamin wird durch ein spezifisches Transportsystem ermöglicht (siehe 2.1.4) und führt zum Disulfidaustausch mit Cystin unter Bildung von Cysteamin-Cystein-Disulfiden. Die Freisetzung ins Cytosol erfolgt mit Hilfe des Transportsystems für kationische Aminosäuren (siehe 2.1.4). Bei allen Cystinose-Formen geht die Erkrankung auf Mutationen im gleichen Gen, dem Cystinose-Gen CTNS, zurück (Pellett *et al.*, 1988), das durch Positionsklonierung auf dem Chromosomenabschnitt 17p13 identifiziert wurde (Town *et al.*, 1998). Dabei findet sich als Folge der häufigsten Mutation eine 65 kb-Deletion, die einen Bereich vor der ersten Transmembrandomäne betreffen.

Die **Cobalamin F-Krankheit** wurde als neue Form der Methylmalonatazidurie von Rosenblatt *et al.* (1985) beschrieben. Dieser Typ der Methylmalonyl-CoA-Stoffwechselerkrankheiten, wurde charakterisiert durch die Akkumulation von freiem Cobalamin (Vitamin B₁₂) in den Lysosomen von Patientenfibroblasten. Die damit verbundenen Symptome sind erhöhte Ausscheidung von Methylmalonat und Homocystin mit dem meist sauren Urin (Homocystinurie) und dem plötzlichen Tod in den ersten Lebensjahren (Kapadia, 1995; Fowler, 1998). Da Cobalamin-Enzyme sowohl an der Umlagerung von Methylmalonyl-CoA zu Succinyl-CoA als auch bei der Methylierung von Homocystin zu Methionin beteiligt sind, liegt der Mangel an cytosolischem Cobalamin zur Erklärung nahe. Welche Bedeutung dabei das charakterisierte Transportsystem der Lysosomen für Cobalamin hat, ist jedoch noch unklar (siehe 2.1.4).

ISSD und **Salla Disease**, zwei Sialinsäure-Speicherkrankheiten, wurden beschrieben (Gahl *et al.*, 1989) bei denen das lysosomale Exportsystem für Monocarbonsäure-Zucker stark bzw. mäßig beeinträchtigt ist (Mancini *et al.*, 1991). Die autosomal-rezessiv verbbare Krankheit

führt in etwa 80 % der beschriebenen Fällen zu einer milden Auprägung, wie sie in der abgelegenen nordfinnischen Region Salla zuerst beobachtet wurde (Aula *et al.*, 1979). Zur Symptomatik gehören eine verspätete psychomotorische Entwicklung, Hypotonie und Ataxie (Bewegungsstörung) innerhalb der ersten 12 Monate. Später können der Rückgang der Psychomotorik und der Sprechfähigkeit, sowie Wachstumsstörungen festgestellt werden. Im Gegensatz zur Salla Disease, wo noch Restaktivitäten des Transporters gemessen werden können, kommt es bei vollständigem Fehlen dieser Aktivität zu dem deutlich schwereren Krankheitsverlauf der ISSD-Patienten. Neben groben Gesichtszügen, Wachstums- und Entwicklungsstörungen, werden auch Organvergrößerungen (Leber und Milz) und mentale wie motorische Retardierungen beobachtet. Die Lebenserwartung ist bei ISSD-Patienten auf die ersten Lebensjahre beschränkt, bei Salla Disease wird hingegen eine nur wenig beeinträchtigte Lebenserwartung verzeichnet (Gahl *et al.*, 1995). Die Diagnose dieser Speicherkrankheiten erfolgt durch Dünnschicht-Chromatographie der Sialinsäure im Urin und dessen Nachweis in Lysosomen, was sie von der Sialuria, mit einer ungehemmten cytoplasmatischen Sialinsäure-Biosynthese unterscheidet (Sepala *et al.*, 1991). Als weitere Speichersubstanz konnten nur geringe Mengen von Glucuronsäure in Patienten-Fibroblasten detektiert werden (Blom *et al.*, 1990) (siehe 2.1.4). Mikrosatellitenanalysen in Salla Disease Familien führten zur Lokalisierung des betroffenen Gens auf dem Chromosom Abschnitt 6q14-q15 (Haatja *et al.*, 1994; Schleutker *et al.*, 1995) und zur Sequenzierung des SLC17A5 Gens. Dieses kodiert für ein 495 Aminosäuren-Protein (53 kDa), das Sialin genannt wurde (Verheijen *et al.*, 1999). Das Gen ist ubiquitär expremiert und weist Homologie zu verschiedenen Na⁺/Phosphat-Cotransportern auf.

Die **Niemann-Pick Typ C** Krankheit zeichnet sich durch die intrazelluläre Speicherung von Sphingomyelin und anderen Lipiden aus, was zu schweren Schädigungen in Nervenzellen, Leber und Milz führt. Niemann-Pick C und die mildere Form (Typ D) werden auf einen fehlerhaften Transport von Cholesterol aus den Lysosomen zurückgeführt. Die Speicherung der Lipide in cytosolischen Bläßchen (Schaumzellen) führt zur Organvergrößerung und Neurodegeneration. Die Positionsklonierung erbrachte die Identifizierung des NPC-1 Gens (siehe 2.1.4).

Das **Sanfilippo Typ C**-Syndrom gehört zu der größten Gruppe lysosomaler Speicherkrankheiten, den Mucopolysaccharidosen. Hierbei ist der Abbau von Heparansulfat durch einen Defekt der Acetyl-CoA:α-glucosaminid-N-acetyltransferase betroffen, was zur Speicherung von unvollständig abgebautem Polysaccharid in den Lysosomen führt (Klein *et al.*, 1978). An

dem Abbau sind schrittweise eine Sulfatase und eine für den endständigen Zuckerrest spezifische Exoglycosidase beteiligt. Da in den Lysosomen keine α -Glucosaminidase, sondern eine α -N-Acetylglucosaminidase aktiv ist, muß dieser besondere Weg der Acetylierung beschriftet werden. Ist dies wie im Falle des Sanfilippo C-Syndroms nicht möglich, kommt es zur Speicherung von Heparansulfat in den Lysosomen und zur vermehrten Ausscheidung mit dem Urin.

2.1.6 Membranproteine in der Proteom-Forschung

Für die kinetischen Untersuchungen der lysosomalen Transportsysteme wurden Lysosomen meist aus Fibroblasten-Kulturen bzw. aus der Rattenleber isoliert. Das Erfordernis, Lysosomen aus frischem Gewebe zu isolieren, macht humane Plazenten speziell für präparative Zwecke zum geeigneten und leicht zugänglichen Material. Als weitere Vorteile sprechen für eine Präparation aus Plazenta der hohe Anteil an Lysosomen und daß menschliches Gewebe, gerade im Hinblick auf die Fülle von Daten aus dem Human Genom Forschungsprojekt, die geeignetste Quelle für Proteom-Studien ist. Die am häufigsten beschriebene Methode für die Isolierung von Lysosomen ist die subzelluläre Fraktionierung durch Ultrazentrifugation in einem Dichtegradienten. Der Einsatz verschiedener Materialien, wie Metrazimid (De Duve *et al.*, 1955; Wattiaux *et al.*, 1978), Saccharose (Dobrota & Hinton, 1980) oder Percoll (Pertoft *et al.*, 1978; Jonas, 1986) wurden dabei zur Fraktionierung der, nach Abtrennung der Zellkerne verbleibenden, Organellen eingesetzt. Dabei erwiesen sich die selbstformenden Percoll-Gradienten als einfach, effektiv und zeitsparend. Alternative Methoden wurden beschrieben, die Lysosomen mit Hilfe von Affinitätschromatographie an Sepharose-gebundenem Agglutinin (*Ricinus communis*) (Kamrath *et al.*, 1984) oder durch Free-Flow-Elektrophorese (Stahn *et al.*, 1970) isolierten. Die Präparation der lysosomalen Membranproteine erfolgt im einfachsten Fall nach hypotoner Lyse durch Ultrazentrifugation. Eine qualitativ bessere Reinigung gelingt bei Anwendung der Methylester-Methode, in Kombination mit einem weiteren Percoll-Gradienten (Symons & Jonas, 1986) oder durch Affinitätsreinigung mit Antikörpern gegen lysosomale Membranproteine, wie lamp-2, nach Ultraschallbehandlung (Dietrich *et al.*, 1996).

Viele der strukturell aufgeklärten Membranproteine wurden als Antigene von poly- oder monoklonale Antikörper isoliert, die gegen lysosomale Membranfraktionen oder zelluläre Komponenten gemacht wurden (siehe 2.1.3). Entscheidend dafür war ihre hohe Konzentration

in den Membranen der lysosomalen Kompartimenten. Die gezielte Isolierung der weniger stark vertretenen Transportproteine erfordert hingegen die schonende Extraktion und Rekonstitution eines aktiven Transporters nach jedem Reinigungsschritt. Bisher ist eine erfolgreiche Rekonstitution nur für drei lysosomale Transportsysteme, der H^+ -ATPase (D'Souza *et al.*, 1987), dem Sialinsäuretransporter (Mancini *et al.*, 1992) und dem Sulfattransporter (Koetters *et al.*, 1995), beschrieben. Molekulargenetische Ansätze wie Mikrosatellitenanalyse und Positionsklonierung ermöglichten erst vor kurzem die Sequenzbestimmung des Cystintransporters (Town *et al.*, 1998) und des Sialinsäuretransporters (Verheijen *et al.*, 1999), sind aber auf genetische Untersuchungen betroffener Familien angewiesen.

Andere Möglichkeiten verfolgt die Analyse des lysosomalen Membranproteoms durch zweidimensionale (2D-)Trennung, wie sie für eine Vielzahl von Zelllinien seit den Neunziger Jahren beschrieben wurden (Wilkins *et al.*, 1996; Celis *et al.*, 1996) und via Internet weltweit zugänglich sind (<http://www.expasy.hcuge.ch/ch2d/2d-index.html>). Nach der von O'Farrell (1975) eingeführten Trennung von Proteinen nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht ist es möglich mehr als 1000 Proteine in einem Gel zu separieren. Verbessert wurde diese Methode durch die Verwendung von Polyacrylderivaten mit denen der Gradient der isoelektrischen Fokussierung (IEF) im Gel fixiert werden konnte. Solche Immobilin-Streifen ermöglichten eine Standardisierung der Trennung und zeichneten sich durch hohe Ladungskapazität und eine höhere Trennschärfe der erhaltenen Proteinflecken (Spots) aus (Bjellqvist *et al.*, 1982). In präparativen 2D-Trennungen können Milligrammmengen Protein aufgetragen werden, die nach der 2. Dimension ausreichend Material für strukturelle Analysen, wie N-terminale Sequenzierungen, liefern. In Kombination mit neueren Methoden der massenspektroskopischen Mikrosequenzierung werden nur noch Proteinmengen im Nanogramm-Bereich benötigt (Shevchenko *et al.*, 1996a). So konnten neben vielen löslichen Proteinen auch einige Membranproteine (Sinha & Righetti *et al.*, 1986; Rouquié *et al.*, 1997; Molloy, 1998) mit Hilfe der Immobilin-2D-Technik identifiziert werden. Dennoch erwiesen sich gerade die Membranproteine als besonders schwierig in der präparativen 2D-Trennung und konnten nur in Einzelfällen durch spezielle Detergenzien, Reduktionsmittel oder methodische Weiterentwicklungen in ausreichenden Mengen isoliert werden.

Als Alternative zur isoelektrischen Fokussierung in Gelsystemen sind für präparative Zwecke Kammern entwickelt worden, bei denen die zu trennenden Proteine in Trägerampholyt-Lösungen fokussiert werden. Zur ersten Generation zählt das Rotofor-System, welches ein geschlossenes zylindrisches System darstellt, bei dem die Proteine zwischen den Elektroden

durch Polyesterfilter in 20 Fraktionen separiert werden können. Für dieses System wurde eine Trennung von Membranproteinen, auch aus sehr heterogenen Proteinlösungen beschrieben (Nore *et al.*, 1994). Bessere Trennmöglichkeiten bieten hingegen Kammern für Durchflußelektrophoresen (engl.: Free-Flow-Elektrophorese, kurz FFE), wie das OCTOPUS-System. In diesen Systemen durchfließt die proteinhaltige Ampholyt-Lösung die Kammer als dünner Film, der einem dazu senkrecht angelegten elektrischen Feld, unter permanenter Kühlung, ausgesetzt ist. Die Proteine fokussieren dabei in dem sich ausbildenden pH-Gradienten und verlassen die Kammer anschließend durch eine Fraktioniereinheit über 96 Auslässe. Dieses komplexe System ermöglicht aufgrund des kontinuierlichen Verfahrens eine rasche Trennung großer Volumina, bei zugleich hoher Trennschärfe und annähernd hundertprozentiger Ausbeute (Burggraf *et al.*, 1995).

Mit der Einführung massenspektroskopischer Verfahren in der Proteinanalytik konnten Proteine nach sequenzspezifischer Spaltung anhand ihres charakteristischen Peptidmusters in Sequenzdatenbanken identifiziert werden. Die Möglichkeit des in-Gel-Verdaus mit Trypsin ermöglichte dabei die direkte Analyse von Spots aus präparativen 2D-Gelen durch die matrix-assisted laser desorption/ionisation (MALDI) -Technik (Henzel *et al.*, 1993). Die weitere Fragmentierung der spezifischen Peptide wurde durch Elektrospray-Ionisation (ES) möglich und resultiert in einem Fragmentmuster, aus dem sich auf die jeweilige Peptidsequenz schließen läßt (Pandey & Mann, 2000). Die Kombination beider Verfahren wird in der Tandem-Massenspektroskopie angewendet, bei der die hohe Spezifität der Sequenzinformation weniger Peptide ausreicht um Proteine auch in EST-Datenbanken aufzuspüren. Als weiteren Vorteil erlauben beide Methoden die Identifizierung von Proteinen aus einem Gemisch.

2.2 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode zur präparativen Trennung lysosomaler Membranproteine entwickelt werden, die auf dem Prinzip der zweidimensionalen Trennung (Trennung nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht) gründet.

1.) An Präparationen immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranen konnten, in Vorarbeiten von O. Diettrich, Proteine mit einem Sialinsäure-Derivat photoaffinitätsmarkiert werden. Diese Markierung war durch die Monocarbonsäurezucker N-Acetylneuraminsäure und Glucuronsäure hemmbar und zeigte Korrelation zu Proteinflecken der zweidimensionalen Trennungen nach Silberfärbung. Mit Hilfe der Immobililine-2D-Gelelektrophorese sollten Polypeptide identifiziert werden, die Eigenschaften des sialinsäurebindenden lysosomalen Membranproteins aufweisen und möglicherweise mit dem Sialinsäuretransporter assoziiert sein könnten.

2.) Eine Methode zur präparativen Trennung der lysosomalen Membranproteine mit Hilfe zweidimensionaler Trennungen sollte entwickelt werden. Dazu sollten zunächst die Möglichkeiten der Immobililine-2D-Gelelektrophorese überprüft werden. Alternativ dazu, sollten die Möglichkeiten zur präparativen isoelektrischen Fokussierung der Membranproteine mit dem OCTOPUS-Gerät, einer Durchflußelektrophoresekammer, untersucht werden. Darauf aufbauend, sollten die fokussierten lysosomalen Membranproteine einer präparativen SDS-PAGE zugänglich gemacht werden.

3.) Die Proteinbestandteile immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranen sollten nach präparativer zweidimensionaler Trennung charakterisiert werden und dazu, in Ansätzen, durch Sequenzierung auf molekularer Ebene identifiziert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Die im folgenden aufgelisteten Chemikalien wurden mindestens in *p. a.* Qualität beschafft.

N-Acetylneuraminsäure	Serva	Heidelberg
Acrylamid	Serva	Heidelberg
Agarose SeaPlaque (niedrig schmelzend)	Biozym	Hess. Oldendorf
AgNO ₃ (Silbernitrat)	Roth	Karlsruhe
Ampholyte (Servalyt 3-10; 3-7; 5-7)	Serva	Heidelberg
Anthron	Merck	Darmstadt
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Serva	Heidelberg
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	Serva	Heidelberg
Bromphenolblau	Serva	Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin, Fraktion V)	Serva	Heidelberg
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)- dimethylammonio-]-1-propansulfonat)	Sigma	Deisenhofen
CHCl ₃ (Chloroform)	Roth	Karlsruhe
Coomassie ® Blue (Brilliant Blue G 250)	Serva	Heidelberg
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma	Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth	Karlsruhe
DTT (Dithiothreitol)	Biomol	Ilvesheim
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Merck	Darmstadt
Essigsäure	Roth	Karlsruhe
Ethanol	Merck	Darmstadt
Ethanolamin	Merck	Darmstadt
Eupergit C1Z	Fluka	Neu-Ulm
Formaldehyd (37%)	Merck	Darmstadt
Glucuronsäure (D-) NaSalz	Sigma	Deisenhofen
Glycerin	ICN	Meckenheim
Glycin	ICN	Meckenheim
HAc (Essigsäure)	Roth	Karlsruhe
Harnstoff ultra pure	Roth	Karlsruhe
HCl (Salzsäure, 32 %)	Merck	Darmstadt
HEPES	Biomol	Ilvesheim
H ₃ PO ₄ (Phosphorsäure)	Merck	Darmstadt
H ₂ SO ₄ , konz. 95-97% <i>p. a.</i>	Merck	Darmstadt
Hydroxylapatit Biogel HTP	BioRad	München
Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) 4 000 cps	Fluka	Neu-Ulm
Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) 5 cps	Fluka	Neu-Ulm
Immobiline-DryPlates pH 4-7;110 ×250 ×0.5 mm	Pharmacia-Biotech	Freiburg

Iodacetamid (IAA)	Serva	Heidelberg
Isopropanol	Roth	Karlsruhe
IAA (Iodacetamid)	Serva	Heidelberg
K ₂ HPO ₄ (Dikaliumhydrogenphosphat)	Merck	Darmstadt
K ₂ HPO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck	Darmstadt
Leupeptin	Boehringer	Mannheim
β-Mercaptoethanol	Sigma	Deisenhofen
Methanol	Baker	Groß-Gerau
Mischbettionenaustauscher AG 501X8	Bio-Rad	München
Molekulargewichtsstandard (Protein, "low mol. weight")	BioRad	München
NaAc (Natriumacetat)	Merck	Darmstadt
Natriumcitrat	Merck	Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Roth	Karlsruhe
Na ₂ CO ₃ (Natriumcarbonat)	Baker	Groß-Gerau
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merck	Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat)	Merck	Darmstadt
NaN ₃ (Natriumazid)	Merck	Darmstadt
NaOH (Natriumhydroxid)	Merck	Darmstadt
Na ₂ S ₂ O ₃ (Natriumthiosulfat)	Roth	Karlsruhe
Natriumtaurocholat	Sigma	Deisenhofen
Natriumthioglycolat	Sigma	Deisenhofen
p-Nitrophenyl-N-acetyl-β-D- glucosaminid	Sigma	Deisenhofen
p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranosid	Sigma	Deisenhofen
Nonidet P-40 (10 % (w/v)-Lösung)	Boehringer	Mannheim
NOVEX-Colloidal-Blue	Serva	Heidelberg
Paraffin, flüssig	Merck	Darmstadt
Percoll	Pharmacia-Biotech	Freiburg
Pepstatin A	Sigma	Deisenhofen
pI –Markerfarbstoffe	Slais & Friedl	Brno (Tschechien)
Phenolrot	Serva	Heidelberg
Phenylglyoxal	Sigma	Deisenhofen
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Serva	Heidelberg
Roti [®] -Quant (Fa. Roth)	Roth	Karlsruhe
Saccharose	Roth	Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat, 100 % C-12)	Serva	Heidelberg
Silbernitrat (AgNO ₃)	Roth	Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Sigma	Deisenhofen
Thioglykolsäure	Sigma	Deisenhofen
Thioharnstoff	Merck	Darmstadt
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Merck	Darmstadt
Triethanolamin	Merck	Darmstadt
Tris (Trishydroxymethan)	ICN	Meckenheim
Triton X-100	Serva	Heidelberg
ZFF (Z-Phe-Phe-diazomethylketon)	Bachem	Heidelberg
Zitronensäure	Roth	Karlsruhe

Das verwendete H₂O entstammte in jedem Fall der Milli Q UF-Anlage (Fa. Millipore, Erkrath)

3.1.2 Enzyme und Antikörper

N-Glykopeptidase F (NGF), rekombinant Boehringer, Mannheim

Maus-anti-lamp-2-Antikörper (MAB-2D5)

der monoklonale Antikörper wurde in unserer Arbeitsgruppe hergestellt und gereinigt.

3.1.3 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller, Ort
Drehrad	Eigenbau der Institutswerkstatt	Universität Münster
ELISA-Reader	MRX	Dynatech Laboratories, Denkendorf
Feinwaage	SBA 33	Scaltec, Heiligenstadt
Free-Flow-Elektrophorese-Gerät	OCTOPUS	Dr. Weber GmbH, Kirchheim
Gefrierschrank -70°C	Umwälzkühlung, Minchiller	Dr. Weber GmbH, Kirchheim
Kühlzentrifuge	Herafreeze	Heraeus, Hanau
Leitfähigkeitsmessgerät	RC 5B+	Sorvall, Bad Homburg
Leuchttische	EC Meter 1481-61	Cole-Pamer Instr., Chicago
Pipetten	Prolite Basic	Kaiser,
PAGE-Kammern	Mäusekino, Institutswerkstatt	Universität Münster
pH-Meter	Pipetman P2;P20;P200;P1000	Gilson
Photometer	Eigenbau der Institutswerkstatt	Universität Marburg
Rotoren für Kühlzentrifuge	Delta 350 & 320	Mettler-Toledo, Gießen
Rotoren für Ultrazentrifuge	Novaspec II	Pharmacia, Freiburg
Schüttler	Ultrospec 3000	Pharmacia, Freiburg
Spannungsgeräte	GSA	Sorvall, Bad Homburg
Speed-Vac	SS 34	Sorvall, Bad Homburg
Tisch-Stoppuhr	TV-865-Rotor	Sorvall, Bad Homburg
Tischzentrifugen	60 Ti	Beckman, München
gekühlt	T-1240	Sorvall, Bad Homburg
Ultrazentrifuge	Eigenbau der Institutswerkstatt	WWU Münster
Vortexer	ECPS 3000/150	Pharmacia, Freiburg
Waage	Model 3000 xi	Bio-rad, München
Wasserbäder	Centrivac	Heraeus, Hanau
Wasserentionisierungsanlage	Junghans	Kobe, Marburg
Wippe	PicoFuge	Stratagene, Heidelberg
	Centrifuge 5415 C	Eppendorf,
	Jouan MR1822	Jouan GmbH, Unterhachingen
	Combi Plus	Sorvall, Bad Homburg
	Vortex Genie 2	Bender & Hohbein, Zürich
	BP 410	Sartorius, Göttingen
	Thermomix BU	Braun, Melsungen
	1003	GFL, Burgwedel
	Milli Q UF plus	Millipore, Eschborn
	Eigenbau der Institutswerkstatt	WWU Münster

3.1.4 Sonstige Materialien

Kunststoffartikel:

Einmalpipetten (1ml, steril)	Falcon	Heidelberg
Einmalspritzen (1ml, 5ml,10ml,50ml,steril)	Falcon	Heidelberg
GSA-Becher (Polypropylen)	Sorvall	Bad Homburg
Kunststoffröhrchen	Greiner	Nürtingen
Mikrotiterplatten (96 wells)	Nunc	Wiesbaden-Biebrich
Reaktionsgefäße	Greiner	Nürtingen
SS 34-Röhrchen (Polyallomer, Polysulfon)	Neolab	Heidelberg
SW 41-Röhrchen (ultra clear)	Kobe	Marburg
Ti 60 Röhrchen	Beckman	München
Polypropylen-Röhrchen, 1.3 ml	Greiner	Nürtingen
Silikonschläuche	Kobe	Marburg

Material und Ersatzteile für das OCTPUS-Gerät wurden bei Dr. Weber (Kirchheim) direkt bezogen.

Filter, Membranen und Papiere

Elektrodenstreifen	Pharmacia Biotech, Freiburg
Cellophanfolie	Pütz Folien, Taunusstein-Wehen
Rundfilter 589 ² Ø 70 mm	Schleicher & Schuell, Dassen

Drucker:

- HP DeskJet 895cxi (Hewlett Packard)
- HP Laserjet 5P (Hewlett Packard)
- HP Scanjet 6200 C (Hewlett Packard)

Software:

Molecular Dynamics	ImageQuant	Auswertung digitalisierter Bilder
Dynatech	Biolinx 2.2	Steuerung und Auswertung des ELISA
Microsoft	Exel 5.0	Kalkulations- und Diagrammprogramm
Microsoft	Word 6.0	Textverarbeitung
Trumpet Software	TCPman 2.1 Revision F	Protokoll für Netzwerkanbindung
Netscape	Communicator 4.61	Internet-Browser

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation von Lysosomen aus humaner Plazenta

3.2.1.1 Isolierung des Organellenkonzentrats

Zur Isolierung intakter Lysosomen eignet sich nur frisches, uneingefrorenes Gewebe. Als entsprechende humane Quelle diente Plazenta von normalen und induzierten Geburten, aus vor Ort ansässigen Entbindungsstationen. Als Nachgeburt freigesetzte Plazenten wurden bei 4 °C abgekühlt und innerhalb der nächsten 30 min, auf Eis, ins Institut transportiert. Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten wurden, sofern nicht anders angegeben, bei 4 °C bzw. auf Eis durchgeführt. Alle zur Aufarbeitung verwendeten Lösungen und Gefäße waren vorgekühlt.

Material

isotonische Kochsalz-Lösung	150 mM	NaCl in A. bidest.*
5× Homogenisierungspuffer	10 mM	Triethanolamin
(fünffach-konzentriert)	10 mM	Essigsäure
	10 mM	Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
	250 mM	Saccharose
		mit NaOH auf pH 7.2 eingestellt

* Alle in dieser Arbeit verwendeten Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, in A. bidest. angesetzt. Dieses wurde aus deionisiertem Wasser in einer Milli-Q-Anlage erzeugt (18 $\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$).

Durchführung

Das Trophoblastengewebe wurde mit einem Messer von dem festeren Gewebe der Chorionplatte abgeschabt und von Verwachsungen und der Nabelschnur befreit. Das Gewebe wurde grob zerteilt und dreimal mit je 500 ml isotonischer Kochsalz-Lösung gewaschen. Vor der weiteren Zerkleinerung in einem Fleischwolf, wurden größere Blutgerinsel entfernt. Je 250 g des erhaltenen Gewebes wurden mit 250 ml einfachkonzentriertem Homogenisierungspuffer versetzt und viermal 5 sec mit einem Ultra-Turrax behandelt. Zwischenzeitlich wurde das Gemisch jeweils kurz auf Eis gestellt.

Das erhaltene Homogenat wurde 10 min in einem GSA-Rotor (Fa. Sorvall) bei 4 000 Upm ($3\,000 \times g_{av}$) zentrifugiert. Anschließend wurde der postnukleäre Überstand (PNÜ) abdekantiert und das Pellet verworfen. Maximal 300 ml des PNÜ wurden in zehn SS34-Röhrchen aliquotiert und mit je 2.4 ml Percoll-Lösung I (siehe 3.2.1.2) vorsichtig unterschichtet. Durch 15minütige Zentrifugation bei 20 000 Upm ($31\,200 \times g_{av}$) wurde das Organellenkonzentrat als lockeres Pellet erhalten. Der Überstand wurde vorsichtig abdekantiert und verworfen. Zur weiteren Aufarbeitung wurden die einzelnen Konzentrate vereinigt (Gesamtvolumen in der Regel 35 ml), mit einfachkonzentriertem Homogenisierungspuffer auf ein Endvolumen von 40 ml gebracht und mit drei Stößen in einem Glas/Teflon-Potter homogenisiert.

3.2.1.2 Dichtegradientenzentrifugation des Organellenkonzentrats

(D. A. Wolff & H. Pertoft (1972); L. H. Rome *et al.* (1979))

Zur präparativen Abtrennung der schweren Lysosomen, von den übrigen Zellorganellen, wurde eine Percoll-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Dabei wurde ein Stufengradient vorgegeben, mit dem sich im selbstformenden Gradienten die schweren Lysosomen von den übrigen Zellorganellen sowie leichten Lysosomen abtrennen ließ.

Material

Saccharose-Lsg.	65 % (w/v)	Saccharose in 1× Homogenisierungspuffer
Percoll-Lösung I	1.090 g/ml	Percoll in 1× Homogenisierungspuffer
Percoll-Lösung II	1.075 g/ml	Percoll in 1× Homogenisierungspuffer

Durchführung

In vier Ultracrimp-Röhrchen aus Polyallomer wurden je 3 ml Saccharose-Lösung, 8 ml Percoll-Lösung I und 14 ml Percoll-Lösung II vorsichtig übereinander geschichtet. Das Organellenkonzentrat (s. 3.2.1.1) wurde darauf verteilt (je 10 ml), sodaß die Röhrchen vollständig gefüllt waren. Diese wurden der Gebrauchsanleitung entsprechend, sorgfältig verschlossen und 30 min bei 21 000 Upm in einem TV-865-Rotor ($35\,500 \times g_{av}$) zentrifugiert. Der farblich deutlich erkennbare Gradient wurde, nach dem Öffnen des Röhrchens, mit einer speziellen Fraktioniervorrichtung (Eigenbau) in 2 ml Fraktionen aufgeteilt. Dabei wurden jeweils 2 ml flüssiges Paraffin auf den Gradienten gepumpt, sodaß über eine Kanüle am unteren Ende des Röhrchens die Fraktionen aufgefangen werden konnten. Da während dieser Prozedur der Gradient ungekühlt war, wurde die Fraktionierung zügig durchgeführt und die Fraktionen

gleicher Nummer (1-16) aus den vier Röhrchen vereinigt und zwischenzeitlich auf Eis gelagert.

Von allen Fraktionen, sowie von PN , Organellenkonzentrat und dem dazugehörigen Überstand wurden Proben zur Bestimmung der spezifischen Aktivitäten von Markerenzymen (s. 3.2.3) zurückbehalten. Die Fraktionen höchster spezifischer Aktivität (in der Regel die Fraktionen 2-5) wurden zu einem Pool dichter Lysosomen (nachfolgend als „dense pool“-Lysosomen bezeichnet) vereinigt und zur Lagerung, tropfenweise in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die dadurch erhaltenen Perlen konnten bei -80  C gelagert und portionsweise verwendet werden.

3.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

(nach Bradford, 1976)

Zur Bestimmung der Proteinmenge aus Percollhaltigen Lösungen wurden die Membranproteine in Gegenwart von Detergenz und Lauge solubilisiert. Dadurch konnte störendes Percoll, das im alkalischen Milieu präzipitiert, durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die Bestimmung wurde in einer Mikrotiterplatte durchgeführt.

Material

Solubilizer	0.250 M	NaOH
	0.025 % (w/v)	Triton X-100
Bradford-Lösung	20 % (v/v)	Roti [�] -Quant
BSA-Standard-Lösung	140 �g/ml	Rinderserumalbumin in Solubilizer

Durchführung

Die Proben wurden in Solubilizer verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 min bei RT und 10 000   g zentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils 20 Öl in eine Vertiefung (well) einer Mikrotiterplatte pipettiert und mit 300 Öl Bradford-Lösung versetzt. In eine Reihe der Mikrotiterplatte wurden BSA-Standards analog des nachfolgenden Schemats pipettiert. Alle Proben und Standards wurden zweifach bestimmt (Doppelwerte).

BSA-Standard-Lösung [μ l]	Solubilizer [μ l]	Proteinkonzentration [μ g/ml]	Proteinmenge [ng]
0	20	0	0
3	18	21	420
5	15	35	700
8	12	56	1 120
11	9	77	1 540
14	6	98	1 960
17	3	119	2 380
20	0	140	2 800

Nach 5minütiger Inkubation bei RT wurde die Absorption der Proben bei 595 nm mit Hilfe eines ELISA-Readers gemessen. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte unter Verwendung von Software MS-Excel.

3.2.3 Aktivitätsbestimmung von Markerenzymen

Zur qualitativen Analyse der Aufreinigung von Lysosomen, wurde die Aktivität der β -N-Acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52), als luminaler lysosomaler Marker, bestimmt. Zur Qualitätsbestimmung von Membranpräparationen wurde zudem die Aktivität der membranassoziierten β -Glucocerebrosidase (EC 3.2.1.45) bestimmt.

2.3.1 Aktivitätsbestimmung der β -N-Acetylhexosaminidase

(nach von Figura, 1977)

Material

isotonische Kochsalz-Lösung	150 mM	NaCl
Substrat-Lösung	100 mM	Natriumcitrat-NaOH, pH 4.6
	0.2 % (w/v)	Triton X-100
	0.2 % (w/v)	BSA
	0.2 % (w/v)	NaN ₃
	10 mM	p-Nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminid
Stop-Lösung	0.4 M	Glycin-NaOH, pH 10.4

Durchführung

Die auf Eis gekühlten Proben wurden mit isotonischer Kochsalz-Lösung verdünnt. Hiervon wurden jeweils 50 µl der verdünnten Probe mit gleichem Volumen Substrat-Lösung versetzt. Danach wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zugabe von Stop-Lösung beendet. Da die Reaktion in Mikrotiterplatten bzw. in Reaktionsgefäßen erfolgte, wurde zur photometrischen Auswertung 200 bzw. 500 µl kalte Stop-Lösung eingesetzt. Danach erfolgte die Absorptionsmessung bei 405 nm im ELISA-Reader bzw. im Photometer.

Von allen Proben wurden Doppelwerte bestimmt, die mit Hilfe der Software MS-Excel ausgewertet wurden.

3.2.3.2 Aktivitätsbestimmung der β -Glucocerebrosidase

(nach von Figura, 1977)

Material

isotonische Kochsalz-Lösung	150 mM	NaCl
Substrat-Lösung	100 mM	NaAc-HAc, pH 5.0
	0.2 % (w/v)	Triton X-100
	0.2 % (w/v)	Natriumtaurocholat
	4.0 mM	p-Nitrophenyl- β -D-glucopyranosid
Stop-Lösung	0.4 M	Glycin-NaOH, pH 10.4

Durchführung

Die Durchführung erfolgte wie unter 3.2.3.1 beschrieben.

3.2.4 Kopplung von MAB-2D5 an Eupergit-C1Z-Perlen

(Grässel *et al.* 1989)

Der gegen die N-terminale Sequenz von humanem lamp-2 gerichtete, monoklonale Antikörper MAB-2D5 (Radons *et al.* 1990) wurde in unserer Arbeitsgruppe präpariert. Die Kopplung erfolgte an nichtporösen Polyacrylharz-Perlen, Eupergit-C1Z (Partikelgröße ca. 1 µm), deren Oberfläche Oxiran-aktiviert war.

Material

Eupergit C1Z		
MAB-2D5		gegen PBS dialysierter MAB-2D5
Bindungspuffer	1 M	KP _i , pH 7.4
Sättigungspuffer	8 M	Ethanolamin-HCl, pH 8.0
PBS	10 mM	NaP _i , pH 7.4
	150 mM	NaCl
BSA-Lösung	50 mg/ml	BSA in A. bidest.
Glycerin	87 % (w/v)	Glycerin
NaN ₃ -Lösung	1 % (w/v)	NaN ₃

Durchführung

Es wurden je 600 µg MAB-2D5 mit A. bidest. auf 250 µl aufgefüllt, mit 250 µl Bindungspuffer versetzt und mit einem Vortex durchmischt (gevortext). Eine 7µl-Probe wurde mit A. bidest. 1:10 (v/v) verdünnt und die Absorption bei 280 nm im Photometer bestimmt. Danach wurden 200 mg Eupergit C1Z dazugegeben und der Ansatz 1 min im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz 2 bis 3 Tage bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Nach einer 2minütigen Zentrifugation bei 10 000 × g wurden 7 µl des Überstandes wie zuvor zur Proteinbestimmung (OD 280) eingesetzt (die Konzentration des freien Proteins sank dabei durchschnittlich auf 15 % des Ausgangswertes). Nach erfolgter Kopplung von MAB-2D5 an Eupergit C1Z, wurden restliche Bindungstellen durch Zugabe von 50 µl Sättigungspuffer bei einer Inkubation von 4 h bei RT auf dem Drehrad inaktiviert. Danach wurden die Eupergit-Perlen mit 500 µl PBS versetzt und wie zuvor abzentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen der Perlen mit je 800 µl PBS wurde der Niederschlag in 320 µl PBS, 50 µl BSA-Lösung, 600 µl Glycerin und 20 µl NaN₃-Lösung aufgenommen und bei -70 °C gelagert.

3.2.5 Präparation von Membranproteinen aus „dense pool“-Lysosomen

Zur Abtrennung der lysosomalen Membranproteine von den löslichen Proteinen (Hydrolasen und Abbauprodukte) wurden zwei Methoden angewandt. Zum einen wurden „dense pool“-Lysosomen (s. 3.2.1) hypoton lysiert und die lysosomalen Membranen durch Ultrazentrifugation pelletiert. Zum anderen erfolgte die Präparation mit Hilfe der Affinitätsperlen 2D5-C1Z mit denen sich lysosomale Membranen anreichern lassen (Diettrich *et al.* 1996).

Das Ausgangsmaterial „dense pool“-Lysosomen wurde bei allen weiteren Verwendungen zunächst in Gegenwart von Proteinase-Inhibitoren aufgetaut. Dabei wurden die folgenden Endkonzentration eingestellt:

Leupeptin	1 μ M	(Stammlösung 5 mM in A. bidest.)
Pepstatin	1 μ M	(Stammlösung 1 mM in DMSO)
Z-F-F	1 μ M	(Stammlösung 1 mM in DMSO)
PMSF	1 mM	(Stammlösung 0.2 M in Isopropanol)
Iodacetamid	5 mM	(Stammlösung 0.5 M in A. bidest.)

3.2.5.1 Membranpräparation durch Ultrazentrifugation

Material

Lysis-Puffer	10 mM	Tris-HCl, pH 7.4
--------------	-------	------------------

Durchführung

Je 2,5 ml „dense-pool“-Lysosomen wurden in eisgekühlte Röhrchen gegeben und mit 22,5 ml Lysis-Puffer verdünnt. Anschließend wurde 2 h bei 4 °C bei 45 000 Upm ($183\,000 \times g_{av}$) in einem Festwinkel-Rotor 60 Ti zentrifugiert. Die bräunliche, feste Interphase aus vier Röhrchen wurde mit einer Pasteurpipette von der glasigen Percoll-Phase abgesaugt und in ein neues Röhrchen überführt. Die so vereinigten Membranpellets wurden mit Lysis-Puffer auf 25 ml gebracht, durchmischt und wiederholt zentrifugiert (s.o.). Das bräunliche Membranpellet wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig vom Boden abgespült und mit dieser oder mit einem Spatel in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.2.5.2 Membranpräparation durch Immunoaffinitätsreinigung

Die Verwendung des monoklonalen anti-h-lamp-2-Antikörpers MAB-2D5, ermöglicht es spezifische Membranfragmente zu isolieren. Dazu muß das Epitop (N-Terminus von h-lamp-2) durch Ultraschall-Behandlung zugänglich gemacht werden.

Material

TBS	10 mM	Tris-HCl, pH 7.4
	150 mM	NaCl

Durchführung

Je 0.5 ml „dense-pool“-Lysosomen wurden in eisgekühlte Reaktionsgefäße gegeben und mit 40 µl 2D5-C1Z-Suspension (s. 3.2.4) versetzt. Danach wurde das Gemisch für 10 sec in ein Ultraschallbad getaucht und die Gefäße zur Antikörperbindung für 4 h bei 4 °C auf einem Drehrad inkubiert. Nach Beimischung von 0.5 ml eiskaltem TBS, ließ man die gebundenen Membranfragmente durch eine Inkubation von 2 h bei 4 °C sedimentieren. Die Abtrennung erfolgte in einer Jouan-Zentrifuge bei 4 °C bei 32 sec maximaler Beschleunigung (entspricht $11\,950 \times g$) und minimaler Bremskraft. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml TBS gewaschen. Durch erneute Zentrifugation für 30 sec unter selbigen Bedingungen und nach Verwerfen des Überstandes, wurden affinitätsgereinigte Membranen erhalten. Diese waren gekoppelt an 2D5-C1Z und wurden bei -20 °C gelagert.

3.2.6 Proteintrennung durch Elektrophorese

Die Trennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen wird am häufigsten zu analytischen Zwecken verwendet. Die besonders hohe Trennleistung in Kombination mit der isoelektrischen Fokussierung (2D-Gelelektrophorese) wurde in dieser Arbeit als grundlegendes Instrument eingesetzt. Für die präparative Trennung von Membranproteinen wurden zudem trägerfreie isoelektrische Fokussierungen durchgeführt. Dazu wurde das OCTOPUS-Gerät, eine Durchflußelektrophorese-Einheit (Fa. Dr. Weber GmbH), eingesetzt.

3.2.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

(nach Lämmli, 1970; Hasilik & Neufeld, 1980)

Für die Auftrennung der Proteine wurden 14%ige Polyacrylamidgele verwendet, die in der Regel 1 mm dick waren und in vertikaler Ausrichtung betrieben wurden. Für präparative Zwecke wurden 1.5 mm dicke Gele dieser Art gegossen, die folgende Zusammensetzung hatten:

Material

	6.4%iges Sammelgel [ml]	14.1%iges Trenngel [ml]
30 % (w/v) Acrylamid	1.6	14
1 % (w/v) Bisacrylamid	1.1	4
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	2.5	----
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	----	7.5
A. bidest.	4.7	4.1
10 % (w/v) SDS (100 % C-12)	0.1	0.3
TEMED	0.01	0.025
25 % (w/v) APS	0.04	0.1

Überschichtungspuffer I	375 mM	Tris-HCl, pH 8.8
	50 % (v/v)	Isopropanol
Überschichtungspuffer II	375 mM	Tris-HCl, pH 8.8
	0.3 % (v/v)	SDS
Anodenpuffer	23 mM	Tris
	384 mM	Glycin
	Durch Zugabe von Tris wurde pH 8.3 eingestellt.	
Kathodenpuffer	0.1 % (w/v)	SDS in Anodenpuffer
	8×10^{-5} % (w/v)	Bromphenolblau
	Der Kathodenpuffer wurde immer frisch angesetzt.	
Thioglykolsäure-Puffer	7 mM	Thioglykolsäure
		in Kathodenpuffer, pH 7.0

Durchführung

Eine mit Ethanol sorgfältig gereinigte Spacer- und Ohrenplatte ($140 \times 100 \text{ mm}^2$) wurde mit einer zwischenliegenden Silikonabdichtung versehen, die nach bündiger Lage der Platten durch Klammern fixiert wurde. Dann wurde die Trenngellösung bis 0.6 cm unterhalb des zu verwendenden Kamms luftblasenfrei eingefüllt und mit Überschichtungspuffer I von Luftsauerstoff abgeschlossen. Nach 1 h Polymerisationszeit wurde die Überschichtungslösung abgesaugt und mit Filterpapier vorsichtig entfernt. Dann wurde die Sammelgellösung bis zur Oberkante der Ohrenplatte gegossen und der Kamm blasenfrei eingeführt. Nach 30 min Polymerisationszeit wurde der Kamm vorsichtig herausgezogen und die Klammern entfernt. Zur

Lagerung in einer feuchten Kammer, wurde die Gelvorrichtung auf einem Träger fixiert und die Probenaschen mit Überschichtungspuffer II gefüllt.

Vor dem Auftrag der Proben wurden die Taschen ausgesaugt und eine Elektrophoresekammer mit vorgekühltem Anodenpuffer (4 °C) gefüllt. Der Träger wurde darin luftblasenfrei versenkt und die Proben in die Taschen pipettiert. Die Proben wurden dann mit Kathodenpuffer vorsichtig überschichtet und die Kathodenkammer mit diesem gefüllt. Die Elektrophoresekammer wurde mit einer Plexiglasplatte verschlossen und die Elektrophorese mit 10 mA/cm² pro Gel gestartet. Nach dem Einlaufen der Bromphenolblau-Bande in das Trenngel wurde die Stromstärke auf 15 mA/cm² pro Gel erhöht. Beendet wurde die Trennung jeweils kurz vor dem Auslaufen der Bromphenolblau-Bande. Zur Visualisierung der getrennten Proteine wurde das Gel wie unter 3.2.7 beschrieben gefärbt.

Präparative SDS-Polyacrylamid-Gele, die für massenspektroskopische Analysen bestimmt waren, wurden hergestellt und vor der Trennung der Proben mit Thioglykolsäure-Puffer vorbehandelt (30 min bei 20 mA/Gel). Nach kolloidaler Coomassie-Blau-Färbung des Gels wurden Banden, die bei -70 °C gelagert bzw. zur massenspektroskopischen Analyse auf Trockeneis verschickt wurden.

3.2.6.2 Zweidimensionale-Gelelektrophorese

(nach Pharmacia-Biotech 1994; Diettrich *et al.* 1996)

Für die zweidimensionale Auftrennung von Proteinen wurde das Immobiline-System von Pharmacia-Biotech verwendet. Die Behandlung der Immobiline-Streifen im Verlauf der Prozedur wurde bei Diettrich *et al.* 1996 beschrieben.

Material

Immobiline-DryPlates pH 4-7		110 × 250 × 0.5 mm
2D-Solubilisierungslösung	9 M	Harnstoff
	0.55 % (w/v)	Triton X-100
Mischbettionenaustauscher		AG 501X8
DTT-Lösung	1 M	Dithiothreitol
CHAPS-Lösung	27 % (w/v)	CHAPS
Ampholyt-Lösung	40 % (w/v)	Servalyte pH 3-7
Paraffin, flüssig		

Elektrodenstreifen		
Equilibrierpuffer I	50 mM	Tris-HCL, pH 6.8
	30 % (w/v)	Glycerin
	2 % (w/v)	SDS
	0.25 % (w/v)	Dithiothreitol
Equilibrierpuffer II	50 mM	Tris-HCL, pH 6.8
	30 % (w/v)	Glycerin
	2 % (w/v)	SDS
	25 mM	Iodacetamid
	6 M	Harnstoff
Agarose-Lösung	0.5 % (w/v)	SeaPlaque Agarose in Kathodenpuffer
Anodenpuffer		s. 3.2.6.1
Kathodenpuffer		s. 3.2.6.1

Durchführung

Für die Probenvorbereitung wurde 2D-Lysis-Lösung mit je 100 mg/ml Mischbettionenaustauscher versetzt. Zur Deionisierung wurde die Lösung bei RT 30 min auf dem Drehrad inkubiert und der Überstand mit CHAPS- und Ampholyt-Lösung auf je 1 % (w/v) eingestellt. Das für die Trennung vorgesehene Probenmaterial (maximales Volumen 30 µl und Salzgehalt < 150 mM) wurde mit dieser Lösung auf ein Volumen von 200 µl gebracht und 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe 5 min bei 10 000 × g zentrifugiert und der Überstand mit DTT-Lösung auf 10 mM eingestellt. Nach erneuter Inkubation (5 min, 37 °C) wurde unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Der Auftrag der Probe erfolgte durch „in-Gel-Rehydratisierung“, wozu Immobiline-DryPlates zunächst zu 3 bzw. 5 mm breiten Streifen geschnitten wurden, die bei -20 °C gelagert wurden. Ein trocken aufgetauter Gelstreifen wurde dann in ein luftdicht verschließbares Behältnis gelegt (Quellkammer, Reagenzglas) und mit der Probe bedeckt. Dabei wurde die Probe während des Quellvorgangs (über Nacht bei RT) in das Fokussierungsgel eingesogen.

Die isoelektrische Fokussierung erfolgte in einer mit flüssigem Paraffin gefüllte Fokussierungswanne, in die die gequollenen Streifen getaucht wurden. Mit der Gelseite nach oben wurden auf den Gelen A. bidest.-getränkte Elektrodenstreifen plaziert. Darauf wurden Platinelektroden angebracht, die ebenfalls ins Paraffin tauchten, sodaß Luftsauerstoff ausge-

geschlossen wurde. Die Fokussierung erfolgte über Nacht bei RT und hatte folgenden Spannungsverlauf:

2 h	300 Volt
2 h	1 000 Volt
12-15 h	2 999 Volt

Für die anschließende Equilibrierung der Streifen wurden diese aus der Fokussierungswanne entnommen und vorsichtig von Paraffin befreit. In Equilibrierpuffer I wurden die Streifen dann zunächst 15 min bei ca. 37 °C geschwenkt und anschließend 1 min bei ca. 95 °C. Zuletzt wurden die Streifen 15 min bei ca. 37 °C in Equilibrierpuffer II inkubiert.

Die Trennung in der zweiten Dimension erfolgte mit Hilfe der unter 3.2.6.1 beschriebenen SDS-PAGE. Dazu wurden bei 2D-Gelen nur Trenngele gegossen, die an einer Seite mit einem etwa 2 cm breiten Sammelgel und maximal 2 Taschen versehen wurden.

Für die Platzierung der Fokussierungsstreifen wurde zunächst 1 ml Kathodenpuffer auf das Trenngel gegeben, damit der Streifen leichter auf das Trenngel geschoben werden konnte. Lag dieser gut an, wurde der Puffer abgesaugt und durch 0.5 ml geschmolzene Agarose-Lösung ersetzt. Nachdem die Proben in die Taschen aufgetragen und die Agarose fest waren, wurde die Kathodenkammer vorsichtig mit Puffer aufgefüllt und die Elektrophorese wie unter 3.2.6.1 beschrieben durchgeführt.

3.2.6.3 Präparative IEF mittels Durchflußelektrophorese

(nach Dr. Weber GmbH 1997)

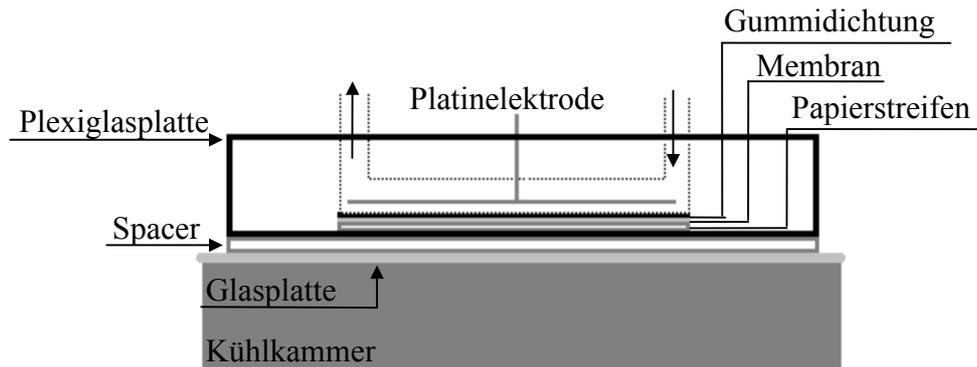
Für die Durchflußelektrophorese (Free-Flow Elektrophorese, FFE) wurde das Gerät OCTOPUS der Firma Dr. Weber GmbH (Kirchheim) eingesetzt. Dieses, in der Entwicklung noch nicht abgeschlossene Gerät, bot die Möglichkeit der isoelektrischen Fokussierung in einem trägerfreien Medium, bei gleichzeitig kontinuierlichem Verfahren. Aufgrund der zentralen Bedeutung des OCTOPUS-Gerätes in dieser Arbeit, wird der Aufbau und das Trennverfahren im folgenden näher beschrieben

3.2.6.3.1 Das OCTOPUS-Gerät

Das OCTOPUS-Gerät setzt sich aus einer Prozeßeinheit (Trennkammer) und einer Steuereinheit, von der aus alle Flüsse (Medien, Kühlung, Strom) reguliert werden, zusammen. Die

Trennkammer (640 × 180 × 80 mm) besteht aus einer Glasplatte, die auf einen Kühlblock (Aluminium) aufgeklebt ist und einer darüber planparallel ausgerichteten Plexiglasplatte. Dazwischen befindet sich ein Spacer (0.4 mm dick), der einen Trennraum umfaßt (siehe Abb. 3).

A



B

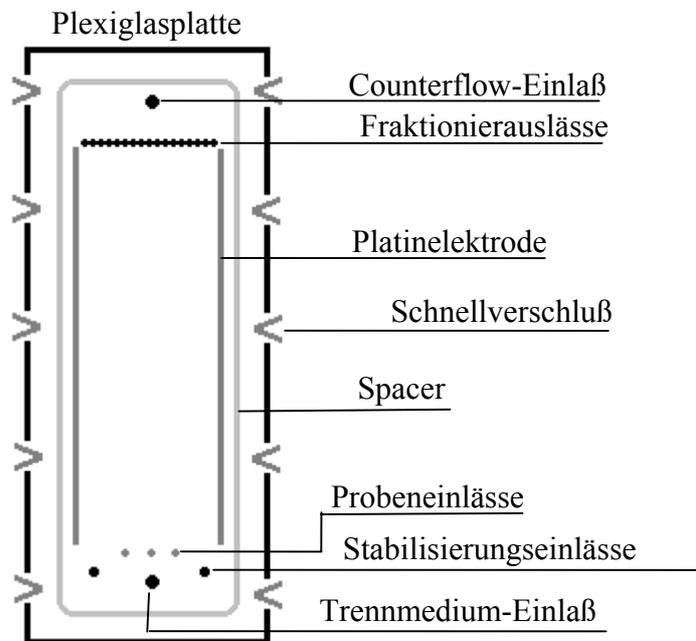


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Trennkammer-Aufbaus.
A: Seitenansicht. B: Aufsicht.

Durch Einlässe am vorderen Ende der Plexiglasplatte kann dieser Raum befüllt werden, sodaß ein Flüssigkeitsfilm entsteht, der über 96 Fraktionierauslässe am oberen Ende austreten kann. Seitlich, in die Frontplatte eingelassen, befinden sich zwei Elektrodenkanäle (inklusive Platinelektroden), durch die Elektrolyte gepumpt werden können. Ein Eindringen in den Trennraum wird dabei jeweils durch eine Ionenaustauscher-Membran verhindert, die von einem Papierstreifen auf eine Elektrodendichtung gepreßt wird. Diese Anordnung begrenzt den eigentlichen Trennbereich auf die Maße $500 \times 100 \times 0.4$ mm. Jenseits der Fraktionierauslässe befindet sich ein weiterer Einlaß, über den ein laminarer Gegenstrom (Counterflow) erzeugt wird, der die Fraktionierung unterstützt.

Alle Einlässe sind über Silikonschläuche mit einer Peristaltikpumpe verbunden, durch die Medien und Proben unabhängig voneinander in die Trennkammer gefördert werden. Über die Steuereinheit werden nicht nur die Medien- und die Probenpumpe geregelt, sondern auch der Kühlkreislauf, die Elektrodenkreisläufe, sowie das Spannungsgerät aktiviert. Um zu verhindern, daß Luftblasen in die Trennkammer gelangen, sind die Schläuche für den Counterflow (CF) und das Trennmedium (TM) mit Blasenfängern ausgestattet. Für den Probenauftrag befinden sich unterhalb der Elektroden, in Reihe angeordnet, drei Einlässe, von denen in der Regel der zentralgelegene eingesetzt wurde. Der Fraktionierauslaß, von 96 aneinandergereihten Teflon-Spaghetti-Schläuchen, wird über eine Fraktioniereinheit auf Mikrotiterplattenformat gebracht, wo die getrennte Probe in 96 Röhrchen aufgefangen wird.

Die Trennkammer ist mit einem Gestell verbunden, mit dem es in drei Positionen gebracht werden kann. Die vertikale Stellung dient zum Einlegen der Elektrodendichtungen und -membranen, da dabei die Plexiglasplatte von der Trennkammer weggekippt werden kann. Die Schräglage ermöglicht die blasenfreie Befüllung und bei horizontaler Ausrichtung der Kammer werden die Trennungen durchgeführt. Dabei ist die Plexiglasplatte durch 10 Schnellverschlüsse auf dem Spacer fixiert.

3.2.6.3.2 Das Verfahren der kontinuierlichen isoelektrischen Fokussierung

Grundvoraussetzung für eine Free-Flow Elektrophorese ist ein laminarer Strom des im Trennraum befindlichen Flüssigkeitsfilms. Dazu wurde den Medien ein hochviskoser Zusatzstoff, Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), zugesetzt, der zudem Diffusionsvorgängen entgegenwirkt.

Bei diesem Trennverfahren strömt ein Ampholyt-haltiges Medium (Trennmedium) durch die Trennraummitte und wird längs der Elektroden von säure- und laugehaltigen Stabilisierungsmedien begleitet. Das Anlegen einer Spannung an die Platinelektroden bewirkt die Ausbildung eines linearen pH-Gradienten zwischen den Stabilisierungsmedien, der am Ende der Elektroden (Fraktionierbereich) seine maximale Schärfe erreicht. Die zu trennende Probe wird dem Trennmedium zugeführt und die Proteine fokussieren gemäß ihrer isoelektrischen Punkte (pI). Mit Hilfe des Counterflows werden die getrennten Proteine über die Fraktionierauslässe in separate Gefäße befördert. Die Trennleistung hängt dabei von der Verweilzeit der Probe, der Viskosität des Mediums und den Spannungsverhältnissen ab.

3.2.6.3.3 Trennung lysosomaler Membranproteine durch Free-Flow-Elektrophorese

Material

Benetzungslösung	0.2 % (w/v)	Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC, 4 000 cps)
Elektrolyt, anodal	100 mM	H ₃ PO ₄
Elektrolyt, kathodal	100 mM	NaOH
Counterflow Medium	9 M	Harnstoff
	0.2 % (w/v)	HPMC, 4000 cps
	0.2 % (w/v)	Triton X-100
		über Mischbettionenaustauscher AG 501X8 deionisiert.
Trennmedium	0.5 % (w/v)	Servalyte (pH 3-10) in Counterflow Medium
Stabilisierungsmedien	100 mM	H ₃ PO ₄ bzw. NaOH in Counterflow Medium
Triton X-100-Lösung	20 % (w/v)	Triton X-100
DTT-Lösung	1 M	Dithiothreitol
pI -Markerfarbstoffe		gesättigte Lösung in DMSO
Phenolrot-Lösung		gesättigte Lösung
1.43×Sol(+SH)	0.36 M	Tris-HCl, pH 6.8
	28.6 % (w/v)	Glycerin
	2.86 % (w/v)	SDS
	28.6 mM	DTT
Iodacetamid-Lösung	0.5 M	Iodacetamid

Durchführung

Inbetriebnahme:

Zur luftblasenfreien Befüllung der Trennkammer wurde diese durch Aktivierung des Kühlkreislaufs in 40 min auf 13 °C temperiert. Zum Einlegen der Elektrodenmembranen wurde die Apparatur in die Schräglage gebracht, die Ionenaustauscher-Membranen und die Papierstreifen mit A. bidest. angefeuchtet und auf den Elektrodendichtungen positioniert. Dann wurde die Plexiglasplatte auf den Spacer zurückgekippt und das mittlere Paar der Schnellverschlüsse geschlossen. Zum Befüllen der Apparatur wurden zudem paarweise, die oberen Schnellverschlüsse geschlossen und der Dreiwegehahn des Counterflows (CF) allseitig geöffnet. Die Blasenfänger (CF und TM) wurden in inverse Position gebracht und die Silikonschläuche im Pumpenbereich auf Andruck gestellt.

Dann wurde über alle Medienschläuche zunächst A. bidest. gefördert, der gefüllte Blasenfänger TM aktiviert und das unterste Schnellverschlußpaar geschlossen. Nachdem der Wasserstand im Trennraum den Elektrodenbereich erreicht hatte wurden die letzten Schnellverschlüsse geschlossen. Der Dreiwegehahn wurde zur Pumpe hin verriegelt und der Blasenfänger CF positioniert. Nachdem der Trennraum vollständig mit A. bidest. gefüllt war, wurde die Medienpumpe auf Vollast gestellt. Während sich der Blasenfänger CF zusehends füllte wurde der Dreiwegehahn auf gleiches Niveau angehoben, bis das Wasser dort austrat. Zum Entlüften wurde der Dreiwegehahn dann nochmals kurz, allseitig geöffnet, bevor er in die nach außen geschlossene Betriebsposition gebracht wurde. Dadurch stieg der Flüssigkeitsspiegel in den Fraktionierschläuchen, bis es dort zu Tropfen begann. Als nächstes wurde über alle vier Medienschläuche bis zu 5 Trennraumvolumina (100 ml) Benetzungslösung gepumpt. Nichtgängige Fraktionierschläuche wurden mit einer Spritze entlüftet bis eine Fraktionierprobe (96 Fraktionen in einer Mikrotiterplatte aufgefangen) ein gleichmäßiges Füllprofil zeigte.

Das Gerät wurde nun auf Trennbedingungen eingestellt, wozu folgende Medien hineingepumpt wurden: Trenn- und Counterflow Medium (je 1.2 ml/min); kathodales und anodales Stabilisierungsmedium (je 0.2 ml/min). Die Trennkammer wurde nun in die vertikale Position gebracht. Der Vorlauf betrug etwa 4 Trennraumvolumina, bevor der Austritt der Stabilisierungsmedien an der Fraktioniereinheit (pH-Kontrolle) die Aktivierung des Spannungsgerätes ermöglichte. Dazu wurden mit den Elektrolyt-Lösungen der Elektrodenkreislauf in Gang gesetzt, die Sicherheitstür eingesetzt und das Spannungsgerät eingeschaltet. Die anfängliche

Stromstärke wurde auf 35 mA begrenzt, sodaß die Spannung von 2 000 Volt nach wenigen Minuten erreicht war. Nachdem die Stromstärke konstant war, wurde die Probe aufgetragen.

Trennung:

Zur Trennung wurden ultrazentrifugierte bzw. immunoaffinitätsgereinigte Membranen eingesetzt. Dazu wurden 1 mg Protein in 250 µl Trennmedium (eingestellt auf 2 % (w/v) Triton X-100) 20 min gevortext. Anschließend wurde die Probe 4 x 30 sec in ein Ultraschallbad getaucht, bevor unlöslicher Rückstand 5 min bei $10\,000 \times g$ abzentrifugiert wurde. Der Überstand wurde auf 10 mM DTT eingestellt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0.5 µl pI-Marker und 1 µl Phenolrot wurde die Probe der Trennung zugeführt.

Dazu wurde der zentrale Probenschlauch mit Medium aus dem Trennraum gespült und nach Ansaugen von Luft (1 cm Schlauch) in die Probe getaucht. Der Auftrag erfolgte bei konstanter Spannung (2 000 V) und bei einer Probenpumpeneinstellung von 0.04 ml/min. Die Auftragsdauer betrug bei einem Probenvolumen von 300 µl ca. 7 min, während die Probe 15 min den Trennbedingungen ausgesetzt war (Trennzeit 15 min). Die Trennung wurde anhand des pI-Markers beobachtet und anschließend fraktioniert. Dazu wurden die Tropfen an der Fraktioniereinheit abgeschlagen und danach in PP-Röhrchen aufgefangen, bis der Farbstoff nicht mehr erkennbar war (Fraktionierzeit ca. 8½ min). Daraus wurden Proben für analytische Zwecke entnommen, die Röhrchen verschlossen, und bei -20 °C gelagert.

Für die Analytik in einem 14%igen Polyacrylamidgel wurden 15 µl Probe mit 3 µl 1.43×Sol (+SH) versetzt und 20 min bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte der Zusatz von 3 µl Iodacetamid-Lösung mit anschließender 10minütiger Inkubation bei 37 °C. Bis zum Auftrag wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

Reinigung:

Nach Beendigung der Trennung wurde das Spannungsgerät abgestellt und die Medien durch A. bidest. ersetzt. Bei annähernder Pumpenvollast wurde der Trennraum mindestens 30 min gespült. Währenddessen wurden die Elektrolyt-Lösung aufgefangen und die Elektrodenkreisläufe mit A. bidest. gespült. Danach wurde das Wasser aus allen Kompartimenten herausgepumpt und dabei der Probenschlauch gespült. Danach wurde der Trennraum geöffnet (mittlere Schnellverschlüsse zuletzt) und der Kühlkreislauf abgestellt. Nach Entfernen und Spülen der Ionenaustauscher-Membranen und der Papierstreifen, wurden die Membranen in A. bidest. bei 4 °C gelagert und die Papierstreifen unter staubfreien Bedingungen getrocknet. Danach

wurde der Trennraum mit fusselfreiem Papier trockengewischt und durch Zurückkippen der Plexiglasplatte geschlossen. Nachdem aus den Schläuchen kein Wasser mehr heraustropfte wurde der Andruck der Peristaltikpumpe wieder gelöst.

3.2.7 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

3.2.7.1 Silberfärbung

(verändert nach Heukeshoven & Dernick, 1988)

Material

Fixierlösung	30 % (v/v) 10 % (v/v)	Ethanol Essigsäure
Thiosulfat-Lösung	0.1 M 30 % (v/v) 0.1 % (w/v) bzw. 0.55 % (w/v)	NaAc, pH 6.0 Ethanol Na ₂ S ₂ O ₃ Na ₂ S ₂ O ₃
Silbernitrat-Lösung	0.1 % (w/v) 0.01 % (w/v)	AgNO ₃ Formaldehyd
Entwickler	2.5 % (w/v)	Na ₂ CO ₃

Durchführung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in Fixierlösung gegeben und 30 min darin geschwenkt. Diese und alle nachfolgenden Inkubationen wurden bei RT auf einem Schüttler durchgeführt. Danach erfolgte eine 30minütige Inkubation in Thiosulfat-Lösung, bevor das Gel dreimal 10 min mit A. bidest. gewaschen wurde. Nach 30 min Inkubation in Silbernitrat-Lösung wurde das Gel kurz (1 min) gewässert und in Entwickler gegeben. Sobald sich der Entwickler durch ungebundenes Silber grau färbte, wurde nochmals kurz gewässert und bis zur vollständigen Entwicklung in frischem Entwickler inkubiert. Dieser Prozeß wurde durch Zugabe von 6 ml Essigsäure während einer 5minütigen Inkubation beendet. Danach wurde zweimal 5 min in A. bidest. gewaschen, bevor das Gel zwischen Cellophanfolien getrocknet wurde.

Im Falle von 2D-Gelen wurde die Färbemethode insoweit geändert, daß nach der Fixierung die Gele in 0.55%iger Thiosulfatlösung über Nacht inkubiert wurden. Danach wurde wie beschrieben fortgefahren.

3.2.7.2 Coomassie-Blau-Färbung

Material

Färbelösung	0.14 % (w/v) Serva-Blue 50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure

Durchführung

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in Färbelösung gegeben und bei RT über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde das Gel in Entfärbelösung gegeben und unter gleichen Bedingungen inkubiert. Dabei wurde die Entfärbelösung jeweils erneuert, wenn der Blauton der Lösung und des Gels vergleichbar waren. Sobald die Proteine gut zu erkennen waren wurde das Gel zweimal 5 min in A. bidest. gewaschen und anschließend zwischen Cellophanfolien getrocknet.

3.2.7.3 Kolloidale Coomassie-Blau-Färbung

Alle verwendeten Materialien wurden mit 1M NaOH vorbehandelt und ausgiebig mit A. bidest. gespült.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in NOVEX-Colloidal-Blue-Färbelösung gegeben und bei RT über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Färbelösung erneuert und unter gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal 1 h in A. bidest. gewaschen und anschließend zwischen Plastikfolien mit einem Scanner dokumentiert. Die blaugefärbten Protein-Banden wurde mit einem Skalpell herausgeschnitten, in sterile Reaktionsgefäße überführt und bei -70 °C gelagert.

3.2.8 Hydroxylapatit-Säulenchromatographie

Zur präparativen Aufreinigung von Triton X-100-gelösten Membranproteinen, in Gegenwart von SDS und Harnstoff, wurde von H. V. J. Kolbe *et al.* (1984) der Einsatz von Hydroxylapatit beschrieben.

Material

silanisierter Glaswolle		
Hydroxylapatit		Biogel HTP
Bindungspuffer	10 mM 0.2 % (w/v)	NaP _i -HCl, pH 6.4 SDS
Elutionspuffer	230 mM 15 % (v/v) 0.1 % (w/v)	NaP _i -HCl, pH 9.3 Isopropanol SDS

Durchführung

In einer Pasteurpipette wurde mit Hilfe von silanisierter Glaswolle und in A. bidest. aufgeschlemmtem Biogel HTP eine Hydroxylapatit-Säule gegossen (Bettvolumen: 0.25 ml; Bindungskapazität ca. 1 mg BSA). Diese wurde mit 10 Säulenvolumina halbkonzentriertem Bindungspuffer equilibriert. Jeweils 2 ml OCTOPUS-Fraktion wurden mit Bindungspuffer 1:1 (v/v) verdünnt, gevortext und in 1 ml-Schritten aufgetragen. Der Durchbruch wurde in 1 ml Fraktionen aufgefangen und die Säule mit 5 Säulenvolumina halbkonzentriertem Bindungspuffer gewaschen. Danach wurde mit 5 Säulenvolumina A. bidest. gespült und anschließend mit 6 Volumina Elutionspuffer eluiert (Fraktioniervolumen ca. 300 µl).

3.2.9 Acetonfällung von Proteinen

Zur Ankonzentrierung von Proteinen aus Fraktionen der Hydroxylapatit-Säulenchromatographie (s. 3.2.8) und zur Entfernung nichtionischer Detergenzien wurde eine Präzipitation mit Aceton durchgeführt.

In einem Reaktionsgefäß wurden zu dem Volumen einer Probe das vierfache Volumen eiskaltes Aceton gegeben, gevortext und bei -20 °C inkubiert. Nach 1 h wurde bei 4 °C und 12 000 × g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet durch

Zugabe von 4 Volumina eiskaltem 80%igem (v/v) Aceton gevortext. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet wiederholt gewaschen, bevor es für weitere Zwecke eingesetzt wurde.

3.2.10 Modifizierung von Proteinen mit Phenylglyoxal

Material

Reaktionspuffer	50 mM	HEPES, pH 7.4
Phenylglyoxal-Lsg.	200 mM	in HEPES, pH 7.4
Glucuronsäure-Lsg.	150 mM	in HEPES, pH 7.4
N-Acetylneuraminsäure-Lsg.	150 mM	in HEPES, pH 7.4

Durchführung

Von viermal je 20 µg (etwa 25 µl) immunoaffinitätsgereinigten Membranproteinen wurden zwei Proben mit Reaktionspuffer auf ein Gesamtvolumen von 150 µl gebracht. Die beiden anderen Proben wurden in gleichem Volumen auf 60 mM Glucuronsäure bzw. N-Acetylneuraminsäure eingestellt und, wie die anderen Proben, durchmischt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Die mit Monocarbonsäuren vorbehandelten sowie eine der unbehandelten Proben wurden mit frisch angesetzter Phenylglyoxal-Lsg. auf 80 mM Phenylglyoxal eingestellt. Die Kontrollprobe wurde mit Reaktionspuffer auf das gleiche Endvolumen (210 µl) gebracht und mit allen anderen Proben eine Stunde bei 37 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die Abtrennung der Membranen erfolgte in einer Jouan-Zentrifuge bei 4 °C und 32 sec maximaler Beschleunigung (erreichte g-Zahl: 11 950) und minimaler Bremskraft. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml TBS gewaschen. Durch erneute Zentrifugation für 30 sec unter gleichen Bedingungen sowie nach Verwerfen des Überstandes wurden die Proben durch Immobililine-2D-Trennung analysiert.

3.2.11 Deglykosylierung von Proteinen mit N-Glykosidase F (NGF-Spaltung)

Für die Massenspektroskopie verwendete Proben wurden zur Entfernung von Asparagin-gebundener Glykane mit N-Glykosidase F behandelt.

Material

NGF-Puffer	1 M	NaP _i -HCl, pH 8.6
	1.2 % (w/v)	Nonidet P-40
	0.2 % (w/v)	SDS
	10 mM	EDTA

Durchführung

Gewaschene Pellets einer Acetonfällung (s. 3.2.9) wurden in 25 µl NGF-Puffer gelöst und 5 min bei 95 °C erhitzt. Durch Zusatz von 2 Volumina A. bidest. (50 µl) wurde die Probe verdünnt und abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 1 µl N-Glykosidase F (0.2 U/µl) und der Ansatz wurde 4 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Probe durch eine Acetonfällung (s.o.) ankonzentriert.

Bei Proteinlösungen wurde die gleiche Prozedur durch Zusatz von 1 Volumen NGF-Puffer und anschließender Verdünnung mit nur 1 Volumen A. bidest. durchgeführt. Die Zugabe von N-Glykosidase F wurde proportional erhöht (0.2 U pro 25 µl-Volumen NGF-Puffer). Bei präparativen Ansätzen wurde die Inkubation bei 37 °C über Nacht durchgeführt und nach 6 h mit gleicher Menge frischer N-Glykosidase F versetzt.

3.2.12 Anthron-Nachweis

Zum Nachweis von Hydroxypropylmethylcellulose wurde der Anthron-Nachweis auf Hexosen durchgeführt.

Material

Anthron-Lösung	28 ml	A. bidest.
	72 ml	H ₂ SO ₄ , konz.
	50 mg	Anthron
	1 g	Thioharnstoff

nach vorsichtiger Zugabe der Schwefelsäure werden Anthron und Thioharnstoff in dem noch warmen Gemisch gelöst. Die Anthron-Lösung ist 4 h nach dem Abkühlen gebrauchsfertig und ist bei 4 °C ca. 2 Wochen haltbar.

Durchführung

Je 100 µl einer Probe wurden mit 500 µl Anthron-Lösung versetzt und 15 min bei 95 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen in einem Wasserbad auf RT (ca. 20 min) wurde die Absorption der Proben bei 620 nm in einem Photometer gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Präparation lysosomaler Membranproteine aus humaner Plazenta

4.1.1 Charakterisierung von „dense pool“-Lysosomen aus humaner Plazenta

Zur Präparation von „dense pool“-Lysosomen aus humaner Plazenta wurde, wie unter 3.2.1 beschrieben, das gereinigte Trophoblastengewebe homogenisiert und von Zellkernen befreit. Nach Konzentrierung der Organellen aus dem postnukleären Überstand (PNÜ) wurden diese, wie bei Rome *et al.* (1979) beschrieben, in einem selbstformenden Percoll-Dichtegradienten getrennt und von unten beginnend (höchste Dichte) fraktioniert. In Proben der einzelnen Reinigungstufen sowie in den erhaltenen Fraktionen des Dichtegradienten wurde die Enzymaktivität der lysosomalen Markerenzyme β -N-Acetylhexosaminidase (EC 3.2.1.52) und β -Glucocerebrosidase (EC 3.2.1.45) als auch die Proteinkonzentration gemessen. Abb. 4 zeigt die Aktivitätsverteilung der beiden Markerenzyme im Percoll-Gradienten einer repräsentativen Lysosomen-Präparation.

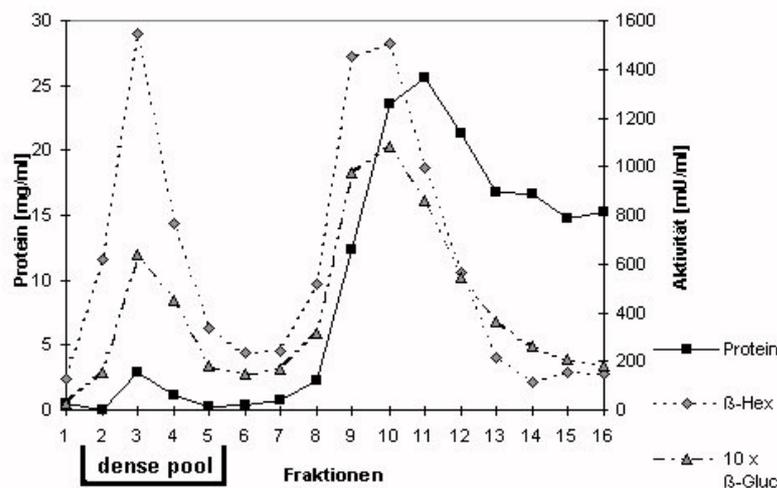


Abbildung 4: Subzelluläre Fraktionierung von β -Hexosaminidase und β -Glucocerebrosidase nach Percoll-Dichtezentrifugation. Ein Organellen-Konzentrat aus dem postnukleären Überstand homogenisierter humaner Plazenta, wurde auf einen selbstformenden Percoll-Gradienten aufgetragen und 30 min bei $34\,000 \times g_{av}$ und $4\,^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. In den 16 erhaltenen Fraktionen (Fraktion 1 entspricht der Bodenfraktion) wurde die Aktivität der β -Hexosaminidase (β -Hex) und β -Glucocerebrosidase (β -Gluc), sowie die Proteinkonzentration bestimmt. Die Fraktionen 2 bis 5 wurden zu „dense pool“-Lysosomen vereinigt.

Zu erkennen ist die Abtrennung einer Lysosomen-Spezies, die im Bereich höherer Dichte des Percoll-Gradienten (Fraktionen 2-5) ein Aktivitätsmaximum der löslichen β -Hexosaminidase sowie der membranständigen β -Glucocerebrosidase zeigt. Ein zweiter Peak in dem beide Enzyme nachgewiesen werden, befindet sich in den Fraktionen des Gradienten mit geringerer Dichte (Fraktion 8-13), wo sich die Hauptmenge des Gesamtproteins wiederfindet. Das Maximum der spezifischen Aktivität lysosomaler Markerenzyme ergibt sich somit für die Fraktionen 2-5, deren Organellen-Spezies als dichte Lysosomen (engl. : dense lysosomes) bezeichnet wird. Die vereinigten, dichten Lysosomen dieser Fraktionen sind im Folgenden als „dense pool“-Lysosomen bezeichnet.

Der geringe Anteil lysosomaler Enzymaktivität in den oberen Fraktionen (Auftragsbereich) zeigt an, daß durch die Aufarbeitung wenig Markerenzym freigesetzt wurde und sich fast ausschließlich in intakten Organellen befindet. Dies läßt auf eine sehr schonende Präparationsweise schließen. Diese Beobachtung spiegelt sich auch in der Anreicherung des lysosomalen Markerenzym β -Hexosaminidase, bezogen auf die Präparation von „dense pool“-Lysosomen aus humaner Plazenta, wider.

Tabelle 2 zeigt die durchschnittliche Anreicherung des lysosomalen Markerenzym β -Hexosaminidase aus 10 repräsentativen Plazenta-Aufarbeitungen, mit Hilfe des beschriebenen Percoll-Gradienten. Der Anreicherungsfaktor der β -Hexosaminidase-Aktivität betrug durchschnittlich 50 ± 24 bei einer Ausbeute von 8 % der Ausgangsaktivität.

Tabelle 2: Reinigung von „dense pool“-Lysosomen aus humaner Plazenta.

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

Die gezeigten Daten entsprechen den Durchschnittswerten aus 10 Plazenta-Aufarbeitungen.

4.1.2 Präparation von Membranproteinen aus „dense pool“-Lysosomen

Zur Präparation von lysosomalen Membranproteinen wurden „dense pool“-Lysosomen, wie unter 3.2.5 beschrieben, in Gegenwart von Proteinase-Inhibitoren aufgetaut und die Membranen durch Ultrazentrifugation bzw. durch Immunoaffinitätsreinigung isoliert.

1. Ultrazentrifugation:

„dense pool“-Lysosomen wurden hypoton lysiert und die Membranen durch Ultrazentrifugation pelletiert. Als Interphase über einer Percoll-Linse wurden die Membranen abpipettiert und gewaschen. Nach wiederholter Ultrazentrifugation wurde ein bräunliches Pellet erhalten, das weitgehend frei von Percoll war.

2. Immunoaffinitätsreinigung:

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

Die Membranpellets wurden jeweils in wenig TBS resuspendiert und die spezifischen Aktivitäten der Markerenzyme β -Hexosaminidase und β -Glucocerebrosidase bestimmt.

Wie aus Tab. 3 ersichtlich, konnte durch die Immunoaffinitätsreinigung die Aktivität der β -Glucocerebrosidase, einer lysosomalen Membrankomponente, in etwa doppelt so stark angereichert werden, wie durch Ultrazentrifugation. Der durchschnittliche Anreicherungsfaktor ($n = 6$) für die membranassoziierte β -Glucocerebrosidase-Aktivität betrug bei Immunoaffinitätsreinigung 3.96 ausgehend von „dense pool“-Lysosomen. Bei ultrazentrifugierten Membranen erhöhte sich dagegen diese spezifische Aktivität im Mittel um den Faktor 1.89 ($n = 6$). Als besonderer Vorteil der Affinitätsreinigung zeigte sich zudem, daß luminale Bestandteile, angezeigt durch die β -Hexosaminidase-Aktivität, besser von den Membranen abgetrennt werden konnten. Die spezifische Aktivität der β -Hexosaminidase wird bei der schonenderen Immunoaffinitätsreinigung bezogen auf „dense pool“-Lysosomen auf ein 20tel reduziert. Bei Ultrazentrifugationspräparationen erfolgte die Reduktion der spezifischen Aktivität lediglich auf ein 5tel. Aufgrund der guten Übereinstimmung der Daten mit den von Diettrich *et al.* (1996)

beschriebenen Anreicherung wurden keine weitere Charakterisierung der Präparationen durchgeführt.

Tabelle 3: Anreicherungs-faktoren und spezifische Enzymaktivitäten der Markerenzyme β -Hexosaminidase und β -Glucocerebrosidase nach Ultrazentrifugation bzw. Immunoaffinitätsreinigung aus „dense pool“-Lysosomen.

	Anreicherung aus „dense pool“-Lysosomen durch			
	Ultrazentrifugation		Immunoaffinitätsreinigung	
	Anreicherungs-faktor*	spezifische Aktivität [U/mg]	Anreicherungs-faktor*	spezifische Aktivität [U/mg]
β -Glucocerebrosidase	1.89	0.043	3.96	0.266
β -Hexosaminidase	0.20	0.110	0.05	0.911

Die gezeigte Daten sind Durchschnittswerte aus jeweils sechs Präparationen.

* Bezogen auf „dense pool“-Lysosomen.

Für die Anreicherung immunoaffinitätsgereinigter, lysosomaler Membranproteine aus dem Homogenat humaner Plazenta ergibt sich somit ein Reinigungsfaktor von etwa 200, wenn die Anreicherung der β -Hexosaminidase und der β -Glucocerebrosidase als gekoppelt angesehen wird.

4.2 Charakterisierung eines sialinsäurebindenden lysosomalen Membranproteins mit Hilfe zweidimensionaler Gelelektrophorese

Um sämtliche lysosomalen Membranproteine aus den Präparationen parallel zu isolieren, wurden sie durch hochauflösende zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese getrennt. Da dabei unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet wurde, konnte eine Charakterisierung einzelner Proteine, außer im Westernblot, nur durch spezifische, kovalente Markierung vor der Solubilisierung erfolgen. Die gute Reproduzierbarkeit der Trennungen mit der Immobililine-2D-Technik liefert dabei für die einzelnen Proteine die charakteristischen Parameter isoelektrischer Punkt (pI) und Molekulargewicht (MW), mit denen eine Zuordnung auch über Laborgrenzen hinaus möglich ist (siehe 2D-Datenbanken unter www.expasy.ch).

4.2.1 Auftrennung lysosomaler Membranproteine durch Immobiline-2D-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der lysosomalen Membranproteine mit Hilfe zweidimensionaler Gelelektrophorese wurden die Proben, wie unter 3.2.6.2 beschrieben, in deionisierter 2D-Solubilisierungslösung unter Zusatz von Ampholyten (pH 3-7) und Detergenz gelöst. Solubilisiertes Protein wurde durch Zentrifugation abgetrennt und nach Denaturierung mit DTT durch „in-Gel“-Rehydratisierung in Immobiline-Streifen (pH 4-7) eingebracht. Die Fokussierung erfolgte über Nacht und endete mit der Equilibrierung der Streifen für die 2. Dimension, in der die Proteine durch SDS-PAGE getrennt und im Gel sichtbar gemacht wurden.

Im ungelösten Rückstand (braunes Pellet) der Solubilisierung aller im Folgenden beschriebenen Proteintrennungen waren etwa 5 % des Gesamtproteins enthalten (Bradford-Bestimmung), die im SDS-PAGE nach Silberfärbung dem Gesamtspektrum der Membranproteine entsprach. Eine repräsentative zweidimensionale Auftrennung immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine ist in Abb. 5 gezeigt, bei die Proteine nach Fokussierung in einem Immobiline-Streifen pH 4-7 und Trennung durch SDS-PAGE durch Silberfärbung sichtbar gemacht wurden.

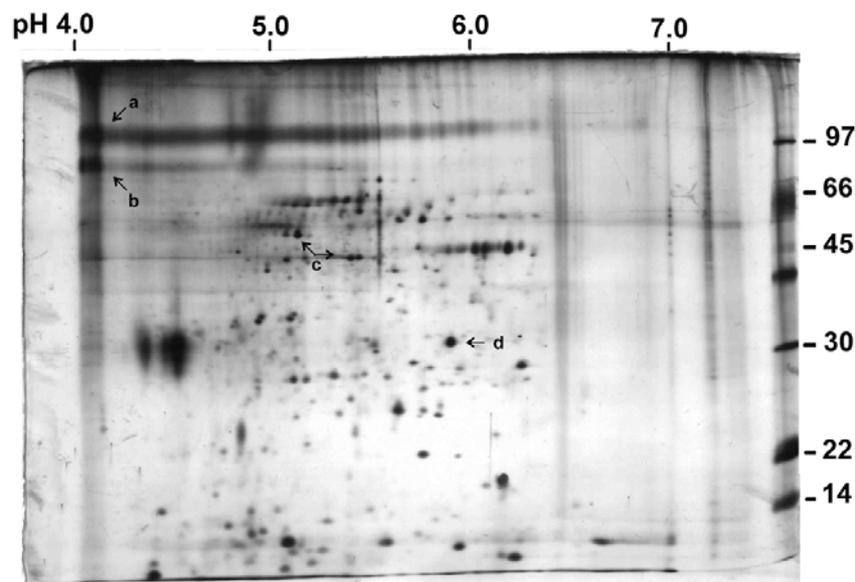


Abbildung 5: Korrelation bekannter lysosomaler Proteine mit immunoaffinitätsgereinigten, lysosomalen Membranen nach analytischer Immobiline-2D-Trennung. Gezeigt sind 20 µg immunoaffinitätsgereinigte, lysosomale Membranproteine, die nach Fokussierung in einem Immobiline-Streifen pH 4-7 durch SDS-PAGE in einem 14%igen Gel getrennt und nach Silberfärbung analysiert wurden. Die Pfeile markieren die Position von lamp-1/2 (a), LIMP II (b), LIMP I/CD63 (c) und ein Protein im Bereich sialinsäurebindender, lysosomaler Membranproteine (d), wie sie bei Diettrich *et al.* (1996) und Chataway *et al.* (1998) beschrieben sind.

Wie in Abb. 5 zu erkennen ist, werden die lysosomalen Membranproteine durch die Immobililine-2D-Technik in dem gewählten pH-Gradienten gut voneinander getrennt und fokussieren weitestgehend in scharfkontrastierende Proteinflecken (Spots). Die Zahl der im Silbergel sichtbar gemachten Proteinflecken liegt etwa zwischen 100 und 150 Spots (bei Fixierung mit Glutardialdehyd sind bis zu 300 Spots darstellbar). Die maximale Auflösung, mit der zwei isoforme Proteine mit unterschiedlichem pI noch deutlich erkennbar getrennt wurden, lag bei $\Delta pI = 0.02$, ein Wert, der durch die Linearität des fixierten pH-Gradienten der Immobililine-Gele gut zu bestimmen ist.

Zu den prominentesten Signalen zählen zwei breite Banden von 110 bzw. 90 kDa, die über einen relativ weiten pH-Bereich (pH 4-6) fokussieren. Frühere Experimente in unserem Labor zeigten, daß ein Teil der 110 kDa-Bande (a) im Westernblot mit dem, auch zur Immunoaffinitätsreinigung eingesetzten, humanes lamp-2-erkennenden Antikörper 2D5 reagiert (O. Diettrich, Dissertation 1996). Ebenso deckt sich dieser Bereich mit dem für humanes lamp-1 beschriebenen Fokussierungsmuster von 110 kDa/pI 3-5 (Chataway *et al.*, 1998). Als weitere breite Bande im pH-Bereich 3-5 wird LIMP II als ein 85 kDa-Polypeptid beschrieben (Chataway *et al.*, 1998), welche mit der in Abb. 5 gezeigten Bande (b) korreliert. Wie bereits gezeigt werden konnte, reichern sich diese Proteine bei der Immunoaffinitätsreinigung besonders stark an (Diettrich *et al.*, 1996). Von jedem dieser Proteine ist eine starke Glykosylierung bekannt, und der Gehalt an Sialinsäuren erklärt ihre Position im sauren Bereich der zweidimensionalen Trennung. Vor allem die mit LIMP II bezeichnete Gruppe erscheint im Original der Silberfärbung meist gelblich, was auf zuckertragende Proteine hinweist. Desweiteren sind aus vergleichbaren Immobililine-2D-Trennungen immunoaffinitätsgereinigter, lysosomaler Membranproteine zwei Polypeptid-Gruppen mit apparentem Molekulargewicht von 45 kDa (pI 5.4-5.5) und 55 kDa (pI 5.0-5.1) (c) bekannt, die mit einem gegen LIMP I/CD63-gerichteten monoklonalen Antikörper immunpräzipitiert werden konnten (Diettrich *et al.*, 1996). Beide LIMP-Proteine gehören den Typ III-Membranproteinen an (Klassifizierung nach Wickner & Lodish, 1985), die im Gegensatz zu den lamp-Proteinen mehrere Transmembrandomänen aufweisen (siehe Einleitung Abb. 2). Neben einigen dieser integralen Membranproteine konnten Diettrich *et al.* (1996) durch 2D-Trennungen weitere Spots identifiziert, die sich durch Affinitätsreinigung deutlich stärker als durch Ultrazentrifugation anreichern ließen. Von diesen konnten bislang einzig Proteine im Bereich von 33 kDa (pI 5.8) mit sialinsäurebindenden, lysosomalen Membranproteinen in Verbindung gebracht und damit näher charakterisiert werden. Die Signale einer Photoaffinitätsmarkierung mit einem Sialinsäurederivat

deckte sich dabei mit Polypeptiden in der Silberfärbung, dessen Position dem in Abb. 5 gezeigten Spot (d) meiner Präparation entspricht, welcher im folgenden als sialinsäurebindendes Protein bezeichnet wird (O. Diettrich, Dissertation 1996).

Die Auftrennung der lysosomalen Membranproteine mit Hilfe der Immobiline-2D-Technik erwies sich als sehr gut reproduzierbar und wurde daher und aufgrund des hohen Auflösungsvermögens, in dieser Arbeit für analytische Zwecke eingesetzt.

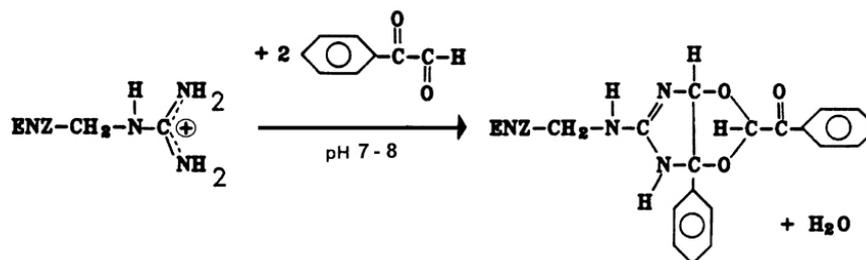
4.2.2 Einfluß von Liganden des sialinsäurebindenden, lysosomalen Membranproteins auf eine Modifizierung durch Phenylglyoxal

Die als sialinsäurebindende Proteine charakterisierten lysosomalen Membranproteine (O. Diettrich, Dissertation 1996) ließen sich mit einem radioaktiv markierten N-Acetylneuraminsäure-Derivat spezifisch photoaffinitätsmarkieren. In der Fluorographie der markierten Proteine, nach zweidimensionalen Gelelektrophorese, zeigten sich Signale bei 33 kDa (pI 5.8 und 5.4) und 27 kDa (pI 5.7), die in Gegenwart von N-Acetylneuraminsäure (NANA) nicht markiert wurden und zum anderen mit Protein-Spots in der Immobiline-2D-Trennung nach Silberfärbung korrelierten. Ebenfalls als Kompetitor dieser Markierung wurde ein weiterer Monocarbonsäurezucker beschrieben, Glucuronsäure (GlcUA), was zu der Vermutung führte, daß es sich bei den markierten Proteinen um das von Mancini *et al.* (1989) untersuchte lysosomale Sialinsäure-Transportsystem handelt. An Rattenlysosomen wurden diese beiden Substrate als stärkste Inhibitoren für den Transport von [14C]N-Acetylneuraminsäure über die lysosomale Membran gezeigt. Die Affinitäten des protonengetriebenen Transportsystems für die beiden Monocarbonsäurezucker wurden mit 0.24 mM (NANA) bzw. 0.11 mM (GlcUA) bestimmt. Die Akkumulation der beiden Zucker in den Lysosomen von Patienten mit ISSD oder der Salla Disease wurde auf einen Defekt dieses Transportsystems zurückgeführt (Mancini *et al.*, 1991).

Die Korrelation der sialinsäurebindenden, lysosomalen Membranproteine mit Spots im Silbergel legte nahe, daß auf dieser Nachweisebene ein Polypeptid der lysosomalen Membranproteinen mit diesen Affinitäten zu identifizieren sei. Um dies durch einen von der Photoaffinitätsmarkierung unabhängigen Versuch zu überprüfen, wurden seitenkettenspezifische Reagenzien verwendet, die das Transportsystem in Abwesenheit von Substrat irreversibel inhibieren können. So zeigten kinetische Untersuchungen, die von Mancini *et al.* (1992) mit [3H]GlcUA an dem lysosomalen Sialinsäuretransporter gemacht wurden, daß die Modifizie-

rung des Transportsystems mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) bzw. Phenylglyoxal (PG) den Transport zu 70-80 % hemmen. Wurde die Modifizierung jedoch in Gegenwart von 30 mM GlcUA durchgeführt, konnte die Aktivität zu 95-100 % erhalten bleiben. Da DEPC und PG spezifisch mit den Aminosäuren Histidin bzw. Arginin reagieren, vermuteten die Autoren entsprechende Aminosäuren im Substratbindungsbereich.

Die Modifizierung der Arginin-Seitenkette durch Phenylglyoxal kann durch die folgende Reaktion illustriert werden:



Durch die beschriebene kovalente Modifizierung verliert die Seitenketten der Aminosäure ihre Eigenschaft als Elektronendonator, sodaß modifizierte Proteine eine verminderte Basizität aufweisen und sich ihre Position in einer 2D-Trennung entsprechend verändern sollte. Der schützende Effekt der Substratbindung sollte zu einer weniger starken Verschiebung in der 2D-Trennung führen.

Zur Modifizierung mit Phenylglyoxal wurden immunoaffinitätsgereinigte, lysosomale Membranproteine in Gegenwart oder Abwesenheit GlcUA bzw. NANA mit Phenylglyoxal bei pH 7.4 inkubiert. Nach Pelletierung und Waschung der Immunoaffinitätsmembranen wurden die Membranproteine, wie unter 3.2.6.2 beschrieben, durch Immobiline-2D-Trennung nach Silberfärbung analysiert. In Abb. 6 ist die Modifizierung von immunoaffinitätsgereinigter, lysosomaler Membranproteine durch Phenylglyoxal in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Glucuronsäure nach anschließender Immobiline-2D-Trennung gezeigt.

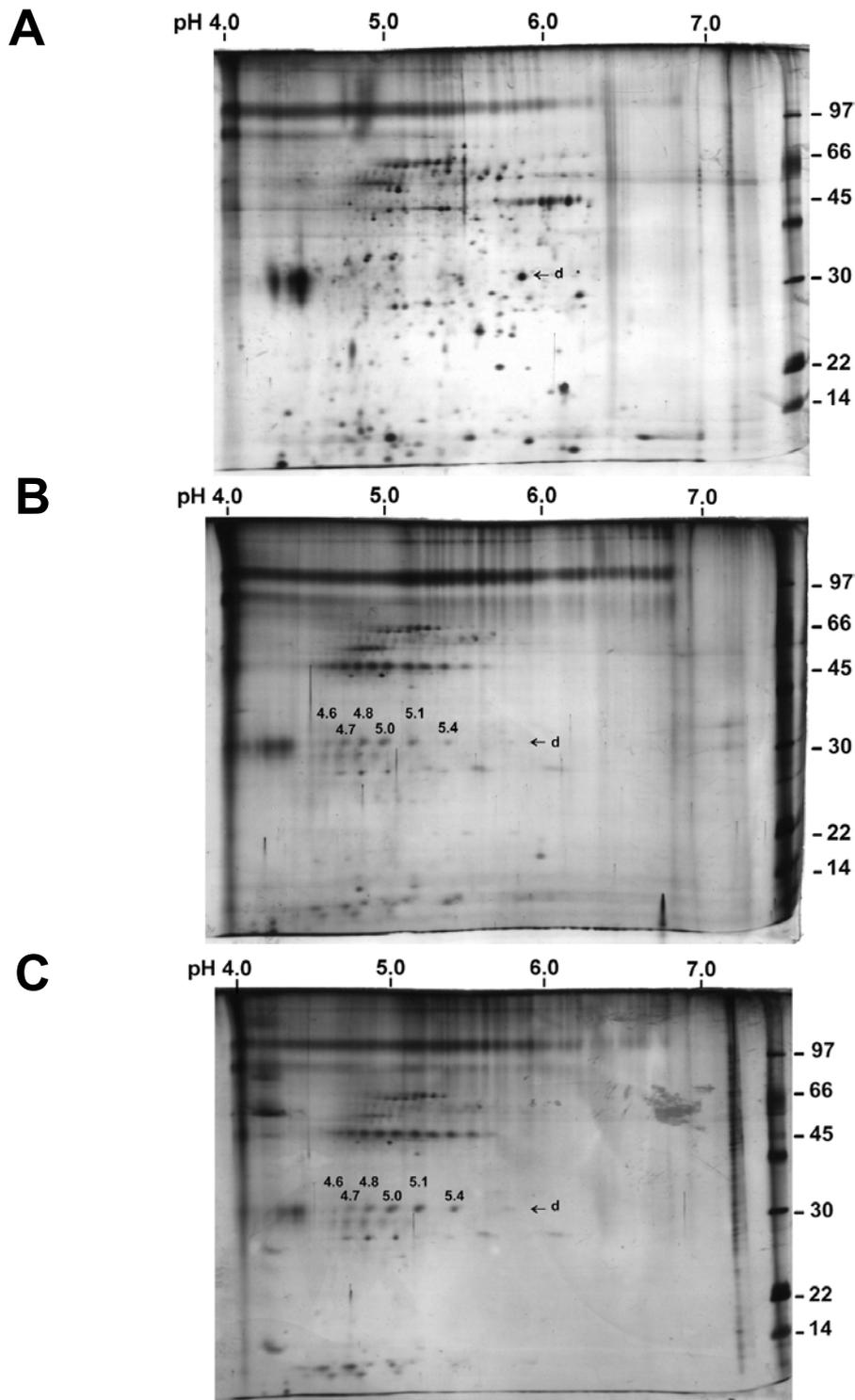


Abbildung 6: Ligandenspezifische Modifizierung eines sialinsäurebindenden, lysosomalen Membranproteins mit Phenylglyoxal. Je 20 µg immunoaffinitäts gereinigte lysosomale Membranproteine sind nach Inkubation mit Phenylglyoxal (PG) und anschließender Immobilin-2D-Trennung mit Silberfärbung gezeigt. A: Kontrollinkubation ohne PG. B: Inkubation mit PG in Abwesenheit von Glucuronsäure. C: Inkubation mit PG in Gegenwart von Glucuronsäure (60 mM GlcUA). Die Markierung weist auf die Position des in Abb. 5 gezeigten sialinsäurebindenden, lysosomalen Membranproteins (d) hin. Die Zahlen in B und C geben die ermittelten isoelektrischen Punkte der darunter erkennbaren Signale wieder.

Im Gegensatz zu dem in Abb. 6A gezeigten, nichtmodifizierten Ausgangsmaterial bewirkt die Behandlung mit Phenylglyoxal bei vielen der Proteine eine Verschiebung ihrer isoelektrischen Punkte in den sauren Bereich (Abb. 6B), was mit einer Neutralisierung der basischen Guanidinogruppe des Arginins durch die Phenylglyoxal-Modifizierung in Einklang steht. Da die Reaktion von PG mit allen zugänglichen Argininseitenketten stattfinden kann, wird die Verschiebung überlagert von einer Aufspaltung eines Einzelspots zu einer Kette von Proteinflecken. So spaltet das mit d bezeichnete 33 kDa-Polypeptid nach Behandlung mit Phenylglyoxal in mindestens sechs verschiedene Signale, mit charakteristischen isoelektrischen Punkten, auf. Die Markierung in Abb. 6B und Abb. 6C ist identisch zu der in Abb. 6A und weist auf die aus dem 33 kDa-Polypeptid hervorgegangenen Isoformen. Deutlich erkennbar ist die Verstärkung des Peptids mit pI 5.4 in Gegenwart von 60 mM GlcUA (Abb. 6C) bei gleichzeitiger Abschwächung des Peptids mit pI 4.6.

Das Ergebnis dieser Modifizierungsstudie konnte in mehreren Versuchen, für die jeweils Material verschiedener Plazenten verwendet wurde, bestätigt werden. Eine Quantifizierung des Verteilungsmusters anhand der gemessenen Signalintensitäten wurde mit Hilfe des Image-Quant-Programms (Spotfinder) durchgeführt. Dies war jedoch nur in zwei Versuchen möglich, bei denen die Peptide nicht mit anderen Signalen überlagert waren. Die Berechnung der Intensitätsverteilung auf die Proteinfractionen aus zwei unabhängigen Versuchen ist in Abb. 7 gezeigt.

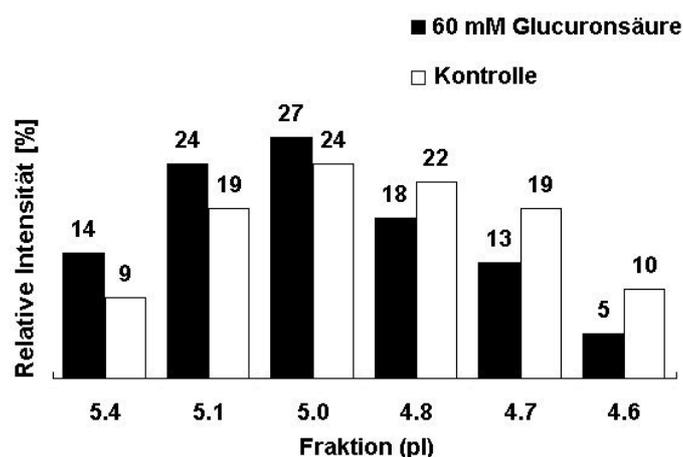


Abbildung 7: Quantifizierung der durch Phenylglyoxal in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Glucuronsäure modifizierten Isoformen des in Abb. 6 gezeigten 33 kDa-Polypeptids. Die in Abb. 6 gezeigten Isoformen aus zwei unabhängigen Versuchsreihen wurden eingescannt und die Signalintensitäten bestimmt. Für jede Reihe wurde die Intensitätsverteilung berechnet und die entsprechenden Mittelwerte dargestellt.

Wie in Abb. 7 deutlich erkennbar ist, wurde der Schwerpunkt der Intensitätsverteilung in Gegenwart von GlcUA zu basischeren Isoformen verschoben, was auf den Erhalt einer basischen Arginin-Seitenkette zurückzuführen wäre. Alle weiteren Punktgruppen, die ausgewertet wurden, zeigten keine Schwerpunktsverlagerung, wodurch die Spezifität der schützenden Wirkung von GlcUA deutlich wird. Beim Einsatz von NANA als schützendes Agens konnte für die aus dem 33 kDa-Polypeptid (d) hervorgehende Punktgruppe kein Verteilungsunterschied beobachtet werden. Versuche, in denen eine ligandenspezifische Modifizierung von lysosomalen Membranproteinen mit DEPC untersucht wurden, waren aufgrund des stark veränderten Proteinmusters nicht auswertbar. Die Reduktion der Inkubationszeit auf ein Sechstel der kinetisch ermittelten Inhibitionszeit (Mancini *et al.*, 1992) ließen ebenfalls keinen Unterschied der Aufspaltungsmuster erkennen.

Wie die Versuche mit Phenylglyoxal gezeigt haben, wird die Modifizierung des 33 kDa-Polypeptids/pI 5.8 (d) in Anwesenheit von GlcUA gehemmt. Die Analogien zu den Ergebnissen der Photoaffinitätsmarkierung (O. Diettrich, Dissertation 1996) ließen daher erwarten, daß unter den Proteinen im Silbergel lysosomale Transportsysteme, wie das des Sialinsäuretransporters, zu identifizieren seien. Als weiteres Qualitätsmerkmal der zur Isolierung von lysosomalen Membranproteinen aus immunoaffinitätsgereinigten Membranen eingesetzten Materialien wurde daher stets die Präsenz des 33 kDa-Polypeptids (pI 5.8) durch Immobiline-2D-Trennung überprüft.

4.3 Präparative Trennung lysosomaler Membranproteine

Um eine partielle Bestimmung der Primärsequenz des 33 kDa-Polypeptids und anderer Proteine der lysosomalen Membranpräparationen möglich zu machen, wurde eine präparative Trennmethode entwickelt. Da diese ebenfalls auf den Parametern isoelektrischer Punkt und Molekulargewicht basieren sollte, wurden zunächst die Möglichkeiten der Immobiline-2D-Technik getestet.

4.3.1 Präparative Trennung lysosomaler Membranproteine durch Immobiline-2D-Gelelektrophorese

Ausgehend von den Bedingungen für die analytische Immobiline-2D-Gelelektrophorese wurde für präparative Zwecke zunächst die Aufnahmekapazität durch „in-Gel-Rehydratisierung“ erhöht. Bei einer Verdopplung der ursprünglichen Breite der Immobiline-Gelstreifen

auf 6 mm, zeigte sich zum einen eine Deformation der Proteinflecken durch eine verstärkte Längsausdehnung (Tropfenform). Darüber hinaus kam es zu einer Streifenbildung bei der 2. Dimension (SDS-PAGE). Beides deutet auf ein verzögertes Eintreten von fokussiertem Protein ins Trenngel hin. Als optimale Breite der Fokussierungsstreifen wurde daher 5 mm gewählt, womit die Aufnahmekapazität durch „in-Gel-Rehydratisierung“ auf etwa 350 μ l erhöht werden konnte.

Die Möglichkeit, Protein nach und nach über einen trichterförmigen Aufsatz („sample cups“) während der Fokussierung aufzutragen, und damit das Auftragsvolumen zu steigern, erwies sich als ungeeignet. In diesen Fällen war bereits die Trennung in der 1. Dimension gestört, da es, bedingt durch die hohe lokale Konzentration an Membranproteinen, zu Präzipitation in der Nähe der Auftragsstelle und damit zum Erliegen der Fokussierung kam.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Bestimmung der maximalen Beladungsmenge gemacht. Dabei zeigte sich bei der Verwendung ultrazentrifugierter, lysosomaler Membranen, daß Proteinmengen über 2 mg sowohl zu Störungen während der Fokussierung als auch beim Austritt aus den Immobililine-Streifen führte. Die Proteinverteilung nach gefärbter 2D-Trennung ließ erkennen, daß einige Proteine in den Randbereichen partiell fokussiert waren, der Großteil der Proteine sich jedoch im Bereich zwischen pH 5-6 als durchgehende Streifen in der 2. Dimension wiederfand.

Eine präparative Trennung ultrazentrifugierter, lysosomaler Membranproteinen unter optimierten Bedingungen ist in Abb. 8A gezeigt. Dazu wurden 1 mg Membranprotein unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen in Gegenwart von 4 % CHAPS gelöst. Nach Auftrag der Probe durch „in-Gel-Rehydratisierung“ in einen 5 mm breiten Immobililine-Streifen erfolgte die Trennung in einem Gradienten von pH 4-7 bei einer Gesamtleistung von 48 kVh. Die Proteine wurden anschließend durch SDS-PAGE getrennt und durch Coomassie-Blau-Färbung sichtbar gemacht.

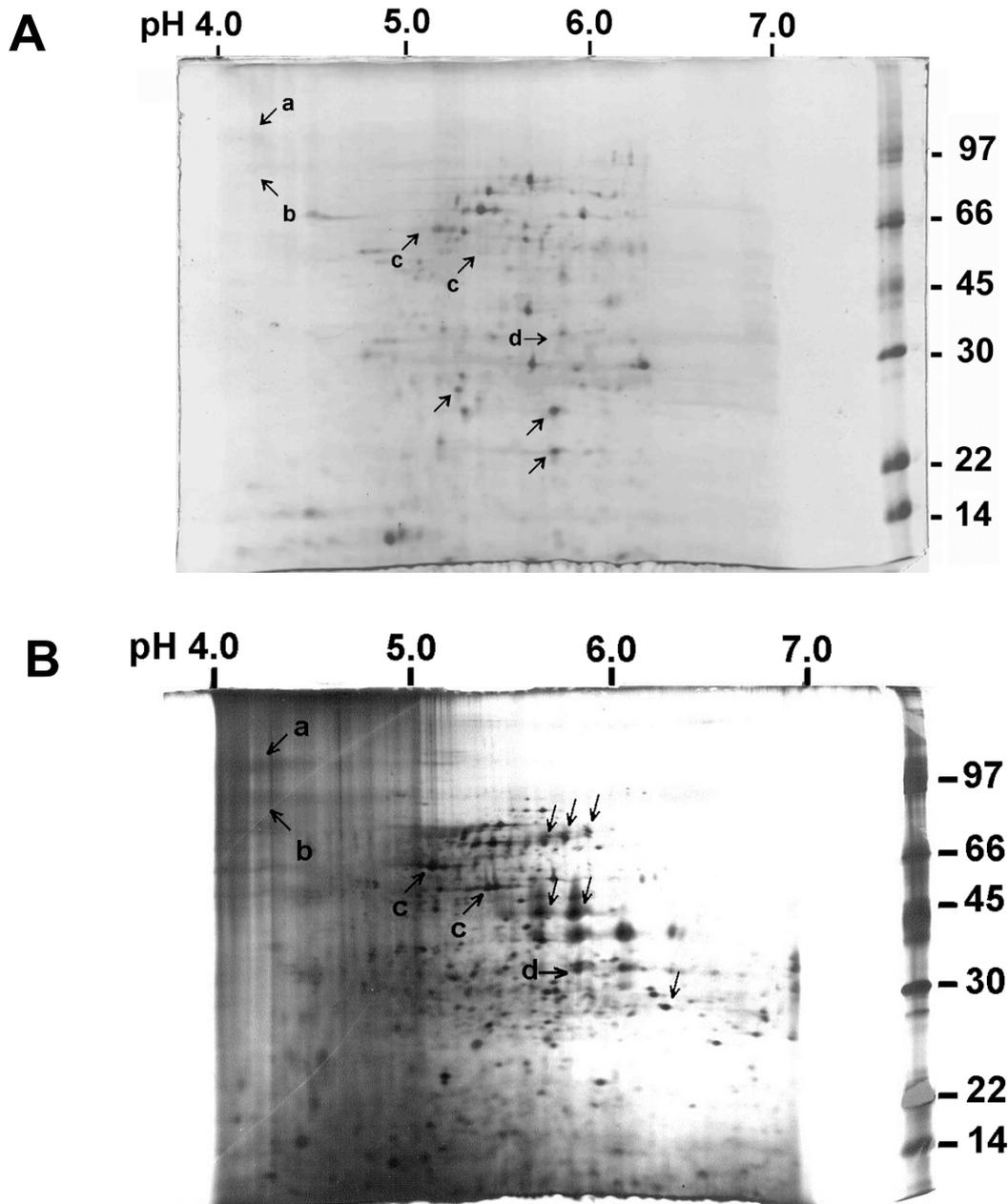


Abbildung 8: Vergleich ultrazentrifugierter, lysosomalen Membranproteine nach präparativer und analytischer Immobiline-2D-Trennung im Gradienten pH 4-7. A: Es wurden 1 mg ultrazentrifugierte, lysosomale Membranproteine in 9M Harnstoff/4 % CHAPS/10 mM DTT solubilisiert und nach präparativer Immobiline-2D-Trennung und Coomassie-Blau-Färbung analysiert. B: 30 µg Membranproteine der gleichen Aufarbeitung sind nach präparativer Immobiline-2D-Trennung und Silberfärbung gezeigt. Die Markierungen zeigen die Positionen der lysosomalen Membranproteine lamp1/2 (a), LIMP II (b) und LIMP I/CD63 (c) und des 33 kDa-Polypeptids (d) hin. Weitere Pfeile markieren Proteine deren Signal vorwiegend in der präparativen (Pfeile in A) bzw. in der analytischen Trennung (Pfeile in B) sichtbar wurden.

Die Abb. 8 zeigt, daß mit der Immobiline-2D-Technik einige der Proteine lysosomaler Membranpräparationen auch präparativ mit guter Qualität trennen ließen. Die Coomassie-Blau-

gefärbten Spots fokussierten vornehmlich im pH-Bereich 4.5 bis 6.5 und erschienen weniger scharf abgegrenzt als die der analytischen Auftrennung, die in Abb. 8B nach Silberfärbung gezeigt ist. Der Vergleich der beiden Trennungen zeigt deutlich, daß sich die Proteinmuster sehr stark von einander unterscheiden. Vor allem ließen sich einige zum Teil prominente Signale des Silbergels nicht in der Coomassie-Blau-gefärbten Auftrennung erkennen. So finden sich in Abb. 8A nur sehr schwache Signale für die lamp-Proteine (a) und für LIMP II (b). Noch deutlicher zeigt sich dieser Unterschied bei den prominenten Punktketten LIMP I/CD63 (c), die in der Silberfärbung (Abb. 8B) zu den prominentesten Polypeptiden gehören. Im Bereich des sialinsäurebindenden 33 kDa-Polypeptids (pI 5.8) (d) befindet sich hingegen in der Coomassie-Blau-Färbung (Abb. 8A) ein Signal, das mit einem in der Silberfärbung erkennbaren 34 kDa-Polypeptid korreliert. Dieses 34 kDa-Polypeptid konnte noch in einigen anderen Präparation, vor allem ultrazentrifugierter Membranen, beobachtet werden, weist jedoch in immunoaffinitätsgereinigten, lysosomalen Membranen keine verstärkte Präsenz auf. Neben einigen anderen Polypeptiden des Silbergels, deren relative Signalintensität in der Coomassie-Blau-Färbung deutlich vermindert erscheint (Pfeile in B) finden sich hingegen auch prominente Spots, die nur in der präparativen Immobiline-2D-Trennung sichtbar wurden (Pfeile in A).

Die stärkere Präsenz der lysosomalen Strukturproteine und des 33 kDa-Polypeptids in immunoaffinitätsgereinigten Membranpräparationen ließ eine selektive Erhöhung der Proteinkonzentration dieser Polypeptide in der Immobiline-2D-Trennung zu. In den präparativen Auftrennungen der immunoaffinitätsgereinigten Membranproteine (bis zu 1 mg) fanden sich jeweils weniger als ein Dutzend einheitlich schwach gefärbter Signale. Trotz starker Repräsentanz im Silbergel ließen sich jedoch weder lamp- noch LIMP-Proteine in Coomassie-Blau-färbbaren Mengen in die 2. Dimension überführen. Die Immobiline-Streifen wiesen nach Färbung im Anschluß an die zweidimensionale Trennung eine hohe Affinität zu Coomassie-Farbstoffen auf. Diese ließ aber kein klares Bandenmuster, als Hinweis auf fokussiertes Protein, erkennen. Problematisch war, daß die Immobiline-Matrix durch ihre puffernden Seitenketten selbst zur Bindung der Coomassie-Farbstoffe beitrug. Lediglich bei Silberfärbungen konnten durch sehr kurze Inkubationszeiten vereinzelt Banden detektiert werden.

Ähnliche Beobachtungen, daß speziell Membranproteine durch präparative Immobiline-2D-Technik nicht zugänglich werden, sind in der Literatur beschrieben worden. Als Hauptursache dafür werden hydrophobe Wechselwirkung der Membranproteine mit der Immobiline-Matrix angesehen (C. Adessi *et al.*, 1997; T. Rabilloud *et al.*, 1997; C. Pasquali *et al.*, 1997). Um

diese zu minimieren wurden Extraktionszusätze wie Thioharnstoff, Sulfobetaine und nichtionische Detergenzien (Triton X-100) in Gegenwart von hochmolarem Harnstoff empfohlen. Die Verwendung des weniger reaktiven Thioharnstoffs (keine Carbamylierungsreaktion) bot neben der beschriebenen Eigenschaft die Löslichkeit hydrophober Proteine am isoelektrischen Punkt zu erhöhen, auch die Möglichkeit die Extraktionstemperatur anzuheben. Der Einsatz dieser Reagenzien zeigte nach zweidimensionaler Auftrennung der lysosomalen Membranproteine wiederholt eine maximal zweifache Verstärkung der bereits unter Standardbedingungen detektierten Signale, von denen keines den bekannten lysosomalen Strukturproteinen zuzuordnen war.

Um zu untersuchen ob die Wechselwirkung der Membranproteine mit der Immobiline-Matrix überwunden werden können, wurden die Equilibrierungsbedingungen variiert. Zum einen wurde die SDS-Konzentration von 2 auf 4 % (w/v) erhöht, und zum anderen wurde die Effektivität der 95 °C-Behandlung, auch in Bezug auf die oben beschriebenen Extraktionsvarianten, kontrolliert. Dabei wurde die einminütige Inkubation in Equilibrierungspuffer I bei 95 °C unter allen Bedingungen als optimal bestätigt. Die Signalintensität in der 2. Dimension wurde jedoch auch durch die Erhöhung der SDS-Konzentration nur um maximal Faktor 2 erhöht.

Da die Kombination der einzelnen Verbesserungsmöglichkeiten für die präparative zweidimensionale Trennung der lysosomalen Membranproteine mit der Immobiline-2D-Technik nicht zu Coomassie-Blau-färbbaren Signalen der strukturellen lysosomalen Membranproteine geführt hat, wurden trägerfreie Möglichkeiten zur Fokussierung untersucht.

4.3.2 Präparative Trennung lysosomaler Membranproteine durch trägerfreie isoelektrische Fokussierung im OCTOPUS

Zur präparativen isoelektrischen Fokussierung der lysosomalen Membranproteine, wurde das OCTOPUS-Gerät zur trägerfreien Durchflußelektrophorese eingesetzt. Als Grundvoraussetzung zur Trennung mit diesem Gerät, muß ein laminarer Medienfluß im Trennraum gewährleistet sein. Dies wurde durch Auftragen von Bromphenolblau-Lösung in 0.2 % (w/v) Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) regelmäßig kontrolliert. Ebenso wichtig war die Überprüfung des durch die Ampholyte ausgebildeten pH-Gradienten nach Stabilisierung der Stromstärke im Trennmedium. Dazu wurden im Vorlauf jeder Trennung pI-Marker aufgetragen und deren Fokussierungsmuster im Trennraum begutachtet. Die Bestimmung der Zeit-

punkte der Fraktionierung konnte anhand dieses Vorlaufes geschehen, wurde aber auch durch den Zusatz von pI-Marker zu der Probe optisch kontrolliert. Da die Fokussierungen in hochmolaren Harnstoff-Lösungen durchgeführt wurden, war es von besonderer Bedeutung, das Auskristallisieren des Harnstoffs an den Fraktionierschläuchen zu verhindern, um eine kontinuierliche Fraktionierung zu gewährleisten.

Für die Bestimmung der zur Trennung der lysosomalen Membranproteine maximal eingesetzten Proteinkonzentration in der Probe, erwies sich die Wahl der eingesetzten Detergenzien als entscheidend. Da der Einsatz zwitterionischer Detergenzien, wie CHAPS, für Trennungen im OCTOPUS nicht geeignet war (Dr. Weber, persönliche Mitteilung) wurden zunächst 0.2 % (w/v) Triton X-100 (10fache kritische micellenbildene Konzentration) im Trennmedium verwendet, welches auch zur Solubilisierung der lysosomalen Membranproteinen eingesetzt wurde. Dies führte jedoch bei Proteinkonzentrationen ab 1 mg/ml zur Präzipitatsbildung im Auftragsbereich der Probe. Die mit bloßem Auge zu beobachtenden Partikel wurden im Medienstrom mitgeführt und in Teilen zur Anode hin abgelenkt. Die Analyse dabei erhaltener Fraktionen durch SDS-PAGE zeigte nach Silberfärbung ein Abbild des gesamten Proteinspektrums, sowohl in zentralen, als auch in Fraktionen im Grenzbereich der Anodenstabilisierung. Der Einlaß solcher Proben auf der kathodal basischen Seite führte zur verzögerten Bildung der beschriebenen Partikel, beginnend im zentralen Fokussierungsbereich. Die Präzipitation erwies sich als pH-abhängig und konnte durch Einstellen der Probenlösung auf pH 5.0 auch außerhalb des OCTOPUS-Gerätes ausgelöst werden. Für die präzipitatfreie Trennung von Proben mit bis zu 2.6 mg/ml lysosomaler Membranproteine war daher die Einstellung der Solubilisierungslösung auf 2 % (w/v) Triton X-100 essentiell. Aufgrund der Fraktionierung fokussierter Proben durch den Gegenstrom einer mobilen Phase (Counterflow) werden die Proteine unabhängig von ihrer Verteilung im Gradienten zusätzlich verdünnt. Proben mit den oben genannten Konzentrationsverhältnissen ermöglichten daher eine Analyse der Fraktionen nach Immobiline-2D-Trennung bzw. eindimensionaler SDS-PAGE nach Silberfärbung ohne vorhergehende Konzentrierung.

Für eine optimale Auftrennung der lysosomalen Membranproteine durch isoelektrische Fokussierung (IEF) im OCTOPUS wurden diese, wie unter 3.2.6.3 beschrieben, in Trennmedium denaturierend solubilisiert und dem laminaren Strom des ampholythaltigen Trennmediums zugeführt. In dem sich bei konstanter Spannung ausbildenden pH-Gradienten (Ampholyte pH 3-10), wurden die Proben in der Durchflußzeit (10-15 min) getrennt und in 96 Frak-

tionen aufgefangen. Nach Bestimmung des pH-Gradienten wurden Proben im Fraktionsbereich pH 3-8 durch SDS-PAGE getrennt und im Gel sichtbar gemacht.

Abb. 9 zeigt eine Trennung ultrazentrifugierter, lysosomaler Membranen nach 15minütiger IEF im OCTOPUS in einem Gradienten pH 3-10 bei 2 000 V nach SDS-PAGE und Silberfärbung.

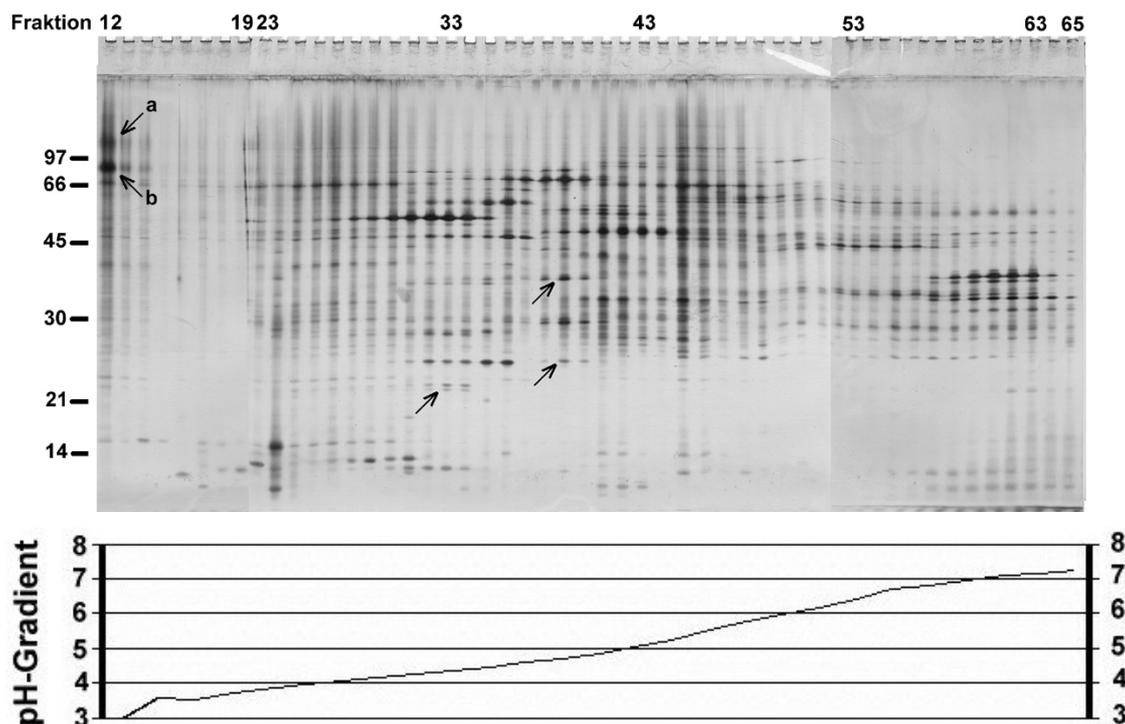


Abbildung 9: Trennung ultrazentrifugierter, lysosomaler Membranproteine durch trägerfreie IEF im OCTOPUS. 800 µg ultrazentrifugierte, lysosomale Membranproteine wurden in Trennmedium (TM) mit 2% Triton X-100 und 10 mM DTT gelöst (2.6 mg Protein/ml) und durch free-flow-isoelektrische Fokussierung im OCTOPUS getrennt. Je 15 µl (1/20tel) der erhaltenen Fraktionen 12-19 und 23-65 (pH 3.0-7.2) wurden in einem 14%igen SDS-Gel getrennt und nach Silberfärbung analysiert. Die Markierungen zeigen die Positionen der lysosomalen Membranproteine lamp-1/2 (a) und LIMP II (b). Weitere Pfeile markieren Proteinbanden die in nur drei Fraktionen fokussierten. Im unteren Bereich der Abbildung ist der gemessene pH-Gradient wiedergegeben.

Wie die Abb. 9 zeigt, lassen sich die zentral aufgetragen (entspricht Fraktion 48), lysosomalen Membranproteine, gut im linearen Gradienten der OCTOPUS-Fokussierung trennen und nehmen bei dem gewählten Gradienten ein breites Fraktionsspektrum ein (Fraktion 12-65). Die prominentesten Proteinbanden lassen mehrere benachbarte Hauptfraktionen erkennen, die von Nebenfraktionen flankiert sind. Die Mehrzahl der Proteinbanden findet sich jedoch in

weniger benachbarten Fraktionen wiedergegeben oder lassen bereits eine Verteilung auf nur drei Fraktionen, mit einer Hauptfraktion, erkennen (Pfeile in Abb. 9). Bei einer durchschnittlich gemessenen pH-Differenz von 0.08 zwischen benachbarten Fraktionen, entspricht dies einer maximalen Trennleistung der isoelektrischen Fokussierung von $\Delta pI = 0.24$. Besonders gut abgetrennt erscheinen die bekannten Signale der lamp-Proteine (a), sowie dem LIMP II-Korrelat (b), die im sauren, nicht linearen Grenzbereich zur Anodenstabilisierung fraktionieren (pH 3-3.5). Im basischeren Fraktionierbereich finden sich Proteine die im pH-Bereich >7 fraktionieren (Fraktionen 58-65 / 40, 35 und 30 kDa-Proteine). Die Molekulargewichtsverteilung der in den Fraktionen detektierbaren Proteine entspricht mit etwa 5-120 kDa den Verhältnissen der Immobiline-2D-Trennungen. Geht man davon aus, daß sich die eingesetzte Proteinmenge von 800 μg (Proteinkonzentration 2.6 mg/ml) auf etwa 60 proteinhaltige Fraktionen verteilt, ergibt sich eine mittlere Proteinkonzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pro Fraktion. Damit gehen die dargestellten Signale der Silberfärbung einer Fraktion auf umgerechnet 0.4 μg Protein (1/20tel Fraktionsvolumen) zurück, was insgesamt bei einer Zahl von bis zu 30 Proteinbanden je Fraktion auf eine gute Ausbeute schließen läßt. Fraktionen, die weniger Proteine aufweisen, enthalten häufig prominentere Banden. Als Besonderheit der Trennung im OCTOPUS-Gerät erweist sich, daß größere Proteinmengen lysosomaler Membranproteine nur durch eine direkte Folge analytischer Fokussierungen getrennt werden können. Dadurch werden präparative Proteinmengen nur in entsprechend großen Fraktionen gewonnen (Verhältnis 1:1 zum Auftragsvolumen).

Ein direkter Vergleich der OCTOPUS-Trennung mit der Immobiline-2D-Trennung desselben Ausgangsmaterials im pH-Bereich 4-7 ist in Abb. 10 gezeigt. Als optische Hilfe wurden im Abbildungsteil B die prominent erscheinenden Spots der Immobiline-2D-Trennung (C) gelb eingefärbt und von der OCTOPUS-Trennung (A) überlagert.

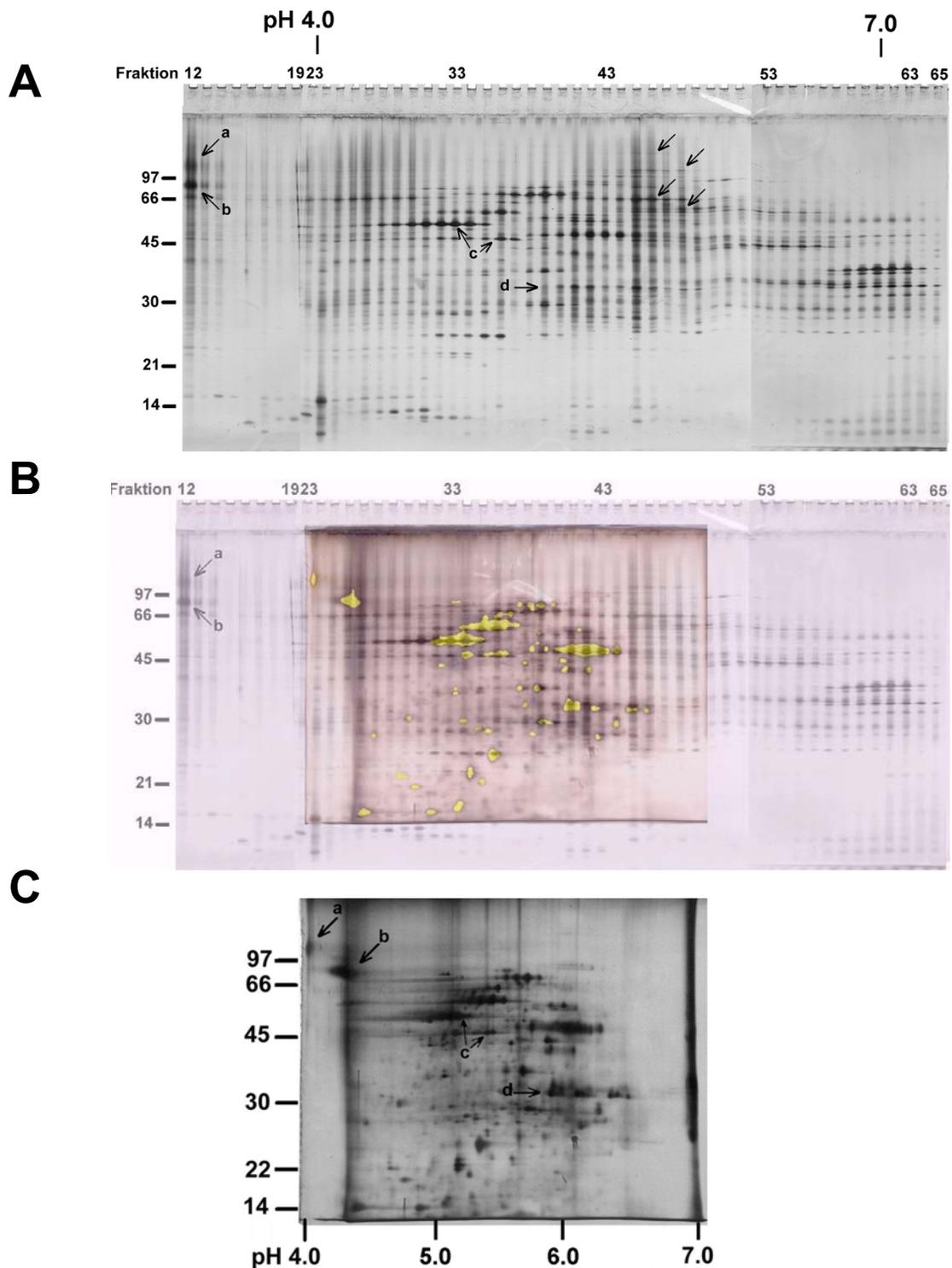


Abbildung 10: Vergleich der OCTOPUS- und der Immobiline-2D-Trennung von ultrazentrifugierten, lysosomalen Membranproteinen. A: Wiedergabe der in Abb. 9 gezeigten Trennung von ultrazentrifugierten, lysosomalen Membranproteinen (800 µg) nach OCTOPUS-2D-Trennung und Silberfärbung mit Angabe des gemessenen Fraktionierungsbereichs pH 4-7. B: Überlagerung von A mit C (prominente Signale in C wurden gelb eingefärbt). C: 50 µg der in A gezeigten lysosomalen Membranpräparation wurden in gleicher Weise in Trennmedium reduzierend solubilisiert und nach Immobiline-2D-Trennung im pH-Gradienten 4-7 und Silberfärbung analysiert. Die Markierungen zeigen die Positionen der lysosomalen Membranproteine lamp-1/2 (a), LIMP II (b), LIMP I/CD63 (c) sowie des 33-kDa-Proteins (d). Weitere Pfeile in A markieren Proteine die nur in der OCTOPUS-Trennung zu erkennen sind.

Abb 10. läßt eine sehr guter Übereinstimmung der gezeigten Trennungen bezüglich der relativen Lage der fokussierten Polypeptide zueinander erkennen. Lediglich die lysosomalen Strukturproteine lamp-1/2 (a), LIMP II (b) und die basischen Polypeptide fokussieren, wie oben erwähnt, außerhalb des durch die Immobiline-Streifen vorgegebenen pH-Bereichs. Geht man davon aus, daß die in Abb. 10A gezeigte Trennung auf umgerechnet 40 µg Protein (ein 20tel der Gesamtproteinmenge 800 µg) zurückgeht, ist in Abb. 10C eine vergleichbare Proteinmenge (50 µg) getrennt und läßt keinen quantitativen Unterschied für die beiden Trennmethode ablesen. Als qualitativen Unterschied zur Immobiline-2D-Trennung zeigt der Vergleich jedoch, daß besonders Polypeptide im Bereich um 100 kDa (Pfeile in A) nur in den OCTOPUS-Fractionen repräsentiert sind. Die Überlagerung der beiden Fokussierungsmuster zeigt weiterhin, daß der in den OCTOPUS-Fractionen gemessene pH-Gradient gegenüber dem Immobiline-Gradienten flacher erscheint. Findet sich mit dem sauren Ende der Immobiline-2D-Auftrennung (pH 4) eine gute Korrelation (Fraktion 23: pH 3.94), so weist das basische Ende der Immobiline-2D-Trennung (pH 7) mit dem in der Fraktion 51 gemessenen pH-Wert (pH 6.17, s. Abb. 9) einen deutlichen Unterschied auf. Vergleiche der pH-Gradienten verschiedener Fraktionierungen zeigten allerdings eine gute Reproduzierbarkeit des linear ansteigenden pH-Wertes im Fraktionsbereich von etwa 18-80. Eine Zuordnung einzelner Proteine zu Fraktionen der OCTOPUS-Trennung, über die aus Immobiline-2D-Trennungen bestimmten pI-Werte, war demnach nicht anhand des pH-Gradienten möglich. Für die Aufarbeitung bestimmter Proteine der OCTOPUS-Trennung wurde daher die Auswahl anhand der Korrelation mit den Immobiline-2D-Silbergelen vorgenommen.

Um die Trennleistung der OCTOPUS-Fokussierung zu verdeutlichen, ist in Abb. 11A eine Trennung von ultrazentrifugierten Membranproteinen durch IEF im OCTOPUS gezeigt, deren Fraktionen 41, 43 und 45 durch Immobiline-2D-Trennung analysiert wurden (Abb. 11B).

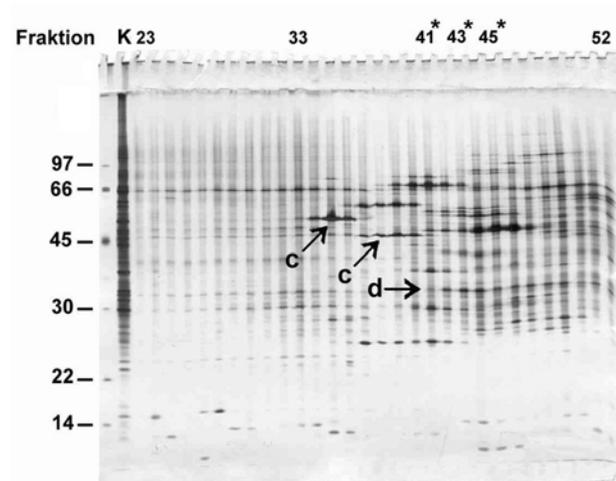
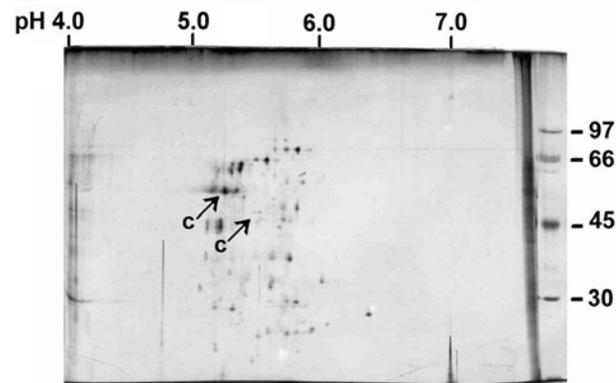
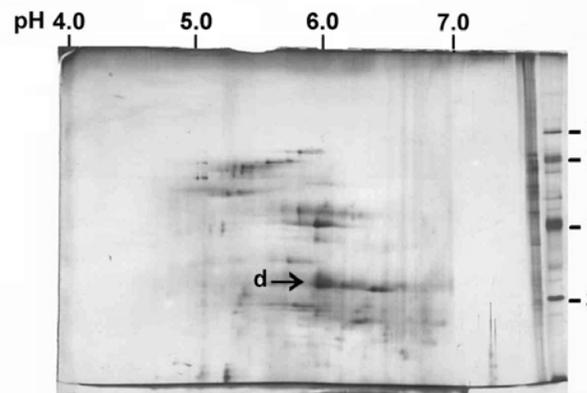
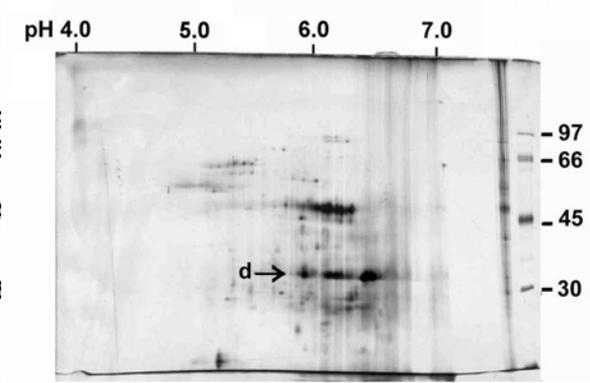
A**B****41****43****45**

Abbildung 11: Immobiline-2D-Trennung der Fraktionen 41, 43 und 45 einer isoelektrischen Fokussierung von ultrazentrifugierten, lysosomalen Membranen nach OCTOPUS-IEF. A: 800 µg ultrazentrifugierte, lysosomale Membranproteine wurden durch IEF im OCTOPUS (pH 3-10) getrennt. Je 10 µl der Fraktionen 23-71 sowie 0.5 µg der Ausgangsprobe (K) wurden nach SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. B: Je 100 µl Probe von denen in A mit einem Stern versehenen Fraktionen 41, 43 und 45 wurden nach Immobiline-2D-Trennung (pH 4-7) und Silberfärbung analysiert. Die Pfeile markieren die Position von LIMP I/CD63 (c) und des sialinsäurebindenden 33 kDa-Proteins (d).

Wie in Abb. 11A zu erkennen ist, wurden die lysosomalen Membranproteine in dem gezeigten Fraktionsbereich zu der in Abb. 10A gezeigten Trennung reproduzierbar gut fokussiert. Die in dem Ausgangsmaterial (K) gezeigten intensiven Banden von 110 kDa (lamp-Proteine) und 88 kDa (LIMP II) sind in diesem Ausschnitt nicht sichtbar, da sie in den Fraktionen < 20 fokussierten (vergleiche Abb. 10). Die Proteinmuster der in Abb. 11B gezeigten Immobiline-2D-Trennungen der Fraktionen 41, 43 und 45 weisen deutliche Unterschiede auf, bei denen die Verteilungsmuster der prominenten Proteine eine Fraktionierung distinkter pH-Bereiche erkennen lassen. Da diese etwa eine pH-Einheit umfassen, kommt es in der zweidimensionalen Trennung der gezeigten Fraktionen zu überlappenden Proteinmuster. Die dabei ablesbare Verschiebung dieser pH-Bereiche mit steigender Fraktionsnummer folgt dem pH-Gradienten der OCTOPUS-Trennung. Vergleicht man die eindimensionale Trennung der Fraktionen (A) mit den jeweiligen Immobiline-2D-Trennungen, findet sich für Fraktion 43 und 45 eine verhältnismäßig gute Korrelation der jeweils prominenten Signale. In Fraktion 41 findet sich hingegen bereits ein deutliches Signal im LIMP I/CD63-Bereich (Markierung c in Abb. 11B), das in der Silberfärbung der OCTOPUS-Trennung keine Entsprechung findet. Die in der 1D-Trennung dieser Fraktion zu den intensivsten Signalen zählenden Proteine (35 kDa und 27 kDa) erscheinen hingegen in der Immobiline-2D-Trennung weniger prominent (pI 5.7). In den zweidimensionalen Trennung der Fraktionen 43 und 45 ist ein starkes Signal für das sialinsäurebindende 33 kDa-Protein (d) zu erkennen, welches in dieser Präparation von Proteinen gleichen Molekulargewichtes begleitet ist. Die eindimensionale Trennung läßt in diesem Bereich der Fraktion 45 ein Signal erkennen (Markierung in A), das in den Nachbarfraktionen 42 bis 44 intensiv erscheint. Von Bedeutung erscheint dabei, daß in diesem Fraktionsbereich (pH 5.2-5.4) nicht nur das sialinsäurebindende Protein (pI 5.8), sondern zudem Protein mit weit höherem pI fraktioniert.

Die Verwendung flacherer pH-Gradienten für die Fokussierung im OCTOPUS (pH 3-7 und pH 5-7) bewirkte eine Ausweitung des Fraktionsbereichs der Protein-Banden, ließ jedoch in der zweidimensionalen Analyse der Fraktionen keine Einengung des durch Protein repräsentierten pH-Bereichs erkennen. Versuche, die Fokussierungsdauer (Trennzeit 20-40 min) durch Herabsetzen der Flußrate zu verlängern, führten ebenfalls zu einer Verbreiterung der Fraktionsbereiche fokussierter Proteine, wie die Analyse der OCTOPUS-Fraktionen durch SDS-PAGE zeigte. Der pH-Gradient erwies sich hingegen als stabil.

Die Trennung im OCTOPUS sollte optimal sein, wenn die Proteine bis zu ihrem Fokussierungsbereich eine möglichst lange Trennstrecke durchlaufen. Dies bedeutet, daß die lysoso-

malen Membranproteine, mit vorwiegend sauren pIs, vorzugsweise auf der basischen Seite des Gradienten pH 3-10 aufgetragen werden sollten. Die zu trennenden Proteine weisen dadurch eine höhere Ladung auf und besitzen eine größere Ionenbeweglichkeit. Wie Trennungen unter diesen Bedingungen zeigten, fraktionierten die meisten Proteine jedoch in höherzähligen Fraktionen und waren in mehr benachbarte Fraktionen nachweisbar als unter Standardbedingungen.

Durch wiederholte Fokussierung einer bzw. mehrerer OCTOPUS-Fraktionen (Refokussierung) kann die Fokussierungsdauer theoretisch erhöht werden. Abb. 12 zeigt eine Trennung lysosomaler Membranproteine durch OCTOPUS-IEF (A) und die Refokussierung von 300 μ l der Fraktion 44 (B) unter identischen Bedingungen nach SDS-PAGE und Silberfärbung.

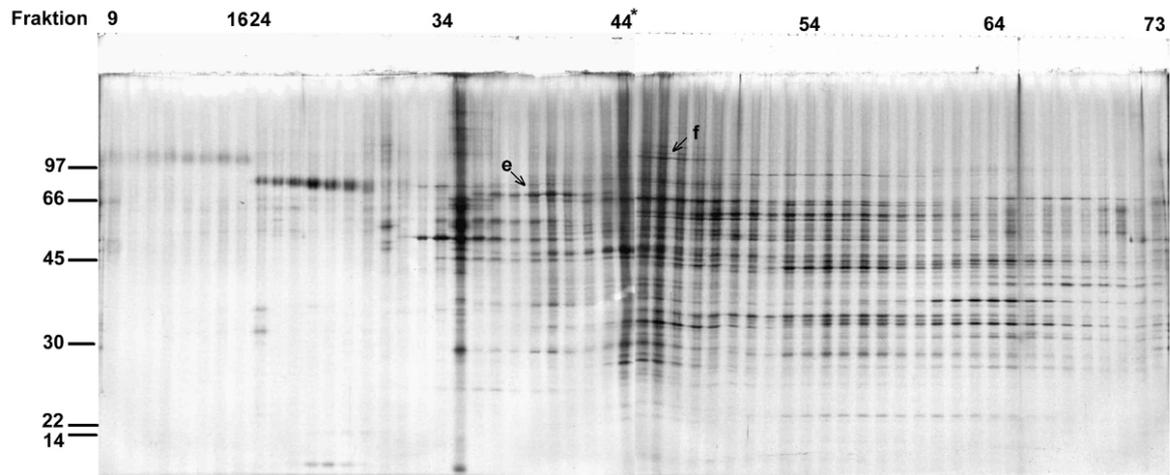
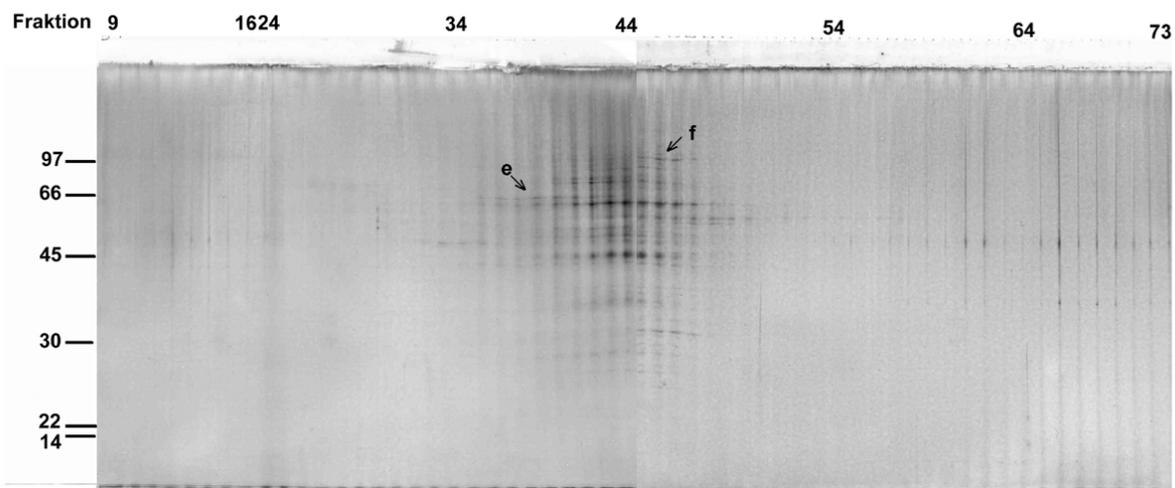
A**B**

Abbildung 12: Zweifache Trennung einer solubilisierten Fraktion ultrazentrifugierter, lysosomaler Membranproteinen nach Trennung durch trägerfreie IEF im OCTOPUS. A: Für die erste Trennung wurden 1 mg ultrazentrifugierter lysosomaler Membranproteine in Trennmedium (TM) mit 2% Triton X-100 und 10 mM DTT (3 mg/ml) gelöst und durch IEF im OCTOPUS (pH 3-10) getrennt. Je 15 μ l der Fraktionen 12-19 und 23-65 (pH 3-7) wurden reduzierend denaturiert und nach Trennung in einem 14%igen SDS-Gel mit anschließender Silberfärbung analysiert. B: Für die zweite Trennung wurden 300 μ l der in A gezeigten Fraktion 44 (Stern) unter zu A identischen Bedingungen getrennt. Je 17 μ l der Fraktionen 9-16 und 24-73 (pH 3-7) wurden wie für A beschrieben durch SDS-PAGE analysiert. Die Pfeile markieren Polypeptide die überwiegend in Fraktion 39 (e) bzw. 46 (f) fokussieren, nach der ersten Trennung jedoch teilweise in Fraktion 44 vorlagen und sich nach der zweiten Trennung in Fraktion 39 bzw. 46 konzentrierten.

Wie Abb.12 zeigt, finden sich Polypeptide, die nach der ersten Trennung in Fraktion 44 (pH 5.39) enthalten waren, nach der zweiten Trennung (Refokussierung) in mehreren benachbar-

ten Fraktionen (Fraktionen 34-51, pH 4.47-6.16) fokussiert. Das Polypeptidmuster dieser Fraktionen ließ das Muster der ersten Trennung in diesem Fraktionsbereich erkennen und wies das Konzentrationsmaximum der prominenteren Polypeptide in Fraktion 44 auf. Dies zeigte, daß bei einer Refokussierung die Polypeptide aus dem Auftragsbereich (Fraktion 48) erneut in diesen Fraktionsbereich einwandern und eine weitere Trennung von Polypeptiden durch isoelektrische Fokussierung möglich ist. Anders als bei den Versuchen in flacheren pH-Gradienten oder bei geringerer Flußrate zu trennen, zeigen sich in der zweiten Fokussierung Polypeptidbanden mit gleichbleibendem Fraktionierbereich und darüberhinaus abgetrennte Polypeptide (Markierungen e und f). Als Nachteil dieses Verfahrens erwies sich die Verdünnung der Proben bei jeder weiteren Trennung mit dem OCTOPUS-Gerät. Eine zweidimensionale Analyse refokussierter Proben konnte, da eine Konzentrierung der Fraktionen zunächst nicht möglich war (siehe 4.3.3), nicht durchgeführt werden. Weiterhin eignet sich dieses Verfahren unter diesen Umständen nur zur gezielten Aufarbeitung einzelner Fraktionen, bei denen Begleitprotein durch Refokussierung abgetrennt wird.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse erkennen, daß bei der isoelektrischen Fokussierung im OCTOPUS-Gerät die lysosomalen Membranproteine bis zur Fraktionierung nicht den durch den pH-Gradienten vorgegebenen pI-Bereich erreichen. Dadurch scheint es, als könne sich im Verlauf der Fokussierung keine Gleichgewichtseinstellung bzw. kein Endpunkt der Fokussierung einstellen, wie sie sich bei der Immobiline-2D-Trennung zeigt. Die in Ansätzen gute Trennung läßt sich durch weiteres Fokussieren verbessern, was aber nur durch eine Refokussierung zu erreichen und daher mit einer weiteren Verdünnung der Proben verbunden ist. Die Fokussierung erwies sich jedoch zudem als gut reproduzierbar und war mit guten Ausbeuten verbunden, sodaß sie für eine präparative Aufarbeitung der schwer zugänglichen lysosomalen Membranproteine geeignet erschien, um Proben für massenspektroskopische Analysen zu gewinnen.

Für die massenspektroskopische Charakterisierung der immunoaffinitätsgereinigten, lysosomalen Membranproteine wurden 1.8 mg affinitätsgereinigte Membranproteine wie unter 3.2.6.2 beschrieben in Trennmedium reduzierend denaturiert und der gelöste Teil durch isoelektrische Fokussierung im OCTOPUS-Gerät (pH 3-10) getrennt. Die Analyse der erhaltenen Fraktionen durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung zeigt die Abb. 13.

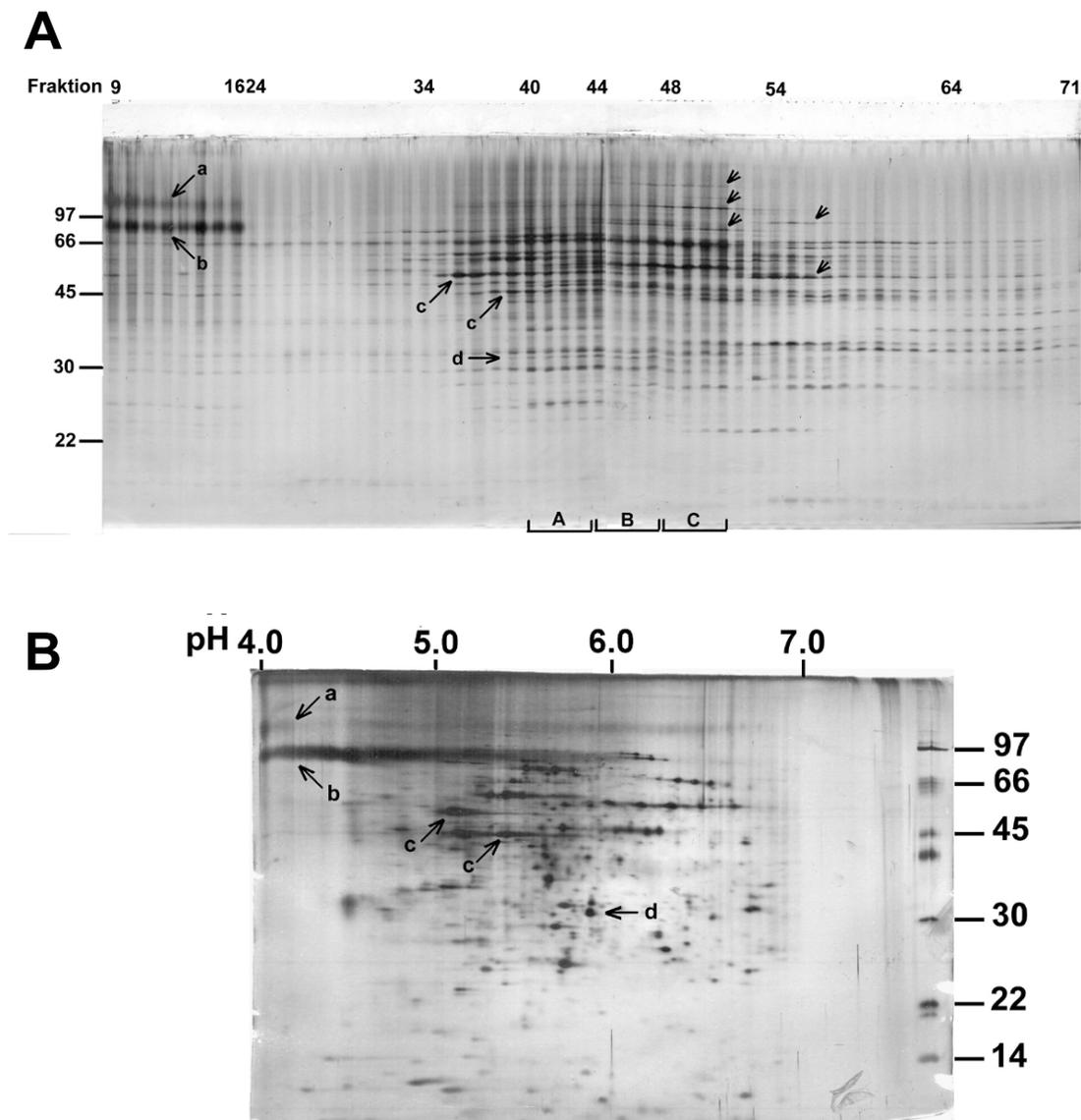


Abbildung 13: Vergleich der OCTOPUS- und der Immobiline-2D-Trennung immunoaffinitätsgereinigter, lysosomaler Membranproteine. A: Es wurden 1.8 mg immunoaffinitätsgereinigte, lysosomale Membranproteine in Trennmedium (TM) mit 2% Triton X-100 gelöst und nach Einstellen auf 10 mM DTT (2.6 mg/ml) durch free-flow-isoelektrische Fokussierung im OCTOPUS getrennt. Je 13 μ l (1/45tel) der erhaltenen Fraktionen 9-16 und 24-73 wurde durch Trennung in einem 14%igen SDS-Gel nach Silberfärbung analysiert. B: Es wurden 40 μ g Protein der in A gezeigten Präparation nach Immobiline-2D-Trennung im Gradient pH 4-7 mit anschließender Silberfärbung gezeigt. Die Markierungen zeigen die Positionen der lysosomalen Membranproteine lamp1/2 (a), LIMP II (b) und LIMP I/CD63 (c) und des 33 kDa-Polypeptids (d). Pfeile in A weisen auf Proteine deren Signal in der Immobiline-2D-Trennung B nicht vorhanden ist. Die im unteren Teil der Abb. 13A markierten Fraktionsbereiche (A-C) wurden präparativ aufgearbeitet.

Die in Abb. 13 gezeigte OCTOPUS-Trennung der immunoaffinitätsgereinigten, lysosomalen Membranproteine läßt ein vergleichbares Verteilungsmuster zu den in Abb. 9 und 11 gezeigten Trennungen erkennen. Der Fokussierungsbereich ist jedoch durch eine verbreiterte Föh-

rung der Anodenstabilisierung (asymmetrisch geschnittener Spacer) um etwa 6 Fraktionen zur Kathode hin verschoben. Dies hatte keinen wesentlichen Einfluß auf die Trennung selbst, wie dem gleichbleibenden Fokussierungsbereich der zentral fokussierenden Proteine (Fraktionen 34-56 = 22 Fraktionen) zu entnehmen ist (vergleiche Abb. 9: 18 Fraktionen). Der Vergleich mit der Immobiline-2D-Trennung des gleichen Materials (Abb. 13B) läßt erkennen, daß Proteine im hochmolekularen Bereich der OCTOPUS-Trennung (Pfeile in A) keine Entsprechung in Abb. 13B zeigen. Die Zuordnung einzelner Proteinspots der Immobiline-2D-Trennung mit Proteinbanden der OCTOPUS-Trennung ist aufgrund der Vielzahl fokussierter Proteine erschwert, ließ sich aber anhand der prominenten Signale (a-c) vornehmen. Da der Bereich des 33 kDa-Polypeptids (d) in der OCTOPUS-Trennung mit Banden in etwa 12 Fraktionen (40-51) korrelierte, wurden, um ausreichendes Material für massenspektroskopische Analysen zu erhalten, die Proben der Fraktionen 40-43 (Pool A), 44-47 (Pool B) sowie 48-51 (Pool C) vereinigt. Zudem konnte dadurch ein breites Spektrum der lysosomalen Membranproteine in nur wenigen Proben bei der weiteren Aufarbeitung für die Trennung durch präparative SDS-PAGE analysiert werden.

4.3.3 Hydroxylapatit-Säulenchromatographie ausgewählter Fraktionen nach isoelektrischer Fokussierung im OCTOPUS

Für eine präparative Isolierung von durch OCTOPUS-IEF getrennten, lysosomalen Membranproteinen mit Hilfe von SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Blau-Färbung mußten Proben der Fraktionen konzentriert werden. Dabei erwies sich die Zusammensetzung der Proben, vor allem durch den hochmolekularen Viskositätszusatz HPMC (MW ca. 84 kDa), als ungeeignet für Filtrationen. Selbst Proteine mit einem Molekulargewicht unterhalb der Ausschlußgrenze wurden nahezu vollständig im hochviskosen HPMC-haltigen Überstand zurückgehalten. Präzipitationen mit Aceton oder Methanol/Chloroform ließen ebenfalls nur einen geringen Teil der Proteine im Niederschlag wiederfinden. Um HPMC und andere Begleitstoffe (Triton X-100, Harnstoff) abtrennen zu können, wurden chromatographische Verfahren untersucht, von denen sich die Hydroxylapatit-Säulenchromatographie für die lysosomalen Membranproteine als geeignet herausstellte. Es zeigte sich, daß eine Hydroxylapatit-Säule mit 0.25 ml Bettvolumen (entspricht 1 mg BSA Bindungskapazität) unter den unter 3.2.8 angegebenen Bedingungen etwa 2 ml-Mengen OCTOPUS-Fraktion binden konnte. Das Cellulosederivat HPMC, das durch den Anthron-Nachweis detektierbar war, wurde nicht gebunden und war daher nahezu vollständig im Durchbruch nachzuweisen. Ein ähnliches Verhalten zeigte

Triton X-100, das nach Messung der OD 280 zu 80-90 % im Durchbruch enthalten war. Um die Membranproteine, im Verlaufe der Abtrennung der Begleitstoffe, dennoch in Lösung zu stabilisieren, wurden die OCTOPUS-Fraktionen mit dem Bindungspuffer auf 0.1% (w/v) SDS eingestellt.

Die Elution an Hydroxylapatit gebundener Proteine mit hochmolaren Phosphatkonzentrationen (750 mM) zeigte, dass die Ausbeuten im Bereich zwischen 80 und 90 % lagen (Vergleich im Silbergel). Dabei eluierten die Proteine in bis zu drei Hauptfraktionen (600 µl), die aufgrund des hohem Phosphatgehalts für eine präparativen SDS-Gelelektrophorese noch einen Deionisierungsschritt erforderten. Dieses Problem wurde umgangen, indem die Elution der vorwiegend sauren Membranproteine mit basischen Phosphat-Lösungen (pH 9.3) unter Zusatz von 15 % (v/v) Isopropanol durchgeführt wurden. Abb. 14A zeigt eine Aufarbeitung von 2 ml gepoolter OCTOPUS-Fraktionen (Pool A in Abb. 13) durch Hydroxylapatit-Säulenchromatographie nach Waschen mit je 2 Säulenvolumina halbkonzentriertem Bindungspuffer und A. bidest. sowie nach Elution mit fünfmal je einem Säulenvolumen Elutionspuffer.

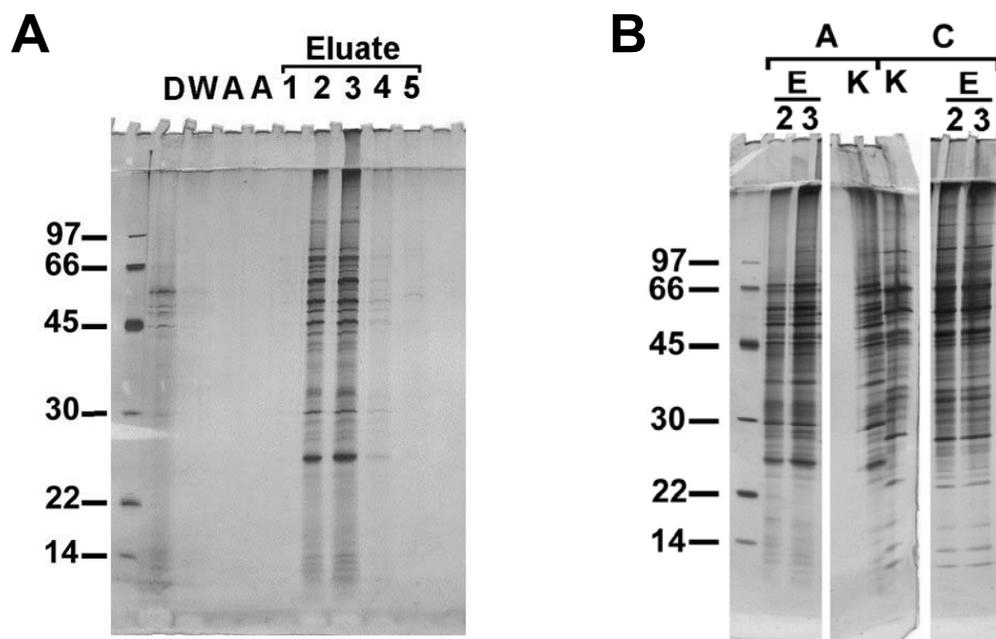


Abbildung 14: Hydroxylapatit-Säulenchromatographie der in Abb. 13 gezeigten OCTOPUS-Fraktionen immunoaffinitätsgereinigter, lysosomaler Membranproteinen (Pool A und C). A: Es wurden je 2 ml OCTOPUS-Fraktion (Pool A und C der Abb. 13) einer Trennung lysosomaler Membranproteine in SDS-haltigem Bindungspuffer (1:1 (v/v)) an eine Hydroxylapatit-Säule gebunden. Nach Waschen mit halbkonzentriertem Bindungspuffer und A. bidest. wurde mit einem isopropanol- und SDS-haltigem Phosphatpuffer (pH 9.3) eluiert (je 300 µl). Die Proben jeder Fraktion wurden unter reduzierenden Bedingungen erhitzt und nach SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Die Chromatographie von Pool A (A) ist durch je 1/40tel Volumen der Fraktionen Durchbruch (D), Waschpuffer (W), A. bidest. (A) und der Eluate (1-5) gezeigt. B: Je 1/30tel Volumen der Eluate 2 (2) und 3 (3), sowie je 1/70tel Volumen der Ausgangsproben (K) von Pool A und C wurden unter reduzierenden Bedingungen erhitzt und nach SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert.

Wie in Abb. 14A dargestellt, konnten die lysosomalen Membranproteine nach Bindung an die Hydroxylapatit-Säule durch den gewählten Eluenten in je zwei Fraktionen isoliert werden. Der Vergleich der Eluate mit dem Ausgangsmaterial in Abb. 14B bestätigt, daß mit dieser Methode insgesamt etwa 85 % des Proteins eluiert werden kann. Dies entspricht bereits einer Konzentrierung der Proteinlösung um Faktor 3. Wie der Bandenmustervergleich der Proben vor und nach der Konzentrierung zeigt (Abb. 14B) ist ein sehr gutes Rückgewinnungsverhalten aller Banden zu beobachten. Die in Abb. 14A im Durchbruch (D) sichtbaren Banden sind auf eine unzureichende Durchmischung vor der Probenentnahme zurückzuführen, wie eine Überprüfung der Durchbrüche von Pool A-C zeigte. Dies läßt jedoch erkennen, daß die Bindungsbedingungen für den Probenanteil A (Pool A) nicht zu einer quantitativen Bindung der Proteine führte.

Für weitere Untersuchungen wurden die beiden Eluate eines Probenanteils A-C jeweils vereinigt und bei minus 20 °C gelagert.

4.4 Charakterisierung lysosomaler Membranproteine nach isoelektrischer Fokussierung im OCTOPUS

4.4.1 Nachweis von N-Glykanen an lysosomalen Membranproteinen ausgewählter OCTOPUS-Fraktionen

Möglicherweise vorhandene Zuckerseitenketten der lysosomalen Membranproteine können zum einen bei der Trypsinspaltung und zum anderen bei der Auswertung erhaltener massenspektroskopischer Signale problematisch sein. Die affinitätsgereinigten, lysosomalen Membranproteine, die durch Massenspektroskopie untersucht werden sollten, wurden daher auf das Tragen von asparagingebundenen Zuckerseitenketten untersucht. Da es sich bei den Proben um Eluate der Hydroxylapatit-Säulenchromatographie, wie unter 4.3.3 beschrieben, handelte, wurde zudem überprüft, ob der Gehalt an Isopropanol bei der Spaltung mit N-Glykopeptidase F (NGF) stört oder ob eine vorherige Abtrennung, z. B. durch Acetonfällung, erforderlich ist.

Abb. 15 zeigt die durch Hydroxylapatit-Säulenchromatographie konzentrierten Pools A-C der OCTOPUS-Trennung in Abb. 14, die mit oder ohne vorheriger Aceton-Fällung in Gegenwart bzw. Abwesenheit von N-Glykopeptidase F für 4 h bei 37 °C inkubiert wurden. Als Kontrollen dienten sowohl unbehandeltes Material der Hydroxylapatit-Säulenchromatographie als auch Ausgangsmaterial der OCTOPUS-Proben (Pool B).

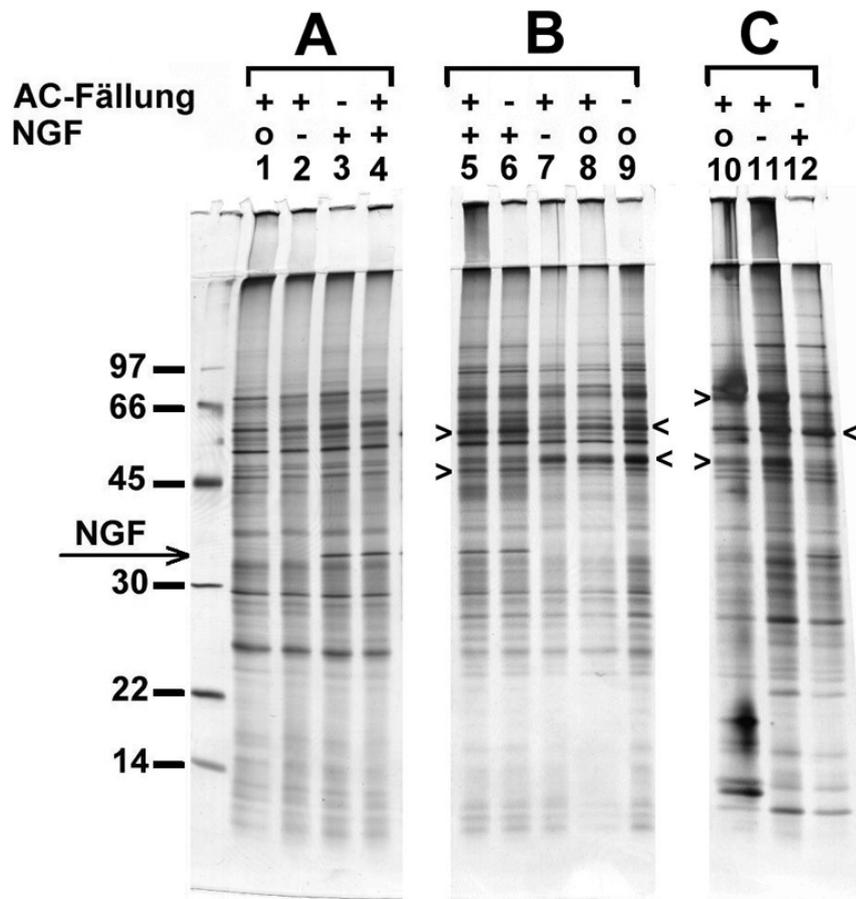


Abbildung 15: Spaltung lysosomaler Membranproteine mit N-Glykopeptidase F (NGF) nach Konzentrierung durch Hydroxylapatit-Säulenchromatographie. Von jeweils einem Zehntel der vereinigten Eluate (60 μ l) nach Hydroxylapatit-Säulenchromatographie der Pools A-C wurde eine Hälfte mit Aceton gefällt, in 25 μ l NGF-Puffer aufgekocht und mit doppeltem Volumen A. bidest. verdünnt. Die Hälfte dieses Ansatzes wurde mit N-Glykopeptidase F (0.2 U) versetzt und wie die andere Hälfte für 4 h bei 37 °C inkubiert. Von dem nicht acetongefällten Teil wurde die Hälfte mit 25 μ l NGF-Puffer aufgekocht, mit gleichem Volumen A. bidest. verdünnt und mit N-Glykopeptidase F (0.2 U) unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die andere Hälfte blieb ohne Inkubation (o). In Bahn 9 ist eine nicht behandelte Probe von OCTOPUS-Pool B (1/70tel Ausgangsvolumen) gezeigt. Die inkubierten Proben wurden erneut durch Aceton-Fällung konzentriert und wie alle weiteren Proben unter reduzierenden Bedingungen erhitzt und nach Trennung durch SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Markierungen weisen auf Positionen von NGF-spaltbaren Polypeptiden und deren Produkte.

Die in Abb. 15 gezeigten Spaltungen mit N-Glykopeptidase F lassen für den Probenanteil A keine spaltbaren Polypeptidbanden erkennen (Bahn 1-4). Für den Probenanteil B finden sich zwei Banden von 54 kDa und 47 kDa (Bahn 7-9), die bei den NGF-behandelten Proben (Bahn 5+6) verstärkte Signalen bei 53 kDa und 46 kDa erkennen lassen. Im Probenanteil C werden zwei Banden bei 65 kDa und 46 kDa (Bahn 11+12) detektiert, deren Molekulargewicht durch NGF-Spaltung reduziert wird. Als mögliche Produkte zeigt sich in der NGF behandelten

Probe jedoch nur ein Signal bei 52 kDa (Bahn 12) verstärkt. Die Abtrennung von Isopropanol durch Aceton-Fällung scheint auf die Spaltung mit N-Glykopeptidase F keinen Einfluß zu haben (vergleiche Bahn 5+6). Auch die Aceton-Fällungen führt nicht zu Proteinverlusten, wie das Bandenmuster der Ausgangsprobe des unbehandelten OCTOPUS-Pools von Probenteil B (Bahn 9) erkennen läßt.

Damit ist die Möglichkeit gegeben, präparative Spaltungsansätze mit N-Glykopeptidase F direkt aus den Eluaten der Hydroxylapatit-Säule durchzuführen. Da die gezeigten Präparationen lysosomaler Membranproteine jedoch nur eine sehr begrenzte Anzahl N-Glykan-tragender Proteine enthalten, die zudem nur einen geringen Glykosylierungsgrad anzeigen, wurden die Proben für massenspektroskopische Analysen keiner präparativen NGF-Spaltung unterzogen.

4.4.2 Präparative Trennung lysosomaler Membranproteine nach OCTOPUS-IEF durch SDS-PAGE

Wie die Analysen der NGF-Spaltungen gezeigt haben, können Proben der immunoaffinitäts-gereinigten, lysosomalen Membranproteine nach OCTOPUS-IEF und Hydroxylapatit-Säulen-chromatographie durch Acetonfällung konzentriert werden. Damit bot sich die Möglichkeit, durch OCTOPUS-IEF getrennte Proteine nach dem unter 4.4 beschriebenen Aufarbeitungsschema einer präparativen Trennung durch SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese zugänglich zu machen und so Proben für massenspektroskopische Analysen zu gewinnen. Die nach Hydroxylapatit-Säulenchromatographie erhaltenen Eluate (Pool A-C je 550 µl) wurden vereinigt und durch Acetonfällung konzentriert. Die Trennung der Proteine erfolgte nach reduzierender Hitzedenaturierung in einem mit Natriumthioglykolat vorbehandelten SDS-Polyacrylamidgel (siehe 3.2.6.1). Abb. 16 zeigt die aufgearbeiteten lysosomalen Membranproteine aus Pool A, B und C nach kolloidaler Coomassie-Blau-Färbung.

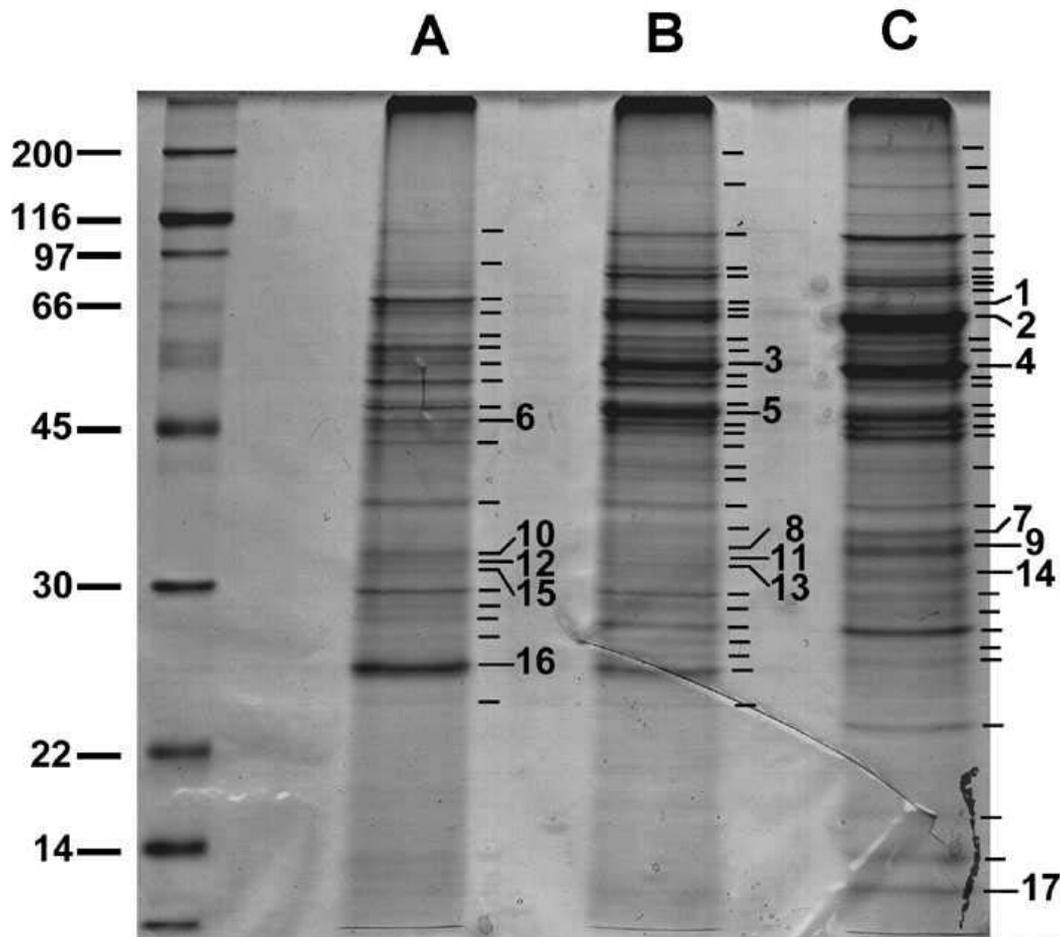


Abbildung 16: Immunoaffinitätsgereinigte, lysosomale Membranproteine nach OCTOPUS-IEF (Teilfraktionen) und präparativer SDS-PAGE. Es wurden je 550 µl vereinigt Eluat von immunoaffinitätsgereinigten, lysosomalen Membranproteinen nach Hydroxylapatit-Säulenchromatographie gepoolter OCTOPUS-Fraktionen (Pool A-C) durch Acetonfällung konzentriert. Das Pellet jedes Pools (A-C) wurden unter reduzierenden Bedingungen gelöst und hitzedenaturiert. Die Trennung erfolgte durch SDS-PAGE in einem mit Natriumthioglykolat vorbehandelten 14%igen Gel in dem die Polypeptide mit kolloidaler Coomassie-Blau-Färbung sichtbar gemacht wurden. Aus dem Gel isolierte Banden sind seitlich markiert. Die massenspektroskopisch untersuchten Banden tragen zusätzlich die der Tab. 4 entsprechenden Nummern.

Wie Abb. 16 zeigt, konnten etwa 100 Coomassie-Blau-gefärbte Banden aus den Proben der in Abb. 13 gezeigten OCTOPUS-Trennung isoliert werden. Die Bandenmuster der präparativen SDS-PAGE zeigten eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit den Mustern der analytischen Trennung. Zur massenspektroskopischen Analyse des 33 kDa-Polypeptids wurden Banden in diesem Molekulargewichtsbereich der Probeanteile A-C ausgewählt. Desweiteren wurden Banden analysiert, die mit prominenten Polypeptiden der Immobiline-2D-Trennung korrelierten und durch Immunoaffinitätsreinigung spezifisch anreichert werden können (Diettrich *et al.* 1996).

4.4.3 Massenspektroskopische Analysen immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine nach präparativer zweidimensionaler Trennung

Ein Teil, der nach präparativer, zweidimensionaler Trennung (OCTOPUS-IEF/SDS-PAGE) der immunoaffinitätsgereinigten, lysosomalen Membranproteine Coomassie-Blau-gefärbten Proteinbanden, wurde in der Zentralen Massenspektroskopie des DKFZ in Heidelberg analysiert.

Die nach Trypsinspaltung aus den Gelstücken extrahierten Fragmente jeder Probe wurden durch Tandemmassenspektroskopie mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer analysiert. Die erhaltenen Spektren wiesen generell verhältnismäßig schwache Signale auf, wie sie aufgrund der scheinbar vorhandenen Proteinmenge (Farbintensität der coomassiegefärbten Banden) nicht zu erwarten waren (A. Schlosser, persönliche Mitteilung). Die massenspektroskopischen Daten aller Spektren wurden mit Hilfe der MASCOT-Software (www.mascot.com) ausgewertet und lieferten Fragmentsequenzen, die nach Datenbankrecherche am NCBI (BLAST) zu den in Tabelle 4. angegebenen Ergebnissen führten. Die Datenbankrecherche wurde ohne Einschränkung von Molekulargewicht, pI oder Spezies anhand von zusammenfassenden Proteinsequenzdatenbanken (nrdb) durchgeführt.

Tabelle 4: Identifikation von immunoaffinitätsgereinigten, lysosomalen Membranproteinen nach zweidimensionaler Trennung durch OCTOPUS-IEF und SDS-PAGE mittels Tandemmassenspektroskopie.

Protein-Index	MW/ pH apparent	MW/ pI berechnet	nachgewiesene Fragmente (Sequenzabdeckung)	identifizierte Proteine (Referenz)	Lokalisation
1	66 kDa/ 5.9-6.1	69 kDa/ 5.5	4 (7 %)	Mortalin-2, HSP70 (Q9BWB7)	Cytoplasma
2a	62 kDa/ 5.9-6.1	56 kDa/ 7.1	10 (31 %)	β -Glucocerebrosidase (P04062)	lysosomale Membran
2b		68 kDa/ 6.3	5 (12 %)	Succinat-DH Untereinheit A (P31040)	innere mitochondr. Membran
2c		76 kDa/ 6.3	5 (9 %)	Glycerol-3-phosphat-DH (P43304)	innere mitochondr. Membran
3a	53 kDa/ 5.6-5.8	56 kDa/ 5.6	6 (16 %)	H ⁺ -ATPase Untereinheit B (V ₁) (P21281)	lysosomale Membran
3b		-	3	Immunglobulin schwere Kette, Maus	-
4	53 kDa/ 5.9-6.1	-	10	Immunglobulin schwere Kette, Maus	-
5a	48 kDa/ 5.6-5.8	49 kDa/ 5.4	6 (25 %)	Ubichinon-cytochrome-C-Reduktase Core 1 (P31930)	mitochondr. Membran
5b		40 kDa/ 5.7	4 (10 %)	Tripeptidylpeptidase 1 (O14773)	Lysosom
6	45 kDa/ 5.3-5.5	42 kDa/ 5.3	6 (23 %)	Actin beta (P02570) gamma (P02571)	Cytoplasma
7a	34 kDa/ 5.9-6.1	35 kDa/ 5.8	5 (26 %)	Spannungsabhängiger Anionenkanal, Porin 2 (P45880)	äußere mitochondr. Membran
7b		35 kDa/ 9.1	1 (2 %)	ähnlich zu Tricarboxylat-Transporter (Q9NTP4)	Mitochondrium (Homologie)
8	33 kDa/ 5.6-5.8	31 kDa/ 5.5	3 (14 %)	3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase (P31937)	Mitochondrium
9a	33 kDa/ 5.9-6.1	34 kDa/ 6.3	7 (25 %)	Enoyl-CoA-Hydratase 1 (XM-008904)	Peroxisom
9b		26 kDa/ 7.7	3 (15 %)	H ⁺ -ATPase Untereinheit E (V ₁) (P36543)	lysosomale Membran
9c		35 kDa/ 8.6	2 (7 %)	Elektronentransfer-Flavoprotein Kette A (P13804)	Mitochondrium
10	32 kDa/ 5.3-5.5	51 kDa/ 5.0	7 (18 %)	ATP Synthase Beta-Kette (F ₁) (P06576)	mitochondr. Membran
11	32 kDa/ 5.6-5.8	34 kDa/ 9.4	1 (3 %)	NADH-Cytochrom-B5-reduktase 1 (Q9UH31)	ER Membran
12	32 kDa/ 5.3-5.5	41 kDa/ 5.9	1 (2 %)	Dihydrolipoamid-S-Succinyltransferase (P36957)	innere mitochondr. Membran
13	31 kDa/ 5.6-5.8	-	keine	-	-
14	31 kDa/ 5.9-6.1	-	keine	-	-
15	31 kDa/ 5.3-5.5	-	2	Keratin	-
16a	24 kDa/ 5.3-5.5	25 kDa/ 5.3	12 (70 %)	Plazenta Laktogen (P01243)	Sekrethormon
16b		19 kDa/ 5.2	9 (81 %)	ATP Synthase D-Kette (F ₀) (O75947)	innere mitochondr. Membran
17	9 kDa/ 5.9-6.1	-	keine	-	-

Der Protein-Index gibt die Bandennummer entsprechend den Markierungen in Abb. 16 an. MW/ pH geben die apparenten Bandendaten wieder. MW/ pI geben die aus den Aminosäuresequenzen (abzüglich spaltbarer Signalsequenzen) abgeleiteten Daten an. Der auf Proteinnamen folgende Klammerausdruck gibt Referenznummern von Swissprot an (für Protein 9a ist die GenBank-Referenz angegeben). Für Protein 7b wurde die Lokalisation aufgrund von Homologie zugeordnet.

Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, wurden insgesamt 23 Proteine durch signifikante Spektroskopiedaten identifiziert. Bei drei Proben (13, 14, 17) reichte das extrahierbare Material nicht aus um geeignete Analysedaten zu erhalten. Mit Hilfe der Tandemmassenspektroskopie konnten bis zu drei verschiedene Proteine in einer Bande nachgewiesen werden. Zwei Proteine (16a und 16b) konnten sogar zu über 70 % der Aminosäuresequenz durch Fragmente belegt werden. Neben Keratin, als Kontamination bekannt, wurde in zwei Proben (3b und 4) Maus-Immunglobulin nachgewiesen, das wahrscheinlich nach der Immunoaffinitätsreinigung freigesetzt wurde. Die weiteren, mit den lysosomalen Membranen isolierten Proteine scheinen sehr unterschiedlichen Ursprungs, wie Mitochondrien (10 Proteine), Lysosomen (4), Peroxisomen (1), Cytoplasma (2), oder Sekretorischen Vesikeln (1). Etwa die Hälfte (11 Proteine) dieser Proteine wird als membran-gebunden beschrieben, von denen einige zu Transportsystemen gehören (3a, 7a, 7b, 9b und 16b). Einige Proteine (2b, 2c, 10, 12), mit mitochondrialer Lokalisation, wiesen einen auffälligen Unterschied zwischen apparentem und berechnetem Molekulargewicht auf, der auf eine partielle Degradation hinweisen könnte. Hingegen stimmen bei drei weiteren Proteinen (7a, 9a, 16a) sowohl die Molekulargewichte als auch die Fokussierungsbereiche überein.

Neben den als signifikant eingestuften Proteinen werden in den Auswertungen weitere Proteine aufgeführt, für die Fragmente anhand der erhaltenen Signale nicht eindeutig zugeordnet werden konnten. Die somit als nicht identifiziert einzustufenden Proteine enthalten jedoch möglicherweise interessante Kandidaten für unbekannte Transportproteine. Als Beleg für diese Hypothese sei auf die in Bande 12 (ein Fragment) identifizierte Dihydro-lipoamid-S-Succinyltransferase hingewiesen, dessen Fragment auch in der in der im Gel benachbarten Bande 15 (siehe Abb. 16) analysiert wurde. Anhand zu geringer massenspektroskopischer Daten der Fragmentionen konnte die Signifikanzgrenze nicht erreicht werden und wurde daher als nicht identifiziert eingestuft. Von Interesse wäre daher ein nicht eindeutig belegtes Fragment aus Bande 1, das zu einer CPx-Typ ATPase, einem Kupferionen-Transporter aus *Candida albicans* (Crd1p), homolog ist (Fragment nicht gezeigt).

Die detaillierten Daten der massenspektroskopischen Analysen wurden den Gutachtern zur Verfügung gestellt und sind bei Herrn Prof. Dr. A. Hasilik (Institut für Physiologische Chemie, Philipps-Universität Marburg) einzusehen.

5 Diskussion

5.1 Präparation lysosomaler Membranproteine aus humaner Plazenta

Für die Gewinnung großer Mengen „dense pool“-Lysosomen aus menschlichem Gewebe stellte die humane Plazenta eine geeignete Quelle dar. Mit der in dieser Arbeit verwendeten Aufarbeitungsmethode konnten, gemessen an dem lysosomalen Marker β -Hexosaminidase, intakte „dense pool“-Lysosomen mit einer Ausbeute von über 8 % bei einem Reinigungsfaktor von 50 ± 24 ($n = 10$) präpariert werden. Dies zeigt eine gute Übereinstimmung mit den von Diettrich *et al.* (1996) beschriebenen Daten, die mit der gleichen Reinigungsmethode einen Reinigungsfaktor von 57 ± 17 bei einer Ausbeute von 10 % der β -Hexosaminidase-Aktivität erzielten. Im Vergleich zu anderen beschriebenen Lysosomen-Präparationen zeigt sich folgendes Bild: Symons und Jonas (1986) beschreiben eine Präparation von Lysosomen aus Rattenleber mit Hilfe eines Percoll-Gradienten, bei der für die vakuoläre ATPase-Aktivität ein Anreicherungsfaktor von 63 ± 12 ($n = 5$) und eine Ausbeute von 4 % erzielt wurde. Bei der Reinigung von Lysosomen aus Schweine-Uterus durch Percoll-Dichtezentrifugation konnten Adamski *et al.* (1987) eine Ausbeute von 7 % und eine 71-fache Anreicherung des lysosomalen Markers β -N-Acetyl-D-Glucosaminidase erzielen. Eine Affinitätsreinigung mit Lektinen ermöglichte es Kamrath *et al.* (1984), Lysosomen aus Rattenleber zu isolieren, bei denen die Anreicherung von lysosomalen Markerenzymen bis zu 260-fach aber mit einer Ausbeute von nur 2 % verbunden war. Daran zeigt sich, daß bei der Präparation von Lysosomen eine gute Anreicherung meist mit einer schlechten Ausbeute verbunden ist. Die in dieser Arbeit verwendete Aufreinigungsmethode stellt daher eine verhältnismäßig gute Präparationsweise für intakte Lysosomen dar.

Die einfache Präparation von Membranen aus „dense pool“-Lysosomen durch Ultrazentrifugation erreichte in dieser Arbeit eine etwa 1.9-fache Anreicherung des membranassoziiert lysosomalen Markers β -Glucocerebrosidase. Durch Immunoaffinitätsreinigung ließ sich die Anreicherung dieser Aktivität in dieser Arbeit mehr als verdoppeln und erreichte einen Faktor von 3.96 ($n = 6$), bezogen auf „dense pool“-Lysosomen. Damit zeigte sich eine gute Reproduzierbarkeit der von Diettrich *et al.* (1996) erzielten Daten, die einen Anreicherungsfaktoren

für dieses Enzym von 1.3 nach Ultrazentrifugation und von 4.5 nach Immunoaffinitätsreinigung (jeweils (n = 2)) beschreiben.

Aufgrund der guten Übereinstimmung der Daten mit den von Diettrich *et al.* (1996) beschriebenen Präparationen lysosomaler Membranproteine, wurde in dieser Arbeit keine weitere Charakterisierung durchgeführt. Die Autoren beschreiben hingegen, daß mit der Immunoaffinitätsreinigung weitere, von mir nicht quantitativ bestimmte, lysosomale Membranproteine angereichert werden. Die mit dieser Methode erzielten Anreicherungsfaktoren erreichen Werte um Faktor 7 (Acetyltransferase: 6.6; lamp-2: 7.4) und lassen für immunoaffinitätsgereinigte Membranen einen höheren Reinigungsfaktor (Faktor 300 gegenüber Homogenat) erwarten. Als Ursache dafür kann die partielle Assoziation der β -Glucocerebrosidase an die lysosomale Membran angesehen werden (K. Imai, 1985), die zu einer Ablösung des Enzyms während der Präparation führen kann (Jonsson *et al.*, 1987). Als weiteres Ergebnis dieser Charakterisierung wurde gezeigt, daß in „dense pool“-Lysosomen auch geringe Mengen mitochondrialer Enzymaktivität vorhanden sind. Weniger als 4% der im Percollgradienten meßbaren Succinat-Dehydrogenase-Aktivität wurde in „dense pool“-Lysosomen vereinigt, für die eine spezifische Aktivität von 23 U/g bestimmt wurde (Diettrich *et al.* 1996). In vergleichbaren Präparation aus Rattenhirn, wurde eine spezifische Aktivität dieses Enzyms nach Percoll-Dichtezentrifugation mit 17 U/g bestimmt die auf 0.01 % der Homogenat-Aktivität zurückging (Ohshita *et al.*, 1995). Desweiteren beschreiben die Autoren, daß bei den Präparationen ein Großteil der Mitochondrien bereits mit den Zellkernen aus dem postnukleären Überstand (PNÜ) abgetrennt werden (zu mehr als 60 %), sodaß für "dense pool"-Lysosomen eine mitochondriale Verunreinigung verhältnismäßig geringen Ausmaßes zu erwarten ist. Für die Immunoaffinitätspräparation wurde allerdings beschrieben, daß im Gegensatz zu den spezifischen Aktivitäten der löslichen lysosomalen Hydrolasen, die spezifische Aktivität des mitochondrialen Markers nicht verringert wird (Diettrich *et al.*, 1996). Als Ursache dafür wurde eine unspezifische Bindung von Mitochondrien an die Affinitätsperlen oder eine Assoziation dieser mit den aufgereinigten lysosomalen Membranen vermutet. Die Möglichkeit, Lysosomen nach selektiver Aufnahme von Aminosäuremethylester osmotisch zu lysieren und die Membranen in einem zweiten Percoll-Gradienten zu isolieren, wurde von Symons und Jonas (1987) beschrieben. Für die Anreicherung lysosomaler Membranproteine aus den Lysosomen wurde dabei ein Faktor 2-4 ermittelt und ebenfalls mitochondriale Enzymaktivität (Cytochrom-C-Oxidase) in den Membranpräparationen nachgewiesen.

Es zeigt sich somit, daß die mit der Immunoaffinitätsreinigung präparierten lysosomalen Membranproteine einer bis zu 7-fachen Anreicherung aus „dense pool“-Lysosomen humaner Plazenta entsprechen, die jedoch nicht frei von mitochondrialen Markern sind.

5.2 Ligandenabhängige Modifizierung eines sialinsäurebindenden lysosomalen Membranproteins

Die zweidimensionale Auftrennung der lysosomalen Membranproteine ermöglicht, durch die Fokussierung in Immobiline-Gelen, eine im analytischen Maßstab gute und reproduzierbare Trennung der einzelnen Membranproteine. Der Vergleich der Proteinmuster mit Daten aus anderen Labors, vergleichbare Präparation und Probenvorbereitung vorausgesetzt, ist daher für charakteristische Proteine möglich und wird anhand von 2D-Datenbanken z. B. für mitochondriale Proteine bereits genutzt (<http://www-dsv.cea.fr/thema/MitoPick/Mito2D.html>).

Die Modifizierung von Proteinen mit seitenkettenspezifischen Reagenzien ist eine vielfach eingesetzte Methode, um z. B. Enzyme spezifisch zu hemmen oder Spaltungssequenzen zu blockieren. Das in dieser Arbeit eingesetzte Reagenz Phenylglyoxal reagiert im Bereich pH 7-8 besonders rasch mit der Guanidino-Gruppe der Argininseitenkette und bildet ein Kondensationsprodukt, bestehend aus zwei Molekülen Phenylglyoxal und dem Argininrest (Takahashi, 1968). Nebenreaktionen mit Histidinen oder terminalen Aminogruppen sind ebenfalls beschrieben, verlaufen in diesem pH-Bereich jedoch erheblich langsamer, wodurch die Reaktion als argininspezifisch betrachtet werden kann (Takahashi, 1977; Riordan, 1979). Wie Untersuchungen der Ribonuklease A aus Rinderpankreas zeigten, weist die durch Phenylglyoxal-Behandlung inaktivierte Ribonuklease eine verminderte Basizität auf. Da im alkalischen Milieu das Reaktionsprodukt langsam zerfällt, bewirkt die Freilegung des Arginins eine Rückkehr der Aktivität (Takahashi, 1968).

Die Modifizierung der immunoaffinitätsgereinigten lysosomalen Membranproteine mit Phenylglyoxal bei pH 7.4 bestätigt, durch die Verschiebung der Proteinverteilung in den sauren Fokussierungsbereich, den beschriebenen Effekt einer Modifizierung von Arginin durch Phenylglyoxal. Aufgrund der begrenzten Anzahl prominenter Signale im Gel der Kontrolle war eine Zuordnung der resultierenden Proteinflecken zu den Ausgangssignalen möglich und ließ darauf schließen, daß mehrere Arginin-Seitenketten der Proteine modifiziert wurden. Die Auswertung dieser Aufsplitterungsmuster, nach PG-Behandlung, in Gegenwart und Abwesenheit von Glucuronsäure, zeigte für ein 33 kDa-Polypeptid (pI 5.8) sowohl in der Silberfär-

bung als auch nach Quantifizierung der Signalintensitäten eine partiell inhibierte Modifizierung. Das Modifizierungsmuster einer Inkubation in Gegenwart von N-Acetylneuraminsäure (in dieser Arbeit nicht gezeigt) ließ hingegen keinen eindeutigen Unterschied erkennen. Aus der Bestätigung dieser Ergebnisse in mehreren unabhängigen Versuchen leitet sich eine Spezifität ab, mit der Glucuronsäure, dieses Protein vor der Arginin-Modifizierung durch Phenylglyoxal partiell zu schützen vermag. Dies läßt insgesamt auf eine Affinität des 33 kDa-Proteins zu der Monocarbonsäure schließen. Analog werden kationische Aminosäuren, Arginin im besonderen, häufig im Substratbindungsbereich von Enzymen, die Reaktionen anionischer Substrate katalysieren, gefunden (Riordan *et al.*, 1979). Da die verhältnismäßig lange Inkubationszeit der PG-Behandlung (eine Stunde) die kovalente Bindung des Phenylglyoxals an Arginin begünstigt und eine schützende ionische Bindung des Liganden überdeckt, wäre die nicht schützende Wirkung der N-Acetylneuraminsäure in diesen Versuchen auch durch eine geringere Affinität des 33 kDa-Proteins zur Sialinsäure erklärbar.

Die Position dieses 33 kDa-Proteins in der zweidimensionalen Trennung immunoaffinitätsgereinigter lysosomaler Membranproteine (pI 5.8), entsprach dem Fokussierungsbereich eines, bereits zuvor als sialinsäurebindendes Protein beschriebenen, Membranproteins vergleichbarer Präparationen (O. Diettrich, Dissertation 1996). Die Ergebnisse der dort beschriebenen Photoaffinitätsmarkierung zeigten in einem Parallelversuch, das die Hemmung der Markierung durch Glucuronsäure (GlcUA) vollständig gelang, die mit N-Acetylneuraminsäure (NANA) hingegen nur partiell. Als Ursache für dieses Verhalten wurden ebenfalls unterschiedliche Bindungsaffinitäten des Proteins für die beiden Substrate angenommen. Die Übereinstimmung des 33 kDa-Proteins mit dem sialinsäurebindenden Protein aus immunoaffinitätsgereinigten lysosomalen Membranen, sowohl im Trennungsverhalten als auch in der Affinität zu den beiden Monocarbonsäuren, läßt auf den Nachweis identischer Proteine schließen. Da sie darüberhinaus mit den von Mancini *et al.* (1989) beschriebenen Affinitätsunterschieden, des Sialinsäure-Transportsystems aus Lysosomen, zu NANA ($K_t = 0.24 \text{ mM}$) und GlcUA ($K_i = 0.11 \text{ mM}$), übereinstimmen, erhärtet sich die Vermutung, daß dieses Polypeptid eng mit dem Sialinsäuretransporter assoziiert ist.

Mittlerweile scheint das Transportsystem durch Positionsklonierung auf DNA-Ebene aufgeklärt und spricht für ein 53 kDa-Protein (495 Aminosäuren), das Sialin genannt wurde (Verheijen *et al.*, 1999). Bislang ist jedoch noch unklar, ob dieses Protein in der lysosomalen Membran lokalisiert und diese Transportaktivität aufweist. Desweiteren ist nicht auszuschließen, daß es *in vivo*, durch posttranslationale Modifizierungen, zu niedermolekularen Unter-

einheiten prozessiert wird. Für das von Havelaar *et al.* (1998) gereinigte lysosomale Sialinsäure-Transportsystem aus Rattenleber, zeigte mit dieser Aktivität ein 57 kDa-Protein Korrelation, das weder durch N-Glykopeptidase F, noch unter reduzierenden Bedingungen in kleinere Fragmente gespalten werden konnte. Als weiteres Substrat dieses Transportsystems konnten die Autoren Laktat mit einem K_m -Wert von 0.4 mM bestimmen.

Die ligandenspezifische Modifizierung von Proteinen, wie sie für das sialinsäurebindende 33 kDa-Protein mit Hilfe zweidimensionaler Trennung gezeigt werden konnte, erscheint für eine Vielzahl von Proteinen mit vergleichbaren kinetischen Ligandenspezifitäten (darunter Transporter und Rezeptoren) als geeignete Nachweismethode. Voraussetzung dafür ist jedoch die Veränderung des isoelektrischen Punktes von Proteinen durch die Modifizierung und eine klare Zuordnungsmöglichkeit der resultierenden zweidimensionalen Muster. Der Einsatz radioaktiv markierter Modifizierungsreagenzien könnte diese Methode noch sensitiver gestalten, wenn zunächst, unter Ligandenschutz, die unspezifischen Aminosäureseitenketten modifiziert werden, und erst im Anschluß daran die geschützte Gruppe selektiv radioaktiv markiert wird. Damit könnte die Eindeutigkeit des Nachweises erhöht und die Nachweisgrenze herabgesetzt werden. Mit dieser Methode wäre ein direkter Nachweis von Enzymen anhand kinetisch ermittelter Bindungsspezifitäten denkbar und könnte wichtige Daten zu deren Isolierung beitragen.

5.3 Präparative Immobiline-2D-Gelelektrophorese

Die Versuche zur präparativen Anwendung der Immobiline-2D-Technik haben gezeigt, daß die Trennung der lysosomalen Membranproteine bei Mengen über 2 mg starken Störungen bei der Fokussierung und beim Übergang in die zweite Dimension unterlag. In präparativen Immobiline-2D-Trennungen von Membranproteinen anderer Quellen mußten bis zu 10 mg (mehrere hundert Spots) getrennt werden, um mit dieser Technik ausreichendes Material für Mikrosequenzierungen zu gewinnen (Michea-Hamzehpour *et al.*, 1993; Rouquié *et al.*, 1997). Dabei wurde ebenfalls beschrieben, daß speziell Proteine mit einem Molekulargewicht über 60 kDa in den zweidimensionalen Proteinmustern unterrepräsentiert erscheinen, was sich mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen deckt.

Die präparative Trennung der lysosomalen Membranproteine zeigte, daß von den bekannten lysosomalen Strukturproteinen keine coomassiefärbbaren Mengen in die zweite Dimension zu überführen waren. Wenn bislang auch nicht abschließend geklärt werden konnte, wo sich der Verlust

der Proteine ereignet, spricht vieles dafür, daß die hydrophoben Proteine durch die lokale Konzentrierung bei der Immobililine-Fokussierung im Streifen präzipitieren. Dieses Verhalten wurde bereits in zahlreichen Publikationen für Membranproteine beschrieben (C. Adessi *et al.*, 1997; Rabilloud *et al.*, 1997; C. Pasquali *et al.*, 1997). Es erscheinen aber auch andere Ursachen möglich. So wurde beobachtet, daß bei analytischen Mengen mit ^{125}Jod markierter lysosomaler Membranproteine, nur etwa 80 % (der gemessenen Radioaktivität) in den Fokussierungsstreifen einquellen (O. Diettrich, Dissertation, 1996). Welche Verhältnisse sich dabei für die Trennung präparativer Mengen ergeben, wurde allerdings nicht näher untersucht. Ein weiterer Aspekt, der besonders den Unterschied der gezeigten Proteinmuster nach Silber- bzw. Coomassie-Färbung betrifft, ist die unterschiedliche Färbetechnik. Werden bei der Silberfärbung die Ag^+ -Ionen vornehmlich an Carboxylgruppen (Asparagin- und Glutaminsäure) gebunden (Review: Rabilloud, 1990), geht die Coomassiefärbung vornehmlich auf die Bindung an basische Seitenketten zurück (Lysin, Arginin und α -Aminogruppen) (Sedmark & Grossberg, 1977; Tal *et al.*, 1985). Da es sich bei den lysosomalen Membranproteinen vornehmlich um saure Proteine (Fokussierungsbereich 4-6) handelt, wären Differenzen dadurch erklärbar. Wie die Färbungen lysosomaler Membranproteine nach Trennung durch OCTOPUS-IEF und SDS-PAGE in dieser Arbeit zeigten, werden solche Differenzen nach analytischer (Silberfärbung) und präparativer Trennung (kolloidale Coomassie-Färbung) jedoch nicht beobachtet.

5.4 Präparative trägerfreie isoelektrische Fokussierung (OCTOPUS-IEF)

Wie sich in dieser Arbeit zeigte, war eine isoelektrische Fokussierung der lysosomalen Membranproteine im OCTOPUS-Gerät nur durch den Einsatz hoher Detergenzkonzentrationen in der Probe möglich. Andernfalls zeigte sich, daß die gelösten Proteine im Auftragsbereich des OCTOPUS-Geräts präzipitieren bzw. Aggregate bilden. Die nähere Prüfung dieses Sachverhaltes zeigte einen pH-abhängigen Verlauf, der sich bei pH 5.0 *in vitro* nachstellen ließ. Aus dem Proteinmuster der gebildeten und zum Teil während der Fokussierung im OCTOPUS getrennten Aggregate konnte keine Selektivität der interagierenden Membranproteine abgeleitet werden. Die Mehrzahl der lysosomalen Membranproteine weist einen sauren isoelektrischen Punkt auf. Dies könnte durch die hohe lokale Konzentration der Proteine im Auftragsbereich zur Aggregation führen. Es erklärt jedoch nicht, daß nach Auftrag der Probe im basischen Bereich eine im Verlaufe der Trennung verspätete Aggregation zu beobachten war. Dies spricht eher für ein spezifisches Verhalten der lysosomalen Proteine und wurden bereits mehrfach beschrieben. Daran beteiligt, scheinen die löslichen Hydrolasen, die lysosomalen

Strukturproteine wie lamp-2 und einige Lipide zu sein (Buckmaster *et al.*, 1988; Jadot *et al.* 1996 & 1997). Wegen der pH-Abhängigkeit und der Korrelation mit den intralysosomalen pH-Bedingungen gehen die Autoren davon aus, daß es im Lumen der Lysosomen zur Ausbildung einer lysosomalen Matrix kommt. Diese könnte sowohl zum Schutz der lysosomalen Proteine als auch der lysosomalen Membran dienen. Der Einsatz von Triton X-100 in der 100-fachen kritischen Micellenkonzentration konnte diese Wechselwirkung aufheben und ermöglichte die Fokussierung der Membranproteine. Die hochmolaren Konzentrationen von Harnstoff verhindern dabei die Bildung von Detergenzmicellen, wie es für derartige Chaotrope beschrieben ist (Midura & Yanagishita, 1995).

Wie die Trennungen durch trägerfreie IEF im OCTOPUS gezeigt haben, lassen sich die lysosomalen Membranproteine reproduzierbar gut in dem linearen Gradienten fokussieren. Dabei nehmen die Membranproteine im Gradienten pH 3-10 ein breites Fraktionspektrum ein (etwa 60 von 80 möglichen Fraktionen) und zeigen gegenüber der Immobiline-Fokussierung eine höhere Ausbeute an Proteinen im Molekulargewichtsbereich größer 60 kDa. Die mengenmäßig prominentesten Membranproteine lamp-1/2 und LIMP II erfahren eine deutliche Abtrennung von der Vielzahl zentralfokussierender Polypeptide. Im basischen Fraktionsbereich wurden Proteine abgetrennt, die im Immobiline-Gradienten (pH 4-7) nicht fokussierten. Diese zeigten aber in immunoaffinitätsgereinigten Membranen keine stärkere Prominenz, was für einen nicht lysosomalen Ursprung dieser Proteine spricht. Chataway *et al.* (1998) trennten ebenfalls Membranproteine aus Plazenta-Lysosomen im pH-Bereich 3-10 und beschreiben den pI-Bereich für lysosomale Membranproteine mit 4.5 bis 7.0, was mit den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen gut korreliert.

Im Fokussierungsbereich der Hauptmenge der lysosomalen Membranproteine zeigte das Proteinmuster eine sehr gute Korrelation zu den Immobiline-2D-Trennungen. Die Analyse der Fraktionen ließ jedoch erkennen, daß die Trennschärfe der OCTOPUS-Fokussierung bei etwa einer pH-Einheit lag und Proteine des basischeren Fokussierungsbereichs nicht in dem, ihrem isoelektrischen Punkt entsprechenden, Fraktionsbereich eingewandert waren. Damit verbunden war ebenfalls eine relativ breite Verteilung des 33 kDa-Polypeptids, das in etwa 12 Fraktionen fokussiert erschien. Als Vorteil dieser unvollständigen Fokussierung, bei verhältnismäßig guter Trennung, kann die gute Ausbeute bei präparativer IEF der Membranproteine betrachtet werden. Bei einer Erhöhung der Trennschärfe ist eine Präzipitation der fokussierten Proteine auch bei der Durchflußelektrophorese nicht ausgeschlossen. Dennoch wäre eine Verbesserung der isoelektrischen Fokussierung im OCTOPUS anzustreben, um sich dieser

Trennschärfe maximal nähern zu können. Die Möglichkeiten hierzu müssen aber nach biophysikalischen Gesichtspunkten als begrenzt eingestuft werden.

Nach Svensson und Veterberg kann die Minimum-Differenz der isoelektrischen Punkte ΔpI zweier noch trennbarer Proteine durch folgende Gleichungen beschrieben werden:

$$(1) \quad \Delta pI = -3 \sqrt{\frac{D \cdot (dpH / dx)}{E \cdot (d\mu / dpH)}} \quad \text{mit:}$$

$$(2) \quad D = \frac{R \cdot T}{\eta \cdot f}$$

$$(3) \quad \mu = v / E = q / (6\pi\eta r)$$

$$(4) \quad f = 6\pi\eta r$$

D = Diffusionskoeffizient
 dpH/dx = pH-Gradient
 E = Feldstärke
 dμ/dpH = pH-abhängige Mobilität
 η = Viskosität
 f = Reibungskoeffizient
 μ = Mobilität
 v = Geschwindigkeit
 q = Ladung
 π = 3.14
 r = Molekülradius

Aus der ersten Gleichung ist abzuleiten, daß die Auflösung (kleines ΔpI) mit reduzierter Diffusion, D, verbessert wird. Für eine gegebene Trennmethode, in diesem Fall die trägerfreie isoelektrische Fokussierung, läßt sich dies nach Gleichung 2 nur durch die Erhöhung der Viskosität η erreichen. Dabei wird jedoch die Mobilität μ der Proteine, die von der Viskosität abhängt (Gleichung 3), herabgesetzt, was Gleichung 1 zur Folge, zu schlechteren Auflösungen führt. Damit stößt auch die Trennung durch trägerfreie isoelektrische Fokussierung an Grenzen: Bei Gelelektrophoresen, wo der Siebeffekt des Gels eine hohe Viskosität bewirkt, läßt sich die Auflösung durch entsprechende Verlängerung der Fokussierungszeit kompensieren. Zudem kann die Feldstärke E im Verlauf der Trennung erhöht werden, da die Leitfähigkeit der Probe im Verlauf der Fokussierung abnimmt und sich somit kein Anstieg der Diffusion durch Joule'sche Wärme erwarten läßt. Eine erhöhte Feldstärke würde gleichzeitig die Mobilität der Proteine steigern und die Fokussierung schneller ihren Endpunkt erreichen. Dies ist bei der Trennung im OCTOPUS, aufgrund der kontinuierlichen Trennung, nicht möglich. Es läßt sich lediglich, durch Einsatz deionisierter Lösungen und salzarme Proben, eine kon-

stant hohe Spannung nutzen. Der zeitliche Faktor ist bei der Trennung im OCTOPUS-Gerät durch den erforderlichen laminaren Fluß sehr eng begrenzt, und beträgt etwa 23 min maximale Trennzeit (Canut *et al.*, 1999). Daher fokussieren die lysosomalen Membranproteine, in der in dieser Arbeit als optimal bestimmten Trennzeit (10-15 min), nicht in den Fraktionen die ihrem pI entsprechen, sondern werden zuvor fraktioniert. Die Ursache für die beobachtete Verschlechterung der Trennung bei einer Durchlaufzeit der Proteine von 20 min ist bislang unklar und stellt ein mögliches Verbesserungspotential dar.

Wie die Refokussierung von OCTOPUS-Fraktionen gezeigt haben, wäre eine weitere Abtrennung von Proteinen durch IEF im OCTOPUS möglich, ist aber mit einer weiteren Verdünnung der Proben und mit einer zusätzlichen Aufarbeitung zur Konzentrierung verbunden. Die Änderung weiterer Parameter, wie Erhöhung der Mobilität durch Einsatz anderer Viskositätszusätze oder Verringerung der Leitfähigkeit durch spezielle Ampholyte (Octolyte) ist für lösliche Proteine bereits erfolgreich eingesetzt worden (Weber & Bocek, 1998). Die Eignung dieser Zusätze zur Trennung von lysosomalen Membranproteinen durch IEF im Octopus-Gerät müßte aber noch gezeigt werden, könnte das Potential dieser Trennmethode jedoch in Bezug auf die Trennleistung noch erhöhen.

Bei der isoelektrischen Fokussierung lysosomaler Membranproteine im OCTOPUS konnten Proteine im 100 kDa-Bereich nachgewiesen werden, die in den analytischen Immobiline-2D-Trennungen nicht oder nur anhand sehr schwacher Signale nachweisbar waren. Geht dieser Vorteil der OCTOPUS-Trennung ebenfalls auf die Vermeidung von Präzipitationen der Proteine am isoelektrischen Punkt zurück, ließe das auf hydrophobe Proteine schließen. Damit wären möglicherweise weitere Kandidaten für bislang nicht identifizierte Transportproteine und anderer Komponenten der lysosomalen Membran isolierbar. Ein Vergleich der OCTOPUS-Trennung von ultrazentrifugierten mit immunoaffinitätsgereinigten Membranen läßt zudem vermuten, daß einige Proteine in diesem Bereich angereichert werden können. Dies ist aber nur in einem noch nicht bestätigten Versuch angedeutet und bedarf der genaueren Untersuchung. Da der pH-Gradient, bei fortlaufender Trennung im OCTOPUS-Gerät, als über Stunden stabil beschrieben wird (Weber & Bocek, 1998), ist die Trennung großer Membranpräparationen und damit verbunden, die Charakterisierung von Proteinen aus einzelnen Fraktion, möglich. Da die Proben bei der Fraktionierung durch den Counterflow verdünnt werden, müssen präparativ getrennte Proteinfractionen für weitere Analysen konzentriert werden.

5.5 Hydroxylapatit-Säulenchromatographie von OCTOPUS-Fraktionen

Die Konzentrierung lysosomaler Membranproteine aus OCTOPUS-Fraktionen erwies sich aufgrund ihrer Zusammensetzung als problematisch. So verblieben die Proteine nach Anwendung von Filtrationsmethoden im HPMC-haltigen Überstand oder ließen sich nur partiell durch Präzipitationsverfahren abtrennen. Nicht ausgeschlossen werden kann eine Wechselwirkung der hydrophoben Membranproteine mit dem viskosen Cellulosematerial, das in der pharmazeutischen Industrie als Ummantelung von Liposomen für den Arzneimittel-Transport genutzt wird (Mecellose[®]). Gutierrez de Rubalcava *et al.* (2000) konnten zeigen, daß für die Adsorption des Polymers an die Liposomenoberfläche hydrophobe Wechselwirkungen entscheidend sind. Solche Wechselwirkungen könnten ebenfalls die Ursache für eine geringe Mobilität der lysosomalen Membranproteine und daraus resultierend die nicht vollständige Fokussierung im OCTOPUS sein. Der Austausch des Viskositätszusatzes durch niedermolekulares HPMC bzw. Glycerol führte jedoch zu schlechten Fokussierungsergebnissen.

Als sehr praktikabel erwies sich die Abtrennung der störenden Zusätze durch die Bindung der lysosomalen Membranproteine an Hydroxylapatit. Diese Methode wurde bereits von mehreren Autoren erfolgreich angewendet, um Membranproteine, in Gegenwart von SDS, DTT und Harnstoff, selektiv an Hydroxylapatit zu binden (Kolbe *et al.*, 1984) oder um einen Detergenzwechsel durchzuführen (Dong *et al.*, 1997). Erstere beschreiben für die Aufreinigung eines mitochondrialen Phosphat-Transportproteins, daß die Bindung an Hydroxylapatit erst durch das ionische Detergenz vermittelt wird. Dabei werden, ihrer Ansicht nach, nichtionische Detergenzien oder an das Protein gebundene Lipide durch SDS verdrängt oder, durch eine vollständige Entfaltung, funktionelle Gruppen freigelegt, was die Bindung an das Säulenmaterial bewirkt. Wie in dieser Arbeit gezeigt, konnten die lysosomalen Membranproteine in Gegenwart von SDS bei pH 7.4 mit hohen Ausbeuten an die Hydroxylapatit-Säule gebunden werden. Da die nicht ionischen Zusätze keine Bindung an die Säule erfuhren, wurden sowohl HPMC (nahezu vollständig) als auch Triton X-100 (zu 80-90 %) abgetrennt. Die Elution mit hochmolaren Phosphat-Lösungen führte zu guten Ausbeuten. Aufgrund der hohen Ionenstärke (750 mM NaP_i) konnten die eluierten Proteine jedoch nicht ohne Entsalzung für eine präparative SDS-PAGE genutzt werden. Als bessere Alternative erwies sich daher ein isopropanolhaltiger Elutionspuffer (pH 9.3) der nur weniger als ein Drittel der Phosphatkonzentration beinhaltete. Dies erscheint plausibel: Zum einen herrscht bei der Hydroxylapatit-

Chromatographie ein Kationenaustauscher-Charakter vor. Dadurch ist die Bindung der Proteine bei niedrigem pH am stärksten und verlangt hohe Phosphat-Konzentrationen zur Elution (Gagnon P., Bio-rad US/EG Bulletin 2156). Entsprechend wird die Bindung bei hohem pH-Wert geschwächt, sodaß Proteine, unabhängig von ihrem isoelektrischen Punkt, bei Elutionen mit hohem pH-Wert kürzere Retentionszeiten aufweisen (Ogawa T., Bio-rad Bulletin 1986). Der Einsatz von organischen Lösungsmitteln wird häufig zur Delipidierung von Membranproteinen genutzt. Zur Elution bei der Hydroxylapatit-Säulenchromatographie wurde bislang nur der Einsatz von Methanol/Chloroform für die Präparation von Bakterio-Rhodopsin aus *E. coli*, beschrieben (Braiman *et al.*, 1987). Das organische Lösungsmittel scheint die Ablösung der Proteine auch in Gegenwart geringer Phosphat-Konzentrationen zu ermöglichen, was auf eine bessere Löslichkeit der hydrophoben Proteine im Elutionspuffer zurückzuführen wäre. Die dadurch gering gehaltene Ionenstärke im Eluat ermöglichte es, die Proben durch Acetonfällung für die SDS-PAGE zu konzentrieren. Entscheidend bleibt, daß mit der in dieser Arbeit gezeigten Aufarbeitungsmethode, die lysosomalen Membranproteine zu über 80 % (des Ausgangsmaterials) in nur zwei Fraktionen eluieren, und daß das resultierende Proteinmuster eine hohe Übereinstimmung mit dem des Ausgangsmaterials zeigt. Als Konzentrierungsfaktor der Hydroxylapatit-Säulenchromatographie ergab sich für die OCTOPUS-Proben ein Wert von 3-4. Die Ausbeute könnte durch Verbesserung der Bindungsbedingungen, mehr Hydroxylapatit oder Bindung bei saurem pH-Wert, wahrscheinlich noch gesteigert werden, da Verluste im wesentlichen auf nicht gebundene Anteile im Durchbruch zurückgehen. Da dies jedoch mit einer festeren Bindung einhergeht, ist ein Verlust bei der Elution zu überprüfen. Durch die einfache und gut zu reproduzierende Chromatographiemethode würde es möglich sein, mit Hilfe einer Mehrkanalpumpe entsprechend viele Fraktionen der OCTOPUS-Trennungen parallel aufzuarbeiten.

5.6 Nachweis von N-Glykanen an lysosomalen Membranproteinen

Im Gegensatz zu den luminalen Hydrolasen, die vornehmlich aufgrund des Mannose-6-Phosphat-Signals in die Lysosomen gelangen, ist für den Transport der lysosomalen Strukturproteine das Tragen von N-Glykanen nicht essentiell (Barriocanal, 1986). Dennoch sind gerade die Strukturproteine der lysosomalen Membran, die lamp-Proteine im besonderen, stark glykosyliert (siehe Review: Hunziker & Geuze, 1996), womit sie, möglicherweise durch die Bildung einer Glykokalix, die Struktur der Lysosomen stabilisieren (Lee *et al.*, 1990). Bei den

reifen Formen der luminalen Proteine wird ebenfalls ein hoher Grad an Glykosylierung beobachtet, bei denen unterschiedliche Zuckerstrukturen gefunden werden, die ebenfalls auf eine Schutzfunktion hindeuten (Hasilik, 1992). Konnten bei allen lysosomalen Proteinen bislang ausschließlich asparagingebundene Glykane nachgewiesen werden, nehmen die lamp-Proteine wiederum eine Sonderstellung ein, da einzig an diesen Proteinen auch O-Glykane identifiziert wurden (Carlsson et al, 1988; Carlsson *et al.*, 1993). Dagegen werden z. B. kernkodierte mitochondriale Proteine an freien Ribosomen im Cytoplasma synthetisiert und gelangen auf direktem Weg zu ihrem Bestimmungsort im mitochondrialen Organell. Daher sind mitochondriale Proteine nicht glykosyliert, und ihr Import erfolgt aufgrund von Signalsequenzen in der Primärstruktur (Review: Mori & Terada, 1998).

Wie die NGF-Spaltungen ausgewählter Proben lysosomaler Membranproteine gezeigt haben, weisen nur wenige Banden N-Glykan-tragende Polypeptide auf. Eine Funktionsbeeinträchtigung dieser Glykosidase durch aus der Aufarbeitung der Proben stammende Isopropanol-Reste wurde nach der Verdünnung im Reaktionspuffer nicht beobachtet. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß nach Abtrennung des HPMCs, durch die Hydroxylapatit-Säulenchromatographie, eine Präzipitation der lysosomalen Membranproteine durch Acetonfällung verlustfrei möglich ist. Die Gewinnung konzentrierter Proteinlösungen aus den Fraktionen von im OCTOPUS-Gerät fokussierter lysosomaler Membranproteine konnte daher durch die Kombination von Hydroxylapatit-Säulenchromatographie und Acetonfällung ermöglicht werden.

Insgesamt konnte nur in vier intensiv gefärbten Proteinbanden N-Glykan-haltiges Material nachgewiesen werden. Dabei bewirkte die NGF-Behandlung eine nur geringfügig höhere Mobilität der Proteine in der SDS-Gelelektrophorese, was, bei vollständiger Spaltung, auf eine geringe Bezuckerung schließen läßt. Die in Abb. 15 in Pool B (54 kDa und 47 kDa) und Pool C (65 kDa und 46 kDa) gezeigten N-Glykan-haltigen Proteinbanden können aufgrund der massenspektroskopischen Analyse wie folgt zugeordnet werden: In der 54 kDa-Bande (Pool B) wurde die Untereinheit B der lysosomalen H⁺-ATPase nachgewiesen (Protein 3a in Tab. 4). Für diese, als 55 - 60 kDa großes Protein der katalytischen V₁-Domäne beschriebene Untereinheit, wurde bislang keine Glykosylierung beschrieben. Desweiteren wurde in dieser Bande die schwere Kette von murinen Immunglobulinen (Protein 3b) nachgewiesen, für die das Tragen von N-Glykanen bekannt ist und somit den NGF-sensitiven Teil dieser Bande erklärt. Von den in der 47 kDa-Bande (Pool B) identifizierten Proteinen, Ubichinoncytochrom c-Reduktase Core 1 (Protein 5a) und Tripeptidyl-Peptidase 1 (TPP1) (Protein 5b), weist nur die in Rind als 46 kDa-Protein beschriebene lysosomale TPP1 fünf potentielle Gly-

kosylierungsstellen auf. Die Spaltung dieser Proteinase mit NGF, so konnte gezeigt werden, läßt Banden im Bereich von 40 kDa entstehen (Junaid *et al.*, 2000). In diesem Molekulargewichtsbereich läßt sich in Pool B nur ein Signal von sehr heterogenem Material finden, aus dem eine Verstärkung nicht abzulesen ist. Da die Zuckerseitenketten eines Glykoproteins meist von heterogener Art sind, führt deren Abspaltung zu einer Vereinheitlichung der Proteingröße und damit, zu einem stärkeren, meist scharfen Signal. Dies spricht für die intensiver erscheinende 46 kDa-Bande als Korrelat im Spaltmaterial von Pool B und deutet auf eine unvollständige Deglykosylierung der lysosomalen Glykosidase hin. Für den Pool C wird Protein mit N-Glykanen in der 65 kDa-Bande gezeigt, in der drei Proteine massenspektroskopisch identifiziert wurden. Dabei handelt es sich um zwei mitochondriale Proteine, die Flavoprotein-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase (Protein 2b) und die Glycerol-3-Phosphat-DH (Protein 2c), die als Träger von N-Glykanen ausgeschlossen werden können. Als einziges Glykoprotein enthielt diese Bande die lysosomale β -Glucocerebrosidase (Protein 2a), deren Aminosäuresequenz fünf potentielle N-Glykane aufweist (Swissprot). Van Weely *et al.* (1990) zeigten, daß die Glucocerebrosidase aus Plazenta ein apparentes Molekulargewicht von 65-68 kDa aufwies und durch Behandlung mit Endoglycosidase F zu einer 52 kDa-Spezies reduziert wurde. Dieser Befund deckt sich mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten, bei denen für die NGF-behandelte Glucocerebrosidase eine Bande von 52 kDa korreliert.

Die Bande niederen Molekulargewichts (46 kDa), die in Pool C weiteres NGF-spaltbares Material enthielt, läßt aufgrund der identifizierten Proteine dieser Bande nur die schwere Kette von Immunglobulinen (Protein 5b), als glykosylierte Spezies erscheinen. Die Ubichinon-cytochrom C-Reduktase (Protein 5a) kann aufgrund ihres mitochondrialen Ursprungs ebenfalls als nicht N-glykosyliert angesehen werden. Zu dieser Bande konnte jedoch, nach NGF-Behandlung, kein eindeutig verstärktes Korrelat mit erhöhter Mobilität identifiziert werden.

Die Daten zeigen, daß bei Proteinen mit geringem Glykosylierungsgrad eine massenspektroskopische Analyse durchaus möglich ist. Die Analyse heterogener Glykoprotein-Proben erfordert hingegen die Isolierung einzelner Proteine, um eine eindeutige Zuordnung der deglykosylierten Proteine sicherzustellen. Dazu wäre eine Verbesserung des Trennverfahrens notwendig, wie sie oben bereits beschrieben wurde.

5.7 Präparative SDS-PAGE von lysosomalen Membranproteinen nach IEF im OCTOPUS

Nach präparativer Acetonfällung der aufgearbeiteten OCTOPUS-Proben und anschließender Trennung durch SDS-PAGE konnte eine Vielzahl von coomassiefärbbaren Banden im Molekulargewichtsbereich von 5 bis über 120 kDa dargestellt werden. Ein Vergleich der Ausgangsproben nach Silberfärbung mit dem entsprechenden Material der Coomassie-Blau-Färbung, ließ erkennen, daß durch die Aufarbeitungsmethode alle Proteinbanden in vergleichbar guter Intensität wiedergegeben werden und zu einem gut übereinstimmenden Bandenmuster führte. Dies zeigt zum einen, daß die durch OCTOPUS-IEF getrennten lysosomalen Membranproteine mit Hilfe der in dieser Arbeit gezeigten Aufarbeitungsmethode in guten Ausbeuten zu präparieren sind. Zum anderen lassen die gut übereinstimmenden Bandenmuster einen Unterschied der beiden Färbemethoden nicht erkennen und deuten somit auf einen selektiven Transfer der durch präparative Immobiline-2D-Trennung separierten Membranproteine hin. Die hohe Qualität der präparativen Trennung lysosomaler Membranproteine durch OCTOPUS-IEF und SDS-PAGE, ließ eine Isolierung von etwa 100 Polypeptidbanden zu, die für massenspektroskopische Untersuchung zur Verfügung standen.

5.8 Charakterisierung lysosomaler Membranproteine durch Massenspektroskopie

Die für biologische Ressourcen entwickelten massenspektroskopischen Methoden (Untersuchung von Proteinen, Lipiden und Zuckerstrukturen) haben es, in Kombination mit hochauflösenden zweidimensionalen Proteintrennungen (2D-Gelelektrophoresen) ermöglicht, heterogene Proteingemische in kurzer Zeit zu analysieren. Damit hat sich auf dem Gebiet der Proteinanalytik ein neuer Zweig entwickelt, der, aus Analogie zu den methodischen Möglichkeiten bei den Genomstudien, als Proteomanalyse bezeichnet wird. Die Grenzen zur Sequenzierung von Proteinen und Proteinfragmenten konnte durch die MALDI-MS- (matrix-assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry) und ESI-MS-Technik (electrospray ionization mass spectrometry) auf den subpicomolaren Bereich herabgesetzt werden (Nguyen *et al.*, 1995; Shevchenko *et al.* 1996; Pandey & Mann 2000). Im Gegensatz zur MALDI-Technik, dessen Peptidmassen-Fingerprinting nur anhand bekannter Sequenzdaten zur Proteinidentifizierung führen kann, ermöglicht die ESI-Technik, die Peptide nach der Massenbestimmung auch auf molekularer Ebene zu analysieren. Dieses auch als Tandemmassenspektroskopie

bezeichnete Verfahren liefert Peptidfragment-Sequenzen, anhand derer auch teilsequenzierte cDNAs (EST) zugeordnet werden können. Damit können Hinweise auf noch unbekannte Proteine erhalten werden. Der bedeutendste Vorteil dieser Methode ist, daß die Identifizierung anhand der Peptidsequenzen nahezu eindeutig ist und sie sich auch aus einem Proteingemisch erzielen läßt (Pandey & Mann, 2000). Das Studium des lysosomalen Membranproteoms ist aufgrund der vielen, bislang weitgehend nur durch kinetische Untersuchungen belegte Transportsysteme von besonderem Interesse. Die Bedeutung der Transportprozesse über die lysosomale Membran hat sich in vielen genetisch bedingten Erkrankungen gezeigt, für deren Ursache Störungen der lysosomalen Transportaktivitäten verantwortlich gemacht wurden.

In dieser Arbeit wurden 17 der etwa einhundert als coomassiegefärbte Banden isolierten, immunoaffinitätsgereinigten, lysosomalen Membranproteine massenspektroskopisch untersucht. Dazu wurden Polypeptide im Bereich des sialinsäurebindenden 33 kDa-Proteins sowie einiger, als in immunoaffinitätsgereinigten, lysosomalen Membranen angereichert beschriebenen Polypeptide (Dietrich *et al.*, 1996) eingesetzt. Im Folgenden beschriebene Proteine sind durch den in Tab. 4 angegebenen Proteinindex sowie deren Abstammung aus den in Abb. 16 gezeigten Fraktionsbereichen Pool A-C definiert.

Die Peptide der Proben wurden nach Trypsinspaltung aus den Gelstücken mit einer standardisierten Acetonitril/Ameisensäure-Lösung extrahiert (Shevchenko *et al.* 1996) und durch ESI-MS massenspektroskopisch untersucht. Da die erhaltenen Spektren generell verhältnismäßig schwache Signale aufwiesen, die aufgrund der scheinbar vorhandenen Proteinmenge (Farbintensität der coomassiegefärbten Banden) nicht zu erwarten waren (A. Schlosser, persönliche Mitteilung), läßt dies eine schlechte Ausbeute bei der Peptidextraktion vermuten, die für zwei Proben mit schwachen Coomassie-Signalen des 33 kDa-Bereichs (Protein 13 und 14) wie auch bei einer deutlich stärker gefärbten 9 kDa-Bande (Protein 17) keine massenspektroskopischen Daten lieferten. Ein Protein das mit den Eigenschaften des sialinsäurebindenden 33 kDa-Polypeptids übereinstimmt, konnte nicht identifiziert werden. Da dieses Polypeptid vornehmlich in dem mit Pool B bezeichneten Fraktionsbereich zu erwarten war, läßt sich eine Korrelation mit den nicht analysierbaren Proteinbanden 13 und 14 nur vermuten. Bei den in dieser Arbeit als integrale Membranproteine identifizierten Polypeptiden finden sich ebenfalls keine Fragmente, die mit den potentiellen Transmembrandomänen korrelieren (Daten nicht gezeigt). Als Ursache für das schlechte Extraktionsverhalten, wäre daher eine verminderte Löslichkeit der Polypeptide in der zur Extraktion eingesetzten Lösung denkbar. Für Mem-

branproteine, wie Bakterio-Rhodopsin und für hydrophobe Peptide, wurden von Barnidge *et al.* (1999) eine verbesserte Extraktion durch Chloroform/Methanol beschrieben, bei der auch störende Trennprozesse in der Elektrospraykapillare unterdrückt werden konnten.

Die Sequenzdaten der Fragmente aus den verbleibenden 14 Polypeptidproben führte zur Identifizierung von 22 Proteinen. Darunter waren drei integrale Membranproteine und sechs Proteine, die Transportproteine oder deren Untereinheiten darstellten. Neben vier lysosomalen Proteinen, die in prominenten Banden der affinitätsgereinigten lysosomalen Membranen identifiziert wurden, war ein Großteil der isolierten Polypeptide (10) mitochondrialen Ursprungs. Aus Größenunterschieden der Polypeptide, die sich aus Vergleichen zu den Literaturdaten für vier mitochondriale Proteine ableiten, kann auf eine partielle Degradation durch lysosomale Proteinasen geschlossen werden. Im folgenden sind diese Proteine und ihre mögliche Zuordnung zu den lysosomalen Membranpräparationen beschrieben:

Lysosomale Proteine

Der Nachweis der **β -Glucocerebrosidase** (Protein 2a) in einer prominenten Proteinbande der lysosomalen Membranproteine bestätigt die Anreicherung dieses Enzyms durch Immunoaffinitätsreinigung. Dieses lysosomale Enzym konnte mit Hilfe des massenspektroskopischen Verfahrens durch Peptid-Fragmente identifiziert werden, die 31 % der Aminosäuresequenz belegen. Dabei erwiesen sich die für dieses Protein nachgewiesenen Zuckerseitenketten als unwesentliche Beeinträchtigung für die Identifizierung. Von den fünf nach Trypsinspaltung zu erwartenden Fragmenten, die eine Konsensus-Sequenz für potentielle N-Glykane aufweisen, konnte nur ein Fragment (Daten nicht gezeigt) massenspektroskopisch nachgewiesen werden. Dadurch wurden Ergebnisse von Takasaki *et al.* (1984) indirekt bestätigt, die besagen, daß für die lysosomale Glucocerebrosidase maximal vier der fünf potentiellen N-Glycosylierungsstellen genutzt werden. Die Autoren beschreiben für die lysosomale Glucocerebrosidase aus Plazenta drei N-Glykane mit Oligosacchariden des komplexen Typs und ein mannosereiches N-Glykan. Die Art der Assoziation mit der lysosomalen Membran ist bislang noch unklar, jedoch wird beschrieben, daß die Glucocerebrosidase über kein Mannose-6-Phosphat-Signal verfügt (Aerts *et al.*, 1988) und zusammen mit den Membranproteine lamp-1/2 zu den Lysosomen gelangt. Als weiterer Unterschied zu den luminalen Hydrolasen wird das Peptidgerüst der Glucocerebrosidase in den Lysosomen nicht prozessiert, was auf eine enge Membraninteraktion zurückgeführt wurde (Tsuji *et al.*, 1986).

Die lysosomale H^+ -ATPase wurde als Untereinheit B2 (Protein 3a, 53 kDa) und Untereinheit E (Protein 9b, 33 kDa) in diesen Präparationen nachgewiesen. Beide sind Untereinheiten des löslichen V_1 -Komplexes und werden als 55-60 kDa bzw. als 26-31 kDa Proteine beschrieben (Review: Finbow & Harrison, 1997), was in guter Korrelation zu den apparenten Molekulargewichten der entsprechenden Coomassie-Banden steht. Die B2 Untereinheit der H^+ -ATPase, auch als Hirn-Isoform bezeichnet, weist zwar höchste Expression in Osteoclasten, Niere und Hirn auf, wird aber ubiquitär exprimiert. In Plazenta werden sowohl die B2- als auch die Nieren-Isoform B1 nachgewiesen (van Hille *et al.*, 1994). Als weitere Untereinheit des löslichen V_1 -Komplexes konnte in dieser Arbeit die E Untereinheit in den Präparationen nachgewiesen werden. Für die, als Produkt eines cDNA-Klons beschriebene Untereinheit E (van Hille, 1993), wurde von den Autoren eine hohe Expression in Muskel, Herz, Hirn und Plazenta beschrieben. Die Untereinheit E wird für die Komplexbildung der, aus mindestens 13 Untereinheiten bestehenden, V-ATPase als essentiell angesehen (Review: Finbow & Harrison, 1997). Aufgrund von Strukturhomologien zur Gamma-Untereinheit der F-ATPase (Bowman *et al.*, 1995), wird sie als mögliche Verbindung zwischen der pseudo-hexameren Struktur aus alternierenden A- und B-Untereinheiten mit dem Membran-Teil (V_o) angesehen (Watts *et al.*, 1995). In immunoaffinitätsgereinigten Präparationen der V-ATPase aus Mäuseosteoclasten, mit einem gegen die Untereinheit E gerichteten Antikörper, wurden neben dieser auch die Untereinheiten A und B angereichert (Holliday *et al.*, 2000). Der Nachweis der beiden Untereinheiten B2 und E, der lysosomalen H^+ -ATPase läßt daher erwarten, daß weitere Bestandteile dieses Komplexes in diesen Präparationen zu identifizieren sind. Von besonderem Interesse wären dabei die präparativ schwer zugänglichen Membran-Komponenten a, c, c', c'' und d.

Die Tripeptidylpeptidase 1 (TPP1) (Protein 6b) ist eine lösliche lysosomale Hydrolase, die als 46 kDa-Glykoprotein in Rind beschrieben wurde (Junaid *et al.*, 2000), was mit der Größe des massenspektroskopisch analysierten Polypeptids dieser Aufarbeitung (48 kDa) korreliert. TPP1 wird auch als lysosomale pepstatin-resistente Proteinase bezeichnet, zu deren natürlichen Substraten die Untereinheit c der mitochondrialen ATP-Synthase gezählt wird. Die Defizienz dieser Exopeptidaseaktivität führt beim Menschen zu der spät-infantilen Form der neuronalen Ceroidlipofuscinosis (LINCL, CLN2), bei der es zur Speicherung dieser hydrophoben ATP Synthase-Untereinheit kommt (Tanner & Dice, 1996). Eine Assoziation mit der lysosomalen Membran wurde bislang noch nicht beschrieben.

Cytoplasmatische Proteine

Bei dem als **Mortalin-2** identifizierten 66 kDa-Polypeptid handelt es sich um ein Hitzeschockprotein der HSP70-Familie. Für die Überexpression des Mortalin-Gens in verschiedenen humanen Fibroblasten-Zelllinien wurde eine immortalisierende Wirkung beobachtet, die der des Maus-homologen Gens ähnelt (Kaul *et al.*, 1998 & 2000). Wie bei Maus-Zellen findet sich eine unterschiedliche Verteilung des Mortalin-Proteins in normalen (pancytosolisch) und immortalisierten Zellen (perinukleär) (Wadhwa *et al.*, 1993c & 1995), was bei der Maus auf zwei Gene, *mot-1* und *mot-2*, zurückgeführt wird. Beim Menschen ist bislang nur ein Mortalin-Gen bekannt, das für ein 73 kDa-Protein kodiert. Eine Spleißvariante wurde von Straußberg beschrieben (Genbank: BC000478), die für Mortalin-2 kodiert, dessen Sequenz in drei Aminosäuren zu Mortalin differiert. Mortalin wird auch als Peptid-bindendes Protein 74 (PBP74) oder Glucose-reguliertes Protein 75 (GRP75) bezeichnet, das eine Rolle in der Antigenprozessierung zu haben scheint (Review: Kaul *et al.*, 1998). Ebenso wurde eine Inaktivierung der Tumorsuppressor-Aktivität von p53 von Kaul *et al.* (2000) beschrieben und mit dem Immortalisationphänotyp humaner Zelllinien in Verbindung gebracht. Mittlerweile wurde Mortalin-2, für das eine mitochondriale Signalsequenz (AS 1-46) vermutet wird, in Mitochondrien, ER und Cytoplasma nachgewiesen (Ran *et al.*, 2000). Chataway *et al.* (1998) identifizierte PBP74 in Membranpräparationen humaner Plazenta-Lysosomen durch N-terminale Sequenzierung. Die gefundene Sequenz spricht für die Abspaltung der mitochondrialen Signalsequenz, ist aber mit Mortalin-2 identisch. Für die Autophagozyose cytosolischer Proteine in Lysosomen wurde ein Chaperon-vermittelter Import beschrieben (Dice, 1990). Daran beteiligt, sollen sowohl das integrale Membranprotein *lamp-2*, als auch ein Hitzeschock-Protein HSC73 sein, für das eine Lokalisation beiderseits der lysosomalen Membran angenommen wird (Cuervo & Dice, 1996). Die Präsenz von Mortalin-2 in den lysosomalen Membranpräparationen scheint daher von besonderem Interesse, wenn auch der Größenunterschied zu dem isolierten Polypeptid auf eine partielle lysosomale Degradation schließen läßt.

Das in den Präparationen lysosomaler Membranproteine identifizierte **Actin** (Protein 6) wird als Beta und Gamma-Isoform vorwiegend als Teil des Cytoskeletts, als an viele subzelluläre Organellen verknüpft, beschrieben. Aufgrund der starken Homologie zwischen Beta- und Gamma-Isoform (98% Identität) läßt sich das 45 kDa-Polypeptid anhand der erhaltenen Fragmentsequenzen nicht eindeutig zuordnen. Die Interaktion von Actin mit Lysosomen wurde bereits mehrfach beschrieben (Marugg *et al.*, 1990; van Deurs *et al.*, 1995). Von großer Bedeutung ist Actin für die Überführung von Transportvesikeln zu späten Endosomen und

Lysosomen beim endocytotischen Transportweg (Apodaca, 2001). Actin wurde als 43 kDa-Protein in magnetoaffinitätsgereinigten Lysosomen aus humanen Fibroblasten nachgewiesen (Diettrich *et al.*, 1998). An Lysosomen aus Rattenleber konnte gezeigt werden, daß Actin spezifisch an die Membran gebunden wird und in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen nicht abgelöst wird (Mehrabian *et al.* 1984). Das Molekulargewicht des mit den lysosomalen Membranen isolierten Polypeptids der vorliegenden Aufarbeitung läßt daher auf intaktes und extra-lysosomal assoziiertes Actin schließen.

Sekretorisches Protein

Plazenta Laktogene (PL) gehören zu den Sekrethormonen der Plazenta und werden als 22-23 kDa Proteine beschrieben, die nach Glykosylierung auch größer sein können (Forsyth, 1986). In der Maus werden zwei Plazenta Laktogene, PL-I und PL-II, beschrieben die zu verschiedenen Stadien der Schwangerschaft in der Plazenta produziert werden. Beim Menschen wurde bislang nur ein Homolog nachgewiesen, das auch als Abbauprodukt im Lumen humaner Plazenta-Lysosomen beschrieben wurde (Chataway *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu erscheint das in dieser Arbeit mit den lysosomalen Membranen isolierte Polypeptid von 24 kDa auf eine noch intakte Form hinzuweisen. Da PL ein Sekrethormon ist, kann eine Kontamination der „dense pool“-Lysosomen mit Sekretgranula nicht ausgeschlossen werden. Beobachtungen von Hamasaki *et al.*(1993) belegen jedoch, daß in Syncytiotrophoblasten humaner Plazenta nach Beendigung der Hormonproduktion PL-haltige Granula auch in den lysosomenartigen Strukturen nachgewiesen werden können. Die Aufnahme von Sekretgranula in Lysosomen wird als Crinophagocytose bezeichnet, ein Vorgang, für den in prolactinproduzierenden Zellen der Hypophyse bei abstillenden Ratten (Smith & Farquhar, 1966; Vila-Porcile *et al.*, 1988) und Schafen (Bernabe *et al.*, 2000), als auch bei endothelinausschüttenden stria intermediate cells während der Vaskularisierung in Mäusen (Fujimura *et al.*, 1999) vergleichbare crinophagische Erscheinungen sprechen. In allen Fällen gehen die Autoren von einem möglichen Regulationsmechanismus für die Hormonausschüttung aus, an dem wahrscheinlich Lysosomen beteiligt sind. Daher besteht die Möglichkeit, daß Plazenta Laktogen sowohl aus freien als auch aus bereits in lysosomale Kompartimente internalisierte Sekretgranula stammt und bei der Dichtezentrifugation nicht vollständig abgetrennt wird.

ER Protein

Als membranständiges Protein des Endoplasmatischen Retikulums wurde die **NADH-Cytochrom-b5-Reduktase 1** aus humanen Lebermikrosomen von Kitajima & Minakami (1983) isoliert. Die Autoren beschreiben das an der Reduktion ungesättigter Fettsäuren im Cytosol beteiligte Enzym als ein Protein mit einem Molekulargewicht von 36 kDa. Desweiteren konnte von ihnen gezeigt werden, daß das Enzym, nach proteolytischer Spaltung (z.B. durch Cathepsin D), auch in einer löslichen 32 kDa-Form, im Cytosol nachzuweisen ist. Der Aminoterminus weist eine stark konservierte Sequenz auf, an die ein Myristylrest gebunden ist, was die Struktur eines Membranankers impliziert (Murakami *et al.*, 1989). Das in dieser Arbeit isolierte Polypeptid der Cytochrom-b5-Reduktase 1 (32 kDa) kann demnach sowohl cytoplasmatischen als auch ER-gebundenen Ursprungs sein, da eine proteolytische Spaltung durch lysosomale Proteinasen nicht ausgeschlossen werden kann.

Für einen lysosomalen Ursprung sprechen hingegen Untersuchungen von Gille und Nohl (2000), die das Redoxsystem **Ubichinon/Ubichinol** in der lysosomalen Membran untersucht haben. Dieses Redoxsystem wurde zunächst als zentrale Schaltstelle bei der Elektronenübertragung der Atmungskette identifiziert, wodurch die hohe Konzentration an Ubichinon in der inneren mitochondrialen Membran erklärt wurde (1.86 µg/mg Protein) (Review: Ernster & Dallner, 1995). Da Ubichinon auch als stabile, halb-reduzierte Form Semiubichinon existieren kann, wird eine weitere Funktion als Radikalfänger und damit als Oxidationschutz für z. B. Membranlipide, Lipoproteine, als auch Membranproteine und DNA beschrieben (Review: Ernster & Dallner 1995). In der lysosomalen Membran werden ebenfalls sehr hohe Konzentrationen an Ubichinon nachgewiesen (1.86 µg/mg Protein), deren Bedeutung bislang unklar blieb (Ernster & Dallner 1995). Neuere Messungen beschreiben für die Konzentration von Ubichinon in der lysosomalen Membran einen Wert von 2.2 nmol/mg Protein (1.75 µg/mg Protein) und lassen weitere Komponenten an der Elektronenübertragung in der lysosomalen Membran vermuten (Gille und Nohl, 2000). Die Autoren finden für die Redoxprozesse sowohl eine Abhängigkeit von NADH, als Substrat für die Ubichinon-Reduktion, als auch von FAD und einem b-Typ-Cytochrom, die an der Elektronenübertragung beteiligt sind. In Analogie zur mitochondrialen Atmungskette vermuten Gille und Nohl (2000) daher eine Funktion dieser Prozesse an der Azidifizierung der Lysosomen. In diesem Zusammenhang scheint der Nachweis einer NADH-Cytochrom-b5-Reduktase in den lysosomalen Membranpräparationen diesen Befund zu unterstützen.

Mitochondriale Proteine

Die meisten der identifizierten mitochondrialen Proteine stammen aus Komplexen der inneren mitochondrialen Membran. Dazu zählten die **Untereinheit A** der **Succinat-Dehydrogenase** (Protein 2b), dem Komplex II der elektronenübertragenden Atmungskette in den Mitochondrien. Von dem aus vier Untereinheiten (A-D) bestehenden Komplex wird die Flavoprotein-Untereinheit A als ein reifes 67 kDa-Protein in Mensch- und Schweine-Mitochondrien beschrieben (Kubota *et al.*, 1998). Daraus läßt sich ein Größenunterschied zum dem in dieser Arbeit identifizierten 62 kDa-Form ableiten, der auf einen partiellen lysosomalen Abbau hinweist. Die Untereinheit A ist über die ebenfalls hydrophile B Untereinheit an die integral in der inneren mitochondrialen Membran verankerten Untereinheit C assoziiert (Lancaster & Kröger, 2000). Von Komplex III der Atmungskette, der **Ubichinon-Cytochrom C-Reduktase**, ist das **Core-Protein 1** (Protein 5a) nachgewiesen worden. Dies ist, neben Core-Protein 2, die größte der bislang beschriebenen 11 Untereinheiten (Review: Trumpower, 1990), die aus humaner Plazenta als cDNA kloniert wurde, und ein gereiftes 50 kDa-Protein erwarten lässt (Hoffman *et al.*, 1993). Als weitere Spezies sind aus Hefe 44-45 kDa-Proteine bekannt (Tzagoloff *et al.* 1986; Beattie *et al.*, 1994) und aus Rind konnte eine 50 kDa-Form isoliert werden (Capaldi *et al.*, 1988). Das in dieser Arbeit isolierte Polypeptid von 48 kDa spricht daher für ein intaktes Core-Protein 1, das als peripher an die innere Mitochondrienmembran gebunden beschrieben wird (Leonard *et al.*, 1981). Desweiteren wurden zwei Untereinheiten der **mitochondrialen ATP-Synthase** nachgewiesen, die als Komplex V der Atmungskette bezeichnet wird. Die Untereinheit D (Protein 16b) ist Teil des membranständigen Protonenkanals (F_o) und konnte in dieser Arbeit zu 81 % der Aminosäuresequenz durch Fragmente belegt werden. Das in dieser Arbeit bestimmte Molekulargewicht von 24 kDa stimmt mit dem für die aus Rinderherz isolierte Untereinheit D (19-24 kDa) überein (Walker *et al.*, 1991). Versuche das Protein N-terminal zu sequenzieren waren erfolglos und wurden auf eine Acetylierung des aminoterminalen Endes zurückgeführt (Walker *et al.*, 1987 & 1991; Collinson *et al.*, 1994). Für die Beta-Untereinheit (Protein 10a) läßt sich eine Größe von 51 kDa erwarten. Sie gehört zu dem membranassoziierten katalytischen Teilkomplex (F_1), der durch den länglichen carboxyterminalen Rest der b-Untereinheit (F_o) an die innere mitochondriale Membran gebunden ist (Wilkins *et al.*, 1994). Das als Untereinheit Beta in den lysosomalen Membranpräparationen identifizierte Polypeptid deutet mit einem Molekulargewicht von 32 kDa auf eine lysosomal degradierte Form hin. Für die **mitochondriale Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase** (mG3PDH) (Protein 2c), die als 66 kDa großes Membranprotein

in Rattentestis beschrieben wird (MacDonald & Brown, 1996), konnte in den lysosomalen Präparationen ein Polypeptid mit vergleichbarem Molekulargewicht (64 kDa) identifiziert werden. Die Lokalisation der mG3PDH auf der äußeren Oberfläche der inneren mitochondrialen Membran konnte von Garrib & McMurray (1988) deutlich gemacht werden. Aus Hydrophobizitätsberechnungen der Aminosäuresequenz leiten sich drei membrangängige Domänen ab, mit der das Enzym in der Membran inseriert ist (MacDonald & Brown, 1996). Ferrer *et al.* (1996) beschreiben in humanen Pankreas-Insel-Zellen ein alternatives Spleißprodukt der mG3PDH, bei dem ein Aminosäureaustausch D525R nachgewiesen wurde. Ein Fragment, das in dieser Arbeit massenspektroskopisch identifiziert werden konnte, belegt die zwölf Aminosäuren in Position 526-538 (Daten nicht gezeigt) der mG3PDH-Sequenz. Da dieses Fragment durch Trypsinspaltung nach R525 aber nicht nach D525 entsteht, liegt die Vermutung einer Expression dieser Isoform in humaner Plazenta nahe.

Desweiteren konnte ein als **neuartiges Protein ähnlich dem Tricarboxylat-Transporter aus Ratten** (Protein 7b) bezeichnetes Protein als ein 34 kDa-Polypeptid identifiziert werden. Dieses Protein wurde aus einer humanen Retinoblastoma-cDNA (R. Straussberg; GenBank BC000124) abgeleitet. Eine Isoform, die sich in nur einer Aminosäure unterscheidet, wurde aus der Sequenz eines klonierten DNA-Abschnitts des humanen Chromosoms 10 (P. Heath; GenBank AL133215) identifiziert. Die höchste Homologie (98 % der Aminosäuresequenz) weist dieses Tricarboxylat-Transporter-ähnliche Protein zu einem Transporter aus Maus auf, das als Sideroflexin 3 bezeichnet wird. Sideroflexin 3 wird als Teil einer neuen Proteinfamilie (Sideroflexin 1-5) beschrieben und weist in dieser Reihe die höchste Homologie zu Sideroflexin 1 auf. Die Gensequenz von Sideroflexin 1 wurde anhand von Mutationsanalysen an „flexed tail“-Mäusen identifiziert (Fleming *et al.*, 2001). Dieser, auf eine Anämie zurückzuführende Phänotyp, wird mit Eisenakkumulation in den Mitochondrien von Erythrocyten koinzidiert und daher als eine Form der sideroblastischen Anämien angesehen (Mixer & Hunt, 1933; Grüneberg 1942a,b). Sideroflexin 1 ist mitochondrial lokalisiert und weist fünf mögliche Transmembrandomänen auf, wie sie auch in vier weiteren Maus-Homologen (Sideroflexin 2-5) sowie den entsprechenden Homologen des Menschen identifiziert wurden (Fleming *et al.*, 2001). Tricarboxylat-Transporter wurde aus Rattenleber-Mitochondrien als 30 -32.5 kDa-Proteine isoliert (Bisaccia *et al.*, 1989; Kaplan *et al.*, 1990), in Rinderleber als 37-38 kDa Protein (Claeys & Azzi, 1989) und aus Aal-Leber mit 30 kDa (Zara *et al.*, 1996) nachgewiesen. Aus Hefe wurde ein homologer Tricarboxylat-Transporter, CTP, als 32 kDa-Protein gereinigt, für den sechs Transmembrandomänen beschrieben werden. Das in

dieser Arbeit als 33 kDa-Polypeptid identifizierte Protein, deutet daher auf eine proteinolytisch unversehrte Form eines mitochondrialen Tricarboxylat-Transporters hin.

Der **spannungsabhängige Anionenkanal Porin 2** (Protein 7a) gehört zu den mitochondrialen Porenproteinen der äußeren Mitochondrienmembran, die ein Molekulargewicht von 30-35 kDa aufweisen (Reviews: Sorgato & Moran, 1993; Benz, 1994; Rostovsteva & Colombini, 1996). Neben humanen Porin 1- und Porin -2 Genen, wurden ein weiteres Gen von Rahmani *et al.* (1998) als humanes Porin 3 identifiziert. Für Spleißvarianten des Porin 2, die einen verkürzten bzw. einen verlängerten N-Terminus aufwiesen, konnte keine Veränderung der mitochondrialen Lokalisation beobachtet werden (Yu *et al.*, 1995). Die Aminosäuresequenz einer Spleißvariante von Porin 2, bei der ein verkürzter C-Terminus bestimmt wurde (Yu *et al.*, 1995) weist zu Porin 2 aus Rind 98 % Identität auf (Hinsch *et al.*, 2001). Dieses Protein wurde von den Autoren mit Hilfe eines gegen diese Isoform gerichteten, spezifischen Antiserums, in Rinderspermien als ein 33 kDa-Protein nachgewiesen. Aus humanen Plazenta-Mitochondrien wurde ebenfalls ein 33 kDa-Porin gereinigt (Gasnier *et al.*, 1993), das nicht weiter spezifiziert wurde, jedoch mit dem in dieser Arbeit gezeigten Polypeptid (33 kDa) gute Übereinstimmung aufweist. Durch Immunodetektion mit einem monoklonalen anti-Porin 1-Antikörper konnte Reymann *et al.* (1998) Proteine von 31 kDa und 28 kDa in Endocytose-Vesikeln aus Rattenniere nachweisen. Das 28 kDa-Polypeptid wurde dabei als Degradationsprodukt des Porin 1 beschrieben. Das in den Membranpräparationen humaner Lysosomen identifizierte 33 kDa-Polypeptid deutet daher auf nicht degradiertes Porin 2 hin. Dies kann als weiterer Hinweis auf das für Lysosomen beschriebene Chlorid-Transportsystem gelten, für das ein spannungsabhängiger Anionenkanal beschrieben wurde (Tilly *et al.*, 1992).

Neben den membranständigen Enzymkomplexen wurden auch Matrixproteine der Mitochondrien in den Präparationen nachgewiesen. Dazu zählt die **Dihydrolipoamid-S-Succinyltransferase (DLST)** (Protein 12), die auch als E2 Komponente des α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes bezeichnet wird. Zusammen mit zwei weiteren Komponenten (E1 und E3) kommt die E2-Untereinheit mit bis zu 24 Kopien in einem Multienzymkomplex vor. Die E2 Komponente wurde mit einer Größe von 48 kDa in Rattenmuskel nachgewiesen (Matuda *et al.*, 1997) und bildet die Core-Struktur des Komplexes (Koike & Koike, 1976; Linn, 1974). In Säugetierzellen ist dieser Komplex an die innere Membran der Mitochondrien gebunden (Maas & Biswanger, 1990). Ein alternatives Spleißprodukt des Ratten-DLST-Gens wurde an der Plasmamembran lokalisiert, wies aber ein Molekulargewicht von 20 kDa auf (Matuda *et al.*, 1997). Das mit den lysosomalen Membranen isolierte 32 kDa-Polypeptid

spricht daher für eine mitochondriale Abstammung und für einen degradativen Abbau durch lysosomale Proteinasen.

Als Elektronenakzeptor vieler Dehydrogenasen dient in der mitochondrialen Matrix ein **Elektronentransfer-Flavoprotein** (ETF), dessen **α -Kette** (Protein 9c) in dieser Arbeit als ein 33 kDa-Polypeptid nachgewiesen wurde. Aus Mensch sind beide Untereinheiten des ETF-Proteins, α und β , als 35 kDa bzw. 27 kDa große Vorläuferproteine bekannt (Finocchiaro *et al.*, 1988). Im Gegensatz zur β -Untereinheit wird die α -Kette während des Imports in die Mitochondrien prozessiert und wird, nach Verlust der Signalsequenz, als gereiftes 32 kDa-Protein beschrieben (Ikeda *et al.*, 1986). Auch für dieses mitochondriale Protein deutet sich daher keine lysosomale Proteinolyse an.

Die **3-Hydroxyisobutyrat-Dehydrogenase** (Protein 8) ist ein Enzym des Valin-Stoffwechsels und wurde aus Kaninchen (34 kDa) (Rougraff *et al.*, 1988) und Ratte (rekombinant: 32 kDa) (Hawes *et al.*, 1995) isoliert. Die gute Übereinstimmung mit dem isolierten Polypeptid von 32 kDa, läßt ein weitgehend intaktes Enzym erwarten. Eine Kolokalisation mit der Mitochondrienmembran wurde für das Matrixprotein bislang nicht beschrieben.

Als peroxisomales Enzym wird die **Enoyl-CoA-Hydratase 1** (ECH1; GenBank XM-008904) (Protein 9a) bezeichnet. Die von FitzPatrick *et al.* (1995) klonierten cDNA-Sequenz aus humaner Retina kodiert für ein Protein, das Homologie zu Enoyl-CoA-Hydratase und eine peroxisomale Signalsequenz im C-Terminus aufweist, wie sie auch für das rattenhomologe Protein rECH1 gefunden wurde. Zudem wurde eine Spleißvariante des humanen ECH1-Gens nachgewiesen, die für eine Isoform mit acht Aminosäureaustauschen kodiert (GenBank U16660) und den massenspektroskopisch analysierten Fragmentsequenzen entspricht. Untersuchungen von Filppula *et al.* (1998) an rECH1 bestätigen für das aus Rattenleber isolierte 36 kDa-Enzym eine Lokalisation in Peroxisomen, konnten aber zudem eine 32 kDa-Form in Mitochondrien nachweisen. Der Größenunterschied wurde von den Autoren auf die Abspaltung einer 40 Aminosäuren umfassenden Signalsequenz zurückgeführt. Mechanistische Studien wiesen dieses Enzym als eine Dienoyl-CoA-Isomerase aus, die Doppelbindungen ungesättigter Fettsäuren aus einer Δ^3 - Δ^5 - in die Δ^2 - Δ^4 -Position isomerisieren (Filppula *et al.*, 1998). Das Gen der humanen Enoyl-CoA-Hydratase 1 kodiert ebenfalls für ein 36 kDa-Protein mit beiden Signalsequenzen (FitzPatrick *et al.*, 1995). Die Anreicherung des als ECH1 identifizierten 33 kDa-Polypeptids kann daher sowohl auf einen mitochondrialen als auch einen per-

oxisomalen Ursprung zurückgehen. Im letzteren Fall wäre allerdings eine partielle lysosomale Degradation zu postulieren.

Identifizierung durch massenspektroskopische Daten

Für die Identifizierung von Proteinen durch Massenspektroskopie sind Vergleiche mit Sequenzdatenbanken (DNA wie Proteinebene) essentiell. Die Tandemmassenspektroskopie erlaubt zwar die Sequenzbestimmung von Proteinfragmenten, benötigt aber für eine eindeutige Zuordnung von Proteinen meist eine Sequenzbelegung durch mehrere Fragmente. Die Signifikanz mit der sich eine Übereinstimmung als sehr wahrscheinlich erweist, hängt im wesentlichen von der Qualität der massenspektroskopischen Daten ab. Um für ein Fragment eine möglichst wahrscheinliche Aminosäureabfolge zu bestimmen, müssen im Fragmentspektrum ausreichend viele Ionen-Massen mit minimaler Abweichung, zu den für eine Sequenz theoretisch errechneten Werten der zu erwartenden Ionen-Massen vorhanden sein. Ist dies nicht gegeben, fällt der zur Bemessung der Daten berechnete MOWSE-Score entsprechend niedrig aus und führt nur in Kombination mit weiteren Fragmenten zu einer Identifizierung. Von den in dieser Arbeit analysierten Proben, konnten drei Proteine anhand nur eines Fragmentes identifiziert werden. Diese müssen ebenso kritisch betrachtet werden wie Fragmente deren Sequenz als weniger wahrscheinlich angesehen werden. Daß die Dihydrolipoamid-S-Succinyltransferase, die in benachbarten Proben (Probe 12 und 15 in Abb.16) anhand gleicher Fragmente mit MOWSE-Scores von 63, als identifiziert, und mit einem Score von 39, als nicht signifikant eingestuft wird, wird auf die unterschiedliche Qualität der massenspektroskopischen Daten zurückgeführt. In diesem Fall kann die Präsenz des Proteins in beiden Proben als sehr wahrscheinlich angesehen werden. Es ist daher zu vermuten, daß unter den nicht identifizierten Proteinen und Fragmenten sich potentiell neue Kandidaten für Transportproteine verbergen.

Interessant erscheint ein Kupfertransportprotein aus *Candida albicans*, **Crd1p**, das zur Familie der ATP-getriebenen Transporter zählt. Das CRD1-Gen kodiert für ein 130 kDa Protein mit vermutlich acht Transmembrandomänen und weist fünf Kopien eines CXXC-Motives auf, das für Kupfertransport charakteristisch ist (CPx-Typ-ATPase) (Riggle & Kumamoto, 2000). Ein Gen mit der identischen Sequenz wurde von Weissman *et al.* (2000), ebenfalls aus *Candida albicans*, beschrieben (GenBank AAF04593). Die Homologie zu anderen P1-Typ-ATPasen, wie den humanen Kupfertransportern, verbunden mit Menkes- (ATP7A) und Wilson-Krankheit (ATP7B), ist aufgrund stark konservierter Bereiche gegeben (Riggle &

Kumato 2000). Das in dieser Arbeit identifizierte Fragment belegt jedoch ein längeres Motiv, das die Konsensus-Sequenz GMXCXXC beinhaltet und für Schwermetall-Transporter charakteristisch ist. Für ATP7A und ATP7B wird eine Lokalisation im trans-Golgi, wie auch in zur Plasmamembran nahegelegenen Vesikeln beschrieben (Strausak *et al.*, 1999). Crd1p hingegen wurde als Fusionsprotein von Crd1p mit GFP (GFP engl.: green fluorescence protein) in Nähe der Plasmamembran als auch mit schwächerem Signal, in Zellkernnähe lokalisiert (Weissman *et al.*, 2000). Ebenso beschreiben die Autoren das Crd1p den Defekt einer Hefe-Zellmutante, mit Deletion der trans-Golgi-ständigen P1-Typ-ATPase (Ccc2), nicht korrigieren konnte. Die humanen Kupfertransporter werden als 160 kDa (ATP7B) und 170 kDa (ATP7A) beschrieben, was ebenso wie die für Crd1p erwarteten 130 kDa einen deutlichen Unterschied zu dem in dieser Arbeit isolierten Polypeptid von 64 kDa aufweist. Von Reddy und Harris (1998) wird jedoch eine Spleißvariante der Menke-ATPase beschrieben, die ein Molekulargewicht von 57 kDa aufweist. Die cDNA-Sequenz der alternativ gespleißten RNA codiert für zwei der acht Transmembrandomänen sowie das Schwermetall-Bindungsmotiv auf und enthielt weitere Schlüsseldomänen wie die Phosphorylierungs- und ATP-Bindungsdomäne (Reddy & Harris, 1998). Das mit den lysosomalen Membranproteinen isolierte Polypeptid, das für eine humane CPx-Typ-ATPase des Crd1p sprechen könnte, kann ebenso mit dem von Havelaar *et al.* (1998) beschriebenen lysosomalen Importsystem von Schwermetall-Ionen in Verbindung stehen. Dieses erwies sich als ATP-abhängig und transportierte sowohl monovalente (Ag^+) wie auch divalente Kationen (Cu^{2+} , Cd^{2+}). Dies läßt die Isolierung dieses Polypeptids zur Identifizierung eines unbekanntes lysosomalen Transportproteins als geeigneten Kandidaten erscheinen.

Die in dieser Arbeit analysierten 14 Proteinbanden geben nur einen Ausschnitt der immunoaffinitätsgereinigten lysosomalen Membranproteine aus humaner Plazenta wieder. Auffällig ist jedoch, daß neben den zu erwartenden lysosomalen Membranproteinen, wie β -Glucocerebrosidase und die vesikuläre H^+ -ATPase, ein großer Anteil mitochondrialer Proteine in den Präparationen nachgewiesen werden konnte. Da in den prominenten Banden der präparativen SDS-PAGE jeweils mehrere Proteine nachgewiesen wurden, läßt sich nicht abschätzen ob die lysosomalen Proteinanteile, die vornehmlich in stark gefärbten Banden vertreten waren, höher als die mitochondrialen Anteile sind. Da von beiden Organellen sowohl luminal als auch transmembrane Proteine identifiziert werden konnten, kann das Ergebnis ebenfalls nicht auf Unterschiede bezüglich der Löslichkeit oder Färbbarkeit durch Coomassie-Farbstoff erklärt werden. Da Proteine aller Bereiche der Mitochondrien, von der äußeren Membran bis hin zur

Matrix, identifiziert wurden, muß von einer parallelen Aufarbeitung von Mitochondrien und Lysosomen ausgegangen werden. Eine selektive Aufreinigung mitochondrialer Proteine bei der Immunoaffinitätsreinigung ist jedoch nur denkbar, wenn es nach der Lyse der Organellen durch Ultraschall-Behandlung zu einer Reorganisation von Vesikeln kommt. Vesikel die sich aus Fragmenten beider Organellmembranen zusammensetzen und damit lamp-2-Antigen präsentieren könnten durch den 2D5-Antikörper gebunden werden. Neben Untereinheiten aus Membrankomplexen, die zumeist ionisch im Komplex gebunden und als weitgehend hydrophil beschrieben sind, werden auch luminal lösliche Proteine beider Organellen nachgewiesen. Dies könnte ebenso auf noch kompartimentiertes Protein deuten und somit für Rekonstitutionsprozesse sprechen.

Der Grad der mitochondrialen Verunreinigung, gemessen an aktiver Succinat-Dehydrogenase, kann die Prominenz der Untereinheit A der Succinat-Dehydrogenase, wie sie in dieser Arbeit durch massenspektroskopische Analyse in den immunoaffinitätsgereinigten Membranen nachgewiesen wurde, nicht erklären. Da dieses Polypeptid, wie auch einige andere identifizierte, mitochondriale Proteine, auf eine partielle Degradation hinweisen, muß daraus geschlossen werden, daß es sich um Substratproteine für den lysosomalen Abbau durch Autophagocytose handelt.

Autophagocytose/Apoptose

Der Abbau von intrazellulären Makromolekülen und Zellorganellen in Lysosomen, wird als Autophagocytose beschrieben und wurde zuerst bei elektronenmikroskopischen Studien beobachtet. Dieser Prozess kann durch Nährstoffmangel in vielen Zelltypen ausgelöst werden und kann bei Aminosäureentzug 70-80 % des intrazellulären Proteinabbaus ausmachen (Seglen, 1987). Autophagocytose scheint beteiligt zu sein an Vorgängen wie Zelldifferenzierung, Zellalterung sowie bei Wachstumsvorgängen, z. B. dem Wachstum der Gebärmutter während der Schwangerschaft und deren Verkümmern nach der Geburt (Morton & Goldspink, 1985). Der Abbau von Zellorganellen, wie z. B. Mitochondrien, durch Makroautophagocytose kann morphologisch von der Aufnahme cytoplasmatischer Bestandteile durch Mikroautophagocytose unterschieden werden (Review: Teter & Klionsky, 2000). Wird bei letzterem das Substrat von der lysosomalen Membran selbst eingeschlossen, werden bei der Makroautophagocytose die Zellorganellen zunächst von einer Doppelmembran, wahrscheinlich von ribosomen-freien Regionen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums abstammend (Dunn, 1990a), umschlossen und bilden ein Autophagosom. Nach der Fusion von Autophagosomen mit pri-

mären Lysosomen reift dieses Vesikel zu einem Autophagolysosom heran, in dem erst die Zersetzung der umschließenden Membran die Proteinolyse des Autophagosomeninhalts ermöglicht.

Nach einer Studie von Elmore *et al.* (1997) hängt die Autophagocytose von Mitochondrien eng mit der Depolarisierung der inneren mitochondrialen Membran zusammen. Mit Hilfe confocaler Fluoreszenzmikroskopie und spezieller Fluorophore konnten sie beobachten, wie einige Mitochondrien spontan depolarisierten und mit Lysosomen kolokalisierten. Bei Hungerstimulus stieg nicht nur die Autophagie-Rate, sondern ebenfalls die Zahl spontan depolarisierender Mitochondrien, und zwar um das neunfache. Solche Depolarisierungseffekte werden ebenfalls für den programmierten Zelltod beschrieben, der nicht durch Nekrose, sondern durch Apoptose erfolgt (Reviews: Lemasters *et al.*, 1998; Crompton 2000). Dieser Prozeß ist charakterisiert durch morphologische Veränderungen wie Chromatin-Kondensation, Kernzusammenbruch, DNA-Fragmentierung und der Bildung eines Apoptosekörpers, die jedoch die Gegenwart von Mitochondrien erfordern (Newmeyer *et al.*, 1994). Zahlreiche Studien haben diesen komplexen Vorgang zum Teil entschlüsseln können, bei dem ein Porenkomplex der mitochondrialen Membran von zentraler Bedeutung scheint (Review: Crompton 1999). Dieser Komplex, an dem ein spannungsabhängiger Anionenkanal (äußere Membran) und eine Adenin-Nukleotid-Translokase (innere Membran) beteiligt sind, wird eine Regulationsfunktion des mitochondrialen Ca^{2+} -Spiegels zugeschrieben (Review: Ichas, 1997). Die Überladung von isolierten Mitochondrien mit supraphysiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen in Gegenwart von Phosphat, führte zur Öffnung des Porenkomplexes, über den auch höhermolekulare Stoffe, wie Cytochrom C, aus den Mitochondrien freigesetzt wurden und zur Depolarisierung der inneren mitochondrialen Membran (Eskes *et al.*, 1998; Pastorino *et al.*, 1999). Sowohl die depolarisierende als auch durchlässigkeitsvermittelnde Wirkung des unter anderem auch als PT-Pore (engl.: permeability transition pore) bezeichneten Komplexes, werden *in vivo* durch zahlreiche pro-apoptotische Proteine ausgelöst (Review: Crompton, 2000). Weitere Faktoren, die den Vorgang der Apoptose, z.B. durch Aktivierung von Caspasen, fortsetzen bzw. in anderen Mitochondrien einleiten, gelangen erst durch die Permeabilität der Mitochondrien-Membran ins Cytosol. Aus diesem Zusammenhang leiten Lemasters *et al.* (1998) ein Modell ab, nachdem Apoptose und Autophagocytose auf die Depolarisierung der inneren Mitochondrienmembran zurückgehen, und daß die Zahl der depolarisierten Mitochondrien entscheidend dafür ist, ob der Zelltod durch Apoptose erfolgt. Diese Hypothese sehen Klionsky und

Emr (2000) dadurch gestützt, daß einige der pro-apoptotischen Faktoren an den Signaltransduktionswegen beider Prozesse beteiligt sind.

In Plazenta werden morphologische Veränderungen wie Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung sowie vermehrte Bildung von Autophagocytose-Vesikeln zum Ende der Schwangerschaft beschrieben (Nelson, 1996; Smith *et al.*, 1997). Dabei wurde eine kernlokalisierte DNA-Fragmentierung in Plazenta, sowohl nach natürlicher als auch nach Kaiserschnitt-Geburt beobachtet (Thiet *et al.*, 2000). Nach Fusion von Autophagocytose-Vesikeln mit Lysosomen entstehen Autophagolysosomen, in deren äußere Membran lamp-Protein nachweisbar ist, wie es für 50 % der Autophagolysosomen detektiert wurde (Dunn, 1990b). Durch die Affinitätsreinigung, mit dem gegen den N-Terminus von h-lamp-2 gerichteten Antikörper, wäre daher eine selektive Aufreinigung derartiger Vesikeln nur nach Ultraschall-Behandlung denkbar und setzt voraus, daß diese in nennenswerten Mengen bei der Dichte-zentrifugation in den „dense pool“-Fraktionen erhalten sind. Der Nachweis von autophagosomen-spezifischen Proteinen ist bislang nicht beschrieben, hingegen beschreiben morphologische Untersuchungen, daß Autophagosomen arm an Membranproteinen sind (Fengsrud *et al.*, 2000). Nach Bildung von Autophagolysosomen ist von einer Verteilung der lysosomalen Membranproteine in der äußeren Membran auszugehen. Anhand der Verteilungsdichte dieser Membranproteine könnte eine Kontamination intakter „dense pool“-Lysosomen mit Autophagolysosomen nachweisbar sein. Für immunologische Nachweise sind jedoch nur Antigene auf der cytoplasmatischen Seite, wie Untereinheiten des V_1 -Teils der vakuolären H^+ -ATPase, geeignet.

Der Nachweis partiell degradiert erscheinender mitochondrialer Proteine in den Membranpräparationen humaner Plazenta-Lysosomen könnte daher für einen autophagolysosomalen Ursprung sprechen. Als weiteren Hinweis für Autophagocytoseprozesse kann die Heterogenität der verschieden lokalisierten Proteine insgesamt angesehen werden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann jedoch nicht beurteilt werden, ob die nachgewiesenen mitochondrialen Polypeptide aus kontaminierenden oder autophagozytierten Mitochondrien stammen.

Ausblick

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, lassen sich mit der präparativen Trennung lysosomaler Membranproteine durch Kombination von free-flow-isoelektrischen Fokussierung und SDS-PAGE sowohl integrale Membran- und Transportproteine als auch deren Untereinheiten mit guten Ausbeuten isolieren und einer massenspektroskopischen Analyse zuführen. Damit konnte eine Grundvoraussetzung zur systematischen molekularen Charakterisierung des lysosomalen Membranproteoms geschaffen werden. Insbesondere der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen sideroflexinverwandte Tricarboxylat-Transporter, als auch der zu Crd1p, aus *Candida albicans*, homologieaufweisende Schwermetallionen-Transporter stellen aussichtsreiche Kandidaten für funktionell bedeutsame lysosomale Membranproteine dar. Die Nutzung von Sequenzdaten, zur Produktion von Antikörpern gegen synthetische Peptide, würde sich im Falle des Tricarboxylat-Transporters anbieten. Die Existenz eines möglichen lysosomalen Kupfertransporters müßte zunächst bestätigt werden. Dies wäre anhand der noch nicht untersuchten, coomassiegefärbten Proteinbanden der entsprechenden Nachbarfraktionen aus dieser Aufarbeitung denkbar. Um ausreichend Material hoher Qualität für den Nachweis bereitstellen zu können, ist eine Präparation aus Einzelfractionen einer OCTOPUS-Trennung zu empfehlen. Das Potential des vorgestellten Verfahrens bietet die Möglichkeit, größere Mengen immunoaffinitätsgereinigter, lysosomaler Membranproteine zu trennen und die Polypeptide jeder einzelnen Fraktion für eine präparative SDS-PAGE einzusetzen. Damit wäre eventuell eine bessere Zuordnung zu den analytischen Immobiline-2D-Trennungen zu erwarten. Die Kombination beider Techniken sollte eine detaillierte Charakterisierung des lysosomalen Membranproteoms möglich machen.

6 Literaturverzeichnis

- Adamski, J., Sierralta, W.D. & Jungblut, P.W.: Harvesting and separation of two populations of lysosomes from porcine endometrium. *Eur. J. Cell Biol.* 45, 238-45 (1987).
- Adessi, C., Miege, C., Albrieux, C. & Rabilloud, T.: Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: a current challenge for immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18, 127-35 (1997).
- Aerts, J.M., Schram, A.W., Strijland, A., van Weely, S., Jonsson, L.M., Tager, J.M., Sorrell, S.H., Ginns, E.I., Barranger, J.A. & Murray, G.J.: Glucocerebrosidase, a lysosomal enzyme that does not undergo oligosaccharide phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta.* 964, 303-8 (1988).
- Andersson, H.C., Kohn, L.D., Bernardini, I., Blom, H.J., Tietze, F. & Gahl, W.A.: Characterization of lysosomal monoiodotyrosine transport in rat thyroid cells. Evidence for transport by system h. *J. Biol. Chem.* 265, 10950-4 (1990).
- Apodaca, G.: Endocytic traffic in polarized epithelial cells: role of the actin and microtubule cytoskeleton. *Traffic* 2, 149-59 (2001).
- Appelgarth, D.A., Dimmick, J.E. & Hall, J.G.: *Organelle Disease*, publiziert bei Chapman & Hall, London (1997).
- Arai, K., Shimaya, A., Hiratani, N. & Ohkuma, S.: Purification and characterization of lysosomal H(+)-ATPase. An anion-sensitive v-type. *J. Biol. Chem.* 268, 5649-660 (1993).
- Aula, P., Autio, S., Raivio, K.O., Rapola, J., Thoden, C.J., Koskela, S.L. & Yamashina, I.: Salla disease: a new lysosomal storage disorder. *Arch. Neurol.* 36, 88-94 (1979).
- Bame, K.J. & Rome, L.H.: Acetyl coenzyme A: alpha-glucosaminide N-acetyltransferase. Evidence for a transmembrane acetylation mechanism. *J. Biol. Chem.* 260, 11293-9 (1985).
- Barnidge, D.R., Dratz, E.A., Jesaitis, A.J. & Sunner, J.: Extraction method for analysis of detergent-solubilized bacteriorhodopsin and hydrophobic peptides by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 269, 1-9 (1999).
- Barriocanal, J.G., Bonifacino, J.S., Yuan, L. & Sandoval, I.V.: Biosynthesis, glycosylation, movement through the golgi system and transport to the lysosomes by an N-linked carbohydrate-independent mechanism of three lysosomal integral membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 261, 16755-61 (1986).
- Barrueco, J.R. & Sirotnak, F.M.: Evidence for the facilitated transport of methotrexate polyglutamates into lysosomes derived from S180 cells. Basic properties and specificity for polyglutamate chain length. *J. Biol. Chem.* 266, 11732-7 (1991).
- Beattie, P., Tan, K., Bourne, R.M., Leach, D., Rich, P.R. & Ward, F.B.: Cloning and sequencing of four structural genes for the Na(+)-translocating NADH-ubiquinone oxidoreductase of *Vibrio alginolyticus*. *FEBS Lett.* 356, 333-8 (1994).
- Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P.G., Gianazza, E., Gorg, A., Westermeier, R. & Postel, W.: Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 6, 317-39 (1982).
- Benz, R.: Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1197, 167-96 (1994).

- Bernabe, A., Gomez, M.A., Seva, J., Vasquez, F., Pallares, F.J. & Serrano, J.: Light and ultrastructural immunocytochemical study of somatotrophic cells (GH cells) in ovine adenohypophysis: lactation and weaning influences. *Anat. Histol. Embryol.* 29, 13-8 (2000).
- Bernar, J., Tietze, F., Kohn, L.D., Bernardini, I., Harper, G.S., Grollman, E.F. & Gahl, W.A.: Characteristics of a lysosomal membrane transport system for tyrosine and other neutral amino acids in rat thyroid cells. *J. Biol. Chem.* 261, 17107-12 (1986).
- Bisaccia, F., De Palma, A. & Palmieri, F.: Identification and purification of the tricarboxylate carrier from rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 977, 171-6 (1989).
- Blom, H.J., Andersson, H.C., Seppala, R., Tietze, F. & Gahl, W.A.: Defective glucuronic acid transport from lysosomes of infantile free sialic acid storage disease fibroblasts. *Biochem. J.* 268, 621-5 (1990).
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-54 (1976).
- Braiman, M.S., Stern, L.J., Chao, B.H. & Khorana, H.G.: Structure-function studies on bacteriorhodopsin. IV. Purification and renaturation of bacterio-opsin polypeptide expressed in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 262, 9271-6 (1987).
- Buckmaster, M.J., Ferris, A.L. & Storrie, B.: Effects of pH, detergent and salt on aggregation of Chinese-hamster-ovary-cell lysosomal enzymes. *Biochem. J.* 249, 921-3 (1988).
- Burggraf, D., Weber, G. & Lottspeich, F.: Free flow-isoelectric focusing of human cellular lysates as sample preparation for protein analysis. *Electrophoresis* 16, 1010-5 (1995).
- Canut, H., Bauer & J., Weber, G.: Separation of plant membranes by electromigration techniques. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 722, 121-39 (1999).
- Capaldi, R.A., Halphen, D.G., Zhang, Y.Z. & Yanamura, W.: Complexity and tissue specificity of the mitochondrial respiratory chain. *J. Bioenerg. Biomembr.* 20, 291-311(1988).
- Carlsson, S.R., Roth, J., Piller, F. & Fukuda, M.: Isolation and characterization of human lysosomal membrane glycoproteins, h-lamp-1 and h-lamp-2. *J. Biol. Chem.* 263, 18911-19 (1988).
- Carlsson, S. R., Lycksell, P.-O. & Fukuda, M.: Assignment of O-glycan attachment sites to hinge-like regions of human lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2. *Arch. Biochem. Biophys.* 304, 65-73(1993).
- Carstea, E.D., Morris, J.A., Coleman, K.G., Loftus, S.K., *et al.*: Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science* 277, 228-231(1997).
- Celis, J.E., Gromov, P., Ostergaard, M., Madsen, P., Honore, B., *et al.*: Human 2-D PAGE databases for proteome analysis in health and disease: <http://biobase.dk/cgi-bin/celis>. *FEBS Lett.* 398, (1996) 129-34 .
- Cha, Y., Holland, S. M. & August, J.T.: The cDNA sequence of mouse lamp-2. *J. Biol. Chem.* 265, 5008-13 (1990).
- Chao H.H., Waheed, A. & Pohlmann, R.: Mannose-6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes. *EMBO J.* 9, 3507-13 (1990).
- Chataway, T.K., Whittle, A.M., Lewis, M.D., Bindloss, C.A., Davey, R.C., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Hopwood, J.J. & Meikle, P.J.: Two-dimensional mapping and microsequencing of lysosomal proteins from human placenta. *Placenta* 19, 643-54 (1998).

- Chen, J.W., Cha, Y., Yuksel, K.U., Gracy, R.W. & August, J.T.: Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding lysosomal membrane glycoprotein mouse lamp-1. *J. Biol. Chem.* 263, 8745-58 (1988).
- Chiang, H.-L. & Dice, J.F.: Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J. Biol. Chem.* 263, 6797-805 (1988).
- Claeys, D. & Azzi, A.: Tricarboxylate carrier of bovine liver mitochondria. Purification and reconstitution. *J. Biol. Chem.* 264, 14627-30 (1989).
- Collarini, E.J., Pisoni, R.L. & Christensen, H.N.: Characterization of a transport system for anionic amino acids in human fibroblast lysosomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 987, 139-44 (1989).
- Collinson, I.R., Runswick, M.J., Buchanan, S.K., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., van Raaij, M.J., Griffiths, D.E. & Walker, J.E.: Fo membrane domain of ATP synthase from bovine heart mitochondria: purification, subunit composition, and reconstitution with F1-ATPase. *Biochemistry* 33, 7971-8 (1994).
- Cowan, S.W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Paupit, R.A., Jansonius, J.N. & Rosenbusch, J.P.: Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins. *Nature* 358, 727-33 (1992).
- Crompton, M.: The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* 341, 233-49 (1999).
- Crompton, M.: Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J. Physiol.* 529, 11-21 (2000).
- Cuervo, A.M. & Dice, J.F.: A receptor for selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273, 501-3 (1996).
- Dahms, N.M., Lobel, P. & Breitmeyer, J., *et al.*: 46 kd mannose 6-phosphate receptor: cloning, expression, and homology to the 215 kd mannose 6-phosphate receptor. *Cell* 50, 181-92 (1987).
- Dahms, N.M., Lobel, P. & Kornfeld, S.: Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting. *J. Biol. Chem.* 264, 12115-8 (1989).
- De Duve, C.R. *et al.*: Tissue fractionation studies. Intracellular distribution pattern of enzymes in rat liver tissue. *Biochem. J.* 60, 604-617 (1955).
- Dietrich, O., Gallert, F. & Hasilik, A.: Purification of lysosomal membrane proteins from human placenta. *Eur. J. Cell Biol.* 69, 99-106 (1996).
- Dietrich, O.: Reinigung lysosomaler Membranproteine und Untersuchung eines Sialinsäurebindenden Proteins. Dissertation, Universität Bonn (1996).
- Dietrich, O., Mills, K., Johnson, A.W., Hasilik, A. & Winchester, B.G.: Application of magnetic chromatography to the isolation of lysosomes from fibroblasts of patients with lysosomal storage disorders. *FEBS Lett.* 441, 369-72 (1998).
- Dobrota, M. & Hinton, R.H.: Large-scale preparation of highly purified lysosomes from normal rat liver. *Anal. Biochem.* 102, 97-102 (1980).
- Dong, M., Baggetto, L.G., Falson, P., Le Maire, M. & Penin, F.: Complete removal and exchange of sodium dodecyl sulfate bound to soluble and membrane proteins and restoration of their activities, using ceramic hydroxyapatite chromatography. *Anal. Biochem.* 247, 333-41 (1997).
- D'Souza, M.P., Ambudkar, S.V., August, J.T. & Maloney, P.C.: Reconstitution of the lysosomal proton pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 84, 6980-4 (1987).

- Dunn, W.A. Jr.: Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110, 1923-33 (1990a).
- Dunn, W.A. Jr.: Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.* 110, 1935-45 (1990b).
- Elmore, S.P., Qian, T., Trost, L.C., Nishimura, Y., Herman, B. & Lemasters, J.J.: Detection of mitochondrial depolarization during autophagy by confocal fluorescence resonance energy transfer (CFRET). *Cell Vision J. Anal. Morphol.* 4, 170-71(1997).
- Ernster, L. & Dallner, G.: Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim. Biophys. Acta.* 1271, 195-204 (1995).
- Eskes, R., Antonsson, B., Osen-Sand, A., Montessuit, S., Richter, C., Sadoul, R., Mazzei, G., Nichols, A. & Martinou, J.C.: Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J. Cell Biol.* 143, 217-24 (1998).
- Fambrough, D.M., Takeyasu, K., Lippincott-Schwartz, J. Spiegel, N.R. & Sommerville, D.: Structure of LEP100, a glycoprotein that shuttles between lysosomes and plasma membrane, deduced from the nucleotide sequence of the encoding cDNA. *J. Cell. Biol.* 106, 61-67 (1988).
- Fengsrud, M., Erichsen, E.S., Berg, T.O., Raiborg, C. & Seglen, P.O.: Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *Eur. J. Cell Biol.* 79, 871-82 (2000).
- Ferrer, J., Aoki, M., Behn, P., Nestorowicz, A., Riggs, A. & Permutt, M.A.: Mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. Cloning of an alternatively spliced human islet-cell cDNA, tissue distribution, physical mapping, and identification of a polymorphic genetic marker. *Diabetes* 45, 262-6 (1996).
- Filppula, S.A., Yagi, A.I., Kilpelainen, S.H., Novikov, D., FitzPatrick, D.R., Vihinen, M., Valle, D. & Hiltunen, J.K.: Delta3,5-delta2,4-dienoyl-CoA isomerase from rat liver. Molecular characterization. *J. Biol. Chem.* 273, 349-55 (1998).
- Finbow, M.E. & Harrison, M.A.: The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *Biochem. J.* 324, 697-712 (1997).
- Finocchiaro, G., Ito, M., Ikeda, Y. & Tanaka, K.: Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNAs encoding the alpha-subunit of human electron transfer flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 263, 15773-80 (1988).
- FitzPatrick, D.R., Germain-Lee, E. & Valle, D.: Isolation and characterization of rat and human cDNAs encoding a novel putative peroxisomal enoyl-CoA hydratase. *Genomics* 27, 457-66 (1995).
- Fleming, M.D., Campagna, D.R., Haslett, J.N., Trenor, C.C. 3rd & Andrews, N.C.: A mutation in a mitochondrial transmembrane protein is responsible for the pleiotropic hematological and skeletal phenotype of flexed-tail (f/f) mice. *Genes Dev.* 15, 652-7(2001).
- Forsyth, I.A.: Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function: the roles of prolactin, growth hormone, and placental lactogen. *J. Dairy Sci.* 69, 886-903 (1986).
- Fowler, B.: Genetic defects of folate and cobalamin metabolism. *Eur. J. Pediatr.* 157, 60-6 (1998).

- Fujita, H., Ezaki, J., Noguchi, Y., Kono, A., Himeno, M. & Kato, K.: Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 85kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 604-11 (1992).
- Fukuda, M., Viitala, J., Matteson, J. & Carlsson, S.R.: Cloning of cDNAs encoding human lysosomal membrane glycoproteins h-lamp-1 and h-lamp-2. *J. Biol. Chem.* 263, 18920-1928 (1988).
- Fukuda, M.: Lysosomal membrane glycoproteins: Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* 266, 21327-330 (1991).
- Gahl, W.A., Bashan, N., Tietze, F., Bernardini, I. & Schulman, J.D.: Cystine transport is defective in isolated leukocyte lysosomes from patients with cystinosis. *Science* 217, 1263-5 (1982).
- Garrib, A. & McMurray, W.C.: Cell-free synthesis of a putative precursor to the rat liver mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 263, 19821-6 (1988).
- Gasnier, F., Rousson, R., Lerme, F., Vaganay, E., Louisot, P. & Gateau-Roesch, O.: Use of Percoll gradients for isolation of human placenta mitochondria suitable for investigating outer membrane proteins. *Anal. Biochem.* 212, 173-8 (1993).
- Gille, L. & Nohl, H.: The existence of a lysosomal redox chain and the role of ubiquinone. *Arch. Biochem. Biophys.* 375, 347-54 (2000).
- Glickman, J.N. & Kornfeld, S.: Mannose 6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts. *J. Cell Biol.* 123, 99-108 (1993).
- Gorlich D. & Rapoport, T.A.: Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* 75, 615-30 (1993).
- Gottschalk, S., Waheed, A., Schmidt, B., Laidler, P. & von Figura, K.: Sequential processing of lysosomal acid phosphatase by a cytoplasmatic thiol proteinase and a lysosomal asaryl proteinase. *EMBO J.* 8, 3215-19 (1989).
- Gough, N.R., Hatem, C.L. & Fambrough, D.M.: The family of LAMP-2 proteins arises by alternative splicing from a single gene: characterization of the avian LAMP-2 gene and identification of mammalian homologs of LAMP-2b and LAMP-2c. *DNA Cell Biol.* 14, 863-7 (1995).
- Granger, B.L., Green, S.A., Gabel, C.A., Howe, C. L., Mellman, I. & Helenius, A.: Characterization and cloning of lgp110, a lysosomal membrane glycoprotein from mouse and rat cells. *J. Biol. Chem.* 265, 12036-43 (1990).
- Grassel, S., Roling, A. & Hasilik, A.: Immunoprecipitation of labeled antigens with Eupergit C1Z. *Anal. Biochem.* 180, 72-8 (1989).
- Grassel, S. & Hasilik, A.: Human cathepsin D precursor is associated with a 60 kDa glycosylated polypeptide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 182, 276-82 (1992).
- Gretz, N., Manz, F., Augustin, R., Barrat, T.M., *et al.*: Survival time in cystinosis. A collaborative study. *Proc. Eur. Dial. Transplant. Assoc.* 19, 582-9 (1983).
- Griffiths, G., Hoflack, B., Simons, K., Mellman, I. & Kornfeld, S.: The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* 52, 329-41 (1988).
- Griffiths, G. & Gruenberg, J.: The arguments for pre-existing early and late endosomes. *Trends Cell Biol.* 1, 5-9 (1991).
- Griffith, G. & Simons, K.: The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science* 234, 438-443 (1986).

- Gross, J.B. Jr., Myers, B.M., Kost, L.J., Kuntz, S.M. & LaRusso, N.F.: Biliary copper excretion by hepatocyte lysosomes in the rat. Major excretory pathway in experimental copper overload. *J. Clin. Invest.* 83, 30-9 (1989).
- Grüneberg, H.: The anaemia of flexed-tail mice (*Mus musculus* L.): I. Static and dynamic haematology. *J. Genet.* 43, 45-68 (1942a).
- Grüneberg, H.: The anaemia of flexed-tail mice (*Mus musculus* L.): II. Siderocytes. *J. Genet.* 44, 246-71 (1942a).
- Gutierrez de Rubalcava, C., Rodriguez, J.L., Duro, R., Alvarez-Lorenzo, C., Concheiro, A. & Seijo, B.: Interactions between liposomes and hydroxypropylmethylcellulose. *Int. J. Pharm.* 203, 99-108 (2000).
- Haataja, L., Schleutker, J., Laine, A.P., Renlund, M., Savontaus, M.L., Dib, C., Weissenbach, J., Peltonen, L. & Aula, P.: The genetic locus for free sialic acid storage disease maps to the long arm of chromosome 6. *Am. J. Hum. Genet.* 54, 1042-9 (1994).
- Haller, T., Volkl, H., Deetjen, P. & Dietl, P.: The lysosomal Ca²⁺ pool in MDCK cells can be released by ins(1,4,5)P₃-dependent hormones or thapsigargin but does not activate store-operated Ca²⁺ entry. *Biochem. J.* 319, 909-12 (1996).
- Hamasaki, K., Doi, Y., Yokoyama, M., Kashimura, M. & Fujimoto, S.: Immunoelectron microscopy of human chorionic gonadotropin (hCG) and human placental lactogen (hPL) in the syncytiotrophoblast of human placenta, clarifying the nature of the so-called large dense bodies. *Med. Electron Microsc.* 26, 133-138 (1993).
- Harper, G.S., Kohn, L.D., Bernardini, I., Bernar, J., Tietze, F., Andersson, H.C. & Gahl, W.A.: Thyrotropin stimulation of lysosomal tyrosine transport in rat FRTL-5 thyroid cells. *J. Biol. Chem.* 263, 9320-5 (1988).
- Hasilik, A. & Neufeld, E.F.: Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight. *J. Biol. Chem.* 255, 4937-45 (1980).
- Hasilik, A.: The early and late processing of lysosomal enzymes: Proteolysis and compartmentation. *Experientia* 48, 130-51 (1992).
- Hatem, C.L., Gough, N.R. & Fambrough, D.M.: Multiple mRNAs encode the avian lysosomal membrane protein LAMP-2, resulting in alternative transmembrane and cytoplasmic domains. *J. Cell Sci.* 108, 2093-100 (1995).
- Havelaar, A.C., Mancini, G.M., Beerens, C.E., Souren, R.M. & Verheijen, F.W.: Purification of the lysosomal sialic acid transporter. Functional characteristics of a monocarboxylate transporter. *J. Biol. Chem.* 273, 34568-74 (1998).
- Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C. & Watanabe, C: Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90, 5011-5 (1993).
- Heukeshoven, J. & Dernick, R.: Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32 (1988).
- Hille-Rehfeld, A.: Mannose 6-phosphate receptors in sorting and transport of lysosomal enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1241, 177-94 (1995).
- Himeno, M., Noguchi, Y., Sasaki, H., Tanaka, Y., Furuno, K., Kono, A., Sakaki, Y. & Kato, K.: Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding 107 kDa sialoglycoprotein in rat liver lysosomal membranes. *FEBS Lett.* 244, 351-56 (1989).

- Hinsch, K.D., Asmarinah, Hinsch, E. & Konrad, L.: VDAC2 (porin-2) expression pattern and localization in the bovine testis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1518, 329-33 (2001).
- Hoffman, G.G., Lee, S., Christiano, A.M., Chung-Honet, L.C., Cheng, W., Katchman, S., Uitto, J. & Greenspan, D.S.: Complete coding sequence, intron/exon organization, and chromosomal location of the gene for the core I protein of human ubiquinol-cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.* 268, 21113-9 (1993).
- Holliday, L.S., Lu, M., Lee, B.S., Nelson, R.D., Solivan, S., Zhang, L. & Gluck, S.L.: The amino-terminal domain of the B subunit of vacuolar H⁺-ATPase contains a filamentous actin binding site. *J. Biol. Chem.* 275, 32331-7 (2000).
- Hopkins, C.R., Gibson, A., Shipman, M. & Miller, K.: Movement of internalized ligand-receptor complexes along a continuous endosomal reticulum. *Nature* 346, 335-9 (1990).
- Howe, C.L., Granger, B.L., Hull, M., Green, S.A., Gabel, C.A., Helenius, A. & Mellman, I.: Derived protein sequence, oligosaccharides, and membrane insertion of the 120 kD lysosomal membrane glycoprotein lgp120: identification of a highly conserved family of lysosomal membrane glycoproteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 7577-81 (1988).
- Hunziker, W. & Geuze, H.J.: Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins. *BioEssays* 18, 379-89 (1995).
- Ichas, F., Jouaville, L.S. & Mazat, J.P.: Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* 89, 1145-53 (1997).
- Idriss, J.M. & Jonas, A.J.: Vitamin B12 transport by rat liver lysosomal membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 266, 9438-41 (1991).
- Ikeda, Y., Keese, S.M. & Tanaka K.: Biosynthesis of electron transfer flavoprotein in a cell-free system and in cultured human fibroblasts. Defect in the alpha subunit synthesis is a primary lesion in glutaric aciduria type II. *J. Clin. Invest.* 78, 997-1002 (1986).
- Imai, K.: Characterization of beta-glucosidase as a peripheral enzyme of lysosomal membranes from mouse liver and purification. *J. Biochem. (Tokyo)* 98, 1405-16 (1985).
- Jadot, M., Wattiaux, R., Mainferme, F., Dubois, F., Claessens, A. & Wattiaux-De Coninck, S.: Soluble form of Lamp II in purified rat liver lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223, 353-9 (1996).
- Jadot, M., Dubois, F., Wattiaux-De Coninck, S. & Wattiaux, R.: Supramolecular assemblies from lysosomal matrix proteins and complex lipids. *Eur. J. Biochem.* 249, 862-9 (1997).
- Jonas, A.J., Smith, M.L. & Schneider, J.A.: ATP-dependent lysosomal cystine efflux is defective in cystinosis. *J. Biol. Chem.* 257, 13185-8 (1982).
- Jonas, A.J.: Studies of lysosomal sialic acid metabolism: retention of sialic acid by Salla disease lysosomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137, 175-81 (1986).
- Jonas, A.J., Speller, R.J., Conrad, P.B. & Dubinsky, W.P.: Transport of N-acetyl-D-glucosamine and N-acetyl-D-galactosamine by rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* 264, 4953-6 (1989).
- Jonas, A.J. & Jobe, H.: Sulfate transport by rat liver lysosomes. *J. Biol. Chem.* 265, 17545-9 (1990).
- Jonsson, L.M., Murray, G.J., Sorrell, S.H., Strijland, A., Aerts, J.F., Ginns, E.I., Barranger, J.A., Tager, J.M. & Schram, A.W.: Biosynthesis and maturation of glucocerebrosidase in Gaucher fibroblasts. *Eur. J. Biochem.* 164, 171-9 (1987).

- Junaid, M.A., Wu, G. & Pullarkat, R.K.: Purification and characterization of bovine brain lysosomal pepstatin-insensitive proteinase, the gene product deficient in the human late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J. Neurochem.* 74, 287-94 (2000).
- Kamrath, F.J., Dodt, G., Debuch, H. & Uhlenbruck, G.: The isolation of lysosomes from normal rat liver by affinity chromatography. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 365, 539-47 (1984).
- Kapadia, C.R.: Vitamin B12 in health and disease: part I--inherited disorders of function, absorption, and transport. *Gastroenterologist* 3, 329-44 (1995).
- Kaplan, R.S., Mayor J.A., Johnston, N. & Oliveira, D.L.: Purification and characterization of the reconstitutively active tricarboxylate transporter from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265, 13379-85 (1990).
- Karlsson, K. & Carlsson, S.R.: Sorting of lysosomal membrane glycoproteins lamp-1 and lamp-2 into vesicles distinct from mannose 6-phosphate receptor/ γ -adaptin vesicles at the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* 273, 18966-73 (1998).
- Kaul, S.C., Mitsui, Y. & Wadhwa, R.: Molecular insights to cellular mortality and immortalization. *Indian J. Exp. Biol.* 36, 345-52 (1998).
- Kaul, S.C., Takano, S., Reddel, R.R., Mitsui, Y. & Wadhwa, R.: Transcriptional inactivation of p53 by deletions and single amino acid changes in mouse mot-1 protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 602-6 (2000).
- Kitajima, S. & Minakami, S.: Human NADH-cytochrome b5 reductases: comparison among those of erythrocyte membrane, erythrocyte cytosol, and liver microsomes. *J. Biochem. (Tokyo)* 93, 615-20 (1983).
- Klein, U., Kresse, H. & von Figura, K.: Sanfilippo syndrome type C: deficiency of acetyl-CoA:alpha-glucosaminide N-acetyltransferase in skin fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 75, 5185-9 (1978).
- Klionsky, D.J. & Emr, S.D.: Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290, 1717-21 (2000).
- Koike, M. & Koike, K.: Structure, assembly and function of mammalian alpha-keto acid dehydrogenase complexes. *Adv. Biophys.* 9, 187-227 (1976).
- Kolbe, H.V., Costello, D., Wong, A., Lu, R.C. & Wohlrab, H.: Mitochondrial phosphate transport. Large scale isolation and characterization of the phosphate transport protein from beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 259, 9115-20 (1984).
- Kominami, E., Hashida, S., Khairallah, E.A. & Katamura, N.: Sequestration of cytoplasmic enzymes in autophagic vacuole-lysosomal system induced by injection of leptin. *J. Biol. Chem.* 258, 6093-100 (1983).
- Koetters, P.J., Chou, H.F. & Jonas, A.J.: Lysosomal sulfate transport: inhibitor studies. *Biochim. Biophys. Acta.* 1235, 79-84 (1995a).
- Koetters, P.J., Chou, H.F. & Jonas, A.J.: Reconstitution of lysosomal sulfate transport in proteoliposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1244, 311-6 (1995b).
- Kornfeld, S.: Structure and function of the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 307-330 (1992).
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S.: Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 631-64 (1985).
- Kubota, S., Gunji, K., Ackrell, B.A., Cochran, B., Stolarski, C., Wengrowicz, S., Kennerdell, J.S., Hiromatsu & Y., Wall, J.: The 64-kilodalton eye muscle protein is the flavoprotein

- subunit of mitochondrial succinate dehydrogenase: the corresponding serum antibodies are good markers of an immune-mediated damage to the eye muscle in patients with Graves' hyperthyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 443-7 (1998).
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5 (1970).
- Lancaster, C.R. & Kröger, A.: Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures. *Biochim. Biophys. Acta.* **1459**, 422-31 (2000).
- Le Borgne, R. & Hoflack, B.: Mechanisms of protein sorting and coat assembly: insights from the clathrin-coated vesicle pathway. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10**, 499-503 (1998).
- Lee, N., Wang, W.C. & Fukuda, M.: Granulocytic differentiation of HL-60 cells is associated with increase of poly-N-acetyllactosamine in Asn-linked oligosaccharides attached to human lysosomal membrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* **265**, 20476-87 (1990).
- Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A. & Herman, B.: The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta.* **1366**, 177-96 (1998).
- Lemons, R.M. & Thoene, J.G.: Mediated calcium transport by isolated human fibroblast lysosomes. *J. Biol. Chem.* **266**, 14378-82 (1991).
- Leonard, K., Wingfield, P., Arad, T. & Weiss, H.: Three-dimensional structure of ubiquinol:cytochrome c reductase from *Neurospora* mitochondria determined by electron microscopy of membrane crystals. *J. Mol. Biol.* **149**, 259-74 (1981).
- Linn, T.C.: Studies on the apparent instability of bovine kidney alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* **161**, 505-14 (1974).
- Liscum, L., Ruggiero, R.M. & Faust, J.R.: The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts. *J. Cell Biol.* **108**, 1625-36 (1989).
- Lloyd, J.B.: Disulphide reduction in lysosomes. The role of cysteine. *Biochem. J.* **237**, 271-2 (1986).
- Lobel, P., Fujimoto, K., Ye, R.D., Griffith, G. & Kornfeld, S.: Mutations in the cytoplasmic domain of the 275 kd mannose 6-phosphate receptor differentially alter lysosomal enzyme sorting and endocytosis. *Cell* **57**, 787-96 (1989).
- Maas, E. & Bisswanger, H.: Localization of the alpha-oxoacid dehydrogenase multienzyme complexes within the mitochondrion. *FEBS Lett.* **277**, 189-90 (1990).
- MacDonald, M.J. & Brown, L.J.: Calcium activation of mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase restudied. *Arch. Biochem. Biophys.* **326**, 79-84 (1996).
- Mancini, G.M., de Jonge, H.R., Galjaard, H. & Verheijen, F.W.: Characterization of a proton-driven carrier for sialic acid in the lysosomal membrane. Evidence for a group-specific transport system for acidic monosaccharides. *J. Biol. Chem.* **264**, 15247-54 (1989).
- Mancini, G.M., Beerens, C.E. & Verheijen, F.W.: Glucose transport in lysosomal membrane vesicles. Kinetic demonstration of a carrier for neutral hexoses. *J. Biol. Chem.* **265**, 12380-7 (1990).
- Mancini, G.M., Beerens, C.E., Aula, P.P. & Verheijen, F.W.: Sialic acid storage diseases. A multiple lysosomal transport defect for acidic monosaccharides. *J. Clin. Invest.* **87**, 1329-35 (1991).

- Mancini, G.M., Beerens, C.E., Galjaard, H. & Verheijen, F.W.: Functional reconstitution of the lysosomal sialic acid carrier into proteoliposomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 89, 6609-13 (1992).
- Mannella, C.A., Forte, M. & Colombini, M.: Toward the molecular structure of the mitochondrial channel, VDAC. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24, 7-19 (1992).
- Marugg, R.A., Gehr, P. & de Leeuw, M.: Secondary lysosomes as an integral part of the cytoskeleton: a morphological study in rat Kupffer cells.
J. Struct. Biol. 105, 146-53 (1990).
- Marzella, L. & Glaumann, H.: in Lysosomes: Their role in protein breakdown.
Herausgegeben von H. Glaumann und F.J. Ballard. Academic Press Inc., Orlando, FL. 319-67 (1987).
- Matuda, S., Kodama, J., Goshi, N., Takase, C., Nakano, K., Nakagawa, S. & Ohta, S.: A polypeptide derived from mitochondrial dihydrolipoamide succinyltransferase is located on the plasma membrane in skeletal muscle.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 241, 151-6 (1997).
- Mehrabian, M., Bame, K.J. & Rome L.H.: Interaction of rat liver lysosomal membranes with actin. *J. Cell Biol.* 99, 680-5 (1984).
- Mellmann, I.: Endocytosis and molecular sorting.
Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 12, 575-625 (1996).
- Metzelaar, M.J., Wijngaard, P.L., Peters, P.J., Sixma, J.J., Niewenhuis, H.K. & Clevers, H.C.: CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukariotic cells. *J. Biol. Chem.* 266, 3239-45 (1991).
- Michea-Hamzehpour, M., Sanchez, J.C., Epp, S.F., Paquet, N., Hughes, G.J., Hochstrasser, D. & Pechere, J.C.: Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis isolation and microsequencing of *Pseudomonas aeruginosa* proteins. *Enzyme Protein* 47, 1-8 (1993).
- Midura, R.J. & Yanagishita, M.: Chaotropic solvents increase the critical micellar concentrations of detergents. *Anal. Biochem.* 228, 318-22 (1995).
- Mitchell, P.: Translocations through natural membranes.
Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 29, 33-87 (1967).
- Mixter, R. & Hunt, H.R.: Anemia in the flexed-tailed mouse, *Mus musculus*.
Genetics 18, 367-87 (1993).
- Miyamoto, H., Homma, M. & Hotta, H.: Molecular cloning of the murine homologue of CD63/ME491 and detection of its strong expression in the kidney and activated macrophages. *Biochim. Biophys. Acta.* 1217, 312-6 (1994).
- Molloy, M.P., Herbert, B.R., Walsh, B.J., Tyler, M.I., Traini, M., Sanchez, J.C., Hochstrasser, D.F., Williams, K.L. & Gooley, A.A.: Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis.
Electrophoresis 19, 837-44 (1998).
- Morales, C.R., Zhao, Q. & Lefrancois, S.: Review: biogenesis of lysosomes by endocytic flow of plasma membrane. *BIOCELL* 23, 149-60 (1999).
- Mori, M. & Terada, K.: Mitochondrial protein import in animals.
Biochim. Biophys. Acta. 1403, 12-27 (1998).
- Morton, A.J. & Goldspink, D.F.: Protein turnover in the rat uterus during and after pregnancy.
Prog. Clin. Biol. Res. 180, 641-3 (1985).

- Murakami, K., Yubisui, T., Takeshita, M. & Miyata, T.: The NH₂-terminal structures of human and rat liver microsomal NADH-cytochrome b₅ reductases. *J. Biochem. (Tokyo)* **105**, 312-7 (1989).
- Nelson, D.M.: Apoptotic changes occur in syncytiotrophoblast of human placental villi where fibrin type fibrinoid is deposited at discontinuities in the villous trophoblast. *Placenta* **17**, 387-91 (1996).
- Newmeyer, D.D., Farschon, D.M. & Reed, J.C.: Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell* **79**, 353-64 (1994).
- Nguyen, D.N., Becker, G.W. & Riggin, R.M.: Protein mass spectrometry: applications to analytical biotechnology. *J. Chromatogr. A.* **705**, 21-45 (1995).
- Nikaido, H. & Saier, M.H. Jr.: Transport proteins in bacteria: common themes in their design. *Science* **258**, 936-42 (1992).
- Nishikata, H., Oliver, C., Mergenhagen, S.E. & Siraganian, R.P.: The rat mast cell antigen AD1 (homologue to human CD63 or melanoma antigen ME491) is expressed in other cells in culture. *J. Immunol.* **149**, 862-70 (1992).
- Nore, B.F., Harrison, M.A., Keen, J.N. & Allen, J.F.: Partial purification of a cyanobacterial membrane protein with amino terminal sequence similarity to the N-methylphenylalanine pilins. *Acta. Chem. Scand.* **48**, 578-81 (1994).
- Novikoff, A.B. *et al.* (1956): Electron microscopy of lysosome-rich fractions from rat liver. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **2 Suppl.**, 179-84 (1956).
- Novikoff, A.B.: Golgi apparatus and lysosomes, in Symposium on Lysosomes. *Fed. Proc.* **23**, 1010-22 (1964).
- Odorizzi, G., Cowles, C.R. & Emr, S.D.: The AP-3 complex: a caot of many colours. *Trends Cell Biol.* **8**, 282-88 (1998).
- O'Farrell, P.H.: High resolution two-dimensional *Electrophoresis* of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**, 4007-21 (1975).
- Ogata, S. & Fukuda, M.: Lysosomal targeting of Limp II membrane glycoprotein requires a novel Leu-Ile motif at a paticular position in its cytoplasmic tail. *J. Biol. Chem.* **269**, 5210-17 (1994).
- Ohshita, T. & Kido, H.: Simple preparation of rat brain lysosomes and their proteolytic properties. *Anal. Biochem.* **230**, 41-7 (1995).
- Ohkuma, S., Moriyama, Y. & Takano, T.: Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein-isothiocyanate-dextran fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **79**, 2758-62 (1982).
- Pandey, A. & Mann, M.: Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**, 837-46 (2000).
- Pasquali, C., Fialka, I. & Huber, L.A.: Preparative two-dimensional gel electrophoresis of membrane proteins. *Electrophoresis* **18**, 2573-81 (1997).
- Pastorino, J.G., Tafani, M., Rothman, R.J., Marcinkeviciute, A., Hoek, J.B., Farber, J.L. & Marcineviciute, A.: Functional consequences of the sustained or transient activation by Bax of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* **274**, 31734-9 (1999).
- Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K. & Saier, M.H. Jr.: Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *J. Mol. Biol.* **277**, 573-92 (1998).

- Pellett, O.L., Smith, M.L., Greene, A.A. & Schneider, J.A.: Lack of complementation in somatic cell hybrids between fibroblasts from patients with different forms of cystinosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 85, 3531-4 (1988).
- Peters, C., Braun, M., Weber, B., Wendland, M., Schmidt, B., Pohlmann, R., Waheed, A. & von Figura, K.: Targeting of a lysosomal membrane protein: a tyrosine-containing endocytosis signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase is necessary and sufficient for targeting to lysosomes. *EMBO J.* 9, 3497-506 (1990).
- Pentchev, P.G., Blanchette-Mackie, E.J. & Liscum, L.: Biological implications of the Niemann-Pick C mutation. *Subcell Biochem.* 28, 437-51 (1997).
- Pertoft, H., Laurent, T.C., Laas, T. & Kagedal, L.: Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Anal. Biochem.* 88, 271-82 (1978).
- Pisoni, R.L., Thoene, J.G. & Christensen, H.N.: Detection and characterization of carrier-mediated cationic amino acid transport in lysosomes of normal and cystinotic human fibroblasts. Role in therapeutic cystine removal? *J. Biol. Chem.* 260, 4791-8 (1985).
- Pisoni, R.L., Thoene, J.G., Lemons, R.M. & Christensen, H.N.: Important differences in cationic amino acid transport by lysosomal system c and system y⁺ of the human fibroblast. *J. Biol. Chem.* 262, 15011-8 (1987a).
- Pisoni, R.L., Flickinger, K.S., Thoene, J.G. & Christensen, H.N.: Characterization of carrier-mediated transport systems for small neutral amino acids in human fibroblast lysosomes. *J. Biol. Chem.* 262, 6010-7 (1987b).
- Pisoni, R.L. & Thoene, J.G.: Detection and characterization of a nucleoside transport system in human fibroblast lysosomes. *J. Biol. Chem.* 264, 4850-6 (1989).
- Pisoni, R.L., Acker, T.L., Lisowski, K.M., Lemons, R.M. & Thoene, J.G.: A cysteine-specific lysosomal transport system provides a major route for the delivery of thiol to human fibroblast lysosomes: possible role in supporting lysosomal proteolysis. *J. Cell Biol.* 110, 327-35 (1990).
- Pisoni, R.L.: Characterization of a phosphate transport system in human fibroblast lysosomes. *J. Biol. Chem.* 266, 979-85 (1991).
- Pisoni, R.L., Park, G.Y., Velilla, V.Q. & Thoene, J.G.: Detection and characterization of a transport system mediating cysteamine entry into human fibroblast lysosomes. Specificity for aminoethylthiol and aminoethylsulfide derivatives. *J. Biol. Chem.* 270, 1179-84 (1995).
- Pisoni, R.L. & Velilla, V.Q.: Evidence for an essential histidine residue located in the binding site of the cysteine-specific lysosomal transport protein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1236, 23-30 (1995).
- Pohlmann, R., Krentler, C., Schmidt, B., Schroeder, W., Lorkowski, G., Culley, J., Mersmann, G., Geier, C., Waheed, A., Gottschalk, S., Grzeschik, K.H., Hasilik, A. & von Figura, K.: Human lysosomal acid phosphatase: cloning, expression and chromosomal assignment. *EMBO J.* 7, 2343-50 (1988).
- Rabilloud, T.: Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* 11, 785-94 (1990).
- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., Lunardi, J.: Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18, 307-16 (1997).

- Radons, J., Isidoro, C. & Hasilik, A.: Brefeldin A prevents uncovering but not phosphorylation of the recognition marker in cathepsin D. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 371, 567-73 (1990).
- Rahmani, Z., Maunoury, C. & Siddiqui, A.: Isolation of a novel human voltage-dependent anion channel gene. *Eur. J. Hum. Genet.* 6, 337-40 (1998).
- Ran, Q., Wadhwa, R., Kawai, R., Kaul, S.C., Sifers, R.N., Bick, R.J., Smith, J.R. & Pereira-Smith, O.M.: Extramitochondrial localization of mortalin/mthsp70/PBP74/GRP75. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 174-9 (2000).
- Rapoport, T.A., Gorlich, D., Musch, A., Hartmann, E., Prehn, S., Wiedmann, M., Otto, A., Kostka, S. & Kraft, R.: Components and mechanism of protein translocation across the ER membrane. *Antonie Van Leeuwenhoek* 61, 119-22 (1992).
- Reeves, J.P.: Accumulation of amino acids by lysosomes incubated with amino acid methyl esters. *J. Biol. Chem.* 254, 8914-21 (1979).
- Reddy, M.C. & Harris, E.D.: Multiple transcripts coding for the menkes gene: evidence for alternative splicing of Menkes mRNA. *Biochem. J.* 334, 71-7 (1998).
- Renlund, M., Tietze, F. & Gahl, W.A.: Defective sialic acid egress from isolated fibroblast lysosomes of patients with Salla disease. *Science* 232, 759-62 (1986).
- Reymann, S., Haase, W., Krick, W., Burckhardt, G. & Thinning, F.P.: Endosomes: another extra-mitochondrial location of type-1 porin/voltage-dependent anion-selective channels. *Pflugers Arch.* 436, 478-80 (1998).
- Riggle, P.J. & Kumamoto, C.A.: Role of a *Candida albicans* P1-type ATPase in resistance to copper and silver ion toxicity. *J. Bacteriol.* 182, 4899-905 (2000).
- Rijnboutt, S., Aerts, H.M.F.G., Geuze, H.J., Targer, J. & Strouss, G.J.: Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepin D, glucocerebroside and sphingolipid-activating protein. *J. Biol. Chem.* 266, 4862-8 (1991).
- Riordan, J.F.: Arginyl residues and anion binding sites in proteins. *Mol. Cell. Biochem.* 26, 71-92 (1979).
- Rome, L.H., Garvin, A.J., Allietta & M.M., Neufeld, E.F.: Two species of lysosomal organelles in cultured human fibroblasts. *Cell* 17, 143-53 (1979).
- Rosenblatt, D.S., Hosack, A., Matiaszuk, N.V., Cooper, B.A. & Laframboise, R.: Defect in vitamin B12 release from lysosomes: newly described inborn error of vitamin B12 metabolism. *Science* 228, 1319-21 (1985).
- Rostovtseva, T. & Colombini, M.: ATP flux is controlled by a voltage-gated channel from the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* 271, 28006-8 (1996).
- Rouillé, Y., Rohn, W. & Hoflack, B.: Targeting of lysosomal proteins. *J. Cell. Dev. Biol.* 11, 165-71 (2000).
- Rougraff, P.M., Paxton, R., Kuntz, M.J., Crabb, D.W. & Harris, R.A.: Purification and characterization of 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase from rabbit liver. *J. Biol. Chem.* 263, 327-31 (1988).
- Rouquié, D., Peltier, J.B., Marquis-Mansion, M., Tournaire, C., Doumas, P. & Rossignol, M.: Construction of a directory of tobacco plasma membrane proteins by combined two-dimensional gel electrophoresis and protein sequencing. *Electrophoresis* 18, 654-60 (1997).

- Saier, M.H. Jr.: Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaned evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58, 71-93 (1994).
- Saier, M.H. Jr.: Molecular phylogeny as a basis for the classification of transport proteins from bacteria, archaea and eukarya. *Adv. Microb. Physiol.* 40, 81-136 (1998).
- Sandoval, I.V., Arredondo, J.J., Alcalde, J. *et al.*: The residues Leu(Ile)475-Ile(Leu, Val, Ala)476, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes. *J. Biol. Chem.* 269, 6622-31 (1994).
- Schleutker, J., Leppanen, P., Mansson, J.E., Erikson, A., Weissenbach, J., Peltonen, L. & Aula, P.: Lysosomal free sialic acid storage disorders with different phenotypic presentations--infantile-form sialic acid storage disease and Salla disease--represent allelic disorders on 6q14-15. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 893-901 (1995).
- Schmid, S.L.: Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting, an integrated process. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 511-48 (1997).
- Schneider, D.L.: ATP-dependent acidification of intact and disrupted lysosomes. Evidence for an ATP-driven proton pump. *J. Biol. Chem.* 256, 3858-64 (1981).
- Sedmak, J.J. & Grossberg, S.E.: A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal. Biochem.* 79, 544-52 (1977).
- Seglen, P. O.: Regulation of autophagic protein degradation in isolated liver cells, Herausgegeben von Glaumann, H. & Ballard, F. J; Academic Press, London: 369-414 (1987).
- Seppala, R., Tietze, F., Krasnewich, D., Weiss, P., Ashwell, G., Barsh, G., Thomas, G.H., Packman, S. & Gahl, W.A.: Sialic acid metabolism in sialuria fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 266, 7456-61 (1991).
- Shakin-Eshleman, S.H., Spitalnik, S.L. & Kasturi, L.: The amino acid at the X position at Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core-glycosylation efficiency. *J. Biol. Chem.* 271, 6363-66 (1996).
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M.: Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-8 (1996).
- Sinha, P.K. & Righetti, P.G.: Isoelectric focusing of sparingly soluble proteins in immobilized pH gradients, exemplified by microvillar membrane hydrolases. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 12, 289-97 (1986).
- Smith, R.E. & Farquhar, M.G.: Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. *J. Cell Biol.* 31, 319-47 (1966).
- Smith, M.L., Greene, A.A., Potashnik, R., Mendoza, S.A. & Schneider, J.A.: Lysosomal cystine transport. Effect of intralysosomal pH and membrane potential. *J. Biol. Chem.* 262, 1244-53 (1987).
- Smith, S.C., Baker, P.N. & Symonds, E.M.: Placental apoptosis in normal human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 177, 57-65 (1997).
- Sorgato, M.C. & Moran, O.: Channels in mitochondrial membranes: knowns, unknowns, and prospects for the future. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 127-71 (1993).
- Stahn, R., Maier, K.P. & Hannig, K.: A new method for the preparation of rat liver lysosomes. Separation of cell organelles of rat liver by carrier-free continuous electrophoresis. *J. Cell Biol.* 46, 576-91 (1970).

- Stewart, B.H., Collarini, E.J., Pisoni, R.L. & Christensen, H.N.: Separate and shared lysosomal transport of branched and aromatic dipolar amino acids. *Biochim. Biophys. Acta.* 987, 145-53 (1989).
- Strausak, D., La Fontaine, S., Hill, J., Firth, S.D., Lockhart, P.J. & Mercer, J.F.: The role of GMXCXXC metal binding sites in the copper-induced redistribution of the Menkes protein. *J. Biol. Chem.* 274, 11170-7 (1999).
- Symons, L.J. & Jonas, A.J.: Isolation of highly purified rat liver lysosomal membranes using two Percoll gradients. *Anal. Biochem.* 164, (1987) 382-90 .
- Takahashi, K.: The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.* 243, 6171-9 (1968).
- Takahashi, K.: Further studies on the reactions of phenylglyoxal and related reagents with proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* 81, 403-14 (1977).
- Takasaki, S., Murray, G.J., Furbish, F.S., Brady, R.O., Barranger, J.A. & Kobata, A.: Structure of the N-asparagine-linked oligosaccharide units of human placental beta-glucocerebrosidase. *J. Biol. Chem.* 259, 10112-7 (1984).
- Tal, M., Silberstein, A. & Nusser, E.: Why does Coomassie Brilliant Blue R interact differently with different proteins? A partial answer. *J. Biol. Chem.* 260, 9976-80 (1985).
- Tanner, A.J. & Dice, J.F.: Batten disease and mitochondrial pathways of proteolysis. *Biochem. Mol. Med.* 57, 1-9 (1996).
- ter Haar, E., Harrison, E. & Kirchhausen, T.: Peptide-in-groove interactions link target proteins to the beta-propeller of clathrin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 1096-100 (2000).
- Terlecky, S.R., Chiang, H.L., Olson, T.S. & Dice, J.F.: Protein and peptide binding and stimulation of in vitro lysosomal proteolysis by the 73-kDa heat shock cognate protein. *J. Biol. Chem.* 267, 9202-9 (1992).
- Terlecky, S.R. & Dice, J.F.: Polypeptide import and degradation by isolated lysosomes. *J. Biol. Chem.* 267, 23490-5 (1993).
- Teter, S.A. & Klionsky, D.J.: Transport of proteins to the yeast vacuole: autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting, and role of the vacuole in degradation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11, 173-9 (2000).
- Thamotharan, M., Lombardo, Y.B., Bawani, S.Z. & Adibi, S.A.: An active mechanism for completion of the final stage of protein degradation in the liver, lysosomal transport of dipeptides. *J. Biol. Chem.* 272, 11786-90 (1997).
- Thiet, M.P., Suwanvanichkij, V., Hasselblatt, K. & Yeh, J.: Apoptosis in human term placenta. A morphological and gene expression study. *Gynecol. Obstet. Invest.* 50, 88-91 (2000).
- Thoene, J.G., Oshima, R.G., Crawhall, J.C., Olson, D.L. & Schneider, J.A.: Cystinosis. Intracellular cystine depletion by aminothiols in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 58, 180-9 (1976).
- Tilly, B.C., Mancini, G.M., Bijman, J., van Gageldonk, P.G., Beerens, C.E., Bridges, R.J., de Jonge, H.R., Verheijen, F.W.: Nucleotide-activated chloride channels in lysosomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 254-60 (1992).
- Town, M., Jean, G., Cherqui, S., Attard, M., Forestier, L., Whitmore, S.A., Callen, D.F., Gribouval, O., Broyer, M., Bates, G.P., van't Hoff, W. & Antignac, C.: A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat. Genet.* 18, 319-24 (1998).

- Trumpower, B.L.: Cytochrome bc₁ complexes of microorganisms. *Microbiol. Rev.* 54, 101-29 (1990).
- Tsuji, S., Choudary, P.V., Martin, B.M., Winfield, S., Barranger, J.A. & Ginns, E.I.: Nucleotide sequence of cDNA containing the complete coding sequence for human lysosomal glucocerebrosidase. *J. Biol. Chem.* 261, 50-3 (1986).
- Tzagoloff, A., Wu, M.A. & Crivellone, M.: Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of COR1, the structural gene for the 44-kilodalton core protein of yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.* 261, 17163-9 (1986).
- Vadgama, J.V., Chang, K., Kopple, J.D., Idriss, J.M. & Jonas, A.J.: Characteristics of taurine transport in rat liver lysosomes. *J. Cell Physiol.* 147, 447-54 (1991).
- van Deurs, B., Holm, P.K., Kayser, L. & Sandvig, K.: Delivery to lysosomes in the human carcinoma cell line HEp-2 involves an actin filament-facilitated fusion between mature endosomes and preexisting lysosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 66, 309-23 (1995).
- van Hille, B., Vanek, M., Richener, H., Green, J.R. & Bilbe, G.: Cloning and tissue distribution of subunits C, D, and E of the human vacuolar H(+)-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 15-21 (1993).
- van Hille, B., Richener, H., Schmid, P., Puettner, I., Green, J.R. & Bilbe, G.: Heterogeneity of vacuolar H(+)-ATPase: differential expression of two human subunit B isoforms. *Biochem. J.* 303, 191-8 (1994).
- Van Weely, S., Aerts, J.M., Van Leeuwen, M.B., Heikoop, J.C., Donker-Koopman, W.E., Barranger, J.A., Tager, J.M. & Schram, A.W.: Function of oligosaccharide modification in glucocerebrosidase, a membrane-associated lysosomal hydrolase. *Eur. J. Biochem.* 191, 669-77 (1990).
- Vega, M.A., Segui-Real, B., Alcalde Garcia, J., Cales, C., Rodriguez, F., Vanderkerckhove, J. & Sandoval, I.V.: Cloning, sequencing, and expression of a cDNA encoding rat LIMP II, a novel 74-kDa lysosomal membrane protein related to the surface adhesion protein CD36. *J. Biol. Chem.* 266, 16818-24 (1991).
- Verheijen, F.W., Verbeek, E., Aula, N., Beerens, C.E., Havelaar, A.C., Joose, M., Peltonen, L., Aula, P., Galjaard, H., van der Spek, P.J. & Mancini, G.M.: A new gene, encoding an anion transporter, is mutated in sialic acid storage diseases. *Nat. Genet.* 23, 462-5 (1999).
- Viitala, J., Carlsson, S.R., Siebert, P.D. & Fukuda, M.: Molecular cloning of cDNAs encoding h-lamp-A, a human lysosomal membrane glycoprotein with apparent mass Mr ≈ 120.000. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 3743-47 (1988).
- Vila-Porcile, E., Picart, R., Olivier, L., Tixier-Vidal, A. & Tougard, C.: Subcellular distribution of laminin and prolactin in stimulated and blocked prolactin cells in the pituitary of lactating rats. *Cell Tissue Res.* 254, 617-27 (1988).
- von Figura, K.: Human alpha-N-acetylglucosaminidase. 1. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.* 80, 523-33 (1977).
- von Figura, K.: Molecular recognition and targeting of lysosomal proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 3, 642-46 (1991).
- Wadhwa, R., Kaul, S.C., Mitsui, Y. & Sugimoto, Y.: Differential subcellular distribution of mortalin in mortal and immortal mouse and human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 207, 442-8 (1993).
- Wadhwa, R., Pereira-Smith, O.M., Reddel, R.R., Sugimoto, Y., Mitsui, Y. & Kaul, S.C.: Correlation between complementation group for immortality and the cellular distribution of mortalin. *Exp. Cell Res.* 216, 101-6 (1995).

- Walker, J.E., Runswick, M.J. & Poulter, L.: ATP synthase from bovine mitochondria. The characterization and sequence analysis of two membrane-associated sub-units and of the corresponding cDNAs. *J. Mol. Biol.* 197, 89-100 (1987).
- Walker, J.E., Lutter, R., Dupuis, A. & Runswick, M.J.: Identification of the subunits of F1F0-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* 30, 5369-78 (1991).
- Watanabe, H., Grubb, J.H., & Sly, W.S.: The overexpressed human 46-kDa mannose 6-phosphate receptor mediates endocytosis and sorting of beta-glucuronidase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87, 8036-40 (1990).
- Watari, H., Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Watari, M., Neufeld, E.B., Patel, S., Pentchev, P.G. & Strauss, J.F. 3rd.: Mutations in the leucine zipper motif and sterol-sensing domain inactivate the Niemann-Pick C1 glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 274, 21861-6 (1999).
- Wattiaux, R., Wattiaux-De Coninck, S., Ronveaux-dupal, M.F. & Dubois, F.: Isolation of rat liver lysosomes by isopycnic centrifugation in a metrizamide gradient. *J. Cell Biol.* 78, 349-68 (1978).
- Watts, S.D., Zhang, Y., Fillingame, R.H. & Capaldi, R.A.: The gamma subunit in the Escherichia coli ATP synthase complex (ECF1F0) extends through the stalk and contacts the c subunits of the F0 part. *FEBS Lett.* 368, 235-8 (1995).
- Weber, G. & Bocek, P.: Recent developments in preparative free flow isoelectric focusing. *Electrophoresis* 19, 1649-53 (1998).
- Weissman, Z., Berdicevsky, I., Cavari, B.Z. & Kornitzer, D.: The high copper tolerance of Candida albicans is mediated by a P-type ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97, 3520-5 (2000).
- Wickner, W.T. & Lodish, H.F.: Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. *Science* 230, 400-7 (1985).
- Wilkens, S., Dunn, S.D. & Capaldi, R.A.: A cryoelectron microscopy study of the interaction of the Escherichia coli F1-ATPase with subunit b dimer. *FEBS Lett.* 354, 37-40 (1994).
- Wilkins, M.R., Sanchez, J.C., Williams, K.L. & Hochstrasser, D.F.: Current challenges and future applications for protein maps and post-translational vector maps in proteome projects. *Electrophoresis* 17, 830-8 (1996).
- Wolff, D.A. & Pertoft, H.: The purification of lysosomes from HeLa cells by centrifugation in colloidal silica density gradients. *Biochim. Biophys. Acta.* 286, 197-204 (1972).
- Youngdahl-Turner, P., Rosenberg, L.E. & Allen, R.H.: Binding and uptake of transcobalamin II by human fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 61, 133-41 (1978).
- Yu, W.H., Wolfgang, W. & Forte, M.: Subcellular localization of human voltage-dependent anion channel isoforms. *J. Biol. Chem.* 270, 13998-4006 (1995).
- Zara, V., Damiano, G., Franco, M.R., Siculella, L. & Gnoni, G.V.: Partial purification and reconstitution of the tricarboxylate carrier from eel liver mitochondria. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 39, 369-75 (1996).
- Zhang, F., Zhang, W., Liu, L., Fisher, C.L., Hui, D., Childs, S., Dorovini-Zis, K. & Ling, V.: Characterization of ABCB9, an ATP binding cassette protein associated with lysosomes. *J. Biol. Chem.* 275, 23287-94 (2000).
- Zhou, X., Thamocharan, M., Gangopadhyay, A., Serdikoff, C. & Adibi, S.A.: Characterization of an oligopeptide transporter in renal lysosomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1466, 372-8 (2000).
- Zhu, Y. & Conner, G.E.: Intermediate association of lysosomal protein precursors during biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 269, 3846-51 (1994).

Danksagung

Zuallererst möchte ich all denjenigen Danken, die an der Aufarbeitung humaner Plazenten beteiligt waren und den Stunden im Kühlraum getrotzt haben. Mein Dank richtet sich dabei sowohl an **Eva** und **Melanie**, die weiterhin auf dem aktuellsten Stand der Marburger Geburtenstatistik sein werden, als auch an alle ehemaligen Mitarbeiter (**Steffi, Silke, Verena** und **Ute**) ohne deren Einsatz meine Arbeit nicht denkbar gewesen wäre.

Danken möchte ich speziell auch **Thomas**, dessen Einsatz bei der Gelelektrophorese ein zuverlässiger Quell der Unterstützung war und nicht zuletzt auch durch die „Politik der ruhigen Hand“ von gleichbleibend guter Qualität war.

Allen weiteren Kollegen, im Besonderen **Traudel, Heinrich, Irena** und **Charlotte** danke ich für die viele Hilfe im Hintergrund. Danken möchte ich auch allen wissenschaftlichen Mitforschern des lysosomalen Verdauungstraktes für ihre kooperative Zusammenarbeit und die „gegenseitige (geistige) Befruchtung“ in vielen Seminaren. Besonderer Dank richtet sich dabei an **Brigitte, Eric, H.W.** und **Peter**, die mir in den Stunden des Zusammenschreibens und beim Durchlesen des Manuskripts mit Rat und Tat zur Seite standen. In angenehmer Erinnerung wird mir die stets freundliche Arbeitsatmosphäre der 2. Etage bleiben, die auch über die Arbeitszeit hinaus glückliche Verbindungen knüpfen ließ, welche weiterhin bestand haben werden.

Gute und immer hilfsbereite Dienste für meine Arbeit leisteten auch die Mitarbeiter der Institutswerkstatt, von denen ich stellvertretend **Armin Heimann** und **Günter Jung** danke.

Ein Dank von besonderer Größe gilt meinem Bruder **Robert**, der maßgeblichen Anteil an der in ihren Händen liegenden Arbeit hat. Durch seine Mithilfe und die massenspektroskopischen Analysen von **Andreas Schlosser**, für die ich ebenso dankbar bin, konnte ein Teil der präparierten Polypeptide erst aufgeklärt werden.

Herrn **Prof. Dr. Marahiel** danke ich für die offenherzige Betreuung, die mich in den schwierigsten Stunden meines Lebens auf den richtigen Pfad zurückgebracht hat.

Meine Dankbarkeit richtet sich respektvoll auch an Herrn **Prof. Dr. Hasilik**, der mir diese interessante Themenstellung anvertraut hat und mich fördernd und (hinter-) fragend bei meiner Arbeit unterstützt hat.

Einen nicht unbedeutenden Anteil an dieser Arbeit hat auch die **Deutsche Forschungsgemeinschaft**, die mein Projekt im Rahmen des SFB 286 "Intrazellulärer Transport und Reifung von Proteinen" finanziell gefördert hat.

Zu guter Letzt möchte ich **meinen Eltern** danken, die mich seit meiner Zeit in Marburg tatkräftig unterstützt haben und ohne die mein wissenschaftlicher Werdegang nicht denkbar wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Bernd Kösters
geboren am 26. Juni 1968, in Epe (Westf.)
Neue Kasseler Straße 18, 35039 Marburg /Lahn
ledig

Berufliche Tätigkeit

4/2001- 7/2001	Weiterbildung - Basiswissen Betriebliches Management Bildungsinstitut Möller (Marburg)
6/1996 - 8/2000	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Universitätsklinikum der Philipps-Universität Marburg, Institut für Physiologische Chemie
seit 1/1997	DFG-gefördertes Projekt im Sonderforschungsbereich 286 "Intrazelluläre Reifung und Transport von Proteinen" Thema: Isolierung und Charakterisierung von lysosomalen Membranproteinen

Diplomstudiengang

4/1989-2/1996	Diplomstudiengang Chemie an der Philipps-Universität Marburg Wahlpflichtfach: Biochemie Vorlesungsbesuch: Toxikologie; Praktika: Neurochemie, Biologie vierzehnmonatige Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung Titel der Arbeit: " <i>in vitro</i> -Induktion eines Homöoboxgens der <i>caudal</i> -Familie in Leberorgankulturen des Huhns" Diplom-Chemiker-Abschluß mit dem Gesamturteil - gut -
---------------	--

Wehrdienst und Schulausbildung

8/1987 - 3/1989	Zivildienst am Lukas-Krankenhaus in Gronau Bereich: Pflegedienst
1984-1987	Werner-v.-Siemens-Gymnasium in Gronau Leistungskurse Biologie/Chemie Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
1978-1984	Carl-Sonnenschein-Realschule in Epe Naturwissenschaftlicher Schwerpunkt Abschluß: Mittlere Reife
1974-1978	Grundschulbesuch