

Aus dem Institut für physiologische Chemie  
der Philipps-Universität Marburg  
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. J. Koolman

**Transport der Myeloperoxidase  
in die azurophilen Granula von HL-60 Zellen**

Inaugural-Dissertation zur  
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
Mireille Gerecitano-Schmidek  
geb. Gerecitano  
aus Hagen

Marburg, 2008

**Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am 30. September 2008  
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.**

**Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund  
Referent: Prof. Dr. A. Hasilik  
1. Korreferent: Prof. Dr. Dr. Bals**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Neutrophile Granulozyten.....	1
1.1.1	Phagozytose und Verdauung.....	3
1.1.2	Die Granulozytopoese (morphologische Entwicklung).....	4
1.2	Granula.....	6
1.3	Die azurophilen Granula.....	10
1.3.1	Hydrolytische Enzyme.....	10
1.3.2	Mikrobizide Proteine und Peptide.....	11
1.3.2.1	Defensine.....	11
1.3.2.2	Bactericidal <i>permeability-increasing</i> Protein (BPI).....	12
1.3.2.3	Lysozym.....	12
1.3.2.4	Myeloperoxidase (MPO).....	13
1.3.2.4.1	Aufbau und Synthese.....	13
1.3.2.4.2	Mikrobizide Eigenschaften und gewebsschädigende Wirkung der MPO...	14
1.3.2.4.3	Die Rolle der MPO bei der Entstehung von Krankheiten.....	16
1.3.3	Proteoglykane.....	21
1.3.3.1	Aufbau.....	21
1.3.3.2	Synthese und Modifizierung.....	22
1.3.3.3	Proteoglykane und Granula.....	23
1.3.3.4	Serglycin.....	23
1.3.3.4.1	Biologische Funktionen von Serglycin.....	24
1.4	Transport der Enzyme in die Granula.....	27
1.4.1	Transport löslicher lysosomaler Enzyme.....	27
1.4.2	Mannose-6-Phosphat-unabhängiger Transport.....	28
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	30
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>32</b>
2.1	Laborgeräte und Materialien.....	32
2.1.1	Laborgeräte.....	32
2.1.2	Chemikalien.....	33
2.1.3	Radiochemikalien.....	34
2.1.4	zellaktive Wirkstoffe. ....	35

2.1.5	Antikörper und gereinigte Enzyme.....	36
2.1.6	Eukaryote Zelllinie.....	37
2.1.7	Material für die Zellkultur.....	37
2.1.8	Medien und Waschlösungen für eukaryote Zellen.....	38
2.1.9	Lösungen.....	38
2.1.10	Sonstige Materialien.....	38
2.2	Methoden.....	39
2.2.1	Kultur und TPA/NaClO <sub>3</sub> -Behandlung von HL-60 Zellen.....	39
2.2.2	Immuncytochemie von HL-60-Zellen.....	39
2.2.3	Metabolische Markierung von HL-60 Zellen .....	40
2.2.3.1	Metabolische Markierung mit Met-Label .....	40
2.2.3.2	Metabolische Markierungen mit [ <sup>35</sup> S]Sulfat.....	41
2.2.4	Affinitätschromatographie mit CS-Sepharose.....	42
2.2.4.1	Herstellung von konzentrierten HL-60 Zellextrakten /TPA-Medien.....	42
2.2.4.2	Affinitätschromatographie mit CS-Sepharose.....	44
2.2.4.2.1	Bestimmung der Bindungsstärke von MPO/promMPO an CS-Sepharose.....	44
2.2.4.2.2	Einfluss von saurem pH-Wert auf die Bindung von MPO an CS-Sepharose.....	45
2.2.4.2.3	CS-Affinitätschromatographie mit Procathepsin D.....	45
2.2.4.2.4	CS-Affinitätschromatographie mit Met [ <sup>35</sup> S]-Label markierten HL-60 Sekreten.....	46
2.2.5	Enzymaktivitätsbestimmung ( <i>o</i> -Dianisidin-Test).....	46
2.2.6	Fällung mit CTAB.....	48
2.2.7	Protein-Gelelektrophorese.....	48
2.2.7.1	Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen.....	48
2.2.7.2	Vorbereitung der Gele für die Fluorographie.....	50
2.2.8	MPO- <i>immunoblot</i> und ECL-Entwicklung.....	50
2.2.8.1	Probenvorbereitung und Beladen der Gele.....	50
2.2.8.2	<i>Western blotting</i> .....	51
2.2.8.3	Immundetektion nach <i>Western blotting</i> .....	51
2.2.8.4	ECL-Entwicklung ( <i>enhanced chemiluminescence</i> ).....	52
2.2.9	Quervernetzung von Proteinen mit Dithio- <i>bis</i> -succinimidyl-Propionat (DSP).....	53

2.2.10	Immunpräzipitation der quervernetzten Proteine .....	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>55</b>
3.1	Immuncytochemie von HL-60 Zellen.....	55
3.2	Affinitätschromatographie reifer MPO und proMPO an CS-Sepharose.....	57
3.2.1	Vergleich der Bindungsstärke von proMPO und reifer MPO .....	57
3.2.2	Einfluss des pH-Wertes auf die Bindung der MPO an CS-Sepharose.....	58
3.3	Einfluss von TPA auf die Sekretion von Serglycin und MPO in HL-60 Zellen.....	60
3.3.1	Quantifizierung des Serglycins durch [ <sup>35</sup> S]Sulfat-Markierung und Fällung mit CTAB-Puffer.....	60
3.3.2.1	Erhöhung der Sekretion des MPO-Proteins, unter dem Einfluss von TPA.....	63
3.3.2.2	Erhöhung der Sekretion enzymatisch aktiver MPO unter dem Einfluss von TPA .....	65
3.3.3	Quervernetzung von MPO mit Serglycin in HL-60 Zellen .....	67
3.3.4	Affinitätschromatographie der in Anwesenheit von TPA-sezernierten Proteine an CS-Sepharose.....	69
3.3.5	Bindungsverhalten von Procathepsin D an CS-Sepharose.....	71
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>73</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung/Abstract</b>	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>107</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>110</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>111</b>
9.1	Tabellarischer Lebenslauf.....	111
9.2	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	112
9.3	Danksagung.....	113

## **Inhaltsverzeichnis**

---

9.4	Veröffentlichungshinweis.....	114
9.5	Ehrenwörtliche Erklärung.....	114

# **1 Einleitung**

Der menschliche Organismus ist in der Lage sich gegen Parasiten zur Wehr zu setzen, zum Beispiel gegen Viren, Bakterien und Pilze. Diese befinden sich überall in unserer Umgebung und können in unseren Körper eindringen und durch ihre Vermehrung zu einer Infektion führen. Der menschliche Organismus besitzt unterschiedliche Abwehrmechanismen, die als spezifisch oder unspezifisch bezeichnet werden. Deren Aufgabe ist es, Pathogene zu erkennen und zu zerstören. Ist eine für die Abwehr essentielle Komponente des Immunsystems defekt, sei es durch Krankheit oder durch einen ererbten Mangel, so ist der Körper nur noch zum Teil oder gar nicht mehr in der Lage, sich vor einer Invasion pathogener Keime zu schützen. Dies kann für den menschlichen Organismus verheerende Folgen haben. Die Essentialität der Abwehrmechanismen macht ihre Erforschung zu einer wichtigen Aufgabe der medizinischen Grundlagenforschung.

## **1.1 Neutrophile Granulozyten**

Die neutrophilen, polymorphkernigen Granulozyten gehören zu der Gruppe der Leukozyten und sind Teil des unspezifischen Abwehrsystems des Körpers. Sie sind in der Lage eingedrungene Mikroorganismen zu phagozytieren und in ihrem Innern zu lysieren. Darüber hinaus gehören sie neben den Makrophagen zu den klinisch bedeutsamsten Effektorzellen akuter Entzündungsprozesse. Beim Gesunden werden täglich ca.  $10^{11}$  Zellen von ihnen umgesetzt, was einer Masse von 100 g entspricht. Ihre Lebensdauer ist mit 2-3 Tagen relativ kurz. Die Halbwertszeit der im Blut zirkulierenden Neutrophilen ist mit 6-7 Stunden sogar noch kürzer. Der Lebenszyklus neutrophiler Granulozyten ist in Abb.1.1 dargestellt.

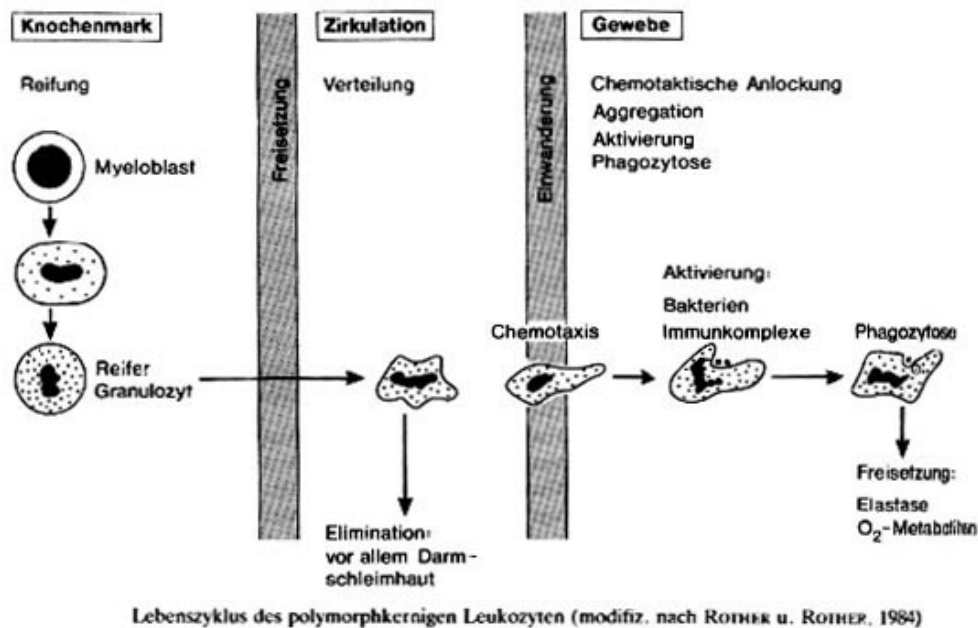
Etwa 90% des gesamten Granulozytenbestandes befindet sich als Reserve im Knochenmark. Bei Auftreten einer Infektion wird diese Reserve mobilisiert. Dabei wandern Granulozyten aktiv mittels amöboider Bewegungen in den Sinus aus. Der restliche Bestand befindet sich zu gleichen Teilen im peripheren Blut oder adhärent am vaskulären Endothel, wo sie den so genannten marginalen Granulozytenpool im Randstrom des Blutes bilden. Von dort aus können sie mittels Diapedese die Gefäßwand durchdringen und an den gewünschten Ort im Gewebe gelangen. Sie

werden hierbei durch chemotaktische Stoffe (so genannte Chemotaxine) angelockt und bewegen sich entlang dieses Gradienten zu dem Ort im Gewebe, an dem die Konzentration dieser Stoffe am höchsten ist. Chemotaxine sind z. B. von Bakterien abgegebene Formylmethionin-haltige Peptide, welche über einen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Rezeptor der Granulozytenmembran wirken, oder aktivierte Komplementfaktoren (C3a, C5a), Antigen-Antikörperkomplexe und kollagenolytische Produkte wie z.B. Knorpelfragmente. Um diese löslichen als auch partikulären Auslöser der Entzündung zu erkennen, tragen die polymorphkernigen Leukozyten auf ihrer Zelloberfläche verschiedene Rezeptoren.

Werden nun auf diese inflammatorischen Signale hin vermehrt Neutrophile in das Blut abgegeben und steigt deren Zahl abnorm an, so bezeichnet man dies als Granulozytose. Untersucht man zu diesem Zeitpunkt den Blutausschlag, so kann man häufig neben den reifen Granulozyten auch unreife Vorstufen, wie Metamyelozyten und stabkernige Granulozyten erkennen.

Entdeckt man jedoch noch unreifere Vorstufen (z.B. Myelozyten, Promyelozyten) so kann dies auf eine myeloproliferative Erkrankung hindeuten, da diese Zellen aufgrund ihres Reifezustandes noch nicht in der Lage sind aktiv das Knochenmark zu verlassen. Dies könnte bedeuten, dass diese Zellen extramedullär, d.h. außerhalb des Knochenmarks entstanden sind. Die Granulozytenzahl kann aber auch stark absinken (Granulozytopenie), sei es durch eine verminderte Produktion im Knochenmark (durch die Einnahme zytotoxischer Medikamente), einen erhöhten Verbrauch (schwere Infektionen) oder durch eine Verschiebung der Granulozyten in das marginale Kompartiment (Virusinfektionen). Besteht dieser Mangel über einen längeren Zeitraum, so können Infektionen vom Körper nicht mehr effektiv bekämpft werden und das kann zu schweren Erkrankungen, bis hin zum Tode des Patienten führen.





**Abb. 1.1 Lebenszyklus des polymorphkernigen Leukozyten.** Nach Abb. 4.14.-9. aus Greiling H, Gressner AM, Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3. neubearb. Auflage, Stuttgart; New York: Schattauer, 1995. Neumann S, Lang H, Entzündung (S.1284).

### 1.1.1 Phagozytose und Verdauung

Wie bereits erwähnt, stellt die Phagozytose und Verdauung mikrobieller Erreger die Hauptaufgabe neutrophiler Granulozyten dar. Werden die Rezeptoren der Granulozyten durch einen der in Punkt 1.1 genannten Auslöser stimuliert, so folgt innerhalb von Sekunden ihre Aktivierungsantwort. Der Granulozyt schiebt sich durch das Gefäßendothel hindurch und gelangt nun, durch chemotaktische Reize angezogen, an den Ort des Geschehens. Er beginnt sogleich mit der Ingestion der Bakterien. Der Granulozyt lagert sich dazu dem Mikroorganismus an und bildet dann Pseudopodien aus, mit denen er den Keim umschlingt und ihn so „einverleibt“. Die so gebildeten Phagosomen verschmelzen im Innern der Zelle mit den enzymhaltigen Granula, deren Inhalt (lysosomale und mikrobizide Enzyme) aktiviert wird und, die Abtötung und intrazelluläre Verdauung des phagozytierten Materials starten.

In manchen Fällen wird der Granulozyt von für ihn zu großen Fremdkörpern aktiviert. Er beginnt dann mit der Sekretion lysosomaler Faktoren in das Interstitium, was man als „frustrierte Phagozytose“ bezeichnet.

Die neutrophilen Granulozyten sterben nach der Phagozytose ab, verfetten und es entsteht eine Demarkations- und Nekrosezone.

### **1.1.2 Die Granulozytopoese (morphologische Entwicklung)**

Die neutrophilen Granulozyten leiten sich wie alle hematopoetischen Zellen von pluripotenten Stammzellen ab, welche noch die Fähigkeit besitzt, sich in die verschiedenen Zelllinien zu differenzieren (Abb. 1.2). Von den pluripotenten werden die so genannten unipotenten Stammzellen gebildet, die sich nur noch in definierte Blutzellreihen weiterentwickeln können, was man als klonale Proliferation bezeichnet. Aus diesen unipotenten Stammzellen entwickeln sich dann im Falle der Granulozyten die Myeloblasten, worauf sich ihr gemeinsamer Differenzierungsweg trennt. Eine Ausnahme hierbei bilden allerdings die Neutrophilen. Sie besitzen keine unipotente Stammzelle. Sie scheint vielmehr gleichzeitig die Ausgangszelle für die Entstehung der Monozyten zu sein und ist somit in diesem Stadium noch pluripotent.

Die gesamte Granulozytopoese findet im Knochenmark statt und dient dazu, eine physiologische Konzentration reifer Granulozyten im Gewebe und im Blut aufrechtzuerhalten und auf gewisse Signale, die z.B. auf eine Infektion des Körpers mit Krankheitserregern hindeuten, mit der raschen Freisetzung aus dem Knochenmark oder einer gesteigerten Produktion der jeweiligen Zelllinie zu reagieren. Die Granulozytopoese dauert insgesamt ca. 14 Tage und gliedert sich in zwei Phasen. In der ersten Phase der Granulozytopoese vermehren sich die Myeloblasten und differenzieren sich in drei Stadien zum Promyelozyten, Myelozyten und dann zum Metamyelozyten. Sie dauert ca. 7 Tage. Die zweite Phase, die Maturationszeit, dauert ca. 6 Tage. In dieser reifen die Metamyelozyten (so genannte jugendliche Granulozyten) zu den stabkernigen und dann zu den segmentkernigen Granulozyten heran.

Die Myeloblasten sind unterschiedlich groß, haben einen kugeligen Kern und weisen noch keine cytoplasmatische Granula auf. Die so genannten *primären azurophilen Granula* sind Peroxidase-positiv und treten erst in der nächsten Differenzierungsstufe, den *Promyelozyten* auf. Mit Hilfe der Peroxidase(POX)-Reaktion kann man myeloisch-monozytäre und lymphozytäre Zellen voneinander unterscheiden. Aus diesem Grund verwendet man die POX-Aktivität zur Differenzierung und Klassifizierung verschiedener Leukämieformen.

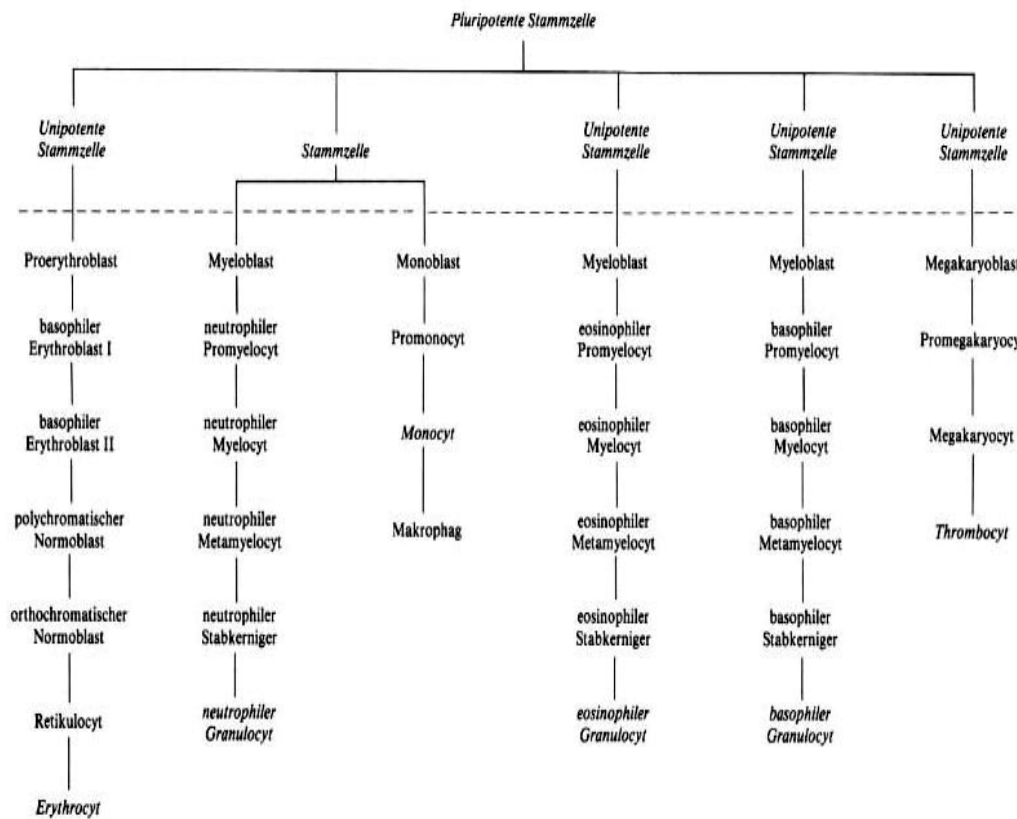
Die sekundären (spezifischen) neutrophilen Granula hingegen sind Peroxidase-negativ und entstehen während des Myelozyten-Stadiums. Das zu diesem Zeitpunkt noch

basophile Cytoplasma des Myeloblasten und Promyelozyten, wird mit Beginn dieses Stadiums zunehmend acidophiler. Der reife Granulozyt besitzt nur sehr wenig azurophile Granula (10-20%), was daran liegen mag, dass sie ausschließlich im Promyelozytenstadium gebildet und so infolge von Mitosen, die sowohl in Promyelozyten, als auch in Myelozyten häufig zu finden sind, prozentual ausgedünnt werden. Während der weiteren Entwicklung des Myelozyten werden unablässig spezifische Granula gebildet, welche später 80-90% der Granula im reifen Granulozyten ausmachen (Bainton und Farquhar, 1966). Nach der Granulopoese beginnt nun die Reife-Phase, die mit der Weiterentwicklung zum Metamyelozyten ihren Anfang nimmt. Diese teilen sich nur noch sehr selten, ihr Cytoplasma ist schwach acidophil und sie besitzen vermehrt spezifische Granulationen.

In dieser Phase bildet sich ein kontraktiles Proteinskelett aus, mit welchem der reife Granulozyt zur aktiven amöboiden Beweglichkeit und zur Phagozytose befähigt wird.

Der in der Granulopoese noch kugelige Kern buchtet sich einseitig ein, wird vorübergehend stabförmig und ist im ausgereiften Granulozyt segmentiert. Die vorher feine Chromatinstruktur wird zunehmend gröber und dichter und die im Myeloblastenstadium noch deutlich zu sehenden Nukleolen sind bereits im Myelozytenstadium ganz verschwunden.

In diesem Reifezustand warten die Granulozyten auf ein Signal, um aus dem Knochenmark ausgeschwemmt zu werden und ihre Aufgabe als Abwehrzelle zu erfüllen.



**Abb. 1.2 Entwicklung der hematopoetischen Stammzelle.** Nach Tabelle 35 aus Bucher O, Wartenberg H, Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 11., vollständig überarbeitete Auflage, Bern, Stuttgart, Toronto: Huber, 1989. Blut und blutbildende Organe S.280.

## 1.2 Granula (primäre, azurophile Granula; sekundäre, spezifische Granula; tertiäre, Gelatinase Granula)

Wie bereits beschrieben enthalten die neutrophilen Granulozyten verschiedene Arten von Granula, so kann man zwischen azurophilen und spezifischen Granula unterscheiden. Neben diesen beiden Granulatypen findet man in den Granulozyten noch einen dritten Granulatyp, die tertiären/Gelatinase Granula. Die verschiedenen Granulaarten variieren in Größe, Dichte, Proteingehalt und Zusammensetzung, abhängig von dem Zeitpunkt ihrer Bildung während der Granulozytopoese.

Die **azurophile Granula** sind größer (ca. 800 nm) und dichter als die spezifischen Granula (ca. 500 nm) und werden ausschließlich während des Promyelozytenstadiums gebildet (Abb. 1.3). Sie werden auf der distalen/konvexen Seite des Golgi-Komplexes gebildet.

Der Inhalt der azurophilen Granula ist reich an *Myeloperoxidase*, weshalb sie auch als Peroxidase-positiv bezeichnet werden. In ihrem Inneren findet man Lysozym,  $\beta$ -Glucuronidase, saure hydrolytische Enzyme (Proteinasen, Glykosidasen, Sulfatasen, Phosphatasen), neutrale Proteinasen (Elastase, Kathepsin G) und eine Reihe von kationischen antibakteriellen und antimykotischen Proteinen (Defensine). Die azurophilen Granula können anhand ihrer Dichte und des Gehalts an Defensinen noch in zwei Untergruppen unterteilt werden. In die sehr dichten und großen Peroxidase-positiven Granula, welche reich an Defensine sind und in die leichteren Peroxidase-positiven Granula, die nur wenig Defensine enthalten (Borregaard *et al.*, 1993). Die Proteinasen und Glykosidasen entwickeln ihre optimale enzymatische Aktivität bei einem pH-Wert unter 7, die Serinproteinasen (neutrale Proteinasen) hingegen haben ihr pH-Wert-Optimum im neutralen Bereich.

Die **sekundären Granula** werden während des Myelozytenstadiums gebildet (Abb. 1.3) und beinhalten keine Peroxidasen (Peroxidase-negativ). Sie sind reich an Lysozym, Kollagenasen, Plasminogen-Aktivatoren, am eisenbindenden Laktoferrin und einem Vitamin B12-bindenden Protein. Des Weiteren besitzen sie eine Reihe verschiedener Membranrezeptoren, die zur Ligandenbindung an die Oberfläche transportiert werden können (C3b, Laminin).

Nach der Aktivierung neutrophiler Granulozyten können die spezifischen Granula mit der Plasmamembran oder mit Phagosomen fusionieren und dabei ihren Inhalt sowohl an das Phagosom als auch an den Extrazellularraum weitergeben (Leffell *et al.*, 1974).

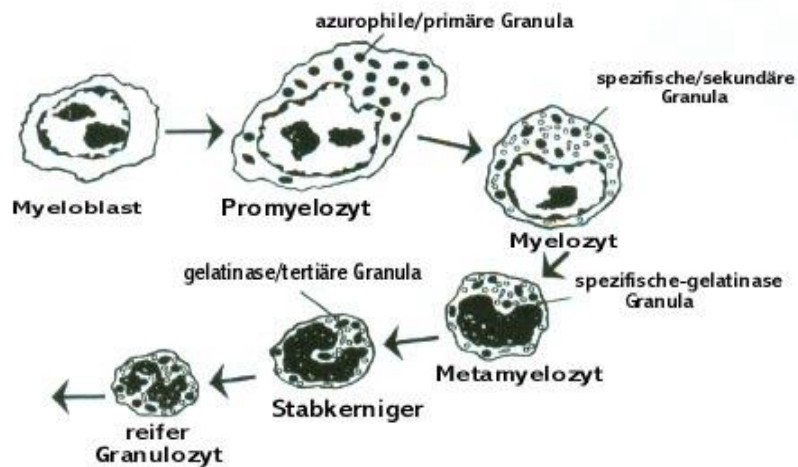
Die primären Granula entleeren normalerweise ihren Inhalt nicht extrazellulär. Sie fusionieren mit Phagosomen und bilden dabei sekundäre Phagosomen und Phagolysosomen (Gallin, 1984; Goldstein, 1984), dabei zersetzen sie die phagozytierten Mikroorganismen. In seltenen Fällen jedoch kann ihr Inhalt in das Interstitium gelangen. Zum einen bei dem Zerfall von Neutrophilen, zum anderen bei der Fusion der primären Granula mit noch nicht komplett verschlossenen Phagolysosomen.

Einige dieser Inhaltsstoffe sind hochaggressiv. Entweichen diese, sind sie für einen Großteil des Schadens verantwortlich, der bei einer Entzündungsreaktion im umgebenden Gewebe entsteht.

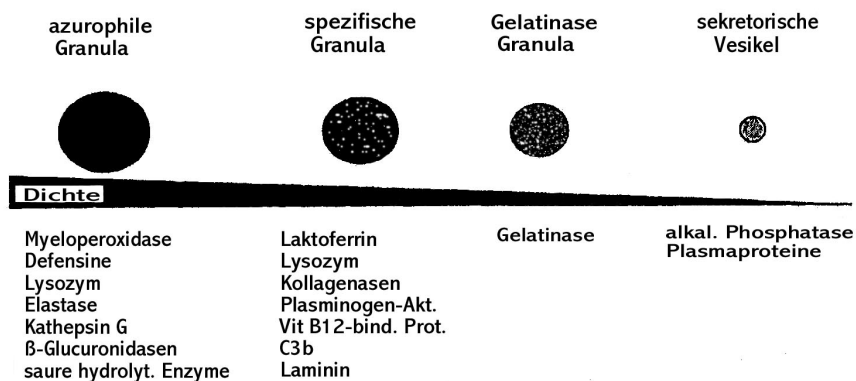
Die **Gelatinase Granula** wurden später als die beiden anderen Granulatypen entdeckt. Benannt wurden sie nach ihrem Leitenzym (Gelatinase), einer Metalloproteinase, die denaturiertes Kollagen abbaut. Hibbs und Bainton fanden 1989 heraus, dass es sich bei der Gelatinase um eine Komponente der spezifischen Granula handelt. Weitere Untersuchungen dieser Granula ergaben, dass je nach Entwicklungsstadium des Granulozyten ein anderer Granulatyp entsteht. Man versuchte anhand des jeweiligen Inhaltsstoffs (Laktoferrin oder Gelatinase) die Granulatypen zu klassifizieren. Es wurde festgestellt, dass die spezifischen (sekundären) Granula, im Myelozytenstadium gebildet, nur Laktoferrin enthielten, während die spezifischen Granula, die im Metamyelozytenstadium gebildet wurden, neben Laktoferrin auch Gelatinase enthielten (Abb. 1.3). Man nannte sie deshalb spezifische-Gelatinase Granula. In den stabkernigen Granulozyten hingegen fand man ausschließlich Granula, die nur Gelatinase enthielten und diese wurden dann tertiäre/Gelatinase Granula genannt (Borregaard *et al.*, 1993; Borregaard and Cowland, 1997; Bainton, 1999). Da dieser Granulatyp genau wie die spezifischen (sekundären) Granula keine Myeloperoxidase enthält, zählen sie zu den POX-negativen Granula. Des Weiteren sind die tertiären Granula weniger dicht und kleiner, als die laktoferrinhaltigen spezifischen Granula (Kjeldsen *et al.*, 1993).

Der Vollständigkeit wegen sollen an dieser Stelle noch kurz die sekretorischen Vesikel erwähnt werden, die 1987 von Borregaard *et al.* entdeckt wurden. Sie werden nur im reifen Granulozyten gebildet und enthalten neben der alkalischen Phosphatase auch Plasmaproteine (Albumin). Es konnte gezeigt werden, dass sie von Bedeutung sind für die Speicherung von plasmamembranständigen Rezeptoren (Borregaard *et al.*, 1993). Diese sekretorischen Vesikel und die Gelatinase Granula zeichnen sich durch eine geringere Dichte und einen kleinen Durchmesser aus (Abb. 1.4). Sie können sehr schnell mobilisiert werden, während die schweren azurophilen Granula sehr schwer zu mobilisieren sind (Borregaard *et al.*, 1993). Nach einer Exozytose der sekretorischen Vesikel werden ca. 6 Stunden benötigt, um neue zu bilden (Sengeløv *et al.*, 1995).

## Entstehung der Granula



**Abb. 1.3** Darstellung der Entstehung der unterschiedlichen Granulatypen in den verschiedenen Entwicklungsstufen des neutrophilen Granulozyten. Die azurophilen/primären Granula sind durch die schwarzen Punkte und die restlichen Granulatypen sind durch die kleinen Kreise dargestellt. Gemäß ihrem Gehalt an Laktoferrin und Gelatinase lassen sich die Granula in die spezifischen/sekundären und die Gelatinase/tertiären Granula unterteilen. Nach Abb. 1 aus Bainton DF. Distinct granule populations in human neutrophils and lysosomal organelles identified by immuno-electron microscopy. Journal of Immunological Methods 1999; 232: 153-168. Modifiziert nach Bainton *et al.*, 1971.



**Abb. 1.4** Schematische Darstellung der verschiedenen Granulatypen und deren Inhalt. Die azurophilen, die spezifischen, die Gelatinase Granula und die sekretorischen Vesikel unterscheiden sich in Größe und Dichte. Nach Abb. 1 aus Gullberg *et al.*, Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development. Eur J Haematol 1997; 58: 137-153.

### **1.3 Die azurophilen Granula**

Lange Zeit ging man davon aus, dass die azurophilen Granula die neutrophilen Lysosomen repräsentieren, da sie eine hohe Konzentration an lysosomalen sauren Hydrolasen aufweisen (de Duve, 1975). Des Weiteren entsprechen Aufgaben und Funktionen der azurophilen Granula weitestgehend den der Lysosomen. Studien über die Membranproteine und den Mannose 6-Phosphat-Rezeptor in neutrophilen Granulozyten konnten zeigen, dass sie nicht als echte Lysosomen klassifiziert werden können. Lysosomen zeichnen sich definitionsgemäß aus (1) durch eine hohe Konzentration an LAMPs (Lysosom-assoziierte Membranproteine), (2) durch eine volle Anzahl an reifen dephosphorylierten lysosomalen Enzymen, (3) durch das Fehlen von Mannose 6-Phosphat-Rezeptoren und (4) durch einen sauren pH (Kornfeld und Mellman, 1989). In den Studien konnte gezeigt werden, dass die azurophilen Granula kein LAMP-1 und LAMP-2 (Dahlgren *et al.*, 1995) besitzen und eine hohe Konzentration an Mannose 6 Phosphat-Rezeptoren aufweisen (Cieutat *et al.*, 1998). Der Definition von Lysosomen zufolge können also die azurophilen Granula keine echten Lysosomen sein, weshalb sie heute in der Fachliteratur vorwiegend als Lysosomen ähnliche Granula bezeichnet werden. Die einzigen Membranproteine, die bis jetzt in der azurophilen Granulamembran gefunden wurden, sind CD63/LAMP-3/Granulophysin (Kuijpers *et al.*, 1991; Cham *et al.*, 1994) und CD68 (Saito *et al.*, 1991).

Man kann die Bestandteile der primären Granula gemäß ihrer Funktion in zwei Gruppen ordnen. Da sind als erste Gruppe mikrobizide Polypeptide, welche einverleibte Mikroorganismen abtöten können und als zweite Gruppe hydrolytische Enzyme, die die bakteriellen Überreste abbauen. Das Proteoglykan Serglycin gelangt zwar auch in die primären Granula, wird aber relativ schnell durch die dort vorhandenen Sulfatasen,  $\beta$ -Hexosaminidase,  $\beta$ -Glucuronidase und Proteinasen abgebaut.

#### **1.3.1 Hydrolytische Enzyme**

Die azurophilen Granula enthalten einige hydrolytische Enzyme, die ein weites Wirkspektrum besitzen und diverse Klassen von Makromolekülen abbauen können (z.B. Proteine, Polysaccharide, Lipide und Nukleinsäuren).

Zu den hydrolytischen Enzymen zählen drei neutrale Proteinasen; die zusätzlich eine bakterizide Wirkung besitzen: Elastase, Kathepsin G und Proteinase 3.



Ihre exakte physiologische Funktion ist bis jetzt noch nicht bekannt, aber aufgrund ihres pH-Wert-Optimums im neutralen Bereich scheint es so, als wären sie während des frühesten Zeitpunkts der Phagozytose bevor der pH-Wert im Inneren des Phagosoms sinkt aktiv.

Des Weiteren beinhalten die azurophilen Granula noch hydrolytische Enzyme, die bei einem sehr niedrigen pH-Wert ihr Optimum besitzen, sogenannte saure Hydrolasen. Dazu gehören Proteinasen wie z.B. das Procathepsin mit einem pH-Wert-Optimum von 4-5 und Glykosidasen wie z.B. die  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase,  $\beta$ -Glucuronidase und RNase etc.. Sie haben die Fähigkeit makromolekulare Strukturen des phagozytierten Materials in kleinere Bausteine mit einem niedrigeren molekularen Gewicht zu zerlegen.

### 1.3.2 Mikrobizide Proteine und Peptide

Folgende mikrobizide Proteine und Peptide kommen in der primären Granula in größeren Mengen vor: MPO, Defensine, bactericides permeability-increasing Protein (BPI) und Lysozym.

Ihr Hauptinhaltsstoff, die MPO, entfaltet ihre mikrobizide Wirkung insbesondere durch Bildung von toxischem HOCl aus Chloridionen und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (s. Punkt 1.3.2.4). Die Wirkung der Defensine, von BPI und Lysozym beruht auf der Zerstörung der bakteriellen Zellwand (s. Punkt 1.3.2.1-1.3.2.3).

Allen gemein ist, dass sie bei physiologischem pH-Wert positiv geladen sind, so dass sie gut an die negativ geladenen Oberflächen von Mikroorganismen binden können und somit ihre antimikrobiellen Eigenschaften gezielt entfalten können.

#### 1.3.2.1 Defensine

Die Defensine bestehen aus drei kleinen Peptiden und sind in der Lage viele verschiedene Arten von Bakterien, Viren und Pilzen zu zerstören (Lehrer *et al.*, 1991).

Die Konzentration der Defensine ist in den neutrophilen Granulozyten recht hoch und macht etwa 5% des gesamten Proteingehaltes der Zelle aus. Sie töten die Bakterien, indem sie ihre Zellmembran zerstören. Dabei sind ausschließlich jene Bakterien betroffen, die einen aktiven Stoffwechsel aufweisen. Bakterien, die sich in einer

nährstofffreien Umgebung befinden sind ihnen gegenüber resistent (Lichtenstein *et al.*, 1988).

### **1.3.2.2 Bactericides permeability-increasing Protein (BPI)**

Das BPI ist ein kationisches Protein mit einer rel. Molmasse von 60 kDa, dessen Sequenz bekannt ist (Gray *et al.*, 1989). Dieses Protein greift genau wie die Defensine die Zellmembran der Bakterien an und beeinträchtigt ihre Schutzbarriere (Zeya *et al.*, 1966). Allerdings schädigt es lediglich gram-negative Bakterien.

### **1.3.2.3 Lysozym**

Das Lysozym wurde 1922 von Sir Alexander Fleming entdeckt, der mit diesem Enzym sein erstes antibiotisch wirksames Agens entdeckte. Dieser Entdeckung folgte später die des Penicillin.

Lysozym ist Bestandteil sowohl der azurophilen, wie auch der spezifischen Granula. Außerdem wird es von Makrophagen und vielen Epithelzellen z.B. Darmepithel gebildet und sezerniert. Es kommt in fast allen Körperflüssigkeiten vor und ist ein kleines, aus einer einzigen, aus 129 Aminosäuren bestehenden, nicht glykosylierten Polypeptidkette mit einer relativen molaren Masse von 14,3 kDa. Lysozym greift Bakterien an, indem es die  $\beta(1\rightarrow4)$  glykosidische Bindung zwischen N-Acetylmuraminsäure (MNAc) und N-Acetylglucosamin des Zellwandmureins hydrolytisch spaltet. Mit der Zerstörung der Zellwand kann Wasser in das Bakterium eindringen, welches dadurch anschwillt und schließlich platzt. Seine Wirksamkeit besteht hauptsächlich in der Zerstörung gram-positiver Bakterien. Gram-negative Bakterien hingegen besitzen in ihrer Zellwandmembran Lipoproteine und Lipopolysaccharide, die sie weitestgehend vor der Wirkung des Lysozyms schützen.

Die optimale enzymatische Aktivität erreicht dieses Enzym bei einem pH-Wert von 4 bis 5, was dem typischen pH-Wert im Innern des Phagosoms entspricht. Es besitzt aber auch noch genügend Aktivität im neutralen Bereich, so dass es auch in den Körperflüssigkeiten antimikrobiell wirksam ist.

### **1.3.2.4 Myeloperoxidase (MPO)**

Myeloperoxidase wurde zum ersten Mal 1941 aus Leukozyten durch K. Agner isoliert. Sie ist ein kationisches grün verfärbtes Hämoprotein, das sowohl in den neutrophilen Granulozyten als auch in Monozyten (in den primären Lysosomen) vorkommt.

#### **1.3.2.4.1 Aufbau und Synthese**

Die Konzentration der MPO ist in polymorphkernigen Leukozyten recht hoch. So macht ihr Gehalt ca. 5% des Gesamtgewichtes des neutrophilen Granulozyten aus. Die MPO wird während des Promyelozytenstadiums als eine größere Vorstufe (proMPO) synthetisiert, also zu dem Zeitpunkt, wo auch die azurophilen Granula gebildet werden. Das MPO-Gen befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 17. Synthetisiert wird die MPO am rauhen endoplasmatischen Retikulum, in dessen Zisternen auch ihre posttranslationalen Modifikationen vorgenommen werden (Abb.1.5 und 1.6).

Im ersten Schritt wird vom primären Translationsprodukt das Signalpeptid abgespalten. Dann werden kotranslational an 5 Stellen mannosereiche Oligosaccharide auf Amid-Gruppen von Asparagin-Resten übertragen. Anschließend werden diese Oligosaccharide noch im ER verkürzt und schließlich im Golgi-Komplex an einen oder mehreren Mannose-Resten phosphoryliert (Bildung von Mannose 6-Phosphat).

Vor dem Häm-Einbau interagiert noch Calreticulin, ein calciumbindendes Protein, das man im ER vieler verschiedener Zellen findet, spezifisch mit der vollständig glykosylierten Häm-freien proMPO. Es interagiert jedoch nicht mit der häm-haltigen proMPO oder der reifen MPO. Man geht davon aus, dass es die pro-Form der MPO in eine Konformation bringt, die den Einbau der Häm-Gruppe ermöglicht.

Um eine enzymatisch aktive proMPO zu erhalten, wird der neu entstandenen proMPO (rel. Molmasse 90kDa) eine Häm-Gruppe mit einem Eisenzentralatom im ER hinzugefügt. Diese prosthetische Gruppe verleiht der MPO auch ihre typische grüne Farbe.

Dementsprechend führt eine Hemmung der Häm-Synthese zu einer Verminderung der Peroxidase-Aktivität und zu einem Prozessierungsstillstand der proMPO in ihre reife Form. Interessanterweise ist die Häm-Gruppe nicht nur wichtig für die enzymatische Aktivität, sondern auch für die Faltung und Stabilität der MPO. Ohne diese Häm-Gruppe wird die proMPO nicht in den Golgi-Apparat weitertransportiert und wird statt

dessen durch ein Qualitätskontrollmechanismus und Proteasomen wieder abgebaut (Nauseef *et al.*, 1992).

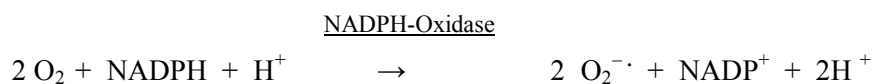
Die korrekt prozessierte proMPO wird zum Golgi-Apparat weitergeleitet und verlässt ihn entweder in Richtung Granula oder wird direkt in den Extrazellularraum sezerniert. Der Teil, der in der Zelle verbleibt, wird weiter proteinolytisch prozessiert und es entstehen die sogenannten intermediären Formen der MPO. Zwei verschiedene intermediäre Formen wurden gefunden: eine mit einer molaren Masse von 81 kDa und die andere mit einer molaren Masse von 74 kDa, wobei die erst genannte wohl ein Vorläufer der leichteren Form zu sein scheint. Der Massenverlust kann durch die Abspaltung des Propeptids am N-terminalen und eines einzelnen Serinrestes am C-terminalen Ende des Proteins erklärt werden.

Akin *et al.* konnten 1986 zeigen, dass für die Bildung der reifen MPO ein neutraler pH bevorzugt wird. Daher kann die Reifung der MPO nicht durch Neutralisierung von sauren Kompartimenten in HL-60 Zellen durch NH<sub>4</sub>Cl gehemmt werden (Hasilik *et al.*, 1984).

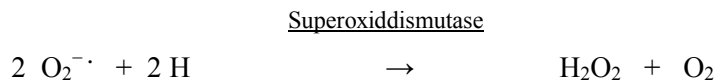
### 1.3.2.4.2 Mikrobizide Eigenschaften und gewebsschädigende Wirkung der MPO

In den azurophilen Granula bildet sich die reife MPO, wo sie bis zu ihrem Gebrauch gespeichert wird. Die reife MPO ist ein Tetramer, mit zwei leichten (14 kDa) und zwei schweren (59 kDa) Ketten, die mit Disulfidbrücken zusammengehalten werden.

Wird ein neutrophiler Granulozyt aktiviert, so reagiert er mit der Stimulierung des Glucosemetabolismus über den Hexosemonophosphat-Shunt der Glykolyse (sog. *respiratory burst*) und der gesteigerten Aufnahme von Sauerstoff. Katalysiert durch eine NAD(P)H-Oxidase entsteht aus Sauerstoff das Superoxidanion O<sub>2</sub><sup>-·</sup>:

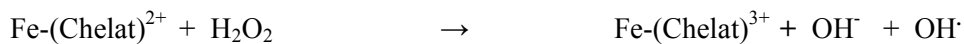


Dieses Anionradikal ist sehr instabil, weshalb es entweder spontan bei einem pH kleiner als 7 oder durch die Superoxiddismutase (SOD) in Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) überführt wird. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wirkt selbst schwach bakterizid, dient aber vorwiegend als Substrat für stärker wirksame mikrobizide Oxidantien (Babior, 1984; Casimir und Teahan, 1994):

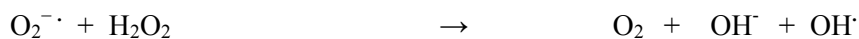


Durch Katalyse oder auch spontan entstehen noch weitere toxische Sauerstoffmetabolite, wie z.B. das Hydroxylradikal  $\text{OH}^{\cdot}$  und der energiereiche Singulett-Sauerstoff. Die Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals  $\text{OH}^{\cdot}$  erfolgt zum einen über die metallkatalysierte Haber-Weiss-Reaktion und zum anderen eisen- oder kupferabhängig über die Fenton-Reaktion (Galle, 2001):

Fenton-Reaktion:

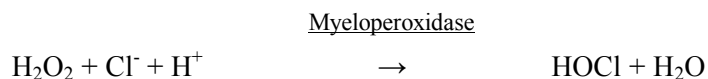


Haber-Weiss-Reaktion:



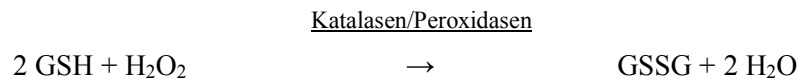
Alle diese verschiedenen Sauerstoffmetabolite vermögen phagozytierte Mikroorganismen abzutöten. Die Hydroxylradikale sind dabei extrem zytotoxisch und hinzu kommt, dass deren Bildung durch  $\text{Fe}^{3+}$ -gesättigtes Lactoferrin stark beschleunigt wird. Durch ihr hohes Redox-Potential (ca. +2V) reagieren sie mit fast jeder Art von Molekülen bzw. Molekülstrukturen und sind hauptsächlich verantwortlich für die Gewebeschäden aktivierter Leukozyten (Ward *et al.*, 1983; Till *et al.*, 1991).

Granulozyten können mit Hilfe der MPO mikrobielle Proteine halogenieren. Diese bildet aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Gegenwart exogener oder endogener Halidionen Hypohalite, beispielsweise das HOCl aus  $\text{Cl}^-$ :



Ort der Entstehung von Hypohaliten und Hydroxylradikalen kann zum einen das Innere des Phagolysosoms sein und zum anderen das Interstitium (nach Exozytose). Die toxischen Sauerstoffmetabolite wirken an oxidierbaren Molekülstrukturen, z.B. Alkohol- und Aldehydgruppen, SH-Gruppen, Aminogruppen, Lipide etc.. Dementsprechend ist es verständlich, dass diese radikalen Metabolite auch

körpereigenes Gewebe zerstören können oder falls sie mit dem Zytosol in Kontakt kommen auch zelleigene Strukturen. Aus diesem Grund besitzt der neutrophile Granulozyt zu seinem eigenem Schutz und zum Schutz des umliegenden Gewebes Wasserstoffperoxid-abbauende Enzyme, wie z.B. Katalasen (in den Peroxisomen) und Glutathion-Peroxidasen, die  $H_2O_2$  umsetzen:



Hierdurch existiert ein Kontrollmechanismus für die Produktion weiterer Sauerstoffmetabolite. Eine Dysbalance zwischen Wasserstoffperoxid-abbauenden und Wasserstoffperoxid-bildenden Enzymen führt durch die exzessive Produktion hochreaktiver Sauerstoffspezies unweigerlich zu oxidativem Stress und einer konsekutiven Zellschädigung.

Ein weiterer Vorteil der MPO für die Erfüllung ihrer mikrobiziden Eigenschaft besteht darin, dass ihr isoelektrischer Punkt relativ hoch ist, was ihr bei physiologischem pH-Wert eine positive Ladung verleiht. Deshalb kann das Enzym besonders gut an die negativ geladene Oberfläche der Bakterien binden. Der theoretische isoelektrische Punkt der proMPO liegt bei 9.26 und der der reifen MPO bei 9.22 (Swiss Prot Datenbank).

Am effektivsten arbeitet die MPO bei einem pH zwischen 4 und 5, was in etwa dem pH-Wert innerhalb der azurophilen Granula entspricht.

### 1.3.2.4.3 Die Rolle der MPO bei der Entstehung von Krankheiten

Unter normalen physiologischen Bedingungen stellen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ein potentes Abwehrsystem gegen Pathogene (Bakterien, Viren) und neoplastisch veränderte Zellen dar. Antioxidative Mechanismen der Zelle dienen dazu, die ROS zu neutralisieren. Ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien führt zum sogenannten oxidativen Stress. Eine Vielzahl pathophysiologischer Prozesse wird in jüngerer Zeit mit der Entstehung von oxidativem Stress assoziiert. Die Beteiligung der ROS an der Pathogenese folgender Erkrankungen stehen zur Diskussion:

Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Chorea Huntington, Amyotrophe Lateralsklerose und Multiple Sklerose. Neben diesen neurodegenerativen Erkrankungen wird auch eine Beteiligung der ROS an bestimmten Herz-Kreislauf-Erkrankungen

(Arteriosklerose, koronare Herzkrankheit), Diabetes mellitus, Nierenerkrankungen und verschiedenen Krebsarten untersucht. Der MPO, als ein an der ROS-Synthese beteiligtes Enzym, wird dabei eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Auf die Beteiligung der MPO an diesen pathophysiologischen Mechanismen soll an dieser Stelle Bezug genommen werden.

Die MPO kann durch Bildung von Hypochlorsäure (HOCl) die menschliche DNA schädigen und Mutationen auslösen. Diese stehen im Verdacht an der Entwicklung verschiedener Krebserkrankungen beteiligt zu sein. Seit 1997 wurden zahlreiche Studien durchgeführt, mit dem Ziel die Bedeutung eines Polymorphismus im Myeloperoxidase-Gen (MPO-463 G/A) als Risikofaktor für bestimmte schadstoffbedingte Krebsarten zu eruieren. Bei Trägern mit der A-Allelvariante zeigte sich durch eine verringerte MPO-Expression eine geringere Aktivierung von Tabakkarzinogenen und somit ein verringertes Risiko für Lungenkarzinome (London *et al.*, 1997; Cascorbi *et al.*, 2000; Le Marchand *et al.*, 2000; Schabath *et al.*, 2000; Kantarci *et al.*, 2002; Feyler *et al.*, 2002; Schabath *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003; Dally *et al.*, 2002 und 2003) Kehlkopfkarzinome (Cascorbi *et al.*, 2000) Gallenblasenkarzinome (Hung *et al.*, 2004) und Hepatoblastome (Pakakasama *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse waren nicht in allen Studien reproduzierbar (Chevrier *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2002; Misra *et al.*, 2001). Der stärkste protektive Effekt konnte in Gewebeproben von Trägern der A Allelvariante in Bezug auf die Entstehung eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms nachgewiesen werden (Dally *et al.*, 2002). Die Untersuchung unterschiedlicher Gewebsanteile (Adeno-CA, Plattenepithel-CA, kleinzelliges CA) innerhalb dieser Studien könnten für die abweichenden und kontroversen Ergebnisse verantwortlich sein (Dally *et al.*, 2003). Ziel der Untersuchungen war die Evaluierung potentieller Biomarker zur Krebsfrüherkennung und die Entschlüsselung möglicher Mechanismen der Karzinogenaktivierung durch den menschlichen Organismus (Bartsch *et al.*, 2003). Des Weiteren soll die klinische Relevanz genetischer Polymorphismen für die Prognose von z.B. Bronchialzellkarzinompatienten mittels dieser Studien überprüft werden.

Auch die folgenden Studien dienten diesem Zweck. Dabei wurden, in durch neurodegenerative Erkrankungen verändertes Gewebe, Anreicherungen von MPO bzw. MPO-Anteilen entdeckt. Man fand diese inner- und außerhalb der Mikroglia/Makrophagen der Multiple-Sklerose-Läsionen (Nagra *et al.*, 1997) und in der Mikroglia seniler Alzheimer Plaques (Reynolds *et al.*, 1999) und Alzheimer-Neuronen

(Green *et al.*, 2004). Zusätzlich wurden erhöhte NAD(P)H-Oxidase-Werte im Bereich der Substantia nigra (pars compacta) in durch Morbus Parkinson geschädigtem Hirngewebe gefunden. Durch Bestimmung der Allelvariante des Polymorphismus im Myeloperoxidase-Gen (MPO-463 G/A) sollte das Erkrankungsrisiko eruiert werden. Das G-Allel war sowohl bei den weiblichen MS- (Nagra *et al.*, 1997) und Alzheimer-Patienten (Reynolds *et al.*, 1999) vorherrschend, während man bei den männlichen Alzheimer-Patienten vorwiegend das A-Allel fand (Reynolds *et al.*, 1999). Da diese Beobachtungen in anderen Studien (Combarros *et al.*, 2002; Styczynska *et al.*, 2003) nicht bestätigt werden konnten, ist der Einfluss eines MPO-Genpolymorphismus auf oben genannte Pathophysiologien weiterhin unklar. Die Tatsache jedoch, dass eine MPO-Anreicherung in diesen geschädigten Geweben, allerdings nicht in äquivalentem gesunden Gewebe vorhanden ist, könnte darauf hinweisen, dass die MPO bei der Pathogenese dieser Erkrankungen eine Rolle spielt (Seymour und Klebanoff, 2005).

Die Rolle der MPO bzw. des oxidativen Stress wird auch für einige Erkrankungen der Niere und ihre Folgeerscheinungen diskutiert: *Rapid progressive Glomerulonephritis* (RPGN) und Vaskulitis (Xiao *et al.*, 2002; D'Agati *et al.*, 2002), Urämie (Witko *et al.*, 1996), Hämodialyse und chronisches Nierenversagen (Toborek *et al.*, 1992; Himmelfarb *et al.*, 2001).

Die G/A-Konversion an Position -463 des MPO-Gens wurde in weiteren Studien mit kardiovaskulären Erkrankungen von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (TNI) in Verbindung gebracht (Pecoits-Filho *et al.*, 2003). Das A Allel führt wahrscheinlich zu einer erniedrigten MPO-Aktivität (s.o.), so dass das Nierengewebe in geringerem Maße oxidativem Stress ausgesetzt wird. Das Ergebnis dieser Untersuchungen konnte zeigen, dass diese G/A-Konversion die Prävalenz von kardiovaskulären Komplikationen bei TNI-Patienten verringert.

Neben diesen Erkrankungen scheint die Rolle der MPO bei der Erforschung der Arteriosklerose in den Vordergrund wissenschaftlichen Interesses gerückt zu sein (s. a. Punkt 4, Diskussion). Es existieren zahlreiche Studien über kausale Zusammenhänge zwischen MPO, Entzündungsprozessen und akuten/chronischen Manifestationen kardiovaskulärer Erkrankungen. In atherosklerotischen Läsionen (Daugherty *et al.*, 1994), nicht jedoch in unbeschädigter Arterienintima (Malle *et al.*, 2000) konnte die MPO und ihre Reaktionsprodukte nachgewiesen werden. Zhang *et al.* (2001) und Sugiyama *et al.* (2001) konnten erhöhte MPO-Konzentrationen im Plasma von

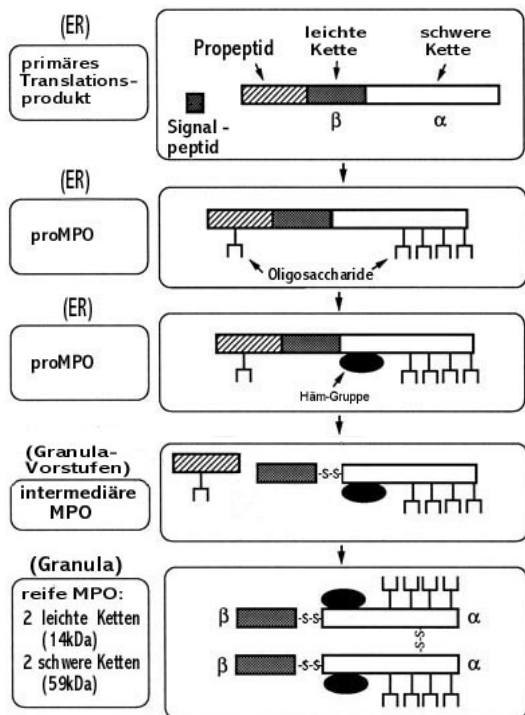


Patienten mit koronarer Herzkrankheit (CAD= *coronary artery disease*) zeigen. Durch Bindung und anschließende Oxidation des LDL (*low density lipoprotein*) zu oxLDL (Carr *et al.*, 2000) und ihre Rolle im NO-Stoffwechsel (Eiserich *et al.*, 2002; Galijasevic *et al.*, 2003) ist sie an der Atherogenese maßgeblich beteiligt.

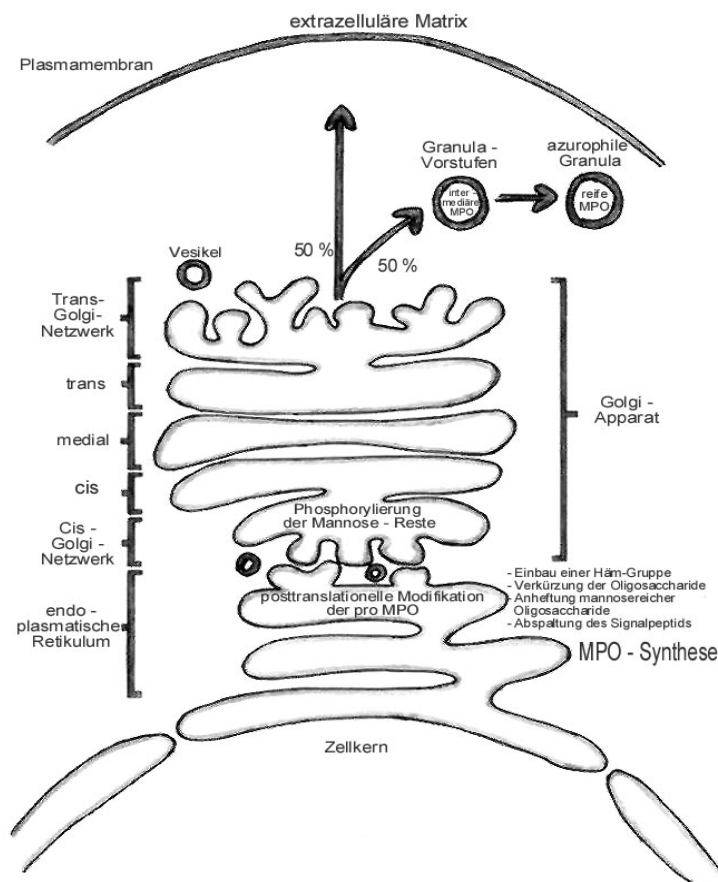
Die Messung der MPO könnte in Zukunft als hochsensitiver Marker zur Risiko- und Prognosestratifizierung oben genannter Krankheiten dienen. Dies wird insbesondere bei der Identifizierung von Patienten mit akutem Koronarsyndrom von großem Interesse sein, da die MPO insbesondere bei den Patienten erhöht ist, die noch keine laborchemischen Hinweis für einen Herzmuskelzelluntergang aufweisen (Baldus *et al.*, 2003; Brennan *et al.*, 2003; Cayley *et al.*, 2004).

Unter der Fragestellung, ob Patienten mit hereditär erhöhten MPO-Spiegeln eventuell gefährdeter sind kardiovaskuläre Erkrankungen zu erleiden, laufen zur Zeit Untersuchungen im Rahmen einer prospektiven Studie unter der Leitung von S. Baldus am kardiologischen Institut des universitären Herzzentrums Hamburg-Eppendorf. Dabei soll der G/A MPO-Polymorphismus und der MPO-Plasma-Spiegel bei jungen Patienten mit rapid progredienten Koronarkrankheit, ischämischer Kardiomyopathie und einem gesunden Kontrollkollektiv (n=700) untersucht werden. Da das Ergebnis dieser Studie noch aussteht, bleibt zur Zeit noch unbeantwortet, ob ein erhöhter MPO Plasma Spiegel mit einem gesteigerten Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis korreliert. Je nach Ausgang der Studie könnte die MPO ein Meilenstein in der prädiktiven Diagnostik darstellen.

Allen Studien gemein ist, dass die Grundlagenforschung der MPO einen wichtigen Beitrag zur Entschlüsselung noch unbekannter Pathomechanismen leistet. Diese Doktorarbeit gliedert sich ein in den Versuch, grundlegende zelluläre Abläufe zu ergründen, um später Therapieansätze zu entwickeln.



**Abb. 1.5**  
**Schematische Darstellung der schrittweisen Prozessierung der MPO.**  
 (modifiziert nach Andersson *et al.*, 1998)  
 Vom primären Translationsprodukt wird zuerst das Signalpeptid abgespalten und darauf folgt die kotranslationale N-Glykosylierung und postrational das Einfügen einer Häm-Gruppe. Die intermediäre MPO wird in den Granula-Vorstufen weiter prozessiert und durch Entfernung des Propeptids entsteht die reife MPO. Die Mannose 6-Phosphorylierung der N-Glykane ist hier nicht aufgeführt.



**Abb. 1.6** Darstellung des Transports der MPO und deren Synthese in den intrazellulären Kompartimenten von HL-60 Zellen. (Eigene Darstellung)

### **1.3.3 Proteoglykane**

Proteoglykane sind komplexe Makromoleküle, die verschiedene Aufgaben erfüllen und in den unterschiedlichsten Gewebetypen (Nabelschnur, Bandscheibe, Haut, Lunge, Knorpel, Knochen etc.) zu finden sind. Sie kommen überwiegend im Extrazellulärraum und auf der Zelloberfläche, sowie z.T. im Zellinneren vor und werden von nahezu allen tierischen Zellen synthetisiert, darunter auch Zellen des Immunsystems und Tumorzellen. Ihre Funktionen innerhalb und außerhalb der Zelle sind sehr vielfältig. Besonders ihre Aufgabe in der extrazellulären Matrix und an der Zelloberfläche sind gut erforscht, jedoch wurde ihre biologische Rolle in der Speichergranula und eventuell anderen Kompartimenten bis vor einigen Jahren noch wenig Beachtung geschenkt.

#### **1.3.3.1 Aufbau**

Das „Rückgrat“ der Proteoglykane bildet eine Polypeptidkette, das sogenannte *core*-Protein. An diese Polypeptidkette ist eine variable Anzahl (einer bis mehr als hundert) von langen Glykosaminoglykan (GAG)-Ketten kovalent gebunden (Abb. 1.7 B) (Kjellén und Lindahl, 1991).

Alle Glykosaminoglykane sind aus Dissacharid-Einheiten aufgebaut. Diese bestehen entweder aus sulfatiertem N-Acetylgalactosamin (Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat) oder sulfatiertem N-Acetylglucosamin (Heparin, Heparansulfat, Keratansulfat) und einer Uronsäure (Glucuronsäure, Iduronsäure) bzw. Galaktose (Greiling *et al.*, 1995).

Einige Kohlenhydrat-Seitenketten tragen Sulfat-Reste, weshalb die Proteoglykane stark sauer sind. Die Uronsäuren-haltigen Glykosaminoglykane sind über folgende Sequenz an das Protein-*core* gebunden: (1→4)-β-D-Glucuronido-(1→3)-β-D-galactosido-(1→3)-β-D-galactosido-(1→4)-β-D-xylosido-O-serin (Abb. 1.7 C) (Kjellén und Lindahl, 1991).

Sowohl die GAGs, durch die negative Ladung ihrer Zucker, als auch die *core*-Proteine können mit anderen Proteinen interagieren (Kjellén und Lindahl, 1991). Aus diesem Grund können Proteoglykane vielfältige Funktionen im Organismus übernehmen.

Biochemische Untersuchungen der HL-60 Zellen ergaben, dass die meisten Proteoglykane 7-8 Chondroitinsulfat-Seitenketten haben mit einer relativen molaren Masse von etwa ~ 10 kDa. Chondroitinsulfate sind der wichtigste Bestandteil der Proteoglykane. Hauptsächlich findet man sie im Knorpel (Chondr.: Wortteil mit der

Bedeutung Knorpel, Korn; von gr. χόνδρος; Pschyrembel, klinisches Wörterbuch, 257. Auflage, 1994, S. 257).

Sie sind aus N-Acetylgalactosamin und Glucuronsäure (Disaccharideinheiten) aufgebaut (Abb. 1.7 A). Unterschieden werden sie anhand der Stellung der Sulfatgruppen am N-Acetylgalactosamin. Beim Chondroitinsulfat A sind die Sulfat-Gruppen in 4-Stellung (Chondroitin-4-sulfat) gebunden, beim Chondroitinsulfat C in 6-Stellung (Chondroitin-6-sulfat) und beim Chondroitinsulfat E sind sowohl die 4. und die 6. Position sulfatiert.

Die meisten Chondroitinsulfat-Seitenketten hematopoetischer Zellen (Schleimhaut-Mastzellen, basophile Granulozyten, natürliche Killerzellen und Thrombozyten) weisen mehr als eine Sulfat-Gruppe pro Disaccharid auf. So ist z.B. das N-Acetylgalactosamin von Mastzellen der Mäuse-Schleimhaut, häufig an Position 4 und 6 sulfatiert (Chondroitinsulfat E). Diese Sulfatgruppen verleihen den Seitenketten, neben den negativen Ladungen der Uronsäuren, eine starke negative Ladung. Lohmander konnte zeigen, dass 85% der Chondroitinsulfat-Seitenketten der HL-60 Zellen in 4-Stellung sulfatiert und 15% nicht sulfatiert sind (Lohmander *et al.*, 1990).

### 1.3.3.2 Synthese und Modifizierung

Der Transkription der *core*-Protein-Gene folgt die Synthese im Nukleus die Prozessierung der mRNA(s) und ihre Translation an den membrangebundenen Polysomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (RER). Bei Proteoglykanen, deren *core*-Proteine Heparin, Heparansulfat, Dermatansulfat und Chondroitinsulfat enthalten, erfolgt der initiale Schritt der Glykosylierung mittels Xylosyltransferase I. Sie katalysiert die Verbindung eines Xyloserestes mit spezifischen Serinresten des *core*-Proteins (Schwartz, 1977). Nach der Fertigstellung dieser Zucker-Verbindung, werden sukzessive weitere Zucker transferiert, wobei die Anheftung des 5. Zuckers über die Glykosaminoglykan-Art entscheidet (Prydz und Dalen, 2000). Zur Herstellung von Chondroitinsulfat, das aus modifizierten N-Acetylgalactosamin (GalNAc)-und Glucuronsäure-Resten aufgebaut ist (s.o.), wird als 5. Zucker GalNAc addiert (Abb. 1.7 C). Der Xylosylierungs-Ort ist zelltyp- und speziesspezifisch. Die Xylosylierung kann sowohl im ER (Kearns *et al.*, 1991; Vertel *et al.*, 1993) als auch im Golgi-Apparat erfolgen (Nuwayhid *et al.*, 1986; Lohmander *et al.*, 1989). Die Verlängerung und Sulfatierung der Ketten der Chondroitinsulfat-Proteoglykane findet im Golgi-Apparat statt.

### **1.3.3.3 Proteoglykane und Granula**

In den azurophilen Granula der Neutrophilen findet man kleine Mengen von Proteoglykanen, während sie im Golgebereich reichlich vorkommen (Niemann *et al.*, 2004). Diese besitzen hauptsächlich Chondroitinsulfat-Seitenketten. Hingegen werden in den proteoglykan-haltigen Granula von Mastzellen und natürlichen Killerzellen Hydrolasen und andere kationische Proteine in Form von Komplexen, in einem dichten Netzwerk anionischer GAG-Ketten, gespeichert (Kamada *et al.*, 1989; Deshpande *et al.*, 1987). Das Proteoglykan verhindert, dass Enzyme in Kontakt mit dem Substrat kommen. Somit kann die Autolyse der Granula vermieden werden. Es scheint als wären die Proteoglykane in dieser Weise für den Erhalt der strukturellen Integrität der Granula verantwortlich, ungeachtet ihres Inhalts mit potentiell destruktiven Enzymen.

### **1.3.3.4 Serglycin**

Serglycin ist das Hauptproteoglykan in den Speichergranula der meisten hematopoetischen Zellen, Monozyten und Makrophagen und gehört somit zu den intrazellulär gelegenen Proteoglykanen. Zum ersten Mal entdeckt wurde dieses Proteoglykan als ein Syntheseprodukt einer Tumorzelllinie (L2) aus dem Dottersack einer Ratte (Oldberg *et al.*, 1981).

Serglycin war das erste Proteoglykan, dessen *core*-Protein cDNA geklont werden konnte (Bourdon *et al.*, 1985). 1988 gelang es Avraham *et al.* aus der komplementären DNA (cDNA), der basophilen leukämischen Rattenzelllinie (RBL-1) die cDNA für das *core*-Protein des Serglycins zu isolieren. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass dieses Protein mit dem Syntheseprodukt der Tumorzelllinie (L2) identisch war. Demzufolge besteht dieses Ratten-Protein, nach der Entfernung des Signalpeptids (26 AS), aus 153 Aminosäuren mit 24 sich wiederholenden Serin-Glycin-Sequenzen (S/G *repeat*), die zwischen der Aminosäure 89 und 137 liegen. Die Serin-Glycin-Sequenzen werden von der Xylosid-Transferase erkannt, die die Synthese der Glykosaminoglykane initiiert (s.o.). An diese Region werden bis 15 Glykosaminoglykan-Ketten angeheftet, die dem Serglycin seine charakteristische Struktur und Eigenschaften verleihen (Abb. 1.7 B).

Später fand man heraus, dass dieses kleine (16 kDa) *core*-Protein in vielen hematopoetischen Zellen gebildet wird. So wurde es auch zum Beispiel aus humanen Thrombozyten gewonnen und die komplette Aminosäuresequenz analysiert (Alliel *et*

*al.*, 1988). Des Weiteren konnte die cDNA von Serglycin aus der humanen promyelozytischen Zelllinie HL-60 generiert und das Protein charakterisiert werden (Stevens *et al.*, 1988). Bei dem Vergleich dieser cDNA und der cDNA, die aus murinen hematopoetischen Zellen kloniert wurde (Kjellén *et al.*, 1989), zeigte sich, dass sie am NH<sub>2</sub>-terminalen Ende viele Übereinstimmung mit dem Protein-*core* der Zelllinie L2 aus der Ratte aufwies, jedoch am COOH-terminalen Ende fast gar keine Übereinstimmungen zu finden waren. Dieses N-terminale Ende scheint somit eine sehr konstante Region zu sein. Daraus folgerte Avraham *et al.* (1988), dass es sich hierbei um eine für die Struktur, Funktion und den Metabolismus wichtige Region handeln muss.

Das humane Serglycin aus HL-60 Zellen besitzt allerdings nur 9 Serin/Glycin-Wiederholungen, wobei ein Serin durch ein Phenylalanin ersetzt ist, was die maximale Anzahl von anheftbaren GAG-Seitenketten auf 8 reduziert.

Auch bei Bindegewebsmastzellen von Mäusen lassen sich Proteoglykane mit der Eigenschaft, kationische Proteinase, Carboxypeptidasen und andere Moleküle zu binden, nachweisen (Humphries *et al.*, 1999; Forsberg *et al.*, 1999). An deren *core*-Protein sind jedoch anstelle der Chondroitinsulfat-Seitenketten überwiegend Heparansulfat-Ketten gebunden. Diese zeigen die größte Anzahl an anionischen Gruppen, die bei vergleichbaren Biopolymeren bis jetzt gefunden wurden. Bindegewebsmastzellen synthetisieren 10 oder auch mehr Heparansulfat-Ketten mit einem Molekulargewicht von ~ 100 kDa, die an dem *core*-Protein des Serglycins kovalent gebunden sind.

### 1.3.3.4.1 Biologische Funktionen von Serglycin

Eine wichtige Aufgabe von Serglycin scheint zum einen der Schutz von Granula vor Selbstverdauung durch Komplexierung von Hydrolasen zu sein und zum anderen die verzögerte, kontrollierte Abgabe von kationischen bioaktiven Substanzen nach Degranulierung am Ort der Entzündung bzw. an der Kontaktstelle von Killer- und Zielzelle zu dienen. Zusätzlich findet durch die Anlagerung der kationischen Gruppen an die anionischen Seitenketten ein Ladungsausgleich statt (Humphries *et al.*, 1999; Forsberg *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte man zeigen, dass Serglycin für den Transport von verschiedenen Proteinen in die sekretorische Granula zuständig sein könnte (Sali *et al.*, 1991; Lemansky und Hasilik, 2001; Niemann *et al.*, 2007). Durch das Vorhandensein des Serglycins in den verschiedenen Zelltypen (siehe Tab.1.1), wird

deutlich, dass es an vielen weiteren biologischen Prozessen beteiligt ist. Für einige dieser Aufgaben, wie z.B. die Abwehr von eingedrungenen Mikroorganismen (Bakterien), die Regulation der Blutstillung, das Abtöten von Tumorzellen und die Wundheilung, ist die Ausschüttung der Inhalte der Sekretionsgranula essentiell.

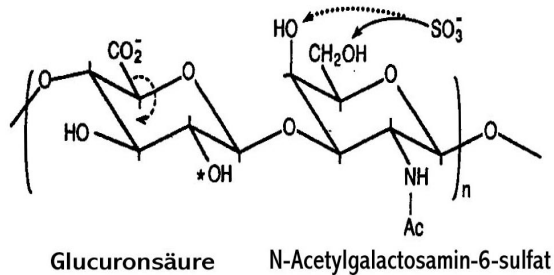
<b>Zelltyp</b>	<b>GAG-Typ</b>	<b>Zusätzliche granuläre Bestandteile</b>
Polymorphnukleäre Leukozyten	CS	Gelatinase, Lactoferrin, MPO
Gewebsmastzellen	Heparansulfat	Histamin, Chymase, (mMCP-4,5), Tryptase
Schleimhautmastzellen	CS	Histamin, Chymase, (mMCP-1,2)
Endothelzellen	CS	Plasminogenaktivator (Gewebstyp)
Pankreatische Azinuszellen	CS	Procarboxypeptidase, Amylase

**Tab. 1.1** Serglycin exprimierende Speichergranula-Zellen und deren zusätzliche granuläre Bestandteile (modifiziert nach Kolset *et al.*, 2004).

A

### Chondroitinsulfat

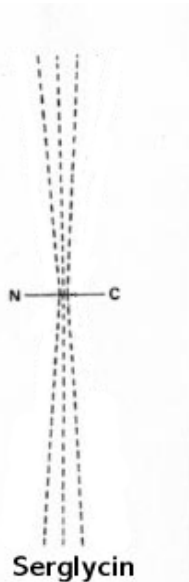
-1,4-glcUA- $\beta$ -1,3-galNAc- $\beta$ -



Glucuronsäure

N-Acetylgalactosamin-6-sulfat

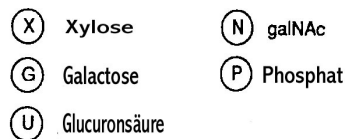
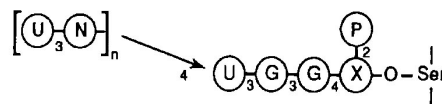
B



Serglycin

C

### Chondroitinsulfat



**Abb. 1.7** Schematische Darstellung des Chondroitinsulfats (Abb. 1.7A), des Serglycins (Abb. 1.7B) und der Verknüpfungsregion der Glykosaminoglykanketten mit dem *core*-Protein (Abb. 1.7C).

**Abb. A** zeigt das Disaccharid Chondroitinsulfat, das aus modifizierten N-Acetylgalactosamin- und Glucuronsäure-Resten besteht. Am häufigsten sind die Hydroxyl-Gruppen des N-Acetylgalactosamins an Position 4 und 6 mit Schwefelsäure verestert (angedeutet mit dem gepunkteten und dem durchgezogenen Pfeil). Diese Sulfatgruppen verstärken die negative Ladung und die hydrophilen Eigenschaften der Chondroitinsulfate.

**Abb. B** zeigt eine schematische Darstellung des Proteoglykans Serglycin. Zu erkennen ist das *core*-Protein (durchgezogene waagerechte Linie), an dessen mittlerer Region (Serin/Glycin-Region) die langen Glykosaminoglykan-Ketten kovalent gebunden sind (gestrichelten Linien). Die Länge dieser Seitenketten und deren Häufigkeit ist zelltyp- und speziesspezifisch.

**Abb. C** zeigt die Verbindungregion der Glykosaminoglykanketten zum *core*-Protein.



Die Verküpfungsregion (*linkage region*) besteht aus vier Zuckern, wobei die terminale Xylose  $\beta$ -glykosidisch mit der Hydroxylgruppe des Serins verbunden ist. Oft ist die Xylose an Position 2 zusätzlich mit einem Phosphat verestert (Oegema *et al.*, 1984).

Nach Abb. 2-2 B (Abb. A), 2-4 (Abb. B), 2-3 A (Abb. C) aus Hay DE. Cell Biology of Extracellular Matrix. 2. Auflage, Plenum Press, New York, 1991. Wight TN, Heinegård DK, Hascall VC. Proteoglycans: Structure and Function.

## 1.4 Transport der Enzyme in die Granula

### 1.4.1 Transport löslicher lysosomaler Enzyme

#### (Mannose-6-Phosphat-abhängiger Transport)

Die Steuerung löslicher lysosomaler Enzyme in die Endosomen/Lysosomen erfolgt überwiegend über die Bindung an Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPRs). Es gibt zwei Arten von MPRs, den kationenabhängigen Mannose-6-Phosphat (M6P)-Rezeptor (CD-MPR) und der kationenunabhängigen M6P/*insuline like growth factor II* (IGF-II)-Rezeptor (CI-MPR). Beide gehören zu den glykosylierten Transmembranproteinen mit einem luminalen N-Terminus (= Typ-I-Membranproteine).

Die lysosomalen Hydrolasen werden nach ihrer Synthese im ER und im Golgi-Apparat mit sog. Erkennungsmarkern (*recognition marker*) modifiziert. Im ER werden Oligosaccharide auf Asparagin-Reste der Enzymproteine übertragen und im *cis*-Golgi Kompartiment an C-6 Hydroxylgruppen von ein bis zwei Mannoseresten N-Acetylglucosaminyl-Phosphatreste übertragen (= *covered recognition marker*). Von den gebildeten Phosphodiester werden im *trans*-Golgi Netzwerk (TGN) durch Hydrolyse die N-Acetylglucosaminylreste entfernt (= *uncovered recognition marker*). Die derart markierten Proteine binden an Mannose-6-Phosphat-Rezeptorproteine (CD-MPR und CI-MPR), die in knospenden Arealen der TGN-Membran konzentriert und in Clathrin-beschichteten Vesikeln verpackt werden. Die Markierung mit Mannose-6-Phosphat-Resten dient der Rezeptor-vermittelten Zielsteuerung und dem Transport dieser Enzyme in die endosomalen/lysosomalen Kompartimente (Dahms *et al.*, 1989). Die Bindung der lysosomalen Proteine an die Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren wird in den sauren späten Endosomen (pH-Wert < 6) gelöst. Die Rezeptoren werden via *recycling* Transportvesikel zum TGN oder zur Plasmamembran gebracht. Die lysosomalen Enzyme werden zu den reifen Lysosomen weitergeleitet und dort dephosphoryliert. Somit enthalten die Lysosomen den Hauptanteil an dephosphorylierten Hydrolasen und

die Endosomen enthalten die phosphorylierten Formen (Ludwig *et al.*, 1991). Ein geringer Prozentsatz der löslichen M6P-haltigen lysosomalen Enzyme (ca. 10%) entgeht der Sortierung im TGN und gelangt über den konstitutiven Transportweg an die Zelloberfläche, wo sie in das extrazelluläre Medium abgegeben werden. Die M6P-Rezeptoren (CI-MPRs), die an die Zelloberfläche geleitet und in den Clathrin-beschichteten Grübchen (*coated pits*) der Plasmamembran konzentriert werden, können die sezernierten Enzyme auf diesem Weg ihrem eigentlichen Bestimmungsort, den Lysosomen, zuführen (= *secretion-recapture*).

Procathepsin ist ein Beispiel löslicher lysosomaler Enzyme. Es wird vorwiegend über den Mannose-6-Phosphat Rezeptor in die Lysosomen geschleust. Es gibt jedoch auch einen Anteil an Procathepsin, der in die Lysosomen unabhängig von den beiden M6P-Rezeptoren transportiert wird.

### 1.4.2 Mannose-6-Phosphat-unabhängiger Transport

Seit der Entdeckung des M6P-abhängigen Transports, versucht man auch die alternativen Transportwege für lysosomale Enzyme zu entschlüsseln, die in einigen Zelltypen aktiv sind. Bei einer genetisch bedingten lysosomalen Speicherkrankheit, genannt I-Zellen-Krankheit, ist der M6P-Transportweg defekt. Den betroffenen Personen fehlt die GlcNAc-Phosphotransferase, d.h. Mannose-Reste in Oligosaccharidseitenketten löslicher lysosomaler Vorläuferproteine können nicht mehr phosphoryliert und dementsprechend von den M6P-Rezeptoren nicht erkannt und nicht in die Lysosomen zahlreicher Organe und Zellen z.B. der Fibroblasten transportiert werden. Die hydrolytischen Enzyme werden aus diesem Grund überwiegend an die Zelloberfläche transportiert und sezerniert. Die Enzyme, die den Lysosomen fehlen, findet man im Blut dieser erkrankten Personen. Interessanterweise werden nicht alle Zellen durch diesen Defekt gleichermaßen beeinflusst. Glickman und Kornfeld (1993) konnten zeigen, dass Patienten, die an der I-Zell-Krankheit leiden, einen normalen Gehalt an lysosomalen Enzymen in Lymphoblasten aufweisen, obwohl auch diese Zellen nicht in der Lage waren Mannose-6-Phosphat-Signale zu bilden. Dem entsprechend sind normale Lymphoblasten in der Lage nicht glykosyliertes Cathepsin D über einen M6P-unabhängigen Transportweg in die Lysosomen zu schleusen. Auch Hepatozyten (Rijnboutt *et al.*, 1991) und Histozyten benutzen einen M6P-unabhängigen Transportweg. In den entsprechenden Zellen und Organen der I-Zellen

Patienten findet man daher keine gravierenden Veränderungen der Lysosomen. In der Literatur sind viele verschiedene Beispiele für den M6P-unabhängigen Transport der lysosomalen Enzyme bekannt und auf einige soll an dieser Stelle verwiesen werden (Waheed *et al.*, 1987; Rijnboutt *et al.*, 1991; McIntyre und Erickson, 1993; Zhu und Conner, 1994; Nishimura und Himemoto, 1995; Tikkanen *et al.*, 1995; Nissler *et al.*, 1998; Hiesberger *et al.*, 1998). Jedoch wenig bekannt sind die Mechanismen des M6P-unabhängigen Transports.

Auch das Lysozym kann den herkömmlichen Weg über den Mannose-6-Phosphat-abhängigen Transport nicht nutzen, da es nicht glykosyliert ist. Das Lysozym ist jedoch in der Lage aufgrund seines basischen Charakters an das Chondroitinsulfat des Serglycins zu binden (Kolset *et al.*, 1996). Basierend auf diesem Wissen konnte gezeigt werden (Lemansky und Hasilik, 2001), dass das Lysozym in U937 Zellen mit der Hilfe von Serglycin in die Lysosomen transportiert wird und nicht wie sonst bei löslichen lysosomalen Enzymen, unter Beteiligung des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors. Überdies besitzen auch die Defensine (ein weiteres kationisches Enzym der azurophilen Granula) keine M6P-Markierung, weshalb auch sie nicht den M6P-Sortierungsmechanismus benutzen können (Ganz *et al.*, 1985; Michaelson *et al.*, 1992; Valore und Ganz, 1992). Nauseef *et al.* (1992) konnte darstellen, dass die reife Myeloperoxidase zwar Mannose-6-Phosphat-Reste aufweist, diese auch von dem M6P-Rezeptor erkannt werden, jedoch scheint dieser Erkennungsprozess nicht entscheidend für den Transport zu den azurophilen Granula zu sein. Interessant erscheint auch, dass in den azurophilen Granula die M6P-Reste intakt bleiben, während sie ansonsten von den lysosomalen Enzymen entfernt werden, wenn sie ihren Bestimmungsort (Lysosomen) erreicht haben. Es scheint als würden die Bedingungen zur Entfernung der Mannose-6-Phosphat-Reste innerhalb der azurophilen Granula nicht existieren (Cieutat *et al.*, 1998).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits in Kapitel 1.4.1 erwähnt, ist der Transport der phosphorylierten löslichen lysosomalen Enzyme zu den Lysosomen/Endosomen recht gut untersucht und geklärt.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen M6P-unabhängigen Weg, der MPO in die azurophilen Granula zu finden und zu untersuchen.

Studien, die sich bisher mit dieser Frage beschäftigt hatten, legten den Schwerpunkt ihrer Suche auf die Funktion des Propeptids beim Transport der MPO in die Granula (Andersson *et al.*, 1998; Bülow *et al.*, 2002). Man kam allerdings zu dem Ergebnis, dass das Propeptid zwar wichtig für die Faltung der MPO sei, somit auch für den Transport aus dem endoplasmatischen Retikulum, jedoch scheint damit auch schon die Funktion des Propeptids erklärt zu sein. Es bleibt also weiterhin anzunehmen, dass ein anderer Mechanismus bei unserer Fragestellung eine Rolle spielt.

Grundlage dieser Arbeit war die Entdeckung, dass das Lysozym durch die Bindung an das Chondroitinsulfat des Serglycins (Kolset *et al.*, 1996) in die Lysosomen transportiert wird (Lemansky und Hasilik, 2001). Hierzu wurden U937 Zellen (eine humane Promonocyten Zelllinie) mit einem Phorbolster (*tetradecanoyl phorbol acetat*, TPA) behandelt, der eine selektive Hemmung der Segregation von Lysozym bewirkt (Radons *et al.*, 1994), d.h. unter dem Einfluss von TPA wurde das Lysozym nicht mehr gespeichert, sondern fast komplett sezerniert.

Die für unsere Versuche notwendige MPO und das Serglycin entstammen der humanen myeloblastären HL-60 Zelllinie (s. Kapitel 2.1.6), welche einen hohen Gehalt dieser Zellprodukte aufweist.

Da es sich bei der MPO desgleichen um ein kationisches Enzym handelt, galt es herauszufinden, ob dieser Transportmechanismus auch auf die MPO und evtl. andere Proteine übertragen werden kann.

Um den Beweis für diese These erbringen zu können, sollte:

1. das Bindungsverhalten der proMPO bzw. reifen MPO an Chondroitinsulfat (CS)-Sephrose untersucht werden
2. der Transportweg des Serglycins zu den azurophilen Granula, durch Markierung der sulfatierten CS-Seitenketten mit [<sup>35</sup>S]Sulfat sichtbar gemacht, und sodann mit dem Transport der MPO verglichen werden
3. durch Behandlung von HL-60 Zellen überprüft werden, ob TPA auf den Transport der MPO und des Serglycins einen ähnlichen Einfluss hat, wie auf das oben genannte

Lysozym

4. die MPO mit Serglycin, als Nachweis für ihre Komplexbildung am Ort der Segregation, d.h. im *trans*-Golgi-Netzwerk in HL-60 Zellen, quervernetzt werden
5. die Affinität von weiteren, in Anwesenheit von TPA sezernierten Proteinen aus HL-60 Zellen zu CS-Sepharose, geklärt werden
6. zum Schluss dieser Arbeit, das Procathepsin, als exemplarisches Beispiel für ein klassisches, M6P-haltiges, lysosomales Enzym herausgegriffen und dessen Bindungsverhalten, ähnlich wie bei der MPO, an CS-Sepharose überprüft werden

Letztendlich dienen alle diese Versuche dem Zweck, Serglycin als möglichen Transporter für alle kationischen Polypeptide zu überprüfen, oder wie im Fall des Procathepsins, als Alternativ-Transportmechanismus zum M6P-Rezeptor-System.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Laborgeräte und Materialien**

#### **2.1.1 Laborgeräte**

Zur Durchführung der Experimente wurden die nachfolgend aufgeführten Geräte mit ihren Zubehörteilen und andere Materialien verwendet:

- Axiophot (von Zeiss)
- Cellophanfolie (Pütz Folien, Taunusstein-Wehen)
- Drehrad (Eigenbau der Universitätswerkstatt)
- Elektrophoresekammern (Eigenbau der Universitätswerkstatt)
- ELISA-Reader (Dynatech Laboratories MRX, Denkendorf)
- GB 004-Filterpapiere (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Flüssigkeitsszintillationszähler (1600 TR, Canberra-Packard, Illinois)
- Gelrockner (Model 583 Bio-RAD, München)
- Heizblock (Eigenbau der Universitätswerkstatt)
- Inkubator für die Zellkultur (Heraeus, Hanau)
- Membran-Vakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim)
- Microtiterplatten (Nunc-Immuno<sup>TM</sup>Modules/Wiesbaden)
- pH-Meter (Modell Delta 320, Mettler/Giessen)
- Phosphor-*imager* (Molecular Dynamics, Krefeld)
- Nitrozellulose-Membran (Sartorius, Göttingen)
- *Semidry-blotting*-Apparatur (Bio-RAD, München)
- Röntgenfilme Kodak XAR-5 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Röntgenfilmkassetten
- Spannungsgerät (Pharmacia EPS 500/400, Freiburg)
- sterile Werkbank (Herasafe, Heraeus Typ HS 12/2, Hanau)
- Tischzentrifugen (RMC 14 & Super T21 Sorvall, Bad Homburg; Modell 5414 Eppendorf, Hamburg; Biofuge 13 Heraeus, Hanau; Labofuge 400e Heraeus, Hanau)

- Ultraschallbad (Model G 112 SPIT, Laboratory supplies, Inc Hicksville, N.Y., USA)
- Vortex (Bender & Hobein AG, Zürich)
- Waagen (Sartorius, Göttingen; Scaltec, Heiligenstadt)
- Wasseraufbereitungsanlage (Milli Q UF-Anlage der Firma Millipore, Erkrath)
- Wasserbäder (Köttermann 3043, Münster; Braun, Thermomix B4, Melsungen)
- Wippe (Eigenbau der Universitätswerkstatt)
- Zellaufschlussgerät (Kontess, Glass Company)
- Zellzählgerät (Casy 1, Schärfe)

### 2.1.2 Chemikalien

Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Serva, Heidelberg
APS (Ammoniumperoxidsulfat)	Serva, Heidelberg
Äthanolamin	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (bovines Serumalbumin)	Serva, Heidelberg
Chondroitinsulfat-Sepharose (Herstellung durch Kopplung von CS an CNBr <sup>-</sup> aktivierte Sepharose nach den Instruktionen des Herstellers)	Pharmacia, Freiburg
Cetylthrimethylammoniumbromid (CTAB)	Merck, Darmstadt
Dithio-bis-succinimidylpropionat (DSP)	Pierce, Rockford, Illinois, USA
ECL (enhanced chemoluminescence)	Amersham Pharmacia, Freiburg
Ethanol	Riedel-de Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Boehringer, Ingelheim
Magnesiumchlorid	Serva, Heidelberg
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Mowiol	Aldrich, Taufkirchen
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorat (NaClO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg

## **Material und Methoden**

Pansorbinzellen (Staph. <i>A</i> -Suspension)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva, Heidelberg
Prestained Protein Marker	Biolabs, New England
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
SDS (sodium/Natriumdodecylsulfat, 100% C-12)	Roth, Karlsruhe
Sepharose C1-4B (CNBr-aktiviert)	Pharmacia, Freiburg
Trichloressigsäure (TCA)	Merck, Darmstadt
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg

Alle nicht genannten Chemikalien kamen von Sigma-Aldrich, Taufkirchen und entsprachen mindestens dem Reinheitsgrad „pro analysi“ (p.a.).

### **2.1.3 Radiochemikalien**

Met [ <sup>35</sup> S]-Label (Mischung aus: 70% L-Methionin 15% L-Cystein)	11-18 MBq/ml, Hartmann Analytic, Braunschweig
[ <sup>35</sup> S]Sulfat	28,5-74 MBq/ml, Hartmann Analytic, Braunschweig
<sup>14</sup> C-methylierter, molekularer Massenstandard für die Gelelektrophorese (kDa)	185 KBq/ml, Sigma- Aldrich, Taufkirchen
Myosin	220
Phosphorylase b	97,4
BSA	69
Ovalbumin	46
Carboanhydrase	30
Lysozym	14,4



### 2.1.4 zellaktive Wirkstoffe

**12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA)** ist ein polyzyklischer Ester, gewonnen aus dem Öl der Crotonpflanze (Euphorbiaceae = Wolfsmilchgewächse, wie z.B. Weihnachtsstern, Kautschukbaum). Es regt verschiedene Leukämie-Zell-Linien (u.a. HL-60 Zellen) zur Differenzierung an (Lotem und Sachs, 1979), indem er als Diacylglycerol-Analogon die Proteinkinase C aktiviert und intrazellulär die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen Konzentration erhöht. Die Proteinkinase C ist ein Enzym, welches für die Signaltransduktion in eukaryoten Zellen und somit für die Differenzierung und Regulierung zellulären Wachstums, eine entscheidende Rolle spielt. Aktiviert wird sie durch einen sogenannten *second messenger*, dem Diacylglycerol (DAG). Aufgrund der ähnlichen Struktur und der längeren Halbwertszeit des Phorbolesters zum natürlich vorkommenden Diacylglycerol, die die Proteinkinase C dementsprechend länger aktiviert, kann ein Krebswachstum begünstigt werden. 1982 konnte Hirakawa *et al.* die Tumorwachstum fördernde Wirkung nachweisen, seither gehört er zu den am häufigsten in Untersuchungen zur Karzinogenese verwandten Phorbolestern. Neben seiner karkinogenen Eigenschaft, kann dieser Phorbolster noch ausgeprägte Hautverätzungen und Gastroenteritiden induzieren.

**Dimethylsulfoxid (DMSO)** dient im Labor, durch seine gute Löslichkeit in Wasser und organischen Lösungsmitteln (Ketone, Ester, Alkohole etc.) unter anderem als Lösungsmittel, Reaktionsmedium (Oxidationsmittel) und in der Kryokonservierung von Zellen als Gefrierschutzmittel. Durch seine polare Eigenschaft, kann es Zellmembranen durchdringen und wird deshalb häufig in der Medizin als Trägersubstanz (für Wirkstoffe in Salben, Gelen und Pflastern) verwandt. Zum einen schleust DMSO die Wirksubstanz in den Organismus ein, zum anderen wirkt es selbst analgetisch und antiphlogistisch. DMSO kann, genau wie TPA (s.o.), eine Differenzierung von HL-60 Zellen bewirken (Collins *et al.* 1979 und 1980).

**Natriumchlorat ( $\text{NaClO}_3$ )**, das Natriumsalz der Chlorsäure, dient unter anderem als Unkrautvernichtungs- und Entlaubungsmittel. In Verbindung mit Schwefel wird es als Bleichmittel in der Papierindustrie verwandt. In eukaryontischen Zellen hemmt es die Bildung von Sulfat und verhindert so die Sulfatierung von Proteoglykanen (Heparin-

und Chondroitinsulfat) im Golgi-Apparat (Baeuerle und Huttner, 1986; Humphries und Silbert, 1988).

**Dithio-bis-succinimidylpropionat (DSP)** → Lomant's Reagenz, ist membrangängig und kann mit Hilfe seiner beiden reaktiven Gruppen (homobifunktional) räumlich eng beieinander stehende Proteine, über primäre Amine, quervernetzen. Die Reichweite dieses Crosslinkers ist wegen des geringen Abstandes der Proteinbindungsstellen, durch einen sogenannten *spacer*, auf 12 Å limitiert.

### 2.1.5 Antikörper und gereinigte Enzyme

- gegen humane MPO gerichteter, polyklonaler Kaninchen-Antikörper;  
Arbeitsgruppe Hasilik, Universität Marburg (Hasilik *et al.*, 1984)
- gegen Kaninchen IgG gerichteter, an Meerrettich-Peroxidase gekoppelter polyklonaler Ziegen-Antikörper (Bio-Rad ; München)
- eine homogene Präparation humaner Neutrophilen-MPO  
(Geschenk von Dr. R. Olsen, Universität Tromsø, Norwegen) mit 7mg/ml, die im Folgenden MPO III genannt wird
- nichtimmunes Kaninchenserum/50% Glycerol (eigene Herstellung)
- gegen humanes LAMP-2 gerichteter, monoklonaler Mausantikörper (2D5-MAb)  
(Arbeitsgruppe Hasilik, Universität Marburg)
- Ziege-anti-Kaninchen-IgG (Cy2 gekoppelt)  
(Dianova, Hamburg)
- Ziege-anti-Maus-IgG/FITC  
(Dianova, Hamburg)
- gegen LIMP-II gerichteter, polyklonaler Kaninchen-Antikörper (0,44 mg/ml + 50% Glycerol)  
Prof. Y.Tanaka , Kyushu-University, Japan
- Procathepsin D, wurde aus konditioniertem Medium von *Spodoptera frugiperda* Zellen isoliert, die mit rekombinantem Baculovirus infiziert worden waren  
(Gopalakrishnan *et al.*, 2004)



### 2.1.8 Medien und Waschlösungen für eukaryote Zellen

Für die Zellkultur wurden folgende Materialien verwendet:

- RPMI 1640 Medium Gibco BRL, Eggenstein
- Hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum Gibco BRL, Eggenstein
- Penicillin-Streptomycin Gibco BRL, Eggenstein
- Markierungsmedien: defizientes RPMI 1640 Medium, dem für Markierung mit  $[^{35}\text{S}]$ Sulfat oder Met  $[^{35}\text{S}]$ Label die Komponenten Sulfat oder Methionin/Cystein fehlen.
- PBS (*phosphate buffered saline*): 20 mM  $\text{NaP}_i$  / 145 mM NaCl, pH 7,4

### 2.1.9 Lösungen

- 1-fach Immunomix (IMM): 10 mM PBS, 0,5% (w/v) Natriumdesoxycholat, 1% (w/v) TX-100, 0,5% (w/v) BSA, pH 7,4
- Neufeld-Puffer: 10 mM Tris/HCl, 600 mM NaCl, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% NP-40, pH 8,5
- 1-fach Probenpuffer: 125 mM Tris/HCl, 10 mM DTT, 1% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerol, 0,01% Bromphenolblau, pH 6,8

### 2.1.10 Sonstige Materialien

#### Kunststoffartikel

Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL)	Greiner, Nürtingen
Szintillationsgefäße (5 mL)	Canberra Packard, Dreieich
Zentrikonröhrchen (50 mL, unsteril)	Amicon Inc. Beverly, MA USA



Probe 1: 0,4 µl Kaninchen-non-Immunsrum

Probe 2: MPO-Antiserum (aus dem Kaninchen)

Probe 3: monoklonale Mausantikörper (2D5-MAb; 1:5)

Nach Zugabe dieser Antiseren wurden die Ansätze unter ständiger Bewegung (Drehrad bzw. Wippe) bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3 mal für 10 min mit 1 ml Waschlösung bei RT gewaschen.

Nun wurde den Proben der 2. Antikörper in 800 µl PBS/NaN<sub>3</sub>/0,3% TX-100 beigefügt:

Probe 1: 1,6 µl Ziege-µ-Kaninchen-IgG/Cy2

Probe 2: 1,6 µl Ziege-µ-Kaninchen-IgG/Cy2

Probe 3: 1,6 µl Ziege-α-Maus-IgG/FITC

Die Zellen wurden 90 min bei 37 °C inkubiert und dann 4x mit 1 ml der PBS-Lösung für 10 min bei RT gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen mit Hilfe eines Deckgläschens und 20 µl 50% Mowiol/PBS auf einem Objektträger fixiert.

Mikroskopiert wurde an einem Zeiss-Axiophot Fluoreszenzmikroskop mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv.

### **2.2.3 Metabolische Markierung von HL-60 Zellen**

#### **2.2.3.1 Metabolische Markierung mit Met-Label**

RPMI 1640 Medium :     – Methionin und Cystein  
                                  + Penicillin und Streptomycin

Lysispuffer:             TBS  
                                  0,5% TX-100  
                                  1 mg/ml BSA  
                                  0,5 mM IAA  
                                  0,2 M PMSF

10 x 10<sup>6</sup> HL-60 Zellen (1 Mio./ml) wurden 3x mit je 5 ml Methionin- und Cystein-freiem-RPMI-Medium, mit Penicillin/Streptomycin, gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 9 ml des zuvor genannten Mediums, welches zusätzlich 10% dialysiertes FKS enthielt aufgenommen. Die Zellen wurden in zwei gleichgroße Aliquots gesplittet und in kleine Kulturflaschen überführt und 1,5 h bei 37 °C in diesem Medium gehungert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen markiert, indem ihnen 650 µl Medium mit 1 mCi <sup>35</sup>S-Translabel steril hinzugefügt wurden. Nach weiteren 50 min wurde die eine Kultur mit DMSO und die andere mit TPA behandelt. Nach einer Markierungszeit von 22 h wurden die Kulturen 5 min mit 2000 rpm bei RT zentrifugiert, die Medien abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter gepresst und schließlich auf Eis gestellt. Die Zellen wurden einmal mit 5 ml PBS gewaschen, dann sogleich in 0,8 ml des oben genannten Puffers lysiert, 10 min bei RT inkubiert und schließlich 2 min mit 14000 rpm bei RT zentrifugiert.

### **2.2.3.2 Metabolische Markierungen mit [<sup>35</sup>S]Sulfat**

Um die Biosynthese und den Transport von Proteoglykanen in HL-60 Zellen charakterisieren zu können wurde ein so genannter *pulse/chase*-Versuch mit [<sup>35</sup>S]Sulfat durchgeführt.

Die Zellausgangszahl betrug 23 x 10<sup>6</sup> HL-60 Zellen in 40 ml Medium, d.h. 0,8 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml, die auf drei Falconröhrchen verteilt wurden. Die HL-60 Zellen wurden dreimal mit 5 ml sulfatfreiem und mit Ampicillin-versetztem RPMI-Medium gewaschen. Die Zellen wurden dann in je 5 ml des oben genannten RPMI-Mediums, dem zuvor 10% dialysiertes (SO<sub>4</sub>-frei), hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum hinzugefügt worden war, resuspendiert. Es wurde nun einer Kultur 2,5 µl DMSO, der anderen 2,5 µl 10<sup>-4</sup> M TPA (aufgelöst in DMSO) hinzugefügt und die dritte Kultur blieb unbehandelt. Um den Zellen das Sulfat zu entziehen wurden die Zellen nun 4 h bei 37 °C inkubiert, dann 4 min mit 2000 rpm bei RT abzentrifugiert und das Medium bis auf einen Rest von 0,5 ml abgezogen.

Die metabolische Markierung wurde, durch den Zusatz von je 0,5 mCi [<sup>35</sup>S]Sulfat (5 µl) und einer 10-minütigen Inkubation bei 37 °C im Wasserbad vorgenommen. Dem Markierungsmedium wurde nun je 1,7 ml eiskaltes RPMI-Medium hinzugefügt, welches

zuvor mit 10% hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum und 10 mM MgSO<sub>4</sub> ergänzt wurde. Es wurde nach 0/30/60/120 min je 0,5 ml Zellsuspension abgenommen.

Für die Quervernetzung von Proteinen mit Dithio-*bis*-succinimidyl-Propionat (DSP) wurden  $9 \times 10^6$  HL-60 Zellen drei mal in 5 ml sulfatfreiem RPMI-Medium gewaschen und zur Sulfatentfernung in 9 ml dieses Mediums (+ 10% FKS, dialysiert) 2 h bei 37 °C gehungert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation (4 min bei 1000 rpm, RT) komplett abgenommen.

Markierungsmedium:	500 µl RPMI (-SO <sub>4</sub> )/10% FKS
	200 µl [ <sup>35</sup> S]Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (= ca. 2 mCi)
	20 µl 0,1 mM NaOH/9% NaCl

Die Zellen wurden in diesem Medium für 20 min (37 °C) markiert. Nach der Zentrifugation (Eppendorffzentrifuge 20 s, RT) wurden die Zellen drei mal mit 800 µl PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert.

### **2.2.4 Affinitätschromatographie mit CS-Sepharose**

#### **2.2.4.1 Herstellung von konzentrierten HL-60 Zellextrakten/TPA-Medien**

Waschlösung:	PBS/NaN <sub>3</sub>
	0,3% TX-100

MOPS-Puffer:	70 mM MOPS/KOH, pH 6,8
	1 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM NaCl
	1 mM EGTA

Lysispuffer:	TBS
	0,5% TX-100
	5 mM IAA



### **TPA-Sekrete**

In RPMI 1640 Medium kultivierte HL-60 Zellen wurden nach Zellzählung in Gegenwart von 50 nM TPA in DMSO für 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Die TPA behandelten Zellen wurden zentrifugiert (5 min bei 2000 rpm), das TPA-Sekret abgenommen, in 2 ml Eppendorf-*caps* überführt und 2 min bei 14000 rpm in der Eppendorfszentrifuge bei RT zentrifugiert. Der Überstand des TPA-Sekrets wurde danach für spätere Versuche eingefroren.

Zur Konzentrierung der TPA-Medien wurden 2 ml der Sekrete mit der gleichen Menge RPMI-Medium in einem 30 K Zentrifugentröhrchen für 20 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert (eine Zentrifugation hat ausgereicht!). Die konzentrierten Medien wurden entnommen und eingefroren und das Filtrat wurde auf Eis gestellt.

Um die MPO-Aktivität des TPA-Mediums mit der Aktivität der schon vorhandenen MPO III (s. 2.1.5) vergleichen zu können, wurde ein *o*-Dianisidin-Test (s. 2.2.5) durchgeführt. Dazu wurden je 10 µl der frischen nicht-konzentrierten TPA-Medien, 10 µl MPO III (verdünnt 1:1000), 10 µl RPMI und die gleiche Menge an Puffer mit 30 µl H<sub>2</sub>O versetzt und nach dem unter Punkt 2.2.4 benannten Schema behandelt und ausgewertet.

Für den MPO-*immunoblot* (Punkt 3.3.2.1) wurden die Zellen wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben, vorbereitet. Um zu kontrollieren, ob die TPA-Zellen Aggregate gebildet hatten und an den Wänden der Platte adhärent geworden waren, wurden sie am nächsten Morgen unter dem Mikroskop angesehen. Nach dieser Kontrolle wurden die Zellsuspensionen in 2 ml Eppendorf-*caps* überführt und in der Eppendorfszentrifuge 4 min mit 2000 rpm bei RT herunter zentrifugiert. Die Medien wurden vorsichtig abgenommen, auf Eis gestellt, die Zellen mit 1,5 ml PBS gewaschen und abermals in der Eppendorfszentrifuge 4 min mit 2000 rpm bei RT zentrifugiert. Der Waschüberstand wurde entfernt, die Zellen in 0,5 ml Lysispuffer aufgelöst und dann 10 min bei RT inkubiert. Nur das TPA-Zelllysat wurde bereits nach 5 min Inkubation in das jeweilige Loch, welches zuvor 1x mit 2 ml PBS vorsichtig ausgespült wurde, der Sixwell-Platte zurückpipettiert, damit noch adhärente Zellen ebenfalls lysiert werden und so möglicher Inhalt für die Auswertung des Versuchs nicht verloren gingen. Danach wurde das Lysat wieder in das Reaktionsgefäß überführt. Um Kerne und Zelltrümmer zu entfernen,

wurden die Zellen und die Medien 1 min mit 14000 rpm bei 4 °C in der Eppendorfszentrifuge zentrifugiert, der Überstand abgenommen, in neue Eppendorf-*caps* überführt und auf Eis gestellt.

Die Aufarbeitung der Zellen und Medien in Versuch 3.3.2.2 (Säulendiagramm) erfolgte ähnlich. Außer, dass die Zellen mit 0,5 ml PBS gewaschen und in Lysispuffer aufgelöst und dann 6,5 min bei RT inkubiert und in das jeweilige Loch der 24-er Platte zurückpipettiert wurden. Zur Messung der Aktivität der MPO wurde der unter 2.2.5 genannte *assay* aus den Zellen und Medien unverdünnt, beim 4,25 h Versuch mit einer 1:10 Verdünnung der Zellen, durchgeführt.

Zur Aufbereitung der Zellen für den *pulse/chase*-Versuch mit [<sup>35</sup>S]Sulfat (Punkt 3.3.1), wurden die Zellsuspensionen 1 min in der Eppendorfszentrifuge mit 4000 rpm bei RT abzentrifugiert, so dass die Medien von den Zellen getrennt wurden. Die Medien wurden dann auf Eis gestellt und die Zellen 1x mit 0,5 ml eiskaltem PBS/10 mM MgSO<sub>4</sub> gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 0,5 ml TBS/0,5% TX-100/1 mg/ml BSA/5 mM JAA für 10 min bei RT extrahiert und die Zellkerne für 1 min bei 14000 rpm in der Eppendorfszentrifuge abzentrifugiert.

### **2.2.4.2 Affinitätschromatographie mit CS-Sepharose**

Tris-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,4

Tris-/BSA-Puffer: 17 mM Tris/HCl, pH 7,4  
0,33 mg/ml BSA

#### **2.2.4.2.1 Bestimmung der Bindungsstärke von MPO/proMPO an CS-Sepharose**

Zur Vorbereitung des Experiments wurden die CS-Säulen zuerst mit 2 M NaCl und dann mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, gewaschen. Die Säule wurde mit einer zuvor erstellten Lösung beladen, bestehend aus: 0,5 ml HL-60 Sekret + 1,5 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, oder mit 3 µl MPO III verdünnt mit 497 µl 10 mM Tris/HCl, pH 7,4. Die Durchflüsse wurden aufgefangen. 10 ml des Tris-Puffers dienten dazu, die Säule abermals von nicht gebundenen Proteinen zu befreien und die Waschlösungen wurden aufbewahrt.

Anschließend wurde in 300 µl-Schritten mit steigender Kochsalzkonzentration eluiert. Die erste Fraktion enthielt nur den 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 Puffer und ab der 2. Fraktion kamen je 50 mM NaCl hinzu, ansteigend bis zu einer Molarität von 500 mM in der letzten Probe. Am Ende des Experimentes wurden die Säulen wie unter Punkt 2.2.3.1 bereits beschrieben gewaschen und es wurde ein MPO-Aktivitätstest durchgeführt, wobei die Fraktionen und der Durchfluss 1 : 5 mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, verdünnt wurde.

### **2.2.4.2.2 Einfluss von saurem pH-Wert auf die Bindung von MPO an CS-Sepharose**

Zuerst wurden 2 µl MPO mit einem ml des Tris-Puffers verdünnt. Zur Vorbereitung der Affinitätschromatographie wurden 5x8 mm Säulen, die mit 200 µl CS-Sepharose Cl-4B gefüllt waren, mit 5 ml der Tris-Lösung äquilibriert. Die CS-Säulen wurden je 10 min mit der MPO III-Lösung beladen und die Durchflüsse aufgefangen. Danach wurden die Säulen mit 10 ml des Tris-Puffers gewaschen und diese Waschlösung wurde ebenfalls aufbewahrt. Die Säulen wurden nun mit je 0,2 ml Puffer eluiert, wobei der pH-Wert der einen Säule konstant gehalten wurde, während der pH-Wert der anderen auf pH 3,5, abgesenkt wurde, indem von der 3. bis zur 7. Fraktion 0,2 ml 10 mM NaCitrat, pH 3,5 auf die Säule gegeben wurde. Von Fraktion 8 wurde wieder mit 0,2 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, gewaschen. Von der 12. bis zur 16. Fraktion wurde dann bei beiden Reihen mit 0,2 ml 10 mM Tris/HCl/1 M NaCl, pH 7,4 eluiert. Die Fraktionen und der Durchfluss wurden dann 1:10 mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, verdünnt, die Waschlösung blieb unverdünnt und es wurde dann ein MPO-Aktivitätstest (wie in 2.2.5 erläutert) durchgeführt. Es wurden Doppelwerte ermittelt.

### **2.2.4.2.3 CS-Sepharose-Affinitätschromatographie mit Procathepsin D**

Für den Bindungsversuch von Procathepsin D wurden 40 µl-Säulen verwendet, die mit 5 ml Tris-Puffer (s.o.) vorgewaschen wurden. Beladen wurden sie 10 min mit 0,5 µg Procathepsin, die in 70 µl 17 mM Tris-/BSA-Puffer aufgelöst wurden. Die Säulen wurden dann mit 2,5 ml des 10 mM Tris-/BSA-Puffers gewaschen und gleich danach mit 2,5 ml des Tris-Puffers ohne BSA. Eluiert wurde in 40 µl-Schritten mit Tris-Puffer und zunehmender Kochsalzkonzentration.

#### **2.2.4.2.4 CS-Sepharose-Affinitätschromatographie mit Met [<sup>35</sup>S]-Label markierten HL-60 Sekreten**

1,1 ml des Met [<sup>35</sup>S]-Label markierten und mit TPA versetzten Mediums wurde 2 min mit 14000 rpm in der Eppendorfcentrifuge bei RT zentrifugiert, um eventuell noch vorhandene Zelltrümmer zu entfernen. 0,5 ml des Überstandes wurden abgenommen und mit 4,5 ml Tris-Puffer verdünnt und auf eine 200 µl Chondroitinsulfat-Sepharose-Säule aufgetragen. Eine Kontrollsäule mit Äthanolamin-Sepharose Cl-4B wurde parallel dazu in gleicher Weise beladen. Die Affinitätschromatographie wurde fast identisch wie in Punkt 2.2.4.2.1 bereits erläutert durchgeführt, außer dass die Säulen in diesem Fall mit je 3 ml des Tris-Puffers vorgewaschen wurden, und nach dem Auftragen der markierten Substanz solange gespült wurde, bis keine Radioaktivität mehr nachweisbar war (in diesem Fall mit 20 ml Tris-Puffer). Die ersten 5 Fraktionen der Elution enthielten 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, die nächsten 5 Fraktionen wurde zusätzlich 1 mg/ml CS hinzugefügt. Je 20 µl aus jeder Fraktion wurden mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

#### **2.2.5 Enzymaktivitätsbestimmung (*o*-Dianisidin-Test)**

Um die Aktivität der MPO messen zu können wurden 40 µl der jeweiligen Probe bei Raumtemperatur (RT) in 96-Loch Mikrotiterplatten mit 160 µl Substrat versetzt, welches sich aus folgenden Substanzen zusammensetzt:

0,8 mM *o*-Dianisidin

0,1 M Na-Citrat, pH 5,5

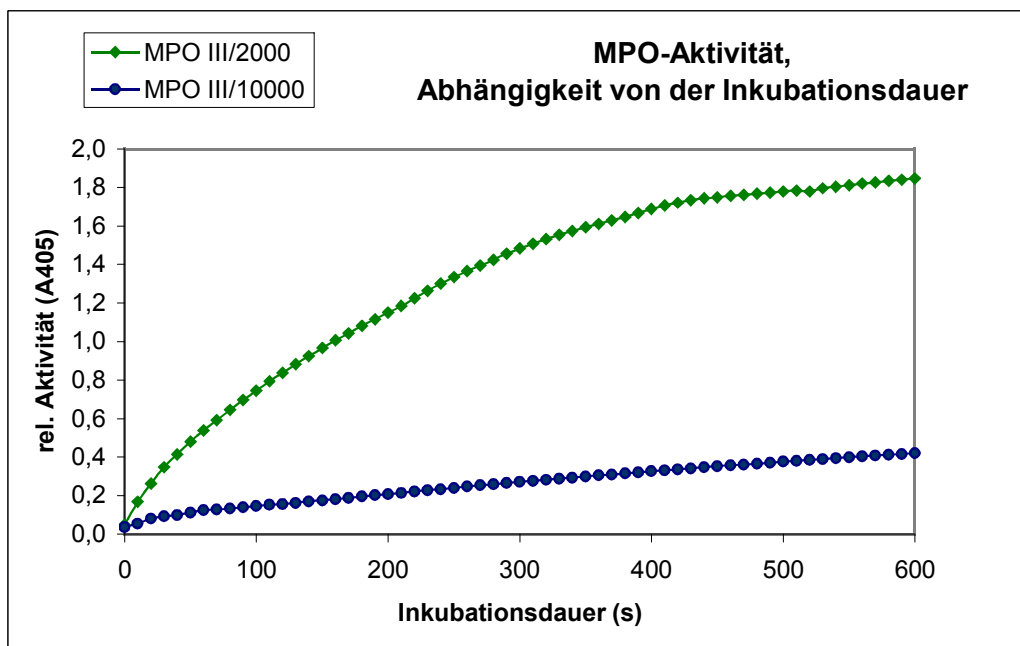
0,125% TX-100 (als Detergenz, da *o*-Dianisidin sich nur schwer löst)

0,1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Es wurden Doppelwerte mit und ohne Hemmung durch 0,01% Natriumazid erstellt. Die MPO-Aktivität wurde durch NaN<sub>3</sub> gehemmt, jedoch die anderen im Medium bzw. im fötalen Kälberserum enthaltenen Peroxidasen nicht. Die MPO-Aktivität wurde als NaN<sub>3</sub>-hemmbare Aktivität definiert; diese wurde spektrophotometrisch durch Bestimmung der Extinktion bei 450 nm ermittelt und in relativen Einheiten angegeben.

Um die Messwerte der verschiedenen Versuche miteinander vergleichen zu können, wurde zuvor der lineare Bereich des oben genannten Aktivitätstests ermittelt. Dazu wurde folgender Versuch durchgeführt:

Es wurden 2 Proben erstellt. Die eine Probe enthielt 20  $\mu\text{l}$  MPO III (1:2000 verdünnt) und die andere 20  $\mu\text{l}$  MPO III (1:10000 verdünnt). Beide wurden mit je 80  $\mu\text{l}$  *o*-Dianisidinsubstrat versetzt. Danach erfolgte für 6 min die Messung der Aktivität (Extinktion 450 nm) in 10 Sekunden-Abständen im Photometer. Bei der 1:10000 Verdünnung der MPO konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der Zeit und der MPO-Aktivität festgestellt werden. Im abgeflachten hinteren Bereich würde man größere Werte bekommen, wenn nicht schon das gesamte Substrat verbraucht wäre, d.h. man misst zu geringe Werte. Die Aktivität wäre eigentlich höher. Daher wurden alle Aktivitätstest dieser Arbeit im linearen Bereich durchgeführt.



**Abb. 2.1 Darstellung des linearen Bereichs der MPO-Aktivität.** Zwei MPO III-Proben wurden 1:2000 und 1:10000 verdünnt. Je 20  $\mu\text{l}$  dieser Proben wurden mit 80  $\mu\text{l}$  *o*-Dianisidinsubstrat versetzt und im Photometer bei einer Extinktion von 450 nm gemessen. Die Ablesung erfolgte für 6 min in 10 Sekunden-Abständen.

### 2.2.6 Fällung mit CTAB

Nach der Aufarbeitung der Zellen wurde 100 µl des Zellextraktes bzw. des Mediums entnommen und diese mit 40 µl 5% CTAB über Nacht bei 4 °C gefällt. Am nächsten Morgen wurden Medien und Zellen in der Eppendorfzentrifuge 5 min mit 14000 rpm bei RT zentrifugiert und die entstandenen Pellets 2x mit 0,8 ml NaCl gesättigtes eiskaltem Ethanol gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Pellets in 90 µl 1,5-fach Probenpuffer (+SH) aufgelöst. Je 45 µl dieser Probe wurden in ein Szintillationsgefäß überführt, mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt, gut durchmischt und im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen, um den Einbau von radioaktivem Sulfat in Proteoglykane feststellen zu können. Die andere Hälfte der Probe wurde bei - 20 °C für die SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE) eingefroren.

### 2.2.7 Protein-Gelelektrophorese

#### 2.2.7.1 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

(nach Lämmli, 1970; modifiziert nach Hasilik und Neufeld,1980)

Es wurden 15%ige Polyacrylamidgele folgender Zusammensetzung verwendet:

<u>Substanzen</u>	<u>Trenngel 15% (ml)</u>	<u>Sammelgel 6,4% (V/ml)</u>
30% Acrylamid	15	1,6
1% Bisacrylamid	4,7	1,1
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	7,5	---
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	---	2,5
Aquabidest	2,4	4,7
10% (w/v) SDS	0,3	0,1
TEMED	0,025	0,01
25% APS	0,1	0,04
Geldicke: 15%		
Anodenpuffer:	23 mM Tris	
	384 mM Glycin	

mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt

Puffer sollte pH 8,3 haben, evtl. mit Trissalzen korrigieren

Kathodenpuffer:                    23 mM Tris  
    384 mM Glycin  
    0,1% (w/v) SDS  
    8 x 10<sup>-5</sup>% (w/v) Bromphenolblau

Bromphenolblau und SDS wurden immer frisch zugesetzt

### **Polyacrylamidgelherstellung**

Zu Beginn wurden die Glasplatten gründlich mit Ethanol gereinigt, aufeinandergelegt, mit Silikon abgedichtet und zusammen geklammert. Die Trenngellösung wurde bis 0,6 cm unterhalb der Probenaschen eingefüllt und mit einem Gemisch aus Isopropanol, 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, und H<sub>2</sub>O Verhältnis (2:1:1) überschichtet. 30 min später war die Polymerisation abgeschlossen und das Sammelgel konnte gegossen werden. Die Flüssigkeit oberhalb des Trenngels wurde abgesaugt und verbleibende Tropfen mit Filterpapier entfernt. Nach dem vorsichtigen Einfüllen der Sammelgellösung (möglichst ohne Luftblasen), wurde der Kamm eingesteckt. Nach weiteren 30 min war die Polymerisation abgeschlossen und der Kamm konnte entfernt werden.

### **Auftragen der Proben**

Die Proben wurden in 1,5-fach konzentrierten Probenpuffer aufgelöst und zusammen mit einem <sup>14</sup>C-markierten, molekularen Massenstandard 5 min bei 95 °C gekocht und dann auf das 15%ige Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Standard diente dazu, die apparente Molekularmasse der dargestellten Proteine zu bestimmen. Um Randeffekte zu vermeiden, blieben mindestens die beiden äußeren Taschen des Gels ohne Probe und wurden, wie alle freibleibenden Taschen, mit dem 1,5-fach Probenpuffer befüllt. Nachdem die Gele vorsichtig mit dem Kathodenpuffer überschichtet worden waren, konnte die Elektrophorese mit 20 mA/Gel gestartet werden. Sobald die Bromphenolblau-Bande das Sammelgel durchlaufen hatte und das Trenngel erreichte, wurde die Stromstärke auf 30 mA/Gel erhöht. Kurz vor dem Auslaufen der Bromphenolblau-Bande wurde die Elektrophorese gestoppt.

### **2.2.7.2 Vorbereitung der Gele für die Fluorographie**

(nach Laskey und Mills, 1975)

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel dreimal für je 20 min (Mindestzeit) in DMSO-Bad I-III entwässert und dann über Nacht im DPO-Bad inkubiert (120 g DPO in 440 ml DMSO). Am nächsten Tag wurde das Gel für ca. 45 min gewässert, damit das DPO auskristallisiert. Zuletzt wurde das Gel zwischen zwei Lagen Zellophan auf einem Geltrockner, der an einer Vakuumpumpe angeschlossen war, für 2 h bei 60 °C unter Vakuum getrocknet und unter Vakuum für ca. 1 h abgekühlt. Die radioaktiven Banden wurden zur qualitativen Auswertung des Gels mit Hilfe von Röntgenfilmen sichtbar gemacht. Das getrocknete Gel wurde in einer Röntgenfilmkassette zwischen zwei Röntgenfilme gepresst und bei -80 °C mehrere h bis Tage, je nach Markierungsintensität, exponiert. Zur Sensibilisierung wurden die Filme vor der Exposition mit geringer Lichtstärke „vorgeblitzt“.

### **2.2.8 MPO-immunoblot und ECL-Entwicklung**

#### **2.2.8.1 Probenvorbereitung und Beladen der Gele**

1x Probenpuffer (+SH):	125 mM Tris/HCl, pH 6,8
	1% SDS
	10% Glycerin
	20 mM Dithiothreitol (DTT)

Für die Vorbereitung der Proben wurde jeweils 20 µl der Zellextrakte und 20 µl Medien in ein separates Reaktionsgefäß überführt. Des Weiteren wurde 10 µl von der 1:100 verdünnten MPO III und 5 µl von dem Prestained Protein Marker (BioLabs, New England) vorbereitet. Alle Proben wurden mit aqua dest. auf das gleiche Volumen (20 µl) gebracht, dann mit 5 µl 5x Probenpuffer (+SH) versetzt und schließlich 5 min bei 95 °C mit offenem Deckel gekocht. Die Proben wurden nun auf zwei Minigele (15%; 1,5 mm, 22 Taschen) aufgetragen und die Elektrophorese mit 120 V pro Gel gestartet und sobald die Bromphenolblau-Bande das Trenngel erreicht hatte auf 200 V pro Gel erhöht.



### 2.2.8.2 Western blotting

Transferpuffer (10x):                    1,92 M Glycin (144,13 g/l)  
    250 mM Tris (30,29 g/l)  
    wurde mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt, der Puffer sollte  
    pH 8,2 haben, evt. mit HCl einstellen

Transferpuffer (1x):                    100 ml Transferpuffer (10x)  
    +200 ml Methanol  
    +700 ml H<sub>2</sub>O

Die nun getrennten Polypeptide wurden mit Hilfe der *semi-dry*-Apparatur (BioRad, München) auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dazu wurden auf dem Boden (Anode) der Apparatur zwei Lagen mit Transferpuffer gut durchtränktes GB 004-Filterpapier gelegt. Hierauf folgte die Nitrozellulose-Membran, das Gel und abschließend zwei Lagen von dem in Transferpuffer getränktem Filterpapier. Mit einer Glaspipette wurden dann vorsichtig Luftblasen aus dem Stapel herausgepresst, um einen gleichmäßigen Kontakt der einzelnen Lagen zueinander herzustellen. Den Abschluss der *blotting*-Apparatur bildete die Kathode. Die Apparatur wurde gut verschlossen und das *Western-blotting* bei einer Stromstärke von 120 mA (ca. 1 mA/cm<sup>2</sup>) für 2 h bei RT eingeleitet.

### 2.2.8.3 Immundetektion nach Western blotting

Blockierungsreagenz („*Blotto*“):    5% [w/v] Magermilchpulver  
    50 mM Tris/HCl, pH 7,8  
    0,05% [v/v] TX-100  
    0,01% [v/v] *Antifoam A*  
    2 mM Calciumchlorid

TBS (10x):                                1,5 M NaCl (175,32 g/l)  
    500 mM Tris (121,14 g/l)  
    auf 2 Liter mit H<sub>2</sub>O auffüllen und  
    mit HCl, pH 7,4 einstellen

TBS-T: 1x TBS  
0,1% TX-100

Nachdem der Transfer abgeschlossen war, wurde die Nitrozellulose-Membran für 2 h bei 37 °C auf einer Wippe in 9 ml Blockierungsreagenz abgesättigt. Nach dieser Zeit wurde der erste (gegen die MPO gerichtete) Antikörper hinzugegeben (Verdünnung 1:3000) und das Ganze über Nacht bei 4 °C im Kühlraum auf der Wippe inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Antikörperlösung verworfen und die Nitrozellulose-Membran gründlich bei RT mit TBS-T gewaschen, d.h. 2x kurz mit TBS-T ausgespült, dann einmal 10 min auf der Wippe und dann wieder 2x kurz mit TBS-T nachgespült. Nach dem Waschen wurde der *blot* 1 h bei 37 °C auf der Wippe mit dem zweiten Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, an Meerrettichperoxidase gekoppelt) 1:6000 verdünnt in *Blotto* inkubiert.

Auch die zweite Antikörperlösung wurde im Anschluss an die Inkubation verworfen und die Nitrozellulose-Membran (zur Reduktion unspezifischer Hintergrundsignale) wie zuvor bereits beschrieben gewissenhaft gewaschen.

Für den Procathepsin D *dot blot* wurden die eluierten Proben der Affinitätschromatographie (s. Punkt 2.2.4.2.3) genommen, mit 50 mM Tris/HCl + 1mg/ml BSA 1:3 verdünnt und je 2 µl dieser Probe auf eine Nitrozellulose-Membran aufgetragen. Die Immundetektion erfolgte in der gleichen Weise, wie unter Punkt 2.2.8.3 beschrieben. Abweichend hiervon waren lediglich die Antikörper.

1. Antikörper:  $\alpha$  Cathepsin D (1:2500 verdünnt)
2. Antikörper: Ziege-anti- Kaninchen-IgG (1:3000 verdünnt)

Die ECL-Entwicklung erfolgte wie unter dem nachfolgenden Punkt beschrieben.

### 2.2.8.4 ECL-Entwicklung (*enhanced chemiluminescence*)

Die ECL-Reaktion beruht auf der Emission von Licht nach Spaltung von Luminol durch die Meerrettichperoxidase. Für die ECL-Entwicklung wurde gemäß Anleitung des Herstellers (Amersham Pharmacia, Freiburg) jeweils 50 µl der Lösung A und 2 ml der Lösung B entnommen und unmittelbar vor Gebrauch gemischt. In der Dunkelkammer

wurden die *blots* auf eine handelsübliche Haushaltsfolie gelegt und mit der Mischung aus Lösung A und B beträufelt. Die Haushaltsfolie wurde über die Nitrozellulose-Membran gebreitet und mit einer Glaspipette wurde das Luminolsubstrat sorgfältig über die Nitrozellulose-Membran verteilt. Die ECL-Reaktion sollte mindestens eine min bei RT in Gang kommen. In die Entwicklungskassette wurde erst eine zuvor zugeschnittene Klarsichtfolie gelegt, hierauf die Nitrozellulose-Membran (Haushaltsfolie wurde verworfen), dann eine zweite Klarsichtfolie und zum Abschluss der Film. Die Kassette wurde verschlossen und je nach Stärke des Lichtsignals wurde der Röntgenfilm für verschiedene Zeiten (bis 30 min) exponiert. Die Filme wurden dann entwickelt und am Schluss zum Trocknen aufgehängt.

### **2.2.9 Quervernetzung von Proteinen mit Dithio-*bis*-succinimidyl-Propionat (DSP)**

Um nachweisen zu können, dass die MPO im *trans*-Golgi/TGN-Bereich mit Serglycin interagiert, wurde ein membrangängiger Quervernetzer eingesetzt (DSP).

Hierfür wurden die Zellen 3 mal mit PBS gewaschen und dann 10 min im Wasserbad bei 37 °C mit 1 mM Dithio-*bis*-succinimidylpropionat (DSP) in PBS inkubiert. Nach der Quervernetzung wurden die Zellen für 20 s in einer Eppendorffzentrifuge bei zunehmender Drehzahl und RT zentrifugiert und die Pellets einmal mit 800 µl TBS gewaschen. Die anschließende 5-minütige Zelllyse erfolgte in 900 µl Lysispuffer mit 10% FKS und nach Zusatz von 9 µl 200 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) bei RT. Zur Hemmung, der bei der Zelllyse freigesetzten Proteinase, dienten die Proteinaseinhibitoren des FKS, das IAA und das PMSF. Mit einer 2-minütigen Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge (14000 rpm) wurde die Lyse abgeschlossen, der Überstand überführt und abermals 1 h lang mit 18000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde weiter verwendet.

### **2.2.10 Immunpräzipitation der quervernetzten Proteine**

Für die Immunpräzipitation wurden 6 Proben (800 µl) des Zellhomogenates mit dem gleichen Volumen einer Staph. *A*-Zellwandsuspension (Pansorbin) für 30 min auf dem Drehrad bei 6 °C präabsorbiert. Mit Hilfe der Staphylokokken werden alle unspezifisch bindenden Proteine aus den Proben entfernt. Die Proben wurden dann 1 min bei RT abzentrifugiert (13000 rpm). Der Überstand wurde 30 min in der Sorvall T 21-

Zentrifuge bei 4 °C mit 18000 rpm abzentrifugiert. Der Probe 1 wurde 6 µl Nonimmunserum (+50% Glycerol), sie diente zur Kontrolle, den Proben 2 und 3 wurde je 3 µl MPO-Antiserum und den Proben 4 und 5 wurden je 2 µl  $\alpha$  – LIMP II (0,44 mg/ml + 50% Glycerol) hinzugefügt und über Nacht bei 6 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde den Proben je 40 µl einer 10%-igen Suspension vorbehandelter Staphylokokken zugesetzt und darin 30 min auf dem Drehrad bei 6 °C inkubiert. Auf diese Weise gehen die Immunkomplexe mit dem Protein A der Bakterienzellwand eine Bindung ein. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation in der Eppendorffzentrifuge bei RT wurden, zur Beseitigung von unspezifisch bzw. nur schwach gebundenen Proteinen, die entstandenen Staph. A-Sedimente gewaschen. Die Pellets wurden je dreimal in 800 µl Immunomix (IMM), zweimal in 800 µl Neufeldpuffer und einmal in 800 µl 1:10 verdünntem TBS gewaschen (Puffer siehe Punkt 2.1.9). Die Proben wurden in 50 µl des 1,5-fachen, reduzierenden Probenpuffers bei 95 °C aufgeköcht, danach 1 min in der Eppendorffzentrifuge bei RT abzentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorff-*caps* überführt. Je 10 µl von den Proben wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt. Der übrige Teil der Probe wurde auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe Punkt 2.2.8). Die Geldicke betrug 15%.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Immunocytochemie von HL-60 Zellen

Das Modellsystem dieses Projekts waren HL-60 Zellen, wobei das spezielle Interesse dem granulären Transport der MPO galt. Diese ist in den azurophilen Granula der gewählten Zellen reichlich vorhanden. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen die MPO und Immunfluoreszenz konnten die azurophilen Granula sichtbar gemacht werden (Abb. 1 A oben, rechts). Diese befinden sich im relativ dünnen Cytoplasmaanteil, der sich um den dominierenden Kern der nicht adhärenen Zellen, erstreckt. Ein weiteres, im Cytoplasma vorkommendes Organell sind die Lysosomen. Um diese Lysosomen bildlich darstellen zu können, wurden die HL-60 Zellen mit einem weiteren Antikörper behandelt (Abb. 3.1 A oben, links). Das LAMP-2 (lysosomal assoziiertes Membranprotein) ist ein Glykoprotein, welches sich in der Membran der Lysosomen befindet (Hunziker und Geuze, 1996) und dort, neben anderen Aufgaben, eine Schutzfunktion für diese Membran besitzt. Gemäß Wickner und Lodish (1985) gehören sie zu den Typ I Membranproteinen, welche eine membrandurchspannende Domäne und einen zytosolischen C-Terminus besitzen. Beide Systeme (azurophile Granula und Lysosomen) sind an der Phagozytose beteiligt und haben in den HL-60 Zellen ungefähr die gleiche Größe.

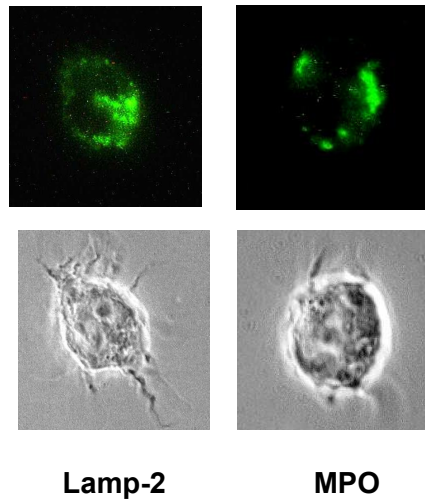
Im Phasenkontrastbild (Abb. 3.1 A) kann man sehr gut Zellausläufer erkennen, jedoch besitzen diese Promyelozyten noch keine amöboide Beweglichkeit; diese Fähigkeit bleibt den reifen Granulozyten vorbehalten.

Die in Abb. 3.1 B abgebildeten HL-60 Zellen wurden mit TPA (50 nM) behandelt.

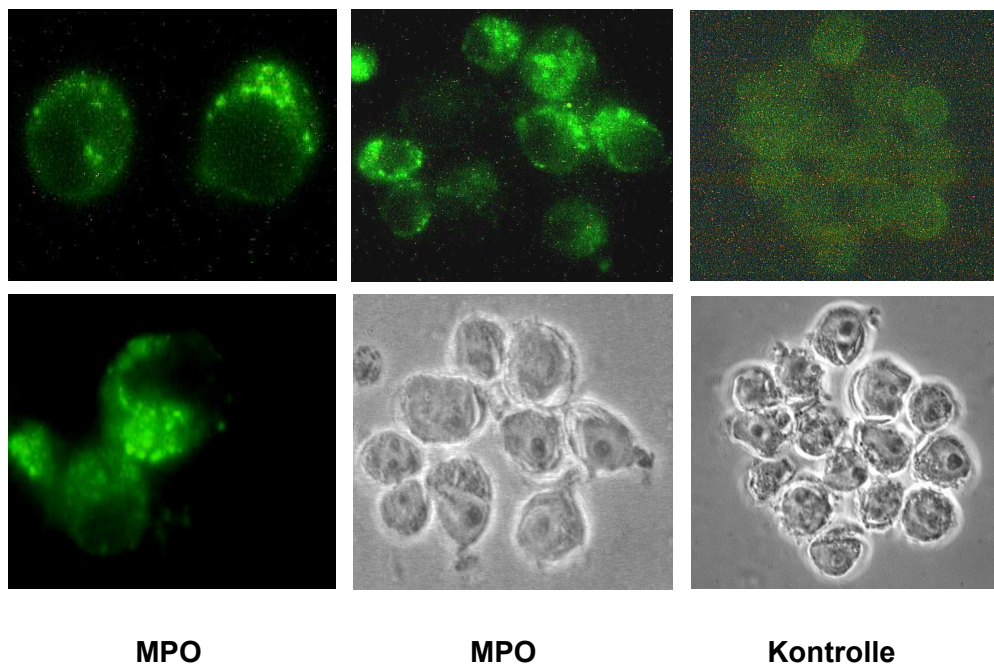
Durch die Behandlung wurden die Zellen adhären und bildeten Zellaggregate. Sie weisen im Gegensatz zu den unbehandelten Zellen keinerlei Zellfortsätze mehr auf. Die azurophilen Granula sind in diesen Zellen deutlicher zu erkennen, da sich die Zellen durch das Anheften auf dem Kulturboden abflachen und strecken, so dass zytoplasmatisch gelegene Zellorganellen besser sichtbar werden. Bei der diffusen zytoplasmatischen Hintergrundfärbung handelt es sich um das MPO-haltige endoplasmatische Retikulum, welches trotz 650-facher Vergrößerung und Ölimmersionsobjektiv im klassischen Fluoreszenzmikroskop nicht aufgelöst wurde.

## Immuncytochemie von HL-60 Zellen

### A. Kontroll HL-60 Zellen



### B. Phorbolster-behandelte HL-60 Zellen



**Abb. 3.1 A** Fluoreszenzmikroskopische und Phasenkontrastbilder von HL-60 Zellen, nach Behandlung mit Lamp-2 Antikörpern und MPO-Antikörpern.

Die LAMP-2 Antikörper färben die Lysosomen; die MPO-Antikörper färben die azurophilen Granula an. Gut sichtbar auch die Zellfortsätze im Phasenkontrastbild (untere Reihe).

**Abb. 3.1 B** Darstellung der gleichen Zellen nach Behandlung mit Phorbolster.

Die Zellen aggregieren und werden adhären. Azurophile Granula sind hier besser zu erkennen. Zu sehen ist auch das proMPO-haltige endoplasmatische Retikulum, als diffuse zytoplasmatische Färbung. In der Kontrollfärbung sind die Zellen im Fluoreszenzbild trotz starker Belichtung durch das Fehlen des ersten Antikörpers, nur durch diffuse, unspezifische Hintergrundfärbung schemenhaft zu erkennen.

## **3.2 Affinitätschromatographie reifer MPO und proMPO an CS-Sepharose**

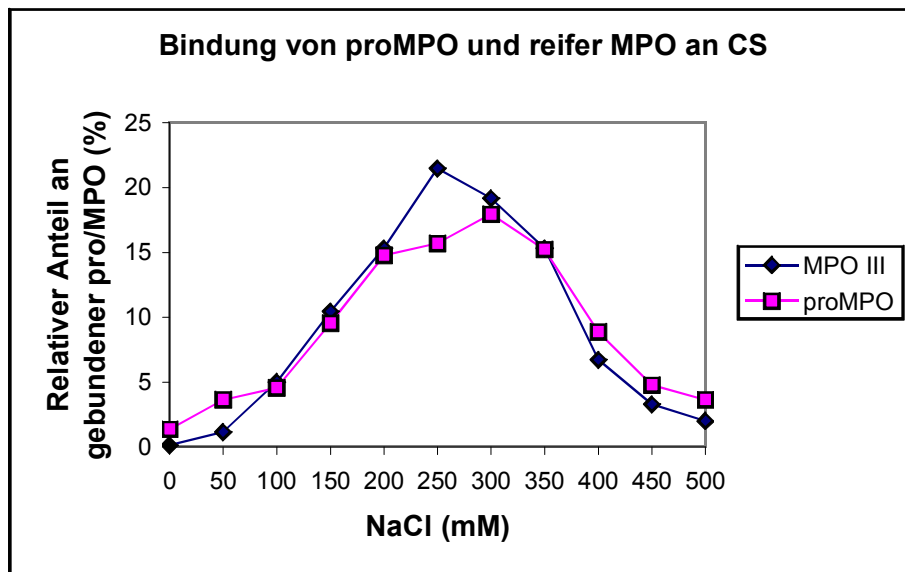
### **3.2.1 Vergleich der Bindungsstärke von proMPO und reifer MPO**

Um über die Interaktion der MPO mit dem Chondroitinsulfat des Serglycins eine Aussage treffen zu können, wurde eingehend deren Bindungsverhalten untersucht.

In diesem Versuch wurde mit Hilfe eines Salzgradienten die Stärke der ionischen Interaktion der reifen MPO mit Chondroitinsulfat-Sepharose (CS-Sepharose) gemessen und mit der der proMPO verglichen. Zwei CS-Sepharose-Säulen wurden 15 min bei RT beladen, die Eine mit verdünnten HL-60 Sekreten (proMPO) und die Andere mit der reifen MPO. Durch schrittweise Steigerung der Salzkonzentration im Puffer (pH-Wert 7,4) wurde die gebundene proMPO bzw. MPO eluiert.

Dabei zeigte sich, dass sowohl proMPO, als auch reife MPO ihr Elutionsmaximum bei fast gleicher Salzkonzentration (zwischen 200 mM und 350 mM) haben (s. Abb.3.2) und demnach annähernd gleiche Bindungseigenschaften besitzen. Während die reife MPO nahezu vollständig an die CS-Sepharose-Säule band, gingen nur etwas mehr als 40% der proMPO mit der CS-Sepharose-Säule eine Bindung ein. Das Propeptid alleine scheint somit keine Rolle für die Interaktion mit Chondroitinsulfat zu haben.

Es kann nunmehr grundsätzlich festgestellt werden, dass die proMPO in der Lage ist in zellulärer Umgebung, d.h. bei einer Ionenstärke von 145 mM NaCl, an die Chondroitinsulfat-Ketten des Serglycins zu binden. Um darstellen zu können, wie die proMPO mit dessen Hilfe zum Speicherort gelangt, wurde in den nächsten Experimenten die Biosynthese und der Transport des Serglycins in die azurophile Granula verfolgt.



**Abb. 3.2** Affinitätschromatographie von proMPO und reifer MPO an CS-Sepharose. HL-60 Zellen wurden über Nacht in Gegenwart von 50 nM TPA bei 37 °C inkubiert. Zwei CS-Sepharose-Säulen wurden 15 min bei RT beladen: die Eine mit verdünnten HL-60 Sekreten (proMPO); die Andere mit der reifen MPO. Das gebundene Enzym wurde durch schrittweise Steigerung der Salzkonzentration im Puffer (pH 7,4) von den Säulen eluiert.

### 3.2.2 Einfluss des pH-Wertes auf die Bindung der MPO an CS-Sepharose

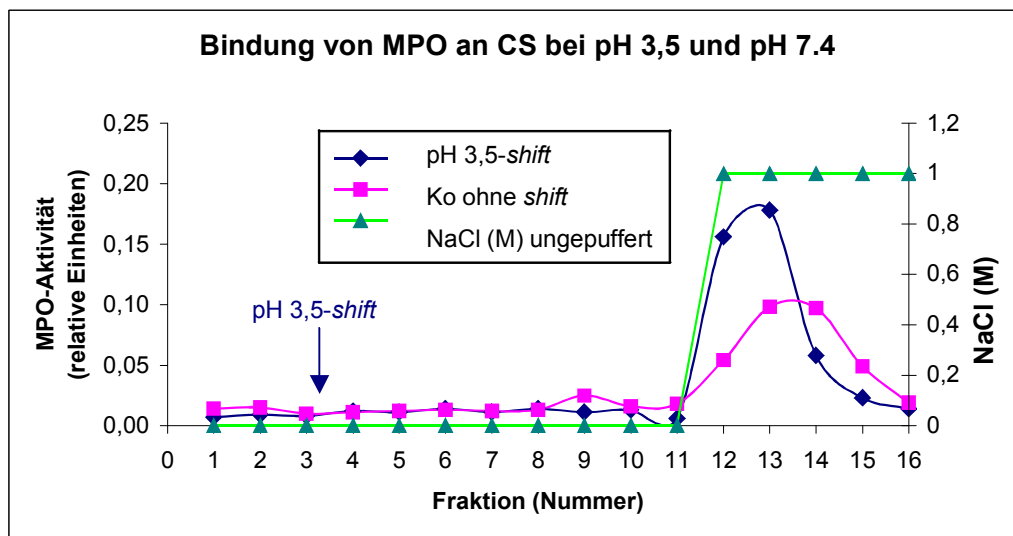
In dem unter Punkt 3.2.1 beschriebenen Experiment konnten gezeigt werden, dass die MPO durch ionische Interaktion an CS-Sepharose bindet.

Im nächsten Experiment ging es darum herauszufinden, ob eine Erniedrigung des pH-Wertes Einfluß auf deren Wechselwirkungen hat. Da der pH-Wert in den Granula deutlich unter dem Neutralpunkt liegt, wäre eine pH-induzierte Dissoziation von Serglycin und MPO analog zur pH-induzierten Dissoziation von lysosomalen Enzymen und M6P-Rezeptoren denkbar. Zu diesem Zweck wurde die gereinigte MPO mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 (schwach ionische Bedingungen), versetzt und auf eine CS-Sepharose-Säule aufgetragen. Die MPO hatte nun 10 min Zeit (RT) mit dem Chondroitinsulfat zu interagieren. Die Säulen wurden nach der Inkubationszeit mit dem gleichen Puffer gründlich gewaschen. Es wurden zwei Säulen beladen, die bis auf eine kurzzeitige Absenkung des pH-Wertes auf 3,5 (durch Gabe von 10 mM Na-Citrat anstelle des Tris-Puffers) der einen Säule, gleich behandelt wurden. Zuletzt wurde alle noch gebundene MPO durch 1 M NaCl eluiert. Die Messungen der MPO-Aktivität in den Eluatens ist in der folgenden Graphik (Abb. 3.3) dargestellt. Deutlich zu erkennen ist, dass die



Änderung des pH-Wertes in den sauren Bereich, somit die teilweise Entladung der Glucuronsäuren ( $pK_a \approx 3,6$ ), keinen Einfluss auf die Bindung der MPO an die CS-Sepharose hat. Dadurch dass, das Sulfat der Chondroitinseitenketten bei pH 3,5 ganz deprotoniert vorliegt und dementsprechend negativ geladen ist, bleibt die MPO gebunden. Unter Kontrollbedingungen (pH 7,4) können sich die ionischen Wechselwirkungen voll entfalten. Erst die Erhöhung der Salzkonzentration, durch Zugabe von 1 M NaCl-Lösung, konnte die Interaktion stören und die MPO vom Chondroitinsulfat lösen (wird im folgenden Experiment genauer veranschaulicht).

Wie in einem, hier nicht gezeigtem Experiment dargestellt werden konnte, führte allerdings die Erhöhung des pH-Wertes auf 12,0 dazu, dass die MPO nicht an CS-Sepharose band. Daraus kann geschlossen werden, dass die funktionellen Gruppen der basischen Aminosäuren der MPO (Lysin und Arginin;  $pK_b$  10,8 bzw. 12,5) deprotoniert wurden und somit essentiell für die Bindung an CS sind.



**Abb. 3.3 Bindung von MPO an CS-Sepharose bei pH 3,5 und pH 7,4.** Gereinigte MPO (2  $\mu$ l) wurde mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 (1 ml), versetzt und auf zwei 5x8 mm Säulen, die mit 200  $\mu$ l CS-Sepharose Cl-4B gefüllt waren, aufgetragen. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit (RT) erfolgte bei einer Säule, eine kurzzeitige Absenkung des pH-Wertes auf 3,5 durch Gabe von 0,2 ml 10 mM Na-Citrat. Zuletzt wurde die gebundene MPO durch 1 M NaCl eluiert.

### 3.3 Einfluss von TPA auf die Sekretion von Serglycin und MPO in HL-60 Zellen

#### 3.3.1 Quantifizierung des Serglycins durch [<sup>35</sup>S]Sulfat-Markierung und Fällung mit CTAB-haltigen Puffer

Grundlage des nächsten Experiments sind die Forschungsergebnisse von Lohmander *et al.* (1990), in dessen Arbeit eine ausgeprägte Sulfatierung des Chondroitinsulfats in HL-60 Zellen gezeigt werden konnte. Da es sich bei dem Hauptvertreter der Proteoglykane in HL-60 Zellen um das Serglycin handelt, kann davon ausgegangen werden, dass der Hauptanteil des von den Zellen aufgenommenen Sulfats, in dieses Proteoglykan eingebaut wird. Aus diesem Grund kann man, mit Hilfe des markierten Sulfats und der gemessenen Radioaktivität, den Anteil des sezernierten und des in die Granula transportierten Serglycins herausfinden.

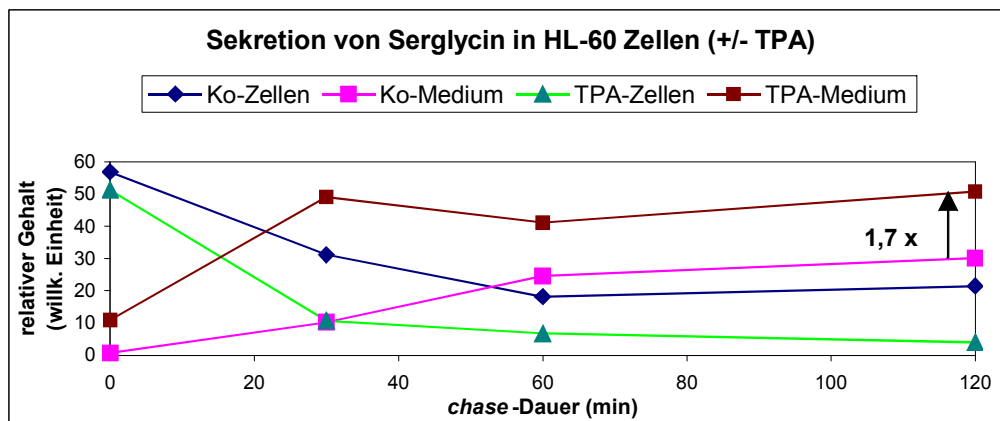
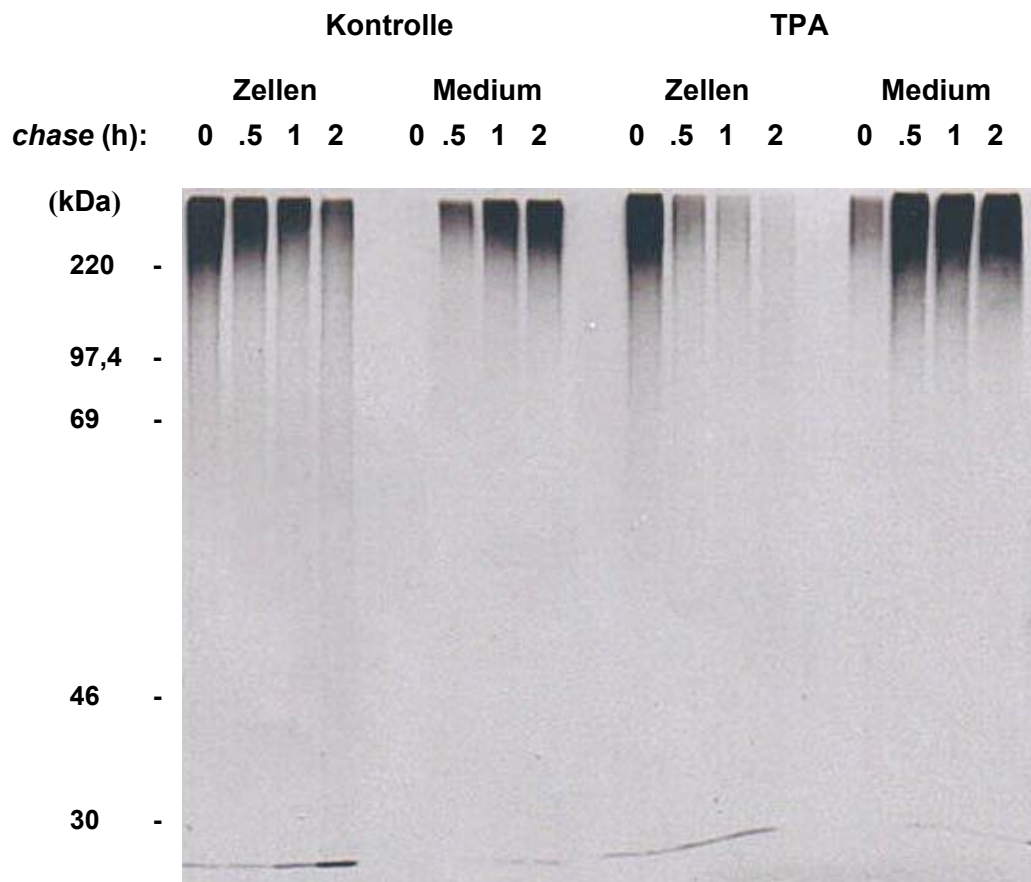
Die HL-60 Zellen wurden wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben vorbereitet, wobei eine Zellkultur zusätzlich mit TPA (12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat) behandelt wurde. Danach folgte eine 10-minütige metabolische Markierung mit [<sup>35</sup>S]Sulfat. Nach der Markierung wurde dem Medium 10 mM MgSO<sub>4</sub> hinzugefügt und nach 0, 30, 60 und 120 min je 0,5 ml der Zellsuspension entnommen.

CTAB ist ein Detergenz, welches in der Lage ist mit Proteoglykanen wasserunlösliche Komplexe zu bilden. Somit kann durch Zugabe von CTAB-haltigen Puffer das [<sup>35</sup>S]sulfatierte Serglycin aus Zellhomogenaten und Medien isoliert und insbesondere von radioaktivem Sulfat getrennt werden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass nicht nur intaktes, sondern auch proteinolytisch verändertes Serglycin gefällt wird, so dass auf diesem Weg auch Material erfasst werden kann, welches bereits partiell degradiert wurde. Um das überschüssige CTAB wieder von dem Serglycin zu entfernen, wurden die Pellets mit NaCl-gesättigtem Ethanol gewaschen. Die Präzipitate wurden in Probenpuffer aufgelöst und geteilt. Eine Hälfte der Probe wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszählung analysiert, die andere Hälfte der markierten Proteoglykane mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe der Fluorographie sichtbar gemacht (siehe Abb. 3.4). Das Ergebnis zeigt, dass das [<sup>35</sup>S]Sulfat in ein Molekül mit einer heterogenen molekularen Masse oberhalb von 220 kDa eingebaut wird. Diese ist charakteristisch für Serglycin. Hauptverantwortlich für die scheinbare Massenheterogenität sind die unterschiedlich langen Glykosaminoglykanketten.

Fluorogramme der Medien, sowie der Extrakte markierter, mit TPA behandelter Zellen, zeigten, dass bereits nach 30 min das gesamte Serglycin fast nur noch im Medium gefunden wurde.

Dies bestätigt die These, dass TPA – ein Aktivator Diacylglycerol-abhängiger Proteinkinasen - die Sekretionsrate nicht nur in U937-Zellen stark ansteigen lässt (Lemansky und Hasilik, 2001), sondern dass dieses Phänomen auch bei HL-60 Zellen zu beobachten ist.

In den Medien findet man, unter dem Einfluss von TPA, eine Steigerung der Sekretionsrate auf das 1,7-fache (Diagramm Abb. 3.4). Vergleicht man den Gehalt von Serglycin in den Zellen mit dem in den Medien, so sieht man, dass das in den Zellen verbleibende Serglycin abgebaut wird, während das sezernierte Serglycin erhalten bleibt. Betrachtet man den 2 h-Wert in der Lauffront, so sieht man eine Anreicherung von niedermolekularem Material. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um bereits in den Granula fragmentiertes Serglycin. Dies kann man als einen Hinweis darauf werten, dass das Serglycin in ein lytisches Kompartiment transportiert wurde; wahrscheinlich in die Granula, die mit den für den Abbau benötigten Enzymen ausgestattet sind. Das Serglycin der TPA-behandelten Zellen wurde bereits nach 30 min in hohem Maße ausgeschüttet und deshalb nimmt der relative zelluläre Gehalt hier auch deutlich schneller ab als in den Kontrollzellen.



**Abb. 3.4 Quantifizierung des Serglycins durch [<sup>35</sup>S]Sulfat-Markierung und Fällung mit CTAB-haltigen Puffer.** Die HL-60 Zellen wurden für 10 min mit [<sup>35</sup>S]Sulfat metabolisch markiert. Dem Medium wurde 10 mM MgSO<sub>4</sub> hinzugefügt und nach 0, 30, 60 und 120 min je 0,5 ml der Zellsuspension entnommen. Die Zellen wurden dann mit 0,5 ml TBS/0,5% TX-100/1 mg/ml BSA / 5 mM JAA für 10 min bei RT extrahiert, 100 µl des Zellextraktes bzw. des Mediums wurde entnommen und mit 40 µl 5% CTAB über Nacht bei 4 °C gefällt. Die Pellets wurden mit NaCl-gesättigtem Ethanol gewaschen. Die Präzipitate wurden in Probenpuffer aufgelöst und geteilt. Eine Hälfte der Probe wurde mittels Flüssigkeitsszintillationszähler analysiert; die andere Hälfte der markierten Proteoglykane mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe der Fluorographie sichtbar gemacht.

### **3.3.2.1 Erhöhung der Sekretion des MPO-Proteins, unter dem Einfluss von TPA**

In einem weiteren Versuch ging es darum den Transport der MPO zu den azurophilen Granula, durch hinzufügen von TPA und NaClO<sub>3</sub>, zu beeinflussen. Mit einer erneuten Behandlung der HL-60 Zellen mit TPA, wurde versucht die Speicherung von Serglycin abermals zu verhindern. Um die negative Ladung der Proteoglykane zu verringern, wurde Natriumchlorat, ein Hemmstoff der Zellsulfatierung ohne negativen Einfluss auf die Proteinsynthese (Bäuerle und Huttner, 1986), eingesetzt.

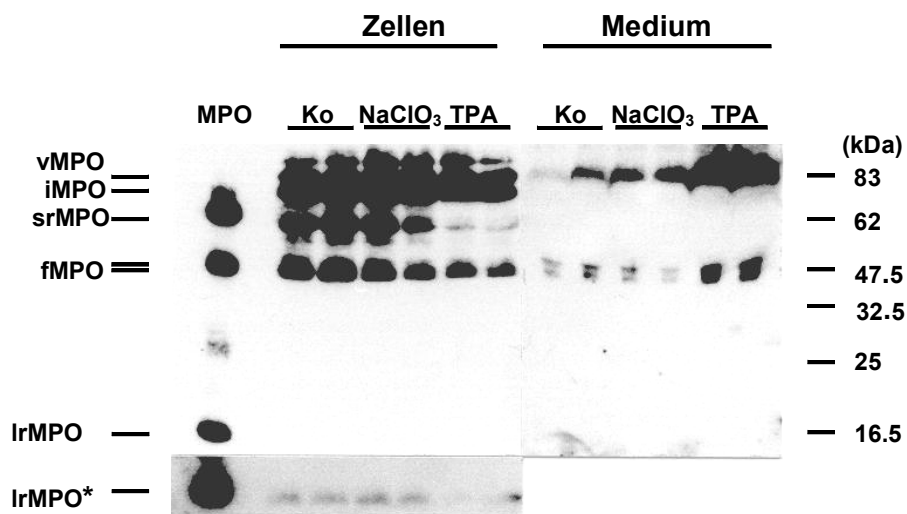
Die HL-60 Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden mit 50 nM TPA bzw. 20 mM NaClO<sub>3</sub> über Nacht inkubiert. Kontrollzellen, erhielten nur DMSO. Die Zellen wurden lysiert und zu gleichen Anteilen mittels SDS-Page und MPO-*immunoblotting* analysiert.

Das Ergebnis in Abb. 3.5 zeigt, die verschiedenen Formen der MPO in HL-60 Zellen und deren Sekrete. Es handelt sich hierbei um die 85 kDa schwere proMPO, welche den Golgi-Apparat verlässt, um in den Granulavorstufen zur intermediären MPO heranzureifen und schließlich in den azurophilen Granula als reife Form gespeichert zu werden (Hasilik *et al.*, 1984; Nauseef *et al.*, 1992). Zusätzlich findet man MPO-Fragmente mit einem Molekulargewicht von 43-47 kDa, die während des Kochens in Probenpuffer durch autokatalytische Prozesse entstanden sind (Taylor *et al.*, 1992). Auch hier zeigt sich, dass unter dem Einfluss von TPA, im Vergleich zu den Kontrollzellen, die Vorläufer-MPO vermehrt in das Medium sezerniert wurde. Im Medium waren zudem die reifen Formen dieses Enzyms nicht detektiert. In den behandelten Zellen werden kaum schwere und leichte Ketten der reifen MPO kaum gebildet. Es scheint, als würde die neu synthetisierte MPO sofort in das Medium abgegeben und nicht in den azurophilen Granula gespeichert bzw. fragmentiert werden. Damit ist gezeigt, dass die MPO ähnlich dem Serglycin im Normalfall teilweise sezerniert und teilweise in die azurophile Granula transportiert wird. Unter dem Einfluss von TPA hingegen werden beide Makromoleküle fast komplett sezerniert. Dieser Befund macht eine Komplexbildung beider Makromoleküle miteinander während des granulären Transports innerhalb der HL-60 Zellen wahrscheinlich. Eine Komplexbildung *in vitro* wurde hier (Abb. 3.7) beschrieben.

Die Verminderung der Sulfatierung, und dadurch der negativen Ladung der Proteoglykane, durch die Zugabe von Natriumchlorat scheint keinerlei Auswirkungen auf den Transport der MPO in die azurophile Granula in HL-60 Zellen zu haben. Dies könnte bedeuten, dass die negative Ladung der Carboxylgruppe der Glucuronsäurereste

in Chondroitinsulfat ausreicht, um die MPO zu binden und so den Transport in die Granula zu gewährleisten.

Um die Bildung der leichten Ketten der reifen MPO zu demonstrieren, wurde ein Teil einer längeren ECL-Exposition dieses *blots* der Abbildung (s. Abb.3.5) unten angefügt, da die erste Exposition ein zu schwaches Signal hatte.



**Abb. 3.5 Erhöhung der Sekretion des MPO-Proteins, unter dem Einfluss von TPA.** HL-60 Zellen wurden mit 20 mM NaClO<sub>3</sub> bzw. 50 nM TPA über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden lysiert und zu gleichen Anteilen mittels SDS-Page und MPO-immunoblotting analysiert. Aufgrund des hohen Gehalts an Serumalbumin im Medium wurde nur ein Anteil von 4:1 für die Zellextrakt und die Medien verwendet, was durch eine höhere ECL-Exposition der Mediumproben wieder ausgeglichen wurde. Zum Vergleich wurden 0,7 µg reife MPO als zusätzliche Bande auf dem Gel aufgetragen. Wegen des schwachen Signals der leichten Kette der MPO, wurde eine längere ECL-Entwicklung dieser *blot*-Region der Abbildung unten angehängt (IrMPO\*). vMPO= vorläufige (unreife) MPO, iMPO = intermediäre MPO, srMPO = schwere Kette der reifen MPO, fMPO = MPO-Fragmente, IrMPO = leichte Kette der reifen MPO. (Ein Teil der Mediumprobe (1. Kontroll-Bahn) ging beim Auftagen auf das Gel aus versehen verloren.)

### **3.3.2.2 Erhöhung der Sekretion enzymatisch aktiver MPO unter dem Einfluss von TPA**

Um die Steigerung der Sekretionsrate der MPO durch TPA auch quantitativ darstellen zu können, wurde das folgende Experiment durchgeführt:

HL-60 Zellkulturen ( $2 \times 10^6$  Zellen/mL) wurden mit 50 nM TPA/DMSO bzw. nur DMSO für 4,25 h und, in einem weiteren Versuch, über Nacht inkubiert. Nach Waschen und Lysieren der Zellen wurde die MPO-Aktivität im Medium und in den Zellysaten gemessen.

Im ersten Teil des Experiments (4,25 h –Inkubation) konnte bei den Kontrollzellen eine relative Sekretionsrate von  $6,6 \pm 0,7\%$  (n=10) gemessen werden und für die TPA-behandelten Zellen (Abb. 3.6 A ) eine relative Sekretionsrate von  $10,9 \pm 0,7\%$  (n=10). In der Kontrolle wurden  $1,52 \pm 0,16$  mU (n=10) im Medium und 21,4 mU in den Zellen gefunden, und in dem Ansatz mit TPA waren es  $2,68 \pm 0,17$  mU (n=10) bzw. 21,8 mU. Auch in diesem Ergebnis findet sich wieder eine deutliche Zunahme der MPO-Sekretion (1,63-fache Steigerung). Diese Zunahme ist mit der 1,7-fachen Steigerung der Serglycin-Sekretionsrate aus dem vorangegangenen Experiment (Punkt 3.3.1, Abb. 3.4) vergleichbar.

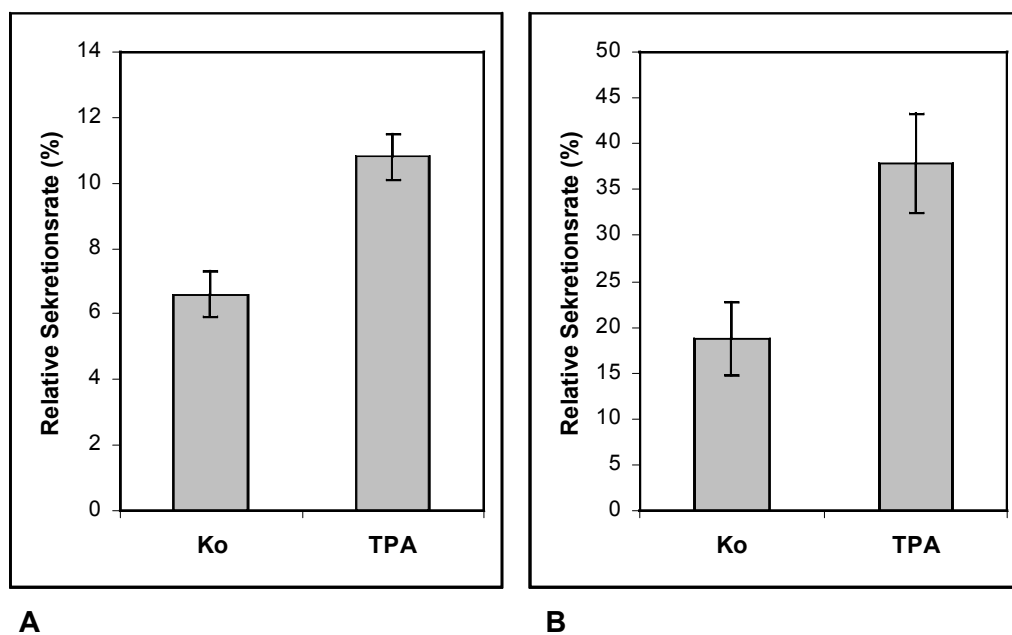
Diese Resultate zeigen, dass zwischen der Verteilung der neu synthetisierten MPO (0,63/1,63=39%) und der des neu synthetisierten Serglycins (0,8/1,8= 44%) in die azurophile Granula der HL-60 Zellen ein Zusammenhang wahrscheinlich ist.

Auch im zweiten Teil des Versuchs konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Die HL-60 Zellen wurden über Nacht mit TPA inkubiert, dementsprechend hoch zeigte sich die relative Sekretionsrate der MPO (2,02-fache Steigerung). So konnte bei den Kontrollzellen eine relative Sekretionsrate von  $18,7 \pm 3,9\%$  (n=12) gemessen werden und für die TPA-behandelten Zellen (Abb. 3.6 B ) eine relative Sekretionsrate von  $37,8 \pm 5,2\%$  (n=12). In der Kontrolle wurden  $1,48 \pm 0,3$  mU im Medium und 27,0 mU in den Zellen gefunden, und in dem Ansatz mit TPA waren es  $1,99 \pm 0,27$  mU bzw. 13,46 mU.

Auch wenn die relativ lange Inkubationszeit bei dem zweiten Experiment noch weitere ungeklärte Effekte auf die HL-60 Zellen gehabt haben könnte, so scheint dennoch auch in diesem Fall das TPA für die Sekretionssteigerung verantwortlich zu sein.

Wie bereits erwähnt (Punkt 3.3.1), konnte eine ähnliche Sekretionssteigerung in vorangegangenen Experimenten für Lysozym und Chondroitinsulfat in mit TPA-behandelten U937-Zellen nachgewiesen werden (Lemansky und Hasilik, 2001).

Die kurze Behandlung der HL-60 Zellen (4,25 h) führte zu einer relativ schnellen Steigerung der MPO-Sekretion, so dass anzunehmen ist, dass dieser Effekt nicht auf eine vermehrte Biosynthese der MPO zurückgeführt werden kann.



**Abb. 3.6 Erhöhung der Sekretion enzymatisch aktivierter MPO unter dem Einfluss von TPA.** HL-60 Zellkulturen ( $2 \times 10^6$  Zellen/mL) wurden mit 50 nM TPA/DMSO bzw. nur DMSO inkubiert. Nach Waschen und Lysieren der Zellen wurde die MPO-Aktivität im Medium und in den Zelllysaten, mittels *o*-Dianisidin-Test, gemessen. Die relative Sekretionsrate der MPO ist dargestellt als Standardabweichung (A: n= 10; B: n= 12) in Prozent der gesamten Aktivität in Zellen und Medium.

A: Inkubation mit TPA für 4,25 h B: Inkubation mit TPA über Nacht



### 3.3.3 Quervernetzung von MPO mit Serglycin in HL-60 Zellen

Im folgenden Experiment wurde der membranpermeable Quervernetzer DSP verwendet, der zwei Amin-reaktive Succinimidgruppen. Dieser Quervernetzer hat den Vorteil, dass selbst schwache bzw. mittelstarke Protein/Protein- bzw. Protein/Proteoglykanwechselwirkungen durch kovalente Fixierung sichtbar gemacht werden können.

Wenn Serglycin den granulären Transport der MPO vermittelt, sollte eine vorübergehende Interaktion beider Moleküle im *trans*-Golgi bzw. TGN-Bereich zustande kommen und nachweisbar sein. Daher wurden HL-60 Zellen für 20 min mit [<sup>35</sup>S]Sulfat markiert und anschließend für 10 min mit DSP für 10 min quervernetzt. Da die Sulfatierung ein Ereignis des *trans*-Golgi-Apparates ist, sollte das Serglycin dort markiert werden und während der Quervernetzungsphase mit den Molekülen reagieren, die mit ihm auf den Weg in die Granula wechselwirken. Dies sollten einerseits „Frachtmoleküle“ sein, die mit Hilfe von Serglycin in die Granula verpackt werden, andererseits sollten auch Wechselwirkungen mit membraninserierten Sortiermolekülen stattfinden, die das Serglycin mit seiner „Fracht“ aus den Sekretionsweg in granuläre Transportvesikel dirigieren.

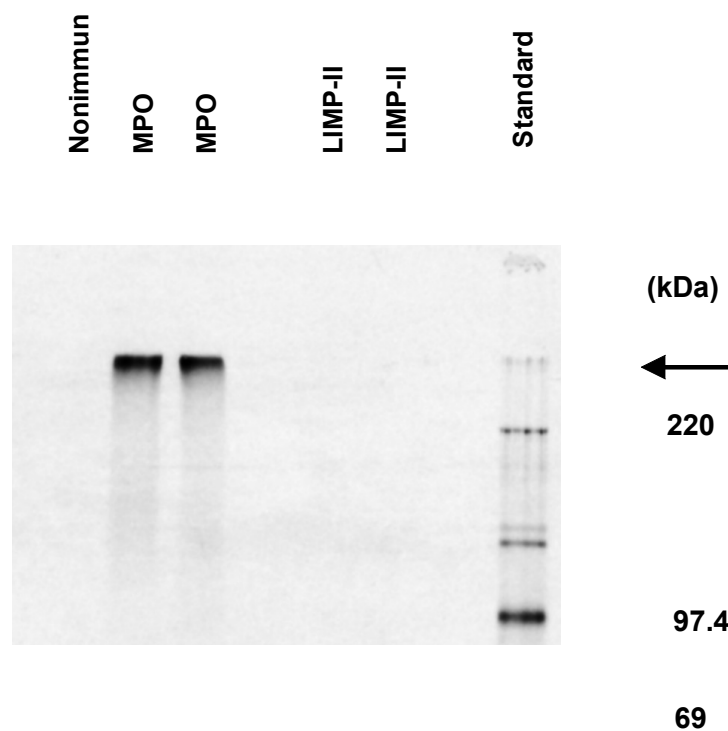
Eine Wechselwirkung kann nun durch Einsatz von spezifischen Antikörpern gegen ein beliebiges Protein nachgeprüft werden. Wenn außer dem spezifischen Protein auch [<sup>35</sup>S]Sulfat-markiertes Serglycin immunpräzipitiert wird, weiß man, dass es eine Wechselwirkung zwischen diesen Molekülen im *trans*-Golgi bzw. im TGN gegeben hat.

Im vorliegenden Experiment wurde ein nichtimmunes Kaninchenserum und ein Kaninchen- Antiserum gegen humane MPO und LIMP-II zur Immunpräzipitation verwendet. Diese Immunpräzipitate wurden unter reduzierenden SDS-PAGE Bedingungen analysiert.

Wie zu erwarten war, wurde mit nichtimmunem Kaninchenserum kein [<sup>35</sup>S]Sulfat-markiertes Serglycin präzipitiert. Auch beim Einsatz eines LIMP-II spezifischen Antiserums wurde kein Serglycin kopräzipitiert. Nur nach Immunpräzipitation der MPO wurde [<sup>35</sup>S]Sulfat-markiertes Serglycin kopräzipitiert. Die MPO und das LIMP-II wurden selber nicht oder nur so schwach markiert, dass sie bei der vorliegenden 4-tägigen Exposition den Röntgenfilm kein Signal ergaben.

Damit ist der Nachweis erbracht, dass die MPO im *trans*-Golgi/TGN-Bereich mit Serglycin interagiert, d.h. in dem subzellulären Bereich, in dem das Sortieren stattfindet. Dagegen scheint das LIMP-II als eines der Hauptmembranproteine von Lysosomen keine Bedeutung für das Sortieren von Serglycin zu haben. Dies lässt sich aber nicht letztgültig behaupten, da die Quervernetzung nur bei Vorhandensein reaktiver Aminogruppen in einem Reagenz-abhängigen Abstand voneinander (1,2 nm bei DSP) möglich ist. Auch eine geringe Anzahl von freien Aminogruppen im luminalen Teil von LIMP-II, bzw. deren Abschirmung durch störende Kohlenhydratseitenketten hätten eine Quervernetzung behindern können.

Wird die MPO aus [<sup>35</sup>S]Sulfat-markierten HL-60 Zellen immunpräzipitiert, die nicht mit DSP behandelt wurden, wird bereits ein gewisser Grad an Copräzipitation von [<sup>35</sup>S]Sulfat markiertem Serglycin erreicht, der aber durch DSP-vermittelte Quervernetzung massiv gesteigert werden kann (siehe Veröffentlichung: Lemansky *et al.*, 2003).



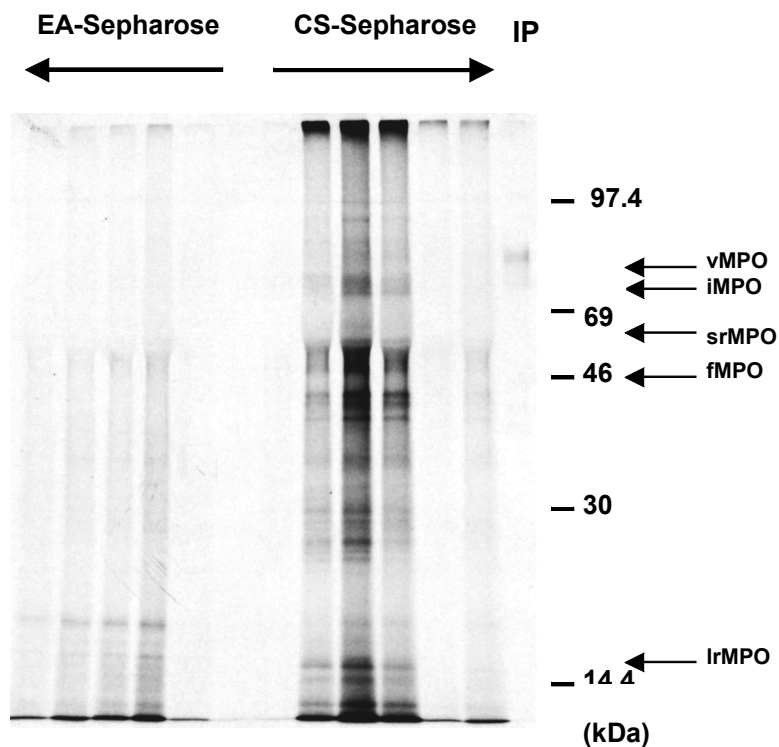
**Abb. 3.7** Untersuchung einer Co-Immunpräzipitation des <sup>35</sup>S-markierten Proteoglykans aus Extrakten DSP-behandelter HL-60 Zellen mit anti-MPO und anti-LIMP-II Antikörpern. HL-60 Zellen wurden 20 min mit [<sup>35</sup>S]Sulfat markiert und anschließend 10 min mit DSP quervernetzt. Aus Aliquots von Zellextrakten wurden danach die MPO und das LIMP-II immunpräzipitativiert. Der Pfeil markiert die Grenze von Sammel- und Trenngel.

### **3.3.4 Affinitätschromatographie der in Anwesenheit von TPA-sezernierten Proteine an CS-Sepharose**

In den zuvor beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die MPO an die Chondroitinsulfat-Ketten des Serglycins bindet und mit dessen Hilfe in die azurophile Granula gelangt. Im nächsten Versuch sollte geklärt werden, ob auch andere positiv geladene Polypeptide an CS-Sepharose binden und so zu ihrem Speicherort gelangen können.

HL-60 Zellen wurden 22 h mit Met [<sup>35</sup>S]-Label markiert und mit 50 nM TPA inkubiert. Die Medien wurden je zur Hälfte auf einer CS-Sepharose-Säule und als Kontrolle auf einer Äthanolamin-Sepharose-Säule aufgetragen. Danach wurden die Säulen solange gewaschen, bis in der Waschlösung < 500 cpm/ml nachweisbar war. Äthanolamin dient zum Abbinden der CNBr(Cyanobromid)-aktivierten Bindungsstellen. CNBr-aktivierte Sepharose bindet freie NH<sub>2</sub>-Gruppen im CS, so dass CS-Sepharose entsteht. Als Kontrollsäule dient die Bindung von Äthanolamin, wobei die Aminogruppen die reaktiven CNBr-Gruppen bindet und am anderen Ende der Säule eine OH-Gruppe nach außen zeigt.

Die Elution erfolgte durch Zugabe von 5 x 200 µl 1 mg/ml CS. Deutlich zu erkennen ist eine Steigerung der Radioaktivität, direkt nach der Zugabe von 1 mg/ml CS, in den Fraktionen 6-9 der CS-Säule. Die Polypeptide des Eluats zeigen die gleiche Mobilität wie die aus den TPA-Sekreten immunpräzipitierte MPO, so dass es sich hier teilweise um die MPO handelt. Eine Identifizierung der Proteine ist anhand dieses Versuchs nicht erfolgt. Es ist wahrscheinlich, dass CS kationische Polypeptide bindet, die in die azurophile Granula transportiert werden (Levy, 1996).



**Abb. 3.8 Affinitätschromatographie der in Anwesenheit von TPA-sezernierten Proteine an Äthanolamin- bzw. CS-Sephrose.** HL-60 Zellen wurden 22 h mit Met [ $^{35}\text{S}$ ]-Label markiert und mit 50 nM TPA inkubiert. Die markierten Medien wurden je zur Hälfte auf einer CS-Sephrose-Säule (CS-Sephrose) und als Kontrolle auf einer Äthanolamin-Sephrose-Säule (EA-Sephrose) aufgetragen. Danach wurden die Säulen mit 20 ml 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 Puffer, gewaschen, bis in der Waschlösung  $< 500$  cpm/ml nachweisbar war. Die Elution erfolgte mit 5 x 200  $\mu\text{l}$  1 mg/ml CS in Tris/HCl, pH 7,4 Puffer. Die Lage der MPO-Polypeptide (Pfeile) entsprechen der in Abb. 11. vMPO= vorläufige (unreife) MPO, iMPO = intermediäre MPO, srMPO = schwere Kette der reifen MPO, fMPO = MPO-Fragmente, lrMPO = leichte Kette der reifen MPO

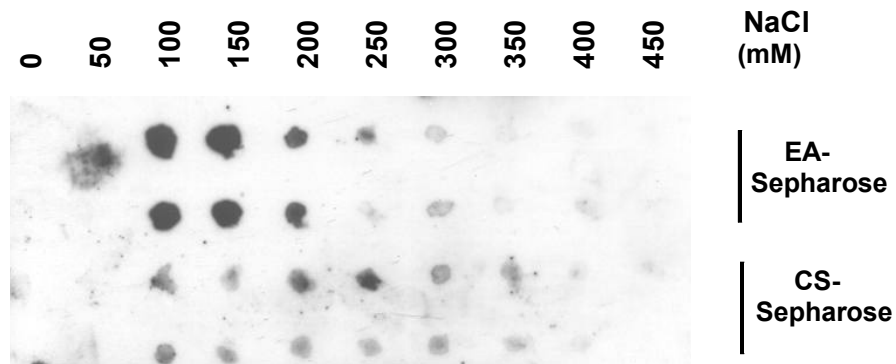
### 3.3.5 Bindungsverhalten von Procathepsin D an CS-Sepharose

Im vorangegangenen Experiment konnte gezeigt werden, dass an CS-Sepharose zusätzlich zur MPO mehrere Polypeptide binden. Im folgenden Versuch wurde das Bindungsverhalten von Procathepsin D, einem weiteren Kandidaten des Serglycin-Transportwegs, untersucht.

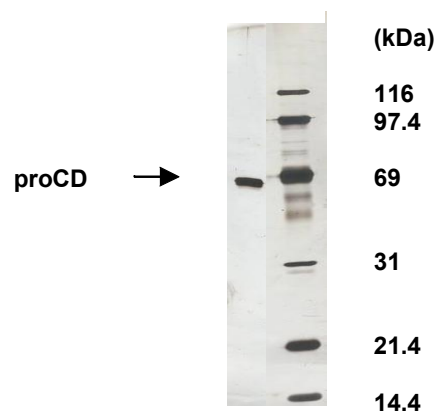
Es ging darum zu testen, ob am Transport von Procathepsin D das Serglycin beteiligt sein könnte. Hierzu wurden eine CS-Sepharose-Säule und eine Äthanolamin-Sepharose-Säule (Kontrolle) mit je 0,5 µg Procathepsin D (in 70 µl 17 mM Tris-/BSA-Puffer aufgelöst) 10 min beladen und mit steigender Kochsalzkonzentration eluiert. Von diesen Elutionen wurde ein *dot blot* erstellt (Abb. 3.9 A). In Abbildung 3.9 B ist ein Western *blot* von Procathepsin D (Pro-CD) zu sehen, das für die Versuche verwendet wurde.

In der *dot blot*-Untersuchung zeigt sich, dass das Pro-CD an CS-Sepharose bindet und mit steigender Salzkonzentration (100-350 mM NaCl) allmählich eluiert wird. Im Unterschied dazu lässt sich das an Äthanolamin-Sepharose gebundene Pro-CD bei niedrigeren Salzkonzentrationen eluieren (100-200 mM NaCl).

Das Procathepsin D scheint somit prinzipiell in der Lage zu sein mit CS ionische Verbindungen einzugehen.



**A**



**B**

**Abb. 3.9 Elution von Procathepsin D von CS-Sepharose.** Eine CS-Sepharose-Säule und eine Äthanolamin-Sepharose-Säule (EA-Sepharose) wurden mit je 0,5 µg Procathepsin D (in 70 µl 17 mM Tris-/BSA-Puffer aufgelöst) 10 min beladen und mit steigender Kochsalzkonzentration eluiert.

**A:** *Dot blot* der oben genannten Elutionen. Es wurden je 2 x 2 µl der Eluate auf eine Nitrozellulose-Membran nebeneinander aufgetragen (Doppelreihen).

**B:** *Western blot* von gereinigtem Procathepsin D (aus dem Kulturbestand rekombinanten Baculovirus infizierter *Spodoptera*-Zellen).

## 4 Diskussion

Ziel dieser Studie war es, den Transportmechanismus der MPO in die azurophilen Granula von HL-60 Zellen, einer humanen myeloblastären Zelllinie, zu untersuchen. Das Sortieren der MPO in die azurophilen Granula ist bei diesen Zellen nicht vollständig. Ein Teil der MPO (ca. 50%) wird, wie unter Punkt 1.3.2.4 beschrieben, als Vorläufermolekül sezerniert. Der in der Zelle verbleibende Anteil der MPO wird proteinolytisch modifiziert, d.h. nach Abspaltung des 14 kDa Propeptids zur reifen MPO umgesetzt (leichte plus schwere Kette) und als solche in den azurophilen Granula gespeichert (Hasilik *et al.*, 1984; Nauseef *et al.*, 1988).

In den letzten Jahren war die Suche nach einem spezifischen Mechanismus für die Sortierung von lysosomalen und granulären Enzymen in ihren jeweiligen Speicherort Inhalt vieler wissenschaftlicher Arbeiten (Gullberg *et al.*, 1997; Dittmer *et al.*, 1999, und andere). Bereits 1984 konnte gezeigt werden, dass MPO und lysosomale Enzyme mit M6P-Signalen ausgestattet werden (Hasilik *et al.*, 1984). Allerdings führt die Hemmung des M6P-Rezeptorabhängigen Transports durch Inkubation von HL-60 Zellen mit NH<sub>4</sub>Cl nicht zu einer Fehlsortierung der MPO. Dies deutete auf einen alternativen Mechanismus für den granulären Transport der MPO hin. In zwei jüngeren Arbeiten, Andersson *et al.* (1998) und Bülow *et al.* (2002), wurde die Rolle des Propeptids beim granulären Transport der MPO untersucht.

Studienobjekt der Arbeit von Andersson *et al.* (1998) war die murine granulozytäre Zelllinie 32D, eine mit Neutrophilen verwandte Linie. In diesen Zellen wurde zum einen die Wildtyp-MPO (wt-MPO) und zum anderen eine MPO-Mutante transfiziert, letzterer fehlte das Propeptid. Die wt-MPO wurde normal prozessiert und als proteinolytisch gereifte Form in azurophilen Granula ähnlichen Vakuolen von 32D-Zellen gespeichert. Die Propeptid-defiziente Variante wurde zu einem wesentlich geringeren Teil als die wt-MPO sezerniert. Sie gelangte jedoch auch nicht in die Vakuolen, wurde nicht zur reifen Form mit leichter und schwerer Kette prozessiert und hatte eine deutlich geringere Halblebenszeit. Obwohl die Autoren daraus schlossen, dass die Prosequenz wichtig für das *targeting* der MPO sei, lassen die publizierten Daten alternative Interpretationen zu, beispielsweise dass das Propeptid wichtig für die korrekte Faltung der MPO im ER ist. Probleme während dieses Faltungsprozesses können sekundär zu Störungen des granulären Transports dieses Enzyms führen. Denn nur die richtige, dreidimensionale Konformation ermöglicht einen Export aus dem

endoplasmatischen Reticulum und letztendlich eine Interaktion der MPO mit Serglycin. Die Autoren eines kürzlich erschienen Review-Artikels (Stevens und Adachi, 2007) sehen in der Bindung von basischen Proteinen an Serglycin eine weitere, dem ER-assoziierten Qualitätskontrollmechanismus nachgeschaltete Kontrollinstanz, um korrekt gefaltete, funktionierende Proteine von fehlgefalteten und damit funktionsgestörten granulären Proteinen zu trennen.

Die Arbeitshypothese dieser wissenschaftlichen Arbeit beruht auf der Beobachtung, dass viele granuläre Proteine basisch sind und mit Hilfe des Proteoglykans Serglycin in die Granula transportiert werden (siehe Auflistung weiter unten). Durch den unter Punkt 3.2.1 beschriebenen Versuch konnte gezeigt werden, dass die reife MPO und die proMPO an CS-Sepharose binden. Beide MPO-Formen konnten bei fast gleicher Salzkonzentration (zwischen 200 mM und 350 mM) eluiert werden. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass die MPO mit den GAG-Seitenketten von Serglycin interagiert und dass in diesem Zusammenhang das Propeptid nicht, wie von Andersson *et al.* (1998), und Bülow *et al.* (2002) postuliert für den Transport der MPO entscheidend ist. Ginge man davon aus, dass alleine die Prosequenz die hauptsächliche Bindungsstelle wäre, so könnte man erwarten, dass die reife MPO schon bei wesentlich niedrigeren Salzkonzentrationen eluiert werden würde.

Die Beobachtung, dass die proMPO, im Gegensatz zur reifen MPO, nicht vollständig, sondern mit nur etwas mehr als 40% an die Chondroitinsulfat-Sepharose-Säule band, ist vermutlich auf Bestandteile des Kulturmediums zurückzuführen, in dem das Proenzym appliziert worden ist.

Im nächsten Versuch (3.2.2) wurde untersucht, ob eine Veränderung des pH-Wertes Auswirkungen auf die Stärke der Interaktion zur CS-Sepharose hat. Der in den späten Endosomen herrschende saure pH-Wert ( $< 6$ ) dient dazu, die an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor gebundenen lysosomalen Proteine zu lösen. Da der pH-Wert in den azurophilen Granula ebenfalls unter dem Neutralpunkt liegt, gilt es zu untersuchen, ob das saure Milieu dazu dient, die MPO wieder von dem Serglycin zu lösen.

Dies kann man ganz klar verneinen, denn (s. Versuch 3.2.2) eine Absenkung des pH-Wertes auf 3,5 führte nicht zu dem erwarteten Effekt. Die MPO verblieb an der Säule. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass das Sulfat der Chondroitin-Seitenketten auch bei diesem pH-Wert deprotoniert vorliegt. In einem vorangegangenen Experiment (nicht Teil dieser Arbeit) wurde gezeigt, dass die funktionellen Gruppen der basischen Aminosäuren der MPO (Lysin und Arginin;  $pK_b$  10,8 bzw. 12,5) eine entscheidende



Rolle für die Bindung spielen. Werden diese durch Erhöhung des pH-Wertes auf 12 größtenteils deprotoniert, so kann das CS nicht mehr mit der MPO interagieren. Wenn man jedoch den pH-Wert auf 3,5 absenkt (wie in Versuch 3.2.2 gezeigt), kann das nun immer noch negativ geladene Chondroitinsulfat an die MPO binden und erst wieder durch Erhöhung der Salzkonzentration (auf 1 M NaCl) gelöst werden. Der Versuch zeigt auch, dass eine Ansäuerung des Milieus, wie es in Endosomen und Lysosomen geschieht, nicht zum Abkoppeln der MPO vom Serglycin führen kann. Verhindert man die Ansäuerung der Lysosomen von HL-60 Zellen mit Hilfe von  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , läuft der Transport der MPO ganz normal weiter (Hasilik *et al.*; 1984). D.h. zu der Freisetzung kommt es vermutlich durch den raschen Abbau von Serglycin im sauren Milieu der Granula in diesen Zellen. Die unter Punkt 3.3 aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass TPA einen Effekt auf das *targeting* von MPO und Serglycin in HL-60 Zellen hat. Beide wurden unter dessen Einfluss ungefähr zu gleichen Teilen, MPO zu 39% und Serglycin zu 44%, vom granulären Weg, zum extrazellulären Weg umgeleitet. Diese Beobachtung ist mit der Möglichkeit kompatibel, dass beide in einem Verbund in Vesikeln in die Granula transportiert werden. Ein ähnlicher Versuch wurde bereits von Lemansky und Hasilik *et al.* (2001) durchgeführt. Diese konnten bei einer humanen promonozytischen U937 Zelllinie eine durch TPA induzierte, fast vollständige Sekretion der Proteoglykane und eine damit korrelierte fast vollständige Sekretion von Lysozym beobachten. Die Sortier-Effizienz des Transportes von Lysozym scheint allerdings weniger effektiv zu sein als bei der MPO, da nur etwa 33% des neusynthetisierten Lysozyms in die Lysosomen transportiert werden, obwohl ca. 80% des Serglycins dorthin gelangen. Diese Beobachtung konnte auch in einem weiteren Versuch der durchgeführten Versuchsreihe bestätigt werden (s. Veröffentlichung Abb. 1 A). Bei der Affinitätschromatographie von Lysozym und MPO an CS-Sepharose, wurde Lysozym wesentlich früher von der Säule eluiert, was auf schwächere ionische Wechselwirkungen schließen lässt. Serglycin, als eines der am häufigsten vorkommenden Proteoglykane in hämatopoetischen Zellen, ist an vielfältigen biologischen Prozessen beteiligt und erfüllt innerhalb der Zelle zahlreiche Funktionen (siehe Einleitung). An dieser Stelle sollen die gewonnenen Erkenntnisse der letzten Jahre aufgeführt und mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen bzw. diskutiert werden.

Das Serglycin wird unter anderem in humanen Mastzellen exprimiert (Humphries *et al.*, 1992), in welchen es, gemäß Åbrink *et al.* (2004), für die Bildung von sekretorischen

Granula und deren strukturellen Aufbau zuständig ist. Seine GAG-Seitenketten werden in diesen Zellen zu Heparansulfat modifiziert.

Des Weiteren wird Serglycin auch in den sekretorischen Zellen von Epithelien (Kulseth *et al.*, 1999; Schick *et al.*, 2001), embryonalen Stammzellen (Schick *et al.*, 2003) und in den Azinuszellen des Pankreas (Biederbick *et al.*, 2003) exprimiert. Interessant erscheint auch die Rolle der GAG-Ketten im Hinblick auf den Sortierungsprozess von Proteinen und des Serglycin selbst zu sein. Biederbick *et al.* (2003) konnten zeigen, dass in den Azinuszellen des Pankreas, die Sortierung von Serglycin in die sekretorischen Vesikel ohne GAG-Ketten nicht erfolgen kann. Auch in anderen Zellen scheint dieser Sortierungsmechanismus wichtig zu sein. Zellen, die Serglycin grundsätzlich ohne diese GAG-Ketten herstellen, enthalten generell wenig Granula und somit auch wenig lysierende Enzyme (Kolset *et al.*, 2004). Diese Beobachtungen können durch einige in dieser Arbeit durchgeführten Versuche an HL-60 Zellen bestätigt werden. Besonders der Versuch 3.3.4 zeigt, dass eine temporäre Interaktion von MPO und Serglycin im *trans*-Golgi bzw. TGN-Bereich zustande kommt. Zu diesem Zweck wurden [<sup>35</sup>S]Sulfat-markierte HL-60 Zellen mit dem homobifunktionalen Quervernetzer DSP versetzt und aus den gewonnenen Zellhomogenaten die MPO immunpräzipitiert. Ein Teil des radioaktiv markierten Serglycin wurde durch MPO-spezifische Antikörper mitpräzipitiert. Dies indizierte eine Vernetzung und letztendlich die Bildung von Komplexen zwischen MPO und Serglycin. Im Unterschied dazu ließ sich das Serglycin mit LIMP-II nicht quervernetzen. LIMP-II ist ein lysosomales Membranprotein, das im TGN sortiert wird (Gamp *et al.*, 2003). Die Quervernetzung von MPO unmittelbar nach der Sulfatierung des Serglycin zeigt, dass die Komplexbildung wahrscheinlich im *trans*-Golgi-Apparat erfolgt. Dies impliziert, dass die Komplexbildung wichtig für deren granulären Transport sein könnte.

Die hydrophile Natur des Serglycins und der MPO lassen vermuten, dass diese Moleküle mit einer oder mehreren Membrankomponenten, welche für deren Verpackung in granuläre Transportvesikeln zuständig sind, interagieren (Gullberg *et al.*, 1997). Diese Membrankomponenten waren zur Zeit der Durchführung dieser Arbeit nicht bekannt. Eine spätere Arbeit zeigte, dass der kationenunabhängige M6P/*insulin-like growth factor* II (IGF-II)-Rezeptor (kurz: CI-MPR), welcher zu einem geringen Teil in der Zellmembran (ca. 10%), jedoch vorwiegend (ca. 90%) im TGN und in den Endosomen lokalisiert ist, in diesen granulären Sortierungs-/ Verpackungsmechanismus involviert ist (Lemansky *et al.*, 2007). Auch bei dieser Arbeit konnte mittels CS-

Affinitätschromatographie dargestellt werden, dass dieser klassische lysosomale Sortier-Rezeptor, mit CS eine Bindung eingeht. Ausgehend von diesem Ergebnis, konnte durch Quervernetzung mit DSP und nachfolgender Immunpräzipitation gezeigt werden, dass Komplexe aus Serglycin und CI-MPR gebildet werden. Dieses Phänomen konnte sowohl in U937 Zellen (humane promonozytäre Zelllinie), als auch in HL-60 Zellen (humane promyeloblastäre Zelllinie) nachgewiesen werden. In beiden Fällen bestätigte sich eine Wechselwirkung des Serglycins mit dem CI-MPR, was die Vermutung nahe legt, dass dieser Sortierungsmechanismus nicht nur in der Monocyten-Makrophagenzelllinie genutzt wird, sondern auch in anderen hämatopoetischen Zellreihen.

Spezifische Untersuchungen der azurophilen Granula ergaben, dass diese angefüllt sind mit vielfältigen kationischen bakteriziden Polypeptiden (Levy *et al.*, 1996; Borregard *et al.*, 1997; Hancock *et al.*, 2000), wie z.B. MPO, Defensine, Lysozym, Cathepsin G, Azurozidin, um nur einige zu nennen (siehe auch Punkt 1.2).

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die positive Ladung dieser Polypeptide nur dazu diene, an der Oberfläche von negativ geladenen Bakterienzellwänden zu binden, um ihre Aufgabe in der Immunabwehr ausführen zu können. Diese und viele andere Arbeiten zeigen jedoch, dass ihre kationische Natur zusätzlich dafür zuständig ist, die Enzyme mittels Serglycin in die azurophilen Granula zu schleusen. Diese These wird auch durch die in Versuch 3.3.4 gemachten Beobachtungen unterstützt. In diesem Experiment wurden die in Anwesenheit von TPA sezernierten Proteine von HL-60 Zellen auf eine CS-Säule aufgetragen. Es gelang der Nachweis, dass viele verschiedene Polypeptide an der CS-Sepharose binden, welche erst nach Beendigung des experimentellen Teils dieser Arbeit identifiziert wurden. Bei ähnlichen Versuchen mit dichten Zellorganellen (Lysosomen, leukozytäre Granula) aus humaner Plazenta konnten folgende kationische Enzyme identifiziert werden: MPO (lange und kurze Kette), Lactoferrin, Cathepsin G und Azurozidin/CAP37 (Lemansky *et al.*, 2003; Veröffentlichung Abb. 7). Eine ähnliche Beobachtung, die Bindung von vielen unterschiedlichen Proteinen an CS-Sepharose, konnte bereits 1996 in einer Studie von Kolset *et al.* gemacht werden. Studienobjekt waren die bereits zuvor erwähnten U937 Zellen, welche mit TPA behandelt wurden. In diesem Fall wurden Lysozym und Makrophagen inflammatorisches Protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) als positiv geladene Proteine identifiziert, die an CS-Sepharose banden. Weitere Studien beschreiben ähnliche

Transport-Funktionen des Serglycins und anderer Proteoglykane, z.B. beim Transport von Proteinasen in die Granula von Mastzellen (Humphries *et al.*, 1999; Forsberg *et al.*, 1999), von Gewebsplasminogen-Aktivatoren in die Sekretionsgranula von menschlichen Endothelzellen (Schick *et al.*, 2001) und von sekretorischen Proteinen in die Zymogengranula von pankreatischen Azinuszellen (Schmidt *et al.*, 2000; Biderbick *et al.*, 2003).

In einer Arbeit mit Serglycin *knock-out* Mäusen konnte gezeigt werden, dass auch die Sortierung der murinen neutrophilen Elastase in azurophile Granula vollständig von Serglycin abhängig ist (Niemann *et al.*, 2007). Interessanterweise waren die MPO und andere kationische Proteine jedoch in normalen Mengen in den Granula von Neutrophilen dieser Mäuse vorhanden. Obwohl bei der Übertragung von solchen, an Tiermodellen gewonnenen Aussagen auf den Menschen Vorsicht geboten ist, ist dennoch klar, dass zumindest in der Maus der granuläre Transport der MPO nicht allein vom Serglycin abhängig ist. Dies könnte bedeuten, dass die früher bei der MPO gefundenen M6P-Signale beim Fehlen von Serglycin aktiv werden und die MPO durch direkte Bindung an M6P-Rezeptoren in die Granula gelangt. Evtl. besitzen Neutrophile der Maus noch andere Proteoglykane, die die Rolle von Serglycin übernehmen können oder zusätzliche, vollkommen unbekannt Mechanismen, die ein Sortieren von kationischen Proteinen ermöglichen. Dieses Phänomen, dass mehrere Mechanismen gleichzeitig für lebenswichtige Aufgaben existieren, lässt sich in der Natur häufig beobachten. Dadurch wird sichergestellt, dass eine lebenswichtige Funktion aufrecht erhalten werden kann, selbst wenn ein Teilmechanismus versagt.

Abschließend lässt sich feststellen, dass der Serglycin-vermittelte, granuläre Transport der MPO (und anderer kationischer Proteine) ein Teilmechanismus ist, der die Ausstattung von Immunzellen mit ihrem „Waffenarsenal“ und damit eine effektive Immunabwehr sicherstellt.

Es existieren Stoffwechselerkrankungen, bei denen die Sortierung der klassischen lysosomalen Enzyme, welche normalerweise über den M6P-Rezeptor sortiert werden, gestört ist. Auf eine dieser Stoffwechselerkrankungen, der sogenannten I-Zellen-Krankheit (Synonym: Mukopolidose Typ II; *I-cell disease*) soll im folgenden genauer eingegangen werden, da hier im Besonderen die Relevanz eines solchen M6P-Sortierungssignals für lysosomale Enzyme, zum tragen kommt (vergl. 1.4.2). Es handelt sich hierbei um einen seltenen autosomal-rezessiv vererbten Enzymdefekt (Mangel an UDP-N-Acetyl-Glukosaminyl-Phosphotransferase), bei dem es zur Ablagerung von

Stoffwechselprodukten in den Zellen verschiedener Organe kommt. Die Speicherung von komplexen Kohlenhydraten und Lipiden in den Lysosomen, die z.B. in Fibroblasten lichtmikroskopisch als sogenannte Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) sichtbar ist, gab dieser Krankheit ihren bekannten Namen. Leroy und DeMars (1967) definierten die Mukolipidose erstmals als eigenständige Erkrankung und grenzten sie zur Mukopolysaccharidose Typ I (Morbus Hurler) ab. Die klinischen Symptome der I-Zellen-Krankheit sind vielgestaltig und sind in der Regel schon bei Geburt feststellbar. Besonders schwer zu behandeln sind die pulmonalen und kardialen Komplikationen, deren Funktionseinschränkung letztendlich bei den meisten Kindern schon vor Erreichen des 8. Lebensjahrs zum Tod führt. Erstaunlicherweise scheinen manche Zellen dieser Patienten in der Lage zu sein, diesen Enzymmangel auszugleichen, in dem sie wahrscheinlich auf alternative M6P-unabhängige Sortierungsmechanismen zurückgreifen. So enthalten die Lysosomen im Parenchym von Leber, Milz, Niere und Gehirn, normale Konzentrationen an lysosomalen Enzymen (Kornfeld, 1986; Braulke *et al.*, 1987; Kornfeld und Sly, 1995). Zu den entsprechenden Zellen gelangen sie also nicht auf dem CI-MPR-basierenden Sortierungssignal in ihren Wirkungsort (Owada und Neufeld, 1982; Tsuji *et al.*, 1988). Das gleiche Phänomen konnte durch Glickman und Kornfeld (1993) auch an Lymphoblasten nachgewiesen werden, obwohl auch diese Zellen die Ausbildung von Mannose-6-Phosphat Signalen auf den Zuckern, von in diesem Fall Procathepsin D, unterblieb.

Der Hypothese folgend, dass Serglycin einen gewissen Anteil an Procathepsin D in die Lysosomen/Granula transportieren könnte, wurde der unter 3.3.5 beschriebene Versuch durchgeführt. In diesem Experiment sollte die Möglichkeit getestet werden, ob Procathepsin D, als ein Vertreter lysosomaler Enzyme mit nicht ausgeprägtem basischen Charakter, trotzdem mit Serglycin interagieren können. Diese Vermutung ließ sich durch die durchgeführten Vernetzungsversuche bestätigen ließ.

Mit großer Wahrscheinlichkeit kann man diese Transportmöglichkeit für alle Enzyme mit einem neutralem isoelektrischen Punkt unter normalen zellulären Bedingungen ausschließen, da diese ständig mit kationischen Proteinen um anionische Bindungsstellen der CS-Seitenketten konkurrieren müssen. Jedoch werden bei der oben geschilderten I-Zellen-Krankheit desgleichen nicht-basische Enzyme (z.B.  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase) von humanen und murinen Lymphozyten regulär in die Lysosomen sortiert (Gable *et al.*, 1983; Dittmer *et al.*, 1999). Dabei könnte der Mangel an M6P-tragenden lysosomalen Enzymen, vor allem wenn die Biosyntheserate von

Serglycin erhöht wäre, zu einer enorm erhöhten Transportkapazität von Serglycin führen. Damit existieren auch für die schwach affinen Liganden des Serglycins wie Procathepsin D und andere lysosomale Enzyme, eine Möglichkeit an Serglycin in ausreichender Menge zu binden, um mit dessen Hilfe in die Lysosomen zu gelangen. Tatsächlich konnte die CI-MPR vermittelte Transportkapazität von Serglycin durch eine Hemmung der Biosynthese M6P-haltiger Oligosaccharide an lysosomalen Enzymen durch Tunicamycin erhöht werden (Lemansky *et al.*, 2007). Es ist unwahrscheinlich, dass eine solche Erhöhung der Serglycin-Transportkapazität in I-Zellen groß genug ist, um den Verlust von M6P-defizienten lysosomalen Enzymen auszugleichen. Zur Klärung dieses Sachverhaltes, müssen zweifelsohne weitere Studien betrieben werden.

Um effiziente Medikamente für diese erkrankten Kinder entwickeln zu können, ist es daher zwingend erforderlich, nicht nur den genetischen Hintergrund, sondern auch den Mechanismus dieser Erkrankung grundlegend zu erforschen. Die Aufklärung aller Vorgänge innerhalb der Zelle, unter anderem die detaillierte Entschlüsselung der normalen Sortierungsprozesse der Enzyme, bilden hierfür die Basis.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche wissenschaftliche Abhandlungen veröffentlicht, die über die bakterizide und zytotoxische Eigenschaft der MPO hinausgehen (siehe Punkt 1.3.2.4 ). Zum einen hat die MPO als leicht zu messender Entzündungsmarker Eingang in viele Studien gefunden, bei denen Entzündungsreaktionen charakterisiert werden (Jungbeck *et al.*, 2007). In anderen Arbeiten konnte eine Korrelation zwischen MPO und arteriosklerotischen Gefäßerkrankungen (KHK) hergestellt werden. Die MPO kann durch die Bildung von Hydroxylradikalen, oxidativen Stress verursachen und damit das Gewebe, z.B. in Gefäßen, schädigen (Ward *et al.*, 1983; Till *et al.*, 1991). Diese Schäden wirken sich, der Studienlage nach, negativ auf das kardiovaskuläre System aus, indem sie vorhandene atherosklerotische Ablagerungen (sog. Plaque) destabilisieren. Weiterhin wirkt das Substrat der MPO, Wasserstoffperoxid, über die Aktivierung des NF- $\kappa$ B Transkriptionsfaktors auf Endothelien proinflammatorisch (Barnes und Adcock, 1997; Ginn und Whisler, 1998; Renard und Raes, 1999). Davidenkova und Shafron brachten 1989 die MPO zum ersten Mal mit Arteriosklerose in Zusammenhang. Erst 10 Jahre später wurde dieses Thema erneut Gegenstand der medizinischen Forschung (Jerlich *et al.*, 1998; Saiki, 1998). Nachdem gesichert schien, dass eine Verbindung zwischen MPO und Arteriosklerose besteht, zeigten die Studien

von Zhang *et al.* (2001) und Sugiyama *et al.* (2001), dass die MPO-Konzentration im Plasma von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (CAD = *coronary artery disease*) erhöht ist. Dabei scheint die MPO-Konzentration sogar mit dem Schweregrad der Arteriosklerose zu korrelieren. Der nächste Schritt in der MPO-Forschung war, MPO als Risikomarker, sowohl für Arteriosklerose, als auch für Patienten mit akutem Coronarsyndrom (ACS = *acute coronary syndrom*) zu identifizieren, um diese in Form von standardisierten Tests in der Klinik zu etablieren. In den letzten fünf Jahren wurden intensiv Nachforschungen auf diesem Gebiet durchgeführt (siehe oben). Basierend auf dem Wissen, dass die MPO zum einen an Entzündungsprozessen, zum anderen an kardiovaskulären Ereignissen beteiligt ist, wurden zu diesem Thema sowohl klinische Studien, als auch Grundlagenforschung im Labor durchgeführt. Tatsächlich konnte die bis dato scheinbar unterschätzte Myeloperoxidase als Prognose- und Risikoindikator für Herzerkrankungen identifiziert werden. Brennan *et al.* (2003) und Baldus *et al.* (2003) konnten in den Veröffentlichungen ihrer Studien äußerst interessante Ergebnisse vorweisen: Hierbei wurde die Myeloperoxidaseaktivität im Serum von Patienten mit Brustschmerzen, bzw. akutem Coronarsyndrom (ACS) gemessen und die Resultate mit Troponin T- und CRP (Capsel-reaktives Protein)-Spiegel der Patienten verglichen. Dabei konnte in überzeugender Weise dargestellt werden, dass bereits eine einmalige Messung der MPO eine Aussage hinsichtlich des Myokardinfarkttrisikos zulässt. Mehr noch, bei positivem Testergebnis ist sogar eine Prognose über ein bevorstehendes Infarktereignis innerhalb der nächsten sechs Monate möglich. Diese Voraussage ist dabei unabhängig vom Troponin-T (Herzmuskelzellen-spezifisches Protein) und CRP-Wert, da diese beiden Parameter erst ansteigen, wenn Herzmuskelgewebe bereits nekrotisiert ist, sprich ein Herzinfarkt bereits stattgefunden hat.

Lange Zeit konnte nicht geklärt werden, warum Patienten trotz guter HDL-Werte unter Arteriosklerose und einem erhöhten Herzinfarktisiko leiden. HDL (= *high density lipoprotein*), wirkt protektiv auf die Gefäße, indem es freies Cholesterin aus dem peripheren Gewebe (z.B. Arterienwänden) aufnimmt, in Cholesterinester umwandelt und zur Leber zurücktransportiert. Hazen (2005) konnte aufzeigen, dass diese scheinbar gesunden Patienten ein sogenanntes „dysfunktionales“ HDL besitzen. 2 Jahre zuvor hatte sein Forschungsteam in Patienten mit Brustschmerzen bereits erhöhte Myeloperoxidase-Werte (s.o. Brennan *et al.*, 2003) feststellen können. Gemäß der Forschungsergebnisse von Hazen beeinträchtigt die MPO das Apolipoprotein A-I in

seiner Gefäß-protectiven Funktion, so dass atherosklerotische Plaques nicht abgetragen werden können (Nicholls, S.J. *et al.*, 2005).

Aufgrund dieser neueren Erkenntnisse und ihrer unbedingten klinischen Relevanz für die Frühdiagnostik der KHK (koronaren Herzerkrankung), wird bereits an der Entwicklung von Tests gearbeitet, mit denen die Plasmakonzentration von MPO quantitativ bestimmt werden kann (Beispiel: Diazyme Europe GmbH, Dresden; haidumed, Perchtoldsdorf, Austria). An der Universität für Bodenkultur in Wien (Abt. Biochemie) wird an der Entwicklung von Inhibitoren für die Myeloperoxidase gearbeitet, mit dem Ziel, die Rolle der MPO bei den oben genannten Krankheitsmechanismen noch spezifischer zu erforschen.

Nicht zuletzt verdeutlichen diese Studien, die Bedeutung von weiterer grundlegenden Erforschung dieses Enzyms, wobei es interessant wäre herauszufinden, in wie vielen Krankheitsmechanismen die MPO eventuell noch involviert sein könnte und ob sich die MPO als „Herzmarkerenzym“ in der täglichen Routinediagnostik der Klinik durchsetzen kann.

Durch den Nachweis, der Beteiligung des Serglycins an den oben genannten Transportprozessen, wurde ein weiterer Baustein für die Entschlüsselung dieses Teilbereichs der zellulären Enzymforschung gelegt. Am Ende dieser Arbeit bleibt die Frage nach bis jetzt noch nicht aufgeklärten, alternativen Sortierungsmechanismen für alle jene Enzyme, die nicht oder nur zum Teil über die beiden genannten Wege in die Granula/Lysosomen gelangen, offen. Dies wird in den kommenden Jahren eine große Herausforderung und ein spannendes Themenfeld wissenschaftlicher Forschung bleiben.



## 5 Zusammenfassung

Das kationische Hämoprotein Myeloperoxidase (MPO) ist Bestandteil der azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten. In dieser Studie sollte ein möglicher Transportweg dieses Enzyms in die azurophilen Granula von HL-60 Zellen untersucht werden. Als Arbeitsgrundlage diente die Entdeckung, dass das ebenfalls positiv geladene Lysozym durch Bindung an das Chondroitinsulfat (CS) des Serglycins (Kolset *et al.*, 1996) in die Lysosomen transportiert wird (Lemansky und Hasilik, 2001).

Die Affinitätschromatographie zeigte, dass reife MPO mit gleicher Bindungsstärke wie proMPO an CS-Sepharose bindet. Dies belegt, dass die gesamte MPO mit den GAG-Seitenketten von Serglycin interagieren kann und könnte bedeuten, dass das Propeptid nicht alleine, wie von Andersson *et al.* (1998), und Bülow *et al.* (2002) postuliert, für den Transport der MPO entscheidend ist.

Die Absenkung des pH-Wertes auf 3,5, was zu einer Teil-Entladung der Glucuronsäurereste ( $pK_a \approx 3,6$ ) führt, hatte keinen Einfluss auf die Bindung der MPO an die CS-Sepharose. Ein pH-abhängiger Abkopplungsmechanismus der MPO vom Serglycin ist somit nicht zu erwarten, was mit früheren experimentellen Befunden gut übereinstimmt (Hasilik *et al.*, 1984).

Das Sortieren der MPO und des Serglycins in die azurophilen Granula geschieht bei HL-60 Zellen nur zu etwa 50%. Es konnte gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von TPA der überwiegende Teil der restlichen Menge von MPO (39%) bzw. des Serglycins (44%) sezerniert werden. Diese Effekte auf das *targeting* lassen den Schluss zu, dass das basische MPO-Protein und das saure Proteoglykan Serglycin evtl. als Verbund in die Granula transportiert werden. Die Ausbildung solcher Komplexe konnte nach Markierung von HL-60 Zellen mit [<sup>35</sup>S]Sulfat und Quervernetzung mit DSP mittels Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden.

Das Auftragen der in Anwesenheit von TPA-sezernierten Proteine auf eine CS-Sepharose-Säule führte zur Bindung von verschiedenen Polypeptiden. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass Serglycin neben der MPO auch andere, vermutlich kationische Proteine binden und möglicherweise in die azurophilen Granula transportieren kann.

Als eine Negativkontrolle für den Serglycin-Transportweg wurde das Procathepsin D untersucht. Dieses lysosomale Enzym, mit nicht ausgeprägtem basischen Charakter, band zwar an CS-Sepharose, jedoch war diese Bindung so schwach, dass kationische Proteine das Procathepsin D in HL-60 Zellen wahrscheinlich vom Serglycin verdrängen würden.

## **5 Abstract**

Myeloperoxidase, a cationic heme-containing enzyme, is one of the major constituents of azurophilic granules in neutrophils. In this study we examined one possible transport pathway into the azurophilic granules of HL-60 cells. The hypothesis of this work is based on the observation, that positively charged lysozyme can bind to the chondroitin sulfate(CS)-chains of serglycin (Kolset *et al.*, 1996) and thus be transported to lysosomes (Lemansky and Hasilik, 2001).

Affinity chromatography of mature MPO and proMPO with CS-Sepharose showed, that the binding-strength of both, mature MPO and proMPO, to CS-Sepharose is identical. This result indicates, that the entire MPO interacts with the carbohydrate side-chains of serglycin. We therefore assume that the propeptide is not exclusively important for the transport of MPO, as postulated by Andersson *et al.* (1998) and Bülow *et al.* (2002).

Simulating the environment of azurophilic granules by lowering the pH-value to 3,5 had no effect on the binding capacity of CS-Sepharose for MPO. A pH-dependent dissociation-mechanism of MPO and serglycin is therefore not to be expected which is in accord with earlier experimental results ( Hasilik *et al.*; 1984).

Within HL-60 cells only 50% of MPO and serglycin is sorted into the azurophilic granules. Under the influence of TPA additional major portions of the remainder (39% of MPO and 44% of serglycin) were secreted. This effect on targeting suggests that MPO and serglycin may form complexes on their way to granules. The formation of these complexes could actually be shown after labeling HL-60 cells with [<sup>35</sup>S]sulfate and cross-linking with DSP by coimmunoprecipitation.

Next we showed that many different polypeptides, secreted in the presence of TPA, can bind to a CS-Sepharose-column. The results indicate that serglycin can bind other cationic proteins besides MPO, and potentially transport them to azurophilic granules.

Procathepsin D was examined as a negative control for serglycin mediated transport. The binding of this nonbasic lysosomal enzyme to CS-Sepharose was significantly

weaker than that of MPO. This indicates that cationic proteins would displace procathepsin D from serglycin within HL-60 cells.

## 6 Literatur

- Åbrink, M., Grujic, M. und Pejler, G., Serglycin is essential for maturation of mast cell secretory granule, *J. Biol. Chem.* **279**, 40897-40905 (2004).
- Agner, K., A ferment isolated from leukocytes, *Acta. Physiol. Scand.* **2**,1 (1941).
- Alliel, P.M., Perin, J.-P., Maillet, P., Bonnet, F., Rosa, J.-P. und Jolles, P., Complete amino acid sequence of a human platelet proteoglycan, *FEBS Lett.* **23**, 123 (1988).
- Akin, D.T. und Kinkade J.M.Jr., Processing of a newly identified intermediate of human myeloperoxidase in isolated granules occurs at neutral pH, *J. Biol. Chem.* **261**, 8370-8375 (1986).
- Andersson, E., Hellman, L., Gullberg, U. und Olsson, I., The role of the Propeptide for Processing and Sorting of Human myeloperoxidase, *J. Biol. Chem.* **273** (8), 4747 (1998).
- Avraham, S., Stevens, R.L., Gartner, M.C., Austen, K.F., Lalley, P.A. und Weis, J.H., Isolation of a cDNA that encodes the peptide core of the secretory granule proteoglycan of rat basophilic leukemia-1 cells and assessment of its homology to the human analogue, *J. Biol. Chem.* **263**, 7292-7296 (1988).
- Bainton, D.F., Distinct granule populations in human neutrophils and lysosomal organelles identified by immuno-electron microscopy, *Journal of Immunological Methods* **232**, 153-168 (1999).
- Bainton, D.F. und Farquhar, M.G., Origin of granules in polymorphonuclear leukocytes, *J. Biol. Chem.* **28**, 277 (1966).
- Baldus, S., Heeschen, C., Meinertz, T., Zeiher, A.M., Eiserich J. P., Münzel, T., Simoons, M.L. und Hamm, C.W., CAPTURE Investigators, Myeloperoxidase

- serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes, *Circulation* **108**, 9034-9035 (2003).
- Barnes, P.J. und Adcock, I.M., NF-kappaB: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **18**, 46-50 (1997).
- Bartsch, H. und Risch, A., Werle-Schneider, G. und Schmezer, P., Krebs - Molekulare Frühwarnsysteme. In Krebsmedizin II, *Spektrum der Wissenschaft Spezial* **3**, 46-50 (2003).
- Bäuerle, P.A. und Huttner, W.B., Chlorate- a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **141**, 870-877 (1986).
- Biederbick, A., Licht, A. und Kleene, R., Serglycin proteoglycan is sorted into zymogen granules of rat pancreatic acinar cells, *Eur J. Cell. Biol.* **82**, 19-29 (2003).
- Borregaard, N. und Cowland, J.B., Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte, *Blood* **10**, 3503-3521 (1997).
- Borregaard, N., Lollike, K., Kjeldsen, L., Sengeløv, H., Bastholm, L., Nielsen, M.H. und Bainton, D.F., Human neutrophil granules and secretory vesicles, *Eur. J. Haematol.* **51**, 187-198 (1993).
- Borregaard, N., Miller, N. und Springer, T.A., Chemoattractant- regulated mobilization of a novel intracellular compartment in human neutrophils, *Science* **237**, 1204-1206 (1987).
- Bourdon MA, Oldberg A, Pierschbacher M. und Ruoslahti E. Molecular cloning and sequence analysis of a chondroitin sulfate proteoglycan cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 1321 (1985).
- Braulke, T., Geuze, H.J., Slot, J.W., Hasilik, A. und von Figura, K., On the effects of weak bases and monensin on sorting and processing of lysosomal enzymes in human cells, *European Journal of Cell Biology* **43**, 316-321 (1987).

- Brennan, M. L., Penn, M.S., Van Lente, F., Nambi, V., Shishehbor, M.H., Aviles, R.J., Goormastic, M., Pepoy, M.L., Mcerlea, E.S., Topol, E.J., Nissen S.E. und Hazen, S.L., Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain, *N. Engl. J. Med.* **349**, 1595-1604 (2003).
- Breitman, T.R., Selonic, S.E. und Collin, S.J., Induction of differentiation of the human promyelocytic leukemia cell line (HL60) by retinoic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 2936 (1980).
- Bucher, O. und Wartenberg, H., Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 11., vollständig überarbeitete Auflage, Bern, Stuttgart, Toronto: *Huber*, Blut und blutbildende Organe (1989).
- Bülow, E., Nauseef, W.M., Goedken, M., McCormick, S., Calafat, J., Gullberg, U. und Olsson, I., Sorting for storage in myeloid cells of nonmyeloid proteins and chimeras with the propeptide of myeloperoxidase precursor, *J. Leukoc. Biol.* **71**, 279-288 (2002).
- Carr, A.C., McCall, M.R. und Frei, B., Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidation protection, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **20**, 1716-1723 (2000).
- Carr, A.C., Myzak, M.C., Stocker, R., McCall, M.R. und Frei, B., Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis, *FEBS Lett.* **486**, 176-180 (2000).
- Cascorbi, I., Henning, S., Brockmoller, J., Gephart, J., Meisel, C., Muller, J.M., Loddenkemper, R. und Roots, I., Substantially reduced risk of cancer of the aerodigestive tract in subjects with variant -463A of the myeloperoxidase gene, *Cancer Res.* **60**, 644-649 (2000).
- Cham, B.P., Gerrard, J.M. und Bainton, D.F., Granulophysin is located in the membrane of azurophilic granules in human neutrophils and mobilizes to the plasma membrane following cell stimulation, *Am. J. Pathol.* **144**, 1369 (1994).

- Cayley, Jr., W.E., Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain, *N. Engl. J. Med.* **350**, 516-518 (2004).
- Chevrier, I., Stucker, I., Houllier, A.M., Cenee, S., Beaune, P., Laurent-Puig, P. und Lorient, M.A., Myeloperoxidase: new polymorphisms and relation with lung cancer risk, *Pharmacogenetics* **13**, 729-739 (2003).
- Cieutat, A.M., Lobel, P., August, J.T., Kjeldsen, L., Sengeløv, H., Borregaard, N. und Bainton, D.F., Azurophilic granules of human neutrophilic leukocytes are deficient in lysosome-associated membrane proteins but retain the mannose 6-phosphate recognition marker, *Blood* **91**, 1044-1058 (1998).
- Collins, S.J., Gallo, R.C. und Gallagher, R.E., Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture, *Nature* **270**, 347- 349 (1977).
- Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E. und Gallo, R.C., Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethylsulfoxide and other polar compounds, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 2458-2462 (1978).
- Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E. und Gallo, R.C., Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation enzyme targeting, *J. Biol. Chem.* **264**, 12115-12118 (1989).
- Combarros, O., Infante, J., Llorca, J., Pena, N., Fernandez-Viadero, C. und Berciano, J., The myeloperoxidase gene in Alzheimer's disease: a case-control study and meta-analysis, *Neurosci. Lett.* **326**, 33-36 (2002).
- D'Agati, V., Antineutrophil cytoplasmic antibody and vasculitis: much more than a disease marker. *J. Clin. Invest.* **110**, 919-921 (2002).



- Dalla Favera, R., Wong-Staal, F. und Gallo, R.C., Onc gene amplification in promyelocytic leukemia cell line HL60 and primary leukemic cells of the same patient, *Nature* **299**, 61 (1982).
- Dally, H., Gassner K., Jäger, B., Schmezer, P., Spiegelhalder, B., Edler, L., Drings, P., Dienemann, H. Schulz, V., Kayser, K., Bartsch, H. und Risch, A., Myeloperoxidase (MPO) genotyp and lung cancer histologic types: the MPO – 463 A allele is associated with reduced risk for small cell lung cancer in smokers, *International Journal of Cancer* **102**, 530-535 (2002).
- Dally, H., Bartsch, H. und Risch, A. : Correspondence re: Feyler *et al.*, Point: Myeloperoxidase (–463)G → A Polymorphism and Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 11: 1550-1554, 2002, and Xu *et al.*, Counterpoint: The Myeloperoxidase (–463)G → A Polymorphism Does Not Decrease Lung Cancer Susceptibility in Caucasians. 11: 1555-1559, 2002. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **12**, 683 (2003).
- Dalton, W.T., Ahearn, M.J., McCredie, K.B., Freireich, E.J., Stass, S.A. und Trujillo, J.M., HL60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3, *Blood* **71**, 242-247 (1988).
- Daugherty, A., Dunn, J.L., Rateri, D.L. und Heinecke, J.W., Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions, *J. Clin. Invest.* **94**, 437-444 (1994).
- Davidenkova, E.F. und Shafron, M.G., Myeloperoxidase of neutrophils and its possible role in lipid peroxidation processes in arteriosclerosis, *Klin.Med. (Mosk)* **67**, 56-58 (1989).
- Deshpande, K.L., Fried, V.A., Ando, M. und Webster, R.G., Glycosylation affects cleavage of an H5N5 influenza virus hemagglutinin and regulates virulence, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 36-40 (1987).

- Dittmer, F., Ulbrich, E.J., Hafner, A., Schmahl, W., Meister, T., Pohlmann, R. und von Figura, K., Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphat receptor-deficient mice are cell type-specific, *Journal of Cell Science* **112**, 1591-1597 (1999).
- Eiserich, J.P., Baldus, S., Brennan, M.L., Ma, W., Zhang, C., Tousson, Castro, L., Lusis, A.J., Nauseef, W.M., White, C.R. und Freeman, B.A., Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase, *Science*. **296**, 2391-2394 (2002).
- Feyler, A., Voho, A., Bouchardy, C., Kuokkanen, K., Dayer, P., Hirvonen, A. und Benhamou, S., Point: Myeloperoxidase (-463)G → A Polymorphism and Lung Cancer Risk. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* **11**, 1550-1554 (2002).
- Forsberg, E., Pejler, G., Ringvall, M., Lunderius, C., Tomasini-Johansson, B., Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Ledin, J., Hellman, L. und Kjellen, L., Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme, *Nature* **400**, 773-776 (1999).
- Gable, C.A., Goldberg, D.E. und Kornfeld, S., Identification and characterization of cells deficient in the mannose 6-phosphate receptor: Evidence for an alternative pathway for lysosomal enzyme targeting, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 775-779 (1983).
- Galijasevic, S., Saed, G.M., Diamond, M.P. und Abu-Soud, H.M., Myeloperoxidase up-regulates the catalytic activity of inducible nitric oxide synthase by preventing nitric oxide feedback inhibition, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 14766-14771 (2003).
- Gallagher, R., Collins, S. und Trujillo, T., *et al.*, Characterization of continuous differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia, *Blood* **54**, 713 (1979).
- Galle, J., Oxidative stress in chronic renal failure, *Nephrol Dial Transplant* **16**, 2135-2137 (2001).

- Gallin, J.I., Neutrophil specific granules: a fuse that ignites the inflammatory response, *Clin. Res.* **32**, 320 (1984).
- Gamp, A.C., Tanaka, Y., Lüllmann-Rauch, R., Wittke, D., D'Hooge, R., De Deyn, P.P., Moser, T., Hartmann, D., Reiss, K., von Figura, K. und Saftig, P., LIMP-2 / LGP85 deficiency causes ureteric pelvic junction obstruction, deafness and peripheral neuropathy in mice, *Hum Mol Genet.* **12**, 631-646 (2003).
- Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S., Daher, K., Bainton, D.F. und Lehrer, R.I., Defensins natural peptide antibiotics of human neutrophils, *J. Clin. Invest.* **76**, 1427 (1985).
- Ginn Pease, M.E. und Whisler, R.L., Redox signals and NF-kappaB activation activation in Tcells, *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 346-361 (1998).
- Glickman, J.N. und Kornfeld, S., Mannose-6-phosphate-independent targeting of lysosomal enzymes in I-cell disease B lymphoblasts, *J. Cell. Biol.* **123**, 99-108 (1993).
- Goldstein, I.M., Neutrophil degranulation in regulation of leukocyte function, *Contemp. Top Immunbiol.* **14**, 221 (1984).
- Gopalakrishnan, M.M., Grosch, H.W., Locatelli-Hoops, S., Werth, N., Smolenová, E., Nettersheim, M., Sandhoff, K., Hasilik, A., Purified recombinant human prosaposins forms oligomers that bind procathepsin D and affect its autoactivation, *Biochem J.* **383**, 507-515 (2004).
- Gray, P.W., Flaggs, G., Leong, S.R., Gumina, R.J., Weiss, J., Ooi, C.E. und Elsbach, P., Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein. Structural und functional correlations, *J. Biol. Chem.* **264**, 9505-9509 (1989).
- Green, P.S., Mendez, A.J., Jacob, J.S., Crowley, J.R., Growdon, W., Hyman, B.T. und Heinecke, J.W., Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease, *J. Neurochem.* **90**, 724-733 (2004).

- Greiling, H., Gressner, A.M., Haubeck, H.D., Keller, R. und Kleesiek K., Bindegewebe, In: Greiling, H., Gressner, A.M. (Hrsg.) Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie, 3. neubearbeitete Auflage, Schattauer, Stuttgart, New York, 1090-1131 (1995).
- Gullberg, U. und Andersson, E., Garwicz, D., Lindmark, A., Olsson, I., Biosynthesis, processing and sorting of neutrophil proteins: insight into neutrophil granule development, *Eur. J. Haematol.* **58**, 137-153 (1997).
- Hancock, R.E.W., und Diamond, G., The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defence. *Trends Microbiol.* **8**, 402-410 (2000).
- Hasilik, A., Pohlmann, R., Olsen, R.L. und von Figura, K., Myeloperoxidase is synthesized as larger phosphorylated precursor, *EMBO Journal* **11**, 2671-2676 (1984).
- Hay, D.E., Cell Biology of Extracellular Matrix, 2. Auflage, Plenum Press, New York: Wight TN, Heinegård DK, Hascall VC. Proteoglycans: Structure and Function, (1991).
- Hibbs, M.S., Bainton, D.F., Human neutrophil gelatinase is a component of specific granules, *J. Clin. Invest.* **84**, 1395 (1989).
- Hiesberger, T., Hüttler, S., Rohlmann, A., Schneider, W., Sandhoff, K. und Herz, J., Cellular uptake of saposin (SAP) precursor and lysosomal delivery by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP), *EMBO Journal*; **17**, 4617-4625 (1998).
- Himmelfarb, J., McMenamin, M.E., Loseto, G. und Heinecke, J.W., Myeloperoxidase-catalyzed 3-chlorotyrosine formation in dialysis patients, *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 1163-1669 (2001).

- Hirakawa, T., Kakumaga, T., Fujiki, H. und Sugimura, T., A new tumor-promoting agent, dihydroteleocidin B, markedly enhances chemically induced malignant cell transformation, *Science* **215**, 527 (1982).
- Humphries, D.E., Nicodemus, C.F., Schiller, V. und Stevens, R.L., The human serglycin gene. Nucleotide sequence and methylation pattern in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and T-lymphoblast Molt-4 cells, *J. Biol. Chem.*, **267**, 13558-13563 (1992).
- Humphries, D.E. und Silbert, J.E., Chlorate: a reversible inhibitor of proteoglycan sulfation, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **154**, 365-371 (1988).
- Humphries, D.E., Wong, G.W., Friend, D.S., Gurish, M.F., Qiu, W.-T., Huang, C., Sharpe, A.H. und Stevens, R.L., Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells, *Nature* **400**, 769-772 (1999).
- Hung, R.J., Boffetta, P., Brennan, P., Malaveille, C., Gelatti, U., Placidi, D., Carta, A., Hautefeuille, A. und Porru, S., Genetic polymorphisms of MPO, COMT, MnSOD, NQO1, interactions with environmental exposures and bladder cancer risk. *Carcinogenesis* **25**, 973-978 (2004).
- Jungbeck, M., Stopfer, P., Bataille, F., Nedospasov, S.A., Männel, D.N. und Hehlhans, T., Blocking lymphotoxin beta receptor signalling exacerbates acute DSS-induced intestinal inflammation-opposite functions for surface lymphotoxin expressed by T and B lymphocytes, *Molecular Immunology* **45**, 34-41 (2008).
- Jerlich, A., Fabjan, J.S., Tschabuschnig, S., Smirnova, A.V., Horakova, L., Hayn, M., Auer, H., Guttenberger, H., Leis, H.J., Tatzber, F., Waeg, G. und Schaur R.J., Human low density lipoprotein as a target of hypochlorite generated by myeloperoxidase, *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 1139-1148 (1998).
- Kamada, M.M., Michon, J., Ritz, J., Holldack, J., Serafin, W.E., Austen, K.F., Mac Dermott, R.P. und Stevens, R.L., Identification of carboxypeptidase and trypsin

- esterase activities that are complexed to proteoglycans in the secretory granules of human cloned natural killer cells, *J. Immunol.* **142**, 609-615 (1989).
- Kantarci, O.H., Lesnick, T.G., Yang, P., Meyer, R.L., Hebrink, D.D., McMurray, C.T. und Weinshenker, B.G., Myeloperoxidase -463 (G → A) polymorphism associated with lower risk of lung cancer, *Mayo Clin. Proc.* **77**, 17-22 (2002).
- Karlson, P., Doenecke, D. und Koolman, J., Glykoside, Oligosaccharide und Polysaccharide, Zell- und Organellenstruktur, Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 14. überarb. Auflage, Stuttgart, NewYork: Thieme, (1994).
- Kearns, A.E., Campbell, S.C., Westley, J. und Schwartz, N.B., Initiation of chondroitin sulfate biosynthesis: A kinetic analysis of UDP-D-xylose: core protein beta-D-xylosyltransferase, *Biochemistry* **30**, 7477-7483 (1991).
- Kjeldsen, L., Bainton, D.F., Sengeløv, H. und Borregaard, N., Structural and functional heterogeneity among peroxidase-negative granules in human neutrophils: Identification of a distinct gelatinase containing granule subset by combined immunocytochemistry and subcellular fractionation, *Blood* **82**, 3183-3191 (1993).
- Kjellén, L. und Lindahl, U., Proteoglycans: structures and interactions, *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 443-475 (1991).
- Kjellén, L., Pettersson, I., Lillhager, P., Steen, M.L., Pettersson, U., Lehtonen, P., Karlsson, T., Ruoslahti, E. und Hellman, L., Primary structure of a mouse mastocytoma proteoglycan core protein, *Biochem. J.* **263**, 105 (1989).
- Kolset, S.O. und Gallagher, J.T., Proteoglycans in haemopoietic cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1032**, 191-211 (1990).

- Kolset, S.O., Mann, D.M., Uhlin-Hansen, L., Winberg, J.O. und Ruoslahti, E.,  
Serglycin-binding proteins in activated macrophages and platelets, *J. Leukoc. Biol.* **59**, 545 (1996).
- Kolset, S.O., Prydz, K. und Pejler, G., Intracellular proteoglycans, *Biochem. J.* **379**,  
217-227 (2004).
- Kornfeld, S. und Mellman, I., The biogenesis of lysosomes, *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5**,  
483 (1989).
- Kuijpers, T.W., Tool, A.T., van der Schoot, C.E., Ginsel, L.A., Onderwater, J.J., Roos,  
D. und Verhoeven, A.J., Membrane surface antigen expression on neutrophils: A  
reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation, *Blood* **78**,  
1105 (1991).
- Kulseth, M.A., Kolset, S.O., und Ranheim, T., Stimulation of serglycin and CD 44  
mRNA expression in endothelial cells exposed to TNF-alpha an IL-1alpha,  
*Biophys. Acta* **1428**, 225-232 (1999).
- Le Beau, M.M., Westbrook, C.A., Diaz, M.O., Rowley, J.D. und Oren, M.,  
Translocation of the p53 gene in t (15;17) in acute promyelocytic leukaemia,  
*Nature* **316**, 826-828 (1985).
- Leffell, M.S. und Spitznagel, J.K., Intracellular and extracellular degranulation of  
human polymorphnuclear azurophil and specific granules induced by immune  
complexes, *Infect. Immunol.* **10**, 1241 (1974).
- Lehrer, R., Ganz, T. und Selsted, M., Defensins: endogenous antibiotic peptide of  
animal cells, *Cell* **64**, 229-230 (1991).
- Lemansky, P., Fester, I., Smoleňová, E., Uhländer, C. und Hasilik, A., The cation-  
independent mannose 6-phosphate receptor is involved in lysosomal delivery of  
serglycin, *J. Leukoc. Biol.* **81**, 1149-1158 (2007).

- Lemansky, P., Gericitano-Schmidek, M., Das, R.C., Schmidt, B. und Hasilik, A., Targeting myeloperoxidase to azuophilic granules in HL-60 cells. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 542-550 (2003).
- Lemansky, P. und Hasilik, A., Chondroitin sulfate is involved in lysosomal transport of lysozyme in U937 cells, *Journal of Cell Science* **114**, 345-352 (2000).
- Le Marchand, L., Seifried, A., Lum, A. und Wilkens, L.,R., Association of the myeloperoxidase -463 → a polymorphism with lung cancer risk, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **9**, 181-184 (2000).
- Leroy, J.G. und DeMars, R.I., Mutant enzymatic and cytological phenotypes in cultured human fibroblasts, *Science* **157**, 804-806 (1967).
- Levy, O., Antibiotic proteins of the polymorphonuclear leukocytes, *Eur. J. Haematol.* **56**, 263-277 (1996).
- Lichtenstein, A.K., Ganz, T., Nguyen, T.M., Selsted, M.E. und Lehrer, R.I., Mechanism of target cytolysis by peptide defensins: target cell metabolic activities, possibly involving endocytosis, are crucial for expression of cytotoxicity, *J. Immunol.* **140**, 2686-2694 (1988).
- London, S.J., Lehmann, T.A. und Taylor, J.A., Myeloperoxidase genetic polymorphism and lung cancer risk., *Cancer Res.* **57**, 5001-5003 (1997).
- Lotem, J. und Sachs, L., Regulation of normal differentiation in mouse and human myeloid leukemic cells by phorbol esters and the mechanism of tumor promotion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5158-5162 (1979).
- Lohmander, L.S., Arnljots, K. und Yanagishita, M., Structure and synthesis of intracellular proteoglycan in HL-60 human leukemic promyelocytes, *J. Biol. Chem.* **265**, 5802-5808 (1990).



- Lohmander, L.S., Shinomura, T., Hascall, V.C. und Kimura, J.H., Xylosyl transfer to the core protein precursor of the rat chondrosarcoma proteoglycan, *J. Biol. Chem.* **264**, 18775-18780 (1989).
- Ludwig, T., Griffiths, G. und Hoflack, B., Distribution of newly synthesized lysosomal enzymes in the endocytic pathway of NRK cells, *J. Cell Biol.* **115**, 1561 (1991).
- Malle, E., Waeg, G., Schreiber, R., Grone, E.F., Sattler, W. und Grone, H.J., Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/halide system in human atherosclerotic lesions: colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins, *Eur. J. Biochem.* **267**, 4495-4503 (2000).
- McIntyre, G.F. und Erickson, A.H., The lysosomal proenzyme receptor that binds procathepsin L to microsomal membranes at pH 5 is a 43-kDa integral membrane protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10588-10592 (1993).
- Michaelson, D., Rayner, J., Couto, M. und Ganz, T., Cationic defensins arise from charge-neutralized propeptides: A mechanism for avoiding leukocyte autotoxicity? *J. Leuk. Biol.* **51**, 634 (1992).
- Misra, R.R., Tangrea, J.A., Virtamo, J., Ratnasinghe, D., Andersen, M.R., Barrett, M., Taylor, P.R und Albanes, D., Variation in the promoter region of the myeloperoxidase gene is not directly related to lung cancer risk among male smokers in Finland, *Cancer Lett.* **164**, 161-167 (2001).
- Nagra, R.M., Becher, B., Tourtellotte, W.W., Antel, J.P., Gold, D., Paladino, T., Smith, R.A., Nelson, J.R., und Reynolds, W.F., Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* **78**, 97 –107 (1997).
- Nauseef, W.M., McCormick, S. und Yi, H., Roles of heme insertion and the mannose-6 phosphate receptor in processing of the human myeloid lysosomal enzyme, Myeloperoxidase, *Blood* **80**, 2622-2633 (1992).

- Nicholls, S.J., Zheng, L. und Hazen, S.L., Formation of dysfunctional high-density lipoprotein by myeloperoxidase, *Trends. cardiovasc. Med.* **15**, 212-219 (2005).
- Nicodemus, C. F., Avraham, S., Austen, K. F., Purdy, S., Jablonski, J. und Stevens, R.L., Characterization of the human gene that encodes the peptide core of secretory granule proteoglycans in promyelocytic leukemia HL-60 cells and analysis of the translated product, *J. Biol. Chem.* **265**, 5889-5896 (1990).
- Niemann, C.U., Åbrink, M., Pejler, G., Fischer R.L., Christensen, E.I., Knight, S.D. und Borregaard, N., Neutrophil elastase depends on serglycin proteoglycan for localization in granules, *Blood* **109**, 4478-4486 (2007).
- Niemann, C.U., Cowland, J.B., Klausen, P., Askaa, J., Calafat, J. und Borregaard, N., Localization of serglycin in human neutrophil granulocytes and their precursor, *J. Leukoc. Biol.* **76**, 406-415 (2004).
- Nishimura, Y. und Himeno, M., Cathepsin D associates with lysosomal membranous protein, *Biopharm Bull* **18**, 1340-1346 (1995).
- Nissler, K., Kreusch, S.T., Rommerskirch, W., Strubel, W., Weber, E. und Wiederanders, B., Sorting of non-glycosylated human procathepsin S in mammalian cells, *J.Biol. Chem.* **379**, 219-224 (1998).
- Nuwayhid, N., Glaser, J.H., Johnson, J.C., Conrad, H.E., Hauser, S.C. und Hirschberg, C.B., Xylosylation and glucuronosylation reactions in rat liver Golgi apparatus and endoplasmatic reticulum, *J. Biol. Chem.* **261**, 12936-12941 (1986).
- Oegema, T.R., Kraft, E.L., Jourdian, G.W. und Van Valen, T.R., Phosphorylation of chondroitinsulfate in proteoglycans from the Swarm rat chondrosarcoma, *J. Biol. Chem.* **259**, 720- 726 (1984).
- Oldberg, A., Hayman, E.G. und Ruoslahti, E., Isolation of a chondroitin sulfate proteoglycan from a rat yolk sac tumor and immunochemical demonstration of its cell surface localization, *J. Biol. Chem.* **256**, 19847 (1981).

- Owada, M. und Neufeld, E.F., Is there a mechanism for introducing acid hydrolases into liver lysosomes that is independent of mannose-6-phosphate recognition? Evidence form I-cell disease, *Biochem. Biophys Res. Commun.* **105**, 814-820 (1982).
- Pakakasama, S., Chen, T.T., Frawley, W., Muller, C., Douglass, E.C. und Tomlinson, G.E., Myeloperoxidase promoter polymorphism and risk of hepatoblastoma, *Int. J. Cancer* **106**, 205-207 (2003).
- Pecoits-Filho, R., Stenvinkel, P., Marchlewska, A., Heimbürger, O., Barany, P., Hoff, C.M., Holmes, C.J., Suliman, M., Lindholm, B., Schalling, M. und Nordfors, L., A functional variant of the myeloperoxidase gene is associated with cardiovascular disease in end-stage renal disease patients, *Kidney Int. Suppl.* **May**, S172-S176 (2003).
- Prydz, K. und Dalen, K.T., Synthesis and sorting of proteoglycans, *J. Cell Sci.* **113**, 93-205 (2000).
- Radons, R., Biewusch, U., Grässel, S., Geuze, H.J. und Hasilik, A., Distinctive inhibition of the lysosomal targeting of lysozyme and cathepsin D by drugs affecting pH gradients and protein kinase C, *Biochem. J.* **302**, 581-586 (1994).
- Renard, P. und Raes, M., The proinflammatory transcription factor NFkappaB: a potential target for novel therapeutical strategies, *Cell. Biol. Toxicol.* **15**, 341-344 (1999).
- Reynolds, W.F., Rhee, J., Maciejewski, D., Paladino, T., Sieburg, H., Maki, R.A. und Masliah, E., Myeloperoxidase polymorphism is associated with gender-specific risk for Alzheimer's disease, *Exp. Neurol.* **155**, 31-41 (1999).
- Rijnboutt, S., Aerts, H.M., Geuze, H. J., Tager, J.M. und Strous, G.J., Mannose 6-phosphate-independent membrane association of cathepsin D,

- glucocerebrosidase, and sphingolipid-activating protein in HepG2 cells, *J. Biol. Chem.* **266**, 4862 (1991).
- Rijnboutt, S., Kal, A.J., Geuze, H.J., Aerts, H.M. und Strous, G.J., Mannose 6-phosphate-independent targeting of cathepsin D to lysosomes in HepG2 cells, *J. Biol. Chem.* **266**, 23586 (1991).
- Saiki, T., Myeloperoxidase concentrations in the stool as a new parameter of inflammatory bowel disease, *Kurume Med. J.* **45**, 69-73 (1998).
- Saito, N., Pulford, K.A., Breton-Gorius, J., Masse, J.M., Mason, D.Y. und Cramer, E.M., Ultrastructural localization of the CD68 macrophage-associated antigen in human blood neutrophils and monocytes, *Am. J. Pathol.* **139**, 1053 (1991).
- Sali, A., Matsumoto, R., McNeil, H.P., Karplus, M. und Stevens, R.L., Three-dimensional models of four mouse mast cell chymases; identification of proteoglycan binding regions and protease-specific antigenic epitopes, *J. Biol. Chem.* **266**, 20316 (1991).
- Schabath, M.B., Spitz, M.R., Delclos, G.L., Gunn, G.B., Whitehead, L.W. und Wu, X., Association between asbestos exposure, cigarette smoking, myeloperoxidase (MPO) genotypes, and lung cancer risk. *Am. J. Ind. Med.* **42**, 29-37 (2002).
- Schabath, M.B., Spitz, M.R., Hong, W.K., Delclos, G.L., Reynolds, W.F., Gunn, G.B., Whitehead, L.W. und Wu, X., A myeloperoxidase polymorphism associated with reduced risk of lung cancer, *Lung cancer* **37**, 35-40 (2003).
- Schabath, M.B., Spitz, M.R., Zhang, X., Delclos, G.L. und Wu, X., Genetic variants of myeloperoxidase and lung cancer risk, *Carcinogenesis* **21**, 1163-1166 (2000).
- Schick, B.P., Gradowski, J.F. und San Antonio, J.D., Synthesis, secretion, and subcellular localization of serglycin proteoglycan in human endothelial cells, *Blood* **97**, 449-458 (2001).

- Schick, B.P., Ho, H.C. Brodbeck, K.C., Wrigley, C.W. und Klimas, J., Serglycin proteoglycan expression and synthesis in embryonic stem cells, *Biochim. Biophys. Acta* **1593**, 259-267 (2003).
- Schmidt, K., Dartsch, H., Linder, D., Kern, H-F., und Kleene, R., A submembranous matrix of proteoglycans on zymogen granule membranes is involved in granule formation in rat pancreatic acinar cells, *J. Cell. Sci.* **113**, 2233-2242 (2000).
- Schwartz, N.B., Regulation of chondroitin sulfate synthesis. Effect of beta-xylosides on synthesis of chondroitin sulfate proteoglycan, chondroitin sulfate chains, and core protein, *J Biol Chem* **252**, 6316-6321 (1977).
- Sengeløv, H., Follin, P., Kjeldsen, L., Lollike, K., Dahlgren, C. und Borregaard, N., Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils, *J. Immunol.* **154**, 4157-65 (1995).
- Stevens, R.L., Avraham, S., Gartner, M.C., Bruns, G.A., Austen, K.F. und Weis, J.H., Isolation and characterization of a cDNA that encodes the peptide core of the secretory granule proteoglycan of human promyelocytic leukemia HL-60 cells, *J. Biol. Chem.* **25**, 7287 (1988).
- Seymour, J. und Klebanoff, S.J., Myeloperoxidase: friend and foe, *J. Leukoc. Biol.* **77**, 598-625 (2005).
- Styczynska, M., Religa, D., Pfeffer, A., Luczywek, E., Wasiak, B., Styczynski, G., Peplonska, B., Gabryelewicz, T., Golebiowski, M., Kobryns, M. und Barcikowska, M., Simultaneous analysis of five genetic risk factors in Polish patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **344**, 99-102 (2003).
- Sugiyama, S., Okada, Y., Sukhova, G.K., Virmani, R., Heinecke, J.W. und Libby, P., Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes, *Am J Pathol* **158**, 879-891 (2001).

- Taylor, K.L., Pohl, J., und Kinkade Jr., J.M., Unique autocatalytic cleavage of human myeloperoxidase. Implications for the involvement of active site MET 409, *J. Biol. Chem.* **267**, 25282-25288 (1992).
- Tikkanen, R., Enomaa, N., Rijkonen, A., Ikonen, E. und Peltonen, L., Intracellular sorting of aspartylglucosaminidase: the role of N-linked oligosaccharides and evidence of Man-6-P-independent lysosomal targeting, *Dev. Cell. Biol.* **14**, 305-312 (1995).
- Till, G.O., Johnson, R., Kunkel, R. und Ward, P.A., Intravascular activation of complement and acute lung injury: dependency on neutrophils and toxic oxygen metabolites, *J. Clin. Invest.* **76**, 517-27 (1991).
- Toborek, M., Wasik, T., Drózd, M., Klin, M., Magner-Wróbel, K. und Kopieczna-Grzebieniak, E., Effect of hemodialysis on lipid peroxidation and antioxidant system in patients with chronic renal failure, *Metabolism* **41**, 1229-1232 (1992).
- Tsuji, A., Omura, K. und Suzuki, Y., I-cell disease: evidence for a mannose 6-phosphate independent pathway for translocation of lysosomal enzymes in lymphoblastoid cells. *Clin. Chim. Acta* **176**, 115-122 (1988).
- Valore, E.V. und Ganz, T., Post-translational processing of defensins in immature human myeloid cells, *Blood* **79**, 1538 (1992).
- Vertel, B.M., Walters, L.M., Flay, N., Kearns, A.E. und Schwartz, N.B., Xylosylation is an endoplasmic reticulum to Golgi event, *J. Biol. Chem.* **268**, 11105-11112 (1993).
- Waheed, A., Van Etten, R.L., Koob, R. und Drenckhahn, D., Targeting of phosphomannosyl-deficient arylsulfatase A to lysosomes of I-cell fibroblasts, *Eur. J. Cell. Biol.* **45**, 262-267 (1987).

- Ward, P.A., Till, G.O., Kunkel, R. und Deauchamp, C., Evidence for role of hydroxyl radical complement and neutrophil-dependent tissue injury, *J. Clin. Invest.* **72**, 789-801 (1983).
- Weik, S., Luksch, T., Evers, A., Böttcher, J., Sotriffer, C.A., Hasilik, A. Löffler, H.-G., Klebe und G. Rademann, J., The Potential of P1 Site Alterations in Peptidomimetic Protease Inhibitors as Suggested by Virtual Screening and Explored by the Use of C-C Coupling Reagents, *Chem. Med. Chem.* **1**, 445-457 (2006).
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillère-Blandin C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen A.T., Zingraff, J., Jungers, P. und Descamps-Latscha, B., Advanced oxidation products as a novel marker of oxidative stress in uremia, *Kidney Int.* **49**, 1304-1313 (1996).
- Wu, X., Schabath, M.B. und Spitz, M.R., Myeloperoxidase promoter region polymorphism and lung cancer risk, *Methods Mol. Med.* **75**, 121-133 (2003).
- Xiao, H., Heeringa, P., Hu, P., Liu, Z., Zhao, M., Aranti, Y., Maeda, N., Falk, R.J. und Jennette, J.C., Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice, *J. Clin. Invest.* **110**, 955-963 (2002).
- Xu, L.L., Liu, G., Miller, D.P., Zhou, W., Lynch, T.J., Wain, J.C., Su, L. und Christiani, D.C., Counterpoint: the Myeloperoxidase -463G → A polymorphism does not decrease lung cancer susceptibility in Caucasians, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **11**, 1555-1559 (2002).
- Zernichow, L., Åbrink, M., Hallgren, J., Grujic, M., Pejler, G. und Kolset S.O., Serglycin is the major secreted proteoglycan in macrophages, and has a role in the regulation of macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  secretion in response to lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* **281**, 26792-26801 (2006).

- Zeya, H.I. und Spitznagel, J.K., Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes, I. Resolution of antibacterial and enzymatic activities, *J. Bacteriol.* **91**, 750-754 (1966).
- Zhang, R., Brennan, M. L., Fu, X., Aviles, R. J., Pearce, G. L., Penn, M. S., Topol, E. J., Sprecher, D. L. und Hazen, S. L., Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease, *JAMA* **286**, 2154-2156 (2001).
- Zhu, Y. und Conner, G.E., Intermolecular association of lysosomal protein precursors during biosynthesis, *J. Biol. Chem.* **269**, 3846-3851 (1994).



## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Å	Ångström
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Bq	Becquerel
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	<i>coronary artery disease</i>
CD-MPR	<i>cation-dependent</i> bzw. kationenabhängiger Mannose-6-Phosphat (M6P)-Rezeptor
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
CI-MPR	<i>cation-independent</i> bzw. kationenunabhängiger Mannose-6- Phosphat-Rezeptor
CNBr	Cyanobromid
cpm	<i>counts per minute</i> , Anzahl pro min
CS	Chondroitinsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPO	2,5- Diphenyloxazol
DSP	Dithio- <i>bis</i> -succimidyl-Propionat
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	Et aliter, und andere
FKS	Fötales Kälberserum
GAG	Glykosaminoglykan
h	Stunde
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HL-60 Zellen	Humane (myeloblastäre) Leukämiezell- Linie 60
IAA	Iodacetamid
IMM	Immunomix
KDa	Kilodalton

LDL	<i>low density lipoprotein</i>
mA	Milliamper
min	Minute
Mio	Million, Millionen
MM	Molekulare Masse
MPO	Myeloperoxidase
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
oxLDL	oxidiertes <i>low density lipoprotein</i>
POX	Peroxidase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Probenpuffer
Pro-CD	Procathepsin D
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro min
RPMI	Zellkulturmedium für normale und neoplastische Leukozyten. Die Formulierung wurde am <i>Roswell Park Memorial Institut</i> entwickelt.
RPGN	<i>Rapid progressive Glomerulonephritis</i>
RT	Raumtemperatur
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
s	Sekunde
StaphA	Präparation der Zellwand von <i>Staphylococcus aureus</i>
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS <i>buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	<i>trans-Golgi network</i>
TNI	terminaler Niereninsuffizienz
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat

## Abkürzungsverzeichnis

---

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100
V	Volt

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildungen</b>	<b>Seite</b>
1.1 Lebenszyklus der polymorphkernigen Leukozyten.....	3
1.2 Entwicklung der hematopoetischen Stammzellen.....	6
1.3 Darstellung der Entstehung der unterschiedlichen Granulatypen in den verschiedenen Entwicklungsstufen des neutrophilen Granulozyten.....	9
1.4 Schematische Darstellung der verschiedenen Granulatypen und deren Inhalt.....	9
1.5 Schematische Darstellung der schrittweisen Prozessierung der MPO.....	20
1.6 Darstellung des Transports der MPO und deren Synthese in den intrazellulären Kompartimenten von HL-60 Zellen.....	20
1.7 Schematische Darstellung des Chondroitinsulfats (Abb. 1.7 A), des Serglycins (Abb. 1.7 B) und der Verknüpfungsregion der Glykosaminoglykanketten mit dem <i>core</i> -Protein (Abb. 1.7 C).....	26/27
2.1 Darstellung des linearen Bereichs der MPO-Aktivität.....	47
3.1 A: Fluoreszenzmikroskopische und Phasenkontrastbilder von HL-60 Zellen, nach Behandlung mit Lamp-2 Antikörpern und MPO-Antikörpern.....	56
B: Darstellung der gleichen Zellen nach Behandlung mit Phorbolster.....	56
3.2 Affinitätschromatographie von proMPO und reifer MPO an CS- Sepharose.....	58
3.3 Bindung von MPO an CS- Sepharose bei pH 3,5 und pH 7,4.....	59
3.4 Quantifizierung des Serglycins durch [ <sup>35</sup> S]Sulfat-Markierung und Fällung mit CTAB-haltigen Puffer.....	62
3.5 Erhöhung der Sekretion des MPO-Proteins, unter dem Einfluss von TPA.....	64
3.6 Erhöhung der Sekretion enzymatisch aktivierter MPO unter dem Einfluss von TPA.....	66
3.7 Untersuchung einer Co-Immunpräzipitation des <sup>35</sup> S-markierten Proteoglykans aus Extrakten DSP-behandelter HL-60 Zellen mit anti-MPO und anti-LIMP-II Antikörpern.....	68
3.8 Affinitätschromatographie der in Anwesenheit von TPA-sezernierten Proteine an Äthanolamin-Sepharose bzw. CS-Sepharose.....	70
3.9 Elution von Procathepsin D von CS-Sepharose.....	72

<b>Tabellen</b>	Seite
1.1 Serglycin exprimierende Speichergranula-Zellen und deren zusätzliche granuläre Bestandteile.....	25

## **9 Anhang**

### **9.1 LEBENS LAUF**

PERSÖNLICHE ANGABEN: \_\_\_\_\_

DERZEITIGE TÄTIGKEIT: \_\_\_\_\_

SCHULAUFBILDUNG: \_\_\_\_\_

BERUFS AUFBILDUNG/BERUFSTÄTIGKEIT: \_\_\_\_\_

HOCHSCHULAUFBILDUNG: \_\_\_\_\_

## **9.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Arnold, R.; Aumüller, G.; Basler, H.-D.; Barth, P.; Baum, E.; Beato, M.; Czubayko, F.; Daut, J.; Feuser, B.; Fruhstorfer, H.; Gemsa, D.; Geus, A.; Görg, C.; Gotzen, L.; Gressner, A.M.; Gudermann, T.; Hasilik, A.; Hofmann, R.; Joseph, K.; Junclas, H.; Kern, H. F.; Klenk, H.D.; Klose, K. J.; Koolmann, J.; Kretschmer, V.; Krieg, J.-C.; Krause, W.; Kroll, P.; Lammel, E.; Lang, R. E.; Lange, H.; Lemansky, P.; Lennartz, H.; Leppek, R.; Maisch, B.; Moosdorf, R.; Mueller, U.; Mutters, R.; Neubauer, A.; Oertel, W. H.; Remschmidt, H.; Richter, G.; Röhm, K.-H.; Rothmund, M.; Schachtschabel, D.; Schäfer, H.; Schneider, J.; Schwarz, R. T.; Seyberth, H.; Slenczka, W.; Sommer, N.; Steiniger, B.; Sturm, G.; Suske, G.; Vohland, H.-W.; Voigt, K.; von Wichert, P.; Weihe, E.; Werner, J.; Westermann, R.; Wolf, M..

### **9.3 Danksagung**

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. A. Hasilik, meinem Doktorvater dieser Arbeit, für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine Unterstützung, die kritische Durchsicht dieser Arbeit und seine Geduld.

Herrn Dr. P. Lemansky möchte ich ganz herzlich danken für die Korrektur dieser Arbeit, die sehr gute und freundschaftliche Betreuung und die ständige Hilfsbereitschaft während der Laborarbeiten und in den Zeiten danach. Insbesondere die Bereitschaft jederzeit ansprechbar zu sein, erachte ich nicht als selbstverständlich. Ich danke ihm für seine unendliche Geduld, für die wertvollen, auch über das Thema dieser Doktorarbeit hinausgehenden Diskussionen, die mich sowohl fachlich, als auch persönlich bereichert haben.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die auf unterschiedliche Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, sei gedankt für die zahlreichen anregenden Gesprächen und für die stets angenehm freundliche und konstruktive Arbeitsatmosphäre.

Ich danke den vielen Personen, die direkt oder indirekt an dieser Arbeit beteiligt waren. Vor allem meinem Ehemann Ansgar und meinen Kindern Vincent und Lucia. Danke für deine Unterstützung, lieber Ansgar. Euch allen Dreien sei gedankt für Eure Geduld. Bei meinen Eltern möchte ich mich für die vielseitige Unterstützung während meines Studiums bedanken. Meiner Mutter danke ich für die liebevolle Betreuung meiner beiden Kinder während der schriftlichen Gestaltung dieser Arbeit.

„Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken.“

J.W. von Goethe  
(An Amalie v. Gallitzin, 6.2.1797)



## 9.4 Veröffentlichungshinweis

Die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Versuche und Ergebnisse wurden unter dem Titel „**Targeting myeloperoxidase to azurophilic granules in HL-60 cells**“ in der Fachzeitschrift *Journal of Leukocyte Biology* **74**, 542-550 (2003) von Lemansky, P., Gerecitano-Schmidek, M., Das, R. C., Schmidt, B. und A. Hasilik veröffentlicht.

## 9.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„**Targeting myeloperoxidase to azurophilic granules in HL-60 cells**“

in dem Institut für Physikalische Chemie unter der Leitung von Prof. Dr. A. Hasilik mit Unterstützung durch Dr. P. Lemansky ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift