

Karol Białkowski

IMMUNOLOGICZNE BADANIA NAD  
MOLEKULARNYM PODOBIENSTWEM  
SULFOHYDROLAZ LIZOSOMALNYCH

Praca magisterska wykonana  
w Zakładzie Biochemii  
Instytutu Biologii  
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika  
i finansowana częściowo  
z grantu UMK 537 B.  
- promotor  
prof. dr hab. J. Gniot-Szulżycka

Toruń - 1992

Coraz to z ciebie, jako z drzazgi smolnej,  
Wokoło lecą szmaty zapalone;  
Gorejąc, nie wiesz, czy stawasz się wolny,  
Czy to, co twoje, ma być zatracone.  
Czy popiół tylko zostanie i zamęt,  
Co idzie w przepaść z burzą? Czy zostanie  
Na dnie popiołu gwiaździsty dyjament,  
Wiekuistego zwycięstwa zaranie?...

C.K. Norwid

Mojemu wspaniałemu Nauczycielowi  
- Dr Antoniemu Leźnickiemu -  
składam najgłębsze wyrazy szacunku  
i podziękowania za trud włożony  
w moją biochemiczną edukację.

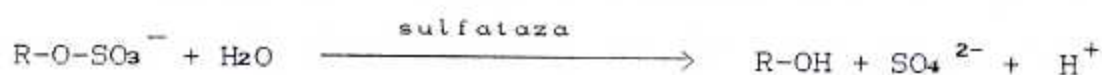
Wszystkim pracownikom Zakładu Biochemii  
dziękuję za niezapomnianą atmosferę pracy  
i życzliwości.

## S P I S   T R E Ś C I

1. WSTEP .....	4
1.1. Arylosulfatazy - ogólna charakterystyka .....	4
1.2. Arylosulfatazy typu II ( A i B ) .....	5
1.2.1. Arylosulfatazy A (ASA) .....	6
1.2.2. Arylosulfatazy B (ASB) .....	11
1.3. Wrodzone choroby spowodowane niedoborem aktywności sulfatazowej .....	14
1.4. Rodzina genów sulfohydrolazowych .....	19
1.5. Cel pracy .....	20
2. MATERIAŁY I METODY .....	21
2.1. Odczynniki .....	21
2.2. Materiały do badań .....	22
2.3 Metody biochemiczne .....	23
3. WYNIKI .....	29
4. DYSKUSJA .....	52
5. STRESZCZENIE .....	60
6. LITERATURA .....	61

## 1. W S T E P

Badania nad sulfohydrolazami posiadają prawie wiekową historię. Lista zarejestrowanych aktywności sulfohydrolazowych wobec różnych pochodnych siarczanowych urosła już do znacznych rozmiarów. Cechą wspólną enzymów tej grupy jest zdolność do hydrolitycznego odszczepiania reszty siarczanowej połączonej wiązaniem estrowym z różnorodnymi alkoholami.



Wśród sulfohydrolaz wyróżnia się grupę arylosulfataz (sulfohydrolaz arylosiarczanów), posiadających zdolność hydrolizowania wiązań estrowych pomiędzy resztą siarczanową a rodnikiem arylowym, a konkretnie - wiązania pomiędzy siarką a tlenem zestryfikowanego hydroksylu (43,57).

### 1.1. Arylosulfatazy - ogólna charakterystyka

Arylosulfatazy są enzymami powszechnymi zarówno w świecie zwierzęcym jak i roślinnym na wszystkich poziomach ewolucyjnych. Ich obecność odkryto w różnych gatunkach bakterii, grzybów, roślin niższych i wyższych (57).

Wśród zwierząt bezkręgowych ich aktywność potwierdzono w tkankach robaków, owadów, mięczaków, szkarłupni (49). Najwięcej danych o arylosulfatazach pochodzi z badań dotyczących zwierząt kręgowych, szczególnie ssaków z człowiekiem na czele, ale także ptaków, gadów, płazów, ryb i bezżuchwoców.

Arylosulfatazy są bardzo niejednorodną grupą enzymów, których fizjologiczne funkcje poznane są najlepiej u ssaków. Brak absolutnej specyficzności substratowej wielu enzymów, czyli ich zdolność do katalizowania przemian zbliżonych chemicznie substratów, prowadzi często do sytuacji, w której jeden i ten sam enzym ukrywa się pod wieloma nazwami. Z takim zjawiskiem mamy do czynienia w przypadku arylosulfataz, które badane były na wiele lat przed odkryciem ich fizjologicznych substratów. Badania enzymologiczne prowadzone w oparciu o

sztuczny substrat często pozwalają na dużą oszczędność czasu i środków i w związku z tym są bardzo rozpowszechnione.

Sztucznymi substratami używanymi w badaniach nad arylosulfatazami są siarczany p-nitrofenolu, p-acetylofenolu, 2-hydroksy-5-nitrofenolu, 4-metyloumbeliferonu i.in. W badaniach histochemicznych stosowano poza powyższymi także siarczany naftolu, 6-bromo-2-naftolu, 6-benzoilo-2-naftolu 8-hydroksychinoliny i AS-BI-naftolu (11,14).

Z uwagi na pewne właściwości wyróżniono podstawowe dwa typy arylosulfataz. Enzymy typu I charakteryzują się wysokim optimum pH (ok. 7) i dużym powinowactwem do siarczanowych estrów prostych fenoli jak siarczan p-nitrofenolu czy p-acetylofenolu, a niewielkim do siarczanu 2-hydroksy-5-nitrofenolu. Ich aktywność jest silnie hamowana przez jony cyjankowe, natomiast fosforany i siarczany wywierają tylko nieznaczny efekt na ich aktywność. Arylosulfatazy tego typu są nierozpuszczalne w roztworach wodnych i występują głównie u mikroorganizmów chociaż odkryto je także w tkankach ssaków: łożysku, wątrobie, chrzastce, nerkach, mózgu i jadrach (26,27,57). U ssaków nazywane są one arylosulfatazami C.

Arylosulfatazy typu II, wśród których wyróżniamy arylosulfatazy A i B są rozpuszczalnymi w wodzie enzymami o dużym powinowactwie do siarczanu 2-hydroksy-5-nitrofenolu w przeciwieństwie do siarczanów prostych fenoli. Silnymi inhibitorami są dla nich fosforany, siarczyny, fluorki, częściowo siarczany, brak natomiast wyraźnego wpływu cyjanków na ich aktywność (9). Należy podkreślić, iż o właściwych arylosulfatazach A i B można mówić jedynie w przypadku enzymów z tkanek ssaków. Arylosulfatazy innych grup zwierząt nazywane są tak przez analogię, choć często ich właściwości odbiegają od tych prezentowanych przez arylosulfatazy ssaków.

## 1.2. Arylosulfatazy typu II (A i B)

Enzymy A i B różnią się masami cząsteczkowymi, punktami izoelektrycznymi, optimum pH, powinowactwem do siarczanu 2-hydroksy-5-nitrofenolu, wrażliwością na inhibitory. Ich cechy

wspólne to szlak biosyntezy, glikoproteinowy charakter, lokalizacja subkomórkowa i długi czas półtrwania w komórce.

Metodą różnicowego wirowania struktur subkomórkowych stwierdzono obecność arylosulfataz A i B we frakcji mitochondrialno-lizosomalnej, a ponieważ łatwo przechodzą do roztworów wodnych, przyjęto ich lizosomalną lokalizację (59). Stahn, Maier i Hannig stosując swobodną elektroforezę kurtynową wizolowali lizosomy o najbardziej ujemnym ładunku powierzchniowym, w których zlokalizowali aktywność arylosulfatazową (62).

Zastosowanie metod cytochemicznych przyniosło liczne potwierdzenia lizosomalnej lokalizacji tych enzymów (32,37,38,39,52,55,58) chociaż część aktywności obserwowano w mikrosomach, mitochondriach, cytoplazmie i na powierzchni komórek.

#### 1.2.1. Arylosulfatazy A (ASA)

Enzymy typu A są globularnymi kwaśnymi glikoproteinami. Punkty izoelektryczne ASA tkanek ludzkich leżą w granicach pH 4.7-4.8, z wątroby i mózgu wołu - 4.3, z wątroby kangura - 5.0 (cyt. za 26).

Masy cząsteczkowe tych enzymów z różnych źródeł wynoszą przeważnie 100-150 kDa. W przypadku ASA z wątroby ludzkiej, mózgu i wątroby wołowej oraz wątroby kangura wykazano istnienie form polimerycznych, zmieniających się w zależności od pH i siły jonowej środowiska. Enzym z wątroby wołowej w pH powyżej 6.5 występuje w postaci monomeru o masie cząsteczkowej 107 kDa, w pH poniżej 5.5 - jako tetramer o masie 411 kDa. W pH równym 5.0, przy niskim stężeniu enzymu obserwuje się formę dimeryczną. Równowaga wszystkich form polimerycznych występuje w zakresie pH 5.5.-6.5.

Waheed i Van Etten (65), wykazali istnienie form dimerycznych ASA (pH 4.5) izolowanych z wątroby człowieka, królika, wieloryba, foki, psa, kota, owcy, konia, świni i wołu. Monomery enzymu wszystkich wymienionych zwierząt wiązały się z monomerem ASA króliczej.

Dane z literatury najnowszej przemawiają za tym, że aktywna cząsteczka ASA zbudowana jest z dwu nieaktywnych podjednostek. Grupa von Figury wykazała, że prekursorowa forma ASA fibroblastów ludzkich, o masie 62 kDa jest przekształcana do dwu asocjujących form dojrzałych o masie 60.5 i 57 kDa (cyt. za 60).

Arylosulfataza A tarczycy wieprzowej zbudowana jest z dwu nieaktywnych podjednostek o masach cząsteczkowych 54 i 58 kDa, które rozdzielić można w warunkach redukujących (60).

Cechą wspólną arylosulfataz A jest nieliniowa kinetyka reakcji, zarówno w przypadku sztucznych jak i naturalnych substratów. W pierwszej fazie obserwuje się dużą szybkość reakcji, która wyraźnie spada w fazie drugiej, by wzrosnąć znów w ostatniej fazie, nie osiągając wszakże wartości początkowej. Enzym łożyska ludzkiego nie wykazuje - właściwego III-ej fazy - ponownego przyspieszenia szybkości reakcji enzymatycznej (28b). Dotąd nie wyjaśniono jednoznacznie przyczyn tych anomalii.

Arylosulfataza A odróżnia się od arylosulfatazy B wysokim powinowactwem do sztucznego substratu - 2-hydroksy-5-nitro-fenylosiarczanu. Wartość  $K_m$  dla enzymu A z wątroby wołowej wynosi 0.47mM, z mózgu i wątroby ludzkiej - 1.54, łożyska ludzkiego - 1.40, nerek ludzkich - 0.09-0.3 (cyt. za 26), narządów szczura - 0.3. (37).

Optimum pH arylosulfataz A z większości źródeł waha się w granicach 4.8-5.6. Wartość ta może jednak zmieniać się w dość szerokich granicach w zależności od czasu inkubacji, stężenia substratu oraz obecności niektórych jonów nieorganicznych (5.8). Być może odchylenia te są spowodowane zmianami konformacyjnymi cząsteczki enzymu.

Budowa centrum aktywnego arylosulfataz A nie jest ostatecznie poznana, przypuszczalnie obecna jest w nim grupa imidazolowa reszty histydyny oraz grupa karbonylowa. Nie wyklucza się, że odgrywają w nim pewną rolę grupy aminowe, kwasowe i fenolowa (cyt. za 26). Badania z użyciem inhibitorów grup -SH wskazują, że grupy te są niezbędne dla aktywności ASA z większości źródeł (66). Wyniki najnowszych badań sugerują



obecność dwu lub więcej reszt argininy w centrum aktywnym obok reszty histydyny (33,53).

Wpływ różnych inhibitorów na aktywność arylosulfataz A z niektórych źródeł został gruntownie przebadany. Na uwagę zasługuje bardzo silna inhibicja tych enzymów przez jony srebrne (6), co stało się podstawą jednej z metod niezależnego oznaczania aktywności ASA i ASB w mieszaninie tych enzymów, przy użyciu sztucznego substratu. Większość kationów nieznacznie hamuje aktywność arylosulfataz A. Najsilniejszymi inhibitorami wśród kationów są jony wapniowców i miedziowców oraz dwuwartościowe żelazowce (6,9). Wśród anionów silnymi inhibitorami są jony siarczynowe, fosforanowe, a słabszymi - jony siarczanowe (5).

Arylosulfatazy są glikoproteinami oddziałującymi z konkana-  
waliną A. Oligosacharydy mogą stanowić do kilkudziesięciu procent masy cząsteczki arylosulfatazy A. W skład enzymu z wątroby wołowej wchodzi 3.85% cukrów obojętnych, 2.18% kwasu sialowego. Prawdopodobnie na jedną cząsteczkę enzymu przypada 14 reszt mannozy, 18 reszt glukozoaminy i 8 kwasu sialowego. Dane dotyczące ASA z mózgu owczego wskazują na obecność 25% cukrów obojętnych (głównie glukozy i mannozy) oraz 0.5% kwasu sialowego.

Badania kliniczne, związane z chorobami spowodowanymi niedoborami enzymatycznymi naprowadziły badaczy na trop substratów naturalnych arylosulfataz A. Najwcześniej odkrytym jest cerebrozydo-3-siarczan ( $\beta$ -D-galaktopiranozylo-3-O-sulfo-  
-/1-1/-ceramid), sulfolipid, występujący w dużych ilościach w układzie nerwowym (48) [Rys.2]. Aktywność cerebrozydo-3-siarczano sulfohydrolazy przejawiają nie tylko arylosulfatazy A z tkanek ssaków. Tę właściwość posiada również ASA z mózgu kury, a także kwaśne formy arylosulfataz wielu bezkręgowców (49).

Już pierwsze badania nad aktywnością wobec tego naturalnego substratu, prowadzone przez Mehla i Jatzkiewitza w roku 1968 (48), zwróciły uwagę na niskocząsteczkowy, termostabilny czynnik białkowy, który konieczny jest do ujawnienia aktywności ASA. Czynnikiem tym jest aktywator białkowy o masie

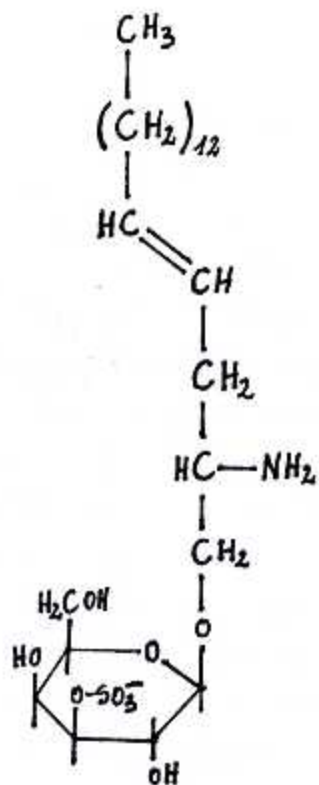
12 kDa, zwany saposyną B, którego funkcją jest stymulowanie hydrolizy trudno rozpuszczalnych glikolipidów (12,51).

Udowodniono także aktywność hydrolityczną arylosulfatazy A wobec sulfogalaktooglicerolu (18), zwanego także seminolipidem ze względu na jego występowanie w plazmie nasienia i jądrach. Dokładniej, seminolipid to 1-O-heksadecylo-2-O-heksanodekanoilo-3- $\beta$ -D-(3-O-sulfo)galaktooglicerol [Rys.3]. Ostatnio sugeruje się wpływ degradacji tego związku przez ASA na proces kapacytacji plemników (21).

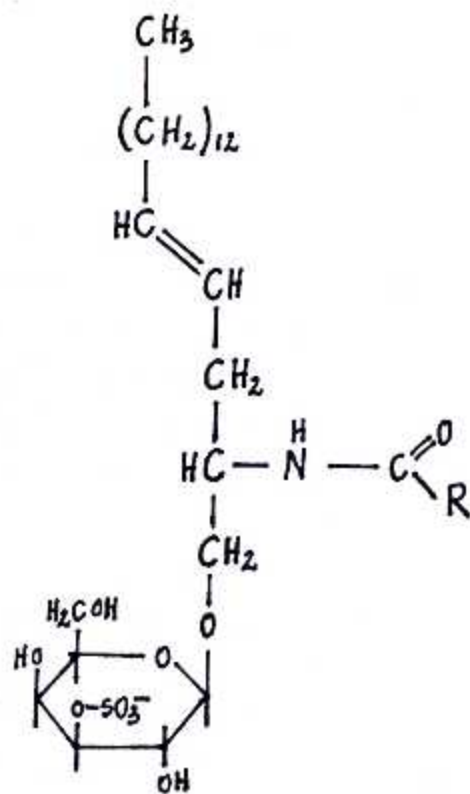
Inne potencjalne, naturalne substraty ASA, występujące w organizmach ssaków to siarczan psychozyny (18), 2-O-siarczan kwasu L-askorbinowego (18), O-siarczan L-tyrozyny (19) [Rys.1,5,4].

Bardzo duża ilość i wysoka aktywność arylosulfatazy A w lizosomach tarczycy wieprzowej (60) sugeruje związek tego enzymu z dojrzewaniem prohormonu tarczycowego, tyreoglobuliny. Prekursor ten jest glikoproteina posiadającą siarczanowane reszty cukrów i siarczanowane reszty tyrozynowe. Wiadomo, że siarczanowanie tyrozyny jest częstą modyfikacją potranslacyjną, a siarczan tyrozyny może być sygnałem dla wewnątrzkomórkowego sortowania i (lub) transportu białek (2). Dla proteolitycznej, wewnątrzlizosomalnej obróbki tyreoglobuliny konieczne jest jednak odszczepienie siarczanu, co może zachodzić pod wpływem arylosulfatazy A.

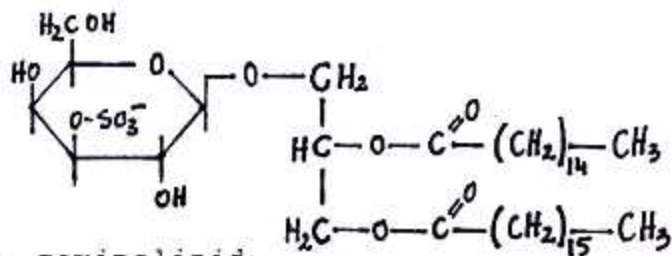
Arylosulfatazy A, jak większość enzymów lizosomalnych, wykazują heterogenność molekularną, choć nie tak wyraźną jak w przypadku arylosulfataz B. Związana jest ona głównie ze wspomnianymi wcześniej modyfikacjami potranslacyjnymi komponenty cukrowej tych enzymów. Das i Bishayee (13) dowiedli, że obecność dwu form ASA mózgu owczego, różniących się punktami izoelektrycznymi jest wynikiem obecności lub braku reszty fosforanowej w obrębie komponenty cukrowej obu form. Forma ufosforylowana enzymu była związana z błonami lizosomów i jej ilość była czterokrotnie mniejsza niż formy nieufosforylowanej. Sugerowali oni, że ufosforylowana cząsteczka enzymu jest formą transportową.



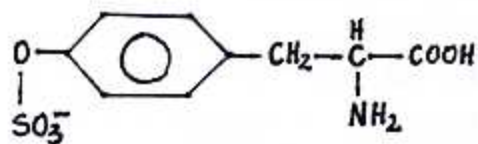
Rys.1. siarczan psychozyny



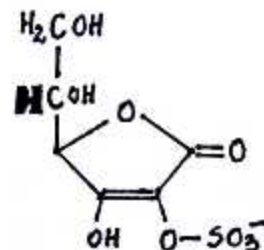
Rys.2. cerebrozydo-3-siarczan



Rys.3. seminolipid



Rys.5. O-siarczan L-tyrozyny



Rys.4. 2-O-siarczan L-askorbinianu

Zastosowanie najnowszych technik z zakresu biochemii i biologii molekularnej pozwoliło ostatnio na poznanie sekwencji aminokwasowej arylosulfatazy A łożyska ludzkiego. Uzyskano kodujący całą cząsteczkę enzymu, komplementary fragment DNA, który został sklonowany i zsekwencjonowany. Na podstawie danych uzyskanych tymi technikami zespół von Figury proponuje sekwencję aminokwasową ASA ludzkiej (63). Enzym zbudowany jest z 507 reszt aminokwasowych, z których pierwsze 18 N-końcowych aminokwasów stanowi odcinany peptyd sygnałowy. Obliczona masa cząsteczkowa pozostałego 489-aminokwasowego polipeptydu wynosi 51.7 kDa. Wartość ta jest zbliżona do masy cząsteczkowej ASA ludzkiej, deglikozylowanej N-glikanazą F, która oznaczona metodą elektroforezy w SDS wynosi 57 kDa. Cząsteczka enzymu posiada 3 potencjalne miejsca N-glikozylacji (reszty asparaginy), z których dwa wydają się być wykorzystywane. Autorzy ci dowodzą także, iż za transport wewnątrzkomórkowy tego enzymu odpowiedzialny jest receptor 6-fosfomannozyłowy, gdyż blokowanie tego receptora specyficznymi przeciwciałami hamowało transport arylosulfatazy do lizosomów.

Badania cerebrozydo-3-siarczano sulfatazy mózgów szczurzych wskazują na charakterystyczne zmiany jej aktywności w okresie postnatalnym (70,71). Niski początkowo poziom aktywności tego enzymu, rośnie gwałtownie w ciągu pierwszych dni życia, osiągając szczyt po dwu tygodniach. Ten nagły wzrost skorelowany jest z procesem intensywnej mielinizacji układu nerwowego. Następnie poziom aktywności enzymu sukcesywnie spada, osiągając stabilizację po czterdziestym dniu życia zwierzęcia.

#### 1.2.2. Arylosulfatazy B (ASB)

Arylosulfatazy B, jako enzymy lizosomalne, są także glikoproteinami. Generalnie posiadają one wyższe punkty izoelektryczne od arylosulfataz A (często powyżej 8). Z powodu wielkiej heterogenności tych enzymów trudno jest podać wąskie granice dla ich punktów izoelektrycznych. Wprowadzenie metod chromatograficznych o wysokiej rozdzielczości pozwoliło na

odkrycie, że ASB z większości źródeł rozdziela się na szereg frakcji.

Już w 1962r. Wortman dokonał rozdziału arylosulfatazy B rogowki wołu i królika na 3 podfrakcje (68). W 1966r. Błeszyński otrzymał także 3 frakcje ASB mózgu wołowego (7), a w 1973r. już 7 form z tego samego źródła (4). Formy te nie różniły się zauważalnie masami cząsteczkowymi, lecz różniły się ładunkiem elektrycznym. Większość ssaczych arylosulfataz B ulega rozdziałowi na dwie zasadnicze frakcje ( B<sub>1</sub> i B<sub>2</sub> ) drogą chromatografii na anionitach. W trakcie ogniskowania izoelektrycznego frakcja B<sub>1</sub> enzymu z nerek szczura rozdziela się jeszcze na cztery podfrakcje, a B<sub>2</sub> aż na siedem. Wszystkie te podfrakcje są przypuszczalnie konformerami ładunkowymi (69).

Masy cząsteczkowe natywnych cząsteczek arylosulfataz B oscylują wokół 50 kDa, z wyjątkiem homodimerycznego enzymu z wątroby kota o masie 100 kDa (47). Niekiedy heterogenność w grupie tych enzymów zauważalna jest również w zakresie wielkości cząsteczki. W 1972r. Gniot-Szulżycka otrzymała 3 subfrakcje ASB łożyska ludzkiego o masach cząsteczkowych 71, 60, 48 kDa i punktach izoelektrycznych odpowiednio: 7.6, 7.9, 8.1 (28). Mathew i Balasubramanian wykazują istnienie głównej formy ASB mózgu ludzkiego o masie 50 kDa oraz siedmiu form o masach od 24 do 62 kDa (45).

Arylosulfatazy B ze wszystkich badanych źródeł charakteryzują się liniową kinetyką katalizowanych reakcji. Powinowactwo tego enzymu do siarczanu 4-nitrokatecholu jest niższe niż arylosulfatazy A. Wartości Km dla ASB wątroby i mózgu wołowego wynoszą odpowiednio 1.8 i 1.0 mM, wątroby ludzkiej - 2.9 mM, narządów szczura 1.2 mM. Enzymy tej klasy najefektywniej hydrolizują ten sztuczny substrat w pH 5.1 - 6.0 .

W centrum aktywnym arylosulfataz B występuje grupa imidazolowa reszty histydyny, oraz grupa karboksylowa reszty kwasu asparaginowego lub glutaminowego (15).

Transport wewnątrzkomórkowy tego enzymu odbywa się za sprawą kationo-zależnego i kationo-niezależnego receptora 6-fosfomannozylowego. Obserwowano hamowanie poboru arylosulfatazy B do komórek w obecności specyficznych

przeciwciał blokujących te receptory (53). Kureha i Eto sugerują, że frakcja B<sub>2</sub> (forma kwaśna) enzymu z mózgu ludzkiego, w przeciwieństwie do formy B<sub>1</sub> (forma zasadowa), posiada resztę mannozylo-6-fosforanową, odpowiedzialną za oddziaływanie z receptorem (36). Mathew i Balasubramanian dowodzą, że obie formy enzymu z mózgu ludzkiego wiążą się z receptorem enzymów lizosomalnych, a różnią się jedynie powinowactwem do niego (45).

Pomimo stosowania nowoczesnych technik biologii molekularnej w badaniach nad ASB ludzką, jej struktura jest jeszcze ciągle niejasna. Zespół Hopwood'a sugeruje następujący model dojrzewania tego enzymu (23). Po zakończeniu syntezy i odcięciu 39 aminokwasów sekwencji sygnałowej polipeptyd o masie 59.8 kDa jest N-glikozylowany w świetle retikulum endoplazmatycznego, osiągając masę 66 kDa po przetransportowaniu do aparatu Golgiego. Następnie ulega on obróbce do formy o masie 57 kDa, która składa się z dwu fragmentów (43 i 8 kDa) połączonych wiązaniem dwusiarczkowym, ulegających wewnątrzlizosomalnemu rozszczepieniu.

Grupa Von Figury sklonowała i zsekwencjonowała cDNA zawierający cały gen ASB ludzkiej (53), wnioskując z uzyskanych danych, że kodowana sekwencja tego enzymu składa się z 533 aminokwasów, z których 41 stanowi peptyd sygnałowy. Wyliczona masa cząsteczki pozbawionej peptydu sygnałowego wynosi 55.7 kDa. Ustalono obecność 6 potencjalnych miejsc N-glikozylacji (reszt asparaginy), z których 4 wydają się być wykorzystywane. Ekspresja sklonowanego genu w hodowlach komórkowych prowadziła do powstania dojrzałych form enzymu o masie 47 kDa.

Najsilniejszymi inhibitorami arylosulfataz B są wielowartościowe aniony (6), wśród których stopień hamowania maleje następująco:  $S_2O_8^{2-}$ ,  $CrO_4^{2-}$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $MoO_4^{2-}$ ,  $SO_3^{2-}$ . Jony siarczynowe i siarczanowe hamują enzym kompetycyjnie. Kationy generalnie aktywują ASB. Szczególnie wyraźną aktywację obserwowano w obecności zasadowego octanu glinu, octanu ołowianego i octanu ceru (5,6).

Udowodniono, iż w warunkach fizjologicznych arylosulfatazy B to N-acetylogalaktozoamino-4-siarczano sulfohydrolazy. Ich

naturalnymi substratami są siarczanowane oligosacharydy, (28c,30) produkty degradacji takich mukopolisacharydów jak siarczan dermatanu i chondroityno-4-siarczan [Rys.6 i 7]. Odszczepienie siarczanu od N-acetylogalaktozoamino-4-siarczanu następuje tylko wtedy, gdy cukier ten znajduje się na nieredukującym końcu oligosacharydu (28c,30).

Naturalnym substratem ASB może być także UDP-N-acetylogalaktozoamino-4-siarczan (16) [Rys.8].

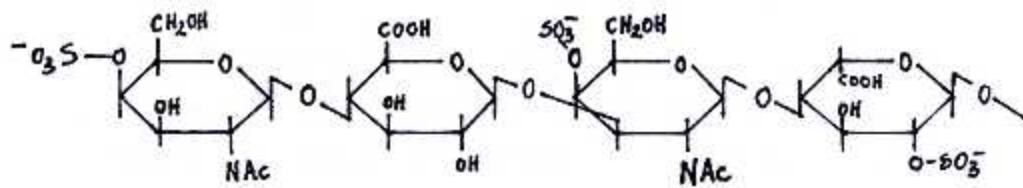
Wartości optimum pH i stałej Michaelisa w przypadku aktywności wobec naturalnego substratu są niższe niż w przypadku hydrolizy sztucznych substratów. Dla enzymu z wątroby ludzkiej optimum pH wynosi 4.0, a  $K_m = 60\mu M$  (23).

W doświadczeniach *in vitro* arylosulfataza B ulegała fosforylacji przy udziale kinazy białkowej zależnej od cAMP (22). Enzym z wątroby ludzkiej, po fosforylacji z zachowaniem fizjologicznych stężeń kinazy i cAMP, wykazywał wzrost aktywności o 50%. Dane te sugerują potencjalny, cAMP-zależny model regulacji aktywności ASB.

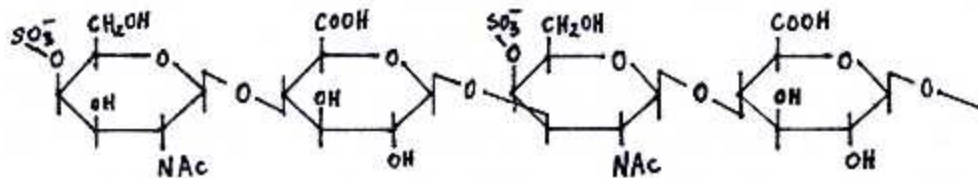
Zaobserwowano, że poziom aktywności arylosulfatazy B jest zróżnicowany w zależności od narządu. Wśród narządów szczurzych nerki posiadają najwyższą aktywność arylosulfatazową, 90% tej aktywności to aktywność ASB (39). Może to sugerować, że nerki są miejscem intensywnej degraacji fragmentów mukopolisacharydów.

### 1.3. Wrodzone choroby spowodowane niedoborem aktywności sulfatazowej.

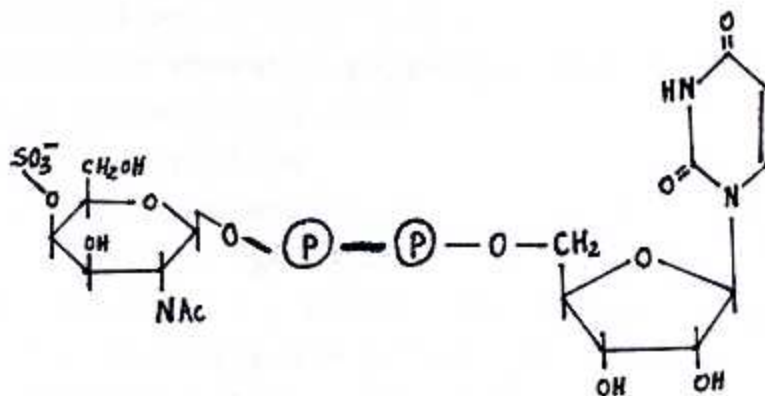
Genetycznie uwarunkowane niedobory aktywności enzymów związanych z procesami lizosomalnego katabolizmu noszą miano tzw. chorób spichrzeniowych. Prowadzą one do wewnątrzkomórkowego odkładania się nie zdegradowanych związków, co powoduje funkcjonalne zaburzenia obciążonych tkanek, a w końcu doprowadzić może do całkowitej ich dysfunkcji.



Rys.6. Fragment struktury siarczanu dermatanu



Rys.7. Fragment struktury chondroityno-6-siarczanu



Rys.8. UDP-N-acetylogalaktozoamino-4-siarczan



### 1.3.1. Metachromatyczna leukodystrofia (MLD)

#### - niedobór aktywności arylosulfatazy A

Metachromatyczna leukodystrofia jest sulfolipidoza dziedzicząca się w sposób autosomalno-recesywny, opisana po raz pierwszy w 1910 r. przez Alzheimerą. Jej związek z niedoborem arylosulfatazy A stwierdzony został dopiero w 1963r. przez Austina i współpracowników (17). W przebiegu choroby dochodzi do postępującego gromadzenia się cerebrozydo-3-siarczanu (charakterystycznego składnika mielin), głównie w lizosomach centralnego i obwodowego układu nerwowego. Powoduje to postępującą demielinizację i zanik istoty białej. W obrazie histologicznym charakterystyczna jest metachromazja w obrębie układu nerwowego, nerek, wątroby i śledziony. Nasilające się objawy kliniczne tej choroby to ogólne osłabienie i niedorozwój umysłowy, niedowład mięśniowy (ataksja), trudności w mówieniu i połykaniu, zanik zdolności widzenia, demencja, aż do śmierci spowodowanej dysfunkcją układu nerwowego. W zależności od gwałtowności przebiegu choroby i wieku, w którym pojawiają się pierwsze objawy, wyróżniono 3 postaci metachromatycznej leukodystrofii:

#### 1. Postać wczesnodziecięca

Pierwsze objawy choroby pojawiają się między pierwszym a drugim rokiem życia i prowadzą do szybkiej śmierci -najpóźniej po kilku latach (54).

#### 2. Postać młodociana

Pierwsze objawy choroby pojawiają się między trzecim a szesnastym rokiem życia (54).

#### 3. Postać wieku dojrzałego

Objawy kliniczne pojawiają się po ukończeniu szesnastego roku życia (54).

Postać młodociana i wieku dojrzałego mają przebieg łagodniejszy i objawiają się głównie w formie postępujących zaburzeń umysłowych i braku koordynacji ruchów (26).

Granice między wyróżnionymi postaciami choroby są raczej umowne, co jest związane z różnorodnością molekularnych defektów na poziomie DNA i stopniem obniżenia fizjologicznego

poziomu aktywności arylosulfatazy A w tkankach chorych. Objawy MLD zazwyczaj obserwuje się u ludzi, których tkanki wykazują poziom aktywności ASA mniejszy niż 10% poziomu aktywności fizjologicznej (25).

Gen arylosulfatazy A zlokalizowany jest w chromosomie 22 i składa się z ośmiu eksonów poprzedzielanych sekwencjami intronowymi. Dokładnie poznano strukturę dwu zmutowanych alleli genu, noszących oznaczenia I i A (54). Allel I powstał na skutek trzech mutacji punktowych: transwersji G→T (powodującej zmianę tryptofanu na cysteinę w pozycji 193) transwersji C→G (zmieniającej treoninę na serynę w pozycji 391) i tranzycji G→A, zaburzającej strukturę miejsca granicznego między drugim eksonem a kolejnym intronem genu. Ostatnia z tych mutacji uniemożliwia proces poprawnego wycięcia intronu z prekursorowej cząsteczki mRNA. Allel A jest efektem tranzycji C→T, powodującej zmianę proliny na leucynę w pozycji 426. Mutacja ta drastycznie obniża czas półtrwania cząsteczki ASA w komórce poprzez zwiększenie jej podatności na działanie proteinyazy cysteinowej. Wszyscy przebadani pacjenci, homozygotyczni pod względem allelu I cierpieli na wczesnodziecięcą postać MLD. Pacjenci heterozygotyczni A/I chorują na młodzieńczą postać choroby, a homozygotyczni pod względem allelu A spełniają kryteria drugiej lub trzeciej postaci MLD. Odnotowano także szereg nie zidentyfikowanych jeszcze alleli genu ASA, powodujących objawy kliniczne.

Dwie tranzycje A→G są podłożem tzw. pseudoniedoboru arylosulfatazy A (arylsulfatase A pseudodeficiency)(24). Pierwsza z nich powoduje zamianę asparaginy (poz.350) na serynę i tym samym utratę jednego miejsca N-glikozylacji cząsteczki enzymu, druga - utratę sygnału do poliadenylacji mRNA i w konsekwencji nikłą jego stabilność. Homozygotyczni nosiciele tego allelu nigdy nie zapadają jednak na metachromatyczną leukodystrofię, jako że obniżenie poziomu aktywności ASA u tych ludzi nie jest tak drastyczne, by doprowadzić do spichrzania sulfolipidów.

Niewielka grupa chorujących na młodzieńczą postać MLD wykazuje normalny poziom aktywności ASA, a schorzenie

powodowane jest genetycznie uwarunkowanym niedoborem saponiny B, białkowego aktywatora enzymu (51).

### **1.3.2. Niedobór aktywności arylosulfatazy B - zespół Maroteaux-Lamy**

Zespół Maroteaux-Lamy (zwany także mukopolisacharydozą VI) jest chorobą wrodzoną, przekazywaną autosomalno-recesywnie. W przebiegu choroby w niektórych narządach i centralnym układzie nerwowym dochodzi do akumulacji mukopolisacharydów (chondroityno-4-siarczanu, a głównie siarczanu dermatanu) posiadających resztę N-acetylogalaktozoamino-4-siarczanu. Objawy tego schorzenia to zahamowanie wzrostu, maskaronizm (charakterystyczne pogrubienie rysów twarzy), wyraźne zmiany w obrębie tkanki kostnej, zmętnienie rogówki, niewydolność krążenia, powiększenie wątroby i śledziony, przy jednoczesnym zachowaniu pełni władz umysłowych. Fibroblasty osób chorych wykazują aktywność ASB na poziomie 10% aktywności fizjologicznej (17). Spadek ten jest spowodowany prawdopodobnie mutacją w genie strukturalnym enzymu. Zmutowanego enzymu z fibroblastów osób chorych nie można odróżnić od normalnego metodami elektroforetycznymi i immunologicznymi (17).

### **1.3.3. Choroby spowodowane niedoborem innych sulfhydrolaz**

Wewnątrzlizosomalna degradacja związków ze złożonej grupy mukopolisacharydów wymaga aktywności także innych sulfhydrolaz. O-siarczanowane i N-siarczanowane w różnych połączeniach aminocukry i kwasy uronowe są komponentami także takich makrozwiązków jak chondroityno-6-siarczan, siarczan keratanu i heparanu oraz heparyna.

Niedobór aktywności 2-O-siarczanosulfhydrolazy kwasu  $\alpha$ -iduronowego, zwany zespołem Hunter lub mukopolisacharydozą II uniemożliwia całkowitą degradację siarczanu dermatanu (50).

Brak kompletnego rozkładu siarczanu heparanu i heparyny towarzyszy niedoborowi N-sulfamino-sulfhydrolazy (sulfamini-

dazy) w przebiegu mukopolisacharydozy III (tzw. zespół Sanfilippo A). Inny wariant tej choroby, tzw. zespół Sanfilippo D (mukopolisacharydoza IIID), objawia się wydalaniem z moczem i odkładaniem w tkankach częściowo zdegradowanego siarczanu heparanu. U pacjentów cierpiących na to schorzenie wykazano silne obniżenie aktywności N-acetyloglukozoamino-6-siarczano-sulfohydrolazy (cyt.za 20,29).

Mukopolisacharydoza IV (zespół Morquio) objawia się akumulacją fragmentów częściowo zdegradowanego siarczanu keratanu, siarczanu heparanu i heparyny na skutek niedoboru N-acetyloglukozoamino-6-siarczano-sulfohydrolazy. Zespół Morquio jest chorobą heterogenną pod względem klinicznym i biochemicznym. Jego odmiana, nazwana zespołem Morquio A lub mukopolisacharydoza IV A, jest powodowana niedoborem także N-acetylogalaktozoamino-6-siarczano sulfohydrolazy. Ofiary tej genetycznej przypadłości akumulują w różnych tkankach i wydalają z moczem siarczan keratanu oraz chondroityno-6-siarczan (cyt. za 44).

Nie rozwiązany jest problem molekularnego podłoża schorzenia zwanego mukosulfolipidoza lub zespołem wielorakiego niedoboru sulfohydrolaz. Obraz kliniczny tej choroby przypomina metachromatyczną leukodystrofię, lecz w tkankach ludzi cierpiących na nią stwierdza się niedobór aktywności arylosulfataz A, B i C, sterolosulfataz, N-sulfamino-sulfohydrolazy, 2-O-siarczano-sulfohydrolazy kwasu  $\alpha$ -iduronowego i galaktozo-6-siarczano-sulfohydrolazy (34). Efektem tych niedoborów enzymatycznych jest akumulowanie i zwiększone wydalanie z moczem sulfatydów, mukopolisacharydów, gangliozydów i sterolosiarczanów (26).

#### 1.4. Rodzina genów sulfohydrolazowych

Badania struktury pierwszorzędowej enzymów z grupy sulfohydrolaz, oparte na sekwencjonowaniu cDNA, wykazały dość dużą zgodność ich sekwencji aminokwasowych (53). Ludzka arylosulfataza B wykazuje 28.5% , 26.6% , 18.3% , 25.2% identyczności sekwencji aminokwasowej odpowiednio z ludzką

arylosulfataza A, ludzka sulfataza sterolosiarczanów, ludzka glukozoamino-6-sulfataza, arylosulfataza zarodka jeżowca. Szczególnie konserwatywny okazał się odcinek sześćciamiнокwasowy zawierający histydyne oraz odcinki zawierające argininę (m.in. pięcio- i trójiamiнокwasowy). Konserwatywność tych odcinków jest związana najprawdopodobniej z obecnością wymienionych aminiokwasów w centrum aktywnym. Sekwencja aminiokwasowa arylosulfatazy A przejawia 35% zgodności z sekwencją sulfohydrolazy sterolosiarczanów (63). Dane te sugerować mogą pochodzenie genów sulfohydrolaz z jednego, pierwotnego ewolucyjnie genu.

Masy prekursorowych cząsteczek ludzkiej ASA, ASB i N-acetylogalaktozoamino-6-siarczano-sulfatazy są zbliżone i wynoszą około 60 kDa (44,53,63), co także potwierdzać może wspólny rodowód tych enzymów.

#### 1.5. Cel pracy

Celem obecnej pracy było uzyskanie wysokooczyszczonych preparatów zasadowej formy arylosulfatazy B (R<sub>1</sub>) z nerek wołowych i arylosulfatazy A z wątroby wołowej oraz użycie ich do otrzymania przeciwciał poliklonalnych skierowanych przeciwko tym enzymom. Stworzy to możliwość wykorzystania tych przeciwciał do badań nad molekularnym podłożem heterogenności wołowej arylosulfatazy B oraz do badań nad strukturalnym podobieństwem między wołowymi arylosulfatazami A i B a arylosulfatazami z innych gatunków zwierząt. Otrzymanie specyficznych przeciwciał może przyczynić się do poznania molekularnej ewolucji tych enzymów.

## 2. MATERIAŁY I METODY

### 2.1. Odczynniki

Sztuczny substrat - dwupotasowa sól 2-hydroksy-5-nitro-fenylosiarczanu ( siarczanu 4-nitrokatecholu, NCS ) otrzymano w naszej pracowni metoda Roy'a (56).

Sepharose CL 4B, CNBr-Sepharose CL 4B, Phenyl-Sepharose CL 4B, Polybuffer Exchanger 94 (PBE94) i Polybuffer 96 zakupiono w firmie PHARMACIA-LKB (Szwecja).

Akrylamid, N,N'-metylenobisakrylamid, TEMED (czteroetylometylenodiamina), Triton X-100, Coomassie Brilliant Blue R-250 i G-250, białka wzorcowe do elektroforezy oraz konkanawalina A pochodziły z firmy SERVA (RFN).

Kwas bis-cynchoninowy (BCA), metylo- $\alpha$ -D-glukopiranozyd ( $\alpha$ -metyloglukozyd), kompletny i niekompletny adjuwant Freund'a otrzymano z firmy SIGMA (USA).

Cibacron Blue F3GA oraz Tris [trój(hydroksymetylo)aminometan] zakupiono w firmie FLUKA (Szwajcaria), DEAE-celulozę DE-32 w angielskiej firmie WHATMAN; preparat suszonych komórek *S.aureus* (Pansorbin Cells) w szwajcarskiej firmie CALBIOCHEM, a żel Protein A-Sepharose Cl-4B do izolowania immunoglobulin G - w firmie PIERCE (USA).

Syntezy Blue-Sepharose CL-4B i Con A-Sepharose CL-4B dokonano w naszej pracowni, sprzęgając Cibacron Blue F3GA z Sepharose CL-4B (42) oraz konkanawalinę A z CNBr-Sepharose CL-4B. Żel przygotowany zgodnie z zaleceniami producenta zmieszano z roztworem Con A (10mg/ml) w octanie sodu doprowadzonym do pH=8.0 i zawierającym jony magnezu, wapnia i manganu w stężeniu 0.5 mM. Zawiesinę żelu inkubowano (delikatnie wytrząsając) przez 2h w temperaturze pokojowej, po czym żel pozostawiono na noc w lodówce. Po zakończonym sprzęganiu żel przemyto na lejku Büchnera 0.1M buforem Tris-octanowym, pH=7.2, zawierającym 0.3M NaCl i 0.5mM chlorki wapnia, magnezu i manganu.

Koncentrat odczynnika Bradforda przygotowano w pracowni i rozcieńczano pięć razy wodą bidestylowaną przed użyciem (10).

Pozostałe oddziały o czystości analitycznej zakupiono w P.O.Ch. (Gliwice)

## 2.2. Materiały do badań

### 2.2.1. Pobranie i przygotowanie materiału

Źródłem arylosulfataz użytych do immunizacji była wątroba i nerki wołowe, pobrane bezpośrednio po uboju zwierząt w miejscowej rzeźni. Po usunięciu dużych błon łącznotkankowych tkankę rozdrabniano w maszynce do mięsa i homogenizowano z dwoma objętościami 25mM buforu Tris-HCl, pH=7.2, w temp. 4°C. Do homogenatu dodano Tritonu X-100 do stężenia 0.1%(v/v), a następnie wirowano 7 godzin przy 2000g. Do zdekantowanego ekstraktu dodawano powoli oziębionego acetonu (-20°C), aż do uzyskania stężenia 20%(v/v) i odstawiano do zamrażarki (-15°C) na kilka godzin. Wytrącone białka odwirowano (1h przy 4000g), a do uzyskanego supernatantu dodawano powoli oziębionego acetonu do stężenia 65%(v/v). Temperaturę mieszaniny utrzymywano na poziomie poniżej -10°C. Po 2 godzinach przechowywania w zamrażarce całość odwirowano (10min., 4000g). Uzyskany osad wytrąconych acetonem białek rozpuszczono w minimalnej ilości 20mM buforu Tris-HCl, pH=7.2 i odwirowano w ultrawirówce (wirnik 6x100, 30 min., 30000g). Osad odrzucono, a supernatant zawierający arylosulfatazy A i B poddawano procesom chromatograficznego oczyszczania.

Arylosulfatazy ludzkie wyizolowano z łożyska fizjologicznego pobranego bezpośrednio po porodzie (dzięki uprzejmości pracowników oddziału położniczego, szpitala bielańskiego w Toruniu). Po oddzieleniu błon łącznotkankowych 358g tkanki rozdrobniono w maszynce do mięsa, a następnie zhomogenizowano w homogenizatorze nożykowym z dwoma objętościami 20mM buforu Tris-HCl, pH=7.2, zawierającego 0,5 mM ditiotreitol, 1mM EDTA i 0.1% Triton X-100. Homogenat wirowano przez 2 godziny przy 3000g, a arylosulfatazy znajdujące się w uzyskanym ekstrakcie oczyszczano metodami chromatograficznymi.

### 2.2.2. Preparaty arylosulfataz innych gatunków zwierząt użyte do porównawczych miareczkowań immunologicznych

Preparaty arylosulfatazy B wątroby minoga (*Lampetra fluviatilis*), wątroby gołębia (*Columba livia*) i nerek szczura (*Rattus norvegicus*) oraz arylosulfatazy A wątroby wieprzowej (*Sus scrofa*) i wątroby owczej (*Ovis avies*) uzyskano w naszej pracowni w latach wcześniejszych (3,41,42.), stosując postępowanie zbliżone do opisanego wyżej.

## 2.3. Metody biochemiczne

### 2.3.1. Chromatografia jonowymienna na DEAE-celulozie DE-32

Na kolumnę uprzednio zrównoważoną 20mM buforem startowym Tris-HCl, pH=7.2 наносzono preparaty o pH doprowadzonym do 7.2 i niskiej sile jonowej. Kolumnę przemywano następnie dużą objętością buforu startowego. Elucji białka związanego dokonywano 0.3M NaCl w buforze startowym. Objętości kolumn oraz objętości zbieranych frakcji były różne i zależały od stopnia oczyszczenia preparatu. W uzyskanych frakcjach mierzono aktywność arylosulfatazową zgodnie z metodą opisaną poniżej.

### 2.3.2. Chromatografia powinowactwa na Blue-Sepharose CL-4B

Na kolumnę o objętości 300ml, zrównoważoną buforem startowym - 50mM Tris-octan, pH=6.0 - наносzono preparaty w buforze startowym o pH doprowadzonym do 6.0. Elucję prowadzono najpierw buforem startowym, a zaadsorbowana aktywność eluowano 50mM buforem Tris-HCl, pH=7.2 + 0.5M NaCl. Zbierano frakcje o objętości od kilkudziesięciu do kilkuset ml, w których oznaczano aktywność arylosulfatazową.

### 2.3.3. Chromatografia powinowactwa na Con A-Sepharose CL-4B

Kolumnę o średnicy 2.5cm i wysokości 8.0cm równoważono wstępnie buforem startowym - 50mM Tris-octan, pH=6.0 + 0.3M



NaCl + 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>. Nanoszone na kolumnę preparaty posiadały pH=6.0 oraz sole obecne w buforze startowym, w takich samych stężeniach. Po naniesieniu preparatu elucję prowadzono najpierw buforem startowym (kilkanaście objętości kolumny), a następnie 15% α-metyloglukozydem w 50mM buforze Tris-HCl o pH=7.2, z dodatkiem soli, jak w buforze startowym. W zebranych frakcjach oznaczano aktywność arylosulfatazową.

#### 2.3.4. Chromatografia hydrofobowa na fenylo-Sepharose CL-4B.

Kolumnę żelu ( 20x45mm ) równoważono 50mM buforem Tris-HCl, pH=7.2 + 3M NaCl. Preparat enzymu w buforze startowym nanoszono na kolumnę. Elucję prowadzono kolejno: buforem startowym, 50mM buforem Tris-HCl, o pH=7.2 + 0.5M NaCl, 25mM buforem Tris-HCl o pH=7.2 i glikolem etylenowym o liniowo wzrastającym stężeniu (0-50%) w 25mM buforze Tris-HCl, pH=7.2. Stosowano pompę perystaltyczną typ 315 (0.5ml/min.). W zebranych frakcjach oznaczano aktywność arylosulfatazową, zawartość białka metodą spektrofotometryczną przez pomiar przy λ=280nm oraz stężenie glikolu etylenowego metodą refraktometryczną.

#### 2.3.5. Chromatoogniskowanie na żelu PBE 94 ( Polybuffer Exchanger 94 )

Chromatoogniskowanie (chromatofokusing) przeprowadzono zgodnie z zaleceniami producenta (1). Kolumnę wypełnioną żelem PBE 94 (0.9cm x 36cm) równoważono odgazowanym 25mM buforem startowym etanolamina-octan, pH=9.25. Następnie na kolumnę nanoszono 5ml dziesięciokrotnie rozcieńczonego, odgazowanego Polibuforu 96 o pH 5.85. Preparaty enzymatyczne, zagęszczone wcześniej z wymianą buforu na bufor startowy, nanoszono na kolumnę, rozpoczynając zbieranie frakcji po 100 kropli ( ok. 2.5ml ) przy prędkości przepływu 0.5ml/min. Elucję prowadzono dalej dziesięciokrotnie rozcieńczonym, odgazowanym Polibuforem 96, pH=5.85. W zebranych frakcjach oznaczano aktywność arylosulfatazową oraz zawartość białka metodą spektrofotometryczną (λ=280nm). W co drugiej frakcji mierzono pH.

### 2.3.6. Elektroforeza w SDS na żelu poliakrylamidowym

Elektroforezę prowadzono w bloku żelu (slab gel electrophoresis) stosując 4% żel zagęszczający o długości 2cm i 12.5% żel rozdzielający o długości 10cm, w buforze 50mM Tris - 384mM glicyna + 0.1% SDS, pH=8.3. Rozdział prowadzono przy natężeniu prądu 20mA. Po zakończonej elektroforezie białko w żelu wybarwiano 0.1% roztworem barwnika Coomassie Brilliant Blue w mieszaninie metanolu, kwasu octowego i wody /5:1:4/. Nadmiar barwnika usuwano dyfuzyjnie, płuczac żel w mieszaninie metanolu, kwasu octowego i wody /1:1:8/.

Elektroforezę białek w warunkach redukujących przeprowadzono gotując preparat 5 min. w środowisku 1% merkaptoetanolu i 0.1% SDS.

### 2.3.7. Immunizacja królików

Przeciwciała przeciwko wołowym arylosulfatazom A i B uzyskano immunizując dwa dojrzałe płciowo króliki z miejscowej hodowli.

Porcję preparatu enzymatycznego o objętości 0.3 - 1.0 ml mieszano dokładnie za pomocą dwu strzykawkę z łącznikiem, z równą objętością adjuwantu, aż do wytworzenia nie rozwarstwiającej się emulsji. Tak przygotowaną emulsję wstrzykiwano królikowi podskórnie, w kilku miejscach w obrębie karku i grzbietu. Pierwszą dawkę antygeny podawano w kompletnym adjuwancie Freund'a. Po miesiącu od rozpoczęcia immunizacji dokonano kolejnych iniekcji (co dwa tygodnie), podając preparat odpowiedniego enzymu w niekompletnym adjuwancie Freund'a. Dwa tygodnie po ostatniej iniekcji pobierano po ok. 20ml krwi z żyły brzeżnej ucha. Surowicę izolowano poprzez odwirowanie krwi (2000g przez 10min.), poprzedzone jej dwugodzinna inkubacja w temp. 37°C.

### 2.3.8. Chromatografia powinowactwa na zelu Białko A-Sepharose CL-4B - oczyszczanie immunoglobulin G antysurowic oraz surowicy kontrolnej

Kolumnę o średnicy 16mm i wysokości 45mm równoważono buforem startowym - 100mM Tris-HCl, pH=8.0. Porcję antysurowicy lub surowicy kontrolnej (2-5ml) наносono po dodaniu 1M buforu Tris-HCl, pH=8.0 w ilości 1/10 objętości porcji. Następnie kolumnę przemywano buforem startowym (10 objętości kolumny) i 10mM buforem Tris-HCl, pH=8.0 (10 objętości kolumny). Od momentu rozpoczęcia наносzenia antysurowicy zbierano frakcje po 300 kropli. Zaadsorbowane IgG eluowano z kolumny 100mM buforem glicyna-HCl, pH=3.0, zbierając frakcje po 75 kropli, do próbek zawierających po 150 $\mu$ l 1M buforu Tris-HCl, pH=8.0. W zebranych frakcjach oznaczano zawartość białka metoda Bradforda.

### 2.3.9. Miareczkowanie immunologiczne preparatów arylosulfataz.

Do próbek Ependorfa pipetowano po 25 $\mu$ l preparatu enzymu o odpowiedniej aktywności i po 25 $\mu$ l kolejno wzrastających rozcieńczeń preparatów immunoglobulin G (kontrolnych bądź skierowanych przeciwko wołowej arylosulfatazie A lub B), poczem odstawiano do lodówki na 1,5 godziny, mieszając co 15min. Do każdej próby dodawano następnie po 50 $\mu$ l 3%-owej zawiesiny Pansorbin Cells w 50mM buforze Tris-HCl, pH=7.2. Po dokładnym wymieszaniu, próby powtórnie inkubowano w lodówce przez 1,5 godziny, systematycznie mieszając, a potem wirowano przez 2 min. w mikrowirówce, typ 320. W supernatantach oznaczano aktywność arylosulfatazową, porównując ją z aktywnością w próbie odniesienia, zawierającej roztwór albuminy surowicy wołowej zamiast roztworu IgG o odpowiednim rozcieńczeniu. Aktywności porównywanych preparatów były maksymalnie zbliżone do siebie, a ich miareczkowanie i oznaczenia aktywności przebiegały w identycznych warunkach.

Do rozcieńczania preparatów enzymów i IgG używano roztworu albuminy wołowej o stężeniu 200 $\mu$ g/ml w 50mM buforze Tris-HCl, pH=7.2.

### 2.3.10. Zagęszczanie preparatów enzymatycznych i preparatów immunoglobulin G

Preparaty po chromatografii zagęszczano metodą ultrafiltracji w komorze Amicon 8050, stosując ultrasączki typu YM 10; w przypadku preparatów o małych objętościach, zagęszczano je w aparatach Centricon z sączkiem YM 10 w wirówce K-70 (1200 obr./min., wirnik 4x500), w temp. 0°C.

Alternatywnie stosowano zagęszczanie preparatów w woreczkach do dializy typu Visking, zawieszonych nad wentylatorem stołowym w lodówce (ustawionej na temp. 0°C).

### 2.3.11. Oznaczanie aktywności arylosulfatazowej

Aktywność enzymatyczną arylosulfataz oznaczano metodą Roy'a, zmodyfikowaną przez Błeszyńskiego (7), stosując jako substrat siarczan 2-hydroksy-5-nitrofenolu (siarczan 4-nitrokatecholu, NCS). 10-100µl preparatu enzymatycznego inkubowano w temperaturze 37°C z 0.3ml roztworu substratu o odpowiednim stężeniu i optymalnym pH przez określony czas. W przypadku standardowych oznaczeń stosowano 5mM roztwór substratu o pH 5.6, inkubując próby 10 min. w 37°C. Reakcję przerywano poprzez dodanie 2ml 10% NaOH do mieszaniny inkubacyjnej. Uwolniony 4-nitrokatechol oznaczano spektrofotometrycznie, dokonując pomiaru w 512nm wobec próby ślepej, którą alkalizowano przed dodaniem preparatu enzymatycznego. Jednostką aktywności enzymu (U) jest taka jego ilość, która uwalnia 1µmol 4-nitrokatecholu w ciągu jednej minuty, w warunkach reakcji. Aktywność wyrażoną w milijednostkach (mU) obliczano z wyrażenia:

$$A = \frac{E_{512}^{1cm} \times 204}{t(\text{min.})}$$

### 2.3.12. Oznaczenie białka

Zawartość białka w homogenatach tkankowych oznaczano standardową metodą biuretową, a w oczyszczanych preparatach enzymatycznych metodą z kwasem biscynchoninowym - BCA (61). Oznaczenia białka w preparatach immunoglobulin G przeprowadzano metodą Bradforda (10), wyznaczając krzywą kalibracyjną w oparciu o wzorcowe roztwory frakcji globulin surowicy krwi wołowej.

### 3. W Y N I K I

3.1. Kolejne etapy oczyszczania arylosulfataz z różnych źródeł przedstawiono w skrócie poniżej. Szczegółowe opisy dotyczące określonego postępowania zamieszczono w Materiałach i Metodach.

#### I. Etapy preparatyki arylosulfatazy B z nerek wołowych

1. Homogenizacja tkanki
2. Frakcjonowanie acetonem białek ekstraktu tkankowego
3. Chromatografia jonowymienna na DEAE-celulozie  
(zachowano frakcję arylosulfatazy B nie związaną na kolumnie i oznaczoną B<sub>1</sub>)
4. Chromatografia powinowactwa enzymu B<sub>1</sub> na Blue-Sepharose
5. Chromatografia powinowactwa na Con A-Sepharose
6. Chromatogniskowanie na PBE 94  
(zebrano 4 podfrakcje arylosulfatazy B<sub>1</sub>: B<sub>1</sub> I, B<sub>1</sub> II  
B<sub>1</sub> III, B<sub>1</sub> IV )
7. Ultrafiltracja

#### II. Etapy preparatyki arylosulfatazy A (ASA) z wątroby wołowej

1. Homogenizacja tkanki
2. Frakcjonowanie acetonem białek ekstraktu tkankowego
3. Chromatografia powinowactwa na Blue-Sepharose  
(rozdziął nieadsorbującą się ASA od adsorbującej się ASB)
4. Chromatografia jonowymienna na DEAE-celulozie
5. Chromatografia powinowactwa na Con A-Sepharose
6. Chromatografia hydrofobowa na fenylo-Sepharose
7. Chromatografia jonowymienna na DEAE-celulozie
8. Ultrafiltracja

III. Arylosulfatazę A i B z łożyska ludzkiego oczyszczano jak arylosulfatazę A z wątroby wołowej, kończąc proces chromatografią na Con A-Sepharose.

### 3.2. Oczyszczenie arylosulfatazy B z nerek wołowych i arylosulfatazy A z wątroby wołowej

Chromatografia białek ekstraktu wątroby i nerek wołowych na DEAE-celulozie w pH=7.2 pozwala na rozdzielenie trzech szczytów aktywności arylosulfatazowej [Rys.9]. Pierwszy z nich to zasadowa frakcja arylosulfatazy B (B<sub>1</sub>), która nie wiąże się na tym anionicie. Frakcja ASB o bardziej kwaśnym punkcie izoelektrycznym (B<sub>2</sub>), słabo zaadsorbowana na kolumnie, eluuje się roztworami o niskim stężeniu NaCl. Elucja najsilniej związanej arylosulfatazy A następuje dopiero pod wpływem ok. 0.2M roztworu NaCl.

Stosując chromatografię na DEAE-celulozie jako pierwszy etap oczyszczania arylosulfatazy B z nerek wołowych, otrzymano zasadową frakcję enzymu (B<sub>1</sub>) w buforze startowym (20mM Tris-HCl, pH=7.2). Umożliwiło to bezpośrednie naniesienie preparatu arylosulfatazy B<sub>1</sub> (po doprowadzeniu pH do 6.0) na kolumnę Blue-sefarozy, bez potrzeby dokonywania dializy. Oczyszczany enzym związał się na kolumnie i został wyeluowany 0.5M roztworem NaCl. Uzyskany preparat arylosulfatazy B<sub>1</sub> zawierał NaCl, co nie przeszkadzało w naniesieniu go na kolumnę konkanawalina A-sefarozy, po uprzednim doprowadzeniu pH preparatu do 6.0, dodaniu chlorku manganu, wapnia, magnezu i rozcieńczeniu do osiągnięcia 0.3M stężenia NaCl. Zaadsorbowany na kolumnie enzym wyeluowano 15%  $\alpha$ -metyloglukozydem, a następnie zagęszczono z wymianą buforu na 20mM Tris-HCl, pH=7.2. Otrzymany preparat ASB<sub>1</sub> posiadał aktywność specyficzną 11.38 U / mg białka.

Preparat ten poddano następnie chromatogniskowaniu na żelu PBE 94. W przypadku rozdziału o mniejszym nachyleniu gradientu pH (8.0- 4.5), uzyskano sześć wyraźnych szczytów aktywności o pI kolejno: pow.8.0, 7.46, 7.35, 7.2, 7.02, 6.72 [Rys.10]. Ponieważ gradient pH w początkowej fazie rozdziału był niestabilny, kolejną porcję preparatu B<sub>1</sub> rozdzielano stosując szerszy (9.45-4.5) i ostrzej nachylony gradient pH. W rozdziale tym uzyskano pięć podfrakcji arylosulfatazy B<sub>1</sub> o pI 8.1, 7.7,

7.6, 7.3, 6.9 [Rys.11].

Odpowiadające sobie szczyty aktywności z obu chromatogniskowań połączono otrzymując cztery preparaty oznaczone: B<sub>1</sub> I, B<sub>1</sub> II, B<sub>1</sub> III, B<sub>1</sub> IV. Aktywności specyficzne uzyskanych preparatów po zagęszczeniu wynosiły:

B<sub>1</sub> I - 6017 mU/mg białka

B<sub>1</sub> II - 2108 mU/mg białka

B<sub>1</sub> III - 2033 mU/mg białka

B<sub>1</sub> IV - 1576 mU/mg białka

Rozdziały elektroforetyczne dwu głównych preparatów - B<sub>1</sub> I i B<sub>1</sub> II - wykazują obecność dwu pasm białka o masach cząsteczkowych 58 i 54 kDa [Rys.12].

Proces oczyszczania arylosulfatazy A z ekstraktu wątroby wołowej zapoczątkowała chromatografia na Blue-sefarozie, na której adsorpcji ulegają wszystkie formy arylosulfatazy B, w przeciwieństwie do arylosulfatazy A. Pozwoliło to na bardzo dokładne i szybkie rozdzielenie obu tych enzymów. Frakcję nie adsorbującą się na kolumnie, zawierającą ASA naniesiono następnie na kolumnę DEAE-celulozy, po czym zaadsorbowany enzym wyeluowano 0.3M roztworem NaCl. Podobnie jak w procesie oczyszczenia arylosulfatazy B, obecność NaCl w preparacie enzymu nie przeszkadzała w naniesieniu go na kolumnę Con A-sefarozy. W preparacie ASA po tej chromatografii, zawierającym 15%  $\alpha$ -metyloglukozyd, zwiększono stężenie NaCl do 3M i naniesiono bezpośrednio na kolumnę fenylo-sefarozy [Rys.13]. Arylosulfataza A dosyć silnie wiąże się z tym nośnikiem, ulegając elucji dopiero pod wpływem ok. 20% glikolu etylenowego. Ostateczne oczyszczenie uzyskano, dokonując powtórnej chromatografii na DEAE-celulozie, co umożliwiło jednoczesne pozbycie się glikolu etylenowego z preparatu enzymu. Wyeluowane roztworem NaCl, aktywne frakcje zagęszczono z wymianą buforu na 20mM Tris-HCl, pH=7.2, uzyskując preparat arylosulfatazy A o aktywności specyficznej 45540 mU/mg białka.

Elektroforeza w SDS, w warunkach nieredukujących ujawnia obecność dwu głównych pasm białek o masach cząsteczkowych 72.5



i 58.5 kDa [Rys.14].

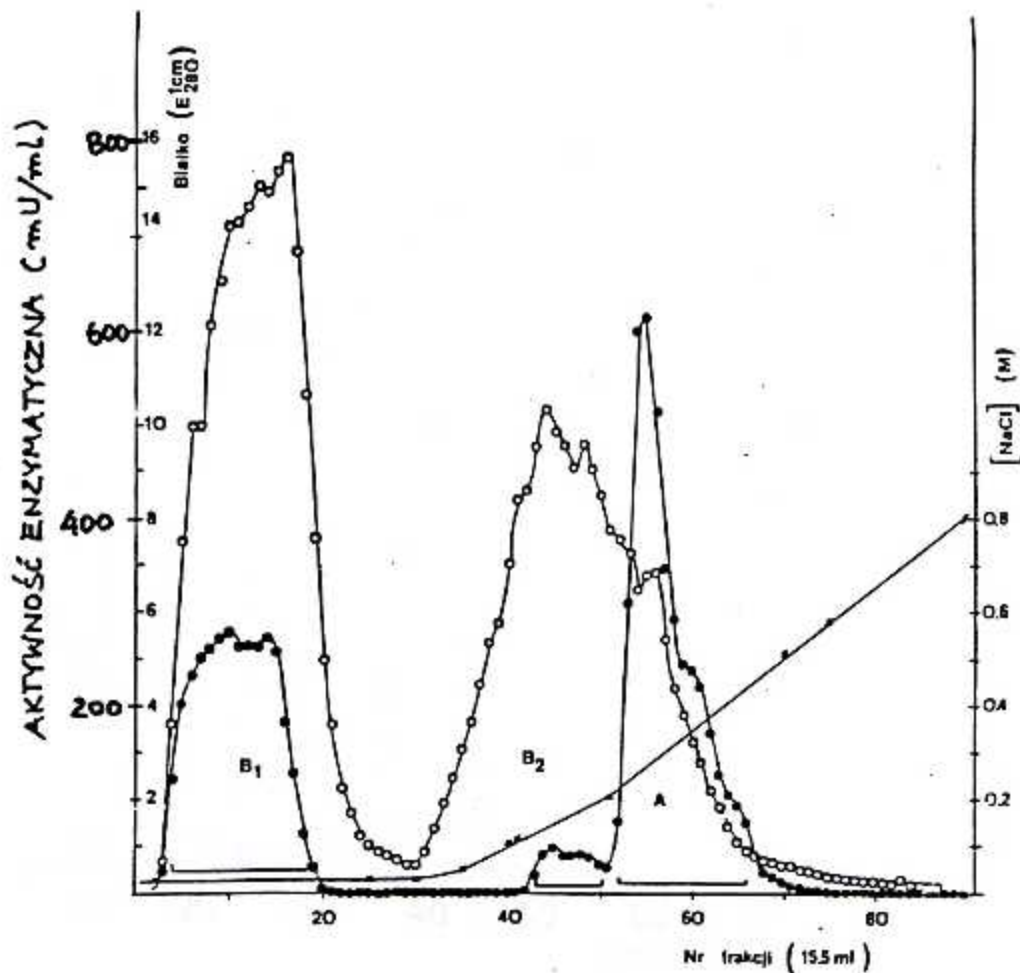
Nieco odmienny jest obraz elektroforezy w warunkach redukujących, który wykazuje obecność dodatkowych pasm białka o masach cząsteczkowych 68, 58.5, 52.5 kDa [Rys.14].

### 3.3. Uzyskanie przeciwciał poliklonalnych przeciwko wysokooczyszczonym preparatom arylosulfataz wołowych

Królika nr 1 immunizowano preparatem zasadowej formy arylosulfatazy B (Ba I) o stężeniu białka 330  $\mu\text{g/ml}$ . Po podaniu w trzech kolejnych iniekcjach 610  $\mu\text{g}$  białka, surowicę krwi królika poddano kontroli na obecność specyficznych przeciwciał. Wykonano próbne miareczkowania immunologiczne arylosulfatazy Ba I ( $A = 1524 \text{ mU/ml}$ ), które wykazały niskie miano specyficznych przeciwciał w antysurowicy. Trzykrotnie rozcieńczona antysurowica precypitowała jedynie 5% aktywności wobec kontroli, w warunkach standardowo przeprowadzonego miareczkowania (patrz p. 2.3.9.). W związku z tym dokonano jeszcze dwu iniekcji antygeny, podając łącznie 627  $\mu\text{g}$  białka. Kolejne miareczkowania kontrolne, wykonane antysurowicą pobraną dwa tygodnie od ostatniej iniekcji antygeny wykazały wysokie miano specyficznych przeciwciał. Miareczkowanie preparatu Ba I o aktywności 760  $\text{mU/ml}$  antysurowicą rozcieńczoną 6 i 48 razy powodowało precypitację odpowiednio 100% i 49% aktywności enzymatycznej porównywanej względem próby kontrolnej. Uzyskane miano przeciwciał uznano za wystarczające.

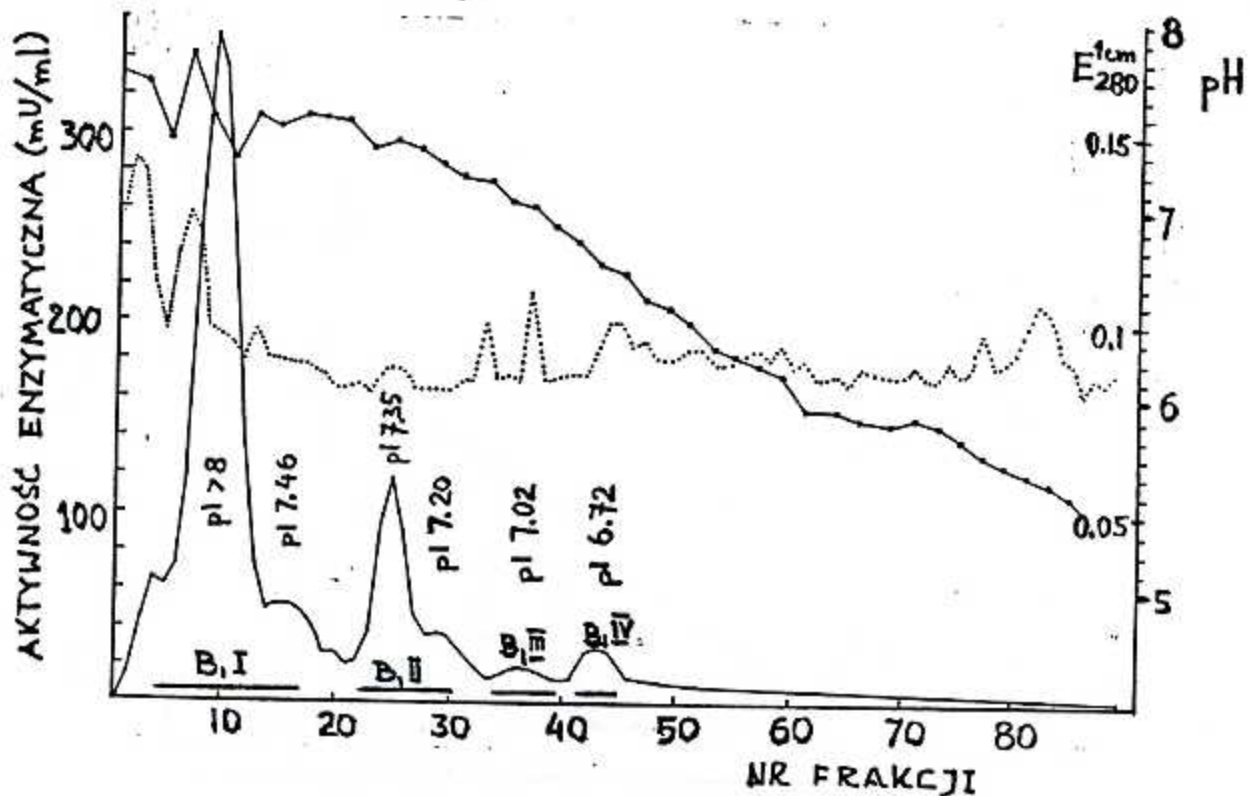
Po wydzieleniu antysurowicy z 40ml krwi królika, oczyszczono z niej immunoglobuliny G stosując chromatografię na kolumnie żelu Białko A-sefaroza [Rys.15]. Wyeluowana z kolumny frakcja IgG została zagęszczona z wymianą buforu na 20mM Tris- HCl, pH=7.2. Stężenie białka w uzyskanym preparacie, nazywanym dalej IgG "anty-Ba I", wynosiło 1.74  $\text{mg/ml}$ .

Królika nr 2 immunizowano oczyszczonym preparatem arylosulfatazy A z wątroby wołowej o stężeniu białka 3.4  $\text{mg/ml}$ .



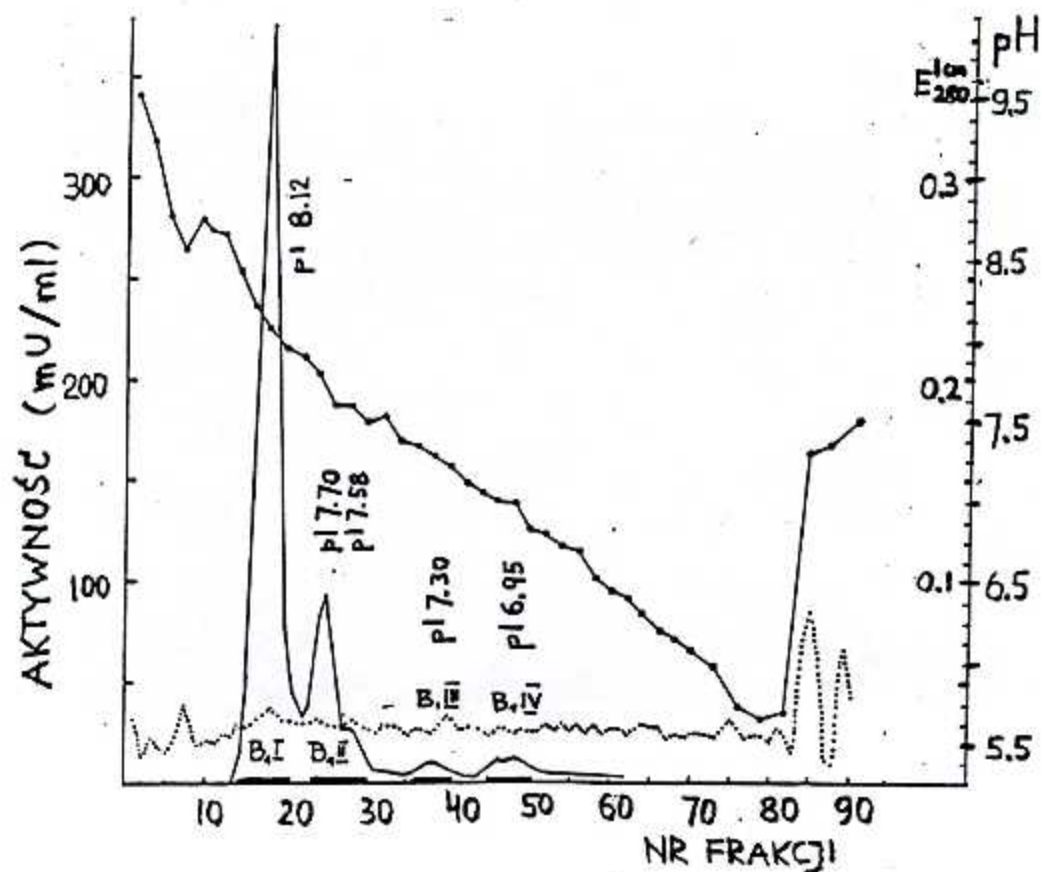
Rys.9. Rozdział chromatograficzny arylosulfataz z ekstraktu wątroby wołowej na kolumnie DEAE-celulozy

Kolumnę jonitu (5,5 x 11cm) zrównoważono 25mM buforem startowym Tris-HCl, pH=7.2. Naniesiono 135ml ekstraktu, elucję prowadzono buforem startowym a następnie zwiększając liniowo stężenie NaCl (-x-). Zbierano frakcje o objętości 15,5ml i w każdej oznaczono aktywność arylosulfatazowa (-●-) oraz zawartość białka wyrażoną jako E<sub>280</sub> (-o-).



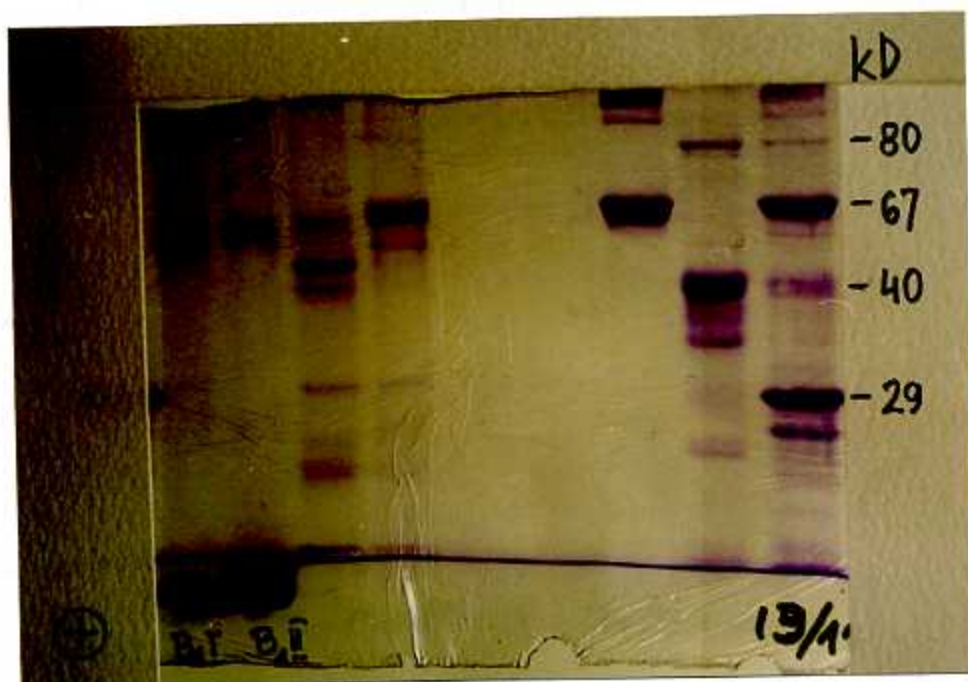
Rys.10. Rozdział izoform arylosulfatazy Ba metoda chromatografii ogniskowania na kolumnie PBE 94

Na kolumnę (0,9 x 35cm) zrównoważoną 25mM buforem imidazol-HCl, pH=7.9 naniesiono częściowo oczyszczony enzym Ba. Elucję prowadzono stosując gradient pH (-.-) generowany przez rozcieńczony Polybuffer 74/Polybuffer 96, pH=4.5. W zebranych frakcjach oznaczono aktywność arylosulfatazową (—) i białko jako E280 (....).



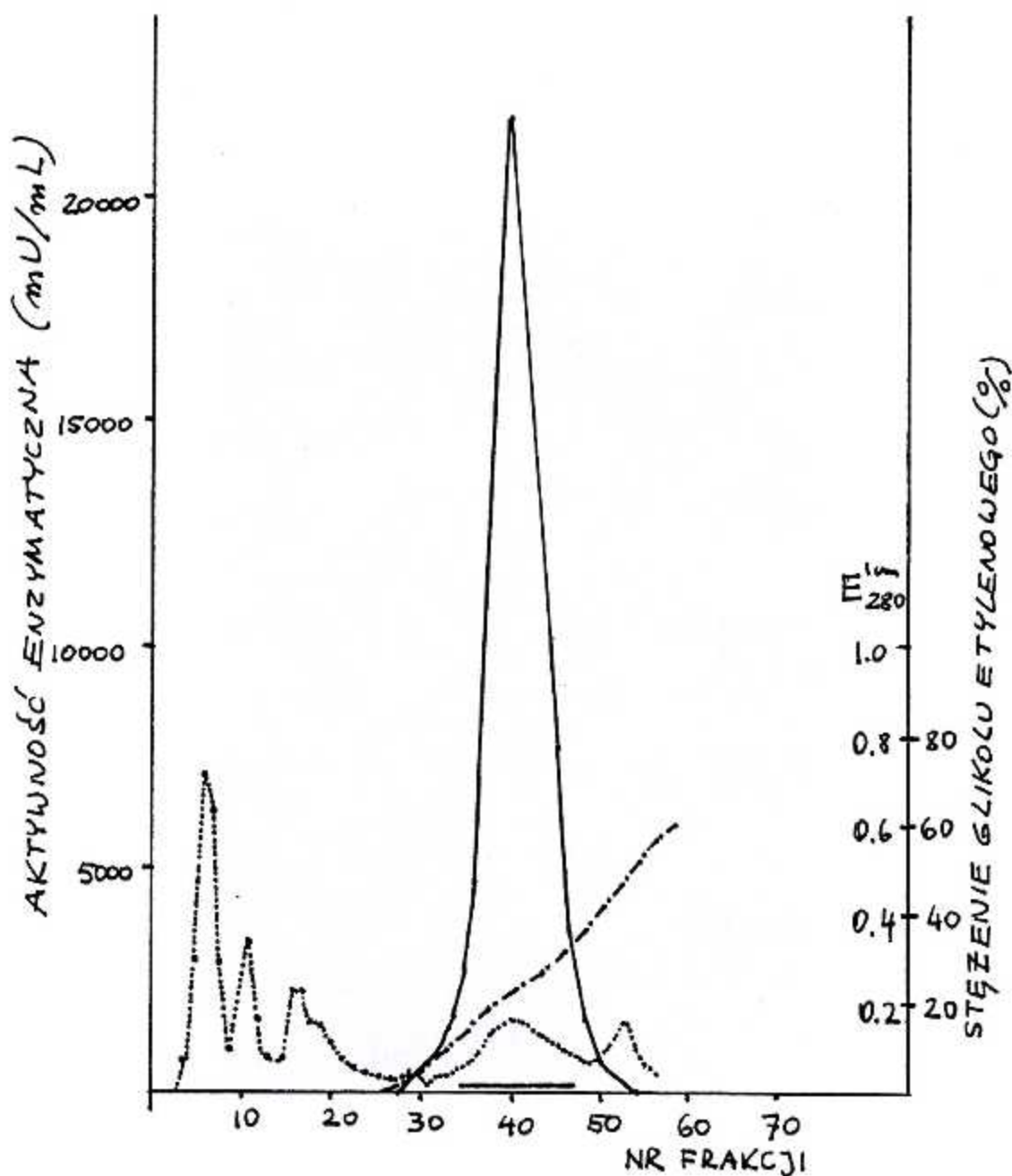
Rys.11. Chromatoogniskowanie arylosulfatazy B<sub>1</sub> na kolumnie PBE 94

Kolumnę (jak w opisie do Rys.10) zrównoważono 25mM buforem etanoloamina-octan, pH=9.25 i po naniesieniu preparatu enzymu B<sub>1</sub> elucję prowadzono rozcieńczonym Polybuffer 96, pH=5.5. Oznaczenia jak na Rys.10.



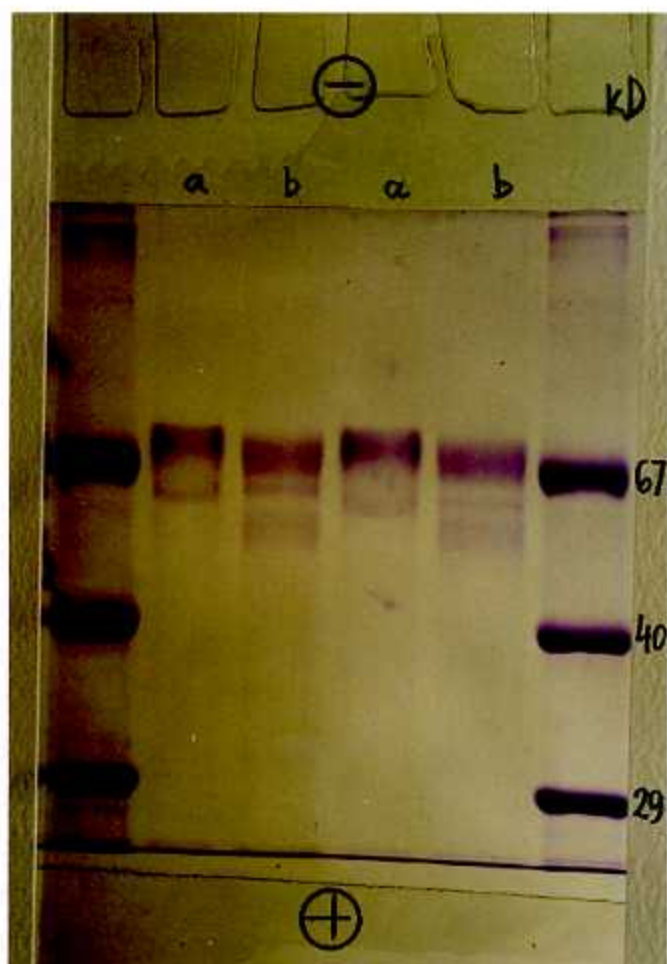
Rys.12. Obraz elektroforetyczny oczyszczonych preparatów arylosulfataz Ba I, Ba II.

Rozdział prowadzono w 12.5% żelu poliakrylamidowym w obecności SDS. Białko wybarwiono błękitem R-250.



Rys.13. Chromatografia hydrofobowa arylosulfatazy A na kolumnie fenylo-sefarozy CL-4B

Na kolumnę żelu (2 x 10cm), zrównoważoną 50mM Tris-HCl, zawierającym 3M NaCl, pH=7.2, naniesiono częściowo oczyszczony preparat ASA. Elucję prowadzono zmniejszając skokowo stężenie NaCl i na koniec glikolem etylenowym (-.-). W zebranych frakcjach oznaczono aktywność (—) i zawartość białka (...).



Rys.14. Obraz elektroforetyczny oczyszczonych preparatów  
 wołowej arylosulfatazy A

Rozdział prowadzono w 10.5% żelu poliakrylamidowym z SDS.  
 a) enzym nie zredukowany b) enzym zredukowany.

Całkowita ilość antygeny, podana w trzech kolejnych iniekcjach wynosiła 3.57 mg. Po podaniu dwu dawek antygeny wykonano kontrolne miareczkowania immunologiczne antysurowicą krwi pobranej od królika. Wykazały one wysokie miano specyficznych przeciwciał w antysurowicy, która rozcieńczona 48 razy, precypitowała 90% aktywności użytego do standardowego miareczkowania preparatu arylosulfatazy A wątroby wołowej o aktywności 598 mU/ml.

Dwa tygodnie po trzecim podaniu antygeny pobrano od królika dwukrotnie po 20ml krwi. Wyizolowaną antysurowicę poddano chromatografii na kolumnie białko A-sefaroza, otrzymując preparat IgG anty-arylosulfataza A z wątroby wołowej o stężeniu białka 2.45 mg/ml, nazywany dalej IgG "anty-ASA".

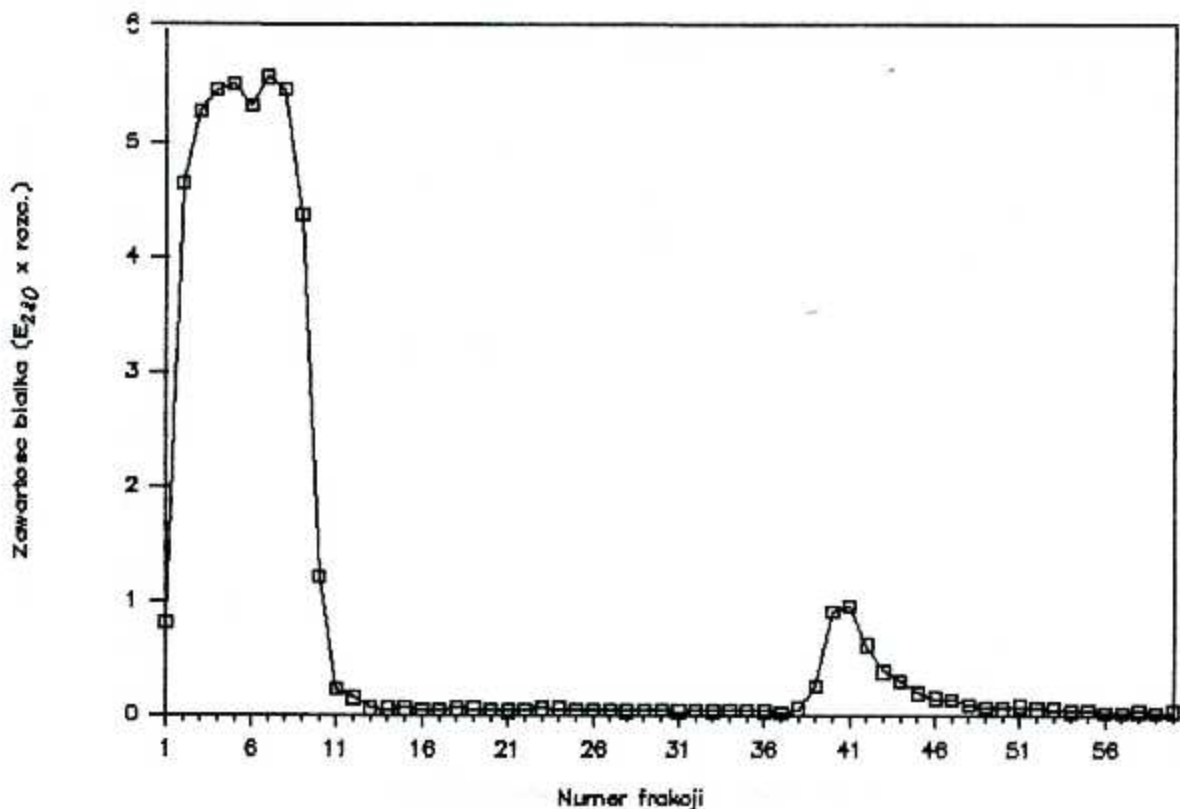
#### 3.4. Miareczkowania immunologiczne preparatów arylosulfataz przeciwciałami "anty-ASB<sub>1</sub> I" i "anty-ASA"

Antysurowica skierowana przeciwko zasadowej frakcji arylosulfatazy B (B<sub>1</sub> I) z nerek wołowych, nie precypitowała aktywności arylosulfatazy A z wątroby wołowej [Rys.16].

Oczyszczonymi immunoglobulinami G "anty-ASB<sub>1</sub> I" zmiareczkowano wszystkie formy ASB z nerek wołowych, wydzielone w procesie chromatogniskowania (B<sub>1</sub> I, B<sub>1</sub> II, B<sub>1</sub> III, B<sub>1</sub> IV). Krzywe miareczkowania wykazują prawie identyczny przebieg, z niewielkimi odchyleniami w granicach błędu [Rys.17]. Kontrolne immunoglobuliny G nie precypitowały aktywności enzymatycznej tych preparatów (dane nie zobrazowane na rysunku).

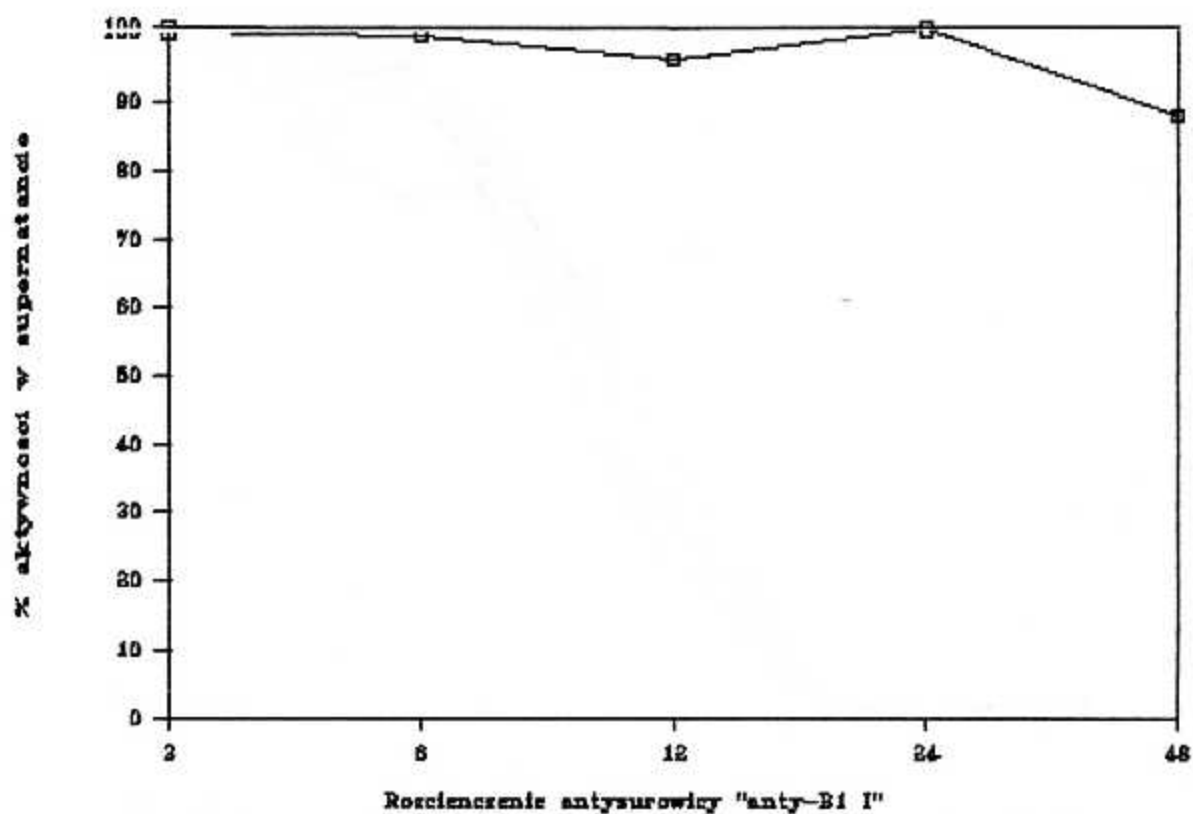
IgG "anty-ASB<sub>1</sub> I" użyto także do miareczkowań preparatów arylosulfataz B wyizolowanych z łożyska ludzkiego, wątroby szczura, wątroby gołębia i wątroby minoga. Wyniki miareczkowań preparatów tych enzymów porównywano z wynikami miareczkowania preparatu wołowej arylosulfatazy B<sub>1</sub> I lub B<sub>1</sub> II, o takiej samej aktywności.





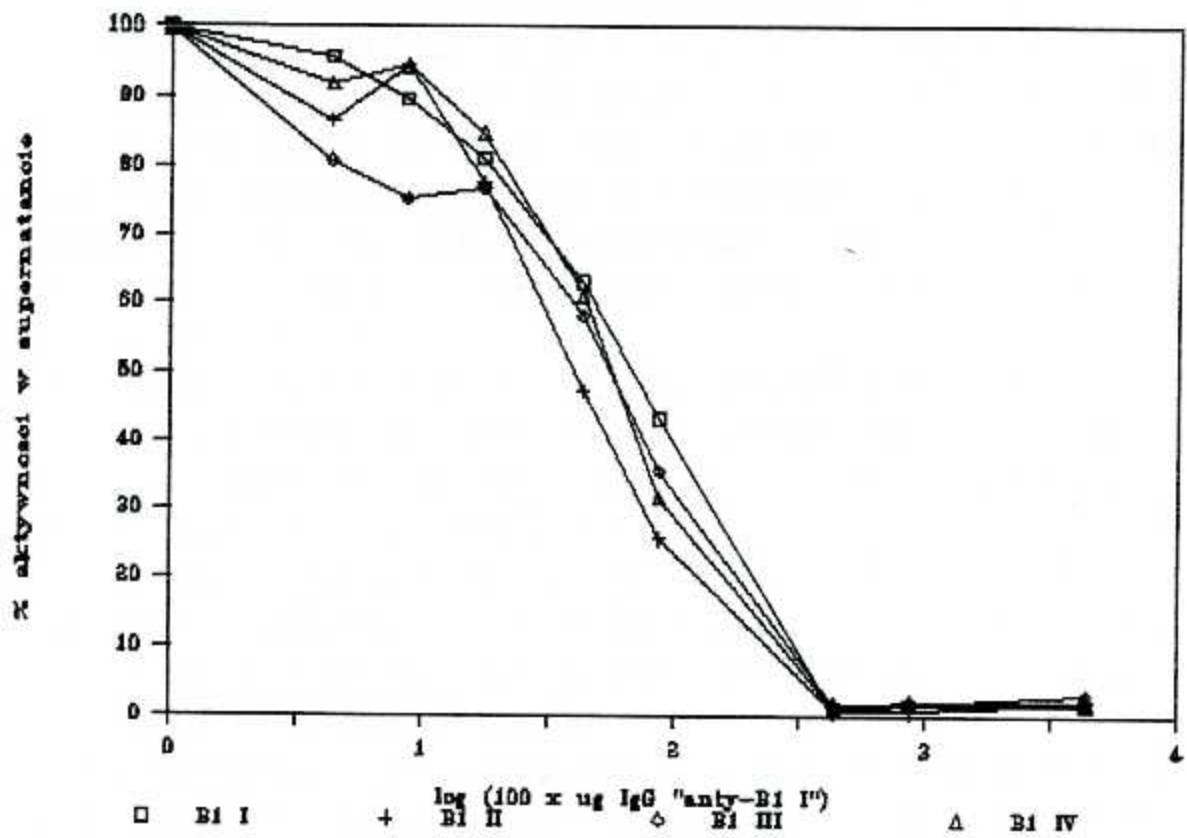
Rys.15. Przykład oczyszczania immunoglobulin G na kolumnie Białko A-sefaroza

Na kolumnę (10ml żelu), zrównoważoną 100mM buforem Tris-HCl, pH=8.0 naniesiomo 2.5ml antysurowicy "anty B<sub>1</sub> I". Kolumnę przemyto buforem startowym (10 obj.), 10-krotnie rozcieńczonym buforem startowym (10 obj.), po czym zaadsorbowane IgG eluowano 100mM buforem glicyna-HCl, pH=3.0. Białko w eluacie oznaczono metodą Bradforda.



Rys.16. Immunomiareczkowanie oczyszczonej ASA wołowej przeciwciałami "anty-B<sub>1</sub> I"

Należy zwrócić uwagę, że stężenie przeciwciał w próbie przedstawiono w postaci logarytmicznej, aby uzyskać większą zawartość wykresu.



Rys.17. Miareczkowanie izoform arylosulfatazy Ba przeciwciałami "anty-Ba I"

Krzywe miareczkowania dla ASB szczurzej i wołowej wskazują na duże podobieństwo immunologiczne obu enzymów [Rys.18]. 43.5  $\mu\text{g}$  IgG "anty-ASB<sub>1</sub> I" w próbie powodowało 100% precypitacji aktywności ASB wołowej (B<sub>1</sub> II) i 80% aktywności ASB szczurzej.

Ludzka arylosulfataza B przejawia zdecydowanie mniejsze podobieństwo immunologiczne do enzymu wołowego (B<sub>1</sub> II). IgG "anty-B<sub>1</sub> I" w ilości 17.4  $\mu\text{g}$  (wystarczającej do całkowitej precypitacji wołowego enzymu B<sub>1</sub> I) powodowały wytrącenie 25% aktywności ludzkiej ASB. Zwiększenie stężenia IgG do 87 $\mu\text{g}$ /próbę spowodowało wytrącenie około 42% aktywności ludzkiej ASB [Rys.19].

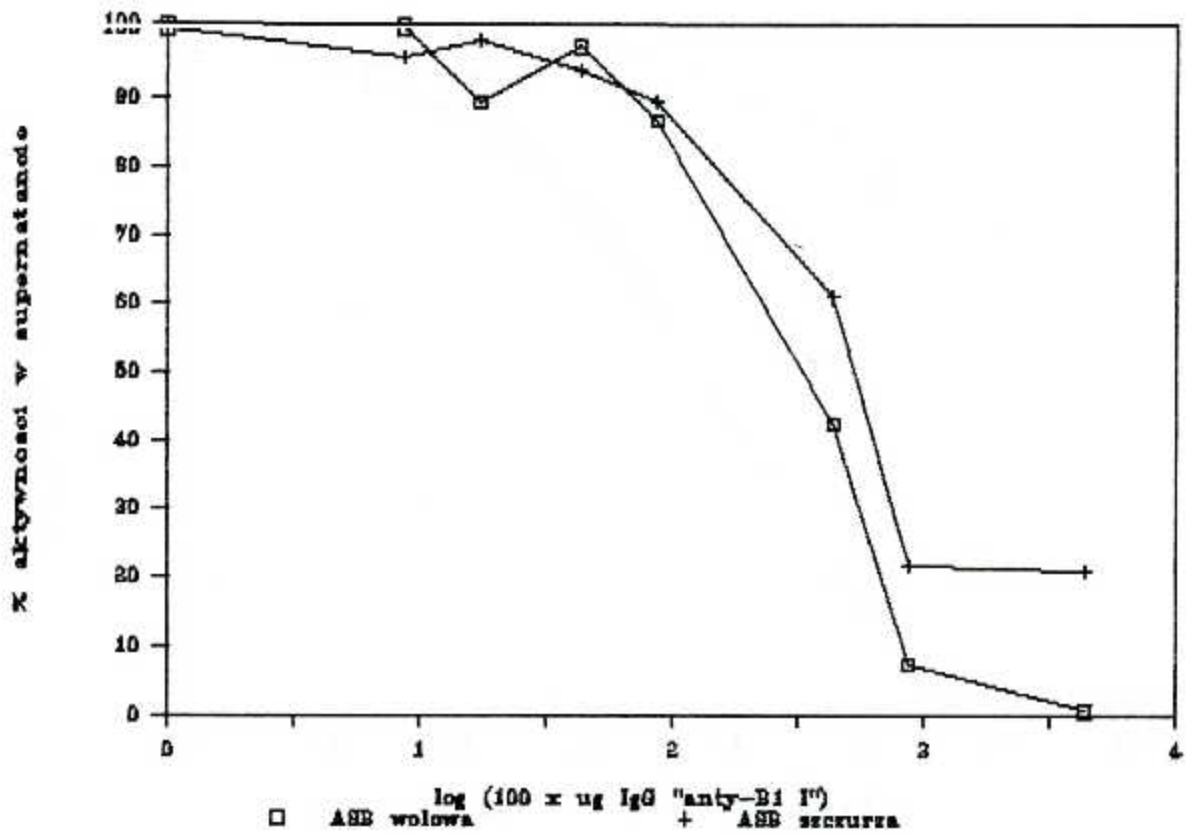
W zakresie zastosowanych w próbach stężeń IgG "anty-B<sub>1</sub> I", nie udało się osiągnąć nawet znikomej precypitacji arylosulfatazy B z wątroby gołębia [Rys.20]. Podobny jest wynik miareczkowania arylosulfatazy B minoga: 4.25  $\mu\text{g}$  IgG "anty-ASB<sub>1</sub> I" na próbę, precypitowało 100% aktywności ASB wołowej (B<sub>1</sub> I), i zaledwie 7% ASB minoga. Nawet 10-krotne zwiększenie stężenia IgG w próbie (do 43.5 $\mu\text{g}$ ) nie spowodowało większej precypitacji enzymu minoga jak 11% [Rys.21].

Immunoglobulin G "anty-ASA" użyto do miareczkowań arylosulfataz A wyizolowanych z wątroby ludzkiej, owczej, wieprzowej i arylosulfatazy B z wątroby gołębia. Wyniki tych miareczkowań porównywano z wynikami miareczkowania właściwego dla stosowanych przeciwciał antygeny (ASA z wątroby wołowej).

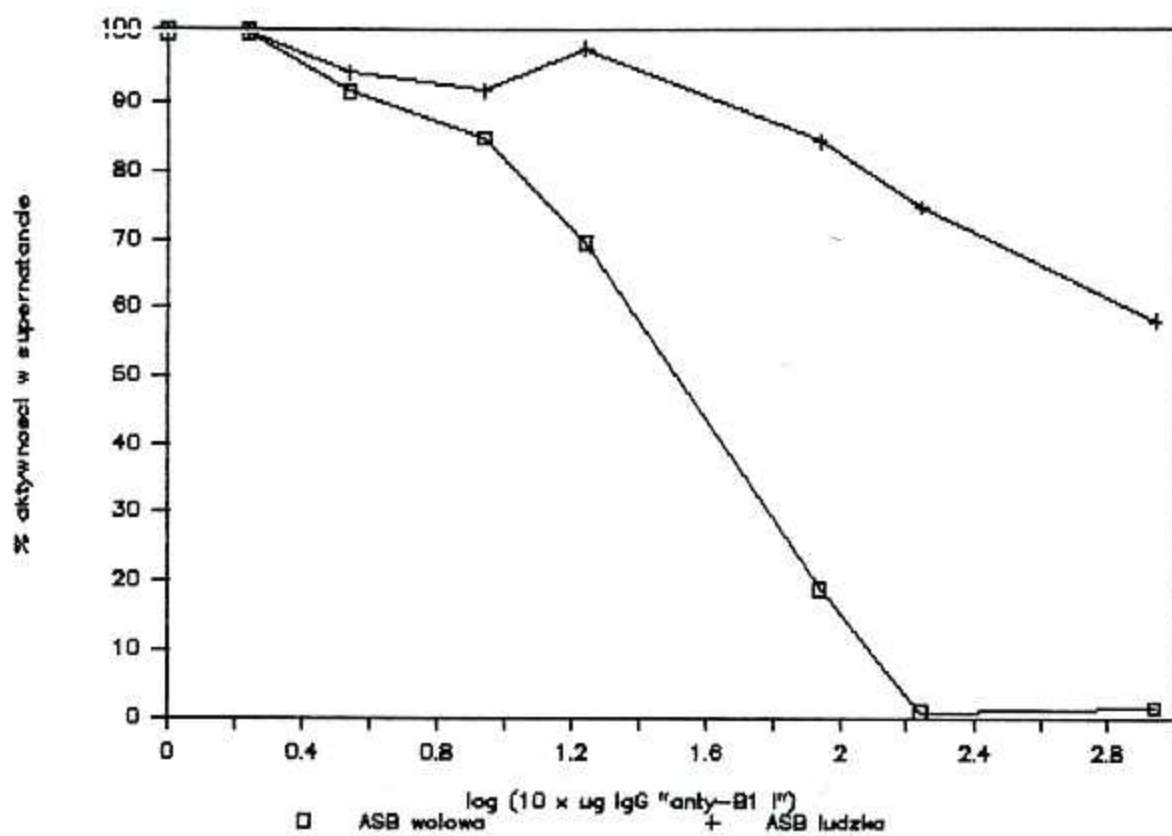
Miareczkowanie owczej ASA na tle miareczkowania ASA wołowej wykazało całkowite podobieństwo immunologiczne obu enzymów [Rys.22].

Przebieg krzywej miareczkowania ASA wieprzowej nieznacznie tylko odbiega od krzywej uzyskanej dla enzymu wołowego [Rys.23]. 6.1  $\mu\text{g}$  przeciwciał w próbie precypitowało 100% aktywności ASA wołowej i 97% aktywności enzymu wieprzowego.

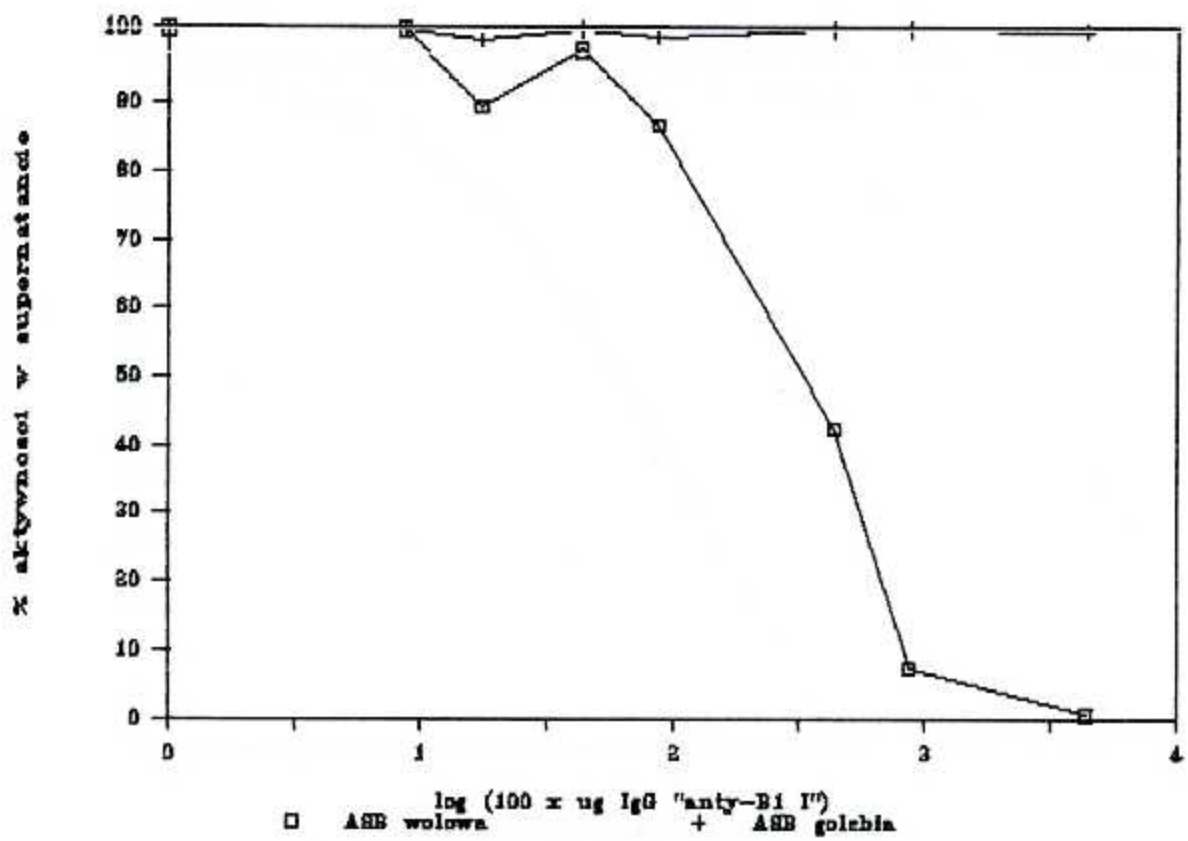
IgG "anty-ASA" znacznie słabiej wiąże się z ludzką arylosulfatazą A. Podczas gdy aktywność ASA wołowej precypitowana jest niemal całkowicie (99%), to w tych samych warunkach wytrąca się tylko 20% aktywności ludzkiego enzymu [Rys.24].



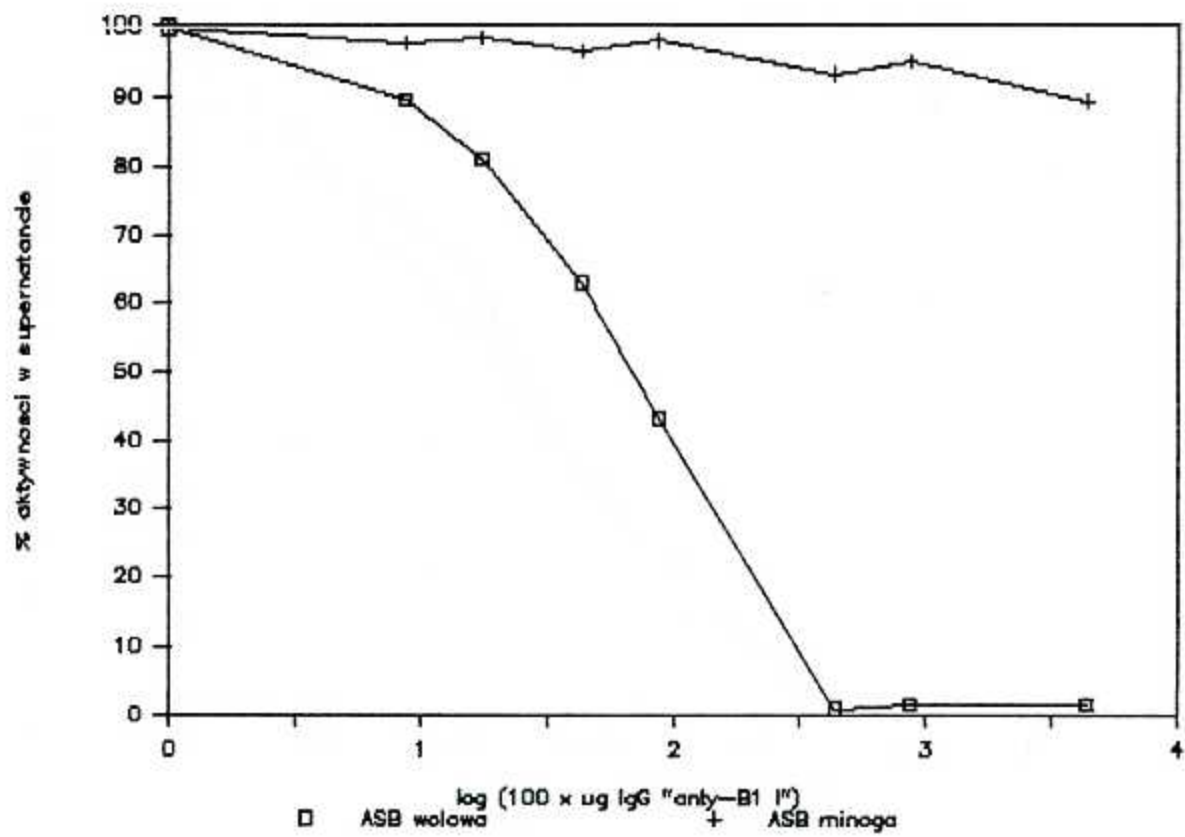
Rys.18. Immunomiareczkowanie szczurzej arylosulfatazy B przeciwciałami "anty-B1 I"



Rys.19. Immunoinaciekowanie ludzkiej arylosulfatazy B przeciwciałami "anty-B<sub>1</sub> I"

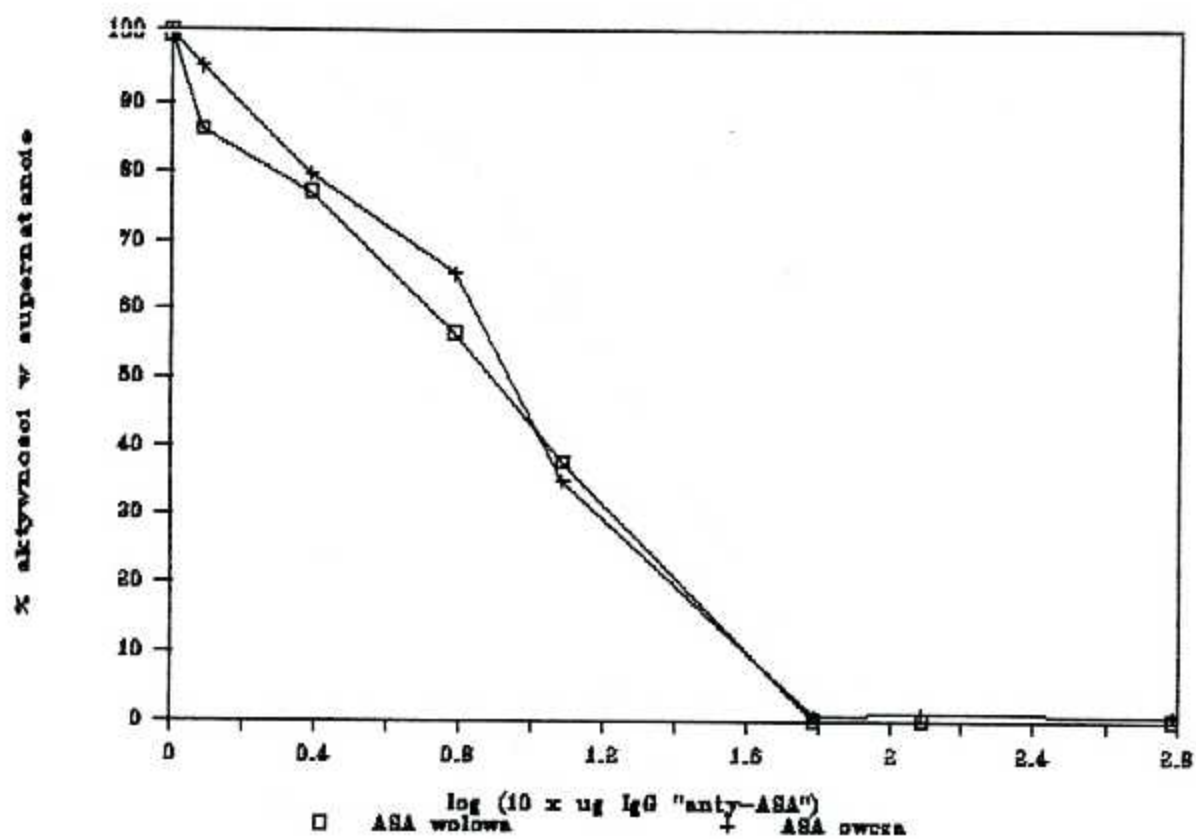


Rys.20. Immunomiareczkowanie arylosulfatazy B gołębia przeciwciałami "anty-B<sub>1</sub> I"

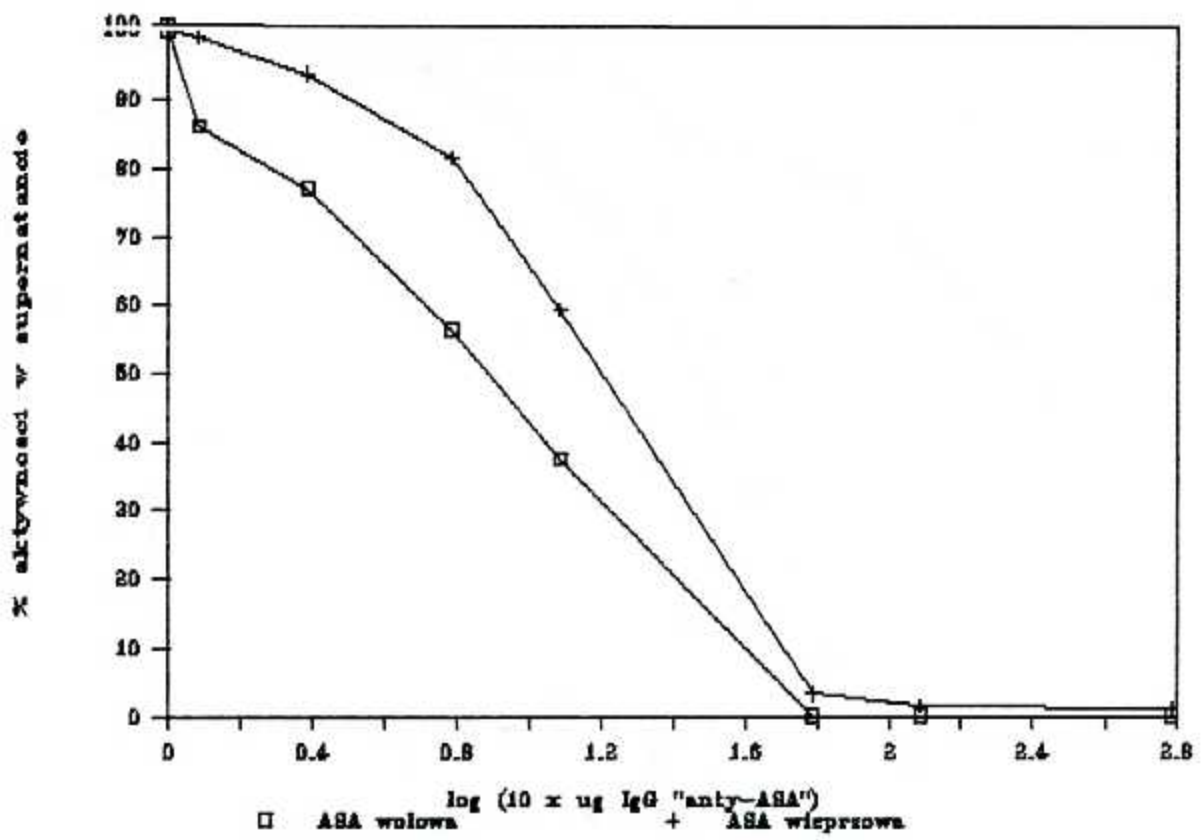


Rys.21. Immunomiareczkowanie arylosulfatazy B minoga przeciwciałami "anty-B<sub>1</sub> I"

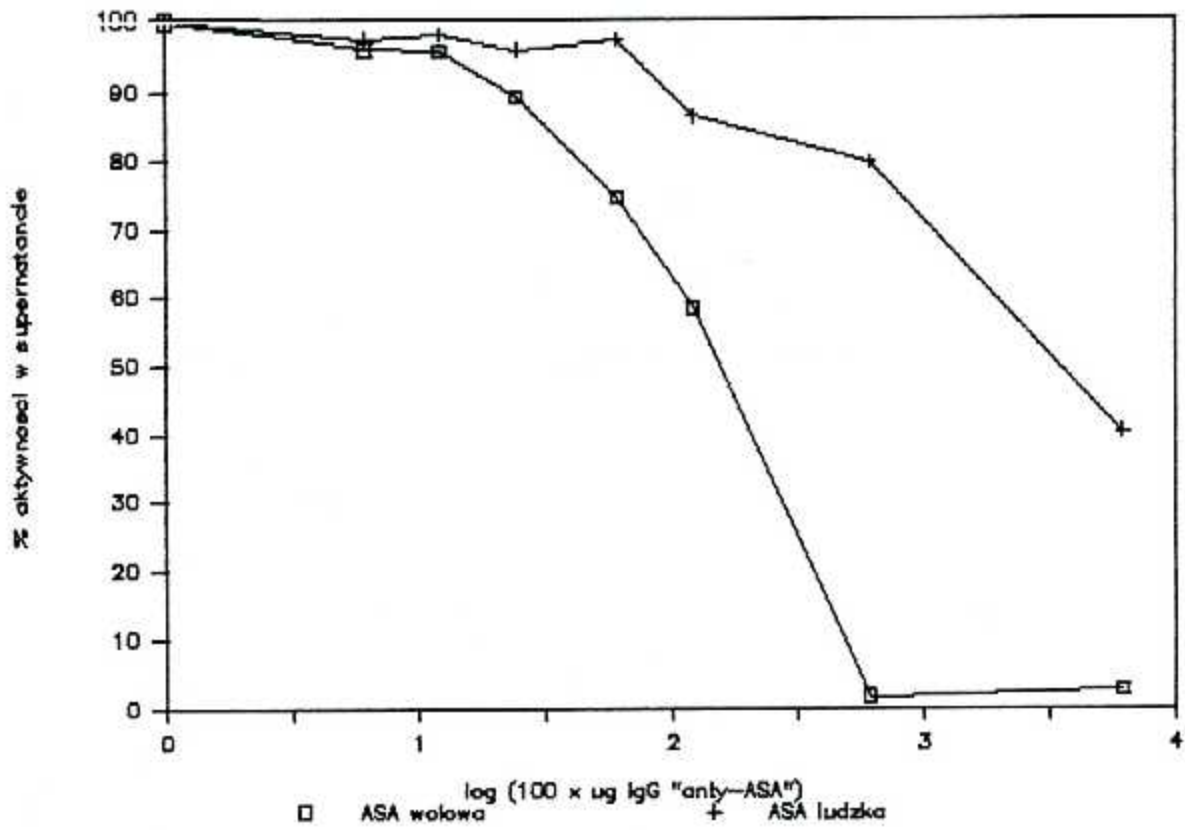




Rys.22. Immunomiareczkowanie owczej arylosulfatazy A przeciwciałami "anty-ASA"

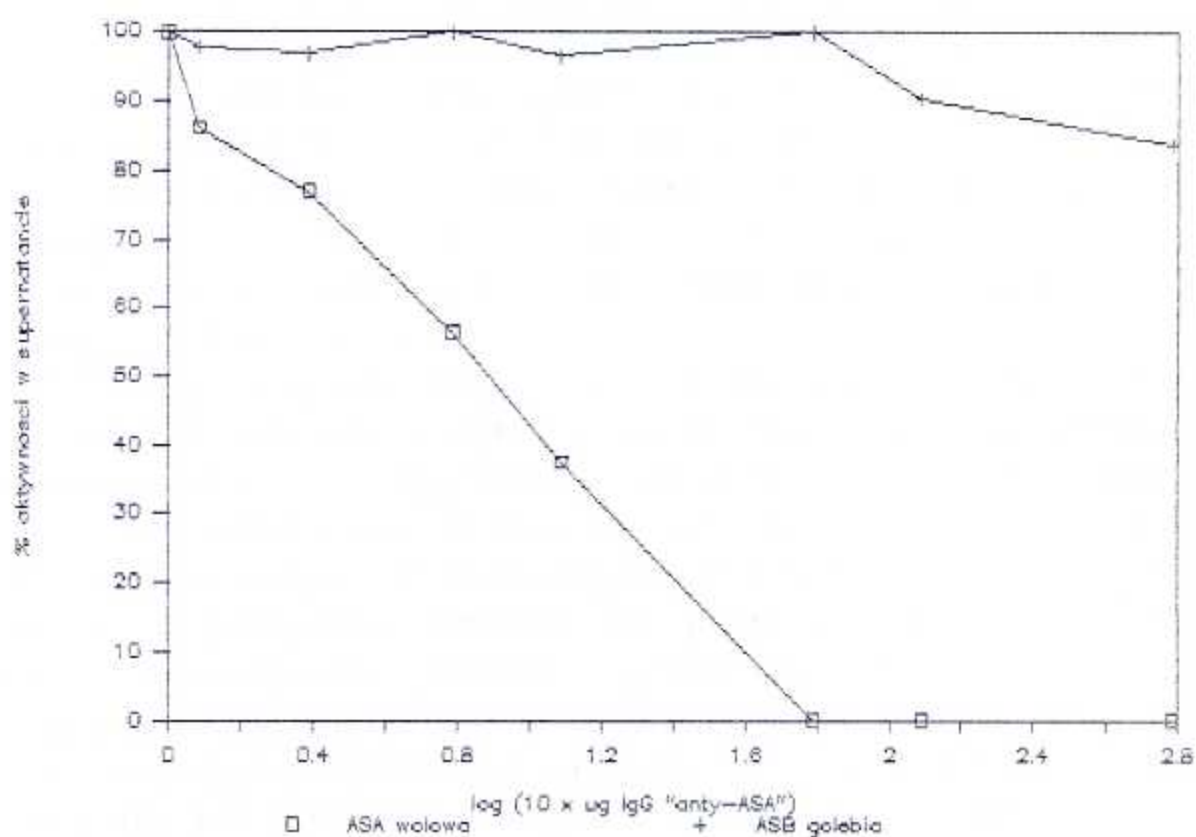


Rys.23. Immunomiareczkowanie wieprzowej arylosulfatazy A przeciwciałami "anti-ASA"



Rys.24. Immunoinaciekowanie ludzkiej arylosulfatazy A przeciwciałami "anty-ASA"

Arylosulfataza B gołębia, nie reagująca zupełnie z IgG "anty-B<sub>1</sub> I, wykazała nieoczekiwanie słabą tendencję do wiązania się z przeciwciałami "anty-ASA" (16% precypitacji aktywności przy stężeniu IgG 61  $\mu$ g w próbce) [Rys.25]. Wynik ten może być jednak artefaktem i wymaga weryfikacji.



Rys.25. Immunomiareczkowanie arylosulfatazy B gołębia przeciwciałami "anty-ASA"

#### 4. D Y S K U S J A

Lizosomalne arylosulfatazy typu II z tkanek ssaków występują w postaci dwu podstawowych enzymów A i B, pełniących odmienne funkcje fizjologiczne. Obie te arylosulfatazy można rozdzielić metodami chromatografii jonowymiennej na DEAE- lub TEAE-celulozie, albo metodą chromatografii powinowactwa na Blue-sefariozie (6,42) [Rys.9]. Do wielu badań enzymologicznych konieczne jest uzyskanie jednorodnych lub wysokooczyszczonych preparatów enzymów. Oczyszczanie arylosulfataz (zwłaszcza enzymów B) jest procedurą wyjątkowo trudną i pracochłonna. Trudności te są spowodowane a) podobnymi właściwościami wielu enzymów lizosomalnych, które trudno od siebie rozdzielić oraz b) występowaniem wielorakich form molekularnych tego samego enzymu lub izoenzymów, co jest często określane terminem - heterogenność molekularna. Kluczem do zrozumienia tego zjawiska są procesy biosyntezy, transportu i dojrzewania enzymów lizosomalnych (31).

Synteza polipeptydu enzymu lizosomalnego zachodzi na poli-rybosomach szorstkiego retikulum endoplazmatycznego. Za sprawą N-końcowej sekwencji sygnałowej, cząsteczka syntetyzowanego białka wprowadzana jest do światła retikulum, gdzie podlega szeregu modyfikacjom. W pierwszym rzędzie sekwencja sygnałowa zostaje enzymatycznie odcięta od pre-proenzymu. Niektóre reszty asparaginowe białka podlegają N-glikozylacji, polegającej na przeniesieniu wysokomannozowego tetradekasacharydu z dolichylodifosfotetradekasacharydu. Oligosacharyd ten składa się z 2 reszt N-acetyloglukozoaminy, 9 reszt mannozy i 3 - glukozy. Po przeniesieniu glikozylowanego białka do części "cis" aparatu Golgiego, reszta oligosacharydowa podlega modyfikacjom, polegającym na enzymatycznym odcięciu 3 reszt glukozy, 3 reszt mannozy i fosforylacji jednej lub dwu terminalnych reszt mannozy.

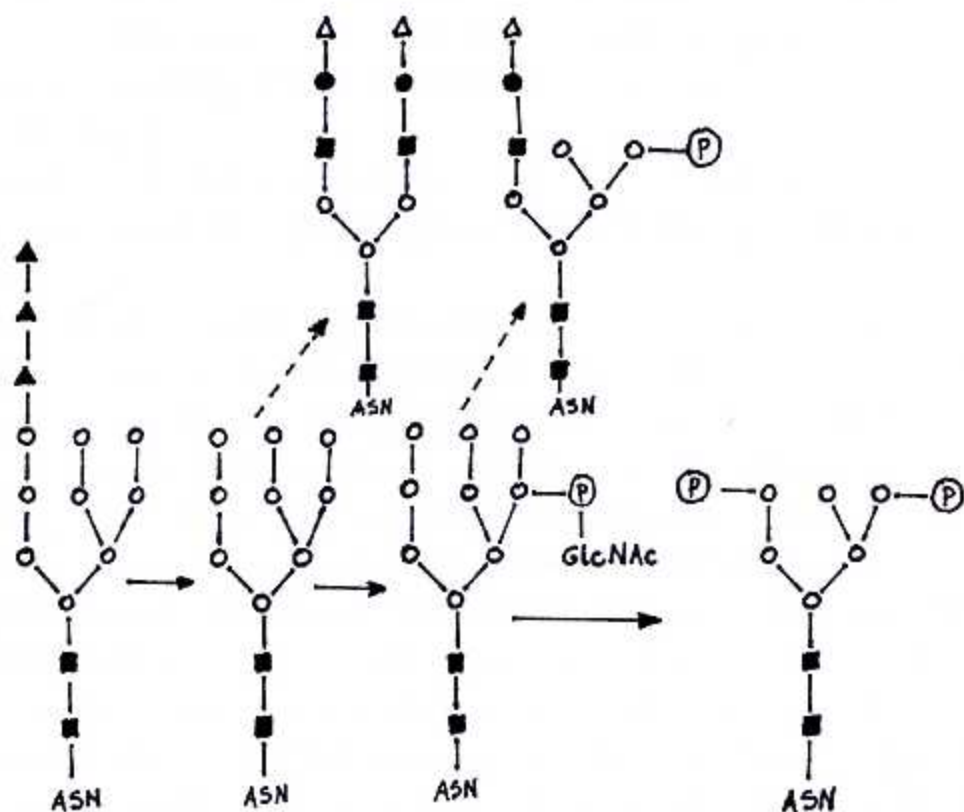
Fosforylacja reszt mannozy jest procesem dwuetapowym. W pierwszym etapie następuje przeniesienie reszty N-acetyloglukozoamino-1-fosforanu z UDP na resztę mannozy, z wytworzeniem wiązania fosfodwuestrowego między szóstym węglem mannozy a pierwszym węglem N-acetyloglukozoaminy. Reakcja ta jest

katalizowana przez specyficzną fosfotransferazę, która aktywna jest jedynie wobec oligosacharydów związanych z enzymami lizosomalnymi. W drugim etapie, glikozydaza fosfodiesterowa odszczepia N-acetyloglukozaminę, pozostawiając resztę fosforanową związaną z oligosacharydem w postaci reszty mannozo-6-fosforanu. Nie jest to jednak jedyny sposób modyfikacji pierwotnego tetradekasacharydu wysokomannozowego, przeniesionego na enzym lizosomalny (31). Pozostałe modele modyfikacji tego oligosacharydu przedstawiono schematycznie na Rys.26. Efektem tych reakcji jest wytworzenie struktury, spełniającej rolę specyficznego znacznika, niezbędnego dla właściwego "sortowania" w obrębie aparatu Golgiego białek o przeznaczeniu lizosomalnym oraz ich transportu do struktury docelowej.

Obecne w błonie aparatu Golgiego receptory 6-fosfomannozyłowe wiążą wyposażone w mannozo-6-fosforan enzymy lizosomalne. Kompleksy enzymów lizosomalnych z tymi receptorami skupiają się w pewnych miejscach błon części "trans" aparatu Golgiego. Pod wpływem białka zwanego klatryną, oddziałującego z błoną od strony cytoplazmatycznej (35), dochodzi do wpuklenia się błony i w końcu do oderwania się pęcherzyka. Zawartość opłaszczzonego pęcherzyka transportowego ulega następnie zakwaszeniu (do pH 5.0-5.5). Klatryna i receptory fosfomannozyłowe podlegają recyklingowi do błon części "trans" aparatu Golgiego. W powstałym lizosomie pierwotnym może dalej zachodzić degradacja komponent cukrowcowych hydrolaz pod wpływem kwaśnej fosfatazy i glikozydaz.

Odcięcie peptydu sygnałowego nie kończy aktów proteolitycznej obróbki hydrolaz w procesie ich dojrzewania. Często obserwowano odcinanie dalszych fragmentów łańcucha polipeptydowego tych enzymów. W przypadku niektórych hydrolaz ( np. kwaśnej fosfatazy,  $\beta$ -glukuronidazy) proces ten zachodzi jeszcze przed osiągnięciem lizosomu (31).

Opisane procesy dojrzewania cząsteczek enzymów lizosomalnych prowadzą jak widać do ich heterogenności. W tym samym czasie na terenie komórki egzystują różne formy tego samego enzymu, różniące się pod względem masy cząsteczkowej i ładunku. Za różnice w masach cząsteczkowych odpowiedzialny



Rys.26. Przypuszczalna struktura komponenty oligosacharydowej enzymów lizosomalnych - strzałki wskazują na możliwe drogi modyfikacji tego oligosacharydu

- mannoza
- N-acetyloglukozoamina
- ▲ glukoza
- galaktoza
- Δ kwas sialowy
- P fosforan
- ASN reszta asparaginy

jest głównie proces proteolitycznego dojrzewania, natomiast efekt heterogenności ładunkowej powodowany jest głównie obecnością lub brakiem grup silnie naładowanych, jak grupy fosforanowe, reszty kwasu siałowego, ale także kwaśne i zasadowe aminokwasy.

Dodatkowym zjawiskiem wprowadzającym heterogenność ładunkową hydrolaz może być też fosforylacja reszt seryny przez kinazy białkowe.

Przez długi czas podejrzewano, że izolowane formy konkretnych hydrolaz lizosomalnych są izoenzymami, będącymi produktami ekspresji różnych genów. Wśród arylosulfataz szczególnie arylosulfataza B występuje w licznych formach różniących się głównie punktem izoelektrycznym (konformery ładunkowe), ale także masą cząsteczkową. Istnieje wiele metod pomocnych w określaniu natury heterogenności enzymu. Metoda najdokładniejszą jest ustalenie i porównanie sekwencji aminokwasowych oraz składu komponenty cukrowcowej izolowanych form enzymu. Są to jednak zabiegi bardzo kosztowne, wymagające ponadto uzyskania jednorodnych preparatów określonej formy molekularnej badanego enzymu.

Metodami tańszymi stosowanymi w tego typu badaniach są metody immunologiczne. Techniki te są w ostatnich latach coraz powszechniej stosowane w badaniach nad heterogennością enzymów lizosomalnych. W 1987 r. Gibson i wsp. otrzymali przeciwciała monoklonalne do N-acetylogalaktozoamino-4-siarczano-sulfohydrolazy (arylosulfatazy B) z wątroby ludzkiej (23). Oczyszczone przeciwciała, związane na nośniku, posłużyły do selektywnego izolowania tego enzymu z innych tkanek ludzkich. Z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych wiąże się jednak pewne ryzyko związane z faktem, iż docelowy epitop dla przeciwciał monoklonalnych może znajdować się na zupełnie różnych białkach. W przypadku wspomnianych autorów głównym białkiem wychwytywanym z homogenatów tkanek ludzkich była ASB o masie cząsteczkowej 57 kDa, rozpadająca się w warunkach redukujących na podjednostki o masach 43 i 13 kDa. Z homogenatu tkanki płucnej przeciwciała te wychwyciły jednak także inne białka o masach 112, 105, 83, 75, 29, 27.5 kDa, których związek z ASB nie został wyjaśniony.



Uzyskanie przeciwciał poliklonalnych skierowanych przeciwko określonej formie enzymu, daje możliwość porównania strukturalnego podobieństwa wszystkich wyizolowanych form. W przypadku prowadzenia immunizacji białkiem nie zdenaturowanym uzyskać można obok przeciwciał skierowanych przeciwko epitopom sekwencyjnym, także przeciwciała rozpoznające epitopy typu konformacyjnego. Założeniem niniejszej pracy było właśnie uzyskanie przeciwciał poliklonalnych przeciwko natywnym cząsteczkom enzymów. Przebieg krzywych miareczkowania czterech wyizolowanych form arylosulfatazy B z nerek wołowych wskazuje na to, iż są one formami tego samego enzymu [Rys.17].

Ponieważ elektroforeza w SDS preparatów B<sub>I</sub> I i B<sub>I</sub> II nie wykazała różnic w masie cząsteczkowej obu form enzymu [Rys.12], sądzimy zatem, że są to konformery ładunkowe, a różnice w ich punktach izoelektrycznych spowodowane są najprawdopodobniej odmiennym składem komponenty cukrowcowej.

Stężenie białka w preparatach dwu pozostałych form ASB (B<sub>I</sub> III i B<sub>I</sub> IV) było zbyt niskie, by wykryć je elektroforetycznie i wyznaczyć ich masę cząsteczkową, ale sądzimy, że są to również konformery ładunkowe. Potwierdzenie przypuszczenia co do natury heterogenności arylosulfataz B zamierzamy uzyskać przeprowadzając badania z użyciem glikopeptydaz, odcinających komponenty cukrowcowe od polipeptydowej części enzymu.

Zastosowanie technik immunochemicznych pozwala z dużym prawdopodobieństwem różnicować izoenzymy, będące produktami różnych genów i molekularne formy tego samego enzymu, powstałe wskutek modyfikacji potranslacyjnych.

W 1985 r. Waheed, van Etten, Gieselmann i von Figura wyizolowali 5 izoenzymów (form) kwaśnej fosfatazy z tkanek ludzkich, różniących się masami cząsteczkowymi i częściowo wrażliwością na inhibitory. Przy użyciu przeciwciał poliklonalnych wykazali, że przynajmniej trzy z tych enzymów są produktami różnych genów (67).

Uzyskanie poliklonalnych przeciwciał do  $\beta$ -mannozydazy z wątroby świnki morskiej (46), pozwoliło na ustalenie jej budowy podjednostkowej. Metodą immunoblotingu wykazano, że forma enzymu o masie cząsteczkowej 150 kDa składa się z trzech podjednostek (97, 37 i 20 kDa).

Zastosowanie technik radioimmunokompetycyjnych umożliwia badanie stężenia enzymów w homogenatach tkankowych. Zespół LaRusso uzyskał przeciwciała poliklonalne do  $\beta$ -glukuronidazy i  $\beta$ -galaktozydazy z wątroby szczurzej oraz oba enzymy wyznakowane jodem radioaktywnym (72). Umożliwiło to pomiary specyficznej aktywności obu tych enzymów bezpośrednio w homogenatach różnych tkanek zwierzęcia i dało skuteczny, szybki sposób obserwacji zmian ich stężenia i aktywności.

Wielkim atutem badań prowadzonych w oparciu o przeciwciała poliklonalne jest możliwość obserwacji zmian ewolucyjnych na poziomie molekularnym, poprzez porównywanie strukturalnego podobieństwa pomiędzy homologicznymi enzymami, pochodzącymi z różnych gatunków zwierząt. U podstaw tego typu dociekań leży założenie, że geny enzymów o analogicznych funkcjach, istniejące u różnych gatunków współcześnie żyjących zwierząt, wyewoluowały z pierwotnego genu wspólnego przodka, czyli są genami homologicznymi.

Metoda immunologicznego ustalania pokrewieństwa między enzymami posiada pewne ograniczenia. Eksperymentalnie ustalono, że przeciwciała poliklonalne uzyskane do konkretnego białka precypityują zauważalnie inne białko tylko w tym przypadku, gdy zbieżność struktur pierwszorzędowych porównywanych białek jest większa od 40%. Ustalone przez grupę von Figury podobieństwo sekwencji aminokwasowych ludzkiej ASA i ASB, wynosi 28.5%. Zapewne sytuacja ma się podobnie w przypadku rozpuszczalnych arylosulfataz wołowych A i B, ponieważ nie stwierdziliśmy precypitacji aktywności wołowej ASA przeciwciałami skierowanymi przeciwko wołowej ASB [Rys.16].

Fakt ten jednocześnie sugeruje, że dyferencjacja potencjalnego genu pierwotnej sulfohydrolazy, nastąpiła bardzo dawno temu.

Pomimo ograniczonej ilości badanych gatunków zwierząt uzyskano interesujące wyniki, dotyczące podobieństwa arylosulfataz A. Wykazano, że wśród przebadanych gatunków zwierząt, największe podobieństwo strukturalne do wołowej arylosulfatazy A wykazuje homologiczny enzym owczy [Rys.22]. Nieco mniejsze podobieństwo strukturalne do enzymu wołowego ujawnia ASA wieprzowa [Rys.23]. Ludzka arylosulfataza A

przejawia zdecydowanie większą odrębność immunologiczną względem ASA wołowej [Rys.24]. Wyniki te zdają się potwierdzać na poziomie molekularnym prawidłowość współcześnie uznawanego scenariusza ewolucyjnego.

Pokrewieństwo immunologiczne arylosulfataz A różnych gatunków zwierząt było już badane przez Waheed'a, Risley'a i van Etten'a (65). Ustalili oni względny dystans immunologiczny pomiędzy arylosulfatazami A dziesięciu gatunków ssaków właściwych (Euteria), posługując się poliklonalnymi przeciwciałami uzyskanymi do arylosulfatazy A z wątroby królika. Arylosulfatazy A torbaczy oraz niższych ewolucyjnie gatunków zwierząt reagowały z tymi przeciwciałami bardzo słabo lub wcale. Dane przez nich uzyskane są zbieżne z naszymi, co do ścisłego podobieństwa strukturalnego wołowej i owczej ASA. Według tych autorów enzym ludzki jest bardziej zbliżony strukturalnie do enzymu wołowego niż wieprzowy. Takiej sugestii nie potwierdzają nasze wyniki. Być może rozbieżność ta spowodowana jest zastosowaniem ASA innego gatunku, jako enzymu odniesienia.

Dotąd brak jest danych odnośnie pokrewieństwa strukturalnego arylosulfataz B u gatunków na różnym szczeblu rozwoju ewolucyjnego. Wśród przebadanych przez nas gatunków najbardziej zbliżona immunologicznie do arylosulfatazy B wołowej okazała się ASB szczurza [Rys.18]. Zdecydowanie mniejsze podobieństwo do enzymu wołowego wykazuje ASB ludzka [Rys.19]. Bardzo słaba precypitacja arylosulfatazy B minoga, sugerować może podobieństwo sekwencji aminokwasowej między enzymem minoga i wołu na poziomie ok. 40% [Rys.21]. Najmniejsze podobieństwo strukturalne do ASB wołowej wykazała w naszych doświadczeniach ASB gołębia, nie reagując wcale z przeciwciałami "anty-E<sub>4</sub> I" [Rys.20].

Zwraca uwagę bardzo zbliżony poziom dystansu immunologicznego pomiędzy wołową i ludzką ASA oraz pomiędzy arylosulfatazami B obu gatunków. Może to świadczyć o podobnym stopniu konserwatywności obu enzymów.

Poszerzenie w najbliższej przyszłości spektrum badanych pod tym kątem gatunków zwierząt przyniesie z pewnością wiele wartościowych spostrzeżeń i przyczyni się do potwierdzenia

lansowanej w ostatnich latach teorii ewolucyjnego zegara  
białek.

## 5. S T R E S Z C Z E N I E

1. Opracowano ulepszone postępowanie prowadzące do szybkiego oczyszczenia arylosulfataz A (ASA) i B (ASB) narządów wołowych do stanu bliskiego jednorodności elektroforetycznej. Kolejne procedury chromatograficzne zostały tak dobrane, że wyeliminowana została konieczność czasochłonnego zagęszczania preparatów przez ultrafiltrację, podczas której występują znaczne straty aktywności.
2. Uzyskano specyficzne, poliklonalne przeciwciała: IgG "anty-ASA" oraz IgG "anty-B<sub>1</sub>I". Przeciwciała te wyodrębniono z surowicy i oczyszczono na kolumnie białko A-sefazy, otrzymując preparaty o wysokim mianie.
3. Miareczkowania immunologiczne wykazały bardzo wysokie podobieństwo czterech molekularnych form arylosulfatazy B. Sugeruje to silnie, że nie są to odrębne izoenzymy jak się niekiedy uważa, a najprawdopodobniej konformery ładunkowe, powstałe w wyniku procesów potranslacyjnych.
4. Stosując technikę immunomiareczkowania wykazano bardzo duże podobieństwo ASB z wątroby wołu i szczura. Ludzka ASB różniła się znacznie od ASB wołowej. Arylosulfatazy B z wątroby gołębia i minoga wykazywały brak immunologicznego podobieństwa do ASB wołowej.
5. Arylosulfataza A wołowa i owcza są immunologicznie identyczne. Wieprzowa ASA różni się bardzo nieznacznie od ASA wołowej. Świadczy to o wysokim podobieństwie strukturalnym tych trzech enzymów. Arylosulfataza A łożyska ludzkiego wykazuje znaczną odrębność immunologiczną w stosunku do enzymu wołowego.

## 7. L I T E R A T U R A

1. -----, *Polybuffer<sup>TM</sup> and Polybuffer exchangers for chromatofocusing; instructions for use*, Pharmacia F.C.
2. Baeuerle P.A., Huttner W.B., *Tyrosine sulfation is trans-Golgi-specific protein modification*, *J. Cell Biol.* 105 (1987), 2655-2664.
3. Bisaga M., *Oczyszczanie i wstępna charakterystyka sulfohydrolaz wątroby gołębia (Columba livia)*, Praca mag. (1990), UMK Toruń.
4. Błaszczyński W., Roy A., *Some properties of sulphatases B of ox brain*, *Biochim. Biophys. Acta.* 317 (1973), 164-171.
5. Błaszczyński W., Lewosz J., Leźnicki A., *Wpływ zasadowego octanu glinu i jonów siarczanowych na aktywności rozpuszczalnych sulfohydrolaz arylosiarczanów mózgu wołowego*, *Zeszyty Naukowe UMK*, 15 (1966).
6. Błaszczyński W., Leźnicki A., *Activators and inhibitors of soluble arylsulphatases from ox brain*, *Enzymologia* 33 (1967), 373-389.
7. Błaszczyński W., *Purification and separation of four soluble arylsulphatases from ox brain*, *Enzymologia* 32 (1967), 169-181.
8. Błaszczyński W., *Wpływ stężenia substratu, pH i nieorganicznych soli na aktywność rozpuszczalnych arylsulfataz mózgu wołowego*, *Zeszyty Naukowe UMK* 15 (1966), 33-45.
9. Błaszczyński W., *Arylosulfatazy układu nerwowego*, Praca hab., UMK (1970).
10. Bradford M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, *Anal. Biochem.* 72 (1976), 248-254.
11. Burstone M.S., *Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasms*, Academic Press (1962).
12. Conzelmann E., Sandhoff K., *Activator proteins for lysosomal glycolipid hydrolysis*, *Methods in Enzymology*, 138(1987), 792-815.
13. Das P.K., Bishayee S., *Differential localisation of phosphorylated and non-phosphorylated forms of arylsulfatase A in*

- lysosomes*, FEBS Letters **111** (1980), 43-47.
14. Dodgson K.S., Spencer B., *Assay of sulfatases*, Methods of Biochem. Anal. **4** (1967), 211-255.
  15. Farooqui A.A., *Evidence of an essential histidyl residue in arylsulphatase B*, Separatum Experientia **32** (1976), 1377.
  16. Farooqui A.A., *The desulphation of hexosamine sulphates by arylsulphatase B*, Experientia **32** (1976), 1242-1244.
  17. Farooqui A.A., Mandel P., *The clinical aspects of arylsulphatases*, Clin. Chim. Acta **71** (1977), 93-100.
  18. Farooqui A.A., Rabel G., Mandel P., *Sulphatide metabolism in brain*, Live Sciences **20** (1977), 569-584.
  19. Fluharty A.L., Stevens R.L., Goldstein E.B., Kihara H., *The activity of arylsulfatase A and B on tyrosine o-sulfates*, Biochim. Biophys. Acta **566** (1979), 321-326.
  20. Freeman C., Clements P.R., Hopwood J.J., *Human liver N-acetylglukosamine-6-sulfate sulfatase*, Biochem. J. **246** (1987), 347-354.
  21. Gadella B.M., Colenbrander B., Lopes-Cardozo M., *Arylsulfatases are present in seminal plasma of several domestic mammals*, Physiol. Reprod. **45** (1991), 381-386.
  22. Gasa S., Balbaa M., Nakamura M., Yonemori H., Makita A., *Phosphorylation of human lysosomal arylsulfatase B by cAMP-dependent protein kinase*, J. Biol. Chem. **262** (1987), 1230-1238.
  23. Gibson G.J., Saccone G.T.P., Brooks D.A., Clements P.R., Hopwood J.J., *Human N-acetylgalactosamine-4-sulfate sulfatase*, Biochem. J. **248** (1987), 755-764.
  24. Gieselmann V., Polten A., Kreysing J., Von Figura K., *Arylsulfatase A pseudodeficiency: Loss of polyadenylation signal and N-glikosylation site*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86** (1989), 9436-9440.
  25. Gieselmann V., Polten A., Kreysing J., Kappler J., Fluharty A., von Figura K., *Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy*, Dev. Neurosci. **13**(1991), 222-227.
  26. Gniot-Szulżycka J., *Arylosulfatazy (E.C. 3.1.6.1.) i ich fizjologiczna rola w świetle badań nad genetycznie uwarunkowanymi schorzeniami*, Praca hab. (1977), UMK Toruń.

27. Gniot-Szulżycka J., Komoszyński M., *Human placenta sulphohydrolase C subfractions*, *Enzymologia* 42 (1972), 11-21.
28. Gniot-Szulżycka J., *Human placenta arylsulphatase B, purification and separation into subfractions*, *Acta Biochem.* 19 (1972), 181-190.
- 28a. Gniot Szulżycka J., *Some properties of highly purified arylsulphatase A from human placenta*, *Acta Biochim Polon.* 21 (1974), 247-254.
- 28b. Gniot-Szulżycka J., Donnelly P.V., *Arylsulphatase B (Maroteaux-Lamy factor): A part of the enzyme system responsible for sulphate release from mucopolisaccharide fragment*, *FEBS Lett.* 65 (1976), 63-68.
29. Gniot-Szulżycka J., *Niedobory enzymatyczne leżące u podstaw mukopolisacharydoz*, *Post.Bioch.* 22 (1976), 17-26.
30. Gorham S.D., Cantz M., *Arylsulphatase B, an exo-sulphatase for chondroitin 4-sulphate tetrasaccharide*, *Z. Physiol. Chem. Bd.* 359 (1978), 1811-1814.
31. Holtzman E., *Lysosomes*, Plenum Press (1989), N.York.
32. Hopsu-Havu V.K., Arstila A.U., Helminen H.J., Kalimo H.O., *Improvements in the method for the electron microscopic localization of arylsulphatase activity*, *Histochemie* 8 (1967), 54-64.
33. James G.T., *Essential arginine residues in human liver arylsulfatase A*, *Arch. Biochem. Biophys.* 197 (1979), 57-62.
34. Joachimiak H., *Badania nad sulfohydrolazami B z narządów wołowych. Próba scharakteryzowania białka aktywatorowego.*, *Praca mag.* (1981), UMK Toruń.
35. Keen J.H., *Clathrin and associated assembly and disassembly proteins*, *Annu. Rev. Biochem.* 59 (1990), 415-438.
36. Kureha Y., Eto Y., *A comparative study of brain arylsulfatases B1 and B2: the difference between the two forms in rates of uptake by multiple sulfatase deficient (MSD) disorder fibroblasts*, *J. Biochem.* 94 (1983), 1489-1492.
37. Leżnicki A., *Praca doktorska 1972*, UMK Toruń.
38. Leżnicki A., Błeszyński W., *Histochemical localization of the soluble arylsulphatase activities in rat brain*, *Histochemie* 24 (1970), 251-265.



39. Leźnicki A., Róžańska M., *Localization of arylsulphatase A and B activities in rat kidney*, Acta Biochim. Polon. 38 (1991), 151-156.
40. Litjens T., Morris P.C., Gibson G.J., Beckmann K.R., Hopwood J.J., *Human N-acetylgalactosamine-4-sulphatase; protein maturation and isolation of genomic clones*, Biochemistry International 24 (1991), 209-215.
41. Maciag A., *Izolacja, oczyszczenie i charakterystyka arylosulfataz wątroby minoga (Lampetra fluviatilis) i okonia (Perca fluviatilis)*, Praca mag. (1989), UMK Toruń.
42. Marchaluk E., *Zastosowanie immobilizowanego Cibacron Blue F3GA (Blue Sepharose) do selektywnego rozdzielenia arylosulfataz B od enzymów A z tkanek ssaków*, Praca mag. (1989), UMK Toruń.
43. Marker A., Roy A.B., *The use of  $^{17}\text{O}$ -NMR in the study of bond cleavage during the hydrolysis of sulphate esters*, Biochim. Biophys. Acta 742 (1983), 446-451.
44. Masue M., Sukegawa K., Orii T., Hashimoto T., *N-acetylgalactosamine-6-sulfate sulfatase in human placenta: purification and characteristics*, J. Biochem. 110 (1991), 965-970.
45. Mathew J., Balasubramanian A.S., *Molecular heterogeneity of anionic arylsulphatase B from monkey brain and preliminary identification of its phosphorylated component*, Indian J. Biochem. Biophys. 25 (1988) 648-654.
46. McCabe N.R., Dawson G., *A study of the heterogenous structure of guinea pig lysosomal  $\beta$ -mannosidase using a polyclonal antibody*, Biochim. Biophys. Acta 1077 (1991), 133-140.
47. McGovern M.M., Vine D.T., Haskins M.E., Desnik R.J., *Purification and properties of feline and human arylsulphatase B isozymes*, J. Biol. Chem. 257 /1982/, 1260-1261.
48. Mehl E., Jatzkiewitz H., *Cerebroside 3-sulfate as a physiological substrate of arylsulfatase A*, Biochim. Biophys. Acta 151 (1968), 619-627.
49. Mraz W., Jatzkiewitz H., *Cerebroside sulphatase activity of arylsulphates from various invertebrates*, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 355 (1974), 33-44.
50. Neufeld E.F., *The biochemical basis for mucopolysaccharido-*

- ses and mucopolidoses*, Prog. in Med. Gen **10** (1974), 81-101.
51. O'Brien J.S., Kishimoto Y., *Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal disorders*, FASEB J. **5** (1991), 301-308.
52. Olson R.L., Nordquist J., Everett M.A., *Ultrastructural localization of arylsulphatase in human epidermis*, Acta derm.-venereol. **48** (1968), 556-562.
53. Peters C., Schmidt B., Rommerskirch W., Rupp K., Zühlendorf M., Vingron M., Meyer H.E., Pohlmann R., von Figura K., *Phylogenetic conservation of arylsulphatases*, J. Biol. Chem. **265** (1990), 3374-3381.
54. Polten A., Fluharty A.L., Fluharty C.B., Kappler J., von Figura K., Gieselmann V., *Molecular basis of different forms of metachromatic leukodystrophy*, New England J. Med. **324** (1991), 18-22.
55. Rowden G., *Lysosomal aryl sulphatase in mouse kidney and liver*, Nature **215** (1967), 1283-1284.
56. Roy A.B., *Comparative studies on the liver sulphatases*, Biochem. J. **68** (1958), 519.
57. Roy A.B., Trudinger P.A., *The sulphatases. The biochemistry of inorganic compounds of sulphur*, Cambridge University Press, Cambridge, (1970), 133-189.
58. Seljelid R., Helminen H.J., *The localization of aryl sulphatase activity in thyroid follicle cells*, J. Histochem. Cytochem. **16** (1968), 467-472.
59. Sellinger O.Z., Hiatt R.A., *Cerebral lysosomes. IV. The regional and intracellular distribution of arylsulphatase and evidence for two populations of lysosomes in rat brain*, Brain Research **7** (1968), 191-200.
60. Selmi S., Maire I., Rousset B., *Evidence for the presence of a very high concentration of arylsulphatase A in the pig thyroid: identification of arylsulphatase A subunits as the two major glycoproteins in purified thyroid lysosomes*, Arch. Biochem. Biophys. **273** (1989), 170-179.
61. Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C., *Measurement of protein using*

- bicychnonic acid*, Anal. Biochem. **150** (1985), 76-85.
62. Stahn R., Maier K.P., Hannig K., *A new method for the preparation of rat liver lysosomes. Separation of cell organelles of rat liver by carrier-free continuous electrophoresis*, J. Cell Biol. **46** (1970), 576-591.
63. Stein C., Gieselmann V., Kreysing J., Schmidt B., Pohlmann R., Waheed A., Meyer H.E., O'Brien J.S., von Figura K., *Cloning and expression of human arylsulfatase A*, J. Biol. Chem. **264** (1989), 1252-1259.
64. Thompson D.B., Daniel W.L., *Comparative biochemistry of mammalian arylsulfatases A and B*, Comp. Biochem. Physiol. **99 B** (1988), 823-831.
65. Waheed A., Risley J.M., van Etten R.L., *Structural and immunological relationships among mammalian arylsulfatase A enzymes*, Comp. Biochem. Physiol. **82 B** (1985), 855-862.
66. Waheed A., van Etten R.L., *Sulfhydryl groups of rabbit liver arylsulfatase A*, Biochim. Biophys. Acta **831** (1985), 67-73.
67. Waheed A., van Etten R.L., Gieselmann V., von Figura K., *Immunological characterization of human acid phosphatase gene products*, Biochemical Genetics **23** (1985), 309-319.
68. Wortman B., *Arylsulfatase activity in beef and rabbit corneal extracts*, Arch. Biochem. Biophys. **97** (1962), 70-74.
69. Załęska-Radziwiłł M., *Badania heterogenności arylsulfataz B z wątroby szczura*, Prac. mag., UMK Toruń (1978).
70. Van der Pal R.H.M., Klein W., van Golde L.M.G., Lopes-Cardozo M., *Galactosylceramide sulfotransferase, arylsulfatase A and cerebroside sulfatase activity in different regions of developing rat brain*, Biochim. Biophys. Acta **1043** (1990), 91-96.
71. Van der Pal R.H.M., Klein W., van Golde L.M.G., Lopes-Cardozo M., *Developmental profiles of arylsulfatases A and B in rat cerebral cortex and spinal cord*, Biochim. Biophys. Acta **1081** (1991), 315-320.
72. De Groen P.C., LeSage G.D., Tietz P.S., LaRusso N.F., *Purification and immunological quantification of rat liver lysosomal glycosidases*, Biochem. J. **264** (1989), 115-123.