

Enzymersatztherapie der  
metachromatischen Leukodystrophie:  
Untersuchungen zur therapeutischen Wirksamkeit  
rekombinanter humaner Arylsulfatase A  
und zum transendothelialen Übertritt  
über die Blut-Hirn-Schranke

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Frank Matthes

aus

Frankfurt am Main

Bonn, 2010

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Referent: Prof. Dr. V. Gieselmann

2. Referent: Prof. Dr. A. Haas

Tag der Promotion: 21. September 2010

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

---

# Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung .....	1
2 Einleitung .....	2
2.1 Lysosomen .....	2
2.2 Lysosomale Speichererkrankungen .....	4
2.3 Metachromatische Leukodystrophie .....	7
2.4 Arylsulfatase A .....	9
2.5 Tiermodell für MLD: die ASA-Knock-out-Maus .....	11
2.6 Enzymersatztherapie .....	12
2.7 Die Blut-Hirn-Schranke .....	13
3 Material .....	17
3.1 Geräte .....	17
3.2 Fertige Reaktionssysteme (Kits) .....	19
3.3 Radioaktive Substanzen .....	19
3.4 Antikörper .....	19
3.5 Enzyme .....	20
3.6 Zellen .....	20
3.7 Mauslinien .....	20
4 Methoden .....	21
4.1 ASA-Bestimmung .....	21
4.1.1 Bestimmung der ASA-Aktivität .....	21
4.1.2 Bestimmung humaner ASA durch indirekten Sandwich-ELISA .....	22
4.2 Zellkultur .....	23
4.2.1 Kultivierung von hASA-überexprimierenden Zellen .....	23
4.2.2 Kultivierung von Hybridomzellen .....	23
4.2.3 miniPerm-Bioreaktor .....	23
4.2.4 Präparation primärer kortikaler Neuronen aus Mäuseembryonen .....	24
4.2.5 Beladung von primären Neuronen mit Sulfatid .....	25
4.2.6 Messung der Mannose-6-Phosphat-abhängigen Endozytose von rhASA .....	25

---

4.3 Mäuse .....	26
4.3.1 Transkardiale Perfusion von Mäusen .....	26
4.3.2 Homogenisierung von Mausgewebe.....	26
4.3.3 Bestimmung des anti-hASA-Antikörper-Titers von Serum .....	27
4.4 Lipide .....	28
4.4.1 Extraktion von Gangliosiden und Sulfatid aus Mausgewebe .....	28
4.4.2 Dünnschichtchromatografie.....	29
4.5 Proteinreinigung.....	29
4.5.1 Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomzellüberständen .....	29
4.5.2 Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein A-Sepharose .....	29
4.5.3 Immunaffinitäts-Aufreinigung von rhASA aus konditioniertem Zellkulturüberstand.....	30
4.5.4 Gelfiltrations-Chromatographie von rhASA .....	30
4.6 Modifikation von Proteinen .....	31
4.6.1 Deglykosylierung von Proteinen mit Endoglykosidase H.....	31
4.6.2 Periodat-Behandlung von rhASA .....	31
4.6.3 Dephosphorylierung von rhASA .....	32
4.6.4 Desialylierung von rhASA.....	32
4.6.5 Generierung von <i>Advanced Glycation Endproducts (AGEs)</i> durch Glykierung .....	33
4.6.6 Kationisierung von Proteinen durch Carbodiimid-vermittelte Amidierung.....	33
4.7 Proteinanalytik .....	34
4.7.1 Bestimmung von Protein-gebundenem Phosphat durch Veraschung.....	34
4.7.2 Isoelektrische Fokussierung.....	35
4.7.2.1 Coomassie-Blau-Färbung von IEF-Streifen.....	36
4.7.3 Immunfluoreszenzfärbung.....	36
<b>5 Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
5.1 Vergleich der verwendeten rhASA-Sorten .....	37
5.1.1 Bestimmung des M6P-Gehalts verschiedener rhASA-Sorten.....	37
5.2 Enzymersatztherapie von ASA-Knock-out-Mäusen.....	38
5.2.1 Behandlung immuntoleranter ASA-Knock-out-Mäuse mit CHO-rhASA und BR- HT1080-rhASA .....	38
5.2.1.1 Lipidanalytik.....	39

---

5.2.2 Hochdosis-Behandlung konventioneller ASA-Knock-out-Mäuse mit verschiedenen rhASA-Sorten .....	42
5.2.2.1 Pharmakokinetik von CHO-, BHK- und HT1080-rhASA .....	42
5.2.2.2 Immunologische Nebenwirkungen.....	44
5.2.2.3 Lipidanalytik.....	45
5.3 Untersuchungen an primären kortikalen Neuronen .....	48
5.3.1 Die Endozytose von CHO-rhASA in primäre Neuronen erfolgt M6P-abhängig	48
5.3.2 Die Aufnahme von rhASA in primäre Neuronen bewirkt keine Sulfatid-Reduktion.....	49
5.4 Untersuchungen am Zellkultur-Modell der Blut-Hirn-Schranke.....	50
5.4.1 Eigenschaften des transendothelialen Übertritts von rhASA .....	51
5.4.1.1 Konzentrationsabhängigkeit des Transports.....	51
5.4.1.2 Transport gegen ein Konzentrationsgefälle.....	52
5.4.1.3 Ladungsabhängigkeit.....	53
5.4.1.4 Transport in Gegenwart polykationischer Substanzen .....	53
5.4.1.4.1 Poly-L-Lysin .....	54
5.4.1.4.2 Protamin .....	55
5.4.1.4.3 Histone.....	55
5.4.1.4.4 Kationisiertes BSA .....	56
5.4.1.5 Konkurrenz mit M6P und G6P.....	57
5.4.1.6 Vergleich verschiedener ASA-Sorten .....	58
5.4.2 Modifikationen von CHO-rhASA und ihre Einflüsse auf den transendothelialen Übertritt.....	59
5.4.2.1 Deglykosylierung .....	59
5.4.2.2 Chemische Inaktivierung terminaler Zucker durch Periodat.....	61
5.4.2.3 Dephosphorylierung .....	63
5.4.2.4 Desialylierung.....	64
5.4.2.5 Kationisierung von CHO-rhASA .....	65
5.4.2.6 Glykierung von CHO-rhASA zur Bildung von RAGE-Liganden .....	67
5.5 Umgehung der Blut-Hirn-Schranke durch intrazerebroventrikuläre Infusion mit osmotischen Minipumpen .....	71
5.5.1 Vierwöchige intrazerebroventrikuläre Infusion von CHO-rhASA.....	72
5.5.2 Einwöchige intrazerebroventrikuläre Infusion in immunkompetente Tiere.....	73
5.5.3 Visualisierung der intrazerebroventrikulären Infusion mittels Evans-Blau .....	75

6 Diskussion.....	77
6.1 Enzymersatztherapie an ASA-Knock-out-Mäusen .....	77
6.1.1 Behandlung immuntoleranter ASA-Knock-out-Mäuse mit CHO-rhASA und BR- HT1080-rhASA .....	77
6.1.2 Behandlung konventioneller ASA-Knock-out-Mäuse mit verschiedenen rhASA- Sorten.....	79
6.2 Untersuchungen am Zellkultur-Modell der Blut-Hirn-Schranke.....	83
6.2.1 Transendothelialer Übertritt von rhASA .....	84
6.2.2 Modifikationen von CHO-rhASA und ihre Einflüsse auf den transendothelialen Übertritt.....	89
6.3 Umgehung der Blut-Hirn-Schranke durch intrazerebroventrikuläre Infusion mit osmotischen Minipumpen .....	95
7 Literatur.....	97
8 Abkürzungen .....	106
Publikationen.....	108
Lebenslauf .....	109
Erklärung .....	110
Danksagung .....	111

# 1 Zusammenfassung

Metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine lysosomale Speichererkrankung, die durch eine Defizienz des Enzyms Arylsulfatase A (ASA) verursacht wird, woraufhin das Sphingolipid 3-*O*-Sulfogalaktosylceramid (Sulfatid) in den Lysosomen akkumuliert. MLD ist gekennzeichnet durch eine fortschreitende Demyelinisierung, die schwere neurologische Symptome hervorruft und letztendlich zum Tod führt. Bei der Enzymersatztherapie wird dem Patienten synthetisches, rekombinant hergestelltes Enzym intravenös injiziert. Lysosomale Enzyme werden aufgrund ihrer Markierung mit Mannose-6-Phosphat (M6P) von Zellen aufgenommen und in die Lysosomen transportiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Sorten rekombinanter humaner ASA (rhASA) in einem MLD-Tiermodell, der ASA-Knock-out-Maus, hinsichtlich ihrer therapeutischen Wirksamkeit in der Enzymersatztherapie verglichen. Es wurden Unterschiede in der Fähigkeit zur Reduktion gespeicherten Sulfatids des peripheren und zentralen Nervensystems sowie in Serumhalbwertszeit und Gewebeverteilung gefunden. Insbesondere eine Sorte mit verkürzten N-Glykanen, BHK-rhASA, wurde vermehrt in Gewebe des Zentralnervensystems aufgenommen und erzielte bessere therapeutische Effekte, die allerdings bei wiederholten Behandlungen durch das Auftreten einer Immunreaktion gemindert wurden.

Um den Zusammenhang zwischen Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit und der Struktur N-glykosidisch gebundener Oligosaccharide zu untersuchen, wurden Experimente mit nativer und modifizierter rhASA an einem Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke durchgeführt. Der transendotheliale Übertritt sowie die Aufnahme von rhASA in die Kapillarendothelzellen ließ sich durch eine Reihe unterschiedlicher Faktoren beeinflussen. Faktoren, die die Bindung von rhASA an M6P-Rezeptoren hemmen (z.B. M6P-Zugabe, Dephosphorylierung, Deglykosylierung, Periodat-Behandlung), bedingten eine verminderte Endozytose. Faktoren, die die negative Nettoladung von rhASA mindern (z.B. Dephosphorylierung, Polykationen), führten zu einem erhöhten transendothelialen Übertritt. Die gefundene Ladungsabhängigkeit des Übertritts spricht für einen adsorptiv-vermittelten Transzytoseweg. Andererseits belegt die beobachtete Hemmung des basolateralen Übertritts durch lösliches M6P eine Beteiligung von M6P-Rezeptoren am Transport. Folglich scheinen zwei Prozesse, adsorptive Transzytose und MPR-Bindung, an der basolateralen Sortierung beteiligt zu sein.

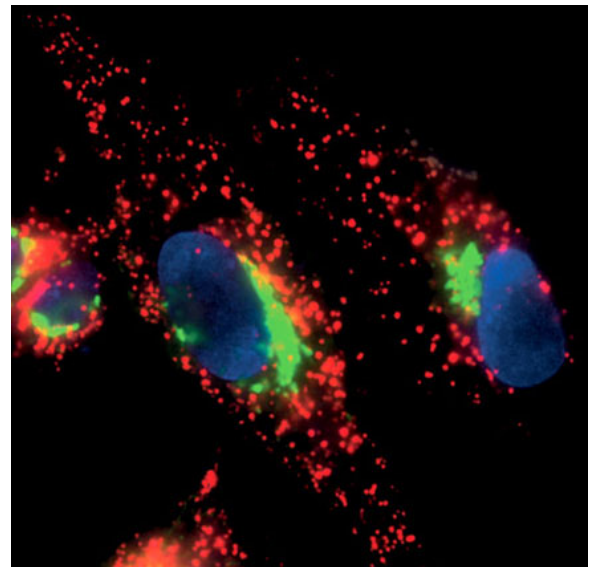
Weiterhin wurden Experimente zur physikalischen Umgehung der Blut-Hirn-Schranke durch kontinuierliche intrazerebroventrikuläre Infusion von rhASA mit osmotischen Minipumpen durchgeführt. Die durchgeführten Versuche zeigen vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der therapeutischen Wirksamkeit, wurden allerdings von technischen Schwierigkeiten bei der Wirkstoffapplikation behindert.

## 2 Einleitung

Mit der Entwicklung der Kompartimentierung haben eukaryote Zellen die Voraussetzung geschaffen, komplexe Stoffwechselforgänge innerhalb der Zelle koordinieren zu können. Membranumschlossene Kompartimente werden als Zellorganellen bezeichnet. Zu den Organellen gehören unter anderem der Zellkern, das endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi-Apparat, Mitochondrien, Peroxisomen, Endosomen und Lysosomen. Alle Organellen haben – unter anderem aufgrund ihrer Ausstattung mit spezifischen Makromolekülen – eine definierte Struktur und Funktion. Um zu gewährleisten, dass alle Organellen mit ihrem charakteristischen Satz an Makromolekülen ausgestattet sind und bleiben, erfordert es vielfältige Synthese-, Kontroll-, Transport- und Verteilungsmechanismen.

### 2.1 Lysosomen

Lysosomen sind membranbegrenzte Organellen tierischer Zellen, die dem enzymatischen Abbau von endogenen und exogenen Makromolekülen dienen. Pro Zelle findet man mehrere Hundert Lysosomen, die sich in Größe (0,1–1  $\mu\text{m}$ ) und Form unterscheiden (Abb. 1). Lysosomen enthalten über 50 lösliche saure Hydrolasen (Journet *et al.*, 2003), z.B. Glykosidasen, Proteasen, Lipasen, Nukleasen, Phosphatasen und Sulfatasen, sowie mehrere Hundert integrale Membranproteine (Callahan *et al.*, 2009). Durch ATP-getriebene Protonenpumpen des V-Typs wird der intralysosomale pH-Wert bei 4,8 gehalten und ist damit deutlich saurer als das Zytoplasma (pH 7,0–7,3). Da das pH-Optimum der lysosomalen Enzyme im Bereich von 5 liegt, sind sie bei einer eventuellen Freisetzung ins Zytoplasma nur wenig aktiv, was vermutlich einen Schutzmechanismus gegen ungewollte Selbstverdauung der Zelle darstellt.

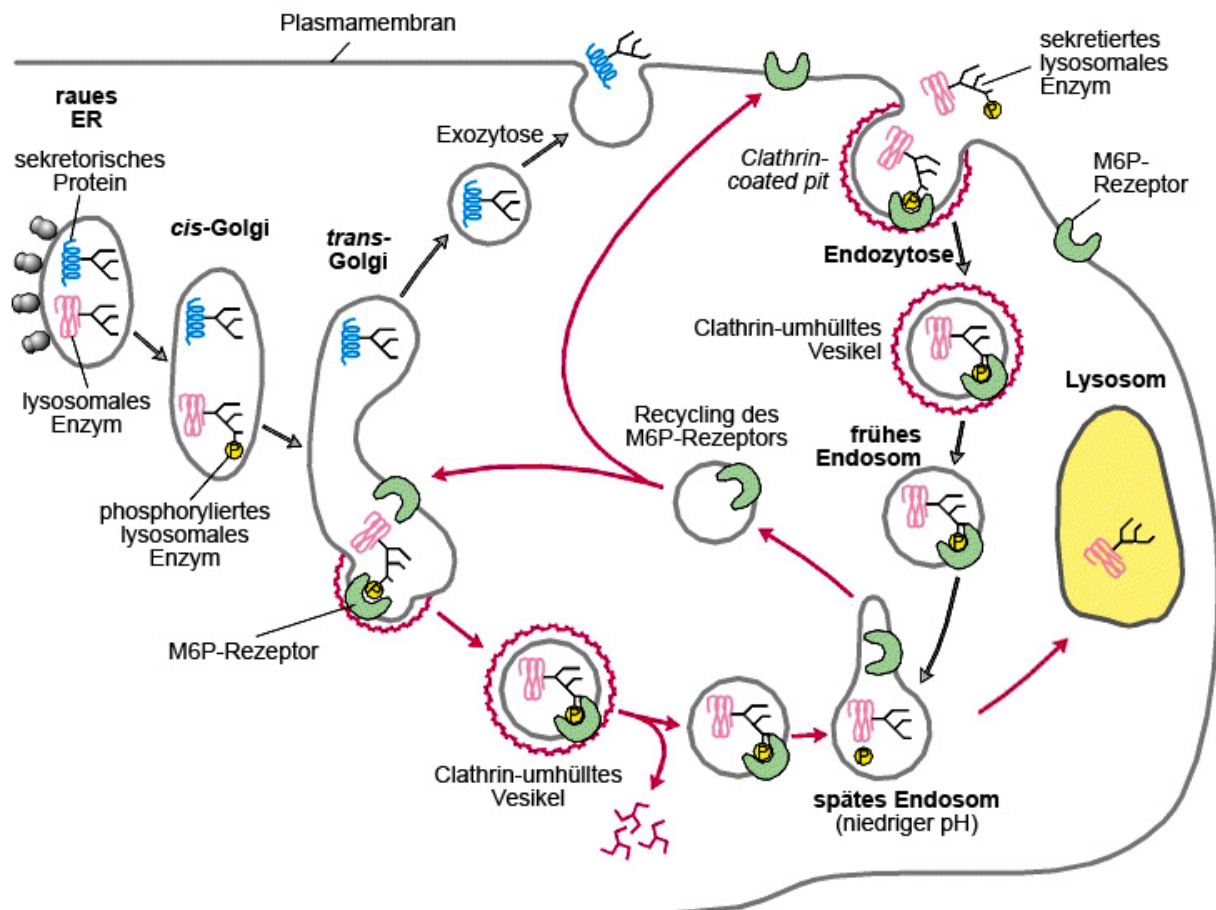


**Abb. 1: Lysosomen-Färbung mit LysoTracker-Rot**  
MDCK-Nierenepithelzellen gefärbt mit rot-fluoreszierendem LysoTracker Red DND-99 (Lysosomen), grün-fluoreszierendem BODIPY FL C<sub>5</sub>-Ceramid (Golgi-Apparat) und blau-fluoreszierendem Hoechst 33258 (Zellkern) (Quelle: www.invitrogen.com).



Die Homöostase von Lysosomen erfordert einen kontinuierlichen Nachschub an neusynthetisierten Komponenten. Lösliche Hydrolasen und lysosomale Membranproteine müssen entlang eines zellulären Biosynthesewegs transportiert werden, an dem ER, Golgi-Apparat, *trans*-Golgi-Netzwerk, Plasmamembran und Endosomen beteiligt sind (Braulke & Bonifacio, 2009). Lösliche lysosomale Proteine werden als Vorläuferpolypeptide mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert, die eine kotranslationale Translokation in das Lumen des ER bewirkt (Abb. 2). Nach der Abspaltung des Signalpeptids werden die Proteine an bestimmten Asparagin-Resten N-glykosyliert und gelangen anschließend durch vesikulären Transport in den Golgi-Apparat. Hier werden die N-Glykane verschiedenartig getrimmt und modifiziert, insbesondere wird in einer Zweischritt-Reaktion auf bestimmte Mannosereste eine Phosphatgruppe übertragen (Lazzarino & Gabel, 1989). Die entstandenen Mannose-6-Phosphat-(M6P)-Reste dienen als lysosomales Lokalisierungssignal und binden im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) an M6P-spezifische Rezeptoren (MPR) (Ghosh *et al.*, 2003). Die MPR-Hydrolase-Komplexe werden in Clathrin-umhüllte Vesikel verpackt und zu Endosomen transportiert, mit denen sie verschmelzen. Der saure pH-Wert der späten Endosomen (<5,5) bewirkt die Freisetzung der Hydrolasen vom MPR ins endosomale Lumen. Während die MPR-Moleküle für weitere Transportzyklen ins TGN zurücktransportiert werden, gelangen die Hydrolasen von den späten Endosomen zu den Lysosomen. Derzeit wird diskutiert, ob dieser Transfer die Reifung später Endosomen zu Lysosomen (Maturationsmodell), die vollständige Fusionen von Endosomen mit Lysosomen (Hybrid-Kompartiment-Modell) oder wiederholte transiente Fusionsprozesse zwischen den beiden Kompartimenten („*kiss-and-run*“-Modell) beinhaltet (Pryor & Luzio, 2009).

Ein gewisser Anteil (5–20 %) löslicher lysosomaler Enzyme entgeht der lysosomalen Sortierung am TGN und wird in den Extrazellulärraum sezerniert (Chao *et al.*, 1990). Da sich auch auf der Plasmamembran MPR-Moleküle befinden (etwa 3–10 % des gesamten zellulären MPR, Braulke *et al.*, 1989), können die Zellen auch extrazellulär vorhandene lysosomale Enzyme M6P-vermittelt endozytieren und in ihre Lysosomen einbringen. Diese extrazellulären lysosomalen Enzyme können aus derselben Zelle oder aus benachbarten Zellen stammen. Der Vorgang wird als „*cross-correction*“ bezeichnet und bildet die theoretische Grundlage verschiedener Therapieansätze für lysosomale Speichererkrankungen (s. unten) (Matzner, 2005).



**Abb. 2: Transport lysosomaler Enzyme zu den Lysosomen**

Während ihrer Biosynthese wandern die lysosomalen Enzyme aus dem rauen ER (links) in den Golgi-Apparat, wo mindestens ein Mannose-Rest phosphoryliert wird. Der M6P-Rezeptor bindet an die derart markierten Proteine und dirigiert sie in Clathrin-umhüllte Vesikel, die mit dem späten Endosom fusionieren. Der niedrige pH-Wert führt zur Freisetzung des phosphorylierten Enzyms. Der freie MPR kann zum *trans*-Golgi rezirkulieren oder an die Plasmamembran geschleust werden. Dort kann er sezernierte lysosomale Enzyme über M6P binden, die durch Rezeptor-vermittelte Endozytose ebenfalls ins Endosom transportiert werden. (Modifiziert nach Lodish *et al.*, 2000.)

## 2.2 Lysosomale Speichererkrankungen

Lysosomale Speichererkrankungen sind eine Gruppe von mehr als 40 metabolischen Erbkrankheiten, die mit einer Gesamtinzidenz von etwa 1 in 7.000–8.000 Geburten auftreten (Winchester *et al.*, 2000). Sie lassen sich makroskopisch durch die Ablagerung von Speichergranula in den lysosomalen Kompartimenten von Zellen charakterisieren. Die Speichergranula bestehen aus nicht oder nur teilweise abgebauten Makromolekülen und können als Folge von Defekten in vielfältigen lysosomalen Funktionen entstehen, jedoch hauptsächlich durch Mutationen in Genen, die für katabolische lysosomale Enzyme codieren. In Konse-

quenz einer reduzierten oder vollständig fehlenden Enzymaktivität akkumuliert das entsprechende Substrat in den Lysosomen und verursacht mit der Zeit zelluläre Dysfunktionen und fortschreitende klinische Manifestationen der Krankheit (Scriver *et al.*, 2001; Futerman & van Meer, 2004).

Die Einteilung von lysosomalen Speichererkrankungen erfolgt traditionell nach der Art des akkumulierenden Speichermaterials. In Sphingolipidosen, Mucopolysaccharidosen und Glykoproteinosen akkumulieren beispielsweise Sphingolipide, Mucopolysaccharide (Glykosaminoglykane) bzw. Glykoproteine. Krankheiten dieser drei Familien werden typischerweise durch die Defizienz einer löslichen lysosomalen Hydrolase verursacht, die an einer für den jeweiligen Substanzabbau zuständigen katabolischen Kaskade beteiligt ist. Etwa zwei Drittel der lysosomalen Speichererkrankungen beruhen auf einer solchen Hydrolasedefizienz (Ballabio & Gieselmann, 2009). Die übrigen Erkrankungen können vielfältige Defekte als Ursache haben, z.B. Mutationen in für den Abbau benötigten Kofaktoren, lysosomalen Transportern und Rezeptoren oder Störungen in der posttranslationalen Modifikationsmaschinerie von ER und Golgi-Apparat (Dierks *et al.*, 2009).

Obwohl lysosomale Enzyme in den meisten Zellen konstitutiv als sogenannte „*housekeeping enzymes*“ exprimiert werden, haben ihre Substrate eine weit weniger einheitliche Gewebeverteilung. So werden Ganglioside und Sphingolipide vor allem im Nervensystem gebildet. Dementsprechend sind Gangliosidosen und Sphingolipidosen neurodegenerative Erkrankungen. Keratan- und Dermatansulfat finden sich dagegen hauptsächlich in Stütz- und Bindegewebe. Mucopolysaccharidosen, die auf Defekten in ihrem Abbau beruhen, verursachen folglich Symptome in der Knorpel- und Knochenentwicklung (Scriver *et al.*, 2001).

Lysosomale Speichererkrankungen werden typischerweise autosomal rezessiv vererbt und sind monogen. Allerdings wurden für die meisten Krankheiten zahlreiche unterschiedliche Mutationen des gleichen Gens in verschiedenen Patienten beschrieben. Manche Mutationen führen zum vollständigen Aktivitätsverlust, andere nur zu reduzierter Aktivität. Jedoch konnte für die meisten lysosomalen Speichererkrankungen keine klare Genotyp-Phänotyp-Korrelation gefunden werden und die Vorhersage des klinischen Verlaufs aufgrund von Mutationsanalysen ist schwierig. Meist erfolgt – basierend auf der Schwere des Krankheitsverlaufs – eine Einteilung in infantile, juvenile und adulte Formen (Winchester *et al.*, 2000).

---

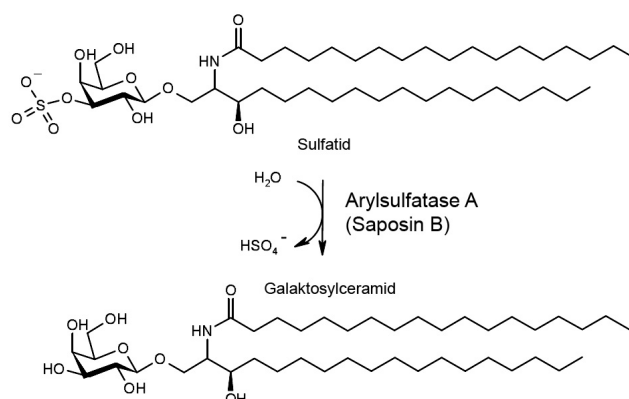
Krankheit	defektes Protein	Hauptspeichermaterial	Prävalenz
<b>Sphingolipidosen</b>			
Fabry	$\alpha$ -Galaktosidase A	Globotriaosylceramid	117.000
Gaucher	$\beta$ -Glukosidase (Glukocerebrosidase)	Glukosylceramid	57.000
GM1-Gangliosidose	$\beta$ -Galaktosidase	GM1-Gangliosid	384.000
GM2-Gangliosidose (Tay-Sachs)	$\beta$ -Hexosaminidase A ( $\alpha$ )	GM2-Gangliosid u.a.	201.000
GM2-Gangliosidose (Sandhoff)	$\beta$ -Hexosaminidase A/B ( $\beta$ )	GM2-Gangliosid u.a.	384.000
Krabbe	Galaktocerebrosidase	Galaktosylceramid	141.000
Metachromatische Leukodystrophie	Arylsulfatase A	Sulfatid	92.000
Niemann-Pick A/B	Sphingomyelinase	Sphingomyelin	248.000
<b>Mucopolysaccharidosen</b>			
MPS I (Hurler-Scheie)	$\alpha$ -Iduronidase	Dermatan-/Heparansulfat	88.000
MPS II (Hunter)	Iduronat-2-sulfatase	Dermatan-/Heparansulfat	136.000
MPS III-A (Sanfilippo A)	Heparan-N-sulfatase	Heparansulfat	114.000
MPS III-B (Sanfilippo B)	N-Acetyl- $\alpha$ -glukosaminidase	Heparansulfat	211.000
MPS III-C (Sanfilippo C)	Acetyl-CoA: $\alpha$ -glukosamid-N-acetyltransferase	Heparansulfat	1.407.000
MPS III-D (Sanfilippo D)	N-Acetylglukosamin-6-sulfatase	Heparansulfat	1.056.000
MPS IV-A (Morquio A)	N-Acetylglukosamin-6-sulfatase	Keratansulfat	169.000
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	N-Acetylglukosamin-4-sulfatase	Dermatansulfat	235.000
MPS VII (Sly)	$\beta$ -Glukuronidase	Heparan-/Dermatansulfat, Chondroitin-4/6-sulfat	2.111.000
<b>Oligosaccharidosen und Glykoproteinosen</b>			
Aspartylglucosaminurie	Aspartylglucosaminidase	Aspartylglucosamine	2.111.000
$\alpha$ -Mannosidose	$\alpha$ -Mannosidase	Man( $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc	1.056.000
Pompe	$\alpha$ -Glukosidase	Glykogen	146.000
Sialidose	Sialidase	Sialyloligosaccharide, Sialylglykopeptide	4.222.000
<b>Lipidosen</b>			
Wolman	saure Lipase	Cholesterolester, Triglyceride	528.000
<b>Defekte in integralen Membranproteinen</b>			
Cystinose	Cystinosin	Cystin	192.000
Niemann-Pick C	NPC1	Cholesterol, Sphingolipide	211.000
Sialinsäure-Speicherkrankheit	Sialin	Sialinsäure	528.000
<b>Andere</b>			
Mucopolysaccharidose II/III (I-Cell)	UDP-N-acetylglukosamin: lysosomales Enzym-N-acetylglukosaminyl-1-phosphotransferase	Oligosaccharide, Mucopolysaccharide, Lipide	325.000
Multiple Sulfatase-defizienz	C $\alpha$ -Formylglycin-generierendes Enzym (FGE)	Sulfatide, Mucopolysaccharide	1.407.000

**Tabelle 1: Beispiele für lysosomale Speichererkrankungen und ihre Prävalenz**

Angegeben ist jeweils das defekte Enzym, das hauptsächlich auftretende Speichermaterial und die Prävalenz in der australischen Bevölkerung (Meikle *et al.*, 1999). Die Einteilung erfolgte nach Futerman & van Meer (2004).

## 2.3 Metachromatische Leukodystrophie

Metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine autosomal rezessiv vererbte lysosomale Speichererkrankung, die durch die Defizienz des Enzyms Arylsulfatase A (ASA) verursacht wird. ASA katalysiert den ersten Schritt im Abbauweg des Sphingolipids 3'-O-Sulfogalaktosylceramid (Sulfatid), die Abspaltung eines Sulfatrests von der Galaktoseeinheit (Abb. 3). Sulfatid kommt insbesondere im Myelin des zentralen und



**Abb. 3: Abbau von Sulfatid**

Arylsulfatase A katalysiert die Hydrolyse von Sulfatid zu Galaktosylceramid. Als Kofaktor wird *in vivo* das Lipidaktivatorprotein Saposin B benötigt.

peripheren Nervensystems vor, wo es etwa 4–6 % der Lipide ausmacht (Eckhardt, 2008). Myelin ist eine lipidreiche Biomembran, welche die Axone der meisten Neuronen spiralförmig umgibt und elektrisch isoliert, wodurch die schnelle saltatorische Erregungsleitung entlang der myelinisierten Axone möglich wird. Sulfatid findet sich auch in anderen Geweben wie den distalen Tubuli der Niere und dem Gallengangepithel. Bei ASA-Defizienz kann Sulfatid nicht mehr abgebaut werden und akkumuliert in den Lysosomen, wo es eine charakteristische metachromatische Färbung hervorruft. Während die Sulfatid-Speicherung keine oder nur geringe funktionelle Auswirkungen auf Niere und Gallenblase hat, wird bei MLD insbesondere die Funktion des Nervensystems beeinträchtigt. Die Krankheit zeichnet sich durch fortschreitende Demyelinisierung aus, wodurch multiple neurologische Symptome und schließlich der Tod verursacht werden (von Figura *et al.*, 2001).

Klinischer Ausbruch und Schweregrad der MLD zeigen große Variationen. Basierend auf dem Alter bei Krankheitsausbruch werden drei klinische Formen unterschieden: eine spät-infantile Form, bei der die ersten Symptome im Alter von etwa zwei Jahren auftreten, eine juvenile Form mit Beginn zwischen dem vierten und 16. Lebensjahr, sowie eine adulte Form, die sich erst nach dem 16. Lebensjahr manifestiert. Die Mehrheit der Patienten lässt sich zu etwa gleichen Teilen in spät-infantile und juvenile Form einteilen, während die adulte Form etwa 25 % ausmacht (von Figura *et al.*, 2001).

In allen Varianten sind die ersten klinischen Symptome Gleichgewichtsstörungen, mentale Regression und Harninkontinenz. In den kindlichen Formen sind weitere Anzeichen Blindheit, Verlust der Sprache, Tetraplegie, periphere Neuropathie und epileptische Anfälle. Patienten mit adulten Formen zeigen Sprach-, Lern- und Verhaltensstörungen sowie Halluzinationen und Demenz, was häufig als Psychose fehldiagnostiziert wird. Die infantilen Formen von MLD verlaufen aggressiver und führen meist innerhalb von fünf Jahren nach Krankheitsausbruch zum Tod, während sich die adulten Verlaufsformen über Jahre und Jahrzehnte erstrecken können, letztendlich aber zu vegetativem Zustand und Tod führen.



**Abb. 4: Patient mit juveniler Form von MLD**

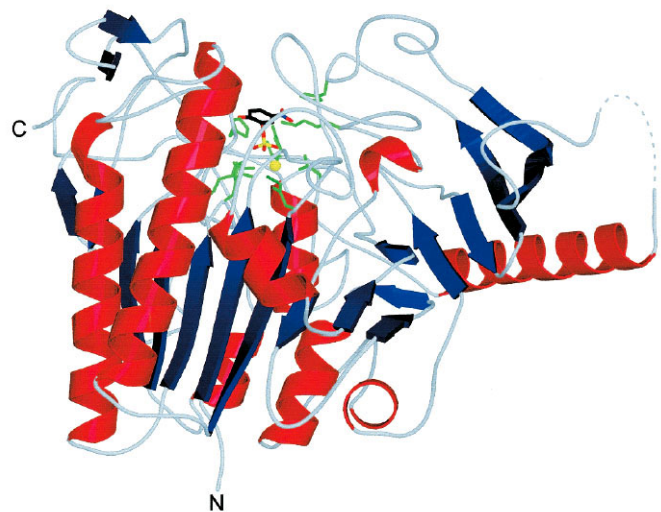
*Links:* Im Alter von 5 ½ Jahren, ein Jahr vor Ausbruch der ersten Symptome, ist das Kind asymptotisch. *Mitte:* Im Alter von 7 Jahren entwickelt das Kind zunehmende Gleichgewichtsprobleme und kann nicht mehr frei stehen. *Rechts:* Im Alter von fast 9 Jahren ist der Patient bettlägerig, hat zunehmende Schluckbeschwerden und muss künstlich ernährt werden. Er kann nicht mehr sprechen, aber erkennt seine Familie und freut sich über Zuwendung (von Figura *et al.*, 2001).

Bis heute wurden mehr als 110 verschiedene Mutationen beschrieben, die MLD verursachen (Human Gene Mutation Database, [www.hgmd.org](http://www.hgmd.org)). Nur wenige Mutationen kommen in hoher Frequenz vor. Untersuchungen von Patienten mit unterschiedlichen Formen von MLD zeigen eine Korrelation zwischen residualer ASA-Aktivität und Schwere der Erkrankung: Homozygote Null-Allel-Träger leiden immer an der schweren spät-infantilen Form, während in der juvenilen und adulten Form ein oder beide Allele mit zumindest geringer ASA-Restaktivität assoziiert sind (Berger *et al.*, 1997). Beim Vergleich von Patienten mit identischen

Genotypen wurden jedoch starke Variationen im Krankheitsverlauf gefunden, selbst innerhalb der gleichen Familie (Arbour *et al.*, 2000). Die uneindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation deutet auf die Existenz noch unbekannter genetischer oder epigenetischer Faktoren hin, die den Phänotyp des Patienten substantiell beeinflussen und damit die Vorhersage des Krankheitsverlaufs erschweren (Gieselmann, 2008).

## 2.4 Arylsulfatase A

Arylsulfatase A (ASA, EC 3.1.6.8, Abb. 5) katalysiert die hydrolytische Spaltung von 3-*O*-Sulfogalaktosylhaltigen Glykolipiden, insbesondere von Sulfatid (Abb. 3, Mechanismus bei Lukatela *et al.*, 1998). Das humane ASA-Gen umfasst etwa drei Kilobasen genomischer Sequenz mit acht Exons (Kreysing *et al.*, 1990) und codiert für ein lösliches lysosomales Glykoprotein mit einer Länge von 507 Aminosäuren. Die 18 N-terminalen Aminosäuren



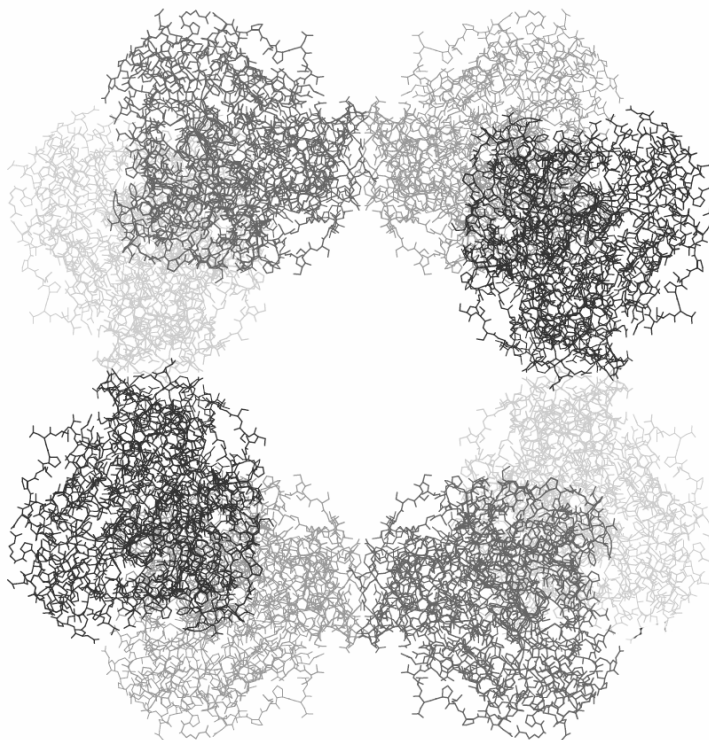
**Abb. 5: Struktur des ASA-Monomers**

Gezeigt ist die ASA-C69A-Mutante im Komplex mit dem künstlichen Substrat p-Nitrokatécholsulfat (von Bülow *et al.*, 2000).

dienen als Signalpeptid für den Import ins ER und werden dort abgespalten. Die verbleibenden 489 Aminosäuren haben eine theoretische Masse von 51.908 Da. Es besteht eine 47–59 %ige Sequenzhomologie mit acht anderen humanen Sulfatasen (Franco *et al.*, 1995). Im katalytischen Zentrum von ASA befindet sich ein konservierter Cysteinrest (Cys-69), der – wie bei allen humanen Sulfatasen – im ER durch das C $\alpha$ -Formylglycin-generierende Enzym (FGE) posttranslational zu einem Aldehyd modifiziert wird (Dierks *et al.*, 2005). Mutationen, die zu einer FGE-Defizienz führen, verursachen die seltene aber schwerwiegende lysosomale Speichererkrankung Multiple Sulfatase-Defizienz (Dierks *et al.*, 2005). In der ASA-Polypeptidkette befinden sich drei N-Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn-158, Asn-184 und Asn-350 (Stein *et al.*, 1989). Nach Übertragung und Trimmen der Zuckerstrukturen werden Mannose-Reste an der ersten und dritten Glykosylierungsstelle (Asn-158 und Asn-350) unter Bildung von M6P-Resten phosphoryliert (Sommerlade *et al.*, 1994) und die reife ASA über den MPR-Weg in die Lysosomen transportiert (Braulke & Bonifacino,

2009). Aufgrund der geschilderten Modifikationen liegt ASA als 62 kDa schweres Polypeptid vor, außerdem kann zu einem geringen Anteil ein proteolytisch prozessiertes 57 kDa-Polypeptid nachgewiesen werden.

Die Quartärstruktur von ASA ist pH-abhängig. Während das Protein bei  $\text{pH} > 6$  als Dimer ( $\alpha_2$ ) vorliegt, assoziiert es bei pH-Werten unter 6, wie sie im Lysosom vorliegen, zu Oktameren ( $\alpha_2$ )<sub>4</sub> (Abb. 6; Lukatela *et al.*, 1998; Vagedes *et al.*, 2002).



**Abb. 6: Struktur des ASA-Oktamers**

Das Oktamer setzt sich aus vier Homodimeren zusammen. Jedes Homodimer besteht aus einem hinten liegenden Monomer (hellgrau) und einem vorne liegenden Monomer (dunkelgrau) (Vagedes *et al.*, 2002).

Sulfatid, das physiologische Substrat von ASA, ist eine Membrankomponente und als solche schlecht wasserlöslich. Um es der enzymatischen Spaltung zugänglich zu machen, wird das Sphingolipid-Aktivatorprotein Saposin B benötigt, welches das membrangebundene Sulfatid rekrutiert und der Substratbindungsstelle von ASA präsentiert (Kolter & Sandhoff, 2005). Saposin B-Defizienz führt zu einem ähnlichen Krankheitsbild wie MLD, jedoch treten zusätzliche Speichersubstanzen auf, da Saposin B auch andere Glykosphingolipid-Substrate aktiviert (Sun *et al.*, 2008). ASA katalysiert auch die Spaltung synthetischer Arylsulfate, woraus letztlich die Namensgebung des Enzyms resultierte. Üblicherweise wird die ASA-Aktivität *in vitro* kolorimetrisch mit dem künstlichen Sulfatester p-Nitrokatecholsulfat bestimmt, welcher gut wasserlöslich ist und keine weiteren Substanzen zur Solubilisierung benötigt (Fluharty & Edmond, 1978).



## 2.5 Tiermodell für MLD: die ASA-Knock-out-Maus

Für MLD existieren keine natürlich vorkommenden Tiermodelle, die Krankheit wurde nur im Menschen beschrieben. Daher wurde von Hess *et al.* (1996) ein ASA-defizientes Knock-out-Mausmodell generiert. Wie humane MLD-Patienten speichern diese Mäuse Sulfatid in der weißen Substanz des Gehirns, in Schwann-Zellen, in den distalen Tubuli der Niere und im Gallenblasenepithel (Schott *et al.*, 2001). Die Mäuse entwickeln progressive neurologische Symptome wie Gleichgewichtsstörungen, Motorkoordinationsprobleme und Hyperaktivität, die an den menschlichen Krankheitsverlauf erinnern (D’Hooge *et al.*, 2001). Erste Symptome können ab einem Alter von sechs Monaten detektiert werden, sie verringern aber nicht die Lebenserwartung der Mäuse (D’Hooge *et al.*, 2001). Der relativ milde Phänotyp lässt sich dadurch erklären, dass das wichtigste pathologische Merkmal der humanen Erkrankung – Demyelinisierung – in den Knock-out-Mäusen nicht nachgewiesen werden konnte (Wittke *et al.*, 2004). Als Grund hierfür wird die kurze Lebensdauer der Maus angesehen, in der sich die zellulären Schädigungen nicht bis zu einem Grad entwickeln, der Demyelinisierung hervorruft (Matzner *et al.*, 2005). ASA-Knock-out-Mäuse stellen somit ein Tiermodell dar, welches die frühen Stadien bzw. die mildere adulte Form der humanen Krankheit repräsentiert.

Um einen verstärkten MLD-Phänotyp hervorzurufen, wurden von Ramakrishnan *et al.* (2007) transgene ASA-Knock-out-Mäuse erzeugt, die das Sulfatid-synthetisierende Enzym Cerebrosid-Sulfotransferase (CST) unter Kontrolle des Proteolipid-Protein (PLP)-Promotors in myelinisierenden Oligodendrozyten und Schwann-Zellen überexprimieren. PLP-CST-transgene ASA-Knock-out-Mäuse weisen eine im Vergleich zu konventionellen ASA-Knock-out-Mäusen verdoppelte Sulfatid-Speicherung in Gehirn und peripheren Nerven auf und zeigen bereits im Alter von einem Jahr eine reduzierte Nervenleitgeschwindigkeit, die in hypo- und demyelinisierten Axonen begründet ist.

Etwa 94 % aller MLD-Patienten sind nicht vollständig ASA-defizient, sondern exprimieren entweder ein ASA-Polypeptid nur in geringer Menge, oder in normaler Menge, jedoch mit reduzierter Aktivität oder Stabilität (von Figura *et al.*, 2001). Demgegenüber zeigen ASA-Knock-out-Mäuse keinerlei ASA-Restexpression (Hess *et al.*, 1996). Bei der experimentellen Untersuchung von Therapien, die auf der Substitution von Wildtyp-ASA beruhen (s. unten), werden die Knock-out-Mäuse folglich mit einem Polypeptid konfrontiert, das dem Immun-

system unbekannt ist. Sie reagieren mit einer teils massiven Immunantwort (Matzner *et al.*, 2005), was die Vergleichbarkeit mit der Situation in Patienten erschwert.

Daher wurde von Matzner *et al.* (2007) ein immuntolerantes ASA-Knock-out-Mausmodell generiert. Die Einbringung eines Transgens, das für eine vollständig inaktive Mutante der humanen ASA (hASA-C69S) codiert und ubiquitär exprimiert wird, induziert Toleranz gegenüber systemisch injizierter humaner ASA, verändert jedoch nicht den MLD-ähnlichen Phänotyp der ASA-Knock-out-Mäuse (Matzner *et al.*, 2007).

## 2.6 Enzymersatztherapie

Zellen sind in der Lage extrazellulär vorhandene lysosomale Enzyme M6P-vermittelt zu endozytieren und in ihre Lysosomen einzubringen. Diese extrazellulären lysosomalen Enzyme können aus der gleichen Zelle oder aus benachbarten Zellen stammen. Auf dieser als *cross-correction* bezeichneten Grundlage wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Therapieansätze für lysosomale Speichererkrankungen entwickelt und evaluiert. Metabolische *cross-correction* lässt sich beispielsweise erzielen durch Stammzell- oder Knochenmarkstransplantation, Transplantation genetisch veränderter Zellen, genetische *in-vitro*-Korrektur von Patientenzellen, *in vivo*-Gentherapie oder aber durch lokale bzw. systemische Injektion von synthetischem Enzym, was als Enzymersatztherapie bezeichnet wird. Andere Ansätze verfolgen Enzymstabilisierungs- (Chaperon-) oder Substratreduktionstherapie (Platt & Lachmann, 2009; Matzner, 2005). Während sich die meisten erwähnten Behandlungsmethoden noch im experimentellen Stadium befinden, wurden die größten Erfolge hinsichtlich breiter klinischer Anwendbarkeit mit der Enzymersatztherapie erzielt.

Bei der Enzymersatztherapie wird dem Patienten synthetisches, rekombinant hergestelltes Enzym intravenös injiziert. Diese Behandlungsform wurde zuerst für die häufigste lysosomale Speichererkrankung, Morbus Gaucher (Typ I), mit großem Erfolg angewendet (Brady, 2006). Bei Morbus Gaucher ist die pathologische Speicherung von Glukosylceramid im Wesentlichen auf Makrophagen des Retikuloendothelialsystems begrenzt, die der intravenösen Enzymgabe leicht zugänglich sind. Zudem konnte die zielgerichtete Aufnahme des Enzyms Glukocerebrosidase in Makrophagen effektiv gesteigert werden, indem durch Exoglykosidase-Behandlung des Enzyms terminale Mannose-Reste freigelegt wurden, die Liganden des

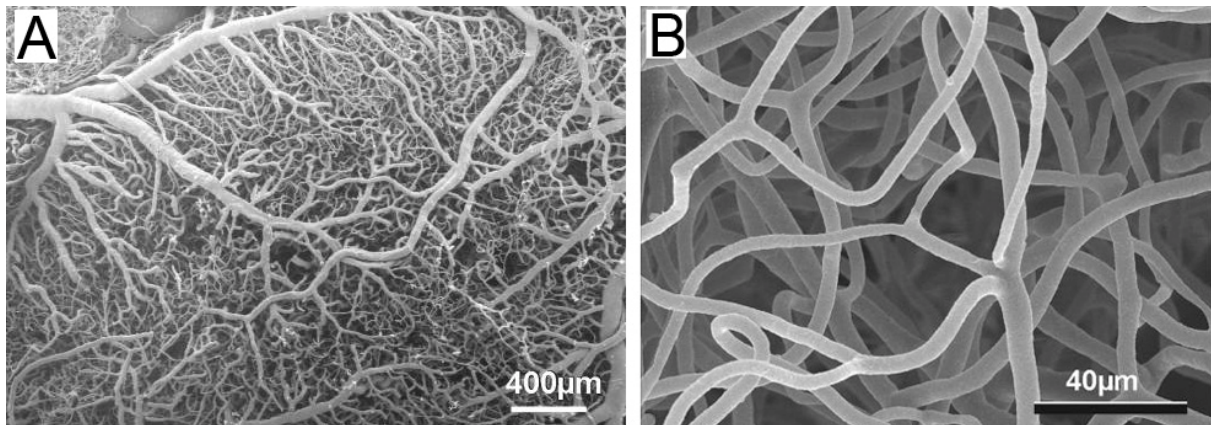
hauptsächlich auf Makrophagen exprimierten Mannoserezeptors sind (van Patten *et al.*, 2007; Irache *et al.*, 2008).

Auch die Behandlung von Morbus Fabry, einer weiteren Glykosphingolipidose, verlief größtenteils erfolgreich, obwohl hier verschiedene Zelltypen in verschiedenen Organen (u.a. in Gefäßsystem, Herz und Niere) betroffen sind. Durch intravenöse Gabe von rekombinanter, M6P-tragender  $\alpha$ -Galaktosidase A konnte Speichermaterial reduziert und die Symptome von Patienten gelindert werden (Wraith *et al.*, 2008; Brady *et al.*, 2001). Klinische Studien zeigten ähnlich vielversprechende Ergebnisse für die Enzyersatztherapie von Morbus Pompe (Kishnani *et al.*, 2007) sowie signifikante Verbesserungen in Teilen der Krankheitsbilder der Mucopolysaccharidosen MPS I (Sifuentes *et al.*, 2007), MPS II (Muenzer *et al.*, 2007) und MPS VI (Harmatz *et al.*, 2008).

Allen bisher erwähnten Erkrankungen ist gemein, dass hauptsächlich viszerale bzw. nicht-neuronale Organe betroffen sind. In diesen Geweben kann durch Enzyersatztherapie die Substratakkumulation reduziert werden, wodurch die pathologischen Zustände verbessert werden und die Patienten an Lebensqualität gewinnen. Enzyersatztherapie scheint jedoch keinen Effekt auf die Manifestation neuronopathischer lysosomaler Speichererkrankungen im Zentralnervensystem zu haben. Grund hierfür ist die Tatsache, dass in die Blutbahn injizierte Proteine die Blut-Hirn-Schranke nicht oder nicht effektiv überwinden können (Begley *et al.*, 2008; Schiffmann, 2010).

## **2.7 Die Blut-Hirn-Schranke**

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine bei allen Landwirbeltieren vorhandene physiologische Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem Zentralnervensystem (ZNS). Neuronen im ZNS kommunizieren durch eine Kombination aus chemischen und elektrischen Signalen, was eine präzise Regulierung der lokalen ionischen Mikroumgebung von Synapsen und Axonen erfordert. Die Blut-Hirn-Schranke dient dazu, diese Milieubedingungen im Gehirn aufrechtzuerhalten und sie von denen des Blutes abzugrenzen. Das Säugetier-Gehirn ist von einem dichten Netzwerk an Kapillargefäßen durchzogen (Abb. 7). Im Menschen weisen die Hirnkapillaren eine Gesamtlänge von etwa 600 km und eine Gesamtoberfläche von 12–18 m<sup>2</sup> auf (Nag & Begley, 2005). Im Gegensatz zu peripheren Kapillargefäßen sind Hirnkapillaren nicht fenestriert.



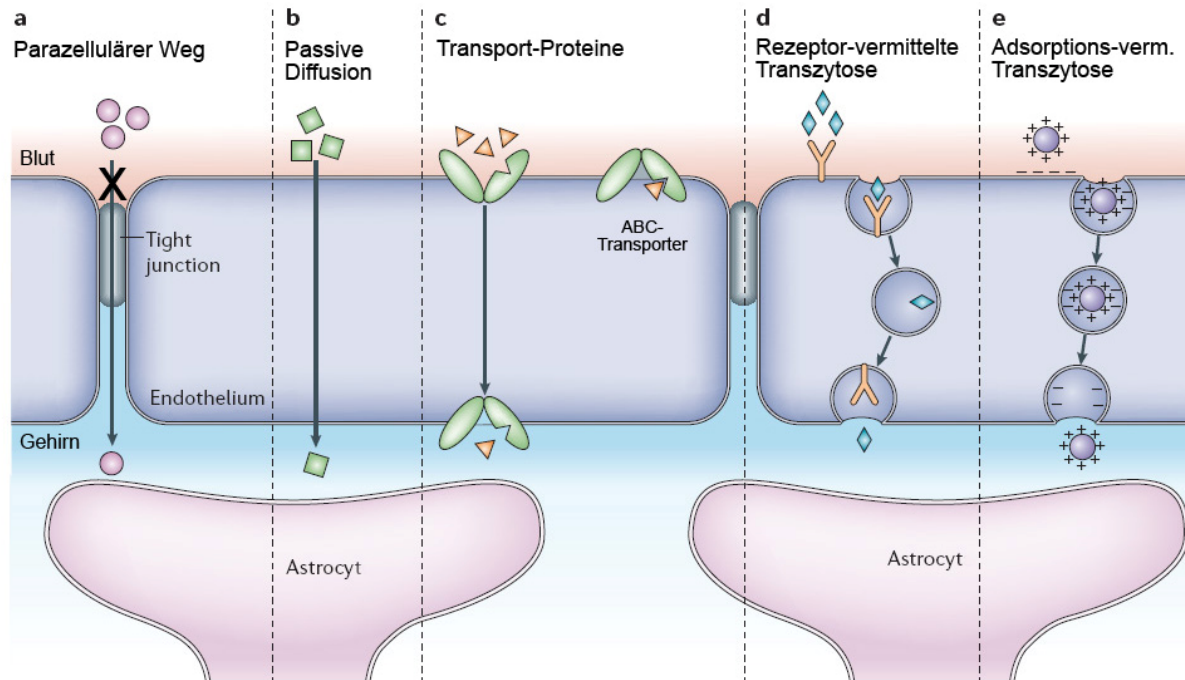
**Abb. 7: Hirnkapillaren der Maus**

Rasterelektronenmikroskop-Aufnahmen von kortikalen vaskulären Korrosionsabgüssen acht Monate alter Wildtyp-Mäuse zeigen das dichte Kapillarnetzwerk im Gehirn (Meyer *et al.*, 2008).

Wesentlicher Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke sind die Endothelzellen, die diese kapillaren Blutgefäße des Gehirns auskleiden (Abbott *et al.*, 2010). Feste Zell-Zell-Verbindungen (*Tight Junctions*) unterbinden den parazellulären Transport von wasserlöslichen Stoffen fast vollständig (Wolburg & Lippoldt, 2002). Ein Maß für die Ionendurchlässigkeit eines Endothels ist der transendotheliale elektrische Widerstand. Er beträgt in peripheren Kapillaren 2–20  $\Omega \text{ cm}^2$ , im Hirnendothel dagegen bis zu 1.800  $\Omega \text{ cm}^2$  (Butt *et al.*, 1990).

Während lipophile Substanzen die Blut-Hirn-Schranke durch passive Diffusion überwinden können (Liu *et al.*, 2004), ist der Übertritt von kleinen hydrophilen Molekülen nur durch transzellulären Transport unter Einbeziehung spezifischer Transportproteine möglich, die in luminaler und abluminaler Membran der Endothelzellen exprimiert werden (Abb. 8). So existieren unterschiedliche spezifische aktive und passive Transporter z.B. für Glukose, Aminosäuren und Nukleoside (Abbott *et al.*, 2010). Potenziell neurotoxische Substanzen, sowohl endogenen als auch xenobiotischen Ursprungs, werden durch verschiedene sogenannte *ATP-binding cassette*-Transporter (ABC-Transporter) aktiv aus dem ZNS entfernt (Begley, 2004).

Proteine können die Blut-Hirn-Schranke ausschließlich durch vesikulären transzytotischen Transport überwinden. Die Transzytose in Hirnkapillarendothelzellen kann – neben dem seltenen unspezifischen Weg über *Caveolae* – einerseits Rezeptor-vermittelt, andererseits Adsorptions-vermittelt erfolgen.



**Abb. 8: Transportwege über die Blut-Hirn-Schranke**

Schematisches Diagramm der Hirnkapillar-Endothelzellen und der Haupttrouten des molekularen Transports über die Blut-Hirn-Schranke. (a) *Tight Junctions* verhindern den parazellulären Transport von wasserlöslichen Substanzen. (b) Die große Oberfläche der endothelialen Lipidmembranen ermöglicht den passiven Übertritt lipidlöslicher Stoffe. (c) Das Kapillarendothel enthält aktive und passive Transportproteine für Glukose, Aminosäuren, Nukleoside und andere niedermolekulare Substanzen. ABC-Transporter entfernen potenziell neurotoxische Agenzien. (d) Bestimmte Proteine werden durch spezifische Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen und durch die Zelle transportiert (Transzytose). (e) Kationische Proteine können über Adsorptions-vermittelte Transzytose ins ZNS transportiert werden (modifiziert nach: Abbott *et al.*, 2006).

Bei der Rezeptor-vermittelten Transzytose löst die Bindung von makromolekularen Liganden an spezifische Rezeptoren auf der Endothelzelloberfläche einen Endozytosevorgang aus. Rezeptor und gebundener Ligand werden über *coated pits* internalisiert, in Clathrin-umhüllten Vesikeln durch das Zytoplasma auf die entgegengesetzte Seite der Zelle transportiert und dort durch Exozytose ausgeschleust. Die Dissoziation von Rezeptor und Ligand erfolgt entweder während des zellulären Transits oder während des Exozytosevorgangs. Beispiele für Proteine, die durch Rezeptor-vermittelte Transzytose transportiert werden, sind Transferrin, Apolipoprotein E und Insulin (Abbott *et al.*, 2010).

Bei der Adsorptions-vermittelten Transzytose werden Endozytosevorgänge durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Endothelzelloberfläche und kationischen Makromolekülen ausgelöst. Auch hier erfolgt die Transzytose in Clathrin-umhüllten Vesikeln. Beispiele für Proteine, die mittels Adsorptions-vermittelter Transzytose transportiert werden, sind kationisiertes Albumin, kationisiertes Immunglobulin G, Histone und Protamin (Hervé *et al.*, 2008).

Während in peripheren Kapillaren die Transzytose von Plasmaproteinen hauptsächlich über *Caveolae* abläuft, ist dieser unspezifische Prozess in Hirnkapillaren äußerst selten. Dennoch können auf diesem Weg geringe Mengen mancher Proteine, z.B. Albumin und Immunglobulin G, über die Blut-Hirn-Schranke transportiert werden (Tuma & Hubbard, 2003; Hervé *et al.*, 2008).

### 3 Material

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (München), Carl Roth (Karlsruhe), Fermentas (St. Leon-Rot) und Pierce/Thermo Fisher (Schwerte) bezogen und in Analysequalität (p.a.) eingesetzt. Zellkultur- und Verbrauchsartikel stammten von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht) und Becton-Dickinson (Heidelberg), Zellkulturmedien und -lösungen von der Firma Invitrogen (Karlsruhe).

Zur Herstellung sämtlicher Puffer und Lösungen wurde Reinstwasser aus einer Barnstead NANOpure-Anlage verwendet. Nicht gesondert erwähnte Lösungen wurden nach Sambrook *et al.* (1989) angesetzt.

#### 3.1 Geräte

Automatikpipette	Handy Step	Brand
Binokular	Stemi SV 6	Zeiss
CO <sub>2</sub> -Inkubator	IR1500	Flow Laboratories
DC-Auftragegerät	Automatic TLC sampler 4 mit Software winCATS V1.2.1	Camag
Dispergiergerät	Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel
Elektrotransfer-Kammer	Trans-Blot SD <i>semi-dry</i>	Bio-Rad
Feinwaage	CP124S-0CE	Sartorius
Film-Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa
Flachbettscanner	PowerLook III mit Software MagicScan V4.3	Umax
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 100 M	Zeiss
Fluoreszenzspektrometer	FP-6200 mit Software Spectra Analysis V1.53	Jasco
FPLC-System	Äkta purifier mit Software UNICORN V4.00.16	Amersham Pharmacia Biotech
Geltrockner	Modell 583	Bio-Rad

---

Heizblock	Block Heater	Stuart Scientific
IEF-System	Protean IEF Cell	Bio-Rad
Infrarot-Fluoreszenz-Scanner	Odyssey mit Software Odyssey V1.2	Li-Cor
Inkubator für DC	UT 6120	Heraeus
Kryostat	CM 1510 S	Leica
Mehrkanalpipette	Transferpette-12	Brand
Mikroplattenleser	GENios mit Software Magellan V3.00.12	Tecan
Mikroplattenwascher	HydroFlex	Tecan
Mikroskop	Telaval 31	Zeiss
pH-Meter	646 digital	Knick
Photometer	DU 640	Beckman
Polyacrylamid-Gelelektrophorese-Systeme	Mini-Protean 3 und Protean II xi	Bio-Rad
Reinstwasseranlage	NANOpure	Barnstead
Sterilbank	Clean Air	Bio-Flow
Szintillationszähler	LS 6500	Beckman Coulter
Thermozykler	T3	Biometra
Ultraschallbad	1210	Branson
Ultrazentrifuge	Optima TLX	Beckman Coulter
Vakuumpumpe	MZ2C	Vacuubrand
Vakuumentrifuge	SpeedVac SC100	Savant
Waage	PC 4400	Mettler
Wasserbad	1083	GFL
Zentrifugen	5415 D, 5417 R, 5810 R Allegra 6KR Labofuge 400e Sorvall RC 5C Plus mit Rotoren GS-3, SS-34	Eppendorf Beckman Heraeus Du Pont

---



---

Flüssigchromatographie-säulen	HiTrap Desalting 5 ml HiTrap Protein A HP 1ml Superdex 200 HR 10/30	Pharmacia Biotech / GE Healthcare
Mini-Gelfiltrationssäulen	CentriSpin 10	Princeton Separations
Säulenmaterial	LiChroprep RP-18 Protein A-Sepharose CL-4B	Merck GE Healthcare
Suspensionskultur-Bioreaktor	miniPERM	Greiner Bio-One

### 3.2 Fertige Reaktionssysteme (Kits)

Chemilumineszenz	<i>ECL Western Blotting Substrate</i>	Pierce
Proteinbestimmung	<i>D<sub>C</sub> Protein Assay</i>	Bio-Rad

### 3.3 Radioaktive Substanzen

1- <sup>14</sup> C-D-Ribose	51,0 mCi/mmol	Hartmann Analytic
<sup>14</sup> C-Ethylendiamin	50,0 mCi/mmol	Biotrend / American Radiolabeled Chemicals

### 3.4 Antikörper

#### Primärantikörper:

Antigen (Bezeichnung)	Spezies	Hersteller
hASA (19-16-3)	Maus, monoklonal	eigene (Hybridomzellen)
hASA (BE#3)	Kaninchen, polyklonal	Eurogentec
PFA-hASA	Kaninchen, polyklonal, affinitätsgereinigt	eigene

**Sekundärantikörper:**

<b>Antigen</b>	<b>Spezies</b>	<b>gekoppelt an</b>	<b>Hersteller</b>
Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	Meerrettichperoxidase	Dianova
Kaninchen IgG	Ziege	Cy3	Dianova
Kaninchen IgG (H+L)	Esel	IRDye800	Rockland
Maus IgG (H+L)	Ziege	MFP488	MoBiTec
Ratte IgG (H+L)	Ziege	Alexa488	Molecular Probes

**3.5 Enzyme**

<b>Enzym</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Hersteller</b>
Alkalische Phosphatase (aus <i>E. coli</i> )	P-4252	Sigma
Endoglykosidase H / H <sub>f</sub>	P0702 / P0703	New England Biolabs
N-Glykosidase F (PNGase F)	11 365 169 001	Roche Applied Science
Sialidase (Neuraminidase)	11 080 725 001	Roche Applied Science

**3.6 Zellen**

BHK-21	DSZM GmbH, Braunschweig
BHK-MPR46-hASA	Chao <i>et al.</i> , 1990
HT1080-hASA C6	T. Dierks, Bielefeld
Hybridoma 19-16-3	Schierau <i>et al.</i> , 1999

**3.7 Mauslinien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Genotyp</b>	<b>generiert von</b>
ASA-Knock-out	mASA -/-	Hess <i>et al.</i> (1996)
immuntolerante ASA-Knock-out	mASA -/ hASA-C69S +	Matzner <i>et al.</i> (2007)
PLP-CST-transgene ASA-Knock-out	PLP-CST + mASA -/-	Ramakrishnan <i>et al.</i> (2007)

## 4 Methoden

Alle nicht aufgeführten Methoden wurden nach Standardprotokollen von Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) oder nach Angaben der jeweiligen Hersteller durchgeführt.

### 4.1 ASA-Bestimmung

#### 4.1.1 Bestimmung der ASA-Aktivität

ASA-Substrat: 10 mM p-Nitro catecholsulfat  
10 % (w/v) NaCl  
0,3 % (w/v) Triton X-100  
1 mg/ml BSA  
in 0,5 M NaAc pH 5,0

Als Standardverfahren wurden 20  $\mu$ l der zu bestimmenden Lösung mit 200  $\mu$ l ASA-Substrat gemischt, 30 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 500  $\mu$ l 1 M NaOH gestoppt. Die Absorption wurde in 1 cm-Küvetten bei 515 nm gemessen ( $\epsilon = 12.400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Bei niedrigen Aktivitäten wurden Inkubationszeit und/oder Probenvolumen variiert. Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\frac{\text{mU}}{\text{ml}} = \frac{\text{Gesamtvolumen [ml]} \cdot 1000}{12,4 \cdot \text{Inkubationszeit [min]} \cdot \text{Probenvolumen [ml]}} \cdot \text{OD}_{515}$$

Zur Bestimmung im 96-Napf-Format wurden je Napf 25–50  $\mu$ l Probenlösung mit 100  $\mu$ l ASA-Substrat gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150  $\mu$ l 1 M NaOH gestoppt und die Absorption in einem Mikroplattenleser bei 505 nm gemessen. Aufgrund des bei abweichender Wellenlänge unbekanntem Extinktionskoeffizienten sowie der unbekanntem optischen Schichtdicke wurden in jeder Platte mehrere ASA-Standards mit bekannten Aktivitäten mitgemessen und die Probenaktivitäten mithilfe einer Kalibriergerade berechnet.

#### 4.1.2 Bestimmung humaner ASA durch indirekten Sandwich-ELISA

Dieses Verfahren zur selektiven Quantifizierung von humaner ASA ermöglichte die Detektion mit einer Nachweisbarkeitsgrenze unter 50 pg und einem linearen Bereich bis ca. 1,5 ng hASA.

Beschichtungspuffer: 25 mM Tris·Cl pH 7,00

Waschpuffer: 0,1 % (w/v) Triton X-100 in PBS

Blotto: 5 % (w/v) Milchpulver  
0,02 % (w/v) Triton X-100 in PBS

ABTS-Substratlösung: 1 mg ABTS pro ml ABTS-Substratpuffer  
(gemäß Herstellerprotokoll Roche Applied Science)

ELISA-Platten: Sarstedt *Tissue Culture Plates 96-well (flat bottom)*, No. 83.1835

Die ELISA-Platte wurde über Nacht bei 4 °C mit 0,125 µg monoklonalem Maus-anti-hASA-Antikörper (19-16-3) in 200 µl Beschichtungspuffer je Vertiefung beschichtet, anschließend mit 300 µl Beschichtungspuffer pro Vertiefung gewaschen und mit je 200 µl Blotto für mindestens 20 min bei RT blockiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 300 µl Waschpuffer pro Vertiefung wurden 100 µl Blotto in jede Vertiefung vorgelegt und *ad* 200 µl mit Standards oder Proben in entsprechenden Puffern aufgefüllt. Die Platte wurde 1,5 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, zweimal mit 300 µl Waschpuffer je Vertiefung gewaschen und nach Zugabe von je 50 µl polyklonalem Kaninchen-anti-hASA-Antikörper (BE#3) 1:2000 in Blotto 1 h ohne Schütteln bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 300 µl Waschpuffer pro Vertiefung wurden je 50 µl Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper 1:2000 in Blotto zugegeben, 1 h bei 37 °C inkubiert und dreimal mit 300 µl Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen. Die enzymatische Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 µl ABTS-Substratlösung je Vertiefung gestartet und die Absorption nach 10–30 min im Mikroplattenleser bei 405 nm (Referenz: 505 nm) vermessen. Die in den Proben enthaltene hASA-Menge wurde mithilfe einer Kalibriergeraden aus Standards mit definierter hASA-Konzentration berechnet.

## 4.2 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch auf 37 °C vorgewärmt.

### 4.2.1 Kultivierung von hASA-überexprimierenden Zellen

BHK-MPR46-hASA- oder HT1080-hASA-Zellen wurden in T175-Flaschen (1- oder 3-Boden-Flaschen) in DMEM / 5 % FCS bis zur Konfluenz angezogen und mit DMEM / 1,5 % FCS weiterkultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte, wenn der enthaltene Indikator Phenolrot durch einen Farbwechsel den Umschwung zu sauren pH-Werten anzeigte. Etwa alle 2–5 Tage wurde das hASA-konditionierte Medium abgenommen und weiterverarbeitet. Nach etwa einem Monat wurden die Zellen entsorgt.

### 4.2.2 Kultivierung von Hybridomzellen

19-16-3-Hybridomzellen wurden in 10- oder 15 cm-Schalen in RPMI-1640-Medium / 10 % FCS angezogen und mit 5 % Serumanteil weiterkultiviert. Da es sich um semi-adhärenente Zellen handelte, wurden zum Wechseln des Mediums die Zellen durch Abspülen mit dem gebrauchten Medium abgelöst, die Zellsuspension 5 min bei 1.000 g zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen. Der konditionierte Überstand wurde eingefroren. Die Zellen wurden 1:5 verdünnt neu ausgesät. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2–4 Tage, abhängig vom pH-Wert des Zellkulturmediums.

### 4.2.3 miniPerm-Bioreaktor

Der miniPerm-Bioreaktor ermöglicht die Kultivierung von Hybridomzellen und anderen nicht- oder semi-adhärenenten Zellen in hohen Dichten. Ein Produktionsmodul mit 40 ml Volumen wird durch eine semipermeable Membran (Ausschlussgrenze 12,5 kDa) von einem Versorgungsmodul (550 ml Volumen) getrennt. Zellen und sekretierte Proteine verbleiben im Produktionsmodul, während das Medium im Versorgungsmodul separat gewechselt werden kann. Ein Rollmechanismus sorgt für Durchmischung und verhindert ein Absetzen der Zellen.

Die Kultivierung von Hybridomzellen erfolgte gemäß Herstellerprotokoll. Die Zellen wurden in 15 cm-Schalen in RPMI-Medium / 10 % FCS herangezogen und in einer Dichte von  $1-2 \cdot 10^6$  Zellen pro ml in das Produktionsmodul gefüllt. Das Versorgungsmodul enthielt 400 ml des gleichen Mediums. Unter Rotation mit 10 rpm wurden die Zellen 2–4 Tage kultiviert und täglich die Zellzahl im Produktionsmodul bestimmt. War eine Dichte von  $1-2 \cdot 10^7$  Zellen pro ml erreicht, so wurde die Zellsuspension entnommen, ein Aliquot mit frischem Medium 1:10 verdünnt und im Produktionsmodul weiterkultiviert. Der Rest der entnommenen Suspension wurde 5 min bei 1.000 g zentrifugiert und der Überstand eingefroren. Das Medium im Versorgungsmodul wurde wöchentlich erneuert.

#### **4.2.4 Präparation primärer kortikaler Neuronen aus Mäuseembryonen**

nach El-Tahir *et al.* (2009)

Neuronen-Medium: Neurobasalmedium (NBM) + 2 % B-27 Supplement + 0,5 % FCS  
+ 0,5 mM L-Glutamin + 25  $\mu$ M L-Glutaminsäure

Trypsin-Inhibitor-Lösung: 9,2 ml Trypsin-Inhibitor 8 mg/ml + 0,8 ml BSA 100 mg/ml

Aus mehreren 14,5–15,5 Tage alten Mäuseembryonen wurden die Gehirne präpariert und in kalter *Hanks' balanced salt solution* gesammelt. Unter dem Binokular wurden die zerebralen Kortizes abgetrennt und von den Meningen separiert. Das Gewebe wurde 10–12 min in 5 ml 0,05 % Trypsin-EDTA bei 37 °C leicht geschüttelt, anschließend die Trypsin-Aktivität durch die Zugabe von Trypsin-Inhibitor-Lösung blockiert und der Überstand verworfen. Die isolierten Neuronen wurden in Neuronen-Medium aufgenommen und die Anzahl vitaler Zellen mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. 1500-3000 Neuronen pro  $\text{mm}^2$  wurden auf Poly-D-Lysin-beschichtete Zellkulturgefäße ausgesät und bis zu drei Wochen kultiviert.

#### 4.2.5 Beladung von primären Neuronen mit Sulfatid

nach Monti *et al.* (1992)

BSA-Lösung: 7 mg/ml BSA (fettfrei)  
0,9 % NaCl

Primäre kortikale Neuronen (4.2.4) wurden auf 6-Napf-Zellkulturplatten ausgesät. Zur Herstellung einer Sulfatid/BSA-Lösung wurden 50 nmol Sulfatid in 15 µl DMSO gelöst und mit 635 µl BSA-Lösung gemischt. Die Lösung wurde 20 min bei 37 °C inkubiert. Je 6-Napf-Vertiefung wurden 150 µl Sulfatid/BSA-Lösung zu 2 ml Medium gegeben. Da das verwendete Neuronen-Medium nur 0,5 % FCS enthielt, wurde auf einen Wechsel zu serumfreiem Medium verzichtet. Die Zellen wurden 24 h kultiviert und anschließend mit PBS gewaschen und geerntet.

#### 4.2.6 Messung der Mannose-6-Phosphat-abhängigen Endozytose von rhASA

BHK-21-Zellen wurden in 6-Napf-Zellkulturplatten ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Je 1 ml BHK-Medium wurde mit 5 µg der zu endozytierenden rhASA sowie entweder 7,5 mM (Endkonzentration) D-Mannose-6-Phosphat-Mononatriumsalz oder 7,5 mM D-Glukose-6-Phosphat-Mononatriumsalz oder dem äquivalenten Volumen sterilen Wassers gemischt und in unterschiedlichen Vertiefungen auf die Zellen gegeben. Nach 20 h wurde das Medium abgenommen, 5 min bei 1.000 g zentrifugiert und der Überstand eingefroren.

Die Zellen jedes Napfes wurden dreimal mit kalter PBS gewaschen, trypsinisiert, in 1,5 ml kalter PBS aufgenommen und 5 min bei 1.000 g sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Zellpellet in 100 µl 0,5 % (w/v) Triton N-101 in TBS aufgenommen. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde die Suspension kräftig durchmischt, eingefroren und nach dem Auftauen 1 min Ultraschall-behandelt. Unlösliche Bestandteile wurden durch 5-minütige Zentrifugation bei 10.000 g sedimentiert und aus dem Überstand die intrazelluläre rhASA-Menge mittels ASA-Aktivitätsbestimmung (4.1.1) oder hASA-ELISA (4.1.2) ermittelt und auf die Proteinkonzentration des Lysats bezogen.

## 4.3 Mäuse

### 4.3.1 Transkardiale Perfusion von Mäusen

Die Maus wurde durch intraperitoneale Injektion von 0,8 ml 25 mg/ml Tribromethanol betäubt und nach einigen Minuten die Schmerzunempfindlichkeit durch Kneifen der Pfoten überprüft. Nach Fixierung der Extremitäten wurde der Brustkorb links und rechts entlang des Sternums eröffnet, das Herz freigelegt und der rechte Vorhof punktiert. Eine Venofix Flügelkanüle (21 G) wurde in den linken Ventrikel eingestochen und mit einer Peristaltikpumpe (Flussrate ca. 6 ml/min) entweder 50 ml PBS oder 25 ml PBS gefolgt von 35 ml Fixativ (4 % Paraformaldehyd in PBS oder 6 % Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3) zugeführt.

### 4.3.2 Homogenisierung von Mausgewebe

Homogenisierungspuffer: TBS pH 7,4  
0,5 % Triton N-101

Protease-Inhibitoren: 2 µg/ml Aprotinin  
(Endkonzentrationen) 1 mM EDTA pH 8,0  
5 mM Iodacetamid  
0,5 µg/ml Leupeptin  
0,4 mM Pefabloc SC  
0,7 µg/ml Pepstatin A

Als Ausgangsmaterial wurden 100–250 mg PBS-perfundiertes Mausgewebe verwendet. Das noch gefrorene Gewebe wurde in 1,5 ml TBS aufgenommen und ca. 10 s mit einem Ultra-Turrax bei 24.000 rpm dispergiert. Entsprechend der vorgesehenen Verwendung wurde das Rohhomogenat wie folgt aufgeteilt und weiterverarbeitet:



	Leber, Niere, Gehirn, Milz	Rückenmark, periphere Nerven
(1) Proteine:	333 µl des Rohhomogenats wurden mit 999 µl Homogenisierungspuffer inkl. Protease-Inhibitoren versetzt und auf Trockeneis eingefroren.	400 µl des Rohhomogenats wurden mit 400 µl Homogenisierungspuffer inkl. Protease-Inhibitoren versetzt und auf Trockeneis eingefroren.
(2) Lipide:	600 µl des Rohhomogenats wurden für die Ultrazentrifugation eingesetzt	1100 µl des Rohhomogenats wurden für die Ultrazentrifugation eingesetzt
(3) Reserve:	ca. 600 µl wurden auf Trockeneis eingefroren	(entfällt)

### 4.3.3 Bestimmung des anti-hASA-Antikörper-Titers von Serum

nach Gieselmann *et al.*(1984)

Nach Zugabe des Antigens (hASA) zum Serum werden die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe mittels Pansorbin ausgefällt, wodurch sich die Antigen-Konzentration im Überstand verringert. Die im Überstand verbliebene Antigenmenge wird durch Messung der ASA-Aktivität bestimmt, woraus der Antikörper-Titer berechnet werden kann.

Zur Herstellung einer Verdünnungsserie wurden 4 µl Serum mit 96 µl 0,2 mg/ml BSA/TBS in einer 96-Napf-Platte mit spitzen Böden gemischt. In jede darunterliegende Reihe wurden 50 µl BSA/TBS vorgelegt. Aus der obersten Reihe wurden 50 µl abgenommen, mit der Lösung der darunterliegenden Reihe gemischt, und erneut 50 µl abgenommen und in die darunterliegende Reihe pipettiert, so dass sich die Serumkonzentration mit jedem Schritt halbierte. Der Vorgang wurde 8-mal wiederholt und die letzten 50 µl verworfen.

In jede Kavität wurden 50 µl 0,75 µg/ml rhASA in BSA/TBS zugegeben und die Platte zur Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe über Nacht bei 4 °C und 100 rpm geschüttelt. Zur Fällung der Antigen-Antikörper-Komplexe wurden je 10-20 µl gewaschenes Pansorbin zugegeben und die Platte 2 h bei 4 °C und 300 rpm inkubiert. Das Pansorbin wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 2.000 g und 4 °C sedimentiert. Je 25 µl Überstand wurden zur ASA-Aktivitätsbestimmung (4.1.1) im 96-Napf-Format verwendet.

## 4.4 Lipide

### 4.4.1 Extraktion von Gangliosiden und Sulfatid aus Mausgewebe

Gewebe-Rohhomogenat (4.3.2) wurde 1 h bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Extraktion apolarer Lipide wurde das Pellet in 5 ml Chloroform/ Methanol 2:1 aufgenommen, mit einem Ultra-Turrax dispergiert und 4 h bei 60 °C gerührt. Unlösliche Bestandteile wurden sedimentiert (5 min bei 1200 rpm, 4 °C) und der Überstand durch eine mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipette filtriert und eingefroren. Zur Isolierung polarer Lipide wurde das Pellet in 5 ml Chloroform/Methanol 1:1 für 4 h bei 60 °C reextrahiert. Unlösliches Material wurde durch erneute Zentrifugation und Filtration des Überstands abgetrennt und das Extrakt mit dem Filtrat des ersten Extraktionsschritts vereinigt. Das Lösungsmittel wurde bei 50 °C im N<sub>2</sub>-Strom vollständig verdampft und die Lipidfraktion in 5 ml Methanol gelöst.

Triglyceride und Phosphoglyceride wurden verseift, indem 125 µl 4 M NaOH zugegeben und 2 h bei 37 °C gerührt wurde. Die alkalische Methanolyse wurde durch Zugabe von 20 µl Eisessig gestoppt und die Lösung bei 50 °C im N<sub>2</sub>-Strom vollständig eingedampft.

Zur Entsalzung des Lipidextrakts wurden selbstgestopfte Säulen aus mit Glaswolle abgedichteten Pasteurpipetten verwendet, die mit LiChroprep-RP-18-Material (Merck) gefüllt und zweimal mit 1 ml Chloroform/Methanol/0,1 M KCl 6:96:94 äquilibriert wurden. Die eingedampfte Lipidfraktion wurde in 1 ml Methanol aufgenommen, mit 1 ml 300 mM Ammoniumacetat versetzt und auf die Säule gegeben. Nach dem Durchsickern wurde die Säule sechsmal mit 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und gebundene Lipide durch Zugabe von 1 ml Methanol gefolgt von sechsmal 1 ml Chloroform/Methanol 1:1 eluiert. Das entsalzte Lipidextrakt wurde bei 50 °C im N<sub>2</sub>-Strom eingedampft und in 600 µl Chloroform/Methanol 1:1 aufgenommen.

Die angegebenen Volumina beziehen sich auf die Extraktion aus Niere, Gehirn und Rückenmark. Für die Extraktion aus peripheren Nerven wurden aufgrund der geringeren Gewebemengen je 2 ml Chloroform/Methanol bzw. halbe Volumina für die alkalische Methanolyse verwendet und das entsalzte Lipidextrakt in 250 µl Chloroform/Methanol 1:1 aufgenommen.

#### **4.4.2 Dünnschichtchromatografie**

Lipidextrakte aus Mausgeweben (4.4.1) sowie entsprechende Lipidstandards wurden mit einem Dünnschichtplatten-Auftragegerät (Camag) auf eine 20 x 20 cm-Kieselgel 60-Dünnschichtplatte (Merck) aufgesprüht. Die Platte wurde in eine mit Laufmittel (Chloroform / Methanol / Wasser, 70 / 30 / 4) gesättigte Laufkammer gestellt und entwickelt, bis die Lauffront etwa drei Viertel der Plattenhöhe erreicht hatte. Zur Visualisierung der Lipide wurde die Platte mit Färbereagenz (625 mM CuSO<sub>4</sub> in 8 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) eingesprüht, mit einem Fön getrocknet und 5 min bei 180 °C inkubiert. Nach dem Einscannen der Platte wurden Lipidbanden mit der Software AIDA densitometrisch quantifiziert.

### **4.5 Proteinreinigung**

#### **4.5.1 Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus Hybridomzellüberständen**

Gesammelte Hybridomzellüberstände wurden aufgetaut, 30 min bei 13.000 g zentrifugiert und filtriert (Porendurchmesser 0,2 µm). Eine Filtratmenge, die geschätzt maximal 10 mg Antikörper enthält, wurde an einer Äkta-FPLC-Anlage mit einer Flussrate von 1 ml/min über eine Protein A-Säule (HiTrap Protein A HP, 1 ml, GE Healthcare) gegeben. Die Säule wurde mit 15 Säulenvolumen PBS pH 7,4 gewaschen und mit 5 Säulenvolumen 100 mM Citrat pH 3,0 eluiert, wobei das Eluat in 500 µl-Fractionen aufgefangen und noch während der Elution mit 1,2 M Tris·Cl pH 8,9 auf neutralen pH eingestellt wurde. Fractionen, die bei 280 nm eine Absorption größer 0,1 aufwiesen, wurden vereinigt und die Proteinkonzentration nach der Bio-Rad D<sub>C</sub>-Methode bestimmt.

Die Reinheit der aufgereinigten Antikörper wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie Brilliantblau-Färbung kontrolliert. Fractionen, die im Gel nur die leichte und schwere Antikörperkette zeigten, wurden mit Natriumazid (0,02 % Endkonzentration) versetzt und bei 4 °C gelagert oder mit 50 % Glycerol versetzt und bei -20 °C gelagert.

#### **4.5.2 Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein A-Sepharose**

Zur Herstellung einer anti-hASA-Immunaффinitätssäule wurden gemäß dem Protokoll von Harlow & Lane (1998) etwa 55 mg monoklonaler Maus-anti-hASA-Antikörper (19-16-3) an

---

6 ml (Trockenvolumen) Protein A-Sepharose CL-4B (GE Healthcare) gebunden und mittels Dimethylpimelimidat bei pH > 8,3 quervernetzt. Die kovalente Bindung der Antikörper an das Säulenmaterial wurde durch Aufkochen des Säulenmaterials in Lämmli-Puffer, SDS-PAGE und anschließender Coomassie Brilliantblau-Färbung kontrolliert.

#### **4.5.3 Immunaффinitäts-Aufreinigung von rhASA aus konditioniertem Zellkulturüberstand**

Konditioniertes Zellkulturmedium wurde 10 min bei 1.500 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand durch Zugabe von 50 % (w/v) Ammoniumsulfat bei 4 °C gefällt. Diese Schritte wurden wiederholt, bis geschätzt mehrere mg gefällte rhASA vorlagen. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 1.500 g und 4 °C wurde der Überstand dekantiert und durch einen Faltenfilter filtriert, während das Pellet, zusammen mit im Faltenfilter zurückgehaltenem Material, in 1/10 des ursprünglichen Volumens TBS pH 7,3 aufgenommen wurde. Die Lösung wurde bei 4 °C viermal für je mindestens 4 h gegen TBS pH 7,3 dialysiert (Ausschlussgrenze: 15 kDa), das Dialysat 30 min bei 13.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand durch einen 0,2 µm-Filter filtriert.

Die Antikörpersäule wurde bei einer Flussrate von 1,5 ml/min mit 5 Säulenvolumen TBS pH 7,3 äquilibriert und mit einer Menge filtriertem Dialysat beladen, die geschätzt weniger als 8 mg rhASA enthielt. Um ungebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule nacheinander mit 10 Säulenvolumen TBS pH 7,3, 5 Säulenvolumen 500 mM NaCl/TBS pH 7,3 und 10 Säulenvolumen TBS pH 7,3 gewaschen. Die Elution erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min mit 2,8 M MgCl<sub>2</sub> / 100 mM NaAc pH 4,5, wobei das Eluat in 1 ml-Fractionen aufgefangen wurde, welche noch während der Elution durch Zugabe von 1,2 M Tris·Cl pH 8,9 auf neutralen pH eingestellt wurden. Fractionen, die ASA-Aktivität enthielten, wurden vereinigt, über Nacht bei 4 °C gegen TBS pH 7,3 dialysiert (Ausschlussgrenze: 10 kDa) und in Centricon Ultrafiltrationseinheiten aufkonzentriert.

#### **4.5.4 Gelfiltrations-Chromatographie von rhASA**

Gelfiltrationspuffer: 150 mM NaCl  
20 mM NaAc pH 5.0

Bei der Gelfiltrations-Chromatographie (Größenausschluss-Chromatographie) werden Moleküle nach ihrem hydrodynamischen Volumen, im Allgemeinen korrelierend mit der Molekülgröße, aufgetrennt. Hierbei konnte die pH-abhängige Oktamerisierung von hASA (Vagedes *et al.*, 2002) ausgenutzt werden, die im Sauren die Abtrennung des 460 kDa-hASA-Oktamers von Proteinen  $\leq 200$  kDa ermöglichte.

Eine Superdex 200 10/300-Säule (Amersham Pharmacia) an einem Äkta-FPLC-System wurde mit 2 Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer äquilibriert und mit maximal 500  $\mu$ l Proteinlösung beladen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Flussrate von 0,25 ml/min über 1,5 Säulenvolumen. Das Eluat wurde in 500  $\mu$ l-Fraktionen aufgefangen und mittels ASA-Aktivitätstest vermessen. ASA-haltige Fraktionen wurden vereinigt, in Centricon Ultrafiltrationseinheiten (Ausschlussgrenze: 10 kDa) aufkonzentriert und durch dreimaliges Auffüllen / Einengen in den gewünschten Puffer umgepuffert.

## 4.6 Modifikation von Proteinen

### 4.6.1 Deglykosylierung von Proteinen mit Endoglykosidase H

Das zu deglykosylierende Protein wurden in einer Konzentration von 1 mg/ml mit der entsprechenden Menge 10x G5-Reaktionspuffer (New England Biolabs) sowie 0,1–6 U/mg Endoglykosidase H oder H<sub>f</sub> gemischt und 24 h bei 37 °C inkubiert. Die jeweils benötigten Enzymmengen wurden in Vorversuchen ermittelt.

Das deglykosylierte Protein wurden mittels Gelfiltrations-Chromatographie (4.5.4) aufgereinigt, Proteinkonzentration sowie spezifische Aktivität bestimmt und der Erfolg des Verbaus durch Größenänderung in der SDS-PAGE verifiziert.

### 4.6.2 Periodat-Behandlung von rhASA

nach Grubb *et al.* (2008)

Periodat-Puffer: 100 mM NaCl  
20 mM Natriumphosphat pH 6,0

Die zu modifizierende rhASA wurde gegen Periodat-Puffer dialysiert und in einer Konzentration von 1 mg/ml mit 10 mM (Endkonzentration) Natriummetaperiodat für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 mM (Endkonzentration) Ethylenglykol gestoppt und die Lösung über Nacht bei 4 °C gegen Periodat-Puffer dialysiert. Zur Reduktion reaktiver Aldehydgruppen wurde der Proteinlösung 100 mM (Endkonzentration) Natriumborhydrid zugegeben, über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend gegen TBS pH 7,4 dialysiert.

Nach der Bestimmung von Proteinkonzentration und spezifischer Aktivität wurde die Modifikation durch Messung der Mannose-6-Phosphat-abhängigen Endozytose (4.2.6) verifiziert.

#### **4.6.3 Dephosphorylierung von rhASA**

Phosphatase-Puffer: 150 mM NaCl  
10 mM Tris·Cl pH 8,0  
10 mM MgCl<sub>2</sub>

Die verwendete alkalische Phosphatase lag als Ammoniumsulfat-Präzipitat vor und wurde vor Verwendung gegen Phosphatase-Puffer dialysiert. Auf gleiche Weise dialysierte rhASA wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml mit 20 mU/mg alkalischer Phosphatase gemischt und 4 h bei 25 °C inkubiert.

Die dephosphorylierte rhASA wurde mittels Gelfiltrations-Chromatographie(4.5.4) aufgereinigt, Proteinkonzentration sowie spezifische Aktivität bestimmt und der Erfolg des Verbaus durch Messung der Mannose-6-Phosphat-abhängigen Endozytose (4.2.6) verifiziert.

#### **4.6.4 Desialylierung von rhASA**

Sialidase-Puffer: 150 mM NaCl  
20 mM NaAc pH 5,5  
4 mM CaCl<sub>2</sub>

Gegen Sialidase-Puffer dialysierte rhASA wurde in einer Konzentration von 1,35 mg/ml mit 50 mU/mg Sialidase 24 h bei 37 °C inkubiert. Die desialisierte rhASA wurde mittels Gelfiltrations-Chromatographie (4.5.4) aufgereinigt, Proteinkonzentration sowie spezifische

Aktivität bestimmt und der Erfolg des Verdaus mittels isoelektrischer Fokussierung (4.7.2) verifiziert.

#### **4.6.5 Generierung von *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs) durch Glykierung**

nach Valencia *et al.* (2004) und Saraswat *et al.* (2008)

Das zu glykierende Protein wurde gegen 0,2 M Natriumphosphat pH 7,4 dialysiert und in einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml mit 500 mM Ribose oder 500 mM Glukose oder 70 mM Glykolaldehyd (jeweils in 0,2 M Natriumphosphat pH 7,4) gemischt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Dunkeln für 1–3 Wochen (Ribose, Glukose) bzw. für wenige Tage (Glykolaldehyd). Anschließend wurde die Proteinlösung gegen PBS pH 7,4 dialysiert und der Erfolg der Glykierung mittels Fluoreszenzspektroskopie (Anregungswellenlänge 335 nm, Emissionswellenlängenbereich 350–600 nm) sowie durch Messung der Absorption bei 340 nm verifiziert.

#### **4.6.6 Kationisierung von Proteinen durch Carbodiimid-vermittelte Amidierung**

nach Kumagai *et al.* (1987)

BSA wurde in PBS pH 7,8 gelöst und in einer Endkonzentration von 13 mg/ml mit 1,74 M Hexamethyldiamin (Endkonzentration) in PBS pH 7,8 gemischt. Nach 20 min wurde 67,7 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid in PBS pH 7,8 zugegeben und 4 h bei RT inkubiert. Die Lösung wurde über Nacht bei 4 °C unter mehrfachem Pufferwechsel gegen PBS pH 7,8 dialysiert. Der Erfolg der Kationisierung wurde mittels isoelektrischer Fokussierung (4.7.2) kontrolliert.

Da ASA nur in Konzentrationen < 5 mg/ml zur Verfügung stand, wurden die Endkonzentrationen reduziert: 1 mg/ml ASA wurde mit 200 mM Hexamethyldiamin und 10 mM 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid inkubiert. Die Kationisierungsreaktion läuft bei niedrigen pH-Werten effektiver ab. Um höhere Kationisierungsraten zu erzielen, wurden Phosphatpuffer mit pH-Werten von 6,8–4,8 in identischen Konzentrationen verwendet. Neben Hexamethyldiamin wurde zur Kationisierung auch das um vier C-Atome verkürzte Ethyldiamin bei identischem Protokoll verwendet.

## 4.7 Proteinanalytik

### 4.7.1 Bestimmung von Protein-gebundenem Phosphat durch Veraschung

nach Buss & Stull (1983)

- Ammoniummolybdat: 10 % (w/v)  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  in 4 M HCl
- Malachitgrün: 0,2 % (w/v) Malachitgrün in  $\text{H}_2\text{O}$
- Phosphatreagenz: 1 Vol. Ammoniummolybdat-Lösung wurde mit 3 Vol. Malachitgrün gemischt, 30 min bei RT geschüttelt und filtriert (0,2  $\mu\text{m}$ -Sterilfilter). Mehrere Wochen bei RT lagerbar. Es kann sich ein Präzipitat bilden, das sich nach kurzem Erwärmen auf 37 °C wieder auflöst.
- Veraschungsreagenz: 10 % (w/v)  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  in 95 % Ethanol
- Phosphatstandards: 0–20  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in  $\text{H}_2\text{O}$
- Reagenzgläser: DURAN 8 x 70 mm, z.B. Roth Art.-Nr. C196.1  
Nur DURAN-Glas verwenden, aus anderen Gläsern (z.B. „Assistent“) kann beim Veraschen Phosphat freigesetzt werden

Die Methode kann zur direkten Bestimmung des Mannose-6-Phosphat-Gehalts verwendet werden, wenn das zu untersuchende Protein keine anderen Phosphorylierungsstellen besitzt und die Proteinpräparation keine phosphathaltigen Verunreinigungen aufweist (z.B. Cofaktoren wie Pyridoxalphosphat, Nukleotide, Nukleinsäuren oder Phospholipide). Alle verwendeten Reagenzien und Gefäße müssen frei von Phosphatverbindungen sein.

Zur Entfernung von eventuell vorhandenen Phosphatverunreinigungen wurden maximal 1,5 ml der zu untersuchenden Proteinlösung über eine 5 ml HiTrap-Entsalzungssäule (GE Healthcare) an einem Äkta FPLC-Systems aufgereinigt. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen TBS pH 7,0 äquilibriert und nach dem Auftrag der Proteinlösung mit 1,5 Säulenvolumen TBS pH 7,0 eluiert (Flussrate: 2,5 ml/min). Das Eluat wurde in 500  $\mu\text{l}$ -Fraktionen aufgefangen, von denen nur die ersten vier Fraktionen kein Phosphat im Puffer enthielten. Die Fraktion mit der höchsten Absorption bei 280 nm wurde weiterverwendet.



Nach der Messung der Proteinkonzentration mittels Bio-Rad D<sub>C</sub>-Methode wurden Proteinmengen, deren erwarteter Phosphatgehalt ca. 0,1–1 nmol entsprach, sowie je 50 µl Phosphatstandards in Reagenzgläser gefüllt und bei 90 °C eingetrocknet. Anschließend wurden 25 µl Veraschungsreagenz zugegeben bei 80 °C eingetrocknet. Die trockenen Proben wurden unter dem Abzug mit einem Gasbrenner zuerst vorsichtig erwärmt, um Kristallwasser auszutreiben, danach unter intensiver Flamme erhitzt (aber nicht ausgeglüht), bis die entstehenden nitrosen Gase entfernt waren. Nach dem Abkühlen wurden 150 µl 1,2 M HCl zugegeben und der weiße Niederschlag durch kräftiges Schütteln vollständig aufgelöst. Zu der klaren Lösung wurden 50 µl Phosphatreagenz pipettiert und 20 min bei RT inkubiert. Die Messung der Absorption bei 660 nm erfolgte in Mikroküvetten gegen Wasser, wobei der Nullwert maximal 0,08 betrug.

Die Kontamination der Proteinpräparation mit freiem Phosphat wurde ausgeschlossen, indem identische Proben unter Auslassung des Veraschungsschritts vermessen wurden.

#### **4.7.2 Isoelektrische Fokussierung**

IEF-Puffer:        8 M Harnstoff  
                      2 % (w/v) CHAPS  
                      50 mM Dithiothreitol  
                      0,2 % (w/v) Bio-Lyte 3/10 Ampholyt (Bio-Rad)

Durch isoelektrische Fokussierung werden Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Hierzu wurden vorgefertigte Polyacrylamid-Gelstreifen mit immobilisiertem pH-Gradient (IPG ReadyStrip 3–10, 17 cm, Bio-Rad) verwendet.

Maximal 30 µl der aufzutrennenden Proteinlösung wurden bei RT in 300 µl IEF-Puffer aufgenommen und in eine 17 cm-Protean IEF-Zelle (Bio-Rad) gefüllt. Der Gelstreifen wurde in die Kammer eingelegt und mit 2,5 ml Mineralöl überschichtet. Die Rehydrierung erfolgte bei 50 V und 20 °C für 12 h, unmittelbar im Anschluss wurde die Fokussierung mit der voreingestellten Standardmethode „*Rapid Ramp*“ gestartet. Nach Beendigung des Laufs wurden die Proteine mittels Coomassie-Blau-Färbung (4.7.2.1) sichtbar gemacht.

#### 4.7.2.1 Coomassie-Blau-Färbung von IEF-Streifen

Fixierer: 20 % (w/v) Trichloressigsäure

Coomassie-Lösung: 0,02 % (w/v) Coomassie Brillantblau R-250  
0,1 % (w/v) CuSO<sub>4</sub>  
in Entfärber

Entfärber: 30 % (v/v) Methanol  
10 % (v/v) Eisessig

Die IEF-Streifen wurden bei RT 1 h in Fixierer geschwenkt, 10 min in Entfärber äquilibriert und 1 h in Coomassie-Lösung gefärbt. Anschließend wurden die Streifen in Entfärber geschwenkt, bis keine unspezifische Hintergrundfärbung mehr erkennbar war.

#### 4.7.3 Immunfluoreszenzfärbung

Blocklösung: 2 % Ziegen Serum in PBS

Zu färbende Zellen wurden auf sterilen Deckgläsern kultiviert und 10 min mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Gewebeschnitte wurden aus gefrorenen Mausorganen mithilfe eines Kryostaten hergestellt. Die zu färbenden Gewebeschnitte oder Deckgläser wurden mit PBS benetzt und bei RT 30 min mit 0,2 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte zur Reduzierung der Autofluoreszenz 10 min in 0,5 % Natriumborhydrid inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch 30-minütige Behandlung mit Blocklösung abgesättigt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte bei 4 °C in wassergesättigter Atmosphäre über Nacht. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper im Dunkeln 2–3 h bei RT auf die Schnitte gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellkerne durch 15-minütige Behandlung mit DAPI (1:500 in PBS) angefärbt, die Schnitte dreimal je 15 min mit PBS gewaschen und in Polyvinylalkohol-Einbettmedium mit DABCO (Fluka) eingebettet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Vergleich der verwendeten rhASA-Sorten

In der vorliegenden Arbeit sollten unterschiedliche Sorten rekombinanter humaner Arylsulfatase A (rhASA) auf ihre therapeutische Wirksamkeit in der Enzymersatztherapie untersucht werden. Die verwendeten rhASA-Sorten unterschieden sich in der zur Expression eingesetzten Zelllinie, der Kultivierungsweise der Zellen sowie der Aufreinigungsprozedur des Proteins (Tabelle 2). Aufgrund dieser Faktoren ergaben sich Unterschiede in der spezifischen Enzymaktivität, in den Strukturen der N-Glykan-Oligosaccharide (Schröder *et al.*, 2010) sowie möglicherweise in noch unbekanntem Eigenschaften des Proteins.

Bezeichnung	Zelllinie	Kultivierung	Aufreinigung	spezifische Aktivität	Glykanstrukturen > Man <sub>5</sub>
<b>BHK-rhASA</b>	BHK (Hamster)	Flaschen, 1,5 % FCS	Immunaффinitätschromatographie	47 U/mg	46 %
<b>CHO-rhASA</b>	CHO (Hamster)	Bioreaktor, serumfrei	Ionenaustauscher (industriell)	39 U/mg	72 %
<b>HT1080-rhASA</b>	HT1080 (human)	Flaschen, 1,5 % FCS	Immunaффinitätschromatographie	5 U/mg	11 %
<b>BR-HT1080-rhASA</b>	HT1080-FGE (human)	Bioreaktor, serumfrei	Ionenaustauscher (industriell)	- ? -	- ? -

**Tabelle 2: Vergleich der in dieser Arbeit verwendeten rhASA-Sorten**

BHK-rhASA und HT1080-rhASA wurden aus Überständen selbst kultivierter Zellen aufgereinigt, während die industriell in Bioreaktoren produzierten Sorten CHO-rhASA und BR-HT1080 von der Firma Shire Human Genetic Therapies (Cambridge, USA) zur Verfügung gestellt wurden. Die spezifische Aktivität wurde mit p-Nitrokatecholsulfat bestimmt. In der Spalte „Glykanstrukturen > Man<sub>5</sub>“ ist der durchschnittliche Prozentsatz an Glykanstrukturen mit mindestens sechs Mannoseresten aller drei N-Glykosylierungsstellen angegeben (nach Schröder *et al.*, 2010). Spezifische Aktivität und Glykosylierung von BR-HT1080-rhASA durften aus vertragsrechtlichen Gründen nicht untersucht werden.

#### 5.1.1 Bestimmung des M6P-Gehalts verschiedener rhASA-Sorten

Der Mannose-6-Phosphat (M6P)-Gehalt von Proteinen wurde bestimmt, indem anorganisches Phosphat durch Veraschung aus den M6P-Gruppen freigesetzt und nach Komplettierung mit

Ammoniummolybdat und Malachitgrün photometrisch quantifiziert wurde (Buss & Stull, 1983). Neben den aufgeführten ASA-Sorten wurde als Kontrolle  $\alpha$ -Galaktosidase A (Replagal von Shire, Hamshire, Großbritannien) vermessen, deren M6P-Gehalt mit 1,3 mol/mol publiziert ist (Sakuraba *et al.*, 2006). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 gezeigt.

ASA-Sorte	mol M6P / mol	Kontrolle	mol M6P / mol
CHO-rhASA	$3,48 \pm 0,18$	$\alpha$ -Galaktosidase A	$1,42 \pm 0,11$
BHK-rhASA	$1,30 \pm 0,06$		
HT1080-rhASA	$0,98 \pm 0,07$		

**Tabelle 3: Mannose-6-phosphat-Gehalt der verschiedenen rhASA-Sorten**

Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Industriell im Bioreaktor produzierte CHO-rhASA wies einen etwa dreifach höheren M6P-Gehalt auf als die in konventioneller Zellkultur exprimierten Sorten BHK- und HT1080-rhASA. Die relativ genaue Übereinstimmung der für  $\alpha$ -Galaktosidase A gemessenen Werte mit dem publizierten M6P-Gehalt zeigte die prinzipielle Eignung der Methode zur M6P-Bestimmung.

## 5.2 Enzymersatztherapie von ASA-Knock-out-Mäusen

### 5.2.1 Behandlung immuntoleranter ASA-Knock-out-Mäuse mit CHO-rhASA und BR-HT1080-rhASA

Immuntolerante ASA-Knock-out-Mäuse weisen neben dem MLD-ähnlichen Phänotyp immunologische Toleranz gegenüber humaner ASA auf (Matzner *et al.*, 2007). An diesen Mäusen sollten zwei industriell hergestellte rhASA-Sorten auf ihre therapeutische Wirksamkeit in der Enzymersatztherapie untersucht werden.

Immuntolerante ASA-Knock-out-Mäuse im Alter von 13–17 Monaten wurden durch vier intravenöse Bolus-Injektionen in wöchentlichen Abständen mit rhASA behandelt. Es wurden zwei rhASA-Sorten, CHO-rhASA und BR-HT1080-rhASA, eingesetzt, die von der Firma Shire Human Genetic Therapies (Cambridge, USA) zur Verfügung gestellt wurden. Die

rhASA-Sorten unterschieden sich in der zur Expression verwendeten Zelllinie. Während CHO-rhASA von Hamster-Ovarialzellen sezerniert wurde, stammte BR-HT1080-rhASA aus einer humanen Fibrosarkomazelllinie. Um eine mögliche Dosisabhängigkeit therapeutischer Effekte zu untersuchen, wurde die Behandlung jeweils mit zwei unterschiedlichen Dosierungen durchgeführt, 5 mg/kg und 20 mg/kg. Kontroll-Mäuse wurden durch Injektion von Puffer scheinbehandelt. Pro Gruppe wurden fünf Mäuse behandelt.

Nach den Injektionen wurden keine Hypersensitivitätsreaktionen beobachtet und das durchschnittliche Gewicht der Mäuse blieb während des Behandlungszeitraums unverändert (nicht gezeigt). Die Mäuse wurden sieben Tage nach der letzten Behandlung getötet und die Organe präpariert. Die durchschnittlichen Gewichte von Gehirn und Nieren wiesen zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede auf (nicht gezeigt).

#### 5.2.1.1 Lipidanalytik

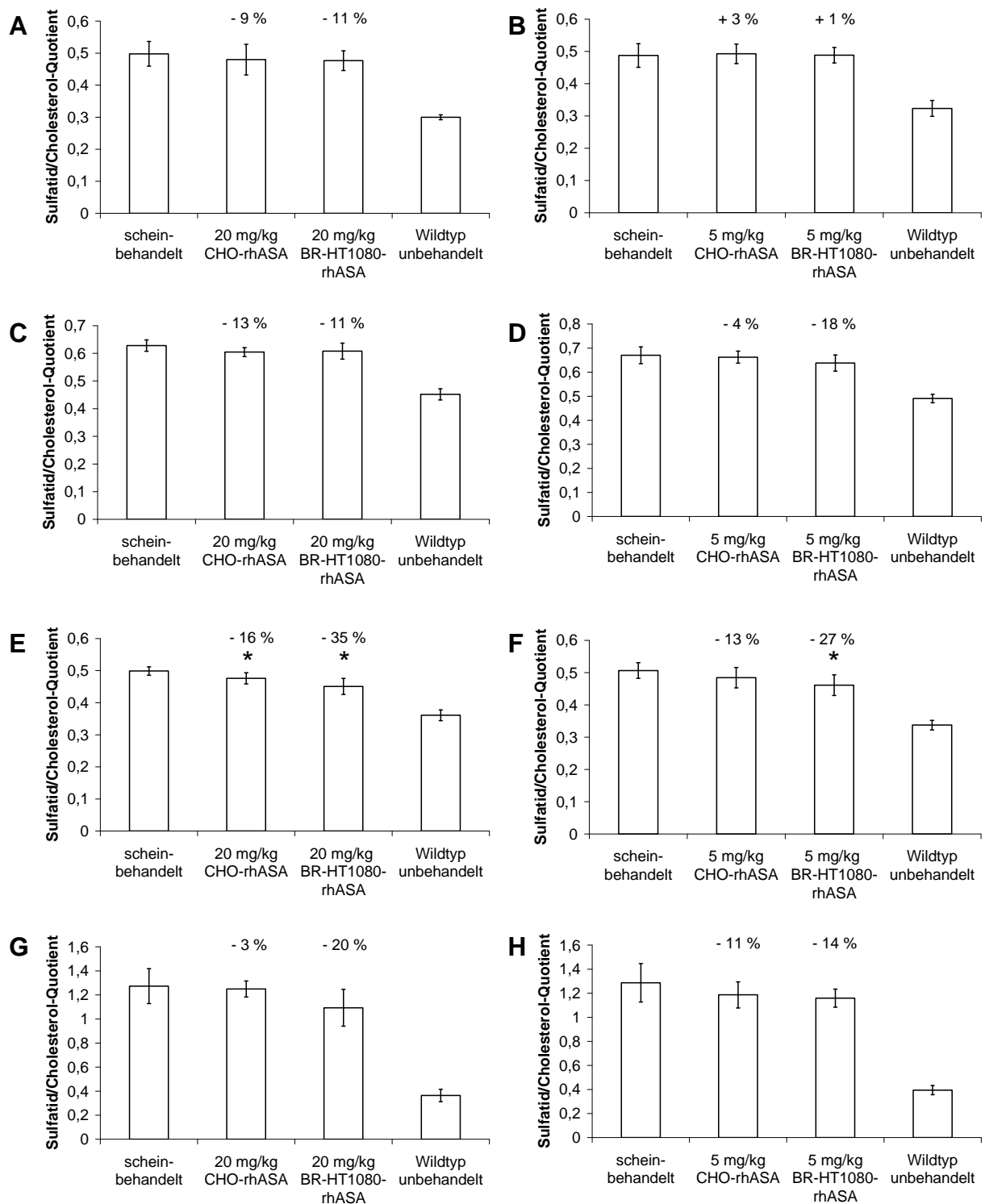
Cholesterol- und Sulfatid-Gehalt von Lipidextrakten aus Gesamtgehirn, Rückenmark, *Plexus brachialis* und Niere wurden mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt. Um die Lipidmengen präzise vergleichen zu können, wurde Cholesterol als interner Standard verwendet und die gemessenen Sulfatid-Werte durch Quotientenbildung auf die jeweiligen Cholesterol-Werte normiert. Zur Quantifizierung der Abnahme des gespeicherten Sulfatids wurden die behandelten Mäuse mit der scheinbehandelten Gruppe sowie altersgleichen unbehandelten Wildtyp-Mäusen verglichen. Der Unterschied zwischen den Sulfatid/Cholesterol-Quotienten von scheinbehandelten Knock-out- und unbehandelten Wildtyp-Mäusen stellte das aufgrund fehlenden Abbaus akkumulierende, überschüssige Sulfatid dar. Zur Berechnung einer prozentualen Abnahme der Sulfatid-Speicherung wurde dieser Wert als 100 % definiert.

Zuerst wurden die Lipide des zentralen Nervensystems untersucht, die für die Therapie der neurodegenerativen MLD-Erkrankung von entscheidender Bedeutung sind. Die Behandlung mit der höheren Dosis von 20 mg/kg bewirkte im Gehirn für beide rhASA-Sorten eine Abnahme des gespeicherten Sulfatids um etwa 10 %, die jedoch statistisch nicht signifikant war (Abb. 9 A). Bei Behandlung mit der niedrigeren Dosis von 5 mg/kg rhASA blieb der Sulfatid-Gehalt unverändert (Abb. 9 B). Im Rückenmark (Abb. 9 C, D) wurde gespeichertes Sulfatid nach Enzymersatztherapie mit beiden rhASA-Sorten um 4–18 % im Vergleich zu scheinbe-

handelnden Tieren abgebaut. Die Werte waren statistisch nicht signifikant und es konnte keine Dosisabhängigkeit festgestellt werden.

Als Teil des peripheren Nervensystems wurden die Sulfatid-Spiegel des *Plexus brachialis* untersucht. Nach Behandlung mit 20 mg/kg war akkumuliertes Sulfatid signifikant reduziert (Abb. 9 E). Für CHO-rhASA wurde eine Reduktion von 16 %, für BR-HT1080-rhASA eine Reduktion von 35 % gemessen. Auch bei Verabreichung der niedrigeren Dosis von 5 mg/kg war die Abnahme der Sulfatid-Speicherung für BR-HT1080-rhASA mit 27 % stärker ausgeprägt als für CHO-rhASA mit 13 % (Abb. 9 F).

In der Niere, einem weiteren Speicherorgan von Sulfatid, bewirkte die Behandlung mit 20 mg/kg CHO-rhASA eine nur geringe Reduktion um 3 %, während 20 mg/kg BR-HT1080-rhASA die Sulfatid-Speicherung um 20 % verminderte (Abb. 9 G). Beim Einsatz der niedrigeren Dosis von 5 mg/kg zeigte sich für beide rhASA-Sorten mit 11 % bzw. 14 % eine ähnliche Sulfatid-Abnahme (Abb. 9 H). Es konnte jedoch keine statistische Signifikanz für die gemessenen Werte in der Niere festgestellt werden. Tendenziell bewirkte BR-HT1080-rhASA, wie im *Plexus brachialis*, eine höhere Reduktion als CHO-rhASA.



**Abb. 9: Sulfatid-Reduktion nach 4-maliger Behandlung mit CHO-rhASA oder BR-HT1080-rhASA in (A, B) Gehirn, (C, D) Rückenmark, (E, F) Plexus brachialis, (G, H) Niere.**

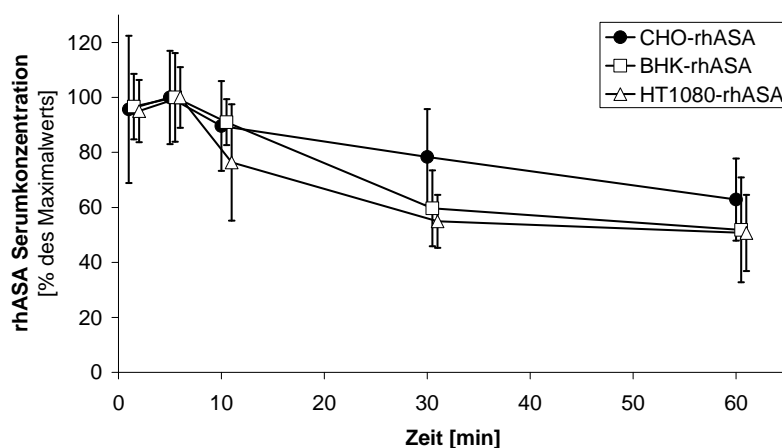
Immuntolerante ASA-Knock-out-Mäuse wurden 4-mal in wöchentlichem Abstand mit 20 mg/kg (linke Spalte) oder 5 mg/kg (rechte Spalte) CHO-rhASA oder BR-HT1080-rhASA intravenös behandelt und die Sulfatid- und Cholesterol-Mengen in unterschiedlichen Geweben mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 5$ ). Die angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die Differenz zwischen scheinbehandelten ASA-Knock-out- und unbehandelten Wildtyp-Mäusen, die als 100 % definiert wurde. Statistisch signifikante Abnahmen sind mit einem Stern markiert ( $t$ -Test,  $P < 0,05$ ).

## 5.2.2 Hochdosis-Behandlung konventioneller ASA-Knock-out-Mäuse mit verschiedenen rhASA-Sorten

Die im vorangegangenen Versuch verwendeten immuntoleranten ASA-Knock-out-Mäuse wiesen den experimentellen Nachteil auf, dass die von ihnen zur Induktion der Immuntoleranz ubiquitär exprimierte humane ASA-Mutante hASA-C69S mit dem hASA-ELISA kreuzreagiert und somit keine Untersuchungen zur Pharmakokinetik der injizierten rhASA möglich waren. Daher wurden im Folgenden konventionelle ASA-Knock-out-Mäuse verwendet, bei denen die ELISA-Messungen möglich waren.

### 5.2.2.1 Pharmakokinetik von CHO-, BHK- und HT1080-rhASA

Zwölf Monate alte ASA-Knock-out-Mäuse wurden mit 40 mg/kg CHO-, BHK- oder HT1080-rhASA durch eine intravenöse Bolus-Injektion in die Schwanzvene behandelt. Zur Bestimmung der Serumkinetik wurde den Mäusen zu festgelegten Zeitpunkten nach der Injektion Blut entnommen und die Serumkonzentration von rhASA bestimmt (Abb. 10). BHK- und HT1080-rhASA wurden schneller vom Gewebe aufgenommen als CHO-rhASA und wiesen eine Serumhalbwertszeit von etwa 60 min im Vergleich zu 80–90 min für CHO-rhASA auf.



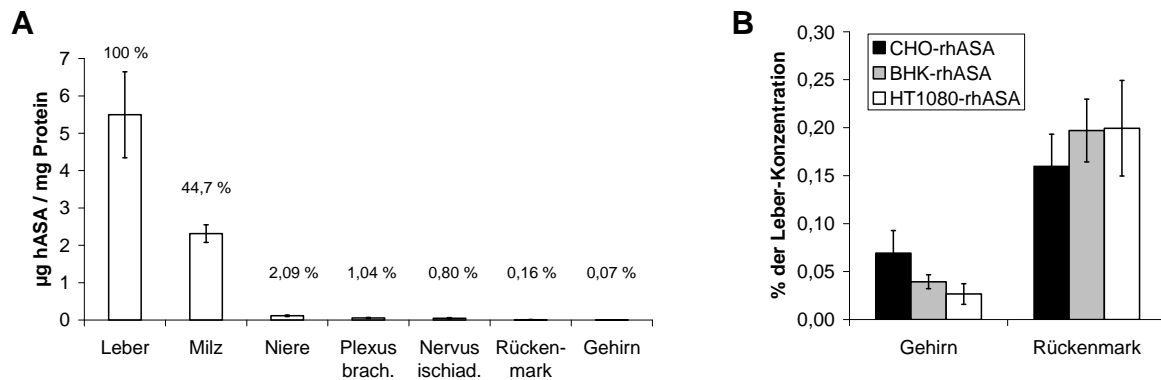
**Abb. 10: Serumkinetik**

Serumkonzentrationen nach Injektion von 40 mg/kg CHO-, BHK- oder HT1080-rhASA. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Konzentrationen auf den jeweiligen Maximalwert normiert. Die Maximalwerte waren 333 µg/ml, 432 µg/ml und 246 µg/ml. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 5).

Zur Bestimmung der Gewebeverteilung wurden die behandelten Mäuse zwei Stunden nach der Injektion perfundiert und die rhASA-Konzentration in den Gewebehomogenaten gemessen (Abb. 11). Die Hauptmenge der injizierten rhASA wurde in der Leber gefunden, während die Konzentrationen im Nervensystem gering waren. Abb. 11 B zeigt die Konzentrationen der



rhASA-Sorten im zentralen Nervensystem. CHO-rhASA wies zwei Stunden nach der Injektion eine höhere Konzentration im Gehirn auf als BHK- und HT1080-rhASA. Im Rückenmark war CHO-rhASA in geringfügig niedrigeren Mengen vorhanden als die beiden anderen rhASA-Sorten.

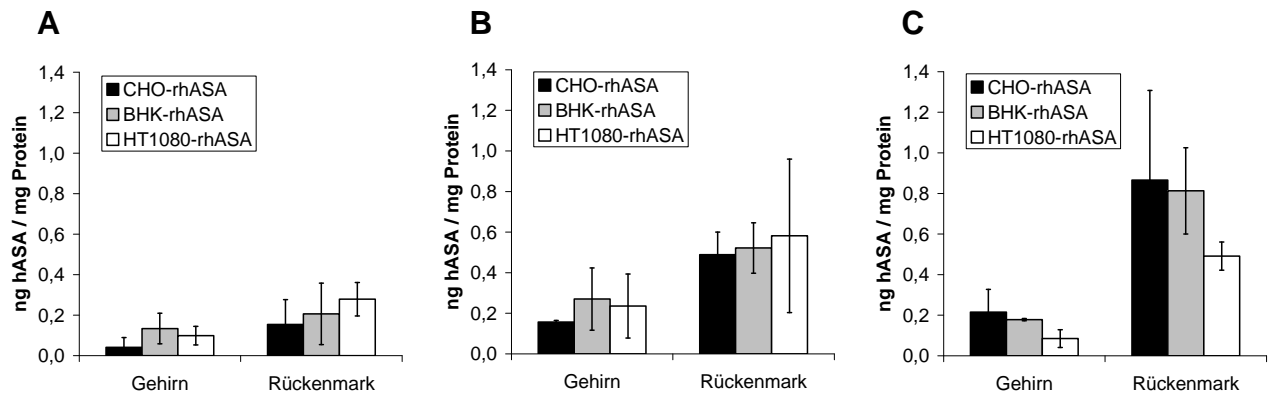


**Abb. 11: Gewebeverteilung zwei Stunden nach Injektion von 40 mg/kg rhASA**

- (A) Konzentration von CHO-rhASA in verschiedenen Geweben, gemessen mittels ELISA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 5$ ). Zusätzlich sind die prozentualen Konzentrationen bezogen auf die Leberkonzentration angegeben.
- (B) Konzentrationen von CHO-, BHK- und HT1080-rhASA im zentralen Nervensystem, gemessen mittels ELISA. Die Werte wurden auf die jeweilige rhASA-Konzentration in der Leber normiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 5$ ).

Um die Gewebeverteilungen der rhASA-Sorten nach mehrfachen Injektionen vergleichen zu können, wurden zwölf Monate alte ASA-Knock-out-Mäuse ein-, zwei-, oder dreimal mit 40 mg/kg rhASA behandelt und sieben Tage nach der Injektion die rhASA-Konzentration in den Geweben des zentralen Nervensystems gemessen (Abb. 12). Im Gehirn von einmal injizierten Mäusen war nach sieben Tagen die Konzentration von BHK-rhASA im Vergleich zu den anderen rhASA-Sorten am höchsten, die von HT1080-rhASA unwesentlich geringer und die von CHO-rhASA am niedrigsten (Abb. 12 A). Auch im Rückenmark wurde für CHO-rhASA die niedrigste Konzentration gemessen, während die HT1080-rhASA-Konzentration fast doppelt so hoch war. Bei zweimal injizierten Mäusen (Abb. 12 B) blieb diese Verteilung – bei insgesamt um den Faktor 2 erhöhten Werten – im Wesentlichen erhalten. Die gemessene BHK-rhASA-Konzentration war im Gehirn höher als die der beiden anderen Sorten. Die Konzentrationsunterschiede im Rückenmark waren gering, zeigten aber tendenziell für HT1080-rhASA die höchste Konzentration. Dreimal mit rhASA injizierte Mäuse zeigten ein anderes Verteilungsmuster (Abb. 12 C). In diesen Mäusen war im Gehirn die CHO-rhASA-

Konzentration am höchsten, während die Konzentrationen von BHK- und HT1080-rhASA niedriger waren als nach der zweiten Injektion. Das Rückenmark wies ähnliche CHO- und BHK-rhASA-Konzentrationen auf, während die HT1080-rhASA-Konzentration deutlich geringer war.



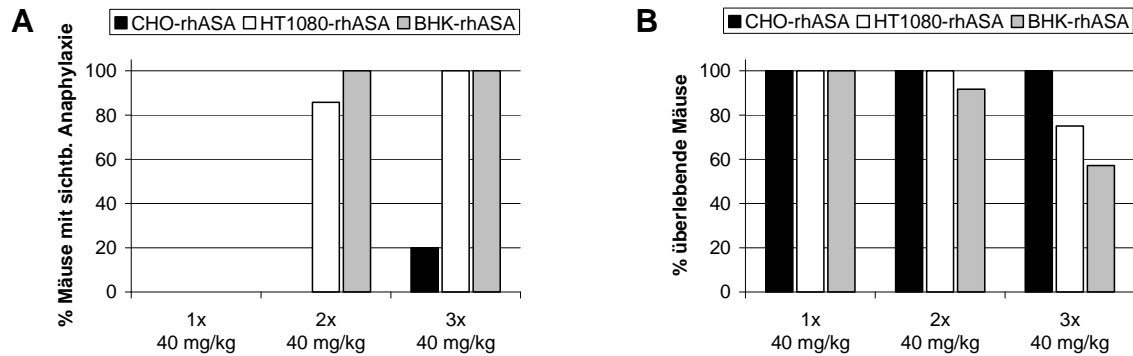
**Abb. 12: Konzentration der rhASA-Sorten im ZNS 7 Tage nach (A) einer, (B) zwei und (C) drei Injektionen**

Die Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 3$ ). Die hohen Standardabweichungen resultierten aus der Messung nahe des Detektionslimits des hASA-ELISAs.

#### 5.2.2.2 Immunologische Nebenwirkungen

Es war bekannt, dass die wöchentlich wiederholte intravenöse Verabreichung von 20 mg/kg CHO-rhASA in ASA-Knock-out-Mäusen, beginnend nach der dritten Injektion, immunologische Nebenwirkungen verursacht (Matzner *et al.*, 2008). Daher wurde die Untersuchung verschiedener rhASA-Sorten auf drei Behandlungen begrenzt und das Käfigverhalten der Mäuse innerhalb der ersten Stunde nach den Injektionen überwacht. Die erste Injektion von 40 mg/kg CHO-, BHK- oder HT1080-rhASA in zwölf Monate alte ASA-Knock-out-Mäuse wurde ohne Nebenwirkungen toleriert. Nach der zweiten Injektion von BHK- und HT1080-rhASA traten jedoch innerhalb von wenigen Minuten bei allen behandelten Mäusen anaphylaktische Symptome auf, die mit einem Kratzverhalten begannen und Atmungsschwierigkeiten sowie reduzierte Käfigaktivität nach sich zogen. Nach der dritten Injektion beider rhASA-Sorten begannen die Symptome früher und waren intensiver ausgeprägt. Bei der Behandlung mit CHO-rhASA traten erste Symptome nach der dritten Injektion vereinzelt und in deutlich schwächerer Form auf (Abb. 13 A).

Während alle Mäuse die erste Injektion überlebten, traten bei der Behandlung mit BHK-rhASA vereinzelt Todesfälle nach der zweiten und bei fast der Hälfte der Mäuse nach der dritten Injektion auf. Ein Viertel der Mäuse verstarb nach der dritten Injektion von HT1080-rhASA. Dagegen verursachte die Behandlung mit CHO-rhASA keine Todesfälle (Abb. 13 B).



**Abb. 13: Anaphylaktische Reaktion und Mortalität nach mehrfachen Injektionen von rhASA**

ASA-Knock-out-Mäusen wurde in wöchentlichen Abständen 40 mg/kg verschiedener rhASA-Sorten in die Schwanzvene injiziert (n = 4–16). (A) Prozentsatz der Mäuse mit äußerlich sichtbarer anaphylaktische Reaktion. Betroffene Mäuse zeigten wenige Minuten nach der Injektion reduzierte Käfigaktivität, schwere Atmung und ein Kratzverhalten. (B) Überlebensrate nach der Injektion verschiedener rhASA-Sorten.

Die Bestimmung der anti-rhASA-Antikörpertiter durch Immunpräzipitation zeigte keine auffälligen Unterschiede zwischen den Seren von CHO-, BHK- und HT1080-rhASA-behandelten Mäusen (nicht gezeigt). In allen drei Gruppen konnten Antikörper nach der zweiten Injektion nachgewiesen werden. Die niedrigen Titer waren nach der dritten Injektion leicht erhöht.

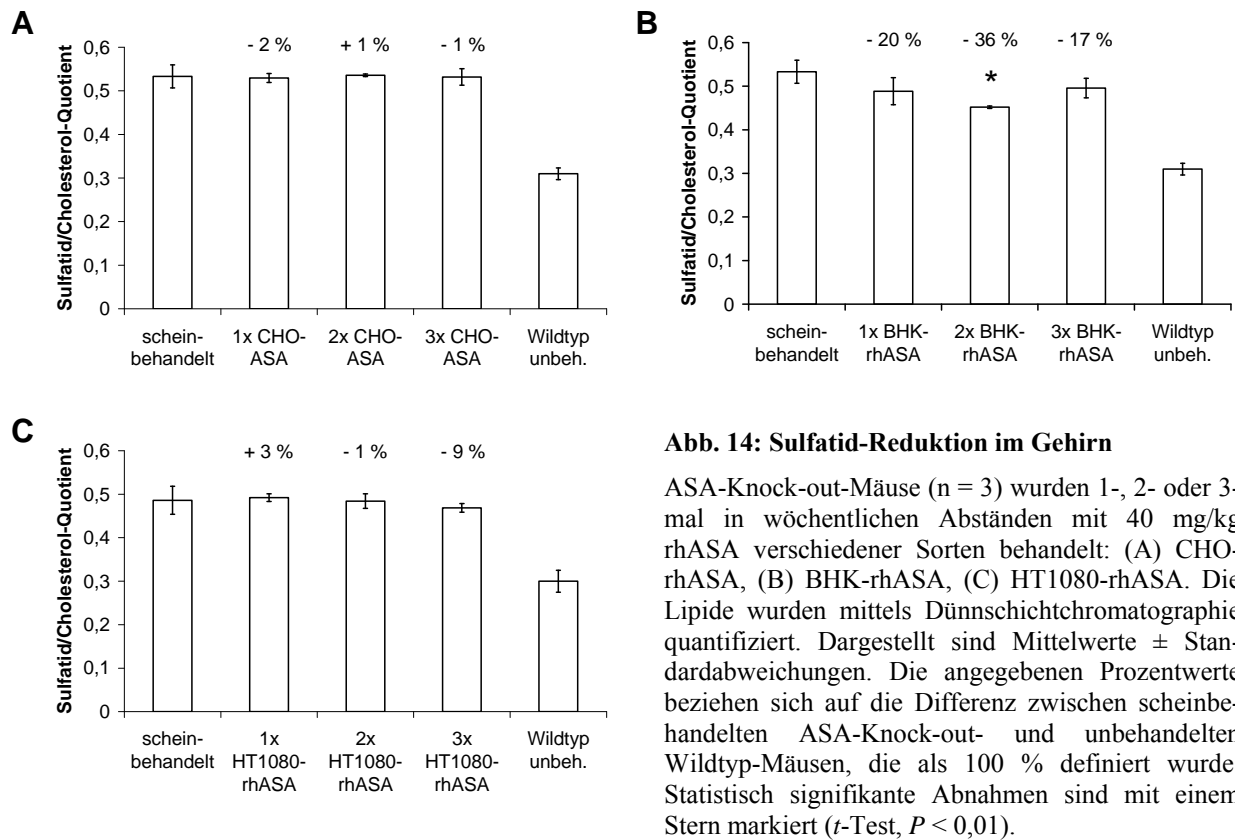
### 5.2.2.3 Lipidanalytik

Um das therapeutische Potenzial der rhASA-Sorten vergleichen zu können, wurden zwölf Monate alte ASA-Knock-out-Mäuse ein-, zwei-, oder dreimal mit 40 mg/kg CHO-, BHK- oder HT1080-rhASA behandelt und sieben Tage nach der letzten Injektion getötet. Die Cholesterol- und Sulfatid-Mengen in Lipidextrakten aus Gesamtgehirn, Rückenmark und Niere wurden mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt. Die gemessenen Sulfatid-Werte wurden durch Quotientenbildung auf den jeweiligen Cholesterolwert normiert. Zur Quantifizierung der Reduktion des gespeicherten Sulfatids wurden die behandelten ASA-Knock-out-Mäuse mit der scheinbehandelten Gruppe sowie altersgleichen unbehandelten Wildtyp-Mäusen verglichen. Der Unterschied zwischen den Sulfatid/Cholesterol-Quotienten von scheinbehandelten Knock-out- und Wildtyp-Mäusen wurde als 100 % festgelegt.

Während die Sulfatid-Spiegel im Gehirn (Abb. 14) auch nach mehrfacher Behandlung mit CHO- und HT1080-rhASA annähernd unverändert blieben, führte die Behandlung mit BHK-rhASA bereits nach der ersten Injektion zu einer tendenziellen Reduktion akkumulierten Sulfatids um 20 % und nach der zweiten Injektion zu einer statistisch signifikanten Abnahme um 36 %. Nach der dritten Injektion stieg der Sulfatid-Spiegel wieder an, war aber im Vergleich zur scheinbehandelten Kontrollgruppe noch immer um 17 % reduziert.

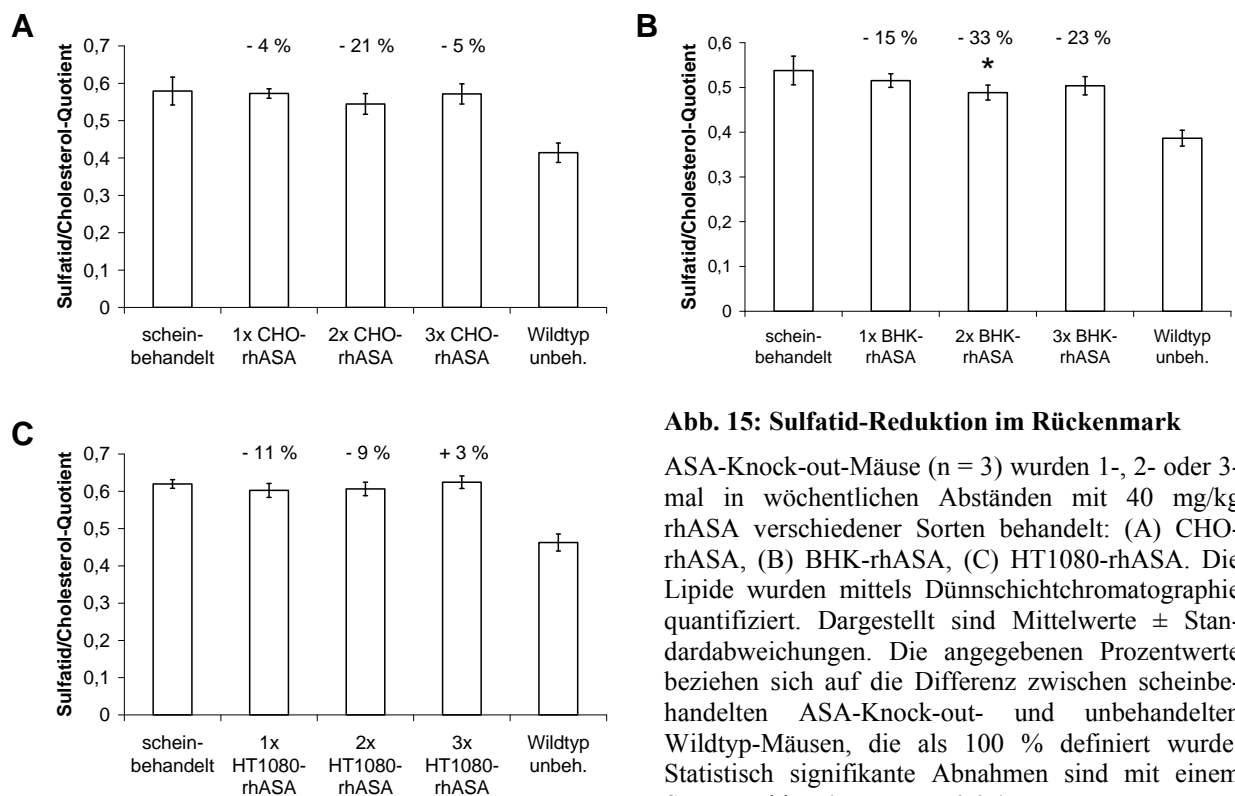
Im Rückenmark (Abb. 15) zeigten die Sulfatid-Spiegel nach der zweifachen Behandlung mit CHO-rhASA eine tendenzielle, aber nicht signifikante Abnahme der Speicherung um 20 %. Die Behandlung mit BHK-rhASA bewirkte schon nach der ersten Dosis eine deutlichere Reduktion als die CHO-rhASA-Behandlung. Nach der zweiten Injektion konnte eine statistisch signifikante Reduktion gespeicherten Sulfatids um 33 % nachgewiesen werden. Wie im Gehirn stieg der Sulfatid-Spiegel auch im Rückenmark nach der dritten BHK-rhASA-Behandlung wieder leicht an, blieb jedoch 20 % niedriger als bei der scheinbehandelten Kontrollgruppe. Die Behandlung mit HT1080-rhASA bewirkte nur eine tendenzielle Reduktion um etwa 10 % nach der ersten und zweiten Injektion.

Die Sulfatid-Speicherung in der Niere (Abb. 16) wurde im Vergleich der rhASA-Sorten von CHO-rhASA am effizientesten reduziert. Während schon die einmalige Behandlung eine Halbierung des gespeicherten Sulfatids und die dreimalige Behandlung eine Reduktion um 62 % bewirkte, war Sulfatid in den zweimalig behandelten Tieren überraschenderweise nur um 9 % erniedrigt. Die Behandlung mit BHK-rhASA war nach der ersten Dosis am effektivsten und führte zu einer Reduktion um 35 %, während der Sulfatid-Spiegel nach der zweiten und dritten Injektion wieder leicht anstieg. Die insgesamt schwächste Reduktion wurde für die HT1080-rhASA-Behandlung beobachtet. Nur nach zweimaliger Injektion war die Sulfatid-Speicherung tendenziell erniedrigt.



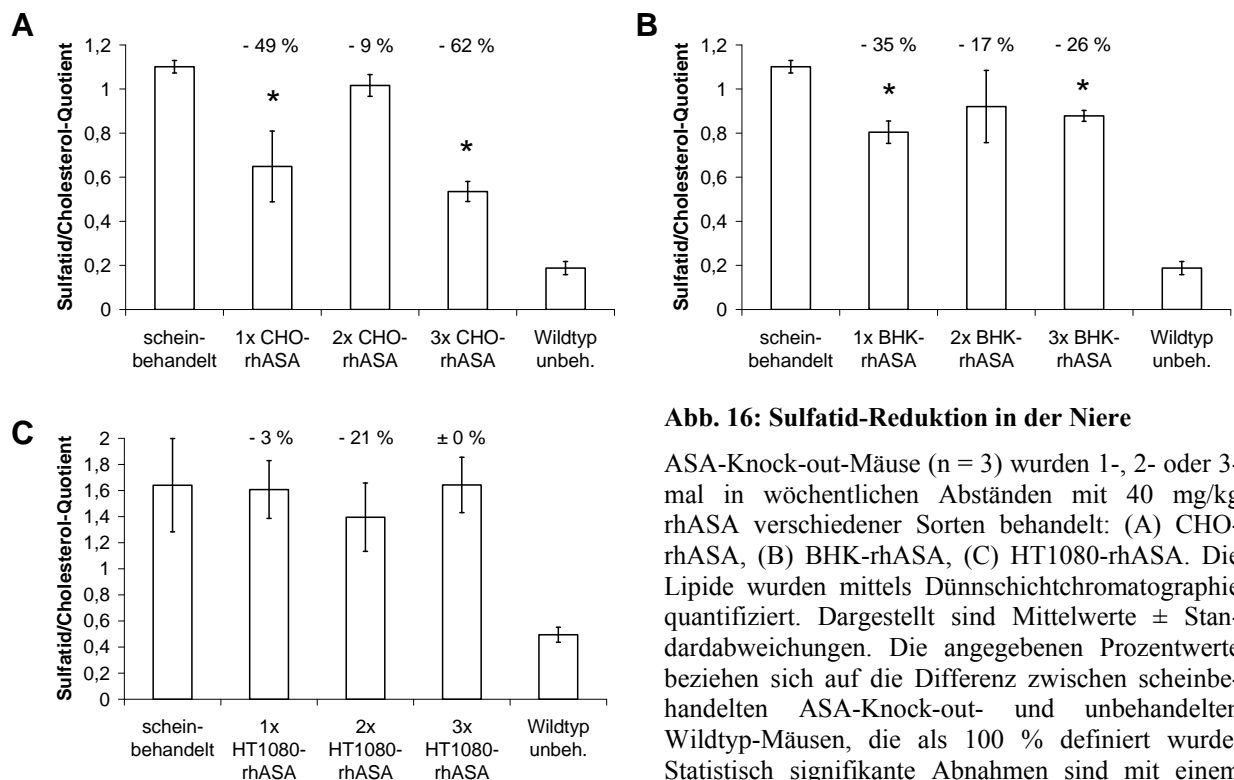
**Abb. 14: Sulfatid-Reduktion im Gehirn**

ASA-Knock-out-Mäuse ( $n = 3$ ) wurden 1-, 2- oder 3-mal in wöchentlichen Abständen mit 40 mg/kg rhASA verschiedener Sorten behandelt: (A) CHO-rhASA, (B) BHK-rhASA, (C) HT1080-rhASA. Die Lipide wurden mittels Dünnschichtchromatographie quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. Die angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die Differenz zwischen scheinbehandelten ASA-Knock-out- und unbehandelten Wildtyp-Mäusen, die als 100 % definiert wurde. Statistisch signifikante Abnahmen sind mit einem Stern markiert ( $t$ -Test,  $P < 0,01$ ).



**Abb. 15: Sulfatid-Reduktion im Rückenmark**

ASA-Knock-out-Mäuse ( $n = 3$ ) wurden 1-, 2- oder 3-mal in wöchentlichen Abständen mit 40 mg/kg rhASA verschiedener Sorten behandelt: (A) CHO-rhASA, (B) BHK-rhASA, (C) HT1080-rhASA. Die Lipide wurden mittels Dünnschichtchromatographie quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. Die angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die Differenz zwischen scheinbehandelten ASA-Knock-out- und unbehandelten Wildtyp-Mäusen, die als 100 % definiert wurde. Statistisch signifikante Abnahmen sind mit einem Stern markiert ( $t$ -Test,  $P < 0,05$ ).



**Abb. 16: Sulfatid-Reduktion in der Niere**

ASA-Knock-out-Mäuse ( $n = 3$ ) wurden 1-, 2- oder 3-mal in wöchentlichen Abständen mit 40 mg/kg rhASA verschiedener Sorten behandelt: (A) CHO-rhASA, (B) BHK-rhASA, (C) HT1080-rhASA. Die Lipide wurden mittels Dünnschichtchromatographie quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen. Die angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die Differenz zwischen scheinbehandelten ASA-Knock-out- und unbehandelten Wildtyp-Mäusen, die als 100 % definiert wurde. Statistisch signifikante Abnahmen sind mit einem Stern markiert ( $t$ -Test,  $P < 0,05$ ).

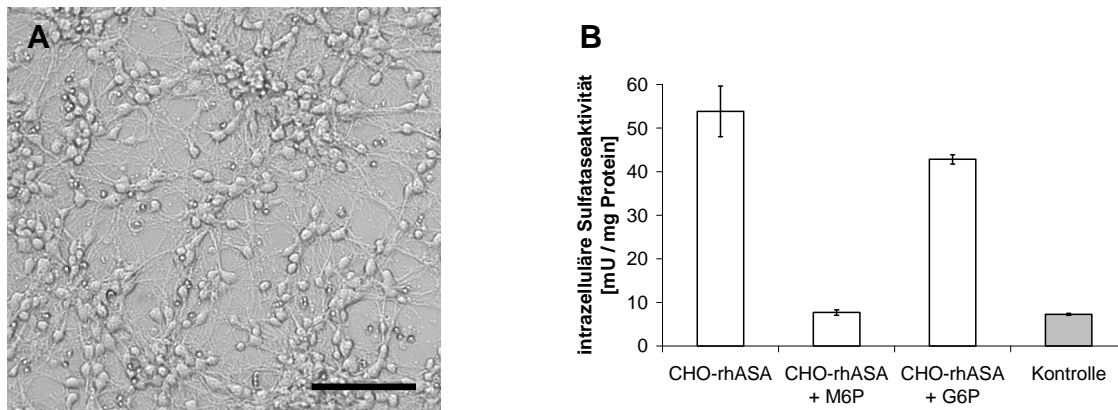
### 5.3 Untersuchungen an primären kortikalen Neuronen

Zur Untersuchung des Endozytoseverhaltens von CHO-rhASA in Neuronen wurde eine Primärkultur von embryonalen kortikalen Neuronen verwendet (El-Tahir *et al.*, 2009). Die Zellen wurden aus E14,4–E15,5 alten Embryonen hergestellt, waren praktisch frei von Fibroblasten und ließen sich mehrere Wochen lang kultivieren. Schon nach wenigen Tagen bildeten sie ein dichtes interzelluläres Netzwerk aus (Abb. 17 A).

#### 5.3.1 Die Endozytose von CHO-rhASA in primäre Neuronen erfolgt M6P-abhängig

Um zu untersuchen, ob CHO-rhASA von Neuronen aufgenommen werden kann, wurden primäre kortikale Neuronen einer NMRI-Maus fünf Tage nach Präparation mit 100 mU/ml CHO-rhASA in An- oder Abwesenheit kompetitorisch wirksamer Konzentrationen (7,5 mM) von M6P inkubiert. Anstelle von M6P wurde zu Kontrollansätzen G6P gegeben oder die

Zellen in Abwesenheit von Zuckerphosphaten kultiviert. Nach 20 Stunden wurden die Zellen geerntet und die intrazelluläre Sulfataseaktivität mit p-Nitrokatecholsulfat bestimmt. Als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen eingesetzt.



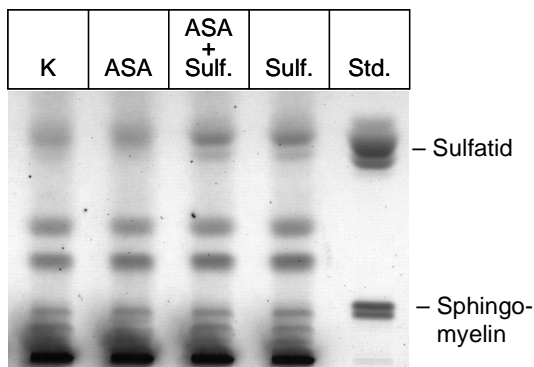
**Abb. 17: M6P-abhängige Aufnahme von CHO-rhASA in primäre kortikale Neuronen**

(A) Primäre embryonale kortikale Neuronen fünf Tage nach Präparation. Die Zellen haben ein dichtes interzelluläres Netzwerk ausgebildet. Maßstabsbalken: 100 µm. (B) M6P-abhängige Endozytose von CHO-rhASA. Die intrazelluläre Sulfataseaktivität wurde mit p-Nitrokatecholsulfat nach 20-stündiger Inkubation der Zellen mit CHO-rhASA in An- und Abwesenheit von 7,5 mM M6P bzw. G6P gemessen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 4$ ).

Der Anstieg der intrazellulären Sulfataseaktivität nach Fütterung mit CHO-rhASA zeigte, dass die primären Neuronen ASA aufgenommen haben. In Gegenwart von 7,5 mM M6P lag die intrazelluläre Sulfataseaktivität auf dem Niveau der Kontrolle und war im Vergleich zu den inhibitorfreien Ansätzen um 99 % reduziert. Die Anwesenheit von 7,5 mM G6P führte nur zu geringfügiger Inhibition der ASA-Aufnahme (24 %). Hieraus kann geschlossen werden, dass die Aufnahme von CHO-rhASA in primäre kortikale Neuronen M6P-abhängig abläuft.

### 5.3.2 Die Aufnahme von rhASA in primäre Neuronen bewirkt keine Sulfatid-Reduktion

Primäre humane Fibroblasten aus Haut können mit Sulfatid-Analoga beladen werden (Monti *et al.*, 1992). Diese Methode wurde verwendet, um den Sulfatidgehalt von primären kortikalen Neuronen zu erhöhen. Primäre kortikale Neuronen aus ASA-Knock-out-Mäusen wurden zuerst 24 Stunden mit Sulfatid/BSA und anschließend 24 Stunden mit 100 mU/ml CHO-rhASA inkubiert. Von den Zellen wurden Lipidextrakte hergestellt und mittels Dünnschichtchromatographie analysiert.



**Abb. 18: Beladung primärer kortikaler Neuronen mit Sulfatid**

Lipidextrakte verschiedenartig behandelter primärer Neuronen wurden mittels HPTLC (Laufmittel: Chloroform / Methanol / Wasser 70:30:4) aufgetrennt. K = unbehandelte Kontrolle, ASA = Inkubation mit CHO-rhASA, ASA + Sulf = Beladung mit Sulfatid und Inkubation mit CHO-rhASA, Sulf = Beladung mit Sulfatid, Std. = Lipidstandards.

In Abb. 18 ist erkennbar, dass die Sulfatidmengen in den beladenen Zellen („Sulf“) erhöht waren. Die Zugabe von CHO-rhASA führte jedoch nicht zu einer Reduktion des Sulfatidgehalts. Auch das in unbeladenen ASA-Knock-out-Zellen vorhandene endogene Sulfatid wurde nicht in erkennbarem Maße abgebaut.

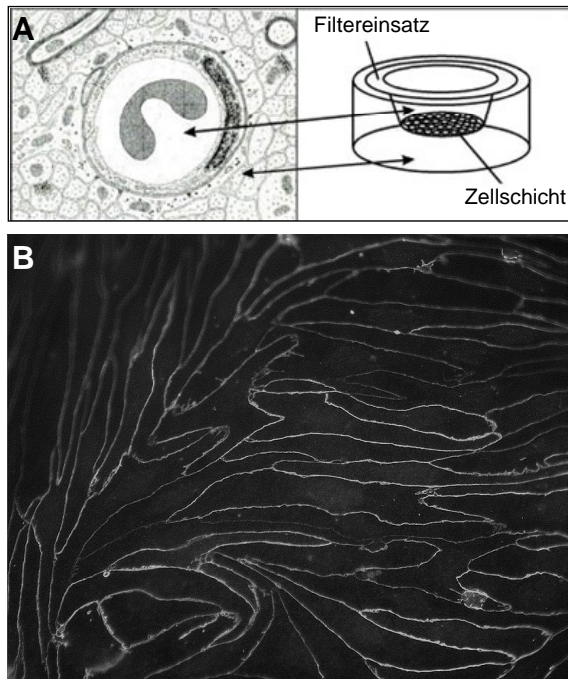
#### 5.4 Untersuchungen am Zellkultur-Modell der Blut-Hirn-Schranke

Zur Untersuchung des Übertritts von rhASA über die Blut-Hirn-Schranke wurde ein etabliertes Zellkultur-Modell eingesetzt (Franke *et al.*, 1999, von Wedel-Parlow *et al.*, 2009). Hierbei werden primäre Kapillarendothelzellen aus Schweinehirnen isoliert und auf *Transwell*-Filtereinsätzen ausgesät. Durch Hydrocortison-Behandlung wird die Ausbildung einer stabilen Barriere induziert, deren Eigenschaften der *in vivo*-Situation an der Blut-Hirn-Schranke ähneln (Franke *et al.*, 1999). Das apikale Kompartiment des Filtereinsatzes repräsentiert die luminale Seite des Kapillarendothels, während das basolaterale Kompartiment der hirnparenchymalen Seite entspricht (Abb. 19 A).

In den folgenden Experimenten wurde der transendotheliale Übertritt von rhASA bestimmt, indem rhASA in das Medium des apikalen Kompartiments zugegeben und nach 24 Stunden im basolateralen Kompartiment mittels hASA-ELISA quantifiziert wurde. Die im basolateralen Kompartiment gemessene hASA-Konzentration wurde auf die ebenfalls gemessene Konzentration im apikalen Kompartiment bezogen. Die Barriereintegrität jedes Filtereinsatzes wurde verifiziert durch die Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands (TEER) vor Beginn und unmittelbar vor Beendigung des jeweiligen



Experiments, sowie die Bestimmung des Permeabilitätskoeffizienten von fluoreszenzmarkiertem Dextran der Molekülmasse 70 kDa. Filtereinsätze, deren TEER-Wert  $600 \Omega \text{ cm}^2$  unterschritt oder deren Dextran-Permeabilitätskoeffizient über  $2 \cdot 10^{-8} \text{ cm/s}$  lag, wurden verworfen.



**Abb. 19: Zellkultur-Modell der Blut-Hirn-Schranke**

(A) Schematische Darstellung des verwendeten Zellkulturmodells. Das obere, apikale Kompartiment des Filtereinsatzes entspricht der luminalen Seite des Kapillarendothels; das untere, basolaterale Kompartiment der hirnparenchymalen Seite.

(B) Immunfluoreszenz-Aufnahme der primären Schweinehirn-Kapillarendothelzellen, gefärbt mit einem Antikörper gegen das *Tight Junction*-Protein *Zonula occludens-1*. Jede Zelle ist von *Tight Junctions* umgeben, die den parazellulären Transport von Substanzen unterbinden und die Barriereintegrität des Zellkulturmodells gewährleisten.

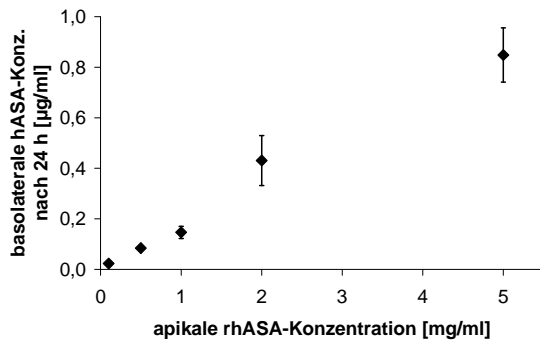
(Bild: Philipp Wölte, Münster)

Die Experimente wurden in Kooperation mit Philipp Wölte (Institut für Biochemie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster) durchgeführt, dem die Präparation und Kultivierung der Kapillarendothelzellen, die Messungen der Barriereintegrität, sowie die Applikation der Substanzen oblag.

#### 5.4.1 Eigenschaften des transendothelialen Übertritts von rhASA

##### 5.4.1.1 Konzentrationsabhängigkeit des Transports

Rezeptor-vermittelter Transport zeichnet sich unter anderem durch Sättigbarkeit aus. Verschiedene Mengen CHO-rhASA im Bereich zwischen 0,1 und 5 mg/ml (Endkonzentrationen) wurden dem Medium des apikalen Kompartiments zugegeben und nach 24 Stunden wurde die Konzentration im basolateralen Kompartiment gemessen. Konzentrationen oberhalb von 5 mg/ml konnten nicht eingesetzt werden, da dies zum Zusammenbruch der Barriereintegrität führte.



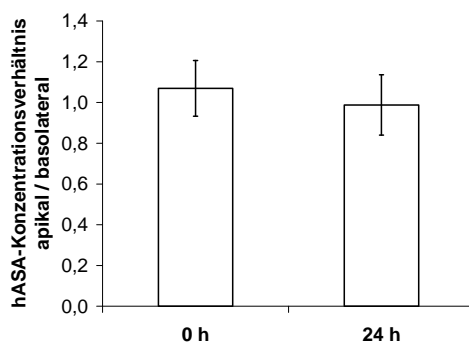
**Abb. 20: Konzentrationsabhängigkeit des Transports**

CHO-rhASA wurde dem apikalen Kompartiment in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben und nach 24 h die ins basolaterale Kompartiment übergetretene hASA-Menge mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 5$ ).

Der transendotheliale Übertritt von CHO-rhASA war mit 0,01–0,02 % der apikal eingesetzten Mengen sehr niedrig. Der Übertritt nahm konzentrationsabhängig in annähernd linearer Weise zu und ließ sich bis zu einer apikalen rhASA-Konzentration von 5 mg/ml nicht sättigen.

#### 5.4.1.2 Transport gegen ein Konzentrationsgefälle

Ein Transport von Molekülen gegen ein chemisches Konzentrationsgefälle kann nur ablaufen, wenn von außen Energie zugeführt wird. Dieser Vorgang wird als aktiver Transport bezeichnet. Um zu untersuchen, ob der Übertritt von rhASA über die Blut-Hirn-Schranke auch entgegen eines Konzentrationsgradienten abläuft, wurden auf beide Seiten des Zellkulturmodells gleiche Mengen (0,1 mg/ml) CHO-rhASA zugegeben. Die Konzentrationen wurden unmittelbar nach Zugabe sowie nach 24 Stunden mittels ELISA gemessen. Das apikale-zu-basolaterale Konzentrationsverhältnis lag in beiden Fällen ungefähr bei 1,0. Es bildete sich kein Konzentrationsgefälle aus und ein Transport in Richtung von höheren ASA-Konzentrationen konnte nicht nachgewiesen werden.

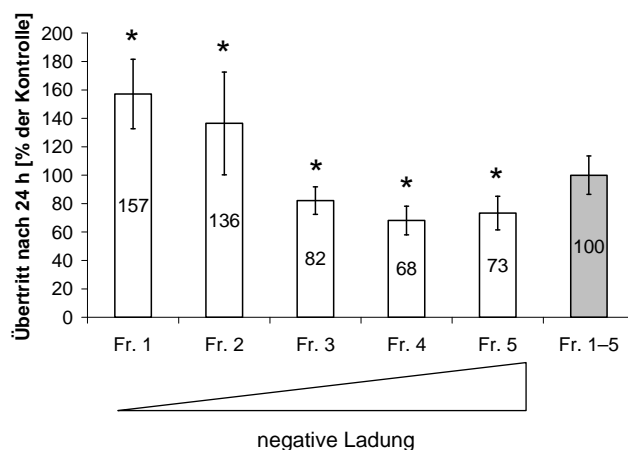


**Abb. 21: Transport gegen ein Konzentrationsgefälle**

Beiden Kompartimenten wurde CHO-rhASA in gleichen Endkonzentrationen (0,1 mg/ml) zugegeben und unmittelbar nach Zugabe (0 h) sowie nach 24 h die hASA-Mengen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 5$ ) der apikalen-zu-basolateralen Konzentrationsverhältnisse.

### 5.4.1.3 Ladungsabhängigkeit

CHO-rhASA wird in der industriellen Produktion durch die Firma Shire (Hamshire, Großbritannien) in einem zum Patent angemeldeten Verfahren über unterschiedliche Ionenaustauscher aufgereinigt (<http://www.freepatentsonline.com/y2008/0003211.html>). Shire stellte fünf verschiedene Fraktionen von CHO-rhASA zur Verfügung, die über eine *BlueSepharose*-Kationenaustauschersäule aufgereinigt und mit steigendem Salzgradienten eluiert worden waren. Bei dieser Methode werden Proteine mit geringerer negativer Ladung früher eluiert als stärker negativ geladene Proteine. Mit steigender Fraktionsnummer nahm daher die negative Ladung der ASA-Moleküle zu. Für jede dieser Fraktionen wurde der Übertritt im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke gemessen und mit der Übertrittsrate einer Mischung aus allen Fraktionen verglichen.



**Abb. 22: Ladungsabhängigkeit des transendothelialen Transfers von CHO-rhASA**

CHO-rhASA wurde über einen Kationenaustauscher in fünf Fraktionen mit zunehmender negativer Ladung aufgetrennt und der transendotheliale Übertritt nach 24 h mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle wurde eine Mischung aller Fraktionen verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 5-6$ ). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert ( $t$ -Test,  $P < 0,05$ ).

Es zeigten sich deutliche Unterschiede in den Übertrittsraten. CHO-rhASA aus Fraktionen 1 und 2 wiesen einen im Vergleich zur Mischfraktion signifikant höheren Übertritt auf, während die stärker negativ geladenen Proteine aus Fraktionen 3–5 signifikant schlechter über die Blut-Hirn-Schranke transportiert wurden als die Proteine der Mischfraktion. Der transendotheliale Transfer von CHO-rhASA ist demnach ladungsabhängig.

### 5.4.1.4 Transport in Gegenwart polykationischer Substanzen

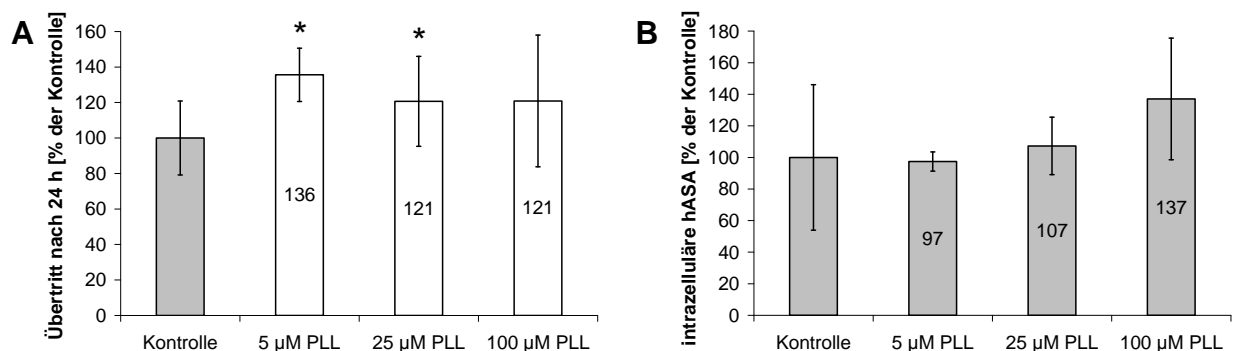
Ein Transportweg für Proteine über die Blut-Hirn-Schranke ist die adsorptiv-vermittelte Transzytose, die auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Zelloberfläche der Kapillarendothelzellen und positiven Ladungen der Proteine basiert (Hervé *et al.*, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass polykationische Substanzen wie Poly-L-Lysin,

Protamin oder Histone den Transport von Proteinen über die Blut-Hirn-Schranke erhöhen können (Pardridge *et al.*, 1989, 1993). Zudem wirken sie in hoher Konzentration als kompetitive Inhibitoren des transendothelialen Transports von kationisierten Proteinen, der vermutlich durch adsorptiv-vermittelte Transzytose erfolgt (Kumagai *et al.*, 1987). Im Folgenden sollte der Einfluss verschiedener polykationischer Substanzen auf den transendothelialen Transport von CHO-rhASA im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke untersucht werden.

#### 5.4.1.4.1 Poly-L-Lysin

CHO-rhASA (0,1 mg/ml Endkonzentration) wurde mit Poly-L-Lysin (PLL, Molekulargewicht 1–5 kDa) in unterschiedlichen Konzentrationen gemischt und der transendotheliale Übertritt nach 24 Stunden gemessen. Für PLL-Konzentrationen bis 25  $\mu\text{M}$  war bekannt, dass sie *in vivo* nicht zur unspezifischen Öffnung der Blut-Hirn-Schranke führen, aber den transendothelialen Übertritt von Peptid-vektorisierendem Doxorubicin, der vermutlich über adsorptive Transzytose erfolgt, inhibieren können (Rousselle *et al.*, 2001).

Die Anwesenheit von PLL löste in Konzentrationen von 5–100  $\mu\text{M}$  generell eine höhere Übertrittsrate von CHO-rhASA aus, jedoch waren nur die Steigerungen für 5 und 25  $\mu\text{M}$  PLL statistisch signifikant (Abb. 23 A). Die Zunahme des Transports war für die geringste verwendete PLL-Konzentration (5  $\mu\text{M}$ ) mit 36 % am höchsten. Die intrazelluläre hASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen erhöhte sich mit zunehmenden PLL-Konzentrationen (Abb. 23 B).



**Abb. 23: Übertritt von CHO-rhASA in Gegenwart von Poly-L-Lysin (PLL)**

CHO-rhASA wurde mit verschiedenen Konzentrationen von PLL gemischt und nach 24 h (A) der transendotheliale Übertritt von CHO-rhASA und (B) die intrazelluläre hASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen mittels hASA-ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 4\text{--}12$ ). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert ( $t$ -Test,  $P < 0,05$ ).

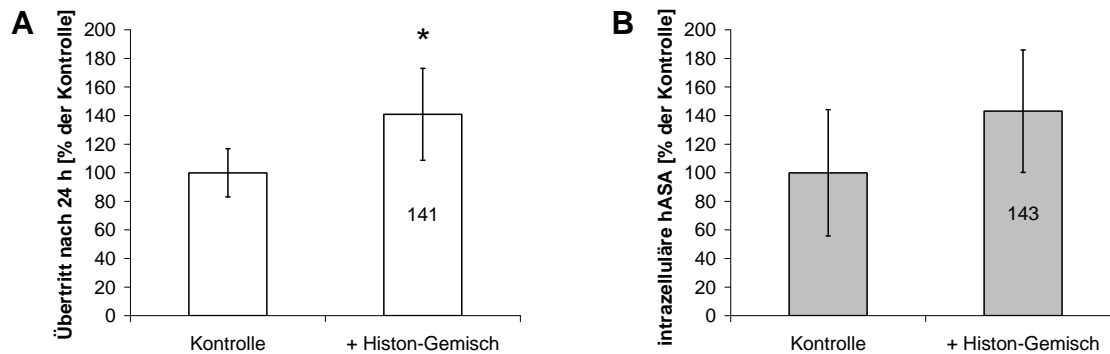
#### 5.4.1.4.2 Protamin

Als Protamin wird eine Mischung mehrerer kleiner (5–7 kDa), Arginin-reicher Proteine bezeichnet, deren isoelektrischer Punkt bei pH 12–13 liegt (Ausió, 1999). CHO-rhASA wurde mit Protamin (0,1 mg/ml Endkonzentration) gemischt und auf die apikale Seite des Zellkulturmodells appliziert. Die Protamin-Zugabe bewirkte einen vollständigen Zusammenbruch der Barriere in allen Filtereinsätzen, die TEER-Werte sanken von durchschnittlich  $860 \Omega \text{ cm}^2$  vor der Zugabe auf  $110 \Omega \text{ cm}^2$  24 Stunden nach der Zugabe. Aufgrund des Verlusts der Barriereintegrität war eine Auswertung des Übertritts von CHO-rhASA in Gegenwart von Protamin nicht sinnvoll.

#### 5.4.1.4.3 Histone

Es wurden zwei unterschiedliche, kommerziell erhältliche Histon-Präparationen aus Rinderthymus verwendet: eine Histon-Gesamtpräparation, die ein Gemisch aus Histonen mit Molekulargewichten von 11,3–21,5 kDa enthielt, sowie eine hauptsächlich aus lysinreichem Histon H1 (21,5 kDa) bestehende Fraktion (de Nooij & Westenbrink, 1962). CHO-rhASA (0,1 mg/ml Endkonzentration) wurde mit je einer der beiden Histonpräparationen in Endkonzentrationen von 0,07 mg/ml gemischt, was etwa einem 3,5–5-fachem molaren Überschuss bezogen auf das bei physiologischem pH vorliegende ASA-Dimer entsprach. Die Mischung wurde auf die apikale Seite des Zellkulturmodells appliziert und der transendotheliale Übertritt von CHO-rhASA nach 24 Stunden gemessen.

Die Anwesenheit des lysinreichen Histons H1 bewirkte einen vollständigen Zusammenbruch der Barriere in allen Filtereinsätzen. Die TEER-Werte sanken von durchschnittlich  $726 \Omega \text{ cm}^2$  vor der Zugabe auf  $106 \Omega \text{ cm}^2$  24 Stunden nach der Zugabe. Aufgrund des Verlusts der Barriereintegrität war eine Auswertung des Übertritts von CHO-rhASA nicht sinnvoll. In Gegenwart des Histon-Gemischs waren die Barriereeigenschaften nicht gestört und der transendotheliale Übertritt von CHO-rhASA um 41 % erhöht (Abb. 24 A). Die Zunahme war statistisch signifikant. Die intrazelluläre hASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen nahm in Gegenwart der Histone etwa im selben Maße zu (Abb. 24 B).



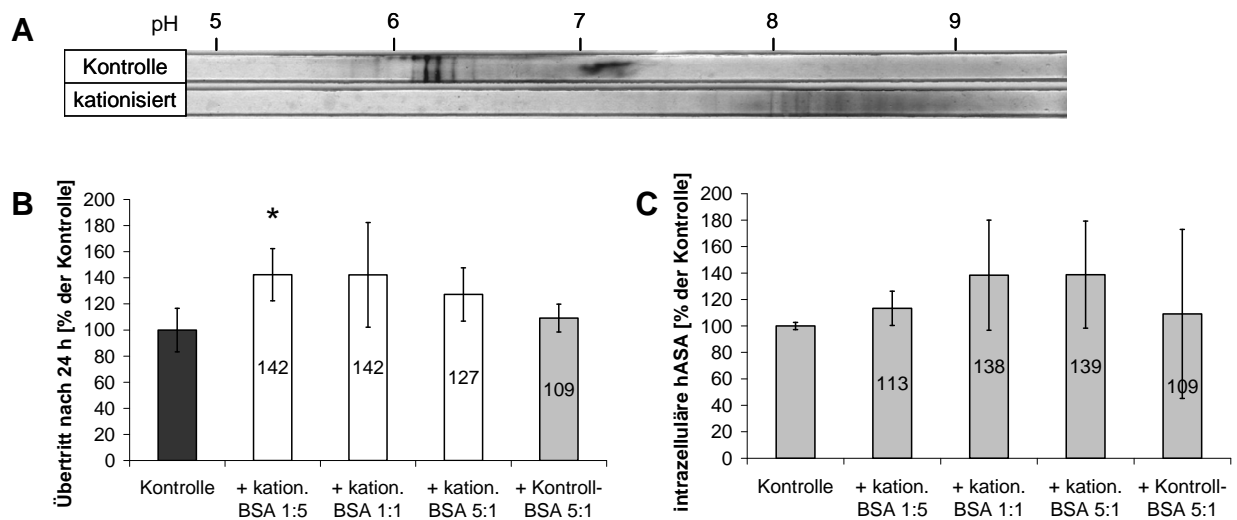
**Abb. 24: Übertritt von CHO-rhASA in Gegenwart von Histonen**

CHO-rhASA wurde mit einem Gemisch verschiedener Histone inkubiert und nach 24 h (A) der transendotheliale Übertritt von CHO-rhASA und (B) die intrazelluläre hASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 4-5$ ). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert ( $t$ -Test,  $P < 0,05$ ).

#### 5.4.1.4.4 Kationisiertes BSA

Bovines Serumalbumin (BSA) wurde durch Carbodiimid-vermittelte Amidierung mit Hexamethyldiamin bei pH 7,8 kationisiert (Reaktionsschema: Abb. 32 A; Kumagai *et al.*, 1987). Der pI des kationisierten BSA wurde mittels isoelektrischer Fokussierung bestimmt (Abb. 25 A) und lag wie erwartet zwischen pH 8 und 9. Um den Einfluss auf den transendothelialen Übertritt von ASA zu messen, wurden CHO-rhASA und kationisiertes BSA in unterschiedlichen molaren Verhältnissen gemischt und auf die apikale Seite des Zellkulturmodells appliziert. Nach 24 Stunden wurde der Übertritt von ASA auf die basolaterale Seite bestimmt (Abb. 25 B).

Der transendotheliale Transfer von CHO-rhASA war in Gegenwart von kationisiertem BSA um bis zu 42 % erhöht, jedoch konnte nur für ein molares Verhältnis von fünf Teilen ASA zu einem Teil kationisiertem BSA statistische Signifikanz festgestellt werden. In Gegenwart eines fünffachen molaren Überschusses von nativem BSA war der Übertritt von CHO-rhASA nur tendenziell schwach erhöht und der Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ohne BSA nicht statistisch signifikant. Die intrazelluläre hASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen war in Gegenwart von kationisiertem BSA grundsätzlich erhöht und nahm mit steigenden BSA-Konzentrationen zu (Abb. 25 C).



**Abb. 25: Kationisiertes BSA: Charakterisierung und Auswirkung auf den Transport von CHO-rhASA**

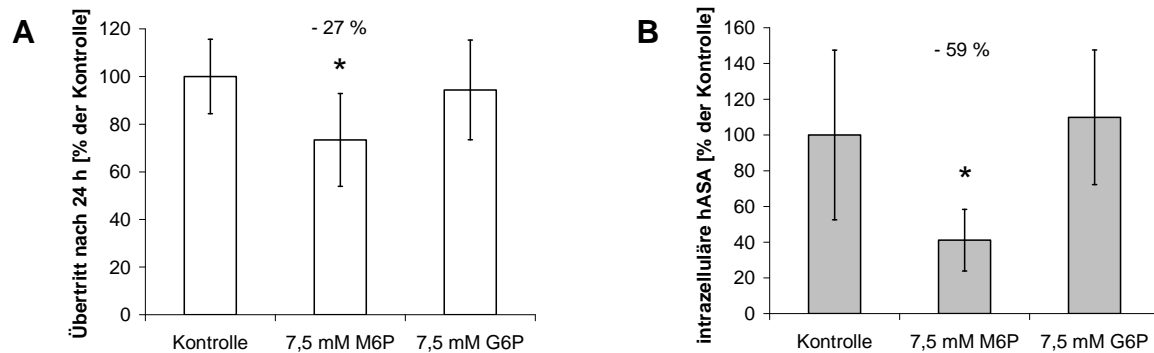
- (A) Isoelektrische Fokussierung von unbehandeltem und kationisiertem BSA. Die Kationisierung erfolgte mit Hexamethylendiamin bei pH 7,8. Aufgetragen wurden je 10  $\mu\text{g}$  Protein. Das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt.
- (B) Transendothelialer Übertritt von CHO-rhASA in Gegenwart von kationisiertem und Kontroll-BSA. Gleiche Mengen CHO-rhASA wurden mit kationisiertem BSA gemischt und der transendotheliale Transfer von ASA nach 24 h mittels ELISA gemessen. Bezogen auf das bei physiologischem pH vorliegende ASA-Dimer wurde das kationisierte BSA in 5-fachem molaren Unterschuss, in äquimolarer Konzentration oder in 5-fachem molaren Überschuss zugegeben. Als zusätzliche Kontrolle diente unbehandeltes BSA in 5-fachem molaren Überschuss. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 3-5$ ). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert ( $t$ -Test,  $P < 0,05$ ).
- (C) Intrazelluläre hASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen unter den gleichen Bedingungen wie in (B). Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 3-5$ ).

#### 5.4.1.5 *Kompetition mit M6P und G6P*

Im Golgi-Apparat werden neusynthetisierte lysosomale Proteine mit M6P markiert und über die Bindung an M6P-Rezeptoren (MPRs) in die Lysosomen dirigiert. Da auch auf der Zelloberfläche MPR-Moleküle vorhanden sind, können Zellen extrazellulär vorhandene lysosomale Enzyme M6P-abhängig endozytieren. Um festzustellen, ob MPRs in den transendothelialen Transport von ASA involviert sind, wurde der Übertritt von CHO-rhASA in Anwesenheit inhibitorischer Konzentrationen (7,5 mM) von M6P im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke gemessen. Während M6P die Bindung an MPRs kompetitiv inhibiert, hat sein strukturell nur minimal unterschiedliche C-2-Epimer G6P keine inhibitorische Wirkung auf MPRs (Fischer *et al.*, 1982).

Aus Abb. 26 A geht hervor, dass der transendotheliale Übertritt von CHO-rhASA in Anwesenheit von M6P um 27 % reduziert war, während G6P keinen Einfluss auf den Trans-

fer hatte. Die intrazelluläre Aufnahme von CHO-rhASA in die Kapillarendothelzellen wurde M6P-spezifisch zu 59 % inhibiert (Abb. 26 B). Dies spricht für eine Beteiligung des MPR am transendothelialen Übertritt von rhASA.



**Abb. 26: Konkurrenz mit M6P und G6P**

CHO-rhASA wurde mit 7,5 mM M6P oder G6P gemischt und dem apikalen Kompartiment zugegeben. Als Kontrolle diente reine CHO-rhASA.

(A) Transendothelialer Übertritt von CHO-rhASA nach 24 h.

(B) Intrazelluläre hASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen nach 24 h.

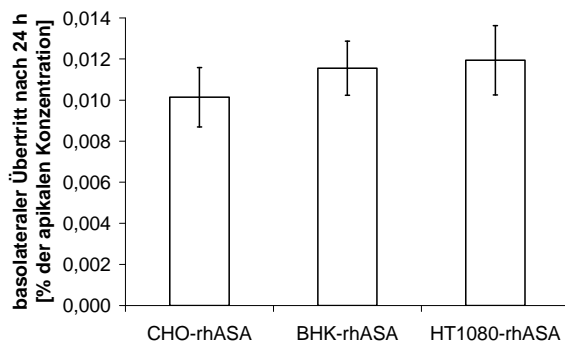
Die hASA-Konzentrationen wurden mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 9-13$ ). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert ( $t$ -Test,  $P < 0,001$ ). Die hohen Standardabweichungen resultierten aus der geringen Gesamtmenge intrazellulärer rhASA, die nahe des Detektionslimits des verwendeten ELISA-Systems lag.

#### 5.4.1.6 Vergleich verschiedener ASA-Sorten

Die verwendeten ASA-Sorten weisen große Unterschiede in der Komplexität ihrer N-Glykosylierungsmustern auf (Schröder *et al.*, 2010), zudem trägt CHO-rhASA etwa dreimal mehr M6P-Reste als BHK- oder HT1080-rhASA (s. 5.1.1). Im Mausmodell unterschieden sich die ASA-Sorten hinsichtlich Gewebeverteilung und therapeutischer Wirksamkeit, insbesondere im ZNS (s.5.2.2).

Im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke konnten für CHO-, BHK- und HT1080-rhASA keine signifikant unterschiedlichen Übertrittsraten gemessen werden. Nach 24 Stunden war der mittlere Übertritt von BHK- und HT1080-rhASA um etwa 15 % höher als der von CHO-rhASA.





**Abb. 27: Übertritt verschiedener ASA-Sorten**

In das apikale Kompartiment wurden 0,1 mg/ml CHO-, BHK- oder HT1080-rhASA zugegeben und nach 24 h die basolaterale hASA-Konzentration mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 6-7$ ). Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ( $t$ -Test,  $P > 0,05$ ).

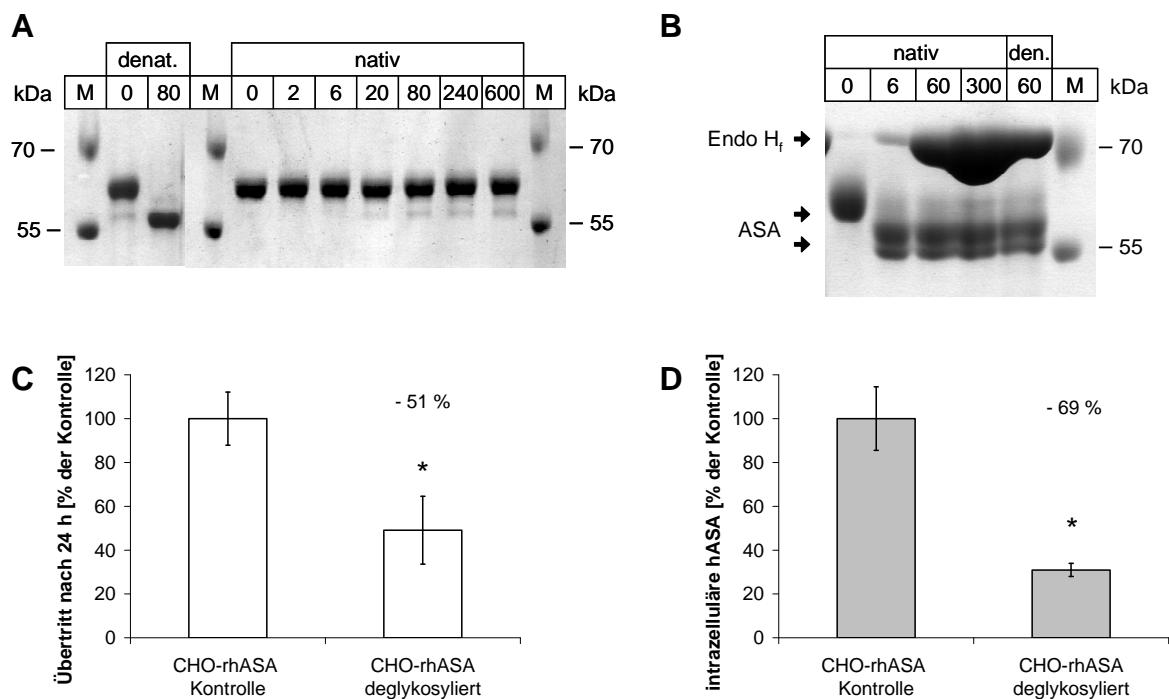
## 5.4.2 Modifikationen von CHO-rhASA und ihre Einflüsse auf den transendothelialen Übertritt

### 5.4.2.1 Deglykosylierung

ASA ist an drei Asn-Resten N-glykosyliert und trägt fast ausschließlich Oligosaccharidstrukturen vom *High-Mannose*-Typ (Schröder *et al.*, 2010). Durch Endoglykosidase-Verdau sollten diese Zuckerstrukturen entfernt und der Einfluss auf den transendothelialen Transfer an der Blut-Hirn-Schranke untersucht werden. Für den Einsatz im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke wurde deglykosylierte CHO-rhASA im nativen Zustand benötigt. Die Endoglykosidase Peptid:N-Glykosidase F (PNGase F) hydrolysiert die Bindung zwischen dem innersten N-Acetylglukosamin-Rest universeller Oligosaccharid-Seitenketten und dem Asparagin-Rest des Glykoprotein-Rückgrats. Mit SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol denaturierte CHO-rhASA ließ sich mit 80 mU PNGase F pro  $\mu\text{g}$  ASA effizient deglykosylieren (Abb. 28 A, dritte Spur). Um zu untersuchen, ob PNGase F auch im nativen Zustand vorliegende ASA deglykosylieren kann, wurde CHO-rhASA mit unterschiedlichen Mengen PNGase F (0–600 mU/ $\mu\text{g}$  ASA) für 24 Stunden inkubiert. Der Nachweis der Deglykosylierung erfolgte mittels SDS-PAGE, in der nach Abspaltung der N-Glykane eine elektrophoretische Größenverschiebung auftrat. Aus Abb. 28 A geht hervor, dass sich CHO-rhASA auch durch hohe Aktivitäten von PNGase F im nativen Zustand nicht nennenswert deglykosylieren ließ.

Aus diesem Grund wurde im Folgenden das Enzym Endoglykosidase H (Endo H) verwendet. Es spaltet die Bindung zwischen dem innersten und dem zweiten N-Acetylglukosamin-Rest von N-Glykanen des *High-Mannose*-Typs sowie von einigen des Hybrid-Typs. Da CHO-rhASA fast ausschließlich *High-Mannose*-Strukturen trägt, wurde eine annähernd vollstän-

dige Deglykosylierung erwartet. Eingesetzt wurde Endo H<sub>f</sub> (New England Biolabs, Ipswich, USA), ein Fusionsprotein aus Endo H und Maltose-bindendem Protein, das identische Deglykosylierungseigenschaften wie Endo H besitzt. Abb. 28 B zeigt, dass bereits eine Aktivität von 6 mU Endo H<sub>f</sub> pro mg ASA ausreicht, um native CHO-rhASA so effizient wie im denaturierten Zustand zu deglykosylieren. Das Bandenmuster im Gel blieb bei höheren Aktivitäten unverändert. Die intensive Bande bei 70 kDa stammt von Endo H<sub>f</sub>.



**Abb. 28: Deglykosylierung von CHO-rhASA und ihr Einfluss auf den transendothelialen Transfer**

- (A) SDS-PAGE des PNGase F-Verdau von CHO-rhASA. Die 24-stündige Inkubation von denaturierter CHO-rhASA mit 80 mU/μg PNGaseF verursachte eine elektrophoretische Verschiebung (links). Für native CHO-rhASA (rechts) war auch nach Inkubation mit zunehmenden Mengen von PNGase F keine nennenswerte Verschiebung sichtbar. Oberhalb der Spuren ist die jeweils verwendete PNGase F-Aktivität in mU/μg ASA angegeben. Aufgetragen wurden jeweils 2,5 μg ASA, das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt. M= Protein-Größenstandards.
- (B) SDS-PAGE des Endo H<sub>f</sub>-Verdau von CHO-rhASA. Für native (links) und denaturierte (rechts) CHO-rhASA wurde nach 24-stündiger Inkubation mit Endo H<sub>f</sub> eine elektrophoretische Verschiebung beobachtet. Oberhalb der Spuren ist die jeweils eingesetzte Endo H<sub>f</sub>-Menge in mU/μg ASA angegeben. Die intensive Bande bei 70 kDa stammte von Endo H<sub>f</sub>, einem Fusionsprotein aus Endo H und Maltose-bindendem Protein. Aufgetragen wurden jeweils 2,5 μg ASA, das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt. M= Protein-Größenstandards
- (C) Transendothelialer Übertritt von deglykosylierter CHO-rhASA und
- (D) intrazelluläre hASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen, bestimmt mittels ELISA. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 4–6). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert (*t*-Test, *P* < 0,01).

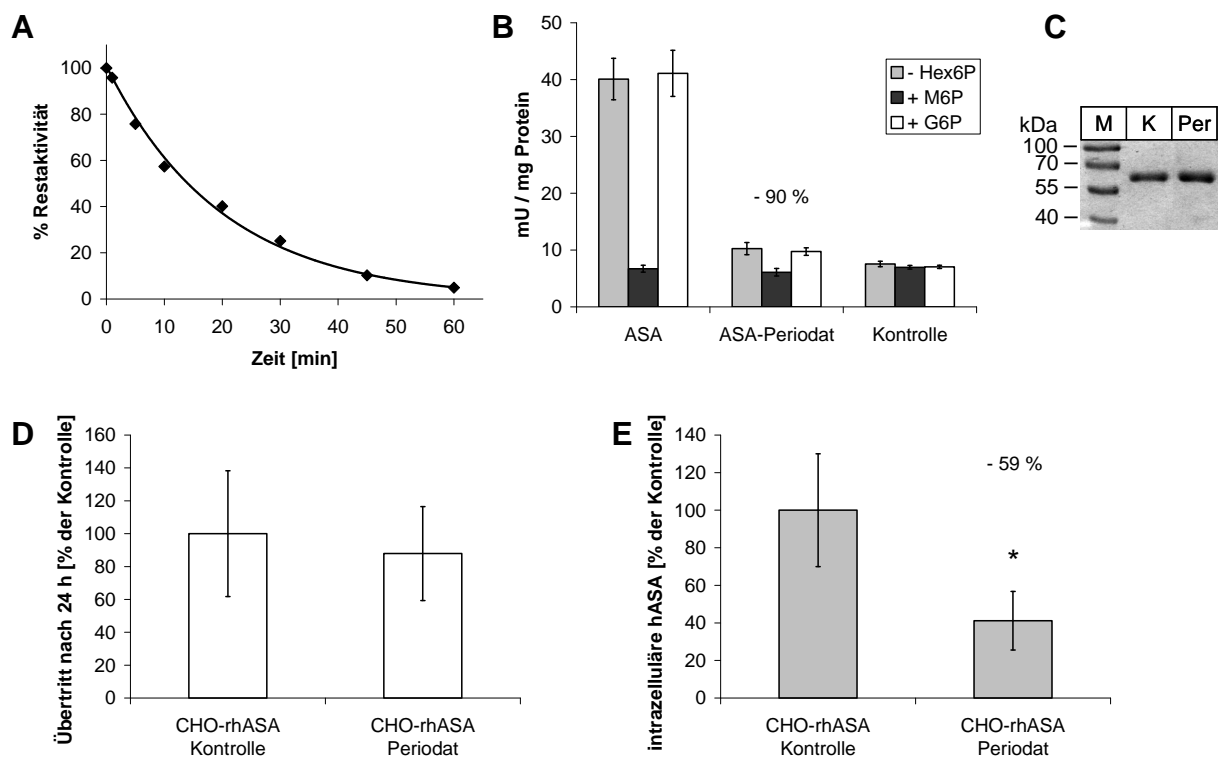
Für die Versuche im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke wurde CHO-rhASA mit 6 mU Endo H<sub>f</sub> / mg ASA für 24 Stunden deglykosyliert und mittels Gelfiltrations- oder Affinitätschromatographie (anti-hASA-Antikörper-Säule) aufgereinigt. Der Kontrollansatz wurde – ohne Zugabe von Endo H<sub>f</sub> – identisch behandelt. Die spezifische Aktivität der deglykosylierten CHO-rhASA betrug 22,6 mU/mg, die des Kontrollansatzes 20,2 mU/mg.

Die Deglykosylierung von CHO-rhASA führte zu einer signifikant erniedrigten Übertrittsrate im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke (Abb. 28 C). Die intrazelluläre hASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen war nach Deglykosylierung um 69 % reduziert (Abb. 28 D).

#### 5.4.2.2 Chemische Inaktivierung terminaler Zucker durch Periodat

Für das lysosomale Enzym  $\beta$ -Glukuronidase, dessen Defizienz die lysosomale Speichererkrankung Mucopolysaccharidose Typ VII verursacht, konnte gezeigt werden, dass die chemische Modifikation von rekombinantem Enzym mit Natriummetaperiodat den Übertritt über die Blut-Hirn-Schranke nach systemischer Injektion im Mausmodell erhöht (Grubb *et al.*, 2008). Als Folge wird neuronales Speichermaterial effektiver abgebaut als bei Infusion von unmodifiziertem Enzym. Periodat reagiert selektiv mit vicinalen Diolen unter oxidativer Spaltung der C-C-Bindung und Bildung zweier Aldehyd-Gruppen. Die Oligosaccharid-Seitenketten von Glykoproteinen enthalten zahlreiche vicinale Diole, die mit Periodat unter Zerstörung der Zuckerstrukturen reagieren können (Spiro, 1964). Um zu untersuchen, ob die Ergebnisse für  $\beta$ -Glukuronidase auf ASA übertragen werden können, sollte Periodat-modifizierte ASA hergestellt und der Übertritt im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke vermessen werden.

Zur Untersuchung der Stabilität von ASA bei der Reaktion mit Periodat wurde CHO-rhASA nach der Methode von Grubb *et al.* (2008) mit 10 mM Natriummetaperiodat inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten die Restaktivität bestimmt. Während die spezifische Aktivität von  $\beta$ -Glukuronidase nach 6,5-stündiger Inkubation mit 20 mM Periodat nur um 14 % reduziert war (Grubb *et al.*, 2008), reagierte CHO-rhASA deutlich empfindlicher und wies bereits nach einer Stunde unter Einsatz der halben Periodat-Konzentration praktisch keine Restaktivität mehr auf (Abb. 29 A).



**Abb. 29: Modifikation von CHO-rhASA mit Periodat: Restaktivität, M6P-abhängige Endozytose, elektrophoretisches Laufverhalten und transendothelialer Übertritt**

- (A) Restaktivität von CHO-rhASA nach zeitabhängiger Behandlung mit 10 mM Natriummetaperiodat, bestimmt mit p-Nitrokatecholsulfat.
- (B) M6P-abhängige Endozytose von CHO-rhASA. Mittels p-Nitrokatecholsulfat wurde die intrazelluläre Sulfataseaktivität von BHK-21-Zellen nach 20-stündiger Inkubation mit unbehandelter CHO-rhASA (ASA) oder 30 min mit 10 mM Natriummetaperiodat behandelte CHO-rhASA (ASA-Periodat) im Vergleich zur Kontrolle ohne ASA gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 4$ ) von Ansätzen ohne Hexose-6-phosphat (Hex6P), mit 7,5 mM M6P oder mit 7,5 mM G6P.
- (C) SDS-PAGE von unbehandelter (K) und 30 min mit 10 mM Natriummetaperiodat behandelte CHO-rhASA (Per). Aufgetragen wurde jeweils 0,5  $\mu$ g ASA. Das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt. M = Protein-Größenstandards
- (D) Transendothelialer Übertritt von Periodat-modifizierter CHO-rhASA nach 24 h und
- (E) intrazelluläre hASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen nach 24 h, bestimmt mittels ELISA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 11$ ). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert ( $t$ -Test,  $P < 0,001$ ).

Für die folgenden Versuche wurde CHO-rhASA verwendet, die 30 min mit 10 mM Natriummetaperiodat inkubiert worden war und nach der Aufreinigung im Vergleich zum identisch behandelten Kontrollansatz (ohne Periodat) einen Aktivitätsverlust von 78 % aufwies (Abb. 29 A). Um zu untersuchen, ob die modifizierte ASA noch immer an den MPR binden kann, wurde die M6P-abhängige Endozytose in BHK-21-Zellen gemessen. Dazu wurden die Zellen mit Periodat-modifizierter oder Kontroll-ASA jeweils in Anwesenheit von 7,5 mM M6P oder 7,5 mM G6P oder ohne Zuckerphosphate inkubiert und nach 20 Stunden die intrazelluläre Sulfataseaktivität gemessen (Abb. 29 B). In Abwesenheit von Zuckerphosphaten sowie in

Anwesenheit von G6P waren die Aktivitäten erhöht, in Anwesenheit von M6P jedoch nicht. Die Endozytose erfolgte also ausschließlich über den MPR, der von freiem M6P kompetitiv inhibiert werden kann. Demgegenüber war die Aufnahme von Periodat-modifizierter CHO-rhASA um 90 % reduziert. Wie (Abb. 29 C) zeigt, ist das Laufverhalten von Kontroll- und Periodat-modifizierter ASA in der SDS-PAGE identisch. Demnach führte die Periodat-Inkubation nicht zur Abspaltung kompletter Oligosaccharid-Strukturen, was sich in einer elektrophoretischen Größenverschiebung geäußert hätte.

Die Messung des transendothelialen Übertritts von Periodat-modifizierter CHO-rhASA im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke ergab eine geringfügige, statistisch nicht signifikante Reduktion des Transfers um 12 % im Vergleich zur Kontroll-ASA. Die intrazelluläre hASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen war demgegenüber um 59 % reduziert.

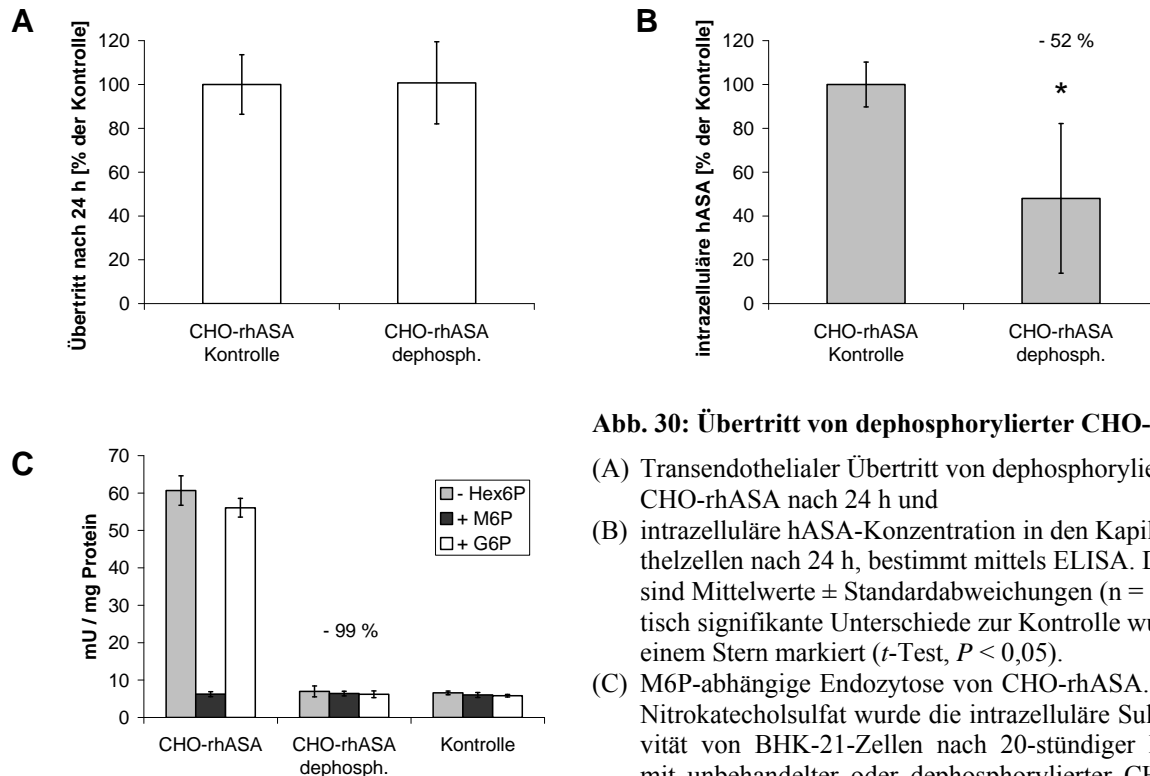
#### 5.4.2.3 Dephosphorylierung

Die teilweise Kompetitierbarkeit des Übertritts von CHO-rhASA durch M6P (s. 5.4.1.5) lässt auf eine Beteiligung des MPR am transendothelialen Transport schließen. Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde CHO-rhASA dephosphoryliert, indem sie vier Stunden bei pH 8,0 und 25 °C mit alkalischer Phosphatase inkubiert und anschließend mittels Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt wurde. Der Kontrollansatz wurde – ohne Zugabe von alkalischer Phosphatase – identisch behandelt. Die spezifische Aktivität der Phosphatase-behandelten CHO-rhASA betrug 33,9 U/mg, die des Kontrollansatzes 31,2 U/mg. Die Proteine zeigten identisches Laufverhalten in der SDS-PAGE (nicht gezeigt).

Der Erfolg der Dephosphorylierung wurde durch M6P-abhängige Endozytose in BHK-21-Zellen kontrolliert. Dazu wurden die Zellen mit nativer oder dephosphorylierter ASA jeweils in Anwesenheit von 7,5 mM M6P oder 7,5 mM G6P oder ohne Zugabe von Zuckerphosphaten inkubiert und nach 20 Stunden die intrazelluläre Sulfataseaktivität gemessen (Abb. 30 C). In Abwesenheit von Zuckerphosphaten sowie in Anwesenheit von G6P war die Aktivität erhöht, in Anwesenheit von M6P jedoch nicht. Die Endozytose von CHO-rhASA erfolgte also ausschließlich über den MPR, der von freiem M6P kompetitiv inhibiert werden kann. Demgegenüber war die Aufnahme von dephosphorylierter CHO-rhASA um 99 % reduziert, woraus auf eine vollständige Dephosphorylierung geschlossen werden konnte.

Die Dephosphorylierung hatte allerdings keinen Einfluss auf den transendothelialen Transfer im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke (Abb. 30 A). Jedoch war die intrazelluläre

hASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen bei Einsatz von dephosphorylierter CHO-rhASA um 52 % reduziert (Abb. 30 B).



**Abb. 30: Übertritt von dephosphorylierter CHO-rhASA**

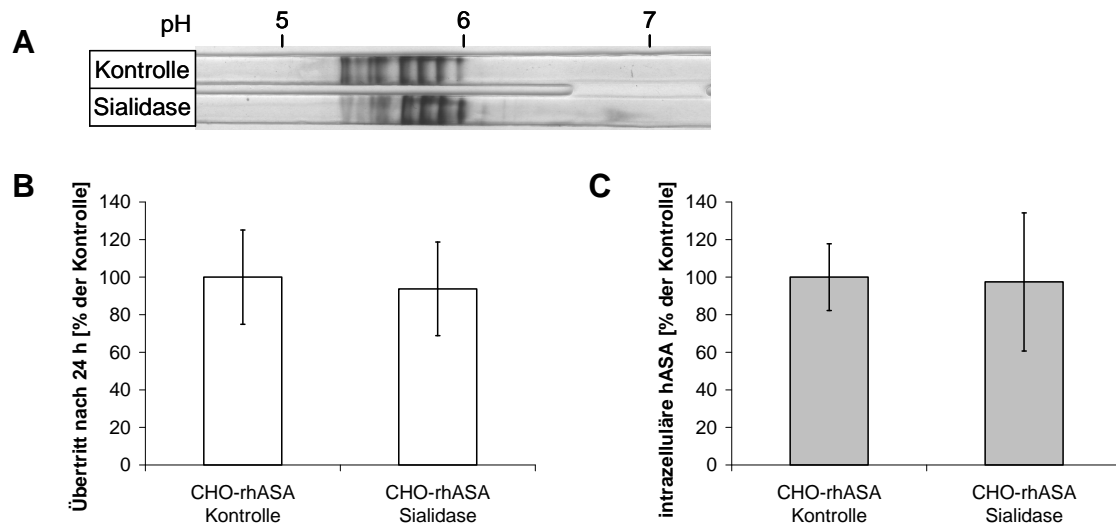
- (A) Transendothelialer Übertritt von dephosphorylierter CHO-rhASA nach 24 h und
- (B) intrazelluläre hASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen nach 24 h, bestimmt mittels ELISA. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 5$ ). Statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle wurden mit einem Stern markiert ( $t$ -Test,  $P < 0,05$ ).
- (C) M6P-abhängige Endozytose von CHO-rhASA. Mittels p-Nitrokatecholsulfat wurde die intrazelluläre Sulfataseaktivität von BHK-21-Zellen nach 20-stündiger Inkubation mit unbehandelter oder dephosphorylierter CHO-rhASA im Vergleich zur Kontrolle ohne ASA gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 3$ ) von Ansätzen ohne Hexose-6-phosphat (Hex6P), mit 7,5 mM M6P oder mit 7,5 mM G6P.

#### 5.4.2.4 Desialylierung

In einer Glykosylierungsstellen-spezifische Analyse von CHO-rhASA wurde an 6 % der Zuckerstrukturen von Glykosylierungsstelle 3 (Asn-350) ein Sialinsäurerest gefunden (Schröder *et al.*, 2010). Insbesondere aufgrund seiner negativen Ladung könnte die Entfernung dieses Restes einen Einfluss auf den transendothelialen Übertritt von ASA haben. Zur Desialylierung wurde CHO-rhASA 24 Stunden mit Sialidase (Neuraminidase) inkubiert und anschließend mittels Gelfiltrationschromatographie aufgereinigt. Der Kontrollansatz wurde – bis auf die Sialidase-Zugabe – identisch behandelt. Die spezifische Aktivität der Sialidase-behandelten ASA betrug 34,7 U/mg, die des Kontrollansatzes 30,9 U/mg. Die Proteine zeigten identisches Laufverhalten in der SDS-PAGE (nicht gezeigt).

Die Abspaltung des Sialylrestes wurde mittels isoelektrischer Fokussierung kontrolliert (Abb. 31 A). Sialidase-behandelte CHO-rhASA zeigte eine Zunahme der Bandenintensität bei pH 6,

die vermutlich aus der Entfernung von negativer Ladung resultierte. Der Effekt war erwartungsgemäß gering, da nur ein geringer Anteil der CHO-rhASA Sialinsäurereste trägt. Im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke bewirkte die Desialylierung von CHO-rhASA keine Unterschiede hinsichtlich transendothelialen Transfers und Aufnahme in die Kapillarendothelzellen (Abb. 31 B,C).



**Abb. 31: Modifikation und Übertritt von desialylierter CHO-rhASA**

- (A) Isoelektrische Fokussierung von unbehandelter und Sialidase-verdauter CHO-rhASA. Aufgetragen wurden je 10 µg Protein. Das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt.  
 (B) Transendothelialer Übertritt von desialylierter CHO-rhASA nach 24 h und  
 (C) intrazelluläre hASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen, bestimmt mittels ELISA. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 5).

#### 5.4.2.5 Kationisierung von CHO-rhASA

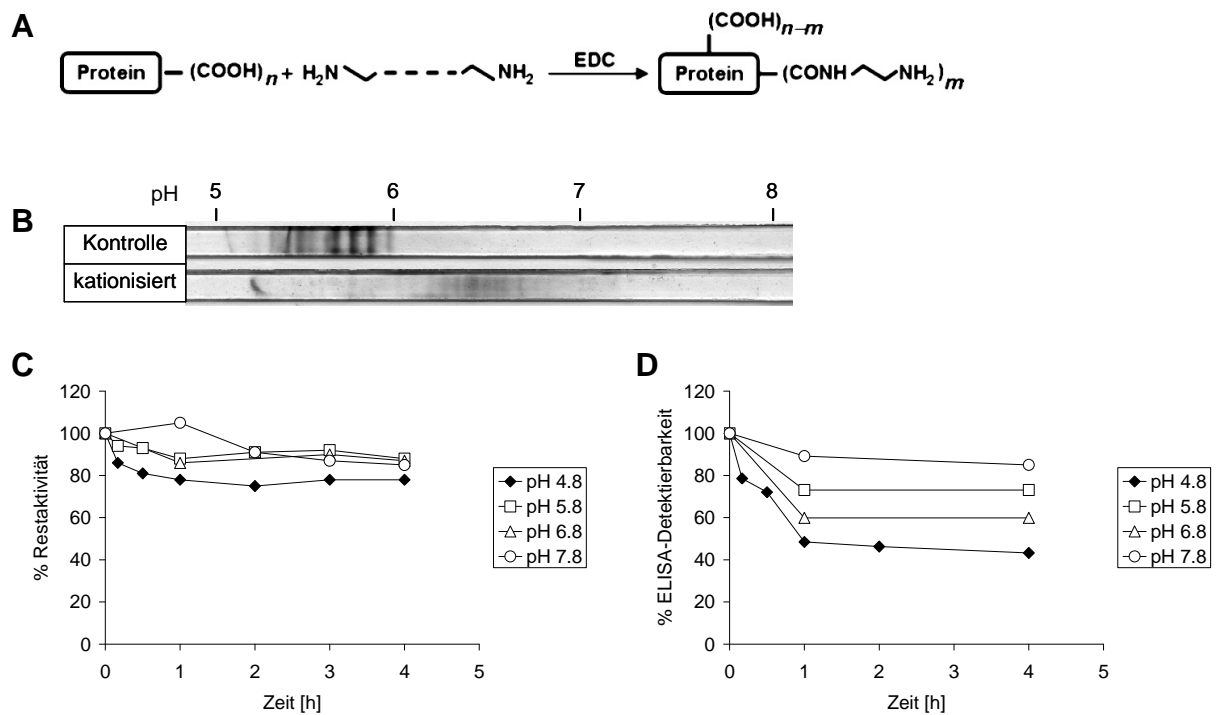
Durch Kationisierung können Proteine ins ZNS dirigiert werden, die normalerweise die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können. Dies wurde unter anderem für BSA und Immunglobulin G gezeigt (Bickel *et al.*, 2001). Der Transport von kationisierten Proteinen verläuft über adsorptive Transzytose (Hervé *et al.*, 2008). CHO-rhASA wurde durch Carbodiimid-vermittelte Amidierung freier Carboxylgruppen mit Hexamethyldiamin oder Ethylendiamin kationisiert (Abb. 32 A; Kumagai *et al.*, 1987). Das Diamin lag hierbei im Vergleich zum Carboxylgruppen-aktivierenden 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid in zehnfachem molaren Überschuss vor und verhinderte so die Protein-Quervernetzung über das Carbodiimid. Die Reaktion ist pH-abhängig und läuft bei niedrigeren pH-Werten effektiver ab (Lambert *et al.*, 1984).

Dies konnte für ASA nachvollzogen werden, indem CHO-rhASA bei verschiedenen pH-Werten zwischen pH 4,8 und 7,8 kationisiert und der Erfolg der Kationisierung mittels isoelektrischer Fokussierung kontrolliert wurde. In Abb. 32 B ist die Verschiebung des isoelektrischen Bereichs nach Kationisierung bei pH 4,8 gezeigt. Die isoelektrischen Punkte der heterogenen ASA-Präparation verschoben sich um durchschnittlich etwa eine pH-Einheit zu höheren Werten. Wurde die Reaktion bei pH 5,8, pH 6,8 oder pH 7,8 durchgeführt, so waren die Verschiebungen weniger stark ausgeprägt und der Grad der Kationisierung nahm in dieser Reihenfolge ab (nicht gezeigt). Abb. 32 C zeigt die Auswirkungen der Kationisierung bei unterschiedlichen pH-Werten auf die enzymatische Restaktivität von CHO-rhASA. Der Aktivitätsverlust war gering und lag bei maximal 25 % für die Kationisierung bei pH 4,8.

Der selektive und sensitive Nachweis von hASA, der für die Untersuchungen im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke unerlässlich ist, basiert auf einem ELISA-Verfahren. Da bei der Kationisierung mit Diaminen freie Carboxylgruppen des Proteins modifiziert werden, können Epitope verloren gehen. Aus diesem Grund wurde CHO-rhASA nach Kationisierung bei unterschiedlichen pH-Werten auf ihre Detektierbarkeit im hASA-ELISA untersucht (Abb. 32 D). Bereits die vergleichsweise schwache Kationisierung bei pH 7,8 bewirkte eine messbare Reduktion der Nachweisbarkeit. Wurde die Reaktion bei pH 4,8 durchgeführt, so war die Abnahme stärker und nach einer Stunde konnte nur noch weniger als die Hälfte der modifizierten rhASA detektiert werden.

Um die ASA-Bestimmung mittels ELISA zu umgehen, wurde die Amidierungsreaktion unter Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -Ethylendiamin durchgeführt, was neben der Kationisierung gleichzeitig die radioaktive Markierung der ASA-Moleküle zur Folge hatte. Unter den beschriebenen Bedingungen konnten jedoch maximal sechs Mol Ethylendiamin pro Mol ASA (bezogen auf das Monomer) gebunden werden. Im Reaktionsansatz wurde CHO-rhASA in einer Konzentration von 1 mg/ml entsprechend 18  $\mu\text{M}$  des Monomers eingesetzt, so dass sich eine Konzentration an gekoppeltem Ethylendiamin von 108  $\mu\text{M}$  ergab. Da hierzu freies Ethylendiamin in einer Konzentration von 200 mM eingesetzt werden musste, lag der Kopplungsfaktor der Reaktion bei nur 0,05 %. Dies war für eine effiziente radioaktive Markierung zu niedrig. Der Einsatz von kationisierter ASA im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke war daher nicht möglich.





**Abb. 32: Kationisierung von CHO-rhASA**

- (A) Reaktionsschema der Carbodiimid-vermittelten Amidierung. Carboxylgruppen des Proteins reagieren nach Aktivierung durch 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) mit Diaminen zu Carbonsäureamiden. Mit jedem gekoppelten Diamin wird eine negative Ladung (Carboxylgruppe des Proteins) in eine positive Ladung (primäre Aminogruppe des Diamins) umgewandelt. (Schema: Hervé *et al.*, 2008.)
- (B) Isoelektrische Fokussierung von unbehandelter und kationisierter CHO-rhASA. Die Kationisierung erfolgte mit Hexamethylendiamin bei pH 4,8. Aufgetragen wurden je 10 µg ASA. Das Gel wurde mit Coomassie-Blau gefärbt. Da einzelne ASA-Moleküle unterschiedlich stark kationisiert wurden, erschienen die Banden nach Kationisierung diffuser.
- (C) Restaktivität von CHO-rhASA, die bei unterschiedlichen pH-Werten kationisiert worden war. Die Restaktivität wurde mit p-Nitrokatecholsulfat gemessen.
- (D) ELISA-Detektierbarkeit von CHO-rhASA, die bei unterschiedlichen pH-Werten kationisiert worden war.

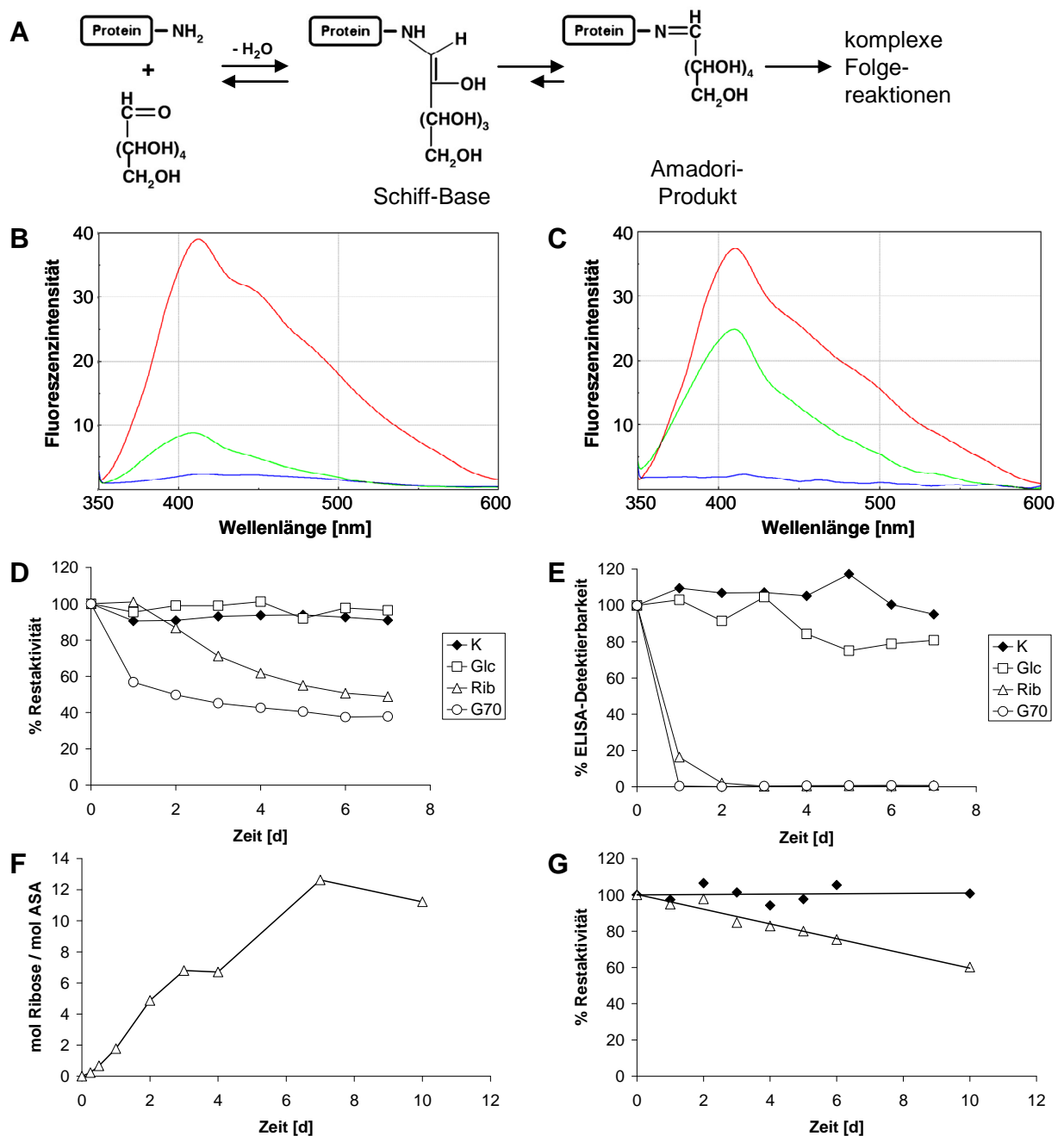
#### 5.4.2.6 Glykierung von CHO-rhASA zur Bildung von RAGE-Liganden

Der *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) wird auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert (Neeper *et al.*, 1992) und bindet unter anderem die Produkte von nichtenzymatischen Glykierungs- und Oxidationsreaktionen, sogenannte *Advanced Glycation Endproducts* (AGEs), die bei pathologischen Zuständen wie Diabetes und der Alzheimer-Krankheit vermehrt gebildet werden (Ramasamy *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass RAGE den Transport des Amyloid- $\beta$ -Peptids über die Blut-Hirn-Schranke vermittelt (Deane *et al.*, 2005) und dass die Glykierung von Proteinen ihre Permeabilität an der Blut-Hirn-Schranke erhöht (Poduslo & Curran, 1994). AGEs entstehen durch die nichtenzymatische

Reaktion der Carbonylgruppen von reduzierenden Zuckern mit den Aminogruppen von Proteinen (Abb. 33 A). Die instabilen Reaktionsprodukte unterliegen einer Amadori-Umlagerung und können in komplexen Reaktionsfolgen, z.B. unter Fragmentierung, Transaminierung oder Polymerisierung, weiterreagieren, was unter dem Begriff Maillard-Reaktion zusammengefasst wird (Zhang *et al.*, 2009). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob CHO-rhASA durch Glykierung mit verschiedenen Zuckern modifiziert werden kann und ob die entstehenden RAGE-Liganden den Übertritt von ASA über die Blut-Hirn-Schranke im Zellkulturmodell erhöhen können.

Die Glykierung von CHO-rhASA zur Generierung von AGEs erfolgte wie beschrieben (Valencia *et al.*, 2003) durch Inkubation mit 500 mM Ribose, 500 mM Glukose oder 70 mM Glykolaldehyd bei 37 °C. Da die Reaktion freie Aldehyd-Gruppen erfordert, ist die Reaktionsgeschwindigkeit abhängig vom Prozentsatz der offenkettigen Aldehydform der Zucker und somit für Ribose höher als für Glukose und am höchsten für das vollständig offenkettig vorliegende Glykolaldehyd. Bei der Maillard-Reaktion von Proteinen entstehen fluoreszierende Gruppen, vermutlich Imidazol-Derivate, mit deren Hilfe die Bildung von AGEs gemessen werden kann (Westwood & Thornalley, 1995). Die in Abb. 33 B und C dargestellten Fluoreszenzspektren von CHO-rhASA nach ein- und dreiwöchiger Glykierung mit Ribose bzw. Glukose zeigen, dass fluoreszierende AGE-Strukturen ausgebildet wurden. Während für die Glykierung mit Ribose bereits nach einer Woche eine maximale Fluoreszenz erreicht war, nahm sie in der langsamer ablaufenden Reaktion mit Glukose innerhalb von drei Wochen zu, blieb aber auch dann noch unterhalb des Ribose-Niveaus.

Die Glykierung von CHO-rhASA bewirkte eine Abnahme der enzymatischen Aktivität (Abb. 33 D). Entsprechend der Geschwindigkeit der Glykierungsreaktion war die ASA-Aktivität bei Reaktion mit Glykolaldehyd nach zwei Tagen um 50 %, bei Reaktion mit Ribose nach sechs Tagen um 50 % reduziert. Die Reaktion mit Glukose hatte innerhalb einer Woche keine Auswirkungen auf die ASA-Aktivität, allerdings war diese nach drei Wochen um 40 % reduziert (nicht gezeigt). Abb. 33 E zeigt die Detektierbarkeit der glykierten CHO-rhASA mittels hASA-ELISA. Bereits nach einem bzw. drei Tagen war die mit Glykolaldehyd bzw. Ribose modifizierte ASA nicht mehr detektierbar. Auch die Glykierung mit der weniger reaktiven Glukose führte nach wenigen Tagen zu einer Abnahme der Detektierbarkeit.



**Abb. 33: Glykierung von CHO-rhASA: Fluoreszenzspektren, Restaktivität, Detektierbarkeit, radioaktive Glykierung mit  $^{14}\text{C}$ -Ribose**

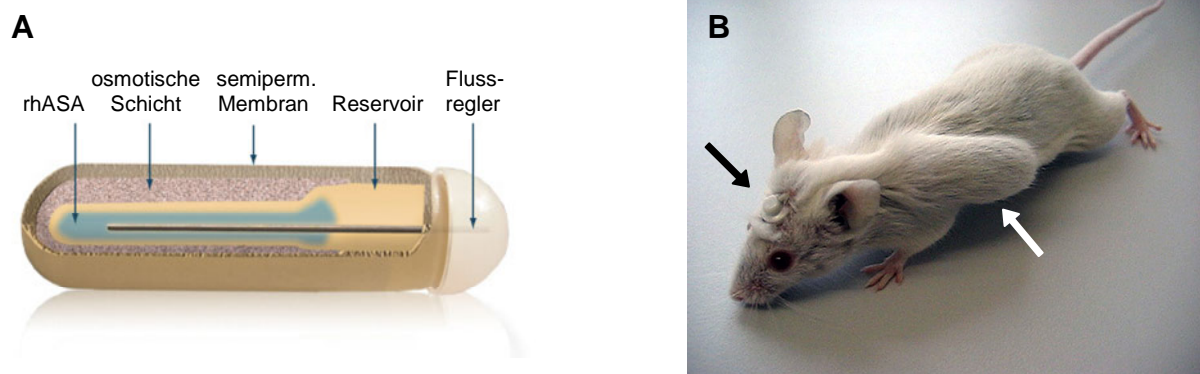
- (A) Reaktionsschema der Anfangsreaktionen der Maillard-Reaktion. Aminogruppen von Proteinen reagieren mit Carbonylgruppen reduzierender Zucker unter Bildung einer Schiffschen Base, die zu Amadori-Produkten umgelagert wird. Diese können in komplexen Reaktionsfolgen weiterreagieren. (Schema modifiziert nach Valencia *et al.*, 2004.)
- (B, C) Fluoreszenzspektren (Anregungswellenlänge 335 nm) von 0,5 mg/ml CHO-rhASA nach (B) 1-wöchiger und (C) 3-wöchiger Inkubation bei 37 °C mit 500 mM Ribose (rot), 500 mM Glukose (grün) oder Puffer (blau). Durch nicht-enzymatische Reaktion der Zucker mit den Aminogruppen des Proteins wurden fluoreszierende Strukturen gebildet.
- (D, E) Restaktivität (D), bestimmt mit p-Nitrokatecholsulfat, und ELISA-Detektierbarkeit (E) von 0,5 mg/ml CHO-rhASA nach Inkubation mit 500 mM Glukose (Glc), 500 mM Ribose (Rib), 70 mM Glykolaldehyd (G70) oder Puffer (K).
- (F, G) Zeitabhängige Kopplungsrate von 50 mM  $^{14}\text{C}$ -Ribose an 0,5 mg/ml CHO-rhASA (F) und dabei auftretender Aktivitätsverlust (G). In (G) zeigen weiße Dreiecke die Werte des Reaktions-, schwarze Vierecke die Werte des Kontrollansatzes ohne Ribose. Über die Inkubationszeit konnte die Anzahl der an ASA bindenden Ribose-Reste gesteuert werden.

Um die Nachweisbarkeit glykierter ASA im ELISA zu erhalten, sollte die Anzahl modifizierender Reste so gering wie möglich gehalten werden. Dazu wurde die Ribose-Konzentration auf 50 mM verringert und radioaktiv markierte 1-<sup>14</sup>C-Ribose beigemischt, um die zeitabhängige Kopplungsrate der Reaktion zu bestimmen (Abb. 33 E). Mit Hilfe dieser Werte konnte durch 17-stündige Inkubation ASA hergestellt werden, die mit genau einem Mol Ribose pro Mol ASA glykiert war. Die Enzymaktivität dieser ASA (Abb. 33 F) lag im Bereich von unbehandelter rhASA, jedoch war die ELISA-Detektierbarkeit um 33 % reduziert. Eine zweitägige Inkubation bewirkte die Kopplung von fünf Mol Ribose pro Mol ASA und führte zu einer Rest-Detektierbarkeit von 11 %.

Da auch geringfügig glykierte ASA nicht mehr oder schlechter mittels hASA-ELISA detektiert werden konnte, war der Einsatz im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke, für den eine quantitative ASA-Bestimmung essenziell ist, unmöglich. Aufgrund der geringen Kopplungseffizienz der Glykierungsreaktion von 0,2 % war unter Verwendung von <sup>14</sup>C-markierter Ribose die radioaktive Markierung des Proteins nicht ausreichend stark, um im Zellkulturmodell eingesetzt werden zu können.

## 5.5 Umgehung der Blut-Hirn-Schranke durch intrazerebroventrikuläre Infusion mit osmotischen Minipumpen

Systemisch injizierte Proteine gelangen normalerweise nicht ins Hirnparenchym, da sie die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können. Eine Möglichkeit, die Blut-Hirn-Schranke zu umgehen, ist die intrathekale Injektion in das ventrikuläre System des Gehirns. Die darin enthaltene Zerebrospinalflüssigkeit wird mehrfach pro Tag ausgetauscht (Pardridge, 2007), daher ist zur effizienten Zuführung von Substanzen eine kontinuierliche Infusion erforderlich. Für die intrazerebroventrikuläre Infusion bei Mäusen sind osmotischen Minipumpen kommerziell erhältlich. Die Pumpen enthalten ein osmotisches Material, das von einer semipermeablen Membran umschlossen wird (Abb. 34 A). Nach subkutaner Implantation bewirkt das mit einer definierten Geschwindigkeit eindringende Gewebewasser die zunehmende Kompression des innerhalb der osmotischen Schicht liegenden Reservoirs, was zu einem über mehrere Wochen konstanten Ausstrom der enthaltenen Substanzlösung führt (Theeuwes & Yum, 1976). Die Substanz wird über eine in der Schädeldecke implantierte Kanüle mit definierter Eindringtiefe in das Ventrikelsystem des Gehirns geleitet.



**Abb. 34: Schema einer osmotischen Minipumpe, Maus nach Implantation**

- (A) Die Pumpe ist von einer semipermeablen Membran umgeben und enthält eine osmotische Schicht. Nach Implantation dringt kontinuierlich Wasser aus dem umgebenden Gewebe mit einer definierten Geschwindigkeit in die Pumpe ein. Der hydrostatische Druck bewirkt die langsame Entleerung des Pumpenreservoirs. (Schema: ALZET Osmotic Pumps, Cupertino, USA)
- (B) Maus mit subkutan implantiertem osmotischer Minipumpe. Der weiße Pfeil markiert die unter die Rückenhaut implantierte Pumpe, der schwarze Pfeil die Abdeckung der Injektionskanüle.

Für die folgenden Experimente wurden osmotische Minipumpen des Modells ALZET 2004 in Verbindung mit dem *Brain Infusion Kit 3* (ALZET Osmotic Pumps, Cupertino, USA) verwendet. Die Minipumpen hatten eine Größe von 30 x 7 mm, eine Kapazität von 200  $\mu$ l,

wiesen eine Flussrate von 0,25  $\mu\text{l/h}$  auf und waren für maximal vierwöchigen Einsatz vorgesehen. Die Implantation der osmotischen Minipumpen erfolgte durch Stijn Stroobants (Labor für Biologische Psychologie, Katholische Universität Leuven, Belgien).

### 5.5.1 Vierwöchige intrazerebroventrikuläre Infusion von CHO-rhASA

Die wiederholte systemische Injektion von rhASA ruft in konventionellen immunkompetenten ASA-Knock-out-Mäusen eine Immunantwort hervor, die den Behandlungserfolg reduzieren kann (Matzner *et al.*, 2008). Um die prinzipielle Eignung osmotischer Minipumpen für die intrazerebroventrikuläre Langzeitinfusion von CHO-rhASA im Mausmodell zu untersuchen, wurden Minipumpen daher in etwa 1 Jahr alte immuntolerante ASA-Knock-out-Mäuse sowie PLP-CST-transgene immuntolerante ASA-Knockout-Mäuse mit verstärktem MLD-Phänotyp (Ramakrishnan *et al.*, 2007) implantiert. Über einen Zeitraum von vier Wochen wurde kontinuierlich CHO-rhASA mit einer Konzentration von 1 mg/ml infundiert. Nach Abschluss der Behandlung wurden die Mäuse mit PBS perfundiert, das Gehirn präpariert und homogenisiert. Die aus den explantierten Minipumpen entnommene rhASA hatte eine Restaktivität von 70 % (nicht gezeigt). Es wurde keine Abnahme der ASA-Konzentration, beispielsweise durch Adsorption an das Kunststoffreservoir, festgestellt (nicht gezeigt).

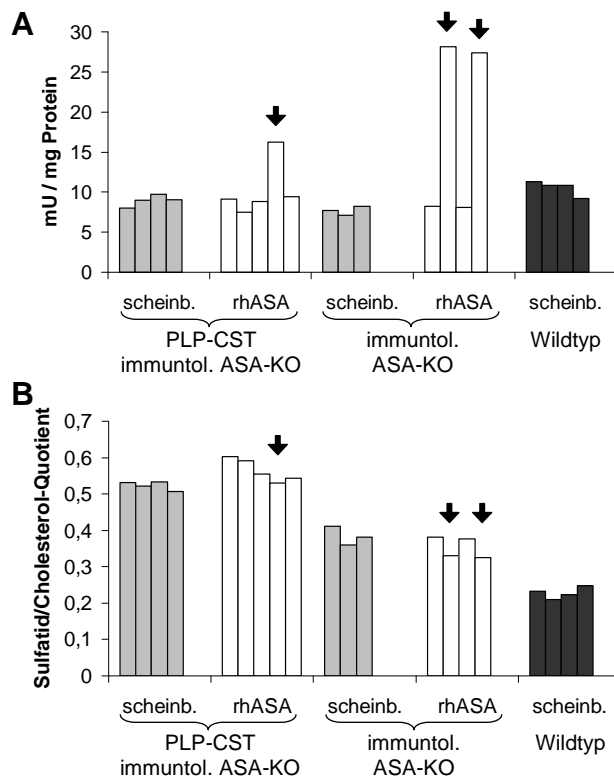
Um die Infusion von rhASA ins Gehirn nachzuweisen, wurde die Sulfatase-Aktivität der Hirnhomogenate mit p-Nitrokatecholsulfat gemessen (Abb. 35 A). Nur drei von neun behandelten Mäuse zeigten im Vergleich zu scheinbehandelten Kontrollen eine erhöhte Sulfatase-Aktivität (markiert mit Pfeilen). In Homogenaten der *Medulla oblongata* und des Rückenmarks konnte keine erhöhte Sulfatase-Aktivität nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob die infundierte rhASA eine Reduktion des Sulfatid-Gehalts im Gehirn bewirkte, wurden die Lipide der Hirnhomogenate mittels Dünnschichtchromatographie quantifiziert (Abb. 35 B). Dabei wurde deutlich, dass die Homogenate, in denen die Sulfatase-Aktivität erhöht war, einen niedrigeren Sulfatid-Gehalt aufwiesen als Homogenate mit Hintergrundaktivität. Im Falle der immuntoleranten ASA-Knock-out-Mäuse war die Sulfatid-Akkumulation im Vergleich zum Durchschnittswert der scheinbehandelten Kontrollgruppe um 34 % bzw. 38 % erniedrigt.

Die scheinbehandelte Kontrollgruppe der PLP-CST-transgenen immuntoleranten ASA-Knock-out-Mäuse wies überraschenderweise einen niedrigeren Sulfatid-Gehalt auf als die Tiere der behandelten Gruppe. Dies beruhte vermutlich auf großen individuellen Schwankun-

---

gen der Sulfatid-Spiegel zwischen den einzelnen Mäusen. Gleichwohl enthielt das einzige Homogenat der behandelten Gruppe, das eine erhöhte Sulfatase-Aktivität zeigte, den niedrigsten Sulfatid-Gehalt. Die Sulfatid-Spiegel von *Medulla oblongata* und Rückenmark wiesen keine Unterschiede zwischen behandelten und scheinbehandelten Gruppen auf (nicht gezeigt).



**Abb. 35: ASA-Aktivität und Sulfatid-Gehalt in Hirn-Homogenaten nach vierwöchiger intrazerebroventrikulärer Infusion von CHO-rhASA**

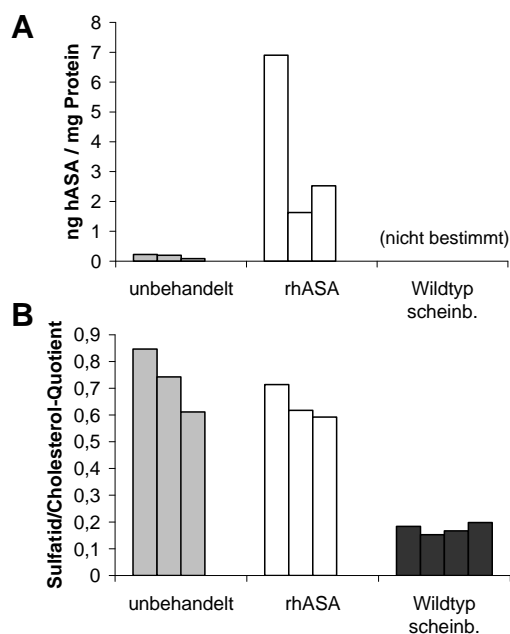
Immuntolerante ASA-Knock-out-Mäuse wurden vier Wochen lang mit CHO-rhASA oder Puffer intrazerebroventrikulär infundiert.

- (A) Sulfatase-Aktivität in Hirn-Homogenaten, bestimmt mittels p-Nitrokatecholsulfat. Im Vergleich zu scheinbehandelten Mäusen erhöhte Aktivität wurde mit Pfeilen markiert.
- (B) Sulfatid-Gehalt der gleichen Hirn-Homogenate wie unter (A), bestimmt mittels Dünnschichtchromatographie. Die drei Gehirne mit erhöhter ASA-Aktivität wiesen einen reduzierten Sulfatid-Gehalt auf (Pfeile).

### 5.5.2 Einwöchige intrazerebroventrikuläre Infusion in immunkompetente Tiere

Die im vorangegangenen Versuch verwendeten immuntoleranten Mäuse wiesen den experimentellen Nachteil auf, dass sie nicht mittels hASA-ELISA untersucht werden konnten, da die von ihnen zur Induktion der Immuntoleranz ubiquitär exprimierte humane ASA-Mutante hASA-C69S mit dem hASA-ELISA kreuzreagiert. Um eine präzisere Untersuchung der intrazerebroventrikulären rhASA-Infusion zu ermöglichen, wurden osmotische Minipumpen in immunkompetente PLP-CST-transgene ASA-Knock-out-Mäuse implantiert. Zur Vermeidung von möglicherweise letalen Immunreaktionen wurde die kontinuierliche Infusion von CHO-rhASA auf acht Tage reduziert. Nach Abschluss der Behandlung wurden die Mäuse mit PBS perfundiert, das Gehirn präpariert und homogenisiert.

In den Hirn-Homogenaten aller behandelten Mäuse konnte hASA nachgewiesen werden. Die Konzentrationen bewegten sich zwischen 1,6–6,9 ng hASA/mg Protein (Abb. 36 A). Die Sulfatid-Speicherung im Gehirn war in der behandelten Gruppe um durchschnittlich 17 % reduziert im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 36 B). Die Abnahme war jedoch statistisch nicht signifikant ( $P = 0,15$ ) und es konnte keine Korrelation zwischen der individuellen Sulfatid-Reduktionen und der Höhe der jeweiligen ASA-Konzentration im Gehirn festgestellt werden. Die großen Schwankungen des Sulfatid-Gehalts zwischen den Tieren der unbehandelten Kontrollgruppe ließen auf hohe individuelle Unterschiede in der Sulfatid-Speicherung der verwendeten PLP-CST-transgenen ASA-Knock-out-Mäuse schließen.



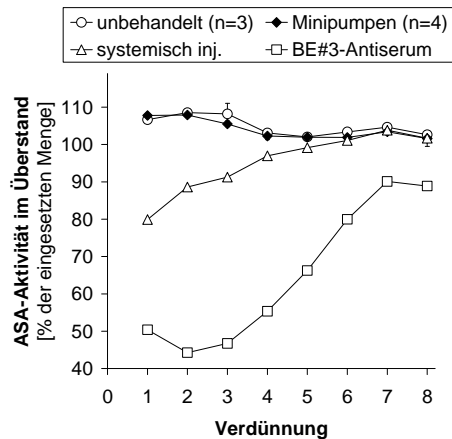
**Abb. 36: hASA-Konzentration und Sulfatid-Gehalt in Hirn-Homogenaten nach einwöchiger intrazerebroventrikulärer Infusion von CHO-rhASA**

Immunkompetente PLP-CST-transgene ASA-Knock-out-Mäuse wurden 8 Tage lang mit CHO-rhASA intrazerebroventrikulär infundiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Mäuse des gleichen Genotyps sowie mit Puffer scheinbehandelte Wildtyp-Mäuse.

- (A) hASA-Konzentration in Hirn-Homogenaten, gemessen mittels ELISA.  
 (B) Sulfatid-Gehalt der gleichen Mäuse wie unter (A), bestimmt mittels Dünnschichtchromatographie.

Um die Bildung von Antikörpern gegen rhASA zu untersuchen, wurde das Serum von vier intrazerebroventrikulär mit CHO-rhASA infundierten PLP-CST-ASA-Knock-out-Mäusen mittels Immunpräzipitation untersucht. Als Kontrollen wurden die Seren dreier unbehandelter Mäuse gleichen Genotyps verwendet. Es konnten keine gegen rhASA gerichtete Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 37).





**Abb. 37:  $\alpha$ -rhASA-Antikörper-Titer**

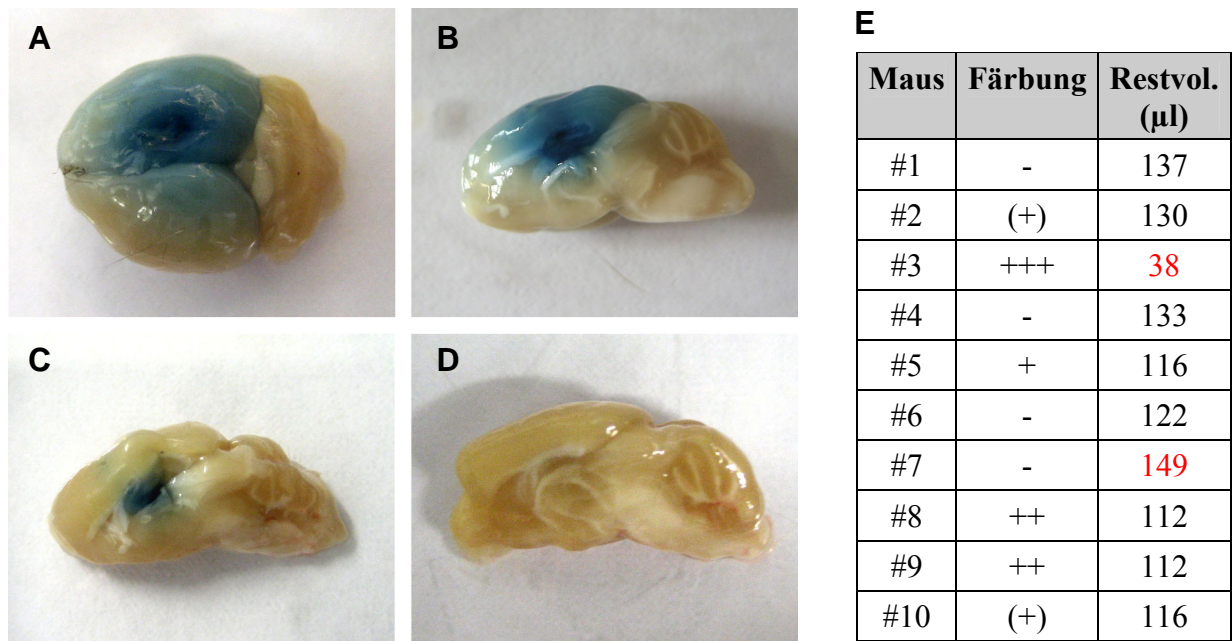
PLP-CST-transgene ASA-Knock-out-Mäuse wurden mittels osmotischer Minipumpen über einen Zeitraum von acht Tagen intrazerebroventrikulär mit CHO-rhASA infundiert. Das Serum von vier behandelten und drei unbehandelten Mäusen wurde mittels Immunpräzipitation analysiert. Die Abnahme der ASA-Aktivität im Überstand ist ein Maß für den  $\alpha$ -rhASA-Antikörper-Titer. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Als Positivkontrollen wurden  $\alpha$ -rhASA-Kaninchen-Antiserum (BE#3) sowie das Serum einer dreimalig systemisch mit 40 mg/kg CHO-rhASA injizierten Maus verwendet.

### 5.5.3 Visualisierung der intrazerebroventrikulären Infusion mittels Evans-Blau

Um die Verteilung von intrazerebroventrikulär infundiertem Protein im Gehirn sichtbar zu machen, wurde eine Mischung aus CHO-rhASA und dem ungiftigen Diazofarbstoff Evans-Blau verwendet. Die Lösung wurde mit osmotischen Minipumpen über einen Zeitraum von drei Wochen in zehn immuntolerante ASA-Knock-out-Mäuse infundiert.

Nach Abschluss der Behandlung wurden die Mäuse mit PBS perfundiert und das Gehirn präpariert. Von zehn untersuchten Gehirnen wiesen vier keine Färbung, zwei eine schwache, drei eine mittlere und ein Gehirn eine starke Farbintensität auf (Abb. 38). Die Färbung war im Bereich der Einstichstellen am intensivsten und konnte in den meisten Gehirnen nur dort nachgewiesen werden. Im Gehirn mit der stärksten Färbung waren die gesamte ipsilaterale sowie Teile der kontralateralen Hemisphäre des zerebralen Kortex angefärbt, während Zerebellum und Hirnstamm keine Färbung aufwiesen (Abb. 38 A, B).

Das in den Minipumpen verbliebene Restvolumen der rhASA-Evans-Blau-Lösung wurde nach der Explantation bestimmt. Da die Pumpen ein Reservoirvolumen von 200  $\mu$ l und eine Flussrate von 0,25  $\mu$ l/h aufwiesen, war nach 21-tägiger Infusion mit einem theoretischen Restvolumen von etwa 70  $\mu$ l zu rechnen. Die Restvolumina der Pumpen bewegten sich zwischen 38 und 149  $\mu$ l, waren aber in den meisten Fällen größer als 100  $\mu$ l (Abb. 38 E). Es wurde eine inverse Korrelation zwischen dem in der Pumpe verbliebenen Restvolumen und der Färbungsintensität im Gehirn festgestellt. Die Tiere, deren Pumpen die größten Restvolumina aufwiesen, zeigten keine Färbung, während insbesondere das Gehirn der Maus mit dem geringsten Restpumpenvolumen am intensivsten angefärbt war.



**Abb. 38: Verteilung von Evans-Blau nach dreiwöchiger intrazerebroventrikulärer Infusion**

Eine Mischung aus CHO-rhASA und Evans-Blau-Lösung wurde über einen Zeitraum von drei Wochen in zehn immuntolerante ASA-Knock-out-Mäuse intrazerebroventrikulär infundiert. Die osmotischen Minipumpen hatten eine Kapazität von 200 µl und eine Flussrate von 0,25 µl/h. Die präparierten Gehirne wiesen große Unterschiede in der Intensität der zerebralen Färbung auf, die mit den in den Pumpen verbliebenen Restvolumina korrelierten.

(A) Dorsale Ansicht des Gehirns mit der intensivsten Färbung (Maus #3). Der Farbstoff war im Bereich der Injektionsstelle am höchsten konzentriert und verteilte sich über die gesamte ipsilaterale Hemisphäre. Auch Teile der kontralateralen Hemisphäre waren angefärbt. (B) Sagittale Ansicht des gleichen Gehirns (#3) nach Schnitt durch die Injektionsstelle. Der Farbstoff war hauptsächlich im zerebralen Kortex lokalisiert, Zerebellum und Hirnstamm waren nicht gefärbt. (C) Sagittale Ansicht von Gehirn #9 nach Schnitt durch die Injektionsstelle. Die Färbung war auf einen Bereich um die Einstichstelle beschränkt. (D) Sagittale Ansicht von Gehirn #1. Es war keine Färbung erkennbar. Der Hauptteil der Lösung (149 von 200 µl) war in der Minipumpe verblieben. (E) Färbungsintensitäten der Gehirne (visuelle Beurteilung nach Schnitt durch die Injektionsstelle) und in den Pumpen verbliebene Restvolumina. Maximales und minimales Restvolumen sind rot hervorgehoben.

## 6 Diskussion

### 6.1 Enzymersatztherapie an ASA-Knock-out-Mäusen

#### 6.1.1 Behandlung immuntoleranter ASA-Knock-out-Mäuse mit CHO-rhASA und BR-HT1080-rhASA

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten zwei industriell hergestellte Sorten rekombinanter humaner Arylsulfatase A (rhASA), CHO-rhASA und BR-HT1080-rhASA, auf ihre therapeutische Wirksamkeit in der Enzymersatztherapie untersucht werden. Als Tiermodell wurden immuntolerante ASA-Knock-out-Mäuse verwendet, die neben dem MLD-ähnlichen Phänotyp immunologische Toleranz gegenüber humaner ASA aufwiesen (Matzner *et al.*, 2007). Die Mäuse wurden durch intravenöse Injektion von rhASA in die Schwanzvene in wöchentlichen Abständen insgesamt viermal behandelt. Um eine Dosisabhängigkeit der therapeutischen Effekte zu untersuchen, wurde entweder eine niedrige rhASA-Dosis von 5 mg/kg oder eine hohe Dosis von 20 mg/kg verabreicht.

Für CHO-rhASA war bekannt, dass die mehrfache systemische Injektion in immuntolerante ASA-Knock-out-Mäuse nicht zu immunologischen Nebenwirkungen führt (Matzner *et al.*, 2007, 2009). Diese Ergebnisse konnten bestätigt und auf BR-HT1080-rhASA erweitert werden. Die Injektion von CHO- oder BR-HT1080-rhASA rief während des gesamten Behandlungszeitraums keine sichtbaren Nebenwirkungen hervor, wie aus der Beobachtung des Käfigverhaltens sowie aus dem konstant bleibenden Körpergewicht und unveränderten Organengewichten geschlossen werden konnte. Immunologische Nebenwirkungen treten in konventionellen immunkompetenten ASA-Knock-out-Mäusen bekanntermaßen nach drei oder vier Injektionen auf (Matzner *et al.*, 2008). Da auch nach der vierten Injektion keine Nebenwirkungen beobachtet wurden, scheint BR-HT1080-rhASA für die Langzeit-Enzymersatztherapie in immuntoleranten Mäusen genauso geeignet zu sein wie CHO-rhASA.

Die therapeutische Wirksamkeit der rhASA-Behandlung wurde durch die Messung der Reduktion der Sulfatid-Speicherung in verschiedenen Geweben ermittelt (Abb. 9). Enzymersatztherapie mit CHO- oder BR-HT1080-rhASA führte in allen untersuchten Geweben zu einer Abnahme des Sulfatid-Spiegels. In Niere, *Plexus brachialis* und Rückenmark wurde

Sulfatid unter allen Behandlungsbedingungen reduziert. Die Abnahme akkumulierten Sulfatids war im zum peripheren Nervensystem gehörenden *Plexus brachialis* mit bis zu 35 % am stärksten ausgeprägt, während sie in den anderen untersuchten Geweben geringer ausfiel und keine statistische Signifikanz festgestellt werden konnte.

Vergleicht man beide rhASA-Sorten hinsichtlich ihrer therapeutischen Wirksamkeit, so wurde in Niere und *Plexus brachialis* von mit BR-HT1080-rhASA-behandelten Mäusen eine deutlichere Sulfatid-Reduktion beobachtet als in mit CHO-rhASA behandelten Mäusen. Obwohl die Unterschiede der Nieren-Spiegel statistisch nicht signifikant waren (*t*-Test,  $P > 0,05$ ), unterstützen niedrigere *P*-Werte für beide BR-HT1080-rhASA-behandelte Gruppen diese Tendenz. Gespeichertes Sulfatid war im *Plexus brachialis* nach BR-HT1080-rhASA-Behandlung etwa doppelt so stark reduziert wie nach CHO-rhASA-Behandlung.

Im Rückenmark bewirkte die Hochdosis-Behandlung mit 20 mg/kg für beide rhASA-Sorten eine ähnliche Sulfatid-Reduktion. Dagegen führte BR-HT1080-rhASA bei der niedrigeren Dosis von 5 mg/kg eine zu einer stärkeren Abnahme als CHO-rhASA. Die Werte waren jedoch statistisch nicht signifikant. Im Gehirn wurde eine Sulfatid-Reduktion nur bei Behandlung mit der höheren rhASA-Dosis von 20 mg/kg beobachtet, nicht aber bei Verabreichung von 5 mg/kg. Diese Dosis-Abhängigkeit der Hirn-Effekte bestätigt frühere Untersuchungen, die gezeigt hatten, dass niedrige CHO-rhASA-Dosen von 2,5 oder 4 mg/kg die Sulfatid-Speicherung im Gehirn nicht reduzieren konnten (Matzner *et al.*, 2007, 2009). Demgegenüber bewirkte eine Langzeitbehandlung mit 52 Injektionen unter Verwendung einer hohen Dosis von 50 mg/kg CHO-rhASA eine Reduktion des im Gehirn akkumulierten Sulfatids um 34 % (Matzner *et al.*, 2009). Die Dosis-Abhängigkeit wurde mit der Blut-Hirn-Schranke erklärt, die den Übertritt von rhASA vom Blut in das Hirngewebe limitiert. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass nach Verabreichung von vier Injektionen à 20 mg/kg oder 5 mg/kg die Mengen von rhASA, die das Hirngewebe erreichten, zu niedrig waren, um signifikante therapeutische Effekte auszuüben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in peripheren Geweben eine klare Tendenz für eine höhere therapeutische Wirksamkeit von BR-HT1080-rhASA im Vergleich zu CHO-rhASA existiert, während im ZNS das Potenzial zur Reduktion gespeicherten Sulfatids für beide rhASA-Sorten sehr ähnlich ist. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte eine höhere spezifische Aktivität von BR-HT1080-rhASA in Verbindung mit einem im Vergleich zu CHO-rhASA niedrigeren Vermögen zur Überquerung der Blut-Hirn-Schranke liegen. Gleiche Aufnahmeraten in den peripheren Geweben würden dann zu einer höheren intrazellulären

Aktivität von BR-HT1080-rhASA führen, während im Gehirn die höhere spezifische Aktivität durch die niedrigere Übertrittsrate über die Blut-Hirn-Schranke zunichte gemacht würde. Der Grund für die unterschiedlichen Übertrittsraten könnte in den posttranslationalen Modifikationen von ASA zu finden sein, die unter anderem N-Glykosylierung, Phosphorylierung von Mannosyl-Resten und Formylglycin-Bildung aus Cystein im aktiven Zentrum beinhalten. Es wurde gezeigt, dass sich die genannten Modifikationen bei rhASA je nach Zelltyp und Kulturbedingung deutlich unterscheiden können (Schröder *et al.*, 2010). Ein Vergleich der posttranslationalen Modifikationen beider rhASA-Sorten sowie ihrer Pharmakokinetik wäre daher interessant, war im Rahmen dieser Arbeit jedoch aus vertragsrechtlichen Gründen nicht möglich.

### **6.1.2 Behandlung konventioneller ASA-Knock-out-Mäuse mit verschiedenen rhASA-Sorten**

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene rhASA-Sorten auf ihre therapeutische Wirksamkeit in der Enzyersatztherapie unter Verwendung konventioneller ASA-Knock-out-Mäuse (Hess *et al.*, 1996) untersucht werden. Diese Mäuse weisen keine Immuntoleranz gegenüber humaner ASA auf, bieten aber im Gegensatz zu den im vorangegangenen Teil verwendeten immuntoleranten Mäusen den Vorteil, dass pharmakokinetische Untersuchungen mittels hASA-ELISA möglich sind. Aufgrund der fehlenden Immuntoleranz musste die Behandlungsdauer auf drei Injektionen verkürzt werden, da bei längerer Behandlung mit CHO-rhASA bekanntermaßen immunologische Nebenwirkungen auftreten (Matzner *et al.*, 2008). Um eventuelle therapeutische Effekte in der kurzen Behandlungszeit möglichst deutlich zu machen, wurde die rhASA-Dosis auf 40 mg/kg erhöht. Neben der auch im vorangegangenen Teil verwendeten, industriell im Bioreaktor produzierten CHO-rhASA wurden mit BHK- und HT1080-rhASA zwei rhASA-Sorten eingesetzt, die in konventioneller Zellkulturtechnik produziert und über eine selbst hergestellte Immunaффinitätssäule aufgereinigt wurden (s. 4.5.3).

Eine Glykosylierungsstellen-spezifische Analyse hatte gezeigt, dass die N-glykosidischen Oligosaccharidstrukturen der rhASA-Sorten große Unterschiede aufweisen (Schröder *et al.*, 2010). Die im Bioreaktor produzierte CHO-rhASA trägt im Durchschnitt deutlich komplexere Zuckerseitenketten als BHK-rhASA, während die Zuckerstrukturen von HT1080-rhASA die geringste Komplexität aufweisen (s. Tabelle 2, S. 37). Eine Bestimmung des M6P-Gehalts zeigte für CHO-rhASA einen etwa dreifach höheren Wert als für BHK- und HT1080-rhASA

(s. 5.1.1, Tabelle 3). Die Unterschiede resultieren vermutlich aus den unterschiedlichen Kulturbedingungen, da von den Zellen sezernierte rhASA-Moleküle in der klassischen Flaschenkultur längere Zeit Kontakt zu im Zellkulturmedium vorhandenen Phosphatasen und Exoglykosidasen haben als im Bioreaktor, wo das Medium kontinuierlich ausgetauscht wird. Zudem können auch Unterschiede zwischen den Zelltypen, z.B. zelltypspezifisch unterschiedlich exprimierte Glykosyltransferasen, für die verschiedenen Glykosylierungsmuster verantwortlich sein. Die spezifische Aktivität von HT1080-rhASA war deutlich geringer als die der beiden anderen rhASA-Sorten. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die verwendeten überexprimierenden HT1080-Zellen vergleichsweise große Mengen an Enzym sezernierten und die Zellmaschinerie mit der für die Enzymaktivität essenziellen posttranslationalen C<sub>α</sub>-Formylierung des Cystein-Rests im aktiven Zentrum überfordert war.

Nach intravenöser Injektion von rhASA in die Schwanzvene von ASA-Knock-out-Mäusen wurde zwischen den untersuchten rhASA-Sorten ein unterschiedliches pharmakokinetisches Verhalten festgestellt. CHO-rhASA wies eine längere Serumhalbwertszeit auf als BHK- und HT1080-rhASA, die beide vergleichbare Werte zeigten (s. Abb. 10). Hinsichtlich der Organverteilung war allen rhASA-Sorten gemein, dass zwei Stunden nach Injektion der Großteil injizierten Enzyms in der Leber wiedergefunden und nur sehr geringe rhASA-Konzentrationen im Nervensystem gemessen wurden. Bei genauerer Betrachtung des ZNS zeigte sich im Gehirn eine höhere Konzentration für CHO-rhASA, während BHK- und HT1080-rhASA im Rückenmark leicht erhöhte Werte aufwiesen (s. Abb. 11).

Eine Woche nach der Injektion wurde im ZNS eine andere rhASA-Verteilung gemessen (s. Abb. 12). Die Konzentration im Gehirn war für BHK-rhASA am höchsten, etwas geringer für HT1080-rhASA und deutlich niedriger für CHO-rhASA. Auch im Rückenmark war die mittlere CHO-rhASA-Konzentration am niedrigsten. Offenbar wird CHO-rhASA, möglicherweise aufgrund der längeren Verweildauer im Blut, zu Beginn vermehrt ins Gehirn aufgenommen, aber eventuell im Gewebe schneller abgebaut als die beiden anderen rhASA-Sorten.

Weiterhin wurden ASA-Knock-out-Mäuse mit mehreren Injektionen der jeweiligen rhASA-Sorten in wöchentlichen Abständen behandelt. Aus früheren Studien war bekannt, dass die wiederholte systemische Gabe von CHO-rhASA nach drei oder vier Injektionen zu immunologischen Nebenwirkungen führt (Matzner *et al.*, 2005, 2008). Bei Verwendung von BHK- und HT1080-rhASA traten die Nebenwirkungen jedoch bereits nach der zweiten Injektion auf und waren insbesondere nach der dritten Injektion deutlich stärker ausgeprägt als für CHO-

rhASA beobachtet (s. Abb. 13). Eine Bestimmung der anti-rhASA-Antikörper ergab in allen Fällen niedrige Titer und es wurden keine Unterschiede zwischen den rhASA-Sorten festgestellt (nicht gezeigt). Die Gründe für die höhere Immunogenität von BHK- und HT1080-rhASA bleiben unklar, ließen sich aber mit den verkürzten N-Glykanresten erklären, die möglicherweise Antigene darstellen, die dem Immunsystem der Mäuse bisher unbekannt sind und deshalb zu einer Abwehrreaktion führen. Zudem wäre das Einbringen von externen Antigenen im Zuge der Herstellung der Proteine denkbar, da die beiden stärker immunogen wirkenden Präparationen, BHK- und HT1080-rhASA, auf identische Weise, CHO-rhASA aber mit anderen, industriellen Methoden aufgereinigt wurde. Die Charakterisierung der Proteine vor der Injektion mittels SDS-PAGE zeigte keine messbaren Verunreinigungen, allerdings wären z.B. Endotoxine mit dieser Methode nicht nachweisbar gewesen.

Die rhASA-Konzentrationen im ZNS waren sieben Tage nach der zweiten Injektion etwa verdoppelt (s. Abb. 12). Die bereits nach einer einzelnen Injektion festgestellte relative Verteilung der rhASA-Sorten blieb aber erhalten: Im Gehirn war BHK-rhASA am höchsten konzentriert, HT1080-rhASA etwas geringer und CHO-rhASA am niedrigsten. Die Konzentrationen im Rückenmark waren für alle rhASA-Sorten ähnlich. Eine Woche nach der dritten Injektion kehrten sich diese Verhältnisse um. Sowohl im Gehirn wie auch im Rückenmark wies CHO-rhASA die höchste Konzentration auf, während BHK- und insbesondere HT1080-rhASA niedriger konzentriert waren. Der Grund für diese Änderung der Verteilung ist wahrscheinlich die erwähnte starke anaphylaktische Reaktion der Mäuse insbesondere nach der dritten Behandlung mit BHK- und HT1080-rhASA. Offenbar haben die Mäuse Antikörper gegen die beiden rhASA-Sorten gebildet, die einen Übertritt ins ZNS verhindern. Allerdings konnte – wie erwähnt – für alle Sorten nur ein schwacher anti-rhASA-Antikörpertiter nachgewiesen werden.

Das therapeutische Potenzial der verschiedenen rhASA-Sorten wurde durch die Messung der Reduktion der Sulfatid-Speicherung in Gehirn, Rückenmark und Niere nach einmaliger, zweimaliger und dreimaliger Injektion bestimmt. In früheren Studien konnte erst nach viermaliger Injektion von 20 mg/kg CHO-rhASA eine Abnahme des Sulfatid-Spiegels im Gehirn nachgewiesen werden (Matzner *et al.*, 2005). Auch mit der in dieser Arbeit verwendeten doppelten Dosis wurde nach dreimaliger Behandlung mit CHO- oder HT1080-rhASA keine Sulfatid-Reduktion im Gehirn festgestellt (s. Abb. 14 A, C). Überraschenderweise zeigten die mit BHK-rhASA behandelten Mäuse schon nach der ersten Injektion eine deutliche, jedoch nicht

statistisch signifikante Abnahme der Sulfatid-Speicherung um 20 %, die sich nach der zweiten Injektion noch auf 36 % verstärkte und statistische Signifikanz erlangte (s. Abb. 14 B). Allerdings wurde nach der dritten Injektion wieder eine Zunahme des Sulfatid-Spiegels im Gehirn beobachtet. Auch im Rückenmark konnte nach zweimaliger BHK-rhASA-Behandlung eine statistisch signifikante Reduktion des akkumulierten Sulfatids um etwa ein Drittel sowie eine Reakkumulation nach der dritten Injektion nachgewiesen werden (s. Abb. 15 B). Die Behandlung mit CHO- oder HT1080-rhASA bewirkte im Rückenmark – im Gegensatz zum Gehirn – messbare, jedoch statistisch nicht signifikante Effekte. Hingegen wurde in der Niere insgesamt eine höhere therapeutische Wirksamkeit für CHO-rhASA festgestellt als für BHK-rhASA (s. Abb. 16). HT1080-rhASA zeigte die schwächsten Abnahmen des Sulfatid-Spiegels.

Die nach BHK-rhASA-Behandlung beobachtete, unerwartet starke Reduktion der Sulfatid-Akkumulation im ZNS lässt sich mit der Fähigkeit von BHK-rhASA erklären, die Blut-Hirn-Schranke in höherem Ausmaß zu überwinden als die beiden anderen rhASA-Sorten. Dies steht im Einklang mit den beobachteten höheren Hirn-Gewebespiegeln von BHK-rhASA, insbesondere nach der ersten Injektion. Zwar wurden auch für HT1080-rhASA im Gehirn und insbesondere im Rückenmark höhere Konzentrationen als für CHO-rhASA gemessen, allerdings verhinderte wahrscheinlich die niedrige spezifische Aktivität von HT1080-rhASA einen messbaren Sulfatid-Abbau. Die Reakkumulation von Sulfatid sowie die nach der dritten Injektion geringeren ASA-Gewebespiegel lassen sich mit der einsetzenden Immunantwort gegen BHK-rhASA erklären, die vermutlich den Übertritt ins ZNS verhinderte. Da sich BHK-rhASA durch im Vergleich zu CHO-rhASA verkürzte Oligosaccharidseitenketten der N-Glykane auszeichnet, könnten diese Strukturen für die erhöhte Permeabilität an der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich sein. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ließe sich in der schon nach der zweiten Injektion auftretenden, anaphylaktischen Reaktion suchen, die einen vorübergehenden Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und einen unspezifischen Übertritt von Proteinen aus dem Blut ins Hirnparenchym zur Folge gehabt haben könnte. Allerdings erscheint diese These unwahrscheinlich, da bereits nach einer einzelnen Injektion von BHK-rhASA, die keine Immunantwort zur Folge hatte, die Sulfatid-Akkumulation im ZNS reduziert war.



Zusammenfassend lässt sich beim Vergleich der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik unterschiedlicher rhASA-Sorten Folgendes feststellen:

Die vier untersuchten rhASA-Sorten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Serumhalbwertszeit, Gewebeverteilung und therapeutischen Wirksamkeit. In Gehirn und Rückenmark korreliert das Ausmaß der Sulfatidreduktion mit der Sorten-spezifisch unterschiedlichen Konzentration, die das substituierte Enzym im Gewebe erreicht. Ausnahme ist eine rhASA-Sorte mit geringer spezifischer Aktivität, die trotz relativ hohen Konzentrationen zu keiner Sulfatid-Reduktion führt. Neben Aktivität und Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit bestimmen auch die immunogenen Eigenschaften der rhASA die therapeutische Wirksamkeit. Eine im Verlauf der Behandlung auftretende starke Immunreaktion vermindert die Sulfatid-Abnahme im ZNS. Die beobachteten Unterschiede in der Aktivität, Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit und Immunogenität können durch Unterschiede in der posttranslationalen Modifikation des aktiven Zentrums bzw. der N-Glykane erklärt werden.

Um den Zusammenhang zwischen Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit und der Struktur N-glykosidisch gebundener Oligosaccharid-Seitenketten zu untersuchen, wurden im Folgenden Experimente an einem Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke durchgeführt, in denen neben einer allgemeinen Charakterisierung des transendothelialen Übertritts von rhASA insbesondere die Einflüsse der N-Glykane untersucht werden sollten.

## **6.2 Untersuchungen am Zellkultur-Modell der Blut-Hirn-Schranke**

Die neurologischen Krankheitssymptome der metachromatischen Leukodystrophie machen deutlich, dass die durch ASA-Defizienz hervorgerufene Sulfatid-Akkumulation in besonderem Maße das zentrale Nervensystem schädigt (von Figura *et al.*, 2001). Im Hinblick auf eine erfolgreiche Enzymersatztherapie wäre es daher wünschenswert, den nach systemischer Injektion von rhASA äußerst geringen Anteil des ins ZNS transportierten Enzyms zu erhöhen. Das größte Hindernis hierbei ist die Blut-Hirn-Schranke, die den Transport von Proteinen und anderen Substanzen vom Blut ins Hirnparenchym strikt reguliert (de Boer & Gaillard, 2007; Pardridge, 2007; Abbott *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde der transendotheliale Übertritt von rhASA in einem etablierten Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke untersucht (Franke *et al.*, 1999; von Wedel-Parlow *et al.*, 2009). Die Verwendung eines Zellkulturmo-

---

dells bot den Vorteil, dass im Vergleich zu *in vivo*-Experimenten an Mäusen deutlich geringere Mengen an rhASA benötigt wurden. Zudem waren die Experimente schneller durchführbar, da auf die Zucht von untereinander vergleichbaren altersgleichen Mäusen verzichtet werden konnte. Das verwendete Zellkulturmodell basiert auf primären Hirnkapillarendothelzellen aus Schweinen und ermöglichte die präzise Messung von rhASA mittels ELISA, da die hierfür eingesetzten Antikörper nicht mit eventuell vorhandener porciner ASA kreuzreagieren.

### 6.2.1 Transendothelialer Übertritt von rhASA

Proteine können die Blut-Hirn-Schranke auf drei verschiedenen Wegen überwinden: dem parazellulären Weg, der Rezeptor-vermittelten Transzytose sowie der adsorptiv-vermittelten Transzytose (Abbott *et al.*, 2006; vgl. Abb. 8). Unter nicht-pathologischen Bedingungen wird der parazelluläre Weg, also die extrazelluläre Umgehung der Kapillarendothelzellen, durch das Vorhandensein intakter *Tight Junctions* blockiert (Wolburg *et al.*, 2009). In allen durchgeführten Versuchen wurde die Barriereintegrität des Zellkulturmodells vor Beginn und vor Ende jedes Experiments durch Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands (TEER) sichergestellt. Die TEER-Werte des Zellkulturmodells erreichten mit  $> 1000 \Omega \text{ cm}^2$  *in vivo*-Niveau (Butt *et al.*, 1990). Als Grenzwert zur Einbeziehung in die Auswertung wurde ein Wert von  $600 \Omega \text{ cm}^2$  festgelegt.

Bei der Untersuchung des transendothelialen Transfers von CHO-rhASA in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1–5 mg/ml) wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der apikal eingesetzten CHO-rhASA-Konzentration und der nach 24 Stunden ins basolaterale Kompartiment übergetretenen rhASA-Menge festgestellt (s. Abb. 20). Der Übertritt war bis zu einer Konzentration von 5 mg/ml, entsprechend  $44 \mu\text{M}$  für das bei physiologischem pH auftretende ASA-Dimer, nicht sättigbar. Dieser Befund spricht aufgrund folgender Überlegungen gegen einen Rezeptor-vermittelten Transportweg. Die zerebralen Kapillarendothelzellen enthalten einige bekannte Rezeptoren, die den transendothelialen Transport verschiedener Proteine vermitteln (Abbott *et al.*, 2010), jedoch wurden für alle untersuchten Rezeptoren Dissoziationskonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich gefunden. An isolierten humanen Hirnkapillaren konnte für die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 1,2 \text{ nM}$  (Pardridge *et al.*, 1985) und für die Bindung von Transferrin an den Transferrinrezeptor eine Dissoziationskonstante von  $K_D = 5,6 \text{ nM}$  (Pardridge *et al.*, 1987) bestimmt werden. In einem Zellkulturmodell, bestehend aus bovinen Kapillarendothel-

---

zellen in Kokultur mit Astrozyten, wurde die halbmaximale Sättigung des Transferrinrezeptors bei 11,3 nM gemessen (Descamps *et al.*, 1996). Eine möglicherweise bei höheren Konzentrationen als 44  $\mu\text{M}$  auftretende Sättigung des rhASA-Transports würde diese Werte um mehr als den Faktor 1000 überschreiten und kann daher nicht auf einer Rezeptor-Sättigung beruhen.

Demgegenüber wurden für kationisierte Proteine, die die Blut-Hirn-Schranke bekanntermaßen mittels adsorptiver Transzytose überwinden (Hervé *et al.*, 2008; s. unten), halbmaximale Sättigungskonzentrationen im mikromolaren Bereich gefunden. An isolierten bovinen Hirnkapillaren wurde die halbmaximale Sättigung von kationisiertem Albumin bei 0,8  $\mu\text{M}$  erreicht (Kumagai *et al.*, 1987), während mit der gleichen Methode für kationisiertes Immunglobulin G eine hochaffine Bindungsstelle mit  $K_D = 0,9 \mu\text{M}$  und eine niedrig-affine Bindungsstelle mit  $K_D = 60 \mu\text{M}$  bestimmt wurden (Triguero *et al.*, 1989). Die  $K_D$  von Histon betrug 15,2  $\mu\text{M}$  (Pardridge *et al.*, 1989). Diese Werte liegen im Bereich einer für CHO-rhASA erwarteten Sättigung bei Konzentrationen  $> 44 \mu\text{M}$  und lassen vermuten, dass CHO-rhASA ebenfalls über einen adsorptiv-vermittelten Transzytoseweg über die Blut-Hirn-Schranke transportiert wird. Eine genaue Bestimmung der halbmaximalen Sättigungskonzentration war für CHO-rhASA im verwendeten Zellkulturmodell nicht möglich, da die Applikation von Konzentrationen  $> 5 \text{ mg/ml}$  zum Zusammenbruch der Barriereintegrität führte. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass CHO-rhASA zumindest teilweise über nicht sättigbaren parazellulären Weg über die Blut-Hirn-Schranke gelangt. Zudem wäre ein unspezifischer Transport über *Caveolae* denkbar, erscheint aber unwahrscheinlich, da dieser Transportweg in den Kapillarendothelzellen des Gehirns nur in sehr geringem Ausmaß auftritt (Tuma & Hubbard, 2003).

Weitere experimentelle Befunde sprechen für einen adsorptiv-vermittelten Transzytosemechanismus. Die CHO-rhASA-Präparation wurde über eine Kationenaustauschersäule in fünf Fraktionen mit zunehmender negativer Ladung aufgetrennt. Die am wenigsten negativ geladene Fraktion wies einen im Vergleich zur Mischfraktion um 57 % höheren transendothelialen Übertritt auf, während die stärker negativ geladenen Fraktionen signifikant schlechter übertraten als die Kontrolle (s. Abb. 22). Dies steht im Einklang mit dem für adsorptive Transzytose angenommenen Mechanismus, der auf elektrostatischen Interaktionen zwischen positiv geladenen Resten des zu transportierenden Proteins und der negativ geladenen Zelloberfläche beruht (Hervé *et al.*, 2008). Je weniger negative Ladungen die eingesetzte CHO-rhASA-Fraktion trägt, desto schwächer werden die Moleküle von der ebenfalls

negativ geladenen Zelloberfläche abgestoßen und können dementsprechend häufiger endozytiert werden.

Polykationische Substanzen wie Poly-L-Lysin (PLL), Protamin oder Histon können den Transport von nicht-kationischen Proteinen wie Albumin über die Blut-Hirn-Schranke erhöhen (Pardridge *et al.*, 1989 & 1993). Zudem wirken sie als kompetitive Inhibitoren des transendothelialen Transports von kationisierten Proteinen, der vermutlich über adsorptive Transzytose verläuft (Kumagai *et al.*, 1987). Der transendotheliale Übertritt von CHO-rhASA wurde in Anwesenheit von PLL, Protamin, Histon und kationisiertem BSA vermessen (s. Abschnitt 5.4.1.4). Interessanterweise bewirkte die Anwesenheit von 5  $\mu\text{M}$  PLL, 4  $\mu\text{M}$  Histon oder 0,2–0,9  $\mu\text{M}$  kationisiertem BSA identische Zunahmen des transendothelialen Transfers von CHO-rhASA um 40 %. Dies spricht für den postulierten adsorptiv-vermittelten Transportweg von CHO-rhASA, da die verwendeten kationischen Substanzen bekanntermaßen adsorptive Transzytose auslösen. Vermutlich werden die negativen Ladungen von CHO-rhASA durch die Polykationen neutralisiert und das Protein so der negativ geladenen Zelloberfläche zugänglich, oder die kationischen Substanzen lösen allgemein eine verstärkte adsorptive Transzytoseaktivität aus, woraufhin die negativ geladenen rhASA-Moleküle „mitgezogen“ werden.

Protamin und eine der eingesetzten Histon-Präparationen führten zum Zusammenbruch der Barriereintegrität des Zellkulturmodells. Das Phänomen ist *in vivo* in der Literatur beschrieben (Vorbrodts *et al.*, 1995; Vehaskari *et al.*, 1984) und beruht vermutlich auf einer allgemeinen Erhöhung der vaskulären Permeabilität als Reaktion auf die stark positiven Ladungen der kationischen Proteine. Die Experimente sollten daher mit niedrigeren Konzentrationen wiederholt werden.

Die Transzytose von Molekülen an der Blut-Hirn-Schranke ist ein energieabhängiger Transportprozess. Sowohl die Endozytose des zu transportierenden Moleküls an der luminalen Seite der Kapillarendothelzellen als auch die Exozytose auf der basolateralen Seite benötigen ATP (Herve *et al.*, 2008). Zerebrale Endothelzellen der Ratte enthalten zur Energiebereitstellung bis zu fünfmal mehr Mitochondrien als periphere Endothelien (Oldendorf *et al.*, 1978). Um zu untersuchen, ob CHO-rhASA einem aktiven Transport unterliegt, wurde der transendotheliale Transfer entgegen eines Konzentrationsgradienten gemessen. Dazu wurden identische Konzentrationen CHO-rhASA auf beide Seiten des Zellkulturmodells der Blut-Hirn-Schranke appliziert und nach 24 Stunden die Konzentrationen erneut gemessen. Das apikale-zu-basolaterale Konzentrationsverhältnis lag in beiden Fällen bei 1,0 (s. Abb. 21). Es

bildete sich kein Konzentrationsgefälle aus und ein Transport in Richtung von höheren ASA-Konzentrationen konnte nicht nachgewiesen werden. Allerdings muss bei der Interpretation dieses Ergebnisses berücksichtigt werden, dass der transendotheliale Transfer von CHO-rhASA generell sehr niedrig ist. Nur etwa 0,02 % der eingesetzten rhASA werden im Zellkulturmodell nach 24 Stunden über das Kapillarendothel transportiert. Auch wenn der aktive Transport in Richtung höherer ASA-Konzentrationen in gleichem Ausmaß ablaufen würde wie gegen sehr niedrige, wären die Unterschiede aufgrund von Schwankungen zwischen den einzelnen Filtern nicht detektierbar. Selbst unter der Annahme einer übertrieben hohen Transferrate von 2 %, entsprechend dem 100-fachen der tatsächlich gemessenen Rate, wäre nur ein apikal-zu-basolaterales Konzentrationsverhältnis von 1,04 zu erwarten, und es bleibt zweifelhaft, ob dieser Wert unter den verwendeten Bedingungen detektiert worden wäre. Aufgrund der vorliegenden Versuchsergebnisse kann daher keine Aussage zum aktiven Transportverhalten des transendothelialen Transfers von CHO-rhASA getroffen werden.

Im Golgi-Apparat werden neusynthetisierte lysosomale Proteine mit Mannose-6-Phosphat (M6P) markiert und über die Bindung an M6P-Rezeptoren (MPRs) in die Lysosomen dirigiert (vgl. Abb. 2). Viele Zelltypen tragen auch auf der Zelloberfläche MPR-Moleküle und können extrazellulär vorhandene lysosomale Enzyme M6P-abhängig endozytieren (Ghosh *et al.*, 2003). In der neonatalen Maus wurde gefunden, dass ein Rezeptor-vermitteltes Transportsystem das lysosomale Enzym  $\beta$ -Glukuronidase M6P-abhängig über die Blut-Hirn-Schranke transportieren kann, allerdings wird dieses System im Alter von sieben Wochen herunterreguliert (Urayama *et al.*, 2004). Es ist nicht bekannt, ob Hirnkapillarzellen im Menschen oder im verwendeten porzinen Zellkulturmodell MPRs exprimieren. Um festzustellen, ob MPRs in den transendothelialen Transport von ASA involviert sind, wurde der Übertritt von CHO-rhASA in Anwesenheit von inhibitorisch wirksamen Konzentrationen von M6P im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke gemessen. In Gegenwart von M6P war der transendotheliale Transfer um 27 % reduziert, während die intrazelluläre CHO-rhASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen sogar um 59 % erniedrigt war (s. Abb. 26). In Anwesenheit von G6P waren beide Werte gegenüber der unbehandelten Kontrolle unverändert. Die M6P-spezifische Kompetitierbarkeit von Endozytose und Transzytose spricht eindeutig für eine Beteiligung des MPR. Vermutlich sind MPRs in die auf der luminalen Seite der Endothelzellen erfolgenden Endozytosevorgängen involviert, da die intrazelluläre Aufnahme stärker durch M6P gehemmt wurde als der gesamte Transzytosevorgang. CHO-rhASA wird demnach zumindest teilweise Rezeptor-vermittelt endozytiert.

---

In einem weiteren Versuch wurden die M6P-Reste von CHO-rhASA durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase entfernt. Dephosphorylierte rhASA war einem Transport über MPRs nicht mehr zugänglich. Die vollständige Dephosphorylierung von CHO-rhASA bewirkte überraschenderweise keine Veränderung des transendothelialen Übertritts, jedoch war auch hier die intrazelluläre rhASA-Konzentration in den Kapillarendothelzellen um 52 % erniedrigt (s. Abb. 30). Dieses Ergebnis lässt sich mit dem Verlust negativer Ladungen erklären. Wie in Abschnitt 5.1.1 gezeigt wurde, trägt jedes ASA-Monomer durchschnittlich 3,5 M6P-Gruppen, was aufgrund der anionischen Phosphat-Gruppen 7 negativen Ladungen entspricht. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass der transendotheliale Transport von CHO-rhASA ladungsabhängig erfolgt und schwächer negativ geladene ASA besser über die Blut-Hirn-Schranke transportiert wird (s. Abb. 22). Offenbar ist die adsorptiv-vermittelte Transzytoserate für die ebenfalls schwächer negativ geladene dephosphorylierte CHO-rhASA erhöht und gleicht die aufgrund der fehlenden M6P-Reste verminderte MPR-abhängige Endozytose aus, so dass der gesamte Transzytosevorgang in der Summe gleiche Mengen dephosphorylierte CHO-rhASA über die Blut-Hirn-Schranke transportiert wie native CHO-rhASA. Dieses Modell würde beinhalten, dass die adsorptiv-vermittelte Transzytose ein schnellerer Vorgang ist als die Kombination aus MPR-vermittelter Endozytose und nachfolgenden intrazellulären, beispielsweise endosomalen Transportprozessen, da in der Bilanz die intrazellulär gemessene Konzentration dephosphorylierter rhASA erniedrigt blieb. Dies ist plausibel, da der einmal gestartete Endozytosevorgang unter Beteiligung von *Clathrin-coated pits* für beide Transportwege – bis auf die Auslösung einerseits durch Rezeptoren und andererseits durch positive Ladungen – vermutlich identisch ist. Wenn die Rezeptor-tragenden Vesikel den endosomalen Weg einschließen, während die adsorptiv-vermittelt gebildeten Vesikel direkt auf der abluminalen Seite exozytiert würden, wäre die intrazellulär gemessene rhASA-Konzentration bei Umgehung des endosomalen Wegs insgesamt erniedrigt.

In Abschnitt 5.2.2 wurden verschiedene rhASA-Sorten hinsichtlich ihrer Pharmakokinetik und therapeutischen Wirksamkeit in der Enzymersatztherapie verglichen. BHK-rhASA zeigte nach systemischer Injektion eine höhere Lokalisation im Gehirn und konnte dort gespeichertes Sulfatid stärker abbauen als CHO- und HT1080-rhASA. Ein Vergleich der drei rhASA-Sorten im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke zeigte einen leicht erhöhten transendothelialen Übertritt von BHK- und HT1080-rhASA, allerdings waren die Unterschiede nicht statistisch signifikant (s. Abb. 27). Wie bereits erwähnt, trägt jedes CHO-rhASA-Monomer im Durchschnitt 3,5 M6P-Reste, während der M6P-Gehalt von BHK- und HT1080-rhASA

---

nur 1,3 bzw. 1,0 Reste pro Molekül beträgt. Möglicherweise bewirkt der damit einhergehende Unterschied an negativen Ladungen – ähnlich wie für dephosphorylierte CHO-rhASA vermutet – eine erhöhte adsorptiv-vermittelte Transzytoserate für die weniger negativ geladenen Sorten BHK- und HT1080-rhASA, die eine eventuell aufgrund der niedrigeren Anzahl an M6P-Resten verringerte MPR-vermittelte Endozytose auf der luminalen Seite ausgleicht und überwiegt. Die Vermutung, dass die von CHO- über BHK- zu HT1080-rhASA abnehmende Komplexität der N-Glykan-Seitenketten direkte Auswirkungen auf den transendothelialen Transfer über die Blut-Hirn-Schranke haben könnte, wurde im Zellkulturmodell nicht bestätigt. Die Ursache für die erhöhte Hirn-Konzentration von BHK-rhASA im Tiermodell bleibt unklar. Um weitere Erkenntnisse über die Auswirkungen der N-Glykan-Strukturen auf den transendothelialen Übertritt zu erlangen, wurden die Oligosaccharidseitenketten von CHO-rhASA auf verschiedene Arten modifiziert.

### **6.2.2 Modifikationen von CHO-rhASA und ihre Einflüsse auf den transendothelialen Übertritt**

ASA ist an drei Asparagin-Resten N-glykosyliert. Eine Glykosylierungsstellen-spezifische Analyse hatte gezeigt, dass CHO-rhASA fast ausschließlich Oligosaccharidstrukturen vom *High-Mannose*-Typ trägt und dass die Glykosylierungsmuster sowohl zwischen den unterschiedlichen Glykosylierungsstellen als auch innerhalb einer Glykosylierungsstelle heterogen sind (Schröder *et al.*, 2010). Um den Einfluss dieser Strukturen auf den transendothelialen Transfer zu untersuchen, wurden die N-Glykane nativer CHO-rhASA durch Endoglykosidase-Behandlung vollständig entfernt. Der transendotheliale Übertritt von deglykosylierter CHO-rhASA war im Vergleich zu nativer CHO-rhASA um 51 % reduziert, während die intrazelluläre Konzentration in den Kapillarendothelzellen sogar um 69 % erniedrigt war (s. Abb. 28). Eine Abnahme der intrazellulären ASA-Konzentration war zu erwarten, da mit der Deglykosylierung auch alle M6P-Reste entfernt wurden und für dephosphorylierte CHO-rhASA eine vergleichbare Reduktion um 52 % festgestellt wurde, was vermutlich den Anteil der M6P-abhängigen Endozytose repräsentiert. Allerdings war der transendotheliale Transfer von dephosphorylierter CHO-rhASA nicht reduziert. Eine mögliche Erklärung für den nach Deglykosylierung halbierten transendothelialen Übertritt ist eine Ladungs-abschirmende Wirkung der N-Glykane. In der nativen dreidimensionalen Struktur von CHO-rhASA könnten sich negativ geladene Aminosäuren in der Nähe der N-Glykosylierungsstellen befinden, die durch die Abspaltung der Oligosaccharidstrukturen freigelegt werden. Diese zusätzlichen

negativen Oberflächenladungen könnten den Transport mittels adsorptiver Transzytose behindern, der – wie gezeigt – ladungsabhängig erfolgt.

Für das lysosomale Enzym  $\beta$ -Glukuronidase konnte gezeigt werden, dass die chemische Modifikation mit Natriummetaperiodat den Übertritt über die Blut-Hirn-Schranke nach systemischer Injektion im Mausmodell erhöht und neuronales Speichermaterial effektiver abgebaut wird als bei Infusion von unmodifiziertem Enzym (Grubb *et al.*, 2008). Periodat reagiert selektiv mit vicinalen Diolen unter oxidativer Spaltung der C-C-Bindung und Bildung zweier Aldehyd-Gruppen und zerstört auf diese Weise die Oligosaccharidstrukturen von Glykoproteinen (Spiro, 1964). CHO-rhASA wurde nach der gleichen Methode modifiziert und der transendotheliale Übertritt im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke gemessen. Es wurde nur eine schwache, statistisch nicht signifikante Reduktion des Übertritts um 11 % festgestellt, während die intrazelluläre Konzentration in den Kapillarendothelzellen um 59 % reduziert war (s. Abb. 29). Diese Werte ähneln den für dephosphorylierte CHO-rhASA gefundenen Ergebnissen. Wie erwartet wurden durch Periodat-Behandlung die M6P-Strukturen zerstört, was sich in einer verminderten intrazellulären rhASA-Konzentration, vermutlich aufgrund von verringerter MPR-vermittelter Endozytose, äußerte. Im Gegensatz zur Deglykosylierung wurden durch die Reaktion mit Periodat nur die Strukturen der N-Glykane zerstört, es erfolgte keine vollständige Abspaltung (s. Abb. 29 C). Daher war der transendotheliale Transfer nur leicht reduziert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der von Grubb *et al.* (2008) für  $\beta$ -Glukuronidase postulierten Hypothese, dass nicht eine aufgrund der Periodat-Modifikation verbesserte Übertrittsrate, sondern die um mehr als den Faktor 100 verlängerte Plasmahalbwertszeit für die erhöhte Hirnkonzentration verantwortlich ist. Die Autoren spekulieren, dass modifizierte wie unmodifizierte  $\beta$ -Glukuronidase über einen unspezifischen Transportweg (Pinozytose oder parazellulär) ins Gehirn gelangen und daher das über einen längeren Zeitraum und in höheren Konzentrationen im Blut verfügbare Periodat-modifizierte Enzym vermehrt die Blut-Hirn-Schranke überqueren kann, während das native Protein von anderen Organen MPR- und Mannose-Rezeptor-vermittelt aufgenommen und aus dem Blut entfernt wird.

Diese Ergebnisse zeigen die Grenzen des Modells der Blut-Hirn-Schranke auf, da vermutlich auch für Periodat-modifizierte  $\beta$ -Glukuronidase kein erhöhter transendothelialer Transfer festgestellt worden wäre, und dennoch *in vivo* positive therapeutische Effekte im Gehirn nachweisbar waren.



Es ist zu vermuten, dass für Periodat-modifizierte rhASA *in vivo* ähnlich vielversprechende Ergebnisse erzielt werden könnten wie für  $\beta$ -Glukuronidase, daher sollten entsprechende Experimente am MLD-Mausmodell durchgeführt werden. Allerdings reagierte CHO-rhASA mit deutlich größerem Aktivitätsverlust auf die Periodat-Behandlung als  $\beta$ -Glukuronidase, was eine vorherige Optimierung der Modifizierungsbedingungen hinsichtlich größtmöglicher Erhaltung der spezifischen Aktivität bei dennoch wirkungsvoller Modifizierung sinnvoll erscheinen lässt. Dies schließt die Frage ein, inwiefern M6P-Reste für die therapeutische Wirksamkeit erhalten werden müssen. Wie Endozytose-Versuche an Fibroblasten zeigten, inaktivierte die Periodat-Behandlung von  $\beta$ -Glukuronidase die M6P-Reste offenbar vollständig. Es bleibt rätselhaft, wie derartig modifiziertes Enzym nach der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke in die Lysosomen der Zielzellen im Gehirn gelangen konnte, da lysosomale Enzyme nur unter den aciden Bedingungen dieser Organelle ihre Aktivität entfalten können.

Proteine, die normalerweise die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können, werden nach Kationisierung über adsorptiv-vermittelte Transzytose ins ZNS transportiert. Dies wurde unter anderem für Albumin und Immunglobulin G gezeigt (Bickel *et al.*, 2001). Die Kationisierung kann als Carbodiimid-vermittelte Amidierung von freien Carboxylgruppen des Proteins mit Diaminen erfolgen (Kumagai *et al.*, 1987). Diese Methode wurde auf CHO-rhASA angewandt, allerdings war nach erfolgreicher Kationisierung die Nachweisbarkeit im hASA-ELISA beeinträchtigt, wahrscheinlich aufgrund des Verlusts von Oberflächenantigenen durch die Modifizierung von an der Antikörperbindung beteiligten Carboxylgruppen (s. Abb. 32). Die sensitive und spezifische Detektion mittels hASA-ELISA war jedoch zur Untersuchung des transendothelialen Transfers im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke unerlässlich. Kationisierte CHO-rhASA konnte trotz der vorhandenen Rest-Detektierbarkeit nicht im Zellkulturmodell eingesetzt werden, weil davon auszugehen war, dass gerade die kationisierten ASA-Moleküle, von denen ein besonders starker Übertritt erwartet wurde, aufgrund ihrer Modifizierungen nicht detektiert werden können.

Die Präinkubation von CHO-rhASA mit ELISA-Detektionsantikörper hätte möglicherweise einen Schutz der für die Detektierbarkeit wichtigen ASA-Epitope während der Kationisierungsreaktion zur Folge. Da im hASA-ELISA ein polyklonales Antiserum verwendet wird und demnach multiple Epitope an der Detektion beteiligt sind, erschien diese Maßnahme nicht sinnvoll. Die Alternative hierzu wäre die Generierung von Antikörpern gegen kationisierte rhASA, was allerdings die experimentelle Anpassung des sensiblen ELISA-Systems erfordern würde.

---

Eine vielversprechende alternative Markierungsmöglichkeit war die Kationisierung unter Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Ethylendiamin, das sowohl die kationisierenden Eigenschaften wie auch die radioaktive Detektierbarkeit vermittelte. Allerdings ließ sich unter den verwendeten Bedingungen für die Amidierungsreaktion von CHO-rhASA nur ein geringer Kopplungsfaktor von 0,05 % erzielen, zusätzlich muss die geringe transendotheliale rhASA-Übertrittsrate von 0,02 % berücksichtigt werden. In der Summe bedeutete dies, dass  $10^7$  radioaktive Diaminmoleküle eingesetzt werden müssten, damit auch nur ein einziges radioaktiv markiertes Molekül in Form einer rhASA-Modifikation die basolaterale Seite des Zellkulturmodells erreicht. Leider war das zur Verfügung stehende  $^{14}\text{C}$ -Ethylendiamin zu schwach radioaktiv markiert, um unter diesen Bedingungen eine Detektion zu erlauben. Dieses Problem könnte umgangen werden durch die radioaktive Markierung von CHO-rhASA mit hochaktivem  $^{125}\text{I}$ od vor oder nach der Kationisierung. Weiterhin könnten im Zuge der Carbodiimid-vermittelten Amidierungsreaktion Molekülgruppen eingebaut werden, die eine sensitive und spezifische biochemische Detektierbarkeit ermöglichen, beispielsweise unter Verwendung von Diamin-gekoppeltem Biotin. Allerdings ist der Einfluss dieser Gruppen auf den transendothelialen Transport unbekannt, zudem könnten sie – im Hinblick auf spätere *in vivo*-Experimente – starke Antigen determinanten darstellen.

Eine weitere Möglichkeit, den Übertritt von Proteinen über die Blut-Hirn-Schranke zu erhöhen, ist die Ausnutzung des Transports über bekannte Rezeptoren. Es wurde gezeigt, dass der *Receptor for Advanced Glycation Endproducts* (RAGE) den Transport des Amyloid- $\beta$ -Peptids über die Blut-Hirn-Schranke vermittelt (Deane *et al.*, 2005) und dass die Glykierung verschiedener Proteine ihre Permeabilität an der Blut-Hirn-Schranke erhöht (Poduslo & Curran, 1994). RAGE ist ein Multiliganden- bzw. Mustererkennungsrezeptor und bindet unter anderem an Proteine, die durch nichtenzymatische Reaktion mit Zuckern glykiert wurden (Ramasamy *et al.*, 2005). CHO-rhASA wurde durch Inkubation mit verschiedenen Monosacchariden glykiert und die Bildung von potenziellen RAGE-Ligandengruppen mittels Fluoreszenzspektroskopie nachgewiesen (s. Abb. 33). Allerdings traten durch die Bindung der Zucker an primäre rhASA-Aminogruppen ähnliche Nebeneffekte auf wie bei der zuvor beschriebenen Kationisierungsreaktion: Die Detektierbarkeit der modifizierten rhASA mittels ELISA wurde – wahrscheinlich aufgrund von Epitopmaskierungen – beeinträchtigt, was den Einsatz im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke verhinderte.

Um das Detektionsproblem zu umgehen, wurde CHO-rhASA mit radioaktiv markierter 1- $^{14}\text{C}$ -Ribose glykiert. Es wurde zwar ein vierfach höherer Kopplungsfaktor gemessen als für die

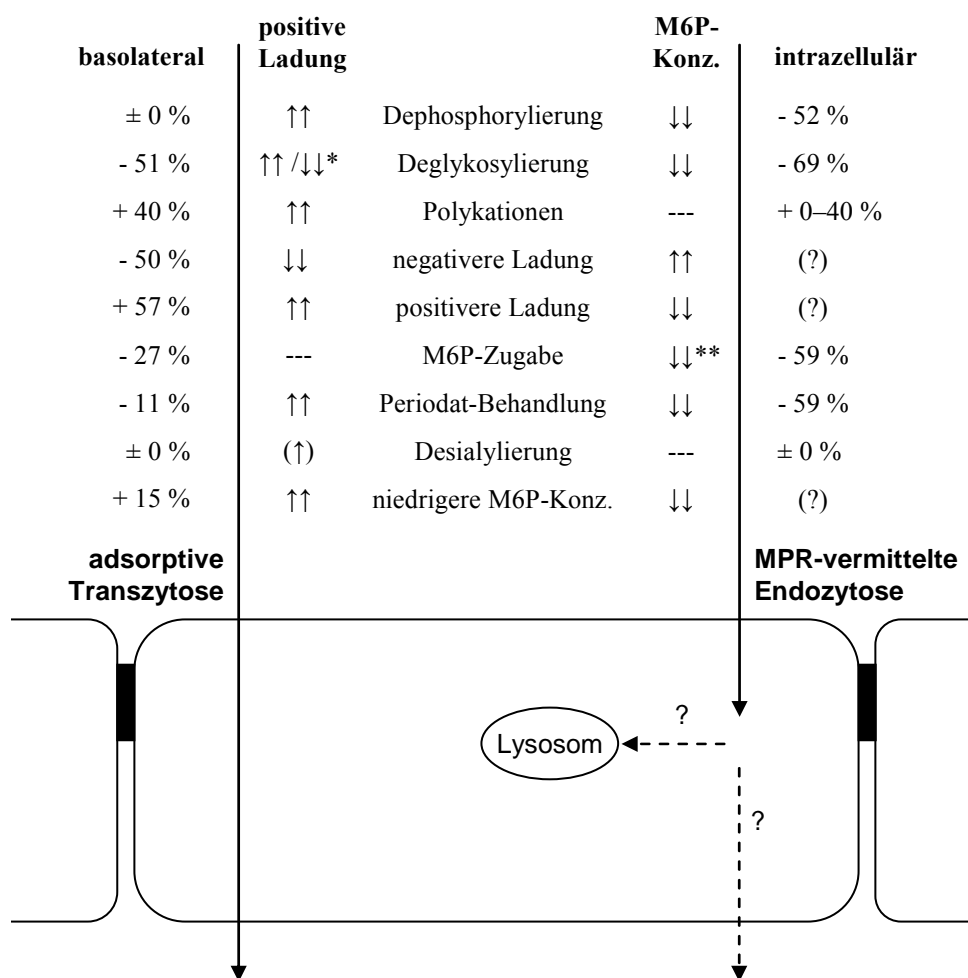
Kationisierungsreaktion, dennoch war die radioaktive Markierung des Proteins in Kombination mit der bereits erwähnten niedrigen transendothelialen Übertrittsrate von 0,02 % nicht ausreichend stark, um im Zellkulturmodell eingesetzt werden zu können. Auch hier wäre die Markierung des glykierten Proteins mit  $^{125}\text{I}$  eine sinnvolle Alternative.

Neben RAGE werden auf der luminalen Seite der zerebralen Kapillarendothelzellen weitere Rezeptoren exprimiert, die Proteine Rezeptor-vermittelt transzytieren können, beispielsweise der Transferrin-Rezeptor, der Apolipoprotein E-Rezeptor oder die LDL-Rezeptor-verwandten Proteine (Abbott *et al.*, 2010). Durch die Kopplung von Liganden dieser Rezeptoren an rhASA, z.B. in Form von Fusionsproteinen, könnte ein transendothelialer Transport ausgelöst und rhASA ins Hirnparenchym eingebracht werden.

Zusammenfassend kann Folgendes festgestellt werden:

Im Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke lässt sich sowohl der transendotheliale Übertritt als auch die Endozytose von rhASA in die Kapillarendothelzellen durch eine Reihe unterschiedlicher Faktoren beeinflussen (zusammengefasst in Abb. 39). Faktoren, die die Bindung von rhASA an Mannose-6-phosphat-Rezeptoren hemmen, bedingen generell eine verminderte Endozytose (z.B. M6P-Zugabe, Dephosphorylierung, Deglykosylierung, Periodat-Behandlung). Faktoren, die die negative Nettoladung von rhASA mindern, führen allgemein zu einem erhöhten transendothelialen Übertritt (z.B. Dephosphorylierung, Polykationen). Die Ladungsabhängigkeit des Übertritts spricht für einen adsorptiv-vermittelten Transzytosetransportweg. Andererseits belegt die beobachtete Hemmung des basolateralen Übertritts durch lösliches M6P eine Beteiligung von MPRs am Transport. Folglich scheinen zwei Prozesse, adsorptive Transzytose und MPR-Bindung, an der basolateralen Sortierung beteiligt zu sein.

Dieser Befund bestätigt frühere Untersuchungen zum Übertritt des lysosomalen Enzyms  $\beta$ -Glukuronidase in einem MPS VII-Mausmodell. An diesem Modell wurde einerseits gezeigt, dass der Übertritt des Enzyms in ZNS mit der Expressionshöhe des MPR korreliert und durch M6P hemmbar ist (Urayama *et al.*, 2004, 2007). Andererseits wurde beobachtet, dass das Enzym auch M6P-unabhängig und nicht-sättigbar übertritt (Grubb *et al.*, 2008).



\* Demaskierung negativer Oberflächenladungen der Polypeptidkette

\*\* Konkurrenz um den Rezeptor

### Abb. 39: Zusammenfassung der Ergebnisse zum Übertritt von rhASA über die Blut-Hirn-Schranke

Einflüsse verschiedener Faktoren (Mitte) auf die übergetretenen basolateralen rhASA-Mengen (links) sowie die intrazellulären hASA-Konzentrationen in den Kapillarendothelzellen (rechts). Angegeben sind prozentuale Abweichungen im Vergleich zu den Kontrollen. Durch Modifikationen hervorgerufene Veränderungen der positiven Ladung von rhASA sowie ihres M6P-Gehalts sind durch Pfeile symbolisiert.

Der untere Teil der Abbildung zeigt ein schematisches Modell des transendothelialen Transports von rhASA über die Kapillarendothelzellen. Zwei Prozesse, adsorptive Transzytose und MPR-vermittelte Endozytose, sind an den Transportvorgängen beteiligt. Es bleibt unklar, ob und in welchen Mengen endozytierte rhASA in Lysosomen dirigiert wird und ob MPRs auch an Exozytose-Vorgängen beteiligt ist.

---

### 6.3 Umgehung der Blut-Hirn-Schranke durch intrazerebroventrikuläre Infusion mit osmotischen Minipumpen

Die naheliegendste Form der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ist ihre physikalische Umgehung durch direkte Injektion in den *Liquor cerebrospinalis* des Rückenmarks oder der Hirnventrikel. Diese Verfahren werden an humanen Patienten seit vielen Jahren zur Therapie verschiedener Erkrankungen klinisch angewandt, beispielsweise zur intrathekalen Chemotherapie von Leukämie und Lymphomen (Kerr *et al.*, 2001), zur Opioid-Gabe bei schweren Schmerzzuständen (Ghafoor *et al.*, 2007) oder zur Baclofen-Verabreichung bei Spastiken (Penn & Kroin, 1984). Um eine kontinuierliche Infusion der Substanzen über mehrere Wochen oder Monate zu ermöglichen, werden den Patienten Reservoir-Behälter aus Kunststoff unter die Kopfhaut implantiert (Ommaya-Reservoir; Sundaresan & Suite, 1989) oder extern steuerbare, batteriebetriebene Pumpen subkutan im Abdomen eingesetzt (Hassenbusch *et al.*, 1990) und die Substanzen über Katheter in den entsprechenden Liquorraum geleitet. Für eine vergleichbare Anwendung in Labortieren stehen osmotische Minipumpen zur Verfügung (Theeuwes & Yum, 1976).

In der vorliegenden Arbeit wurden ASA-Knock-out-Mäuse über Zeiträume von 1–4 Wochen durch intrazerebroventrikuläre Infusion von CHO-rhASA mittels subkutan implantierter osmotischer Minipumpen behandelt. Einwöchige kontinuierliche Infusion in die Hirnventrikel führte zu keiner Antikörperbildung gegen rhASA in immunkompetenten ASA-Knock-out-Mäusen. Messungen der zerebralen Sulfatase-Aktivität sowie Experimente mit koinfundiertem Evans-Blau-Farbstoff zeigten große Schwankungen der infundierten rhASA-Mengen (s. Abb. 38 E). In einigen Pumpen war ein Großteil der zu infundierenden Lösung im Pumpenreservoir verblieben, während andere Pumpen im erwarteten Maß entleert waren. Es wurde eine inverse Korrelation zwischen dem in der Pumpe verbliebenen Restvolumen und der Evans-Blau-Färbungsintensität im Gehirn festgestellt. Das in Abb. 38 A und B dargestellte Gehirn der Maus mit dem geringsten Restvolumen zeigte insgesamt die intensivste Färbung und eine Farbstoffverteilung, die sich über die gesamte ipsilaterale sowie Teile der kontralateralen Hemisphäre des zerebralen Kortex erstreckte, während Zerebellum und Hirnstamm keine Färbung aufwiesen. Die Verteilung von Substanzen über das ventrikuläre System scheint demnach bestimmte Hirnbereiche bevorzugt zu erreichen.

Messungen des Sulfatid-Gehalts im Gehirn zeigten, dass Mäuse, bei denen aufgrund einer erhöhten zerebralen Sulfatase-Aktivität von einer erfolgreichen rhASA-Infusion ausgegangen

werden konnte, einen erniedrigten Sulfatid-Spiegel aufwiesen (s. Abb. 35). Dies lässt eine erfolgreiche therapeutische Wirkung der intrazerebroventrikulären Infusionsbehandlung vermuten. Allerdings konnte aufgrund von zu geringen Gruppengrößen und der erwähnten Schwankungen der Infusionsvolumina keine statistischen Aussagen getroffen werden. Der Grund für die großen Unterschiede der infundierten Volumina könnte in einer fehlerhaften Implantationstechnik der zerebroventrikulären Kanülen liegen. Die Kanülen haben eine definierte Länge, die so bemessen ist, dass bei korrekter stereotaktischer Implantation die Schädeldecke und das Hirngewebe durchdrungen wird und die Kanüle genau in den lateralen Ventrikel reicht. Bei ASA-Knock-out-Mäusen wurde eine verdickte Schädeldecke beobachtet, so dass möglicherweise die Kanülenlänge nicht ausreichend war, was eine Infusion direkt ins Hirngewebe bzw. vermutlich eine Verstopfung der Kanüle zur Folge hätte. In einigen Mäusen wurde die Bildung von Granulationsgewebe im Bereich der Injektionsstelle beobachtet, was ebenfalls zu einer Verschiebung und nachfolgender Verstopfung der Kanüle geführt haben könnte.

Die durchgeführten Experimente zeigen vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der therapeutischen Wirksamkeit, wurden allerdings offenbar von technischen Schwierigkeiten bei der Wirkstoffapplikation behindert. Die Implantationstechnik der zerebroventrikulären Kanülen sollte im Hinblick auf eine möglicherweise verdickte Schädeldecke der ASA-Knock-out-Mäuse überprüft werden. Zukünftige Versuche sollten mit großen Versuchsgruppen durchgeführt werden und nur diejenigen Mäuse in die Auswertung einbezogen werden, bei denen die Bestimmung des Pumpenrestvolumens eine erfolgreiche rhASA-Infusion vermuten lässt. Zudem sollten genauere Untersuchungen der Hirnareale im Hinblick auf Unterschiede in der Zugänglichkeit für intrazerebroventrikulär infundierte Substanzen unternommen werden.

---

## 7 Literatur

- Abbott, N.J., Patabendige, A.A., Dolman, D.E., Yusof, S.R., Begley, D.J. (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* **37**, 13-25.
- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 41-53.
- Arbour, L.T., Silver, K., Hechtman, P., Treacy, E.P., Coulter-Mackie, M.B. (2000) Variable onset of metachromatic leukodystrophy in a Vietnamese family. *Pediatr. Neurol.* **23**, 173-6.
- Ausió, J. (1999) Histone H1 and evolution of sperm nuclear basic proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 31115-8.
- Ausubel, F.A., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1987) Current protocols in molecular biology. Greene Publishing and Wiley Interscience, New York
- Ballabio, A., Gieselmann, V. (2009) Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 684-96.
- Begley, D.J. (2004) ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 1295-312.
- Begley, D.J., Pontikis, C.C., Scarpa, M. (2008) Lysosomal storage diseases and the blood-brain barrier. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 1566-80.
- Berger, J., Löschl, B., Bernheimer, H., Lugowska, A., Tylki-Szymanska, A., Gieselmann, V., Molzer, B. (1997) Occurrence, distribution, and phenotype of arylsulfatase A mutations in patients with metachromatic leukodystrophy. *Am. J. Med. Genet.* **69**, 335-40.
- Bickel, U., Yoshikawa, T., Pardridge, W.M. (2001) Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **46**, 247-79.
- Brady, R.O. (2006) Enzyme replacement for lysosomal diseases. *Annu. Rev. Med.* **57**, 283-96.
- Brady, R.O., Murray, G.J., Moore, D.F., Schiffmann, R. (2001) Enzyme replacement therapy in Fabry disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* **24** (Suppl. 2), 18-24.
- Braulke, T., Bonifacino, J.S. (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 605-14.
- Braulke, T., Gartung, C., Hasilik, A., von Figura, K. (1989) Is movement of mannose 6-phosphate-specific receptor triggered by binding of lysosomal enzymes? *J. Cell Biol.* **104**, 1735-42.

- 
- Brown, M.S., Basu, S.K., Falck, J.R., Ho, Y.K., Goldstein, J.L. (1980) The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *J. Supramol. Struct.* **13**, 67-81.
- Buss, J. E., Stull, J.T. (1983) Measurement of Chemical Phosphate in Proteins *Meth. Enzymol.* **99**, 7-14.
- Butt, A.M., Jones, H.C., Abbott, N.J. (1990) Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J. Physiol.* **429**, 47-62.
- Callahan, J.W., Bagshaw, R.D., Mahuran, D.J. (2009) The integral membrane of lysosomes: its proteins and their roles in disease. *J. Proteomics* **72**, 23-33.
- Chao, H.H., Waheed, A., Pohlmann, R., Hille, A., von Figura, K. (1990) Mannose 6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes. *EMBO J.* **9**, 3507-13.
- de Nooij, E., Westenbrink, H.G. (1962) Isolation of a homogeneous lysine-rich histone from calf thymus. *Biochim. Biophys. Acta* **62**, 608-9.
- Deane, R., Du Yan, S., Subramanian, R.K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., Zhu, H., Ghiso, J., Frangione, B., Stern, A., Schmidt, A.M., *et al.* (2003) RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat. Med.* **9**, 907-13.
- Descamps, L., Dehouck, M.P., Torpier, G., Cecchelli, R. (1996) Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **270**, 1149-58.
- D'Hooge, R., Van Dam, D., Franck, F., Gieselmann, V., De Deyn, P.P. (2001) Hyperactivity, neuromotor defects, and impaired learning and memory in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Brain Res.* **907**, 35-43.
- Dierks, T., Dickmanns, A., Preusser-Kunze, A., Schmidt, B., Mariappan, M., von Figura, K., Ficner, R., Rudolph, M.G. (2005) Molecular basis for multiple sulfatase deficiency and mechanism for formylglycine generation of the human formylglycine-generating enzyme. *Cell* **121**, 541-52.
- Dierks, T., Schlotawa, L., Frese, M.A., Radhakrishnan, K., von Figura, K., Schmidt, B. (2009) Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolidosis II/III and Niemann-Pick C1 disease - Lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 710-25.
- Eckhardt, M. (2008) The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Mol. Neurobiol.* **37**, 93-103.
- El-Tahir, H. M., Abouzied, M. M., Gallitzendörfer, R., Gieselmann, V., Franken, S. (2009) Hepatoma-derived growth factor-related protein-3 interacts with microtubules and promotes neurite outgrowth in mouse cortical neurons. *J. Biol. Chem.* **284**, 11637-51.
-



- 
- Fischer, H.D., Creek, K.E., Sly, W.S. (1982) Binding of phosphorylated oligosaccharides to immobilized phosphomannosyl receptors. *J. Biol. Chem.* **257**, 9938-43.
- Fluharty, A.L., Edmond, J. (1978) Arylsulfatases A and B from human liver. *Meth. Enzymol.* **50**, 537-47.
- Franco, B., Meroni, G., Parenti, G. *et al.* (1995) A cluster of sulfatase genes on Xp22.3: mutations in chondrodysplasia punctata (CDPX) and implications for warfarin embryopathy. *Cell* **81**, 15-25.
- Franke, H., Galla, H.J., Beuckmann, C.T. (1999) An improved low-permeability in vitro-model of the blood-brain barrier: transport studies on retinoids, sucrose, haloperidol, caffeine and mannitol. *Brain Res.* **818**, 65-71.
- Futerman, A.H., van Meer, G. (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 554-65.
- Ghafoor, V.L., Epshteyn, M., Carlson, G.H., Terhaar, D.M., Charry, O., Phelps, P.K. (2007) Intrathecal drug therapy for long-term pain management. *Am. J. Health Syst. Pharm.* **64**, 2447-61.
- Ghosh, P., Dahms, N.M., Kornfeld, S. (2003) Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 202-12.
- Gieselmann, V. (2008) Metachromatic leukodystrophy: genetics, pathogenesis and therapeutic options. *Acta Paediatr. Suppl.* **97**, 15-21.
- Gieselmann, V., Hasilik, A, von Figura, K. (1984) Tartrate-inhibitable acid phosphatase. Purification from placenta, characterization and subcellular distribution in fibroblasts. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **365**, 651-60.
- Goti, D., Hrzenjak, A., Levak-Frank, S., Frank, S., van der Westhuyzen, D.R., Malle, E., Sattler, W. (2001) Scavenger receptor class B, type I is expressed in porcine brain capillary endothelial cells and contributes to selective uptake of HDL-associated vitamin E. *J. Neurochem.* **76**, 498-508.
- Greaves, D.R., Gordon, S. (2009) The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. *J. Lipid Res.* **50**, Suppl. S282-6.
- Grubb, J.H., Vogler, C., Levy, B., Galvin, N., Tan, Sly, W.S. (2008) Chemically modified  $\beta$ -glucuronidase crosses blood-brain barrier and clears neuronal storage in murine mucopolysaccharidoses VII. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 2616-21.
- Harlow, E., Lane, D. (1998) Using antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Harmatz, P., Giugliani, R., Schwartz, I.V. *et al.* (2008) Long-term follow-up of endurance and safety outcomes during enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: Final results of three clinical studies of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Mol. Genet. Metab.* **94**, 469-75.
-

- 
- Hassenbusch, S.J., Pillay, P.K., Magdinec, M., Currie, K., Bay, J.W., Covington, E.C., Tomaszewski, M.Z. (1990) Constant infusion of morphine for intractable cancer pain using an implanted pump. *J. Neurosurg.* **73**, 405-9.
- Hervé, F., Ghinea, N., Scherrmann, J.M. (2008) CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J.* **10**, 455-72.
- Hess, B., Saftig, P., Hartmann, D., Coenen, R., Lullmann-Rauch, R., Goebel, H.H., Evers, M., von Figura, K., D'Hooge, R., Nagels, G., DeDeyn, P., Peters, C., Gieselmann, V. (1996) Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**, 14821-26.
- Irache, J.M., Salman, H.H., Gamazo, C., Espuelas, S. (2008) Mannose-targeted systems for the delivery of therapeutics. *Expert Opin. Drug Deliv.* **5**, 703-24.
- Journet, A., Chapel, A., Kieffer, S., Roux, F., Garin, J. (2002) Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. *Proteomics* **2**, 1026-40.
- Kerr, J.Z., Berg, S., Blaney, S.M. (2001) Intrathecal chemotherapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **37**, 227-36.
- Kishnani, P.S., Corzo, D., Nicolino, M. *et al.* (2007) Recombinant human acid [alpha]-glucosidase: major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology* **68**, 99-109.
- Kolter, T., Sandhoff, K. (2005) Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**, 81-103.
- Kreysing, J., von Figura, K., Gieselmann, V. (1990) Structure of the arylsulfatase A gene. *Eur. J. Biochem.* **191**, 627-31.
- Kumagai, A.K., Eisenberg, J.B., Pardridge, W.M. (1987) Absorptive-mediated endocytosis of cationized albumin and a beta-endorphin-cationized albumin chimeric peptide by isolated brain capillaries. Model system of blood-brain barrier transport. *J. Biol. Chem.* **262**, 15214-9.
- Lambert, P.P., Doriaux, M., Sennesael, J., Vanholder, R., Lammens-Verslijpe, M. (1984) Pathogenicity of cationized albumin in the dog: renal and extrarenal effects. *Clin. Sci. (Lond.)* **67**, 19-33.
- Lazzarino, D., Gabel, C. (1989) Mannose processing is an important determinant in the assembly of phosphorylated high mannose-type oligosaccharides. *J. Biol. Chem.* **264**, 5015-23.
- Liu, X., Tu, M., Kelly, R.S., Chen, C., Smith, B.J. (2004) Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability. *Drug Metab. Dispos.* **32**, 132-9.
-

- 
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.E. (2000) *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman & Co., New York
- Lukatela, G., Krauss, N., Theis, K., Selmer, T., Gieselmann, V., von Figura, K., Saenger, W. (1998) Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry* **37**, 3654-64.
- Matzner, U. (2005) Therapy of lysosomal storage diseases. in: *Lysosomes* (Saftig, P. ed.), Springer, New York, pp. 112-29.
- Matzner, U., Herbst, E., Hedayati, K.K., Lüllmann-Rauch, R., Wessig, C., Schröder, S., Eistrup, C., Möller, C., Fogh, J., Gieselmann, V. (2005) Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1139-52.
- Matzner, U., Lüllmann-Rauch, R., Stroobants, S., Andersson, C., Weigelt, C., Eistrup, C., Fogh, J., D'Hooge, R., Gieselmann, V. (2009) Enzyme replacement improves ataxic gait and central nervous system histopathology in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Mol. Ther.* **17**, 600-6.
- Matzner, U., Matthes, F., Herbst, E., Lüllmann-Rauch, R., Callaerts-Vegh, Z., D'Hooge, R., Weigelt, C., Eistrup, C., Fogh, J., Gieselmann, V. (2007) Induction of tolerance to human arylsulfatase A in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Mol. Med.* **13**, 471-9.
- Matzner, U., Matthes, F., Weigelt, C., Andersson, C., Eistrup, C., Fogh, J., Gieselmann, V. (2008) Non-inhibitory antibodies impede lysosomal storage reduction during enzyme replacement therapy of a lysosomal storage disease. *J. Mol. Med.* **86**, 433-42.
- Meikle, P.J., Hopwood, J.J., Clague, A.E., Carey, W.F. (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* **281**, 249-54.
- Meyer, E.P., Ulmann-Schuler, A., Staufenbiel, M., Krucker, T. (2008) Altered morphology and 3D architecture of brain vasculature in a mouse model for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 3587-92.
- Monti, E., Preti, A., Novati, A., Aleo, M.F., Clemente, M.L., Marchesini, S. (1992) Uptake and metabolism of a fluorescent sulfatide analogue in cultured skin fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1124**, 80-7.
- Muenzer, J., Gucsavas-Calikoglu, M., McCandless, S.E., Schuetz, T.J., Kimura, A. (2007) A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Mol. Genet. Metab.* **90**, 329-37.
- Nag, S., Begley, D.J. (2005) Blood-brain barrier, exchange of metabolites and gases. in: Kalimo, H. (ed.) *Pathology and genetics, cerebrovascular diseases*. ISN Neuropath Press, Basel.
-

- 
- Neeper, M., Schmidt, A.M., Brett, J., Yan, S.D., Wang, F., Pan, Y.C., Elliston, K., Stern, D., Shaw, A. (1992) Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 14998-5004.
- Oldendorf, W.H., Cornford, M.E., Brown, W.J. (1978) The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann. Neurol.* **1**, 409-17.
- Pardridge, W.M. (2007) Drug targeting to the brain. *Pharm. Res.* **24**, 1729-32.
- Pardridge, W.M., Buciak, J.L., Kang, Y.S., Boado, R.J. (1993) Protamine-mediated transport of albumin into brain and other organs of the rat. Binding and endocytosis of protamine-albumin complex by microvascular endothelium. *J. Clin. Invest.* **92**, 2224-9.
- Pardridge, W.M., Eisenberg, J., Yang, J. (1985) Human blood-brain barrier insulin receptor. *J. Neurochem.* **44**, 1771-8.
- Pardridge, W.M., Eisenberg, J., Yang, J. (1987) Human blood-brain barrier transferrin receptor. *Metabolism* **36**, 892-5.
- Pardridge, W.M., Triguero, D., Buciak, J. (1989) Transport of histone through the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **251**, 821-6.
- Penn, R.D., Kroin, J.S. (1984) Intrathecal baclofen alleviates spinal cord spasticity. *Lancet* **323**, 1078.
- Platt, F.M., Lachmann, R.H. (2009) Treating lysosomal storage disorders: current practice and future prospects. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 737-45.
- Poduslo, J.F., Curran, G.L. (1994) Glycation increases the permeability of proteins across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **23**, 157-62.
- Pryor, P.R., Luzio, J.P. (2009) Delivery of endocytosed membrane proteins to the lysosome. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 615-24.
- Ramakrishnan, H., Hedayati, K.K., Lüllmann-Rauch, R., Wessig, C., Fewou, S.N., Maier, H., Goebel, H.H., Gieselmann, V., Eckhardt, M. (2007) Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy. *J. Neurosci.* **27**, 9482-90.
- Ramasamy, R., Vannucci, S.J., Yan, S.S., Herold, K., Yan, S.F., Schmidt, A.M. (2005) Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology* **15**, 16R-28R.
- Rousselle, C., Smirnova, M., Clair, P., Lefauconnier, J.M., Chavanieu, A., Calas, B., Scherrmann, J.M., Temsamani, J. (2001) Enhanced delivery of doxorubicin into the brain via a peptide-vector-mediated strategy: saturation kinetics and specificity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 124-31.
-

- 
- Sakuraba, H., Murata-Ohsawa, M., Kawashima, I., Tajima, Y., Kotani, M., Ohshima, T., Chiba, Y., Takashiba, M., Jigami, Y., Fukushige, T., Kanzaki, T., Itoh, K. (2006) Comparison of the effects of agalsidase alfa and agalsidase beta on cultured human Fabry fibroblasts and Fabry mice. *J. Hum. Genet.* **51**, 180-8.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Saraswat, M., Reddy, P.Y., Muthenna, P., Reddy, G.B. (2009) Prevention of non-enzymic glycation of proteins by dietary agents: prospects for alleviating diabetic complications. *Br. J. Nutr.* **101**, 1714-21
- Schierau, A., Dietz, F., Lange, H., Schestag, F., Parastar, A., Gieselmann, V. (1999) Interaction of arylsulfatase A with UDP-N-acetylglucosamine:Lysosomal enzyme-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *J. Biol. Chem.* **274**, 3651-8.
- Schiffman, R. Therapeutic approaches for neuronopathic lysosomal storage disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2010 Feb 17. [Epub ahead of print]
- Schott, I., Hartmann, D., Gieselmann, V., Lüllmann-Rauch, R. (2001) Sulfatide storage in visceral organs of arylsulfatase A-deficient mice. *Virchows Arch.* **439**, 90-6.
- Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. *et al.* (eds.) (2001) The metabolic and molecular bases of inherited disease. Lysosomal disorders. 8<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, New York.
- Schröder, S., Matthes, F., Hyden, P., Andersson, C., Fogh, J., Müller-Loennies, S., Bräulke, T., Gieselmann, V., Matzner, U. (2010) Site-specific analysis of N-linked oligosaccharides of recombinant lysosomal arylsulfatase A produced in different cell lines. *Glycobiology* **20**, 248-59.
- Sifuentes, M., Doroshov, R., Hoft, R., Mason, G., Walot, I., Diamant, M., Okazaki, S., Huff, K., Cox, G.F., Swiedler, S.J., Kakkis, E.D. A follow-up study of MPS I patients treated with laronidase enzyme replacement therapy for 6 years. *Mol. Genet. Metab.* **90**, 171-80.
- Sommerlade, H.J., Selmer, T., Ingendoh, A., Gieselmann, V., von Figura, K., Neifer, K., Schmidt, B. (1994) Glycosylation and phosphorylation of arylsulfatase A. *J. Biol. Chem.* **269**, 20977-81.
- Spiro, R.G. (1964) Periodate oxidation of the glycoprotein fetuin. *J. Biol. Chem.* **239**, 567-73.
- Stein, C., Gieselmann, V., Kreysing, J., Schmidt, B., Pohlmann, R., Waheed, A., Meyer, H.E., O'Brien, J., von Figura, K. (1989) Cloning and expression of human arylsulfatase A. *J. Biol. Chem.* **264**, 1252-9.
- Sun, Y., Witte, D.P., Ran, H., Zamzow, M., Barnes, S., Cheng, H., Han, X., Williams, M.T., Skelton, M.R., Vorhees, C.V., Grabowski, G.A. (2008) Neurological deficits and glyco-sphingolipid accumulation in saposin B deficient mice. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 2345-56
-

- 
- Sundaresan, N., Suite, N.D. (1989) Optimal use of the Ommaya reservoir in clinical oncology. *Oncology* **3**, 15-22.
- Theeuwes, F., Yum, S.I. (1976) Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. *Ann. Biomed. Eng.* **4**, 343-53.
- Tuma, P.L., Hubbard, A.L. (2003) Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol. Rev.* **83**, 871-932.
- Urayama, A., Grubb, J.H., Banks, W.A., Sly, W.S. (2007) Epinephrine enhances lysosomal enzyme delivery across the blood brain barrier by up-regulation of the mannose 6-phosphate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 12873-8.
- Urayama, A., Grubb, J.H., Sly, W.S., Banks, W.A. (2004) Developmentally regulated mannose 6-phosphate receptor-mediated transport of a lysosomal enzyme across the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 12658-63.
- Vagedes, P., Saenger, W., Knapp, E. W. (2002) Driving forces of protein association: the dimer-octamer equilibrium in arylsulfatase A. *Biophys. J.* **83**, 3066-78.
- Valencia, J.V., Weldon, S.C., Quinn, D., Kiers, G.H., DeGroot, J., TeKoppele, J.M., Hughes, T.E. (2004) Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. *Anal. Biochem.* **324**, 68-78.
- van Patten, S.M., Hughes, H., Huff, M.R., Piepenhagen, P.A., Waire, J., Qiu, H., Ganesa, C., Reczek, D., Ward, P.V., Kutzko, J.P., Edmunds, T. (2008) Effect of mannose chain length on targeting of glucocerebrosidase for enzyme replacement therapy of Gaucher disease. *Glycobiology* **17**, 467-78.
- Vehaskari, V.M., Chang, C.T., Stevens, J.K., Robson, A.M. (1984) The effects of polycations on vascular permeability in the rat. A proposed role for charge sites. *J. Clin. Invest.* **73**, 1053-61.
- von Bülow, R., Schmidt, B., Dierks, T., von Figura, K., Usón, I. (2001) Crystal structure of an enzyme-substrate complex provides insight into the interaction between human arylsulfatase A and its substrates during catalysis. *J. Mol. Biol.* **305**, 269-77.
- von Figura, K., Gieselmann, V., Jaeken, J. (2001) Metachromatic leukodystrophy. in: Scriver *et al.* (eds.) The metabolic and molecular bases of inherited disease. 8<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill, New York.
- von Wedel-Parlow, M., Wölte, P., Galla, H.J. (2009) Regulation of major efflux transporters under inflammatory conditions at the blood-brain barrier in vitro. *J. Neurochem.* **111**, 111-8.
- Vorbrodt, A.W., Dobrogowska, D.H., Ueno, M., Lossinsky, A.S. (1995) Immunocytochemical studies of protamine-induced blood-brain barrier opening to endogenous albumin. *Acta Neuropathol.* **89**, 491-9.
-

- Westwood, M.E., Thornalley, P.J. (1995) Molecular characteristics of methylglyoxal-modified bovine and human serum albumins. Comparison with glucose-derived advanced glycation endproduct-modified serum albumins. *J. Protein Chem.* **14**, 359-72.
- Winchester, B., Vellodi, A., Young, E. (2000) The molecular basis of lysosomal storage diseases and their treatment. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 150-4.
- Wittke, D., Hartmann, D., Gieselmann, V., Lüllmann-Rauch, R. (2004) Lysosomal sulfatide storage in the brain of arylsulfatase A-deficient mice: cellular alterations and topographic distribution. *Acta Neuropathol.* **108**, 261-71.
- Wolburg, H., Lippoldt, A. (2002) Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul. Pharmacol.* **38**, 323-37.
- Wolburg, H., Noell, S., Mack, A., Wolburg-Buchholz, K., Fallier-Becker, P. (2009) Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* **335**, 75-96.
- Wraith, J.E., Tytki-Szymanska, A., Guffon, N., Lien, Y.H., Tsimaratos, M., Vellodi, A., Germain, D.P. (2008) Safety and efficacy of enzyme replacement therapy with agalsidase beta: an international, open-label study in pediatric patients with Fabry disease. *J. Pediatr.* **152**, 563-70.
- Yao, J.K., Rastetter, G.M. (1985) Microanalysis of complex tissue lipids by high-performance thin-layer chromatography. *Anal. Biochem.* **150**, 111-6.
- Zhang, Q., Ames, J.M., Smith, R.D., Baynes, J.W., Metz, T.O. (2009) A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *J. Proteome Res.* **8**, 754-69.

---

## 8 Abkürzungen

AGE	<i>Advanced glycation endproducts</i>
ASA	Arylsulfatase A
BHK	<i>Baby hamster kidney</i> (Zelllinie gewonnen aus Nierengewebe des Goldhamsters, <i>Mesocricetus auratus</i> )
BR-HT1080	in einem Bioreaktor kultivierte HT1080-Zellen
BSA	Bovines Serumalbumin
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i> (Zelllinie gewonnen aus Ovarialgewebe des Chinesischen Streifenhamsters, <i>Cricetulus griseus</i> )
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest)
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
FGE	C <sub>α</sub> -Formylglycin-generierendes Enzym
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i> (schnelle Protein-Flüssigchromatografie)
G6P	Glukose-6-Phosphat
hASA	Humane Arylsulfatase A
HT1080	(Humane Fibrosarkom-Zelllinie)
IEF	Isoelektrische Fokussierung
HPTLC	<i>High performance thin layer chromatography</i> (Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie)
M6P	Mannose-6-Phosphat
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MPS	Mucopolysaccharidose
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PLP-CST	Cerebrosid-Sulfotransferase unter der Kontrolle des Proteolipidprotein-Promotors (Ramakrishnan <i>et al.</i> , 2007)
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
rhASA	Rekombinante humane Arylsulfatase A
rpm	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)



RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TEER	<i>Transendothelial electric resistance</i> (transendothelialer elektrischer Widerstand)
ZNS	Zentralnervensystem

## Publikationen

Matzner, U., Matthes, F., Herbst, E., Lüllmann-Rauch, R., Callaerts-Vegh, Z., D'Hooge, R., Weigelt, C., Eistrup, C., Fogh, J., Gieselmann, V. (2007) Induction of tolerance to human arylsulfatase A in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Mol. Med.* **13**, 471-9.

Matzner, U., Matthes, F., Weigelt, C., Andersson, C., Eistrup, C., Fogh, J., Gieselmann, V. (2008) Non-inhibitory antibodies impede lysosomal storage reduction during enzyme replacement therapy of a lysosomal storage disease. *J. Mol. Med.* **86**, 433-42.

Schröder, S., Matthes, F., Hyden, P., Andersson, C., Fogh, J., Müller-Loennies, S., Braulke, T., Gieselmann, V., Matzner, U. (2010) Site-specific analysis of N-linked oligosaccharides of recombinant lysosomal arylsulfatase A produced in different cell lines. *Glycobiology* **20**, 248-59.

### Posterpräsentationen:

Frank Matthes, Stephan Schröder, Volkmar Gieselmann and Ulrich Matzner (2007) Enzyme replacement reduces sulfatide storage in the central nervous system of a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *16<sup>th</sup> ESGLD Workshop*, Perugia.

Frank Matthes, Stephan Schröder, Philipp Wölte, Hans-Joachim Galla, Volkmar Gieselmann and Ulrich Matzner (2009) Transendothelial transfer of arylsulfatase A in a cell culture model of the blood-brain barrier. *2<sup>nd</sup> ELA Research Foundation Congress*, Luxembourg.

### Konferenzbeitrag:

Frank Matthes, Stephan Schröder, Philipp Wölte, Hans-Joachim Galla, Volkmar Gieselmann and Ulrich Matzner (2009) Transendothelial transfer of arylsulfatase A in a cell culture model of the blood-brain barrier. *17<sup>th</sup> ESGLD Workshop*, Bad Honnef.



ESGLD  
Young Scientist's Award  
2009

---

---

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Ferner erkläre ich, die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben.

Bonn, Mai 2010

Frank Matthes

## Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. V. Gieselmann für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, die konsequente Unterstützung meiner Projekte und sein unschätzbares Wissen.

Herrn Prof. Dr. A. Haas danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ein ganz besonderer Dank gebührt Dr. Ulrich Matzner für die hervorragende, engagierte Betreuung dieser Arbeit, die Einführung in zahlreiche Methoden und Techniken sowie die stetige Diskussionsbereitschaft und die vielen sprühenden Ideen.

Für die fruchtbare Kooperation bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H.-J. Galla, Institut für Biochemie der Universität Münster, insbesondere bei Philipp Wölte für die Durchführung der Experimente am Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke. Stijn Stroobants vom Labor für Biologische Psychologie der Universität Leuven danke ich für die Implantation der osmotischen Minipumpen. Den Firmen Shire Human Genetic Therapies und Zymenex A/S sei für die großzügige Bereitstellung rekombinanter humaner ASA gedankt.

Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie möchte ich mich für die entgegengebrachte Unterstützung und die gute Arbeitsatmosphäre herzlich bedanken. Ulla Buttkau danke ich für Hilfe bei Zellkulturarbeiten und Norbert Rösel für seine unerschöpfliche Hilfsbereitschaft in allen technischen Fragen. Besonderer Dank gilt allen meinen Laborkolleg(inn)en der „Fam. Eckhardt“, unseren „Ehemaligen“ Marion, Rebekka, Ivonne, Christina, Annette, Stephan, Tim und Afshin, meiner BBB-Mitstreiterin Annika und natürlich Lenchen, спасибо.

Nicht zuletzt sei meinen Eltern gedankt für die Ermöglichung meines Studiums sowie ihre kontinuierliche Unterstützung.

---

*Felix qui potuit rerum cognoscere causas*

(Vergil)