

**Enzymersatztherapie der
metachromatischen Leukodystrophie**

**Untersuchungen zur Steigerung des Übertritts der
Arylsulfatase A über die Blut-Hirn-Schranke
durch die Verwendung von
Peptidvektoren**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Annika Böckenhoff

aus

Bocholt

Bonn, 2013

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

1. Gutachter: Prof. Dr. V. Gieselmann
2. Gutachter: Prof. Dr. A. Haas

Tag der mündlichen Prüfung: 9. April 2013

Erscheinungsjahr: 2013

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | Zusammenfassung | 1 |
| 2 | Einleitung | 2 |
| 2.1 | Lysosomen | 2 |
| 2.2 | Lysosomale Speicherkrankheiten | 5 |
| 2.3 | Metachromatische Leukodystrophie | 6 |
| 2.4 | Arylsulfatase A | 9 |
| 2.5 | Therapie lysosomaler Speicherkrankheiten | 11 |
| 2.5.1 | Enzymersatztherapie..... | 13 |
| 2.6 | Blut-Hirn-Schranke..... | 14 |
| 2.7 | Arzneimitteltransport über die BHS – therapeutische Ansätze | 16 |
| 2.7.1 | Adsorptive Transzytose | 17 |
| 2.7.2 | Rezeptor-vermittelte Transzytose..... | 18 |
| 3 | Material..... | 20 |
| 3.1 | Geräte..... | 20 |
| 3.2 | Fertige Reaktionssysteme (Kits)..... | 22 |
| 3.3 | Enzyme | 22 |
| 3.3.1 | Enzyme zur Deglykosylierung von Proteinen..... | 23 |
| 3.3.2 | Enzyme zum Restriktionsverdau von DNA | 23 |
| 3.4 | Antikörper | 23 |
| 3.4.1 | Primärantikörper:..... | 23 |
| 3.4.2 | Sekundärantikörper: | 24 |
| 3.5 | Vektoren zur Klonierung von ASA-Fusionsproteinen | 24 |
| 3.6 | Oligonukleotide (MWG-Biotech AG) zur Klonierung von | |
| | ASA-Fusionsproteinen..... | 24 |
| 3.7 | Zellen | 26 |
| 3.7.1 | Eukaryotische Zellen | 26 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.7.2 | Bakterien..... | 26 |
| 3.8 | Zellkulturmedien..... | 27 |
| 3.9 | Mauslinie | 27 |
| 4 | Methoden..... | 28 |
| 4.1 | Molekularbiologische Methoden | 28 |
| 4.1.1 | Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA..... | 28 |
| 4.1.2 | Saure Ethanolfällung | 28 |
| 4.1.3 | Hybridisierung von Oligonukleotiden zu doppelsträngiger DNA..... | 29 |
| 4.1.4 | Polymerase-Kettenreaktion | 30 |
| 4.1.5 | Auftrennung von DNA in Agarosegelen..... | 31 |
| 4.1.6 | Spaltung von Nukleinsäuren..... | 31 |
| 4.1.7 | Ligation von DNA-Fragmenten | 32 |
| 4.2 | Protein-Analytik..... | 32 |
| 4.2.1 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) | 32 |
| 4.2.2 | Protein-Färbung..... | 33 |
| 4.2.3 | Westernblot..... | 33 |
| 4.2.4 | Vorbehandlung von Pansorbin A | 34 |
| 4.2.5 | Immunpräzipitation von ASA bzw. ASA-Fusionsprotein | |
| | aus Zellkulturüberständen | 34 |
| 4.2.6 | Deglykosylierung von Proteinen | 35 |
| 4.2.6.1 | Endoglykosidase H (Endo H)..... | 35 |
| 4.2.6.2 | PNGase F | 35 |
| 4.2.7 | Bestimmung von Protein-gebundenem Phosphat durch Veraschung | 36 |
| 4.2.8 | Gelfiltrations-Chromatographie von ASA und ASA-Fusionsproteinen..... | 37 |
| 4.2.9 | Immunfluoreszenzfärbung..... | 38 |
| 4.3 | Mäuse..... | 39 |
| 4.3.1 | Transkardiale Perfusion von Mäusen | 39 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.3.2 | Homogenisierung von Mausgewebe | 39 |
| 4.3.3 | Bestimmung der Serumhalbwertszeit..... | 40 |
| 4.4 | Nachweis von ASA und ASA-Fusionsproteinen..... | 41 |
| 4.4.1 | Bestimmung rekombinanter humaner ASA und rekombinanter ASA-Fusionsproteine durch indirekten Sandwich-ELISA..... | 41 |
| 4.4.2 | Bestimmung der ASA- bzw. β -Hex-Aktivität..... | 42 |
| 4.5 | Zellkultur | 43 |
| 4.5.1 | Einfrieren und Auftauen von Zellen..... | 43 |
| 4.5.2 | Kultivierung adhärenter Zellen..... | 43 |
| 4.5.3 | Kultivierung von CHO-Suspensionszellen | 44 |
| 4.5.4 | Transfektion von Zellen | 44 |
| 4.5.5 | Herstellen von Zellhomogenaten..... | 44 |
| 4.5.6 | Messung der M6P- bzw. LRP-1-abhängigen Endozytose von ASA und ASA-Fusionsproteinen | 45 |
| 4.5.7 | Sekretion neu-synthetisierter lysosomaler Proteine ins Medium | 46 |
| 4.6 | Herstellung rekombinanter ASA-Fusionsproteine..... | 46 |
| 4.6.1 | Stabile Transfektion von CHO-S Zellen durch Elektroporation | 46 |
| 4.6.2 | Generierung stabil transfizierter CHO-S Einzelzellklone | 47 |
| 4.6.3 | Detektion und Expansion von CHO-S Einzelzellklonen mit hoher Enzymaktivität..... | 47 |
| 4.6.4 | Produktion rekombinanter Proteine im miniPerm®-Bioreaktor | 48 |
| 4.6.5 | Aufreinigung von ASA-Fusionsproteinen aus Zellkulturüberstand durch Affinitätschromatographie..... | 49 |
| 5 | Ergebnisse..... | 50 |
| 5.1 | Klonierung von ASA-Fusionskonstrukten..... | 50 |
| 5.2 | Initiale Charakterisierung der ASA-Fusionsproteine..... | 52 |
| 5.2.1 | Expression aktiver ASA-Fusionsproteine | 52 |
| 5.2.2 | Sekretion in das Medium..... | 54 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.3 | Produktion rekombinanter ASA-Fusionsproteine | 57 |
| 5.3.1 | Stabile Expression in CHO-S Zellen | 57 |
| 5.3.2 | Aufreinigung rekombinanter Proteine | 61 |
| 5.4 | Biochemische Charakterisierung | 62 |
| 5.4.1 | Spezifische Aktivität | 62 |
| 5.4.2 | Glykosylierung | 63 |
| 5.4.3 | M6P-Gehalt | 65 |
| 5.4.4 | Oktamerisierung | 66 |
| 5.4.5 | Lysosomale Sortierung der ASA-Fusionsproteine | 67 |
| 5.5 | Endozytose-Versuche | 69 |
| 5.5.1 | Endozytose von Wildtyp-ASA durch endotheliale und nicht-endotheliale Zellen | 69 |
| 5.5.2 | Endozytose von ASA-Fusionsproteinen..... | 70 |
| 5.5.3 | M6P-abhängige Aufnahme..... | 71 |
| 5.5.4 | M6P-unabhängige Aufnahme..... | 73 |
| 5.5.5 | LRP-abhängige Aufnahme | 74 |
| 5.6 | Blut-Hirn-Schranken-Modell..... | 76 |
| 5.6.1 | Optimierung der Versuchsbedingungen | 78 |
| 5.6.2 | Eigenschaften des transendothelialen Übertritts von ASA..... | 82 |
| 5.6.2.1 | Konzentrationsabhängiger Transport | 82 |
| 5.6.2.2 | Zeitabhängiger Transport | 83 |
| 5.6.2.3 | Ladungsabhängiger Transport..... | 84 |
| 5.6.2.4 | Aktiver Transport | 85 |
| 5.6.3 | Transendothelialer Übertritt der ASA-Fusionsproteine | 85 |
| 5.7 | Pharmakokinetik der ASA-Fusionsproteine <i>in vivo</i> | 88 |
| 5.7.1 | Serumhalbwertszeit | 88 |
| 5.7.2 | Gewebeverteilung..... | 89 |

| | | |
|---------|---|-----|
| 6 | Diskussion | 91 |
| 6.1 | Produktion und Charakterisierung von ASA-Fusionsproteinen | 92 |
| 6.1.1 | Biochemische Charakterisierung der rekombinanten ASA-Fusionsproteine | 96 |
| 6.2 | Untersuchungen zur Funktionalität der an die ASA fusionierten Peptide | 100 |
| 6.2.1 | Auswirkungen der fusionierten Peptide auf die zelluläre Aufnahme der ASA | 101 |
| 6.2.2 | Exkurs: Untersuchungen zum transendothelialen Transport von | |
| | Wildtyp-ASA am Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke | 105 |
| 6.2.3 | Einfluss der fusionierten Peptide auf den transendothelialen Übertritt | |
| | der ASA <i>in vitro</i> und ihre pharmakokinetischen Eigenschaften <i>in vivo</i> | 108 |
| 6.2.3.1 | Transendothelialer Übertritt über die <i>in vitro</i> Blut-Hirn-Schranke | 108 |
| 6.2.3.2 | Pharmakokinetik | 109 |
| 7 | Literatur | 113 |
| 8 | Abkürzungen | 125 |
| | Plasmidkarten | 128 |
| | Publikationen | 130 |
| | Erklärung | 131 |
| | Danksagung | 132 |

1 Zusammenfassung

Metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine lysosomale Speicherkrankheit, die durch die Defizienz des lysosomalen Enzyms Arylsulfatase A (ASA) hervorgerufen wird. Zur klinischen Behandlung ist für einige lysosomale Speicherkrankheiten eine Enzymersatztherapie (ERT) zugelassen, bei der dem Patienten rekombinant hergestelltes Enzym intravenös appliziert wird. Bei Krankheiten mit vorwiegend zentralnervösen Störungen wie der MLD ist die therapeutische Wirksamkeit der ERT allerdings sehr begrenzt, da der effiziente Übertritt des Enzyms (ASA) ins Gehirn durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) verhindert wird.

Um die Effizienz der ERT zu steigern, wurden Fusionsproteine bestehend aus ASA und sogenannten *shuttle*-Peptiden hergestellt, für die ein effektiver Transport an sie gebundener Moleküle über die BHS beschrieben wurde. Bei den Peptiden handelt es sich um die Proteintransduktionsdomäne des HIV-1 *transactivator of transcription*-Proteins (Tat), Rezeptorbindedomänen der Apolipoproteine B (ApoB) und E (ApoE-I und ApoE-II), die dritte Domäne des *receptor-associated protein* (RAPd3) und das synthetische Peptid Angiopep-2 (Ang.-2). Die Fusionsproteine ASA-Tat, ASA-ApoB, ASA-ApoE-I, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 konnten in CHO Suspensionszellen exprimiert werden, waren enzymatisch aktiv und wurden nach extrazellulärer Zugabe in die Lysosomen von ASA-defizienten Zellen transportiert. Im Gegensatz zu Wildtyp-ASA wurden die Fusionsproteine neben der Mannose-6-Phosphat (M6P) vermittelten Endozytose über zusätzliche Wege in Zellen aufgenommen. Die M6P-unabhängige Aufnahme aller ASA-Fusionsproteine durch Gehirndothelzellen war im Vergleich zu Wildtyp-ASA signifikant erhöht. In CHO Zellen wurde die Internalisierung von ASA-Tat, ASA-ApoE-I, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 zu einem gewissen Teil über das *low density lipoprotein receptor related protein 1* (LRP-1) vermittelt. In einem Zellkulturmodell der BHS sowie nach intravenöser Injektion in ASA-defiziente Mäuse waren die transendothelialen Transportraten bzw. die Gehirnspiegel von ASA-ApoE-I und ASA-ApoE-II signifikant erhöht, während ASA-Tat und ASA-Ang.-2 keine Unterschiede zur Kontrolle aufwiesen. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass vom Apolipoprotein E abgeleitete Peptide sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Lage sind, den Übertritt der fusionierten aktiven ASA über die BHS sowie dessen Transport ins Gehirn zu erhöhen.

2 Einleitung

2.1 Lysosomen

Lysosomen sind membranumhüllte dynamische Zellorganellen, die hauptsächlich dem enzymatischen Abbau von extrazellulären und intrazellulären Makromolekülen dienen, die über Endozytose, Autophagie oder andere zelluläre Transportwege in die Lysosomen gelangen (Luzio et al., 2007). Lysosomen enthalten mehr als 50 lösliche saure Hydrolasen, z.B. Glykosidasen, Proteasen, Lipasen, Nukleasen, Phosphatasen und Sulfatasen, sowie über 120 lysosomale Membranproteine (Braulke and Bonifacino, 2009), die u.a. an der Ansäuerung des Lumens, dem Transport von Abbauprodukten und Nährstoffen ins Zytosol und der Fusion von Lysosomen mit Endosomen und der Plasmamembran beteiligt sind (Pohl et al., 2009). Im Gegensatz zum pH-neutralen Zytosol haben Lysosomen einen sauren pH-Wert von 4,5-5, der durch ATP-getriebene Protonenpumpen des V-Typs in der Lysosomenmembran aufrecht erhalten wird (Mindell, 2012). Da die lysosomalen Enzyme ihr Aktivitätsmaximum nur in saurer Umgebung erreichen (pH-Optimum liegt bei ca. 5), sind zytosolische Inhaltsstoffe auch bei eventueller Freisetzung der Hydrolasen ins Zytosol vor hydrolytischem Abbau geschützt.

Zellen können bis zu mehreren hundert Lysosomen enthalten, die in ihrer Größe und Morphologie stark variieren. Die Biogenese der Lysosomen erfordert einen kontinuierlichen Nachschub an neu-synthetisierten Komponenten. Lösliche Hydrolasen sowie lysosomale Membranproteine werden dazu entlang eines komplexen zellulären Biosyntheseweges transportiert, der das Endoplasmatische Retikulum (ER), den Golgi-Apparat, das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN), die Plasmamembran sowie Endosomen beinhaltet (Braulke und Bonifacino, 2009).

Lösliche lysosomale Enzyme werden als Vorläuferpolypeptide am rauen ER synthetisiert. Sie erhalten eine N-terminale Signalsequenz, die eine kotranslationale Translokation in das ER-Lumen vermittelt. Während das Signalpeptid abgespalten wird, werden die Proteine an bestimmten Asparagin-Resten glykosyliert (N-Glykosylierung) und erreichen anschließend über vesikulären Transport den Golgi-Apparat. Hier werden die N-Glykane z.B. durch das Anhängen weiterer Zuckerreste modifiziert. Eine spezielle Modifikation löslicher

lysosomaler Enzyme stellt die Phosphorylierung von Mannose-Resten an mindestens einer Zuckerseitenkette vom mannosereichen Typ dar. Die Bildung der Mannose-6-Phosphat-(M6P-) Reste erfolgt durch zwei aufeinanderfolgende enzymatische Reaktionen. M6P-Reste dienen als lysosomales Sortierungssignal und werden im TGN von M6P-Rezeptoren (MPRs) erkannt (Coutinho et al., 2012). Es existieren zwei unterschiedliche MPRs, die aufgrund ihres ungefähren Molekulargewichts von 46 kDa und 300 kDa als MPR46 und MPR300 bezeichnet werden. Die MPR-Hydrolase-Komplexe knospen in Clathrin-umhüllten Vesikeln vom TGN ab und fusionieren schließlich mit Endosomen (s. Abbildung 1).

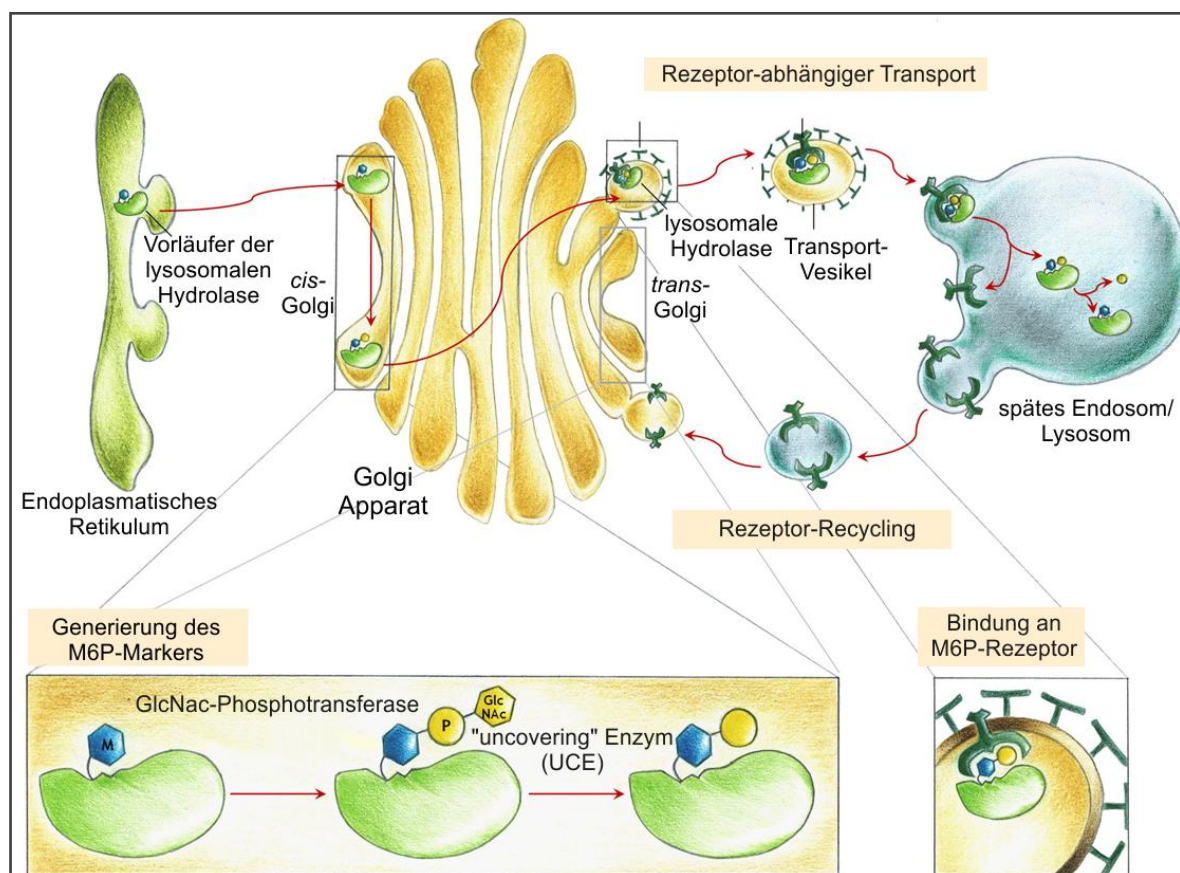


Abbildung 1: Transport löslicher lysosomaler Enzyme zu den Lysosomen

Lysosomale Hydrolasen werden als Vorläuferpolypeptide am rauhen ER synthetisiert und gelangen anschließend über vesikulären Transport zum Golgi-Apparat. Dort überträgt die UDP-N-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase (GlcNac-Phosphotransferase) GlcNac-1-Phosphat auf mindestens einen Mannose-Rest der lysosomalen Enzyme. Das sogenannte „uncovering“ Enzym (UCE) N-Acetylglucosamin-1-Phosphodiester α -N-Acetylglucosaminidase spaltet schließlich GlcNac ab und legt damit den M6P-Rest frei. Im *trans*-Golgi binden die so markierten Enzyme an MPR-Moleküle. Die Rezeptor-Ligand Komplexe werden in Clathrin-umhüllte Vesikel verpackt, die schließlich mit Endosomen fusionieren. Der niedrige pH-Wert der Endosomen führt zur Dissoziation der Hydrolasen von MPR-Molekülen, die in Vesikeln verpackt für weitere Transportrunden zum Golgi-Apparat zurücktransportiert werden (modifiziert nach Coutinho et al., 2012).

Durch den sauren pH von 5-6 dissoziieren die Rezeptor-Ligand-Komplexe in späten Endosomen und die ins endosomale Lumen abgegebenen Hydrolasen gelangen schließlich in die Lysosomen. Die MPR-Moleküle werden entweder zurück zum TGN transportiert, um für weitere Transportrunden zur Verfügung zu stehen, oder zu einem geringen Teil an die Plasmamembran (Ghosh et al., 2003). Einige lösliche lysosomale Enzyme (5-20 %) entgehen der lysosomalen Sortierung am TGN und werden sekretiert (s. Abbildung 2). Da sich auch auf der Plasmamembran MPR-Moleküle befinden (3-10 % des gesamten zellulären MPR), können dieselben oder benachbarte Zellen die sekretierten lysosomale Proteine M6P-abhängig binden und über Clathrin-vermittelte Endozytose zum Lysosom transportieren (Platt und Lachmann, 2009). Dabei ist die Endozytose M6P-enhaltender Liganden auf den MPR300 beschränkt (Braulke und Bonifacino, 2009).

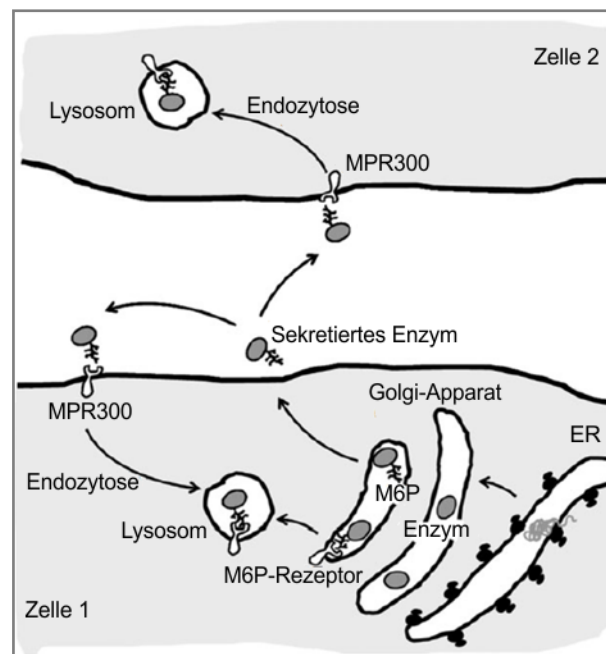


Abbildung 2: Resorption und interzelluläre Übertragung löslicher lysosomaler Proteine

Einige lösliche lysosomale Enzyme entgehen dem direkten Transport vom Golgi zum Lysosom und werden in die extrazelluläre Umgebung sekretiert, wo sie an MPR300-Moleküle auf der Oberfläche der gleichen oder einer anderen Zelle binden können. Die Bindung vermittelt eine Clathrin-abhängige Aufnahme und den anschließenden Transport zu den Lysosomen. Dieser Weg bildet die Grundlage für den zielgerichteten lysosomalen Transport rekombinanter Enzyme bei der Enzymersatztherapie (modifiziert nach Muro, 2010).

Diese Besonderheit des Transports lysosomaler Enzyme bildet die Voraussetzung für die Behandlung vieler lysosomaler Speichererkrankungen durch Enzymersatztherapie, bei der ein im Patienten defektes Enzym als M6P-enhaltendes rekombinantes Enzym exogen

verabreicht wird und in betroffenen Zellen die enzymatische Funktion übernimmt („*cross-correction*“) (Platt und Lachmann, 2009).

Der Transport endozytierter Enzyme von Endosomen zu Lysosomen ist bislang nicht vollständig geklärt. Die folgenden Modelle wurden vorgeschlagen: die Reifung von späten Endosomen zu Lysosomen („Reifungsmodell“), der vesikuläre Transport von Endosomen zu Lysosomen („vesikuläres Transportmodell“), die wiederholte transiente („kiss-and-run“) und die komplette Fusion von späten Endosomen und Lysosomen („Hybrid-Kompartiment-Modell“) (Pryor und Luzio, 2009).

2.2 Lysosomale Speicherkrankheiten

Lysosomale Speicherkrankheiten bezeichnen eine Gruppe von bislang ca. 50 bekannten metabolischen Erbkrankheiten, die mit einer Gesamtinzidenz von ungefähr 1 in 8000 Geburten auftreten (Schultz et al., 2011). Die meisten lysosomalen Speicherkrankheiten werden durch Mutationen in Genen verursacht, die für katabolische lysosomale Enzyme wie Proteasen, Lipasen und Sulfatasen kodieren. Da diese sogenannten sauren Hydrolasen für den Abbau von Makromolekülen essentiell sind, führt eine reduzierte oder vollständig fehlende Enzymaktivität zur Anreicherung des jeweiligen Substrats in den Lysosomen. Dadurch kommt es zu zellulären Fehlfunktionen und diversen Symptomen. Der Zusammenhang zwischen Enzymdefizienz und Symptomen ist in vielen Fällen nur unzureichend geklärt (Ballabio und Gieselmann, 2009). Es wurde gezeigt, dass die lysosomale Speicherung verschiedener Makromoleküle einen Einfluss auf diverse zelluläre Prozesse wie z.B. Signaltransduktion, Autophagozytose, Lipidbiosynthese, Sortierung von Proteinen und intrazelluläre Calcium-Homöostase hat (Ballabio und Gieselmann, 2009; Cox und Cachón-González, 2012). Diese Veränderungen könnten wiederum zu den vielfältigen Symptomen führen, die mit lysosomalen Speicherkrankheiten einhergehen.

Seltenere Formen lysosomaler Dysfunktion, die ebenfalls zu lysosomaler Speicherung führen, beinhalten Defekte in posttranslationalen Modifikationen lysosomaler Enzyme, fehlerhafte Enzym-Sortierung oder mangelhafte Funktionen nicht-enzymatischer Transmembran- oder löslicher Proteine (Dierks et al., 2009; Platt und Lachmann, 2009).

Lysosomale Speicherkrankheiten sind monogen und werden in den meisten Fällen autosomal rezessiv vererbt. Genetische Untersuchungen haben gezeigt, dass verschiedene Patienten unterschiedliche Mutationen in dem gleichen Gen aufweisen. Während einige der Mutationen zu einem kompletten Verlust enzymatischer Aktivität führen, wird durch andere lediglich eine reduzierte Aktivität hervorgerufen. Dennoch gibt es kaum eine Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp. Die gleiche Mutation im gleichen Gen kann in einem Patienten zu einem schweren Krankheitsverlauf führen, wohingegen ein anderer Patient keine Symptome aufweist (Futerman und van Meer, 2004).

Mehr als zwei Drittel der lysosomalen Speicherkrankheiten werden durch unzureichende oder fehlende Aktivität lysosomaler Hydrolasen hervorgerufen (Platt und Lachmann, 2009). Traditionell werden sie bezüglich des anfallenden Speichermaterials u.a. in Sphingolipidosen, Mukopolysaccharidosen und Oligosaccharidosen unterteilt.

Obwohl lysosomale Enzyme in fast allen Zellen exprimiert werden, sind ihre Substrate ungleichmäßig verteilt, weshalb durch Fehlfunktionen verschiedener Hydrolasen unterschiedliche Gewebe verschieden stark betroffen sind. In Mukopolysaccharidosen treten neben Symptomen wie Organomegalie, Knorpelschäden und auch zentralnervösen Störungen (Ballabio und Gieselmann, 2009) aufgrund der Akkumulation von Glykosaminoglykanen wie Dermatan-, Heparan- und Keratansulfat in peripheren Stütz- und Bindegeweben schwere Skelettfehlbildungen auf (Scaramuzza et al., 2012). Aufgrund des vermehrten Vorkommens von Sphingolipiden im Gehirn handelt es sich bei Sphingolipidosen häufig um neurodegenerative Erkrankungen (Eckhardt, 2010). Mehr als zwei Drittel der lysosomalen Speichererkrankungen führen zu Fehlfunktionen des zentralen Nervensystems, die häufig zu einem dramatischen Krankheitsverlauf und frühen Tod des Patienten führen (Schultz et al., 2011).

2.3 Metachromatische Leukodystrophie

Bei der metachromatischen Leukodystrophie (MLD) handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit, die mit einer ungefähren Wahrscheinlichkeit von 1:100.000 bei Neugeborenen in der europäischen Bevölkerung auftritt (Gieselmann und Krägeloh-Mann, 2010). Ein zu Grunde liegender genetischer Defekt des lysosomalen Enzyms Arylsulfatase A (ASA), oder seltener ihres

Aktivatorproteins Saposin B, führt zu einer Anreicherung des Sphingolipids Sulfatid (3-O-Sulfogalaktosylceramid) in den Lysosomen bestimmter Zelltypen. Sulfatid ist mit 4-6 % der gesamten Myelinlipide einer der Hauptbestandteile von Myelinscheiden (Eckhardt, 2008), die für eine hohe Nervenleitgeschwindigkeit im peripheren sowie im zentralen Nervensystem unabdingbar sind. Myelin wird von Oligodendrozyten im zentralen und von Schwannzellen im peripheren Nervensystem gebildet. Neben Oligodendrozyten und Schwannzellen findet man in MLD-Patienten Sulfatidspeicherung außerdem in Subpopulationen von Neuronen und auch außerhalb des Nervensystems zum Beispiel in Niere, Galle und Leber. Die Sulfatidanreicherung im Nervensystem führt zu einer fortschreitenden Demyelinisierung (s. Abbildung 3), die vielfältige und schwerwiegende neurologische Symptome hervorruft und das Hauptkennzeichen der MLD ist (Gieselmann, 2008).

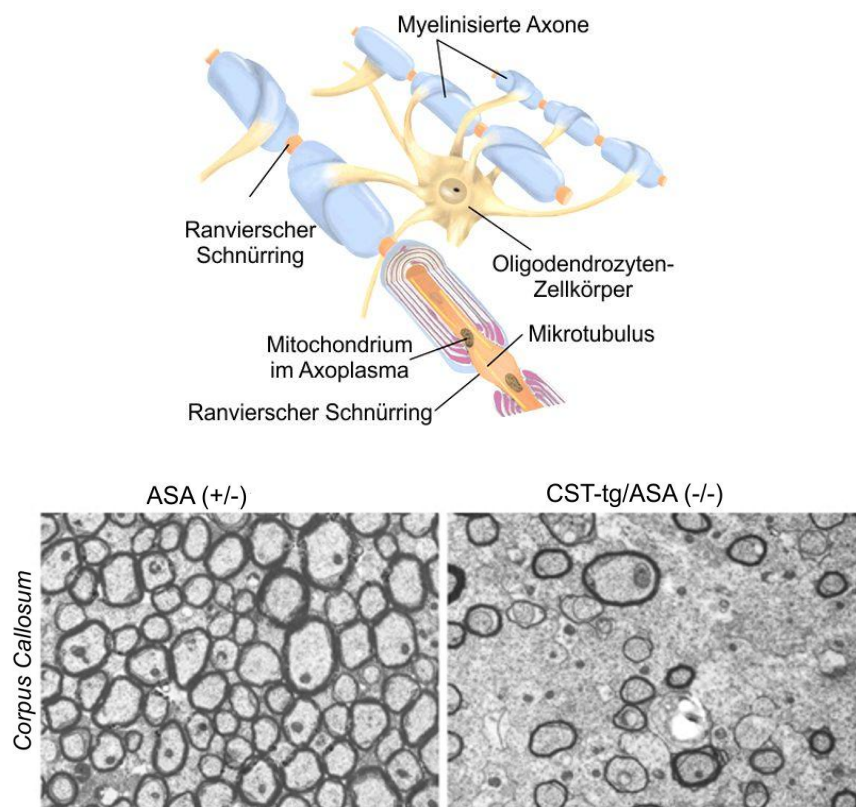


Abbildung 3: (De-) Myelinisierung von Axonen

Im zentralen sowie im peripheren Nervensystem sind die Axone von Neuronen von Myelinscheiden umgeben, die eine schnelle Erregungsweiterleitung ermöglichen. Im ZNS sind Oligodendrozyten für die Myelinisierung der Zellen verantwortlich (oberes Bild, Quelle: wmaresh.wikispaces.com). Bei MLD führt eine Anreicherung von Sulfatid in Oligodendrozyten zu voranschreitender Demyelinisierung im ZNS, wobei der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht bekannt ist (unteres Bild). Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Demyelinisierung im Gehirn (hier: *Corpus Callosum*) von CST-tg/ASA-Knockout-Mäusen, die als MLD-Modell dienen, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (modifiziert nach Ramakrishnan et al., 2007).

In viszeralen Geweben hat die Lipidspeicherung dagegen kaum funktionelle Auswirkungen. Bislang wurden über 100 (in den meisten Fällen sog. „missense“-) Mutationen im ASA-Gen gefunden (Gieselmann, 2008), von denen allerdings innerhalb von Europa nur drei mit einer größeren Häufigkeit auftreten (Berger et al., 1997). Die Mutationen können in zwei Klassen unterteilt werden. Sie führen entweder zu einem kompletten Aktivitätsverlust oder zu einer verringerten ASA-Aktivität. Bei den meisten Mutationen führt ein Aminosäureaustausch zur Fehlfaltung des Enzyms im ER, welches daraufhin direkt proteasomal abgebaut wird, und ein vollständiger Aktivitätsverlust ist die Folge (Poeppel et al., 2005). Einige Mutationen führen dazu, dass die ASA zwar die Qualitätskontrolle im ER besteht, den Golgi-Apparat durchläuft und zum Lysosom transportiert wird, dort allerdings nicht stabil ist und aufgrund struktureller Veränderungen sehr schnell abgebaut wird. Im Falle einer der drei häufigsten Mutationen konnte gezeigt werden, dass der Aminosäureaustausch die pH-abhängige Bildung von oktameren ASA-Komplexen, die für die Stabilität des Enzyms im Lysosomen entscheidend sind, stark beeinträchtigt (Von Bülow et al., 2002) (s. Abschnitt 2.4). Patienten mit solch einer Mutation zeigen eine geringe ASA-Restaktivität.

Bezogen auf das Alter, in dem die MLD ausbricht, wird zwischen drei klinischen Formen unterschieden, die unterschiedlich häufig auftreten: die spät-infantile (40-50 %), die juvenile (30-40 %) und die adulte Form (18-20 %) (s. Tabelle 1).

| Klinische Form | Alter | Anfängliche Symptome | Symptome im Endstadium | Lebenserwartung |
|-----------------------|--------------|--|---------------------------------------|---|
| spät-infantil | < 3 Jahre | Gleichgewichtsstörungen, atypische Bewegungsmuster, Entwicklungsrückschritte | Ataxie, Blindheit, Taubheit, Demenz, | wenige Jahre |
| juvenil | 3 – 16 Jahre | gestörte Feinmotorik, Probleme in der Schule, Verhaltensauffälligkeiten | Muskelschwäche bzw. Muskelhypertonie, | sehr variabel, Patienten erreichen teilweise das Erwachsenenalter |
| adult | > 16 Jahre | intellektuelle Veränderungen, Gedächtnisverlust, psychotische Symptome | spastische Lähmungen, Tetraplegie | im Durchschnitt ca. 12 Jahre nach der Diagnose |

Tabelle 1: Klinische Formen der metachromatischen Leukodystrophie

(Hageman et al., 1995; Biffi et al., 2008; Colsch et al., 2008; Gieselmann und Krägeloh-Mann, 2010)

Die starken Veränderungen des Gehirns, die mit dem Verlust lebenswichtiger zentraler Funktionen einhergehen, führen schließlich zum Tod der Betroffenen (Gieselmann und Krägeloh-Mann, 2010).

Bei MLD-Patienten kann im Gegensatz zu vielen anderen lysosomalen Speichererkrankungen in vielen Fällen eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation beobachtet werden (Polten et al., 1991; Berger et al., 1997). Sie lässt sich durch unterschiedliche ASA-Restaktivitäten erklären, die mit dem Genotyp der Betroffenen assoziiert sind. Patienten, die homozygot für ein Allel sind, welches zu einem vollständigen Aktivitätsverlust führt (Null-Allel), entwickeln die schwerste, spät-infantile Form. Die Folge ist ein früher und schneller Anstieg der Sulfatidspeicherung. Dagegen führt Homozygotie eines Allels, welches die Expression geringer Mengen aktiven Enzyms erlaubt, meistens zu der adulten Form. Die geringen Mengen an verbleibendem Enzym können noch gewisse Mengen Sulfatid abbauen (Conzelmann und Sandhoff, 1991). Patienten, die heterozygot für ein solches und ein Null-Allel sind, leiden häufig an der juvenilen Form (Gieselmann und Krägeloh-Mann, 2010).

Einen Sonderfall stellt die sogenannte ASA-Pseudodefizienz dar. Ungefähr 0,2-0,5 % der kaukasischen Bevölkerung zeigen einen genetischen Polymorphismus im ASA-Gen, welcher zu einer erheblichen ASA-Defizienz führt. Betroffene Personen zeigen jedoch aufgrund der verbleibenden 10 % ASA-Restaktivität keinerlei klinische Symptome (Gieselmann et al., 1989; Gieselmann und Krägeloh-Mann, 2010). Auch Individuen mit einem Null-Allel und einem Pseudodefizienz-Allel sind symptomfrei.

2.4 Arylsulfatase A

Die humane Arylsulfatase A (ASA, E.C. 3.1.6.8.) ist ein lösliches lysosomales Enzym mit einer Länge von 507 Aminosäuren. Die ersten 18 N-terminalen Aminosäuren dienen als Signalpeptid und vermitteln eine kotranslationale Translokation des Polypeptids ins ER (Stein et al., 1989), in dem sich die synthetisierte ASA zu Dimeren zusammenlagert. ASA besitzt drei potentielle N-Glykosylierungsstellen, die hauptsächlich mannosereiche Oligosaccharide tragen (Schröder et al., 2010). Durch die Phosphorylierung bestimmter Mannose-Reste im Golgi-Apparat erhält die ASA M6P-Reste, die als Erkennungssignal dienen und den MPR-abhängigen Transport vom TGN zu den Lysosomen vermitteln

(Storch und Braulke, 2005). Wie bei allen Sulfatasen kodiert das ASA-Gen für ein konserviertes Cystein im aktiven Zentrum, welches durch das C α -Formylglycin generierende Enzym (FGE) im ER zu Formylglycin oxidiert wird. Ohne diese posttranslationale Modifikation besitzen Sulfatasen keine katalytische Aktivität. Mutationen im SUMF-Gen (*sulfatase modifying factor 1*), die eine FGE-Defizienz zur Folge haben, führen folglich zur Multiplen Sulfatase-Defizienz (Dierks et al., 2009).

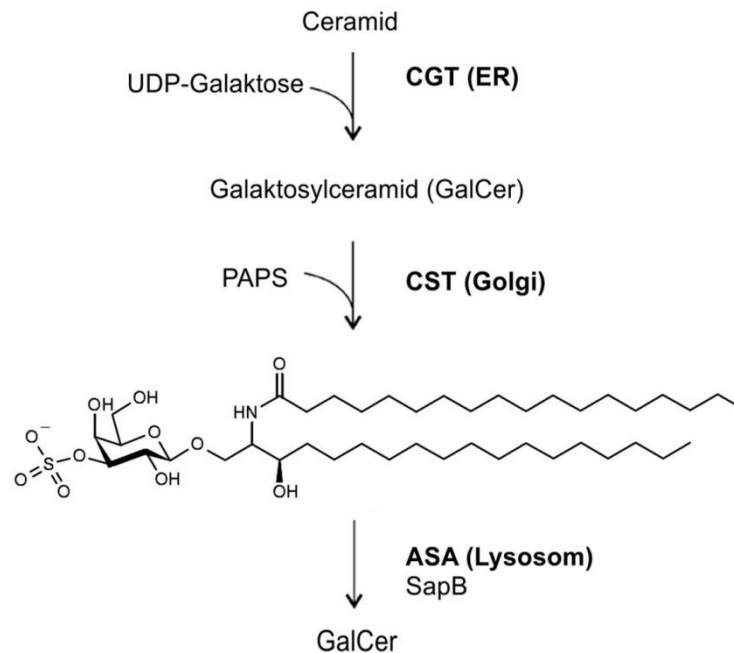


Abbildung 4: Biosynthese und Abbau von Sulfatid

Im ER vermittelt die UDP-Galaktose:Ceramid Galaktosyltransferase (CGT) die Übertragung von Galaktose auf Ceramid, wodurch Galaktosylceramid (GalCer) entsteht. Im Golgi-Apparat wird GalCer zu Sulfatid umgewandelt, indem katalysiert durch die 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat:Cerebrosid Sulfotransferase (CST) eine Sulfatgruppe vom 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) auf GalCer übertragen wird. Der Abbau des Sulfatids startet im Lysosom mit der ASA-vermittelten Desulfatierung (modifiziert nach Eckhardt, 2008).

Als lysosomale Hydrolase katalysiert ASA die hydrolytische Spaltung des Sphingolipids Sulfatid (Abbildung 4), welches sich hauptsächlich im Myelin des zentralen und peripheren Nervensystems befindet (Eckhardt, 2008). Hierzu benötigt das Enzym das Aktivatorprotein Saposin B (SapB), das wasserunlösliches Sulfatid aus Membranen extrahiert und der ASA in einem 1:1-Komplex präsentiert. Auch seltener vorkommende SapB-Defekte führen durch einen raschen Anstieg der Sulfatid-Speicherung zu einer Krankheit, die der ASA-Defizienz klinisch sehr ähnlich ist (Gieselmann und Krägeloh-Mann, 2010).

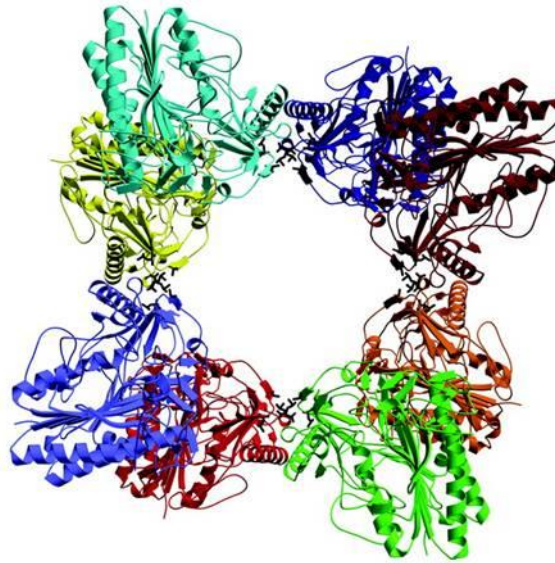


Abbildung 5: Struktur eines ASA-Oktamers

ASA bildet nach ihrer Fertigstellung im ER Dimere, die zunächst zum Golgi und anschließend MPR-vermittelt weiter zum Lysosom transportiert werden. Hier lagern sich pH-abhängig je vier Dimere zu einem Oktamer zusammen. Die Bildung dieser Komplexe schützt die ASA vor proteolytischem Abbau und ist entscheidend für die Stabilität im Lysosom (modifiziert nach von Bülow et al., 2002).

In den Lysosomen ist die ASA verschiedenen Cathepsinen ausgesetzt, bei denen es sich um lysosomale Proteasen mit diversen Substratspezifitäten handelt. Unter sauren Bedingungen, wie sie im Lysosom zu finden sind, lagern sich die ASA-Dimere zu Oktameren zusammen (Abbildung 5). Die Kontaktfläche zwischen zwei Dimeren beinhaltet eine Cathepsin L-Schnittstelle, die nach Bildung der Komplexe nicht mehr zugänglich ist, wodurch die ASA im Lysosom stabil ist (Von Bülow et al., 2002). Eine Mutation, die häufig zur adulten Form der MLD führt, verhindert die Oligomerisierung und es kommt zu einem schnellen Abbau des Enzyms.

2.5 Therapie lysosomaler Speicherkrankheiten

Obwohl in den letzten Jahren große Fortschritte in der Entwicklung kausaler Therapien erzielt werden konnten, sind lysosomale Speichererkrankungen bis heute nicht heilbar. Die meisten Therapieansätze basieren auf der Fähigkeit von Zellen, extrazellulär vorkommende lysosomale Enzyme vorwiegend über MPR-vermittelte Endozytose aufzunehmen und zum Lysosom zu transportieren (*cross-correction*). Schon vor mehr als 50 Jahren wurde entdeckt, dass der metabolische Defekt kultivierter Fibroblasten von

Mukopolysaccharidose-Patienten von Faktoren, die von „gesunden Zellen“ ins Medium abgegeben werden, kompensiert werden kann (Fratantoni et al., 1968). Metabolische *cross-correction* kann zum Beispiel durch Stammzelltransplantation, *in vivo*-Gentherapie, Transplantation von *in vitro*-modifizierten Patientenzellen oder durch eine lokale bzw. systemische Gabe von rekombinantem Enzym, was als Enzyersatztherapie (*enzyme replacement therapy*, ERT) bezeichnet wird, erreicht werden. Neuere Ansätze sind die Chaperon- und Substrat-Reduktions-Therapie. Im ersten Fall vermitteln Enzym-Inhibitoren als sogenannte chemische Chaperone die korrekte Faltung lysosomaler Enzyme, die aufgrund von Mutationen normalerweise durch ihre Fehlfaltung direkt im Proteasom abgebaut würden, bevor sie das Lysosom erreichen. Idealerweise wird durch die Chaperone die Enzymaktivität nicht beeinträchtigt, da sie unter den sauren lysosomalen Bedingungen nicht mehr am Enzym binden. Im Falle der Substratreduktionstherapie wird versucht, die Synthese des Speichermaterials zu verringern, indem Enzyme inhibiert werden, die am Aufbau der jeweiligen Stoffe beteiligt sind (Platt und Lachmann, 2009; Beck, 2010).

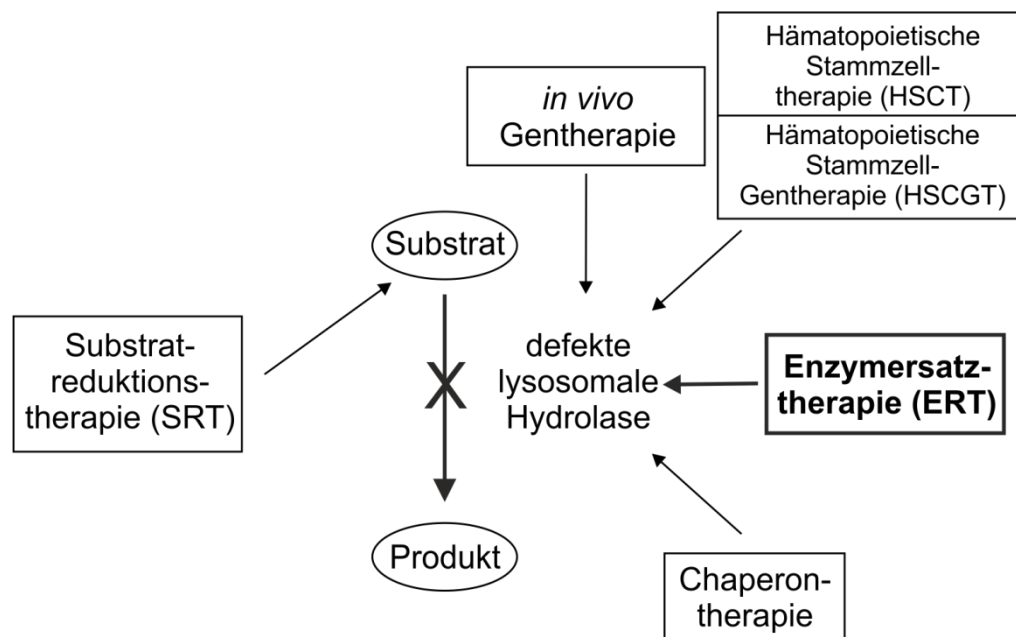


Abbildung 6: Therapieansätze zur Behandlung lysosomaler Speicherkrankheiten

Während mit Hilfe der Substratreduktionstherapie die Synthese des Speichermaterials reduziert wird, werden andere therapeutische Ansätze wie die Gentherapie, Stammzelltherapie und ERT angewendet, um das defiziente Enzym durch katalytisch aktives Enzym zu ersetzen. Bei der Chaperontherapie wird die korrekte Faltung defizienter Enzyme, die zwar katalytisch aktiv aber durch Mutationen fehlgefaltet werden, unterstützt, so dass diese nicht abgebaut, sondern ins Lysosom transportiert werden.

Die größten Erfolge wurden bislang mit der ERT erzielt, die für bestimmte lysosomale Speicherkrankheiten schon seit mehreren Jahrzehnten klinische Anwendung findet.

2.5.1 Enzymersatztherapie

Bei der ERT wird dem Patienten rekombinant hergestelltes Enzym intravenös injiziert. Über Rezeptor- (meist MPR-) vermittelte Endozytose gelangt es in die Zellen und wird zu den Lysosomen transportiert, wo es die Aufgabe des defekten Enzyms übernimmt (Ghosh et al., 2003; Platt und Lachmann, 2009). Als erstes wurde die ERT zur Behandlung von Morbus Gaucher (Typ I) schon vor mehr als 20 Jahren angewandt (Brady, 2006), wo sie mittlerweile mit großem Erfolg als Standardtherapie eingesetzt wird (Weinreb et al., 2002). Durch einen Glukocerebrosidase-Defekt kommt es zur Anreicherung von Glukosylceramid, die sich hauptsächlich auf retikuloendotheliale Makrophagen beschränkt und Symptome wie Hepatosplenomegalie, Anämie und Thrombozytopenie hervorruft. Durch die systemische Gabe des rekombinanten Enzyms Imiglucerase (Cerezyme®, Genzyme Corporation, Cambridge, MA) können die Symptome deutlich gemindert werden. Die zielgerichtete Aufnahme in Makrophagen wurde zudem erheblich verbessert, indem in den Komplex-Typ N-Glykanen durch partielle enzymatische Deglykosylierung der Glukocerebrosidase Mannose-Moleküle freigelegt wurden. Diese binden als Liganden an Mannose-Rezeptoren, die vor allem in der Plasmamembran von Makrophagen zu finden sind (Weinreb, 2008). Mittlerweile wird die ERT auch zur Behandlung von Morbus Fabry (Beck, 2009), Morbus Pompe (Nicolino et al., 2009) und den Mukopolysaccharidosen Typ I (Clarke et al., 2009), Typ II (Wraith et al., 2008) und Typ IV (Harmatz et al., 2008) eingesetzt. Symptome, die periphere Organe und Gewebe betreffen, werden gelindert. Dies führt zu einer gesteigerten Lebensqualität der Patienten.

Im Gegensatz zu solchen lysosomalen Speicherkrankheiten, in denen vor allem viszerale und nicht neuronale Organe und Gewebe betroffen sind, ist die ERT bei Krankheiten mit zentralnervösen Störungen, die bei über zwei Dritteln der lysosomalen Speicherkrankheiten auftreten (Schultz et al., 2011), bislang nicht erfolgreich. Der Grund hierfür ist, dass die meisten Proteine die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und ins Blut injizierte Enzyme die metabolischen Defekte im Gehirn nicht kompensieren können (Begley et al., 2008).

2.6 Blut-Hirn-Schranke

Schon 1885 gelang es Paul Ehrlich, einen Beweis für die Existenz einer Barriere zwischen Blut und Gehirn zu erbringen. Er injizierte in das Blutkreislaufsystem von Ratten einen Vitalfarbstoff und konnte zeigen, dass das Gehirn, im Gegensatz zu anderen Geweben, nicht angefärbt wurde (Ehrlich, 1885). Jahre später (1913) bestätigte sein Mitarbeiter Goldman diesen Befund, indem er umgekehrt einen Farbstoff in die Cerebrospinalflüssigkeit von Hunden injizierte und Färbung nur im Rückenmark und Gehirn, nicht aber in peripheren Geweben vorfand (Goldman, 1913).

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) ist eine physiologische Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem Zentralnervensystem (ZNS) von Landwirbeltieren. Ihre Hauptaufgabe ist es, den Stoffaustausch zwischen Blut und Gehirn streng zu kontrollieren und damit die Gehirn-Homöostase aufrecht zu erhalten. Mit einer Gesamtlänge von ca. 600 km und einer Gesamtoberfläche von ca. 20 m² ist das menschliche Gehirn von einem dichten Netzwerk an Kapillargefäßen durchzogen und fast jedes Neuron wird von einer eigenen Kapillare versorgt (De Boer und Gaillard, 2007). Im Gegensatz zu peripheren Kapillargefäßen sind Gehirnkapillaren nicht fenestriert (Schlageter et al., 1999).

Spezialisierte polarisierte Endothelzellen, die die Blutgefäße im Gehirn auskleiden, bilden die Grundlage der BHS. Feste Zell-Zell-Verbindungen, sogenannte *tight junctions*, über die benachbarte Zellen miteinander verbunden sind, verhindern weitestgehend den parazellulären Transport wasserlöslicher Substanzen und stellen eine physikalische Barriere dar (Wolburg und Lippoldt, 2002). Ein Maß für die Ionendurchlässigkeit eines Endothels ist der transendotheliale elektrische Widerstand (*transendothelial electrical resistance*, TEER). In peripheren Kapillaren beträgt er 2-20 Ω cm², in Hirnkapillaren dagegen > 1000 Ω cm² (Butt et al., 1990; Abbott et al., 2006). Neben den Endothelzellen sind eine Reihe weiterer Zelltypen wie Neurone, Astrozyten, Perizyten und Mikroglia, die über verschiedene Signalwege miteinander kommunizieren, an der Bildung, Aufrechterhaltung und Modulation der Barriere-Funktion beteiligt. Zusammen bilden sie eine neurovaskuläre Einheit (*neurovascular unit*, NVU).

Während der Gasaustausch von O₂ und CO₂ sowie der Übertritt kleiner lipophiler Substanzen über freie Diffusion erfolgt, regulieren spezielle Transportsysteme auf der luminalen und abluminalen Membran den transzellulären Austausch hydrophiler Moleküle

zwischen Blut und Gehirn (Abbildung 7). Signalmoleküle und vom Gehirn benötigte Nährstoffe können so kontrolliert zugeführt und die entstandenen Stoffwechselprodukte abgeführt werden. Eine Kombination aus intra- und extrazellulären Enzymen liefert zudem eine metabolische Barriere, durch die Peptide und ATP metabolisiert und viele neuroaktive sowie toxische Stoffe (z.B. durch Monoaminoxidase und Cytochrom P450) inaktiviert werden (Abbott et al., 2006). Außerdem sorgen sogenannte *ATP-binding cassette*-Transporter (z.B. P-Glykoprotein) für den aktiven Transport neurotoxischer Substanzen aus dem Gehirn (Begley, 2004). Somit wird es vor im Blut zirkulierenden Krankheitserregern, toxischen Substanzen und Botenstoffen geschützt.

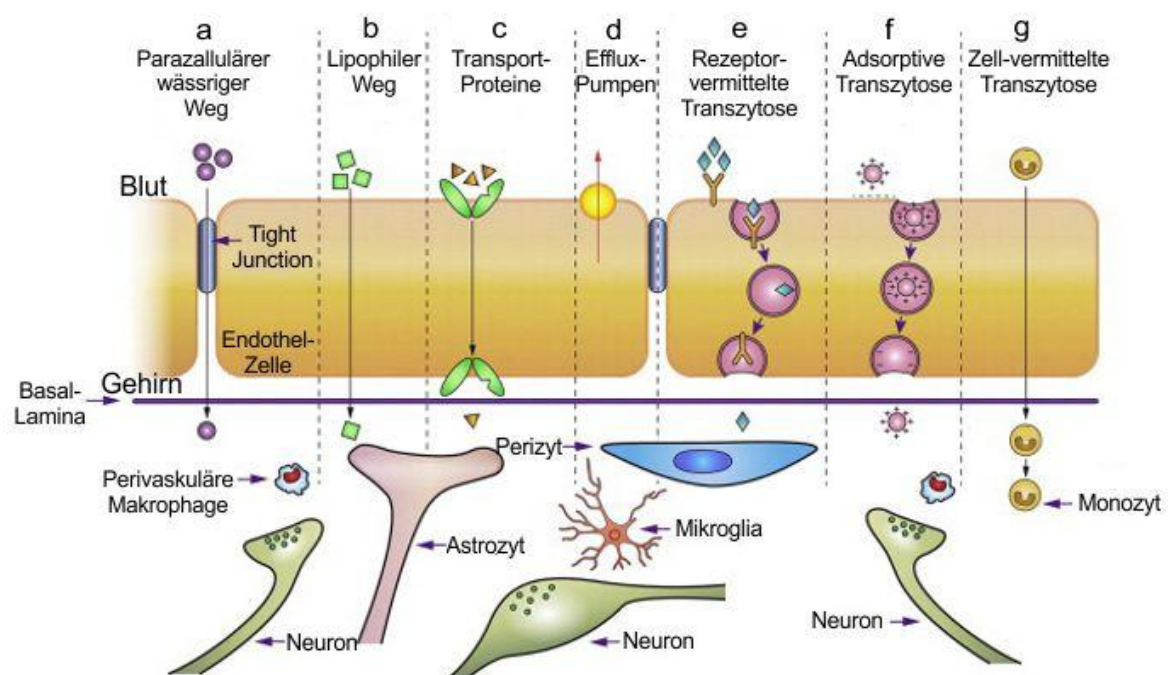


Abbildung 7: Transportwege über die Blut-Hirn-Schranke

Gehirn-Endothelzellen, die über *tight junctions* dicht miteinander „vernietet“ sind, bilden die Blut-Hirn-Schranke. Zusammen mit Neuronen, perivaskulären Astrozyten-Endfüßen, Perizyten und Mikroglia ergeben sie eine neurovaskuläre Einheit. (a) Der Durchtritt wasserlöslicher Substanzen wird durch die *tight junctions* sehr stark begrenzt. (b) Die große Oberfläche der endothelialen Lipidmembranen erlaubt eine effektive Diffusion kleiner lipidlöslicher Substanzen ins Gehirn. (c) Transportproteine dienen der Versorgung mit Nährstoffen wie Glukose, Aminosäuren und Nucleosiden und sorgen für den Abtransport von Stoffwechselprodukten ins Blut. (d) Einige Energie-getriebene Transporter, die sogenannten Efflux-Pumpen wie zum Beispiel das P-Glykoprotein, sind in der apikalen Endothelmembran lokalisiert. Sie vermitteln den Transport vieler Substrate, zu denen zahlreiche Arzneistoffe wie Antibiotika zählen, aus der Zelle und schützen das Gehirn vor toxischen Substanzen. (e) Verschiedene Proteine wie Transferrin, Lipoproteine und Insulin werden über Rezeptor-vermittelte Transzytose ins Gehirn transportiert. (f) Kationische Proteine können über adsorptiv-vermittelte Transzytose ins Gehirn gelangen. (g) Immunzellen, z.B. Monozyten, sind in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke entweder durch die Endothelzellen oder parazellulär durch Modulation der *tight junctions* zu überqueren (modifiziert nach Chen und Liu, 2012).

Große hydrophile Moleküle wie Proteine können die BHS ausschließlich über vesikulären Transport überwinden, der als Transzytose bezeichnet wird und ein besonderes Merkmal der BHS darstellt (Abbott et al., 2010). Die Moleküle werden auf der luminalen Seite endozytiert, in Vesikeln durch die Zelle transportiert und schließlich an der abluminalen Seite exozytiert. Während ein sehr geringer Teil der Proteine über Caveolae-vermittelte Flüssigphasen-Transzytose über die BHS transportiert wird (Tuma und Hubbard, 2003), gelangen die meisten Proteine in Clathrin-umhüllten Vesikeln entweder über die relativ unspezifische adsorptive Transzytose (AMT, *adsorptive-mediated transcytosis*) oder über spezifische Rezeptor-vermittelte Transzytose (RMT, *receptor-mediated transcytosis*) ins Gehirn (Hervé et al., 2008).

Bei der AMT bedingen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Endothelzelloberfläche und positiv geladenen Makromolekülen die Invagination von *coated pits*, die von der Membran abknospen und zur abluminalen Membran transportiert werden. Proteine, die über AMT ins Gehirn gelangen, sind z.B. kationisiertes Albumin, Histone und das *transactivator of transcription* (Tat-) Protein des humanen Immundefizienzvirus (HIV-1) (Hervé et al., 2008).

Bei der RMT löst die Bindung des Liganden an den Rezeptor einen Endozytosevorgang aus. Dabei werden die Rezeptor-Ligand-Komplexe in *coated pits* internalisiert und in Clathrin-umhüllten Vesikeln durch das Zytoplasma transportiert. Durch die Ansäuerung der endozytotischen Vesikel dissoziiert der Ligand vom Rezeptor und wird schließlich auf der gegenüberliegenden Seite der Zelle durch Exozytose entlassen. Beispiele für Proteine, die über RMT über die BHS transportiert werden, sind Transferrin, Lipoproteine und Insulin (Abbott et al., 2010).

2.7 Arzneimitteltransport über die BHS – therapeutische Ansätze

Aufgrund des streng kontrollierten Transports stellt die BHS ein großes Hindernis dar, Arzneimittel effektiv ins Gehirn zu befördern. Nur sehr wenige Medikamente, die typischerweise lipidlöslich sind, weniger als zehn Wasserstoffbrückenbindungen aufweisen und ein Molekulargewicht von < 500 Da haben, gelangen über passive Diffusion über die

BHS (Pardridge, 2003). Der Transport von anderen Medikamenten ins Gehirn kann durch verschiedene Methoden erreicht werden. Dazu gehören lokale invasive Therapien wie die direkte Infusion in die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) oder intrazerebrale Injektion von viralen Vektoren. Sie umgehen zwar die BHS, allerdings sind die therapeutischen Effekte häufig auf den Bereich der Injektionsstelle beschränkt, da die Pharmaka nicht komplett ins gesamte Gehirn diffundieren (Gaillard et al., 2005). Der Transport über den vaskulären Weg ermöglicht dagegen eine ausgedehnte Verteilung des Medikaments über das gesamte Gehirn (Pardridge, 2002). Durch eine Erhöhung der BHS-Permeabilität, die z.B. durch verschiedene vasoaktive Stoffe erreicht werden kann, gelangen ins Blut injizierte Stoffe leichter ins Gehirn. Die nicht-selektive Öffnung der BHS sowie eine chemische Inhibition von endogenen Efflux-Transportern kann allerdings zur Folge haben, dass neben den gewünschten Stoffen auch potentielle Neurotoxine oder Botenstoffe ungehindert ins Gehirn gelangen und schwerwiegende Nebenwirkungen hervorrufen (Miller, 2002; Begley, 2004).

Eine mögliche Methode, Medikamente über den vaskulären Weg gezielt ins Gehirn zu befördern, ist die Verwendung endogener Transportmechanismen (Abbildung 8).

2.7.1 Adsorptive Transzytose

Die AMT ist ein relativ unspezifischer Transportmechanismus, über den kationische Substanzen die BHS überwinden können. Die sogenannten *cell-penetrating peptides* (CPPs) bilden eine Gruppe positiv-geladener Peptide, die an sie gebundene kleine Moleküle aber auch Proteine in Zellen transportieren können (Zorko und Langel, 2005). CPPs, die sich von natürlichen Proteinen ableiten, sind in der Regel 10-27 Aminosäuren lang und tragen mehrere positive Ladungen. Aufgrund ihrer meist amphipathischen Struktur bilden sie Helices und sind in der Lage, mit negativ-geladenen Lipidmembranen zu interagieren (Hervé et al., 2008). Ein Beispiel ist die Proteintransduktionsdomäne (Aminosäuren 47-57: YGRKKRRQRRR) des *transactivator of transcription*-Proteins des HIV-1 (Tat). Es wurde bereits in Mäusen gezeigt, dass Tat den Eintritt von fusionierten Proteinen wie β -Galaktosidase (120 kDa) und Erythropoietin (36-40 kDa) ins Gehirn ermöglicht (Schwarze et al., 1999; Zhang et al., 2010). Viele Studien deuten darauf hin, dass der Tat-vermittelte Transport über die BHS wahrscheinlich über AMT verläuft (Hervé et al., 2008; Abbott et al., 2010; Chen und Liu, 2012).

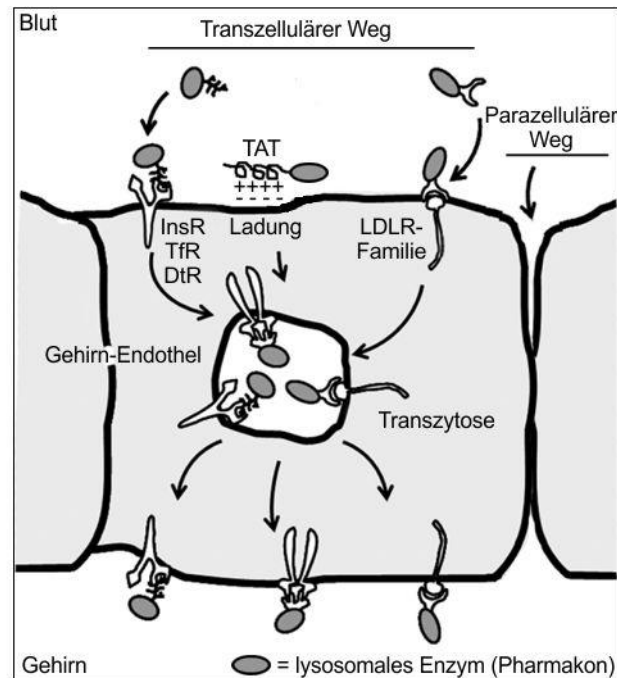


Abbildung 8: Arzneimittel-Transport über die BHS am Beispiel eines lysosomalen Enzyms

Um den Transport lysosomaler Enzyme ins Gehirn bei der ERT zu erhöhen, können die Enzyme als Fusionsproteine synthetisiert werden. Sie bestehen aus dem katalytisch aktiven Enzym und einem Peptid, welches entweder über AMT oder RMT über die BHS transportiert wird. Zu solchen Peptiden gehören Liganden der LDL-Rezeptorfamilie sowie des Insulin- (InsR), Transferrin- (TfR) und Diphtherietoxin-Rezeptors (DtR). Andererseits werden *cell penetrating peptides* (CPPs) wie zum Beispiel Tat verwendet, um eine ladungsabhängige AMT fusionierter Proteine ins Gehirn zu vermitteln (modifiziert nach Muro, 2010).

2.7.2 Rezeptor-vermittelte Transzytose

Die RMT ist im Gegensatz zur AMT ein spezifischer Transportweg über die BHS für endogene Proteine, der ebenfalls für therapeutische Zwecke ausgenutzt wird und den Transport großer Moleküle ins Gehirn ermöglicht (Jones und Shusta, 2007; Gabathuler, 2010a). Mitglieder der *low-density lipoprotein* (LDL)-Rezeptorfamilie, vor allem der LDL-Rezeptor (LDLR) und die *LDL-related proteins-1 und -2* (LRP-1, LRP-2), sind neben dem Transferrin-, Insulin- und Diphtherietoxin-Rezeptor die bekanntesten Rezeptoren, die am Transport über die BHS beteiligt sind (Dehouck et al., 1997; Rip et al., 2009). LDL-Rezeptoren sind multifunktionale Rezeptoren, die am Lipoproteintransport, der Cholesterolemie und der Signalweiterleitung in verschiedenen Geweben, wie auch dem Gehirn, beteiligt sind (Go und Mani, 2012). Verschiedene Liganden der LDL-Rezeptoren wurden bereits verwendet, um fusionierte oder gebundene Moleküle über RMT ins Gehirn zu befördern.

Apolipoproteine bilden zusammen mit den Phospholipiden die hydrophile Oberfläche von Lipoproteinen. Sie besitzen Rezeptorbindedomänen, über die die Proteinkomplexe gezielt in Zellen aufgenommen werden.

Die LDLR-Bindedomäne des Apolipoprotein B (**apoB**) wurde bereits erfolgreich verwendet, um fusionierte Proteine wie Glukocerebrosidase und die Metalloproteinase Neprilysin über die BHS zu transportieren (Spencer und Verma, 2007; Spencer et al., 2011).

Apolipoprotein E (**apoE**) hat als Ligand des LRP-1, welcher im Gehirn stark exprimiert wird (Herz und Strickland, 2001), eine Schlüsselrolle beim Lipidtransport im Blut und auch im ZNS (Hatters et al., 2006; Go und Mani, 2012). Nach intravenöser Injektion von kovalent an ApoE-gebundenen Nanopartikeln waren diese im Gegensatz zu Nanopartikeln ohne ApoE im Gehirn der behandelten Mäuse zu finden (Zensi et al., 2009). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass der LRP-1 für einen effizienten Transport von ApoE und anderen Liganden über die BHS verantwortlich ist (Chen und Liu, 2012).

RAP (*low density lipoprotein receptor-related protein associated protein*, LRPAP-1) ist ein im ER lokalisiertes Protein, welches als Chaperon an der Faltung und dem Transport von Mitgliedern der LDL-Rezeptorfamilie beteiligt ist (Li et al., 2002). Es bindet effizient an LDL-Rezeptoren und verhindert dadurch die Bindung anderer Liganden. Exogen appliziertes RAP wird durch alle Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie endozytiert. Es konnte außerdem in *in vitro* und *in vivo* Versuchen gezeigt werden, dass es die BHS effizienter überwindet als Transferrin - wahrscheinlich über LRP1- bzw. LRP2- vermittelte Transzytose (Pan et al., 2004).

Eine Gruppe synthetisch hergestellter Peptide, die *Angiopeps*, leiten sich von Proteinen ab, die die BHS effizient über LRP-vermittelte Transzytose überwinden. Das bekannteste Mitglied ist **Angiopep-2** (TFFYGGSRGKRNNFKTEEY) (Demeule et al., 2008a). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass der Übertritt verschiedener niedermolekularer Chemotherapeutika wie Paclitaxel (Thomas et al., 2009), Doxorubicin und Etoposide (Ché et al., 2010) ins Gehirn durch die chemische Bindung an Angiopep-2 bis zu 80-fach gesteigert werden kann.

3 Material

Alle nicht gesondert erwähnten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim) und Thermo Scientific (Schwerte) bezogen. Für Klonierungen wurden Enzyme und Puffer von Fermentas /Thermo Scientific (St. Leon-Rot) verwendet.

Verbrauchsmaterialien stammten von Sarstedt (Nümbrecht), Becton Dickinson (Heidelberg), VWR (Darmstadt), Braun (Melsungen), Engelbrecht (Edermünde), Fuji Film (Düsseldorf), Zellkulturmedien von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), PAA (Pasching, Österreich) und Invitrogen (Karlsruhe).

Sämtliche Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser aus einer NANOpure-Anlage (Barnstead) hergestellt. Nicht gesondert erwähnte Lösungen wurden nach (Sambrook et al., 1989) angesetzt.

3.1 Geräte

| Gerät | Bezeichnung | Herkunft |
|------------------------|--|--------------------------|
| Autoklav | Varioklav® EC | Thermo Scientific |
| Automatikpipette | Handy Step | Brand |
| Bakterienschüttler | Controlled Environment Incubator Shaker | New Brunswick Scientific |
| Brutschrank (Zellen) | FUNCTION Line | Heraeus Instruments |
| Brutschrank (Zellen) | IR 1500 Automatic CO ₂ Incubator | Flow Laboratories |
| Dispergiergerät | Ultra-Turrax T25 | Janke & Kunkel |
| Elektrophorese-System | PerfectBlue Gelsystem Mini L Power Station 300 | Peqlab Labnet |
| Elektroporationsgerät | GENE PULSER® II | BioRad |
| Elektrotransfer-Kammer | PerfectBlue Semi-Dry Electro Blotter | Peqlab |
| Feinwaage | CP124S-OCE | Sartorius |

| | | |
|--|--|--|
| Film-Entwicklermaschine | Curix 60 | Agfa |
| Flachbettscanner | V700 PHOTO | Epson |
| Fluoreszenzmikroskop | Axiovert 100 M | Zeiss |
| Flüssigkeitschromatographie-Säulen | HiTrap Desalting 5 ml Superdex 200 HR 10/30 | GE Healthcare Pharmacia Biotech |
| FPLC-System | Äkta purifier mit Software UNICORN V4.00.16 | Amersham Pharmacia Biotech |
| Gel-Dokumentationssystem | GelDoc 2000 | BioRad |
| Heizblock | TH 26 | HLC |
| Inkubator | B12 Function Line | Heraeus Instruments |
| Laborgasbrenner | Gasprofi 1 | WLD-TEC |
| Magnetrührer | ARE Heating Magnetic Stirrer | Velp Scientifica |
| Mehrkanalpipette | Tranferpette® S-12 | Brand |
| Mikroplattenleser | GENios mit Software Magellan V3.00.12 | Tecan |
| Mikroplattenwascher | hydroFLEX | Tecan |
| Mikroskop | Axiovert 25 | Zeiss |
| Peristaltikpumpe | P-1 | Pharmacia Fine Chemicals |
| pH-Meter | InLab® Micro (Elektrode) pH-Monitor | Mettler Toledo Pharmacia Fine Chemicals |
| Photometer | DU® 640 | Beckman |
| Pipettierhilfe | Easypet | Eppendorf |
| Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System | Mini-PROTEAN® Tetra System | BioRad |
| Reinstwasseranlage | NANOpure | Barstead |
| Schüttelwasserbad | 1083 | GFL |
| Schüttler | Vibrax® VXR | IKA |
| Spannungsgeber für Elektrophoreseapparatur | PowerPac 300 | BioRad |
| Spektrophometer | NanoDrop 2000 | Thermo Scientific |
| Sterilbank | LaminAir® HB 2448 | Heraeus Instruments |
| Suspensionskultur-Bioreaktor | miniPERM® | Sarstedt |
| Thermozykler | T3 | Biometra |
| Überkopfschüttler | Rotamix RM1 | Elmi |
| Ultraschallbad | 1210 | Branson |

| | | |
|---|--|---|
| Universaldrehvorrichtung für Miniperm® Bioreaktoren | Universal Tuning Device | Sarstedt |
| Vakuumpumpe | Vakuum-Sicherheits-Absaugsystem | HLC |
| Vortexer | UNIMAG ZX3 | UniEquip |
| Waage | PC 4400 | Mettler |
| Wasserbad | U3 | Julabo |
| Zählkammer für Zellen | BLAUBRAND®-Zählkammer Neubauer improved | Brand |
| Zentrifugen | Z 333 MK 5415 C, 5810 R (F-34-6-38, A-4-62), 5702 Avanti® J-E (JA-10) Sorvall RC 5C Plus (GS-3) | Hermle Eppendorf Beckman Coulter Du Pont |

3.2 Fertige Reaktionssysteme (Kits)

| Verwendung | Bezeichnung | Hersteller/Herkunft |
|---------------------|--|---------------------|
| Chemilumineszenz | ECL Western Blotting Substrate | Thermo Scientific |
| DNA-Gewinnung (Gel) | Zymoclean Gel DNA Recovery Kit | Zymo Research |
| DNA-Reinigung | Qiagen Plasmid Midi Kit QIAprep Spin Miniprep Kit | Qiagen |
| Proteinbestimmung | D _C Protein Assay | BioRad |
| Transfektion | Turbofect Transfection Reagent | Thermo Scientific |
| Fotoentwicklung | Developer und Rapid Fixer | Agfa |

3.3 Enzyme

| Enzym | Herkunft |
|---|------------------------------|
| rekombinante humane Arylsulfatase A (ASA) | Zymenex (Hillerod, Dänemark) |

3.3.1 Enzyme zur Deglykosylierung von Proteinen

| Enzym | Bestellnummer | Herkunft |
|----------------------------|----------------|-----------------------|
| Endoglykosidase H (EndoH) | P0702 | New England Biolabs |
| N-Glykosidase F (PNGase F) | 11 365 169 001 | Roche Applied Science |

3.3.2 Enzyme zum Restriktionsverdau von DNA

| Enzym | Erkennungssequenz |
|-------------|-------------------|
| BamHI | G↓GATCC |
| BglII | A↓GATCT |
| EcoRI | G↓AATTC |
| HindIII | A↓AGCTT |
| KpnI | GGTAC↓C |
| NheI | G↓CTAGC |
| SpeI (BcuI) | A↓CTAGT |
| XbaI | T↓CTAGA |

3.4 Antikörper

3.4.1 Primärantikörper:

| Antigen (Bezeichnung) | Spezies | Herkunft |
|-------------------------|---|---|
| humane ASA (19-16-3) | Maus, monoklonal | eigene Herstellung (Hybridomzellen) |
| humane ASA (BE#3, BE#2) | Kaninchen, polyklonal | Eurogentec |
| humane ASA (PFA-hASA) | Kaninchen, polyklonal, affinitätsgereinigt | eigene Herstellung |
| LRP (1704) | Kaninchen, polyklonal | C. Pietrzik |
| murines LAMP-2 (Abl-93) | Ratte, monoklonal | Developmental Studies Hybridoma Bank |
| β -Aktin | Maus, monoklonal | Sigma-Aldrich |

3.4.2 Sekundärantikörper:

| Antigen | Spezies | gekoppelt an | Herkunft |
|----------------------|---------|-----------------------|----------|
| Kaninchen IgG (H+L) | Ziege | Meerrettichperoxidase | Dianova |
| Kaninchen IgG (H+L) | Ziege | Cy3 | Dianova |
| Ratte IgG (H+L) | Ziege | Dyelight488 | Dianova |
| Maus IgG + IgM (H+L) | Ziege | Meerrettichperoxidase | Dianova |

3.5 Vektoren zur Klonierung von ASA-Fusionsproteinen

| Bezeichnung | Beschreibung |
|---------------|---|
| pcDNA3 | Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promotor (Invitrogen) |
| pBEH-HT14/CP8 | Plasmid zur eukaryotischen Expression humaner ASA (Stein et al., 1989) |

3.6 Oligonukleotide (MWG-Biotech AG) zur Klonierung von ASA-Fusionsproteinen

| Bezeichnung | Nukleotidsequenzen (5' → 3') |
|----------------|--|
| ASA_forward | CTCGCAAAGCTTAGTAGCCCTCCCTCTCTTGG |
| ASA_reverse | CAAGAATTCACCGCTAGCATGGGGATCTGGGCAATG |
| Linker_forward | AGCTTAACTAGTGGAGGTGGAGGTAGCGGAGGTGGAGGTTCCGGA GGTGGAGGTTCCGGTGGAGGTGGATCCGTTAACGGTACCGAATTCA ATGAA |
| Linker_reverse | TTCATTGAATTCGGTACCGTTAACGGATCCACCTCCACCGGAACCT CCACCTCCGGAACCTCCACCTCCGCTACCTCCACCTCCACTAGTTAA GCT |
| Tat_forward | AGATCTTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAGCGACGAAGATGAGGT ACC |
| Tat_reverse | GGTACCTCATCTTCGTCGCTGTCTCCGCTTCTTCTGCCATAAGATC T |

| | |
|--------------------|--|
| ApoB_forward_1 | GATCTAGCAGCGTGATCGACGCCCTGCAGTACAAGCTGGAGGGCA CCACCAGACTGACCAGAAAGAGAGGCCTGAAGCTGGCCACCGCCC TGAGCC |
| ApoB_forward_2 | TGAGCAACAAGTTCGTGGAGGGCAGCTAATAGGTAC |
| ApoB_reverse_1 | CTATTAGCTGCCCTCCACGAAGTTGTTGCTCAGGCTCAGGGCGGTG GCCAGCTTCAGGCCTCTCTTTCTGG |
| ApoB_reverse_2 | TCAGTCTGGTGGTGCCTCCAGCTTGTAAGTGCAGGGCGTCGATCAC GCTGCT |
| ApoE-I_forward | AGATCTACCGAGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCCACCTGCGCA AGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCTGAGGTACC |
| ApoE-I_reverse | GGTACCTCAGGCATCGCGGAGGAGCCGCTTACGCAGCTTGCGCAGG TGGGAGGCGAGGCGCACCCGCAGCTCCTCGGTAGATCT |
| ApoE-II_forward | AGATCTCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCTGCGCAAGCTGC GTAAGCGGCTCCTCTGAGGTACC |
| ApoE-II_reverse | GGTACCTCAGAGGAGCCGCTTACGCAGCTTGCGCAGGAGGAGCCG CTTACGCAGCTTGCGCAGAGATCT |
| Angiopep-2_forward | CCGGAACTTTTTCTATGGAGGTTCCAGAGGCAAAGAAATAACTT CAAACTGAGGAATACTAAGGTAC |
| Angiopep-2_reverse | CTTAGTATTCCTCAGTTTTGAAGTTATTTCTTTTGCCTCTGGAACCTC CATAGAAAAAAGTT |
| RAPd3_forward | CTCGCAAGATCTGAGGAGCCCAGGGTGATTGACCTGTG |
| RAPd3_reverse | GGTACCTCAGAGTTCGTTGTGCCGAGCTCTGGAGATCC |
| ASA-Stop_forward | CTCGCAAAGCTTAGTAGCCCTCCCTCTCTGG |
| ASA-Stop_reverse | TGCTCTAGATCAGGCATGGGGATCTGGGCAATGG |

3.7 Zellen

3.7.1 Eukaryotische Zellen

| Zelltyp | Bezeichnung | Herkunft |
|---------------------------------|--|--|
| bEND.3 | <i>mouse brain endothelial cells</i> | G. Bendas |
| CHO-S | <i>chinese hamster ovary cells</i> (Suspension) | Zymenex |
| CHO-K1 | <i>chinese hamster ovary cells</i> | DSMZ |
| CHO-lrp ^{-/-} (13-5-1) | <i>chinese hamster ovary cells</i> (LRP-defizient) | C. U. Pietrzik |
| CHO-wt | <i>chinese hamster ovary cells</i> (LRP-exprimierend) | C. U. Pietrzik |
| MEF | <i>mouse embryonic fibroblasts</i> | eigene Präparation aus C57BL/6-Mäusen |
| MEF-asa ^{-/-} | <i>mouse embryonic fibroblasts</i> (ASA-defizient) | (Hess et al., 1996) |
| MEF-mpr ^{-/-} | <i>mouse embryonic fibroblasts</i> (MPR300-defizient) | (Pohlmann et al., 1995) |

3.7.2 Bakterien

| Name | Beschreibung |
|-----------------|--|
| XL-1 Blue | supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA46, thi-1, relA1, lac[F'proAB ⁺ , lacI ₂ lacZΔM15 Tn10 (tetr ^r)]; (Bullock, 1987) |
| IRATp970D07128D | Bakterienklon, der das humane lrpap-1 (<i>low density lipoprotein receptor-related protein associated protein</i>) Gen trägt; ImaGenes GmbH |

3.8 Zellkulturmedien

| Bezeichnung | Zusätze | Kultivierung folgender Zellen |
|-----------------------|--|---|
| DMEM (Invitrogen) | 2 mM L-Glutamin (bzw. Glutamax TM) 100 Units/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 5 bzw. 10 % FCS | bEND.3, MEF, MEF-mpr ^{-/-} , MEF-asa ^{-/-} |
| DMEM/F12 (PAA) | 2 mM L-Glutamin 100 Units/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10 % FCS | CHO-K1 |
| α-MEM (Invitrogen) | 2 mM L-Glutamin 100 Units/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 5% FCS | CHO-wt, CHO-lrp ^{-/-} |
| ExCell302 (Sigma) | 2 mM L-Glutamin 100 Units/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 1x HT Supplement (100 µM Hypoxanthin, 16 µM Thymidin) | CHO-S |

3.9 Mauslinie

| Bezeichnung | Genotyp | generiert von |
|--------------|----------|--------------------|
| ASA-Knockout | mASA -/- | Hess et al. (1996) |

4 Methoden

Allgemeines

Alle nicht aufgeführten Standardprotokolle wurden nach Sambrook et al. (1989) bzw. nach den jeweiligen Herstellerangaben durchgeführt.

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

Zur Entfernung eventueller Verunreinigungen durch Proteine bzw. RNA wurden Plasmid-Lösungen, die zur Transfektion von CHO-S Zellen verwendet wurden, mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt.

Die zu reinigende Plasmid-Lösung wurde mit 250 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gemischt, 30 s in der Hand geschüttelt und 5 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung des Phenols wurde die obere wässrige Phase (in der sich die DNA befindet) mit 500 µl Chloroform gemischt, 5 min bei 15.000 x g zentrifugiert und anschließend die obere Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltene DNA wurde durch Mischung mit 500 µl Isopropanol gefällt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 15.000 x g wurde das DNA-Pellet in 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, getrocknet und die DNA schließlich in gewünschtem Volumen ddH₂O gelöst.

4.1.2 Saure Ethanolfällung

Zur Fällung von DNA wurden 1/10 des Probenvolumens einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,6) sowie das 2,5-fache Probenvolumen Ethanol (96 %) zur DNA-Lösung gegeben. Nach kräftigem Mischen wurde die Lösung 20 min bei -80° C inkubiert und die gefällte DNA anschließend durch zehnmünütige Zentrifugation bei 15.000 x g und 4° C pelletiert.

Die DNA wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut 5 min zentrifugiert. Die an der Luft getrocknete DNA wurde schließlich in dem gewünschten Volumen ddH₂O aufgenommen.

4.1.3 Hybridisierung von Oligonukleotiden zu doppelsträngiger DNA

| | |
|---------------------------|--|
| 2x-Hybridisierungspuffer: | 200 mM Kaliumacetat 4 mM Magnesiumacetat 60 mM HEPES/KOH, pH 7,4 |
|---------------------------|--|

Je 1 µl in Wasser gelöste komplementäre Oligonukleotide (100 pmol/µl) wurden mit 12,5 µl 2x-Hybridisierungspuffer gemischt und auf 20 µl mit ddH₂O aufgefüllt.

Die Aneinanderlagerung der Oligonukleotide erfolgte im Thermozykler nach folgendem Schema:

| | |
|--------------------------|-------|
| 5 min | 95° C |
| 10 min | 70° C |
| 0,1° C/s Abkühlung auf | 60° C |
| 10 min | 60° C |
| 0,1° C/s C Abkühlung auf | 50° C |
| 10 min | 50° C |
| 0,1° C/s Abkühlung auf | 40° C |
| 10 min | 40° C |
| 0,1°/s Abkühlung auf | 25° C |
| 10 min | 25° C |
| 0,1°/s Abkühlung auf | 10° C |
| 10 min | 10° C |
| ∞ | 4° C |

4.1.4 Polymerase-Kettenreaktion

Unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide und der thermostabilen Taq DNA-Polymerase (Thermo Scientific) wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) definierte DNA-Fragmente amplifiziert.

Reaktionsansatz:

| | |
|-----------|---------------------------|
| 5 µl | 10x Taq Polymerase-Puffer |
| 5 µl | 2 mM dNTP-Mix |
| 2-4 µl | 25 mM MgCl ₂ |
| 1 ng | Plasmid-DNA |
| 100 pmol | Oligonukleotid 1 |
| 100 pmol | Oligonukleotid 2 |
| 2,5 Units | Taq DNA-Polymerase |
| ad 50 µl | PCR-H ₂ O |

Die Amplifikation erfolgte im Thermozykler unter folgenden Bedingungen:

| | | | |
|---------|-------|--------------------------------|-----------|
| 5 min | 95° C | Initiale Denaturierung | |
| 30 s | 95° C | Denaturierung | 30 Zyklen |
| 2 min | X° C | Anlagerung der Oligonukleotide | |
| 1-2 min | 72° C | Verlängerung der DNA-Fragmente | |
| 7 min | 72° C | Auffüllen von Enden | |
| ∞ | 4° C | | |

Die Temperatur (X) zur Anlagerung der Oligonukleotide lag dabei 2-10° C unter ihrer Schmelztemperatur. Zur Optimierung wurden MgCl₂-Konzentrationen und Anlagerungstemperaturen variiert.

4.1.5 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

| | |
|--------------------------------------|---|
| 50x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer | 2,5 M Tris 100 mM EDTA 1 M Natriumacetat, pH 8,0 |
| Ladepuffer (LIV) | 0,25 mM Bromphenolblau 30 % Glycerol 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 |

Abhängig von ihrem Molekulargewicht, ihrer Konformation und ihrer Basenzusammensetzung können DNA-Moleküle in einem Agarosegel durch eine angelegte Spannung aufgetrennt werden.

Zur Detektion der DNA wurde der mit TAE-Puffer angesetzten Agarosegel-Lösung Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,7 µg/ml), welches in die DNA interkaliert, zugesetzt. Die Agarosekonzentration (1-2 %) wurde dabei an die Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente angepasst. Die flüssige Lösung wurde in eine entsprechende Kammer geschüttet und bei RT abgekühlt. In die Taschen des polymerisierten Agarosegels wurden die mit Ladepuffer versetzten Proben sowie ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer angelegten Spannung von 80-120 V.

4.1.6 Spaltung von Nukleinsäuren

In der Regel wurde 1 µg der zu spaltenden DNA mit 10 Units des gewünschten Restriktionsenzym und dem entsprechenden Enzym-Puffer (Thermo Scientific) 1 h bzw. über Nacht bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Eine Unit entspricht dabei der Menge des Restriktionsenzym, die benötigt wird, um 1 µg Lambda-DNA vollständig zu schneiden. Zur Aufreinigung und/oder Kontrolle wurden die DNA-Fragmente im Agarosegel getrennt.

4.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von linearisierten Plasmiden (Vektor) mit DNA-Fragmenten, die über PCR oder über die Hybridisierung von Oligonukleotiden generiert wurden (Insert), wurde die T4 DNA-Ligase (Thermo Scientific) verwendet. Dazu wurde ein drei- bis vierfacher molarer Überschuss des Inserts mit 20 ng des Vektors gemischt und nach Zugabe einer Weiss-Einheit T4 DNA-Ligase 1 h bei RT inkubiert. Nach erfolgreicher Ligation, die mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft wurde, wurden die Plasmide durch Transformation chemisch kompetenter Zellen (XL-1 Blue) repliziert (Sambrook et al., 1989).

4.2 Protein-Analytik

4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970)

| | |
|----------------------------------|---|
| 10x SDS-Laufpuffer | 250 mM Tris-HCl 1,9 M Glycin 1 % SDS, pH 8,6 |
| 4x Probenpuffer (Laemmli-Puffer) | 8 % SDS 40 % Glycerol 240 mM Tris-HCl 4 % Bromphenolblau 4 % β -Mercaptoethanol |

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse wurden die zu untersuchenden Proteinlösungen mit einem entsprechenden Volumen 4x Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95° C denaturiert und in die Taschen des SDS-Gels gefüllt. Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte bei 100-200 V. Zur Größenbestimmung wurde ein Molekulargewichtsstandard verwendet (Thermo Scientific).

Zusammensetzung der SDS-Gele:

| | Sammelgel (1 ml) | Trenngel (5 ml) |
|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| H ₂ O | 0,604 ml | 2,40 ml |
| 40 % Acrylamid | 0,125 ml | 1,25 ml |
| 1,5 M Tris-HCl pH 6,8 | 0,250 ml | - |
| 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 | - | 1,25 ml |
| 10 % SDS | 0,010 ml | 0,05 ml |
| 10 % APS | 0,010 ml | 0,05 ml |
| Temed | 0,001 ml | 0,01 ml |

4.2.2 Protein-Färbung

SDS-Gele wurden 30-120 min in Coomassie-Lösung (*PageBlue Protein Staining Solution*, Thermo Scientific) geschwenkt, bis blaue Banden sichtbar waren und anschließend in mehrfach gewechseltem ddH₂O bis zur Entfernung der Hintergrundfärbung gewaschen.

4.2.3 Westernblot

| | |
|-------------|--|
| Blot-Puffer | 48 mM Tris-HCl 39 mM Glycin 0,037 % SDS 20 % (v/v) Methanol |
|-------------|--|

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe des Halbtrocken-Verfahrens auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (45 min bei 150 mA). Die Membran wurde anschließend in 5 % Magermilchpulver (Reformhaus) in TBS/T (0,05 % (w/v) Tween in 1x TBS) über Nacht bei 4° C geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach fünfminütigem Waschen mit TBS/T wurde die Membran 1,5 h mit dem Primärantikörper, der in 5 % Magermilchpulver in TBS/T verdünnt war, inkubiert und anschließend dreimal je 5 min mit TBS/T gewaschen. Nach einstündiger Inkubation mit dem ebenfalls in 5 % Magermilchpulver in TBS/T verdünnten Sekundärantikörper wurde die Membran wieder dreimal mit TBS/T gewaschen. Die

Detektion erfolgte über verstärkte Chemilumineszenz nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific).

4.2.4 Vorbehandlung von Pansorbin A

| | |
|------------|---|
| Net-Puffer | 50 mM Tris-HCl pH 7,4 150 mM NaCl 5 mM EDTA |
|------------|---|

Zur Immunpräzipitation verwendetes Pansorbin A (Calbiochem) wurde wie folgt vorbehandelt. Nach fünfminütiger Zentrifugation der Pansorbin A-Suspension (1 ml) bei 16.000 x g wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat in 1 ml Net-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert, das Präzipitat in 1 ml Net-Puffer mit 1 % SDS gelöst und 5 min bei 95° C inkubiert. Die Suspension wurde 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert und das Präzipitat dreimal mit je 1 ml Net-Puffer mit 5 mg/ml BSA und 0,5 % Triton X-100 und dann zweimal mit je 1 ml PBS (pH 7,4) gewaschen. Schließlich wurde das Präzipitat in einem zehnfachen Volumen (w/v) PBS (pH 7,4) mit 10 % BSA und 0,04 % NaN₃ resuspendiert und bei 4° C gelagert.

4.2.5 Immunpräzipitation von ASA bzw. ASA-Fusionsprotein aus Zellkulturüberständen

Zellkulturüberstände transient transfizierter CHO-K1 Zellen wurden 5 min bei 200 x g zentrifugiert, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Je 1 ml der Überstände wurde mit 1 µg monoklonalem Maus-anti-hASA-Antikörper (19-16-3) 16 h bei 4° C unter ständiger Durchmischung inkubiert, nach Zugabe von 4 µl vorbehandeltem Pansorbin A eine weitere Stunde bei 4° C gemischt und anschließend 2 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Das sedimentierte Präzipitat wurde zweimal mit je 750 µl PBS pH 7,4 gewaschen, in 50 µl 4x-Probenpuffer (nach Laemmli) 5 min bei 95° C erhitzt, erneut 5 min bei 20.000 x g zentrifugiert und der Überstand in der SDS-PAGE analysiert.

4.2.6 Deglykosylierung von Proteinen

4.2.6.1 Endoglykosidase H (Endo H)

Zum Vergleich der Glykosylierung von ASA und den ASA-Fusionsproteinen wurden je 5 µg des zu untersuchenden Proteins mit 1 µl Denaturierungspuffer (New England Biolabs) gemischt, auf 10 µl mit ddH₂O aufgefüllt und 10 min bei 100° C inkubiert. Nach Zugabe von 2 µl G5-Reaktionspuffer (New England Biolabs) und 500 U EndoH wurde das Gemisch mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt und 16 h bei 37° C inkubiert. Eine erfolgreiche Deglykosylierung wurde durch Größenänderung von verdauten und nicht-verdauten Proteinen in der SDS-PAGE verifiziert.

4.2.6.2 PNGase F

Im Gegensatz zur EndoH, welche ausschließlich mannosereiche und einige Hybrid-Typ-Oligosaccharide von N-gebundenen Glykoproteinen abspaltet, werden durch die Behandlung mit PNGase F alle drei Formen (mannosereich, hybrid, komplex) N-gebundener Zuckerseitenketten entfernt.

Dem zu verdauenden Protein (je 5 µg) wurde 1 µl Denaturierungspuffer (siehe 4.2.6.1) zugegeben und auf 10 µl mit ddH₂O aufgefüllt. Nach zehnmütiger Inkubation bei 100° C wurden 2,5 µl 10 % NP-40, 2,5 µl Reaktionspuffer (500 mM Natriumphosphat pH 7,4) und 500 mU PNGase F zugefügt, das Gemisch mit ddH₂O auf 25 µl aufgefüllt und 16 h bei 37° C inkubiert. Deglykosylierung wurde durch eine Größenänderung in der SDS-PAGE nachgewiesen.

4.2.7 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 H_2O |
| Phosphatreagenz | 1 Vol. Ammoniummolybdat-Lösung wurde mit 3 Vol. Malachitgrün gemischt, 30 min bei RT geschüttelt und filtriert (0,2 µl-Sterilfilter). 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 µM KH_2PO_4 |
| Reagenzgläser | DURAN 8 x 70 mm, (Roth) Es wird nur DURAN-Glas verwendet, da aus anderen Gläsern beim Veraschen Phosphat freigesetzt werden kann. |
| Mikroküvetten | Plastibrand Mikro 70-850 µl (z = 8,5 mm), (Roth) |

Die Methode kann zur direkten Bestimmung des M6P-Gehalts verwendet werden, wenn die Proteinpräparation keine phosphathaltigen Verunreinigungen aufweist (z.B. Nukleotide, Nukleinsäuren oder Phospholipide) und das zu untersuchende Protein keine anderen Phosphorylierungsstellen besitzt.

Zunächst wurden maximal 1,5 ml der zu untersuchenden Proteinlösung über eine HiTrap Entsalzsäule (GE Healthcare) an einem Äkta FPLC-System aufgereinigt, um eventuelle Phosphatverunreinigungen aus der Lösung zu entfernen. Die Säule wurde mit fünffachem Säulenvolumen TBS pH 7,0 äquilibriert und die dann aufgetragene Proteinlösung mit 1,5-fachem Säulenvolumen TBS pH 7,0 eluiert (2,5 ml/min). Das Eluat wurde in 500 µl-Fractionen aufgefangen, wobei der Hauptanteil des Proteins in den phosphatfreien Fraktionen 4-6 zu finden war (Messung mittels BioRad D_C-Methode). Proteinmengen, deren erwarteter Phosphatgehalt 0,1-1 nmol entsprach (20 µg), sowie je 50 µl der Phosphatstandards wurden mittig in Reagenzgläser gefüllt und bei 95° C eingetrocknet. Nach Zugabe von je 25 µl Veraschungsreagenz wurden die Proben bei

80° C eingetrocknet und anschließend mit einem Gasbrenner zunächst vorsichtig erwärmt, um Kristallwasser zu verdampfen und dann unter intensiver Flamme erhitzt (nicht gegläht), bis der Großteil der entstehenden nitrosen Gase entfernt war und sich ein weißer Niederschlag gebildet hatte. Nach dem Abkühlen wurden 150 µl 1,2 M HCl zugegeben und kräftig gemischt, bis sich alle Partikel vollständig aufgelöst hatten und die Lösung klar war. Die Proben wurden mit je 50 µl Phosphatreagenz versetzt, 20 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 660 nm (gegen Wasser) gemessen, wobei der Nullwert maximal 0,08 betrug.

Phosphatverunreinigungen in den Proteinlösungen wurden ausgeschlossen, in dem jeweils identische Proben mit Phosphatreagenz versetzt und vermessen wurden, ohne die Proben vorher zu veraschen.

4.2.8 Gelfiltrations-Chromatographie von ASA und ASA-Fusionsproteinen

| | |
|----------------------|-----------------------------------|
| Gelfiltrationspuffer | 150 mM NaCl 20 mM NaAc, pH 5,0 |
|----------------------|-----------------------------------|

Mit Hilfe der Gelfiltrations-Chromatographie (Größenausschluss-Chromatographie) lassen sich Moleküle aufgrund ihres hydrodynamischen Volumens, welches in der Regel mit ihrer Molekülgröße korreliert, auftrennen. Mit dieser Methode wurde untersucht, ob die ASA-Fusionsproteine unter sauren Bedingungen Wildtyp-ASA-typische Oktamere bilden, die der ASA im Lysosom Stabilität verleihen (Von Bülow et al., 2002).

Dazu wurde eine Superdex 200 10/30-Säule (Amersham Pharmacia), die an einem Äkta-FPLC-System angeschlossen war, mit 2-fachem Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer äquilibriert und mit 50 µg Protein in TBS beladen. Die Auftrennung über 1,5 Säulenvolumen erfolgte bei 0,25 ml/min. Als Vergleich diente das Elutionsprofil humaner Wildtyp-ASA.

4.2.9 Immunfluoreszenzfärbung

Auf sterilen Deckgläsern kultivierte Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, zweimal je 3 min „sauer gewaschen“ (50 mM Glycin, 150 mM NaCl, pH 3), um an die Oberfläche gebundene Proteine zu entfernen und noch einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in eiskaltem Methanol 10 min fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz wurden die Deckgläser 20 min in 50 mM NH₄Cl in PBS inkubiert, dann zweimal mit TBS gewaschen und bei RT 10 min in 0,3 % Triton X-100 in TBS permeabilisiert. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte über Nacht bei 4° C in Blockierlösung (10 % normales Ziegenserum). Nach 90-minütiger Inkubation (RT) mit dem in 1 % BSA/TBS verdünnten Primärantikörper wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit TBS entfernt. Der ebenfalls in 1 % BSA/TBS verdünnte fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde zusammen mit DAPI (1:250.000 einer 5 mg/ml-Stocklösung), welches die Zellkerne anfärbt, 1 h bei RT auf die Zellen gegeben und diese anschließend zweimal mit TBS gewaschen. Die Deckgläser wurden zur Entfernung von Salzkristallen einmal in HPLC-Wasser, dann in 96 %iges Ethanol getaucht und nach zehnminütigem Trocknen an der Luft mit ProLong® Gold (Invitrogen) eingebettet.

4.3 Mäuse

4.3.1 Transkardiale Perfusion von Mäusen

Durch intraperitoneale Injektion von 0,8 ml 25 mg/ml Tribromethanol wurde die Maus betäubt und nach einigen Minuten die Schmerzunempfindlichkeit durch Kneifen der Vorder- und Hinterpfoten überprüft. Die Bauchhöhle der an den Extremitäten fixierten Maus wurde geöffnet, der Brustkorb aufgeschnitten und das Herz freigelegt. Nach Punktierung des rechten Vorhofes wurden ca. 500 µl Blut, welches sich in der Brusthöhle angesammelt hatte, entnommen und zur Serumgewinnung 8 min bei 13.000 x g zentrifugiert. Eine 21 G-Flügelkanüle (Venofix, Braun) wurde von der Herzspitze gerade in den linken Ventrikel eingestochen und 30 ml PBS mit einer Peristaltikpumpe (Flussrate ca. 6 ml/min) zugeführt.

4.3.2 Homogenisierung von Mausgewebe

| | |
|--|---|
| Homogenisierungspuffer | TBS pH 7,4 0,5 % Triton N-101 |
| Proteaseinhibitoren (Endkonzentrationen) | 2 µg/ml Aprotinin 1 mM EDTA pH 8,0 50 mM Iodacetamid 0,5 µg/ml Leupeptin 0,7 µg/ml Pepstatin A 100 µg/ml Pefabloc SC |

Zur Herstellung eines Rohhomogenates wurden 100-250 mg noch gefrorenes Mausgewebe in 1,5 ml TBS (pH 7,4) aufgenommen und einige Sekunden mit einem Ultra-Turrax bei 24.000 U/min dispergiert. Zur Weiterverarbeitung zum finalen Homogenat wurden die Gewebe wie folgt mit Homogenisierungspuffer versetzt:

| | |
|----------------------|--|
| | Leber, Niere, Milz, Gehirn |
| Proteine: (ELISA) | 333 µl Rohhomogenat wurden mit 999 µl Homogenisierungspuffer incl. Proteaseinhibitoren gemischt und bei -20° C eingefroren |
| Reserve: | ca. 1100 µl Rohhomogenat wurden bei -20° C gelagert |

4.3.3 Bestimmung der Serumhalbwertszeit

Zur Bestimmung der Verweildauer der ASA-Fusionsproteine im Blut nach intravenöser Injektion in die Schwanzvene von ASA-Knockout-Mäusen (Hess et al., 1996) wurden 5 und 120 min nach Injektion Blutproben entnommen. Zur Serumgewinnung wurde das Blut 8 min bei 13.000 x g zentrifugiert und die darin enthaltenen Konzentrationen der ASA-Fusionsproteine mittels ELISA ermittelt. Mit Hilfe der folgenden Gleichungen, die auf dem Zerfallsgesetz basieren, wurden aus den gemessenen Werten die Halbwertszeit und die Serumkonzentration zum Zeitpunkt N_0 bestimmt.

$$T_{\frac{1}{2}} = \frac{(x_2 - x_1) \cdot \ln 2}{\ln y_1 - \ln y_2}$$

$$N_0 = y_1 \cdot 2^{\frac{x_1}{T_{\frac{1}{2}}}}$$

Dabei stellen x_1 und x_2 die Zeitpunkte der Blutentnahme (5 min bzw. 120 min) sowie y_1 und y_2 die in den jeweiligen Serumproben bestimmten Konzentrationen dar.

4.4 Nachweis von ASA und ASA-Fusionsproteinen

4.4.1 Bestimmung rekombinanter humaner ASA und rekombinanter ASA-Fusionsproteine durch indirekten Sandwich-ELISA

Dieses Nachweisverfahren ermöglichte die selektive Quantifizierung rekombinanter humaner ASA bzw. rekombinanter ASA-Fusionsproteine in einem Nachweisbereich zwischen < 50 pg und ca. 1,5 ng.

| | |
|----------------------|--|
| Mikrotestplatten: | <i>Tissue culture plate 96-well (flat bottom)</i> , Sarstedt (Nr. 83.1835) |
| Beschichtungspuffer: | 20 mM Tris-HCl, pH 7,0 |
| Waschpuffer: | 0,1 % Triton X-100 in PBS |
| Blockierungspuffer: | 5 % (w/v) Milchpulver 0,02 % (w/v) Triton X-100 in TBS |
| ABTS-Lösung: | 1 mg ABTS/ml ABTS-Substratpuffer (Roche Applied Science, Nr. 1112597 / 10102946001) |

Die Mikrotestplatte wurde über Nacht bei 4° C mit 0,125 µg Maus-anti-hASA-Antikörper (19-16-3) in 200 µl Beschichtungspuffer je Vertiefung inkubiert, mit je 300 µl Beschichtungspuffer gewaschen und dann mit 200 µl Blockierungspuffer pro Vertiefung 20 min bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach zweimaligem Waschen mit 300 µl Waschpuffer pro Vertiefung wurden je 100 µl Blockierlösung in die Vertiefungen vorgelegt, Standards und Proben zugefügt und schließlich mit entsprechendem Puffer auf je 200 µl aufgefüllt. Nach 90-minütiger Inkubation bei 37° C auf dem Schüttler wurden die Vertiefungen zweimal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend 1 h bei 37° C mit je 50 µl Kaninchen-anti-hASA-Antiserum (BE#3, 1:2000 in Blockierungspuffer verdünnt) ohne Schütteln inkubiert und anschließend erneut zweimal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit je 50 µl Peroxidase-gekoppeltem Ziege-anti-Kaninchen Antikörper je Vertiefung 1:2000 in Blockierungspuffer verdünnt bei 37° C. Nach

dreimaligem Waschen mit je 300 µl Waschpuffer wurden zur enzymatischen Farbreaktion 50 µl ABTS-Lösung in jede Vertiefung gefüllt und wenige Minuten bei RT inkubiert, bis die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 405 nm (Referenzwellenlänge 505 nm) für den höchsten Standard eine OD von ca. 1 ergab. Die in den Proben enthaltene Enzymmenge (rekombinante ASA bzw. rekombinantes ASA-Fusionsprotein) wurde mit Hilfe der für die Standards gemessenen Werte berechnet.

4.4.2 Bestimmung der ASA- bzw. β -Hex-Aktivität

| | |
|--------------------------|--|
| ASA-Substrat | 10 mM p-Nitrocatecholsulfat (Sigma) 10 % (w/v) Natriumchlorid 0,3 % Triton X-100 (nicht essentiell) 0,5 M Natriumacetat, pH 5,0 |
| ASA-Stopplösung | 1 M NaOH |
| β -Hex-Substrat | 10 mM p-NPAG (4-Nitrophenyl N-acetyl- β -D-Glukosaminid, Sigma) 0,2 % BSA 0,3 % Triton X-100 (nicht essentiell) 0,1 M Natriumcitrat, pH 4,6 |
| β -Hex-Stopplösung | 0,4 M Glycin, pH 10,4 (mit 10 M NaOH eingestellt) |

Standardmäßig wurden 20 µl der zu untersuchenden Probe mit 200 µl ASA- bzw. β -Hex-Substrat gemischt, 30 min bei 37° C inkubiert, und anschließend wurde die Reaktion mit 500 µl 1 M NaOH (ASA) bzw. 0,4 M Glycin pH 10,4 (β -Hex) gestoppt. Die Absorption wurde bei 515 nm (ASA) bzw. 405 nm (β -Hex) in 1 cm-Küvetten (Extinktionskoeffizienten: $\varepsilon = 12.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bzw. $18.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) gemessen. Bei niedrigen oder hohen Aktivitäten wurden Inkubationszeiten bzw. Volumina entsprechend variiert. Zur Berechnung der ASA- bzw. β -Hex-Aktivitäten wurden folgende Gleichungen verwendet:

$$\text{ASA:} \quad \frac{mU}{ml} = \frac{\text{Gesamtvolumen [ml]} \cdot 1000}{\varepsilon \cdot \text{Probenvolumen [ml]} \cdot \text{Inkubationszeit [min]}} \cdot OD_{515}$$

$$\beta - \text{Hex:} \quad \frac{mU}{ml} = \frac{\text{Gesamtvolumen [ml]} \cdot 1000}{\varepsilon \cdot \text{Probenvolumen [ml]} \cdot \text{Inkubationszeit [min]}} \cdot OD_{405}$$

4.5 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden in wassergesättigter Atmosphäre bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen unter Verwendung von hitzesterilisierten oder Einmalplastik-Materialien. Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch, soweit nicht anders erwähnt, auf 37° C vorgewärmt.

4.5.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden direkt nach ihrer Entnahme bei 37° C im Wasserbad aufgetaut, bei 200 x g sedimentiert und in frischem Medium aufgenommen. Zum Einfrieren wurden die Zellen einer konfluenten 10 cm-Schale bzw. T75-Flasche durch Inkubation mit 2 ml 0,05 %igem Trypsin-EDTA (Invitrogen) vom Boden abgelöst, nach Zugabe von 8 ml frischem Medium sedimentiert und in 1 ml Zellkulturmedium, dem zuvor 10 % DMSO zugefügt worden waren, aufgenommen. Die Zellen wurden bei -80° C in einer Styropor-Box eingefroren und nach einigen Tagen zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

4.5.2 Kultivierung adhärenter Zellen

Adhärenente Zellen wurden in 10 ml des jeweiligen Mediums auf 10 cm-Schalen bzw. in T75-Flaschen kultiviert. Konfluent gewachsene Zellen wurden mit PBS gewaschen, durch Inkubation mit 2 ml einer 0,05 %igen Trypsin-Lösung vom Boden abgelöst und nach Zugabe von 8 ml Medium sedimentiert. Zum Teilen der Zellen wurde das Zellpellet in 10 ml Medium resuspendiert und ein gewünschtes Volumen der Zellsuspension mit frischem Medium auf 10 ml aufgefüllt.

4.5.3 Kultivierung von CHO-Suspensionszellen

CHO-S Zellen wurden in T175-Flaschen in 21 ml serumfreiem ExCell302-Medium (2 mM L-Glutamin, 100 Units/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1x HT Supplement: (100 µM Hypoxanthin, 16 µM Thymidin) bei 90 U/min auf dem Schüttler kultiviert, bis der enthaltene Indikator Phenolrot den Umschwung zu einem sauren pH durch einen Farbwechsel anzeigte. Durch Ersetzen von ca. 16 ml Zellsuspension durch frisches Medium wurden die Zellen alle 3-4 Tage geteilt.

4.5.4 Transfektion von Zellen

Die transiente Transfektion adhärenter Zellen wurde unter Verwendung des Transfektionsreagenzes Turbofect® (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.5.5 Herstellen von Zellhomogenaten

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

Die Zellen wurden durch Inkubation mit einem angemessenen Volumen 0,05 %igem Trypsin-EDTA (Invitrogen) vom Boden der Zellkulturgefäße gelöst. Anschließend wurde die Trypsin-Aktivität durch Zugabe von PBS/5% FCS blockiert, und die Zellen wurden bei 3.000 x g für 5 min in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in einem für die weitere Verarbeitung angemessenen Volumen Homogenisierungspuffer aufgenommen und die Suspension anschließend kräftig gemischt. Nach dreiminütiger Ultraschall-Behandlung wurde die Lösung erneut kräftig gemischt und verbleibendes Zellmaterial durch Zentrifugation bei 13.000 x g für 5 min bei 4° C abgetrennt. Der Überstand, in dem sich die löslichen Proteine befanden, wurde in ein neues Gefäß überführt und zur Analyse verwendet oder bei -20° C gelagert.

4.5.6 Messung der M6P- bzw. LRP-1-abhängigen Endozytose von ASA und ASA-Fusionsproteinen

| | |
|-------------------|-----------------------------------|
| Saure Waschlösung | 50 mM Glycin 150 mM NaCl, pH 3 |
|-------------------|-----------------------------------|

Die für Endozytoseversuche verwendeten Zellen wurden in entsprechendem Medium in 6-Napf-Zellkulturplatten (bEND.3 und MEF, 200.000 Zellen/Vertiefung) bzw. 12-Napf-Zellkulturplatten (MEF-mpr^{-/-}, CHO-wt und CHO-lrp^{-/-}, 120.000 Zellen/Vertiefung) ausgesät und bis zur Konfluenz 1-2 Tage kultiviert. Die zu endozytierenden Proteine wurden in einer Konzentration von 2,5 µg/ml Medium mit entweder 7,5 mM (Endkonzentration) D-Mannose-6-Phosphat Mononatriumsalz (M6P, Sigma-Aldrich) oder D-Glucose-6-Phosphat Mononatriumsalz (G6P, Sigma-Aldrich) gemischt, und je 1 ml (12-Napf-Zellkulturplatte) bzw. 500 µl (6-Napf-Zellkulturplatte) der Proteinlösungen wurden in jeweils 3 Vertiefungen (pro Bedingung) auf die Zellen gegeben. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und 5 min bei 3000 x g zentrifugiert, um verbleibende Zellen abzutrennen. Die Überstände wurden eingefroren. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen zweimal je 3 min mit der sauren Waschlösung inkubiert, um an die Zelloberfläche gebundene Proteine zu entfernen und anschließend mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch eine etwa dreiminütige Inkubation mit 0,05 % Trypsin-EDTA von der Platte abgelöst, 5 min bei 3000 x g zentrifugiert, in 200 µl PBS aufgenommen und 5 min bei 3000 x g sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und die Zellen in 100 µl Homogenisierungspuffer (0,5 % Triton N-101 in TBS) resuspendiert. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurde die Suspension kräftig durchmischt, 3 min mit Ultraschall behandelt und nach erneutem Durchmischen 5 min bei 13.000 x g zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Die im Überstand enthaltenen Mengen ASA bzw. ASA-Fusionsprotein wurden mittels ELISA ermittelt.

4.5.7 Sekretion neu-synthetisierter lysosomaler Proteine ins Medium

Die Sekretion von Proteinen, die sich auf dem endosomalen Sortierungsweg befinden, kann durch einen durch Zugabe von Ammoniumchlorid erzeugten intrazellulären pH-Anstieg gesteigert werden.

Das Zellkulturmedium von CHO-K1 Zellen, die am Tag zuvor mit den ASA-Fusionskonstrukten transient transfiziert worden waren, wurde bei der Hälfte der Ansätze durch Medium ersetzt, dem 10 mM Ammoniumchlorid zugefügt worden waren. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Sulfataseaktivitäten in den Überständen aller Zellen mittels p-Nitrocatecholsulfat bestimmt und miteinander verglichen.

4.6 Herstellung rekombinanter ASA-Fusionsproteine

4.6.1 Stabile Transfektion von CHO-S Zellen durch Elektroporation

5×10^6 CHO-S Zellen wurden 5 min bei 300 x g sedimentiert und direkt in 700 μ l 4° C-kaltem PBS resuspendiert. Je 60 μ g zuvor linearisiertes Plasmid wurde zugefügt, vorsichtig auf- und abpipettiert und die Suspension in eine 4 mm-Elektroporations-Küvette (*Electroporation cuvette*, Bridge BioScience) überführt. Die Permeabilisierung der Zellmembranen erfolgte im Elektroporationsgerät durch Anlegen eines elektrischen Feldes bei 0,75 kV und 25 μ F in zwei direkt aufeinanderfolgenden Pulsen. Die gemessene Zeitkonstante lag hier bei 0,32 – 0,38 ms. Die Zellen wurden 10 min bei RT in der Küvette stehen gelassen, anschließend in 9 ml 37° C-warmem Medium aufgenommen und in einer T75-Flasche bei 90 U/min (Schüttler) kultiviert. Zwei bis drei Tage nach der Elektroporation wurde durch Zugabe von 1 mg/ml G418 zum Medium mit der Selektion stabil transfizierter Zellen begonnen. Die verwendeten Plasmide enthielten ein Neomycin-Resistenzgen, wodurch Zellen, die das Plasmid nicht stabil ins Genom integriert hatten, durch G418-Behandlung starben. Das G418-enthaltene Medium wurde dreimal wöchentlich erneuert, bis sich nach zwei bis drei Wochen nur noch G418-resistente Zellen in der Kultur befanden.

4.6.2 Generierung stabil transfizierter CHO-S Einzelzellklone

Zur Herstellung von halbflüssigem Medium zur Anzucht von Suspensions-Einzelzellklonen wurden 40 ml Methylcellulosemedium (MethoCult®, Stemcell) über Nacht bei 4° C aufgetaut, mit 60 ml CHO-S Zellkulturmedium kräftig gemischt und 8 ml-Aliquots bei -20° C gelagert. Je 500 vorselektionierte, stabil transfizierte CHO-S Zellen (Zellzahlbestimmung: Neubauer-Zählkammer) wurden 5 min bei 300 x g sedimentiert, in 2 ml FCS resuspendiert und in einem 15 ml-Röhrchen in 8 ml auf RT aufgewärmtem, halbflüssigem Medium aufgenommen, welchem zusätzlich 1 mg/ml G418 zugefügt wurde. Die Zellsuspension wurde mehrmalig invertiert, auf einer 10 cm-Schale ausplattiert und 5-8 Tage ohne weitere Behandlung inkubiert, bis makroskopisch einzelne Zellkolonien sichtbar waren.

Diese wurden mit Hilfe einer 10 µl-Pipette unter mikroskopischer Betrachtung aufgesaugt und in je 200 µl CHO-S Zellkulturmedium (+10 % FCS) in den Vertiefungen einer Mikrottest Zellkulturplatte (*96-well Microtest Plate*, Becton Dickinson) kultiviert.

4.6.3 Detektion und Expansion von CHO-S Einzelzellklonen mit hoher Enzymaktivität

Zur Herstellung großer Mengen rekombinanter ASA-Fusionsproteine wurden CHO-S Einzelzellklone benötigt, die das jeweilige Enzym in hohem Maße exprimieren und ins Medium sekretieren.

Je 120 µl Zellkulturüberstand von in Mikrottest Zellkulturplatten kultivierten CHO-S Einzelzellklonen wurden in die Vertiefungen einer Mikrottestplatte mit konischem Boden überführt und zum Absinken von enthaltenen Zellen 5 min bei 1000 x g zentrifugiert. Je 40 µl zellfreier Überstand wurden parallel in die Vertiefungen zweier Mikrottestplatten mit Flachboden übertragen und mit je 100 µl ASA- bzw. β -Hex-Substrat 3-4 h bei 37° C inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl 1 M NaOH (ASA) bzw. 100 µl 0,4 M Glycin pH 10,4 (β -Hex) wurden die enzymatischen Reaktionen gestoppt und die Absorptionen bei 505 nm (ASA) bzw. 405 nm (β -Hex) im Mikroplattenleser (Tecan) gemessen. Die für die einzelnen Zellkulturüberstände ermittelten ASA-Aktivitäten wurden als Maß für die Zelldichte auf die jeweiligen β -Hex-Aktivitäten bezogen, um Einzelzellklone mit hoher ASA-Aktivität zu ermitteln. Aufgrund des bei abweichender Wellenlänge unbekanntem

Extinktionskoeffizienten sowie der unbekanntenen optischen Schichtdicke konnten keine absoluten Enzymaktivitäten berechnet werden.

Die jeweils drei bis zehn Einzelzellklone mit den höchsten relativen ASA-Aktivitäten und besten Wachstumseigenschaften wurden in serumfreiem CHO-S Zellkulturmedium zunächst in Zellkulturplatten mit größeren Vertiefungen und schließlich in Zellkulturflaschen bei 90 U/min expandiert und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.6.4 Produktion rekombinanter Proteine im miniPerm®-Bioreaktor

Der miniPerm®-Bioreaktor dient der Kultur von nicht- bzw. semi-adhären Zellen in hoher Dichte und wurde hier zur Produktion rekombinanter ASA-Fusionsproteine in CHO-S Zellen verwendet.

Ein Produktionsmodul mit einem Volumen von 40 ml wird durch eine semipermeable Membran (Ausschlussgrenze: 12,5 kDa) von einem Versorgungsmodul mit einem Volumen von 550 ml getrennt. Zellen und sekretierte Proteine verbleiben im Produktionsmodul, wodurch das Medium im Versorgungsmodul separat gewechselt werden kann. Ein Rollmechanismus sorgt für einen optimalen Nährstoff- und Gasaustausch und verhindert, dass sich die Suspensionszellen absetzen.

Stabil transfizierte CHO-S Zellen wurden in T175-Flaschen in serumfreiem ExCell302-Medium herangezogen und schließlich 36 ml einer Zellsuspension mit einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in das Produktionsmodul eingespritzt. 360 ml des gleichen Mediums wurden in das Versorgungsmodul gefüllt und wöchentlich gewechselt. Die Zellen wurden unter Rotation (10 U/min) kultiviert, bis das im Medium enthaltene Phenolrot durch einen Farbumschlag einen sauren pH anzeigte. Folgend wurden zwei- bis dreimal pro Woche 20-24 ml der Zellsuspension entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Die entnommenen Zellen wurden 10 min bei 300 x g sedimentiert und die im Überstand enthaltenen Proteine durch Zugabe von 50 % (w/v) Ammoniumsulfat und langsames Rühren bei 4° C (≥ 10 min) gefällt. Zuvor wurde jeweils ein Aliquot zur Bestimmung der ASA-Aktivität abgenommen, um die im Überstand befindliche Masse an rekombinantem ASA-Fusionsprotein abzuschätzen. Zur Abschätzung wurde eine spezifische ASA-

Aktivität von 40 U/mg angenommen. Gefällte Überstände wurden gesammelt und bei 4° C gelagert, bis ca. 10-30 mg ASA-Fusionsprotein vorhanden waren.

4.6.5 Aufreinigung von ASA-Fusionsproteinen aus Zellkulturüberstand durch Affinitätschromatographie

Gesammelte CHO-S Zellkulturüberstände wurden 30 min bei 1.500 x g zentrifugiert, der Überstand über einen Faltenfilter filtriert und das Pellet zusammen mit dem im Filter zurückgehaltenen Material in $\geq 1/10$ des Ausgangsvolumens TBS gelöst. Die Lösung wurde fünfmal für je mindestens 4 h gegen TBS pH 7,4 bei 4° C dialysiert (Ausschlussgrenze: 14 kDa), das Dialysat 30 min bei 13.000 x g und 4° C zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe eines Sterilfilters (Porendurchmesser: 0,2 μm) filtriert (\rightarrow Ausgangsdialysat).

Bei einer Flussrate von 0,6-1 ml/min (Gravitationsfluss) wurde eine anti-hASA-Immunaффinitätssäule (Frank Matthes, Dissertation) zunächst mit 10-fachem Säulenvolumen TBS äquilibriert und dann mit einer Menge filtriertem Dialysat beladen, die geschätzt ≤ 10 mg ASA-Fusionsprotein enthielt. Anschließend wurde die Säule nacheinander mit je 10-fachem Säulenvolumen TBS pH 7,4, 0,5 M NaCl/TBS pH 7,4 und TBS pH 7,4 gewaschen, um ungebundene Proteine von der Säule zu entfernen. An die Säule gebundene Proteine wurden mit 2-fachem Säulenvolumen 2,8 M $\text{MgCl}_2/0,1$ M NaAc pH 4,5 eluiert und das Eluat in 1 ml-Fraktionen aufgefangen, welche während der Elution durch Zugabe von 2-12 μl 1,2 M Tris-HCl pH 8,9 auf neutralen pH eingestellt wurden. Die Säule wurde direkt im Anschluss mit 15-fachem Säulenvolumen TBS pH 7,4 neutralisiert und zur Lagerung mit 5-fachem Säulenvolumen 0,02 % NaN_3/TBS pH 7,4 beladen. Fraktionen, die ASA-Aktivität enthielten, wurden vereinigt und viermal für mindestens 3 h gegen ~ 100 -faches Volumen TBS pH 7,4 dialysiert und das Dialysat (\rightarrow Enddialysat) bei -20° C gelagert. Entsprechend der Menge ASA-Fusionsprotein im Ausgangsdialysat wurde der Säulenlauf ein- bis zweimal wiederholt und die Enddialysate aller Säulenläufe zusammen in Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheiten (*Amicon® Ultra*, Ausschlussgrenze 30 kDa, Millipore) aufkonzentriert. Die Reinheit der Proteinlösung wurde mittels SDS-PAGE (siehe 4.2.1) und anschließender Proteinfärbung (siehe 4.2.2) überprüft.

5 Ergebnisse

Als Ziel dieser Arbeit sollten rekombinante ASA-Fusionsproteine entwickelt und produziert werden, die zu einem gesteigerten Übertritt der ASA über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und damit einer erhöhten Enzym-Konzentration im Gehirn nach intravenöser Applikation im Rahmen einer Enzymersatztherapie (ERT) führen. Die Fusionsproteine bestehen aus ASA, die über eine flexible Verbindung (Linker) mit verschiedenen Peptiden verbunden ist, die auf unterschiedliche Weise die BHS überwinden können. Als Peptide wurden die Proteintransduktionsdomäne Tat des *trans-activator of transcription* Proteins des humanen Immundefizienz Virus-1 (Aminosäuren 47-57 (Schwarze et al., 1999; Zhang et al., 2010)), die Rezeptorbindedomäne ApoB des humanen Apolipoprotein B (Aminosäuren 3371-3409 (Spencer und Verma, 2007)), zwei publizierte Rezeptorbindemotive des humanen Apolipoprotein E, ApoE-I (Aminosäuren 130-152 (Clayton et al., 1999)) und ApoE-II (Aminosäuren 141-149 als direkt aufeinanderfolgende Wiederholung (Wang et al., 1997)) sowie das synthetische LRP-1 bindende Peptid Angiopep-2 aus der Reihe der Angiopeps (hier als Ang.-2 bezeichnet (Demeule et al., 2008b)) verwendet. Desweiteren wurde die Rezeptor-bindende dritte Domäne des *low density lipoprotein receptor-related protein associated protein* (RAPd3 (Ellgaard et al., 1997)), für das ein effizienter Transport über die BHS gezeigt werden konnte (Pan et al., 2004), an die ASA-Domäne fusioniert.

5.1 Klonierung von ASA-Fusionskonstrukten

Für die Charakterisierung von ASA-Fusionsproteinen und deren Produktion in eukaryotischen Zellen wurden sechs verschiedene Expressionsvektoren kloniert. Dazu wurde zunächst mittels PCR die Vollängen-ASA cDNA aus dem Plasmid pBEH-HT14/CP8 (Stein et al., 1989) unter Einführung zweier Mutationen amplifiziert. Erstens wurde eine stumme Mutation in das letzte Aminosäure-kodierende Codon eingeführt, die zur Generierung einer einmalig vorkommenden NheI-Schnittstelle und Eliminierung des Stopp-Codons führte (GCC TGA → GCT AGC). Außerdem wurden in die flankierenden nicht-kodierenden Bereiche der cDNA eine 5'-terminale HindIII- und eine 3'-terminale EcoRI-Schnittstelle eingefügt. Die so mutierte ASA cDNA wurde über HindIII und EcoRI

in das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA3 (Life Technologies, Darmstadt, Germany) eingefügt (pcDNA3-ASA). Eine Nukleotidsequenz, die für einen flexiblen Linker mit der Aminosäuresequenz LGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (nach Arai et al., 2001) kodiert, wurde über Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden generiert und über NheI/SpeI und EcoRI in das pcDNA3-ASA Plasmid *in frame* inkloniert. Die Nukleotidsequenzen, die für die Peptide Tat, ApoB, ApoE-I, ApoE-II und Ang.-2 kodieren und jeweils mit einem Stopp-Codon enden, wurden ebenfalls über Hybridisierung von komplementären Oligonukleotiden erstellt und über BamHI/BglIII und KpnI an das 3'-Ende vom Linker kloniert. Die RAPd3-kodierende Sequenz wurde über PCR ebenfalls unter Einführung einer 5'-terminalen BglIII- und einer 3'-terminalen KpnI-Schnittstelle aus einer Bakterien-Kultur, die das humane Irap-1 Gen trägt (Klon IRATp970D07128D, Imagenes GmbH, Berlin, Germany) amplifiziert und an den C-Terminus des Linkers kloniert. Zur Herstellung eines ASA-Kontrollplasmids wurde die Vollängen-ASA cDNA (Stein et al., 1989) inklusive Stopp-Codon mittels PCR amplifiziert und über HindIII und XbaI ebenfalls in den pcDNA3-Vektor inkloniert.

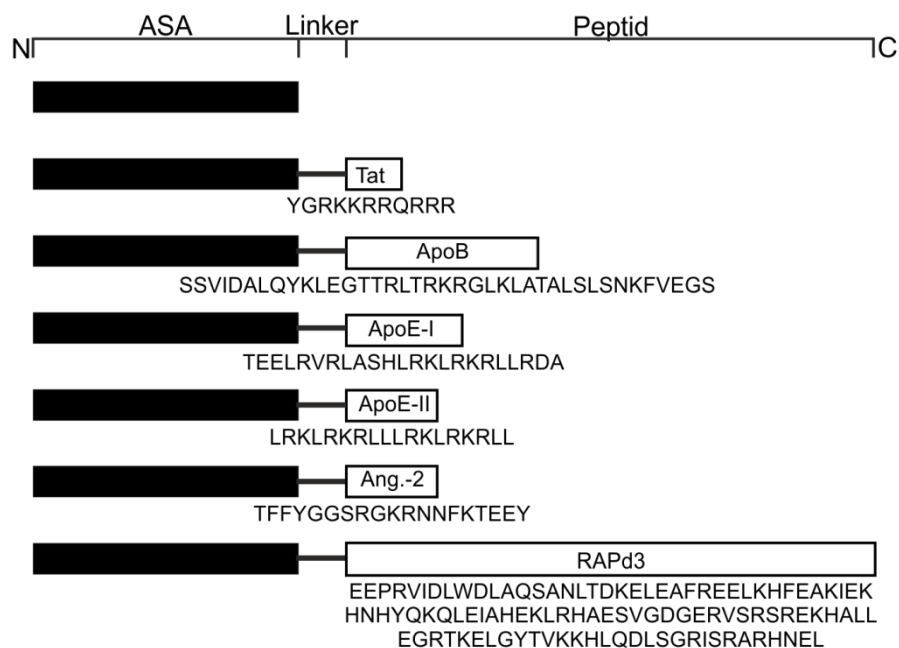


Abbildung 9: Schematische Darstellung der ASA-Fusionsproteine

Die chimären Proteine bestehen aus dem humanen ASA-Polypeptid, einem 21-Aminosäuren langen Linker und einem der sechs Peptide (Tat, ApoB, ApoE-I, ApoE-II, Ang.-2 und RAPd3), deren Aminosäuresequenzen im Ein-Buchstaben-Code angegeben sind. Die Peptide wurden an den C-Terminus kloniert, da die ASA ein N-terminales ER-Importsignal besitzt. Es wurde beobachtet, dass zusätzliche Aminosäuresequenzen am N-Terminus des reifen ASA-Polypeptids in der Regel zur Fehlfaltung und Retention des Proteins im ER führen (unveröffentlichte Daten).

Die Richtigkeit der Sequenzen wurde mittels zyklischer Sequenzierung (GATC Biotech AG, Konstanz) überprüft. In Abbildung 9 sind die daraus resultierenden ASA-Fusionsproteine schematisch dargestellt. Die Klonierung sowie die initiale Charakterisierung des Fusionsproteins ASA-ApoB bis zur Selektion stabil exprimierender Einzelzellen wurde in weiten Teilen von Simeon Knieling (Bachelorstudent) durchgeführt, der von mir betreut wurde.

5.2 Initiale Charakterisierung der ASA-Fusionsproteine

5.2.1 Expression aktiver ASA-Fusionsproteine

Für die Herstellung großer Mengen rekombinanter ASA-Fusionsproteine wurden CHO Zellen als eukaryotisches Expressionssystem ausgewählt, da posttranslationale Modifikationen wie z.B. Glykosylierung, u.a. für die Stabilität und korrekte Sortierung lysosomaler Enzyme entscheidend sind und sich die Modifikationen in prokaryotischen bzw. Hefe-Systemen deutlich unterscheiden.

Zu Beginn wurde getestet, ob die ASA-Fusionsproteine in CHO-K1 Zellen nach transienter Transfektion exprimiert werden. Abbildung 10 zeigt einen Westernblot von Zellhomogenaten, die aus Zellen hergestellt wurden, die mit den pcDNA3-ASA-Fusionskonstrukten bzw. pcDNA3-ASA als Kontrolle transfiziert waren. In allen Spuren (außer ASA) sind Doppelbanden zu erkennen. Die oberen Banden entsprechen vermutlich jeweils den ASA-Fusionsproteinen, da die Molekulargewichte in etwa mit den vorhergesagten Werten übereinstimmen (ASA-Tat: 60 kDa, ASA-ApoB: 62 kDa, ASA-ApoE-I: 62 kDa, ASA-ApoE-II: 61 kDa, ASA-Ang.-2: 61 kDa, ASA-RAPd3: 71 kDa). Die unteren Banden befinden sich auf der Höhe der Wildtyp-ASA-Bande (57 kDa). Es wurde beobachtet, dass Expressionskulturen mit einem hohen Anteil abgestorbener Zellen eine stärkere Bande bei 57 kDa aufweisen. Es wird deshalb vermutet, dass nach Erreichen des Lysosoms der Linker und das jeweilige Peptid enzymatisch abgespalten werden.

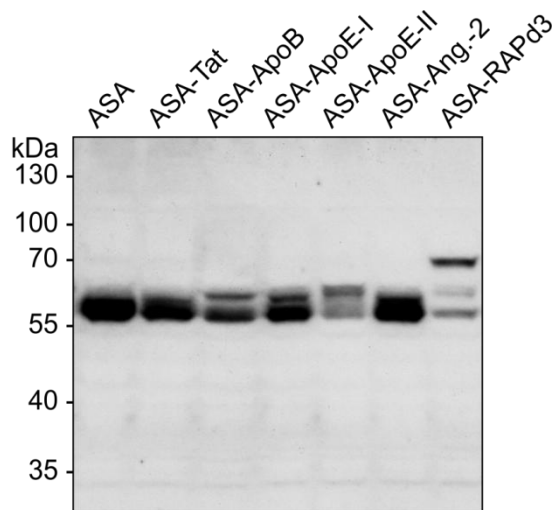


Abbildung 10: Transiente Expression von ASA-Fusionsproteinen

CHO-K1 Zellen wurden mit pcDNA3-ASA bzw. den pcDNA3-ASA-Fusionskonstrukten transfiziert. Je 30 µg Gesamtprotein aus den jeweiligen Zellysaten wurden 48 h nach der Transfektion im SDS-Gel aufgetrennt und ASA bzw. die ASA-Fusionsproteine im Westernblot mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-humane ASA Antikörper (BE# 3, 1:10.000) detektiert.

Die ASA ist als lysosomales Enzym für den intrazellulären Abbau von Sulfatid verantwortlich. Zur Untersuchung der enzymatischen Aktivität der ASA-Fusionsproteine wurde die Sulfataseaktivität von Zellen, die mit dem ASA-Konstrukt bzw. den ASA-Fusionskonstrukten transfiziert waren, bestimmt. Dazu wurde das künstliche Substrat p-Nitrocatecholsulfat verwendet (Baum et al., 1959).

P-Nitrocatecholsulfat ist kein ASA-spezifisches Substrat und wird auch von einigen anderen Sulfatasen umgesetzt. Um die enzymatische Aktivität zu bestimmen, die auf die Überexpression der ASA-Fusionsproteine zurückzuführen ist, wurde außerdem die Sulfataseaktivität in Kontrollzellen, die mit einem Leervektor transfiziert waren, gemessen. Der Mittelwert der in den Kontrollproben gemessenen Sulfataseaktivitäten wurde anschließend von allen Werten abgezogen. Zellen, die ASA bzw. die ASA-Fusionsproteine exprimierten, zeigten im Vergleich zu den Kontrollzellen eine gesteigerte Enzymaktivität (Abbildung 11A). Die Fusion der Peptide führt demnach nicht zu einem generellen Aktivitätsverlust der ASA.

Zusätzlich wurde die Expression der Fusionsproteine mittels eines ELISA bestimmt, der spezifisch für die humane ASA ist (Matzner et al., 2000). Die Ergebnisse zeigen (Abbildung 11B), dass der ELISA neben der Wildtyp-ASA auch die ASA-Domänen der Fusionsproteine detektiert.

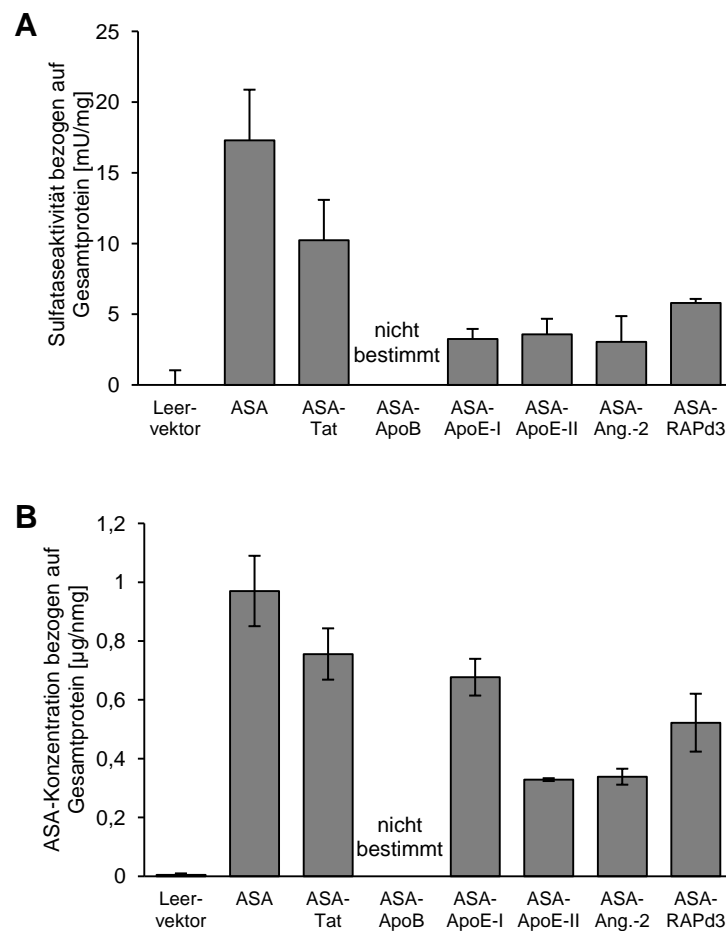


Abbildung 11: Transient exprimierte ASA-Fusionsproteine sind enzymatisch aktiv und mittels ASA-ELISA nachweisbar

- (A) Aktivitäts-Bestimmung der Fusionsproteine. CHO-K1 Zellen wurden mit pcDNA3-ASA, den pcDNA3-ASA-Fusionskonstrukten bzw. dem pcDNA3-Leervektor (als Negativ-Kontrolle) transfiziert. Mit p-Nitrocatecholsulfat wurde 48 h nach der Transfektion die Sulfataseaktivität in den Zellhomogenaten bestimmt. Die Aktivität wurde auf die Gesamtproteinkonzentration, die mittels BioRad D_C-Methode gemessen wurde, bezogen. Der Mittelwert der Aktivitäten in den Kontrollproben (Leervektor) wurde von allen Werten abgezogen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 3).
- (B) Nachweisbarkeit der Fusionsproteine. Mittels ELISA wurde die in den Zellhomogenaten aus (A) vorhandene ASA-Konzentration detektiert und auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen. Wie in (A) wurde der Mittelwerte der ASA-Konzentrationen in den Kontrollproben von allen Werten abgezogen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 3).

5.2.2 Sekretion in das Medium

Lysosomale Enzyme wie ASA werden im ER synthetisiert und gelangen vom Golgi-Apparat aus über den endosomalen Weg zum Lysosom (Brulke und Bonifacino, 2009). Genetisch veränderte lysosomale Enzyme erreichen häufig nicht das Lysosom, da sie durch Fehlfaltung im ER zurückgehalten werden. Eine Methode, die endosomal/lysosomale

Sortierung von Proteinen zu untersuchen, ist die pH-abhängige gesteigerte Ausschüttung von Proteinen aus endosomalen Kompartimenten, die sich auf dem Weg zum Lysosom befinden. In Zellkulturexperimenten kann durch Zugabe von schwachen Basen wie Ammoniumchlorid zum Medium der pH-Wert des endosomalen/lysosomalen Kompartiments erhöht werden (Poole und Ohkuma, 1981). Durch den pH-Anstieg werden neu-synthetisierte lysosomale Proteine nicht mehr zu den Lysosomen transportiert, sondern ins Medium sekretiert (Gonzalez-Noriega et al., 1980). Grund für die Hypersekretion ist die ausbleibende Entkopplung der lysosomalen Enzyme von M6P-Rezeptoren im Endosom und eine resultierende Depletion der Rezeptoren im TGN.

Im Überstand von CHO-K1 Zellen, die mit ASA-Fusionskonstrukten bzw. dem ASA-Konstrukt transfiziert waren, wurde nach Zugabe von 10 mM Ammoniumchlorid ein Anstieg der Sulfataseaktivität gemessen (Abbildung 12). Daraus kann geschlossen werden, dass die ASA-Fusionsproteine nicht im ER zurückgehalten werden. Einige Prozent lysosomaler Enzyme werden auch unter normalen Bedingungen (ohne Ammoniumchlorid) ins Medium abgegeben, vor allem wenn sie überexprimiert werden. Das erklärt die im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Sulfataseaktivität auch in Überständen von Zellen, die nicht mit Ammoniumchlorid inkubiert wurden.

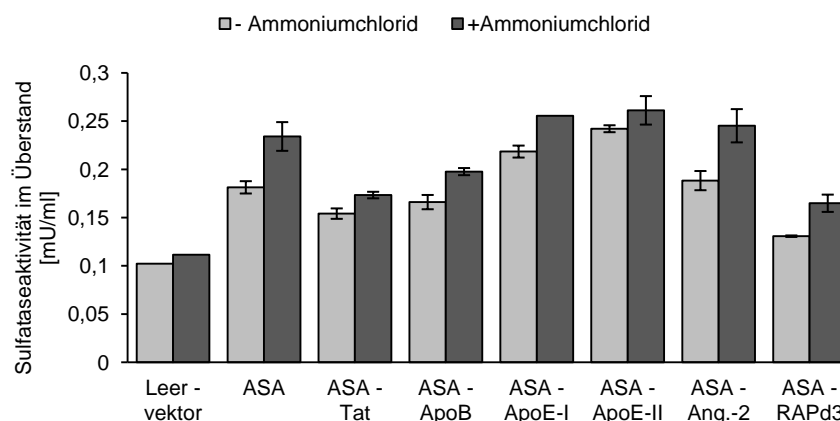


Abbildung 12: Aktivitätsanstieg im Medium nach Ammoniumchlorid-Zugabe

CHO-K1 Zellen wurden mit pcDNA3-ASA, den pcDNA3-ASA-Fusionskonstrukten bzw. dem pcDNA3-Leervektor (als Negativ-Kontrolle) transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, und der Hälfte der Ansätze wurde 10 mM Ammoniumchlorid zugesetzt. Nach weiteren 24 h wurden die Sulfataseaktivitäten in den Überständen der Zellen gemessen (hellgrau – ohne Ammoniumchlorid, dunkelgrau – mit Ammoniumchlorid). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 2-3$).

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass nach transienter Transfektion aktive ASA-Fusionsproteine von CHO-K1 exprimiert und ins Medium abgegeben wurden.

Im folgenden Versuch (Abbildung 13) wurden Überstände von CHO-K1 Zellen, die zuvor ebenfalls mit den pcDNA3-ASA-Fusionskonstrukten transfiziert worden waren, mit einem monoklonalen Maus-anti-humane ASA Antikörper (19-16-3) gemischt und die Antikörper-Antigen-Komplexe anschließend präzipitiert. Die Westernblot Analyse der Immunpräzipitate (Abbildung 13) bestätigt, dass die ASA-Fusionsproteine sowie Wildtyp-ASA ins Medium sekretiert werden. Dieses ermöglichte unter anderem eine einfache Aufreinigung größerer Mengen rekombinanter Proteine, die für die weitere Charakterisierung der ASA-Fusionsproteine benötigt wurden. Außerdem zeigten die Immunpräzipitations-Versuche, dass die ASA-Fusionsproteine an den monoklonalen anti-humane ASA Antikörper 19-16-3 binden, der nur native ASA erkennt. Dieser wird neben dem ASA-ELISA in der im Labor etablierten Aufreinigung rekombinanter humaner ASA durch Immunaффinitätschromatographie verwendet.

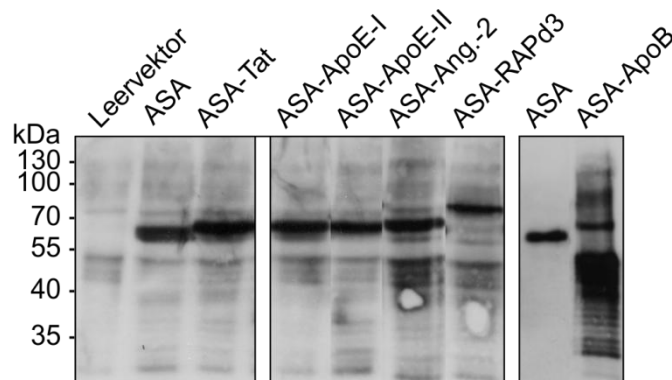


Abbildung 13: Immunpräzipitation von ASA-Fusionsproteinen aus Überständen transient transfizierter CHO-K1 Zellen - Westernblot

CHO-K1 Zellen wurden mit pcDNA3-ASA, den pcDNA3-ASA-Fusionskonstrukten bzw. dem pcDNA3-Leervektor (als Negativ-Kontrolle) transfiziert. Nach 24 h wurden dem Medium 10 mM Ammoniumchlorid zugesetzt, um die Sekretion neu-synthetisierter lysosomaler Proteine zu erhöhen. Nach 48 h wurden ASA und die ASA-Fusionsproteine mit einem monoklonalen Maus-anti-humane ASA Antikörper aus den Zellkulturüberständen präzipitiert. Je 20 μ l Präzipitat wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und ASA bzw. ASA-Fusionsproteine im Westernblot mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-humane ASA Antikörper (BE #3, 1:10.000) detektiert. In der vorletzten Spur wurden zur Kontrolle 15 ng rekombinante ASA aufgetragen.

5.3 Produktion rekombinanter ASA-Fusionsproteine

Nachdem in den ersten Experimenten gezeigt werden konnte, dass nach transienter Transfektion von CHO-K1 enzymatisch aktive ASA-Fusionsproteine exprimiert und ins Medium sezerniert werden, konnte nachfolgend mit der Herstellung größerer Mengen rekombinanter Proteine begonnen werden. Zur Produktion wurden CHO-Suspensionszellen (CHO-S Zellen) als eukaryotisches Zellkultursystem gewählt, welche auch zur Produktion klinisch zugelassener rekombinanter Proteine verwendet werden.

5.3.1 Stabile Expression in CHO-S Zellen

Zur stabilen Expression der ASA-Fusionsproteine wurden CHO-S Zellen mit zuvor linearisierten ASA-Fusionskonstrukten durch Elektroporation transfiziert. Durch zwei- bis dreiwöchige Inkubation mit G418 wurden diejenigen Zellen selektioniert, die das Plasmid, welches eine Neomycin-Resistenzkassette enthält, stabil ins Genom integriert hatten. Zum Nachweis der Sekretion von ASA-Fusionsproteinen wurde die Sulfataseaktivität in Überständen der stabil transfizierten CHO-S Zellen (Mischkultur) mit p-Nitrocatecholsulfat bestimmt. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen eingesetzt.

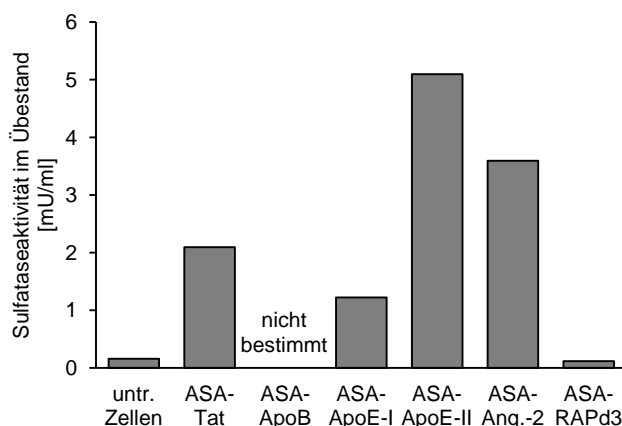


Abbildung 14: ASA-Aktivität in Überständen der Mischkulturen

Pro Ansatz wurden 5 Mio. CHO-S Zellen mit je 60 µg linearisiertem pcDNA3-ASA-Fusionskonstrukt mittels Elektroporation transfiziert und stabil transfizierte Zellen durch zwei- bis dreiwöchige Inkubation mit G418 selektioniert. Zum Nachweis der Expression und Sekretion der ASA-Fusionsproteine ins Medium wurde die Sulfataseaktivität in den Überständen der selektionierten CHO-S Zellen (Mischkulturen) mit p-Nitrocatecholsulfat bestimmt. Als Kontrolle dienten untransfizierte Zellen.

Die stark erhöhten Enzymaktivitäten in den selektionierten ASA-Tat-, ASA-ApoE-I-ASA-ApoE-II- und ASA-Ang.-2-Mischkulturen (Abbildung 14) deuteten darauf hin, dass die Selektion und Anreicherung von Zellen, die die ASA-Fusionsproteine stabil

exprimierten, erfolgreich war. Im Gegensatz dazu zeigten mit dem ASA-RAPd3-Konstrukt transfizierte Zellen keine Aktivitätssteigerung im Medium.

Um optimale Bedingungen für die Produktion von mehreren Milligramm der verschiedenen ASA-Fusionsproteine zu schaffen, wurden Einzelzellklone benötigt, die das jeweilige Fusionsprotein in hohem Maße exprimieren. Dazu wurden die zuvor stabil transfizierten Zellen vereinzelt und ca. 100-300 Einzelzellklone pro Fusionsprotein in einem Rasterverfahren bezüglich ihrer Sulfataseaktivität untersucht. Die Enzymaktivitäten in den Überständen der einzelnen Klone waren sehr unterschiedlich. Abbildung 15 zeigt eine tabellarische Auflistung (A) sowie graphische Darstellung (B) von den jeweils 10 Klonen, bei denen die höchsten Sulfataseaktivitäten im Überstand gemessen wurden. Da die Zellzahlen der einzelnen Klone stark variierten, wurde die Sulfataseaktivität auf die β -Hexosaminidase (β -Hex)-Aktivität in den jeweiligen Überständen als Maß für die Zelldichte normiert. Je ASA-Fusionsprotein wurden die drei bis zehn Zellklone mit den höchsten Sulfataseaktivitäten und besten Wachstumseigenschaften weiter expandiert und bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Unterstriche (A) bzw. Pfeile (B) in Abbildung 15 kennzeichnen die Klone, die im weiteren Verlauf zur Produktion der rekombinanten Proteine verwendet wurden.

Wie aufgrund der fehlenden Sulfataseaktivität im Überstand der ASA-RAPd3-Mischkultur (Abbildung 14) zu erwarten war, konnten auch innerhalb der ca. 300 getesteten Einzelzellklone keine Klone mit ausreichender Sulfataseaktivität gefunden werden. Daher wurde in den folgenden Versuchen nicht mit ASA-RAPd3 weitergearbeitet.

Die Fusionsproteine ASA-Tat (Klon 1-G6), ASA-ApoB (Klon 1-C4), ASA-ApoE-I (Klon 6-A12), ASA-ApoE-II (Klon 13-C10) und ASA-Ang.-2 (Klon 15-B3) wurden über mehrere Wochen in CHO-S Zellen exprimiert. Dazu wurden die Zellen in miniPERM® Bioreaktoren (Sarstedt, Deutschland) kultiviert, die speziell für die effektive Kultivierung von Zellen in hohen Dichten bei gleichzeitiger Produktion rekombinanter Proteine entwickelt wurden.

A

| <i>Bezeichnung des Zellklons</i> | | | | | | | | | | |
|---|----------------------|--------------------|--------------------|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| <i>ASA-Aktivität/β-Hex-Aktivität</i> | | | | | | | | | | |
| ASA-Tat | <i>3-C4</i> | <i>1-B6</i> | <u><i>1-G6</i></u> | <i>2-C9</i> | <i>3-B12</i> | <i>2-G11</i> | <i>1-A3</i> | <i>3-B11</i> | <i>3-D3</i> | <i>1-F6</i> |
| | 1,26 | 1,20 | 1,20 | 1,13 | 0,99 | 0,93 | 0,75 | 0,74 | 0,72 | 0,80 |
| ASA-ApoB | <i>1-D4</i> | <u><i>1-C4</i></u> | <i>1-G3</i> | <i>1-A5</i> | <i>1-C10</i> | <i>2-B1</i> | <i>2-D4</i> | <i>2-E1</i> | <i>2-E9</i> | <i>2-F4</i> |
| | 4,19 | 3,06 | 2,86 | 2,60 | 2,35 | 1,85 | 1,77 | 1,71 | 1,45 | 1,33 |
| ASA-ApoE-I | <u><i>6-A12</i></u> | <i>6-B9</i> | <i>6-B4</i> | <i>6-H12</i> | <i>6-C7</i> | <i>6-F7</i> | <i>6-F11</i> | <i>6-E3</i> | <i>6-H6</i> | <i>6-B3</i> |
| | 0,98 | 0,79 | 0,62 | 0,57 | 0,54 | 0,51 | 0,49 | 0,49 | 0,47 | 0,47 |
| ASA-ApoE-II | <u><i>13-C10</i></u> | <i>13-F5</i> | <i>13-E2</i> | <i>11-A6</i> | <i>13-D12</i> | <i>11-B6</i> | <i>13-E8</i> | <i>13-F7</i> | <i>11-C1</i> | <i>13-C12</i> |
| | 6,98 | 3,75 | 3,54 | 3,50 | 3,47 | 3,45 | 3,37 | 3,08 | 2,79 | 2,62 |
| ASA-Ang.-2 | <u><i>15-B3</i></u> | <i>15-C4</i> | <i>15-A4</i> | <i>15-B4</i> | <i>17-A6</i> | <i>14-A12</i> | <i>14-A6</i> | <i>14-A2</i> | <i>15-C7</i> | <i>15-B2</i> |
| | 7,12 | 5,19 | 4,91 | 4,79 | 4,74 | 3,43 | 3,06 | 2,59 | 4,16 | 4,08 |
| ASA-RAPd3 | <i>7-F6</i> | <i>7-G1</i> | <i>7-D11</i> | <i>7-E11</i> | <i>7-F8</i> | <i>7-F9</i> | <i>7-F10</i> | <i>7-G5</i> | <i>7-E4</i> | <i>7-H8</i> |
| | 0,31 | 0,31 | 0,30 | 0,30 | 0,30 | 0,30 | 0,30 | 0,30 | 0,29 | 0,29 |

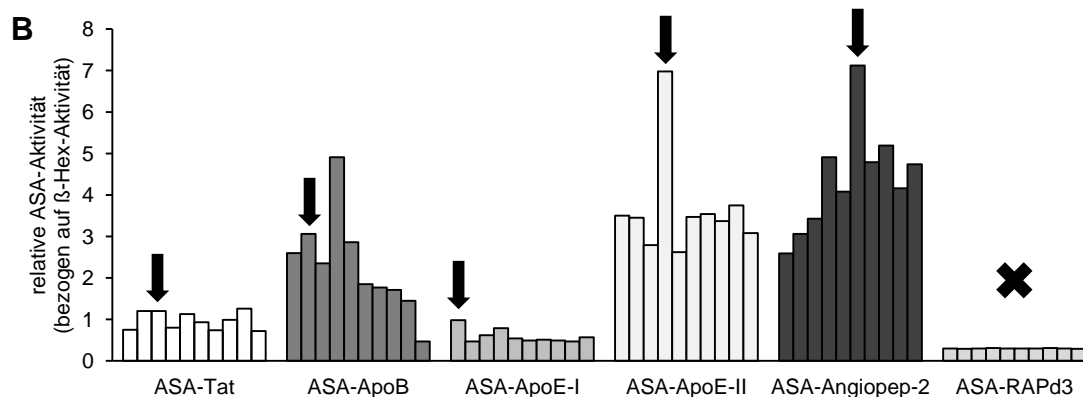


Abbildung 15: Relative ASA-Aktivität in stabil exprimierenden CHO-S Einzelzellklonen

Stabil mit den ASA-Fusionskonstrukten transfizierte CHO-S Zellen wurden vereinzelt und Einzelzellklone in Mikrottest Zellkulturplatten expandiert. Nach zwei bis drei Tagen wurde die Sulfataseaktivität in den Überständen der Einzelzellklone mit p-Nitrocatecholsulfat gemessen und als Maß für die Zelldichte auf die jeweilige β -Hex-Aktivität normiert. Die Klone, die im weiteren Verlauf aufgrund ihrer hohen Sulfataseaktivität und ihres schnellen Wachstums für die Produktion der ASA-Fusionsproteine verwendet wurden, sind in (A) unterstrichen und in (B) mit einem Pfeil markiert. Unter den mit dem ASA-RAPd3-Konstrukt transfizierten Zellen konnte kein Klon mit ausreichender Sulfataseaktivität gefunden werden.

Mit Hilfe von Westernblot Analysen der zwei- bis dreimal wöchentlich gesammelten CHO-S Zellüberstände wurde die Expression der Fusionsproteine kontrolliert. Dazu wurden, wie in Abbildung 16A beispielhaft gezeigt, Zellkulturüberstände der für die

Produktion der Fusionsproteine kultivierten CHO-S Zellklone auf ein SDS-Gel aufgetragen und die rekombinanten Proteine im Westernblot nachgewiesen. Wie bereits in Abschnitt 5.2 erwähnt wurde, gab es starke Evidenzen, dass die fusionierten Peptide im Lysosom proteolytisch von der ASA abgespalten werden. Daher war es für die Produktion der ASA-Fusionsproteine wichtig, das Vorkommen von (toten) Zellen in den gesammelten Überständen möglichst gering zu halten, da nekrotische Zellen ihren lysosomalen Inhalt an das Medium abgeben. Sobald deutlich erkennbare Banden auf Höhe der Wildtyp-ASA im Westernblot detektiert wurden, die auf ein vermehrtes Vorkommen toter Zellen im Medium hindeuteten, wurden die jeweiligen Überstände und Zellen verworfen und frische MiniPERM®-Kulturen angesetzt.

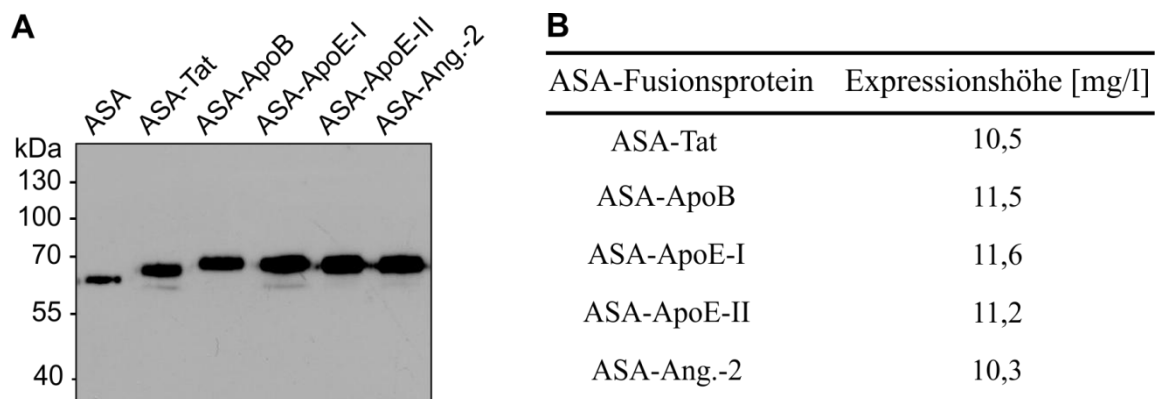


Abbildung 16: Produktion rekombinanter ASA-Fusionsproteine

- (A) Westernblot Analyse. Aufgereinigte ASA (50 ng) bzw. 2,5-10 μ l konditioniertes Medium von CHO-S Zellen, die die ASA-Fusionsproteine stabil exprimierten, wurden pro Spur geladen. Die rekombinanten Proteine wurden mit einem polyklonalen Kaninchen-anti-humane ASA Antikörper (BE #3, 1:10.000) detektiert.
- (B) Expressionshöhe der ASA-Fusionsproteine. Die Sulfataseaktivität in den mehrmals wöchentlich gesammelten Überständen von CHO-S Zellen, die für die Produktion der ASA-Fusionsproteine verwendet wurden, wurde mit p-Nitrocatecholsulfat bestimmt. Die mittlere spezifische ASA-Aktivität, die aus mehreren voneinander unabhängigen Aufreinigungen ermittelt wurde, liegt bei ca. 40 U/mg (Daten nicht gezeigt). Aus dieser für die ASA-Fusionsproteine angenommenen spezifischen Aktivität wurden die ungefähren Expressionshöhen ermittelt.

Durch Messung der Sulfataseaktivität in allen gesammelten Überständen wurden die Expressionshöhen abgeschätzt (Abbildung 16). Dabei wurde eine mittlere spezifische ASA-Aktivität von 40 U/mg als Referenz verwendet. Diese wurde errechnet aus den spezifischen ASA-Aktivitäten, die für ASA-Proben aus mehreren voneinander unabhängigen Aufreinigungen bestimmt worden waren. Die Expressionshöhen lagen für alle ASA-Fusionsproteine zwischen 10 und 13 mg/l.

5.3.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine

Aus den gesammelten CHO-S Überständen, in denen sich jeweils ca. 10-30 mg Fusionsprotein befanden, wurden die rekombinanten Proteine über Immunaффinitätschromatographie unter Verwendung einer anti-hASA-Immunaффinitätsäule aufgereinigt. Die Eluatfraktionen, in denen mittels p-Nitrocatecholsulfat Sulfataseaktivität nachgewiesen werden konnte, wurden vereinigt und gegen TBS dialysiert.

A

| ASA-Fusionsprotein | Proteinkonzentration [mg/ml] | Gesamtausbeute [mg] |
|--------------------|---------------------------------|------------------------|
| ASA-Tat | 2,1 | 9,5 |
| ASA-ApoB | 1,8 | 9,0 |
| ASA-ApoE-I | 2,0 | 8,0 |
| ASA-ApoE-II | 3,5 | 14,0 |
| ASA-Ang.-2 | 3,7 | 19,6 |

B

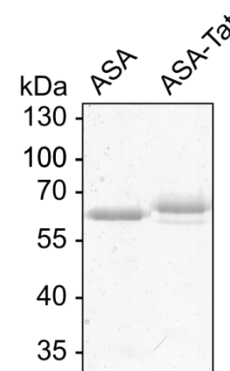


Abbildung 17: Aufreinigung rekombinanter ASA-Fusionsproteine

- (A) Die Fusionsproteine wurden über Affinitätschromatographie unter Verwendung einer anti-hASA-Immunaффinitätsäule aus den gesammelten Zellkulturüberständen aufgereinigt. Die in TBS umgepufferten Proteinlösungen wurden mit Hilfe von Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheiten eingeeengt, um die Proteinkonzentrationen anzugleichen.
- (B) Um das Molekulargewicht und die Reinheit der aufgereinigten rekombinanten Proteine zu kontrollieren, wurden je 2 µg des jeweiligen Fusionsproteins (hier exemplarisch dargestellt: ASA-Tat) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die im Gel enthaltenen Proteine mit Coomassie-Lösung detektiert. Zum Größenvergleich wurden gleiche Mengen ASA aufgetragen.

Anschließend wurden die aufgereinigten Proteinlösungen eingeeengt, um die Konzentrationen der Fusionsproteine zu erhöhen (Abbildung 17A). In Abbildung 17A ist zudem die nach Aufreinigung und Aufkonzentrieren vorhandene Enzymmenge für jedes Fusionsprotein dargestellt, die mittels BioRad D_C-Methode bestimmt wurde. Nach jeder Aufreinigung wurden das Molekulargewicht der Fusionsproteine und die Reinheit der Probe mit Hilfe der SDS-PAGE überprüft. Wie in Abbildung 17B exemplarisch für ASA-Tat gezeigt, konnten durch Coomassie-Färbung keine kontaminierenden Proteine detektiert werden.

5.4 Biochemische Charakterisierung

Um erfolgreich für die Enzyersatztherapie eingesetzt werden zu können, müssen die rekombinanten Fusionsproteine verschiedene biochemische Eigenschaften aufweisen, die in den folgenden Versuchen analysiert wurden.

5.4.1 Spezifische Aktivität

Um mögliche inhibitorische Effekte der fusionierten Peptide auf die enzymatische Funktion der ASA-Domäne zu quantifizieren, wurden die spezifischen Aktivitäten der aufgereinigten ASA-Fusionsproteine bestimmt. Dazu wurde die Sulfataseaktivität mit p-Nitrocatecholsulfat bestimmt und auf die jeweilige Proteinkonzentration bezogen.

| rekombinantes Protein | spezifische Aktivität [U/mg] |
|-----------------------|---------------------------------|
| ASA | 27 |
| ASA-Tat | 29 |
| ASA-ApoB | 30 |
| ASA-ApoE-I | 18 |
| ASA-ApoE-II | 17 |
| ASA-Ang.-2 | 17 |

Tabelle 2: Spezifische Aktivitäten der rekombinanten ASA-Fusionsproteine

ASA-Fusionsproteine wurden aus Überständen kultivierter stabil exprimierender CHO-S Zellen aufgereinigt, während die industriell hergestellte ASA von der Firma Zymenex (Hillerod, Dänemark) zur Verfügung gestellt wurde. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde die Sulfataseaktivität mit p-Nitrocatecholsulfat bestimmt und auf die mittels BioRad D_C Methode ermittelte Proteinkonzentration bezogen.

Die spezifischen Aktivitäten der Fusionsproteine sind in Tabelle 2 gezeigt. Als Kontrolle wurde die spezifische Aktivität der Wildtyp-ASA bestimmt, die von der Firma Zymenex (Hillerod, Dänemark) zur Verfügung gestellt wurde. Die spezifischen Aktivitäten bewegten sich im Bereich zwischen 63 % und 111 % der ermittelten Wildtyp-ASA-Aktivität. Damit konnte gezeigt werden, dass die über den Linker an den C-Terminus der ASA fusionierten Peptide die enzymatische Funktion des Enzyms nicht wesentlich beeinträchtigen.

5.4.2 Glykosylierung

Für die lysosomale Sortierung und Stabilität von ASA ist die korrekte Glykosylierung des Enzyms unabdingbar. Wildtyp-ASA besitzt drei Asn-Reste, die als Glykosylierungsstellen dienen und hauptsächlich mannosereiche N-Glykane tragen (Schröder et al., 2010). Der Linker und die Peptidsequenzen beinhalten keine potenziellen Glykosylierungsstellen. Zum Vergleich der Glykosylierung von ASA und ASA-Fusionsproteinen wurden die rekombinanten Proteine mit dem Enzym EndoH behandelt, welches N-gebundene Oligosaccharide vom mannosereichen Typ abspaltet. Nach Behandlung mit EndoH waren die Molekulargewichte von ASA, ASA-Tat, ASA-ApoB und ASA-ApoE-I um 4,0-4,9 kDa, das von ASA-Ang.-2 um 3,4 kDa (Abbildung 18) erniedrigt. Im Gegensatz dazu wurde für ASA-ApoE-II eine Größenverschiebung von nur 1,1 kDa gefunden.

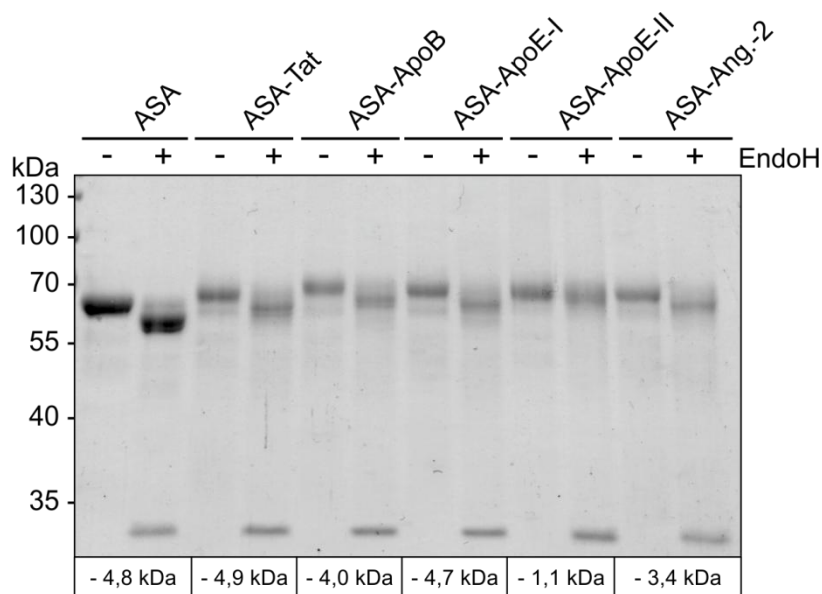


Abbildung 18:
Deglykosylierung
durch EndoH

Zur Abspaltung mannosereicher N-Glykane wurden die rekombinanten Proteine mit 100 U/ μ g EndoH inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Als Vergleich wurden ASA und die Fusionsproteine ohne EndoH unter sonst gleichen Bedingungen behandelt. Die Proteine im Gel (je 1 μ g pro Spur) wurden mit Coomassie-Lösung sichtbar gemacht. Die Angaben unter den jeweiligen Spuren bezeichnen die mittlere Molekulargewichtsabnahme nach EndoH-Behandlung. Die Banden bei < 35 kDa stammen von der EndoH, welche ein Molekulargewicht von 29 kDa besitzt.

Wenn ASA und ASA-ApoE-II dagegen mit PNGase F behandelt wurden, welches alle drei Typen N-gebundener Oligosaccharide (mannosereich, hybrid, komplex) spaltet, wurde in beiden Fällen eine Größenabnahme von 6,0-7,1 kDa detektiert (Abbildung 19).

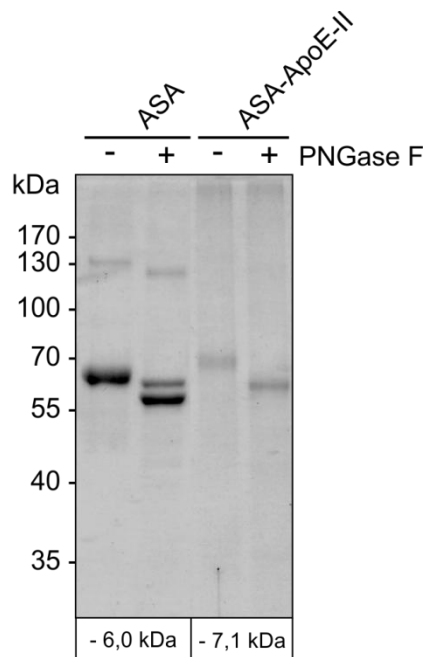


Abbildung 19: Deglykosylierung durch PNGase F

ASA und ASA-ApoE-II wurden zur Abspaltung aller drei N-Glykan-Typen (mannosereich, hybrid, komplex) mit 100 mU/ μ g PNGase F behandelt und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (aufgetragen wurde je 1 μ g Protein). Als Vergleich wurden die rekombinanten Proteine ohne PNGase F unter sonst gleichen Bedingungen behandelt. Das Gel wurde mit Coomassie-Lösung gefärbt. Die Angaben unter den jeweiligen Spuren bezeichnen die Molekulargewichtsabnahme nach PNGase F-Behandlung.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass mannosereiche N-Glykane bei der Wildtyp-ASA und allen ASA-Fusionsproteinen mit Ausnahme von ASA-ApoE-II vorherrschen, welches einen hohen Anteil N-gebundener Zuckerseitenketten vom Hybrid- und/oder Komplex-Typ aufweist.

5.4.3 M6P-Gehalt

Wie andere lysosomale Enzyme trägt die ASA an ihren N-Glykanen M6P-Reste, die ihre Endozytose und lysosomale Sortierung über den MPR300 vermitteln (Sommerlade et al., 1994; Coutinho et al., 2012). Der Polypeptidanteil der ASA ist nicht phosphoryliert, so dass der M6P-Gehalt über den Gesamtphosphatgehalt des Glykoproteins bestimmt werden kann (Schröder et al., 2010). Zur Bestimmung des M6P-Gehalts der Fusionsproteine sowie der Wildtyp-ASA als Kontrolle wurde anorganisches Phosphat durch Veraschung aus den M6P-Gruppen freigesetzt und nach Komplexierung mit Ammoniummolybdat und Malachitgrün photometrisch quantifiziert (Buss und Stull, 1983). Zuvor wurden Verunreinigungen durch lösliches Phosphat über Größenausschlusschromatographie aus den Proben entfernt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

| rekombinantes Protein | mol M6P / mol Protein |
|-----------------------|-----------------------|
| ASA | 2,82 ± 0,33 |
| ASA-Tat | 2,77 ± 0,28 |
| ASA-ApoB | 2,37 ± 0,18 |
| ASA-ApoE-I | 2,64 ± 0,05 |
| ASA-ApoE-II | 1,17 ± 0,14 |
| ASA-Ang.-2 | 2,26 ± 0,12 |

Tabelle 3: M6P-Gehalt der ASA-Fusionsproteine

Durch Veraschung wurde der M6P-Gehalt der rekombinanten Proteine ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 4-6).

Durch das detektierte molare Verhältnis von durchschnittlich 2,8 M6P-Resten pro ASA-Molekül konnten vorherige Ergebnisse reproduziert werden (Matthes et al., 2011). Die ASA-Fusionsproteine besaßen mit 80-95 % der normalen M6P-Konzentration ähnlich viele M6P-Reste. Die einzige Ausnahme bildete ASA-ApoE-II, welches mit nur durchschnittlich 1,2 M6P-Molekülen weniger als 50 % des normalen M6P-Gehalts aufwies.

5.4.4 Oktamerisierung

Im lysosomalen Kompartiment ist die ASA einer Vielzahl von Cathepsinen ausgesetzt, bei denen es sich um lysosomale Proteasen mit diversen proteolytischen Aktivitäten handelt. Unter den sauren pH-Bedingungen der Lysosomen setzen sich je vier ASA-Dimere zu Oktameren zusammen (Abbildung 5), wodurch Cathepsin-L Schnittstellen abgeschirmt und der lysosomale Abbau des Enzyms verhindert wird (Von Bülow et al., 2002).

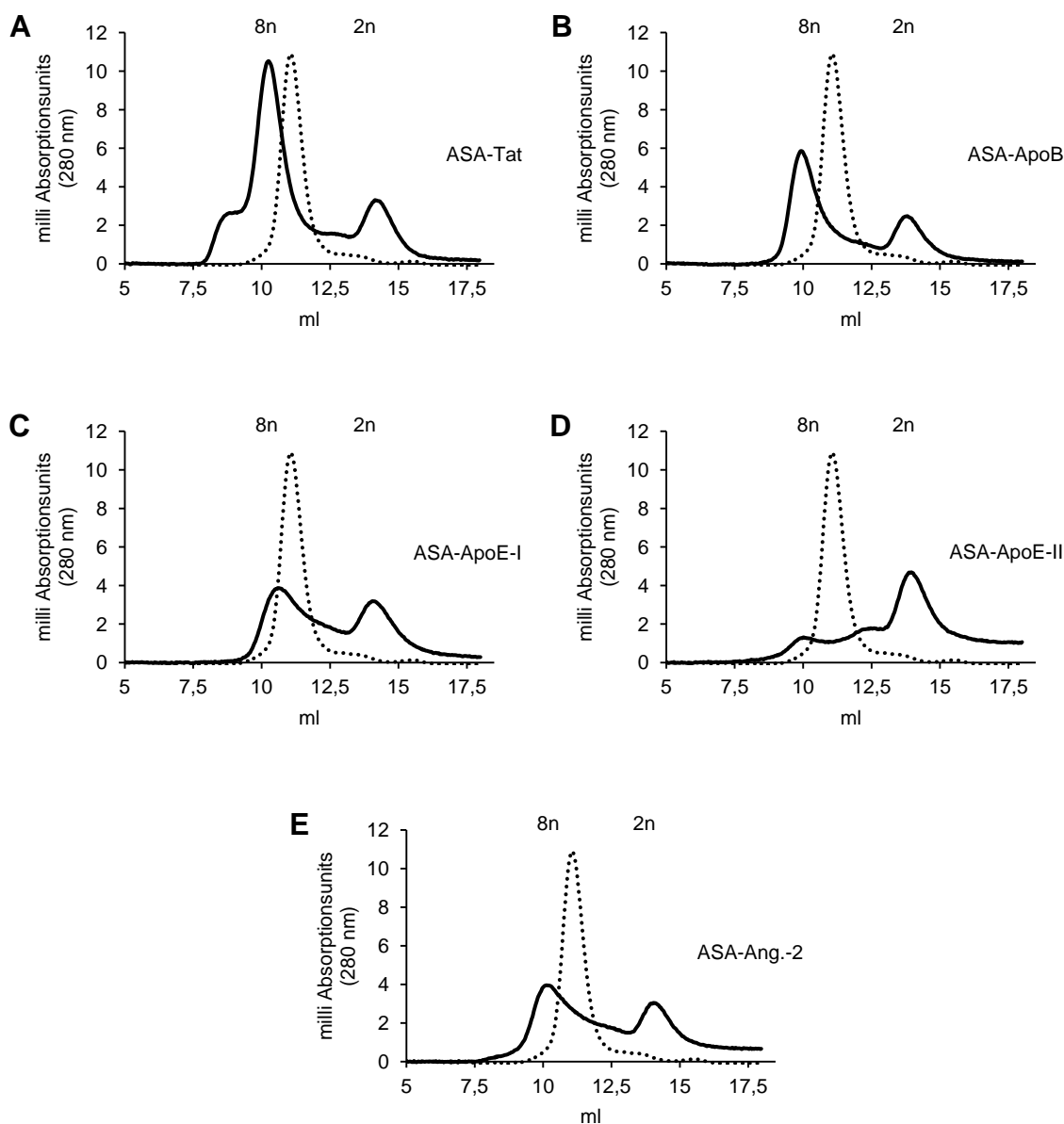


Abbildung 20: Oktamerisierung der ASA-Fusionsproteine

Wildtyp-ASA bzw. ASA-Fusionsproteine wurden bei pH 5 durch Gelfiltration aufgetrennt. Dargestellt sind die Elutionsprofile der Fusionsproteine (durchgezogene Linien) im Vergleich zu dem der Wildtyp-ASA (gestrichelte Linie). 8n = Oktamer, 2n = Dimer.

Die Oktamerisierung der Fusionsproteine wurde durch Gelfiltration bei pH 5 untersucht (Abbildung 20). Unter diesen sauren Bedingungen war eine effektive Oktamerisierung der Wildtyp-ASA zu sehen und ASA-Dimere und -Monomere waren kaum bzw. nicht erkennbar (Abbildung 20A-E, gestrichelte Linie). Auch die ASA-Fusionsproteine formten Oktamere und Monomere wurden nicht detektiert (Abbildung 20A-E, durchgezogene Linie). Allerdings war der Anteil der Dimere im Vergleich zur Kontrolle (ASA) erhöht. Für ASA-ApoE-II (Abbildung 20D) war der Anstieg am höchsten und es waren mehr Dimere als Oktamere zu finden. Das Oktamer/Dimer-Verhältnis korrelierte dabei weder mit der Länge der fusionierten Peptide noch mit dem prozentualen Gehalt basischer oder saurer Aminosäuren (ASA-Tat > ASA-ApoB > ASA-ApoE-I/ASA-Ang.-2 > ASA-ApoE-II; siehe dazu Abbildung 9). Folglich lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass die fusionierten Peptide die Oligomerisierung der ASA-Fusionsproteine nicht verhindern, Oktamere aber abhängig vom Peptid in unterschiedlichem Ausmaße destabilisiert werden.

5.4.5 Lysosomale Sortierung der ASA-Fusionsproteine

Bei der ERT erfordert die metabolische Korrektur ASA-defizienter Zellen eine lysosomale Sortierung des extrazellulären lysosomalen Enzyms. Um den intrazellulären Transport substituierter ASA-Fusionsproteine in einem Zellkulturmodell der MLD zu analysieren, wurden ASA-defiziente MEF Zellen (MEF-asa^{-/-}) (Hess et al., 1996) mit den Fusionsproteinen bzw. zur Kontrolle mit ASA gefüttert. Die Ko-Färbung von ASA und dem lysosomalen Protein *lysosomal-associated membrane protein 2* (LAMP2) zeigt eine endosomal/lysosomale Lokalisation von Wildtyp-ASA, ASA-Tat, ASA-ApoB und ASA-ApoE-I. Auch ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 waren in LAMP2-positiven Vesikeln lokalisiert, allerdings war die Anzahl der Vesikel, in denen das jeweilige Fusionsprotein detektiert werden konnte, deutlich verringert (Abbildung 21).

Daraus resultiert, dass die Peptide die korrekte lysosomale Sortierung der ASA-Domäne nicht verhindern, nachdem die Fusionsproteine über MPR300 oder andere Wege internalisiert wurden.

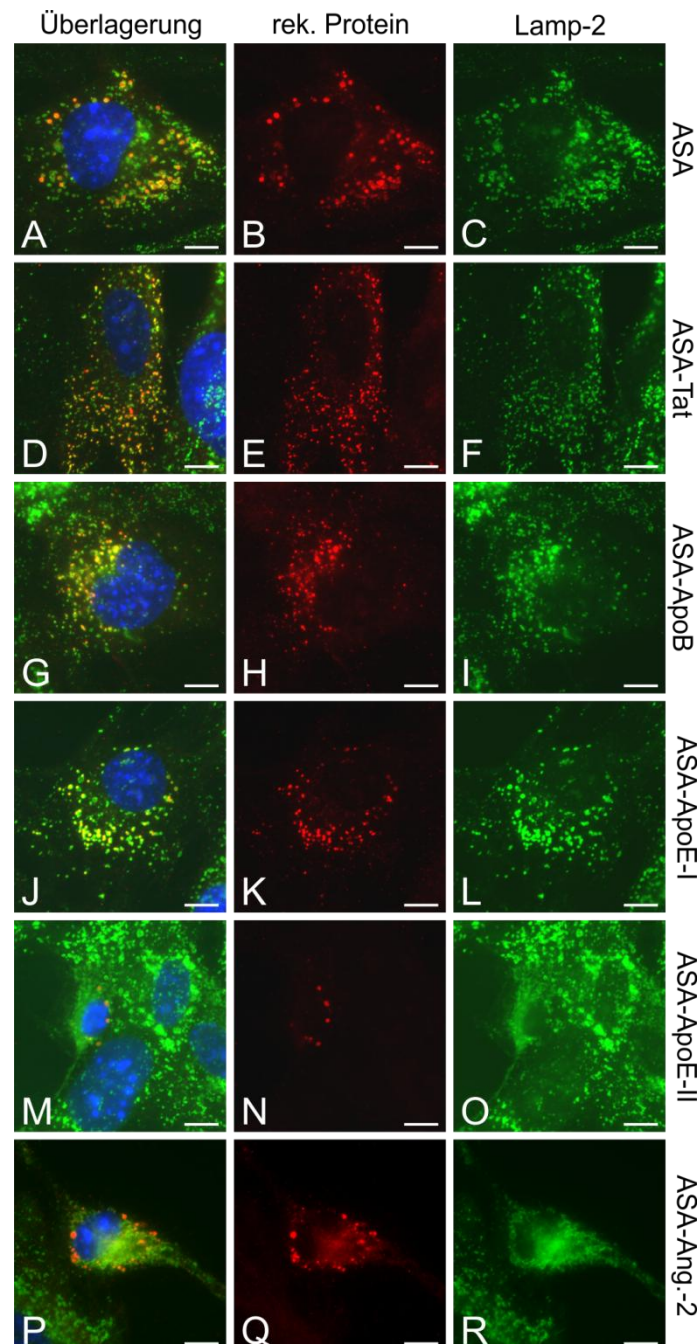


Abbildung 21: Immunfluoreszenzfärbung zur Untersuchung der intrazellulären Sortierung extrazellulär zugegebener ASA-Fusionsproteine

ASA-defiziente MEF Zellen (MEF-asa^{-/-}) wurden 24 h mit 2,5 µg/ml ASA (A-C), ASA-Tat (D-F), ASA-ApoB (G-I), ASA-ApoE-I (J-L), ASA-ApoE-II (M-O) bzw. ASA-Ang.-2 (P-R) inkubiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden ASA bzw. die Fusionsproteine (rot dargestellt) mit einem affinitätsgereinigten polyklonalen Kaninchen-anti-humane ASA Antikörper (PFA-hASA) und Lysosomen (grün dargestellt) mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen das lysosomale Protein LAMP2 gerichtet ist (Abl-93), detektiert. Die Überlagerungsbilder (linke Spalte) zeigen zudem Zellkerne, die mit DAPI gefärbt wurden. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm.

5.5 Endozytose-Versuche

Im Hinblick auf eine mögliche Verwendung in der ERT wurde die zelluläre Aufnahme der Fusionsproteine untersucht. Dabei sollte u.a. analysiert werden, ob die Fusionsproteine genauso wie die Wildtyp-ASA M6P-vermittelt endozytiert werden, und ob die Fusionsproteine zudem über zusätzliche Wege in die Zellen gelangen.

5.5.1 Endozytose von Wildtyp-ASA durch endotheliale und nicht-endotheliale Zellen

In einer ersten Serie von Zellkulturexperimenten wurde die intrazelluläre Aufnahme von Wildtyp-ASA in zwei verschiedene Zelltypen Gehirn-endothelialen Ursprungs (bEND.3, PBCEC) und zwei Zelltypen nicht-endothelialen Ursprungs (CHO-K1, MEF) verglichen. CHO-K1 und MEF Zellen endozytierten 71- bzw. 47-mal mehr ASA als bEND.3 Zellen (Abbildung 22). Die Aufnahme von PBCEC lag 37- bzw. 24-fach unter der von CHO-K1 und MEF Zellen, obwohl die PBCEC mit einer 40-fach höheren ASA-Konzentration inkubiert worden waren.

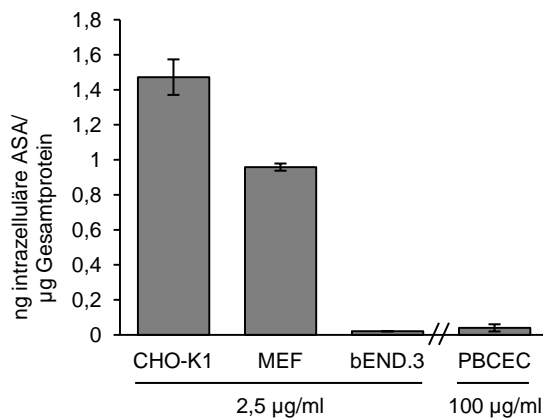


Abbildung 22: Aufnahme von Wildtyp-ASA in Zellen des peripheren und zentralen Gewebes

CHO-K1, MEF und bEND.3 Zellen wurden mit 2,5 µg/ml ASA gefüttert. Nach 24-stündiger Inkubation wurden an die Zelloberfläche gebundene Proteine durch einen sauren Waschschrift entfernt. Die intrazelluläre Enzymkonzentration wurde mittels ELISA gemessen und auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen. Zur Bestimmung der Aufnahme in PBCEC wurden Zellen, die zur Messung des transendothelialen Übertritts rekombinanter ASA auf einem Filter ausgesät waren (siehe dazu Abschnitt 5.6), mit

0,1 mg/ml ASA inkubiert. Die intrazelluläre ASA-Konzentration wurde ebenfalls nach 24 h mittels ELISA bestimmt und auf die Gesamtproteinkonzentration bezogen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3-5$).

5.5.2 Endozytose von ASA-Fusionsproteinen

Zur Analyse der zellulären Aufnahme der Fusionsproteine wurden CHO-K1, MEF und bEND.3 Zellen mit ASA-Tat, ASA-ApoB, ASA-ApoE-I, ASA-ApoE-II bzw. ASA-Ang.-2 gefüttert und die Aufnahmen mit der von Wildtyp-ASA verglichen. In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass sehr unterschiedliche Mengen der verschiedenen ASA-Fusionsproteine durch CHO-K1 und MEF Zellen aufgenommen wurden.

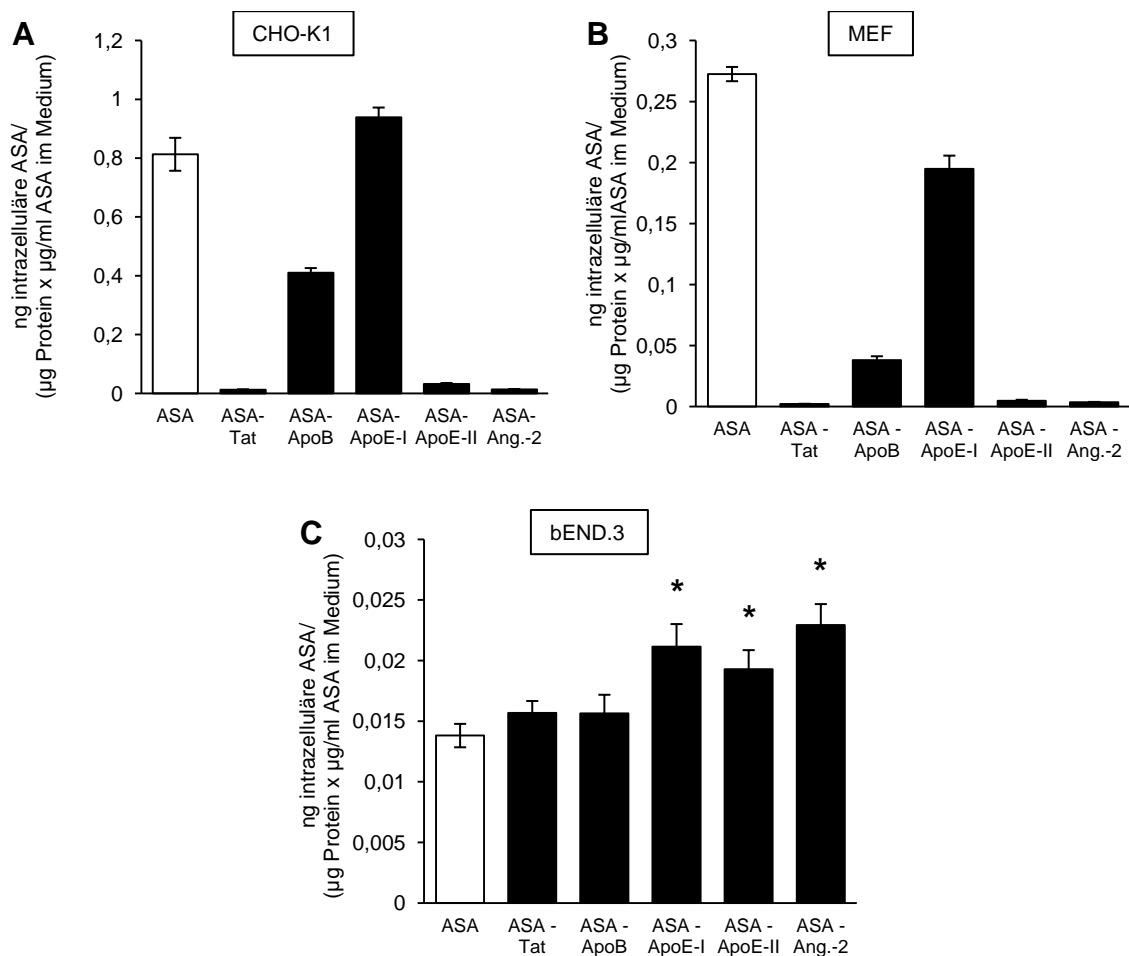


Abbildung 23: Aufnahme von ASA-Fusionsproteinen

ASA-Fusionsproteine wurden in einer Endkonzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ zu CHO-K1 (A), MEF (B) und bEND.3 Zellen (C) gegeben. Nach Entfernung an die Zelloberfläche gebundener Proteine durch saures Waschen der Zellen 24 h nach Zugabe der rekombinanten Proteine wurde die intrazelluläre ASA-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Als Kontrolle wurden Zellen unter den gleichen Bedingungen mit Wildtyp-ASA gefüttert. Die Aufnahme ist wiedergegeben als $\frac{\text{ng intrazelluläre ASA}}{\mu\text{g Protein} \times \mu\text{g/ml ASA(-Fusionsprotein) im Medium}}$. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$). Statistisch signifikante Unterschiede zur Wildtyp-ASA sind in (C) mit einem Stern gekennzeichnet (t-Test, $p < 0,05$).

Zum Beispiel war die Aufnahme von ASA-Tat, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 durch CHO-K1 Zellen um mehr als 96 % und die von ASA-ApoB um 50 % geringer als die von Wildtyp-ASA (Abbildung 23A). ASA-ApoE-I wurde dagegen mit 115 % besser als Wildtyp-ASA aufgenommen. Ähnliche Peptid-spezifische Unterschiede wurden auch für MEF Zellen gefunden (Abbildung 23B). ASA-ApoB und ASA-ApoE-I wurden mit 14 bzw. 72 % der Endozytoserate von Wildtyp-ASA vergleichsweise effizient endozytiert, wogegen die Aufnahme von ASA-Tat, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 mit 1-2 % deutlich vermindert war.

Verglichen mit den zuvor beschriebenen nicht-endothelialen Zellen war die Aufnahme sowohl der Fusionsproteine als auch der Wildtyp-ASA in bEND.3 Zellen wesentlich niedriger (Abbildung 23C). Innerhalb der Fusionsproteine und im Vergleich zur Kontrolle waren geringere Unterschiede zu verzeichnen und die Endozytose von ASA-ApoE-I, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 war im Vergleich zu Wildtyp-ASA um 54, 40 bzw. 66 % statistisch signifikant gesteigert. Für ASA-Tat und ASA-ApoB war nur eine Tendenz zu vermehrter Aufnahme zu beobachten.

5.5.3 M6P-abhängige Aufnahme

Um den Einfluss der Peptide auf die M6P-abhängige Aufnahme genauer zu untersuchen, wurde der MPR300 von CHO-K1, MEF und bEND.3 Zellen durch kompetitiv wirksame Konzentrationen von M6P (7,5 mM) blockiert. Als Kontrolle wurde in Parallelansätzen das C-2-Epimer G6P, welches keine inhibitorische Wirkung auf MPRs ausübt (Fischer et al., 1982), zugefügt. ASA und ASA-Fusionsproteine wurden wie zuvor in einer Konzentration von 2,5 µg/ml zugegeben. Bei den in Tabelle 4 gezeigten G6P-Ansätzen handelt es sich um Werte, die in Abbildung 23 zur besseren Veranschaulichung bereits graphisch dargestellt wurden.

Wie zu erkennen ist (Tabelle 4), wurden alle ASA-Fusionsproteine sowie Wildtyp-ASA unter M6P-Bedingungen durch CHO-K1 und MEF Zellen signifikant weniger effizient aufgenommen als in Abwesenheit des Inhibitors (Sterne in Tabelle 4 kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen M6P- und G6P-Bedingungen). Zum Beispiel war die Aufnahme von ASA-ApoB und ASA-ApoE-I in CHO-K1 Zellen nach Zugabe von M6P um mehr als 98 % vermindert. ASA-Tat, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 wurden zu 76, 80 bzw. 69 % ebenfalls schlechter endozytiert. In den endothelialen bEND.3 Zellen war die

Auswirkung von M6P auf die zelluläre Aufnahme weniger ausgeprägt. Abhängig vom Fusionsprotein war die Endozytose um maximal 27 % (ASA-ApoE-I) vermindert (Wildtyp-ASA: 47 %) und die M6P-abhängige Abnahme erreichte im Falle von ASA-Tat, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 keine statistische Signifikanz.

Die Ergebnisse bestätigen, dass alle ASA-Fusionsproteine über MPR300 endozytiert werden, die Beteiligung des Rezeptors an der Gesamtaufnahme allerdings abhängig vom Zelltyp und vom fusionierten Peptid beträchtlich variiert.

| | CHO-K1 + G6P | MEF + G6P | bEND.3 + G6P |
|-------------|-------------------|-----------------|-------------------|
| | CHO-K1 + M6P | MEF + M6P | bEND.3 + M6P |
| ASA | 0,8130 ± 0,0560 | 0,2725 ± 0,0058 | 0,0138 ± 0,0010 |
| | 0,0049 ± 0,0002 * | 0,0018 ± 0,0001 | 0,0073 ± 0,0005 * |
| ASA-Tat | 0,0126 ± 0,0001 | 0,0021 ± 0,0002 | 0,0157 ± 0,0010 |
| | 0,0030 ± 0,0003 * | 0,0016 ± 0,0001 | 0,0141 ± 0,0007 |
| ASA-ApoB | 0,4102 ± 0,0159 | 0,0381 ± 0,0032 | 0,0156 ± 0,0015 |
| | 0,0062 ± 0,0003 * | 0,0028 ± 0,0001 | 0,0123 ± 0,0006 * |
| ASA-ApoE-I | 0,9388 ± 0,0332 | 0,1949 ± 0,0108 | 0,0212 ± 0,0019 |
| | 0,0036 ± 0,0001 * | 0,0028 ± 0,0004 | 0,0154 ± 0,0010 * |
| ASA-ApoE-II | 0,0321 ± 0,0032 | 0,0048 ± 0,0008 | 0,0193 ± 0,0016 |
| | 0,0064 ± 0,0004 * | 0,0021 ± 0,0003 | 0,0175 ± 0,0004 |
| ASA-Ang.-2 | 0,0132 ± 0,0010 | 0,0035 ± 0,0003 | 0,0229 ± 0,0017 |
| | 0,0041 ± 0,0003 * | 0,0028 ± 0,0002 | 0,0227 ± 0,0014 |

Tabelle 4: M6P-abhängige Endozytose von ASA-Fusionsproteinen

CHO-K1, MEF und bEND.3 Zellen wurden wie angegeben mit 2,5 µg/ml ASA bzw. ASA-Fusionsprotein gefüttert. Zur Blockierung der MPR-vermittelten Endozytose wurden die Zellen mit 7,5 mM M6P (obere Werte) oder mit G6P als Kontrolle (untere Werte) ko-inkubiert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37° C wurden an die Zelloberfläche gebundene Proteine durch einen sauren Waschschrift entfernt und die intrazellulären Enzymkonzentrationen mittels ELISA bestimmt. Die Aufnahme ist wiedergegeben als ng intrazelluläre(s) ASA(-Fusionsprotein)/(µg lösliches Gesamtprotein * µg/ml ASA (-Fusionsprotein) im Medium). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 3 pro Bedingung). Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen M6P- und G6P-Fütterungen unter sonst gleichen Bedingungen (*t*-Test, p < 0,05).

5.5.4 M6P-unabhängige Aufnahme

Zur gesteigerten Überwindung der BHS wurde die ASA wie einleitend erwähnt an Peptide fusioniert, für die eine gesteigerte BHS-Permeabilität bereits beschrieben wurde. Um den Einfluss der Peptide auf die MPR300-unabhängige Aufnahme der ASA-Fusionsproteine in Gehirndothelzellen zu analysieren, die *in vivo* unter Beteiligung weiterer Zellen die BHS bilden, wurden bEND.3 Zellen in Anwesenheit von 7,5 mM M6P mit ASA bzw. den ASA-Fusionsproteinen inkubiert. Die Blockierung des Rezeptors führte zu einer um den Faktor 2-3 gesteigerten Aufnahme der ASA-Fusionsproteine im Vergleich zur Wildtyp-ASA (Abbildung 24 und Tabelle 4, untere Werte).

Um mögliche Nebeneffekte hoher M6P-Konzentrationen zu vermeiden, sollte die M6P-unabhängige Aufnahme der Fusionsproteine in MPR300-defizienten MEF (MEF-mpr^{-/-}) Zellen (Pohlmann et al., 1995) bestimmt werden. Wie schon für bEND.3 Zellen in Anwesenheit von M6P zu beobachten war (Abbildung 24A), wurden die ASA-Fusionsproteine auch in MEF-mpr^{-/-} Zellen signifikant effizienter aufgenommen als Wildtyp-ASA (Abbildung 24C). Somit wurde gezeigt, dass durch die an die ASA fusionierten Peptide eine MPR300-unabhängige Aufnahme in endotheliale (bEND.3) sowie nicht-endotheliale Zellen (MEF-mpr^{-/-}) vermittelt wird.

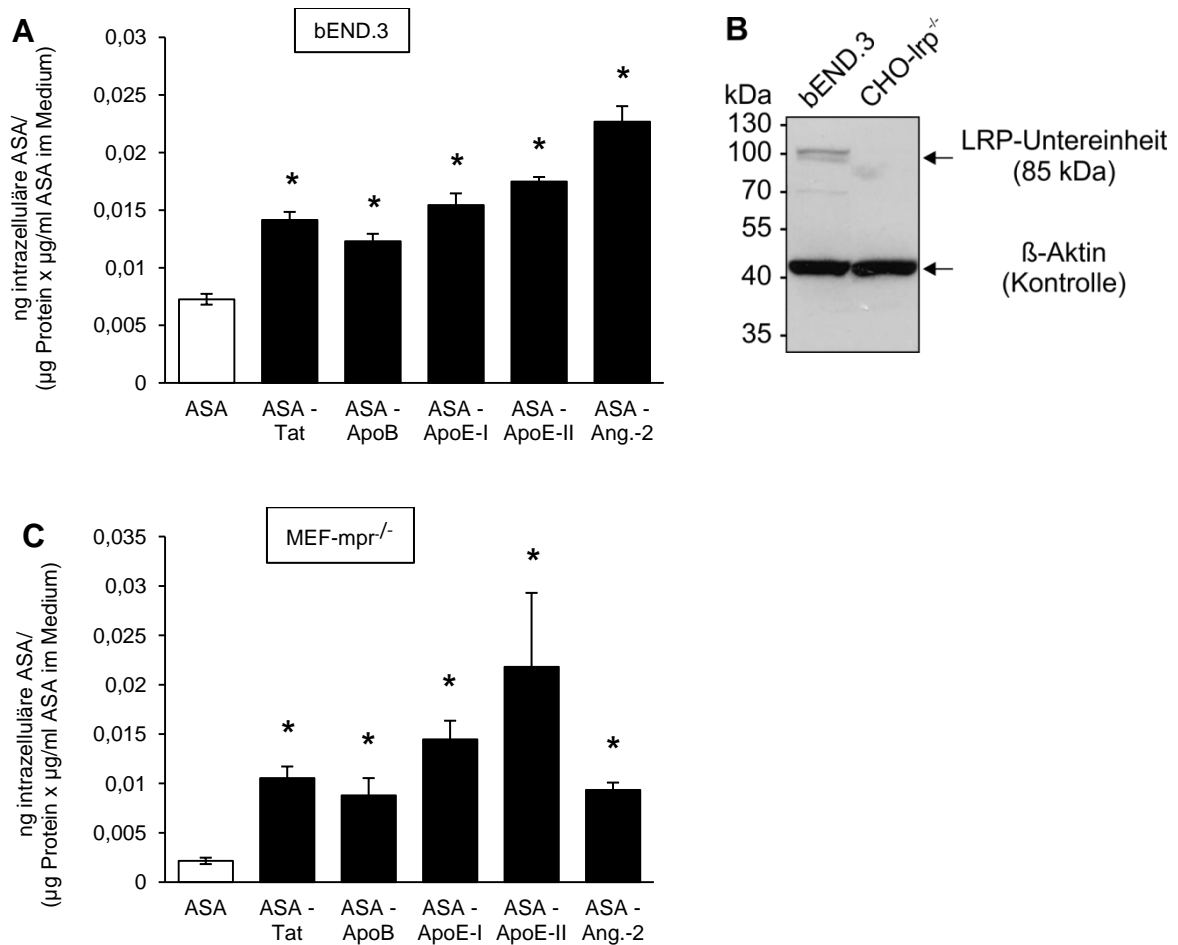


Abbildung 24: M6P-unabhängige Aufnahme von ASA-Fusionsproteinen durch LRP-exprimierende bEND.3 und MPR-defiziente MEF Zellen

- (A, C) M6P-unabhängige Endozytose. Nach 24-stündiger Inkubation von bEND.3 Zellen (A) in Anwesenheit von 7,5 mM M6P bzw. von MPR-defizienten MEF Zellen (C) mit je 2,5 µg/ml ASA (weiße Balken) bzw. ASA-Fusionsprotein (schwarze Balken) wurden an die Zelloberfläche gebundene Proteine durch einen sauren Waschschrift entfernt und die intrazellulären ASA- bzw. Fusionsproteinkonzentrationen mittels ELISA bestimmt. Die Aufnahme ist wiedergegeben als ng intrazelluläre(s) ASA(-Fusionsprotein)/(µg lösliches Gesamtprotein * µg/ml ASA (-Fusionsprotein) im Medium). Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (A: n = 3, C: n = 4-6). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen ASA und den ASA-Fusionsproteinen sind durch einen Stern gekennzeichnet (*t*-Test, $p < 0,05$).
- (B) LRP-Expression in bEND.3 Zellen. Je 20 µg Gesamtprotein von bEND.3 Zellysaten und CHO-lrp^{-/-} Zellysaten (Negativ-Kontrolle) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und LRP mit einem polyklonalen Antikörper (1704, 1:10.000), der gegen den C-Terminus des LRP gerichtet ist, mittels Westernblot detektiert (Pietrzik et al., 2002). Als Ladekontrolle diente β-Aktin (1:10.000).

5.5.5 LRP-abhängige Aufnahme

Verschiedene Mitglieder der *low-density lipoprotein* (LDL-) Rezeptor-Familie wie der LDL-Rezeptor (LDLR) und das *LDLR-related protein* (LRP-1) vermitteln den Transport von Apolipoproteinen ins Gehirn. Auch von diversen Apolipoprotein-abgeleiteten Peptiden

ist bekannt, dass sie die BHS über Rezeptor-vermittelte Transzytose überwinden (Gabathuler, 2010b). Zudem wurde für das Tat-Protein eine LRP-abhängige Aufnahme in Neurone gezeigt (Liu et al., 2000). Um zu testen, ob die M6P-unabhängige Endozytose der ASA-Fusionsproteine über LRP-1 vermittelt wird, wurde ihre Aufnahme durch LRP-1-exprimierende und LRP-1-defiziente CHO-K1 Zellen miteinander verglichen (Abbildung 25B). Dabei wurde die MPR300-vermittelte Internalisierung durch Zugabe kompetitiver M6P-Konzentrationen zum Zellkulturmedium inhibiert.

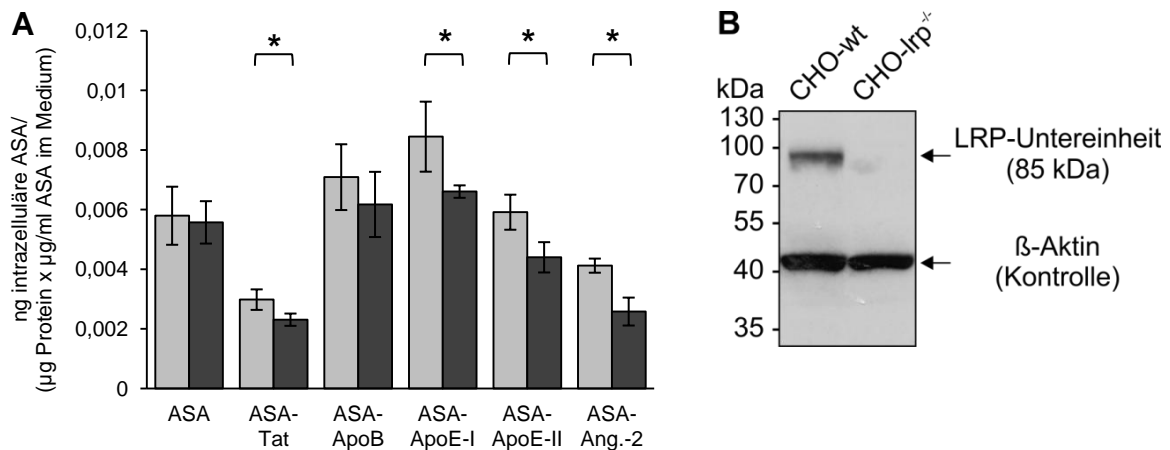


Abbildung 25: LRP-abhängige Endozytose

- (A) LRP-exprimierende (CHO-wt, hellgraue Balken) und LRP-defiziente CHO Zellen (CHO-lrp^{-/-}, dunkelgraue Balken) wurden mit 2,5 µg/ml ASA bzw. ASA-Fusionsprotein und 7,5 mM M6P 24 h ko-inkubiert, um die M6P-abhängige Aufnahme zu blockieren. Nach Entfernung an die Zelloberfläche gebundener Proteine durch einen sauren Waschschrift wurden intrazelluläre ASA- bzw. Fusionsproteinkonzentrationen mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 3-6).
- (B) Western blot Analyse zur Detektion von LRP in CHO-wt Zellen. Je 20 µg Gesamtprotein von CHO-wt Zelllysaten und CHO-lrp^{-/-} Zelllysaten wurden auf einem SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. LRP wurde mit einem polyklonalen Antikörper (1704, 1:10.000), der gegen den C-Terminus des LRP gerichtet ist, detektiert (Pietrzik et al., 2002). Als Ladekontrolle diente β-Aktin (1:5000).

Während Wildtyp-ASA von LRP-1-exprimierenden und LRP-1-defizienten Zellen in gleichem Maße aufgenommen wurde und auch ASA-ApoB keinen signifikanten Unterschied aufwies, war die Endozytose von ASA-Tat, ASA-ApoE-I, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 in LRP-defizienten Zellen signifikant erniedrigt (Abbildung 25A). Demnach trug LRP-1 zur intrazellulären Aufnahme aller Fusionsproteine mit Ausnahme von ASA-ApoB bei.

5.6 Blut-Hirn-Schranken-Modell

Zur Bestimmung des Übertritts von ASA und ASA-Fusionsproteinen über die Blut-Hirn-Schranke (BHS) wurde ein etabliertes Zellkulturmodell verwendet (Von Wedel-Parlow et al., 2009). Primäre, aus Schweinehirnen präparierte Kapillarendothelzellen werden hierzu auf Filtereinsätzen ausgesät, die in den Vertiefungen einer Zellkulturplatte platziert sind. Durch Behandlung mit Hydrocortison wird die Bildung einer durch *Tight Junctions* gewährleisteten dichten Einzelzellschicht mit stabiler Barriere-Funktion induziert, die mit der *in vivo*-Situation an der BHS vergleichbar ist (Hoheisel et al., 1998). Dabei entspricht das apikale Kompartiment der Blutseite, das basolaterale Kompartiment stellt die Hirnseite des Endothels dar (Abbildung 26).

Zur Analyse des transendothelialen Übertritts wurden ASA bzw. Fusionsproteine zum apikalen Medium gegeben und der Übertritt nach 24 h durch Messung der Konzentration im basolateralen Kompartiment mittels ELISA bestimmt. Mit Hilfe kontinuierlicher Messung des transendothelialen elektrischen Widerstands (TEER) während des gesamten Versuchs sowie der Messung des Permeabilitätskoeffizienten von fluoreszenzmarkiertem FITC-Dextran (70 kDa) wurde die Aufrechterhaltung der Barriere-Funktion jedes Filtereinsatzes kontrolliert. Dabei wurden Filterproben, deren TEER-Werte unter $550 \Omega \text{ cm}^2$ bzw. Dextran-Permeabilitätskoeffizienten über $6 \times 10^{-8} \text{ cm/s}$ lagen, nicht in die Auswertung einbezogen.

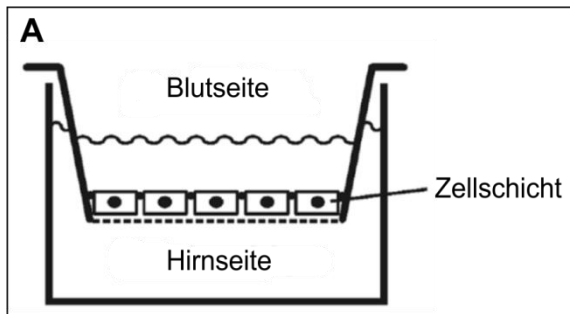
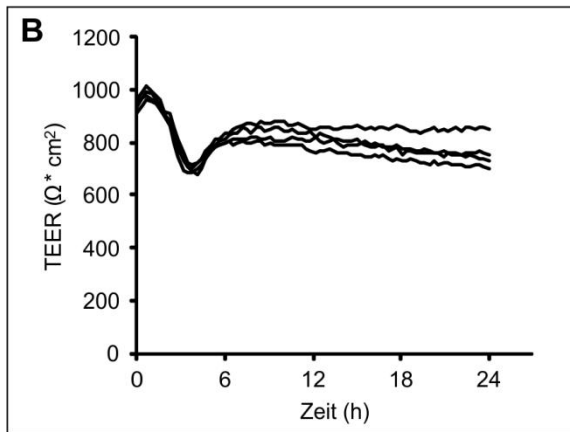
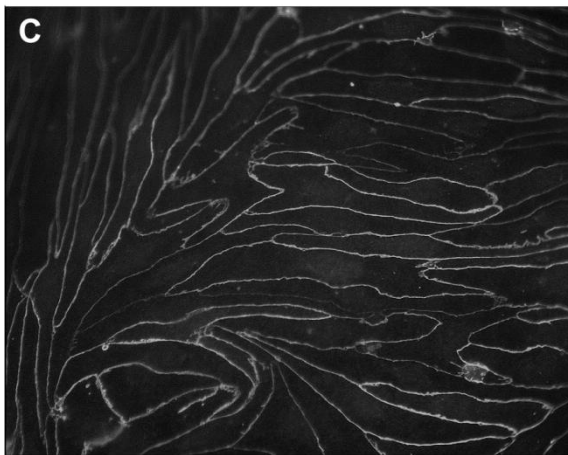


Abbildung 26: Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke

(A) Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmodells. Zur Trennung eines apikalen (dem Blut entsprechend) und basolateralen (dem Gehirnparenchym entsprechend) Kompartiments werden primäre Schweinehirn-Kapillarendothelzellen (*porcine brain capillary endothelial cells*, PBCEC) bis zur Ausbildung einer dichten Einzelzellschicht auf einem Filtereinsatz kultiviert.



(B) Beispiel für eine kontinuierliche TEER-Messung über 24 h. In den Transfer-Experimenten wurden Filter, deren TEER-Werte unter $550 \Omega \cdot \text{cm}^2$ fielen, nicht in die statistische Auswertung einbezogen. (Messung: Sandra Cramer, Universität Münster)



(C) Immunfluoreszenz-Aufnahme der PBCEC. Die Zellen wurden mit einem Antikörper gegen das *Tight-Junction*-Protein *Zonula occludens-1* gefärbt. Durch die dichte Vernetzung benachbarter Zellen über *Tight Junctions*, die auch *in vivo* zur Ausbildung eines hohen transendothelialen Widerstands führt, wird der parazelluläre Transport von Substanzen verhindert und die Barriere-Integrität des Zellkulturmodells sichergestellt. (Bild: Philipp Wölte, Universität Münster)

Die BHS-Versuche wurden in Kooperation mit Philipp Wölte und Sandra Cramer (Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Institut für Biochemie) durchgeführt. Sie waren für die Präparation und Kultivierung der Kapillarendothelzellen, die Kontrolle der Barriere-Integrität, die Applikation der rekombinanten Proteine und Substanzen sowie die Probenentnahme verantwortlich.

5.6.1 Optimierung der Versuchsbedingungen

In früheren Versuchen wurde beobachtet, dass die ASA in dem standardmäßig im Zellkulturmodell der BHS verwendeten serumfreien Medium (50 % Hams-F10, 50 % Dulbecco's MEM (DMEM), 2 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Gentamycin, 550 nM Hydrocortison = CMD + Zus.) nicht stabil ist. Zur Optimierung der Versuchsbedingungen sollte daher zunächst die ASA-Stabilität in verschiedenen Zellkulturmedien miteinander verglichen werden. Hierbei handelte es sich um die Medien Ham's F-10, DMEM, DMEM/F12, Cystein-freies DMEM und CDM. Desweiteren wurde untersucht, ob die verwendeten Zusätze (2 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Gentamycin, 550 nM Hydrocortison) einen negativen Einfluss auf die Stabilität ausüben.

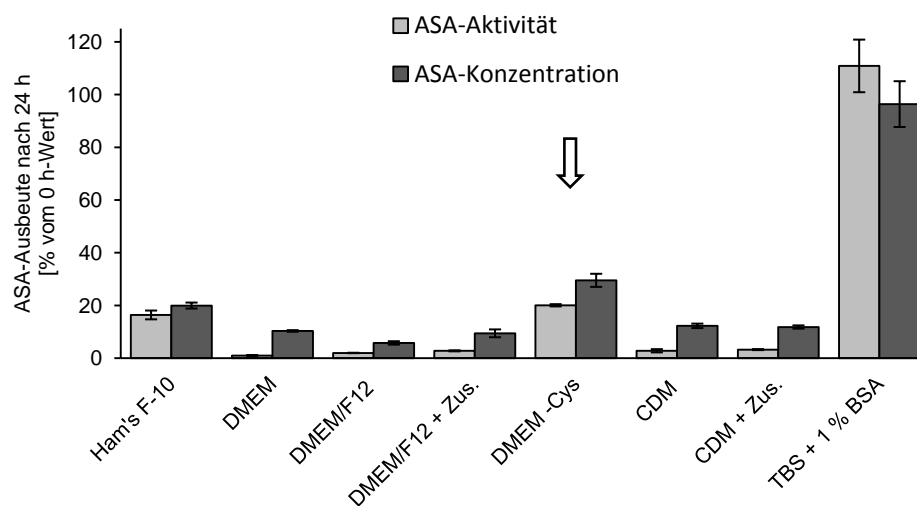


Abbildung 27: ASA-Stabilität unter verschiedenen Medienbedingungen

ASA wurde in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml mit verschiedenen Zellkulturmedien bzw. TBS/1 % BSA als Kontrolle gemischt und 0 bzw. 24 h bei 37° C inkubiert. Die Sulfataseaktivität (hellgraue Balken) wurde mit p-Nitrocatecholsulfat und die ASA-Konzentration (dunkelgraue Balken) mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3$) der 24 h-Proben bezogen auf die Ausgangswerte (0 h-Proben). DMEM = Dulbecco's MEM, DMEM/F12 = Dulbecco's MEM/Ham's F-12 (1:1), Zus. = Zusätze (2 % L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Gentamycin, 550 nM Hydrocortison), -Cys = Cystein-frei, CDM = chemisch definiertes Medium (50 % Hams-F10, 50 % Dulbecco's MEM).

Rekombinante ASA wurde dazu in einer Konzentration von 0,1 mg/ml, die üblicherweise auch für Transfer-Versuche in dem Zellkulturmodell eingesetzt wird, für 24 h bei 37° C in den verschiedenen Zellkulturmedien inkubiert. Als Kontrolle wurde TBS/1% BSA verwendet, in dem die ASA erfahrungsgemäß stabil ist. Anschließend wurde die ASA-Aktivität bzw. ASA-Konzentration in den Proben gemessen und auf die entsprechenden Ausgangswerte bezogen.

In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass nach Inkubation in TBS/1 % BSA die gesamte eingesetzte ASA-Menge wiederzufinden war. Auch die nach 24 h gemessene Sulfataseaktivität (96 %) war mit dem Ausgangswert vergleichbar. Dagegen waren sowohl die enzymatischen Aktivitäten als auch die detektierbaren ASA-Mengen nach Inkubation in allen getesteten Zellkulturmedien deutlich verringert. Beim Vergleich zwischen DMEM/F12 und DMEM/F12 + Zus. ist zu erkennen, dass die ASA-Ausbeute nach 24 h unter beiden Bedingungen nahezu gleich gering war und die Zusätze somit keinen erkennbaren Einfluss auf die ASA-Stabilität ausübten. Dieses Ergebnis konnte durch den Vergleich von CDM und CDM + Zus. bestätigt werden.

Im Gegensatz dazu schien das Vorhandensein von Cystein im Medium die ASA-Stabilität zu verringern. Sowohl die ASA-Aktivität als auch die detektierbare ASA-Konzentration war nach Inkubation in Cystein-freiem DMEM (DMEM –Cys) im Vergleich zu dem entsprechenden Cystein-haltigen Medium (DMEM) deutlich gesteigert (Abbildung 27, Pfeil).

Durch Inkubation von ASA in Cystein-freiem DMEM (DMEM –Cys.), dem unterschiedliche Cystein-Mengen im Bereich von 0-72 µg/ml zugesetzt worden waren, wurde ein möglicher Cystein-abhängiger ASA-Stabilitätsverlust untersucht.

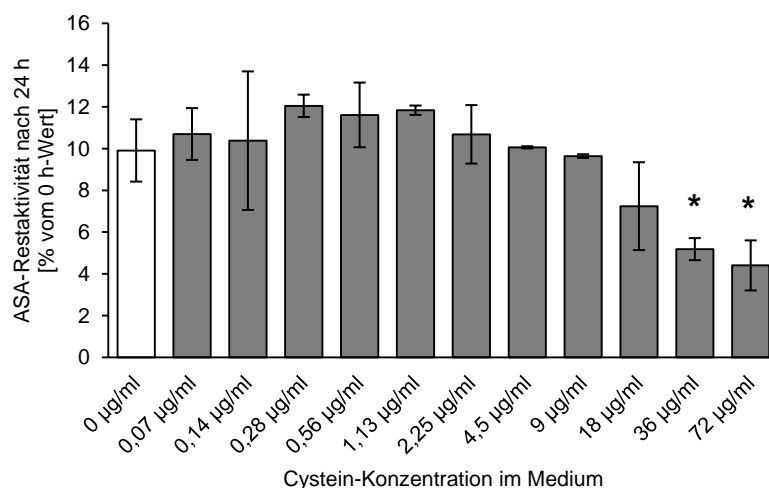


Abbildung 28: ASA-Aktivität in Abhängigkeit von der Cystein-Konzentration

ASA wurde in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml in Cystein-freiem Medium (siehe Abbildung 27, DMEM –Cys) inkubiert, dem zuvor verschiedenen Cystein-Mengen in einem Bereich von 0,07-72 µg/ml zugesetzt worden waren. Als Kontrolle diente Medium ohne Cystein. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37° C wurde die Sulfataseaktivität in den Proben mit Hilfe von p-Nitrocatecholsulfat ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 3) der 24 h-Proben bezogen auf die Ausgangswerte (0 h-Proben). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Medien mit den angegebenen Cystein-Konzentrationen sind jeweils durch einen Stern gekennzeichnet (*t*-Test, $p < 0,05$).

Während zwischen Cystein-freiem und Medium mit geringen Cystein-Konzentrationen (0,07-18 µg/ml) keine Aktivitätsunterschiede verzeichnet wurden (Abbildung 28), waren die Sulfataseaktivitäten im Medium mit 36 bzw. 72 µg/ml Cystein signifikant erniedrigt.

Zudem konnte in zwei weiteren Experimenten ein ASA-stabilisierender Effekt durch die Zugabe von BSA zum Medium nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), und auch die Inkubation in konditioniertem Medium, welches zuvor zur Kultivierung der Endothelzellen (PBCEC) verwendet worden war, wirkte sich positiv auf die ASA-Stabilität aus (Daten nicht gezeigt).

Das verwendete BHS-Modell stellt ein empfindliches Zellkultursystem dar, in dem Änderungen der Kultivierungsbedingungen der Endothelzellen häufig zu einem Verlust der Barriere-Integrität führen. Um die etablierten Bedingungen möglichst beizubehalten, wurde das standardmäßig verwendete Medium (CDM + Zus.) nach den Befunden der drei vorangegangenen Experimente modifiziert. Im Folgenden wurden die ASA-Stabilitäten unter den in Abbildung 29 dargestellten modifizierten Bedingungen miteinander verglichen.

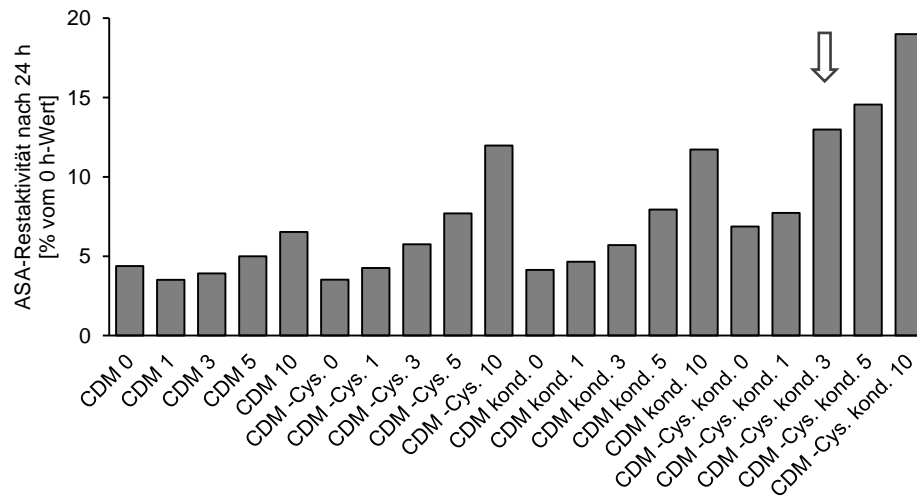


Abbildung 29: ASA-Restaktivitäten unter verschiedenen Bedingungen

ASA (0,1 mg/ml) wurde mit Cystein-freiem/ -haltigem CDM gemischt, welches BSA in verschiedenen Konzentrationen enthielt. Zusätzlich wurden Ansätze mit CDM angefertigt, welches zuvor zur Kultivierung von Endothelzellen (PBCEC) verwendet worden war (konditioniert). Dargestellt sind Mittelwerte ($n = 2$) der 24 h-Proben bezogen auf die Ausgangswerte (0 h-Proben). CDM = chemisch definiertes Medium (50 % Hams-F10, 50 % Dulbecco´s MEM), - Cys. = Cystein-frei, kond. = konditioniert, 0 (1, 3, 5, 10) = 0 (1, 3, 5, 10) mg/ml BSA.

Die Endothelzellen tolerieren eine maximale BSA-Konzentration von 3 mg/ml zur Erhaltung der Barriere-Integrität (Ergebnisse von Philipp Wölte, Universität Münster). Daher wurde aufgrund der in Abbildung 29 dargestellten Ergebnisse für alle folgenden BHS-Versuche Cystein-freies, konditioniertes CDM mit 3 mg/ml BSA verwendet (Pfeil).

In den folgenden Versuchen zum transendothelialen Übertritt der ASA stellte sich heraus, dass unter den optimierten Bedingungen nach 24-stündiger Inkubation die zugegebene ASA-Menge sogar nahezu verlustfrei mittels ELISA detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt), was aufgrund der ermittelten ASA-Restaktivität von 13 % (siehe Abbildung 29, Pfeil) nicht zu erwarten war. Dies könnte auf einen zusätzlichen ASA-stabilisierenden Effekt der Endothelzellen hindeuten. Eine mögliche Adsorption der ASA an verschiedene verwendete Plastikmaterialien (Abbildung 29), die die erniedrigte ASA-Aktivität erklären könnten, wurde nicht festgestellt (Daten nicht gezeigt).

5.6.2 Eigenschaften des transendothelialen Übertritts von ASA

In vorangegangenen Studien zur ERT an Mausmodellen wurde gezeigt, dass die intravenöse Applikation hoher ASA-Dosen zu einer Abnahme der Sulfatidspeicherung im ZNS führt (Matzner et al., 2009) und dass gewisse Mengen rekombinanter ASA in den Gehirnen der behandelten Mäuse nachgewiesen werden können (Matzner et al., 2005).

Unabhängig von den Fusionsproteinen sollten daher zunächst die Eigenschaften des transendothelialen Übertritts von Wildtyp-ASA in Abhängigkeit verschiedener Parameter im Zellkulturmodell untersucht werden.

5.6.2.1 Konzentrationsabhängiger Transport

Zunächst sollte durch Einsetzen verschiedener Mengen ASA im BHS-Modell untersucht werden, ob der transendotheliale Übertritt des Enzyms sättigbar ist, was auf einen Rezeptor-vermittelten Transport hindeuten würde.

Dazu wurde ASA in verschiedenen Konzentrationen (0-1 mg/ml) dem Medium des apikalen Kompartiments zugefügt und nach 24 h die basolaterale Enzymkonzentration bestimmt.

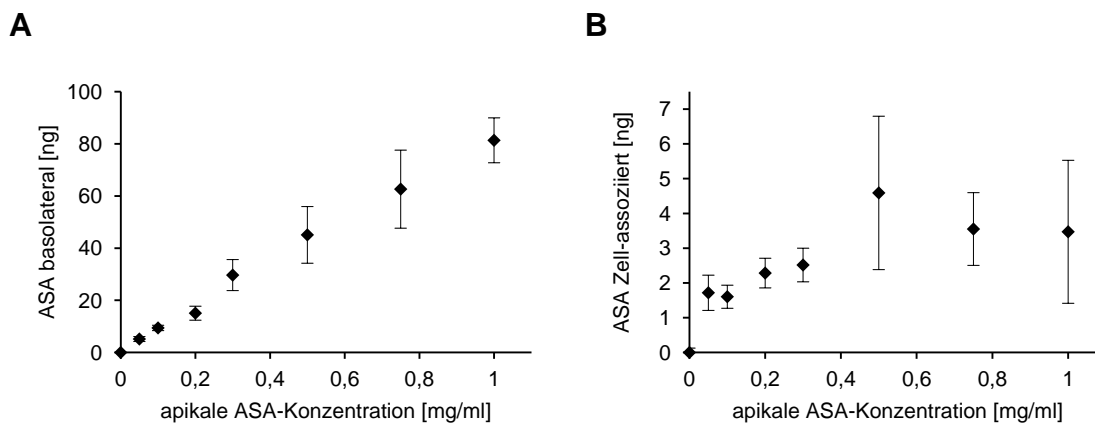


Abbildung 30: Basolateraler Übertritt von ASA und ihre Interaktion mit den Endothelzellen in Abhängigkeit von der apikalen Konzentration

Nach Zugabe steigender ASA-Mengen zum apikalen Medium der Endothelzellen wurde die basolaterale (A) und Zell-assoziierte (B) ASA-Menge nach 24-stündiger Inkubation mittels ELISA bestimmt. Aufgetragen sind die gemessenen Absolut-Werte im gesamten basolateralen Medium sowie in den gesamten Endothelzellen (*Monolayer*). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3-5$).

Jeweils 0,01-0,02 % der apikal zugegebenen ASA-Menge wurden im basolateralen Medium detektiert. Der transendotheliale Übertritt nahm mit zunehmender apikal eingesetzter ASA-Menge konzentrationsabhängig nahezu linear zu (Abbildung 30A). Auch bis zu einer ASA-Konzentration von 5 mg/ml konnte keine Sättigung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Nach mehrmaligem Waschen der Filter mit PBS (pH 7,4) wurde zusätzlich die Zell-assoziierte ASA-Menge bestimmt. Im Gegensatz zum basolateralen Übertritt trat mit Annäherung an eine hohe apikale ASA-Konzentration von 1 mg/ml eine Sättigung auf (Abbildung 30B).

5.6.2.2 Zeitabhängiger Transport

Zur Erstellung eines Zeitprofils wurden dem apikalen Medium 0,1 mg/ml ASA zugefügt und der Übertritt durch Messung der basolateralen ASA-Konzentration nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (0-24 h) bestimmt. Das in Abbildung 31A dargestellte Zeitprofil des transendothelialen Transports deutet auf einen konstanten Übertritt 6-24 h nach Zugabe des rekombinanten Enzyms hin. Der steilere Anstieg innerhalb der ersten 6 h hing wahrscheinlich mit der gleichzeitig auftretenden vorübergehenden Abnahme des TEER zusammen, die beständig direkt nach Zugabe des rekombinanten Proteins beobachtet werden konnte (Abbildung 26B).

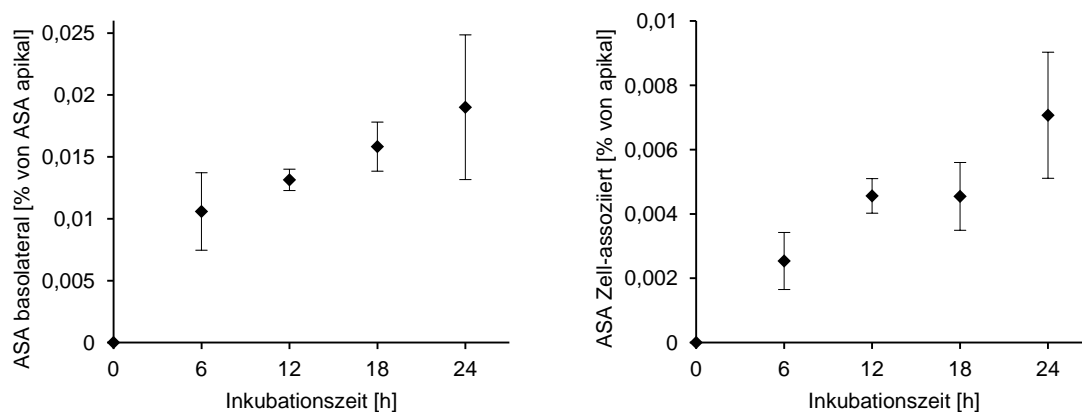


Abbildung 31: Transendothelialer Übertritt von ASA in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Nach apikaler Zugabe von 0,1 mg/ml ASA wurde die ASA-Konzentration im basolateralen Kompartiment (A) sowie die Zell-assoziierte ASA-Konzentration (B) nach 6-, 12-, 18- und 24-stündiger Inkubation mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 5).

Die Zell-assoziierte ASA-Menge stieg dagegen im gemessenen Zeitrahmen annähernd linear an.

5.6.2.3 Ladungsabhängiger Transport

Rekombinante humane ASA wird industriell in CHO-S Zellen hergestellt. Die Firma Zymenex stellte fünf verschiedene ASA-Fraktionen zur Verfügung, die über eine Kationenaustauschersäule aufgereinigt und mit steigendem Salzgradienten eluiert worden waren. Proteine mit geringer negativer Ladung werden bei dieser Methode früher eluiert als stärker negativ geladene Proteine.

Der transendotheliale Übertritt dieser fünf Fraktionen wurde im BHS-Modell bestimmt und mit dem Transport einer gleichmäßigen Mischung aus allen Fraktionen verglichen.

Die Messung der basolateralen Konzentrationen 24 h nach Zugabe von 0,1 mg/ml der jeweiligen ASA ergab deutliche Unterschiede. Der Übertritt der wenig negativ geladenen ASA aus Fraktionen 1 und 2 war im Vergleich zu dem der Mischfraktion signifikant gesteigert (Abbildung 32).

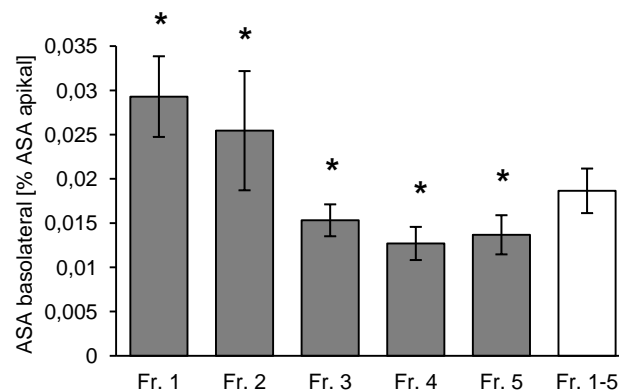


Abbildung 32: Basolateraler Transport von ASA in Abhängigkeit ihrer Ladung

Nach apikaler Zugabe von 0,1 mg/ml ASA, die zuvor über einen Kationenaustauscher in fünf Fraktionen (Fr.) mit zunehmend negativer Ladung aufgetrennt worden war (schwarz), wurde nach 24 h der transendotheliale Übertritt ins basolaterale Medium mittels ELISA gemessen. Eine gleichmäßige Mischung aller fünf Fraktionen diente als Kontrolle (weiß). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 5-6$). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und den verschiedenen Fraktionen sind durch einen Stern gekennzeichnet (t -Test, $p < 0,05$).

Die zunehmend stärker negativ geladene ASA aus den Fraktionen 3-5 wurde dagegen schlechter über die Endothelzellschicht transportiert als die der Mischfraktion. Somit konnte ein ladungsabhängiger transendothelialer Transfer von ASA zugunsten der weniger negativ geladenen ASA-Moleküle gezeigt werden.

5.6.2.4 Aktiver Transport

Um zu testen, ob die ASA auch gegen ein Konzentrationsgefälle und damit aktiv unter Verbrauch von Energie über die BHS transportiert wird, wurden dem apikalen und gleichzeitig dem basolateralen Medium 0,1 mg/ml ASA zugefügt. Direkt nach der Zugabe bzw. nach 24-stündiger Inkubation wurden die ASA-Konzentrationen im basolateralen sowie im apikalen Kompartiment mittels ELISA bestimmt. Das Konzentrationsverhältnis direkt nach Zugabe der ASA lag bei ca. 1 und wies keinen signifikanten Unterschied zum Verhältnis nach 24-stündiger Inkubation auf (Abbildung 33). Es konnte demnach kein aktiver Transport der ASA gegen ein Konzentrationsgefälle nachgewiesen werden.

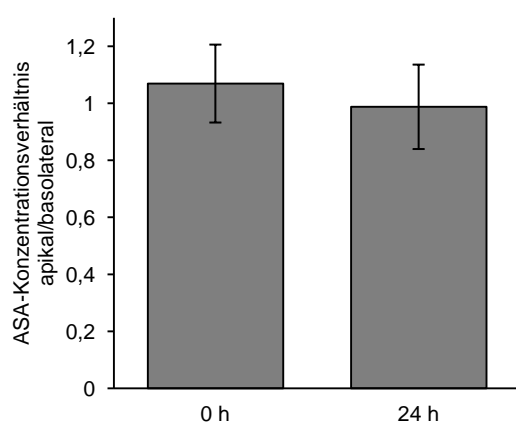


Abbildung 33: Gerichteter ASA-Transport

Dem apikalen und basolateralen Kompartiment wurden je 0,1 mg/ml ASA zugegeben und die ASA-Konzentrationen in beiden Kompartimenten direkt nach Zugabe (0 h) sowie nach 24-stündiger Inkubation mittels ELISA bestimmt. Aufgetragen ist das Verhältnis zwischen apikaler und basolateraler ASA-Konzentration. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 4).

5.6.3 Transendothelialer Übertritt der ASA-Fusionsproteine

Durch Messung des basolateralen Übertritts der ASA-Fusionsproteine sollte getestet werden, ob die fusionierten Peptide den Transport der ASA über die BHS begünstigen. Dazu wurde die Enzymkonzentration im basolateralen Kompartiment 24 h nach apikaler Zugabe von 0,1 mg/ml Fusionsprotein mittels ELISA bestimmt. Für die ASA-Kontrollen

wurde ein Übertritt ins basolaterale Medium von ca. 0,02 % der apikal zugegebenen Wildtyp-ASA gemessen (Daten nicht gezeigt). Damit wurden Ergebnisse aus vorherigen Transportstudien reproduziert (Matthes et al., 2011). Zum besseren Vergleich der ASA-Fusionsproteine wurde in Abbildung 34 der Mittelwert der jeweiligen Wildtyp-ASA-Kontrollen als 100 % definiert.

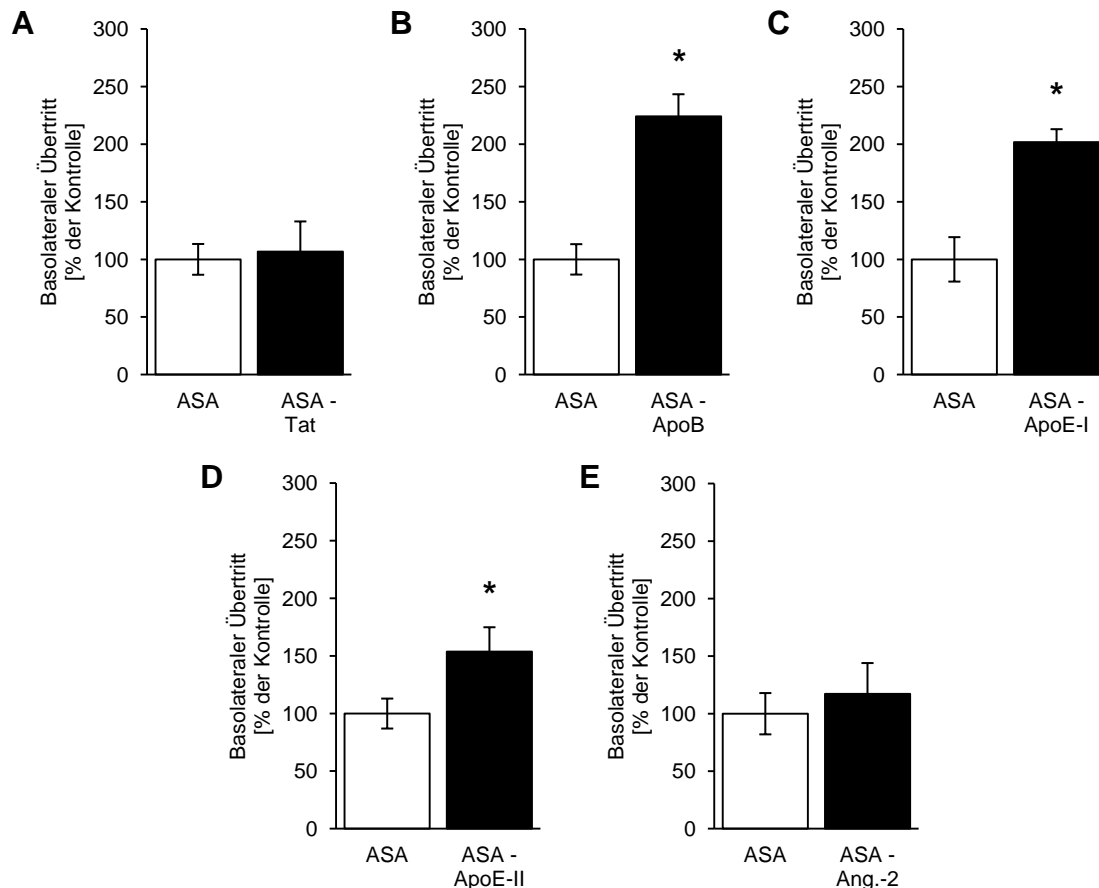


Abbildung 34: Basolateraler Übertritt von ASA-Fusionsproteinen

Nach Zugabe von 0,1 mg/ml ASA-Tat (A), ASA-ApoB (B), ASA-ApoE-I (C), ASA-ApoE-II (D) und ASA-Ang.-2 (E) bzw. ASA (als Kontrolle, A-E) zum apikalen Medium wurden nach 24 h die Konzentrationen von ASA (weiß) und ASA-Fusionsproteinen (schwarz) im basolateralen Medium mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3-5$). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen ASA und dem jeweiligen ASA-Fusionsprotein sind durch einen Stern gekennzeichnet. (t -Test, $p < 0,05$).

Während die Transportraten von ASA-Tat und ASA-Ang.-2 sich nicht von der der Wildtyp-ASA unterschieden (Abbildung 34A und E), waren die im basolateralen Medium gemessenen Enzymkonzentrationen nach Zugabe von ASA-ApoB, ASA-ApoE-I und

ASA-ApoE-II signifikant erhöht (Abbildung 34B-D). ASA-ApoB wurde 2,2-fach, ASA-ApoE-I 2,0-fach und ASA-ApoE-II 1,5-fach besser über die Endothelzellen transportiert als Wildtyp-ASA.

Im Gegensatz zu ApoE-II, welches Lipid-unabhängig an LRP-1 bindet (Wang et al., 1997), wurde für ApoE-I beschrieben, dass es erst nach Interaktion mit Lipiden eine aktive Rezeptor-bindende Konformation annimmt (Clayton et al., 1999). Um den Effekt von Lipiden auf den Transport von ASA-ApoE-I ins basolaterale Kompartiment im *in vitro*-Modell zu testen, wurde der entsprechende Transportversuch in Anwesenheit von Dodecylphosphocholin (DPC)-Micellen bzw. 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin (DOPC)-Liposomen wiederholt. Als Kontrolle wurden dem apikalen Medium keine Lipide zugegeben. Wie in Abbildung 35 zu erkennen ist, konnten zwischen den drei Bedingungen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des transendothelialen Transports festgestellt werden.

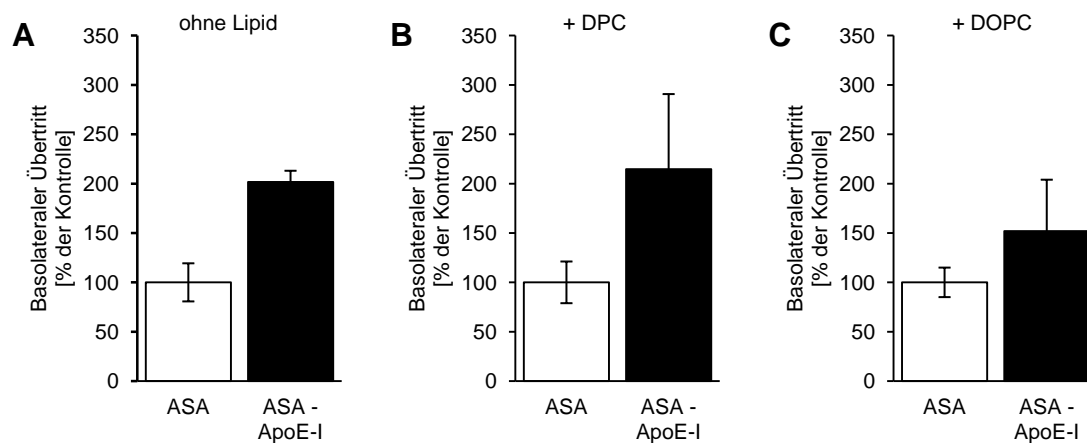


Abbildung 35: Lipidabhängiger Transport von ASA-ApoE-I

Dem apikalen Medium wurden ASA-ApoE-I (0,1 mg/ml) und ein 10 bzw. 20-facher Überschuss DPC-Micellen bzw. DOPC-Liposomen zugegeben, um den Effekt von Lipiden auf den basolateralen Übertritt des Fusionsproteins zu testen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 3-5$). DPC und DOPC hatten keinen signifikanten Effekt auf den Transfer von ASA-ApoE-I in das basolaterale Kompartiment. DPC = Dodecylphosphocholin, DOPC = 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-Phosphocholin.

Die Zugabe von Lipiden wirkte sich somit nicht begünstigend auf den BHS-Übertritt von ASA-ApoE-I aus, wie es aufgrund der Literaturdaten zu erwarten gewesen wäre.

5.7 Pharmakokinetik der ASA-Fusionsproteine *in vivo*

Am Zellkulturmodell der BHS konnte gezeigt werden, dass einige der Peptide einen begünstigenden Einfluss auf den transendothelialen Übertritt von ASA über die Endothelzellen haben. In den folgenden Versuchen sollte getestet werden, ob sich der *in vitro* gesteigerte BHS-Übertritt von ASA-ApoB, ASA-ApoE-I und ASA-ApoE-II *in vivo* bestätigen lässt.

5.7.1 Serumhalbwertszeit

ASA bzw. die ASA-Fusionsproteine wurden mit einer Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht intravenös in die Schwanzvene von ASA-Knockout-Mäusen (Hess et al., 1996) injiziert. Zur Bestimmung der Halbwertszeit im Blut wurden den Mäusen 5 und 120 min nach der Injektion Blutproben entnommen und die Serumkonzentrationen der injizierten Enzyme mittels ELISA gemessen. Wildtyp-ASA wurde mit einer Halbwertszeit von 11 min schnell aus dem Blutkreislauf entfernt (Tabelle 5). Für ASA-Tat, ASA-ApoB, ASA-ApoE-I und ASA-Ang.-2 wurden ähnliche Halbwertszeiten von 16, 14, 15 und 13 min ermittelt. ASA-ApoE-II dagegen verblieb mit einer Halbwertszeit von 30 min zwei- bis dreimal länger im Blut.

| rekombinantes Protein | Serumhalbwertszeit |
|-----------------------|--------------------|
| ASA | 11,06 ± 0,97 |
| ASA-Tat | 16,07 (n = 2) |
| ASA-ApoB | 14,48 ± 0,53 |
| ASA-ApoE-I | 15,37 ± 0,58 |
| ASA-ApoE-II | 30,52 ± 3,57 |
| ASA-Ang.-2 | 13,49 ± 0,55 |

Tabelle 5: Serumhalbwertszeiten

ASA bzw. die ASA-Fusionsproteine wurden intravenös in einer Konzentration von 20 mg/kg Körpergewicht in ASA-Knockout-Mäuse (Hess et al., 1996) injiziert. Blutproben wurden nach 5 und 120 min entnommen und zur Serumgewinnung verwendet. Die ASA- bzw. Fusionsproteinkonzentrationen in den Serumproben wurden mittels ELISA gemessen. Mit Hilfe des Zerfallsgesetzes wurden daraus die Serumhalbwertszeiten bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 5-20 Mäuse, falls nicht anders angegeben).

5.7.2 Gewebeverteilung

Zur Bestimmung der Gewebeverteilung des injizierten Proteins wurden die Mäuse 2 h nach der Injektion perfundiert und die Konzentrationen der Fusionsproteine in Leber-, Milz-, Nieren- und Gehirnhomogenaten mittels ELISA gemessen (Abbildung 36). Für jedes Fusionsprotein wurden zum Vergleich Mäuse mit Wildtyp-ASA behandelt. Da die ASA-Konzentrationen in den verschiedenen Geweben sehr unterschiedlich waren, wurden die Gewebespiegel der jeweiligen ASA-Kontrollen als 100 % definiert. ASA-Tat und ASA-Ang.-2 zeigten die gleiche Gewebeverteilung wie Wildtyp-ASA (Abbildung 36A und E), wogegen die anderen drei Fusionsproteine signifikante Unterschiede aufwiesen. Der durchschnittliche Gehirn-Spiegel von ASA-ApoB war im Vergleich zur ASA-Kontrolle um 41 % erniedrigt, was auf einen ungünstigen Effekt des ApoB-Peptids auf den Eintritt der ASA ins Gehirn hindeutet (Abbildung 36B). Im Gegensatz dazu steigerten ApoE-I und ApoE-II die Gehirnspiegel von ASA um 32 % (Abbildung 36C) bzw. 91 % (Abbildung 36D). Auch in Leber- und Nierenhomogenaten von mit ASA-ApoE-II behandelten Mäusen konnten im Vergleich zur Kontrolle erhöhte ASA-Konzentrationen gemessen werden, wohingegen ein gegenteiliger Effekt für ApoE-I gefunden wurde. Außerdem waren die durchschnittlichen ASA-Konzentrationen nach Behandlung mit ASA-ApoB in der Niere erhöht.

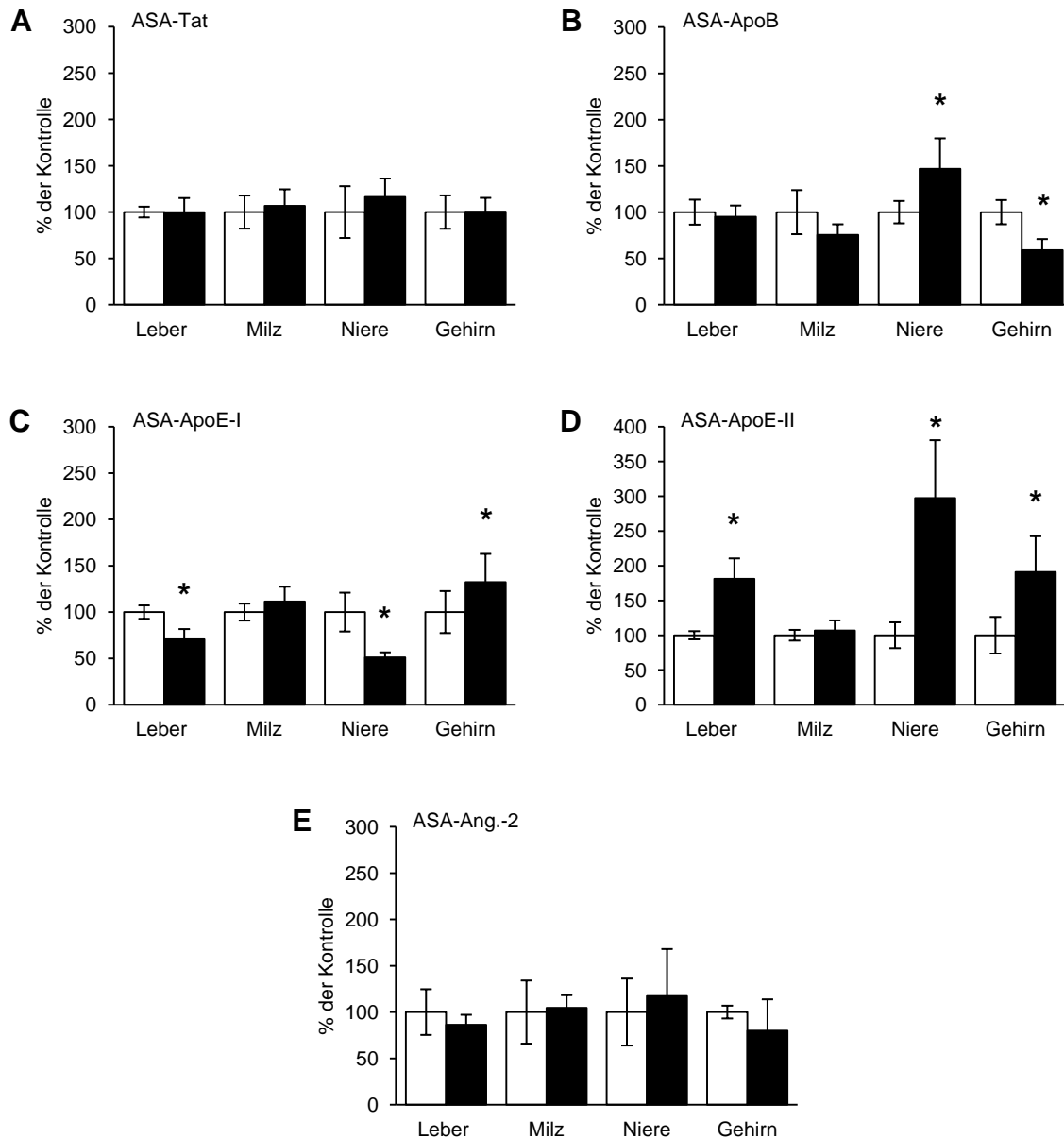


Abbildung 36: Pharmakokinetik der ASA-Fusionsproteine

ASA-Knockout-Mäusen (Hess et al., 1996) wurde intravenös ASA-Tat (A), ASA-ApoB (B), ASA-ApoE-I (C), ASA-ApoE-II (D) oder ASA-Ang.-2 (E) in einer Konzentration von 20 mg/kg Körpergewicht injiziert (schwarze Balken). Für jedes Fusionsprotein wurden separate Kontrollmäuse mit derselben Dosis ASA behandelt (weiße Balken). 2 h nach der Injektion wurden die Mäuse perfundiert und die Konzentration der Fusionsproteine bzw. der Kontroll-ASA mittels ELISA bestimmt. Die in den Geweben gemessene Enzymkonzentration wurde auf die Gesamtproteinkonzentration und die nach Injektion im Blut ermittelte Enzymkonzentration bezogen. Die für Wildtyp-ASA ermittelten Werte wurden als 100 % definiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 4-5$ Mäuse). Sterne kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen ASA und den ASA-Fusionsproteinen (t -Test, $p < 0,05$).

6 Diskussion

Die „*molecular Trojan horse*“-Strategie zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) stellt eine große Herausforderung dar, Medikamente effizient ins Gehirn zu befördern. Die „*molecular Trojan horse*“-Strategie macht sich zunutze, dass bestimmte Peptide über adsorptive (*adsorptive-mediated transcytosis*, AMT) oder Rezeptor-vermittelte Transzytose (*receptor-mediated transcytosis*, RMT) auf natürlichem Wege ins Gehirn gelangen. Für verschiedene Peptide konnte bereits gezeigt werden, dass sie kovalent gebundene Frachtmoleküle ins Gehirn befördern können (Gabathuler, 2010a; Chen und Liu, 2012).

Die Enzymersatztherapie (ERT) ist aufgrund der Besonderheiten der Sortierung löslicher lysosomaler Proteine eine potenzielle Behandlungsmethode für viele lysosomale Speicherkrankheiten (Platt und Lachmann, 2009; Schultz et al., 2011). Bei der metachromatischen Leukodystrophie (MLD) (i Dali und Lund, 2009) und anderen Krankheiten mit vorwiegend zentralnervösen Störungen war die Therapie jedoch nicht erfolgreich, da die BHS den Übertritt der ASA und anderer lysosomaler Enzyme vom Blut ins Gehirn weitestgehend verhindert. In verschiedenen präklinischen Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die Behandlung von MLD-Mäusen mit sehr hohen Dosen intravenös injizierter ASA (≥ 20 mg/kg) zu einer teilweisen Abnahme der Sulfatidspeicherung im ZNS und einer Verbesserung zentralnervöser Störungen führt. Diese positiven Effekte sind darauf zurückzuführen, dass geringe Mengen intravenös applizierter ASA das Gehirnparenchym erreichen (Matzner et al., 2005, 2009; Matthes et al., 2012).

Um die Effizienz der ERT in einem Mausmodell der MLD zu steigern war das Ziel dieser Arbeit, mit Hilfe der „*molecular Trojan horse*“-Strategie den Übertritt der ASA über die BHS zu erhöhen. Dazu wurden im ersten Teil dieser Arbeit verschiedene ASA-Fusionsproteine hergestellt, die im darauffolgenden zweiten Teil in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Versuchen bezüglich ihres Potenzials, die ASA über die BHS zu befördern, untersucht wurden.

6.1 Produktion und Charakterisierung von ASA-Fusionsproteinen

Bei der Planung bifunktioneller Fusionsproteine ist darauf zu achten, dass sich die zwei Domänen in ihrer Funktion nicht gegenseitig behindern. Dies wird durch die Verwendung von Verbindungen (Linker) erreicht, die die Proteine bzw. Peptide räumlich voneinander trennen (Arai et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde ein 21-Aminosäuren langer Linker gewählt, um eine deutliche Trennung der ASA-Domäne von der jeweiligen Peptid-Domäne zu erreichen und dadurch gegenseitige funktionelle Behinderungen zu minimieren. Durch die Verwendung von Glycin- und Leucinresten wurde verhindert, dass die Linkersequenz eine definierte Sekundärstruktur ausbildet, die nach Injektion als antigene Determinante erkannt werden könnte. Da die optimale Länge des Linkers nicht vorauszusagen war, wurde in die entsprechende Nukleotidsequenz eine Schnittstelle eingefügt, die bei Bedarf eine einfache Verkürzung des Linkers auf 12 Aminosäuren erlaubt hätte.

Vor der Produktion der rekombinanten ASA-Fusionsproteine im Milligramm-Maßstab wurden zunächst grundlegende Eigenschaften wie die Expression, subzelluläre Lokalisation, enzymatische Aktivität und Präzipitierbarkeit mit Hilfe transient transfizierter CHO-K1 Zellen analysiert. Da keine gegen die fusionierten Peptide gerichteten Antikörper zur Verfügung standen, wurde in den Versuchen stets mit monoklonalen sowie polyklonalen Antikörpern gearbeitet, die gegen die humane ASA gerichtet sind.

Die Expression der Fusionsproteine wurde als erstes mittels Westernblot gezeigt. Bei der Analyse von Gesamtzelllysaten konnten für alle ASA-Fusionsproteine Banden auf der zu erwarteten Höhe detektiert werden (Abbildung 10). Daneben traten allerdings auch deutliche Banden auf Höhe der Wildtyp-ASA auf. Da der verwendete Antikörper spezifisch für die humane ASA ist, konnte es sich nicht um endogene ASA der CHO-K1 Zellen handeln. Bei der Analyse von konditioniertem Medium wurden dagegen fast ausschließlich Banden auf Höhe der ASA-Fusionsproteine detektiert. Lösliche lysosomale Proteine werden am rauen ER translatiert und gelangen über den Golgi-Apparat zum endosomalen/lysosomalen Kompartiment. Ein Teil der neu-synthetisierten Proteine entgeht dem Sortierungsprozess zum Lysosom und wird sezerniert (Coutinho et

al., 2012). Das Auftreten trunkierter Fusionsproteine in den Zellhomogenaten, nicht aber im Überstand, deutet auf eine proteolytische Spaltung im Bereich des Linkers in späten Endosomen oder Lysosomen hin.

Auch mit Hilfe des für die humane ASA spezifischen ELISA (Matzner et al., 2000) konnte ASA bzw. das jeweilige ASA-Fusionsprotein in transient transfizierten Zellen nachgewiesen werden. In diesen wurde zudem eine erhöhte Sulfataseaktivität gemessen, die auf enzymatische Aktivität der Fusionsproteine hinwies (Abbildung 11).

Die Detektierbarkeit mittels ELISA zeigte, dass sowohl der polyklonale (BE#3) als auch der monoklonale anti-humane ASA Antikörper (19-16-3), der nur an native ASA bindet, die ASA-Domäne der Fusionsproteine erkennt. Dieses Ergebnis wurde dadurch bestätigt, dass durch 19-16-3 sekretierte ASA-Fusionsproteine aus dem Medium transient transfizierter Zellen präzipitiert und im Westernblot durch BE#3 nachgewiesen werden konnten (Abbildung 13). Die Bindung der ASA-Fusionsproteine an den monoklonalen Antikörper bildete eine wichtige Voraussetzung für die spätere Immunaffinitätsaufreinigung größerer Mengen der rekombinanten Proteine und die Quantifizierbarkeit der ASA-Fusionsproteine durch ELISA.

Verschiedene MLD auslösende Mutationen im ASA-Gen führen zu einer Fehlfaltung des Proteins, wodurch dieses nicht zum Golgi-Apparat weitertransportiert wird, da es die Proteinqualitätskontrolle im ER nicht besteht (Poeppel et al., 2005). Auch die Fusion von Peptiden an die ASA bedingt eine genetische Veränderung und kann zu einer Fehlfaltung der ASA-Domäne führen. Um eine mögliche Retention der Fusionsproteine im ER zu untersuchen, wurden transient transfizierte CHO-K1 Zellen mit Ammoniumchlorid inkubiert. Durch die Zugabe einer schwachen Base wie z.B. Ammoniumchlorid zum Zellkulturmedium lässt sich die Ausschüttung neu-synthetisierter lysosomaler Proteine aus dem Golgi-Apparat induzieren (Gonzalez-Noriega et al., 1980; Poole und Ohkuma, 1981) (Abbildung 12). Im Überstand transient transfizierter Zellen wurde nach Ammoniumchlorid-Zugabe eine erhöhte Sulfataseaktivität gefunden. Dies bestätigt, dass sich ein messbarer Anteil der ASA-Fusionsproteine auf dem lysosomalen Sortierungsweg in prä-lysosomalen Kompartimenten befand. Der Aktivitätsanstieg nach Zugabe von Ammoniumchlorid war allerdings geringer als erwartet. Es wurde aber zudem beobachtet, dass im Vergleich zur Kontrolle (Transfektion mit Leervektor) auch eine erhöhte Sulfataseaktivität in Zellen gemessen wurde, die nicht mit Ammoniumchlorid inkubiert

worden waren. Dies weist darauf hin, dass aufgrund starker Überexpression bereits ein großer Teil der Enzyme auch ohne die Zugabe von Ammoniumchlorid in das Medium sekretiert wurde. Vermutlich konnte die Ausschüttung der neu-synthetisierten Enzyme durch die Zugabe von Ammoniumchlorid somit nur gering gesteigert werden. Im Falle einer ER-Retention wäre kein Aktivitätsanstieg im Medium messbar gewesen und es hätten auch keine ASA-Fusionsproteine im Medium detektiert werden können (Abbildung 13). Wie bereits erwähnt, befinden sich in den Überständen der mit den ASA-Fusionskonstrukten transient transfizierten Zellen fast ausschließlich ASA-Fusionsproteine, die Linker und Peptid besitzen. Die im Überstand gemessene Aktivitätssteigerung belegt somit, dass auch die ASA-Fusionsproteine Sulfataseaktivität besitzen.

Für alle hier verwendeten ASA-Fusionsproteine konnte gezeigt werden, dass sie enzymatisch aktiv sind, lysosomal sortiert und zudem ins Medium sekretiert werden. Des Weiteren können sie mit Hilfe ASA-spezifischer Antikörper präzipitiert und mittels verschiedener Methoden detektiert werden. Im Folgenden sollten die rekombinanten ASA-Fusionsproteine in einem größeren Maßstab produziert werden.

Zur industriellen Herstellung therapeutisch angewandter Proteine werden vorwiegend Säugerzellen verwendet (Wurm, 2004; Pham et al., 2006). Gegenüber anderen Zellsystemen haben sie den Vorteil, dass sie Proteine exprimieren, die dem nativen Protein u.a. bezüglich ihrer Glykosylierung und anderer posttranslationaler Modifikationen sehr ähnlich sind. Wie alle Sulfatasen besitzt die ASA im aktiven Zentrum ein konserviertes Cystein, welches durch das C_α-Formylglycin generierende Enzym (FGE) im ER zu Formylglycin oxidiert wird. Ohne diese posttranslationale Modifikation besitzen Sulfatasen keine katalytische Aktivität. Desweiteren erhalten lösliche lysosomale Hydrolasen im Golgi-Apparat M6P-Reste, die ihren MPR-vermittelten Transport vom TGN zum den Lysosomen vermitteln. Beispielsweise ist in der Hefe *Pichia pastoris* exprimierte humane ASA enzymatisch inaktiv, besitzt keine endständigen M6P-Reste und ist hyperglykosyliert (Matzner, unveröffentlichte Daten). Innerhalb der Säugerzellen stellen CHO Zellen die am häufigsten zur Produktion rekombinanter Proteine verwendete Zelllinie dar. Auch für ASA konnte gezeigt werden, dass sich das in CHO Zellen produzierte rekombinante Protein durch einen hohen M6P-Gehalt und eine große Gemeinsamkeit mit dem nicht-rekombinanten Enzym auszeichnet (Schröder et al., 2010).

Zur Produktion der ASA-Fusionsproteine wurden CHO Zellen verwendet, die an die serumfreie Kultivierung in Suspension angepasst sind. Zur Generierung von Zellen, die die ASA-Fusionsproteine stabil exprimierten, wurden durch Selektion zunächst Mischkulturen erzeugt. Diese bestanden aus einer Mischung von Zellklonen, die das jeweilige Plasmid, welches durch Elektroporation in die Zellen eingebracht worden war, stabil ins Genom integriert hatten. Die Expression der ASA-Fusionsproteine wurde durch Messung der Sulfataseaktivität im Medium der Mischkulturen kontrolliert (Abbildung 14). Im Medium von ASA-RAPd3-Mischkulturen war im Gegensatz zu den Medien aller anderen Mischkulturen keine erhöhte Sulfataseaktivität im Vergleich zur Negativ-Kontrolle messbar. Dies ließ vermuten, dass die Zellen entweder enzymatisch inaktives ASA-RAPd3 exprimierten oder die Zellen resistent gegenüber dem Selektionsmedium waren. Die erhöhte Sulfataseaktivität im Medium der übrigen Mischkulturen deutete darauf hin, dass die Anreicherung von Zellen, die das jeweilige ASA-Fusionsprotein stabil exprimierten, erfolgreich war.

Um die Produktionsbedingungen zu optimieren, wurden aus den Mischkulturen Einzelzellklone isoliert. Die Klone, die sich durch eine hohe Sulfataseaktivität im Medium sowie ein schnelles Wachstum auszeichneten, wurden für die Produktion der rekombinanten ASA-Fusionsproteine verwendet (Abbildung 15). Wie bereits aufgrund der niedrigen Sulfataseaktivität im Medium der ASA-RAPd3-Mischkultur zu erwarten war, wurden innerhalb der > 300 gerasterten Klone keine mit einer deutlich erhöhten Aktivität im Medium gefunden, so dass im Folgenden nicht mit dem ASA-RAPd3-Fusionsprotein weitergearbeitet wurde. Im Vergleich zu allen weiteren hier verwendeten ASA-Fusionsproteinen, die Peptide mit Sequenzlängen von 11-39 Aminosäuren aufweisen, besitzt ASA-RAPd3 mit 105 Aminosäuren ein verhältnismäßig langes Peptid. Auch für weitere ASA-Fusionsproteine mit langen Peptid-Domänen, die im Rahmen dieser Arbeit keine Anwendung fanden, wurde eine schwache Expression beobachtet. Es ist demnach anzunehmen, dass sich fusionierte Peptide ab einer gewissen Länge negativ auf eine effiziente Expression, zumindest in dem hier verwendeten CHO-Expressionssystem, auswirken.

Die in Abbildung 15 gekennzeichneten Einzelzellklone wurden in MiniPERM® Bioreaktoren kultiviert, die speziell für die effiziente Kultivierung von Zellen in hoher Dichte bei gleichzeitiger Produktion rekombinanter Proteine in hoher Konzentration

entwickelt wurden (www.sarstedt.com). Da das Vorhandensein toter Zellen im Medium zu einer Anreicherung lysosomaler ASA ohne Linker und Peptid führen könnte, wurden die zwei- bis dreimal wöchentlich gesammelten Überstände mittels Westernblot kontrolliert. Sobald deutliche Banden auf Höhe der Wildtyp-ASA zu sehen waren, wurden die jeweiligen Überstände und Zellen verworfen. Nach Aufreinigung und Aufkonzentrieren der gesammelten Überstände stand mit 8-20 mg Gesamtausbeute eine ausreichende Menge der rekombinanten Fusionsproteine für die folgenden *in vitro* und *in vivo* Versuche zur Verfügung.

6.1.1 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten ASA-Fusionsproteine

Um den Einfluss der fusionierten Peptide auf charakteristische biochemische Eigenschaften der ASA zu untersuchen, wurden u.a. das Glykosylierungsmuster, der M6P-Gehalt und die spezifische Aktivität der rekombinanten ASA-Fusionsproteine ermittelt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass alle ASA-Fusionsproteine enzymatisch aktiv sind. Die spezifische Aktivität von ASA-ApoE-I, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 war im Vergleich zu ASA um 33 bzw. 37 % vermindert. Für ASA-Tat und ASA-ApoB wurde eine spezifische Aktivität von 29 bzw. 30 U/mg ermittelt, die der der verwendeten ASA (27 U/mg) entspricht. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die fusionierten Peptide das katalytische Zentrum der ASA nicht blockieren und auch nicht auf andere Weise die enzymatische Funktion des Enzyms wesentlich beeinträchtigen. Aus früheren Experimenten ist bekannt, dass die Effizienz der Bildung von Formylglycin aus dem hochkonservierten Cystein im aktiven Zentrum der ASA unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen variieren kann (Schröder et al., 2010). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, besitzen Sulfatasen ohne diese posttranslationale Modifikation, die durch das C_α-Formylglycin generierende Enzym (FGE) katalysiert wird, keine katalytische Aktivität. Es ist denkbar, dass die geringfügig erniedrigten spezifischen Aktivitäten von ASA-ApoE-I, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 dadurch zustande gekommen sind, dass die produzierenden CHO-S Zellen vergleichsweise viel Enzym sezernierten und nicht genügend FGE zur Verfügung stand, um die Cystein-Reste aller Fusionsprotein-Moleküle in das für die Enzymaktivität essentielle C_α-Formylglycin umzuwandeln. Tatsächlich lagen die Expressionshöhen von ASA-ApoE-I, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 mit 24-26 mg/l deutlich höher als die von ASA-Tat und ASA-ApoB mit ungefähr 15 mg/l.

In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass Veränderungen der N-Glykosylierung lysosomaler Hydrolasen die Aktivität, Stabilität und Oligomerisierung der Enzyme beeinflussen. Des Weiteren kann eine Veränderung der N-Glykan-Struktur die Sortierung der lysosomalen Enzyme im Golgi beeinträchtigen sowie zu ihrer Akkumulation im ER führen (Pohl et al., 2009). Auch bei der ERT vermitteln die N-gebundenen Oligosaccharide den Transport des intravenös injizierten Enzyms in die Lysosomen der defizienten Zellen und sind daher von großer Bedeutung (Storch und Braulke, 2005). Die humane ASA besitzt drei N-Glykosylierungsstellen, die vorwiegend Oligosaccharide vom mannosereichen Typ tragen (Schröder et al., 2010). Die Behandlung der ASA-Fusionsproteine mit dem Enzym EndoH, welches ausschließlich N-Glykane vom mannosereichen Typ spaltet, führte mit Ausnahme von ASA-ApoE-II zu einer Molekulargewichtsabnahme von ca. 3,5-5 kDa, die mit der von Wildtyp-ASA vergleichbar war (Abbildung 18). ASA-ApoE-II zeigte nach EndoH-Behandlung lediglich eine Reduktion um ca. 1 kDa. Dagegen führte die Abspaltung aller drei Oligosaccharid-Typen (mannosereich, hybrid, komplex) durch die Behandlung mit PNGase F zu einer Molekulargewichtsabnahme, die in etwa der der Wildtyp-ASA entsprach. Daraus lässt sich schließen, dass mit Ausnahme von ASA-ApoE-II, welches vor allem N-Glykane vom Hybrid- und/oder Komplex-Typ aufweist, bei allen anderen ASA-Fusionsproteinen mannosereiche Zuckerseitenketten vorherrschen.

Auch der M6P-Gehalt aller ASA-Fusionsproteine, ausgenommen ASA-ApoE-II, entspricht mit 2-3 M6P-Resten pro Molekül in etwa dem der ASA (2,8 mol/mol). Dagegen besitzt ASA-ApoE-II nur ca. 1 M6P-Rest pro Molekül (Tabelle 3). Die verminderte Phosphorylierung von Mannosyl-Resten steht im Einklang mit dem herabgesetzten Anteil mannosereicher N-Glykane, der für ASA-ApoE-II bestimmt wurde. Dieser Zusammenhang konnte tendenziell auch für ASA-Ang.-2 bestätigt werden. Beim Vergleich mit den übrigen Fusionsproteinen wurde der geringste Anteil N-gebundener Glykane vom mannosereichen Typ sowie das kleinste molare Verhältnis von M6P-Resten bestimmt, obwohl die Unterschiede hier verglichen mit ASA-ApoE-II deutlich geringer waren. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die ApoE-II-Domäne die N-Acetylglukosamin-1-Phosphotransferase behindert, die den ersten Schritt der Bildung von M6P-Resten katalysiert (Coutinho et al., 2012). Die Phosphorylierung von mannosereichen N-Glykanen geht der weiteren Modifizierung der Oligosaccharide voraus und beeinträchtigt ihre Reifung zu Hybrid- oder Komplex-Typ Strukturen (Miller et al., 1993). Somit könnte die für ASA-ApoE-II

beobachtete Verschiebung hin zu N-Glykanen vom Hybrid- und/oder Komplex-Typ eine Folge der geringen Mannosyl-Phosphorylierung sein.

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Eigenschaften zeigten die Fusionsproteine bezüglich der Oligomerisierung eine größere Variabilität. ASA liegt unter neutralen Bedingungen als Dimer vor und bildet nach Erreichen des Lysosoms pH-abhängig Oktamere. Die daraus resultierende Abschirmung von Cathepsin-Schnittstellen verhindert den lysosomalen Abbau, wodurch die Stabilität des Enzyms gewährleistet wird (Von Bülow et al., 2002). Unter sauren Bedingungen konnte auch hier eine effektive Oktamerisierung der ASA gezeigt werden (Abbildung 20). ASA-Tat und ASA-ApoB bildeten ebenfalls größtenteils Oktamere, wobei ein geringer Prozentsatz der Fusionsproteine als Dimer vorlag. Der Anteil dimerisierter Fusionsproteine war im Falle von ASA-ApoE-I und ASA-Ang.-2 erhöht, aber auch hier waren vorwiegend Oktamere zu finden. Nur ASA-ApoE-II bildete erneut eine Ausnahme, da die Anzahl der Dimere die der Oktamere überstieg. Daraus resultiert, dass die fusionierten Peptide die Oktamerisierung der Fusionsproteine nicht komplett verhindern, die Stabilität der Oktamere jedoch abhängig vom Peptid beeinträchtigt wird. Dabei konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der Länge des Peptids oder dem Gehalt basischer oder saurer Aminosäuren und dem Verhältnis zwischen Oktameren und Dimeren festgestellt werden.

Voraussetzung für die therapeutische Wirksamkeit der ERT ist, dass das intravenös applizierte rekombinante Enzym über Endozytose in die Zellen gelangt und dort zu den Lysosomen transportiert wird (Platt und Lachmann, 2009). Verschiedene Beispiele zeigen, dass bei einigen Sphingolipidosen die Aufnahme bzw. das zelluläre Targeting gestört ist. Zum Beispiel wurde in Makrophagen von Mäusen, die keine saure Sphingomyelinase exprimieren und damit ein Modellsystem der Niemann-Pick-Krankheit darstellen, eine erheblich reduzierte Aufnahme des applizierten rekombinanten Enzyms im Vergleich zu Wildtyp-Zellen beobachtet (Dhami und Schuchman, 2004). In Fibroblasten von Tay-Sachs-Patienten wurde zwar eine effiziente Aufnahme von β -Hexosaminidase A beobachtet, aber die Menge an lysosomal sortiertem Enzym reichte nicht aus, um das Speichermaterial GM2 Gangliosid zu hydrolysieren (Martino et al., 2002). Im Gegensatz dazu wird ASA von ASA-defizienten Zellen effizient endozytiert und korrekt sortiert (Klein et al., 2009). Die Aufnahme durch ASA-defiziente Sulfatid-speichernde Nierenzellen ist im Gegensatz zu Wildtyp-Zellen sogar um den Faktor 2 erhöht, da die

Anzahl an MPR300-Molekülen an der Zelloberfläche erhöht ist und diese Rezeptoren zudem eine gesteigerte Internalisierungsrate aufweisen. Für ASA-Tat, ASA-ApoB und ASA-ApoE-I konnte nach extrazellulärer Zugabe zu ASA-defizienten MEF Zellen eine korrekte lysosomale Lokalisation gezeigt werden (Abbildung 21). Diese Peptide wirken sich somit nicht inhibierend auf die lysosomale Sortierung aus. Auch ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 wurden zwar in die Lysosomen transportiert, allerdings war die Anzahl der Vesikel, in denen die Fusionsproteine detektiert werden konnten, im Vergleich zu Wildtyp-ASA vermindert. Nicht nur die Anzahl der Vesikel innerhalb einer Zelle, sondern auch die Anzahl an Zellen, die ASA-ApoE-II bzw. ASA-Ang.-2 in detektierbarem Maße aufgenommen hatten, war geringer (nicht gezeigt). Dies könnte auf eine verringerte M6P-abhängige Endozytoserate hinweisen, die auch in Wildtyp MEF sowie in CHO-K1 Zellen beobachtet wurde. Im Falle von ASA-ApoE-II könnte der niedrige M6P-Gehalt, der eine deutlich geringere Affinität zum MPR300 zur Folge hat, Grund für die verminderte Aufnahme sein.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass alle Fusionsproteine enzymatisch aktiv sind, nach extrazellulärer Zugabe in die Lysosomen gelangen und mit Ausnahme von ASA-ApoE-II hauptsächlich mannosereiche Oligosaccharide tragen sowie einen der ASA vergleichbaren M6P-Gehalt aufweisen. Auch unter Bedingungen hoher Überexpression führt keines der Peptide zu einer Zurückhaltung der Fusionsproteine im ER. Stattdessen passieren alle ASA-Fusionsproteine die ER-Qualitätskontrolle und werden zum Golgi-Apparat weitergeleitet. Des Weiteren besitzen alle ASA-Fusionsproteine die Fähigkeit, unter sauren Bedingungen Oktamere zu bilden, auch wenn diese abhängig vom fusionierten Peptid nicht die gleiche Stabilität wie Wildtyp-ASA-Oktamere aufweisen. Es ist möglich, dass die fusionierten Peptide aus sterischen Gründen eine effektive Oktamerisierung der Fusionsproteine erschweren. Es wurde gezeigt, dass Cathepsin L unter anderem für die Degradation einer häufig vorkommenden ASA-Mutante verantwortlich ist, bei der die Bildung von Oktameren durch den Aminosäureaustausch stark beeinträchtigt ist (Von Bülow et al., 2002). Es konnte jedoch beobachtet werden, dass eine Leupeptin-vermittelte Hemmung des Cathepsin L nach 24-stündiger Fütterung von Zellen mit ASA-ApoE-II nicht zu einer gesteigerten intrazellulären Konzentration des Fusionsproteins führte (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass ASA-ApoE-II trotz der *in vitro* gemessenen verminderten Oktamerisierungsrate im Lysosom stabil ist, da

ansonsten eine erhöhte intrazelluläre ASA-ApoE-II-Konzentration nach Hemmung von Cathepsin L zu erwarten gewesen wäre.

Nach der Analyse der biochemischen Eigenschaften konnten demnach alle rekombinanten ASA-Fusionsproteine als potenziell für die ERT geeignet angesehen werden. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Fähigkeit der fusionierten Peptide, die ASA über neue Wege in Zellen zu dirigieren und ihren Übertritt über die Blut-Hirn-Schranke zu erhöhen, untersucht.

6.2 Untersuchungen zur Funktionalität der an die ASA fusionierten Peptide

Das Prinzip des gesteigerten Übertritts der ASA-Fusionsproteine über die BHS ist, dass die fusionierten Peptide an Rezeptoren bzw. an die Zelloberfläche der Gehirndothelzellen binden und die fusionierte ASA über RMT oder AMT ins Gehirn befördern sollen.

Für das Peptid Tat wurde gezeigt, dass es fusionierte Proteine wie die β -Galaktosidase oder Erythropoietin nach Injektion in die Blutzirkulation von Mäusen ins Gehirn befördert (Schwarze et al., 1999; Zhang et al., 2010). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass Tat den Transport über die BHS über AMT vermittelt (Chen und Liu, 2012). Dagegen wurde RMT als Transportweg für Peptide, die von den Apolipoproteinen E und B abgeleitet sind sowie für die synthetisch hergestellten Angiopeps beschrieben. ApoB wurde erfolgreich eingesetzt, um die fusionierten Proteine Glukocerebrosidase, GFP und die Metalloproteinase Nephilysin über die BHS zu befördern (Spencer und Verma, 2007; Spencer et al., 2011). Die Rezeptorbindedomäne des Apolipoprotein E bzw. das gesamte Protein wurden verwendet, um β -Galaktosidase, Antikörper und Nanopartikel ins ZNS zu dirigieren (Zensi et al., 2009; Sarkar et al., 2011). Für Angiopep-2 (hier: Ang.-2) wurde gezeigt, dass es den Übertritt konjugierter Nanopartikel und therapeutischer Wirkstoffe mit einem geringen Molekulargewicht wie Paclitaxel, Doxorubicin und Etoposid ins Gehirn vermittelt (Gabathuler, 2010a, 2010b).

6.2.1 Auswirkungen der fusionierten Peptide auf die zelluläre Aufnahme der ASA

Anhand verschiedener Endozytose-Versuche wurde das Potenzial der fusionierten Peptide untersucht, die ASA über neue Rezeptor-abhängige oder -unabhängige Wege in Zellen zu befördern. Dabei wurde die Aufnahme der ASA-Fusionsproteine im Vergleich zur ASA-Aufnahme in endothelialen sowie nicht-endothelialen Zellen analysiert.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass Wildtyp-ASA von CHO-K1 und MEF Zellen - als Beispiele für periphere Zellen - sehr effizient endozytiert wird. Die intrazellulären ASA-Konzentrationen betragen ca. 1,5 bzw. 1,0 ng/ μ g Gesamtprotein (Abbildung 22). Die Zugabe kompetitiver M6P-Konzentrationen reduzierte die Aufnahme um mehr als 99 % (Tabelle 4). Auch für andere periphere Zelltypen wie primäre Hepatozyten oder Nierenzellen konnte eine drastische Reduktion der ASA-Aufnahme durch kompetitive M6P-Mengen gezeigt werden (Schmitz et al., 1995; Muschol et al., 2002; Matzner et al., 2008). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Wildtyp-ASA hauptsächlich durch MPR300-vermittelte Endozytose von peripheren Zellen aufgenommen wird und andere Endozytose-Rezeptoren wie Mannose- oder Fucose-Rezeptoren keine bzw. eine untergeordnete Rolle spielen. Dagegen war in Gehirndothelzellen mit 0,02 (bEND.3) bzw. 0,04 ng/ μ g (PBCEC) eine bis zu 71-fach geringere ASA-Aufnahme zu verzeichnen (Abbildung 22). Nach Zugabe von M6P wurde die Aufnahme in bEND.3 Zellen zwar ebenfalls signifikant, allerdings nur etwa um die Hälfte, reduziert (Tabelle 4). Weiterhin war ersichtlich, dass durch Blockierung des MPR300 die hohe endozytotische Aktivität der peripheren Zellen auf die Ebene der endothelialen bEND.3 Zellen reduziert wurde. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die unterschiedlichen Aufnahmeraten in endothelialen im Vergleich zu Zellen peripheren Ursprungs allein auf eine sehr geringe MPR300-abhängige Aufnahme in Gehirndothelzellen zurückzuführen sind. Aufgrund der Beobachtung, dass die Wildtyp-ASA fast ausschließlich über den MPR300 in Zellen aufgenommen wird und dieser Rezeptor an der BHS adulter Mäuse eine sehr geringe Endozytose-Aktivität zeigt (Urayama et al., 2004, 2008), könnte der Transport intravenös injizierter ASA ins Gehirn durch eine Reduktion der MPR300-vermittelten Aufnahme in periphere Gewebe gesteigert werden. Unabhängig davon würde auch die Fähigkeit des Enzyms, alternative M6P-

unabhängige Wege über die Gehirndothelzellen zu verwenden, eine gesteigerte ASA-Konzentration im Gehirn zur Folge haben.

Die Fütterung von CHO-K1 und MEF Zellen mit ASA-Fusionsproteinen führte zu sehr unterschiedlichen Aufnahmeleistungen. Mit Ausnahme von ASA-ApoE-I in CHO-K1 Zellen wurden alle Fusionsproteine von beiden Zelltypen weniger effizient endozytiert als Wildtyp-ASA (Abbildung 23). Die intrazellulären Konzentrationen von ASA-ApoB und ASA-ApoE-I waren mit 50 bzw. 115 % der Wildtyp-ASA in CHO-K1 und 14 bzw. 72 % in MEF Zellen im Vergleich zu den übrigen Fusionsproteinen relativ hoch und wurden durch Zugabe von M6P um mehr als 98 % in CHO-K1 und mehr als 92 % in MEF Zellen vermindert. Damit war der MPR300 maßgeblich an der Endozytose dieser Fusionsproteine beteiligt. ASA-Tat, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 wurden dagegen um mehr als 96 % weniger aufgenommen als Wildtyp-ASA. Dabei war der Anteil, der über M6P-abhängige Endozytose in die Zellen gelangte, geringer. Die Blockierung des MPR300 reduzierte die Aufnahme um 76, 80 bzw. 69 %.

Glykoproteine mit zwei M6P-Resten auf demselben Glykan binden mit hoher Affinität an den MPR300 ($K_D = 1\text{-}20\text{ nM}$), wogegen die Bindung von Proteinen mit nur einem M6P-Rest schwach ist ($K_D = 6\text{-}7\text{ }\mu\text{M}$) (Byrd und MacDonald, 2000). Im Gegensatz zu ASA und den weiteren Fusionsproteinen, die 2-3 M6P-Reste pro Polypeptid aufweisen, trägt ASA-ApoE-II nur 1,2 Reste. Die im Vergleich zu Wildtyp-ASA, ASA-ApoB und ASA-ApoE-I verminderte M6P-abhängige Aufnahme von ASA-ApoE-II in CHO-K1 und MEF Zellen ist vermutlich die Folge des niedrigeren M6P-Gehalts. Überraschenderweise war auch die MPR300-vermittelte Aufnahme von ASA-Tat und ASA-Ang.-2 stark beeinträchtigt, obschon sowohl das Glykosylierungsmuster als auch der M6P-Gehalt in etwa mit dem der Wildtyp-ASA übereinstimmten. Es ist denkbar, dass das Tat-Peptid mit seinem hohen Anteil positiv geladener Aminosäuren (YGRKKRRQRRR) aufgrund der negativen Oberflächenladungen der ASA an dieser haftet, was durch den flexiblen Linker ermöglicht wird. Aus sterischen Gründen könnte die Bindung an den MPR300 dadurch stark behindert werden. Für ein Fusionsprotein bestehend aus der humanen β -Glukuronidase und dem an den C-Terminus fusionierten Tat-Peptid, GUS-Tat, wurde gegenüber der nativen β -Glukuronidase eine verminderte Aufnahme in humane Fibroblasten gefunden (Orie et al., 2005). Zudem lag der Anteil M6P-vermittelter Endozytose bei nur 30-50 %, wogegen die Internalisierung des nativen Enzyms durch die Zugabe kompetitiver M6P-Mengen

komplett inhibiert wurde. Das Fusionsprotein GUS-Tat weist demnach einige Parallelen mit ASA-Tat auf. Eine Erklärung für die verminderte M6P-abhängige Aufnahme von GUS-Tat war allerdings die geringere Phosphorylierung des Fusionsproteins, die für ASA-Tat nicht zutrifft. Der Grund für die drastisch verminderte M6P-abhängige Aufnahme von ASA-Ang.-2 konnte nicht geklärt werden. Mit Ausnahme von ASA-ApoE-II besaß ASA-Ang.-2 verglichen mit Wildtyp-ASA und den übrigen ASA-Fusionsproteinen den kleinsten Anteil mannosereicher N-Glykane (Abbildung 18) und die geringste Anzahl an M6P-Reste (Tabelle 3). Ob die Glykosylierung oder eventuelle sterische Effekte des fusionierten Peptids die MPR300-vermittelte Aufnahme vermindern, bleibt unklar.

Nichtsdestotrotz wurde ein gewisser Anteil ASA-Tat, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 M6P-vermittelt in die Zellen transportiert, da die Zugabe kompetitiver M6P-Mengen eine signifikant verminderte Endozytoserate bewirkte. Auch die lysosomale Sortierung aller Fusionsproteine nach Aufnahme in MEF-asa^{-/-} Zellen deutet darauf hin, dass eine MPR300-abhängige Aufnahme stattfindet. Durch diesen Mechanismus, der bei der ERT zur Behandlung vieler lysosomaler Speicherkrankheiten ausgenutzt wird, gelangt das rekombinante Enzym in die defizienten Zellen und wird zu den Lysosomen transportiert (Braulke und Bonifacino, 2009; Platt und Lachmann, 2009).

Die ASA-Fusionsproteine wurden von den Gehirndothelzellen (bEND.3) im Gegensatz zu den peripheren Zellen effizienter aufgenommen als Wildtyp-ASA. Während die Steigerung in Abwesenheit von M6P nur für ASA-ApoE-I, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 statistisch signifikant war (Abbildung 23), führte die Blockierung des MPR300 zu einer signifikant erhöhten Aufnahme aller ASA-Fusionsproteine im Vergleich zu Wildtyp-ASA (Abbildung 24). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Zugabe von M6P zum Medium keinen signifikanten Effekt auf die intrazelluläre Konzentration von ASA-Tat, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 in den bEND.3 Zellen hatte (Tabelle 4), für die auch in CHO-K1 und MEF Zellen eine deutlich erniedrigte M6P-abhängige Endozytose gefunden wurde.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass alle fünf Fusionsproteine überwiegend M6P-unabhängig in die Gehirndothelzellen gelangen. Aufgrund der Beobachtung, dass die Aufnahme der ASA-Fusionsproteine auch durch MPR300-defizienten MEF Zellen signifikant erhöht war (Abbildung 24), zeigte, dass die Fusionsproteine auf zusätzlichen Wegen in endotheliale sowie nicht-endotheliale Zellen gelangen.

Auch für Fusionsproteine aus Tat und β -Glukuronidase bzw. Tat und Galaktocerebrosidase konnte gezeigt werden, dass sie sowohl über M6P-vermittelte Endozytose als auch über MPR300-unabhängige Mechanismen von Zellen aufgenommen werden (Orii et al., 2005; Zhang et al., 2008; Grubb et al., 2010). Weiterhin wurde gezeigt, dass Mitglieder der LDL-Rezeptor-Familie, insbesondere der LRP-1 sowie der LDLR an der Endozytose von Apolipoprotein E bzw. B sowie davon abgeleiteten Peptiden beteiligt sind (Wang et al., 1997; Spencer und Verma, 2007; Gabathuler, 2010a). An die Rezeptorbindedomäne von Apolipoprotein B gebundene synthetische nano-LDL-Partikel sowie Liposomen wurden über LDLR-vermittelte Endozytose aufgenommen (Nikanjam et al., 2007; Kopecka et al., 2011). Für bEND.3 Zellen wurde eine RAP-sensitive Aufnahme von Nanopartikeln, die kovalent mit Apolipoprotein E verknüpft waren, gefunden, die zumindest teilweise über LRP-1 vermittelt wurde (Wagner et al., 2012). Auch Angiopep-modifizierte Nanopartikel sowie Angiopep-2 alleine wurden von Gehirndothelzellen vermutlich über LRP-1-vermittelte Endozytose aufgenommen (Ke et al., 2009; Bertrand et al., 2010).

Es wurde zudem gezeigt, dass der LRP-1 *in vitro* und *in vivo* ein effizientes Transportsystem darstellt, welches die Transzytose von Proteinen vom Blut ins Gehirn vermittelt. Im Gegensatz zu seiner Rolle als Endozytose-Rezeptor z.B. in Epithelien wurde im *in vitro* BHS-Modell bestätigt, dass der LRP-1 hier als Transzytose-Rezeptor fungiert (Gabathuler, 2010b).

Im folgenden Versuch sollte analysiert werden, ob der LRP-1 einen Einfluss auf die Endozytose der ASA-Fusionsproteine hat. Die Aufnahme von ASA-Tat, ASA-ApoE-I, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 durch CHO-lrp^{-/-} Zellen war im Vergleich zu CHO-wt Zellen signifikant erniedrigt. Auch ASA-ApoB zeigte die gleiche Tendenz, der Unterschied erreichte jedoch keine Signifikanz (Abbildung 25). Dagegen wurde Wildtyp-ASA durch LRP-exprimierende sowie LRP-defiziente Zellen mit gleicher Rate endozytiert. Daraus kann gefolgert werden, dass Tat, ApoE-I, ApoE-II und Ang.-2 eine LRP-1-abhängige zelluläre Aufnahme der fusionierten ASA vermitteln. Diese könnte zumindest teilweise auch für die gesteigerte MPR300-unabhängige Endozytose verantwortlich sein, die für MEF-mpr^{-/-} sowie für bEND.3 Zellen gefunden wurde. Die Unterschiede zwischen den CHO-wt und CHO-lrp^{-/-} Zellen waren allerdings relativ gering. Dies lässt vermuten, dass eventuell weitere Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie an der Endozytose von ASA-ApoB, ASA-ApoE-I, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2 beteiligt

sind. Neben LRP-1 handelt es sich zum Beispiel auch bei LRP-2 und LDLR um multifunktionelle Rezeptoren mit verschiedenen Liganden, die auch an der BHS exprimiert werden (Rip et al., 2009). ASA-Tat könnte zudem über alternative Wege wie der adsorptiven Endozytose internalisiert werden. Für ein Fusionsprotein aus der humanen β -Glukuronidase und dem Tat-Peptid wurde bereits gezeigt, dass es zum Teil über adsorptive Endozytose in Zellen aufgenommen wird (Orii et al., 2005).

Im Gegensatz zu ASA-ApoE-I, ASA-ApoE-II und ASA-Ang.-2, für die aufgrund vorheriger Studien (s.o.) eine LRP-1-vermittelte zelluläre Aufnahme vermutet wurde, war die Rezeptor-abhängige Endozytose von ASA-Tat überraschend. Vielzählige Ergebnisse deuten darauf hin, dass Tat nach Bindung an die negativ geladene Zelloberfläche über adsorptive Endozytose in verschiedene Zellen gelangt und auch über die Endothelzellen ins Gehirn transzytiert wird (Lundberg et al., 2003; Orii et al., 2005; Chen und Liu, 2012). In einer Studie, in der der Mechanismus zur Entwicklung neurologischer Krankheiten nach HIV-1 Infektion untersucht worden war, wurde allerdings eine LRP-abhängige Aufnahme des Tat-Proteins in Neurone beobachtet (Liu et al., 2000).

Zusammenfassend zeigen die Endozytose-Versuche, dass die fusionierten Peptide die Aufnahme der ASA in periphere Zellen vermindern und gleichzeitig eine erhöhte Endozytose in Gehirndothelzellen vermitteln. Damit sind beide zuvor genannten Bedingungen für einen verbesserten BHS-Übertritt erfüllt.

6.2.2 Exkurs: Untersuchungen zum transendothelialen Transport von Wildtyp-ASA am Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke

In vorangegangenen Studien wurde beobachtet, dass nach intravenöser Injektion hoher ASA-Dosen geringe Mengen an ASA im Gehirn der behandelten Mäuse zu finden sind. Die Behandlung ASA-defizienter Mäuse führte zu einer Reduktion der Sulfatidspeicherung und zu funktionellen Verbesserungen des ZNS (Matzner et al., 2005, 2009). Da unbekannt war, wie die ASA die Endothelzellen überwindet, sollte der zugrundeliegende Transportmechanismus anhand eines etablierten Zellkulturmodells der BHS untersucht werden (Franke et al., 1999; von Wedel-Parlow et al., 2009). Die Nutzung eines Zellkulturmodells hatte den Vorteil, dass im Vergleich zu *in vivo* Experimenten an Mäusen sehr viel weniger rekombinantes Enzym benötigt wurde und die Versuche deutlich schneller durchführbar waren. Durch die Messung des transendothelialen elektrischen

Widerstandes (*transendothelial electrical resistance*, TEER) während des gesamten Experiments wurde die Barriere-Integrität der Zellkultur-BHS sichergestellt. Mit TEER-Werten von $> 1000 \Omega \text{ cm}^2$ erreichte das BHS-Modell Widerstände, die mit *in vivo* gemessenen Werten vergleichbar sind (Butt et al., 1990). Ansätze, deren TEER-Werte unter $550 \Omega \text{ cm}^2$ betragen, wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Unter nicht pathologischen Bedingungen können Proteine die BHS auf zwei verschiedenen Wegen überwinden: der adsorptiv-vermittelten (AMT) sowie der Rezeptor-vermittelten (RMT) Transzytose (Abbott et al., 2006, 2010). Um herauszufinden, welchen Transportweg die ASA zur Überwindung der Endothelzellen verwendet, wurde der transendotheliale Transfer in Abhängigkeit von der Konzentration, der Zeit sowie der Ladung untersucht.

Ein Merkmal von Rezeptor-vermitteltem Transport ist die Sättigbarkeit. An der BHS befinden sich verschiedenen Rezeptoren, die die Transzytose von Proteinen ins Gehirn vermitteln (Chen und Liu, 2012). Dazu zählen u.a. der Insulin- sowie der Transferrin-Rezeptor. Für beide Rezeptoren wurden an isolierten humanen Hirnkapillaren Dissoziationskonstanten im niedrigen nanomolaren Bereich gefunden. Für die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor wurde 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. Aufsteigende ASA-Konzentrationen im apikalen Medium führten zu einem nahezu linearen Anstieg der ASA-Konzentrationen im basolateralen Medium (Abbildung 30). Die in diesem Experiment maximal eingesetzte ASA-Konzentration betrug 1 mg/ml , was ca. $18 \mu\text{M}$ entspricht. Damit lag die ASA-Konzentration bereits mehr als 1000-fach über der für die Bindung von Insulin bzw. Transferrin an die jeweiligen Rezeptoren ermittelten Dissoziationskonstante. Auch nach Zugabe von 5 mg/ml ASA, was einer molaren Konzentration von ca. $88 \mu\text{M}$ entspricht, wurde keine Sättigung des transendothelialen Übertritts festgestellt. Diese Ergebnisse sprechen gegen einen Rezeptor-vermittelten Transport. Für adsorptiv-vermittelte Transportprozesse über die BHS wurden mikromolare Halbsättigungskonstanten gefunden (Hervé et al., 2008). Eine genaue Bestimmung der Halbsättigungskonstante für ASA konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden, da apikal eingesetzte Konzentrationen von $> 5 \text{ mg/ml}$ zu einem Zusammenbruch der Barriere-Integrität führten.

Versuche mit ladungs-fraktionierter ASA lieferten weitere Hinweise auf einen adsorptiv-vermittelten Transport (Abbildung 32). Während die am wenigsten negativ geladene ASA (Fr. 1) etwa 1,5-fach besser über die BHS gelangte als die Mischfraktion, wurde die stärker negativ geladene ASA aus Fraktionen 3, 4 und 5 signifikant schlechter über die Endothelzellen transportiert. Dies ist im Einklang mit dem für AMT beschriebenen Mechanismus, bei dem elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der negativ geladenen Endothelzelloberfläche und positiven Ladungen der zu transportierenden Makromoleküle den Transzytosevorgang auslösen (Hervé et al., 2008).

Allerdings konnte in weiteren Experimenten gezeigt werden, dass der transendotheliale Transfer durch die Zugabe kompetitiver M6P-Konzentrationen zum apikalen Medium signifikant erniedrigt war (Frank Matthes, Dissertation). Dies lässt neben der AMT auf eine Beteiligung des MPR300 am Transport der ASA über die *in vitro* BHS schließen.

Anhand der in dieser Arbeit und zusätzlich durchgeführter Versuche wurde ein Modell des Transports von ASA über die BHS entwickelt (Matthes et al., 2011), in dem sowohl adsorptive Endozytose als auch eine MPR300-vermittelte Internalisierung an der Transzytose der ASA beteiligt sind. Diese Hypothese unterstützt Ergebnisse von Sly und Mitarbeitern, die den Transport des lysosomalen Enzyms β -Glukuronidase nach ERT in einem Mausmodell der Mukopolysaccharidose Typ VII untersucht haben (Urayama et al., 2007; Grubb et al., 2008). Sie fanden heraus, dass sowohl eine Überexpression des MPR300 an der BHS als auch eine Inaktivierung der M6P-Reste des Enzyms eine Steigerung der β -Glukuronidase-Spiegel im Gehirn zur Folge hatte. Diese zunächst widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse könnten durch das für den ASA-Transport vorgeschlagene Modell erklärt werden, indem M6P-Reste einerseits die MPR300-vermittelte Endozytose stimulieren und andererseits auf Grund ihrer negativen Ladung die AMT behindern (Matthes et al., 2011).

6.2.3 Einfluss der fusionierten Peptide auf den transendothelialen Übertritt der ASA *in vitro* und ihre pharmakokinetischen Eigenschaften *in vivo*

Die Fusionierung der Peptide an die ASA hatte zum Ziel, den Übertritt des Enzyms über die BHS zu verbessern und somit aufgrund einer höheren ASA-Konzentration im Gehirn die Effizienz der ERT zu steigern.

6.2.3.1 Transendothelialer Übertritt über die *in vitro* Blut-Hirn-Schranke

Der Transport der ASA-Fusionsproteine wurde zunächst *in vitro* am Zellkulturmodell der BHS untersucht. Während ASA-Tat und ASA-Ang.-2 dieselben Transportraten wie Wildtyp-ASA über die Endothelzellen zeigten, waren die von ASA-ApoB, ASA-ApoE-I und ASA-ApoE-II signifikant erhöht. ASA-ApoB wurde 2,2-fach, ASA-ApoE-I 2,0-fach und ASA-ApoE-II 1,5-fach besser über die BHS transportiert (Abbildung 34). Dabei zeigte sich in keinem der Fälle ein störender Einfluss der Peptide auf die Barriere-Funktion. In verschiedenen Zellkultur- und Mausmodellen wurde gezeigt, dass das Tat-Protein die Integrität der BHS beeinflusst, indem es zu einer Steigerung der endothelialen Permeabilität (Kim et al., 2003; Xu et al., 2012), einer veränderten Expression von *Tight Junctions*-Proteinen (András et al., 2003; Pu et al., 2005) sowie zu Apoptose von endothelialen Zellen führt (Kim et al., 2003). Ein solcher Effekt wurde für das in dieser Arbeit verwendete Tat-Peptid nicht gefunden. Zudem war gezeigt worden, dass das Tat-Peptid zwar die Aufnahme von fusioniertem GFP in bEND.3 Zellen und Astrozyten vermittelt, allerdings keinen effizienten Transport über eine Endothelzellschicht aus bEND.3 Zellen bewirkt. Die hier für ASA-Tat beobachteten Ergebnisse sind im Einklang mit diesen Ergebnissen von Simon und Mitarbeitern (2011). Obwohl Tat eine signifikant gesteigerte Aufnahme der fusionierten ASA in bEND.3 Zellen vermittelte, konnte kein verstärkter Übertritt über die *in vitro* BHS festgestellt werden. Für das Apolipoprotein E und davon abgeleitete Peptide wurde in früheren Studien vielfach gezeigt, dass sie nur in Anwesenheit von Lipiden effektiv an den Rezeptor binden (Innerarity et al., 1979; Clayton et al., 1999; Ruiz et al., 2005). Allerdings wurden auch kontroverse Ergebnisse erzielt, die Lipid-unabhängige Interaktionen zwischen Apolipoprotein E und davon abgeleiteten Rezeptor-bindenden Peptiden mit LRP zeigen (Narita et al., 2002; Croy et al., 2004). Für ASA-ApoE-I wurde nach Zugabe von DPC-Micellen bzw. DOPC-Liposomen zum

apikalen Medium kein erhöhter transendothelialer Transfer beobachtet (Abbildung 35). Da ASA-ApoE-I aber sowohl ohne Lipide als auch in Anwesenheit von Lipiden effizienter über die Endothelzellen gelangte als Wildtyp-ASA, kann davon ausgegangen werden, dass ASA-ApoE-I und Mitglieder der LDL-Rezeptor Familie Lipid-unabhängig miteinander interagieren und Lipide keine Auswirkung auf die Affinität des Fusionsproteins zum Rezeptor haben.

6.2.3.2 Pharmakokinetik

Wie gezeigt werden konnte, fördern einige der in dieser Arbeit verwendeten Peptide den transendothelialen Übertritt der fusionierten ASA über die *in vitro* BHS. In den folgenden Versuchen sollte getestet werden, ob sich der im Zellkulturmodell gesteigerte BHS-Übertritt von ASA-ApoB, ASA-ApoE-I und ASA-ApoE-II *in vivo* bestätigen lässt und ob die Peptide weitere pharmakokinetische Eigenschaften der ASA beeinflussen.

Als Kontrolle wurde zunächst die Gewebsverteilung von Wildtyp-ASA untersucht. 2 h nach Injektion von 20 mg ASA/kg Körpergewicht in die Schwanzvene von ASA-Knockout-Mäusen war das Enzym mit Konzentrationen von 3246 bzw. 1199 ng/mg Organlysat hauptsächlich in Leber und Milz zu finden. In der Niere konnte eine ASA-Konzentration von 37 ng/mg werden. Im Gehirn betrug die ASA-Konzentration dagegen lediglich 0,6 ng/mg und stellte damit einen sehr geringen Anteil der injizierten ASA-Menge dar (n = 25, Daten nicht gezeigt). Auch unter Zellkulturbedingungen wurde die ASA von Gehirnendothelzellen in sehr geringem Maße aufgenommen, wogegen nicht-endotheliale Zellen eine bis zu 59-fach höhere Endozytoserate aufwiesen (Abbildung 22). Übereinstimmend mit der *in vivo* beobachteten Gewebeverteilung werden im Falle einer typischen ERT nach intravenöser Injektion nur äußerst geringe Mengen ASA in das Gehirn befördert, da die endothelialen mit den nicht-endothelialen Zellen in der Peripherie um das substituierte Enzym konkurrieren müssen. Wie bereits erwähnt, könnte eine Minderung der M6P-abhängigen Aufnahme eine Umverteilung des injizierten Enzyms zugunsten der Gehirnendothelzellen bewirken, da weniger Enzym in der Peripherie abgefangen wird. Zudem war die M6P-unabhängige Aufnahme aller ASA-Fusionsproteine in Gehirnendothelzellen (bEND.3) signifikant erhöht (Abbildung 24A).

Wie in Abbildung 36 gezeigt, war die Gewebeverteilung der ASA-Fusionsproteine 2 h nach intravenöser Injektion sehr unterschiedlich. Tat und Ang.-2 hatten keinerlei Effekt auf

die Verteilung der fusionierten ASA in peripheren Geweben wie Leber, Milz und Niere im Vergleich zu der Wildtyp-ASA. Übereinstimmend mit dem unveränderten Transport über die *in vitro* BHS war auch der Eintritt ins Gehirn nicht erhöht. Wie bereits für verschiedene fusionierte Makromoleküle gezeigt werden konnte (Orii et al., 2005; Zhang et al., 2008; Simon et al., 2011) vermittelt das Tat-Peptid eine Aufnahme der fusionierten ASA in verschiedene Zelltypen. Tat bewirkte allerdings keinen erhöhten Transport der fusionierten ASA ins Gehirn und zeigte keine gesteigerte Transzytose über die *in vitro* BHS, was aufgrund vorheriger Ergebnisse zu erwarten gewesen wäre (Schwarze et al., 1999; Zhang et al., 2010; Yu et al., 2012). Die Beobachtungen sind aber im Einklang mit Ergebnissen aus zwei Studien, in denen Tat mit β -Glukuronidase bzw. GFP fusioniert wurde. Wie für ASA-Tat gezeigt, wurde auch hier eine MPR-unabhängige zelluläre Aufnahme der Tat-Fusionsproteine gefunden, der Transport ins Gehirn bzw. der Transfer über eine endotheliale Einzelzellschicht war aber nicht erhöht (Orii et al., 2005; Simon et al., 2011). Für Ang.-2 wurde bislang vor allem eine erhöhte Gehirnkonzentration konjugierter Nanopartikel oder therapeutischer Wirkstoffe mit geringem Molekulargewicht erzielt (Gabathuler, 2010a, 2010b). Demnach wäre es denkbar, dass das Peptid zwar wie berichtet über LRP-vermittelte Transzytose ins Gehirn gelangt, aber nicht fähig ist, den Transport fusionierter Proteine, wie hier für ASA-Ang.-2 gezeigt wurde, über die BHS zu vermitteln.

Mit ASA-ApoE-I und ASA-ApoE-II konnten dagegen signifikant höhere Gehirnkonzentrationen als mit Wildtyp-ASA erreicht werden. Dieses ist im Einklang mit der vermehrten Aufnahme in bEND.3 Zellen sowie dem gesteigerten transendothelialen Transport, der im *in vitro* Modell der BHS beobachtet wurde. Wie in Abbildung 36 zu erkennen ist, war die Konzentration im Gehirn von ASA-ApoE-II höher als die von ASA-ApoE-I, was mit einem verminderten M6P-Gehalt, einer geringeren Aufnahme in CHO-K1 und MEF Zellen sowie einer verlängerten Serumhalbwertszeit des Fusionsproteins einhergeht (Tabelle 5). Für ASA-Tat, ASA-ApoB, ASA-ApoE-I und ASA-Ang.-2 wurden Serumhalbwertszeiten zwischen 13 und 16 min ermittelt. Diese waren gegenüber der für Wildtyp-ASA gemessenen Serumhalbwertszeit von 11 min nur leicht erhöht. ASA-ApoE-II blieb dagegen mit einer Halbwertszeit von 30 min ca. zwei- bis dreimal länger im Blut, was vermutlich auf die geringere Anzahl an M6P-Resten pro Molekül zurückzuführen ist. Das längere Vorhandensein von ASA-ApoE-II in der Zirkulation könnte sich positiv auf die über LRP-1 vermittelte Transzytose über die BHS ins Gehirn auswirken. Diese Hypothese wird unterstützt durch Studien, in denen die N-gebundenen

Oligosaccharide des lysosomalen Enzyms β -Glukuronidase chemisch modifiziert wurden, um die Aufnahme über den MPR300 oder andere Kohlenhydrat-abhängige Rezeptoren zu unterbinden (Grubb et al., 2008; Huynh et al., 2012). Im Vergleich zu dem unmodifizierten Enzym besaß die modifizierte β -Glukuronidase eine um mehr als den Faktor 100 verlängerte Halbwertszeit, die nach Ansicht der Autoren für den gesteigerten Übertritt ins Gehirn und den damit verbundenen effektiven Abbau neuronalen Speichermaterials verantwortlich war. Zudem ist auch denkbar, dass die mit einem geringeren M6P-Gehalt einhergehende reduzierte Anzahl negativer Ladungen zu einer erhöhten adsorptiven Transzytose von ASA-ApoE-II über die BHS führt (Matthes et al., 2011). Mit Hilfe der *in vitro* BHS konnte gezeigt werden, dass weniger negativ geladene ASA effizienter über die Endothelzellen gelangt als ASA mit einer höheren Anzahl negativer Ladungen (s. dazu auch Kapitel 6.2.2).

Im Gegensatz zu ApoE-I und ApoE-II bewirkte ApoB keine Anreicherung des Enzyms im Gehirn, und die gemessenen Werte lagen sogar unter denen von Wildtyp-ASA. Dieses Ergebnis war überraschend, da für ASA-ApoB unter allen Fusionsproteinen im BHS-Zellkulturmodell der effizienteste transendotheliale Transfer gemessen wurde. Diese *in vitro* und *in vivo* erscheinen widersprüchlich. Obwohl ApoB in der Lage ist, die fusionierte ASA vermutlich über Rezeptor-vermittelte Transzytose über die BHS zu befördern, vermittelt das Peptid keinen gesteigerten Übertritt der ASA ins Gehirn. Eine Begründung könnte sein, dass ApoB an Rezeptoren in peripheren Geweben bindet, so dass das Fusionsprotein ASA-ApoB rasch aus der Zirkulation entfernt wird und dem Gehirn wenig Enzym zur Verfügung steht. Es könnte spekuliert werden, dass der ubiquitär exprimierte LDLR (Go und Mani, 2012) der Grund für eine rasche Aufnahme von ASA-ApoB in periphere Gewebe sein könnte. Allerdings spricht das Fehlen einer vermehrten Anreicherung von ASA-ApoB in der Leber, dem Organ mit der höchsten LDLR-vermittelten endozytotischen Aktivität (Spady et al., 1983), gegen diese Hypothese. Die von Spencer und Verma (2007) publizierten Ergebnisse, die einen ApoB-abhängigen Transport von fusionierter Glukocerebrosidase und fusioniertem GFP ins Gehirn zeigen, konnten für ASA-ApoB nicht bestätigt werden (Abbildung 36). Allerdings sind die Ergebnisse nicht direkt miteinander vergleichbar. Im Gegensatz zu der hier verwendeten intravenösen Applikation definierter Mengen des rekombinanten Fusionsproteins bzw. der Wildtyp-ASA wurden in der Studie lentivirale Vektoren zur Expression der rekombinanten Proteine verwendet. Nach intraperitonealer Injektion der Lentiviren gelangen diese in die

Leber, die als Depotorgan für die Produktion und Sekretion der Proteine dient. Demnach kann nicht ausgeschlossen werden, dass das rekombinante Fusionsprotein und das Kontrollprotein (ohne ApoB-Domäne) unterschiedlich stark exprimiert werden. Es ist denkbar, dass neben dem beschriebenen ApoB-abhängigen Transport ins Gehirn auch höhere Konzentrationen im Blut zu einem verstärkten Übertritt des rekombinanten Proteins über die BHS führen können.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass vom Apolipoprotein E abgeleitete Peptide sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Lage sind, den Übertritt des fusionierten Enzyms ASA über die BHS sowie dessen Transport ins Gehirn zu erhöhen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die beiden Fusionsproteine ASA-ApoE-I und ASA-ApoE-II an den Rezeptor LRP-1 binden, der als leistungsfähiges Transportsystem den schnellen Übertritt von Proteinen aus dem Blut ins Gehirn vermittelt (Gabathuler, 2010b). Dies lässt vermuten, dass auch der Gebrauch weiterer LRP-1 Liganden wie z.B. Melanotransferrin und RAP, für die bereits der Transport über die BHS gezeigt werden konnte (Chen und Liu, 2012), die therapeutische Effizienz der ERT zur Behandlung verschiedener lysosomaler Speicherkrankheiten steigern könnte. Die Verwendung von RAP als „Trojan horse“ scheiterte in dieser Arbeit an der Produktion des Fusionsproteins ASA-RAPd3.

Es wurde in früheren Studien gezeigt, dass die Behandlung von MLD-Mäusen mit hohen Dosen rekombinanter ASA eine Reduktion der Sulfatid-Speicherung im Gehirn zur Folge hat. Dieser Effekt wird durch geringe Mengen ASA bedingt, die das Gehirnparenchym erreichen (Matzner et al., 2005, 2009; Matthes et al., 2012). Des Weiteren ist bekannt, dass unter MLD-Patienten geringe Unterschiede der ASA-Restaktivität einen starken Einfluss auf den Beginn und die Schwere der Krankheit haben (Von Figura et al., 2001). Daher könnte auch schon eine Verdopplung der ASA-Konzentration im Gehirn, wie sie für ASA-ApoE-II in dieser Arbeit gefunden wurde, den therapeutischen Nutzen einer ERT erheblich verbessern. Diese Hypothese müsste durch weitere Studien wie durch eine Langzeittherapie mit ASA-ApoE-II bestätigt werden. Des Weiteren könnte eine Reduktion des M6P-Gehalts des ASA-ApoE-I den Übertritt des Enzyms ins Gehirn erhöhen, da die Gehirnkapillaren längere Zeit höheren Konzentrationen des Fusionsproteins ausgesetzt wären.

7 Literatur

Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiology of Disease* 37, 13–25.

Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E. (2006). Astrocyte – endothelial interactions at the blood – brain barrier. *Nature Reviews. Neuroscience* 7, 41–53.

András, I.E., Pu, H., Deli, M.A., Nath, A., Hennig, B., Toborek, M. (2003). HIV-1 Tat Protein Alters Tight Junction Cultured Brain Endothelial Cells. *Journal of Neuroscience Research* 74, 255–265.

Arai, R., Ueda, H., Kitayama, A., Kamiya, N., Nagamune, T. (2001). Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein. *Protein Engineering* 14, 529–532.

Ballabio, A., Gieselmann, V. (2009). Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793, 684–696.

Baum, H., Dogson, K.S., Spencer, B. (1959). The assay of arylsulphatases A and B in human urine. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 4, 453–455.

Beck, M. (2009). Agalsidase alfa for the treatment of Fabry disease: new data on clinical efficacy and safety. *Expert Opinion on Biological Therapy* 9, 255–261.

Beck, M. (2010). Therapy for lysosomal storage disorders. *IUBMB Life* 62, 33–40.

Begley, D.J. (2004). Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities. *Pharmacology & Therapeutics* 104, 29–45.

Begley, D.J., Pontikis, C.C., Scarpa, M. (2008). Lysosomal storage diseases and the blood-brain barrier. *Current Pharmaceutical Design* 14, 1566–1580.

Berger, J., Löschl, B., Bernheimer, H., Lugowska, A., Tyłki-Szymanska, A., Gieselmann, V., Molzer, B. (1997). Occurrence, distribution, and phenotype of arylsulfatase A mutations in patients with metachromatic leukodystrophy. *American Journal of Medical Genetics* 69, 335–340.

Bertrand, Y., Currie, J.-C., Demeule, M., Régina, A., Ché, C., Abulrob, A., Fatehi, D., Sartelet, H., Gabathuler, R., Castaigne, J.-P., et al. (2010). Transport characteristics of a novel peptide platform for CNS therapeutics. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14, 2827–2839.

Biffi, A., Lucchini, G., Rovelli, A., Sessa, M. (2008). Metachromatic leukodystrophy: an overview of current and prospective treatments. *Bone Marrow Transplantation* 42 *Suppl* 2, S2–6.

- De Boer, A.G., Gaillard, P.J. (2007). Drug targeting to the brain. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 47, 323–355.
- Brady, R.O. (2006). Enzyme replacement for lysosomal diseases. *Annual Review of Medicine* 57, 283–296.
- Braulke, T., Bonifacino, J.S. (2009). Sorting of lysosomal proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793, 605–614.
- Buss, J.E., Stull, J.T. (1983). Measurement of chemical phosphate in proteins. *Methods in Enzymology* 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. *Journal of Physiology* 429, 47–62.
- Byrd, J.C., MacDonald, R.G. (2000). Mechanisms for high affinity mannose 6-phosphate ligand binding to the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 18638–18646.
- Von Bülow, R., Schmidt, B., Dierks, T., Schwabauer, N., Schilling, K., Weber, E., Usón, I., Von Figura, K. (2002). Defective oligomerization of arylsulfatase a as a cause of its instability in lysosomes and metachromatic leukodystrophy. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 9455–9461.
- Chen, Y., Liu, L. (2012). Modern methods for delivery of drugs across the blood – brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64, 640–665.
- Ché, C., Yang, G., Thiot, C., Lacoste, M.-C., Currie, J.-C., Demeule, M., Régina, A., Béliveau, R., Castaigne, J.-P. (2010). New Angiopep-modified doxorubicin (ANG1007) and etoposide (ANG1009) chemotherapeutics with increased brain penetration. *Journal of Medicinal Chemistry* 53, 2814–2824.
- Clarke, L.A., Wraith, J.E., Beck, M., Kolodny, E.H., Pastores, G.M., Muenzer, J., Rapoport, D.M., Berger, K.I., Sidman, M., Kakkis, E.D., et al. (2009). Long-term efficacy and safety of laronidase in the treatment of mucopolysaccharidosis I. *Pediatrics* 123, 229–240.
- Clayton, D., Brereton, I.M., Kroon, P.A., Smith, R. (1999). NMR studies of the low-density lipoprotein receptor-binding peptide of apolipoprotein E bound to dodecylphosphocholine micelles. *Protein Science* 8, 1797–1805.
- Colsch, B., Afonso, C., Turpin, J.-C., Portoukalian, J., Tabet, J.-C., Baumann, N. (2008). Sulfogalactosylceramides in motor and psycho-cognitive adult metachromatic leukodystrophy: relations between clinical, biochemical analysis and molecular aspects. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1780, 434–440.
- Conzelmann, E., Sandhoff, K. (1991). Biochemical basis of late-onset neurolipidoses. *Developmental Neuroscience* 13, 197–204.

- Coutinho, M.F., Prata, M.J., Alves, S. (2012). Mannose-6-phosphate pathway: a review on its role in lysosomal function and dysfunction. *Molecular Genetics and Metabolism* 105, 542–550.
- Cox, T.M., Cachón-González, M.B. (2012). The cellular pathology of lysosomal diseases. *The Journal of Pathology* 226, 241–254.
- Croy, J.E., Brandon, T., Komives, E.A. (2004). Two apolipoprotein E mimetic peptides, ApoE(130-149) and ApoE(141-155)2, bind to LRP1. *Biochemistry* 43, 7328–7335.
- Dehouck, B., Fenart, L., Dehouck, M.P., Pierce, A., Torpier, G., Cecchelli, R. (1997). A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *The Journal of Cell Biology* 138, 877–889.
- Demeule, M., Currie, J.-C., Bertrand, Y., Ché, C., Nguyen, T., Régina, A., Gabathuler, R., Castaigne, J.-P., Béliveau, R. (2008a). Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2. *Journal of Neurochemistry* 106, 1534–1544.
- Demeule, M., Re, A., Che, C., Poirier, J., Nguyen, T., Gabathuler, R., Castaigne, J., Be, R. (2008b). Identification and Design of Peptides as a New Drug Delivery System for the Brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 324, 1064–1072.
- Dhami, R., Schuchman, E.H. (2004). Mannose 6-phosphate receptor-mediated uptake is defective in acid sphingomyelinase-deficient macrophages: implications for Niemann-Pick disease enzyme replacement therapy. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 1526–1532.
- Dierks, T., Schlotawa, L., Frese, M.-A., Radhakrishnan, K., Von Figura, K., Schmidt, B. (2009). Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolipidosis II/III and Niemann-Pick C1 disease - Lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793, 710–725.
- Eckhardt, M. (2008). The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. *Molecular Neurobiology* 37, 93–103.
- Eckhardt, M. (2010). Pathology and current treatment of neurodegenerative sphingolipidoses. *Neuromolecular Medicine* 12, 362–382.
- Ehrlich, P. (1885). *Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus: Eine farbenanalytische Studie* (Berlin: Hirschwald).
- Ellgaard, L., Holtet, T.L., Nielsen, P.R., Etzerodt, M., Gliemann, J., Thøgersen, H.C. (1997). Dissection of the domain architecture of the alpha2macroglobulin-receptor-associated protein. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 244, 544–551.
- Von Figura, K., Gieselmann, V., Jaeken, J. (2001). Metachromatic Leukodystrophy. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, C.R. Scriver, A.L. Beaudet, and W.S. Sly, eds. (New York: McGraw-Hill), pp. 3695–3724.

- Fischer, H.D., Creek, K.E., Sly, W.S. (1982). Binding of phosphorylated oligosaccharides to immobilized phosphomannosyl receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 257, 9938–9943.
- 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 Research* 818, 65–71.
- Fratantoni, J.C., Hall, C.W., Neufeld, E.F. (1968). Hurler and Hunter Syndromes: Mutual Correction of the Defect in Cultured Fibroblasts. *Science* 162, 570–572.
- Futerman, A.H., Van Meer, G. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5, 554–565.
- Gabathuler, R. (2010a). Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiology of Disease* 37, 48–57.
- Gabathuler, R. (2010b). Development of new peptide vectors for the transport of therapeutic across the blood-brain barrier. *Therapeutic Delivery* 1, 571–586.
- Gaillard, P.J., Visser, C.C., De Boer, A.G. (2005). Targeted delivery across the blood-brain barrier. *Expert Opinion on Drug Delivery* 2, 299–309.
- Ghosh, P., Dahms, N.M., Kornfeld, S. (2003). Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4, 202–212.
- Gieselmann, V. (2008). Metachromatic leukodystrophy: genetics, pathogenesis and therapeutic options. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway : 1992). Supplement* 97, 15–21.
- Gieselmann, V., Krägeloh-Mann, I. (2010). Metachromatic Leukodystrophy – An Update. *Neuropediatrics* 41, 1–6.
- Gieselmann, V., Polten, A., Kreysing, J., Von Figura, K. (1989). Arylsulfatase A pseudodeficiency: loss of a polyadenylation signal and N-glycosylation site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 9436–9440.
- Go, G.-W., Mani, A. (2012). Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *The Yale Journal of Biology and Medicine* 85, 19–28.
- Goldman, E.E. (1913). *Vitalfärbung am Zentralnervensystem. Beitrag zur Physio-Pathologie des Plexus Chorioideus und der Hirnhäute* (Berlin: Königliche Akademie der Wissenschaften).
- Gonzalez-Noriega, A., Grubb, J.H., Talkad, V., Sly, W.S. (1980). Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *The Journal of Cell Biology* 85, 839–852.
- Grubb, J.H., Vogler, C., Levy, B., Galvin, N., Tan, Y., Sly, W.S. (2008). Chemically modified beta-glucuronidase crosses blood-brain barrier and clears neuronal storage in

murine mucopolysaccharidosis VII. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 2616–2621.

Grubb, J.H., Vogler, C., Sly, W.S. (2010). New strategies for enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Rejuvenation Research* *13*, 229–236.

Hageman, A.T.M., Gabreels, F.J.M., De Jong, J.G.N., Gabreels-Festen, A.A.W.M., Van den Berg, C.J.M.G., Van Oost, B.A., Wevers, R.A. (1995). Clinical Symptoms of Adult Metachromatic Leukodystrophy and Arylsulfatase A Pseudodeficiency. *Archives of Neurology* *52*, 408–413.

Harmatz, P., Giugliani, R., Schwartz, I.V.D., Guffon, N., Teles, E.L., Miranda, M.C.S., Wraith, J.E., Beck, M., Arash, L., Scarpa, M., 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. *Molecular Genetics and Metabolism* *94*, 469–475.

Hatters, D.M., Peters-Libeu, C.A., Weisgraber, K.H. (2006). Apolipoprotein E structure: insights into function. *Trends in Biochemical Sciences* *31*, 445–454.

Hervé, F., Ghinea, N., Scherrmann, J.-M. (2008). CNS delivery via adsorptive transcytosis. *The AAPS Journal* *10*, 455–472.

Herz, J., Strickland, D.K. (2001). Multiligand receptors LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *The Journal of Clinical Investigation* *108*, 779–784.

Hess, B., Saftig, P., Hartmann, D., Coenen, R., Lüllmann-Rauch, R., Goebel, H.H., Evers, M., Von Figura, K., D’Hooge, R., Nagels, G., et al. (1996). Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 14821–14826.

Hoheisel, D., Nitz, T., Franke, H., Wegener, J., Hakvoort, A., Tilling, T., Galla, H.-J. (1998). Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *244*, 312–316.

Huynh, H.T., Grubb, J.H., Vogler, C., Sly, W.S. (2012). Biochemical evidence for superior correction of neuronal storage by chemically modified enzyme in murine mucopolysaccharidosis VII. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 17022–17027.

i Dali, C., Lund, A.M. (2009). *Intravenous Enzyme Replacement Therapy for Metachromatic Leukodystrophy (MLD)*. MLD Foundation.

Innerarity, L., Pitas, E., Mahley, R.W. (1979). Binding of Arginine-rich (E) Apoprotein after Recombination with Phospholipid Vesicles to the Low Density Lipoprotein Receptors of Fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* *254*, 4186–4190.

Jones, A.R., Shusta, E. V (2007). Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharmaceutical Research* *24*, 1759–1771.

- Ke, W., Shao, K., Huang, R., Han, L., Liu, Y., Li, J., Kuang, Y., Ye, L., Lou, J., Jiang, C. (2009). Gene delivery targeted to the brain using an Angiopep-conjugated polyethyleneglycol-modified polyamidoamine dendrimer. *Biomaterials* 30, 6976–6985.
- Kim, T.-A., Avraham, H.K., Koh, Y.-H., Jiang, S., Park, I.-W., Avraham, S. (2003). HIV-1 Tat-mediated apoptosis in human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 170, 2629–2637.
- Klein, D., Yaghoofam, A., Matzner, U., Koch, B., Bräulke, T., Gieselmann, V. (2009). Mannose 6-phosphate receptor-dependent endocytosis of lysosomal enzymes is increased in sulfatide-storing kidney cells. *Biological Chemistry* 390, 41–48.
- Kopecka, J., Campia, I., Olivero, P., Pescarmona, G., Ghigo, D., Bosia, A., Riganti, C. (2011). A LDL-masked liposomal-doxorubicin reverses drug resistance in human cancer cells. *Journal of Controlled Release* 149, 196–205.
- Lachmann, R.H. (2011). Enzyme replacement therapy for lysosomal storage diseases. *Current Opinion in Pediatrics* 23, 588–593.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Li, Y., Lu, W., Schwartz, A.L., Bu, G. (2002). Receptor-associated protein facilitates proper folding and maturation of the low-density lipoprotein receptor and its class 2 mutants. *Biochemistry* 41, 4921–4928.
- Liu, Y., Jones, M., Hingtgen, C.M., Bu, G., Larabee, N., Tanzi, R.E., Moir, R.D., Nath, A., He, J.J. (2000). Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nature Medicine* 6, 1380–1387.
- Lundberg, M., Wikström, S., Johansson, M. (2003). Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Molecular Therapy* 8, 143–150.
- Luzio, J.P., Pryor, P.R., Bright, N.A. (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8, 622–632.
- Martino, S., Emiliani, C., Tancini, B., Severini, G.M., Chigorno, V., Bordignon, C., Sonnino, S., Orlacchio, A. (2002). Absence of metabolic cross-correction in Tay-Sachs cells: implications for gene therapy. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 20177–20184.
- Matthes, F., Stroobants, S., Gerlach, D., Wohlenberg, C., Wessig, C., Fogh, J., Gieselmann, V., Eckhardt, M., D’Hooge, R., Matzner, U. (2012). Efficacy of enzyme replacement therapy in an aggravated mouse model of metachromatic leukodystrophy declines with age. *Human Molecular Genetics* 21, 2599–2609.
- Matthes, F., Wölte, P., Böckenhoff, A., Hüwel, S., Schulz, M., Hyden, P., Fogh, J., Gieselmann, V., Galla, H.-J., Matzner, U. (2011). Transport of arylsulfatase A across the blood-brain barrier in vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 17487–17494.

- Matzner, U., Harzer, K., Learish, R.D., Barranger, J.A., Gieselmann, V. (2000). Long-term expression and transfer of arylsulfatase A into brain of arylsulfatase A-deficient mice transplanted with bone marrow expressing the arylsulfatase A cDNA from a retroviral vector. *Gene Therapy* 7, 1250–1257.
- 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. *Human Molecular Genetics* 14, 1139–1152.
- 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. *Molecular Therapy* 17, 600–606.
- 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. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 86, 433–442.
- Miller, A.L., Norton, V., Robertson, R., Jenks, M., Yeh, R.Y., Wright, D. (1993). Light and heavy lysosomes: characterization of N-acetyl-beta-D-hexosaminidase isolated from normal and I-cell disease lymphoblasts. *Glycobiology* 3, 313–318.
- Miller, G. (2002). Breaking down barriers. *Science* 297, 1116–1118.
- Mindell, J.A. (2012). Lysosomal acidification mechanisms. *Annual Review of Physiology* 74, 69–86.
- Muro, S. (2010). New biotechnological and nanomedicine strategies for treatment of lysosomal storage disorders. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2, 189–204.
- Muschol, N., Matzner, U., Tiede, S., Gieselmann, V., Ullrich, K., Braulke, T. (2002). Secretion of phosphomannosyl-deficient arylsulphatase A and cathepsin D from isolated human macrophages. *Biochemical Journal* 363, 845–853.
- Narita, M., Holtzman, D.M., Fagan, A.M., LaDu, M.J., Yu, L., Han, X., Gross, R.W., Bu, G., Schwartz, A.L. (2002). Cellular Catabolism of Lipid Poor Apolipoprotein E via Cell Surface LDL Receptor-Related Protein. *Journal of Biochemistry* 132, 743–749.
- Nicolino, M., Byrne, B., Wraith, J.E., Leslie, N., Mandel, H., Freyer, D.R., Arnold, G.L., Pivnick, E.K., Ottinger, C.J., Robinson, P.H., et al. (2009). Clinical outcomes after long-term treatment with alglucosidase alfa in infants and children with advanced Pompe disease. *Genetics in Medicine* 11, 210–219.
- Nikanjam, M., Blakely, E.A., Bjornstad, K.A., Shu, X., Budinger, T.F., Forte, T.M. (2007). Synthetic nano-low density lipoprotein as targeted drug delivery vehicle for glioblastoma multiforme. *International Journal of Pharmaceutics* 328, 86–94.

- Orii, K.O., Grubb, J.H., Vogler, C., Levy, B., Tan, Y., Markova, K., Davidson, B.L., Mao, Q., Orii, T., Kondo, N., et al. (2005). Defining the pathway for Tat-mediated delivery of beta-glucuronidase in cultured cells and MPS VII mice. *Molecular Therapy* 12, 345–352.
- Pan, W., Kastin, A.J., Zankel, T.C., Van Kerkhof, P., Terasaki, T., Bu, G. (2004). Efficient transfer of receptor-associated protein (RAP) across the blood-brain barrier. *Journal of Cell Science* 117, 5071–5078.
- Pardridge, W.M. (2002). Drug and gene delivery to the brain: the vascular route. *Neuron* 36, 555–558.
- Pardridge, W.M. (2003). Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Molecular Interventions* 3, 90–105.
- Pardridge, W.M., Eisenberg, J., Yang, J. (1985). Human blood-brain barrier insulin receptor. *Journal of Neurochemistry* 44, 1771–1778.
- Pardridge, W.M., Eisenberg, J., Yang, J. (1987). Human Blood-Brain Barrier Transferrin Receptor. *Metabolism* 36, 892–895.
- Pham, P.L., Kamen, A., Durocher, Y. (2006). Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. *Molecular Biotechnology* 34, 225–237.
- Pietrzik, C.U., Busse, T., Merriam, D.E., Weggen, S., Koo, E.H. (2002). The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing. *The EMBO Journal* 21, 5691–5700.
- Platt, F.M., Lachmann, R.H. (2009). Treating lysosomal storage disorders: current practice and future prospects. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793, 737–745.
- Poepfel, P., Habetha, M., Marcão, A., Büssow, H., Berna, L., Gieselmann, V. (2005). Missense mutations as a cause of metachromatic leukodystrophy. Degradation of arylsulfatase A in the endoplasmic reticulum. *The FEBS Journal* 272, 1179–1188.
- Pohl, S., Marschner, K., Storch, S., Braulke, T. (2009). Glycosylation- and phosphorylation-dependent intracellular transport of lysosomal hydrolases. *Biological Chemistry* 390, 521–527.
- Pohlmann, R., Boeker, M.W., Von Figura, K. (1995). The two mannose 6-phosphate receptors transport distinct complements of lysosomal proteins. *The Journal of Biological Chemistry* 270, 27311–27318.
- Polten, A., Fluharty, A.L., Fluharty, C.B., Kappler, J., Von Figura, K., Gieselmann, V. (1991). Molecular Basis of Different Forms of Metachromatic Leukodystrophy. *The New England Journal of Medicine* 324, 18–22.
- Poole, B., Ohkuma, S. (1981). Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages. *The Journal of Cell Biology* 90, 665–669.

- Pryor, P.R., Luzio, J.P. (2009). Delivery of endocytosed membrane proteins to the lysosome. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793, 615–624.
- Pu, H., Tian, J., Andras, I.E., Hayashi, K., Flora, G., Hennig, B., Toborek, M. (2005). HIV-1 Tat protein-induced alterations of ZO-1 expression are mediated by redox-regulated ERK 1/2 activation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25, 1325–1335.
- 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. *The Journal of Neuroscience* 27, 9482–9490.
- Rip, J., Schenk, G.J., De Boer, A.G. (2009). Differential receptor-mediated drug targeting to the diseased brain. *Expert Opinion on Drug Delivery* 6, 227–237.
- Ruiz, J., Kouliavskaia, D., Migliorini, M., Robinson, S., Saenko, E.L., Gorlatova, N., Li, D., Lawrence, D., Hyman, B.T., Weisgraber, K.H., et al. (2005). The apoE isoform binding properties of the VLDL receptor reveal marked differences from LRP and the LDL receptor. *Journal of Lipid Research* 46, 1721–1731.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sarkar, G., Curran, G.L., Mahlum, E., Decklever, T., Wengenack, T.M., Blahnik, A., Hoesley, B., Lowe, V.J., Poduslo, J.F., Jenkins, R.B. (2011). A carrier for non-covalent delivery of functional beta-galactosidase and antibodies against amyloid plaques and IgM to the brain. *PloS One* 6, e28881.
- Scaramuzzo, L., Perisano, C., Leone, A., Graci, C., Spinelli, M.S., Di Giacomo, G., Venanzi, E., Schiavone Panni, A., Maccauro, G. (2012). Skeletal modifications in mucopolysaccharidoses: an overview. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 26, 139–144.
- Schlageter, K.E., Molnar, P., Lapin, G.D., Groothuis, D.R. (1999). Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: microvessel populations with distinctive structural and functional properties. *Microvascular Research* 58, 312–328.
- Schmitz, F., Bresciani, R., Hartmann, H., Braulke, T. (1995). Effect of insulin-like growth factor II on uptake of arylsulfatase A by cultured rat hepatocytes and Kupffer cells. *Journal of Hepatology* 22, 356–363.
- 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, 248–259.
- Schultz, M.L., Tecedor, L., Chang, M., Davidson, B.L. (2011). Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends in Neurosciences* 34, 401–410.

- Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., Dowdy, S.F. (1999). In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *Science* 285, 1569–1572.
- Simon, M.J., Kang, W.H., Gao, S., Banta, S., Morrison, B. (2011). TAT is not capable of transcellular delivery across an intact endothelial monolayer in vitro. *Annals of Biomedical Engineering* 39, 394–401.
- Sommerlade, H.J., Selmer, T., Ingendoh, A., Gieselmann, V., Von Figura, K., Neifer, K., Schmidt, B. (1994). Glycosylation and phosphorylation of arylsulfatase A. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 20977–20981.
- Spady, D.K., Bilheimer, D.W., Dietschy, J.M. (1983). Rates of receptor-dependent and -independent low density lipoprotein uptake in the hamster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 3499–3503.
- Spencer, B., Marr, R.A., Gindi, R., Potkar, R., Michael, S., Adame, A., Rockenstein, E., Verma, I.M., Masliah, E. (2011). Peripheral delivery of a CNS targeted, metallo-protease reduces a β toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *PloS One* 6, e16575.
- Spencer, B.J., Verma, I.M. (2007). Targeted delivery of proteins across the blood-brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 7594–7599.
- Stein, C., Gieselmann, V., Kreysing, J., Schmidt, B., Pohlmann, R., Waheed, A., Meyer, H.E., O'Brien, J.S., Von Figura, K. (1989). Cloning and expression of human arylsulfatase A. *The Journal of Biological Chemistry* 264, 1252–1259.
- Storch, S., Braulke, T. (2005). Transport of lysosomal enzymes. In *Lysosomes*, P. Saftig, ed. (Georgetown (USA): Landes Bioscience), pp. 17–26.
- Thomas, F.C., Taskar, K., Rudraraju, V., Goda, S., Thorsheim, H.R., Gaasch, J. a, Mittapalli, R.K., Palmieri, D., Steeg, P.S., Lockman, P.R., et al. (2009). Uptake of ANG1005, a novel paclitaxel derivative, through the blood-brain barrier into brain and experimental brain metastases of breast cancer. *Pharmaceutical Research* 26, 2486–2494.
- Tuma, P.L., Hubbard, A.L. (2003). Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiological Reviews* 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 12873–12878.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12658–12663.

- Urayama, A., Grubb, J.H., Sly, W.S., and Banks, W.A. (2008). Mannose 6-phosphate receptor-mediated transport of sulfamidase across the blood-brain barrier in the newborn mouse. *Molecular Therapy* *16*, 1261–1266.
- Wagner, S., Zensi, A., Wien, S.L., Tschickardt, S.E., Maier, W., Vogel, T., Worek, F., Pietrzik, C.U., Kreuter, J., Von Briesen, H. (2012). Uptake mechanism of ApoE-modified nanoparticles on brain capillary endothelial cells as a blood-brain barrier model. *PloS One* *7*, e32568.
- Wang, X., Ciruolo, G., Morris, R., Gruenstein, E. (1997). Identification of a neuronal endocytic pathway activated by an apolipoprotein E (apoE) receptor binding peptide. *Brain Research* *778*, 6–15.
- 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. *Journal of Neurochemistry* *111*, 111–118.
- Weinreb, N.J. (2008). Imiglucerase and its use for the treatment of Gaucher's disease. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* *9*, 1987–2000.
- Weinreb, N.J., Charrow, J., Andersson, H.C., Kaplan, P., Kolodny, E.H., Mistry, P., Pastores, G., Rosenbloom, B.E., Scott, C.R., Wappner, R.S., et al. (2002). Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry. *The American Journal of Medicine* *113*, 112–119.
- Wolburg, H., Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascular Pharmacology* *38*, 323–337.
- Wraith, J.E., Scarpa, M., Beck, M., Bodamer, O.A., De Meirleir, L., Guffon, N., Meldgaard Lund, A., Malm, G., Van der Ploeg, A.T., Zeman, J. (2008). Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy. *European Journal of Pediatrics* *167*, 267–277.
- Wurm, F.M. (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* *22*, 1393–1398.
- Xu, R., Feng, X., Xie, X., Zhang, J., Wu, D., Xu, L. (2012). HIV-1 Tat protein increases the permeability of brain endothelial cells by both inhibiting occludin expression and cleaving occludin via matrix metalloproteinase-9. *Brain Research* *1436*, 13–19.
- Yu, R., Zeng, Z., Guo, X., Zhang, H., Liu, X., Ding, Y., Chen, J. (2012). The TAT peptide endows PACAP with an enhanced ability to traverse bio-barriers. *Neuroscience Letters* *527*, 1–5.
- Zensi, A., Begley, D., Pontikis, C., Legros, C., Mihoreanu, L., Wagner, S., Büchel, C., Von Briesen, H., Kreuter, J. (2009). Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. *Journal of Controlled Release* *137*, 78–86.

Zhang, F., Xing, J., Liou, A.K.-F., Wang, S., Gan, Y., Luo, Y., Ji, X., Stetler, R.A., Chen, J., Cao, G. (2010). Enhanced Delivery of Erythropoietin Across the Blood-Brain Barrier for Neuroprotection against Ischemic Neuronal Injury. *Translational Stroke Research* 1, 113–121.

Zhang, X.-Y., Dinh, A., Cronin, J., Li, S.-C., Reiser, J. (2008). Cellular uptake and lysosomal delivery of galactocerebrosidase tagged with the HIV Tat protein transduction domain. *Journal of Neurochemistry* 104, 1055–1064.

Zorko, M., Langel, U. (2005). Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 529–545.

8 Abkürzungen

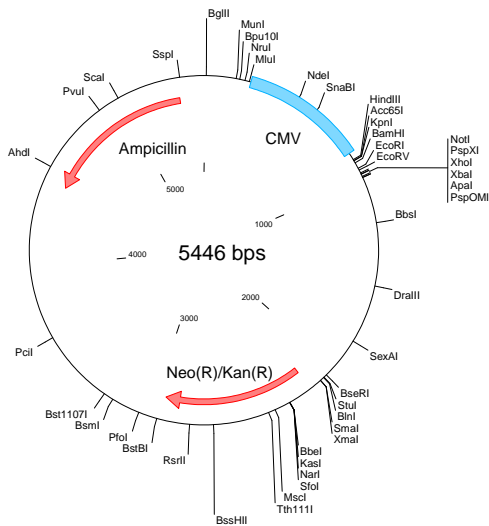
| | |
|--------------------|--|
| Abts | <i>2,2-Azino-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate(6)]diammonium salt</i> |
| AMT | Adsorptiv-vermittelte Transzytose |
| apoB | Apolipoprotein B |
| apoE | Apolipoprotein E |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ASA | Arylsulfatase A |
| Asn | Asparagin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| bEND.3 | <i>Mouse brain endothelial (cells)</i> |
| BHK | <i>Baby hamster kidney (cells)</i> |
| BHS | Blut-Hirn-Schranke |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| cDNA | <i>Complementary DNA</i> (komplementäre DNA) |
| CGT | UDP-Galaktose:Ceramid Galaktosyltransferase |
| CHO | <i>Chinese hamster ovary (cells)</i> |
| CHO-S | <i>Chinese hamster ovary suspension (cells)</i> |
| CPPs | <i>Cell penetrating peptides</i> |
| CSF | Cerebrospinalflüssigkeit |
| CST | 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat:Cerebrosid Sulfotransferase |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindol |
| ddH ₂ O | <i>Double-distilled water</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | <i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| dNTP | Desoxyribonukleotidtriphosphat |
| DtR | Diphtherietoxin-Rezeptor |
| ECL | <i>Enhanced chemiluminescence</i> (verstärkte Chemilumineszenz) |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | <i>Enzym-linked immunosorbent assay</i> (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest) |
| Endo H | Endoglykosidase H |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERT | <i>Enzyme replacement therapy</i> (Enzymersatztherapie) |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum) |
| FGE | Formylglycin-generierendes Enzym |

| | |
|--------|--|
| FITC | <i>Fluorescein isothiocyanate</i> |
| FPLC | <i>Fast protein lipid chromatography</i> (schnelle Protein-Flüssigchromatographie) |
| G6P | Glukose-6-Phosphat |
| GalCer | Galaktosylceramid |
| GFP | <i>Green fluorescent protein</i> |
| GlcNac | N-Acetylglukosamin |
| hASA | Humane Arylsulfatase A |
| HIV-1 | Humanes Immundefizienzvirus |
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) |
| HT1080 | <i>Humane Fibrosarcom-Zelllinie</i> |
| InsR | Insulin-Rezeptor |
| LAMP | <i>Lysosomal associated membrane protein</i> |
| LDL | <i>Low density lipoprotein</i> |
| LDLR | <i>Low density lipoprotein receptor</i> |
| LRP-1 | <i>Low density lipoprotein receptor related protein 1</i> |
| LRP-2 | <i>Low density lipoprotein receptor related protein 2</i> |
| M6P | Mannose-6-Phosphat |
| MEF | <i>Mouse embryonic fibroblasts</i> |
| MLD | Metachromatische Leukodystrophie |
| MPR(s) | Mannose-6-Phosphat-Rezeptor(en) |
| NVU | Neurovaskuläre Unit |
| OD | Optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PAPS | 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat |
| PBCEC | <i>Porcine brain capillary endothelial cells</i> |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung) |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion) |
| p-NPAG | <i>4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide</i> |
| RAP | <i>low density lipoprotein receptor-related protein associated protein</i> |
| RMT | Rezeptor-vermittelte Transzytose |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure) |
| RT | Raumtemperatur |
| SapB | Saposin B |
| SDS | <i>Sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat) |
| SUMF | <i>Sulfatase modifying factor 1</i> |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |

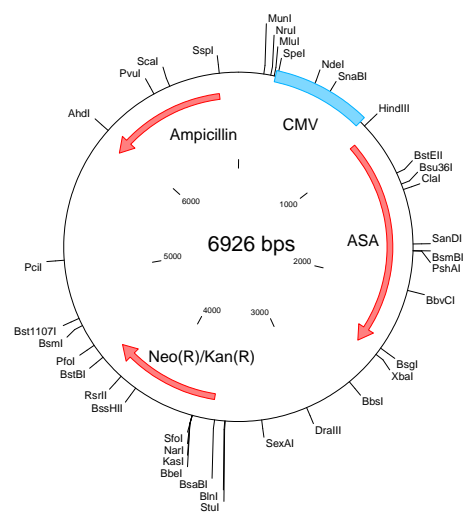
| | |
|--------------|--|
| Tat | <i>Transactivator of transcription</i> |
| TBS | <i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung) |
| TEER | <i>Transendothelial electrical resistance</i> (Transendothelialer elektrischer Widerstand) |
| TfR | Transferrin-Rezeptor |
| tg | Transgen |
| TGN | Trans-Golgi Netzwerk |
| Tris | Tris(hydroxymethyl-)aminomethan |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| UCE | „uncovering“ Enzym |
| UDP | Uridindiphosphat |
| Vol. | Volumen |
| wt | Wildtyp |
| β -Hex | β -Hexosaminidase |

Plasmidkarten

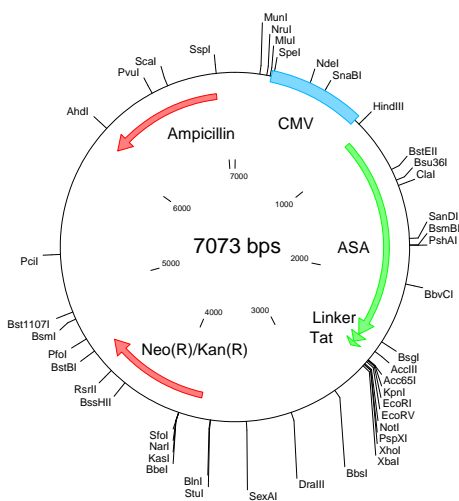
pcDNA3



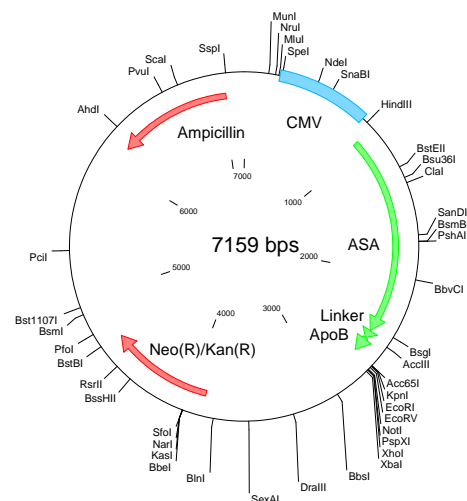
pcDNA3-ASA



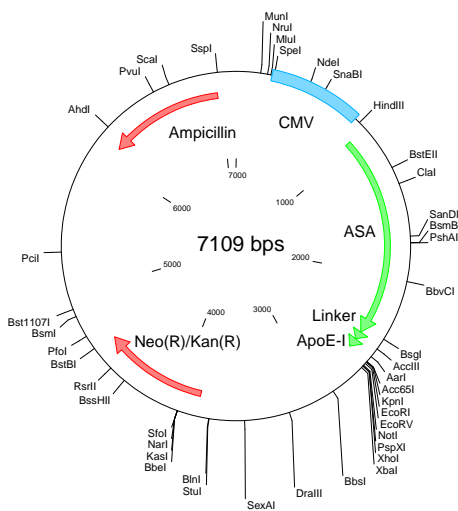
pcDNA3-ASA-Tat



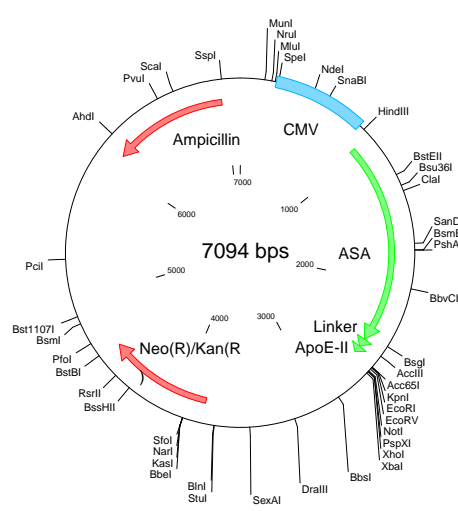
pcDNA3-ASA-ApoB



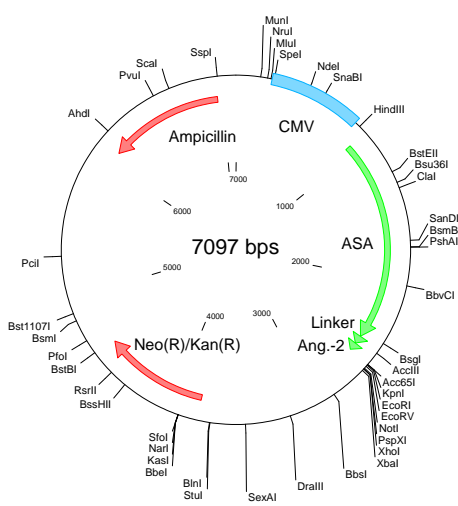
pcDNA3-ASA-ApoE-I



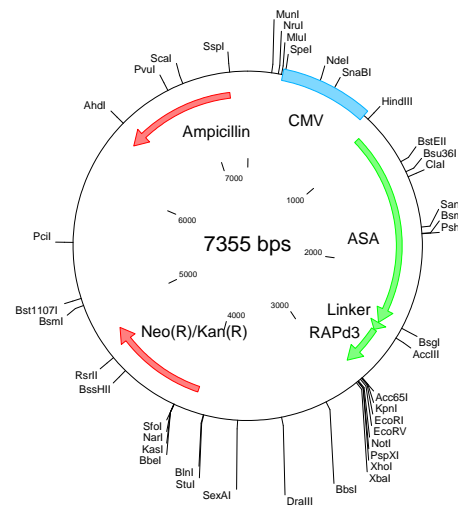
pcDNA3-ASA-ApoE-II



pcDNA3-ASA-Ang.-2



pcDNA3-ASA-RAPd3



Publikationen

Matthes, F., Wölte, P., Böckenhoff, A., Hüwel, S., Schulz, M., Hyden, P., Fogh, J., Gieselmann, V., Galla, H.-J., Matzner, U. (2011). Transport of Arylsulfatase A across the Blood-Brain Barrier in Vitro. *The Journal of Biological Chemistry* 286, 17487-17494.

Böckenhoff, A., Cramer, S., Wölte, P., Knieling, S., Wohlenberg, C., Gieselmann, V., Galla, H.-J., Matzner, U. (2012). Apolipoprotein E-derived peptide vectors mediate brain delivery of the lysosomal enzyme arylsulfatase A. [*eingereicht*]

Posterbeiträge:

Annika Böckenhoff, Philipp Wölte, Hans-Joachim Galla, Volkmar Gieselmann, Ulrich Matzner (2009). Enzyme replacement therapy of metachromatic leukodystrophy: ASA fusion proteins for improved brain delivery of enzyme activity. *17th ESGLD Workshop*, Bad Honnef, Germany.

Konferenzbeiträge:

Annika Böckenhoff, Philipp Wölte, Hans-Joachim Galla, Volkmar Gieselmann, Ulrich Matzner (2011). Enzyme replacement therapy of metachromatic leukodystrophy: ASA fusion proteins for improved delivery of enzyme activity. *18th ESGLD Workshop*, Långvik, Finland.

Annika Böckenhoff, Philipp Wölte, Volkmar Gieselmann, Hans-Joachim Galla, Ulrich Matzner (2012). Enzyme replacement therapy of metachromatic leukodystrophy: ASA-fusion proteins for improved brain delivery of enzyme activity. *6th Brains for Brain Workshop*, Frankfurt, Germany.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe; insbesondere, dass wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht worden sind. Ferner erkläre ich, die von mir vorgelegte Dissertation an keiner anderen Hochschule eingereicht zu haben.

Bonn, Januar 2013

Annika Böckenhoff

Danksagung

Als erstes bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Volkmar Gieselmann für die Überlassung des interessanten Themas, das stetige Interesse an meinen Projekten und die ständige Hilfsbereitschaft. Desweiteren hat es mich sehr gefreut, durch seine Unterstützung in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. David Begley (King's College, London) Laborerfahrungen im Ausland zu sammeln.

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Albert Haas für die freundliche und unkomplizierte Übernahme des Korreferates.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Ulrich Matzner, der mich während meiner gesamten Doktorandenzeit hervorragend betreut und zahlreiche interessante Diskussionen angeregt hat. Er war stets interessiert an meinen Ideen, bei deren Umsetzung er mich tatkräftig unterstützt hat und mir somit ein spannendes und selbstständiges Arbeiten ermöglichte.

Bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Galla (Institut für Biochemie, Universität Münster), besonders bei Philipp Wölte und Sandra Cramer, bedanke ich mich für die Durchführung der Experimente am Zellkulturmodell der Blut-Hirn-Schranke und die gute Kooperation. Der Firma Zymenex sei gedankt für die großzügige Bereitstellung rekombinanter humaner ASA.

Weiterhin möchte ich mich bei der gesamten AG Gieselmann für die „Gute-Laune-Atmosphäre“ sowohl im Labor als auch im Doktorandenbüro bedanken. Durch die unerschöpfliche Hilfsbereitschaft vieler netter Kollegen (Norbert, Karola, Christof, Ali & Nevzat, Frank Scheerer ...) konnten auch schwierige Situationen gemeistert werden. Ein ganz besonderer Dank gilt Claudia für die großartige Unterstützung vor allem in Sachen „MiniPERM“, Kühlraum- und sonstiger Geschichten. Heidi, Debby, Tilman, Axel, Frank, Izzie, Julia und viele andere haben durch ihre nette und hilfsbereite Art zu einem angenehmen, spannenden und häufig lustigen Arbeitsalltag am IBMB beigetragen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund („alles ist gut“) bedanken, auf die ich in jeder Situation uneingeschränkt zählen kann und die mich während meiner Studenten- und Doktorandenzeit immer unterstützt haben. Danke!