

Substratreduktionstherapie der Metachromatischen Leukodystrophie:  
Expression der Cerebrosid-Sulfotransferase und  
Etablierung einer hochdurchsatzfähigen Aktivitätsbestimmung

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Isabell Zech  
aus  
Hannover

Bonn, 2013



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

1. Gutachter: Prof. Dr. Volkmar Gieselmann
2. Gutachter: Prof. Dr. Christa E. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2013

Erscheinungsjahr: 2013



Meiner Familie



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>2</b>
2.1 Lysosomale Speichererkrankungen .....	2
2.2 Metachromatische Leukodystrophie .....	4
2.3 Cerebrosid-Sulfotransferase .....	8
2.4 Sulfatid .....	9
2.5 Tiermodelle der MLD .....	11
2.6 Substratreduktionstherapie .....	12
<b>3 Material .....</b>	<b>16</b>
3.1 Geräte .....	16
3.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien .....	18
3.3 Allgemeine Lösungen und Puffer .....	20
3.4 Lösungen und Medien für die Bakterienkultur .....	21
3.5 Lösungen und Medien für die Zellkultur .....	22
3.6 Radioaktive Substanzen .....	22
3.7 Antikörper .....	23
3.7.1 Primärantikörper .....	23
3.7.2 Sekundärantikörper .....	23
3.8 Größenstandards.....	24
3.9 Oligonukleotide.....	24
3.10 Plasmide.....	25
3.11 Bakterienstämme.....	26
3.12 Zelllinien .....	26
<b>4 Methoden.....</b>	<b>27</b>
4.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	27
4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA .....	27
4.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	27
4.1.3 DNA-Spaltung mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen .....	27
4.1.4 Auftrennung von DNA in Agarosegelen .....	28

4.1.5	DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....	28
4.1.6	Polymerase-Kettenreaktion .....	28
4.1.6.1	Mutagenese-PCR.....	29
4.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten .....	29
4.1.8	Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien .....	30
4.1.9	Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	30
4.2	Arbeiten mit Zellen .....	30
4.2.1	Kultivierung von Zellen .....	30
4.2.2	Passagieren von Zellen.....	31
4.2.3	Auftauen von Zellen .....	31
4.2.4	Einfrieren von Zellen .....	31
4.2.5	Transfektion .....	32
4.2.6	Anpassung adhärent wachsender Zelllinien an serumfreie Bedingungen ...	32
4.2.7	Kultivierung sCST-überexprimierender Zellen .....	32
4.2.8	Kultivierung shCST-überexprimierender Zellen .....	33
4.3	Proteinanalytik.....	33
4.3.1	Herstellung von Zelllysaten .....	33
4.3.2	Proteinbestimmung .....	34
4.3.3	SDS-PAGE .....	34
4.3.4	Proteintransfer mittels Western Blot .....	35
4.3.5	Coomassie Färbung von SDS-Gelen .....	35
4.3.6	Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen in Zellen.....	36
4.3.7	Trennung von ER und Golgi-Apparat .....	36
4.3.8	Deglykosylierung von Proteinen .....	38
4.4	Sulfotransferase 1A1.....	38
4.4.1	Bakterielle Expression.....	38
4.4.2	Affinitäts-Reinigung .....	38
4.4.3	Aktivitätsbestimmung .....	40
4.5	Cerebrosid-Sulfotransferase.....	40
4.5.1	Affinitäts-Reinigung .....	40
4.5.2	Größenausschlusschromatographie.....	42
4.5.3	Enterokinase-Verdau.....	42
4.5.4	Aktivitätsbestimmungen .....	43
4.5.4.1	Radioaktive Aktivitätsbestimmung .....	43
4.5.4.2	Fluorimetrische Aktivitätsbestimmung .....	44
4.5.4.2.1	<i>High-throughput screening</i> .....	45

<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
5.1	Charakterisierung muriner CST .....	46
5.1.1	ER-Retention .....	46
5.1.2	Mutagenese-Studie.....	50
5.2	Lösliche CST-Fusionsproteine .....	52
5.2.1	Murines CST-Fusionsprotein .....	52
5.2.1.1	Sekretion löslicher CST (sCST) .....	52
5.2.1.2	$K_M$ -Wert-Bestimmung .....	56
5.2.1.3	Kongorot-Inhibition .....	57
5.2.2	Humanes CST-Fusionsprotein.....	58
5.2.2.1	Sekretion löslicher CST (shCST) .....	58
5.2.3	Produktion und Reinigung löslicher CST.....	60
5.2.3.1	Reinigung aus serumhaltigem Medium .....	60
5.2.3.2	Generierung von Suspensionszellen .....	61
5.2.3.3	Bildung höhermolekularer Komplexe .....	62
5.2.3.4	Generierung shCST-überexprimierender Zellen .....	64
5.2.3.5	Lagerungs- und Elutionsbedingungen .....	67
5.2.3.6	Produktion und Reinigung im präparativen Maßstab.....	68
5.2.4	Enzymatische Spaltung des Fusionsproteins .....	72
5.2.5	Deglykosylierung .....	73
5.3	Fluorimetrische Aktivitätsbestimmung .....	75
5.3.1	Allgemeines .....	75
5.3.2	SULT1A1: Expression, Reinigung und Aktivitätsbestimmung .....	76
5.3.3	Gekoppelte Aktivitätsbestimmung (shCST/SULT1A1) .....	80
5.3.4	Linearitätsnachweis .....	81
5.3.5	Einfluss von Pufferkomponenten .....	83
5.3.6	$K_M$ -Wert-Bestimmung .....	84
5.3.7	Psychosin als Substrat .....	85
5.3.8	DMSO-Toleranz und $Z'$ -Faktor-Bestimmung.....	87
5.3.9	<i>High-throughput screening</i> .....	88
5.3.9.1	Reinigung der Enzyme .....	88
5.3.9.2	Substanz-Testung .....	90
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>94</b>
6.1	SRT als mögliche Behandlungsstrategie für MLD .....	94
6.2	ER-Retention der CST .....	97
6.3	Produktion und Reinigung löslicher CST .....	99

6.4	Etablierung einer hochdurchsatzfähigen CST-Aktivitätsbestimmung .....	104
6.5	Mögliche Ansätze für die Identifizierung von Inhibitoren der CST .....	108
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>112</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>120</b>
8.1	Plasmidkarten .....	120
8.2	Aminosäuresequenz shCST (t-ProtA-hCST) .....	122
	<b>Publikationen .....</b>	<b>123</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>124</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ASA	Arylsulfatase A
bp	Basenpaare
BHK-Zellen	Babyhamsternierenzellen (aus dem Englischen: <i>Baby hamster kidney</i> )
BSA	Rinderserumalbumin
CGT	Ceramid-Galaktosyltransferase
Ch.	Charge
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
CHO-Zellen	CHO K1: Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (aus dem Englischen: <i>Chinese hamster ovary</i> )
CST	Cerebrosid-Sulfotransferase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dünnschichtchromatographie
dH <sub>2</sub> O	Deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ECL	Verstärkte Chemiluminiszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EET	Enzymersatztherapie
EGFP	Verstärkt grün fluoreszierendes Protein (aus dem Englischen: <i>Enhanced green fluorescent protein</i> )
Endo H	Endoglykosidase H (Endo-β-N-Acetylglukosaminidase H)
EK	Enterokinase

ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum
FPLC	schnelle Protein-Flüssigchromatographie (aus dem Englischen: <i>Fast protein liquid chromatography</i> )
GalT	Galaktosyltransferase
HA	Hämagglutinin
hCST	humane Cerebrosid-Sulfotransferase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPTLC	Hochleistungsdünnschicht-Chromatographie (aus dem Englischen: <i>High performance thin layer chromatography</i> )
HTS	Tests im Hochdurchsatz (aus dem Englischen: <i>High-throughput screening</i> )
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
IF	Immunfluoreszenz
kDa	Kilodalton
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
MU	4-Methylumbelliferon
MUS	4-Methylumbelliferylsulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NB-DGJ	N-butyldeoxygalaktonojirimycin
NB-DNJ	N-butyldeoxynojirimycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
OD	Optische Dichte

PAP	Adenosin-3',5'-bisphosphat
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (aus dem Englischen: <i>Polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldehyd
RFU	Relative Fluoreszenz Einheit (aus dem Englischen: <i>Relative fluorescence unit</i> )
RT	Raumtemperatur
sCST	lösliche ( <i>soluble</i> ) murine Cerebrosid-Sulfotransferase
shCST	lösliche ( <i>soluble</i> ) humane Cerebrosid-Sulfotransferase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRT	Substratreduktionstherapie
SULT1A1	Sulfotransferase 1A1 (Ratte)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
Upm	Umdrehungen pro Minute
$V_{\max}$	maximale Umsatzgeschwindigkeit
WB	Western Blot
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 2-1: Beispiele lysosomaler Speichererkrankungen .....	3
Abb. 2-2: Beispiele einiger Sphingolipidosen .....	4
Abb. 2-3: Degradation von Sulfatid .....	5
Abb. 2-4: Schematische Darstellung eines Neurons .....	5
Abb. 2-5: Ein Patient mit der juvenilen Form von MLD .....	6
Abb. 2-6: Synthese von Sulfatid .....	9
Abb. 5-1: ER-Retention der CST bei Überexpression .....	47
Abb. 5-2: Trennung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und Golgi-Apparats von CHO-Sulf-Zellen und Bestimmung der relativen CST-Aktivität .....	49
Abb. 5-3: Mutagenese innerhalb der mutmaßlichen PAPS-Bindungsstelle .....	51
Abb. 5-4: Einfluss des Protein A-Teils auf die Sekretion aktiver muriner CST in den Zellkulturüberstand .....	53
Abb. 5-5: Expression und Sekretion aktiver sCST der stabil transfizierten Zelllinie CHO ProtA-CST .....	55
Abb. 5-6: $K_M$ -Wert-Bestimmung für sCST und PAPS .....	56
Abb. 5-7: Kongorot-Inhibition der sCST .....	58
Abb. 5-8: Sekretion des löslichen humanen Fusionsproteins (shCST) nach transienter Transfektion .....	59
Abb. 5-9: Reinigung der sCST aus serumhaltigen Zellkulturüberständen unter Verwendung von IgG-Sepharose .....	61
Abb. 5-10: Bildung höhermolekularer Komplexe der sCST im Zellkulturüberstand .....	64
Abb. 5-11: Generierung der Suspensionszelllinie CHO-S ProtA-hCST .....	65
Abb. 5-12: Reinigung der shCST aus serumfreien Zellkulturüberständen mit dem Batch-Verfahren unter Verwendung von IgG-Sepharose .....	66
Abb. 5-13: Einfluss der Lagerungsbedingungen der Zellkulturüberstände und Elutionsbedingungen der Fusionsproteine auf die CST-Aktivität .....	67
Abb. 5-14: CST-Aktivität im Zellkulturüberstand der CHO-S ProtA-hCST-Zelllinie verglichen mit der CHO-S ProtA-CST-Zelllinie .....	69

---

Abb. 5-15: Reinigung der shCST im präparativen Maßstab unter Verwendung der Äkta-FPLC-Anlage .....	71
Abb. 5-16: Enzymatische Abspaltung des Protein A-Teils von gereinigter shCST.....	72
Abb. 5-17: Deglykosylierung von shCST.....	73
Abb. 5-18: Schematische Darstellung der gekoppelten Enzymreaktion zum Nachweis der CST-Aktivität.....	76
Abb. 5-19: Reinigung des SULT1A1 Polyhistidin-Tag Fusionsproteins .....	77
Abb. 5-20: Mengen- und Reinheitsbestimmung der SULT1A1 .....	78
Abb. 5-21: Aktivitätsbestimmung der SULT1A1 .....	79
Abb. 5-22: Fluorimetrische CST-Aktivitätsbestimmung .....	81
Abb. 5-23: Linearitätsnachweis der gekoppelten Enzymreaktion .....	82
Abb. 5-24: Einfluss verschiedener Reaktionspufferkomponenten auf die Aktivitätsbestimmung .....	84
Abb. 5-25: $K_M$ -Wert-Bestimmung für shCST und PAPS .....	85
Abb. 5-26: Psychosin als Substrat der shCST.....	86
Abb. 5-27: Vorversuche für ein <i>high-throughput screening</i> (HTS) .....	87
Abb. 5-28: Reinigung und Charakterisierung der für ein HTS in großen Mengen benötigten Enzyme SULT1A1 und shCST.....	89
Abb. 5-29: Festlegung der Auswertungskriterien für das HTS.....	91
Abb. 5-30: <i>High-throughput screening</i> einer Bibliothek mit 18.520 Testsubstanzen .....	93



# 1 Zusammenfassung

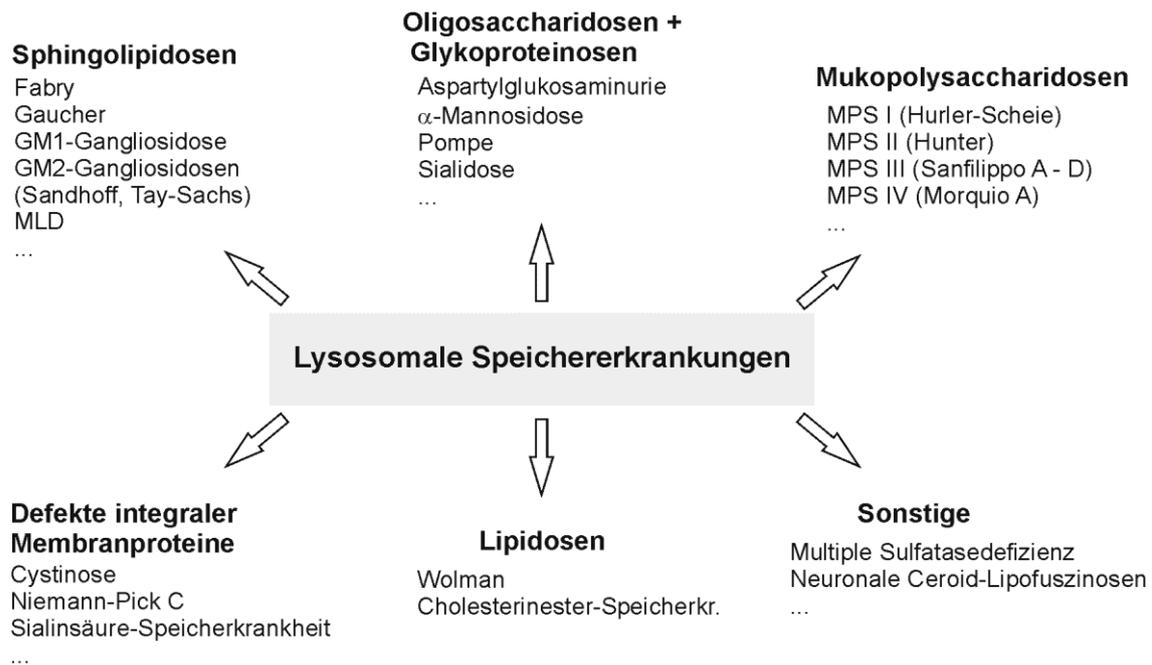
Metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine lysosomale Speichererkrankung, die durch die Defizienz des lysosomalen Enzyms Arylsulfatase A (ASA) verursacht wird. Normalerweise katalysiert die ASA den Abbau von 3-O-Sulfogalaktosylceramid (Sulfatid) zu Galaktosylceramid. Das Fehlen von ASA-Aktivität führt zu einer intralysosomalen Speicherung des Lipids Sulfatid, woraus eine fortschreitende Demyelinisierung im zentralen und peripheren Nervensystem resultiert. Da bis heute keine effektive Therapie existiert, steht die Schmerz- und Symptombehandlung im Vordergrund. Substratreduktionstherapie (SRT) ist ein vielversprechender Ansatz, da dieser auf der Gabe von kleinen chemischen Molekülen basiert, welche die Blut-Hirn-Schranke überqueren können. Der letzte Schritt in der Synthese von Sulfatid, wird durch das Enzym Cerebrosid-Sulfotransferase (CST) katalysiert, wobei eine Sulfatgruppe von 3'-Phosphoadenosin 5'-phosphosulfat (PAPS) auf Galaktosylceramid übertragen wird. Dieses Enzym stellt daher einen interessanten Angriffspunkt für eine mögliche SRT dar. Große Mengen an CST werden benötigt, um eine detaillierte Strukturanalyse und die Testung spezifischer Inhibitoren durchzuführen und somit diesen therapeutischen Ansatz für die Behandlung von MLD zu ermöglichen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine stabil transfizierte CHO-Zelllinie generiert, die die Expression löslicher und aktiver humaner CST in großen Mengen erlaubt. Die Zellen sekretieren ein Fusionsprotein, bestehend aus der luminalen Domäne humaner CST, dem Signalpeptid von Transin zur Sekretion und der IgG-Bindedomäne von Protein A zur Reinigung. Erstmals war es möglich, größere Mengen des rekombinanten Enzyms aus Zellkulturüberständen in aktiver Form zu reinigen. Zusätzlich konnte für die Hochdurchsatz-Testung potentieller Inhibitoren eine nicht-radioaktive Methode zur Aktivitätsbestimmung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit produzierten und gereinigten löslichen CST entwickelt werden. Die Methode beruht auf einer gekoppelten Enzymreaktion mit einer zweiten Sulfotransferase (SULT1A1), die das während der CST-Reaktion gebildete Adenosin-3',5'-bisphosphat zu PAPS regeneriert, wobei das Substrat 4-Methylumbelliferylsulfat zu 4-Methylumbelliferon umgesetzt wird. Dies führt zu einer Änderung des Fluoreszenzsignals und lässt somit den Aktivitätsnachweis zu. Die im Rahmen dieser Arbeit für die CST entwickelte fluorimetrische Bestimmung macht erstmals den nicht-radioaktiven Aktivitätsnachweis im Hochdurchsatz möglich. Inwieweit mit der entwickelten Methode potentielle Inhibitoren für die CST zu finden sind, wird sich in näherer Zukunft durch die Testung großer Substanzbibliotheken zeigen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Lysosomale Speichererkrankungen

Lysosomen sind membranumschlossene Kompartimente der tierischen Zelle und wurden erstmals von de Duve 1955 beschrieben (de Duve *et al.*, 1955). Sie enthalten neben zahlreichen integralen Membranproteinen (Callahan *et al.*, 2009) mehr als 50 verschiedene Hydrolasen (Journet *et al.*, 2002), wie Proteasen, Lipasen, Sulfatasen und Nukleasen. Innerhalb der Lysosomen findet der Abbau von sowohl endogenen als auch exogenen Makromolekülen statt, wobei ein saurer pH-Wert (4,5 – 5) eine optimale Aktivität der lysosomal lokalisierten Enzyme gewährleistet. Lysosomen spielen eine wichtige Rolle für die Degradation von Lipiden, Proteinen, Proteoglykanen und anderen Makromolekülen.

Lysosomale Speichererkrankungen werden meist durch Mutationen in Genen verursacht, die für lysosomale Hydrolasen kodieren. Darüber hinaus spielen aber auch Mutationen in Genen eine Rolle, die für Proteine kodieren, welche für die Prozessierung und den Transport lysosomaler Enzyme von Bedeutung sind, die Expression von in der lysosomalen Membran lokalisierten Transportern bedingen oder für andere Proteine mit zum Teil nicht vollständig verstandener Funktion kodieren (Eckhardt, 2010). Insgesamt ist eine intralysosomale Akkumulation von nicht metabolisierten Substraten als primäre Ursache der Erkrankungen zu nennen, welche normalerweise nach Art des Speichermaterials in Sphingolipidosen, Mukopolysaccharidosen oder Oligosaccharidosen eingeteilt werden, in denen folglich vornehmlich Sphingolipide, Glykosaminoglykane oder Oligosaccharide akkumulieren (Futerman und van Meer, 2004). Eine Übersicht einiger lysosomaler Speichererkrankungen ist in Abb. 2-1 gezeigt. Durch welche Mechanismen das Speichermaterial in den Lysosomen schlussendlich zu den pathologischen Veränderungen in den Patienten führt, ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Als sekundäre Effekte der Speicherung werden unter anderem oxidativer Stress, ER-Stress, Defekte der Autophagie, eine veränderte Calciumhomöostase, Entzündungsreaktionen und ein veränderter Lipidtransport diskutiert (Vitner *et al.*, 2010).



**Abb. 2-1: Beispiele lysosomaler Speichererkrankungen.** (Die Einteilung erfolgte nach Futerman und van Meer, 2004.)

Bis heute sind über 50 lysosomale Speichererkrankungen bekannt, wobei die Inzidenz dieser seltenen Erkrankungen auf insgesamt 1:5.000 geschätzt wird (Fuller *et al.*, 2006). Diese unterscheiden sich klinisch stark voneinander und fast alle Organe können betroffen sein. Lysosomale Enzyme werden zwar in den meisten Zellen exprimiert, deren Substrate weisen jedoch eine weniger einheitliche Gewebeverteilung auf. Die Substratverteilung bedingt jedoch, welche Gewebe bei den unterschiedlichen lysosomalen Speichererkrankungen vornehmlich betroffen sind. Keratan- und Dermatansulfat werden beispielsweise insbesondere im Skelett stark exprimiert, daher sind Mukopolysaccharidosen, welche Defekte der entsprechenden Degradationswege bedingen, durch Abnormalitäten der Knorpel- und Knochenentwicklung charakterisiert. Bei Mukopolysaccharidosen, bei denen der Abbau von Heparansulfat defekt ist, ist auch das ZNS betroffen. Wegen der hohen Konzentration von Gangliosiden im ZNS zeigen die meisten Spingolipidosen eine ausgeprägte Beteiligung von diesem (Platt und Lachmann, 2009). Einige Spingolipidosen sind beispielhaft in Abb. 2-2 dargestellt.

Normalerweise sind lysosomale Speichererkrankungen monogenetisch, wobei für die meisten zahlreiche Mutationen im selben Gen bei verschiedenen Patienten beschrieben wurden. Dabei führen einige Mutationen zu einem kompletten Verlust von Enzymaktivität, wohingegen andere lediglich zu einer geringeren Aktivität führen. Trotzdem existiert für die meisten lysosomalen Speichererkrankungen keine klare Genotyp-Phänotyp Korrelation und eine sichere Vorhersage des individuellen klinischen Verlaufs ist daher

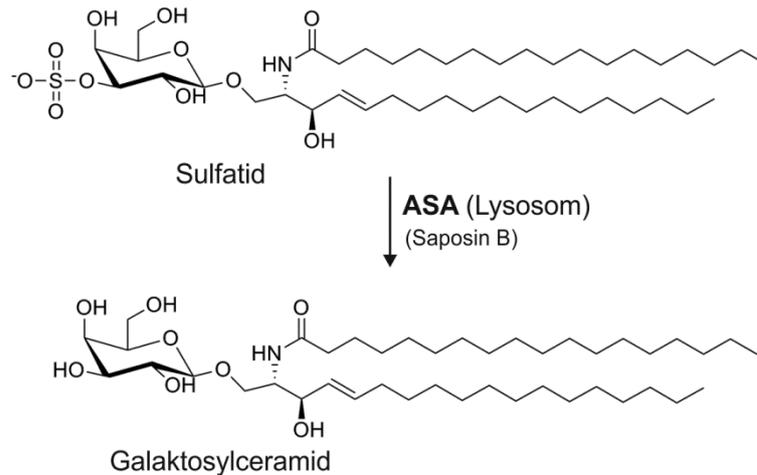
unmöglich. Die meisten Erkrankungen existieren in einer infantilen, juvenilen und adulten Form. Die infantilen Formen zeigen den schwerwiegendsten Verlauf und die Patienten sterben meist in den ersten Lebensjahren. In den adulten Formen kommt es zu einer deutlich langsameren Entwicklung mit entsprechend längeren Überlebenszeiten. Die juvenilen Formen nehmen eine Stellung zwischen der infantilen und adulten Form ein (Futerman und van Meer, 2004).

<b>Sphingolipidose</b>	<b>Defektes Protein</b>	<b>Hauptspeichermaterial</b>
Fabry	$\alpha$ -Galaktosidase A	Globotriaosylceramid
Farber	Ceramidase	Ceramide
Gaucher	$\beta$ -Glukosidase	Glukosylceramid
GM1-Gangliosidose	$\beta$ -Galaktosidase	GM1-Gangliosid
GM2-Gangliosidose (Sandhoff)	$\beta$ -Hexosaminidase A/B	GM2-Gangliosid u.a.
GM2-Gangliosidose (Tay-Sachs)	$\beta$ -Hexosaminidase A	GM2-Gangliosid u.a.
GM2-Gangliosidose (GM2-Aktivator-Defizienz)	GM2-Aktivatorprotein	GM2-Gangliosid u.a.
Krabbe	Galaktocerebrosidase	Galaktosylceramid
MLD	Arylsulfatase A	Sulfatid
Niemann-Pick A/B	Sphingomyelinase	Sphingomyelin

**Abb. 2-2: Beispiele einiger Sphingolipidosen.** Angegeben sind der Name der Erkrankung, das defekte Enzym und das Hauptspeichermaterial (Futerman und van Meer, 2004).

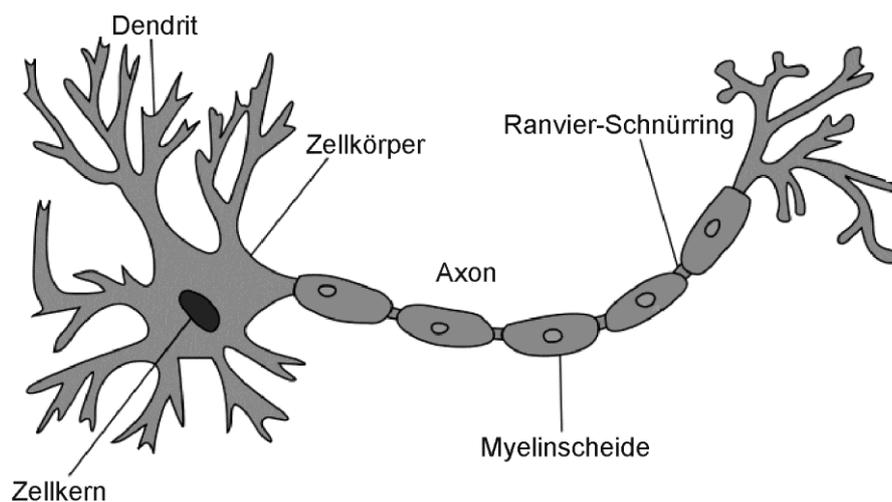
## 2.2 Metachromatische Leukodystrophie

Metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine autosomal rezessiv vererbare, lysosomale Speichererkrankung, die zu den Sphingolipidosen (vergleiche Abb. 2-2) gezählt wird und durch die Defizienz der Arylsulfatase A (EC 3.1.6.8, ASA) verursacht wird. Normalerweise katalysiert dieses lysosomale Enzym den ersten Schritt in der Degradation des Sphingolipids 3-O-Sulfogalaktosylceramid (Sulfatid), wobei Galaktosylceramid entsteht (Abb. 2-3). In MLD-Patienten kommt es aufgrund einer zu geringen ASA-Aktivität zu einer intralysosomalen Speicherung des Lipids. Dies führt zu einer charakteristischen metachromatischen Färbung in Gewebeschnitten nach Behandlung mit dem Farbstoff Kresylviolett (von Figura *et al.*, 2001).



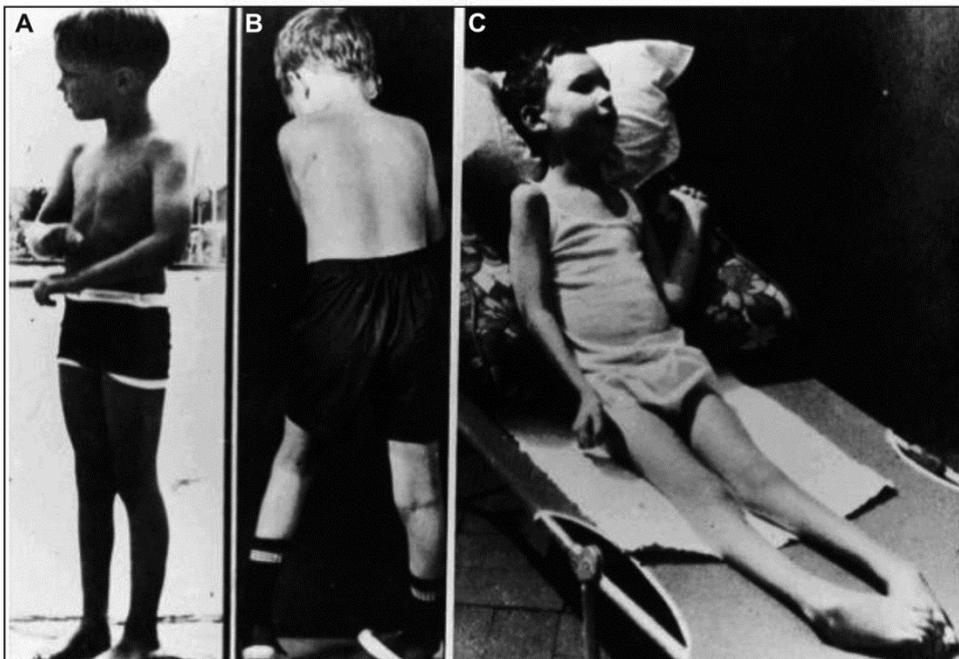
**Abb. 2-3: Degradation von Sulfatid.** Die Arylsulfatase A (ASA) katalysiert den Abbau von Sulfatid zu Galaktosylceramid durch Desulfatierung. Das Aktivatorprotein Saposin B wird *in vivo* benötigt, damit das Lipid enzymatisch zugänglich ist.

Sulfatid kommt insbesondere im zentralen und peripheren Nervensystem vor und macht dort ca. 4 - 6 % der Myelinlipide aus (Eckhardt, 2008). Myelin ist eine lipidreiche Biomembran, welche die Axone der meisten Neurone umgibt, elektrisch isoliert und von Ranvier-Schnürringen unterbrochen wird. Dies ermöglicht die schnelle saltatorische Erregungsleitung entlang der myelinisierten Nervenzellfortsätze (Abb. 2-4).



**Abb. 2-4: Schematische Darstellung eines Neurons.** Im zentralen und peripheren Nervensystem sind die Axone von Neuronen spiralförmig von Myelinscheiden umhüllt, welche von Ranvier-Schnürringen unterbrochen werden. Dies gewährleistet eine schnelle, saltatorische Erregungsweiterleitung. Eine Demyelinisierung geht daher mit schweren neurologischen Symptomen einher. Im ZNS wird die Myelinisierung durch Oligodendrozyten und im peripheren Nervensystem durch Schwann-Zellen bewerkstelligt. (Bild modifiziert nach: <[http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neuron\\_Hand-tuned.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neuron_Hand-tuned.svg)>, Stand 10.03.2013).

Durch den Mangel an ASA akkumuliert Sulfatid im Nervensystem. Das pathologische Kennzeichen der Erkrankung ist die fortschreitende Demyelinisierung im zentralen und peripheren Nervensystem, welche verschiedene und letztendlich tödliche neurologische Symptome verursacht. Daneben kommt es zu einer Speicherung im Gallenblasenepithel und Nierentubulus, woraus aber keine oder eine nur geringe funktionelle Beeinträchtigung resultiert. Basierend auf dem Alter zu Beginn der ersten Symptome werden drei klinische Formen unterschieden: Eine spät-infantile Form, mit den ersten sich entwickelnden Symptomen im Alter von unter zwei Jahren, eine juvenile Form mit Patienten zwischen drei und sechzehn Jahren und einer adulten Form, die sich im Alter ab sechzehn Jahren manifestiert (Gieselmann, 2008).



**Abb. 2-5: Ein Patient mit der juvenilen Form von MLD. (A)** Gezeigt ist der gesunde Junge in einem Alter von 5 ½ Jahren, ein Jahr vor Beginn der Symptome. **(B)** Mit knapp 7 Jahren kommt es zu verstärkten Gangschwierigkeiten und der Junge ist nicht imstande alleine zu stehen. **(C)** Mit fast 9 Jahren ist der Patient bettlägerig, muss künstlich ernährt werden und ist nicht fähig zu sprechen (von Figura *et al.*, 2001).

Bei der spät-infantilen Form treten zunächst abnormale Bewegungsmuster und Gangstörungen auf. Im weiteren Verlauf entwickeln die Patienten eine spastische Tetraplegie und epileptische Anfälle, es kommt zum Verlust der Sprechfähigkeit, zur Erblindung und die Patienten sterben schlussendlich in einem dezerebrierten Zustand. Patienten mit juveniler Form zeigen einen etwas mildereren Phänotyp beginnend mit

verminderten feinmotorischen Fähigkeiten, Konzentrations- und Verhaltensproblemen. Sie entwickeln aber im weiteren Verlauf ähnliche Symptome wie bei der spät-infantilen Form (Abb. 2-5). Bei der adulten Form lassen die ersten Symptome oft die Diagnose einer psychischen Erkrankung, speziell Schizophrenie, und den Rückgang intellektueller Fähigkeiten zu und der Krankheitsverlauf schreitet insgesamt langsamer und milder voran. Die mittlere Überlebensrate von adulten MLD-Patienten nach der Diagnosestellung ist ungefähr 12 Jahre, wohingegen die spät-infantile und juvenile Form relativ schnell zum Tod führen. (von Figura *et al.*, 2001, Gieselmann, 2008).

Europäische Studien zeigen, dass ca. 40 - 50 % der Patienten die spät-infantile Form haben, ungefähr 30 - 40 % leiden an der juvenilen und 18 - 20 % an der adulten Form (Gieselmann und Krägeloh-Mann, 2010). Mehr als 100 Mutationen, die MLD verursachen, wurden beschrieben (Gieselmann und Krägeloh-Mann, 2010). Im Gegensatz zu vielen anderen lysosomalen Speichererkrankungen existiert für MLD eine gewisse Genotyp-Phänotyp Korrelation (Polten *et al.*, 1991; Berger *et al.*, 1997). Dies kann anhand der unterschiedlichen Menge ASA-Restaktivität, die mit dem Genotyp des Patienten assoziiert ist, erklärt werden. Es gibt dennoch eine erhebliche Heterogenität zwischen Patienten mit demselben ASA-Genotyp. Auch bei Geschwistern, die identische Mutationen tragen, kann der Krankheitsverlauf bei der juvenilen oder adulten Form unterschiedlich sein. Dies deutet auf noch unbekannte genetische oder epigenetische Faktoren hin, die die Vorhersage des Krankheitsverlaufs der Patienten erschweren (Gieselmann und Krägeloh-Mann, 2010). Eine seltene Variante von MLD wird durch das Fehlen des Aktivator Proteins Saposin B verursacht. Dieses Protein wird benötigt, um Sulfatid aus der Membran herauszulösen und somit für die ASA zugänglich zu machen (Kretz *et al.*, 1990).

Wie die Sulfatid-Akkumulation zu neurologischen Symptomen, dem Verlust an Myelin oder neuronaler Degeneration in einigen Hirnarealen führt, ist weitgehend unbekannt. Bis heute existiert keine ursächliche Behandlung für MLD, sondern die Therapie ist auf die Schmerz- und Symptombehandlung begrenzt.

Ungefähr 0,5 – 2 % der Bevölkerung haben sehr niedrige Mengen an ASA-Aktivität, aber sind asymptomatisch. Dieser Zustand wird ASA-Pseudodefizienz genannt und stellt einen Sonderfall dar. In den meisten Fällen wird dies dadurch verursacht, dass die Patienten homozygot für das Pseudodefizienzallel sind (Polten *et al.*, 1991). Eine verbleibende ASA-Restaktivität von 5 – 15 % scheint demnach ausreichend für einen normalen Sulfatidmetabolismus zu sein (von Figura *et al.*, 2001).

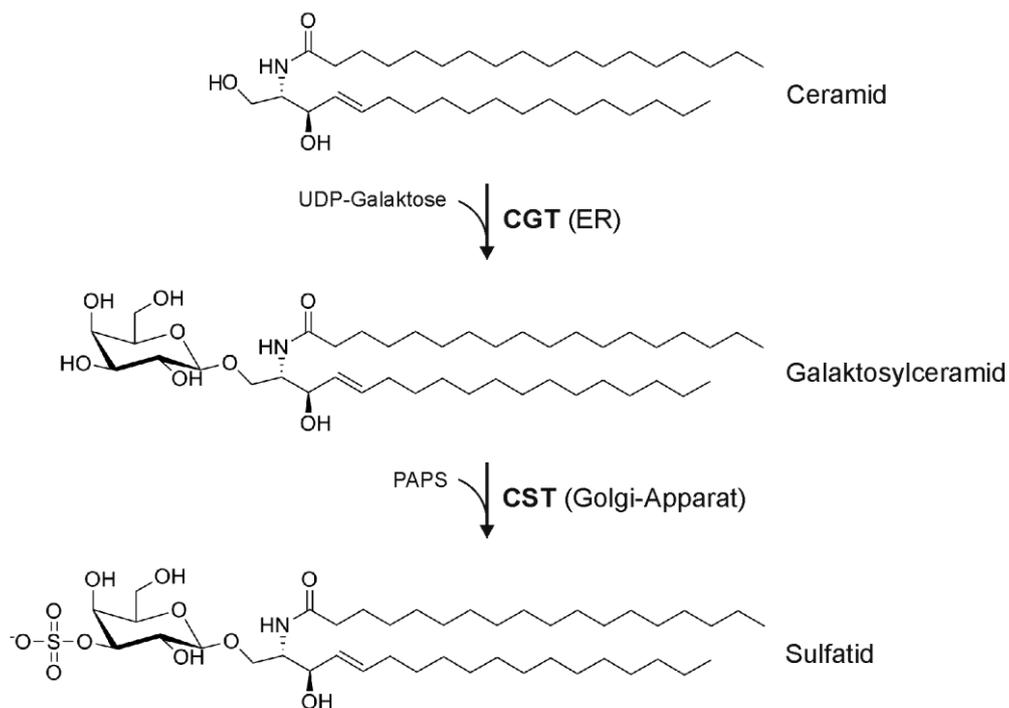
## 2.3 Cerebrosid-Sulfotransferase

Sulfotransferasen katalysieren den Transfer einer Sulfatgruppe von dem ubiquitär vorkommenden Sulfatdonor 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) auf verschiedene Substrate. Dabei stellt PAPS eine biologisch aktive Form von anorganischem Sulfat dar. Die sulfatierten Moleküle spielen in verschiedenen biologischen Prozessen, wie Zellkommunikation, Wachstum, Entwicklung, Biotransformation und Abwehr eine Rolle. In Eukaryonten werden dabei zwei Klassen von Sulfotransferasen unterschieden. Zum einen gibt es die löslichen zytosolischen Sulfotransferasen (SULT), die kleinere Moleküle wie Steroide, Bioamine und therapeutische Arzneistoffe sulfatieren und zum anderen membran-assoziierte Sulfotransferasen, die große Substrate wie Glykosaminoglykane und Proteine haben. Eine Sequenzhomologie der zytosolischen und membrangebundenen Sulfotransferasen fehlt jedoch und die Substrat-Bindungsstellen unterscheiden sich sehr stark zwischen den beiden Klassen (Negishi *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu ist in allen Sulfotransferasen die PAPS-Bindungsstelle hoch konserviert (Kakuta *et al.*, 1998).

Die Cerebrosid-Sulfotransferase (CST, EC 2.8.2.11) ist ein Typ II-Transmembranprotein des Golgi-Apparates (Tennekoon *et al.*, 1983) und katalysiert den Transfer einer Sulfatgruppe auf die 3'-Hydroxyl-Gruppe des Zuckerrestes in verschiedenen Glykolipiden (Honke *et al.*, 1996). Hauptprodukte der CST sind die Lipide 3-O-Sulfogalaktosylceramid (Sulfatid), welches hauptsächlich im Gehirn und in der Niere nachgewiesen wurde, sowie 3-O-Sulfogalaktosyl-1-alkyl-2-acyl-glycerol (Seminolipid), welches überwiegend im Hoden vorkommt. Beiden Lipiden kommen wichtige Funktionen in verschiedenen physiologischen Prozessen zu. Es konnte gezeigt werden, dass CST-defizienten Mäusen diese beiden Lipide vollständig fehlen (Honke *et al.*, 2004; Ogawa *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Die CST wurde bereits aus verschiedenen Geweben gereinigt und sowohl die murine als auch die humane cDNA kloniert (Honke *et al.*, 1996, 1997; Hirahara *et al.*, 2000). Das Enzym besitzt zwei Glykosylierungsstellen, die maßgeblich an der katalytischen Aktivität beteiligt sind, wobei dafür die N-Glykosylierung von Asn-312 und etwas weniger von Asn-66 von Bedeutung ist (Eckhardt *et al.*, 2002). Von verschiedenen Glykosyltransferasen des Golgi-Apparates ist bekannt, dass diese Homo- oder Heterodimere bzw. größere Oligomere bilden (Marks *et al.*, 1999; Sasai *et al.*, 2001). Auch die CST bildet Homodimere, wobei die Dimerisierung durch die luminale Domäne vermittelt wird (Yaghootfam *et al.*, 2007). Sowohl das murine als auch das humane Enzym bestehen aus 423 Aminosäuren und weisen eine Sequenzidentität von 84 % auf (Hirahara *et al.*, 2000).

## 2.4 Sulfatid

3-O-Sulfogalaktosylceramid ist das erste Sulfoglykolipid, das aus menschlichem Gehirn isoliert wurde und dem im Jahr 1884 von Thudichum der Name Sulfatid gegeben wurde (Eckhardt, 2008). Die Synthese des Sphingolipids beginnt im Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch die Übertragung eines Galaktose-Rests von UDP-Galaktose auf Ceramid. Dieser Schritt wird durch das Enzym Ceramid-Galaktosyltransferase (EC 2.4.1.45, CGT) katalysiert (Bosio *et al.*, 1996a). Das somit entstandene Galaktosylceramid wird zum Golgi-Apparat transportiert, wo die zur Bildung des Sulfatids führende 3-O-Sulfatierung des Galaktose-Rests durch die Cerebrosid-Sulfotransferase (CST) erfolgt. Die Syntheseschritte von Sulfatid sind schematisch in Abb. 2-6 dargestellt.



**Abb. 2-6: Synthese von Sulfatid.** Im ER erfolgt der Transfer von Galaktose auf Ceramid durch die CGT. Nach dem Transport von Galaktosylceramid in den Golgi-Apparat überträgt im finalen Syntheseschritt die CST eine Sulfatgruppe von PAPS, wodurch Sulfatid gebildet wird.

Der initiale Schritt des Abbaus von Sulfatid erfolgt durch die Hydrolyse der 3-O-Sulfatgruppe durch das Enzym Arylsulfatase A (ASA) in den Lysosomen (vergleiche Abb. 2-3). Dafür wird zusätzlich das Sphingolipid-Aktivatorprotein Saposin B benötigt, welches das Lipid aus den Membranen extrahiert und somit für die ASA zugänglich macht (Kolter und Sandhoff, 2005).

Sulfatid werden unterschiedliche biologische Funktionen sowohl bei normalen als auch bei pathologischen Mechanismen in verschiedenen Geweben zugeordnet. So konnte ein Einfluss des Lipids unter anderem bei der Insulinsekretion, im Immunsystem, bei der Hämostase bzw. Thrombose, bei Krebs, sowie bakteriellen und viralen Infektionen gezeigt werden (Takahashi und Suzuki, 2012). Im zentralen Nervensystem kommt das Lipid überwiegend in den Myelinscheiden vor, wo es 4 - 6 % der Myelinlipide ausmacht (Eckhardt, 2008). Obwohl es hauptsächlich in Oligodendrozyten und Schwann-Zellen gefunden wurde, wurden auch niedrige Mengen in Neuronen und Astrozyten detektiert (Berntson *et al.*, 1998; Pernber *et al.*, 2002).

Im Nervensystem erfüllt Sulfatid unterschiedliche Aufgaben. So wurde beschrieben, dass es im peripheren Nervensystem mit zur Myelinbildung durch Schwann-Zellen beiträgt (Roberts *et al.*, 1985; Pesheva *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2005). Des Weiteren fungiert es als negativer Regulator der Oligodendrozyten-Differenzierung, was anhand von CST-defizienten Mäusen gezeigt werden konnte. So führte das Fehlen von Sulfatid zu einer zwei- bis dreifachen Zunahme der Anzahl differenzierter Oligodendrozyten (Hirahara *et al.*, 2004). Die nähere Analyse CST-defizienter Mäuse zeigte zudem, dass diese normal kompaktiertes Myelin aufweisen (Honke *et al.*, 2002). Auch die initiale Phase der Myelinisierung ist nicht beeinflusst, während die Myelin-Erhaltung jedoch gestört zu sein scheint (Marcus *et al.*, 2006). Sulfatid ist darüber hinaus ein Inhibitor des axonalen Wachstums (Winzeler *et al.*, 2011) und eine Bindung an das Myelin- und Lymphozyten (MAL)-Protein konnte gezeigt werden (Kim *et al.*, 1995; Frank *et al.*, 1998). Dem MAL-Protein wird eine wichtige Rolle für die Ausbildung von Mikrodomänen innerhalb der Membran im Myelin zugesprochen (Erne *et al.*, 2002). Sulfatid beeinflusst außerdem die glia-axonale Signalweiterleitung (Ishibashi *et al.*, 2002; Marcus *et al.*, 2006). Zusammengefasst zeigen die verfügbaren Daten, dass Sulfatid die Differenzierung myelinisierender Zellen modulieren kann, aber nicht essentiell für die Bildung von kompaktem Myelin ist. Dem Lipid kommt jedoch eine wichtige Rolle bei den Glia-Axon-Wechselwirkungen zu (Eckhardt, 2008).

Neben den zuvor dargestellten diversen Funktionen von Sulfatid im Nervensystem scheint das Lipid ebenfalls in verschiedenen Erkrankungen und pathologischen Vorgängen des zentralen Nervensystems (ZNS) involviert zu sein. So konnten veränderte Mengen von Sulfatid in bestimmten Hirnarealen von Parkinson-Patienten (Fabelo *et al.*, 2011) und Alzheimer-Patienten (Han *et al.*, 2002, 2003) aufgezeigt werden. Zudem wurde eine Autoimmunreaktion auf Sulfatid und andere Lipide bei Patienten mit Multipler Sklerose nachgewiesen, was mit zu der Pathogenese der Demyelinisierung beitragen könnte

(Kanter *et al.*, 2006). Weiterhin führt eine Erhöhung des Sulfatidgehalts in Maus-Neuronen zu letalen Anfällen, die durch einen audiogenen Stimulus hervorgerufen werden (van Zyl *et al.*, 2010). Und nicht zuletzt führt eine Defizienz des lysosomalen Enzyms ASA oder Mutationen in dem Gen, welches für Saposin B kodiert, zu einer Akkumulation von Sulfatid und der Entwicklung der lysosomalen Speichererkrankung MLD, die mit einer starken Demyelinisierung einhergeht (von Figura *et al.*, 2001) (vergleiche Abschnitt 2.2).

## 2.5 Tiermodelle der MLD

Das Fehlen der vollständigen Aufklärung der molekularen Mechanismen, die bei der lysosomalen Speichererkrankung MLD die Demyelinisierung und neurologischen Symptome verursachen, sowie die Suche nach effektiven therapeutischen Ansätzen macht die nähere Untersuchung an Tiermodellen sinnvoll. Da die Erkrankung nur bei Menschen beschrieben wurde und kein natürliches Tiermodell vorhanden war, wurden zunächst ASA-defiziente Mäuse generiert (Hess *et al.*, 1996). Im Hinblick auf das vollständige Fehlen von ASA-Aktivität entsprechen diese genetisch gesehen der spät-infantilen Form der humanen Erkrankung MLD. Die Mäuse zeigten zwar fortschreitende neuromotorische Störungen, verschlechterte Lern- und Gedächtnisleistungen und mit zunehmendem Alter Tremor, was jedoch nicht zu einer verkürzten Lebenserwartung führte. Die Mäuse wiesen, verglichen mit der humanen Erkrankung, einen deutlich milderen Phänotyp auf (D'Hooge *et al.*, 2001). Es konnte zwar eine ähnliche Verteilung der Sulfatidspeicherung in verschiedenen Organen beobachtet werden, aber weder im zentralen noch im peripheren Nervensystem der ASA-defizienten Mäuse wurde eine Demyelinisierung bis zu einem Alter von zwei Jahren beobachtet (Gieselmann *et al.*, 1998; Wittke *et al.*, 2004). Warum sich der Phänotyp der ASA-defizienten Mäuse so stark von dem der humanen Erkrankung unterscheidet, ist nicht bekannt. Eine mögliche Begründung könnten Unterschiede des Sphingolipidmetabolismus zwischen verschiedenen Spezies sein. Auch die geringere Lebenszeit von Mäusen, welche eine Sulfatidspeicherung im gleichen Ausmaß wie bei MLD-Patienten verhindert, wäre als Ursache denkbar (Eckhardt, 2008). Das Mausmodell repräsentiert somit eher die milderen Formen der Erkrankung wie beispielsweise die adulte Form bzw. spiegelt den Zustand zu Beginn der Erkrankung wider.

Um die humane Erkrankung besser wiederzugeben, wurde ein Mausmodell mit einem stärkeren Phänotyp entwickelt, wofür die Sulfatidsynthese in Myelin-produzierenden Zellen erhöht wurde. Es wurden dafür transgene Mäuse generiert, die das Sulfatid synthetisierende Enzym CST unter der Kontrolle eines Oligodendrozyten und Schwann-

Zell spezifischen Proteolipid-Protein (PLP) Promotors überexprimierten. Anschließend wurden die transgenen Mäuse mit den ASA-defizienten Mäusen gekreuzt (Ramakrishnan *et al.*, 2007). Die zusätzliche Überexpression der CST in der neuen Mauslinie führte dabei zu einem signifikanten Anstieg der Sulfatidspeicherung im Gehirn und in den peripheren Nerven, was mit einer Verstärkung neurologischer Symptome bei älteren Tieren und dem Verlust an Myelin in 18 Monate alten Mäusen einherging. Die Mauslinie stellt somit ein Tiermodell dar, in dem die Symptome den typischen Kennzeichen der spät-infantilen Form humaner MLD deutlich näher kommen (Ramakrishnan *et al.*, 2007; Eckhardt, 2008).

## 2.6 Substratreduktionstherapie

Es existieren verschiedene Behandlungsmöglichkeiten für lysosomale Speichererkrankungen. Therapeutische Strategien basieren unter anderem darauf den Enzymdefekt zu korrigieren. Dazu gehört zum einen ein funktionales Enzym bereitzustellen, durch z.B. Knochenmarktransplantation, Gentherapie oder Enzymersatztherapie (EET). Zum anderen soll mithilfe der Chaperon-Therapie, die auf der Gabe kleiner Moleküle basiert, das defekte Enzym stabilisiert bzw. reaktiviert werden. Einen anderen denkbareren Angriffspunkt potentieller neuer Therapien stellen nachgeschaltete zelluläre Signalwege dar, welche durch die lysosomale Speichererkrankung verändert sind. Und ein weiterer Ansatz ist die Biosynthese des akkumulierenden Metaboliten zu reduzieren, was als Substratreduktionstherapie (SRT) bezeichnet wird (Futerman und van Meer, 2004; Platt und Lachmann, 2009). Zuletzt verbleibt beim Fehlen einer ursächlichen Therapie lediglich die Behandlung von Symptomen, wie z.B. eine Schmerztherapie.

Die EET stellt einen großen Anteil der eingesetzten Therapien dar. Bei sechs lysosomalen Speichererkrankungen findet diese bereits Anwendung und für weitere Erkrankungen werden klinischen Studien mit den rekombinanten Enzymen durchgeführt (Desnick und Schuchman, 2012). Aber auch andere Behandlungen werden eingesetzt oder befinden sich in der Entwicklung. Denn neben den anfallenden hohen Kosten einer EET weist diese hauptsächlich zwei weitere klinische Begrenzungen auf. Zum einen ist die Behandlung invasiv und mit einem hohen Zeitaufwand verbunden. Zum anderen überwinden die rekombinanten Enzyme nicht in einem ausreichenden Maße die Blut-Hirn-Schranke und können somit nicht zufriedenstellend bei Erkrankungen mit einer ZNS-Beteiligung eingesetzt werden. Dies stellt jedoch ein Charakteristikum der meisten lysosomalen Speichererkrankungen dar (Platt *et al.*, 2012).

Auch für die lysosomale Speichererkrankung MLD, die mit einer starken ZNS-Beteiligung einhergeht, ist keine effektive Therapie vorhanden, sondern die Schmerz- und Symptombehandlung steht im Vordergrund. Verschiedene sowohl in Patienten als auch in Tiermodellen getestete Ansätze, wie hämatopoetische und mesenchymale Stammzelltransplantation, EET, intrazerebrale Gentherapie und verschiedene zellbasierte Versuche führten bisher zu keiner ausreichend wirksamen klinischen Anwendung (Gieselmann und Krägeloh-Mann, 2010; Batzios und Zafeiriou, 2012).

Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer Therapieformen, die die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke ermöglichen, eine große Herausforderung. Die SRT stellt diesbezüglich einen interessanten Ansatzpunkt dar, da diese auf der Gabe kleiner chemischer Substanzen basiert. Dabei soll die Menge des akkumulierenden Substrates soweit reduziert werden, dass dies die verringerte Degradation durch die verminderte Aktivität der lysosomalen Hydrolase ausgleichen kann. Insbesondere Patienten, in denen noch eine Restaktivität des Enzyms nachgewiesen werden kann, sollten von diesem Ansatz profitieren. So findet der Iminozucker N-butyldeoxynojirimycin (Miglustat, NB-DNJ) neben der EET bereits Anwendung in der Therapie des Morbus Gaucher Typ I. Die Substanz fungiert dabei als Glukosylceramid-Synthase-Inhibitor und greift damit in den ersten Schritt der Glykolipidsynthese ein. Dies macht auch den Einsatz bei anderen Erkrankungen möglich, die auf der Speicherung von Lipiden beruhen, deren Synthese von Glukosylceramid ausgeht. Bei Gaucher-Patienten vermindert der Hemmstoff die Bildung von Glukosylceramid, welches primär in den Lysosomen akkumuliert. Die klinische Effektivität konnte bei Gaucher Typ I-Patienten nachgewiesen werden (Heitner *et al.*, 2002; Elstein *et al.*, 2004), obwohl auch ein relativ großes Nebenwirkungsspektrum aufgezeigt wurde (Ficicioglu, 2008). Dabei geht die Typ-I-Erkrankung nicht mit einer Beteiligung des ZNS einher, wohingegen dies bei Typ-II und Typ-III der Fall ist. Bei letztgenannten Patienten konnte jedoch der neurodegenerative Phänotyp durch die zusätzliche Gabe des Inhibitors bei der EET nicht signifikant verbessert werden. Trotzdem hatte die additive Behandlung mit Miglustat einen positiven Effekt auf die systemische Erkrankung (Schiffmann *et al.*, 2008). Mittlerweile hat Eliglustat als eine weitere Substanz die klinischen Studien zum Einsatz in der SRT bei Morbus Gaucher Typ-I erreicht. Eine Verbesserung der hämatologischen, viszeralen und der Skelettmanifestation nach Gabe des Inhibitors konnte bereits gezeigt werden (Lukina *et al.*, 2010).

SRT stellt einen vielversprechenden Ansatz auch bei anderen lysosomalen Speichererkrankungen mit ZNS-Beteiligung dar (Platt und Butters, 2004; Cox, 2005; Aerts *et al.*, 2006; Platt und Jeyakumar, 2008).

So zeigten sich beispielsweise positive Effekte bei der Niemann-Pick Typ C-Erkrankung. Diese lysosomale Speichererkrankung geht auf Mutationen in den Genen, die für die Proteine NPC1 oder seltener NPC2 kodieren, zurück. Diesen wird eine Transportfunktion für Cholesterol und andere Moleküle zugeschrieben. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer Speicherung von Cholesterol und Gangliosiden, was mit schweren neurologischen Symptomen einhergeht (Vanier, 2010). Zunächst konnte an entsprechenden Mausmodellen gezeigt werden, dass eine Behandlung mit NB-DNJ zu einem verspäteten Beginn einer neurologischen Dysfunktion, einer verlängerten Lebenszeit und einer reduzierten Gangliosid-Akkumulation mit begleitenden neuropathologischen Veränderungen führte (Zervas *et al.*, 2001). Und auch bei Patienten konnte die Gabe des Iminozuckers zu einer Verbesserung und/oder Stabilisierung verschiedener neurologischer, klinischer Parameter führen (Patterson *et al.*, 2007, 2010; Galanaud *et al.*, 2008; Pineda *et al.*, 2009; Wraith *et al.*, 2010), weshalb die Substanz auch seit neuerem klinische Anwendung bei Niemann-Pick Typ C-Patienten findet.

Darüber hinaus konnten in diversen Mausmodellen lysosomaler Speichererkrankungen mit ZNS-Beteiligung positive Effekte der SRT demonstriert werden. So konnten in den Mausmodellen der zu den GM2-Gangliosidosen gehörenden Erkrankungen Tay-Sachs und Sandhoff positive Auswirkungen der Substratsynthesehemmung gezeigt werden. Im Tay-Sachs-Mausmodell führte die Verabreichung von NB-DNJ zu einer deutlich verminderten Menge der Speichersubstanz im Gehirn (Platt *et al.*, 1997). Und die Gabe des Inhibitors führte bei Mäusen, die die Sandhoff-Erkrankung widerspiegeln, zu einem verspäteten Beginn der Symptome, reduzierten Mengen des Speichermaterials in Gehirn und peripheren Geweben, sowie einer erhöhten Lebenserwartung (Jeyakumar *et al.*, 1999; Baek *et al.*, 2008). In klinischen Studien an Patienten mit GM2-Gangliosidosen konnte eine Verbesserung der neurologischen Manifestation jedoch nicht bestätigt werden (Shapiro *et al.*, 2009). Auch die GM1-Gangliosidose, die in dem Fehlen des lysosomalen Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase begründet liegt, zeichnet sich durch eine starke ZNS-Beteiligung aus. Es konnte zunächst in jungen  $\beta$ -Galaktosidase-defizienten Mäusen gezeigt werden, dass die Gabe des Iminozuckers NB-DNJ die Speicherung von GM1-Gangliosiden und die Menge der gesamten Gehirnlipide reduzierte (Kasperzyk *et al.*, 2004, 2005). Eine weitere Studie mit einer lebenslangen Behandlung adressierte zusätzlich die Fragestellung der Effektivität und Tolerierbarkeit der Iminozucker NB-DNJ und N-butyldeoxygalaktonojirimycin (NB-DGJ) in  $\beta$ -Galaktosidase-defizienten Mäusen im Vergleich. Die Verabreichung beider Substanzen führte zu funktionellen Verbesserungen. Dabei waren diese nach NB-DNJ-Gabe größer und eine effizientere Unterdrückung der

ZNS-Inflammation wurde gezeigt. NB-DGJ reduzierte hingegen in weniger unerwünschten Wirkungen im Gastrointestinal-Trakt (Elliot-Smith *et al.*, 2008).

Des Weiteren scheint eine Kombination der SRT mit anderen Therapieformen den Krankheitsverlauf verschiedener lysosomaler Speichererkrankungen positiv zu beeinflussen. So führte eine SRT in Mausmodellen der Sandhoff-Erkrankung zusammen mit einer Knochenmarkstransplantation (Jeyakumar *et al.*, 2001) oder der zusätzlichen Gabe antiinflammatorischer Arzneistoffe mit der NB-DNJ-Behandlung zu einer verlängerten Lebensdauer (Jeyakumar *et al.*, 2004). Ebenso zeigt die Injektion von neuronalen Stammzellen in das ZNS am Mausmodell synergistische Effekte mit der Verabreichung von NB-DNJ und NB-DGJ. Eine verlängerte Lebenszeit, ein verzögerter Beginn von Defiziten der Motorfunktion und eine verminderte Lipidspeicherung konnten unter anderem beobachtet werden (Lee *et al.*, 2007). Morbus Krabbe gehört ebenfalls zu der Gruppe lysosomaler Speichererkrankungen, die mit einer schwerwiegenden Demyelinisierung einhergehen (Sakai, 2009). Auch in Mausmodellen dieser Erkrankung bewirkte die Kombination einer Knochenmarkstransplantation und einer SRT durch Gabe von L-Cycloserin eine verlängerte Lebenszeit (Biswas und LeVine, 2002).

Zahlreiche Studien an Mausmodellen führten folglich zu einer positiven Bewertung einer SRT und insbesondere Kombinationstherapien führten zu synergistischen und additiven Effekten. Inwieweit die erhaltenen Daten auf den Mensch übertragbar sind, bleibt hierbei jedoch abzuwarten.

Auch für MLD könnte die SRT einen vielversprechenden Ansatz darstellen. Somit sind die Enzyme CGT und CST, welche die letzten beiden Schritte der Sulfatidsynthese katalysieren (vergleiche Abb. 2-6), interessante Angriffspunkte. Als Hauptvorteile des Einsatzes kleiner chemischer Moleküle sind unter anderem die orale Verfügbarkeit, gut charakterisierte biologische und pharmakologische Eigenschaften und nicht zuletzt verhältnismäßig niedrige Kosten zu erwähnen. Kleine Moleküle bieten aber vor allem den Vorteil, dass sie zumindest durch chemische Modifizierungen unter Umständen die Blut-Hirn-Schranke überwinden können und somit das ZNS erreichen.

## 3 Material

### 3.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarosegelkammer	40-1214	Peqlab
Bioimager Screen Scanner	BAS-1800 II	Fujifilm
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Electron IR1500	Forma Scientific Flow Laboratories
Digital pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Dispergiergerät	Ultra Turrax T25	Janke & Kunkel
Eismaschine		Ziegra
Elektrophoresekammer (groß)	Protean® II xi Cell	BioRad
Elektrophoresekammer (klein)	Mini-Protean 3	BioRad
Elektrotransfer-Kammer	Trans-Blot® SD Cell	BioRad
Feinwaage	CP124S-0CE	Sartorius
Filmentwickler-Maschine	Curix 60	Agfa
Flachbettscanner	V700 Photo	Epson
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 100M	ZEISS
FPLC-System	Äkta purifier Software UNICORN V4.00.16	Amersham Pharmacia Biotech
Gefrierschrank -20 °C	Öko Arctis super	AEG
Gefrierschrank -80 °C	Ultra low	Sanyo
Gefriertruhe -80 °C	Ultra low	Sanyo
Geldokumentationsanlage	Gel Doc 2000	BioRad
Geltrockner	Modell 583	BioRad

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
	Thermomixer 5436	Eppendorf
Inkubator	Function Line	Heraeus Instruments
Infrarot-Fluoreszenz-Scanner	Odyssey	Li-Cor
	Software Odyssey V1.2	
Kühlschrank		Bosch
Lichtmikroskop	Telaval 31	Zeiss
Magnetrührer	RCT basic	Janke und Krunkel IKA
Mikroplatten-Messgeräte	GENios	Tecan
	Mithras LB 940	Berthold Technologies
Mikrowelle	Histoprocessor	Milestone
Minizentrifuge	Galaxy MiniStar	VWR
PCR-Gerät	T3 Thermocycler	Biometra
Peristaltikpumpe	P1	Pharmacia
Schüttelinkubator		New Brunswick Scientific
Schüttler Suspensionszellen	KS 250 basic	IKA
Spektrophotometer	NanoDrop 2000	Thermo Scientific
	DU-640	Beckman
Sterilbank	Clean-Air	Bio-Flow
Szintillationszähler	LS 6500	Beckman Coulter
Über-Kopf-Schüttler	Rotamix RM1	Elmi
Ultraschallbad	2510	Branson
Ultraschallsonde	UP 50 H	Hielscher
Ultrazentrifugen	Optima™ TLX Ultracentrifuge	Beckman Coulter
	Avanti® J-E	Beckman Coulter
	L7-65 Ultracentrifuge	Beckman Coulter

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Universaldrehvorrichtung für miniPERM Bioreaktoren		Sarstedt
Vakuumzentrifuge	SpeedVac SC100 RVC 2-18	Savant Christ
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Instruments
Waage	PC 4400	Mettler
Wasseraufbereitungsanlage	NANOpure	Barnstead
Wasserbad	1083	GFL
Zellzählkammer	Neubauer	Brand GmbH
Zentrifugen	5424, 5417 R, 5810 R Labofuge 400e Heraeus Pico 17	Eppendorf Heraeus Instruments Thermo Scientific

### 3.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Alle Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien wurden, falls nicht gesondert aufgeführt, von den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose (UltraPure™)	Life Technologies
Bioimager Screen	Fujj/Raytest
B-PER Puffer	Thermo Scientific
Cerebroside (Gesamtgehirn, 131303P)	Avanti Polar Lipids
Chemilumineszenz Substrat (ECL-Kit)	Pierce
Kobalt-Säulen HisPur™	Thermo Scientific
Endoglykosidase H (500 U/μl)	New England BioLabs
Enterokinase Kit	Novagen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
FIA-Platte, schwarz (384-well), Bindung mittel	Greiner Bio-One
Filterpapier (Blotting Papier) BF 2	Sartorius AG
Galaktosylceramid (860544P)	Avanti Polar Lipids
Halt™ Protease Inhibitor Cocktail	Thermo Scientific
IgG Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare
Kryogefäße	Nalgene
Leersäulen (Pierce™ Spin Columns)	Thermo Scientific
Magermilchpulver	Reformhaus
miniPERM Bioreaktor	Greiner Bio-One
N-Glykosidase F (PNGase F, 1 U/μl)	Roche Applied Science
Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schüll
Objektträger	Engelbrecht
OptiPrep™ Dichtegradient-Medium	Sigma-Aldrich
PAGE Blue™ Färbelösung	Fermentas
Phusion™ DNA-Polymerase	Finnzymes
ProLong® Gold Reagenz	Life Technologies
QIA-Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIA-Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraktion	Qiagen
QIAquick PCR Purification	Qiagen
Restriktionsendonukleasen	New England BioLabs
Röntgenfilme SuperRX	Fuji Medical X-Ray Film
Superdex 200 10/300-Säule	Amersham Pharmacia
Ultrafiltrationseinheiten (Amicon Ultra, Ausschlussgrenze: 10 kDa/50 kDa)	Millipore

### 3.3 Allgemeine Lösungen und Puffer

Alle verwendeten Lösungen und Puffer wurden mit Reinstwasser aus einer Barnstead NANOpure-Anlage angesetzt und sofern nicht anders angegeben nach Vorschrift aus dem Laborhandbuch von Sambrook (Sambrook, 1989) hergestellt.

Name	Zusammensetzung
Antikörper-Blockierlösung	5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T
APS	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat
Blotpuffer	48 mM Tris-HCl 39 mM Glycin 0,037 % SDS 20 % (v/v) Methanol
BSA-Blockierlösung	1 % Bovines Serumalbumin (BSA) in 1x PBS oder 1x TBS
DAPI-Lösung	5 mg/ml DAPI
EtBr-Lösung	5 mg/ml Ethidiumbromid
IPTG-Lösung	1 M IPTG
Lämmli-Probenpuffer (4x)	8 % SDS 40 % Glycerol 240 mM Tris-HCl 4 % Bromphenolblau 4 % $\beta$ -Mercaptoethanol
L-(IV)-Puffer	0,25 % Bromphenolblau 30 % Glycerin 10 mM Tris-HCl (pH 7)
PBS (10x)	100 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 1,5 M NaCl 25 mM KCl, pH 7,0
PFA-Lösung (4 %)	4 % Paraformaldehyd in PBS
Ponceau S-Lösung	0,2 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4 % SDS
SDS-Laufpuffer (10x)	250 mM Tris-HCl 1,9 M Glycin 1 % SDS, pH 8,6
TAE-Puffer (50x)	2,5 M Tris-HCl 100 mM EDTA 1 M Natriumacetat, pH 8,0
TBS (10x)	100 ml 1 M Tris-HCl 300 ml 5 M NaCl Ad 1 l mit dH <sub>2</sub> O, pH 8,0
TBS-T	1x TBS (pH 7,0) 0,05 % Tween-20
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4 % SDS
Tris-Puffer	0,1 M Tris-HCl in dH <sub>2</sub> O, pH 7; pH 8; pH 9

### 3.4 Lösungen und Medien für die Bakterienkultur

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Ampicillin-Stocklösung	100 mg/ml Ampicillin in dH <sub>2</sub> O
Kanamycin-Stocklösung	50 mg/ml Kanamycin in dH <sub>2</sub> O
LB-Agarplatten	1,5 % Agar in LB-Medium lösen und autoklavieren Auf 50 °C abgekühlte Lösung in Petrischalen gießen
LB-Medium	1 % NaCl 0,5 – 1 % Hefe-Extrakt 1 % Trypton Auf pH 7,2 einstellen und autoklavieren

### 3.5 Lösungen und Medien für die Zellkultur

Zellkultur- und Verbrauchsartikel wurden von der Firma Sarstedt (Nümbrecht) bezogen. Zellkulturmedien und -lösungen wurden von Life Technologies GmbH (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und PAA (Cölbe) verwendet.

Zelllinie	Medium	Sonderzusätze
CHO (adhärent)	DMEM-F12 (5 % hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)	
CHO ProtA-CST (adhärent)	DMEM-F12 (5 % hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)	300 µg/ml Puromycin
CHO-S ProtA-CST (Suspension)	Ex-Cell™ 302 (HT Media Supplement, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)	300 µg/ml Puromycin
CHO ProtA-hCST (adhärent)	DMEM-F12 (5 % hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)	50 µg/ml Puromycin
CHO-S ProtA-hCST (Suspension)	Ex-Cell™ 302 (HT Media Supplement, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)	50 µg/ml Puromycin
CHO-Sulf	DMEM-F12 (5 % hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)	300 µg/ml Zeocin 500 µg/ml G418
OLN-93	DMEM (10 % hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)	
<b>Einfriermedium</b>		
CHO (adhärent)	DMEM F12, 10 % DMSO, 10 % FCS	
CHO (Suspension)	45 % Ex-Cell™ 302, 45 % konditionierter Zellkulturüberstand, 10 % DMSO	

### 3.6 Radioaktive Substanzen

PAP[<sup>35</sup>S]: 1 – 3 Ci/mmol (abhängig von der entsprechenden Charge), Perkin Elmer

## 3.7 Antikörper

### 3.7.1 Primärantikörper

Folgende Antikörper wurden zur Detektion von Proteinen in Immunfluoreszenz (IF)-Analysen und Western Blot (WB)-Analysen verwendet:

Name	Hersteller	Konzentration
β-COP-Antikörper	Sigma-Aldrich	WB: 1:1.000
Calnexin-Antikörper (NT)	Stressgen	WB: 1:5.000
GM130-Antikörper	Abcam BD Biosciences	IF: 1:250 WB: 1:500
Anti-Maus-Immunglobuline	DAKO	WB: 1:2.000 - 2.500
PDI-Antikörper (Protein-Disulfid-Isomerase)	Sigma-Aldrich	IF: 2 µg/ml
ST2-Antiserum (Polyklonales CST-Antiserum aus Kaninchen)	Herstellung beschrieben: Yaghootfam <i>et al.</i> , 2007	WB: 1:5.000

### 3.7.2 Sekundärantikörper

Name	Hersteller	Konzentration
Ziege-anti-Kaninchen Cy3 gekoppelt	Dianova	IF: 1:500
Ziege-anti-Kaninchen DyLight 800	Pierce	WB: 1:5.000
Ziege-anti-Kaninchen Peroxidase gekoppelt	Dianova	WB: 1:5.000
Ziege-anti-Maus Peroxidase gekoppelt	Dianova	WB: 1:5.000

### 3.8 Größenstandards

Die im Folgenden aufgelisteten Größenstandards wurden bei DNA-Analysen verwendet:

Name	Größen [bp]	Hersteller
$\lambda$ EcoRI/HindIII	564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4286, 4973, 5148, 21226	Fermentas
100bpLadderplus	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000	Fermentas

Der nachfolgend dargestellte Größenstandard wurde bei Protein-Analysen verwendet:

Name	Größen [kDa]	Hersteller
PageRuler™ ( <i>Prestained Protein Ladder</i> )	10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130, 170	Fermentas

### 3.9 Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer stammen von MWG Biotech AG:

Interne Nummer	Name	Sequenz 5' - 3'	Beschreibung
L-3129	CST-R164A-for	cggaccctgctcgtctctcga	Primer für Mutagenese-PCR CST-HA (R164A)
L-3130	CST-R164A-rev	cgatgacggtgatgaaggtgg	Primer für Mutagenese-PCR CST-HA (R164A)
L-3399	delpProtAfor	attagctagctacgacgatgacgataag	Primer für die Klonierung von pdelPROTA-CST
L-3400	delpProtarev	taatgctagcgtgcagaacctccatgc	Primer für die Klonierung von pdelPROTA-CST
L-3397	Gal3St1for	attagaattctgccggcctggcctcca	Primer für die Klonierung von pPROTA-hCST
L-3472	Gal3St1rev2Mun	gttacaattgggctcaccaccgcaggaaatcgc	Primer für die Klonierung von pPROTA-hCST

Interne Nummer	Name	Sequenz 5' - 3'	Beschreibung
L-3785	rAST4-R68G-F1	tggcggcgccccatctatgcc cgggtac	Primer für Mutagenese-PCR SULT1A1 (R68G)
L-3784	rAST4-K65E-R1	cactcctctagcttgccaccctg atagatcatatcca	Primer für Mutagenese-PCR SULT1A1 (K65E)

### 3.10 Plasmide

Interne Nummer	Name	Beschreibung
E005	pcDNA3.1/CST-HA	Murine CST mit C-terminalem HA-Tag
E032	pCST(TM)-EGFP	Transmembrandomäne der murinen CST (AS 1 - 36) mit C-terminalem EGFP-Tag
E035	pCST-EGFP	Murine CST mit C-terminalem EGFP-Tag
E266	pcDNA3.1/CST-HA (R164A)	Punktmutante (R164A) CST-HA (E005)
E299	pdelPROTA-CST	Signalpeptid Transin und murine CST (ab AS 39)
E313	pPROTA-hCST	Fusionsprotein shCST: Signalpeptid Transin, IgG- Bindedomäne Protein A, EK-Schnittstelle, humane CST (ab AS 39)
E419	pQE80L-ArylSTIV- K65E/R68G	Punktmutante (K65E/R68G) SULT1A1 (#1571)
#1505	pPROTA-EK	Fusionsprotein t-ProtA: Signalpeptid Transin, IgG- Bindedomäne Protein A, EK-Schnittstelle
#1509	pPROTA-CST	Fusionsprotein sCST (t-ProtA-CST): Signalpeptid Transin, IgG-Bindedomäne Protein A, EK- Schnittstelle, murine CST (ab AS 39)
#1571	pQE-Aryl-STIV	Ratten-SULT 1A1 mit amino-terminalem Polyhistidin-Tag

### 3.11 Bakterienstämme

E. coli XL-1 blue      Bullock *et al.*, BioTechniques, 5, 376, 1987

E. coli BL21 (DE3)      Life Technologies

### 3.12 Zelllinien

Nachfolgend sind die verwendeten Zelllinien aufgeführt:

<b>Zelllinie</b>	<b>Beschreibung</b>
CHO (CHO K1)	<i>Chinese Hamster Ovary cells</i> ; Theodore T. Puck, 1957
CHO ProtA-CST	CHO-GalT-Zellen stabil transfiziert mit pPROTA-CST (Eckhardt <i>et al.</i> , 2002)
CHO-S ProtA-CST	An serumfreie Bedingungen angepasste CHO ProtA-CST-Zellen (Suspensionszellen)
CHO ProtA-hCST	CHO-Zellen stabil transfiziert mit pPROTA-hCST
CHO-S ProtA-hCST	An serumfreie Bedingungen angepasste CHO ProtA-hCST-Zellen (Suspensionszellen)
CHO-Sulf	CHO-GalT-Zellen stabil transfiziert mit muriner CST (Eckhardt <i>et al.</i> , 2002)
OLN 93	Oligodendrozyten-Zelllinie aus Ratte (Erhalten von C. Richter-Landsberg, Universität Oldenburg)

## 4 Methoden

### 4.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

#### 4.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde mit den DNA-Extraktions Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Für kleine DNA-Mengen wurde dafür das Qiagen MiniPrep Kit® und für größere Mengen an DNA das Qiagen MidiPrep Kit® verwendet. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

#### 4.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Konzentrationsbestimmung von DNA wurde das Gerät NanoDrop 2000 nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific) verwendet.

#### 4.1.3 DNA-Spaltung mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen. Diese Enzyme erkennen spezifische DNA-Sequenzen und können unter definierten Bedingungen die Phosphodiesterbindung zweier DNA-Basen trennen. Die Methode diente zum einen der Analyse der DNA und zum anderen präparativen Zwecken, um die DNA für weitere Klonierungsschritte vorzubereiten. Dabei wurde wie im Folgenden aufgezeigt vorgegangen:

Komponente	analytisch	präparativ
DNA	~1 µg/1 µl Minipräparation	abhängig von der benötigten Menge
10x Puffer	2 µl	5 µl
Restriktionsenzym (1 U/µl)	0,5 U	1 – 2 U
dH <sub>2</sub> O	ad 20 µl	ad 50 µl

Für die analytische Spaltung wurde für 1 – 2 h und für die präparative Spaltung für mindestens 4 h bei 37 °C inkubiert.

Die DNA-Spaltung wurde durch Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel kontrolliert.

### 4.1.4 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Bei dieser Methode wandern die DNA-Moleküle auf Grund Ihrer negativen elektrischen Ladung bei Anlegung eines elektrischen Feldes innerhalb des Agarosegels. Es erfolgt eine Auftrennung nach Größe, wobei kleinere Moleküle weiter wandern als größere.

Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren, wurden 0,8 – 2 %ige Gele (Agarose in 1x TAE-Puffer) hergestellt. Zur späteren Visualisierung der DNA-Moleküle unter UV-Licht (260 nm) wurde den Gelen 0,5 – 2 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Zu den Proben wurde L-(IV)-Puffer gegeben und die Ansätze in die Agarosegeltaschen pipettiert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei einer konstanten Spannung von 80 – 140 V in 1x TAE-Puffer.

### 4.1.5 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Für die Isolierung der DNA aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraktions Kit® der Firma Qiagen verwendet. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

### 4.1.6 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion lassen sich definierte DNA-Abschnitte unter Verwendung einer hitzestabilen Polymerase vervielfältigen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Phusion™ DNA-Polymerase der Firma Finnzymes verwendet. Es wurde dabei nach folgendem Pipettierschema vorgegangen:

DNA (~ 10 ng/µl)	1 µl
5 x Phusion Puffer GC	10 µl
2 mM dNTPs	5 µl
Oligonukleotid 1 (10 pmol/µl)	2,5 µl
Oligonukleotid 2 (10 pmol/µl)	2,5 µl
Phusion™ DNA-Polymerase	0,5 µl
dH <sub>2</sub> O	28,5 µl

Das Reaktionsgemisch wurde in ein 0,2 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und in das PCR-Gerät überführt. Die Polymerase-Kettenreaktion setzt sich aus drei definierten Reaktionsschritten zusammen. Als erstes erfolgt die Denaturierung der DNA bei hoher Temperatur (98 °C). Im zweiten Schritt findet die Anlagerungsreaktion der Oligonukleotide an die entsprechenden DNA-Abschnitte statt und zuletzt die Amplifikationsreaktion. Durch eine Wiederholung dieser Schritte kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der entsprechenden DNA.

Verwendetes PCR-Programm:	30 s	98 °C	} 30 Zyklen
	20 s	98 °C	
	30 s	xx °C*	
	30 s/kb	72 °C	
	10 min	72 °C	
	∞	4 °C	

\*xx °C: 3 °C unterhalb der Schmelztemperatur des Oligonukleotids mit der niedrigeren Schmelztemperatur

Die amplifizierte DNA wurde anschließend entweder mittels Agarose-Gelelektrophorese weiter analysiert oder mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits® gereinigt.

#### 4.1.6.1 Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR wurde genutzt, um unter der Verwendung mutationsenthaltender Oligonukleotide Punktmutationen in Plasmide einzuführen. Die Durchführung erfolgte dabei analog zu Abschnitt 4.1.6. Nach Spaltung mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen und anschließender Ligation wurden erneut zirkuläre Plasmide erhalten.

#### 4.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Als Ligation bezeichnet man die enzymatische Verknüpfung von DNA-Fragmenten unter Nutzung einer T4 DNA-Ligase (Thermo Scientific), wobei eine neue Phosphodiesterbindung geknüpft wird. Die gewählten Ligationsbedingungen sind zum einen von der Größe der zu verknüpfenden DNA-Fragmente und zum anderen davon abhängig, ob es sich um überhängende oder nicht-überhängende Enden handelt. Entsprechend wurde nach Angaben des Herstellers (Thermo Scientific) vorgegangen, wobei die Ligationen entweder für 1 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C durchgeführt wurden.

### **4.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterien**

Unter Transformation versteht man das Einbringen von DNA in Prokaryonten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Transformation in kompetente Bakterien genutzt. Durch das Vorhandensein eines Resistenzgens für ein bestimmtes Antibiotikum auf der zu transformierenden Plasmid-DNA kann nach dessen Zugabe zu den Bakterien auf die erfolgreich transformierten Bakterien selektioniert werden. Dafür wurden 100 µl kompetente XL-1 blue-Bakterien für 10 min auf Eis aufgetaut, die entsprechende mit dH<sub>2</sub>O auf 10 µl aufgefüllte DNA-Probe (1 ng Plasmid-DNA/5 µl Ligationsansatz/1 µl Minipräparation) dazugegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock für 45 s bei 42 °C unterzogen. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurde zu der Probe 1 ml auf 37 °C erwärmtes LB-Medium gegeben und der Ansatz in einem 15 ml-Spitzröhrchen für 1 h bei 37 °C geschüttelt. 100 µl der Bakteriensuspension wurden auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht in den Brutschrank (37 °C) gestellt.

### **4.1.9 Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Die Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurde extern von der Firma GATC durchgeführt.

## **4.2 Arbeiten mit Zellen**

### **4.2.1 Kultivierung von Zellen**

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter Werkbänken mit der Laminar-Air-Flow Technik durchgeführt und erfolgten unter sterilen Bedingungen und Verwendung von hitzesterilisierten Materialien. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturschalen oder Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 37 °C und mit einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre.

Die verwendeten Suspensionszellen wurden zusätzlich auf einem Schüttler bei 90 Umdrehungen pro Minute (Upm) geschüttelt.

### **4.2.2 Passagieren von Zellen**

Für das Passagieren von adhärenenten Zelllinien wurden die Zellen zunächst mit 37 °C warmem PBS gewaschen und im Anschluss mit einer 0,05 %igen Trypsin-Lösung versetzt, sodass der Boden des verwendeten Zellkulturgefäßes vollständig bedeckt war. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 5 min wurde das Ablösen der Zellen mit Hilfe des Mikroskops kontrolliert. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe von FCS-haltigem Zellkulturmedium gestoppt und bei 600 x g für 5 min und RT zentrifugiert. Die Zellen wurden mit einer Pipette in frischem Medium vollständig resuspendiert und in ein neues Zellkulturgefäß überführt.

Für das Passagieren der Suspensionszellen wurde zunächst entsprechend der gewünschten Zellzahl eine definierte Menge Zellsuspension bei 200 x g für 10 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in frischem Zellkulturmedium aufgenommen, vollständig resuspendiert und mit frischem Medium in ein neues Zellkulturgefäß überführt.

### **4.2.3 Auftauen von Zellen**

Entsprechendes Zellkulturmedium wurde in einem Spitzröhrchen auf 0 °C abgekühlt. Das Kryogefäß wurde aus dem Stickstofftank entnommen und im 37 °C warmen Wasserbad erwärmt, bis nur noch ein kleiner Eiskern erkennbar war. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in das Spitzröhrchen mit dem kalten Medium überführt und die Mischung durch einmaliges über Kopf kippen vorsichtig durchmischt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, das Zellpellet in der entsprechenden Menge 37 °C warmen Zellkulturmedium resuspendiert und in ein Zellkulturgefäß überführt.

### **4.2.4 Einfrieren von Zellen**

Die Zellen wurden pelletiert, langsam die entsprechenden Menge Einfriermedium zugegeben, das Zellpellet vorsichtig resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Zum langsamen Durchfrieren wurde das Einfriergefäß zunächst für mind. 24 h in Styropor bei -80 °C gelagert und anschließend für die Langzeitlagerung in die flüssige Phase des Stickstofftanks überführt.

### 4.2.5 Transfektion

Die Transfektion der verwendeten Zelllinien wurde mit dem Turbofect® Transfektionsreagenz (Fermentas) durchgeführt. Dabei wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen.

### 4.2.6 Anpassung adhärent wachsender Zelllinien an serumfreie Bedingungen

Für die Produktion größerer Mengen löslicher CST-Fusionsproteine wurden adhärent wachsende Zelllinien an das Wachstum unter serumfreien Bedingungen angepasst.

Die schrittweise Anpassung wurde nach dem in der Produktinformation des Ex-Cell™ 302-Mediums (SAFCBiosciences™) enthaltenen Protokoll durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zunächst vollständig in Ex-Cell™ 302-Medium mit 5 % FCS überführt und nach dem Erreichen einer Konfluenz von 80 - 90 % in einer Dichte von 100.000 Zellen/ml bei einer verminderten FCS-Konzentration von 2 % weiter kultiviert. Nachdem die Zellen zu ca. 70 % konfluent waren, wurde die FCS-Konzentration im Medium weiter auf 1 % FCS gesenkt und die Zellen darin mit einer Dichte von 200.000 Zellen/ml aufgenommen. Nach erneutem Erreichen einer Konfluenz von ca. 70 % wurden die im Medium befindlichen Zellklumpen resuspendiert, die adhären Zellen vom Flaschenboden gelöst und die vereinigten Zellen durch Zentrifugation pelletiert. Im letzten Anpassungsschritt wurden die Zellen in serumfreiem Medium in einer Zelldichte von 800.000 Zellen/ml aufgenommen, auf einem Schüttler (90 Upm) weiter kultiviert und nach drei bis vier Passagen für weitere Versuche verwendet.

### 4.2.7 Kultivierung sCST-überexprimierender Zellen

CHO-S ProtA-CST-Zellen wurden in miniPERM Bioreaktoren der Firma Greiner Bio-One kultiviert. Dies ermöglicht ein Wachstum in hoher Zelldichte und die Produktion von Proteinen in hoher Konzentration.

Der miniPERM Bioreaktor besteht aus einem kleineren Produktionsmodul (40 ml) und einem größeren Versorgungsmodul (400 ml), welche durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt sind. In dem Produktionsmodul befinden sich die Zellen in einer sehr hohen Zelldichte und in dem Versorgungsmodul das Zellkulturmedium. Während die Zellen und die höhermolekularen Proteine die Membran nicht passieren können, kann ein

Austausch von Gas und niedermolekularen Stoffen erfolgen. Für die Kultivierung wurden  $1 - 2 \times 10^6$  Suspensionszellen/ml in 36 ml Medium resuspendiert und in das Produktionsmodul überführt. Anschließend wurden 360 ml Medium in das Versorgungsmodul gegeben und die Bioreaktoren in den Inkubator überführt. Eine ständige Rotation in einer Universaldrehvorrichtung bei 10 Upm verhinderte das Absetzen der Zellen. Alle 2 - 3 Tage wurden 24 ml Zellsuspension aus dem Produktionsmodul entnommen und durch das entsprechende Volumen frischen Mediums ersetzt. Die Zellsuspension wurde bei 200 x g für 10 min zentrifugiert und der Zellkulturüberstand direkt verwendet oder für spätere Untersuchungen bei -20 °C gelagert. Der Wechsel des Mediums im Versorgungsmodul erfolgte wöchentlich.

#### **4.2.8 Kultivierung shCST-überexprimierender Zellen**

CHO-S ProtA-hCST-Zellen wurden in T175-Zellkulturflaschen unter ständigem Schütteln (90 Upm) kultiviert. Alle 2 - 5 Tage wurden die Zellen passagiert, das shCST-enthaltene Medium abgenommen und entweder direkt weiterverarbeitet oder für die spätere Verwendung bei -20 °C gelagert.

### **4.3 Proteinanalytik**

#### **4.3.1 Herstellung von Zelllysaten**

Lysepuffer:

- 1 % Triton X-100
- 20 mM Tris-HCl pH 7
- 50 mM NaCl
- 5 mM EDTA

Der Lysepuffer wurde bei 4 °C gelagert und kurz vor Gebrauch die entsprechende Menge Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (100x) oder PMSF (1 mM), Aprotinin (1 µg/ml) und Leupeptin (1 µg/ml) zugesetzt.

Zur Herstellung der Lysate wurden die adhärennten Zellen zunächst ca. 5 min mit PBS unter Zusatz von 2 mM EDTA inkubiert, mit einem Zellschaber abgelöst und bei 1.200 x g für 5 - 10 min pelletiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 40 - 500 µl Lysepuffer resuspendiert und 20 - 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C und

15.000 x g (15 min) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Zellysate wurde entweder direkt verwendet oder bei -20 °C gelagert.

### 4.3.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das BioRad DC Assay System nach Herstellerangaben verwendet. Nach erfolgter Reaktion wurde die Absorption mit Hilfe eines Mikropplatten-Messgeräts bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Um die Proteinkonzentration der Probe bestimmen zu können, wurde jeweils gleichzeitig eine Standardreihe (0 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 2,5 mg/ml BSA in Lysepuffer) mitvermessen. Die Proteinbestimmung wurde in Triplikaten durchgeführt.

### 4.3.3 SDS-PAGE

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Für jede durchgeführte SDS-PAGE wurden frisch Polyacrylamid-Gele gegossen, die aus einem Trenn- und einem Sammelgel bestehen. Je nach Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins wurde das Trenngel in einer Konzentration von 7,5 %, 10 % oder 12,5 % hergestellt.

#### Sammelgel (5 ml):

- 0,625 ml 40 % Acrylamid
- 3,020 ml dH<sub>2</sub>O
- 1,250 ml 4-fach konzentrierter Sammelgelpuffer
- 0,050 ml 10 % SDS

#### Trenngel (5 ml):

	7,5 %	10 %	12,5 %
40 % Acrylamid	0,940 ml	1,250 ml	1,560 ml
dH <sub>2</sub> O	2,700 ml	2,400 ml	2,100 ml
Trenngelpuffer (4-fach)	1,250 ml	1,250 ml	1,250 ml
10 % SDS	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
10 % APS	0,050 ml	0,050 ml	0,050 ml
TEMED	0,005 ml	0,005 ml	0,005 ml

Die Proben wurden zunächst mit denaturierendem 4x Lämmli-Puffer versetzt und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf RT wurden die Proben in die einzelnen Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Elektrophorese der kleinen Gele wurde bei konstanter Spannung (80 – 200 V) und die der großen Gele bei einer konstanten Stromstärke von 8 mA über Nacht unter Kühlung durchgeführt. Um die Molekulargewichte der aufzutrennenden Proteine bestimmen zu können wurde ein Proteingrößenstandard mit auf das Gel aufgetragen.

#### **4.3.4 Proteintransfer mittels Western Blot**

Beim Western Blot wird ein zuvor im SDS-Gel aufgetrenntes Proteingemisch auf eine Membran transferiert und anschließend werden einzelne Proteine mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Dafür wurden sechs Lagen Whatman-Papier auf die entsprechende Gelgröße zugeschnitten, mit Blotpuffer angefeuchtet und drei davon auf die Anode der Blottingapparatur gelegt. Eine passend zugeschnittene Nitrocellulosemembran wurde ebenfalls mit Blotpuffer befeuchtet und auf dem Whatman-Papier Stapel platziert, gefolgt von dem in Blotpuffer equilibrierten SDS-Gel. Darauf wurden die restlichen drei Whatman-Papiere gelegt. Der Blot erfolgte bei einer konstanten Stromstärke für 60 – 90 min. Der fehlerfreie Transfer wurde mit Hilfe der Ponceau S-Färbelösung sichtbar gemacht und anschließend freie Bindungsstellen mit 5 % Magermilchpulver in TBS-T für mindestens 60 min bei RT unter Schütteln gesättigt. Die folgende Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 60 - 90 min bei RT, wobei der Antikörper in 5 %iger Magermilchblockierlösung verdünnt wurde. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und für 60 min mit dem Sekundärantikörper in TBS-T bei RT inkubiert. Nach erneuten drei Waschschrritten mit TBS-T wurde die Antikörperbindung auf der Membran nachgewiesen. Bei der Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten Antikörpers wurde dafür das System der verstärkten Chemilumineszenz (ECL) nach Herstellerangaben (Pierce) genutzt. Bei Verwendung eines Fluoreszenz-Antikörpers erfolgte die Visualisierung der Signale mit Hilfe eines Infrarot-Fluoreszenz-Scanners.

#### **4.3.5 Coomassie Färbung von SDS-Gelen**

Mithilfe des Triphenylmethanfarbstoffes Coomassie-Brillant-Blau lassen sich Proteine in einem SDS-Gel anfärben und somit sichtbar machen. Dafür wurden die SDS-Gele nach der Elektrophorese zweimal für mind. 10 min in dH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde

das Gel mit der PAGE Blue-Färbelösung (Fermentas) unter ständigem Schütteln bei RT über Nacht inkubiert. Zum Entfärben des Hintergrundes wurde mehrmals mit dH<sub>2</sub>O gewaschen.

### 4.3.6 Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen in Zellen

Für die Immunfluoreszenzfärbung von Proteinen in Zellen wurden Deckgläschen in eine 24-well Platte überführt, 40.000 – 50.000 Zellen darauf pipettiert und am folgenden Tag die Transfektion durchgeführt. 24 – 48 h nach Transfektion wurden die Zellen mit PBS (37 °C) gewaschen und mit 4 %iger PFA-Lösung für 10 min bei RT fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS und Inkubation mit NH<sub>4</sub>Cl-Lösung (50 mM in PBS) für ca. 20 min wurden die Zellen zweimal mit TBS gewaschen.

Zum Permeabilisieren der Zellen wurden diese für 5 – 10 min mit Triton X-100-Lösung (0,3 % in TBS pH 7,0) versetzt und anschließend unspezifische Bindungsstellen durch 30-minütige Inkubation mit 1 %iger BSA-Blockierlösung gesättigt. Die Deckgläser wurden auf einem 50 µl Tropfen der in 1 % BSA verdünnten Primärantikörperlösung in einer feuchten Kammer für 60 - 120 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit TBS gewaschen. Der Sekundär-Antikörper wurde zusammen mit der DAPI-Lösung (1:25.000) in 1 %iger BSA-Blockierlösung verdünnt und die Inkubation erfolgte analog zum Primärantikörper für 60 min im Dunkeln. Danach wurde zunächst dreimal mit TBS (pH 7,0), dann einmal mit dH<sub>2</sub>O und zuletzt einmal mit 100 % Ethanol gewaschen. Die Deckgläschen wurden im Dunkeln für 10 min getrocknet und anschließend mit 6 µl ProLong® Gold auf Objektträgern fixiert. Nach Lagerung über Nacht bei RT im Dunkeln wurden die Objektträger bis zur mikroskopischen Analyse lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

### 4.3.7 Trennung von ER und Golgi-Apparat

Der diskontinuierliche Dichtegradient zur Trennung von ER und Golgi-Apparat wurde modifiziert nach dem OptiPrep™-Protokoll S37 durchgeführt.

Dafür wurden die folgenden Lösungen benötigt:

---

OptiPrep™-Lösung	Iodixanol-Lösung 60 % (w/v)
Homogenisierungspuffer	250 mM Saccharose
	1 mM EDTA
	10 mM HEPES-NaOH pH 7,4

---

Verdünnungspuffer	250 mM Saccharose 6 mM EDTA 60 mM HEPES-NaOH pH 7,4
OptiPrep™-Arbeitslösung	Iodixanol-Lösung 50 % (w/v) 5:1 Verdünnung der OptiPrep™-Lösung mit dem Verdünnungspuffer

---

Jeder Lösung wurde frisch PMSF in einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt.

Für die Trennung von Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat mittels Dichtegradientenzentrifugation wurden zunächst die Membranfraktionen angereichert. Dafür wurden die Zellpellets von 5 - 10 konfluenten 15 cm-Zellkulturschalen (CHO-Sulf-Zellen) in 1 ml Homogenisierungspuffer resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Behandlung mit einem Glashomogenisator und anschließendem Auf- und Abziehen durch eine 1 ml-Spritze (20 G-Kanüle) homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 1.000 x g für 10 min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in 400 µl Homogenisierungspuffer homogenisiert, erneut wie beschrieben zentrifugiert und die Überstände vereinigt. Nach Zentrifugation bei 3.000 x g für 10 min wurde der dabei erhaltenen Überstand mit einer Ultrazentrifuge für 45 min bei 100.000 x g zentrifugiert und das erhaltene Pellet weiter verwendet.

Für einen diskontinuierlichen Gradienten wurden je 10 ml einer Iodixanol-Lösung (2,5 %, 5 %, 7,5 %, 10 %, 12,5 %, 15 %, 17,5 %, 20 % und 30 % (w/v)) durch Verdünnung der OptiPrep™-Arbeitslösung mit Homogenisierungspuffer hergestellt und je 1,3 ml mit abnehmender Dichte in ein Ultrazentrifugegefäß überführt. Zuletzt wurde die in 2,5 %iger Lösung resuspendierten Membranfraktionen oben auf pipettiert. Es erfolgte eine Zentrifugation für 90 min bei 32.000 Upm (SW41-Rotor). Anschließend wurden die Fraktionen (1,3 ml) in einzelne Reaktionsgefäße überführt.

Die CST-Aktivität in den Fraktionen wurde mit der radioaktiven CST-Aktivitätsbestimmung ermittelt. Für Western Blot-Analysen wurde zunächst eine Proteinfällung in den Fraktionen durchgeführt, um die enthaltene Proteine anzureichern und somit besser nachweisbar zu machen. Dafür wurde 1 ml jeder Fraktion mit 1 ml 20 % TCA für 20 min bei RT inkubiert und im Anschluss 30 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 600 µl eiskaltem Aceton versetzt, 15 min bei 20.000 x g zentrifugiert und das Pellet anschließend in Lämmli-Probenpuffer resuspendiert. Die Probe stand nun direkt für eine Western Blot-Analyse zur Verfügung. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4 °C.

### 4.3.8 Deglykosylierung von Proteinen

Die Deglykosylierung von Proteinen wurde mit den Enzymen Endoglykosidase H (Endo H, New England BioLabs) oder N-Glykosidase F (PNGase F, Roche Applied Science) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Inkubation bei 37 °C erfolgte dabei für 3 – 4 h.

## 4.4 Sulfotransferase 1A1

### 4.4.1 Bakterielle Expression

Für die bakterielle Expression des Enzyms SULT1A1 (K65E/R68G) wurden zunächst 200 – 300 ng des Plasmids pQE80L-ArylSTIV-K65E/R68G (E419) in BL21-Zellen transformiert, auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 5 ml LB-Medium (+ 100 µg/ml Ampicillin) wurden mit einer BL21-Kolonie versetzt und unter Schütteln bei 37 °C erneut über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Vorkultur in 500 ml auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium (+ 100 µg/ml Ampicillin) überführt und in einen Schüttelinkubator bei 37 °C gestellt. In 30 minütigen Abständen wurde die optische Dichte (OD) mit einem Spektrophotometer bei 600 nm gemessen, wobei LB-Medium zum Nullabgleich verwendet wurde. Nach Erreichen einer OD zwischen 0,5 und 0,6 (ca. nach 2 h) wurde durch die Zugabe von 500 µl IPTG-Lösung (Endkonzentration 1 mM) die Expression induziert. Die Bakteriensuspension wurde in einen Schüttelinkubator überführt und die Kultur ca. 22 h bei RT geschüttelt.

### 4.4.2 Affinitäts-Reinigung

Die Herstellung der Bakterienlysaten und Extraktion der Proteine wurde mit dem B-PER® Bakterien Extraktions Reagenz (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Affinitäts-Reinigung der SULT1A1 wurden HisPur™ Kobalt-Säulen (Säulenbettvolumen: 1ml) von Thermo Scientific benutzt. Es wurden die im Folgenden aufgelisteten Puffer verwendet:

**Waschpuffer (pH 7,4)**

50 mM Natriumphosphat  
300 mM NaCl  
10 mM Imidazol

---

<b>Elutionspuffer (pH 7,4)</b>	50 mM Natriumphosphat 300 mM NaCl 150 mM Imidazol
<b>Regenerationspuffer (pH 5,0)</b>	20 mM MES 0,1 M NaCl

---

Alle Puffer wurden vor dem Gebrauch durch einen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm filtriert. Der Vorgang wurde entweder nicht automatisiert mit einer Spritze bei RT **(A)** oder unter Verwendung der Äkta-FPLC-Anlage bei 4 °C **(B)** durchgeführt.

#### **(A) Nicht automatisierte Reinigung**

Zunächst wurde das Säulenbett mit 10 ml Waschpuffer equilibriert und anschließend der Überstand des Bakterienlysates mit Waschpuffer 1:1 gemischt, filtriert und mit einer Spritze und einer Flussrate von maximal 1 ml/min über die Säule gedrückt. Danach wurde mit 10 ml Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 5 ml Elutionspuffer an das Säulenmaterial gebundenes Fusionsprotein eluiert, wobei 0,5 – 1 ml-Fractionen aufgefangen wurden. Die Eluatfraktionen, die Sulfotransferase enthielten, wurden vereinigt, in einen Dialyseschlauch (Ausschlussgröße: 12 – 14 kDa) überführt und bei 4 °C dreimal für je mind. 3 - 4 h gegen 5 l 100 mM Tris-HCl (pH 7,6) dialysiert. Die Lagerung bis zur Weiterverwendung erfolgte bei -80 °C.

#### **(B) Reinigung unter Verwendung der Äkta-FPLC-Anlage**

Für die Reinigung mit Hilfe der Äkta-FPLC-Anlage wurden alle Puffer und die Probe mit einer konstanten Flussrate von 1ml/min über die Kobalt-Säule geleitet. Die Equilibrierung, Probenvorbereitung und der Probenauftrag erfolgten dabei analog zu (A). Anschließend wurde mit 15 ml Waschpuffer gewaschen und das Fusionsprotein mit 20 ml Puffer eluiert, wobei 0,5 ml-Fractionen aufgefangen wurden. Vor dem nächsten Probenauftrag wurde das Säulenbettmaterial mit 10 ml MES-Puffer, gefolgt von 10 ml dH<sub>2</sub>O und 5 ml Equilibrierungspuffer regeneriert. Während des gesamten Reinigungsvorganges wurde ein UV-Spektrum bei 280 nm aufgezeichnet. Elutionsfraktionen, die SULT1A1-Protein enthielten (mind. 700 mAU), wurden vereinigt und eine Dialyse analog zu (A) durchgeführt.

### 4.4.3 Aktivitätsbestimmung

Zur Aktivitätsbestimmung der SULT1A1 wurde eine bereits in der Literatur beschriebene Methode unter leicht modifizierten Bedingungen durchgeführt (Chen *et al.*, 2005). Das Enzym katalysiert die Bildung von PAPS durch die Übertragung einer Sulfatgruppe von 4-Methylumbelliferylsulfat (MUS) auf PAP. Das dabei entstehende desulfatierte 4-Methylumbelliferon (MU) führt zu einer Verschiebung des Fluoreszenzsignals, welches mittels eines Fluoreszenzmessgerätes bestimmt und als Maß für die enzymatische Aktivität herangezogen werden kann.

Verwendeter Reaktionspuffer:

Komponente	Konzentration
β-Mercaptoethanol	5 mM
MUS	4 mM
PAP	20 μM
Kaliumphosphatpuffer pH 7,0	100 mM

Jede Reaktion wurde in einem Endvolumen von 50 μl durchgeführt und durch die Zugabe von 0,5 μg SULT1A1 (K65E/R68G) gestartet. Die Reaktionsansätze wurden in eine 96-well-Platte (Mikrotiterplatte 96 well F, Sarstedt) überführt und die Fluoreszenzwerte (RFU) mit Hilfe eines Mikroplatten-Messgeräts über einen definierten Zeitraum in regelmäßigen Abständen gemessen. Dabei wurde kontinuierlich bei 37 °C inkubiert und die Platte vor jeder Messung 3 s geschüttelt. Es wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Als Fluoreszenzmessgerät wurde das Gerät GENios (Hersteller Tecan) verwendet, wobei als Anregungswellenlänge 360 nm verwendet wurde und die gemessene Emissionswellenlänge bei 460 nm lag.

## 4.5 Cerebrosid-Sulfotransferase

### 4.5.1 Affinitäts-Reinigung

Für die Reinigung der löslichen CST-Fusionsproteine (murin und human) wurde IgG Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) verwendet. Die Reinigung erfolgte entweder unter Verwendung einer Peristaltik-Pumpe (**A**), des Batch-Verfahrens (**B**) oder der Äkta-FPLC-Anlage (**C**).

Für die Reinigungsverfahren wurden die im Folgenden aufgelisteten Puffer verwendet:

<b>Waschpuffer 1 (pH 7,6)</b>	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20
<b>Waschpuffer 2 (pH 5,0)</b>	5 mM NH <sub>4</sub> Ac
<b>Elutionspuffer (pH 3,4)</b>	0,5 M Essigsäure/NH <sub>4</sub> Ac

Alle Puffer wurden vor dem Gebrauch durch einen Filter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm filtriert und vor Gebrauch wurde die IgG-Sepharose unabhängig von der verwendeten Reinigungsmethode mit je 2 – 4 Säulenvolumen wie folgt equilibriert:

1) Elutionspuffer, 2) Waschpuffer 1, 3) Elutionspuffer, 4) Waschpuffer 1.

#### **(A) Reinigung unter Verwendung einer Peristaltik-Pumpe**

Für die Reinigung wurde eine selbst hergestellte Säule (Säulenbettvolumen: 2 ml) verwendet, die an eine Peristaltikpumpe angeschlossen wurde (konstante Flussrate 1,2 ml/min). Zuvor zentrifugiertes, konditioniertes Zellkulturmedium wurde über die Säule gepumpt und mit mind. 10 Säulenvolumen Waschpuffer 1 und 3 Säulenvolumen Waschpuffer 2 gewaschen. Die Elution erfolgte mit einer 1 ml-Spritze unter Verwendung des Elutionspuffers, wobei 1 ml-Fraktionen aufgefangen wurden.

#### **(B) Reinigung mit Hilfe des Batch-Verfahrens**

IgG-Sepharose wurde in ein Reaktionsgefäß/Spitzröhrchen überführt, die unter Verwendung von Ultrafiltrationseinheiten (Ausschlussgrenze 50 kDa) konzentrierte Probe\* dazugegeben und in einem Über-Kopf-Schüttler bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Beads wurden in ein Leersäulchen überführt und mit mind. 10 Säulenvolumen Waschpuffer 1, gefolgt von 2 Säulenvolumen Waschpuffer 2 gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution in 1 ml-Fraktionen.

\* Bei der Probe handelte es sich um konditioniertes Medium oder um nach Ammoniumsulfatfällung hergestelltes Dialysat. Um das Dialysat zu erhalten, wurden Proteine aus konditioniertem Medium durch Zugabe von 50 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt. Dies erfolgte, um eine längere Lagerung von mehreren Ansätzen bei 4 °C zu ermöglichen. Nachdem für den Versuch ausreichend Probe vorhanden war, wurden die Präzipitate für 30 min bei 4.500 x g zentrifugiert (4 °C), der Überstand dekantiert und durch einen Faltenfilter gegeben. Das Pellet wurde zusammen mit dem im Faltenfilter zurückgehaltenen Material in TBS (1/10 des ursprünglichen Volumens) aufgenommen und die Probe gegen TBS pH 7,4 bei 4 °C dialysiert (Ausschlussgrenze: 14 kDa).

### **(C) Reinigung unter Verwendung einer Äkta-FPLC-Anlage**

Das konditionierte Medium wurde aufgetaut und für 30 min bei 4.500 x g (4 °C) zentrifugiert. Die Überstände wurden zunächst durch einen Faltenfilter und anschließend durch einen Sterilfilter (Porendurchmesser 0,2 µm) filtriert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Für die Reinigung wurde eine selbst hergestellte Säule (Säulenbettvolumen: 5 ml) verwendet, die an eine Äkta-FPLC-Anlage angeschlossen wurde (Flussrate: max. 2 ml/min, Druck < 0,2 MPa). Nachdem die vorbereitete Probe über die Säule gepumpt worden war, wurde mit mindestens 10 Säulenvolumen Waschpuffer 1 und 3 Säulenvolumen Waschpuffer 2 gewaschen. Anschließend wurde abweichend von Reinigung (A) und (B) mit 0,1 M Glycin-HCl pH 3,0 eluiert. Dabei wurden 1 ml-Fractionen aufgefangen, welche durch den direkten Zusatz von 1 M Tris-HCl (pH 9) noch während der Elution neutralisiert wurden. Die Reinigung erfolgte bei 4 °C und während des gesamten Vorganges wurde ein UV-Spektrum (280 nm) aufgenommen. Elutionsfraktionen, die CST-Protein enthielten (mind. 300 - 400 mAU), wurden vereinigt und gegen TBS (pH 7,0) bei 4 °C dialysiert (Ausschlussgrenze: 14 kDa).

### **4.5.2 Größenausschlusschromatographie**

Bei der Größenausschlusschromatographie werden Moleküle entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, wobei kleinere Moleküle tiefer in das poröse Material der stationären Phase eindringen können, was zu einer verlängerten Retentionszeit und somit späteren Elution führt. Die Methode kann somit zur Größenanalyse von Proteinen bzw. Proteinkomplexen herangezogen werden. Für die Untersuchung wurden 250 µl Probe auf eine Superdex 200 10/300-Säule (Amersham Pharmacia) aufgetragen, die an ein Äkta-FPLC-System angeschlossen war. Es wurde eine Flussrate von 0,5 ml/min eingestellt und 0,5 ml-Fractionen aufgefangen. Als Puffer wurde TBS (pH 7,1) verwendet.

### **4.5.3 Enterokinase-Verdau**

Das Enzym Enterokinase (EK) erkennt spezifisch das Pentapeptidmotiv AspAspAspAspLys innerhalb eines Proteins und ermöglicht somit die gezielte Spaltung von Fusionsproteinen an der Enterokinaseschnittstelle. Für den EK-Verdau wurde das Enterokinase Kit der Firma Novagen nach Herstellerangaben verwendet.

## 4.5.4 Aktivitätsbestimmungen

### 4.5.4.1 Radioaktive Aktivitätsbestimmung

(Jungalwala *et al.*, 2000)

Die radioaktive CST-Aktivitätsbestimmung wurde sowohl für gereinigtes Enzym als auch für den Aktivitätsnachweis in Zelllysaten und Zellkulturüberständen verwendet. Für die Bestimmung wurde radioaktiv markiertes PAP<sup>35</sup>S genutzt und das durch den Enzymumsatz gebildete, radioaktiv markierte Sulfatid nachgewiesen.

Dafür wurden zunächst in einem Schraubdeckelgefäß 20 µg Cerebroside (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:1) und 10 µl einer 1 %igen Triton X-100-Lösung (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 2:1) mit einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Als Standardverfahren wurde nach Zugabe von 40 µl Reaktionspuffer die Enzym-Reaktion durch den Zusatz von 10 µl der entsprechenden CST-Proben gestartet und in einem Heizblock bei 37 °C und 700 Upm über 60 min inkubiert. Bei niedrigen Aktivitäten wurden Inkubationszeit und/oder Probenvolumen variiert.

Verwendeter Reaktionspuffer:

Komponente	Konzentration	Endkonzentration
Tris-HCl pH 7,1	100 mM	80 mM
MgCl <sub>2</sub>	20 mM	16 mM
PAPS	25 µM	20 µM

Das im Reaktionspuffer enthaltene PAPS setzte sich abhängig von der eingesetzten Enzymmenge zu 10 – 50 % aus radioaktiv markierten PAP<sup>35</sup>S und der entsprechend korrespondierenden Menge nicht radioaktivem PAPS zusammen. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2:1) gestoppt und 200 µl 150 mM NaCl zugefügt. Die Proben wurden 30 bis 60 s gevortext und im Anschluss für 5 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Nach Überführung der organischen Phase in ein neues 1,5 ml-Schraubdeckelgefäß wurden zum Waschen 100 µl MeOH/150 mM NaCl/ CHCl<sub>3</sub> (48:47:3) zugegeben und zentrifugiert. Die obere Phase wurde vollständig entfernt und die Proben in einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Die getrockneten Lipide wurden in 20 µl CHCl<sub>3</sub>/MeOH (2:1) gelöst und auf eine DC-Platte (HPTLC Silica gel 60, Merck) aufgetragen. Die Platte wurde in eine mit Laufmittel (CHCl<sub>3</sub>/MeOH/dH<sub>2</sub>O, 65/25/4) gesättigte Laufkammer gestellt und entwickelt, bis die Laufmittelfront etwa zwei Drittel der

Plattenhöhe erreicht hatte. Anschließend wurde für die spätere Quantifizierung 1 µl des Reaktionspuffers in einer 1:5, 1:10, 1:20 und 1:100-Verdünnung (in Wasser) am oberen Rand der DC-Platte aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde diese in einen Autoklavierbeutel überführt, ein Bioimager Screen aufgelegt und im Dunkeln einige Stunden oder über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Signale mit einem Bioimager Screen Scanner sichtbar gemacht. Die Auswertung der radioaktiven Signale erfolgte unter Verwendung der *Software* AIDA. Über die ebenfalls aufgetragene Standardreihe konnten die Signale quantifiziert werden.

### 4.5.4.2 Fluorimetrische Aktivitätsbestimmung

In der Literatur wurde eine fluorimetrische Aktivitätsbestimmung der Dehydroepiandrosteron-Sulfotransferase beschrieben (Chen *et al.*, 2005). Zur Aktivitätsbestimmung der CST wurde diese Methode unter modifizierten Bedingungen durchgeführt, wobei die CST-Reaktion mit der SULT1A1-Reaktion (vergleiche Abschnitt 4.4.3) gekoppelt wurde. Nachdem durch die CST-Reaktion neben Sulfatid auch PAP gebildet wird, kann letzteres durch die zweite Sulfotransferase regeneriert werden. Dabei katalysiert das Enzym die Bildung von PAPS durch die Übertragung einer Sulfatgruppe von MUS auf PAP. Bei einem Überschuss an SULT1A1 ist das gemessene Fluoreszenzsignal proportional zu der CST-Aktivität.

Verwendeter Reaktionspuffer:

Komponente	Konzentration
β-Mercaptoethanol	5 mM
MUS	4 mM
PAPS	20 µM
Kaliumphosphatpuffer pH 7,0	100 mM

Als Standardverfahren wurden je Reaktionsansatz 20 µg Cerebroside (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:1) und 10 µl einer 1 %igen Triton X-100-Lösung (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 2:1) in die Vertiefung einer 96-well Platte (Mikrotestplatte 96 well F, Sarstedt) pipettiert und an der Luft eingetrocknet. Jede Reaktion wurde in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. Zunächst wurde nach Zugabe von 1 µg SULT1A1 (bzw. einer je nach verwendeter Charge angepassten Enzymmenge, die eine Bestimmung im linearen Bereich gewährleistete) und Überführung

des Reaktionsgemisches in die Mikrotiterplatte für mind. 15 min bei 37 °C präinkubiert. Dieser Schritt dient dazu, dass im PAPS als Verunreinigung enthaltene PAP zunächst vollständig zu regenerieren. Nachfolgend wurden 0,25 – 1,25 µg shCST zugegeben und die Fluoreszenzwerte [RFU] in kontinuierlichen Abständen bei 37 °C gemessen. Die Messung erfolgte jeweils in Duplikaten oder Triplikaten. Zur Hitzeinaktivierung der shCST wurde das Enzym für 10 min auf 90 °C erhitzt (Negativkontrolle).

Als Fluoreszenzmessgerät wurde das Gerät GENios (Hersteller Tecan) verwendet, wobei als Anregungswellenlänge 360 nm verwendet wurde und die gemessene Emissionswellenlänge bei 460 nm lag. Falls nicht gesondert erwähnt, wurde an dem Messgerät *Gain* 50 eingestellt. Vom Standardverfahren abweichende Bedingungen sind an entsprechender Stelle angegeben.

#### **4.5.4.2.1 High-throughput screening**

Für das HTS wurde die in Abschnitt 4.5.4.2 beschriebene Aktivitätsbestimmung unter leicht modifizierten Bedingungen angewendet. Dabei wurde die MUS- und Galaktosylceramid-Konzentration reduziert, sowie das Gesamtvolumen der Reaktion auf 24 µl gesenkt. Da einige Arbeitsschritte von einem Pipettierroboter ausgeführt wurden, wurden die zu pipettierenden Volumina entsprechend angepasst (8 µl + 8 µl + 8 µl). Für das HTS wurde mit 384-*well* Platten (FIA-Platte, schwarz, Bindung mittel, Greiner Bio-One) gearbeitet und die in Abschnitt 5.3.8.1 dargestellten Enzympräparationen verwendet. Es wurde wie im Folgenden beschrieben vorgegangen:

Die entsprechend benötigte Menge an Galaktosylceramid-Lösung (0,5 µg/µl in CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1:1) und 2,5 %ige Triton X-100-Lösung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, mit Hilfe des Roboters je 4 µl in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert und an der Luft eingetrocknet. Anschließend wurde dreifach konzentrierter Reaktionspuffer (15 mM β-Mercaptoethanol, 3 mM MUS, 60 µM PAPS und 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0) mit 0,75 µl SULT1A1-Lösung versetzt und 25 min bei 37 °C präinkubiert. Die nächsten Schritte erfolgten mit Hilfe des Pipettierroboters, wobei zunächst 8 µl des präinkubierten Reaktionspuffers in eine Vertiefung der vorbereiteten Platte überführt wurden, gefolgt von 8 µl shCST-Verdünnung (0,7 – 0,8 µl shCST verdünnt in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0) und zuletzt 8 µl der Testsubstanzen (60 µM in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0, 6 % DMSO). Auf jeder 384-*well*-Platte wurden Reaktionsansätze von je 16 Positivkontrollen (6 % DMSO anstelle der Testsubstanz) und 16 Negativkontrollen (hitzeinaktiviertes shCST und 6 % DMSO anstelle der Testsubstanz) vermessen.

## 5 Ergebnisse

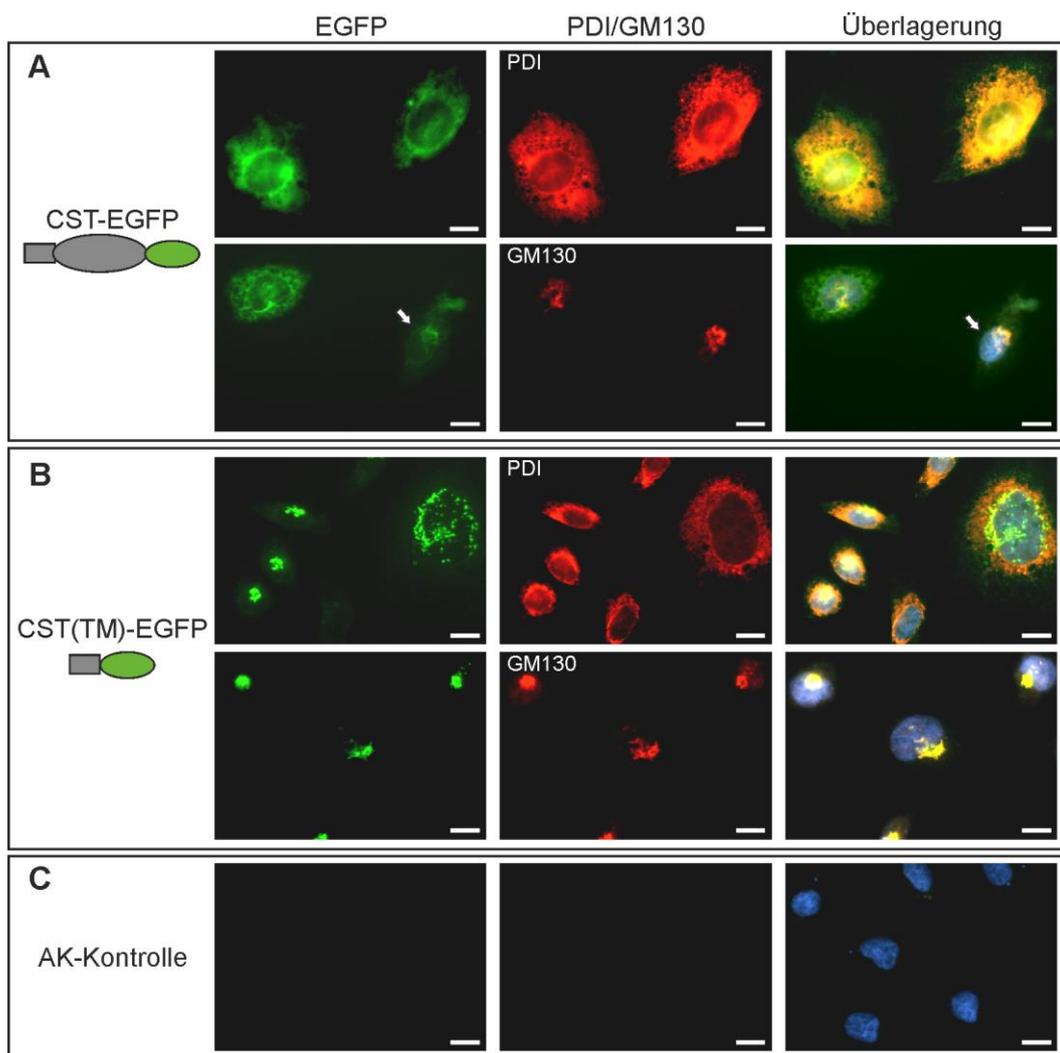
### 5.1 Charakterisierung muriner CST

#### 5.1.1 ER-Retention

Die Anwendung einer Substratreduktionstherapie durch Inhibition der CST stellt einen neuen therapeutischen Ansatz für die Behandlung von MLD dar. Für die Entwicklung werden große Mengen des Enzyms benötigt, um eine detaillierte Analyse und die Testung potentieller Inhibitoren möglich zu machen. Dabei ist es von Vorteil, eine enzymatisch aktive lösliche Form der normalerweise membrangebundenen CST zu generieren, da lösliche Enzyme biochemisch in der Regel leichter zu handhaben sind als membrangebundene. In vorangegangenen Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, dass die Expression großer Mengen löslicher CST unter den verwendeten Bedingungen nicht möglich war. Dabei wurde unter anderem gezeigt, dass nur ein geringer Anteil eines Fusionsproteins bestehend aus der CST ohne TM-Domäne (ab AS 39) und einem Interleukin-2-Signalpeptid von transfizierten CHO-Zellen in den Zellkulturüberstand sekretiert wurde. Fusionsproteine, die aus der Acetylcholinesterase oder sekretorischen alkalischen Phosphatase fusioniert mit der CST ohne TM-Domäne (ab AS 39) bestanden, konnten gar nicht im Zellkulturüberstand transfizierter Zellen detektiert werden. Diese Befunde wurden auf eine verstärkte Retention des Enzyms im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgeführt (van Zyl, 2009).

In den nachfolgenden Versuchen zur subzellulären Lokalisation der CST sollten diese Vorbefunde näher untersucht werden. Dafür wurden CHO-Zellen mit dem Plasmid pCST-EGFP transfiziert, welches für ein Fusionsprotein aus der murinen CST und EGFP (aus dem Englischen: *Enhanced green fluorescent protein*) kodiert. Nach 48 h wurden die Zellen fixiert und zur Beurteilung der Lokalisation der grün fluoreszierenden CST-Fusionsproteine die Proteine PDI (Protein-Disulfid-Isomerase) als ER-Marker bzw. GM130 als Golgi-Marker mit Hilfe spezifischer Antikörper sichtbar gemacht (rot). Wie in Abb. 5-1 A gezeigt, liegt ein großer Anteil des CST-EGFP-Fusionsproteins mit dem als ER-Marker genutzten Protein PDI kolokalisiert in der Zelle vor. Lediglich in Zellen, die wenig CST-EGFP exprimierten, wurde eine nahezu vollständige Kolokalisation mit dem Golgi-Protein GM130 beobachtet. In Abb. 5-1 A ist dies beispielhaft an einer Zelle gezeigt (Markierung mit einem weißen Pfeil). Zusätzlich wurden Zellen mit dem Plasmid pCST(TM)-EGFP transfiziert und analog behandelt, um den Einfluss der luminalen

Domäne der CST auf die Retention zu untersuchen. Diese Zellen exprimierten ein Fusionsprotein, das lediglich aus den ersten 36 Aminosäuren der murinen CST (Transmembrandomäne) fusioniert mit EGFP besteht und dem somit im Vergleich zu CST-EGFP die luminale Domäne fehlt. Es wurde bereits beschrieben, dass dieses Protein effektiv in den Golgi-Apparat transportiert wird (Yaghootfam *et al.*, 2007). Wie aus Abb. 5-1 B hervorgeht, konnte dies durch starke Kolokalisation mit dem genutzten Golgi-Marker bestätigt werden.



**Abb. 5-1: ER-Retention der CST bei Überexpression.** Dargestellt sind Immunfluoreszenz-Analysen von CHO-Zellen, die mit den Plasmiden pCST-EGFP (A) oder pCST(TM)-EGFP (B) transfiziert wurden. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der EGFP-Fusionsproteine (grün) mit einem PDI-Antikörper (ER-Marker) bzw. GM130-Antikörper (Golgi-Marker) inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde Cy3-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet (rot). Die weißen Pfeile markieren eine Zelle, die wenig CST-EGFP exprimiert, welches fast vollständig mit dem Golgi-Protein GM130 kolokalisiert vorliegt. (C) AK-Kontrolle: Zellen, die nur mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert wurden. Zur Darstellung des Nukleus wurde DAPI verwendet. Die Maßstabsbalken entsprechen 10 µm.

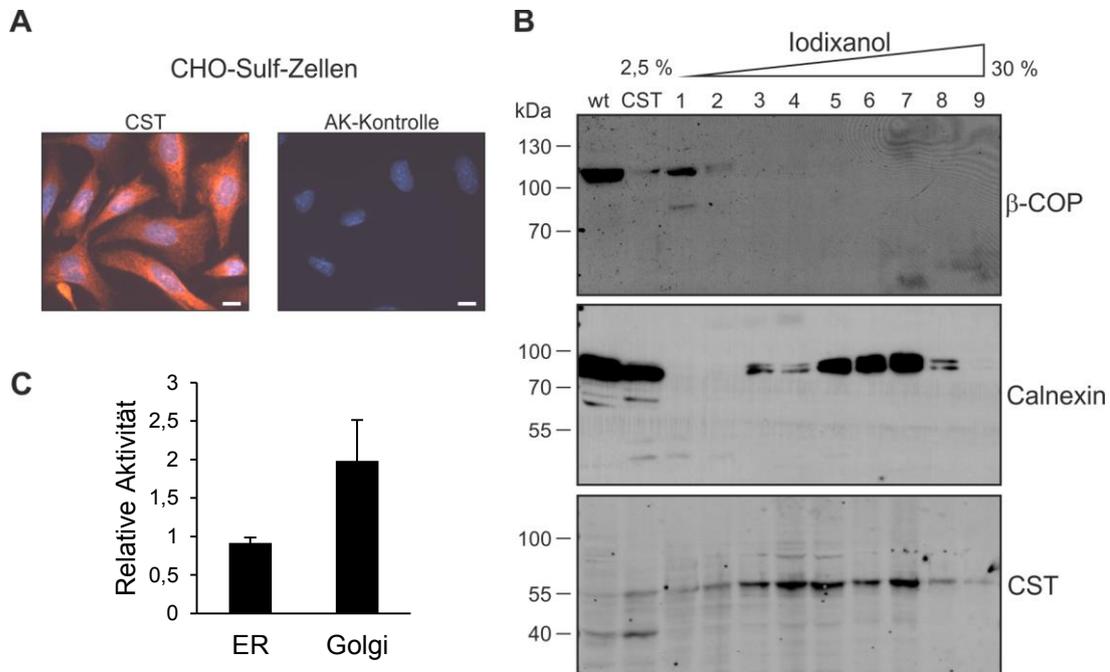
Im Gegensatz zu dem Fusionsprotein der vollständigen CST, welches aus der Transmembrandomäne und der luminalen Domäne besteht, wurde hier auch bei starker Überexpression kaum eine Lokalisation im ER beobachtet. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die TM der CST für die Lokalisation im Golgi-Apparat verantwortlich ist, während die Expression der luminalen Domäne zu einer verstärkten ER-Retention führt.

Um das Ausmaß der ER-Retention der CST besser quantifizieren zu können, sollte eine Methode etabliert werden, die die Trennung von ER und Golgi-Apparat und die anschließende Bestimmung der jeweiligen CST-Mengen ermöglicht. Auf Grund der unterschiedlichen Dichten der Organellen können diese durch Zentrifugation von Zellhomogenaten in einem Dichte-Gradienten getrennt werden. Durch Bestimmung der spezifischen Aktivität der CST in ER und Golgi-Apparat sollten Rückschlüsse ermöglicht werden, ob die Retention auf eine unvollständige bzw. falsche Faltung des Enzyms zurückgeführt werden kann, was eine entsprechend niedrigere Aktivität der CST im ER vermuten ließ.

Ziel der Dichtegradientenzentrifugation war es, ER und Golgi-Apparat von CHO-Sulf-Zellen, welche neben der Ceramid-Galaktosyltransferase (CGT) stabil die murine CST exprimieren (Eckhardt *et al.*, 2002), zu trennen. Anschließend wurde zum einen die jeweilige Proteinmenge der CST und zum anderen die spezifische Aktivität in den jeweiligen Organellen bestimmt. In Abb. 5-2 A ist eine Immunfluoreszenzanalyse der verwendeten Zelllinie dargestellt, wobei die intrazelluläre Lokalisation der CST sichtbar gemacht wurde (rote Färbung). Auch bei stabil transfizierten Zellen schien ein großer Anteil des Enzyms im ER lokalisiert zu sein, was anhand der Färbung deutlich wurde.

Unterschiedliche Ansätze, in denen ein Dichte-Gradient mit Hilfe von verschiedenen Saccharose-Konzentrationen generiert wurde, führten zu keiner erfolgreichen Trennung von Golgi-Apparat und ER (nicht gezeigt). Daher erfolgte die Separation unter Verwendung des OptiPrep™-Mediums (Iodixanol-Lösung). Anschließend wurde in den einzelnen Fraktionen des Dichte-Gradienten mit Hilfe der radioaktiven CST-Aktivitätsbestimmung die Enzymaktivität bestimmt. Um eine erfolgreiche Trennung von Golgi-Apparat und ER zu prüfen, wurden die einzelnen Fraktionen mittels Western Blot-Analyse auf das Vorhandensein der Golgi-Proteine  $\beta$ -COP oder GM130 bzw. des ER-Proteins Calnexin untersucht. Die Fraktionen, in denen  $\beta$ -COP oder GM130 nachgewiesen werden konnten, wurden als Golgi-Fraktionen und die, in denen Calnexin nachgewiesen wurde, als ER-Fraktionen definiert. In Abb. 5-2 B ist beispielhaft eine Western Blot-Analyse dargestellt. Während sich in den Fraktionen 1 und 2 der Golgi-Marker nachweisen ließ, wurde in den Fraktionen 3 – 8 Calnexin detektiert. In einer dritten

Western Blot-Analyse wurde untersucht, in welchen Fraktionen die CST zu finden ist. Wie Abb. 5-2 B (unten) zeigt, wurde das Enzym in allen Fraktionen nachgewiesen, wobei die stärksten Signale in den ER-Fraktionen sichtbar wurden.



**Abb. 5-2: Trennung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und Golgi-Apparats von CHO-Sulf-Zellen und Bestimmung der relativen CST-Aktivität.** (A) Immunfluoreszenz-Analyse der für den Dichte-Gradienten verwendeten CHO-Sulf-Zellen (stabil mit vollständiger muriner CST transfizierte CHO-GalT-Zellen). Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation der CST wurden die Zellen fixiert und mit ST2-Antiserum inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde Cy3-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet (rot). AK-Kontrolle: Zellen, die nur mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert wurden. Zur Darstellung des Nukleus wurde DAPI verwendet. Die Maßstabsbalken entsprechen 10  $\mu$ m. (B) Es wurden CHO-Sulf-Zellen homogenisiert und in einem Iodixanol-Gradienten (2,5 – 30 %) zentrifugiert, um eine Trennung von ER und Golgi-Apparat zu erreichen. Der Gradient wurde in neun Fraktionen geteilt und gleiche Anteile dieser auf ein SDS-Gel aufgetragen. Anschließend wurden die Proben elektrophoretisch getrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Zur Identifizierung der Golgi-Fraktionen wurde ein  $\beta$ -COP-Antikörper (Sekundär-Antikörper: Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Maus-Antikörper) und der ER-Fraktionen ein Calnexin-Antikörper (Sekundärantikörper: Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper) verwendet. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL). Dabei konnte  $\beta$ -COP in den Fraktionen 1 - 2 und Calnexin in den Fraktionen 3 - 8 detektiert werden. Zum Nachweis der CST wurde die Membran mit ST2-Antiserum inkubiert und als Sekundär-AK DyLight 800 gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Die Signale wurden mit Hilfe eines Infrarot-Fluoreszenz-Scanners visualisiert und anschließend die Anteile der CST-Menge in den Golgi- bzw. ER-Fraktionen quantifiziert. wt/CST: Zelllysat von CHO- bzw. CHO-Sulf-Zellen (50  $\mu$ g Gesamtprotein).  $\beta$ -COP: ~ 110 kDa, Calnexin: ~ 90 kDa, CST: ~ 54 kDa. (C) Darstellung der relativen Aktivität der CST im ER bzw. Golgi-Apparat. Dafür wurden äquivalente Mengen der Gradientenfraktionen in der radioaktiven CST-Aktivitätsbestimmung analysiert und die Anteile der Aktivität in den Golgi- bzw. ER-Fraktionen an der Gesamtaktivität berechnet. Die Anteile der Aktivität und CST-Menge in dem jeweiligen Kompartiment wurde in Relation gesetzt und dadurch die relative Aktivität ermittelt. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen; n = 3; p = 0,0738, Welch t-Test).

In drei unabhängig durchgeführten Gradienten konnte eine Trennung der Organellen erzielt werden und bei allen befand sich der größere Anteil der CST in den ER-Fractionen.

Um die relative spezifische Aktivität der CST zu bestimmen, wurde die CST-Aktivität, die in den ER- bzw. Golgi-Fractionen ermittelt wurde, als Anteil der Summe beider Aktivitäten ausgedrückt. Ebenso wurde mit den quantifizierten Western Blot-Signalen verfahren. Die relative spezifische Aktivität ergab sich danach als Quotient von beiden ermittelten Anteilen. In Abb. 5-2 C ist die relative spezifische Aktivität dargestellt, wobei eine mit  $1,98 \pm 0,53$  mehr als zweifach höhere relative Aktivität der im Golgi lokalisierten CST gegenüber dem im ER nachgewiesenen Enzym von  $0,92 \pm 0,07$  nachgewiesen wurde. Die gemessenen Aktivitätsunterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit einer weiteren Methode die Beobachtungen der Immunfluoreszenzanalyse bestätigt wurden. In den Western Blot-Analysen wurde eine starke Kollokalisierung des ER-Chaperons Calnexin und der CST nachgewiesen. Zusätzlich wurde ermittelt, dass die spezifische Aktivität des Enzyms im ER nicht signifikant vermindert war. Tendenziell wurde im Golgi-Apparat jedoch eine höhere spezifische Aktivität der CST gemessen.

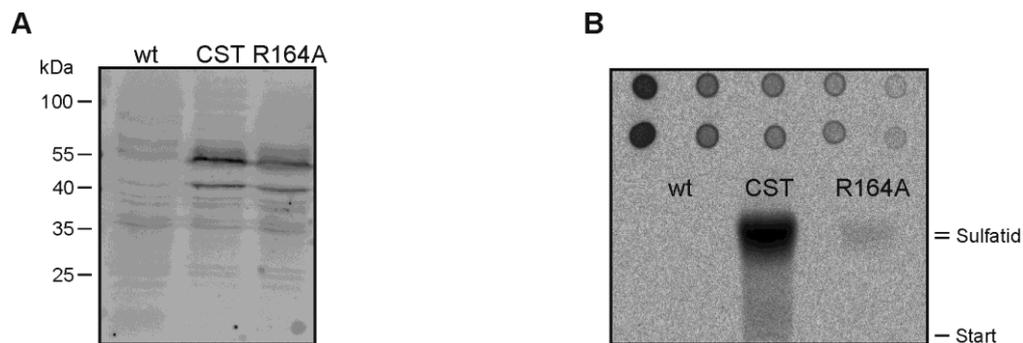
### 5.1.2 Mutagenese-Studie

Mutagenese-Studien, bei denen gezielte Mutationen in ein Protein eingeführt werden, spielen eine wichtige Rolle für dessen nähere Charakterisierung. Unter anderem wird diese Methode eingesetzt, um ein besseres Verständnis von katalytischen Mechanismen während einer Enzymreaktion zu bekommen.

Es wurde beschrieben, dass zwei spezielle Regionen innerhalb der katalytischen Domäne in fast allen Sulfotransferasen vorhanden sind. Es handelt sich um die Bereiche, die bei der Interaktion mit dem 5'-Phosphosulfat- oder der 3'-Phosphatgruppe von PAPS eine wichtige Rolle spielen. Dabei wurde offensichtlich, dass ein Arginin-Rest in dem Bereich, der für die Bindung der 3'-Phosphatgruppe von PAPS verantwortlich ist, in nahezu allen Sulfotransferasen vorhanden ist. Ong und Mitarbeiter führten eine gerichtete Mutagenese der HNK-1-Sulfotransferase durch, die zum Austausch dieser Aminosäure gegen Alanin führte. Die generierte Mutante zeigte anschließend eine Restaktivität  $< 1\%$  (Ong *et al.*, 1998, 1999).

Auch die CST enthält an Aminosäureposition 164 einen Arginin-Rest, der sich innerhalb der mutmaßlichen PAPS-Bindungsstelle befindet. Es sollte daher untersucht werden, ob der Austausch gegen die Aminosäure Alanin auch bei der CST einen Einfluss auf die

katalytische Aktivität hat. Mit Hilfe einer Mutagenese-PCR wurde eine Punktmutation in die murine CST eingeführt. Dafür wurde das Plasmid, welches für die murine CST mit C-terminalem HA-Tag kodiert, als Vorlage genutzt. Beide Plasmide wurden in OLN-93-Zellen transfiziert und die Expression mit einer Western Blot-Analyse kontrolliert, wobei beide Proteine mit einem Molekulargewicht von ~ 54 kDa nachgewiesen werden konnten (Abb. 5-3 A). Für die Aktivitätsbestimmung der Mutante wurden ebenfalls OLN-93-Zellen mit den für die nichtmutierte und mutierte CST kodierenden Plasmiden transfiziert und 24 h später die CST-Aktivität in den Zelllysaten mit der radioaktiven Bestimmungsmethode ermittelt. Wie aus Abb. 5-3 B hervorgeht, wurde in Proben der Zellen, die mit der mutierten CST transfiziert worden waren, nahezu kein radioaktiv markiertes Sulfatid während der CST-Reaktion gebildet. In drei unabhängig durchgeführten Versuchen wurde eine Restaktivität der R164A-Mutante von  $0,62 \pm 0,25$  % bestimmt.



**Abb. 5-3: Mutagenese innerhalb der mutmaßlichen PAPS-Bindungsstelle. (A)** Dargestellt ist eine Western Blot-Analyse von transient transfizierten OLN-93-Zellen. Die Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3.1/CST-HA bzw. pcDNA3.1/CST-HA (R164A) transfiziert und nach 24 h Zelllysate generiert. Je 50 µg Gesamtprotein wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Anschließend erfolgte eine Western Blot-Analyse, wobei als Primärantikörper ST2-Antiserum und als Sekundärantikörper DyLight 800 gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet wurde. Die Signale wurden mit Hilfe eines Infrarot-Fluoreszenz-Scanners visualisiert. CST-HA bzw. CST-HA (R164A): ~ 54 kDa. **(B)** OLN-93-Zellen wurden transient mit den Plasmiden pcDNA3.1/CST-HA bzw. pcDNA3.1/CST-HA (R164A) transfiziert, nach 24 h Zelllysate angefertigt und 50 µg Gesamtprotein je Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Dargestellt sind die mit Hilfe eines Bioimager Screen Scanners visualisierten radioaktiven Signale der dünnenschichtchromatographischen Analyse (radioaktiv markiertes Sulfatid). Zusätzlich aufgetragen wurde als Standardreihe 1 µl Reaktionspuffer und die entsprechenden 1:5-, 1:10-, 1:20- und 1:100-Verdünnungen. wt: Lysat von nicht transfizierten OLN-93-Zellen.

## 5.2 Lösliche CST-Fusionsproteine

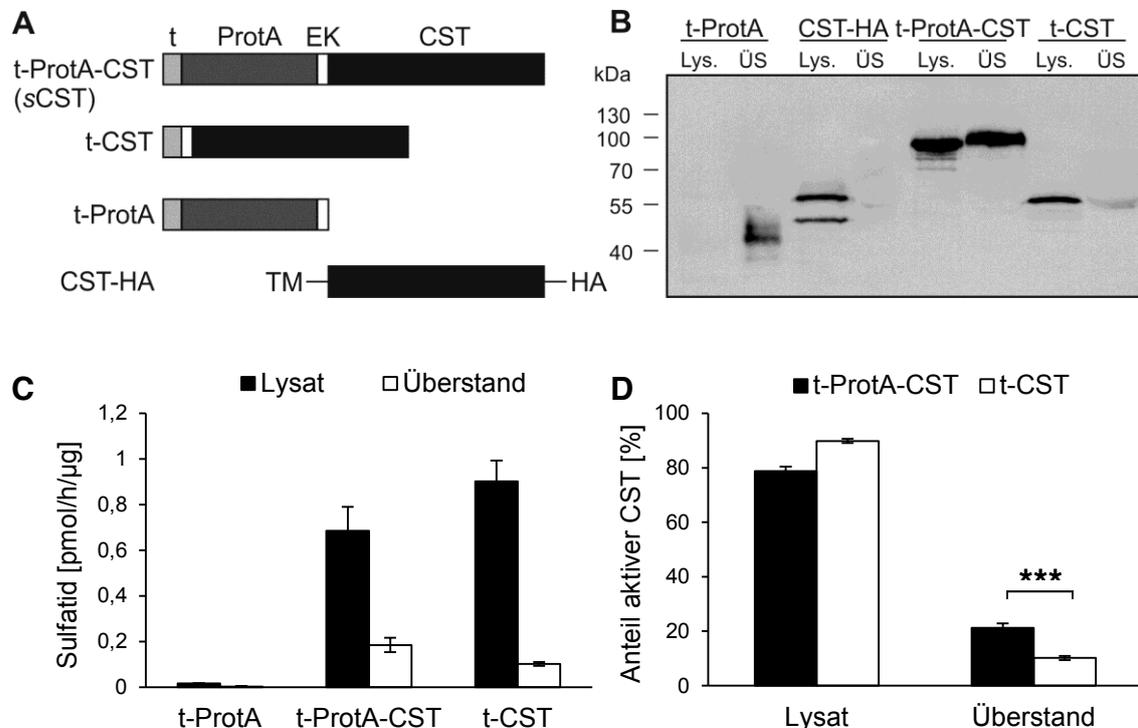
### 5.2.1 Murines CST-Fusionsprotein

#### 5.2.1.1 Sekretion löslicher CST (sCST)

Um große Mengen CST in löslicher Form (ohne Transmembrandomäne) zu produzieren und anschließend reinigen zu können, sollten zunächst zwei Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Sekretion in den Zellkulturüberstand näher charakterisiert werden. Das eine Fusionsprotein (t-ProtA-CST/sCST) besteht aus dem Signalpeptid von Transin, der IgG-Bindedomäne von Protein A und der luminalen Domäne der murinen CST, wobei sich zwischen dem Protein A- und dem CST-Teil eine Enterokinase (EK)-Schnittstelle befindet. Dabei sollte das Signalpeptid von Transin den Transport aus der Zelle und das Protein A-Tag die Reinigung des Fusionsproteins aus dem Zellkulturüberstand ermöglichen. Die Enterokinase ist eine Serinprotease, welche hinter der Aminosäuresequenz [Asp]<sub>4</sub>-Lys spaltet. Das Einbringen des Erkennungsmotivs zwischen dem Protein A-Teil und der luminalen Domäne der murinen CST soll das enzymatische Abtrennen des großen Protein A-Teils nach der Reinigung ermöglichen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass mit dem entsprechenden Plasmid (pProtA-CST) stabil transfizierte CHO GalT-Zellen, CST in löslicher und aktiver Form in den Zellkulturüberstand sekretieren (Eckhardt *et al.*, 2002). Dem zweiten zu untersuchenden Fusionsprotein (t-CST) fehlt der Protein A-Teil, sodass dieses lediglich aus dem Signalpeptid von Transin, der EK-Schnittstelle und der luminalen Domäne der murinen CST zusammengesetzt ist. Für die Untersuchung wurden CHO-Zellen transient mit Plasmiden, die für die in Abb. 5-4 A dargestellten Proteine kodieren, transfiziert und nach 24 h die Menge der exprimierten Proteine mittels Western-Blot-Analyse in den Zelllysaten und entsprechend gleichen Prozentsätzen der Zellkulturüberstände bestimmt (Abb. 5-4 B). Aus der Abbildung geht hervor, dass das Fusionsprotein t-ProtA-CST zu etwa gleich großen Mengen im Lysat und Überstand der Zellen nachweisbar war, während nur ein sehr geringer Anteil des Fusionsproteins t-CST im Überstand detektiert wurde. Die murine CST mit Transmembrandomäne und C-terminalen HA-Tag (CST-HA) ließ sich hingegen nur im Zelllysate nachweisen, während das Fusionsprotein bestehend aus dem Signalpeptid von Transin fusioniert mit der IgG-Bindedomäne von Protein A (t-ProtA) ausschließlich im Überstand detektiert wurde.

Da in Hinblick auf das zu erreichende Ziel der vorliegenden Arbeit, große Mengen an löslicher und aktiver CST zu erhalten, nicht die Proteinmenge der CST-Fusionsproteine alleine von Bedeutung war, sondern die vorhandene CST-Aktivität im Zellkulturüberstand

als entscheidender Parameter angesehen wurde, wurde die CST-Aktivität in den Lysaten und Überständen der transfizierten Zellen bestimmt (Abb. 5-4 C). Wie erwartet, wurde dabei in den t-ProtA enthaltenen Proben keine CST-Aktivität gemessen.



**Abb. 5-4: Einfluss des Protein A-Teils auf die Sekretion aktiver muriner CST in den Zellkulturüberstand. (A)** Schematische Darstellung der untersuchten Proteine. t: Signalpeptid von Transin (AS 1 - 32), ProtA: IgG-Bindedomäne von Protein A, EK: Enterokinase-Schnittstelle, CST: luminale Domäne der murinen CST (ab AS 39), TM: Transmembrandomäne, HA: HA-Tag. **(B)** Western Blot-Analyse von transient transfizierten CHO-Zellen. Dafür wurden die Zellen mit den Plasmiden, die für die Proteine t-ProtA-CST, t-CST, t-ProtA oder CST-HA kodieren, transfiziert und 24 h später Zelllysate angefertigt, je 0,8 µg Gesamtprotein der Lysate (Lys.) und der entsprechend gleiche Prozentsatz der Zellkulturüberstände (ÜS) auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Um die Signalverstärkung der Protein A-Fusionsproteine abzuschwächen, wurde der Blot über Nacht mit Maus-IgGs präinkubiert. Anschließend wurde die Membran mit ST2-Antiserum inkubiert und als Sekundärantikörper Peroxidase gekoppelter Ziegenanti-Kaninchen-Antikörper benutzt. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL). **(C)** CST-Aktivität in den Lysaten und korrespondierenden Zellkulturüberständen transient transfizierter CHO-Zellen. Die Zellen wurden mit Plasmiden, die für die Proteine t-ProtA-CST, t-CST oder t-ProtA kodieren transfiziert und 24 h später die CST-Aktivität [pmol Sulfatid/h/µg Gesamtprotein] in den Lysaten und in dem entsprechend gleichen Prozentsatz der Zellkulturüberstände bestimmt. (Mittelwerte ± Standardabweichungen; n = 3). **(D)** Dargestellt ist der Anteil an der gesamten CST-Aktivität in den Zelllysaten bzw. korrespondierenden Überständen der in (C) beschriebenen Proben. (Mittelwerte ± Standardabweichungen; n = 3; \*\*\* p < 0,001, t-Test).

Zudem wurde gezeigt, dass die Summe aus der in Lysat und Überstand gemessenen CST-Gesamtaktivität mit  $0,87 \pm 0,13$  pmol Sulfatid/h/µg Gesamtprotein für die t-ProtA-CST und  $1,00 \pm 0,10$  pmol Sulfatid/h/µg Gesamtprotein für die t-CST enthaltenen Proben

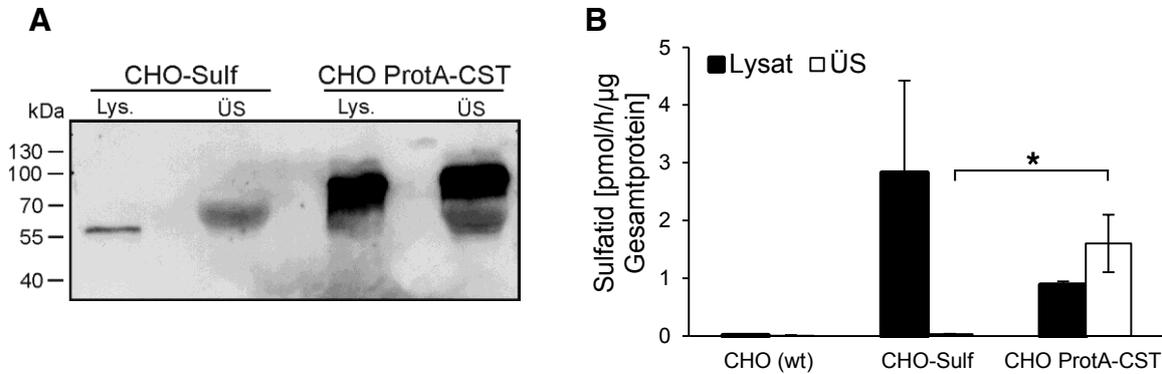
nicht signifikant unterschiedlich war. Bei Auswertung der Anteile der jeweiligen CST-Aktivität in den Zelllysaten und korrespondierenden Überständen wurde sichtbar, dass  $10,16 \pm 0,74$  % der CST-Aktivität bei den t-CST exprimierenden Zellen im Überstand gemessen wurde, wobei der Anteil signifikant auf  $21,24 \pm 1,68$  % bei den t-ProtA-CST exprimierenden Zellen anstieg (Abb. 5-4 D).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass mehr von dem den Protein A-Teil enthaltenden Fusionsprotein im Zellkulturüberstand der entsprechend transfizierten Zellen detektiert wurde, was auch mit einem signifikant höheren Anteil der CST-Aktivität einherging. Aus diesem Grund wurde beschlossen, für die Gewinnung großer Mengen löslicher CST das den Protein A-Teil enthaltende Fusionsprotein zu nutzen. Im weiteren Verlauf wird dieses lösliche Fusionsprotein der murinen CST als sCST (englisch *soluble*: löslich) bezeichnet.

Überraschenderweise wurde für die vollständige CST mit C-terminalem HA-Tag (CST-HA) eine mit  $16,86 \pm 1,97$  pmol Sulfatid/h/ $\mu$ g Gesamtprotein insgesamt deutlich höhere Aktivität gemessen (nicht gezeigt). Wie aus der in Abb. 5-4 B dargestellten Western Blot-Analyse hervorgeht, ging dies nicht mit einer höheren Expressionsmenge des Proteins einher. Hierbei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die sogar intensivere Western Blot-Bande des Protein A-Fusionsproteins gegenüber CST-HA auf eine Signalverstärkung des IgG-bindenden Protein A-Teils zurückzuführen ist. Nach Transfektion des Plasmides pcDNA3.1/zeo/CST (vollständige CST ohne C-terminales HA-Tag) und anschließender Aktivitätsbestimmung wurde jedoch mit  $0,85$  pmol Sulfatid/h/ $\mu$ g Gesamtprotein eine ähnliche Gesamtaktivität, wie bei den löslichen Fusionsproteinen ermittelt, wobei dieser Versuch nur einmalig durchgeführt wurde (nicht gezeigt). Inwieweit das C-terminales HA-Tag eventuell einen Einfluss auf die CST-Aktivität hat, bedarf demnach weiterer Untersuchungen.

Da gezeigt wurde, dass aktives CST-Fusionsprotein (sCST) nach transients Transfektion von CHO-Zellen in den Zellkulturüberstand sekretiert wurde, sollte im Weiteren näher untersucht werden, wie sich dieses nach stabiler Transfektion verhält. Ein Vorteil der stabilen Transfektion ist, dass die DNA stabil in das Genom der Zelle integriert wird, was eine kontinuierliche Expression des gewünschten Proteins ermöglicht, ohne eine erneute Transfektion notwendig zu machen. Es stand bereits eine innerhalb der Arbeitsgruppe generierte Zelllinie zur Verfügung (CHO ProtA-CST), die stabil mit dem Plasmid pPROTA-CST transfiziert worden ist und somit sCST exprimiert und in den Zellkulturüberstand sekretiert. Zusätzlich exprimieren die Zellen stabil die Ceramid-Galaktosyltransferase (Eckhardt *et al.*, 2002). Bei dieser Zelllinie handelt es sich um einen Mischklon, was

bedeutet, dass nach der Selektionierung mit dem Antibiotikum keine Vereinzlung der Zellen erfolgte.



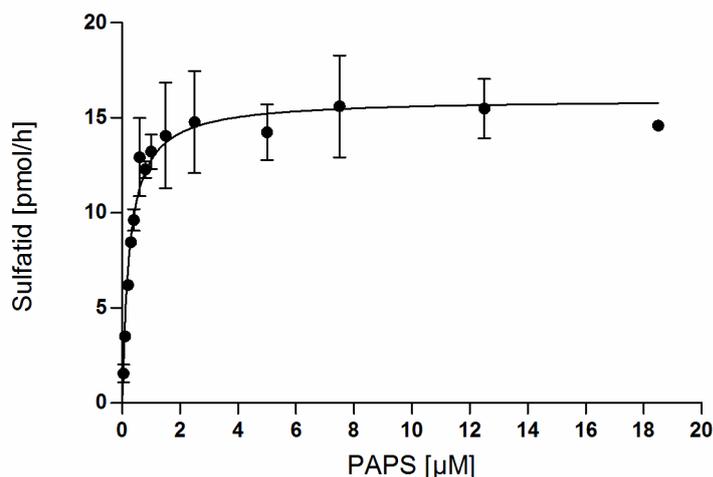
**Abb. 5-5: Expression und Sekretion aktiver sCST der stabil transfizierten Zelllinie CHO ProtA-CST.** (A) Dargestellt ist eine Western Blot-Analyse von prozentual gleichen Anteilen von Lysat (Lys.) und Zellkulturüberstand (ÜS) der Zelllinie CHO-Sulf (stabil mit vollständiger muriner CST transfizierte CHO-GalT-Zellen) und CHO ProtA-CST. Die Membran wurde zunächst mit ST2-Antiserum inkubiert und als Sekundärantikörper Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL). CST: ~ 54 kDa, sCST: ~ 100 kDa. (B) CST-Aktivität [pmol Sulfatid /h/µg Gesamtprotein] in den Lysaten und gleichen Prozentsätzen der korrespondierenden Zellkulturüberständen von CHO-Zellen, CHO-Sulf-Zellen und CHO ProtA-CST-Zellen. (Mittelwerte ± Standardabweichungen; n = 3; \* p < 0,05, Welch t-Test)

Zur Untersuchung der stabilen Zelllinie wurden Western Blot-Analysen und Aktivitätsbestimmungen durchgeführt. Wie aus der Western Blot-Analyse in Abb. 5-5 A hervorgeht, wurde ein großer Anteil des Fusionsproteins bei der stabil transfizierten Zelllinie CHO ProtA-CST im Überstand detektiert und auch im Lysat konnte das Fusionsprotein nachgewiesen werden. Um zu zeigen, dass das Vorhandensein von sCST im Überstand auf eine aktive Sekretion und nicht auf das Vorhandensein toter Zellen zurückzuführen war, wurden als Kontrolle Lysate und Überstände der Zelllinie CHO-Sulf untersucht. Dies sind stabil mit der vollständigen CST (inklusive TM-Domäne) transfizierte CHO GalT-Zellen (Eckhardt *et al.*, 2002), bei denen keine Sekretion der CST in den Zellkulturüberstand erwartet wurde. Während die CST hierbei im Lysat nachgewiesen werden konnte, war dies in den entsprechenden Überständen nicht der Fall (Abb. 5-5 A). Die Signale in den Proben der Überstände beider Zelllinien zwischen 55 und 70 kDa sind unspezifisch und wahrscheinlich auf Serumproteine im Medium zurückzuführen. Um zu zeigen, dass es sich bei dem mittels Western Blot-Analyse im Zellkulturüberstand nachgewiesenen Fusionsprotein (sCST) um eine zumindest zum Teil aktive Form handelt, wurde die CST-Aktivität in Zelllysaten und korrespondierenden Überständen bestimmt.

Sowohl im Zelllysat ( $0,88 \pm 0,06$  pmol Sulfatid/h/ $\mu$ g Gesamtprotein) als auch im Zellkulturüberstand ( $1,60 \pm 0,50$  pmol Sulfatid/h/ $\mu$ g Gesamtprotein) wurde CST-Aktivität gemessen, wobei die Aktivität in dem Überstand sogar höher war (Abb. 5-5 B). Dahingegen konnte in den Überständen der CHO-Sulf-Zellen mit  $0,03 \pm 0,01$  pmol Sulfatid/h/ $\mu$ g Gesamtprotein nahezu keine Aktivität gemessen werden. Bei diesen wurde, wie erwartet, nur in den Zelllysaten Aktivität ( $2,82 \pm 1,60$  pmol Sulfatid/h/ $\mu$ g Gesamtprotein) gemessen (Abb. 5-5 B). Die Angabe Gesamtprotein bezieht sich jeweils auf die im Zelllysate ermittelte Menge. Als Negativkontrolle für die Aktivitätsbestimmung wurde Lysat und Zellkulturüberstand von untransfizierten CHO-Zellen eingesetzt, in denen erwartungsgemäß keine CST-Aktivitäten gemessen wurden.

### 5.2.1.2 $K_M$ -Wert-Bestimmung

Die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_M$ ) ist eine wichtige Kenngröße für ein Enzym, um dieses bzw. eine enzymatische Reaktion zu charakterisieren und gibt die Substratkonzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit an. Um das CST-Fusionsprotein (sCST) weiterführend enzymkinetisch zu charakterisieren, wurde der  $K_M$ -Wert für das Substrat PAPS bestimmt.



**Abb. 5-6:  $K_M$ -Wert-Bestimmung für sCST und PAPS.** Dargestellt ist die Umsatzgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der PAPS-Konzentration für die lösliche murine CST (sCST). Mit Hilfe nichtlinearer Regression wurden der  $K_M$ -Wert mit  $0,26 \pm 0,07$   $\mu$ M und eine  $V_{max}$  mit  $16,10 \pm 2,3$  pmol/h ermittelt unter Verwendung der *Software* GraphPad Prism 5. Es wurden je Reaktionsansatz 20  $\mu$ g Gesamtprotein aus Zelllysaten der CHO ProtA-CST-Zelllinie in der radioaktiven CST-Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Dargestellt ist die gemittelte Kurve von drei unabhängigen Versuchen. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 3$ ).

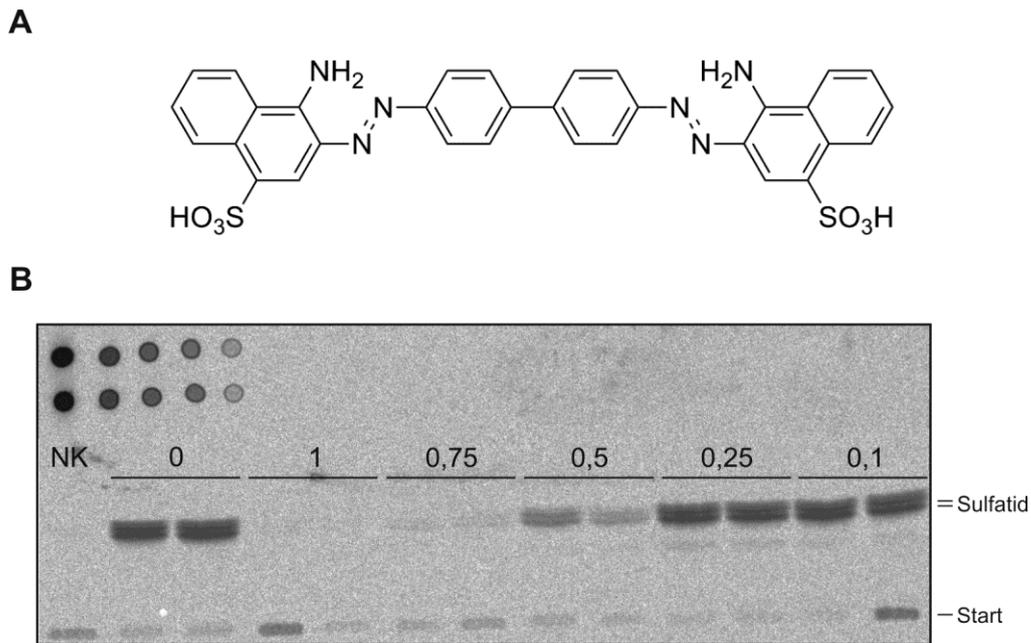
Für die Untersuchung wurden Zellysate der CHO ProtA-CST-Zelllinie hergestellt und die radioaktive CST-Aktivitätsbestimmung mit ansteigenden PAPS-Konzentrationen durchgeführt. Die Darstellung der Umsatzgeschwindigkeit (Sulfatid [pmol/h]) gegen die PAPS-Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] von drei unabhängigen Versuchen lieferte eine Sättigungskurve (Abb. 5-6). Nach nichtlinearer Regression der erhaltenen Daten jedes einzelnen Versuchs wurde für sCST und PAPS ein  $K_M$ -Wert von  $0,26 \pm 0,07 \mu\text{M}$  und eine maximale Umsatzgeschwindigkeit ( $V_{\text{max}}$ ) von  $16,10 \pm 2,3 \text{ pmol/h}$  (je  $20 \mu\text{g}$  Gesamtprotein) bestimmt.

### 5.2.1.3 Kongorot-Inhibition

Ein weiterführendes Ziel dieser Arbeit stellt die Identifizierung potentieller Inhibitoren der CST dar, um dadurch einen möglichen therapeutischen Ansatz (Substratreduktionstherapie) für MLD-Patienten zu erreichen. Es wurde bereits beschrieben, dass einige aromatische Farbstoffe wie u.a. Cibacron-Blau ( $K_i = 0,02 \text{ mM}$ ) und Kongorot ( $K_i = 0,04 \text{ mM}$ ) kompetitiv die Cerebrosid-Sulfotransferase aus Rattenhirn inhibieren (Zaruba *et al.*, 1985). In dem nachfolgenden Versuch wurde getestet, ob eine konzentrationsabhängige Inhibition der sCST durch Kongorot, dessen chemische Struktur in Abb. 5-7 A dargestellt ist, bestätigt werden kann.

Für das Experiment wurden CHO-Zellen transient mit dem Plasmid pPROTA-CST transfiziert und 24 h später Zellysate generiert. Anschließend wurden diese mit der radioaktiven CST-Aktivitätsbestimmung analysiert, wobei Kongorot in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt wurde.

Wie aus Abb. 5-7 B hervorgeht, welche die visualisierten Signale des während der CST-Reaktion gebildeten radioaktiv markierten Sulfatids nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung zeigt, wurde eine konzentrationsabhängige Verminderung des gebildeten Sulfatids beobachtet. Es wurde somit in einem ersten Versuch eine inhibitorische Wirkung von Kongorot auf die sCST gezeigt. Für die nähere Beurteilung und Bestimmung eines  $\text{IC}_{50}$ -Wertes sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig.



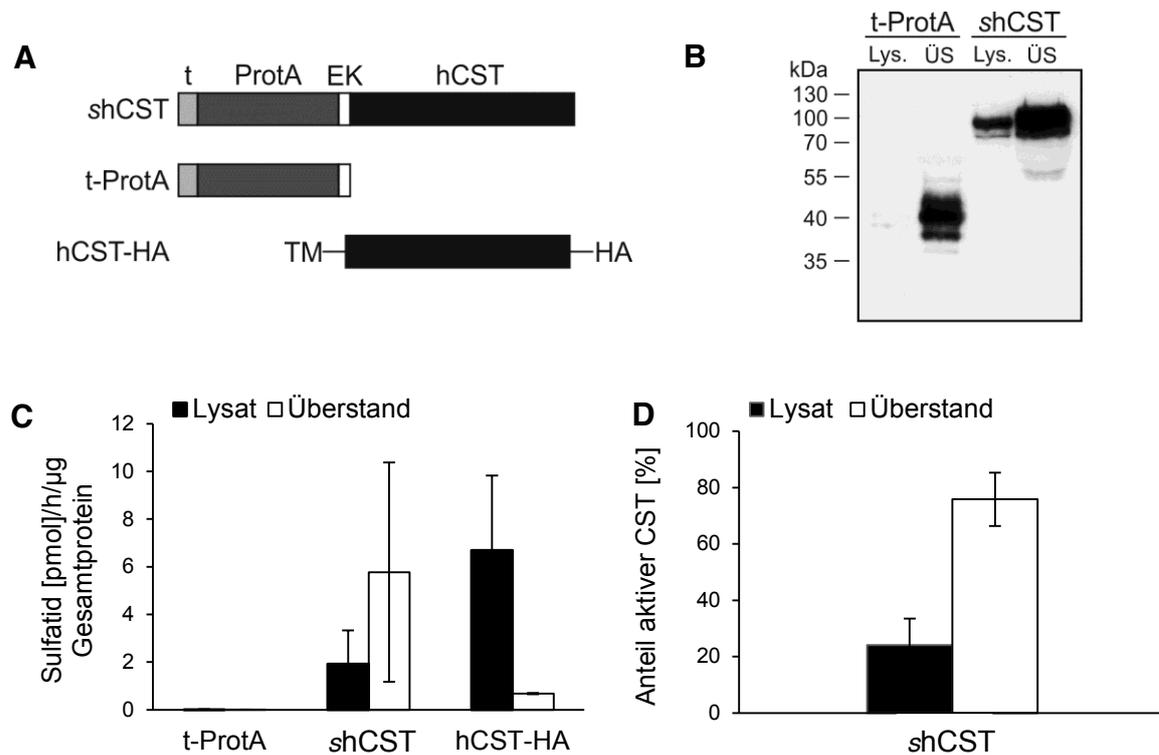
**Abb. 5-7: Kongorot-Inhibition der sCST.** (A) Chemische Struktur von Kongorot. (B) Radioaktive CST-Aktivitätsbestimmung nach Zusatz unterschiedlicher Kongorot-Konzentrationen (0 mM, 1 mM, 0,75 mM, 0,5 mM, 0,25 mM und 0,1 mM). CHO-Zellen wurden transient mit pPROTA-CST transfiziert, nach 24 h Zelllysate angefertigt und 20 µg Gesamtprotein je Reaktionsansatz für die Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Dargestellt sind die mit Hilfe eines Bioimager Screen Scanners visualisierten radioaktiven Signale der dünnenschichtchromatographischen Analyse. Zusätzlich aufgetragen wurde als Standardreihe 1 µl Reaktionspuffer und die entsprechenden 1:5-, 1:10-, 1:20- und 1:100-Verdünnungen. NK: Lysat von CHO-Zellen, die mit dem Plasmid pPROTA transfiziert wurden.

## 5.2.2 Humanes CST-Fusionsprotein

### 5.2.2.1 Sekretion löslicher CST (shCST)

Da bereits gezeigt werden konnte, dass das Fusionsprotein aus dem Signalpeptid von Transin, der IgG-Bindedomäne von Protein A und der luminalen Domäne der murinen CST die Produktion löslicher und aktiver CST ermöglicht (vergleiche Abschnitt 5.2.1.1), sollte das analoge Konstrukt mit der luminalen Domäne der humanen CST (shCST) kloniert werden. Die Produktion des humanen Enzyms sollte erfolgen, da für den therapeutischen Einsatz zur Behandlung von MLD-Patienten, Inhibitoren für dieses Enzym identifiziert werden sollen. Dafür wurde wie bei dem murinen Fusionsprotein die humane CST ohne Transmembrandomäne (ab AS 39) mit dem Transin/Protein A-Teil fusioniert, wobei ebenfalls eine Enterokinase-Schnittstelle zwischen den Fusionspartnern eingefügt wurde. Die genaue AS-Sequenz ist im Anhang dargestellt (vergleiche Abschnitt 8.2). Zur näheren Untersuchung des Fusionsproteins wurden anschließend CHO-Zellen mit Plasmiden, die für die in Abb. 5-8 A dargestellten Proteine kodieren, transfiziert und 24 h später die Zelllysate und Zellkulturüberstände analysiert. Wie in Abb. 5-8 B

dargestellt, konnte das Fusionsprotein erfolgreich exprimiert werden, was an einem Signal auf der erwarteten Höhe von ~ 100 kDa in der entsprechenden Probe der Western Blot-Analyse zu erkennen ist. Ebenfalls ist zu sehen, dass ein Großteil der shCST in den Zellkulturüberstand sekretiert wurde. Diese Beobachtungen konnten auch mit Hilfe der radioaktiven CST-Aktivitätsbestimmung bestätigt werden (Abb. 5-8 C).



**Abb. 5-8: Sekretion des löslichen humanen Fusionsproteins (shCST) nach transienter Transfektion.** (A) Schematische Darstellung der untersuchten Proteine. t: Signalpeptid von Transin (AS 1 - 32), ProtA: IgG-Bindedomäne von Protein A, EK: Enterokinase-Schnittstelle, hCST: luminale Domäne der humanen CST (ab AS 39), TM: Transmembrandomäne, HA: HA-Tag. (B) Western Blot-Analyse von transient transfizierten CHO-Zellen. Dafür wurden die Zellen mit Plasmiden, die für die Proteine t-ProtA oder shCST kodieren transfiziert und 24 h später Zelllysate angefertigt, je 0,4 µg Gesamtprotein der Lysate (Lys.) und der entsprechend gleiche Prozentsatz der Zellkulturüberstände (ÜS) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Zunächst wurde der Blot mit Anti-Maus-IgGs aus Kaninchen inkubiert und als Sekundärantikörper wurde Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL). Dargestellt ist eine repräsentative Western-Blot-Analyse. (C) CST-Aktivität in den Lysaten und korrespondierenden Zellkulturüberständen transient transfizierter CHO-Zellen. Die Zellen wurden mit Plasmiden, die für die Proteine t-ProtA, shCST oder hCST-HA kodieren, transfiziert und 24 h später die CST-Aktivität in den Lysaten und dem entsprechend gleichen Prozentsatz der Zellkulturüberstände bestimmt. (Mittelwerte ± Standardabweichungen; n = 3 - 4). (D) Anteil aktiver shCST [%] im Lysat und Zellkulturüberstand transient transfizierter CHO-Zellen. Zur Auswertung wurden die in (C) dargestellten Ergebnisse herangezogen. (Mittelwerte ± Standardabweichungen; n = 4)

Hierbei war die Summe der CST-Aktivität in Lysat und Überstand für die shCST-exprimierenden Zellen mit  $7,70 \pm 5,73$  pmol Sulfatid/h/ $\mu$ g und die hCST-HA-exprimierenden Zellen (humane CST mit Transmembrandomäne und C-terminalen HA-Tag) mit  $7,37 \pm 2,58$  pmol Sulfatid/h/ $\mu$ g Gesamtprotein annähernd identisch. In den Überständen der Zellen, die die vollständige CST mit Transmembrandomäne und C-terminalen HA-Tag exprimierten, wurde jedoch eine deutlich niedrigere Aktivität gemessen. Dass hier überhaupt CST-Aktivität messbar war, kann auf ursprünglich intrazellulär lokalisierte hCST zurückgeführt werden, die aus toten Zellen freigesetzt wurde.

Bei den shCST-exprimierenden Zellen konnte 24 h nach Transfektion im Kulturüberstand ein Anteil von  $75,83 \pm 9,40$  % der insgesamt vorhandenen CST-Aktivität nachgewiesen werden (Abb. 5-8 D).

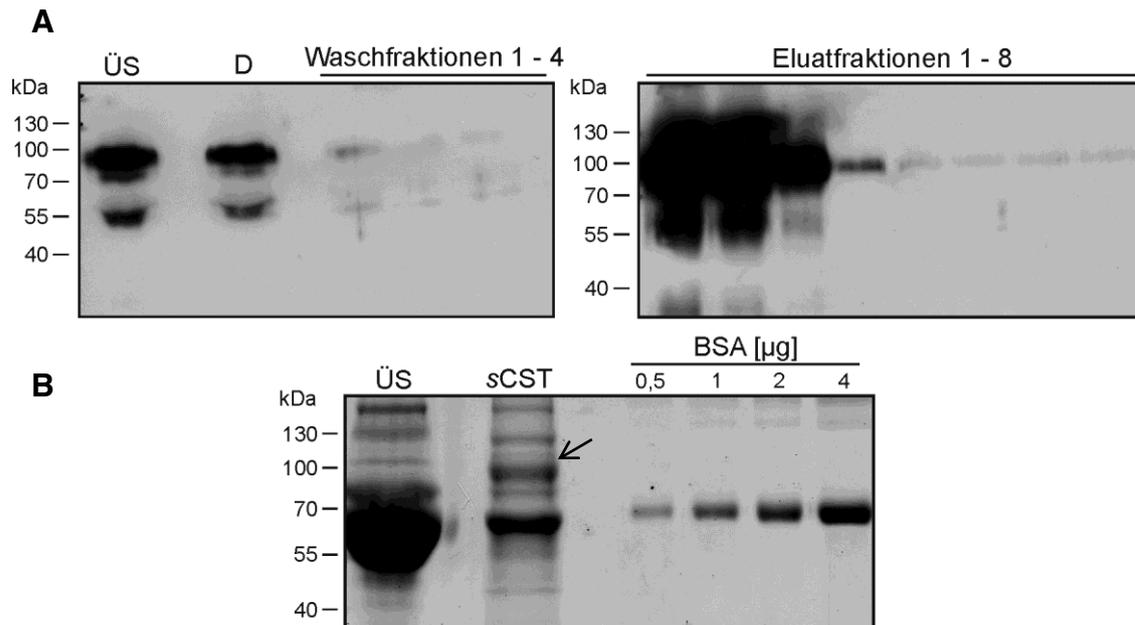
### 5.2.3 Produktion und Reinigung löslicher CST

#### 5.2.3.1 Reinigung aus serumhaltigem Medium

Zunächst wurde getestet, ob die affinitätschromatographische Reinigung der Protein A-Fusionsproteine unter Verwendung von IgG-Sepharose möglich ist und ob mit dieser Methode größere Mengen Enzym aus dem Zellkulturüberstand gereinigt werden können. Dazu wurde zunächst Zellkulturüberstand der CHO ProtA-CST-Zelllinie mit einer konstanten Flussrate von 1,2 ml/min mit Hilfe einer Peristaltikpumpe über eine mit IgG-Sepharose gefüllte Säule (Säulenbettvolumen 2 ml) gepumpt und anschließend mit einer Spritze das Fusionsprotein in 1 ml-Fractionen eluiert. Um den Reinigungsvorgang beurteilen zu können, wurden die Proben mit Hilfe einer Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 5-9 A).

Wie aus der Abbildung hervorgeht wurde der Hauptanteil des CST-Fusionsproteins in den ersten drei Eluatfraktionen detektiert. Betrachtet man jedoch die nahezu gleich starken Intensitäten der Signale in den Spuren der Proben vor dem Auftrag (ÜS) und Durchfluss (D) wird deutlich, dass nur ein sehr geringer Anteil des Enzyms an die IgG-Sepharose gebunden hat. Im weiteren Verlauf wurden 10 % der vereinigten Eluatfraktionen 1 - 3 in einem Coomassie-Gel analysiert (Abb. 5-9 B), um die Reinheit und Menge des Proteins beurteilen zu können. Dabei markiert der Pfeil das Fusionsprotein, dessen Identität mit einer massenspektrometrischen Analyse bestätigt wurde (nicht gezeigt). Anhand der Signalintensitäten der aufgetragenen BSA-Standardproben wurde ermittelt, dass mindestens 45  $\mu$ g sCST aus einem Liter Zellkulturüberstand gereinigt werden können.

Das Enzym wurde jedoch in sehr unreiner Form erhalten, was in der Coomassie-Färbung anhand der vielen zusätzlichen Proteinbanden deutlich wird. Dabei wurde angenommen, dass ein großer Anteil der Verunreinigungen auf den Zusatz von fetalem Kälberserum zum Zellkulturmedium zurückzuführen war. Obwohl die Reinigung prinzipiell funktionierte, wurde eine weitere Optimierung des Reinigungsvorganges als notwendig erachtet.



**Abb. 5-9: Reinigung der sCST aus serumhaltigen Zellkulturüberständen unter Verwendung von IgG-Sepharose. (A)** Dargestellt ist eine Western Blot-Analyse von verschiedenen Proben des Reinigungsvorgangs. ÜS: 0,0005 % des Zellkulturüberstandes, D: 0,0005 % Durchflussfraktion, 0,05 % Waschfraktionen 1 - 4 und 0,05 % Eluatfraktionen 1 - 8. Zur Detektion der Protein A-Fusionsproteine wurde die Membran mit Maus-IgGs gefolgt von Peroxidase gekoppelten Ziegenanti-Kaninchen-Antikörper inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL). sCST: ~ 100 kDa. **(B)** Dargestellt ist ein mit Coomassie-Lösung gefärbtes SDS-Gel. ÜS: 20 µl Zellkulturüberstand der CHO ProtA-CST-Zelllinie. sCST: 10 % der vereinigten Eluatfraktionen 1 - 3, die zuvor mit 10 kDa Centricons konzentriert wurden. Zusätzlich wurden zur Mengenbestimmung 0,5, 1, 2 und 4 µg BSA aufgetragen und die Intensitäten der Proteinsignale mit Hilfe der Software AIDA densitometrisch ausgewertet. Der Pfeil markiert sCST. Aus ca. 470 ml Zellkulturüberstand konnten somit 21 µg sCST gewonnen werden.

### 5.2.3.2 Generierung von Suspensionszellen

Um die Effektivität der Produktion und Reinigung der löslichen CST zu erhöhen, sollte eine Suspensionszelllinie generiert werden. Dies ermöglicht zum einen die leichtere und effizientere Kultivierung der produzierenden Zellen und ließ somit eine größere Ausbeute des Enzyms erwarten. Zum anderen können Suspensionszellen unter serumfreien Bedingungen wachsen. Daher wurde davon ausgegangen, dass die Verwendung von

Suspensionszellen nach den zuvor dargestellten Ergebnissen (Reinigung aus serumhaltigem Medium) einen deutlich effizienteren Reinigungsvorgang ermöglicht.

Da jedoch die direkte Transfektion mit anschließender Selektionierung von CHO-Suspensionszellen nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurden die bereits zuvor beschriebenen adhärent wachsenden CHO ProtA-CST-Zellen (vergleiche Abschnitt 5.2.1.1) an das Wachstum unter serumfreien Bedingungen angepasst. Während einer Anpassungszeit von zwei bis vier Wochen wurde den Zellen schrittweise fetales Kälberserum bis zum vollständigen Weglassen entzogen. Es wurde eine schwimmende und vom Phänotyp von Wildtyp-Suspensionszellen nicht zu unterscheidende Zelllinie erhalten, die weiterhin einen großen Anteil aktiver sCST in den Zellkulturüberstand sekretierte (vergleiche Abb. 5-10). Die Kultivierung der Zellen wurde dabei erfolgreich in miniPerm-Bioreaktoren durchgeführt, die die Kultivierung in hoher Zelldichte und die Gewinnung von Protein in einer hohen Konzentration ermöglicht.

### **5.2.3.3 Bildung höhermolekularer Komplexe**

Bei den Reinigungen löslicher CST aus den Zellkulturüberständen mit IgG-Sepharose wurde in Western Blot-Analysen beobachtet, dass ein großer Teil des Fusionsproteins in den Durchflüssen vorhanden war (vergleiche Abb. 5-9 A). Daher sollte in dem folgenden Versuch untersucht werden, ob das Protein A-markierte Enzym bei der Zugabe eines deutlichen Überschusses an Immunglobulinen vollständig an diese bindet. Dafür sollte methodisch die Größenausschlusschromatographie genutzt werden, bei der Moleküle entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Kleinere Moleküle können dabei tiefer in das poröse Material der stationären Phase eindringen, was zu einer verlängerten Retentionszeit führt. Dies bedeutet, dass größere Moleküle in früheren Eluatfraktionen detektiert werden als kleine. Eine Bindung des Fusionsproteins an IgG führt zu einem größeren Molekulargewicht und ließ somit eine Verschiebung zu früheren Elutionsfraktionen erwarten. IgG hat ein Molekulargewicht von ~ 150 kDa und ist aus zwei schweren (~ 50 kDa) und zwei leichten (~ 25 kDa) Proteinketten aufgebaut. Das CST-Fusionsprotein weist ein Molekulargewicht von ~ 100 kDa auf. Es wurde daher auf Grund der Größe in ähnlichen Eluatfraktionen wie IgG erwartet. Als Säule wurde die Superdex 200 10/300-Säule verwendet, mit der Peptide und Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10 – 600 kDa getrennt werden können. Alle größeren Proteine verweilen nicht auf der Säule und werden direkt nach dem Totvolumen eluiert.

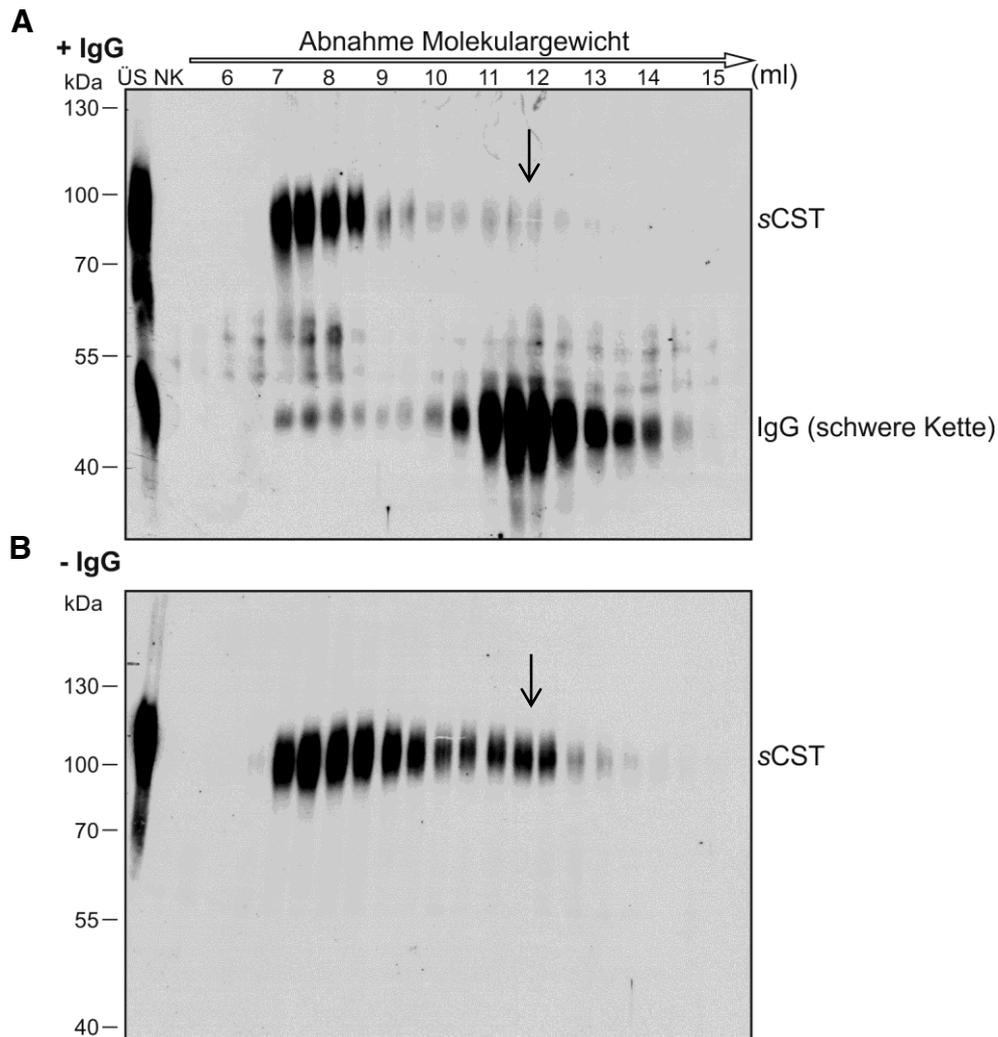
Um zunächst abschätzen zu können, in welchen Fraktionen die Proteine erwartet werden, wurden IgGs (anti-Maus-IgG) mit sCST-freiem Zellkulturüberstand inkubiert, über eine

Superdex 200-Säule aufgetrennt und das Eluat in 0,5 ml-Fractionen aufgefangen. Äquivalente Volumina der Eluate wurden mittels Western Blot analysiert und die IgG-enthaltenen Eluatfraktionen ermittelt. Danach ergab sich, dass IgG in den Elutionsvolumina 10,5 – 13,5 ml enthalten war (nicht gezeigt), was mit den Angaben des Herstellers der Säule übereinstimmte, nach dessen Protokoll IgG (160 kDa) bei ca. 13,2 ml eluiert wird.

Als nächstes wurde Zellkulturüberstand der CHO-S ProtA-CST-Zellen mit anti-Maus-IgGs inkubiert und anschließend analysiert oder analog ohne vorherige IgG-Inkubation einer Größenausschlusschromatographie unterzogen. Äquivalente Volumina der Elutionsfraktionen wurden mit einer Western Blot-Analyse untersucht. Wie aus Abb. 5-10 A ersichtlich, wurde der überwiegende Anteil der IgG-Fraktion in den Elutionsvolumina 10,5 – 13,5 ml detektiert (analog zu dem Testlauf mit sCST-freiem Zellkulturüberstand, Daten nicht gezeigt). Bei der chromatographischen Auftrennung des Zellkulturüberstands ohne IgG-Inkubation zeigte sich jedoch, dass der Großteil der sCST in deutlich früheren Elutionsvolumina von ~ 7 – 8,5 ml enthalten war (Abb. 5-10 B). Zudem wurde nur ein sehr geringer Anteil des Fusionsproteins in späteren Fraktionen eluiert (Markierung mit einem Pfeil).

Im Gegensatz dazu wurde annähernd kein Fusionsprotein mehr in den niedermolekularen Fraktionen nach IgG-Inkubation detektiert (Abb. 5-10 A, Markierung mit einem Pfeil), was auf eine Bindung mit IgG zurückgeführt wurde, während auch hier ein Großteil des Proteins in frühen Fraktionen eluiert worden war. Weiterführende Untersuchungen zeigten außerdem, dass in den höhermolekularen sCST-Fractionen nahezu keine CST-Aktivität messbar war, während eine hohe Aktivität in den niedermolekularen Fraktionen nachgewiesen werden konnte. Da diese Experimente jedoch nur einmalig durchgeführt wurden, sind für eine schlussendliche Bewertung noch weitere Untersuchungen notwendig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nur ein kleiner Anteil des murinen Fusionsproteins aus dem Zellkulturüberstand an IgG bindet und ein großer Teil in einer höhermolekularen Struktur vorzuliegen scheint, die keine Bindung mit IgG eingeht.



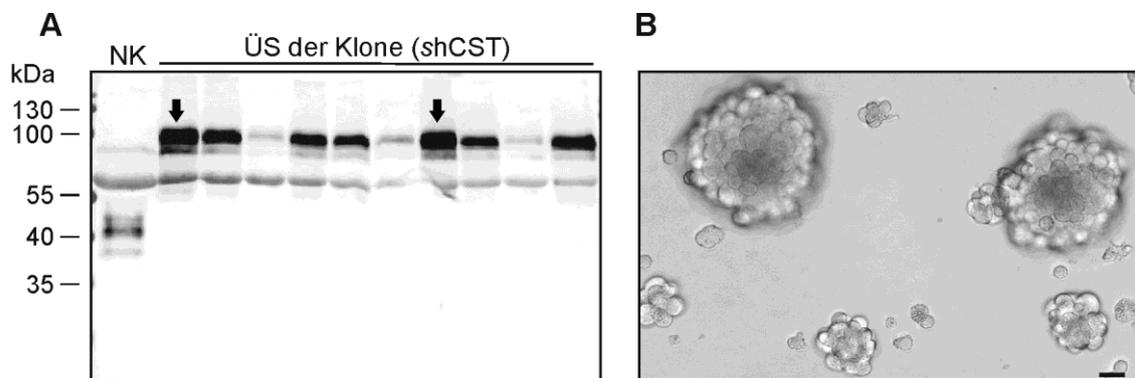
**Abb. 5-10: Bildung höhermolekularer Komplexe der sCST im Zellkulturüberstand.** Zellkulturüberstand von CHO-S ProtA-CST-Zellen wurde mit 0,06 µg/µl IgG (**A**) oder ohne IgG (**B**) über Nacht bei 4 °C inkubiert, größenchromatographisch über die Superdex 200-Säule aufgetrennt und die Eluate in 0,5 ml-Fractionen gesammelt. Äquivalente Volumina der Fractionen 11 – 31 (5,5 – 15,5 ml) wurden mittels Western Blot analysiert. ÜS: Probe vor Auftrag auf die Säule (1 µl), NK: Ex-Cell™ 302 Medium (1 µl). Die Pfeile markieren das murine CST-Fusionsprotein in den niedermolekularen Fractionen. Als Primärantikörper wurde ST2-Antiserum und als Sekundärantikörper Peroxidase-gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL).

#### 5.2.3.4 Generierung shCST-überexprimierender Zellen

Der relativ große Anteil der CST-Aktivität im Zellkulturüberstand ( $75,83 \pm 9,40$  %) beim löslichen humanen Fusionsprotein (vergleiche Abschnitt 5.2.2.1) ließ eine effiziente Produktion des Enzyms vermuten. Daher wurde beschlossen, parallel eine mit dem Plasmid pPROTA-hCST stabil transfizierte Zelllinie zu generieren.

Dafür wurden zunächst adhärent wachsende CHO-Zellen nach Transfektion mit ansteigenden Puromycin-Konzentrationen selektioniert (Endkonzentration: 50 µg/ml) und

von den Zellkulturüberständen der nach zwei Wochen vereinzelt und anschließend vermehrten Einzelklone eine Western Blot-Analyse durchgeführt. In allen 15 getesteten Klonen wurde shCST im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Um beurteilen zu können, welcher Zellklon am meisten Enzym in den Überstand sekretiert, wurde eine definierte Zellzahl ausgeteilt und nach 24 h die Zellkulturüberstände analysiert. Die Menge an Fusionsprotein in den entsprechenden Zellkulturüberständen wurde mittels Western Blot-Analyse und anschließender Quantifizierung der erhaltenen Signale bestimmt. In Abb. 5-11 A ist die Western Blot-Analyse von zehn Klonen dargestellt. Die mit den Pfeilen markierten Zellklone wurden für die Anpassung an serumfreie Bedingungen gewählt, da diese zu den am meisten sekretierenden Zellen gehörten. Einer dieser Zellklone wurde erfolgreich an das Wachstum in Suspensionskultur adaptiert, wobei sich der Phänotyp der generierten Zelllinie deutlich von Wildtyp-Suspensionszellen unterschied. Die Zellen wuchsen, wie aus der mikroskopischen Aufnahme in Abb. 5-11 B hervorgeht, in großen Klumpen, die zum Teil auch makroskopisch erkennbar waren. Auch durch starkes Resuspendieren ließen sich die Zellen kaum vereinzeln. Trotzdem war die Kultivierung in Suspensionskultur und die Produktion löslichen Enzyms mit diesen Zellen möglich. Zusätzlich erfolgte die Kultivierung ohne den Zusatz von FCS zum Medium.

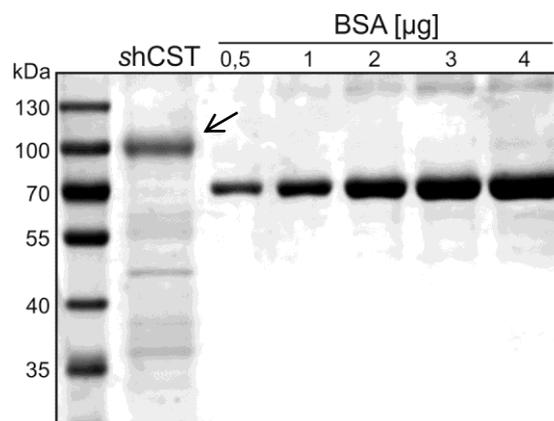


**Abb. 5-11: Generierung der Suspensionszelllinie CHO-S ProtA-hCST.** (A) Dargestellt ist eine Western Blot-Analyse der Zellkulturüberstände von zehn der mit pPROTA-hCST stabil transfizierten Einzelklone (CHO-Zellen adhären). Es wurde eine definierte Zellzahl ausgesät, am nächsten Tag der Zellkulturüberstand abgenommen und gleiche Mengen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Als NK wurde ÜS von mit dem Plasmid pPROTA transient transfizierten CHO-Zellen verwendet. Der Blot wurde zunächst mit ST2-Antiserum inkubiert und als Sekundär-AK wurde DyLight 800 gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Die Signale wurden mit Hilfe eines Infrarot-Fluoreszenz-Scanners visualisiert und anschließend quantifiziert. shCST: ~ 100 kDa. Die Pfeile markieren die Proben, in denen die größte Menge an shCST nachgewiesen wurde. (B) Mikroskopische Aufnahme der CHO-S ProtA-hCST-Zellen. Maßstabsbalken: 20 µm.

Nachdem eine FCS unabhängige, stabil transfizierte Suspensionszelllinie generiert worden war, die lösliches humanes CST-Fusionsprotein sekretiert, wurde die Reinigung

aus dem Zellkulturüberstand mit Hilfe des Batch-Verfahrens getestet. Um die Zellkulturüberstände für einen längeren Zeitraum zu lagern, wurden die enthaltenen Proteine durch Zugabe von 50 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt und die Präzipitate bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die Proben wurden nach Aufarbeitung (Dialyse und Konzentrierung) mit IgG-Sepharose inkubiert und im Anschluss das Fusionsprotein eluiert. Um die Effektivität der Bindung beurteilen zu können, wurde die CST-Aktivität im Zellkulturüberstand vor und nach der Inkubation ermittelt. Aus der Messung ging hervor, dass ~ 21,4 % des aktiven Enzyms auch nach der Inkubation im Überstand verblieben. Wie in Abb. 5-12 zu sehen ist, konnte das humane Fusionsprotein angereichert und in relativ reiner Form gewonnen werden. Über mit auf das Gel aufgetragene BSA-Standards konnte die Gesamtmenge an gereinigter shCST mit ~ 80 µg bestimmt werden. Da für die Reinigung ~ 300 ml Zellkulturüberstand als Ausgangsmaterial eingesetzt worden waren, ergab sich eine Ausbeute von ca. 0,25 mg shCST pro Liter Zellkulturüberstand.

Hinsichtlich der Reinheit und Menge des CST-Proteins wurde die Reinigung verglichen mit der des murinen Enzyms aus serumhaltigen Zellkulturüberständen deutlich optimiert.



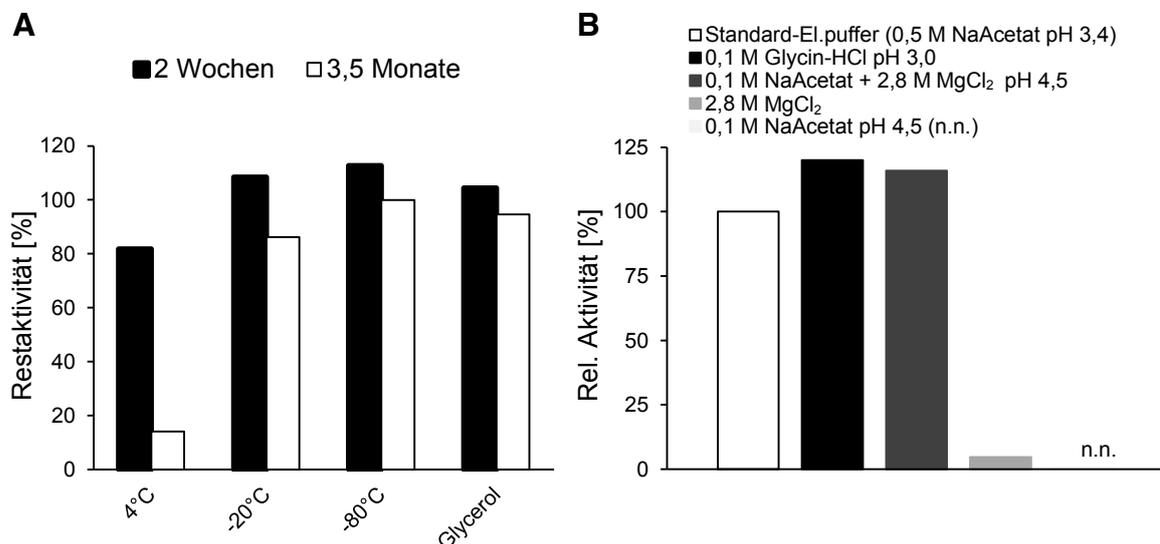
**Abb. 5-12: Reinigung der shCST aus serumfreien Zellkulturüberständen mit dem Batch-Verfahren unter Verwendung von IgG-Sepharose.** Der Zellkulturüberstand wurde zur Lagerung mit 50 % (w/v) Ammoniumsulfat versetzt. Im dargestellten Coomassie-Gel wurden 0,9 % der Elutionsfraktionen und zur Mengenbestimmung 0,5, 1, 2, 3 und 4 µg BSA aufgetragen. Die Intensitäten der Proteinsignale wurden mit Hilfe der *Software* AIDA densitometrisch ausgewertet. Der Pfeil markiert shCST. Aus ca. 300 ml Zellkulturüberstand konnten 80 µg shCST gereinigt werden.

Im weiteren Verlauf wurde festgestellt, dass die Suspensionszellen in den miniPerm-Bioreaktoren deutlich schlechter wuchsen verglichen mit der Kultivierung in T175-Zellkulturflaschen. Dies ging auch mit einer messbar höheren CST-Aktivität einher. Aus diesem Grund wurde für die effektivere Produktion der shCST im Weiteren die

Kultivierung in T175-Zellkulturflaschen gewählt. Da jedoch für die in Abb. 5-12 dargestellte Reinigung zu etwa 50 % Zellkulturüberstände aus miniPerm-Bioreaktoren verwendet wurden, ließ dies vermuten, dass hinsichtlich der Menge des gereinigten Enzyms durch die nun veränderte Kultivierung eine weitere Optimierung möglich war.

### 5.2.3.5 Lagerungs- und Elutionsbedingungen

Um größere Mengen an Fusionsprotein über einen längeren Zeitraum lagern zu können, wurden verschiedene Bedingungen getestet. Hierbei war das Ziel, den Aktivitätsverlust der CST möglichst gering zu halten.



**Abb. 5-13: Einfluss der Lagerungsbedingungen der Zellkulturüberstände und Elutionsbedingungen der Fusionsproteine auf die CST-Aktivität.** (A) Dargestellt ist die Restaktivität der sCST [%] im Zellkulturüberstand nach 2 Wochen und 3,5 Monaten Lagerung bei unterschiedlichen Temperaturen (4 °C, -20 °C, -80 °C). Glycerol: Lagerung in 20 Vol.-% Glycerol bei -80 °C. Die Messung erfolgte jeweils in Duplikaten. (B) Dargestellt ist die relative CST-Aktivität [%] in den ersten beiden Eluatfraktionen nach Verwendung verschiedener Elutionspuffer. Zur Affinitätsreinigung der CST-Fusionsproteine wurde das Batch-Verfahren mit zuvor konzentriertem Überstand der CHO-S ProtA-hCST-Zellen verwendet. Dabei wurde die Aktivität nach Elution mit dem Standardpuffer (0,5 M Acetatpuffer pH 3,4) als 100 % definiert. In allen Ansätzen erfolgte die direkte Neutralisation mit dem entsprechenden Volumen an 1 M Tris-Puffer pH 9. n.n.: nicht nachweisbar. In den ersten beiden Eluatfraktionen wurde die Aktivitätsbestimmung in Duplikaten und in den zweiten Eluatfraktionen mit Einfachmessungen durchgeführt.

Zunächst wurde dafür die CST-Aktivität in dem Überstand von CHO-S ProtA-CST-Zellen bestimmt und Proben anschließend bei 4 °C, -20 °C, -80 °C und nach Zusatz von Glycerol (20 Vol.-%) bei -80 °C gelagert. Nach 2 Wochen und nach 3,5 Monaten wurde erneut die

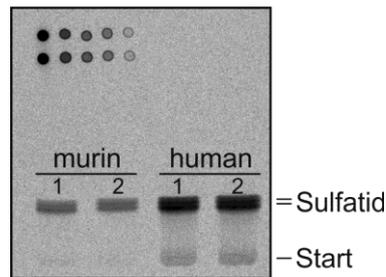
Aktivität bestimmt. Wie aus Abb. 5-13 A hervorgeht, nahm die Aktivität nach 2 Wochen lediglich in der bei 4 °C gelagerten Probe leicht ab. Nach 3,5 Monaten wurde für diese jedoch nur noch eine Restaktivität von 14,0 % bestimmt, während bei einer Lagerung von -20 °C die Aktivität leicht auf 86,1 % sank. Im Gegensatz dazu wurde in den bei -80 °C gelagerten Zellkulturüberständen nahezu kein Aktivitätsverlust gemessen.

Für die Elution der Enzyme wurde bei allen Reinigungen der von dem Hersteller der IgG-Sepharose (GE Healthcare) angegebene Standardpuffer (0,5 M Acetatpuffer, pH 3,4) verwendet. Obwohl nach Elution der Enzyme eine direkte Neutralisation erfolgte, wurde beobachtet, dass ein großer Anteil an Aktivität dabei verloren ging. Aus diesem Grund wurde der Einfluss verschiedener Puffer auf die CST-Aktivität verglichen. Es wurde shCST aus Zellkulturüberständen mit Hilfe des Batch-Verfahrens gereinigt, wobei neben dem Standardpuffer vier weitere Elutionspuffer verwendet wurden. In den ersten beiden Elutionsfraktionen wurde im Anschluss die CST-Aktivität bestimmt. Um zu gewährleisten, dass eine niedrigere Aktivität auf die Elutionsbedingungen und nicht auf eventuell weniger gebundenes Enzym zurückging, wurde die CST-Aktivität in jeder Probe vor und nach Inkubation mit IgG-Sepharose bestimmt. Für alle Proben konnte dabei eine annähernd gleiche Bindung von 92,8 – 95,1 % bestimmt werden. Wie aus Abb. 5-13 B ersichtlich wird, konnte durch Verwendung des Glycin-HCl-Puffers (pH 3,0) die relative Aktivität in den ersten beiden Fraktionen bezogen auf den Standardpuffer am stärksten erhöht werden (120 %). Aus diesem Grund wurde dieser als Elutionspuffer für Reinigungen löslicher und aktiver CST im präparativen Maßstab gewählt.

### **5.2.3.6 Produktion und Reinigung im präparativen Maßstab**

Von beiden stabil transfizierten adhärennten Zelllinien, die das lösliche murine oder humane CST-Fusionsprotein exprimierten, wurde erfolgreich eine Suspensionszelllinie generiert. Verschiedene Ergebnisse ließen bereits vermuten, dass die Produktion und Reinigung des humanen Enzyms zu höheren Ausbeuten führt.

Um schlussendlich zu entscheiden, welche Zelllinie für die Produktion und anschließende Reinigung im Großmaßstab herangezogen werden soll, wurde eine vergleichende CST-Aktivitätsbestimmung durchgeführt. Dafür wurde in äquivalenten Volumina der Zellkulturüberstände der beiden Suspensionszelllinien die CST-Aktivität bestimmt (Abb. 5-14).



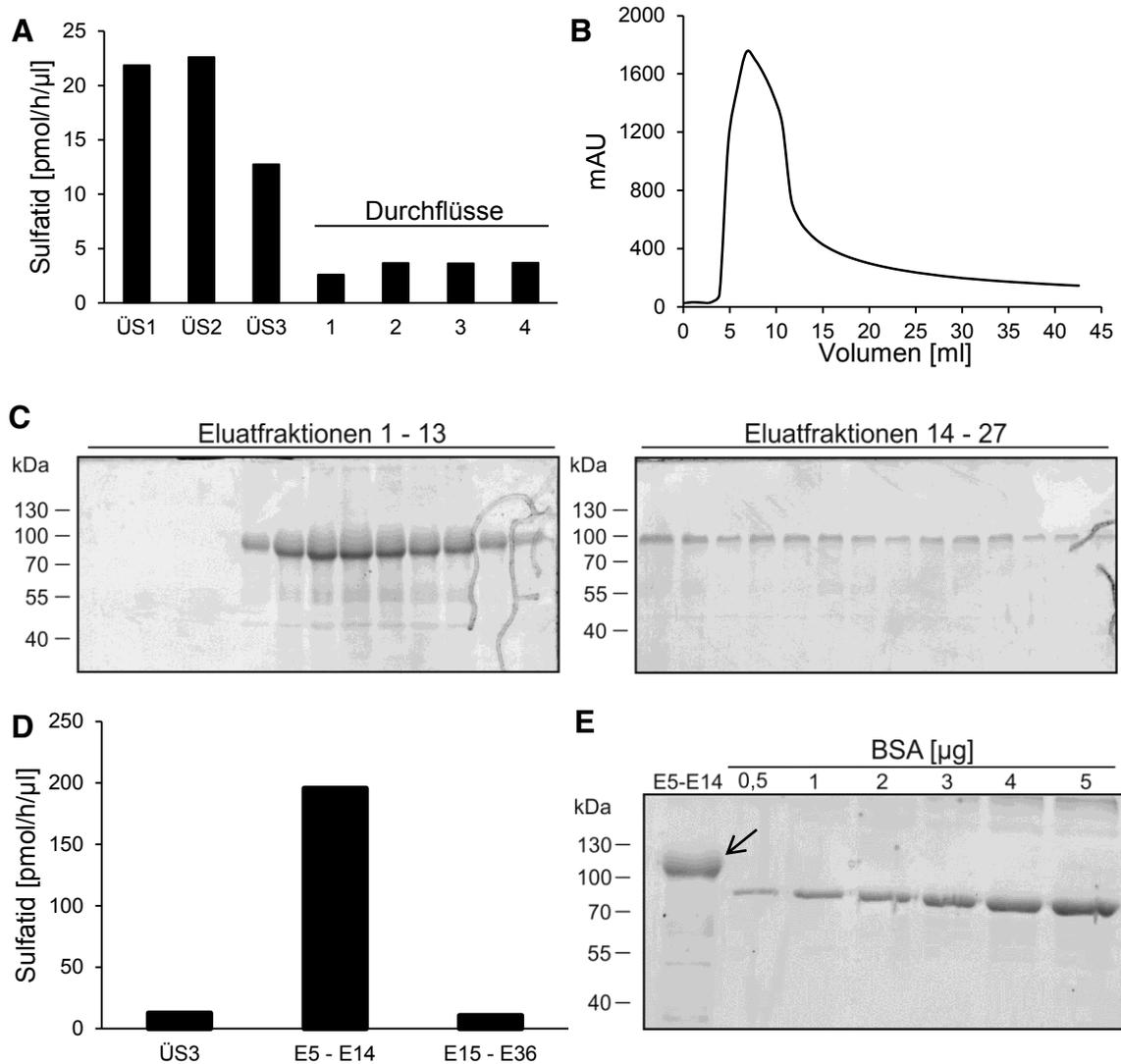
**Abb. 5-14: CST-Aktivität im Zellkulturüberstand der CHO-S ProtA-hCST-Zelllinie verglichen mit der CHO-S ProtA-CST-Zelllinie.** Es wurde eine radioaktive CST-Aktivitätsbestimmung von äquivalenten Mengen Zellkulturüberstand (10  $\mu$ l) der generierten Suspensionszelllinien (Expression des murinen bzw. humanen CST-Fusionsproteins) durchgeführt. Dargestellt sind die mit Hilfe eines Bioimagers visualisierten radioaktiven Signale der dünnenschichtchromatographischen Analyse. Als Standardreihe wurden 1  $\mu$ l Reaktionspuffer und die entsprechenden 1:5-, 1:10-, 1:20- und 1:100-Verdünnungen aufgetragen. Den mit 2 beschrifteten Proben wurde 1 mg/ml BSA während der Aktivitätsbestimmung zugesetzt, was jedoch nahezu keinen Einfluss auf die CST-Aktivität hatte.

Dabei wurde während der Enzymreaktion des humanen Enzyms mit 75,5 pmol Sulfatid/h über zehnfach mehr Produkt gebildet als während der Reaktion mit murinem Enzym (6,6 pmol Sulfatid/h). Aufgrund dessen wurde entschieden, die CHO-S ProtA-hCST-Zelllinie für die Produktion und Reinigung im präparativen Maßstab zu nutzen.

Damit größere Mengen an Zellkulturüberstand für die Reinigung verwendet werden konnten, wurde eine IgG-Sepharose-Säule mit der Äkta-FPLC-Anlage verbunden, um mit einer kontinuierlichen Flussrate (max. 2 ml/min) ein großes Volumen über die Säule zu pumpen. Außerdem erlaubte die Methode eine kontinuierliche Kontrolle des Reinigungsprozesses durch eine permanente pH-Wert- und Druckmessung, sowie der Aufzeichnung eines UV-Spektrums bei 280 nm. Für die Reinigung wurde der vorbereitete Zellkulturüberstand über die Säule geleitet und anschließend das Fusionsprotein in 1 ml-Fractionen eluiert. In Abb. 5-15 sind verschiedene Untersuchungen zur Beurteilung des Reinigungsvorganges zusammengefasst dargestellt. Zur Vorbereitung des Überstandes wurde dieser nach dem Auftauen zunächst zentrifugiert und im Anschluss steril filtriert bevor er über die Säule gegeben wurde. Wie in Abb. 5-15 A gezeigt ist, ging durch die Filtration ein großer Anteil an CST-Aktivität verloren. Durch Bestimmung der CST-Aktivität in den Durchflüssen (1 – 4) des über die IgG-Sepharose geleiteten Überstandes zeigte sich, dass etwa 70 – 80 % des aktiven Enzyms an das Säulenmaterial gebunden haben. Das in Abb. 5-15 B dargestellte UV-Spektrum des Elutionsvorganges zeigte ein stark ansteigendes Signal kurz nach Beginn der Elution, das zum Ende des Vorganges abnahm, jedoch nicht vollständig den Ausgangswert erreichte. Das UV-Signal korrelierte gut mit einem hohen shCST-Gehalt in den entsprechenden Fraktionen, was durch die Analyse in einem Coomassie-Gel gezeigt wurde (Abb. 5-15 C). Um zu beurteilen, ob

aktives Enzym eluiert wurde, wurden zum einen die Fraktionen E5 – E14 und zum anderen die Fraktionen E15 – E36 vereinigt, dialysiert und anschließend die CST-Aktivität bestimmt. Aus der Abb. 5-15 D geht hervor, dass in der vereinigten Probe E5 – E14 mit einer Produktbildung von 195,52 pmol Sulfatid/h/µl eine stark angereicherte Aktivität nachgewiesen wurde. Um die Proteinmenge in dem aktiveren Eluat und die Reinheit des Fusionsproteins zu untersuchen, wurde ein Teil auf ein SDS-Gel aufgetragen, elektrophoretisch getrennt und die Proteine mit Hilfe einer Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht. Es konnten demnach ~ 1,7 mg aktive shCST aus einem Liter Zellkulturüberstand gewonnen werden. Dabei bleibt an dieser Stelle zu erwähnen, dass in die Berechnung nur die Menge in der deutlich höher konzentrierten Probe (E5 – E14) eingegangen ist. Zusätzlich wurde beim Wechsel des Elutionspuffers auf den Waschpuffer erneut ein ansteigendes UV-Signal beobachtet (nicht gezeigt). Dies deutet ebenfalls auf shCST-Protein hin, das durch die geänderte Puffersubstanz von der Säule eluiert wurde und nicht mit in die Berechnung eingegangen ist.

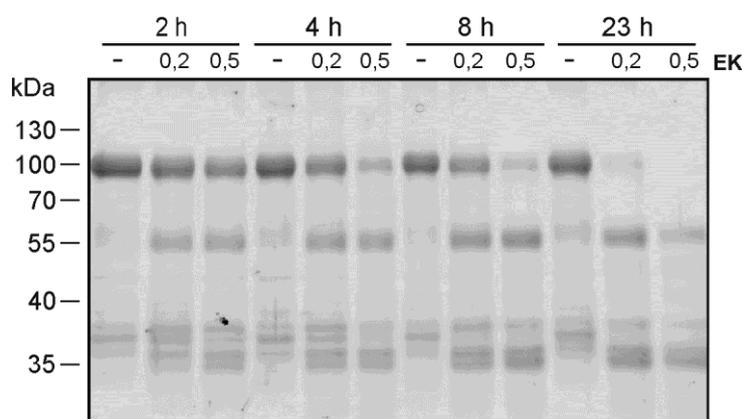
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dieser Reinigungsmethode im präparativen Maßstab sowohl die Ausbeute, als auch die Reinheit des Fusionsproteins gesteigert wurde. Des Weiteren wurden jedoch auch einige noch optimierbare Arbeitsschritte deutlich.



**Abb. 5-15: Reinigung der shCST im präparativen Maßstab unter Verwendung der Äkta-FPLC-Anlage.** (A) CST-Aktivität [pmol Sulfatid/h/µl] in dem für die Reinigung verwendeten Zellkulturüberstand (insgesamt ca. 1800 ml) nach dem Auftauen (ÜS1), der anschließenden Zentrifugation (ÜS2) und Sterilfiltration (ÜS3). Der ÜS3 wurde über eine IgG-Säule gepumpt und die Durchflüsse 1 - 4 (1: 760 ml, 2: 220 ml, 3: 145 ml, 4: Rest) gesammelt. (B) UV-Spektrum (280 nm) während des Elutionsvorganges. Ein hohes UV-Signal deutet auf eine große Proteinmenge hin. (C) Coomassie-Färbung von SDS-Gelen auf die äquivalente Mengen der Eluatfraktion 1 – 27 (12 µl) aufgetragen wurden. (D) CST-Aktivitätsbestimmung [pmol Sulfatid/h/µl] in den vereinigten und anschließend dialysierten Eluatfraktionen E5 – E14 bzw. E15 – E36. Zum Vergleich ist die bereits in (A) dargestellte CST-Aktivität in dem auf die Säule aufgetragenen Zellkulturüberstand gezeigt. Es konnte eine mindestens 15-fache Anreicherung der Aktivität in E5 – E14 gemessen werden. (E) Mengenbestimmung der gereinigten shCST. Dafür wurden ~ 0,13 % der Probe E5 – E14 und verschiedene Mengen an BSA-Standard (0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg und 5 µg) auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine durch Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht und die Signalintensitäten der erhaltenen Proteinbanden mit Hilfe der Software AIDA densitometrisch ausgewertet. Die Konzentration an gereinigter shCST wurde mit ~ 0,32 µg/µl bestimmt. Es konnten somit mind. 3 mg Enzym mit hoher Aktivität gereinigt werden. Der Pfeil markiert das CST-Fusionsprotein.

### 5.2.4 Enzymatische Spaltung des Fusionsproteins

Wie bereits zuvor erwähnt, befindet sich zwischen dem Protein A-Teil und der luminalen Domäne der murinen bzw. humanen CST eine EK-Schnittstelle. Die EK ist eine Serinprotease, welche hinter der speziellen Aminosäuresequenz [Asp]<sub>4</sub>-Lys spaltet. Das Einbringen des Erkennungsmotivs zwischen der luminalen Domäne der CST und dem großen Protein A-Teil sollte das enzymatische Abtrennen von diesem nach der Reinigung ermöglichen. Im Folgenden wurde getestet, ob die Enterokinase-Schnittstelle funktionell ist. Dafür wurde gereinigtes humanes Fusionsprotein mit verschiedenen EK-Konzentrationen versetzt und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten aus dem Reaktionsgemisch Proben entnommen und diese analysiert. In der in Abb. 5-16 dargestellten Coomassie-Färbung ist auf der Höhe von ~ 100 kDa ein Signal erkennbar, das auf das nicht enzymatisch gespaltene Fusionsprotein zurückgeführt wurde, welches ein berechnetes Molekulargewicht von ~ 100 kDa aufweist. Mit zunehmender Inkubationszeit und EK-Konzentration nahm die Signalintensität ab, wobei gleichzeitig ein stärkeres Signal auf der Höhe von ~ 55 kDa sichtbar wurde, was dem erwarteten Molekulargewicht des CST-Spaltproduktes entspricht. Ausgehend von der in Abb. 5-4 B dargestellten Western Blot-Analyse, wurde für den gespaltenen Protein A-Teil ein Molekulargewicht zwischen 40 – 50 kDa erwartet. In der Coomassie-Färbung konnten jedoch mit zunehmender Inkubationszeit bzw. EK-Konzentration lediglich zusätzliche Proteinbanden auf einer Höhe um 35 kDa detektiert werden. Ob diese auf den Protein A-Teil des Fusionsproteins zurückgehen, wurde bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht geklärt.

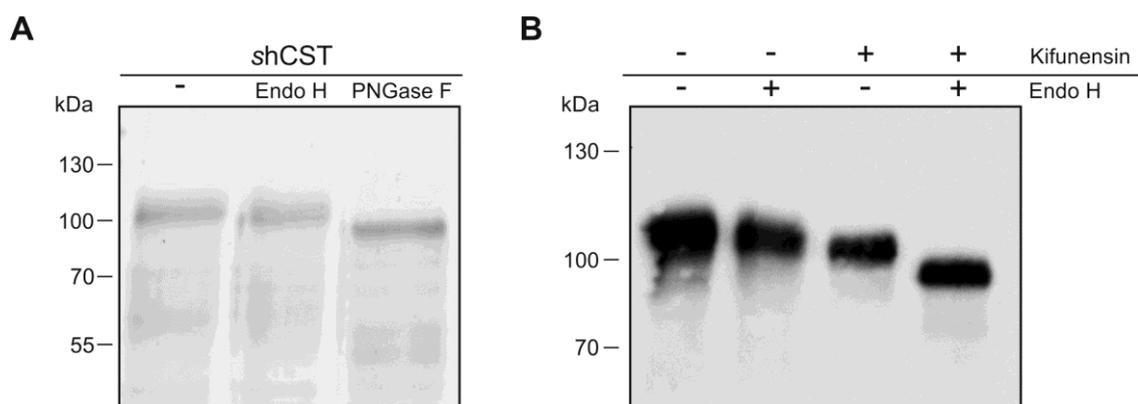


**Abb. 5-16: Enzymatische Abspaltung des Protein A-Teils von gereinigter shCST.** Äquivalente Mengen gereinigter shCST (9,6 µg) wurden mit 0,2 oder 0,5 Einheiten EK versetzt und nach verschiedenen Inkubationszeiten (2 h, 4 h, 8 h und 23 h) je 20 % der Probe entnommen. Zum Vergleich wurde shCST ohne den Zusatz der EK unter sonst identischen Bedingungen behandelt. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht. shCST: ~ 100 kDa. Die EK hat ein Molekulargewicht von 26 kDa und wurde bei den eingesetzten Mengen nicht nachgewiesen.

Insgesamt korrelierte die Abnahme des Fusionsproteins bzw. Zunahme des mutmaßlichen CST-Spaltproduktes mit steigender EK-Konzentration und Inkubationszeit, was auf einen gezielten enzymatischen Verdau hindeutet. Ein erster Versuch weist darauf hin, dass die hCST nach Abspaltung des großen Protein A-Teils immer noch Aktivität aufweist. Diese erste Beobachtung muss jedoch in weiteren Versuchen bestätigt werden.

### 5.2.5 Deglykosylierung

Die Möglichkeit, größere Mengen lösliche und aktive CST in reiner Form zu gewinnen, schafft die Grundvoraussetzung für eine Kristallstrukturanalyse. Es ist jedoch bekannt, dass sich die Aufklärung dieser für Glykoproteine als schwierig gestaltet. Oft ist die Glykosylierung zwar wichtig für die vollständige und korrekte Faltung der Proteine, verhindert aber die Kristallisation auf Grund der chemischen und konformativen Heterogenität (Chang *et al.*, 2007).



**Abb. 5-17: Deglykosylierung von shCST.** **(A)** Gereinigte und denaturierte shCST (2,7 µg) wurden mit Endo H (500 U) oder PNGase F (0,3 U) inkubiert und die Proben anschließend mittels SDS-PAGE gefolgt von einer Coomassie-Färbung analysiert. Zum Vergleich wurde das Enzym nicht mit Endo H bzw. PNGase F inkubiert und analog behandelt. **(B)** CHO-S ProtA-hCST-Zellen wurden für drei Wochen unter Zusatz (10 µM) bzw. ohne Zusatz von Kifunensin kultiviert. Proben der Zellkulturüberstände (9 µl) wurden nach Denaturierung mit Endo H (500 U) inkubiert und anschließend eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Als Primärantikörper wurde ST2-Antiserum verwendet und als Sekundärantikörper Peroxidase gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit Hilfe der verstärkten Chemilumineszenz (ECL).

In dem folgenden Versuch wurde daher zunächst die Glykosylierung des löslichen humanen CST-Fusionsproteins näher untersucht. Dafür wurde das gereinigte Enzym zum einen mit dem Enzym Endoglykosidase H (EndoH) und zum anderen mit dem Enzym N-Glykosidase F (PNGase F) behandelt. Während Endo H die Bindung zwischen dem

innersten und dem zweiten N-Acetylglukosamin-Rest von N-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden vom mannosereichen Typ sowie von einigen vom Hybrid-Typ spaltet, hydrolysiert PNGase F die Bindung zwischen dem innersten N-Acetylglukosamin-Rest und dem Asparagin-Rest des Proteins. Dabei kann auch die Abspaltung von Oligosacchariden des komplexen Typs erfolgen. Wie aus Abb. 5-17 A hervorgeht, ließ sich denaturierte shCST mit PNGase F deglykosylieren, während die Behandlung mit Endo H zu keiner sichtbaren Abnahme des Molekulargewichts führte. Es konnte somit keine Sensitivität des Proteins gegenüber Endo H beobachtet werden.

Es wurde beschrieben, dass der Zusatz des  $\alpha$ -Mannosidase I-Inhibitors Kifunensin zu Zellen für drei bis vier Wochen zu der Bildung von Endo H-sensitiven Glykoproteinen führen kann. Diese Methode wurde genutzt, um qualitativ hochwertige Kristalle des Glykoproteins CTLA-4 für die Strukturanalyse zu erhalten (Yu *et al.*, 2011). Um zu untersuchen, ob die Behandlung der CHO-S ProtA-hCST-Zellen mit Kifunensin zu einer Endo H-Sensitivität der in den Zellkulturüberstand sekretierten shCST führt, wurde dem Zellkulturmedium über den Zeitraum von drei Wochen der  $\alpha$ -Mannosidase I-Inhibitor in einer Konzentration von 10  $\mu$ M zugesetzt. Bei den Zellen wurde kein verschlechtertes Wachstum gegenüber den nicht mit Kifunensin behandelten Kontrollzellen über den gesamten Zeitraum beobachtet. Anschließend wurden Proben der Zellkulturüberstände mit Endo H behandelt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Wie aus Abb. 5-17 B hervorgeht, war nach Behandlung mit Endo H das Molekulargewicht der zuvor denaturierten shCST aus dem Überstand der Kifunensin behandelten Zellen deutlich vermindert. Im Gegensatz dazu konnte bei dem Fusionsprotein aus dem Zellkulturüberstand der Zellen, die unter normalen Bedingungen kultiviert worden waren, keine Änderung des Molekulargewichtes beobachtet werden. Der Zusatz des  $\alpha$ -Mannosidase I-Inhibitors führte somit zu der Sekretion eines Endo H-sensitiven Enzyms. Inwieweit die katalytische Aktivität der shCST beeinflusst ist und die Abspaltung der Oligosaccharide durch Endo H auch im nativen Zustand des Proteins möglich ist, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

## 5.3 Fluorimetrische Aktivitätsbestimmung

### 5.3.1 Allgemeines

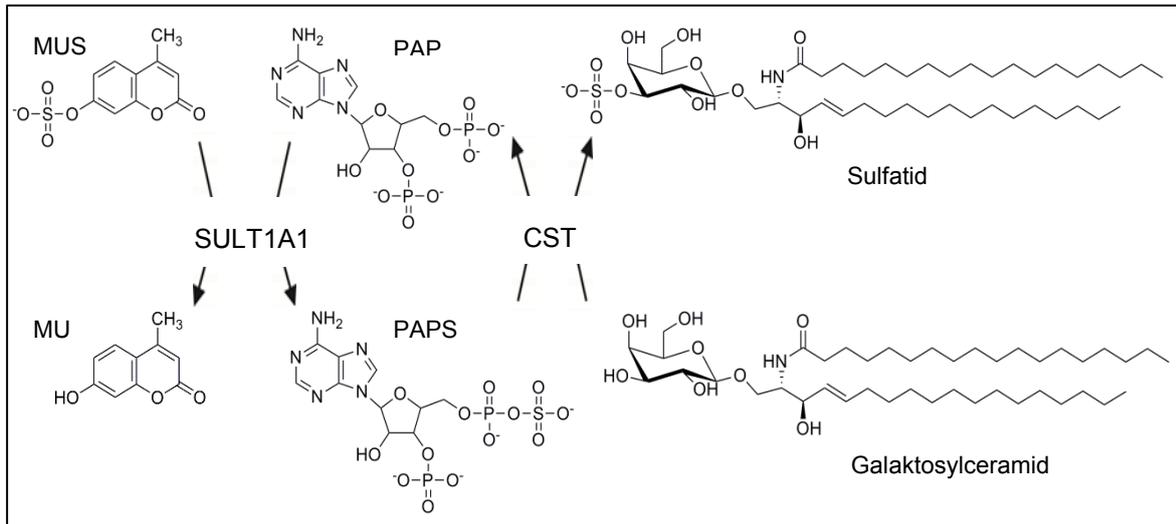
Als Standardmethode für die Bestimmung der CST-Aktivität wurde bisher die von Jungalwala und Mitarbeitern beschriebene radioaktive Aktivitätsbestimmung genutzt, bei der radioaktiv markiertes PAP [<sup>35</sup>S] eingesetzt wird (Jungalwala *et al.*, 2000). Diese ist jedoch aufgrund des Zeit- und Kostenaufwandes, sowie der Radioaktivität nicht geeignet für ein *high-throughput screening* (HTS) tausender potentiell inhibitorisch wirkender Substanzen. Daher sollte eine neue Methode entwickelt werden, die auf einer fluorimetrischen Bestimmung zum Nachweis der Enzymaktivität beruht, wofür die bereits beschriebene Methode für die Aktivitätsbestimmung zweier zytosolischer Sulfotransferasen modifiziert werden sollte (Chen *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2010). Dabei katalysieren die Sulfotransferasen den Transfer einer Sulfatgruppe von PAPS auf das entsprechende Substrat, was zu der Bildung von PAP führt. Dies kann durch eine gekoppelte Reaktion mit der Ratten-Sulfotransferase 1A1 wieder zu PAPS umgesetzt werden. Das Fluoreszenzsubstrat Methylumbelliferylsulfat (MUS) dient dabei als Sulfatdonor und wird zu dem desulfatierten Methylumbelliferon (MU) umgesetzt, was zu einer Änderung des Fluoreszenzsignals führt (Chen *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2010).

In der Literatur wurde beschrieben, dass das Wildtyp-Enzym der SULT1A1 fest gebundenes PAP enthält, welches als Sulfotransferase-Inhibitor fungiert und somit die Regeneration von PAPS verlangsamt. Es konnte gezeigt werden, dass die Einführung von zwei Punktmutationen in das Enzym, welche zu dem Austausch von Lysin gegen Glutaminsäure an Aminosäure-Position 65 und Arginin gegen Glycin an Position 68 (K65E/R68G) führen, die enzymatische Regeneration von PAPS effizient ermöglicht und die Reaktion unter den gewählten Bedingungen nicht durch PAP und MU inhibiert wurde (Yang *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2005). Daher wurde bei den gekoppelten Enzymreaktionen die Punktmutante der SULT1A1 (K65E/R68G) als Hilfsenzym verwendet, um den Aktivitätsnachweis der zweiten Sulfotransferasen zu ermöglichen. Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wird die SULT1A1-Mutante (K65E/R68G) nur mit SULT1A1 bezeichnet.

Es sollte untersucht werden, ob die von Chen bzw. Lu und Mitarbeitern beschriebenen zytosolischen Sulfotransferasen durch die shCST ersetzt werden können und somit ein nicht-radioaktiver Aktivitätsnachweis der CST möglich wird.

In Abb. 5-18 ist die gekoppelte Enzymreaktion schematisch dargestellt. Die CST katalysiert die Sulfatierung von Galaktosylceramid, was neben der Bildung von Sulfatid zu

der Bildung von PAP führt (rechter Teil). Eine Kopplung mit der SULT1A1-Reaktion sollte zu der Regeneration des gebildeten PAP zu PAPS führen, wobei MUS zu MU desulfatiert wird (linker Teil). Die Bildung von MU führt zu einer Verschiebung des Fluoreszenzsignals, was die fluorimetrische Bestimmung der CST-Aktivität ermöglichen sollte.



**Abb. 5-18: Schematische Darstellung der gekoppelten Enzymreaktion zum Nachweis der CST-Aktivität.** Die CST katalysiert den Transfer einer Sulfatgruppe von PAPS auf Galaktosylceramid, was zu der Bildung von Sulfatid und PAP führt. Das gebildete PAP kann durch die zweite Sulfotransferase (SULT1A1) regeneriert werden. Dabei setzt das Enzym Methylumbelliferylsulfat (MUS) zum desulfatierten Methylumbelliferon (MU) um, was zu veränderten Fluoreszenzwerten bei definierten Wellenlängen führt. (Modifiziert nach Chen *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2010).

In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen konnte zunächst gezeigt werden, dass ein linearer Zusammenhang (Korrelationskoeffizient: 0,997) zwischen der MU-Konzentration (0 – 40  $\mu\text{M}$ ) und dem gemessene Fluoreszenzsignal über mindestens 70 min besteht (nicht gezeigt). Dies lieferte die Grundvoraussetzung, um über das Fluoreszenzsignal auf den Substratumsatz und somit die Enzymaktivität zurückschließen zu können.

### 5.3.2 SULT1A1: Expression, Reinigung und Aktivitätsbestimmung

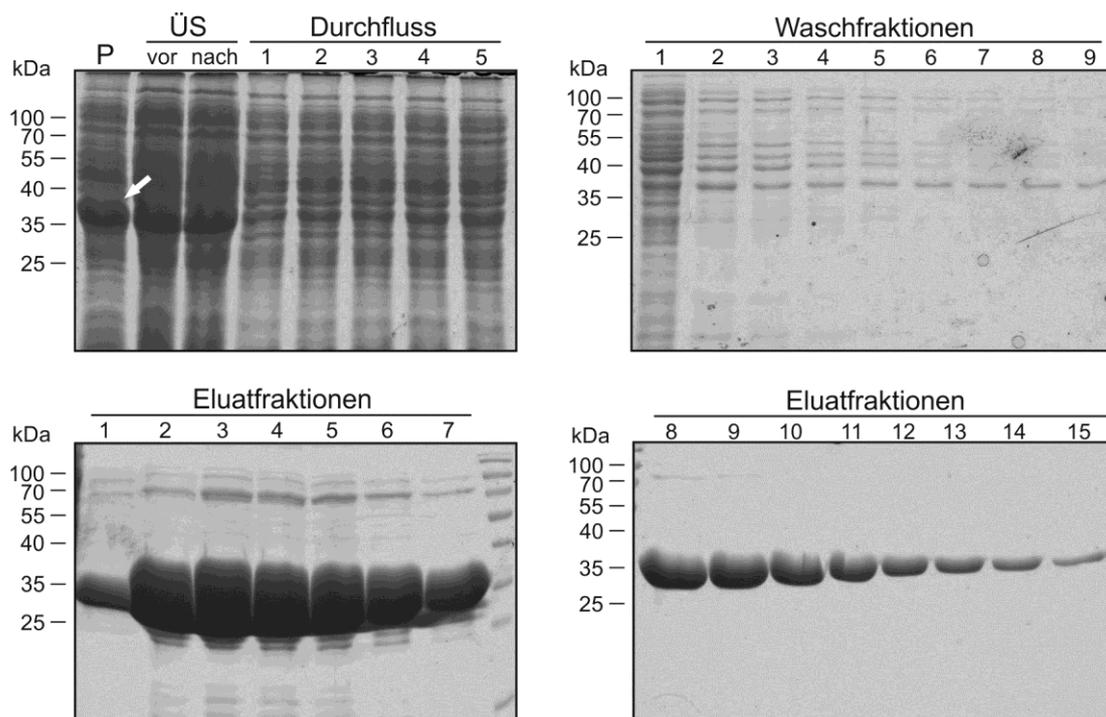
Um die gekoppelte Enzymreaktion durchführen zu können, wurde zunächst die zweite benötigte Sulfotransferase (SULT1A1) bakteriell exprimiert und anschließend in größeren Mengen und aktiver Form gereinigt. Das Plasmid für die bakterielle Expression des

Enzyms mit einem aminoterminalen Polyhistidin-Tag wurde bereits innerhalb der Arbeitsgruppe kloniert und stand für die vorliegende Arbeit zur Verfügung.

Aus den bereits oben dargestellten Gründen sollte die SULT1A1-Mutante (K65E/R68G) verwendet werden. Daher wurden zunächst mittels Mutagenese-PCR die zuvor genannten Punktmutationen in das Plasmid eingeführt.

In allen weiteren Experimenten wurde die SULT1A1-Mutante (K65E/R68G) verwendet, die im weiteren Verlauf aber nur mit SULT1A1 bezeichnet wird.

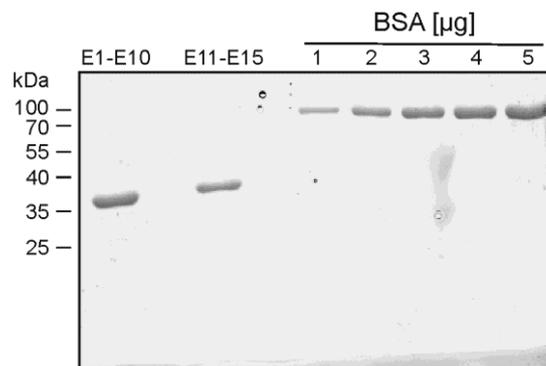
Die Expression der Sulfotransferase erfolgte in *E. coli* BL21-Bakterien nach IPTG-Induktion und die anschließende Reinigung des Enzyms mit Polyhistidin-Tag unter Verwendung von Kobalt-Säulen. Um den Reinigungs-Vorgang beurteilen zu können, wurden währenddessen Proben abgenommen und diese anschließend mittels SDS-PAGE gefolgt von einer Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 5-19).



**Abb. 5-19: Reinigung des SULT1A1 Polyhistidin-Tag Fusionsproteins.** Während der Reinigung des Enzyms über eine Kobalt-Säule wurden Proben genommen und diese mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Coomassie-Färbelösung sichtbar gemacht. Es wurden 0,04 % des Bakterienpellets (P) und des Überstandes (ÜS) vor bzw. nach Sterilfiltration, 0,12 % der Durchflüsse 1 - 5, 0,6 % der Waschfraktionen 1 - 9 und je 18 µl der Eluatfraktionen (E1 – E10: 3,6 %, E11 – E14: 1,8 %, E 15: 0,9 %) aufgetragen. Der Pfeil in der Abbildung markiert das SULT1A1-Fusionsprotein (~ 35 kDa).

Sowohl im nicht auf die Säule aufgetragenen Bakterienpellet, als auch in dem nach Bakterienlyse erhaltenen und für die Reinigung verwendeten Überstand ist ein hoher Proteingehalt erkennbar. Dabei ist ein intensives Signal bei einem Molekulargewicht von etwa 35 kDa sichtbar, wobei davon ausgegangen wurde, dass diese Proteinbande auf die SULT1A1 zurückgeht, die ein berechnetes Molekulargewicht von ~ 35 kDa aufweist. Nach Abschätzung der Signalintensitäten wurde geschlussfolgert, dass ca. 50 % des zu reinigenden Enzyms nach Bakterienlyse löslich im Überstand vorlagen. Auch in den Eluatfraktionen wurde eine große Menge der Sulfotransferase detektiert, wobei die Menge wie erwartet mit zunehmender Eluatfraktion abnahm. In den ersten Eluatfraktionen sind weitere Proteine als Verunreinigung vorhanden, die unspezifisch an das Säulenmaterial gebunden haben müssen. Im Verhältnis zu der Menge an SULT1A1, wurden diese jedoch als vernachlässigbar angesehen. In den höheren Eluatfraktionen (ab Eluatfraktion 8) konnten in der Coomassie-Färbung keine weiteren Proteine angefärbt werden.

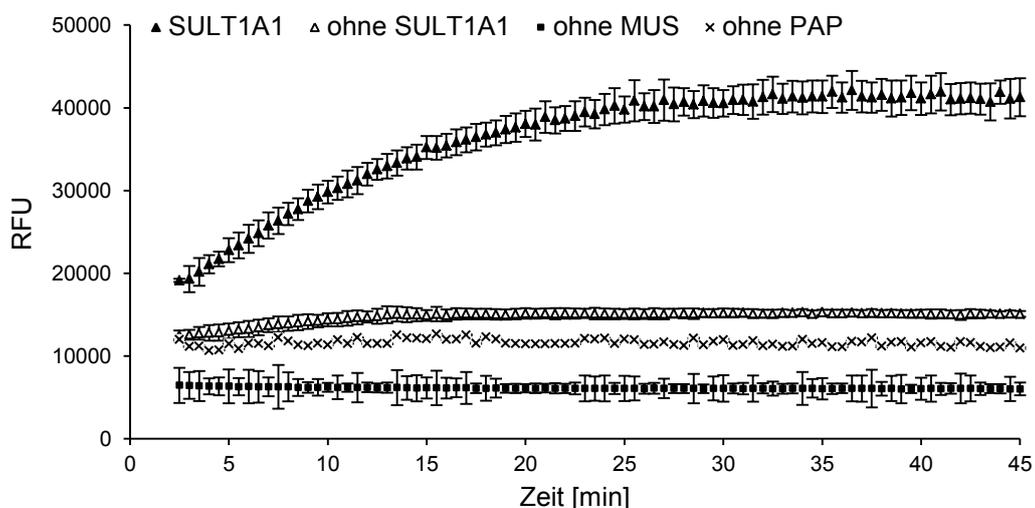
Um die Menge des gereinigten Enzyms bestimmen zu können, wurden zunächst die Eluatfraktionen 1 – 10 sowie 11 – 15 vereinigt, gegen 100 mM Tris-Puffer pH 7,6 dialysiert (Burkart and Wong, 1999) und anschließend Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen. Zur Mengenbestimmung wurden zusätzlich definierte Mengen an BSA aufgetragen. Nach Durchführung einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung, konnte in beiden Proben sauberes Fusionsprotein nachgewiesen werden (Abb. 5-20).



**Abb. 5-20: Mengen- und Reinheitsbestimmung der SULT1A1.** Für die Konzentrationsbestimmung des gereinigten Enzyms wurden verschiedene Mengen an BSA (1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg und 5 µg), 0,03 % der vereinigten und dialysierten Fraktionen E1 – E10 und 0,13 % E11 –E15 auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Färbung der Proteine mit Coomassie-Färbelösung, wurden die Intensitäten der erhaltenen Proteinsignale mit Hilfe der *Software* AIDA densitometrisch ausgewertet. Die Konzentration gereinigter SULT1A1 wurde mit ~ 2,3 µg/µl (E1 – E10) und 0,3 µg/µl (E11 – E15) bestimmt. SULT1A1-Fusionsprotein: ~ 35 kDa.

Die Konzentration in E1 – E10 wurde mit  $\sim 2,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  und in E11 – E15 mit  $\sim 0,3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  bestimmt. Demnach wurden mindestens 15 mg Enzym aus einer 500 ml *E. coli* BL21-Bakterienkultur für die weitere Verwendung in reiner Form gewonnen.

Um zu ermitteln, ob die gereinigte Sulfotransferase aktiv ist, wurde die von Chen und Mitarbeitern beschriebene Aktivitätsbestimmung durchgeführt. Dafür wurden  $0,5 \mu\text{g}$  des Enzyms dem Reaktionspuffer zugesetzt, welcher die für die Einzelreaktion (Abb. 5-18, linker Teil) benötigten Substrate MUS und PAP enthält. Durch die Enzymreaktion sollte PAP zu PAPS umgesetzt werden unter der Verwendung des Substrates MUS. Die Bildung des desulfatierten MU führt zu einer entsprechenden Zunahme des Fluoreszenzsignals und sollte somit die Enzymaktivität messbar machen. Als Negativkontrollen wurden die Reaktionen entweder ohne Zusatz der für die Reaktion benötigten Substrate PAP bzw. MUS oder ohne das Enzym durchgeführt. Mit Hilfe eines Mikroplatten-Messgeräts wurden die Fluoreszenzwerte über 45 min gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 5-21 dargestellt.



**Abb. 5-21: Aktivitätsbestimmung der SULT1A1.** Für die Aktivitätsbestimmung wurde der Reaktionspuffer je Ansatz mit  $0,5 \mu\text{g}$  Enzym versetzt und  $50 \mu\text{l}$  in eine Vertiefung einer 96-well-Platte überführt. Die Fluoreszenzwerte [RFU] wurden bei  $37^\circ\text{C}$  über 45 min gemessen. Dargestellt sind die Gesamtreaktion (SULT1A1) und die Negativkontrollen (ohne SULT1A1/MUS/PAP). Die Zeitpunkte der erhaltenen Messwerte wurden jeweils auf volle 30 s gerundet. Gain: 60. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen;  $n = 3$ ).

Das gemessene Fluoreszenzsignal nahm nur in der Gesamtreaktion bis ca. 25 - 30 min Inkubationszeit stetig zu, während es sich in den untersuchten Negativkontrollen über den gesamten Zeitraum nahezu nicht veränderte. Somit konnte gezeigt werden, dass unter den gewählten Reaktionsbedingungen der Nachweis des Enzymumsatzes mit Hilfe der

fluoreszenzbasierten Aktivitätsbestimmung möglich war. Dass die gemessenen Werte in der Kontrollprobe ohne MUS unterhalb der Messwerte für die beiden weiteren Kontrollen lagen, wurde auf das bei der verwendeten Anregungswellenlänge vorhandene Hintergrundsignal von MUS zurückgeführt.

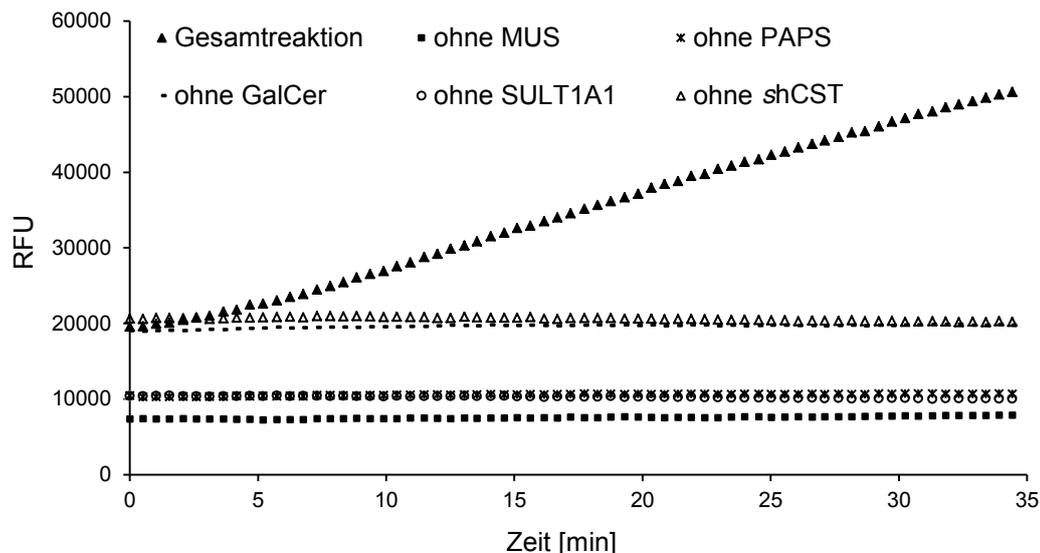
Es konnten somit große Mengen an SULT1A1 in aktiver Form gereinigt werden. In den nachfolgenden Versuchen sollte nun untersucht werden, ob die CST-Reaktion mit der SULT1A1-Reaktion gekoppelt werden kann und es somit indirekt möglich ist shCST-Aktivität zu messen.

### 5.3.3 Gekoppelte Aktivitätsbestimmung (shCST/SULT1A1)

Nachdem mit Hilfe des Fluoreszenzsubstrates MUS die Aktivität der SULT1A1 alleine nachgewiesen werden konnte, sollte getestet werden, ob diese Reaktion mit der CST-Reaktion gekoppelt werden kann. Dafür wurde der Reaktion zusätzlich zu dem für den Einzelnachweis der SULT1A1 beschriebenen Reaktionspuffer PAPS anstelle von PAP und Galaktosylceramid als Substrate der CST zugesetzt. Um das Lipid in dem Reaktionsansatz in Lösung zu halten, wurde des Weiteren zusätzlich Triton X-100 dazu gegeben.

Nach einer Präinkubation aller Bestandteile, um das im PAPS als Verunreinigung enthaltene PAP zu regenerieren (Chen *et al.*, 2005), wurden die Reaktionsansätze mit shCST versetzt und die Fluoreszenzwerte über 35 min gemessen. Gleichzeitig wurden Kontrollreaktionen durchgeführt, in denen spezifische Komponenten der Reaktionsmischung nicht vorhanden waren (ohne Galaktosylceramid, PAPS, SULT1A1, MUS oder shCST).

Wie aus Abb. 5-22 hervorgeht, wurde nur in dem Reaktionsansatz mit allen Komponenten eine konstante Signalzunahme beobachtet, während die Fluoreszenzwerte in allen Kontrollreaktionen konstant blieben. Da das Fehlen der Komponenten PAPS, MUS und SULT1A1 dazu führte, dass die SULT1A1-Reaktion nicht stattfinden konnte, lagen die Werte hierbei niedriger als in den anderen Kontrollen. Dies liegt daran, dass bereits während der Präinkubationsphase die Regeneration des als Verunreinigung im PAPS enthaltenen PAP nicht möglich war. Das Weglassen des Galaktosylceramids und der shCST führte hingegen nur zu einer Verhinderung der CST-Reaktion, weswegen die Fluoreszenzwerte während der stattfindenden Präinkubation aufgrund des regenerierten PAP auf das dargestellte Niveau anstiegen.



**Abb. 5-22: Fluorimetrische CST-Aktivitätsbestimmung.** Für die Aktivitätsbestimmung wurden die Ansätze des Reaktionsgemisches nach Präinkubation mit 1 µg shCST versetzt und die Fluoreszenzwerte [RFU] über die Zeit [min] gemessen. Als Negativkontrollen wurden die Reaktionen ohne Galaktosylceramid, PAPS, SULT1A1, MUS oder shCST durchgeführt. Die Messung erfolgte über 35 min. Gain: 60. Dargestellt sind die Mittelwerte von einem in Triplikaten durchgeführten Versuch.

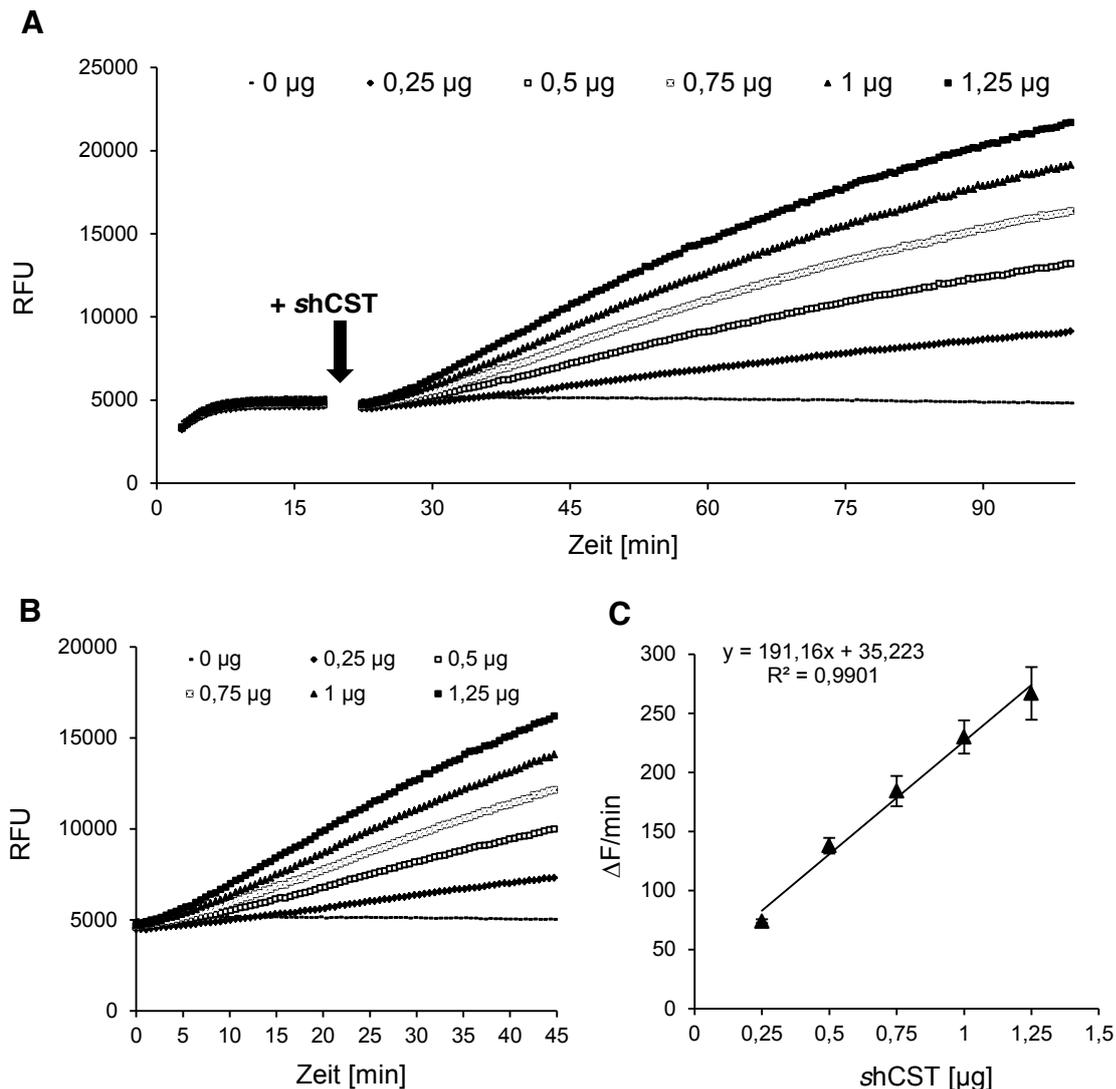
Es kann daher festgehalten werden, dass die Kopplung der CST-Reaktion mit der Reaktion der SULT1A1 funktionierte. In weiteren Versuchen sollte die fluorimetrische Aktivitätsbestimmung nun näher charakterisiert werden.

### 5.3.4 Linearitätsnachweis

Nachdem zuvor gezeigt worden war, dass mit Hilfe des Enzyms SULT1A1 die Messung der CST-Aktivität möglich war, sollte im Weiteren ein linearer Zusammenhang zwischen der in der Reaktion eingesetzten shCST-Menge und dem bei der Messung erhaltenen Fluoreszenzsignal nachgewiesen werden.

Dafür wurden verschiedene Reaktionsansätze hergestellt, denen nach Präinkubation (20 min) mit einer konstante Menge an SULT1A1, unterschiedliche Mengen shCST (0 µg, 0,25 µg, 0,5 µg, 0,75 µg, 1 µg und 1,25 µg) zugesetzt wurden. Die sich während der Reaktion ändernden Fluoreszenzwerte wurden über einen Zeitraum von insgesamt 100 min aufgenommen (Abb. 5-23 A). In allen Proben wurde beobachtet, dass die Fluoreszenzwerte zu Beginn der Präinkubationsphase anstiegen, bis diese ab einer Inkubationszeit von etwa 10 min konstant blieben. Dies wurde auf die vollständige Regeneration des im PAPS bereits als Verunreinigung enthaltenen PAP zurückgeführt. Wie in Abb. 5-23 A zu sehen ist, wurde nach Zugabe der shCST (Markierung mit einem

Pfeil) in allen Proben eine Zunahme des Fluoreszenzsignals über die Zeit gemessen. Dabei nahm die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Enzymmenge zu, was an der entsprechend stärkeren Steigung zu erkennen ist. Aus den in Abb. 5-23 A dargestellten Kurven wurde abgeleitet, dass über eine shCST-Reaktionszeit von mindestens 45 min, ein linearer Anstieg des Fluoreszenzsignals über die Zeit bei allen getesteten Enzymmengen zu beobachten war (Abb. 5-23 B).



**Abb. 5-23: Linearitätsnachweis der gekoppelten Enzymreaktion.** (A) Dargestellt sind die gemessenen Fluoreszenzwerte [RFU] über die Zeit von Reaktionsansätzen, denen unterschiedliche Mengen shCST (0  $\mu\text{g}$ , 0,25  $\mu\text{g}$ , 0,5  $\mu\text{g}$ , 0,75  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$ , 1,25  $\mu\text{g}$ ) zugesetzt wurden. Dafür wurden die Reaktionsansätze zunächst ~ 20 min mit je 1  $\mu\text{g}$  SULT1A1 präinkubiert und die Fluoreszenzwerte [RFU] über die Zeit gemessen, was nach Zugabe der shCST-Proben (Markierung mit einem Pfeil) fortgesetzt wurde. Dargestellt sind die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches. (B) Ausschnitt aus (A): Darstellung der ersten 45 min der Reaktion nach shCST-Zugabe. (C) Dargestellt ist die Reaktionsgeschwindigkeit [ $\Delta F/\text{min}$ ] der ersten 45 min nach shCST-Zugabe gegen die Enzymmenge [ $\mu\text{g}$ ]. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen;  $n = 3$ ).

Um einen linearen Zusammenhang zwischen der Reaktionsgeschwindigkeit und der eingesetzten Proteinmenge zu bestätigen, wurde in drei unabhängigen Versuchen die mittlere Reaktionsgeschwindigkeit ( $\Delta F/\text{min}$ ) in Abhängigkeit von der shCST-Menge bestimmt und eine lineare Funktion angepasst. Hierbei konnte ein Korrelationskoeffizient von 0,99 erreicht werden (Abb. 5-23 C). Es wurde somit davon ausgegangen, dass die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten beim Einsatz derselben spezifischen SULT1A1-Aktivität ein direktes Maß für die shCST-Aktivität darstellen.

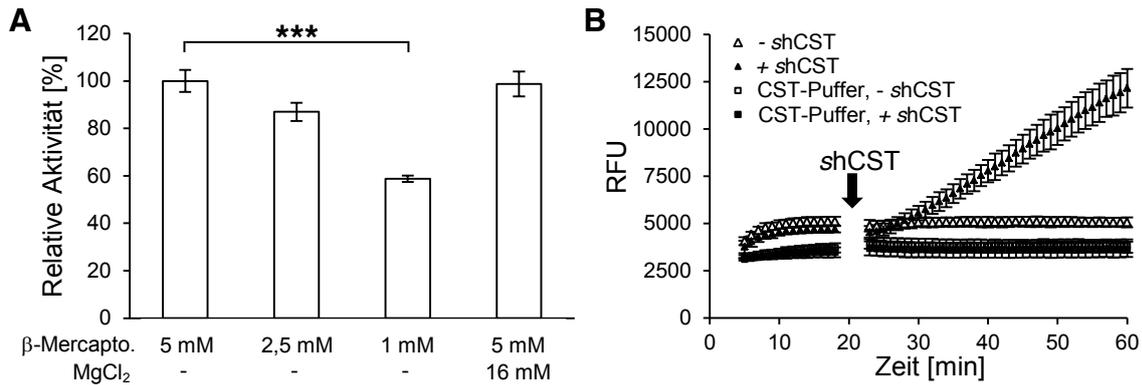
Es wurde sowohl bei diesem als auch bei den folgenden Versuchen über die Reaktionsgeschwindigkeiten und nicht direkt über die gemessenen Fluoreszenzwerte zu einem definierten Zeitpunkt ausgewertet (Endpunktmessung), da bei der Endpunktauswertung deutlich größere Standardabweichungen erhalten wurden. Die Auswertung über die Steigung über einen definierten Zeitraum lieferte diesbezüglich deutlich bessere Übereinstimmungen.

### 5.3.5 Einfluss von Pufferkomponenten

Bei der Untersuchung der gekoppelten Enzymreaktion wurde zunächst der in der Literatur beschriebene Reaktionspuffer für die gekoppelte Enzymreaktion der Sulfotransferase 1A1 und der humanen Dehydroepiandrosteron-Sulfotransferase verwendet (Chen *et al.*, 2005). Dieser Puffer enthält unter anderem 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol. Durch Reduktion der  $\beta$ -Mercaptoethanolkonzentration auf 2,5 mM und 1 mM im Reaktionspuffer, sollte der Einfluss dieser Komponente auf die gekoppelte Aktivitätsbestimmung der shCST mit der SULT1A1 untersucht werden. Außerdem wurde untersucht, ob der Zusatz von Magnesiumchlorid (16 mM) einen Einfluss auf die Reaktion hat. Diese Magnesiumkonzentration wird in der Aktivitätsbestimmung mit radioaktiv-markierten PAPS eingesetzt. Aus der Abb. 5-24 A geht hervor, dass die Verringerung der  $\beta$ -Mercaptoethanol-Konzentration im Reaktionspuffer einen negativen Effekt auf die Bestimmung hatte. Dabei wurde die Aktivität auf  $87,0 \pm 5,6$  % (nicht signifikant) bei Reduktion auf 2,5 mM und signifikant auf  $58,7 \pm 4,3$  % bei Reduktion auf 1 mM verringert. Im Gegensatz dazu hatte der Zusatz von 16 mM  $\text{MgCl}_2$  zum Reaktionsgemisch keinen signifikanten Einfluss auf die gemessene Enzymaktivität.

Zusätzlich wurde untersucht, welche Effekte der Austausch des SULT1A1-Reaktionspuffers (100 mM Kaliumphosphat pH 7,0, 5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) gegen den CST-Reaktionspuffer (Reaktionspuffer für die radioaktive CST-Aktivitätsbestimmung: 80 mM Tris-HCl pH 7,1, 16 mM  $\text{MgCl}_2$ ) hat (Abb. 5-24 B). Während eine Zunahme des

Fluoreszenzsignals der Proben in dem SULT1A1-Reaktionspuffer beobachtet werden konnte, konnte in dem CST-Puffer keine Aktivität nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich darin, dass die als Hilfsenzym fungierende SULT1A1 in diesem Puffer nicht arbeitet. Vergleicht man in Abbildung Abb. 5-24 B die Präinkubationskurven (0 – 20 min) wird deutlich, dass bereits vor Zugabe der shCST das Fluoreszenzsignal in den Ansätzen, die im CST-Puffer inkubiert wurden, nicht zunahm.



**Abb. 5-24: Einfluss verschiedener Reaktionspufferkomponenten auf die Aktivitätsbestimmung.** (A) Dargestellt ist die relative Aktivität [%] von Proben mit veränderter Reaktionspufferzusammensetzung bezogen auf die erhaltenen Messwerte unter Standardbedingungen (5 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, kein MgCl<sub>2</sub>). Für die Darstellung der relativen Aktivität wurde die Reaktionsgeschwindigkeit [ $\Delta F$ /min] über die ersten 45 min nach shCST-Zugabe (0,5  $\mu$ g) ermittelt. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen; n = 3; \*\*\* p < 0,001, ANOVA gefolgt von Dunnett-Test). (B) Dargestellt sind die gemessenen Fluoreszenzwerte [RFU] über 60 min von Reaktionsansätzen mit 1  $\mu$ g aktiver oder hitzeinaktivierter shCST (+ shCST/- shCST) im Standardreaktionspuffer (siehe unter A) oder CST-Reaktionspuffer (4 mM MUS, 16 mM MgCl<sub>2</sub>, 20  $\mu$ M PAPS, 80 mM Tris-HCl pH 7,1). Nach der Präinkubationsphase mit SULT1A1 für ca. 20 min, wurde 1  $\mu$ g shCST zugesetzt (Markierung durch einen Pfeil). Die Zeitpunkte der Messwerte wurden jeweils auf volle Minuten gerundet. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen; n = 3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den getesteten Bedingungen eine  $\beta$ -Mercaptoethanol-Konzentration von 5 mM im Reaktionspuffer die besten Ergebnisse lieferte, der Zusatz von 16 mM MgCl<sub>2</sub> keinen Einfluss hatte und kein Aktivitätsnachweis im CST-Reaktionspuffer möglich war.

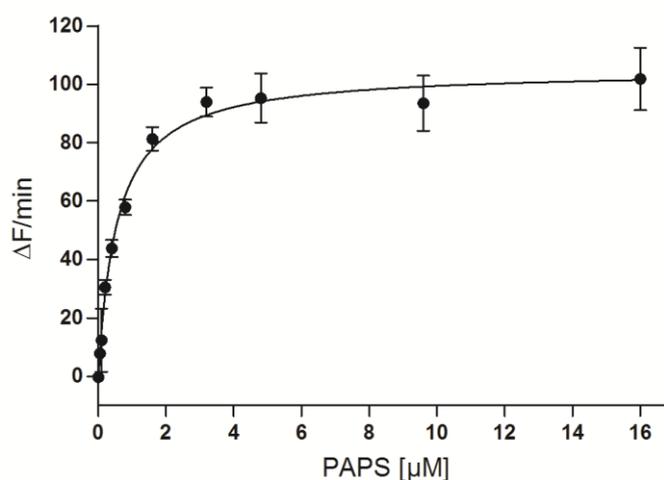
### 5.3.6 K<sub>M</sub>-Wert-Bestimmung

Um das humane CST-Fusionsprotein (shCST) enzymkinetisch zu charakterisieren, sollten die K<sub>M</sub>-Werte für die beiden Substrate Galaktosylceramid und PAPS mit Hilfe der fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung ermittelt werden. Für die Bestimmung der K<sub>M</sub>-Werte

der gereinigten shCST wurde die fluorimetrische Aktivitätsbestimmung mit ansteigenden Galaktosylceramid- bzw. PAPS-Konzentrationen durchgeführt.

Für das Substrat Galaktosylceramid und die shCST konnte kein  $K_M$ -Wert ermittelt werden, da das Substrat in Mizellen solubilisiert vorliegt.

Für das Substrat PAPS lieferte die Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeiten [ $\Delta F/\text{min}$ ] gegen die PAPS-Konzentrationen [ $\mu\text{M}$ ] von drei unabhängigen Versuchen eine Sättigungs-Kurve (Abb. 5-25). Nach nichtlinearer Regression der erhaltenen Daten jedes einzelnen Versuchs wurde für die shCST und PAPS ein  $K_M$ -Wert von  $0,55 \pm 0,06 \mu\text{M}$  und eine  $V_{\text{max}}$  von  $104,94 \pm 8,77 \Delta F/\text{min}$  bestimmt.

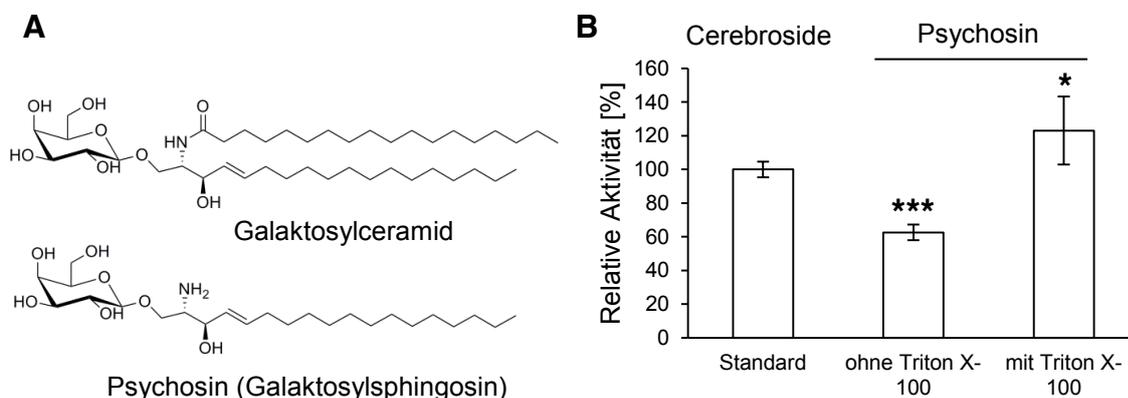


**Abb. 5-25:  $K_M$ -Wert-Bestimmung für shCST und PAPS.** Dargestellt ist die Reaktionsgeschwindigkeit [ $\Delta F/\text{min}$ ] in Abhängigkeit von der PAPS-Konzentration [ $\mu\text{M}$ ] für die lösliche humane CST (shCST). Für die Bestimmung wurde jeweils die Reaktionsgeschwindigkeit [ $\Delta F/\text{min}$ ] über den Zeitraum von 20 – 50 min nach shCST-Zugabe herangezogen. Mit Hilfe nichtlinearer Regression wurde der  $K_M$ -Wert mit  $0,55 \pm 0,06 \mu\text{M}$  und eine  $V_{\text{max}}$  von  $104,94 \pm 8,77 \Delta F/\text{min}$  unter Verwendung der *Software* GraphPad Prism 5 bestimmt. Dargestellt ist die gemittelte Kurve von drei unabhängigen Versuchen. Die Reaktion wurde je Ansatz mit  $2 \mu\text{g}$  Galaktosylceramid und in einem Endvolumen von  $30 \mu\text{l}$  durchgeführt. Als Mikrotiterplatten wurden schwarze 384-well-Platten (Corning, Produktnummer 3573) verwendet. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen,  $n = 3$ ).

### 5.3.7 Psychosin als Substrat

In weiteren Versuchen sollte getestet werden, ob Psychosin (Galaktosylsphingosin) in der fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung Galaktosylceramid als Substrat ersetzen kann. Das Lipid stellt die deacylierte Form des Galaktosylceramids dar (Abb. 5-26 A) und weist durch den fehlenden Fettsäurerest eine höhere Hydrophilie auf. Es wurde bereits beschrieben,

dass Psychosin als Substrat der renalen Ratten-Sulfotransferase fungieren kann und auch in einer Enzympräparation aus den Schleimhäuten des Verdauungstraktes der Ratte konnte gezeigt werden, dass Psychosin als Akzeptor der Sulfatgruppe dienen kann (Lin und Horowitz, 1982; Tennekoon *et al.*, 1985). Mit Hilfe der radioaktiven CST-Aktivitätsbestimmung konnte bestätigt werden, dass Psychosin auch von der shCST sulfatiert werden kann (nicht gezeigt). Für die Enzymreaktion mit Galaktosylceramid als Substrat wurde außerdem gezeigt, dass der Zusatz des Detergenz Triton X-100 essentiell ist (nicht gezeigt). Im folgenden Experiment wurde die Aktivitätsbestimmung zum einen unter Standardbedingungen mit Galaktosylceramid als Substrat und zum anderen mit Psychosin ohne den Zusatz von Triton X-100 bzw. mit Zugabe des Detergenz durchgeführt.



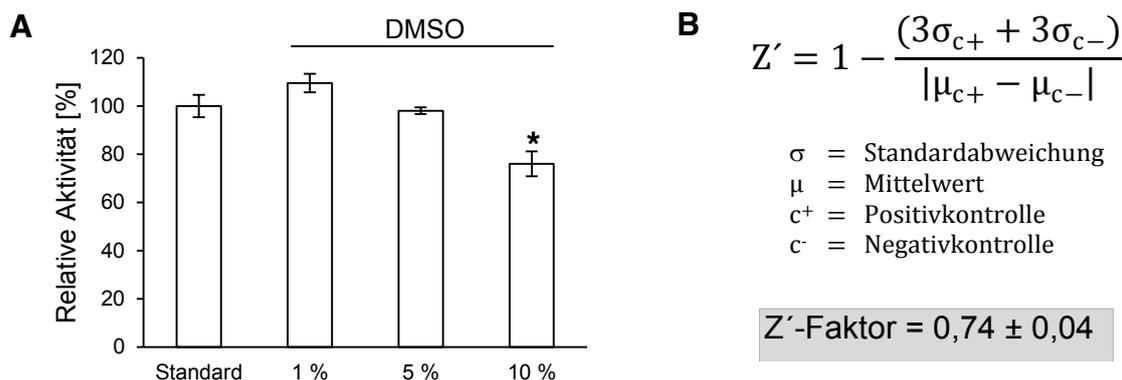
**Abb. 5-26: Psychosin als Substrat der shCST.** (A) Struktur von Galaktosylceramid und Psychosin im Vergleich. Psychosin (Galaktosylsphingosin) ist die deacylierte Form des Galaktosylceramids. (B) Dargestellt ist die relative Aktivität [%] bei Verwendung von Psychosin als Substrat bezogen auf die erhaltenen Werte unter Standardbedingungen. Standard: 20 µg Cerebroside (~ 500 µM, berechnet mit einem mittleren Molekulargewicht von 800 g/mol), mit Triton X-100/ohne Triton X-100: 500 µM Psychosin mit/ohne Zusatz von Triton X-100. Für die Auswertung der relativen Aktivität wurde die Reaktionsgeschwindigkeit [ΔF/min] über die ersten 45 min der Reaktion nach shCST-Zugabe (0,5 µg) ermittelt. (Mittelwerte ± Standardabweichungen; n = 3; \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001, ANOVA gefolgt von Dunnett-Test).

Aus den in Abb. 5-26 B dargestellten Ergebnissen wird deutlich, dass eine signifikant verminderte Aktivität beim Einsatz von Psychosin ohne Triton X-100 gemessen wurde (62,5 ± 4,6 %). Bei dem Reaktionsansatz, der sowohl Psychosin als auch das Detergenz enthielt, wurde hingegen eine signifikant höhere Aktivität gemessen (123,1 ± 20,2 %).

Zusammengefasst wurde, wie bereits radioaktiv ermittelt, nachgewiesen, dass Psychosin als Substrat der shCST fungiert. Dabei ist die fluorimetrische Aktivitätsbestimmung auch ohne den Zusatz von Triton X-100 möglich.

### 5.3.8 DMSO-Toleranz und Z'-Faktor-Bestimmung

Hinsichtlich des Ziels mit Hilfe der fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung Inhibitoren für die shCST in einem *high-throughput screening* (HTS) zu identifizieren, wurden vorab einige Versuche gemacht, um die Eignung der Methode dafür besser beurteilen zu können.



**Abb. 5-27: Vorversuche für ein *high-throughput screening* (HTS). (A)** Einfluss des DMSO-Zusatzes auf die fluorimetrische Aktivitätsbestimmung. Dargestellt ist die relative Aktivität [%] nach DMSO-Zusatz (1 %, 5 % und 10 %), bezogen auf die erhaltenen Werte unter Standardbedingungen (Standard). Für die Darstellung der relativen Aktivität wurde die Reaktionsgeschwindigkeit [ $\Delta F/\text{min}$ ] über die ersten 45 min der Reaktion nach shCST-Zugabe (0,5  $\mu\text{g}$ ) ermittelt. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen;  $n = 3$ ; \*  $p < 0,05$ , ANOVA gefolgt von Dunnett-Test). **(B)** Gleichung für die Z'-Faktor Bestimmung, in dessen Berechnung sowohl die Größe des Messfensters als auch die Standardabweichungen eingehen. Als Positivkontrolle wurde aktive shCST verwendet und als Negativkontrolle hitzeinaktiviertes Enzym. Es wurden jeweils 22 - 24 Reaktionsansätze hergestellt und gemessen. Die erhaltenen Reaktionsgeschwindigkeiten [ $\Delta F/\text{min}$ ] der ersten 45 min nach shCST-Zugabe wurden für die Berechnung des Z'-Faktors herangezogen. Abweichend vom Protokoll wurden 2  $\mu\text{g}$  Galaktosylceramid und eine Endkonzentration von 2 % DMSO eingesetzt. Des Weiteren wurden 2,2  $\mu\text{l}$  einer neu gereinigten shCST-Charge verwendet, wobei die spezifische Aktivität auf die zuvor verwendeten 0,5  $\mu\text{g}$  shCST angepasst wurde. Der ermittelte Z'-Faktor betrug 0,74  $\pm$  0,04. (Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen;  $n = 3$ ).

Da bekannt ist, dass viele Testsubstanzen aus den für HTSs verwendeten Molekülbibliotheken schwer wasserlöslich sind und somit in DMSO gelöst eingesetzt werden, wurde getestet, inwieweit der DMSO-Zusatz toleriert werden kann. Dafür wurde die gekoppelte Aktivitätsbestimmung in verschiedenen DMSO-Konzentrationen (1 %, 5 % und 10 %) durchgeführt. Bei der Betrachtung der Ergebnisse in Abb. 5-27 A, in der die relative Aktivität bezogen auf die Aktivitätsbestimmung ohne DMSO-Zusatz dargestellt ist, wird deutlich, dass der Zusatz von 1 % DMSO zu einer mit 109,5  $\pm$  3,9 % leicht höheren, jedoch nicht statistisch signifikant veränderten Aktivität führte. Der Zusatz von 5 % DMSO

hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivitätsbestimmung ( $98,0 \pm 1,3 \%$ ), während 10 % DMSO zu einer signifikanten Aktivitätsminderung auf  $76,0 \pm 5,2 \%$  führten.

Es wurde beobachtet, dass eine zunehmende DMSO-Konzentration zu höheren Ausgangsfluoreszenzwerten nach SULT1A1-Präinkubation führte, wobei die Ursache nicht geklärt werden konnte. Trotz alledem wurde durch Auswertung der Reaktionsgeschwindigkeiten der shCST-Reaktionen deutlich, dass eine DMSO-Konzentration bis mindestens 5 % keine Verminderung dieser bewirkte.

Als ein zweiter Vorversuch wurde der Z'-Faktor bestimmt, da dieser als wichtiges Kriterium gilt, um die Eignung einer Methode für das HTS potentieller Inhibitoren zu beurteilen. In die Berechnung (Abb. 5-27 B) gehen sowohl die Größe des Messfensters als auch die Standardabweichungen ein. Dabei gilt, je höher der Z'-Faktor ist, desto geeigneter ist die untersuchte Methode für ein HTS (Zhang, 1999).

Üblicherweise wird als Negativkontrolle vollständig inhibiertes Enzym eingesetzt. Da für die shCST jedoch kein geeigneter Inhibitor zur Verfügung stand, wurde hitzeinaktiviertes Enzym verwendet. Für die Bestimmung wurden jeweils 22 – 24 Reaktionsansätze (Positivkontrollen bzw. Negativkontrollen) an drei unabhängigen Tagen hergestellt und die Reaktionsgeschwindigkeiten über die ersten 45 min der Reaktionen nach shCST-Zusatz ermittelt. Es wurde unter den genutzten Bedingungen ein Z'-Faktor von  $0,74 \pm 0,04$  erreicht.

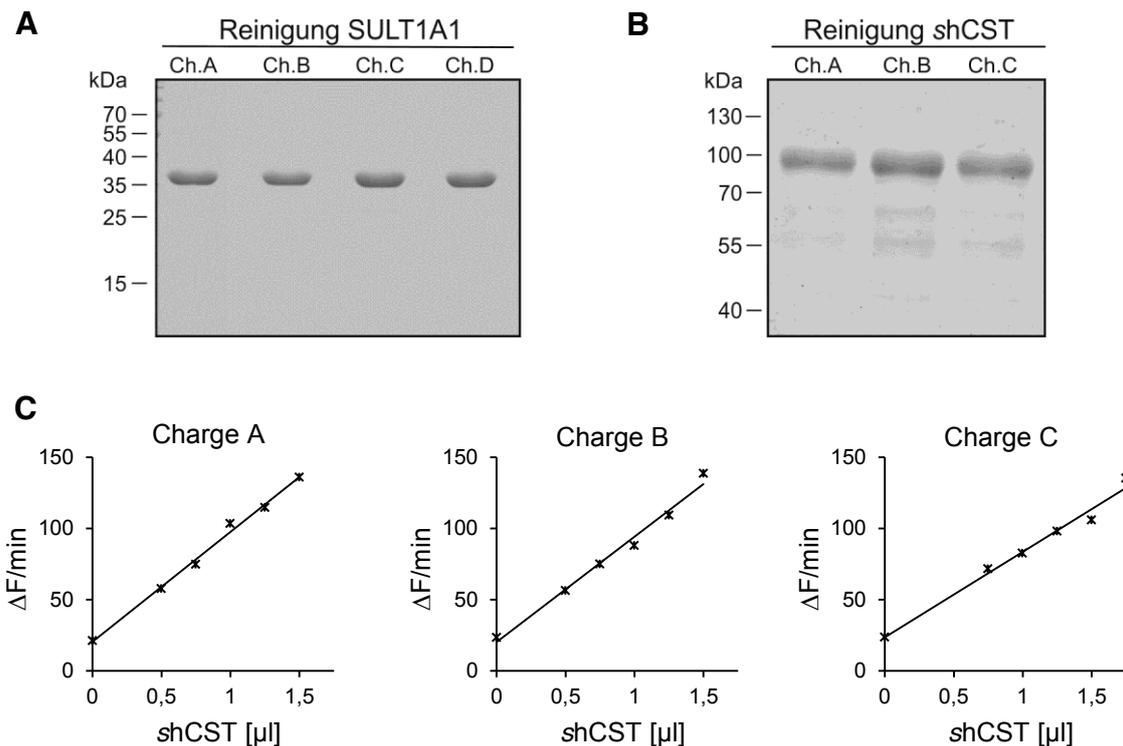
### **5.3.9 High-throughput screening**

#### **5.3.9.1 Reinigung der Enzyme**

Nachdem die Linearität der gekoppelten Reaktion und ein guter Z'-Faktor nachgewiesen worden waren und zusätzlich gezeigt werden konnte, dass eine DMSO-Konzentration bis 5 % keinen negativen Einfluss auf die shCST-Aktivität hat, sollte eine Testung potentieller Inhibitoren im Hochdurchsatz erfolgen. Die hauptsächliche Zielsetzung war dabei schlussendlich beurteilen zu können, ob die Methode für ein HTS geeignet ist.

Um eine Hochdurchsatztestung tausender Substanzen durchführen zu können, mussten dafür zunächst große Mengen der Enzyme SULT1A1 und shCST gereinigt und die spezifische Aktivität ermittelt werden. Die Reinigung der SULT1A1 erfolgte wie bereits in Abschnitt 5.3.2 dargestellt unter Verwendung einer Kobalt-Säule. Um die Reinigung größerer Ansätze möglich zu machen, wurde diese jedoch unter Verwendung der Äkta-FPLC-Anlage durchgeführt. In Abb. 5-28 A ist eine Coomassie-Färbung von vier direkt hintereinander gereinigten SULT1A1-Chargen (Ch. A – D) dargestellt. Alle vier Ansätze

wurden nach Dialyse zu einer Enzympräparation von insgesamt ca. 25 ml vereinigt. Auch für die Reinigung der shCST aus Zellkulturüberständen der CHO-S ProtA-hCST-Zelllinie wurde die Äkta-FPLC-Anlage genutzt und in drei direkt hintereinander durchgeführten Reinigungen relativ reines Enzym gewonnen, wie aus der in Abb. 5-28 B dargestellten Coomassie-Färbung eines SDS-Gels hervorgeht. Hierbei wurden 10,6 ml (Ch. A), 11,4 ml (Ch. B) bzw. 13,2 ml (Ch. C) Enzymlösung erhalten.



**Abb. 5-28: Reinigung und Charakterisierung der für ein HTS in großen Mengen benötigten Enzyme SULT1A1 und shCST.** (A) Die Reinigung der SULT1A1 erfolgte unter Verwendung einer Äkta-FPLC-Anlage. Dafür wurden je 25 % der aus 1,5 l Bakterienkultur generierten Lysate über eine Kobalt-Säule (1 ml Säulenmaterial) gepumpt und das gesamte Bakterienlysate in vier aufeinander folgenden Ansätzen gereinigt (Ch. A – D). Äquivalente Mengen (2 μl) wurden mittels SDS-PAGE gefolgt von einer Coomassie-Färbung analysiert. SULT1A1-Fusionsprotein: ~ 35 kDa. (B) Die Reinigung der shCST erfolgte unter Verwendung einer Äkta-FPLC-Anlage. Dafür wurden je ~ 2,5 l Zellkulturüberstand der CHO-S ProtA-hCST-Zellen in drei aufeinander folgenden Ansätzen gereinigt (Ch. A – C). Dabei wurde die Elution des Proteins anhand des UV-Spektrums kontrolliert, jeweils die Eluatfraktionen die CST-Protein enthielten vereinigt und dialysiert. Äquivalente Mengen (6 μl) wurden mittels SDS-PAGE gefolgt von einer Coomassie-Färbung analysiert. shCST: ~ 100 kDa. (C) Aktivitäts- und Linearitätsnachweis mit Hilfe der fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung. Dargestellt sind die Reaktionsgeschwindigkeiten [ΔF/min] gegen die shCST-Menge [μl] der unterschiedlichen Enzymchargen. Dafür wurde der Reaktionspuffer zunächst mit 1,5 μl der SULT1A1-Präparation (A) präinkubiert und anschließend mit unterschiedlichen Volumina der Ch. A/B (0 μl, 0,5 μl, 0,75 μl, 1 μl, 1,25 μl oder 1,5 μl) bzw. der Ch. C (0 μl, 0,75 μl, 1 μl, 1,25 μl, 1,5 μl oder 1,75 μl) versetzt. Die Fluoreszenzwerte wurden über 30 min gemessen und die Reaktionsgeschwindigkeiten [ΔF/min] über den Zeitraum von 10 – 30 min bestimmt. Abweichend vom Standardprotokoll wurden 2 μg Galaktosylceramid je Ansatz verwendet und mit einer Endkonzentration von 1 mM MUS gearbeitet.

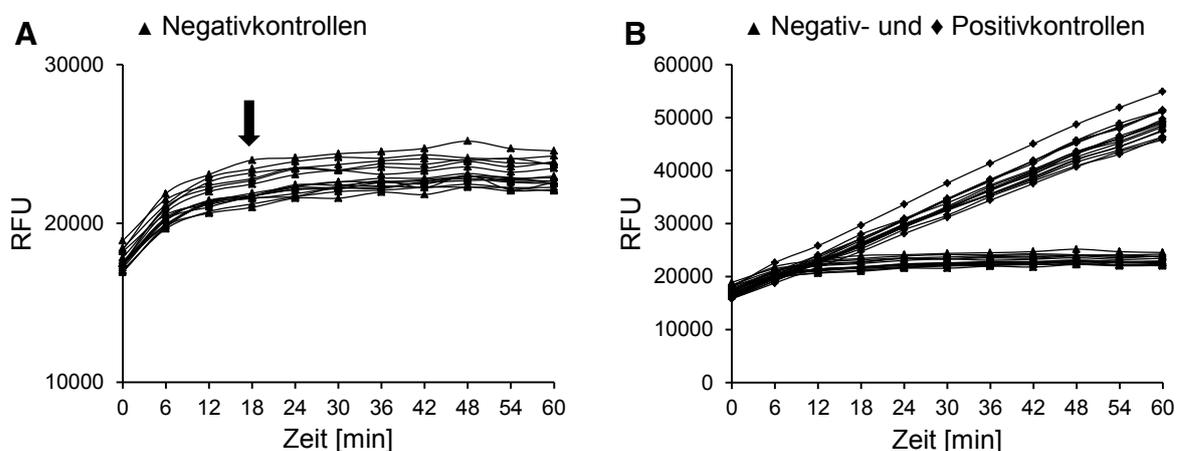
Um sicher zu stellen, dass auch bei den neu gereinigten Enzymen im linearen Bereich gearbeitet und zudem ein ausreichend hohes Fluoreszenzsignal erreicht wird, erfolgte zunächst eine nähere Charakterisierung der gereinigten Enzyme mit der gekoppelten Aktivitätsbestimmung. Dabei wurde eine konstante Menge an SULT1A1 und unterschiedliche Volumina der shCST-Chargen eingesetzt. In Abb. 5-28 C ist dargestellt, dass zwischen den Reaktionsgeschwindigkeiten und Volumina der unterschiedlichen Enzympräparationen ein linearer Zusammenhang bestand. Rein rechnerisch ergab sich somit, dass die SULT1A1-Menge für ca. 16.600 und die shCST-Menge für ca. 23.300 Reaktionsansätze bei einem Reaktionsvolumen von 50  $\mu\text{l}$  ausreichend sind. Für die Berechnung wurde eine gewünschte Reaktionsgeschwindigkeit von 120 – 130  $\Delta\text{F}/\text{min}$  zugrunde gelegt. Zusätzlich wurden zur Material- und somit Kostenreduktion niedrigere MUS- und Galaktosylceramid-Endkonzentrationen verwendet (1 mM MUS und 2  $\mu\text{g}$  Galaktosylceramid).

### 5.3.9.2 Substanz-Testung

Da im weiteren Verlauf tausende von Substanzen in einem HTS hinsichtlich ihres inhibitorischen Potentials gegenüber der shCST getestet werden sollten, wurde zunächst, um bei der Aktivitätsbestimmung an Material- und Enzymmenge zu sparen, die Aktivitätsbestimmung auf ein Endvolumen von 24  $\mu\text{l}$  (zuvor 50  $\mu\text{l}$ ) angepasst. Dies ermöglichte die Halbierung der Enzymmengen und die Durchführbarkeit im 384-*well*-Format. Dabei wurde in einem Versuch ermittelt, dass dies zu keiner erheblichen Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit [ $\Delta\text{F}/\text{min}$ ] führte. So wurde zuvor mit 1  $\mu\text{l}$  shCST der Charge A und 1,5  $\mu\text{l}$  der SULT1A1-Präparation eine Reaktionsgeschwindigkeit von 103,45 [ $\Delta\text{F}/\text{min}$ ] erreicht (vergleiche. Abb. 5-28 C, links). Bei Halbierung der Enzymmengen, Reduzierung des Endvolumens auf 24  $\mu\text{l}$  und Durchführung in einer 384-*well*-Platte wurde mit 101,6 [ $\Delta\text{F}/\text{min}$ ] demnach eine kaum veränderte Reaktionsgeschwindigkeit gemessen. Zusätzlich wurde hierbei bereits die später auch während des HTS vom Standardprotokoll leicht abgewandelte Methode angewendet. Bei dieser wurden zunächst je Reaktionsansatz 8  $\mu\text{l}$  dreifach konzentrierter SULT1A1-enthaltener Reaktionspuffer präinkubiert und im Anschluss 8  $\mu\text{l}$  shCST-Verdünnung und 8  $\mu\text{l}$  Inhibitorverdünnung zugesetzt (vergleiche Abschnitt 4.5.4.2.1). Dieses neu etablierte Pipettierschema hat den Vorteil, dass die Volumina ohne größere Abweichungen von dem Pipettierroboter pipettiert werden können, welcher in dem HTS Anwendung fand.

Die Testung der Substanzen fand in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Michael Famulok (Life & Medical Sciences (LIMES) Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) statt, die die Testsubstanzbibliothek, den Pipettierroboter inklusive dessen Bedienung und das Messgerät zur Verfügung stellte.

Während der Durchführung des HTS wurden auf jeder Mikrotiterplatte (384-well) neben 352 Reaktionsansätzen, denen die entsprechenden Testsubstanzen zugesetzt wurden, zusätzlich 16 Reaktionsansätze Positivkontrollen (nicht inhibierte shCST) und 16 Reaktionsansätze Negativkontrollen (hitzeinaktivierte shCST) pipettiert und vermessen. Nach der Messung der ersten Testplatte wurden die Auswertungskriterien festgelegt. Bei Betrachtung der sich über die Zeit ändernden Fluoreszenzwerte der 16 Negativkontrollen, wurde dabei beobachtet, dass die gemessenen Fluoreszenzwerte bis zu einer Messzeit von ca. 18 min leicht anstiegen und erst danach über den gesamten Messzeitraum (60 min) nahezu konstant blieben (Abb. 5-29 A), wobei die Fluoreszenzwerte der 16 Positivkontrollen stetig zunahmen (Abb. 5-29 B). Es wurde daher zur Auswertung der Reaktionsgeschwindigkeiten der Messzeitraum von 18 – 48 min gewählt, wobei sich für die erste Platte eine Streuung der Werte der Positivkontrollen um  $100 \pm 6,9 \%$  ergab und ein Z'-Faktor von 0,76 kalkuliert wurde.



**Abb. 5-29: Festlegung der Auswertungskriterien für das HTS.** Dargestellt sind die Fluoreszenzänderungen [RFU] über die Zeit von den 16 Reaktionsansätzen der Negativkontrollen (hitzeinaktivierte shCST) (A) bzw. Negativ- und Positivkontrollen (shCST) (B) der ersten für das HTS vermessenen 384-well-Platte. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt, ab dem die Fluoreszenzwerte der NK annähernd konstant blieben (18 min).

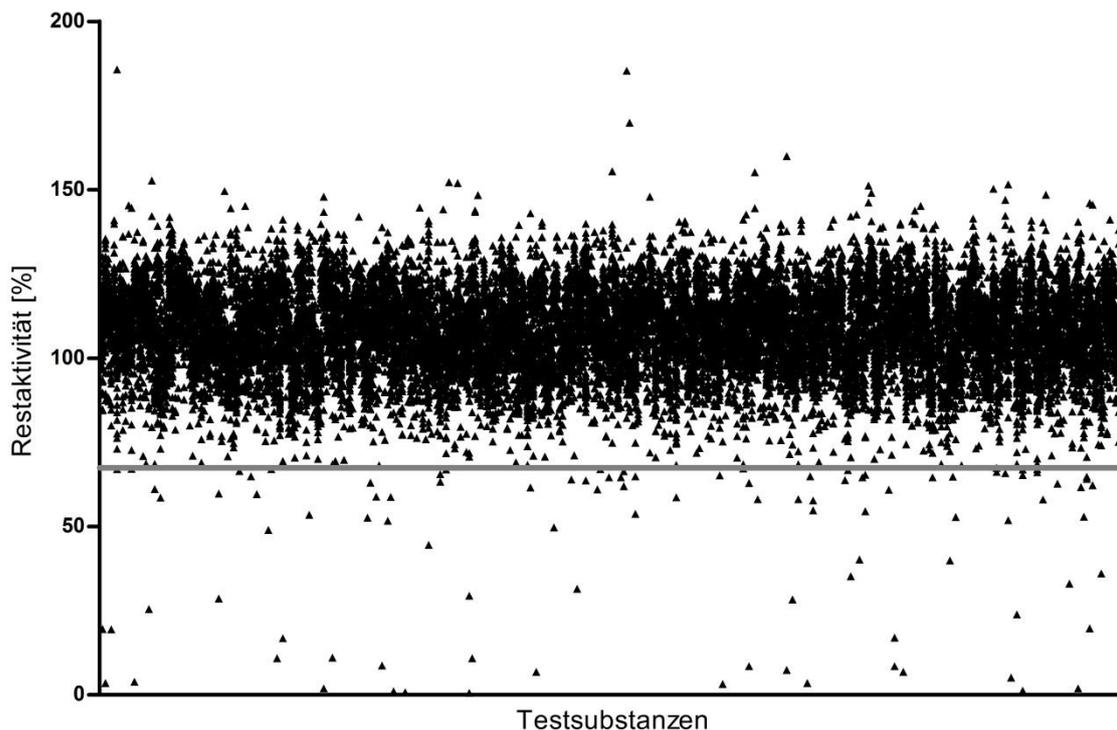
Insgesamt wurden 18.520 Substanzen in einer Endkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  (DMSO-Konzentration 2 %) im 384-well-Format (55 Platten) getestet, wobei jeweils nur Einfachbestimmungen durchgeführt wurden. Es wurde für 53 der 55 Testplatten ein Z'-

Faktor  $> 0,50$  ermittelt. Lediglich bei 2 Platten befand sich der  $Z'$ -Faktor unterhalb von  $0,50$  ( $0,47$  bzw.  $0,43$ ), was jedoch jeweils auf einen einzelnen stark abweichenden Messwert einer Negativkontrolle zu einem Zeitpunkt zurückgeführt werden konnte. Durchschnittlich wurde für alle getesteten 55 Mikrotiterplatten ein  $Z'$ -Faktor von  $0,71 \pm 0,09$  bei Auswertung mit Hilfe der Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt. Bei der Berechnung des  $Z'$ -Faktors über die Endpunkt-Auswertung (Fluoreszenzwerte nach 60 min Messzeit), ergab sich im Mittel ein  $Z'$ -Faktor von  $0,60 \pm 0,12$ , der aber bei 12 Platten nur zwischen  $0,30$  und  $0,50$  lag.

Für die Auswertung wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten bestimmt und die Restaktivität bezogen auf die Positivkontrollen der jeweiligen Testplatte berechnet. In Abb. 5-30 sind die Ergebnisse des HTS grafisch dargestellt. Dabei entspricht jeder einzelne Datenpunkt einem Reaktionsansatz, dem eine Testsubstanz zugesetzt wurde.

Obwohl alle Aktivitäten um einen Wert von  $100\%$  schwankten, wurde, wie aus Abb. 5-30 deutlich wird, im Mittel eine Aktivität in den unterschiedlichen Reaktionsansätzen bestimmt, die oberhalb des  $100\%$ -Wertes lag ( $107,9 \pm 13,5\%$ ). Zudem nahm während der gesamten Testphase die Reaktionsgeschwindigkeit innerhalb der 384-*well*-Platte von oben (Reihe A) nach unten (Reihe P) ab (nicht gezeigt). Diese erkennbaren Systematiken konnten während der Testung ursächlich nicht behoben werden.

Mit einer grauen Linie ist in Abb. 5-30 der Grenzwert ( $67,4\%$  Restaktivität) markiert, unterhalb dessen eine Substanz ein zweites Mal auf ihr inhibitorisches Potential überprüft wurde. Der Grenzwert wurde dreimal der Standardabweichung ( $3\sigma$ ) vom Mittelwert entfernt gewählt, was dem Intervall, innerhalb dessen  $99,7\%$  normalverteilter Zufallsgrößen liegen, entspricht. Die als sogenannte Primärtreffer ( $\sim 0,6\%$  der getesteten Verbindungen) erhaltenen Substanzen wurden erneut mit Hilfe der robotergestützten Methode und anschließend per Hand getestet. Nicht erneut untersucht wurden Substanzen, bei denen zwar die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten vermindert waren, von denen aber aufgrund der insgesamt erhöhten absoluten Fluoreszenzwerte vermutet wurde, dass diese lediglich Einfluss auf die Bestimmungsmethode haben (fluoreszenzaktive Substanzen). Zwei der Testsubstanzen wurden sowohl mit der fluorimetrischen als auch der radioaktiven Aktivitätsbestimmung als inhibitorisch aktiv bestätigt. Weiterführende Experimente der frisch angesetzten Reinsubstanzen konnten dies jedoch in dem Ausmaß zunächst nicht bestätigen. Es bedarf daher näherer Untersuchungen, die bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht durchgeführt wurden.



**Abb. 5-30: High-throughput screening einer Bibliothek mit 18.520 Testsubstanzen.** Dargestellt ist die Restaktivität [%] der shCST in dem jeweiligen Reaktionsansatz, wobei jeder Datenpunkt einer Testsubstanz zugeordnet werden kann. Für die Auswertung wurden die gemittelten Reaktionsgeschwindigkeiten der Positivkontrollen der entsprechenden 384-well-Platte als 100 %-Wert festgelegt. Mit einer grauen Linie ist die Restaktivität von 67,4 % markiert, welche als Grenzwert für eine zweite Untersuchung der potentiellen Inhibitoren festgesetzt wurde. Zehn Datenpunkte liegen außerhalb des dargestellten Bereichs von 0 – 200 %. Die Testung der Substanzen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Michael Famulok (Life & Medical Sciences (LIMES) Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) durchgeführt, die die Testsubstanzbibliothek, den Pipettierroboter inklusive dessen Bedienung und das Messgerät zur Verfügung stellte.

## 6 Diskussion

### 6.1 SRT als mögliche Behandlungsstrategie für MLD

Die pathophysiologischen Effekte der lysosomalen Speichererkrankung MLD werden durch die Akkumulation des Lipids Sulfatid verursacht, was auf eine fehlende Aktivität des für die Degradation benötigten Enzyms ASA zurückgeführt werden kann. Ein Hauptkennzeichen der Erkrankung ist die fortschreitende Demyelinisierung mit einer starken ZNS-Beteiligung (von Figura *et al.*, 2001). Bisher existiert keine spezifische Therapie, sondern die Schmerz- und Symptombehandlung steht im Vordergrund. EET konnte bereits bei verschiedenen lysosomalen Speichererkrankungen erfolgreich eingesetzt werden (Desnick und Schuchman, 2012), zeigt jedoch eine beschränkte Wirksamkeit, wenn das ZNS involviert ist. Dies kann durch das Vorhandensein der Blut-Hirn-Schranke begründet werden, deren Überwindung durch ein Enzym nahezu unmöglich ist (Pardridge, 2003).

Die Enzyme CGT und CST spielen eine entscheidende Rolle bei der Synthese (vergleiche Abb. 2-6) des in MLD-Patienten akkumulierenden Metaboliten Sulfatid. Dabei katalysiert die CGT die Übertragung des Galaktose-Rests auf Ceramid und die CST transferiert die Sulfatgruppe auf das gebildete Galaktosylceramid. Wie in der Einleitung dargestellt (vergleiche Abschnitt 2.6), wird die SRT als Behandlungsansatz in der Literatur als vielversprechend für zahlreiche lysosomale Speichererkrankungen mit hoher ZNS-Beteiligung bewertet. Sowohl die CGT als auch die CST stellen potentielle Zielmoleküle zur Hemmung der Sulfatidsynthese durch spezifische Inhibitoren dar. Durch die CST wird hierbei der letzte Schritt katalysiert. Der Angriff würde somit auf einer späten Stufe der Lipidsynthese erfolgen, was weniger unerwünschte Nebeneffekte erwarten lässt. Eine Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Grundlagen für die Identifizierung von Inhibitoren der CST zu schaffen. Es werden große Mengen des Enzyms benötigt, um eine detaillierte Strukturanalyse und die Testung auf spezifische Inhibitoren durchzuführen. Inwiefern SRT bei MLD ein sinnvoller Ansatz ist, wird jedoch kontrovers diskutiert und einige Aspekte sollen im Folgenden dargestellt werden.

Tiermodelle helfen oft, ein besseres Verständnis verschiedener biochemischer und pathologischer Vorgänge zu erhalten. So kann in CST-defizienten Mäusen kein Sulfatid im Gehirn nachgewiesen werden. CST-heterozygote Tiere zeigen zwar eine um ca. 50 % verminderte CST-Aktivität im Gehirn, was aber nicht mit reduzierten Sulfatidmengen

einhergeht (Honke *et al.*, 2002). Es könnte somit spekuliert werden, dass eine Inhibition der CST um bis zu 50 % zu keiner Verminderung der Sulfatidspeicherung und folglich Verbesserung des Phänotyps in MLD-Patienten führt. Zusätzlich wurde für die CST-defizienten Mäuse gezeigt, dass diese einen schwerwiegenden Phänotyp aufweisen. Die Tiere werden gesund geboren, beginnen aber in einem Alter von sechs Wochen fortschreitende neurologische Defizite zu entwickeln und überleben nur für gut ein Jahr (Honke *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu wurde in CST-transgenen ASA-defizienten Mäusen zwar eine ca. 60-fach höhere CST-Aktivität gegenüber Wildtypmäusen gemessen, was jedoch nicht mit einer entsprechend erhöhten Sulfatidmenge korrelierte (Ramakrishnan *et al.*, 2007). Diese Beobachtungen könnten den therapeutischen Ansatz einer SRT durch Hemmung des Enzyms als wenig sinnvoll erscheinen lassen, da veränderte CST-Aktivitäten nur einen geringen Einfluss auf den Sulfatidgehalt hatten. Hierfür könnten verschiedene Gründe verantwortlich sein. Zum einen kann die Sulfatidsynthese durch die vorhandenen Galaktosylceramidmengen begrenzt sein. Zum anderen ist ein direkter oder indirekter negativer Rückkopplungsmechanismus des gebildeten Sulfatids denkbar. Weiterhin kann die subzelluläre Lokalisation der CST einen entscheidenden Einfluss haben. Es konnte auch in innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Zellversuchen gezeigt werden, dass zwar die Aktivität der im Golgi-Apparat und im ER lokalisierten CST nicht signifikant unterschiedlich war, aber ein Großteil des Enzym nach Überexpression falsch lokalisiert im ER vorlag (vergleiche Abschnitt 6.2). Somit könnte die ER-Lokalisation der CST nach Überexpression auch ein denkbarer Erklärungsansatz für die oben aufgezeigte Diskrepanz der *in vitro* bestimmten CST-Aktivität und den Sulfatidmengen in den CST-transgenen ASA-defizienten Mäusen sein. Es ist leicht vorstellbar, jedoch noch nicht hinreichend geklärt, dass die Synthese und der Abbau von Myelinlipiden stark reguliert wird. Dabei müssen, um eine stabile Myelinscheide zu erhalten, die beteiligten Komponenten innerhalb eines engen Konzentrationsbereiches vorhanden sein, wobei dessen Einhaltung durch übergeordnete Regulationsmechanismen gewährleistet werden könnte, die ein besseres und komplexeres Verständnis der Vorgänge erfordern.

Es konnte auch gezeigt werden, dass eine Feinregulation des Sulfatidgehalts im Myelin durch die CST wichtig für die normale Funktion von myelinisierten Axonen ist. Bei CST-heterozygoten Mäusen konnten Hayashi und Mitarbeiter (2013) reduzierte Sulfatidmengen in den Ischiasnerven bestimmen, wobei eine starke Heterogenität innerhalb der Tiere sichtbar wurde. Eine Korrelation zwischen der Nervenleitgeschwindigkeit und dem Sulfatidgehalt im Ischiasnerv wurde demonstriert (Hayashi *et al.*, 2013). Diese Daten lassen, im Gegensatz zu den oben aufgezeigten

Beobachtungen, einen Einfluss der CST auf Sulfatidmenge und Nervenfunktion vermuten. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die nur eine funktionelle Kopie des CGT-Gens aufweisen, verminderte Galaktosylceramid- und Sulfatidmengen haben (Bosio *et al.*, 1996b; Coetzee *et al.*, 1996). Eine Kreuzung dieser mit den ASA-defizienten Tieren lieferte CGT-heterozygote ASA-defiziente Mäuse, denen neben dem für den Abbau des Sulfatid verantwortlichen Enzym ASA eine funktionelle Kopie des Galaktosylceramid-synthetisierenden Enzyms CGT fehlt. Gegenüber den nur ASA-defizienten Tieren zeigen diese zwar keine verminderte Sulfatidspeicherung, jedoch ist die neuronale Degeneration von Zellen im Spiralganglion des Innenohrs reduziert und die Tiere weisen in Verhaltenstests einen verbesserten Phänotyp auf (Franken *et al.*, 2006). Da eine geringe, aber deutlich erkennbare Abschwächung des Krankheitsverhaltens gezeigt werden konnte, lässt dies einen positiven Einfluss der SRT bei MLD-Patienten möglich erscheinen. Die Annahme, dass die Inhibition der CST eventuell zu einer Akkumulation der Substrate führt, könnte anhand von Untersuchungen an CST-defizienten Mäusen entkräftet werden. Es wurden bei diesen keine signifikanten Änderungen der Glykolipidzusammensetzungen und insbesondere der Galaktosylceramidmengen gefunden (Honke *et al.*, 2002).

Zusammengenommen konnten, wie in der Einleitung beschrieben, positive Effekte der SRT in verschiedenen lysosomalen Speichererkrankungen gezeigt werden und es ließen sich durch Kombination mit anderen Therapieformen synergistische und additive Effekte erzielen (vergleiche Abschnitt 2.6). Dies könnte ebenso für MLD gelten. Eine vollständige Vorhersage des humanen Phänotyps basierend auf Mausmodellen kann nicht getroffen werden. Dies verdeutlichen auch die existierenden MLD-Mausmodelle, die bereits in der Einleitung dargestellt wurden (vergleiche Abschnitt 2.5). So weisen ASA-defiziente Mäuse zwar eine ähnliche Gewebeverteilung der Sulfatidspeicherung wie MLD-Patienten auf, der Phänotyp der Tiere fällt jedoch aufgrund einer fehlenden Demyelinisierung deutlich milder aus und spiegelt nicht die Schwere der humanen Erkrankung wider (Hess *et al.*, 1996; Gieselmann *et al.*, 1998; D'Hooge *et al.*, 2001; Wittke *et al.*, 2004). Um für die Behandlung der schwerwiegenden Erkrankung MLD eine Therapiemöglichkeit zu eröffnen, sollte daher die Entwicklung einer SRT verfolgt werden.

Die weitere Diskussion gliedert sich in vier Abschnitte. Zunächst wird dargestellt, welche möglichen Ursachen dazu führen, dass es bislang nicht gelang, größere Mengen der CST in löslicher Form zu exprimieren. Im zweiten Teil wird diskutiert, wie durch die Generierung löslicher Fusionsproteine, aktives Enzym nach Expression in CHO-Zellen gewonnen werden konnte. Im dritten Teil wird auf eine innerhalb der Arbeit entwickelte

hochdurchsatzfähige Aktivitätsbestimmung der CST eingegangen und zuletzt ein Ausblick gegeben, wie erste innerhalb dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen die Identifizierung von Inhibitoren möglich machen könnten.

## 6.2 ER-Retention der CST

Die CST ist ein Typ II-Transmembranprotein des Golgi-Apparates (Tennekoon *et al.*, 1983). Für die Produktion größerer Mengen der CST ist die Expression einer löslichen Form wünschenswert, was eine leichtere und effizientere Reinigung ermöglicht. Es wurde bereits von van Zyl (2009) beschrieben, dass verschiedene Ansätze, dieses Ziel zu erreichen, nicht erfolgreich waren. So wurden verschiedene Konstrukte generiert und deren Sekretion in das Medium transfizierter CHO-Zellen untersucht. Durch das Entfernen der Transmembrandomäne (AS 1 – 36) bei gleichzeitiger Fusion des Interleukin-2-Signalpeptids konnte keine Sekretion in den Zellkulturüberstand beobachtet werden. Ebenso führten weitere Verkürzungen ausgehend vom N-Terminus bis zur AS 51 zu keinem effektiven Transport aus der Zelle. Zuletzt lieferte auch die Expression von Fusionsproteinen bestehend aus der luminalen Domäne der CST und der Acetylcholinesterase bzw. der sekretorischen alkalischen Phosphatase, welche Proteine sind, von denen bekannt ist, dass diese effektiv sekretiert werden, keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Dabei wurde dieser Umstand auf die Retention des Enzyms im ER zurückgeführt (van Zyl, 2009).

Es wurde bereits postuliert, dass für die ER-Retention der CST die luminalen Domäne verantwortlich ist (van Zyl, 2009). So wurde ein Fusionsprotein bestehend aus der Transmembrandomäne der CST und EGFP effizient in den Golgi-Apparat transportiert (Yaghootfam *et al.*, 2007), während das Fusionsprotein bestehend aus der vollständigen CST und EGFP im ER lokalisiert vorlag (van Zyl, 2009). Auch eine Fusion der aminoterminalen Membran-Domäne des Plasmamembran-Proteins Dipeptidylpeptidase IV und der luminalen Domäne der CST führte zu einer ER-Retention (van Zyl, 2009).

Um diese Beobachtung näher zu untersuchen, wurden CHO-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für die EGFP-Fusionsproteine der vollständigen murinen CST bzw. nur der TM-Domäne dieser kodieren. Durch Immunfluoreszenzanalysen wurde bestätigt, dass die CST ohne luminalen Domäne effizient in den Golgi-Apparat transportiert wurde, während das vollständige CST-Fusionsprotein überwiegend im ER lokalisiert war (Abb. 5-1). Es bestätigte sich dadurch, dass die luminalen Domäne der CST für die ER-Retention

verantwortlich ist. Interessanterweise wurde zusätzlich deutlich, dass die ER-Lokalisation mit steigenden Expressionsmengen der CST zunahm. Somit befand sich in Zellen, in denen nur geringe Mengen des Enzyms exprimiert wurden, dieses überwiegend im Golgi-Apparat, während eine überwiegende ER-Retention in stark exprimierenden Zellen zu sehen war (Abb. 5-1). Eine mögliche Schlussfolgerung ist, dass eine Überexpression der CST in CHO-Zellen die ER-Retention bedingt und diese mit der Expressionsmenge des Proteins zunimmt. Auch in CHO-Sulf-Zellen, einer stabil mit der CST und CGT transfizierte CHO-Zelllinie (Eckhardt *et al.*, 2002), wurde eine ER-Lokalisation der CST in Immunfluoreszenzanalysen aufgezeigt (Abb. 5-2 A).

Ausgehend von den bisherigen Befunden wurden zwei mögliche Hypothesen für die ER-Retention der CST nach Überexpression aufgestellt. Die erste geht davon aus, dass das Enzym fehlgefaltet und in aggregierter Form im ER vorliegt und somit nicht effizient in den Golgi-Apparat transportiert wird. Es ist bekannt, dass am rauen ER synthetisierte Proteine einer strikten Qualitätskontrolle unterliegen. Nur Proteine, welche korrekt gefaltet sind, werden für den Transport in die Zielkompartimente freigegeben. Dahingegen verbleiben viele Proteine im ER, die noch nicht richtig prozessiert wurden, nicht vollständig oder fehlgefaltet sind oder als Aggregate vorliegen (Hurtley und Helenius, 1989; Ellgaard, 1999). Bei einer Fehlfaltung ist von einem deutlichen Aktivitätsverlust des Enzyms auszugehen. Um dies näher zu untersuchen, wurde zunächst zur Trennung von ER und Golgi-Apparat eine Dichtegradientenzentrifugation mit CHO-Sulf-Zellen etabliert und durchgeführt. Mit Hilfe von Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung eines Iodixanol-Gradienten eine erfolgreiche Separation erreicht wurde (Abb. 5-2 B). Diese Methode bestätigte quantitativ, dass ein Großteil der CST im ER lokalisiert vorlag. Eine Bestimmung der spezifischen Aktivität des Enzyms in den unterschiedlichen Organellen zeigte eine tendenziell höhere, aber nicht signifikant unterschiedliche relative spezifische Aktivität des Enzyms im Golgi-Apparat gegenüber des im ER lokalisierten Proteins (Abb. 5-2 C). Da auch in diesem Kompartiment eine hohe relative spezifische CST-Aktivität ermittelt werden konnte, lässt sich schlussfolgern, dass die ER-Retention nicht auf eine vollständige Fehlfaltung bzw. Aggregation des überexprimierten Proteins zurückzuführen ist.

Die zweite Hypothese zur Erklärung der ER-Retention der CST bei Überexpression ist, dass möglicherweise ein zusätzliches Protein (Export-Faktor) für den effizienten ER-Golgi-Transport notwendig ist. So wäre denkbar, dass das partielle Fehlen dieses Proteins in dem genutzten Expressionssystem (CHO-Zellen) den limitierenden Faktor für den ER-Export bei Überexpression der CST darstellt. Es konnte bereits für andere

Enzyme gezeigt werden, dass für den vollständigen Transport zum Golgi-Apparat die Koexpression eines weiteren Proteins essentiell ist. So wurde beispielsweise für das Enzym Pipe, welches ein Typ II-Transmembranprotein des Golgi-Apparates aus *Drosophila melanogaster* mit Homologie zu der Heparansulfat-2-O-Sulfotransferase aus Säugetieren ist, beschrieben, dass dieses das Protein Wind, ein PDI-verwandtes Protein, für den effizienten Transport aus dem ER benötigt. Sowohl durch *in vitro* als auch *in vivo* Untersuchungen wurde gezeigt, dass für die korrekte Lokalisation von Pipe das Wind-Protein benötigt wird (Sen *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2003; Barnewitz *et al.*, 2004). Ein weiteres Beispiel ist das normalerweise im Golgi-Apparat lokalisierte Enzym  $\beta$ 1,4-N-Acetylgalaktosaminyltransferase (GalNAcTB), ebenfalls aus *Drosophila melanogaster*, für dessen Aktivität und Translokation in den Golgi-Apparat ebenfalls ein weiteres Protein notwendig ist. Dabei handelt es sich um GalNAcTB pilot (GABPI), ohne dessen Koexpression GalNAcTB in einer inaktiven Form im ER verbleibt. Werden die Proteine hingegen zusammen exprimiert, führt dies zu einer Translokation in den Golgi-Apparat (Johswich *et al.*, 2009; Kraft *et al.*, 2011).

Wie bereits erwähnt, wäre es, ausgehend von den bisherigen Befunden, auch für die CST möglich, dass solch ein Export-Faktor zu einem effizienteren Transport aus dem ER führt. Ein solcher Faktor könnte durch einen Expressionsklonierungsansatz oder die Analyse von mit der CST interagierenden Proteinen identifiziert werden.

Für die Existenz eines zusätzlich benötigten Faktors sprechen auch die bereits erläuterten Befunde aus den Analysen CST-transgener ASA-defizienter Mäuse (vergleiche Abschnitt 6.1), bei denen erhöhte CST-Aktivitäten nicht mit den entsprechenden Sulfatidmengen korrelierten. Dies lässt übergeordnete Regulationsmechanismen bzw. zusätzlich benötigte Proteine vermuten.

### 6.3 Produktion und Reinigung löslicher CST

Bisherige Versuche, lösliche CST in größeren Mengen zu produzieren, führten zu keinem Erfolg (vergleiche Abschnitt 6.2). Daher war ein primäres Ziel dieser Arbeit, die Produktion größerer Mengen aktiven und löslichen Enzyms und die anschließende Reinigung aus Zellkulturüberständen zu ermöglichen. Als Expressionssystem sollten eukaryotische Zellen genutzt werden, da beide innerhalb der murinen CST vorhandenen potentiellen N-Glykosylierungsstellen (Asn-312/Asn-66) für eine vollständige katalytische Aktivität von Bedeutung sind (Eckhardt *et al.*, 2002). Es wurden CHO-Zellen gewählt, da diese eine einfache Kultivierung und Handhabbarkeit gewährleisten.

Bereits publizierte Daten zeigen, dass CHO-Zellen, welche stabil die CGT exprimierten und zusätzlich stabil mit dem Plasmid pPROTA-CST transfiziert worden waren, lösliches Enzym in den Zellkulturüberstand sekretierten (Eckhardt *et al.*, 2002). Dies konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden (Abb. 5-5). Das Plasmid pPROTA-CST kodiert für ein Fusionsprotein, bestehend aus dem Signalpeptid von Transin, der IgG-Bindedomäne von Protein A, einer EK-Schnittstelle und der luminalen Domäne muriner CST (ab AS 39). Es wurde bereits postuliert, dass unter Verwendung des pPROTA-Vektors die Expression und Sekretion von Protein A-Fusionsproteinen in eukaryotischen Zellen ermöglicht wird und eine anschließende Reinigung des Proteins mit Hilfe einer IgG-Chromatographie durchgeführt werden kann (Sanchez-Lopez *et al.*, 1988). Das beschriebene CST-Fusionsprotein wurde in der Arbeit nähergehend untersucht. Zunächst wurde dieses und ein analoges Fusionsprotein ohne den Protein A-Teil verglichen. Es wurde festgestellt, dass sich die CST-Gesamtaktivitäten in Lysaten und Zellkulturüberständen von CHO-Zellen, die mit den beiden Konstrukten transfiziert worden waren, nicht signifikant unterschied (Abb. 5-4 C). Es konnte aber mit  $21,24 \pm 1,68 \%$  gegenüber  $10,16 \pm 0,74 \%$  ein signifikant höherer Anteil der CST-Aktivität in den Zellkulturüberständen jener Zellen detektiert werden, die das Protein A enthaltende Fusionsprotein exprimierten (Abb. 5-4 D). Nicht vollständig ausgeschlossen werden kann jedoch, dass die Unterschiede auf verschiedene Expressionsmengen zurückzuführen sind, da die Western Blot-Signale der beiden Fusionsproteine nicht vergleichbar sind (Abb. 5-4 B). Dies geht auf eine extreme Signalverstärkung durch den IgG-bindenden Teil innerhalb des Protein A-Teils des einen Fusionsproteins zurück. Da jedoch mehr aktives Enzym im Überstand von Zellen, die mit dem Plasmid pPROTA-CST transfiziert worden waren, detektiert wurde, führte dies zu dem Entschluss mit diesem Fusionsprotein weiter zu arbeiten. Ob der Protein A-Teil hierbei tatsächlich zu einem effizienteren Transport aus der Zelle führt oder lediglich Einfluss auf die Stabilität des Enzyms im Zellkulturüberstand hat, wurde nicht untersucht.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde neben dem löslichen Fusionsprotein, welches die luminal Domäne der murinen CST (sCST) enthält, das analoge humane Konstrukt kloniert und näher untersucht. Auch das humane Fusionsprotein ohne TM-Domäne (shCST) konnte in CHO-Zellen exprimiert werden und wies enzymatische Aktivität auf (Abb. 5-8). Es wurden jedoch deutliche Unterschiede zwischen dem murinen und dem humanen Fusionsprotein festgestellt. Zum einen wurde nach transienter Transfektion in CHO-Zellen eine mit  $7,70 \pm 5,73$  pmol Sulfatid/h/ $\mu$ g Gesamtprotein höhere CST-Gesamtaktivität in den Proben gemessen, die das humane Fusionsprotein enthielten (Abb. 5-8 C), gegenüber jenen, die das murine Fusionsprotein enthielten, mit einer Aktivität von  $0,87 \pm 0,13$  pmol Sulfatid/h/ $\mu$ g Gesamtprotein (Abb. 5-4 C). Auch der Anteil

von aktivem, sekretiertem humanen Enzym war mit  $75,83 \pm 9,40$  % signifikant größer (Abb. 5-8 D), im Vergleich zu dem murinen Fusionsprotein mit nur  $21,24 \pm 1,68$  % im Zellkulturüberstand (Abb. 5-4 D). Diese Unterschiede ließen bereits eine effizientere Produktion von shCST erwarten und führten zu dem Entschluss, eine stabil transfizierte CHO-Zelllinie (CHO ProtA-hCST) zu generieren (Abb. 5-11 A). Um große Mengen sCST und shCST zu produzieren, sollten Suspensionszelllinien verwendet werden. Um diese zu erhalten, wurden die bereits stabil transfizierten adhären Zellen CHO ProtA-CST und CHO ProtA-hCST erfolgreich an das Wachstum unter serumfreien Bedingungen angepasst. Dies vereinfacht die Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine (Sinacore *et al.*, 2000). Die Kultivierung erfolgt mit deutlich höheren Zelldichten im Vergleich zu adhären Zellen, was zu einer höheren Proteinkonzentration im Medium führt. Zudem wird die praktische Durchführung erleichtert, da für das Verdünnen der Zellen der Einsatz von Trypsin entfällt. Weiterhin können Suspensionszellen in serumfreiem Zellkulturmedium wachsen. Dies macht die Reinigung des exprimierten und in den Überstand sekretierten Proteins einfacher, da von vornherein weniger andere Proteine im Medium enthalten sind.

Ebenso wie bei den adhären Zellen wurde auch bei den Suspensionszellen bestätigt, dass ein großer Anteil der exprimierten Fusionsproteine in aktiver Form in den Zellkulturüberstand sekretiert wurde. Hierbei konnte weiterhin eine Diskrepanz zwischen murinem und humanem Enzym festgestellt werden. So unterschieden sich die neu generierte CHO-S ProtA-CST-Zelllinie morphologisch nicht sichtbar von den Wildtyp-Suspensionszellen. Dagegen zeigten Zellen, die das humane Enzym exprimierten, einen deutlich anderen Phänotyp. Die Zellen wuchsen nicht, wie erwartet, in kleinen, traubenförmigen Zellverbänden, sondern in großen Zellklumpen, die makroskopisch sichtbar waren (Abb. 5-11 B). Dennoch konnte bei dieser Zelllinie eine deutlich (ca. zehnfach) höhere CST-Aktivität im Zellkulturüberstand gegenüber den das murine Fusionsprotein exprimierenden Suspensionszellen ermittelt werden (Abb. 5-14). Die Fragestellung, inwieweit der Phänotyp der Zellen und die Expressionsmenge bzw. die Aktivität des Enzyms in einen Zusammenhang gestellt werden können, wurde in dieser Arbeit nicht weiter verfolgt, könnte jedoch einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen darstellen. Es konnte nicht geklärt werden, ob die höheren Enzymaktivitäten im Zellkulturüberstand auf eine höhere spezifische Aktivität des humanen gegenüber dem murinen Enzym oder unterschiedliche Expressionsmengen zurückzuführen ist. Die Tatsache, dass die spezifische Aktivität gemessen in einer humanen renalen Zelllinie mit  $1,2$  U/mg (Honke *et al.*, 1996) deutlich höher war als die

des Enzyms aus Mausgehirn mit 0,05 mU/mg (Sundaram und Lev, 1992), lässt zumindest vermuten, dass Unterschiede in der spezifischen Aktivität eine Rolle spielen könnten.

Durch Einfügen des großen Protein A-Teils zwischen dem Signalpeptid von Transin und der luminalen Domäne der murinen bzw. humanen CST konnte somit ein Fusionsprotein generiert werden, welches die Sekretion von löslichem Enzym in den Zellkulturüberstand von CHO-Zellen ermöglicht. Dieses warf jedoch die Frage auf, inwieweit dieser große Teil des Fusionsproteins einen Einfluss auf die katalytische Aktivität der CST hat. Die bis zum jetzigen Zeitpunkt durchgeführten Experimente lassen den Schluss zu, dass keine nennenswerte Beeinflussung vorliegt. Zum einen wurde gezeigt, wie bereits zuvor diskutiert, dass eine annähernd gleiche Gesamtaktivität in sCST-exprimierenden Zellen und in solchen, die ein entsprechendes Fusionsprotein ohne den Protein A-Teil exprimierten, gemessen wurde. Zum anderen konnte in einer Bestimmung für das murine Enzym und das Substrat PAPS ein  $K_M$ -Wert von  $0,26 \pm 0,07 \mu\text{M}$  (Abb. 5-6) und für das humane Enzym und PAPS ein  $K_M$ -Wert von  $0,55 \pm 0,06 \mu\text{M}$  (Abb. 5-25) ermittelt werden. Vergleiche aus der Literatur für CSTs aus verschiedenen Nagerspezies und Geweben liefern Werte zwischen  $0,45 \mu\text{M}$  –  $5,2 \mu\text{M}$  (Lin und Horowitz, 1982; Tennekoon *et al.*, 1985; Sundaram und Lev, 1992) bzw.  $104 \mu\text{M}$  (Sakac *et al.*, 1992). Trotz der starken Heterogenität der Daten lag der  $K_M$ -Wert von sCST bzw. shCST und PAPS in dieser Größenordnung, was als ein Indiz für die nicht wesentliche Beeinflussung der katalytischen Aktivität durch den Protein A-Teil angesehen wurde.

Wie bereits zu Beginn dieses Abschnittes angeführt, befindet sich vor der luminalen Domäne der CST innerhalb der Fusionsproteine sCST und shCST eine EK-Schnittstelle. Die EK ist eine Serinprotease, welche hinter der Aminosäuresequenz  $[\text{Asp}]_4\text{-Lys}$  spaltet. In ersten Versuchen wurde demonstriert, dass diese Schnittstelle innerhalb des humanen Proteins funktionell ist (Abb. 5-16). Ein Aktivitätsverlust durch die Spaltung scheint nicht einzutreten, was aber durch weitere Experimente noch näher analysiert werden muss. Insgesamt lassen die Befunde den Schluss zu, dass das enzymatische Entfernen des Tags nach der Reinigung möglich ist. Sollte daher in weiteren Untersuchungen ermittelt werden, dass der Protein A-Teil einen nicht gewünschten Einfluss hat, könnte dies durch Spaltung des Proteins umgangen werden. Zudem könnte diese Methode Anwendung finden, falls eine Kristallisation des Enzyms ohne den Protein A-Teil erfolgen soll.

Eine große Bedeutung innerhalb der Arbeit kam neben der Produktion löslicher CST, der Reinigung dieser aus den Zellkulturüberständen in aktiver Form zu. Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression, Sekretion und Reinigung verschiedener Glykosyltransferasen und auch Sulfotransferasen nach Einfügen eines Protein A-Tags

möglich ist (Bierhuizen und Fukuda, 1992; Sasaki *et al.*, 1993; Nakayama und Fukuda, 1996; Zeng *et al.*, 1997; Ong *et al.*, 1998). Die Reinigung der CST-Fusionsproteine erfolgte unter Verwendung von IgG-Sepharose. Schrittweise wurde der Reinigungsvorgang näher analysiert und optimiert. So wurde zunächst aus den Überständen der adhärenen CHO ProtA-CST-Zellen murines Fusionsprotein gereinigt. Es konnten unter den gewählten Bedingungen 0,045 mg murines Fusionsprotein aus einem Liter Zellkulturüberstand gewonnen werden (Abb. 5-9). Die Reinheit des Enzyms wurde jedoch als unzureichend bewertet. Wie bereits oben beschrieben, wurden zur Produktion löslicher CST Suspensionszelllinien generiert, welche unter serumfreien Bedingungen kultiviert wurden. Dies führte zu einem deutlich niedrigeren Proteingehalt im Medium und ließ somit die Gewinnung reineren Enzyms erwarten. Mit Hilfe des Batch-Verfahrens konnte die Ausbeute von humanem Enzym der Suspensionszellen auf 0,25 mg / l verbessert werden, was auch mit einer höheren Reinheit einherging (Abb. 5-12). Bei einer anschließenden Reinigung im präparativen Maßstab konnte ohne Einbußen der Reinheit, sogar 1,7 mg / l shCST gewonnen werden (Abb. 5-15). Für die Diskrepanz zu den mit dem Batch-Verfahren erhaltenen Mengen könnten verschiedene Ursachen denkbar sein: Die Durchführung im Batch-Verfahren führte zu höheren Verlusten, da hierbei mit Zentrifugationsschritten und Abnehmen der jeweiligen Überstände während des Reinigungsvorgangs gearbeitet wurde. Des Weiteren wurden für die Reinigung, in der weniger shCST erhalten wurde, zu etwa der Hälfte Überstände aus der Kultivierung in Miniperm-Bioreaktoren verwendet, für die in dieser Arbeit ein schlechteres Wachstum der Zellen gezeigt werden konnte. Und zuletzt wurden die in den Überständen enthaltenen Proteine für die Langzeitlagerung mit Ammoniumsulfat gefällt und das präzipitierte Enzym vor dem Reinigungsvorgang verschiedenen Behandlungsmethoden unterzogen, was einen größeren Verlust des Proteins auf verschiedenen Stufen nicht ausschließen lässt. Zusammengefasst lässt sich jedoch festhalten, dass sich durch die Etablierung einer halbautomatischen Methode mindestens 1,7 mg shCST aus einem Liter Zellkulturüberstand reinigen ließen.

Die Ausbeute sollte allerdings noch weiter zu verbessern sein. Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil des murinen Fusionsproteins in den Zellkulturüberständen der Suspensionszelllinien in höhermolekularen Komplexen vorliegt (Abb. 5-10) und diese nur wenig CST-Aktivität aufweisen. Zudem scheinen die höhermolekularen Proteinaddukte nicht an IgG-Sepharose zu binden, was auf eine Denaturierung der enthaltenen Fusionsproteine hinweisen könnte. Dafür spricht ebenfalls, dass in Western Blot-Analysen sichtbar wurde, dass nur ein sehr geringer Anteil des Fusionsproteins während des Reinigungsvorganges an IgG bindet (Abb. 5-9 A). Ob die Aggregation bereits innerhalb

der Zelle oder erst im Medium stattfindet, wurde nicht untersucht. Findet diese erst außerhalb der Zelle statt, ließe sich dies eventuell durch häufigeres Abnehmen der Zellkulturüberstände oder den Zusatz stabilisierender Substanzen reduzieren, was eine Effizienzsteigerung der Menge gereinigter Fusionsproteine bedeuten würde. Für die Aggregatbildung im Überstand sprechen veröffentlichte Daten. So zeigten Yaghootfam und Mitarbeiter mit Hilfe einer Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, dass 70 % eines CST-EGFP-Fusionsproteins nach Transfektion in BHK-Zellen im Golgi-Apparat als kleinere Oligomere, wahrscheinlich überwiegend Dimere, vorliegen (Yaghootfam *et al.*, 2007) und folglich nur ein geringer Anteil in aggregierter Form vorhanden sein kann.

Um das gewählte Expressionssystem (CHO-Zellen), sowie die Ausbeute von reinem Enzym beurteilen zu können, bietet sich ein Vergleich mit einigen in der Literatur beschriebenen Glykosyl- bzw. Sulfotransferasen an. So konnten unter Verwendung von Insekten-Zelllinien als Expressionssystem aus einem Liter Überstand ca. 2,1 mg rekombinante lösliche humane N-Acetylglukosamin-6-O-Sulfotransferase (Togame *et al.*, 2003) bzw. 2 - 3 mg rekombinante bovine N-Acetylgalaktosaminyltransferase in löslicher Form (Homa *et al.*, 1995) gereinigt werden. Und das rekombinante lösliche humane Enzym  $\beta$ -1,4-Galaktosyltransferase wurde mit einer Ausbeute von ca. 1,4 mg aus einem Liter Zellkulturüberstand exprimierender COS-Zellen gewonnen (Borsig *et al.*, 1997). Obwohl sich sowohl die genutzten Expressionssysteme, als auch die Reinigungsbedingungen unterscheiden, konnten mit ca. 1,7 mg shCST aus einem Liter Zellkulturüberstand der neu generierten CHO-Suspensionszelllinie, vergleichbare Mengen gereinigt werden.

## 6.4 Etablierung einer hochdurchsatzfähigen

### CST-Aktivitätsbestimmung

Im Hinblick auf einen möglichen neuen therapeutischen Ansatz bei MLD mittels SRT sollen Inhibitoren für die CST in einem HTS identifiziert werden. Darunter versteht man eine automatisierte Methode, bei der im Hochdurchsatz tausende biochemische oder pharmakologische Tests durchgeführt werden. In der Pharmaforschung ist dies eine gängige Methode, um neue biologisch aktive Substanzen für die Arzneistoffentwicklung zu identifizieren. Dies macht einen großen Probendurchsatz notwendig. Die bisher als Standardmethode genutzte Aktivitätsbestimmung der CST erfordert die Verwendung von radioaktiv markiertem PAPS und basiert auf einer dünnschichtchromatographischen Analyse (Jungalwala *et al.*, 2000). Die Bestimmung ist mit einem hohen Kosten- und

Zeitaufwand verbunden, sowie auf die Verwendung von radioaktiven Substanzen angewiesen und somit trotz der hohen Sensitivität nicht für ein HTS tausender Substanzen in diversen Enzymreaktionen geeignet. Daher war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit den nicht-radioaktiven Aktivitätsnachweis der CST zu ermöglichen, wofür eine neue Methode entwickelt und etabliert wurde.

Für zwei zytosolische Sulfotransferasen wurde bereits eine fluorimetrische Aktivitätsbestimmung durch die Kopplung der Enzymreaktion mit einer zweiten Sulfotransferase als Hilfsenzym demonstriert (Chen *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2010). Dabei handelt es sich um eine Variante der Sulfotransferase SULT1A1 mit zwei Punktmutationen (K65E/R68G), welche die Regeneration des während der vorgeschalteten Enzymreaktion umgesetzten PAPS ermöglicht, wobei MUS als Sulfatgruppendonator fungiert und desulfatiertes MU entsteht. Die Desulfatierung von MUS führt zu einer Verschiebung des Fluoreszenzsignals und macht damit die Aktivitätsbestimmung mit einem Fluorimeter möglich. Ausgehend von den von Lu bzw. Chen und Mitarbeitern beschriebenen Bedingungen sollte die Entwicklung einer fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung der shCST erfolgen und somit die CST-Reaktion mit der SULT1A1-Reaktion gekoppelt werden (Chen *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2010) (Abb. 5-18).

Zunächst wurde die SULT1A1 bakteriell exprimiert und gereinigt (Abb. 5-19), wobei aktive SULT1A1 in großen Mengen gewonnen werden konnte (Abb. 5-20 und Abb. 5-21). Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die einzelne Enzymreaktion mit der CST-Reaktion gekoppelt werden kann. Dafür wurde die exprimierte und gereinigte lösliche humane CST (shCST) verwendet. Neben den Enzymen, wurden Galaktosylceramid und PAPS als Substrate der CST, sowie MUS, welches neben dem durch die CST-Reaktion gebildeten PAP das zweite Substrat der SULT1A1 ist, eingesetzt. Vor der Zugabe der shCST wurde die Reaktion einer Präinkubationsphase unterzogen, da bekannt ist, dass käuflich erworbenes PAPS signifikant hohe Mengen an PAP enthält, was somit zunächst vollständig zu PAPS umgesetzt werden kann (Chen *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2010). Nach Zugabe der shCST konnte gezeigt werden, dass die Aktivität über eine Zunahme des Fluoreszenzsignals detektierbar ist (Abb. 5-22). Es besteht darüber hinaus ein linearer Zusammenhang zwischen den ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten für mindestens 45 min und den shCST-Mengen in dem untersuchten Bereich von 0,25 - 1,25 µg Protein (Abb. 5-23). Es konnte folglich davon ausgegangen werden, dass die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten beim Einsatz einer konstanten SULT1A1-Menge direkt ein Maß für die CST-Aktivität darstellen. Zusammenfassend war es also möglich, die Aktivität

der shCST über eine fluorimetrische Methode unter Verwendung von Mikrotiterplatten zu messen.

Weiterhin wurde getestet, ob das Substrat Galaktosylceramid durch dessen deacylierte Form (Psychosin) ersetzt werden kann. Das Fehlen der Fettsäurekette führt zu einer besseren Wasserlöslichkeit des Substrates und könnte daher einen Verzicht auf das Detergenz Triton X-100 ermöglichen. Für Galaktosylceramid konnte gezeigt werden, dass die Sulfatierung ohne die Solubilisierung durch das Detergenz nicht möglich ist. Es wurde eine mit  $62,5 \pm 4,6$  % signifikant niedrigere Aktivität bei Verwendung von Psychosin in Abwesenheit von Triton X-100 als Substrat gemessen. Unerwarteterweise wurde für die deacylierte Form des Lipides in Anwesenheit des Detergenz jedoch eine mit  $123,1 \pm 20,2$  % signifikant höhere Aktivität verglichen mit Galaktosylceramid bestimmt (Abb. 5-26 B). Dies stellt eine Diskrepanz zu veröffentlichten Studien dar. Dabei wurde für das Ratten-Enzym aus verschiedenen Gewebeproben festgestellt, dass Psychosin zwar als Substrat fungiert, aber ein schlechterer Akzeptor als Galaktosylceramid ist (Lin und Horowitz, 1982; Tennekoon *et al.*, 1985). Die Ursache für diese widersprüchlichen Beobachtungen konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht gefunden werden. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass Psychosin trotz der signifikant niedrigeren Aktivität als Alternativsubstrat der shCST in der fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung ohne den Zusatz von Detergenzien eingesetzt werden kann.

Weiterführende Zielsetzung der Entwicklung und Etablierung der fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung stellte die Durchführbarkeit eines HTS dar. Um vorab die Eignung der entwickelten Methode dafür besser bewerten zu können, wurden zwei weitere Untersuchungen angestrebt. In diesen wurde zum einen die Anfälligkeit des Systems gegenüber dem Zusatz von DMSO getestet und zum anderen eine Z'-Faktor-Bestimmung durchgeführt. Viele chemische Substanzen, die in einem HTS auf ihr inhibitorisches Potential getestet werden, sind schlecht in Wasser löslich und liegen aus diesem Grund in DMSO gelöst vor. Es ist somit nicht vermeidbar, dass eine geringe DMSO-Endkonzentration nach Zusatz der Komponenten zu einem Reaktionsansatz vorhanden ist. Für die fluorimetrische Bestimmung konnte ermittelt werden, dass der Zusatz von 1 % und 5 % DMSO keinen signifikanten Einfluss ausübte, während eine DMSO-Endkonzentration von 10 % zu einer signifikanten Reduktion der ermittelten Reaktionsgeschwindigkeit auf  $76,0 \pm 5,2$  % führte (Abb. 5-27 A). Es bleibt also festzuhalten, dass eine Konzentration von mindestens 5 % DMSO keinen Einfluss auf die Bestimmung hat. Dies kann als ausreichend robust bewertet werden, da normalerweise in HTS mit einer Endkonzentration von 1 – 2 % DMSO getestet wird.

Der Z'-Faktor stellt einen charakteristischen Parameter für die Qualität einer Bestimmungsmethode dar und kann für die Beurteilung während der Entwicklung, Optimierung und Bewertung genutzt werden. In die Berechnung des dimensionslosen Parameters gehen sowohl die Größe des Messfensters als auch die Standardabweichungen der Positiv- und Negativkontrollen ein (Abb. 5-27 B). Ein geeigneter Z'-Faktor gilt als wichtiges Kriterium, um die Eignung einer Methode für die Hochdurchsatz-Testung potentieller Inhibitoren zu beurteilen (Zhang, 1999). Ein Z'-Faktor  $\geq 0,5$  gilt allgemein als gut. Mit dem bestimmten Z'-Faktor von  $0,74 \pm 0,04$  (Abb. 5-27 B) ist die entwickelte Aktivitätsbestimmung somit für ein HTS geeignet.

Zwei offensichtliche Nachteile der fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung sollen an dieser Stelle jedoch nicht unerwähnt bleiben. Zum einen werden aufgrund der Verwendung der SULT1A1 als Hilfsenzym auch potentielle Hemmstoffe dieses Enzyms in einem HTS identifiziert. Somit muss durch nachgeschaltete radioaktive Aktivitätsbestimmungen verifiziert werden, dass ein inhibitorischer Effekt in der Hemmung der CST begründet liegt. Zum anderen lässt die Methode die Identifizierung fluoreszenzaktiver Inhibitoren nur begrenzt zu.

Zusammenfassend konnte eine robuste, fluorimetrische Aktivitätsbestimmung für die shCST entwickelt werden, was erstmals eine Testung im Mikrotiterplattenformat möglich macht.

Neben der nicht-radioaktiven fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung konnte die Aktivität der shCST auch mit Hilfe eines kapillarelektrophoretischen Ansatzes nachgewiesen werden. Auf diese Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher eingegangen, da die Methodenentwicklung und Durchführung der Messung innerhalb der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Christa E. Müller (Pharmazeutisches Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn) durchgeführt wurde. Die Methode basiert auf der Quantifizierung des während der Enzymreaktion gebildeten PAP, wobei zuvor die elektrophoretische Auftrennung der Komponenten unter Verwendung einer Kapillare erfolgt. Die anschließende Quantifizierung der erhaltenen Peakfläche macht den Aktivitätsnachweis möglich. Es soll daher an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass somit eine weitere nicht-radioaktive Methode für die Aktivitätsbestimmung der shCST zur Verfügung steht. Diese ermöglicht zum einen, neben der radioaktiven Bestimmung, die Verifizierung potentieller Inhibitoren, da der Aktivitätsnachweis unabhängig von einem zweiten Enzym durchgeführt wird. Zum anderen kann mit dieser Methode eine nähere Charakterisierung der Inhibitoren erfolgen. Ein Hauptnachteil für die Verwendung in einem HTS gegenüber der fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung stellt der hohe Zeitaufwand

einer einzelnen Messung dar, da für die Aktivitätsbestimmung eines einzelnen Reaktionsansatzes ein mindestens zehn minütiger Elektrophoreselauf notwendig ist (persönliche Mitteilung von Wenjin Li).

### **6.5 Mögliche Ansätze für die Identifizierung von Inhibitoren der CST**

Um Inhibitoren für die CST zu identifizieren, sind verschiedene weiterführende Ansätze denkbar. Neben einem HTS, in dem tausende chemische Substanzen hinsichtlich ihres inhibitorischen Potentials gegenüber der CST getestet werden können, wäre eine chemische Modifizierung von bereits als Hemmstoffen bekannten Molekülen sinnvoll. Zusätzlich könnten Mutagenese-Studien und eine detaillierte Strukturanalyse nähere Aufschlüsse über das Enzym geben und folglich unter anderem das Inhibitor-Design optimieren. Innerhalb der Arbeit wurden diesbezüglich bereits einige Untersuchungen vorgenommen, die im Folgenden dargestellt werden.

Die Kristallstrukturen von zwölf humanen zytosolischen Sulfotransferasen und mindestens zwei humanen Sulfotransferasen des Golgi-Apparates wurden bereits aufgeklärt (Negishi *et al.*, 2001; Rath *et al.*, 2004; Bojarová und Williams, 2008). Dabei konnte die strukturelle Charakterisierung unter anderem Aufschlüsse über die katalytischen Mechanismen geben. Auch durch Vergleiche von Aminosäuresequenzen innerhalb der gleichen oder ähnlichen Enzymgruppen, sowie durch die Durchführung von Mutagenese-Studien kann ein besseres Verständnis von Vorgängen während der Katalyse erzielt werden. So wurden zwei Bereiche innerhalb der Sulfotransferasen identifiziert, die bei der Interaktion mit der 5'-Phosphosulfat- oder der 3'-Phosphatgruppe von PAPS eine wichtige Rolle spielen (Kakuta *et al.*, 1998). Ein Arginin-Rest in dem Bereich, der für die Bindung der 3'-Phosphatgruppe eine Rolle spielt, wurde dabei in fast allen Sulfotransferasen gefunden und eine gerichtete Mutagenese in der HNK-1-Sulfotransferase führte zu einer Reduktion der Restaktivität auf < 1 % (Ong *et al.*, 1998, 1999). Auch die murine CST weist an Aminosäureposition 164 einen Arginin-Rest innerhalb der mutmaßlichen PAPS-Bindungsstelle auf. Es konnte durch eine gerichtete Mutagenese, welche zu dem Austausch des Arginin-Restes gegen Alanin führte, auch für die CST gezeigt werden, dass dies einen massiven Aktivitätsverlust zur Folge hatte. Das Enzym wies lediglich eine Restaktivität von  $0,62 \pm 0,25$  % auf (Abb. 5-3 B), was mit den publizierten Daten in Einklang zu bringen ist. Weitere Mutagenese-Studien könnten weiterführende Hinweise liefern, welche Bereiche innerhalb des Enzyms für die Katalyse von Bedeutung sind.

Die Grundvoraussetzung für eine Kristallstrukturanalyse stellt die Gewinnung des zu untersuchenden Proteins in großer Menge dar. Da dies nun durch die Expression der löslichen CST-Fusionsproteine möglich ist, könnte eine detaillierte Analyse angestrebt werden. Von Glykoproteinen ist jedoch bekannt, dass sich die Strukturaufklärung oft als problematisch erweist, was auf die chemische und konformative Heterogenität der Zuckeranteile zurückgeführt werden kann (Chang *et al.*, 2007). Sowohl die murine CST als auch das humane Enzym enthalten zwei N-Glykosylierungsstellen (Honke *et al.*, 1997; Hirahara *et al.*, 2000). Zusätzlich wurde die Vermutung angestellt, dass der Protein A-Teil des CST-Fusionsproteins ebenfalls glykosyliert vorliegt (Eckhardt *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit führte eine Inkubation der gereinigten shCST mit dem deglykosylierenden Enzym PNGase F zu einer deutlichen Abnahme des Molekulargewichtes (Abb. 5-17 A) und ließ, wie erwartet, auf eine Glykosylierung des löslichen Enzyms schließen, was die Kristallbildung erschweren könnte. In den meisten Glykoproteinen, die N-glykosidisch verknüpfte Oligosaccharidketten tragen, spielt die Glykosylierung eine wichtige Rolle. Den Zuckerketten wird eine wichtige Funktion bei der korrekten Faltung und Prozessierung der Proteine im ER zugesprochen. Ein Fehlen hat oft eine Fehlfaltung, Aggregation und Degradation zur Folge und verhindert, dass das Protein aus dem ER transportiert wird (Helenius, 1994). Einen möglichen Kompromiss stellt die Behandlung der exprimierenden Zelllinien mit dem  $\alpha$ -Mannosidase I-Inhibitor Kifunensin dar. Die Faltung und initiale Glykosylierung kann dabei normal ablaufen. Die weitere Prozessierung der N-Glykane wird jedoch dahingehend beeinflusst, dass das Entfernen dieser durch das Enzym Endo H möglich wird. So wurden beispielsweise hochwertige Kristalle des Glykoproteins CTLA-4 nach Zusatz von 10  $\mu$ M Kifunensin für drei bis vier Wochen in das Zellkulturmedium der CTLA-4 exprimierenden CHO-Zellen gewonnen (Chang *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2011). Wie bereits oben erwähnt, zeigte shCST zwar eine Sensitivität gegenüber dem deglykosylierenden Enzym PNGase F, eine Inkubation mit Endo H führte jedoch zu keiner erkennbaren Molekulargewichtsabnahme (Abb. 5-17 A), was auf N-Glykane vom komplexen Typ hinweist. Jedoch konnte nach Kifunensin-Behandlung der Zellen gezeigt werden, dass das Molekulargewicht des im Überstand der Zellen befindlichen Fusionsproteins nach Endo H-Verdau abnahm (Abb. 5-17 B). Dabei zeigten die behandelten Zellen kein offensichtlich verändertes Wachstum gegenüber den unbehandelten. Es lässt sich also ableiten, dass die Langzeitkultivierung unter Kifunensin-Zusatz auch für die shCST-Expression genutzt werden kann, um im Weiteren chemisch und konformativ homogene Proteine für die Kristallbildung zu erhalten. Es bleibt jedoch noch zu testen, ob die Abspaltung der Oligosaccharide durch Endo H auch im nativen Zustand des Proteins möglich ist und inwieweit die katalytische

Aktivität des Enzyms durch eine Kifunensin-Behandlung beeinflusst wird. Es konnte gezeigt werden, dass die CST enzymatisch aktiv ist, wenn sie in CHO-Glykosylierungs-Mutanten (15 B) exprimiert wird (Eckhardt *et al.*, 2002). Diesen Zellen fehlt die N-Acetylglukosaminyltransferase I, die den ersten Schritt in der Synthese komplexer N-Glykane katalysiert. Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich vermuten, dass eine Kifunensin-Behandlung keinen negativen Einfluss auf die Aktivität der CST hat. Der Methode ist jedoch ein enormer Kostenaufwand gegenüber zu stellen, da sowohl Kifunensin, als auch Endo H in großen Mengen benötigt werden. Dies wirft die Frage auf, ob nicht zunächst die Kristallbildung trotz des Vorliegens eines Glykoproteins zu testen wäre. Die Aufklärung der Kristallstruktur der CST könnte unter anderem zu einer Optimierung von im HTS identifizierten Inhibitoren beitragen.

Nachdem es gelungen war, lösliche humane CST in ausreichenden Mengen für eine nicht-radioaktive Aktivitätsbestimmung zu erhalten und eine im Mikrotiterplattenformat durchführbare, fluorimetrische Aktivitätsbestimmung zu entwickeln, sollte diese in einem ersten HTS eingesetzt werden. Dieses erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Michael Famulok (Life & Medical Sciences (LIMES) Institut der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn), die neben der Testsubstanzbibliothek den Pipettierroboter inklusive dessen Bedienung und das Messgerät zur Verfügung stellte. Zunächst musste dafür das entwickelte Protokoll der fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung angepasst werden. Unter anderem konnte das Reaktionsvolumen erfolgreich von 50  $\mu\text{l}$  auf 24  $\mu\text{l}$  mehr als halbiert und die Durchführbarkeit im 384-*well*-Format gezeigt werden. Dies führt zu einer deutlichen Einsparung an eingesetzten Enzymen, Substraten und sonstigen Pufferkomponenten und geht folglich mit einer großen Kostenersparnis einher. Nach Reinigung und Charakterisierung ausreichender Enzymmengen (Abb. 5-28) wurden 18.520 Substanzen in einer Endkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  (DMSO-Konzentration 2 %) untersucht (Abb. 5-30). Für jede Mikrotiterplatte wurde der bereits zuvor erläuterte Z'-Faktor ermittelt. Insgesamt konnte für alle Platten ein durchschnittlicher Z'-Faktor von  $0,71 \pm 0,09$  bestimmt werden, was als gut und ausreichend eingestuft werden kann. Ein Vergleich mit dem während der Optimierung der fluorimetrischen Aktivitätsbestimmung ermittelten Z'-Faktor von  $0,74 \pm 0,04$  zeigte ähnliche Werte, was die Übertragbarkeit auf die robotergestützte Methode unterstreicht. Während des HTS wurden jedoch einige Auffälligkeiten sichtbar. So lag im Mittel die Aktivität aller Reaktionsansätze mit  $107,9 \pm 13,5$  % oberhalb des 100 %-Wertes (Abb. 5-30) und eine innerhalb der 384-*well*-Platte erkennbare Systematik hinter den gemessenen Messwerten, abhängig von der Position des *Wells* innerhalb der Mikrotiterplatte war offensichtlich. Dies konnte während des durchgeführten HTS

ursächlich nicht geklärt werden, kann aber eventuell auf Verdunstungseffekte zurückgeführt werden und bedarf näherer Untersuchungen.

Eine Herausforderung während einer Hochdurchsatztestung ist, die aktiven Substanzen innerhalb der großen Datenmengen zu finden und somit die Grenzen für einen Inhibitor richtig zu definieren. Eine gängige Methode dabei ist, den Grenzwert drei Standardabweichungen ( $3\sigma$ ) entfernt von den Mittelwerten der erhaltenen Daten aller Proben zu wählen (Zhang, 1999; Brideau *et al.*, 2003), da innerhalb dieses Bereichs 99,7 % normalverteilter Zufallsgrößen liegen. Bei Anwendung dieser Grenzfestlegung ergab sich, dass bei einer Restaktivität unterhalb von 67,4 %, eine Testsubstanz als inhibitorisch aktiv eingestuft werden konnte, was zu einer Anzahl von  $\sim 0,6$  % identifizierten Primärtreffern führte (Abb. 5-30). Durch weitere Testungen konnte eine Inhibition für zwei der Substanzen aus der Testplatte erneut gezeigt werden. Dies konnte jedoch nach Verwendung frisch angesetzter Verdünnungen der Reinsubstanzen in dem Ausmaß zunächst nicht bestätigt werden und macht nähere Untersuchungen notwendig. Es konnte somit innerhalb der getesteten Substanzbibliotheken unter den festgesetzten Kriterien und angewendeten Bedingungen kein Inhibitor identifiziert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass erfolgreich ausreichende Mengen der benötigten Enzyme (shCST/SULT1A1) für ein HTS von 18.520 Substanzen produziert und gereinigt werden konnten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die entwickelte Aktivitätsbestimmung auf die Durchführbarkeit mit Hilfe eines Pipettierroboters positiv erprobt werden konnte und eine hohe Robustheit aufwies. Inwieweit durch weitere HTSs mit größeren Substanzbibliotheken Inhibitoren identifiziert werden können, bleibt abzuwarten. Insgesamt stellt die Hochdurchsatztestung einen vielversprechenden Ansatz dar. So konnten beispielsweise durch ein quantitatives HTS von fast 60.000 Testsubstanzen drei potente, selektive und strukturell neuartige Glukocerebrosidase-Inhibitoren identifiziert werden. Diese könnten als Leitstrukturen für eine Chaperon-Therapie in der Behandlung von Morbus Gaucher Anwendung finden (Zheng *et al.*, 2007). Nach der Identifizierung einer solchen Inhibitor-Leitstruktur für die CST wäre ihre weitere Optimierung denkbar. So konnte auch durch die Modifizierung der bereits zur Inhibition innerhalb der Glykosphingolipidsynthese eingesetzten Iminozucker eine bessere Selektivität und Wirksamkeit erreicht werden (Butters *et al.*, 2000, 2005).

Zusammengenommen konnten somit in der Arbeit verschiedene Ansätze aufgezeigt werden, die eine Grundlage für die Identifizierung von Inhibitoren der CST schaffen. Ein potenter und selektiver Inhibitor könnte eine Behandlungsmöglichkeit für MLD im Zuge einer SRT eröffnen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aerts, J.M.F.G., Hollak, C.E.M., Boot, R.G., Groener, J.E.M. und Maas, M. (2006). Substrate reduction therapy of glycosphingolipid storage disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 29, 449–456.
- Baek, R.C., Kasperzyk, J.L., Platt, F.M. und Seyfried, T.N. (2008). N-butyldeoxygalactonojirimycin reduces brain ganglioside and GM2 content in neonatal Sandhoff disease mice. *Neurochemistry International* 52, 1125–1133.
- Barnewitz, K., Guo, C., Sevvana, M., Ma, Q., Sheldrick, G.M., Söling, H.-D. und Ferrari, D.M. (2004). Mapping of a substrate binding site in the protein disulfide isomerase-related chaperone wild based on protein function and crystal structure. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 39829–39837.
- Batzios, S.P. und Zafeiriou, D.I. (2012). Developing treatment options for metachromatic leukodystrophy. *Molecular Genetics and Metabolism* 105, 56–63.
- Berger, J., Löschl, B., Bernheimer, H., Lugowska, A., Tytki-Szymanska, A., Gieselmann, V. und Molzer, B. (1997). Occurrence, distribution, and phenotype of arylsulfatase A mutations in patients with metachromatic leukodystrophy. *American Journal of Medical Genetics* 69, 335–340.
- Berntson, Z., Hansson, E., Rönnbäck, L. und Fredman, P. (1998). Intracellular sulfatide expression in a subpopulation of astrocytes in primary cultures. *Journal of Neuroscience Research* 52, 559–568.
- Bierhuizen, M.F.A. und Fukuda, M. (1992). Expression cloning of a cDNA encoding UDP-GlcNAc:Gal $\beta$ 1-3-GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc)  $\beta$ 1-6 GlcNAc transferase by gene transfer into CHO cells expressing polyoma large tumor antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 9326–9330.
- Biswas, S. und Levine, S.M. (2002). Substrate-reduction therapy enhances the benefits of bone marrow transplantation in young mice with globoid cell leukodystrophy. *Pediatric Research* 51, 40–47.
- Bojarová, P. und Williams, S.J. (2008). Sulfotransferases, sulfatases and formylglycine-generating enzymes: a sulfation fascination. *Current Opinion in Chemical Biology* 12, 573–581.
- Borsig, L., Berger, E.G. und Malissard, M. (1997). Expression and purification of His-tagged  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase in yeast and in COS cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 240, 586–589.
- Bosio, A., Binczek, E., Le Beau, M.M., Fernald, A.A. und Stoffel, W. (1996a). The human gene CGT encoding the UDP-galactose ceramide galactosyl transferase (cerebroside synthase): cloning, characterization, and assignment to human chromosome 4, band q26. *Genomics* 34, 69–75.
- Bosio, A., Binczek, E. und Stoffel, W. (1996b). Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13280–13285.
- Brideau, C., Gunter, B., Pikounis, B., und Liaw, A. (2003). Improved statistical methods for hit selection in high-throughput screening. *Journal of Biomolecular Screening* 8, 634–647.
- Burkart, M.D. und Wong, C.-H. (1999). A continuous assay for the spectrophotometric analysis of sulfotransferases using aryl sulfotransferase IV. *Analytical Biochemistry* 274, 131–137.

- Butters, T.D., Dwek, R.A. und Platt, F.M. (2000). Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis: application to lysosomal storage disorders. *Chemical Reviews* 100, 4683–4696.
- Butters, T.D., Dwek, R.A. und Platt, F.M. (2005). Imino sugar inhibitors for treating the lysosomal glycosphingolipidoses. *Glycobiology* 15, 43R–52R.
- Callahan, J.W., Bagshaw, R.D. und Mahuran, D.J. (2009). The integral membrane of lysosomes: its proteins and their roles in disease. *Journal of Proteomics* 72, 23–33.
- Chang, V.T., Crispin, M., Aricescu, A.R., Harvey, D.J., Nettleship, J.E., Fennelly, J.A., Yu, C., Boles, K.S., Evans, E.J., Stuart, D.I., *et al.* (2007). Glycoprotein structural genomics: solving the glycosylation problem. *Structure* 15, 267–273.
- Chen, W.-T., Liu, M.-C. und Yang, Y.-S. (2005). Fluorometric assay for alcohol sulfotransferase. *Analytical Biochemistry* 339, 54–60.
- Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., Suzuki, K. und Popko, B. (1996). Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell* 86, 209–219.
- Cox, T.M. (2005). Substrate reduction therapy for lysosomal storage diseases. *Acta Paediatrica* 94, 69–75.
- Desnick, R.J. und Schuchman, E.H. (2012). Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges. *The Annual Review of Genomics and Human Genetics* 13, 307–335.
- D'Hooge, R., Van Dam, D., Franck, F., Gieselmann, V. und De Deyn, P.P. (2001). Hyperactivity, neuromotor defects, and impaired learning and memory in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Brain Research* 907, 35–43.
- 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.
- Eckhardt, M., Fewou, S.N., Ackermann, I. und Gieselmann, V. (2002). N-glycosylation is required for full enzymic activity of the murine galactosylceramide sulphotransferase. *The Biochemical Journal* 368, 317–324.
- Ellgaard, L., Molinari, M. und Helenius, A. (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* 286, 1882–1888.
- Elliot-Smith, E., Speak, A.O., Lloyd-Evans, E., Smith, D. A., van der Spoel, A.C., Jeyakumar, M., Butters, T.D., Dwek, R. A., d'Azzo, A. und Platt, F.M. (2008). Beneficial effects of substrate reduction therapy in a mouse model of GM1 gangliosidosis. *Molecular Genetics and Metabolism* 94, 204–211.
- Elstein, D., Hollak, C., Aerts, J.M.F.G., van Weely, S., Maas, M., Cox, T.M., Lachmann, R.H., Hrebicek, M., Platt, F.M., Butters, T.D. *et al.* (2004). Sustained therapeutic effects of oral miglustat in type 1 Gaucher disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 27, 757–766.
- Erne, B., Sansano, S., Frank, M. und Schaeren-Wiemers, N. (2002). Rafts in adult peripheral nerve myelin contain major structural myelin proteins and myelin and lymphocyte protein (MAL) and CD59 as specific markers. *Journal of Neurochemistry* 82, 550–562.
- Fabelo, N., Martín, V., Santpere, G., Marín, R., Torrent, L., Ferrer, I. und Díaz, M. (2011). Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease. *Molecular Medicine* 17, 1107–1118.

- Ficiocioglu, C. (2008). Review of miglustat for clinical management in Gaucher disease type 1. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 4, 425–431.
- Frank, M., van der Haar, M.E., Schaeren-Wiemers, N. und Schwab, M.E. (1998). rMAL is a glycosphingolipid-associated protein of myelin and apical membranes of epithelial cells in kidney and stomach. *The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience* 18, 4901–4913.
- Franken, S., Wittke, D., Mansson, J.E., D'Hooge, R., De Deyn, P.P., Lüllmann-Rauch, R., Matzner, U. und Gieselmann, V. (2006). Modest phenotypic improvements in ASA-deficient mice with only one UDP-galactose:ceramide-galactosyltransferase gene. *Lipids in Health and Disease* 5, 21.
- Fuller, M., Meikle, P.J. und Hopwood, J.J. (2006). Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. *Oxford: Oxford PharmaGenesis; 2006, Kapitel 2.*
- Futerman, A.H. und van Meer, G. (2004). The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5, 554–565.
- Galanaud, D., Tourbah, A., Lehericy, S., Leveque, N., Heron, B., Billette de Villemeur, T., Guffon, N., Feillet, F., Baumann, N., Vanier, M.T., *et al.* (2008). 24 month-treatment with miglustat of three patients with Niemann-Pick disease type C: follow up using brain spectroscopy. *Molecular Genetics and Metabolism* 96, 55–58.
- Gieselmann, V. (2008). Metachromatic leukodystrophy: genetics, pathogenesis and therapeutic options. *Acta Paediatrica* 97, 15–21.
- Gieselmann, V. und Krägeloh-Mann, I. (2010). Metachromatic leukodystrophy – an update. *Neuropediatrics* 41, 1–6.
- Gieselmann, V., Matzner, U., Hess, B., Lüllmann-Rauch, R., Coenen, R., Hartmann, D., D'Hooge, R., DeDeyn, P. und Nagels, G. (1998). Metachromatic leukodystrophy: molecular genetics and an animal model. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 21, 564–574.
- Han, X., Fagan, A.M., Cheng, H., Morris, J.C., Xiong, C. und Holtzman, D.M. (2003). Cerebrospinal fluid sulfatide is decreased in subjects with incipient dementia. *Annals of Neurology* 54, 115–119.
- Han, X., Holtzman, D.M., McKeel Jr, D.W., Kelley, J. und Morris, J.C. (2002). Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer ' s disease: potential role in disease pathogenesis. *Journal of Neurochemistry* 82, 809–818.
- Hayashi, A., Kaneko, N., Tomihira, C. und Baba, H. (2013). Sulfatide decrease in myelin influences formation of the paranodal axo-glia junction and conduction velocity in the sciatic nerve. *Glia* 61, 466–474.
- Heitner, R., Elstein, D., Aerts, J., van Weely, S. und Zimran, A. (2002). Low-dose n-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) for type I Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 28, 127–133.
- Helenius, A. (1994). How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell* 5, 253–265.
- 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.
- Hirahara, Y., Bansal, R., Honke, K., Ikenaka, K. und Wada, Y. (2004). Sulfatide is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation: development in sulfatide-null mice. *Glia* 45, 269–277.

- Hirahara, Y., Tsuda, M., Wada, Y. und Honke, K. (2000). cDNA cloning, genomic cloning, and tissue-specific regulation of mouse cerebroside sulfotransferase. *European Journal of Biochemistry* 267, 1909–1917.
- Homa, F.L., Baker, C. A., Thomsen, D.R. und Elhammer, A.P. (1995). Conversion of a bovine UDP-GalNAc:polypeptide, N-acetylgalactosaminyltransferase to a soluble, secreted enzyme, and expression in Sf9 cells. *Protein Expression and Purification* 6, 141–148.
- Honke, K., Hirahara, Y., Dupree, J., Suzuki, K., Popko, B., Fukushima, K., Fukushima, J., Nagasawa, T., Yoshida, N., Wada, Y., *et al.* (2002). Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4227–4232.
- Honke, K., Tsuda, M., Hirahara, Y., Ishii, A., Makita, A. und Wada, Y. (1997). Molecular cloning and expression of cDNA encoding human 3'-phosphoadenylylsulfate:galactosylceramide 3'-sulfotransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 272, 4864–4868.
- Honke, K., Yamane, M., Ishii, A., Kobayashi, T. und Makita, A. (1996). Purification and characterization of 3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate:GalCer sulfotransferase from human renal cancer cells. *Journal of Biochemistry* 119, 421–427.
- Hurtley, M.S. und Helenius, A. (1989). Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Annual Review of Cell Biology* 5, 277–307.
- Ishibashi, T., Dupree, J.L., Ikenaka, K., Hirahara, Y., Honke, K., Peles, E., Popko, B., Suzuki, K., Nishino, H. und Baba, H. (2002). A myelin galactolipid, sulfatide, is essential for maintenance of ion channels on myelinated axon but not essential for initial cluster formation. *The Journal of Neuroscience* 22, 6507–6514.
- Jeyakumar, M., Butters, T.D., Cortina-Borja, M., Hunnam, V., Proia, R.L., Perry, V.H., Dwek, R.A. und Platt, F.M. (1999). Delayed symptom onset and increased life expectancy in Sandhoff disease mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6388–6393.
- Jeyakumar, M., Norflus, F., Tiffit, C.J., Cortina-Borja, M., Butters, T.D., Proia, R.L., Perry, V.H., Dwek, R.A. und Platt, F.M. (2001). Enhanced survival in Sandhoff disease mice receiving a combination of substrate deprivation therapy and bone marrow transplantation. *Blood* 97, 327–329.
- Jeyakumar, M., Smith, D.A., Williams, I.M., Borja, M.C., Neville, D.C.A., Butters, T.D., Dwek, R.A. und Platt, F.M. (2004). NSAIDs increase survival in the Sandhoff disease mouse: synergy with N-butyldeoxynojirimycin. *Annals of Neurology* 56, 642–649.
- Johswich, A., Kraft, B., Wuhrer, M., Berger, M., Deelder, A.M., Hokke, C.H., Gerardy-Schahn, R. und Bakker, H. (2009). Golgi targeting of *Drosophila melanogaster* beta4GalNAcTB requires a DHHC protein family-related protein as a pilot. *The Journal of Cell Biology* 184, 173–183.
- Journet, A., Chapel, A., Kieffer, S., Roux, F. und Garin, J. (2002). Proteomic analysis of human lysosomes: application to monocytic and breast cancer cells. *Proteomics* 2, 1026–1040.
- Jungalwala, F.B., Natowicz, M.R., Chaturvedi, P. und Newburg, D.S. (2000). Analysis of sulfatide and enzymes of sulfatide metabolism. *Methods in Enzymology* 311, 94–105.
- Kakuta, Y., Pedersen, L.G., Pedersen, L.C. und Negishi, M. (1998). Conserved structural motifs in the sulfotransferase family. *Trends in Biochemical Sciences* 23, 129–130.
- Kanter, J.L., Narayana, S., Ho, P.P., Catz, I., Warren, K.G., Sobel, R.A., Steinman, L. und Robinson, W.H. (2006). Lipid microarrays identify key mediators of autoimmune brain inflammation. *Nature Medicine* 12, 138–143.

- Kasperzyk, J.L., d'Azzo, A., Platt, F.M., Alroy, J. und Seyfried, T.N. (2005). Substrate reduction reduces gangliosides in postnatal cerebrum-brainstem and cerebellum in GM1 gangliosidosis mice. *Journal of Lipid Research* 46, 744–751.
- Kasperzyk, J.L., El-Abbadi, M.M., Hauser, E.C., d'Azzo, A., Platt, F.M. und Seyfried, T.N. (2004). N-butyldeoxygalactonojirimycin reduces neonatal brain ganglioside content in a mouse model of GM1 gangliosidosis. *Journal of Neurochemistry* 89, 645–653.
- Kim, T., Fiedler, K., Madison, D.L., Krueger, W.H. und Pfeiffer, S.E. (1995). Cloning and characterization of MVP17: a developmentally regulated myelin protein in oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience Research* 42, 413–422.
- Kolter, T. und Sandhoff, K. (2005). Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 81–103.
- Kosicek, M. und Hecimovic, S. (2013). Phospholipids and Alzheimer's disease: alterations, mechanisms and potential biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 1310–1322.
- Kraft, B., Johswich, A., Kauczor, G., Scharenberg, M., Gerardy-Schahn, R. und Bakker, H. (2011). "Add-on" domains of *Drosophila*  $\beta$ 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase B in the stem region and its pilot protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68, 4091–4100.
- Kretz, K.A., Carson, G.S., Morimoto, S., Kishimoto, Y., Fluharty, A.L. und O'Brien, J.S. (1990). Characterization of a mutation in a family with saposin B deficiency: a glycosylation site defect. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 2541–2544.
- Lee, J.-P., Jeyakumar, M., Gonzalez, R., Takahashi, H., Lee, P.-J., Baek, R.C., Clark, D., Rose, H., Fu, G., Clarke, J., *et al.* (2007). Stem cells act through multiple mechanisms to benefit mice with neurodegenerative metabolic disease. *Nature Medicine* 13, 439–447.
- Li, S., Liquari, P., McKee, K.K., Harrison, D., Patel, R., Lee, S. und Yurchenco, P.D. (2005). Laminin-sulfatide binding initiates basement membrane assembly and enables receptor signaling in Schwann cells and fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* 169, 179–189.
- Lin, Y.N. und Horowitz, M.I. (1982). Cerebroside sulfotransferase in rat gastric mucosa. *International Journal of Biochemistry* 14, 831–838.
- Lu, L.-Y., Hsu, Y.-C. und Yang, Y.-S. (2010). Spectrofluorometric assay for monoamine-preferring phenol sulfotransferase (SULT1A3). *Analytical Biochemistry* 404, 241–243.
- Lukina, E., Watman, N., Arreguin, E.A., Dragosky, M., Iastrebner, M., Rosenbaum, H., Phillips, M., Pastores, G.M., Kamath, R.S., Rosenthal, D.I., *et al.* (2010). Improvement in hematological, visceral, and skeletal manifestations of Gaucher disease type 1 with oral eliglustat tartrate (Genz-112638) treatment: 2-year results of a phase 2 study. *Blood* 116, 4095–4098.
- Ma, Q., Guo, C., Barnewitz, K., Sheldrick, G.M., Soling, H.-D., Usón, I. und Ferrari, D.M. (2003). Crystal structure and functional analysis of *Drosophila* Wind, a protein-disulfide isomerase-related protein. *The Journal of Biological Chemistry* 278, 44600–44607.
- Marcus, J., Honigbaum, S., Shroff, S., Honke, K., Rosenbluth, J. und Dupree, J.L. (2006). Sulfatide is essential for the maintenance of CNS myelin and axon structure. *Glia* 53, 372–381.
- Marks, D.L., Wu, K., Paul, P., Kamisaka, Y., Watanabe, R. und Pagano, R.E. (1999). Oligomerization and topology of the Golgi membrane protein glucosylceramide synthase. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 451–456.
- Nakayama, J. und Fukuda, M. (1996). A human polysialyltransferase directs in vitro synthesis of polysialic acid. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 1829–1832.

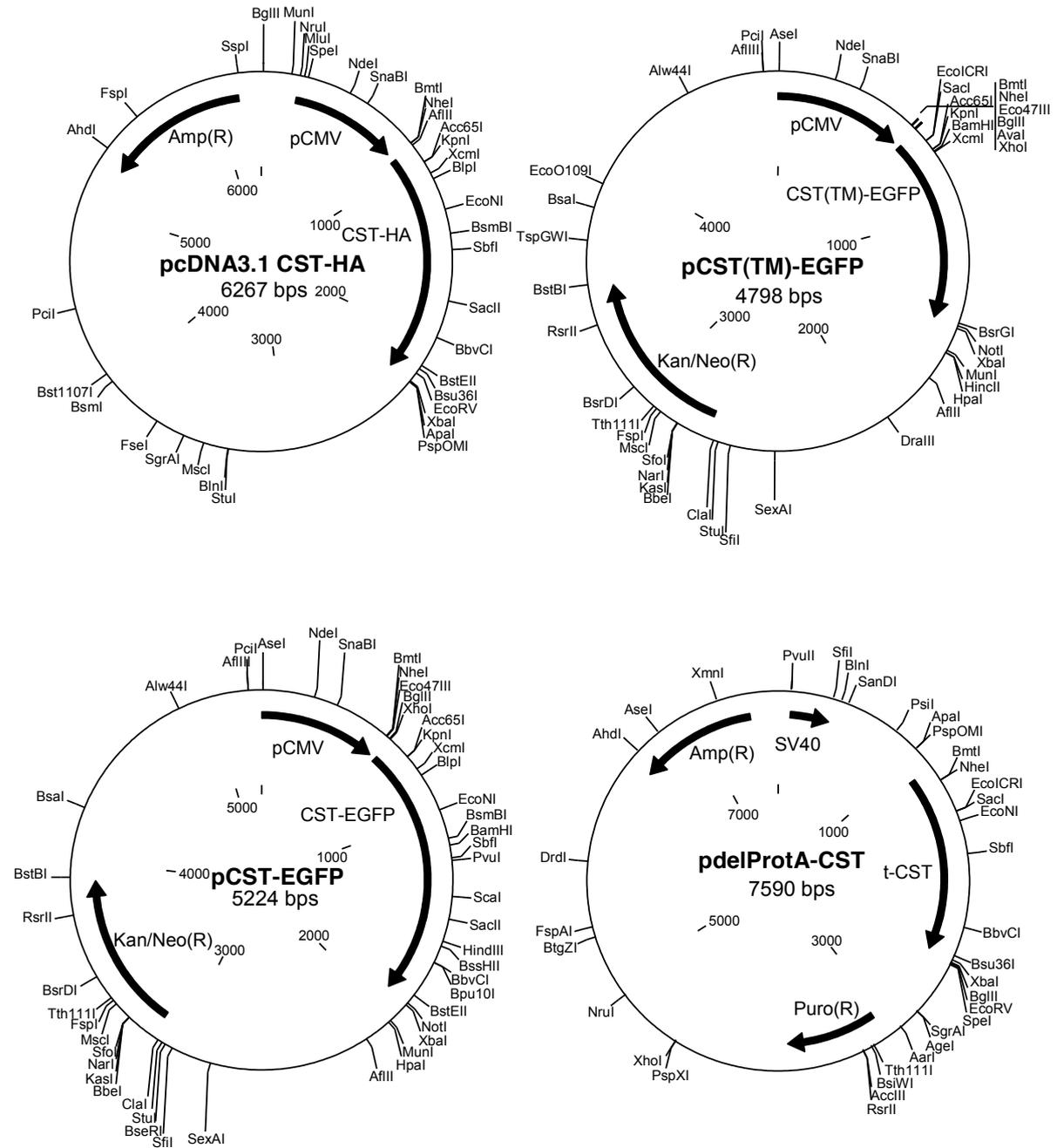
- Negishi, M., Pedersen, L.G., Petrotchenko, E., Shevtsov, S., Gorokhov, A., Kakuta, Y. und Pedersen, L.C. (2001). Structure and function of sulfotransferases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 390, 149–157.
- Ong, E., Yeh, J.-C., Ding, Y., Hindsgaul, O., Pedersen, L.C., Negishi, M. und Fukuda, M. (1999). Structure and function of HNK-1 sulfotransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 25608–25612.
- Ong, E., Yeh, J.-C., Ding, Y., Hindsgaul, O. und Fukuda, M. (1998). Expression cloning of a human sulfotransferase that directs the synthesis of the HNK-1 glycan on the neural cell adhesion molecule and glycolipids. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 5190–5195.
- Pardridge, W.M. (2003). Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. *Molecular Interventions* 3, 90–105.
- Patterson, M.C., Vecchio, D., Jacklin, E., Abel, L., Chadha-Boreham, H., Luzy, C., Giorgino, R. und Wraith, J.E. (2010). Long-term miglustat therapy in children with Niemann-Pick disease type C. *Journal of Child Neurology* 25, 300–305.
- Patterson, M.C., Vecchio, D., Prady, H., Abel, L. und Wraith, J.E. (2007). Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurology* 6, 765–772.
- Pernber, Z., Molander-Melin, M., Berthold, C.-H., Hansson, E. und Fredman, P. (2002). Expression of the myelin and oligodendrocyte progenitor marker sulfatide in neurons and astrocytes of adult rat brain. *Journal of Neuroscience Research* 69, 86–93.
- Pesheva, P., Gloor, S., Schachner, M. und Probstmeier, R. (1997). Tenascin-R is an intrinsic autocrine factor for oligodendrocyte differentiation and promotes cell adhesion by a sulfatide-mediated mechanism. *The Journal of Neuroscience* 17, 4642–4651.
- Pineda, M., Wraith, J.E., Mengel, E., Sedel, F., Hwu, W.-L., Rohrbach, M., Bembi, B., Walterfang, M., Korenke, G.C., Marquardt, T., *et al.* (2009). Miglustat in patients with Niemann-Pick disease Type C (NP-C): a multicenter observational retrospective cohort study. *Molecular Genetics and Metabolism* 98, 243–249.
- Platt, F.M., Boland, B. und van der Spoel, A.C. (2012). Lysosomal storage disorders: the cellular impact of lysosomal dysfunction. *The Journal of Cell Biology* 199, 723–734.
- Platt, F.M. und Butters, T.D. (2004). Substrate deprivation: a new therapeutic approach for the glycosphingolipid lysosomal storage diseases. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 2, 1–17.
- Platt, F.M. und Jeyakumar, M. (2008). Substrate reduction therapy. *Acta Paediatrica* 97, 88–93.
- Platt, F.M. und Lachmann, R.H. (2009). Treating lysosomal storage disorders: current practice and future prospects. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1793, 737–745.
- Platt, F.M., Neises, G.R., Reinkensmeier, G., Townsend, M.J., Perry, V.H., Proia, R.L., Winchester, B., Dwek, R.A. und Butters, D.T. (1997). Prevention of lysosomal storage in Tay-Sachs mice treated with n-butyldeoxynojirimycin. *Science* 276, 428–431.
- Polten, A., Fluharty, A.L., Fluharty, C.B., Kappler, J., von Figura, K. und Gieselmann, V. (1991). Molecular basis of different forms of metachromatic leukodystrophy. *The New England Journal of Medicine* 324, 18–22.
- Ramakrishnan, H., Hedayati, K.K., Lüllmann-Rauch, R., Wessig, C., Fewou, S.N., Maier, H., Goebel, H.-H., Gieselmann, V. und 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.

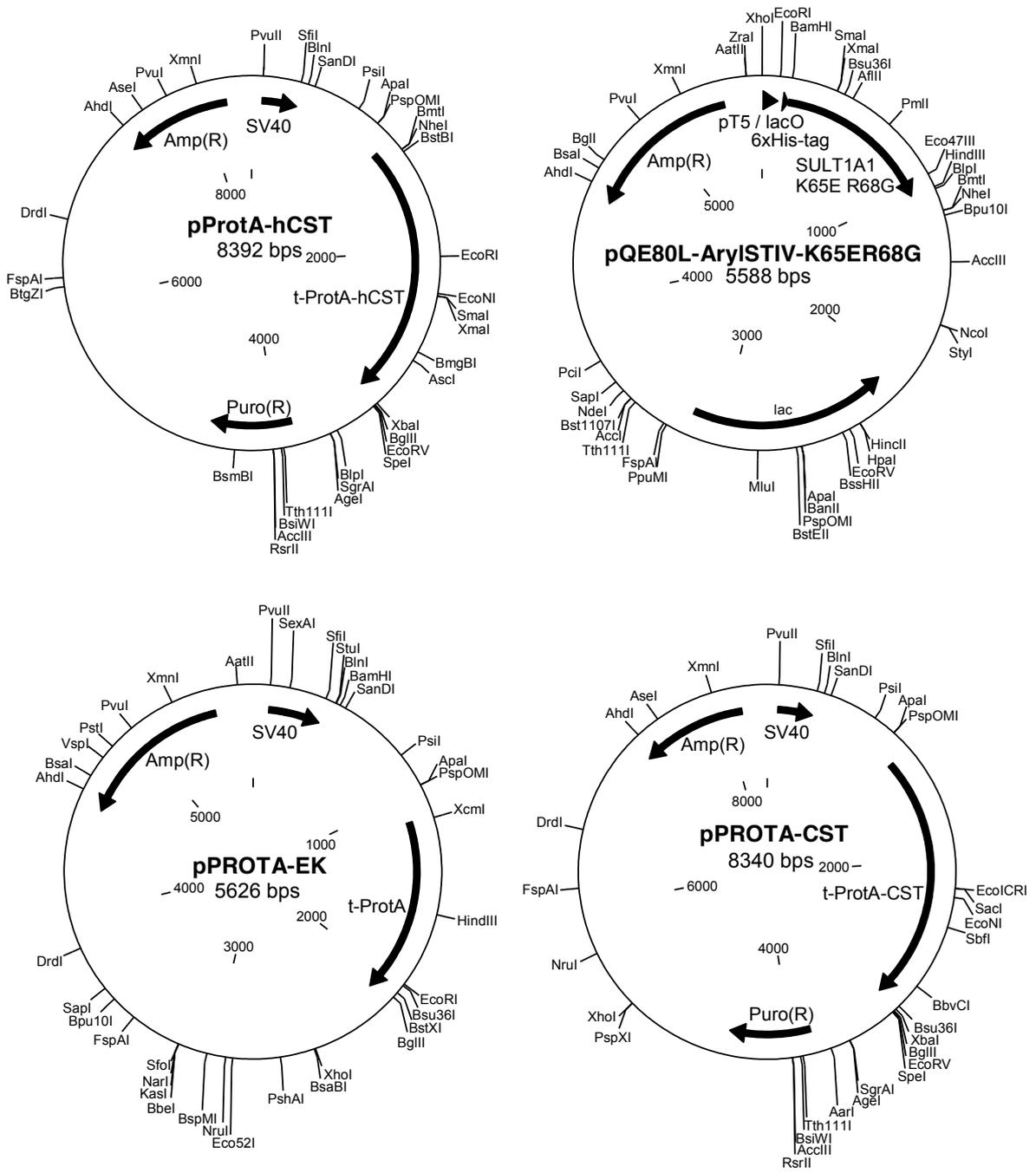
- Rath, V.L., Verdugo, D. und Hemmerich, S. (2004). Sulfotransferase structural biology and inhibitor discovery. *Drug Discovery Today* 9, 1003–1011.
- Roberts, D.D., Rao, C.N., Magnani, J.L., Spitalnik, S.L., Liotta, L.A. und Ginsburg, V. (1985). Laminin binds specifically to sulfated glycolipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82, 1306–1310.
- Sakac, D., Zachos, M. und Lingwood, C.A. (1992). Purification of the testicular galactolipid: 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate sulfotransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 1655–1659.
- Sakai, N. (2009). Pathogenesis of leukodystrophy for Krabbe disease: molecular mechanism and clinical treatment. *Brain & Development* 31, 485–487.
- Sanchez-Lopez, R., Nicholson, R., Gesnel, M.C., Matrisian, L.M. und Breathnach, R. (1988). Structure-function relationships in the collagenase family member transin. *The Journal of Biological Chemistry* 263, 11892–11899.
- Sasai, K., Ikeda, Y., Tsuda, T., Ihara, H., Korekane, H., Shiota, K. und Taniguchi, N. (2001). The critical role of the stem region as a functional domain responsible for the oligomerization and Golgi localization of N-acetylglucosaminyltransferase V. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 759–765.
- Sasakis, K., Watanabe, E., Kawashima, K., Sekine, S., Dohi, T., Oshima, M., Hanai, N., Nishi, T. und Hasegawa, M. (1993). Expression cloning of a novel Gal $\beta$ (1-3/1-4)GlcNAc  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase using lectin resistance selection. *The Journal of Biological Chemistry* 268, 22782–22787.
- Schiffmann, R., FitzGibbon, E.J., Harris, C., DeVile, C., Davies, E.H., Abel, L., van Schaik, I.N., Benko, W., Timmons, M., Ries, M., *et al.* (2008). Randomized, controlled trial of miglustat in Gaucher's disease type 3. *Annals of Neurology* 64, 514–522.
- Sen, J., Goltz, J.S., Konsolaki, M., Schüpbach, T. und Stein, D. (2000). Windbeutel is required for function and correct subcellular localization of the *Drosophila* patterning protein Pipe. *Development* 127, 5541–5550.
- Shapiro, B.E., Pastores, G.M., Gianutsos, J., Luzy, C. und Kolodny, E.H. (2009). Miglustat in late-onset Tay-Sachs disease: a 12-month, randomized, controlled clinical study with 24 months of extended treatment. *Genetics in Medicine* 11, 425–433.
- Sinacore, M.S., Drapeau, D. und Adamson, S.R. (2000). Adaptation of mammalian cells to growth in serum-free media. *Molecular Biotechnology* 15, 249–257.
- Sundaram, K.S. und Lev, M. (1992). Purification and activation of brain sulfotransferase. *The Journal of Biological Chemistry* 267, 24041–24044.
- Takahashi, T. und Suzuki, T. (2012). Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues. *Journal of Lipid Research* 53, 1437–1450.
- Tennekoon, G., Aitchison, S. und Zaruba, M. (1985). Purification and characterization of galactocerebroside sulfotransferase from rat kidney. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 240, 932–944.
- Togame, H., Shimazaki, M., Yamato, A., Watanabe, S.-I., Saito, K. und Reinemer, P. (2003). Development of a simple homogeneous assay to screen for inhibitors of N-acetylglucosamine-6-sulfotransferases. *Analytical Biochemistry* 315, 67–76.
- Vanier, M.T. (2010). Niemann-Pick disease type C. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 5, 1–18.
- van Zyl, R.M. (2009). Untersuchung zur Speicherung und Funktion von Sulfatid in Neuronen anhand von transgenen Mäusen [Dissertation]. Köln: Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln.

- van Zyl, R., Gieselmann, V. und Eckhardt, M. (2010). Elevated sulfatide levels in neurons cause lethal audiogenic seizures in mice. *Journal of Neurochemistry* 112, 282–295.
- von Figura, K., Gieselmann, V., Jaeken, J. (2001). Metachromatic leukodystrophy. In: Scriver *et al.* (eds.). *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. McGraw-Hill, New York. 3695-3724.
- Venier, R.E. und Igdoura, S.A. (2012). Miglustat as a therapeutic agent: prospects and caveats. *Journal of Medical Genetics* 49, 591–597.
- Vitner, E.B., Platt, F.M. und Futerman, A.H. (2010). Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 20423–20427.
- Winzeler, A.M., Mandemakers, W.J., Sun, M.Z., Stafford, M., Phillips, C.T. und Barres, B.A. (2011). The lipid sulfatide is a novel myelin-associated inhibitor of CNS axon outgrowth. *The Journal of Neuroscience* 31, 6481–6492.
- Wittke, D., Hartmann, D., Gieselmann, V. und Lüllmann-Rauch, R. (2004). Lysosomal sulfatide storage in the brain of arylsulfatase A-deficient mice: cellular alterations and topographic distribution. *Acta Neuropathologica* 108, 261–271.
- Wraith, J.E., Vecchio, D., Jacklin, E., Abel, L., Chadha-Boreham, H., Luzy, C., Giorgino, R. und Patterson, M.C. (2010). Miglustat in adult and juvenile patients with Niemann-Pick disease type C: long-term data from a clinical trial. *Molecular Genetics and Metabolism* 99, 351–357.
- Yaghootfam, A., Sorkalla, T., Häberlein, H., Gieselmann, V., Kappler, J. und Eckhardt, M. (2007). Cerebroside sulfotransferase forms homodimers in living cells. *Biochemistry* 46, 9260–9269.
- Yang, Y.S., Marshall, A.D., McPhie, P., Guo, W.-X.A., Xie, X., Chen, X. und Jakoby, W.B. (1996). Two phenol sulfotransferase species from one cDNA: nature of the differences. *Protein Expression and Purification* 8, 423–429.
- Yu, C., Crispin, M., Sonnen, A.F.-P., Harvey, D.J., Chang, V.T., Evans, E.J., Scanlan, C.N., Stuart, D.I., Gilbert, R.J.C. und Davis, S.J. (2011). Use of the  $\alpha$ -mannosidase I inhibitor kifunensine allows the crystallization of apo CTLA-4 homodimer produced in long-term cultures of Chinese hamster ovary cells. *Acta Crystallographica Section F* 67, 785–789.
- Zaruba, M., Hilt, D. und Tennekoon, G. (1985). Inhibition of rat brain galactocerebroside sulfotransferase by triazine aromatic dyes: interaction with the 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate binding site. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 129, 522-529.
- Zeng, S., Dinter, A., Eisenkrätzer, D., Biselli, M., Wandrey, C. und Berger, E.G. (1997). Pilot scale expression and purification of soluble protein A tagged beta 1,6N-acetylglucosaminyltransferase in CHO cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237, 653–658.
- Zervas, M., Somers, K.L., Thrall, M.A. und Walkley, S.U. (2001). Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C. *Current Biology* 11, 1283–1287.
- Zhang, J.-H., Chung, T.D.Y. und Oldenburg, K.R. (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of Biomolecular Screening* 4, 67–73.
- Zheng, W., Padia, J., Urban, D.J., Jadhav, A., Goker-Alpan, O., Simeonov, A., Goldin, E., Auld, D., LaMarca, M.E., Inglese, J., *et al.* (2007). Three classes of glucocerebrosidase inhibitors identified by quantitative high-throughput screening are chaperone leads for Gaucher disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 13192–13197.

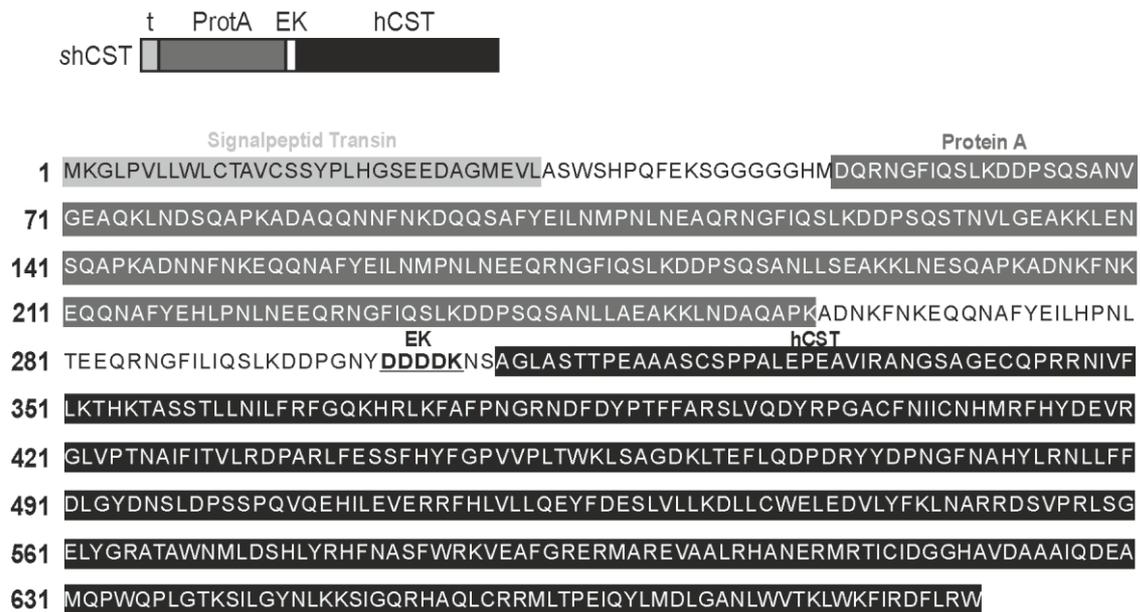
# 8 Anhang

## 8.1 Plasmidkarten





## 8.2 Aminosäuresequenz shCST (t-ProtA-hCST)



## Publikationen

Kuronen, M., Hermansson, M., Manninen, O., Zech, I., Talvitie, M., Laitinen, T., Gröhn, O., Somerharju, P., Eckhardt, M., Cooper, J. D., Lehesjoki A.-E., Lahtinen, U. und Kopra, O. (2012): Galactolipid deficiency in the early pathogenesis of neuronal ceroid lipofuscinosis model Cln8<sup>md</sup>: implications to delayed myelination and oligodendrocyte maturation. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38, 471 – 486.

### Vortrag

Isabell Zech (2011): Expression and intracellular transport of cerebroside sulfotransferase. European Study Group on Lysosomal Diseases Workshop. Långvik, Finland.

### Posterpräsentation

Isabell Zech, Volkmar Gieselmann und Matthias Eckhardt (2011): Expression and intracellular transport of cerebroside sulfotransferase. International Symposium of the NRW International Graduate Research School BIOTECH-PHARMA. Bonn, Deutschland.

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. V. Gieselmann für die Überlassung des Promotionsthemas, sowie das stete Interesse und die hilfreichen Anregungen an meinem Projekt bedanken.

Zudem danke ich Frau Prof. Dr. C. E. Müller für die unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Matthias Eckhardt für die gute und konstante Betreuung. Ich konnte stets auf gewinnbringende Ideen, Hilfestellungen und angeregte Diskussionen bei jeglichen Fragen und Problemen bauen.

Des Weiteren möchte ich mich für die gute Kooperation bei den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. M. Famulok und Frau Prof. C. E. Müller bedanken. Hierbei insbesondere bei Wenjin Li für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit.

Bei der NRW International Graduate Research School BIOTECH-PHARMA bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung und bei Annika für die tolle Begleitung während dieser Zeit.

Allen Mitarbeitern des IBMB danke ich herzlichst. Ich habe mich immer wohl gefühlt und es herrschte stets eine super Arbeitsatmosphäre, wobei der Spaß definitiv nicht verloren ging! Es war einfach schön! Insbesondere erwähnen möchte ich die AG Eckhardt mit Asisa, Elvira (auch eine hervorragende Unterstützung in der Zellkultur - danke), Ivonne, Julia, Klaudia, Lena, Lihua, Matthias und Robert. Nicht zu vergessen „Adoptivkind“ Pezzie, nicht zuletzt für die Hilfe bei der Reinigung feinsten CST.

Darüber hinaus danke ich ganz besonders meiner Familie, ohne deren Unterstützung ich niemals so weit gekommen wäre! Insbesondere auch meiner Schwester Amelie, die einfach immer da ist und das ist unsagbar gut zu wissen.

Zuletzt gilt ein ganz besonderer Dank Philip für seine uneingeschränkte und kontinuierliche Unterstützung und Motivation, sowie seinem riesigen Vertrauen in mich und meine Fähigkeiten. Danke!