

Aus dem Institut für Zellbiochemie
(Prof. Dr. rer. nat. P. Rehling)
im Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Untersuchungen zur molekularen Ursache der Multiplen Sulfatase-
Defizienz: Reinigung, Funktions- und Strukturanalyse von
varianten Proteinen des Formylglycin-generierenden Enzyms**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Marie Helene Mühlhausen

aus

Gießen

Göttingen 2014

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Peter Rehling

II. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Markus Zweckstetter

III. Berichterstatter: Prof. Dr. hum. biol. Margarete Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Grundlagen der Multiplen Sulfatase-Defizienz</i>	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Pathophysiologie	1
1.1.3	Klinik und Verlauf	3
1.1.4	Diagnostik	5
1.1.5	Therapieansätze	6
1.2	<i>Das Formylglycin-generierende Enzym (FGE)</i>	8
1.2.1	Domänenstruktur und N-terminale Prozessierung des FGEs	8
1.2.2	Kristallstruktur und Konformationen des FGEs	10
1.2.3	Synthese und Funktion des C α -Formylglycins in Sulfatasen	12
1.2.4	Interaktionspartner des FGEs	15
1.2.5	MSD-verursachende Mutationen des SUMF1-Gens	16
1.3	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	20
2	Material	21
2.1	<i>Laboraausstattung</i>	21
2.2	<i>Materialien</i>	22
2.3	<i>Chemikalien und Reagenzien</i>	24
2.4	<i>Puffer und Lösungen</i>	26
2.5	<i>Kits</i>	28
2.6	<i>Enzyme</i>	28
2.6.1	Restriktionsendonukleasen	28
2.6.2	Weitere Enzyme	28
2.7	<i>Vektoren</i>	29
2.8	<i>Primer</i>	29
2.9	<i>Antibiotika</i>	30
2.10	<i>Peptide</i>	30
2.11	<i>Antikörper</i>	30
2.11.1	Primärantikörper	30
2.11.2	Sekundärantikörper	30
2.12	<i>Protein-Größenstandards</i>	31

2.13	<i>Bakterienstämme</i>	31
2.14	<i>Zelllinien</i>	31
2.15	<i>Zellkulturmedien</i>	31
2.16	<i>Medien zur Kultivierung von E.coli</i>	32
2.17	<i>Software</i>	32
3	Methoden	33
3.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	33
3.1.1	Mutagenese-Polymerasekettenreaktion.....	33
3.1.2	DpnI-Verdau der template DNS.....	35
3.1.3	Restriktionsverdau des Vektors.....	35
3.1.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	36
3.1.5	Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen.....	37
3.1.6	Aufreinigung bakterieller Plasmid-DNS.....	37
3.1.7	Sequenzierung von DNS-Fragmenten.....	39
3.1.8	Bestimmung der DNS-Konzentration und -Reinheit	40
3.2	<i>Zellbiologische Methoden</i>	41
3.2.1	Kultivieren von Zellen	41
3.2.2	Passagieren von Zellen.....	41
3.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	42
3.2.4	Stabile Transfektion eukaryotischer Zelllinien	42
3.2.5	Vorbereitung der Zellpellets für Expressions-Analysen mittels Westernblot	43
3.3	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	44
3.3.1	BCA-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration	44
3.3.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	45
3.3.3	Westernblot	46
3.3.4	Entfernen von Antikörpern	47
3.3.5	Fällung von Proteinen	47
3.3.6	Entsalzung und Umpuffern von Proteinproben durch Dialyse	48
3.3.7	Färben von Gelen	49
3.3.8	Konzentrieren von Proben mittels Lyophilisierung	50
3.3.9	Konzentrierung proteinhaltiger Proben durch Ultrafiltration	51
3.3.10	Substratbindungschromatographie der FGE-Mutanten.....	51

3.3.11	Affinitätschromatographie	54
3.3.12	Entsalzung durch Gelfiltration	56
3.3.13	Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie.....	56
3.3.14	Aufreinigung mittels ASA-C69S-Affigel-Peptidmatrix	57
3.3.15	Prinzip der MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	58
3.3.16	Messung der <i>in vitro</i> -Aktivität des FGEs.....	59
3.3.17	In-Gel-Protein-Verdau	61
3.3.18	Protein-Sequenz-Analyse mit Hilfe der DriedDroplet-Auftragsmethode	62
4	Ergebnisse	64
4.1	<i>Produktion der FGE-Mutanten.....</i>	64
4.1.1	Expression der FGE-Mutanten vor Aufreinigung.....	64
4.1.2	Optimierung der Zellkulturbedingungen zur Effizienzsteigerung von Expression und Aufreinigung der FGE-Mutanten	66
4.2	<i>Untersuchung zur Substratbindung der FGE-Mutanten im Vergleich zum FGE-Wildtyp.....</i>	69
4.2.1	Analyse des Bindungsverhaltens des FGE-WTs an die C69S-Peptidmatrix bei steigender FGE-Konzentration.....	70
4.2.2	Quantifizierung der Menge an FGE-Mutanten im jeweiligen Dialysat	71
4.2.3	Quantitativer Vergleich der Substratbindung der FGE-Mutanten mit der des FGE-WTs.....	73
4.3	<i>Aufreinigung der FGE-Mutanten A177P, W179S, G247R und G263V aus Zellkulturüberständen.....</i>	75
4.3.1	Aufreinigung mittels HisTrap-Affinitätschromatographie	75
4.3.2	Aufreinigung der FGE-Mutante G263V mittels der ASA-C69S-Affigel- Peptidmatrix	79
4.3.3	Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie.....	81
4.4	<i>Proteinidentifizierung der FGE-Mutanten mittels Massenspektrometrie.....</i>	86
4.5	<i>In vitro-FGE-Aktivitätstest zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der FGE-Mutanten.....</i>	88
5	Diskussion	94
5.1	<i>Bei schrittweiser Reduktion von FKS im Zellkulturmedium kann die Expression aufrechterhalten werden.....</i>	94
5.2	<i>Affinitätschromatographie und Anionenaustauschchromatographie ermöglichen eine effiziente Aufreinigung der FGE-Mutanten</i>	95

5.2.1	Reduktion von FKS im Zellkulturmedium hat keinen messbar positiven Effekt auf das Aufreinigungsergebnis nach HisTrap-Affinitätschromatographie.....	95
5.2.2	Affinitätschromatographie der Mutante FGE-G263V über die ASA-C69S-Peptidmatrix führt zu geringer Ausbeute.....	96
5.2.3	Die Anionenaustauschchromatographie ermöglicht eine effiziente Aufreinigung der FGE-Mutanten A177P, W179S und G247R.....	97
5.3	<i>Charakteristika und strukturelle Besonderheiten der FGE-Mutanten</i>	98
5.3.1	FGE-Mutante A177P und W179S	99
5.3.2	FGE-Mutante G263V	100
5.3.3	FGE-Mutante G247R	100
6	Zusammenfassung	103
7	Literaturverzeichnis	105
8	Anhang (Tabellen und Abbildungen)	114
8.1	<i>Abkürzungen</i>	114
8.2	<i>Tabellenverzeichnis</i>	118
8.3	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	118
8.4	<i>Proteinsequenz von FGE</i>	120

1 Einleitung

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Multiplen Sulfatase-Defizienz

1.1.1 Epidemiologie

Die Multiple Sulfatase-Defizienz (MSD) ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung mit einer Prävalenz von 1:1,4 Millionen Neugeborenen (Hopwood und Ballabio 2001). In der Gruppe der angeborenen Stoffwechseldefekte (*inborn errors of metabolism*, IEM) wird sie zum Formenkreis der lysosomalen Speicherkrankheiten gezählt, welche mit etwa 60 % den größten Anteil der IEMs ausmachen (Coelho et al. 1997). Im Vergleich zu anderen lysosomalen Speicherkrankheiten, z.B. der Metachromatischen Leukodystrophie (Prävalenz: 1:92000) oder Mukopolysaccharidosen vom Typ I (Prävalenz: 1-5,5:144927), tritt die MSD deutlich seltener auf (Baehner et al. 2005; Meikle et al. 1999; Murphy et al. 2009). Der klinische Phänotyp der MSD wurde erstmals 1963 und 1965 durch Austin beschrieben (Austin 1963, 1965). Die Anzahl der weltweit in der Literatur beschriebenen Fälle beläuft sich derzeit auf weniger als 50 (Schlotawa et al. 2011).

1.1.2 Pathophysiologie

Von den ersten Beschreibungen des Krankheitsbildes der MSD 1963 bis zur Entschlüsselung des zugrundeliegenden Pathomechanismus vergingen mehrere Jahrzehnte. 2003 gelang zwei Forschungsgruppen unabhängig voneinander die Identifikation des verantwortlichen Gens (*sulfatase-modifying factor 1*, SUMF1) und des kodierten Proteins (*Formylglycin-generierendes Enzym*, FGE) (Cosma et al. 2003; Dierks et al. 2003). Zelllinien von Patienten mit MSD wiesen eine oder mehrere Mutationen im SUMF1-Gen auf. Die MSD ist eine monogenetische Erkrankung. Bis heute konnten mehr als 30 verschiedene FGE-Mutationen identifiziert werden, wobei es sich insbesondere um *missense*-Mutationen handelt (Artigalás et al. 2009; Cosma et al. 2004; Diaz-Font et al. 2005; Dierks et al. 2003, 2005). Eine Schlüsselrolle im Entstehungsmechanismus der Erkrankung spielt das durch den Gendefekt modifizierte FGE, welches für die Aktivierung neu synthetisierter Sulfatasen im endoplasmatischen Retikulum (ER) essentiell ist. Alle Sulfatasen besitzen in ihrem aktiven Zentrum die sogenannte Signatursequenz I, eine konservierte, lineare Aminosäureabfolge mit dem Motiv CxPxR (siehe Kapitel 1.2.2). Das darin enthaltene Cystein wird mit Hilfe des FGEs in einer ko- oder posttranslationalen

1 Einleitung

Modifikation in eine Sulfatase-spezifische, nicht-proteinogene Aminosäure umgewandelt, das C α -Formylglycin (FGly, 2-Amino-3-oxopropionsäure) (Schmidt et al. 1995) (siehe Kapitel 1.2.3). Dieses ist für die katalytische Aktivität der Sulfatasen essentiell. Bei Patienten mit MSD ist das FGE defekt, so dass FGly nicht oder nur unvollständig gebildet werden kann (Dierks et al. 1997, 1999; Knaust et al. 1998). Infolgedessen ist die Aktivität aller 17 bis heute bekannten Sulfatasen gleichzeitig reduziert (siehe Tabelle 1). Bis heute sind 13 Sulfatasen biochemisch charakterisiert. 8 unterschiedliche Krankheitsbilder konnten als Folge isolierter Sulfatasedefizienzen beschrieben werden (Dierks et al. 2009; Diez-Roux und Ballabio 2005). Das Vorkommen dieser verschiedenen Defizienzen verdeutlicht, dass Sulfatasen nicht redundant sind und über eine hohe Substratspezifität verfügen (Hanson et al. 2004). Je nach ihrer subzellulären Lokalisierung werden sie in lysosomale und nicht-lysosomale Enzyme eingeteilt. Der größere Teil, etwa die Hälfte, ist in Lysosomen lokalisiert, wo sie die hydrolytische Spaltung von Glykosaminoglykanen (GAGs) und Sulfolipiden katalysieren (Hanson et al. 2004). Die aus verschiedenen Disaccharideinheiten aufgebauten GAGs werden in Abhängigkeit von der Art der Zuckerreste und der Position zusätzlicher Sulfatgruppen in vier Hauptkategorien eingeteilt: Hyaluronat (Vorkommen: Synovialflüssigkeit, Glaskörper, Nabelschnur), Chondroitinsulfat (Knorpel, Haut, Blutgefäße, Herzklappen), Heparin/ Heparansulfat (Lunge, Mastzellen, Basallamina, Epithel) und Keratansulfat (Kornea, Knorpel, Nucleus pulposus) (Rassow et al. 2008). Je nach Art des Enzymausfalls kommt es zur Akkumulation des jeweiligen Substrats in den Lysosomen und zur Ausscheidung von partiellen Abbau-produkten im Urin (siehe Tabelle 1). Zu den nicht-lysosomalen Sulfatasen werden alle Enzyme gezählt, die ihren Wirkungsort an der Zelloberfläche, im ER und im Golgi-Apparat haben. Hier sind die Sulfatasen u.a. an Umsatz und Aktivierung von Steroidhormonen (z.B. Dehydroepiandrosteron 3-sulfat) beteiligt sowie der Modulation von Signaltransduktionsprozessen (Dierks et al. 2009). Für einige Sulfatasen sind Lokalisation, Substrat und Funktion noch nicht charakterisiert. Ein gleichzeitiger Ausfall aller Sulfatasen, wie er bei MSD-Patienten vorkommt, führt folglich zu einer komplexen Beeinträchtigung zellulärer Funktionen. Die Substratakkumulation führt über den Prozess einer gestörten Autophagie letztlich zu einem irreversiblen Zellschaden und zur Apoptose (Settembre et al. 2008).

1 Einleitung

Sulfatase (Abkürzung)	Substrat	Lokalisierung	Assoziierte Erkrankung
Arylsulfatase A (ASA)	Cerebrosid-3-sulfat	Lysosomen	Metachromatische Leukodystrophie (MLD)
Arylsulfatase B (ARB)	Chondroitin-4-sulfat, Dermatansulfat	Lysosomen	Maroteaux-Lamy Syndrom (MPS VI)
Arylsulfatase C (ASC)	Steroidsulfat	ER	X-chromosomale Ichthyose (XLI)
Arylsulfatase D (ASD)	-	ER	-
Arylsulfatase E (ASE)	-	Golgi	Chondrodysplasia Punctata Typ I (CDPX)
Arylsulfatase F (ASF)	-	ER	-
Arylsulfatase G (ASG)	-	Lysosomen	-
Arylsulfatase H (ASH)	-	-	-
Arylsulfatase I (ASI)	-	-	-
Arylsulfatase J (ASJ)	-	-	-
Arylsulfatase K (ASK)	-	-	-
Galaktosamin-6-Sulfatase (GalN6S)	Chondroitin-6-sulfat, Keratansulfat	Lysosomen	Morquio A Syndrom (MPS IVA)
Glukosamin-6-Sulfatase (GlcN6S)	Heparansulfat, Keratansulfat	Lysosomen	Sanfilippo D Syndrom (MPS IIID)
Heparan N-Sulfatase (Sulfamidase, SGSH)	Heparansulfat	Lysosomen	Sanfilippo A Syndrom (MPS IIIA)
Iduronat-2-Sulfatase (IdoA2S)	Dermatansulfat, Heparansulfat	Lysosomen	Hunter Syndrom (MPS II)
Sulfatase 1 (Sulf1)	Heparansulfat	Zelloberfläche	-
Sulfatase 2 (Sulf2)	Heparansulfat	Zelloberfläche	-

Tabelle 1: Übersicht über Substrate, Lokalisierung und assoziierte Erkrankungen humaner Sulfatasen

ER: endoplasmatisches Retikulum, MPS: Mukopolysaccharidose, -: unbekannt. Zusammengestellt aus Hanson et al. 2004, Diez-Roux und Ballabio 2005, Futerman und van Meer 2004, Freese et al. 2008.

1.1.3 Klinik und Verlauf

Austin beschrieb die MSD erstmalig als eine Variante der Metachromatischen Leukodystrophie (MLD), einer lysosomalen Speicherkrankheit auf Grund einer Defizienz der Arylsulfatase A (ASA), die zu Demyelinisierungen im zentralen und peripheren Nervensystem führt (siehe Tabelle 1) (Austin 1963). Später erfolgte die Bezeichnung als MSD auf Grund der Kombination klinischer und pathobiochemischer Charakteristika einzelner Sulfatasedefizienzen (Austin 1973; Eto et al. 1974). Die MSD zeigt ein heterogenes klinisches Erscheinungsbild. Der klinische Phänotyp reicht von milderen juvenilen Verlaufsformen bis hin zu schweren neonatalen Formen mit progressivem Verlauf und frühem Tod der Patienten. Die Symptome der Patienten sind eine Kombination verschiedener singulärer Sulfatasedefekte (Hopwood und Ballabio 2001; Nyhan und Ozand 1998; van der Knaap und Valk 2005). Ähnlich dem Verlauf der MLD weisen Patienten mit MSD neurodegenerative Symptome mit progredientem Verlust sensorischer und motorischer Fähigkeiten auf. Weitere klinische Zeichen wie

1 Einleitung

Entwicklungsverzögerung, Hepatosplenomegalie, Vergrößerung der Gesichtszüge, Gelenksteife, Taubheit und Hornhauttrübung treten ähnlich wie bei MPS auf. Skelettveränderungen und Verkalkungen des Knorpelgewebes vergleichbar mit der Chondrodysplasia punctata Typ I sind bekannt. Eine weitere häufig auftretende Begleiterkrankung ist die X-chromosomal vererbte Form der Ichthyose, eine Verhornungsstörung der Haut mit schuppenartigen Hyperkeratosen (Hopwood und Ballabio 2001; Nyhan und Ozand 1998; van der Knaap und Valk 2005). Die Symptomkonstellation und der unterschiedliche Zeitpunkt ihres Auftretens ermöglichen eine Einteilung der MSD in verschiedene Krankheitstypen: eine milde sowie eine schwere kindliche, eine neonatale und eine jugendliche Verlaufsform (siehe Tabelle 2) (Hopwood und Ballabio 2001; Nyhan und Ozand 1998; Schlotawa et al. 2008).

Der kindliche Subtyp der MSD ist am häufigsten zu beobachten. Er ähnelt in seiner Symptomkonstellation der späten kindlichen MLD, wobei zusätzlich klinische Zeichen einer MPS auftreten können. Je nach Ausprägung und Beginn der Symptomatik wird eine Unterteilung in schwere und leichte Fälle vorgenommen (siehe Tabelle 2) (Schlotawa et al. 2008). Zu Beginn der Erkrankung sind die Kinder häufig noch unauffällig oder weisen allenfalls eine geringe Entwicklungsverzögerung auf. Sie erlangen in der Regel die Fähigkeit zu stehen und einige Wörter zu sprechen. Ab dem zweiten Lebensjahr kommt es zu einem zunehmenden Verlust erworbener Fähigkeiten. Die Kinder können Zeichen einer progressiven Enzephalopathie, Spasmen, Blindheit, Hörverlust und Schluckstörungen aufweisen, bis hin zu einer vollständigen Areflexie im finalen Stadium. (Díaz-Font et al. 2005; Loffeld et al. 2002; Mancini et al. 2001; van der Knaap und Valk 2005). Eine Variante der spätinfantilen Form wurde als sogenannte Saudi-Variante veröffentlicht. Die beschriebenen Patienten zeigten einen klinischen Phänotyp, der sich von den vier MSD-Subtypen unterscheidet (al Aqeel et al. 1992).

Im Falle der neonatalen Verlaufsformen wird die Erkrankung auf Grund der Schwere ihrer Symptome bereits kurz nach der Geburt diagnostiziert. Die Patienten zeigen früh charakteristische Merkmale verschiedener MPS wie Gesichtsdysmorphien, einen verkürzten Nacken, eine schwere Dysostosis multiplex, Hornhauttrübungen und eine Makrozephalie als Folge eines Hydrozephalus. Weiterhin leiden die Kinder an einer schweren Enzephalopathie, die meist zum Tode im Lauf des ersten Lebensjahres führt (Busche et al. 2009; Dierks et al. 2009; van der Knaap und Valk 2005).

Die äußerst seltene jugendliche Form der MSD wurde bisher nur in einer Veröffentlichung beschrieben. Die Betroffenen entwickelten sich zunächst normal und fielen erst im späten

1 Einleitung

Kindesalter mit vereinzelt MSD-Symptomen auf. Dazu zählen Ichthyose, Hydrozephalus, Kleinwuchs und mentale Retardierung. Untypisch für eine MSD war die nur langsam fortschreitende neurologische Symptomatik und das Fehlen einer Hepatosplenomegalie (Blanco-Aguirre et al. 2001).

Symptome/ Erkrankungstyp	neonatal (sehr schwer)	kindliche (schwer)	kindliche (leicht)	juvenil (leicht)
Retardierung	+++	+++	+++	++
Neurodegeneration/ neurologische Symptome	+++	+++	+++	++
Ichthyose	+++	+++	++	+
Dimorphismus	+++	+++	-	+
Organomegalie	+++	+++	-	-
Skelettveränderungen	+++	+++	+	-
Intrauterine Manifestation	+++	+++	-	-
Herzerkrankung	+++	-	-	-
Hornhauttrübung	+++	-	-	-
Hydrozephalus	+++	-	-	-

Tabelle 2: Symptomkonstellation und -beginn bei den verschiedenen MSD-Subtypen

Alter bei Symptombeginn: +++ < 2 Jahre, ++ 2-4 Jahre, + > 4 Jahre, - nicht beobachtet. Übernommen aus Dierks et al. 2009.

1.1.4 Diagnostik

Der Verdacht einer Erkrankung an MSD erfolgt anhand klinischer Merkmale. Die Diagnose einer MSD sollte insbesondere bei jungen Patienten mit den typischen Symptomen einer MLD und gleichzeitig Zeichen einer MPS sowie einer begleitenden Ichthyose in Betracht gezogen werden (Burk et al. 1984). Auffälligkeiten in der bildgebenden Diagnostik, insbesondere der zerebralen Magnetresonanztomographie (MRT)-Bildgebung stellen wesentliche paraklinische Zeichen dar. Ähnlich wie bei MLD-Patienten können bei MSD-Patienten hyperintense MRT-Signale in periventrikulären und subkortikalen Bereichen der weißen Substanz als Zeichen einer Demyelinisierung sichtbar sein. In späteren Krankheitsstadien kommt es bei einem Teil der Kinder zu einer schweren Atrophie der gesamten weißen Substanz (van der Knaap und Valk 2005). Zeichen von knöchernen Deformationen oder einer Chondrodysplasia Punctata Typ I sind zusätzliche Auffälligkeiten bei der Anwendung bildgebender Verfahren. Die Abgrenzung zu singulären Sulfatasedefekten und damit der Nachweis der MSD gelingen durch

1 Einleitung

biochemische Analytik. Die Anreicherung von GAGs als Speicherprodukten in Geweben und deren Ausscheidung im Urin zeigt ein Muster, das für die MSD charakteristisch ist. Im Urin kann die gleichzeitige Ausscheidung von Dermatansulfat, Chondroitinsulfat und Heparansulfat bestimmt werden. Die Messung verminderter Enzymaktivitäten einzelner Sulfatasen in Leukozyten oder kultivierten Fibroblasten von Patienten zeigt die Defizienz der betroffenen Enzyme. (Dierks et al. 2009; Eto et al. 1979, 1982; Guerra et al. 1990).

Nach Entdeckung des SUMF1-Gens ist mittlerweile eine molekulargenetische Diagnostik zur Bestätigung einer Erkrankung möglich. Diese erlaubt auch eine pränatale Diagnostik in betroffenen Familien (Dierks et al. 2009). Zusätzlich zu der klinischen Einteilung der MSD können Patienten anhand der Sulfatase-Restaktivitäten in kultivierten Fibroblasten in zwei Gruppen klassifiziert werden. Gruppe I umfasst neonatale und spätinfantile schwere Fälle. Die Sulfatase-Restaktivität beträgt weniger als 15 % der Aktivität gesunder Kontrollpersonen. Die Restaktivität der Sulfatasen von Patienten aus Gruppe II, die spätinfantile mildere und juvenile Fälle umfasst, liegt über 15 % bis hin zu normaler Aktivität (Chang et al. 1983; Conary et al. 1988; Steckel et al. 1985).

1.1.5 Therapieansätze

Bis heute gibt es keine kausale Therapie der MSD. Prinzipiell mögliche Therapieansätze sind eine Enzymersatztherapie, eine Gentherapie oder der Einsatz sogenannter pharmakologischer Chaperone zur Stabilisierung varianter Proteine der FGE-Mutanten (Dierks et al. 2009; Sawkar et al. 2005; Ulloa-Aguirre et al. 2004; Zito et al. 2007). Einige dieser Therapieverfahren befinden sich in der Erprobung im Zell- und Tiermodell. Der Nutzen einer klassischen Enzymersatztherapie ist für eine Vielzahl singulärer Sulfatasedefekte belegt (Decker et al. 2010; Harmatz et al. 2004, 2005, 2010; Muenzer et al. 2002, 2006, 2007). Die Enzymersatztherapie macht sich zu Nutze, dass extrazelluläre lysosomale Enzyme, von anderen Zellen sezerniert oder künstlich dem Plasma zugefügt, nach Endozytose das Lysosom erreichen und dort funktionsfähig sein können. Neufeld et al. beobachteten erstmals eine solche Speicherung endozytierter lysosomaler Enzyme in kultivierten Fibroblasten von Patienten mit unterschiedlichen Formen von MPS (Neufeld et al. 1999). Obwohl kein lysosomales Enzym, konnte auch für FGE nachgewiesen werden, dass es nicht nur sezerniert und von benachbarten Zellen wieder aufgenommen werden kann, sondern in den Empfängerzellen ein Rücktransport des FGEs in das ER erfolgt. Das aufgenommene FGE führte in den Empfängerzellen zu einem signifikanten Anstieg der

1 Einleitung

Sulfataseaktivitäten (Zito et al. 2007). Weiterführende Untersuchungen, welche eine Enzymersatztherapie für MSD möglich machen würden, stehen allerdings bis heute aus. Probleme ergeben sich dabei zum Beispiel dadurch, dass auf Grund der zerebralen Beteiligung bei Patienten mit MSD die Blut-Hirn-Schranke eine intraventrikuläre Injektion der Enzyme erforderlich macht (Crawley et al. 2011; Dickson et al. 2007). Für diverse lysosomale Erkrankungen weisen Studienergebnisse z.B. an Hunden auf einen positiven Effekt der intrathekalen Enzymersatztherapie hin (Crawley et al. 2011). Darüber hinaus führten intrazerebrale Koinjektionen des FGEs und der ASA bei MLD-Mäusen zu einer Aktivitätssteigerung der ASA im Gehirn sowie zu einer Verbesserung neurologischer Funktionen. Erstaunlicherweise konnten die positiven Effekte auch in der nicht-therapierten Gehirnhälfte nachgewiesen werden. Intravenöse Injektionen führten des Weiteren zu einer erhöhten ASA-Aktivität im Serum (Kurai et al. 2007).

Ein anderes Konzept in der Behandlung von isolierten Sulfatasedefizienzen stellt die Gentherapie dar, bei der eine Koexpression von SUMF1-cDNS mit der cDNS bzw. dem Gen der jeweiligen Sulfatase erfolgt. Untersuchungen an Patientenzellen und im Mausmodell ergaben, dass eine zusätzliche Expression des FGEs den Anstieg der Sulfataseaktivitäten fördert (Fraldi et al. 2007a, b; Kurai et al. 2007; Takakusaki et al. 2005; Tomatsu et al. 2008, 2010). Eine damit verbundene Reduktion der intrazellulär gespeicherten Sulfolipide und GAGs konnte in Experimenten an MLD-, MPS IIIA- und MPS IVA -Mäusen bereits nachgewiesen werden (Fraldi et al. 2007a; Kurai et al. 2007; Tomatsu et al. 2010).

Auch für die MSD scheint eine Gentherapie möglich. In SUMF1-defizienten Mäusen führte die Expression des Adeno-assoziierten Virus Serotyp 9 (rAAV9) im Gehirn und auf systemischem Wege zu einer umfassenden Aktivierung der Sulfatasen und einer deutlichen Besserung der kognitiven und motorischen Leistungen (Spampanato et al. 2011).

Eine dritte Therapieoption stellt die Stabilisierung varianter Proteine der FGE-Mutanten dar. Analog zu Ergebnissen vom Einsatz sogenannter molekularer Chaperone bei klassischen lysosomalen Speicherkrankheiten, die zu einer Stabilisierung varianter Proteine im ER führen und den Transport in das Lysosom ermöglichen, ist eine positive Beeinflussung der Fehlfaltung zur Aktivitätssteigerung von FGE-Mutanten denkbar (Sawkar et al. 2005; Ulloa-Aguirre et al. 2004). Entsprechende Versuchsreihen werden zurzeit allerdings noch nicht durchgeführt.

1 Einleitung

1.2 Das Formylglycin-generierende Enzym (FGE)

Das FGE ist ein in Pro- und Eukaryoten vorkommendes hoch konserviertes Enzym (Dierks et al. 2003; Landgrebe et al. 2003). Das 41 kDa große Protein ist beim Menschen aus 374 Aminosäuren aufgebaut und wird ubiquitär exprimiert. Intrazellulär ist es im ER lokalisiert, wo es die ko- oder posttranslationale Oxidation eines Cysteinrestes innerhalb der Konsensussequenz CxPxR eukaryotischer Sulfatasen zum katalytisch aktiven C α -Formylglycin katalysiert (Dierks et al. 1997, 1998, 2005; Preusser-Kunze et al. 2005; Roeser et al. 2006). Das humane FGE wird durch das SUMF1-Gen kodiert. Dieses 106 kb große Gen ist auf Chromosom 3p26 lokalisiert und ist analog sowohl in pro- als auch in anderen eukaryotischen Organismen zu finden (Cosma et al. 2003; Dierks et al. 2003; Landgrebe et al. 2003). Mutationen im SUMF1-Gen führen zum Krankheitsbild der MSD (siehe Kapitel 1.1.2).

1.2.1 Domänenstruktur und N-terminale Prozessierung des FGEs

Das reife humane FGE ist aus zwei Domänen aufgebaut, einer N-terminalen Domäne mit den Aminosäureresten 34-90 sowie einer Kerndomäne mit den Aminosäureresten 91-374 (siehe Abbildung 1). Eine am N-terminalen Ende befindliche Signalsequenz (Aminosäuren 1-33) dient der Translokation ins ER und wird anschließend abgespalten. Die Kerndomäne enthält das aktive Zentrum und ist *in vitro* auch ohne die N-terminale Domäne enzymatisch aktiv (Preusser-Kunze 2005). Die N-terminale Domäne, die nur in Eukaryoten zu finden ist, ist für die *in vivo*-Aktivität des FGEs essentiell und vermittelt die Retention des Enzyms im ER (Mariappan et al. 2008b).

FGE enthält acht Cysteine, zwei in der N-terminalen Domäne und sechs in der Kerndomäne (siehe Abbildung 1). Vier der Cysteine innerhalb der Kerndomäne bilden Disulfidbrücken (Cys218-Cys365, Cys235-Cys346). Ihnen wird eine strukturstabilisierende Funktion zugeschrieben. Eine besondere Funktion kommt den Cystein-Resten Cys336 und Cys341 zu. Sie sind im aktiven Zentrum lokalisiert und als Bestandteil der Substratbindungstasche direkt an der Aktivierung der Sulfatasen beteiligt. In Kristallen konnten sie sowohl in reduzierter als auch in disulfidverbrückter Form gefunden werden (siehe Abbildung 1, Dierks et al. 2005). Ebenfalls redoxaktiv sind die zwei N-terminalen Cysteine Cys50 und Cys52, die reduziert oder miteinander verbrückt gefunden wurden, aber auch an der Bildung von disulfidverbrückten FGE-Homodimeren mit einer Größe von etwa 80 kDa beteiligt sein können (Preusser-Kunze et al. 2005). Cys50 und Cys52 sind

1 Einleitung

Teil eines CGC- Thioredoxinmotivs, das als funktionelles Mimikry des aktiven Zentrums der Proteindisulfidisomerase (PDI) (Woycechowsky und Raines 2003) mit bislang unklarer Funktion für FGE diskutiert wird (siehe Kapitel 1.2.4). Fest steht bereits, dass beide Cysteine für die katalytische Aktivität des FGEs in der Zelle von Bedeutung sind. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine Mutation von Cys52 zum vollständigen Verlust der *in vivo*-Aktivität des FGEs führt, während eine Mutation von Cys50 die *in vivo* FGE-Aktivität um 50 % reduziert. Diese Erkenntnisse verdeutlichen die Bedeutung der N-terminalen Domäne für die FGly-Bildung *in vivo* und lassen eine Interaktion mit dem aktiven Zentrum der Kerndomäne des FGEs vermuten. Eine weitere Funktion der N-terminalen Domäne besteht in der Retention des FGEs im ER über eine Interaktion mit dem ER-residenten Protein ERp44 (Mariappan et al. 2008a, 2008b) (siehe Kapitel 1.2.4).

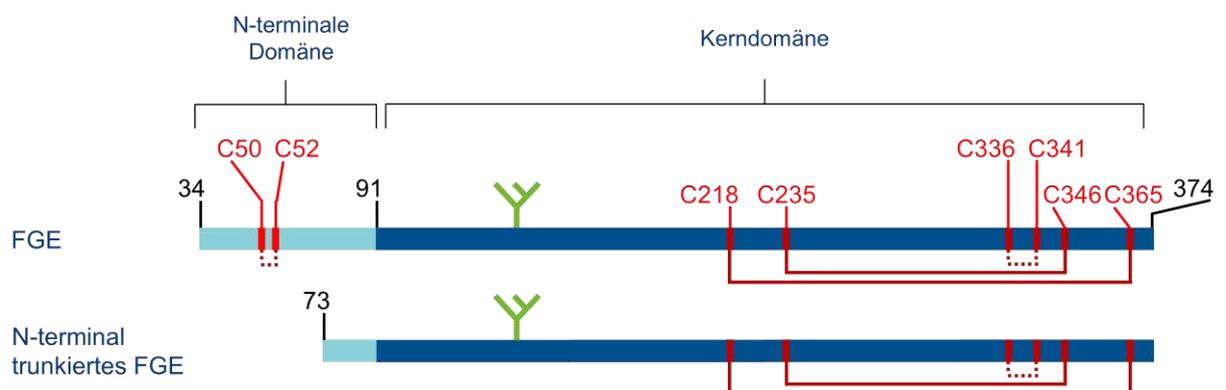


Abbildung 1: Schematische Darstellung der reifen Form und der N-terminal trunkierten Form des FGEs

In der reifen Form des humanen FGEs (oben) sind acht Cysteine dargestellt. Die Cysteine Cys50 und Cys52 sind in der N-terminalen Domäne (hellblau) lokalisiert und an der Bildung von disulfidverbrückten FGE-Homodimeren beteiligt (Preusser-Kunze et al. 2005). Die im aktiven Zentrum des FGEs lokalisierten Cysteine Cys336 und Cys341 sind direkt an der Aktivierung der Sulfatasen beteiligt und zum Teil in Disulfidverbrückter Form gefunden worden (punktierte rote Linie). Zwischen den Strukturcysteinen Cys218-Cys235 und Cys346-Cys365 eingezeichnete rote Linien stellen strukturstabilisierende Disulfidbrücken dar. An der in dunkelblau dargestellten Kerndomäne ist die N-glykosidisch verknüpfte Oligosaccharid-Seitenkette (grün) abgebildet. Das N-terminal trunkierte FGE (unten) entsteht bei der Sekretion des Enzyms nach Abspaltung der Aminosäurereste 34-72 durch die Golgi-ständige Endoprotease Furin (verändert nach Dierks et al. 2009).

Im Bereich der Aminosäurereste 69-72 besitzt die N-terminale Domäne eine Spaltstelle für die Protease Furin. Sie spielt eine wesentliche Rolle bei der Prozessierung des FGEs im sekretorischen Weg. Bei Überexpression des Enzyms in der Zelle zeigte sich eine verstärkte Sekretion des Proteins ins Medium (Preusser-Kunze et al. 2005, Zito et al. 2007). Analysen des Mediums ergaben, dass es sich hierbei, neben der reifen Form,

1 Einleitung

vornehmlich um eine trunkierte Form des FGEs handelt, der der Hauptanteil der N-terminalen Domäne fehlt (Mariappan et al. 2008b) (siehe Abbildung 1). Diese Abspaltung des N-Terminus erfolgt durch die Ca^{2+} -abhängige Serin-Endoprotease Furin am C-terminalen Ende des Sequenzmotivs Arg-Tyr-Ser-Arg (Ennemann et al. 2013). Diese im trans-Golgi-Apparat lokalisierte und ubiquitär exprimierte Präprotein-Konvertase katalysiert die proteolytische Spaltung zahlreicher Vorläuferproteine von Hormonen, Wachstumsfaktoren und Proteasen der Blutgerinnungskaskade (Hosaka et al. 1991; Molloy et al 1992). Dabei zeichnet sie sich durch eine hohe Substratspezifität aus (Thomas 2002). An Position Asn141 der Kerndomäne wird FGE im ER glykosyliert. Während bei intrazellulärem FGE der für ER-ständiges FGE typische Mannose-reiche Typ dominiert, weist sezerniertes FGE, das auf dem sekretorischen Weg durch den Golgi-Apparat modifiziert wurde, vornehmlich Zucker des komplexen Typs auf (Preusser-Kunze et al. 2005).

1.2.2 Kristallstruktur und Konformationen des FGEs

Die Kristallstruktur des humanen sezernierten, N-terminal trunkierten FGEs zeigt eine globuläre Struktur der Kerndomäne (Dierks et al. 2005) (siehe Abbildung 2). Zwischen den insgesamt sechs Cysteinen sind zwei strukturegebende intramolekulare Disulfidbrücken ausgebildet. Eine Besonderheit in der Faltung des Enzyms stellen die beiden formstabilisierenden Ca^{2+} -Ionen und der auffallend geringe Gehalt an Sekundärstruktur dar (20 % β -Faltblätter, 13 % α -Helices). Weiterhin finden sich am Pro115 und Pro266 zwei cis-Peptidbindungen und eine N-Glykosylierung an Asn141.

Die im aktiven Zentrum des FGEs lokalisierte Substratbindungstasche stellt sich als schmale, oval geformte Vertiefung dar. Die Bindung des kokristallisierten Substratpeptids an das FGE erfolgt in einer gestreckten Konformation. Bedingt durch die hohe Komplementarität der FGE-Oberfläche zum Substrat sind für die Substratbindung nur minimale Konformationsänderungen erforderlich. Wie in Kapitel 1.1.2 bereits beschrieben ist für die Substratbindung das Vorhandensein eines CxPxR-Motivs innerhalb der Sulfatasesequenz erforderlich. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die durch die Arginin- und Prolin-Seitenketten vermittelten Wechselwirkungen mit Aminosäureresten der Substratbindungsstelle. Eine mögliche Interaktion erfolgt zwischen den beiden Cysteinen des aktiven Zentrums des FGEs (Cys336 und Cys341) mit dem Cystein-Rest des Sulfatasepeptids. Es wird vermutet, dass es während der Katalyse zu einer kovalenten

1 Einleitung

Bindung durch die Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke zwischen Cys341 und dem Cystein-Rest des Substratkernmotivs kommt (Roeser et al. 2006).

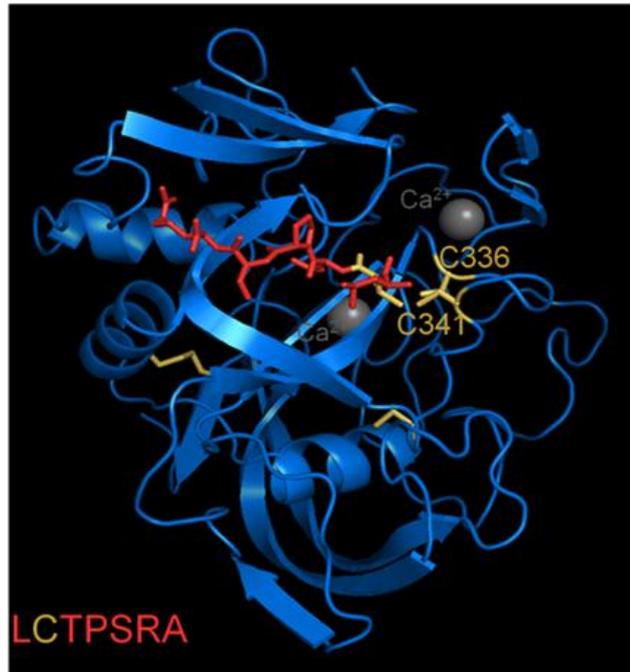


Abbildung 2: Kristallstruktur der FGE-Kerndomäne

FGE ist im als Kokristall mit dem in rot markiertem Sulfatase-Substratpeptid LCTPSRA dargestellt. Die Struktur wird durch in gelb hervorgehobene Disulfidbrücken sowie zwei Ca^{2+} -Ionen (grau) stabilisiert. Die für die katalytische Aktivität des FGEs erforderlichen Cystein-Reste Cys341 und Cys336 sind ebenfalls in gelb dargestellt (verändert nach Dierks et al. 2009).

Nach SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen und anschließender Analyse mittels Westernblot konnten mehrere Banden für FGE identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um unterschiedliche Konformationen des FGEs, wobei die Bande bei 37 kDa als geschlossene und oxidierte, jene bei 40 kDa als offene und reduzierte Form und eine dazwischen als intermediäre Form des FGEs bezeichnet wird (siehe Abbildung 3). Durch *in vivo*-Experimente konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung kultivierter Fibroblasten mit N-Ethylmaleimid (NEM) die geschlossene/oxidierte Form stabilisiert (Wachs 2009). Alle drei Formen wurden auch für das FGE-Homodimer nachgewiesen. Die funktionelle Bedeutung dieser Konformationen ist noch nicht abschließend untersucht.

1 Einleitung

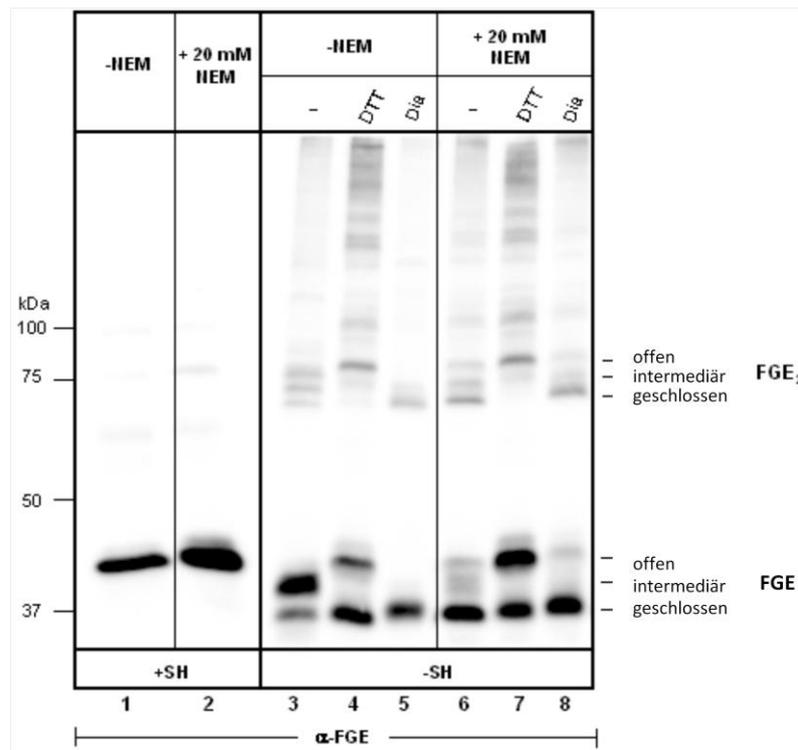


Abbildung 3: Verschiedene Konformationen des FGE-Wildtyps *in vivo*

Im Westernblot unter nicht-reduzierenden Bedingungen (-SH) konnte zelluläres FGE in drei verschiedenen Formen nachgewiesen werden, die als offene/reduzierte, intermediäre und geschlossene/oxidierte Konformation bezeichnet werden. Durch Behandlung der Zellen mit DTT kommt es zu einer Zunahme der offenen/reduzierten Konformation. Das Oxidans Diamid dagegen führt zu einem vermehrten Auftreten der geschlossenen/oxidierten Form. NEM stabilisiert die geschlossene/oxidierte Form. Im Westernblot unter reduzierenden Bedingungen (+SH) ist nur die offene Form sichtbar. Die drei Konformationen zeigen sich beim FGE-Monomer (FGE) und –Homodimer (FGE₂) (verändert nach Wachs 2009).

1.2.3 Synthese und Funktion des C α -Formylglycins in Sulfatasen

Die Generierung des FGly im aktiven Zentrum humaner Sulfatasen erfolgt ko- oder posttranslational im ER-Lumen vor der vollständigen Faltung des Sulfatase-Polypeptids in seine native Struktur. In dieser durch das FGE katalysierten Reaktion wird ein konservierter Cystein-Rest des CxPxR-Kernmotivs der Sulfatasen zu FGly oxidiert. Das FGly ist die für die katalytische Aktivität der Sulfatasen essentielle Aminosäure (siehe Kapitel 1.1.2).

Mit Hilfe der Kristallstruktur einer Sulfatase von *Pseudomonas aeruginosa* konnte der Katalysemechanismus der Sulfatasen beschrieben werden (Boltes et al. 2001). Als Transsulfatierungs-Eliminierungs-Mechanismus beginnt er mit einer Hydratisierung des FGly zum geminalen Diol (siehe Abbildung 4, Schritt 1). Das entstandene Aldehydhydrat

1 Einleitung

stellt die katalytische Form des FGly dar. Es folgt der Schritt der Transsulfatierung durch nukleophilen Angriff eines der beiden Hydroxylsauerstoffatome des Aldehydhydrats auf das Schwefelatom des Substratsulfatesters. Das Sulfat wird als Hemiacetal an FGE gebunden, während der Rest des Substrats als Alkohol abgespalten wird (Schritt 2). Die zweite OH-Gruppe dient nun der Eliminierung der Sulfatgruppe. Dadurch wird der Aldehyd regeneriert (Schritt 3) (Lukatela et al. 1998; von Bülow et al. 2001).

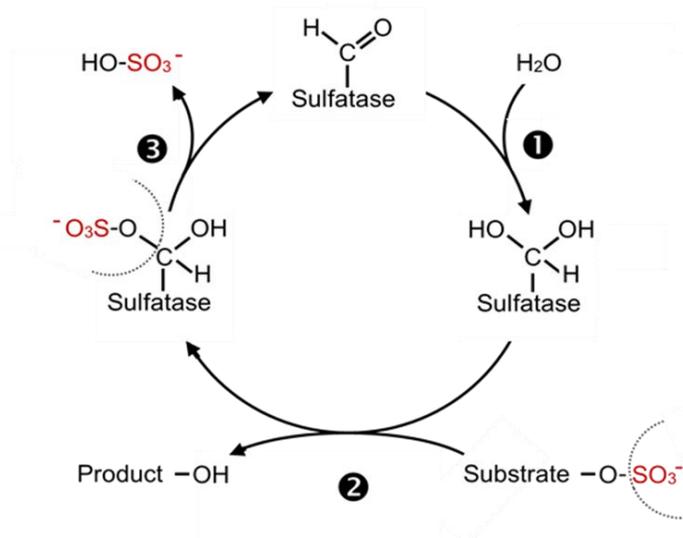


Abbildung 4: Transsulfatierungs-Eliminierungsmechanismus der Sulfatasen

Die Reaktion beginnt mit einer Hydratisierung der Formylgruppe des Aldehyds zum katalytisch aktiven Aldehydhydrat (1). Im zweiten Schritt erfolgt die Sulfatierung des Enzyms nach einem nukleophilen Angriff einer der geminalen Hydroxylgruppen des Aldehydhydrats auf die Sulfatestergruppe (2). Die zweite OH-Gruppe wird für die Eliminierung des Sulfats benötigt, was den Aldehyd regeneriert (3) (verändert nach Dierks et al. 2009).

Im Gegensatz zum Reaktionszyklus der Sulfatesterhydrolyse konnte der Mechanismus der FGly-Generierung bis heute nicht vollständig entschlüsselt werden. Die bisher vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass es sich hierbei um einen komplexen Redoxprozess handelt in welchem das FGE die Funktion einer Monooxygenase einnimmt und molekularer Sauerstoff in äquimolaren Mengen für die FGly-Generierung verbraucht wird (Dierks et al. 2005). Neben dem Sauerstoff und einem reduzierenden Agens benötigt FGE für die Bildung von FGly keine weiteren Cofaktoren wie z.B. Metallionen (Roeser et al. 2006). Damit unterscheidet sich der Mechanismus von dem bekannter Oxygenasen und Dehydrogenasen. Ein auf Kristallstrukturdaten basierendes, vereinfachtes Modell der FGly-Generierung ist in Abbildung 5 dargestellt (Dierks et al. 2009; Schmidt unveröffentlicht). Vermittelt durch FGE kommt es zu einer Abspaltung des

1 Einleitung

Sauerstoffmoleküls, dessen eines Atom zur Bildung von Sulfensäure (-CH₂S-OH) zunächst am Cystein-Rest Cys336 genutzt wird (nicht dargestellt). Anschließend wird die Wasserstoffgruppe unter Reduktion und Abspaltung von H₂O auf das Cystein der Sulfatase übertragen (siehe Abbildung 5, Schritt 1). Im Folgenden wird ein Wassermolekül abgespalten, wodurch die Sulfensäure in ein instabiles Thioaldehyd (-CHS) umgewandelt wird (Schritt 2). Auf Grund der Instabilität des Thioaldehyds unter wässrigen Bedingungen kommt es zu einer spontanen Hydrolyse und zur Generierung des FGly-Aldehyd (-CHO) (Schritt 3).

Der molekulare Sauerstoff dient dabei als Elektronenakzeptor. Von den für seine Reduktion benötigten vier Elektronen stammen zwei aus der Sulfatase und die restlichen zwei *in vitro* aus Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol (Dierks et al. 2009). Als mögliches physiologisches Reduktans wird Glutathion diskutiert oder auch Redoxenzyme wie die Proteindisulfidisomerase (PDI). Eine Übersicht über die verschiedenen Interaktionspartner des FGEs findet sich in folgendem Kapitel.

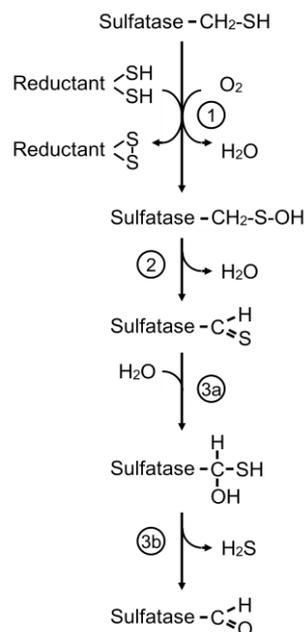


Abbildung 5: Hypothetischer Mechanismus der FGly-Generierung

FGE-vermittelte Abspaltung eines Sauerstoffmoleküls. Ein Sauerstoffatom wird als H₂O abgespalten, das andere Atom zur Bildung von Sulfensäure im Substratpeptid genutzt (Schritt 1). Dehydratisierung der Sulfensäure der Sulfatase zum Thioaldehyd (Schritt 2). Spontane Hydrolyse des instabilen Thioaldehyds zu Formylglycin und H₂S (Schritt 3) (Dierks et al. 2009; Schmidt unveröffentlicht).

1 Einleitung

1.2.4 Interaktionspartner des FGEs

Bisher konnten fünf ER-residente Proteine, die mit dem FGE in der Zelle interagieren, nachgewiesen werden: ERGIC-53, ERp44, ERp57, PDI und pFGE. Die Funktion der Interaktionspartner ist nicht vollständig aufgeklärt. Sie werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Bei dem im ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment*) lokalisierten Protein ERGIC-53 handelt es sich um ein Ca^{2+} -abhängiges Lectin. In seiner Funktion als Cargo-Rezeptor ist es am Transport von Glykoproteinen vom ER zum ERGIC bzw. Golgi-Apparat beteiligt (Appenzeller et al 1999). Durch die Interaktion von ERGIC-53 mit FGE verhindert es dessen Abbau (Fraldi et al. 2008).

Das zur Thioredoxin-Familie zählende lösliche Protein ERp44 ist sowohl im ERGIC als auch im cis-Golgi zu finden (Anelli et al. 2002, 2003). Es enthält eine Thioredoxindomäne und an seinem C-Terminus ein ER-Lokalisationssignal (RDEL). Seine Aufgabe besteht in einer häufig Thiol-abhängigen Retention verschiedener Proteine im ER. Für FGE konnte eine kovalente Interaktion der Cystein-Reste Cys50 und Cys52 des FGEs mit ERp44 nachgewiesen werden, die zur Bildung von heterodimeren, zu einem geringeren Teil auch heterotetrameren oder oktameren Komplexen führt. Die beobachtete Retention des FGEs im ER durch ERp44 findet aber unabhängig von Dimerformen statt (Mariappan et al. 2008a; Fraldi et al. 2008).

Das ERp57 ist in seiner Funktion als ER-ständige Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase an der oxidativen Faltung der schweren Ketten von Immunglobulinen beteiligt (Zhang et al. 2009). In gleicher Weise unterstützt es das FGE in seiner Faltung und fördert dessen Retention im ER (Fraldi et al. 2008).

Die Proteindisulfidisomerase (PDI) ist ein 55 kDa großes lösliches ER-ständiges Protein mit vielfältiger Funktion. Im Lumen des ER katalysiert es die Ausbildung, Reduktion oder Isomerisierung von Disulfidbrücken (Schwaller et al. 2003) und fungiert zudem als redox-sensitives Chaperon (Tsai et al. 2001). Die Interaktion von FGE und PDI führt zu einer verstärkten Retention des FGEs im ER sowie zu einer Abnahme seiner Homodimerisierung. Darüber hinaus ist PDI möglicherweise als Kofaktor an der FGE-abhängigen Sulfatase-Aktivierung beteiligt. Dies könnte zum einen über die Regeneration eines für die Aktivität des FGE erforderlichen Reduktans im aktiven Zentrum des FGEs erfolgen oder über eine Erhöhung der Faltungsraten der Sulfatasen und des FGEs direkt nach der Synthese (Fraldi et al. 2008; Schlotawa et al. unveröffentlicht).

1 Einleitung

Das durch das SUMF2-Gen codierte ER-residente Protein pFGE wird als Paralog des FGEs bezeichnet. Hinsichtlich Struktur und Faltung lässt es eine große Ähnlichkeit zum FGE erkennen (57,4 % Homologie). Auf Grund der Gemeinsamkeiten beider Enzyme wird davon ausgegangen, dass sie durch Genduplikationen eines gemeinsamen Vorläufer-Gens entstanden sind (Cosma et al. 2003; Dierks et al. 2003, 2005). Im Gegensatz zum FGE fehlen pFGE jedoch die komplette N-terminale Domäne sowie sechs der acht Cysteine, so dass es zu keiner FGly-Generierung fähig ist. Die Reduktion der FGE-Aktivität durch Überexpression von pFGE legt die Vermutung nahe, dass die beiden Proteine um die Bindungsstellen an den Sulfatasen konkurrieren. Weiterhin deutet dieser inhibitorische Effekt auf eine mögliche Funktion des pFGE in der Regulation der FGE-Aktivität hin (Mariappan et al. 2005; Zito et al. 2005).

1.2.5 MSD-verursachende Mutationen des SUMF1-Gens

Bei Mutationsanalysen der etwas weniger als 50 beschriebenen Fälle von MSD konnten mehr als 30 verschiedene MSD-verursachende Mutationen des SUMF1-Gens identifiziert werden. Neben einzelnen *nonsense*-Mutationen, welche durch Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide zu Leserasterverschiebungen und Stopp-Codons führen können oder den Spleiß-Prozess beeinträchtigen, sind die Mehrzahl der Mutationen Punktmutationen, die sowohl homozygot als auch compound-heterozygot auftreten. Zwei Punktmutationen betreffen das N-terminale Methionin, wodurch es zu Fehlern in der Initiation der Translation kommt (Cosma et al. 2003, 2004; Diaz-Font et al. 2005; Dierks et al. 2003, 2005). Die anderen Mutationen sind in ihrer Auswirkung auf das FGE-Protein in Abbildung 6 dargestellt. Für diese 18 *missense*-Mutationen können hinsichtlich ihres zu erwartenden Schädigungsverhaltens auf der Basis der Kristall-Daten Voraussagen getroffen werden.

1 Einleitung

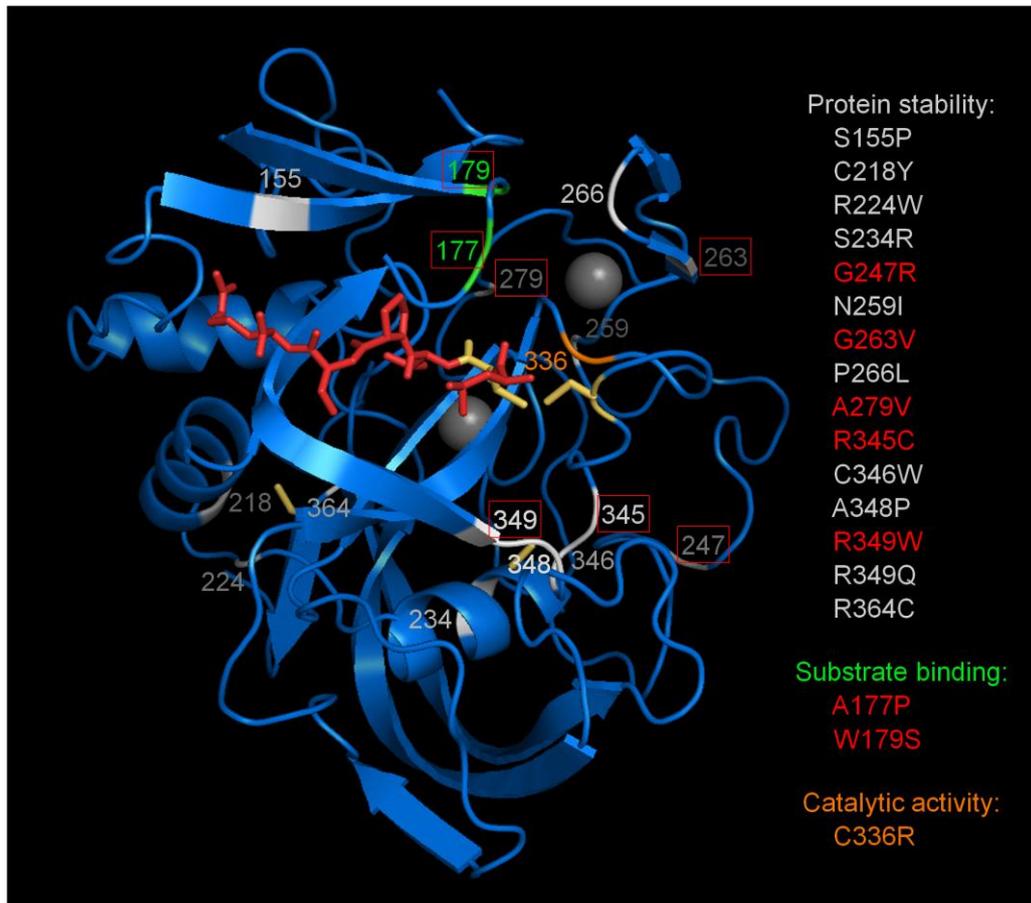


Abbildung 6: Lokalisation von MSD-verursachenden *missense*-Mutationen in der Kristallstruktur der Kerndomäne

Die 18 Mutationen sind hinsichtlich ihres zu erwartenden Schädigungsverhaltens farblich markiert. Weiß: Destabilisierung der FGE-Struktur, grün: Beeinträchtigung der Substratbindung, orange: Verminderung der katalytischen Aktivität. Die in rot umrandeten Mutationen werden in Tabelle 3 näher beschrieben (verändert nach Dierks et al. 2009).

Die Mutationen lassen sich in drei Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe werden Mutationen gerechnet, für die ein Verlust wichtiger Seitenketten-Interaktionen und dadurch eine gestörte Faltung des Proteins und mögliche Destabilisierung der FGE-Struktur vorausgesagt werden. Sie stellen den überwiegenden Teil der Mutationen dar. Hierzu zählen unter anderem die bei türkisch-stämmigen Patienten auftretende Mutation R349W sowie die Mutation A279V, die häufig bei Patienten mit französischer bzw. französisch-kanadischer Herkunft vorkommt. Die zweite Gruppe bilden Mutationen, die eine Beeinträchtigung der Substratbindung nahelegen. Zu ihr werden die nahe der Substratbindungsstelle lokalisierten Mutationen A177P und W179S gezählt (siehe Abbildung 6). Mutationen, welche die katalytische Aktivität des FGEs beeinträchtigen,

1 Einleitung

werden der dritten Gruppe zugeordnet. So zum Beispiel die Nullmutation C336R, die ein Cystein 336 betrifft für das eine Beteiligung an der Katalyse gezeigt werden konnte (Dierks et al. 2005, 2009).

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Nullmutationen im SUMF1-Gen zu einem vollständigen Verlust jeglicher Sulfataseaktivität führen (Settembre et al. 2007). Eine Analyse der Sulfataseaktivitäten in SUMF1-defizienten Mausfibroblasten, in denen FGE-Mutanten von MSD-Patienten exprimiert wurden, ergab jedoch messbare, wenn auch sehr geringe Enzymaktivitäten. Diese Erkenntnisse bestätigen, dass es sich bei der MSD um eine Erkrankung handelt, die durch hypomorphe Mutationen verursacht wird. Diese gewährleiten die unterschiedlich hohen FGE-Restaktivitäten (Annunziata et al. 2007; Schlotawa et al. 2008).

Die hypomorphe Natur der Mutationen und das heterogene Erscheinungsbild der MSD deuten auf das Vorliegen einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation hin. Diese Vermutung wird durch aktuelle Untersuchungen von Schlotawa et al. über den Zusammenhang von spezifischer Enzymaktivität und intrazellulärer Stabilität der FGE-Mutanten mit der klinischen Präsentation der Patienten bestätigt. Eine Klassifizierung des klinischen Phänotyps auf Basis der jeweiligen Krankheitssymptome ergab, dass unterschiedliche Patienten mit der gleichen Mutation einen vergleichbaren Phänotyp aufweisen. In zwei Versuchsreihen untersuchten Schlotawa et al. verschiedene FGE-Mutationen im Hinblick auf Expression, Retention, Stabilität und Aktivität der FGE-Mutanten. Die Ergebnisse der molekularen Analyse von 7 *missense*-Mutationen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Hierbei zeigte sich, dass die FGE-Mutanten von Patienten mit der schweren kindlichen Verlaufsform von MSD (LIS, *late infantile severe*) sowohl hinsichtlich ihrer Stabilität als auch ihrer katalytischen Restaktivität stark beeinträchtigt waren. Auch die intrazellulär gemessenen Sulfataseaktivitäten in Fibroblasten waren deutlich reduziert (G247R, R345C, R349W). Bei Patienten mit der mildereren Verlaufsform von MSD (LIM, *late infantile mild*) trat hingegen eine Kombination von einerseits hoher Restaktivität mit niedriger Stabilität oder niedriger Restaktivität mit hoher Stabilität auf. Die Analyse der Sulfataseaktivitäten in kultivierten Patientenfibroblasten bei diesen Patienten zeigte variable Ergebnisse (A177P, W179S, A279V), aber höhere Aktivitäten als in Fibroblasten schwer betroffener Patienten. Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen folgern, dass die residuale Aktivität der FGE-Mutanten und ihre Stabilität einen prognostischen Faktor für die Krankheitsschwere der MSD darstellen (Schlotawa et al. 2008, 2011).

1 Einleitung

FGE-Mutanten	A177P	W179S	G247R	G263V	R345C	A279V	R349W
Expression	++	+++	+	+	+	+	-
Intrazelluläre Stabilität	WT	↓	↓↓	↓↓	↓	↓	↓↓
Katalytische Aktivität (% vom WT)	1	3	7	16	2	23	1
Relative Sezernierung	↓	↑	↑↑	↑↑	↑	↑	WT
Klinischer Phänotyp	LIM	LIM	LIS	LIM	LIS	LIM	LIS

Tabelle 3: Stabilität, Aktivität, Retention und klinischer Phänotyp der FGE-Mutanten

WT: Wildtyp, LIM: *late infantile mild*, milde kindliche Form von MSD; LIS: *late infantile severe*, schwere kindliche Form von MSD. Zusammengefasst aus Schlotawa et al. 2008, 2011.

1 Einleitung

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Bei der Multiplen-Sulfatase-Defizienz (MSD) handelt es sich um eine schwere autosomal-rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit, die mit einem frühen Tod der betroffenen Patienten bereits im Kindesalter einhergeht. Ursächlich für diese monogenetische Erkrankung sind Mutationen im SUMF1-Gen. Dem in ihm kodierten ER-residenten Formylglycin-generierenden Enzyms (FGE) kommt eine Schlüsselrolle im Entstehungsmechanismus der Krankheit zu (Cosma et al. 2003; Dierks et al. 2003; Hopwood und Ballabio 2001). Während der FGE-Wildtyp biochemisch charakterisiert und nach Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse seine dreidimensionale Struktur bestimmt wurde (Preusser-Kunze 2005), liegen für die MSD-Mutanten des FGEs bislang nur biochemische Daten partiell gereinigter Enzyme vor (Schlotawa et al. 2008, 2011). Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, MSD-Mutanten des FGE rekombinant zu exprimieren und zu reinigen, um sie anschließend einer detaillierten biochemischen Analyse zu unterziehen und wenn möglich, Proteinkristalle für eine Röntgenstrukturanalyse herzustellen. Da die Reinigung des FGEs aus Zelllysaten nur in geringen Ausbeuten möglich ist, wurden für die vorliegende Arbeit FGE-Mutanten ausgewählt, die in Zellkultur in das Medium sezerniert werden. An den Arbeiten von Schlotawa et al. (Schlotawa et al. 2008, 2011) konnte gezeigt werden, dass zu diesen die FGE-Mutanten A177P, W179S, G247R, G263V, R345C, A279V und R349W zählen.

In verschiedenen Versuchsreihen sollten diese FGE-Mutanten zunächst in einem humanen Zellexpressionssystem produziert und die Expressionsbedingungen optimiert werden. Im Anschluss sollten im Rahmen dieser Arbeit die jeweils effektivsten Aufreinigungsmethoden für die FGE-Mutanten ermittelt werden. Die so aufgereinigten Proteine sollten in weiteren Versuchen zum einen hinsichtlich ihrer Qualität analysiert und zum anderen im Hinblick auf ihre Funktionalität durch Bestimmung der *in vitro*-Enzymrestaktivität untersucht werden. Die auf diese Weise charakterisierten Proteine sollten im Anschluss für weitere Versuchsansätze zur Verfügung stehen, insbesondere einer vergleichenden Strukturanalyse nach Kristallisation.

2 Material

2 Material

2.1 Laborausstattung

Gerät	Hersteller
Abi Prism [®] 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, US
Brutschrank	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach
Elektrophorese Netzgerät, Power Supply, Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen
Feinwaage 2001 MP2	Sartorius Laboratories GmbH, Göttingen
Gefrierschrank Ultra Low (-152 °C)	SANYO, Wood Dale (USA)
Gefrierschrank Forma Scientific (-80 °C)	Labotect GmbH, Göttingen
Heizblock, Thermoblock TB2	Biometra GmbH, Göttingen
Inkubationsschüttler, Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Magnetrührer	Schütt GmbH, Göttingen
Microplatten-Lesegerät Synergy Mx	BioTek Instruments GmbH, Bad
Monochromatorbasierter Multi-Detektions- Reader (BC-Assay)	Friedrichhall
Mikrowellenherd	Siemens, München
Parafilm	Pechiney (UK)
pH-Meter CG 820	Schott Geräte GmbH, Hofheim
Rotor JA10, J2-MC Centrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
Rotor Ti45, Optima L-90K Ultracentrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
Rotor GPR refrigerated centrifuge (Amicon)	Beckmann Coulter, Krefeld
Sicherheitswerkbank HERAsafe [®] KS / KSP	Kendro Laboratory Products GmbH, Langensebold
Spektrophotometer, Nanodrop ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tischwaage	Sartorius Laboratories GmbH, Göttingen
Vakuumentrifuge (Speed Vac Concentrator mit Gefriertrocknungsanlage)	Fa. Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Ultraschall-Gerät (Sonorex)	Bandelin Electronic, Berlin
Vortex-Mixer, WIZARD	VELP Scientifica, Usmate (Italien)

2 Material

Wasserreinigungsanlage Mili-Q plus Ultra pure water system	Millipore GmbH, Schwalbach
Wärmeinkubator Heraeus® HERAcell® 150 tri-gas incubator (Zellkultur)	Kendro Laboratory Products GmbH, Langensebold
Wärmebad	Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach
Wippe rocking platform WT 15	Biometra GmbH, Göttingen
Wippe, Kühlraum	W.Krannich GmbH, Göttingen
Zentrifuge, Eppendorf Universal 320	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Zentrifuge, Eppendorf 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, Eppendorf 5424 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge, Kühlzentrifuge Mikro 200R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
SMART-System: analytische und mikropräparative HPLC	Pharmacia Biotech, Uppsala (Schweden)
Chromatographiesystem ÄKTA purifier UPC 10	GE Healthcare, Freiburg
MALDI-Flugzeit-Massenspektrometer	Bruker Daltronik GmbH, Bremen

2.2 Materialien

Material	Hersteller
6-Well-Platten (Multiwell)	Falcon-Becton Dickinson, Le pont de Claix, (Frankreich)
96-Well-Platten, Polystyrol	Greiner bio-one GmbH, Solingen
96-Well-Platten, für ABI-Sequencer	Sarstedt AG & Co., Nürnbergrecht
Affinitätssäule HisTrap-HP 1 ml	GE Healthcare, Freiburg
Anionenaustauschsäule, Mono Q 5/50 GL	GE Healthcare, Freiburg
Chromatographiesäule, 50 ml	GE Healthcare, Freiburg
Dialyseschlauch, ZelluTrans, Ausschlussvolumen 12 kDa, 10 mm breit	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2 Material

Dialyseschlauch, ZelluTrans, Ausschlussvolumen 6 kDa, 25 mm breit	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Einmalfilter, Minisart® single use filter unit	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Entsalzungssäule, Leersäule	GE Healthcare, Freiburg
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one GmbH, Solingen
Kryoröhrchen	Nunc A/S, Roskilde (Dänemark)
MALDI-Probenträger, MTP 384 target plate polished steel, mit Transponder	Bruker Daltronik GmbH, Bremen
MALDI-Probenträger, MTP AnchorChip™ 800-384 target plate, mit Transponder	Bruker Daltronik GmbH, Bremen
Messpipetten 1, 2, 5, 10, 25 ml	Sarstedt Ag & Co., Nürnbrecht
Mikroliterpipetten 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg
Pasteurpipetten (long size)	WU, Mainz
Pipettenspitzen	Sarstedt Ag & Co., Nürnbrecht
Pipettierhilfe (Pipetboy accu)	Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Stoppuhr	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt Ag & Co., Nürnbrecht
Reaktionsgefäße (2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Ultrafiltrationshülsen, Typ UH 100/25	Schleicher & Schuell, Dassel (Deutschland)
Ultrazentrifuge, Amicon Ultra-15 (10 kDa Ausschlussgröße)	Millipore GmbH, Schwalbach
Wägepapier MN 226	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Whatman Protran (Nitrocellulose Transfermembran)	Whatman GmbH, Dassel
Zellkulturflaschen T- 25, T-75 und T-175	Greiner bio-one GmbH, Solingen
Zellschaber, 25 cm	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht

2 Material

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Hersteller
1 x Trypsin/EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)	Bruker Daltronik GmbH, Bremen
β - Mercaptoethanol 99 %	Sigma Aldrich, München
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Acetonitril	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agar Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Bioline GmbH, Luckenwalde
Ameisensäure	Merck KgaA, Darmstadt
Aminosäuren	Merck KgaA, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS \geq 99,5 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
BC Assay Reagent A	Uptima GmbH, Montlucon (Frankreich)
BC Assay Reagent B	Uptima GmbH, Montlucon (Frankreich)
Bio-Gel [®] P-6 Medium, Polyacrylamidgel	BioRad, Hercules (USA)
BSA STANDARD for Protein Assay	Uptima GmbH, Montlucon (Frankreich)
Bromphenolblau Natriumsalz	Merck KgaA, Darmstadt
C69S-Peptid	JPT Peptide Technologies GmbH, Acton (USA)
Coomassie Brilliant Blue G-250	BioRad, Hercules (USA)
dATP, dGTP, dCTP, dTTP	Promega, Madison (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KgaA, Darmstadt
DNS-Ladepuffer (6x)	Fermentas, St. Leon-Rot
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) (4,5 g/L Glucose)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Dulbecco's PBS (1x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom AG, Berlin

2 Material

GelRed™	Biotium, Hayward CA, USA
Glycerin (≥ 98 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hi-Dye Formamid	Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
Imidazol ≥ 99 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Iodacetamid (IAA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KgaA, Darmstadt
L-Glutamin, 200 mM Lösung	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Laemmli-Puffer, Roti®-Load1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Lipofectamine 2000	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Milchpulver blotting grade	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck KgaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Merck KgaA, Darmstadt
N,N,N',N' –Tetramethylethyldiamin (TEMED), 99 %	Carl, Roth GmbH, Karlsruhe
Phosphorsäure	Merck KgaA, Darmstadt
Ponceau S solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamid- Lösung)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Silbernitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trifluoressigsäure (TFA)	Flukta Chemie AG, Buchs (Schweiz)
Tris ULTRA (Tris/HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2 Material

2.4 Puffer und Lösungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
0,05 % PBS-T	0,05 % (w/v) Tween 20 In 1 x PBS pH 7,4
0,1 % PBS-T	0,1 % (w/v) Tween 20 in 1 x PBS pH 7,4
Aminosäuremix (50 mg/ml)	je 100 mg der 20 proteinogenen Aminosäuren 40 ml ddH ₂ O
Auftragspuffer HisTrap	10 mM Tris/HCl 0,5 M NaCl 40 mM Imidazol 2,5 mM DTT pH 8,0
Auftragspuffer Mono Q	20 mM Tris/HCl 20 mM NaCl 2,5 mM DTT pH 8,0
Dialyse-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0
Elutionspuffer Affigel	10 mM Tris/HCl 0,3 M KCl 1 mg/ml Aminosäuremix 200 µM C69S-Peptid ad dd H ₂ O pH 8,0
Elutionspuffer HisTrap	10 mM Tris/HCl 0,5 M NaCl 500 mM Imidazol 2,5 mM DTT pH 8,0
Elutionspuffer Mono Q	20 mM Tris/HCl 1 M NaCl 2,5 mM DTT pH 8,0
Elutions-Waschpuffer	10 mM Tris/HCL 0,3 M KCL 1 mg/ml Aminosäuremix pH 8,0
Fast Desalting-Puffer	20 mM Tris/HCl 2,5 mM DTT pH 8,0
Fixier-Lösung	40 % (v/v) Ethanol 10 % (v/v) Essigsäure in ddH ₂ O
Laemmli-Puffer (4x)	12 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8

2 Material

	4 g	SDS
	29 g	87 % Glycerin auf 40 ml mit ddH ₂ O
(+SH)	1 Spatelspitze	Bromphenolblau
	10 ml	β- Mercaptoethanol 99 %
NEB-Puffer 2	10mM	Tris/HCl
	10 mM	MgCl ₂
	100 mM	NaCl
	1 mM	DTT
		pH 7,9
PBS (10x)	80 g	NaCl (140 mM)
	2 g	KCl (2,5 mM)
	14 g	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (6,5 mM)
	2 g	KH ₂ PO ₄ (1,5 mM)
		pH 7,4
SDS-Laufpuffer (10 x)	3 g	Tris/HCl
	14,4 g	Glycin
	10 ml	10 % SDS
		ad 1000 ml ddH ₂ O
SDS-Polyacrylamid-Sammelgel 5 % (1x)	3,4 ml	dd H ₂ O
	0,83 ml	30 % Acrylamid-Lösung
	0,63 ml	1,0 M Tris/HCl pH 6,8
	0,05 ml	10 % SDS
	0,05 ml	10 % Ammoniumpersulfat
	0,005 ml	TEMED
SDS-Polyacrylamid-Trenngel 12 % (1x)	4,9 ml	dd H ₂ O
	6,0 ml	30 % Acrylamid-Lösung
	3,8 ml	1,5 M Tris/HCl pH 8,8
	0,15 ml	10 % SDS
	0,15 ml	10 % Ammoniumpersulfat
	0,006 ml	TEMED
TAE-Puffer	40 mM	Tris
	1mM	EDTA-Na ₂
	40 mM	Essigsäure
		ad 1000 ml ddH ₂ O
		pH 8,5
Transferpuffer Westernblot	3 g	Tris/HCl (24,8 mM)
	12 g	Glycin (160 mM)
	200 ml	Methanol
	800 ml	dd H ₂ O
Wasch-Puffer (A)	10 mM	Tris/HCl
	2 M	NaCl
	1 mg/ml	Aminosäuremix
		pH 8,0
Wasch-Puffer (B)	10 mM	Tris/HCl
	1 mg/ml	Aminosäuremix
		pH 8,0

2 Material

2.5 Kits

	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce/KMF Laborchemie Handels GmbH, St. Augustin
BigDye [®] Terminator v3.1 Sequencing Kit	Applied Biosystem, Foster City (USA)
Effectene [®] Transfektions Reagent	Qiagen, Hilden
Lumi-Light Westernblotting Substrate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
NucleoSpin [®] Plasmid (Mini-Präparation)	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Nucleobond [®] (Midi-Präparation)	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Peptide Calibration Standard für MALDI	Bruker Daltronik GmbH, Bremen
QuikChange [™] Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla (USA)

2.6 Enzyme

2.6.1 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Hersteller
DpnI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
HindIII	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Nde	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
XhoI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
XbaI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt

2.6.2 Weitere Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>Pfu</i> -Polymerase	Promega, Madison (USA)
Trypsin (V5111, Sequencing Grade Modified)	Promega, Madison (USA)

2 Material

2.7 Vektoren

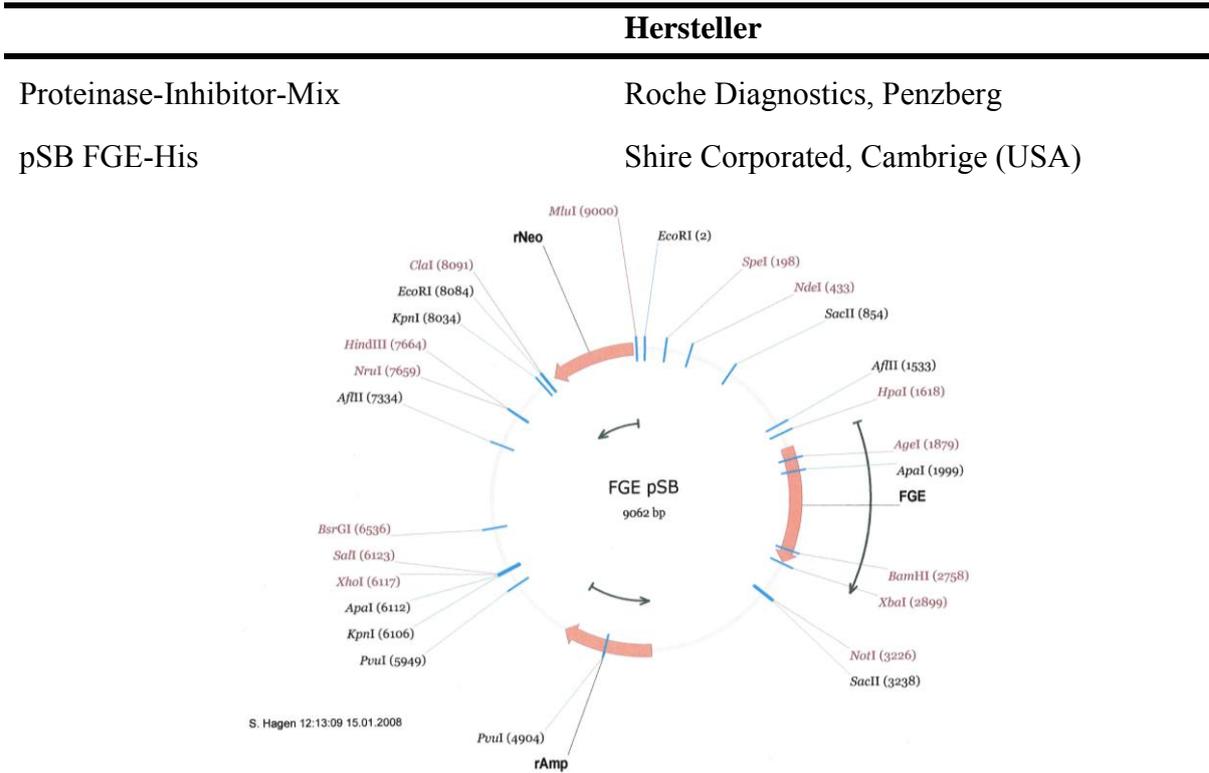


Abbildung 7: Aufbau des FGE pSB-Vektors

2.8 Primer

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
FGE_A177P fwd	5' -caacaggcagttgcagctcctccctggtggttacctg-3'
FGE_A177P rev	5' -caggtaaccaccagggaggagctgcaactgctgttg-3'
FGE_W179S fwd	5' -gttgcagctgctcctcgtggttacctgtgaaagg-3'
FGE_W179S rev	5' -cctttcacaggttaaccacgagggagcagctgcaac-3'
FGE_G247R fwd	5' -atagactttccctggcgcaaaaactgcagc-3'
FGE_G247R rev	5' -gctgcagttgttgcgccaggggaaaagtctat-3'
FGE_G263V fwd	5' -tgccaacatttggcaggtcgagttccggtga-3'
FGE_G263V rev	5' -tcaccgaaactgacctgcaaatgttggca-3'
FGE_A279V fwd	5' -gcttccaaggaactgtgctgtgatgccttccc-3'
FGE_A279V rev	5' -gggaaggcatcaacaggcacagttccttgaagc-3'
FGE_R345C fwd	5' -tattgttacaggtattgctgtgctgctcgagcc-3'
FGE_R345C rev	5' -ggctccgagcagcacagcaataacctgtaacaata-3'

2 Material

FGE_R349W fwd 5' -ggatcgcgtgtgcttgagccagaacacacc-3'
FGE_R349W rev 5' -gggtgttctggtccaagcacagcgatacc-3'

2.9 Antibiotika

Antibiotikum	Hersteller
Geneticin (G418)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Penicillin/ Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

2.10 Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz
P23-Substratpeptid	Acetyl-Met-Thr-Asp-Phe-Tyr-Val-Ser-Leu-Cys-Thr-Pro-Ser-Arg-Ala-Ala-Leu-Leu-Thr-Gly-Arg-Ser-Amid
C69S-ASA-Peptid	Acetyl-Pro-Val-Ser-Leu-Ser-Thr-Pro-Ser-Arg-Ala-Ala-Leu-Leu-Thr-Gly-Arg-Amid

2.11 Antikörper

2.11.1 Primärantikörper

Antikörper	Herkunft	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Anti-FGE EBO-4	Kaninchen, polyklonal	1:2500	BC II, Uni Göttingen
Anti-His RGS-His6-tag	Maus, monoklonal	1:2000	Qiagen, Hilden

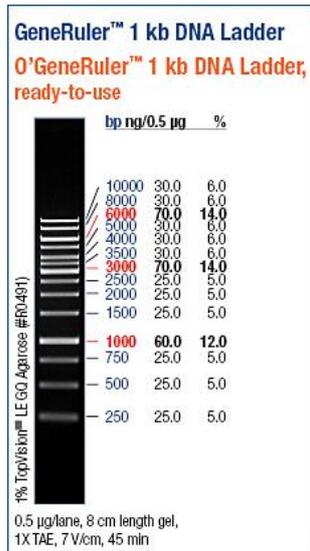
2.11.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Herkunft	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Ziege-Anti-Kaninchen-IgG- HRP-Konjugat	Ziege	1:10 000	Dianova GmbH, Hamburg
Ziege-anti-Maus-IgG HRP-Konjugat	Ziege	1:5000	Dianova GmbH, Hamburg

2 Material

2.12 Protein-Größenstandards

Größenstandard	Hersteller
GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Proteinmarker Precision Plus All Blue	BioRad, Hercules (USA)



2.13 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E.coli</i> bio blue 10 ⁹ , chemisch kompetent	<i>recA1</i> , <i>em>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>supE44</i> <i>relA1</i> <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacI</i> ^q ΔM15 Tn10(Tet ^r)]	Bioline GmbH, Luckenwalde

2.14 Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Hersteller
HT1080	Humane Fibrosarcoma-Zellen	Shire Pharmaceuticals, Wayne, USA

2.15 Zellkulturmedien

Medium/ Puffer	Zusammensetzung
DMEM-Medium (Dubecco's modified eagle medium)	500 ml DMEM High Glucose (1000 mg/ml) 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin 1 % (v/v) Sterilfiltration, Lagerung bei +4 °C
DMEM Hungermedium	500 ml DMEM High Glucose (1000 mg/ml) 2 % (v/v) FKS

2 Material

	1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin
	2 mM	L-Glutamin
	1 % (v/v)	Sterilfiltration, Lagerung bei +4 °C
Einfriermedium	10 % (v/v)	DMSO in DMEM
G418 Selektionsmedium (50 mg/ml)	8 ml	G418
	500 ml	DMEM High Glucose (1000 mg/ml)
	10 % (v/v)	FKS
	1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin
	2 mM	L-Glutamin
	1 % (v/v)	Sterilfiltration, Lagerung bei -20 °C

2.16 Medien zur Kultivierung von *E.coli*

Medium/Puffer	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 10 g NaCl ad 1000 ml ddH ₂ O
LB-Agar	10 g Trypton 5 g Hefe-Extrakt 10 g NaCl 15 g Agar ad 1000 ml ddH ₂ O

2.17 Software

Software/ Programme	Anwendung	Vertreiber
BioTools™ Version 3.2	Verarbeitung von MS und MS/MS Spektren	Bruker Daltronik GmbH, Bremen
Data Collection Software 2.0	DNS-Sequenzer	Applied Biosystems
FlexControl™ Version 2.4	MALDI Steuerungsprogramm	Bruker Daltronik GmbH, Bremen
FlexAnalysis™ Version 2.4	Verarbeitung von MALDI-Massenspektren	Bruker Daltronik GmbH, Bremen
Gen5™ Version 1.08	Microplatten-Lesegerät Synergy Mx	BioTek Instruments GmbH, Friedrichshall
LAS-4000 Luminescent Image Analyzer	CCD-Kamera	Fuji Photo Film (Europe) GmbH, Düsseldorf
Multi-Gauge Version 3.1	Quantifizierung von Proteinmengen	Fuji Photo Film (Europe) GmbH, Düsseldorf
Sequenzierung Analysis Software Version 5.1	DNS-Sequenzer	Applied Biosystems
Unicorn 5.11	ÄKTA Explorer	GE Healthcare, Freiburg

3 Methoden

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Mutagenese-Polymerasekettenreaktion

Der Prozess der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1983 von Kary B. Mullis entdeckt. Dabei handelt es sich um ein technisches Verfahren zur exponentiellen *in vitro*-Amplifikation kleinster DNS-Mengen (Mullis 1990). Der Vorgang der DNS-Vervielfältigung besteht aus einer Abfolge von drei Teilschritten, einem Denaturierungs-, einem Annealing- und einem Elongationsschritt. Die Schritte werden unter jeweils unterschiedlichen Temperaturoptima in etwa 30-35 Zyklen wiederholt. Voraussetzung für den Ablauf der Prozesse ist ein Primer, ein etwa zwanzig Nukleotide langer DNS-Doppelstrang mit einem freien 3'-OH-Ende, eine thermostabile DNS-Polymerase und ein Stück zu amplifizierender DNS (Template). In einem ersten Schritt wird die Temperatur des Ansatzes auf 95-98 °C erhöht, wodurch die beiden Stränge der Template-DNS voneinander getrennt werden (Denaturierung). In einer zweiten Phase erfolgt das Binden der Primer an die DNS-Einzelstränge (Annealing). Dieser Vorgang erfordert niedrigere Temperaturen um etwa 55 °C, die jedoch je nach verwendetem Primerpaar variieren. Durch ein erneutes Anheben der Temperatur auf 72 °C, dem Temperaturoptimum der DNS-Polymerase, erfolgt die Vervielfältigung der komplementären DNS-Stränge (Elongation) (Kessler 2006).

In dieser Arbeit wurde die thermostabile (*Pfu*)-DNS-Polymerase (Promega, Madison) verwendet, welche neben der 5'-3' Polymerisationsaktivität über die Besonderheit einer 5'-3' Exonukleaseaktivität verfügt. Diese auch als Korrekturlese-Aktivität (*proof reading* Aktivität) bezeichnete Eigenschaft ermöglicht ihr, falsch eingebaute Nukleotide zu erkennen und den Fehler durch erneute Polymerisation zu beheben (Kessler 2006). Dadurch wird die Fehlerrate falsch eingebauter Basen bis um den Faktor 10 reduziert (Mülhardt 2006).

Die Primerpaare für die Mutagenese wurden individuell durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellt, indem gezielt einzelne Aminosäuren entfernt (Deletion) bzw. eingefügt (Insertion) wurden. Für jedes variante Protein der FGE-Mutanten eines Patienten wurde ein entsprechendes Primerpaar gestaltet und erworben (Metabion, Martinsried). Die Durchführung der Mutagenese erfolgte mit Hilfe des *QuikChangeTM site-directed*

3 Methoden

mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla) nach den Angaben der Hersteller. Für eine möglichst hohe Effizienz der Mutagenese-Reaktion mussten die Primer gewissen Anforderungen gerecht werden. Die Konstrukte sollten zwischen 25 und maximal 45 Basenpaare lang sein, wobei sich die gewünschte Mutation in der Mitte befinden sollte. Weiterhin sollten die Basen Cystein und Guanosin mit einem Anteil von etwa 40 % vertreten sein und die Schmelztemperatur der Primer bei etwa 78 °C liegen. Als Vektor diente der von der Firma Shire (Shire Corporated, Cambridge, USA) zur Verfügung gestellte pSB-Vektor, in den zuvor durch Dierks et al. (Dierks et al. 2003) die SUMF1-Wildtyp-cDNS mit einem C-terminalen 6-fach His-Tag kloniert wurde. Der Vektor besitzt eine Größe von 9060 Bp inklusive SUMF1-cDNS. Er enthält eine Ampicillin-Resistenz für die bakterielle Expression und ein Geneticin-Resistenzgen für die stabile Expression in Säugetierzellen.

Die Komponenten des PCR-Ansatzes und das Temperaturprofil sind in folgenden Tabellen aufgeführt.

Reagenz	Ausgangskonzentration	eingesetztes Volumen	Endkonzentration
Template-DNS	50 ng/µl	1 µl	50 ng
Primer (fwd)	50 ng/µl	2 µl	100 ng
Primer (rew)	50 ng/µl	2 µl	100 ng
dNTPs	3,75 mM	2,6 µl	1,4 mM
<i>Pfu</i> -Polymerase	3 U/µl	1 µl	3 U/µl
<i>Pfu</i> -Puffer	10 x	5 µl	1 x
ddH ₂ O	-	36,4 µl	-

Tabelle 4: Mutagenese-PCR-Ansatz

3 Methoden

		Temperatur °C	Zeit
Aufwärmen		95 °C	2 min
Denaturierung	25 x {	95 °C	30 sec
Primerbindung		60 °C	30 sec
DNS-Synthese		72 °C	10 min
abschließender Synthese-Schritt		72 °C	10 min
Lagerung		4 °C	∞

Tabelle 5: Temperaturprofil der Mutagenese-PCR

3.1.2 DpnI-Verdau der template DNS

Der überwiegende Teil der DNS aus *E.coli* Stämmen liegt in methylierter Form vor, wohingegen die mittels PCR amplifizierte DNS unmethyliert ist. Die PCR-Produkte und die Template-DNS werden durch die Endonuklease DpnI (siehe Kapitel 3.1.3) verdaut, die lediglich methylierte und hemimethylierte, aber keine unmethylierte DNS verdauen kann. Auf diese Weise sorgt DpnI für den vollständigen Abbau der Template-DNS, nicht aber der amplifizierten DNS-Produkte (Maas 2004).

Der Verdau erfolgte durch die Zugabe von 1 µl DpnI zum PCR-Ansatz und einer darauffolgenden zweistündigen Inkubation bei 37 °C. Die verdaute Template-DNS wurde anschließend mit Hilfe des Restriktionsverdau analysiert (siehe Kapitel 3.1.3).

Das PCR-Produkt wurde in *E.coli* bio blue-Zellen transformiert und der gesamte Ansatz auf Agarplatten mit LB-Medium ausplattiert. Die Zugabe von Ampicillin (Konzentration: 100 µg/ml) ermöglichte ein selektives Wachstum der transformierten Bakterien, durch ein im pSB-Vektor enthaltenes Ampicillin-Resistenzgen (siehe Kapitel 2.7). Für die anschließende Extraktion der DNS wurden die bakteriellen Plasmide mit Hilfe der Mini- und Midi-Präparation von *Marcherey & Nagel* (Düren) aufgereinigt (siehe Kapitel 3.1.6).

3.1.3 Restriktionsverdau des Vektors

Mit Hilfe des Restriktionsverdau der Plasmid-DNS sollte überprüft werden, ob die Integrität des Vektors nach der Mutagenese erhalten war.

3 Methoden

Reagenz	Ausgangskonzentration	eingesetztes Volumen	Endkonzentration
DNS	500 ng	1 μ l	50 ng
NEB-Puffer 2	10 x	1 μ l	1x
Restriktionsenzym	10.000 U/ml	1 μ l	10 U
BSA	10 x	1 μ l	1 x
ddH ₂ O	-	ad 10 μ l	-

Tabelle 6: Restriktionsverdau

Die hier aufgeführten Restriktionsenzyme (NdeI, HindIII, XhoI, XbaI) benötigen für eine maximale Aktivität jeweils unterschiedliche Puffer. Damit auch die Puffer eine optimale Aktivität erreichen, wird dem Ansatz BSA zugefügt.

Die Inkubation der Restriktionsansätze erfolgte für 2 h bei 37 °C. Die durch den Verdau entstandenen Fragmente wurden anhand ihrer Größe mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe Kapitel 3.1.4).

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Nach dem Restriktionsverdau der Plasmid-DNS wurden die entstandenen linearen, doppelsträngigen DNS-Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Dabei besteht in großen Bereichen der DNS eine lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus der Fragmentlänge und der relativen Wanderungstrecke im Agarosegel (Jurk 2006).

Den DNS-Proben wurde ein DNS-Ladepuffer zugesetzt (Fermentas, St. Leon-Rot). Die darin enthaltenen Substanzen wie Glycerin erhöhen die Dichte der DNS-Lösung, wodurch die Proben in die Geltaschen absinken und eine Diffusion im TAE-Laufpuffer verhindert wird. Darüber hinaus enthält der Puffer Farbstoffe wie Bromphenolblau, um die DNS-Wanderung im Gel kontrollieren zu können. Das in der Lösung enthaltene EDTA bindet zweiwertige Metall-Ionen und hemmt somit Metall-abhängige Nukleasen. Parallel zu den Proben werden bei der Elektrophorese Größenstandards mitgeführt, die eine Molekulargewichtsbestimmung der DNS-Fragmente ermöglichen.

3 Methoden

Eine 1%ige (w/v) Agarose-Lösung in 1 x TAE-Puffer (siehe Kapitel 2.4) wurde angesetzt und durch kurzes Aufkochen im Mikrowellenherd gelöst. Für die Detektion der DNS-Fragmente unter UV-Licht wurde das Gemisch mit 1,5 µl GelRed (siehe Kapitel 2.3) pro 150 ml Agarosegel versetzt. Die noch warme Agarose-Lösung wurde in eine Gelkammer gefüllt und ein Kamm gewünschter Größe eingesetzt. Nachdem das Gel nach etwa 30 min auspolimerisiert war, wurde es mit 1 x TAE-Puffer bedeckt und der Kamm entfernt. Die Geltaschen wurden mit den entsprechend vorbereiteten DNS-Proben und einem 1 kb DNS-Größenstandard (siehe Kapitel 2.12) beladen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für 60-90 min durchgeführt. Die DNS wurde mit Hilfe eines UV-Transluminators visualisiert und über ein Gel-Dokumentationssystem gesichert.

3.1.5 Transformation chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen

Die Transformation der chemisch kompetenten *E.coli* bio blue-Zellen erfolgte mit Hilfe der Hitzeschockmethode. Dazu wurden 5 µl des zu transformierenden Plasmids mit 50 µl der *E.coli* bio blue-Zellen gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis folgte der Hitzeschock durch Inkubation der Ansätze für 45 sec bei 42 °C. Die Zellen wurden erneut 2 min auf Eis inkubiert. 250 µl vorgewärmtes LB-Medium wurde hinzugegeben und die Zellen für 45 min und 37 °C im Thermomixer angezogen. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Gewachsene Bakterienkolonien wurden im Anschluss für die weiteren Analysen asserviert.

3.1.6 Aufreinigung bakterieller Plasmid-DNS

Die Isolierung und Aufreinigung der bakteriellen Plasmid-DNS wurde mit Hilfe der Mini- und Midi-Präparation von *Macherey & Nagel* (Düren) gemäß dem Protokoll der Hersteller für die Isolation von *high-copy plasmid DNS* durchgeführt.

Für die Mini-Präparation wurden die entsprechenden Bakterien-Kolonien über Nacht in 5 ml LB-Medium (Ampicillin-Konzentration: 100 µg/ml) bei 37 °C vorkultiviert, um das selektive Wachstum transformierter Bakterien zu erreichen. Am folgenden Tag wurde die Flüssigkultur in 10 ml LB-Medium (Ampicillin-Konzentration: 100 µg/ml) über Nacht unter Schütteln (250 rpm) vermehrt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation über 30 sec bei 11000 x g. Für die Zellyse wurden das Zellpellet in 250 µl Puffer A1 resuspendiert, bis keine Zellklumpen mehr zu sehen waren. 250 µl Puffer A2 wurden hinzupipettiert und

3 Methoden

vorsichtig durch achtmaliges Invertieren des Röhrchens durchmischt. Anschließend wurde das Homogenat 5 min bei RT inkubiert, bis das Lysat klar erschien. Der letzte Lyse-Schritt erfolgte durch die Zugabe von 300 µl Puffer A3 und einem gründlichen Durchmischen der Suspension durch erneutes achtmaliges Invertieren des Zentrifugenröhrchens. Zuletzt wurde das Lysat für 5 min bei 11000 x g bei RT zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde in 750 µl-Portionen auf eine NucleoSpin Plasmid Säule geladen und jeweils für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Durch die Zugabe von 500 µl vorgewärmtem Puffer AW (50 °C) und Zentrifugieren für 1 min bei 11000 x g wurde die Säulen-Membran gewaschen. Abschließend wurden 600 µl Puffer A4 (mit Ethanol) auf die Säule pipettiert und erneut zentrifugiert. Der Durchfluss wurde nach jedem Zentrifugier-Schritt verworfen. Um die Membran vollständig zu trocknen, wurde die Säule bei 11000 x g für 2 min zentrifugiert. Für die Elution der DNS von der Säule wurde diese in ein neues 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt mit 50 µl Puffer AE für 1 min bei RT inkubiert und abschließend 1 min bei 11000 x g zentrifugiert.

Dem Protokoll der Midi-Präparation folgend, wurden die Kolonien nach erfolgreicher Transformation geerntet und in 5 ml LB-Medium (Ampicillin-Konzentration: 100 µg/ml) bei 37 °C und 300 rpm für 8 h im Schüttelinkubator vorkultiviert. Am folgenden Tag wurden die Kulturen mit 100 ml LB-Medium (Ampicillin-Konzentration: 100 µg/ml) 1:1000 verdünnt und über Nacht bei 37 °C und 300 rpm inkubiert.

Die optische Dichte (OD) der Zellkultur wurde ermittelt und daraus das entsprechende Zellkulturvolumen errechnet ($V[\text{ml}] = 400/\text{OD}_{600}$). Die Zellen wurden bei 5000 x g und 4°C für 15 min abzentrifugiert und das Pellet vollständig in 8 ml Resuspensions-Puffer RES+RNase A resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte durch Zugabe von 8 ml Lyse-Puffer LYS und vorsichtiges Mischen durch mehrmaliges Invertieren des Probenröhrchens. Parallel zur Inkubation dieses Ansatzes bei RT für 5 min erfolgte die Äquilibration der NucleoBond[®]Xtra-Säule und des eingesetzten Filters durch gleichmäßige Benetzung mit 12 ml EQU-Puffer. Anschließend wurden 8 ml Neutralisations-Puffer NEU beigelegt, das Lysat durch 15maliges Invertieren des Röhrchens durchmischt und direkt auf die Säule gegeben. Die Säule und der Filter wurden mit 5 ml EQU-Puffer gewaschen, der Filter entfernt und die Säule erneut mit 8 ml Wasch-Puffer gereinigt. Durch die Zugabe von 5 ml Elutions-Puffer ELU wurde die Plasmid-DNS von der Säule eluiert. Die Präzipitation erfolgte durch die Zugabe von 3,5 ml Isopropanol mit darauffolgendem Durchmischen und 2-minütiger Ruhephase. Das Präzipitat wurde bei 5000 x g und RT für 15 min zentrifugiert

3 Methoden

und der Überstand verworfen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 2 ml 70%igem Ethanol bei RT und Zentrifugation bei 5000 x g für 5 min. Nach der vollständigen Entfernung des Ethanols wurde das Pellet für 10 min bei RT getrocknet und vor der weiteren Verwendung in TE-Puffer wieder aufgenommen.

3.1.7 Sequenzierung von DNS-Fragmenten

Mit der Sequenzierung sollte überprüft werden, ob die gewünschte Mutation in der Vektor-Plasmid-DNS enthalten war. Dies erfolgte unter Zuhilfenahme des *BigDye Terminator v3.1 Cycle* Sequenzierungskits (siehe Kapitel 2.5) sowie sequenzspezifischer Oligonukleotide.

Reagenz	eingesetztes Volumen
DNS-Matrize	x (400-500 ng)
Primer	0,5 µl
BigDye	1 µl
5x Cycle-Sequencing Puffer	2 µl
ddH ₂ O	(6,5-x) µl

Tabelle 7: Sequenzierungs-PCR-Ansatz

Der Reaktionsansatz wurde anschließend im PCR-Cycler inkubiert und nach folgendem Schema 24 Mal wiederholt.

1. Zyklus: 10 sec 96 °C
2. Zyklus: 4 min 60 °C

Vor der weiteren Verarbeitung des Amplifikats musste dieses zunächst aufbereitet werden, was die Entfernung von Bestandteilen des Sequenzierungskits und nicht eingebauter dNPTs umfasste. Dazu wurde eine Ethanolpräzipitation der PCR-Produkte nach unten aufgeführtem Ansatz in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß durchgeführt:

3 Methoden

Reagenz	eingesetztes Volumen
Sequenzierungs-PCR-Produkt	10 μ l
3 M Natriumacetat (pH 4,6)	10 μ l
100 % Ethanol (RT)	220 μ l
ddH ₂ O	120 μ l

Tabelle 8: Ethanolpräzipitations-Ansatz der Sequenzierungs-PCR

Der Ansatz wurde kurz durch Vortexen gemischt und anschließend 15 min bei RT inkubiert. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand verworfen und 300 μ l 70 % Ethanol hinzugefügt. Es folgte ein weiterer Zentrifugations-Schritt von 10 min bei 14000 rpm. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Präzipitat im Heizblock bei 37 °C getrocknet. Zuletzt wurden der DNS in 10 μ l Hi-Dye Formamid gelöst.

Die DNS-Fragmente wurden mittels DNS-Sequencer *ABI PRISM, 3100 Genetic Analyzer* analysiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte anhand der *Sequencing Analysis Software Version 5.1*, sowie der *Data Collection Software 2.0* von Applied Biosystems.

3.1.8 Bestimmung der DNS-Konzentration und -Reinheit

Die Konzentrationsbestimmung der DNS-Proben erfolgte mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 260 nm. Hierbei bedient man sich einer Eigenschaft der Nukleinsäuren, genauer gesagt der aromatischen Ringe ihrer Basen, welche ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm besitzen. Die Messung erfolgte stets mit Quarzküvetten (Schichtdicke: 1 cm), da diese kein UV-Licht absorbieren. Als Referenzwert für die Konzentrationsbestimmungen der DNS wurde der OD-Wert herangezogen (Optische Dichte, OD). Dabei entspricht ein OD₂₆₀-Wert von 1 einer 50 μ g/ml-Lösung doppelsträngiger DNS. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurereste bei 280 nm. Auf diese Weise lässt sich die Reinheit einer DNS-Probe im Hinblick auf Verunreinigungen durch Proteine mit dem OD₂₆₀/OD₂₈₀-Verhältnis abschätzen. Reine DNS-Lösungen haben einen OD₂₆₀/OD₂₈₀-Wert von 1,8 (Jurk 2006).

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen der DNS erfolgten mit Hilfe des Spektrophotometers *Nano Drop ND-1000* der Firma Peqlab (siehe Kapitel 2.1).

3 Methoden

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Kultivieren von Zellen

Die Kultivierung der adhärent wachsenden HT1080-Zellen erfolgte in T-25-, T-75- und T-175-Zellkulturflaschen unter 5 % CO₂-Atmosphäre bei 37 °C und 99 % Luftfeuchtigkeit im CO₂-Inkubator. Als Kulturmedium wurde DMEM High Glucose (1000 mg/ml) verwendet mit Zusatz von 10 % bzw. 2 % FKS (v/v), 1 % L-Glutamin (v/v) und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (v/v). Das Arbeiten mit den Zellen erfolgte stets unter der Sterilbank.

3.2.1.1 Kultivierung der FGE-Mutanten in serumfreiem Medium

In Vorbereitung auf die Expressionsanalysen in serumfreiem Medium wurden die Klone der FGE-Mutanten in HT1080-Zellen überexprimiert und zunächst bis zur vollständigen Konfluenz in einer T-75-Zellkulturflasche und Zellkulturmedium mit 10 % FKS kultiviert. Von jeder Mutante wurden die Klone zur vergleichenden Analyse stets in zwei Zellkulturflaschen gezüchtet. Zur Ermittlung der Expression zu Versuchsbeginn wurden die Zellen in frischem FKS-haltigem Zellkulturmedium kultiviert, wobei nach 24 und 48 Stunden Mediumproben entnommen wurden. Nach zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel mit einerseits 10 % FKS im Zellkulturmedium sowie parallel in FKS-freiem Medium. Es wurden erneut Mediumproben nach 24 und 48 Stunden entnommen und anschließend ein Mediumwechsel mit ausschließlich serumhaltigem Zellkulturmedium (10 % FKS) durchgeführt. Von allen Mediumproben wurden gleiche Mengen (30 µl) eingesetzt und einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen sowie einer anschließenden Westernblot-Analyse unterzogen.

3.2.2 Passagieren von Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bis zum Erreichen einer Konfluenz von 90-100 %. Je nach Teilungsrate der Zelllinien erforderte dies ein Passagieren nach 2-3 Tagen. Die angewachsenen Zellen einer T-25-Zellkulturflasche wurden zum Entfernen von Serumtrypsininhibitoren mit jeweils 5 ml vorgewärmtem PBS gewaschen, danach mit 0,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung gleichmäßig benetzt und 5 min im CO₂-Inkubator inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Reaktion durch Zugabe von 8,5 ml vorgewärmtem Medium gestoppt und die Zellen durch wiederholtes Auf- und

3 Methoden

Abpipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde anschließend in einem Verhältnis von 1:3, 1:6 oder 1:9 geteilt, in einer T-25-Zellkulturflasche wieder bis auf 5 ml mit Medium aufgefüllt und erneut zu einer Konfluenz von 90-100 % kultiviert.

3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden die adhärennten Zellen einer T-75-Zellkulturflasche mit 1,5 ml Accutase schonend abgelöst und in 8,5 ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 10 ml Falconröhrchen überführt und die Zellen bei 800 rpm 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das verbliebene Zellpellet in 10 ml gekühltem Einfriermedium (10 % DMSO in DMEM) resuspendiert. Das beigefügte DMSO dient dem Schutz der Zellintegrität, indem es die Eiskristallbildung der eingefrorenen Zellen einschränkt. Die Suspension wurde zügig in 1 ml Aliquots auf Kryoröhrchen verteilt und über Nacht bei -80 °C eingefroren. Danach erfolgte die Umsetzung der Zellen in Aufbewahrungsboxen im -80 °C Gefrierschrank. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -150 °C.

Zum Auftauen wurden die kryokonservierten Zellen zügig bei 37 °C erwärmt und nach Verflüssigung sofort in 8 ml eiskaltem Medium eines 15 ml Falconröhrchens aufgenommen, um das zytotoxische DMSO des Einfriermediums zu verdünnen. Die Zellsuspension wurde bei 800 rpm 5 min in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 ml vorgewärmtem Medium aufgenommen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie zuvor beschrieben in T-25-Zellkulturflaschen (Voit 2006).

3.2.4 Stabile Transfektion eukaryotischer Zelllinien

Die Transfektion der verwendeten HT1080-Zellen erfolgte mit Hilfe des *Effectene*[®] *Transfection Reagent* (Quiagen, Hilden) nach dem Protokoll der Hersteller. Bei dieser Methode wird die DNS zunächst mit einem Enhancer-Reagenz kondensiert und anschließend Lipide (Effectene-Reagenz) hinzugegeben, die die kondensierte DNS mizellenartig umhüllen. Der Vorteil dieser Methode liegt in einer geringen Menge benötigter DNS und einer spontanen Formation gleichgroßer Mizellen, die eine Reproduzierbarkeit der Transfektions-Ergebnisse ermöglichen.

3 Methoden

Die zu transfizierenden HT1080-Zellen wurden etwa 18 h vor Transfektion auf einer 100 mm-Petrischale in DMEM-Medium (siehe Kapitel 2.15) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % kultiviert. Am Tag der Transfektion wurden 2 µg DNS in 300 µl EC-Puffer eines 1,5 ml Reaktionsgefäßes gelöst und nach Zugabe von 16 µl Enhancer 1 sec gevortext. Der Ansatz wurde anschließend 5 min bei RT inkubiert und für wenige Sekunden zentrifugiert, um eine Tropfenformation am Deckel des Reaktionsgefäßes zu vermeiden. 60 µl Effectene Transfection Reagent wurden hinzugefügt und die Probe durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren durchmischt. Für die Ausbildung der Komplexe wurde der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 8 ml frischem Medium versetzt. Der DNS-Mizellen-Komplex wurde in 3 ml DMEM-Medium resuspendiert und direkt im Anschluss gleichmäßig auf die Zellen verteilt. Unter diesen Bedingungen wurden die Zellen für 24 Stunden inkubiert.

Für eine stabile Transfektion wurden die Zellen einem Verhältnis von 1:5 passagiert und anschließend in G418 Selektionsmedium (siehe Kapitel 2.15) kultiviert. Unter dem Selektionsdruck des hinzugegebenen Mediums (Geneticin-Konzentration: 0,8 mg/ml) überlebten nur die Zellen mit stabil integrierter Plasmid-DNS. Für ein effizientes Selektionsergebnis wurde das Medium mehrfach gewechselt und die Zellen anschließend in DMEM-Zellkulturmedium kultiviert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen eingefroren (siehe Kapitel 3.2.3).

3.2.5 Vorbereitung der Zellpellets für Expressions-Analysen mittels Westernblot

Nach dem Auftauen der Zellen und Kultivierung in einer T-25-Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von 90-100 % wurden die Zellen mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst, pelletiert und in 5 ml Medium resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in eine Kavität einer 6-Well-Platte überführt und je 1 ml Medium hinzugefügt. Nach 24 h wurde der Zellüberstand abgesaugt, verworfen und je 1 ml frisches Medium auf die adhären wachsenden Zellen gegeben. Nach weiteren 24 h wurde das Medium von je zwei Kavitäten (2 ml) in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt. Die Zellen von jeweils zwei Kavitäten wurden mit Trypsin abgelöst in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit je 500 µl PBS versehen, einige Sekunden gevortext und erneut 5 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit 50 µl ddH₂O versetzt und Proteinase-Inhibitor (PI) in einem Verhältnis von 1:100 hinzu pipettiert. Zur Lyse der Zellen wurde die Zellsuspension 3 x 1 min sonifiziert. Nach jeweils einer Minute

3 Methoden

Ultraschallbehandlung wurden die Zellen 1 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Suspension 15 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei der folgenden Analyse der FGE-Mutanten im Westernblot wurden von den Zelllysaten und zugehörigen Medium-Überständen nach der Proteinbestimmung (siehe Kapitel 3.3.1) jeweils gleiche Proteinmengen für eine SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.3.2) verwendet.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 BCA-Assay zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Der BCA-Assay stellt eine gebräuchliche Methode für eine quantitative Proteinbestimmung durch Farbttests dar. Dieser von Smith et al. 1985 veröffentlichte Test arbeitet mit Bicinchoninsäure (BCA) als Nachweissystem. Das Prinzip dieses Proteinnachweises beruht auf der Eigenschaft von Proteinen Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen zu reduzieren, welche anschließend mit BCA in alkalischer Lösung einen violetten Farbkomplex bilden. Die photometrische Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 526 nm, welche dem Absorptionsmaximum des Farbkomplexes entspricht. Die Intensität der Farbstoffbildung ist dabei unter anderem von der Temperatur abhängig, was eine Variation der Sensitivität des Tests über die Temperatur ermöglicht (Fischer 2006).

Die folgenden Pipettierschritte erfolgten jeweils in Doppelwerten in die Kavitäten einer 96-Well Platte. Zunächst wurde eine Eichkurve mit 2 mg/ml BSA-Standard der Konzentrationen 0, 5, 10, 15, 20 und 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ BSA erstellt und auf 25 μl mit ddH₂O aufgefüllt. Von den Proteinlysaten (siehe Kapitel 3.2.5) wurden 3 μl pipettiert und ebenfalls auf 25 μl mit ddH₂O aufgefüllt. Bei der Analyse der Proteinmenge in den aufgereinigten Proteinproben der FGE-Mutanten fügte man eine dem Aufreinigungsergebnis entsprechende Menge an Probe hinzu. Zu jeder der aufgetragenen Proben wurden 200 μl Detektionslösung (BCA Protein Assay Kit, Pierce) im Verhältnis 50:1 hinzugegeben und die Platte anschließend 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der gebildete Farbkomplex bei einer Wellenlänge von 562 nm mit der Mikroplatten Analyse Software *Gen5 v. 1.08* analysiert. Mit Hilfe der erstellten Eichgraden des Standardproteins konnten die entsprechenden Proteinkonzentrationen ermittelt werden.

3 Methoden

3.3.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-Polyacrylamidgel Elektrophorese (SDS-PAGE) handelt es sich um ein Verfahren, bei dem Proteine unter denaturierenden Bedingungen ihrem Molekulargewicht entsprechend durch elektrische Spannung in einer Polyacrylamid-Gelmatrix aufgetrennt werden. Das hierbei verwendete anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) verbindet als Seife Proteine zu negativ geladenen Protein-Komplexen (Micellen) mit einem konstanten Verhältnis von negativer Ladung pro Masseinheit. Weiterhin bewirkt es eine Denaturierung der Proteine und führt zu einer Unterbindung von Protein-Protein-Wechselwirkungen (Rehm 2006). Über bestimmte Bereiche weist die Elektrophorese mit 0,1 % SDS eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molmasse und den Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Micellen auf (Görg und Westermeier 2006).

Vor dem Beladen des Gels werden die Proben vorbereitend 5 min bei 95 °C in Laemmli-Puffer (+SH) aufgeköcht. Das Erhitzen führt zur Auflösung der Tertiär- und Sekundärstruktur und die Zugabe von β -Mercaptoethanol bewirkt ein zusätzliches Aufbrechen der Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen der Proteine.

In dieser Arbeit wurde als SDS-Laufpuffer ein SDS-Tris/HCl-Glycin-haltiges System verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte in einem 5%igem Polyacrylamid-Sammel- und 12%igem Trenngel. Es wurden 1,5 mm dicke Acrylamidgele mit je nach Probenvolumen 10 oder 16 Probentaschen verwendet. Zunächst wurde das Trenngel zwischen zwei gesäuberte Glasplatten bis etwa 1 cm unter Kammhöhe eingefüllt und mit 500 μ l Isopropanol beschichtet. Nach etwa 1 h war das Gel ausgehärtet, so dass nach Entfernung des Isopropanols das Sammelgel aufgetragen werden konnte. Sofort im Anschluss daran wurde der Kamm eingesetzt und das Gel nach etwa 2h zur vollständigen Auspolimerisation über Nacht im Kühlraum gelagert. Das fertige Gel wurde nach Entfernung des Kamms in die Laufkammer eingespannt, diese mit 1 x SDS-Laufpuffer aufgefüllt und die Proben in die Taschen pipettiert. Als Größenstandard diente der Proteinmarker Precision Plus All Blue (BioRad). Die Elektrophorese wurde für 3-4 h bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA durchgeführt. Bei sehr salzhaltigen Proben erfolgte die Auftrennung über Nacht bei 5 mA.

3 Methoden

3.3.3 Westernblot

Mit Hilfe des von *Towbin* und *Renard* 1979 entwickelten Verfahrens können die Proteine eines SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Membran übertragen und für eine nachfolgende Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern fixiert werden. Bei dem Transfer auf die Blot-Membran bleibt die geometrische Anordnung der im SDS-Gel aufgetrennten Proteine erhalten (Linke 2006). Für die Immunodetektion wird die geblottete Membran zunächst mit dem Primärantikörper inkubiert, was zur Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes führt. Dieser kann durch die Zugabe eines zum F_c-Teil des Primärantikörpers spezifischen Meerrettich-Peroxidase-markierten Sekundärantikörpers detektiert werden. Der Nachweis des Komplexes erfolgt mittels verstärkter Chemielumineszenz (ECL, *Enhanced Chemiluminescence*), durch das darin enthaltene Luminol. Dieses wird in Gegenwart von Wasserstoffperoxid durch eine von der Peroxidase katalysierte Oxidation zu 3-Aminophthalat umgewandelt. Das nun im angeregten Zustand vorliegende Oxidationsprodukt führt beim Übergang in den Grundzustand zu einer detektierbaren Lichtemission, die im Rückschluss eine Messung der Peroxidase-Aktivität ermöglicht.

In dieser Arbeit wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine unter Verwendung einer Semi-Dry-Blot-Apparatur auf eine Blot-Membran aus Nitrozellulose (Whatman Protran) übertragen. Das Filterpapier wurde zusammen mit der Nitrozellulose und das Gel in einem separaten Behälter in Transferpuffer äquilibriert. Die Blot-Apparatur wurde nach folgendem Schema zusammengesetzt:

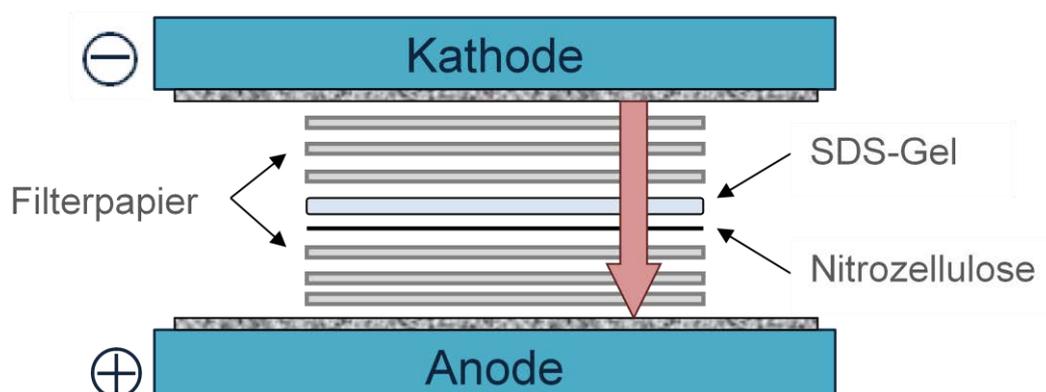


Abbildung 8: Aufbau der Blot-Apparatur für den Transfer von Proteinen

Der Transfer erfolgte im elektrischen Feld in Richtung Anode für etwa 70 min bei einer konstanten Stromstärke von 135 mA (1 mA pro 1 cm² Filterpapier). Anschließend wurde

3 Methoden

die Membran 1 h in 5 % Milchpulver in 0,05 % PBS-T-Puffer bei RT inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen und somit unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu vermindern. Die Inkubation des Primärantikörpers in einer zuvor ermittelten Konzentration (in 5 % Milchpulver in 0,05 % PBS-T-Puffer (v/v)) erfolgte über Nacht auf der Wippe bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran 4 x 10 min mit 0,1 % PBS-T gewaschen und bei RT 1 h mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert. Für den Chemielumineszenz-Nachweis wurde die Membran erneut 4 x 5 min mit 0,1 % PBS-T gewaschen und anschließend mit 5 ml einer 1:1 (v/v) Mischung aus Luminol und H₂O₂ (Lumi-Light Westernblotting Substrate, Roche) 5 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Detektion der spezifischen Proteinbanden erfolgte digital mit einer CCD (*Charge Coupled Device*)-Kamera (Fuji). Die Quantifizierung der einzelnen Proteinbanden erfolgte mit Hilfe der Software Multi-Gauge (Fuji) anhand einer Referenzprobe, die eine definierte Menge an aufgereinigtem FGE-WT enthielt.

3.3.4 Entfernen von Antikörpern

Primär- und Sekundärantikörper lassen sich von der Nitrozellulosemembran entfernen („stripfen“), wodurch die Membran einer zweiten Inkubation mit Antikörpern zugänglich gemacht wird. Zu diesem Zweck wird die Nitrozellulosemembran zunächst bei RT 5 min mit PBS gewaschen. Danach erfolgen vier weitere Waschschrte bei RT für jeweils 5 min, abwechselnd in ddH₂O und 0,2N NaOH-Lösung. In einem letzten Waschschrte wird das NaOH durch zweimaliges 5-minütiges Waschen mit ddH₂O entfernt. Das weitere Vorgehen der Inkubation mit Milchpulver sowie mit Primär- und Sekundärantikörper erfolgt gemäß den Beschreibungen in Kapitel 3.3.3.

3.3.5 Fällung von Proteinen

3.3.5.1 Native Fällung von Proteinen mit Ammoniumsulfat

Bei dieser auch als Aussalzung bezeichneten Präzipitations-Methode werden die Proteine durch die Zugabe von Ammoniumsulfat schonend und unter Schutz der biologischen Aktivität des Proteins gefällt (Lottspeich 1998).

Bei der Fällung der Proteine wurde der Mediumüberstand von etwa zehn 175-Zellkulturflaschen einer FGE-Mutante der konfluent wachsenden HT1080-Zellen (etwa 200 ml Mediumüberstand) in einem Glaskolben gesammelt und auf Eis gestellt. Direkt im

3 Methoden

Anschluss daran wurde Ammoniumsulfat in einem Verhältnis von 2:1 (etwa 100 g Ammoniumsulfat) hinzu gegeben. Die Ammoniumsulfat-Lösung wurde anschließend etwa 2 h bei 4 °C auf dem Magnetrührer bis zur vollständigen Fällung gerührt. Das Medium wurde in 2,5 L Mediumflaschen gesammelt und bei 4 °C im Kühlraum gelagert.

3.3.5.2 Aceton-Fällung

Die Fällungsmethode mittels Aceton wird in dieser Arbeit zur Aufkonzentrierung von Proben für die anschließende Analyse mittels SDS-PAGE verwendet. Dazu wird die Probe in einem Verhältnis von 1:4 mit 100 % Aceton (-20 °C) versetzt und 1 h bei -20 °C inkubiert. Anschließend wird das Gemisch für 20 min bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet 500 µl Aceton (80 %) gewaschen. Es folgt eine zweite 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 14000 rpm. Der Überstand wird verworfen und das Pellet für die weitere Analyse mittels SDS-PAGE in 1-fach Laemmli-Puffer aufgenommen.

3.3.6 Entsalzung und Umpuffern von Proteinproben durch Dialyse

Die Dialyse ist ein Verfahren zur Entfernung niedermolekularer Stoffe aus proteinhaltigen Lösungen und eignet sich somit zum Entsalzen nach einer Ammoniumsulfat-Fällung oder zum Umpuffern, wenn mehrere chromatographische Verfahren mit verschiedenen Puffern hintereinander angewendet werden.

Die Methode wurde sowohl bei der Vorbereitung auf die Bindungs-Tests (siehe Kapitel 3.3.10) als auch vor den jeweiligen Aufreinigungsschritten mittels Affinitätschromatografie (siehe Kapitel 4.3) angewandt.

Als Dialysemembran wurde ein Dialyseschlauch aus regenerierter Zellulose verwendet (ZelluTrans, Roth), welcher zuvor mit Dialysepuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0) gespült wurde. Bei einem großen Dialysevolumen (ab etwa 1 Liter Ammoniumsulfat-Suspension) wurde ein Schlauch mit einem Ausschlussvolumen von 6 kDa verwendet. Für kleinere Mengen konnte ein schmalere Schlauch mit einem Ausschlussvolumen von 12 kDa verwendet werden. Je nach Volumen der zu dialysierenden Probe erfolgte die Entsalzung unter Rühren bei 4 °C in 1 oder 5 Litern vorgekühltem Puffer.

Um die Ammoniumsulfat-Suspension für die Dialyse vorzubereiten wurde sie zunächst bei 10000 rpm ultrazentrifugiert (4 °C, 30 min), der Überstand verworfen und das Pellet in Dialysepuffer resuspendiert. Die Proteinlösung wurde anschließend in den Dialyseschlauch

3 Methoden

gefüllt und in den Puffer gehängt. Für ein möglichst effektives Entsalzungsergebnis erfolgte eine erste Dialyse zunächst für 1 h in einem kleineren Volumen (0,5-1 Liter). Die darauffolgenden Dialyse-Schritte wurden über 48 h in einem großen Volumen (1-5 Liter) bei einem 2-3maligen Pufferwechsel durchgeführt. Das Dialysat wurde vor der weiteren Verwendung bei 10000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

3.3.7 Färben von Gelen

3.3.7.1 Kolloidale Coomassie-G250-Färbung

Die Färbemethode mit Coomassie Brilliant Blue G250 beruht auf einer reversiblen Anlagerung des Farbstoffs an Amino-Gruppen der Proteine und ermöglicht über diese Interaktion einen Nachweis ab einer unteren Grenze von etwa 100-200 ng Protein pro Bande im SDS-Gel.

In dieser Arbeit wurde ein von der D. Hesse und O. Jahn Proteomics Group (Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin) überarbeitetes Protokoll von Neuhoff et al. verwendet (Neuhoff et al. 1988).

Zunächst wurde eine Stocklösung aus 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 2 % (w/v) ortho-Phosphorsäure und 10 % (w/v) Ammoniumsulfat hergestellt. In dieser Form konnte die Coomassie-Lösung über mehrere Wochen gelagert werden. Unmittelbar vor dem Gebrauch wurden jeweils 80 % der Coomassie-Stocklösung und 20 % Methanol auf dem Magnetrührer vermischt. Das SDS-Gel wurde vor der Färbung zunächst 1 h in Fixierlösung (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure in ddH₂O) geschwenkt und anschließend zweimal für 10 min mit ddH₂O gewaschen. Die Färbung mit der Coomassie-Lösung erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurde das Gel in einen neuen Behälter mit 1 % (v/v) Essigsäure überführt und darin gewaschen. Der Waschvorgang wurde so lange durchgeführt bis der Hintergrund frei von Färbepartikeln war, wobei die Essigsäure-Lösung mehrmals gewechselt wurde.

3.3.7.2 Silber-Färbung

Die Silbergel-Färbung beruht auf einer Komplexbildung zwischen den Ag⁺-Ionen des Silbernitrats und den Asp-, Cys- und Glu-Resten der Proteine. Die Hinzugabe von Formaldehyd bedingt eine Reduktion des Ag⁺ zu Ag und ermöglicht auf diese Weise einen Nachweis von Banden ab einer Menge von 10 ng Protein.

3 Methoden

Vor dem Färbevorgang wurde das Gel zunächst 1 h in Fixierlösung (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure in ddH₂O) geschwenkt, um die Proteine im Gel zu fixieren. Es folgten drei Waschschrte für jeweils 20 min, zweimal in 30 % Ethanol (v/v) und einmal in ddH₂O.

Zur Verbesserung der Nachweisgrenze erfolgte ein erster Reduktionsschritt durch eine einminütige Inkubation des Gels in einer 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat-Lösung. Nach drei weiteren Waschschrten für jeweils 20 sec mit ddH₂O wurde das Gel in einem zweiten Reduktionsschritt für 1 h bei 4 °C in einer 0,2 % (w/v) Silbernitrat-Lösung unter Zugabe von 0,02 % (v/v) Formaldehyd inkubiert. Für den darauffolgenden Waschvorgang wurde das Gel in einen neuen Behälter überführt und dreimal für jeweils 20 sec mit ddH₂O gewaschen.

Die Entwicklung erfolgte letztlich in einer 3 % (w/v) Natriumcarbonat-Lösung, welche ebenfalls mit 0,02 % (v/v) Formaldehyd versetzt wurde. Je nach Proteinmenge dauerte die Entwicklung 3-15 min. Sie wurde mittels einer zehnminütigen Inkubation mit 5 % (v/v) Essigsäure gestoppt und das Gel abschließend zweimal in ddH₂O geschwenkt.

3.3.8 Konzentrieren von Proben mittels Lyophilisierung

Die Methode der Lyophilisierung stellt ein schonendes Verfahren zur Konzentrierung von Proteinproben unter Erhalt der Aktivität des jeweiligen Proteins dar. Dieser auch als Gefriertrocknung bezeichnete Prozess erfolgt im Vakuum und ermöglicht, dass Wasser gefrorener Proteinlösungen durch Sublimation entfernt werden kann (Pohl, 1990).

In dieser Arbeit wurde das Verfahren angewandt, um die mittels Affinitätschromatographie und Anionenaustauschchromatographie aufgereinigten Proteinproben (mit einem Volumen von 3-6 ml) für die darauffolgende Kristallisation zu konzentrieren. Dazu wurde die Probe in eine Ultrahülse pipettiert und in dieser in vorgekühltem Dialysepuffer (10 mM Tris/HCL pH 8.0) bei 4 °C dialysiert. Dabei erfolgte die Dialyse zunächst für 1 h in einem kleineren Volumen (etwa 0,5 Liter). Die darauffolgenden Dialyse-Schritte wurden über 24 h in einem großen Volumen (etwa 2 Liter) durchgeführt.

Um den Verlust an Protein möglichst gering zu halten erfolgte die anschließende Lyophilisierung schrittweise in kleinen Mengen. Etwa 500 µl des dialysierten Proteingemisches wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C eingefroren. Für den Druckausgleich bei der Lyophilisierung wurde der Deckel mit einer sterilen Kanüle mehrfach durchstoßen. Die gefrorene Probe wurde anschließend in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vag, Fa. Bachhofer) auf etwa 50 µl eingeengt. Es wurden erneut etwa 500 µl des dialysierten Proteingemisches hinzu pipettiert und bei -80 °C eingefroren.

3 Methoden

Diese Schritte wurden so oft wiederholt, bis das gesamte Dialysat auf etwa 50 μ l einkonzentriert war. Die Proben wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

3.3.9 Konzentrierung proteinhaltiger Proben durch Ultrafiltration

Die Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration wurde genutzt, um die mit der ASA-C69S-Peptidmatrix aufgereinigten varianten Proteine der FGE-Mutante G263V zu konzentrieren. Hierzu wurde ein mit einer Filtereinheit ausgestattetes Amicon-Röhrchen (Amicon Ultra-15) mit einem maximalem Füllungsvolumen von 15 ml und einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet (siehe Kapitel 2.2). Durch Zentrifugation in einer Zentrifuge mit schwingendem Einsatz wurde die Probe durch die Membran filtriert. Die Zentrifugier- und Waschschrte erfolgten dabei stets bei 1500 x g und 4 °C. Vor der Verwendung wurde das Röhrchen zweimal für 60 min mit 15 ml Puffer (10 mM Tris/HCL pH 8,0) äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinprobe in 15 ml-Fraktionen auf das Röhrchen gegeben und jeweils für 50 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde nach jedem Schritt verworfen und das aufgefangene Konzentrat abschließend zweimal mit 5 ml PBS pH 8,0 gewaschen. Der Waschvorgang sollte vorsichtig durchgeführt werden, da es hierbei zum Ausfallen der Proteine kommen kann. Je 2 % des Durchflusses sowie der Konzentrat- (K) und Konzentrat-Waschfraktionen (KW) wurden abgenommen und durch Aceton-Fällung aufkonzentriert. Die Pellets wurden in 1-fach Laemmli-Puffer (+SH) aufgenommen und mittels SDS-PAGE und Silber-Färbung analysiert. Die Proben der Konzentrat- und Konzentrat-Waschfraktionen wurden zusätzlich in 1-fach Laemmli-Puffer (-SH) aufgenommen, um die Proben auf das Vorhandensein von FGE-Dimeren untersuchen zu können.

3.3.10 Substratbindungschromatographie der FGE-Mutanten

Die Analyse der Bindungseigenschaften der FGE-Mutanten wurde mit Hilfe der ASA-C69S-Peptidmatrix durchgeführt. Bei dem Peptid handelte sich um die Aminosäuresequenzen 65-80 des FGE-Substrats ASA mit dem hoch konservierten CxPxR-Motiv, wobei der Cystein-Rest an Stelle 69 durch einen Serin-Rest ausgetauscht wurde (siehe Kapitel 1.1.2). Die Aminosäuresequenz des Substratpeptids lautet H₂N-PVSLSTPSRAALLTGR-COOH. Der Austausch von Cystein an Position 69 gegen Serin verhindert die FGly-Bildung im aktiven Zentrum von FGE. Die Kopplung des C69S-Peptids (JPT Peptide Technologies GmbH) erfolgte an eine Affi-Gel[®] 10 Affinitätsmatrix

3 Methoden

(BioRad, München), einem derivatisierten, quervernetzten Agarosegel. Dabei kam es zur Ausbildung von Esterbindungen zwischen der mit dem Gel verknüpften N-Hydroxysuccinimidgruppen und den Liganden der Amino-Gruppen.

Die Lagerung des ungekoppelten Affi-Gels® erfolgte in 100 % Isopropanol, welcher vor der Kopplung des Peptids entfernt werden musste. Dazu wurden 10 ml des Affi-Gels® in eine 50 ml Chromatographiesäule überführt und dreimal mit 10 ml ddH₂O sowie dreimal mit 10 ml gekühltem Puffer A (100 mM HEPES, pH 8.0) gewaschen. Anschließend wurden 100 mg des Peptids in 10 ml Puffer A gelöst und damit die Säule befüllt. Die darauffolgende Kopplung erfolgte über Nacht auf dem Drehrad bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde der Durchfluss aufgefangen und das Gel dreimal mit 10 ml Puffer A gewaschen. Die Säule wurde in 30 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

Für die Herstellung des Aminosäuremix als Bestandteil des Wasch-Puffers wurden 100 mg jeder Aminosäure abgewogen. Dabei wurden Tyrosin und Cystein zunächst separat in 20 ml ddH₂O unter Zutropfen von NaOH gelöst. Die restlichen 18 Aminosäuren wurden in 20 ml ddH₂O gelöst und der Tyrosin-/ Cystein-Lösung unter Rühren beigemischt. Vor der weiteren Verwendung wurde die Lösung steril filtriert.

Als Ausgangsmaterial für den Bindungstest mit dem FGE-WT diente DMEM-Zellkulturmedium (100 ml), welches 2:1 mit Ammoniumsulfat (etwa 50 g) gefällt wurde (siehe Kapitel 3.3.5). Das Homogenat wurde anschließend bei 10000 rpm und 10 °C für 30 min ultrazentrifugiert (Rotor Ti45). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 ml Dialysepuffer (10 mM Tris/HCL, pH 8.0) resuspendiert. Die Suspension wurde in einen Dialyseschlauch mit einem Ausschlussvolumen von 12 kDa pipettiert und über Nacht in vorgekühltem Dialysepuffer bei 4 °C dialysiert (siehe Kapitel 3.3.6). Am darauffolgenden Tag wurde das Dialysat in mehrere 1,5 ml-Reaktionsgefäße verteilt und erneut bei 10000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Von dem zentrifugierten Dialysat wurden je 20 µl in sechs neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 179 µl PBS pH 8.0 hinzu pipettiert. Die Gefäße wurden mit 1 µl gereinigtem FGE-WT (Aufreinigung analog Kapitel 4.3) unterschiedlicher Konzentrationen versetzt (250 ng/µl, 500 ng/µl, 1 µg/µl, 2 µg/µl, 3 µg/µl und 4 µg/µl).

Von den jeweils 200 µl Startmaterial für den Substratbindungsversuch wurden 100 µl abgenommen und auf Eis gelagert. Von den anderen 100 µl wurden 25 µl für spätere Westernblot-Analysen mit 4-fach Laemmli-Puffer (+SH) versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert.

3 Methoden

Währenddessen wurden etwa 40 µl Bettvolumen der C69S-AffiGel-Peptidmatrix in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert, dreimal mit je 500 µl PBS pH 8.0 gewaschen und abzentrifugiert. Wie auch bei allen folgenden Zentrifugationsschritten des Bindungstests erfolgte dies bei 7000 rpm und 4 °C für 5 min. Das restliche PBS wurde entfernt und die 100 µl des auf Eis ruhenden Startmaterials auf die Matrix gegeben. Es folgte eine Inkubation auf dem Drehrad für 2 h bei 4 °C sowie eine erneute Zentrifugation. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert und 25 µl davon mit 4-fach Laemmli-Puffer (+SH) versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurde die Matrix dreimal mit 500 µl Wasch-Puffer (A) (siehe Kapitel 2.4) gewaschen und zentrifugiert. Um das FGE von der Peptidmatrix zu eluieren wurde diese mit 100 µl 1-fach Laemmli-Puffer (+SH) versetzt, für 5 min bei 95 °C inkubiert und zentrifugiert. Vom Überstand wurden 25 µl abgenommen und zusammen mit den anderen Proben einer Westernblot-Analyse unter reduzierenden Bedingungen unterzogen. Als Primärantikörper wurde der Kaninchen-anti-FGE-Antikörper Ebo4 und als Sekundärantikörper das Ziege-Anti-Kaninchen-IgG- HRP-Konjugat verwendet. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mithilfe des Programms Multi-Gauge Version 3.1.

Als Ausgangsmaterial für den Bindungstest mit den FGE-Mutanten diente der Mediumüberstand von stabil transfizierten HT1080-Zellen einer T-175-Zellkulturflasche. Alle Zellen wurden in Zellkulturmedium mit einem Zusatz von 10 % FKS kultiviert. Die Zellen der Mutanten A177P und W179S wurden zusätzlich in Zellkulturmedium mit einem Zusatz von nur 2 % FKS kultiviert. Die Abnahme des Mediumüberstands erfolgte nach 24 h mit einer anschließenden 2:1 Fällung mit Ammoniumsulfat. Jeweils 50 ml der Ammoniumsulfat-Suspension wurden abgenommen und bei 10000 rpm für 10 min bei 4 °C ultrazentrifugiert (Rotor Ti45). Das Pellet wurde in 2 ml Dialysepuffer (10 mM Tris/HCL pH 8.0) resuspendiert und in einen Dialyseschlauch mit einem Ausschlussvolumen von 12 kDa gefüllt. Die Dialyse erfolgte über Nacht bei 4 °C in vorgekühltem Dialysepuffer. Anschließend wurde das Dialysat der FGE-Mutanten bei 10000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Von dem zentrifugierten Dialysat wurde ein definiertes Volumen abgenommen und in einem Verhältnis von 1:1, 1:2 oder 1:3 mit PBS pH 8.0 verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden unterschiedliche Volumina (4-40 µl) abgenommen, mit 2-fach- bzw. 4-fach Laemmli-Puffer (+SH) versetzt und 5 min bei 95 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proben mittels Westernblot analysiert. Die Inkubation mit Primär- und

3 Methoden

Sekundärantikörper sowie die Quantifizierung der Proteinbanden entsprachen dem Vorgehen beim FGE-WT. Als Vergleichsstandard für die Quantifizierung diente die beim Wildtyp Bindungstest ermittelte definierte Menge an FGE-WT.

Den Ergebnissen der Quantifizierung folgend wurde eine dem FGE-WT Standard entsprechende Menge an Dialysat (bspw. 4 µl) für die jeweilige Mutante abgenommen und auf 200 µl mit PBS pH 8.0 aufgefüllt. Dieses Startmaterial für den Bindungstest wurde wie bei dem Versuch mit dem FGE-WT in zwei 100 µl Fraktionen aufgeteilt wobei 25 µl abgenommen und 5 min bei 95 °C in 4-fach Laemmli-Puffer inkubiert wurden. Das weitere Vorgehen der Durchführung des Bindungstest entsprach den Abläufen beim FGE-WT.

3.3.11 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie zählt zu den spezifischsten und gleichzeitig selektivsten chromatographischen Trennverfahren zur Isolierung und Reinigung von Biomolekülen. Die Methode beruht auf der spezifischen und reversiblen Bindung einer Substanz an einen kovalent an eine Matrix gebundenen Liganden (Kellner 2006).

Für den ersten Aufreinigungsschritt der FGE-Mutanten wurde ein besonderer Chromatographie-Typ, die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) mit Ni²⁺ verwendet. Diese Methode eignet sich insbesondere für die Isolierung von Fusionsproteinen mit einem eingebauten Polyhistidinschwanz (*His-tag*), wobei es zu einer spezifischen Bindung der Imidazolringe des Histidins an die zweiwertigen Nickel-Ionen kommt (siehe Abbildung 9). Die Elution der gebundenen Proteine erfolgt mit einer steigenden Konzentration an Imidazol, welches mit dem gebundenen Histidin um die Bindungsstellen konkurriert.

Die MSD-verursachenden FGE-Mutanten wurden sämtlich mit C-terminalem *His-tag* exprimiert. Die Chromatographie erfolgte an immobilisierter Ni-Sepharose (1 ml HisTrap-HP-Säule, GE Healthcare) mit dem Chromatographiesystem *ÄKTA purifier UPC 10* (GE Healthcare).

Das Ausgangsmaterial von 2-7 Litern gefällter Zellkulturüberstände (siehe Kapitel 3.3.5) wurde in 350 ml Fraktionen bei 10000 rpm ultrazentrifugiert (30 min, 4 °C, Rotor JA10). Die Pellets wurden in etwa 10-20 ml Dialysepuffer (10 mM Tris/HCL pH 8,0) resuspendiert, in einen Dialyseschlauch gefüllt (Ausschlussvolumen 6 kDa) und über Nacht in 5 Litern Dialysepuffer dialysiert. Am nächsten und übernächsten Tag fand ein Pufferwechsel statt. Das dialysierte Proteingemisch wurde bei 35000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert (Rotor Ti45) und anschließend durch mehrere Einmalfilter (siehe Kapitel

3 Methoden

2.2) mit einem Durchmesser von 0,45 μm und 0,2 μm filtriert. Vor dem Auftrag der Probe wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen HisTrap-Auftragspuffer (siehe Kapitel 2.4) äquilibriert und im Anschluss das Filtrat mit einer Flussrate von 500 $\mu\text{l}/\text{min}$ auf die Affinitätssäule aufgetragen. Um unspezifisch gebundene Komponenten zu entfernen, wurde die Affinitätssäule mit HisTrap-Auftragspuffer gewaschen bis die Signalstärke auf etwa 20 mAU abgesunken war (Flussrate 1 ml/min). Die Elution erfolgte bei gleichbleibender Flussrate mit einem linearen Gradienten von 0 bis 100 % HisTrap-Elutionspuffer (siehe Kapitel 2.4). Die Eluate mit einem Volumen von 1 ml wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und auf Eis gelagert. Zur Analyse wurden jeweils 6 μl (\triangleq 1 %) der Fraktionen 3-10, zusammen mit etwa 5 μl (\triangleq 0,001 %) Startmaterial und 5 μl (\triangleq 0,001 %) Durchfluss in Laemmli-Puffer aufgekocht, durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silber-Färbung (siehe Kapitel 3.3.7.2) untersucht. Je nach Reinheitsgrad und Menge an FGE in der aufgereinigten Probe wurden etwa 3-4 Fraktionen zusammengefügt und in Vorbereitung auf den zweiten Aufreinigungsschritt eine Entsalzung durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.12).

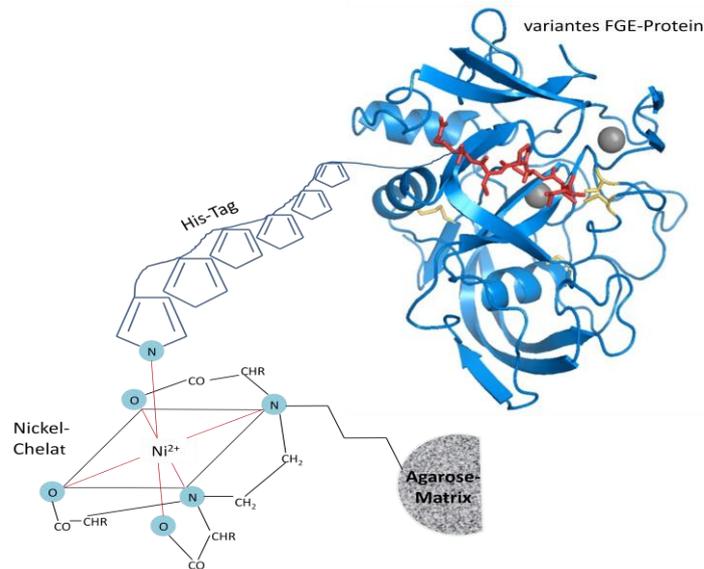


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Bindungsprinzips der Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) mit Ni²⁺-Ligand und dem varianten Protein einer FGE-Mutante als Adsorbent

Alle FGE-Mutanten sind mit einem His-Tag, bestehend aus sechs Imidazolringen, ausgestattet. Er ist bereits im pSB-Vektor enthalten, so dass nach Klonierung alle Mutanten mit einem Polyhistidinschwanz ausgestattet sind. Diese Fusionsproteine binden auf Grund der hohen Bindungsaffinität von Imidazolringen an zweiwertige Nickel-Ionen an der Agarosematrix der Säule.

3 Methoden

3.3.12 Entsalzung durch Gelfiltration

Die Gelfiltration ist ein Chromatographie-Verfahren bei welchem Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Entscheidend für den zu filtrierenden Größenbereich ist die Wahl des Säulenmaterials. Nach der Reinigung mittels Affinitätschromatographie wurde das Protein-Gemisch mit einer Leersäule (GE Healthcare) mit dem Chromatographiesystem *ÄKTA purifier UPC 10* (GE Healthcare) entsalzt, um niedermolekulare Substanzen zu entfernen. Als Säulenmatrix wurde Bio-Gel[®] P-6 Medium (BioRad) ein Polyacrylamidgel mit einem Bettvolumen von 6 ml verwendet. Zunächst wurde die Säule mit 10 ml Puffer E (10 mM Tris/HCL, 2,5 mM DTT pH 8,0) äquibriert und anschließend das Probenmaterial in 1 ml Fraktionen (1 ml/min) auf die Säule aufgetragen. Nach der Elution mit Puffer E wurden die Proben mit Hilfe eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 280 nm analysiert und die einzelnen Fraktionen anschließend vereinigt.

Die weitere Aufreinigung erfolgte im Falle der FGE-Mutationen A177P, W179S und G247R mit Hilfe einer Anionenaustauschsäule (Mono Q 5/50 GL, GE Healthcare). Die Mutante G263V wurde auf Grund ihrer Bindungseigenschaften im Bindungstest (siehe Kapitel 4.2) mit Hilfe der ASA-C69S-AffiGel-Peptidmatrix aufgereinigt.

3.3.13 Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie

Das Prinzip der Anionenaustauschchromatographie beruht auf der Bindung negativ geladener Partikel an die positiv geladenen Gruppen der Säulenmatrix. Dabei haben der pH, die Ionenstärke des Puffers, der isoelektrische Punkt des Proteins sowie die Dichte der Ladungen auf der Matrix maßgeblichen Einfluss auf Ausmaß und Stärke der Bindung des Proteins (Rossomando 1990). Durch Steigerung der Ionenstärke (Salzgradient) werden die Proteine von der Säule eluiert. Die Auftrennung wird durch die unterschiedlichen Ladungen der Proteine bei gleichbleibendem pH ermöglicht, welche bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen und zu verschiedenen Zeiten eluiert werden.

Für alle FGE-Mutanten, die auf Grund ihrer geringen Bindungskapazität nicht mit der ASA-C69S-AffiGel-Peptidmatrix aufgereinigt werden konnten (siehe Kapitel 4.2), wurde als zweiter Aufreinigungsschritt die Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Um eine kompetitive Bindung von Salz-Ionen an die Matrix zu unterbinden, wurden die durch Affinitätschromatographie aufgereinigten Proben zunächst entsalzt (siehe Kapitel 3.3.12). Die anschließende Separation erfolgte unter Verwendung einer Mono Q 5/50 GL-Säule

3 Methoden

(GE Healthcare) mit dem HPLC-System SMART (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) bei einer Flussrate von 500 µl/min. Die entsalzten Protein-Proben wurden vereinigt und in 500 µl Fraktionen (maximal 50 mg Protein) mit einer Spritze in die Probenschleife des HPLC-Systems injiziert. Bei einer konstanten Wellenlänge des UV-Signals von 280 nm wurde die Säule durch Zugabe von Mono Q-Auftragspuffer (siehe Kapitel 2.4) äquilibriert und der Probenauftrag gestartet. Mit einem linearen Gradienten von 0 bis 100 % Mono Q-Elutionspuffer (siehe Kapitel 2.4) wurden die Proben von der Säule eluiert und in 500 µl Fraktionen aufgefangen. Der Chromatographie-Verlauf wurde durch Beobachtung der Absorption bei 280 nm und der Leitfähigkeit verfolgt. Die Zusammensetzung der gesammelten Fraktionen wurde durch SDS-PAGE und anschließender Silber-Färbung des Gels festgestellt. Anschließend wurden die Fraktionen mit dem größten Reinheitsgrad vereinigt und für die Kristallisation mit Hilfe der Lyophilisierungs-Methode konzentriert (siehe Kapitel 3.3.8).

3.3.14 Aufreinigung mittels ASA-C69S-Affigel-Peptdimatrix

Die Aufreinigung großer Proteinmengen mit der ASA-C69S-Peptdimatrix entspricht vom Prinzip dem in Kapitel 3.3.10 beschriebenen Bindungsversuch. Hinsichtlich der Materialien wurde derselbe Pool gekoppelten Affi-Gels verwendet und auch die Zusammensetzung des Aminosäuremixes sowie der Waschpuffer A und B sind identisch. Als Ausgangsmaterial dienten die vorgereinigten Elutionsfraktionen der FGE-Mutante G263V aus dem ersten Aufreinigungsschritt mit Hilfe der HisTrap-Affinitätschromatographie (siehe Kapitel 4.3.1). Diese wurden vereinigt und vor der weiteren Verarbeitung mit der Gefiltrationsmethode entsalzt (siehe Kapitel 3.3.12). Die entsalzte Probe mit einem Volumen von 22 ml wurde auf 40 ml mit PBS pH 8,0 aufgefüllt. Von diesem Startmaterial wurden 100 µl für eine spätere Westernblot-Analyse abgenommen und auf Eis gelagert. Für den Versuch wurde eine 50 ml Chromatographiesäule mit einem Bettvolumen von 7 ml Affi-Gel verwendet, welches zuvor durch Waschen mit 50 ml PBS pH 8,0 äquilibriert wurde. Das Startmaterial wurde auf die Säule gegeben und diese für 12 h bei 4 °C auf dem Drehrad gerührt. Nach dem Binden der Proteine wurde der Durchfluss aufgefangen und auf Eis gelagert. Es folgten 6 Waschschritte mit je 15 ml Wasch-Puffer (A) und abschließend ein Waschschritt mit 15 ml Wasch-Puffer (B) (siehe Kapitel 2.4). Das Affigel-Protein-Gemisch wurde anschließend mit 10 ml Affigel-Elutionspuffer für 4 h bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Die erste Elution (E1) wurde aufgefangen, auf Eis gelagert und die Matrix mit 10 ml Elutions-Waschpuffer gewaschen (E1W). Dieser

3 Methoden

Vorgang wurde zweimal wiederholt und alle Fraktionen E2, E2W, E3 und E3W auf Eis gelagert. Es wurden Proben von Startmaterial (0,1 %), Durchfluss (0,1 %), Waschfraktionen (1,5 %) sowie Elutions- und Elutions-Waschfraktionen (2 %) entnommen und die Proteine durch Aceton-Fällung aufkonzentriert (siehe Kapitel 3.3.5.2). Die Pellets wurden in 1-fach Laemmli-Puffer (-SH) aufgenommen und einer SDS-PAGE sowie anschließenden Silber-Färbung unterzogen.

3.3.15 Prinzip der MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die Durchführung der Aktivitätstest erfolgte mit Hilfe der Matrix-gestützten Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit Massenspektrometrie (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*, MALDI-TOF-MS). Dieses Verfahren stellt ein Instrument zur Bestimmung der Masse verschiedenster Substanzen dar, wie Proteinen, Peptiden, Zuckern, Lipiden sowie anderer organischer und anorganischer Verbindungen (Lottspeich 2006).

Ein Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle (hier MALDI), in der aus einer Analytprobe ein Strahl gasförmiger Ionen gebildet wird, einem Massenanalysator (hier TOF), der die Ionen hinsichtlich ihres Masse/Ladungs-Verhältnis auftrennt und einem Detektor, welcher Informationen über die Menge der gebildeten Ionen liefert (Meyer 2006).

Um die Masse eines Proteins oder Peptids mit Hilfe der MALDI-TOF-MS bestimmen zu können, müssen diese zunächst in Kristalle von UV-absorbierenden Molekülen eingebaut werden. Bei diesem als Kokristallbildung bezeichneten Vorgang übertragen die sauren UV-absorbierenden Moleküle (Matrix) ein oder zwei Protonen auf die Proteine/Peptide (Ionisierung). Bis zu einer Masse von ungefähr 10.000 Da ist das zugehörige Ion einfach positiv geladen, während bei größeren Proteinen auch zwei- oder dreifache Ladungen auftreten. Die Kokristalle werden nun mit einem UV-Laser bestrahlt, was zur explosionsartigen Freisetzung der Matrix-Moleküle und der eingebauten Protein/Peptid-Ionen führt. Über elektrische Felder können diese dann auf einen Ionendetektor gelenkt und dabei ihre Masse bestimmt werden (Letzel 2006). Zur Berechnung der Masse wird die Flugzeit der Ionen vom Laserbeschuss (Desorption) bis zum Auftreten auf den Detektor gemessen. Da nach der Desorption die leichten Ionen stärker und die schweren etwas schwächer beschleunigt werden, ist die gemessene Zeit proportional zur Wurzel aus der

3 Methoden

Masse des Analyten geteilt durch die Ladung des Ions ($t \sim \sqrt{\frac{m}{z}}$). Aus der gemessenen Flugzeit lässt sich somit die Masse des jeweiligen Analyten berechnen (Meyer 2006).

3.3.16 Messung der *in vitro*-Aktivität des FGEs

Bei der *in vitro*-Aktivitätsmessung von Wildtyp-FGE und der MSD verursachenden FGE-Mutationen wird die MALDI-TOF-MS genutzt, um die Bildung von FGly aus dem Cysteinrest eines speziellen Substratpeptids quantitativ zu bestimmen. Als Substrat dient das von der ASA abgeleitete Peptid P23 (Acetyl-Met-Thr-Asp-Phe-Tyr-Val-Ser-Leu-Cys-Thr-Pro-Ser-Arg-Ala-Ala-Leu-Leu-Thr-Gly-Arg-Ser-Amid), das die Konsensussequenz für die Ausbildung von FGly, CTPSR, enthält. Das Peptid P23 hat die Masse (m/z) 2526,28 [M-H]⁺. Nach Konvertierung des Cysteins zu Serin beträgt die Masse (m/z) 2508,29 [M-H]⁺. Die katalytische Aktivität des FGEs lässt sich aus dem Verhältnis der Intensitätssignale für das Substrat und das Produkt ermitteln (Peng et al. 2002; Dierks et al. 2003). Die spezifische Aktivität lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$\frac{\text{Umsatz (0 - 1)} * \text{CS1 - Substrat (pmol)} * 1000}{\text{FGE - Menge (ng)} * \text{Inkubationszeit (min)}} = \frac{\text{mU}}{\text{mg}}$$

Für den FGE-Aktivitätstest wurden Mediumproben der stabil transfizierten HT1080-Zellen nach 48 stündiger Überexpression abgenommen und wie in Kapitel 4.3 beschrieben mit der HisTrap-Affinitätschromatographie und Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Die Proben des FGE-WT wurden gemäß dem Protokoll von Preusser-Kunze aufgereinigt und danach bei -80 °C gelagert (Preusser-Kunze et al. 2005).

Von jeder Mediumprobe wurde zunächst die Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA-Assays ermittelt (siehe Kapitel 3.3.1) und anschließend die genaue Konzentration von FGE durch SDS-PAGE und Westernblot bestimmt (siehe Kapitel 3.3.2 und 3.3.3).

Die folgenden Pipettierschritte erfolgten alle auf Eis. Für die Massenanalyse mittels MALDI wurden unterschiedliche Verdünnungen der Medien in 2 mg/ml BSA-Lösung im Bereich von etwa 50 ng angefertigt. Jeweils 1 µl der verdünnten FGE-Probe wurde zum Aktivitätstest-Ansatz (siehe Tabelle 9) hinzu pipettiert. Weiterhin wurden diesem 2 mM DTT als Reduktionsmittel zugesetzt. Nach Zugabe des P23-Substratpeptids wurde die Zeit gestoppt und die Proben bei 37 °C und 850 rpm im Rotor für 0,5-1 h inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Reaktion mit 2 µl 10 % Trifluoressigsäure gestoppt. In diesem Zustand konnten die Proben für wenige Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

3 Methoden

Für die Messungen wurden MALDI-Proben­träger (MTP 384 target plate polished steel, Bruker Daltronik) aus poliertem Stahl verwendet. Als Matrix für die massenspektrometrische Detektion und Quantifizierung von Substrat und Produkt verwendete man eine Dünnschicht/Nitrozellulose/ α -Cyano-Präparation. α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (HCCA) wurde in 100 % Aceton bis zur Sättigung gelöst. Die Lösung wurde gevortext, für 5 min im Ultraschallbad behandelt und für die weitere Verwendung abzentrifugiert. Die Nitrozellulose wurde in 50 % Aceton und 50 % Isopropanol gelöst und in einem Verhältnis von 1:4 mit der α -Cyano-Lösung vermischt.

Vor dem Probenauftrag wurden zunächst 0,5 μ l Matrixlösung auf den Proben­träger aufgebracht und bei RT inkubiert, bis das Lösungsmittel vollständig verdampft war. Anschließend wurden 0,5 μ l 10 % Ameisensäure und sofort im Anschluss daran 1 μ l Probenlösung aufgetragen und ebenfalls bis zum Eintrocknen bei RT inkubiert. Die Messung der einzelnen Probe erfolgte in einem Massenbereich von 2480 m/z-2580 m/z bei einer Laser-Pulsenergie von etwa 75 %.

Die gewonnenen Massenspektren wurden im Verarbeitungsprogramm FlexControl (Bruker Daltronik) aufgezeichnet und mit Hilfe des Programms FlexAnalysis (Bruker Daltronik) wiedergegeben. Die Kalibrierung erfolgte extern, durch die Verwendung von Peptidstandards von 1000-3500 Da (Bruker Daltronik). Dabei stellten die Spektren Durchschnittswerte von ungefähr 5000-10000 Laser-Schüssen dar.

Reagenz	eingesetztes Volumen
Puffer (150 mM Tris/HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 45 μ M CaCl ₂)	10 μ l
ddH ₂ O (HPLC-Grad)	10 μ l
2 mg/ml BSA in ddH ₂ O	5 μ l
20 mM DTT in ddH ₂ O	3 μ l
FGE in 2 mg/ml BSA-Lösung (2-10 ng FGE)	1 μ l
P23-Substratpeptid in 30 % Acetonitril (ACN), 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)	1 μ l
	—
	Σ 30 μ l

Tabelle 9: Aktivitätstest-Ansatz

3 Methoden

3.3.17 In-Gel-Protein-Verdau

Mit Hilfe des In-Gel-Proteinverdaus sollen die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine in definierte Peptide gespalten werden, um sie einer Peptidmassen-Fingerabdruck-Analyse mittels MALDI-TOF-MS (siehe Kapitel 3.3.15) zugänglich zu machen. Für den Verdau der Proteine wurde die Serinprotease Trypsin verwendet, welche eine C-terminale Hydrolyse von Peptidbindungen der Aminosäuren Lysin und Arginin katalysiert. Darüber hinaus wurden im Rahmen verschiedener Waschschriffe des Verdau-Prozesses die durch Coomassie-Färbung an das Gel gebundenen Chemikalien entfernt. Negative Einflussfaktoren bei der Identifikation der Proteine sollen auf diese Weise minimiert werden.

Zunächst erfolgte die Exzision der gewünschten Proteinbande aus einem mit Coomassie gefärbten 2D-Gel mit Hilfe einer Stanze von 2 mm Durchmesser. Die anschließenden Waschschriffe wurden im Inkubationsschüttler bei 37 °C durchgeführt. Die Gel-Stücke wurden in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und 5 min mit 100 µl 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat ($\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{ddH}_2\text{O}$) gewaschen. Der Überstand wurde wie vor jedem weiteren Schritt verworfen und die Gel-Fragmente erneut zweimal 10 min mit 100 µl 50 % (v/v) Acetonitril und 25 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{ddH}_2\text{O}$ inkubiert. Es folgte ein letzter fünfminütiger Waschschriff mit 100 µl 100 % (v/v) Acetonitril und anschließender Trocknen-Phase durch Inkubation des geöffneten Reaktionsgefäßes für 5 min bei RT. Durch die Zugabe von 10 µl 10 mM DTT und 25 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{ddH}_2\text{O}$ und Inkubation der Proben bei 56 °C für 30 min wurden die Schwefelwasserstoffbrücken der Cysteine reduziert.

Nach einigen Minuten Inkubation auf Eis folgte im nächsten Schritt die Carbamidomethylation der Cystein tragenden Peptide durch Zugabe von 10 µl 25 mM Iodacetamid-Lösung und 25 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{ddH}_2\text{O}$ mit anschließender Inkubation für 20 min bei RT im Dunkeln. Der Überstand wurde entfernt und die Proben nach Hinzufügen von 10 µl 10 mM DTT und 25 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{ddH}_2\text{O}$ im Inkubationsschüttler für 2 min bei 37 °C inkubiert. Als Nächstes wurden die Gel-Stücke für 10 min bei 37 °C unter Schütteln in 100 µl einer 25 mM $\text{NH}_4\text{HCO}_3/\text{ddH}_2\text{O}$ gepufferten 50 % (v/v) Acetonitril-Lösung gewaschen, bevor sie durch Zugabe von 100 µl 100 % (v/v) Acetonitril für 5 min dehydriert wurden. Es folgte eine Trocknen-Phase durch Inkubation des geöffneten Reaktionsgefäßes für 5 min bei RT.

3 Methoden

Der eigentliche In-Gel-Verdau erfolgte durch die Zugabe von 125 ng eisgekühltem Trypsin (Promega V5111, Seq. Grade Modified) in 6 µl einer Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung. Die Herstellung der Lösung erfolgte durch die Zugabe von 2,5 µl einer Trypsin-Stocklösung (0,5 µg/µl in 0,01% TFA/ddH₂O) zu 60 µl 25 mM NH₄HCO₃/ddH₂O. Zum Quellen der Gel-Stücke wurden die Reaktionsgefäße zunächst für 15 min auf Eis gestellt und die Proteine anschließend für 2 Stunden bei 45 °C im Inkubator verdaut.

Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Verdau durch Zugabe von 20 µl 1 % TFA/ddH₂O und 15-minütiger Inkubation bei 37 °C gestoppt. Die extrahierten Peptide des Überstands wurden in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert, in der Vakuumentrifuge (Speed Vag, Fa. Bachhofer) eingetrocknet (siehe Kapitel 3.3.8) und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Vor der Protein-Sequenz-Analyse mittels MALDI-TOF-MS wurde das Lyophilisat der verdauten Proteine mit je 10 µl 0,1 % TFA/ddH₂O vermischt und für 30 sec im Ultraschallbad gelöst.

3.3.18 Protein-Sequenz-Analyse mit Hilfe der DriedDroplet-Auftragsmethode

Die Matrix-Präparation für den Auftrag der verdauten Proteine (siehe Kapitel 3.3.17) auf den MALDI-Probenteller (MTP AnchorChipTM 800-384 target plate, Bruker Daltronik) erfolgte anhand des Protokolls von *Bruker Daltronics*, der DriedDroplet-Auftragsmethode für MALDI-AnchorChip targets.

Für die Matrixpräparation wurde α-Cyano-4-hydroxymethylsäure (HCCA) verwendet und damit eine gesättigte Lösung von HCCA in Acetonitril (ACN) hergestellt. Zu diesem Zweck wurden etwa 8 mg HCCA für 5 min im Ultraschallbad in 1 ml 90 % ACN gelöst und anschließend 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Proteinstandard (Bruker Daltronik) wurde in 125 µl 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) aufgenommen, für einige Sekunden gevortext und bis zur weiteren Verwendung in 3 µl Aliquots bei -20 °C eingefroren. Die beiden Stocklösungen für den Auftrag der Proteinfractionen sowie des Peptidstandards wurden separat angesetzt. Dazu wurden 748 µl TA95 (95 % ACN, 5 % ddH₂O, 0,1 % TFA) für den Probenauftrag bzw. 748 µl TA 85 (85 % ACN, 5 % ddH₂O, 0,1 % TFA) für den Auftrag des Standards, 36 µl der gesättigten HCCA-Stocklösung sowie 8 µl 10 % TFA und 8 µl 100 mM NH₄H₂PO₄/ddH₂O (Ammoniumhydrogenphosphat) gemischt.

Für den Auftrag der Proteinproben wurden nacheinander 0,5 µl der TA95-Lösung und 0,5 µl der verdauten Proteinprobe auf den MALDI-Probenteller pipettiert. Von der TA85-

3 Methoden

Lösungen wurden 300 µl abgenommen, mit 3 µl Peptidstandard (in 0,1 % TFA) vermischt und 0,5 µl des Gemisches auf den MALDI-Probenhalter aufgetragen.

Die Messungen der Probenspots und Darstellung der gewonnenen Massenspektren erfolgte gemäß den Angaben in Kapitel 3.3.16 mit Hilfe der von Bruker Daltonik entwickelten Software FlexControl und FlexAnalysis. Für die Auswertung der MALDI-Spektren wurde das Programm BioTools (Bruker Daltonik) verwendet, welches aus der resultierenden Peakliste eine statistische Zuordnung zu dem jeweiligen Protein vornimmt. Spektren, die keine eindeutige Proteinidentifizierung ermöglichten wurden manuell nachbearbeitet. Dabei handelte es sich in erster Linie um nicht erkannte Peaks oder falsch zugeordnete monoisotopische Massen.

4 Ergebnisse

4.1 Produktion der FGE-Mutanten

Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten FGE-Mutationen erfolgte auf der Grundlage von Ergebnissen aus vorherigen Analysen (Artigalás et al. 2009; Cosma et al. 2003, 2004; Diaz-Font et al. 2005; Dierks et al. 2003, 2005, 2009, Schlotawa et al. 2008, 2011). Die Kriterien für die Auswahl waren Proteinstabilität, katalytische Aktivität und Expressionsrate der jeweiligen FGE-Mutante (siehe auch Kapitel 1.2.5., Tabelle 3). Auf dieser Basis wurden insgesamt sieben *missense*-Mutationen ausgewählt (A177P, W179S, G247R, G263V, R235C, A279V, R349W). Eine weitere unabdingbare Voraussetzung für die Aufreinigung aus Zellkulturüberständen bestand in der Sekretion der varianten Proteine in den Zellkulturüberstand. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass die sezernierten Proteine den Qualitäts-Kontroll-Mechanismus des ER passiert haben und somit ausschließlich nativ gefaltete Proteine für die Aktivitätsanalysen und Kristallisierung verwendet wurden (Schlotawa et al. 2011). Für alle in dieser Arbeit untersuchten FGE-Mutanten konnte bestätigt werden, dass sie diese Voraussetzungen erfüllen.

4.1.1 Expression der FGE-Mutanten vor Aufreinigung

Zur Expression der FGE-Mutanten wurde eine humane HT1080-Zelllinie verwendet, welche bereits in den Voruntersuchungen der FGE-Mutanten zum Einsatz kam. Zunächst wurden HT1080-Zelllinien hergestellt, die jeweils den FGE-Wildtyp und die Mutanten exprimieren. Die Bestimmung der Expressionsrate der Proteine war erforderlich um die für eine Aufreinigung benötigte Menge an Mediumüberstand der entsprechenden FGE-Mutante zu ermitteln (siehe Abbildung 10).

4 Ergebnisse

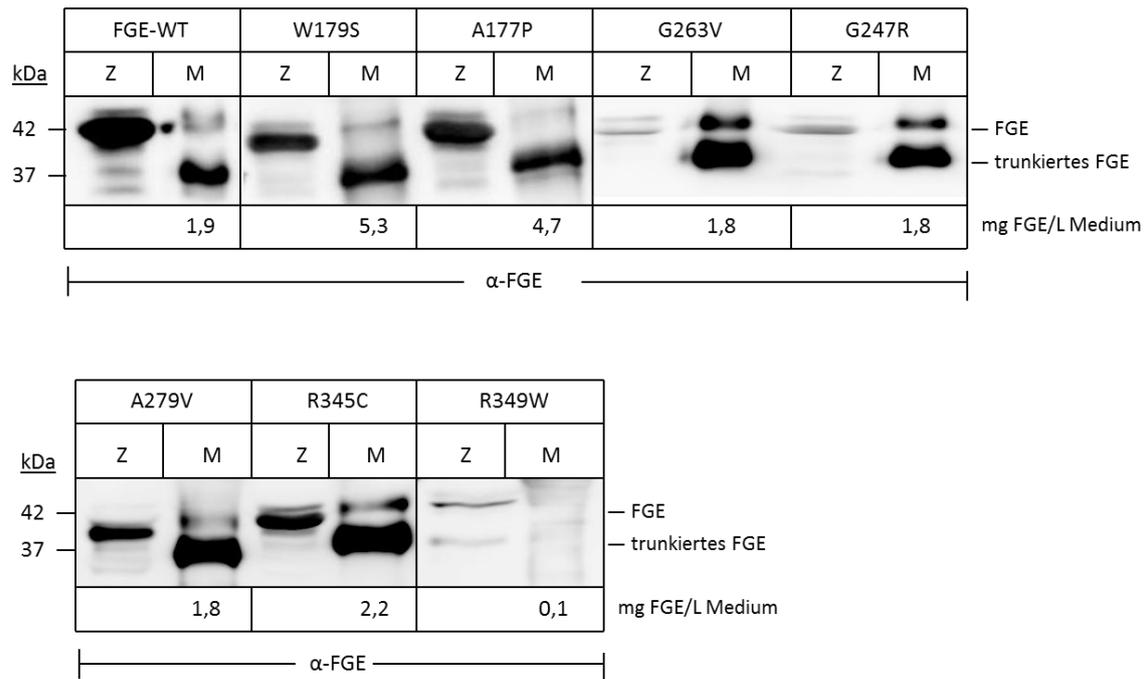


Abbildung 10: Untersuchung der Expression der FGE-Mutanten

Der FGE-WT und die FGE-Mutanten wurden nach stabiler Transfektion in HT1080-Zellen exprimiert. Nach 24 h wurden Zellen und Medium geerntet und einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen sowie einer Westernblot-Analyse unterzogen. Von der jeweiligen FGE-Mutante wurden stets 50 µg Gesamtzellprotein des Zelllysats sowie 30 µl Medium eingesetzt. Die Detektion der Banden erfolgte mit einem Anti-FGE-Antikörper. Die Quantifizierung der FGE-Menge einer Proteinbande erfolgte anhand eines 25 ng FGE-WT-Standards. Alle ausgewählten FGE-Mutanten werden ins Medium sezerniert. Dabei macht der Anteil des trunkierten FGEs bei allen untersuchten Proben den größeren Teil des Sekretions-Produkts aus.

Alle FGE-Mutanten konnten erfolgreich in HT1080-Zellen exprimiert werden. Dabei bewegen sich die Expressionsraten nach 24 h zwischen 0,1 und 5,3 mg FGE/L Medium. Die höchsten Expressionsraten werden bei den Mutanten A177P (4,7 mg/L) und W179S (5,3 mg/L) gefunden. Sie liegen deutlich über der Expressionsleistung des FGE-WTs (1,9 mg FGE/L). Eine dem FGE-WT ähnliche Expression zeigen die Mutanten G247R, G263V, A279V und R345C mit 1,8 bzw. 2,2 mg FGE/L. Mit lediglich 0,1 mg FGE/L liegt die Expression der FGE-Mutante R349W am niedrigsten. Das Sekretionsprodukt der Mutanten G247R und G263V weist einen im Vergleich hohen Anteil der volle-Längen-Form des FGEs auf. Mit Ausnahme dieser beiden Mutanten, sowie zu einem geringeren Anteil der Mutante R345C, werden alle übrigen FGE-Mutanten nahezu ausschließlich in der N-terminal trunkierten Form ins Medium sezerniert. Die Mutante FGE-A279V läuft in der SDS-Gelelektrophorese etwas schneller als die anderen FGE-Formen. Um zu testen, ob der His-Tag am C-terminalen Ende der Mutante nicht inseriert wurde, wurde ein Westernblot

4 Ergebnisse

mit einem Anti-His-Antikörper durchgeführt. Das Fehlen einer Bande im Vergleich zur Mutante FGE-R345C lässt darauf schließen, dass in der Mutante FGE-A279V der His-Tag fehlt (siehe Abbildung 11).

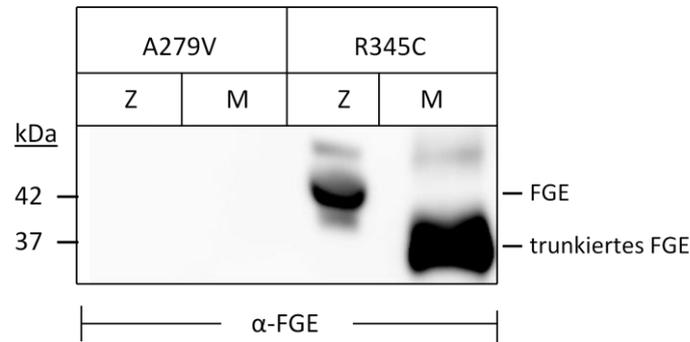


Abbildung 11: Überprüfung der FGE-Mutanten auf die Anwesenheit des His-Tags

Die FGE-Mutanten wurden nach stabiler Transfektion in HT1080-Zellen exprimiert. Nach 24 h wurden Zellen und Medium geerntet und einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen sowie einer Westernblot-Analyse unterzogen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe eines Anti-His-Antikörpers. Hierbei konnte der His-Tag der Mutante R345C nachgewiesen werden, bei der Mutante A279V jedoch nicht.

Zwei der Mutanten erfüllen daher nicht die Voraussetzungen für eine weitere Aufreinigung über den His-Tag (Affinitätschromatographie mit einer HisTrap-Säule, siehe Methoden Kapitel 3.3.11), die Mutante R349W auf Grund ihrer geringen Expressionsrate und die FGE-Mutante A279V wegen des fehlenden His-Tags. Daher wurden fünf (A177P, W179S, G247R, G263V, R345C) der eingangs sieben FGE-Mutanten für eine weitere Bearbeitung ausgewählt.

4.1.2 Optimierung der Zellkulturbedingungen zur Effizienzsteigerung von Expression und Aufreinigung der FGE-Mutanten

In einer weiteren Versuchsreihe wurde untersucht, inwiefern sich die Zellkulturbedingungen optimieren lassen. Das Ziel bestand darin, den Anteil von Fremdprotein, insbesondere Albumin, im Zellkulturüberstand durch die Verwendung eines möglichst geringen Anteils an fötalem Kälberserum zu minimieren. Ein geringerer Anteil Fremdprotein sollte eine effektive Aufreinigung der FGE-Mutanten aus dem Zellkulturüberstand erleichtern.

4 Ergebnisse

4.1.2.1 Kultivierung der FGE-Mutanten in serumfreiem Medium

Zunächst wurden Versuche mit serumfreiem Medium durchgeführt. Für diese Expressionsversuche wurden die stabilen Zelllinien G247R und R345C in unterschiedlichen Ansätzen mit und ohne FKS inkubiert und die Sekretion in den Zellkulturüberstand zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels Westernblot überprüft. In Abbildung 12 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Wie auch in den Vorexperimenten zur Bestimmung der Expressionsraten sichtbar (siehe Kapitel 4.1.1), ist die Konzentration von FGE-R345C im Medium höher als die von FGE-G247R, allerdings ist der Unterschied in diesem Experiment deutlich ausgeprägter (Abbildung 12, Reihen 1, 2 und 6, 7). In FKS-haltigem Medium zeigt die Mutante FGE-G247R zu Beginn der Untersuchungen eine geringe, die Mutante R345C hingegen eine sehr hohe Expression (Reihe 1 und 6). Ein Vergleich der 24-stündigen mit der 48-stündigen Kultivierung in serumhaltigem Medium zeigt kaum einen Anstieg der Proteinkonzentration (Reihen 1, 2 und 6, 7). Ein deutlich sichtbarer Rückgang der Expression zeigt sich bei beiden Mutanten nach der Kultivierung in serumfreiem Medium (Reihen 3, 4 und 8, 9). Der Abfall der Expression ist nach einem Austausch durch FKS-haltiges Medium nicht reversibel (Reihe 5 und 10). Zusammenfassend konnte mit diesem Kultivierungsversuch gezeigt werden, dass bei einem abrupten Wechsel von 10 % FKS-haltigem zu serumfreiem Medium die Expression beider Mutanten irreversibel einbricht.

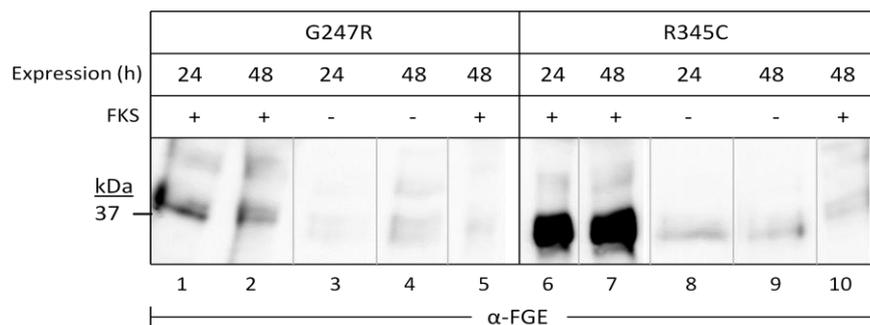


Abbildung 12: Kultivierung der FGE-Mutanten in serumfreiem Zellkulturmedium

Die Expression der FGE-Mutanten erfolgte nach stabiler Transfektion in HT1080-Zellen. Die Zellen wurden in 10 % FKS-haltigem (+) und FKS-freiem (-) Zellkulturmedium für 24 bzw. 48 Stunden kultiviert. Von jeder entnommenen Mediumprobe wurden jeweils 30 µl eingesetzt und eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen sowie eine anschließende Westernblot-Analyse durchgeführt. Die Detektion der Banden erfolgte mit einem Anti-FGE-Antikörper. Im Falle der FGE-Mutante R345C zeigt sich nach anfänglich hoher Expression in serumhaltigem Medium ein deutlicher Abfall der Expression bei Kultivierung in serumfreiem Medium. Die Sekretionsleistung konnte durch Zugabe von FKS-haltigem Medium nicht wieder erhöht werden.

4 Ergebnisse

4.1.2.2 Kultivierung der FGE-Mutanten in Medium unterschiedlichen Serumgehalts

Nachdem in der in Kapitel 4.1.2.1 beschriebenen Versuchsreihe beobachtet wurde, dass ein abrupter Wechsel von FKS-haltigem zu FKS-freiem Medium für den raschen Abfall der Expression der FGE-Mutanten verantwortlich war, wurde versucht die Menge an FKS im Zellkulturmedium sukzessive zu verringern, um sich dem Ziel einer hohen Expression bei möglichst geringem Anteil an FKS im Zellkulturmedium schrittweise anzunähern. In Abbildung 13 sind die Ergebnisse der Versuche mit den stabilen Zelllinien HT1080-FGE-A177P, -W179S sowie -R345C dargestellt. Sie wurden auf Grund ihrer relativ hohen Expression im Medium ausgewählt. Wie auch im vorherigen Versuch wurden jeweils gleiche Mengen Zellkulturüberstand der entsprechenden Zellen für eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen mit anschließender Westernblot-Analyse eingesetzt. Über den gesamten Versuchszeitraum wurde von jeder Mutante jeweils eine Zellkulturflasche kontinuierlich in Zellkulturmedium mit 10 % FKS kultiviert (siehe Abbildung 13, Reihen 2, 4, 7, 11, 13, 15, 17, 21, 23, 25 und 27). Sie diente als Vergleich für die Bestimmung der Ausgangsmengen sezernierten Proteins. Die Reduktion des FKS im Medium erfolgte in 3 Schritten von 10 % auf 5 %, 2,5 % und letztlich 2 % FKS im Zellkulturmedium. Dabei wurde den Zellen jeweils eine Woche Zeit gegeben an die neuen Kulturbedingungen zu adaptieren. Die Abbildung 13 zeigt, dass die Abhängigkeit der Expressionsrate von der FKS-Konzentration für die einzelnen Mutanten verschieden ist. In 5 % FKS bleibt sie für alle Mutanten relativ konstant. Bei der Mutante R345C ist nach 3 Tagen lediglich ein geringer Rückgang der Expression festzustellen (siehe im Vergleich Reihe 14 und 15). Die Kultivierung dieser Mutante in 2,5 und 2 % FKS-haltigem Medium führt hingegen zu einer deutlichen Abnahme der Expression (Reihe 16 und 18). Im Gegensatz hierzu nimmt die Expressionsleistung der Mutanten A177P und W179S in 2,5 % FKS-haltigem Medium nur geringfügig ab (Reihe 6 und 26). Auch in Medium mit 2 % FKS lässt sich bei der Mutante A177P im Vergleich zum Versuchsbeginn lediglich ein geringer Rückgang der Expression verzeichnen. Bei der Mutante W179S ist ein Rückgang der Expression auf etwa die Hälfte zu verzeichnen (siehe im Vergleich Reihe 21 und 29). Folglich sind die Mutanten A177P und W179S für eine Kultivierung in 2 % FKS-haltigem Medium geeignet, die Mutante FGE-R345C nicht.

4 Ergebnisse

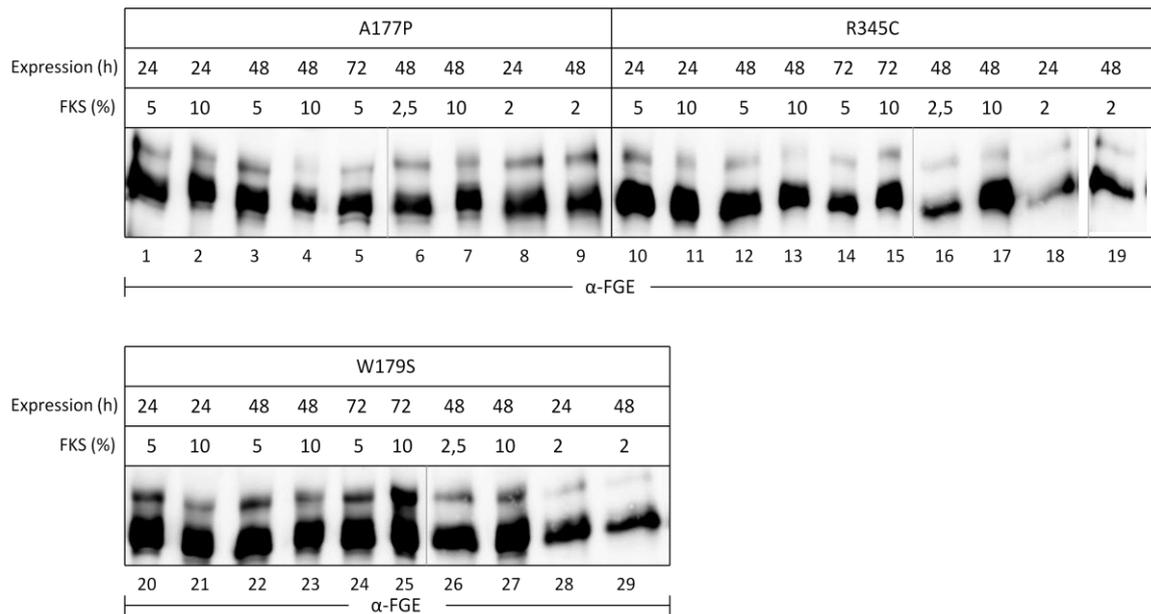


Abbildung 13: Kultivierung von FGE-Mutanten in Medien unterschiedlichen Serumgehalts

Die FGE-Mutanten wurden stabil in HT1080-Zellen transfiziert und in Zellkulturmedium mit einem Anteil von 10 % FKS kultiviert. Im Folgenden wurde der Anteil von FKS im Zellkulturmedium sukzessive von 10 auf 5, 2,5 und letztlich 2 % reduziert. Zu definierten Zeitpunkten (24, 48 bzw. 72 h) wurden Mediumproben (30 µl) entnommen und einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen sowie einer anschließenden Westernblot-Analyse unterzogen. Die Detektion der Banden erfolgte mit einem Anti-FGE-Antikörper. Bei der Mutante R345C lässt sich mit zunehmend geringerem Anteil an FKS im Medium eine schrittweise Reduktion der Expressionsleistung verfolgen. Im Falle der Mutanten A177P und W179S zeigt sich hingegen nur ein geringer Abfall der Expression.

4.2 Untersuchung zur Substratbindung der FGE-Mutanten im Vergleich zum FGE-Wildtyp

Das FGE wurde bislang erfolgreich über Affinitätschromatographie aufgereinigt (Preusser-Kunze et al. 2005). Dabei wurde im ersten Schritt eine HisTrap- und im zweiten eine Peptidsäule verwendet. Das Peptid entspricht der Sequenz der Aminosäure 65-80 der Arylsulfatase A. Es enthält das konservierte FGE-Substrat mit dem CxPCR-Motiv des aktiven Zentrums aller Sulfatasen, jedoch ist die Aminosäure Cystein an Position 69 durch einen Serin-Rest ersetzt. Dieses Peptid stellt somit ein Substrat für FGE dar und bindet an das aktive Zentrum des Enzyms. Während Peptide mit der originalen Aminosäuresequenz (Cys an Position 69) katalytisch umgesetzt werden und daher nur transient an FGE binden, lässt sich FGE von immobilisiertem C69S-Peptid durch Zugabe von löslichem C69S-Peptid im Überschuss eluieren. Damit stellt das Peptid einen Indikator für die Substratbindungsfähigkeit von FGE dar. Bei ausreichend guter Bindung erlaubt es die

4 Ergebnisse

Aufreinigung von FGE. Um die Anwendbarkeit der Affinitätschromatographie über die ASA-C69S-Peptidsäule für die Reinigung der FGE-Mutanten zu testen, wurde ein Bindungstest mit den die FGE-Mutanten enthaltenden Medienüberständen durchgeführt. Dieser Test dient gleichzeitig der vergleichenden Analyse der Substrataffinität der einzelnen Mutanten im Vergleich zum FGE-WT, um Rückschlüsse auf strukturelle Auswirkungen der einzelnen Mutationen auf die Substratbindung ziehen zu können. Indirekt werden die Aufreinigungsbedingungen sowie die zu erwartende katalytische Aktivität der FGE-Mutanten determiniert.

4.2.1 Analyse des Bindungsverhaltens des FGE-WTs an die C69S-Peptidmatrix bei steigender FGE-Konzentration

Das Ziel dieses Versuchs war die Bestimmung der maximalen Bindungskapazität der C69S-Peptidmatrix für den FGE-WT. Hierzu sollte zunächst die Menge an FGE ermittelt werden, die der maximalen Bindungskapazität der im Versuch eingesetzten Menge an Matrix entspricht. Dabei wurde eine festgesetzte Menge an Peptidmatrix (40 μ l Bettvolumen) verwendet und die Menge an eingesetztem FGE-WT schrittweise erhöht. Dabei zeigte sich der Anteil der ungebundenen Fraktion mit 16 - 18 % zunächst konstant, aber ab einer eingesetzten Menge von ca. 125 ng FGE-WT linear zunehmend (siehe Abbildung 14A und B). Dieser Wert von 125 ng wurde als maximale Bindungskapazität der Matrix für den FGE-WT definiert.

4 Ergebnisse

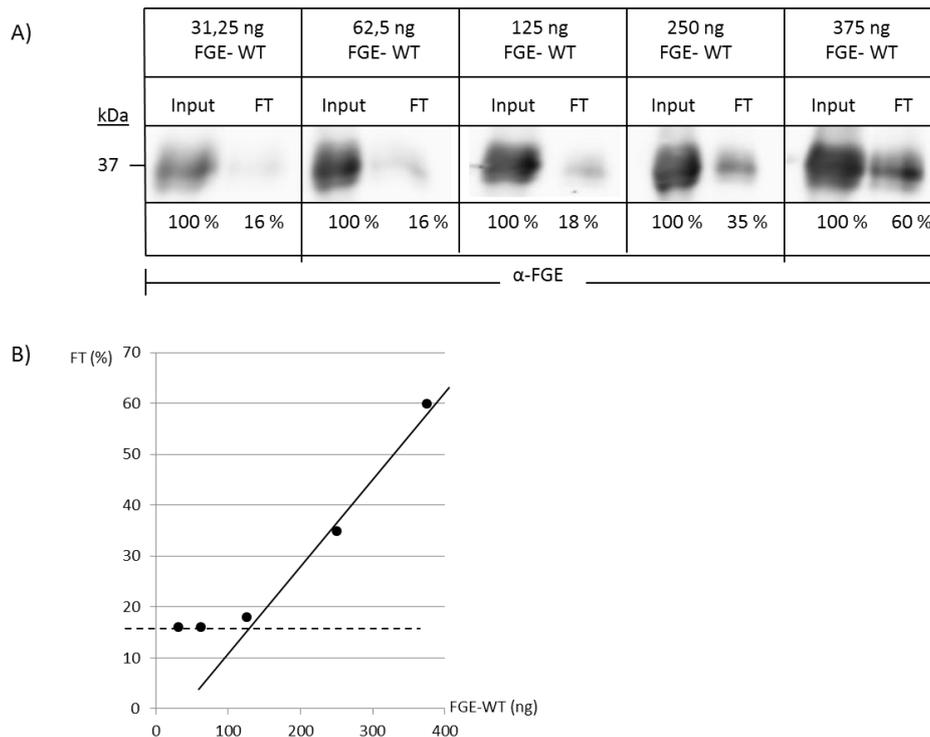


Abbildung 14: Untersuchung der Bindungsaffinität des FGE-Wildtyps an die ASA-C69S-Peptidmatrix

Von gereinigtem FGE-WT (Preusser-Kunze et al. 2005) mit einer Ausgangskonzentration von 25,2 µg/µl wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und die einzelnen Proben in Reaktionsgefäße mit dialysiertem Zellkulturmedium pipettiert. Dieses Startmaterial (Input) wurde nach zweistündiger Inkubation mit der Peptidmatrix (40 µl Bettvolumen) und Zentrifugation als Überstand entfernt (FT) und die Matrix dreimal mit PBS gewaschen. Die Elution der an die Matrix gebundenen Proteine (E) erfolgte durch Aufkochen in Laemmli-Puffer (+SH). Jeweils 25 % der Fraktionen wurden einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen sowie einer Westernblot-Analyse unterzogen. FGE-WT wurde mit einem Anti-FGE-Antikörper detektiert und die Signale quantifiziert (A). In der graphischen Darstellung des Bindungsversuches mit dem FGE-WT lässt sich bei Anstieg der eingesetzten Menge an FGE-WT ab 125 ng ein linearer Anstieg des ungebundenen Proteins erkennen (B).

4.2.2 Quantifizierung der Menge an FGE-Mutanten im jeweiligen Dialysat

Um in den Bindungsversuchen mit den FGE-Mutanten gleiche Mengen an FGE einsetzen zu können, musste zunächst die Menge an FGE-Mutanten nach der Dialyse quantifiziert werden. Dafür wurden die Proteine im Mediumüberstand von stabil transfizierten HT1080-Zellen einer T-175-Zellkulturflasche mit Ammoniumsulfat gefällt und anschließend gegen PBS dialysiert. Für die Quantifizierungsanalysen sowie für den Bindungsversuch wurde nach Zentrifugation des Dialysats der Überstand mit PBS verdünnt und über SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Als Standard für die Quantifizierung diente FGE-WT bekannter Konzentration.

4 Ergebnisse

In Abbildung 15 ist am Beispiel der FGE-Mutante G263V eine Verdünnungsreihe des Dialysats dargestellt. Daraus ist zu erkennen, dass 16 μl Dialysat dieser Mutante 125 ng FGE entsprechen. In gleicher Weise wurde auch mit den anderen FGE-Mutanten verfahren. In Tabelle 10 ist die jeweils ermittelte Dialysatmenge der FGE-Mutanten dargestellt, welche 125 ng FGE-WT entspricht. Die aus dem Dialysat der Mutante FGE-R345C bestimmte Proteinmenge war zu gering, um einen Bindungstest mit dieser Mutante durchführen zu können.

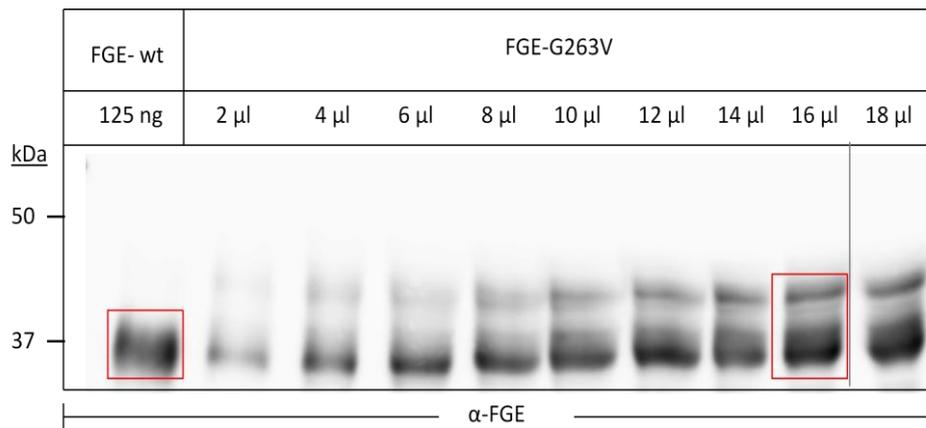


Abbildung 15: Quantifizierung der Menge an FGE im Dialysat der Mutante G263V im Vergleich zu 125 ng FGE-WT

Der FGE-WT wurde, wie in Abbildung 14 beschrieben, gewonnen. Von der Ausgangskonzentration von 25,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ wurde eine Verdünnung von 125 ng erstellt. Die FGE-Mutante G263V wurde stabil in HT1080-Zellen transfiziert. Der Mediumüberstand wurde nach 24 h abgenommen, mit Ammoniumsulfat gefällt und dialysiert. Von dem zentrifugierten Dialysat wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und die Proben zusammen mit dem FGE-WT einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen und einer Westernblot-Analyse unterzogen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe eines Anti-FGE-Antikörpers. Mit einer ansteigenden Konzentration an Dialysat der Mutante G263V nimmt die Menge an detektierbarem FGE zu. Eine anschließende Quantifizierung zeigt, dass die Konzentration des FGEs in 16 μl Dialysat der Mutante G263V 125 ng FGE-WT entsprechen.

Mutante	A177P		W179S		G247R	G263V
FKS im Medium (%)	10	2	10	2	10	10
Dialysatmenge \triangleq 125 ng FGE (μl)	6	9	3	11	4	16

Tabelle 10: Dialysatmengen der FGE-Mutanten, die 125 ng FGE-WT entsprechen

4 Ergebnisse

4.2.3 Quantitativer Vergleich der Substratbindung der FGE-Mutanten mit der des FGE-WTs

Der Substratbindungstests der FGE-Mutanten wurde entsprechend dem Bindungstest für den FGE-WT durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.1). Im Falle der FGE-Mutanten A177P und W179S wurden die Bindungstests mit 2 % und 10 % FKS im Zellkulturmedium durchgeführt, um einen Einfluss der FKS-Konzentration auf die Substratbindung feststellen zu können. Für beide Mutanten zeigte sich dabei eine Varianz von weniger als 2 % Bindung, die innerhalb der experimentellen Schwankungsbreite lag.

Wie die Abbildung 16 zeigt, ist die Substratbindung der Mutanten A177P, W179S sowie G247R im Vergleich zum FGE-WT stark reduziert. Nahezu die gesamte Proteinmenge lässt sich in der ungebundenen Fraktion nachweisen. Von allen untersuchten Mutanten bindet, wenn auch mit reduzierter Affinität, einzig die FGE-Mutante G263V an die ASA-C69S-Peptidmatrix. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Mutationen A177P, W179S und G247R zu Strukturveränderungen im FGE-Molekül und damit zu einem dramatischen Verlust der Substrataffinität führen, der die reduzierte katalytische Aktivität erklären kann. Weiter zeigen die Ergebnisse, dass ausschließlich die Mutante G263V für eine Aufreinigung über die Peptidsäule geeignet ist und die Mutanten A177P, W179S und G247R über alternative Methoden aufgereinigt werden müssen.

4 Ergebnisse

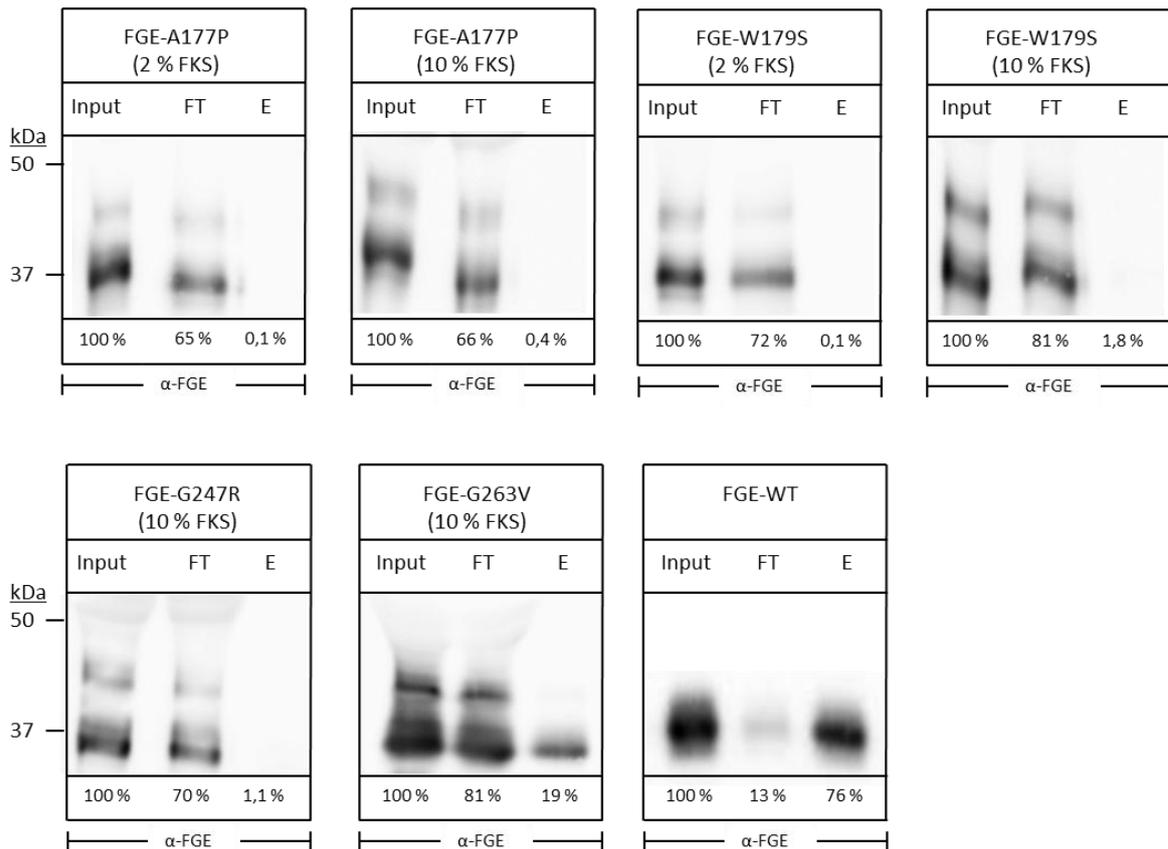


Abbildung 16: Untersuchung der Substratbindung der FGE-Mutanten an die Peptidmatrix

Die FGE-Mutanten wurden nach stabiler Transfektion in HT1080-Zellen exprimiert. Dabei erfolgte die Kultivierung der FGE-Mutanten A177P und W179S in Zellkulturmedium mit einem Anteil von 10 % sowie 2 % FKS. Für alle anderen Mutanten wurde DMEM-Zellkulturmedium mit einem Zusatz von 10 % FKS verwendet. Der Mediumüberstand wurde nach 24 h gesammelt, in Ammoniumsulfat gefällt und anschließend dialysiert. Das Dialysat (Input) wurde verdünnt und 125 ng mit 40 μ l Bettvolumen ASA-C69S-Peptidmatrix für 2 h inkubiert. Nach Abnahme des ungebundenen Materials (FT) wurde die Matrix dreimal mit PBS gewaschen. Die gebundenen Proteine (E) wurden durch Aufkochen der Matrix in Laemmli-Puffer eluiert. Jeweils 25 % der Fraktionen, einschließlich der Menge FGE die für den Versuch eingesetzt wurde (Input), wurden einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen sowie einer Westernblot-Analyse unterzogen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit einem Anti-FGE-Antikörper. Die FGE-Mutanten A177P, W179S und G247R weisen eine sehr geringe Bindungsfähigkeit an die Peptidmatrix von 0,1 bis 1,8 % auf. 19 % des eingesetzten FGEs der Mutante G263V bindet an die Matrix, deutlich geringer als der FGE-WT, welcher zu 76 % an die Matrix bindet.

4 Ergebnisse

4.3 Aufreinigung der FGE-Mutanten A177P, W179S, G247R und G263V aus Zellkulturüberständen

Da alle FGE-Mutanten für biochemische Analysen, aber insbesondere auch für die Kristallisation eingesetzt werden sollten, war es wichtig, dass die Enzyme in hochkonzentrierter und möglichst reiner Form vorliegen. Als für die Aufreinigung und alle weiteren Untersuchungen geeignet ergaben sich nach den Voruntersuchungen vier der zuvor sieben ausgewählten Mutanten nämlich A177P, W179S, G247R, G263V (siehe Tabelle 10). Die ursprünglich geplanten drei weiteren Mutanten wurden nicht weiter bearbeitet wegen zu geringer Expressionsrate in 2 % FKS (R345C), generell zu niedriger Expression (R349W) oder Fehlen des C-terminalen His-Tags (A279V). Entsprechend den in Kapitel 4.1.2.2 gewonnenen Ergebnissen wurden die FGE-Mutanten A177P und W179S einerseits mit 2 % FKS und andererseits mit 10 % FKS im Zellkulturmedium kultiviert und das daraus gewonnene Dialysat getrennt aufgereinigt. Die Menge der benötigten Zellkulturüberstände pro FGE-Mutante wurde anhand der Expressionsanalysen errechnet und lag zwischen 2-7 Litern (siehe Kapitel 4.1.1). Jede Mutante wurde in zwei Schritten aufgereinigt, wobei an erster Stelle für alle untersuchten Mutanten die Aufreinigung mit Hilfe der HisTrap-Affinitätschromatographie stand. Als zweite Aufreinigungsmethode wurde für die Mutante G263V, den Ergebnissen des Bindungstests folgend, die ASA-C69S-Peptidmatrix ausgewählt. Für die Mutanten A177P, W179S und G247R, welche nicht an die Peptidmatrix banden, wurde als zweiter Reinigungsschritt eine Anionenaustauschchromatographie verwendet.

4.3.1 Aufreinigung mittels HisTrap-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung mit Hilfe der HisTrap-Affinitätschromatographie erfolgte unter Verwendung des Chromatographie-Systems ÄKTA *purifier* UPC 10 und einer 1 ml HisTrap-HP-Affinitätssäule. Die Zellkulturüberstände der jeweiligen FGE-Mutante wurden wie in Kapitel 3.3.11 beschrieben aufbereitet. In Abbildung 17 ist exemplarisch das Elutionsprofil der FGE-Mutante W179S (10 % FKS) dargestellt. Die Detektion der Elution erfolgte durch UV-Absorption bei 280 nm.

4 Ergebnisse

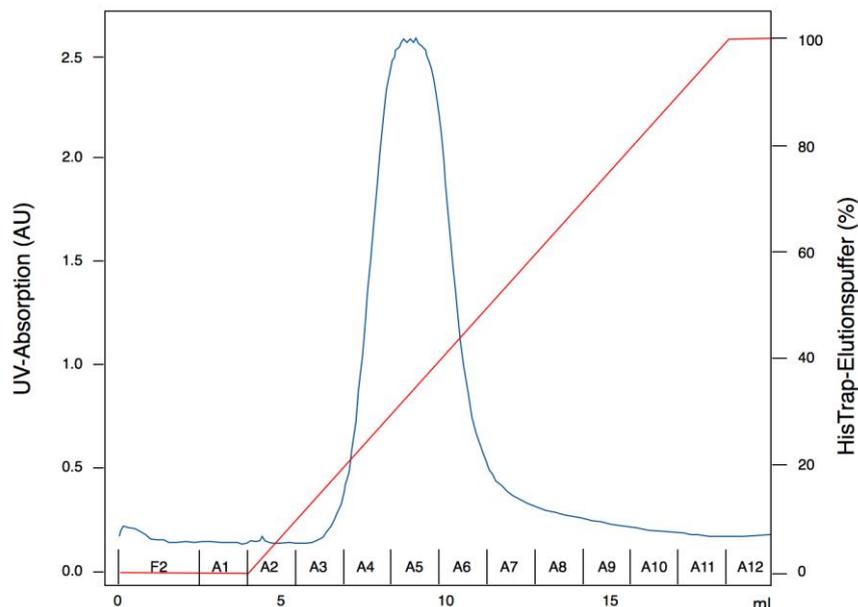


Abbildung 17: Elutionsprofil der FGE-Mutante W179S nach HisTrap-Affinitätschromatographie

Nach Überexpression der FGE-Mutante in HT1080-Zellen wurden etwa 2 Liter Zellkulturüberstand gesammelt, 1:50 mit Ammoniumsulfat gefällt und anschließend dialysiert. Die Aufreinigung erfolgte nach Zentrifugation und Filtrierung mit Hilfe der HisTrap-Affinitätschromatographie unter Verwendung einer 1 ml HisTrap-Säule. Für die Elution der Proteine wurde Imidazol verwendet, wobei ein linearer Gradient von 0 bis 500 mM Imidazol (1ml/min) gefahren wurde (rot). Die gemessene UV-Absorption ist in blau und die gesammelten Fraktionen sind unten in schwarz dargestellt.

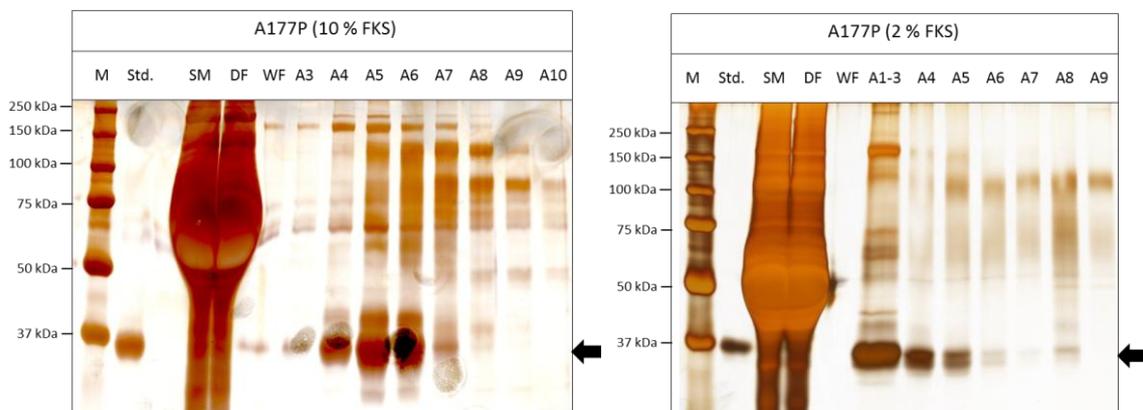
Die maximale UV-Absorption variierte je nach FGE-Mutante sowie der Menge gefällter Zellkulturüberstände und dem prozentualen Anteil von FKS im Zellkulturmedium (siehe Tabelle 11). Der Elutionspeak ist bei nahezu allen Mutanten in den Fraktionen A3-A8 zu sehen. Hier enthält der Elutionspuffer etwa eine Konzentration von 100-300 mM Imidazol. Den höchsten Wert mit 2500 mAU erreichen die Mutanten W179S (10 % FKS) und G247R, worauf die Mutanten G263V mit 2000 mAU und die Mutante A177P (10 % FKS) mit 1200 mAU folgen. Die geringere UV-Absorption bei den Mutanten A177P (400 mAU) und W179S (250 mAU) nach Kultivierung in Zellkulturmedium mit 2 % FKS lässt sich möglicherweise auf eine verminderte Expression in serumreduziertem Medium zurückführen.

4 Ergebnisse

Mutante	A177P		W179S		G247R	G263V
FKS im Medium (%)	10	2	10	2	10	10
Zellkulturüberstand (L)	2,3	7	3,2	6	4,2	4,7
max. UV-Absorption (mAU)	1200	400	2500	250	2500	2000

Tabelle 11: Maximale UV-Absorption im Elutionsprofil der FGE-Mutanten nach HisTrap-Affinitätschromatographie

Die Elutionsfraktionen nach der HisTrap-Affinitätschromatographie wurden mit SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung analysiert (siehe Abbildung 18). Hierbei zeigte sich, dass die FGE-Mutanten mit dem höchsten Elutions-Peak (W179S und G247R) entsprechend die größte Menge an FGE (42- und 37 kDa-Proteinbanden) im Eluat aufweisen. Der Anteil des eluierten FGEs bei den Mutanten A177P (2 % FKS) und W179S (2 % FKS) ist vergleichsweise gering. Hieraus lässt sich ein direkter Zusammenhang von der Höhe des Elutions-Peaks zum Anteil der eluierten FGE-Fraktion herstellen. Mit Blick auf den Reinigungserfolg lässt sich anhand des Vergleichs von Startmaterial, Durchfluss und Elutionsfraktionen ein deutlicher Reinigungseffekt dieser Methode erkennen. Dennoch weisen die Elutionsfraktionen aller FGE-Mutanten weiterhin einen großen Teil an Fremdprotein auf. Bis zur vollständigen Reinheit der Proben ist somit ein weiterer Aufreinigungsschritt notwendig. In hier nicht dargestellten Experimenten zeigte sich, dass ein zweiter HisTrap-Lauf mit den FGE-Mutanten A177P und W179S diesbezüglich keinen zusätzlichen Reinigungseffekt erbrachte.



4 Ergebnisse

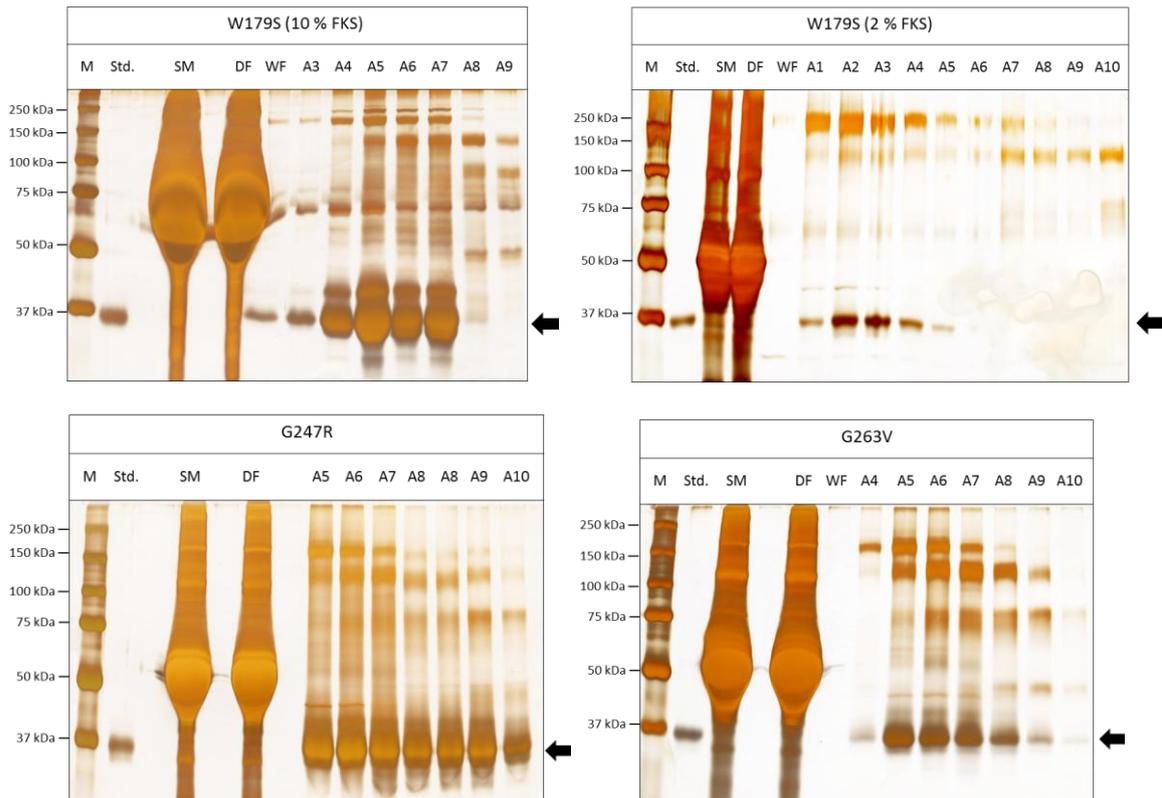


Abbildung 18: Ermittlung der Menge an Fremdprotein in den Elutionsfraktionen nach HisTrap-Affinitätschromatographie und Silber-Färbung

Die Proben von Startmaterial (SM, 0,005%), Durchfluss (DF, 0,005 %), letzter Waschfraktion (WF, 0,5 %) und den Elutionsfraktionen (Ax, 0,5 %) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Silberfärbung detektiert. Zur Detektion von FGE und zur Abschätzung der FGE-Konzentration wurde ein Protein-Marker (M) sowie ein 250 ng FGE-Standard verwendet (Std.). Die FGE-Mutanten lassen sich als Banden von 37 kDa und zum Teil auch 42 kDa in den Elutionsfraktionen detektieren, wobei die FGE-Mutanten W179S (10 % FKS) und G247R die größte Menge an FGE aufweisen (siehe Pfeil).

Vor der weiteren Verarbeitung der Proben wurden die Elutionsfraktionen mit der größten Signalstärke vereinigt und einer Entsalzung durch Gelfiltration mit der Säulenmatrix Bio-Gel[®] P-6 Medium (BioRad) zugeführt (siehe Kapitel 3.3.12), mit dem Ziel durch die Abtrennung von Salzen und anderen niedermolekularen Bestandteilen eine Beeinflussung der FGE-Bindung im zweiten Aufreinigungsschritt zu unterbinden. Die Gelfiltration wurde hierbei der Dialyse vorgezogen, da sie schneller durchführbar und der Verlust an Protein geringer ist. In Abbildung 19 ist am Beispiel der FGE-Mutante W179S ein Entsalzungsprofil nach Gelfiltration dargestellt.

4 Ergebnisse

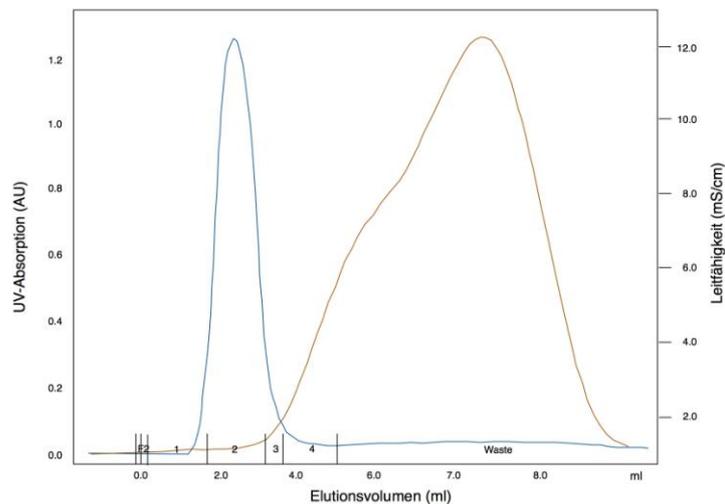


Abbildung 19: Entsalzungsprofil der FGE-Mutante W179S nach Gelfiltration

Die vereinigten Elutionsfraktionen der jeweiligen FGE-Mutanten wurden in 1 ml-Fractionen auf eine Gelfiltrationssäule (Bio-Gel® P-6 Medium) aufgetragen. Im Entsalzungsprofil ist die Abtrennung der FGE-Mutanten (Absorption bei 280 nm, blau) von niedermolekularen Substanzen (Leitfähigkeit in ms/cm, braun) dargestellt.

Wie die Absorption bei 280 nm zeigt, eluieren die FGE-Proteine früh in den Fraktionen 1-3. Die Leitfähigkeit der Salze und anderer niedermolekularer Verbindungen zeigt die späte Elution in Fraktion 4 und danach. Direkt im Anschluss an die Entsalzung wurden die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt und im Falle der FGE-Mutanten A177P, W179S und G247R mittels Anionenaustauschchromatographie und im Falle der Mutante G263V mit Hilfe von Affinitätschromatographie über eine ASA-C69S-Peptidmatrix weiter verarbeitet.

4.3.2 Aufreinigung der FGE-Mutante G263V mittels der ASA-C69S-Affigel-Peptidmatrix

Als einzige der getesteten FGE-Mutanten war die Mutante G263V in der Lage, an die ASA-C69S-Peptidmatrix zu binden (siehe Kapitel 4.2.3) und konnte somit im zweiten Reinigungsschritt mit dieser Methode aufgereinigt werden. Als Ausgangsmaterial dienten die Elutionsfraktionen nach Aufreinigung über HisTrap-Affinitätschromatographie (siehe Kapitel 4.3.1). Sie wurden vereinigt und vor der weiteren Verarbeitung durch Gelfiltration von niedermolekularen Substanzen befreit (s.o.). Die Aufreinigung erfolgte mit einer 50 ml-Chromatographiesäule (siehe Kapitel 3.3.14) nach dem Prinzip des oben beschriebenen Bindungsversuchs. Bei der Elution wurde, anders als im Bindungsversuch, ein eigens angefertigter Elutionspuffer verwendet und nach jeder der drei Elutionsschritte (E1-E3) ein

4 Ergebnisse

zusätzlicher Waschschrift eingebaut (E1W-E3W). Um den Reinheitsgrad der einzelnen Fraktionen bestimmen zu können, wurden Proben von Startmaterial, Durchfluss sowie Wasch- und Elutionsfraktionen entnommen und einer SDS-PAGE mit anschließender Silber-Färbung unterzogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

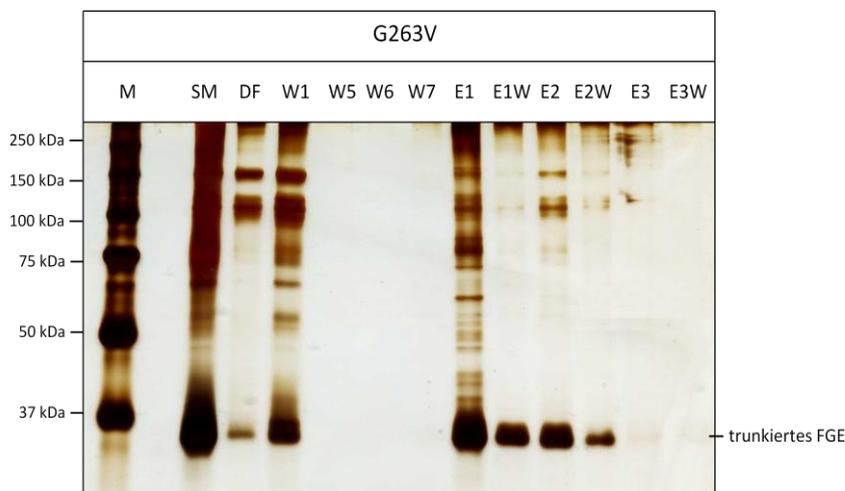


Abbildung 20: Aufreinigung der FGE-Mutante G263V mit Hilfe der ASA-C69S-Peptidmatrix

Die Elutionsfraktionen A5-A9 des ersten Aufreinigungsschrittes mittels HisTrap-Affinitätschromatographie wurden vereinigt und entsalzt. Die zweite Aufreinigung erfolgte ebenfalls durch Affinitätschromatographie unter Verwendung der ASA-C69S-Peptidmatrix (siehe Kapitel 3.3.10). Für die SDS-PAGE mit anschließender Silber-Färbung wurden 0,1 % des Startmaterials (SM) und des Durchflusses (DF) sowie 1,5 % der Waschfraktionen (Wx) und 2 % der Elutions (Ex)- und Elutions-Waschfraktionen (ExW) eingesetzt. Das FGE ist als N-terminal trunkiertes FGE in der Höhe von 37 kDa sichtbar. M zeigt den Proteinmarker. Ein deutlicher Reinigungseffekt ist in den Fraktionen E1W, E2 und E2W zu erkennen.

Das Startmaterial (0,1 %) weist eine deutliche Verunreinigung durch Fremdprotein bei einem gleichzeitig hohen Teil an FGE auf. Im Vergleich zum Durchfluss (0,1 %) zeigt sich, dass der überwiegende Teil des FGEs an die Matrix gebunden hat. Gleichzeitig kam es jedoch zur Bindung weiterer höhermolekularer Proteine an die Matrix. Ein Großteil dieser gebundenen Proteine wurde im ersten Waschschrift von der Matrix abgelöst (W1). Zusätzlich enthält die Fraktion aber auch einen großen Anteil nicht gebundenen FGEs. Die letzten Waschfraktionen (W5-7) sind frei von Protein. Der überwiegende Teil des gebundenen FGEs wird in der ersten Elution von der Matrix abgelöst. Diese Fraktion enthält allerdings noch verunreinigendes Fremdprotein. Die folgenden Fraktionen E1W, E2 und E2W enthalten nahezu ausschließlich reines FGE. Sie wurden vereinigt und durch Filtration für die Kristallisation aufkonzentriert (zur Methode siehe Kapitel 3.3.9).

4 Ergebnisse

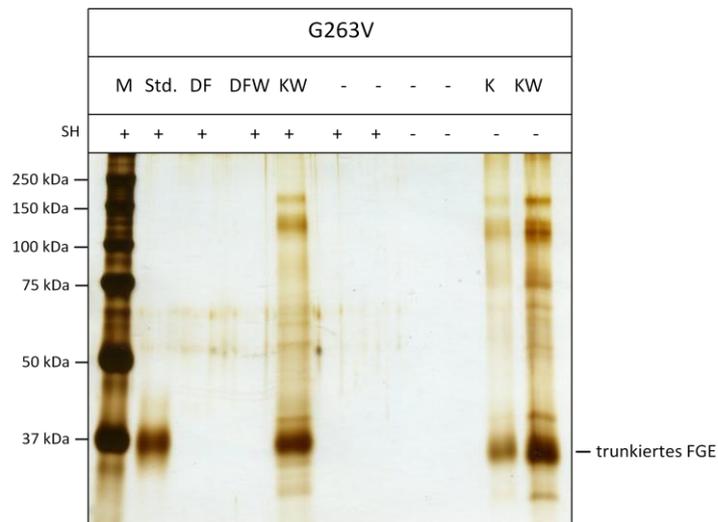


Abbildung 21: Aufkonzentrierung der gereinigten FGE-Mutanten der FGE-Mutante G263V mittels Ultrafiltration

Die Elutionsfraktionen E1W, E2 und E2W aus der Aufreinigung mit der ASA-C69S-Peptidmatrix wurden vereinigt (etwa 30 ml) und mit Hilfe einer Ultrazentrifuge (Amicon-15) mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa auf ein Volumen von 250 μ l konzentriert. Die Proben des Durchflusses (DF), der Waschfraktion (DFW) sowie 2 % des Konzentrates (K) und des gewaschenen Konzentrats (KW) wurden in einer SDS-PAGE unter reduzierenden (+SH) und nicht reduzierenden (-SH) Bedingungen eingesetzt. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch Silber-Färbung. Zur Detektion des FGEs und zur Abschätzung der FGE-Konzentration wurde ein Protein-Marker (M) sowie ein 250 ng FGE-Std. verwendet (Std.). Sowohl in den Konzentrat- als auch den gewaschenen Konzentratfraktionen lässt sich eine deutliche Verunreinigung durch Fremdprotein erkennen.

In Abbildung 21 zeigt sich, dass sowohl die Konzentrat-, als auch die gewaschenen Konzentratfraktionen noch deutliche Verunreinigungen durch Fremdprotein aufweisen. Für eine folgende Kristallisation sind diese Proben daher ungeeignet. Auf Grund der geringen Menge der FGE-Proteine war eine erneute Aufreinigung über Anionenaustauschchromatographie oder Affinitätschromatographie nicht erfolgversprechend. Die FGE-Proben konnten jedoch für weitere Tests, beispielsweise *in vitro*-Aktivitätsmessungen genutzt werden.

4.3.3 Aufreinigung mittels Anionenaustauschchromatographie

Die weitere Aufreinigung der FGE-Mutanten A177P, W179S und G247R erfolgte über Anionenaustauschchromatographie mit Hilfe eines HPLC-Systems (SMART, Pharmacia) unter Verwendung eines starken Anionenaustauschers (Trimethylamin-Matrix einer Mono Q 5/50-Säule, siehe Kapitel 3.3.13). Bei dieser Aufreinigungsmethode handelt es sich um ein etabliertes Verfahren zur Aufreinigung von komplexen Proteingemischen. Darüber

4 Ergebnisse

hinaus bietet die Methode den Vorteil verdünnte Proteinproben auf kleine Volumina zu konzentrieren. Nach der Entsalzung der Proben (siehe Kapitel 4.3.1) wurden die Proben der jeweiligen FGE-Mutante vereinigt und direkt in das HPLC-System injiziert, wo es zur Bindung der negativ geladenen Proteine an die positiv geladenen Trimethylamin-Gruppen der Säulenmatrix kam. Mit einem zweigipfligen Salzgradienten von 20 mM bis 1 M NaCl Mono Q-Elutionspuffer wurden die FGE-Mutanten von der Säule eluiert (siehe Kapitel 2.4). In Abbildung 22 ist das Elutionsprofil der Proteine über UV-Absorption bei 280 nm bei der Reinigung der FGE-Mutante W179S dargestellt.

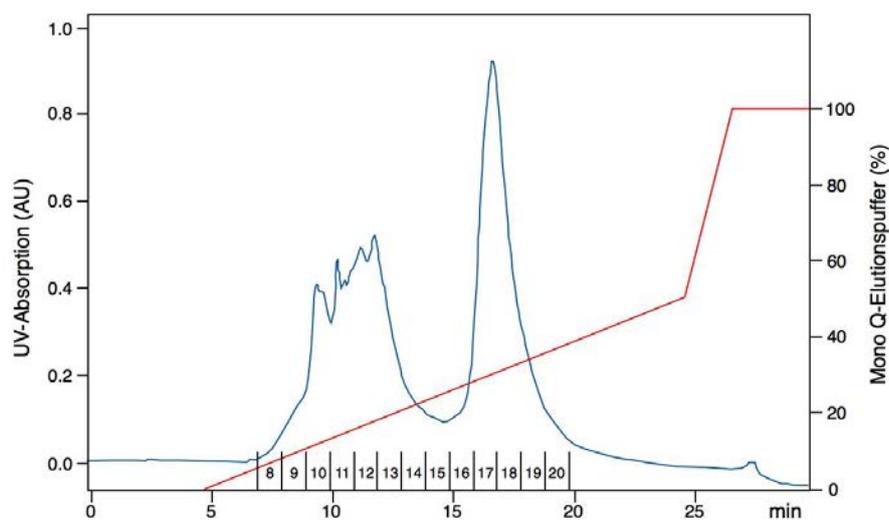


Abbildung 22. Elutionsprofil während der Reinigung der FGE-Mutante W179S über Anionenaustauschchromatographie

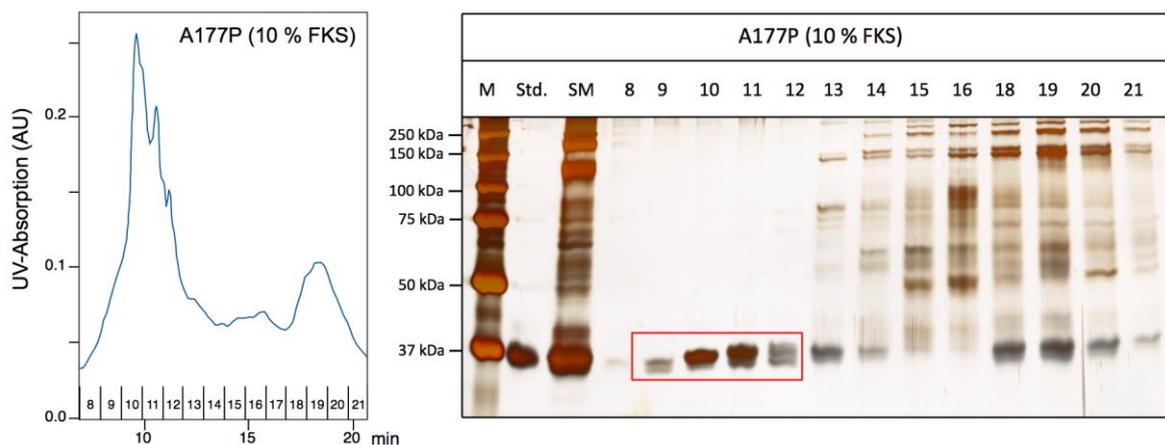
Nach HisTrap-Affinitätschromatographie der Mutante W179S und Entsalzung durch Gelfiltration wurden die Elutionsfraktionen vereinigt und durch Anionenaustauschchromatographie an einer Mono Q 5/50-Säule aufgereinigt. Die Elution erfolgte durch einen linearen Salzgradienten von 20 mM bis 1 M NaCl im Elutionspuffer (rote Linie: Leitfähigkeit). Mono Q-Elutionspuffer (rot). Die Elutionsfraktionen 1-27 mit einem Volumen von je 500 μ l sind in schwarz unten gekennzeichnet. Das Elutionsprofil zeigt einen mehr- und einen eingipfligen Elutionspeak mit einer maximalen UV-Absorption von etwa 0,55 bzw. 0,9 AU.

Wie in Abbildung 22 und Abbildung 23 dargestellt, zeigt das Mono Q-Elutionsprofil der FGE-Mutanten einen mehrgipfligen Verlauf. Die genauere Analyse der einzelnen Fraktionen über SDS-PAGE und Silber-Färbung zeigt, dass der jeweils erste Peak bzw. Peakkomplex mit einer maximalen UV-Absorption von 0,03 bis 0,55 AU-Fraktionen repräsentiert, die nahezu frei von Fremdproteinen sind (siehe Abbildung 23). Hierbei handelt es sich insbesondere um die Fraktionen 8-12 im Elutionsbereich von 50-150 mM NaCl. Wie nach Reinigung über die HisTrap-Säule ist auch hier eine Korrelation von UV-

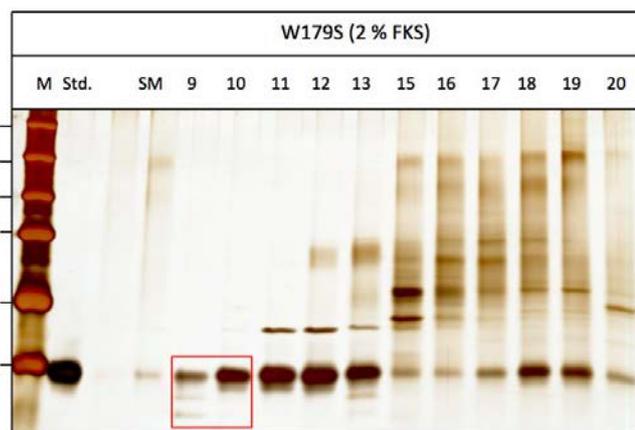
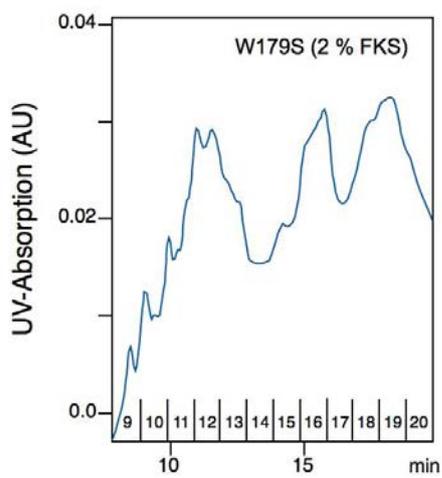
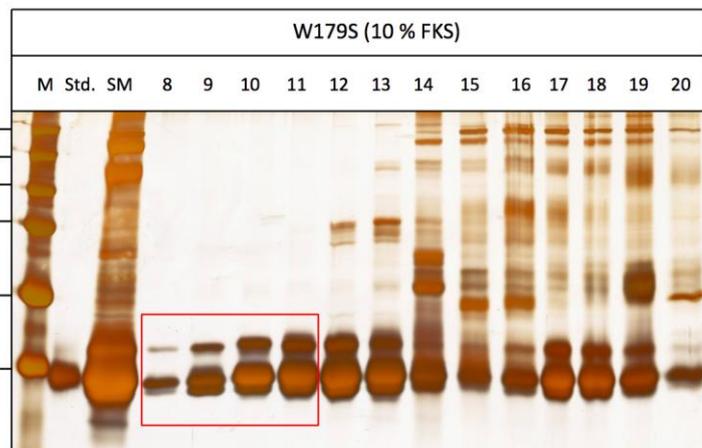
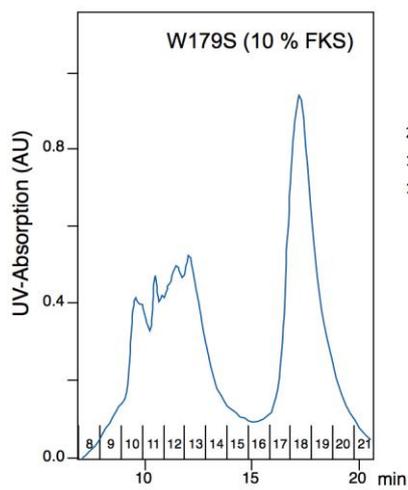
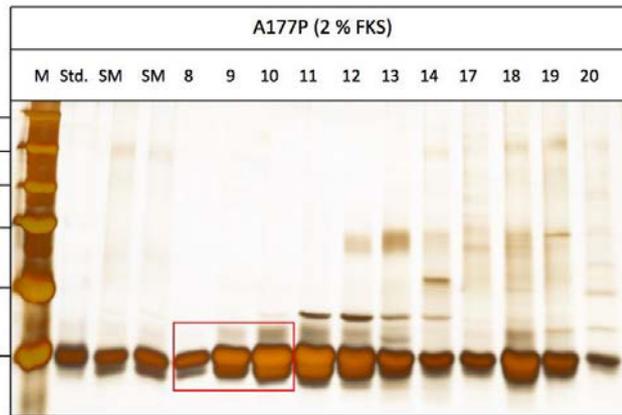
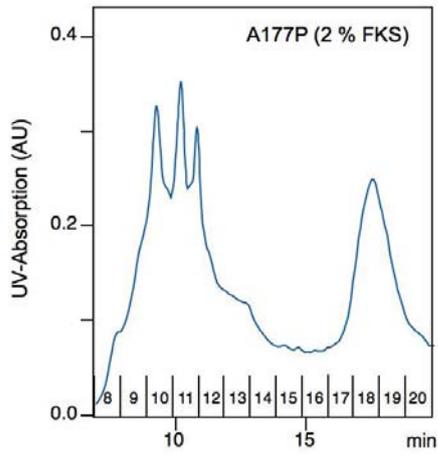
4 Ergebnisse

Absorption und der Menge eluierter FGEs erkennbar. So zeigt die FGE-Mutante W179S (10 % FKS) mit der stärksten UV-Absorption ebenso die größte Menge an aufgereinigtem FGE, wohingegen die Mutante W179S (2 % FKS) deutlich weniger FGE-Proteine im Eluat aufweist. Mit dem Ziel den Ertrag reinen FGEs zu steigern wurde mit den Fraktionen 17 und 18 der Mutante W179S (10 % FKS) ein zweiter Mono Q-Lauf durchgeführt, der nach Analyse über SDS-PAGE und Silber-Färbung zu keiner Erhöhung des Reinheitsgrades führte. Im Gegensatz zum vorherigen Elutionsprofil (siehe Abbildung 22) zeigte sich lediglich ein eingipfliger Elutionspeak bei den Fraktionen 17-19 (Ergebnisse nicht dargestellt).

Zusammengenommen lassen die Ergebnisse des zweiten Aufreinigungsschrittes einen deutlichen Reinigungseffekt erkennen. Einzig die Mutante G247R konnte nicht erfolgreich aufgereinigt werden. Im Vergleich des Startmaterials dieser Mutante vor (SM-FD) und nach (SM) Entsalzung über Gelfiltration (siehe Kapitel 4.3.1) wurde deutlich, dass ein Teil der Proteine bei dem Entsalzungsprozess verloren gegangen ist. Die letztlich für die Kristallisation verwendeten Proteinproben aller Mutanten sind in Abbildung 23 mit einem roten Rahmen versehen. Die Proteinproben der 2- und 10 %-FKS haltigen Eluate der Mutanten A177P und W179S wurden vereinigt, da für die Kristallisation möglichst große Mengen aufgereinigten FGEs benötigt werden. Auf Grund des geringen Ertrags reinen Proteins wurde die FGE-Mutante G247R nicht weiter verarbeitet.



4 Ergebnisse



4 Ergebnisse

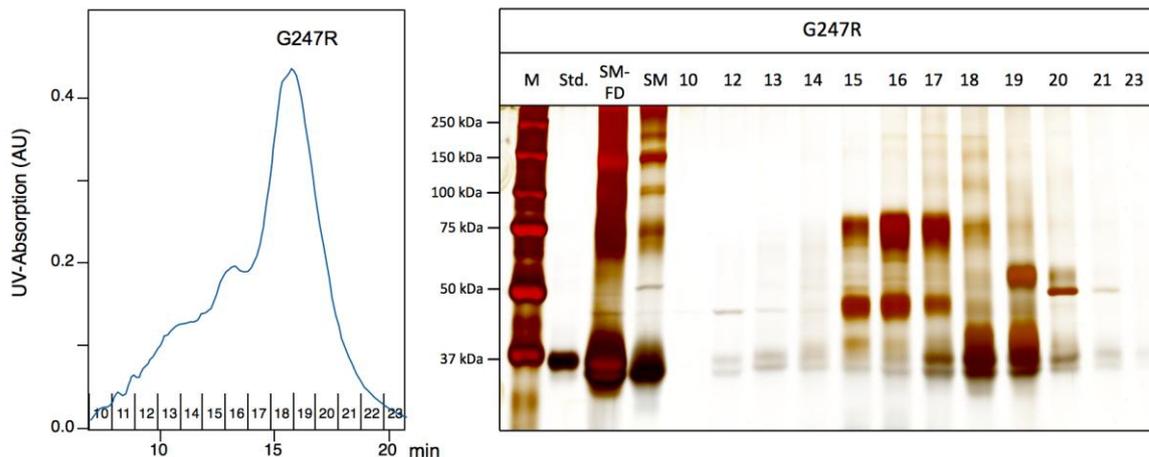


Abbildung 23: Ermittlung der Menge an Fremdproteinen über SDS-PAGE und Silberfärbung in den Elutionsfraktionen nach Anionenaustauschchromatographie

Auf der linken Seite ist das jeweilige Anionenaustausch-Elutionsprofil der Mutante dargestellt (zur Methode siehe Legende zur Abbildung 22). Die Proben von Startmaterial (SM, 0,1-0,3 %) und den Elutionsfraktionen 8-23 (2-8 %) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Silber-Färbung sichtbar gemacht. Im Falle der Mutante G247R wurde zusätzlich zum Startmaterial (SM, 0,03 %) auch das Startmaterial vor Entsalzung über Gelfiltration (SM-FD, 0,1 %) eingesetzt (zur Entsalzung siehe Kapitel 4.3.1). Der Protein-Marker (M) ermöglichte die Bestimmung des Molekulargewichts, ein 250 ng FGE-Standard (Std.) die Abschätzung der FGE-Konzentration. Je nach Höhe der UV-Absorption wurden unterschiedliche Anteile der Elutionsfraktionen (2-4 %) für die SDS-PAGE eingesetzt. Auf Grund des geringen Absorptionsmaximums der Mutante W179S (2 % FKS) von lediglich 30 mAU, wurden hier 8 % der Elutionsfraktionen eingesetzt. Die jeweils rot umrahmten Proben wurden vereinigt und für eine Kristallisation durch Lyophilisierung aufkonzentriert.

Die FGE-Konzentration der jeweiligen FGE-Mutante wurde unter Zuhilfenahme des FGE-WT-Standards abgeschätzt und die Proben mit einem Gesamtvolumen von je etwa 2 ml durch Lyophilisierung aufkonzentriert (siehe Kapitel 3.3.8), um die für den Kristallisationsprozess notwendige Protein-Konzentration zu gewährleisten. Nach Einengung der Proben wurde die Proteinkonzentration in den Konzentraten über einen Proteinbestimmungs-Assay ermittelt. Für die Mutante W179S lag sie bei 4 mg/ml und einem Endvolumen von 20 μ l. Die Endkonzentration der Mutante A177P lag bei 5,5 mg/ml. Für nachfolgende Analysen, wie die *in vitro*-Aktivitätstests und für den Mutationsnachweis wurden jeweils 1 μ l der Konzentrate sowie der Elutionsfraktionen entnommen.

4 Ergebnisse

4.4 Proteinidentifizierung der FGE-Mutanten mittels Massenspektrometrie

Der Nachweis der entsprechenden FGE-Mutationen in den aufgereinigten FGE-Konzentraten erfolgte mit Hilfe der Matrix-gestützten Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie. Hierzu wurden die aufgereinigten FGE-Mutanten einer SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen sowie einer anschließenden Coomassie-Färbung unterzogen (siehe Kapitel 3.3.7.1). In Abbildung 24 sind die vollständig aufgereinigten Konzentrate der FGE-Mutanten A177P und W179S dargestellt. Der Vergleich mit dem FGE-WT Standard zeigt, dass die Proteine ausschließlich in ihrer N-terminal trunkierten Form vorliegen.

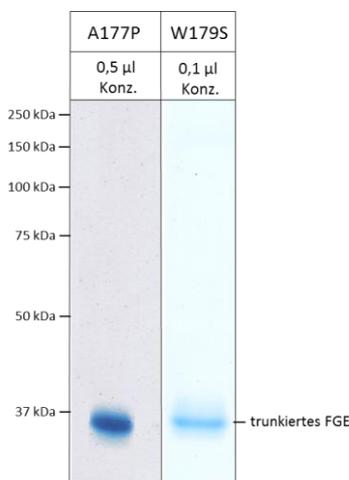


Abbildung 24: SDS-PAGE der aufgereinigten Konzentrate der FGE-Mutanten A177P und W179S

Die über Affinitätschromatographie und Anionenaustauschchromatographie aufgereinigten und aufkonzentrierten Mutanten FGE-A177P und FGE-W179S wurden über SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen analysiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch Coomassie-Färbung.

Um die Proteine einer massenspektrometrischen Analyse zugänglich zu machen wurden die gewünschten Proteinbanden des Coomassie-gefärbten Gels ausgeschnitten, nach dem Protokoll des In-Gel-Verdaus (siehe Kapitel 3.3.17) weiterverarbeitet und die Proteine mit Hilfe der Massenspektrometrie und Datenbankanalyse identifiziert. In Abbildung 25A ist das Peptidmassen-Fingerprint-Spektrum (MS) der FGE-Mutante W179S dargestellt. In der Aminosäuresequenz humanen FGEs sind die gefundenen tryptischen Peptide blau und das Peptid mit der Mutation W179S (1794,84 Da) mit einem roten Rahmen markiert. Von dem Peptid mit der Masse 1794,84 Da wurde eine MS/MS-Analyse durchgeführt, deren Ergebnis in Abbildung 25B dargestellt ist. Das Spektrum zeigt die durch Fragmentierung entstandenen b- und y-Ionen. Über die Serie der y-Ionen und die internen Fragmente PSW und PSWL kann die Mutation W179S eindeutig bestimmt werden.

4 Ergebnisse

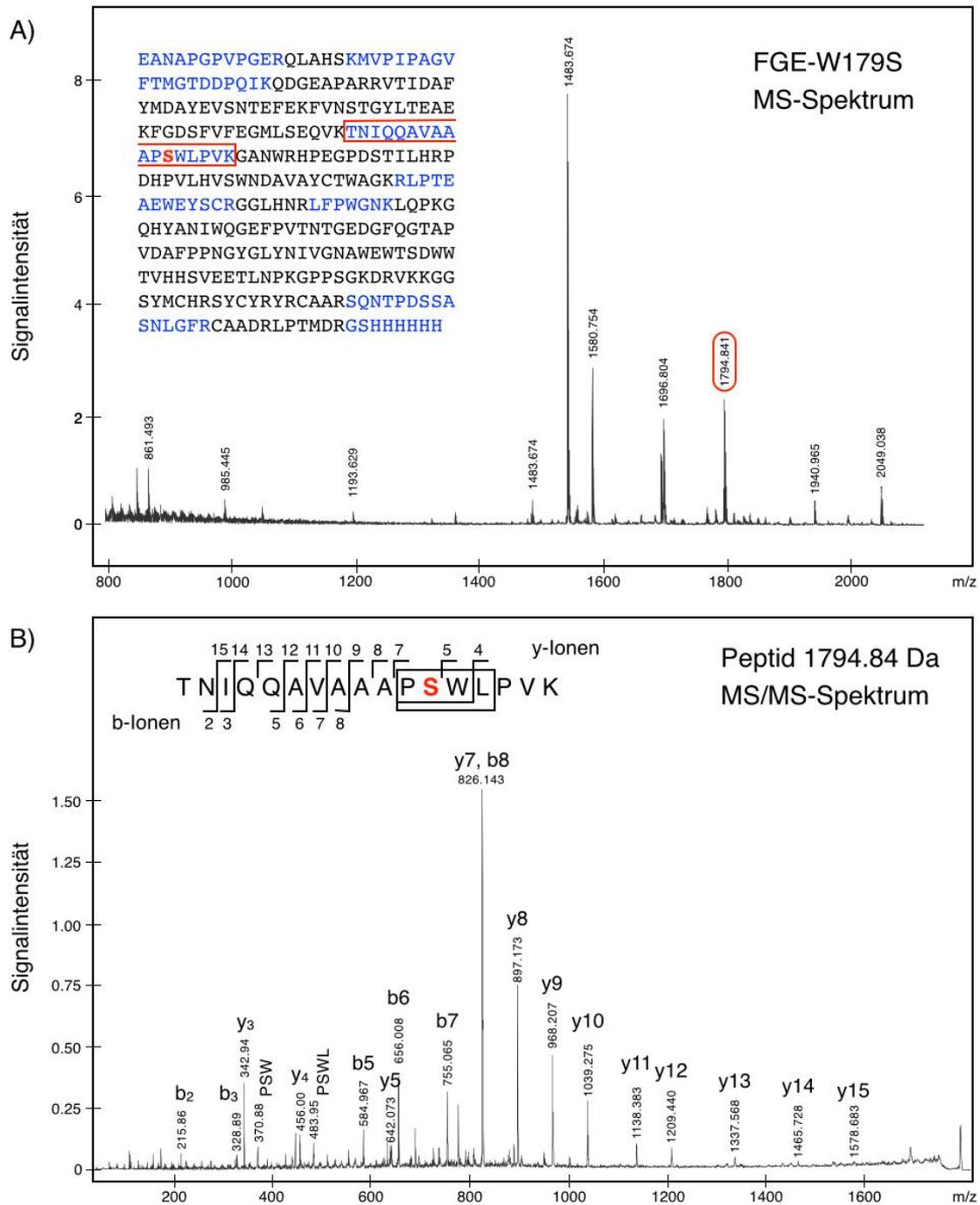


Abbildung 25: Analyse der FGE-Mutante W179S über Massenspektrometrie

Proben der aufgereinigten FGE-Mutante W179S wurden in eine SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen eingesetzt und die Proteinbanden mittels Coomassie-G250 angefärbt. Die zu analysierenden Proteinbanden wurden ausgeschnitten und nach dem Protokoll des In-Gel-Verdau für die massenspektrometrische Messung vorbereitet. Abbildung A zeigt das MS-Spektrum der tryptischen Peptide der Mutante FGE-W179S. In der Aminosäuresequenz sind die identifizierten Peptide aus dem tryptischen Verdau farblich blau hervorgehoben, das Peptid mit der Mutation W179S rot umrahmt.

Das MS/MS-Spektrum des Peptids mit der Masse 1794,84 und der Mutation W179S zeigt die durch Fragmentierung entstandenen b- und y-Ionen (B).

4 Ergebnisse

Die Konzentrate mit einer Endkonzentration von 4 mg/ml (W179S) bzw. 5,5 mg/ml (A177P) wurden zur Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse nach Basel zu PD Dr. Markus Rudolph (Firma Hoffmann – La Roche) verschickt. Die Ergebnisse dieser Analysen stehen noch aus.

4.5 *In vitro*-FGE-Aktivitätstest zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der FGE-Mutanten

Mit Hilfe der FGE-Aktivitätstest sollte untersucht werden, inwieweit die jeweiligen Mutationen des SUMF1-Gens die *in vitro*-Aktivität des FGEs beeinflussen. Zur Präparation der Proben wurden Medienproben der stabil transfizierten HT1080-Zellen nach 48 stündiger Überexpression abgenommen und die FGE-Mutanten wie in Kapitel 4.3 beschrieben durch HisTrap-Affinitätschromatographie und Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Als Auswahlkriterium für die einzelnen Proben der FGE-Mutanten wurde ihr Reinheitsgrad im Coomassie-gefärbten Gel herangezogen. Die Messung der *in vitro*-FGE-Aktivität der FGE-Mutanten erfolgte mittels der MALDI-TOF-MS nach dem in Kapitel 3.3.16 beschriebenen Protokoll. Für die Bestimmung der Aktivität der jeweiligen FGE-Mutante wurde der prozentuale Anteil des Produkts vom gesamten Substratpeptid berechnet. In Abbildung 26 ist exemplarisch ein Massenspektrum des Aktivitätstest mit 4 ng FGE-WT und einer Inkubationsdauer von 20 min dargestellt.

4 Ergebnisse

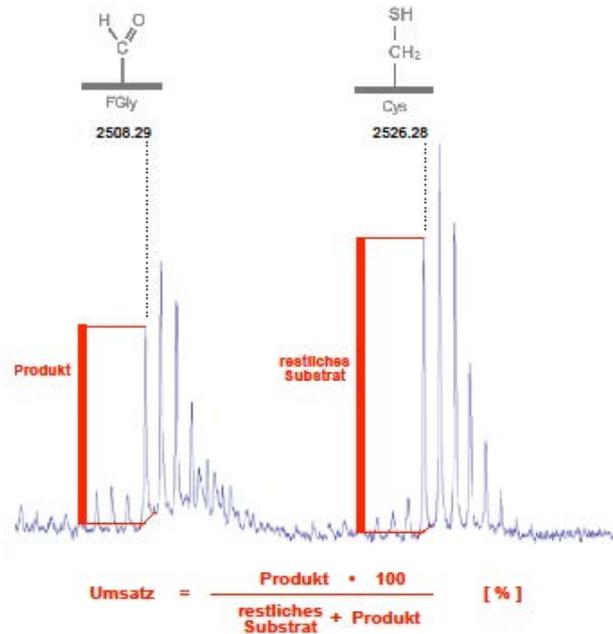


Abbildung 26: MALDI-TOF-Massenspektrum des FGE-Substratpeptids P23 und seines Produkts nach Modifikation durch FGE

Nach Durchführung des Aktivitätstests mit 4 ng FGE-WT bei einer Inkubationszeit von 20 min erfolgte eine massenspektrometrische Analyse unter Verwendung einer Dünnschicht/Nitrozellulose/ α -Cyano-Präparation. Die Wiedergabe der Massenspektren erfolgte mit Hilfe des Programms FlexAnalysis (Bruker Daltronik). Die katalytische Aktivität des FGEs (Umsatz) lässt sich entsprechend der aufgeführten Rechnung aus dem Verhältnis der Intensität der monoisotopischen Signale für das Substrat und das Produkt ermitteln.

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten und die spezifische Aktivität errechnen zu können, wurde zunächst die Konzentration der aufgereinigten FGE-Mutanten mit Hilfe von SDS-PAGE und Westernblot ermittelt. Das Ziel bestand darin eine für alle Mutanten gleiche Probenmenge von 50 ng FGE zu verwenden. Ein beigefügter FGE-WT-Standard diente der Quantifizierung der Proteinbanden. In Abbildung 27 und Tabelle 12 sind die daraus ermittelten Konzentrationen der FGE-Mutanten G247R, A177P und W179S zusammengefasst. Die Mutante G263V konnte weder im Westernblot noch in der Aktivitätsmessung durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Neben den dialysierten Konzentraten wurden auch Proben der Aufreinigung der Mono Q-Läufe analysiert, die zuvor nicht dialysiert wurden. Vor der Westernblot-Analyse wurden die Konzentrate der Mutanten A177P und W179S 1:100 in 10 mM Tris/HCl pH 8.0 verdünnt. Die mit W179S MQ12 bezeichnete Probe mit einem Salzgehalt von etwa 150 mM NaCl entspricht der Fraktion 12 des Mono Q-Laufs mit 10 % FKS (siehe Kapitel 4.3.3). Weiterhin wurde die Fraktion 11 des Mono Q-Laufs der Mutante W179S mit 2 %

4 Ergebnisse

FKS getestet, welche ebenfalls einen Salzgehalt von etwa 150 mM NaCl aufweist (W179S MQ11). Da die Mutante G247R nicht gänzlich aufgereinigt werden konnte, wurde die Fraktion 11 des Mono Q-Laufs mit einem Salzgehalt von etwa 140 mM für die Aktivitätsbestimmungen herangezogen. Die mit A177P MQ49 (2 % FKS) bezeichnete Probe stammt aus einem Mono Q-Lauf einer Aufreinigungsreihe dessen Ergebnisse in dieser Arbeit nicht dargestellt sind. Die Aufreinigung erfolgte entsprechend dem Protokoll der Mutante A177P mit 2 % FKS im Zellkulturmedium (siehe Kapitel 4.3.1 und 4.3.3).

Bei der Analyse der FGE-Konzentrationen zeigt sich, dass die Mutante W179S MQ12 mit 500 ng/ μ l die höchste Konzentration aufweist. Eine vergleichsweise geringe Konzentration zeigen die Mutanten G247R mit 10 ng/ μ l sowie W179S MQ11 mit 16 ng/ μ l. Die FGE-Konzentration des Konzentrats der Mutante A177P liegt mit 83 ng/ μ l unter jener der Mutante W179S mit einem FGE-Gehalt von 125 ng/ μ l. Die Mono Q-Fraktion der FGE-Mutante A177P weist ebenfalls eine Konzentration von 125 ng/ μ l und besitzt einen Salzgehalt von etwa 430 mM NaCl. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Konzentrationen aller FGE-Mutanten ausreichend waren, um den *in vitro*-Aktivitätstest durchführen zu können.

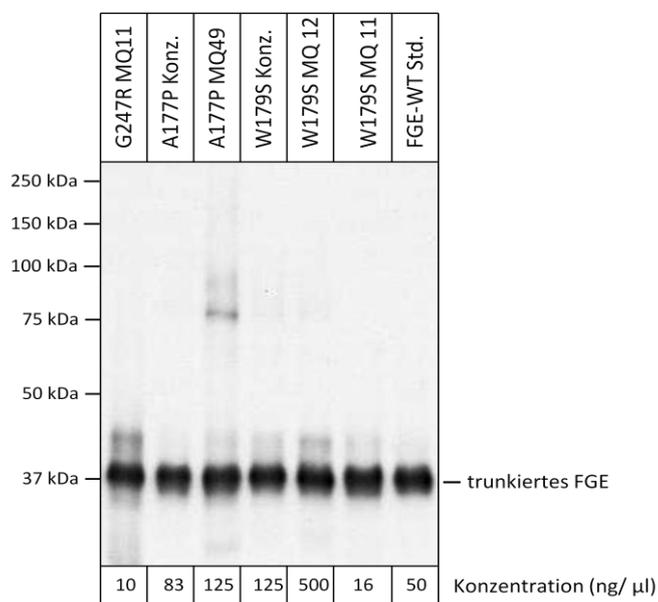


Abbildung 27: Westernblot zur Ermittlung der Expressionslevel der FGE-Mutanten

Die HT1080-Zellen wurden stabil mit der cDNS der FGE-Mutanten transfiziert. Der Mediumüberstand wurde über HisTrap-Affinitätschromatographie und Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Entsprechend der Sekretionsleistung der jeweiligen FGE-Mutante wurden 0,1-5 μ l der Mediumproben unter reduzierenden Bedingungen (+SH) mit Hilfe von SDS-PAGE und α -FGE-Antikörpern im Westernblot analysiert und quantifiziert (siehe Kapitel 3.3.2 und 3.3.3).

4 Ergebnisse

Mutante	eingesetzte Probenmenge (μl)	Konzentration ($\text{ng}/\mu\text{l}$)
G247R Mono Q 11	4,9	10
A177P Konzentrat	0,6	83
A177P Mono Q 49	0,4	125
W179S Konzentrat	0,4	125
W179S Mono Q 12	0,1	500
W179S Mono Q 11	3,2	16

Tabelle 12: Analyse der FGE-Konzentration der aufgereinigten FGE-Mutanten

Die Konzentration der einzelnen Proben der FGE-Mutanten wurde mit Hilfe des Westernblots in Abbildung 27 ermittelt. Die FGE-Konzentration wurde anschließend aus der eingesetzten Menge an Probenmaterial ermittelt. Mit 500 $\text{ng}/\mu\text{l}$ weist die Mutante W179S MQ12 die höchste und die Mutante G247R mit 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ die geringste Konzentration auf.

Um die spezifische Aktivität der FGE-Mutanten möglichst exakt bestimmen zu können, wurde jeweils über Verdünnung der Ausgangsprobe eine Konzentrationsreihe hergestellt und die Aktivität der FGE-Mengen im Bereich von 10-100 ng bestimmt. Dafür wurden die Proben der Mutanten zunächst in BSA (2mg/ml) auf 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ verdünnt. Auf Grund der im Vergleich zu den FGE-Mutanten hohen Aktivität des FGE-WTs wurde hier eine Verdünnung von 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ erstellt. Gemäß dem in Kapitel 3.3.16 beschriebenen Aktivitätstest-Ansatz (siehe Tabelle 9) wurden jeweils 1-6 μl der Proteinproben eingesetzt und die Menge des zu pipettierenden BSAs entsprechend angepasst. Die Menge an FGE-Mutante betrug 10, 20, 40, 60, 80, und 100 ng, wobei jede Probe 1 h mit dem P23-Substratpeptid inkubiert wurde. Die Versuche mit dem FGE-WT erfolgten mit 1, 2, 4, 6 und 8 ng bei einer Inkubationszeit von je 15 min. Auf Grund der hohen Sensitivität der Messmethode und damit verbundener Variabilität der Messergebnisse wurden jeweils drei identische Ansätze pipettiert. Die Ergebnisse der Aktivitätstests sind in Abbildung 28 und in Form eines Diagramms grafisch dargestellt.

4 Ergebnisse

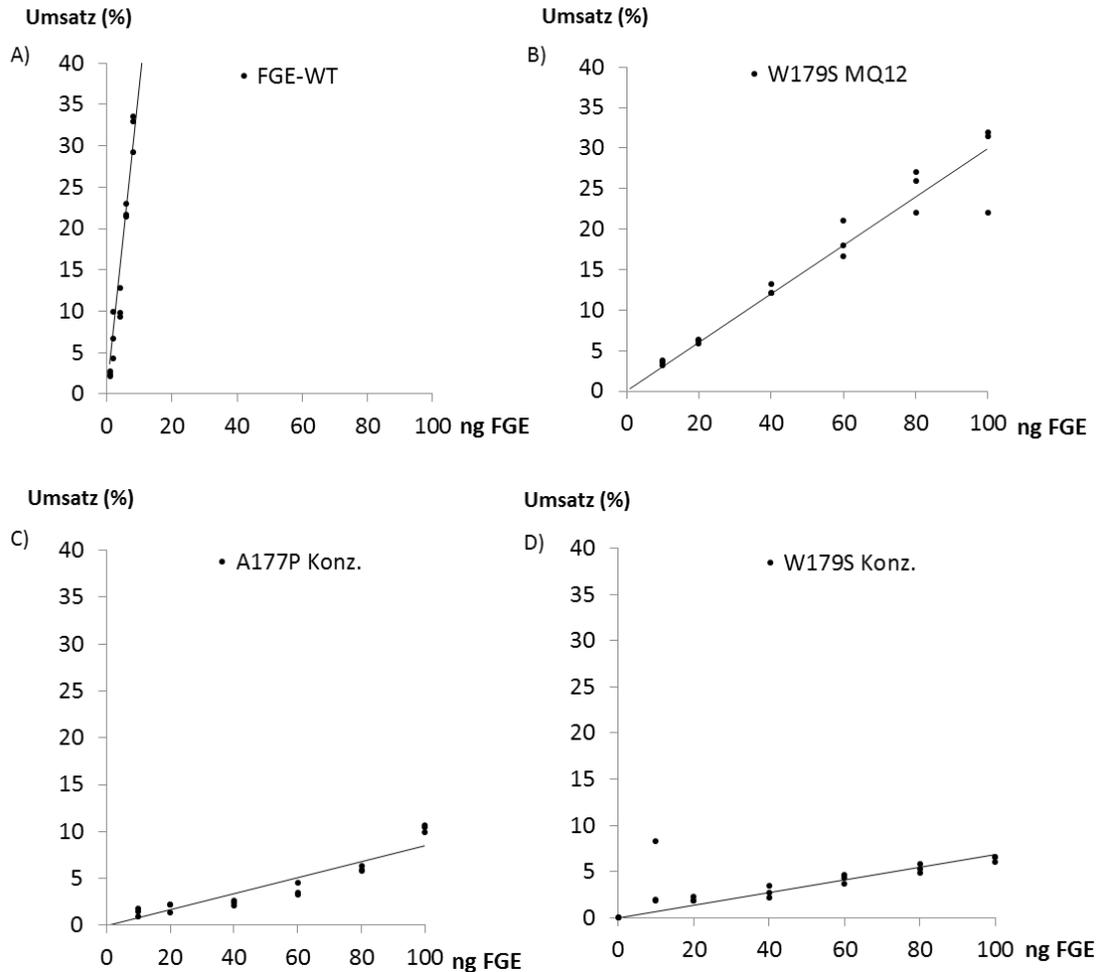


Abbildung 28: Substratumsatz der FGE-Mutanten A177P, W179S und W179S MQ12 und des FGE-WTs in Abhängigkeit von der FGE-Konzentration

Für den Aktivitätstest wurden die Konzentrate der FGE-Mutanten A177P und W179S nach Aufreinigung durch Affinitätschromatographie und Anionenaustauschchromatographie sowie anschließender Lyophilisierung verwendet. Die mit W179S MQ12 bezeichnete Probe entspricht der Fraktion 12 des Mono Q-Laufs mit ehemals 10 % FKS im Medium (siehe Kapitel 4.3.3). Es wurden jeweils 10, 20, 40, 60, 80 und 100 ng FGE-Mutante für die Untersuchung eingesetzt und für 1 h mit dem P23-Substratpeptid inkubiert. Als Vergleichsstandard dienten Proben des FGE-WT mit einem FGE-Gehalt von 1, 2, 4, 6 und 8 ng. Die Inkubation des FGE-WTs erfolgte für 15 min. Die Probe W179S MQ12 mit einem Salzgehalt von etwa 150 mM NaCl weist eine etwa dreifach höherer Substratumsatz als ihr entsprechendes Konzentrat auf (vergleiche B und D). Der Umsatz der beiden Konzentrate liegt nahe beieinander und ist vergleichsweise niedrig (vergleiche C und D). Der Umsatz des FGE-WTs liegt um ein Vielfaches höher (A).

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl beim FGE-WT als auch bei den FGE-Mutanten ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge des eingesetzten FGEs und dem gemessenen Substratumsatz besteht. Weiterhin ist der Umsatz bei den FGE-Mutanten A177P und W179S und dem FGE-WT ausreichend hoch, um den *in vitro*-Aktivitätstest durchführen zu können. Der Substratumsatz der FGE-Mutanten der Proben G247R MQ11 und A177P MQ

4 Ergebnisse

war hingegen für eine Aktivitätsmessung nicht ausreichend. Mit Blick auf die Aktivitätslevel liegen die aufgereinigten Konzentrate der beiden FGE-Mutanten A177P und W179S nahe beieinander und sind im Vergleich zu den anderen Proben deutlich geringer. Der Substratumsatz der Probe W179S MQ12 ist etwa dreimal so hoch wie ihr entsprechendes Konzentrat (siehe Abbildung 28). Der Umsatz des FGE-WTs liegt trotz geringerer Inkubationszeit deutlich über jenem der FGE-Mutanten. Die Berechnung der spezifischen Aktivitäten ergibt eine spezifische Aktivität von 0,1 mU/mg für die Probe A177P Konz, von 0,15 mU/mg für die Probe W179S Konz, von 0,3 mU/mg für die Probe W179S MQ12 und von 9,7 mU/mg für den FGE-WT. Demgemäß besitzen die Konzentrate der Mutanten eine katalytische Aktivität von 0,9 % (A177P) und von 1,6 % (W179S) im Vergleich zum FGE-WT. Diese Ergebnisse decken sich weitestgehend mit den Aktivitätsmessungen von Schlotawa et al. aus Zelllysaten, die eine katalytische Aktivität von 1 % für die Mutante A177P und von 3 % für die Mutante W179S ergaben (Schlotawa et al. 2008).

5 Diskussion

Bei der MSD handelt es sich um eine monogenetische Erkrankung, die auf Mutationen in dem für das FGE kodierenden SUMF1-Gen zurückzuführen ist. Der FGE-WT konnte bereits erfolgreich aufgereinigt und anhand seiner dreidimensionalen Struktur detailliert biochemisch analysiert werden. Die biochemische Analyse der FGE-Mutanten gelang bisher nur für partiell gereinigte Enzyme. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals zwei FGE-Mutanten (A177P, W179S) erfolgreich aufgereinigt werden. Als geeignete Methode für ein optimales Reinigungsergebnis erwies sich eine Kombination aus HisTrap-Affinitätschromatographie und Anionenaustauschchromatographie.

5.1 Bei schrittweiser Reduktion von FKS im Zellkulturmedium kann die Expression aufrechterhalten werden

Für eine erfolgreiche Kristallisation der FGE-Mutanten ist es von Bedeutung, dass die Proteine in möglichst reiner Form und hochkonzentriert vorliegen. Daher lag ein besonderes Augenmerk auf einer effizienten Expression und der Auswahl der geeigneten Aufreinigungsbedingungen. Aus vorangehenden Untersuchungen ist bekannt, dass die in dieser Arbeit untersuchten FGE-Mutanten (siehe Tabelle 3) in Zellkultur alle ins Medium sezerniert werden und somit die Aufreinigung aus Mediumüberstand möglich ist (Schlotawa et al. 2008, 2011). In Anlehnung an diese Studien wurden alle in dieser Arbeit untersuchten FGE-Mutanten in HT1080-Zellen überexprimiert.

Der FGE-WT konnte bereits erfolgreich mittels HisTrap-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (Preusser-Kunze et al. 2005). Da bei dieser Methode bei strukturellen Veränderungen, wie etwa des aktiven Zentrums der FGE-Mutanten, keine unmittelbaren Auswirkungen auf die Bindung an die Säulenmatrix zu erwarten waren, wurde diese Methode im ersten Aufreinigungsschritt ausgewählt. Um mögliche unspezifische Bindungen von im Mediumüberstand enthaltenem Fremdprotein zu unterbinden wurden zunächst Expressionsanalysen bei reduziertem Anteil an FKS im Zellkulturmedium durchgeführt. Dabei zeigte sich bei einem abrupten Wechsel von 10 % FKS-haltigem Medium zu serumfreiem Medium bei den Mutanten FGE-G247R und FGE-R345C ein deutlicher Rückgang der Expression (siehe Abbildung 12). Dieser lässt sich im Falle der Mutante G247R durch das rasche Absterben der Zellen nach Inkubation in serumfreiem Medium erklären. Bei gutem Zellwachstum der Mutante R345C ist der Rückgang möglicherweise auf eine Reduktion der Sekretionsleistung in serumfreiem Milieu oder

5 Diskussion

einen verstärkten Abbau der Proteine zurückführen. Da die intrazelluläre Expression in diesem Versuchsrahmen nicht berücksichtigt wurde, können diesbezüglich nur Vermutungen aufgestellt werden.

Erfolgversprechend zeigte sich der Versuch einer Expression unter schrittweiser Reduktion des FKS-Gehalts im Medium mit einer integrierten Adaptionsphase an die veränderten Kulturbedingungen (siehe Abbildung 13). Dabei zeigte sich eine relative Konstanz der Expressionsleistung der untersuchten FGE-Mutanten A177P, W179S und R345C bei Kultivierung in 5 % FKS-haltigem Medium, im Falle der FGE-Mutante A177P sogar in 2 % FKS-haltigem Medium. Dagegen reduzierte sich die Expressionsleistung der Mutante W179S unter 2 % FKS-Bedingungen auf etwa die Hälfte, jene der Mutante R345C auf etwa ein Viertel. Ursächlich für den Expressionsverlust kann sowohl ein beeinträchtigtes Wachstum der Zellen als auch ein Rückgang der Sekretionsleistung betrachtet werden. Im Folgenden war von Interesse, ob die Reduktion von FKS im Zellkulturmedium, trotz der dadurch bedingten Abnahme der Expressionsleistung der FGE-Mutanten, das Aufreinigungsergebnis positiv beeinflussen kann.

5.2 Affinitätschromatographie und Anionenaustauschchromatographie ermöglichen eine effiziente Aufreinigung der FGE-Mutanten

5.2.1 Reduktion von FKS im Zellkulturmedium hat keinen messbar positiven Effekt auf das Aufreinigungsergebnis nach HisTrap-Affinitätschromatographie

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Expressionsversuchen erfolgte die Kultivierung der FGE-Mutanten A177P und W179S parallel in 2 % und 10 % FKS-haltigem Medium. Der Anteil gesammelten Mediums wurde entsprechend dem prozentualen Rückgang der Expression angepasst (siehe Tabelle 11). Ein Vergleich der HisTrap-Elutionsfraktionen mit den HisTrap-Auftragsfraktionen der untersuchten Mutanten A177P, W179S und G247R lässt eine deutliche Reduktion der Proteinverunreinigung erkennen. Dennoch weisen alle Elutionsfraktionen unabhängig von 2 % oder 10 % FKS eine fortbestehende, sichtbare Verunreinigung durch Fremdprotein, insbesondere im höhermolekularen Bereich zwischen 75 und 150 kDa auf (siehe Abbildung 18). Die Vermutung, dass es sich hierbei um FGE-Homodimere oder – Tetramere handelt, konnte durch eine massenspektrometrische Peptidmassen-Fingerabdruck-Analyse nicht bestätigt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Im Vergleich

5 Diskussion

zu den Versuchen mit dem FGE-WT ist die Ausbeute bei den Versuchen mit den FGE-Mutanten deutlich geringer (vgl. Preusser-Kunze 2009). Dies ist zum einen auf eine geringere Expression der Mutanten zurückzuführen. Darüber hinaus weist das Vorkommen von FGE in der letzten Waschfraktion der Mutante FGE-W179S (10 % FKS) und zu einem geringeren Anteil der Mutante FGE-A177P (10 % FKS) darauf hin, dass ein nicht zu vernachlässigender Teil der vormals gebundenen FGE-Mutanten während des Waschprozesses von der Matrix abgelöst wurden. Ursächlich für die im Vergleich zum FGE-WT schwächere Bindung an die Matrix könnten durch die Mutationen bedingte veränderte Seitenketteninteraktionen und Faltungsanomalien sein.

Im Vergleich zu den 10 % FKS-haltigen Proben der Mutanten A177P und W179S konnte bei den 2 % FKS-haltigen Proben derselben Mutanten eine deutlich geringere Menge aufgereinigten FGEs detektiert werden (siehe Abbildung 18). Möglicherweise ist dies auf eine abnehmende Expression in serumreduzierten Medium zurückzuführen. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die erhoffte Reduktion unspezifischer Bindungen von FKS-Bestandteilen an die Säulenmatrix durch die Reduktion von FKS im Medium im Hinblick auf die Reinheit der aufgereinigten Proben keinen Erfolg erbrachte. Die Ausbeute bei den FGE-Mutanten in 2 % FKS war sogar deutlich geringer.

Zusammenfassend konnte für alle FGE-Mutanten ein deutlicher Reinigungseffekt mit Hilfe der HisTrap-Affinitätschromatographie erzielt werden. Für eine Kristallisation der FGE-Mutanten ist der Verunreinigungsgrad jedoch zu groß, so dass eine zweite Aufreinigungsstrategie entwickelt werden musste. Vor einer weiteren Aufreinigung wurden die vereinigten Elutionsfraktionen der einzelnen FGE-Mutanten durch Gelfiltration mit der Säulenmatrix Bio-Gel[®] P-6 Medium (BioRad) von Salzen und anderen niedermolekularen Substanzen getrennt.

5.2.2 Affinitätschromatographie der Mutante FGE-G263V über die ASA-C69S-Peptidmatrix führt zu geringer Ausbeute

Auf Grund ihrer Bindungseigenschaften im Bindungstest (siehe Kapitel 4.2.3) wurde die Mutante G263V im zweiten Schritt mit Hilfe der ASA-C69S-Peptidmatrix aufgereinigt. Im silbergefärbten SDS-Gel konnten in drei (E1W, E2, E2W) der insgesamt sechs Elutionsfraktionen nahezu vollständig gereinigte Proben der FGE-Mutanten gewonnen werden (siehe Abbildung 20). Der Vergleich von Startmaterial und Elutionsfraktionen zeigt jedoch einen deutlichen Verlust an FGE dieser Mutante. Eine Ursache könnte das für

5 Diskussion

den Wildtyp bekannte Problem sein, das ASA-C69S-Peptidbaus dem aktiven Zentrum zu lösen und damit FGE von der Säule zu eluieren (Schmidt et al. unveröffentlicht).

Bei der Kontrolle der Proben nach Aufkonzentrierung über Ultrazentrifugation zeigte sich eine deutliche Verunreinigung durch Fremdprotein (siehe Abbildung 21). Die Detektion der Mutante-G263V mittels Westernblot war erfolglos. Die Durchführung des Aktivitätstest mit aufgereinigten Proben dieser Mutante zeigte keine messbare Aktivität. Auf Grund der äußerst geringen Stabilität dieser Mutante wäre es denkbar, dass die Proteine bei dem Einfrier- und Auftauprozess ausgefallen sind und somit nicht mehr detektiert werden konnten. Folglich stellt die Peptidsäule keine effiziente Methode zur Aufreinigung dieser Mutante dar, da der Verlust an Protein sehr hoch und der Reinigungseffekt gering ist. Für eine erneute Aufreinigung dieser Mutante wäre die Anionenaustauschchromatographie eine erfolgversprechende Option, da sie für zwei der im Rahmen dieser Arbeit aufgereinigten Mutanten ein sehr gutes Reinigungsergebnis erzielen konnte.

5.2.3 Die Anionenaustauschchromatographie ermöglicht eine effiziente Aufreinigung der FGE-Mutanten A177P, W179S und G247R

Die übrigen FGE-Mutanten (A177P, W179S, G247R) wurden im zweiten Schritt mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie an einer Mono Q 5/50-Säule aufgereinigt. Mit Ausnahme der FGE-Mutante G247R zeigte das Mono Q-Elutionsprofil einen zweigipfligen Verlauf. Bei den Mutanten A177P und W179S konnten im jeweils ersten Peakkomplex Elutionsfraktionen im silbergefärbten SDS-Gel detektiert werden, welche nahezu frei von Fremdprotein waren. Bei der Mutante G247R tauchte lediglich der zweite Peakkomplex auf, dessen Fraktionen viel Fremdprotein und nur wenig FGE enthielten (siehe Abbildung 23). Die geringe Ausbeute könnte möglicherweise durch einen Verlust der FGE-Mutante G247R beim Entsalzungsprozess mittels Gelfiltration erklärt werden. Für diese These spricht der Vergleich des Startmaterials vor (0,1 % eingesetzt) und nach (0,03 %) Entsalzung der Mutante G247R (siehe Abbildung 23). Abgesehen von diesem Verlust wäre zu erwarten gewesen, dass zumindest ein geringer Teil der FGE-Mutante in reiner Form erhalten wird. Anregungen für weitere Erklärungen zum unterschiedlichen Bindungsverhalten der FGE-Mutanten liefern Untersuchungen von Alam, welche unter Abschnitt 5.3.3 diskutiert werden (Alam unveröffentlicht).

Die aufgereinigten Proben der FGE-Mutanten A177P und W179S wurden abschließend durch Lyophilisierung aufkonzentriert. Die Endkonzentration lag im Falle der Mutante

5 Diskussion

W179S bei 4 mg/ml (20 µl Endvolumen), bei der Mutante A177P bei 5,5 mg/ml. Rückblickend betrachtet war die Ausbeute bei etwa 4-6 mg FGE aus 9 Litern gesammelter Zellkulturüberstände äußerst gering. Einen möglichen Schwachpunkt stellt die Konzentrierung durch Lyophilisierung dar, bei welcher es zum Ausfallen der Proteine kommen kann. Darüber hinaus zeigte sich in der Aktivitäts-Analyse mittels Massenspektrometrie bei der Mutante W179S im Vergleich der Probe vor und nach Aufkonzentrierung ein deutlicher Aktivitätsverlust, welcher ebenfalls auf Probleme beim Aufkonzentrieren zurückgeführt werden kann (Abbildung 28).

Für weiterführende Experimente wäre von Interesse, inwieweit sich die Aufreinigungsbedingungen im Hinblick auf Ausbeute und Reinheit der FGE-Mutanten optimieren lassen. Ebenso wäre die Ausbeute von zwei aus anfänglich sieben ausgewählten FGE-Mutanten optimierbar. Die Aufreinigung des FGE-WTs mit der HisTrap-Affinitätschromatographie zeigte eine deutlich höhere Effizienz, was insbesondere auf die höhere Expression und Ausgangskonzentration an FGE zurückgeführt werden kann. Eine Expressionssteigerung wäre möglicherweise durch die Nutzung von Insektenexpressionssystemen zu erzielen, welche vor Kurzem für den FGE-WT und für einige FGE-Mutanten erfolgreich erprobt wurden (Alam unveröffentlicht). Der Nachteil dieser Methode im Vergleich zu einer Nutzung humaner Zelllinien liegt jedoch in der Ferne zum Wirtsorganismus. So wäre denkbar, dass die mittels Insekten exprimierten Proteine eine defiziente Glykosylierung aufweisen oder neue Seitenketteninteraktionen auftreten, die zu einer veränderten Struktur der Proteine führen. Dies wiederum hätte bedeutende Auswirkungen auf die Kristallisationsergebnisse und deren Interpretation.

5.3 Charakteristika und strukturelle Besonderheiten der FGE-Mutanten

Die Projektion der FGE-Mutationen in die Kristallstruktur des FGE-WT ermöglichte bereits erste Vorhersagen über potentielle strukturelle Auswirkungen und Funktionsbeeinträchtigungen für einzelne Mutanten (Dierks et al. 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse liefern eine Reihe von neuen Erkenntnissen für eine erweiterte biochemische Analyse der einzelnen untersuchten FGE-Mutanten.

5 Diskussion

5.3.1 FGE-Mutante A177P und W179S

In den Untersuchungen zum Expressionsverhalten konnten die FGE-Mutanten A177P (4,7 mg/L) und W179S (5,3 mg/L) sehr gute Expressionsraten erzielen, welche deutlich über denen des FGE-WTs (1,9 mg/L) lagen. Diese Daten decken sich größtenteils mit den Ergebnissen von Schlotawa et al., allerdings fiel die Expression der Mutanten FGE-A177P hier etwas geringer aus (Schlotawa et al. 2008). Unter gleichen Zellkulturbedingungen ist dies vermutlich auf geringe Schwankungen in der Expression einzelner Klone zurückzuführen. Sowohl das Elutionsprofil des FGE-WTs nach Anionenaustauschchromatographie (siehe hierzu Alam unveröffentlicht) als auch jenes der Mutanten zeigt ein zweigipfliges Profil. In den Fraktionen des ersten Peakkomplexes der FGE-Mutanten konnte gereinigtes Protein detektiert werden, wohingegen die Fraktionen im zweiten Peakkomplex viel Fremdprotein enthielten. Im Gegensatz zu den FGE-Mutanten konnte in den Fraktionen des FGE-WTs auch im zweiten Peakkomplex vollständig gereinigtes FGE nachgewiesen werden. In den Experimenten von Alam ist dies möglicherweise auf den höheren Reinheitsgrad der Proben vor Durchführung der Anionenaustauschchromatographie zurückzuführen. In Kapitel 5.3.3 werden mögliche Gründe für das Zustandekommen der beiden Peakkomplexe und Besonderheiten der jeweiligen Fraktionen genauer diskutiert. Deutliche Unterschiede zwischen FGE-WT und Mutanten zeigten sich erwartungsgemäß bei der Durchführung des Bindungstests. Während der FGE-WT zu mehr als 70 % an die Peptidmatrix band, zeigten die Mutanten FGE-A177P und FGE-W179S kaum Substratbindung. Die geringere Bindungsfähigkeit lässt sich anhand des Kristallstrukturmodells der Kerndomäne des FGEs (siehe Abbildung 6) nachvollziehen. So sind beide Mutationen in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert, was einen starken Einfluss auf die Substratbindungseigenschaften erwarten lässt (Dierks et al. 2005). In diesem Zusammenhang lässt sich auch die geringe Aktivität der Mutanten im Aktivitätsassay erklären. Die Messung der katalytischen Aktivität erfolgte hier massenspektrometrisch über die Ermittlung des prozentualen Anteils der Bildung des FGlyS aus dem Cysteinrest des von der Arylsulfatase abgeleiteten Substratpeptids (P23). Eine Mutation in der Nähe des aktiven Zentrums könnte somit auch die Bindungseigenschaften zum Substratpeptid negativ beeinflussen und für die geringe Aktivität verantwortlich sein. Letzten Aufschluss über die strukturellen Auswirkungen der einzelnen Mutationen liefert einzig die Analyse ihrer jeweiligen Kristallstruktur.

5 Diskussion

5.3.2 FGE-Mutante G263V

Zwischen der Mutante FGE-G263V und dem FGE-WT lassen sich mehrere Parallelen erkennen. So ist die Expression der Mutante mit 1,8 mg/L vergleichbar mit der des FGE-WTs von 1,9 mg/L. Darüber hinaus konnte sie beim Bindungstest als einzige der untersuchten Mutanten an die Matrix binden, wobei der Anteil gebundenen FGEs mit 19 % jedoch deutlich unter dem des FGE-WTs von 76 % lag. Dies lässt Rückschlüsse auf eine Intaktheit des aktiven Zentrums dieser Mutante schließen. Diese Vermutung wird durch das Kristallstrukturmodell gestützt, das die Mutation in einer oberflächlich gelegenen Schlinge lokalisiert, die weiter vom aktiven Zentrum entfernt liegt. Dierks et al. vermuten, dass dies zwar einen gewissen destabilisierenden Effekt auf die Faltung des FGEs in seine dreidimensionale Struktur haben könnte, jedoch keine unmittelbaren Auswirkungen auf die Substratbindung hat (Dierks et al. 2005). Vor diesem Hintergrund können auch die Ergebnisse des *in vitro*-Aktivitätstests der FGE-Mutante G263V interpretiert werden, in dem die Mutante mit 16 % die höchste prozentuale Wildtyp-Aktivität aufwies.

5.3.3 FGE-Mutante G247R

In den Untersuchungen von Schlotawa et al. zeigten die beiden FGE-Mutanten G247R und G263V im Hinblick auf ihre Expression, intrazelluläre Stabilität und katalytische Aktivität ein ähnliches Verhalten. Die Expressionsergebnisse sind vergleichbar mit den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten, die für beide Mutanten Werte von 1,8 mg/L lieferten. Im Gegensatz zur Mutante G263V zeigte die Mutante G247R jedoch keine Bindung an die Peptidmatrix. Dies ist insofern unerwartet, da beide Mutanten relativ weit vom aktiven Zentrum des FGEs entfernt liegen (Dierks et al. 2005). Daher wäre zu erwarten gewesen, dass die Mutante G247R an die Matrix bindet. Es ist anzunehmen, dass neben den Voraussetzungen eines intakten aktiven Zentrums weitere Faktoren existieren, welche die Substratbindung bzw. die Konformation des FGE beeinflussen. Aus Arbeiten von Wachs ist bekannt, dass das FGE in drei Konformationen (offen/ intermediär/ geschlossen) vorliegen kann, wobei nur die geschlossene Konformation zur Substratbindung befähigt, da die Substratbindungstasche bei der offenen Form wahrscheinlich nicht vollständig intakt gefaltet ist (Alam unveröffentlicht; Wachs 2009). Es wäre folglich möglich, dass die Mutante FGE-G263V an die Peptidmatrix bindet, weil sie vornehmlich in der geschlossenen Konformation vorliegt, die Mutante G247R hingegen nicht, da hier die offene Konformation überwiegt. Auffällig ist, dass das Mono Q-Profil der Mutante G247R

5 Diskussion

im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Proben eingipflig war und nur den zweiten Peakkomplex enthielt. In der Arbeit von Alam zeigten sich bei der Aufreinigung des FGE-WTs mittels Anionenaustauschchromatographie zwei Peakkomplexe. Eine weiterführende Analyse der verschiedenen Fraktionen ergab, dass die jeweiligen FGE-WT-Proben aus dem ersten Komplex die geschlossene Konformation aufwiesen, wohingegen der zweite Peakkomplex FGE-WT in der offenen Konformation enthielt. Weiterhin wiesen die Enzyme der ersten Fraktionen eine sehr hohe, jene des zweiten Peakkomplexes eine deutlich geringere katalytische Aktivität auf (Alam unveröffentlicht). Diese Ergebnisse stützen die These, dass die Mutante G247R vornehmlich in der offenen Konformation vorlag, was ihre mangelnde Bindung an die Peptidmatrix und die geringe katalytische Aktivität erklären würde. Könnte man die geschlossene Konformation dieser Mutante stabilisieren, wäre es eventuell möglich, auch diese Mutante erfolversprechend aufzureinigen. Als bedeutsame Stabilisatoren konnte Alam unter anderem Kalzium sowie eine stabile Disulfidbrücke zwischen den beiden Cysteinen C235 und C346 identifizieren. So führte die Zugabe von Kalzium im Überschuss zu einer Zunahme des ersten Peakkomplexes im Elutionsprofil nach Anionenaustauschchromatographie, es kam also zu einer Umwandlung von der offenen in die geschlossene Konformation. Man kann vermuten, dass die Zugabe von Kalzium im Falle der Mutante FGE-G247R eine vergleichbare Wirkung erzielen könnte, was folglich den Ertrag gereinigten Proteins deutlich steigern könnte. Eine weitere Erklärung für das Auftreten der offenen Konformation liefert die genauere Betrachtung des Kristallstrukturmodells des FGE-WTs. Hierbei fällt die unmittelbare räumliche Nachbarschaft des Cystein-Restes C346 und der Mutation G247R auf. Es wäre denkbar, dass die FGE-Mutante G247R eine Destabilisierung der Disulfidbrücke zum Cystein C235 bewirkt und dadurch die gesamte Enzymstruktur instabil wird. Die geringe Stabilität konnte zuvor bereits durch Untersuchungen von Schlotawa et al. nachgewiesen werden (Schlotawa et al. 2011). Bei den Versuchen von Alam muss jedoch berücksichtigt werden, dass hier nicht humane Zelllinien, sondern ein Insektenzell-Expressionssystem verwendet wurde. Obwohl gezeigt werden konnte, dass der FGE-WT aus humanen Zelllinien viele Gemeinsamkeiten mit jenem aus Insektenzellen aufweist, ist nicht auszuschließen, dass bedingt durch beispielsweise unterschiedliche Glykosylierungsmuster Abweichungen bei Seitenketteninteraktionen vorkommen können. Um dem Ziel einer effizienten Expression und Aufreinigung der FGE-Mutanten näher zu kommen, bietet die Nutzung von Insektenzell-Expressionssystemen dennoch eine aussichtsreiche Alternative.

5 Diskussion

Letzten Aufschluss über die in dieser Arbeit diskutierten möglichen Fehlfaltungen einzelner Mutanten und den postulierten Zusammenhang von Lokalisierung im Kristallstrukturmodell des FGE-WTs und voraussichtlicher Funktionsbeeinträchtigung kann letztlich nur die Kristallstruktur der einzelnen FGE-Mutanten liefern. Dies zeigte sich bereits bei der Kristallisation des FGE-WTs, welche unter anderem Voraussagen für den katalytischen Mechanismus der FGly-Generierung lieferte (Dierks et al. 2005). Darüber hinaus ermöglicht die Analyse des Zusammenwirkens von Genotyp, biochemischen Charakteristika in Verbindung mit der Struktur der FGE-Mutanten, den klinischen Verlauf der Erkrankung besser abschätzen zu können. Auf diesem Wege könnten diese Erkenntnisse neue Möglichkeiten in der Entwicklung therapeutischer Strategien zur Behandlung der MSD eröffnen, indem versucht wird, die FGE-Struktur zu stabilisieren. Neben der Analyse der Kristallstruktur wäre eine weiterführende Charakterisierung der aufgereinigten FGE-Konzentrate beispielsweise mit Hilfe massenspektrometrischer Disulfidbrückentests sowie Koordinationstests mit Kalzium denkbar. Darüber hinaus könnten die FGE-Mutanten im Hinblick auf ihre EGTA-Sensitivität sowie pH-Abhängigkeit untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Die Multiple-Sulfatase-Defizienz (MSD) ist eine angeborene Stoffwechselstörung, die durch Mutationen im SUMF1-Gen verursacht wird. Das in ihm kodierte ER-ständige α -Formylglycin-generierende Enzym (FGE) katalysiert die Aktivierung neu synthetisierter Sulfatasen, indem es kotranslational einen konservierten Cystein-Rest zum α -Formylglycin (FGly) oxidiert, dem katalytisch aktiven Aminosäurerest der Sulfatasen. Einige FGE-Mutanten konnten bereits näher biochemisch charakterisiert und erste Vermutungen über den Zusammenhang von Genotyp und Phänotyp der Erkrankung aufgestellt werden. Die Kristallisation des FGE-WTs ermöglichte zudem - über die Lokalisierung der Mutationen im Modell - Voraussagen hinsichtlich ihres zu erwartenden Schädigungsverhaltens zu treffen. Die Bestätigung des vermuteten Zusammenhangs von genotypischen Spezifitäten und phänotypischen Auswirkungen anhand des Kristallstrukturmodells einer FGE-Mutante konnte bis heute nicht erzielt werden. Auch liegen aktuell keine Daten von vollständig aufgereinigten FGE-Mutanten vor.

In der vorliegenden Arbeit wurden FGE-Mutanten in humanen Zelllinien überexprimiert, aus dem Mediumüberstand aufgereinigt und für die Kristallisation vorbereitet. Bei der Suche nach geeigneten Aufreinigungsmethoden wurde zunächst - wie bei der Reinigung des FGE-WTs - im ersten Schritt eine Aufreinigung mittels HisTrap-Affinitätschromatographie vorgesehen. Im zweiten Schritt wurde eine Substrataffinitätschromatographie eingesetzt, weshalb zunächst Bindungstests durchgeführt wurden. Es zeigte sich, dass nur die Mutante FGE-G263V die Substratmatrix binden konnte, was bedeutet, dass bei dieser Mutante das aktive Zentrum intakt sein muss. Legt man die Kristallstruktur des FGE-WTs zugrunde, kommt die Mutante auf einer peripher gelegenen Schleife zu liegen, was das gute Substratbindungsvermögen erklären könnte. Zwei weitere Mutanten (A177P, W179S), deren Mutationen nahe der Substratbindungsstelle lokalisiert sind, zeigten keine Bindung, was vermuten lässt, dass bei ihnen das aktive Zentrum durch die Mutation deformiert ist und ihre geringe katalytische Aktivität in den durchgeführten Aktivitätstests erklären würde. Da die Kombination von HisTrap-Affinitätschromatographie und Substrataffinitätschromatographie für die Reinigung der Mutante FGE-G263V erfolglos blieb, wurde im zweiten Schritt die Anionenaustauschchromatographie eingesetzt. Durch die Kombination mit der HisTrap-Affinitätschromatographie konnten die Mutanten A177P und W179S erfolgreich aufgereinigt werden. Die Aufreinigung der FGE-Mutante G247R blieb erfolglos. Es zeigten sich bei dieser Mutante im Gegensatz zum FGE-WT und den

6 Zusammenfassung

anderen Mutanten nach Anionenaustauschchromatographie nicht wie üblich zwei Elutionspeaks, sondern nur der zweite Elutionspeak. Der Vergleich mit den Ergebnissen einer Reinigung des FGE-WTs aus Insektenzellkulturen legt nahe, dass FGE im zweiten Elutionspeak in einer Konformation vorliegt, die kaum Substrat bindet und daher nur geringe Aktivität aufweist. Insgesamt war der Ertrag reinen Proteins in Anbetracht der großen Menge gesammelter Zellkulturüberstände gering, was auf eine geringe Expression sowie den Verlust von Protein während der Aufreinigung zurückgeführt werden kann. Ein besonderes Problem stellte die Proteinkonzentrierung durch Lyophilisierung dar, die einen deutlichen Verlust an Protein und Aktivität der Mutante W179S zur Folge hatte.

Die gereinigten FGE-Mutanten A177P und W179S werden zurzeit kristallisiert, um durch Röntgenstrukturanalyse eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation auf der Basis von Kristallstrukturmodellen zu ermöglichen. Auf diese Weise soll der Weg zur Entwicklung von Therapiestrategien für die MSD geebnet werden, welche auf eine Stabilisierung der FGE-Struktur abzielen.

7 Literaturverzeichnis

- al Aqeel A, Ozand PT, Brismar J, Gascon GG, Brismar G, Nester M, Sakati N (1992): Saudi variant of multiple sulfatase deficiency. *J Child Neurol* 7, 12-21
- Anelli T, Alessio M, Mezghrani A, Simmen T, Talamo F, Bachi A, Sitia R (2002): ERp44, a novel endoplasmic reticulum folding assistant of the thioredoxin family. *EMBO J* 21, 835-844
- Anelli T, Alessio M, Bachi A, Bergamelli L, Bertoli G, Camerini S, Mezghrani A, Ruffato E, Simmen T, Sitia R (2003): Thiol-mediated protein retention in the endoplasmic reticulum: the role of ERp44. *EMBO J* 22, 5015-5022
- Annunziata I, Bouchè V, Lombardi A, Settembre C, Ballabio A (2007): Multiple sulfatase deficiency is due to hypomorphic mutations of the SUMF1 gene. *Hum Mutat* 28, 928
- Appenzeller C, Andersson H, Kappeler F, Hauri HP (1999): The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat Cell Biol* 1, 330-334
- Artigalás OA, da Silva LR, Burin M, Pastores GM, Zeng B, Macedo N, Schwartz IV (2009): Multiple sulfatase deficiency: clinical report and description of two novel mutations in a Brazilian patient. *Metab Brain Dis* 24, 493-500
- Austin JH (1973): Studies in metachromatic leukodystrophy. XII. Multiple Sulfatase deficiency. *Arch Neurol* 28, 258-264
- Austin JH: Recent studies in the metachromatic and globoid body forms of diffuse sclerosis; in: *Brain Lipids and Lipoproteins, and Leucodystrophies*; hrsg. v. Folch-Pi J, Bauer HJ; Elsevier Science Ltd, Amsterdam 1963, 120
- Austin JH: Mental retardation, metachromatic leucodystrophy (sulfatide lipidosis, metachromatic leucoencephalopathy); in: *Medical Aspects of Mental Retardation*; hrsg. v. Carter CH; Thomas, Springfield 1965, 768
- Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, Miebach E, Bajbouj M, Whybra C, Kohlschütter A, Kampmann C, Beck M (2005): Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. *J Inher Metab Dis* 28, 1011-1017
- Ballabio A, Parenti G, Napolitano E, Di Natale P, Andria G (1985): Genetic complementation of steroid sulphatase after somatic cell hybridization of X-linked ichthyosis and multiple sulphatase deficiency. *Hum Genet* 70, 315-317
- Blanco-Aguirre ME, Kofman-Alfaro SH, Rivera-Vega MR, Medina C, Valdes-Flores M, Rizzo WB, Cuevas-Covarrubias SA (2001): Unusual clinical presentation in two cases of multiple sulfatase deficiency. *Pediatr dermatol* 18, 388-392

7 Literaturverzeichnis

- Boltes I, Czapinska H, Kahnert A, von Bülow R, Dierks T, Schmidt B, von Figura K, Kertesz MA, Usón I (2001): 1.3 A structure of arylsulfatase from *Pseudomonas aeruginosa* establishes the catalytic mechanism of sulfate ester cleavage in the sulfatase family. *Structure* 9, 483-491
- Burch M, Fensom AH, Jackson M, Pitts-Tucker T, Congdon PJ (1986): Multiple sulphatase deficiency presenting at birth. *Clin Genet* 30, 409-415
- Burk RD, Valle D, Thomas GH, Miller C, Moser A, Moser H, Rosenbaum KN (1984): Early manifestations of multiple sulfatase deficiency. *J Pediatr* 104, 574-578
- Busche A, Hennermann JB, Bürger F, Proquitté H, Dierks T, von Arnim-Baas A, Horn D (2009): Neonatal manifestation of multiple sulfatase deficiency. *Eur J Pediatr* 168, 969-973
- Chang PL, Davidson RG (1980): Complementation of arylsulfatase A in somatic hybrids of metachromatic leukodystrophy and multiple sulfatase deficiency disorder fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 6166-6170
- Chang PL, Rosa NE, Ballantyne SR, Davidson RG (1983): Biochemical variability of arylsulphatases -A, -B and -C in cultured fibroblasts from patients with multiple sulphatase deficiency. *J Inher Metab Dis* 6, 167-172
- Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R (1997): Selective screening of 10000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr* 156, 650-654
- Conary JT, Hasilik A, von Figura K (1988): Synthesis and stability of steroid sulfatase in fibroblasts from multiple sulfatase deficiency. *Biol Chem Hoppe Seyler* 369, 297-302
- Cosma MP, Pepe S, Annunziata I, Newbold RF, Grompe M, Parenti G, Ballabio A (2003): The Multiple Sulfatase Deficiency Gene Encodes an Essential and Limiting Factor for the Activity of Sulfatases. *Cell* 113, 445-456
- Cosma MP, Pepe S, Parenti G, Settembre C, Annunziata I, Wade-Martins R, Di Domenico C, Di Natale P, Mankad A, Cox B, Uziel G, Mancini GM, Zammarchi E, Donati MA, Kleijer WJ, Filocamo M, Carrozzo R, Carella M, Ballabio A (2004): Molecular and functional analysis of SUMF1 mutations in multiple sulfatase deficiency. *Hum Mutat* 23, 576-581
- Crawley AC, Marshall N, Beard H, Hassiotis S, Walsh V, King B, Hucker N, Fuller M, Jolly RD, Hopwood JJ, Hemsley KM (2011): Enzyme replacement reduces neuropathology in MPS IIIA dogs. *Neurobiol Dis* 43, 422-434
- Decker C, Yu ZF, Giugliani R, Schwartz IV, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Wraith JE, Beck M, Arash L, Scarpa M, Ketteridge D, Hopwood JJ, Plecko B, Steiner R, Whitley CB, Kaplan P, Swiedler SJ, Conrad S, Harmatz P (2010): Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: Growth and pubertal development in patients treated with recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *J Pediatr Rehabil Med* 3, 89-100

7 Literaturverzeichnis

- Díaz-Font A, Santamaría R, Cozar M, Blanco M, Chamoles N, Coll MJ, Chabás A, Vilageliu L, Grinberg D (2005): Clinical and mutational characterization of three patients with multiple sulfatase deficiency: report of a new splicing mutation. *Mol Genet Metab* 86, 206-2011
- Dickson P, McEntee M, Vogler C, Le S, Levy B, Peinovich M, Hanson S, Passage M, Kakkis E (2007): Intrathecal enzyme replacement therapy: successful treatment of brain disease via the cerebrospinal fluid. *Mol Genet Metab* 91, 61-68
- Dierks T, Schmidt B, von Figura K (1997): Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 11963-11968
- Dierks T, Lecca MR, Schmidt B, von Figura K (1998): Conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases occurs by a common mechanism in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 423, 61-65
- Dierks T, Lecca MR, Schlotterhose P, Schmidt B, von Figura K. (1999): Sequence determinants directing conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases. *EMBO J* 18, 2084-91.
- Dierks T, Schmidt B, Borissenko L, Peng J, Preusser A, Mariappan M, von Figura K (2003): Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(α)-formylglycine generating enzyme. *Cell* 113, 435-444
- Dierks T, Dickmanns A, Preusser-Kunze A, Schmidt B, Mariappan M, von Figura K, Ficner R, Rudolph MG (2005): Molecular basis for multiple sulfatase deficiency and mechanism for formylglycine generation of the human formylglycine-generating enzyme. *Cell* 121, 541-552
- Dierks T, Schlotawa L, Frese MA, Radhakrishnan K, von Figura K, Schmidt B. (2009): Molecular basis of multiple sulfatase deficiency, mucopolipidosis II/III and Niemann-Pick C1 disease - Lysosomal storage disorders caused by defects of non-lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 1793, 710-725
- Diez-Roux G, Ballabio A (2005): Sulfatases and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genetic* 6, 355-379
- Ennemann EC, Radhakrishnan K, Mariappan M, Wachs M, Pringle TH, Schmidt B, Dierks T (2013): Proprotein convertases process and thereby inactivate formylglycine generating enzyme. *J Biol Chem* 288, 5828-5839
- Eto Y, Wiesmann UN, Carson JH, Herschkowitz NN (1974): Multiple sulfatase deficiencies in cultured skin fibroblasts. Occurrence in patients with a variant form of metachromatic leukodystrophy. *Arch Neurol* 30, 153-156
- Eto Y, Numaguchi S, Handa T (1979): Urinary acid mucopolysaccharides in multiple sulfatase deficiency (mucosulfatidosis). *Eur J Pediatr* 132, 207-211

7 Literaturverzeichnis

- Eto Y, Tokoro T, Handa T, Herschkowitz NN, Rennert OM (1982): Acid mucopolysaccharide (AMPS) abnormality in multiple sulfatase deficiency: chemical compositions of AMPS in urine and liver. *Pediatr Res* 16, 395-399
- Fedde K, Horwitz AL (1984): Complementation of multiple sulfatase deficiency in somatic cell hybrids. *Am J Hum Genet* 36, 623-633
- Fischer L: Proteinbestimmungen; in: *Bioanalytik*; hrsg. v. Lottspeich F, Engels JW; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006, 35-46
- Fraldi A, Biffi A, Lombardi A, Visigalli I, Pepe S, Settembre C, Nusco E, Auricchio A, Naldini L, Ballabio A, Cosma MP (2007a): SUMF1 enhances sulfatase activities in vivo in five sulfatase deficiencies. *Biochem J* 403, 305-312
- Fraldi A, Hemsley K, Crawley A, Lombardi A, Lau A, Sutherland L, Auricchio A, Ballabio A, Hopwood JJ (2007b): Functional correction of CNS lesions in an MPS-IIIa mouse model by intracerebral AAV-mediated delivery of sulfamidase and SUMF1 genes. *Hum Mol Genet* 16, 2693-2702
- Fraldi A, Zito E, Annunziata F, Lombardi A, Cozzolino M, Monti M, Spanpanato C, Ballabio A, Pucci P, Sitia R, Cosma MP (2008): Multistep, sequential control of the trafficking and function of the multiple sulfatase deficiency gene product, SUMF1 by PDI, ERGIC-53 and ERp44. *Hum Mol Genet* 17, 2610-2621
- Frese MA, Schulz S, Dierks T (2008): Arylsulfatase G, a novel lysosomal Sulfatase. *J Biol Chem* 283, 11388-11395
- Futerman AH, van Meer G (2004): The Cell Biology of Lysosomal Storage Disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 554-565
- Görg A, Westermeier R: Elektrophoretische Verfahren; in: *Bioanalytik*; hrsg. v. Lottspeich F, Engels JW; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006, 235-268
- Guerra WF, Verity MA, Fluharty AL, Nguyen HT, Philippart M (1990): Multiple sulfatase deficiency: clinical, neuropathological, ultrastructural and biochemical studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 49, 406-423
- Hanson SR, Best MD, Wong C (2004): Sulfatases: structure, mechanism, biological activity, inhibition, and synthetic utility. *Angew Chem Int Ed Engl* 43, 5736-5763
- Harmatz P1, Whitley CB, Waber L, Pais R, Steiner R, Plecko B, Kaplan P, Simon J, Butensky E, Hopwood JJ (2004): Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome). *J Pediatr* 144, 574-580
- Harmatz P, Ketteridge D, Giugliani R, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Yu ZF, Swiedler SJ, Hopwood JJ (2005): Direct comparison of measures of endurance, mobility, and joint function during enzyme-replacement therapy of mucopolysaccharidosis VI (Maroteaux-Lamy syndrome): results after 48 weeks in a phase 2 open-label clinical study of recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *Pediatrics* 115, 681-689

7 Literaturverzeichnis

- Harmatz P, Yu ZF, Giugliani R, Schwartz IV, Guffon N, Teles EL, Miranda MC, Wraith JE, Beck M, Arash L, Scarpa M, Ketteridge D, Hopwood JJ, Plecko B, Steiner R, Whitley CB, Kaplan P, Swiedler SJ, Hardy K, Berger KI, Decker C (2010): Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI: evaluation of long-term pulmonary function in patients treated with recombinant human N-acetylgalactosamine 4-sulfatase. *J Inher Metab Dis* 33, 51-60
- Hopwood J, Ballabio A: Multiple sulfatase deficiency and the nature of the sulfatase family; in: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, vol. III; hrsg. v. Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B; McGraw-Hill, New York 2001, 3725-3732
- Horwitz AL (1979): Genetic complementation studies of multiple sulfatase deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 6496-6499
- Hosaka M, Nagahama M, Kim WS, Watanabe T, Hatsuzawa K, Ikemizu J, Murakami K, Nakayama K (1991): Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* 266, 12127-12130
- Jurk M: Aufarbeitung von Nucleinsäuren/ Elektrophorese; in: *Bioanalytik*; hrsg. v. Lottspeich F, Engels JW; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006, 663-690
- Kellner C : Chromatographische Trennmethode; in: *Bioanalytik*; hrsg. v. Lottspeich F, Engels JW; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006, 215-233
- Kessler C: Polymerasekettenreaktion; in: *Bioanalytik*; hrsg. v. Lottspeich F, Engels JW; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006, 743-775
- Knaust A, Schmidt B, Dierks T, von Bülow R, von Figura K (1998): Residues critical for formylglycine formation and/or catalytic activity of arylsulfatase A. *Biochemistry* 37, 13941-13946
- Kurai T, Hisayasu S, Kitagawa R, Migita M, Suzuki H, Hirai Y, Shimada T (2007): AAV1 mediated co-expression of formylglycine-generating enzyme and arylsulfatase a efficiently corrects sulfatide storage in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Mol Ther* 15, 38-43
- Landgrebe J, Dierks T, Schmidt B, von Figura K (2003): The human SUMF1 gene, required for posttranslational sulfatase modification, defines a new gene family which is conserved from pro- to eukaryotes. *Gene* 316, 47-56
- Letzel T, Rehm H: Massenspektrometrie von Proteinen und Peptiden; in: *Der Experimentator. Proteinbiochemie/Proteomics*; hrsg. v. Rehm H; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006, 235-310
- Linke R: Immunologische Techniken; in: *Bioanalytik*; hrsg. v. Lottspeich F, Engels JW; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006, 61-101

7 Literaturverzeichnis

- Loffeld A, Gray RG, Green SH, Roper HP, Moss C (2002): Mild ichthyosis in a 4-year-old boy with multiple sulphatase deficiency. *Br J Dermatol* 147, 353-355
- Lottspeich F: Proteinreinigung; in: *Bioanalytik*; hrsg. v. Lottspeich F, Engels JW; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006, 13-33
- Lukatela G, Krauss N, Theis K, Selmer T, Gieselmann V, von Figura K, Saenger W (1998): Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry* 37, 3654-3664
- Maas R (2004): Prereplicative purine methylation and postreplicative demethylation in each DNA duplication of the Escherichia coli replication cycle. *J Biol Chem* 279, 51568-51573
- Mancini GM, van Diggelen OP, Huijmans JG, Stroink H, de Coo RF (2001): Pitfalls in the diagnosis of multiple sulfatase deficiency. *Neuropediatrics* 32, 38-40
- Mariappan M, Radhakrishnan K, Dierks T, Schmidt B, von Figura K (2008a): ERp44 mediates a thiol-independent retention of formylglycine-generating enzyme in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 283, 6375-6383
- Mariappan M, Gande SL, Radhakrishnan K, Schmidt B, Dierks T, von Figura K (2008b): The non-catalytic N-terminal extension of formylglycine-generating enzyme is required for its biological activity and retention in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 283, 11556-11564
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999): Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281, 249-254
- Meyer HE: Massenspektrometrie; in: *Bioanalytik*; hrsg. v. Lottspeich F, Engels JW; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006, 329-372
- Molloy SS, Bresnahan PA, Leppla SH, Klimpel KR, Thomas G (1992): Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem* 267, 16396-16402
- Muenzer J, Lamsa JC, Garcia A, Dacosta J, Garcia J, Treco DA (2002): Enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a preliminary report. *Acta Paediatr Suppl* 91, 98-99
- Muenzer J, Wraith JE, Beck M, Giugliani R, Harmatz P, Eng CM, Vellodi A, Martin R, Ramaswami U, Guzsavas-Calikoglu M, Vijayaraghavan S, Wendt S, Puga AC, Ulbrich B, Shinawi M, Cleary M, Piper D, Conway AM, Kimura A (2006): A phase II/III clinical study of enzyme replacement therapy with idursulfase in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Genet Med* 8, 465-473
- Muenzer J, Guzsavas-Calikoglu M, McCandless SE, Schuetz TJ, Kimura A (2007): A phase I/II clinical trial of enzyme replacement therapy in mucopolysaccharidosis II (Hunter syndrome). *Mol Genet Metab* 90, 329-337

7 Literaturverzeichnis

- Mülhardt C: Der Experimentator. Molekularbiologie/Genomics; 5. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006
- Mullis KB (1990): The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262, 56-65
- Murphy AM, Lambert D, Treacy EP, O'Meara A, Lynch SA (2009): Incidence and prevalence of mucopolysaccharidosis type 1 in the Irish republic. *Arch Dis Child* 94, 52-54
- Neufeld EB, Wastney M, Patel S, Suresh S, Cooney AM, Dwyer NK, Roff CF, Ohno K, Morris JA, Carstea ED, Incardona JP, Strauss JF 3rd, Vanier MT, Patterson MC, Brady RO, Pentchev PG, Blanchette-Mackie EJ (1999): The Niemann-Pick C1 protein resides in a vesicular compartment linked to retrograde transport of multiple lysosomal cargo. *J Biol Chem* 274, 9627-9635
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 6, 255-262
- Nyhan WL, Ozand PT: Atlas of Metabolic Diseases. Hodder Arnold Verlag, London 1998
- Peng J, Schmidt B, von Figura K, Dierks T (2002): Identification of formylglycine in sulfatases by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 38, 80-86
- Perlmutter-Cremer N, Libert J, Vamos E, Spehl M, Liebaers I (1981): Unusual early manifestation of multiple sulfatase deficiency. *Ann Radiol* 24, 43-48
- Pohl T (1990): Concentration of proteins and removal of solutes. *Methods Enzymol* 182, 68-83
- Preusser-Kunze A, Mariappan M, Schmid B, Gande SL, Mutenda K, Wenzel D, von Figura K, Dierks T (2005): Molecular characterization of the human Calpha-formylglycine-generating enzyme. *J Biol Chem* 15, 14900-14910
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R: Biochemie; 2. Auflage; Thieme Verlag KG, Stuttgart 2008
- Rehm H: Der Experimentator. Proteinbiochemie/Proteomics. 5. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006
- Roeser D, Preusser-Kunze A, Schmidt B, Gasow K, Wittmann JG, Dierks T, von Figura K, Rudolph MG (2006): A general binding mechanism for all human sulfatases by the formylglycine-generating enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 81-86
- Rossomando E (1990): Ion-exchange chromatographie. *Methods Enzymol* 182, 309-317

7 Literaturverzeichnis

- Sawkar AR, Adamski-Werner SL, Cheng WC, Wong CH, Beutler E, Zimmer KP, Kelly JW (2005): Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. *Chem Biol* 12, 1235-1244
- Schlotawa L, Steinfeld R, von Figura K, Dierks T, Gärtner J (2008): Molecular analysis of SUMF1 mutations: stability and residual activity of mutant formylglycine-generating enzyme determine disease severity in multiple sulfatase deficiency. *Hum Mutat* 29, 205
- Schlotawa L, Ennemann EC, Radhakrishnan K, Schmidt B, Chakrapani A, Christen HJ, Moser H, Steinmann B, Dierks T, Gärtner J (2011): SUMF1 mutations affecting stability and activity of formylglycine generating enzyme predict clinical outcome in multiple sulfatase deficiency. *Eur J Hum Genet* 19, 253-261
- Schmidt B, Selmer T, Ingendoh A, von Figura K (1995): A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* 82, 271-278
- Schwaller M, Wilkinson B, Gilbert HF (2003): Reduction-reoxidation cycles contribute to catalysis of disulfide isomerization by protein-disulfide isomerase. *J Biol Chem* 278, 7154-7159
- Settembre C, Annunziata I, Spampinato C, Zarcone D, Cobellis G, Nusco E, Zito E, Tacchetti C, Cosma MP, Ballabio A (2007): Systemic inflammation and neurodegeneration in a mouse model of multiple sulfatase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4506-4511
- Settembre C, Fraldi A, Jahreiss L, Spampinato C, Venturi C, Medina D, de Pablo R, Tacchetti C, Rubinsztein DC, Ballabio A (2008): A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet* 17, 119-129
- Spampinato C, De Leonibus E, Dama P, Gargiulo A, Fraldi A, Sorrentino NC, Russo F, Nusco E, Auricchio A, Surace EM, Ballabio A (2011): Efficacy of a combined intracerebral and systemic gene delivery approach for the treatment of a severe lysosomal storage disorder. *Mol Ther* 19, 860-869
- Steckel F, Hasilik A, von Figura K (1985): Multiple sulfatase deficiency: degradation of arylsulfatase A and B after endocytosis in fibroblasts. *Eur J Biochem* 151, 147-152
- Takakusaki Y, Hisayasu S, Hirai Y, Shimada T (2005): Coexpression of formylglycine-generating enzyme is essential for synthesis and secretion of functional arylsulfatase A in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. *Hum Gene Ther* 16, 929-936
- Thomas G (2002): Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 753-766
- Tomatsu S, Montañó AM, Ohashi A, Gutierrez MA, Oikawa H, Oguma T, Dung VC, Nishioka T, Orii T, Sly WS (2008): Enzyme replacement therapy in a murine model of Morquio A syndrome. *Hum Mol Genet* 17, 815-824

7 Literaturverzeichnis

- Tomatsu S, Montaña AM, Dung VC, Ohashi A, Oikawa H, Oguma T, Orii T, Barrera L, Sly WS (2010): Enhancement of drug delivery: enzyme-replacement therapy for murine Morquio A syndrome. *Mol Ther* 18, 1094-1102
- Tsai B, Rodighiero C, Lencer WI, Rapoport TA (2001): Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell* 104, 937-948
- Ulloa-Aguirre A, Janovick JA, Brothers SP, Conn PM (2004): Pharmacologic rescue of conformationally-defective proteins: implications for the treatment of human disease. *Traffic* 5, 821-837
- Vamos E, Liebaers I, Bousard N, Libert J, Perlmutter N (1981): Multiple sulphatase deficiency with early onset. *J Inher Metab Dis* 4, 103-104
- van der Knaap MS, Valk J: *Magnetic resonance of Myelination and Myelin Disorders*. 3. Auflage; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2005
- Voit R: Analyse von Promotorstärke und aktiver RNA-Synthese; in: *Bioanalytik*; hrsg. v. Lottspeich F, Engels JW; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2006, 901-922
- von Bülow R, Schmidt B, Dierks T, von Figura K, Usón I (2001): Crystal structure of an enzyme-substrate complex provides insight into the interaction between human arylsulfatase A and its substrates during catalysis. *J Mol Biol* 305, 269-277
- Wachs M: *Strukturelle und funktionelle Untersuchungen zur Rolle der Cysteine des Formylglycin-generierenden Enzyms*. Biochem. Diplomarbeit, Bielefeld 2009
- Woycechowsky KJ, Raines RT (2003): The CXC motif: a functional mimic of protein disulfide isomerase. *Biochemistry* 42, 5387-5394
- Zhang Y, Kozlov G, Pocanschi CL, Brockmeier U, Ireland BS, Maattanen P, Howe C, Elliott T, Gehring K, Williams DB (2009): ERp57 does not require interactions with calnexin and calreticulin to promote assembly of class I histocompatibility molecules, and it enhances peptide loading independently of its redox activity. *J Biol Chem* 284, 10160-10173
- Zito E, Buono M, Pepe S, Settembre C, Annunziata I, Surace EM, Dierks T, Monti M, Cozzolino M, Pucci P, Ballabio A, Cosma MP (2007): Sulfatase modifying factor 1 trafficking through the cells: from endoplasmic reticulum to the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 26, 2443-2453

8 Anhang (Tabellen und Abbildungen)

8.1 Abkürzungen

(Δ 34-72) FGE	N-terminal trunke Form des FGEs, in der Aminosäurereste 34-72 fehlen
°C	Grad Celsius
A	Ampere
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASA	Arylsulfatase A
AU	<i>absorbance units</i>
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CCD	<i>charge coupled device</i>
cDNS	komplementäre DNS
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DF	Durchfluss
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	2'-Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
E	Elution
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERp44	endoplasmatisches Retikulum Protein 44
FD	<i>fast desalting</i>

8 Anhang (Tabellen und Abbildungen)

FGE	Formylglycin-generierendes Enzym
FGly	C α -Formylglycin
FKS	fötales Kälberserum
FT	<i>flow through</i> (ungebundene Fraktion)
g	Gramm
G418	Neomycin (Gentamycinsulfat)
GAG	Glykosaminoglykan
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HT1080	humane Fibrosarcomzelllinie
IAA	Iodacetamid
IgG	Immunglobulin Klasse G
kb	Kilobasen
L	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molar (mol/L)
min	Minute
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
mol	Stoffmenge
MPS	Mucopolysaccharidose
MRT	Magnetresonanztomographie
MSD	Multiple Sulfatase-Defizienz
OD	optische Dichte
p.A.	<i>per Analysis</i>
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i> (Phosphatsalzpuffer)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase

8 Anhang (Tabellen und Abbildungen)

pFGE	Paralog des FGEs
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PI	Proteinase-Inhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SM	Startmaterial
Std	Proteinstandard
SUMF1	<i>Sulfatase-modifying factor 1</i>
SUMF2	<i>Sulfatase-modifying factor 2</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	DNS-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Enzymeinheit 1U = 1µmol/min
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
WF	Waschfraktion
WT	Wildtyp
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
Z	Zellen

Aminosäure	Abkürzung	Einbuchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N

8 Anhang (Tabellen und Abbildungen)

Aspartat	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamat	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Tabelle 13: Abkürzungen der Aminosäuren und der dazugehörige Einbuchstaben-Code

Nucleoside	Einbuchstaben-Code
Adenosin	A
Cytidin	C
Guanosin	G
Thymidin	T
Uridin	U

Tabelle 14: Einbuchstaben-Code der Nucleoside

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über Substrate, Lokalisierung und assoziierte Erkrankungen humaner Sulfatasen.....	3
Tabelle 2: Symptomkonstellation und -beginn bei den verschiedenen MSD-Subtypen.....	5
Tabelle 3: Stabilität, Aktivität, Retention und klinischer Phänotyp der FGE-Mutanten.....	19
Tabelle 4: Mutagenese-PCR-Ansatz	34
Tabelle 5: Temperaturprofil der Mutagenese-PCR	35
Tabelle 6: Restriktionsverdau.....	36
Tabelle 7: Sequenzierungs-PCR-Ansatz	39
Tabelle 8: Ethanolpräzipitations-Ansatz der Sequenzierungs-PCR	40
Tabelle 9: Aktivitätstest-Ansatz	60
Tabelle 10: Dialysatmengen der FGE-Mutanten, die 125 ng FGE-WT entsprechen.....	72
Tabelle 11: Maximale UV-Absorption im Elutionsprofil der FGE-Mutanten nach HisTrap-Affinitätschromatographie.....	77
Tabelle 12: Analyse der FGE-Konzentration der aufgereinigten FGE-Mutanten.....	91
Tabelle 13: Abkürzungen der Aminosäuren und der dazugehörige Einbuchstaben-Code	117
Tabelle 14: Einbuchstaben-Code der Nucleoside.....	117

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der reifen Form und der N-terminal trunkierten Form des FGEs	9
Abbildung 2: Kristallstruktur der FGE-Kerndomäne.....	11
Abbildung 3: Verschiedene Konformationen des FGE-Wildtyps <i>in vivo</i>	12
Abbildung 4: Transsulfatierungs-Eliminierungsmechanismus der Sulfatasen.....	13
Abbildung 5: Hypothetischer Mechanismus der FGly-Generierung.....	14
Abbildung 6: Lokalisation von MSD-verursachenden <i>missense</i> -Mutationen in der Kristallstruktur der Kerndomäne	17

8 Anhang (Tabellen und Abbildungen)

Abbildung 7: Aufbau des FGE pSB-Vektors	29
Abbildung 8: Aufbau der Blot-Apparatur für den Transfer von Proteinen	46
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Bindungsprinzips der Metallchelateffinitätschromatographie (IMAC) mit Ni ²⁺ -Ligand und dem varianten Protein einer FGE-Mutante als Adsorbent.....	55
Abbildung 10: Untersuchung der Expression der FGE-Mutanten	65
Abbildung 11: Überprüfung der FGE-Mutanten auf die Anwesenheit des His-Tags	66
Abbildung 12: Kultivierung der FGE-Mutanten in serumfreiem Zellkulturmedium.....	67
Abbildung 13: Kultivierung von FGE-Mutanten in Medien unterschiedlichen Serumgehalts	69
Abbildung 14: Untersuchung der Bindungsaffinität des FGE-Wildtyps an die ASA-C69S-Peptidmatrix.....	71
Abbildung 15: Quantifizierung der Menge an FGE im Dialysat der Mutante G263V im Vergleich zu 125 ng FGE-WT.....	72
Abbildung 16: Untersuchung der Substratbindung der FGE-Mutanten an die Peptidmatrix	74
Abbildung 17: Elutionsprofil der FGE-Mutante W179S nach HisTrap-Affinitätschromatographie	76
Abbildung 18: Ermittlung der Menge an Fremdprotein in den Elutionsfraktionen nach HisTrap-Affinitätschromatographie und Silber-Färbung	78
Abbildung 19: Entsalzungsprofil der FGE-Mutante W179S nach Gelfiltration.....	79
Abbildung 20: Aufreinigung der FGE-Mutante G263V mit Hilfe der ASA-C69S-Peptidmatrix.....	80
Abbildung 21: Aufkonzentrierung der gereinigten FGE-Mutanten der FGE-Mutante G263V mittels Ultrafiltration.....	81
Abbildung 22. Elutionsprofil während der Reinigung der FGE-Mutante W179S über Anionenaustauschchromatographie	82
Abbildung 23: Ermittlung der Menge an Fremdproteinen über SDS-PAGE und Silberfärbung in den Elutionsfraktionen nach Anionenaustauschchromatographie	85

8 Anhang (Tabellen und Abbildungen)

Abbildung 24: SDS-PAGE der aufgereinigten Konzentrate der FGE-Mutanten A177P und W179S.....	86
Abbildung 25: Analyse der FGE-Mutante W179S über Massenspektrometrie	87
Abbildung 26: MALDI-TOF-Massenspektrum des FGE-Substratpeptids P23 und seines Produkts nach Modifikation durch FGE	89
Abbildung 27: Westernblot zur Ermittlung der Expressionslevel der FGE-Mutanten	90
Abbildung 28: Substratumsatz der FGE-Mutanten A177P, W179S und W179S MQ12 und des FGE-WTs in Abhängigkeit von der FGE-Konzentration.....	92

8.4 Proteinsequenz von FGE

```
1 MAAPALGLVC GRCPELGLVL LLLLLSLLCG AAGSQEAGTG AGAGSLAGSC GCGTPQRPGA
61 HGSSAAAHRY SREANAPGPV PGERQLAHSK MVPIPAGVFT MGTDDPQIKQ DGEAPARRVT
121 IDAFYMDAYE VSNTEFEKQV NSTGYLQEAQ KFGDSFVFEG MLSEQVKTNI QQAVAAAPWW
181 LPVKGANWRH PEGPDSTILH RPDHPVLHVS WNDAYAYCTW AGKRLPQEAQ WEYSCRGGLH
241 NRLFPWGNKL QPKGQHYANI WQGEFPVTNT GEDGFQGTAP VDAFPNGYG LYNIVGNQWE
301 WTSDWWTVHH SVEETLNPKG PPSGKDRVKK GGSYMCHRSY CYRYRCAARS QNTPDSSASN
361 LGFRCAADRL PTMDRGSHHH HHH
```

9 Danksagung

9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei **Prof. Dr. P. Rehling** für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuern **Dr. Bernhard Schmidt** und **Dr. Lars Schlotawa** für die freundliche und erfolgreiche Zusammenarbeit, ohne deren Hilfe ich meine Arbeit nicht hätte fertigstellen können.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. J. Gärtner bedanken. Großen Dank schulde ich hier insbesondere **Nicole Holstein**, die mir mit viel Geduld und persönlichem Engagement bei allen meinen Fragen mit Rat und Tat zur Seite stand und über deren Freundschaft ich sehr glücklich bin. Daneben möchte ich mich bei **Kathrin, Tanja, Julia, Marcel, Corinna, Merle, Conny, Jens** und allen anderen aus der Pädiatrie II bedanken, die mir immer wieder mit Materialien und nützlichen Tipps ausgeholfen haben.

Besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei der Arbeitsgruppe von Dr. Bernhard Schmidt, insbesondere bei **Nicole Eiselt**, für die praktische Einführung und Anleitung in verschiedene Techniken der Laborarbeit. Weiterhin möchte ich **Klaus Neifer** danken, für seine große Hilfe bei der Durchführung der chromatografischen Verfahren sowie **Olaf Bernhard** für seine Unterstützung bei den massenspektrometrischen Auswertungen. Bei **Alam** möchte ich mich für die Unterstützung bei der Labortätigkeit bedanken.

Dank gilt außerdem **PD Dr. Markus Rudolph** für seine Bemühungen in der Kristallisation meiner Mutanten.

Ich danke weiterhin dem Team der Arbeitsgruppe von **Prof. Dr. T. Dierks** in Bielefeld für die anregende und herzliche Zusammenarbeit, insbesondere **Michaela, Elena** und **Eva**.