

**Charakterisierungsstudien der biologischen und neurotrophen  
Eigenschaften des *cerebral dopamine neurotrophic factor* (CDNF)**

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Michael Barkholz**

aus Marburg

Marburg/Lahn 2011

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am  
\_\_\_\_\_ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Maike Petersen

Zweitgutachter: Prof. Dr. Carsten Culmsee

Tag der mündlichen Prüfung am \_\_\_\_\_

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Charakterisierungsstudien der biologischen und neurotrophen Eigenschaften des cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF)“**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

.....  
(Michael Barkholz)

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Neurotrophe Faktoren.....	1
1.2	CDNF/ MANF Familie.....	3
1.2.1	Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor ( <i>MANF</i> ) .....	4
1.2.2	Cerebral dopamine neurotrophic factor ( <i>CDNF</i> ).....	5
1.3	Retention von endoplasmatischen Proteinen .....	6
1.4	Proteintransduktion.....	7
1.5	Zielsetzung.....	10
<b>2</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>22</b>
3.1	Produktion der rekombinanten Proteine.....	22
3.1.1	Klonierung .....	22
3.1.2	Transfektion.....	32
3.1.3	Klonselektion .....	35
3.1.4	Kryokonservierung von kultivierten Säugetierzellen.....	36
3.1.5	„Seed train“.....	37
3.1.6	Fermentation .....	37
3.2	Analytik.....	41
3.2.1	BCA-Gesamtproteinanalyse .....	41
3.2.2	UV Gesamtproteinanalyse .....	42
3.2.3	SDS-Gelelektrophorese .....	42
3.2.4	Dot blot.....	45
3.2.5	MTT-Test.....	46
3.2.6	ELISA.....	47
3.2.7	Proteinfällung.....	49
3.3	Aufreinigung der GFP-Konstrukte, CDNF und SAPLIP-Domäne .....	50
3.3.1	Präparative Chromatographie .....	50
3.3.2	Dialyse.....	55
3.3.3	Konzentrierung .....	55
3.4	Durchflusszytometrie.....	56
3.5	Fluoreszenzmikroskopie .....	58
3.6	ER-Isolierung.....	59
3.7	Induktion von neuronalem Zelltod bei unterschiedlichen Zell-kultursystemen.....	60
3.7.1	6-Hydroxydopamin (6-OHDA)-Schädigungsmodell.....	61
3.7.2	Glutamat-Schädigungsmodell.....	62
3.7.3	LUHMES-Zellen: Kultivierung und Induktion des Zelltods durch 6-OHDA-Schädigung .....	63
3.7.4	Kultivierung primärer Neurone aus Rattenembryonen und 6-Hydroxydopamin-Schädigung.....	64
3.7.5	Kultivierung von HT-22-Zellen und Induktion des Zelltods durch Glutamat-Schädigung .....	65
3.8	Statistische Auswertung.....	65

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>67</b>
<b>4.1</b>	<b>Herstellung der Fusionsproteine</b>	<b>67</b>
4.1.1	Design der DNA-Sequenzen	67
4.1.2	Amplifikation von CDNF und MANF aus einer humanen Leber cDNA-Datenbank	69
4.1.3	Design und Herstellung des Tat-Konstrukts	74
4.1.4	Mutation der internen <i>Bgl</i> II Schnittstelle von CDNF	75
4.1.5	Mutation der internen <i>Xho</i> I Schnittstelle von GFP	76
4.1.6	Design und Herstellung verschiedener CDNF-Mutanten mit veränderten C-terminalen Endsequenzen	77
4.1.7	Sequenzierung	78
4.1.8	Proteinexpression	79
4.1.9	Proteinreinigung	89
<b>4.2</b>	<b>Durchflusszytometrische Bestimmung der Assoziation von CDNF an Zellmembranen</b>	<b>98</b>
<b>4.3</b>	<b>Charakterisierung der zellulären Lokalisation von mutierten CDNF-Proteinen</b>	<b>102</b>
4.3.1	ER-Isolierung aus CDNF- und MANF-HEK293 Klonen	102
4.3.2	Bestimmung von externem und internem Gehalt an CDNF	103
4.3.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung	105
<b>4.4</b>	<b>Inkubation von neuronalen Zellkultursystemen mit extern zugegebenem CDNF bzw. SAPLIP-Domäne</b>	<b>107</b>
4.4.1	Externe Zugabe von CDNF auf LUHMES-Zellen	108
4.4.2	Externe Zugabe von CDNF zu primären Neuronen aus Rattenembryonen (PCN)	114
4.4.3	Externe Zugabe von CDNF zu HT-22-Zellen	118
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>122</b>
<b>5.1</b>	<b>Herstellung und Aufreinigung von GFP-Fusionsproteinen, CDNF und SAPLIP-Domäne</b>	<b>122</b>
<b>5.2</b>	<b>Transduktion und zelluläre Lokalisation</b>	<b>124</b>
5.2.1	Transduktion	124
5.2.2	Zelluläre Lokalisation	125
<b>5.3</b>	<b>Neurotrophe Eigenschaften</b>	<b>128</b>
5.3.1	LUHMES-Zellen	128
5.3.2	Primäre Neurone aus Rattenembryonen	131
5.3.3	HT-22-Zellen	133
<b>5.4</b>	<b>Einfluss der einzelnen Protein-Domänen auf zytoprotektive Eigenschaften von CDNF und MANF</b>	<b>134</b>
5.4.1	SAPLIP-Domäne	135
5.4.2	SAF-Domäne	138
<b>5.5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>140</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>142</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>146</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>157</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Neurotrophe Faktoren

Neurone, die nicht über die notwendigen Verknüpfungen verfügen, werden dem apoptotischen Zelltod zugeführt (Oppenheim, 1991). Zu Beginn der Entwicklung des Nervensystems werden mehr Nervenzellen gebildet als für die optimale Funktion notwendig sind. Durch diese Optimierung ist der programmierte apoptotische Zelltod ein charakteristisches Merkmal der neuronalen Entwicklung. Im Verlauf der Differenzierung überleben nur solche neuronale Zellen, die korrekt in neuronale Netzwerke eingebettet sind. Diese funktionalen Verknüpfungen mit anderen Zellen führen zur Expression extrinsischer und intrinsischer neurotropher Faktoren, die den apoptotischen Zelltod verhindern. Bei der Entwicklung neuronaler Strukturen sterben Zellen ohne funktionale Verknüpfung wieder ab (Oppenheim, 1991).

Neurotrophe Faktoren sichern darüber hinaus im ausgereiften Nervensystem das Überleben der neuronalen Zellstrukturen. Dies ist von besonderer Bedeutung, da sich ausdifferenzierte Neurone nicht durch Zellteilung erneuern. Die Neurogenese aus Stammzellen reicht nicht aus, um einen adäquaten Zellersatz und damit die Funktionstüchtigkeit neuronaler Zellstrukturen zu gewährleisten. Das Fehlen kurzfristiger Möglichkeiten zur Neurogenese und die daraus entstehende Abhängigkeit zu bestehenden neuronalen Zellen machen das neuronale System sehr empfindlich gegenüber toxischen Einflüssen. Irreversible Neurodegeneration und der damit verbundene Verlust der betroffenen Hirnfunktion sind somit die Folgen von anhaltenden gravierenden Schädigungen durch neurotoxische Substanzen (Calabrese et al., 2002).

Neurotrophe Faktoren ermöglichen das Überleben von Neuronen auch unter pathologischen Stressbedingungen. Weiter können neurotrophe Faktoren auch eine erneute Proliferation nach Beschädigung neuronaler Zellstrukturen ermöglichen. Eine Reihe unterschiedlicher Proteine haben diese Eigenschaften in präklinischen Tests bewiesen.

Neurotrophe Faktoren sind definiert als sekretierte Proteine. Sie werden nach Strukturhomologien, Rezeptoren und Signaltransduktionswegen in verschiedene Familien unterteilt. Die Bezeichnung „neurotropher Faktor“ umfasst Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen. Diese Proteine können in drei Hauptgruppen unterteilt werden:

## 1. Einleitung

- Neurotrophine (Levi-Montalcini et al., 1985)
- *Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligands (GFLs)* (Lin et al., 1993)
- Neuropoietische Zytokine oder Neurozytokine (Bauer et al., 2007) (auch Interleukin-6 (IL-6) Gruppe (Heinrich et al., 2003)).

Diese Faktoren haben alle gemein, dass sie ihre Signalwirkung über transmembrane Tyrosinkinaserzeptoren oder Rezeptoren, die mit Kinasen assoziiert sind, ausüben. (Bespalov und Saarma, 2007). Zusätzlich besitzen auch weitere Wachstumsfaktoren neurotrophe Eigenschaften (z.B. *fibroblast growth factor*). Neurone beziehen die genannten Faktoren wahrscheinlich aus unterschiedlichen Quellen (Davies, 1998; Krieglstein 2004):

- Zielgewebe
- Intermediärgewebe oder Gliazellen
- Präsynaptische Neurone
- Autokrine trophische Unterstützung

Zellen ohne ausreichenden Zugang zu neurotrophen Faktoren sterben ab. Hier zeigt sich, dass die Sekretion von neurotrophen Faktoren unabdingbar für die Unterstützung der Neurone ist. Die Familie der Neurotrophine wurde in den 1950er Jahren mit der Entdeckung des *nerve growth factor* NGF (Levi-Montalcini et al., 1985) begründet. Neurotrophine umfassen des Weiteren die Faktoren *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) (Barde et al., 1982), und Neurotrophine 3 bis 5 (NT-3, NT-4, NT-5) (Ernfors et al., 1990; Berkemeier et al., 1991; Hallböök et al., 1991). Die Familie der GFLs, ist Mitglied der TGF- $\beta$  Superfamilie. Zu ihnen gehören *glia cell-derived neurotrophic factor* GDNF (Lin et al., 1993), *neurotin* (NRTN) (Kotzbauer et al., 1996), *Artemin* (ART) (Baloh et al., 1998) und *Prosaposin* (PSPN) (Milbrandt et al., 1998). Neurozytokine beeinflussen neuronale Zellstrukturen und auch hämatopoietische Zellen. Sie werden verstärkt bei Entzündungsprozessen und bei der Immunabwehr ausgeschüttet. Sie beeinflussen die Neurogenese sowie die Ausdifferenzierung von Stammzellen und weitere Prozesse (Bauer et al., 2007; Heinrich et al., 2003). Zu der Gruppe der Neurozytokine gehören u.a. *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), Interleukin-6 (IL-6), IL-11, *Oncostatin M* (OSM), *leukaemia inhibitory factor* (LIF), *Cardiotrophin-1* (CT-1), *cardiotrophin-like cytokine* (CLC) und *B cell stimulating factor 3* (BSF3) (Bauer et al., 2007).

## 1. Einleitung

Wie diese Vielzahl an Faktoren untereinander reagieren oder ob sie einander substituieren können ist nicht bekannt. Wir haben noch keinen umfassenden Überblick darüber, welche Faktoren mit welchen Mitteln in den Prozess der Neurogenese eingreifen und zum Erhalt der neuronalen Strukturen beitragen. Die Rolle von verschiedenen neurotrophen Faktoren auf neuronale Subpopulationen, die sich in ihrem neurochemischen Profil, ihrer topographischen Verteilung, ihrem Phänotyp und ihrer Empfindlichkeit unterscheiden, konnte auch noch nicht geklärt werden (di Giovanni, 2009). Deswegen können Aussagen über molekulare Eigenschaften von neurotrophen Faktoren, welche über die in dem entsprechenden Tiermodell oder *in vitro* getesteten Studien hinausgehen, nur bedingt getroffen werden. Als Beispiel dient eine 2009 verfasste Studie mit TGF- $\beta$ 2 und GDNF *double knockout* Mäusen (Rahhal et al., 2009), die direkt nach der Geburt versterben. Sowohl TGF- $\beta$ 2, als auch GDNF werden als wichtige Faktoren bei der neuronalen Genese beschrieben (Lin et al., 1993; Kriegstein et al., 2004) und trotzdem zeigen sich bei den Mäusen keine Anomalien im Bereich des dopaminergen Systems im Mittelhirn. Das momentan am besten erforschte GDNF zeigt im Tiermodell hervorragende Ergebnisse (Tomac et al., 1995) und auch die wichtigsten molekularbiologischen Mechanismen sind bekannt (Tomac et al., 2000; Airaksinen und Saarma, 2002). Jedoch konnte GDNF leider keine signifikante Wirkung bei Patienten mit der Parkinson-Krankheit (*Parkinsons Disease*, PD) hervorrufen (Gill et al., 2003; Lang et al., 2006) (siehe 5.4 neurotrophe Eigenschaften).

Die Einflüsse und Interaktionen von neurotrophen Faktoren auf entsprechende neuronale Zellen zu bestimmen, ist wichtig um diese Proteine gezielt gegen neurodegenerative Krankheiten einsetzen zu können.

## 1.2 CDNF/ MANF Familie

Die neue CDNF/MANF Familie wurde erstmals von Lindholm und Saarma in 2010 definiert (Lindholm und Saarma, 2009). Die CDNF/MANF Familie zeigt Protektion und Proliferation von Neuronen im präklinischen Bereich durch extern zugeführtes Protein. Diese Proteinfamilie könnte somit einen neuen Ansatz zu einer weiteren Therapiemöglichkeit von neurodegenerativen Krankheiten bieten. Diese zwei interessanten Proteine teilen einige Eigenschaften, welche kürzlich zusammengefasst wurden (Lindholm und Saarma, 2009). Beide Proteine haben ein Molekulargewicht von ungefähr 21 kDa. Der Amino (N)-Terminus



## 1. Einleitung

enthält eine globuläre saposinähnliche (*saposin like protein* SAPLIP)-Domäne. Diese Domäne wurde bereits kristallisiert und grafisch dargestellt (Parkash et al., 2009) (Abb. 1.1).

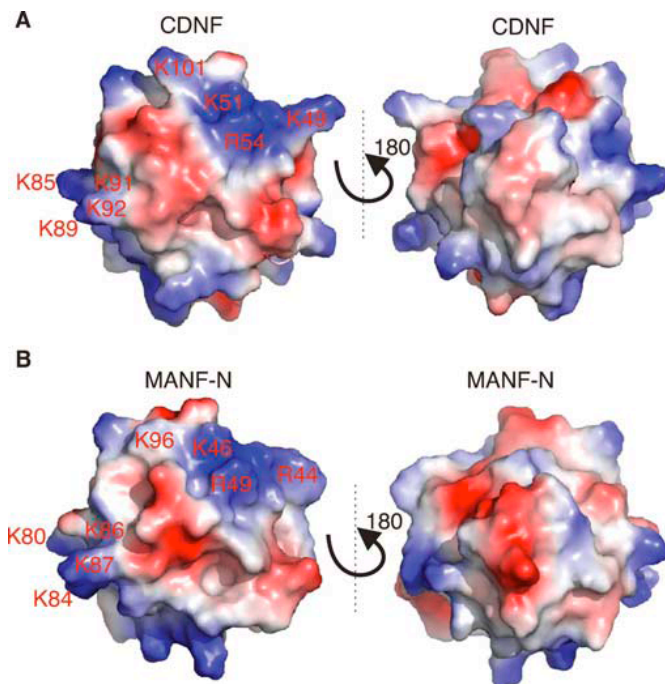


Abb. 1.1: Oberflächendarstellung der elektrostatischen Verteilung der N-terminalen Saposindomäne von CDNF und MANF (aus Parkash et al., 2009)

Im Gegensatz zu MANF konnte CDNF bisher nicht vollständig kristallisiert werden (Hellmann et al., 2010). Die Sequenz des Carboxy (C)-Terminus ist verwandt mit der Sequenz von *scaffold attachment factors* (SAFs) und enthält analog zu SAFs eine redoxaktive Cysteinbrücke eingebettet in ein CXXC-Motiv.

### 1.2.1 Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF)

*Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor* (MANF) war das erste Protein dieser Familie, das 1996 entdeckt wurde (Shridhar et al., 1996). Bevor die neurotrophischen Eigenschaften des Proteins aufgeklärt wurden (Petrova et al., 2007), wurde das Protein nach einer argininreichen Sequenz *arginine-rich protein* (ARP) oder *arginine-rich, mutated in early stage tumors* (ARMET) benannt. Wie sich jedoch später herausstellte, ist die argininreiche Sequenz nicht proteinkodierend und befindet sich vor dem N-terminalen

## 1. Einleitung

Startpunkt der Synthese (Petrova et al., 2007). Aufgrund dieser Umstände wurde das Protein in *mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor* umbenannt. Die neuroprotektiven Eigenschaften von MANF wurden *in vitro* an nigralen, dopaminergen Neuronen nachgewiesen. MANF zeigte nur bei nigralen, dopaminergen Neuronen, jedoch nicht bei GABAergen oder serotonergen Neuronen protektive Eigenschaften (Petrova et al., 2007). In einem *in vivo* Labormodel der PD in Ratten wird 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) intrastriatal appliziert und führt durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zum selektiven Absterben der dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc). In diesem Model konnten die neuroprotektiven Eigenschaften von MANF im Gegensatz zu CDNF nicht bestätigt werden (Voutilainen et al., 2011). In einem weiteren Modellversuch jedoch zeigte MANF neuroprotektive Eigenschaften gegen cerebrale Ischämie (Airavaara et al., 2009): Rekombinanter humaner MANF wurde lokal in den cerebralen Cortex von Ratten appliziert und erzeugte dort eine infarktreduzierende Wirkung nach dem Einleiten einer cerebralen Ischämie. Molekularbiologisch konnte MANF als ER-residentes Protein, welches über den *unfolded protein response* (UPR) via *endoplasmatic reticulum stress response element* (ERSE)-II-Element induziert wird, charakterisiert werden (Mizobuchi et al., 2007). Dies wurde durch eine Studie mit U2OS-Zellen, die mit Tunica-mycin behandelt wurden, bestätigt (Apostolou et al., 2008): Zellen, die unter ER-Stress inkubiert wurden, zeigten einen stetigen Anstieg der MANF (Apostolou et al., 2008) Konzentration.

### 1.2.2 Cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF)

*Cerebral dopamine neurotrophic factor* (CDNF) wurde 2007 bioinformatisch entdeckt (Lindholm et al., 2007). Zu MANF homologe DNA-Sequenzen konnten hierbei in Arten der Wirbeltiere und der Wirbellosen charakterisiert werden. Die cDNA von CDNF, die das Paralogon von MANF in Wirbeltieren kodiert, konnte durch RT-PCR und den Einsatz von homogenisiertem Mäuse- und menschlichem Hirngewebe isoliert werden (Lindholm et al., 2007). In der gleichen Studie wurde in Anlehnung an die neuroprotektiven Fähigkeiten des verwandten MANF, CDNF in einem 6-OHDA Parkinson-Modell *in vivo* (Maus) getestet. CDNF zeigte dabei neuroprotektive sowie neuroproliferative Eigenschaften. Im Gegensatz zu MANF jedoch wurden diese neurotrophischen Eigenschaften noch nicht in *in vitro* Modellen, die die neuronale Apoptose abbilden, nachgewiesen. Humanes CDNF besitzt eine N-Glycosylierung am Asparagin 57 gekoppelt an ein NFS-Motiv in der Saposindomäne. Diese Glycosylierung scheint jedoch für die Funktion als neurotropher Faktor nicht von Bedeutung

## 1. Einleitung

zu sein (Lindholm et al., 2007). CDFN und MANF sind ER-residente Proteine. CDFN wird jedoch nicht über den UPR reguliert. Dieses Ergebnis brachte die zuvor erwähnten Studie an U2OS-Zellen nach Tunicamycinbehandlung, die auch MANF mit einbezog (Apostolou et al., 2008). Die Expression von CDFN wird somit, trotz ausgeprägt struktureller Ähnlichkeiten zu MANF, von anderen, bisher nicht identifizierten Transkriptionsbedingungen und/oder Stressfaktoren beeinflusst.

### 1.3 Retention von endoplasmatischen Proteinen

Das Endoplasmatische Reticulum (ER) stellt die größte einzelne Organelle in den meisten Zellarten dar. Es ist als eine zusammenhängende schlauchartige Einheit aufgebaut, bei der mehrere untergeordnete Funktionseinheiten unterschieden werden können. Die momentan bekannten, voneinander abgrenzbaren Funktionseinheiten umfassen das raue ER (RER) und das glatte ER (SER) (Sitia, 1992). Eine weitere Unterteilung dieser Einheiten wird über die angrenzenden Zellorganellen oder spezielle Funktionen vorgenommen. Zu diesen Funktionseinheiten zählen die Mitochondrien-assoziierte Membran (MAM), die ER Qualitätskontrolleinheit (ERQC) und die Plasmamembran-assoziierte Membran (PAM). Für diese Funktionseinheiten konnten spezifische Markerproteine isoliert werden, die eine spezifische Zuordnung im Gesamtkomplex des ER ermöglichen (Lynes und Simmen, 2011).

Die generell im ER vorherrschenden Umgebungsbedingungen sind optimiert für die Proteinfaltung und Reifung. Sie unterscheiden sich stark vom Cytosol hinsichtlich Ionenstärke, Redox-Konditionen und der Konzentration an molekularen Chaperonen. Dies bedingt, dass viele posttranslationale Proteinmodifikationen, die für die richtige Proteinfaltung notwendig sind, nur im ER stattfinden können (z.B. Ausbildung von Disulfidbrücken, Abtrennen des Signalpeptids und N-Glykosidierung) (Wickner, 1999). Die korrekte Proteinfaltung ist im Weiteren ein wichtiges Kriterium für die Qualitätskontrolle im ER. Die Stabilität der Konformation (die freie Energie der Faltung) ist dabei ein entscheidender Parameter in der Qualitätsbewertung (Kowalski, 1998).

Das ER produziert kontinuierlich native sekretorische und Membranproteine sowie Membranlipide. Proteine, die im ER verbleiben sollen, enthalten ER-Retentionssignale. Das am längsten bekannte ER-Retentionssignal ist die C-terminale KDEL-Sequenz, die an vielen ER-residenten Proteinen zu finden ist (Munro und Pelham, 1987). Dieses Motiv wird vom KDEL-Rezeptor, welcher im Golgi-Komplex lokalisiert ist, erkannt. Gebunden an den

## 1. Einleitung

KDEL-Rezeptor wird das ER-residente Protein über *coatamer protein I (COPI)-coated* Vesikel zurück ins ER geführt (Letourneur et al., 1994). Weitere C-terminale Signale, die ähnlich der KDEL-Sequenz Proteine im ER zurückhalten, sind KKXX, KXKXX und XKXX (der Buchstabe X steht für eine beliebige Aminosäure) (Jackson et al., 1990). Der ER-interne Sortiermechanismus für einzelne ER-Funktionseinheiten scheint dabei den generellen Retentionsmechanismus für ER-residente Proteine zu überlagern (Myhill, 2008). Zum Beispiel trägt das Enzym Triacylglycerolhydrolase das ER-Retentionsmotiv HIEL am C-Terminus und ist im SER lokalisiert. Wird dieses Motiv jedoch zur klassischen KDEL Sequenz mutiert, kann eine eindeutige Lokalisation der Triacylglycerolhydrolase im SER nicht mehr nachgewiesen werden (Gilham et al., 2005). Die Anlagerung/Assoziation von weiteren Proteinen an ER-residente Proteine kann zur Artefaktbildung hinsichtlich der ER-Lokalisation führen: die Oxidoreduktase ERp44 (Mitglied der ER-Proteindisulfidisomerasen) ist in seiner endogenen Form an ER *exit sites* und im Golgi-Apparat lokalisiert. Wird es gentechnisch N-terminal mit Hämagglutinin fusioniert tritt eine Lokalisation im RER hervor (Anelli et al., 2002; Gilchrist et al., 2006). Diese und weitere Studien zeigen die Wichtigkeit von nativen Proteinen mit unverändertem und nicht maskiertem C-Terminus bei der Bewertung ihrer ER-Lokalisation.

Der C-Termini von CDFN und MANF tragen auch ein mögliches ER-Retentionssignal. Ähnlich zum allgemeinen ER-Retentionssignal KDEL trägt CDFN eine C-terminale KTEL-Sequenz. Die ER-Retention der C-terminalen RTDL-Sequenz von MANF wurde durch eine Studie von Mizubouchi et al. (2007) bestätigt. Im Verlauf dieser Arbeit wird der Einfluss der KTEL-Sequenz von CDFN und speziellen CDFN-Mutanten näher untersucht und die ER-Retentionseigenschaften erläutert.

## 1.4 Proteintransduktion

Therapeutische Proteine oder Oligonukleotide in Zellen zu schleusen, ist durch die selektiv durchlässige Zellmembran nur sehr beschränkt möglich. Eine therapeutische Droge muss sehr lipophil oder sehr klein sein, um die Zellmembran rezeptorunabhängig überwinden zu können. Diese Restriktionen erlauben nur einem sehr kleinen Teil möglicher therapeutischer Substanzen den Zugang ins Zellinnere. Die natürliche Struktur von Proteinen oder Oligonukleotiden verhindert das passive Eindringen dieser Stoffe in die Zelle.

In 1988 wurde anhand des Oberflächenproteins *transactivator protein (Tat)* aus *human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)* das erste Mal ein Transduktionsprozess beobachtet

## 1. Einleitung

(Abb. 1.1). Tat, gebunden an ansonsten nicht internalisierbare Proteine, konnte die Zellmembran durchdringen (Frankel und Pabo, 1988).

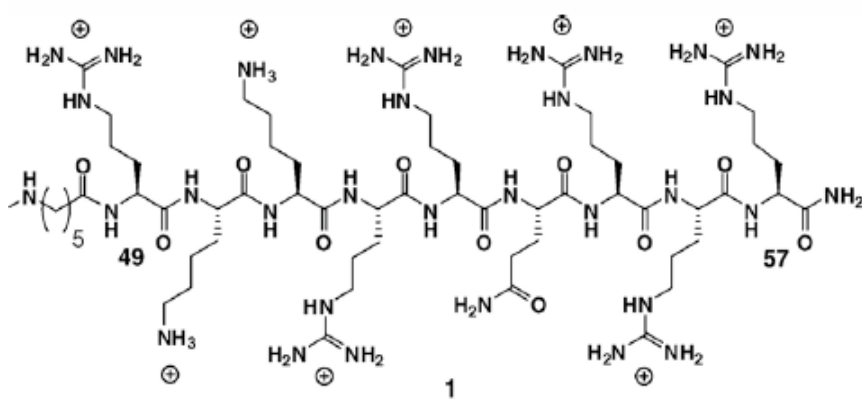


Abb.1.1.: Argininreiche Molekülstruktur von Tat. Die gezeigte Aminosäuresequenz lautet: RKKRRQRRR (aus Wender et al., 2008; Frankel & Pabo, 1991)

Weiterhin wurden mehrere Peptidsequenzen mit den gleichen Eigenschaften entdeckt. Für diese wurde die Bezeichnung *cell penetrating peptides* (CPPs) oder Molekültransporter gewählt. CPPs oder Molekültransporter sind dabei Stoffe, welche, gebunden an einen ansonsten schlecht bioverfügbaren Stoff, den Durchtritt durch biologische Membranen erhöhen oder ermöglichen (Wender, 2000).

Wichtig für diese Stoffklasse ist ein hoher Anteil an Lysin und Arginin (Ziegler, 2007). Die argininreiche Tat-Sequenz mit den positiv geladenen Guanidiniumseitenketten spielt eine wesentliche Rolle bei der Transduktion oder Endocytose von CPPs. Die Guanidiniumgruppen binden an negativ geladenen Glucosaminoglykane (z.B. Heparansulfat) an der Zelloberfläche (Abb. 1.2.).

## 1. Einleitung

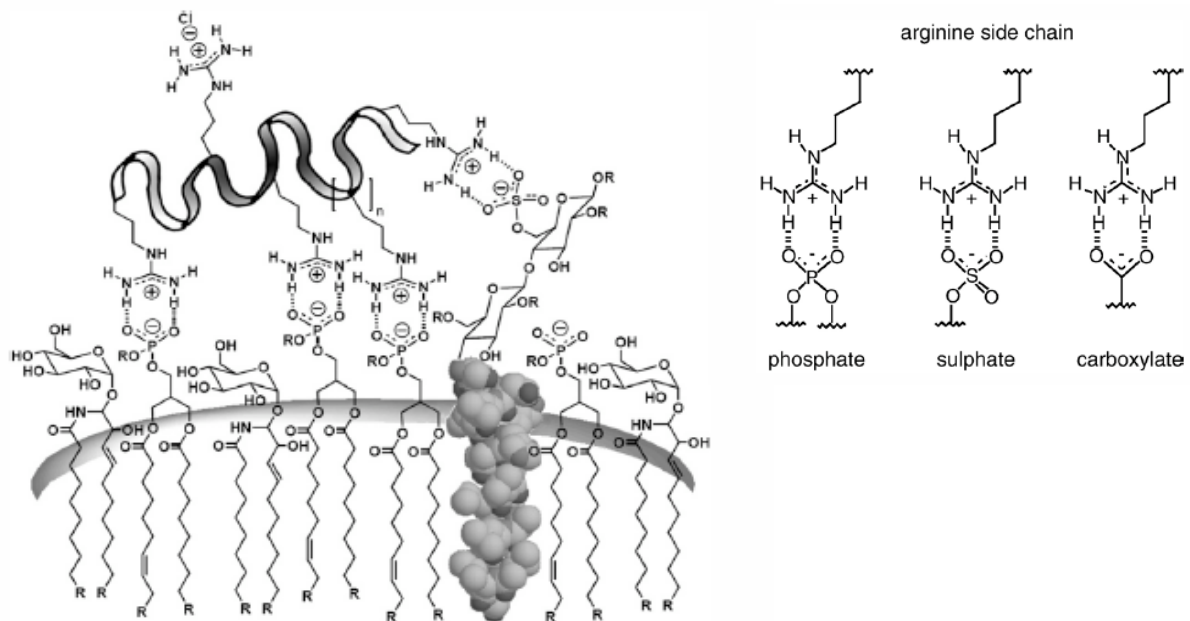


Abb. 1.2.: Schematische Darstellung der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen bei der Bindung von Guanidiniumgruppen an negativ geladenen Glucosaminoglykane und andere polare Kopfgruppen der Zellmembran (aus Wender et al., 2008). Die Guanidiniumgruppen bilden dabei Wasserstoffbrückenbindungen mit Sulfat-, Phosphat- und Carboxylatgruppen der Membran aus (aus Nakase et al., 2007).

Werden die Wasserstoffbrückenbindungen durch Methylierung der Amine der Guanidiniumgruppen unterbunden, reduziert sich die Aufnahme dramatisch (Rothbard et al., 2004).

Ob CPPs eine echte Transduktion auslösen oder eine Aufnahme durch Endozytose stattfindet, wird kontrovers diskutiert (Schwarze und Dowdy, 1999; Lundberg und Johansson, 2001; Ziegler, 2007). Viele Ergebnisse, die vor 2001 produziert wurden, sind wohl Artefakte. Diese Artefakte sind durch Probleme bei der Fixierung von Zellen mit Methanol entstanden. Methanol erzeugt Mikroläsionen in der Membran, durch die CPPs passiv in die Zelle eindiffundiert sind (Lundberg und Johansson, 2001).

Die Mechanismen der Translokation von CPPs sind noch nicht vollständig verstanden. In den letzten Jahren konnte ein maßgeblicher Einfluss der endozytotischen Aufnahme festgestellt werden (Veldhoen et al., 2008). Die Transduktionseffizienz ist, wenn vorhanden, äußerst

## 1. Einleitung

gering. Auch die eingeschränkte Kompatibilität der Fusionsproteine an bestimmte Zellsysteme und Umgebungsbedingungen sind ein großes Problem (Chauhan et al., 2007).

### 1.5 Zielsetzung

Für die in dieser Dissertation dargestellten Versuche waren umfangreiche biotechnologische Vorarbeiten (Proteindesign, Klonierung, Zellkulturmanagement, Produktion und Aufreinigung von verschiedensten Proteinkonstrukten) die maßgebliche Voraussetzung. Bisher standen keine Daten zur Etablierung eines Produktionsprozesses von CDNF im Milligramm-Maßstab zur Verfügung. Für die angestrebten Studien sind größere Mengen der Zielproteine jedoch notwendig. Für natives CDNF, CDNF-Mutanten und die SAPLIP-Domäne mussten Produktionsstrategien entwickelt werden. In dieser Arbeit werden die biotechnologischen Schritte zur Herstellung größerer Mengen dieser Zielproteine beschrieben. Dabei werden verschiedenste Systeme getestet und optimiert, um eine möglichst hohe Ausbeute und Reinheit der Zielproteine zu erreichen.

Mit den hergestellten Proteinen sollten unterschiedliche Charakterisierungen der Eigenschaften von CDNF, CDNF-Mutanten und dessen SAPLIP-Domäne erfolgen. Grundlage der ersten Versuche war die Überprüfung eines möglichen Eintritts von externem CDNF in die Zelle. Bisher sind kein CDNF-Rezeptor und keine Internalisation von externem CDNF in die Zelle bekannt. In dieser Arbeit wird die These untersucht, ob CDNF ausgehend von seiner SAPLIP-Domäne transduktorische Eigenschaften besitzen könnte.

Weiter sollte über molekularbiologische und biochemische Methoden die Möglichkeit einer ER-Retention von CDNF überprüft werden. Ausgehend von Literaturangaben zu MANF scheint eine ER-Retention sehr wahrscheinlich. Über die ER-Retention von CDNF wurde ausgehend von seiner C-terminalen KTEL-Sequenz bisher nur spekuliert. In dieser Arbeit wird die ER-Retention von CDNF bestätigt. Durch verschiedene CDNF-Mutanten wird weiterhin versucht, die ER-Retention von CDNF zu verhindern und eine gesteigerte Sekretion zu erzielen.

Um eventuell neuroprotektive Mechanismen von CDNF zu erforschen, wurden Arbeiten mit Schädigungsmodellen an neuronalen Zellkultursystemen unternommen. Bisher konnte ein neuroprotektiver Effekt von CDNF ausschließlich *in vivo* nachgewiesen werden. Ein *in vitro* System zur Darstellung und Erforschung des neuroprotektiven Mechanismus von CDNF ist nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde versucht mit *in vitro* Schädigungssystemen die

## 1. Einleitung

neuroprotektiven Eigenschaften von CDFN nachzuvollziehen. Dabei war es notwendig, ein *in vitro* Schädigungsmodell mit 6-OHDA zu etablieren, um an diesem Versuche mit CDFN durchführen zu können.



## 2 Material

### PCR

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
Gene Amp PCR System 9700 Thermocycler	Applied Biosystems, Darmstadt
Human liver cDNA Bank	Invitrogen, Darmstadt
Perfect Taq DNA Polymerase	5Prime, Hamburg
Pfu Ultra-Polymerase	Stratagene, Waldbronn
Phusion-Polymerase	Finnzymes, Schwerte
dNTPs	5Prime, Hamburg
Primer	MWG Operon, Ebersberg
Water PCR Reagent	Sigma-Aldrich, München
Restriktionsenzym <i>DpnI</i>	Stratagene, Waldbronn
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit II XL	Stratagene, Waldbronn
QIAquick <sup>®</sup> PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

### Primer

Die Primer sind in Richtung 5' nach 3' angegeben. Eingefügte Schnittstellen sind angegeben. Alle Primer haben interne Nummern und können den entsprechenden Klonen zugeordnet werden. Alle Primer wurden von Operon, Ebersberg bezogen.

GFP <i>XhoI</i> Deletion forw. GAAACATTCTCGGACACAACTCCAGTACA ACTATAACTCACACAATG
GFP <i>XhoI</i> Deletion rev. CATTGTGTGAGTTATAGTTGTACTGGAGTTTGTGTCCGAGAATGTTTC
GFP <i>BamHI</i> forw. GTGGGATCCGGGGCAGCGGAGGCTCTATGGCTAGCAAAGGAGAAGAAC
GFP <i>XhoI</i> rev. CACGGATCCGCGAGATCTATCCATGCCATGTGTAATCCCA
TAT Synthese <i>BglII/XhoI</i> GTGAGATCTGGGGGCAGCGGAGGGTCCGGCGGATCTGGAGGCTCTTACG GACGGAAAAAGCGG
TAT Synthese <i>BglII/XhoI</i> CACCTCGAGCTACCGCCGCTCTGCCTCCGCTTTTCCGTCCGTAAGAGCC TCCAGATCCGCC
GFP TAT-Fusion für pMARES <i>EcoRI</i> GTGGAATTCATGAAGTGGGTAAGCTTTATTTC
GFP TAT-Fusion für pMARES <i>NotI</i> GAGGCGGCCGCTACCGCCGCTCTGCCT
CDNF Touch Down PCR forw. GGCGATTGAAGCTGCTGGCCC

## 2. Material

CDNF Touch Down PCR rev. CTCTCTAATTACAAGTCACAAATGTG
CDNF Nested PCR forw. (Anfangssequenz des Signalpeptid) ATGTGGTGCGCGAGCCCAG
CDNF Nested PCR rev. TCAGAGCTCTGTTTTGGGGTG
CDNF <i>Bg/III/XhoI</i> forw. CGAGATCTGGGGGCAGCGGAGGGTCCGGCGGATCTGGAGGCTCTCAGGA GGCCGGGGGGC
CDNF <i>Bg/III/XhoI</i> rev. CACCTCGAGTCAGAGCTCTGTTTTGGGGTG
CDNF del <i>Bg/III</i> forw. GCTGAAGAAGTTGGATAGCCAAATCTGTGAGCTGAAATATG
CDNF del <i>Bg/III</i> rev. CATATTCAGCTCACAGATTTGGCTATCCAACCTTCTTCAGC
GFP CDNF-Fusion für pMARES <i>EcoRV</i> forw. GTGGATATCATGAAGTGGGTAAGCTTTATTTTC
GFP CDNF-Fusion für pMARES <i>NotI</i> rev. GTGCGGCCGCTCAGAGCTCTGTTTTGGGGTG
GFP STOP <i>BamHI</i> rev. CACGGATCCTCAATCCATGCCATGTGTAATCCCA
GFP STOP <i>NotI</i> rev. CACGCGGCCGCTCAATCCATGCCATGTGTAATCCCA
SAP-Domäne <i>Bg/III</i> forw GGGAGATCTCCAGGGGCCGACTGTGAAG
SAP-Domäne <i>NotI</i> rev. GGGGCGGCCGCTCAATATTTTCAGCTCACAGATTTG
CDNF <i>Bg/III</i> forw GGGAGATCTCAGGAGGCCGGGGGGCG
CDNF <i>BstAPI</i> rev GGGGCAGGATCTGCTTCAGCTCTG
CDNF optimierte Sequenz für Produktion in CHO Deletionsmutagenese 1 forw. GGGCGTGCAGTGCGGCAGACCTGGCG
CDNF optimierte Sequenz für Produktion in CHO Deletionsmutagenese 1 rev. CGCCAGGTCTGCCGCACTGCACGCC
CDNF optimierte Sequenz für Produktion in CHO Deletionsmutagenese 2 forw. GCGAGCTGAAGTACCACCATCATCACCATCAC
CDNF optimierte Sequenz für Produktion in CHO Deletionsmutagenese 2 rev. GTGATGGTGATGATGGTGGTACTTCAGCTCGC
CDNF optimierte Sequenz für Produktion in CHO Reamplifikation <i>EcoRI</i> forw. CCGAATTCGCCACCATGGAA
CDNF optimierte Sequenz für Produktion in CHO Reamplifikation <i>NotI</i> rev. CACGCGGCCGCTACTAGTACTTCAGCTCGCAAATCTG
CDNF nativ <i>BamHI</i> forw. GTGGGATCCATGTGGTGCGCGAGCCCAG
CDNF nativ <i>NotI</i> rev. GTGGCGGCCGCTCAGAGCTCTGTTTTGGGGTG

## 2. Material

CDNF optimiert <i>Bam</i> HI forw. GTGGGATCCATGGAATTTGGCCTGTCCTGG
CDNF optimiert <i>Not</i> I rev. CACGCGGCCGCTCACAGCTCGGTCTTAGGGTGGG
CDNF nativ ab Signalpeptid jedoch ohne Endsequenz KTEL rev. CACGCGGCCGCTCAGGGGTGTGTCGCTGCATACT
CDNF nativ ab Signalpeptid mit modifizierter Endsequenz RSDI rev. CACGCGGCCGCTCAGATGTCGGAGCGGGGTGTGTCGCTGCATACT
CDNF nativ ab Signalpeptid jedoch mit modifizierter Endsequenz AAAA rev. CACGCGGCCGCTCATGCGGCAGCTGCGGGGTGTGTCGCTGCATACT
CDNF nativ ab Signalpeptid jedoch mit Endsequenz KDEL CACGCGGCCGCTCACAGCTCGTCCTTAGGGTGGG
CDNF optimiert ab Signalpeptid jedoch ohne Endsequenz KTEL rev. GTGGCGGCCGCTCAAGGGTGGGTGGCGGCGTA
CDNF optimiert ab Signalpeptid jedoch mit modifizierter Endsequenz RSDI rev. GTGGCGGCCGCTCAGATGTCGGAGCGAGGGTGGGTGGCGGCGTA
CDNF optimiert ab Signalpeptid jedoch mit modifizierter Endsequenz AAAA rev. GTGGCGGCCGCTCATGCGGCAGCTGCAGGGTGGGTGGCGGCGTA
MANF Touch Down PCR forw. GGAGGAGGAGGAGGAGGAGGATG
MANF Touch Down PCR rev. CATGGGGTACTGTAGGGCCAGC
MANF Nested PCR forw GTGGAATTCATGAGGAGGATGAGGAGGATG
MANF Nested PCR rev. CTCGCGGCCGCTACAAATCGGTCCGTGCACT

### Restriktionsenzyme

Folgende Restriktionsenzyme wurden von Invitrogen, Darmstadt bezogen:

*Bam*HI, *Bst*API, *Cla*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Kpn*I, *Nhe*I, *Not*I, *Pme*I, *Spe*I, *Xba*I, *Xho*I

Folgendes Restriktionsenzym wurden von New England Biolabs, Frankfurt am Main bezogen:

*Bg*III

### Plasmide

- pCR4-TOPO<sup>®</sup> von Invitrogen, Darmstadt

## 2. Material

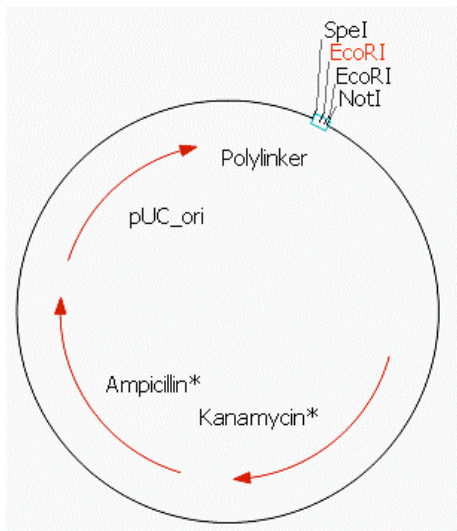


Abb. 2.1.: pCR4-Topo Vektor

- pIRES/neo von Clontech, Göttingen Laboratories

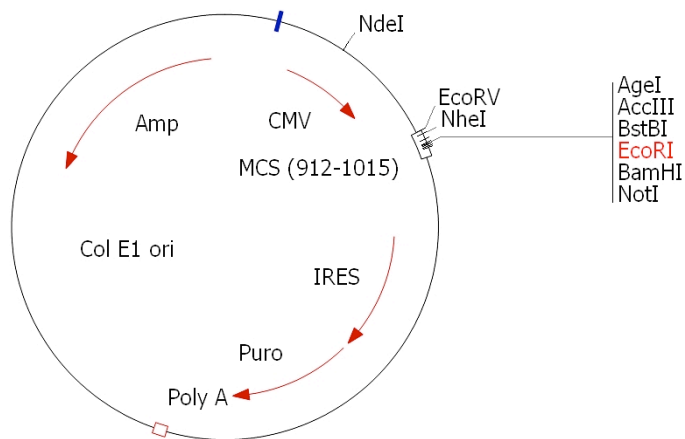


Abb. 2.2.: pIRES/neo Vektor

- Vektor wurde auf Basis des pIRES/neo zur Transfektion von CHO-Zellen optimiert. Vektor wurde um ein *matrix attachment region* (MAR)-Element erweitert (Buceta et al., 2011).

### Ligation

#### Produkt

Alkaline Phosphatase CIAP  
T4 DNA Ligase  
DNA Ligase Reaction Buffer

#### Firma

Promega, Mannheim  
Invitrogen, Darmstadt  
Invitrogen, Darmstadt

## 2. Material

### **Transformation**

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
SOC Medium	Invitrogen, Darmstadt
LB Broth-Medium	Gibco, Darmstadt
Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Ampicillin AmpTabs 25 mg/ Tab	Stratagene, Waldbronn
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar technisch	Merck, Darmstadt
Brutschrank Typ B5042	Heraeus, Hanau
Zellinkubator Minitron	Infors, Einsbach

### **Bakterienstämme**

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
One Shot® TOP10	Invitrogen, Darmstadt
XL1 Blue MRF'	Stratagene, Waldbronn
XL10 Gold	Stratagene, Waldbronn

### **Reinigung von Plasmid DNA**

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
QIAprep Kit (Miniprep)	Qiagen, Hilden
QIAprep Kit (Midiprep)	Qiagen, Hilden
DU530 Life Science UV/Vis Spectrophotometer	Beckman Coulter, Krefeld

### **Elektrophorese**

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
Image Master VDS	Pharmacia Biotech
LE Genetic Pure	Biozym, Oldendorf
Agarose	Roth, Karlsruhe
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich, München
EDTA	Sigma-Aldrich, München
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, München
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumborat Decahydrat	Merck, Darmstadt

## 2. Material

1 kb Ladder	New England Biolabs, Frankfurt am Main
10x DNA-Loading Dye	Thermo Scientific, München
Ethidiumbromid	Applichem, Darmstadt
QIAquick <sup>®</sup> Spin Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden
2301 Macrodrive Power Supply	LKB Bromma
Gelkammer für 20 x 30 cm Gele	Renner, Darmstadt

### SDS Gelelektrophorese und Blotten

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
NuPAGE <sup>®</sup> LDS Sample Buffer	Invitrogen, Darmstadt
NuPAGE <sup>®</sup> Sample Reducing Agent	Invitrogen, Darmstadt
NuPAGE <sup>®</sup> MES/ MOPS Running Buffer	Invitrogen, Darmstadt
NuPAGE <sup>®</sup> Transfer Buffer	Invitrogen, Darmstadt
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen, Darmstadt
NuPAGE <sup>®</sup> Novex 4-12% Bis-Tris Gel	Invitrogen, Darmstadt
NuPAGE <sup>®</sup> Novex 10% Bis-Tris Gel	Invitrogen, Darmstadt
Nitrocellulose 0,2 µm pore size	Invitrogen, Darmstadt
Tris Buffered Saline, pH 8,0 with 3 % nonfat milk	Sigma-Aldrich, München
Sigma-Aldrich Fast BCIP / NBT	Sigma-Aldrich, München
SimplyBlue SafeStain	Invitrogen, Darmstadt
PowerEase <sup>®</sup> 500 Power Supply	Invitrogen, Darmstadt
XCell SureLock <sup>™</sup> Mini-Cell	Invitrogen, Darmstadt
XCell II <sup>™</sup> Blot Module	Invitrogen, Darmstadt
SilverXpress <sup>®</sup> Kit	Invitrogen, Darmstadt

### Transfektion

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
Geneticin	Sigma-Aldrich, München
Accutase	Sigma-Aldrich, München
Lipofektamin 2000 CD Reagent	Gibco, Darmstadt
Puromycin	InvivoGen, Toulouse, France
Elektroporator Nucleofector	Amaxa, Oldendorf
Nucleofector Kit	Amaxa, Oldendorf

## 2. Material

### Zellkulturmedien

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
CD CHO	Gibco, Darmstadt
Freestyle293	Gibco, Darmstadt

### Zellkulturen

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
CHO-K1	Invitrogen, Darmstadt
HEK293	Invitrogen, Darmstadt

Mit großem Dank erwähne ich, dass folgende neuronale Zelllinien von Prof. Dr. Carsten Culmsee zur Verfügung gestellt wurden: LUHMES, HT-22 und primäre Neurone aus Rattenembryonen

### Kryokonservierung

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Freezing Container	Nalgene, München

### Fermentation

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
pH Sonde Easyferm Plus K8 425	Hamilton, Höchst
O <sub>2</sub> Sonde Oxyferm FDA 425	Hamilton, Höchst
10 l Glasfermenter	Sartorius, Goettingen
WAVE Bioreaktor	GE Healthcare, München
Fermentersteuereinheit BioStat B-DCU	Sartorius, Goettingen
Steuerungssoftware MFCS/win	Sartorius, Goettingen
Analysesystem Bioprofile Flex	Novabiomedical, Rödermark
Tiefenfilter Kleenpak Nova	Pall, Dreieich

### Downstream

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
Ni Sepharose 6 Fast Flow	GE Healthcare, München
Talon Metal Affinity Resin	Becton Dickinson, Heidelberg

## 2. Material

Imidazol	Merck, Darmstadt
Spiral ultrafiltration cartridge type S1Y3	Millipore, Schwalbach
Phenyl Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, München
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt
Centriprep centrifugal filter device	Millipore, Schwalbach
Äkta Explorer	GE Healthcare, München

### **Gesamtproteinbestimmung**

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
BCA Protein Assay Kit	Pierce, München

### **ELISA**

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
LowCross Buffer	Candor Bioscience, Wangen
Blocking Solution	Candor Bioscience, Wangen
Carbonate-Bicarbonate Buffer Capsules	Sigma-Aldrich, München
PBS-T with Tween <sup>®</sup> 20	Sigma-Aldrich, München
GFP Antibody Monoclonal	Abcam, Cambridge, UK
GFP Antibody Polyclonal	Abcam, Cambridge, UK
Chromogen TMB	Dade Behring, Marburg
Puffer/Substrat TMB	Dade Behring, Marburg
Stopplösung POD	Dade Behring, Marburg
Nunc-Immuno Plate U96 Maxisorp	Nunc, Langenselbold
Behring Elisa Processor II	Dade Behring, Marburg

### **Immunfluoreszenz**

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
Chamber Slides Permanox	Nunc, Langenselbold
Paraformaldehyd powder (95 %ig)	Sigma-Aldrich, München
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride)	Invitrogen, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Goat serum	Abcam, Cambridge, UK
Rabbit grp94 antibody	Abcam, Cambridge, UK



## 2. Material

Donkey Alexa Fluor 488 antirabbit antibody	Dianova, Hamburg
Goat CDNF antibody	R&D Systems, Wiesbaden
Goat MANF antibody	R&D Systems, Wiesbaden
Rabbit Qdot <sup>®</sup> 655 antigoat antibody	Invitrogen, Darmstadt
FluorSafe	Merck, Darmstadt
Axio Imager Z1 mit AxioCam HRc	Carl Zeiss Jena, Jena

### **Durchflusszytometrie**

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
FACSFlow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSRinse	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSClean	Becton Dickinson, Heidelberg
CaliBrite beads	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg

### **ER-Isolierung**

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
Calciumphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Evolution RC	Sorvall, Newport Pagnell, UK
Rotor SS-34	Sorvall, Newport Pagnell, UK

### **Kulturmedien und Zusätze für neuronale Zelllinien**

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
Multiwell Platten	Greiner, Frickenhausen
15 ml, 50 ml Plastikröhrchen	Greiner, Frickenhausen
0,22 $\mu$ m Sterilfilter	Pall, Dreieich
DMEM/ F12 Serum Free Medium	Sigma-Aldrich, München
Neurobasal	
Dibutyryl cAMP	Sigma-Aldrich, München
6-Hydroxydopamin	Sigma-Aldrich, München
Glutamat	Sigma-Aldrich, München
N2- Supplement	Invitrogen, Darmstadt
Penecillin/ Streptomycin	Invitrogen, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München

## 2. Material

Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, München
Puromycin	Sigma-Aldrich, München
Fibronectin	Sigma-Aldrich, München
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, München
FGFb Rec Hu	Invitrogen, Darmstadt
GDNF	R&D Systems, Wiesbaden

### Weitere Laborgeräte

<i>Produkt</i>	<i>Firma</i>
Sterile Werkbank I200	Thermo Scientific, München
IKAmag-REC-G Magnetrührer	IKA, Staufen
Vortexer VF2	IKA, Staufen
Thermomixer Typ 5436	Eppendorf, Hamburg
Schüttler Rocky	Ltf-Labortechnik, Wasserburg
Vacuum Concentrator Typ BHVL 300H	Bachofer
Wasserbad Typ 3047	Köttermann, Uetze
Analysenwaage MC210 P	Sartorius, Goettingen
Analysenwaage LP5200P-OCE	Sartorius, Goettingen
Präzisionswaage Type 1702	Sartorius, Goettingen
pH-Meter Typ CG804	Schott, Mainz
pH-Meter 764	Knick, Zweibrücken
Tecan Reader infinite M200	TECAN, Crailsheim
Mikroliterpipetten aller Art	Eppendorf, Hamburg
Heracell CO <sub>2</sub> Inkubator	Kendro, Langenselbold

## 3 Methoden

### 3.1 Produktion der rekombinanten Proteine

#### 3.1.1 Klonierung

Die DNA-Sequenzen der CDNF/MANF Familie sind aus einer humanen Leber cDNA Datenbank amplifiziert worden (siehe 2. Material). Die Amplifikation von DNA-Sequenzen sollte auf der Basis von cDNA erfolgen, um bereits gespleißte Gene zu erhalten. Gespleißte Gene enthalten im Gegensatz zu genomischer DNA keine Exons mehr und bestehen aus einer durchgehenden Protein-codierenden Sequenz.

##### 3.1.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA ist die PCR aus dem molekularbiologischen Labor nicht mehr wegzudenken (Saiki et al., 1988). Durch die exponentielle Vermehrung eines DNA-Abschnitts zwischen zwei kurzen Primer-Sequenzen können wenige Moleküle DNA ausreichend sein, um detektierbare Mengen zu erhalten. Das Grundschema der zyklisch verlaufenden Reaktion beginnt mit der Aufspaltung des DNA-Doppelstranges (Template) durch Hitze ( $> 94^{\circ}\text{C}$ , Initial 5 min, weitere Zyklen 1 min) in Einzelstränge. Die eingesetzten Anfangsmengen richten sich nach der Art des Templates:

- 10-20 ng Plasmid-DNA
- 0,5-1,0 ng cDNA
- ca. 1,0 ng DNA-Amplifikat aus einer vorher durchgeführten PCR

Nach der Hitzedenaturierung können zuvor entworfene und synthetisch hergestellte Primer an komplementäre Bereiche der DNA-Einzelstränge anlagern (Annealing). Beim Entwurf der Primer sollte eine gewisse Länge ( $> 10$  bp) und ein relativ hoher GC-Gehalt ( $> 50\%$ ) nach Möglichkeit berücksichtigt werden, um eine gute Anlagerung zu erzielen. Im Gegensatz zu

### 3. Methoden

Adenin und Thymin mit zwei, sind Guanin und Cytosin durch drei Wasserstoffbrückenbindungen verbunden. GC-Gehalt und Länge der Primer bestimmen die theoretische Annealingtemperatur  $T_A$ . Eine Methode, die  $T_A$  zu berechnen, bezieht sich auf die theoretische Schmelztemperatur  $T_M$ :

$$T_A = T_M - 5^\circ\text{C}.$$

Zur Bestimmung von  $T_M$  werden allen Basen der Primer Temperaturen zugeordnet:

- Guanin und Cytosin  $4^\circ\text{C}$
- Adenin und Thymin  $2^\circ\text{C}$ .

$$T_M = (A + T) \times 2^\circ\text{C} + (G + C) \times 4^\circ\text{C}$$

Die Temperaturen werden addiert und die Summe bildet  $T_M$ . Diese sollte zwischen 55 und 64  $^\circ\text{C}$  liegen. Die Primer für das 5'- sowie das 3'-Ende sollten die gleiche  $T_M$  besitzen.

Nach dem Annealing wird die Temperatur auf den optimalen Arbeitsbereich der hitzestabilen Polymerase erhöht (72  $^\circ\text{C}$ ). Ausgehend von den Primern wird der komplementäre Einzelstrang in 5'  $\rightarrow$  3' Richtung unter Verbrauch von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) synthetisiert (Elongation). Die Länge der amplifizierten DNA und die Geschwindigkeit der Polymerase bestimmen hierbei das Zeitfenster. Verschiedene Polymerasen können DNA mit einer Geschwindigkeit von 1000 – 2000 bp synthetisieren. Der Zyklus startet nach diesem Schritt von vorn. Die Anzahl der Zyklen  $n$  bestimmt die Anzahl der amplifizierten Moleküle ( $2^{n-1}$ ) abhängig von der eingesetzten DNA-Anfangsmenge.

#### 3.1.1.1.1 Touch Down und Nested PCR

Um Gene aus cDNA-Datenbanken zu amplifizieren, werden Modifikationen des oben genannten Protokolls notwendig. Zuerst wird eine Touch Down PCR durchgeführt. Die Primer sollten einen möglichst hohen GC-Anteil haben. Die initiale  $T_A$  wird wie oben genannt berechnet und wird jedoch nach jedem Zyklus um jeweils 0,2  $^\circ\text{C}$  erniedrigt, um von

### 3. Methoden

einer spezifischen zu einer unspezifischeren Anlagerung zu modulieren. Dies erhöht die Chance das gesuchte Gen zu amplifizieren. Wird das Amplifikat aufgrund seiner Größe identifiziert, folgt die spezifische Nested PCR, die beim Startcodon beginnt und beim Stoppcodon des Gens endet.

#### 3.1.1.1.2 Mutagenese

Mutationen werden mit Hilfe der PCR in DNA-Sequenzen eingeführt. Dabei werden die Primer so entworfen und synthetisiert, dass sie sich im Bereich des zu mutierenden DNA Abschnitts anlagern, jedoch die zu verändernden Nukleotide nicht enthalten (Deletion), zusätzlich enthalten (Insertion) oder alternative Nukleotide als Austauschmöglichkeit (Variation) enthalten. Es ist möglich, während einer Mutagenese größere Abschnitte zu deletieren. Eine Insertion oder Variation erfolgt aber nur mit wenigen Basenpaaren. Die PCR verläuft dabei wie beschrieben (siehe 3.1.1.1 Polymerase Kettenreaktion), einzig die Auswahl des Templates und das Design der Primer unterscheiden sich. Als Template muss ein Plasmid verwendet werden, das das zu mutierende Gen enthält. Das aus *E. coli* isolierte Plasmid liegt methyliert vor, wogegen die *in vitro* mutagenisierten Plasmide unmethyliert sind. Das methylierte Ursprungsplasmid wird am Ende der Mutagenese durch Zugabe des Enzyms DpnI, das nur methylierte DNA angreift, abgebaut. Die mutagenisierte DNA bleibt erhalten und kann aufgereinigt werden.

Die Primer sollten zwischen 25 und 45 bp lang sein und einen GC-Gehalt von mindestens 40% aufweisen. Die theoretische  $T_M$  wird sehr hoch gewählt und sollte  $\geq 78$  °C sein. Die Berechnung hierfür lautet (Formel aus QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit II XL, Stratagene, Waldbronn):

$$T_M = 81,5 \text{ °C} + (0,41 * (\%GC) * 1 \text{ °C}) - (675 * 1 \text{ °C}) / N - (\%mismatch * 1 \text{ °C})$$

$T_M$  = die Schmelztemperatur sollte  $\geq 78$  °C betragen

(%GC) = prozentualer Anteil der Nukleotide G und C, bezogen auf alle Nukleotide des betroffenen Abschnitts

N = Anzahl aller Nukleotide

% mismatch = prozentualer Anteil der Nukleotide im Primer, welche keine

### 3. Methoden

Wasserstoffbrücken mit einem komplementären Nukleotid der Template-DNA ausbilden

Die hohe Temperatur  $T_M \geq 78 \text{ °C}$  ist notwendig, um bei einer  $T_A$  von  $60 \text{ °C}$  eine starke Bindung des Primers trotz der fehlenden komplementären Basenpaare zu erzielen.

#### 3.1.1.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren über Agarosegel-Elektrophorese

Die durchgehend negativ geladenen Nukleinsäuren erlauben eine Größentrennung einzelner DNA-Fragmente im elektrischen Feld. Sie wandern somit im elektrischen Feld zur Anode. Kleinere Fragmente wandern dabei schneller durch ein Agarosegel als größere Fragmente. Als Kontrolle dient das Mitführen eines DNA-Standards. Dieser erlaubt eine erste Größenabschätzung der zu trennenden DNA-Fragmente.

Die Reinigung der DNA-Fragmente wurde über ein 1%-iges Agarosegel durchgeführt. Die Agarose wurde in TAE-Puffer (2 mM Tris-Acetat, 50 mM EDTA, pH 8,5) suspendiert und in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht. Das Kochen der Lösung wurde beendet, wenn die Agarose vollständig gelöst war. Nach dem Abkühlen auf ca.  $45 \text{ °C}$  wurde die Lösung in eine Gelform gegossen. Die Kavitäten zur Probenaufnahme wurden über Plastikämme, die an verschiedenen Positionen in die Form eingehängt werden können, hergestellt. Nach dem Aushärten wurden die Gele in die Elektrophoresekammer gelegt und mit *sodium boric acid* (SB)-Puffer übergossen.

Die Proben wurden mit Probenpuffer (siehe 2. Material) im Verhältnis 1:10 versetzt, gemischt und aufgetragen. Nach Auftragung der Proben wird eine angemessene Spannung, abhängig von der verwendeten Elektrophoresekammer und Gelgröße angelegt. Ist die Spannung zu hoch, wird das Gel zu heiß und verflüssigt sich. Das Gel wird nach Beendigung der Elektrophorese für 15 min in ein Ethidiumbromidbad ( $50 \text{ µg/l}$ ) überführt. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA an und macht diese unter UV-Licht sichtbar. Die Banden können nun zur weiteren Verwendung ausgeschnitten oder zu Dokumentationszwecken fotografiert werden. Als Größenstandard wurde die 1 kb DNA *Ladder* von Gibco, Darmstadt verwendet (Abb. 3.1).

### 3. Methoden

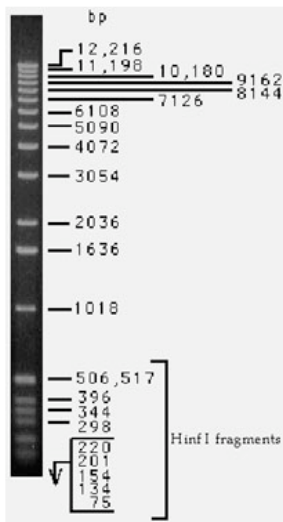


Abb. 3.1: 1 kb DNA *Ladder* (Produktinformation Gibco, Darmstadt)

#### 3.1.1.3 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Die Banden werden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zur Extraktion wurde der QIAquick® Gel Extraction Kit verwendet (siehe 2. Material). Das Gel wird in einem Guanidinthiocyanat-Puffer bei 50 °C in 10 min aufgelöst. Der Guanidinthiocyanat-Puffer sollte im Vergleich zur Masse des Gelausschnittes in dreifacher Menge eingesetzt werden. Danach fügt man Isopropanol in einem Verhältnis von 1:4 hinzu, um die Löslichkeit der DNA in wässriger Lösung zu verringern. Die Lösung wird in eine Extraktionssäule aus dem Gel Extraction Kit überführt. Die Säule wird in ein Eppendorfgefäß gesteckt und 1 min bei 17900 g zentrifugiert. Dabei bindet die DNA an die Silikaoberfläche der Extraktionssäule. Der Durchfluss wird verworfen. Zwei Waschschritte mit je 750 µl ethanolhaltigem Puffer folgen, bevor die Säule mit 35 µl doppelt destilliertem Wasser eluiert wird. Die DNA kann nun zur weiteren Verwendung eingesetzt oder bei -20 °C eingefroren werden.

#### 3.1.1.4 Enzymatischer Verdau durch Restriktionsendonucleasen

Restriktionsendonucleasen erkennen zu großen Teilen palindromische Sequenzen. Palindromische Sequenzen bestehen in beiden DNA-Strängen von 5' nach 3' aus der gleichen

### 3. Methoden

Sequenz. Beispielsweise erkennt die Restriktionsendonuclease *EcoRI* die palindromische Sequenz:



Die Endonuclease schneidet die Sequenz nach dem ersten Nukleotid G. Dadurch entstehen zwei Enden mit einem TTA-5' Überhang. Solche Überhänge werden als „Sticky Ends“ bezeichnet. Manche Endonucleasen spalten die DNA aber auch ohne Überhänge flach ab, diese Schnitte werden „Blunt Ends“ genannt.

Die Enzymaktivität wird in Units (U) angegeben. Eine Unit ist die Menge an Enzym, die 1 µg Referenz-DNA in 1 h bei 37 °C verdaut. Als Referenz-DNA dient meist die des Lambda Phagen, welche aus ca. 49000 bp besteht. Mittels dieser Referenz berechnet sich die einzusetzende Enzymmenge folgendermaßen (Formel aus *Roche Applied Science Restriction Enzymes FAQs and Ordering Guide*):

$$U = m_{\text{Plasmid}} \frac{l_{\text{Referenz-DNA}} \times n_{\text{Plasmid}}}{l_{\text{Plasmid}} \times n_{\text{Referenz-DNA}}} \times 1/\mu\text{g}$$

- U: Units
- $m_{\text{Plasmid}}$ : Masse des zu spaltenden Plasmids [µg]
- $l_{\text{Referenz-DNA}}$ : Länge der Referenz-DNA, meistens Lambda Phage [bp]
- $n_{\text{Plasmid}}$ : Zahl der Schnittstellen auf dem Plasmid
- $l_{\text{Plasmid}}$ : Länge des zu spaltenden Plasmids [bp]
- $n_{\text{Referenz-DNA}}$ : Zahl der Schnittstellen auf der Referenz-DNA, meistens Lambda Phage

Die Inkubationsdauer des Verdaus richtet sich nach der eingesetzten Endonuclease und ist meist aus den Herstellerangaben ersichtlich. Die Inkubationstemperatur wird vom Arbeitsoptimum der Endonuclease vorgegeben, liegt aber meist bei 37 °C. Die Aufreinigung der geschnittenen DNA erfolgt analog zu 3.1.1.3 Gelextraktion.



### 3. Methoden

#### 3.1.1.5 Ligation

Ligation ist die Verknüpfung von DNA-Fragmenten (3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatende einer doppelsträngigen DNA), z.B. einem aufgeschnittenen Plasmid und einer einzuklonierenden DNA („insert“), unter ATP-Verbrauch durch Bildung einer Phosphodiesterbindung (Weiss und Jacquemin-Sablon 1968). Das verwendete Enzym T4 DNA-Ligase autoinhibiert sich und sollte nicht mit zu hoher Konzentration eingesetzt werden. Die Ligation wird über Nacht bei 15 °C durchgeführt. Höhere Temperaturen sind nicht effizient (Dugaiczky et al., 1975). Es wurden nur „sticky end“-Ligationen durchgeführt. Das molekulare Verhältnis von Vektor zu Insert sollte 3:1 betragen.

#### 3.1.1.6 Transformation

Transformation beschreibt das passive Eindringen von externer DNA in eine prokaryotische Zelle. Eine erhöhte Transformationsrate kann mit kompetenten Zellen erreicht werden. Sie werden am einfachsten über die Calciumchlorid-Methode erzeugt (Dagert, et al., 1979). Die Permeabilisierung der bakteriellen Zellwand wird dabei durch eine stark hypertonische Calciumchloridlösung erzielt. Im Gegensatz zur artifiziellen Kompetenz zeigen Bakterien auch natürliche Kompetenz. Diese ist vor allem bei grampositiven Bakterien zu finden (Avery et al., 1944), wird aber auch bei gramnegativen Bakterien beobachtet (Baur et al., 1997). Im gentechnischen Bereich wird am häufigsten *Escherichia coli* (*E. coli*) verwendet. *E. coli* ist ein säurebildendes (Laktose-positiv), gramnegatives, stäbchenförmiges, Oxidase-negatives und peritrich begeißeltes Bakterium, das im Darm von Säugern vorkommt (Familie der Enterobacteriaceae (griech. „enteron“: Darm)). Benannt wurde es 1919 nach seinem Entdecker Theodor Escherich (Flamm, 2011). Der wegen seiner Unbedenklichkeit weltweit verwendete Bakterienstamm *E. coli* K12 wurde zuerst von Mandel und Higa (1970) in eine kompetente Form überführt und transformiert.

Transformationen können mittels hypertonischer Medien, Hitzeschock und/oder Elektroporation durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde ausschließlich ein Hitzeschock-Protokoll umgesetzt, welches sich als ausreichend effizient erwies. Der genaue Zusammenhang zwischen der Hitzeschock-Methode und der resultierenden Plasmidaufnahme ist noch nicht bekannt.

### 3. Methoden

Die exakte Einhaltung der Zeiten und Temperaturen sowie ein sehr langsames und vorsichtiges Pipettieren sind für ein erfolgreiches Ergebnis unabdingbar. Chemisch kompetente Zellen sind aufgrund ihrer Membranmodifikation äußerst empfindlich. Die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  lagernden kompetenten Zellen ( $50\ \mu\text{l}$ ) werden ca. 10 min auf Eis aufgetaut. Dann werden maximal 10 ng Plasmid-DNA in maximal  $3\ \mu\text{l}$  Flüssigkeit zu der Zellsuspension gegeben. Nach 30 min Inkubationszeit werden die Zellen bei  $42^{\circ}\text{C}$  für 30 sec hitzegeschockt. Die Zellen werden sofort wieder auf Eis gelagert. Nach einer weiteren Inkubation von 5 min wird  $500\ \mu\text{l}$  SOC-Medium zugegeben und die Zellen unter leichtem Schütteln bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 1 h inkubiert. Danach werden die Zellen auf einer Agarplatte mit Selektionsmedium ausplattiert. Das Selektionsmedium richtet sich nach der auf dem Plasmid kodierten Resistenz. Häufig werden Resistenzen gegen Antibiotika verwendet (z.B. Ampicillin, Kanamycin).

#### **3.1.1.7 Selektion transformierter Klone**

Die transformierten Zellen werden zur Selektion auf Agarplatten ausplattiert. Die Agarplatten enthalten Lysogeny-Broth-Kulturmedium (Bertani, 1951) mit 15 g/l Agar-Agar. Das Medium wird aufgekocht und auf  $60\ ^{\circ}\text{C}$  abgekühlt. Bei  $< 60^{\circ}\text{C}$  wird das hitzelabile Antibiotikum Ampicillin ( $25\ \text{mg/l}$ ) zugegeben. Ab  $45^{\circ}\text{C}$  kann das Medium zum Aushärten in die Petrischalen gegossen werden. Der gesamte Transformationsansatz wird auf die Agarplatte gegeben und mit einem zuvor abgeflammten Drigalskispatel verstrichen. Die Inkubation erfolgt bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht. Nach der Inkubation sind bei erfolgreicher Transformation mehrere Kolonie-bildende Einheiten (KbE) erkennbar. Diese sollten klar voneinander abgegrenzt sein, um Einzelklone picken zu können. Je ein Einzelklon wird in ein Kulturröhrchen mit flüssigem LB-Medium mit  $50\ \text{mg/l}$  Ampicillin überführt. Das beimpfte Kulturröhrchen wird über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln inkubiert.

#### **3.1.1.8 Amplifikation und Reinigung von Plasmiden**

Zur Durchführung wurde der QIAprep<sup>®</sup> Kit nach Angaben des Herstellers verwendet (siehe 2. Material). Die Amplifikation der Plasmide erfolgt in den erfolgreich transformierten

### 3. Methoden

Zellen. Diese Bakterienklone werden kultiviert (siehe 3.1.1.7. Klonselektion) und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen zur weiteren Behandlung mit NaOH und SDS lysiert. Dabei denaturieren Proteine und DNA der Zelle. Bei der anschließenden Neutralisation bildet die chromosomale DNA einen unlöslichen Komplex. Die wesentlich kleineren und zirkulären Plasmide verbleiben in Lösung. Durch Zentrifugation werden die unlöslichen Bestandteile abgetrennt (Birnboim und Doly, 1979). Der Überstand wird auf eine Silicasäule pipettiert und mittels Vakuum abgesaugt. Das negativ geladene Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA bindet über Wasserstoffbrückenbindungen an die Silanoloberflächen der Silicasäule (Abb. 3.2). Dafür ist der Entzug der Hydrathülle der DNA notwendig. Dies wird über das chaotrope Salz Guanidiniumthiocyanat und einem Anteil Isopropanol, das die DNA aus der wässrigen Phase drängt, ermöglicht.

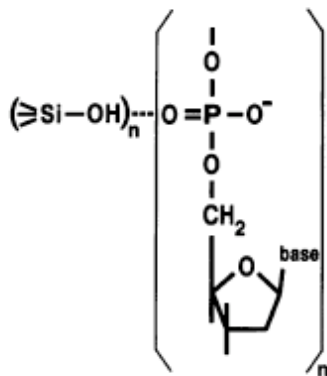


Abb. 3.2: Bindung von DNA an Silanoloberflächen über Wasserstoffbrückenbindungen nach Mao (1994).

Die Plasmide werden mit ethanolhaltigem Puffer von Salzen und weiteren Rückständen befreit. Danach wird erneut Vakuum angelegt, um das Ethanol zu entfernen. Die trockene, mit Plasmid-DNA beladene Säule wird mit doppelt destilliertem Wasser eluiert.

#### 3.1.1.9 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wird gleichzeitig bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Dies ist notwendig, da zuviel Protein die DNA-Messung stört und das Ergebnis verfälscht. Das

### 3. Methoden

Verhältnis von OD260 zu OD280 sollte dabei 1,65 – 1,85 betragen. Niedrigere Werte deuten auf eine zu hohe Proteinverunreinigung hin. Ist die Probe ausreichend sauber, entspricht ein Adsorptionswert von einer Einheit einer Konzentration von 50 µg/ml (Schultze und Heremans, 1966).

#### **3.1.1.10 Sequenzierung**

Die Sequenzierung der Plasmide wurde extern von Eurofins MWG Operon, Ebersberg durchgeführt. Die Sequenzierung von DNA wird automatisiert mit der Methode nach Sanger durchgeführt. Hierbei verwendet man Primer und eine thermostabile DNA-Polymerase in einem PCR-ähnlichen Verfahren. Die Reaktionsmischung enthält außerdem einen gewissen Anteil modifizierter Nukleotide. Bei diesen sogenannten Terminatoren handelt es sich, um 2', 3'-Didesoxynukleotide (ddCTP, ddATP, ddGTP und ddTTP). ddNTPs fehlt die 3'-OH-Gruppe der Desoxynukleotide. Wenn das ddNTP anstelle des dNTP in das naszierende Polynucleotid eingebaut wird, ist die Kettenverlängerung beendet, weil die Addition des nächsten Nucleotids eine freie 3'-OH-Gruppe erfordert (Sanger, 1977). ddNTPs sind radioaktiv oder mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert. Die Anwesenheit dieser Terminatoren in der Reaktion sorgt dafür, dass eine statistische Mischung zahlreicher Produkte unterschiedlicher Länge gebildet wird. Jedes dieser Produkte repräsentiert Art und Position einer Base der Ursprungssequenz und ist durch die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung in einer hochauflösenden Elektrophorese klar zu detektieren. Für die elektrophoretische Trennung verwendet man entweder konventionelle Polyacrylamidgele oder Polyacrylamid-gefüllte Glaskapillaren. Automatisierte Kapillarsequenziersysteme sind dabei mit Lasersystemen zur Detektion gekoppelt. Man lässt die vier Reaktionsmischungen einzeln reagieren, vereinigt sie und lässt sie elektrophoretisch auf einer einzigen Bahn auftrennen (Voet, 2002). Diese automatisierten Systeme können mit einem Primer bis zu 800 bp sequenzieren. Sind längere Sequenzierungen nötig, müssen dementsprechend mehrere Primer als neue Startpunkte eingesetzt werden.

### 3. Methoden

#### 3.1.2 Transfektion

Transfektion ist das Einbringen von exogener DNA mittels nicht viraler Methoden in eine eukaryotische Zelle. Um nicht transfizierte Zellen zu eliminieren, wird ein Resistenzgen mittransfiziert, das den transfizierten Zellen einen Wachstumsvorteil unter Selektionsdruck (meist ein Antibiotikum) verschafft.

In Hinblick auf die Größe und Ladung der DNA und der Zellmembran, sowie enzymatischen Barrieren, ist die spontane Aufnahme von DNA in die Zelle und ihr Einbau in das Genom ein sehr ineffizienter Prozess. Um dies dennoch zu ermöglichen, wurde Methoden zum Erleichtern des Prozesses entwickelt. Diese Methoden umfassen das Verwenden von Polykationen, Calciumphosphat, Liposomenfusion, Microinjektion, Elektroporation und Herstellung von Protoplasten (zur Herstellung transgener Pflanzen) (Felgner et al.,1987). Transfektionen können abnormale Auffälligkeiten der transfizierten Zellen erzeugen (veränderte Morphologie, Adhäsion, Proteom etc.), oder auch zum sofortigen Absterben führen.

##### 3.1.2.1 Lipofektion von HEK293 Zellen

Zwei Tage vor der Transfektion wurden die HEK293 Zellen mit Wachstumsmedium im Verhältnis 1:2 verdünnt. Dies ist von Vorteil, da die Transfektionseffizienz bei Zellen, die sich in der Phase des exponentiellen Wachstums befinden, größer ist. Zellkulturen, die zu 100% konfluent angewachsen sind, sollten somit zuerst passagiert werden. Die HEK293 Zellen wurden vereinigt, zentrifugiert (5 min, 300 g) und 10 min mit Accutase (ca. 1 ml auf  $1 \times 10^6$  Zellen) behandelt. Die Verwendung von Accutase verhindert die Entstehung von Zellaggregaten. Die Zellen im Innern eines Zellaggregats sind vom Transfektionsansatz abgeschirmt, und dies vermindert die Transfektionseffizienz. Anschließend werden sie mit Medium aufgefüllt (Verhältnis Medium zu Accutase sollte größer 5:1 sein) und ausgezählt. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert und auf eine Zellzahl von  $10^6$  Zellen/ml eingestellt. Für jeden Transfektionsansatz wurden 4  $\mu$ l Lipofektamin mit 96  $\mu$ l HEK293-Medium auf eine Konzentration von 40  $\mu$ g/ml verdünnt. In eine schräg liegende 12-Well Platte („Well“ bedeutet eine Mikrokavität auf einer Kunststoffplatte) werden pro Ansatz in jedes vierte Well 100  $\mu$ l HEK293-Medium und ca. 3  $\mu$ g des zu transformierenden Plasmids vorgelegt. Pro 12-Well Platte können drei Transfektionen angesetzt werden. Nach einer Inkubationszeit von 5

### 3. Methoden

min werden der Lipofectamin- und Plasmidansatz in der 12-Well Platte gemischt. Nach maximal 20 min Inkubation des Ansatzes ist die DNA vom Lipofektamin vollständig aggregiert. Dabei bindet die positiv geladene Aminogruppe des Lipofectamins (Abb. 3.3) an die negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückgrats.

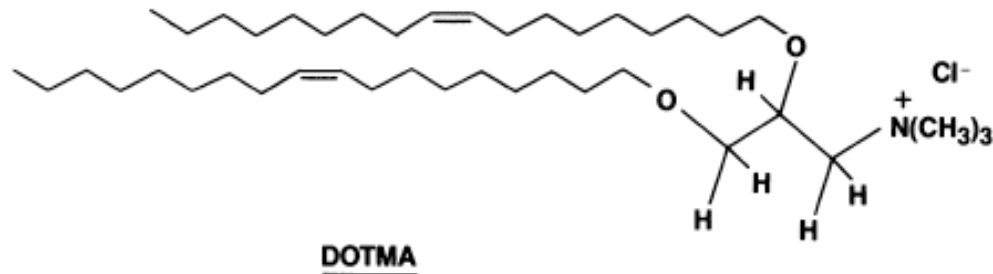


Abb. 3.3: Darstellung der Aminolipidstruktur DOTMA (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid) zum Einsatz bei der Lipofektion (Felgner et al.,1987). Molekulare Strukturen für Lipofectamin2000 im Speziellen sind nicht verfügbar.

Die äußeren Lipidstrukturen des Lipofectamin/Plasmid-Aggregats ermöglichen den Kontakt zu Zellmembranen. Die Zellen werden nun mit einem Volumen von 1 ml zu dem Lipofectamin/Plasmid-Ansatz pipettiert und die Platte nach leichtem Schwenken 5 h im Brutschrank (7,5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C) inkubiert. Danach wird jeder Ansatz mit HEK293-Medium auf 4 ml aufgefüllt und mit jeweils 1 ml auf die benachbarten drei Wells aufgeteilt.

Nach 48 h werden die Ansätze mit Puromycin (4 µg/ml) unter Selektionsdruck gesetzt. Als Kontroll-Plasmid dient ein leeres Plasmid ohne inkloniertes Gen. Diese Kontrolle dient einer Aussage über das exprimierte Konstrukt und seinen möglichen Einfluss auf die Klone.

#### 3.1.2.2 Elektroporation von CHO K1S1 Zellen (CHO Zellen)

Zwei Tage vor der Transfektion wurden die CHO Zellen mit Wachstumsmedium im Verhältnis 1:2 verdünnt. Auch hier gilt, dass die Transfektionseffizienz bei Zellen, die sich in der Phase des exponentiellen Wachstums befinden, größer ist (siehe 3.1.2.1. Lipofektion von HEK293). Das Prinzip der Elektroporation beruht auf der Beobachtung, dass durch das

### 3. Methoden

Anlegen eines starken elektrischen Impulses (Dauer  $\sim 5 \mu\text{s}$ ) die Zellmembran permeabilisiert werden kann. Dadurch entstehen in der Zellmembran für einen kurzen Zeitraum Poren, sodass exogene DNA in die Zelle gelangen kann. Die Bildung der Poren ist nicht nur von dem elektrischen Impuls abhängig, sondern auch von der Art des verwendeten Mediums. Zum Beispiel verringert die Anwesenheit von Magnesiumchlorid die Transfektionseffizienz dramatisch (Neuman et al., 1982). Die Zellmembran trennt das Medium von dem elektrisch leitfähigen Cytoplasma und stellt somit eine Isolierung dar. Elektrischer Strom kann so lange nicht fließen, bis Poren in der Membran entstanden sind. Dies geschieht bei einer Spannung von 0,2 – 1 V. Hier erreicht die transmembrane Spannung ihren kritischen Wert und eine lokale Zerstörung der Membranintegrität führt spontan zur drastischen Erhöhung ihrer Leitfähigkeit. Die nun primär entstandenen hydrophoben Poren formen sich bei Erreichen eines kritischen Radius spontan in relativ stabile hydrophile Poren (0,5 – 1 nm) um. Es wird angenommen, dass die Poren sich durch Dipolinteraktionen mit dem elektrischen Feld stabilisieren (Abb. 3.4). Die Poren haben eine Lebensdauer von wenigen Sekunden bis einigen Minuten (Chen, 2005). Die DNA gelangt nun durch einfache Diffusion in die Zelle. Im Zwei-Puls-Verfahren ermöglicht eine schwache Spannung nach der eigentlichen Elektroporation das Eindringen der DNA durch Elektrophorese (Sukharev, 1992).

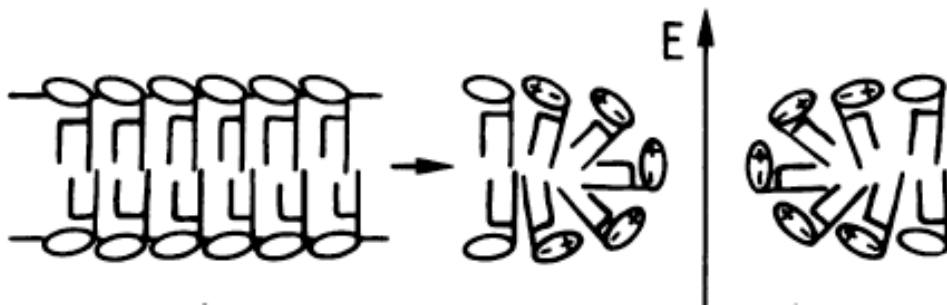


Abb. 3.4: Bildung einer hydrophilen Pore und deren Stabilisierung durch Dipolinteraktionen der Lipidkopfgruppen

Zur Wiederherstellung der Membranintegrität müssen die Poren wieder geschlossen werden. Dies wird durch das Absenken der Temperatur erzielt. Nach der Elektroporation werden die Zellen kurzzeitig auf Eis gelagert. Die Elektroporation der CHO Zellen wurde mit einem Amaxa<sup>®</sup> Nucleofector Elektroporator nach dem Protokoll des Cell Line Nucleofector Kit V (Amaxa<sup>®</sup>) für CHO-K1 Zellen [ATCC Cat. No. CCL-61] durchgeführt.

### 3. Methoden

Um Einzelklone zu kultivieren, wird der Elektroporationsansatz mit Kulturmedium auf 4 ml aufgefüllt und auf 1 ml-Portionen verteilt. Diese Ansätze werden 48 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wird jeder Ansatz mit Selektionsmedium (Kulturmedium mit 5 mg/ml Geneticin) auf 80 ml aufgefüllt. Die nun stark verdünnte Zellsuspension wird mit einer Mehrkanalpipette in eine 96-Well Platte pipettiert (200 µl pro Well). Statistisch enthält jedes Well nur einen Klon. Pro Elektroporationsansatz können somit  $4 \times 96 = 384$  Einzelklone produziert werden. Die Einzelklone werden mindestens zwei Wochen bei 37°C inkubiert und anschließend auf Wachstum und Expressionsleistung untersucht.

#### 3.1.3 Klonselktion

Der Erfolg einer Transfektion kann je nach Konstrukt verschieden definiert sein. Meist ist jedoch die Quantität oder auch die Qualität der exprimierten Konstrukte von entscheidender Wichtigkeit. Die Produktrate (mg/l) wird im Überstand oder im Zellysat bestimmt. Die Produktqualität kann z.B. über Faltungszustand oder posttranslationale Modifikationen (Glycosidierungsmuster) definiert sein. Die Selektion in dieser Arbeit erfolgte ausschließlich nach der Produktrate. Diese wurde je nach Produkt und Screeningaufwand über Westernblot, Dotblot oder ELISA bestimmt.

Dabei wurde unterschieden zwischen Klonen zur Produktion von aufgereinigtem Zielprotein und Klonen, die zum Versuchsaufbau für zellbiologische Fragestellungen genutzt wurden. Folgende Konstrukte wurden fermentiert und aufgereinigt:

- GFP-Fusionsproteine
- CDNF mit C-terminalem Hexahistidin-Tag
- SAPLIP-Domäne mit C-terminalem Hexahistidin-Tag

Die Selektion des Produktionsklons erfolgte nach der Menge an sekretiertem Zielprotein. Dafür wurde nach Transfektion ein Vorscreening unternommen, um potentiell Zielprotein sekretierende Klone zu selektieren. Diese wurden darauf folgend in größerem Maßstab kultiviert (T-Flaschen). Nach dem Umsetzen in das größere Volumen wurden die Klone einmal passagiert. Nach erneutem Anwachsen der Klone wurde der Kulturüberstand erneut vermessen und der Klon mit der besten Produktionsrate (Menge an Zielprotein in mg/l) zur weiteren Verwendung ausgewählt. Zur Absicherung gegen einzelne Klonausfälle während des



### 3. Methoden

*scale up* wurden die drei Klone mit der besten Produktionsrate einer Transfektion kryokonserviert.

Folgende Konstrukte wurden nicht zur Produktion von Zielprotein eingesetzt:

- Natives MANF
- Natives CDFN
- CDFN-Mutanten mit veränderten C-terminalen Sequenzen

Nach der Transfektion wurde das Screening direkt unternommen und die Klone mit der besten Expressionsrate verwendet. Dabei wurde zwischen zellulärem und externem Zielprotein unterschieden. Die drei bis fünf besten Klone einer Transfektion wurden daraufhin zur weiteren Verwendung kryokonserviert.

#### **3.1.4 Kryokonservierung von kultivierten Säugetierzellen**

Die kultivierten Säugetierzellen sollen sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Die Zellsuspension, z.B. aus einer T80-Flasche (ca. 25 ml Zellsuspension), wird zentrifugiert (200 g, 5 min). Anschließend werden die Zellen mit 5 ml Accutase für 10 min vereinzelt. Das konditionierte Medium wird zur späteren Verwendung aufgehoben. Danach werden 35 ml Normalmedium zugesetzt, die Zellzahl bestimmt und erneut zentrifugiert. Die enthaltene Accutase wird durch die Verdünnung mit Kulturmedium stark reduziert, sodass die Zellen keinen weiteren Schaden nehmen. Nach dem Zentrifugieren werden die Zellen in einem speziellen Medium zur Kryokonservierung aufgenommen und auf eine Zelldichte von  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Dieses auf 4°C gekühlte Medium setzt sich wie folgt zusammen:

- 50% konditioniertes Medium
- 42,5% frisches Medium
- 7,5% Dimethylsulfoxid (DMSO)

DMSO reduziert die Bildung spitzer Eiskristalle und schützt so die Zellmembranen. Um die Eiskristallbildung noch weiter einzuschränken, wird ein schneller und kontinuierlicher Einfrierschritt bevorzugt. Dafür wird die fertige Zellsuspension zu Einheiten von ca. 1,5 ml in

### 3. Methoden

Kryoröhrchen aufgeteilt und in ein spezielles Behältnis (Kryostat) eingesetzt. Der Kryostat ist ein doppelwandiges Gefäß, das auf 4°C vortemperiert wird. Die Doppelwände des Kryostaten sind mit Isopropanol gefüllt, welches einen niedrigeren Gefrierpunkt als Wasser hat. Dadurch wird den Kryoröhrchen die Wärme gleichmäßiger entzogen. Der Kryostat wird 24 Stunden in einer Tiefkühltruhe (-80 °C) gelagert, anschließend werden die Kryoröhrchen in eine Ultragefriertruhe (-150 °C) überführt. Zur Kontrolle der Vitalität wird nach 24 h ein Kryoröhrchen aufgetaut und kultiviert.

#### 3.1.5 „Seed train“

“Seed train“ beschreibt das Überführen von Zellkulturen in konsekutiv größer werdende Kulturmedienvolumina bis zum Animpfen des Fermenters. Im Gegensatz zu prokaryotischen Fermentationen, bei denen sehr große Verdünnungen der Animpfkultur möglich sind, sollten tierische Zellkulturen höchstens 1:10 verdünnt werden. Die Vitalität der Zellen kann bei höheren Verdünnungen drastisch zurückgehen. Im Extremfall stirbt die Zellkultur ab.

Die jeweils stark angewachsenen Zellkulturen werden in folgende Volumina überführt:

Kryokultur mit mindestens  $5 \times 10^6$  Zellen/ml → 25 ml T80-Flasche → 80 ml T175-Flasche  
→ 500 ml Rollerflasche

Der Fermenter, unabhängig vom Gesamtvolumen, wird mit Zellzahlen von  $>2 \times 10^5$  Zellen/ml angeimpft, um ein kontinuierliches Wachstum zu gewährleisten.

#### 3.1.6 Fermentation

##### 3.1.6.1 Rührkesselreaktor

Das wahrscheinlich erste aus einer fermentierten eukaryotischen Zellkultur gewonnene Produkt war ein Impfstoff gegen Maul- und Klauenseuche. Dieses Produkt wurde 1965 in einem 30 l Bioreaktor in *Baby Hamster Kidney* (BHK)-Zellen erzeugt (Capstick et al., 1965). Seitdem wurden viele Prozesse zur Herstellung von rekombinanten Proteinen entwickelt, die

### 3. Methoden

zuvor durch ineffizientere Prozesse aus Serum oder Gewebe extrahiert werden mussten. Dabei spielt eine effiziente Fermentation die entscheidende Rolle. Trotz der Entwicklung verschiedener Bioreaktormodelle (Schüttelreaktoren, Schlaufenreaktoren, Wirbelschichtreaktoren etc.), wird die Fermentation von Zellkulturen größtenteils in Rührkesselreaktoren (Stirred Tank Reaktor, STR) durchgeführt. Der Grund dafür sind umfangreiche Erfahrungen und die daraus resultierende theoretische Beschreibbarkeit des Systems. Viele Parameter sind bekannt oder können berechnet werden, und somit wird eine umgestaltbare Designgrundlage sowie spätere Automatisierung des Systems ermöglicht. Die Dimensionen eines STR sind beliebig auslegbar. Zu beachten ist jedoch das Verhältnis von Höhe (H) zum Durchmesser (D). Dieses Verhältnis, auch Schlankheitsgrad  $s$ , wird zwischen 2 und 3 gewählt (Chmiel, 2005):

$$s = \frac{H}{D}$$

Dies hat im Wesentlichen zwei Gründe:

- Der eingeblasene Sauerstoff hat eine längere Verweilzeit im Reaktor und hat mehr Zeit sich zu lösen.
- Die Temperatur des Reaktorinhalts kann besser geregelt werden.

Die Kultivierung von Zellkulturen im STR entspricht weitestgehend der Kultur von Mikroorganismen. Die Scherempfindlichkeit der Zellkulturen erfordert jedoch den Einsatz von speziellen Rührern und erlaubt nur geringe Rührgeschwindigkeiten. Während dieser Arbeit wurden ausschließlich Schrägblattrührer („Elefantenohr“) im Winkel von ca. 45° verwendet. Der weitere Aufbau des Fermentationsprozesses erfolgte nach Abb. 3.5.

Nach dem Aufbau werden die Begasungsschläuche abgeklemmt und ein Überdruck im System erzeugt. An den Filter der Abluft wird ein Barometer geklemmt und über die Luftzufuhr der Druck erhöht. Bei einem Druck von  $> 300$  mbar wird der Überdruck abgestellt. Bleibt der Überdruck stabil, ist das System hermetisch abgeriegelt und kann zur Sterilisation in einen Autoklaven gestellt werden.

Alle Fermentationen wurden im Batch- bzw. Fed-Batch-Betrieb durchgeführt. CHOK1 Klone wurden in 10 l Glasfermentern kultiviert. Die Fermenter wurden über Biostat B-DCU

### 3. Methoden

Fermentationssysteme gesteuert. Die Kontrolle der Fermentation erfolgte über das Program MFCS/win. Folgende Regelparameter wurden verwendet:

Rührergeschwindigkeit	200 U/min
Temperatur	37 °C
pH (1 M NaOH)	7.0
O <sub>2</sub> -Sättigung	5%
Overlay mit Luft	1 l/min
Gasinput via Ringsparger am Fermenterboden (Luftbegasung)	

Der Fermenterüberstand wurde mit Luftdruck über ein Tiefenfiltersystem geerntet und in einen sterilen Plastiksack gedrückt.

3. Methoden

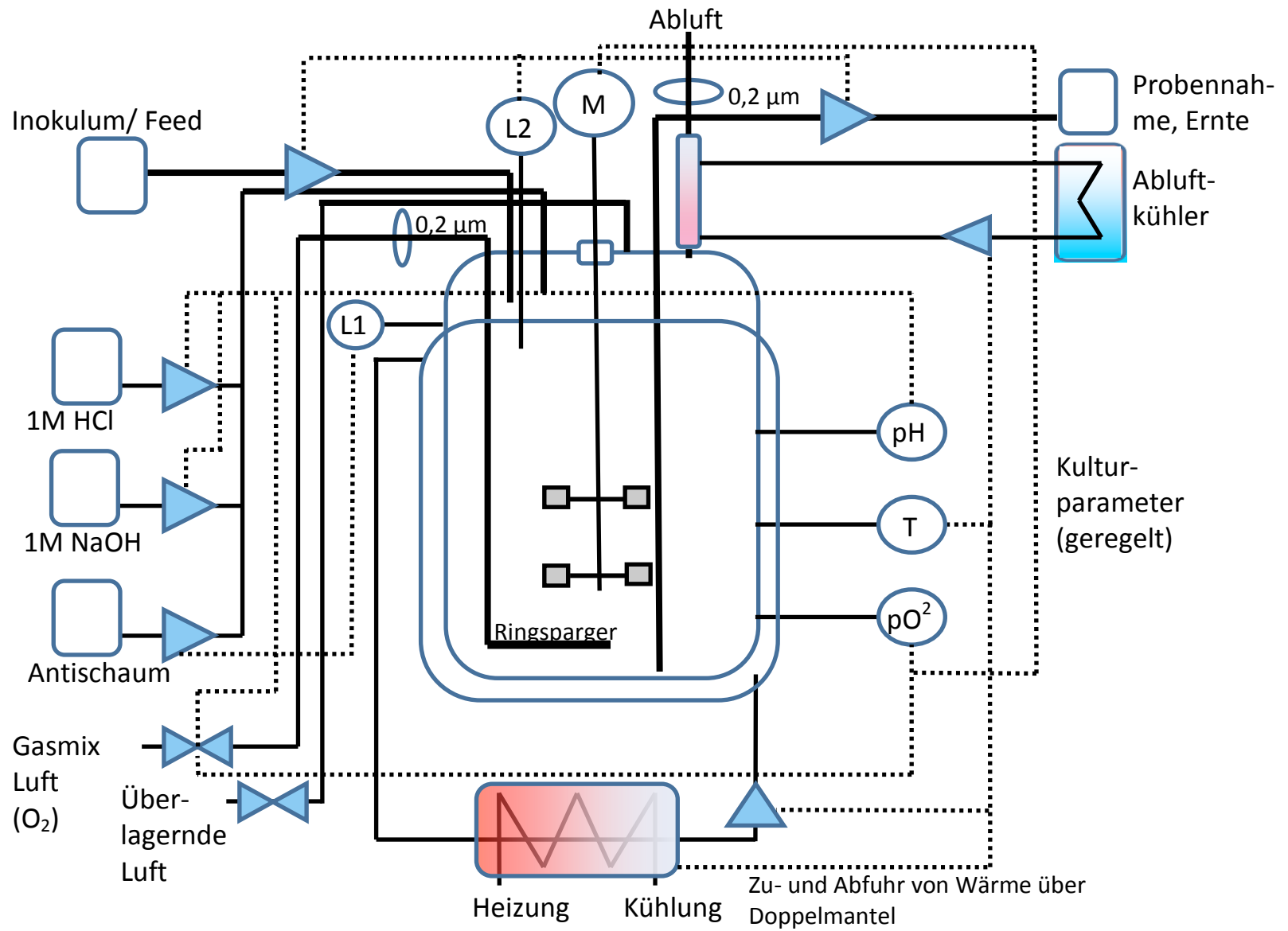


Abb. 3.5: Fließbild des Fermentationsprozesses.

### 3. Methoden

#### 3.1.6.2 WAVE Schüttelreaktor

Der WAVE Schüttelreaktor ist ein Einmalsystem zur Fermentation. Auf einer Schüttelplatte liegt ein mit Medium gefüllter Plastiksack. Der Plastiksack wird begast, wobei die gleichen Parameter wie bei dem zuvor genannten Rührkesselreaktor (siehe 3.1.6.1 Rührkesselreaktor) geregelt werden können. Durch die Schüttelplatte wird eine Welle erzeugt, die einen verbesserten Eintrag von Gasen ins Medium ermöglicht. Die Schüttelfrequenz der Platte wird geregelt, um den Eintrag von Gasen ins Medium zu steuern.

Es wurden insgesamt drei Fermentationen im 10 l Maßstab durchgeführt. Während der Fermentationen zeigte sich eine erhöhte Empfindlichkeit der Klone gegenüber dem im Schüttelreaktor auftretenden Stress. Die Vitalität der Zellen verschlechterte sich, und die Fermentationen mussten abgebrochen werden. Aufgrund dessen wurden weitere Fermentationen nur noch in Rührkesselreaktoren durchgeführt.

## 3.2 Analytik

### 3.2.1 BCA-Gesamtproteinanalyse

Der quantitative Nachweis des Proteingehaltes erfolgte mittels der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  an funktionellen Gruppen der Proteine und der resultierenden Komplexbildung des farbstoffbildenden Reagenzes Bicinchoninsäure (BCA) (Abb. 3.6) (Smith et al., 1985).

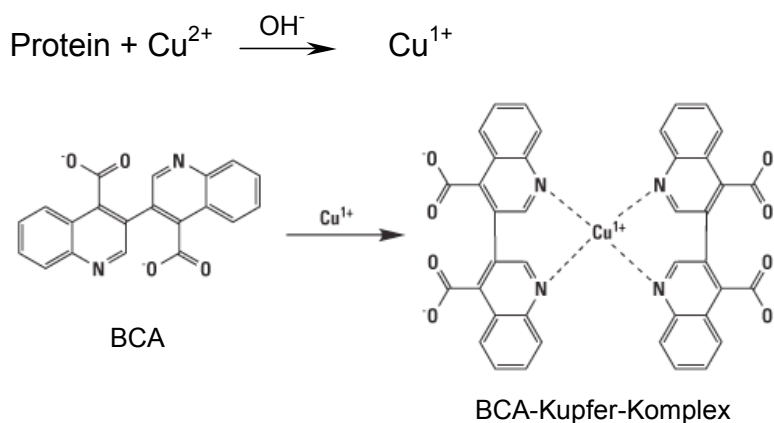


Abb. 3.6: Komplexbildung des einwertigen Kupfers mit BCA (Smith et al., 1985)

### 3. Methoden

Die Intensität des Farbstoffumschlags korreliert mit der Konzentration der Proteine und wird photometrisch bei 562 nm bestimmt. Unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes wird die gemessene Absorption als Funktion der Proteinkonzentration graphisch dargestellt und der molare Absorptionskoeffizient aus dem Anstieg der resultierenden Geraden bestimmt (Software gesteuert).

Die Verdünnung der Proben erfolgt hierzu in der Regel 5-fach, 10-fach, 20-fach und 50-fach. Bei der Erstellung der Kalibriergeraden diente Rinderserumalbumin (BSA, bovine serum albumin) als Standard. Die Stammlösung hatte eine Konzentration von 1 mg/ml. Der Standard wurde zur Erstellung einer Kalibriergeraden mehrfach verdünnt und doppelt gemessen. Die Messung erfolgte in einer Mikrotiterplatte. Zur Durchführung wurde der Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### **3.2.2 UV Gesamtproteinanalyse**

Aromatische Aminosäuren und die Peptidbindung der Proteine absorbieren UV-Licht mit einer Wellenlänge von 280 nm. Diese Eigenschaft erlaubt eine schnelle Abschätzung der Gesamtproteinmenge einer Lösung. Eine 100 µl fassende Quarzküvette wird mit der zu bestimmenden Proteinlösung befüllt. Die Proteinlösung muss verdünnt werden, wenn sie außerhalb des linearen Messbereichs (100 – 900 mU) des Photometers liegt.

#### **3.2.3 SDS-Gelelektrophorese**

Die diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) trennt Proteine ihrer Größe nach auf. Die Poren des eingesetzten Polyacrylamidgels wirken dabei als Netz. Das Mischungsverhältnis von Acrylamid zu N,N-Methylenbisacrylamid bestimmt die Porengröße des Gels. Je nachdem, in welchem Größenbereich eine möglichst gute Auftrennung erfolgen soll, werden spezifische Mischungsverhältnisse verwendet. Durch Natriumdodecylsulfat (SDS) im Probenpuffer wird die Nettoladung der Proteine aufgehoben und die Proteine durch SDS-Anlagerung durchgehend negativ geladen. Eine Auftrennung des Proteingemischs nach der Größe der vorliegenden Proteine ist nun möglich, da die negative

### 3. Methoden

Ladung proportional zum Molekulargewicht der Proteine steht. Diese würden ansonsten aufgrund ihrer unterschiedlichen isoelektrischen Punkte und des umliegenden pH-Wertes keine einheitliche Richtung im elektrischen Feld einnehmen. Die Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld ist direkt proportional zu ihrer Gesamtladung und indirekt proportional zu ihrer Masse. Weiterhin wird unter reduzierenden Bedingungen die Struktur der Proteine durch Thiolverbindungen (z.B.  $\beta$ -Mercaptoethanol) gebrochen.

Zur Durchführung werden die Proben mit Probenpuffer (siehe 2. Material) versetzt. Der Probenpuffer enthält SDS,  $\beta$ -Mercaptoethanol, einen Farbstoff zum Visualisieren der Laufstrecke und PEG oder Glycerin zum Erhöhen der Dichte der Probe. Durch die höhere Dichte sinkt die Probe in die Gelkammern ein. Zur Denaturierung der Proteine werden die Proben vor dem Auftragen für 10 min bei 94°C erhitzt. Danach werden sie in die vorgesehenen Geltaschen pipettiert. Das Gel wird in die Elektrophoresekammer eingespannt, und die Kammer wird mit Puffer befüllt. Danach sollten die Proben bei ca. 100 V in das Gel einlaufen. Nachdem die Proben vollständig in das Gel eingesunken sind, kann die Spannung auf ca. 200 V erhöht werden. Zur Durchführung wurde das NuPAGE-System von Invitrogen, Darmstadt nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### **3.2.3.1 Färbung von Gelen mit Coomassie Blue**

Nach der Elektrophorese wird das Gel 3x 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen, um Pufferrückstände der Elektrophorese zu entfernen. Danach wird die „ready to use“ Färbelösung Coomassie Blue auf das Gel gegeben. Bei dem organischen Farbstoff Coomassie Brilliant Blue handelt es sich um einen Säurefarbstoff (Triphenylmethan). Der Farbstoff wird in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form durch die Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein stabilisiert. Er bindet dabei unspezifisch an kationische und unpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine (Produktinformation der Firma Sigma-Aldrich, München). Die Inkubationszeit variiert mit der Stärke der Banden. Eine gute Färbung wird jedoch stets nach einer längeren Inkubation über Nacht erzielt. Danach wird das Gel erneut für eine bis mehrere Stunden mit entmineralisiertem Wasser gewaschen. Ziel ist, die unspezifische Hintergrundfärbung des Gels so gut wie möglich zu eliminieren. Die Empfindlichkeit der Methode liegt bei ca. 20 ng pro Bande.



### 3. Methoden

#### **3.2.3.2 Silberfärbung von Gelen**

Grundlage der Silberfärbung ist die Komplexbildung zwischen Glutaminsäure-, Asparaginsäure- und Cysteinresten der Proteine und den Silberionen der Färbelösung. Bevorzugt durch die Carboxyl- und Sulfhydrylgruppen werden die Silberionen zu metallischem Silber reduziert und Kristallisationskeime gebildet (Rabilloud, 1988). Die Komplexbildung des Silbers an den Proteinen ist von entscheidender Bedeutung bei der späteren Entwicklung der Banden, bei der die Reduktion des Silbers drastisch erhöht wird. Die Komplexbildung ist dabei die notwendige Reaktion, um das Signal-Rausch-Verhältnis zugunsten der Proteinbanden positiv zu beeinflussen (Rabilloud, 2009). Durch die vorherige Inkubation der Gele mit reduzierendem Natriumthiosulfat wird ein zusätzlich verbessertes Färbeverhalten der Proteinbanden zum Hintergrund erzielt (Blum et al., 1987). Alternativ kann auch Glutaraldehyd verwendet werden, welches zusätzlich die Proteine quervernetzt (Porro et al., 1982). Die anschließende Behandlung mit Formaldehyd reduziert Silberionen zu elementarem Silber, welches die Proteinbanden bräunlich-schwarz färbt. Gestoppt wird die Reaktion, indem der pH-Wert in den sauren Bereich verschoben wird. Gute Färbeprotokolle erlauben eine Nachweisgrenze von bis zu 0,1 ng pro Bande. Die Proteine binden Silberionen in nicht stöchiometrischem Verhältnis. Zur Durchführung wurde der SilverXpress<sup>®</sup> Kit von Invitrogen, Darmstadt nach Angaben des Herstellers verwendet (siehe 2. Material).

#### **3.2.3.3 Westernblot**

Um Proteine spezifisch in Proteingemischen nachweisen zu können, wird das Westernblot-Verfahren angewendet. Die Proteine des SDS-Gels werden dabei elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose- oder Polyvinylidendifluoridmembran übertragen (Towbin et al., 1989). Der Transfer auf die Membran erfolgt senkrecht zur Trennrichtung des SDS-Gels und spiegelt somit dessen Auftrennung wieder. Der Transfer kann über zwei Verfahren erfolgen: Semi-Dry oder Wet Blot. Der Semi-Dry Blot zeichnet sich durch geringeren Verbrauch von Transferpuffer aus, ist aber vom Trennverfahren her identisch mit dem Wet Blot. In dieser Arbeit wurde ausschließlich der Wet Blot verwendet. Nach dem Blotten können die immobilisierten Proteine mit spezifischen Antikörpern markiert und gefärbt werden.

### 3. Methoden

Die für den Wet Blot benötigte Blotkammer wird leicht schräg in eine saubere Laborschale gelegt. Die weiteren Komponenten werden ähnlich eines Sandwichs aufeinander folgend und zwingend luftblasenfrei in die Blotkammer gelegt (Abb. 3.7). Schwämme, Filterpapiere und die Membran werden vorher in Transferpuffer getränkt. Das SDS-Gel wird vor dem Überführen in die Blotkammer mit Wasser abgewaschen. Der fertige Blotaufbau wird mit dem Deckel der Blotkammer verschlossen und in die Elektrophoresekammer überführt. Die Blotkammer wird mit Transferpuffer geflutet. Das Blotten erfolgt bei 160 V, 25 A für ca. 1 h.

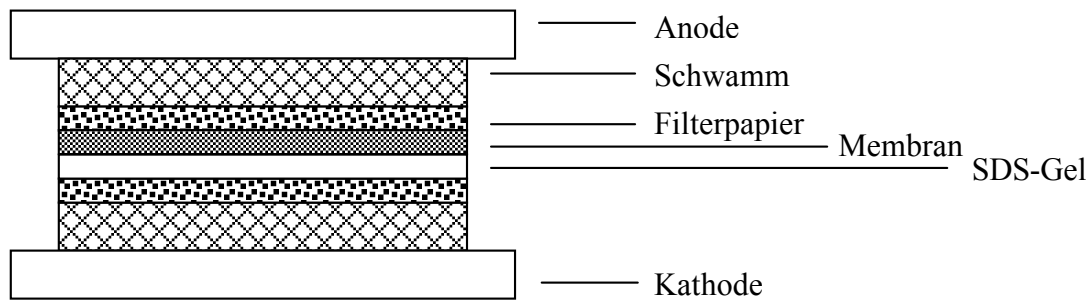


Abb. 3.7: Schematischer Aufbau eines Westernblots

Nach dem Blotten wird die Membran für mind. 1 h mit Magermilchpuffer (Tris Buffered Saline (TBS)-Puffer, pH 8,0, mit 3 % Nonfat Milk) geblockt. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Erstantikörper, der, je nach Antikörper und Hersteller, 1:500 -1:2000 in Magermilchpuffer verdünnt wird. Die Inkubationszeit sollte  $> 4$  h betragen. Ist der Erstantikörper direkt markiert, kann nach dreimaligem Waschen (2x 20 mM TBS-Puffer, 0,1% Tween pH 8,0; 1x 20 mM TBS-Puffer, pH 8,0) der Membran die Farbreaktion erfolgen. Sollte ein markierter Zweitantikörper benötigt werden, wird nach dem Waschen die Membran erneut mit dem Zweitantikörper, analog zum Erstantikörper, inkubiert und erneut gewaschen.

#### 3.2.4 Dotblot

Um CHO Einzelklone qualitativ schneller screenen zu können, wird ein Dotblot durchgeführt. Dabei wird eine Nitrozellulosemembran in eine Vakuumapparatur gespannt. Diese besteht aus einem Oberteil mit 96 Kavitäten, die durch einen Dichtring verschlossen sind. Die Dichtringe befinden sich an der Seite, die der Membran aufsitzt. Zwischen dem Oberteil und dem

### 3. Methoden

Unterteil wird die Membran eingelegt. Das Unterteil hat eine Vertiefung zum Auffangen der Probenflüssigkeit, einen Vakkumanschluss und Klammern zum festen Verbinden des Oberteils mit der dazwischen liegenden Membran (Abb).

Von den Einzelklonen wird 50 µl Zellsuspension entnommen und abzentrifugiert (13600 g, 1 min). Der Überstand wird restlos in die Kavitäten der Dotblot-Apparatur pipettiert. Jede Kavität entspricht dabei einem Einzelklon oder den mitgeführten Kontrollen. Nachdem alle Kavitäten befüllt sind, wird für 2 min Vakuum angelegt. Die restliche Probenflüssigkeit wird dabei durch die Membran gesaugt. Die Detektion spezifischer Proteine auf der Nitrozellulosemembran durch Antikörperreaktionen erfolgt analog zur der des Westernblots (siehe 3.2.3.3. Westernblot).

#### 3.2.5 MTT-Test

Der MTT-Test für adhärenente Zellen ist ein kolorimetrischer Test zur Bestimmung der Vitalität eukaryotischer Zellkulturzellen. Das gelbliche 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) wird dabei von mitochondrialen Dehydrogenasen in vitalen Zellen zu unlöslichem, lilafarbenem Formazan reduziert (Abb. 3.8).

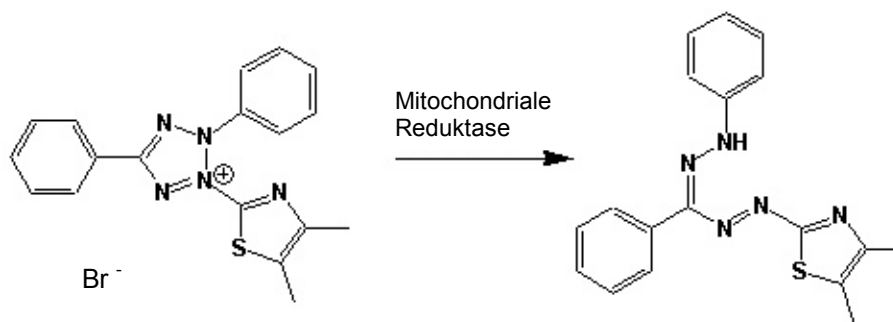


Abb. 3.8: Reduktion des gelblichen MTT-Tetrazoliumsalzes zu lilafarbenem Formazan durch aktive mitochondriale Dehydrogenasen (Mosmann, 1983).

Nach Lyse der Zellen wird die Absorption des freigesetzten Formazans spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm (gegen die Referenzwellenlänge 630 nm) gemessen. MTT absorbiert bei dieser Wellenlänge nicht (Mosmann, 1983).

### 3. Methoden

Nach erfolgter Inkubation der adhärenenten neuronalen Zellen werden in jedes *Well* einige Milliliter einer 10 x MTT-Stammlösung (5 mg/ml) zugegeben. Die exakte Menge richtet sich nach der Endkonzentration, die 0,5 mg/ml MTT betragen soll. Die Zellen werden nach Zugabe 1 h bei 37°C inkubiert. Das Medium wird abgesaugt und die Platten bei -80°C für mindestens eine Stunde gelagert. Danach werden 50-100 µl DMSO (Volumen für 96-Well Platten) einpipettiert und die Platten unter Schütteln bei 37°C 1 h inkubiert. Die Platten können nun spektralphotometrisch vermessen werden.

Durch die mangelhafte Umsetzung des MTT-Reagenz durch LUHMES-Zellen musste der MTT-Tests durch weitere Schritte ergänzt werden. Teilweise reichte die Umsetzung des MTT-Reagenz durch LUHMES-Zellen nicht aus, um ein ausreichendes photometrisches Signal zu erzeugen. Dies ist besonders bei der Kultivierung in 96 *Well* Platten häufig aufgetreten. Die wenigen Zellen innerhalb einer Kavität setzten nicht genügend Reagenz für eine valide Auswertung um. Daraufhin wurden LUHMES-Zellen in den größeren Kavitäten einer 24 *Well* Platte kultiviert. Das umgesetzte MTT-Reagenz in der 24 *Well* Platte wurde mit 170 µl DMSO gelöst und in eine 96 *Well* Platte überführt. Durch diesen Schritt konnten genauere Messungen im linearen Messbereich (0,1- 1 U) des Photometers durchgeführt werden.

#### 3.2.6 ELISA

Die Technik des enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) wurde 1971 erstmals für eine Immunglobulin G-Analyse beschrieben (Envall und Perlman, 1971). Die ELISA-Technik beschreibt ein immunologisches Verfahren, welches die Affinität zwischen Antigen und Antikörper zum quantitativen Nachweis von Strukturelementen anhand einer Standardreihe nutzt. Ein Antigen oder Antikörper wird hierbei mit einem Enzym gekoppelt, welches ein spezifisches Substrat umsetzt. Dieses erzeugt einen detektierbaren Farbumschlag, der proportional zum umgesetzten Substat ist. Der hier verwendete Sandwich-ELISA verwendet zwei Antikörper, die verschiedene Strukturen (Epitope) des zu quantifizierenden Antigens binden. Der Erstantikörper wird auf einer 96-well Mikrotiterplatte immobilisiert und anschließend mit dem Antigen inkubiert. Nach dem Auswaschen des nicht gebundenen Antigens wird der Zweitantikörper hinzugegeben. Dieser ist mit Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase = HRP) markiert. Das Substrat 3, 3', 5, 5'- Tetramethylbenzidin (TMB) wird in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid durch HRP-Katalyse polymerisiert. Die



### 3. Methoden

Die Mikrotiterplatte wird 3x mit 300 µl PBS-Puffer pro Well gewaschen.

- **Inkubation mit dem Detektionsantikörper**

Der mit HRP konjugierte Detektionsantikörper (Verdünnung 1:20000 in PBS-Puffer) wird an das Antigen gebunden. Die Inkubationszeit beträgt 1 h.

- **Waschen**

Die Mikrotiterplatte wird 3x mit 300 µl PBS-Puffer pro Well gewaschen.

- **Farbreaktion**

Die Umsetzung von TMB erfolgt für ca. 30 min in einer dunklen Kammer.

- **Stopp**

Die Umsetzung wird mit Schwefelsäure gestoppt.

- **Detektion**

Der Farbumschlag wird mittels Plattenreader detektiert. Die Intensität des Farbumschlags korreliert mit der Proteinkonzentration der Probe. Anhand einer Standardkurve mit bekannten Albuminkonzentrationen werden die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt.

#### 3.2.7 Proteinfällung

Die Proben werden mit 50%-iger Trichloressigsäure (trichloroacetic acid: TCA) in einem Verhältnis von 4:1 (Probenvolumen zu TCA-Lösungsvolumen) und einer 1%-igen Triton X-100 Lösung im Verhältnis 8:1 (Probenvolumen zu Triton X-100-Lösungsvolumen) versetzt. Triton X-100 dient hierbei als Detergenz, um eine homogene Durchmischung zu erzielen. Die Proben werden zentrifugiert (13600 g, 5 min) und das Sediment in 2 M TBS-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Die Menge an TBS-Puffer richtet sich nach der Löslichkeit des Sediments und der gewünschten Ankonzentrierung. Die Schritte sollten zügig hintereinander erfolgen, da eine längere Inkubation der Proben mit dem TCA/Triton X-100-Gemisch eine schlechtere Löslichkeit der ausgefallenen Proteine zur Folge hat.

### 3. Methoden

#### 3.3 Aufreinigung der GFP-Konstrukte, CDFN und SAPLIP-Domäne

Die Aufreinigung der heterolog exprimierten Proteine erfolgte nach zwei Mustern, die aus den jeweiligen Aufreinigungsentwicklungen hervorgingen. Die GFP-Konstrukte (Abb. 3.10) und CDFN, sowie dessen separat produzierte SAPLIP-Domäne (Abb. 3.11), wurden über zwei verschiedene Schemata gereinigt.

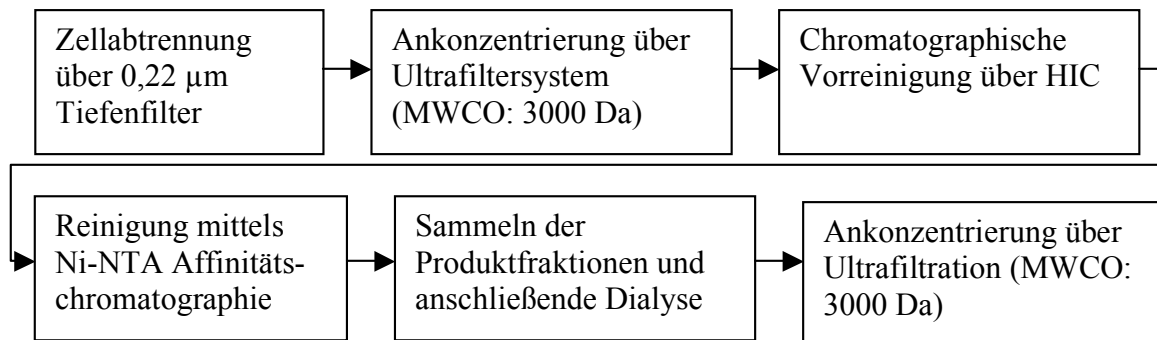


Abb. 3.10: Schema der Aufreinigung der GFP-Konstrukte

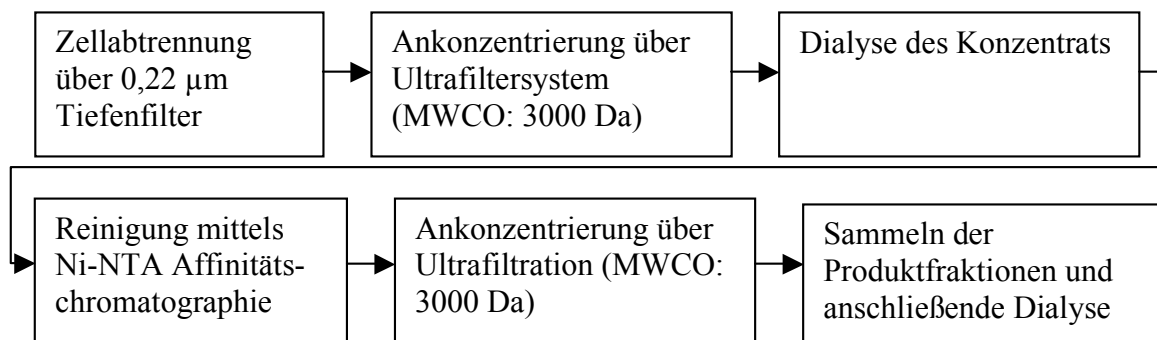


Abb. 3.11: Schema der Aufreinigung von CDFN und SAPLIP-Domäne

Im Weiteren werden die einzelnen Aufreinigungsschritte näher beschrieben.

##### 3.3.1 Präparative Chromatographie

Die chromatographische Trennung eines Gemischs erfolgt durch die Verteilung der zu trennenden Stoffe zwischen einer stationären und einer mobilen Phase. Die für die Trennung

### 3. Methoden

erforderlichen physikalischen Vorgänge können in zwei Gruppen geordnet werden:

- Adsorptions-Chromatographie ist die Trennung durch Adsorption an der Oberfläche der stationären Phase.
- Verteilungs-Chromatographie ist die Stofftrennung durch den Lösevorgang in beiden, miteinander nicht mischbaren Phasen.

Beide Trennprinzipien kommen meistens nicht rein sondern in unterschiedlichem Maße gemischt vor. Die hier verwendeten chromatographischen Methoden sind Ionenaustausch- (IEXC), hydrophobe Interaktions- (HIC) und Affinitätschromatographie (Nickel/Kupfer-Nitrilotriessigsäure (Ni/Cu-NTA)). Ionenaustausch- und Kupferchelatchromatographie wurden nur zu Versuchszwecken durchgeführt. Zur Affinitätsreinigung wurde ein Ni-NTA-Material gewählt. Nickel zeigte gegenüber Kupfer während eigener Vorexperimente in kleinerem Maßstab bessere Aufreinigungseigenschaften. Ni-NTA bindet spezifisch die Imidazolgruppe von repetitiven Histidinsequenzen (Abb. 3.12). Hierzu werden mithilfe entsprechender codierender Sequenzen an die exprimierten Proteine N- oder C-terminal sechs Histidinreste angehängt.

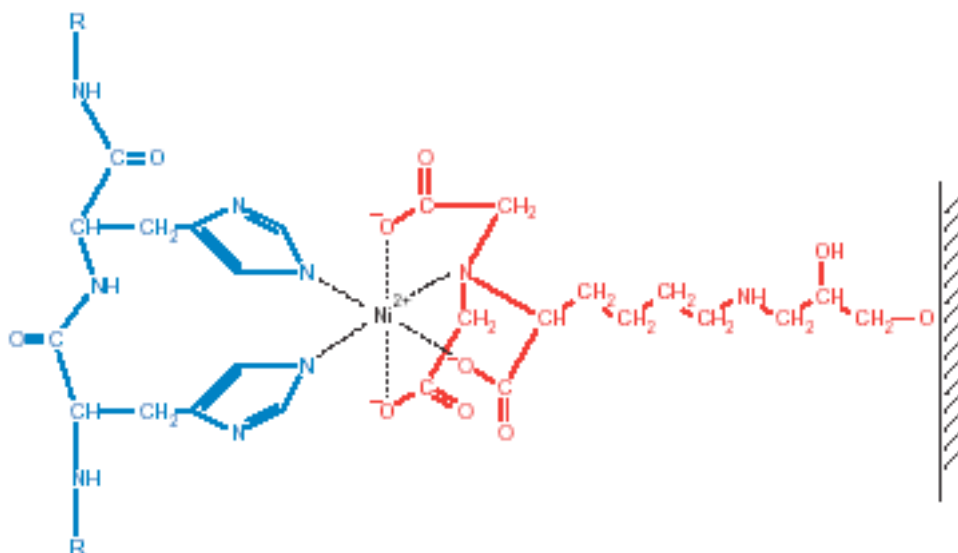


Abb. 3.12: Komplexbildung der funktionellen Gruppe des NTA-Trägermaterials beladen mit Nickel und zwei Histidin-Resten (schematisch) (The QIAexpressionist Handbuch, 2002).

Die Elution erfolgt über Verdrängung der Histidine aus dem Chelatkomplex durch Imidazol (Abb. 3.13).



### 3. Methoden

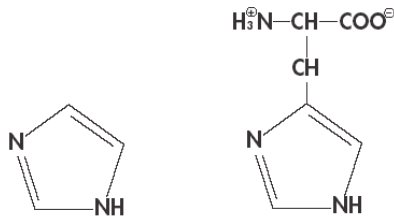


Abb. 3.13: Das Elutionsmittel Imidazol im Vergleich zum Histidin (schematisch).

Die Proteinlösungen wurden zuvor mit einer Ultrafiltrationsmembran (MWCO: 3000 kDa) konzentriert, sterilfiltriert und auf 4°C gekühlt. Während des gesamten Prozesses wurden die Lösungen konsequent auf Eis gelagert und die doppelwandige Chromatographiesäule zusätzlich mit einem Wasserbad auf 4°C gekühlt.

Bei der Aufreinigung der GFP-gekoppelten Proteine stellte die extreme Verschmutzung der Ni-NTA Säulen ein großes Problem dar. Nickel wurde stark ausgewaschen, und es zeigte sich eine bräunliche Färbung des Säulenmaterials, die nur sehr schwer entfernt werden konnte. Es ist wahrscheinlich, dass Detergenzien zur Schaumvermeidung (Antischaummittel wie z.B. Pluronic) stark zur Verschmutzung beigetragen haben. Zur Reduzierung der Verschmutzung der Ni-NTA-Säulen wurden verschiedene Vorreinigungsschritte getestet (Abb. 3.14).

### 3. Methoden

#### Aufreinigung

1. Schritt	<u>Ni-NTA</u>	Dialyse	Dialyse	HIC
↓				
2. Schritt		<u>Ni-NTA</u>	IXEC	<u>Ni-NTA</u>
↓				
3. Schritt			<u>Ni-NTA</u>	
Ergebnis	X	X	~	OK

Abb. 3.14: Chronologisches Vorgehen der Reinigungsversuche für die GFP-Konstrukte. Stark verschmutzte Elutionsfraktionen (X), stark bis leicht verschmutzte Elutionsfraktionen (~), saubere bis leicht verschmutzte Elutionsfraktionen (OK)

Die Vorreinigung der Proteinlösungen über HIC zeigte gute Ergebnisse. Eine Steigerung der Ausbeute sowie eine weitere Reduzierung der Verschmutzung konnte über die konsequente Prozessdurchführung bei 4°C erzielt werden. Die niedrigere Temperatur unterdrückte evtl. unspezifische Reaktionen von Medienbestandteilen am Säulenmaterial. Das Säulenvolumen der HIC-Säule betrug 95,9 ml. Folgende Puffer wurden für die HIC verwendet:

Binde- und Waschpuffer      20 mM Tris-HCl, 30% (w/v) Ammoniumsulfat, pH 7,6

Elutionspuffer                20 mM Tris-HCl, pH 7,6

Das Protein wurde mit einem Salzgradienten von 0 bis 30% Ammoniumsulfat bei einer Flussrate von 2 ml/min eluiert. Das Gesamtvolumen der Elutionsfraktionen betrug ca. 90 ml, variierte jedoch mit der Gesamtmenge an gebundenem Zielprotein. Die erhaltenen Fraktionen wurden sofort eingefroren und bei -20°C gelagert. Zuvor wurden Proben zur Analyse entnommen und ebenfalls eingefroren.

### 3. Methoden

Die HIC-Säule wurde mit 100 % Elutionspuffer und 1 M NaOH gewaschen (8-10 SV). Fraktionen mit entsprechender Reinheit und Proteinmenge wurden nach erneutem Auftauen vereinigt und zur Auftreinigung über die Ni-NTA-Säule verwendet.

Das Säulenvolumen der Ni-NTA Säule betrug 67,4 ml. Folgende Puffer wurden für die Ni-NTA-Chromatographie verwendet:

Bindepuffer	30 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 7,2
Waschpuffer	30 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 15 mM Imidazol pH 7,2
Elutionspuffer	30 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 100 mM Imidazol, pH 7,2

Das Protein wurde mit einem Imidazolgradienten von 15 bis 100 mM Imidazol bei einer Flussrate von 2 ml/min eluiert. Das Gesamtvolumen der Elutionsfraktionen betrug ca. 50 ml, variierte jedoch mit der Gesamtmenge an gebundenem Zielprotein. Die Proteine wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm detektiert.

Die Ni-NTA-Säule wurde mit 100 % Elutionspuffer und 1 M NaOH gewaschen (8-10 SV) und anschließend Nickel mit 50 mM EDTA von der Säule entfernt. Für jede neue Reinigung wurde die Säule zuvor mit frischem Nickelsulfat beladen. Eine mehrfache Verwendung der Säule ohne diese Behandlung verschlechterte das Aufreinigungsergebnis massiv. Mit der Verwendung von stets frisch beladenen Säulen konnte reproduzierbar eine sehr gute Aufreinigung erzielt werden.

Die gleichen Säulen und Puffer wurden auch bei der Aufreinigung von CDNF und SAPLIP-Domäne durch die Ni-NTA Säule gewählt. Zusätzlich wurden zu den dialysierten Konzentraten 15 mM Imidazol und 100 mM NaCl zugefügt. Dies reduzierte die unspezifischen Bindungen abermals und wirkte sich nur unwesentlich auf die Bindungskapazität aus.

Alle chromatographischen Schritte wurden durch Optimierung verschiedener Parameter bis zur zufrieden stellenden Reinheit der Zielproteine entwickelt. Es wurden u.a. verschiedene Puffervolumina bei den Binde-, Elutions- und Waschschrinen getestet. Nach Optimierung und Etablierung der Prozesse wurden die gefundenen Parameter beibehalten (siehe 3.1.9 Proteinreinigung).

### 3. Methoden

#### 3.3.2 Dialyse

Die Fraktionen mit GFP-Fusionsproteinen wurden gesammelt und in einen Dialyseschlauch überführt. Der Dialyseschlauch besteht aus einer semipermeablen Membran, die Substanzen niedriger Molekulargewichte, jedoch nicht größere Moleküle wie Proteine durchqueren können. Nach der Aufreinigung über eine Ni-NTA-Säule muss vor allem das cytotoxische Nickel, welches ständig von der Säule mit eluiert werden kann, verdünnt werden. Als Dialysepuffer wurde auf 4°C vortemperierter TBS-Puffer (30 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, pH 7,2) verwendet. Es wurden drei Dialyseschritte durchgeführt. Das Verhältnis von Proteinvolumen zu Puffervolumen war dabei stets > 1:100. Die ersten beiden Dialysen erfolgen über einen Zeitraum von jeweils mindestens 1 h. Der dritte Dialyseschritt erfolgte sicherheitshalber über Nacht. Alle Dialysen erfolgen im Kühlraum bei 4°C. Der Dialysepuffer wurde zur besseren Durchmischung leicht gerührt. Dabei sollte sich im Idealfall der Dialyseschlauch nicht mitdrehen.

CDNF und SAPLIP-Domäne wurden nach der chromatographischen Aufreinigung zuerst leicht konzentriert. Die Dialyse erfolgte in Dialysekassetten, die speziell auf die Dialyse weniger Milliliter ausgelegt sind. Alle weiteren Schritte waren identisch zur zuvor genannten Vorgehensweise.

#### 3.3.3 Konzentrierung

Nach dem Abtrennen der Zellen wurde der Fermenterüberstand über einen gewickelten Ultrafilter konzentriert. Dabei läuft der Fermenterüberstand durch eine Filterkerze über eine Ultrafiltrationsmembran (MWCO = 3000 Da). Am Ende der Filterkerze wird über ein Ventil ein geringer Überdruck im Inneren der Filterkerze (< 1000 mbar) eingestellt. Durch den Überdruck werden niedermolekulare Stoffe durch die Membran gedrückt. Das Filtrat wird abgefangen und verworfen. Das Retentat wird zurückgeführt und erneut durch die Filterkerze gepumpt bis das gewünschte Volumen erreicht ist.

Die Konzentrierung nach erfolgter Aufreinigung wurde in Zentrifugationsröhrchen mit eingesetzter Ultrafiltrationsmembran (MWCO = 3000 Da) vorgenommen (Abb. 3.15). Die

### 3. Methoden

Membran wird zur Herstellung einer verbesserten Integrität mit einem Tropfen Glycerin benetzt. Die Konzentratoren werden höchstens mit 2800 g zentrifugiert.

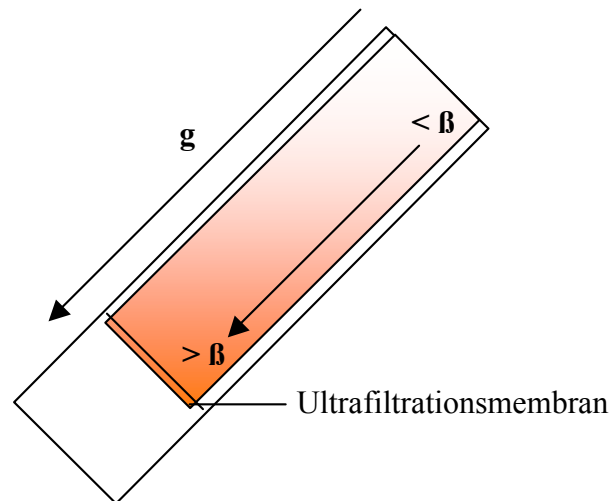


Abb. 3.15: Bildung eines Konzentrationsgradienten im Konzentrator während der Zentrifugation (schematisch)

Wichtig bei der Durchführung ist das wiederholte Aufschwemmen des Retentats. An der Membranoberfläche können sich ansonsten hohe Konzentrationsgradienten bilden ( $>100$  mg/l) und zu einem Ausfällen des Proteins führen.

### 3.4 Durchflusszytometrie

Die Zellsuspension wird vom Durchflusszytometer mit einer Nadel angesaugt und in einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom („Sheath-Fluid“) geleitet. Durch Ultraschall werden die Zellen zu einem ultradünnen Strahl, der nur eine Zelle in der horizontalen Ebene enthält, vereinzelt. Die einzelnen Zellen werden von einem Argonlaser (488 nm) angeregt und emittieren dabei unterschiedliche Signale. Die Signale werden von Detektoren für Streulicht und Fluoreszenzlicht aufgefangen (Abb. 3.16).

### 3. Methoden

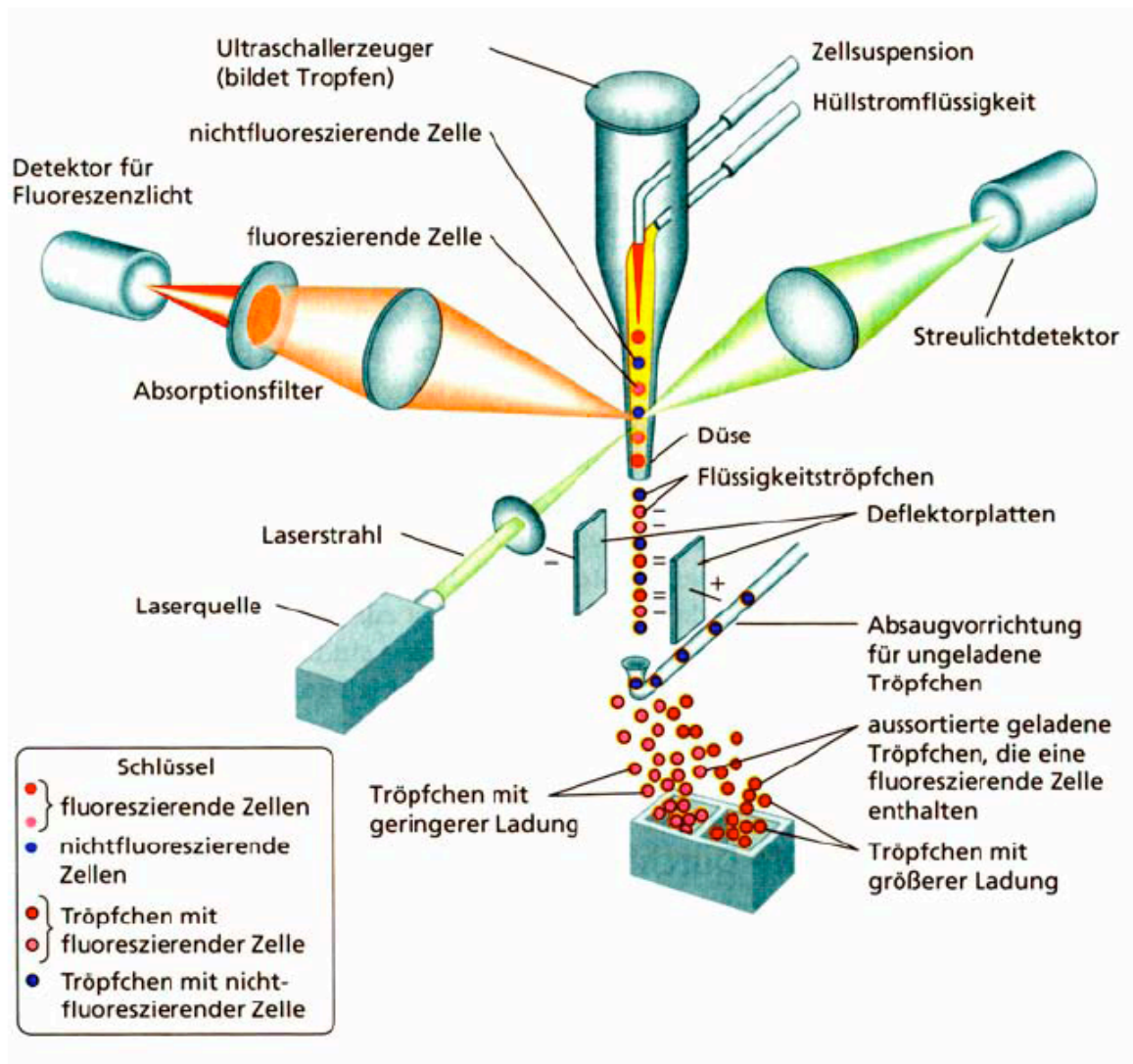


Abb. 3.16: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie mit gekoppeltem Zellsortierer (Lodish, 2001)

Das Streulicht wird von Photomultipliern in Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht unterschieden. Das Vorwärts-Streulicht, detektiert vom *Forward Scatter* (FSC), ist ein Maß für die Beugung des Lichts und ist abhängig vom Volumen der jeweiligen Zelle. Das Seitwärts-Streulicht, detektiert von *Sideward Scatter* (SSC), ist ein Maß für die Brechung des Lichts rechtwinklig zum einfallenden Strahlengang und beschreibt die Fragmentierung (Zellkerngröße, Granula, Vesikelmenge etc.) der Zelle. Des Weiteren kann von Zellen emittiertes Fluoreszenzlicht detektiert werden. Die emittierte Wellenlänge kann dabei durch drei vorgeschaltete Absorptionsfilter unterschieden werden. Die folgenden Absorptionsfilter wurden verwendet:

- 530 nm (Referenzfluorophor Fluoresceinisothiocyanat (FITC))
- 585 nm (Referenzfluorophor Phycoerythrin (PE))

### 3. Methoden

- 695 nm (Referenzfluorophor Peridinin-Chlorophyll-Komplex (PerCP))

Die Zellen selbst können nur durch spezifische Marker oder spezielle rekombinant exprimierte Proteine zur Emission angeregt werden. Größe und Fragmentierung der Zellen jedoch können auch ohne Fluorophore unterschieden werden. Diese Unterscheidung kann z.B. bei der Untersuchung von Blutzellen verwendet werden. Die Abkürzung des verwendeten Durchflusszytometers FACS<sup>TM</sup> steht für *fluorescence activated cell sorting*, bzw. *fluorescence activated cell scanner*. In dieser Arbeit wurde ausschließlich ein *fluorescence activated cell scanner* verwendet.

Zur Vorbereitung des FACSCalibur<sup>TM</sup>-Systems werden unmarkierte sowie fluoreszenzmarkierte *Silicabeads* zur Kalibrierung eingesetzt. Die Größe und das Fluoreszenzverhalten der *Beads* werden mit internen Standardwerten abgeglichen.

CHOK1 Zellsuspensionen mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml wurden bei 37°C inkubiert. Dem Medium wurden jeweils vier verschiedene Mengen an GFP-CDNF, GFP-Tat oder GFP zugesetzt (0,05 – 0,1 - 0,2 – 0,5 mg/ml). Die Inkubationsdauer betrug 5, 15, 30 und 60 min. Danach wurde 1 ml Zellsuspension entnommen und zentrifugiert (300 g, 5 min). Die sedimentierten Zellen wurden in 2 ml PBS-Puffer (pH 7,2) resuspendiert. Die Probe wurde in zwei Aliquots aufgeteilt. Ein Aliquot wurde sofort vermessen und das Zweite erneut gewaschen. Zur Detektion von toten Zellen wurde eine Propidiumjodid-Stammlösung zupipettiert, um eine Endkonzentration von 2.5 µg/ml zu erzielen. 500 µl der Probe wurden direkt gemessen. Die GFP-Konstrukte wurden mit dem FL-1 Fluoreszenzkanal des FACSCalibur Systems detektiert und 10000 Zellen pro Probe gemessen. Die restlichen 1,5 ml der Probe wurden erneut zentrifugiert und mit einem PBS-Puffer mit niedrigem pH (pH 4,0) gewaschen, um evtl. an die Zellmembran gebundenes Protein zu entfernen. Die weitere Messung erfolgte wie zuvor beschrieben.

### 3.5 Fluoreszenzmikroskopie

Die Emission von Fluoreszenzlicht ist nahezu simultan mit der Absorption des Exzitationslichts. Die Verzögerung zwischen der Photonenabsorption und der Photonenemission beträgt weniger als eine Mikrosekunde. Leuchtet das Emissionslicht länger als die Anregung durch das Exzitationslicht, spricht man von Phosphoreszenz. Die

### 3. Methoden

Anregungswellenlänge ist immer kürzer als die Emissionswellenlänge. In den 1930er Jahren wurden Fluorochrome erstmals in der Biologie verwendet, um Gewebe, Bakterien und andere biologische Materialien zu färben. Viele dieser Färbungen waren hochspezifisch und stimulierten die Entwicklung des Fluoreszenzmikroskops. Die Hauptaufgabe des Fluoreszenzmikroskops besteht darin, eine bevorzugte Wellenlänge zu separieren und damit das schwache Fluoreszenzlicht vom Exzitationslicht zu trennen. In einem Fluoreszenzmikroskop wird das Exzitationslicht von einer einfachen multispektralen Lampe (z.B. Halogen), Dioden oder Lasern erzeugt. Das Licht wird über einen Exzitationswellenlängenfilter zu einem dichromatischen Spiegel und durch das Okular und auf die Probe geleitet. Gibt die Probe Fluoreszenzlicht ab, wird dieses durch den dichromatischen Spiegel geführt. Hinter dem dichromatischen Spiegel wird die gewünschte Wellenlänge von Emissionswellenlängenfiltern selektiert und das Bild in die obere Optik des Mikroskops projiziert.

Zur Durchführung der Versuche wurden HEK 293-Zellen auf Objektträgern kultiviert. Die Objektträger wurden zuvor mit Poly-L-Lysin über Nacht im Kühlschrank beschichtet. Bei einer Konfluenz von ca. 50%-70% wurden die Zellen mit 2x PBS-Puffer gewaschen und umgehend mit 4%iger Paraformaldehydlösung fixiert. Danach erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit Triton X-100 (0,05% in PBS-Puffer). Die freien Valenzen der Oberflächen wurden 60 min mit 6%iger Rinderserumalbumin-Lösung und 5%iger Ziegenserumalbumin-Lösung geblockt (gelöst in PBS-Puffer). Die Zellen wurden nacheinander mit *rabbit grp94 antibody* (Abcam, Cambridge, UK), *donkey Alexa Fluor 488 antirabbit antibody* (Dianova, Hamburg), *goat CDNF antibody* (R&D Systems, Wiesbaden) oder *goat MANF antibody* (R&D Systems, Wiesbaden) und *rabbit Qdot 655 antigoat antibody* (Invitrogen, Darmstadt) inkubiert. Die Inkubationen mit *goat CDNF antibody*, *goat MANF antibody* und *rabbit grp94 antibody* erfolgten über Nacht. Weitere Schritte wurden nach Angaben des *Qdot staining* Protokolls von Invitrogen, Darmstadt durchgeführt. Die Proben wurden versiegelt und mit einem Zeiss Imager Z1 Konfokalmikroskop mikroskopiert.

#### 3.6 ER-Isolierung

Die Zellkulturen werden abzentrifugiert (1000 g, 5 min) und der Überstand restlos entfernt. Eine biologische Feuchtmasse von 1,2 g wird aus dem Pellet entnommen, in 2 ml eiskalter



### 3. Methoden

KCl-Lösung (40 mM) aufgenommen und wenigstens dreimal eingefroren (-80°C) und wieder aufgetaut (37°C). Die vollständige Lyse der Zellen wird unter einem Mikroskop überprüft. Die Microsomen bleiben während des Einfrierens intakt (Sukhodub und Burchell, 2005). Danach wird mit KCl-Lösung auf 8 ml aufgefüllt und bei 2-4°C zentrifugiert (8000 g, 10 min.). Der Überstand wird entnommen und mit 50 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung (8 mM) titriert. Die Titration erfolgt langsam, mit einer Geschwindigkeit von 2-2,5 ml/min. Raues endoplasmatisches Retikulum wird durch die Titration mit CaCl<sub>2</sub> präzipitiert und im nächsten Schritt bei 2-4°C abzentrifugiert (8000 g, 10 min.). Die im Pellet befindlichen Microsomen werden in 300 µl KCl-Lösung (40 mM) aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die beschriebene Durchführung erfolgte nach Hamilton et al. (1999).

### **3.7 Induktion von neuronalem Zelltod bei unterschiedlichen Zellkultursystemen**

Verschiedene neuronale Zellkultursysteme wurden auf den Einfluss von CDFN oder SAPLIP-Domäne getestet:

- LUHMES-Zellen
- Primäre Neurone aus Rattenembryonen
- HT-22-Zellen

Die Zellen wurden kultiviert und zu definierten Zeitpunkten geschädigt. Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen mit CDFN oder SAPLIP-Domäne vorinkubiert oder direkt bei Induktion der Schädigung auch die Proteine zugegeben. Die Zellen wurden über Nacht kultiviert und bei einer Zellvitalität von ca. 50% der Versuch ausgewertet. Die Auswertung erfolgte über einen MTT-Test (siehe [3.2.5 MTT-Test](#)). Im Weiteren werden die Schädigungsmodelle und Zellkultursysteme näher beschrieben.

### 3. Methoden

#### 3.7.1 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)-Schädigungsmodell

Das charakteristische pathologische Zeichen der Parkinson'schen Krankheit ist das fortschreitende Absterben von dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc). Das Absterben der dopaminergen Zellen ist mit dem Auftreten von eosinophilen intraneuronalen Inklusionen, den sogenannten *Lewy bodies*, verbunden (Tretiakoff, 1919). Die unlöslichen *Lewy bodies* setzen sich aus Neurofilamenten und Ubiquitin zusammen (Goldman et al., 1983; Mayer et al., 1989). Bei der Parkinson'schen Krankheit folgt das Absterben der Neurone einem bestimmten Muster. Der laterale Bereich des ventralen Areal der SNpc ist stärker betroffen (Fearnley und Lees, 1991), was einen dramatischen Dopaminmangel im Striatum hervorruft. Dieser Mangel ist der eigentliche Auslöser der motorischen Symptome, dem schwindenden Vermögen, die Bewegungen willentlich zu beeinflussen (Akinesie).

Nigrale dopaminerge Neurone sind sehr anfällig und degenerieren schnell (Uhl, 1998). Eine Ursache dafür sind hohe Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Inneren von dopaminergen Neuronen. Schon der normale enzymatische Katabolismus von Dopamin induziert die Entstehung von Wasserstoffperoxid über den Abbau durch die Monoaminoxidase (MAO). Dieser Prozess wird zusätzlich durch die Autooxidation von Dopamin verstärkt, was die Entstehung von Neuromelanin zur Folge hat. Neuromelanin reagiert mit ionischem Eisen und erhöht darüber die Wasserstoffperoxidkonzentration abermals (Fahn und Cohen 1992, Jenner et al., 1992). Des Weiteren wurde in den empfindlichen Arealen der SNpc ein starker Rückgang der Glutathion Peroxidase beobachtet, was zu einer unzureichenden Detoxifikationskapazität der Zelle führt (Damier et al., 1993).

6-Hydroxydopamin (6-OHDA) ist ein Analogon des natürlichen Dopamins. Es wurde 1959 (Senoh und Witkop, 1959) isoliert und die toxische Wirkung im autonomen Nervensystem des Herzens nachgewiesen (Porter et al., 1963). Darauf folgend wurde erkannt, dass 6-OHDA die Nervenzellen des Sympathikus schädigt (Thoen et al., 1997). Da 6-OHDA die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann, wurde es *intracranial* appliziert. Dabei wurde der toxische Einfluss auf catecholaminerge Neurone nachgewiesen (Uretzky und Iversen, 1970). Studien haben gezeigt, dass die Applikation von 6-OHDA oxidativen Stress *in vivo* (Kumar et al., 1995), als auch *in vitro* (Lotharius, 1999) verursacht. Die Entstehung von ROS erfolgt wahrscheinlich durch zwei getrennte Hauptreaktionen: Die Desaminierung des 6-OHDA über die MAO und die Autooxidation von 6-OHDA. Es wird weiterhin angenommen, dass diese Prozesse durch die anschließende Fenton-Reaktion verstärkt werden:

### 3. Methoden

Fenton-Reaktion:



#### 3.7.2 Glutamat-Schädigungsmodell

Der endogene Neurotransmitter Glutamat kann in pathologisch erhöhter Konzentration oxidativen Stress erzeugen und Zellen mit ionotropen Glutamatrezeptoren (z.B. 2-Amin-3-(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-yl)propionat (AMPA), N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA)), sowie Zellen ohne Glutamatrezeptoren schädigen (Schubert und Piasecki, 2001). Bei Zellen mit ionotropen Glutamatrezeptoren wird nach Bindung von Glutamat ein verstärkter Einstrom von  $\text{Ca}^+$  und  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zelle initiiert. Die folglich veränderte Calcium-Homöostase vermindert die mitochondriale Synthese von ATP. Durch die Gegenregulation der Zelle, die den Elektronentransport der Mitochondrien wieder verstärkt, werden verstärkt ROS gebildet (Sattler und Tymianski, 2001). Zusätzlich versucht die Zelle, der erhöhten  $\text{Na}^+$ -Konzentration durch gesteigerte  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Pumpleistung entgegenzuwirken. Der dadurch gesteigerte ATP-Verbrauch wirkt sich zusätzlich positiv auf die Bildung von ROS aus.

Die verwendeten HT-22-Zellen (siehe 3.7.5 Kultivierung von HT-22-Zellen und Induktion des Zelltods durch Glutamat-Schädigung) besitzen keine ionotropen Glutamatrezeptoren. Die extrazellulär erhöhte Glutamatkonzentration wirkt sich negativ auf die Glutathionkonzentration (GSH) der Zellen aus. Dieser rezeptorunabhängige Signalweg erfolgt über den Glutamat/Cystin-Antiporter  $x_c^-$  (Murphy et al., 1989). Dieser transportiert im Normalzustand intrazelluläres Glutamat aus der Zelle und extrazelluläres Cystin in die Zelle. Die erhöhte Glutamatkonzentration blockiert den Glutamat/Cystin-Antiporter  $X_c^-$  und führt somit zu einer verminderten Aufnahme von Cystin. Cystin wird intrazellulär zu Cystein umgewandelt und wird zur Synthese von GSH verwendet (Burdo et al., 2006). GSH ist ein Tripeptid (Glutamat, Glycin und Cystein) und repräsentiert eines der zentralen intrazellulären Antioxidanzien. Die nun verminderte Synthese von GSH hat folglich eine Akkumulation von ROS zur Folge. Dies führt nach wenigen Stunden zu erhöhtem oxidativem Stress und der Zerstörung von intrazellulären Strukturen wie z.B. Mitochondrien (Tobaben et al., 2011). Der glutamatinduzierte Zelltod zeigt biochemisch und morphologisch sowohl Merkmale der Apoptose als auch der Nekrose (Tan et al., 2001).

### 3. Methoden

#### 3.7.3 LUHMES-Zellen: Kultivierung und Induktion des Zelltods durch 6-OHDA-Schädigung

Lund Human Mesencephalic (LUHMES)-Zellen sind eine Subklonierung der menschlichen mesencephalen MESC2.10 Zelllinie. Die MESC2.10 Zelllinie wurde von Lotharius et al. (2005) charakterisiert. Dieser humane mesencephale Zelltyp wurde über ein v-myc (virales Myelocytomatose-Onkogen) über-exprimierendes System in eine permanente Zellkultur umgewandelt. In diesem System aktiviert ein Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator die Expression von v-myc. Der Transaktivator unterliegt einer negativen Aktivierungskontrolle, sodass bei Zugabe von Tetracyclin die Expression von v-myc blockiert wird (Lotharius et al., 2002).

Kulturgefäße für LUHMES-Zellen müssen mit Poly-L-Lysin und Fibronectin beschichtet werden. Die Gefäße werden zuerst mit einer Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml) über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit sterilem bidestilliertem Wasser (Bidest) wird Fibronectin-Lösung (0,5 µg/ml) zugegeben und über Nacht inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Bidest können die Zellen in den Gefäßen kultiviert werden.

LUHMES-Zellen werden in DMEM/F12-Medium, angereichert mit 1% N2-Supplement, 1% Penicillin/Streptomycin und 40 ng/ml bFGF (Hauptfibroblastenwachstumsfaktor) in Kultur gehalten (Proliferationsmedium). Nachdem die Zellen die Gefäße konfluent bewachsen haben, wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Trypsinlösung (PBS-Puffer mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA) abgelöst (Inkubation bei 37°C für 3-6 min). Nachdem die Zellen suspendiert sind, werden 7 ml Medium und 1 ml 10%ige (w/v) BSA-Lösung zum Inhibieren des Trypsins zugegeben. Die Zellen werden zentrifugiert (1000 g, 5 min) und in frischem Proliferationsmedium resuspendiert.

Die Zellen werden gezählt und die benötigten Volumina in die Kulturgefäße pipettiert. Nachdem die Zellen über Nacht angewachsen sind, wird das Proliferationsmedium gegen das Differenzierungsmedium getauscht. Die Basis des Differenzierungsmediums ist DMEM/F12-Medium angereichert mit: 1% N2-Supplement, 1 µg/ml Tetracyclin, 1 mM Dibutyryl-cAMP (db-cAMP) und 2 ng/ml *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF). Das Medium wird jeden zweiten Tag um 50% erneuert. Nach 6 Tagen sind die Zellen ausdifferenziert.

Zur Induktion der Apoptose werden die Zellen mit bis zu 30 µM 6-OHDA über Nacht inkubiert. Das Differenzierungsmedium wird mit 0,05 µM Ascorbinsäure versetzt (DiffAA), um eine zu schnelle Autooxidation des 6-OHDA zu vermeiden. Außerdem sollte direkte Lichtbestrahlung des Mediums vermieden werden. Die Arbeiten sollten in abgedunkelter Umgebung stattfinden. Das präparierte Medium DiffAA wird verwendet, um eine 6-OHDA-

### 3. Methoden

Stammlösung herzustellen. Aus der Stammlösung werden weitere Verdünnungen mit DiffAA + 6-OHDA hergestellt. Das Differenzierungsmedium der Zellen wird abgesaugt und durch die entsprechende Verdünnung DiffAA + 6-OHDA ersetzt. Nach Zugabe von DiffAA + 6-OHDA wird umgehend die entsprechende Menge des eingesetzten neurotrophen Faktors oder die Kontrolllösung zupipettiert. Die Zellen werden über Nacht inkubiert und anschließend die Menge abgestorbener Zellen mikroskopisch erfasst. Dabei wird die Morphologie, Zellnetzwerk und Adhäsion der Zellen an den Gefäßboden betrachtet. Lebende Zellen weisen einen langgestreckten, glatten Zellkörper auf, während tote Zellen zusammengezogen und faltig erscheinen. Tote Zellen sind teilweise oder ganz vom Gefäßboden gelöst und das Zellnetzwerk zerstört. Bei einer Menge von ungefähr 50% abgestorbener Zellen in der Negativkontrolle wird der Versuch ausgewertet.

#### **3.7.4 Kultivierung primärer Neurone aus Rattenembryonen und 6-Hydroxydopamin-Schädigung**

Mit großem Dank erwähne ich, dass die primären Neurone von Mitarbeitern des Labors von Herrn Prof. Dr. Culmsee aus embryonalen Sprague-Dawley Ratten (17 Tage alt) präpariert und mir zur Verfügung gestellt wurden.

Die primären Neurone, verdünnt in MEM+ Medium (Eagle's minimum essential medium), werden mit einer Zelldichte von 8 or 16 x 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> in 96 Well Platten ausgesät. Nach einer vierstündigen Inkubation wird das MEM+ Medium gegen NB+ Medium getauscht. Nach erneuten 5d in Kultur wird das NB+ Medium erneuert. Nach 6-8 d entwickeln die primären Neurone funktionale Glutamatrezeptoren und sind somit einsatzbereit für das Glutamat-Schädigungsmodell (Culmsee et al, 2005). Um vergleichbare Zelleigenschaften zu haben, wurde auch die 6-OHDA-Schädigung nach frühestens 6 Tagen durchgeführt .

Zur Induktion der Apoptose werden die Zellen mit bis zu 40 µM 6-OHDA über Nacht inkubiert. Das NB+ Medium wird mit 0,05 µM Ascorbinsäure versetzt (NBAA). Die Arbeiten sollten in abgedunkelter Umgebung stattfinden. Das präparierte Medium NBAA wird verwendet, um eine 6-OHDA-Stammlösung herzustellen. Aus der Stammlösung werden weitere Verdünnungen mit NBAA + 6-OHDA hergestellt. Das NB+ Medium der Zellen wird abgesaugt und durch die entsprechende Verdünnung NBAA + 6-OHDA ersetzt. Nach Zugabe von NBAA + 6-OHDA wird umgehend die entsprechende Menge des eingesetzten neurotrophen Faktors oder die Kontrolllösung zupipettiert. Die Zellen werden über Nacht

### 3. Methoden

inkubiert und darauf folgend die Menge abgestorbener Zellen mikroskopisch erfasst. Bei einer Menge von ungefähr 50% abgestorbener Zellen in der Negativkontrolle wird der Versuch ausgewertet.

#### **3.7.5 Kultivierung von HT-22-Zellen und Induktion des Zelltods durch Glutamat-Schädigung**

HT-22-Zellen sind ein glutamatsensitiver Subklon der neuronalen Zelllinie HT4. HT4-Zellen sind aus dem Hippocampus einer Maus isoliert und mittels des temperatursensitiven SV40 T-Antigens immortalisiert (Morimoto und Koshland, 1990). HT-22-Zellen wurden aufgrund ihrer Glutamatsensitivität selektioniert, exprimieren jedoch keine ionotropen Glutamatrezeptoren (Maher und Davis, 1996).

Die HT-22-Zellen werden in T80 Flaschen kultiviert und alle 3-4 Tage 1:10 verteilt. Dabei wird das Medium abgesaugt und 2 ml Trypsinlösung (PBS-Puffer mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA) zu den Zellen gegeben und bei 37°C für 3-6 min inkubiert. Nachdem die Zellen abgelöst sind wird 7 ml Medium und 1 ml 10 %ige (w/v) BSA-Lösung zum Inhibieren des Trypsins zugegeben. Die Zellen werden zentrifugiert (1000 g, 5 min) und mit frischem Medium resuspendiert. Mit einer Zelldichte von  $6-8 \times 10^4$  Zellen/Well wird die Zellsuspension in 24 Well Platten ausgesät.

Nach einer Ruhephase von 24 h wird die Apoptose durch Glutamat induziert. Das Medium wird abgesaugt und neues Medium mit 0,5-2 mM Glutamat zugefügt. Die Zellen werden 6-20 h inkubiert, um eine ausreichende Schädigung zu erzielen. Nach erfolgter Inkubation wird die Auswertung vorgenommen.

### **3.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel und dem Add-In WinStat über den t-Test nach Student. Zunächst wurden die Mittelwerte aus den jeweiligen Daten gebildet und anschließend die Standardabweichungen, Varianzen sowie die Standardfehler der Mittelwerte berechnet. Die Standardabweichung wird hierbei als Maß für die Messwertstreuung und Fehler des Messsystems angegeben. Der Standardfehler beschreibt

### 3. Methoden

die Standardabweichungen der Mittelwerte und wird als SEM (*standard error of the mean*) angegeben (Hüsler and Zimmermann, 2001). Ausgangspunkt ist die Nullhypothese die beschreibt, dass es keinen Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Stichproben gibt. Sollte der berechnete Signifikanzwert  $p$  kleiner als 0,05 ( $p < 0,05$ ) sein, so besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Stichproben. Die Nullhypothese kann mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $< 5\%$  abgelehnt werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Herstellung der Fusionsproteine

#### 4.1.1 Design der DNA-Sequenzen

Es wurden verschiedene CDNF-Mutanten entworfen und hergestellt, die bestimmte Fragen hinsichtlich der Lokalisation und Funktion von CDNF beantworten sollten. Da zu Anfang der Arbeiten die ER-Retention von CDNF noch nicht bekannt war, gab es bei Zellklonen mit nativem CDNF, d.h. mit endständiger KTEL-Sequenz, erhebliche Probleme bei der Expression bzw. Sekretion. Besonders das GFP-(4xGGS)-CDNF Fusionsprotein wurde nur in geringstem Maße im Medium gefunden (<50 ng/l). Die trotzdem aus dem Medium erhaltene Menge ist wahrscheinlich auf das Austreten des Proteins aus lysierten Zellen zurückzuführen. Die anfangs noch nicht erkannten Expressionsprobleme führten zur Entwicklung einer für CHO-Zellen optimierten CDNF-DNA-Sequenz. Die Sequenz wurde von der Firma GENEART<sup>®</sup> optimiert. Nach der Erkenntnis, dass die endständige KTEL-Sequenz für die schlechten Wiederfindungsraten verantwortlich war, wurde die optimierte CDNF-Sequenz nicht weiter bearbeitet.

Am Anfang des Projekts sollte CDNF kloniert und in CHO-Zellen produziert werden. Es sollte als sekretiertes Produkt vorliegen und nach der Ernte des Kulturüberstandes aufgereinigt werden. Zum markieren des Proteins wurde GFP verwendet, dass mit einem 4-fachen GGS-Linker an das N-terminale Ende von CDNF kloniert wurde. Ein Hexahistidin-Tag wurde für spätere Detektions- und Aufreinigungsmöglichkeiten an das N-terminale Ende des GFP gebunden. Weitere GFP-Fusionsprodukte wurden nach denselben Kriterien für den späteren Versuchsaufbau kloniert und produziert. Mit den aufgereinigten GFP-Fusionsprodukten (siehe 4.1.9.1. Reinigung der GFP-Fusionsprodukte) sollte eine potentielle transduktorische Eigenschaft von CDNF überprüft werden (siehe 4.2. Durchflusszytometrische Bestimmung der Assoziation von CDNF an Zellmembrane).

Im Verlauf des Projekts sollten weitere CDNF-Mutanten und Klone mit nativem CDNF transfiziert werden, um Fragen der zellulären Lokalisation von CDNF zu klären. Dafür wurde das potentielle ER-Signal von CDNF mutiert und der Einfluss der Mutationen auf die Sekretion von CDNF untersucht. Zur Ausweitung der gefundenen Ergebnisse sollte zusätzlich MANF mit nativem potentiellen ER-Signal kloniert, transfiziert und untersucht werden (siehe



## 4. Ergebnisse

4.3. Charakterisierung der zellulären Lokalisation von mutierten CDFN-Proteinen). Naives CDFN, natives MANF und die CDFN-Mutanten wurden in HEK293 Zellkulturen produziert. Um Versuche an neuronalen Zelllinien durchführen zu können (siehe 4.4. Inkubation von neuronalen Zellkultursystemen mit extern zugegebenem CDFN bzw. SAPLIP-Domäne), sollten CDFN und die SAPLIP-Domäne produziert und hochrein aufgearbeitet werden (siehe 4.1.9.2. Reinigung von CDFN und SAPLIP-Domäne). CDFN und SAPLIP-Domäne wurden dafür mit Hexahistidin-Tags verbunden. Die Herstellung erfolgte in einem der beiden zur Verfügung stehenden Zellkultursysteme (CHO oder HEK293).

In Tab. 4.1 sind alle Proteine die während dieser Arbeit geplant, kloniert und hergestellt wurden aufgelistet.

#### 4. Ergebnisse

Tab. 4.1: Aufzählung der klonierten DNA-Sequenzen in dieser Arbeit. Beschreibung der verwendeten Abkürzungen für Tags und Mutationen: (6xHis), Hexahistidin-Tag; eine Mutation wird angegeben, indem zuerst ein Ausschnitt der nativen Sequenz gezeigt ist und danach die mutierte Sequenz. Der Übergang von nativer zu mutierter Sequenz wird mit einem Pfeil (→) gekennzeichnet.

<u><i>GFP-Fusionskonstrukte</i></u>
(6xHis)- <b>GFP</b>
(6xHis)- <b>GFP</b> -(4xGGS)- <b>Tat</b>
(6xHis)- <b>GFP</b> -(4xGGS)- <b>CDNF</b>
<u><i>CDNF-Konstrukte</i></u>
natives <b>CDNF</b>
(6xHis)- <b>CDNF</b>
<b>CDNF</b> -(6xHis)
<b>CDNF</b> (KTEL→KDEL)
<b>CDNF</b> (KTEL→AAAA)
<b>CDNF</b> (KTEL→RSDI)
<b>CDNF</b> (KTEL deletiert)
<u><i>SAPLIP-Domänen Konstrukte</i></u>
(6xHis)- <b>SAPLIP-Domäne</b>
<b>SAPLIP-Domäne</b> -(6xHis)
<u><i>MANF Konstrukte</i></u>
natives <b>MANF</b>

Im Folgenden werden die Gewinnung wichtiger Sequenzen und Sequenzveränderungen genauer beschrieben. Verdau mit Restriktionsenzymen und Umklonierungen in verschiedene Vektorsysteme erfolgte nach standardisierten Protokollen (siehe 3.1.1. Klonierung).

#### 4.1.2 Amplifikation von CDFN und MANF aus einer humanen Leber cDNA-Datenbank

#### 4. Ergebnisse

CDNF und MANF wurden aus humaner Leber-cDNA amplifiziert. Die DNA-Sequenz von CDNF wurde aus der Human Protein Reference DataBase (www.hprd.org) entnommen (Abb. 4.1).

#### CDNF (561 bp)

```
ATGTGGTGCG    CGAGCCCAGT    TGCTGTGGTG    GCCTTTTGCG    CCGGGCTTTT
GGTCTCTCAC    CCGGTGCTGA    CGCAGGGCCA    GGAGGCCGGG    GGGCGGCCAG
GGGCCGACTG    TGAAGTATGT    AAAGAATTCT    TGAACCGATT    CTACAAGTCA
CTGATAGACA    GAGGAGTTAA    CTTTTCGCTG    GACACTATAG    AGAAAGAATT
GATCAGTTTT    TGCTTGGACA    CCAAAGGAAA    AGAAAACCGC    CTGTGCTATT
ATCTAGGAGC    CACAAAAGAC    GCAGCCACAA    AGATCCTAAG    TGAAGTCACT
CGCCCAATGA    GTGTGCATAT    GCCTGCAATG    AAGATTTGTG    AGAAGCTGAA
GAAGTTGGAT    AGCCAGATCT    GTGAGCTGAA    ATATGAAAAA    ACACTGGACT
TGGCATCAGT    TGACCTGCGG    AAGATGAGAG    TGGCAGAGCT    GAAGCAGATC
CTGCATAGCT    GGGGGGAGGA    GTGCAGGGCC    TGTGCAGAAA    AAAC TACTA
TGTGAATCTC    ATCAAGAGC    TGGCCCCCAA    GTATGCAGCG    ACACACCCCA
AAACAGAGCT    C
```

Abb. 4.1: Verwendete humane DNA-Sequenz von CDNF. Die gezeigte Sequenz wurde durch Vollängensequenzierung der amplifizierten Fragmente aus der humanen Leber cDNA-Bank bestätigt.

Die korrespondierende Proteinsequenz wurde bioinformatisch mit ähnlichen Sequenzen von bekannten Proteinen verglichen und zwei Domänen identifiziert. N-terminal besitzt CDNF eine SAPLIP-Domäne und C-terminal eine Scaffold-Attachment Factor Domäne. Außerdem wurde ein mögliches ER-targeting Signal identifiziert, welches sich im Verlauf dieser Arbeit als starke ER-Retentionssequenz herausstellte (Abb 4.2).

#### CDNF

```
1      MWCASPVAVV AFCAGLLVSH PVLTQGOEAG GRPGADCEVC KEFLNRFYKS
51     LIDRGVNFSL DTIEKELISF CLDTKGKENR LCYYLGATKD AATKILSEVT
101    RPMSVHMPAM KICEKLLKLD SQICELKYEK TLDLASVDLR KMRVAELKQI
151    LHSWGEECRA CAEKTDYVNL IQELAPKYAA THPKTEL
```

1 – 24: Signalpeptid (gelber Hintergrund)

33- 128: SAPLIP-Domäne (violetter Hintergrund)

131-176: Scaffold-Attachment Factor (SAF) Domäne (grüner Hintergrund)

#### 4. Ergebnisse

184-187: **KTEL**: ER-targeting Signal

Disulfidbrücken zwischen AS 37 - 124, 40 - 113, 71 - 82 und 158 - 161.

Abb. 4.2: Aminosäuresequenz von humanem CDNF mit eingezeichneten Domänen. Die SAPLIP-Domäne wurde wie eingezeichnet isoliert und hergestellt.

MANF wurde auch aus der für CDNF verwendeten humanen Leber cDNA-Bank gewonnen. Die Sequenz wurde wie zuvor aus der HPRD abgelesen. In der HPRD waren jedoch noch die argininreichen N-terminalen Domänen im *open reading frame* eingezeichnet (insgesamt 6 Aminosäuren: MRR MRR), welche aber zuvor als nicht proteinogen charakterisiert wurden (Petrova et al.,2003) (Abb 4.3).

#### MANF (537 bp)

ATGTGGGCCA	CGCAGGGGCT	GGCGGTGGCG	CTGGCTCTGA	GCGTGCTGCC
GGGCAGCCGG	GCGCTGCGGC	CGGGCGACTG	CGAAGTTTGT	ATTTCTTATC
TGGGAAGATT	TTACCAGGAC	CTCAAAGACA	GAGATGTCAC	ATTCTCACCA
GCCACTATTG	AAAACGAACT	TATAAAGTTC	TGCCGGGAAG	CAAGAGGCAA
AGAGAATCGG	TTGTGCTACT	ATATCGGGGC	CACAGATGAT	GCAGCCACCA
AAATCATCAA	TGAGGTATCA	AAGCCTCTGG	CCCACCACAT	CCCTGTGGAG
AAGATCTGTG	AGAAGCTTAA	GAAGAAGGAC	AGCCAGATAT	GTGAGCTTAA
GTATGACAAG	CAGATCGACC	TGAGCACAGT	GGACCTGAAG	AAGCTCCGAG
TTAAAGAGCT	GAAGAAGATT	CTGGATGACT	GGGGGGAGAC	ATGCAAAGGC
TGTGCAGAAA	AGTCTGACTA	CATCCGGAAG	ATAAATGAAC	TGATGCCTAA
ATATGCCCCC	AAGGCAGCCA	GTGCACGGAC	CGATTTG	

Abb. 4.3: Verwendete humane DNA-Sequenz von MANF. Die gezeigte Sequenz wurde durch Vollständigsequenzierung der amplifizierten Fragmente aus der humanen Leber cDNA-Bank bestätigt.

MANF besitzt eine ähnliche Domänenarchitektur wie CDNF. Analog zu CDNF befinden sich N-terminal eine SAPLIP-Domäne und C-terminal eine Scaffold-Attachment Factor Domäne. Das ER-targeting Signal von MANF verhindert eine generelle Sekretion von MANF, ermöglicht aber unter ER-Stress den Austritt von MANF aus der Zelle (Mizobuchi et al.,2007) (Abb. 4.4).

## 4. Ergebnisse

### MANF

1 MWATQGLAVA LALSVLPGSR ALRPGDCEVC ISYLGRFYQD LKDRDVTFSP  
51 ATIENELIKF CREARGKENR LCYYIGATDD AATKIINEVS KPLAHHIPVE  
101 KICEKLKKKD SQICELKYDK QIDLSTVDLK KLRVKELKKI LDDWGETCKG  
151 CAEKSDYIRK INELMPKYAP KAASARTDL

1 – 21: Signalpeptid (gelber Hintergrund)

23- 118: SAPLIP-Domäne (violetter Hintergrund)

121-166: Scaffold-Attachment Factor (SAF) Domäne (grüner Hintergrund)

176-179: **RTDL**: ER-targeting Signal

Disulfidbrücken zwischen 27-114, 30-103, 61-72 und 148-151.

Abb. 4.4: Aminosäuresequenz von humanem MANF mit eingezeichneten Domänen.

Zur Amplifikation von CDFN und MANF wurden *Touch Down* und *Nested* PCRs durchgeführt. Die Banden der *Touch Down* PCRs waren äußerst schwach und sind auf dem gezeigten Bild nicht sichtbar. Exemplarisch ist das erfolgreich verwendete Gel der CDFN *Touch Down* PCR gezeigt (Abb. 4.5). Die anschließende *Nested* PCR erzielte zwei Banden (Abb. 4.5). Beide Banden wurden sequenziert und die größere als CDFN identifiziert. Die kleinere Bande enthielt eine nicht näher identifizierbare Sequenz. Eine Ähnlichkeit mit CDFN oder MANF war nicht gegeben.

#### 4. Ergebnisse

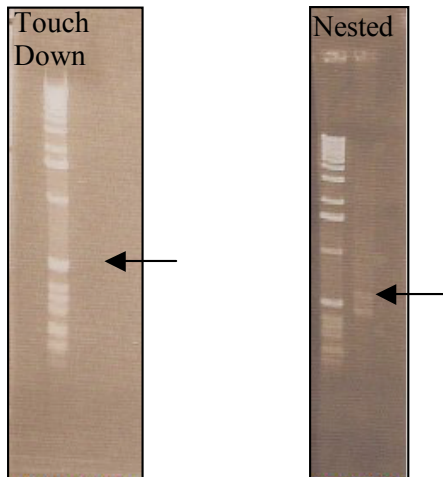


Abb. 4.5: *Touch Down* und *Nested* PCR zur Gewinnung von CDNF. Die Pfeile zeigen die identifizierten CDNF-Banden.

Die *Nested* MANF PCR erzielte nur eine Bande, welche nach der Sequenzierung als korrekte MANF-Sequenz identifiziert werden konnte (Abb. 4.6).

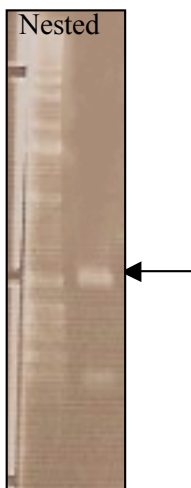


Abb. 4.6: *Nested* PCR zur Gewinnung von MANF. Der Pfeil zeigt die identifizierte MANF-Bande.

Die amplifizierten CDNF und MANF Sequenzen wurden in einen PCR4-Vektor kloniert und bei -20 °C zur weiteren Verwendung gelagert. Zum Einsetzen in verschiedene Vektoren und zur Herstellung der angegebenen Konstrukte (siehe 1.1.1 Design der DNA-Sequenzen)

#### 4. Ergebnisse

wurden über PCR verschiedene Schnittstellen (siehe 2. Material, Unterpunkt Primer) an die 3' und 5' Enden der gewonnenen DNA-Sequenzen gesetzt.

##### 4.1.3 Design und Herstellung des Tat-Konstrukts

Die kurze Tat-Sequenz (RKKRRQRRR) wurde mit einem 5' vierfachen GGS-Linker, einer 5' *Bgl*III und einer 3' *Xho*I Schnittstelle über eine PCR mit überlappenden Primern amplifiziert. Folgende Primer wurden zur Gewinnung des Tat-Konstrukts verwendet:

*Forward* 5'-GTGAGATCTGGGGGCAGCGGAGGGTCCGGCGGATCTGGAGGCT  
CTTACGGACGGAAAAAGCG-3'

*Reverse* 5'-CACCTCGAGCTACCGCCGCCTCTGCCTCCGCTTTTCCGTCCGTA  
AGAGCCTCCAGATCCGCC3'

Das Konstrukt wurde erfolgreich amplifiziert, in pCR4-Vektor ligiert und in E.Coli eingebracht. Klone 1-4 (Abb. 4.7) wurden sequenziert. Klon 1 besaß die korrekte Sequenz und wurde für weitere Klonierungen eingesetzt.

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4 5 6 7 8 9

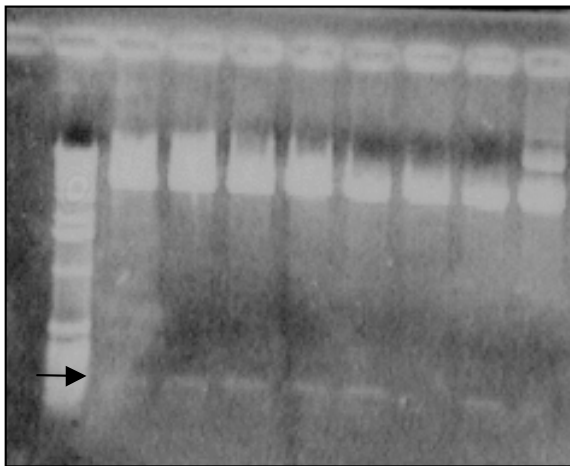


Abb. 4.7: Bandenmuster der erhaltenen Klone des Tat-Peptids. Die erwarteten Banden (→) nach Verdau mit *Bgl*III / *Xho*I wurden gefunden und die korrekte Sequenz durch Sequenzierung bestätigt. Bahn 1: 1 kb Standard. Bahnen 2-9: Klone 1-8.

## 4. Ergebnisse

Das Konstrukt wurde an das 3'-Ende eines GFP in einem GFP-Vektor über *Bgl*III/*Xho*I ligiert.

### 4.1.4 Mutation der internen *Bgl*III Schnittstelle von CDNF

Um eine *Bgl*III-Schnittstelle (Erkennungssequenz AGATCT) im pMARES-Vektor verwenden zu können, wurde eine CDNF-interne *Bgl*III-Schnittstelle mutiert. Die Sequenz wurde homolog substituiert, sodass sich keine Änderung in der Aminosäureabfolge ergab. Folgende Mutageneseprimer wurden verwendet und das markierte Nukleotid (rot) erfolgreich in die Sequenz eingebaut:

Forward 5'-GCTGAAGAAGTTGGATAGCCA<sup>A</sup>ATCTGTGAGCTGAAATATG-3'

Reverse 5'-CATATTCAGCTCACAGAT<sup>T</sup>TGGCTATCCAACTTCTTCAGC-3'

Die interne *Bgl*III-Schnittstelle wurde erfolgreich mutiert und Klon 1 und 4 (Abb. 4.8) sequenziert. Klon 1 besaß die korrekte Sequenz und wurde für weitere Klonierungen eingesetzt.

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4 5 6 7 8 9

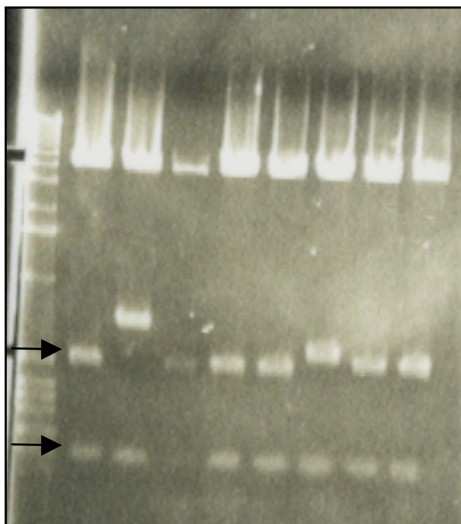


Abb. 4.8: Bandenmuster der erhaltenen CDNF-Klone mit mutierter *Bgl*III-Schnittstelle. Verdau mit *Eco*RI. Die erwarteten Banden (→) nach Verdau mit *Eco*RI wurden gefunden und





## 4. Ergebnisse

### 4.1.6 Design und Herstellung verschiedener CDNF-Mutanten mit veränderten C-terminalen Endsequenzen

Die verschiedenen Mutanten wurden über PCR mit C-terminal modifizierten Primern erzeugt (Abb. 4.10). Die Primer lagerten sich vor der nativen KTEL-Endsequenz (schwarz) an. Der nicht komplementäre C-terminale Teil der Primer enthielt die gewünschte Sequenz (rot):

CDNF (KTEL deletiert) : 5'-TCA GGGGTGTGTCGCTGCATACT-3'

CDNF (KTEL→AAAA): 5'-TCA **TGCGGCAGCTGC** GGGGTGTGTCGCTGCATACT-3'

CDNF (KTEL→RSDI) : 5'-TCA **GATGTCGGAGCG** GGGGTGTGTCGCTGCATACT-3'

CDNF (KTEL→KDEL) : 5'-TCA **CAGCTCGTCCTT** AGGGTGGG-3'

Die vier C-terminalen Aminosäuren wurden erfolgreich mutiert bzw. deletiert. Von CDNF (KTEL deletiert) wurden Klon 4 und 7 sequenziert (Abb. 4.10). Klon 4 besaß die korrekte Sequenz und wurde für weitere Klonierungen eingesetzt. Von CDNF (KTEL→AAAA) wurden Klon 2 und 4 sequenziert (Abb. 4.10). Klon 4 besaß die korrekte Sequenz und wurde für weitere Klonierungen eingesetzt.

Bahnen-Nr.:

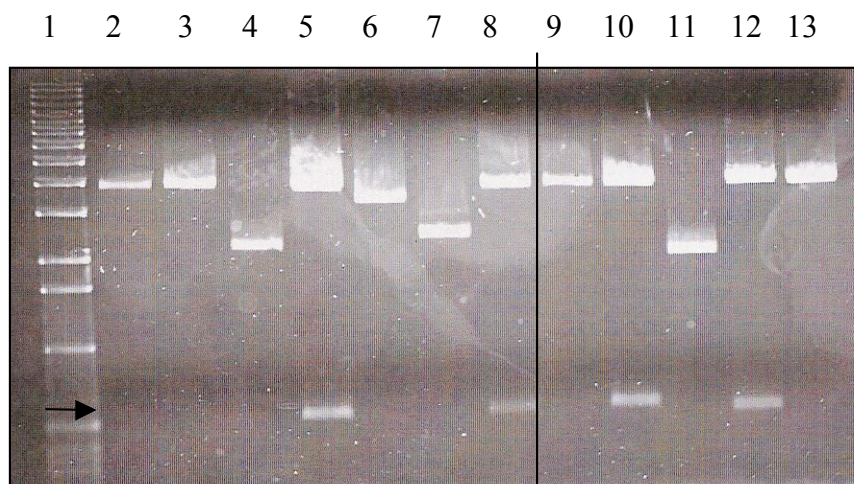


Abb. 4.10: Bandenmuster der erhaltenen Klone verschiedener CDNF-Mutanten. Die erwarteten Banden (→) nach Verdau mit *Bam*HI und *Not*I wurden gefunden und die korrekte Sequenz durch Sequenzierung bestätigt. Bahn 1: 1 kb Standard. Bahnen 2-8: CDNF (KTEL

## 4. Ergebnisse

deletiert) Klone 1-7. Bahnen 9-13: CDNF (KTEL→AAAA) Klone 1-5. Die PCR-Fragmente wurden in den TOPO PCR4-Vektor einkloniert.

Von CDNF (KTEL→RSDI) wurden Klon 1 und 2 sequenziert (Abb. 4.11). Klon 1 besaß die korrekte Sequenz und wurde für weitere Klonierungen eingesetzt. Von CDNF (KTEL→KDEL) wurde Klon 3 sequenziert (Abb. 4.11). Klon 3 besaß die korrekte Sequenz und wurde für weitere Klonierungen eingesetzt.

Banden-Nr.:

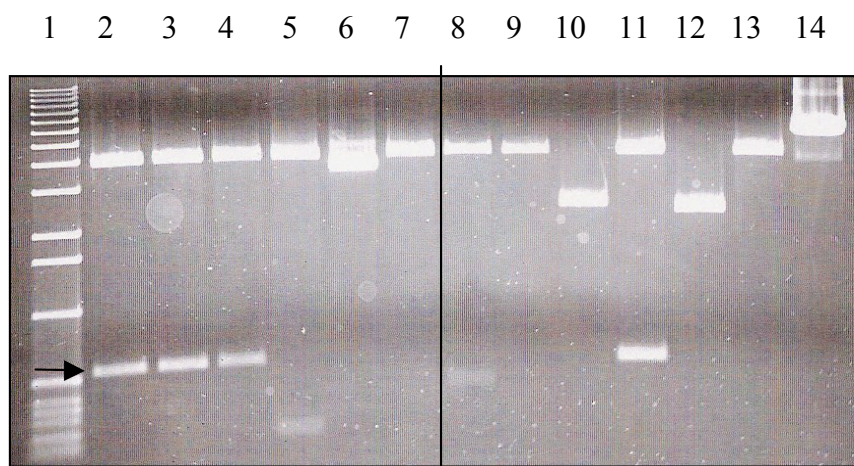


Abb. 4.11: Bandenmuster der erhaltenen Klone verschiedener CDNF-Mutanten. Die erwarteten Banden (→) nach Verdau mit *Bam*HI und *Not*I wurden gefunden und die korrekte Sequenz durch Sequenzierung bestätigt. Bahn 1: 1 kb Standard. Bahnen 2-7: CDNF (KTEL→RSDI) Klone 1-6. Bahnen 8-14: CDNF (KTEL→KDEL) Klone 1-7. PCR-Fragmente sind in den TOPO PCR4-Vektor einkloniert.

### 4.1.7 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden durchgeführt, um die Richtigkeit von Mutagenesen, Ligationen, Synthesen oder PCR-Konstrukten zu überprüfen. Von jedem Plasmid wurde das definierte Fragment in Leserichtung (5'-3') und gegen die Leserichtung (3'-5') sequenziert. Bei allen hergestellten rekombinanten Proteinen zeigte sich in der DNA-Sequenzierung die gewünschte Sequenz.

## 4. Ergebnisse

### 4.1.8 Proteinexpression

#### 4.1.8.1 GFP-Fusionsprodukte

CHO Zellen wurden mit GFP-Fusionsplasmiden transfiziert und zu Einzelklonen verdünnt. Nach vier Wochen wurden die überlebenden Einzelklone selektiert. Da GFP über fluoreszenztechnische Methoden nachzuweisen ist und eine Korrelation zwischen internem und externem Protein besteht, wurde die Produktionsleistung der Klone zuerst über eine FACS-Analyse abgeschätzt. Aus diesem Screening wurden die Klone mit den stärksten Fluoreszenzsignalen ausgewählt. Die weitere Auswertung der Expressionsleistung der einzelnen Klone erfolgte über ELISA und Westernblot.

Die Expressionsleistung der Klone war höchst unterschiedlich. Aufgrund der verfügbaren Literaturangaben wurde CDNF als sekretiertes Protein angenommen. Somit wurde ein Klon mit nativem CDNF (mit endständiger KTEL Sequenz) und N-terminalem 6xHis-tag entworfen ( $\rightarrow$  (6xHis)-GFP-(4xGGS)-CDNF). Dieses Design berücksichtigte noch nicht die ER-Retention von CDNF. Die Expressionsleistung des Klons war mit  $80 \mu\text{g/l}$  im Fermenter sehr schlecht. Außerdem trat eine Fraktionierung des Proteins auf, welche nicht geklärt werden konnte. Die unterste Bande der drei Fraktionen ( $\rightarrow$ ) hat die gleiche Größe wie freies GFP (Abb. 4.12). Der Unterschied bei den oberen Banden entstand eventuell durch partielle Glycosylierung von CDNF. Klon 17 wurde gewählt und zur weiteren Verwendung kryokonserviert.

#### 4. Ergebnisse

Bahnen-Nr.:

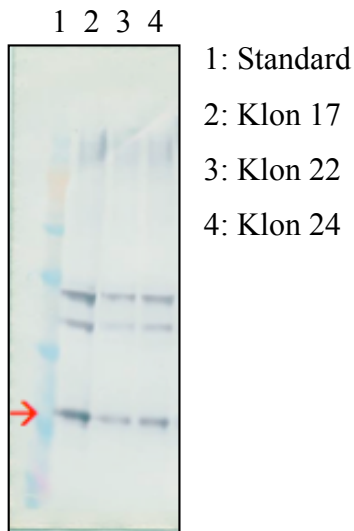


Abb. 4.12: SDS-PAGE und Westernblot des Klonscreening von GFP-CDNF-Fusionprodukt produzierenden CHO-Klonen. Kulturüberstand (5:1 konzentriert) von konfluent gewachsenen Kulturen verschiedener Klone. Klon 17 wurde zur weiteren Verwendung kryokonserviert.

Auch alle GFP-Tat-Klone zeigten eine deutliche Doppelbande (Abb. 4.13:). Die Expression des Fusionsproduktes war jedoch wesentlich stärker als bei GFP-CDNF. Klon 7 wurde gewählt und zur weiteren Verwendung kryokonserviert.

Bahnen-Nr.:

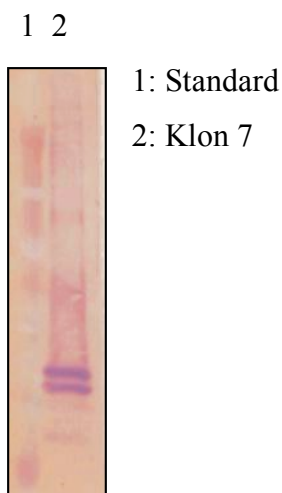


Abb. 4.13: SDS-PAGE und Westernblot des Klonscreening von GFP-Tat-Fusionprodukt produzierenden CHO-Klonen. Kulturüberstand (nicht ankonzentriert) einer konfluent gewachsenen Kultur des Klon 7, welcher zur weiteren Verwendung kryokonserviert wurde.

## 4. Ergebnisse

Die gewählten GFP-Klone 9 und 21 zeigten auch eine Doppelbande (Abb. 4.14:). Auch die Expression des GFP-Kontrollprodukts war wesentlich stärker als bei GFP-CDNF. Klon 21 wurde gewählt und zur weiteren Verwendung kryokonserviert.

Bahnen-Nr.:

1 2 3

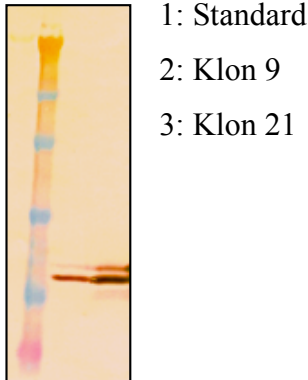


Abb. 4.14: SDS-PAGE und Westernblot des Klonscreening von GFP-Kontrollprodukt produzierenden CHO-Klonen. Kulturüberstand (nicht ankonzentriert) konfluent gewachsener Kulturen verschiedener Klone. Klon 21 wurde zur weiteren Verwendung kryokonserviert.

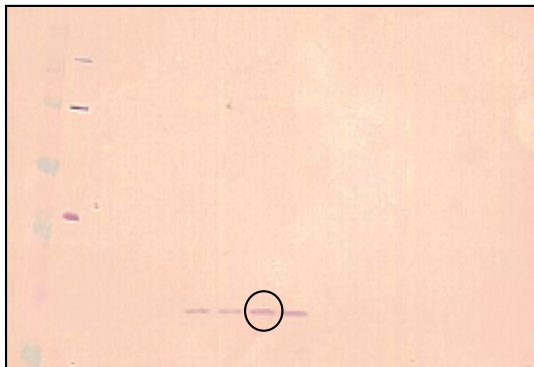
### 4.1.8.2 CDNF mit C-terminalem Hexahistidin-Tag

HEK293 Zellen wurden mit CDNF-Expressionsplasmiden (CDNF-(6xHIS)) transfiziert und in Zellpools verdünnt. Insgesamt wurden 12 Pools angelegt. Das Medium der überlebenden Pools wurde nach 3 Wochen Inkubation mittels Westernblot gescreent. Aus diesem Screening wurde der Klon mit der stärksten Bande ausgewählt. Klon 6 (Bande in Abb. eingekreist) wurde gewählt und zur weiteren Verwendung kryokonserviert (Abb. 4.15).

## 4. Ergebnisse

Bahnen Nr.:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



1: Standard

2: Hexahistidin-Tag Kontrolle

3-14: Klone 1-12

Abb. 4.15: SDS-PAGE und Westernblot des Klonenscreening von CDNF-(6xHIS) produzierenden HEK293 Klonen. Kulturüberstand (nicht ankonzentriert) von konfluent gewachsenen Kulturen verschiedener Klone.

Gleichzeitig wurden auch CHO Einzelklone angelegt. Nach vier Wochen wurden die überlebenden Einzelklone mittels Dotblot gescreent (Abb. 4.16). Das CDNF Konstrukt konnte auch in CHO Zellen produziert werden. Hier zeigte sich, dass das CDNF Konstrukt mit maskiertem C-Terminus auch von CHO Zellen sekretiert wird. Das zuvor transfizierte Fusionsprodukt GFP-CDNF mit unmaskierter KTEL Sequenz wurde von CHO-Zellen nicht so stark sekretiert, dass es in nicht ankonzentriertem Überstand detektierbar war. Im Gegensatz zum GFP-CDNF Konstrukt mit freier KTEL Sequenz, ermöglichte das CDNF Konstrukt mit maskierter KTEL Sequenz nun eine gute Expression und Sekretion in CHO Zellen.

## 4. Ergebnisse

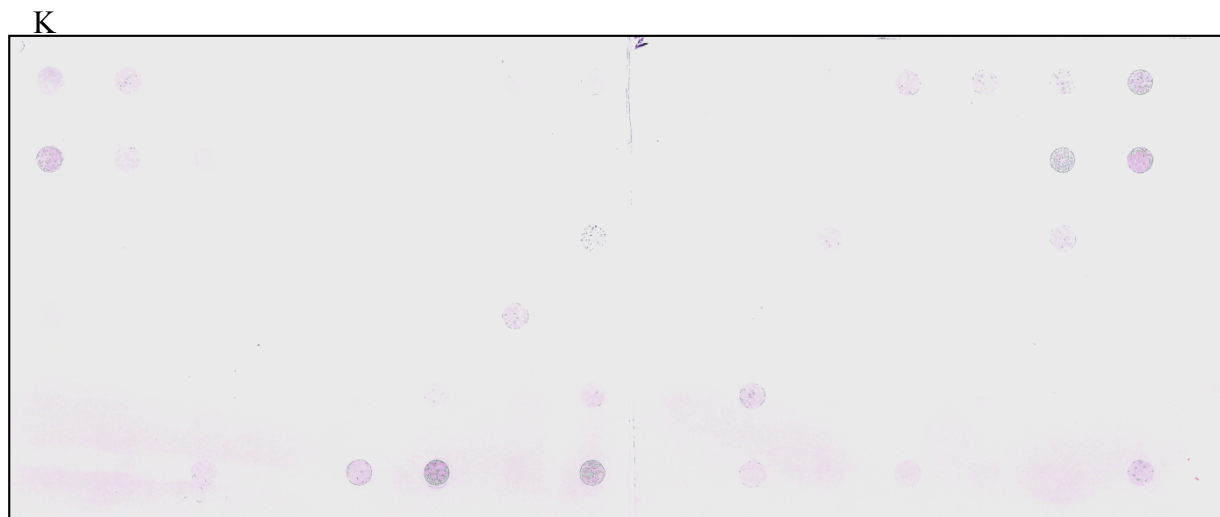


Abb. 4.16: Dotblot des Kulturüberstands von CDNF produzierenden CHO-Klonen. K: CDNF Kontrolle (20 ng). Alle weiteren Punkte sind positive Signale von Einzelklonpopulationen.

Ein weiteres Screening der CHO Einzelklone erfolgte nicht, da HEK293 Klon 6 sehr gute Produktionsergebnisse erzielte. Die CHO Einzelklone wurden nicht zur Produktion von CDNF verwendet.

### 4.1.8.3 MANF

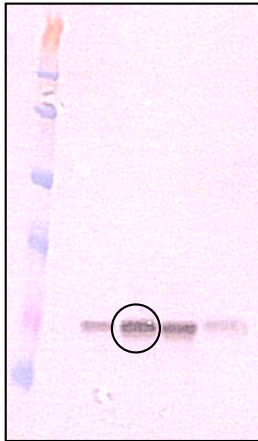
HEK293 Zellen wurden mit MANF-Expressionsplasmiden transfiziert und in Zellpools verdünnt. Insgesamt wurden 12 Pools angelegt. Die überlebenden Pools wurden nach 3 Wochen Inkubation mittels Westernblot gescreent. Aus diesem Screening wurde der Klon mit der stärksten Bande ausgewählt. Klon 2 (Bande in Abb. eingekreist) wurde gewählt und zur weiteren Verwendung kryokonserviert (Abb. 4.17).



## 4. Ergebnisse

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4 5



1: Standard

2-4: Klone 1-4

Abb. 4.17: SDS-PAGE und Westernblot des Klonscreening von MANF produzierenden HEK293 Klonen. Kulturüberstand (5:1 konzentriert) von konfluent gewachsenen Kulturen verschiedener Klone.

### 4.1.8.4 SAPLIP-Domäne mit C-terminalem Hexahistidin-Tag

HEK293 Zellen wurden mit der N-terminalen SAPLIP-Domäne von CDNF (SAPLIP-(6xHIS)) transfiziert und in Zellpools verdünnt. Insgesamt wurden 12 Pools angelegt. Die überlebenden Pools wurden nach 3 Wochen Inkubation mittels Westernblot gescreent. Die HEK293 Klone zeigten keine ausreichende Expressionsleistung.

Gleichzeitig wurden CHO Einzelklone angelegt. Nach vier Wochen wurden die überlebenden Einzelklone mittels Dotblot vorgescreent (Abb. 4.18). Aus diesem Screening wurden die Klone mit den stärksten Blotsignalen ausgewählt und in frischem Medium eine weitere Woche inkubiert.

#### 4. Ergebnisse

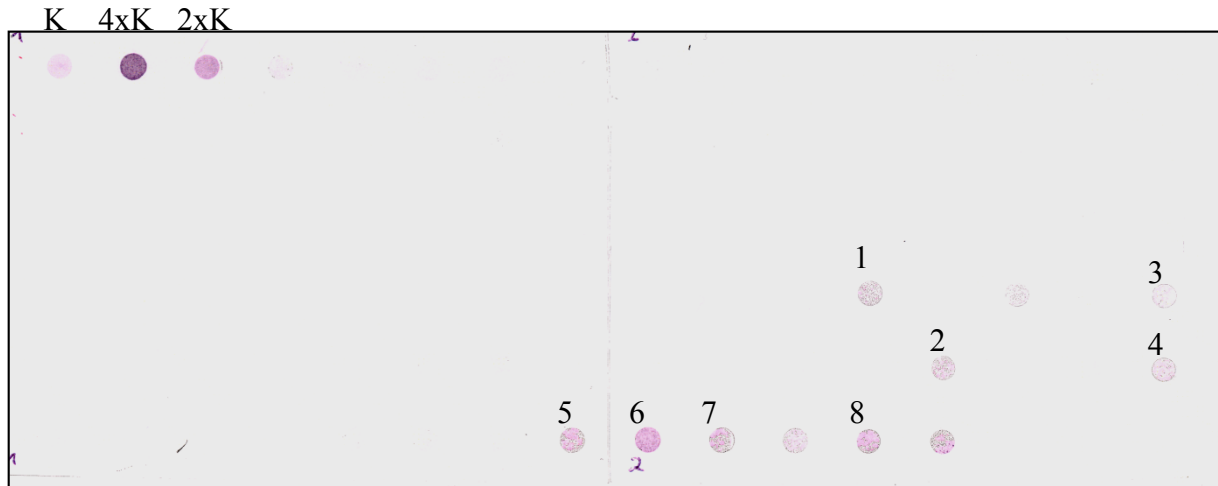


Abb. 4.18: Dotblot des Kulturüberstands von SAPLIP-(6xHIS) produzierenden Klonen. Acht Klone wurden ausgewählt, neu durchnummeriert und nochmals gescreent. Da kein SAP-Kontrollprotein verfügbar war, wurde CDNF als Kontrollprotein verwendet. K: CDNF Kontrolle (20 ng), 2xK: CDNF Kontrolle (40 ng), 4xK: CDNF Kontrolle (80 ng). Klonnummern sind identisch mit Abb. 4.19.

Nach dieser Woche erfolgte die weitere Auswertung der Expressionsleistung der gewählten Klone nach Silberfärbung der Proteine (Abb. 4.19). Klon 6 (Bande in Abb. eingekreist) wurde gewählt und zur weiteren Verwendung kryokonserviert.

Bahnen-Nr.:

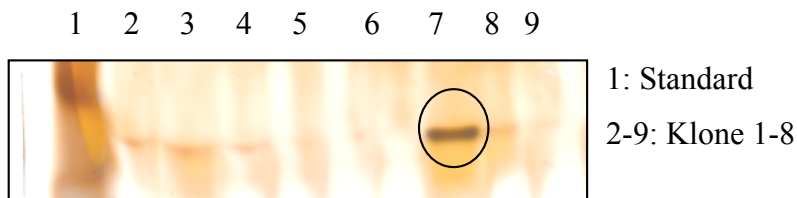


Abb. 4.19: SDS-PAGE und Silberfärbung zum Screening von SAPLIP-(6xHIS) produzierenden HEK293 Klonen nach Vorscreening über Dotblot. Überstand (nicht ankonzentriert) von konfluent gewachsenen Kulturen verschiedener Klone. Klon 6 (eingekreist) wurde zur Produktion verwendet.

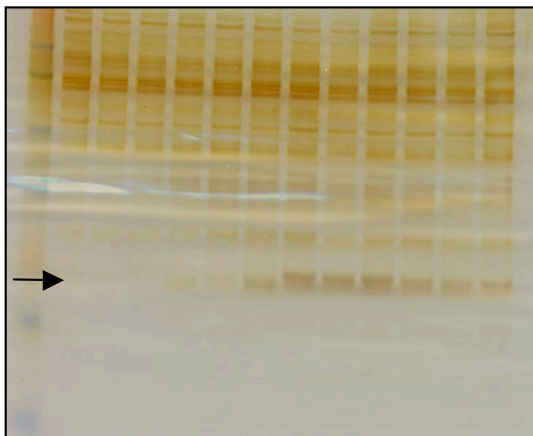
## 4. Ergebnisse

### 4.1.8.5 Natives CDNF und CDNF-Mutanten mit veränderten C-terminalen Sequenzen

Um die Eigenschaften der C-terminalen Sequenz KTEL zu erforschen, wurden Plasmiden mit den folgenden CDNF-Genvarianten produziert: CDNF, CDNF (KTEL deletiert), CDNF (KTEL→AAAA), CDNF (KTEL→RSDI), CDNF (KTEL→KDEL). Natives CDNF und die ersten drei mutierten CDNF-Proteine wurden in einem Transfektionsansatz produziert (Abb. 4.20, Abb. 4.21, Abb. 4.22.). Durch Verzögerungen während der Klonierungsarbeiten wurde CDNF (KTEL→KDEL) zu einem späteren Zeitpunkt in einem separaten Ansatz transfiziert (Abb. 4.23). Zusätzlich zu diesen Klonen wurde der bereits vorhandene Klon CDNF-(6xHis) (siehe 4.1.8.2. CDNF mit C-terminalem Hexahistidin-Tag) mit maskierter KTEL-Sequenz für die weiterführenden molekularbiologischen Versuche verwendet. Natives CDNF und CDNF-Mutanten wurden in entsprechend transfizierten HEK293 Zellen produziert und in Zellpools verdünnt. Insgesamt wurden für jedes Konstrukt 12 Pools angelegt. Nach 3 Wochen Inkubation wurden drei Pools zufällig ausgewählt und in ein größeres Volumen überführt. Die Zellen wurden mehrere Tage kultiviert und tote Zellen durch mehrmaliges Passagieren ausverdünnt, bis eine Vitalität von >90% bei allen Kulturen gegeben war. Danach wurden die Zellen für weitere zwei Tage inkubiert und die Kulturüberstände nach Elektrophorese und Silberfärbung bzw. Westernblot gescreent (Abb. 4.20). Das Screening auf natives CDNF und CDNF (KTEL→KDEL), welche nur zellintern nachzuweisen waren, erfolgte über Westernblots von Zelllysaten (Abb. 4.21, Abb. 4.23).

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



1: Standard

2-4: CDNF Klone 1-3

5-7: CDNF (KTEL deletiert) Klone 1-3

8-10: CDNF (KTEL→AAAA) Klone 1-3

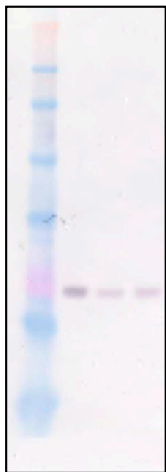
11-13: CDNF (KTEL→RSDI) Klone 1-3

#### 4. Ergebnisse

Abb. 4.20: SDS-PAGE und Silberfärbung der Kulturüberstände von konfluent gewachsenen Klonen (Vitalität >90%) transfiziert mit nativem CDNF und CDNF Mutanten. Die Banden mit dem Zielprotein sind mit einem Pfeil gekennzeichnet (→). Banden von CDNF mit deletierter KTEL-Sequenz verlaufen durch die Deletion etwas unterhalb der anderen Zielproteinbanden.

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4



1: Standard

2-4: CDNF Klone 1-3

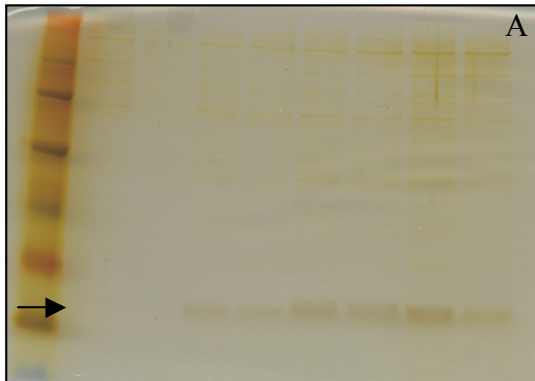
Abb. 4.21: SDS-Page und Westernblot der Zelllysate von Klonen transfiziert mit nativem CDNF. Natives CDNF konnte im Überstand nicht detektiert werden. Somit wurde die Expression von CDNF in Zelllysaten nachgewiesen.

Die jeweils ersten beiden Klone von nativem CDNF und CDNF-Mutanten wurden für weitere sieben Tage kultiviert bis eine Vitalität von > 95% gegeben war und erneut getestet (Abb. 4.22).

## 4. Ergebnisse

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4 5 6 7 8 9



1: Standard

2-4: CDNF Klone 1-2

5-7: CDNF (KTEL deletiert) Klone 1-2

8-10: CDNF (KTEL→AAAA) Klone 1-2

11-13: CDNF (KTEL→RSDI) Klone 1-2

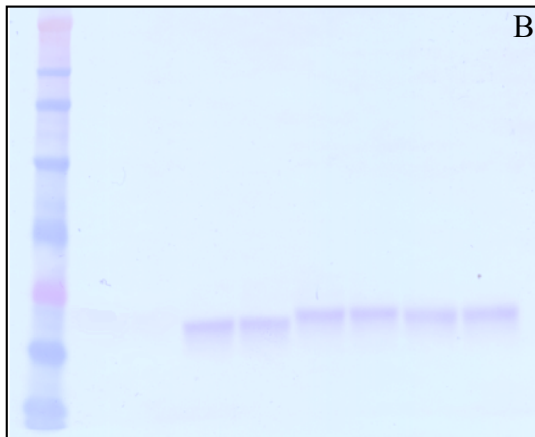


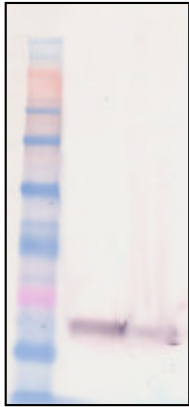
Abb. 4.22: SDS-PAGE und Silberfärbung (A) bzw. Westernblot (B) der Kulturüberstände von konfluent gewachsenen Klonen (Vitalität >95%) transfiziert mit nativem CDNF und CDNF Mutanten. Die Banden mit dem Zielprotein sind mit einem Pfeil gekennzeichnet (→). Banden von CDNF mit deletierter KTEL-Sequenz verlaufen durch die Deletion etwas unterhalb der anderen Zielproteinbanden.

Die Kulturüberstände der ausgewählten CDNF (KTEL→KDEL) Klone zeigten wie erwartet kein Signal. Das Screening erfolgte wie auch bei nativem CDNF über die Auswertung von Westernblots von Zelllysaten (Abb. 4.23).

## 4. Ergebnisse

Bahnen-Nr.:

1 2 3



1: Standard

2-3: CDNF (KTEL → KDEL) Klone 1-2

Abb. 4.23: SDS-PAGE und Westernblot der Zelllysate von Klonen (Vitalität >95%) transfiziert mit CDNF (KTEL→KDEL). CDNF (KTEL→KDEL) konnte im Überstand nicht detektiert werden. Somit wurde die Expression von CDNF in Zelllysaten nachgewiesen.

Das Screening endete erfolgreich mit dem Auffinden der Klone, die CDNF bzw. CDNF-Mutanten produzieren. Die gezeigten Klone von nativem CDNF und CDNF-Mutanten aus Abb. 4.22 und Abb. 4.22 wurden zur weiteren Verwendung kryokonserviert.

### 4.1.9 Proteinreinigung

#### 4.1.9.1 Reinigung der GFP-Fusionsprodukte

Zur Untersuchung der Eigenschaften von CDNF in Hinblick auf eine mögliche Proteintransduktion (siehe 4.2. Durchflusszytometrische Bestimmung der Assoziation von CDNF an Zellmembranen) wurden verschiedene GFP-Fusionsproteine aufgereinigt. Die GFP-Fusionsproteine wurden in transfizierten CHO-Zellen im 10 l Maßstab produziert und wie beschrieben (siehe 3.3. Aufreinigung der GFP-Konstrukte, CDNF, und SAPLIP-Domäne) aufgereinigt. Wegen der schlechten Expression des GFP-CDNF-Fusionsproteins wurden im *Fed-Batch* Verfahren 20 l Fermenterüberstand hergestellt. Exemplarisch werden Immunoblots der einzelnen Eluatfraktionen einer Aufreinigung gezeigt, welche den Unterschied in den

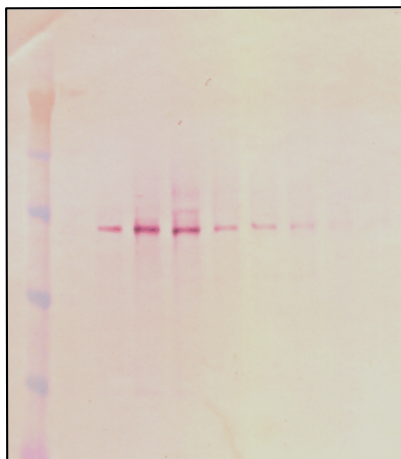
#### 4. Ergebnisse

Proteinmengen zwischen den einzelnen Konstrukten verdeutlichen. Die genaue Bestimmung der Konzentrationen erfolgte über ELISA (Tab. 4.2).

Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften von GFP wurde als erster Reinigungsschritt eine HIC durchgeführt. Das Säulenvolumen (SV) betrug 95,9 ml. Es wurden ca. fünf Säulenvolumen ankonzentrierter Kulturüberstand bei einer Flussrate von 10 ml/min auf die HIC-Säule gegeben. Zur Elution wurde ein absteigender Ammoniumsulfat-Gradient über 40 min angelegt. Die Säule wurde mit 100% Elutionspuffer gewaschen (4-8 SV) und anschließend mit ca. 4 SV Ladepuffer äquilibriert. Die Elution der Proteine erfolgte bei ca. 20% des Gradienten. Das Eluat wurde in 10 ml-Fractionen gesammelt. Abb. 4.24 zeigt exemplarisch HIC-Eluatfraktionen von GFP-CDNF.

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



1: Standard

2: Waschfraktion

3-9: Eluatfraktionen 1-7

10: Fermenterüberstand

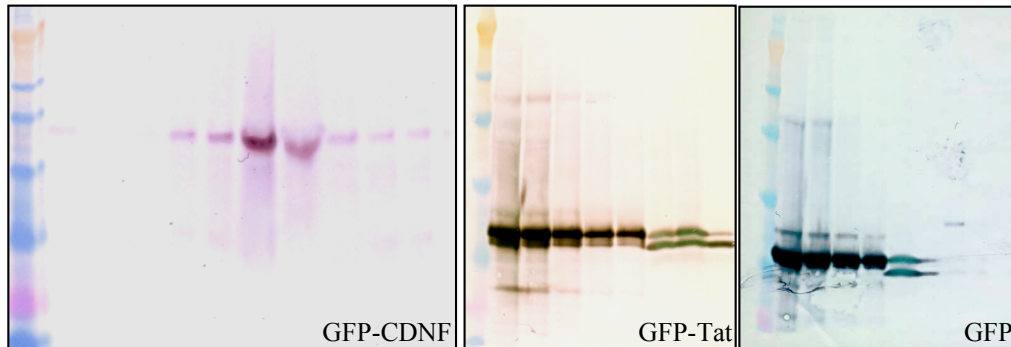
Abb. 4.24: SDS-PAGE und Westernblot von GFP-CDNF Eluatfraktionen einer HIC-Reinigung, markiert mit Hexahistidinantikörper.

Die Eluatfraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt und mit einem Fluss von 2 ml/min auf eine Ni-NTA-Säule geladen. Das Säulenvolumen des Ni-NTA-Trägermaterials betrug 67,4 ml. Zur Elution wurde ein Tris-HCl Puffer mit 100 mM Imidazol verwendet und ein Elutionsgradient über 30 min angelegt. Die Eluatfraktionen wurden gesammelt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

#### 4. Ergebnisse

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 / 1 2 3 4 5 6 7 8 9 / 1 2 3 4 5 6 7 8



GFP-CDNF	GFP-Tat	GFP
1: Standard	1: Standard	1: Standard
2: Waschfraktion	2-8: Eluatfraktionen 1-7	3-11: Eluatfraktionen 1-6
3-11: Eluatfraktionen 1-9	9: Waschfraktion	8: Waschfraktion

Abb. 4.25: SDS-PAGE und Westernblots von Ni-NTA Eluatfraktionen der verschiedenen GFP-Fusionsproteine, markiert mit Hexahistidinantikörper. GFP-Tat und GFP eluierten in einem stark ansteigenden Peak der flach abfällt. GFP-CDNF eluierte in einem moderat ansteigenden, sowie moderat absteigenden Peak.

Bei der ELISA-Analyse bestätigten sich die Daten aus den Westernblots (Tab. 4.2). GFP-CDNF war mit einer Masse von 1,6 mg in 20 l Fermenterüberstand um den Faktor >10 schlechter exprimiert als die beiden anderen GFP-Fusionsproteine.

Tab. 4.2: ELISA Daten der GFP-Fusionsproteine aus dem Produktionsprozess

	<b>GFP-CDNF</b>	<b>GFP-Tat</b>	<b>GFP</b>
Fermenter (µg/l)	80	810	860
Gesamtmasse im Fermenter (µg)	1600	8100	8600
Masse nach HIC (µg)	1200	5500	6100
Masse nach Ni-NTA und Dialyse (µg)	1100	4900	5300
Ausbeute (%)	69	60	62



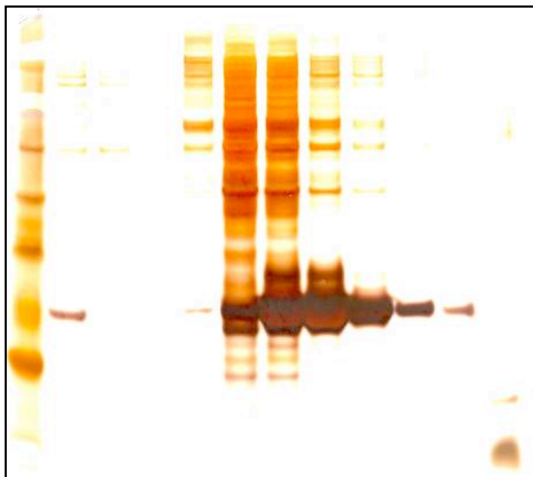
## 4. Ergebnisse

### 4.1.9.2 Reinigung von CDFN und SAPLIP-Domäne

CDNF und SAPLIP-Domäne wurden in Rollerflaschen und Schüttelkolben in mehreren Chargen produziert und wie beschrieben (siehe 3.3. Aufreinigung der GFP-Konstrukte, CDFN und SAPLIP-Domäne) aufgereinigt. Exemplarisch werden Silber- und Coomassiefärbungen der einzelnen Eluatfraktionen der Aufreinigung gezeigt, welche den Aufreinigungserfolg während der Reinigungsentwicklung verdeutlichen. Die Reinheit der Proteine war hier von besonderer Bedeutung, da diese für weitere Versuche an neuronalen Zellkultursystemen (siehe 4.4. Inkubation von neuronalen Zellkultursystemen mit extern zugegebenem CDFN bzw. SAPLIP-Domäne) eingesetzt wurden. Unbehandelte Fermenterüberstände konnten nicht direkt auf die Ni-NTA-Säulen geladen werden (Abb. 4.26).

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



1: Standard

2: Waschfraktion

3-11: Eluatfraktionen 1-9

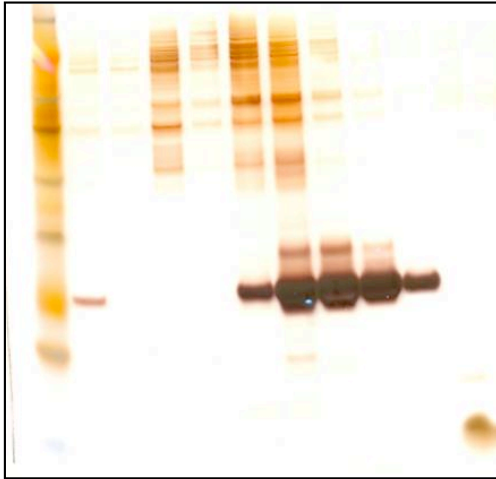
Abb. 4.26: SDS-PAGE und Silberfärbung von CDFN-Eluatfraktionen einer Ni-NTA-Chromatographie. Die ersten Fraktionen sind stark verunreinigt, erst die letzten beiden CDFN-Fraktionen sind ausreichend rein.

Die Säule zeigte schon kurz nach Start des Ladens bräunliche Verfärbungen, Auswaschungen und das Zielprotein wurde nicht mehr gebunden. Um störende niedermolekulare Stoffe zu entfernen, wurde vor der affinitätschromatographischen Aufreinigung über Ni-NTA eine Dialyse mit TBS-Puffer (20 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, pH 7,4) durchgeführt (Abb. 4.27).

#### 4. Ergebnisse

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



1: Standard

2: Waschfraktion

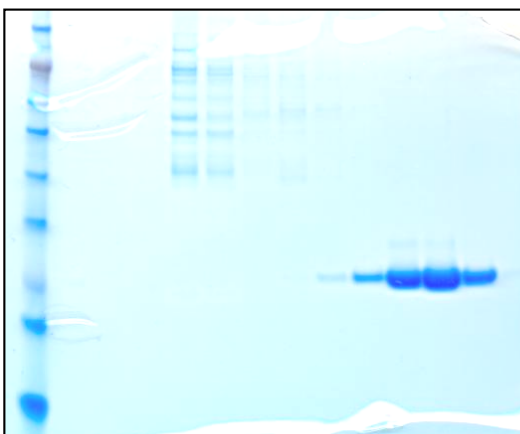
3-11: Eluatfraktionen 1-9

Abb. 4.27: SDS-PAGE und Silberfärbung von CDFN-Eluatfraktionen einer Ni-NTA-Chromatographie. Eine weitere Optimierung ist nötig, um die oberen Fremdbanden weiter zu reduzieren.

Diese Maßnahme erwies sich als effektiv, um ein möglichst sauberes Protein im Folgeschritt zu erzielen. Nach Reduzierung der Prozesstemperatur (alle Lösungen auf Eis und Säulenmantel auf 4°C gekühlt) und Reduktion der geladenen Säulenvolumina auf < 12 erwies sich die Aufreinigung als zufrieden stellend. Fremdbanden konnten nach Elektrophorese und Färbung mit Coomassie Brilliant Blue nicht mehr detektiert werden (Abb. 4.28)

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



1: Standard

2-3: Waschfraktion 1 und 2

4-13: Eluatfraktionen 1-9

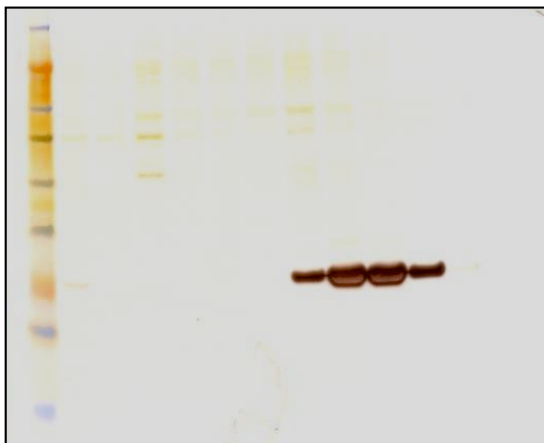
#### 4. Ergebnisse

Abb. 4.28: SDS-PAGE und Coomassiefärbung von CDNF-Eluatfraktionen einer Ni-NTA-Chromatographie. Die Optimierung ist abgeschlossen und der Prozess etabliert.

Die dialysierten Überstände (höchstens 12 SV) wurden vereinigt und mit einer Flussrate von 2 ml/ min auf die Ni-NTA-Säule geladen. Zur Elution wurde ein Imidazolgradient von 15 bis 100 mM über 30 min angelegt. Die Eluatfraktionen wurden gesammelt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Fremdbanden waren auch nach der sensitiven Silberfärbung sehr schwach oder nicht vorhanden (Abb. 4.29).

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



1: Standard

2-3: Waschfraktion 1 und 2

4-13: Eluatfraktionen 1-9

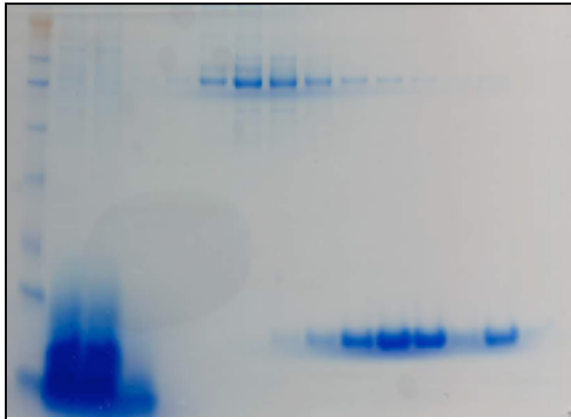
Abb. 4.29: SDS-PAGE und Silberfärbung von CDNF-Eluatfraktionen einer Ni-NTA-Chromatographie. Die Optimierung ist abgeschlossen und der Prozess etabliert.

Bei den ersten Reinigungsversuchen für die SAPLIP-Domäne verunreinigten Fremdproteine die Eluatfraktionen (Abb. 4.30) Dadurch wurde eine Optimierung des verwendeten CDNF-Aufreinigungsprotokolls nötig.

#### 4. Ergebnisse

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15



1: Standard

2-3: Waschfraktion 1 und 2

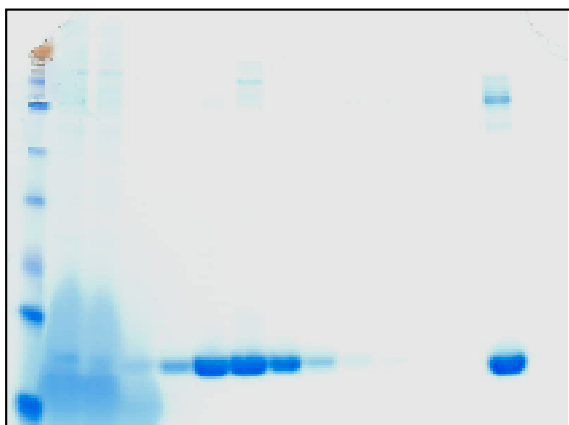
4-15: Eluatfraktionen 1-11

Abb. 4.30: SDS-PAGE und Coomassie-Färbung nach Elektrophorese der Eluatfraktionen einer Ni-NTA-Chromatographie der SAPLIP-Domäne. Eine weitere Optimierung ist nötig, um die oberen Fremdbanden zu reduzieren.

Zuerst wurde den vorbehandelten Kulturüberständen mehr Imidazol zugefügt. Jedoch erwiesen sich Konzentrationen von  $> 35$  mM als zu hoch, da im Durchfluss zuviel Zielprotein miteluiert wurde (Abb. 4.31). Die erhöhte Konkurrenz um die freien Bindungsstellen verschob sich zu stark zu Lasten der Bindung des Zielprotein.

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



1: Standard

2-3: Waschfraktion 1 und 2

4-13: Eluatfraktionen 1-9

14: Durchfluss

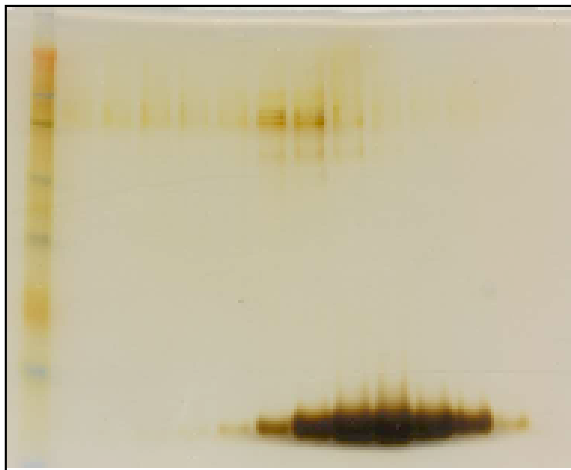
Abb. 4.31: SDS-PAGE und Coomassie-Färbung nach Elektrophorese der Eluatfraktionen einer Ni-NTA-Chromatographie der SAPLIP-Domäne. Zu viel des Zielproteins wird nicht gebunden und läuft in den Durchfluss (Bahn 14).

#### 4. Ergebnisse

Bei  $< 35$  mM Imidazol wurde die Bindung des Zielproteins deutlich verbessert. Im Durchfluss konnte das Zielprotein nicht mehr detektiert werden (Abb. 4.32). Die miteluierten Fremdbanden konnten im Gel nach Coomassie-Färbung auch nicht mehr detektiert werden. Die empfindlichere Silberfärbung zeigte jedoch eine geringe Verschmutzung der Eluatfraktionen.

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



1: Standard

2-3: Waschfraktion 1 und 2

4-13: Eluatfraktionen 1-9

14: Durchfluss

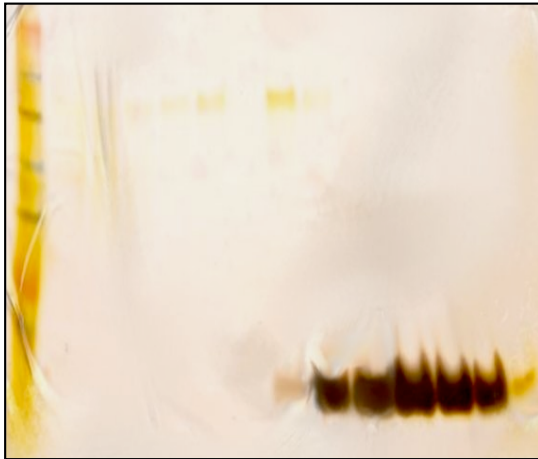
Abb. 4.32: SDS-PAGE und Silberfärbung der Eluatfraktionen der SAPLIP-Domäne nach einer Ni-NTA Chromatographie und SDS-Gelelektrophorese. Eine weitere Optimierung ist nötig, um die oberen Fremdbanden weiter zu reduzieren.

Durch Imidazolkonzentrationen von ca. 25 mM in den aufgetragenen Kulturüberständen konnten sehr gute Ergebnisse erzielt werden. Außerdem wurde eine höhere NaCl-Konzentration von 200 mM im vorbehandelten Kulturüberstand eingesetzt. Dies erlaubte eine hochreine Elution der meisten Fraktionen des Zielproteins wie Abb 4.33. zeigt.

## 4. Ergebnisse

Bahnen-Nr.:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14



1: Standard

2-3: Waschfraktion 1 und 2

4-14: Eluatfraktionen 1-10

Abb. 4.33: SDS-PAGE und Silberfärbung der Eluatfraktionen der SAPLIP-Domäne nach einer Ni-NTA Chromatographie und SDS-Gelelektrophorese. Die Optimierung ist abgeschlossen und der Prozess etabliert.

Von den einzelnen Aufreinigungen wurden nur die saubersten Eluatfraktionen verwendet. Diese wurden vereinigt und weiter konzentriert, dialysiert und sterilfiltriert abgefüllt. Die für die Versuche mit neuronalen Zellkultursystemen verwendeten Chargen sind in Abb. 4.34 dargestellt. Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über die Proteinkonzentrationen der Chargen. Die Proteinkonzentrationen wurden über einen BCA-Test ermittelt.

## 4. Ergebnisse

Bahnen-Nr.:

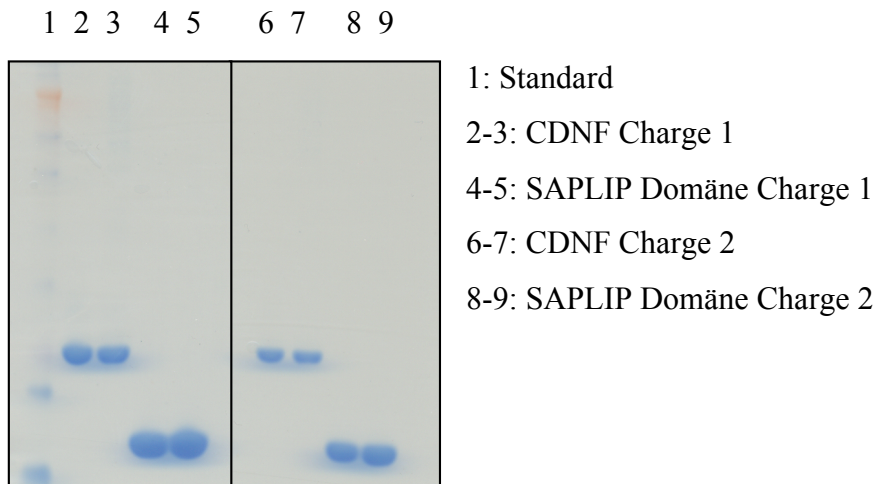


Abb. 4.34: SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der für die Versuche mit neuronalen Zellkultursystemen verwendeten CDNF und SAPLIP-Domäne Chargen nach vollständiger Aufreinigung.

Tab. 4.3: Proteinkonzentrationen der für die Versuche mit neuronalen Zellkultursystemen verwendeten CDNF und SAPLIP-Domäne Chargen

	<b>CDNF Ch. 1</b>	<b>SAP Ch. 1</b>	<b>CDNF Ch. 2</b>	<b>SAP Ch. 2</b>
Proteinkonzentrationen nach Aufreinigung ( $\mu\text{g/ml}$ )	1700	4600	860	1100

Die unterschiedlichen Konzentrationen ergeben sich aus verschiedenen Volumina während der Kultivierung und der ausgesuchten Eluatfraktionen. Durch die ausschließliche Verwendung der saubersten Eluatfraktionen war die Ausbeute der Aufreinigung mit  $< 35\%$  schlecht. Durch die sehr guten Produktionsraten der verwendeten Klone im Milligramm-Bereich konnte jedoch ausreichend hochreines Produkt hergestellt werden.

### 4.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Assoziation von CDNF an Zellmembranen

Zur Bestimmung der Internalisation von extern appliziertem CDNF wurden CHO-Zellen mit einem GFP-(4xGGS)-CDNF-Fusionsprotein inkubiert. Als Positivkontrolle wurde ein GFP-

#### 4. Ergebnisse

(4xGGS)-Tat-Fusionsprotein verwendet, aber es konnte kein Transduktions- oder Endozytoseeffekt erzielt werden. Eine Aufnahme des GFP-(4xGGS)-Tat-Fusionsproteins in die Zelle konnte somit nicht detektiert werden. Trotzdem konnte reproduzierbar eine Membranassoziation des GFP-(4xGGS)-Tat-Fusionsprotein beobachtet werden, die im Weiteren als Positivkontrolle für eine Membranassoziation der getesteten GFP-Fusionsprodukte dient. Um membrangebundene Proteine zu entfernen, wurden die Zellen mit PBS-Puffer mit niedrigem pH-Wert (pH 4,0) gewaschen. Zuvor wurde die Empfindlichkeit von CHO Zellen gegenüber diesem Medium getestet, um ein sofortiges Absterben der Zellen zu verhindern (Abb. 4.35).

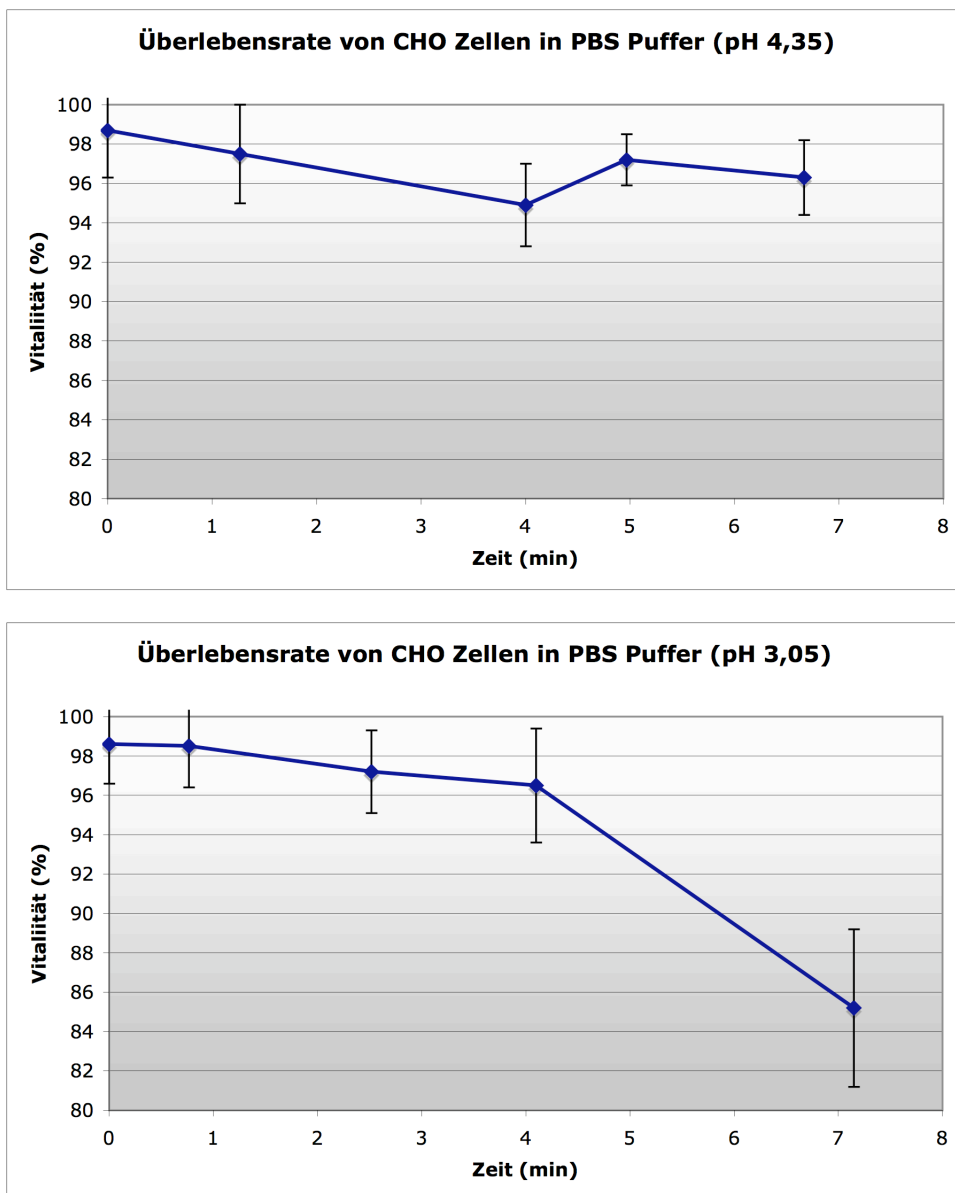


Abb. 4.35: Quantifizierung der Überlebensrate von CHO-Zellen bei Inkubation in PBS-Puffer mit niedrigen pH Werten (pH 3,05 und pH 4,35) (n=3).



## 4. Ergebnisse

CDNF besteht aus zwei Subdomänen: der *saposin like protein* Domäne (SAPLIP) und der *scaffold attachment factor* (SAF) Domäne. SAPLIP-Domänen können Lipide binden oder auch Membranstrukturen zerstören (Kolter et al., 2005). Folglich wurden Versuche mit extern zugegebenem CDNF durchgeführt, um einen möglichen membranassoziativen oder sogar transduzierenden Effekt zu finden. Zur einfachen Detektion von CDNF wurde ein GFP-4x(GGS)-CDNF-Fusionsprotein hergestellt. Als Positivkontrolle sollte eine Transduktionsmethode mithilfe des Tat-Proteins (*trans-activator of transcription*) als Proteintransduktionsdomäne (PTD) dienen (Ryu et al., 2003). Tat ist ein Oberflächenprotein des *human immunodeficiency virus-1* (HIV-1) (Frankel und Pabo, 1988). Die positiv geladenen Guanidiniumseitenketten der argininreichen Tat-Sequenz spielen eine herausragende Rolle bei der Transduktion und Endocytose von PTD-haltigen Proteinen (Wender et al., 2008). Guanidiniumgruppen binden an negativ geladene Glukosaminoglykane wie Heparansulfat auf der Zelloberfläche (Ziegler, 2007). PTDs werden nach dem Kontakt mit der Zelloberfläche hauptsächlich über einen energieabhängigen endozytotischen Prozess internalisiert (Veldhoen et al, 2008; Wender et al., 2008).

CHOK1S1-Zellen wurden hierfür mit unterschiedlichen Konzentrationen der GFP-Fusionsproteine (GFP-4x(GGS)-CDNF, GFP-4x(GGS)-Tat, GFP-Negativkontrolle) inkubiert. Nach definierten Inkubationszeiten wurden Proben aus den Ansätzen entnommen, behandelt und gemessen (siehe 3.4 Durchflusszytomtrie).

Das nicht fusionierte GFP als Negativkontrolle zeigte keine Assoziation mit der Zellmembran (Abb. 4.36).

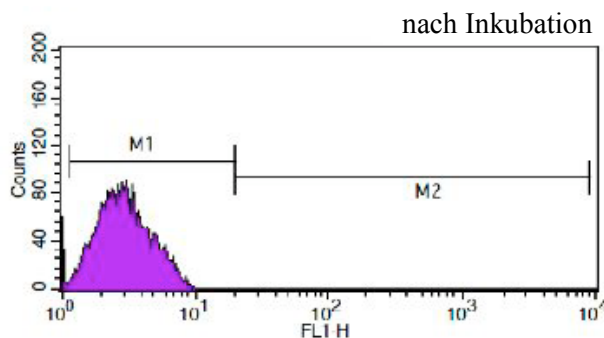


Abb. 4.36: FACS-Analyse von CHOK1-Zellen, die mit GFP-Fusionsproteinen inkubiert wurden. Die Negativkontrolle GFP wurde nicht an die Membran gebunden. M1 und M2 sind manuell gesetzte Abschnitte zur späteren statistischen Auswertung der Messergebnisse. Der Abschnitt M1 umfasst dabei den Bereich, der als Negativsignal gewertet wird.

#### 4. Ergebnisse

Das GFP-4x(GGS)-Tat-Fusionsprotein konnte eindeutig als membranassoziiert bestimmt werden (Abb. 4.37). Ein Transduktions- oder Endozytoseeffekt wurde nicht beobachtet. Die Fusionsproteine wurden nicht internalisiert. Nach einem Waschschritt mit PBS-Puffer mit niedrigem pH (pH 4,0) verschwand das zuvor detektierte Signal. Dies weist darauf hin, dass das Protein schnell wieder von der Zellmembran abgelöst wurde und daher nicht in die Membran eingelagert gewesen sein kann und es auch nicht die Membran passiert haben kann.

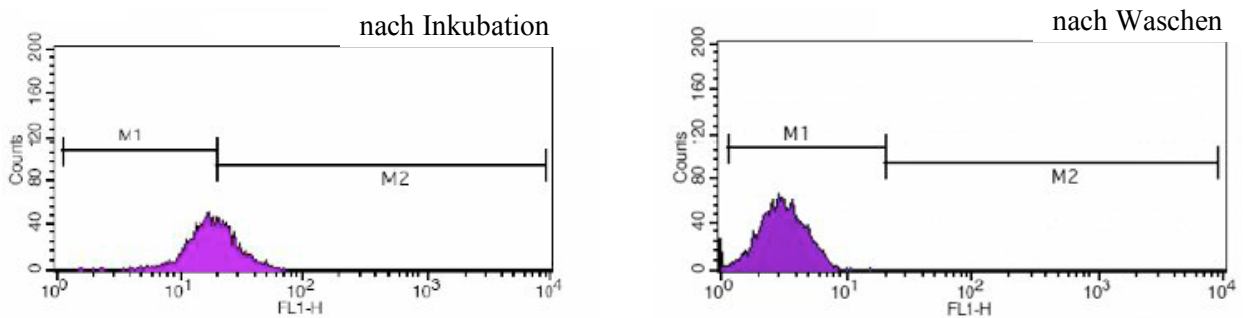


Abb. 4.37: FACS-Analyse des zu CHO-K1-Zellen zugegebenen GFP-(4xGGS)-Tat Fusionsproteins. Die Positivkontrolle GFP-(4xGGS)-Tat war an die Membran gebunden, wurde aber nicht von den Zellen aufgenommen. Nach dem Waschen der Zellen mit Waschpuffer (pH 4,0), konnte das Signal nicht mehr detektiert werden.

Die Inkubation der CHO-Zellen mit einem GFP-4x(GGS)-CDNF-Fusionsprotein zeigte keine Assoziation mit der Zellmembran (Abb. 4.38).

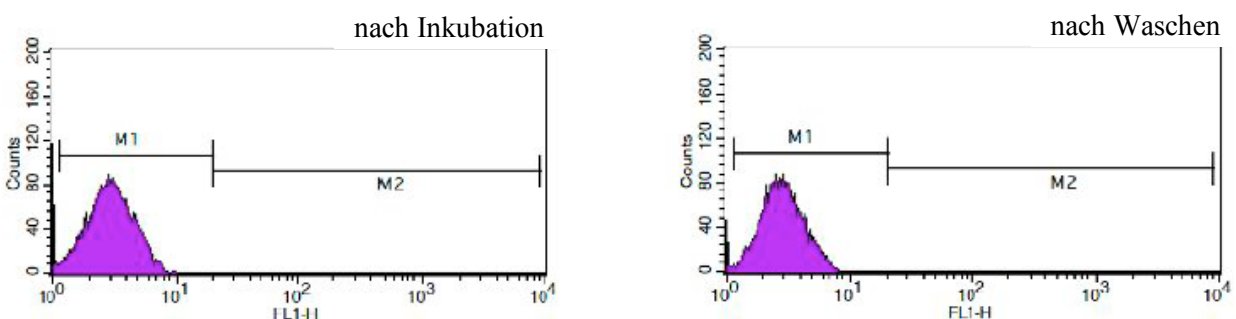


Abb. 4.38: FACS-Analyse von CHO-K1-Zellen, die mit dem GFP-(4xGGS)-CDNF-Fusionsprotein inkubiert wurden. GFP-(4xGGS)-CDNF zeigte keine Bindung an die Membran.

## 4. Ergebnisse

### 4.3 Charakterisierung der zellulären Lokalisation von mutierten CDNF-Proteinen

#### 4.3.1 ER-Isolierung aus CDNF- und MANF-HEK293 Klonen

Die biologischen Mechanismen hinter dem neuroprotektiven Effekt von extern zugegebenem MANF oder CDNF sind größtenteils unbekannt. Beide Proteine werden als sekretiert (Lindholm et al., 2007; Petrova et al., 2003; Apostolou et al., 2008; Tadimalla et al., 2008) oder partiell ER-resident beschrieben. Sie tragen am äußersten C-Terminus Sequenzen wie RTDL (MANF) oder KTEL (CDNF), die eine starke Ähnlichkeit zum ER-Retentionssignal KDEL besitzen. Einige Studien wurden mit maskiertem C-Terminus durchgeführt, was zu Problemen bei der Ergebnisinterpretation führte. Tadimalla et al. (2008) zeigten, dass endogenes MANF unter normalen Bedingungen nicht sekretiert wird. Wurden die Zellen ER-Stress ausgesetzt, wurde MANF sekretiert. Maskierten sie jedoch den äußersten C-Terminus RTDL mit einem Hämagglutinin-Tag, wurde MANF auch unter normalen Bedingungen sekretiert.

Zur Untersuchung der Lokalisation wurde das Endoplasmatische Retikulum aus HEK293-Zellen, die mit MANF oder CDNF transfiziert waren, isoliert. Beide Proteine, MANF mit C-terminaler RTDL-Sequenz (Abb. 4.39) und CDNF mit C-terminaler KTEL-Sequenz (Abb. 4.40, 4.41, 4.42), waren nur im Inneren der Zelle vorzufinden. Folglich wurden die Proteine nicht oder nur unterhalb der Detektionsgrenze sekretiert. Auch bei zehnfach konzentriertem Medium konnten CDNF bzw. MANF nicht im Zellkulturmedium detektiert werden.

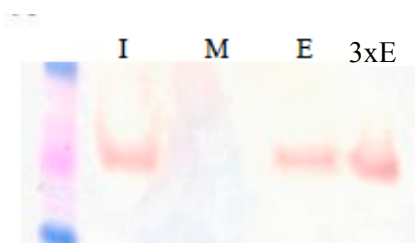


Abb. 4.39: MANF wurde in Zelllysaten (I) aber nicht im Kulturüberstand detektiert (Kulturüberstand 10:1 konzentriert) (M). Die Isolierung des ER zeigte, dass MANF ER-resident ist (E, 3xE = dreifache Masse an ER-Präzipitat). ER-Proben wurden 3:1 konzentriert.

## 4. Ergebnisse

Natives CDNF trägt ein C-terminales KTEL-Motiv, welches durch Mutagenese zum allgemeinen Retentionssignal KDEL geändert wurde. Weitere Modifikationen der KTEL-Sequenz waren die Mutation zu AAAA und die vollständige Elimination von KTEL. Alle Proteine konnten in ER-Präparationen nachgewiesen werden, jedoch nicht in den zuvor abgetrennten Zelldebris der Zellyse. Die erhaltenen Signale für Proteine mit den C-terminale Retentionssequenzen KTEL oder KDEL waren dabei stärker sichtbar als die Signale der Mutanten ohne Retentionssignal (Abb. 4.40).

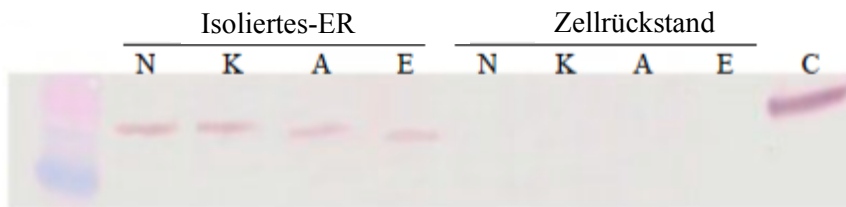


Abb. 4.40: Lokalisation von nativem und mutiertem CDNF in ER-Präparationen: natives CDNF (mit C-terminalem KTEL) (N), CDNF mit C-terminalem KDEL (K), CDNF mit C-terminalem AAAA (A), CDNF mit eliminiertem C-terminalem KTEL (E). Aufgereinigtes CDNF mit Hexahistidin-Tag wurde als Kontrolle (C) eingesetzt.

### 4.3.2 Bestimmung von externem und internem Gehalt an CDNF

Die Sekretion von nativem CDNF und CDNF-Mutanten wurde durch SDS-Gelelektrophorese mit nachfolgendem Westernblot bzw. Silverstain getestet (Abb. 4.41). Zusätzlich zu den zuvor genannten CDNF-Mutanten wurde noch eine Mutante mit dem C-terminalen Motiv RSDI getestet. Dieser Austausch erfolgte, um zu erkennen, ob Aminosäuren mit identischen chemischen Eigenschaften ein ähnliches Ergebnis wie KTEL erzeugen. Alle Proteine außer dem nativen CDNF konnten im Zellkulturmedium nachgewiesen werden. Zusätzlich, um Artefakte zu vermeiden, wurden jeweils vier verschiedene Transfektanden untersucht. Alle Transfektanden zeigten das gleiche Muster.

#### 4. Ergebnisse

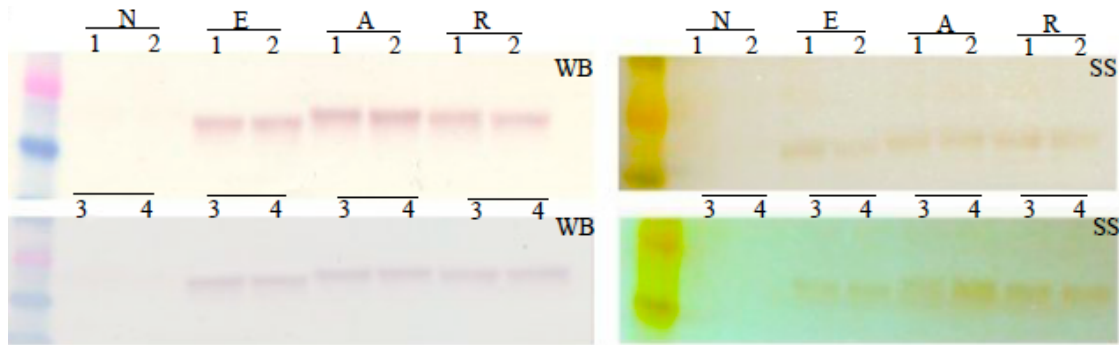


Abb. 4.41: Vier verschiedene, mit nativem und mutiertem CDNF transfizierte Klone (1-4) wurden auf sekretiertes Protein getestet, um klonspezifische Ergebnisse zu eliminieren: Natives CDNF (mit C-terminalem KTEL) (N), CDNF mit eliminiertem C-terminalem KTEL (E), CDNF mit C-terminalem AAAA (A), CDNF mit C-terminalem RSDI (R). Die Kulturüberstände wurden 10:1 konzentriert. Proben wurden mit Westernblot (WB) und nach Silberfärbung (SS) analysiert.

Zur Bestimmung von zellinternem und extrazellulärem Auftreten von nativen oder mutiertem CDNF wurden Proteinpräparationen von 200.000 Zellen bzw. 250 µl Medium einer konfluent bewachsenen Zellkultur (Vitalität >95%) analysiert (Abb. 4.42). Zusätzlich zu den bereits erwähnten Mutanten der vorherigen Experimente wurde eine Mutante mit maskiertem, nativem C-Terminus getestet. Zur Maskierung der KTEL-Endsequenz wurde ein Hexahistidin-Tag verwendet. Alle CDNF-Mutanten, unabhängig von den C-terminalen Aminosäuren, traten in den Zellen auf. CDNF mit der nativen KTEL-Endsequenz oder mit dem ER-Retentionssignal KDEL am C-Terminus konnten nicht extrazellulär nachgewiesen werden. Die Mutanten, deren vier C-terminale Aminosäuren zu RSDI oder AAAA geändert, deletiert oder maskiert wurden, konnten im Medium nachgewiesen werden. Dies zeigt die Bedeutung der KTEL-Endsequenz von CDNF, für eine starke Retention im ER. Eine Vitalität der verwendeten Zellkulturen von >95% war für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse essentiell. Nur durch frische Zellkulturen mit einer hohen Vitalität wird gewährleistet, dass eine reale Sekretion und nicht das gelöste Protein aus lysierten Zellen nachgewiesen wird.

## 4. Ergebnisse

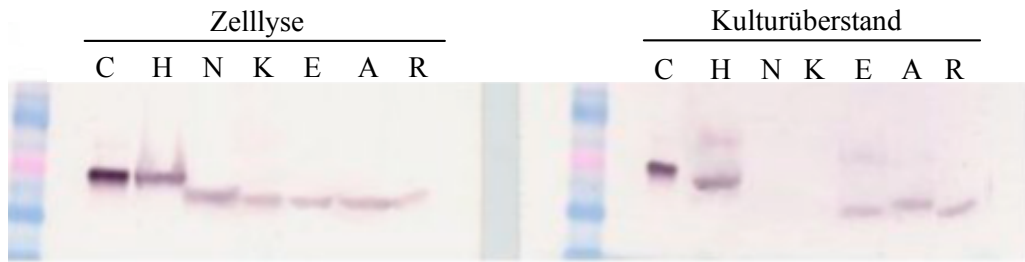


Abb. 4.42: Detektion von internem und externem Protein aller hergestellten CDNF Mutanten (siehe oben). Zusätzlich wurde als weitere Probe natives CDNF, dessen C-Terminus von einem Hexahistidin-Tag maskiert wird, aufgetragen (H). Internes Protein wurde aus der Präparation von 200.000 lysierten Zellen gewonnen. Externes Protein wurde aus 250  $\mu$ l Kulturüberstand von 100% konfluent gewachsenen Zellen mit einer Vitalität >95 % gewonnen.

### 4.3.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung

Verschiedene CDNF-Mutanten und natives CDNF wurden durch Immunfärbung und anschließende fluoreszenztechnische Auswertung untersucht. Transfizierte HEK293 Zellen wurden mit CDNF-Antikörpern und *glucose related protein 94* (grp94)-Antikörpern markiert. Grp94, auch bekannt als Endoplasmin oder *heat shock protein 90kDa beta member 1* (HSP90B1), ist ein ER-residentes Protein und wurde dementsprechend als ER-Marker verwendet. Immunfärbung der mit nativem CDNF transfizierten Zellen zeigten kein Protein im Innern des Zellkerns, jedoch Co-Lokalisation mit grp94 im ER (Abb. 4.43). Durch 3D-Aufnahmen konnte nachgewiesen werden, dass der Bereich des Zellkerns ungefärbt blieb. Die Co-Lokalisation ist in der direkten Umgebung des Kerns stärker ausgeprägt und nimmt in Richtung der peripheren Teile der Zelle ab. Kontrollversuche mit HEK293 MANF-Klonen, die mit dem gleichen Vektorsystem transfiziert und mit CDNF-Antikörper inkubiert wurden, wiesen keine unspezifische Färbung auf. Die Kontrollen wiesen ausschließlich das Muster der grp94 Verteilung im ER auf. Weiterhin zeigten auch alle CDNF-Mutanten Co-Lokalisation im ER, keine Assoziation mit dem Zellkern und eine ausgeprägte Färbung um den Zellkern herum (Abb. 4.43). Das Auffinden der mutierten Proteine mit maskierter oder deletierter KTEL-Sequenz im ER bestätigt somit auch die Ergebnisse der ER-Isolation. Bei den KTEL-

#### 4. Ergebnisse

deletierten Mutanten scheint eine geringere Menge an intrazellulärem CDNF vorzuliegen. Hier wird entweder naszierendes Protein angefärbt und/oder das Protein ist an ein zweites ER-residentes Protein gekoppelt.

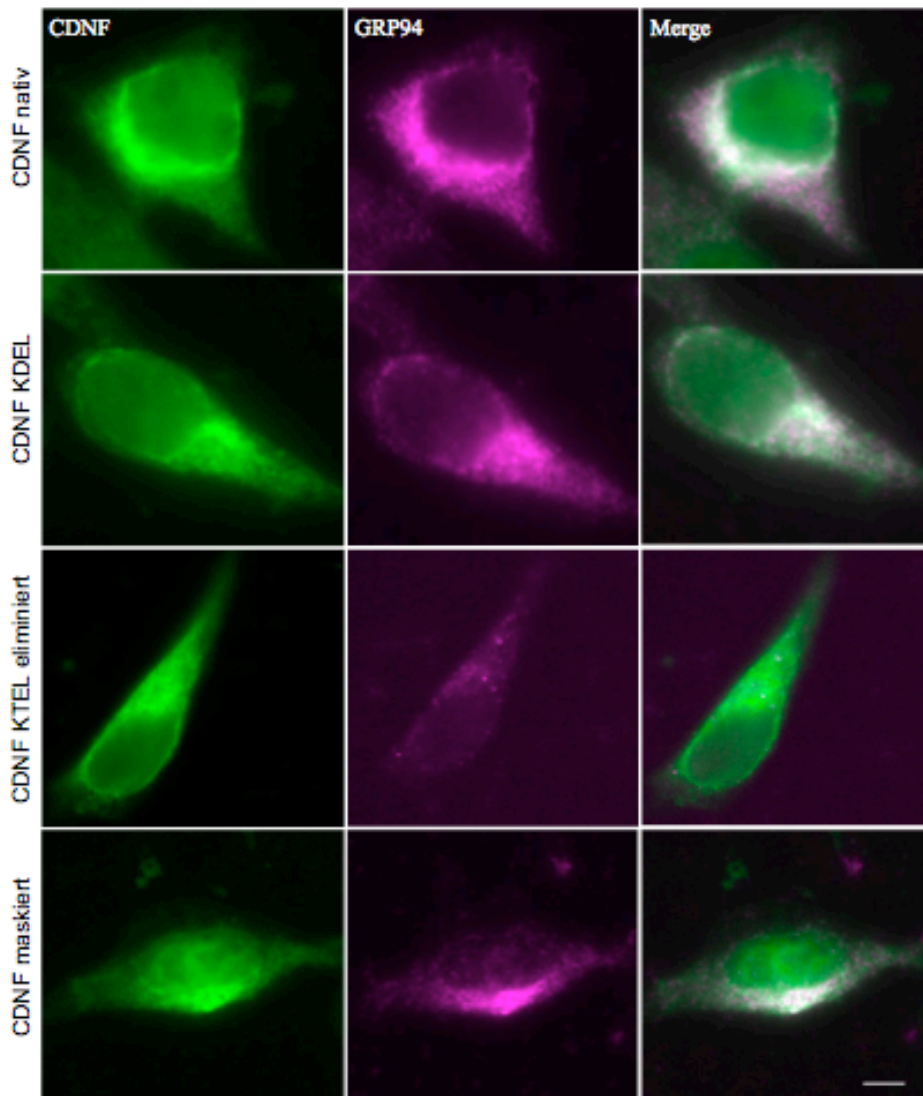


Abb. 4.43: Immunfluoreszenzanalyse von HEK293 Klonen, die natives und C-terminal mutiertes CDNF exprimieren. Die Zellen wurden doppelt fluoreszenzmarkiert mit CDNF-Antikörpern (Zeiss Filter 38, Anregung: 470 nm; Emission: 525 nm, dargestellt in magenta) und einem Antikörper gegen den ER-Marker GRP94 (Semrock<sup>®</sup> QD655-A Filter, Anregung: 435 nm, Emission: 655 nm, dargestellt in grün). Eine Co-Lokalisation wird durch Überlappung der Falschfarben zu weiß dargestellt (Merge). Kontrollversuche mit HEK293 MANF-Klonen, die mit dem gleichen Vektorsystem transfiziert und mit CDNF-Antikörper

## 4. Ergebnisse

inkubiert wurden, wiesen keine unspezifische Färbung auf. 3D-Aufnahmen zeigten einen ungefärbten Zellkern. Die Proben wurden mit einem Zeiss Imager Z1 Konfokal-mikroskop mikroskopiert. Der Maßstabsbalken ist 5  $\mu\text{m}$  groß.

### **4.4 Inkubation von neuronalen Zellkultursystemen mit extern zugegebenem CDNF bzw. SAPLIP-Domäne**

Die entsprechenden neuronalen Zellen wurden kultiviert und ab einem definierten Zeitpunkt geschädigt (siehe 3.7.1. 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)-Schädigungsmodell bzw. 3.7.2. Glutamat-Schädigungsmodell). CDNF oder SAPLIP-Domäne wurden in verschiedenen Konzentrationen entweder direkt während der Schädigung zugegeben oder die Kulturen mit den Proteinen vorinkubiert. Nach Schädigung und Inkubation über Nacht wurden die Kulturen beobachtet und die Inkubation gestoppt, indem das Medium abgesaugt und ein MTT-Test durchgeführt wurde. Zusätzlich wurden Zellen fixiert und die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenyldiol (DAPI) gefärbt. Über die Färbung und die Fragmentierung der Zellkerne von toten Zellen konnte das Ergebnis des MTT-Tests zusätzlich überprüft werden. Die Quantifizierung der Zellkerne über DAPI-Färbung unterstützen die Ergebnisse der MTT-Tests, dass kein reproduzierbarer, signifikanter Einfluss der Proteine auf das Überleben der Zellen in den getesteten Systemen detektiert werden konnte. Im Folgenden werden die Versuchsdurchführungen beschrieben und die Daten der MTT-Tests gezeigt. Durch das Fehlen eines messbaren Effekts konnten keine Dosis/Wirkungs-Beziehungen hergestellt werden. Weder wenige Nanogramm- noch zweistellige Mikrogramm-konzentrationen zeigten messbare Auffälligkeiten. Es wurden im Weiteren als Orientierungspunkt Konzentrationen im unteren Mikrogrammbereich gewählt, da die neuroprotektiven Eigenschaften von CDNF bei Lindholm et al. zwischen 3 und 10  $\mu\text{g}$  pro intrastriatler Applikation auftraten.

Während der Zellkulturversuche wurde eine Grenze für beide Proteine bei 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  festgestellt. Ab einer Konzentration von  $> 40 \mu\text{g}/\text{ml}$  zeigten sich negative Auswirkungen der Proteine auf die Kulturen, und die Vitalität verschlechterte sich im Vergleich zur Kontrolle. Mitgeführte Kontrollen von Waschfraktionen der chromatographischen Aufreinigungen zeigten diesen Effekt nicht. Somit ist ein Effekt über Verunreinigungen weitestgehend auszuschließen.



## 4. Ergebnisse

Die folgenden Ergebnisse zeigen die statistische Auswertung des Verhältnisses der Schädigung zum unbehandelten Zellkultursystem (Negativkontrolle). Als statistisches Modell wurde ein t-Test nach Student verwendet. Die Nullhypothese wird ab einem Signifikanzwert  $p < 0,05$  abgelehnt und das Ergebnis als statistisch signifikant gewertet (siehe 3.8 Statistische Auswertung).

### 4.4.1 Externe Zugabe von CDFN auf LUHMES-Zellen

Um eine starke Oxidation von 6-OHDA zu vermeiden, wurde den Kulturmedien Ascorbinsäure (AA) zugesetzt. Um Einflüsse von AA auf die Zellen zu erfassen, wurden LUHMES-Zellen über Nacht mit verschiedenen Konzentrationen behandelt. Bei einer Konzentration von  $>0,1 \mu\text{M}$  zeigte sich ein rapider Einbruch der Vitalität. Für weitere Versuche wurde eine Konzentration  $0,04 \mu\text{M}$  AA verwendet, die sich als unkritisch herausstellte (Abb. 4.44).

LUHMES-Zellen sind in allen Belangen äußerst empfindlich und müssen dementsprechend vorsichtig behandelt werden. Diese vorsichtige Behandlung ist teilweise schwer vereinbar mit einer zügigen Arbeitsweise. LUHMES-Zellen reagieren z.B. sehr empfindlich auf kurzzeitigen Kontakt mit der Umgebungsluft während des Mediumwechsels. Das Medium musste jedoch beim geplanten Versuchsablauf bis auf wenige Mikroliter komplett abgesaugt werden. Um den Einfluss des Mediumwechsels auf die Zellen zu testen, wurden diese exakt zehn Sekunden nach dem Absaugen des alten Mediums mit neuem Medium benetzt. Das Ergebnis zeigt, dass ein Zeitfenster von zehn Sekunden unkritisch ist (Abb. 4.44). Alle Pipettierarbeiten wurden daraufhin unterhalb des Zeitfensters von zehn Sekunden ausgeführt.

#### 4. Ergebnisse

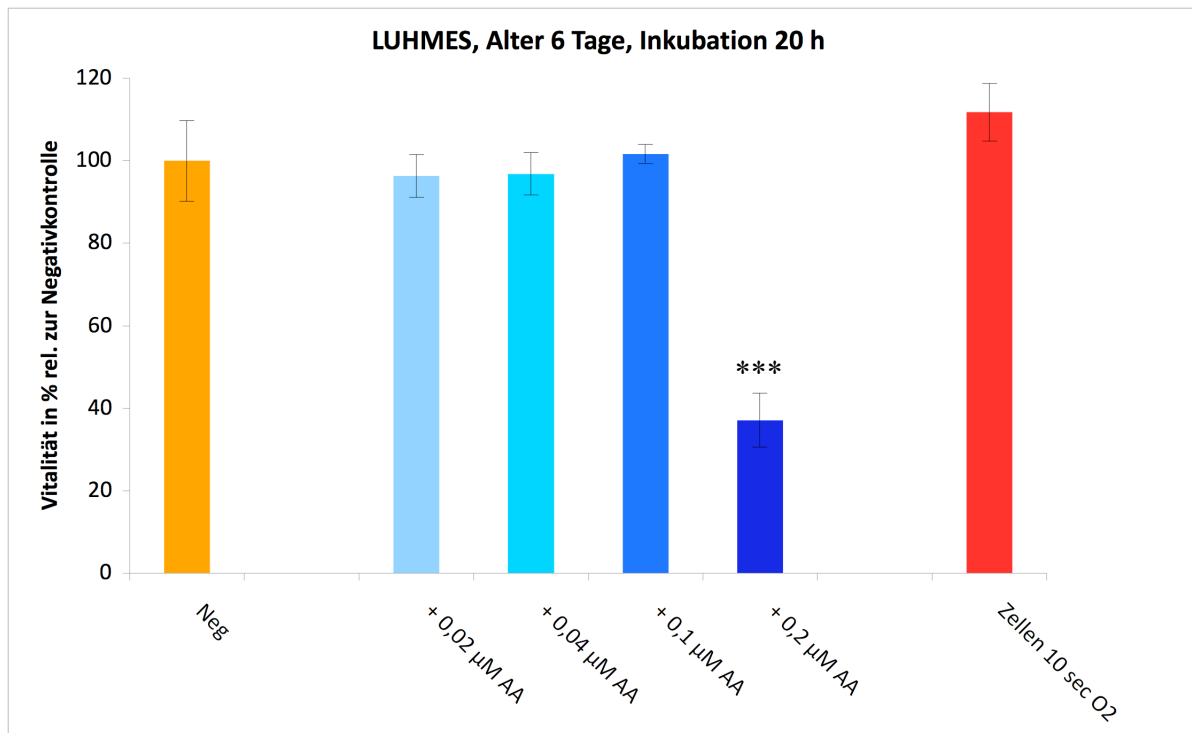


Abb. 4.44: Quantifizierung des Effekts von Ascorbinsäure auf LUHMES-Zellen. Außerdem wurde ein Empfindlichkeitstest gegenüber einer zehnssekündigen Exposition mit Umgebungsluft während eines kompletten Medienwechsels (Zellen 10 sec O<sub>2</sub>) durchgeführt. Statistische Auswertung über Student t-Test:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

Die LUHMES-Zellen reagierten auf verschiedene 6-OHDA Konzentrationen unterschiedlich. Eine definierte Konzentration, bei der nach einem definierten Zeitraum eine gewünschte Schädigung von 50-75 % der Zellen erreicht war, konnte nur bedingt ermittelt werden. Jede neue Kultur reagierte unterschiedlich und musste somit mit mehreren 6-OHDA Konzentrationen behandelt werden. Diese Vorgehensweise war aber auch nicht sicher, da teilweise Kulturen während eines Experiments mit einer Konzentration entweder komplett oder fast gar nicht geschädigt waren. Zum Beispiel war Versuch V9 (interne Nummer) gescheitert, da bei einer 6-OHDA-Konzentration von 15 µM die Kultur nur noch eine Überlebensrate von <20 % hatte, der nächste Konzentrationsschritt von 10 µM aber schon eine Vitalität von >80 %. Der Versuch war somit nicht auswertbar. Die 6-OHDA-Konzentrationen, um eine ausreichende Schädigung während eines 24 h Versuchs zu erzielen, variierten kontinuierlich zwischen 10 und 30 µM. Trotzdem konnten einige Versuche ausgewertet werden und zeigten deutlich, dass kein protektiver Effekt von den eingesetzten

#### 4. Ergebnisse

Proteinen detektiert werden konnte. Während der ersten Versuche wurde das Zielprotein ohne Vorinkubation direkt bei der Schädigung zugegeben (Abb. 4.45).

Als Vehikel wurden Waschfraktionen der chromatographischen Aufreinigungen ohne Zielprotein verwendet. Dadurch war es möglich den Einfluss von Verunreinigungen detektieren zu können. Das Volumen des Vehikels entsprach dem höchsten eingesetzten Volumen an Zielprotein während des Versuchs. In keinem Versuch konnte ein Effekt des Vehikels auf die Schädigung beobachtet werden.

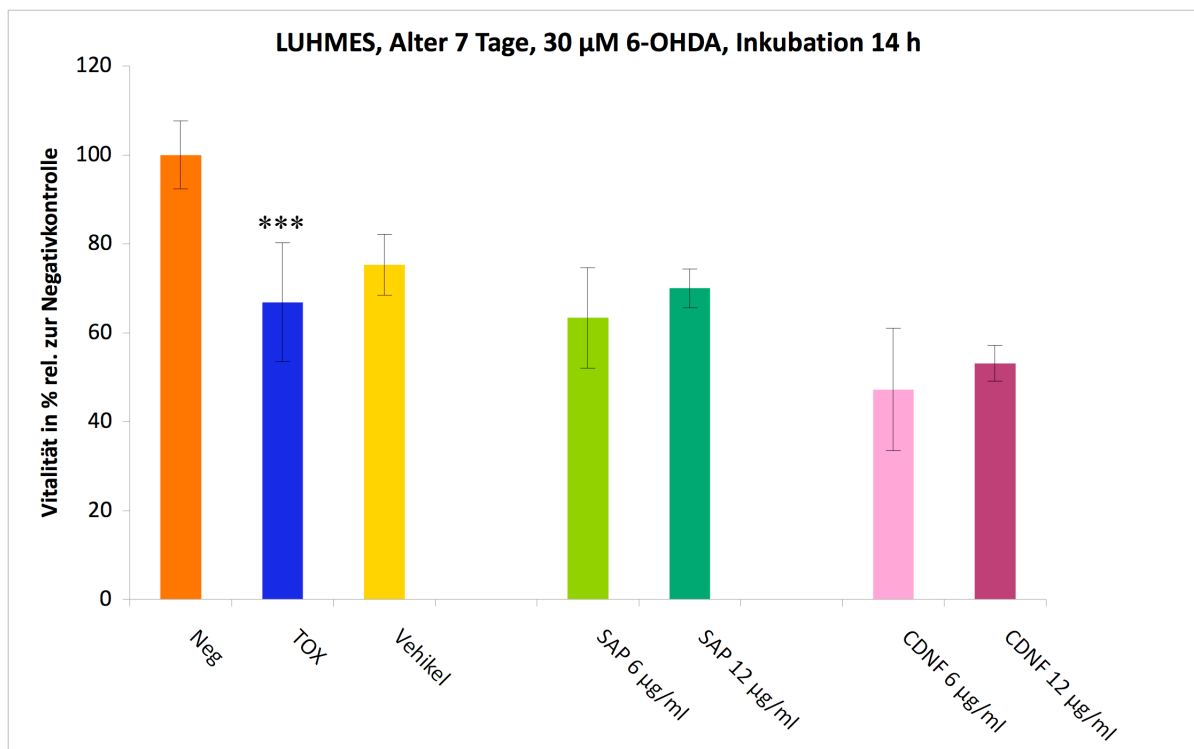


Abb. 4.45: Quantifizierung des Einflusses von SAPLIP-Domäne (SAP) und CDNF auf 6-OHDA (30 µM) geschädigte LUHMES-Zellen ohne Vorinkubation mit den Zielproteinen. Abkürzungen: Negativkontrolle: Unbehandelte Zellen (Neg), 6-OHDA Toxizitätskontrolle (TOX), Vehikelkontrolle: 6-OHDA + Vehikel (Vehikel). Die LUHMES-Zellen wurden sieben Tage ausdifferenziert. Nach einer Inkubation von 14 h wurde der Versuch ausgewertet. n=8, 96 Well Platte. Statistische Auswertung über Student t-Test: p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*)

Die Ergebnisse *in vivo* zeigten neuroprotektive Effekte nachdem CDNF vier Tage nach initialer Schädigung durch 6-OHDA appliziert wurde (Lindholm et al., 2007). Nachdem *in vitro* bei direkter Zugabe der Proteine während der Schädigung jedoch keine protektiven

#### 4. Ergebnisse

Effekte erzielt werden konnten, wurde das Versuchsprotokoll geändert und eine Vorinkubation der Proteine eingeführt. Die Proteine wurden mehrere Stunden vor Beginn der Schädigung zugefügt. Auch diese Maßnahme führte zu keiner messbaren Neuroprotektion (Abb. 4.46).

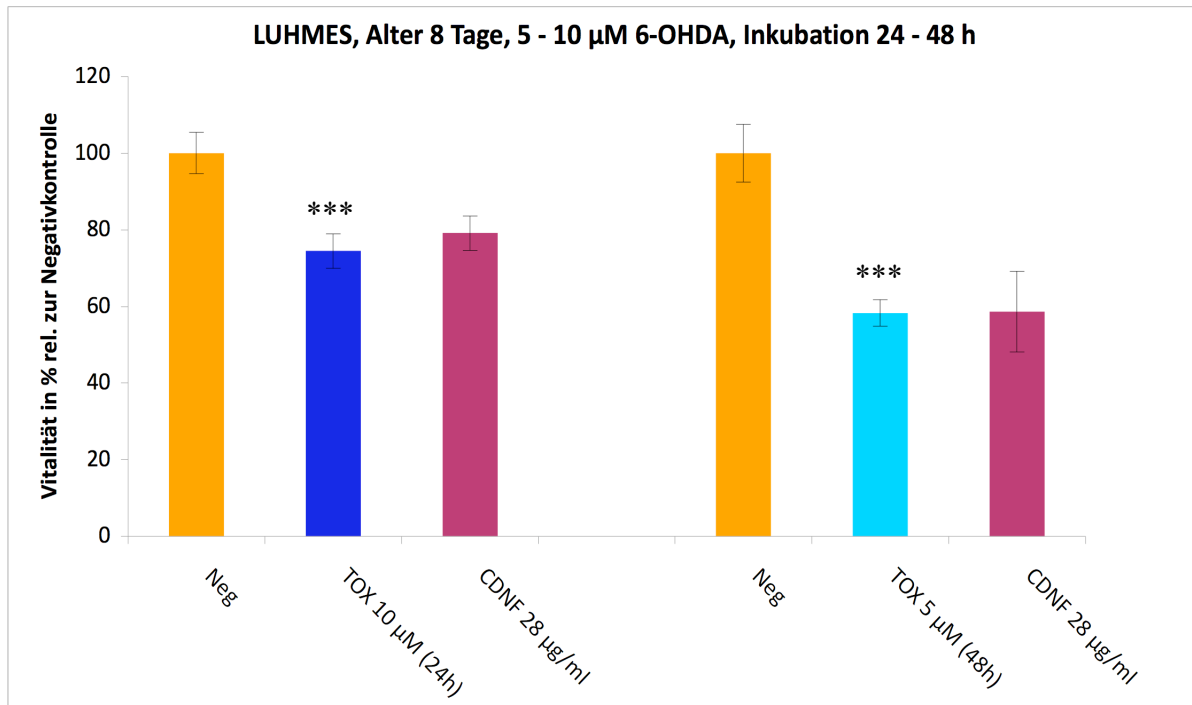


Abb. 4.46: Quantifizierung des Einflusses von CDNF auf 6-OHDA (5-10 µM) geschädigte LUHMES-Zellen mit Vorinkubation (6 h) mit CDNF. Die LUHMES-Zellen wurden acht Tage ausdifferenziert. Nach einer Inkubation von 24-48 h wurde der Versuch ausgewertet. n=8, 96 *Well* Platte. Statistische Auswertung über Student t-Test: p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*).

Die Versuche in 96 *Well* Platten waren schwer handhabbar, da die Zellen sich oft vom Plattenboden lösten, abnorme Zellstrukturen annahmen oder gänzlich abstarben. Des Weiteren hatte der auf die Kultivierung folgende MTT-Test ein hohes Grundrauschen, das die Auswertung stark beeinträchtigte und teilweise zu nicht validen Ergebnissen führte, sodass ganze Versuchsreihen verworfen werden mussten. Zusätzlich setzten die LUHMES-Zellen das MTT-Reagenz nur sehr schwach um. Dies hatte zur Folge, dass, obwohl lebende Zellen vorhanden waren, der untere Schwellenwert des Messbereichs nicht erreicht wurde. Die 96 *Well* Platten wurden gegen 24 *Well* Platten getauscht und die Versuche in größeren Volumina und mit weniger Replikationen wiederholt. Es wurde versucht, eine neue Dosis-Wirkungs-

#### 4. Ergebnisse

Kurve für die geänderten Bedingungen zu erstellen. Leider konnte dadurch die Unberechenbarkeit des Verhältnisses der Schädigung zur 6-OHDA Konzentration nicht eliminiert werden. Dies zeigt das Ergebnis der Dosis-Wirkungs-Kurve (Abb. 4.47) im Verhältnis zum Ergebnis des anschließend dargestellten Protektionsversuchs (Abb. 4.48). Die beiden Versuche gleichen sich in Bezug auf Zellalter, Zellzahl 6-OHDA Konzentration und Inkubationszeit. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung von 6-OHDA Konzentration zur Schädigung jedoch unterscheiden sich extrem: Ausdifferenzierte LUHMES-Zellen gleichen Alters, gleicher Zellzahl und gleicher Schädigungsdauer wurden mit  $5 \mu\text{M}$  6-OHDA einerseits zu 27 % (Abb. 4.47) geschädigt und andererseits zwei Wochen später zu 70 % (Abb. 4.48). Bei einer Schädigung mit  $10 \mu\text{M}$  6-OHDA wurden die Zellen einerseits zu 79 % (Abb. 4.47) geschädigt, und zwei Wochen später waren die Zellen komplett abgestorben (nicht dargestellt, da keine Auswertung möglich).

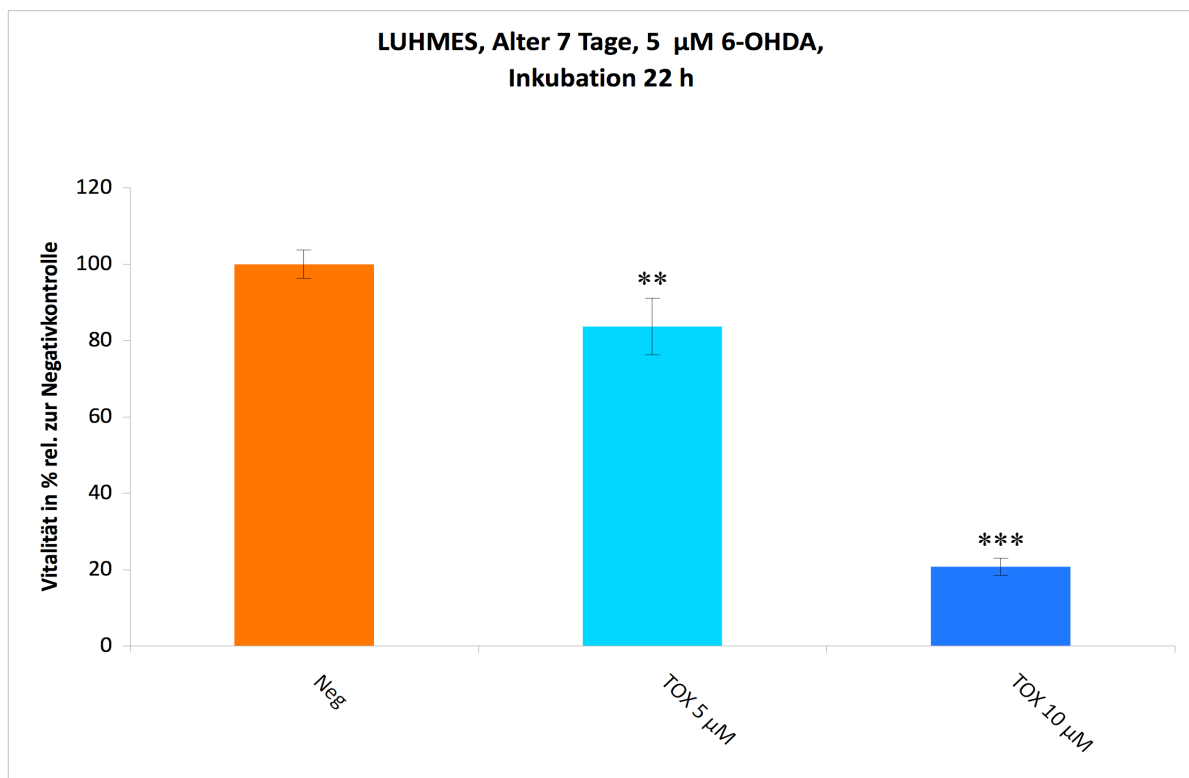


Abb. 4.47: Dosis-Wirkungs-Beziehung von 6-OHDA (5-10  $\mu\text{M}$ ) auf LUHMES-Zellen. Die LUHMES-Zellen wurden sieben Tage ausdifferenziert. Nach einer Inkubation von 22 h wurde der Versuch ausgewertet.  $n=4$ , 24 *Well* Platte, MTT-Reagenz in 24 *Well* Platte mit 170  $\mu\text{l}$  DMSO gelöst und in 96 *Well* Platte zur Messung im Photometer überführt (siehe 3.2.5 MTT-Test). Statistische Auswertung über Student t-Test:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

#### 4. Ergebnisse

Im Rahmen von Optimierungsversuchen konnte durch die gestiegene Anzahl an färbbaren Zellstrukturen und die Aufnahme des umgesetzten MTT-Reagenz in kleine Volumina DMSO der lineare Messbereich des Photometers leichter eingehalten werden, und das Grundrauschen des Tests verringerte sich erheblich (< 10%) (siehe 3.2.5 MTT-Test). Doch auch nach diesen Änderungen blieb das Bild der Versuche gleich: Eine Neuroprotektion war nicht zu erkennen (Abb. 4.48).

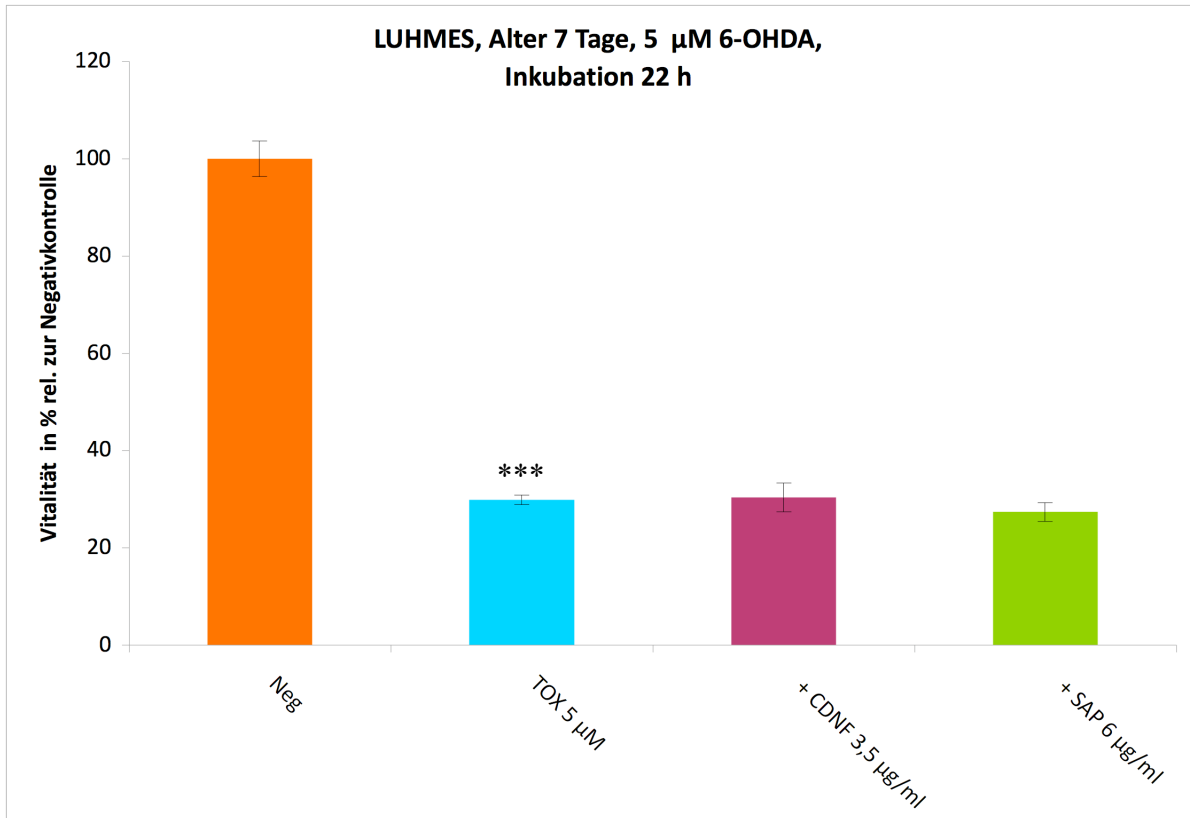


Abb. 4.48: Quantifizierung des Einflusses von SAPLIP-Domäne (SAP) und CDNF auf 6-OHDA (5  $\mu$ M) geschädigte LUHMES-Zellen mit Vorinkubation (6 h) der Zellen mit den Proteinen. Die LUHMES-Zellen wurden sieben Tage ausdifferenziert. Nach einer Inkubation von 22 h wurde der Versuch ausgewertet. n= 4, 24 *Well* Platte, MTT-Reagenz in 24 *Well* Platte mit 170  $\mu$ l DMSO gelöst und in 96 *Well* Platte zur Messung im Photometer überführt (siehe 3.2.5 MTT-Test). Statistische Auswertung über Student t-Test: p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*)

## 4. Ergebnisse

### 4.4.2 Externe Zugabe von CDNF zu primären Neuronen aus Rattenembryonen (PCN)

Während der Versuche mit primären Neuronen aus Rattenembryonen (PCN) wurde den Kulturmedien, wie zuvor den LUHMES-Kulturmedien, AA zugesetzt. Um Einflüsse von AA auf die PCN zu erfassen, wurde den Kulturmedien dieselbe AA Konzentration (0,04 mM) wie den LUHMES-Kulturmedien zugesetzt. Diese Konzentration stellte sich ebenso wie bei den LUHMES-Zellen als unkritisch heraus.

Der gesamte Versuchsablauf der LUHMES-Zellversuche wurde für die PCN übernommen. Die Arbeiten verliefen meist zügiger, da PCN eine stärkere Adhärenz zum Plattenboden besitzen und sie sich generell robuster während der Versuchsdurchführung zeigten. Als erstes wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt, bei der auch Versuche mit zwei CDNF-Konzentrationen (13 und 26  $\mu\text{g/ml}$ ) durchgeführt wurden (Abb. 4.49). Es zeigte sich, dass 6-OHDA-Konzentrationen im einstelligen Mikrogrammbereich nicht ausreichend waren für eine ausreichende Schädigung. Es ließ sich jedoch schon ablesen, dass auch PCN wahrscheinlich nicht durch CDNF protektiert werden können. Die Zunahme der Schädigung bei höheren 6-OHDA-Konzentrationen bei Kulturen mit CDNF war genauso hoch wie die der Kontrollgruppen. Die Kultivierung der PCN sowie die Durchführung des MTT-Tests in 96 *Well* Platten erwiesen sich hingegen als unproblematisch.

#### 4. Ergebnisse

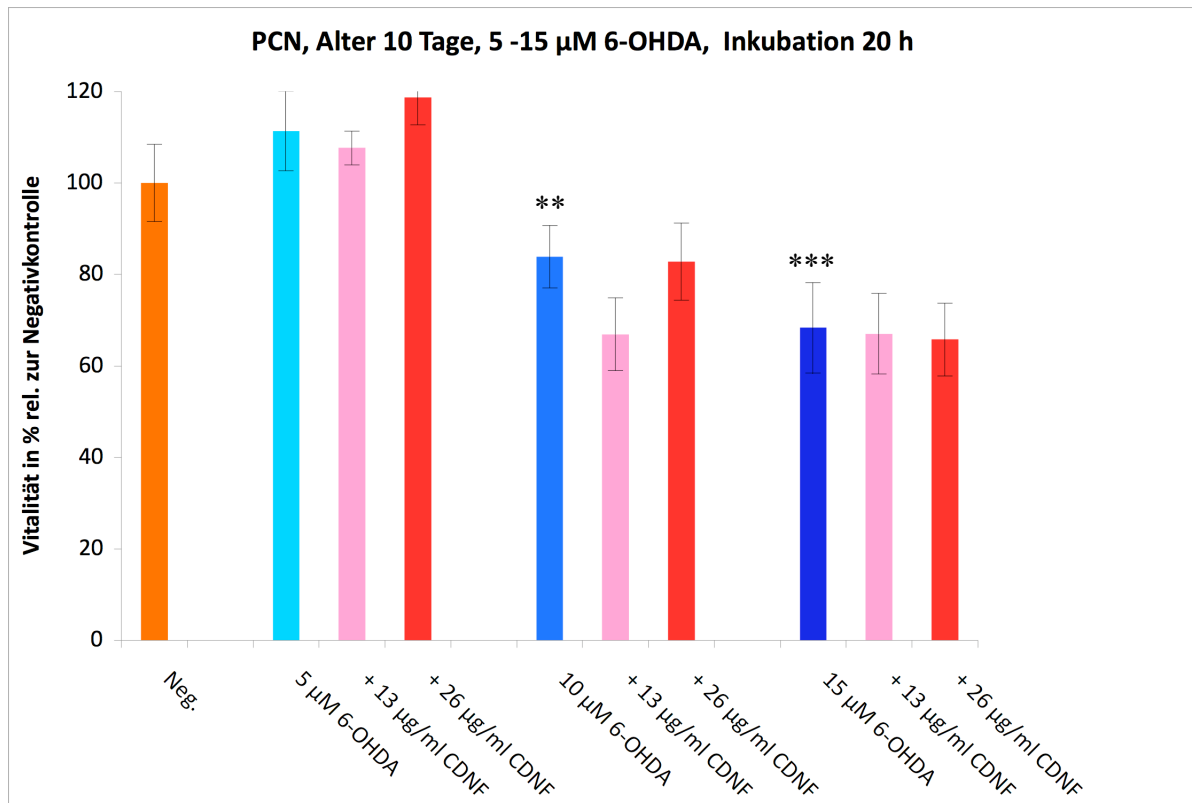


Abb. 4.49: Quantifizierung des Einflusses von CDNF auf 6-OHDA (5-15 µM) geschädigte PCN ohne Vorinkubation der Zellen mit den Proteinen. Die PCN wurden zehn Tage nach Isolierung kultiviert. Nach einer Inkubation von 20 h wurde der Versuch ausgewertet. n= 16, 96 *Well* Platte. Statistische Auswertung über Student t-Test: p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*)

Als Resultat wurden für die nächsten Versuche die 6-OHDA-Konzentrationen auf bis zu 35 mM erhöht (Abb. 4.50). Die Schädigungssymptome von PCN mit verschiedenen 6-OHDA Konzentrationen waren wesentlich robuster und damit beherrschbarer als bei LUHMES-Zellen. Mit 6-OHDA-Konzentrationen von 25-35 µM konnten reproduzierbar 50-60 % der Zellen bei einer Inkubationsdauer von ca. 20 h geschädigt werden. Es zeigten sich keine reproduzierbaren signifikanten protektiven Eigenschaften von CDNF. Zusätzlich wurde eine CDNF Kontrolle mitgeführt, die dieselbe CDNF-Konzentration enthielt und nicht geschädigt wurde, um eventuelle Effekte besser abschätzen zu können (Abb. 4.50). Eine Kontrolle mit einer entsprechenden Konzentration eines Fremdproteins (Albumin) wurde ebenso getestet. Beide Proteine hatten keinen signifikanten Einfluss auf die PCN-Kulturen.



#### 4. Ergebnisse

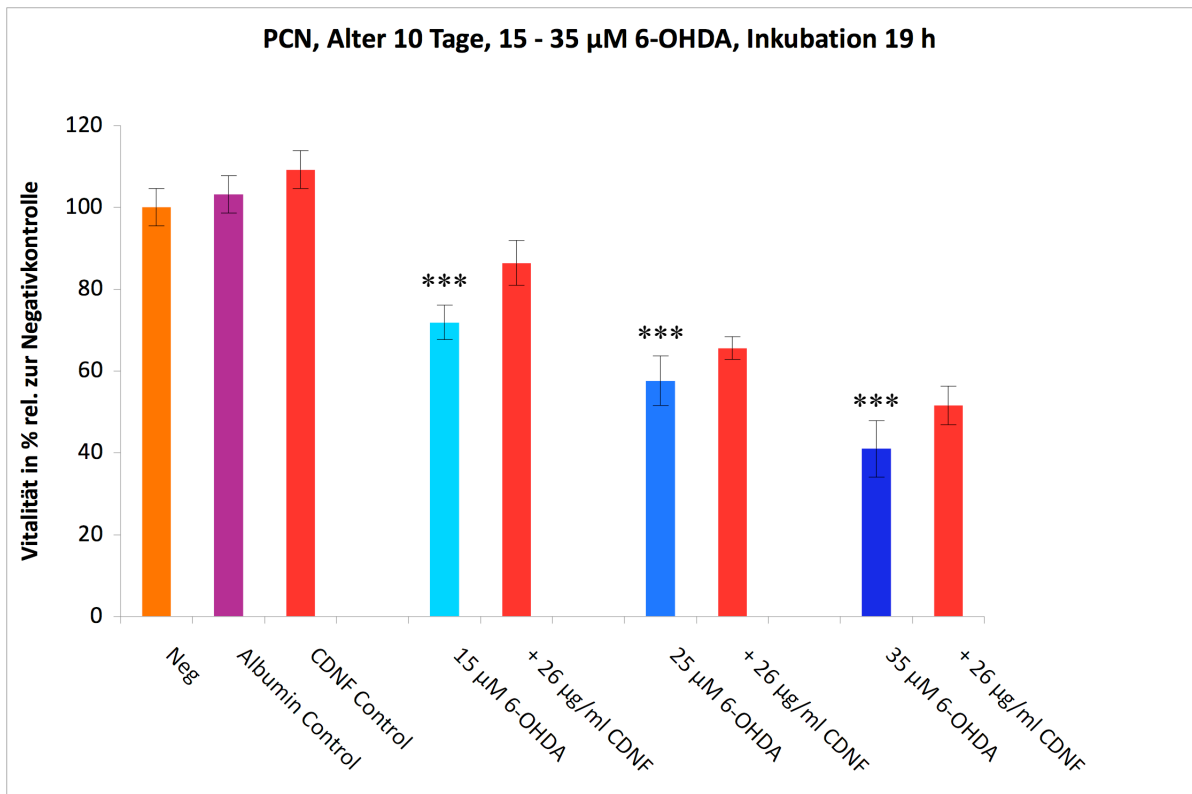


Abb. 4.50: Quantifizierung des Einflusses von CDNF auf 6-OHDA (15-35 µM) geschädigte PCN nach Vorinkubation der Zellen mit den Proteinen (5 h). Die PCN wurden zehn Tage nach Isolierung kultiviert. Nach einer Inkubation von 20 h wurde der Versuch ausgewertet. n= 16, 96 Well Platte. Statistische Auswertung über Student t-Test: p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*).

Bei weiteren Versuchen zeigten sich auch keine reproduzierbaren signifikanten protektiven Eigenschaften der SAPLIP-Domäne. Die Versuche wurden parallel zu den CDNF Versuchen unternommen und gleichen sich in Aufbau und Parametrierung. Zusätzlich wurde auch hier eine Kontrolle mitgeführt, die die gleiche Konzentration der SAPLIP-Domäne enthielt und nicht geschädigt wurde. Eine Kontrolle mit einer entsprechenden Konzentration eines Fremdproteins (Albumin) wurde ebenso getestet. Beide Proteine hatten keinen signifikanten Einfluss auf die PCN-Kulturen (Abb. 4.51).

#### 4. Ergebnisse

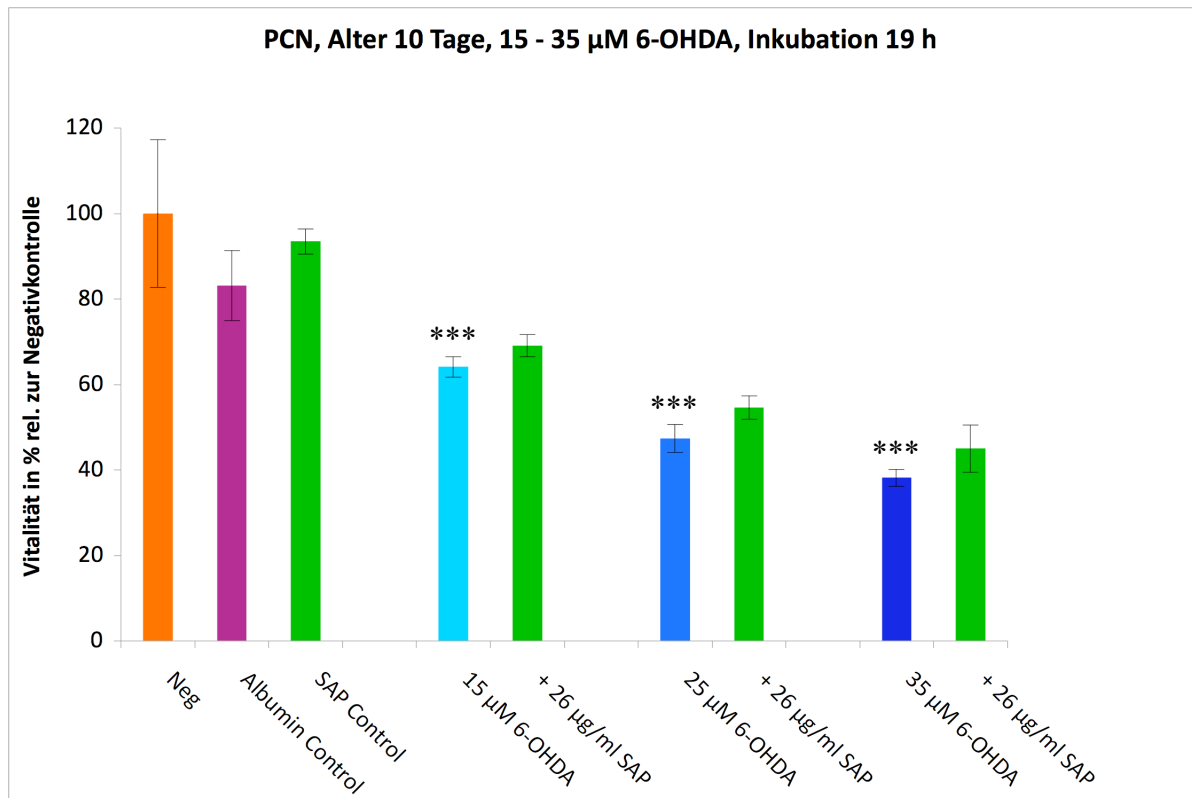


Abb. 4.51: Quantifizierung des Einflusses der SAPLIP-Domäne (SAP) auf 6-OHDA (15-35 µM) geschädigte PCN nach Vorinkubation der Zellen mit den Proteinen (5 h). Die PCN wurden zehn Tage nach Isolierung kultiviert. Nach einer Inkubation von 20 h wurde der Versuch ausgewertet. n= 16, 96 Well Platte. Statistische Auswertung über Student t-Test: p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*).

In verschiedenen *in vitro* Experimenten wurde GDNF als neuroprotektiv beschrieben (Petrova et al., 2007). GDNF kann im Nanogrammbereich (ng/ml) dopaminerge Neurone im Wachstum fördern und vor Schädigung schützen, jedoch wurde hauptsächlich ein Schutz als Additiv in serumfreien Kulturmedien (siehe 5. Diskussion) nachgewiesen. Hier sollte mit GDNF eine Positivkontrolle eingeführt werden, die eine permanente Schädigung von 6-OHDA verhindert. Im Bereich von wenigen ng bis zu 1 µg/ml zeigten sich keine protektiven Eigenschaften (Abb. 4.52). Die Schädigung mit 6-OHDA konnte somit auch von GDNF nicht verhindert werden. Es zeigten sich weiterhin keine reproduzierbaren signifikanten protektiven Eigenschaften von CDFN oder SAPLIP-Domäne. Die drei getesteten Proteine hatten keinen signifikanten Einfluss auf die PCN-Kulturen (Abb 4.52).

## 4. Ergebnisse

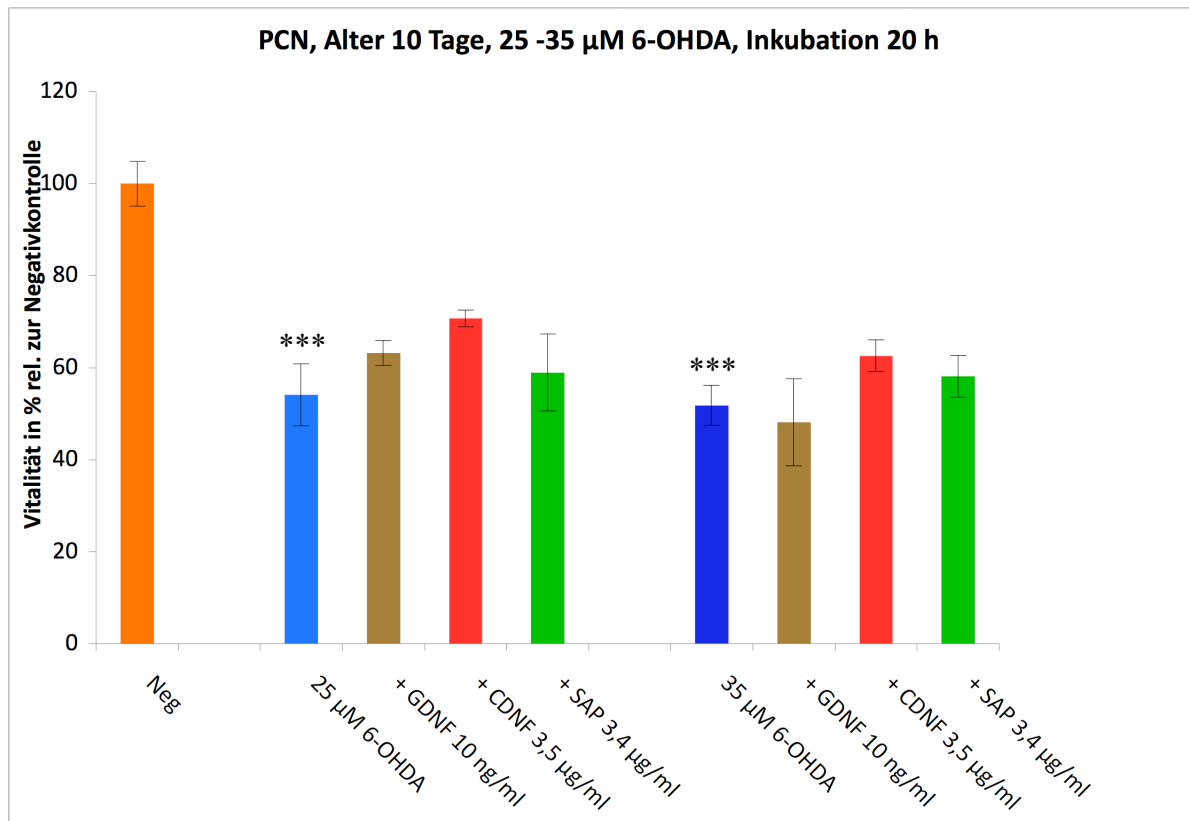


Abb. 4.52: Quantifizierung des Einflusses von GDNF, CDNF und SAPLIP-Domäne (SAP) auf 6-OHDA (15-35 µM) geschädigte PCN nach Vorinkubation der Zellen mit den Proteinen (6 h). Die PCN wurden zehn Tage nach Isolierung kultiviert. Nach einer Inkubation von 20 h wurde der Versuch ausgewertet. n= 16, 96 *Well* Platte. Statistische Auswertung über Student t-Test: p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*).

### 4.4.3 Externe Zugabe von CDNF zu HT-22-Zellen

Als drittes Testsystem wurden HT-22-Zellen verwendet. Die Zellen wurden nicht mit 6-OHDA sondern mit Glutamat geschädigt. Mit Glutamatkonzentrationen von 0,5-2 µM konnten reproduzierbar 40-80 % der Zellen bei einer Inkubationsdauer von ca. 15 h geschädigt werden. Als weitere Kontrolle wurde Neurobasal (Invitrogen, Darmstadt) mit B-27 (Invitrogen, Darmstadt) *Supplement* eingesetzt, das normalerweise bei der Kultivierung von primären Neuronen verwendet wird. Neurobasal ist ein chemisch definiertes Medium und B-27 ein synthetisches Stoffgemisch zur Proliferation von primären embryonalen Neuronen. Die Zusammensetzung ist geheim und daher nicht genauer anzugeben. Die guten neuroprotektiven Eigenschaften von Neurobasal/B-27 auch auf HT-22-Zellen wurden zufällig

#### 4. Ergebnisse

entdeckt: Beim ersten Versuch mit HT-22-Zellen wurde in Neurobasal/B-27 verdünntes CDNF verwendet. Daraufhin wurde ein signifikantes Ergebnis erzielt, das sich später jedoch auf den minimalen Einsatz von Neurobasal/B-27 zurückführen ließ. Neurobasal/B-27 zeigte einen echten neuroprotektiven Effekt. Anhand der signifikanten Ergebnisse von Neurobasal/B-27 und deren Robustheit, unabhängig von Pipettierschema, Konzentrationschwankungen, Testvarianz, Alter der Zellkultur etc. konnte hier eine sehr gute Positivkontrolle eingeführt werden. Weiterhin sollte zusätzlich GDNF als neurotropher Faktor getestet werden, um somit eine definierte, auf einem Wachstumsfaktor basierende Positivkontrolle zu erhalten. Die Glutamatschädigung der HT-22-Zellen konnte jedoch auch von GDNF nicht aufgehalten werden. Im Bereich von wenigen ng bis zu 100 ng/ml zeigten sich keine protektiven Eigenschaften. CDNF und SAPLIP-Domäne wurden auch hier im unteren Mikrogrammbereich eingesetzt. CDNF zeigte auch hier toxische Eigenschaften ab Konzentrationen von  $>40 \mu\text{g/ml}$ . Es zeigten sich jedoch keine reproduzierbaren signifikanten protektiven Eigenschaften von CDNF oder SAPLIP-Domäne (Abb. 4.53).

#### 4. Ergebnisse

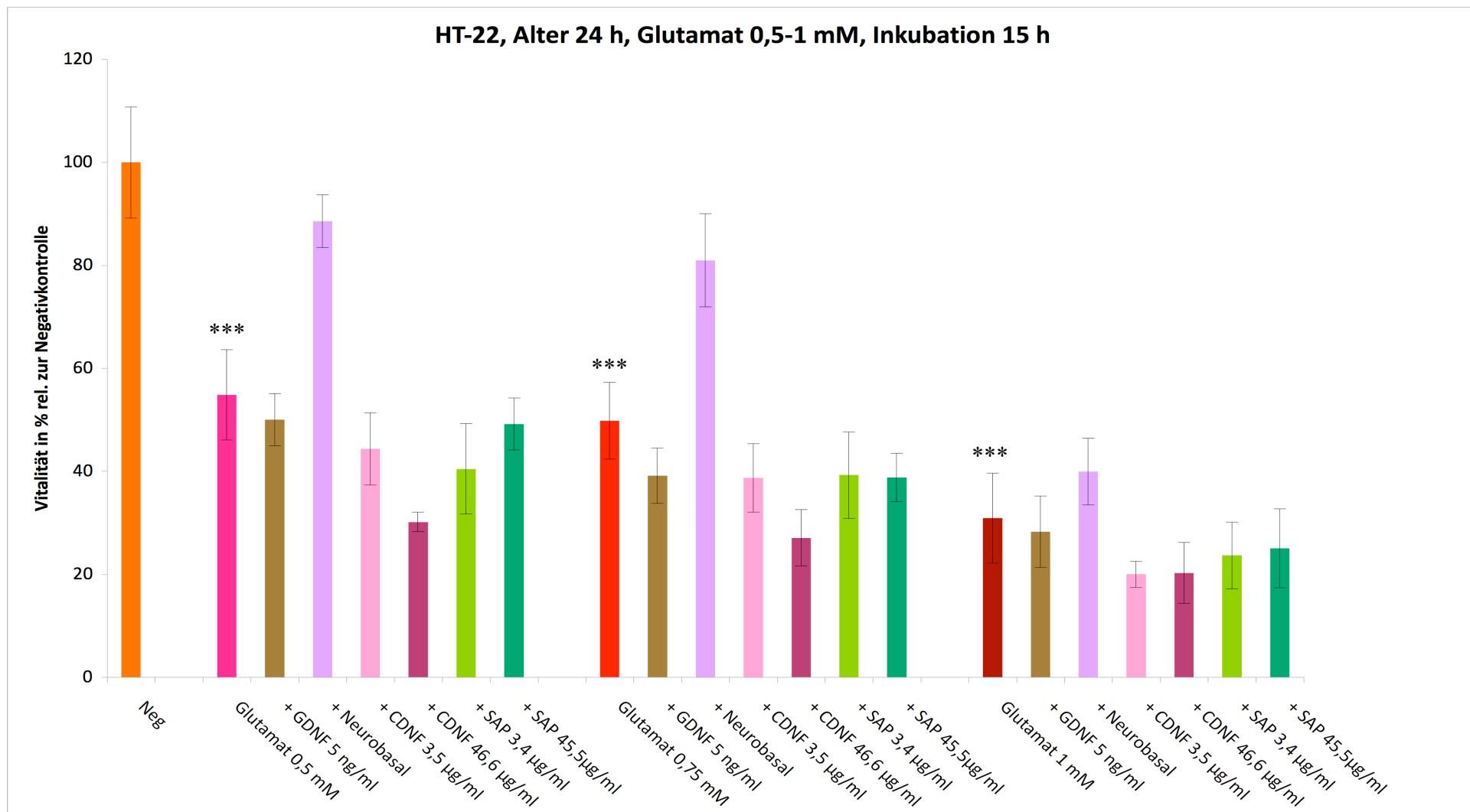


Abb. 4.53: Quantifizierung des Einflusses von GDNF, Neurobasal, CDNF und SAPLIP-Domäne (SAP) auf Glutamat (0,5-1 mM) geschädigte HT-22-Zellen nach Vorinkubation der Zellen mit den Proteinen (6 h). Die PCN wurden 24 h vor Schädigung kultiviert. Nach einer Inkubation von 15 h wurde der Versuch ausgewertet. n= 16, 96 *Well* Platte. Statistische Auswertung über Student t-Test: p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*).

#### 4. Ergebnisse

Nach den erneuten negativen Ergebnissen wurden weitere Versuche mit längerer Inkubationsdauer unternommen. Teilweise zeigte die Erfahrung aus der Kultivierung von HT-22-Zellen, dass ein Wechsel zu größeren *Multiwell*-Platten und die damit einhergehende Erhöhung der Fläche, Zellzahl und der Kulturvolumina die Ergebnisse beeinflussen kann. Somit wurden die HT-22-Zellen in unterschiedlichen Volumina in verschiedenen *Multiwell*-Platten kultiviert. Jedoch konnten auch diese Maßnahmen keine protektiven Ergebnisse hervorrufen. Auch Vorinkubationen von 24 h brachte keine Veränderung der vorherigen negativen Ergebnisse (Abb. 4.54).

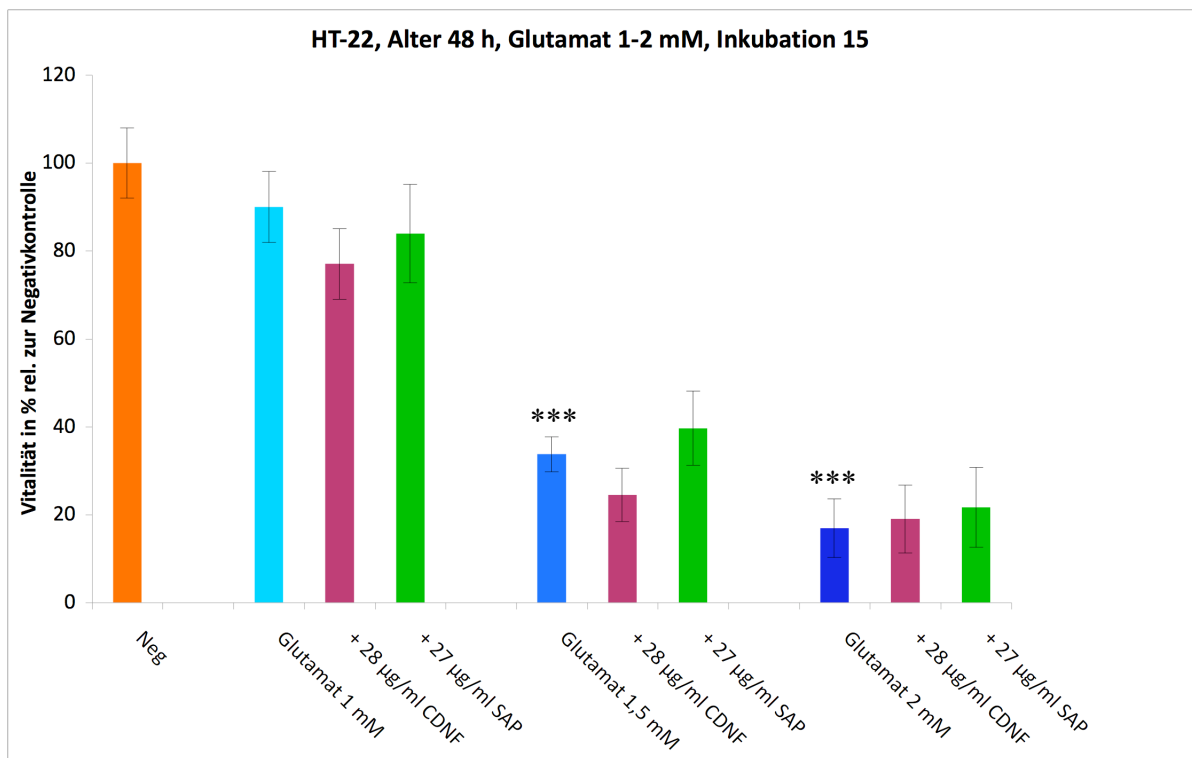


Abb. 4.54: Quantifizierung des Einflusses von CDNF und SAPLIP-Domäne (SAP) auf Glutamat (1-2 mM) geschädigte HT-22-Zellen nach Vorinkubation der Zellen mit den Proteinen (24 h). Die PCN wurden 48 Stunden vor Schädigung kultiviert. Nach einer Inkubation von 15 h wurde der Versuch ausgewertet. n= 4, 24 *Well* Platte. Statistische Auswertung über Student t-Test: p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*).

## 5 Diskussion

### 5.1 Herstellung und Aufreinigung von GFP-Fusionsproteinen, CDNF und SAPLIP-Domäne

Im Verlauf dieses Projekts wurden folgende Fusionsproteine produziert und aufgereinigt (in chronologischer Reihenfolge), um sie in Aufnahmeversuchen zu überprüfen oder ihre Wirkung auf neuronale Zellkultursystemen zu testen:

- GFP Fusionsproteine (GFP-CDNF, GFP-Tat und GFP-Kontrolle)
- CDNF
- SAPLIP-Domäne

Der Aufreinigungsprozess für jedes Protein wurde neu entwickelt und etabliert. Ziel der Produktion war der Erhalt von sekretiertem Protein durch Fermentation eines hoch-exprimierenden Klons und die Aufarbeitung zu hochreinem, konzentriertem Protein. Eine Anwendung der Herstellungs- und Aufreinigungsprotokolle (siehe 3.3. Aufreinigung der GFP-Konstrukte, CDNF und SAPLIP-Domäne) sollte auch im großtechnischen Maßstab möglich sein.

Dabei zeigte der Start des Projekts mit der schlechten Expression des GFP-CDNF-Konstrukts in CHO-Zellen schon erste Hinweise auf spätere Erkenntnisse. Jedoch waren zu Anfang die starken ER-Retentionseigenschaften der C-terminalen KTEL-Sequenz von CDNF noch nicht bekannt. CDNF wurde als sekretorisch beschrieben und diese Aussage zunächst nicht weiter hinterfragt (Lindholm et al., 2007; Apostolou et al., 2008) (siehe [5.2.2. Zelluläre Lokalisation](#)). Die labortechnische Vorgehensweise bei der Produktion des Proteins und unterschiedliche Probleme wie mögliche Toxizität des Produkts, schneller Abbau oder schlechte Integration der Ziel-DNA wurden diskutiert, führten aber zu keinem zufrieden stellenden Ergebnis. Währenddessen wurden durch die großen Fermentationsvolumina und die optimierte Aufreinigung genug GFP-CDNF-Protein hergestellt, um die ersten Transduktionsversuche starten zu können.

Erstmals wird in dieser Arbeit die Produktion von CDNF und dessen SAPLIP-Domäne in Säugerzellen im Milligramm-Maßstab beschrieben. Bis dato befasste sich keine Veröffentlichung weiterführend mit der Produktion und Aufreinigung von CDNF. Die Produktion von CDNF wird zwar in der Dissertation von Lindholm (2009) beschrieben,

## 5. Diskussion

jedoch werden tatsächliche Ausbeuten nicht erwähnt. Zur Produktion wurde ein Flag-6xHis-CDNF-Konstrukt verwendet. Mit diesem wurden über ein Baculovirussystem Sf9-Insektenzellen transfiziert. Der Kulturüberstand wurde über Ni-NTA und Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt. Die Reinheit des Proteins wurde mit ca. 90 % angegeben (Lindholm, 2009).

CDNF und SAPLIP-Domäne wurden für diese Arbeit in Säugetierzellen produziert, die in Rollerflaschen und Schüttelkolben kultiviert wurden. Durch ein sehr gutes Klonscreening und damit einhergehende hohe Produktionsraten waren Produktionen im Fermenter nicht nötig. Ein weiteres *scale up* durch die Produktion im Fermenter wäre jedoch möglich. Dies hätte eine weitere Erhöhung der Volumina und Proteinmassen zur Folge und könnte durch größere Fermentersysteme beliebig gesteigert werden. Die Aufreinigung erfolgte über einen Hexahistidintag, der jedoch einen störenden Einfluss auf die biologische Funktion haben könnte. Die Reinheit der Proteine nach Anwendung der hier gezeigten Aufreinigungsmethoden für CDNF und SAPLIP-Domäne beträgt nach Abschätzung >95 %. Die saubersten Fraktionen weisen nach SDS-Gelelektrophorese und einer sehr sensitiven Silberfärbung keine detektierbaren Fremdbanden mehr auf. Die Produktion eines therapeutisch einsetzsfähigen CDNF sollte jedoch mit nativem CDNF ohne Zusatzsequenzen zur Aufreinigung durchgeführt werden, um keine biologischen Nebeneffekte (z.B. immunogene Eigenschaften) zu erzeugen. Natives CDNF ist leicht basisch und hat einen pI von 7,7 und könnte somit in einem ersten Schritt über Ionenaustauschchromatographie vorgereinigt werden. Als weitere Aufreinigung zu einem hochreinen Produkt wäre eine Affinitätschromatographie mit einem immobilisierten CDNF-Antikörper in Betracht zu ziehen. Einzig die Retentionssequenz KTEL müsste für einen Prozess, der ein sekretiertes Produkt fordert, eliminiert oder mutiert werden, da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass diese N-terminale Sequenz die Retention des Proteins in den Zellen bedingt. Die Veränderung des N-Terminus sollte die biologischen Eigenschaften wie Proteinfaltung oder evtl. Rezeptorerkennung nicht beeinflussen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CDNF nach Beseitigung der Retentionseigenschaften der KTEL-Sequenz sehr gut von Säugerzellen sezerniert werden kann. Dies würde einen wirtschaftlichen Produktionsprozess begünstigen, sollte ein therapeutischer Ansatz in Zukunft einen echten Fortschritt in der Behandlung von neurodegenerativen Krankheiten aufzeigen.



## 5.2 Transduktion und zelluläre Lokalisation

### 5.2.1 Transduktion

Bis dato ist es nicht verstanden, wie neurotrophe Faktoren aus der CDNF/MANF Familie die Neuroprotektion auslösen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CDNF im ER zurückgehalten wird. Bei externer Zugabe von CDNF zu CHO-Zellen konnte keine Anlagerung an die Zellmembran nachgewiesen werden. CDNF wurde auch in vielen weiteren Organen (z.B. Herz, Leber, Hoden etc.) nachgewiesen (Lindholm, 2007), was auf eine eher allgemeine biologische Funktion hinweist. Eventuell ist der Fokus auf die neuronale Protektion nicht direkt zielführend im Hinblick auf die eigentliche biologische Funktion von CDNF. Diese Funktion jedoch könnte im Umkehrschluss eine Antwort auf die neurotrophen Eigenschaften bringen. Zur weiteren Klärung des neuroprotektiven Effekts von extern appliziertem CDNF oder MANF wäre das Auffinden eines Rezeptors oder transduktorisches Mechanismus zum Eindringen des Proteins in die Zelle von herausragender Bedeutung, vor allem in Hinblick auf die hier beschriebenen Ergebnisse, dass CDNF normalerweise stark im ER zurückgehalten wird. Unsere Vermutungen über die Internalisation von CDNF über Transduktion oder Endozytose konnten durch die ausgeführten Experimente nicht bestätigt werden. Diese Information und robuste Daten über den Effekt von CDNF auf Neurone *in vitro* sind jedoch essenziell, um einen primären Effekt von CDNF auf Neuronen nachweisen zu können. Sollten diese Annahmen nicht zutreffend sein und ein Internalisationsmechanismus sowie ein neuroprotektiver Effekt *in vitro* nicht gefunden werden, besteht die weitere Möglichkeit, dass CDNF *in vivo* einen Sekundäreffekt auslöst. Die genaue Kenntnis der kritischen Parameter wäre jedoch von größter Wichtigkeit, um CDNF/MANF als erfolgreiches Therapeutikum zu etablieren. Einen Hinweis auf eine mögliche Endozytose von CDNF bietet die Entdeckung, dass externes Saposin und dessen Aufnahme in die Zellen über das *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP), den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor und den Mannose-Rezeptor erfolgt (Hiesberger, 1998). Außer der membranlytisierenden Wirkung von Saposin-ähnlichen Proteinen wie NK-Lysin, Amoebaporen (Sordillo, 2005) und *lung surfactant factor B* (Cochrane und Revak, 1991; Yang et al., 2010) besteht kein weiterer Hinweis auf eine membrantransduzierende Wirkung von Saposin-ähnlichen Proteinen. Diese Hinweise, verbunden mit unseren Ergebnissen, führen zu der Annahme, dass Proteine der CDNF/MANF Familie, sofern eine Notwendigkeit und damit ein Mechanismus zur Aufnahme dieser Proteine besteht, durch rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert werden.

## 5. Diskussion

Als Positivkontrolle für die Internalisierung exogen zugegebener Proteine wurde ein GFP-Tat-Fusionsprotein verwendet. Dieses wurde während unserer Transduktionsversuche jedoch nicht in die Zellen aufgenommen. Die Proteintransduktionsdomäne (PTD) Tat (Ryu et al., 2003) ist ein Oberflächenprotein des *human immunodeficiency virus-1* (HIV-1) (Frankel und Pabo, 1988). In verschiedenen Studien band Tat, mit den positiv geladenen Guanidiniumseitenketten seiner argininreichen Sequenz, an negativ geladene Glukosaminoglykane (z.B. Heparansulfat) auf der Zelloberfläche (Wender et al., 2008; Ziegler, 2007). Nach der Bindung an die Membran werden PTDs über einen energieabhängigen endozytotischen Prozess oder über energieunabhängige Transduktion internalisiert (Leifert et al., 2002; Veldhoen, 2008). Die Proteintransduktion an sich wird sehr kontrovers diskutiert (Richard, 2003). Die Transduktionsmethode ist auch mit anderen PTDs wie Penetratin noch nicht ausgereift um als Standardmethode etabliert werden zu können. Ein echter Transduktionseffekt wird bis heute angezweifelt (Wender et al., 2008; Veldhoen et al., 2008; Leifert et al., 2002; Chauhan et al., 2007; Ziegler, 2007; Richard et al., 2003). Minimale Transduktionseffizienzen und viele unbekannte Variablen während der Versuchsdurchführung sind von entscheidendem Nachteil. Der Einfluss von fusionierten Proteinen, Zellarten, Zellalter, Medienbedingungen etc. sind für jeden Transduktionsversuch und jedes PTD im Einzelnen spezifisch zu evaluieren (Veldhoen, 2008).

Die Undurchlässigkeit der Zellmembran ist die größte Hürde für eine erfolgreiche Therapie mit extrazellulär zugeführten Proteinen. Proteine, die intravenös appliziert werden, können die Zellmembranen nicht überwinden und werden metabolisiert bevor sie eine therapeutische Wirkung entfalten können. Seit ihrer Entdeckung (Frankel und Pabo, 1988) beschäftigen sich viele Arbeitsgruppen mit den Eigenheiten der Proteintransduktion, um eine Standardmethode zum Einbringen von therapeutischen Proteinen in das Zellinnere zu etablieren (Chauhan et al., 2007).

### 5.2.2 Zelluläre Lokalisation

Beide Proteine der CDNF/MANF Familie sind als neurotrophe Faktoren beschrieben worden (Lindholm et al., 2007; Petrova et al., 2003). Die Sekretion von MANF wird unter ER-Stress hochreguliert. Dieser regulatorische Mechanismus wird über das ERSE-II Element gesteuert (Mizobuchi et al., 2007). Humanes CDNF trägt als C-terminale Sequenz KTEL, welche eine starke Ähnlichkeit zur allgemeinen ER-Retentionssequenz KDEL besitzt. Der Austausch der

## 5. Diskussion

Asparaginsäure (D) zu Threonin (T) scheint die Eigenschaften der Retentionssequenz dabei nur wenig zu beeinflussen. CDFN konnte in der vorliegenden Arbeit nicht im Medium nachgewiesen werden, wenn Kulturüberstände aus einer Kultur mit sehr guter Vitalität (> 95%) getestet wurden. CDFN wird somit nicht sekretiert oder nur in geringsten Mengen, die selbst in zehnfach konzentriertem Medium nicht detektierbar waren. Die dabei entscheidende Rolle der KTEL-Sequenz wurde in dieser Arbeit durch verschiedene Mutanten aufgezeigt. Die KTEL-Sequenz wurde deletiert oder maskiert. Bei allen Mutanten resultierte die Veränderung des C-Terminus im Auffinden von CDFN im Medium. Die Gegenprobe mit dem konservierten ER-Retentionssignal KDEL (CDFN-KDEL) zeigte die gleichen Eigenschaften wie natives CDFN. CDFN-KDEL konnte im Medium nicht detektiert werden. Natives CDFN kann des Weiteren im ER nachgewiesen werden. Für diesen Nachweis transfizierten wir humane HEK293 Zellen und zeigten die ER-Lokalisation über Immunfluoreszenz sowie ER-Isolierung. Alle weiteren CDFN-Mutanten wurden ebenfalls im ER nachgewiesen, wobei nicht abschließend geklärt werden konnte, ob es sich dabei um naszierendes Protein handelt. Eine weitere Möglichkeit wäre die Assoziation von CDFN an ein weiteres ER-residentes Protein (Munro und Pelham, 1987).

Die ER-Lokalisation von MANF wurde zuvor von Mizobuchi et al. (2007) nachgewiesen. Mizobuchi et al. zeigten weiterhin die Sekretion von MANF unter Stressbedingungen. Wir konnten keinen Nachweis über die Sekretion von nativem CDFN unter Stress erbringen. ER-Stress wurde hauptsächlich bei HEK293-Zellen durch Hitzeschock oder 6-OHDA-Exposition induziert. Auf Proteinebene konnten dabei keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Es wurde auch kein signifikanter Unterschied zwischen den CDFN-Mutanten bei Induktion von ER-Stress detektiert. Dies passt zu den Beobachtungen von Apostolou et al. (2008), welche keine gesteigerte Sekretion von CDFN mit C-terminalem Hexahistidin-Tag durch Tunicamycin-gestresste HeLa-Zellen detektieren konnten. Zur weiteren Identifikation von Expressionsunterschieden zwischen CDFN-Mutanten bei Induktion von ER-Stress wäre eine Analyse auf RNA-Ebene sinnvoll. Ein experimenteller Aufbau, der auf die Möglichkeiten von Microarray-Tests ausgelegt ist, wäre hierbei sicherlich ein zielführender Schritt. Die biologischen Mechanismen von CDFN würden mit dem Wissen über weitere Faktoren, die durch selbiges aktiviert, zusammengesetzt, getriggert etc. werden, stärker eingegrenzt und eventuell definiert.

MANF und CDFN wurden in verschiedenen Arbeiten als sekretorische Proteine beschrieben, wenn der jeweilige C-Terminus maskiert war (Lindholm et al., 2007; Petrova et al., 2003; Apostolou et al., 2008; Tadimalla et al., 2008). Dies ist in Übereinstimmung mit unseren

## 5. Diskussion

Ergebnissen. In einer weiteren Studie mit CDNF und verschiedenen CDNF-Mutanten, alle Proteine C-terminal maskiert mit einem Hämagglutinin-Tag, wurden CDNF und sieben weitere Mutanten als sekretiert beschrieben (Sun et al., 2010). In einigen der genannten Studien wurde der Einfluss der Maskierung nicht weiter diskutiert. Die Ergebnisse der genannten Studien und unsere Ergebnisse zeigen jedoch die Notwendigkeit eines nicht maskierten C-Terminus, um ein natürliches Verhalten von Proteinen der CDNF/MANF Familie in der Zelle zu beschreiben. Die Maskierung des jeweiligen C-Terminus führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu artifiziellen Ergebnissen bei der Beurteilung der Verteilung des Proteins in der Zelle.

Zwei weitere Proteine mit einer C-terminalen KTEL-Sequenz sind bekannt: das Glycoprotein 6b eines Katzen-Peritonitis-Coronavirus (Vennema et al., 1992) und ein Protein namens hCLP46 (Teng, 2006). Interessanterweise wurde das virale Glycoprotein mit einer freien KTEL-Endsequenz als partiell sekretiert beschrieben. Es wird zu 17% sekretiert und dementsprechend zu 83% in der Zelle zurückgehalten. Im Gegensatz dazu ist hCLP46 nur intrazellulär aufzufinden, obwohl die KTEL-Endsequenz mit einem myc-His-Tag maskiert wurde, einer Modifikation, die bei der KTEL-Endsequenz von CDNF zur partiellen Sekretion führt. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse mit CDNF stimmen mit der Literatur zu ER-Retentionssignalen überein, welche beschreibt, dass ein ER-Retentionssignal am äußersten C-terminalen Ende des Proteins liegen muss, um seine Funktion erfüllen zu können (Munro und Pelham, 1987). Andererseits besteht jedoch auch die Annahme, dass ER-residente Proteine ohne ER-Retentionssignal an Proteine mit vorhandenem ER-Retentionssignal binden und somit im oder am ER festgehalten werden können (Munro und Pelham, 1987).

Einige Arbeitsgruppen konnten unabhängig von einem freien C-Terminus MANF und CDNF aus Kulturüberständen isolieren. Petrova et al. (2003) isolierten sehr geringe Mengen MANF aus fünf Litern Kulturüberstand einer mesencephalen Zellkultur. Nach der Entdeckung und Aufreinigung von MANF wurde von Petrova et al. eine Produktion mit einem C-terminal maskierten MANF-Konstrukt etabliert. Auch Lindholm et al. (2007) konnten natives CDNF im Medium einer transfizierten HEK293 Zellkultur nachweisen. Die Proteinmenge in den Zellen war jedoch wesentlich größer als im Kulturüberstand. Zur Produktion verwendeten Lindholm et al. ein CDNF-Konstrukt mit N-terminalem Tag und freiem C-Terminus. Als Expressionssystem diente dabei jedoch eine Insektenzelllinie. Die hier erfassten Ergebnisse sollen jedoch speziell im Rahmen von Säugerzellen diskutiert werden. In der vorliegenden Studie wurde auch ein GFP-CDNF-Konstrukt in CHO Zellen produziert. Während des

## 5. Diskussion

Prozesses konnte auch Protein im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Die erzielten Mengen waren jedoch äußerst gering (50 ng/l) und nicht vergleichbar mit gut sekretierten Proteinen, die in Konzentrationen von mehreren mg pro l im Kulturüberstand zu finden sind. Während der Fermentation sind somit die geringen GFP-CDNF Proteinmengen im Kulturüberstand wahrscheinlich auf lysierte Zellen zurückzuführen.

### 5.3 Neurotrophe Eigenschaften

#### 5.3.1 LUHMES-Zellen

Der Entzug von Serum oder Wachstumsfaktoren aus dem Medium von neuronalen Zellkultursystemen ist eine verbreitete Methode, um neurotrophe Eigenschaften von extern zugeführten Proteinen zu erfassen (Lin et al., 1993; Petrova et al., 2003; Tadimalla et al., 2008). Methoden durch aktive Schädigung mit Inhibitoren oder Zellgiften sind jedoch zielführender, um molekulare Mechanismen von neurotrophen Faktoren zu erfassen. Es gibt Schädigungsmodelle, die *in vitro* und *in vivo* angewendet werden können (z.B. Schädigung durch 6-OHDA). In dieser Arbeit wurde u.a. durch diese Möglichkeit versucht, die *in vivo* nachgewiesenen neurotrophen Eigenschaften *in vitro* nachzuvollziehen. Die Versuche sollten als Kontrolle dienen und durch die definierte Schädigung Ergebnisse liefern, die auf einen eingegrenzten biologischen Mechanismus hinweisen. Die Ergebnisse können durch eine definierte Schädigung besser interpretiert und durch molekularbiologische Methoden nachvollzogen werden. Der Entzug von Serum oder Wachstumsfaktoren hingegen ermöglicht nur eine schwache Aussage, ob die Zellen sterben oder nicht. Die zugesetzten Proteine könnten dabei nur über verbesserten osmotischen Druck oder enzymatische Umsetzung als Nahrungsquelle dienen und somit keine speziellen neurotrophen Effekte auslösen. Durch die nicht weiter definierte Schädigung bei Entzug von Serum oder Wachstumsfaktoren, sind auch bei signifikant gesteigerten Überlebensraten spezifischere molekularbiologische Aussagen über das eingesetzte Protein nicht zu treffen.

Die neurotrophen Eigenschaften von CDNF wurden bis dato *in vivo* nachgewiesen (Lindholm et al., 2007 und Lindholm et al., 2009). Als Standardsystem wurden dopaminerge Neurone der *Substantia nigra pars compacta* (SNpc) von Ratten unilateral durch intrastriatale Injektion mit 6-OHDA geschädigt (Ungerstedt et al., 1970). Der exakte zelluläre Mechanismus von 6-

## 5. Diskussion

OHDA induzierter Neurodegeneration in der SNpc ist nicht genau definiert, jedoch wurde ein Einfluss von oxidativem Stress postuliert (Sachs und Jonsson, 1975). Studien zeigen, dass 6-OHDA innerhalb des Zytosols akkumuliert. Dort generiert es ROS und bildet Chinone, die Makromoleküle inaktivieren (Cohen et al., 1984). Weiterhin wurde gezeigt, dass bei der 6-OHDA induzierten Neurodegeneration auch Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale involviert sind (Sachs und Jonsson, 1975). In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass 6-OHDA auch über die Hemmung des mitochondrialen Komplexes I neurotoxische Effekte auslösen kann (Sachs und Jonsson, 1975). Weiterhin induziert 6-OHDA durch die Bildung von ROS auch ER-Stress (Chen et al., 2004). Dies wurde auch von Ryu et al. (2002) gezeigt, die eine Aktivierung des UPR nach 6-OHDA Inkubation nachweisen konnten.

Der Einfluss von Monoaminoxidasen (MAO-A und MAO-B) muss auch bei der Entstehung von ROS durch Abbau von Dopamin oder 6-OHDA betrachtet werden. MAO-A und MAO-B sind mitochondriale Enzyme, die in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. MAO-A wird besonders hoch in catecholaminergen Neuronen exprimiert. Die höchsten Werte von MAO-B werden in serotonergen Neuronen und Astrozyten gefunden (Vanyukov et al., 2004). Beim Abbau von Dopamin über die MAO entstehen ROS (Cookson, 2005). Erst wenn beide MAO-Enzyme gehemmt werden, erfolgt der Abbau von Dopamin über die Catechol *O*-Methyltransferase, die keine ROS produziert. Therapeutische MAO-B-Hemmer (Wirkstoff: Rasagiline) werden bereits in der Therapie des Morbus Parkinson eingesetzt. Diese Therapie kann zwar die dopaminerge Neurotransmission für eine gewisse Zeit erhöhen, jedoch die Neurodegeneration nicht aufhalten (Olanow et al., 2009).

Die nachgewiesenen Effekte von 6-OHDA sind zahlreich und eine genaue Eingrenzung, welche Effekte die wichtigste Rolle bei der Neurotoxizität haben, ist noch nicht möglich. Jedoch sind die Aussagen aus diesem neurodegenerativen *in vivo* Schädigungsmodell für dopaminerge Neurone belastbar, da keine anderen Hirnareale geschädigt werden und die Validität der Vorhersagen für momentan angewandte Antiparkinsontherapien hoch ist.

Als Quantifizierung der Neurodegeneration nach unilateraler intrastriärer Applikation von 6-OHDA dient ein durch die Schädigung initiiertes und nach Amphetamingabe ausgelöstes ipsilaterales Rotationsverhalten der Ratten. Je mehr Neurone unilateral abgestorben sind, desto schneller dreht sich das Versuchstier nach Amphetamingabe. CDFN konnte die Rotationen der behandelten Versuchstiere deutlich verringern (Lindholm et al., 2007). Auch im immunhistologischen Bild der SNpc zeichnete sich eine signifikante Protektion der dopaminergen Neurone ab. CDFN musste jedoch auch intrastriär appliziert werden, da es Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann (Lindholm et al., 2007). Dies ist ein erheblicher

## 5. Diskussion

Nachteil in Bezug auf einen möglichen Therapieansatz für neurodegenerative Krankheiten. Eine weitere Hürde auf dem Weg zur einsatzbereiten Therapie stellt momentan auch die fehlende Kenntnis über CDNF Rezeptoren, die biologischen Funktion von CDNF sowie den molekularen Mechanismus der neuroprotektiven Eigenschaften dar. Der biologische Einfluss von CDNF auf eine Neuronenschädigung mit 6-OHDA ist durch eine Verbesserung der klinischen Befunde der Versuchstiere noch nicht hinreichend gezeigt. Um die biologische Funktion von CDNF näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die 6-OHDA Schädigung an einem humanen neuronalen Zellsystem zu etablieren. Der Endpunkt sollte dem Nachweis eines primären Effekts von CDNF auf die dopaminergen Neurone *in vitro* darstellen. Dies hätte einen fundierten Ansatz zur Klärung der *in vivo* beobachteten neurotrophen Eigenschaften von CDNF ermöglicht. Des Weiteren hätte durch eine reproduzierbare Protektion *in vitro* ein Sekundäreffekt von intrastriatal appliziertem CDNF ausgeschlossen werden können.

Die Einführung der Schädigung von PCN und LUHMES-Zellen mit 6-OHDA war ein weitreichender Schritt, der in Anbetracht des zeitlichen Rahmens schnell umgesetzt werden musste. Die 6-OHDA Schädigung ist seit den 1970er Jahren etabliert (Ungerstedt et al., 1970). Die Schädigung an sich stellt eine eigene Herausforderung dar, die nicht unterschätzt werden sollte. Biologische Testsysteme reagieren höchst unterschiedlich in verschiedenen Laboren, haben eine hohe Varianz und erfordern Zeit zur Einarbeitung. Kleine Änderungen der Parameter oder wie hier die Einführung neuer Zelllinien lassen ein scheinbar beherrschbares Testsystem in sich zusammenbrechen und erfordern einen kompletten Neuaufbau als eigenständiges, mit dem vorherigen Testsystem nicht mehr zu vergleichendes, neuartiges Testsystem. Bis ein reproduzierbares Protokoll etabliert ist, sind viele Daten und Erfahrungen zu sammeln. Ein weiterer limitierender Faktor war die Sensibilität der LUHMES-Zellen. Es wurde versucht, die Zellen in 96 *Well*-Platten zu kultivieren um, im kleinsten mit hinreichender Genauigkeit zu bearbeitenden Maßstab möglichst viele Replikationen pro Versuch unterzubringen. Nach langen und ausdauernden Versuchen zeigte sich aber, dass die LUHMES-Zellen sich zu oft und unkontrolliert vom Plattenboden lösten oder viele Zellen schon vor Versuchsbeginn abgestorben waren. Bei größeren Volumina trat dieser Effekt fast nicht auf, und somit wurden die 96 *Well*-Platten verworfen. Die 6-OHDA Schädigung war aber auch bei größeren Volumina schwer zu kontrollieren. Gleiche 6-OHDA Konzentrationen konnten extrem unterschiedliche Schädigungen während mehrerer Versuchsreihen hervorrufen. Die LUHMES-Zellen wurden während der Behandlung zu Versuchsbeginn immer nur kurz aus dem Brutschrank entnommen, und die Pipettierarbeiten

## 5. Diskussion

fanden auf einer Styroporplatte statt, um einen zu starken Wärmeverlust zu vermeiden. Weiterhin wurde mit indirekter Lichteinstrahlung und denselben Pipetten gearbeitet, um eine immer gleiche Vorgehensweise während des Versuchsablaufs zu gewährleisten. Die Medien wurden immer frisch angesetzt und die 6-OHDA/AA Medien höchstens 15 min nach Präparation über Verdünnungsreihen auf die LUHMES-Zellen gegeben. Die getroffenen Maßnahmen reichten aber nicht aus, um eine Kontinuität des Verhältnisses von Schädigung zu 6-OHDA Konzentration zu erlangen.

Die drei zu beherrschenden Systeme und Methoden in diesem Falle waren:

- Kultivierung und Differenzierung der LUHMES-Zellen
- Etablierung eines 6-OHDA Schädigungsprotokolls für LUHMES-Zellen
- Etablierung eines Testprotokolls für neurotrophe Faktoren

Es ist bekannt, dass CDNF *in vitro* auf verschiedene Neuronentypen aus Ratte und Maus (*P1 mouse superior cervical ganglion sympathetic neurons*, *E14 rat motoneurons* oder *E14* und *E15 mouse dorsal root ganglion sensory neurons*) nicht als trophischer Faktor wirkt (Lindholm, 2007). Anders als z.B. GDNF und MANF wurde CDNF noch nicht erfolgreich als trophischer Faktor *in vitro* eingesetzt. Mit den hier gezeigten Versuchen wurde getestet, ob der positive Effekt für CDNF in einem *in vitro* 6-OHDA Schädigungsmodell nachgebildet werden kann. Dies ist jedoch nicht gelungen. Aus einer erfolgreichen Etablierung hätten sich weitere Möglichkeiten ergeben, Rezeptoren, biologische Mechanismen oder Sekundäreffekte zu überprüfen.

### 5.3.2 Primäre Neurone aus Rattenembryonen

Die Kultivierung und Schädigung von PCN konnte, im Gegensatz zu LUHMES-Zellen, durch exaktes Arbeiten gut umgesetzt werden. Im Vergleich zu LUHMES-Zellen waren PCN sehr robust gegen moderate äußere Erschütterungen, wie sie unausweichlich während der Versuchsdurchführung sind (Platte aus dem Kulturschrank nehmen, unter *Cleanbench* platzieren etc.). Auch hier wurden Abläufe standardisiert, um eine immer gleiche Vorgehensweise während des Versuchsablaufs zu gewährleisten. Diese Kontinuität reichte aus, um ein hinreichend genaues Protokoll für die 6-OHDA Schädigung zu etablieren. Die PCN wurden am Tag 10 nach Isolierung mit 6-OHDA Konzentrationen zwischen 25 und 35



## 5. Diskussion

$\mu\text{M}$  behandelt, und ca. 19 h später konnte eine Schädigung der Kultur zwischen 50 und 60 % der Zellen erzielt werden. Das Schädigungsmodell konnte somit valide reproduziert und erfolgreich etabliert werden. 6-OHDA wurde zu den PCN-Kulturen zugegeben und die Inkubation bis zum Erreichen der gewünschten Schädigung fortgesetzt. Der Schädigungsgrad wurde nach Inkubation über Nacht am nächsten Tag über mikroskopische Beobachtung der Zellmorphologie eingeschätzt (siehe 3.7.4 Kultivierung primärer Neurone aus Rattenembryonen und 6-Hydroxydopamin-Schädigung). Bei einer Schädigung von ca. 50% der Zellen (visuell, Schätzwert) wurde die Inkubation beendet.

Im Tests mit diesem Schädigungsmodell konnten keine protektiven Eigenschaften von CDNF oder SAPLIP-Domäne festgestellt werden. Auch das als Kontrolle mitgeführte GDNF konnte in verschiedenen Konzentrationsbereichen keine Protektion der Zellen bewirken. Dabei wurden auch die von Kearns et al. (1997) beschriebenen notwendigen Vorinkubationen von GDNF berücksichtigt, um einen möglichst großen Effekt zu erzielen. Auch hier war evtl. das durchgeführte Schädigungsmodell zu stringent, um einen protektiven Effekt der eingesetzten neurotrophen Faktoren zu detektieren. Die initiierten und während der Inkubation aufrechterhaltenen Schädigungsmechanismen könnten protektive Auswirkungen der neurotrophen Faktoren überlagert haben. Eine Anpassung des Modells könnte hier eine Verbesserung aufweisen. Dies kann durch eine kurzzeitige 6-OHDA-Exposition ermöglicht werden. 6-OHDA wird nur wenige Minuten mit den Zellen inkubiert und danach durch vollwertiges Kulturmedium ersetzt. Ugarte et al. (2003) konnten mit einer fünfzehnminütigen 6-OHDA Schädigung einer dopaminergen Zelllinie aus Mäuseneuronen (MN9D) eine signifikante Neuroprotektion durch GDNF nachweisen. Die kurzzeitig eingesetzten 6-OHDA-Konzentrationen (50–1000  $\mu\text{M}$ ) waren dabei wesentlich höher als die hier permanent eingesetzten Konzentrationen ( $\leq 35 \mu\text{M}$ ). Durch diese erfolgreich umgesetzte Protektion *in vitro* konnte z.B. beobachtet werden, dass die durch 6-OHDA induzierten Membranläsionen nicht durch GDNF aufgehalten werden konnten. Die Aktivierung der PI3K und MAPK Signalwege durch GDNF jedoch konnten die Zellen schützen. Für eine erfolgreiche Protektion konnte GDNF (10 ng/ml) vor, während und kurz nach der Schädigung zugegeben werden (Ugarte et al., 2003). Bei dieser Studie war somit keine Vorinkubation von GDNF notwendig, um einen protektiven Effekt hervorzurufen.

Die Aktivierung von Signalwegen und die Synthese von weiteren Proteinen sind essentiell für die protektiven Eigenschaften von GDNF. Nach Hemmung der Signalwege (Ugarte et al., 2003) oder der Proteinsynthese (Kearns et al., 1997) verliert GDNF seine protektiven Eigenschaften gegen 6-OHDA-Schädigungen.

## 5. Diskussion

Von MANF und CDFN sind noch keine Studien bekannt, die eine Protektion bei der 6-OHDA-Schädigung von primären neuronalen Zellkulturen zeigen. Nur MANF konnte trophische Eigenschaften nach Serumentzug bei primären neuronalen Zellkulturen aufweisen (Petrova et al., 2003; Tadimalla et al., 2008). Damit steht der Beweis einer Protektion durch aktive Schädigung noch aus. Eventuell können weitere Versuche mit kürzerer 6-OHDA-Inkubation und damit abgeschwächten Schädigungsfolgen die möglichen protektiven Eigenschaften von MANF und CDFN in primären neuronalen Zellkulturen herausstellen. Dies würde die Überprüfung von postulierten protektiven Mechanismen von extern zugeführtem CDFN oder MANF (Lindholm et al., 2009) gegen 6-OHDA Schädigungen wie oxidativen Stress, Hemmung des Atmungskettenkomplexes I, Apoptose und Entzündungsvorgängen ermöglichen. Sollten nach Etablierung weiterer *in vitro* Schädigungsmodelle die Erfolge dennoch ausbleiben, müsste ein *in vivo* entstandener Sekundäreffekt nach Applikation von CDFN oder MANF in Betracht gezogen werden.

### 5.3.3 HT-22-Zellen

Die Schädigung von neuronalen Zelllinien durch Glutamat ist molekularbiologisch besser aufgeklärt und somit ausgereifter als das 6-OHDA Schädigungsmodell (siehe 3.7.1. 6-Hydroxydopamin (6-OHDA)-Schädigungsmodell (Parkinson Modell) und 3.7.2. Glutamat-Schädigungsmodell). Weiterhin wurde die verwendete HT-22-Zellkultur speziell auf erhöhte Glutamatsensitivität hin selektiert (Maher und Davis, 1996).

Am Ende der Glutamatschädigungskaskade stehen eine drastische Reduktion von reduziertem Glutathion (GSH) und eine nachfolgende Akkumulation von ROS (Sagara et al., 1998). Bei einer erfolgreichen Protektion hätte eventuell ein direkter Einfluss von CDFN auf die Entstehung oder den Abbau von ROS nachgewiesen werden können. Dies wäre eine Möglichkeit gewesen, eine Verbindung zu dem ebenfalls verstärkt ROS bildenden 6-OHDA Schädigungsmodell zu formulieren.

Das Protokoll für die Glutamatschädigung von HT-22-Zellen war bereits etabliert und die Parameter des Protokolls wurden übernommen. Das Testsystem mit HT-22-Zellen war im Vergleich zu PCN und LUHMES-Zellen am einfachsten zu bearbeiten und erwies sich ohne weitere Einschränkungen als hinreichend robust. Jedoch konnten auch hier nicht erklärbare Prozesse beobachtet werden. Die verwendeten Glutamatkonzentrationen variierten moderat im Bereich von 0,25 – 2,0 mM. Die Inkubationsdauer variierte aber sehr stark zwischen ca. 4

## 5. Diskussion

und 20 h. Teilweise starben die HT-22-Kulturen während der Inkubation über Nacht komplett ab oder zeigten sich gegenüber der gleichen Glutamatkonzentration als unempfindlich. Dieses Phänomen war jedoch sehr gut über den Einsatz verschiedener Glutamatkonzentrationen während eines Versuchsdurchlaufs beherrschbar.

Die eingesetzten Proteine GDNF, CDNF und SAPLIP-Domäne zeigten auch im Glutamatschädigungsmodell keine Protektion. Hier war im Gegensatz zu den 6-OHDA Schädigungsmodellen auch keine Tendenz einer möglichen Protektion zu erkennen. Im Bereich von wenigen ng bis zu 100 ng/ml zeigte GDNF keine protektiven Eigenschaften. Durch verlängerte Vorinkubation mit GDNF konnte auch keine Protektion erzielt werden. CDNF und SAPLIP-Domäne wurden im unteren Mikrogrammbereich eingesetzt und ebenfalls über mehrere Stunden vorinkubiert. Es konnte jedoch keine Protektion festgestellt werden. Wie in den LUHMES- und primären Zellkulturen zuvor zeigte CDNF auch hier toxische Eigenschaften ab Konzentrationen von  $>40 \mu\text{g/ml}$ .

### **5.4 Einfluss der einzelnen Protein-Domänen auf zytoprotektive Eigenschaften von CDNF und MANF**

Neurotrophe Faktoren regulieren das Überleben, die Entwicklung und die Funktion von Neuronen. Nicht nur die Entwicklung einzelner Zellen wird von neurotrophen Faktoren gefördert, sondern auch die Ausprägung des neuronalen Netzwerks. (Airaksinen und Saarma, 2002). Neurotrophe Faktoren des zentralen Nervensystems sind hauptsächlich sekretierte Proteine. Diese werden durch strukturelle Verwandtschaft oder sie bindende Rezeptoren und somit auch über gleiche Wege der Signaltransduktion in übergeordnete Familien eingruppiert. Die Faktoren stammen wahrscheinlich alle von einem ursprünglichen Gen ab und haben sich im Laufe der Evolution differenziert. Die Familie der Neurotrophine wurde mit der Entdeckung des *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) 1982 begründet (Barde et al., 1982). Neurotrophine umfassen weiterhin die Faktoren *nerve growth factor* NGF (Levi-Montalcini et al., 1985), *neurotrophin-3* (NT-3) (Ernfors et al., 1990), *neurotrophin-4* (NT-4) und *neurotrophin-5* (NT-5) (Berkemeier et al., 1991; Hallböök et al., 1991). Eine weitere wichtige Familie ist die *glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands* (GFLs), ein Mitglied der *tissue growth factor* (TGF)- $\beta$  Superfamilie. Zu ihnen gehören *glia cell-derived neurotrophic factor* (GDNF) (Lin et al., 1993), Neurotin (NRTN) (Kotzbauer et al., 1996), Artemin (ARTN) (Baloh et al., 1998) und Persephin (PSPN) (Milbrandt et al., 1998). Die

## 5. Diskussion

Eigenschaften der genannten Faktoren sind nur präklinisch getestet worden. Bisher hat kein Faktor, außer GDNF, die Hürde hin zu einer klinischen Prüfung überwunden. Die klinischen Versuche zu GDNF zeigen keinen einheitlichen positiven Effekt bei der Behandlung von PD Patienten. Einerseits konnten durch direkte Infusionen von GDNF in das Putamen klinische Verbesserungen erzielt werden (Gill et al., 2003). Ein weiterer randomisierter Doppelblindversuch in 2006 konnte einen positiven Effekt von GDNF nicht mehr erfassen (Lang et al., 2006).

Zu den oben genannten potentiell neurotrophen Faktoren kommt seit der Entdeckung von MANF (Petrova et al., 2003) eine weitere Familie potentiell neurotropher Proteine hinzu: die CDNF/MANF Familie. MANF wurde aus dem Kulturüberstand einer mesencephalen Typ-1 Astrocytenzelllinie (VMCL1) gewonnen, während CDNF über bioinformatische Methoden entdeckt wurde (Lindholm et al., 2007). Die beiden konservierten Faktoren vereinen folgende charakteristische Merkmale:

- acht Cysteine mit ähnlichen Abständen innerhalb der Sequenz
- N-terminale SAPLIP-Domäne
- C-terminale SAF-Domäne
- CXXC-Motiv innerhalb der SAF-Domäne
- unterschiedlich ausgeprägte ER-Retentionssignale

Auch hier zeigen die Faktoren und ihre teils isolierten Domänen viel versprechende Eigenschaften in präklinischen Versuchen. Im Weiteren werden die einzelnen Domänen näher beschrieben und die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse diskutiert.

### 5.4.1 SAPLIP-Domäne

Saposin-ähnliche Proteine besitzen als charakteristische Eigenschaft die Möglichkeit, mit Membranen oder Lipiden zu interagieren (Bruhn, 2005). Saposin C interagiert durch seine exponierten, positiv geladenen Aminosäurereste mit den negativ geladenen Kopfgruppen von Lipiden (Liu et al., 2005). Andere SAPLIPs können über die positiv geladenen Aminosäurereste an ihrer Oberfläche an die negativ geladenen Kopfgruppen von Zellmembranen binden (Sánchez-Barrena et al., 2003). Die SAPLIP-Domänen von CDNF und MANF besitzen ebenfalls diese wichtigen negativ geladenen Oberflächenstrukturen, die in

## 5. Diskussion

zwei getrennt liegenden Feldern angeordnet sind. Die Saposin-ähnliche Struktur des N-Terminus von CDNF und MANF führte zu der Annahme, dass diese an Membranen binden und über diese Bindung weitere Effekte auslösen (Parkash et al., 2009). Nach Strukturangaben von Parkash et al. (2009) gleichen sich die N-Termini von MANF und CDNF in vielen Details. Sie bestehen aus fünf Helices, gefolgt von einer  $3_{10}$  Helix am Übergang zum C-Terminus. Weiterhin sind die Abstände der Cysteine identisch zu den Saposindomänen anderer Proteine (z.B. Saposin A-D, Granulysin und NK-Lysin) und die strukturelle Faltung der Helices entspricht einer geschlossenen saposinähnlichen Konformation.

Es gibt mehrere Hinweise, dass der neurotrophe Effekt der CDNF/MANF Familie von der N-terminalen SAPLIP-Domäne ausgelöst wird. Prosaposin bindet an Rezeptoren von Schwann-Zellen und Oligodendrocyten und vermittelt durch Signaltransduktion die erhöhte Produktion von Myelinlipiden (Hiraiwa, 1997). Prosaposin könnte als myelinotropher Faktor während der Entwicklung der Myelinscheide von Nerven wirken (Hiraiwa, 1997). Dies wird von Ergebnissen mit Prosaposin *Knockout*-Mäusen bestätigt, die einen Fehlaufbau des Myelins aufweisen. Neuronale Zellen besitzen einen hochaffinen G-Protein gekoppelten Rezeptor  $G0\alpha$ , über den Prosaposin die biologischen Effekte vermittelt. Prosaposin wird weiterhin von den multifunktionalen Rezeptoren *low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP), Mannose-Rezeptor und Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M-6-R) gebunden und über Endocytose eingeschleust (Hiesberger, 1998). Nach Serumentzug konnte Prosaposin Neuroblastomazellen, primäre hippocampale Neurone und Schwann-Zellen schützen. PC12 Zellen konnten nach Induktion der Apoptose durch verschiedene Reagenzien durch Prosaposin geschützt werden. Auch für nicht-neuronale Zellen kann Prosaposin als trophischer Faktor eingesetzt werden. Bei U937 Zellen wurde durch Tumornekrosefaktor  $\alpha$  ( $TNF\alpha$ ) der Zelltod eingeleitet. Mit Prosaposin behandelte Zellen zeigten eine signifikante Erhöhung der Überlebensrate (Misasi, 2004). Dabei zeigte sich durch Versuche mit spezifischen Inhibitoren, dass Prosaposin extrazellulär signalregulierte Kinasen (ERKs) und den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K/Akt) Signalweg aktivierte. Ergänzend zeigten Lee et al. (2004) auch die Signaltransduktion bei der antiapoptotischen Wirkung von Sap C über den PI3K/Akt Weg an Prostatakrebszellen. Interessanterweise konnte *in vitro* der PI3K/Akt Weg auch bei der Signaltransduktion von GDNF nachgewiesen werden (Ugarte et al., 2003). Weiter zeigte sich, dass durch Apolipoprotein B100 und Pertussistoxin die schützenden Effekte von Prosaposin eingeschränkt wurden. Dies ist ein Hinweis auf eine Signalübertragung durch LRP und G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Misasi, 2004). Die

## 5. Diskussion

Bindung von Prosaposin auch an multifunktionale, auf fast allen Zelltypen vorhandene Rezeptoren wie LRP, könnte ein Hinweis auf eine umfassende Rolle von Prosaposin als Signalmolekül sein. Sollte die Bindung an Strukturen des (Pro-)Saposins stattfinden, die auch in den Saposin-Domänen der CDNF/MANF Familie zu finden sind, wäre eine solche Rolle auch für diese Proteine denkbar. *In vitro* sind jedoch noch wenig bis keine positiven Eigenschaften einer Signaltransduktion oder Schutzfunktion von extern appliziertem CDNF oder MANF entdeckt worden. MANF kann in manchen Fällen eine schützende Funktion aufweisen: Petrova et al. (2003) zeigten protektive Eigenschaften von MANF an dopaminergen Neuronen und Tadimalla et al. (2008) konnten protektive Eigenschaften an nicht-neuronalem Gewebe (*primary neonatal rat ventricular myocyte cultures*) nachweisen. Andererseits zeigen sich aber auch keine Effekte bei externer Zugabe von MANF zu einer neuronalen Zellkultur (*superior cervical ganglion (SCG) neurons*) (Hellman et al., 2011). MANF konnte weder bei Entzug des Wachstumsfaktors, noch bei der aktiven Schädigung der neuronalen Zellkultur durch Etoposid oder Staurosporin einen protektiven Effekt aufweisen. Für CDNF konnten noch keine protektiven Effekte *in vitro* nachgewiesen werden. CDNF konnte in dieser Arbeit dopaminerge Zellen vor dem Einfluss von 6-OHDA nicht signifikant schützen. Die Schädigung durch Glutamat an HT-22-Zellen konnte von CDNF auch nicht signifikant aufgehoben oder zurückgedrängt werden. Eine weitere Studie zeigte, dass auch Neurone des Dorsalwurzelganglions (DRG) oder der frühen postnatalen sympathischen Cervicalganglien (SCG) nicht vor Schädigung geschützt werden (Lindholm et al., 2007). Diese Studien sind jedoch Einzelstudien und nicht sehr zahlreich. Es wurden verschiedene Zelltypen und Schädigungsmodelle verwendet und MANF und CDNF nicht miteinander verglichen. Die Aussagekraft, die durch Analyse dieser Studien möglich wird, ist somit begrenzt. Auch die hier dargestellten Ergebnisse sollten als Hinweis dienen, um evtl. besser geeignete Versuche zu entwickeln. Zum Beispiel ist möglicherweise die Schädigung durch permanent einwirkendes 6-OHDA zu gravierend, um geringere Effekte von CDNF erkennen zu können. Eine Möglichkeit dies zu ändern, wäre der Einsatz von 6-OHDA für wenige Minuten, um Schädigungsprozesse nur zu initiieren. Hierbei würde das 6-OHDA nach einer kurzen Inkubation entfernt und die neuronalen Zellen mit normalem Kulturmedium weiter inkubiert. Die Zugabe von CDNF könnte vor und nach Initiierung der Schädigung erfolgen. Sollte CDNF protektiv wirken, könnte weiterhin überprüft werden, ob es auch *in vitro* einen neurorestorativen Effekt nach einer bereits eingesetzten Schädigung hervorruft. *In vivo* wurde CDNF vier Wochen nach Initiierung der 6-OHDA-Schädigung appliziert. Dabei zeigte die

## 5. Diskussion

Behandlung mit CDFN eine Verbesserung der pathologischen Symptome und einen neurorestorativen Effekt (Lindholm et al., 2007).

### 5.4.2 SAF-Domäne

SAF-Domänen enthalten ein CXXC-Motiv. Proteine mit diesem Motiv sind größtenteils in Reduktions-, Oxidations- und Isomerisierungsprozessen im ER involviert. Diese dienen der Herstellung der richtigen Konformation von Disulfidbrücken anderer Proteine (Horibe et al., 2004). Diese findet man u.a. in Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen, wie Thioredoxinen, welche im ER lokalisiert sind. Zur Familie der Thioredoxine gehört u.a. das Enzym Proteindisulfidisomerase (PDI) (Ellgaard und Ruddock, 2005). Wird das aktive Zentrum von PDI nitrosyliert, kann eine Akkumulation von polyubiquitinierten Proteinen und ein frühzeitiger Zelltod beobachtet werden. Außerdem konnte nitrosyliertes PDI auch in Gehirngewebe von PD Patienten festgestellt werden. Dies kann als Hinweis auf einen möglichen Einfluss von nicht funktionsfähigem PDI bei der Entstehung der Parkinson'schen Krankheit verstanden werden (Uehara et al., 2006).

In den als neurotroph beschriebenen Proteinen MANF und CDFN befindet sich am C-terminalen Ende auch eine SAF-Domäne. Innerhalb dieser Domäne wird durch jeweils ein CXXC-Motiv eine Disulfidbrücke gebildet.

Das Wissen über die C-terminale Domäne von CDFN und MANF ist jedoch limitiert. Wie schon erwähnt, sind Rezeptoren und biologische Mechanismen der CDFN/MANF Familie noch nicht bekannt. Einige Hinweise hierzu können aus Versuchen mit Saposinen oder Saposin-ähnlichen Molekülen abgeleitet werden (siehe 5.1.1. Saposin-Domäne). Jedoch sollte auch der Einfluss der SAF-Domäne mit Blick auf den möglichen redoxaktiven Effekt des CXXC-Motivs nicht unbeachtet gelassen werden. Weiter ist auch der erwähnte Einfluss von PDI auf neuronale Strukturen eine Möglichkeit, Verbindungen zwischen der Funktion von Proteinen mit CXXC-Motiv und neuroprotektiven Vorgängen herzustellen.

Die N-terminale Domäne von MANF besteht aus drei Helices ( $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ), wobei das CXXC-Motiv zwischen den beiden letzten Helices  $\alpha 7$  und  $\alpha 8$  angeordnet ist (Hellman et al., 2010). Die Struktur von CDFN wurde noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch ist durch die zu 60% gleiche Aminosäuresequenz und Berechnungen über Swiss-Model (Arnold et al., 2006; Schwede et al., 2003; Guex et al., 1997) eine ähnliche Struktur für die N-terminale

## 5. Diskussion

Domäne von CDFN wahrscheinlich (Abb. 5.1.).

A

TARGET	2		L	DLASVDLRKM	RVAELKQILH	SWGEECRACA	EKTDYVNLIQ
2kveA	94	mgkydkq--i	dlstvdllkl	rvkelkkild	dwgetckgca	eksdyrkin	

TARGET			hhhhhhhhh	hh		hhhhhhhhh
2kveA			hhhhhhhhh	hh		hhhhhhhhh

TARGET	43	ELAP	-----	-----
2kveA	142	elmpkyapka	asartdl	

TARGET  
2kveA

B



C

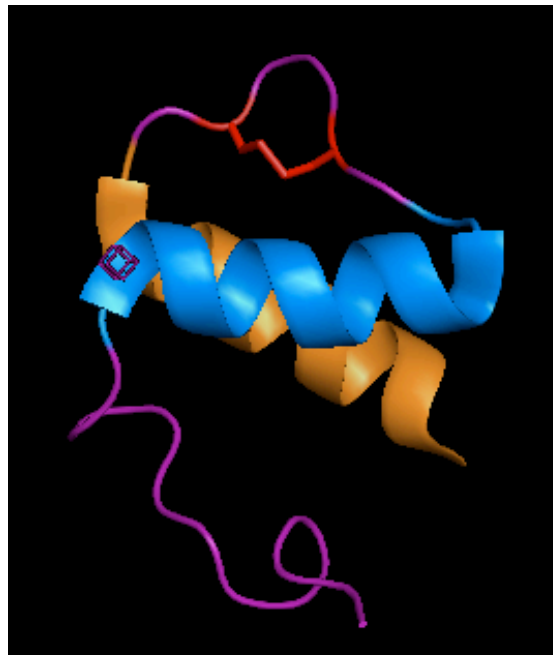


Abb. 5.1.: A, *Alignment* der Aminosäuresequenzen der SAF-Domäne von CDFN (Target) und des C-Terminus von MANF (PDB-ID: 2KVE). Die zweite und vierte Zeile markieren die Sekundärstrukturen einer Sequenz (h = Helix). B, SAF-Domäne von CDFN berechnet auf bekannte MANF Struktur. C, SAF-Domäne von MANF (Hellman et al., 2010). Schematische Darstellung der Cysteinreste und der Disulfidbrücke in rot.

Die Anordnung der Helices der SAF-Domäne von CDFN und MANF sind nach den durchgeführten Berechnungen gleich. Mittig in der Schleife zwischen den Helices  $\alpha_7$  und  $\alpha_8$  befindet



## 5. Diskussion

sich äußerst exponiert und gut zugänglich das CXXC-Motiv. Die vergleichbare Anordnung des CXXC-Motivs deutet auf eine gleiche Funktion für die SAF-Domäne von MANF und CDFN hin, aber auf möglicherweise verschiedene potentielle Liganden. Die SAF-Domäne ist zudem sehr beweglich und die gezeigte Konformation ist sicherlich nur eine unter vielen möglichen (Parkash et al., 2010).

Hellman et al. (2011) zeigten, dass MANF *in vitro* nach Mikroinjektion in die Zelle eine protektive Wirkung auf Neurone besitzt, diese Wirkung aber bei Zugabe von außen nicht hervorrufen kann. Das gleiche Ergebnis zeigte sich nach Versuchen mit der C-terminalen Domäne von MANF. Die Zellen wurden in diesem Experiment passiv durch Entzug des Wachstumsfaktors und aktiv mit dem Topoisomerase-II-Inhibitor Etoposid oder dem Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin geschädigt. In dieser Arbeit konnte durch externe Zugabe von CDFN und dessen SAPLIP-Domäne auch keine Neuroprotektion *in vitro* nachgewiesen werden (Hellman et al., 2011).

Diese Versuche könnten mit einer isolierten SAF-Domäne von CDFN wiederholt werden. Außerdem könnte eine Mikroinjektion im Versuchsaufbau mit eingeschlossen werden, um das Problem der anscheinend schlechten Bioverfügbarkeit von CDFN zu umgehen. Dieser Ansatz würde zeigen, ob auch die SAF-Domäne von CDFN maßgeblich zu einer Neuroprotektion beiträgt und könnte ein weiterer Schritt zu einer Beschreibung des molekularbiologischen Wirkmechanismus sein.

### 5.5 Ausblick

Die klinischen Versuche mit GDNF zeigen die schlechte Vereinbarkeit von präklinischen Ergebnissen und dem klinischen Verlauf einer Proteintherapie gegen neurodegenerative Krankheiten (Gill et al., 2006). Die Erkenntnisse über den Wirkmechanismus von GDNF (Multimerisierung, Rezeptoren, Signaltransduktionswege etc.) waren fortgeschritten und die präklinischen Ergebnisse viel versprechend (Airaksinen und Saarma, 2002). Trotzdem konnte die Anwendung im Menschen nicht zum gewünschten Ziel führen.

Für die CDFN/MANF Familie sind die Grundlagen des Wirkmechanismus und die biologische Funktion noch nicht bekannt. Um Verständnis über den Wirkmechanismus der Neuroprotektion zu erlangen, sollten *in vitro* und *in vivo* Versuche ineinander greifen. Zuerst könnte ein neuroprotektiver Effekt für CDFN in einem validen *in vitro* Schädigungsmodell

## 5. Diskussion

mit einer neuronalen Zelllinie etabliert werden. Die Schädigung sollte nach Möglichkeit mit 6-OHDA erfolgen, um eine gute Vergleichbarkeit mit den vorhandenen *in vivo* Ergebnissen zu ermöglichen (Lindholm et al., 2007). Basierend auf diesem Modell könnten verschiedene Testreihen zur Entwicklung eines Wirkmechanismus stattfinden (Microarray-Analysen, siRNA-Tests, Proteomanalysen, ATP-Tests, spezifische Inhibitoren unterschiedlicher Signaltransduktionsmechanismen etc.). Der postulierte Wirkmechanismus sollte, wenn möglich, *in vivo* bestätigt werden, um Artefakte und Sekundäreffekte in beiden Systemen auszuschließen.

Daneben sollte die biologische Funktion von CDFN erforscht werden. Welche Rolle wird endogenem CDFN im Organismus zugeschrieben? Microarray-Analysen von Zelllinien, die CDFN und CDFN-Mutanten überexprimieren, könnten dabei auf mögliche Interaktionspartner von CDFN hinweisen. Weiterhin könnten elektronen- oder fluoreszenzmikroskopische Versuche genauere Daten zur nativen Lokalisation von CDFN im ER bringen.

*In vivo* könnte die Züchtung von CDFN-Knockout-Mäusen aufklären, in welchem Bereich ein Mangel an CDFN zu Fehlbildungen führt und ob dieser Mangel (z.B. durch MANF) substituiert werden kann. Außerdem könnte evaluiert werden, ob CDFN-Knockout-Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber neurodegenerativen Substanzen aufweisen. Damit wäre ein starker Beweis für eine primäre Rolle von CDFN als neurotropher Faktor erbracht.

## 6 Zusammenfassung

Charakterisierungsstudien der biologischen und neurotrophen Eigenschaften des *cerebral dopamine neurotrophic factor* (CDNF).

Michael Barkholz

Neurotrophe Faktoren ermöglichen das Überleben von Neuronen auch unter pathologischen Stressbedingungen sowie eine erneute Proliferation neuronaler Zellstrukturen nach Beschädigung. Neurotrophe Faktoren sind definiert als sekretierte Proteine. Sie werden nach Strukturhomologien, Rezeptoren und Signaltransduktionswegen in verschiedene Familien unterteilt. Die Bezeichnung „neurotropher Faktor“ umfasst Proteine mit unterschiedlichsten Funktionen. Die neurotrophen Eigenschaften von CDNF, das zur CDNF/MANF Proteinfamilie gehört, wurden durch intrastriatale Injektion und darauf folgende Protektion und Proliferation von Neuronen in einem *in vivo* Schädigungsmodell nachgewiesen. Diese Proteinfamilie könnte somit einen neuen Ansatz zu einer Therapiemöglichkeit von neurodegenerativen Krankheiten bieten. CDNF und MANF haben ein Molekulargewicht von ungefähr 21 kDa. Der Aminoterminus enthält eine globuläre Saposin-ähnliche (*saposin like protein* SAPLIP)-Domäne, und der Carboxyterminus ist verwandt mit der Sequenz von *scaffold attachment factors* (SAFs) und enthält analog zu SAFs eine redoxaktive Cysteinbrücke eingebettet in ein CXXC-Motiv. Die biologische Funktion, Rezeptoren und Wirkmechanismus der Neuroprotektion der CDNF/MANF Proteinfamilie sind bisher unbekannt. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Versuche zur Charakterisierung der Eigenschaften von CDNF und dessen SAPLIP-Domäne unternommen. Für alle Versuche waren umfangreiche biotechnologische Vorarbeiten notwendig, die in der Forschungsabteilung von CSL Behring, Marburg vorgenommen wurden.

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Überprüfung der These, dass CDNF, ausgehend von seiner SAPLIP-Domäne, transduktorische Eigenschaften besitzen könnte: Makromoleküle in Zellen zu schleusen, ist durch die selektiv durchlässige Zellmembran nur sehr beschränkt möglich. Diese Restriktionen erlauben nur einem sehr kleinen Teil möglicher therapeutischer Substanzen den Zugang ins Zellinnere. Die natürliche Struktur von beispielsweise Proteinen verhindert das passive Eindringen dieser Stoffe in die Zelle. In den 1980er Jahren wurden jedoch Peptidsequenzen entdeckt, die als Molekültransporter Makromoleküle in das Zellinnere schleusen können. Die N-terminalen Domäne von CDNF

## 6. Zusammenfassung

besitzt nicht die klassische Struktur proteinogener Molekültransporter, sie ist jedoch verwandt mit Saposinen. Saposine und Saposin-ähnliche Domänen weiterer Proteine können Lipide binden oder Zellmembranen permeabilisieren. Diese Eigenschaften führten zu der These, dass auch die SAPLIP-Domäne von CDNF potentielle transduktorische Funktionen ausüben könnte. Zur Überprüfung der These wurden CDNF-Fusionsproteine biotechnologisch produziert und auf ihre transduktorischen Eigenschaften untersucht. Es konnte aber keine Transduktion von CDNF oder Assoziation mit der Zellmembran detektiert werden.

Der zweite Teil der Arbeit zeigt die zelluläre Lokalisation von nativem CDNF. CDNF wird als sekretierter neurotropher Faktor beschrieben. Die C-terminale KTEL-Sequenz von CDNF weist jedoch eine große Ähnlichkeit zum allgemeinen ER-Retentionssignal KDEL auf. Wir zeigen in dieser Arbeit mit unterschiedlichen Methoden zum ersten Mal, dass CDNF tatsächlich im ER retardiert wird. Es wurden weiterhin CDNF-Mutanten mit verändertem C-Terminus produziert. Die CDNF-Mutante mit C-terminaler KDEL-Sequenz und natives CDNF konnten nicht im Überstand von transfizierten Säugetier-Zellkulturen detektiert werden. Im Gegensatz zu CDNF-Mutanten mit deletiertem, maskiertem oder anderweitig verändertem C-Terminus, die im Kulturüberstand nachweisbar waren. Dieser Vergleich mit unterschiedlichen CDNF-Mutanten zeigt die wichtige Funktion einer freien C-terminalen KTEL-Sequenz bei der zellulären Lokalisation von CDNF.

Der dritte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit den neurotrophen Eigenschaften von CDNF *in vitro*. Nach erfolgreicher Protektion sollte durch molekulare und biochemische Methoden der unbekannte Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung von CDNF näher untersucht werden. Verschiedene neuronale Zellkulturen wurden dafür mit 6-Hydroxydopamin oder Glutamat geschädigt. Rekombinant hergestelltes CDNF oder dessen SAPLIP-Domäne wurden extern zugeführt und der Einfluss der zugesetzten Proteine analysiert. Im Gegensatz zu den vorherigen Ergebnissen *in vivo*, konnte in keinem der verwendeten *in vitro* Systeme eine signifikante Protektion oder Proliferation durch CDNF beobachtet werden.

## 6. Zusammenfassung

Characterization studies on the biological and neurotrophic effects of cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF)

Michael Barkholz

Neurotrophic factors enable the survival of neurons under pathological conditions and mediate novel proliferation of damaged neuronal cell structures. Neurotrophic factors are defined as secretory proteins. They are clustered into families according to structural similarities, receptors and signal transduction pathways. These neurotrophic protein families contain proteins of diverse functions. The neurotrophic abilities of CDNF - a member of the CDNF/MANF family - first have been discovered *in vivo*. Protection and proliferation of neurons were observed after intrastriatal application of CDNF in a rat model of neuronal degeneration. This protein family could therefore lead to a new concept in the therapy of neurodegenerative diseases. CDNF and MANF have a molecular weight of around 21 kDa. The amino terminus is formed by a globular saposin-like protein (SAPLIP) domain, whereas the carboxy terminus is related to scaffold attachment factors (SAF) and also contains a redox-active cysteine bridge presented in a CXXC motif. The biological function, receptors and molecular mechanisms involved in the neurotrophic effect are hence unknown. This work presents a set of experiments to characterize the properties of CDNF and its SAPLIP domain. The extensive biotechnological work of the performed experiments was conducted at CSL Behring, Marburg.

The first part of this thesis investigates a proposed theory that the SAPLIP domain of CDNF could initiate a transduction effect. Due to their size and natural structure macromolecules are not able to pass cell membranes passively. Therefore only a few therapeutical substances have easy access to the interior of cells. In the 1980's a special class of transporter peptides was discovered that can pass the cell membrane together with attached macromolecules. The N-terminal domain of CDNF does not contain the typical structure of these cell membrane-penetrating peptides but it is related to saposins. Saposins and saposin-like domains of other proteins can bind lipids (e.g. for degradation in lysosomes) or even permeabilize cell membranes. These abilities lead to the proposal of the potential transduction effect of the SAPLIP domain of CDNF. CDNF fusion proteins were designed and produced biotechnologically to investigate the transduction effect of the SAPLIP domain. However, no transduction effect or association of CDNF with cell membranes could be detected.

## 6. Zusammenfassung

The second part shows the cellular localization of native CDNF which has been described as a secretory neurotrophic factor. Interestingly, the C-terminal KTEL sequence of CDNF is similar to the general ER retention sequence KDEL. We could show for the first time with different experimental methods that CDNF is retarded in the ER. Different CDNF mutants were designed to proof the importance of the KTEL retention signal. The CDNF mutant with the general ER retention sequence KDEL and native CDNF could not be detected in the supernatant of confluent cell cultures. In contrast, CDNF mutants with deleted, masked or otherwise altered C-terminus could be discovered in the medium as secreted proteins. This shows the importance of a free C-terminal KTEL sequence to investigate native CDNF localization and trafficking.

The third part of the thesis was designed to endeavour the neurotrophic mechanisms of CDNF *in vitro*. Putative neuroprotective effects should be further investigated by molecular and biochemical methods. Different neuronal cell cultures were damaged by 4-hydroxydopamin or glutamate. Recombinant CDNF or the isolated SAPLIP domain were externally administered to investigate the protective effect of these proteins. In contrast to the formerly discovered protective effect *in vivo* no protective or proliferative effects of CDNF were observed *in vitro*.

## 7 Literatur

- Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nat Rev Neurosci.* 2002; 3(5):383-94.
- Airavaara M, Shen H, Kuo CC, Peränen J, Saarma M, Hoffer B, Wang Y. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor reduces ischemic brain injury and promotes behavioral recovery in rats. *J Comp Neurol.* 2009; 515(1):116-24.
- Altmann F, Staudacher E, Wilson IB, März L. Insect cells as hosts for the expression of recombinant glycoproteins. *Glycoconj J.* 1999; 16(2):109-23.
- Anelli T, Alessio M, Mezghrani A, Simmen T, Talamo F, Bachi A, Sitia R. ERp44, a novel endoplasmic reticulum folding assistant of the thioredoxin family. *EMBO J.* 2002; 21(4):835-44.
- Apostolou A, Shen Y, Liang Y, Luo J, Fang S. Armet, a UPR-upregulated protein, inhibits cell proliferation and ER stress-induced cell death. *Exp Cell Res.* 2008; 314(13):2454-67.
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 2006; 22(2):195-201.
- Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med.* 1944; 79(2):137-58.
- Baloh RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahrner TJ, Enomoto H, Simburger KS, Leitner ML, Araki T, Johnson EM Jr, Milbrandt J. Artemin, a novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals through the GFRalpha3-RET receptor complex. *Neuron.* 1998; 21(6):1291-302.
- Barde YA, Edgar D, Thoenen H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J.* 1982;1(5):549-53.
- Bauer S, Kerr BJ, Patterson PH. The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nat Rev Neurosci.* 2007; 8(3):221-32.
- Baur B, Hanselmann K, Schlimme W, Jenni B. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62(10):3673-8.
- Behl C, Holsboer F. Oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease and antioxidant neuroprotection. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 1998; 66 (3):113-21.
- Berkemeier LR, Winslow JW, Kaplan DR, Nikolics K, Goeddel DV, Rosenthal A. Neurotrophin-5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron.* 1991; 7(5):857-66.

## 7. Literatur

- Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1951; 62(3):293-300.
- Bespalov MM, Saarma M. GDNF family receptor complexes are emerging drug targets. Trends Pharmacol Sci. 2007; 28(2):68-74.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 1979; 7(6):1513-23.
- Blum H, Beier H, Gross H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis. 1987; 8(2):93-99.
- Buceta M, Galbete JL, Kostic C, Arsenijevic Y, Mermod N. Use of human MAR elements to improve retroviral vector production. Gene Ther. 2011; 18(1):7-13.
- Burdo J, Dargusch R, Schubert D. Distribution of the cystine/glutamate antiporter system xc- in the brain, kidney, and duodenum. J Histochem Cytochem. 2006; 54(5):549-57.
- Calabrese V, Scapagnini G, Ravagna A, Giuffrida Stella AM, Butterfield DA. Molecular chaperones and their roles in neural cell differentiation. Dev Neurosci. 2002; 24(1):1-13.
- Capstick PB, Garland AJ, Chapman WG, Masters RC. Production of foot-and-mouth disease virus antigen from BHK 21 clone 13 cells grown and infected in deep suspension cultures. Nature. 1965; 205(976):1135-6.
- Chauhan A, Tikoo A, Kapur AK, Singh M. The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: myths and realities. J Control Release. 2007; 117(2):148-62.
- Chen C, Smye SW, Robinson MP, Evans JA. Membrane electroporation theories: a review. Med Biol Eng Comput. 2006; 44(1-2):5-14.
- Chmiel H. Bioprozesstechnik. Spektrum Akademischer Verlag. 2005; 3. Auflage, ISBN: 978-3827424763.
- Cochrane CG, Revak SD. Pulmonary surfactant protein B (SP-B): structure-function relationships. Science. 1991; 254(5031):566-8.
- Cookson MR. The biochemistry of Parkinson's disease. Annu Rev Biochem. 2005; 74:29-52.
- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. Science. 1993; 262 (5134):689-95.
- Culmsee C, Zhu C, Landshamer S, Becattini B, Wagner E, Pellicchia M, Blomgren K, Plesnila N. Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. J Neurosci. 2005; 25:10262-10272.
- Dagert M, Ehrlich SD. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. Gene. 1979; 6(1):23-8.



## 7. Literatur

- Davies AM. Developmental changes in the neurotrophic factor survival requirements of peripheral nervous system neurons. *Prog Brain Res.* 1998; 117:47-56.
- Duan J, Kasper DL. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology.* 2011; 21(4):401-9.
- Dugaiczky A, Boyer HW, Goodman HM. Ligation of EcoRI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J Mol Biol.* 1975; 96(1):171-84.
- Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron.* 1990; 5(4):511-26.
- Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.* 1971; 8(9):871-4.
- European Medicines Agency, ICH Topic Q 6 B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. 1999, Document # CPMP/ICH/365/96.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987; 84(21):7413-7.
- Flamm H. The Austrian pediatrician Theodor Escherich as bacteriologist and social hygienist: The 100th anniversary of his death on February 15th, 1911. *Wien Klin Wochenschr.* 2011; 123(5-6):157-71.
- Frank L, Bucher JR, Roberts RJ. Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species. *J Appl Physiol.* 1978; 45(5):699-704.
- Frankel AD, Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell.* 1988; 55(6):1189-93.
- Di Giovanni G, Di Matteo V, Esposito E. Birth, life and death of dopaminergic neurons in the Substantia Nigra. Springer, 2009, 1. Auflage, ISBN: 978-3211926598.
- Gilchrist A, Au CE, Hiding J, Bell AW, Fernandez-Rodriguez J, Lesimple S, Nagaya H, Roy L, Gosline SJ, Hallett M, Paiement J, Kearney RE, Nilsson T, Bergeron JJ. Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell.* 2006 Dec 15;127(6):1265-81.
- Gilham D, Alam M, Gao W, Vance DE, Lehner R. Triacylglycerol hydrolase is localized to the endoplasmic reticulum by an unusual retrieval sequence where it participates in VLDL assembly without utilizing VLDL lipids as substrates. *Mol Biol Cell.* 2005; 16(2):984-96.
- Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med.* 2003; 9(5):589-95

## 7. Literatur

- Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 1997; 18(15):2714-23.
- Hallböök F, Ibáñez CF, Persson H. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron*. 1991; 6(5):845-58.
- Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*. 1994; 102 Suppl 10:5-12.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*. 1986; 246(2):501-14.
- Hamilton RL, Moorehouse A, Lear SR, Wong JS, Erickson SK. A rapid calcium precipitation method of recovering large amounts of highly pure hepatocyte rough endoplasmic reticulum. *J Lipid Res*. 1999; 40(6):1140-7.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003; 374(1):1-20.
- Hellman M, Arumäe U, Yu LY, Lindholm P, Peränen J, Saarma M, Permi P. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) has a unique mechanism to rescue apoptotic neurons. *J Biol Chem*. 2011; 286(4):2675-80.
- Hellman M, Peränen J, Saarma M, Permi P. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N resonance assignments of the human mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor. *Biomol NMR Assign*. 2010; 4(2):215-7.
- Hiesberger T, Hüttler S, Rohlmann A, Schneider W, Sandhoff K, Herz J. Cellular uptake of saposin (SAP) precursor and lysosomal delivery by the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *EMBO J*. 1998; 17(16):4617-25.
- Hiraiwa M, Campana WM, Martin BM, O'Brien JS. Prosaposin receptor: evidence for a G-protein-associated receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997; 240(2):415-8.
- Horibe T, Gomi M, Iguchi D, Ito H, Kitamura Y, Masuoka T, Tsujimoto I, Kimura T, Kikuchi M. Different contributions of the three CXXC motifs of human protein-disulfide isomerase-related protein to isomerase activity and oxidative refolding. *J Biol Chem*. 2004; 279(6):4604-11.
- Hüsler J, Zimmermann H. *Statistische Prinzipien für medizinische Projekte*. Verlag Hans Huber. 2001; 5. Auflage, ISBN: 9783456848686
- Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*. 1990; 9(10):3153-62.
- Kabouridis PS. Biological applications of protein transduction technology. *Trends Biotechnol*. 2003; 21(11):498-503.
- Kappus H. Oxidative stress in chemical toxicity. *Arch Toxicol*. 1987; 60(1-3):144-9.

## 7. Literatur

- Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(14):3059-66.
- Kjeldsen T, Ludvigsen S, Diers I, Balschmidt P, Sorensen AR, Kaarsholm NC. Engineering-enhanced protein secretory expression in yeast with application to insulin. *J Biol Chem.* 2002 ; 277(21):18245-8.
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol.* 2002; 30(6):620-50.
- Kokame K, Kato H, Miyata T. Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J Biol Chem.* 2001; 276(12):9199-205. Epub 2000 Dec 8.
- Kolter T, Winau F, Schaible UE, Leippe M, Sandhoff K. Lipid-binding proteins in membrane digestion, antigen presentation, and antimicrobial defense. *J Biol Chem.* 2005; 280(50):41125-8.
- Konno K, Wakabayashi Y, Akashi-Takamura S, Ishii T, Kobayashi M, Takahashi K, Kusumoto Y, Saitoh S, Yoshizawa Y, Miyake K. A molecule that is associated with Toll-like receptor 4 and regulates its cell surface expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 339(4):1076-82.
- Kotzbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, Golden JP, Creedon DJ, Johnson EM Jr, Milbrandt J. Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature.* 1996; 384(6608):467-70.
- Kowalski JM, Parekh RN, Mao J, Wittrup KD. Protein folding stability can determine the efficiency of escape from endoplasmic reticulum quality control. *J Biol Chem.* 1998; 273(31):19453-8.
- Kriegstein K. Factors promoting survival of mesencephalic dopaminergic neurons. *Cell Tissue Res.* 2004; 318(1):73-80.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259):680-5.
- Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, Brooks DJ, Hotton G, Moro E, Heywood P, Brodsky MA, Burchiel K, Kelly P, Dalvi A, Scott B, Stacy M, Turner D, Wooten VG, Elias WJ, Laws ER, Dhawan V, Stoessel AJ, Matcham J, Coffey RJ, Traub M. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol.* 2006 Mar;59(3):459-66. Erratum in: *Ann Neurol.* 2006; 60(6):747.
- Lee TJ, Sartor O, Luftig RB, Koochekpour S. Saposin C promotes survival and prevents apoptosis via PI3K/Akt-dependent pathway in prostate cancer cells. *Mol Cancer.* 2004; 3:31.

## 7. Literatur

- Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, Thoenen H, Barde YA. Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature*. 1989; 341(6238):149-52.
- Leifert JA, Harkins S, Whitton JL. Full-length proteins attached to the HIV tat protein transduction domain are neither transduced between cells, nor exhibit enhanced immunogenicity. *Gene Ther*. 2002; 9(21):1422-8.
- Leitner ML, Molliver DC, Osborne PA, Vejsada R, Golden JP, Lampe PA, Kato AC, Milbrandt J, Johnson EM Jr. Analysis of the retrograde transport of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), neurturin, and persephin suggests that in vivo signaling for the GDNF family is GFRalpha coreceptor-specific. *J Neurosci*. 1999; 19(21):9322-31.
- Levi-Montalcini R, Aloe L. Differentiating effects of murine nerve growth factor in the peripheral and central nervous systems of *Xenopus laevis* tadpoles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985; 82(20):7111-5.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*. 1993; 260(5111):1130-2.
- Lindholm, P. Novel CDNF/MANF Protein Family: Molecular Structure, Expression and Neurotrophic Activity, Institute of Biotechnology and Faculty of Biosciences, University of Helsinki, Finland 2009, ISBN:978-952-10-5586-7
- Lindholm P, Saarma M. Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. *Dev Neurobiol*. 2010; 70(5):360-71.
- Lindholm P, Voutilainen MH, Laurén J, Peränen J, Leppänen VM, Andressoo JO, Lindahl M, Janhunen S, Kalkkinen N, Timmusk T, Tuominen RK, Saarma M. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature*. 2007; 448(7149):73-7.
- Liu B, Yang Y, Qiu Z, Staron M, Hong F, Li Y, Wu S, Li Y, Hao B, Bona R, Han D, Li Z. Folding of Toll-like receptors by the HSP90 paralogue gp96 requires a substrate-specific cochaperone. *Nat Commun*. 2010; 1:79.
- Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*, 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000, ISBN-10: 0-7167-3136-3
- Lotharius J, Falsig J, van Beek J, Payne S, Dringen R, Brundin P, Leist M. Progressive degeneration of human mesencephalic neuron-derived cells triggered by dopamine-dependent oxidative stress is dependent on the mixed-lineage kinase pathway. *Neurosci*. 2005; 25(27):6329-42.
- Lotharius J, Barg S, Wiekop P, Lundberg C, Raymon HK, Brundin P. Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line. *J Biol Chem*. 2002; 277(41):38884-94.
- Lundberg M, Johansson M. Is VP22 nuclear homing an artifact? *Nat. Biotechnol*. 2001; 19:713-714

## 7. Literatur

- Lynes EM, Simmen T. Urban planning of the endoplasmic reticulum (ER): how diverse mechanisms segregate the many functions of the ER. *Biochim Biophys Acta*. 2011 ; 1813(10):1893-905.
- Mao Y, Daniel LN, Whittaker N, Saffiotti U. DNA binding to crystalline silica characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Environ Health Perspect*. 1994; 102 Suppl 10:165-71.
- Maher P, Davis JB. The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci*. 1996; 16(20):6394-401.
- Milbrandt J, de Sauvage FJ, Fahrner TJ, Baloh RH, Leitner ML, Tansey MG, Lampe PA, Heuckeroth RO, Kotzbauer PT, Simburger KS, Golden JP, Davies JA, Vejsada R, Kato AC, Hynes M, Sherman D, Nishimura M, Wang LC, Vandlen R, Moffat B, Klein RD, Poulsen K, Gray C, Garces A, Johnson EM Jr. Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron*. 1998; 20(2):245-53.
- Mizobuchi N, Hoseki J, Kubota H, Toyokuni S, Nozaki J, Naitoh M, Koizumi A, Nagata K. ARMET is a soluble ER protein induced by the unfolded protein response via ERSE-II element. *Cell Struct Funct*. 2007; 32(1):41-50.
- Morimoto BH, Koshland DE Jr. Excitatory amino acid uptake and N-methyl-D-aspartate-mediated secretion in a neural cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(9):3518-21.
- Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2): 55-63.
- Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A et al. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 1989; 2 (6):1547-58.
- Munro S, Pelham HR. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell*. 1987; 48(5):899-907
- Myhill N, Lynes EM, Nanji JA, Blagoveshchenskaya AD, Fei H, Carmine Simmen K, Cooper TJ, Thomas G, Simmen T. The subcellular distribution of calnexin is mediated by PACS-2. *Mol Biol Cell*. 2008; 19(7):2777-88.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J*. 1982; 1(7):841-5.
- Nundlall S, Rajpar MH, Bell PA, Clowes C, Zeeff LA, Gardner B, Thornton DJ, Boot-Handford RP, Briggs MD. An unfolded protein response is the initial cellular response to the expression of mutant matrilin-3 in a mouse model of multiple epiphyseal dysplasia. *Cell Stress Chaperones*. 2010; 15(6):835-49.
- Olanow CW, Rascol O, Hauser R, Feigin PD, Jankovic J, Lang A, Langston W, Melamed E, Poewe W, Stocchi F, Tolosa E; ADAGIO Study Investigators. A double-blind, delayed-start trial of rasagiline in Parkinson's disease. *N Engl J Med*. 2009; 361(13):1268-78.
- Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 1991; 14:453-501.

## 7. Literatur

- Parkash V, Lindholm P, Peränen J, Kalkkinen N, Oksanen E, Saarma M, Leppänen VM, Goldman A. The structure of the conserved neurotrophic factors MANF and CDFN explains why they are bifunctional. *Protein Eng Des Sel*. 2009; 22(4):233-41.
- Petrova P, Raibekas A, Pevsner J, Vigo N, Anafi M, Moore MK, Peaire AE, Shridhar V, Smith DI, Kelly J, Durocher Y, Commissiong JW. MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. *J Mol Neurosci*. 2003; 20(2):173-88.
- Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev*. 2006; 52(2):201-43.
- Porro M, Viti S, Antoni G, Saletti M. Ultrasensitive silver-stain method for the detection of proteins in polyacrylamide gels and immunoprecipitates on agarose gels. *Anal Biochem*. 1982; 127(2):316-21.
- Rabilloud T, Carpentier G, Tarroux P. Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis*. 1988; 9(6):288-91.
- Rabilloud T, Vuillard L, Gilly C, Lawrence JJ. Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1994; 40(1):57-75. Review.
- Rahhal B, Heermann S, Ferdinand A, Rosenbusch J, Rickmann M, Krieglstein K. In vivo requirement of TGF-beta/GDNF cooperativity in mouse development: focus on the neurotrophic hypothesis. *Int J Dev Neurosci* 2009; 27(1):97-102.
- Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ, Chernomordik LV, Lebleu B. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem*. 2003; 278(1):585-90.
- Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol*. 1994; 65(1):27-33.
- Romig H, Fackelmayer FO, Renz A, Ramsperger U, Richter A. Characterization of SAF-A, a novel nuclear DNA binding protein from HeLa cells with high affinity for nuclear matrix/scaffold attachment DNA elements. *EMBO J*. 1992; 11(9):3431-40.
- Ryu J, Han K, Park J, Choi SY. Enhanced uptake of a heterologous protein with an HIV-1 Tat protein transduction domains (PTD) at both termini. *Mol Cells*. 2003; 16(3):385-91.
- Sagara Y, Dargusch R, Chambers D, Davis J, Schubert D, Maher P. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med*. 1998; 24:1375-89.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(12):5463-7.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988; 239(4839):487-91.

## 7. Literatur

- Saran M, Bors W. Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis. *Free Radic Res Commun.* 1989; 7(3-6):213-20.
- Sattler R, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol Neurobiol.* 2001; 24(1-3):107-29.
- Schubert D, Piasecki D. Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *J Neurosci.* 2001; 21(19):7455-62.
- Schultze, H. E., Heremans, J. F. *Molecular Biology of Human Proteins. Elsevier, Amsterdam, Vol I, 1966,*
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(13):3381-5.
- Shridhar V, Rivard S, Shridhar R, Mullins C, Bostick L, Sakr W, Grignon D, Miller OJ, Smith DI. A gene from human chromosomal band 3p21.1 encodes a highly conserved arginine-rich protein and is mutated in renal cell carcinomas. *Oncogene.* ;12(9):1931-9.
- Sitia R, Meldolesi J. Endoplasmic reticulum: a dynamic patchwork of specialized subregions. *Mol Biol Cell.* 1992; 3(10):1067-72.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985; 150(1):76-85.
- Sukhodub AL, Burchell A. Preparation of intact microsomes from cultured mammalian H4IIE cells. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2005; 52(3):330-4.
- Sukharev SI, Klenchin VA, Serov SM, Chernomordik LV, Chizmadzhev YuA. Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys J.* 1992; 63(5):1320-7.
- Sun ZP, Gong L, Huang SH, Geng Z, Cheng L, Chen ZY. Intracellular trafficking and secretion of cerebral dopamine neurotrophic factor in neurosecretory cells. *J Neurochem.* 2011; 117(1):121-32.
- Tadimalla A, Belmont PJ, Thuerauf DJ, Glassy MS, Martindale JJ, Gude N, Sussman MA, Glembofski CC. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is an ischemia-inducible secreted endoplasmic reticulum stress response protein in the heart. *Circ Res.* 2008; 103(11):1249-58.
- Tan S, Schubert D, Maher P. Oxytosis: A novel form of programmed cell death. *Curr Top Med Chem.* 2001; 1(6):497-506.
- Teng Y, Liu Q, Ma J, Liu F, Han Z, Wang Y, Wang W. Cloning, expression and characterization of a novel human CAP10-like gene hCLP46 from CD34(+) stem/progenitor cells. *Gene.* 2006; 371(1):7-15.

## 7. Literatur

- Tobaben S, Grohm J, Seiler A, Conrad M, Plesnila N, Culmsee C. Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons. *Cell Death Differ.* 2011; 18(2):282-92.
- Tomac AC, Grinberg A, Huang SP, Nosrat C, Wang Y, Borlongan C, Lin SZ, Chiang YH, Olson L, Westphal H, Hoffer BJ. Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor alpha 1 availability regulates glial cell line-derived neurotrophic factor signaling: evidence from mice carrying one or two mutated alleles. *Neuroscience.* 2000; 95(4):1011-23.
- Tomac AC, Lindqvist E, Lin LF, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature.* 1995; 373(6512):335-9.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1989; 27(8):495-501.
- Vanyukov MM, Maher BS, Devlin B, Tarter RE, Kirillova GP, Yu LM, Ferrell RE. Haplotypes of the monoamine oxidase genes and the risk for substance use disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2004; 125B(1):120-5.
- Veldhoen S, Laufer SD, Restle T. Recent developments in peptide-based nucleic acid delivery. *Int J Mol Sci.* 2008; 9(7):1276-320.
- Vennema H, Heijnen L, Rottier PJ, Horzinek MC, Spaan WJ. A novel glycoprotein of feline infectious peritonitis coronavirus contains a KDEL-like endoplasmic reticulum retention signal. *J Virol.* 1992; 66(8):4951-6.
- Voutilainen MH, Bäck S, Peränen J, Lindholm P, Raasmaja A, Männistö PT, Saarma M, Tuominen RK. Chronic infusion of CDNF prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2011; 228(1):99-108.
- Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med.* 2004; 10(3):310-5.
- Weiss B, Jacquemin-Sablon A, Live TR, Fareed GC, Richardson CC. Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4. *J Biol Chem.* 1968; 243(17):4543-55.
- Wender PA, Galliher WC, Goun EA, Jones LR, Pillow TH. The design of guanidinium-rich transporters and their internalization mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(4-5):452-72.
- Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science.* 1999; 286(5446):1888-93.
- Wurm F, Bernard A. Large-scale transient expression in mammalian cells for recombinant protein production. *Curr Opin Biotechnol.* 1999; 10(2):156-9.



## 7. Literatur

Yang L, Johansson J, Ridsdale R, Willander H, Fitzen M, Akinbi HT, Weaver TE. Surfactant protein B propeptide contains a saposin-like protein domain with antimicrobial activity at low pH. *J Immunol.* 2010; 184(2):975-83.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev.* 1994; 74(1):139-62.

Ziegler A. Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008; 60(4-5):580-97.

## **Danksagung**

Für die Bereitstellung des Themas und der Arbeitsmaterialien möchte ich mich bei Herrn Dr. Schulte und Herrn Dr. Hoffmann bedanken. Mein weiterer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Weimer für die fachliche Betreuung. Die labortechnische Anleitung durch Herrn Herbert Dersch war einzigartig und Ihm gilt mein besonderer Dank. Allen weiteren Mitarbeitern von CSL Behring möchte ich auch herzlich danken.

Für Ratschläge, Diskussionen, Betreuung und fachliche Anleitung möchte ich mich sehr herzlich bei Prof. Dr. Maike Petersen bedanken. Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Culmsee für die Möglichkeit in seinem Labor arbeiten zu dürfen und die Übernahme des Zweitgutachtens. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Klebe und Herrn Prof. Dr. Kockskämper bedanken. Mein Dank für die Unterstützung geht auch an alle Mitglieder der AG Petersen und AG Culmsee.

Vielen Dank, meine lieben Freunde, für die schönen Stunden und den bedingungslosen Rückhalt.

Mein tiefster Dank geht an meine Familie. Ihr seid mein Leben und meine Freude.

## **Curriculum vitae**

### Persönliche Daten

Name: Michael Barkholz

Geb.: 20.04.1982 in Marburg a.d. Lahn

### Ausbildung

05/ 2008 – 02/ 2012	Promotion bei CSL Behring und der Pharmazie der Universität Marburg
09/ 2003 – 05/ 2008	Studium der Biotechnologie an der Hamburger Universität für angewandte Wissenschaften
08/ 2002 – 09/ 2003	Zivildienst und Ausbildung zum Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz, Marburg
09/ 2001 – 07/ 2002	Physikalisch-technische Fachhochschulreife an der Adolf Reichwein Schule, Marburg
09/ 1998 – 07/ 2001	Ausbildung zum Biologielaborant bei PharmaServe, Marburg
09/ 1998	Abschluss der mittleren Reife an der Emil von Behring Schule, Marburg