

Aus der Universitätsklinik für  
Kinder- und Jugendmedizin Tübingen  
Abteilung Kinderheilkunde III mit Poliklinik  
Ärztliche Direktorin: Frau Professor Dr. I. Krägeloh-Mann

**Analytik von Galaktocerebrosid-3-sulfat im Urin  
zur Diagnostik der Metachromatischen Leukodystrophie**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Christine Weißenberg  
aus Stuttgart

2011

Dekan:

Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Bruchelt

2. Berichterstatter:

PD Dr. Dr. W. Bernhard

*für Tom und Birgit*



## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>5</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>11</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>13</b>
1.1 Metachromatische Leukodystrophie.....	13
1.1.1 Ätiologie und Pathogenese .....	13
1.1.2 Arylsulfatase A .....	15
1.1.3 Galaktocerebrosid-3-sulfat .....	18
1.1.4 Genetik.....	19
1.1.5 Pseudodefizienz der ASA.....	20
1.1.6 Klinik .....	21
1.1.7 Diagnostik .....	26
1.1.7.1 Biochemische Diagnostik.....	26
1.1.7.2 Genetische Diagnostik.....	27
1.1.7.3 Histopathologische Diagnostik.....	28
1.1.7.4 Neurophysiologische Diagnostik.....	29
1.1.7.5 Bildgebende Diagnostik .....	29
1.1.7.6 Pränatale Diagnostik.....	32
1.1.7.7 Neugeborenenenscreening .....	32
1.1.8 Therapie.....	33
1.1.8.1 Stammzelltransplantation.....	34
1.1.8.2 Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut .....	38
1.1.8.3 Enzymersatztherapie.....	39
1.1.8.4 Gentherapie.....	42
1.1.9 Rekombinante humane Arylsulfatase A.....	43
1.2 Zielsetzung der Arbeit.....	44
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>47</b>
2.1 Material .....	47
2.1.1 Chemikalien .....	47
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	48
2.1.3 Geräte .....	48
2.1.4 Lösungen und Puffer.....	49
2.1.4.1 Isolierung von Leukozyten aus Blutproben .....	49
2.1.4.2 Photometrie .....	49
2.1.4.3 Dünnschichtchromatographie .....	50
2.1.4.4 Isotachophorese .....	51
2.1.4.5 Weitere Lösungen .....	51

2.2	Methoden .....	52
2.2.1	Isolierung von Leukozyten aus EDTA-Blut mittels Dextran-sedimentation.....	52
2.2.2	Analyse von Leukozyten mittels Advia-120 .....	53
2.2.3	Differenzierung der Leukozyten nach Sedimentation mit Advia-120 ....	54
2.2.4	Gewinnung von ASA enthaltendem Enzymextrakt aus Leukozyten ....	55
2.2.5	Photometrische Ermittlung des Umsatzes von para-Nitrocatecholsulfat .....	55
2.2.5.1	Allgemeine Prinzipien .....	55
2.2.5.2	Ermittlung der ASA-Aktivität über den Umsatz von pNCS .....	56
2.2.5.3	Photometrische Messung der Aktivität der ASA aus Leukozyten .....	57
2.2.5.4	Bestimmung der Aktivität der rekombinanten Arylsulfatase A .....	58
2.2.5.5	Erstellung einer Kalibrierkurve für para-Nitrocatechol.....	59
2.2.6	Dünnschichtchromatographie.....	61
2.2.6.1	Allgemeines Prinzip .....	61
2.2.6.2	Ziel der Verwendung der Dünnschichtchromatographie .....	62
2.2.6.3	Berechnung des Retentionsfaktors.....	63
2.2.6.4	Referenzwerte .....	63
2.2.6.5	Urinaufarbeitung zur Sulfatidbestimmung.....	64
2.2.6.6	Trennung und Analyse von Sulfatid und Galaktocerebrosid .....	65
2.2.6.7	Standardmethode zur Sulfatidbestimmung im Urin.....	66
2.2.7	Isotachophorese.....	67
2.2.7.1	Aufbau des ITP-Geräts ItaChrom EA101.....	68
2.2.7.2	Funktionsweise der Isotachophorese .....	69
2.2.7.3	Konzentrationsadaptation .....	72
2.2.7.4	Prinzip der Zonenschärfung.....	72
2.2.7.5	Detektion .....	73
2.2.7.6	Wahl des Elektrolytsystems .....	75
2.2.7.7	Analyse der Proben mit der Isotachophorese.....	75
2.2.7.8	Voreinstellung der Isotachophorese .....	76
2.2.8	Saure Hydrolyse der Sulfatgruppe von Galaktose-6-sulfat als Modell für Galaktocerebrosid-3-sulfat.....	76
2.2.9	Bestimmung von Sulfatid im Urin mittels Massenspektrometrie.....	78
2.2.9.1	Urinaufarbeitung für die Massenspektrometrie .....	78
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>81</b>
3.1	Zielsetzung.....	81
3.2	Photometrie.....	82
3.2.1	Kalibrierkurve für para-Nitrocatechol.....	82
3.2.2	Einfluss der Verdünnung der Proben auf den Extinktionswert.....	84
3.2.3	Umsatz von pNCS nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen der rhASA.....	85
3.2.4	Aktivität der rhASA in Gegenwart verschiedener Inkubationszusätze ..	87
3.2.5	Aktivität der rhASA in Gegenwart von Serum und Heparin-Plasma ....	89
3.2.6	Zusammenfassung – Umsatz von pNCS durch rhASA .....	91

---

3.2.7	Optimierung des Umsatzes von para-Nitrocatecholsulfat .....	91
3.2.8	Enzymkinetik der rekombinanten Arylsulfatase A.....	93
3.2.9	Stabilität der rhASA in Heparin-Plasma und Heparin-Vollblut.....	94
3.2.10	Zusammenfassung – Enzymkinetik und -Stabilität der rhASA .....	97
3.2.11	Optimierung der Inkubationsbedingungen im Hinblick auf die Sulfatid- bestimmung mit der ITP .....	98
3.2.11.1	Reduktion der Ionenkonzentration des Inkubationspuffers .....	98
3.2.11.2	Umsatz von pNCS in Taurocholatlösung .....	100
3.2.11.3	Optimierung des Umsatzes von pNCS in Taurocholatlösung .....	103
3.2.12	Zusammenfassung – Optimierung des Puffers für die ITP.....	104
3.3	Dünnschichtchromatographie.....	105
3.3.1	Referenzbanden.....	105
3.3.2	Vorversuche: Inkubationspuffer für den Umsatz von Sulfatid mit rhASA.....	106
3.3.3	Zusammenfassung und Bewertung der Vorversuche.....	109
3.3.4	Inkubationspuffer für den Umsatz von Sulfatid nach Raghavan.....	110
3.3.5	Umsatz von Galaktocerebrosid-3-sulfat durch rhASA.....	110
3.3.6	Reduktion der Konzentrationen der Pufferbestandteile im Hinblick auf die ITP .....	112
3.3.7	Prüfung des Taurocholats auf abspaltbare Sulfatgruppen und Verwendung von reinem Taurocholat .....	114
3.3.8	Zusammenfassung - Pufferoptimierung für die Umsetzung von Sulfatid .....	117
3.3.9	Prüfung der Methode zur Urin-Aufarbeitung auf den Verlust von Sulfatid .....	117
3.3.10	Identifikation der Sulfatid-Bande in einer Urinprobe .....	119
3.3.11	Inkubation von Sulfatid in Urin mit rekombinanter Arylsulfatase A.....	120
3.3.12	Umsatz von nachträglich zu Urin gegebenem Sulfatid .....	121
3.3.13	Optimierung des Umsatzes von nachträglich zu Urin gegebenem Sulfatid .....	123
3.3.14	Zusammenfassung - Umsetzung von Sulfatid in Urinproben .....	124
3.4	Isotachophorese.....	125
3.4.1	Chlorid-Caprionsäure-Elektrolytssystem.....	125
3.4.2	Zuordnung der Pufferbestandteile zur jeweiligen Substrat-Stufe.....	126
3.4.3	pNCS-Kalibrierkurve in H <sub>2</sub> O im Chlorid-Caprionsäure-Elektrolyt- system.....	128
3.4.4	Umsatz von pNCS durch rhASA bei reduzierter Pufferkapazität .....	130
3.4.5	Stabilität der rhASA in Heparin-Plasma .....	132
3.4.6	Umsatz von pNCS durch Arylsulfatase A aus Leukozyten.....	133
3.4.7	Zusammenfassung - pNCS-Umsatz im Cl <sup>o</sup> -Caprionsäure-Elektrolyt- system.....	134
3.4.8	Inkubation von Galaktose-4- und -6-sulfat mit rhASA .....	134
3.4.9	Saure Hydrolyse von Galaktose-6-sulfat als Model für die Sulfat- abspaltung von Galaktocerebrosid-3-sulfat.....	137
3.4.9.1	Saure Hydrolyse von Galaktose-6-sulfat mit 5 molarer Salzsäure..	137
3.4.9.2	Saure Hydrolyse von Galaktose-6-sulfat mit 0,1 M Salzsäure.....	138

---

3.4.10	Zusammenfassung - Umsatz von Galaktose-4- und -6-sulfat .....	140
3.4.11	Sulfatdetektion im Chlorid-Citronensäure-Elektrolytsystem.....	140
3.4.12	Sulfat-Kalibrierkurve in H <sub>2</sub> O .....	141
3.4.13	Sulfat-Kalibrierkurve mit Galaktose-6-sulfat im Ansatz.....	143
3.4.14	Sulfat-Kalibrierkurve in Sulfatid-Lösung .....	144
3.4.15	Reproduzierbarkeit der Auswertungen in der Isotachophorese.....	146
3.4.16	Zusammenfassung – Sulfat-Kalibrierkurven .....	147
3.4.17	Untersuchung von Taurocholat auf abspaltbare Sulfat-Gruppen.....	148
3.4.18	Kinetik der Sulfatabspaltung von Sulfatid durch rhASA.....	149
3.4.19	Reduktion der Sulfatidkonzentration bei der Inkubation mit rhASA....	151
3.4.20	Zusammenfassung – Umsatz von Sulfatid durch rhASA.....	152
3.4.21	Entfernung des freien Sulfats aus Urinproben.....	153
3.4.22	Entfernung von Urinbestandteilen der hydrophilen Phase mit Vitamin C als Referenzsubstanz .....	154
3.4.23	Fällung des anorganischen Sulfats im Urin mit Bariumchlorid .....	156
3.4.24	Zusammenfassung – Entfernung des freien Sulfats aus dem Urin ....	157
3.4.25	Umsatz von Sulfatid in Urin durch die rekombinante Arylsulfatase A ..	157
3.4.26	Umsatz von Sulfatid geringerer Konzentration in Urin durch rhASA ..	160
3.4.27	Zusammenfassung – Sulfatidbestimmung im Urin .....	163
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>165</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>177</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>180</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>182</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>195</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>197</b>







## Abkürzungsverzeichnis

ASA	Arylsulfatase A
c	Konzentration
C/M=2:1	Chloroform/Methanol gemischt im Verhältnis 2:1
DC	Dünnschichtchromatographie
E	Extinktion (Photometrie) bzw. Elektrische Feldstärke (Isotachophorese)
e	Elementarladung
ERT	Enzymersatztherapie (enzyme replacement therapy)
F	Kraft
g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
Gal-6-S	Galaktose-6-sulfat
GC	Galaktocerebrosid
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPTLC	High performance thin-layer chromatography
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
I	Stromstärke
ITP	Isotachophorese
KG	Körpergewicht
M	mol/l
μ	Mobilität (ITP) bzw. mikro-
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
MSC	Mesenchymale Stammzellen
n	Anzahl der Versuche bzw. Probenzahl
NaCl	Natriumchlorid
Na-PP	Natriumpyrophosphat
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	Phosphatidylcholin
PD	Pseudodefizienz der Arylsulfatase A
pNC	para-Nitrocatechol
pNCS	para-Nitrocatecholsulfat
PNS	peripheres Nervensystem
RF	Retentionsfaktor
RH	Relative Stufenhöhe
rhASA	Rekombinante humane Arylsulfatase A
s	Laufstrecke
SD	Standardabweichung
Sulfatid	Galaktocerebrosid-3-sulfat
SZT	Stammzelltransplantation
t	Zeit
tT	technisches Taurocholat
U	Spannung [Volt]
v	Geschwindigkeit
VF	Verdünnungsfaktor
ZNS	zentrales Nervensystem



# Kapitel 1

## Einleitung

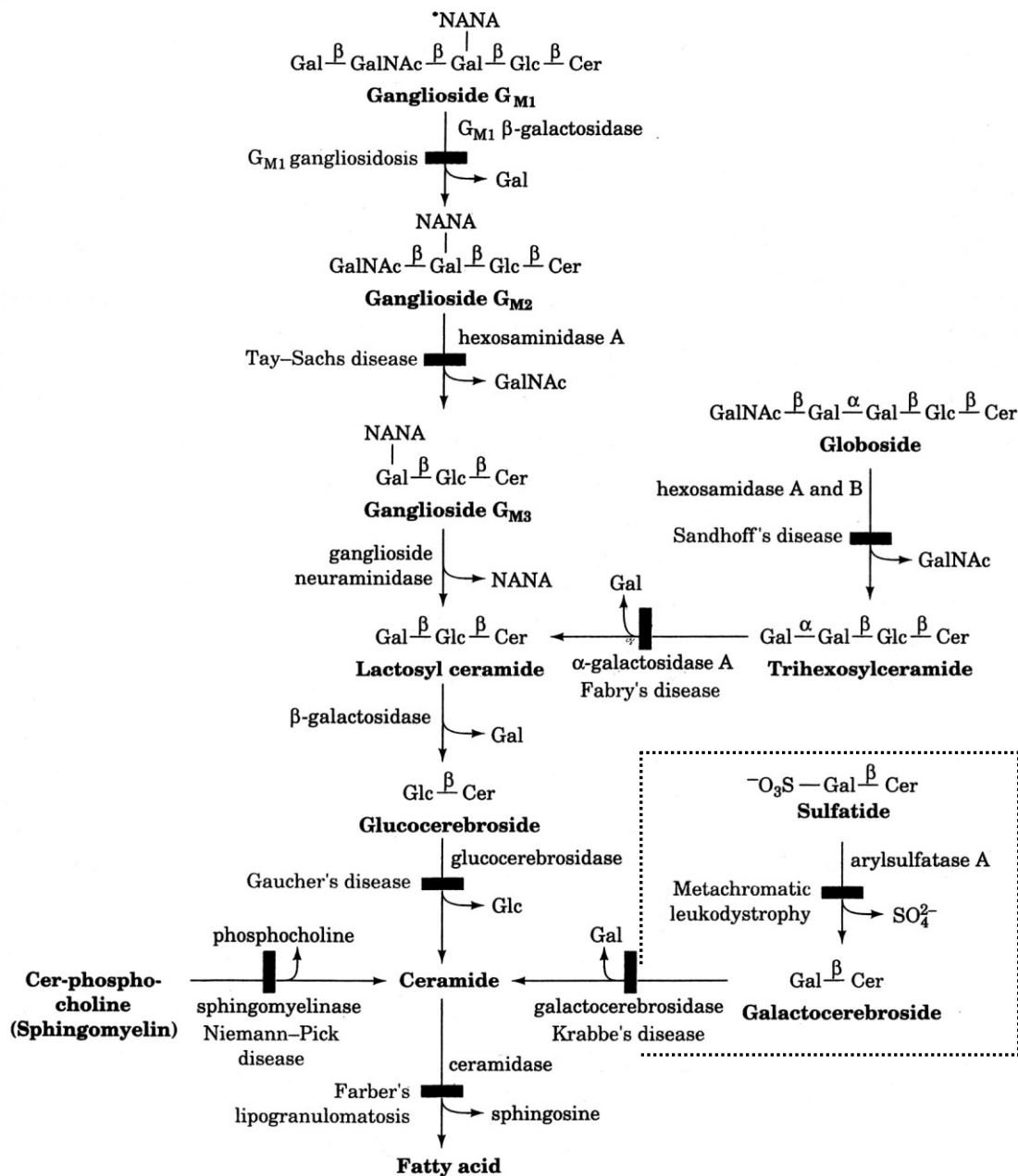
### 1.1 Metachromatische Leukodystrophie

#### 1.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Die Metachromatische Leukodystrophie (MLD) gehört zu der Gruppe der lysosomalen Speichererkrankungen. Dabei handelt es sich um Stoffwechselstörungen, die durch einen genetisch bedingten Defekt der sauren Hydrolasen in den Lysosomen verursacht werden. Diese Enzyme sind für den Abbau hochmolekularer Substanzen wie Lipide, Glykoproteine und Glykosaminoglykane verantwortlich. Durch den Defekt eines dieser Enzyme kommt es zur Anhäufung der entsprechenden Substanz und dadurch zur Funktionsbeeinträchtigung der betroffenen Zellen. Alle lysosomalen Speicherkrankheiten gemeinsam treten mit einer Häufigkeit von ca. 1 auf 7700 Geburten auf [Meikle et al, 1999; Hoffmann, 2009]. Die Heterozygotenwahrscheinlichkeit liegt damit bei 0,5%. Die Untergruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten, zu der die Metachromatische Leukodystrophie zählt, sind die Sphingolipidosen. Sphingosin ist ein einfach ungesättigter Aminoalkohol, der über eine Amidbindung der Aminogruppe am C<sub>2</sub>-Atom mit einer Fettsäure zu einem Sphingolipid wird. Als Sphingolipidosen werden die Speicherkrankheiten bezeichnet, bei denen ein Defekt der abbauenden Enzyme dieser Sphingolipide vorliegt (siehe **Bild 1**).

Die Metachromatische Leukodystrophie ist eine neurologische Erkrankung, die durch einen fortschreitenden Verlust der Myelinscheiden im zentralen und peripheren Nervensystem verursacht wird. Die Myelinscheiden werden durch das Galaktocerebrosid-3-sulfat geschädigt, das bei der Erkrankung in den Zellen angehäuft wird. Die Anhäufung beruht auf einem angeborenen Defekt des Abbauweges des Galakto-

cerebrosid-3-sulfats. In den meisten Fällen ist das abbauende Enzym die Arylsulfatase A (ASA), seltener das Aktivatorprotein der ASA, das Sulfatase Aktivator Protein B (Saposin B), für den mangelnden Abbau verantwortlich [Holtschmidt et al, 1991].



**Bild 1:** Abbauweg der Sphingolipide mit den entsprechenden lysosomalen Enzymen sowie der zugehörigen Erkrankung bei Enzymdefekt. Eingerahmt: Abbauweg des Sulfatids mit MLD als Folge des Enzymdefekts [Voet & Voet, 1995]

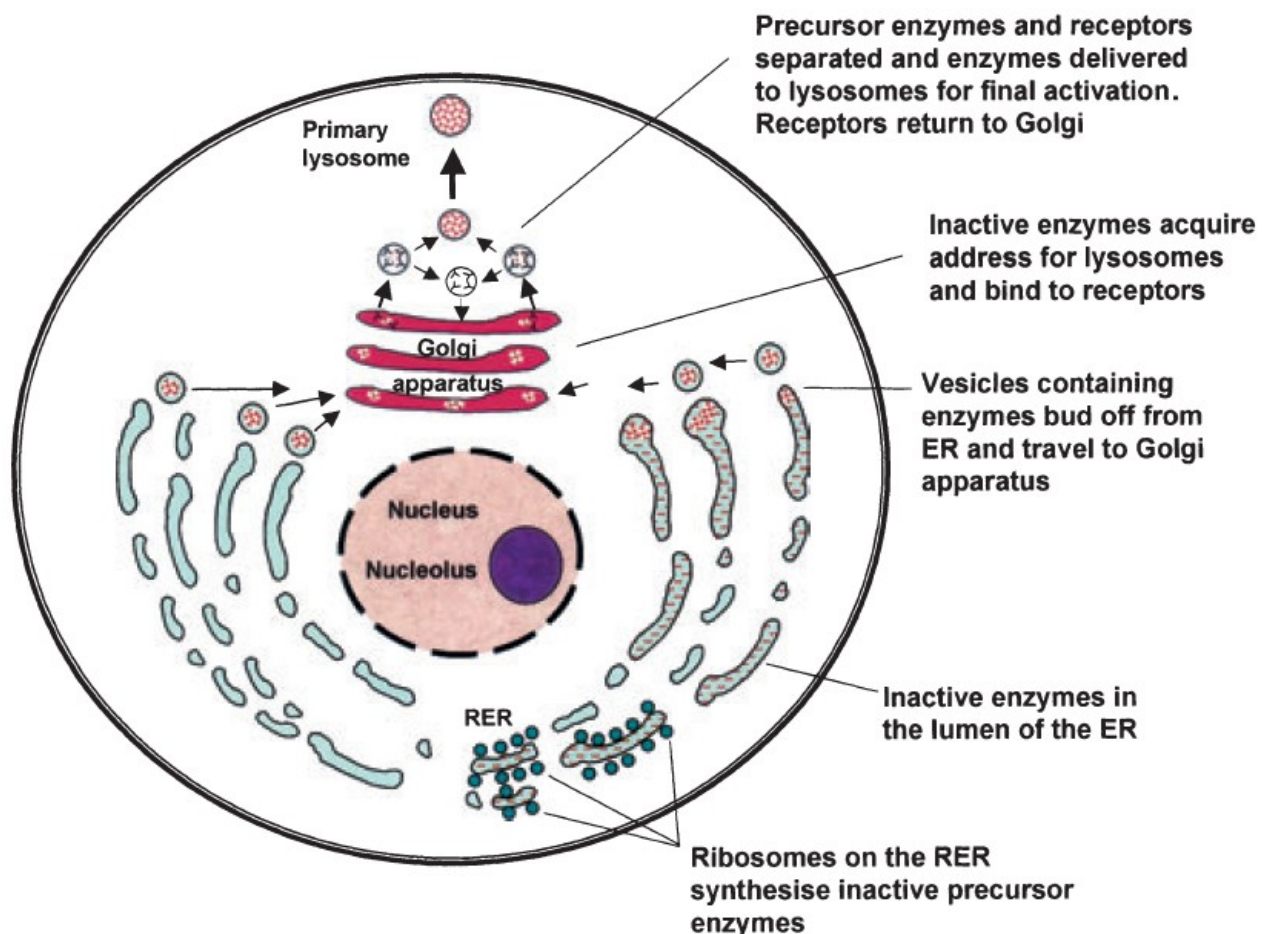
Die Akkumulation des Galaktocerebrosid-3-sulfats, das auch als Sulfatid bezeichnet wird, führt zu metachromatischen, granulären Ablagerungen in Oligodendrozyten, in Makrophagen und in einigen Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) sowie in Schwann-Zellen und in Makrophagen des peripheren Nervensystems (PNS). Auch in viszeralen Organen wie Nieren, Leber, Gallenblase, Pankreas, Hoden, Schweißdrüsen, Nebennierenrinde und Rektum kommt es zur Anhäufung des Sulfatids. Obwohl die Sulfatide auch in diesen viszeralen Organen akkumulieren, führen sie dort aus Gründen, die bisher nicht verstanden sind, nicht zu funktionellen Schädigungen der Zellen [Philippart, 1996].

Die Pathogenese der MLD ist noch nicht genau verstanden. Unklar bleibt, warum die Sulfatid-Ablagerungen in den Oligodendrozyten zur Schädigung der Zellen führen. Gieselmann (2003) konnte im Mausmodell zeigen, dass nur ein einziges Protein bei der MLD in den Oligodendrozyten Auffälligkeiten aufweist. Es handelt sich dabei um das Myelin und Lymphozyten Protein (MAL), ein Proteolipid Protein, das in den Zellen der MLD-knockout-Mäuse supprimiert ist. Der Grund dafür ist unklar, es ist aber bekannt, dass Veränderungen in der Expression dieses Proteolipid-Gens zu einer Demyelinisierung führen [Anderson et al, 1998].

### **1.1.2 Arylsulfatase A**

Die Arylsulfatase A ist ein saures Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 57 kDa [Waheed et al, 1983]. Das Enzym ist hoch konserviert und gehört zur Gruppe der Sulfatasen. Alle Sulfatasen haben eine hohe Substratspezifität und sechs der bekannten zehn Sulfatasen kommen wie die ASA in den Lysosomen vor und bauen dort Sulfolipide und Glykosaminoglykane ab [Georgeson et al, 2002]. Die natürlichen Substrate der ASA sind neben Galaktocerebrosid-3-sulfat Laktosylceramidsulfat, Psychosinesulfat und Sulfogalaktoglycerolipid (Seminolipid) [Kolodny & Fluharty, 1995]. Die ASA spaltet die Sulfatgruppen von diesen Molekülen durch Hydrolyse der 3-O-Esterbindung ab. Zudem baut sie auch synthetisch hergestellte Fluorogene und Chromogene, wie beispielsweise das in dieser Arbeit eingesetzte para-Nitrocatecholsulfat ab [Hanson et al, 2004].

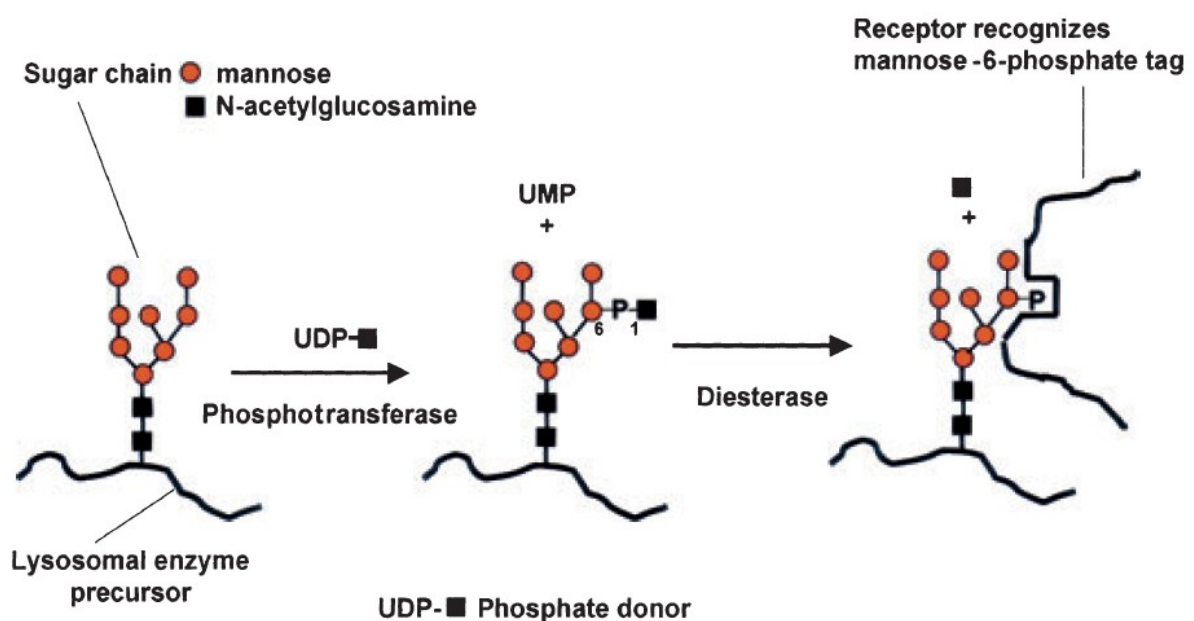
Die ASA weist in den menschlichen Zellen eine ganz unterschiedliche Aktivität auf. Sogar innerhalb der verschiedenen Leukozyten unterscheidet sich die ASA-Aktivität. Während in eosinophilen achtmal und basophilen Granulozyten zweimal mehr Arylsulfatase A gebildet wird als in neutrophilen Granulozyten [Philippart, 1996], ist die ASA-Aktivität in Lymphozyten mit nur 60% der Aktivität in neutrophilen Granulozyten am geringsten [Strobel, 2005]. Die ASA liegt als lösliches Enzym in den Lysosomen vor [Chang et al, 1981]. Lysosomen sind Zellorganellen, die nur in tierischen Zellen vorkommen und für den Abbau zelleigener und zellfremder Bestandteile wie Viren und Bakterien verantwortlich sind. In den Lysosomen herrscht ein saurer pH-Wert von 4,5 bis 5. Deshalb liegt das pH-Optimum der lysosomalen Enzyme und damit der ASA in diesem Bereich. Dies dient zum Schutz der Zelle. Wird die Membran eines Lysosoms verletzt, werden die abbauenden Enzyme durch den neutralen pH-Wert im Zytosol der Zelle inaktiviert. Bei einem pH-Wert von 4,5 liegt die ASA als Monomer vor, bei einem pH-Wert von 6,5 hingegen als Dimer [Fogh et al, 2008].



**Bild 2:** Synthese der Arylsulfatase A und Transport in das Lysosom [Vellodi, 2005]



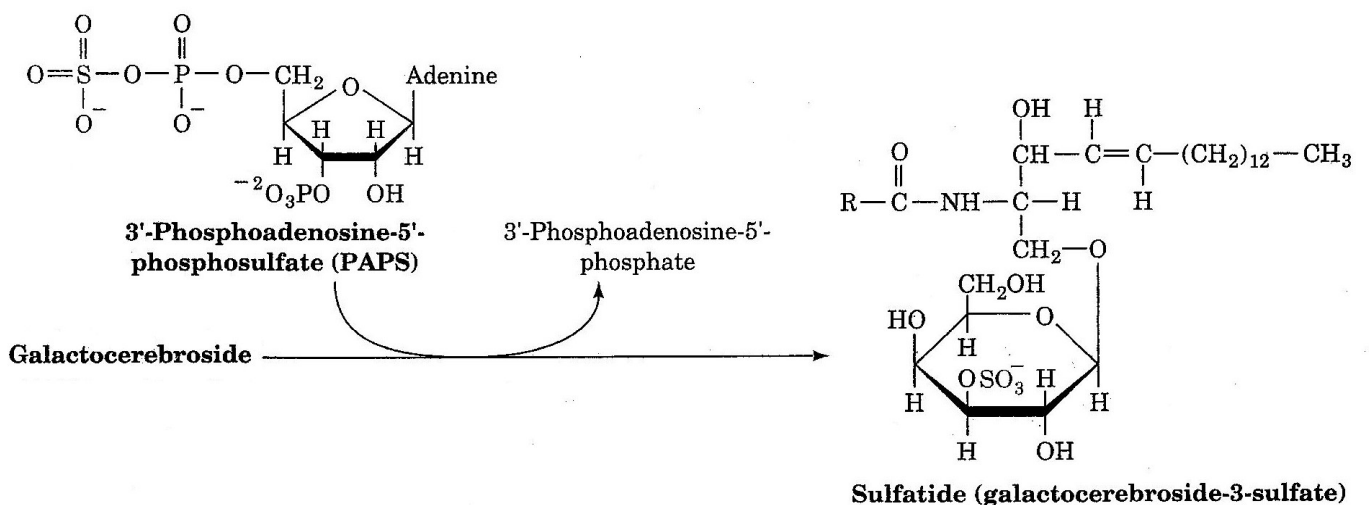
Von dem Gen der Arylsulfatase A werden drei verschiedene mRNAs unterschiedlicher Länge transkribiert, deren Produkt aber dasselbe Enzym ergibt. Die ASA wird über membrangebundene Ribosomen als Vorläufer von 507 Aminosäuren in das Lumen des rauen endoplasmatischen Retikulums synthetisiert. Dort wird sie zu einem 489 Aminosäuren enthaltenden Protein prozessiert und erhält eine Glykosylierung an den Asparagin-Resten (**Bild 2**). Anschließend gelangt das Enzym, wie auch die exkretorischen Glykoproteine in vesikulären Transportern zum Golgi-Apparat. Im Golgi-Apparat werden alle Enzyme, die für die Lysosomen bestimmt sind, von einer Phosphotransferase erkannt. Die Phosphotransferase vermittelt ein Anhängen von Mannose-6-Phosphat-Resten an die Oligosaccharid-Seitenketten dieser Enzyme (**Bild 3**) [Sommerlade et al, 1994-b]. Diese Mannose-6-Phosphat-Gruppen werden von einem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor im Golgi-Apparat erkannt, was dazu führt, dass die Arylsulfatase A in spezielle Transportvesikel eingeschlossen wird, in denen sie zu den Lysosomen transportiert wird. Durch Verschmelzen dieser Transportvesikel mit den Lysosomen werden die Enzyme in das Lysosom freigesetzt [Kornfeld, 1992; Gieselmann, 1995 & 2003].



**Bild 3:** Markierung der ASA mit dem für die lysosomalen Enzyme spezifischen Mannose-6-Phosphat-Rest [Vellodi, 2005]

### 1.1.3 Galaktocerebroside-3-sulfat

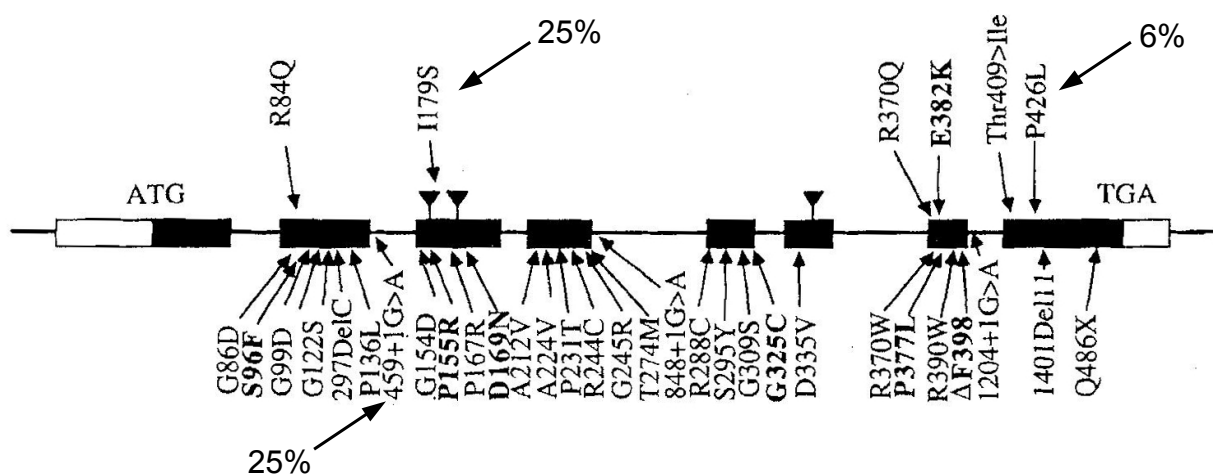
Das Galaktocerebroside-3-Sulfat ist ein Sphingolipid, dessen Hydroxylgruppe des C<sub>3</sub>-Atoms am Galaktoserest mit einer Sulfatgruppe verestert ist. Es ist ein Hauptbestandteil des Myelins des zentralen und peripheren Nervensystems. Myelin hat als Biomembran mit 75% generell einen sehr hohen Fettanteil verglichen mit den anderen Biomembranen des Körpers. Das Galaktocerebroside-3-sulfat hat einen Anteil an den Lipiden des Myelins von 4 - 6%. Gemeinsam mit seinem Vorläufer Galaktocerebroside beträgt der Anteil an den Lipiden des Myelins sogar ein Drittel [Sevin et al, 2007]. Sulfatide sind vor allem Bestandteil der Außenschicht des Myelins, sie tragen zur Differenzierung der myelinisierenden Zellen bei, sind Bestandteil der Kontakte zwischen Glia- und Nervenzelle im Bereich der Ravierverschen Schnürringe und für die Aufrechterhaltung des Myelins verantwortlich [Eckhardt, 2008]. Zudem fungieren sie als Bestandteil des Opiat-, GABA- und des Serotonin-Rezeptors [Philippart, 1996]. Das Galaktocerebroside wird durch eine Glykosyltransferase aus UDP-Galaktose und Ceramid gebildet. Anschließend wird diesem Galaktocerebroside mit Hilfe einer mikrosomalen Sulfotransferase eine Sulfatgruppe in aktivierter Form von 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat übertragen (**Bild 4**) [Farrell & McKhann, 1971].



**Bild 4:** Biosynthese des Galaktocerebroside-3-sulfats (Sulfatids) [Voet & Voet, 1995]

### 1.1.4 Genetik

Die MLD wird wie die meisten Stoffwechselerkrankungen autosomal rezessiv vererbt. Beide Geschlechter sind gleichermaßen betroffen. Das Gen der Arylsulfatase A befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 22 (22q13.31) und hat eine Länge von 3,2 Kilo-Basenpaaren. Es ist damit sehr kurz und besteht aus acht Exons [Barth et al, 1993] (**Bild 5**). 2008 waren 116 verschiedene Mutationen des ASA-Gens bekannt [Biffi et al, 2008-a]. Der Großteil dieser Mutationen kommt nur in einzelnen Familien vor. Nur drei Mutationen treten mit einer relevanten Häufigkeit auf. Bei der ersten handelt es sich um eine Insertion eines Nukleotids am Übergang zwischen Exon 2 und Intron 2, sodass es zu einem alternativen Splicing kommt und damit eine fehlerhafte mRNA gebildet wird. Diese Mutation betrifft das Nukleotid 459 + 1G>A. Bei der zweiten Mutation handelt es sich um eine Punktmutation, wodurch Prolin an der Stelle 426 durch Leucin ersetzt wird (1277 C>T). Das Genprodukt weist gegenüber der normalen ASA eine drastisch reduzierte Halbwertszeit auf. Diese beiden Mutationen sind jeweils bei ca. 25% der Patienten zu finden [Barth et al, 1995]. Die dritte Mutation wird in ca. 6% der Patienten gefunden. Durch Punktmutation an Position 179 ist die für Isoleucin kodierende Region durch Leucin ersetzt. Das entspricht dem Nukleotid 536 T>G. Diese Mutation kommt nicht homozygot vor, sondern ist stets mit einer anderen Mutation verbunden [Gieselmann, 2003; Biffi et al, 2008-b].



**Bild 5:** ASA-Gen mit 8 Exons. Oberhalb des Gens sind die Mutationen markiert, die zu einer Restfunktion der ASA führen, unterhalb die Mutationen, bei denen keine Enzymaktivität nachweisbar ist [Gieselmann et al, 1994]. Die drei häufigsten Mutationen sind mit Prozentangaben markiert

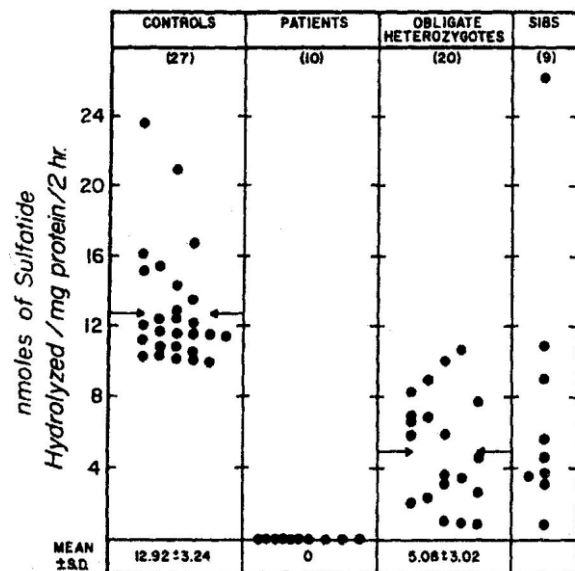
Die Mutationen auf dem ASA-Gen können aufgrund der Restfunktion der Arylsulfatase A in zwei Gruppen eingeteilt werden. Bei Patienten mit sogenannten 0-Allelen kann durch biochemische Tests keine Enzymfunktion nachgewiesen werden. Als R-Allele werden solche Mutationen bezeichnet, die eine Restfunktion der ASA aufweisen. Bei der ersten der drei beschriebenen Mutationen handelt es sich um ein 0-Allel, bei 2 und 3 um ein R-Allel (vgl. **Bild 5**).

Der Phänotyp und der klinischer Verlauf korrelieren eng mit dem Genotyp von Patienten mit MLD. Während Patienten, die homozygot für das 0-Allel sind, meist eine spätinfantile Form der MLD entwickeln, weisen Patienten mit einer Restfunktion der ASA vorwiegend eine adulte Form der Erkrankung auf. Die Mutation 536 T>G führt initial zu psychischen Veränderungen, während die zweite beschriebene Mutation, 1277 C>T, mit neurologischen Symptomen beginnt. Biffi et al. (2008-b) stellten fest, dass die periphere Polyneuropathie, die aufgrund der Demyelinisierung der peripheren Nerven auftritt, am besten mit dem klinischen Verlauf der Patienten korreliert und damit den besten prognostischen Faktor darstellt. Bei Patienten mit zwei 0-Allelen ist bereits bei Diagnosestellung die Nervenleitgeschwindigkeit hochgradig reduziert und verschlechtert sich im Verlauf kaum noch. Patienten mit einem 0- und einem R-Allel sind bezüglich der klinischen Symptome ebenso schwer betroffen wie die Patienten mit zwei 0-Allelen, die Progressionsgeschwindigkeit der Erkrankung ist jedoch geringer. Patienten mit 0/0 und 0/R sind mit Hilfe des MRTs nicht zu unterscheiden. Die Patienten mit einem R-Allel haben aber eine deutlich weniger ausgeprägte periphere Neuropathie. Patienten mit zwei R-Allelen leiden hingegen nie unter einer Polyneuropathie [Biffi et al, 2008-b].

### 1.1.5 Pseudodefizienz der ASA

Auch bei Gesunden kommt ein partieller Mangel an Arylsulfatase A vor [Gieselmann et al, 1989]. Diese Form des ASA-Mangels wird als Pseudodefizienz der Arylsulfatase A (PD) bezeichnet. Die Restaktivität des Enzyms liegt dabei zwischen 5 und 10% und ist ausreichend, um das im Körper anfallende Galaktocerebrosid-3-sulfat abzubauen (**Bild 6**). Es sind zwei Mutationen bekannt, 1049 A>G und 96 A>G, die diese Pseudodefizienz verursachen [Biffi et al, 2008-a].

Die erste der beiden Mutationen führt zum Verlust einer der drei Bindungsstellen für die Oligosaccharid-Seitenketten. Der Grund für die Minderung der Aktivität der ASA ist bei dieser Mutation noch unklar. Bei der zweiten Mutation ist die kleinste der drei transkribierten mRNAs (vgl. Kap. 1.1.2) defekt. Diese mRNA hat normalerweise einen Anteil an der gesamten transkribierten mRNA des ASA-Gens von 90%. Das heißt, es wird ein normales, funktionsfähiges Enzym, jedoch in zu geringer Menge, hergestellt [Gieselmann et al, 1994]. Ein einziges Gen, das eine PD-Mutation trägt, ist ausreichend, um die Ausbildung einer Metachromatischen Leukodystrophie zu verhindern. Ein Träger einer MLD-Mutation auf dem einen Allel des ASA-Gens und einer PD-Mutation des zweiten Allels, entwickelt deshalb keine Symptome der Erkrankung [Polten et al, 1991]. Bis zu 2,6% der Bevölkerung sind homozygot für die Pseudodefizienz-Mutation des ASA-Gens. Damit liegt die Wahrscheinlichkeit, heterozygot für eine der Mutationen im PD-Gen zu sein, bei 30% [Barth et al, 1994-b].



**Bild 6:** Aktivität der ASA in Leukozyten von Gesunden, MLD-Patienten und Heterozygoten [Raghavan et al, 1981]

### 1.1.6 Klinik

Die Metachromatische Leukodystrophie wird nach dem Alter des Auftretens der ersten Symptome in vier Gruppen eingeteilt. Die am frühesten einsetzende Erkrankungsform ist die spätinfantile Form, gefolgt von der frühen und späten juvenilen Form, sowie der adulten Form. Die MLD tritt für alle Formen gemeinsam mit einer Häufigkeit von 1,21 – 1,42 auf 100.000 Geburten auf [Poorthuis et al, 1999; Meikle et al, 1999]. Die klinischen Symptome und die Progressionsgeschwindigkeit variieren stark innerhalb der nach Alter des ersten Auftretens gewählten Einteilung. Obwohl es in vielen Zellen des Körpers zu Ablagerungen des Sulfatids kommt, sind nur das ZNS

sowie das PNS von den zellschädigenden Effekten betroffen. Die viszerale Organe, wie Leber und Niere, bleiben von der Destruktion aus unklaren Gründen verschont. Die Ablagerungen des Sulfatids führen zum Untergang von Schwann-Zellen und Oligodendrozyten. Dadurch kommt es zur Entmarkung der Axone der Nervenzellen, wodurch die zahlreichen Symptome der MLD verursacht werden.

### **Spätinfantile Form**

Die am häufigsten auftretende Form der MLD ist die spätinfantile Form. Es handelt sich dabei gleichzeitig um die Erkrankungsform mit den schwerwiegendsten Symptomen zu Beginn und dem raschesten Fortschreiten. Meist werden die ersten Symptome zwischen dem 12. und 18. Lebensmonat beobachtet [Cheon et al, 2002]. Erstes, aber unspezifisches Symptom sind Magen-Darm-Beschwerden, welche durch die auftretende Hypotonie verursacht werden [Gieselmann, 2007]. Das Laufen wird nur langsam erlernt. Stolpern, häufiges Fallen und Zehengang sind häufig frühzeitig auftretende Symptome. Die Extremitäten sind hypoton, die Sehnenreflexe sind abgeschwächt oder fehlen ganz. Häufig tritt ein Genu recurvatum auf. Gelegentlich sind auch ausschließlich Schwäche und Ataxie im Rahmen eines Infektes die ersten Symptome. Diese verschwinden nach wenigen Wochen und treten nach einem symptomfreien Intervall erneut auf [Kolodny & Fluharty, 1995].

Im Verlauf kommt es zu einer stammbetonten Ataxie, einer Verschlechterung der Grob- und Feinmotorik der oberen Extremität und einem Verfall der sprachlichen Fähigkeiten [Philippart, 1996]. Die sprachlichen Fähigkeiten sind meist erst mit einer Verzögerung gegenüber den motorischen Symptomen betroffen. Die Sprache wirkt zunächst verwaschen, Wortfindungsstörungen treten auf und schließlich geht die Fähigkeit zu sprechen vollständig verloren. Desinteresse, Frustration und aggressives Verhalten werden häufig beobachtet [McFaul et al, 1982]. Im Alter von zwei bis drei Jahren verlieren die Patienten die Fähigkeit zu sitzen, der Muskeltonus der Beine ist erhöht, der Körperstamm ist hypoton. Ein Nystagmus und zerebrale Krampfanfälle können auftreten. Es kommt zur Atrophie des Sehnervs und zur Entfärbung der Makula [Scott et al, 1993]. Intermittierend können die Patienten Schmerzen in Armen und Beinen haben. Im Endzustand der Erkrankung sind die Patienten an das Bett gebunden, leiden unter einer spastischen Tetraparese, sind erblindet und nicht mehr in der Lage Kontakt zu ihrer Umwelt aufzunehmen.

### **Juvenile Form**

Die juvenile Form der MLD beginnt zwischen dem 4. und dem 16. Lebensjahr und verläuft sehr variabel. Sie wird deshalb in vielen Einteilungen nochmals in eine frühe juvenile Form mit Beginn der ersten Symptome vor dem sechsten Lebensjahr und eine späte juvenile Form mit Beginn im Alter von über sechs Jahren unterteilt. Verschlechterung der schulischen Leistungen und Verhaltensänderungen sind häufig die ersten Zeichen. Bei der frühen juvenilen Form der MLD ist die geistige Retardierung für einige Jahre nahezu das einzige Zeichen der Erkrankung [Haltia et al, 1980]. Auch die Genetik der juvenilen Form ist sehr variabel und viele seltene Genmutationen werden beobachtet. Daher kommt es vor, dass bei ganz unterschiedlichen klinischen Verläufen die gleiche ASA-Aktivität in den Zellen gemessen wird. Eine periphere Polyneuropathie ist im Gegensatz zu den beiden anderen Verlaufsformen selten nachweisbar. Ebenfalls im Unterschied zu der spätinfantilen Form zeigt das MRT initial vorwiegend einen Befall der weißen Substanz der anterioren Hirnregionen [Del Carro et al, 2004] (vgl. Kap. 1.1.7.5).

### **Adulte Form**

Die adulte Form der MLD ist mit Abstand die seltenste, wobei eine hohe Dunkelziffer vermutet wird. Es werden zwei unterschiedliche Verlaufsformen beobachtet, die auf einer unterschiedlichen Lage der Mutation innerhalb des ASA-Gens beruhen [Baumann et al, 2002]. Die erste der beiden Verlaufsformen beginnt ausschließlich mit den Symptomen einer peripheren Neuropathie [Fressinaud et al, 1992]. Aufgrund des schleichenden Beginns und zunächst häufig ausschließlicher Ungeschicklichkeit der Betroffenen wird die Diagnose meist erst viele Jahre nach dem Auftreten der ersten Symptome gestellt. Die motorischen Symptome sind oft so unscheinbar, dass sie häufig lange Zeit unerkannt bleiben oder fehlgedeutet werden. Rückblickend zeigen viele Patienten abgeschwächte Muskeleigenreflexe, eine Abspreizhemmung der Beine oder eine leichte Apraxie, die sich zum Beispiel in dem Problem äußern kann, die Führerschein-Prüfung zu bestehen [Philippart, 1996]. Ebenso kann ein mentaler Abbau das erste Symptom der adulten Form der MLD sein. Dieser schreitet fort und neurologische Symptome treten meist erst mit einer Latenz auf, die Jahre andauern kann. Die Patienten zeigen zum Teil keine elektrophysiologisch nachweisbaren Zeichen einer peripheren Neuropathie. Der Grund für diese beiden unterschiedlichen

Verlaufsformen der adulten Form der MLD liegt an der unterschiedlichen Lage der Mutation innerhalb des ASA-Gens [Marcão et al, 2005]. Verhaltensänderungen, wie Reizbarkeit und aggressives Verhalten treten häufig auf [Hageman et al, 1995]. Nur sehr selten leiden die Patienten an neurologischen Symptomen, insbesondere Ataxien, ohne dass psychische Auffälligkeiten oder Verhaltensänderungen vorhanden sind [Baumann et al, 1991]. Die psychischen Veränderungen wurden als schizophrenieähnliche Symptome beschrieben, Aufmerksamkeitsdefizite kommen vor, aber auch ein nur intermittierendes Auftreten von postpartaler Depression von vier Wochen Dauer wurde beobachtet [Kumperscak et al, 2005]. Die periphere Neuropathie ist selten symptomatisch, elektrophysiologisch aber nahezu immer vorhanden. Im Endstadium zeigen die meisten Patienten eine Demenz, schwerwiegende Ataxien und Verhaltensauffälligkeiten [Hageman et al, 1995].

### **Saposin B Defekt**

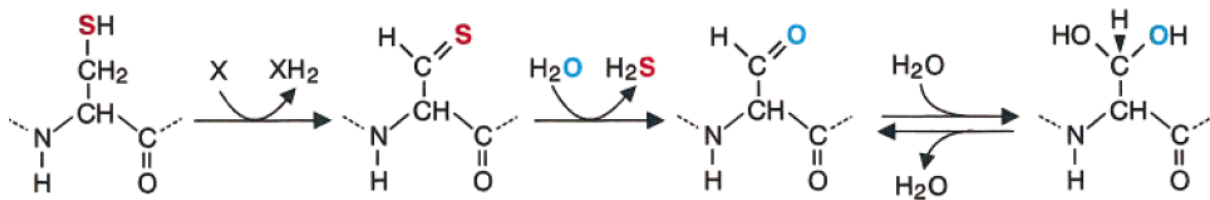
Das Saposin B hat die Aufgabe, das hydrophobe Galaktocerebrosid-3-sulfat löslich und damit für die Arylsulfatase A zugänglich zu machen. Das Saposin B-Gen befindet sich auf Chromosom 10 und wird als Prosaposin abgelesen. Dieses Prosaposin enthält vier Aktivatorproteine, Saposin A, B, C und D. Es wird proteolytisch in diese einzelnen Aktivatorproteine zerlegt [Holtschmidt et al, 1991]. Mutationen in dem Prosaposin-Gen können nur ein einziges dieser Aktivatorproteine betreffen. Der klinische Verlauf von Patienten mit Saposin B Defekt ist sehr variabel und kann alle Formen der MLD imitieren [Kuchař et al, 2008; Schlote et al, 1991]. Durch die Routinetestung zur Bestimmung der ASA-Aktivität über den Umsatz des künstlichen Substrats pNCS (vgl. Kap. 1.1.7.1) wird ein Defekt des Saposin B nicht erkannt. Das liegt daran, dass dieses künstliche Substrat der ASA selbst gut wasserlöslich ist und damit kein Vermittler für dessen Umsatz durch die ASA erforderlich ist [Gieselmann et al, 1994].

### **Multipler Sulfatasemangel**

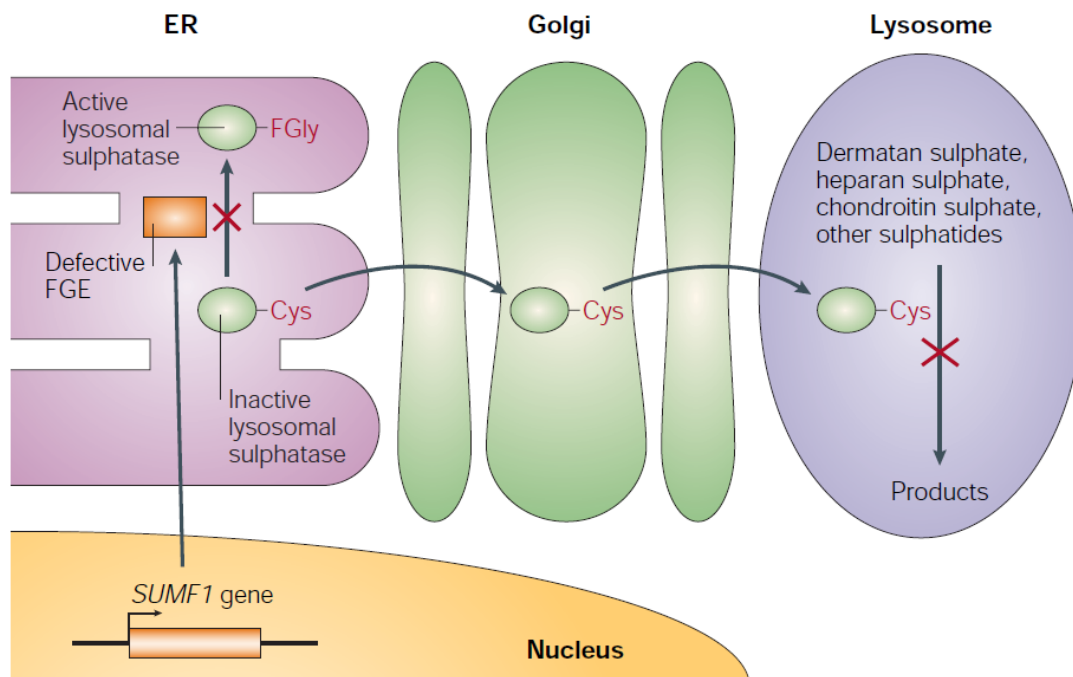
Eine eigene Erkrankung, bei der unter anderem die Arylsulfatase A defekt ist, ist der Multiple Sulfatase-Mangel. Alle bekannten Sulfatasen sind betroffen und werden als nur kaum aktive Polypeptide hergestellt. Der Grund dafür ist, dass eine Proteinmodifikation ausfällt, die normalerweise bei allen Sulfatasen im rauen endoplasmatischen Retikulum durchgeführt wird und die das aktive Zentrum aller Sulfatasen betrifft [von



Figura et al, 1998]. Bei der ausfallenden Proteinmodifikation handelt es sich um eine ungewöhnliche Formylglycin-Struktur, die an die Stelle eines Cysteinrestes in der Peptidkette der Sulfatasen tritt. Diese C $\alpha$ -Formylglycin-Gruppe ist für die Abspaltung von Sulfatgruppen aus den entsprechenden sulfatierten Verbindungen essentiell (**Bild 7**) [Dierks et al, 2003]. Diese Modifikation wird durch den sogenannten Sulfatase-Modifikations-Faktor 1 ermöglicht, der bei Patienten mit Multiplem Sulfatase-mangel defekt ist (**Bild 8**) [Futerman & van Meer, 2004].



**Bild 7:** Überführung des Cysteinrestes der Sulfatasen zu Formylglycin-Hydrat. 1.Reaktion: Oxidation der Thiol- zu einer Thioaldehyd-Gruppe mit X als Akzeptor. 2. und 3. Reaktion: Hydrolyse der Thioaldehyd-Gruppe mit Abspaltung eines Aldehyd-Sulfats. Das Aldehyde-Hydrat kann spontan auftreten [von Figura et al, 1998]



**Bild 8:** Defekt der Sulfatasen durch Mutation im Sulfatase-Modifikations-Faktor-1-Gen (SUMF-1). Dieser ist für die Konvertierung des Cysteins (Cys) zu C $\alpha$ -Formylglycin (FGly) im aktiven Zentrum der Sulfatasen verantwortlich. Als Folge werden inaktive Sulfatasen in die Lysosomen transportiert [Futerman & van Meer, 2004]

Die Patienten zeigen die Symptomatik einer spät-infantilen Form der MLD. Zusätzlich treten Symptome der Mukopolysaccharidose, wie Vergrößerung der Gesichtszüge, Hepatosplenomegalie und Skelettanomalien auf [Kolodny & Fluharty, 1995].

### **1.1.7 Diagnostik**

#### **1.1.7.1 Biochemische Diagnostik**

##### **Aktivität der Arylsulfatase A**

Die Standardmethode zum biochemischen Nachweis der Metachromatischen Leukodystrophie ist die Bestimmung der Aktivität der Arylsulfatase A nach Variationen der Methode von Baum et al. (1959). Die untersuchte Arylsulfatase A wird dazu aus Leukozyten oder einer Fibroblastenkultur gewonnen [Porter et al, 1969]. Die Aktivität wird über den Umsatz eines künstlichen Substrats der ASA, des para-Nitrocatecholsulfats (pNCS), bestimmt. Die ASA spaltet die Sulfatgruppe des pNCS ab. Die Konzentration des Abbauprodukts para-Nitrocatechol kann photometrisch bestimmt werden. Da pNCS im Gegensatz zu Galaktocerebrosid-3-sulfat auch ein Substrat der Arylsulfatase B ist, die ebenfalls in den Lysosomen vorkommt, bei der MLD aber nicht verändert ist, wird durch einen Inhibitor die Aktivität der Arylsulfatase B unterdrückt.

In dieser Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um die Aktivität der rekombinanten Arylsulfatase A mit der körpereigenen zu vergleichen. Als Inhibitor der Arylsulfatase B wurde 10%ige NaCl-Lösung verwendet [Kolodny & Fluharty, 1995].

Darüber hinaus kann in Fibroblasten-Kulturen oder Leukozyten der Umsatz von radioaktiv markiertem Sulfatid gemessen werden. Bei diesem sogenannten Sulfatid-Beladungstest nehmen die Leukozyten bzw. Fibroblasten, die selbst kein Sulfatid synthetisieren, das markierte Sulfatid aus dem Kulturmedium auf. Der Abbau des Sulfatids in den Lysosomen der Zellen gibt Auskunft über die Aktivität der ASA [Raghavan et al, 1981]. Mit dieser Methode können Patienten mit Pseudodefizienz der ASA von Patienten mit MLD differenziert werden [Philippart, 1996].

### **Bestimmung des Sulfatids im Urin**

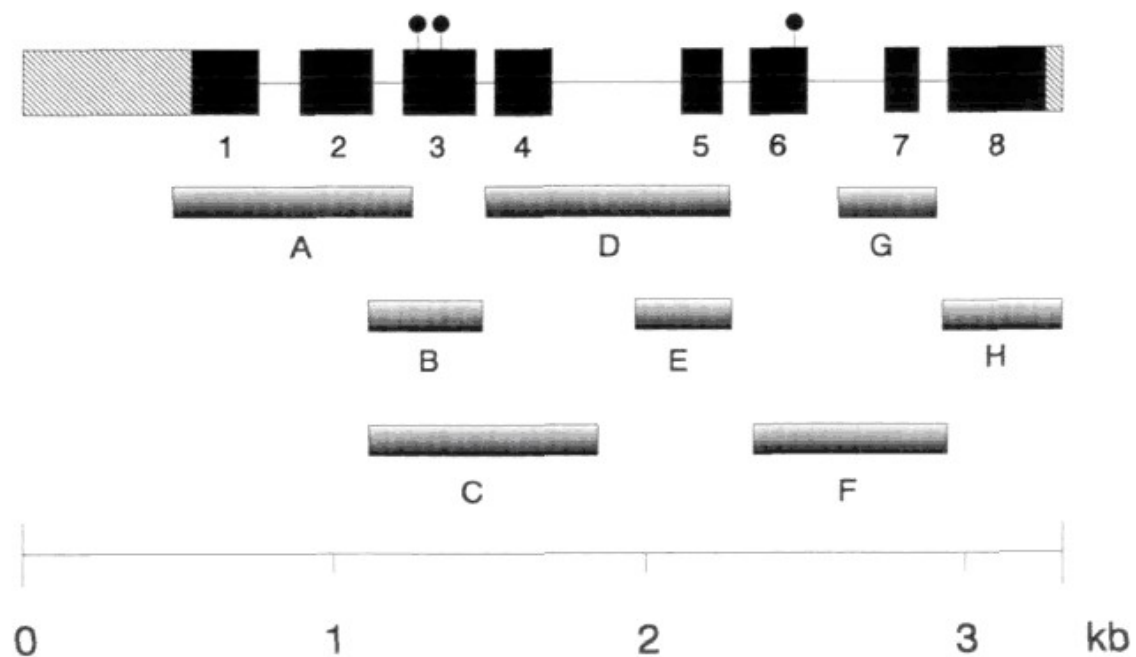
Die Grenzen der Aktivitätsbestimmung der Arylsulfatase A liegen bei der Unterscheidung der MLD von Gesunden mit Pseudodefizienz der ASA (PD) und Patienten mit Saposin B Defekt und bei der Testung nach Stammzelltransplantation. In unklaren Fällen muss deshalb eine Bestimmung des Sulfatids im Urin durchgeführt werden. Patienten mit PD weisen normale oder minimal erhöhte Sulfatidkonzentrationen im Urin auf, wohingegen Patienten mit Saposin B Defekt bei normaler ASA-Aktivität bei der Verwendung von pNCS als Substrat, ebenso wie die Patienten mit MLD eine gegenüber den Gesunden ca. 35fach erhöhte Sulfatidausscheidung aufweisen [Klaus Harzer – persönliche Kommunikation]. Nach einer Knochenmarktransplantation stammen nach erfolgreicher Transplantation die Leukozyten von den Stammzellen des Spenders ab. Die Bestimmung der ASA in den Leukozyten liegt dann im Normbereich und ist deshalb als Parameter nicht mehr aussagekräftig.

Die Bestimmung des Sulfatids in einer Urinprobe kann semiquantitativ mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie erfolgen. In dieser Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, das Sulfatid mit Hilfe der Isotachophorese nachzuweisen. Das Verfahren dieser Isotachophorese wird ausführlich in Kap. 2.2.7 erläutert. Seit kurzer Zeit kann zur Bestimmung des Sulfatids im Urin auch die Massenspektrometrie eingesetzt werden [Whitfield et al, 2001].

#### **1.1.7.2 Genetische Diagnostik**

Da eine enge Korrelation zwischen Lokalisation der Mutation innerhalb des ASA-Gens und dem klinischen Verlauf besteht, gewinnt die genetische Diagnostik der MLD zunehmend an Wichtigkeit. In einer Screening-Untersuchung können die beiden häufigsten Mutationen durch Hybridisierung mit allelspezifischen Oligonukleotiden erfasst werden [Barth et al, 1994-a]. Nach diesem Routine-Screening für die Genmutation der MLD bleiben damit aber ca. 50% der Mutationen unerkannt [Biffi et al, 2008-a]. Zur Analyse der seltenen Mutationen wird mit Hilfe von Exon-spezifischen Primern eine Polymerasekettenreaktion des ASA-Gens durchgeführt. Barth et al (1993) erhielten auf diesem Weg acht DNA-Fragmente (**Bild 9**). Durch den Einsatz der SSCP (single strand conformation polymorphism analysis) kann der Einzelstrang-Abschnitt dieser DNA-Fragmente identifiziert werden, in dem

die Mutation vorliegt. Ein einzelnes fehlerhaftes Basenpaar ist ausreichend, die Sekundärstruktur des betroffenen DNA-Einzelstrangs zu verändern. In der Elektrophorese weist der mutierte DNA-Abschnitt eine Veränderung der Wanderungstrecke auf. Dadurch kann das DNA-Fragment identifiziert werden, in dem die Mutation vorliegt. Die genaue Lokalisation des veränderten Basenpaares wird durch Inkubation der veränderten DNA-Abschnitte mit einer markierten wildtyp-DNA durchgeführt. Im Bereich der Mutation kommt es zu Bildung von zwei heterologen Abschnitten, mit nicht vollständiger Übereinstimmung, und zwei homologen Doppelstrang-Abschnitten. Über die Inkubation dieser heterologen Abschnitte mit markiertem Cytidin im ersten Ansatz und markiertem Thymidin in einem zweiten Ansatz, kann die ungepaarte Base erkannt und identifiziert werden [Montandon et al, 1989].



**Bild 9:** Fragmente A – H des ASA-Gens nach Amplifikation. Schwarze Rechtecke: Exons, Kreise: Potentielle N-Glykosylierungen [Barth et al, 1993]

### 1.1.7.3 Histopathologische Diagnostik

Histologische Untersuchungen von Nervenbiopsien werden heutzutage nur noch in Ausnahmefällen durchgeführt. Die Biopsie wird in den meisten Fällen aus dem Nervus suralis gewonnen. Nach einer von v. Hirsch und Pfeiffer (1955) entwickelten Methode färbten sich die Sulfatid-Ablagerungen in den Schwann-Zellen mit essigsaurem

Kresylviolett braun an. Daher stammt auch die Bezeichnung „metachromatisch“. Verantwortlich für die Braunfärbung ist die Sulfatgruppe des Galaktoerebrosid-3-sulfats. Histologisch sind zusätzlich große perivaskuläre Makrophagen erkennbar und als Zeichen der De- und Remyelinisierung ist die Dicke des Myelins reduziert und zwiebelschalenartige Formationen sind erkennbar [Haltia et al, 1980].

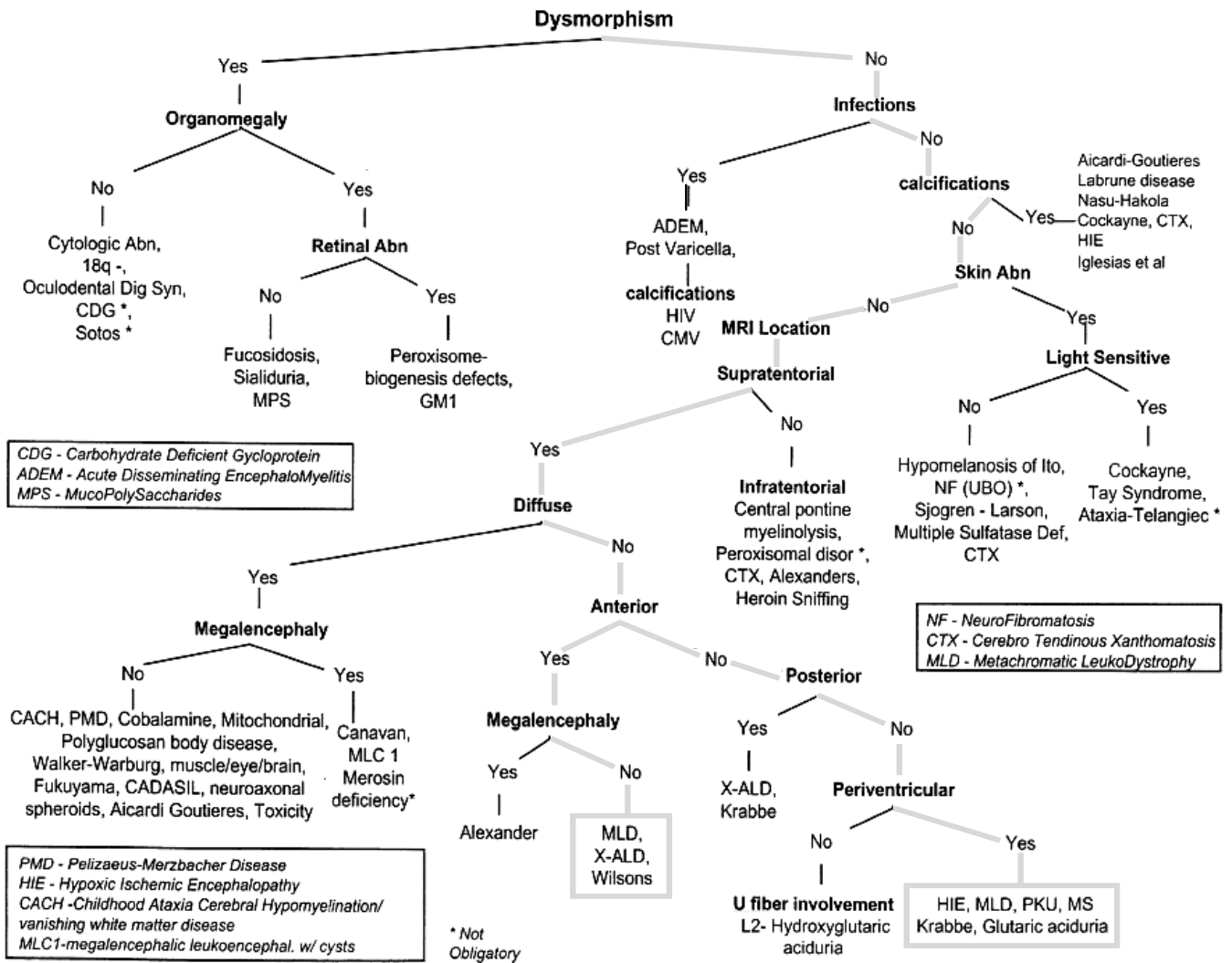
#### 1.1.7.4 Neurophysiologische Diagnostik

Eine periphere Neuropathie ist ein häufig auftretendes Symptom der Metachromatischen Leukodystrophie. Elektrophysiologisch ist sie sogar in den meisten Fällen nachweisbar. Die Nervenleitgeschwindigkeit ist reduziert und die somatosensibel evozierten Potentiale zeigen eine gesteigerte Latenzzeit. Hingegen bleiben akustisch und visuell evozierte Potentiale lange Zeit normal [Steck et al, 2003]. Etwa ein Drittel der Patienten zeigen zerebrale Krampfanfälle. Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung ist die Hirnstrom-Frequenz im EEG mit 2 - 7 Hz diffus verlangsamt und die Amplitude erhöht [Kolodny & Fluharty, 1995]. In einigen Fällen finden sich im EEG irreguläre schnelle Aktivitäten, aber normalerweise keine epilepsietypischen Spike-Wave-Komplexe [Philippart, 1996].

#### 1.1.7.5 Bildgebende Diagnostik

Die Kernspintomographie (MRT) ist die Methode der Wahl für die Beurteilung der weißen Substanz des zentralen Nervensystems. Die breite Verfügbarkeit brachte eine Wende in der früher häufig langdauernden Phase bis zur Diagnosefindung. Durch den Untergang der Oligodendrozyten im ZNS kommt es bei der MLD zu Läsionen der weißen Substanz. Im MRT wird diese Demyelinisierung des zentralen Nervensystems sichtbar gemacht. Die Läsionen haben einen hohen Wassergehalt, wodurch es zu einer Signalabschwächung der periventrikulären Regionen der weißen Substanz in T<sub>1</sub>-gewichteten Bildern (Längsrelaxation, Fettgewebe hell) und zu einer Signalanhebung in T<sub>2</sub>-gewichteten Bildern (Querrelaxation, stehende Flüssigkeit hell) des MRTs kommt [Barker & Horská, 2004]. In **Bild 10** ist ein Algorithmus zur Diagnosefindung bei Läsionen der weißen Substanz dargestellt.

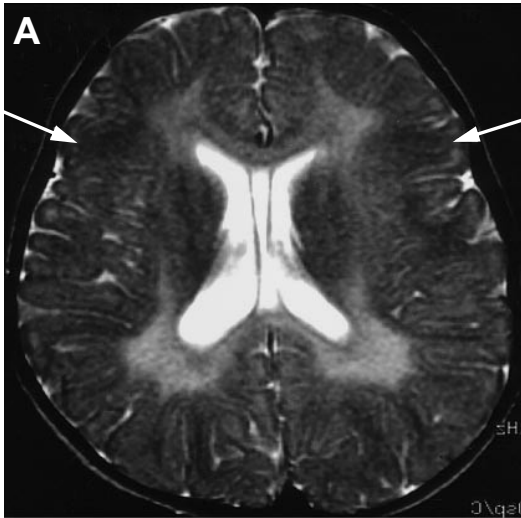
## Suggested Algorithm for Clinical Correlates of MRI White Matter Abnormalities



**Bild 10:** Differentialdiagnose einer Läsion der weißen Substanz des ZNS unklarer Genese im MRT [Child Neurology Society Washington DC, 2002]

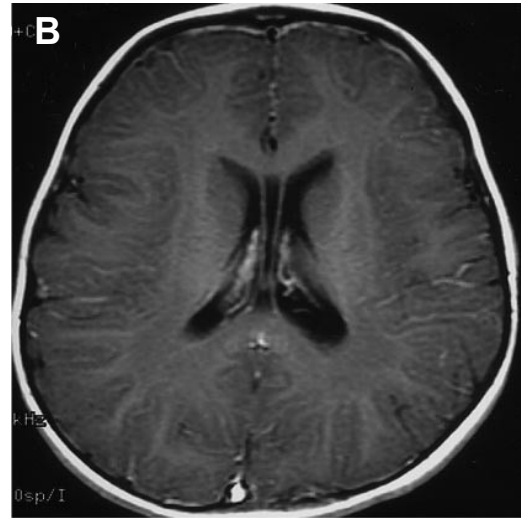
Die Demyelinisierung ist symmetrisch und lässt zunächst die subkortikalen Fasern unberührt. Sie beginnt periventrikulär, abgesehen von einem schmalen Randsaum um die Ventrikel, und im Zentrum semiovale (**Bild 11a**). Bei Patienten mit der späten-fantilen Form der MLD liegt der Schwerpunkt der Entmarkung zunächst okzipital, während die Demyelinisierung bei der juvenilen Form von frontal ausgehend fortschreitet. Auch im Kleinhirn und häufig im Corpus callosum, den kortikospinalen Bahnen und der inneren Kapsel können hyperintense Signale als Zeichen der Demyelinisierung im T<sub>2</sub>-gewichteten MRT-Bild auftreten [Cheon et al, 2002]. Durch die

Gabe von gadoliniumhaltigem Kontrastmittel kommt es nicht zu einer Anreicherung im Bereich der Läsionen (**Bild 11b**).

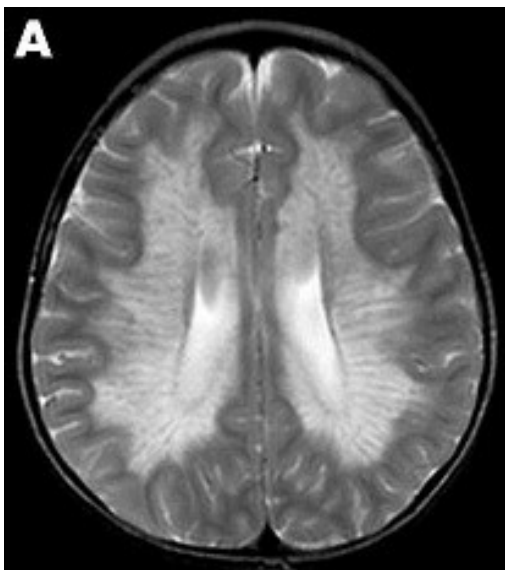


**Bild 11a:** T<sub>2</sub>-gewichtetes MRT-Bild mit konfluierender Signalanhebung der periventrikulären weißen Substanz. Die subkortikalen Fasern sind regelrecht myelinisiert (weiße Pfeile)

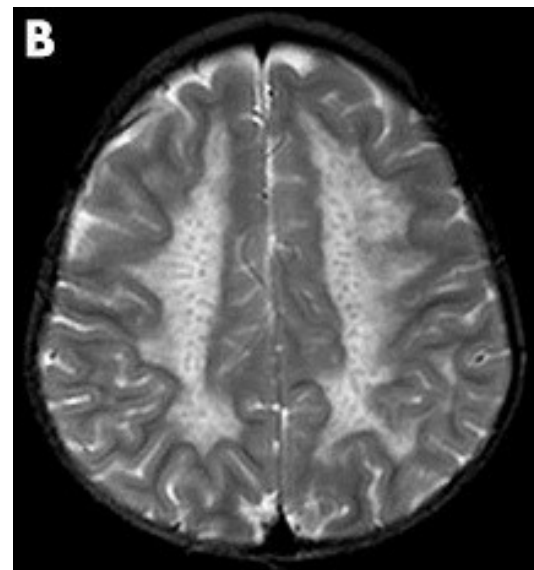
Quelle: [Cheon et al, 2002]



**Bild 11b:** T<sub>1</sub>-gewichtetes MRT-Bild bei MLD nach Kontrastmittelgabe (KM). Keine Anreicherung von KM im Bereich der Läsionen



**Bild 12a:** Tigroid pattern: tigerfellähnliche Streifung der weißen Substanz



**Bild 12b:** leopard pattern: Tüpfelung der weißen Substanz auf Höhe des Zentrum semiovale

Quelle: [Nandhagopal & Krishnamoorthy, 2006]

In der weißen Substanz ist im MRT teilweise eine Streifung erkennbar, das sog. tigroid pattern, das weiter kranial als sog. leopard Pattern imponiert (**Bild 12a + b**). Dieses Phänomen kommt dadurch zustande, dass die perivaskulären Regionen zunächst von der Demyelinisierung verschont bleiben [Kim et al, 1997]. Später kommt es in einigen Fällen auch zu einem Verlust der Myelinisierung der subkortikalen Regionen [Biffi et al, 2008]. Späte Zeichen der Metachromatischen Leukodystrophie in der bildgebenden Diagnostik sind eine kortikale und subkortikale Atrophie und ein Hydrozephalus ex vacuo [Black et al, 2008].

#### **1.1.7.6 Pränatale Diagnostik**

Ist die Metachromatische Leukodystrophie in der Familie bereits aufgetreten, kann eine pränatale Diagnostik durchgeführt werden. Die Aktivität der Arylsulfatase A wird dabei in Amnionzellen bestimmt, die aus dem Fruchtwasser gewonnen werden. Dazu wird eine Zellkultur angelegt, und die Aktivität der ASA bezogen auf die Zellzahl auf dieselbe Weise wie in Leukozyten bestimmt (vgl. Kap. 1.1.7.1). Zum Vergleich wird eine Kultur von Amnionzellen mit normalem Enzymgehalt unter denselben Bedingungen mitgeführt. Die Aktivität der ASA der Amnionzellen ist dabei deutlich höher als die der Leukozyten. Liegt in der Familie des untersuchten Patienten die Genmutation für die Pseudodefizienz der ASA vor, muss zusätzlich ein Sulfatid-Belastungstest durchgeführt werden. Alternativ kann die Mutation über eine Gen-Sequenzierung nachgewiesen werden. Der Verdacht, dass eine lysosomale Speichererkrankung vorliegt, kann auch durch die Diagnose eines nicht-immunogenen Polyhydramnions im Ultraschall entstehen [Kooper et al, 2006].

#### **1.1.7.7 Neugeborenencreening**

Mit dem Neugeborenencreening werden in Deutschland genetisch bedingte Stoffwechselerkrankungen erfasst. Diese Krankheiten haben eine kumulative Häufigkeit von ca. 1:1.500. Um in das Neugeborenencreening aufgenommen zu werden, müssen die Erkrankungen bestimmte Kriterien erfüllen. Sie müssen in ausreichender Häufigkeit vorkommen und ein symptomfreies Intervall nach Geburt aufweisen, in



dem eine klinische Diagnose nicht möglich ist. Zudem muss ein Nutzen der frühzeitigen Einleitung einer Therapie vorhanden sein und die Diagnostik muss kostengünstig und möglichst aus Trockenblut mit hoher Sensitivität und Spezifität durchführbar sein [Hoffmann, 2009].

Durch die Entwicklung verschiedener Therapiemöglichkeiten der lysosomalen Speichererkrankungen würden diese heute die vorgegebenen Kriterien erfüllen. Patienten mit MLD würden entscheidend von einer Diagnose im asymptomatischen Stadium profitieren, da die heute therapeutisch eingesetzte Stammzelltransplantation im asymptomatischen Stadium die besten Aussichten auf Erfolg hat (siehe Kap. 1.1.8.1). Meikle et al. (2006) haben eine Methode entwickelt 11 lysosomale Speichererkrankungen, darunter auch die MLD, aus Trockenblutproben zu diagnostizieren. Dabei wird die Enzymkonzentration in  $\mu\text{g/l}$  gemessen. Bei der MLD stellen die gesunden Untersuchten mit Pseudodefizienz der Arylsulfatase A ein diagnostisches Problem dar. Ihre Enzymkonzentration liegt zwar zwischen den Werten von Patienten mit MLD und Gesunden, dennoch ist eine relativ hohe falsch-positiv-Rate nicht ausgeschlossen. Die Kosten für die benötigten Reagenzien belaufen sich für alle 11 LSD auf umgerechnet ca. 3,40 €. Dem hohen Kostenaufwand eines flächendeckenden Screenings aller Neugeborenen und der eventuell hohen falsch-positiv-Rate bei der Diagnostik der MLD stehen entscheidende Vorteile gegenüber. Durch die frühzeitige Diagnose bestünde die Möglichkeit einer genetischen Familienberatung, noch bevor Geschwisterkinder geboren werden. Zudem könnten Patienten Behandlungen zugeführt werden, die ihnen sonst durch zu späte Diagnose verschlossen blieben. Außerdem könnte die relative Immunsuppression der Neugeborenen genutzt werden um den Erfolg und die Verträglichkeit einer Stammzelltransplantation zu optimieren [Krivit, 2004; Meikle et al, 2006].

### 1.1.8 Therapie

Momentan existiert keine Therapie, durch die Patienten mit Metachromatischer Leukodystrophie geheilt werden können. Die Unterstützung der Patienten und Familien, die Anbindung an ein Zentrum und der Kontakt zu Selbsthilfegruppen stellt ein wichtiges Ziel dar.

Physiotherapie wird eingesetzt, um einen möglichst langen Funktionserhalt zu gewährleisten und Kontrakturen vorzubeugen. Es wird versucht, die Kinder möglichst lange in ihrem normalen Umfeld in Schule und Kindergarten einzubinden und zu fördern. Viele Beschwerden können durch medikamentöse Therapie gelindert werden. Zur Kontrolle von zerebralen Krampfanfällen wird bevorzugt Carbamazepin sowie Phenobarbital eingesetzt. Treten schmerzhafte Krämpfe der Muskulatur auf, wird Clorazepat verwendet. Im Endstadium müssen die Patienten meist über eine Sonde ernährt werden. Der häufig auftretende gastrooesophagealer Reflux kann durch eine Fundoplicatio nach Nissen gemildert werden [Philippart, 1996]. Vigabatrin ist ein Hemmer der GABA-Aminotransferase und reduziert die Spastik bei Kindern mit MLD. Zudem wird eine Ataxie durch dieses Medikament verbessert [Kulemann & Palm, 1991]. Als kausaler Therapieansatz wurde versucht, die Synthese des Galaktocerebrosid-3-sulfats durch spezielle Diäten einzuschränken. In Studien wurde eine Vitamin A-arme Diät durchgeführt bzw. die Schwefelzufuhr beschränkt. Beide Substanzen sind zur Synthese des Galaktocerebrosid-3-sulfats erforderlich. Leider blieben aber anhaltende Effekte auf den Krankheitsverlauf aus [Warner, 1975].

#### **1.1.8.1 Stammzelltransplantation**

Die Stammzelltransplantation (SZT) ist momentan die einzige Möglichkeit, den Krankheitsverlauf der Metachromatischen Leukodystrophie kausal zu beeinflussen. Sie wird seit über 30 Jahren bei ausgewählten Patienten mit MLD angewendet. Es gibt nur wenige detaillierte Berichte über den Gesundheitszustand von Patienten in den Jahren und Jahrzehnten nach Transplantation. Dieses risikoreiche Verfahren bleibt daher weiter umstritten. In Tübingen wird deshalb derzeit im Rahmen des Leukonet-Projekts an einem entsprechenden Schema gearbeitet, um anhand klinischer Kriterien eine Therapieentscheidung im Sinne des Patienten treffen zu können [B. Kustermann, Universitätskinderklinik Tübingen, persönliche Kommunikation].

Der therapeutische Effekt der Stammzelltransplantation beruht darauf, dass aus den hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) gesunder Spender Monozyten ausreifen, die in das ZNS gelangen, sich dort in Makrophagen und Mikrogliazellen differenzieren und Arylsulfatase A an ihre Umgebung abgeben, die von den umliegenden Zellen wieder aufgenommen werden kann. Diese sog. Kreuzkorrektur des Enzymdefekts ist

deshalb möglich, weil ein Teil der Arylsulfatase A nach Modifikation im Golgi-Apparat nicht in Vesikel die Lysosomen erreicht, sondern aus dem Golgi-Apparat in das Zytoplasma freigesetzt wird. Dieses Enzym kann über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor von umliegenden Zellen aufgenommen werden. So kommt es durch die SZT indirekt zu einer Korrektur des Enzymdefektes in Zellen des ZNS [Prasad & Kurtzberg, 2008]. Die Begrenzung dieses Verfahrens liegt darin, dass weniger als eine mikrogliale Progenitorzelle aus dem Blut pro 1.000 residente Zellen pro Tag im ZNS hinzugefügt wird [Lawson et al, 1992]. In vier Wochen werden somit nur 2-3% der mikroglialen Zellpopulation ersetzt [Kennedy & Abkowitz, 1997].

Für die Stammzelltransplantation muss ein geeigneter Spender zur Verfügung stehen. Ein verwandter Spender stellt die besten Voraussetzungen für den Erfolg der SZT dar. Die Wahrscheinlichkeit, einen kompatiblen Spender in der Familie zu finden, beträgt für jedes Geschwisterkind 25% und für alle anderen Familienmitglieder ca. 5%. Steht kein geeigneter Spender in der Familie zur Verfügung, wird in Datenbanken nach einem geeigneten Spender gesucht. Diese Suche dauert aber im Mittel 3,5 Monate. Hinzu kommt, dass in einigen ethnischen Gruppen nur eine sehr geringe Spenderzahl verfügbar ist. Zudem besteht ein erhöhtes Risiko für Transplantatversagen, höhergradige Graft-versus-host-Reaktionen und opportunistische Infektionen nach Transplantation [Wagner et al, 1996].

Nach SZT ist das Outcome der Patienten sehr unterschiedlich und abhängig von der Form der MLD, der Progressionsgeschwindigkeit der Erkrankung und dem Zeitpunkt der Durchführung der SZT. Eine Abwägung des Für und Wider einer SZT wird dadurch erschwert, dass wenige Berichte über den Langzeitverlauf von Patienten mit und ohne SZT vorliegen. Im folgenden sollen einige Fälle beschrieben werden, die die Variabilität des Verlaufs nach SZT zeigen.

Werden Patienten mit spät-infantiler Form der MLD transplantiert, die bereits Symptome aufweisen, zeigt sich keine Veränderung gegenüber dem natürlichen Verlaufs der Erkrankung [Malm et al, 1996]. Bredius et al, 2007 beschreiben einen Patienten mit spät-infantiler Form der MLD, der im Alter von sieben Wochen in einem asymptomatischen Stadium transplantiert wurde. Auch MRT, EEG, evozierte Potentiale, Nervenleitgeschwindigkeit und Elektromyographie waren zu diesem Zeitpunkt unauffällig. Trotz Transplantation entwickelte der Patient alle Symptome und klinischen Zeichen der MLD.

Im Vergleich dazu zeigen asymptotische Patienten mit spät-infantiler Form des Morbus Krabbe, einer anderen lysosomalen Speicherkrankheit ebenfalls mit Gehirnbeteiligung, nach Transplantation ein sehr gutes Gesamtüberleben von über 90%. Aufgrund einer Spastik der Beine können aber 80% der Patienten im Alter von zwei Jahren nicht laufen. Patienten, die zum Zeitpunkt der SZT Symptome aufweisen, haben eine niedrigere Gesamtüberlebensrate und eine deutlich schlechtere neurologische Funktion [Prasad & Kurtzberg, 2008].

Bei einer Patientin mit juveniler Form der MLD wurde die Diagnose im Alter von 4,3 Jahren gestellt, nachdem der Bruder mit 5,8 Jahren bereits schwer erkrankt diagnostiziert worden war. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sie einen leichten Intensionstremor als einziges klinisches Symptom, einen auffälligen elektrophysiologischen Befund sowie eine pathologische Veränderung des MRTs. Drei Monate später wurde die Patientin transplantiert. Sie litt in der Follow-up-Untersuchung zwei Jahre nach Transplantation an einem gelegentlich auftretenden Babinski-Reflex, einem emotionalen Tremor und besuchte zum zweiten Mal die erste Klasse, da sie aufgrund des Tremors nur sehr langsam schreiben konnte [Guffon et al, 1995]. Eine weitere Patientin mit spät-juveniler Form der MLD wurde im 16. Lebensjahr, zwei Jahre nach Diagnosestellung transplantiert und sechs sowie dreizehn Jahre nach Transplantation nochmals untersucht. In den ersten zwei Jahren war die Erkrankung langsam fortgeschritten [Kapaun P et al, 1999]. Dreizehn Jahre nach SZT war die Patientin aufgrund einer schweren Spastik der Beine an den Rollstuhl gebunden und moderat mental retardiert. Der mentale und körperliche Zustand der Patientin hatte sich in den letzten elf Jahren nicht geändert. Die Enzymaktivität der Arylsulfatase A in Leukozyten lag, wie zu erwarten, im Normbereich, das Galaktocerebrosid-3-sulfat im Urin blieb hingegen unverändert deutlich erhöht [Görg et al, 2007].

In der Universitäts-Kinderklinik in Tübingen wurden einer Patientin mit juveniler Form der MLD im Alter von fünf Jahren Stammzellen transplantiert. Zu diesem Zeitpunkt zeigte die Patientin eine leichte Koordinationsstörung, sowie eine milde Schwäche beider Beine. Die Diagnosestellung erfolgte im asymptotischen Stadium aufgrund der Erkrankung der sechs Jahre älteren Schwester. Neun Jahre nach Transplantation besucht die Patientin die Realschule, vorübergehend aufgetretene Ataxie und Pyramidenbahnzeichen sind nicht mehr nachweisbar und sogar die Auffälligkeiten im MRT sind rückläufig, was bei keinem anderen Patienten nach SZT bisher zu be-

obachten war [Opherk et al, Veröffentlichung in der Vorbereitung und Christiane Kehrer - persönliche Kommunikation].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Patienten mit spätinfantiler Form der MLD trotz Transplantation ein Fortschreiten der Erkrankung und der Demyelinisierung im MRT zeigen, auch wenn sie in einem frühen Stadium mit milden Symptomen, z.B. ausschließlich Magen-Darm-Beschwerden, transplantiert werden [Malm et al, 1996]. Im symptomfreien Stadium lässt sich der Krankheitsverlauf in manchen Fällen bei späterem Symptombeginn etwas verlangsamen. Auf den Krankheitsverlauf der spätinfantilen Form sowie der frühen Form der juvenilen MLD (steht im Widerspruch zu dem von Guffon et al. (1995) beschriebenen Fall) hat die SZT dagegen keinen Einfluss [Krivit, 1999 & 2004].

Der Grund dafür ist darin zu sehen, dass es Monate bis Jahre dauert, bis durch die SZT genug Arylsulfatase A im ZNS bereitgestellt wird und es damit zu einem Stillstand der Erkrankung kommt. Deshalb ist die Progressionsgeschwindigkeit der Erkrankung so entscheidend für das Outcome der Patienten nach Transplantation.

Die beschriebenen Fälle deuten darauf hin, dass die Progression der Erkrankung noch bis zu zwei Jahre anhalten kann. Die mentale Funktion nach Transplantation stabilisiert sich stets bei einem IQ-Wert unterhalb des Durchschnitts und vor allem bei früh symptomatischen Patienten schreitet die Krankheit schneller fort, als die Therapie wirken kann sodass eine fortschreitende Demenz nach Transplantation beobachtet wird [Shapiro et al, 1995].

### **Einsatz von mesenchymalen Stammzellen bei der SZT**

Seit einiger Zeit werden mesenchymale Stammzellen zusätzlich zur klassischen Knochenmarktransplantation eingesetzt. Es handelt sich dabei um multipotente mesenchymale Stromazellen (MSC). Diese sind in der Lage, in verschiedene Körpergewebe wie Knochen, Knorpel, Muskel, Sehnen und Fettgewebe auszudifferenzieren [Pittenger et al, 1999]. Die mesenchymale Stammzellen können aus dem Knochenmark isoliert und außerhalb des Körpers vermehrt werden. Die Zellen können immunmodulatorisch wirken und sind selbst nicht immunogen [Keating, 2006]. Die Erholung des Knochenmarks wird durch die zusätzliche Übertragung von MSC beschleunigt [Galotto et al, 1999] und die Wahrscheinlichkeit, eine Graft-versus-host-Reaktion zu entwickeln, verringert.

Der therapeutische Gewinn für die Metachromatische Leukodystrophie beruht darüber hinaus auf einem zusätzlichen Effekt. In vitro konnte gezeigt werden, dass die MSC wie auch die hämatopoetischen Stammzellen in der Lage sind, Arylsulfatase A an ihre Umgebung abzugeben. Müller et al. (2006) stellten fest, dass diese von den MSC abgegebene Arylsulfatase A über den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor von Fibroblasten eines Patienten mit MLD aufgenommen wird. Die MSC verteilen sich nach Applikation über den gesamten Körper und differenzieren sich in Zellen verschiedener Gewebe. Die Migration der MSC in das zentrale Nervensystem ist für den Erfolg der Behandlung der MLD entscheidend. In verschiedenen Modellen konnte nachgewiesen werden, dass die MSC das ZNS nach intravenöser oder peritonealer Applikation erreichen [McBride et al, 2003]. Noch ist der genaue Mechanismus der MSC im ZNS nicht verstanden. Durch die immunmodulatorische Eigenschaft könnte ggf. eine Entzündungsreaktion und damit weitere Zerstörung von Neuronen unterdrückt werden [Müller et al, 2006]. Durch mehrfaches Verabreichen von multipotenten mesenchymalen Stammzellen desselben Spenders nach Knochenmarktransplantation konnte außerdem bei einem Teil der Patienten mit MLD eine Verbesserung von Nervenleitgeschwindigkeit und Knochenmineralisierung erreicht werden [Koç et al, 2002].

Abschließend lässt sich feststellen, dass nach Knochenmarktransplantation im Gegensatz zur Enzyersatztherapie (siehe Kap. 1.1.8.3) durch die angesiedelten Zellen eine kontinuierliche Quelle geschaffen wird, über die Arylsulfatase A an die defizienten Zellen abgegeben wird. Leider hat die Therapie nur in frühen Stadien der Erkrankung bei Patienten mit juveniler und adulter Form einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf, nicht aber bei Patienten mit der spätinfantilen Form [Sevin et al, 2007].

### **1.1.8.2 Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut**

Nabelschnurblut stellt eine alternative Quelle für die Gewinnung von multipotenten Zellen zur Stammzelltransplantation dar. Nabelschnurblut enthält je nach Zellreihe 2 bis 27 mal mehr koloniebildende hämatopoetische Stammzellen als das Blut von Erwachsenen. Auch die Proliferationsrate der gewonnenen Stammzellen übersteigt die im Blut von Erwachsenen um das 4,3 bis 6fache [Cairo & Wagner, 1997]. Die Zellen sind in der Lage, in Neuronen, Astrozyten, Leberzellen, Pankreaszellen, Osteo-

klasten, Chondrozyten und Herzmuskelzellen zu differenzieren [Kögler et al, 2004]. Das ist dadurch erklärbar, dass es sich bei den gewonnenen Stammzellen um sogenannte Progenitor- oder Vorläuferzellen handelt, also Zellen, die uni- bis multipotent sind. Die Häufigkeit der möglichen Zellteilungen dieser Stammzellen ist aber limitiert, was den Vorteil der umbilikalen Stammzellen, die sich nur selten geteilt haben, gegenüber den Stammzellen eines Erwachsenen erklärt. Die Eigenschaft, sich nur begrenzt teilen zu können, unterscheidet sie von den pluripotenten embryonalen Stammzellen.

Die Verwendung von Stammzellen aus dem Nabelschnurblut hat darüber hinaus noch weitere Vorteile gegenüber Knochenmarktransplantation. Die Verfügbarkeit von Nabelschnurblut ist hoch, über 200.000 Einheiten stehen zur Verfügung. Zudem kann das Nabelschnurblut ohne invasive Maßnahmen nach der Geburt problemlos entnommen werden, wohingegen bei der Gewinnung der adulten Stammzellen stets auch ein Risiko für den Spender besteht. Darüber hinaus treten nach neusten Studien vermutlich weniger Graft-versus-host-Reaktionen auf als bei der Knochenmarktransplantation. Deshalb können diese Stammzellen auch bei einer geringeren HLA-Übereinstimmung transplantiert werden. Nur 4 von 6 Genloci müssen bei der HLA-Typisierung übereinstimmen [Prasad & Krutzberg, 2008].

Nur für 30% der Patienten steht ein verwandter Spender zur Verfügung. Für 70% kann über die Datenbanken ein geeigneter Spender gefunden werden [Bethge et al, 2006]. Für Patienten, für die kein passender Spender in der Familie oder in den Datenbanken gefunden werden kann, eröffnen die Stammzellen des Nabelschnurbluts neue Möglichkeiten. 15 Patienten mit MLD wurden in einem Transplantations-Zentrum Stammzellen aus Nabelschnurblut transplantiert. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug nach Transplantation bei Patienten mit lysosomalen Speichererkrankungen 58% [Prasad et al, 2008].

### **1.1.8.3 Enzyersatztherapie**

Bei der Enzyersatztherapie (ERT) wird den Patienten das fehlende Enzym in einer hochgereinigten Form in regelmäßigen Abständen intravenös infundiert. Die ERT wird erfolgreich bei Patienten mit Morbus Gaucher Typ I, einer anderen lysosomalen Speichererkrankung, eingesetzt [Charrow, 2009]. Allerdings wurde die ERT noch nie

erfolgreich bei Patienten mit einer lysosomalen Speichererkrankung durchgeführt, bei denen das zentrale Nervensystem betroffen war. Das Problem besteht darin, dass das rekombinante Enzym nur in sehr geringen Mengen die Blut-Hirn-Schranke überschreiten kann [Sevin et al, 2006].

In vitro wird die rekombinante humane Arylsulfatase A (rhASA) von angezüchtetem Gewebe aufgenommen und baut nachweislich in den Gewebszellen enthaltenes (<sup>35</sup>S) Sulfatid ab. Dies konnte sowohl in Hautfibroblasten als auch in Zellen des Gehirns eines Fetus mit MLD gezeigt werden [Kolodny & Fluharty, 1995]. Der therapeutische Effekt beruht wie bei der SZT darauf, dass die rhASA über einen Kationen-unabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor aufgenommen werden kann, der auf der Zelloberfläche aller Zellen vorliegt.

Im Mausmodell wurde nach einmaliger intravenöser Enzymgabe zwar eine Aktivität der rhASA in verschiedenen Organen, nicht aber in Gehirnzellen gemessen. Wurde Mäusen vier wöchentliche Injektionen mit 20 mg Enzym/kg KG verabreicht, so konnte auch in Gehirn und Knochenmark eine Reduktion der Sulfatid-Speicherung um 13% gemessen werden. Die neuromotorische Funktion verbesserte sich deutlich ebenso wie die Histopathologie des ZNS [Matzner et al, 2005]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass durch eine Langzeitbehandlung der klinische Verlauf der MLD verbessert werden kann. Bei schneller Progression aber ist die metabolische Korrektur vermutlich zu langsam, um den raschen Abbau des Myelins verhindern zu können [Sevin et al, 2006]. Ein wichtiger therapeutischer Effekt wird für die motorischen Symptome vermutet, die von einer Schädigung der Zellen in Rückenmark und peripheren Nervensystem herrühren. Dies trifft in besonderem Maße zu, da dieses Symptom von SZT und Gentherapie kaum beeinflusst wird [Sevin et al, 2007].

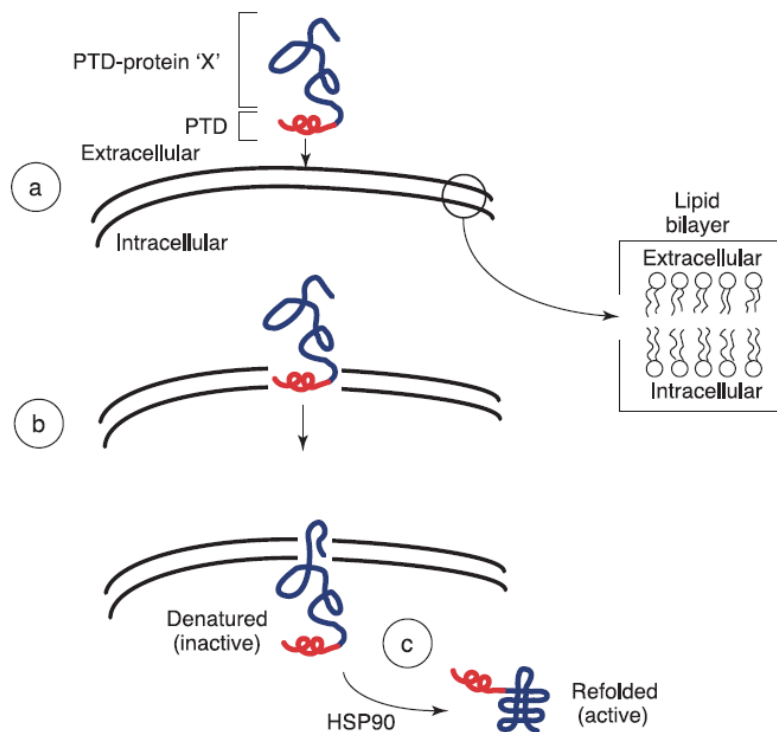
Im Mausmodell wurde festgestellt, dass nach Verabreichung der rhASA nicht-inhibitorische rhASA-Antikörper auftreten können. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass der Maus das menschliche Enzym verabreicht wurde. Diese Antikörper hemmen die Mannose-6-Phosphat-Rezeptor vermittelte Enzymaufnahme in die Sulfatid speichernden Zellen, das Enzym wird intrazellulär fehlgeleitet und die Enzymstabilität beeinträchtigt [Matzner et al, 2008]. Bereits nach dreimaliger Applikation der rhASA kommt es zu einer Antikörperbildung, die eine anaphylaktische Reaktion auslöst und eine Therapie über die vierte Enzymgabe hinaus unmöglich macht [Matzner et al, 2005]. Die ASA-knockout Mäuse exprimieren überhaupt kein Enzym. Patienten mit



MLD hingegen exprimieren meist eine mutierte Form des rhASA-Polypeptids, das vermutlich eine Immuntoleranz gegenüber der rhASA verursacht.

### Wege über die Blut-Hirn-Schranke

Am Beispiel der  $\beta$ -Galaktosidase konnte gezeigt werden, dass ein Enzym mit Hilfe einer Protein-Transduktionsdomäne (PTD) die Blut-Hirnschranke überwinden kann. Bei der Transduktionsdomäne handelt es sich um die Aminosäure-Sequenz Tyr-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg, das sog. HIV-1 TAT. Der Mechanismus der Transduktion dieser PTD ist unbekannt [Schwarze et al, 2000]. Eine Möglichkeit ist in **Bild 13** dargestellt. Es wird in jedem Fall aber ein Rezeptor-unabhängiger Transport vermutet. Damit ist eine Transduktion in alle Zellen möglich [Fogh et al, 2008]. Eventuell können in Zukunft auf diesem Wege Enzyme, wie die Arylsulfatase A, mit Hilfe von speziellen Transduktionsdomänen auch die Blut-Hirnschranke überwinden.



**Bild 13:** Model zur Transduktion von Proteinen in eine Zelle. (a) Die positiv geladenen Protein-Transduktionsdomäne (PTD) kommt in Kontakt mit der negativ geladenen Zellwand; (b) im entfalteten Stadium wird das Protein durch die Membran geschleust; (c) mit Hilfe von HSP90 Proteinen wird das Protein in seine aktive Form überführt [Schwarze et al, 2000]

#### 1.1.8.4 Gentherapie

Für die spätinfantile Form der MLD, die mit ca. 60% die häufigste Form darstellt, gibt es zur Zeit keine zufriedenstellende Therapie. Durch die Stammzelltransplantation kann bei einzelnen Patienten die Demyelinisierung des ZNS verlangsamt oder gestoppt werden, aber nur in sehr frühen Stadien der juvenilen oder adulten Form der MLD, hingegen nicht bei der spätinfantilen Form [Krivit et al, 1999]. Deshalb wird nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten dieser Patienten gesucht. Mit Hilfe der Gentherapie soll erreicht werden, mehr Enzym im ZNS verfügbar zu machen. Dies wird momentan auf zwei unterschiedliche Arten erprobt. Zum einen werden Stammzellen transplantiert, die die ASA überexprimieren, zum anderen wird das ASA-Gen mittels eines viralen Vektors in das ZNS eingebracht, wodurch der Defekt der Zellen korrigiert werden soll.

Biffi et al. (2004) transplantierten ASA-knockout-Mäusen autologe Stammzellen, denen mittels lentiviralen Vektoren das ASA-Gen übertragen worden war. Diese modifizierten Stammzellen produzieren eine ASA-Konzentration die die normaler Stammzellen übersteigt [Kornfeld S, 1992]. Nach Transplantation der HSZ zeigen diese Mäuse in allen klinischen, neurophysiologischen und histologischen Untersuchungen deutlich bessere Ergebnisse als die Mäuse, denen allogene HSZ eines gesunden Spenders transplantiert worden waren. Im ZNS ist die ASA in den Lysosomen der Mikrogliazellen und auch der Neuronen nachweisbar. Es kommt zur Korrektur des Defekts, zum Beispiel in den Epithelzellen von Nieren und Leber und auch im ZNS kann eine leichte Verbesserung des Verhältnisses von Galaktocerebrosid zu Sulfatid gemessen werden, was bedeutet, dass die Sulfatid-Speicherung im ZNS abnimmt [Matzner et al, 2002]. Biffi et al (2006) ist es sogar gelungen einen Rückgang von bereits aufgetretenen Symptomen bei den transplantierten Mäusen erreichen.

In der zweiten Methode wird den ASA-knockout-Mäusen das ASA-Gen mittels Vektor direkt intrathekal appliziert. Die ASA-knockout-Mäuse entwickeln normalerweise im Alter von drei Monaten einen Befall des ZNS. Zu diesem Zeitpunkt wird den Mäusen cDNA der ASA in AAV5-Vektoren dreimal in das Ventrikelsystem und das Kleinhirn injiziert. AAV5 ist ein nicht toxisches Virus das eine langanhaltende und ausgedehnte Expression der therapeutisch übertragenen Gene im ZNS ermöglicht [Tenenbaum et al, 2004]. Nach drei bzw. zwölf Monaten wurde die rhASA vorwiegend von Neuronen,

aber auch von Astrozyten (bis 20%) und Mikrogliazellen (bis 2%) exprimiert [Cartier et al, 2005]. Die Oligodendrozyten sind in vivo aus unklaren Gründen refraktär gegenüber dem Gentransfer [Rafi et al, 2005]. Die für die ASA kodierende DNA kann nicht nur an der Einstichstelle sondern auch in Frontalhirn, Kleinhirn und Hirnstamm und sogar im Rückenmark nachgewiesen werden, was durch Diffusion der AVV5-Vektoren und der rhASA selbst möglich ist. In Leber und Niere wurde hingegen keine DNA gefunden, die Blut-Hirn-Schranke wird von den AVV5-Vektoren also nicht überschritten. Die untersuchten Mäuse zeigten im Alter von 18 Monaten nahezu keine krankheitstypischen Symptome.

Obwohl alle Experimente im Tiermodell vielversprechend sind und eine kausale Therapie versprechen, müssen Komplikationen beachtet werden, wie sie bei Behandlung von Kindern mit Immundefekt mittels Gentransfer über virale Vektoren aufgetreten sind [Hacein-Bey-Abina et al, 2003].

### **1.1.9 Rekombinante humane Arylsulfatase A**

Die in der ERT eingesetzte rekombinante humane Arylsulfatase A wird in Ovarienzellen eines chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) hergestellt. Dazu wird eine cDNA, die das ASA-Gen enthält, mit Hilfe eines viralen Vektors in das Genom der CHO-Zellen übertragen. Durch den zusätzlichen Einbau eines Resistenz-Gens gegen ein Antibiotikum kann ein selektives Wachstum der Zellen erreicht werden, die die cDNA der Arylsulfatase A in ihr Genom integriert haben. Dazu wird dem Medium das Antibiotikum zugegeben, gegen das die modifizierten Zellen resistent sind. Das ASA-Gen wird mit einer Promotorsequenz versehen und enthält eine sog. tag-Sequenz. Die tag-Sequenz fungiert als Markierung und dient der Erkennung der in das Medium sezernierten rhASA. Über zahlreiche Reinigungsschritte wird das Enzym aus dem Medium extrahiert. Mittels Tangentialflussfiltration werden Proteine von unter 100 - 300 kDa abgetrennt. Die rhASA hat bei einem pH-Wert von 4,5 ein theoretisches Molekulargewicht von 480 kDa und wird von der verwendeten Membran bei der Filterung zurückgehalten. Mit einer anionischen Ionenaustauschchromatographie werden alle negativ geladenen und neutralen Moleküle entfernt. In einem weiteren Schritt werden auf ähnliche Art durch hydrophobe Interaktionschromatographie die Proteine nach

ihrem Anteil an apolaren Gruppen getrennt. Zunächst wird den Proteinen dabei die Hydrathülle durch ein stark hyperhydrierendes Salz entzogen. Dadurch bilden die Proteine mit ihren apolaren Gruppen Bindungen über Van-der-Waalsche Kräfte zu den apolaren Gruppen des Säulenmaterials aus. Durch Waschen der Säule mit absteigenden NaCl-Konzentrationen lösen sich die Proteine wieder von der Säule, diejenigen zuerst, deren Anteil an apolaren Gruppen am geringsten ist. Die rhASA wird bei einer NaCl-Konzentration von 0,25 – 0,75 M eluiert. Abschließend wird das Enzym mit Hilfe eines Sterilfilters von eventuellen mikrobiellen Kontaminationen befreit und in einer geeigneten Trägerlösung gelöst [Fogh et al, 2008].

In dieser Arbeit wurde die Arylsulfatase eingesetzt, mit dem Ziel über die Messung des Sulfats mit Hilfe der Isotachophorese indirekt eine quantitative Bestimmung des Galaktocerebrosid-3-sulfats zu erreichen.

## 1.2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war der quantitative Nachweis des Sulfatids im Urin. Dieser Nachweis sollte mit der Isotachophorese erfolgen. Dabei handelt es sich um eine relativ unbekannt Methode, die deshalb in dem Methodenteil in Kapitel **2.2.7** genauer erläutert wird.

Ein Nachweis des Sulfatids als diagnostischer Parameter hat, wie bereits erläutert, gegenüber der Bestimmung der Aktivität der Arylsulfatase A in den Leukozyten entscheidende Vorteile. Sowohl eine Pseudodefizienz der ASA als auch ein Defekt des Saposin B kann mit dieser Methode erkannt werden. Bei gesunden Menschen mit Pseudodefizienz der ASA liegt die Sulfatidkonzentration im Urin im Normbereich oder ist nur leicht erhöht, obwohl die ASA-Aktivität in den Leukozyten supprimiert ist. Patienten mit Defekt des Saposin B weisen trotz normaler ASA-Aktivität im biochemischen Test mit pNCS eine erhöhte Sulfatidausscheidung auf. Auch nach Stammzelltransplantation kann die Messung der Sulfatidausscheidung weiterhin ausgewertet werden, wobei noch unklar ist welche Auswirkung die Transplantation auf die Sulfatidkonzentration im Urin hat. Im Gegensatz dazu ist die Bestimmung der ASA-Aktivität nicht mehr verwertbar, weil die Leukozyten des Patienten nach erfolgreicher

Transplantation von den hämatopoetischen Zellen des Stammzell-Spenders abstammen (vgl. Kap. **1.1.8.1**).

Der Nachweis des Sulfatids im Urin erfolgt in der Diagnostik bisher meist semiquantitativ mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie. Die Isotachophorese hätte gegenüber der Dünnschichtchromatographie den Vorteil, dass zur Durchführung ein deutlich kürzerer Zeitaufwand und ein geringerer Materialeinsatz erforderlich wäre. Um das Sulfatid mit der Isotachophorese zu bestimmen, wurde die rhASA verwendet, die bei der Enzyersatztherapie eingesetzt wird, um die Sulfatgruppe des Galaktocerebrosid-3-sulfat abzuspalten. Nur dieses abgespaltete freie Sulfat kann in der Isotachophorese ausgewertet werden. Um sicherzustellen, dass alles gemessene Sulfat auch von dem Sulfatid abstammt, musste eine Möglichkeit gefunden werden, das im Urin enthaltene freie Sulfat zunächst vollständig aus der Probe zu entfernen. Anschließend musste das Galaktocerebrosid-3-sulfat von der rhASA vollständig in freies Sulfat und Galaktocerebrosid gespalten werden, damit eine quantitative Bestimmung der Sulfatidkonzentration möglich war.



---

## Kapitel 2

### Material und Methoden

#### 2.1 Material

##### 2.1.1 Chemikalien

β-Alanin	Merck
Albumin human	Serva
Ascorbinsäure	Merck
Capronsäure	Sigma
Chloroform/Trichlormethan	Roth
Citronensäure	Merck
Dextran T250 (MG ca. 250 000)	Roth
Essigsäure	Merck
Galaktocerebrosid	Sigma
Galaktose-4-sulfat	Sigma
Galaktose-6-sulfat	Sigma
H <sub>2</sub> O (Deionat)	Roth
Heparin	Ltd Wrexham UK
Kaliumchlorid	Merck
Methanol	Merck
4-Methoxybenzaldehyd	Fluka
Methylcellulose	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natronlauge	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumpyrophosphat	Fluka
Natriumsulfat	Merck
4-Nitrocatecholsulfat	Sigma

Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco
Salzsäure	Merck
Schwefelsäure	Merck
Sulfatide bovine	Sigma
Taurocholat (rein)	Sigma
Taurocholat (technisch)	Fluka

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

EDTA-Röhrchen	Sarstedt
Eppendorfcups 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf
Faltenfilter	Ederol
HPTLC-Platten 10 x 10 cm und 10 x 20 cm	Merck
Küvetten	Sarstedt
Parafilm	Pechiney
pH-Indikatorstäbchen	Merck
Pipettenspitzen	Sarstedt
Polypropylene Conical Tube 15 und 50 ml	Falcon
Sterile Einmalspritzen 20 und 50 ml	Braun
Ultrafiltrationsröhrchen	Millipore

### 2.1.3 Geräte

ADVIA-120	Bayer/Siemens
Heizblock	Liebisch
Heizofen	Melag
Isotachophorese EA 101	Merck
Magnetrührer	Heidolph
pH-Meter	WTW - Weilheim
Photometer DU 640	Beckman Coulter GMBH
Ultraschallbad	
Vortex VRZ	IKA-Labortechnik
Waage MC1 Analytic AC 210 S	Sartorius
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf



## 2.1.4 Lösungen und Puffer

### 2.1.4.1 Isolierung von Leukozyten aus Blutproben

#### Dextran-Lösung

5,0 g	Dextran
0,7 g	Natriumchlorid (NaCl)
0,05 g	Natrium-Heparin
100 ml	H <sub>2</sub> O

### 2.1.4.2 Photometrie

#### Natriumazetat-Puffer pH 5,0

1 Teil	0,5 M Essigsäure (CH <sub>3</sub> COOH)
3 Teile	0,5 M Natriumazetat (CH <sub>3</sub> COO <sup>-</sup> Na <sup>+</sup> )

#### pNCS-Puffer

0,5 mM	Natriumpyrophosphat (Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )
100 g/l	Natriumchlorid (10%)

→ gelöst in Natriumazetat-Puffer

#### pNCS-Lösung

10 mM para-Nitrocatecholsulfat (pNCS)

→ gelöst in pNCS-Puffer

→ einstellen des pH auf 5,0 mit 0,5 M Essigsäure

#### pNC-Lösung

10 mM para-Nitrocatechol (pNC)

→ gelöst in pNCS-Puffer

(z.B. 155 mg pNC /100 ml Natriumazetat-Puffer)

### 2.1.4.3 Dünnschichtchromatographie

#### Laufmittel 1

1 Teil	H <sub>2</sub> O (demineralisiert)
6 Teile	Methanol (CH <sub>3</sub> OH)
14 Teile	Chloroform (CHCl <sub>3</sub> )

#### Laufmittel 2

1 Teil	Laufmittel 1
1 Teil	bestehend aus:
	- 47 Teile Chloroform
	- 2 Teile Essigsäure 37%
	- 1 Teil Methanol

#### Sprühreagenz

98 ml	Essigsäure 37%
2 ml	Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )
0,6 ml	4-Methoxybenzaldehyd

#### Sulfatid-Stammlösung (1,2 mM)

1 mg Galaktocerebrosid-3-sulfat / ml Chloroform/Methanol = 2:1

#### Galaktocerebrosid-Stammlösung (1,37 mM)

1 mg Galaktocerebrosid / ml Chloroform/Methanol = 2:1

#### Sulfatid-Puffer [Raghavan et al, 1981]

25 mM	Natriumazetat-Puffer
5 mM	Magnesiumchlorid (statt Manganchlorid)
3 g/l	Taurocholat (0,3 %)

#### Sulfatid-Lösung (350 µM) [Raghavan et al, 1981]

70 nmole	Galaktocerebrosid-3-sulfat
in 200 µl	Sulfatid-Puffer

#### 2.1.4.4 Isotachophorese

##### Leitelektrolyt (LE) 0,01 M Cl<sup>-</sup>

10 mM HCl → pH 2,0

β-Alanin (bis ein pH von 3,3 erreicht wurde)

1 g/l Methylcellulose

Damit sich die Methylcellulose löste, wurde die Leitelektrolyt-Lösung 48 Stunden im Kühlraum bei 4 °C mit dem Magnetrührer gemischt und anschließend ungelöste Bestandteile mittels eines Faltenfilters entfernt [Schmidt et al, 1980].

##### Endelektrolyt 0,01 M Capronsäure (TE1)

10 mM Capronsäure in H<sub>2</sub>O

##### Endelektrolyt 5 mM Citronensäure (TE2)

5 mM Citronensäure in H<sub>2</sub>O

#### 2.1.4.5 Weitere Lösungen

##### Galaktose-4-sulfat-Lösung

verwendet für die saure Hydrolyse, Auswertung mit der Isotachophorese  
2 mM oder 10 mM Galaktose-4-sulfat in H<sub>2</sub>O (Deionat)

##### Galaktose-6-sulfat-Lösung

verwendet für die saure Hydrolyse, Auswertung mit der Isotachophorese  
2 mM oder 10 mM Galaktose-6-sulfat in H<sub>2</sub>O (Deionat)

##### Stammlösung der rekombinanten Arylsulfatase A

Die in dieser Arbeit verwendete, rekombinante humane Arylsulfatase A (rhASA) wurde von der Firma Zymenex hergestellt, mit folgenden Eigenschaften nach Angaben des Herstellers:

Aktivität 148 U/l

5,4 mg rhASA/ml

285 mosmol/kg

pH 7,5

1,04 ml per vial

100% Reinheit (HPLC)

Steril

Natrium-Phosphat-Puffer mit Mannitol und Glycerin

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolierung von Leukozyten aus EDTA-Blut mittels Dextransedimentation

In Anlehnung an die von [Kampine et al, 1968] beschriebene Methode zur Gewinnung von Leukozyten aus dem menschlichen Blut wurde gesunden Probanden venöses Blut in EDTA-Monovetten entnommen und ein Differentialblutbild erstellt. Dieses Differentialblutbild wurde durch ein Blutzell-Analysegerät (Advia-120 der Firma Bayer/Siemens) bestimmt. Durch dieses erste Blutbild der Probe erhielt man die zu erwartende Leukozytenzahl und deren Zusammensetzung.

Zur Isolierung der Leukozyten wurden 8,5 ml EDTA-Blut mit 3 ml Dextran-Lösung in ein 15 ml Polypropylen-Röhrchen gegeben. Durch mehrfaches Wenden des Röhrchens wurden Blut und Dextran-Lösung gut gemischt. Anschließend wurde das Röhrchen eine Stunde bei Zimmertemperatur zur Sedimentation stehen gelassen. Durch die Dextran-Lösung wurden die Erythrozyten vernetzt und setzten sich am Boden des Röhrchens ab. Die Leukozyten hingegen verblieben im Plasma. Der Überstand, in dem nach dem Absinken der Erythrozyten nur noch die Leukozyten als zelluläre Bestandteile enthalten waren, wurde abgenommen und in ein weiteres 15 ml Polypropylen-Röhrchen überführt. Dieses wurde für 10 Minuten bei 1359 g zentrifugiert. Der dadurch entstandene Überstand war zellfrei und wurde verworfen. Das Zellpellet am Boden des Röhrchens enthielt die Leukozyten und wenige nicht sedimentierte Erythrozyten.

Diese Zellen wurden in 4 ml 0,9%iger NaCl-Lösung vorsichtig mit einer Pipette resuspendiert. Mit Hilfe des Blutzellanalysegeräts Advia-120 wurde jetzt nochmals die

Leukozytenzahl der Probe bestimmt. Ausgehend von dieser Zellzahl wurde die Zellsuspension so auf Eppendorfcups verteilt, dass jedes Cup  $5 \times 10^6$  Zellen enthielt. Die Eppendorfcups wurden anschließend nochmals 10 Minuten bei 1359 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jedem Zellpellet 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  (Deionat) zugegeben. Durch Zugabe des demineralisierten Wassers platzten die Leukozyten durch den osmotischen Wassereinstrom. Anschließend wurden die Zellen eingefroren und durch die im Wasser gebildeten Eiskristalle wurden die Zellmembranen zusätzlich geschädigt. Die Proben wurden in den Eppendorfcups bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  im Tiefkühlschrank aufbewahrt.

### 2.2.2 Analyse von Leukozyten mit Advia-120

Die Zellzahl des EDTA-Blutes und der isolierten Leukozyten wurde mit dem Blutanalyse-Gerät Advia-120 der Firma Bayer/Siemens bestimmt.

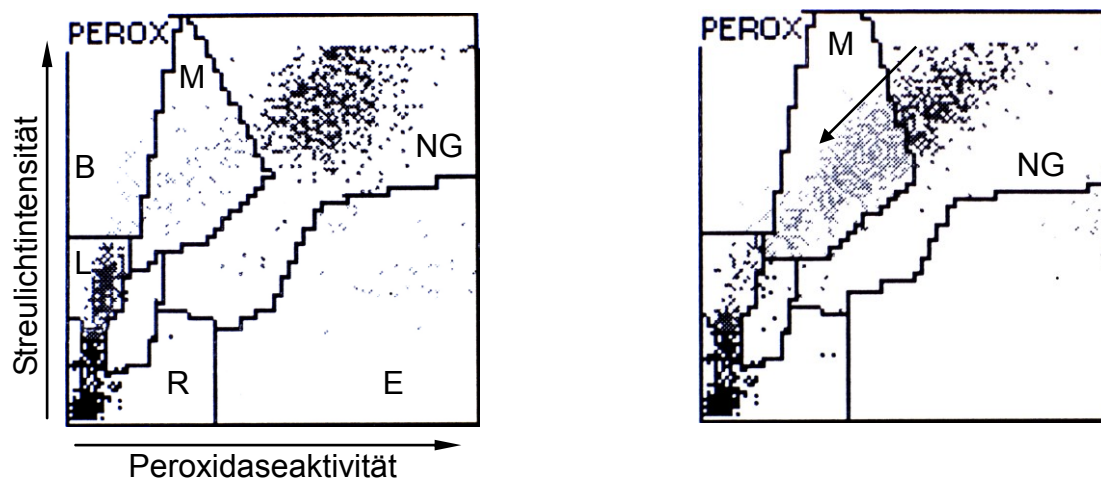
Dieses Blutanalyse-Gerät erstellt ein Differentialblutbild aus Blutproben. Die Differenzierung der Leukozyten erfolgt dabei über zwei verschiedene Analysen a) im Peroxidasekanal und b) im Basophilenkanal. Jeder Leukozyt wird dabei einzeln analysiert. Im Peroxidasekanal wird zum einen das Streulicht-Signal bestimmt, das durch die Größe und die Granulierung der Zellen ( $y$ -Achse, **Bild 14a**) beeinflusst wird. Zum anderen wird die Peroxidaseaktivität ( $x$ -Achse) der Zellen gemessen. Aus der Kombination der beiden Informationen wird die Art des Leukozyten bestimmt. Peroxidase positiv sind eosinophile und neutrophile Granulozyten, sowie in geringerer Aktivität die Monozyten. Lymphozyten und basophile Granulozyten sind Peroxidase negativ.

Im Basophilenkanal erfolgt eine Differenzierung der Leukozyten an Hand der verschiedenen Streuung von Licht durch die Zellkerne. Nach Zerstörung der Zellmembran und Fixierung lässt sich so eine Einteilung in Zellen mit annähernd rundem Zellkern (Lymphozyten und Monozyten) und polymorphkernige Leukozyten (neutrophile und eosinophile Granulozyten) treffen. Die basophilen Granulozyten werden im Basophilenkanal nicht zerstört und lassen sich dadurch von den anderen Leukozyten unterscheiden (**Bild 15a + b**).

Durch Auswerten der Daten des Peroxidase- und des Basophilenkanals können die einzelnen Leukozytenfraktionen eindeutig differenziert werden.

### 2.2.3 Differenzierung der Leukozyten nach Sedimentation mittels Advia-120

Nach der Sedimentation der Erythrozyten wurde wie in Kap. 2.2.1 beschrieben mit dem Blutanalysegerät nochmals ein Blutbild erstellt, um die Zellzahl der angereicherten Leukozyten zu ermitteln. Die Sedimentation und die anschließenden Zentrifugationen bedeuteten allerdings Stress für die Zellen, insbesondere für die neutrophilen Granulozyten, wodurch ein Teil der Peroxidase aus deren Granula freigesetzt wurde. Dadurch wurden diese neutrophilen Granulozyten im Diagramm (**Bild 14a**) nach links in das Monozytenfeld verschoben (**Bild 14b**). Nach Sedimentation wurde deshalb eine zu hohe Monozytenzahl und eine zu niedrige Zahl an neutrophilen Granulozyten gemessen. Die Gesamtzahl der Leukozyten war aber korrekt.



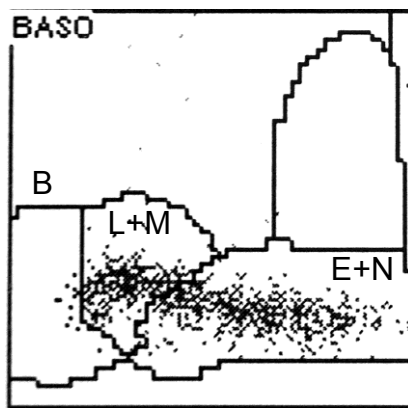
**Bild 14a:** Leukozytendifferenzierung im Peroxidasekanal vor Aufarbeitung der Blutprobe

B: Blasten u.a. M: Monozyten,  
NG: Neutrophile Granulozyten,  
L: Lymphozyten und Basophile,  
E: Eosinophile, R: Rauschen

**Bild 14b:** Leukozytendifferenzierung im Peroxidasekanal nach Sedimentation der Erythrozyten

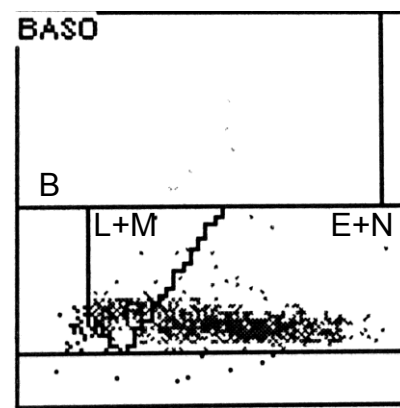
→ Verschiebung der neutrophilen Granulozyten durch Degranulation in das Monozytenfeld

Dass sich die Anzahl der verschiedenen Leukozytenfraktionen durch die Sedimentation der Erythrozyten nicht änderte, obwohl eine zu hohe Monozytenzahl ausgegeben wurde, konnte mit dem Basophilenkanal überprüft werden. Das Verhältnis der annähernd rundkernigen Leukozyten (L+M) inklusive der Monozyten zu den polymorphkernigen Leukozyten (E+N) blieb vor und nach Sedimentation der Erythrozyten gleich (vgl. **Bild 15a + b**).



**Bild 15a:** Leukozytendifferenzierung im Basophilenkanal vor Aufarbeitung der Blutprobe

L+M: annähernd runde Zellkerne  
 E+N: polymorphkernige  
 B: Basophile Granulozyten



**Bild 15b:** Leukozytendifferenzierung im Basophilenkanal nach Sedimentation der Erythrozyten, die Verteilung der Leukozyten entspricht der in Bild 15a

## 2.2.4 Gewinnung von ASA enthaltendem Enzymextrakt aus Leukozyten

Die bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerten Leukozyten wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut. In jeder Probe befanden sich  $5 \times 10^6$  Zellen in  $200\text{ }\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  (Deionat), vergleiche Kap. 2.1.4.1. Zu jeder Probe wurden  $300\text{ }\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  zugegeben und die Zellen so lange mit einer Pipette gemischt, bis eine homogene Suspension entstanden war. Die Zellmembranen und Zellstrukturen wurden durch die Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}$  (Deionat), das Einfrieren und Auftauen und das Mischen zerstört, sodass die Arylsulfatase A aus den Lysosomen austreten konnte. Die Suspension wurde drei Minuten bei  $500\text{ g}$  zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Verwendung abgenommen.

## 2.2.5 Photometrische Ermittlung des Umsatzes von para-Nitrocatecholsulfat

### 2.2.5.1 Allgemeine Prinzipien

Die Photometrie ist eine Methode, mit der die Konzentration bestimmter Moleküle mit Licht im sichtbaren oder im UV-Bereich bestimmt werden kann. Verwendet wird dabei

monochromatisches Licht einer einstellbaren Wellenlänge. Dieses Licht wird mit Hilfe einer Spektrallampe erzeugt. In den Strahlengang des monochromatischen Lichts wird eine Küvette mit vorgegebener Abmessung gestellt. Die auszuwertende Probe wird in die Küvette gegeben. Hinter der Küvette misst ein Detektor die Transmission des Lichts, das die Küvette durchdrungen hat. Der Transmissionsgrad (T) ist dabei abhängig von der Zusammensetzung der Probe und von der Konzentration der absorbierenden Bestandteile.

Die vom Photometer bestimmte Größe ist die Extinktion (E), diese ist definiert als negativer dekadischer Logarithmus des Transmissionsgrades.

$$E = -\log(T)$$

Die gemessene Extinktion ist proportional zu der Konzentration der absorbierenden Moleküle in der Probe. Es gilt das Lambert-Beersche Gesetz:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient; c = Konzentration der absorbierenden Substanz;

d = Durchmesser der Küvette

### Kalibrierung des Photometers

Alle photometrischen Messungen der Extinktion der Proben erfolgten im Vergleich zu der Extinktion reinen Wassers. Das heißt, zur Kalibrierung des Photometers wurde vor jeder Messung die Extinktion von H<sub>2</sub>O (Deionat) bestimmt und der gemessene Extinktionswert am Gerät manuell auf Null eingestellt.

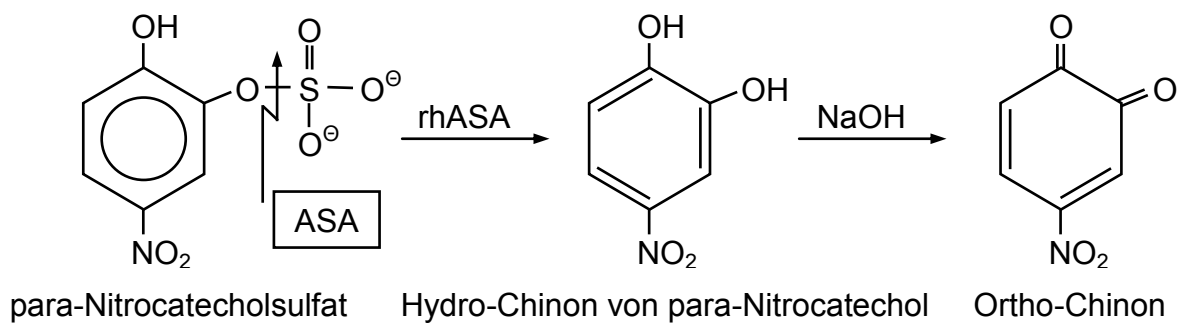
### **2.2.5.2 Ermittlung der ASA-Aktivität über den Umsatz von pNCS**

Durch photometrische Messung der para-Nitrocatechol-Konzentration konnte die Aktivität der Arylsulfatase A (ASA) bestimmt werden. Para-Nitrocatecholsulfat (pNCS) wurde, durch Abspaltung der Sulfatgruppe, von der Arylsulfatase A zu para-Nitrocatechol (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>O<sub>4</sub>) umgesetzt. Bei para-Nitrocatecholsulfat handelt es sich um ein in der Natur nicht vorkommendes, künstlich hergestelltes Substrat der Arylsulfatase A. Die ASA spaltet von para-Nitrocatecholsulfat die Sulfatgruppe unter Anlagerung eines Wassermoleküls ab. Das Ortho-Chinon dieses para-Nitrocatechols hat bei einer Wellenlänge von 514 nm ein Extinktionsmaximum. Das para-Nitrocatecholsulfat



dagegen führt bei 514 nm zu keiner Abschwächung des Lichts. Die gemessene Extinktion ist zu der Substratkonzentration proportional. Deshalb ließ sich aus der gemessenen Extinktion, mit Hilfe einer Kalibrierkurve, die Konzentration des pNCS bestimmen, die durch die Arylsulfatase A umgesetzt wurde. Der Umsatz des pNCS wiederum ist ein Maß für die Aktivität der Arylsulfatase A.

Die Überführung des Hydro-Chinons in das Ortho-Chinon des para-Nitrocatechols wurde durch pH-Änderung in der Probe erreicht. In einem alkalischen Milieu entstand das Ortho-Chinon durch Oxidation aus dem Hydro-Chinon. Die Reaktion war durch einen Farbumschlag der Probe von gelb nach rot mit bloßem Auge erkennbar.



Die Probe wurde in eine Halbmikroküvette gegeben und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 514 nm im Photometer gemessen. Von dem Ergebnis wurde anschließend die Extinktion des Leerwerts subtrahiert. Der Leerwert wurde an einer Probe ermittelt, die ebenfalls 200 µl pNCS-Lösung, 50 µl Enzym und 250 µl Natronlauge enthielt. Die Natronlauge wurde der Probe die als Leerwert diente vor Inkubation zugegeben, damit kein pNCS von der Arylsulfatase A umgesetzt werden konnte.

Ergebnis:  $\Delta E = E (\text{Probenansatz}) - E (\text{Leerwert})$

### 2.2.5.3 Photometrische Messung der Aktivität der ASA aus Leukozyten

Für die Bestimmung der Aktivität der Arylsulfatase A aus einer Blutprobe in Anlehnung an die Methode von Sommerlade et al (1994-a) und Baum et al (1959), wurden Substrat und Enzym gemeinsam inkubiert und die Probe anschließend ausgewertet. Jede Probe enthielt 200 µl pNCS-Lösung zu der 50 µl Leukozytenextrakt gegeben wurde. 50 µl Enzymextrakt (Präparation siehe Kap. 2.2.4) entsprachen dabei dem Gehalt an Arylsulfatase A aus  $5 \times 10^5$  Zellen.

Die Proben wurden anschließend maschinell gemischt und bei 4 °C im Kühlschrank für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 0,5 M Natronlauge beendet. Die Menge an zugegebener Natronlauge entsprach dabei dem Probenvolumen und damit 250 µl. Durch die Zugabe der Natronlauge wurde der pH-Wert in den alkalischen Bereich angehoben und damit die Arylsulfatase A inaktiviert, da das pH-Optimum des Enzyms bei 4-5 liegt.

#### 2.2.5.4 Bestimmung der Aktivität der rekombinanten Arylsulfatase A

In dieser Arbeit wurde eine rekombinante Form der humanen Arylsulfatase A (rhASA) verwendet um im Urin die Sulfatgruppe von Galaktocerebrosid-3-sulfat abzuspalten. Um die Bedingungen für eine vollständige Abspaltung zu ermitteln, wurde die Aktivität der rhASA zunächst wie die der Arylsulfatase A bestimmt, die aus Leukozyten gewonnen wurde.

Es wurde eine rhASA-Stammlösung erstellt und diese mehrfach mit H<sub>2</sub>O (Deionat) verdünnt, sodass eine Verdünnungsreihe der rhASA unterschiedlicher Enzymkonzentration vorlag (siehe **Tabelle 1**).

Im Vergleich zum Ansatz mit Enzymextrakt aus Lymphozyten wurde den Proben statt dem Enzymextrakt 10 µl rhASA und 50 µl einer Inkubationslösung zugegeben. Die eingesetzte Inkubationslösung wurde variiert und dazu H<sub>2</sub>O (Deionat), Albuminlösung, Enzymextrakt, 50%iges Plasma, 50%iges Serum oder Taurocholatlösung verwendet.

Probe:        50 µl Inkubationslösung  
               200 µl pNCS-Lösung  
               10 µl rhASA unterschiedlicher Verdünnung

Die Probe wurde entweder 48 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank oder in Annäherung an die Situation im menschlichen Körper bei 37 °C im Wasserbad für 1 Stunde inkubiert. Um die Enzymkinetik der rekombinanten Arylsulfatase A zu untersuchen, wurden unterschiedliche Inkubationszeiten bei 37 °C im Wasserbad gewählt. Die Auswertung erfolgte über die photometrische Bestimmung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 514 nm. Die Messung wurde nach Kalibrierung des Photometers mit reinem Wasser durchgeführt. Von dem Ergebnis wurde der jeweilige Leerwert, bei

dem es sich um einen Ansatz mit derselben Inkubationslösung, derselben pNCS-Lösung und H<sub>2</sub>O statt rhASA handelte, subtrahiert.

**Tabelle 1:** Verdünnungsstufen der rhASA mit H<sub>2</sub>O und der entsprechenden Aktivität in U/l und in  $\mu$ U pro 10  $\mu$ l im Inkubationsansatz

	Verdünnung der rhASA mit H <sub>2</sub> O	Verdünnungsstufe der rhASA	c (rhASA) [U/l]	c (rhASA) [ $\mu$ U/Ansatz]
c <sub>1</sub>	rhASA-Stammlösung		148	1480
c <sub>2</sub>	1 Teil c <sub>1</sub> + 9 Teile H <sub>2</sub> O	1:10	14,8	148
c <sub>3</sub>	1 Teil c <sub>2</sub> + 9 Teile H <sub>2</sub> O	1:100	1,48	14,8
c <sub>4</sub>	1 Teil c <sub>3</sub> + 4 Teile H <sub>2</sub> O	1:500	0,296	2,96
c <sub>5</sub>	1 Teil c <sub>4</sub> + 1 Teil H <sub>2</sub> O	1:1.000	0,148	1,480
c <sub>6</sub>	1 Teil c <sub>4</sub> + 4 Teile H <sub>2</sub> O	1:2.500	0,0592	0,592
c <sub>7</sub>	1 Teil c <sub>6</sub> + 1 Teil H <sub>2</sub> O	1:5.000	0,0296	0,296
c <sub>8</sub>	1 Teil c <sub>6</sub> + 2 Teile H <sub>2</sub> O	1:7.500	0,0197	0,197
c <sub>9</sub>	1 Teil c <sub>7</sub> + 1 Teil H <sub>2</sub> O	1:10.000	0,0148	0,148

### 2.2.5.5 Erstellung einer Kalibrierkurve für para-Nitrocatechol

Ziel der photometrischen Messungen war die Bestimmung der Aktivität der Arylsulfatase A. Die im Photometer gemessene Extinktion verhielt sich proportional zu der Konzentration an para-Nitrocatechol (pNC) in der Probe. Mit Hilfe einer Kalibrierkurve für para-Nitrocatechol ließ sich deshalb aus jeder Probe die para-Nitrocatechol-Konzentration bestimmen die durch die ASA umgesetzt wurde. Der Umsatz in Prozent von der ursprünglich in der Probe vorhandenen para-Nitrocatecholsulfat-Konzentration war ein Maß für die Aktivität der Arylsulfatase A in der Probe.

$$\text{Umsatz [\%]} = c(\text{pNC nach Inkubation aus } \Delta E) : c(\text{pNCS im Ansatz}) \times 100$$

Für die Kalibrierkurve wurde als Ausgangslösung eine 10 mM pNC-Lösung (siehe Kap. 2.1.4.2) verwendet. Diese wurde mit Natriumazetat-Puffer in neun Verdünnungsschritten jeweils so verdünnt, dass die para-Nitrocatechol-Konzentration jeweils halbiert wurde. Auf diese Weise ergab sich in der neunten Verdünnungsstufe eine

Verdünnung von 1/512. Das entsprach einer pNC-Konzentration von 19,5  $\mu\text{M}$  (**Tabelle 1**). In der Spalte „Umsatz“ wird angegeben, wie viel pNCS bei einem bestimmten Extinktionswert von der ASA umgesetzt wurde, wenn ein standardisierter Ansatz mit 200  $\mu\text{l}$  einer 10 mM pNCS-Lösung verwendet wurde. Für die Kalibrierkurve wurden deshalb ebenfalls 200  $\mu\text{l}$  einer 10 mM para-Nitrocatechol-Lösung verwendet. In einer Probe mit 10 mM para-Nitrocatechol befanden sich  $2 \times 10^{-6}$  Mole/200  $\mu\text{l}$ . Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  0,5 M Natronlauge wurden die Extinktionswerte der Proben bei einer Wellenlänge von 514 nm photometrisch bestimmt. Für jede Verdünnungsstufe wurde ein Leerwert mit einer pNCS-Lösung der entsprechenden Verdünnung erstellt.

Ergebnis:  $\Delta E = E(\text{pNC-Lösung}) - E(\text{Leerwert})$

Aus der linearen Kalibrierkurve ließ sich der Umsatz wie folgt berechnen (Gleichung 1). Die Extinktion  $\Delta E$  wurde mit der Konzentration multipliziert, die einem Extinktionswert von  $E = 1,0$  entsprach (siehe Kap. 3.2.1). Da ein Umsatz von 100% einer pNC-Konzentration von  $200 \times 10^{-8}$  Molen entsprach, wurde das Ergebnis durch  $200 \times 10^{-8}$  dividiert und mal 100 genommen um den Umsatz in Prozent zu erhalten (vgl. **Tabelle 2**).

**Tabelle 2:** Ansatz zur Erstellung einer Kalibrierkurve von pNC mit den Molen/200  $\mu\text{l}$  und dem errechneten Umsatz von pNCS bezogen auf einen Standardansatz

	Verdünnung der pNC-Lösung mit Natriumazetat-Puffer	c (pNC) [ $\mu\text{M}$ ]	$\times 10^{-8}$ Mole pNCS/200 $\mu\text{l}$	„Umsatz“ [%]
a	10 mM pNC-Lösung	10.000	200	100
b	1 Teil a + 1 Teil Puffer	5.000	100	50
c	1 Teil b + 1 Teil Puffer	2.500	50	25
d	1 Teil c + 1 Teil Puffer	1.250	25	12,5
e	1 Teil d + 1 Teil Puffer	625	12,5	6,25
f	1 Teil e + 1 Teil Puffer	312,5	6,25	3,125
g	1 Teil f + 1 Teil Puffer	156	3,125	1,56
h	1 Teil g + 1 Teil Puffer	78	1,56	0,78
i	1 Teil h + 1 Teil Puffer	39	0,78	0,389
j	1 Teil i + 1 Teil Puffer	20	0,39	0,194

$$\text{Umsatz}[\%] = \frac{\Delta E \times VF \times c_{\text{pNC}} (\Delta E = 1)}{200 \times 10^{-8} \text{ Mole}} \times 100 \quad (1)$$

In dem Fall, dass die Probe vor Messung der Extinktion verdünnt wurde, um einen für das Photometer gut auswertbaren Extinktionswert zu erreichen, musste die Extinktion  $\Delta E$  mit dem Verdünnungsfaktor (VF) multipliziert werden. Einzig die durch die Methode vorgegebene Verdünnung der Proben durch die Zugabe von 0,5 M Natronlauge im Verhältnis 1:1 wurde vernachlässigt, weil diese Verdünnung ausnahmslos für alle Proben, die mit dem Photometer gemessen wurden, durchgeführt wurde.

## 2.2.6 Dünnschichtchromatographie

### 2.2.6.1 Allgemeines Prinzip

Mit der Dünnschichtchromatographie können die Bestandteile einer Probe infolge unterschiedlicher Laufstrecken aufgetrennt werden. Die Proben werden auf eine Platte aufgetragen, die mit einer feinkörnigen Schicht, der sogenannten stationären Phase, beschichtet ist. In dieser Arbeit wurden mit Kieselgel beschichtete HPTLC-Platten verwendet.

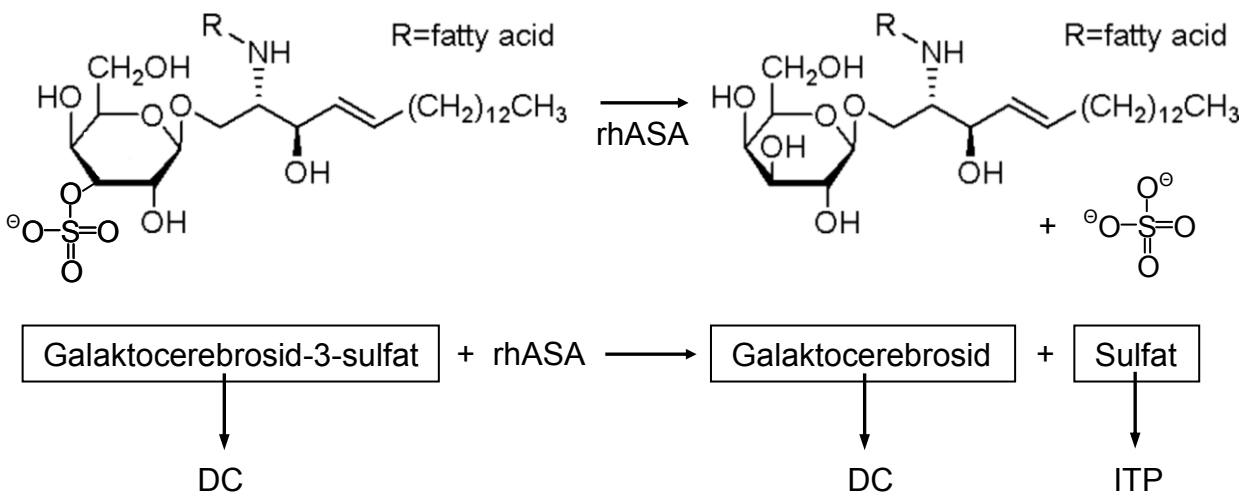
Nach dem Auftragen der Probe wird die Platte senkrecht in eine Lösung, die mobile Phase, eingetaucht. Durch kapillare Kräfte steigt die flüssige Phase an der stationären Phase nach oben und trägt die Probenbestandteile mit sich. Die verschieden großen und geladenen Probenbestandteile interagieren unterschiedlich mit den beiden Phasen. Durch die unterschiedlich starken Anziehungskräfte (Kapillarkräfte und Wasserstoffbrückenbindung) der beiden Phasen wandern die Substanzen unterschiedlich weit vom Startpunkt während eines Laufs auf der Platte. Das kommt dadurch zustande, dass sich je nach Molekül ein unterschiedlich großer Anteil einer Substanz mit der mobilen Phase mit bewegt. Dabei haben die Moleküle dieser Substanz dieselbe Geschwindigkeit wie die mobile Phase selbst. Der übrige Anteil haftet an der stationären Phase. Die beiden Anteile sind fließend im Gleichgewicht, sodass die mobilen und die stationären Substanzanteile ständig ausgetauscht werden. Die resultierende Geschwindigkeit, mit der eine Substanz auf der Platte wandert, ist deshalb von dem prozentualen Anteil abhängig, der sich in der mobilen Phase befindet.

Je größer der Anteil in der mobilen Phase ist, desto größer ist die Wanderungsgeschwindigkeit einer Substanz. Das Silica- bzw. Kieselgel der stationären Phase ist durch eine freie OH-Gruppe polar und polare Moleküle werden bevorzugt gebunden. Als mobile Phase wurde zur Darstellung von Galaktocerebrosid-3-sulfat ein Gemisch aus Chloroform, Methanol und Essigsäure verwendet.

Nach der Auftrennung und dem Trocknen der Platte werden die entstandenen Substanz-Banden mit einer geeigneten Methode sichtbar gemacht. In dieser Arbeit wurden die Platten dazu mit einer essigsäurehaltigen Lösung eingesprüht und bei 100 °C inkubiert.

### 2.2.6.2 Ziel der Verwendung der Dünnschichtchromatographie

Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) kann Galaktocerebrosid-3-sulfat und auch das Abbauprodukt Galaktocerebrosid semiquantitativ ausgewertet werden.



Das bedeutet, dass durch den direkten Vergleich der Banden zweier Proben, grob abgeschätzt werden konnte in welchem Verhältnis das Substrat in den Proben etwa vorhanden war. Dazu wurde die Stärke der Banden, unter Berücksichtigung der Stärke aller Banden einer Probe, verglichen. Eine quantitative Auswertung der Konzentration war aber nicht möglich. Die Dünnschichtchromatographie wurde in dieser Arbeit dazu eingesetzt, den Umsatz des Sulfatids semiquantitativ sichtbar zu machen. Mit Hilfe der Isotachophorese sollte dann versucht werden einen quantitativen Nachweis des Galaktocerebrosid-3-sulfats indirekt durch Bestimmung des abgespalteten

Sulfats zu erreichen. Eine direkte Bestimmung des Sulfatids mit Hilfe der Isotachophorese war wegen des stark lipophilen Anteils des Moleküls nicht möglich.

### 2.2.6.3 Berechnung des Retentionsfaktors

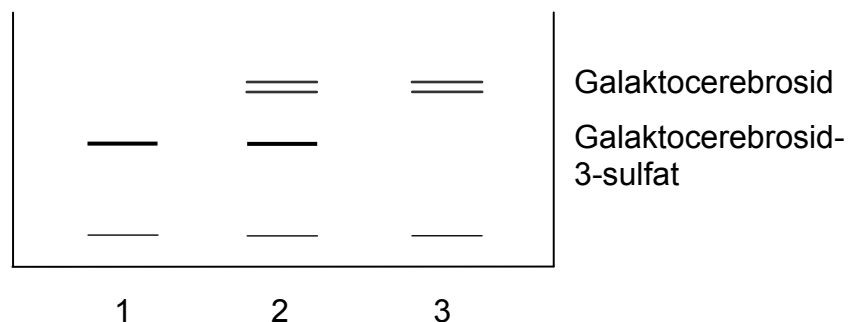
In der Dünnschichtchromatographie ist die Laufstrecke  $s$  einer Substanz im Verhältnis zur Laufstrecke des Laufmittels konstant, wenn dieselbe stationäre Phase und dasselbe Laufmittel verwendet wird. Diese Konstante wird als Retentionsfaktor (RF) bezeichnet.

$$\text{RF (Substanz)} = \frac{s(\text{Substanz})}{s(\text{Laufmittel})} \quad (2)$$

### 2.2.6.4 Referenzwerte

Zur Identifikation der Banden in der Dünnschichtchromatographie war es möglich, sowohl Galaktocerebrosid-3-sulfat als auch Galaktocerebrosid einzeln in C/M=2:1 gelöst mitzuführen.

Man erhielt dann folgendes Bild:



**Bild 16:** Schematische Darstellung einer HPTLC-Platte auf der 1) Galaktocerebrosid-3-sulfat, 2) Testlösung mit beiden Substanzen und 3) Galaktocerebrosid aufgetragen wurde

### 2.2.6.5 Urinaufarbeitung zur Sulfatidbestimmung

Die Urinaufarbeitung wurde in Anlehnung an die Methode von Harzer & Recke (1975) durchgeführt. Der zu untersuchende Urin wurde vor Aufarbeitung mit 37%iger Salzsäure auf einen pH-Wert zwischen 2,5 und 3,0 eingestellt. Anschließend wurde der angesäuerte Urin für 12 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt, um eventuell ausgefallene Salze wieder in Lösung zu bringen.

Zur Isolierung des Galaktocerebrosid-3-sulfats wurden 2,5 ml Urin in ein verschließbares 50 ml Polypropylen-Röhrchen gegeben. Dem Ansatz wurden außerdem 5 ml Methanol und 12 ml eines Chloroform-Methanol-Gemisches im Verhältnis Chloroform zu Methanol 2:1 (C/M=2:1) hinzugefügt. Die Lösungen wurden durch mehrfaches vorsichtiges Wenden des Röhrchens gemischt. Dadurch bildeten sich zwei Phasen in dem Polypropylen-Röhrchen, eine hydrophile Ober- und eine lipophile Unterphase. Da sich das Sulfatid bevorzugt in der lipophilen Phase löst, wurde durch dreimalige Zugabe von je 5 ml H<sub>2</sub>O und Verwerfen der jeweils wässrigen Oberphase, der größte Teil der hydrophilen Urinbestandteile aus der Probe durch vorsichtiges Absaugen mit der Pipette entfernt. Zum Schutz der lipophilen Unterphase wurde bei jedem Absaugen der hydrophilen Phase etwas Oberphase belassen. Dieses Volumen sollte dabei möglichst klein sein, da sich in der hydrophilen Phase das im Urin enthaltene anorganische Sulfat befand und dieses möglichst quantitativ aus der Probe entfernt werden musste um sicherzustellen, dass bei der Auswertung der Proben mit der Isotachophorese nur das Sulfat, das aus Galaktocerebrosid-3-Sulfat abgespaltet wurde, gemessen wurde. Auf der anderen Seite durfte die Oberfläche der lipophilen Phase aber nicht verletzt werden, da sich das Sulfatid wegen der Sulfatgruppe vor allem am Übergang der beiden Phasen aufhält.

Anschließend wurde die verbliebene lipophile Phase gemeinsam mit der „Schutzschicht“ in einem 80 ml Becherglas zur Trockene eingedampft. Dazu wurde die Probe in dem Becherglas im Abzug mit Hilfe eines Föns erhitzt. Der Rückstand wurde in 1 ml C/M=2:1 gelöst und in ein 10 ml Becherglas überführt. Das 80 ml Becherglas wurde nochmals mit 0,5 ml Chloroform gespült, um möglichst alle Rückstände in Lösung zu bringen. Auch die 0,5 ml Chloroform wurden anschließend in das 10 ml Becherglas überführt. Die Flüssigkeit wurde wieder verdampft, der Rückstand nochmals in 100 µl C/M gelöst und mit 100 µl Chloroform nachgespült. Beide Lösungen wurden



in einen Eppendorfcup gegeben und die Flüssigkeit ein letztes Mal verdampft. Der Rückstand konnte im verschlossenen Eppendorfcup in dieser Form bei Raumtemperatur bis zur Auswertung aufbewahrt werden.

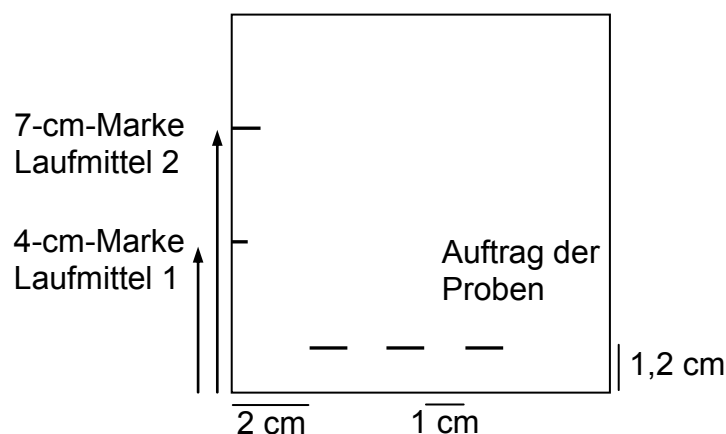
Zur Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie wurde der Rückstand in 20 µl Chloroform/Methanol im Verhältnis 2:1 gelöst und auf eine Kieselgel-Platte zur Auswertung aufgetragen.

#### 2.2.6.6 Trennung und Analyse von Sulfatid und Galaktocerebrosid

Vor dem Auftragen der Probe auf die Kieselgel-Platte musste die Platte im Ofen bei 100 °C für 5 min erhitzt werden, um das Kieselgel der Platten zu aktivieren.

Als Referenzwert für die Sulfatidbestimmung wurde von einer Sulfatid-Stammlösung mit 1,5 mg/ml eine 1:30 Verdünnung mit C/M=2:1 hergestellt.

Auf der HPTLC-Platte wurden Markierungen für den Auftrag der Proben 1,2 cm vom unteren Rand von je 1 cm Länge und ebenfalls einem 1 cm Abstand voneinander angebracht (siehe **Bild 17**). Das war deshalb wichtig, damit die aufgetragenen Proben nicht in das Laufmittel eintauchten, sich nicht mischten und sich gegenseitig nicht durch unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten störten. Von den Rändern sollten die Markierungen je 2 cm entfernt sein. Am Seitenrand der Platte wurden zwei Markierungen in Höhe 4 und 7 cm angebracht, die das Ende des Laufs in den beiden Laufmitteln markierten.



**Bild 17:** Schematische Beschriftung einer 10 x 10 cm HPTLC-Platte

Nach dem Auftragen und Trocknen von 5 bis 20 µl Probenvolumen wurde die HPTLC-Platte senkrecht in eine Glaskammer gestellt, die 5 ml bei einer 10x10 cm Platte bzw. 50 ml bei einer 10x20 cm Platte Laufmittel 1 enthielt. Die Platte wurde entnommen, wenn die flüssige Phase, die infolge kapillarer Kräfte an der Platte nach oben stieg, die 4-cm-Marke erreicht hatte. Die Platte wurde unter dem Abzug getrocknet und in eine zweite Doppeltrogkammer gestellt, die 5 bzw. 50 ml Laufmittel 2 enthielt. Erreichte das Laufmittel die 7-cm-Markierung, wurde die Platte getrocknet und unter dem Abzug gleichmäßig sparsam mit Sprühreagenz eingesprüht. Die Platte wurde bei Raumluft getrocknet, dann nochmals 10 min im Ofen bei 120 °C inkubiert und konnte anschließend ausgewertet werden [Schlote et al, 1991].

#### **2.2.6.7 Standardmethode zur Sulfatidbestimmung im Urin**

Im neurometabolischen Labor der Kinderklinik der Universität Tübingen wird routinemäßig Sulfatid mittels DC nach einer von Klaus Harzer entwickelten Methode im Urin bestimmt. Die in Kap. 2.2.6.6 beschriebene Methode wurde aus diesem Protokoll entwickelt. Die Routinemethode ist im Folgenden dargestellt.

##### Aufarbeitung:

Einer Probe mit 2,5 ml angesäuertem Urin, 5 ml Methanol und 12 ml Chloroform wurde, wie in Kap. 2.2.6.6 beschrieben, drei mal 5 ml H<sub>2</sub>O zugegeben und eingedampft.

##### Auftragen auf die 10 x 10 cm Kieselgel-Platte:

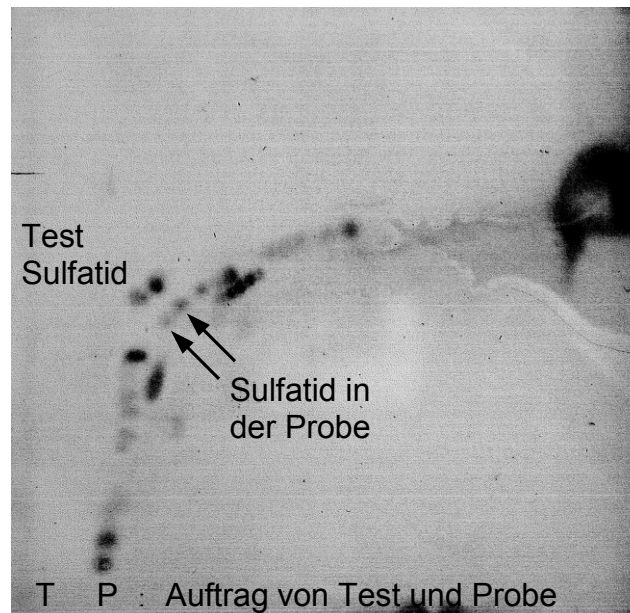
Nach dem Eindampfen wurden 10 µl einer Test-Lösung mit 0,5 mg Sulfatid / ml Chloroform/Methanol im Verhältnis 2:1 je 0,6 cm vom linken und unteren Rand entfernt punktförmig aufgetragen. Der eingedampfte Rückstand der Urinprobe wurde in 20 µl C/M=2:1 resuspendiert und 1,5 cm vom linken Rand und einem Abstand von 0,6 cm vom unteren Rand ebenfalls punktförmig aufgetragen.

##### Lauf und Auswertung:

Die Kieselgel-Platte wurde senkrecht in eine Kammer mit 5 ml Laufmittel 1 gestellt, bis das Laufmittel eine Laufstrecke von 7 cm auf der Platte erreicht hatte. Anschließend wurde die Platte getrocknet, um 90° nach links gedreht und in eine Doppeltrogkammer mit 5 ml Laufmittel 2 gegeben. Dieser Lauf wurde erst beendet,

wenn das Laufmittel die Oberkante der Platte erreicht hatte. Die Platte wurde getrocknet und wie in Kap. 2.2.6.6 beschrieben ausgewertet.

Ein Beispiel für die Auswertung des Urins eines Patienten mit Metachromatischer Leukodystrophie ist in **Bild 18** dargestellt. Wird hingegen die Urinprobe eines Gesunden aufgearbeitet färbt sich an der Position des Sulfatids kein Substrat an.



**Bild 18:** Dünnschichtchromatographie des Urins eines Patienten mit MLD nach der Standardmethode der Kinderklinik in Tübingen

### 2.2.7 Isotachophorese

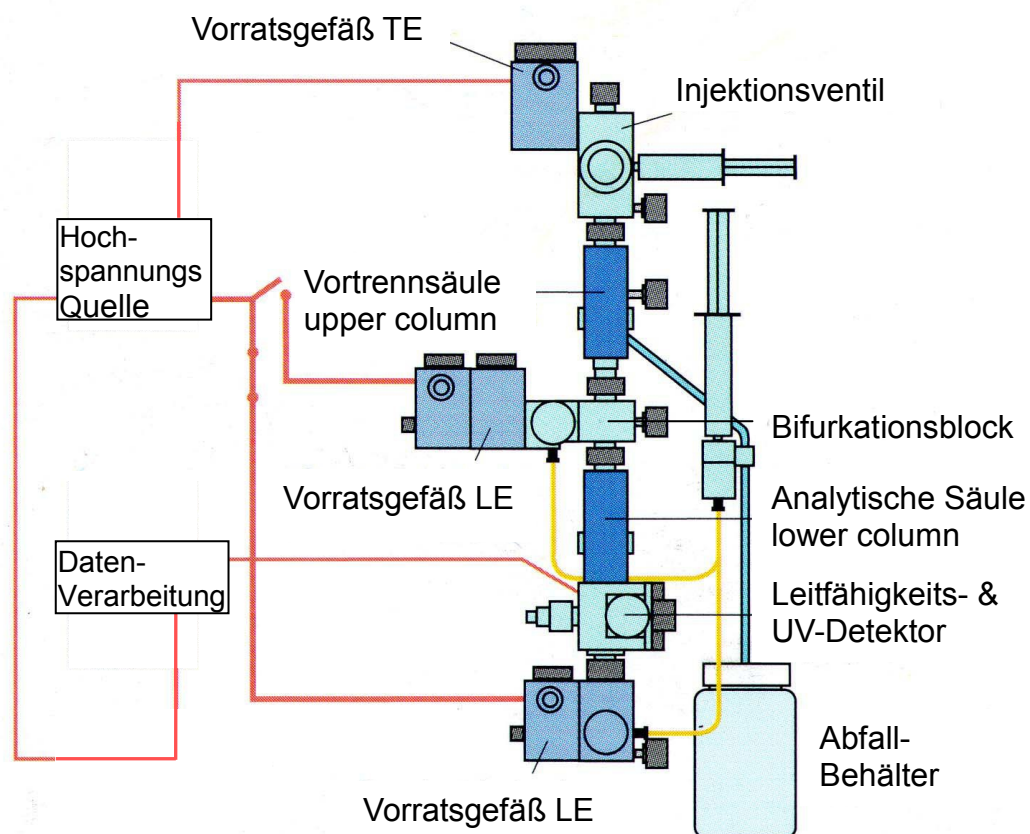
Die Isotachophorese (ITP) ist ein analytisches Verfahren, mit dem die Konzentration von Ionen bestimmt werden kann. In dieser Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um die Konzentration des Galaktocerebrosid-3-sulfats, das bei der Metachromatischen Leukodystrophie in vielen verschiedenen Zellen des Körpers akkumuliert und auch in den Körperflüssigkeiten nachweisbar ist, quantitativ zu messen. Da Galaktocerebrosid-3-sulfat in einer wässrigen Umgebung praktisch unlöslich ist, wurde deshalb die Sulfatgruppe mit Hilfe der Arylsulfatase A von Galaktocerebrosid-3-sulfat abgespalten und anschließend die Konzentration dieses freien Sulfats mit der Isotachophorese ausgewertet.

### 2.2.7.1 Aufbau des ITP-Geräts ItaChrom EA101

Für alle Analysen dieser Arbeit wurde das Isotachophorese-Gerät ItaChrom EA101 der Firma J&M (Aalen) eingesetzt. Dieses Gerät verfügt über zwei senkrecht stehenden, hintereinandergeschalteten Kapillaren, die obere Vortrennsäule und die untere analytische Säule (**Bild 19**). Beide Kapillaren bestehen aus fluoriertem Ethylen-Propylen-Copolymer, die sich durch eine Minimierung des elektroosmotischen Flusses auszeichnen, und haben eine Länge von 90 bzw. 160 mm. Über ein Injektionsventil (Mehrwegeventil) wird die Probe mit einer 1 ml-Spritze oberhalb der oberen Kapillare eingegeben. Die Probe wird im Überschuss eingespritzt und durch ein vorgegebenes Innenvolumen des Injektionsventils auf genau 30 µl dosiert.

In der Vortrennkapillare, die mit 0,8 mm einen größeren Innendurchmesser hat, beginnt die Trennung der Ionen der Probe. Im Gegensatz zu anderen Verfahren wird in der Isotachophorese kein Hintergrundelektrolyt verwendet, sondern ein diskontinuierliches Elektrolytsystem eingesetzt. Dieses besteht aus einem Leitelektrolyt (LE - leading electrolyte) und einem Endelektrolyt (TE - terminating electrolyte). Das Kapillarsystem der ITP ist unterhalb des Injektionsventils vollständig mit der Leitelektrolyt-Lösung gefüllt. Durch zwei mit LE gefüllte Vorratsgefäße wird sichergestellt, dass die Konzentration des LE nicht verändert wird. Oberhalb des Injektionsventils ist das Kapillarsystem der ITP mit einer Endelektrolyt-Lösung befüllt. Durch Anlegen eines elektrischen Stroms konstanter Stärke werden die Ionen der eingespritzten Probe zwischen LE und TE in der Kapillare getrennt. Die Stromstärke wird an dem Gerät eingestellt und mit Hilfe eines Hochspannungsnetzgeräts, das eine Spannung bis zu 30 kV erzeugt, konstant gehalten. Die Ionen wandern in dem elektrischen Feld nach Anlegen des Stroms in der Kapillare nach unten. Über den sogenannten Bifurkationsblock können die Teilchen entweder zu dem oberen LE-Vorratsgefäß oder aber zur unteren Kapillare geleitet werden (siehe **Bild 19**). Zunächst werden die Ionen zu dem oberen mit LE gefüllten Vorratsgefäß am Ende der Vortrennsäule geleitet, um das Volumen des Leitelektrolyts zu reduzieren, das in die untere Kapillare gelangt. Die Verwendung einer Vortrennsäule hat den Vorteil, dass aufgrund des größeren Innendurchmessers von 0,8 mm eine höhere Stromstärke angelegt werden kann, wodurch die Geschwindigkeit der Ionen in der Kapillare erhöht und die Analysezeit verkürzt werden kann. Nach einer einstellbaren Laufzeit werden die Ionen, bevor sie den Bi-

furkationsblock erreichen, zur unteren Kapillare umgeleitet. Die untere Kapillare hat einen Innendurchmesser von 0,3 mm und dient der Analyse der Probe. Wiederum werden die Ionen in der Kapillare einem mit LE gefüllten Vorratsgefäß zugeleitet. Beide Vorratsgefäße sind über eine semipermeable Membran mit dem Kapillarsystem verbunden. Diese Membran ist zwar für ionische Bestandteile nicht aber für neutrale Lösungsmittel durchlässig. Dadurch wird eine Flüssigkeitsbewegung aus den senkrecht stehenden Kapillaren in die Vorratsgefäße verhindert [Hins, 2003]. Die Auswertung der Ionenkonzentrationen erfolgt über einen Leitfähigkeits- und einen UV-Detektor am unteren Ende der analytischen Säule.



**Bild 19:** Schema der Isotachophorese-Geräts ItaChrom EA101

### 2.2.7.2 Funktionsweise der Isotachophorese

Bei der Isotachophorese handelt es sich um ein analytisches Verfahren, das Ionen gleicher Ladung in einem elektrischen Feld nach ihren Mobilitäten trennt. Die Mobilität  $\mu$  kennzeichnet die Beweglichkeit von Ionen in einem elektrischen Feld. Sie ist für

jedes Ion charakteristisch und abhängig von der Ladung und dem Radius des Ions [Meissner, 1998]. Die Mobilität kann mit der folgenden Gleichung 3 berechnet werden.

$$\mu = \frac{Z \cdot e}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (3)$$

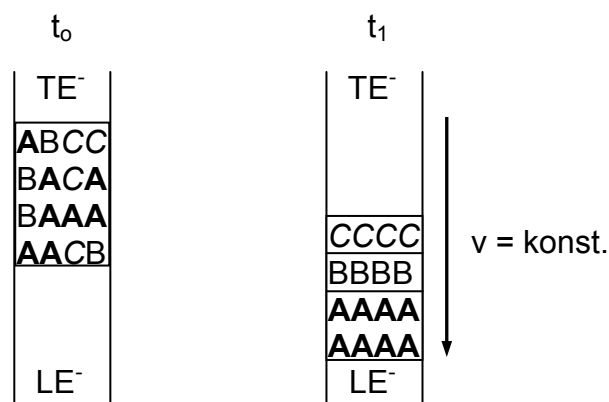
Z: Ladungszahl

e: Elementarladung

$\eta$ : Viskosität der Lösung

r: Ionenradius

In der ITP beeinflussen zusätzlich weitere Faktoren wie die Hydrathülle, das Ionenmilieu, der Dissoziationsgrad und die umgebende Lösung die effektive Mobilität. Durch Anlegen eines Gleichstroms trennen sich die Ionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Mobilitäten in dem verwendeten Elektrolytssystem in diskrete Zonen. Der Leitelektrolyt wird so gewählt, dass er im Vergleich zu den zu differenzierenden Ionen die höchste Mobilität aufweist. Die zu analysierenden Ionen ordnen sich im elektrischen Feld hinter dem Leitelektrolyt in absteigender Mobilität in Zonen an (**Bild 20**). Eine Ionenlücke kann auf Grund der Forderung nach gleichem Strom- und damit Ladungstransport in der Kapillare nicht entstehen. Der zweite Bestandteil des Elektrolytensystems der ITP, der Endelektrolyt, wird so gewählt, dass er eine niedrigere Mobilität aufweist als die zu trennenden Ionen. Im LE sind zusätzlich dem LE entgegengesetzt geladene Ionen enthalten. Diese sogenannten Gegenionen wandern in dem elektrischen Feld der Isotachophorese in entgegengesetzter Richtung zu Leitelektrolyt, Endelektrolyt und den zu analysierenden Ionen.



**Bild 20:** Probeionen  $A^-$ ,  $B^-$  und  $C^-$  zum Zeitpunkt  $t_0$  vor Anlegen des Stroms;  $t_1$ : Anordnung der Ionen nach Mobilität ( $\mu_A > \mu_B > \mu_C$ ) nach Anlegen des Stroms und Erreichen des Gleichgewichtszustandes

Die Gegenionen gewährleisten Elektroneutralität der Zonen und pH-Stabilität [Meissner T; 1998]. Aus diesem Grund können in einem Elektrolytssystem der ITP stets nur Anionen oder nur Kationen getrennt werden. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Anionen untersucht, da es Ziel dieser Arbeit war, die Konzentration von Sulfat zu bestimmen. Deshalb wurde für das Elektrolytssystem ein negativ geladenes Leitelektrolyt-Ion und ein negativ geladener Endelektrolyt gewählt. Die Gegenionen sind demzufolge Kationen.

Ein Charakteristikum der Isotachophorese ist, dass sich nach der Bildung der Zonen alle Ionen in der Kapillare mit derselben Geschwindigkeit bewegen. Daher kommt auch der Name Iso-tacho-phorese, der Wanderung mit gleicher Geschwindigkeit bedeutet. Es gilt:

$$v = \text{konstant} \quad v: \text{Geschwindigkeit}$$

Damit sich die Ionen mit unterschiedlicher Mobilität alle mit der gleichen Geschwindigkeit fortbewegen, ist für jede Ionen-Zone eine unterschiedlich starke treibende Kraft erforderlich. Auf die Teilchen wirken nach Anlegen des Stroms in der Kapillare zwei Kräfte, die Kraft  $F$  des elektrischen Feldes und die Reibungskraft  $F_R$  in einer Flüssigkeit, die dieser entgegen gerichtet ist. Die Kraft  $F$  ist proportional zur Ladung des Teilchens und zur Stärke des elektrischen Feldes.

$$F = Z \cdot e \cdot E \quad (4)$$

Z: Ladungszahl  
E: el. Feldstärke

Die Reibungskraft  $F_R$  wirkt der Kraft  $F$  entgegen. Nach Stokes gilt für kugelförmige Teilchen:

$$F_R = 6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v \quad (5)$$

$\eta$ : Viskosität  
r: Ionenradius  
v: Geschwindigkeit

Aus den beiden Kräften kann die effektive Geschwindigkeit  $v$  berechnet werden, mit der sich das Teilchen im Feld bewegt.

$$v = \frac{Z \cdot e \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad (6)$$

Aus Gleichung 3 und 6 ergibt sich für die Geschwindigkeit eines Ions in der ITP die folgende Beziehung:

$$v = \mu \cdot E \quad (7)$$

Aus Gleichung 7 folgt, dass die Feldstärke  $E$  mit abnehmender Mobilität  $\mu$  ansteigen muss, um die Geschwindigkeit  $v$  in der Kapillare aufrecht zu erhalten. Da sich die Mobilität der Ionen an den Zonengrenzen abrupt ändert, ändert sich an diesen Grenzen auch die elektrische Feldstärke sprunghaft. Diese Änderung der physikalischen Eigenschaften an den Zonengrenzen ermöglicht die Unterscheidung der Ionen in der Isotachophorese.

### **2.2.7.3 Konzentrationsadaptation**

Nach dem mathematischen Prinzip von Kohlrausch findet bei der Trennung der Ionen in diskrete Zonen eine Konzentrationsadaptation statt. Das heißt, Ionen, die in der Probe höher konzentriert sind als der LE werden verdünnt und Ionen mit niedriger Konzentration werden in ihrer Zone konzentriert. Diese Anpassung kommt aufgrund von Diffusionsprozessen in der Kapillare zustande. Infolge des sehr kleinen Probenvolumens von 30  $\mu\text{l}$  im Verhältnis zu dem Volumen der Elektrolyte ist dies möglich, ohne dass die Konzentration von LE und TE verändert wird. Nach Bildung der Zonen hängt die Konzentration eines Ions in seiner Zone nur von der Konzentration der vorangehenden Zone ab. Die Konzentrationsadaptation ist ein Charakteristikum der Isotachophorese und ermöglicht die Quantifizierung der Probenbestandteile [Meissner 1998].

Da sich die Konzentration aller Ionen in der Kapillare an die des LE anpassen, ist die Laufzeit eines Signals, das durch eine bestimmte Ionenart verursacht wird, ein Maß für die ursprüngliche Konzentration dieses Ions in der Probe.

### **2.2.7.4 Prinzip der Zonenschärfung**

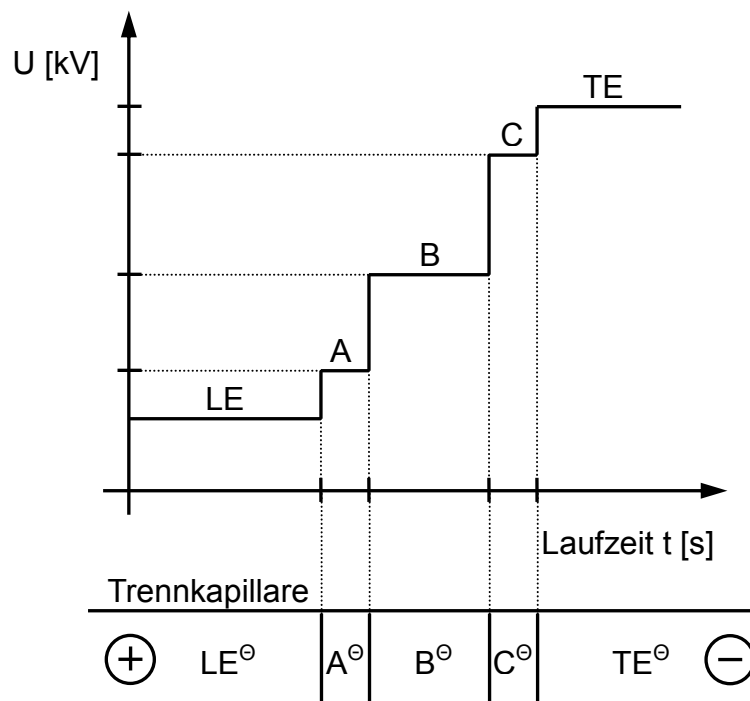
Eine Zone in der ITP enthält immer nur eine einzige Art Ionen aus der Probe und die Gegenionen. Diese exakte Trennung kommt durch die unterschiedliche Mobilität der



Ionen zustande. In jeder Zone wirkt, wie zuvor beschrieben, eine andere elektrische Feldstärke  $E$ . Gelangt ein Ion in die Zone vor der eigenen, ist es umgeben von Ionen höherer Mobilität, das heißt, es wirkt eine geringere elektrische Feldstärke auf diese Zone. Das Ion wird langsamer und fällt in seine Zone zurück. Ist ein Ion hingegen zu langsam und gelangt in die nachfolgende Zone, wird es in dieser nachfolgenden Zone aufgrund der dort herrschenden höheren Feldstärke beschleunigt und gelangt so wiederum in seine eigene Zone zurück.

### 2.2.7.5 Detektion

Die isotachophoretischen Zonen unterscheiden sich in ihren physikalischen Eigenschaften und lassen sich dadurch unterscheiden. Die Auswertung der Proben erfolgt über zwei verschiedene Detektoren, den Leitfähigkeits- und den UV-Detektor.



**Bild 21:** Idealisertes Schaubild einer Auswertung der Ionen A, B und C mit der Isotachophorese und schematische Darstellung der Anordnung der Ionen in der Kapillare nach Bildung der Zonen mit  $\mu_A > \mu_B > \mu_C$  und  $v = \text{konst.}$

## Leitfähigkeitsdetektor

Der Leitfähigkeitsdetektor misst den elektrischen Widerstand in der Kapillare über eine Elektrode. Die Leitfähigkeit  $L$  entspricht dem Kehrwert des Widerstands  $R$ . In der Auswertung der ITP wird jedoch ein Diagramm erstellt, in dem die Spannung in Volt über der Laufzeit in Sekunden aufgetragen wird. Spannung und Leitfähigkeit verhalten sich umgekehrt proportional zueinander.

$$U = R \cdot I \quad \text{mit} \quad I = \text{konst.} \quad (8)$$

L: Leitfähigkeit  
U: Spannung  
R: Widerstand  
I: Stromstärke

Damit gilt  $U \sim R$  und deshalb  $U \sim 1/L$ . An den Zonengrenzen ändert sich der Widerstand und damit auch die Spannung plötzlich und steigt mit jeder Zone an, sodass ein stufenförmiges Schaubild entsteht (**Bild 21**).

## UV-Detektor

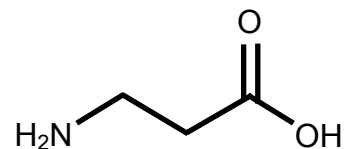
Der UV-Detektor stellt eine zusätzliche Möglichkeit zur Erkennung von Ionen in der Probe dar. Das Messprinzip beruht auf der Absorption von UV-Licht durch einzelne funktionelle Gruppen der Ionen. Durch entsprechende Interferenzfilter lassen sich unterschiedliche, diskrete Wellenlängen im ultravioletten Bereich einstellen, bei dem verwendeten Gerät ItaChrom EA101 auf 254, 280 und 405 nm. Alle Auswertungen dieser Arbeit wurden bei einer Wellenlänge von 254 nm durchgeführt. Moleküle die bei dieser Wellenlänge Licht absorbieren sind Carbonylgruppen, aromatische Ringe, sowie Moleküle, die zwei konjugierte Doppelbindungen bzw. Doppelbindung mit einem freien Elektronenpaar in vicinaler Stellung enthalten.

Im Gegensatz zu dem stufenförmigen Kurvenverlauf, der sich bei Einsatz des Leitfähigkeitsdetektors einstellt, liefert der UV-Detektor bei Absorption des ultravioletten Lichts durch bestimmte Ionen ein annähernd rechteckiges Spannungs-Signal. Zur Bestimmung der Konzentration wird dabei die Breite des Signals auf halber Höhe gemessen.

### 2.2.7.6 Wahl des Elektrolytsystems

Für alle Auswertungen in dieser Arbeit mit der Isotachophorese (ITP) wurde Chlorid als Leitelektrolyt verwendet. Als Gegenion wurde dem Leitelektrolyten  $\beta$ -Alanin zugegeben.  $\beta$ -Alanin wurde in fester Form zu 10 mM HCl gegeben, bis ein pH-Wert von 3,3 erreicht war.

Es hat die Strukturformel:



Zusätzlich enthielt der Leitelektrolyt 1 g/l Methylcellulose, die dazu diente die Viskosität des Leitelektrolyts zu erhöhen und den elektroosmotischen Fluss zu unterdrücken [Danková et al, 2001]. Methylcellulose löst sich nur in kalten Lösungen und wurde daher unter Rühren für 12 Stunden in einem 4 °C-Kühlraum in Lösung gebracht. Anschließend wurde der LE gefiltert und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Es wurden zwei verschiedene Endelektrolyte eingesetzt, 10 mM Capronsäure sowie 5 mM Citronensäure jeweils in H<sub>2</sub>O (Deionat) gelöst.

### 2.2.7.7 Analyse der Proben mit der Isotachophorese

Für die Auswertung von Proben mit der Isotachophorese wurde ein definiertes Probenvolumen von 30  $\mu$ l mit einer 1 ml Spritze im Bereich der Grenzzone zwischen Leit- und Endelektrolyt eingespritzt. Anschließend wurde eine konstante Stromstärke zwischen 50 und 200  $\mu$ A angelegt. Dadurch wanderten die Anionen in der Kapillare mit konstanter Geschwindigkeit. Sie trennten sich nach ihren Mobilitäten in Zonen, die dann nur noch ein einziges Anion enthielten. Diese Zonen passierten den oberen Detektor, der in den Versuchen nicht verwendet wurde und erreichten nach ungefähr 30 bis 50 Minuten den unteren Leitfähigkeitsdetektor (Cond 2 siehe **Tabelle 3**) und anschließend den UV-Detektor. Nachdem der Endelektrolyt die Detektoren erreicht hatte, wurde die Analyse beendet.

### 2.2.7.8 Voreinstellung der Isotachophorese

Verschiedene Voreinstellungen konnten bei der verwendeten Isotachophorese EA 101 gewählt werden. Die Stromstärke  $I$  wurde vorgegeben und beeinflusste die Geschwindigkeit, mit der sich die Ionen in der Kapillare bewegten. Je höher die Stromstärke, desto größer war die Wanderungsgeschwindigkeit. Bei Stufe (Step) 5 (**Tabelle 3**) fand jeweils die Auswertung der Proben statt. Die obere Kapillare wurde nicht zur Auswertung verwendet. Zunächst wurden die Einstellungen der Isotachophorese variiert, um die Analysezeit zu optimieren. **Tabelle 3** zeigt die Einstellungen die sich bewährt hatten und die für alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche verwendet wurden.

**Tabelle 3:** Voreinstellung von Laufzeiten und angelegtem Strom in  $\mu\text{A}$  von Step 1 bis 5, sowie Festlegung in welcher Stufe die Daten gespeichert werden

Step	Method			Data Aqiration			
	Zeit [s]	$I$ [ $\mu\text{A}$ ]	Comp	Column	Cond 1	Cond 2	UV
1	150	100	0	upper	o	o	o
2	150	200	10	upper	o	o	o
3	140	200	0	upper	x	o	o
4	330	50	0	lower	o	o	o
<b>5</b>	<b>2.000 (++)</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>lower</b>	<b>o</b>	<b>x</b>	<b>x</b>

x: Markiert die Stufe in der die Daten des jeweiligen Detektors gespeichert wurden

### 2.2.8 Saure Hydrolyse der Sulfatgruppe von Galaktose-6-sulfat als Model für Galaktocerebrosid-3-sulfat

Die saure Hydrolyse ist eine Spaltung von Verbindungen durch Anlagerung von Wassermolekülen in Gegenwart einer Säure. In den durchgeführten Versuchen wurde die hydrolytische Spaltung der Esterbindungen zwischen Galaktose und Sulfat untersucht. Galaktose-6-sulfat wurde dabei als Model für die Abspaltung des Sulfats von Galaktocerebrosid-3-sulfat verwendet. Galaktose-6-sulfat hat den Vorteil, dass es mit der Isotachophorese nachweisbar ist. Die Sulfatgruppe ist an Galaktose über eine

Esterbindung gebunden, beim Galaktocerebrosid-3-sulfat am C<sub>3</sub>-Atom des Galaktose-Rings und bei Galaktose-6-sulfat am C<sub>6</sub>-Atom. Da durch die saure Hydrolyse die Esterbindung zwischen Sulfat und Zucker unspezifisch gespaltet wird, kann, im Gegensatz zur enzymatischen Bestimmung, jeder Sulfat-Zucker eingesetzt werden und die Ergebnisse sind direkt auf das Galaktocerebrosid-3-sulfat übertragbar.

Da das Galaktocerebrosid-3-sulfat mit der Isotachophorese indirekt über das Sulfat bestimmt wurde, konnte die saure Hydrolyse eventuell eine Alternative zur Sulfatabspaltung mit Hilfe der rekombinanten Arylsulfatase A darstellen. Dadurch würde die Verwendung eines Puffers unnötig, der optimal für die enzymatische Reaktion, aber ungeeignet für die Auswertung mit der Isotachophorese war. Ein Nachteil wäre, dass durch die saure Hydrolyse Sulfat unspezifisch aus allen möglichen sulfathaltigen Verbindungen des Urins freigesetzt werden könnte.

Für die saure Hydrolyse wurde Galaktose-6-sulfat (Gal-6-S) mit verschiedenen Salzsäurekonzentrationen inkubiert. Die Darstellung von Galaktose-6-sulfat war nur im Chlorid-Caprionsäure-Elektrolytssystem möglich, nicht aber wenn Citronensäure als Endelektrolyt verwendet wurde. Die Galaktose-6-sulfat-Lösung wurde mit verschiedenen Salzsäure-Konzentrationen bei 100 °C über Nacht, d.h. für 12 bis 16 Stunden, in 15 cm langen Reagenzgläsern unter dem Abzug erhitzt. Die Reagenzgläser wurden in einen Heizblock gestellt, in den sie ca. 1 cm eintauchten. Sie ragten damit 14 cm über den Heizblock hinaus, sodass die verdampfende Flüssigkeit im oberen Teil des Reagenzglases wieder kondensieren konnte. Verschlossen wurden die Röhrchen mit einem locker aufsitzenden Plastikdeckel, um die Entstehung von Überdruck zu verhindern.

Ansatz: 200 µl Salzsäure (0,2 bzw. 10 mM)  
200 µl Galaktose-6-sulfat-Lösung (2 bzw. 10 mM)

Nach der Inkubation wurden die Proben in Eppendorfcups überführt und eingedampft, wenn hochkonzentrierte 10 mM Salzsäure verwendet wurde. Konzentrationen der Salzsäure von 0,2 mM wurden stattdessen vor der Auswertung mit H<sub>2</sub>O (Deionat) verdünnt. Die Messung der Sulfatkonzentration erfolgte mit der Isotachophorese. Deshalb musste darauf geachtet werden, dass die Chlorid-Konzentration in den Proben nicht zu stark von der des Leitelektrolyts (10 mM Cl<sup>-</sup>) abwich.

### **2.2.9 Bestimmung von Sulfatid im Urin mittels Massenspektrometrie**

Die Massenspektrometrie sollte in dieser Arbeit ergänzend eingesetzt werden. Nur die Aufarbeitung der Proben nach Kap. **2.2.9.1** wurde in Eigenarbeit durchgeführt. Die Analyse der Proben und die Auswertung sollen zu einem späteren Zeitpunkt von Herrn PD Dr. Dr. Bernhard freundlicherweise im Hertie-Institut in Tübingen vorgenommen werden.

Bei der Massenspektrometrie handelt es sich um eine Methode, mit der Teilchen nach dem Verhältnis ihrer Masse ( $m$ ) zu ihrer Ladung ( $q$ ) differenziert werden können. Die Ladung des zu untersuchenden Moleküls muss dabei bekannt sein. Der Quotient  $m/q$  hat die Einheit Thomson (Th). Je größer die Masse eines Moleküls ist, desto größer ist die Variationsbreite der Zusammensetzung des Moleküls.

Das Massenspektrometer besteht aus einem Ionisator, einem Analysator und einem Detektor. Der Ionisator überträgt durch Ionen-Stoß-Ionisation Energie auf das Molekül und überführt es dadurch in einen ionisierten Zustand. Durch diese Ionisation zerfällt ein Teil der Moleküle in meist vorhersehbare Fragmente, die bei der quantitativen Auswertung berücksichtigt werden müssen. Der Anteil der fragmentierten Moleküle ist abhängig von der für die Ionisation zugeführten Energie. In einem Analysator werden die ionisierten Fragmente in einem elektrischen Feld beschleunigt und in einem Wechselfeld nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/q$ ) selektiert. Durch das Anlegen unterschiedlicher Spannungen erreichen immer nur Ionen mit demselben Masse-zu-Ladungs-Verhältnis den Detektor, der den Ionenstrom misst. Dieser Ionenstrom wird mit Hilfe einer Software in eine Zählrate umgerechnet.

#### **2.2.9.1 Urinaufarbeitung für die Massenspektrometrie**

Die Urinproben für die Massenspektrometrie wurden in Anlehnung an die Methode von Bligh & Dyer (1959) hergestellt. Aufgearbeitet wurden je zwei Urinproben eines gesunden Probanden und zwei eines Patienten mit MLD. Je einer der beiden Proben von Patient und Proband wurde ein Sulfatid-Standard mit 5 nmol N-palmitoyl-Sulfatid (16:0-Sulfatid) und 2 nmol Phosphatidylcholin (PC 20:0 / 20:0) zugegeben. Dieser wird eingesetzt um die Sulfatidkonzentration der Proben quantifizieren zu können.

gesunder Proband: Ansatz 1: 4 ml Urin, keine weiteren Zugaben  
Ansatz 2: 4 ml Urin + 16:0-Sulfatid (5 nmol, 3,89 µg)  
+ PC 20:0 / 20:0 (2 nmol)

MLD-Patient: Ansatz 3: 4 ml Urin, keine weiteren Zugaben  
Ansatz 4: 4 ml Urin + 16:0-Sulfatid (5 nmol, 3,89 µg)  
+ PC 20:0 / 20:0 (2 nmol)

Je Ansatz wurden 4 ml Urin in ein spezielles, Methanol-gereinigtes Glasröhrchen mit Schraubverschluss (Teflonseptum, 35 ml) gegeben. Zu jeder Probe wurden 12 ml Methanol und 4 ml Chloroform zugegeben. Die Röhrchen wurden geschüttelt, geschwenkt und 15 Minuten zur Phasentrennung im Kühlschrank stehen gelassen. Anschließend wurden die Proben nochmals gemischt und jeder Probe wurden 8 ml H<sub>2</sub>O (Deionat) und 8 ml Chloroform zugegeben. Die fest verschlossenen Glasröhrchen wurden eine Minute lang kräftig in horizontaler Lage geschüttelt und 15 min bei 788 g zentrifugiert. Danach war eine Phasentrennung in eine wässrige Phase aus H<sub>2</sub>O und Methanol (ca. 24 ml) und eine lipophile Unterphase die das Chloroform (ca. 12 ml) enthielt erkennbar. Die Oberphase wurde abgesaugt und der letzte Rest der Oberphase mit einer Pasteurpipette abgenommen. In der Pasteurpipette fand eine Phasentrennung statt, weshalb der abgenommene Teil der Unterphase wieder zu der Probe zurückgeführt werden konnte. Anschließend wurden den Proben nochmals je 12 ml Methanol und 12 ml H<sub>2</sub>O (Deionat) zugegeben und die Entfernung der Oberphase wurde wiederholt. Diese Aufarbeitung diente der Entfernung der im Urin enthaltenen Salze aus der Probe, die die Massenspektrometrie beeinträchtigen. Die gesamte Unterphase wurde anschließend bei 40° C unter Stickstoffbegasung auf ca. 5 ml eingeeengt und bis zur Auswertung bei –80°C eingefroren.





## Kapitel 3

### Ergebnisse

#### 3.1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, die Galaktocerebrosid-3-sulfat-Konzentration im menschlichen Urin zu bestimmen. Dieses so bezeichnete Sulfatid ist bei Patienten mit Metachromatischer Leukodystrophie (MLD) im Urin um ein Vielfaches (ca. 30 - 40fach) gegenüber Gesunden erhöht [K. Harzer – persönliche Kommunikation] und wird meist semiquantitativ mit der Dünnschichtchromatographie bestimmt. Könnte man eine reproduzierbare Methode entwickeln, das Sulfatid im Urin quantitativ zu bestimmen, wäre damit ein wichtiger Laborwert zur Diagnose geschaffen und eine Methode mit der eventuell Verlaufskontrollen bei Patienten mit MLD durchgeführt werden könnten. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, mit Hilfe der analytischen Isotachophorese eine quantitative Bestimmungsmethode für Sulfatid im Urin zu entwickeln. Die Isotachophorese ist zur Analyse von Anionen gut geeignet, das Galaktocerebrosid-3-sulfat ist aber durch die beiden Fettsäuren vorwiegend lipophil. Das macht eine Auswertung in dem hydrophilen Elektrolytssystem unmöglich. Das Galaktocerebrosid-3-sulfat hat zwar einen großen lipophilen Anteil, es besitzt jedoch eine geladene Sulfatgruppe. Freies Sulfat eignet sich gut für die Analyse mit der Isotachophorese, da dieses Ion einen kleinen Durchmesser hat und zweifach negativ geladen ist. Daher wurde versucht  $\text{SO}_4^{2-}$  aus Sulfatid quantitativ freizusetzen. Dieses abgespaltene Sulfat ermöglicht einen indirekten Nachweis des Sulfatids. Die Sulfatgruppe kann vom Galaktocerebrosid-3-sulfat mit der Arylsulfatase A (ASA) abgespalten werden. Dies entspricht dem natürlichen Abbauvorgang von Sulfatid. Die Arylsulfatase A spaltet das Galaktocerebrosid-3-sulfat unter Anlagerung eines Wassermoleküls zu Sulfat und Galaktocerebrosid (siehe Schema Kap. 2.2.6.2).

Zunächst wurde in dieser Arbeit die rekombinante Arylsulfatase A (rhASA) genauer untersucht. Dazu wurden Versuche mit einem künstlich hergestellten Substrat der Arylsulfatase A, dem para-Nitrocatecholsulfat (pNCS), durchgeführt. Para-Nitrocatecholsulfat wird routinemäßig in einem photometrischen Test zur Diagnosesicherung bei Verdacht auf Metachromatische Leukodystrophie eingesetzt [Philippart, 1996].

Um die Sulfatabspaltung von Galaktocerebrosid-3-sulfat durch die rhASA sichtbar zu machen wurde die Dünnschichtchromatographie verwendet. Das Galaktocerebrosid-3-sulfat sowie dessen Abbauprodukt, das Galaktocerebrosid, sind als unterschiedliche Banden auf Kieselgel-Platten abgrenzbar (siehe Kap. 2.2.6.3). Um von der gemessenen Sulfatkonzentration auf die Sulfatidkonzentration im Urin schließen zu können, musste ein nahezu hundertprozentiger Umsatz des Sulfatids durch die rhASA angestrebt werden. Um dies zu erreichen wurde als erstes die dafür erforderliche Enzymkonzentration ermittelt. Abschließend wurde das von Galaktocerebrosid-3-sulfat abgespaltene Sulfat mit der Isotachophorese bestimmt. Dafür musste der Inkubations-Puffer für die Sulfatabspaltung an die Bedingungen der Isotachophorese angepasst und das Elektrolytssystem der Isotachophorese für die Sulfatdetektion optimiert werden. Problematisch war, dass der menschliche Urin selbst anorganisches Sulfat enthält, das durch eine geeignete Aufarbeitung zuvor vollständig aus den Proben entfernt werden musste, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden.

## 3.2 Photometrie

Um die Aktivität der rekombinanten Arylsulfatase A (rhASA) beurteilen zu können, wurde diese mit der körpereigenen Arylsulfatase A verglichen. Zum Vergleich der beiden Enzyme wurde die in Kap. 2.2.5.3 beschriebene Methode zur Bestimmung der Aktivität der Arylsulfatase A verwendet.

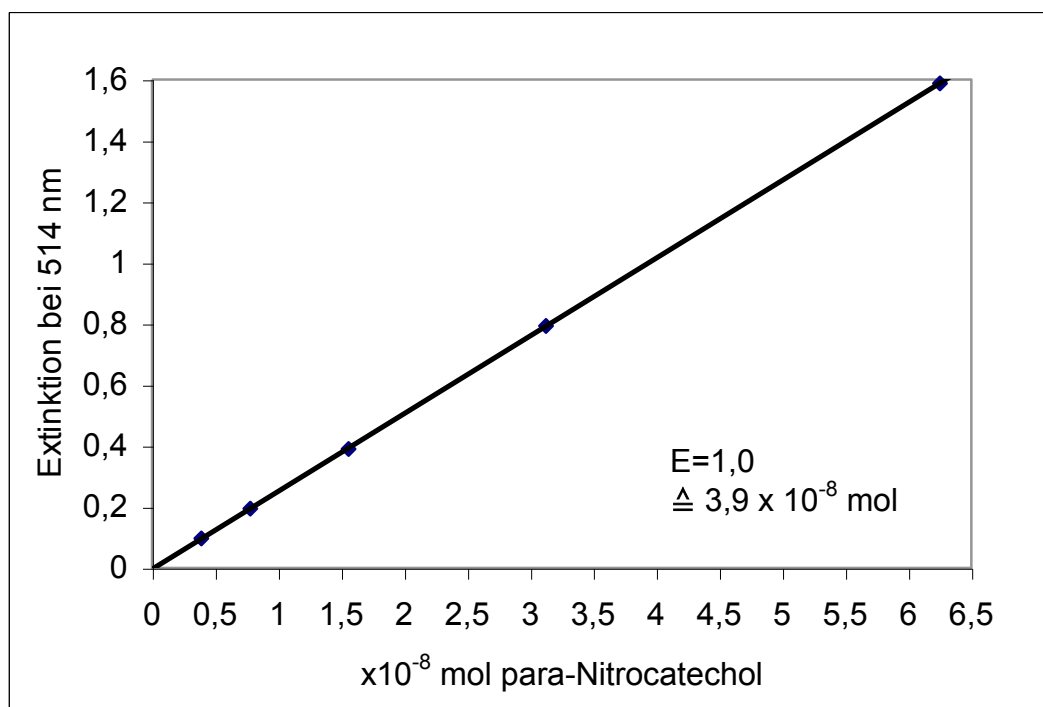
### 3.2.1 Kalibrierkurve für para-Nitrocatechol

Um aus den gemessenen Extinktionswerten nach Inkubation von para-Nitrocatecholsulfat mit der ASA den Umsatz berechnen zu können wurde zunächst, wie in Kapitel

**2.2.5.5** beschrieben, eine Kalibrierkurve für das bei der Reaktion entstandene para-Nitrocatechol erstellt. Dazu wurde eine 10 mM pNC-Lösung hergestellt, die Extinktion verschiedener Verdünnungen dieser pNC-Lösung nach der Überführung in die Chinon-Form mittels NaOH gemessen und über der Konzentration in einem Diagramm aufgetragen.

Ergebnis:

Die pNC-Kalibrierkurve, in der der bei 514 nm gemessene Extinktionswert in Abhängigkeit von der para-Nitrocatechol-Konzentration aufgetragen wurde, zeigte in dem photometrisch gut auswertbaren Bereich, (F bis J – **Tabelle 4**), einen linearen Verlauf (**Bild 22**).



**Bild 22:** Photometrisch bestimmte Kalibrierkurve für para-Nitrocatechol nach dessen Umwandlung zum Chinon durch Zugabe von NaOH

Der Extinktionswert  $\Delta E = 1,0$  entsprach einer para-Nitrocatechol-Konzentration von  $3,9 \times 10^{-8}$  Molen. Daraus ließ sich der Umsatz wie folgt berechnen (Gleichung 9):

$$\text{Umsatz} [\%] = \frac{\Delta E \times VF \times 0,39 \times 10^{-8} \text{ mol}}{200 \times 10^{-8} \text{ mol}} \times 100 \quad (9)$$

Die Extinktion  $\Delta E$  wurde mit  $0,39 \times 10^{-8}$  multipliziert, um die umgesetzte pNCS-Konzentration in  $10^{-8}$  mol zu erhalten. Da ein Umsatz von 100% einer pNC-Konzentration von  $200 \times 10^{-8}$  Molen entsprach, wurde das Ergebnis durch  $200 \times 10^{-8}$  dividiert. Die Multiplikation mit Faktor 100 lieferte den Umsatz in Prozent (vergleiche **Bild 22**).

**Tabelle 4:** Kalibrierkurve von pNC mit zugehörigen Extinktionswerten  $\Delta E$ , den Molen pro 200  $\mu$ l und dem errechneten Umsatz von pNCS bezogen auf einen Standard-Ansatz

	Verdünnung der pNC-Lösung mit Natriumazetat-Puffer	c (pNC) [ $\mu$ M]	Extinktion $\Delta E$	$\times 10^{-8}$ Mole / 200 $\mu$ l	„Umsatz“ [%]
A	pNC-Lösung 10 mM	10.000		200	100
B	1 Teil A + 1 Teil Puffer	5.000	3,9985	100	50
C	1 Teil B + 1 Teil Puffer	2.500	3,9921	50	25
D	1 Teil C + 1 Teil Puffer	1.250	3,8690	25	12,5
E	1 Teil D + 1 Teil Puffer	625	3,1297	12,5	6,25
F	1 Teil E + 1 Teil Puffer	312,5	1,5877	6,25	3,125
G	1 Teil F + 1 Teil Puffer	156	0,7929	3,125	1,56
H	1 Teil G + 1 Teil Puffer	78	0,3893	1,56	0,78
I	1 Teil H + 1 Teil Puffer	39	0,1938	0,78	0,389
J	1 Teil I + 1 Teil Puffer	20	0,0968	0,39	0,194

F - J: Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz (siehe Kap. **2.2.5.1**) gut auswertbarer Bereich

### 3.2.2 Einfluss der Verdünnung der Proben auf den Extinktionswert

Die Extinktion des para-Nitrocatechols konnte nur in geringer Konzentration direkt photometrisch gemessen werden. Nur bei Extinktionswerten, die zwischen 0 und 2 lagen, bestand ein proportionaler Zusammenhang zwischen Extinktionswert und Konzentration der absorbierenden Substanz in der Probe. Ein Extinktionswert von 0 bis 2 entsprach einem Umsatz von 0 bis ca. 4% des para-Nitrocatecholsulfats in dem normalerweise verwendeten Reaktionsansatz (10 mM).

Da in vielen Versuchen ein deutlich höherer Umsatz erreicht wurde, mussten die Proben bei einem Extinktionswert über 2 nach der Zugabe von NaOH nochmals verdünnt werden.

Dazu war folgendes Schema verwendet worden:

Extinktionswert	2 – 2,5	Verdünnung	1:1
	2,5 – 3		1:5
	> 3		1:10 bis 1:500

Dass die Verdünnung einer Probe den errechneten Umsatz nicht veränderten, soll anhand eines Beispiels gezeigt werden. Dazu wurde eine Probe mit para-Nitrocatechol um verschiedene Faktoren mit pNCS-Puffer vor der Auswertung verdünnt. Die gemessenen Extinktionswerte wurden anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und die Ergebnisse tabellarisch mit Mittelwert und Standardabweichung in **Tabelle 5** dargestellt.

**Tabelle 5:** Beispiel für die Reliabilität der nachträglichen Verdünnung einer Probe vor Auswertung um 1:50 bis 1:500 (Probe: Inkubation von pNCS mit rhASA 1:50 verdünnt für 2 Stunden bei 37 °C im Wasserbad)

Extinktion $\Delta E$	Verdünnungsfaktor (VF)	$\Delta E \times VF$	Umsatz [%]
0,8506	50	42,53	82,93
0,4129	100	41,29	80,52
0,2139	200	42,78	83,42
0,0863	500	41,80	81,51
<b>Mittelwert</b>		<b>42,1</b> ( $\pm 0,68$ ; n=4)	<b>82,01</b> ( $\pm 1,33$ ; n=4)

### 3.2.3 Umsatz von pNCS nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen der rhASA

Die Aktivität der verwendeten rhASA wurde vom Hersteller mit 148 U/l angegeben. Um zu ermitteln, mit welcher Konzentration der rhASA ein Umsatz erreichbar war,

der dem Umsatz der körpereigenen Arylsulfatase A aus  $5 \times 10^5$  Leukozyten unter gleichen Inkubationsbedingungen entsprach, wurde eine Verdünnungsreihe der rhASA (148 U/l) nach Kap. **2.2.5.4** erstellt.

Einem Ansatz wurde als Leerwert statt 10  $\mu$ l rhASA H<sub>2</sub>O zugegeben. Die Extinktion des Leerwerts wurde von den Extinktionswerten, der mit der rhASA inkubierten Proben subtrahiert. Zum Vergleich wurde eine Probe mit Enzymextrakt aus Leukozyten mitgeführt.

Versuchsbedingungen:

Ansatz:	50 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
	200 $\mu$ l 10 mM pNCS-Lösung
	10 $\mu$ l rhASA *
Ansatz (Leukozyten):	50 $\mu$ l Enzymextrakt (aus $5 \times 10^5$ Leukozyten)
	200 $\mu$ l pNCS-Lösung
	10 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
Inkubationszeit:	48 Stunden
Inkubationstemperatur:	4 °C
Reaktionsende:	Zugabe von 260 $\mu$ l 0,5 M Natronlauge

\* Verdünnungsstufen der ASA:  $c_1 = 1:10$ ;  $c_2 = 1:100$ ;  $c_3 = 1:500$ ;  $c_4 = 1:1.000$ ;  $c_5 = 1:2.500$ ;  $c_6 = 1:5.000$ ;  $c_7 = 1:7.500$ ;  $c_8 = 1:10.000$  (Konzentrationen siehe **Tabelle 6**)

Ergebnis:

Je höher die Konzentration an rekombinanter Arylsulfatase A in der Probe war, desto höher war erwartungsgemäß der Umsatz an para-Nitrocatecholsulfat (**Tabelle 6**). Die Konzentration der endogenen Arylsulfatase A aus dem Enzymextrakt von  $5 \times 10^5$  Leukozyten eines gesunden Probanden entsprach einer Aktivität der rekombinant hergestellten Arylsulfatase A von etwa 1,6  $\mu$ U.

**Tabelle 6:** Extinktionswerte  $\Delta E$  von pNC nach Umsatz von pNCS durch rhASA in verschiedenen Verdünnungen und endogene ASA aus Leukozyten, Inkubation 48 h bei 4 °C

Konzentration der rhASA [ $\mu\text{U}/\text{Ansatz}$ ]	Verdünnungsstufe der rhASA	$\Delta E$	Umsatz (pNCS) [%]
C <sub>1</sub> 148,000	1:10	4,1602	*
C <sub>2</sub> 14,800	1:100	4,1603	*
C <sub>3</sub> 2,960	1:500	1,8508	3,61
C <sub>4</sub> 1,480	1:1.000	0,7124	1,39
C <sub>5</sub> 0,592	1:2.500	0,2788	0,54
C <sub>6</sub> 0,296	1:5.000	0,1409	0,27
C <sub>7</sub> 0,197	1:7.500	0,0961	0,19
C <sub>8</sub> 0,148	1:10.000	0,0919	0,18
Enzymextrakt	entspr. rhASA-Konzentration	$\Delta E$	Umsatz (pNCS) [%]
$5 \times 10^5$ Zellen	$\sim 1,6 \mu\text{U}$	0,7881	1,54

\* nicht auswertbar, da nur Extinktionswerte zwischen 0 und 2 auswertbar sind

### 3.2.4 Aktivität der rhASA in Gegenwart verschiedener Inkubationszusätze

Die Arylsulfatase A kommt im menschlichen Körper intrazellulär in den Lysosomen vor. Verschiedene Substanzen könnten in den Lysosomen der Arylsulfatase A als Effektoren, also Aktivatoren oder Inhibitoren, dienen. Inwiefern sich lipophile Zellbestandteile bzw. Albumin auf die Aktivität der rhASA auswirkten, sollte in diesem Versuch untersucht werden. Dazu wurden parallel drei Versuchsreihen mit drei Inkubationszusätzen unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Als Inkubationszusätze wurden H<sub>2</sub>O (Deionat), Albumin und Enzymextrakt aus Leukozyten verwendet. In den drei Versuchsreihen wurden je sieben verschiedene Konzentrationen der rhASA eingesetzt. Die Verdünnungsstufen der rhASA wurden wie in Kap. 2.2.5.4 beschrieben hergestellt. Für jeden Inkubationszusatz wurde ein Ansatz mit 10  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O statt rhASA als Leerwert mitgeführt. Die Auswertung erfolgte durch photometrische Bestimmung der Konzentration von para-Nitrocatechol nach Inkubation der Proben.

Versuchsbedingungen:

Inkubationszusätze:	1. H <sub>2</sub> O 2. Albuminlösung (2 mg/ml) 3. Enzymextrakt aus 5x10 <sup>5</sup> Leukozyten
Ansatz:	50 µl Inkubationszusatz 200 µl 10 mM pNCS-Lösung 10 µl rhASA 1:500 - 1:10.000 verdünnt (2960 – 148 nU/l)
Inkubationszeit:	48 Stunden
Inkubationstemperatur:	4 °C
Reaktionsende:	Zugabe von 260 µl 0,5 M Natronlauge

Ergebnis:

In allen drei Versuchsreihen wurde umso mehr para-Nitrocatecholsulfat von der rhASA umgesetzt, je höher die Konzentration der rhASA war (**Bild 23**). Vergleicht man die Inkubationszusätze untereinander, wurde in dem Ansatz mit H<sub>2</sub>O bei derselben Verdünnungsstufe der rhASA am wenigsten pNCS abgebaut. Der Umsatz mit Albuminlösung lag deutlich höher als mit H<sub>2</sub>O, aber deutlich unter dem in Enzymextrakt. Der Vorteil von Enzymextrakt als Inkubationszusatz wurde besonders bei den kleinsten gewählten Konzentrationen deutlich. Bei Verwendung von 1:5.000 bis 1:10.000 verdünnter rhASA wurden unter 1% des pNCS umgesetzt. Im Gegensatz dazu wurde in Enzymextrakt ein ca. 4 - 8,5%iger Umsatz, abzüglich des Leerwertes, erreicht.

Nur bei der Verwendung von Enzymextrakt als Inkubationszusatz wurde ein Umsatz in der Leerwert-Probe gemessen. Der Grund dafür ist, dass die Arylsulfatase A der Leukozyten selbst einen Teil des pNCS umsetzt. Daher wurde in jedem Ansatz der Enzymextrakt enthielt, ein Teil des Umsatzes (ca. 4%) von der endogenen ASA erbacht. Selbst abzüglich des maximalen Wertes für den Umsatz durch die endogene ASA wurden aber, bei Verwendung derselben ASA-Konzentration, höhere Extinktionswerte als in Albuminlösung gemessen. Daraus lässt sich schließen, dass das Enzymextrakt mit den Zellbestandteilen der Leukozyten die geeignetsten Umgebungsbedingungen für den Zugang der rhASA zum Substrat darstellte.

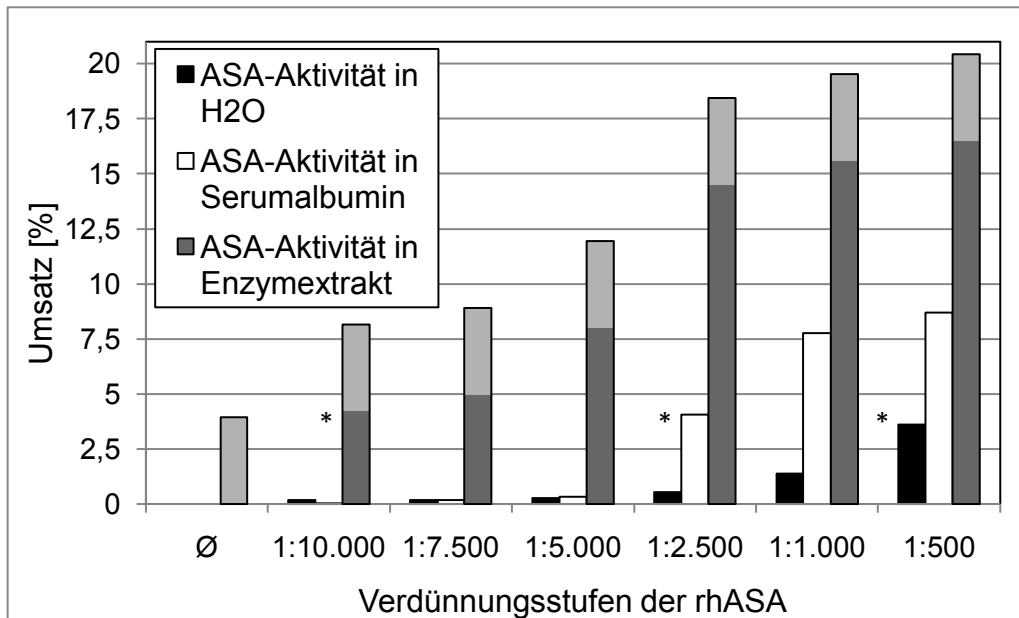


Ein mittlerer Extinktionswert von ca. 2 (ca. 4% Umsatz) wurde in Gegenwart verschiedener Inkubationszusätze (H<sub>2</sub>O, Albuminlösung und Enzymextrakt) durch unterschiedliche Konzentrationen der rhASA erreicht (vergleiche **Bild 23**):

\*c (rhASA<sub>H<sub>2</sub>O</sub>) = 1 : 500

\*c (rhASA<sub>Albumin</sub>) = 1 : 2.500

\*c (rhASA<sub>Enzymextrakt</sub>) = 1 : 10.000



**Bild 23:** Aktivität von verschiedenen Konzentrationen rhASA mit H<sub>2</sub>O, Albuminlösung und Enzymextrakt als Inkubationslösung nach Inkubation für 48 h bei 4 °C

\* markiert einen Umsatz von ca. 4% in den unterschiedlichen Inkubationszusätzen  
 ■ markiert den Umsatz (4%), der in dem Ansatz mit Enzymextrakt durch die endogene ASA erbracht wird

### 3.2.5 Aktivität der rhASA in Gegenwart von Serum und Heparin-Plasma

Die rekombinante Arylsulfatase A wird bei ausgewählten Patienten mit MLD im Rahmen einer Studie versuchsweise als Enzyersatztherapie eingesetzt. Das Enzym wird dabei intravenös appliziert und liegt deshalb zunächst extrazellulär im Blut vor. In diesem Versuch sollte herausgefunden werden, wie sich die Anwesenheit von Serum und dem noch die Gerinnungsfaktoren enthaltenden Blutplasma als Inkubationszusatz auf die Aktivität der rhASA auswirkt. Serum und Heparin-Plasma wurden aus

dem menschlichen Blut gesunder Probanden gewonnen und jeweils im Verhältnis 1:1 mit D-PBS verdünnt.

#### Versuchsbedingungen:

Ansatz: 50 µl 50%iges Serum bzw. 50%iges Plasma  
 200 µl 10 mM pNCS-Lösung  
 10 µl rhASA 1:500 bzw. 1:1000

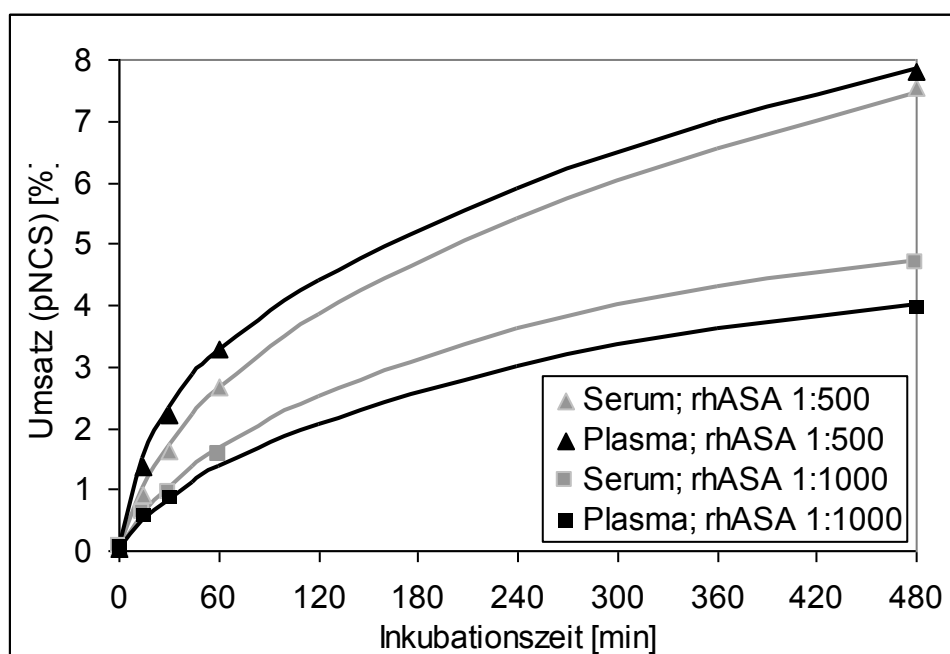
Inkubationszeit:  $t_0 = 0$  min;  $t_1 = 15$  min;  $t_2 = 30$  min;  $t_3 = 60$  min;  $t_4 = 480$  min

Inkubationstemperatur: 37 °C

Reaktionsende: Zugabe von 260 µl 0,5 M Natronlauge

#### Ergebnis:

Der Umsatz von pNCS ist in einem Diagramm über der Inkubationszeit aufgetragen. Sowohl mit Blut-Plasma als auch mit Serum als Inkubationszusatz wurde ein ähnlich hoher Umsatz des pNCS erreicht (**Bild 24**). Bei doppelter Konzentration der rhASA (Verdünnung 1:500) wurde sowohl in Serum als auch in Blut-Plasma pro Zeiteinheit ungefähr doppelt so viel para-Nitrocatecholsulfat umgesetzt wie im Ansatz mit 1:1000 verdünnter rhASA.



**Bild 24:** Inkubation der rhASA mit pNCS in Gegenwart von Serum bzw. Heparin-Plasma bei 37 °C für verschiedene Inkubationszeiten

### 3.2.6 Zusammenfassung – Umsatz von pNCS durch rhASA

Die rekombinante Arylsulfatase A war wie die körpereigene Arylsulfatase A in der Lage die Sulfatgruppe von para-Nitrocatecholsulfat abzuspalten. Eine 1:1.000 Verdünnung der rhASA-Stammlösung war dabei ausreichend um etwa denselben Umsatz von pNCS mit H<sub>2</sub>O als Inkubationszusatz zu erreichen, wie die endogene ASA aus 5x10<sup>5</sup> Leukozyten. Diese Verdünnungsstufe der rhASA entsprach einer Aktivität von 1,48 µU/Ansatz. Wurde Enzymextrakt als Inkubationszusatz für den Umsatz von pNCS durch die rhASA verwendet, war sogar eine Konzentration der rhASA von 0,148 µU/Ansatz ausreichend um einen mit der endogenen ASA vergleichbaren Umsatz zu erhalten.

Mit Albuminlösung und Enzymextrakt aus Leukozyten als Inkubationszusatz wurde bei derselben Verdünnungsstufe der rhASA ein deutlich höherer Umsatz von pNCS erreicht als in Gegenwart von H<sub>2</sub>O. Enzymextrakt war der Albuminlösung bei dem Umsatz von pNCS überlegen, auch abzüglich des durch die endogene ASA erbrachten Umsatzes (4 °C, 48h). In Serum und Plasma als Inkubationszusatz wurde unter denselben Inkubationsbedingungen etwa gleich viel pNCS umgesetzt (37 °C Messung). Der Vergleich der beiden rhASA-Konzentrationen zeigte, dass durch die 1:500 verdünnte rhASA im Vergleich zur 1:1000 verdünnten rhASA pro Zeiteinheit ein ungefähr doppelt so hoher Umsatz von pNCS erreicht wurde.

### 3.2.7 Optimierung des Umsatzes von para-Nitrocatecholsulfat

Im Hinblick auf das Ziel, Galaktocerebrosid-3-sulfat über seine abgespaltene Sulfatgruppe mit der Isotachophorese nachzuweisen, musste ein nahezu hundertprozentiger Umsatz des Galaktocerebrosid-3-sulfats erreicht werden.

Ziel dieses Versuches war deshalb, die Bedingungen für einen möglichst vollständigen Umsatz zu ermitteln. Para-Nitrocatecholsulfat wurde primär als Modells substrat verwendet. Dazu sollte in diesem Experiment die Verdünnungsstufe der rhASA ermittelt werden, die für einen hundertprozentigen Umsatz des pNCS erforderlich war. Die ermittelte Konzentration der rhASA könnte dann als Basis für die Entwicklung eines Ansatzes zur Umsetzung des Sulfatids dienen. Als Inkubationszusatz wurde H<sub>2</sub>O

gewählt, um möglichst wenig störende Komponenten im Hinblick auf die nachfolgenden Experimente mit der ITP zu verwenden.

#### Versuchsbedingungen:

Ansatz: 40 µl H<sub>2</sub>O  
 200 µl 10 mM pNCS-Lösung  
 10 µl rhASA in verschiedenen Verdünnungen:  
 $c_1 = 1:1.000$ ;  $c_2 = 1:500$ ;  $c_3 = 1:100$ ;  $c_4 = 1:50$ ;  $c_5 = 1:25$

Inkubationszeit: 60 bzw. 120 Minuten  
 Inkubationstemperatur: 37 °C  
 Reaktionsende: Verdünnen der Proben jeweils in vier Verdünnungsstufen von 1:25 bis 1:1.000  
 Zugabe von 250 µl 0,5 M Natronlauge

#### Ergebnis:

Für die Messung der Extinktionswerte der Proben mittels Photometer war vor Auswertung eine Verdünnung der Proben von mindestens 1:50 erforderlich. Verdünnt wurde mit 10 mM pNCS-Lösung und H<sub>2</sub>O im Verhältnis 4:1. Alle Extinktionswerte wurden deshalb zur Berechnung des Umsatzes mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und der Umsatz nach Gleichung 9 berechnet. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 7** dargestellt.

**Tabelle 7:** Ergebnisse des Umsatzes von para-Nitrocatecholsulfat nach Inkubation von 1 bzw. 2 Stunden bei 37 °C mit verschiedenen Konzentrationen der rhASA

Inkubation 1 h bei 37 °C		Inkubation 2 h bei 37 °C	
Verdünnungsstufe der rhASA	Umsatz [%]	Verdünnungsstufe der rhASA	Umsatz [%]
1:25	86,52	1:25	95,85
1:50	55,41	1:50	82,10
1:100	41,32		
1:500	1,71		
1:1.000	1,50		

Nach Inkubation des para-Nitrocatecholsulfats für zwei Stunden bei 37 °C im Wasserbad, wurde bei Verwendung von rhASA in der Verdünnung 1:25 mit 95,9% ein nahezu vollständiger Umsatz erreicht.

### 3.2.8 Enzymkinetik der rekombinanten Arylsulfatase A

Um die Kinetik der Abspaltung des Sulfats von pNCS durch die rhASA zu charakterisieren, wurde para-Nitrocatecholsulfat für acht verschiedene Inkubationszeiten zwischen 5 und 120 Minuten mit rhASA inkubiert. Dazu wurden zwei mal acht gleiche Ansätze erstellt. Die Inkubation wurde mit zwei verschiedenen Verdünnungen der rhASA durchgeführt. Verwendet wurden die zwei Verdünnungsstufen 1:10 und 1:25 der rhASA-Stammlösung. Für beide Versuchsreihen gemeinsam wurde ein Ansatz mit H<sub>2</sub>O statt rhASA mitgeführt.

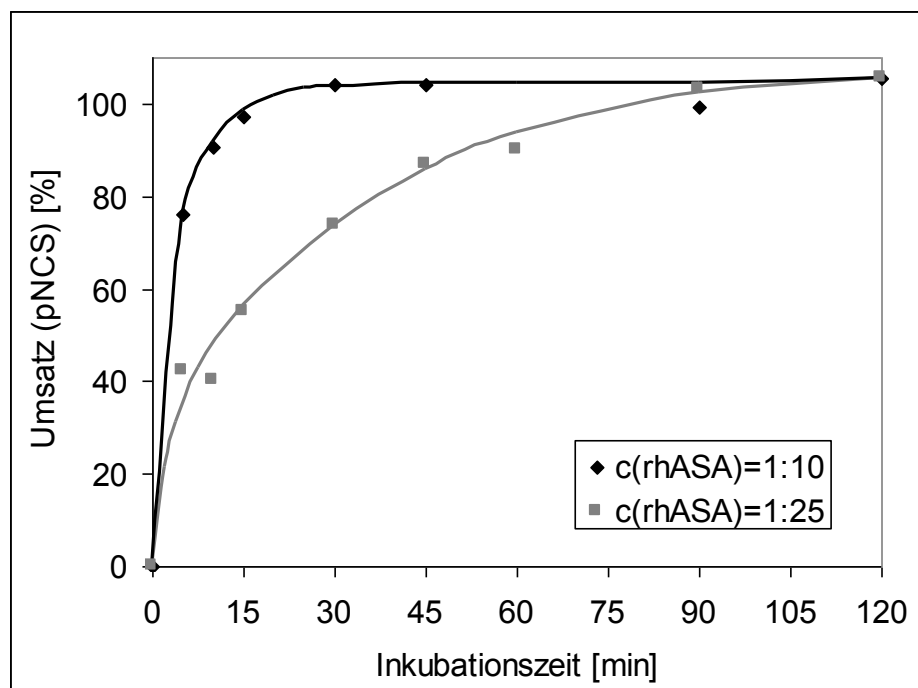
#### Versuchsbedingungen:

Ansatz:	40 µl H <sub>2</sub> O 200 µl 10 mM pNCS-Lösung 10 µl rhASA in der Verdünnung 1:10 bzw. 1:25
Inkubationszeit:	t <sub>1</sub> = 5 min; t <sub>2</sub> = 10 min; t <sub>3</sub> = 15 min; t <sub>4</sub> = 30 min; t <sub>5</sub> = 45 min; t <sub>6</sub> = 60 min; t <sub>7</sub> = 90 min; t <sub>8</sub> = 120 min
Inkubationstemperatur:	37 °C
Reaktionsende:	Sofortiges Verdünnen der Proben um 1:50 mit pNCS-Lösung und H <sub>2</sub> O im Verhältnis 4:1 Anschließend Zugabe von 0,5 M Natronlauge

#### Ergebnis:

Der Umsatz des pNCS wurde aus den Extinktionswerten nach Gleichung 9 berechnet und in einem Diagramm über der Inkubationszeit aufgetragen. Zur Berechnung des Umsatzes wurden alle Extinktionswerte mit dem Verdünnungsfaktor (VF = 50) multipliziert, da vor der photometrischen Messung alle Proben 1:50 verdünnt worden waren.

Die Kurven beider Versuchsreihen mit den beiden Verdünnungsstufen der rhASA zeigten einen raschen Anstieg des Umsatzes von para-Nitrocatecholsulfat in den ersten 15 bzw. 45 Minuten (**Bild 25**). In der Kurve der Versuchsreihe mit 1:10 verdünnter rhASA war der Anstieg deutlich steiler. Beide Kurven unterlagen einer Sättigung und näherten sich asymptotisch einem Umsatz von 100% an. Ein hundertprozentiger Umsatz wurde bei der höher konzentrierten rekombinanten Arylsulfatase A, also bei der Verdünnung von 1:10, bereits nach 30 Minuten erreicht, bei einer Verdünnung von 1:25 nach 1,5 Stunden.



**Bild 25:** Umsatz von pNCS nach Inkubation mit rhASA in zwei Verdünnungsstufen (1:10 und 1:25) für verschiedene Inkubationszeiten bei 37 °C

### 3.2.9 Stabilität der rhASA in Heparin-Plasma und Heparin-Vollblut

Damit die rekombinante Arylsulfatase A nach intravenöser Applikation ihren Einsatzort erreichen und dort von den Körperzellen aufgenommen werden kann, ist es wichtig, dass sie im Blut über längere Zeit funktionsfähig bleibt. Das bedeutet, sie sollte weder von Blutzellen aufgenommen, noch durch proteolytische Enzyme abgebaut werden.

Um die Stabilität der rhASA im Blut zu untersuchen, wurde 1:500 verdünnte rhASA in Heparin-Vollblut für 5 Minuten bis 12 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde diese nach unterschiedlichen Inkubationszeiten aus der Blutprobe entnommene rhASA mit pNCS-Lösung inkubiert um herauszufinden, wie viel pNCS sie noch zu pNC umsetzen konnte. Um entscheiden zu können, ob es sich bei Aktivitätsverlust der rhASA um eine Aufnahme in die Blutzellen oder um einen proteolytischen Abbau des Enzyms handelte, wurde parallel dazu eine Versuchsreihe mit 1:500 verdünnter rhASA in zellfreiem Heparin-Plasma unter denselben Bedingungen mitgeführt. Verliefen beide Kurven parallel zueinander, spräche das für einen Abbau der rhASA. Fiele dagegen die Kurve, mit der in Vollblut inkubierten rhASA, steiler ab, würde das für eine Aufnahme der rhASA in die im Blut enthaltenen Zellen sprechen.

Für den Ansatz wurden einem gesunden Probanden 20 ml Blut entnommen und sofort mit 1 ml Natrium-Heparin (100 I.E.) gemischt. Zur Gewinnung des Heparin-Plasmas wurde die Hälfte dieses Heparin-Vollbluts bei 500 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand nach Zentrifugation enthielt das zellfreie Heparin-Plasma.

#### Versuchsbedingungen – Inkubation der rhASA in Vollblut und Heparin-Plasma:

Probe (Vollblut):	3 ml Heparin-Vollblut 0,6 ml rhASA 1:500
Probe (Plasma):	1 ml Heparin-Plasma 0,2 ml rhASA 1:500
Inkubationszeit:	$t_0 = 0$ min; $t_1 = 5$ min; $t_2 = 15$ min; $t_3 = 30$ min; $t_4 = 60$ min; $t_5 = 120$ min; $t_6 = 240$ min; $t_7 = 720$ min
Inkubationstemperatur:	37 °C
Reaktionsende:	Einfrieren der Proben bei -70 °C

Die beiden Ansätze mit Vollblut und rhASA sowie mit Plasma und rhASA wurden in einem Reagenzglas bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt t wurden zwei Proben von je 50 µl aus dem Ansatz mit Heparin-Plasma entnommen und sofort in zwei Eppendorf-Cups eingefroren. Aus dem Ansatz mit Heparin-Vollblut wurden zu jedem Zeitwert zwei mal 300 µl entnommen und beide einzeln 5 Minuten bei 13000 g

zentrifugiert. Nur der Überstand wurde weiter verwendet, die zellulären Bestandteile wurden verworfen. Der Überstand wurde sofort auf Trockeneis eingefroren.

#### Versuchsbedingungen - Auswertung:

Für alle Inkubationszeiten  $t_0$ - $t_7$  wurden zwei Ansätze 1 und 2 erstellt und auf zwei verschiedene Weisen ausgewertet.

Ansatz (Vollblut):            50  $\mu$ l Probe (Überstand Vollblut mit rhASA)  
                                      200  $\mu$ l 10 mM pNCS-Lösung

Ansatz (Plasma):            50  $\mu$ l Probe (Plasma mit rhASA)  
                                      200  $\mu$ l 10 mM pNCS-Lösung

Inkubationszeit und        Ansatz 1: 48 Stunden bei 4 °C

Inkubationstemperatur:    Ansatz 2: 1 Stunde bei 37 °C

Reaktionsende:            Verdünnung (4 °C-Ansatz 1:10; 37 °C-Ansatz 1:20)  
                                      Zugabe von 250  $\mu$ l 0,5 M Natronlauge

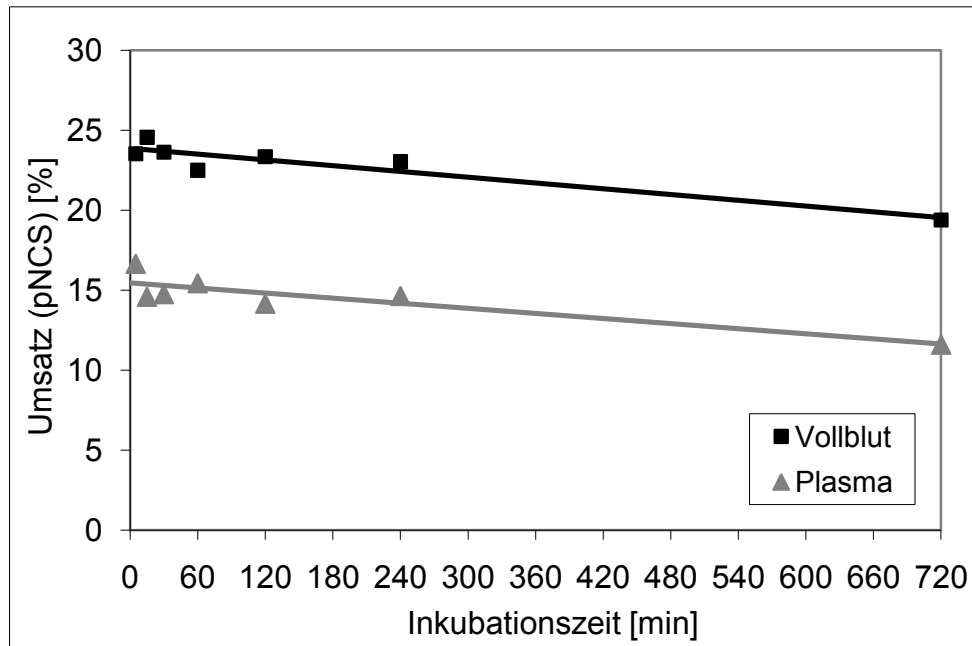
Alle Proben wurden unter gleichen Bedingungen mit der para-Nitrocatecholsulfat-lösung inkubiert. Je Inkubationszeit  $t$  wurde ein Ansatz für eine Stunde im Wasserbad und ein Ansatz für 48 Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach der Zugabe der Natronlauge erfolgte die photometrische Auswertung der gebildeten para-Nitrocatecholkonzentration.

#### Ergebnis:

Die Kurven beider Versuchsreihen mit in Vollblut sowie in Plasma inkubierter rhASA zeigen einen linearen Abfall des Umsatzes von pNCS (**Bild 26**). Die Einbußen des Umsatzes von pNCS durch die rekombinante Arylsulfatase A betragen aber nach maximaler Inkubationszeit von 12 Stunden nur 4,1% in der Vollblut-Probe. Das entsprach einem Umsatzverlust der rhASA von ungefähr einem Sechstel. Die Kurve der Proben mit Plasma und Vollblut verliefen parallel zueinander. Damit konnte eine signifikante Aufnahme der rhASA in die Zellen des peripheren Blutes ausgeschlossen werden.



(Nachfolgend ist nur das Diagramm mit der 4 °C-Inkubation als Auswertung abgebildet, da sich die beiden Auswertungen entsprechen.)



**Bild 26:** Aktivität der rhASA nach Inkubationszeiten von 5 Minuten bis 12 Stunden in Heparin-Vollblut und -Plasma bei 37 °C. Photometrische Bestimmung der Restaktivität der rhASA durch Umsatz von pNCS bei 4 °C

### 3.2.10 Zusammenfassung – Enzymkinetik und -Stabilität der rhASA

Ein nahezu hundertprozentiger Umsatz von para-Nitrocatecholsulfat wurde in H<sub>2</sub>O (Deionat) bei einer Verdünnungsstufe der rhASA von 1:25 nach einer Inkubationszeit von 1,5 bzw. 2 Stunden erreicht, bei einer Verdünnungsstufe von 1:10 sogar schon nach 30 Minuten. Die Enzymkinetik des Umsatzes von pNCS unterlag einer Sättigung. In den ersten 5 Minuten war bei 37 °C der Umsatz am höchsten und näherte sich anschließend asymptotisch 100% an. Die rekombinante Arylsulfatase A erwies sich in Vollblut als erstaunlich stabil. Nach einer Inkubation der rhASA in Vollblut für 12 Stunden hatte die Aktivität gegenüber dem Ausgangswert nur um etwa ein Sechstel geringer.

### **3.2.11 Optimierung der Inkubationsbedingungen im Hinblick auf die Sulfatidbestimmung mit der ITP**

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zur Bestimmung von Galactocerebroside-3-sulfat (Sulfatid) mit der ITP zu entwickeln. Da das lipophile Sulfatid nicht direkt mit der ITP ausgewertet werden konnte, war eine quantitative Abspaltung der Sulfatgruppe mit der rhASA erforderlich, deren Konzentration dann mit der ITP gemessen werden konnte. Dazu war es im Vorfeld notwendig, die Inkubationsbedingungen so zu wählen, dass in der ITP keine Störungen durch die Komponenten der Pufferlösung auftraten. Insbesondere war es erforderlich, die Ionenkonzentration zu reduzieren und den Einfluss der Taurocholsäure zu untersuchen. Taurocholsäure ist zwar nicht für den Umsatz des gut wasserlöslichen pNCS erforderlich, aber für die Umsetzung des lipophilen Sulfatids durch die rhASA unerlässlich. Die folgenden Versuche wurden durchgeführt um die Inkubationsbedingungen und die Voraussetzungen für den Einsatz der ITP zu optimieren.

#### **3.2.11.1 Reduktion der Ionenkonzentration des Inkubationspuffers**

Im ersten Versuchsblock wurde untersucht, wie sich eine Reduktion der Konzentration der Pufferbestandteile auf den Umsatz von para-Nitrocatecholsulfat auswirkte. Im günstigsten Fall sollte der Umsatz bei derselben Konzentration der rhASA gleich bleiben. Es wurden zwei verdünnte 10 mM pNCS-Lösungen hergestellt, die 50 mM und 10 mM Natriumazetat (statt 500 mM) enthielten. Die anderen Pufferbestandteile blieben gleich (NaCl: 8 mM, Na-PP: 0,5 mM). In beiden verdünnten pNCS-Lösungen wurde nach Fertigstellung der pH-Wert bestimmt um sicherzustellen, dass dieser trotzdem weiterhin im für die rhASA optimalen Bereich des pH-Wertes von 5 lag. Das war erforderlich, da bei einem pH-Wert von 4,0 bzw. 6,0 durch die Arylsulfatase A nur ein Umsatz von 10% bzw. 3% verglichen mit dem Umsatz bei dem pH-Optimum von 5,0 erreicht würde [Raghavan et al, 1981]. Die drei pNCS-Lösungen mit unterschiedlicher Natriumazetatkonzentration wurden jeweils mit zwei rhASA-Konzentrationen, 1:100 und 1:1.000 verdünnter Stammlösung, für unterschiedliche Zeiten im Wasserbad inkubiert.

Versuchsbedingungen:

Ansatz: 50  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O  
 200  $\mu\text{l}$  pNCS-Lösung (\*A, B und C)  
 10  $\mu\text{l}$  rhASA in der Verdünnung 1:100 bzw. 1:1.000

Inkubationszeit: 15 Minuten, 60 Minuten und ca. 14 Stunden

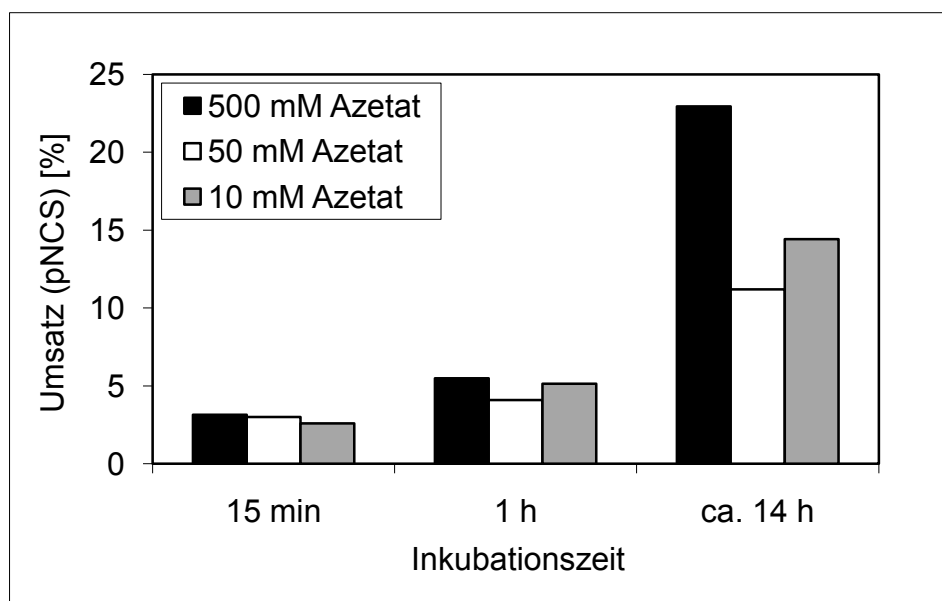
Inkubationstemperatur: 37 °C

Reaktionsende: Zugabe von 260  $\mu\text{l}$  0,5 M Natronlauge

*	Essigsäure [mM]	Natriumazetat [mM]	NaCl [mM]	Na-PP [mM]	pNCS [mM]	NaOH [mM]
A	500	500	8	0,5	10	500
B	50	50	8	0,5	10	500
C	10	10	8	0,5	10	500

Ergebnis:

Nach einer Stunde Inkubation waren die Unterschiede im Umsatz von pNCS bei beiden rhASA-Konzentrationen zwischen den verschiedenen konzentrierten Natriumazetat-Puffern nicht eindeutig erkennbar (**Bild 27**).



**Bild 27:** Umsatz von pNCS in pNCS-Lösungen mit Natriumazetat-Puffer in den Konzentrationen 500 mM, 50 mM und 10 mM nach Inkubation mit rhASA der Verdünnung 1:100 für 15 Minuten, eine, sowie ca. 14 Stunden. Inkubationszusatz H<sub>2</sub>O

Nach ca. 14stündiger Inkubationszeit waren aber sowohl in dem 50 mM als auch dem 10 mM Natriumazetat-Puffer etwa 50% weniger pNCS umgesetzt, als im Ansatz mit dem unverdünnten Natriumazetat-Puffer (500 mM). Der Umsatz von pNCS im 500 mM-Puffer durch die 1:1.000 verdünnte rhASA betrug nur 0,4% nach einer Stunde und 0,8% nach ca. 14stündiger Inkubation.

### 3.2.11.2 Umsatz von pNCS in Taurocholatlösung

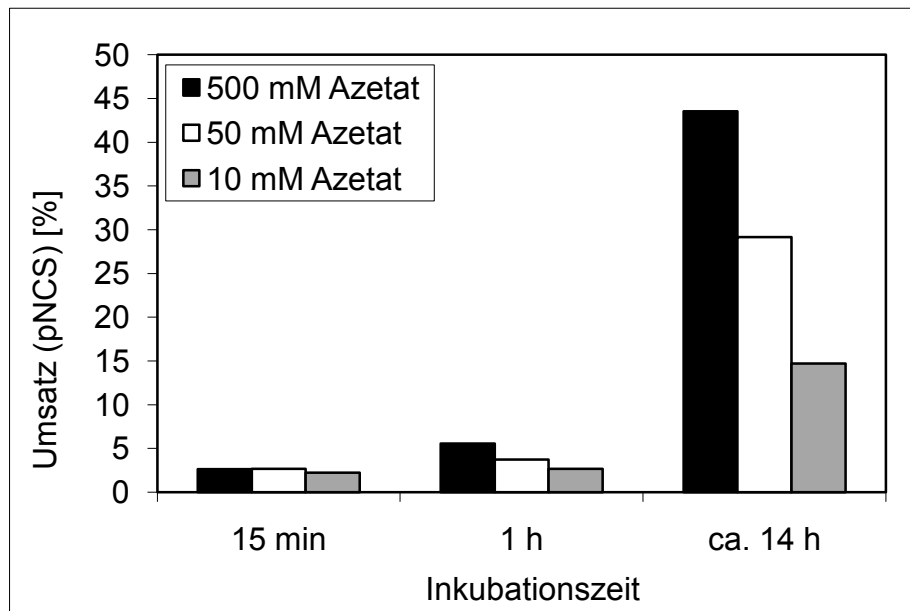
Der für den Umsatz des Galaktocerebrosid-3-sulfats verwendete Puffer enthielt technisches Taurocholat, das dazu diente das Sulfatid, das vorwiegend lipophil war, in dem hydrophilen Puffer zu lösen. Als Taurocholate werden Gallensäuren bezeichnet die mit Taurin konjugiert sind. Das Taurocholat begünstigte zudem den Zugang der rhASA zum Substrat. In vivo wird diese Aufgabe durch das Aktivator-Protein Saposin B übernommen. In diesem Versuch sollte der bisher verwendete pNCS-Puffer im Hinblick auf die Umsetzung von Galaktocerebrosid-3-sulfat um Taurocholat ergänzt werden. Der Einfluss von Taurocholat auf den Umsatz des pNCS wurde bei verschiedenen Inkubationszeiten überprüft. Dazu wurde eine Lösung mit 10 g/l Taurocholat (1%) in H<sub>2</sub>O (Deionat) erstellt. Zum Vergleich wurde ein Ansatz mit Enzymextrakt aus Leukozyten als Vermittler mitgeführt.

#### Versuchsbedingungen:

Inkubationszusätze:	1. 1%ige Taurocholatlösung 2. Enzymextrakt aus $4 \times 10^5$ Leukozyten
Ansatz:	40 µl Inkubationszusatz 200 µl pNCS-Lösung (500 mM, 50 mM und 10mM) 10 µl rhASA 1:100 bzw. 1:1.000 verdünnt
Inkubationszeit:	15 Minuten, 60 Minuten und ca. 14 Stunden
Inkubationstemperatur:	37 °C
Reaktionsende:	Zugabe von 250 µl 0,5 M Natronlauge

Ergebnis:

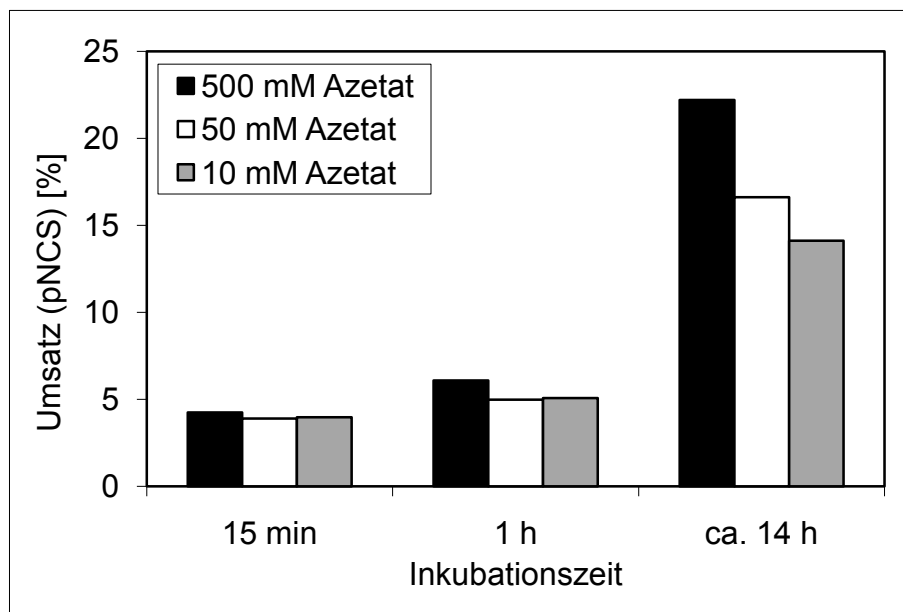
Der Umsatz von pNCS wurde nach Gleichung 9 berechnet. Im Ansatz mit Taurocholatlösung war nach 15 Minuten in allen Ansätzen mit den drei unterschiedlich konzentrierten Natriumazetat-Puffern ca. 3% des pNCS umgesetzt worden (**Bild 28**).



**Bild 28:** Umsatz von pNCS nach Inkubation mit rhASA 1:100 in Taurocholatlösung unter Verwendung von drei verschiedenen Natriumazetat-Konzentrationen des Puffers (500 mM, 50 mM und 10 mM)

Im Gegensatz dazu ist nach einer Inkubationszeit von einer sowie ca. 14 Stunden zwischen den unterschiedlich konzentrierten Natriumazetat-Puffern ein deutlicher Unterschied erkennbar, der mit der Dauer der Inkubationszeit zunimmt. Während im 500-mM-Puffer nach ca. 14stündiger Inkubation 45% des pNCS umgesetzt worden war, betrug der Umsatz im 50-mM-Puffer nur 2/3 und im 10-mM-Puffer sogar nur 1/3 des Umsatzes in 500-mM-Puffer. Die 1:1.000 verdünnte rhASA erbrachte maximal einen Umsatz von pNCS von 4% bei 500-mM-Puffer und Inkubation für ca. 14 Stunden. Obwohl das pNCS eigentlich Taurocholat als Vermittler nicht benötigt, beschleunigte das Taurocholat die Reaktion. Das zeigte sich besonders nach ca. 14stündiger Inkubation. Während nach dieser Zeit mit Taurocholat als Inkubationszusatz ca. 43% des im Ansatz enthaltenen pNCS umgesetzt worden war, betrug der Anteil ohne Taurocholat nur ca. 23% (vgl. **Bild 27**).

Bei Verwendung von Enzymextrakt als Inkubationszusatz war der Umsatz von pNCS in den unterschiedlich konzentrierten Puffern nach 15 Minuten und einer Stunde etwa gleich und lag um 5% (**Bild 29**). Wiederum wurde dabei ein Teil des Umsatzes durch die in dem Enzymextrakt enthaltene ASA erbracht (vgl. Kap. **3.2.4**).



**Bild 29:** Umsatz von pNCS durch rhASA 1:100 in Enzymextrakt mit 500 mM, 50 mM und 10 mM Natriumazetat-Puffer für 15 min, 1 h, sowie ca. 14 h

Nach Inkubation mit rhASA für ca. 14 Stunden, war jedoch auch hier bei Reduktion der Natriumazetat-Konzentration ein geringerer Umsatz von pNCS zu verzeichnen. Im 50 mM-Puffer waren ca. 3/4, im 10 mM-Puffer ca. 2/3 des Umsatzes in 500 mM-Puffer erreicht worden. In beiden Inkubationszusätzen war der prozentuale Umsatz von para-Nitrocatecholsulfat bei Verwendung von 500 mM Natriumazetat-Puffer am höchsten. Dies zeigte sich insbesondere bei ca. 14stündiger Inkubation. Bei der 1:1.000 Verdünnung der rhASA ergab sich maximal ein Umsatz von 3,5%. Taurocholat stellte somit auch für den Umsatz des pNCS durch die rhASA den geeigneteren Inkubationszusatz dar. Nach 14stündiger Inkubation mit 1:100 verdünnter rhASA war im Ansatz mit Taurocholatlösung fast doppelt so viel pNCS umgesetzt wie in dem Ansatz mit Enzymextrakt der Leukozyten (**Bild 28**, **Bild 29**). Gegenüber der Zugabe von H<sub>2</sub>O als Inkubationszusatz war sowohl das Enzymextrakt als auch die Taurocholatlösung deutlich überlegen.

### 3.2.11.3 Optimierung des Umsatzes von pNCS in Taurocholatlösung

In den Experimenten in Kap. 3.2.11.2 wurde in keinem Fall ein hundertprozentiger Umsatz des pNCS erreicht. Deshalb mussten die Bedingungen für einen nahezu hundertprozentigen Umsatz weiter optimiert werden. Dazu wurde die rhASA in höherer Konzentration eingesetzt. Verwendet wurde eine 1:10 verdünnte rhASA, mit der in dem in Kap. 3.2.7 beschriebenen Versuch ein nahezu hundertprozentiger Umsatz von pNCS erreicht wurde. Zudem wurde für einen der Ansätze eine pNCS-Lösung erstellt, die statt 10 mM nur 1 mM pNCS enthielt. Damit konnte die Enzym/Substrat-Relation zusätzlich erhöht werden. Diese 1 mM pNCS-Lösung wurde darüber hinaus in einem weiteren Ansatz mit 1:100 verdünnter rhASA inkubiert. Dieser Ansatz hatte dadurch dieselbe Enzym/Substrat-Relation wie der Ansatz mit 10 mM pNCS und 1:10 verdünnter rhASA. Als Inkubationszusätze wurden Taurocholatlösung und Enzymextrakt eingesetzt.

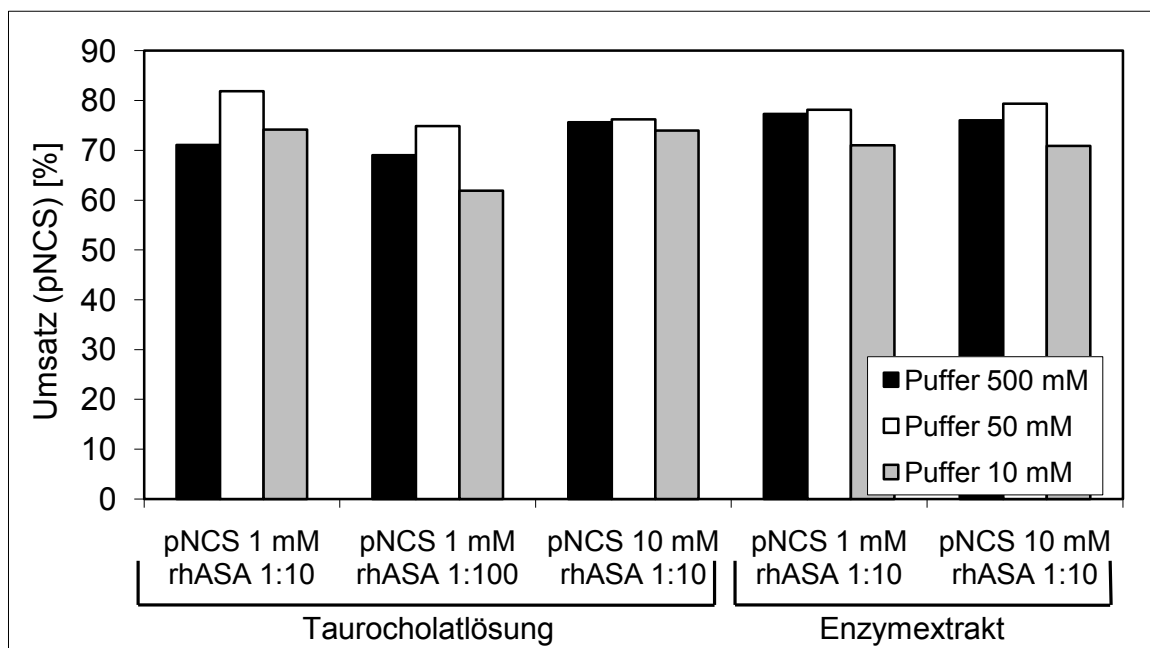
#### Versuchsbedingungen:

Inkubationszusätze:	1. 1%ige Taurocholatlösung 2. Enzymextrakt aus $4 \times 10^5$ Leukozyten
Ansatz (1 mM pNCS):	40 $\mu$ l Inkubationszusatz 200 $\mu$ l 1 mM pNCS-Lösung (500 mM, 50 mM und 10mM) 10 $\mu$ l rhASA 1:10 bzw. 1:100 verdünnt
Ansatz (10 mM pNCS):	40 $\mu$ l Inkubationszusatz 200 $\mu$ l 10 mM pNCS-Lösung (500 mM, 50 mM und 10mM) 10 $\mu$ l rhASA 1:10 verdünnt (148 $\mu$ U)
Inkubationszeit:	ca. 14 Stunden
Inkubationstemperatur:	37 °C
Reaktionsende:	Zugabe von 250 $\mu$ l 0,5 M Natronlauge

#### Ergebnis:

In allen Ansätzen wurde nach 14stündiger Inkubation ein Umsatz im Bereich von 70-75% erreicht (**Bild 30**). Bei der langen Inkubationszeit spielte weder die Art des Inkubationszusatzes, noch die Konzentration der verwendeten rhASA oder die Substrat-

konzentration eine Rolle. Dass in allen Fällen kein hundertprozentiger Umsatz des pNCS erreicht wurde, wäre möglicherweise dadurch erklärbar, dass es sich um eine Messungenauigkeit infolge der starken Verdünnung der Proben mit H<sub>2</sub>O (Deionat) (siehe Kap. 3.2.2) vor Auswertung handelte. Zum einen entsteht durch die hohe Verdünnung ein Multiplikationsfehler zum anderen wurde von dem Extinktionswert jeder Probe ein Leerwert subtrahiert, dessen Extinktionswert sich durch das Verdünnen vor der Auswertung nicht veränderte, wodurch stets ein zu hoher Extinktionswert von der Probe subtrahiert wurde.



**Bild 30:** Umsatz von pNCS in Taurocholatlösung und Enzymextrakt nach Inkubation bei 37 °C für ca. 14 h unter Verwendung von zwei verschiedenen pNCS-Konzentrationen und von zwei Verdünnungen der rhASA (1:10 und 1:100)

### 3.2.12 Zusammenfassung – Optimierung des Puffers für die Isotachophorese

Eine Reduktion der Konzentration des Natriumacetat-Puffers in der pNCS-Lösung führte nach einer Inkubationszeit von einer Stunde zu keiner signifikanten Abnahme des Umsatzes von pNCS. Nach ca. 14stündiger Inkubation hingegen musste sowohl bei einer Reduktion des Natriumacetats von 1:50 als auch bei 1:10 ein Umsatzverlust von 25 - 50% in Kauf genommen werden. Das galt für alle verwendeten Inkubations-



zusätze H<sub>2</sub>O, Taurocholatlösung und Enzymextrakt. Beim Vergleich der Inkubationszusätze untereinander war nach einer Stunde bei Inkubation mit der rhASA 1:100 kein Unterschied erkennbar. Der Umsatz betrug bei allen drei Inkubationszusätzen 5-6%. Nach ca. 14stündiger Inkubation war die Taurocholatlösung mit 43% Umsatz den beiden anderen Inkubationszusätzen mit je nur ca. 23% Umsatz deutlich überlegen. Bei Inkubation von pNCS in Taurocholatlösung mit 1:10 verdünnter rhASA für ca. 14 Stunden wurde ein maximaler Umsatz von pNCS von ca. 75% erreicht.

### 3.3 Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie wird routinemäßig zum Nachweis von Sulfatiden im Urin bei Patienten mit Metachromatischer Leukodystrophie eingesetzt (siehe Kap. 2.2.6.7). Es handelt sich dabei um einen semiquantitativen Nachweis des Sulfatids. Mit der Dünnschichtchromatographie lassen sich Galaktocerebroside-3-sulfat und das Abbauprodukt Galaktocerebroside darstellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um die Sulfatabspaltung von Galaktocerebroside-3-sulfat durch die rekombinanten Arylsulfatase A zu überprüfen. Durch Vergleich von Proben, die mit der rhASA inkubiert wurden und solchen, denen keine rhASA zugegeben wurde, kann eine grobe Abschätzung des erfolgten Umsatzes von Galaktocerebroside-3-sulfat getroffen werden.

#### 3.3.1 Referenzbanden

Zur Orientierung innerhalb komplexer Dünnschichtchromatographien wurden Sulfatid und Galaktocerebroside zunächst als Reinsubstanzen in Chloroform/Methanol im Verhältnis 2:1 gelöst, auf eine HPTLC-Platte aufgetragen und ausgewertet.

Ansatz 1: 5 µl Sulfatid-Stammlösung (1 mg/ml; 1,2 mM) 1:10 verdünnt

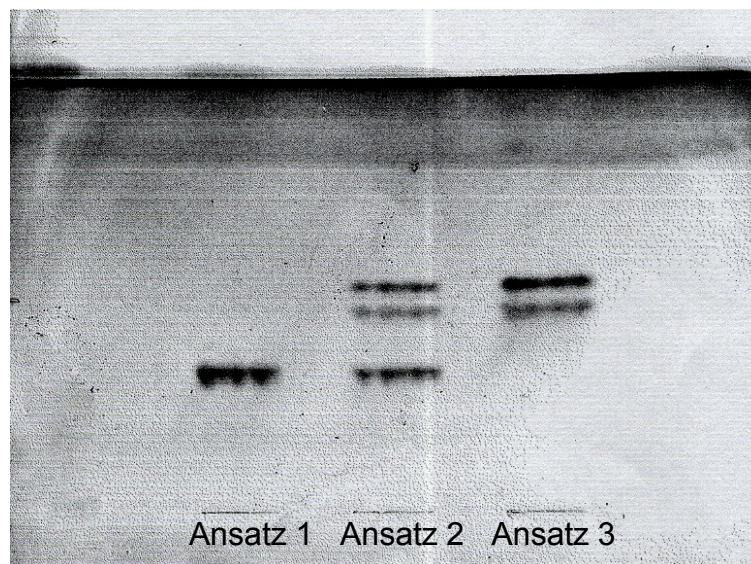
Ansatz 2: 5 µl Sulfatid-Stammlösung 1:10 verdünnt

5 µl Galaktocerebroside-Stammlösung (1 mg/ml, 1,37 mM) 1:10 verdünnt

Ansatz 3: 5 µl Galaktocerebroside-Stammlösung 1:10 verdünnt

Ergebnis:

Das Sulfatid, in Ansatz 1 und 2 in **Bild 31** dargestellt, hinterließ eine einzelne Bande. Die Auftrennung des Galaktocerebroside ergab zwei eng zusammenliegende Banden. Die Galaktocerebroside wanderten im Verhältnis zur Sulfatid-Bande deutlich weiter. Der Unterschied im Wanderungsverhalten kam vermutlich dadurch zustande, dass das Kieselgel der HPTLC-Platte über seine OH-Gruppe eine Wasserstoffbrücke zur Sulfatgruppe des Galaktocerebroside-3-sulfats ausbildete. Dadurch wurde die Wanderungsgeschwindigkeit des Sulfatids verringert.



**Bild 31:** Darstellung einer HPTLC-Platte mit Ansatz 1) Galaktocerebroside-3-sulfat, 2) beide Substanzen und 3) Galaktocerebroside jeweils in Chlorform/Methanol = 2:1

### 3.3.2 Vorversuche: Inkubationspuffer für den Umsatz von Sulfatid mit rhASA

Ansatz nach der Vorschrift für den Nachweis des Morbus Krabbe

Da die rekombinante Arylsulfatase A in einer wässrigen Lösung vorlag, das Galaktocerebroside-3-sulfat aber wegen des Ceramid-Anteils vorwiegend lipophil ist, stellte die Herstellung eines geeigneten Puffers für die Sulfatabspaltung ein Problem dar. Zunächst wurde versucht, einen Probenansatz aus der Methode zum Nachweis des Morbus Krabbe zu entwickeln, die im neurometabolischen Labor der Kinderklinik in Tübingen routinemäßig eingesetzt wird. Bei Patienten mit Morbus Krabbe ist das Enzym Galaktocerebrosidease defekt. Galaktocerebrosidease, das sogenannte

Krabbe-Enzym, ist für den weiteren Abbau des Galaktocerebrosids zuständig. Damit ist die Galaktocerebrosidase für den Arbeitsschritt verantwortlich, der beim Abbau des Galaktocerebrosid-3-sulfats auf die Sulfat-Abspaltung durch die Arylsulfatase A folgt. Die Galaktocerebrosidase spaltet das Galaktocerebrosid in Galaktose und Ceramid (**Bild 1**). In Anlehnung an die im neurometabolischen Labor der Kinderklinik Tübingen verwendete Methode, wurden technisches Taurocholat und Sulfatid je in Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1 gelöst und gemeinsam zur Trockene eingedampft. Der verbliebene Rückstand wurde in Natriumazetat-Puffer und Albuminlösung im Verhältnis 1:1 resuspendiert.

#### Versuchsbedingungen:

Ansatz (nach M. Krabbe): 100 µl	Taurocholat 1% in Chloroform/Methanol
5 µl	Sulfatid in Chloroform/Methanol (1mg Sulfatid/1ml C/M=2:1)
→	zur Trockene eingedampft
25 µl	500 mM Natriumazetat-Puffer
25 µl	Albuminlösung (2 mg/ml)
5 µl	H <sub>2</sub> O od. rhASA verschiedener Konzentration

Es wurden drei Proben erstellt, eine mit H<sub>2</sub>O als Ausgangswert und zwei mit Zugabe von 5 µl rhASA in den Konzentrationen 1:10 und 1:100 verdünnt. Die Proben wurden bei 37 °C für vier Stunden im Wasserbad inkubiert und dann ausgewertet.

In der Dünnschichtchromatographie war kein Unterschied zwischen den drei Proben erkennbar. Entweder verdeckten andere Banden, die durch die Pufferbestandteile verursacht wurden, die Banden von Sulfatid und Galaktocerebrosid, oder aber es fand kein Umsatz statt. Alternativ wäre es möglich, dass sich das Sulfatid im Puffer nicht gelöst hatte.

Im Einzelnen wurden folgende Variationen dieses Ansatzes getestet:

#### Ansatz ohne Albumin-Lösung

In einem weiteren Ansatz wurde der oben beschriebene Versuch nochmals durchgeführt. Als einzige Variation wurde in diesem Ansatz die Albuminlösung weggelassen

und durch Natriumazetat-Puffer ersetzt. Wiederum war kein Unterschied zwischen den Auftrennungen der drei Proben erkennbar.

#### Klärung der Herkunft der Banden und Auftragen der lipophilen Phase

Zur Klärung der Frage, welche Substanzen die Banden verursachten, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt bei dem die Puffersubstanzen einzeln aufgetragen wurden.

Ansatz:

- 1 Natriumazetat-Puffer
- 2 Natriumazetat-Puffer und technisches Taurocholat
- 3 Natriumazetat-Puffer, technisches Taurocholat und Galaktocerebroxid
- 4 Natriumazetat-Puffer, technisches Taurocholat und Sulfatid
- 5 Natriumazetat-Puffer und Sulfatid
- 6 Natriumazetat-Puffer, Sulfatid und Galaktocerebroxid
- 7 Natriumazetat-Puffer und Galaktocerebroxid

Alle Ansätze wurden nach der Herstellung eingedampft und in 50 µl Natriumazetat-Puffer wieder gelöst. Durch Zugabe von Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1 (C/M=2:1), trennten sich zwei Phasen. Die hydrophile Oberphase wurde verworfen, die lipophile Unterphase auf eine HPTLC-Platte aufgetragen. Dadurch wurden die wasserlöslichen Substanzen aus den Proben entfernt.

Durch alleiniges Auftragen der lipophilen Phase war die Zahl der Taurocholat-Banden etwas geringer, als in den vorherigen Versuchen. Die Ansätze 2, 3 und 4 zeigten ein identisches Bild. Daraus ließ sich schließen, dass sich Sulfatid und Galaktocerebroxid aus dem Niederschlag nach dem Eindampfen entweder nicht im Puffer lösten oder dass das Taurocholat die Banden vollständig überdeckte. Der Ansatz 1, der ausschließlich Natriumazetat-Puffer enthielt, zeigte in der Auftrennung keine Banden. Die Auftrennung von Ansatz 5, 6 und 7 erfolgte problemlos, die Sulfatid- und Galaktocerebroxid-Banden waren deutlich erkennbar und entsprachen denen in **Bild 31**.

### Auswertung der hydrophilen Oberphase

Falls es möglich gewesen wäre, das Sulfat als Bande darzustellen, hätte der Abbau des Sulfatids zum Galaktocerebrosid durch die rhASA auch auf diesem Weg sichtbar gemacht werden können.

Eine Auswertung der hydrophilen Oberphase zeigte aber in keinem der Ansätze eine Bande. Auch durch die Zugabe von Sulfat trat keine zusätzliche Bande auf, sodass ein indirekter Nachweis des Abbaus von Galaktocerebrosid-3-sulfat durch die rhASA über einen Nachweis des Sulfats nicht möglich war.

### Ansatz ohne Taurocholat

Der Versuch, das Taurocholat im Ansatz wegzulassen, war erfolglos. Es dient als Vermittler zwischen dem größtenteils lipophilen Sulfatid und der rekombinanten Arylsulfatase A. Das Galaktocerebrosid-3-sulfat ließ sich ohne Zugabe von Taurocholat nicht in dem Inkubationspuffer lösen.

### Ansatz ohne Puffer

Wurde der Niederschlag von Sulfatid und Taurocholat in H<sub>2</sub>O mit Eisessig (pH 5) statt in Puffer gelöst, ließ sich durch Zugabe von Chloroform/Methanol im Verhältnis 2:1 noch nicht einmal eine Trennung der Lösung in zwei Phasen erreichen.

### Verwendung von reinem statt technischem Taurocholat als Vermittler

In einem Ansatz wurde versucht, statt technischem reines Taurocholat zu verwenden. Es stellte sich heraus, dass das reine Taurocholat nicht über die vermittelnden Eigenschaften des technischen Taurocholats verfügte. Selbst mit Hilfe der Inkubation im Ultraschallbad konnten Sulfatid und Galaktocerebrosid nicht mit reinem Taurocholat in Lösung gebracht werden.

## **3.3.3 Zusammenfassung und Bewertung der Vorversuche**

Abschließend lässt sich feststellen, dass ein Nachweis des Umsatzes von Galaktocerebrosid-3-sulfat mit dem hier verwendeten Puffer nicht möglich war. Auch auf das technische Taurocholat als Vermittler zu verzichten war nicht möglich, weil sich das

Sulfatid ohne Zugabe von Taurocholat nicht in dem hydrophilen Inkubationspuffer lösen ließ. Das gleiche galt, wenn reines statt technischem Taurocholat zugegeben wurde.

Wurde Sulfatid oder Galaktocerebrosid in Chloroform/Methanol im Verhältnis 2:1 direkt in Natriumazetat-Puffer gelöst, waren die entsprechenden Banden gut darstellbar und entsprachen denen in **Bild 31**. Das heißt, das es nicht der Natriumazetat-Puffer war, der die Umsetzung des Sulfatids behinderte. Der Natriumazetat-Puffer selbst hinterließ bei den gewählten Laufmitteln keine eigenen Banden.

Wurde ausschließlich die lipophilen Phase aufgetragen, die sich nach Zugabe von Chloroform/Methanol zum Ansatz bildete, führte das zu einer Reduktion der Zahl der abgebildeten Taurocholat-Banden. Sulfat ließ sich durch Auftragen der hydrophilen Oberphase nach Zugabe von Chloroform/Methanol nicht in der Dünnschichtchromatographie als Substrat-Bande abbilden.

### 3.3.4 Inkubationspuffer für den Umsatz von Sulfatid nach Raghavan

Nach der von Raghavan et al. (1981) beschriebenen Methode wurde der in Kap. 2.1.4.3 beschriebene Sulfatid-Puffer erstellt, der für alle folgenden Versuche verwendet wurde:

Sulfatid-Puffer :	25 mM	Natriumazetat-Puffer
	5 mM	Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )
	0,3%	Taurocholat
	→ davon pro Ansatz 200 µl	
Sulfatid-Lösung:	200 µl	Sulfatid-Puffer
(350 µM)	70 nM	Sulfatid

### 3.3.5 Umsatz von Galaktocerebrosid-3-sulfat durch rhASA

Dieser Versuch wurde angesetzt um zu prüfen, ob sich das Sulfat aus Galaktocerebrosid-3-sulfat durch Zugabe von rhASA abspalten ließ. Dazu wurden zwei mal

je drei Ansätze erstellt. Die Proben wurden im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde je einer Probe der drei Ansätze 210 µl Methanol zugegeben und das Gemisch direkt aufgetragen. Zu den anderen drei Proben wurden je 210 µl C/M im Verhältnis 2:1 gegeben und nur die lipophile Phase aufgetragen.

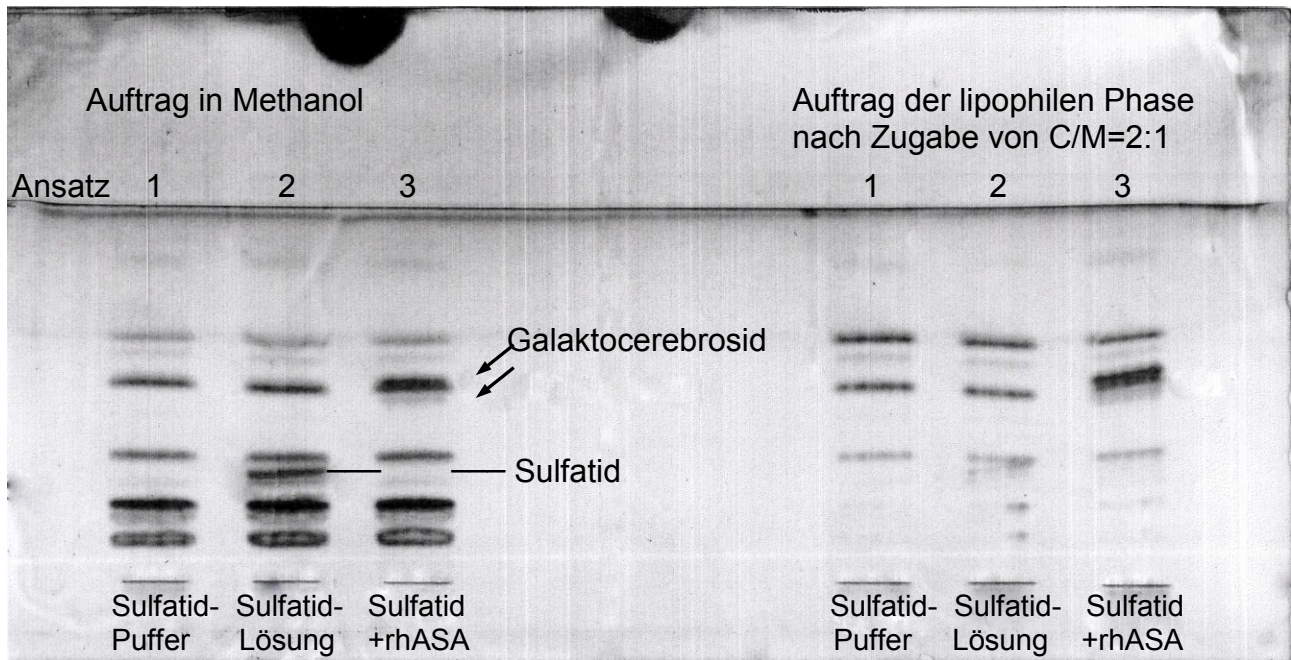
#### Versuchsbedingungen:

Ansatz 1 (2x):	200 µl Sulfatid-Puffer 10 µl H <sub>2</sub> O
Ansatz 2 (2x):	200 µl 350 µM Sulfatid-Lösung 10 µl H <sub>2</sub> O
Ansatz 3 (2x):	200 µl 350 µM Sulfatid-Lösung 10 µl rhASA 1:10 verdünnt
Inkubationszeit:	2 Stunden
Inkubationstemperatur:	37 °C
Reaktionsende:	Zugabe von 210 µl Methanol bzw. Chloroform/Methanol = 2:1

#### Ergebnis:

In Ansatz 1 (**Bild 32**) traten nur die Banden auf, die durch das Taurocholat verursacht wurden, da durch Natriumazetat nach Kap. **3.3.2** keine Banden entstehen. In Ansatz 2 war deutlich eine weitere Bande erkennbar, die im ersten Ansatz nicht auftrat. Dabei handelte es sich um das Galaktocerebrosid-3-sulfat. Das war sowohl in der Auftrennung nach Zugabe von Methanol, als auch in dem Ansatz, dem Chloroform und Methanol zugegeben wurde, deutlich erkennbar. Im Ansatz 3 war die Sulfatid-Bande nicht mehr vorhanden. Dafür waren zwei zusätzliche Banden aufgetreten, die das Galaktocerebrosid darstellten. Das Sulfatid wurde demnach im Ansatz 3 soweit in der Dünnschichtchromatographie erkennbar vollständig von der 1:10 verdünnten rekombinanten Arylsulfatase A zu Galaktocerebrosid umgesetzt.

Nach Gleichung 2 beträgt der in Kap. **2.2.6.3** beschriebene Retentionsfaktor 0,414 für Sulfatid und 0,543 sowie 0,586 für die beiden Banden des Galaktocerebrosids.



**Bild 32:** Auftrennung von Sulfatid-Puffer und Sulfatid-Lösung mit und ohne Inkubation mit rhASA 1:10 verdünnt, Auftrag in Methanol bzw. Chloroform/Methanol = 2:1

### 3.3.6 Reduktion der Konzentrationen der Pufferbestandteile im Hinblick auf die Isotachophorese

Da es im Hinblick auf die Auswertung mit der Isotachophorese günstiger ist wenn die Bestandteile der Proben möglichst niedrige Ionenkonzentrationen aufweisen, wurden in diesem Versuch die Konzentrationen von Natriumazetat und Taurocholat reduziert (vergleiche Kap. 3.2.11). Zusätzlich wurde die Konzentration des Sulfatids im Ansatz reduziert. In den verschiedenen Ansätzen wurden die Bestandteile je um die Hälfte der Ausgangskonzentration verdünnt. Dazu wurde eine  $MgCl_2$ -Lösung mit 5 mM  $MgCl_2$  in  $H_2O$  (Deionat) erstellt, sowie eine Taurocholat- $MgCl_2$ -Lösung mit 5 mM  $MgCl_2$  und 0,3% technischem Taurocholat in  $H_2O$  (Deionat).

#### Versuchsbedingungen:

Ansatz 1: 50%ige Reduktion der Konzentration von Sulfatid

100  $\mu$ l 350  $\mu$ M Sulfatid-Lösung

100  $\mu$ l Sulfatid-Puffer



10 µl rhASA 1:10 verdünnt bzw. H<sub>2</sub>O

Ansatz 2: 50%ige Reduktion der Konzentrationen von Sulfatid und Natriumazetat

100 µl 350 µM Sulfatid-Lösung

100 µl Taurocholat-MgCl<sub>2</sub>-Lösung

10 µl rhASA 1:10 verdünnt bzw. H<sub>2</sub>O

Ansatz 3: 50%ige Reduktion der Konzentrationen von Sulfatid, Natriumazetat und Taurocholat

100 µl 350 µM Sulfatid-Lösung

100 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung

10 µl rhASA 1:10 verdünnt bzw. H<sub>2</sub>O

Inkubationszeit: 2 Stunden

Inkubationstemperatur: 37 °C

Reaktionsende: 210 µl Chloroform/Methanol = 2:1

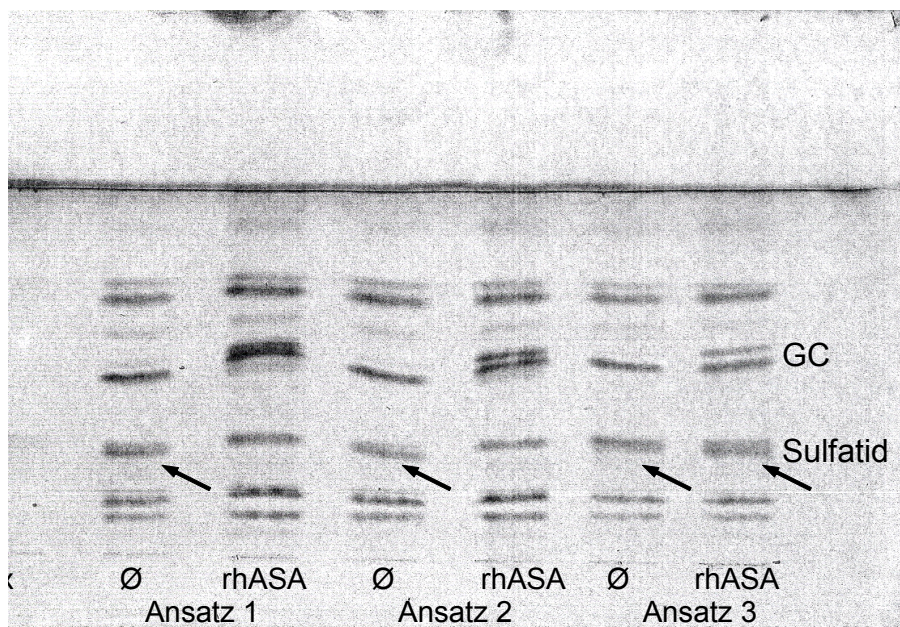
Zu je einer der Proben dieser drei Ansätze wurden 10 µl H<sub>2</sub>O zugegeben. Diese Proben dienten dazu, die maximale Ausprägung der Sulfatid-Bande darzustellen, damit diese mit den Sulfatid-Banden der übrigen Proben verglichen werden konnten. Den anderen drei Proben wurden 10 µl einer 1:10 Verdünnung der rhASA-Stammlösung zugegeben. Alle Ansätze wurden für zwei Stunden im Wasserbad inkubiert. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurde die lipophile Phase von allen Proben nach Zugabe von C/M=2:1 aufgetrennt.

### Ergebnis:

Die Sulfatid-Banden waren in den Proben ohne rhASA gut sichtbar, **Bild 33**. Ansatz 1, in dem die Sulfatidkonzentration halbiert wurde, zeigte nach zweistündiger Inkubation einen vollständigen Umsatz des Sulfatids zu Galaktocerebroxid. Auch in Ansatz 2, in dem die Natriumazetatkonzentration auf 12,5 mM halbiert wurde, wurde nach Inkubation ebenfalls ein vollständigen Umsatz des Sulfatids erreicht. Wurde zusätzlich die Taurocholatkonzentration halbiert, erschien nur eine sehr schwache Galaktocerebroxid-Bande und die Sulfatid-Bande blieb deutlich erkennbar (Ansatz 3).

Demzufolge musste bei Reduktion der Taurocholatkonzentration ein geringerer Umsatz des Sulfatids in Kauf genommen werden.

Da aber für die Analyse der Proben mit der Isotachophorese eine möglichst vollständige Sulfatabspaltung von Sulfatid erforderlich war, um von der gemessenen Sulfatkonzentration auf die Sulfatidkonzentration in der Probe zu schließen, stellte es sich als nicht zielführend heraus, die Taurocholatkonzentration in den folgenden Versuchen zu reduzieren.



**Bild 33:** Reduktion der Bestandteile der Sulfatid-Lösung: Ansatz 1: 50% Sulfatid; Ansatz 2: 50% Sulfatid, Natriumazetat; Ansatz 3: 50% Sulfatid, Natriumazetat, Taurocholol Auswertung nach Inkubation mit rhASA

Ø: Ausgangswert ohne Zugabe von rhASA

→: Sulfatid-Bande (diese ist auf der Kopie schlecht zu erkennen)

GC: Galaktocerebrosid-Bande (erkennbar an der kräftigen Doppel-Bande)

### 3.3.7 Prüfung des Taurocholats auf abspaltbare Sulfatgruppen und Verwendung von reinem Taurocholol

Das technische Taurocholol enthält aufgrund der Herstellung Verunreinigungen, durch die in der Dünnschichtchromatographie zahlreiche zusätzliche Banden erzeugt wurden. Das erschwerte die Beurteilung der Sulfatid- und Galaktocerebrosid-

Banden. Um das Sulfatid in dem hydrophilen Puffer in Lösung zu bringen, war jedoch ein Vermittler erforderlich. Diese Funktion erfüllte das technische Taurocholat sehr gut.

Ein weiteres Problem bei der Verwendung des technischen Taurocholats war, dass es Sulfatgruppen enthält, die eventuell durch die rekombinante Arylsulfatase A abgespalten werden konnten. Zudem war nicht vorherzusehen, wie sich das Taurocholat auf die Auswertung mit der Isotachophorese auswirken würde. Deshalb wurde in diesem Experiment nochmals versucht, reines statt technischem Taurocholat für den Umsatz von Sulfatid zu verwenden. Das reine Taurocholat wird bei der Herstellung gereinigt, sodass es  $\geq 97\%$  mit Taurin konjugierte Gallensäuren enthält. Die Herstellung des technischen Taurocholats unterliegt weniger hohen Reinigungsanforderungen. Der Begriff „technisch“ bedeutet zudem, dass der Gehalt an Taurocholat schwanken kann. Klaus Harzer hatte experimentell ermittelt, dass sich dieses technische Taurocholat zum Lösen des Sulfatids in einem hydrophilen Puffer und damit für den Nachweis der Sulfatide in Urin hervorragend eignet, im Gegensatz zu reinem Taurocholat [Klaus Harzer - persönliche Kommunikation].

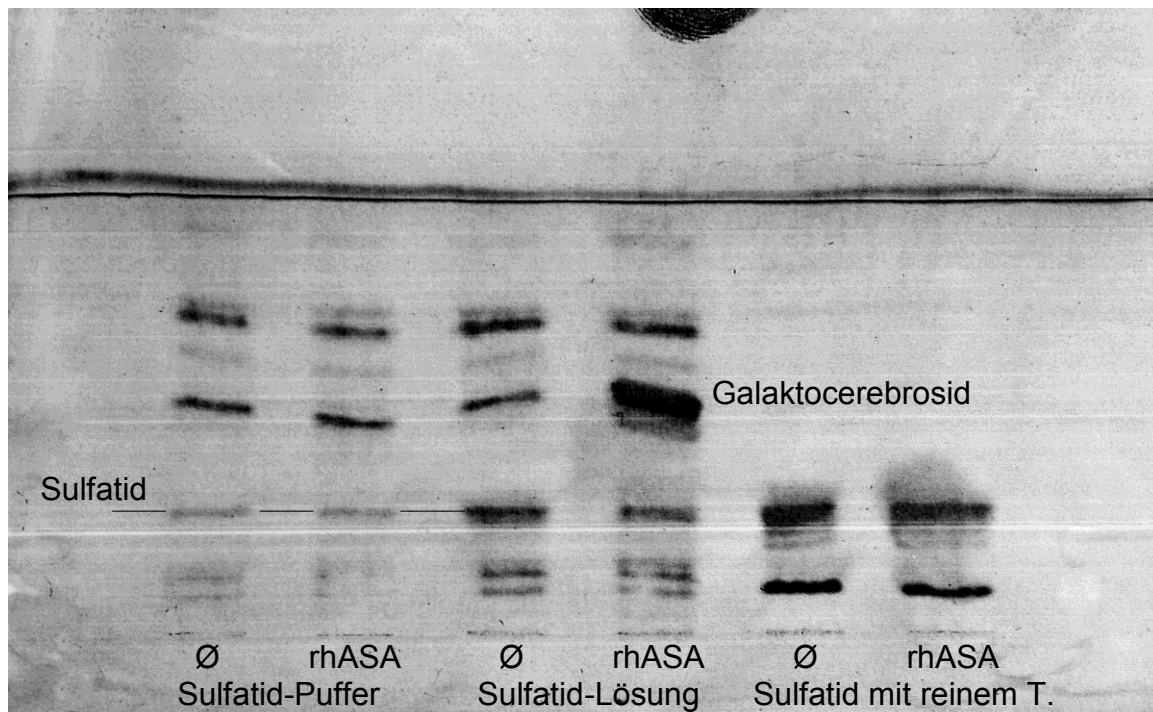
Um zu überprüfen, ob sich die Anordnung der Taurocholat-Banden durch Inkubation mit der rhASA veränderten, wurde zusätzlich ein Ansatz mit Sulfatid-Puffer ohne Sulfatid mit 10  $\mu\text{l}$  rhASA inkubiert. Eine Veränderung der Bandenanordnung hätte auf eine Abspaltung von Sulfat-Gruppen von Taurocholat hingewiesen. Zum Vergleich wurde ein Ansatz mit Sulfatid-Lösung mit und ohne rhASA mitgeführt.

#### Versuchsbedingungen:

Ansatz 1 (2x):	200 $\mu\text{l}$ 0,3% reines Taurocholat in 350 $\mu\text{M}$ Sulfatid-Lösung 10 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$ bzw. rhASA 1:10
Ansatz 2 (2x):	200 $\mu\text{l}$ Sulfatid-Puffer 10 $\mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}$ bzw. rhASA 1:10 (148 $\mu\text{U}$ )
Inkubationszeit:	2 Stunden
Inkubationstemperatur:	37 °C
Reaktionsende:	Zugabe von 210 $\mu\text{l}$ Methanol bzw. Chloroform/Methanol = 2:1

Ergebnis:

Im Gegensatz zu dem in Kap. 3.3.2 beschriebenen Experiment ließ sich das Sulfatid in einem Sulfatid-Puffer mit 0,3% reinem Taurocholol lösen. Eine Auftrennung der Ansätze (Ansatz 1) mit reinem Taurocholol war aber nicht möglich. An der erwarteten Stelle, an der sich normalerweise die Sulfatid-Bande befindet, ließ sich keine einzelne Bande abgrenzen (**Bild 34**). Nach Inkubation mit der rhASA erschien auch keine Galaktocerebrosid-Bande an der erwarteten Position. Die Auftrennung des Sulfatid-Puffers (Ansatz 2) nach Inkubation mit rhASA zeigte keinen Unterschied zu dem Ansatz, dem H<sub>2</sub>O zugegeben worden war. Durch die rhASA wurde von jenen Bestandteilen des Taurocholols, die sich als Banden darstellten, demnach kein Sulfat abgespalten. Andernfalls hätte sich die Anzahl oder das Aussehen der Banden gegenüber dem Ansatz ohne rhASA verändern müssen. Allerdings ließ sich über die Anteile des technischen Taurocholols, die keine Bande in der Dünnschichtchromatographie bildeten, keine Aussage treffen.



**Bild 34:** Auftrennung von Sulfatid-Puffer und Sulfatid-Lösung mit technischem Taurocholol sowie Sulfatid in Puffer mit reinem Taurocholol ohne und nach 2 h Inkubation mit rhASA (148 µU/Ansatz)

### 3.3.8 Zusammenfassung - Pufferoptimierung für die Umsetzung von Sulfatid

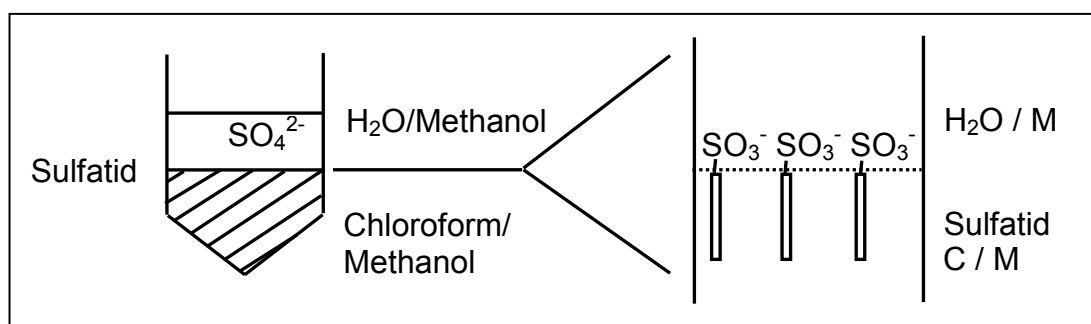
Durch die Verwendung der Methode nach Raghavan et al. (1981) zur Herstellung des Sulfatid-Puffers (vgl. Kap. 2.1.4.2) ließ sich ein Umsatz von Sulfatid durch die rhASA erreichen. Der erfolgte Umsatz konnte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie dargestellt werden. Nach zweistündiger Inkubation mit 1:10 verdünnter rhASA war das Sulfatid im Ansatz soweit beurteilbar vollständig zu Galaktocerebrosid umgesetzt worden.

Nach Reduktion des Sulfatids im Ansatz auf die Hälfte der Ausgangskonzentration war die Bande des Galaktocerebrosid-3-sulfats noch gut darstellbar. Bei Halbierung der Azetatkonzentration im Ansatz kam es nicht zu einer nachweisbaren Reduktion des Umsatzes von Sulfatid. Im Gegensatz dazu konnte bei einer Verringerung der Taurocholatkonzentration um 50% kein kompletter Umsatz des Sulfatids erreicht werden.

Der Versuch, reines statt technisches Taurocholol als Vermittler zu verwenden, war nicht erfolgreich, da sich nach der Auftrennung in der Dünnschichtchromatographie keine Sulfatid- und Galaktocerebrosid-Bande abgrenzen ließ. Die rhASA war nicht in der Lage Sulfat nachweislich aus dem technischen Taurocholol abzuspalten. Daher wurde im folgenden stets technisches Taurocholol als Vermittler für den Umsatz von Sulfatid verwendet.

### 3.3.9 Prüfung der Methode zur Urin-Aufarbeitung auf den Verlust von Sulfatid

Das Sulfatid befindet sich in einer Probe mit einer hydrophilen und einer lipophilen Phase aufgrund seiner hydrophilen Sulfatgruppe und dem lipophilen Ceramidanteil vermutlich an der Grenzschicht zwischen den beiden Phasen. Bei der Aufarbeitung



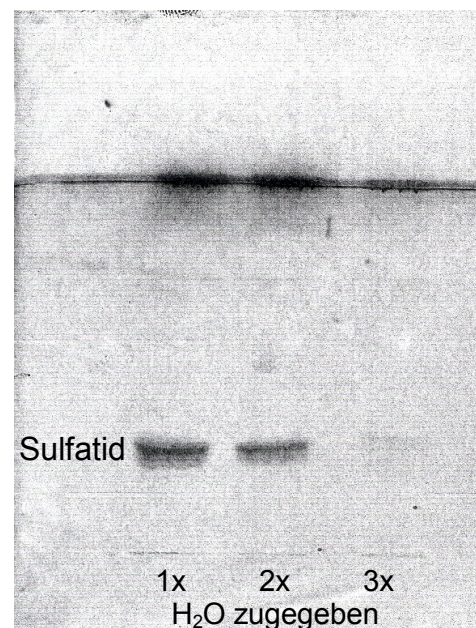
des Urins nach der in Kap. **2.2.6.5** beschriebenen Methode wurden drei mal 5 ml H<sub>2</sub>O (Deionat) zu der Probe zugegeben, um das anorganische Sulfat weitestgehend aus der Probe zu entfernen. In diesem Versuch sollte deshalb untersucht werden, ob durch die mehrmalige Zugabe von H<sub>2</sub>O und das Entfernen der hydrophilen Phase Sulfatid verloren ging. Das wäre zum Beispiel durch Übertreten von Sulfatid in die wässrige Phase möglich, die bei der Aufarbeitung verworfen wurde.

Für diesen Versuch wurden je 10 µl Sulfatid-Lösung (350 µM) in drei Eppendorfcups zur Trockene eingedampft. In zwei der Eppendorfcups mit dem Sulfatid-Niederschlag wurde vorsichtig mittels Pipette je 500 µl H<sub>2</sub>O (Deionat) zugegeben. Das Wasser wurde anschließend wieder bis auf eine belassene Schutzschicht abgesaugt und die restliche Flüssigkeit in der Probe schließlich eingedampft. Bei einem der beiden Cups wurde dieser Vorgang ein zweites Mal durchgeführt. Eine weitere Probe wurde zum Vergleich ohne Zugabe von H<sub>2</sub>O aufgearbeitet. Anschließend wurde zu allen Proben 210 µl Chloroform/Methanol im Verhältnis 2:1 zugegeben und die Proben mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

#### Ergebnis:

Bei einmaliger Zugabe von 500 µl H<sub>2</sub>O zu der eingedampften Probe war bereits ein Teil des Sulfatids verloren gegangen, wodurch die Sulfatid-Bande deutlich schwächer in Erscheinung trat, als in der Probe, der kein Wasser zugegeben wurde (**Bild 35**). Nach zweimaliger Zugabe von H<sub>2</sub>O war die Sulfatid-Bande kaum noch erkennbar.

Problematisch an diesem Modellsystem war aber, dass durch den ersten Tropfen H<sub>2</sub>O aus der Pipette ein Teil des Sulfatid-Niederschlags mechanisch abgesprengt wurde, aufschwamm und beim Absaugen verloren ging. Trotz vorsichtigem Pipettieren löste sich das eingedampfte Sulfatid bei Zugabe von H<sub>2</sub>O sehr leicht ab, was in mehreren Versuchen bestätigt wurde. Dieses Problem kann bei der eingesetzten Methode zur



**Bild 35:** 1-3malige H<sub>2</sub>O-Zugabe zu einer eingedampften Probe mit nachträglich zugegebenem Sulfatid in Urin

Aufarbeitung des Urins für die Sulfatidbestimmung nicht auftreten. Insofern ist die in **Bild 35** gezeigte Abnahme des Sulfatids mit großer Vorsicht zu beurteilen und das Ergebnis lässt sich nicht auf die Methode zur Urinaufarbeitung übertragen. Sulfatid kann bei diesem Vorgehen nur verloren gehen, indem Sulfatid in die hydrophile Phase übertritt und mit der Oberphase entfernt wird.

### 3.3.10 Identifikation der Sulfatid-Bande in einer Urinprobe

Um zu überprüfen, ob es möglich war eine Sulfatid-Bande auch in einer Urinprobe mit gleicher Laufrichtung der beiden Laufmittel abzugrenzen, wurde in diesem Versuch Sulfatid-Lösung zu Urin eines gesunden Probanden zugegeben und eine Auftrennung mittels DC durchgeführt. Verwendet wurden zwei unterschiedliche Urinproben eines gesunden Probanden, ein Morgenurin und ein Spontanurin.

Zu 2,5 ml Urin wurden 100 µl Sulfatid-Lösung (350 µM) zugegeben und diese, wie in Kapitel **2.2.6.5** beschrieben, aufgearbeitet. Der Urin wurde mit Chloroform und Methanol gemischt, das endogene Sulfat durch dreimalige Zugabe von H<sub>2</sub>O (Deionat) und Entnahme der hydrophilen Oberphase entfernt und die lipophile Unterphase jeweils zur Trockene eingedampft. Im Vergleich dazu wurde in einem zweiten Ansatz dem Urin ausschließlich Sulfatid-Puffer zugegeben, um durch Vergleichen der Auftrennungen die Sulfatid-Bande identifizieren zu können. Nach der Aufarbeitung wurden alle Proben in 20 µl Chloroform/Methanol = 2:1 gelöst. Auf je eine Kieselgel-Platte wurden 3x je 20 µl Sulfatid in Urin, 3x je 20 µl Sulfatid-Puffer in Urin und 3x je 5 µl Sulfatid in Urin derselben Probe (Spontan- und Morgenurin) aufgetragen.

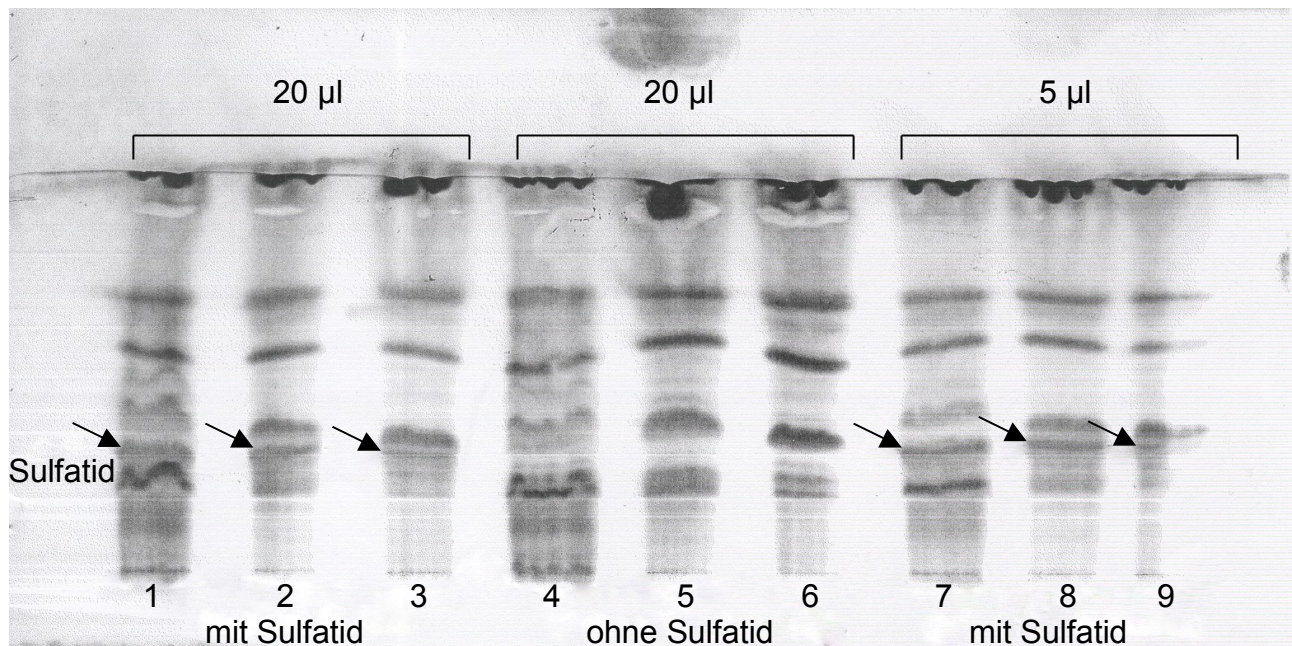
#### Sulfatidkonzentration in den Proben:

Urin (normal):	~ 0,12 µM Sulfatid
Urin (MLD):	~ 4,22 µM Sulfatid
Urin (normal) + 100 µl Sulfatid-Lösung:	~ 13,6 µM Sulfatid

#### Ergebnis:

Das Ergebnis war bei der Verwendung von Morgen- sowie Spontanurin identisch. Durch Vergleich der Ansätze mit und ohne Sulfatid ließ sich die Sulfatid-Bande ein-

deutig in der Auftrennung identifizieren (**Bild 36**). Durch Auftragen von nur 5  $\mu\text{l}$  Probe auf die Kieselgel-Platte wurde eine deutlich bessere Darstellung der Banden erreicht.



**Bild 36:** Auftrennung von Sulfatid-Lösung (1-3 und 7-9) und Sulfatid-Puffer (4-6) in Morgenurin

### 3.3.11 Inkubation von Sulfatid in Urin mit rekombinanter Arylsulfatase A

In diesem Versuchsblock sollte untersucht werden, wie in Urin gelöstes Sulfatid mit Hilfe der rhASA zu Galaktocerebrosid umgesetzt werden kann. Dazu wurden 5 ml Urin statt der sonst üblichen 2,5 ml aufgearbeitet und das Volumen aller Lösungsmittel entsprechend verdoppelt. Zu den 5 ml Urin eines gesunden Probanden wurden 500  $\mu\text{l}$  Sulfatid-Lösung vor der Aufarbeitung zugegeben. Die Probe enthielt damit ca. 31,8  $\mu\text{M}$  Sulfatid, sowie eine endogene Sulfatidkonzentration von 0,12  $\mu\text{M}$  Sulfatid. Anschließend wurde der Urin gemäß Kap. 2.2.6.5 aufgearbeitet. Der Rückstand der aufgearbeiteten Probe wurde anschließend in 550  $\mu\text{l}$  Sulfatid-Puffer resuspendiert und auf fünf Eppendorfcups verteilt. Je 100  $\mu\text{l}$  Probe wurden mit 10 bzw. 20  $\mu\text{l}$  einer 1:10 verdünnten rhASA für eine bzw. drei Stunden bei 37  $^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Als Ausgangswert diente eine Probe, der 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  zugegeben worden waren. Nach der Inkubation wurden die Proben eingedampft und in C/M=2:1 resuspendiert. Es bil-



deten sich zwei Phasen, eine hydrophile Ober- und eine lipophile Unterphase. Die Oberphase wurde entfernt, die übrige Probe nochmals eingedampft, in 25 µl C/M=2:1 resuspendiert und ohne Entfernen der Oberphase auf eine HPTLC-Platte zur Auswertung aufgetragen.

#### Ergebnis:

Die Sulfatid-Bande war in der Auftrennung gut erkennbar, durch die Inkubation mit der rhASA allerdings konnte kein Abbau zu Galaktocerebrosid erreicht werden (Abbildung hier nicht dargestellt).

### **3.3.12 Umsatz von nachträglich zu Urin gegebenem Sulfatid**

Zur Klärung der Frage, ob es die lipophilen Urinbestandteile waren, die in Kap. **3.3.11** den Umsatz von Galaktocerebrosid-3-sulfat mit der rhASA störten, wurde das Sulfatid in diesem Versuch erst nach der Aufarbeitung des Urins zugegeben. Dazu wurden 5 ml Urin mit doppelten Volumina aller Lösungen nach der in Kap. **2.2.6.5** beschriebenen Methode aufgearbeitet. Erst nach dem Eindampfen des Urins wurde Galaktocerebrosid-3-sulfat in Form von 550 µl Sulfatid-Lösung zugegeben. Anschließend wurde das Sulfatid in Urin auf fünf Ansätze verteilt und mit rhASA inkubiert. Nach der Inkubation wurde Chloroform/Methanol zugegeben und die entstandene Oberphase entfernt. Eine dünne Schicht Oberphase wurde zum Schutz des Sulfatids belassen. Die verbliebene Probe wurde nochmals eingedampft und der Rückstand in 20 µl Chloroform/Methanol gelöst und zur Auswertung auf eine Kieselgel-Platte aufgetragen.

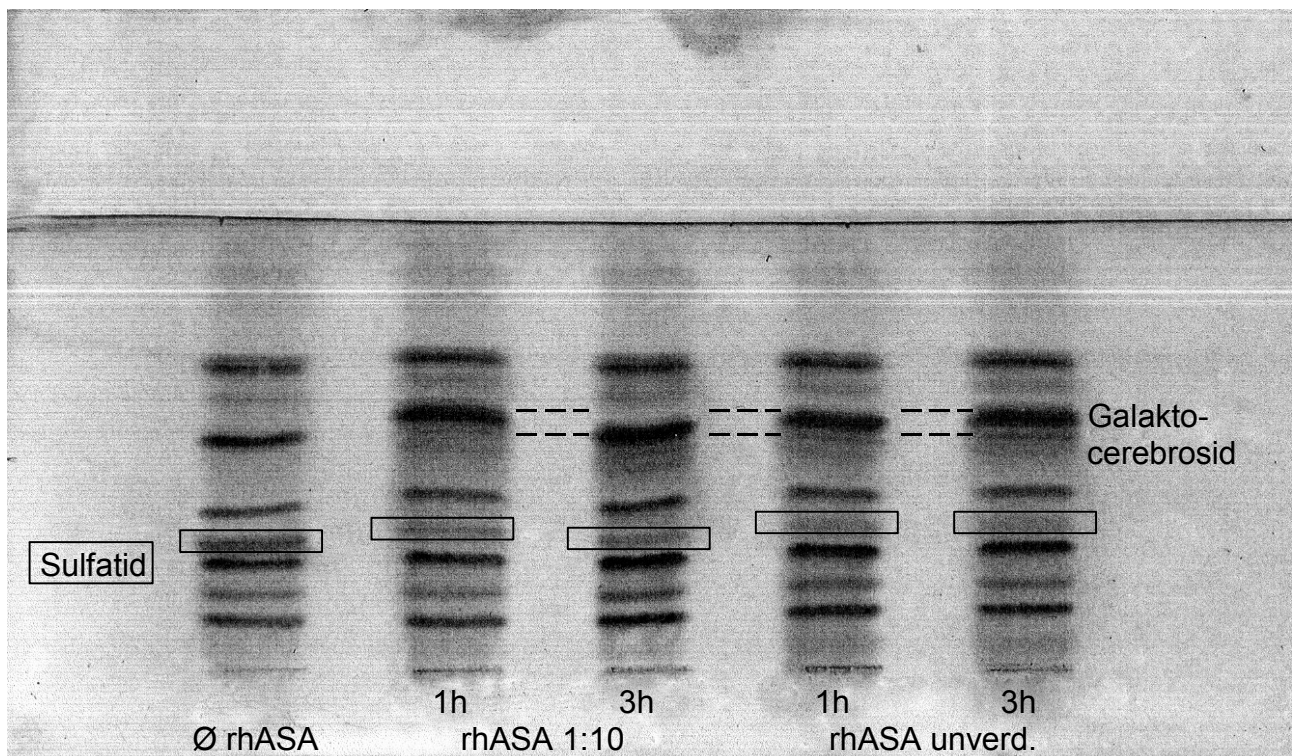
#### Inkubationsbedingungen:

Ansatz ohne rhASA:	100 µl Sulfatid in Urin
	10 µl H <sub>2</sub> O
Ansatz 1 (2x):	100 µl Sulfatid in Urin
	10 µl rhASA unverdünnt
Ansatz 2 (2x):	100 µl Sulfatid in Urin
	10 µl rhASA 1:10 verdünnt

Inkubationszeit: 1 bzw. 3 Stunden  
Inkubationstemperatur: 37 °C  
Reaktionsende: Zugabe von 110 µl Chloroform/Methanol = 2:1

### Ergebnis:

Bei Zugabe des Sulfatids zu dem bereits aufgearbeiteten Urin wurde in allen Ansätzen, die rhASA enthielten, Sulfatid zu Galaktocerebrosid abgebaut. Die Galaktocerebrosid-Bande war nach einer Inkubationszeit von drei Stunden deutlicher erkennbar als nach einstündiger Inkubation (**Bild 37**). Nach einstündiger Inkubation wurde durch Verwendung von unverdünnter rhASA ein größerer Umsatz von Sulfatid erreicht, als mit 1:10 verdünnter rhASA. In allen Ansätzen wurde aber kein vollständiger Umsatz des Sulfatids erzielt, die Sulfatid-Bande war in allen Ansätzen noch sichtbar. Die Tatsache, dass unter diesen Bedingungen ein Umsatz des Sulfatids stattgefunden hatte belegte, dass es nicht an Bestandteilen des Urins lag, dass in dem Experiment in Kap. 3.3.11 kein Umsatz des Sulfatids erfolgt war.



**Bild 37:** Inkubation von nachträglich zu Urin zugegebenem Sulfatid mit unverdünnter und 1:10 verdünnter rhASA, Inkubationszeitzeit 1 bzw. 3 Stunden

### 3.3.13 Optimierung des Umsatzes von nachträglich zu Urin gegebenem Sulfatid

In diesem Versuch sollten die Bedingungen so optimiert werden, dass möglichst ein hundertprozentiger Umsatz des Sulfatids in Urin erreicht würde. Dazu wurden nochmals 5 ml Urin aufgearbeitet und nach dem Eindampfen 650 µl Sulfatid-Lösung zugegeben. Es wurden daraus sechs Proben mit je 100 µl erstellt. Jeder Ansatz wurde zweimal hergestellt, um durch Vergleich der Ansätze untereinander auch schwache Sulfatid-Banden erkennen zu können. Alle Proben wurden, wie in Kap. 3.3.11 beschrieben, aufgearbeitet und mit der Dünnschichtchromatographie ausgewertet.

#### Inkubationsbedingungen:

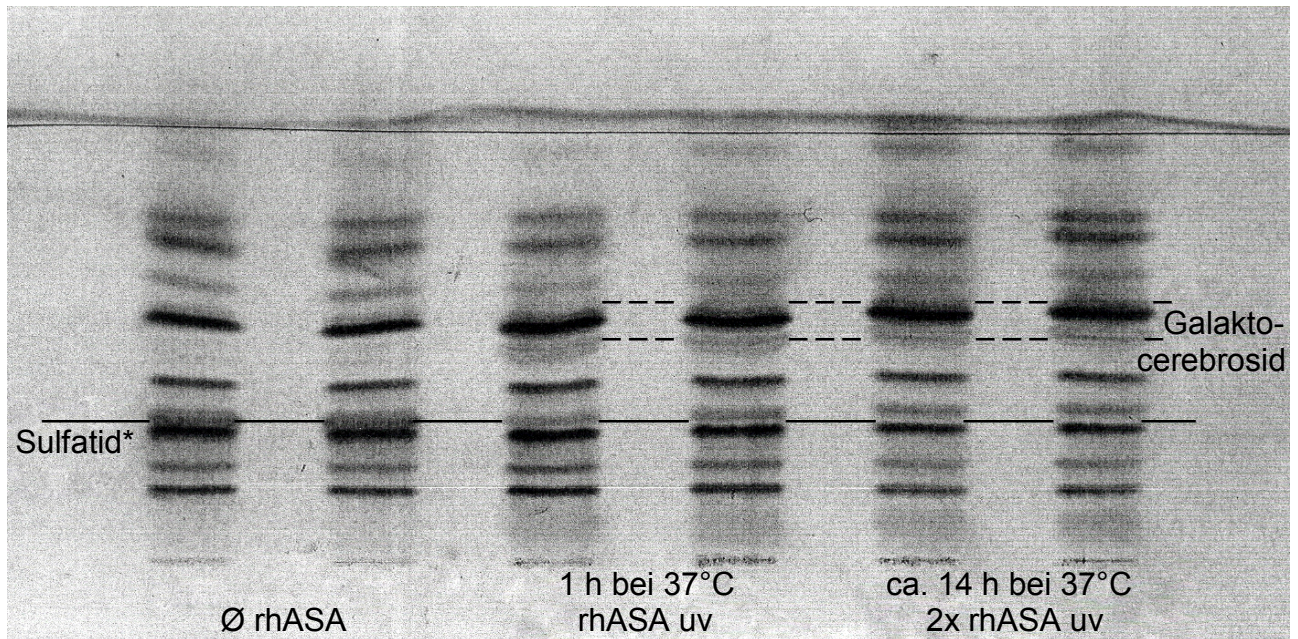
Ansatz ohne rhASA (2x):	100 µl Sulfatid in Urin 10 µl H <sub>2</sub> O
Ansatz 1 (1h):	100 µl Sulfatid in Urin 10 µl rhASA unverdünnt (1,48 mU)
Ansatz 2 (ca. 14 h):	100 µl Sulfatid in Urin 10 µl rhASA unverdünnt zusätzlich nach 1 Stunde nochmals 10 µl rhASA unverdünnt
Inkubationszeit:	1 bzw. ca. 14 Stunden
Inkubationstemperatur:	37 °C
Reaktionsende:	Zugabe von 110 µl bzw. 120 µl Chloroform/Methanol = 2:1

#### Ergebnis:

Nach einer einstündigen Inkubation war noch eine schwache Sulfatid-Bande erkennbar (**Bild 38**). Nach ca. 14stündiger Inkubation und einer Zugabe von insgesamt 20 µl unverdünnter rhASA war keine Sulfatid-Bande mehr nachweisbar.

Mit der Einschränkung, dass es sich bei der Dünnschichtchromatographie um eine semiquantitative Nachweismethode für das Galaktocerebroside-3-sulfat handelt, ließ die Auswertung vermuten, dass ein nahezu vollständiger Umsatz des Sulfatids nach 14stündiger Inkubation stattgefunden hatte. Damit konnte gezeigt werden, dass ein

vollständiger Umsatz des Sulfatids auch in Gegenwart von lipophilen Urinbestandteilen möglich war.



**Bild 38:** Inkubation von nachträglich zu eingedampftem Urin gegebenem Sulfatid mit unverdünnter rhASA für 1 sowie ca. 14 Stunden, (\* die Sulfatid-Bande befindet sich zwischen zwei weiteren Substrat-Banden, nach 14stündiger Inkubation sind nur noch die Banden ober- und unterhalb der Sulfatid-Bande erkennbar)

### 3.3.14 Zusammenfassung - Umsetzung von Sulfatid in Urinproben

Der Nachweis der Umsetzung von Sulfatid unter den Bedingungen im Urin stellte einen sehr wichtigen Schritt für das Gelingen dieser Arbeit dar.

Durch Vergleich mit der Auftrennung eines Ansatzes, der ausschließlich Puffer in Urin enthielt, ließ sich die Sulfatid-Bande in Urin gut von den übrigen Banden abgrenzen.

Die Umsetzung von Sulfatid in Urin bereitete zunächst Schwierigkeiten. Wurde das Sulfatid aber erst nach der Aufarbeitung zu der Urinprobe zugegeben, war eine Umsetzung dieses Sulfatids zu Galaktocerebrosid problemlos möglich. Nach zwölfstündiger Inkubation und Zugabe von 2,96 mU rhASA wurde ein vollständiger Umsatz des Sulfatids erreicht. Die Frage, ob ein Teil des Sulfatids bei der Urinaufarbeitung verloren ging, konnte damit aber nicht beantwortet werden.

### 3.4 Isotachophorese

Die Isotachophorese ermöglicht eine quantitative Bestimmung von Ionenkonzentrationen im wässrigen System. Die Ionenkonzentration wird aus der Laufzeit der entsprechenden Stufe eines Analyten bestimmt (vergleiche Kap. 2.2.7). Um die Konzentration eines Analyten aus der Laufzeit seines Signals zu ermitteln, muss zunächst mit bekannten Konzentrationen des Ions eine Kalibrierkurve erstellt werden. Proben unbekannter Konzentration konnten anschließend mit der Kalibrierkurve ausgewertet werden, die im selben Elektrolytssystem bestimmt wurde.

Durch die Wahl des Elektrolytsystems wurde zunächst festgelegt, ob Anionen oder Kationen untersucht werden sollten. Da die Methode in dieser Arbeit vor allem für die Sulfatdetektion eingesetzt wurde, wurde ein anionisches Elektrolytssystem gewählt. Darüber hinaus wurde mit dem Elektrolytssystem die maximale Spannungsdifferenz festgelegt und damit die nachweisbaren Ionen.

Die Stufenhöhe jedes Signals wird in Relation zu Leit- und Endelektrolyt angegeben. Die Stufenhöhe des Leitelektrolyten ist dabei immer gleich 0 und die des Endelektrolyten immer gleich 1 gesetzt. Daraus ergibt sich, dass alle gemessenen Stufenhöhen der Analyten zwischen Null und Eins angegeben werden. Diese relative Stufenhöhe eines Ions ist im selben Elektrolytssystem immer gleich und damit charakteristisch für die jeweilige Substanz. Sie dient der Erkennung des Ions in komplexeren Proben. Dabei ist zu beachten, dass sich sowohl die relative Stufenhöhe als auch die Laufzeit des Signals eines Ions ändert, wenn die Zusammensetzung oder Art des Leit- oder Endelektrolyts, verändert wird.

#### 3.4.1 Chlorid-Capronsäure-Elektrolytssystem

In dieser Arbeit wurde als Endelektrolyt zunächst Capronsäure eingesetzt. Bei der Capronsäure handelt es sich um eine Hexansäure ( $C_5H_{11}-COOH$ ), die relativ schlecht in Wasser löslich ist und nur eine geladene  $COO^{\ominus}$ -Gruppe besitzt. Sie weist daher eine niedrige Mobilität auf und die Spannungsdifferenz zwischen dem Leitelektrolyt Chlorid und dem Endelektrolyt Capronsäure betrug bei einer Stromstärke von 50  $\mu A$  ca. 5 kV. Das Chlorid-Capronsäure-Elektrolytssystem wurde verwendet, um

die Anionen para-Nitrocatecholsulfat, Galaktose-4-sulfat und Galaktose-6-sulfat zu bestimmen.

### 3.4.2 Zuordnung der Pufferbestandteile zur jeweiligen Substrat-Stufe

Bei der Auswertung eines Sulfatid-Puffers (Natriumazetat, Taurocholat) mit der Isotachophorese entstanden zahlreiche Substanz-Stufen. Um eine Zuordnung dieser Stufen zu ermöglichen, wurden die einzelnen Bestandteile des Puffers nacheinander in Proben mit Sulfatid-Puffer erhöht. Durch Veränderung der Laufzeit der Stufen im Diagramm konnten die verursachenden Anionen identifiziert werden.

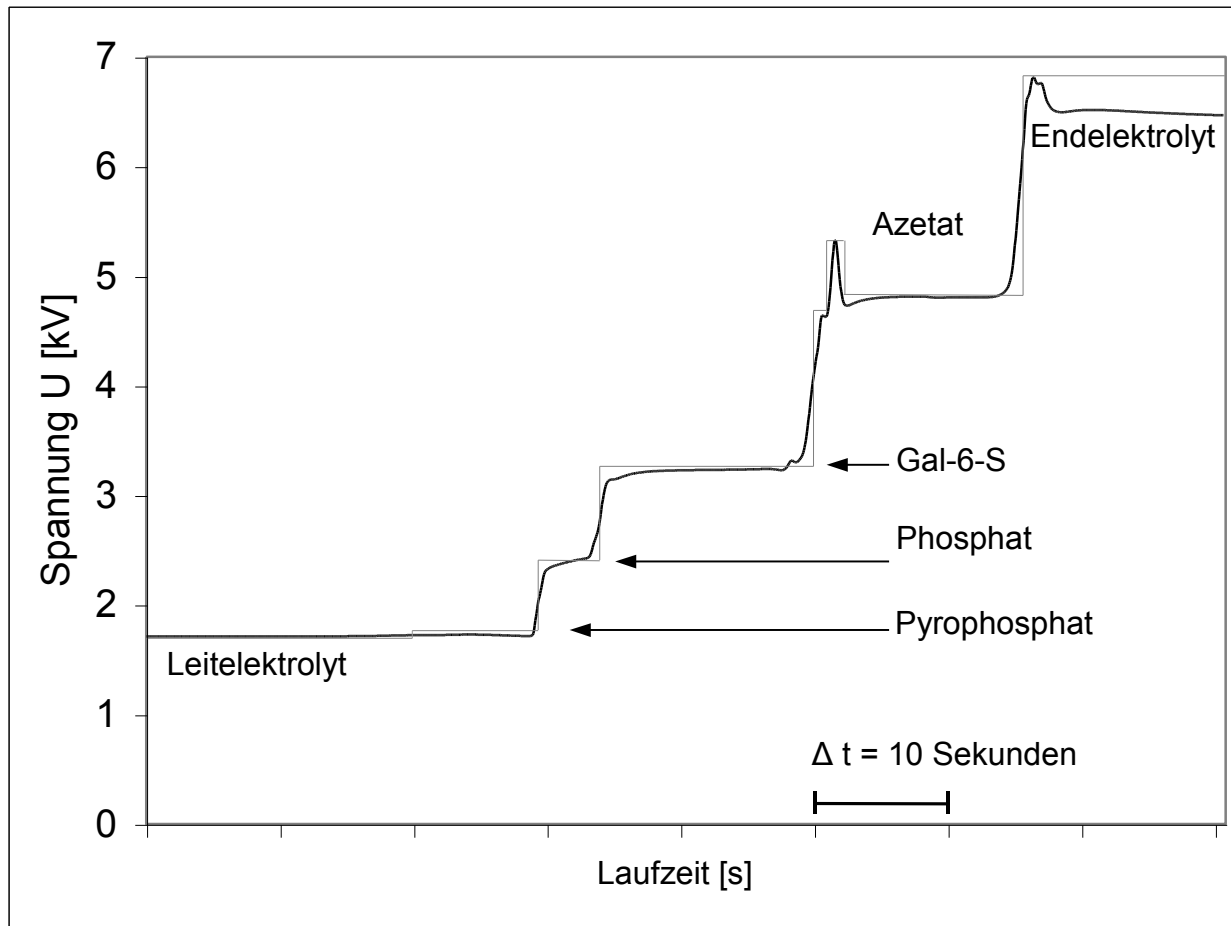
Für die Azetatdetektion wurden Puffer mit 10 mM und 50 mM Natriumazetat unverdünnt, sowie in den Verdünnungen 1:10 und 1:50 ausgewertet. Das Azetat-Anion hat die Strukturformel  $\text{CH}_3\text{COO}^\ominus$  und ist damit einfach negativ geladen. Ein weiterer Bestandteil des Puffers, das Pyrophosphat hat die Strukturformel  $(\text{O}_3\text{P})\text{-O}\text{-(PO}_3\text{)}^{4-}$  und ist vierfach negativ geladen. Pyrophosphat sowie Natriumchlorid wurden in zwei weiteren Ansätzen in höherer Konzentration in einem Sulfatid-Puffer gelöst und mit der Isotachophorese ausgewertet.

#### Ergebnis:

Die Azetat-Stufe lässt sich durch Variation der zugegebenen Konzentration eindeutig identifizieren (siehe **Bild 39**). Eine Probe mit einem 50 mM Natriumazetat-Puffer und anschließender Verdünnung 1:10 ergibt beispielsweise ein Azetat-Signal mit einer Laufzeit von 2470 Sekunden. Durch Zugabe einer höheren Konzentration von Pyrophosphat verlängerten sich zwei Stufen deutlich. Dies ließ den Schluss zu, dass ein Teil des zugegebenen Pyrophosphats zerfiel und es sich bei der zweiten Stufe um freies Phosphat handelte. Die relativen Stufenhöhen von Phosphat und Pyrophosphat sind sehr gering und beide Ionen haben damit im Vergleich zu Azetat eine deutlich höhere Mobilität (**Tabelle 8**). Das Pyrophosphat-Signal wies eine, dem Sulfat sehr ähnliche Stufenhöhe auf.

Durch eine Erhöhung der Konzentration von Natriumchlorid ist keine Änderung der Anordnung der Signale zu erwarten gewesen, da als Leitelektrolyt Chlorid verwendet wurde. Durch Zugabe von Natriumchlorid verlängerte sich ausschließlich die Laufzeit

des Leitelektrolyts. Die restlichen Stufen stammten offensichtlich von dem unreinen, technischen Taurocholat und ließen sich deshalb nicht näher bestimmen.



**Bild 39:** Isotachogramm von Galaktose-6-sulfat (0,1 mM) und pNCS-Puffer (0,2 mM Natriumazetat, 0,01 mM Pyrophosphat) im Chlorid-Capronsäure-Elektrolytsystem mit der Isotachophorese. Auswertung 50  $\mu$ A. Die „Ideal graph“ Funktion ist schematisch dargestellt.

**Tabelle 8:** Relative Höhe der Stufen von Pufferbestandteilen eines insgesamt 1:50 verdünnten pNCS-Puffers

Pufferbestandteil	Substanz	Relative Stufenhöhe
Natriumazetat	Azetat	0,586 ( $\pm$ 0,0119; n=10)
Natriumpyrophosphat	Pyrophosphat Phosphat	0,02 (n=1) 0,142 ( $\pm$ 0,0030; n=9)
NaCl	Chlorid	0

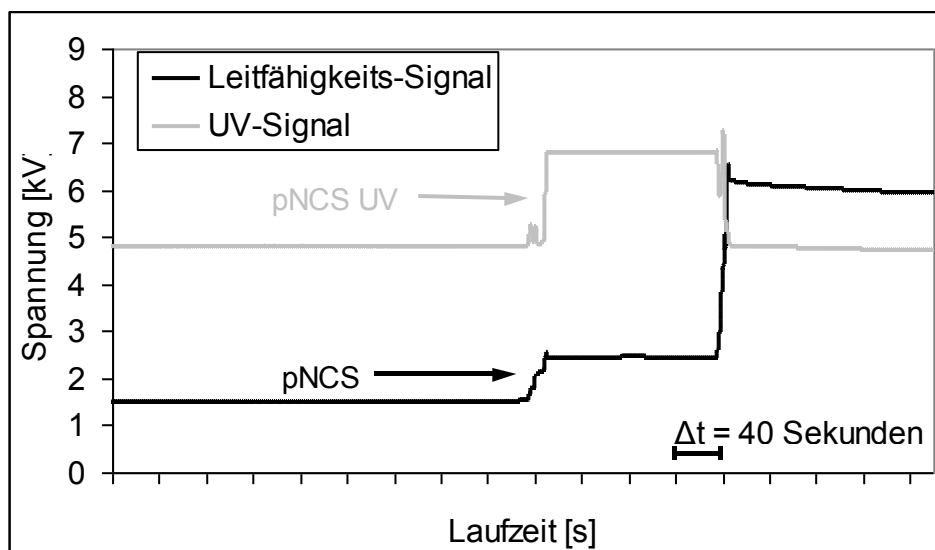
### 3.4.3 pNCS-Kalibrierkurve in H<sub>2</sub>O im Chlorid-Capronsäure-Elektrolytssystem

Das para-Nitrocatecholsulfat (pNCS) ist durch seine Sulfatgruppe zweifach negativ geladen. Deshalb ließ es sich gut mit der Isotachophorese auswerten. Eine pNCS-Kalibrierkurve sollte dazu verwendet werden, den Umsatz durch die Arylsulfatase A zu quantifizieren. Der Umsatz von pNCS sollte in diesem Versuch, über die Abnahme des Substrats statt über die Zunahme des Produkts (Sulfat) ausgewertet werden. Das war erforderlich, da die Sulfatdetektion mit Capronsäure als Endelektrolyt Schwierigkeiten bereitete. Für die Kalibrierkurve wurde eine 1 mM pNCS-Stamm-lösung erstellt und diese immer wieder 1:1 mit H<sub>2</sub>O (Deionat) verdünnt, bis eine Probenreihe von 8,44 µM bis 1 mM vorlag.

#### Ergebnis:

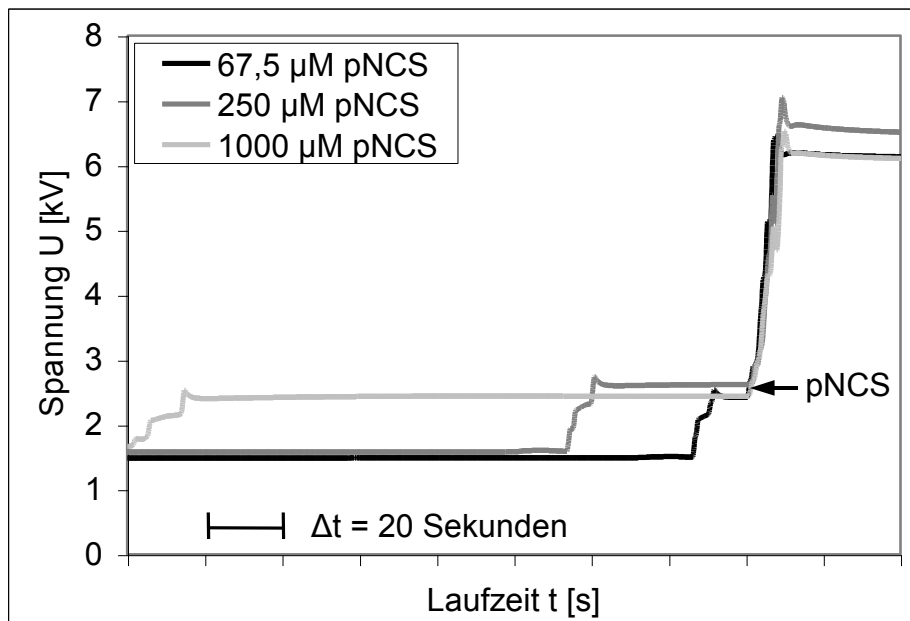
Das pNCS-Signal wurde als Stufe mit einer relativen Stufenhöhe von 0,192 ( $\pm 0,0042$ ;  $n=7$ ) abgebildet (**Bild 40a+b**).

Wurde die Laufzeit im Diagramm über der pNCS-Konzentration aufgetragen, lagen alle Messwerte auf einer Geraden (**Bild 40c**). Es bestand ein linearer Zusammenhang zwischen der Laufzeit des Signals des para-Nitrocatecholsulfats und der Konzentration in der Probe. Aus diesem Zusammenhang konnte der Umsatz, nach einer Inkubation einer Probe von 10 mM pNCS mit der rhASA, berechnet werden.

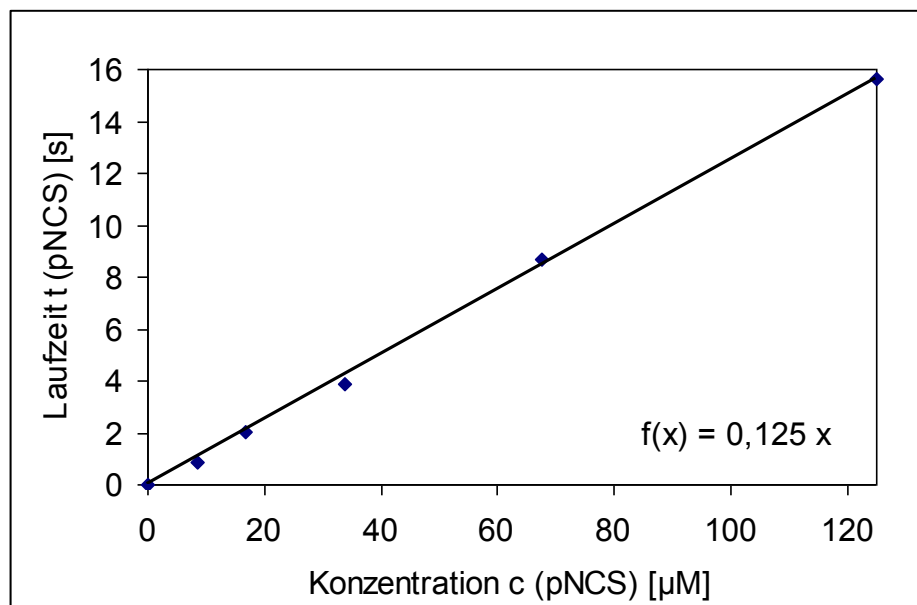


**Bild 40a:** Isotachogramm mit Leitfähigkeits- und UV-Signal von 1 mM para-Nitrocatecholsulfat in H<sub>2</sub>O (30 µl Probenvolumen)





**Bild 40b:** Isotachogramm von 67,5, 250 sowie 1000 μM pNCS in H<sub>2</sub>O



**Bild 40c:** Kalibrierkurve von pNCS in H<sub>2</sub>O. Laufzeit des pNCS-Signals in der Isotachophorese in Abhängigkeit von der Konzentration in der Probe

Eine Konzentration von 0,1 mM pNCS entsprach nach der Ausgleichsgerade der Kalibrierkurve einer Laufzeit von 12,7 Sekunden. Damit ergab sich für die Ausgangskonzentration des pNCS (10 mM) eine 100fach längere Laufzeit von 1270 Sekunden. Aus diesem Zusammenhang konnte der Umsatz, nach einer Inkubation einer Probe

von 10 mM pNCS mit der rhASA, berechnet werden. Wurde nach Inkubation eines Ansatzes mit 10 mM pNCS eine Rest-Laufzeit des pNCS von 12,5 Sekunden gemessen, dann waren 99% des pNCS zu para-Nitrocatechol umgesetzt worden. Daraus ergab sich bei einem Ansatz mit 10 mM pNCS folgende Gleichung für den Umsatz:

$$\text{Umsatz (pNCS)}[\%] = 100 - \left( \frac{t(\text{pNCS-Signal}) \times \text{VF}}{1.250\text{s}} \times 100 \right) \quad (10)$$

Wurde die Probe vor der Auswertung mit der Isotachophorese verdünnt, musste die Länge des Signals, wie in Kap. 2.2.5.5 beschrieben mit dem Verdünnungsfaktor (VF) multipliziert werden.

#### 3.4.4 Umsatz von pNCS durch rhASA bei reduzierter Pufferkapazität

Um die Kinetik der Abspaltung des Sulfats von para-Nitrocatecholsulfat zu objektivieren, wurde neben den photometrischen Messungen auch eine Auswertung mit der Isotachophorese durchgeführt. Durch Vergleich mit der pNCS-Kalibrierkurve konnte aus den gemessenen Laufzeiten die pNCS-Konzentration errechnet werden.

Darüber hinaus wurde untersucht, wie sich unterschiedliche Natriumazetat-Konzentrationen auf den Umsatz von pNCS auswirkten. Falls die Pufferkonzentration keinen Einfluss auf den Umsatz hätte, wäre die niedrigste mögliche Pufferkonzentration am besten für die Auswertung mit der Isotachophorese geeignet. Der Grund dafür war, dass die Konzentration des Sulfatids im Urin zwischen ca. 0,1 (normal) und im Mittel 4,2  $\mu\text{M}$  (MLD) liegt. Bereits die niedrigste gewählte Natriumazetat-Konzentration lag mit 10 mM um etwa den Faktor 1000 höher als die Konzentration des Sulfatids. Verwendet wurde ein 1:10 verdünnter pNCS-Puffer mit 50 mM Natriumazetat und ein 1:50 verdünnter pNCS-Puffer mit 10 mM Natriumazetat. In die beiden verwendeten pNCS-Puffer wurden je 10 mM pNCS gegeben.

##### Versuchsbedingungen:

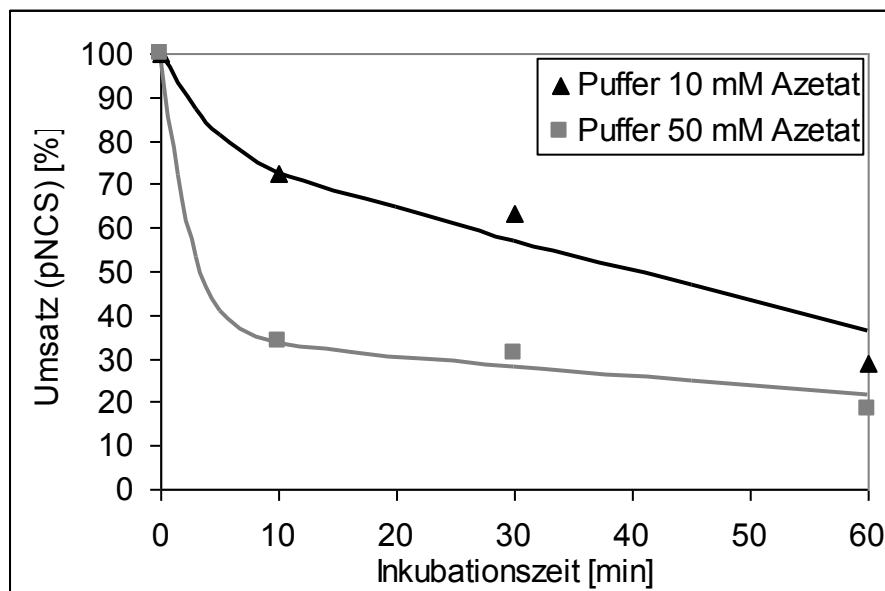
Ansatz: 50  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O (Deionat)  
 200  $\mu\text{l}$  pNCS-Puffer 10 bzw. 50 mM mit je 10 mM pNCS  
 10  $\mu\text{l}$  rhASA 1:10 verdünnt

Inkubationszeit: 10, 30 und 60 Minuten und ca. 14 Stunden  
Inkubationstemperatur: 37 °C  
Reaktionsende: nachträgliche Verdünnung 1:10 mit H<sub>2</sub>O

Zum Vergleich wurde ein Ansatz mit 10 µl H<sub>2</sub>O statt rhASA mitgeführt. Die Proben wurden im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Vor Analyse mit der Isotachophorese wurden die Proben noch einmal 1:10 mit H<sub>2</sub>O (Deionat) verdünnt. Dadurch reduziert sich die Anfangskonzentration von pNCS in den Proben auf  $2 \times 10^{-7}$  Mole pro Ansatz. Alle Ergebnisse wurden prozentual zur Ausgangskonzentration des pNCS angegeben. Dazu wurde die Laufzeit des Ausgangswertes gleich 100% gesetzt und alle anderen Laufzeiten zur Laufzeit des Ausgangswertes ins Verhältnis gesetzt.

#### Ergebnis:

Unter Verwendung der beiden verdünnten pNCS-Puffer wurde in den Proben eine zeitabhängige Abnahme des pNCS erreicht.



**Bild 41:** Umsatz von pNCS nach Inkubation mit rhASA bezogen auf die Ausgangskonzentration von 10 mM pNCS in 2 verschiedenen konzentrierten pNCS-Puffern (50 mM und 10 mM Natriumazetat) für 0, 10, 30 und 60 Minuten

Nach ca. 14stündiger Inkubation war bei der Verwendung von 50 mM-pNCS-Puffer kein pNCS-Signal mehr nachweisbar. In Puffer mit 10 mM Natriumazetat waren nach

ca. 14stündiger Inkubation noch 5,4% der Ausgangskonzentration des pNCS vorhanden. Durch den Vergleich der Kurven der verschiedenen konzentrierten pNCS-Puffer wurde deutlich, dass bei geringerer Pufferkapazität durch weniger Natriumazetat der Umsatz von pNCS langsamer ablief (**Bild 41**). Während z.B. nach 10 Minuten im 50 mM-pNCS-Puffer zwei Drittel des para-Nitrocatecholsulfats umgesetzt waren, wurde im 10 mM-pNCS-Puffer nur ein Drittel umgesetzt.

### 3.4.5 Stabilität der rhASA in Heparin-Plasma

Die Stabilität der rhASA in Blutplasma wurde bereits photometrisch ausgewertet (vgl. Kap. 3.2.5). Mit der Isotachophorese wurden ausgewählte Proben nochmals analysiert. Ausgewählt wurden die Proben mit 1:500 verdünnter rhASA in Heparin-Plasma und davon die Inkubationszeiten 0, 2, 4 und 12 Stunden.

#### Versuchsbedingungen - Auswertung:

Ansatz:	25 µl Probe (Plasma und ca. 1,48 µU rhASA/Ansatz)
	25 µl H <sub>2</sub> O
	200 µl pNCS-Lösung 10 mM
Inkubationszeit:	60 Minuten
Inkubationstemperatur:	37 °C
Reaktionsende:	Einfrieren der Proben bei -18 °C

Zur Auswertung mittels Isotachophorese wurden alle Proben jeweils 60 Minuten im Wasserbad inkubiert. Direkt anschließend wurden die Proben eingefroren. Vor der Auswertung mit der Isotachophorese war es erforderlich, alle verbliebenen größeren Plasmabestandteile aus den Proben zu entfernen. Große Moleküle besitzen eine geringe Mobilität und würden daher die Auswertung behindern. Deshalb wurden die Proben vor der Auswertung zwei mal für je fünf Minuten bei 10500 g mit einer Ependorf-Zentrifuge ultrafiltriert. Die Zentrifugation erfolgte in speziellen Röhrchen, mit einem Filter mit einer Filtrationsgrenze von 30.000 D. Anschließend wurden die Proben außerdem 1:10 mit H<sub>2</sub>O (Deionat) verdünnt.

Ergebnis:

Die Auswertung zeigte, wie bei der photometrischen Auswertung in Kap. 3.2.5, keine relevante Abnahme der rhASA-Aktivität in den Proben. Nach zwölfstündiger Inkubation der rhASA in einer Blutplasma-Probe wurden nur 5% weniger pNCS umgesetzt als von der rhASA die nicht in Plasma inkubiert worden war. Das photometrisch erhaltene Ergebnis wurde somit bestätigt. Die photometrische Auswertung stellte für diese Auswertung die geeignetere Methode dar, da sie eine Auswertung ohne vorherige Ultrafiltration ermöglichte.

**3.4.6 Umsatz von pNCS durch Arylsulfatase A aus Leukozyten**

In diesem Versuch sollte der Umsatz von pNCS durch die endogene Arylsulfatase A aus Enzymextrakt der Leukozyten mit der Isotachophorese bestimmt werden. Die Inkubation von 200  $\mu$ l 10 mM pNCS-Lösung mit 50  $\mu$ l Enzymextrakt aus  $5 \times 10^5$  Leukozyten wurde für 1 und 4 sowie ca. 14 Stunden bei 37 °C durchgeführt. Vor der Auswertung mit der Isotachophorese wurden auch diese Proben wie in Kap. 3.4.5 beschrieben ultrafiltriert und anschließend 1:10 mit H<sub>2</sub>O (Deionat) verdünnt.

Ergebnis:

Es zeigte sich keine relevante Abnahme des pNCS und nur eine sehr geringe Zunahme der Laufzeit der Sulfatstufe. Dieses Ergebnis war zu erwarten gewesen, da nach Kap. 3.2.3 die Aktivität der endogenen ASA aus  $5 \times 10^5$  Leukozyten der von 10  $\mu$ l einer 1:1000 verdünnten rhASA Stammlösung (0,148  $\mu$ U/10  $\mu$ l) entsprach. Nach den Ergebnissen in Kap. 3.2.11.1 wurde durch 0,148  $\mu$ U rhASA nach einer Inkubationszeit von einer Stunde mit einer 10 mM pNCS-Lösung ein Umsatz von 0,38% erreicht. Nach etwa 14stündiger Inkubation betrug der Umsatz 0,55% des pNCS. Aus diesen Werten errechnete sich eine Verkürzung der Laufzeit des pNCS-Signals in der ITP von 4,75 Sekunden bei einstündiger Inkubation bzw. 7 Sekunden nach einer ca. 14stündiger Inkubation im Vergleich zu dem pNCS-Signal vor Inkubation. Durch die nachträgliche Verdünnung der Probe vor der Auswertung um 1:10 mit H<sub>2</sub>O, verringerte sich die Änderung der Laufzeit sogar auf 0,48 bzw. 0,7 Sekunden. Der Unterschied der Laufzeiten vor und nach Inkubation war bei einer Laufzeit des pNCS-

Signals vor Inkubation von ca. 70 Sekunden zu gering um sicher auswertbar zu sein. Damit stellte sich die enzymatische Methode zur Bestimmung der ASA-Aktivität der Leukozyten bei geringen Änderungen des Umsatzes von pNCS gegenüber einem Nachweis mittels ITP als deutlich überlegen heraus.

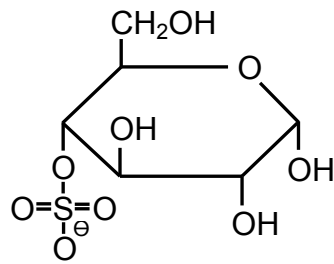
### **3.4.7 Zusammenfassung - pNCS-Umsatz im $\text{Cl}^{\ominus}$ -Capronsäure-Elektrolytsystem**

Das para-Nitrocatecholsulfat ließ sich im Chlorid-Capronsäure-Elektrolytsystem mit einer relativen Stufenhöhe von 0,192 gut abbilden. Der Umsatz des pNCS durch rekombinante Arylsulfatase A wurde über die Abnahme der Laufzeit des pNCS-Signals bestimmt. Die Abbauprodukte, Sulfat und para-Nitrocatechol, ließen sich im Gegensatz zu pNCS im Chlorid-Capronsäure-Elektrolytsystem nicht darstellen. Die Geschwindigkeit des Umsatzes von pNCS war abhängig von der Natriumazetatkonzentration im Ansatz. Bei einer Natriumazetatkonzentration von 50 mM waren nach 30 Minuten ca. 60% des pNCS umgesetzt, bei einer Natriumazetatkonzentration von 10 mM hingegen nur ca. 30%. Nach einer Inkubation der Proben für ca. 14 Stunden war in dem 50 mM-Puffer kein pNCS in der Probe mehr nachweisbar, in dem Ansatz mit 10 mM Natrium-Azetat noch 5,4%.

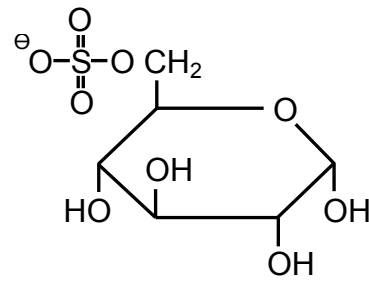
Die Stabilität der rhASA in Heparin-Plasma konnte auch mit der ITP bestätigt werden. Nach zwölfstündiger Inkubation in Heparin-Plasma wurden von der rhASA (ca. 0,148  $\mu\text{U}/\text{Ansatz}$ ) im Vergleich zu dem Umsatz vor Inkubation in Plasma (100%) noch etwa 95% des pNCS umgesetzt.

### **3.4.8 Inkubation von Galaktose-4- und -6-sulfat mit rhASA**

An das Galaktocerebrosid-3-sulfat ist das Sulfat über eine Esterbindung an dem  $\text{C}_3$ -Atom des Galaktose-Rings gebunden. In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob auch Galaktoseverbindungen, die eine Sulfatgruppe an einem anderen C-Atom gebunden haben, Substrate der rhASA sein könnten. Dazu wurden Galaktose-4-sulfat und Galaktose-6-sulfat in pNCS-Puffer mit der rhASA inkubiert.



Galaktose-4-sulfat

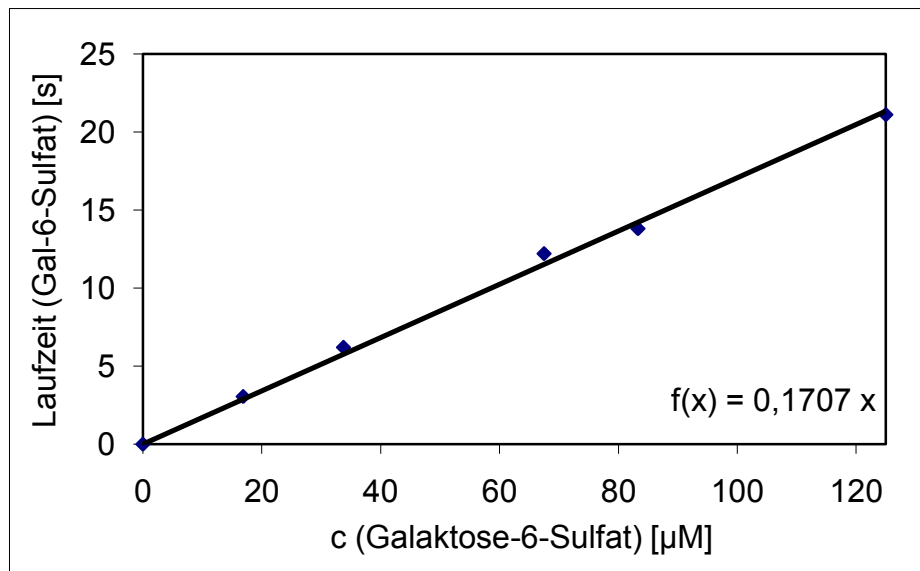


Galaktose-6-sulfat

Zuvor wurde mit verschiedenen Konzentrationen des Galaktose-6-sulfats eine Kalibrierkurve erstellt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von Galaktose-6-sulfat in Wasser mit Konzentrationen von 16,88 bis 125  $\mu\text{M}$  hergestellt. Dieser Verdünnungsreihe wurde zusätzlich Sulfat in der jeweils selben Konzentration wie Galaktose-6-sulfat zugegeben. Das Sulfat wurde zugegeben, weil Ionen mit höherer Mobilität in der Isotachophorese Einfluss auf die Konzentrationen und damit auf die Laufzeiten der Zonen in den folgenden Stufen haben, siehe Kap. **2.2.7**. Es zeigte sich eine lineare Zunahme der Laufzeit des Signals in der Isotachophorese mit der Konzentration von Galaktose-6-sulfat in der Probe (**Bild 42**).

Die relative Stufenhöhe von Galaktose-4-sulfat betrug 0,29 ( $\pm 0,009$ ;  $n=3$ ) und eine Konzentration von 91  $\mu\text{M}$  Galaktose-4-sulfat (ursprünglich 4,55 mM Galaktose-4-Sulfat und einer nachträglichen Verdünnung der Probe um 1:50 mit  $\text{H}_2\text{O}$ ) verursachte ein Signal mit einer Laufzeit von 15,1 Sekunden ( $\pm 0,33$ ;  $n=3$ ). Die relative Stufenhöhe von Galaktose-6-sulfat betrug 0,302 ( $\pm 0,0056$ ;  $n=7$ ) (siehe **Bild 39**) und unterschied sich damit nur geringfügig von der Stufenhöhe von Galaktose-4-sulfat. Das Galaktose-6-sulfat-Signal wies bei einer Konzentration von 91  $\mu\text{M}$  eine Laufzeit von 13,0 Sekunden ( $\pm 0,66$ ;  $n=3$ ) auf. Die Sulfat-Stufe war in keiner der Schaubilder der ITP auswertbar.

Als Inkubationszusatz für die Inkubation der beiden Galaktose-Sulfate mit der rhASA wurde ein pNCS-Puffer nach Kap. **2.1.4.2** verwendet. Für Galaktose-4-sulfat und Galaktose-6-sulfat wurde je ein separater Versuch durchgeführt. Dazu wurden jeweils zehn Ansätze erstellt. Verwendet wurden die zwei Verdünnungen des pNCS-Puffers 1:10 (50 mM) und 1:50 (10 mM), zwei rhASA-Konzentrationen, sowie zwei Inkubationszeiten. Zusätzlich wurde je ein Ausgangswert ohne Zugabe von rhASA mitgeführt.



**Bild 42:** Kalibrierkurve von Galaktose-6-sulfat in  $\text{H}_2\text{O}$ . Sulfat war jedem Ansatz in derselben Konzentration wie Galaktose-6-sulfat zugegeben worden

#### Versuchsbedingungen:

Ansatz:                    50  $\mu\text{l}$  10 mM Galaktose-Sulfat in pNCS-Puffer  
                                   (10 bzw. 50 mM)  
                                   50  $\mu\text{l}$  pNCS-Puffer (10 bzw. 50 mM)  
                                   10  $\mu\text{l}$  rhASA 1:10 bzw. 1:100

Inkubationszeit:        1 und ca. 14 Stunden

Inkubationstemperatur: 37 °C

Reaktionsende:        Verdünnung 1:50 mit  $\text{H}_2\text{O}$  (Deionat)

#### Ergebnis:

Das Sulfat-Signal war in den Ansätzen nicht auswertbar. Der Umsatz von Galaktose-4-sulfat bzw. Galaktose-6-sulfat durch die rhASA erfolgte deshalb über den Vergleich der Laufzeiten der Substrate vor und nach Inkubation. Weder Galaktose-4-sulfat noch Galaktose-6-sulfat zeigten eine Konzentrationsabnahme. Für Galaktose-6-sulfat war dies bereits durch Kolodny & Fluharty (1995) beschrieben worden. Daraus ließ sich schließen, dass beide Verbindungen kein Substrat der rhASA sind und die rhASA entweder nur Esterbindungen spalten kann, die am dritten Kohlenstoffatom



der Galaktose gebunden sind, oder dass weitere Erkennungsstellen an einem sulfathaltigen Molekül erforderlich sind um von der rhASA als Substrat erkannt zu werden.

### **3.4.9 Saure Hydrolyse von Galaktose-6-sulfat als Model für die Sulfatabspaltung von Galaktocerebrosid-3-sulfat**

Die Esterbindung zwischen Sulfat und Galaktose kann auch durch eine saure Hydrolyse mit Salzsäure (HCl) gespalten werden. Bei der sauren Hydrolyse handelt es sich um eine unspezifische Spaltung von Esterbindungen.

Vorteil einer sauren Hydrolyse zur indirekten Sulfatidbestimmung im Hinblick auf die ITP wäre, dass bei der Abspaltung des  $\text{SO}_4^{2-}$  vom Sulfatid kein Taurocholat als Vermittler für die Sulfatabspaltung verwendet werden müsste. Problematisch war aber der niedrige pH-Wert der Proben infolge der verwendeten HCl, sodass die Proben nicht direkt mit der Isotachophorese analysiert werden konnten. Der Chloridgehalt der zur Abspaltung verwendeten Salzsäure lag mit 5 M HCl 500fach höher als die Chloridkonzentration des Leitelektrolyts mit 10 mM  $\text{Cl}^-$ . Ein weiteres Problem bestand in der Unklarheit darüber, ob im Urin noch weitere sulfathaltige Verbindungen vorliegen, aus denen durch die saure Hydrolyse anorganisches Sulfat freigesetzt würde.

#### **3.4.9.1 Saure Hydrolyse von Galaktose-6-sulfat mit 5 molarer Salzsäure**

Die Spaltung der Esterbindung zwischen Galaktose und Sulfat wurde zunächst mit 5 M HCl nach Kap. 2.2.8 durchgeführt. Dazu wurde eine Galaktose-6-sulfat-Lösung mit 10 mM Galaktose-6-sulfat in  $\text{H}_2\text{O}$  (Deionat) erstellt und volumengleich mit einer 10 mM HCl versetzt. Dadurch entstand eine Probe mit 5 mM Galaktose-6-sulfat und 5 M HCl.

Ansatz 5 M:	200 $\mu\text{l}$ 10 mM Galaktose-6-sulfat-Lösung
	200 $\mu\text{l}$ 10 M HCl
Inkubationszeit:	ca. 14 Stunden
Inkubationstemperatur:	100 °C im Heizblock

Die hohe Salzsäurekonzentration erforderte eine nachträgliche Reduktion der Salzsäurekonzentration in der Probe, um eine Auswertung mit der ITP möglich zu machen. Dazu wurde nach Inkubation die Flüssigkeit in den Reagenzgläsern bei 140 °C unter dem Abzug eingedampft. Anschließend wurde der Rückstand in 500 µl H<sub>2</sub>O (Deionat) wieder gelöst. Dieser Vorgang wurde noch ein zweites Mal wiederholt. In einer zur Kontrolle mitgeführten Probe, die ausschließlich 5 M HCl enthielt, wurde vor Aufarbeitung ein pH-Wert von 0 gemessen. Nach dem zweimaligen Eindampfen betrug der pH-Wert in der Kontrollprobe 4,5. Ein pH-Wert von 4,5 entspricht einer H<sup>+</sup>-Konzentration von 0,03 mM. Damit konnte die Probe nach dem Verdünnen problemlos mit der ITP ausgewertet werden.

#### Ergebnis:

Durch das Eindampfen entstand im Reagenzglas ein rotbrauner, schwer löslicher Rückstand, bei dem es sich vermutlich um Galaktose und Galaktose-6-sulfat handelte. Damit war eine Auswertung des Gal-6-S-Signals nicht mehr möglich. Unter diesen definierten Versuchsbedingungen war aber ausnahmsweise eine Auswertung des Sulfat-Signals möglich.

5 M-Wert:                    t (Sulfat) = 1651,5 s                    t (Gal-6-S): nicht auswertbar

Eine Laufzeit des Sulfat-Signals von 1650 Sekunden ließ vermuten, dass durch die saure Hydrolyse zumindest ein Großteil des Sulfats von Galaktose-6-sulfat abgespalten worden war. Dass die Stufe, die als Sulfat interpretiert wurde, möglicherweise durch ein anderes Ion verursacht wurde konnte ausgeschlossen werden, da in der Probe kein Ion mit einer dem Sulfat vergleichbaren Mobilität vorhanden war.

#### **3.4.9.2 Saure Hydrolyse von Galaktose-6-sulfat mit 0,1 M Salzsäure**

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse des Vorversuchs, wurde in diesem Ansatz versucht die Konzentration der eingesetzten Salzsäure zu reduzieren, um das Eindampfen der Probe nach Inkubation zu umgehen. Dazu wurde eine 2 mM Galaktose-6-sulfat-Lösung in H<sub>2</sub>O erstellt und volumengleich mit 0,2 M HCl-Lösung, wie in Kap. 2.2.8 beschrieben, gemischt und inkubiert. Der Ansatz enthielt dadurch 1 mM Galaktose-6-sulfat und 0,1 M HCl.

Ansatz H<sub>2</sub>O: 1 ml 2 mM Galaktose-6-sulfat-Lösung  
1 ml H<sub>2</sub>O

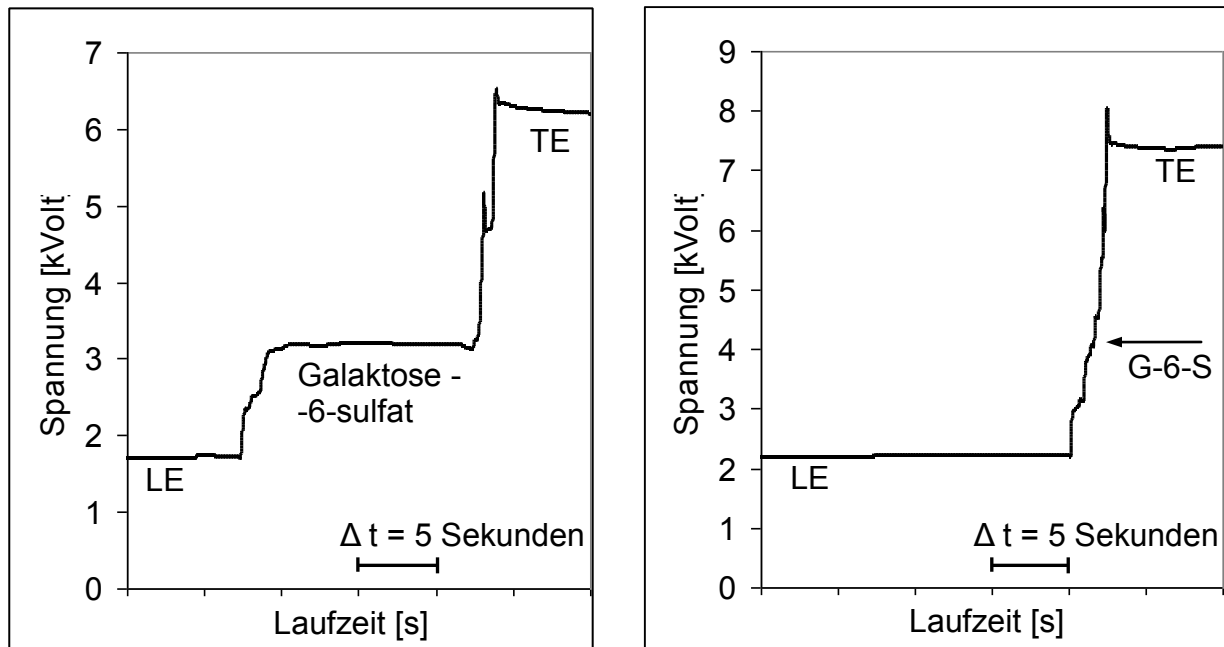
Ansatz 0,1 M: 1 ml 2 mM Galaktose-6-sulfat-Lösung  
1 ml 0,2 M HCl

Inkubationszeit: ca. 14 Stunden

Inkubationstemperatur: 100 °C im Heizblock

### Ergebnis:

Die Probe wurde sowohl 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt als auch unverdünnt mittels Isotachophorese ausgewertet. Da in diesem Versuch die Probe nicht eingedampft werden musste, ließ sich das Ergebnis über das Galaktose-6-sulfat-Signal auswerten. Sowohl in der 1:10 verdünnten Probe, als auch in der unverdünnten Probe war eventuell ein kurzes Galaktose-6-sulfat-Signal mit einer Laufzeit von maximal 0,6 Sekunden erkennbar (**Bild 43a + b**).



**Bild 43a + b:** Galaktose-6-sulfat-Signal (0,2 mM bei nachträglicher Verdünnung 1:10 mit H<sub>2</sub>O) vor und nach saurer Hydrolyse mit 0,1 M HCl

vor Hydrolyse (unverdünnt):  $t(\text{Gal-6-S}) = 117,85 \text{ s}$   
nach Hydrolyse mit 0,1 M HCl (verdünnt und unverdünnt):  $t(\text{Gal-6-S}) = \text{max. } 0,6 \text{ s}$

Das ungeladene Abbauprodukt Galaktose ließ sich nicht als Signal in der Auswertung nachweisen und auch das abgespaltene Sulfat war aufgrund der ähnlichen Mobilität zu dem Leitelektrolyten Chlorid nicht als Stufe nachweisbar. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigte, dass durch die saure Hydrolyse mit 0,1 M Salzsäure von einer nahezu vollständigen Abspaltung der Sulfat-Gruppe von Galaktose-6-sulfat ausgegangen werden konnte.

#### **3.4.10 Zusammenfassung - Umsatz von Galaktose-4- und Galaktose-6-sulfat**

Die rekombinante Arylsulfatase A konnte die Sulfatgruppe von Galaktose-4- und -6-sulfat nicht abspalten. Das ließ den Schluss zu, dass die rhASA entweder nur Sulfatgruppen abspalten kann, die am C<sub>3</sub>-Atom der Galaktose gebunden sind, oder dass weitere Bestandteile des Sulfatids zur Erkennung als Substrat erforderlich sind.

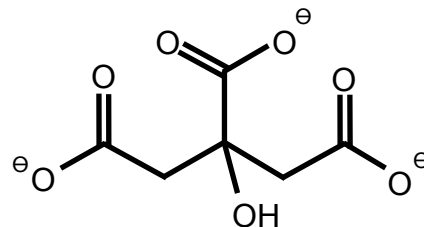
Die saure Hydrolyse mit Salzsäure stellte eine Alternative zur Spaltung der Esterbindung zwischen Sulfat und Galaktose dar. Zur Abspaltung der Sulfatgruppe wurde 0,1 M HCl mit Galaktose-6-sulfat inkubiert. Nach Inkubation war in der ITP kein Galaktose-6-sulfat mehr nachweisbar. Allerdings erschien diese Methode zur Abspaltung des Sulfats von Sulfatid insofern problematisch, als dass die Sulfatabspaltung im Gegensatz zur enzymatischen Methode auch zur Abspaltung von anderen im Urin vorhandenen Sulfatgruppen führen könnte.

#### **3.4.11 Sulfatdetektion im Chlorid-Citronensäure-Elektrolytssystem**

Mit dem Chlorid-Citronensäure-Elektrolytssystem stellte die Sulfatdetektion ein Problem dar. Die Computersoftware ITPWin der Isotachophorese erkannte die Spannungsänderung zwischen Chlorid- und Sulfat-Stufe nicht zuverlässig. Das kam dadurch zustande, dass die Mobilität von Cl<sup>⊖</sup> und SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> sehr ähnlich war und die Spannungsdifferenz dadurch zu gering war, um das Sulfat-Signal als eine, vom Leitelektrolyt abgegrenzte Zone zu detektieren. Die sogenannte „Ideal graph“-Funktion war aber un-

erlässlich, um eine exakte und objektive Auswertung der Laufzeit des Sulfat-Signals zu erhalten. Die relative Stufenhöhe wurde für jedes detektierte Ion in Bezug auf die Spannungsdifferenz zwischen Leit- und Endelektrolyt angegeben. Für das Chlorid-Caproneisäure-Elektrolytsystem betrug die Spannungsdifferenz zwischen den Plateaus von Leit- und Endelektrolyt bei 50  $\mu\text{A}$  ca. 4.600 Volt.

Mit einem neuen Elektrolytsystem sollte versucht werden, die Spannungsdifferenz zwischen Leit- und Endelektrolyt zu verringern, um die relative Stufenhöhe der Sulfat-Zone zu vergrößern. Der Leitelektrolyt konnte nicht verändert werden, da kein geeignetes Anion mit höherer Mobilität zur Verfügung stand. Durch Wahl eines anderen Endelektrolyts ließ sich hingegen die Spannungsdifferenz zwischen Leit- und Endelektrolyt beeinflussen. Ein neuer Endelektrolyt wurde mit 5 mM Citronensäure (TE2) in  $\text{H}_2\text{O}$  erstellt. Citronensäure wird auch als 2-Hydroxypropan-1,2,3-tricarbonsäure bezeichnet und hat die Strukturformel:



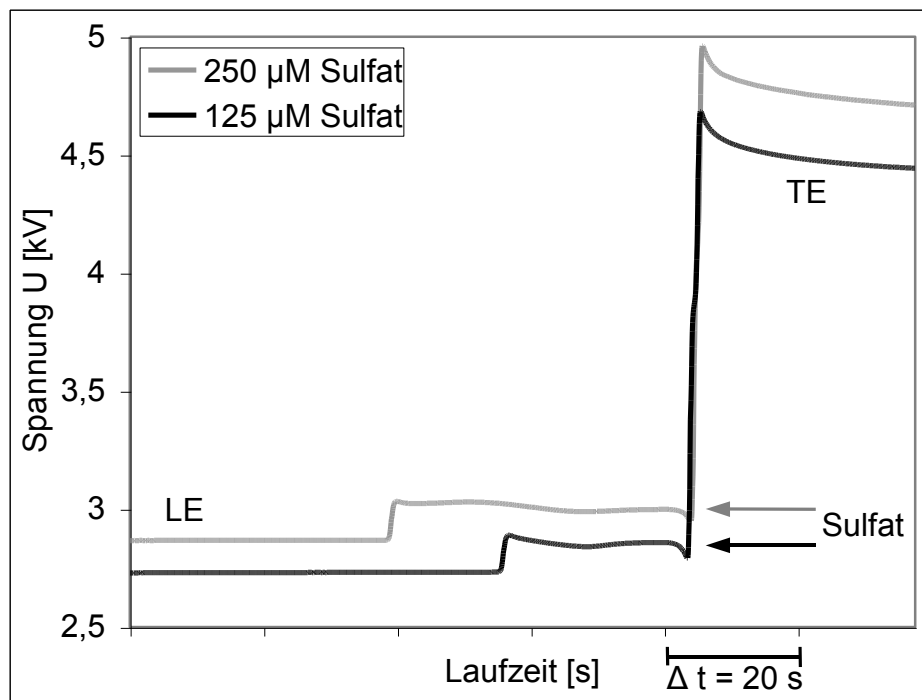
Im Chlorid-Citronensäure-Elektrolytsystem entsprach eine relative Stufenhöhe von 1 zwischen Leit- und Endelektrolyt einer Spannungsdifferenz von ca. 1.700 Volt (vgl. Chlorid-Caproneisäure-Elektrolytsystem: 4.600 Volt). Die relative Stufenhöhe jedes Analyten wurde dadurch im Vergleich zum Chlorid-Caproneisäure-Elektrolytsystem um das ca. 2,7fache erhöht.

#### 3.4.12 Sulfat-Kalibrierkurve in $\text{H}_2\text{O}$

Es wurde eine Sulfat-Stammlösung mit 1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in  $\text{H}_2\text{O}$  erstellt und aus dieser eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurde die Stammlösung wie in Kap. 2.2.5.4 beschrieben verdünnt, sodass eine Probenreihe mit Sulfatkonzentrationen zwischen 125  $\mu\text{M}$  und 1 mM entstand.

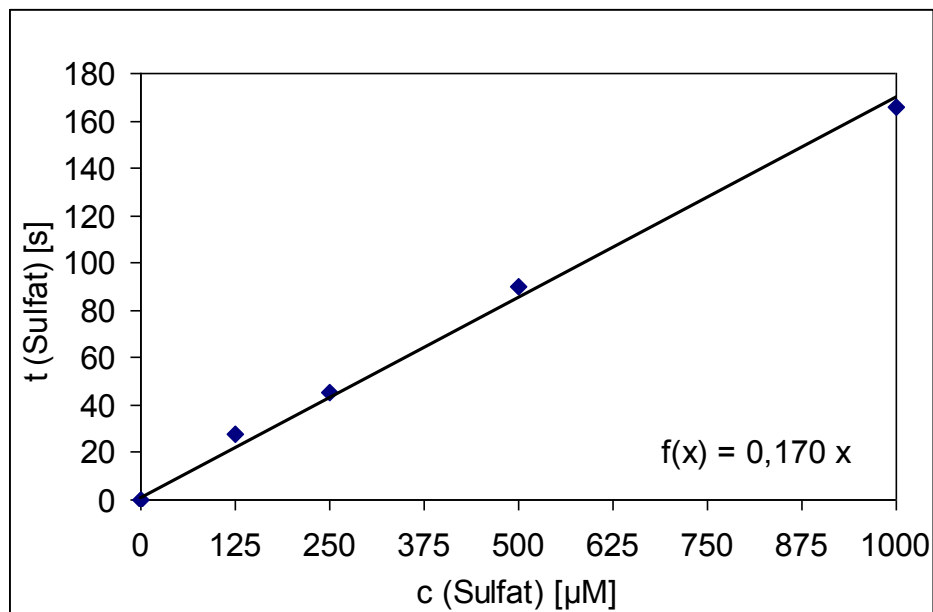
Ergebnis:

Es zeigte sich, dass alle Sulfat-Signale von der Computersoftware „Ideal graph“ als eigene Stufen erkannt wurden und somit quantitativ auswertbar waren. Ein Beispiel für die Sulfat-Signale von 125  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  ist in **Bild 44** dargestellt. Daraus ließ sich schließen, dass die Sulfatdetektion im Chlorid-Capronsäure-Elektrolytssystem ausschließlich ein Problem der, für die „Ideal graph“- Funktion der Computersoftware zu niedrigen Spannungsdifferenz war.



**Bild 44:** Isotachogramme von 125  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Sulfat in  $\text{H}_2\text{O}$  nach Auswertung im Chlorid-Citronensäure-Elektrolytssystem

Im Diagramm in **Bild 45** wurde die Länge des Sulfat-Signals über der Sulfatkonzentration in der Probe aufgetragen. Die Länge des Sulfat-Signals in der Isotachophorese stieg mit zunehmender Sulfatkonzentration kontinuierlich an. Die Kurve der Laufzeiten der Sulfat-Signale ließ sich im Diagramm durch eine Gerade darstellen. Die relative Stufenhöhe des Sulfat-Signals betrug  $0,073 (\pm 0,0062; n=5)$ .



**Bild 45:** Sulfat-Kalibrierkurve in  $\text{H}_2\text{O}$  mit Sulfatkonzentrationen von 0 bis 1000  $\mu\text{M}$ . Laufzeit des Sulfat-Signals über der -konzentration aufgetragen

### 3.4.13 Sulfat-Kalibrierkurve mit Galaktose-6-sulfat im Ansatz

In einem weiteren Versuch sollte überprüft werden, ob mit diesem Chlorid-Citronensäure-Elektrolytssystem neben Sulfat auch Galaktose-6-sulfat nachgewiesen werden konnte und ob sich die Zugabe von Galaktose-6-sulfat auf die Länge des Sulfat-Signals auswirkte. Dazu wurde zu je einer 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  Sulfat-Lösung in  $\text{H}_2\text{O}$  (Deionat) Galaktose-6-sulfat in gleicher Konzentration zugegeben.

#### Ergebnis:

Galaktose-6-sulfat ließ sich im Chlorid-Citronensäure-Elektrolytssystem nicht darstellen. Das zeigte, dass die Mobilität des Galaktose-6-sulfats geringer war als die der Citronensäure. Deshalb war es sehr wichtig nach jeder Auswertung einer Probe in der Isotachophorese das Endelektrolyt-Reservoir gut zu spülen und den Endelektrolyt selbst völlig zu ersetzen, um das Galaktose-6-sulfat, das in das Reservoir gelangt war, vollständig zu entfernen.

Die Laufzeiten der Sulfat-Signale zeigten nur geringfügige Abweichungen von den Laufzeiten, die für die Kalibrierkurve mit derselben Sulfatkonzentration ohne Galak-

tose-6-sulfat gemessen wurden (**Tabelle 9**). Das war auch zu erwarten gewesen, weil sich nur die vorangehenden Zonen in der Isotachophorese, also mobilere Anionen, auf die Konzentration der nachfolgenden Zonen auswirkten und damit deren Laufzeit beeinflussten.

**Tabelle 9:** Vergleich der Laufzeiten von Sulfat in verschiedenen Konzentrationen in H<sub>2</sub>O, in einem Ansatz mit und ohne Galaktose-6-sulfat

c (Sulfat) [µM]	t (Sulfat) [s] mit Gal-6-sulfat	t (Sulfat) [s] ohne Gal-6-S	RH (Sulfat) mit Gal-6-S	RH (Sulfat) ohne Gal-6-S
125	25,2	28,0	0,101	0,071
250	53,1	45,3	0,086	0,066
500	110,7	89,9	0,087	0,077

#### 3.4.14 Sulfat-Kalibrierkurve in Sulfatid-Lösung

Eine weitere Kalibrierkurve wurde erstellt, in der Sulfat in verschiedenen Konzentrationen von 0 bis 1 mM zu einer Sulfatid-Lösung (350 µM) zugegeben wurde. Durch die komplexe Zusammensetzung des Sulfatid-Puffers, vor allem durch das darin enthaltene Taurocholat, war es wahrscheinlich, dass sich die Laufzeit des Sulfat-Signals im Vergleich zu einer rein wässrigen Sulfat-Lösung veränderte.

Ansatz: 190 µl 350 µM Sulfatid-Lösung  
10 µl Sulfat in H<sub>2</sub>O (Deionat) - verschiedenen Verdünnungen

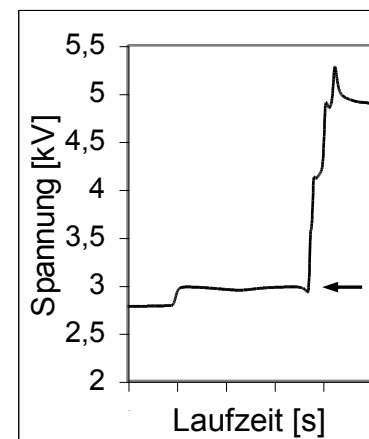
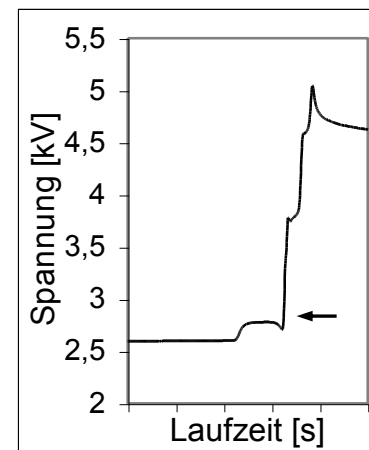
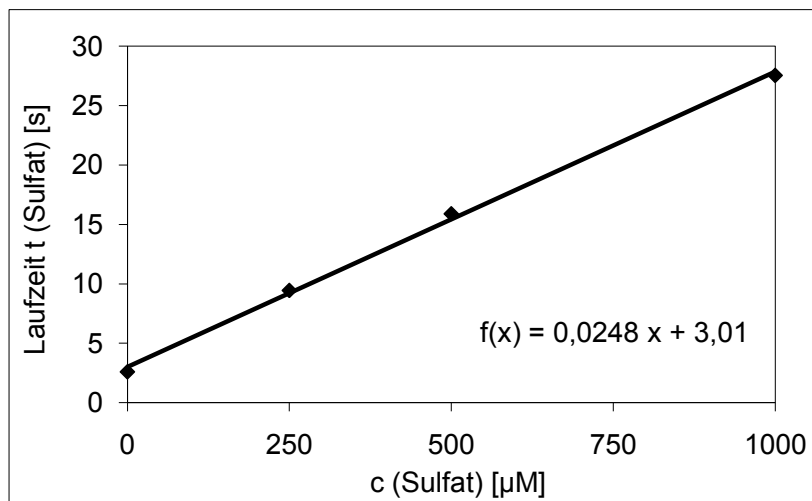
#### Ergebnis:

Es zeigte sich eine lineare Zunahme der Laufzeit des Sulfat-Signals mit der Sulfatkonzentration (**Bild 46**).

Die einzelnen Laufzeiten des Sulfat-Signals waren aber deutlich kürzer als bei der Auswertung derselben Konzentrationen in H<sub>2</sub>O (siehe **Bild 47**). Eventuell lag das daran, dass sich die Viskosität der Probe durch die Pufferbestandteile veränderte oder aber an einem Anion mit einer Mobilität die zwischen Chlorid und Sulfat lag. In Frage

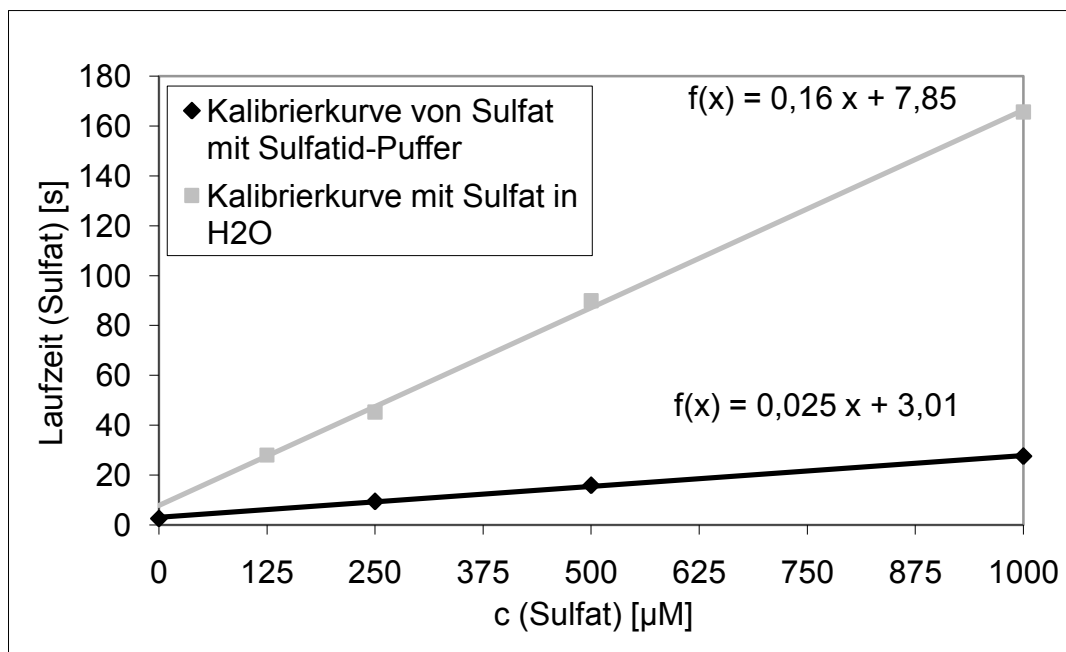


kam beispielsweise das Pyrophosphat. Die Signallänge für Sulfat in Wasser überstieg die in Sulfatid-Puffer um über das Vierfache (**Bild 47**). Auch der Ansatz ohne Sulfatzugabe wies ein Signal auf, dass mit einer relativen Stufenhöhe von 0,060 leicht mit dem Sulfat-Signal verwechselt werden konnte. Es hätte sich um freies Sulfat oder auch um beispielsweise Pyrophosphat handeln können. Dass es sich nicht um Sulfat handelte war deshalb wahrscheinlicher, weil die Sulfat-Signale bei der Kalibrierkurve in Sulfatid-Lösung deutlich kürzer waren als bei derselben Sulfat-Konzentration in Wasser. Da nur ein vorrangendes Ion in der Isotachophorese auf die Laufzeit der nachfolgenden Zonen einen Einfluss hat, musste davon ausgegangen werden, dass vor dem Sulfat ein weiteres Ion mit höherer Mobilität in der Kapillare vorlag. Dafür sprach auch das im Ansatz ohne Zugabe von Sulfat gefundene Signal, dessen Stufenhöhe deutlich von der mittleren Sulfat-Stufenhöhe abwich. Die relative Höhe der Sulfat-Stufen betrug  $0,093 (\pm 0,0060; n=10)$ .



**Bild 46:** Sulfat-Kalibrierkurve in Sulfatid-Lösung mit Sulfatkonzentrationen bis  $1000 \mu\text{M}$ , sowie Isotachogramme von  $250 \mu\text{M}$  Sulfat (oben rechts) und  $1000 \mu\text{M}$  Sulfat (unten rechts) mit  $\Delta t = 10$  Sekunden ( $\rightarrow$  Sulfat)

In der Auswertung (**Bild 47**) wurde die Laufzeit des unklaren Signals in der Probe ohne Sulfat trotzdem berücksichtigt, da diese Stufe in den Auswertungen der Ansätze die Sulfat enthielten nicht von dem Sulfat-Signal abgrenzbar waren. Damit ging dieses Signal auch in den Proben mit Sulfat vermutlich in das gemessene Sulfat-Signal ein. In der Kalibrierkurve mit  $\text{SO}_4^{2-}$  in  $\text{H}_2\text{O}$  hingegen wurde kein Signal in der Probe, der kein Sulfat zugegeben worden war, gemessen.



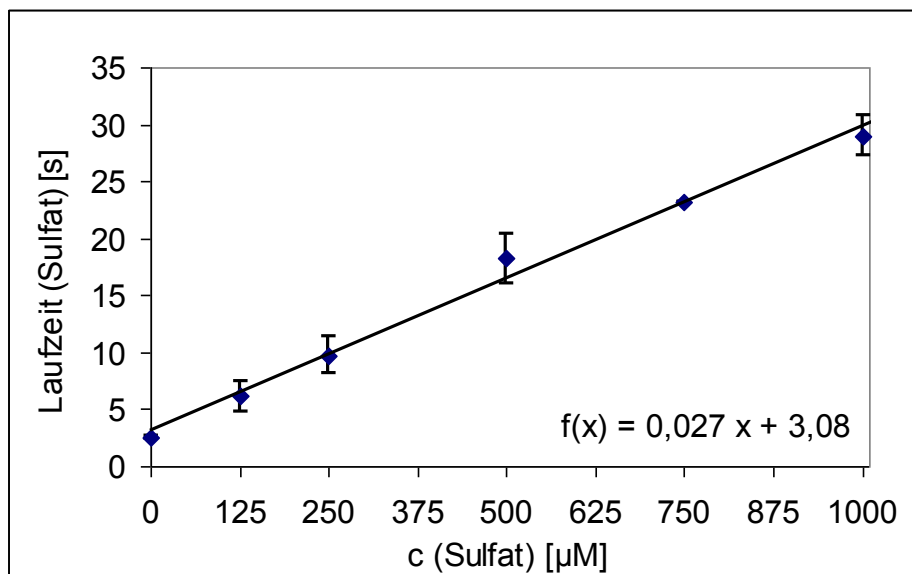
**Bild 47:** Vergleich von zwei Sulfat-Kalibrierkurven in  $\text{H}_2\text{O}$  bzw. in Sulfatid-Puffer

### 3.4.15 Reproduzierbarkeit der Auswertungen in der Isotachophorese

Wie bereits im Vorfeld erläutert, schien es angemessen, bei jedem neu hergestellten Leitelektrolyten eine neue Kalibrierkurve für die im selben System ausgewerteten Proben zu erstellen. Es stellte sich jedoch heraus, dass sich die verschiedenen Kalibrierkurven bei gleichem Leit- und Endelektrolyt nur wenig unterscheiden. Die Messwerte der einzelnen Kalibrierkurven, sowie die errechneten Mittelwerte der Laufzeiten der Sulfat-Signale mit Standardabweichung sind in **Tabelle 10** dargestellt. Die Mittelwerte der Laufzeiten der Sulfat-Signale bei gleicher Konzentration von  $\text{SO}_4^{2-}$  lagen ebenfalls wieder auf einer Geraden (**Bild 48**).

**Tabelle 10:** Mittelwert von vier verschiedenen Sulfat-Kalibrierkurven Sulfatid-Puffer

Kalibrierkurve	A	B	C	D	Mittelwert $\pm$ SD
c (Sulfat) [ $\mu$ M]	Laufzeit [s]	Laufzeit [s]	Laufzeit [s]	Laufzeit [s]	Laufzeit [s]
0	2,60	2,50	-	2,35	2,48 $\pm$ 0,126; n=3
125	-	7,55	5,75	5,05	6,12 $\pm$ 1,29; n=3
250	9,45	9,75	7,90	11,90	9,75 $\pm$ 1,65; n=4
500	15,90	18,40	17,50	21,10	18,23 $\pm$ 2,18; n=4
750	-	-	23,20	-	(23,2)
1000	27,55	29,85	27,50	31,10	29,0 $\pm$ 1,78; n=4
<b>Formel der Kalibrierkurve</b>	$f(x) = 0,025x + 3,01$	$f(x) = 0,027x + 3,46$	$f(x) = 0,026x + 2,67$	$f(x) = 0,030x + 3,23$	$f(x) = 0,027x + 3,08$

**Bild 48:** Kalibrierkurve nach Errechnen der Mittelwerte der Laufzeiten von Sulfat in Sulfatid-Puffer aus vier einzelnen Kalibrierkurven

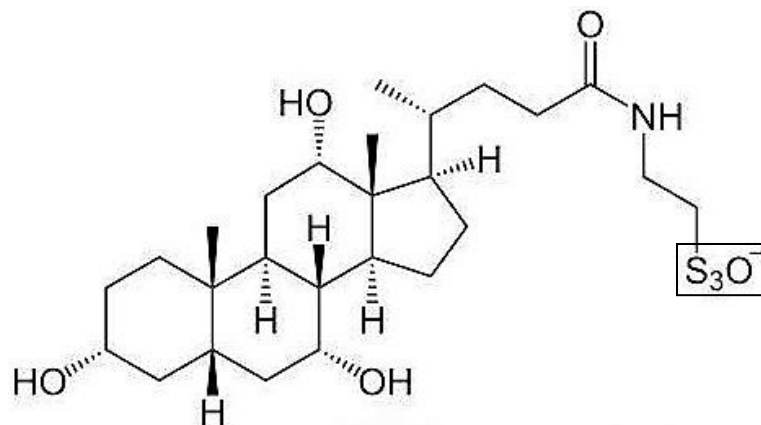
### 3.4.16 Zusammenfassung – Sulfat-Kalibrierkurven

Im Chlorid-Citronensäure-Elektrolytssystem ließ sich das Sulfat problemlos auswerten. In  $H_2O$  (Deionat) zeigte die Kalibrierkurve einen linearen Verlauf. Wurde zu dieser Kalibrierkurve in  $H_2O$  zusätzlich Galaktose-6-sulfat zugegeben, beeinflusste das die Laufzeit des Sulfat-Signals nicht.

In einer in Sulfatid-Puffer erstellten Kalibrierkurve hingegen waren die Laufzeiten der Sulfat-Signale nur etwa ein Viertel so lang wie die der Sulfat-Signallaufzeiten in  $H_2O$ . Zusätzlich unterschieden sich die beiden Kalibrierkurven darin, dass der y-Achsenabschnitt der Kalibrierkurve in Sulfatid-Lösung nicht bei Null lag, obwohl ohne Zugabe von Sulfat kein Sulfat-Signal gemessen wurde. Die Kalibrierkurve die aus den Mittelwerten von vier verschiedenen Sulfat-Kalibrierkurven in Sulfatid-Lösung ermittelt wurde, korrelierte sehr gut mit den einzelnen Kurven. Die Mittelwerte selbst lagen ebenfalls auf einer Geraden.

### 3.4.17 Untersuchung von Taurochololat auf abspaltbare Sulfatgruppen

Wie schon in Kap. 3.3.7 beschrieben, sollte auch mit der Isotachophorese geprüft werden, ob aus irgendeiner Verbindung des Sulfatid-Puffers Sulfat durch die rhASA freigesetzt werden konnte. Der einzige Bestandteil des Sulfatid-Puffers, der dafür infrage kam, war das Taurochololat. Taurochololat hat die Strukturformel:

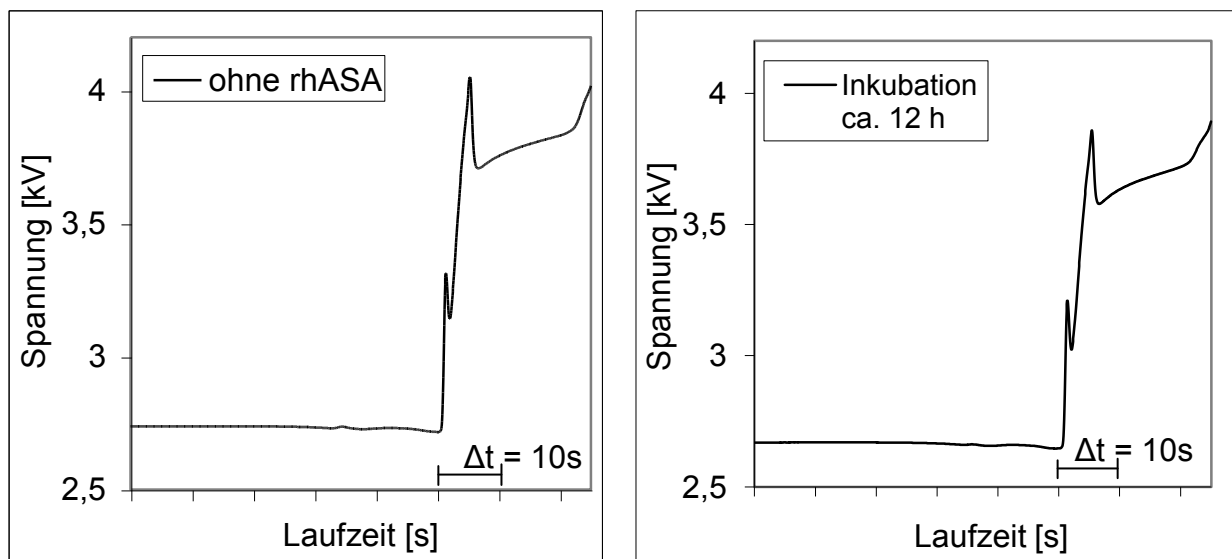


Die Isotachophorese stellte für diesen Nachweis die sicherste Methode dar, weil durch die Bestimmung der Sulfatkonzentration nach Inkubation eines Sulfatid-Puffers mit der rhASA jedes abspaltbare Sulfat erfasst wurde. Im Vergleich dazu war mit der Dünnschichtchromatographie nur eine Beurteilung der Bestandteile des technischen Taurocholats möglich, die sich in einer Auftrennung als Banden abbilden ließen. Zudem musste ein sulfathaltiger Bestandteil in höherer Konzentration im Taurochololat enthalten sein, um in der Dünnschichtchromatographie eine Bande zu bilden. Mit der Isotachophorese hingegen lassen sich selbst sehr geringe Sulfatkonzentrationen nachweisen. Für diesen Versuch wurde eine Probe mit Sulfatid-Puffer und 1:10 ver-

dünnter rhASA für ca. 14 Stunden im Wasserbad inkubiert. Verglichen wurde dieser Ansatz mit einem weiteren, dem keine rhASA zugegeben wurde.

#### Ergebnis:

Die beiden Kurven des Ansatzes ohne Inkubation und nach zwölfstündiger Inkubation mit der rhASA waren identisch. Nach Inkubation war keine Sulfat-Stufe erkennbar. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Sulfatgruppe im Taurocholat nicht durch die rekombinante Arylsulfatase A abgespalten werden konnte. Damit konnte gezeigt werden, dass nach Inkubation einer Sulfatid-Lösung mit der rhASA das gemessene Sulfat ausschließlich aus dem Galactocerebrosid-3-sulfat freigesetzt wurde.



**Bild 49:** Taurocholat in Natriumazetat-Puffer vor und nach ca. 14stündiger Inkubation mit 148  $\mu\text{M}$  rhASA

#### **3.4.18 Kinetik der Sulfatabspaltung von Sulfatid durch rhASA**

In diesem Versuch sollte die Sulfatkonzentration nach Inkubation einer Sulfatid-Lösung mit der rhASA bestimmt werden. Dazu wurde eine Sulfatid-Lösung nach Kap. 2.1.4.3, aber mit 1 mM Sulfatid in Sulfatid-Puffer erstellt. Diese wurde im Wasserbad für verschiedene Zeiten inkubiert und nach Inkubation bis zur Auswertung mit der Isotachophorese eingefroren. Durch Vergleichen der Ergebnisse mit der Sulfatid-

Kalibrierkurve A (siehe Kap. 3.4.15) sollte der Umsatz an Sulfatid, der durch die rhASA erreicht wurde, berechnet werden.

Versuchsbedingungen:

Ansatz: 200  $\mu$ l 1 mM Sulfatid-Lösung  
10  $\mu$ l rhASA unverdünnt (1,48 mU)

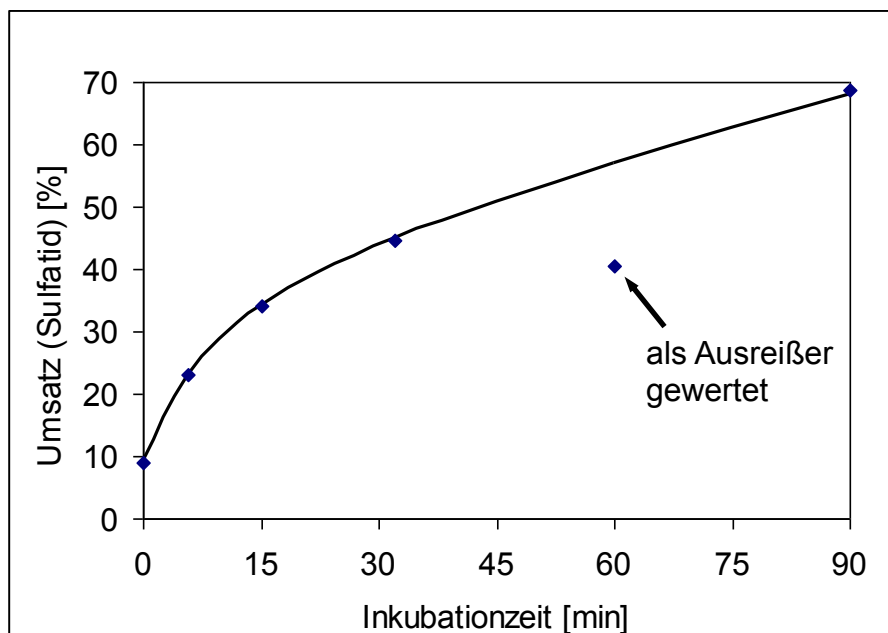
Inkubationszeit:  $t_0 = 0$  min;  $t_1 = 5,75$  min;  $t_2 = 15$  min;  $t_3 = 32$  min;  $t_4 = 60$  min;  
 $t_5 = 90$  min;  $t_6 = 124$  min

Inkubationstemperatur: 37 °C

Reaktionsende: Einfrieren der Proben bei -18 °C

Ergebnis:

Es zeigte sich ein rascher Anstieg des abgespalteten Sulfats bei Zunahme der Inkubationszeit (**Bild 50**). Nach 15 Minuten war bereits ungefähr ein Drittel des zugegebenen Sulfatids umgesetzt. Mit zunehmender Inkubationszeit verlief die Kurve flacher und erreichte nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten einen Umsatz von ca. 70%.



**Bild 50:** Anteiliger Umsatz von Sulfatid von der Anfangskonzentration durch die rhASA in Prozent nach verschiedenen Inkubationszeiten von 0 bis 90 Minuten

Der Umsatz wurde aus der Kalibrierkurve in Kap. **2.2.5.5** wie folgt berechnet: Nach der Formel von Kalibrierkurve A in Kap. **3.4.15** ergab sich für einen vollständigen Umsatz des 1 mM Sulfatids eine errechnete Laufzeit des Sulfat-Signals von 27,81 Sekunden. Diese Laufzeit entsprach einem Umsatz von 100%.

Aus diesem Zusammenhang ließ sich die folgende Gleichung 11 für die Berechnung des Umsatzes von Sulfatid ableiten:

$$\text{Umsatz(Sulfatid) [\%]} = \frac{t(\text{Sulfat})[\text{s}] \times \text{VF}}{27,81\text{s}} \times 100 \quad (11)$$

### **3.4.19 Reduktion der Sulfatidkonzentration bei der Inkubation mit rhASA**

Basierend auf den in Kap. **3.4.18** gezeigten Ergebnissen sollten in diesem Versuch die Bedingungen optimiert werden, um möglichst einen hundertprozentigen Umsatz des Sulfatids zu erreichen. Dazu wurde die Sulfatidkonzentration im Ansatz verringert. Sulfatid wurde in einem Sulfatid-Puffer in einer Konzentration von 330  $\mu\text{M}$  gelöst und die Ausgangskonzentration des Sulfatids damit gegenüber dem Experiment in Kap. **3.4.18** auf ein Drittel reduziert. Parallel zu der Sulfatbestimmung mit der Isotachophorese wurde eine Dünnschichtchromatographie mit denselben Proben durchgeführt. Für den Ausgangswert wurde einer Probe statt rhASA 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  (Deionat) zugegeben. Aus der Kalibrierkurve errechnet sich für einen hundertprozentigen Umsatz nach Kalibrierkurve B eine Laufzeit des Sulfat-Signals von 12,4 s.

#### Versuchsbedingungen:

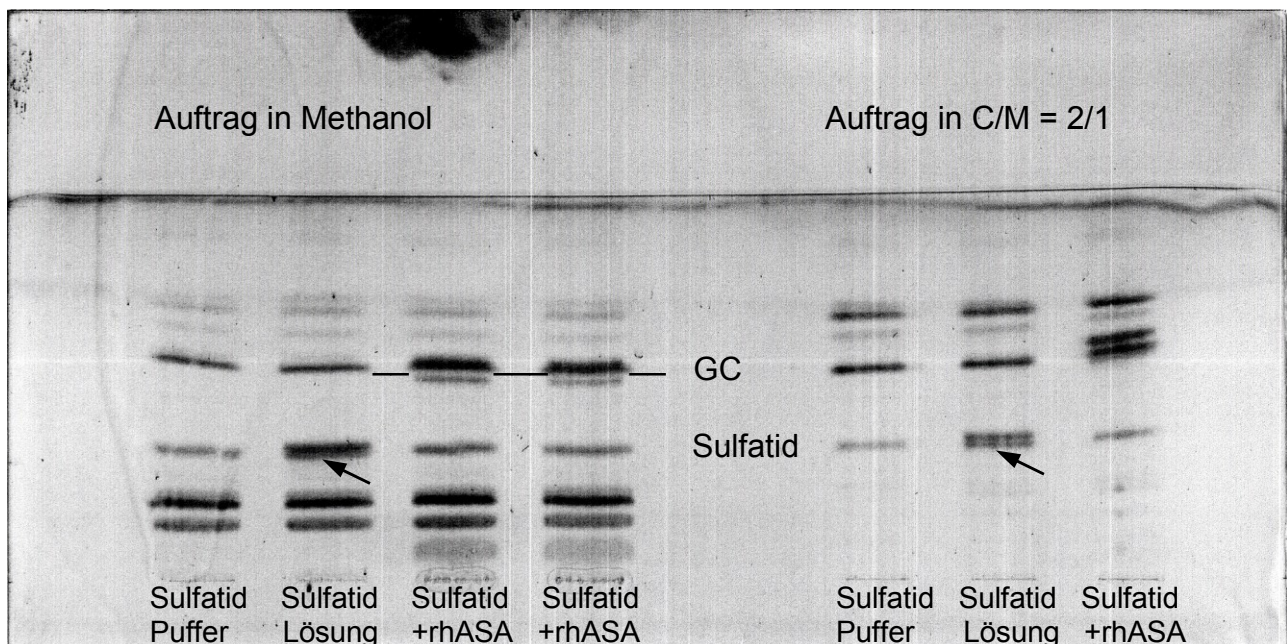
Ansatz:	200 $\mu\text{l}$ 330 $\mu\text{M}$ Sulfatid-Lösung
	10 $\mu\text{l}$ rhASA unverdünnt
Inkubationszeit:	2,5 Stunden
Inkubationstemperatur:	37 $^{\circ}\text{C}$
Reaktionsende:	Einfrieren der Proben bei $-18$ $^{\circ}\text{C}$

#### Ergebnis:

Nach einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden wurde eine Laufzeit des Sulfat-Signals von 11,85 Sekunden erreicht. Der errechnete Wert aus der Kalibrierkurve für einen

hundertprozentigen Umsatz betrug 12,4 Sekunden. Da nach den Ergebnissen aus Kap. 3.4.17 davon ausgegangen werden konnte, dass die rekombinante Arylsulfatase A das Sulfat spezifisch von Sulfatid abspaltete, konnte bei diesem Ergebnis von einem nahezu 100%igem Umsatz des zugegebenen Sulfatids ausgegangen werden. Die Abweichung der Laufzeit des Sulfat-Signals von 0,55 von dem errechneten Wert für einen hundertprozentigen Umsatz lag im Rahmen der Messgenauigkeit.

Der vollständige Umsatz des Sulfatids wurde durch die Dünnschichtchromatographie bestätigt. Nach zweieinhalbstündiger Inkubation mit der rhASA war keine Sulfatid-Bande mehr nachweisbar (**Bild 51**).



**Bild 51:** Abbau von Sulfatid (330  $\mu\text{M}$ ) in Sulfatid nach 2,5stündiger Inkubation mit rhASA (1,48 mU/Ansatz)

### 3.4.20 Zusammenfassung – Umsatz von Sulfatid durch rhASA

Die rekombinante Arylsulfatase A war nicht in der Lage Sulfat aus dem technischen Taurocholat freizusetzen. Das Sulfat, das nach dem Umsatz von Galaktocerebrosid-3-sulfat in Puffer gemessen wurde, stammte also ausschließlich vom Sulfatid.

Bei Verwendung von unverdünnter rhASA (1,48 mU/Ansatz) für den Umsatz von Sulfatid konnte nach 2,5 Stunden ein vollständiger Abbau des Galaktocerebrosid-3-



sulfats (330  $\mu\text{M}$ ) erreicht werden. Obwohl keine Versuche mit exakt denselben Bedingungen für den Umsatz von pNCS und Galaktocerebrosid-3-sulfat vorlagen, zeigte der Vergleich ähnlicher Experimente, dass der Umsatz von Sulfatid deutlich langsamer vonstatten ging als der von pNCS. Während nach 45 min von einer 1:10 verdünnten rhASA (148  $\mu\text{U}$ ) 2  $\mu\text{mole}$  pNCS umgesetzt wurden (vgl. Kap. 3.2.8), wurde von einer unverdünnten rhASA (1,48 mU) in derselben Zeit nur 0,1  $\mu\text{mol}$  Galaktocerebrosid-3-sulfat umgesetzt (siehe Kap. 3.4.18). Das entsprach den Experimenten von Farooqui & Mandel (1977), die zeigten, dass die Hydrolyserate von pNCS ca. 24 mal so hoch ist wie die von Galaktocerebrosid-3-sulfat.

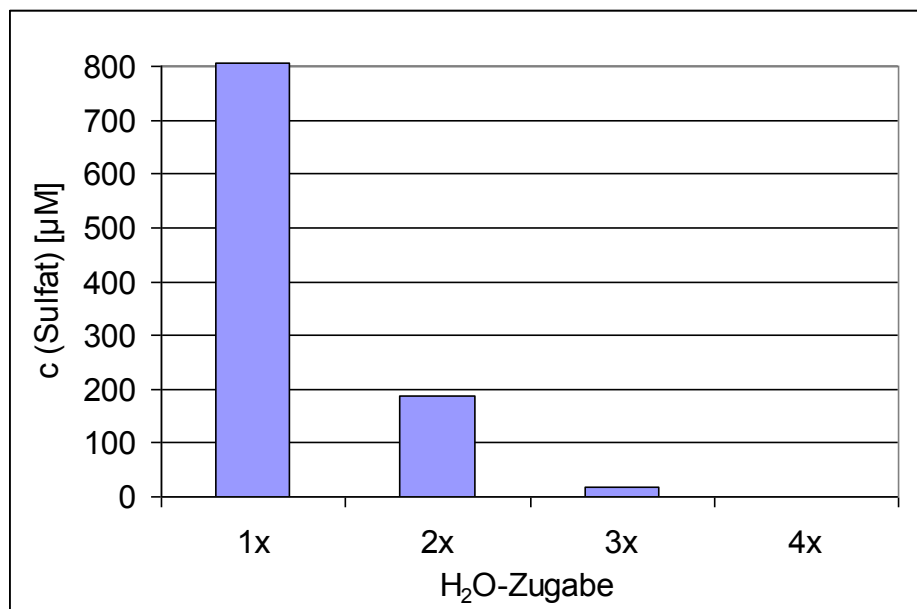
#### 3.4.21 Entfernung des freien Sulfats aus Urinproben

Nachdem in Kap. 3.4.19 eine quantitative Umsetzung von Galaktocerebrosid-3-sulfat zu Sulfat gezeigt werden konnte, wurde im nächsten Schritt versucht die Sulfatabspaltung im Urin durchzuführen. Dabei entstand das Problem, dass der menschliche Urin ca. 2 g/l Sulfat enthält. Dieses Sulfat übersteigt das Sulfatid damit mengenmäßig um ein Vielfaches. Deshalb war es erforderlich, dieses endogene Sulfat vor der Bestimmung des Sulfatids möglichst vollständig aus den Urinproben zu entfernen. Dazu wurden verschiedene Versuche durchgeführt.

Zunächst musste herausgefunden werden, wie viel endogenes Sulfat nach Aufarbeitung einer Urinprobe noch in der Probe enthalten war. Dazu wurde Urin eines gesunden Probanden nach Kap. 2.2.6.5 aufgearbeitet, bis das erste Mal  $\text{H}_2\text{O}$  zugegeben wurde. Nach Zugabe von Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1 zu Urin bildeten sich zwei Phasen. Das Sulfat befand sich dann in der hydrophilen Oberphase. Dem Urin wurde zum Entfernen dieser Oberphase  $\text{H}_2\text{O}$  zugegeben. In diesem Versuch wurde nach jeder Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}$  zu der Urinprobe aus der hydrophilen Phase eine Probe entnommen. Viermal wurde dem Urin je 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  zugegeben, die Oberphase anschließend abgenommen und die Sulfatkonzentration darin mit der Isotachophorese bestimmt.

Ergebnis:

Die beiden ersten Proben, denen nur ein- bzw. zweimal  $\text{H}_2\text{O}$  zugegeben worden war, wurden vor der Auswertung mit der Isotachophorese 1:25 bzw. 1:1 verdünnt und die Laufzeit des Sulfat-Signals durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor errechnet. Aus der Kalibrierkurve konnte die jeweilige Sulfat-Konzentration aus der Laufzeit der Signale bestimmt werden. Nach Zugabe der ersten 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  betrug die Sulfatkonzentration in der hydrophilen Oberphase ca. 800  $\mu\text{M}$ . Nach der ersten Abnahme der Oberphase und der zweiten Zugabe von 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  enthielt die Oberphase noch ca. ein Viertel der ursprünglichen Sulfatkonzentration (**Bild 52**). Nach viermaliger Zugabe von 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  und damit dreimaliger Entnahme der Oberphase war nach der Kalibrierkurve kein Sulfat mehr in der hydrophilen Phase nachweisbar.

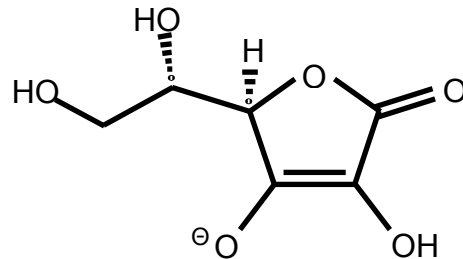


**Bild 52:** Sulfatkonzentration in der hydrophilen Phase des Urins bei der Urinaufarbeitung nach ein- bis viermaliger Zugabe von 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$

### 3.4.22 Entfernung von Urinbestandteilen der hydrophilen Phase mit Vitamin C als Referenzsubstanz

Zur Überprüfung der Effektivität der Sulfatextraktion (siehe **Bild 52**) wurde einer Urinprobe Ascorbat zugegeben. Ascorbat löst sich, wie auch das freie Sulfat, nach

Zugabe von Chloroform und Methanol ausschließlich in der hydrophilen Phase. Gegenüber Sulfat hatte Ascorbat bei der Auswertung mit der ITP zwei Vorteile. Zum einen konnte es aufgrund der niedrigeren Mobilität im Chlorid-Caprionsäure-Elektrolytsystem mit der ITP ausgewertet werden. Zweitens wurde durch Ascorbat zusätzlich zum Leitfähigkeits-Signal bei einer Wellenlänge von 254 nm ein UV-Signal erzeugt. Ascorbinsäure ist als Vitamin C ( $C_6H_8O_6$ ) bekannt:



Zu 2,25 ml Urin eines gesunden Probanden wurden 0,25 ml einer Lösung mit 250 mM Ascorbat in  $H_2O$  (Deionat) gegeben. Das entsprach einer Ascorbat-Konzentration von 4,4 g/l und damit etwa der doppelten Konzentration an freiem Sulfat im Urin.

#### Ergebnis:

Die Probe, der einmal 10 ml  $H_2O$  zugegeben wurde (**Bild 53**), wurde vor der Auswertung mit der Isotachophorese im Verhältnis 1:25 mit  $H_2O$  verdünnt und das Ergebnis anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Aus der Oberphase wurden folgende Laufzeiten  $\Delta t$  des Ascorbat-Signals bestimmt:

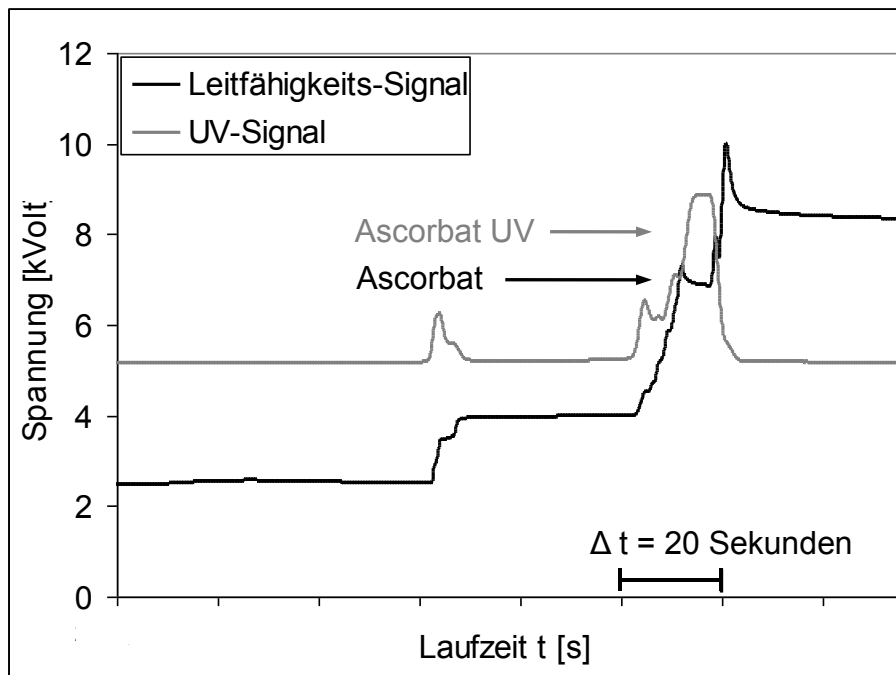
1 x  $H_2O$ -Zugabe:  $\Delta t$  (Ascorbat) = 125,0 s

2 x  $H_2O$ -Zugabe:  $\Delta t$  (Ascorbat) = 6,8 s

3 x  $H_2O$ -Zugabe:  $\Delta t$  (Ascorbat) = 1,2 s

4 x  $H_2O$ -Zugabe:  $\Delta t$  (Ascorbat) = 0 s

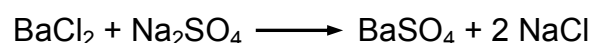
Eine deutliche Abnahme der Laufzeit des Ascorbat-Signals, war nach jeder zusätzlichen Zugabe von  $H_2O$  erkennbar. Nach der vierten Zugabe von 10 ml  $H_2O$  und dreimaligem Verwerfen der Oberphase wurde keine Ascorbat-Stufe mehr abgebildet. Somit konnte das Ergebnis der Entfernung von Sulfat durch die Urinaufarbeitung (**Bild 52**) bestätigt werden. Das Ascorbat-Signal wies eine relative Stufenhöhe von 0,589 ( $\pm 0,004$ ;  $n=3$ ) auf.



**Bild 53:** Ascorbat-Signal (Leitfähigkeit- und UV-Signal) im Urin-Überstand nach einmaliger Zugabe von 10 ml H<sub>2</sub>O zu einer Urinprobe, nachträgliche Verdünnung der Probe 1:25

### 3.4.23 Fällung des anorganischen Sulfats im Urin mit Bariumchlorid

Die Experimente in Kap. 3.4.21 haben gezeigt, dass das anorganische Sulfat durch dreimalige Zugabe von H<sub>2</sub>O zu der Urinprobe effektiv entfernt werden konnte. Ein weiteres Problem blieb dabei aber noch unberücksichtigt. In der in Kap. 3.3.9 dargestellten Skizze wird deutlich, dass sich das Sulfatid in der organischen Phase, dort aber vornehmlich an der organisch-wässrigen Grenzschicht ansammeln würde. Dadurch bestand die Gefahr, dass bei jeder Zugabe von H<sub>2</sub>O Sulfatid in die wässrige Oberphase gelangen konnte und mit dieser abgesaugt würde. Als eine weitere Möglichkeit wurde daher versucht, das endogene Sulfat mit Hilfe von Bariumchlorid zu fällen. Wird Bariumchlorid zu einer sulfathaltigen Lösung gegeben, entsteht Bariumsulfat, das als schwer lösliches Salz ausfällt. Das freiwerdende Chlorid bleibt in Lösung.



Für die Fällung wurde eine Sulfat-Lösung mit 2 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in  $\text{H}_2\text{O}$  (Deionat) hergestellt. Diese wurde 1:1 mit einer Bariumchlorid-Lösung, mit 4 mM Barium in  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst, versetzt. Daraus ergab sich eine Sulfatkonzentration im Ansatz von 1 mM. Der Ansatz wurde für ein Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert und der Überstand direkt mit der ITP ausgewertet. Zum Vergleich wurde die Laufzeit des Sulfat-Signals einer 1 mM- $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösung als Ausgangswert bestimmt.

#### Ergebnis:

1 mM Sulfat in  $\text{H}_2\text{O}$  ergab eine Signallaufzeit von 144,6 Sekunden. Nach der Fällung des Sulfats mit Bariumchlorid wurde noch ein Sulfat-Signal von 4,95 Sekunden gemessen. Das entsprach einer verbliebenen Konzentration von 2,66  $\mu\text{M}$  Sulfat bzw. 3,4% des Ausgangswertes.

#### **3.4.24 Zusammenfassung – Entfernung des freien Sulfats aus dem Urin**

Die in Kap. 2.2.6.5 beschriebene Methode zur Aufarbeitung des Urins für die Sulfatidbestimmung stellte sich als geeignet heraus, das freie Sulfat, das im Urin in einer Konzentration von ca. 2 g/l enthalten ist, vollständig zu entfernen. Das gilt sofern dem Urin drei mal 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  zugegeben wurden und die Oberphase drei mal bis auf einen geringen Rest entfernt wurde. Dieser Rest an Oberphase musste belassen werden um zu gewährleisten, dass möglichst wenig Sulfatid bei der Aufarbeitung verloren wurde.

Durch Fällen des Sulfats mit Bariumchlorid, konnte das freie Sulfat bis auf 3,4% aus der Urinprobe entfernt werden, ohne dass eine Aufarbeitung des Urins erforderlich war.

#### **3.4.25 Umsatz von Sulfatid in Urin durch die rekombinante Arylsulfatase A**

Dieser Versuch wurde durchgeführt um herauszufinden, ob es auch unter den im Urin herrschenden Bedingungen möglich war, einen vollständigen Umsatz des Sulfatids durch die rhASA zu erreichen. Im Gegensatz zu den Experimenten in Kapitel

**3.3.12** und **3.3.13** wurde Galaktocerebrosid-3-sulfat vor der Aufarbeitung zu der Urinprobe zugegeben.

#### Urinaufarbeitung:

In vier 50 ml Polypropylen-Röhrchen wurden je 2,5 ml Urin desselben gesunden Probanden gegeben. Zu zwei Ansätzen wurden je 300 µl Sulfatid-Lösung mit 1 mM Sulfatid und zu den anderen beiden je 300 µl Sulfatid-Puffer zugegeben. Alle Ansätze wurden anschließend einzeln aufgearbeitet. Die in Kap. **2.2.6.5** beschriebene Methode wurde dabei dahingehend modifiziert, dass jeweils nur einmal 10 ml H<sub>2</sub>O (Deionat) zugegeben wurde. Dann wurden alle vier Proben wie üblich eingedampft und nach dem zweiten Eindampfen der Rückstand in 300 µl (statt 100 µl) C/M=2:1 und 200 µl (statt 100 µl) Chloroform gelöst. Grund für diese Änderung war, dass sich relativ viel Rückstand gebildet hatte, der sich auch auf diese Weise nicht vollständig lösen ließ. Außerdem war die Volumenreduktion der Probe, wie sie für das Auftragen auf die Kieselgel-Platte zur Auswertung mit der Dünnschichtchromatographie erforderlich war, für die Analyse mit der Isotachophorese nicht nötig. Der Rückstand wurde in Sulfatid-Puffer gelöst und mit der rhASA inkubiert.

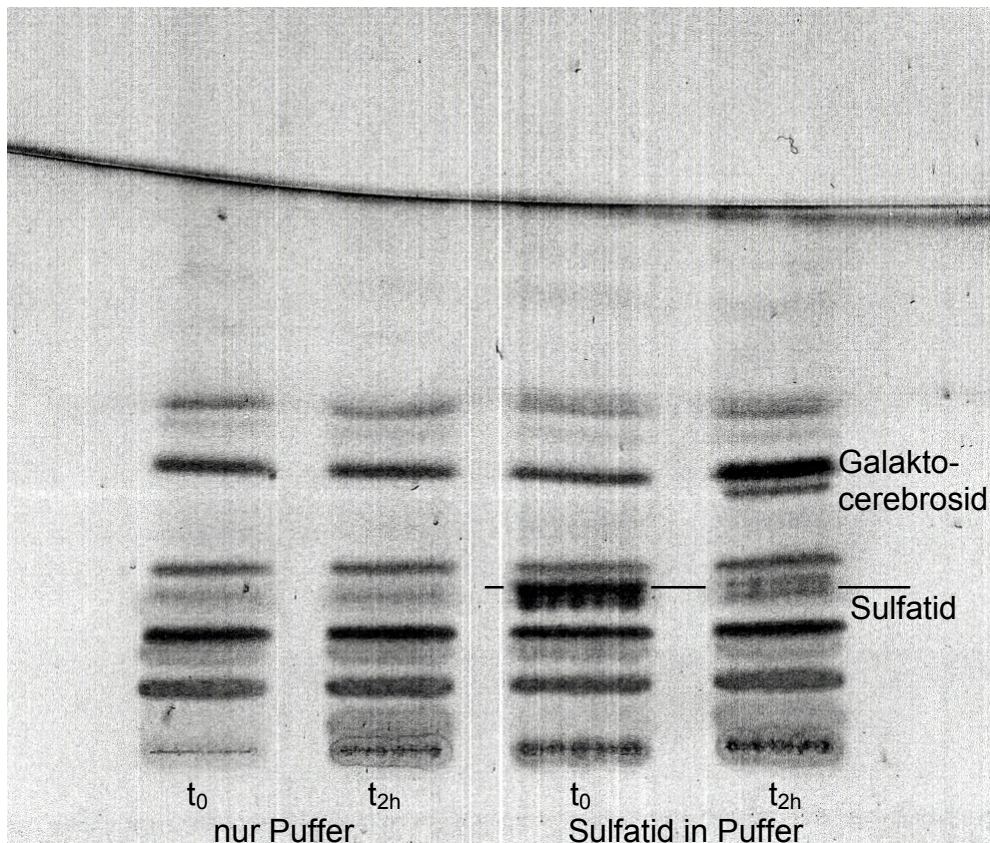
#### Inkubationsbedingungen:

Probe 1 (2x):	2,5 ml Urin 300 µl Sulfatid-Puffer
Probe 2 (2x):	2,5 ml Urin 300 µl 1 mM Sulfatid-Lösung
Ansatz (H <sub>2</sub> O):	je 1x Probe 1 bzw. Probe 2 (eingedampft) 300 µl Sulfatid-Puffer 15 µl H <sub>2</sub> O
Ansatz (rhASA):	je 1x Probe 1 bzw. Probe 2 (eingedampft) 300 µl Sulfatid-Puffer 15 µl rhASA unverdünnt (2,22 mU)
Inkubationszeit:	2 Stunden
Inkubationstemperatur:	37 °C
Reaktionsende:	Zugabe von 30 µl Methanol zu 30 µl Ansatz für die DC

Für die Isotachophorese wurden von den Proben 130  $\mu\text{l}$  zur Auswertung abgenommen. Allen Proben wurde vor der Auswertung je 13  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  zugegeben um ein genügend großes Probenvolumen für die Isotachophorese zu erhalten. Durch die Verdünnung und die Zugabe von 15  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bzw. rhASA waren die Proben insgesamt ungefähr 5:1 verdünnt und enthielten Sulfatid in einer Konzentration von ca. 800  $\mu\text{M}$ .

### Ergebnis:

In Ansatz ( $\text{H}_2\text{O}$ ) der keine rhASA enthielt stellte sich kein Sulfat-Signal bei der Auswertung mit der Isotachophorese dar. Das war deshalb erstaunlich, weil der Urinprobe bei der Aufarbeitung nur einmal  $\text{H}_2\text{O}$  zur Entfernung des freien Sulfats des Urins zugegeben worden war. Nach zweistündiger Inkubation mit der rhASA wurde ein Sulfat-Signal mit einer Laufzeit von 19,85 Sekunden gemessen. Das entsprach nach der zugehörigen Kalibrierkurve C (siehe Kap. 3.4.15) einer Sulfatkonzentration von 660,8  $\mu\text{M}$ . Daraus errechnete sich ein Umsatz des Sulfatids von 82,6%.



**Bild 54:** Sulfatid-Lösung und Sulfatid-Puffer in Urin zwei Stunden mit rhASA inkubiert, Auftrag in Chloroform/Methanol =2:1

Auch in der Dünnschichtchromatographie war nach zweistündiger Inkubation des Galaktocerebrosid-3-sulfats in der Urinprobe mit der rhASA noch eine schwache Sulfatid-Bande abgrenzbar. Das sprach ebenfalls gegen einen vollständigen Umsatz des Galaktocerebrosid-3-sulfats (**Bild 54**). Die Auswertung der Urinprobe, der kein Sulfatid zugegeben wurde, zeigte vor und nach Inkubation mit der rhASA dasselbe Bild. Es wurde weder eine Sulfatid- noch eine Galaktocerebrosid-Bande abgebildet. Die Sulfatidkonzentration, die in dem Urin eines gesunden Probanden enthalten war, war demnach zu gering um in der Dünnschichtchromatographie eine Sulfatid-Bande zu bilden.

#### 3.4.26 Umsatz von Sulfatid geringerer Konzentration in Urin durch rhASA

In diesem Versuch sollte eine Konzentration an Galaktocerebrosid-3-sulfat in einer Urinprobe ausgewertet werden, wie sie bei einem Patienten mit MLD vorliegen könnte. Dazu wurde dem Urin eines gesunden Probanden Sulfatid vor der Aufarbeitung zugegeben, sodass der Urin anschließend insgesamt eine Galaktocerebrosid-3-sulfat-Konzentration von 2.100 µg/l (2,53 µM) aufwies.

Zu 2,5 ml Urin wurden 25 µl einer Sulfatid-Lösung mit 200 mg Sulfatid pro Liter Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1 zugegeben. Dadurch ergab sich eine Konzentration von 5,25 µg Sulfatid pro 2,5 ml Urin (Berechnung siehe **Anhang**). Anschließend wurde die Probe nach der in Kap. **2.2.6.5** beschriebenen Methode aufgearbeitet. Nach dem ersten Eindampfen der Flüssigkeit in einem Glasgefäß, wurde der Rückstand jedoch direkt in ein verschließbares Glasgefäß überführt und die Flüssigkeit darin nochmals verdampft, um durch die Aufarbeitung möglichst wenig Sulfatid zu verlieren. Der Rückstand im Glasgefäß wurde dann in 400 µl Sulfatid-Puffer resuspendiert. Zwei Ansätze mit je 150 µl der Suspension aus derselben Urinprobe wurden hergestellt. Dem einen Ansatz wurde als Ausgangswert H<sub>2</sub>O und dem zweiten Ansatz rhASA zugegeben. Beide Ansätze wurden im Wasserbad inkubiert und mit Isotachophorese ausgewertet.



Inkubationsbedingungen:

Ansatz 1:	150 µl Urinprobe mit Sulfatid (f.c.: 15,8 µM)
	15 µl H <sub>2</sub> O
Ansatz 2:	150 µl Urinprobe mit Sulfatid (f.c.: 15,8 µM)
	15 µl rhASA unverdünnt (2,22 mU)
Inkubationszeit:	2,5 Stunden
Inkubationstemperatur:	37 °C

Ergebnis:

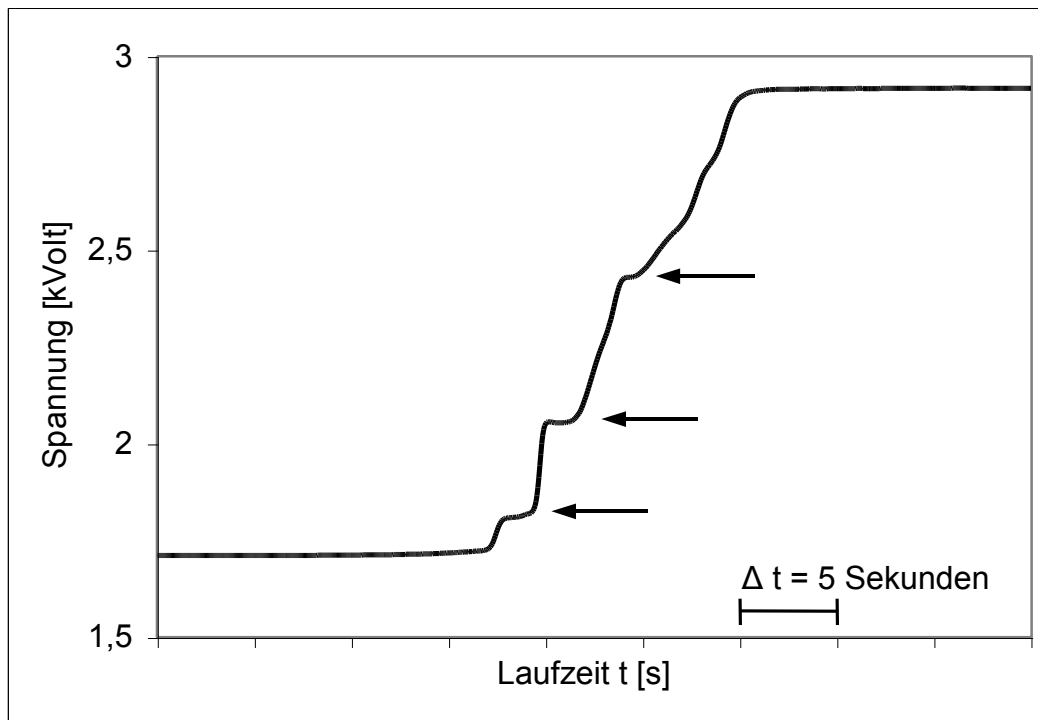
In der Isotachophorese war in dem Ansatz 1 ohne rhASA kein Sulfat-Signal nachweisbar (**Bild 55a**). Im Ansatz 2 hingegen zeigte sich nach Inkubation mit der rhASA eine Sulfat-Signal mit einer Laufzeit von 2,75 Sekunden (**Bild 55b**). Aus der entsprechenden Kalibrierkurve D aus Kap. **3.4.15** mit dem y-Achsenabschnitt von  $t = 2,35$  Sekunden und einer Steigung von  $m = 0,0295$  wurde die Sulfatkonzentration in Ansatz 2 folgendermaßen berechnet:

$$c(\text{Sulfat}) = (2,75 \text{ s} - 2,35 \text{ s}) : 0,0295 \mu\text{M} \times \text{VF}$$

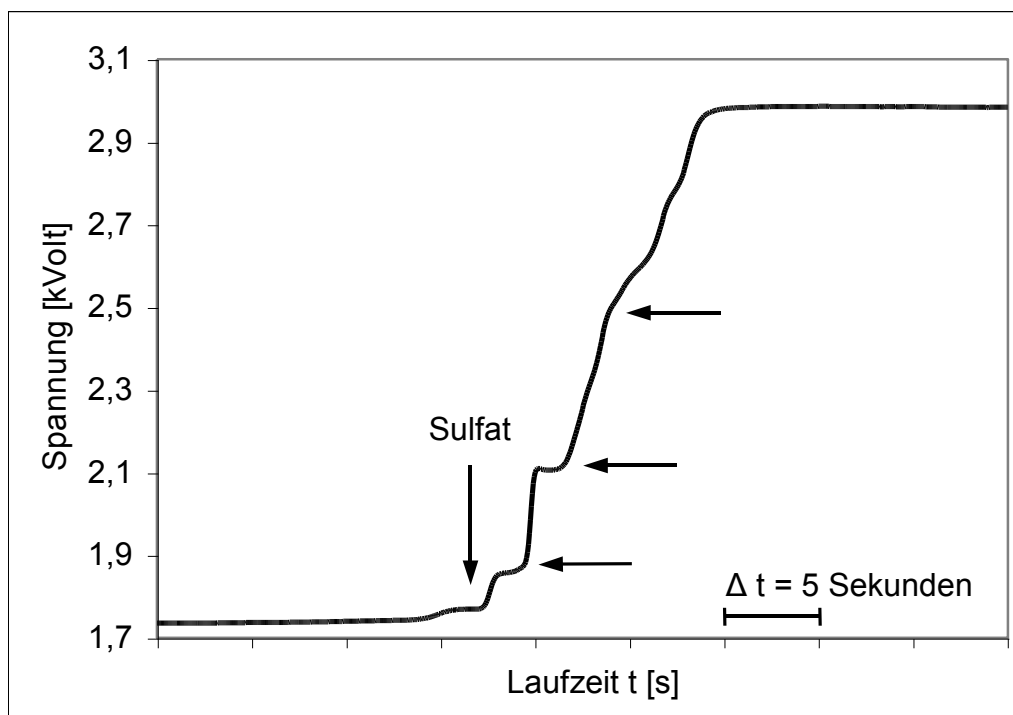
$$c(\text{Sulfat}) = 13,6 \mu\text{M} \times \text{VF}$$

$$c(\text{Sulfat}) = 15,0 \mu\text{M}$$

Durch die Zugabe der rhASA war der Ansatz vor Auswertung noch um 10% verdünnt worden. Addiert man diese 10% hinzu, erhielt man eine Sulfat-Konzentration von 15,0 µM. In der Probe waren also vor Inkubation mit der rhASA rein rechnerisch 15,0 µM Sulfatid enthalten, wenn der Umsatz vollständig erfolgt war. Wurde von einer mittleren endogenen Sulfatidkonzentration von 100 µg Sulfatid pro Liter Urin (0,13 µM) eines gesunden Probanden ausgegangen und wurden die zugegebenen 2000 µg/l (2,4 µM) addiert, errechnete sich daraus eine Sulfatidkonzentration in der Probe nach Inkubation von 15,8 µM (siehe **Anhang**). Aus dem Ergebnis ließ sich schließen, dass das Galaktocerebroside-3-sulfat vollständig von der rhASA umgesetzt worden war.



**Bild 55a:** Sulfat-Signal nach Inkubation von zu Urin zugegebenem Galaktocerebrosid-3-sulfat für 2,5 h **ohne Zugabe von rhASA** ( → sind nicht-identifizierte Urinkomponenten)



**Bild 55b:** Sulfat-Signal nach Inkubation von zu Urin zugegebenem Galaktocerebrosid-3-sulfat für 2,5 h **mit unverdünnter rhASA (2,22 mU im Reaktionsansatz)**

### 3.4.27 Zusammenfassung – Sulfatidbestimmung im Urin

Galaktocerebrosid-3-sulfat (1 mM), das vor der Aufarbeitung zu Urin gegeben wurde ließ sich von der rhASA problemlos umsetzen. Nach zweistündiger Inkubation der Urinprobe mit unverdünnter rhASA (2,22 mU / 165 µl Reaktionsansatz) wurde nach der Auswertung mit der Isotachophorese ein 82%iger Umsatz des Sulfatids erreicht. Dieses Ergebnis war gut mit der Auswertung derselben Probe mittels Dünnschichtchromatographie vereinbar.

Aus dem Ergebnis des Experiments in Kap. **3.4.26** wurde ersichtlich, dass durch die geringe Konzentration an Galaktocerebrosid-3-sulfat im menschlichen Urin maximal ein Sulfat-Signal von wenigen Sekunden in der Auswertung mit der ITP erreicht werden konnte. Diese Laufzeiten im Sekundenbereich sind nicht verlässlich auswertbar. Kleine Abweichungen beim Abwiegen des Sulfatids, der Aufarbeitung der Probe, der Fehler der Kalibrierkurve und der systematische Fehler der auswertenden Computersoftware lassen bei Laufzeiten im Sekundenbereich keine quantitative Auswertung des Sulfat-Signals zu.

Die Methode lässt sich, davon abgesehen, problemlos durchführen und eignet sich gut zum qualitativen Nachweis des Sulfatids im Urin von Patienten mit Metachromatischer Leukodystrophie, bei denen Sulfatidkonzentrationen im Bereich von ca. 4 µM zu erwarten sind. Die Sulfatidkonzentration im Urin eines Gesunden verursacht nach Inkubation mit der rhASA für 2,5 Stunden in der Isotachophorese kein Sulfat-Signal. Wird hingegen eine Urinprobe mit erhöhter Sulfatidkonzentration, der eines Patienten mit MLD vergleichbar ausgewertet, konnte nach Inkubation mit der Isotachophorese ein Sulfat-Signal gemessen werden.



## Kapitel 4

### Diskussion

Die Lipidspeichererkrankung Metachromatische Leukodystrophie (MLD) wurde erstmals im Jahre 1910 unabhängig voneinander von Perusini und Alzheimer beschrieben [Kolodny & Fluharty, 1995]. Es handelt sich dabei um eine autosomal-rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit, als deren Ursache meist ein Enzymdefekt der Arylsulfatase A (ASA) und in sehr seltenen Fällen ein Mangel des Aktivatorproteins Saposin B vorliegt. Eine Verminderung der ASA-Aktivität kommt auch bei gesunden Menschen vor und wird als Pseudodefizienz der ASA bezeichnet [Gieselmann et al, 1989]. Durch Anhäufung von Galaktocerebrosid-3-sulfat (Sulfatid) kommt es zum fortschreitenden Untergang von Oligodendrozyten im zentralen und von Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem. Die dadurch entstehende Entmarkung der Nervenfasern führt bei einem Erkrankungsbeginn im Kindesalter zu einer progredienten Entwicklung von neurologischen Symptomen, wie Ataxie, Tetraplegie und zerebralen Krampfanfällen [Biffi et al, 2006].

Eine Heilung der MLD ist zur Zeit noch nicht möglich. Durch Stammzelltransplantation (SZT) kann der Krankheitsverlauf in einigen Fällen jedoch verlangsamt oder sogar gestoppt werden. Einen weiteren Therapieansatz stellt die Enzymersatztherapie (ERT) dar, die zur Zeit experimentell durchgeführt wird. Dabei wird das fehlende Enzym in Form einer rekombinanten humanen Arylsulfatase A (rhASA) in regelmäßigen Abständen intravenös appliziert. Die Begrenzung dieses Therapieansatzes besteht darin, dass das Enzym die Blut-Hirn-Schranke nur in minimalem Maße überschreitet. Die deshalb vermutlich nur außerhalb des zentralen Nervensystems auftretende Wirkung der ERT könnte aber, in der Kombination mit der Stammzelltransplantation, einen großen therapeutischen Gewinn bringen. Symptome, die auf Störungen des peripheren Nervensystems beruhen, und die bei nahezu allen Patienten mit MLD auf-

treten, werden von der Stammzelltransplantation, die ihre Wirkung ausschließlich im zentralen Nervensystem entfaltet, nicht beeinflusst [Sevin et al, 2007]. Durch Kombination beider Therapien könnte im Idealfall eine Kontrolle aller Symptome, des zentralen und des peripheren Nervensystems, der Patienten mit MLD erreicht werden.

Im Tiermodell werden durch Reimplantation von autologen Stammzellen, die durch Modifikation mit einem viralen Vektor Arylsulfatase A überexprimieren, erfolgsversprechende Ergebnisse erreicht. In Zukunft könnten dadurch möglicherweise die Erfolgsaussichten der Stammzelltransplantation verbessert werden [Matzner & Gieselmann, 2005].

Die Diagnostik der MLD beruht auf dem Nachweis des Enzymdefekts mittels Bestimmung der ASA-Aktivität von Leukozyten, auf der genetischen Diagnostik und der Messung der Sulfatidausscheidung im Urin. Letztere hat den Vorteil, dass damit die Pseudodefizienz der ASA von der MLD unterschieden und ein Saposin B Defekt diagnostiziert werden kann. Bisher wird das Sulfatid meist semiquantitativ mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt. In dieser Arbeit sollte versucht werden, eine quantitative Methode zur Bestimmung der Sulfatidkonzentration im Urin mit Hilfe der Isotachophorese (ITP) zu entwickeln.

### **Einsatz der Sulfatidbestimmung im Urin**

Der Nachweis der Sulfatidausscheidung im Urin stellt ein Standardverfahren zur Diagnostik der MLD dar. Vor allem bei der Primärdiagnostik wird diese Methode eingesetzt. Die Ausscheidung von Sulfatid im Urin ist pathognomonisch für die MLD und schließt auch die Erkennung eines Saposin B-Defektes mit ein, bei dem die enzymatisch bestimmte Aktivität der Arylsulfatase A mittels des künstlichen Substrats para-Nitrocatecholsulfat im Normbereich liegt. Die in Leukozyten bestimmten Restaktivität der Arylsulfatase A, die vor allem bei der juvenilen Form der MLD sehr unterschiedlich hoch sein kann, zeigt eine schlechte Korrelation mit dem Erkrankungsverlauf [Marcão et al, 2005]. Auch gesunde Menschen, die homozygot für eine Pseudodefizienz-Mutation in dem ASA-Gen sind, oder aber eine Mutation in einem der beiden ASA-Gene und eine Pseudodefizienz-Mutation im zweiten Gen aufweisen, zeigen in der enzymatischen Bestimmung der ASA-Aktivität ein pathologisches Ergebnis. Im Gegensatz dazu scheiden diese gesunden Träger einer Pseudodefizienz-Mutation

keine oder nur sehr geringe Mengen an Sulfatid mit dem Urin aus und können damit eindeutig von Patienten mit MLD unterschieden werden.

Als Therapie-Verlaufsparemeter sind die vorhandenen diagnostischen Verfahren nur mit Einschränkung einsetzbar. Nach der Stammzelltransplantation ist die Bestimmung der ASA-Aktivität aus Leukozyten nicht mehr zu verwenden, da die Leukozyten im Idealfall nach SZT vollständig von den Spender-Stammzellen abstammen und damit eine normale Aktivität aufweisen. Die Sulfatidausscheidung im Urin bleibt hingegen weiterhin meist unverändert erhöht [Görg et al, 2007]. Aber auch der Wert der Bestimmung des Sulfatids im Urin ist fraglich, da der Großteil des im Urin ausgeschiedenen Sulfatids aus den Tubuluszellen der Nieren stammt. Dies kann an der Verteilung der Fettsäuren des Ceramid-Anteils des Galaktocerebrosid-3-sulfats gezeigt werden. In den Nierenzellen und im Urin kommt eine ähnliche Verteilung der Fettsäuren vor, die sich von der des ZNS deutlich unterscheidet [Philippart et al, 1971]. Das Sulfatid, das im Urin ausgeschieden wird, stammt demnach vermutlich aus der Niere und den anderen peripheren Organen [Nishio et al, 1985]. Bei der SZT ist deshalb keine Änderung der Sulfatidausscheidung zu erwarten, da sich die Wirkung der SZT vor allem im Gehirn entfaltet. Durch zusätzliche Transplantation von mesenchymalen Stammzellen (MSC), die in der Lage sind sich in Zellen verschiedener Organe zu differenzieren, soll auch ein Einfluss auf die Sulfatid-Speicherung der peripheren Organe erreicht werden.

Bei der Enzymersatztherapie, bei der die rekombinante Arylsulfatase A über Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren aus dem Blut aufgenommen werden kann, sollte die Sulfatidausscheidung rückläufig sein, wenn die Therapie anspricht. Da alle Zellen Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen, würde in diesem Fall das gespeicherte Sulfatid auch in den Tubuluszellen der Niere und den peripheren Organen durch die rhASA abgebaut werden. Trotz einer Abnahme der Sulfatidausscheidung ließe sich aber keine Aussage über das Ansprechen der Therapie im ZNS treffen. In dem Fall aber, dass die Enzymersatztherapie zur Behandlung der Sulfatidablagerung außerhalb des zentralen Nervensystems eingesetzt wird, würde die Sulfatidausscheidung im Urin möglicherweise als Verlaufsparemeter von Nutzen sein.

### **Bestimmung der Sulfatidkonzentration im Urin**

Um das Sulfatid im Urin mit der Isotachophorese bestimmen zu können, mussten zunächst noch einige Hürden überwunden werden. Da die Sulfatidkonzentration über die Sulfatgruppe ausgewertet wird, musste das im Urin enthaltene freie Sulfat zunächst vollständig aus der Urinprobe entfernt werden. Gleichzeitig musste die Sulfatgruppe im Urin nahezu hundertprozentig von Galaktocerebrosid-3-sulfat abgespalten werden, um einen Rückschluss von der gemessenen Sulfatkonzentration auf die Sulfatidkonzentration zuzulassen. Zudem musste geprüft werden, ob die rhASA aus Bestandteilen des verwendeten Puffers oder des Urins Sulfat freisetzen kann, da dies ebenfalls zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen würde.

### **Entfernung des freien Sulfats aus der Urinprobe**

Das Galaktocerebrosid-3-sulfat ist durch seine Sulfatgruppe zwar polar, durch den großen Ceramidanteil aber hydrophob. Für die direkte Auswertung mit der Isotachophorese ist das Sulfatid daher nicht geeignet, da es sich bei dem Elektrolytssystem der Isotachophorese stets um ein wässriges System handelt. Durch die Spaltung der Esterbindung von Galaktocerebrosid-3-sulfat entsteht freies Sulfat, das prinzipiell sehr gut mit der Isotachophorese ausgewertet werden kann. Da die Abspaltung der Sulfatgruppe durch die rhASA im Urin stattfinden sollte, musste vor dieser Abspaltung das im Urin enthaltene freie Sulfat entfernt werden. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt. In dem ersten Verfahren wurde durch die Zugabe eines Chloroform-Methanol-Gemisches zur Urinprobe eine Bildung von zwei Phasen erreicht. Das freie Sulfat befindet sich nach Trennung der beiden Phasen ausschließlich in der hydrophilen Oberphase. Durch dreimalige Zugabe von H<sub>2</sub>O (Deionat) zu der Probe und jeweiliges Absaugen der Oberphase, konnte eine vollständige Entfernung des Sulfats aus dem Urin erreicht werden. Da sich das Galaktocerebrosid-3-sulfat aufgrund seiner hydrophilen Galaktose-3-sulfat-Gruppe vermutlich vorwiegend an der Grenzschicht zwischen unterer lipophiler und oberer hydrophiler Phase aufhält, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass durch diese Aufarbeitung ein Teil des Sulfatids in die hydrophile Phase übertrat und durch das Absaugen verloren ging. Deshalb wurde stets ein geringer Rest an wässriger Lösung belassen, der die lipophile Phase bedeckte. Harzer & Recke (1975) konnten mit Hilfe von radioaktiv markiertem Sulfatid zeigen, dass bei dieser Methode auch nach dreimaliger Zugabe von H<sub>2</sub>O und Ab-



saugen der Oberphase der Urinprobe weniger als 10% des Sulfatids verloren geht. Um diesen Verlust weiter zu reduzieren wurde in der vorliegenden Arbeit immer eine hydrophile Schicht zum Schutz des Sulfatids belassen, was in der Methode von Harzer & Recke (1975) nicht beschrieben ist. Deshalb wäre es möglich, dass der Verlust an Sulfatid durch das in dieser Arbeit verwendete Verfahren noch weiter verringert werden konnte.

Bei der zweiten Methode wurde das freie Sulfat mit Hilfe von Bariumchlorid aus der Probe entfernt. Durch die Zugabe von Bariumchlorid zu einer sulfathaltigen Lösung fällt schwer lösliches Bariumsulfat aus. Das Chlorid wird aus seiner Bindung verdrängt und liegt gelöst vor. Die Schwierigkeit dieses Verfahrens besteht darin, dass das Bariumchlorid im Überschuss zu der Probe gegeben werden muss, um mit Sicherheit eine vollständige Fällung des Sulfats zu erreichen. Falls das überschüssige Bariumchlorid durch die dreimalige Zugabe von  $H_2O$  und das Absaugen der Oberphase nicht vollständig aus der Probe entfernt wird, könnte es auch mit dem Sulfat, das aus Galaktocerebrosid-3-sulfat abgespalten wird, reagieren und damit das Messergebnis verfälschen.

In dieser Arbeit wurde daher nur die erste Methode, in der das Sulfat manuell aus der Probe entfernt wird, fortgeführt.

### **Vollständiger Umsatz von Galaktocerebrosid-3-sulfat**

Um von der Sulfatkonzentration, die mit der Isotachophorese gemessen wurde, auf die Konzentration an Sulfatid in der Probe schließen zu können, musste unter den Bedingungen im Urin eine nahezu vollständige Abspaltung der Sulfatgruppe erreicht werden. Die Abspaltung der Sulfatgruppe wurde auf zwei unterschiedlichen Wegen durchgeführt. Zum einen wurde die rekombinante Arylsulfatase A zur enzymatischen Spaltung der Esterbindung verwendet und zum anderen eine saure Hydrolyse mit Salzsäure zur Abspaltung der Sulfatgruppe eingesetzt.

Für die Abspaltung der Sulfatgruppe mit Hilfe der rhASA war der Einsatz eines Puffers erforderlich, der verschiedene Bedingungen erfüllen musste. Um den pH-Wert auf das pH-Optimum der Arylsulfatase A von 5 einzustellen, wurde ein Natriumacetat-Puffer eingesetzt. Zusätzlich enthielt der Puffer Taurocholat, um das Galaktocerebrosid-3-sulfat in Lösung zu bringen und einen Zugang des Enzyms zum Substrat zu ermöglichen. Diese Aufgabe wird im menschlichen Körper durch das Aktivator-

Protein Saposin B erfüllt. Des Weiteren war in dem Puffer Magnesium enthalten, da Raghavan et al (1981) experimentell herausgefunden hatten, dass Magnesium-Ionen den Umsatz von Galaktocerebrosid-3-sulfat durch die Arylsulfatase A fördern. Für die Isotachophorese war es aber erforderlich, dass die Konzentrationen der Probenbestandteile nicht zu hoch waren, da in der Kapillare durch die freie Beweglichkeit von H<sub>2</sub>O ein Konzentrationsausgleich aller Probenbestandteile stattfindet. Es wurde versucht, die Konzentration der Pufferbestandteile zu reduzieren, um die Zonen in der Isotachophorese zu verkürzen, wobei dennoch ein vollständiger Umsatz des Sulfatids erreicht werden sollte. Um zu prüfen, in welchem Umfang eine Verminderung der Pufferkonzentration zu einer Reduktion des Umsatzes führte, wurde ein künstliches Substrat der Arylsulfatase A, das para-Nitrocatecholsulfat (pNCS), eingesetzt. Dieses pNCS hat den Vorteil, dass für den Umsatz kein Vermittler wie Taurocholat erforderlich ist und dass der Umsatz mit der Isotachophorese sowie mittels Photometer über die Absorption von sichtbarem Licht der Wellenlänge 514 nm gemessen werden konnte. Darüber hinaus wird pNCS 24mal schneller von der Arylsulfatase A umgesetzt als Galaktocerebrosid-3-sulfat [Farooqui & Mandel, 1977]. Ein Einfluss der Konzentration der Pufferbestandteile auf den Umsatz konnte dadurch mit pNCS als Substrat viel differenzierter untersucht werden, als mit Sulfatid.

Untersucht wurden Natriumazetat-Konzentrationen zwischen 10 und 500 mM. Der Umsatz von pNCS lag bei derselben Inkubationszeit bei 500 mM Natriumazetat etwa drei mal höher als der Umsatz bei 10 mM Natriumazetat. Dennoch konnte durch Verlängerung der Inkubationszeit auch bei der Verwendung von Puffern geringerer Ionenstärke, ein nahezu vollständiger Umsatz erreicht werden. Daher wurde im Folgenden für die Inkubation von Galaktocerebrosid-3-sulfat in Urin mit der rhASA ein Puffer mit 25 mM Natriumazetat eingesetzt.

Alternativ zu dem enzymatischen Umsatz durch die Arylsulfatase A wurde eine Abspaltung der Sulfatgruppe von einem Galaktose-Ring durch Zugabe von Salzsäure untersucht. Bei diesem Verfahren, das als saure Hydrolyse bezeichnet wird, werden Esterbindungen, wie die zwischen Sulfat und Galaktocerebrosid, unspezifisch gespalten. Die Energie dazu wird in Form von Wärme zugeführt. Eine 0,1 mM HCl-Lösung war ausreichend, um nach zwölfstündiger Inkubation bei 100° C eine vollständige Abspaltung der Sulfatgruppe von Galaktose-6-sulfat zu erreichen. Galaktose-6-sulfat wurde als Model eingesetzt, da es im Gegensatz zu Galaktocerebrosid-3-

sulfat in dem Chlorid-Caprionsäure-Elektrolytssystem der Isotachophorese eine eigene Substanzstufe verursacht und damit die Abspaltung der Sulfatgruppe auch über die Abnahme der Galaktose-6-sulfat-Stufe nachgewiesen werden konnte.

Die Abspaltung der Sulfatgruppe mittels saurer Hydrolyse hat den Vorteil, dass kein Puffer für den Umsatz erforderlich ist. Zudem ist die zugegebene Chloridkonzentration mit 0,1 mM HCl so gering, dass keine Störung des Elektrolytssystems der Isotachophorese bei der Analyse zu erwarten ist. Allerdings hat diese Methode den Nachteil, dass durch die Salzsäure unspezifisch auch andere Sulfatgruppen aus verschiedenen Verbindungen im Urin freigesetzt werden könnten. Deshalb wurde für die Versuche im Urin schließlich die zuvor beschriebene enzymatische Methode zur Abspaltung der Sulfatgruppe von Sulfatid eingesetzt.

Um einen hundertprozentigen Umsatz von 5,25 µg Galaktocerebrosid-3-sulfat in der Probe zu erreichen, musste 2,5 Stunden bei 37° C inkubiert und 2,22 mU rhASA eingesetzt werden. Die eingesetzte Sulfatidkonzentration entspricht 2100 µg/l Urin und damit der niedrigsten möglichen Sulfatidkonzentration bei einem Patienten mit MLD. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie wurde bestätigt, dass bei dieser Methode ein vollständiger Umsatz des Sulfatids stattgefunden hatte.

### **Substratspezifität der rekombinanten Arylsulfatase A**

Sowohl in dem Pufferbestandteil Taurocholat als auch möglicherweise im Urin sind Sulfatgruppen gebunden, deren Abspaltung durch die rhASA zur Verfälschung der Auswertung hätten führen können. Um von der gemessenen Sulfatkonzentration auf die ursprüngliche Konzentration des Sulfatids in der Urinprobe schließen zu können, musste jedoch sichergestellt sein, dass das Sulfatid das einzige Molekül in der Probe ist, aus dem die rhASA Sulfat abspalten kann.

Durch Inkubation einer Pufferlösung ohne Sulfatid und einer Urinprobe eines gesunden Probanden mit rhASA, konnte mit Hilfe der Isotachophorese nachgewiesen werden, dass außer aus Sulfatid aus keiner der enthaltenen Verbindungen durch die rhASA Sulfat freigesetzt werden konnte. Dies bedeutet, dass nach Inkubation der Urinprobe mit der rhASA das gemessene Sulfat ausschließlich aus dem Galaktocerebrosid-3-sulfat stammt.

Darüber hinaus ergab dieser Versuch, dass die im Urin eines gesunden Menschen enthaltene Sulfatidkonzentration zu gering ist, um nach vollständiger Abspaltung der

Sulfatgruppe mit der rhASA eine nachweisbare Substratstufe in der Isotachophorese zu verursachen. Eine Sulfatkonzentration von ca. 100 µg/l unterschreitet damit die Nachweisgrenze der Isotachophorese für Sulfat, sodass nur pathologisch erhöhte Sulfatidkonzentrationen, wie sie bei Patienten mit MLD vorkommen, eine Sulfat-Stufe im Isotachogramm verursachen.

### **Sulfatdetektion mit der Isotachophorese**

Ein häufig verwendetes Elektrolytssystem der Isotachophorese beinhaltet Capronsäure als Endelektrolyt. In dieser Arbeit eingesetzte Substanzen wie pNCS, Galaktose-4- und -6-sulfat, Ascorbat und Azetat lassen sich mit diesem Endelektrolyt problemlos darstellen. Als Leitelektrolyt wurde Chlorid eingesetzt, das im Vergleich zu Sulfat eine höhere Mobilität aufweist [Meissner, 1998]. Dennoch ließ sich Sulfat in diesem Elektrolytssystem nicht nachweisen, weil die relative Stufenhöhe des Sulfats bezogen auf die Differenz der Höhe von Leit- und Endelektrolyt zu gering war, um von der auswertenden Computersoftware „ITPWin“ erfasst zu werden.

Um die Detektion der Sulfat-Stufe zu ermöglichen, wurde daher Citronensäure als Endelektrolyt eingesetzt, die gegenüber der Capronsäure eine deutlich höhere Mobilität aufweist. In diesem Elektrolytssystem ließ sich die Sulfat-Stufe mittels der vorhandenen Computersoftware problemlos auswerten. Auch in diesem Elektrolytssystem wurde Chlorid als Leitelektrolyt eingesetzt.

Das Forschungsziel, eine Methode zum quantitativen Nachweis von Galaktocerebro-sid-3-sulfat im Urin mit der Isotachophorese zu entwickeln, wurde somit prinzipiell erfolgreich umgesetzt.

Die Konzentrationen des Sulfatids im menschlichen Urin ist allerdings mit ca. 100 µg/l beim Gesunden und circa 3500 µg/l bei einem Patienten mit MLD so gering, dass ein Probenvolumen von 2,5 ml Urin nicht ausreicht, um eine gut auswertbares Signal in der Isotachophorese zu erreichen. Bei einer Sulfatkonzentration im pathologischen Bereich ist infolge des geringen Sulfat-Signals der Fehler der Auswertung zu groß, um eine sichere und reproduzierbare quantitative Bestimmung zuzulassen.

Eine qualitative bzw. semiquantitative Auswertung ist dagegen möglich, da nach Inkubation der Urinprobe mit der rhASA nur dann eine Sulfat-Stufe in der ITP vorhanden war, wenn eine pathologisch erhöhte Sulfatidkonzentration im Urin vorlag. Der Vorteil dieses Verfahrens gegenüber der ebenfalls semiquantitativen Sulfatidbestim-

mung mittels Dünnschichtchromatographie besteht darin, dass ein geringerer Materialeinsatz erforderlich ist und die Analysezeit mit der Isotachophorese deutlich geringer ist.

Prinzipiell wäre es vorteilhaft ein größeres Probenvolumen als 2,5 ml Urin zu verwenden. Allerdings müsste das Urinvolumen mindestens verzehnfacht werden, um einen verlässlich auswertbare Sulfatkonzentration in der Isotachophorese zu erreichen. Das würde bedeuten, dass 170 ml Lösungsmittel eingesetzt werden müsste. Das Problem ist, dass dieses Volumen für die ITP auf ein Probenvolumen von maximal 100 µl reduziert werden müsste. Dabei müssten vermutlich hohe Verluste von Sulfatid in Kauf genommen werden. Die Zielsetzung eine gegenüber der Dünnschichtchromatographie weniger aufwendige Methode zu entwickeln, die einen geringeren Materialeinsatz erfordert, wäre damit nicht gegeben.

Eine neue Entwicklung zur Bestimmung des Sulfatids im Urin stellt die Massenspektrometrie dar. Mit dieser kann das Sulfatid direkt, ohne vorherige Abspaltung der Sulfatgruppe analysiert werden. Dennoch ist die Methode aufgrund der hohen Reparaturanfälligkeit der Massenspektrometer und der Forderung nach Salzfreiheit der Proben nicht unproblematisch für die Sulfatidbestimmung im Urin anwendbar. Generell aber hat sich die Anwendbarkeit und Verfügbarkeit der Massenspektrometrie in den letzten Jahren sprunghaft weiterentwickelt. Ein großer Vorteil ist die einfache Probenaufarbeitung und Durchführung der Methode [Whitfield et al, 2001]. Damit wird die Massenspektrometrie in Zukunft vermutlich das Standardverfahren zum Nachweis der Sulfatidkonzentration im Urin werden.

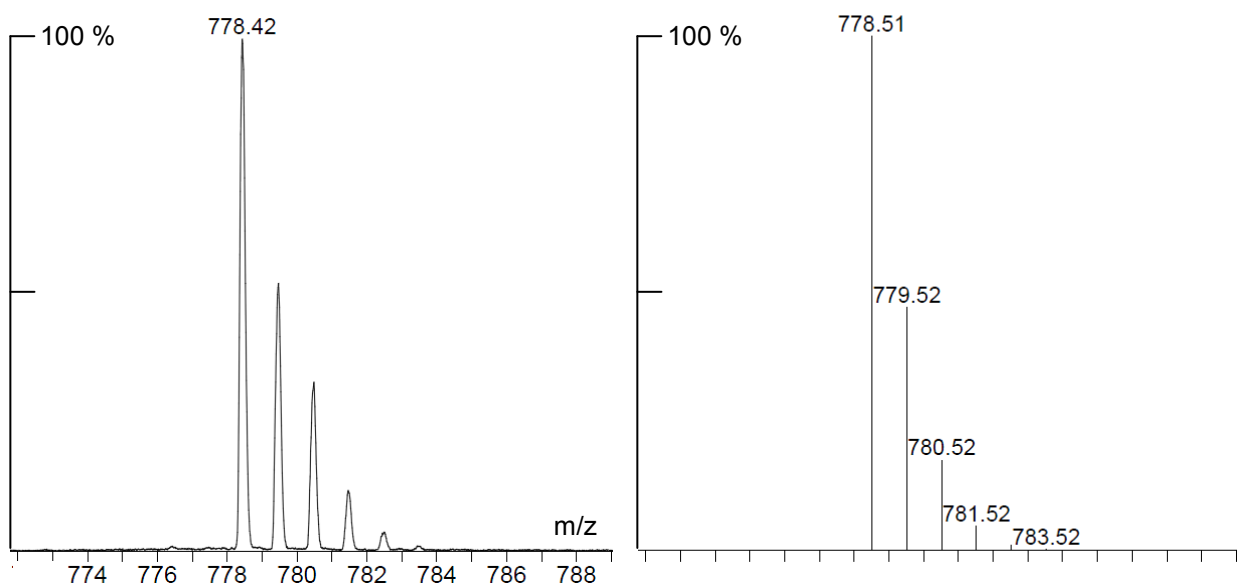
### **Massenspektrometrie**

Abschließend sollte die Massenspektrometrie zur Bestimmung der Sulfatide im Urin eingesetzt werden. Mit Hilfe dieser Methode kann das Galaktocerebrosid-3-sulfat nach einer geeigneten Aufarbeitung quantitativ im Urin bestimmt werden [Kuchař et al, 2009; Whitfield et al, 2001]. Für diese Bestimmung ist es jedoch wiederum erforderlich, die Urinprobe vor der Messung in geeigneter Weise aufzuarbeiten. Die Aufarbeitung der Proben war nach Kap. 2.2.9.1 durchgeführt worden. Aufgrund vielfältiger Schwierigkeiten, die sich vor allem durch die im Urin enthaltenen Salze und durch Geräteprobleme am Massenspektrometer ergeben haben, konnte die Bestimmung der aufgearbeiteten Proben bis zum Abschluss der Arbeit noch nicht

erfolgen. Stattdessen soll hier zumindest das Prinzip der Bestimmung kurz erläutert werden.

### Massenspektrum von N-palmitoyl-Sulfatid

Zur Verdeutlichung des möglichen Einsatzes der MS ist in **Bild 56** ein Massenspektrum von N-palmitoyl-Sulfatid abgebildet, das freundlicherweise von der Firma Matreya LCC zur Verfügung gestellt wurde.



**Bild 56:** Linkes Bild: Spektrum im negativ-Ionen-Modus von N-palmitoyl-Sulfatid (16:0); rechtes Bild: softwaregeneriertes Isotopenmodell von N-palmitoyl-Sulfatid  
[Quelle: Matreya LCC]

Bei N-palmitoyl-Sulfatid handelt es sich um ein Sulfatid, das eine C16:0 Fettsäureseitenkette enthält, ein Molekulargewicht von 780 besitzt und die Strukturformel  $C_{40}H_{77}NO_{11}S$  aufweist. Dieses N-palmitoyl-Sulfatid wurde in einer Lösung mit 90% Azetonitril und 10% 10 mM Ammoniumazetat-Lösung gelöst und die mobile Phase mittels Massenspektrometer ausgewertet. Im ersten Bild ist das Massenspektrum der Probe gezeigt und in der zweiten Abbildung eine schematische Darstellung des N-palmitoyl-Sulfatids. Das Massenspektrum wurde im negativ-Ionen-Modus erzeugt. Das bedeutet, dass aus dem untersuchten Molekül durch Ionisation ein Proton vor der Auswertung entfernt wurde. Dadurch wird die Masse des N-palmitoyl-Sulfatids um 1 Dalton geringer. In den dargestellten Diagrammen ist die relative Isotopenhäu-

figkeit über dem Masse-zu-Ladungsverhältnis aufgetragen. Man erkennt dabei, dass das dargestellte Molekül nur eine negative Ladung aufweist, da das Masse-zu-Ladungsverhältnis der Molekülmasse des Ions entspricht. Bei den Peaks, die sich dem Hauptpeak (entspricht  $m/z = 778$  in **Bild 56**) anschließen handelt es sich um die sogenannten  $C_{13}$ -Peaks. Diese sind dadurch zu erklären, dass jedes C-Atom mit einer 1,1%igen Wahrscheinlichkeit als  $C_{13}$ -Atom vorkommt. Da das N-palmitoyl-Sulfatid 40 C-Atome besitzt, ergibt sich daraus eine relative Häufigkeit von 44%, dass ein  $C_{13}$ -Atom in dem Molekül enthalten ist, 9,4% für zwei und 1,3% für drei  $C_{13}$ -Atome [Gross, 1999]. Dies lässt sich in **Bild 56** gut nachvollziehen. Darüber hinaus erkennt man, dass das Massenspektrum der schematischen Darstellung sehr gut entspricht.





## Kapitel 5

### Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es das Sphingolipid Galaktocerebroside-3-sulfat mit Hilfe der Isotachophorese quantitativ im Urin zu bestimmen. Dieses sogenannte Sulfatid wird beim Gesunden durch das körpereigene Enzym Arylsulfatase A abgebaut. Die Arylsulfatase A ist bei Patienten mit Metachromatischer Leukodystrophie (MLD) defekt, sodass das Galaktocerebroside-3-sulfat in Zellen angehäuft wird und auch im Urin in ca. 30-40fach höherer Konzentration als beim Gesunden vorkommt. Der qualitative Nachweis von Sulfatid im Urin mittels Dünnschichtchromatographie stellt eine Standardmethode zur Diagnostik der MLD dar. Der Vorteil einer quantitativen Bestimmung des Sulfatids mit der Isotachophorese wäre, dass es eventuell möglich würde die Effekte einer Enzyersatztherapie der MLD zu überprüfen. Des Weiteren könnte die Diagnostik der MLD vereinfacht und der Materialbedarf gegenüber der Dünnschichtchromatographie verringert werden.

Mit Hilfe der Isotachophorese wurde das aus Galaktocerebroside-3-sulfat abgespaltene Sulfat quantitativ bestimmt. Dazu musste zunächst das im Urin enthaltene freie Sulfat entfernt werden und anschließend das Sulfatid vollständig in Galaktocerebroside und Sulfat gespalten werden, damit man von der Konzentration des Sulfats in der Probe auf die des ursprünglich im Urin vorhandenen Sulfatid schließen konnte. Die Sulfatabspaltung erfolgte mit einer rekombinant hergestellten Arylsulfatase A, die auch im Rahmen der Enzyersatztherapie der MLD eingesetzt wird.

Durch eine geeignete Aufarbeitung war es möglich, das endogene Sulfat im Urin nachweislich zu entfernen und durch einen geeigneten Puffer konnte eine vollständige Abspaltung des Sulfats von Galaktocerebroside-3-sulfat durch die rekombinante Arylsulfatase A erreicht werden. Damit konnte das Ziel der Arbeit, das Sulfatid quanti-

tativ im Urin nachzuweisen erreicht werden. Allerdings erwies sich die Konzentration des Galaktocerebrosid-3-sulfats im Urin als zu gering, um eine genaue Bestimmung der Sulfatkonzentration bei einem Probenvolumen von 5 ml Urin zu ermöglichen. Eine Unterscheidung zwischen pathologischem Urin und der Urinprobe eines Gesunden ließ sich aber eindeutig darstellen. Ein größeres Urinvolumen einzusetzen würde dieses Problem möglicherweise beheben, war aber nicht zielführend, da damit die Forderung nach einem geringeren Materialeinsatz gegenüber der Dünnschichtchromatographie nicht mehr gegeben wäre und sich die Massenspektrometrie zunehmend zu einer Standardmethode entwickelt, mit der auch eine Bestimmung des Galaktocerebrosid-3-sulfats durchgeführt werden kann.



## Anhang

### Berechnung der endogenen Sulfatidkonzentration im Urin

Im Urin eines gesunden Menschen sind ca. 100 µg Sulfatid pro Liter (88 - 119 µg/l) enthalten, beim einem Patienten der an MLD leidet, ist die Sulfatidkonzentration ca. 35 mal so hoch und beträgt damit ca. 3566 µg/l (± 1855 µg/l) [Klaus Harzer - persönliche Kommunikation]. Mit Hilfe dieser Größen und mittels der in Sulfatid-Puffer erstellten Kalibrierkurve, lässt sich die zu erwartende Sulfat-Laufzeit in der Isotachophorese berechnen.

Sulfatid: MG ~830

830 g/l = 1 M

830 µg/l =  $1 \times 10^{-6}$  M

= 1 µM

100 µg/l = 0,120 µM gesunder Proband

3500 µg/l = 4,217 µM Patient mit MLD

### Urinaufarbeitung der 2,5 ml Urinprobe eines Gesunden:

Sulfatidkonzentration in der verwendeten Urinprobe (2,5 ml):

100 µg/l Urin

0,1 µg/ml Urin

0,25 µg/2,5 ml Urin

Sulfatidkonzentration im Ansatz nach Aufarbeitung des Urins und Zugabe von 300 µl

Sulfatid-Puffer:

0,25 µg/300 µl Ansatz

0,833 µg/1000 µl

0,833 mg/l

---

830 g/l	=	1 M
830 mg/l	=	1 mM
0,833 mg/l	=	0,001004 mM
0,833 mg/l	=	<u>1,004 <math>\mu</math>M</u>

### Urin mit Zugabe von 2000 $\mu$ g/l Sulfatid:

#### Sulfatidkonzentration in der Urinprobe

2,5 ml Urin eines gesunden Probanden mit im Mittel 100  $\mu$ g Sulfatid pro Liter

25  $\mu$ l 200 mg/l Sulfatid in Chloroform und Methanol (dadurch Verdünnung 1:100)

$100 \mu\text{g/l} + 1/100 \times 200 \text{ mg/l} = 2100 \mu\text{g/l} (2,53 \mu\text{M})$

2100  $\mu$ g/l Urin

2,1  $\mu$ g/ml Urin

5,25  $\mu$ g/2,5 ml Urin

#### Sulfatidkonzentration im Ansatz:

5,25  $\mu$ g/400  $\mu$ l Sulfatid-Puffer

13,125  $\mu$ g/ml

13,125 mg/l

830 g/l = 1 M

830 mg/l = 1 mM

13,125 mg/l = 0,0158 mM

13,125 mg/l = 15,8  $\mu$ M

**5,25  $\mu$ g/400  $\mu$ l = 15,8  $\mu$ M**

## Literaturverzeichnis

Anderson TJ, Schneider A, Barrie JA, Klugmann M, McCulloch MC, Kirkham D, Kyriakides E, Nave KA, Griffiths IR (1998)  
Late-onset neurodegeneration in mice with increased dosage of the proteolipid protein gene  
J Comp Neurol 394(4): 506 - 519

Barker PB & Horská A (2004)  
Neuroimaging in Leukodystrophies  
J Child Neurol 19(8): 559 - 570

Barth ML, Fensom A, Harris A (1995)  
Identification of seven novel mutations associated with metachromatic leukodystrophy  
Hum Mutat 6(2): 170 - 176

Barth ML, Fensom A, Harris A (1994-a)  
The arylsulfatase A gene and molecular genetics of metachromatic leukodystrophy  
J Med Genet 31(9): 663 - 666

Barth ML, Ward C, Harris A, Saad A, Fensom A (1994-b)  
Frequency of arylsulphatase A pseudodeficiency associated mutations in a healthy population  
J Med Genet 31(9): 667 - 671

Barth ML, Fensom A, Harris A (1993)  
Missense mutations in the arylsulfatase A genes of metachromatic leukodystrophy patients  
Hum Mol Genet 2(12): 2117 - 2121

Baum H, Dodgson KS, Spencer B (1959)  
The assay of arylsulphatases A and B of human urine  
Clin Chim Acta 4(3): 453 - 455

Baumann N, Masson M, Carreau V, Lefevre M, Herschkowitz N, Turpin JC (1991)  
Adult forms of metachromatic leukodystrophy: clinical and biochemical approach  
Dev Neurosci 13(4-5): 211 - 215

Baumann N, Turpin JC, Lefevre M, Colsch B (2002)  
Motor and psycho-cognitive clinical types in adult metachromatic leukodystrophy: genotype/phenotype relationships?  
J Physiol Paris 96(3-4): 301 - 306

Bethge WA, Haegele M, Faul C, Lang P, Schumm M, Bornhauser M, Handgretinger R, Kanz L (2006)

Haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation in adults with reduced-intensity conditioning and CD3/CD19 depletion: Fast engraftment and low toxicity  
*Exp Hematol* 34(12): 1746 - 1752

Biffi A, Cesani M, Fumagalli F, Del Carro U, Baldoli C, Canale S, Gerevini S, Amadio S, Falautano M, Rovelli A, Comi G, Roncarolo MG, Sessa M (2008- a)

Metachromatic leukodystrophy – mutation analysis provides further evidence of genotype-phenotype correlation  
*Clin Genet* 74(4): 349 - 357

Biffi A, Lucchini G, Rovelli A Sessa M (2008- b)

Metachromatic leukodystrophy: an overview of current and prospective treatments  
*Bone Marrow Transplant* 42(Suppl. 2): S2 - S6

Biffi A, Capotondo A, Fasano S, del Carro U, Marchesini S, Azuma H, Malaguti MC, Amadio S, Brambilla R, Grompe M, Bordignon C, Quattrini A, Naldini L (2006)

Gene therapy of metachromatic leukodystrophy reverses neurological damage and deficits in mice  
*J Clin Invest* 116(11): 3070 - 3082

Biffi A, Visigalli I, Quattrini A, Bertani I, De Palma M, Del Carro U, Brambilla R, Marchesini S, Bordignon C, Naldini L (2004)

Ex vivo gene therapy provides a unique therapeutic benefit and corrects metachromatic (MLD) and globoid (GLD) leukodystrophy in the mouse models  
*Molecular Therapy* 9(Suppl. 1): 17 - 18

Black DN, Taber KH, Hurley RA (2008)

Metachromatic leukodystrophy a model for the study of psychosis  
In: Hurley RA & Taber KH. *Windows to the brain*. Amer Psychiatric Pub Inc.

Bligh EG, Dyer WJ (1959)

A rapid method of total lipid extraction and purification  
*Can J Biochem Physiol* 37(8): 911 - 917

Brady RO (2006)

Enzyme replacement for lysosomal diseases  
*Annu Rev Med* 57: 283 - 296

Bredius RG, Laan LA, Lankester AC, Poorthuis BJ, van Tol MJ, Egeler RM, Arts WF (2007)

Early marrow transplantation in a pre-symptomatic neonate with late infantile metachromatic leukodystrophy does not halt disease progression  
*Bone Marrow Transplant* 39(5): 309 - 310

- Cairo MS & Wagner JE (1997)  
Review article - placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation  
*Blood* 90(12): 4665 - 4678
- Cartier N, Sevin C, Benraiss A, DeDeyn P, Bonnin D, Vanier MT, Philippe M, Gieselmann V, Aubourg P (2005)  
AAV5-mediated delivery of human aryl sulfatase a (hARSA) prevents sulfatide storage and neuropathological phenotype in metachromatic leukodystrophy (MLD) mice  
*Molecular Therapy* 11(Suppl. 1): 166 - 167
- Chang PL, Rosa NE, Davidson RG (1981)  
Differential assay of arylsulfatase A and B activities: A sensitive method for cultured human cells  
*Anal biochem* 117(2): 382 - 389
- Charrow J (2009)  
Enzyme replacement therapy for Gaucher disease  
*Expert Opin Biol Ther* 9(1): 121 - 131
- Cheon JE, Kim IO, Hwang YS, Kim J, Wang KC, Cho BK, Chi G, Kim CJ, Kim WS, Yeon KM (2002)  
Leukodystrophy in children: a pictorial review of MR imaging features  
*Radiographics* 22(3): 461 - 476
- Danková M, Strašák S, Molnárová M, Kaniánský D, Marák J (2001)  
Capillary zone electrophoresis of orotic acid in urine with on-line isotachopheresis sample pretreatment and diode array detection  
*J Chromatogr A* 916(1-2): 143 - 153
- Del Carro U, Biffi A, Baldoli C, Gerevini S, Amadio S, Fumagalli F, Roncarolo MG, Sessa M (2004)  
Clinical history and new prognostic indicators in metachromatic leukodystrophy  
*J Peripher Nerv Syst* 9(2): 112 - 113
- Dierks T, Schmidt B, Borissenko LV, Peng J, Preusser A, Mariappan M, von Figura K (2003)  
Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C<sub>α</sub>-formylglycine generating enzyme  
*Cell* 113(4): 435 - 444
- Eckhardt M (2008)  
The role and metabolism of sulfatide in the nervous system  
*Mol Neurobiol* 37(2-3): 93 - 103
- Farooqui AA & Mandel P (1977)  
Recent developments in the biochemistry of globoid and metachromatic leucodystrophies  
*Biomedicine* 26(4): 232 - 236



- Farrell DF & McKhann GM (1971)  
Characterization of cerebroside sulfotransferase from rat brain  
J Biol Chem 246(15): 4694 - 4702
- Fogh J, Andersson C, Weigelt C, Moller C, Hyden P - Zymenex A/S Hillerod (DK) (2008)  
Production and purification of recombinant arylsulfatase  
United States patent application publication No.: US 2008/0003211 A1
- Fressinaud C, Vallat JM, Masson M, Jauberteau MO, Baumann N, Hugon J (1992)  
Adult-onset metachromatic leukodystrophy presenting as isolated peripheral neuropathy  
Neurology 42(7): 1396 - 1398
- Futerman AH & van Meer G (2004)  
The cell biology of lysosomal storage disorders  
Nat Rev Mol Cell Biol 5(7): 554 - 565
- Galotto M, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, Dufour C, Battista Ferrara G, Abbondandolo A, Dini G, Bacigalupo A, Cancedda R, Quarto R (1999)  
Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients  
Exp Hematol 27(9): 1460 - 1466
- Georgeson GD, Szöny BJ, Streitmann K, Sallay E, Kovács A, Kovács L, László A (2002)  
Arylsulfatase-A in umbilical cord blood: gestational age and mode of delivery do not influence enzyme activity  
Bone Marrow Transplant 29(6): 487 - 490
- Gieselmann V (2007)  
Metachromatic leukodystrophy  
In: Barranger JA & Cabrera-Salazar MA. Lysosomal Storage Disorders. Springer US
- Gieselmann V (2003)  
Metachromatic leukodystrophy: recent research developments  
J Child Neurol 18(9): 591 - 594
- Gieselmann V (1995)  
Review lysosomal storage diseases  
Biochim Biophys Acta 1270: 103 -136
- Gieselmann V, Zlotogora J, Harris A, Wenger DA, Morris CP (1994)  
Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy  
Hum Mutat 4: 233 - 242

- Gieselmann V, Polten A, Kreysing J, von Figura K (1989)  
Arylsulfatase A pseudodeficiency: Loss of a polyadenylation signal and N-glycosylation site  
Proc Natl Acad Sci USA 86(23): 9436 - 9440
- Görg M, Wilck W, Granitzny B, Suerken A, Lukacs Z, Ding X, Schulte-Markwort M, Kohlschütter A (2007)  
Stabilization of juvenile metachromatic leukodystrophy after bone marrow transplantation: a 13-year follow-up  
J Child Neurol 22(9): 1139 - 1142
- Gross JH, (1999)  
Massenspektrometrie. Skript zum Kurs 'Spektroskopische Methoden in der Anorganischen und Organischen Chemie', 4. Aufl., MS-Abt. am OCI, INF 270, Heidelberg
- Guffon N, Souillet G, Maire I, Dorche C, Mathieu M, Guibaud P (1995)  
Juvenile metachromatic leukodystrophy: neurological outcome two years after bone marrow transplantation  
J Inher Metab Dis 18(2): 159 - 161
- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP et al. (2003)  
LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1  
Science 302(5644): 415 - 419
- Hageman AT, Gabreëls FJ, de Jong JG, Gabreëls-Festen AA, van den Berg CJ, van Oost BA, Wevers RA (1995)  
Clinical symptoms of adult metachromatic leukodystrophy and Arylsulfatase A pseudodeficiency  
Arch Neurol 52(4): 408 - 413
- Haltia T, Palo J, Haltia M, Icén A (1980)  
Juvenile metachromatic leukodystrophy. Clinical, biochemical, and neuropathologic studies in nine new cases  
Arch Neurol 37(1): 42 - 46
- Hanson SR, Best MD, Wong CH (2004)  
Sulfatasen: Struktur, Mechanismus, biologische Aktivität, Inhibition, Anwendung in Synthesen  
Angew Chem 116(43): 5858 - 5886
- Harzer K & Recke AS (1975)  
Sulfatide excreting heterozygous carrier of juvenile metachromatic leukodystrophy or asymptomatic patient of adult metachromatic leukodystrophy  
Humangenetik 29(4): 299 - 307
- Hins J (2003)  
Methodenentwicklung in der Isotachophorese und Kapillarzonenelektrophorese  
J&M GmbH Aalen

- Hoffmann GF (2009)  
Stoffwechselerkrankungen 6: 87 - 122  
In: Speer PC & Gahr M. Pädiatrie 3. Auflage. Springer
- Holtschmidt H, Sandhoff K, Kwon HY, Harzer K, Nakano T, Suzuki K (1991)  
Sulfatide activator protein. Alternative splicing that generates three mRNAs and a newly found mutation responsible for a clinical disease  
J Biol Chem 266(12): 7556 - 7560
- Kampine JP, Martensson E, Yankee RA, Kanfer JN (1968)  
Sphingolipid metabolism in leucocytes. I. Incorporation of  $^{14}\text{C}$ -glucose and  $^{14}\text{C}$ -galactose into glycosphingolipids by intact human leucocytes  
Lipids 3(2): 151 - 156
- Kapaun P, Dittmann RW, Granitzny B, Eickhoff W, Wulbrand H, Neumaier-Probst E, Zander A, Kohlschütter A (1999)  
Slow progression of juvenile metachromatic leukodystrophy 6 years after bone marrow transplantation  
J Child Neurol 14(4): 222 - 228
- Keating A (2006)  
Mesenchymal stromal cells  
Curr Opin Hematol 13(6): 419 - 425
- Kennedy DW & Abkowitz JL (1997)  
Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model  
Blood 90(3): 986 - 993
- Kim TS, Kim IO, Kim WS, Choi YS, Lee JY, Kim OW, Yeon KM, Kim KJ, Hwang YS (1997)  
MR of childhood metachromatic leukodystrophy  
AJNR Am J Neuroradiol 18(4): 733 - 738
- Koç ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W (2002)  
Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH)  
Bone Marrow Transplant 30(4): 215 - 222
- Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P (2004)  
A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential  
J Exp Med 200(2): 123 - 135

- Kolodny EH & Fluharty AL (1995)  
Metachromatic leukodystrophy and multiple sulfatase deficiency: sulfatide lipidosi  
In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of  
inherited disease – Volume II. 7<sup>th</sup> edition. McGraw-Hill, Inc.
- Kornfeld S (1992)  
Structure and function of the mannose 6-phosphate / insulin-like growth factor II re-  
ceptors  
Annu Rev Biochem 61: 307 - 330
- Krivit W (2004)  
Allogeneic stem cell transplantation for the treatment of lysosomal and peroxisomal  
metabolic diseases  
Springer Semin Immunopathol 26(1-2): 119 - 132
- Krivit W, Aubourg P, Shapiro E, Peters C (1999)  
Bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy, adrenoleukodystrophy,  
metachromatic leukodystrophy, and Hurler syndrome  
Curr Opin Hematol 6: 377 - 382
- Kuchař L, Ledvinová J, Hřebíček M, Myšková H, Dvořáková L, Berná L, Chrástina P,  
Asfaw B, Elleder M, Petermüller M, Mayrhofer H, Staudt M, Krägeloh-Mann I, Paton  
BC, Harzer K (2009)  
Prosaposin deficiency and saposin B deficiency (activator-deficient metachromatic  
leukodystrophy): report on two patients detected by analysis of urinary sphingolipids  
and carrying novel PSAP gene mutations  
Am J Med Genet A 149A(4): 613 - 621
- Kumperscak HG, Paschke E, Gradisnik P, Vidmar J, Bradac SU (2005)  
Adult metachromatic leukodystrophy: disorganized schizophrenia-like symptoms and  
postpartum depression in 2 sisters  
J Psychiatry Neurosci 30(1): 33 - 36
- Kurlemann G, Palm DG (1991)  
Vigabatrin in metachromatic leucodystrophy; positive influence on spasticity  
Dev Med Child Neurol 33(2): 182
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S (1992)  
Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain  
Neuroscience 48(2): 405 - 415
- MacFaul R, Cavanagh N, Lake BD, Stephens R, Whitfield AE (1982)  
Metachromatic leucodystrophy: review of 38 cases.  
Arch Dis Child 57(3): 168 - 175

Malm G, Ringdén O, Winiarski J, Gröndahl E, Uyebrant P, Eriksson U, Håkansson H, Skjeldal O, Månsson JE (1996)

Clinical outcome in four children with metachromatic leukodystrophy treated by bone marrow transplantation

Bone Marrow Transplant 17(6): 1003 - 1008

Marcão AM, Wiest R, Schindler K, Wiesmann U, Weis J, Schroth G, Miranda MC, Sturzenegger M, Gieselmann V (2005)

Adult onset metachromatic leukodystrophy without electroclinical peripheral nervous system involvement: a new mutation in the ARSA gene

Arch Neurol 62(2): 309 - 313

Matzner U, Matthes F, Weigelt C, Andersson C, Eistrup C, Fogh J, Gieselmann V (2008)

Non-inhibitory antibodies impede lysosomal storage reduction during enzyme replacement therapy of a lysosomal storage disease

J Mol Med 86: 433 - 442

Matzner U, Herbst E, Hedayati KK, Lüllmann-Rauch R, Wessig C, Schröder S, Eistrup C, Möller C, Fogh J, Gieselmann V (2005)

Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy

Hum Mol Genet 14(9): 1139 - 1152

Matzner U, Gieselmann V (2005)

Gene therapy of metachromatic leukodystrophy

Expert Opin Biol Ther 5(1): 55 - 65

Matzner U, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, Coenen R, Rothert F, Månsson JE, Fredman P, D'Hooge R, De Deyn PP, Gieselmann V (2002)

Bone marrow stem cell-based gene transfer in a mouse model for metachromatic leukodystrophy: effects on visceral and nervous system disease manifestations

Gene Ther 9(1): 53 - 63

McBride C, Gaupp D, Phinney DG (2003)

Quantifying levels of transplanted murine and human mesenchymal stem cells in vivo by real-time PCR

Cytotherapy 5(1): 7 - 18

Meikle PJ, Grasby DJ, Dean CJ, Lang DL, Bockmann M, Whittle AM, Fietz MJ, Simonsen H, Fuller M, Brooks DA, Hopwood JJ (2006)

Newborn screening for lysosomal storage disorders

Mol Genet Metab 88(4): 307 - 314

Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999)

Prevalence of lysosomal storage disorders

JAMA 281(3): 249 - 254

- Meissner T (1998)  
Isotachophorese/Zonenelektrophorese Kompendium  
J&M GmbH Aalen
- Montandon AJ, Green PM, Giannelli F, Bentley DR (1989)  
Direct detection of point mutations by mismatch analysis: application to haemophilia B  
Nucleic Acids Res 17(9): 3347 - 3358
- Müller I, Kustermann-Kuhn B, Holzwarth C, Isensee G, Vaegler M, Harzer K, Krägeloh-Mann I, Handgretinger R, Bruchelt G (2006)  
In vitro analysis of multipotent mesenchymal stromal cells as potential cellular therapeutics in neurometabolic diseases in pediatric patients  
Exp Hematol 34(10): 1413 - 1419
- Nandhagopal R & Krishnamoorthy SG (2006)  
Neurological picture. Tigroid and leopard skin pattern of dysmyelination in metachromatic leucodystrophy  
J Neurol Neurosurg Psychiatry 77(3): 344
- Nishio H, Kodama S, Matuso T (1985)  
Analysis of fatty acids and sphingosines from urinary sulfatides in a patient with metachromatic leukodystrophy by gas chromatography-mass spectrometry  
Brain Dev 7(6): 614 - 621
- Opherk K, Kehrer C, Grodd W, Müller I, Handgretinger R, Krägeloh-Mann I  
Improvement of symptomatic MLD after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation  
- Veröffentlichung in Vorbereitung -
- Philippart M (1996)  
Metachromatic leukodystrophies  
In: Handbook of Clinical Neurology 22(66): Neurodystrophies and Neurolipidosis.  
Moser HW, ed. Elsevier Science B.V.
- Philippart M, Sarlieve L, Meurant C, Mechler L (1971)  
Human urinary sulfatides in patients with sulfatidosis (metachromatic leukodystrophy)  
J Lipid Res 12(4): 434 - 441
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999)  
Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells  
Science 284(5411): 143 - 147
- Polten A, Fluharty AL, Fluharty CB, Kappler J, von Figura K, Gieselmann V (1991)  
Molecular basis of different forms of metachromatic leukodystrophy  
N Engl J Med 324(1): 18 - 22

- Poorthuis BJ, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JE, de Jong JG, Van Weely S, Niezen-Koning KE, van Diggelen OP (1999)  
The frequency of lysosomal storage diseases in the Netherlands  
*Hum Genet* 105(1-2): 151 - 156
- Porter MT, Fluharty AL, Kihara H (1969)  
Metachromatic leukodystrophy: arylsulfatase-A deficiency in skin fibroblast cultures  
*Proc Natl Acad Sci USA* 62(3): 887 - 891
- Prasad VK & Kurtzberg J (2008)  
Emerging trends in transplantation of inherited metabolic diseases  
*Bone Marrow Transplantat* 41(2): 99 - 108
- Prasad VK, Mendizabal A, Parikh SH, Szabolcs P, Driscoll TA, Page K, Lakshminarayanan S, Allison J, Wood S, Semmel D, Escolar ML, Martin PL, Carter S, Kurtzberg J (2008)  
Unrelated donor umbilical cord blood transplantation for inherited metabolic disorders in 159 pediatric patients from a single center: influence of cellular composition of the graft on transplantation outcomes  
*Blood* 112(7): 2979 - 2989
- Rafi MA, Zhi Rao H, Passini MA, Curtis M, Vanier MT, Zaka M, Luzi P, Wolfe JH, Wenger DA (2005)  
AAV-mediated expression of galactocerebrosidase in brain results in attenuated symptoms and extended life span in murine models of globoid cell leukodystrophy  
*Mol Ther* 11(5): 734 - 744
- Raghavan SS, Gajewski A, Kolodny EH (1981)  
Leucocyte sulfatidase for the reliable diagnosis of metachromatic leukodystrophy  
*J Neurochem* 36(2): 724 - 731
- Schlote W, Harzer K, Christomanou H, Paton BC, Kustermann-Kuhn B, Schmid B, Seeger J, Beudt U, Schuster I, Langenbeck U (1991)  
Sphingolipid activator protein 1 deficiency in metachromatic leucodystrophy with normal arylsulphatase A activity. A clinical, morphological, biochemical, and immunological study  
*Eur J Pediatr* 150(8): 584 - 591
- Schmidt K, Hagmaier V, Bruchelt G, Rutishauser G (1980)  
Analytical isotachopheresis: a rapid and sensitive method for determination of urinary oxalate  
*Urol Res* 8(3): 177 - 180
- Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF (2000)  
Protein transduction: unrestricted delivery in all cells?  
*Trends Cell Biol* 10(7): 290 - 295

- Scott IU, Green WR, Goyal AK, de la Cruz Z, Naidu S, Moser H (1993)  
New sites of ocular involvement in late-infantile metachromatic leukodystrophy revealed by histopathologic studies  
Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 231(3): 187 - 191
- Sevin C, Aubourg P, Cartier N (2007)  
Enzyme, cell and gene-based therapies for metachromatic leukodystrophy  
J Inherit Metab Dis 30(2): 175 - 183
- Sevin C, Benraiss A, Van Dam D, Bonnin D, Nagels G, Verot L, Laurendeau I, Vidaud M, Gieselmann V, Vanier M, De Deyn PP, Aubourg P, Cartier N (2006)  
Intracerebral adeno-associated virus-mediated gene transfer in rapidly progressive forms of metachromatic leukodystrophy  
Hum Mol Genet 15(1): 53 - 64
- Shapiro EG, Lockman LA, Balthazor M, Krivit W (1995)  
Neuropsychological outcomes of several storage diseases with and without bone marrow transplantation  
J Inherit Metab Dis 18(4): 413 - 429
- Sommerlade HJ, Hille-Rehfeld A, von Figura K, Gieselmann V (1994-a)  
Four monoclonal antibodies inhibit the recognition of Arylsulfatase A by the lysosomal enzyme phosphotransferase  
Biochem J 297(Pt 1): 123 - 130
- Sommerlade HJ, Selmer T, Ingendoh A, Gieselmann V, von Figura K, Neifer K, Schmidt B (1994-b)  
Glycosylation and phosphorylation of arylsulfatase A  
J Biol Chem 269(33): 20977 - 20981
- Steck AJ, Hartung HP, Kieseier BC (2003)  
Leukodystrophien  
In: Demyelinisierende Erkrankungen. Neuroimmunologie und Klinik. Steinkopff
- Strobel SGC (2005)  
Bestimmung von sphingolipidabbauenden Enzymen in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zur Optimierung der Labordiagnostik bei Sphingolipid-Speichererkrankungen  
Inaugural-Dissertation. Medizinische Fakultät Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Tenenbaum L, Chtarto A, Lehtonen E, Velu T, Brotchi J, Levivier M (2004)  
Recombinant AAV-mediated gene delivery to the central nervous system  
J Gene Med 6 (Suppl. 1): S212 - S222
- Vellodi A (2005)  
Lysosomal storage disorders  
Br J Haematol 128(4): 413 - 431



Voet D & Voet JG (1995)

Phospholipid and glycolipid metabolism

In: Biochemistry. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley & Sons, Inc.

von Figura K, Schmidt B, Selmer T, Dierks T (1998)

A novel protein modification generating an aldehyde group in sulfatases: its role in catalysis and disease

Bioessays 20(6): 505 - 510

von Hirsch T & Pfeiffer J (1955)

Über histologische Methoden in der Differentialdiagnose von Leukodystrophien und Lipidosen

Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 194(1): 88 - 104

Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, Shu XO, Davies SM, Ramsay NK, McGlave PB, Sender L, Cairo MS (1996)

Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease

Blood 88(3): 795 - 802

Waheed A, Steckel F, Hasilik A, von Figura K (1983)

Two allelic forms of human arylsulfatase A with different numbers of asparagine-linked oligosaccharides

Am J Hum Genet 35(2): 228 - 233

Warner JO (1975)

Juvenile onset metachromatic leucodystrophy. Failure of response on a low vitamin A diet

Arch Dis Child 50(9): 735 - 737

Whitfield PD, Sharp PC, Johnson DW, Nelson P, Meikle PJ (2001)

Characterization of urinary sulfatides in metachromatic leukodystrophy using electrospray ionisation-tandem mass spectrometry

Mol Genet Metab 73(1): 30 - 37



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als Doktorandin in der Abteilung für Neuropädiatrie, Entwicklungsneurologie und Sozialpädiatrie des Universitätsklinikums für Kinder- und Jugendmedizin in Tübingen. Die der Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen wurden im Rahmen eines durch die Firma Zymanex geförderten Forschungsvorhabens durchgeführt.

Der Ärztlichen Direktorin der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Frau Prof. Dr. Krägeloh-Mann danke ich für die großzügige Förderung der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gernot Bruchelt für die tolle Rundum-Betreuung, die wichtigen Diskussionen, all die wertvollen Anregungen und Gespräche, die Offenheit für jedwede Anliegen und Fragen, natürlich die Durchsicht der Arbeit, sowie die mir stets entgegengebrachte Unterstützung.

Herrn PD Dr. Dr. Bernhard danke ich für das Interesse an meiner Arbeit, den Einblick in sein Labor und die Übernahme des Mitberichts.

Frau Dr. Christiane Kehrer möchte ich für die Einsicht der Videodokumentationen und Patientenakten danken, durch die ich einen guten Einblick in das Krankheitsbild gewinnen konnte.

Nicht zuletzt danke ich den Mitarbeiterinnen des Metabolischen Labors, Birgit Kustermann und Claudia Backes, für die anregenden Diskussionen, die Einweisung in die Durchführung der Laboruntersuchungen und die Probenbereitstellung und Sandra Pajarola für die gute Zusammenarbeit.

Außerdem möchte ich meinen Eltern, Julia Klein, Dominikus Krüger, Jörg Wittich, und Achim Stößl für die Korrekturen der Dissertationsschrift und die Hilfe mit Software und Layout, sowie Rat und Tat bei der Fertigstellung der Arbeit danken.



## Lebenslauf

**Name:** Christine Weißenberg

Geburtsdatum: 17. Januar 1984

Geburtsort: Stuttgart – Bad Cannstatt

**Schulische Bildung:** Friedrich-Silcher-Grundschule Malsheim  
1990 – 1994  
Gymnasium Renningen  
1994 – 2003  
Allgemeine Hochschulreife: 24. Juni 2003

**Studium:** Humanmedizin  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
2003 – 2010  
Ärztliche Prüfung: 11. Juni 2010