

***Untersuchungen zur Prozessierung, Qualitätskontrolle und  
Assoziation  
von unterschiedlichen humanen Arylsulfatase A Proteinen  
innerhalb des endoplasmatischen Reticulums, sowie deren  
Degradation im Falle von Missfaltungen***

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

*vorgelegt von  
Peter Poeppel  
aus  
Düsseldorf*

*Bonn 2006*

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

1. Referent: Prof. Dr. V. Gieselmann

2. Referent: Prof. Dr. J. Höhfeld

Tag der Promotion: 28.06.2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

*meiner Michi*

**I     Inhaltsverzeichnis**

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungen	V
III	Abbildungen	VIII
IV	Tabellen	IX
1.	Einleitung	1
1.1	Proteinbiosynthese lysosomaler Enzyme	1
1.1.1	Prozessierung der Oligosaccharid-Seitenketten im ER	2
1.1.2	Prozessierung der Oligosaccharid-Seitenketten im Golgi-Komplex	7
1.1.3	Sortierung der lysosomalen Hydrolasen	8
1.2	Arylsulfatase A	9
1.3	Metachromatische Leukodystrophie	12
2.	Zielsetzung	14
3.	Material	15
3.1	Chemikalien	15
3.2	Antikörper	15
3.3	Oligonukleotide	16
3.4	Bakterien	16
3.5	Vektor	16
3.6	Eukaryontische Zelllinien	17
3.7	Kits	17
3.8	Lösungen und Puffer	17
3.8.1	Allgemeine Lösungen und Puffer	18
3.8.2	Lösungen und Puffer für die DNA-Präparation und Agarose-Gelelektrophorese	18
3.8.3	Lösungen und Puffer für die Immunpräzipitation	19
3.8.4	Lösungen und Puffer für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	19
3.8.5	Lösungen für die Coomassie® Brillantblau Färbung von Polyacrylamid Gelen	20
3.8.6	Lösungen und Puffer für die Westernblot Analyse	20
3.8.7	Puffer für die Aktivitätsmessung der ASA	21
3.9	Medien und Lösungen für die Kultivierung von eukaryontischen Zellen	21
3.10	Medien und Lösungen für die Kultivierung von Bakterien	21
3.11	Verbrauchsmaterialien	22
3.12	Geräte	22

4.	Methoden	24
4.1	Aktivitätsbestimmung der Arylsulfatase A	24
4.2	SDS-PAGE	24
4.3	Färben von SDS Polyacrylamid Gelen mit Coomassie® Brillantblau	25
4.4	Westernblot	26
4.5	Erzeugung der HA-Epitop markierten hASA-cDNA	26
4.6	Transformation von Bakterien und Präparation von Plasmid-DNA	28
4.7	Kultivieren von eukaryontischen Zellen	28
4.7.1	Auftauen und Einfrieren von Zellen	28
4.8	Gewinnung von monoklonalen Antikörpern und deren Biotin-Markierung	29
4.8.1	Konditionieren von Medium mit J774-Zellen	29
4.8.2	Kultivierung der Hybridomazellen	29
4.8.3	Aufreinigung monoklonaler Antikörper	29
4.8.4	Biotin-Markierung monoklonaler Antikörper	30
4.9	Erzeugung von stabil exprimierenden LTK <sup>-</sup> -Zellen	30
4.9.1	Transfektion und Selektion der LTK <sup>-</sup> -Zellen	30
4.9.2	Probenvorbereitung für die Expressionsuntersuchung mit Westernblot Analyse	31
4.10	Erzeugung transient exprimierender BHK21 Zellen	31
4.11	Radioaktive Markierung, Immunpräzipitation und Detektion der markierten hASA-Proteine	31
4.11.1	Radioaktive Markierung von Proteinen („pulse-chase“-Versuch)	31
4.11.1.1	Bestimmung der Einbauraten	32
4.11.2	Immunpräzipitation radioaktiv markierter Proteine	32
4.11.2.1	Vorbehandlung von Pansorbin A	33
4.11.3	Detektion der radioaktiv markierten Proteine	33
4.12	Immunpräzipitation nicht radioaktiv markierter Proteine	34
5.	Ergebnisse	35
5.1	Untersuchungen zur Prozessierung und Degradation der aminosäuresubstituierten hASA-Proteine Asp335Val, Gly86Asp, Pro377Leu, Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu	35
5.1.1	Untersuchungen zur Prozessierung der Oligosaccharid-Seitenketten im ER und deren Einfluss auf die Degradation der aminosäuresubstituierten hASA-Proteine	35

5.1.1.1 Einfluss der Glykosidaseinhibitoren Deoxynojirimycin und Kifunensin auf die Degradation der hASA-Proteine Asp335Val, Gly86Asp, Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His, Pro136Leu und Pro 377 Leu	36
5.1.1.2 Einfluss des Mannosidaseinhibitors Deoxymannojirimycin auf die Degradation der hASA-Proteine Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His, Pro136Leu und Pro377Leu	38
5.1.1.3 Untersuchungen mit den kombinierten Glykosidaseinhibitoren DMM/DNM DMM/Kif und DNM/Kif	39
5.1.1.4 Untersuchung der aus der ER $\alpha$ 1,2-Mannosidase I Inhibition resultierenden Folgen für die aminosäuresubstituierten hASA-Proteine	40
5.1.2 Untersuchungen zum Degradationsweg der hASA-Proteine Asp335Val, Gly86Asp, Pro377Leu, Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu	42
5.2 Untersuchung der Interaktionen von wtASA mit den aminosäuresubstituierten hASA-Proteinen im ER	44
5.2.1 Generierung der HA markierten wtASA (wtASA-HA)	44
5.2.1.1 Überprüfung der enzymatischen Aktivität der wtASA-HA	45
5.2.1.2 Untersuchungen der Expression und Sekretion der wtASA-HA	45
5.2.2 Immunpräzipitation von wtASA-HA aus Zellen, die HA markierte und unmarkierte hASA exprimieren	48
5.2.3 Analyse des Assoziationsgrades von wtASA-HA mit Pro377Leu und wtASA-HA mit PD-ASA	50
5.2.4 Bestimmung des Zeitpunktes der Assoziation	53
5.2.5 Untersuchungen der physiologischen Folgen einer Assoziation von wtASA mit aminosäuresubstituierten hASA-Proteinen	54
5.2.5.1 Messung der Sulfataseaktivität bei der Coexpression von wtASA und aminosäuresubstituierten hASA-Proteinen	54
5.2.5.2 Untersuchung der Degradation und Sekretion von hASA an Zellen, die wtASA oder Pro377Leu exprimieren oder wtASA und Pro377Leu coexprimieren	56
5.2.5.3 Versuch mit einer Überexpression von wtASA die Sekretion von Pro377Leu zu initiieren	58
5.2.6 Mögliche Ursachen der reduzierten Sulfataseaktivität und verstärkten wtASA Degradation bei einer Coexpression mit aminosäuresubstituierter hASA	60
5.2.6.1 Vergleich der spezifischen Sulfataseaktivität von wtASA-HA exprimierenden und wtASA-HA und Pro377Leu coexprimierenden Zellen	60

5.2.6.2 Untersuchung der Epitopbildung an wtASA und Thr274Met exprimierenden Zellen mit dem mAK A2	61
5.2.7 Untersuchungen zum Degradationsweg der mit aminosäuresubstituierter hASA assoziierten wtASA	63
6. Diskussion	65
6.1 Prozessierung der Oligosaccharid-Seitenketten und Qualitätskontrolle im ER	65
6.1.1 Therapeutischer Ansatz in der ER Qualitätskontrolle	73
6.2 Degradation der aminosäuresubstituierten hASA-Proteine	74
6.3 Assoziation der hASA-Proteine im ER	75
6.4 Schicksal der hASA-Proteine, welche in einem heterogenen Oligomer miteinander assoziiert sind	79
7. Zusammenfassung	84
8. Literatur	86
Erklärung	95
Veröffentlichungen	96
Danksagungen	97

## II Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxydisulfat
$\alpha$ 1-AT	$\alpha$ 1-Antitrypsin
$\alpha$ 1-AT Z	$\alpha$ 1-Antitrypsin Z
BHK21	Baby Hamster Nierenzellen 21
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cst	Castanospermin
DMM	Deoxymannojirimycin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNM	Deoxynojirimycin
EDEM	ER degradation-enhancing $\alpha$ -mannosidase-like protein
Endo H	Endoglykosidase H
ER	endoplasmatisches Reticulum
ERAD	endoplasmatic reticulum associated degradation
FGE	$C_{\alpha}$ -Formylglycin-Generierendes Enzym
FKS	fötales Kälberserum
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GT	UDP-Glucose:Glykoprotein Glucosetransferase
h	Stunde
hASA	humane Arylsulfatase A
Ig	Immunglobulin
kDa	kilo-Dalton
Kif	Kifunensin
Lc	Lactacystin
Lp	Leupeptin
Lsg.	Lösung
M6P	Mannose-6-Phosphat
mAK	monoklonalen Antikörper
Man	Mannose
max.	maximal
min	Minute

MLD	metachromatische Leukodystrophie
MPR	Mannose-6-Phosphat Rezeptor
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
OA	Ocadaic Acid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektophorese
PAO	Phenylarsinoxid
Pen	Penicillin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PD	Pseudodefizienz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOV	Natrium Orthovanadat
SRP	signal recognition particle
Strep	Streptomycin
TCA	Trichloressigsäure
wtASA	Wildtyp-Arylsulfatase A
wtASA-HA	HA Epitop markierte humane Wildtyp-Arylsulfatase A

**Aminosäuren-Code:**

A	Ala	Alanin
R	Arg	Arginin
N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure
C	Cys	Cystein
E	Glu	Glutaminsäure
Q	Gln	Glutamin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
L	Leu	Leucin
K	Lys	Lysin
M	Met	Methionin
F	Phe	Phenylalanin
P	Pro	Prolin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
V	Val	Valin

### III Abbildungen

Abbildung 1: Struktur des bei der Glykosylierung übertragenen Oligosaccharids	3
Abbildung 2: Prozessierung von N-Glykanen richtig gefalteter Proteine im ER	4
Abbildung 3: Prozessierung von N-Glykanen fehlgefalteter Proteine im ER	5
Abbildung 4: Beispiele einer Mannose-reichen und komplexen Oligosaccharid-Seitenkette	8
Abbildung 5: Substrate der ASA	11
Abbildung 6: Vektorkarte des pBEH Expressionsvektors	16
Abbildung 7: Einfluss der Glykosidaseinhibitoren DNM und Kif auf die Stabilität der aminosäuresubstituierten hASA-Moleküle	37
Abbildung 8: Inhibition der ER $\alpha$ 1,2-Mannosidase II mit DMM	38
Abbildung 9: Untersuchungen mit den Glykosidaseinhibitor-Kombinationen DMM/DNM, DMM/Kif und DNM/Kif	39
Abbildung 10: Einfluss von Kif auf die Retention der aminosäuresubstituierten hASA-Proteine im ER	41
Abbildung 11: Einfluss der Protease- und Phosphataseinhibitoren Lc, Lp, OA, PAO und SOV auf die Stabilität der aminosäuresubstituierten hASA-Proteine	43
Abbildung 12: Sulfataseaktivität von mit wtASA und wtASA-HA-cDNA transient transfizierten BHK21 Zellen	45
Abbildung 13: Bestimmung der Bedingungen für die quantitative Immunpräzipitation der wtASA-HA mit dem HA-mAK	46
Abbildung 14: Immunpräzipitation von wtASA-HA, mit dem HA-mAK, aus dem Medium NH <sub>4</sub> Cl behandelter BHK21 Zellen	47
Abbildung 15: Westernblot Analyse von wtASA-HA Präzipitaten mit HA-mAK	48
Abbildung 16: Immunpräzipitation der wtASA-HA nach Cotransfektion mit wtASA-HA-cDNA und der cDNA der hASA-Proteine Asp335Val, Gly86Asp, Pro377Leu, Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu	49
Abbildung 17: Immunpräzipitation der HA markierten hASA-Proteine Asp335Val-HA, Gly86Asp-HA, Thr274Met-HA, Asp255His-HA und Pro136Leu-HA nach einer Cotransfektion mit PD-ASA	50
Abbildung 18: Immunpräzipitation der hASA nach der Transfektion mit unterschiedlichen Plasmidverhältnissen von wtASA-HA zu Pro377Leu oder wtASA-HA zu PD-ASA	52

Abbildung 19: Coimmunpräzipitation zur Bestimmung des Assoziationszeitpunktes von wtASA-HA mit PD-ASA und Pro377Leu	53
Abbildung 20: ASA-Enzymaktivität in Zellen die hASA und aminosäuresubstituierte hASA coexprimieren	55
Abbildung 21: Immunpräzipitation von metabolisch markierter wtASA und Pro377Leu aus Zellen die wtASA, Pro377Leu oder wtASA und Pro377Leu exprimieren	56
Abbildung 22: Graphische Darstellung der aus Abbildung 21 quantifizierten Signale der Gesamtmenge wtASA und Pro377Leu	57
Abbildung 23: Graphische Darstellung der aus Abbildung 21 quantifizierten Signale der ins Medium sezernierten wtASA	58
Abbildung 24: Immunpräzipitation zur Überprüfung einer möglichen Stabilisierung von Pro377Leu durch ein überwiegend aus wtASA-Untereinheiten aufgebautes Heterooligomer	59
Abbildung 25: Auswirkungen der Coexpression von wtASA-HA und Pro377Leu auf die spezifische ASA-Aktivität	61
Abbildung 26: Epitopenuntersuchung an hASA coexprimierenden Zellen	63
Abbildung 27: Degradationsweg der mit Pro377Leu assoziierten wtASA	64
Abbildung 28: Modell zur Prozessierung von N-Glykanen im ER	72

#### ***IV Tabellen***

Tabelle 1: Verwendete primär Antikörper	15
Tabelle 2: Verwendete sekundär Antikörper	15
Tabelle 3: Zusammensetzung der Trengellösung	25
Tabelle 4: Zusammensetzung der Sammelgellösung	25
Tabelle 5: PCR-Bedingungen für HA markierte hASA	27
Tabelle 6: Anzahl der Aminosäuren die zwischen den glykosylierten Asparaginen und den substituierten Aminosäuren liegen	69

## 1. Einleitung

Mit der Entwicklung der Kompartimentierung haben eukaryontische Zellen die Voraussetzung geschaffen, komplexe Stoffwechselvorgänge innerhalb der Zelle koordinieren zu können. Membranumschlossene Kompartimente werden als Zellorganellen bezeichnet. Zu den Organellen gehören unter anderem der Zellkern, das endoplasmatische Reticulum (ER), der Golgi-Apparat, die Endosomen, Lysosomen und die Peroxisomen. Alle Organellen haben - unter anderem durch ihre Ausstattung mit spezifischen Makromolekülen - eine definierte Struktur und Funktion. Um zu gewährleisten, dass alle Organellen mit ihrem charakteristischen Satz von Makromolekülen ausgestattet sind und bleiben, erfordert es vielfältiger Synthese-, Kontroll-, Transport- und Verteilungsmechanismen. Im Folgenden wird die Synthese, Prozessierung, Sortierung und der Transport der löslichen, nicht membranständigen Enzyme des Lysosoms erörtert und anschließend auf die Arylsulfatase A (ASA) im Besonderen eingegangen.

### 1.1 Proteinbiosynthese lysosomaler Enzyme

Die Lysosomen sind ein terminales, degradierendes Kompartiment in eukaryontischen Zellen. Innerhalb der Lysosomen erfolgt der Abbau von zelleigenem sowie von endozytiertem Material. Die Abbauprozesse werden durch saure Hydrolasen katalysiert, deren pH-Optimum in einem Bereich von pH 4,5 – 5 liegt. Da das innere Milieu der Lysosomen einen pH-Wert von 4,5 – 5 aufweist, können die sauren Hydrolasen hier ihre maximale enzymatische Aktivität entfalten. Heute sind mehr als 40 saure Hydrolasen bekannt, zu denen die Lipasen, Glykosidasen, Proteasen, Phospholipasen, Nukleaseen und Sulfatasen gehören. Bis diese Proteine in den Lysosomen ihre enzymatische Aktivität vollständig entfalten können, bedarf es zuvor zahlreicher definierter Synthese- und Prozessierungsschritte.

Lysosomale Proteine werden - ebenso wie sekretorische und ein großer Teil zellulärer Membranproteine - am rauen endoplasmatischen Reticulum synthetisiert. Zu Beginn der Translation wird N-terminal eine Aminosäuresequenz synthetisiert, welche, sobald sie aus dem Ribosom herausgetreten ist, als Signalsequenz von dem „signal recognition particle“ (SRP) erkannt und gebunden wird [1]. Durch assoziative Wechselwirkungen zwischen den SRP mit dem Ribosom wird die Elongation vorübergehend angehalten [2]. Der entstandene SRP-Ribosomenkomplex diffundiert zur Membran des rauen ER und bindet dort an einen membranständigen SRP-Rezeptor [3]. Von diesem wird der SRP-Ribosomenkomplex auf den membranständigen Sec61-Komplex, eine Translokationspore, übertragen, woraufhin der

SRP-Rezeptor sowie das SRP von dem Komplex dissoziieren. Nachdem die bereits synthetisierte Aminosäuresequenz in den Sec61-Komplex eingeschleust worden ist, wird der Arrest der Elongation wieder aufgehoben. Der Proteinimport in das ER erfolgt nun kotranslational, wohingegen ein Proteintransport in den Zellkern oder in das Mitochondrium posttranslational erfolgt. Einige wenige Proteine werden aber auch durch posttranslationalen Proteinimport ins ER transportiert, was anhand des Beispiels der ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase II gezeigt wurde [4]. Das Signalpeptid bleibt, bis es durch eine Signalpeptidase abgeschnitten wird, mit dem Sec61-Kanal assoziiert. In dieser Zeit wird das naszierende Protein in Form einer wachsenden Schleife ins ER transloziert.

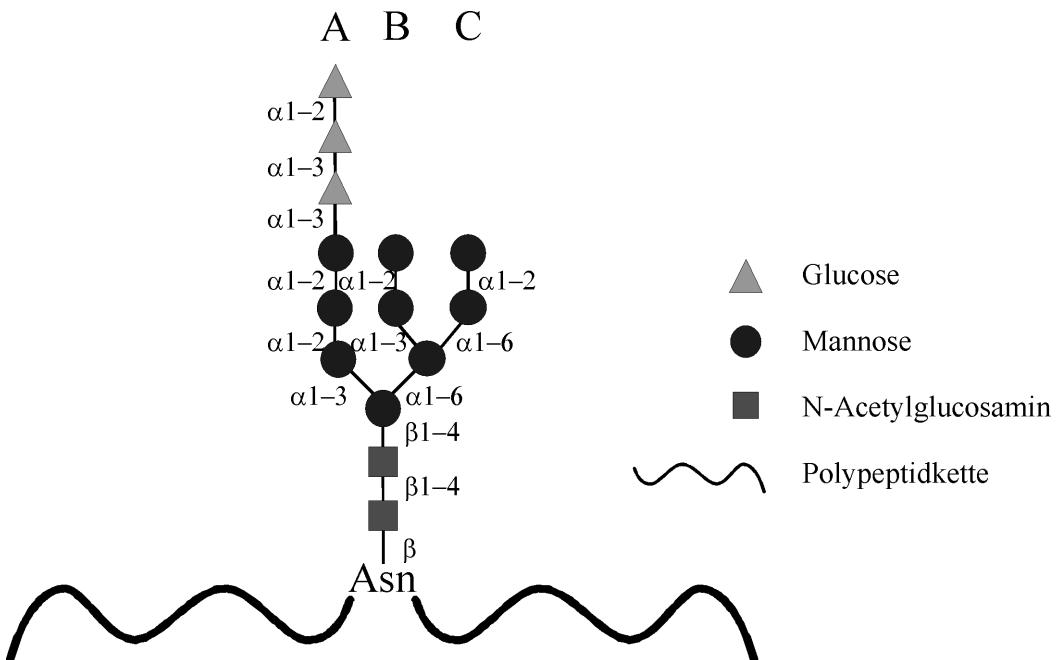
Bis aus einer Polypeptidkette ein funktionsfähiges Protein wird, bedarf es in den meisten Fällen weiterer Modifikationen und Prozessierungsschritte. Die ersten Schritte werden im ER noch parallel zur Translokation durchgeführt. Neben der bereits erwähnten Abtrennung des Signalpeptids durch eine membranständige Signalpeptidase wird z.B. die Ausbildung von Disulfidbrücken durch eine Protein-Disulfidisomerase katalysiert. Diese Quervernetzung innerhalb einer Polypeptidkette hat einen maßgeblichen Einfluss auf die Proteinstruktur und -stabilität. Eine weitere komplexe Modifikation ist die Anlagerung und Prozessierung der Oligosaccharid-Seitenketten. Außer den lysosomalen Proteinen werden sowohl sekretorische als auch membranständige Proteine glykosyliert.

### 1.1.1 Prozessierung der Oligosaccharid-Seitenketten im ER

Asn-X-Thr/Ser (X ist eine bis auf Pro beliebige Aminosäure) ist eine Aminosäuresequenz, die in lysosomalen Enzymen, ebenso wie in allen anderen im ER prozessierten Proteinen, vergleichsweise selten vorkommt. Es handelt sich um die Konsensussequenz zur Glykosylierung von Proteinen [5]. Innerhalb dieser Sequenz wird der Stickstoff des Asn Säureamidrests glykosyliert. Sobald 12–14 Aminosäuren nach dem Asn den Translokationskanal ins ER Lumen verlassen haben [6], wird das Oligosaccharid mit einer definierten Struktur „*en bloc*“ von dem Trägerlipid Dolichol auf den Asn-Rest der noch naszierenden Polypeptidkette übertragen. Katalysiert wird die Glykosylierung durch die membranständige, mit dem Sec61-Komplex assoziierte, Oligosaccharyl-Transferase.

Die Oligosaccharide werden am Dolichol durch die Übertragung von zwei N-Acetylglucosaminen (GlcNAc), neun Mannosen (Man) und drei Glucosen (Glc) ( $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$  s. Abbildung 1) synthetisiert. Alle Zuckermoleküle werden dabei einzeln, beginnend auf der cytosolischen Seite der ER-Membran, endend auf der luminalen Seite der Membran, nacheinander auf das entstehende Oligosaccharid übertragen. Das fertige

Oligosaccharid ist durch eine Pyrophosphatgruppe, mit einem hohen Übertragungspotential, an Dolichol gebunden.



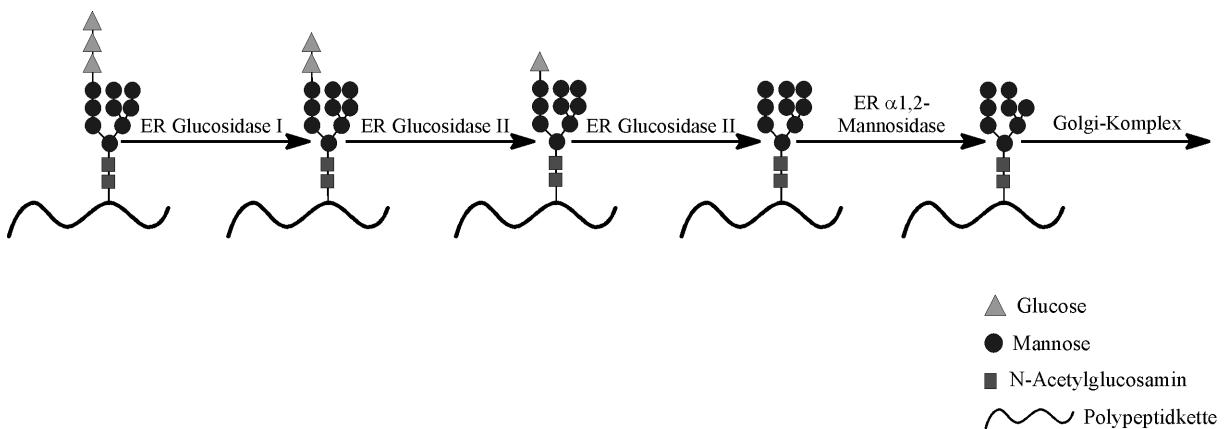
**Abbildung 1: Struktur des bei der Glykosylierung übertragenen Oligosaccharids**

Dargestellt ist die durch die Oligosaccharyl-Transferase auf einen Asparagin (Asn)-Rest übertragene Oligosaccharid-Seitenkette unter Angabe der Bindungsverhältnisse zwischen den einzelnen Zuckern. Über den „Ästen“ des Oligosaccharids sind die Buchstaben (A, B, C) entsprechend der Nomenklatur vermerkt.

Nach der Übertragung der Oligosaccharid-Seitenketten werden diese, im ER beginnend, weiterprozessiert. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass die Prozessierung der Zuckerstrukturen im ER nicht nur zur Ausbildung der Proteinstruktur notwendig ist. In zahlreichen Arbeiten konnte bewiesen werden, dass die Prozessierung eine maßgebliche Rolle bei der Protein-Sortierung, Qualitätskontrolle [7-11], Retention und der ER assoziierten Degradation („endoplasmatic reticulum associated degradation“ (ERAD)) spielt [12-17].

Im ersten Schritt der Prozessierung wird durch die membranständige ER-Glucosidase I, mit der Abtrennung des terminalen Glc-Rests, eine  $\text{Glc}_2\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$  Struktur erzeugt. Anschließend schneidet die im ER-Lumen lokalisierte ER-Glucosidase II die beiden verbliebenen Glucosen nacheinander ab [18]. Für diese beiden Prozessierungsschritte hat die ER-Glucosidase II zwei voneinander getrennte aktive Zentren [19]. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, bezogen auf die komplette Deglykosylierung, ist die Abtrennung der dritten Glucose [20, 21]. Aus dieser Reaktion resultiert eine  $\text{Man}_8\text{-GlcNAc}_2$  Seitenkette. Richtig gefaltete Proteine werden nun durch eine ER Mannosidase I prozessiert. Mit der entstandenen  $\text{Man}_8\text{-GlcNAc}_2$  Struktur können die

Glykoproteine in den Golgi-Apparat transportiert werden. Abbildung 2 zeigt schematisch die Prozessierung der N-Glykane an korrekt gefalteten Proteinen innerhalb des ER [22].



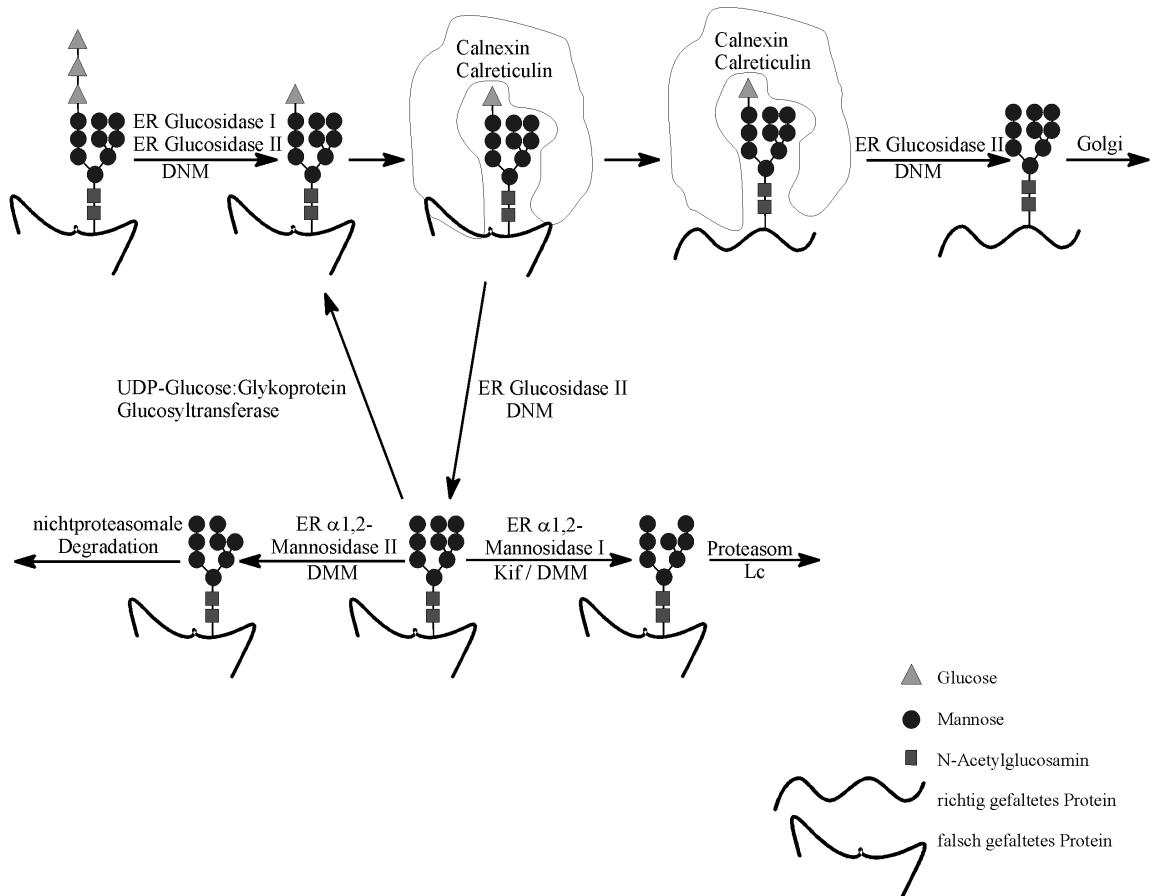
**Abbildung 2: Prozessierung von N-Glykanen richtig gefalteter Proteine im ER**

Die Prozessierung der N-Glykane beginnt mit der Abtrennung der terminalen Glucose durch die ER Glucosidase I. Zwei unterschiedliche aktive Zentren der ER Glucosidase II katalysieren dann die Deglucosylierung der beiden verbliebenen Glucosen. Schließlich wird durch eine Mannosidase das Mannose 8 Strukturisomer C erzeugt, womit die Glykoproteine vom ER in den Golgi-Komplex transportiert werden können (modifiziert nach Spio et al., 2004).

Nach der ersten Deglucosylierung durch die ER-Glucosidase II sind partiell gefaltete oder missgefaltete Proteine potentielle Bindungspartner für zwei lektinartigen Chaperone, das membranständige Calnexin und das luminaire Calreticulin [23-25]. Beide Chaperone haben eine hohe Affinität zu Glc-Man<sub>9</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>, binden aber auch mit geringerer Affinität an Glc-Man<sub>8-5</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> Strukturen und unterstützen aktiv die korrekte Rückfaltung der Proteine. Zur Ablösung von den Chaperonen kommt es durch die von der ER-Glucosidase II initiierte Deglucosylierung der gebundenen Zuckerseitenkette. Diese Deglucosylierung erfolgt letztlich auch bei noch nicht korrekt gefalteten Proteinen.

Partiell gefaltete und missgefaltete Proteine mit einer Man<sub>9</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> Struktur dienen als Substrat für die UDP-Glucose Glykoprotein Glucosyltransferase (GT). Dieses Enzym reglucosyliert Man<sub>9</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> zu Glc-Man<sub>9</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> [26, 27]. Es konnte gezeigt werden, dass die Reglucosylierung bevorzugt in räumlicher Nähe einer Fehlfaltung stattfindet, wobei unklar ist, ob dies ausschließlich in solchen Bereichen erfolgt [28]. Mit der erneut gebildeten Glc-Man<sub>9</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> Struktur besitzen die Proteine wieder das Bindungssignal für die Chaperone Calnexin und Calreticulin, wodurch ein Zyklus entstanden ist, der mehrfach durchlaufen werden kann [7]. Kann die richtige Tertiärstruktur trotz der beschriebenen Hilfestellungen nicht gebildet werden, wird unter Beteiligung der ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase I die

proteasomale Degradation, bzw. unter Beteiligung der ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase II die nicht-proteasomale Degradation eingeleitet [22, 29-32]. In Abbildung 3 sind alle angeführten Prozessierungsschritte schematisch dargestellt.



**Abbildung 3: Prozessierung von N-Glykanen fehlgefalteter Proteine im ER**

Nachdem die ER Glucosidasen I und II eine Glc-Man<sub>9</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> Struktur erzeugt haben, binden die Proteine an die Chaperone Calnexin und Calreticulin. Unabhängig davon, ob die korrekte Konformation gebildet wurde oder nicht, erfolgt die Ablösung der Chaperone durch die ER Glucosidase II. Sind die Proteine weiterhin fehlgefaltet, gibt es drei Möglichkeiten:

- 1) Die ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase I erzeugt das Man<sub>8</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> Strukturisomer B, welches als Signal für die proteasomale Degradation dient.
- 2) Die ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase II erzeugt das Strukturisomer C, welches Signal für die nicht-proteasomale Degradation ist.
- 3) Die UDP-Glucose: Glykoprotein Glucosyltransferase reglucosyliert die N-Glykane und die Proteine verbleiben im Calnexin/Calreticulin Zyklus.

Unter einigen Prozessierungsschritten sind die entsprechenden Inhibitoren vermerkt. Deoxymannojirimycin (DMM), Deoxynojirimycin (DNM), Kifunensin (Kif) und Lactacystin (Lc) (modifiziert nach Spiro et al., 2004).

Strukturuntersuchungen an Oligosacchariden fehlgefalteter Proteine haben gezeigt, dass Man<sub>6-3</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> Strukturen vor der proteasomalen Degradation gebildet werden [33-36]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Man<sub>8</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> Oligosaccharide vor der proteasomalen Proteolyse mehrfach durch mindestens eine Mannosidase prozessiert werden. In diesem Zusammenhang werden 3 Modelle diskutiert.

- 1) *In vitro* Experimente haben gezeigt, dass bei hohen ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase I Konzentrationen mehrere  $\alpha$ 1,2-Mannosen abgespalten werden können [37]. Daher wird eine weitergehende Prozessierung durch die ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase I angenommen.
- 2) Eine noch nicht identifizierte ER Mannosidase ist für diese Prozessierung verantwortlich [33].
- 3) Missgefaltete Proteine mit einer Man<sub>8</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> Isomer B Struktur werden in den Golgi-Komplex transportiert und nach der Abspaltung von 3 - 4 Mannosen durch Golgi-Mannosidasen wieder ins ER zurückgebracht, um dann zur Degradation retrotransloziert zu werden [22, 38].

Von den mit ERAD in Verbindung stehenden Abbauprozessen ist die ubiquitinabhängige proteasomale Degradation die am besten beschriebene [15-17, 39-41]. Proteasomen sind Proteinkomplexe mit einer ATP-abhängigen proteolytischen Aktivität die ca. 1 % der zellulären Proteine ausmachen. Die Lokalisation der Proteasomen erstreckt sich über das gesamte Cytosol sowie den Zellkern, weshalb Proteine aus dem ER dieses verlassen müssen bevor sie proteasomal abgebaut werden können. Unklar ist, ob die Glykoproteine vor oder nach der Retrotranslokation deglykosyliert werden. Ebenso ist der Transportmechanismus, durch den die zu degradierenden Proteine aus dem ER-Lumen an die Retrotranslokationspore befördert werden, noch nicht aufgeklärt. Bisher galt die Annahme, dass die Retrotranslokation durch den Sec61-Komplex erfolgt [42-44]. In neueren Untersuchungen wurde jedoch gezeigt, dass ein weiterer Proteinkomplex, Derlin-1, als Retrotranslokationskanal fungiert [45, 46]. Im Cytosol werden die Proteine ubiquitiniert und anschließend durch das Proteasom proteolytisch zu kurzen Peptiden abgebaut. Bezuglich der Lokalisation der Proteasomen, die die retrotranslatierten Proteine abbauen, gibt es 2 unterschiedliche Modelle. Während die eine Modellvorstellung davon ausgeht, dass sich die Proteasomen frei im Cytosol befinden, geht die zweite Vorstellung von einer Assoziation mit der Retrotranslokationspore aus [22].

Eine große Zahl von Untersuchungsergebnissen weist darauf hin, dass Proteine durch ERAD nicht nur proteasomal abgebaut werden [29, 47-51]. Die Degradationswege scheinen aber für alle untersuchten Proteine individuell zu sein. Bisher wurde noch kein nicht-proteasomaler Abbauweg beschrieben, durch den mehrere Proteine in Verbindung mit ERAD abgebaut

werden. Neben dem Abbau der Proteine im Cytosol wurden auch proteolytische Prozesse innerhalb des ERs nachgewiesen. In einigen Fällen scheint es auch zu einem parallelen proteasomalen und nicht-proteasomalen Proteinabbau zu kommen [29, 50, 52].

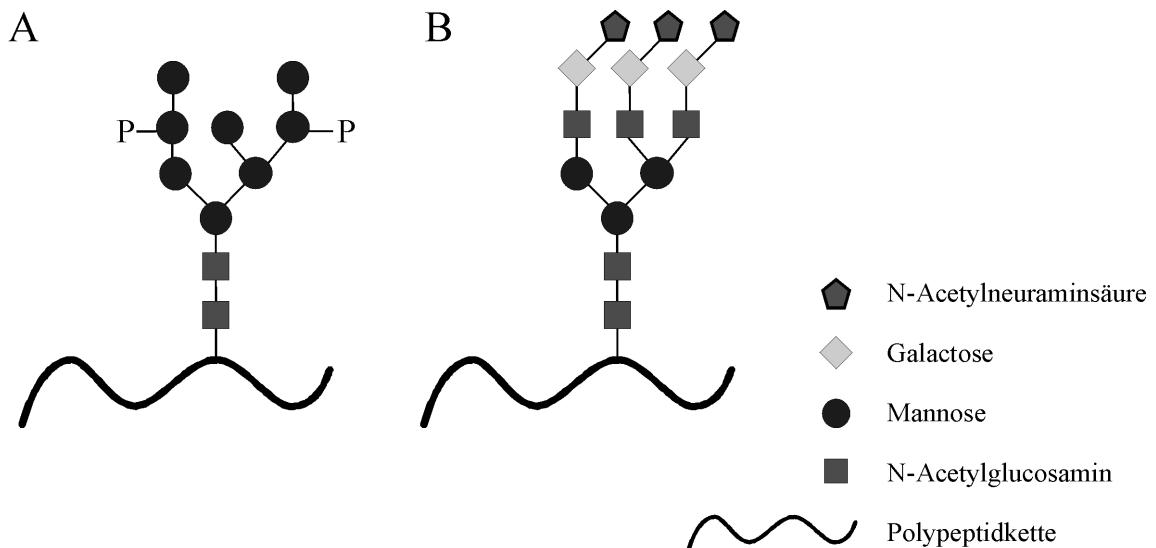
Proteine die im Verlauf ihrer Prozessierung innerhalb des ER ihre richtige Konformation erreichen können, werden ebenso wie falschgefaltete Proteine noch einmal demannosyliert. Damit ist die Prozessierung der Oligosaccharide innerhalb des ERs abgeschlossen und die lysosomalen und sekretorischen Proteine können das ER verlassen. Der Transport erfolgt in „coat protein II“ (COPII) umhüllten Vesikeln und verläuft über das ER-Golgi-Intermediärkompartiment zum cis-Golgi-Kompartiment.

### ***1.1.2 Prozessierung der Oligosaccharid-Seitenketten im Golgi-Komplex***

Im Golgi-Apparat werden die Oligosaccharid-Seitenketten der Glykoproteine weiter prozessiert [5]. Die entstandenen Oligosaccharid-Strukturen können letztlich in zwei Gruppen unterteilt werden, zum einen in die Mannose-reichen und zum anderen in die komplexen Oligosaccharide.

Bei der Erzeugung der Mannose-reichen Oligosaccharide werden im Golgi 1 - 3 Mannosen von der  $\text{Man}_8\text{-GlcNAc}_2$  Struktur durch die Golgi-Mannosidase I abgetrennt (Beispiel s. Abbildung 4). Wie viele Mannosen abgeschnitten werden, scheint von den sterischen Verhältnissen um die Oligosaccharid-Seitenkette abzuhängen. Je dichter die Oligosaccharide auf der Proteinoberfläche liegen, desto mehr Mannosen bleiben erhalten. An einige Mannose-reichen Zuckerseitenketten wird noch eine GlcNAc-Gruppe angefügt. Allen Mannose-reichen Oligosacchariden ist gemein, dass sie durch eine hochspezifische Endoglykosidase H (Endo H) von den Proteinen abgespalten werden können.

Im Verlauf der Prozessierung der komplexen Oligosaccharide werden zuerst fünf der noch acht vorhandenen Mannosen durch die Golgi-Mannosidasen I und II abgetrennt. Anschließend erfolgt, durch entsprechende Glycosyltransferasen katalysiert, die Addition von GlcNAc, Galactose, Sialinsäure und gegebenenfalls auch Fucose. Ebenso wie bei den Mannose-reichen, variieren die komplexen Oligosaccharide von Protein zu Protein, wobei die jeweilige Struktur von der Proteinkonformation abhängig zu sein scheint. Hat ein Glykoprotein zwei oder mehr Oligosaccharid-Seitenketten, so können diese in ihrer Struktur variieren. Im Gegensatz zu den Mannose-reichen können die komplexen Oligosaccharid-Seitenketten nicht mit Endo H von der Polypeptidkette abgeschnitten werden. Ein Beispiel für ein komplexes Oligosaccharid ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4: Beispiele einer Mannose-reichen und komplexen Oligosaccharid-Seitenkette**

Die Abbildung zeigt zwei Beispiele von im Golgi prozessierten Oligosaccharid-Seitenketten. Links ist eine Mannose-reiche Struktur mit 2 phosphorylierten Man-Resten (M6P) dargestellt, rechts eine komplexe Oligosaccharid-Seitenkette.

### 1.1.3 Sortierung der lysosomalen Hydrolasen

Bis heute sind ca. 50 lysosomale Enzyme bekannt. Sequenz- und Oberflächenanalysen haben bisher keine einheitlichen Strukturmerkmale an den sauren Hydrolasen erkennen lassen. Vermutlich werden sie, wie für die Arylsulfatasen A (ASA) und B bereits gezeigt, durch Lysin-Seitenketten, die auf der Enzymoberfläche lokalisiert sind, von der UDP-N-Acetylglucosamin: lysosomales Glykoprotein N-Acetylglucosamin-1-phosphotransferase (im folgenden Phosphotransferase genannt) erkannt [53]. Diese ist im cis-Golgi-Komplex lokalisiert und überträgt eine N-Acetylglucosamin-1-Phosphat-Gruppe von UDP-N-Acetylglucosamin auf Mannose in Position C-6. Damit wird der erste Schritt zur Sortierung der lysosomalen Enzyme durchgeführt. Von der entstandenen N-Acetylglucosamin-1-Phospho-6-Mannose wird durch die N-Acetylglucosamin-1-Phosphodiester  $\alpha$ -N-Acetylglucosaminidase die GlcNAc Gruppe entfernt, wodurch eine Mannose-6-phosphat (M6P) Gruppe an der Oligosaccharid-Seitenkette entsteht [5, 54, 55]. Generell werden 1 - 2 Mannosen von Mannose-reichen Strukturen an den  $\alpha$ 1,6 und  $\alpha$ 1,3 Ästen phosphoryliert (s. Abbildung 4).

Durch die Markierung der lysosomalen Enzyme mit M6P-Resten können die Proteine von zwei Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren erkannt und daran gebunden werden. Die M6P-Rezeptoren initiieren die weitere Sortierung und den vesikulären Proteintransport vom trans-Golgi-Netzwerk zu den Endosomen [55, 56]. Bekannt sind ein 46 kilo-Dalton (kDa) und

ein 300 kDa M6P-Rezeptor, die beide eine hohe Sequenzhomologie aufweisen. Der größere Rezeptor (MPR 300), wird auch als „insulin-like growth factor II“ bezeichnet. Für den Transport werden die Enzym-Rezeptor-Komplexe in Clathrin umkleidete Vesikel, welche sich vom trans-Golgi-Komplex abschnüren, verpackt. Nach dem Verschmelzen der Vesikel mit den späten Endosomen dissoziieren die lysosomalen Hydrolasen von den Rezeptoren ab. Die Dissoziation erfolgt aufgrund des pH-Wertes von ca. pH 5,5. Beide M6P-Rezeptoren gelangen auf dem vesikulären Weg wieder zurück zum trans-Golgi-Netzwerk und stehen erneut für den Transport von lysosomalen Proteinen zur Verfügung. Da die M6P-Rezeptoren beladenen Vesikel auch zwischen den intrazellulären Membranen und der Plasmamembran zirkulieren, hat die Bindungsaufhebung durch die Absenkung des pH-Wertes eine wichtige Funktion bei der Sortierung der lysosomalen Proteine. Da nur in den späten Endosomen der pH-Wert unter 6 liegt wird gewährleistet, dass die rezeptorgebundenen sauren Hydrolasen nicht in andere intra- und extrazelluläre Bereiche gelangen. Untersuchungen an unterschiedlichen Zelltypen haben jedoch gezeigt, dass bis zu 30 % der lysosomalen Enzyme sezerniert werden können.

M6P markierte Proteine aus dem Extrazellulärtraum dienen als Liganden für den MPR 300 während dieser auf der Plasmamembran präsent ist [57, 58]. Die Zellen können daher lysosomale Enzyme durch Endozytose internalisieren und in ihre Lysosomen einbringen. Über diesen Transportweg findet somit ein Rezeptor vermittelter Enzymtransfer statt, welcher auch als „cross-correction“ bezeichnet wird. Auf den erläuterten molekularen Mechanismen aufbauend wird versucht, Enzymersatz-Therapien im Bereich der lysosomalen Speichererkrankungen zu entwickeln [59].

Neben dem M6P abhängigen Weg gibt es auch noch einen M6P unabhängigen Sortierungs- und Transportmechanismus in die Lysosomen. Über diesen gelangen Lysosomen assoziiertes Membranprotein (LAMP) und Lysosomen integrales Membranprotein (LIMP) zunächst in die späten Endosomen und dann in die Lysosomen [54]. Als Signal für diese Sortierung dient, ebenso wie für die lysosomale-saure-Phosphatase, eine kurze cytosolische Peptidsequenz [60].

## 1.2 Arylsulfatase A

Die ASA ist ein ubiquitär exprimierte, lösliches, lysosomales Glykoprotein. Die Nukleotidsequenzen sind unter anderem von humaner [61] und muriner ASA-cDNA [62] bekannt. Von der humanen cDNA wird eine 507 Aminosäuren lange Polypeptidkette codiert, wobei die ersten 18 N-terminalen Aminosäuren als Signalpeptid für den Import ins ER

dienen. In der Polypeptidkette der hASA befinden sich drei potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn158, Asn184 und Asn350 [61].

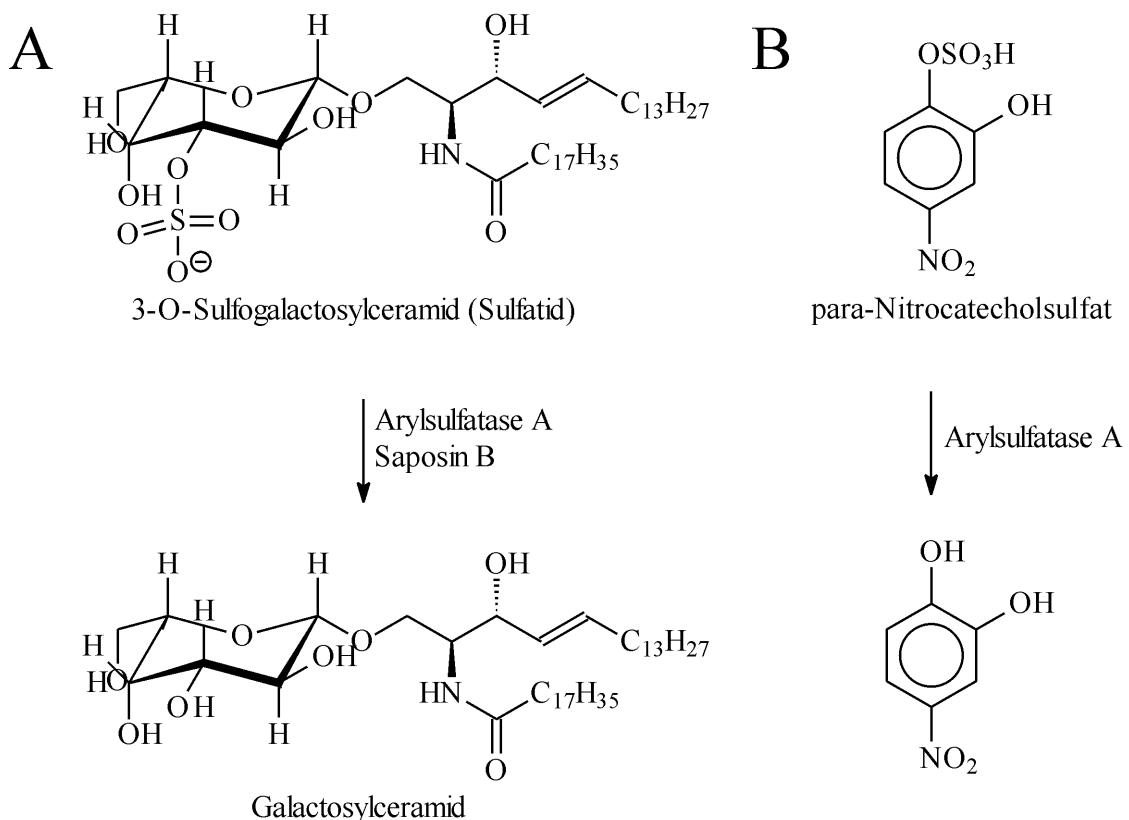
Im aktiven Zentrum der ASA befindet sich - ebenso wie bei den sieben weiteren bisher bekannten Sulfatasen eukaryontischer Zellen - ein konserviertes Cystein. Dieser Cystein-Rest wird bei allen Sulfatasen im ER durch ein  $C_{\alpha}$ -Formylglycin-generierendes Enzym (FGE) modifiziert. Die Thiol-Gruppe des Cys-Rests, im Falle der ASA Cys69, wird katalytisch zu einem Aldehyd umgesetzt [63-67]. Voraussetzung für diese posttranskriptionale Modifikation ist das dem Cys nachfolgende Sequenzmotiv (CXPSRXXX[L/M]TG[R/K/L]).

Nach dieser speziellen und den bereits zuvor geschilderten Modifikationen im ER, werden die Oligosaccharide der ASA im cis-Golgi in den Positionen Asn158 und Asn350 durch die Phosphotransferase phosphoryliert. In Position Asn184 erfolgt keine Phosphorylierung [68, 69]. Schließlich werden die ASA-Proteine durch den M6P gesteuerten Weg in die Lysosomen transportiert [68].

Aufgrund der geschilderten Modifikationen entsteht ein 62 kDa schweres Polypeptid und als solches liegt die hASA überwiegend in den Lysosomen vor. Daneben kann noch, zu einem geringen Anteil, ein 57 kDa Polypeptid nachgewiesen werden.

Bisher wurde angenommen, dass sich bereits im ER aus jeweils zwei hASA-Polypeptiden Homodimere bilden. In den Lysosomen, so die Annahme, formiert sich aus je vier homodimeren Untereinheiten ein homooktamerer Komplex. Basis für diese Modellvorstellung ist die Dimer- bzw. Oktamerbildung in Abhängigkeit vom pH-Wert des Umgebungs-Milieus. Im neutralen überwiegt die dimere Form, im sauren Milieu die oktamere Form [70-72].

Unter physiologischen Bedingungen ist ein sulfatiertes Galactocerebroside vorwiegendes Substrat der hASA (Abbildung 5). Strukturell besteht das Molekül aus Sphingosin, einem Aminoalkohol, der mit einer Fettsäure acyliert ist. An diesem Molekül, welches auch als Ceramid bezeichnet wird, befindet sich in Position C1 Galactose, welche in Position C3 mit einem Sulfatrest verestert ist. Das Glykolipid 3-O-Sulfogalactosylceramid wird auch als Sulfatid bezeichnet.



**Abbildung 5: Substrate der ASA**

A) 3-O-Sulgogalactosylceramid ist unter physiologischen Bedingungen vorwiegendes Substrat der ASA. Um Sulfatid der Desulfatierung zugänglich zu machen, wird das Sphingolipid-Aktivatorprotein Saposin B benötigt. B) p-Nitrocatecholsulfat, das synthetische Substrat zur Bestimmung der enzymatischen ASA Aktivität.

Im zentralen und peripheren Nervensystem liegt der Anteil dieses Glykolipids in den Myelinscheiden bei ca. 3 – 4 % [73]. Da Lipide extrem schlecht wasserlöslich sind, wird Sulfatid, um es der enzymatischen Spaltung zugänglich zu machen, an das Sphingolipid-Aktivatorprotein Saposin B gebunden. An dem Lipid-Saposin B Komplex erfolgt auch die enzymatische Desulfatierung des Sulfatids durch die ASA innerhalb der Lysosomen [74]. Die ASA katalysiert auch die Spaltung synthetischer Arylsulfate, woraus letztlich die Namensgebung des Enzyms resultierte. Üblicherweise wird die ASA-Aktivität *in vitro* mit dem Substrat p-Nitrocatecholsulfat bestimmt (s. Abbildung 5). p-Nitrocatecholsulfat ist gut wasserlöslich, weshalb keine weiteren Substanzen zur Solubilisierung benötigt werden. Das desulfatierte Produkt, Nitrocatechol, hat einen hohen molaren Extinktionskoeffizienten bei 515 nm, was eine sehr gute Quantifizierung der Desulfatierungsreaktion mittels Absorptionsspektroskopie erlaubt.

### 1.3 Metachromatische Leukodystrophie

Bei der metachromatischen Leukodystrophie (MLD) handelt es sich um eine lysosomale Speichererkrankung. Unter dem Begriff lysosomale Speichererkrankungen wird eine Gruppe von ca. 40 Erkrankungen zusammengefasst. In den meisten Fällen handelt es sich um genetisch bedingte Defekte lysosomaler Enzyme, welche dazu führen, dass die katalytischen Abbauprozesse von z.B. Oligosacchariden, Lipiden oder Glykosaminoglykanen massiv gestört sind. In selteneren Fällen führen aber auch genetisch bedingte Defekte von Proteinen, die für die Prozessierung, Sortierung oder Aufrechterhaltung der Funktion der sauren Hydrolasen benötigt werden, zu lysosomalen Speichererkrankungen. Zu diesen Proteinen zählen z.B. die Phosphotransferase, die M6P-Rezeptoren oder Saposin B. In derartigen Fällen kommt es zwar zur Expression enzymatisch aktiver Enzyme, diese gelangen dann aber nicht ins Lysosom bzw. können nicht mit ihrem Substrat interagieren. Dadurch unterbleibt in allen Fällen die katalytische Funktion.

MLD ist eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit, die durch das Fehlen von hASA oder die Expression enzymatisch inaktiver hASA-Proteine verursacht wird. Als Ursache für die ASA-Defizienz konnten bis heute über 80 Mutationen - in der Regel Punktmutationen hervorgerufen durch einen Basenaustausch in der ASA codierenden Region - nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Defizienz akkumuliert Sulfatid in den Lysosomen von Oligodendrozyten, Schwann-Zellen, Neuronen und epithelialen Zellen. Durch einen noch nicht aufgeklärten Zusammenhang kommt es zu einer progressiven Demyelinisierung im Nervensystem, was bei den betroffenen MLD-Patienten zu vielfältigen neurologischen Symptomen und schließlich zum Tode führt [75]. In diesem Zusammenhang wird das cytotoxische Lysosulfatid, welches im Gewebe von MLD-Patienten in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen wurde, als pathogener Faktor diskutiert [76]. Periphere Organe der MLD-Patienten bleiben relativ unbeeinträchtigt.

Untersuchungen, die an einigen rekombinanten hASA-Proteinen – mit Aminosäure-substitutionen wie sie in MLD-Patienten auftreten - durchgeführt wurden, zeigen im Wesentlichen zwei mechanistische Gründe, die zum Auftreten des MLD Phänotyps führen. Bei ungefähr der Hälfte der untersuchten Enzyme gelangten diese nicht in die Lysosomen, sie wurden im ER reteniert und degradiert [77-79]. Die andere Hälfte der Enzyme wurde durch den M6P-Weg in die Lysosomen sortiert, dort aber sehr schnell abgebaut [79-81]. An einigen aminosäuresubstituierten hASA-Proteinen wurden weitergehende Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt, die nur an Epitope binden, welche sich bei einer korrekten Tertiärstruktur bilden. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass es infolge der

Aminosäuresubstitutionen bei keinem dieser Proteine zur Ausbildung der „normalen“ Konformation kam. Bei den im ER retenierten Proteinen waren die Missfaltungen offensichtlich ausgeprägter, als bei den Proteinen, die die Lysosomen erreichten [82]. Durch diese starken Konformationsänderungen werden die hASA-Proteine vermutlich bereits im ER durch das Protein-Qualitätskontrollsystem erkannt und der Degradation zugeführt. Bisher konnte bei keinem der im ER retenierten Enzyme eine katalytische Aktivität nachgewiesen werden. Einige der aminosäuresubstituierten hASA-Proteine die das Lysosom erreichen, haben noch eine geringe enzymatische Restaktivität. Aufgrund ihrer im Vergleich zur wtASA veränderten Konformation weisen sie aber Angriffspunkte für lysosomale Proteasen auf, wodurch es zu einer schnellen Degradation der Proteine kommt.

## **2. Zielsetzung**

Die metachromatische Leukodystrophie ist eine durch humane ASA-Defizienz verursachte lysosomale Speichererkrankung. Von 7 in menschlichen Patienten gefundenen, aminosäuresubstituierten ASA-Proteinen ist bekannt, dass sie nach der kotranslationalen Translokation im endoplasmatischen Reticulum reteniert und von dort aus der Degradation zugeführt werden. Keines der 7 Proteine besitzt enzymatische Aktivität und die korrekte Tertiärstruktur.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und wie diese 7 Proteine einer Prozessierung der Oligosaccharid-Seitenketten und damit verbunden der Protein-Qualitätskontrolle innerhalb des ER unterzogen werden. Da bekannt ist, dass die Aminosäuresubstitutionen unterschiedliche Effekte auf die Konformationsausbildung haben, galt es auch die Frage zu klären, ob alle 7 Proteine einheitlich prozessiert werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, durch welche Mechanismen die hASA-Proteine im Rahmen des ERAD degradiert werden. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass neben dem proteasomalen Abbau auch nicht-proteasomale Degradationswege an ERAD beteiligt sind.

Aus Gelfiltrations- und Röntgenkristallstruktur-Untersuchungen ist bekannt, dass Wildtyp-ASA (wtASA) in Form von homodimeren Komplexen das Lysosom erreicht und hier aufgrund des pH-Wertes Enzymkomplexe aus 4 dimeren Untereinheiten bildet.

Da unklar ist, wo und wie es im Verlauf der hASA Prozessierung zu einer Dimer-Bildung kommt, sollten hierzu Untersuchungen durchgeführt werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die 7 aminosäuresubstituierten hASA-Proteine ebenfalls in der Lage sind, miteinander oder mit der wtASA zu assoziieren und, für den letzteren Fall, welche Folgen aus einer solchen Komplexbildung für die beteiligten Proteine resultieren.

### **3. Material**

#### **3.1 Chemikalien**

Die Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen BioRad Laboratories GmbH (München), Boehringer (Mannheim), Fermentas (St.Leon-Rot), Gibco/BRL (Karlsruhe), Invitrogen/Life Technologies (Karlsruhe), Merk/Calbiochem-Novabiochem (Schwalbach), Pharmacia (Freiburg), Pierce (Rockford, USA) und Sigma/Fluka (München) bezogen und in Analysequalität (p.A.) eingesetzt.

Die Glykosidaseinhibitoren Deoxymannojirimycin und Deoxynojirimycin wurden mir freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Bause (Institut für Physiologische Chemie, Rheinische-Friedrich-Wilhelms Universität Bonn) überlassen und sind aus seiner eigenen Herstellung.

Radioaktives L-[<sup>35</sup>S]-Methionin wurde von Amersham (Buckinghamshire, UK) bzw. Hartmann Analytik (Braunschweig) mit einer spezifischen Aktivität > 39 TBq/mmol bezogen.

#### **3.2 Antikörper**

**Tabelle 1: Verwendete primär Antikörper**

Antigen	Herkunft	Hersteller
hASA	Kaninchen, 1057, Serum	eigene Herstellung
hASA	Kaninchen, BE#3, Serum	Eurogentec (Seraring, Belgien)
hASA	Hybridoma, A2, aufgereinigt	A. Schierau [83]
HA	Hybridoma, 12CA5, aufgereinigt	Roche (Mannheim)
HA	Hybridoma, 12CA5, aufgereinigt und biotinyliert	Roche (Mannheim) eigene Herstellung

**Tabelle 2: Verwendete sekundär Antikörper**

gerichtet gegen	Herkunft	Markierung	Hersteller
Kaninchen	Ziege	Peroxidase	Dianova (Hamburg)

Zum Nachweis von Biotin-markiertem Primärantikörper wurde Fluorophor markiertes Streptavidin (Invitrogen/Life Technologies (Karlsruhe)) verwendet.

### 3.3 Oligonukleotide

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma ARK (Steinheim) in lyophylisierter Form bezogen. Sie wurden zur Herstellung der HA-markierten hASA verwendet. Die Stammkonzentrationen wurden zur Lagerung bei -20° C jeweils auf 100 pmol/µl mit TE-Puffer eingestellt.

Oligonukleotid 1:

5`-dAAAGAATTCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGTAGGCATGGGATCTGG  
GCAATG-3`

Oligonukleotid 2:

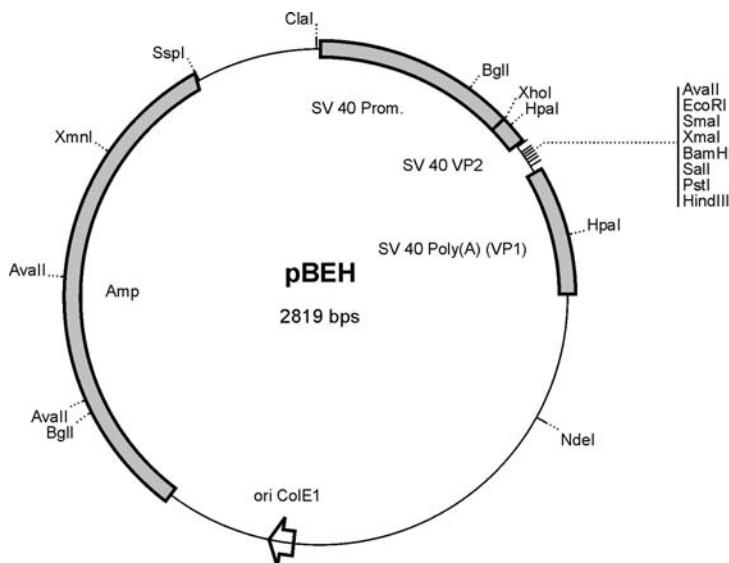
5`-dTGTGAATTCCATGTCCATGGGGCACCGCGGTC-3`

### 3.4 Bakterien

Escherichia coli DH5 $\alpha$ , Genotyp: F $^{\prime}$ /endA1 hsdR17(r $_k^-$ m $_k^+$ ) supE44 thi-1 recA1 GyrA (Nal $r$ ) relA1  $\Delta$ (lacZYA-argF)u<sub>169</sub>(m80lacZ $\Delta$ M15), New England Biolabs (Schwalbach)

### 3.5 Vektor

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Transfektion von eukaryontischen Zellen der pBEH Expressionsvektor verwendet. Die Vektorkarte ist in Abbildung 6 dargestellt.



*Abbildung 6: Vektorkarte des pBEH Expressionsvektors*

### **3.6 Eukaryontische Zelllinien**

Verwendet wurden:

BHK21-Zellen (Baby Hamster Nierenzellen 21), Fibroblasten Zelllinie, DSM (Braunschweig)  
LTK<sup>-</sup>-Zellen, Thyminkinase defiziente Fibroblasten mit einem C3H Maus Hintergrund,  
ATCC (Rockville, USA)

J774-Zellen, Makrophagen Zelllinie mit einem BALB/c Hintergrund, ATCC (Rockville,  
USA)

### **3.7 Kits**

Plasmidaufreinigung:

QIA-Plasmid Mini Kit, Qiagen (Hilden)  
QIA-Plasmid Midi Kit, Qiagen (Hilden)  
PhenoIX™ Midiprep Kit, QBIOTec (Heidelberg)

DNA-Isolierung aus Agarosegel:

Nucleotrap Kit, Macherey und Nagel (Stuttgart)  
QIAquik Gel Extraktion, Qiagen (Hilden)

Proteingehaltsanalyse:

D<sub>C</sub> Protein Assay, BioRad Laboratories GmbH (München)

Chemilumineszenz für Westernblot:

Super<sup>®</sup> Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (ECL-Kit), Pierce (Rockford, USA)

PCR-Produkt Aufreinigung:

QIAquick PCR Purification, Qiagen (Hilden)

### **3.8 Lösungen und Puffer**

So weit nicht anders vermerkt wurden die Lösungen, Puffer und Medien mit Aqua bidest. angesetzt und nach Einstellung der pH-Werte, durch Verwendung von NaOH bzw. HCl, autoklaviert. Alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden nach Sambrook et al. (1989) angesetzt.

### 3.8.1 Allgemeine Lösungen und Puffer

0,5 M EDTA                            186,12 g Ethylendiamintetraessigsäure  
in 800 ml Aqua bidest. lösen, pH 8,0 mit konz. NaOH Lsg. einstellen, auf 1 l auffüllen

Lysispuffer                            50 mM Tris/HCl, pH 7,4  
    150 mM NaCl  
    0,3 % (v/v) Triton® X-100

Diesem Puffer wurden jeweils vor Gebrauch die nachfolgenden Proteaseinhibitoren zugesetzt.  
Bei den angegebenen Konzentrationen handelt es sich um Endkonzentrationen.

1 mM EDTA  
10 µg/ml Leupeptin  
100 U/ml Aprotinin  
1 mM Iodacetamid  
100 µg/ml Pefabloc SC

10x PBS                              100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4  
    1,5 M NaCl  
    25 mM KCl

TBS                                    10 mM Tris/HCl, pH 7,4  
    150 mM NaCl

1 M Tris/HCl                        121,1 g Tris-Base  
in 800 ml Aqua bidest. lösen, pH-Wert mit konz. HCl auf den entsprechenden Wert einstellen,  
auf 1 l auffüllen

### 3.8.2 Lösungen und Puffer für die DNA-Präparation und Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE                              2 M Tris-Base  
    100 mM EDTA  
    mit Eisessig auf pH 8,0 einstellen

10x TE                                100 mM Tris/HCl, pH 7,6  
    10 mM EDTA

### **3.8.3 Lösungen und Puffer für die Immunpräzipitation**

Net-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 5 mM EDTA
Neufeldpuffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,4 600 mM NaCl 0,1 % (w/v) SDS 0,05 % (w/v) NP-40
Wasch-Immunomix-Lsg.	10 mM Natrium Phosphat Puffer, pH 7,4 150 mM NaCl 1 % (v/v) Triton X100 0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholat

### **3.8.4 Lösungen und Puffer für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelektrophorese (SDS-PAGE)**

Acrylamid	40 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
Ammoniumperoxydisulfat (APS)	10 % (w/v) Ammoniumperoxydisulfat
10x Laufpuffer, SDS-PAGE	250 mM Tris-Base 1,9 M Glycin auf pH 8,6 einstellen 1 % (w/v) SDS
Probenpuffer	65 mM Tris/HCl, pH 6,8 5 mM DTT 0,5 % (w/v) SDS 5 % (v/v) Glycerin 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

---

Sammelgelpuffer	500 mM Tris/HCl, pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS
10 % SDS	10 g Natriumdodecylsulfat in 100 ml Aqua bidest. bei 65° C gelöst
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS

### ***3.8.5 Lösungen für die Coomassie® Brilliantblau Färbung von Polyacrylamid Gelen***

Färbelösung	1 % (w/v) Coomassie® Brilliantblau 40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Eisessig 50 % (v/v) Aqua bidest.
Entfärbler	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Eisessig 40 % (v/v) Aqua bidest.

### ***3.8.6 Lösungen und Puffer für die Westernblot Analyse***

Membran-Waschpuffer	TBS, pH 7,4 0,05 % (v/v) Tween-20
Transferpuffer	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin auf pH 8,5 einstellen 0,037 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol

### **3.8.7 Puffer für die Aktivitätsmessung der ASA**

ASA-Substratlösung	0,5 M Acetatpuffer, pH 5,0 10 mM p-Nitrocatecholsulfat 10 % (w/v) NaCl
--------------------	--

### **3.9 Medien und Lösungen für die Kultivierung von eukaryontischen Zellen**

Die Lösungen und Medien für die Zellkultur wurden von der Firma Gibco/BRL (Eggenstein) bezogen. Fötales Kälberserum (FKS) wurde vor der Verwendung Hitze-inaktiviert.

Trypsin/EDTA	0,5 g/l Trypsin; 0,2 g/l EDTA
10x PBS	Hersteller-fertig
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Hersteller-fertig
Standardmedium	DMEM, Hersteller-fertig 100 U/ml Pen/Strep 2 mM L-Glutamin 5% (v/v) FKS
methionin- und cysteinfreies Medium	DMEM, ohne L-Methionin, ohne L-Cystein 2 mM L-Glutamin 0,4 mM L-Cystein 5% (v/v) dialysiertes FKS
RPMI-Medium	DMEM, Hersteller-fertig 100 U/ml Pen/Strep 2 mM L-Glutamin 10 % (v/v) FKS

### **3.10 Medien und Lösungen für die Kultivierung von Bakterien**

Ampicillin	100 mg/ml, mit NaOH neutralisiert
------------	-----------------------------------

LB-Medium (pH 7,4) (autoklaviert)	1 % (w/v) NaCl 1 % (w/v) Hefe-Extrakt 0,5 % (w/v) Trypton
LB-Nährböden (pH 7,4)	1,5 % (w/v) Agar 1 % (w/v) Gelrite
in LB-Medium gelöst und autoklaviert, bei Bedarf mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, in 10 cm Kulturschalen gegossen, Lagerung bei 4° C	

### 3.11 Verbrauchsmaterialien

Die Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Falcon/Becton Dickenson (Heidelberg), Greiner (Nütringen), Nunc (Wiesbaden) und Sarstedt (Braunschweig) bezogen.

### 3.12 Geräte

Bio Max MR-Filme	Kodak	
Blotkammer	BioRad	
Brutschrank	Forma Scientific	
Eismaschine AF-10	Scotsman	
Elektrophoresekammern für Agarosegele	Hoefer Scientific Instruments	
Elektrophoresekammern für PAGE	BioRad	
Entwicklermaschine, Typ Curix 60	AGFA	
Netzteil für Elektrophorese	BioRad	
ELISA-Reader Tecan	Tecan	
Geltrockner Typ SDG 2000	Savant	
Heizblock Modell Thermostat 5320	Eppendorf	
Hyperkassette	Amersham	
Laserscanner, Typ Odyssey	Li-Cor	
LPLC-Anlage, Typ ÄKTA	Amersham	
Magnetrührer Ika Combimag Red	Janke & Kunkel	
Membranpumpe	Vacuubrant	
Mikroskope:	Axiovert M (Epifluoreszenz)	Zeiss
	Durchlichtmikroskop Axiovert 135	Zeiss
pH-Meter (Digital-pH-Meter 646)	Knick	

Phosphoimager ES 1000	Raytest (Fuji)
Schüttelwasserbad GFL	Köttermann
Spektralphotometer, DU 640 Spektrophotometer	Beckman Coulter
Sterilbank Labgard class II, Typ A/B3	Nuaire
Thermo-Cycler	Biometra
Trockenschrank	Memmert
UV-Handlampe	Konrad Bender
Vortexgerät Genie	Bender & Hobein
Waagen:	
1264 MP	Sartorius
1265	Sartorius
Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q plus	Millipore
Zentrifugen:	
Eppendorfzentrifuge 5810R	Eppendorf
Eppendorf Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
CPKR Centrifuge	Beckman Coulter
Zählkammer für eukaryontische Zellen	Neubauer

## 4. Methoden

Alle nicht aufgeführten Methoden wurden nach Standardprotokollen (Ausubel et al., 1987 und Sambrook et al., 1989) oder nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

### 4.1 Aktivitätsbestimmung der Arylsulfatase A

Immunpräzipitate oder Zelllysate (jeweils 20 µl) wurden mit 200 µl ASA-Substratlösung versetzt und 0,5 – 7 h bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl 1 M NaCl gestoppt und die Absorption bei 515 nm mit einem Spektralphotometer gemessen. Die ASA-Aktivität wurde nach folgender Formel berechnet und anschließend auf den Gehalt pro mg Gesamtprotein in den jeweiligen Zelllysaten umgerechnet.

$$\frac{\text{ges. Reaktionsansatz [ml]} \cdot 1000}{\frac{\text{mol. Extinktionskoeffizient}}{1000} \cdot \text{Probenvolumen [ml]} \cdot \text{Reaktionszeit [min]}} \cdot OD_{515} = \text{mU/ml}$$

molarer (mol.) Extinktionskoeffizient bei 515 nm ( $\epsilon$ ) = 12.400 cm<sup>2</sup>/mmol  
40 mU entsprechen 1 µg Protein

### 4.2 SDS-PAGE

Die Trennung von Proteinen aufgrund ihrer molekularen Masse, erfolgte durch diskontinuierliche SDS-PAGE. In der vorliegenden Arbeit fanden zwei vertikale Elektrophoresesysteme der Firma BioRad Verwendung, Mini-Protean 3 Elektrophorese System (Mini-Gel) und Protean II XL Vertikal Elektrophorese (Maxi-Gel).

Vor dem Zusammenbau der Gelkammer wurden die dafür verwendeten Glasplatten mit SDS-haltigem Wasser gereinigt und anschließend mit Wasser und zuletzt mit Aqua bidest. gespült. Nach Lufttrocknen der Platten, wurde die Gelkammer mit den dafür vorgesehenen Vorrichtungen zusammengesetzt und das Trenngel nach der in Tabelle 3 angegebenen Zusammensetzung gegossen.

Um ein gleichmäßiges Polymerisieren des Gels zu gewährleisten, erfolgte nach dem Gießen eine Überschichtung mit wassergesättigtem n-Butanol. Nach ca. 45 min wurde das n-Butanol dekantiert und das Sammelgel nach der in Tabelle 4 angegebenen Zusammensetzung über das Trenngel gegossen.

**Tabelle 3: Zusammensetzung der Trenngellösung**

	5 ml Mini-Gel [ml]	30 ml Maxi-Gel [ml]
Aqua bidest.	2,4	14,4
Acrylamid-Lsg.	1,25	7,5
Trenngelpuffer	1,25	7,5
10 % SDS	0,05	0,3
10 % APS	0,05	0,3
TEMED	0,005	0,03

**Tabelle 4: Zusammensetzung der Sammelgellösung**

	2 ml Mini-Gel [ml]	8 ml Maxi-Gel [ml]
Aqua bidest.	1,2	4,8
Acrylamid-Lsg.	0,25	1
Sammelgelpuffer	0,5	2
10 % SDS	0,02	0,08
10 % APS	0,02	0,08
TEMED	0,002	0,008

Die angelegten Ströme und Spannungen waren wie folgt:

Mini-Gel: 80 V bis die Probe vollständig in das Sammelgel eingewandert war, danach 120 V

Maxi-Gel: 40 mA je Gel mit einer Spannungsbegrenzung auf 500 V

Nachdem die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte, wurde der Strom abgeschaltet und das Gel aus der Kammer genommen. Anschließend wurde das Gel entsprechend dem Verwendungszweck weiterbehandelt (s. entsprechende Abschnitte).

#### **4.3 Färben von SDS Polyacrylamid Gelen mit Coomassie® Brillantblau**

Die SDS Polyacrylamid Gele wurden 1–16 h in der Färbelösung unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Gele durch die Inkubation in Entfärbler entfärbt, dieser wurde mehrfach gewechselt.

#### 4.4 Westernblot

Die mittels Westernblot analysierten Proteinproben wurden zuerst durch diskontinuierliche SDS-PAGE in 10%igen Mini-Gelen nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Anschließend wurden die Proteine mit einem semitrockenen Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dazu wurden zuerst 3 Filterpapiere, in Transferpuffer getränkt und übereinander auf die Anode gelegt. Nun wurde die in Aqua bidest. inkubierte Nitrocellulose-Membran aufgelegt. Das SDS-Gel wurde aus der Gelkammer entnommen und auf die Membran aufgelegt. Abschließend wurden noch einmal 3 Transferpuffer-getränktes Filterpapiere aufgelegt, die Kathode aufgelegt und die Blotkammer geschlossen. Der Protein-Transfer dauerte bei einer Stromstärke von  $0,7 \text{ mA/cm}^2$  2 h. Anschließend wurde die Membran für 16 h in Membran-Waschpuffer mit 5 % Magermilchpulverlösung inkubiert. Die Membran wurde 2x mit Membran-Waschpuffer gewaschen und 2 h mit Primärantikörper inkubiert. Für die Verdünnung der Primärantikörper wurde Membran-Waschpuffer verwendet. Die Antikörperverdünnungen waren wie folgt: Antiserum hASA 1:20.000, mAK anti HA 1  $\mu\text{g/ml}$ . Um den überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran 2x für 10 min, einmal für 15 min und 2x für 5 min jeweils mit frischem Membran-Waschpuffer inkubiert. Die Membran wurde nun für 2 h mit Sekundärantikörper bzw. Streptavidin inkubiert, wobei die Verdünnungen wie folgt mit Membran-Waschpuffer angesetzt wurden: Peroxidase markierter Ziegenantikörper anti Kaninchen 1:10.000, Fluorophor markiertes Streptavidin 1:20.000. Überschüssiger Antikörper bzw. Streptavidin wurde, nach oben beschriebenem Waschprotokoll entfernt und die Antikörper-Antigen Komplexe entweder durch eine Chemilumineszenz-Reaktion und Fotofilm-Exposition oder durch Laser angeregte Fluoreszenz mit einem Li-Cor Laserscanner detektiert.

#### 4.5 Erzeugung der HA-Epitop markierten hASA-cDNA

Die Amplifizierung der HA markierten hASA-cDNAs erfolgte mit den beiden in Abschnitt 3.3 angeführten Oligonukleotiden. Als „Template“ wurden Expressionsvektoren mit den jeweiligen cDNA-Kassetten der hASA eingesetzt. Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

„Template“, 100 pg/ $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
Oligonukleotid 1, 10 mmol/ $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
Oligonukleotid 2, 10 mmol/ $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
dNTP's, 2 mM	5 $\mu\text{l}$

Pfu DNA Polymerase (Fermentas), 1 U/ $\mu$ l	1 $\mu$ l
10x Pfu-Puffer (Fermentas)	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> , 50 mM	4 $\mu$ l
DMSO	2 $\mu$ l
Aqua bidest.	8 $\mu$ l

Die PCR wurde nach den in Tabelle 5 aufgeführten Bedingungen durchgeführt.

**Tabelle 5: PCR-Bedingungen für HA markierte hASA**

Schritt	Temperatur [° C]	Dauer [sek]	Wiederholung(en)
Vordenaturierung	96	120	1
Denaturierung	96	10	35
Anlagerung	66	15	35
Synthese	72	120	35
Lagerung	4		1

Das PCR-Produkt wurde an beiden Enden mit der Restriktionsendonuklease *Eco*RI (Fermentas) gespalten (nach Herstellerangaben), durch Agarose Gelelektrophorese aufgereinigt und mit einem der beiden unter 3.7 angegebenen Gel Elutions Systemen aus dem Agarosegel eluiert. Der Expressionsvektor pBEH wurde mit *Eco*RI linearisiert und, um eine Religation zu vermeiden, mit Kälber Pankreas alkalischer Phosphatase (Fermentas) dephosphoryliert (nach Herstellerangaben). Mit Hilfe eines Agarosegels wurde der Vektor aufgereinigt und anschließend aus dem Gel eluiert.

Die hASA-cDNA wurde in pBEH ligiert, wobei sich der Ligationsansatz wie folgt zusammensetzte:

Vektor, 50 ng	2 $\mu$ l
DNA-Fragment, 100 ng	2 $\mu$ l
10x Ligase Puffer (Fermentas)	2 $\mu$ l
T4-DNA-Ligase (Fermentas), 2 U	2 $\mu$ l
ad 20 $\mu$ l mit Aqua bidest.	

Die Inkubation erfolgte bei 16° C für 16 h. 10  $\mu$ l des Ligationsansatzes wurden, wie unter 4.6 beschrieben für eine Transformation von Bakterien eingesetzt. Von 24 auf der Kulturplatte gewachsenen Bakterienkolonien wurden jeweils 5 ml LB-Medium-Kulturen angelegt und 16 h kultiviert. Anschließend wurden die Plasmide mit dem unter 3.7 angegebenen Mini Kit nach Herstellerangaben präpariert. Jeweils 1  $\mu$ g der aufgereinigten Plasmide wurde mit der Restriktionsendonuklease *Bsu*15I (Fermentas) geschnitten (nach Herstellerangaben) und das

Produktgemisch mittels eines Agarosegels qualitativ untersucht. Aufgrund der erhaltenen Fragmente konnte die korrekte Orientierung der hASA-cDNAs in dem pBEH Expressionsvektor nachgewiesen werden.

#### ***4.6 Transformation von Bakterien und Präparation von Plasmid-DNA***

200 µl einer bei –80° C gelagerten Glycerin-Kultur chemisch kompetenter DH5 $\alpha$ , wurden für 10 min auf Eis temperiert bevor 1 ng Plasmid (bei einer Retransformation) oder 10 µl Ligationsansatz (bei einer Transformation) hinzugegeben wurden. Die Kultur wurde weitere 15 min auf Eis inkubiert worauf ein Hitzeschock von 45 sek bei 42° C folgte. Nachdem die Lösung für weitere 2 min auf Eis inkubiert wurde, wurde der Transformationsansatz zu 1 ml LB-Medium gegeben und für 60 min unter Schütteln bei 37° C inkubiert. 80 µl der Kultur wurden schließlich auf einer LB<sub>amp</sub>-Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen und 16 h bei 37° C inkubiert.

Von der Kulturplatte wurden entsprechend des jeweiligen Versuchsziels Einzelkolonien in jeweils 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium, 16 h unter Schütteln bei 37° C kultiviert. Für die Präparation größerer Plasmidmengen wurden 50 ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit 1 ml der Vorkultur angeimpft und solange bei 37° C unter Schütteln kultiviert bis eine OD<sub>600</sub> von 1,6 erreicht war. Aus dieser Kultur wurden die Plasmide nach Angaben des Herstellers für Midi-Kits (s. 3.7) präpariert.

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der präparierten Plasmide erfolgte photometrisch oder mittels Agarose-Gelelektrophorese. Die Lagerung erfolgte anschließend bei –20° C.

#### ***4.7 Kultivieren von eukaryontischen Zellen***

Alle Zelllinien wurden bei 37° C und wassergesättigter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bevor die Zellen mit Medien oder anderen Lösungen in Kontakt kamen wurden diese, wenn nicht anders angegeben, auf 37° C vorgewärmt.

##### ***4.7.1 Auftauen und Einfrieren von Zellen***

Alle Zelllinien wurden nach dem gleichen Protokoll eingefroren und revitalisiert. Vor dem Einfrieren mussten die Zellen eine Konfluenz von 100 % erreicht haben. Die Zellen wurden trypsinisiert und bei 200x g 5 min sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 900 µl eiskaltem

DMEM, mit 100 U/ml Pen/Strep und 10 % FKS pro  $2 \times 10^6$  Zellen resuspendiert. Anschließend wurde 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugegeben und die Zellsuspension zu 1 ml aliquotiert. Danach wurden die Zellen bei -80° C eingefroren und nach 24 h schließlich über flüssigem Stickstoff bei -198° C eingelagert.

Zum Revitalisieren der Zellen wurden die Einfrierröhrchen aus dem Stickstoff genommen und in einem 37° C Wasserbad aufgetaut. Die Zellsuspension wurde vorsichtig in 8 ml vorgewärmtes Standardmedium überführt und bei 200x g für 5 min sedimentiert. Nach vorsichtigem Resuspendieren der Zellen in 3 ml Standardmedium, wurde die Suspension in eine T25-Flasche überführt und in einem Brutschrank kultiviert. 24 h später wurde das Medium gewechselt.

## **4.8 Gewinnung von monoklonalen Antikörpern und deren Biotin-Markierung**

### **4.8.1 Konditionieren von Medium mit J774-Zellen**

Zur Kultivierung von J774-Zellen wurde RPMI-Medium verwendet. Nachdem die Zellen konfluent waren, wurde das Medium in Abständen von 4 Tagen gewechselt. Das abgenommene Medium wurde bei 200x g 5 min zentrifugiert und der Überstand bei -20° C gelagert.

### **4.8.2 Kultivierung der Hybridomazellen**

Die Hybridomazellen wurden nach dem Auftauen in RPMI-Medium unter Zusatz von 10 % J774 konditioniertem Medium in Kultur genommen. Nach einer Woche erfolgte die weitere Kultivierung mit reinem RPMI-Medium. Nachdem der Flaschenboden vollständig mit einer Schicht Zellen bedeckt war, wurde das Medium in Abständen von 4 Tagen gewechselt. Der Zellüberstand wurde bei 200x g 5 min zentrifugiert und der Überstand bei -20° C gelagert.

### **4.8.3 Aufreinigung monoklonaler Antikörper**

Zur Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern wurden die gesammelten Überstände der Hybridomazellen (s. 4.8.2) aufgetaut, bei 16.000x g für 15 min sedimentiert und der abgenommene Überstand filtriert (Porendurchmesser 0,2 µm). Mit Hilfe einer LPLC-Anlage wurde der aufbereitete Überstand über eine Protein A-Sepharose Säule (Amersham) gegeben. Anschließend wurden die Sepharose mit dem 20 fachen Säulenvolumen 10 mM PBS (pH 7,4) gewaschen und der Antikörper mit einem 200 mM Glycin/HCl Puffer (pH 2,6) eluiert und

fraktioniert aufgefangen. Der pH-Wert des Eluats wurde noch während der Elution mit 1 M Tris/HCl (pH 9) auf pH 7,4 eingestellt. Nachdem der Proteingehalt des Eluats nach Lowry bestimmt worden war (s. 3.7), wurden die Proteine der Fraktionen, die einen Proteingehalt über 0,2 mg/ml aufwiesen, mittels diskontinuierlicher 10%iger SDS-PAGE und anschließender Coomassie® Brillantblau Färbung untersucht. Fraktionen die nur die leichte und schwere Antikörper-Kette enthielten wurden mit NaN<sub>3</sub> (Endkonzentration 0,02 %) versetzt und bei 4° C gelagert, oder mit 50 % Glycerol versetzt und bei -20° C gelagert.

#### **4.8.4 Biotin-Markierung monoklonaler Antikörper**

Die Biotin-Markierung der monoklonalen Antikörper erfolgte mit Sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionat (EZ-Link® Sulfo-NHS-SS-Biotin). Nachdem die Antikörper mit Hilfe einer Gelfiltration in einen aminfreien Reaktionspuffer (10 mM PBS, pH 7,4) umgepuffert worden waren, wurde die Proteinkonzentration auf 2 mg/ml eingestellt. Durch die Zugabe einer frisch angesetzten, 10 mM EZ-Link® Sulfo-NHS-SS-Biotin Lösung im Verhältnis von 1:38 (38 entspricht dem Anteil der Antikörperlösung), wurde ein 20facher, molarer Überschuss an EZ-Link® Sulfo-NHS-SS-Biotin bezüglich der Antikörperkonzentration in der Reaktionslösung erzeugt. Nach zweistündiger Reaktion wurden die Antikörper durch Gelfiltration von dem ungebundenen Biotin abgetrennt, mit NaN<sub>3</sub> (Endkonzentration 0,02 %) versetzt und bei 4° C gelagert.

### **4.9 Erzeugung von stabil exprimierenden LTK-Zellen**

#### **4.9.1 Transfektion und Selektion der LTK-Zellen**

8x10<sup>6</sup> LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden in einer 10 cm Petrischale eingesät. Nachdem die Zellen zu ca. 70 % konfluent waren (ca. 24 h später) erfolgte die Transfektion. Die Transfektionslösung wurde wie folgt angesetzt. 630 µl 150 mM NaCl-Lösung (sterilfiltriert) wurden mit 12,6 µg Expressionsvektor, der ein entsprechendes hASA-cDNA Insert beinhaltete und 1,4 µg Expressionsvektor, der ein Aminoglykosid-Phosphotransferase-cDNA Insert enthielt, versetzt. Dazu wurden 46,2 µl ExGen500 (Fermentas) gegeben. Nach Durchmischen der Lösung (Vortex, 10 sek), folgte eine 10 min Inkubationszeit. Das Zellkulturmedium wurde durch 6,3 ml frisches Standardmedium ersetzt und die Transfektionslösung dazugegeben. 16 h später wurde das Transfektionsmedium durch 10 ml Standardmedium ersetzt. Weitere 24 h

später wurden die Zellen durch Zugabe von 50 µg/ml Neomycin (G418) (Sigma) selektioniert. Das Selektionsmedium wurde täglich ausgetauscht und der Selektionsdruck für ca. 8 Wochen aufrechterhalten. Nach ca. 14 bis 21 Tagen konnten einzelne, stabil exprimierende Klone, von der Kulturschale isoliert und separiert weiter kultiviert werden. Eine Kontrolle hinsichtlich der hASA Überexpression erfolgte durch Westernblot Analyse.

#### **4.9.2 Probenvorbereitung für die Expressionsuntersuchung mit Westernblot Analyse**

In einer 24-well-Platte wurden 250.000 LTK<sup>-</sup>-Zellen je „Well“ eingesät. 24 h später wurden die Zellen einmal mit 10 mM PBS (pH 7,4) gewaschen und anschließend mit 100 µl Lysispuffer lysiert. Nach 5 min sedimentieren der Membranbestandteile bei 16.000x g wurden 50 µl des Überstandes mit 50 µl 2x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95° C inkubiert. Für die Westernblot Analyse wurden 20 µl der Probe auf ein Gel aufgetragen.

#### **4.10 Erzeugung transient exprimierender BHK21 Zellen**

Alle nachfolgenden Maßangaben beziehen sich auf eine Kulturfläche von 1 cm<sup>2</sup>. BHK21 Zellen wurden in einer Dichte von 45.000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. 24 h später erfolgte die Transfektion, wobei die Transfektionslösung wie folgt angesetzt wurde. 12,5 µl 150 mM NaCl-Lösung (sterilfiltriert) wurde mit 0,3 µg Expressionsvektor versetzt. Bei einer Cotransfektion wurden die Vektoren in einer Gesamtmenge von 0,3 µg eingesetzt, wenn weniger als 0,3 µg Expressionsvektor verwendet wurde, wurde diese Menge durch Zugabe von Leervektor erreicht. Anschließend wurden 0,95 µl ExGen500 zugegeben, die Lösung gut durchmischt (Vortex, 10 sec.) und 10 min inkubiert. Der Zellüberstand wurde durch 125 µl frisches Standardmedium ersetzt und die Transfektionslösung zugegeben. 16 - 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für die entsprechenden Versuche eingesetzt.

#### **4.11 Radioaktive Markierung, Immunpräzipitation und Detektion der markierten hASA-Proteine**

##### **4.11.1 Radioaktive Markierung von Proteinen („pulse-chase“-Versuch)**

LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden 16 h vor der radioaktiven Markierung in einer Dichte von 15.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> eingesät. BHK21 Zellen wurden wie unter 4.10 beschrieben transfiziert und konnten 16 h später markiert werden. Alle nachfolgenden Maßangaben beziehen sich auf eine

Kulturfläche von 1 cm<sup>2</sup>. Zuerst wurden die Zellen für 1 h mit 135 µl methioninfreiem-Medium inkubiert. Die radioaktive Markierung erfolgte durch eine Zugabe von L-[<sup>35</sup>S]-Methionin ins Kulturmedium. Für eine Markierung bis zu 30 min wurden 40 µCi und über 30 min 4 µCi L-[<sup>35</sup>S]-Methionin zugegeben. Beendet wurde die Markierung entweder durch das Lysieren der Zellen oder das Einleiten des „chase“ (Zugabe von L-Methionin auf eine Endkonzentration von 0,1 mM, oder Ersetzen des Markierungs-Mediums durch Standardmedium). Im Anschluss an den „chase“ wurden die Zellen lysiert.

#### **4.11.1.1 Bestimmung der Einbauraten**

Um zu gewährleisten, dass unterschiedliche Signalintensitäten innerhalb einer Versuchsreihe nicht durch physiologische Veränderungen (z.B. verursacht durch einen der zugegebenen Inhibitoren), oder fehlerhaftes Arbeiten (z.B. Pipettierfehler bei der Zugabe von L-[<sup>35</sup>S]-Methionin) hervorgerufen worden sind, wurden die Einbauraten von L-[<sup>35</sup>S]-Methionin in die Gesamt-Proteinmenge bestimmt. Jeweils 5 µl Zelllysat wurde auf ein 1x1 cm großes Stück Filterpapier pipettiert und das Papier getrocknet. Anschließend wurden die Filter zuerst 5 min in frisch angesetzter, eisgekühlter, 20%iger Trichloressigsäure (TCA) inkubiert und dann in 5%iger TCA für 5 min gekocht. Nach dem Kochen wurden die Filter in eisgekühlter, 5%iger TCA und danach in einem Gemisch aus Diethylether und Ethanol (1:1) gewaschen. Das Papier wurde getrocknet und die Radioaktivität in einem β-Zähler unter Verwendung von Szintillationsflüssigkeit gemessen.

#### **4.11.2 Immunpräzipitation radioaktiv markierter Proteine**

Vor der Immunpräzipitation wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen und wenn daraus nicht präzipitiert werden sollte, wurde es verworfen. Die Zellen wurden einmal mit auf 4° C temperiertem, 10 mM PBS (pH 7,4) gewaschen. Zur Zelllyse wurden, wenn nicht anders angegeben, 60 µl Lysispuffer pro cm<sup>2</sup> Kulturfläche eingesetzt. Um die Membranbestandteile vom Lysat zu trennen, wurde das Lysat 5 min bei 20.800x g sedimentiert. Erfolgte auch eine Präzipitation aus dem Kulturüberstand wurde dieser 5 min bei 200x g zentrifugiert. Zur prä-Präzipitation wurden die Überstände mit 5,6 µl Pansorbin A (Calbiochem) 1 h lang inkubiert und anschließend 40 min bei 20.800x g zentrifugiert. Die Überstände wurden für 16 h mit 2,5 – 5 µg mAK oder 2 µl Antiserum bei 4° C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Die Präzipitation des Antigen-Antikörper-Komplex erfolgte durch eine Inkubation von 1 h mit 55 µl gewaschenem Pansorbin A (s. 4.11.2.1). Das Präzipitat

wurde wie nachfolgend beschrieben gewaschen. Alle angegebenen Volumina der Waschpuffer wurden unabhängig von der Größe des Präzipitats verwendet und die Überstände verworfen. Zuerst wurde die Präzipitations-Suspension 2 min bei 20.800x g zentrifugiert und das Präzipitat in 750 µl Neufeldpuffer resuspendiert. Diese Suspension wurde 2 min bei 20.800x g zentrifugiert und das Präzipitat in 750 µl Wasch-Immunomix-Lsg. resuspendiert. Nach dem Zentrifugieren der Suspension für 2 min bei 20.800x g erfolgte das Resuspendieren des Präzipitats in 750 µl 1,5 M KCl. Die Suspension wurde 2 min bei 20.800x g zentrifugiert. Der nachfolgende Waschschnitt wurde 2x wiederholt, hierbei wurde das Präzipitat in 750 µl 10 mM PBS (pH 7,4) resuspendiert und 2 min bei 20.800x g zentrifugiert. Schließlich wurde das Präzipitat in 120 µl Probenpuffer (unabhängig von der Größe des Präzipitats) resuspendiert und 5 min bei 95° C inkubiert. Die Suspension wurde 5 min bei 20.800x g zentrifugiert und der Überstand entweder bei -20° C gelagert oder unmittelbar für die SDS-PAGE verwendet. Eine Auf trennung der präzipitierten Proteine erfolgte durch diskontinuierliche SDS-PAGE in 10%igen Maxi-Gelen.

#### **4.11.2.1 Vorbehandlung von Pansorbin A**

Das zur Immunpräzipitation verwendete Pansorbin A wurde wie folgt vorbehandelt. 1 ml Pansorbin A Suspension wurde 5 min bei 16.000x g zentrifugiert, der Überstand, wie im folgenden immer, verworfen und das Präzipitat in 1 ml Net-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde 5 min bei 16.000x g zentrifugiert, das Präzipitat in 1 ml Net-Puffer mit 1 % SDS resuspendiert und 5 min bei 95° C inkubiert. Die Suspension wurde 5 min bei 16.000x g zentrifugiert. Der nun folgende Waschschnitt wurde 3x wiederholt. Das Präzipitat wurde in 1 ml Net-Puffer mit 5 mg/ml BSA und 0,5 % Triton X100 resuspendiert und 5 min bei 16.000x g zentrifugiert. Der nachfolgende Waschschnitt wurde 2x wiederholt, hierbei wurde das Präzipitat in 1 ml 10 mM PBS (pH 7,4) resuspendiert und 5 min bei 16.000x g zentrifugiert. Schließlich wurde das Präzipitat in einem 10fachen Volumen (w/v) 10 mM PBS (pH 7,4) mit 10 % BSA und 0,04 % NaN<sub>3</sub> resuspendiert und bei 4° C gelagert.

#### **4.11.3 Detektion der radioaktiv markierten Proteine**

Nachdem die Proteine aus der Immunpräzipitation (4.11.2) in einem 10%igen SDS-Gel aufgrund ihrer Größe voneinander getrennt wurden, wurden die Gele in eine Cellophan-Folie eingeschlagen und 2 h bei 74° C mit angelegtem Unterdruck (Membranpumpe) getrocknet. Das getrocknete Gel wurde für ca. 70 h unter Lichtausschluss auf einen Screen

(Phosphoimager) aufgelegt, bevor dieser im Phosphoimager eingelesen wurde. Sichtbar gemacht und quantifiziert wurden die Proteinbanden mit dem Programm „AIDA“.

#### ***4.12 Immunpräzipitation nicht radioaktiv markierter Proteine***

Vor der Immunpräzipitation wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen und verworfen, wenn daraus nicht präzipitiert werden sollte. Die Zellen wurden einmal mit auf 4° C temperiertem, 10 mM PBS (pH 7,4) gewaschen. Zur Zelllyse wurden, wenn nicht anders angegeben, 60 µl Lysispuffer pro cm<sup>2</sup> Zellfläche eingesetzt. Um die Membranbestandteile vom Lysat zu trennen, wurde das Lysat 5 min bei 20.800x g sedimentiert. Erfolgte auch eine Präzipitation aus dem Kulturüberstand wurde dieser 5 min bei 200x g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Überstände, wenn nicht anders angegeben, für 16 h mit 2,5 – 5 µg mAK oder 2 µl Antiserum bei 4° C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Die Präzipitation des Antigen-Antikörper-Komplex erfolgte durch eine einstündige Inkubation mit 55 µl gewaschenem Pansorbin A (s. 4.11.2.1). Aus der Suspension wurde das Präzipitat durch eine 2 min Zentrifugation bei 20.800x g sedimentiert und anschließend in 750 µl 10 mM PBS (pH 7,4) resuspendiert. Dieser Waschschritt wurde 2x durchgeführt (von hier an sind die angegebenen Volumina unabhängig von der Menge des Präzipitats). Nun wurde das Präzipitat in 120 µl Probenpuffer resuspendiert und 5 min bei 95° C inkubiert. Die Suspension wurde 5 min bei 20.800x g zentrifugiert und der Überstand entweder bei -20° C gelagert oder unmittelbar für die SDS-PAGE verwendet. Eine Auftrennung der präzipitierten Proteine erfolgte durch diskontinuierliche SDS-PAGE in 10%igen Gelen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Untersuchungen zur Prozessierung und Degradation der aminosäuresubstituierten hASA-Proteine Asp335Val, Gly86Asp, Pro377Leu, Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu

Von den 7 aminosäuresubstituierten hASA-Proteinen Asp335Val, Gly86Asp, Pro377Leu, Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu war bisher bekannt, dass sie keine enzymatische Aktivität aufweisen, eine geringere Protein-Halbwertszeit haben als wtASA, nicht phosphoryliert werden und dadurch auch nicht durch den Mannose-6-Phosphatrezeptor initiierten vesikulären Transport ins Lysosom gelangen [77-79]. Daher wurden an diesen 7 Proteinen Untersuchungen durchgeführt, die weitere Informationen über deren Prozessierung und mögliche Mechanismen zur Proteinqualitätskontrolle innerhalb des ER liefern sollten. Im Mittelpunkt stand hierbei die Prozessierung der Oligosaccharid-Seitenketten. Außerdem wurden Untersuchungen durchgeführt, die Aufschluss über den oder die Degradationswege geben sollten, da unklar war, ob alle 7 hASA-Proteine über den selben Degradationsweg abgebaut werden.

#### 5.1.1 Untersuchungen zur Prozessierung der Oligosaccharid-Seitenketten im ER und deren Einfluss auf die Degradation der aminosäuresubstituierten hASA-Proteine

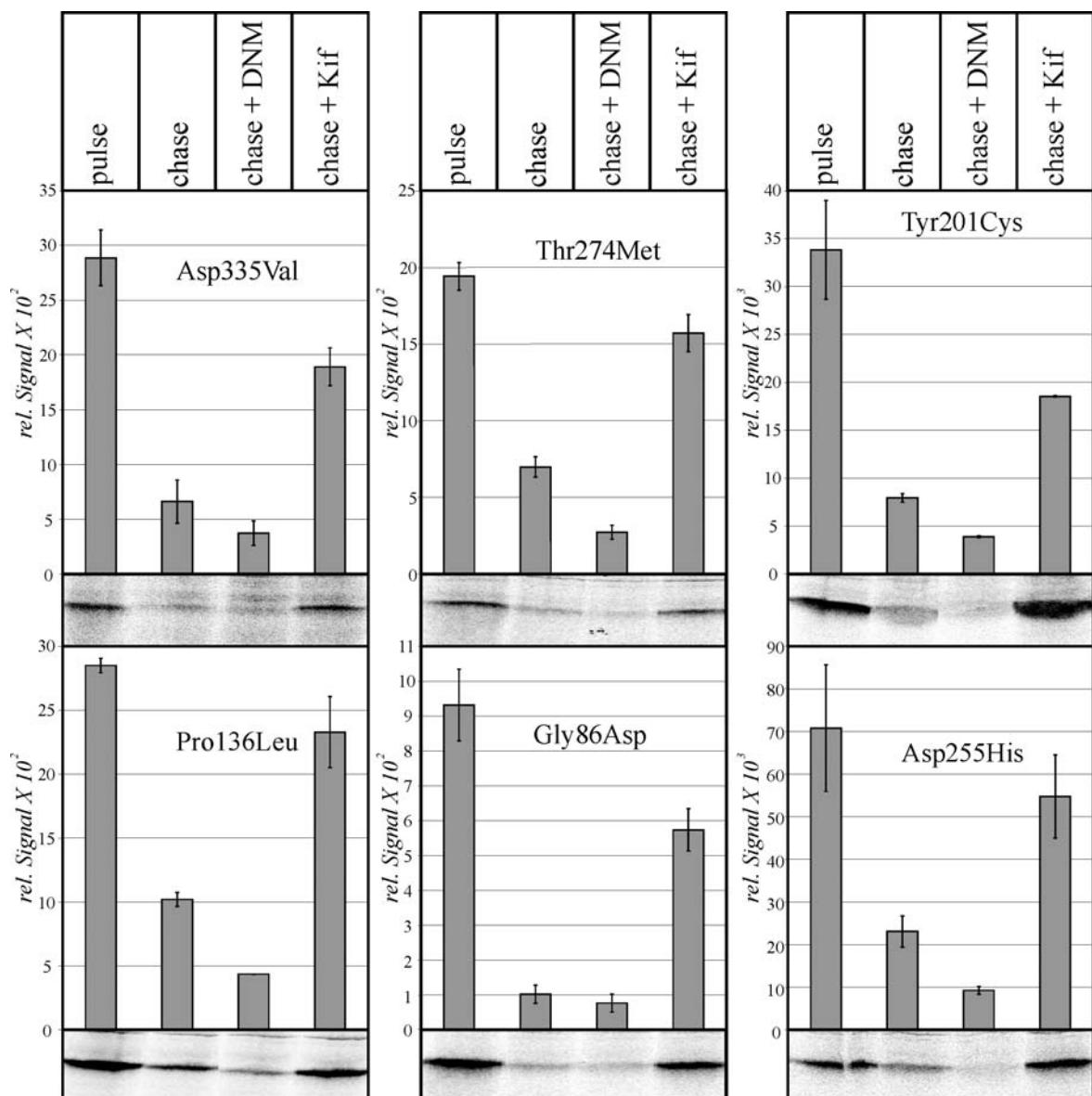
In der Literatur gibt es zahlreiche Belege dafür, dass die Prozessierung der Oligosaccharid-Seitenketten von Glykoproteinen innerhalb des ER eine maßgebliche Rolle im Protein-Qualitätskontrollsystem spielt. Diesem Kontrollsysteem angeschlossen ist die „endoplasmatic reticulum associated degradation“ (ERAD), durch die fehlgefaltete Glykoproteine degradiert werden [22, 31]. Von diesen Resultaten ausgehend wurde im Folgenden untersucht, ob und wie die Prozessierung der Oligosaccharid-Seitenketten der fehlgefalteten hASA-Proteine ebenfalls in das ER Qualitätskontrollsystem eingebunden ist.

### **5.1.1.1 Einfluss der Glykosidaseinhibitoren Deoxynojirimycin und Kifunensin auf die Degradation der hASA-Proteine Asp335Val, Gly86Asp, Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His, Pro136Leu und Pro 377 Leu**

Um einen möglichen Zusammenhang des Oligosaccharid-Seitenketten-„trimming“ mit der Prozessierung und Degradation der hASA-Proteine in stabil exprimierenden Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen in „pulse-chase“-Experimenten mit Deoxynojirimycin (DNM), einem Inhibitor der ER-Glucosidasen I und II, und Kifunensin (Kif), einem Inhibitor der ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase I, behandelt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase I durch die Erzeugung des  $\text{Man}_8\text{GlucNAc}_2$ -Strukturisomeren B in das Protein-Qualitätskontrollsystem von Glykoproteinen, die im ER prozessiert werden, involviert ist [29, 30, 32].

Die Zellen wurden für 2 h mit L-[<sup>35</sup>S]-Methionin metabolisch markiert. In Abhängigkeit von der in nicht gezeigten Vorexperimenten ermittelten Degradationsrate wurden die nachfolgenden „chase“-Zeiten so gewählt, dass bis zu 80 % der markierten Proteine in dieser Zeit abgebaut wurden.

Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, wurden alle Proteine, durch die Inhibition der ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase I mit Kif deutlich stabilisiert. Dagegen bewirkte die Inhibition der ER-Glucosidasen I und II bei allen untersuchten hASA-Proteinen eine messbare Beschleunigung der Degradationsraten. Die Versuchsergebnisse für Pro377Leu sind hier nicht dargestellt, da die Inhibitoren die gleichen Effekte wie zuvor beschrieben zeigen.



**Abbildung 7:** Einfluss der Glykosidaseinhibitoren DNM und Kif auf die Stabilität der aminosäuresubstituierten hASA-Moleküle

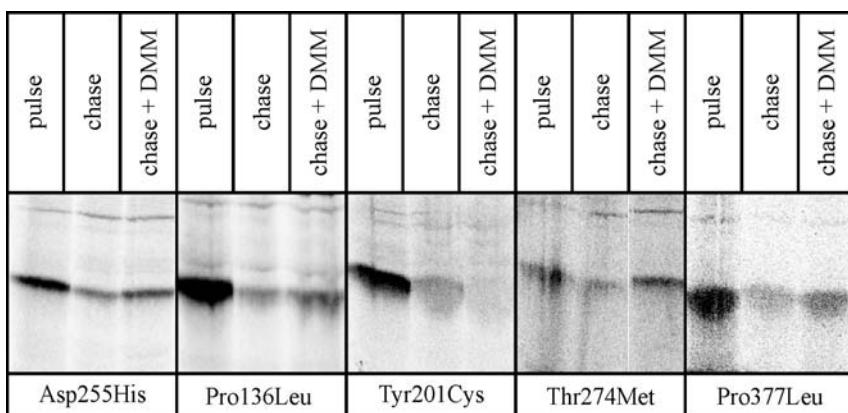
Stabil transfizierte LTK<sup>-</sup>-Zellen, die die jeweilige hASA exprimierten, wurden für 2 h mit 30 µCi/ml L-[<sup>35</sup>S]-Methionin markiert. Der „chase“ erfolgte durch Zugabe von L-Methionin auf eine Endkonzentration von 125 µM (Verhältnis L-[<sup>35</sup>S]-Methionin/L-Methionin 1/12500) und wurde zeitlich den jeweiligen Degradationsraten angepasst (Asp335Val, 4,5 h; Gly86Asp, 5,25 h; Tyr201Cys, 5 h; Thr274Met, 4,5 h; Asp255His, 4,5 h; Pro136Leu, 4,5 h). Während der „chase“-Zeiten wurden die Zellen, wie über den Spuren beschrieben, mit 1 mM DNM oder 0,1 mM Kif inkubiert. Nach dem Lysieren der Zellen wurde die hASA mit dem polyklonalen ASA-Antiserum BE#3 aus dem Homogenat immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE (10%iges Gel) getrennt und mit einem Phosphoimager sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit dem Programm AIDA, die Signalintensität (rel. Signal) resultiert aus der densitometrischen Vermessung und Integration der Signale und ist eine programmspezifische Größe. Unter jeder graphisch dargestellten Quantifizierung ist repräsentativ die Fluorographie eines Experimentes abgebildet. Die Säulenhöhe ergibt sich aus dem Mittelwert von 2 Experimenten, der Fehlerbalken bezieht sich auf den entsprechenden Minimal- bzw. Maximalwert.

### 5.1.1.2 Einfluss des Mannosidaseinhibitors Deoxymannojirimycin auf die Degradation der hASA-Proteine Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His, Pro136Leu und Pro377Leu

Aus der Literatur geht hervor, dass die ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase II bei fehlgefalteten Glykoproteinen das Man<sub>8</sub>GlucNAc<sub>2</sub>-Strukturisomer C erzeugt, welches ein Erkennungssignal für den nicht-proteasomalen Degradationsweg ist [22]. Widersprüchliche Angaben finden sich aber in der Literatur über die Wirkweise des ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase II Inhibitors Deoxymannojirimycin (DMM). Hier gibt es Kontroversen über die mögliche zusätzliche Inhibition der ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase I [84-86].

Um zu untersuchen, ob die Prozessierung und Qualitätskontrolle der hASA-Proteine Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His, Pro136Leu und Pro377Leu durch DMM beeinflusst wird, wurden kultivierte Zellen mit DMM in einem „pulse-chase“-Experiment behandelt.

Abbildung 8 zeigt die Immunpräzipitate aus Versuchen mit den aminosäuresubstituierten Proteinen Pro377Leu, Thr274Met, Asp255His, Tyr201Cys und Pro136Leu. Die Proteine Pro377Leu, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu wurden durch die Inkubation mit DMM deutlich stabilisiert. Das Protein Tyr201Cys wurde nicht stabilisiert. Es erfolgte wie bei der Inkubation mit DMM eine beschleunigte Degradation. Dies ist die erste festgestellte Abweichung der bisher uniformen Effekte von Glykosidaseinhibitoren auf die Stabilisierung, bzw. beschleunigte Degradierung der untersuchten hASA-Proteine.

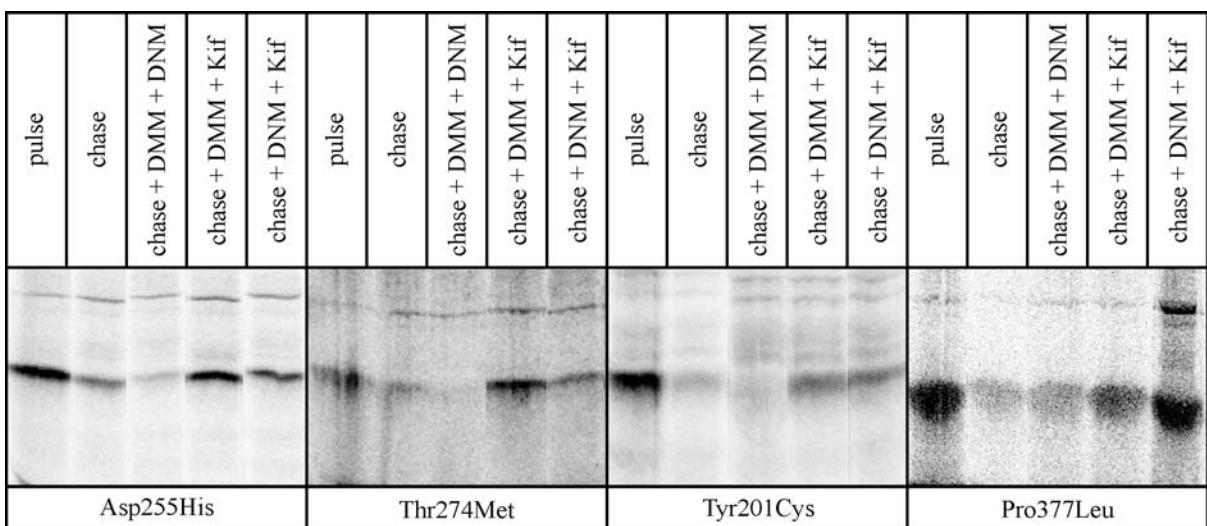


**Abbildung 8: Inhibition der ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase II mit DMM**

Die mit der jeweils mutierten hASA-cDNA stabil transfizierten LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden für 2 h mit 30  $\mu$ Ci/ml L-[<sup>35</sup>S]-Methionin markiert. Der „chase“ erfolgte durch Zugabe von L-Methionin auf eine Endkonzentration von 125  $\mu$ M (Verhältnis L-[<sup>35</sup>S]-Methionin/L-Methionin 1/12500) und wurde zeitlich den jeweiligen Degradationsraten angepasst (Pro377Leu 3,25 h, Thr274Met 4,25 h, Asp255His 4,5 h, Tyr201Cys 5,75 h, Pro136Leu 5 h). Während der „chase“-Zeiten wurden die Zellen wie über den Spuren beschrieben, mit 1 mM DMM behandelt. Nach dem Lysieren der Zellen wurde die hASA mit dem polyklonalen ASA-Antiserum BE#3 aus dem Homogenat immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE (10%iges Gel) getrennt und mit einem Phosphoimager sichtbar gemacht.

### 5.1.1.3 Untersuchungen mit den kombinierten Glykosidaseinhibitoren DMM/DNM, DMM/Kif und DNM/Kif

Um die Reihenfolge beim Prozessieren der Oligosaccharid-Seitenketten, insbesondere die terminale Deglucosylierung und die Erzeugung der Man<sub>8</sub>GlucNAc<sub>2</sub>-Strukturisomere B und C zu untersuchen, wurde die Oligosaccharid Prozessierung durch die Kombination verschiedener Glykosidaseinhibitoren gehemmt. Wie in den Abschnitten 5.1.1.1 und 5.1.1.2 beschrieben, wurden „pulse-chase“-Experimente durchgeführt. Dabei wurden stabil transfizierte Zellen, welche die hASA-Proteine Pro377Leu, Thr274Met, Asp255His und Tyr201Cys exprimierten, gleichzeitig mit DMM/DNM, DMM/Kif oder DNM/Kif behandelt.



**Abbildung 9: Untersuchungen mit den Glykosidaseinhibitor-Kombinationen DMM/DNM, DMM/Kif und DNM/Kif**

Die mit der jeweils mutierten hASA-cDNA stabil transfizierten LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden für 2h mit 30 µCi/ml L-[<sup>35</sup>S]-Methionin markiert. Der „chase“ erfolgte durch Zugabe von L-Methionin auf eine Endkonzentration von 125 µM (Verhältnis L-[<sup>35</sup>S]-Methionin/L-Methionin 1/12500) und wurde zeitlich den jeweiligen Degradationsraten angepasst (Pro377Leu 3,25 h, Thr274Met 4,25 h, Asp255His 4,5 h, Tyr201Cys 5 h). Während der „chase“-Zeiten wurden die Zellen, wie über den Spuren beschrieben, mit 1 mM DMM/ 1 mM DNM, 1 mM DMM/ 0,1 mM Kif oder 1 mM DNM/ 0,1 mM Kif inkubiert. Nach dem Lysieren der Zellen wurde die hASA mit dem polyklonalen ASA-Antiserum BE#3 aus dem Homogenat immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE (10%iges Gel) aufgereinigt. Die Gele wurden getrocknet und die ASA mit einem Phosphoimager sichtbar gemacht.

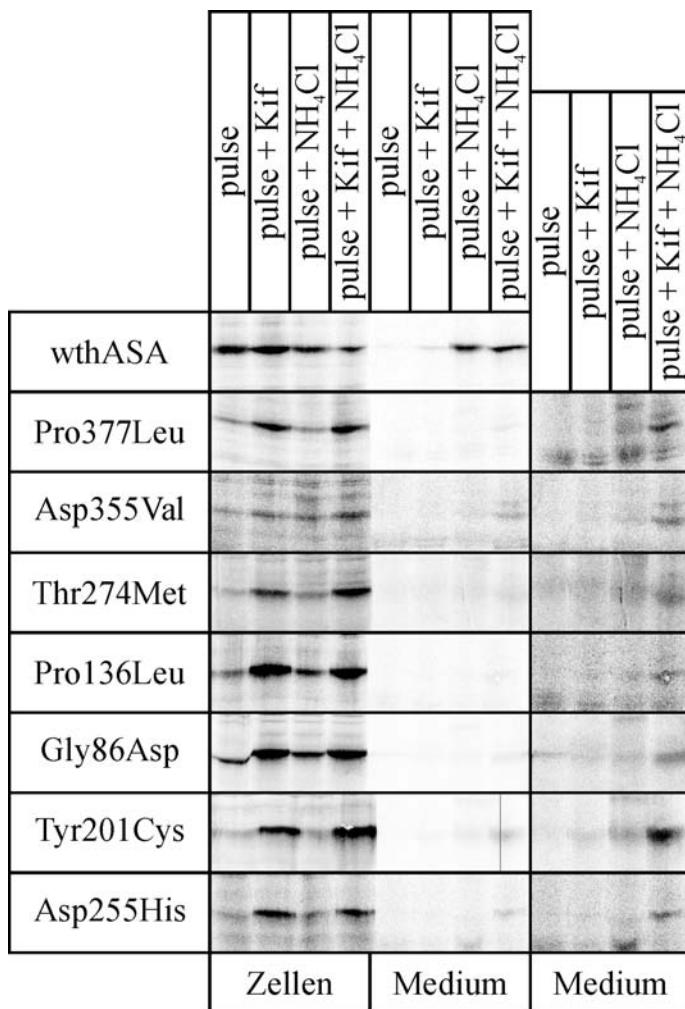
Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche. Bei der Inkubation mit DMM/DNM ist offensichtlich der destabilisierende Effekt des DNM dominant. Alle 4 untersuchten Proteine werden schneller abgebaut, wie auch bei den Zellen, die nur mit DNM behandelt wurden (s. Abbildung 7). Wurden DMM und Kif kombiniert, reduzieren die Degradationsgeschwindigkeit einheitlich bei allen 4 Proteinen. Nach der Behandlung mit

DNM und Kif ist ebenfalls eine Stabilisierung der 4 hASA-Proteine festzustellen. Beim quantitativen Vergleich der Kombinationen DMM/Kif und DNM/Kif unterscheiden sich aber die Proteine Asp255His und Thr274Met von den Proteinen Tyr201Cys und Pro377Leu. Asp255His und Thr274Met werden beide deutlich stärker durch die Behandlung mit DMM/Kif stabilisiert, wohingegen Tyr201Cys von beiden Wirkstoffkombinationen gleich stark stabilisiert wird. Im Vergleich mit den beiden zuvor genannten Proteinen ist die Degradationsreduktion durch DMM/Kif schwächer und ähnelt damit der Stabilisierung durch DNM/Kif. Die stabilisierende Wirkung der beiden Kif haltigen Kombinationen ist bei Pro377Leu im Vergleich zu Asp255His und Thr274Met genau umgekehrt. Hier zeigt die gemeinsame Behandlung mit DNM und Kif einen deutlich stabilisierenderen Effekt als die Kombination DMM/Kif. Auch diese Ergebnisse deuten also auf Unterschiede bei der Prozessierung der hASA-Proteine Pro377Leu, Thr274Met, Asp255His und Tyr201Cys hin.

#### ***5.1.1.4 Untersuchung der aus der ER $\alpha$ 1,2-Mannosidase I Inhibition resultierenden Folgen für die aminosäuresubstituierten hASA-Proteine***

hASA wird nach dem Verlassen des ER im cis-Golgi durch die Phosphotransferase an den Oligosaccharid-Seitenketten I und III phosphoryliert [53, 69]. Die Phosphotransferase phosphoryliert Mannosen in N-verknüpften Oligosaccharid-Seitenketten an Position 6. Im trans-Golgi werden die Mannose-6-Phosphatgruppen (M6P) an einen M6P-Rezeptor gebunden, welcher den weiteren vesikulären Transport lysosomaler Enzyme ins Lysosom steuert [68]. Wird dem Medium kultivierter Zellen Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) zugegeben, kommt es zu einer Reduktion des pH-Gradienten zwischen Cytosol und Lysosom. Hierdurch werden lysosomale Enzyme durch den M6P-Rezeptor nicht mehr in die Lysosomen transportiert sondern ins Kulturmedium sezerniert [87, 88]. Von den 7 hASA-Proteinen Asp335Val, Gly86Asp, Pro377Leu, Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu ist bekannt, dass sie unter dem Einfluss von  $\text{NH}_4\text{Cl}$  nicht sezerniert werden.

Um einen möglichen Effekt der proteinstabilisierenden Wirkung von Kif auf die weitere Prozessierung und Proteinsortierung zu untersuchen, wurden die Zellen für 15 h in Gegenwart von Kif und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  metabolisch markiert. Nach der Markierung wurden die hASA-Proteine aus den Medien und den Zelllysaten immunpräzipitiert. Zur Kontrolle wurde der gleiche Versuch mit humaner wtASA durchgeführt.



**Abbildung 10: Einfluss von Kif auf die Retention der aminosäuresubstituierten hASA-Proteine im ER**

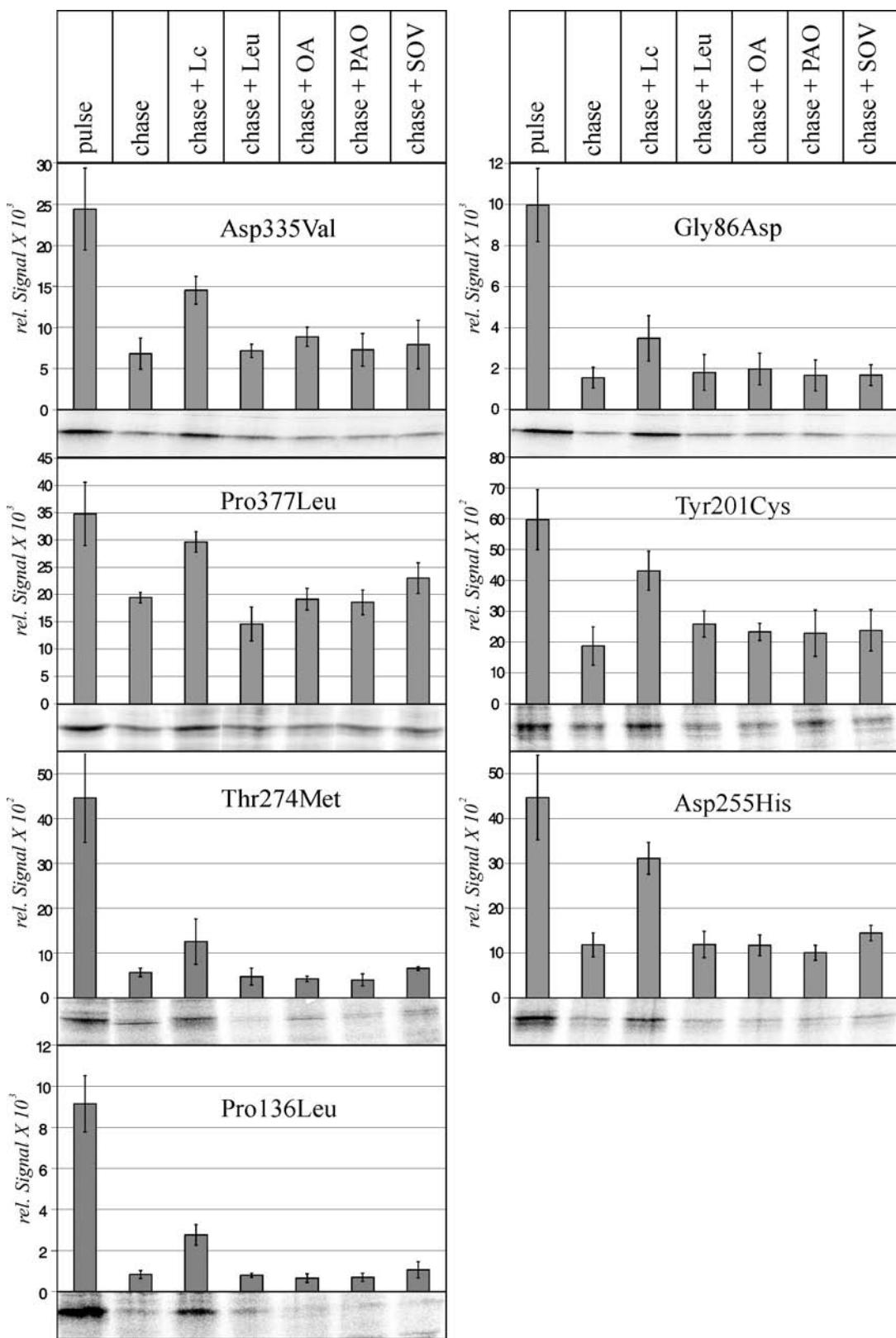
Die mit der jeweils mutierten hASA-cDNA stabil transfizierten LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden für 15 h mit 90 µCi/ml L-[<sup>35</sup>S]-Methionin markiert. Während der Markierung wurde wie über den Spuren beschrieben ein Teil der Zellen mit 10 mM NH<sub>4</sub>Cl und/oder mit 1 mM Kif behandelt. Vor dem Lysieren der Zellen wurde das Medium abgenommen und die hASA mit dem polyklonalen ASA-Antiserum BE#3 aus dem Homogenat und dem Medium immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE (10%iges Gel) aufgereinigt und mit einem Phosphoimager sichtbar gemacht. Die zweite Spalte mit den Präzipitaten aus dem Medium entspricht der Ersten, der hell-dunkel-Kontrast wurde hier stark abgesenkt, um auch sehr geringe Proteinmengen sichtbar zu machen.

Die Ergebnisse in Abbildung 10 zeigen, dass wtASA in Gegenwart von NH<sub>4</sub>Cl eine deutlich gesteigerte Sekretionsrate aufweist. Im Gegensatz dazu wurden nur ca. 5 % der exprimierten hASA-Proteine in Gegenwart von Kif ins Medium sezerniert. Um dies zu veranschaulichen wurde, wie in den rechten Spalten zu sehen ist, der hell-dunkel-Kontrast mit Hilfe der Software stark abgesenkt. In der linken und mittleren Spalte sind die Präzipitationen der Zelllysate und Medien bei gleicher Helligkeit zu sehen. Der marginale Effekt von Kif ist bei allen 7 aminosäuresubstituierten hASA-Proteinen gleich.

### 5.1.2 Untersuchungen zum Degradationsweg der hASA-Proteine *Asp335Val*, *Gly86Asp*, *Pro377Leu*, *Tyr201Cys*, *Thr274Met*, *Asp255His* und *Pro136Leu*

Von einigen im ER prozessierten missgefalteten Proteinen ist bekannt, dass sie durch einen proteasomalen und einen nicht-proteasomalen Degradationsweg abgebaut werden [29, 30]. Um zu untersuchen, durch welchen Degradationsweg die aminosäuresubstituierten hASA-Proteine degradiert werden, wurden Zellen, die diese Proteine stabil überexprimieren, einer metabolischen Markierung in „pulse-chase“-Experimenten unterzogen. Während des „chase“ wurden dem Kulturmedium Inhibitoren der beiden angeführten Degradationswege zugesetzt [29, 30]. Lactacystin (Lc) inhibiert irreversibel das 20S Proteasom. Es wurde bereits während des „pulse“ zugesetzt, da sich durch eine spontane Konversion zuerst der aktive Inhibitor, clasto-Lactacystin- $\beta$ -Lacton, bilden musste. Leupeptin (Lp) inhibiert in der verwendeten Konzentration lysosomale Cystein- und Serin-Proteasen, die unter anderem an der Degradation aminosäuresubstituierter hASA-Proteine beteiligt sind, welche ins Lysosom gelangen [81]. Ocadaic Acid (OA) inhibiert Serin- und Threonin-Phosphatasen. Es wurde gezeigt, dass Phenylarsinoxid (PAO) und Natrium Orthovanadat (SOV) missgefaltetes  $\alpha$ 1-Antitrypsin ( $\alpha$ 1-AT) und PAO Immunglobulin (Ig) Ketten stabilisieren [29, 30]. Beide Substanzen haben ein breites, nicht komplett analysiertes Wirkspektrum auf Zellen, wozu unter anderem ein inhibitorischer Effekt auf Tyrosin-Phosphatasen gehört.

In der gewählten Versuchsdurchführung wurden die Zellen für einen Zeitraum von 2 h mit L-[<sup>35</sup>S]-Methionin metabolisch markiert. Die anschließende „chase“-Zeit wurde in Abhängigkeit der Degradationsrate so gewählt, dass bis zu 80 % der markierten Proteine in dieser Zeit degradiert wurden. Abbildung 11 zeigt die quantifizierten Versuchsergebnisse der 7 untersuchten hASA-Proteine. Bei allen 7 Proteinen wird die Degradationsgeschwindigkeit durch eine Inhibition des Proteasoms mit Lc reduziert, führte aber in keinem Fall zu einer vollständigen Stabilisierung der untersuchten Proteine. Ein Effekt der anderen Inhibitoren ist nicht zu erkennen.



**Abbildung 11: Einfluss der Protease- und Phosphataseinhibitoren Lc, Lp, OA, PAO und SOV auf die Stabilität der aminosäuresubstituierten hASA-Proteine**

Die mit der jeweils mutierten hASA-cDNA stabil transfizierten LTK<sup>-</sup>-Zellen wurden für 2 h mit 30 µCi/ml L-[<sup>35</sup>S]-Methionin markiert. Der „chase“ erfolgte durch Zugabe von L-Methionin auf eine Endkonzentration von 125 µM (Verhältnis L-[<sup>35</sup>S]-Methionin/L-Methionin 1/12500) und wurde zeitlich den jeweiligen Expressions- und

Degradationsraten angepasst (Asp335Val, 4,5 h; Gly86Asp, 5,25 h; Pro377Leu, 4 h; Tyr201Cys, 6 h; Thr274Met, 4,5 h; Asp255His, 4,5 h; Pro136Leu, 8 h). Während der „chase“-Zeiten wurden die Zellen wie über den Spuren beschrieben, mit 0,2 mM Lp, 0,1 mM OA, 0,8 mM PAO oder 0,5 mM SOV behandelt. Die Inkubation mit 25 µM Lc erfolgte während des „pulse“ und des „chase“. Nach dem Lysieren der Zellen wurde die hASA mit dem polyklonalen ASA-Antiserum BE#3 aus dem Homogenat immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE (10%iges Gel) getrennt und mit einem Phosphoimager sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Signale erfolgte mit dem Programm AIDA, die Signalintensität (rel. Signal) resultiert aus der densitometrischen Vermessung und Integration der Signale und ist eine programmspezifische Größe. Unter jeder graphisch dargestellten Quantifizierung ist repräsentativ die Fluorographie eines Experimentes abgebildet. In den Diagrammen ergibt sich die Säulenhöhe aus dem Mittelwert von 4 Experimenten, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

## 5.2 Untersuchung der Interaktionen von wtASA mit den aminosäuresubstituierten hASA-Proteinen im ER

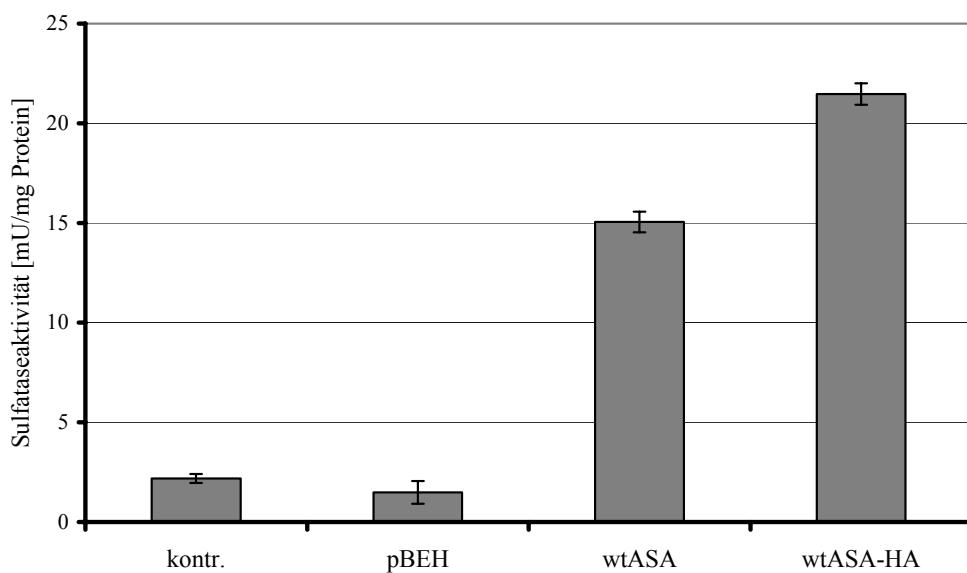
Aus Röntgenkristallstrukturuntersuchungen und dem Laufverhalten in der Gelfiltration ist bekannt, dass wtASA im neutralen Milieu als Dimer und im sauren Milieu als Oktamer vorliegt [71, 72, 89]. Daher wurde angenommen, dass die hASA-Proteine bereits im ER zu Dimeren assoziieren und die Oktamerisierung aufgrund des sauren pH-Wertes in den Lysosomen stattfindet. Im Falle einer Dimerisierung innerhalb des ER stellen sich folgende Fragen: Ist auch eine Assoziation zwischen wtASA- und aminosäuresubstituierten hASA-Proteinen möglich, und wenn ja, welche Konsequenzen resultieren daraus für die unterschiedlichen Untereinheiten? Um dieser Fragestellung mit Hilfe der Immunpräzipitation und SDS-PAGE nachgehen zu können, müssen u. a. zwei Voraussetzungen erfüllt sein: Zum einen muss gewährleistet sein, dass der zur Präzipitation verwendete Antikörper nur eine Untereinheit erkennt, und zum anderen müssen die Bindungspartner einen Massenunterschied aufweisen durch den sich die Proteine in der SDS-PAGE voneinander trennen. Aus diesem Grund wurde die hASA am C-Terminus mit einem, aus einer Kette von 9 Aminosäuren bestehenden, 1 kDa schweren, HA-Peptid fusioniert. Das HA-Peptid kann mit dem monoklonalen Antikörper (mAK) aus den Hybridomazellen Klon 12CA5 präzipitiert, oder im Westernblot detektiert werden.

### 5.2.1 Generierung der HA markierten wtASA (wtASA-HA)

Die wtASA-HA-cDNA wurde mittels PCR generiert und in den pBEH Expressionsvektor kloniert. Aufgrund der strukturellen Nähe des N-Terminus zum aktiven Zentrum der ASA wurde der HA-Tag C-terminal angefügt.

### 5.2.1.1 Überprüfung der enzymatischen Aktivität der wtASA-HA

Um sicher zu stellen, dass wtASA-HA die gleichen physiologischen Eigenschaften aufweist wie wtASA, wurde die wtASA-HA in BHK21 Zellen transient exprimiert und die Enzymaktivität gemessen. In Abbildung 12 sind die gemessenen Enzymaktivitäten von untransfizierten, mit wtASA- und wtASA-HA-cDNA transfizierten Zellen dargestellt. wtASA-HA transfizierte Zellen weisen ebenso wie wtASA transfizierte Zellen eine erhöhte Sulfataseaktivität auf.



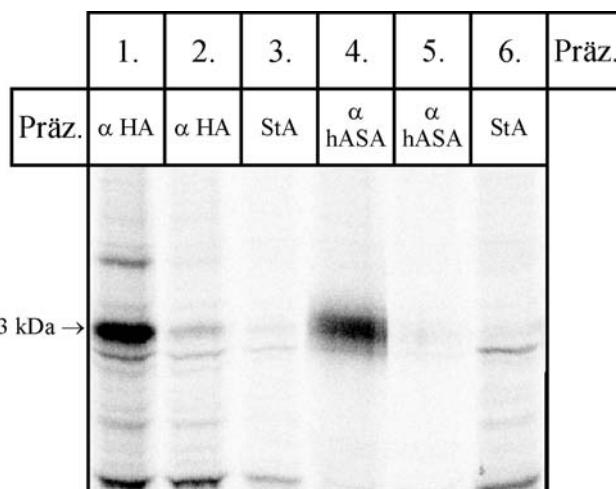
**Abbildung 12: Sulfataseaktivität von mit wtASA und wtASA-HA-cDNA transient transfizierten BHK21 Zellen**

BHK21 Zellen wurden in einer 24-well-Platte mit wtASA- oder wtASA-HA-cDNA transfiziert. Als Kontrolle (kontr.) dienten untransfizierte bzw. mit Leervektor (pBEH) transfizierte Zellen. 20 h nach der Transfektion erfolgte die Zelllyse. Aus dem Lysat wurde der Proteingehalt nach Lowry bestimmt und die Sulfataseaktivität mit p-Nitrocatecholsulfat, Substrat der ASA, gemessen. Der Fehlerbalken ergibt sich aus dem Mittelwert von 3 parallel durchgeführten Experimenten.

### 5.2.1.2 Untersuchungen der Expression und Sekretion der wtASA-HA

Wie dargestellt (5.2.1.1), weist das in BHK21 Zellen überexprimierte wtASA-HA-Protein eine zur wtASA vergleichbare Sulfataseaktivität auf. Daher wurde im nächsten Schritt die Präzipitierbarkeit durch den HA-mAK geprüft. Da, wie in einigen der folgenden Versuche zu sehen sein wird, eine quantitative Präzipitation der wtASA-HA notwendig war, wurde ein Versuchsprotokoll erstellt, mit dessen Hilfe die optimalen Bedingungen für die quantitative Präzipitation sofort ermittelt werden konnten. BHK21 Zellen wurden mit wtASA-HA-cDNA transient transfiziert und anschließend mit [<sup>35</sup>S]-Methionin metabolisch markiert. Nach dem

Lysieren der Zellen wurde 2x mit HA-mAK präzipitiert. Um sicher zu gehen, dass der gesamte mAK durch das eingesetzte Pansorbin A aus dem Homogenat präzipitiert worden ist, erfolgte eine dritte Präzipitation ausschließlich mit Pansorbin A. Nun wurde, wiederum zweimal, mit polyklonalem Antiserum gegen hASA präzipitiert. Zum Abschluss erfolgte eine letzte Präzipitation mit Pansorbin A. In Abbildung 13 ist die Fluorographie des Gels abgebildet, durch das jeweils die Proteine der 6 aufeinander folgenden Präzipitate voneinander getrennt wurden. Im ersten Präzipitat, hergestellt unter Verwendung des HA-mAK, ist die wtASA-HA-Bande deutlich zu erkennen, wohingegen in der ersten Nachpräzipitation nur noch ein marginaler Rest der wtASA-HA präzipitiert werden konnte. In der dritten Nachpräzipitation ist keine wtASA-HA Bande mehr zu erkennen. In der ersten Nachpräzipitation mit dem polyklonalen Antiserum gegen die hASA ist wieder deutlich eine Bande auf der Laufhöhe der wtASA-HA zu erkennen, woraus folgt, dass die wtASA-HA nicht vollständig durch den HA-mAK präzipitiert werden konnte. In den beiden nachfolgenden Präzipitaten fehlt diese Bande.



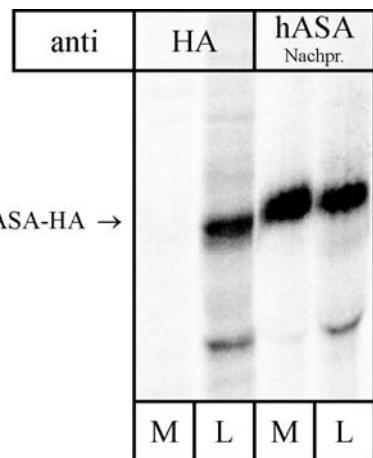
**Abbildung 13: Bestimmung der Bedingungen für die quantitative Immunpräzipitation der wtASA-HA mit dem HA-mAK**

Transient mit wtASA-HA-cDNA transfizierte BHK21 Zellen wurden für 3 h mit 30  $\mu$ Ci/ml L-[35S]-Methionin markiert. Nach Lysieren der Zellen wurde die wtASA-HA nach folgendem Schema sequentiell präzipitiert:

1. 10  $\mu$ g HA-mAK, 12CA5, 150  $\mu$ l Pansorbin A
2. 10  $\mu$ g HA-mAK, 12CA5, 150  $\mu$ l Pansorbin A
3. 100  $\mu$ l Pansorbin A
4. 8  $\mu$ l polyklonales Antiserum, 1057, 160  $\mu$ l Pansorbin A
5. 8  $\mu$ l polyklonales Antiserum, 1057, 160  $\mu$ l Pansorbin A
6. 100  $\mu$ l Pansorbin A

Pansorbin wurde jeweils mit 120  $\mu$ l Lämmlipuffer aufgekocht und die in den Proben enthaltenen Proteine durch SDS-PAGE (10%iges Gel) voneinander getrennt. Das Gel wurde getrocknet und die ASA mit einem Phosphoimager sichtbar gemacht.

Um zu prüfen ob die wtASA-HA durch die M6P-Rezeptoren in die Lysosomen transportiert wird, wurde nun die Präzipitierbarkeit des Proteins aus dem Kulturmediumüberstand nach einer Behandlung mit NH<sub>4</sub>Cl untersucht. BHK21 Zellen wurden wieder mit wtASA-HA-cDNA transient transfiziert und mit [<sup>35</sup>S]-Methionin metabolisch markiert. Dem Medium wurde während der Markierung NH<sub>4</sub>Cl zugesetzt. Nach dem Ernten der Zellen wurden Medium und Zellysat zuerst mit dem HA-mAK gegen die wtASA-HA präzipitiert und anschließend erfolgte eine Nachpräzipitation mit Antiserum gegen die hASA. Wie in Abbildung 14 zu erkennen ist, konnte die wtASA-HA aus dem Medium nicht mit dem HA-mAK präzipitiert werden. Dass wtASA-HA-Protein sezerniert wurde, zeigt die Nachpräzipitation des Mediums. In diesem Präzipitat ist eine deutliche von der wtASA-HA stammende Bande zu erkennen.

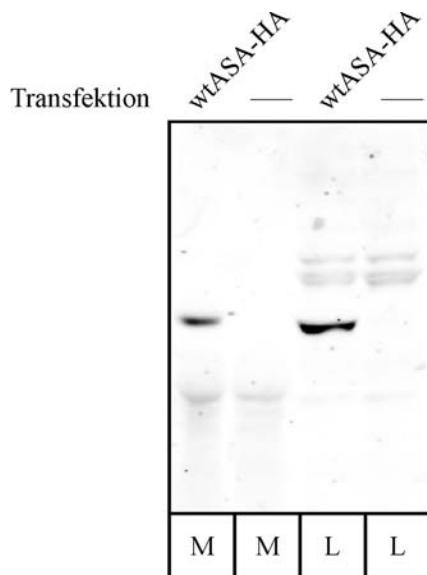


**Abbildung 14: Immunpräzipitation von wtASA-HA, mit dem HA-mAK, aus dem Medium NH<sub>4</sub>Cl behandelter BHK21 Zellen**

BHK21 Zellen wurden in einer 24-well-Platte mit wtASA-HA-cDNA transfiziert. Anschließend wurde 16 h mit 30 µCi/ml L-[35S]-Methionin in Gegenwart von 10 mM NH4Cl markiert. Vor dem Lysieren der Zellen wurde das Medium abgenommen und die wtASA-HA zuerst mit dem HA-mAK aus dem Medium (M) und dem Zelllysat (L) immunpräzipitiert. Im Anschluss wurde mit polyklonalem Serum gegen die hASA aus dem Medium und Lysat nachpräzipitiert. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (8%iges Gel) aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und die ASA mit einem Phosphoimager sichtbar gemacht.

Aus den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche geht hervor, dass das HA-Epitop während der Prozessierung im ER oder Golgi-Apparat entweder abgespalten wird, oder durch eine Konformationsänderung für eine Immunpräzipitation mit dem HA-mAK aus sterischen Gründen nicht mehr zugänglich ist. Um zu prüfen, ob das HA-Epitop unter denaturierenden Bedingungen detektiert werden kann, wurden wtASA-HA exprimierende BHK21 Zellen mit NH<sub>4</sub>Cl-haltigem Medium kultiviert. Das Medium wurde mit einem polyklonalen gegen die

hASA gerichteten Antiserum immunpräzipitiert und das Präzipitat im Westernblot analysiert. Zur Detektion der wtASA-HA auf dem Blot wurde HA-mAK verwendet. Wie aus dem in Abbildung 15 gezeigten Blot hervorgeht, hat die aus dem Medium präzipitierte wtASA offensichtlich noch das HA-Epitop.



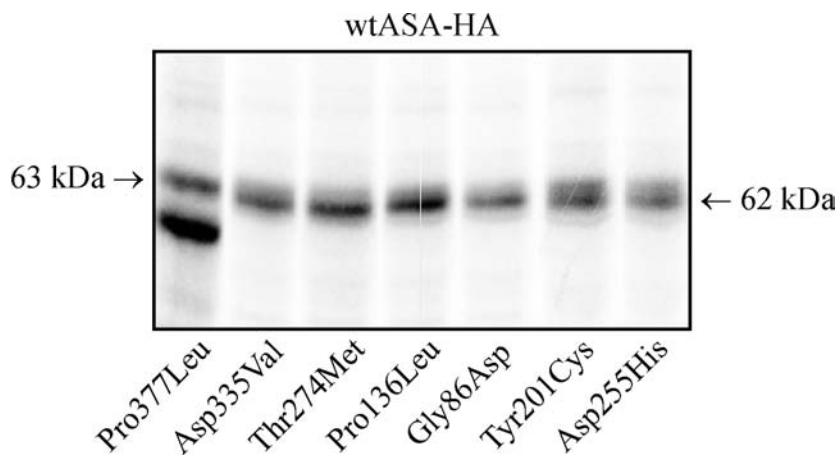
**Abbildung 15: Westernblot Analyse von wtASA-HA Präzipitaten mit HA-mAK**

Transient transfizierte BHK21 Zellen wurden 32 h mit 10 mM NH<sub>4</sub>Cl Kulturmedium inkubiert (das Medium wurde nach den ersten 10 h gewechselt). Das gesamte Medium (M) wurde mit einem gegen die hASA gerichteten Antiserum (1057) immunpräzipitiert. Das Präzipitat sowie eine Probe des nach der Inkubation hergestellten Zelllysats (L) wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen und die Proteine nach dem Lauf im elektrischen Feld auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Zur Kontrolle wurde der gleiche Versuch mit untransfizierten Zellen durchgeführt (-). Der HA Nachweis auf dem Blot erfolgte mit einem biotinylierten HA-mAK und Fluorophor markiertem Streptavidin. Die ASA wurde mit einem Li-Cor Laserscanner sichtbar gemacht.

### 5.2.2 Immunpräzipitation von wtASA-HA aus Zellen, die HA markierte und unmarkierte hASA exprimierten

Um eine mögliche Assoziation von wtASA-HA mit den hASA-Proteinen Asp335Val, Gly86Asp, Pro377Leu, Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu zu untersuchen, wurden BHK21 Zellen mit der wtASA-HA-cDNA sowie jeweils mit der cDNA der aminosäuresubstituierten Proteine cotransfiziert. Nach der metabolischen Markierung wurde aus dem Lysat mit dem HA-mAK präzipitiert. In der ersten Spalte von Abbildung 16 sind deutlich zwei voneinander abgegrenzte Banden zu erkennen. Hier wurde das Präzipitat der wtASA-HA und Pro377Leu cotransfizierten Zellen auf das Gel aufgetragen. Die obere 63 kDa Bande stammt von der wtASA-HA, die untere von dem Protein Pro377Leu.

Aufgrund der Aminosäuresubstitution kommt es bei Pro377Leu nicht zur Glykosylierung der Position Asn350. In Folge dessen haben die Proteine wtASA-HA und Pro377Leu im SDS-Gel ein sehr unterschiedliches Laufverhalten. In den Präzipitaten aus den Zellen der anderen sechs Cotransfektionen sind ebenfalls Doppelbanden zu erkennen, die Bandenabgrenzung ist aber aufgrund der verhältnismäßig geringen Gewichtsdifferenz von einem kDa nicht so groß.



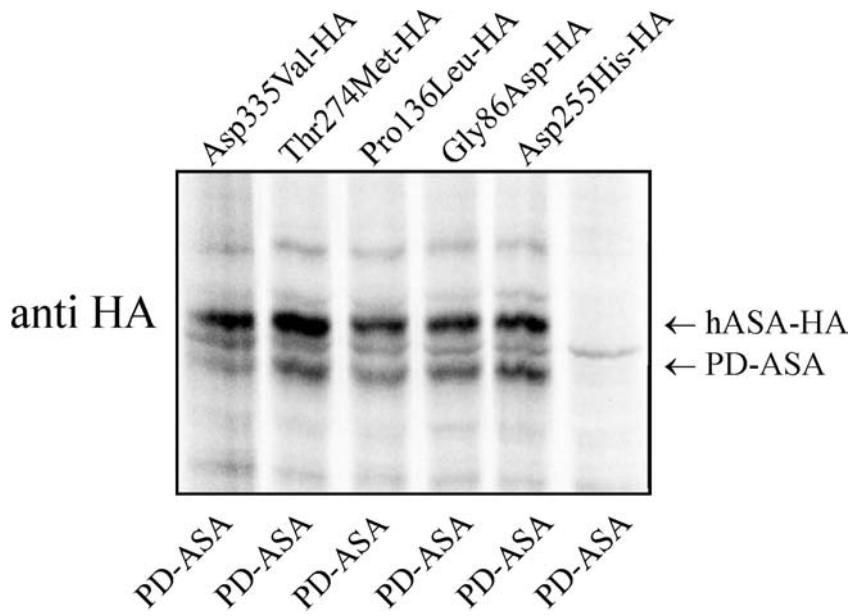
**Abbildung 16: Immunpräzipitation der wtASA-HA nach Cotransfektion mit wtASA-HA-cDNA und der cDNA der hASA-Proteine Asp335Val, Gly86Asp, Pro377Leu, Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu**

Transient mit wtASA-HA-cDNA und der cDNA der hASA-Proteine Asp335Val, Gly86Asp, Pro377Leu, Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu cotransfizierte BHK21 Zellen wurden für 2 h mit 30 µCi/ml L-[35S]-Methionin markiert. Nach Lysieren der Zellen wurde die wtASA-HA mit dem HA-mAK aus dem Lysat immunpräzipitiert und die Proteine durch SDS-PAGE (10%iges Gel) aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und die ASA mit einem Phosphoimager sichtbar gemacht.

Da nicht alle Doppelbanden in Abbildung 16 gut zu erkennen sind und um sicher zu stellen, dass es zu einer Assoziation zwischen den 5 hASA-Proteinen, Asp335Val, Gly86Asp, Thr274Met, Asp255His, Pro136Leu und der wtASA kommen kann, wurden BHK21 Zellen mit der cDNA der 5 HA-Peptid fusionierten aminosäuresubstituierten Proteine sowie der cDNA der pseudodefizienten (PD) Form der hASA cotransfiziert.

Die PD-ASA verhält sich physiologisch ähnlich wie wtASA. Das Protein wird nach dem Verlassen des ER phosphoryliert und durch den M6P-Rezeptor in die Lysosomen transportiert. Aufgrund der Aminosäuresubstitution Asn350Ser wird das Protein jedoch in Position Ser350 nicht glykosyliert. In der SDS-PAGE ist aus diesem Grund eine deutliche Bandenabgrenzung zu den hASA-Proteinen mit 3 Oligosaccharid-Seitenketten gewährleistet. Somit ergeben sich bessere Möglichkeiten, eine Assoziation zu untersuchen.

Nach der metabolischen Markierung wurden die HA-Epitop markierten aminosäuresubstituierten Proteine mit dem HA-mAK immunpräzipitiert. Wie in Abbildung 17 deutlich zu erkennen ist, wurde in allen Fällen die PD-ASA durch die markierten hASA-Proteine copräzipitiert. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass alle 7 aminosäuresubstituierten hASA-Proteine bei einer Coexpression in der Lage sind mit der wtASA zu assoziieren.



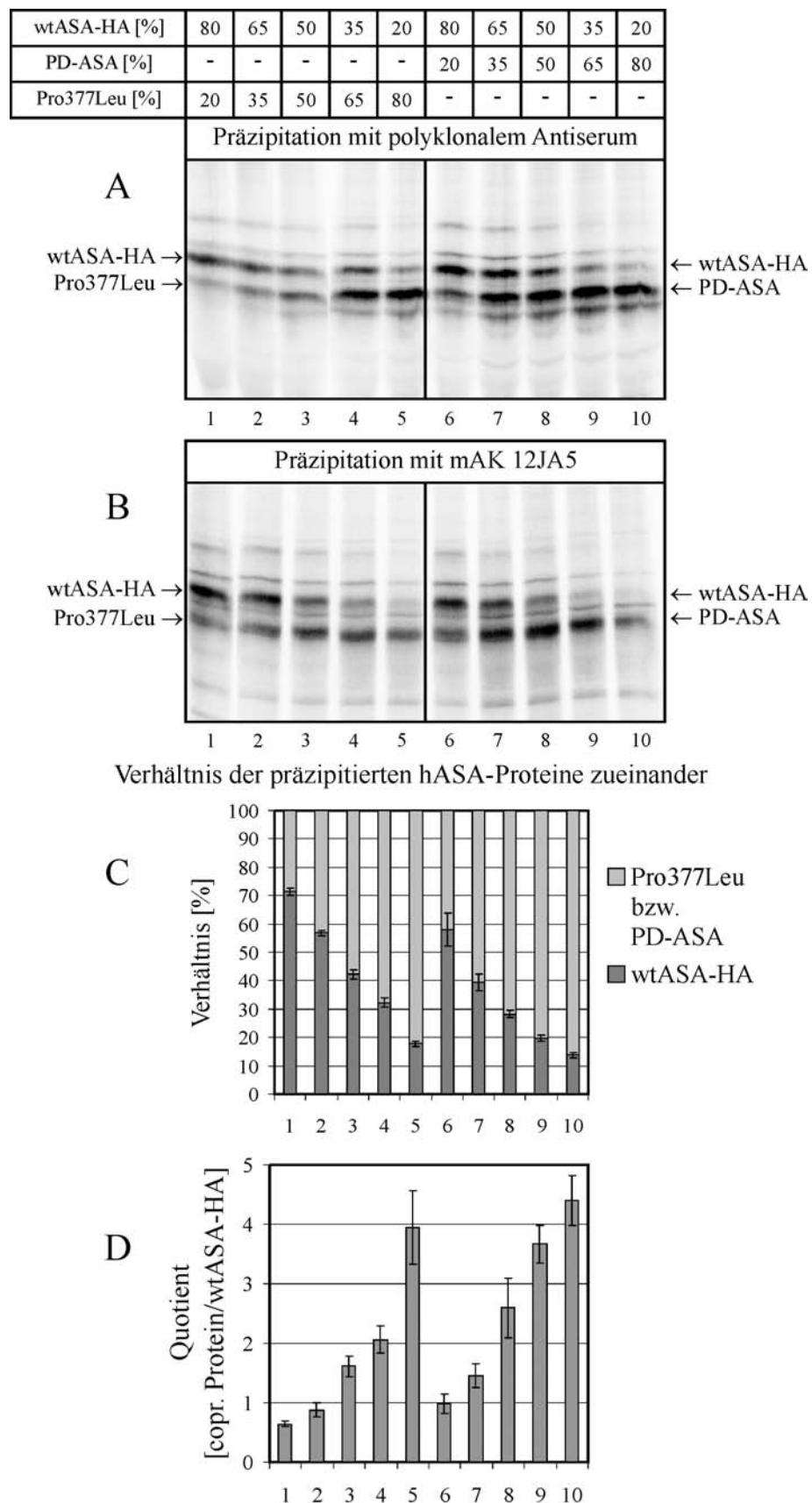
**Abbildung 17: Immunpräzipitation der HA markierten hASA-Proteine Asp335Val-HA, Gly86Asp-HA, Thr274Met-HA, Asp255His-HA und Pro136Leu-HA nach einer Cotransfektion mit PD-ASA**

Transient mit Asp335Val-HA, Gly86Asp-HA, Pro377Leu-HA, Thr274Met-HA bzw. Asp255His-HA und PD-ASA cotransfizierte BHK21 Zellen wurden für 30 min mit 150  $\mu$ Ci/ml L-[35S]-Methionin markiert. Nach dem Lysieren der Zellen wurden die HA-Proteine mit dem HA-mAK aus dem Lysat immunpräzipitiert und die Proteine durch SDS-PAGE (10%iges Gel) aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und mit ASA einem Phosphoimager sichtbar gemacht.

### 5.2.3 Analyse des Assoziationsgrades von wtASA-HA mit Pro377Leu und wtASA-HA mit PD-ASA

Bei einem Vergleich der unter 5.2.2 erhaltenen Bandenintensitäten fällt auf, dass die Banden der aminosäuresubstituierten hASA-Proteine immer intensiver sind, als die der entsprechenden wtASA Banden. Daraus resultiert die Frage, aus wie vielen hASA-Proteinen die copräzipitierter Komplexe bestehen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden BHK21

Zellen transient mit unterschiedlichen Verhältnissen wtASA-HA zu Pro377Leu oder wtASA-HA zu PD-ASA-cDNA transfiziert und metabolisch markiert. Nach Lysieren der Zellen wurden die hASA-Proteinkomplexe mit HA-mAK oder polyklonalem ASA Antiserum immunpräzipitiert. Abbildung 18 zeigt die Immunpräzipitate aus diesen Versuchen. Die maximal errechneten Quotienten aus den quantifizierten Signalen der copräzipitierter Pro377Leu oder PD-ASA und der wtASA mit HA-mAK betragen 4,6 bzw. 4,8. Die maximal errechneten Quotienten aus den quantifizierten Signalen der gesamt präzipitierter Pro377Leu oder PD-ASA und der wtASA mit polyklonalem Antiserum betragen 4,9 bzw. 6,8.

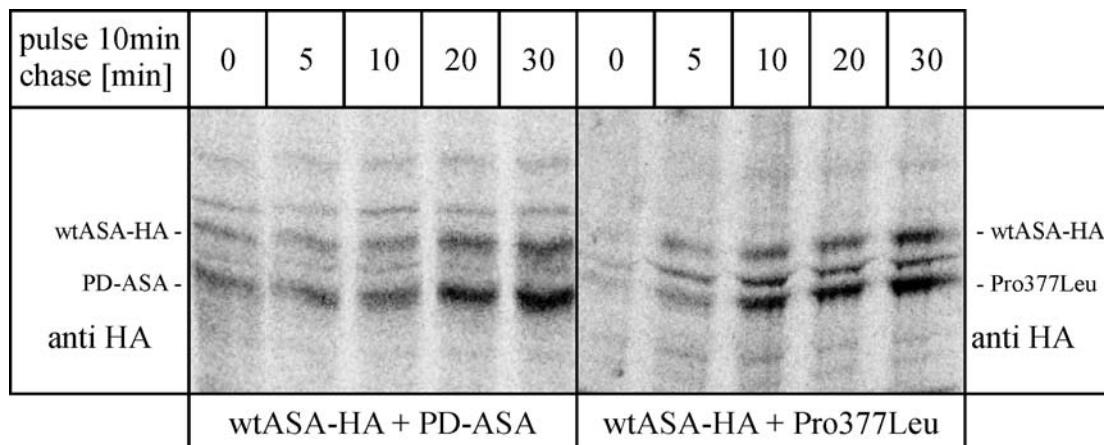


**Abbildung 18: Immunpräzipitation der hASA nach der Transfektion mit unterschiedlichen Plasmidverhältnissen von wtASA-HA zu Pro377Leu oder wtASA-HA zu PD-ASA**

BHK21 Zellen wurden in einer 24-well-Platte transient mit unterschiedlichen Verhältnissen wtASA-HA-cDNA und Pro377Leu-cDNA bzw. PD-ASA-cDNA cotransfiziert. Die Gesamtplasmidmenge belief sich immer auf 1 µg je Transfektion. Die prozentualen Anteile der jeweiligen Plasmide sind über den entsprechenden Spalten (1 - 10) angegeben. Die Zellen wurden für 30 min mit 300 µCi/ml L-[35S]-Methionin markiert. Nach Lysieren der Zellen wurde die gesamt hASA mit dem polyklonalen Antiserum 1057 (A) oder die wtASA-HA mit dem mAK 12CA5 (B) aus den Lysaten immunpräzipitiert und die Proteine durch SDS-PAGE (10%iges Gel) aufgetrennt. Mit einem Phosphoimager wurde die ASA nach dem trocknen der Gele sichtbar gemacht und die Signalintensitäten mit dem Programm „AIDA“ quantifiziert. Die relativen Signalintensitäten der hASA-Proteine nach der Copräzipitation (B) sind in C graphisch dargestellt. Die Säulenhöhen ergeben sich aus dem Mittelwert von 2 parallelen Versuchen, die Fehlerbalken aus den minimalen bzw. maximalen Werten. Unter C sind die Quotienten dargestellt, die sich aus der Division der copräzipitierter ASA durch die wtASA-HA errechnen. Die Fehlerbalken ergeben sich durch den minimalen und maximalen Quotienten.

#### 5.2.4 Bestimmung des Zeitpunktes der Assoziation

Zur Untersuchung des Zeitpunktes der Assoziation der hASA-Proteine, wurden BHK21 Zellen transient mit wtASA-HA und Pro377Leu sowie wtASA-HA und PD-ASA-cDNA cotransfiziert, 10 min Zeit metabolisch markiert und die wtASA-HA mit dem HA-mAK immunpräzipitiert.



**Abbildung 19: Coimmunpräzipitation zur Bestimmung des Assoziationszeitpunktes von wtASA-HA mit PD-ASA und Pro377Leu**

Transient mit jeweils 200 ng wtASA-HA- und 800 ng PD-ASA- oder 200 ng wtASA-HA- und 800 ng Pro377Leu-Expressionsvektor transfizierte BHK21 Zellen wurden für 10 min mit 300 µCi/ml L-[35S]-Methionin markiert. Der „chase“ erfolgte durch Austausch des Mediums, wobei dem „chase“-Medium zusätzlich 125 µM L-Methionin zugesetzt wurde. Die „chase“-Zeiten sind jeweils über den Spuren angegeben. Nach dem Lysieren der Zellen wurde die wtASA-HA mit dem HA-mAK aus dem Homogenat immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE (10%iges Gel) aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und die ASA mit einem Phosphoimager sichtbar gemacht.

Da sich die PD-ASA physiologisch annähernd so wie die wtASA verhält (s. Abschnitt 5.2.2), dient dieser Versuchsteil der Kontrolle. Im Voraus konnte nicht ausgeschlossen werden, dass eine wtASA-wtASA Assoziation anders verläuft als die wtASA Assoziation mit einem fehlgefalteten hASA-Protein.

Abbildung 19 zeigt die aufgetrennten Proteinbanden der Präzipitate. Bereits nach dem 10 min „pulse“ ist zu erkennen, dass die hASA-Proteine Pro377Leu und PD-ASA mit der wtASA-HA copräzipitiert werden konnten.

### ***5.2.5 Untersuchungen der physiologischen Folgen einer Assoziation von wtASA mit aminosäuresubstituierten hASA-Proteinen***

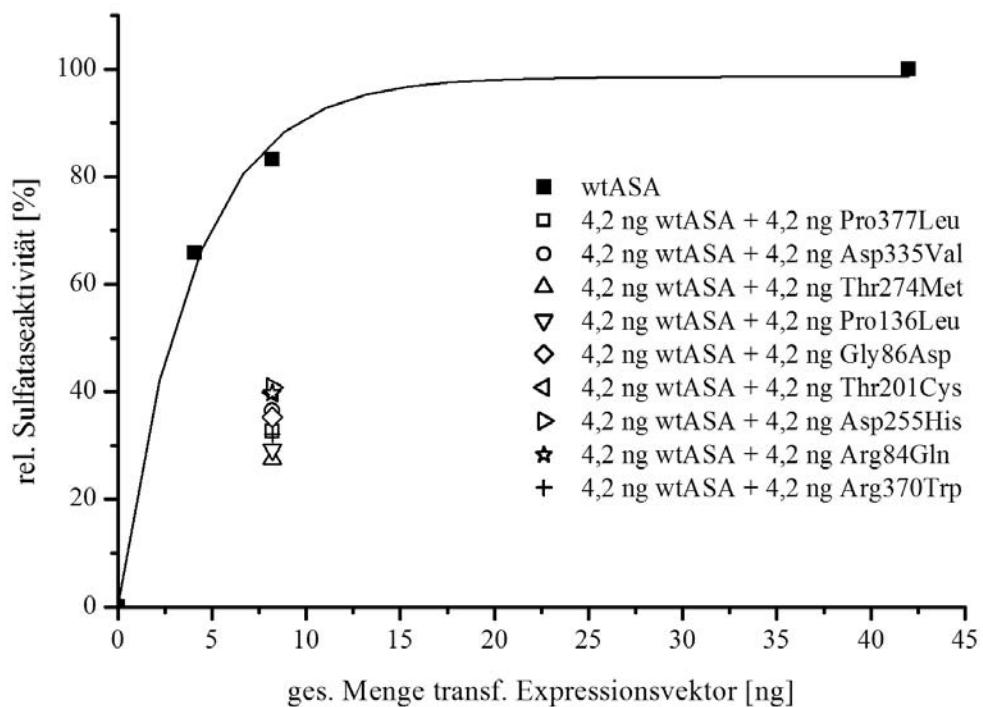
wtASA und die im ER retenierten aminosäuresubstituierten hASA-Proteine weisen, wie gezeigt, hinsichtlich ihrer physiologischen Eigenschaften große Unterschiede auf. Eine Assoziation dieser Proteine im ER legt daher die Vermutung nahe, dass es zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Proteine kommt. Daher wurden folgende Untersuchungen an cotransfizierten Zellen durchgeführt:

1. Messungen der Sulfataseaktivität
2. Messungen der Degradations- und Sekretionsraten
3. Untersuchungen zur Sekretion von Pro377Leu bei einer Coexpression mit wtASA

#### ***5.2.5.1 Messung der Sulfataseaktivität bei der Coexpression von wtASA und aminosäuresubstituierten hASA-Proteinen***

Bei den posttranslationalen Modifikationen der hASA im ER wird unter anderem Cys69, welches sich im reifen Protein im aktiven Zentrum der ASA befindet, von der FGE formyliert [63-66]. Es ist bekannt, dass diese Modifikation, Zelllinien abhängig, ein limitierender Faktor bei der spezifischen Sulfataseaktivität der wtASA sein kann [90]. Ob es zu einer Formylierung des Cys69-Rests der aminosäuresubstituierten hASA-Proteine kommt, ist bislang nicht bekannt. Für die im Folgenden durchgeführten Versuche musste auf jeden Fall sichergestellt werden, dass sich die Sulfataseaktivität der wtASA, bezüglich der Proteinexpression, in einem linearen Steigungsbereich befindet. In Vorversuchen wurde daher zuerst die Enzymaktivität in Bezug zur transfizierten Menge des wtASA-Expressionsvektors bestimmt und von diesen Ergebnissen ausgehend, erfolgten dann die Aktivitätsmessung aus cotransfizierten Zellen.

Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, ist die Steigerung der ASA-Aktivität bis zu einer transfizierten Plasmidmenge von ca. 8 ng linear. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit 4,2 ng wtASA-Vektor und 4,2 ng des Vektors, der die jeweilige punktmutierte hASA-cDNA enthielt, cotransfiziert. Die anschließende Aktivitätsmessung ergab, jeweils in Relation zur Aktivität nach der Transfektion nur mit wtASA-Vektor, eine um ca. 45 % verminderte Enzymaktivität nach der Transfektion mutierter cDNA. Der Aktivitätsverlust war bei den untersuchten hASA-Proteinen Asp335Val, Gly86Asp, Pro377Leu, Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His Pro136Leu, Arg370Trp und Arg84Gln einheitlich. Anzumerken ist, dass die Proteine Arg370Trp und Arg84Gln nicht im ER reteniert werden.

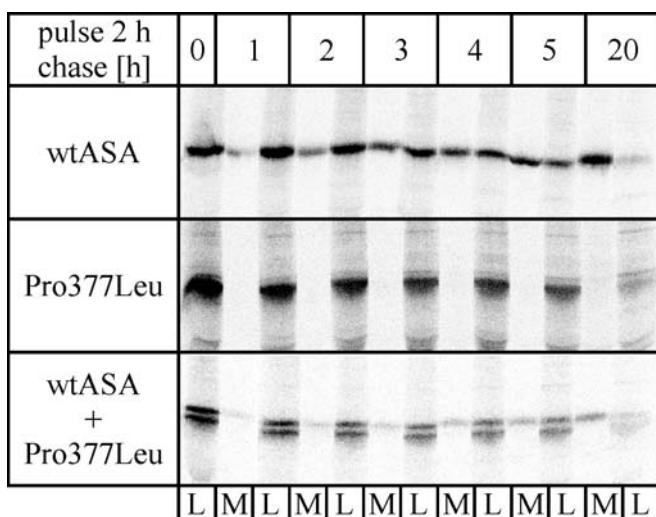


**Abbildung 20: ASA-Enzymaktivität in Zellen die hASA und aminosäuresubstituierte hASA coexprimieren**

BHK21 Zellen wurden in einer 24-well-Platte mit 4,2 ng, 8,4 ng oder 40 ng wtASA-Vektor bzw. 4,2 ng wtASA-Vektor und 4,2 ng des Vektors der die jeweilige punktmutierte hASA-cDNA enthielt transfiziert. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen eingesetzt. 44 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Aus dem Homogenat wurde der Proteingehalt nach Lowry bestimmt und die Sulfataseaktivität mit p-Nitrocatecholsulfat gemessen und die Enzymaktivität auf den Proteingehalt umgerechnet. In dem Diagramm wurde die maximal gemessene ASA-Aktivität gleich 100% gesetzt und alle anderen Aktivitäten wurden darauf bezogen. Die relativen Enzymaktivitäten sind in Abhängigkeit zur jeweils transfizierten DNA Menge dargestellt.

### 5.2.5.2 Untersuchung der Degradation und Sekretion von hASA an Zellen, die wtASA oder Pro377Leu exprimieren oder wtASA und Pro377Leu coexprimieren

In Abschnitt 5.2.5.1 wurde gezeigt, dass die Coexpression von wtASA und aminosäuresubstituierter hASA einen negativen Einfluss auf die Sulfataseaktivität der wtASA hat. Daher wurde auf molekularer Ebene untersucht, ob und in wie weit eine Coexpression zu Veränderungen der Degradations- und oder Sekretionsraten der hASA-Proteine in Gegenwart von NH<sub>4</sub>Cl führt. Dazu wurden „pulse-chase“-Experimente an Zellen durchgeführt, die wtASA, Pro377Leu oder wtASA und Pro377Leu transient exprimierten. Die dem „pulse“ folgenden „chase“-Zeiten reichten von 1 bis zu 20 h, wobei dem Zellkulturmedium stets NH<sub>4</sub>Cl zugesetzt wurde. Abbildung 21 zeigt Gelbereiche in denen die präzipitierten Proteine voneinander getrennt wurden, Abbildung 22 und Abbildung 23 die graphisch dargestellte Quantifizierung der gemessenen Proteinsignale.

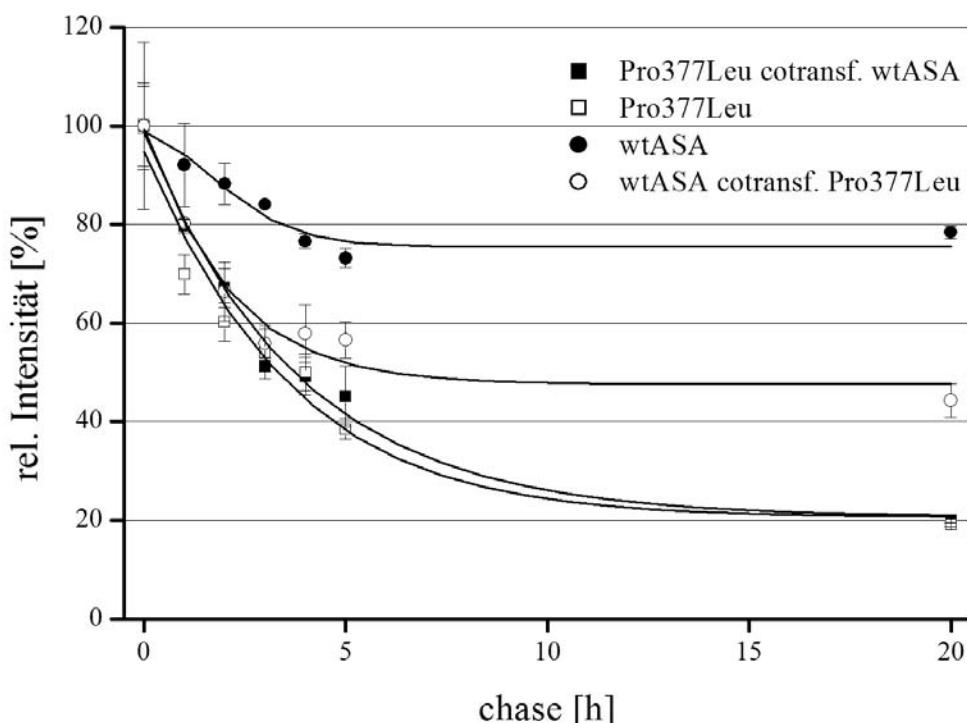


**Abbildung 21: Immunpräzipitation von metabolisch markierter wtASA und Pro377Leu aus Zellen die wtASA, Pro377Leu oder wtASA und Pro377Leu exprimieren**

Transient mit jeweils 1 µg wtASA-, 1 µg Pro377Leu- oder 200 ng wtASA- und 800 ng Pro377Leu-Vektor transfizierte BHK21 Zellen wurden für 2 h mit 30 µCi/ml L-[35S]-Methionin markiert. Das „pulse“-Medium enthielt 10 mM NH<sub>4</sub>Cl. Der „chase“ erfolgte durch Austausch des Mediums, wobei dem „chase“-Medium zusätzlich 125 µM L-Methionin und 10 mM NH<sub>4</sub>Cl zugesetzt wurde. Die „chase“-Zeiten sind jeweils über den Spuren angegeben. Vor dem Lysieren der Zellen wurde das Medium abgenommen und die hASA wurde ebenso wie aus dem Zelllysat mit dem polyklonalen Antiserum 1057 immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE (10%iges Gel) aufgetrennt (L = Zellhomogenat, M = Medium). Das Gel wurde getrocknet und die ASA mit einem Phosphoimager sichtbar gemacht.

Aus dem Vergleich der gesamt-wtASA Proteinmengen (Addition der Signale aus den Zellen und dem entsprechenden Medium) geht hervor, dass die Gesamtmenge an wtASA innerhalb

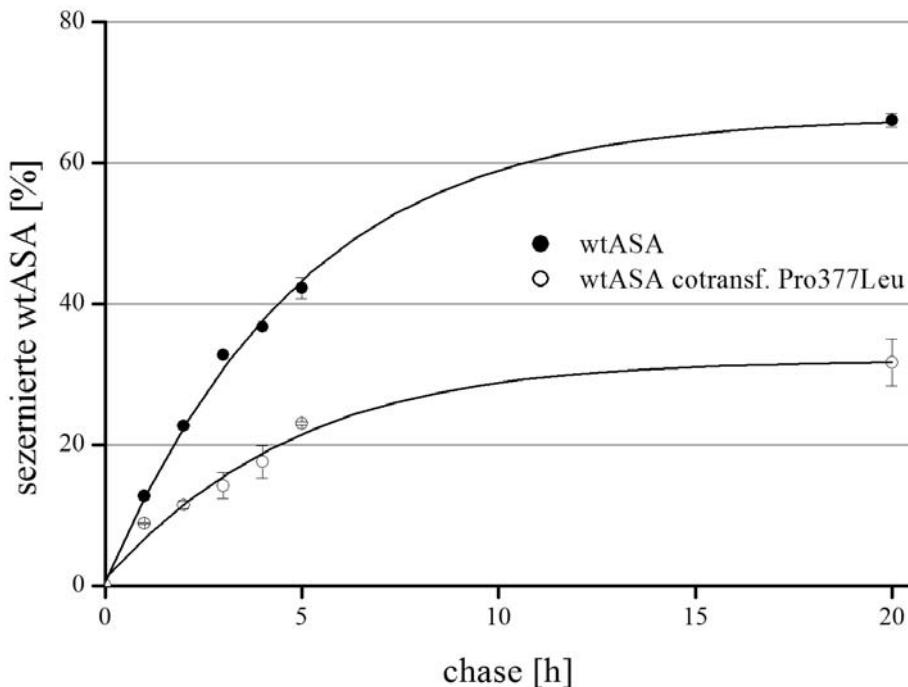
der ersten 5 h nach dem „pulse“ in cotransfizierten Zellen prozentual deutlich schneller abnahm, als in nur mit wtASA transfizierten Zellen (Abbildung 22). Nach ca. 6 h wurde bei den wtASA transfizierten Zellen ein „steady state“ erreicht, dieser lag bei ungefähr 75 % der während des „pulse“ markierten ASA. Wurde Pro377Leu coexprimiert so verringert sich die Stabilität der wtASA. Unter diesen Bedingungen sind 6 h nach dem „pulse“ nur noch etwa 48 % vorhanden. Umgekehrt ist die Degradation von Pro377Leu von der Coexpression der wtASA unbeeinflusst (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Graphische Darstellung der aus Abbildung 21 quantifizierten Signale der Gesamtmenge wtASA und Pro377Leu**

Proteinsignale aus Abbildung 21 und eines weiteren Versuches wurden mit dem Programm AIDA quantifiziert und graphisch in Relation zu den entsprechenden „chase“-Zeiten dargestellt. Die wtASA Werte errechnen sich aus der Addition der Signale aus dem Zelllysat und dem entsprechenden Medium. Die Signale aus den jeweiligen „pulse“-Versuchen wurden auf 100 % gesetzt, alle anderen Werte beziehen sich darauf. Die Fehlerbalken ergeben sich aus den entsprechenden Minimal- und Maximalwerten.

Ein Vergleich der Sekretionsgeschwindigkeiten der wtASA verdeutlicht die Abbauraten des Proteins noch stärker. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, sind 20 h nach dem „pulse“ unter NH<sub>4</sub>Cl ca. 66 % des wt-Proteins aus mit wt-cDNA transfizierten Zellen sezerniert worden. Dagegen wurden nur ca. 32 % wtASA aus den cotransfizierten Zellen sezerniert. Eine Sekretion von Pro377Leu aus den cotransfizierten Zellen ist nicht erkennbar.



**Abbildung 23: Graphische Darstellung der aus Abbildung 21 quantifizierten Signale der ins Medium sezernierten wtASA**

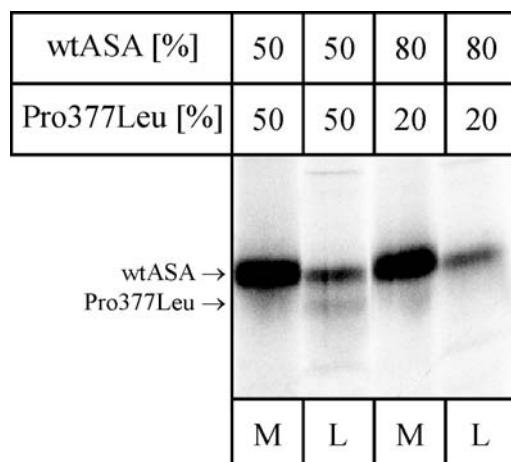
Die Proteinsignale der wtASA die ins Medium sezerniert wurde (s. Abbildung 21) und eines weiteren Versuchs wurden mit dem Programm AIDA quantifiziert und graphisch in Relation zu den entsprechenden „chase“-Zeiten dargestellt. Die Signale aus den jeweiligen „pulse“-Versuchen wurden auf 100 % gesetzt, alle anderen Werte beziehen sich darauf. Die Fehlerbalken ergeben sich aus den entsprechenden Minimal- und Maximalwerten.

### 5.2.5.3 Versuch mit einer Überexpression von wtASA die Sekretion von Pro377Leu zu initiieren

Aus den bisher durchgeföhrten Untersuchungen geht hervor, dass es im Falle einer Coexpression von wtASA und aminosäuresubstituierten hASA-Proteinen zu einem negativen Effekt für die wtASA kam. Dieser resultierte aus einer verstärkten Degradation und einer, vermutlich dadurch bedingten, reduzierten Sulfataseaktivität der wtASA. In vielen der zuvor beschriebenen Versuche wurden bei den Transfektionen Plasmidverhältnisse von wtASA zu aminosäuresubstituierter hASA eingesetzt, die zwischen 1:1 und 1:4 lagen. Wenn ein Plasmid in höherer Konzentration eingesetzt wurde, handelte es sich fast immer um das der aminosäuresubstituierten hASA. In Abschnitt 5.2.3 konnte gezeigt werden, dass sich durch die Assoziation der hASA im ER Oligomere bildeten. Deren Zusammensetzung veränderte sich offenbar mit den unterschiedlich eingesetzten Plasmidverhältnissen bei den Transfektionen. Daher sollte die Möglichkeit untersucht werden, ob aminosäuresubstituierte

Proteine in einem aus überwiegend wtASA Untereinheiten aufgebauten Heterooligomer dem ERAD entzogen werden können. In einem solchen Fall müssten die fehlgefalteten hASA-Proteinuntereinheiten bei der Inkubation der Zellen mit NH<sub>4</sub>Cl ins Medium sezerniert werden.

Transient, mit Plasmidverhältnissen von 1:1 und 4:1 (wtASA:Pro377Leu), transfizierte Zellen wurden in Gegenwart von NH<sub>4</sub>Cl 18 h metabolisch markiert und die hASA mit einem polyklonalen hASA Antiserum aus dem Medium und dem Zelllysat immunpräzipitiert. Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, ist das Signal von Pro377Leu im Zelllysat nach einer 1:1 Transfektion zu erkennen. Im Medium ist kein Proteinsignal von Pro377Leu zu erkennen. Bei einem Transfektionsverhältnis von 4:1 ist weder im Medium noch im Zelllysat ein Signal auf der Laufhöhe von Pro377Leu zu erkennen. Dass im Zelllysat kein Pro377Leu Signal mehr zu sehen ist liegt vermutlich daran, dass die wtASA aufgrund der langen „pulse“-Zeit sehr stark akkumuliert. Dadurch nimmt das Pro377Leu Signal ab und kann aufgrund der Methode nicht mehr sichtbar gemacht werden.



**Abbildung 24: Immunpräzipitation zur Überprüfung einer möglichen Stabilisierung von Pro377Leu durch ein überwiegend aus wtASA-Untereinheiten aufgebautes Heterooligomer**

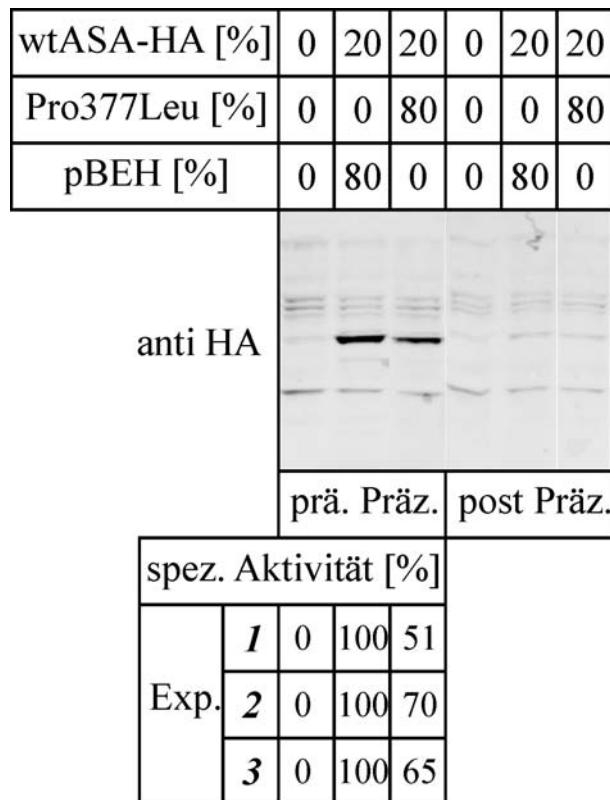
Transient mit wtASA- und Pro377Leu-cDNA in den Verhältnissen 50:50 und 80:20 (Gesamtmenge immer 1 µg Vektor) transfizierte BHK21 Zellen wurden für 18 h mit 60 µCi/ml L-[35S]-Methionin markiert. Die Verhältnisse der Plasmidkonzentrationen sind jeweils in Prozent über den Spuren angegeben. Das Medium enthielt 10 mM NH<sub>4</sub>Cl. Vor dem Lysieren der Zellen wurde das Medium abgenommen und die hASA wurde ebenso wie aus dem Zelllysat mit dem polyclonalen Antiserum 1057 immunpräzipitiert und durch SDS-PAGE (10%iges Gel) aufgetrennt (L = Zellhomogenat, M = Medium). Das Gel wurde getrocknet und die ASA mit einem Phosphoimager sichtbar gemacht.

### **5.2.6 Mögliche Ursachen der reduzierten Sulfataseaktivität und verstärkten wtASA Degradation bei einer Coexpression mit aminosäuresubstituierter hASA**

Um einen Erklärungsansatz für die in den Abschnitten 5.2.5.1 und 5.2.5.2 gefundene reduzierte Sulfataseaktivität und verstärkte Degradation der wtASA zu finden, wurden im Folgenden die Ursachen dafür näher untersucht. Im Vordergrund stand dabei die Suche nach möglichen strukturellen Veränderungen der wtASA. Die spezifische Sulfataseaktivität der aus dem ER präzipitierten wtASA-HA, die mit fehlgefalteten hASA-Untereinheiten assoziiert war, sowie eine mögliche Copräzipitation von aminosäuresubstituierter hASA mit Hilfe von mAK, sollten Aufschluss über Konformationsänderungen liefern.

#### **5.2.6.1 Vergleich der spezifischen Sulfataseaktivität von wtASA-HA exprimierenden und wtASA-HA und Pro377Leu coexprimierenden Zellen**

Um die spezifische Aktivität zu messen, wurden BHK21 Zellen mit wtASA-HA- oder wtASA-HA- und Pro377Leu-cDNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und ein Teil des Lysats für den Auftrag auf ein SDS-Gel präpariert. Aus dem restlichen Lysat wurde die wtASA-HA mit dem HA-mAK präzipitiert. Nach der Präzipitation wurde wieder ein Teil des Lysats für den Auftrag auf ein SDS-Gel präpariert. Von dem Präzipitat wurde die Enzymaktivität gemessen. Abbildung 25 zeigt die Banden des Westernblots mit den, wie oben beschrieben, präparierten Proben. Der wtASA-HA Nachweis auf dem Blot erfolgte mit einem biotinylierten HA-mAK und Fluorophor markiertem Streptavidin. Die Banden wurden quantifiziert und der Quotient aus der Enzymaktivität und der Signalintensität berechnet. Die Quotienten aus den Untersuchungen mit wtASA-HA transfizierten Zellen wurden auf 100 % gesetzt und die Quotienten aus den entsprechenden Cotransfektionen dazu in prozentuale Relation gebracht. Aus den 3 voneinander unabhängigen Versuchen geht hervor, dass die spezifische Aktivität der wtASA-HA nach der Cotransfektion auf 50 bis 70 % der Normalaktivität abfällt.



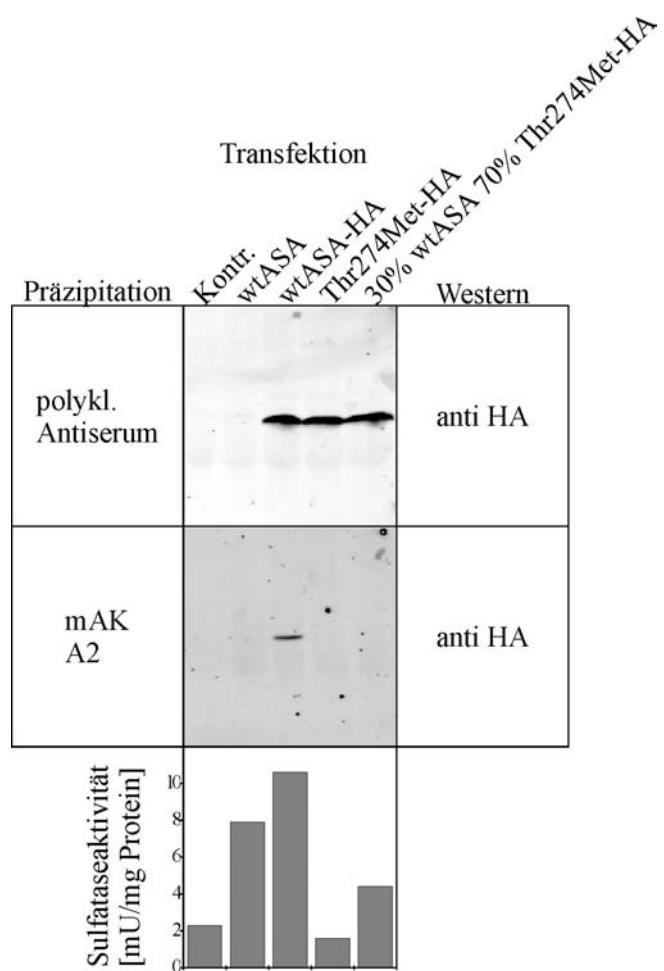
**Abbildung 25: Auswirkungen der Coexpression von wtASA-HA und Pro377Leu auf die spezifische ASA-Aktivität**

BHK21 Zellen wurden in einer 6-well-Platte mit insgesamt 5,4 µg Vektor transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit 1,08 µg (20 %) wtASA-HA-Vektor und 4,32 µg (80 %) pBEH Leervektor oder 1,08 µg (20 %) wtASA-HA- und 4,32 µg (80 %) Pro377Leu-Vektor. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 250 µl Lysispuffer geerntet. Aus dem Homogenat wurde der Proteingehalt nach Lowry gemessen. Jeweils 10 µl des Homogenats wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Aus dem restlichen Homogenat wurde die wtASA-HA mit 10 µg HA-mAK präzipitiert und wieder jeweils 10 µl des Homogenats auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Blotten des Gels auf eine Nitrocellulosemembran wurde die wtASA-HA durch biotinylierten HA-mAK und fluorophormarkiertes Streptavidin mit Hilfe eines Laserscanner qualitativ und quantitativ nachgewiesen. Die im Präzipitat enthaltene Sulfataseaktivität wurde durch eine sechsstündige Inkubation des Präzipitats mit dem Sulfatasesubstrat p-Nitrocatecholsulfat gemessen. Aus den gemessenen Enzymaktivitäten und Signalintensitäten der entsprechenden wtASA-HA Banden wurden die Quotienten berechnet und die Werte aus den Experimenten einer wtASA-HA Expression mit denen der Coexpression von wtASA-HA mit Pro377Leu in prozentualen Bezug zueinander gesetzt. Alle, wie zuvor beschrieben, berechneten Werte wurden noch auf die gemessenen Proteingehalte bezogen.

#### 5.2.6.2 Untersuchung der Epitopbildung an wtASA und Thr274Met exprimierenden Zellen mit dem mAK A2

Wie aus der Literatur hervorgeht, kann das hASA-Protein Thr274Met aufgrund struktureller Defizite nicht durch den konformationsspezifischen mAK A2 immunpräzipitiert werden [82].

Im Folgenden wurde untersucht, ob wtASA die mit Thr274Met assoziiert ist, durch den mAK A2 präzipitiert werden kann. Dazu wurden BHK21 Zellen transient mit wtASA, wtASA-HA oder Thr274Met-HA transfiziert, sowie mit wtASA und Thr274Met-HA cotransfiziert. Aus den Lysaten der Zellen wurde die hASA mit polyklonalem Antiserum und mAK A2 immunpräzipitiert und die Präzipitate im Westernblot auf das HA-Epitop untersucht. Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, konnte das HA-Epitop in den Präzipitaten mit polyklonalem Antiserum aus den Lysaten der Zellen, die mit wtASA-HA, Thr274Met-HA oder wtASA und Thr274Met-HA transfiziert wurden, nachgewiesen werden. Wie zu erwarten war, ist der HA Nachweis aus untransfizierten und mit wtASA transfizierten Zellen negativ. Nach der Präzipitation mit dem mAK A2 war der Nachweis des HA-Epitops nur in dem Präzipitat aus dem Lysat der wtASA-HA transfizierten Zellen positiv. In keinem der anderen Lysate konnte das HA-Epitop nachgewiesen werden. Um die Expression der wtASA in den transfizierten Zellen zu prüfen, wurde die Sulfataseaktivität in allen Zelllysaten gemessen. Aus dem Säulendiagramm im unteren Teil von Abbildung 26 geht hervor, dass eine erhöhte Sulfataseaktivität in den Zelllysaten der wtASA, wtASA-HA und wtASA mit Thr274Met-HA transfizierten Zellen gemessen wurde. Ähnlich wie bereits in Abschnitt 5.2.5.1 war die Sulfataseaktivität nach der Cotransfektion von wtASA mit Thr274Met-HA im Vergleich zu der Einzeltransfektion mit wtASA deutlich erniedrigt.



**Abbildung 26: Epitopenuntersuchung an hASA coexprimierenden Zellen**

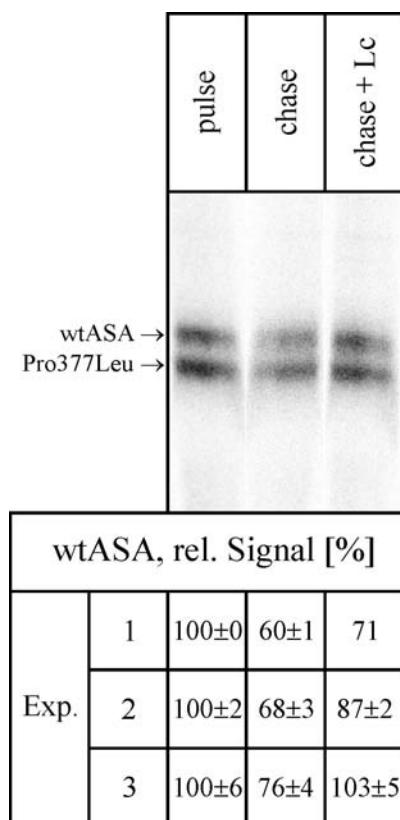
BHK21 Zellen wurden in 10 cm Platten mit jeweils 14 µg Vektor transient transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit 14 µg wtASA-, 14 µg wtASA-HA-, 14 µg Thr274Met-HA- oder 4,2 µg (30 %) wtASA- und 9,8 µg (70 %) Thr274Met-HA-Expressionsvektor. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. 20 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit 4,5 ml Lysispuffer lysiert. Der Proteingehalt des Lysats wurde nach Lowry und die Sulfataseaktivität mit p-Nitrocatecholsulfat gemessen. Aus jeweils 1,4 ml des Homogenats wurde die hASA mit 5 µl polyklonalem Antiserum (1057) oder 10 µg mAK A2 sowie 100 µl StA immunpräzipitiert. Die Präzipitate wurden 2x mit 10 mM PBS gewaschen und mit 100 µl Probenpuffer 5 min auf 95° C erhitzt. Jeweils 15 µl der Probe wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran wurde das HA-Epitop durch einen biotinylierten HA-mAK und fluorophormarkiertes Streptavidin mit Hilfe eines Laserscanner nachgewiesen.

### 5.2.7 Untersuchungen zum Degradationsweg der mit aminosäuresubstituierter hASA assoziierten wtASA

In Abschnitt 5.1.2 wurde gezeigt, dass die hASA-Proteine Asp335Val, Gly86Asp, Pro377Leu, Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu durch proteasomale Degradation abgebaut wurden. In Abschnitt 5.2.5.2 konnte eine erhöhte Degradation der wtASA im Falle einer Coexpression von wtASA mit Pro377Leu nachgewiesen werden.

Daraus ergab sich die Frage, auf welchem Weg wtASA, die mit aminosäuresubstituierter hASA assoziiert ist, degradiert wird.

Um dies zu untersuchen, wurde mit Zellen, die transient mit wtASA-cDNA und Pro377Leu-cDNA cotransfiziert worden waren, ein wie in Abschnitt 5.1.2 beschriebenes „pulse-chase“-Experiment, mit dem proteasomalen Inhibitor Lc, durchgeführt. Abbildung 27 zeigt den Bereich des Gels, in dem die hASA Proteine voneinander getrennt wurden. Es ist deutlich zu erkennen, dass Lc zu einer Reduktion der Degradationsgeschwindigkeit von wtASA und Pro136Leu während des „chase“ führt. Im unteren Teil der Abbildung sind die Quantifizierungen von drei unabhängigen Doppelversuchen tabellarisch dargestellt.



**Abbildung 27: Degradationsweg der mit Pro377Leu assoziierten wtASA**

Transient mit wtASA- und Pro377Leu-cDNA transfizierte BHK21 Zellen wurden für 2 h mit 30 µCi/ml L-[<sup>35</sup>S]-Methionin markiert. Der zweistündige „chase“ erfolgte durch Zugabe von L-Methionin auf eine Endkonzentration von 125 µM (Verhältnis L-[<sup>35</sup>S]-Methionin/L-Methionin 1/12500). Teilweise wurden die Zellen während der „chase“ Zeiten wie über den Spuren beschrieben mit 25 µM Lc behandelt. Im Anschluss an den „chase“ wurden die Zellen lysiert, mit dem polyklonalen Antiserum 1057 immunpräzipitiert und die Präzipitate durch SDS-PAGE (10%iges Gel) aufgereinigt. Die Gele wurden getrocknet, die ASA mit einem Phosphoimager sichtbar gemacht und die Banden mit dem Programm AIDA quantifiziert. Die Versuche wurden als Doppelversuche je 3x durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurde das wtASA Signal aus den entsprechenden „pulse“-Versuchen auf 100% und die Signale aus den „chase“ Versuchen dazu in Relation gesetzt. Die ± Werte errechnen sich aus den minimalen und maximalen Werten der Doppelversuche.

## 6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Prozessierung, Assoziation und Proteinqualitätskontrolle von Wildtyp und aminosäuresubstituierten defekten hASA-Proteinen, untersucht. Des Weiteren erfolgten Untersuchungen zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, durch die fehlgefaltete hASA-Polypeptide in Verbindung mit ERAD abgebaut werden.

### 6.1 Prozessierung der Oligosaccharid-Seitenketten und Qualitätskontrolle im ER

Von den aminosäuresubstituierten hASA-Proteinen Asp335Val, Gly86Asp, Pro377Leu, Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu war bisher bekannt, dass sie keine enzymatische Aktivität aufweisen, eine wesentlich geringere Halbwertzeit als wtASA haben, nicht im Golgi-Apparat phosphoryliert werden und den Golgi-Komplex nicht mit dem Ziel Lysosomen verlassen [77-79]. Die durchgeführten Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit auch die Oligosaccharid-Seitenketten der hASA durch die in der Einleitung beschriebenen Mechanismen prozessiert werden. Wie unter 5.1.1.1, 5.1.1.2 und 5.1.1.3 beschrieben, wurden kultivierte Zellen in „pulse-chase“-Versuchen während des „chase“ mit den Glykosidaseinhibitoren Kif, DNM, DMM und den Kombinationen DMM/DNM, DMM/Kif und DNM/Kif behandelt. Zur besseren Übersicht ihrer Wirkung sind die Inhibitoren in Abbildung 3 unter den entsprechenden Glykosidasen vermerkt.

Aufgrund einer Inhibition der ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase I durch Kif kommt es bei den untersuchten aminosäuresubstituierten hASA-Proteinen zu einer Verzögerung der Degradation. Eine Inhibition der ER Glykosidasen I und II durch DNM hingegen bewirkt bei allen hASA-Proteinen eine Erhöhung der Degradationsgeschwindigkeit. Die Effekte der Mannosidaseinhibition durch DMM sind proteinabhängig. Pro377Leu, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu werden während der Inkubation mit DMM deutlich stabilisiert, Tyr201Cys wird, wie bei der Inkubation der Zellen mit DNM, schneller abgebaut.

Durch Kif reduzierte Degradationsgeschwindigkeiten der aminosäuresubstituierten hASA-Proteine lassen sich dadurch erklären, dass die zur proteasomalen Degradation notwendige  $\text{Man}_8\text{-GlcNAc}_2$  Isomer B Struktur nicht mehr gebildet werden kann. Aus diesem Grund wird das zu degradierende Protein vermutlich nicht mehr von einem für den weiteren Degradationsprozess notwendigen Lektin gebunden und weitertransportiert bzw. prozessiert. Es kommt daher zu einer Akkumulation des zu degradierenden Proteins im ER. In der Literatur wird einheitlich eine Reduktion der Degradationsgeschwindigkeit, unter dem Einfluss von Kif, auf die dort untersuchten Proteine beschrieben [29, 30, 32, 91, 92].

Die in der Literatur beschriebenen Effekte, die durch eine Inhibition der ER-Glucosidasen I und II auftreten, sind gegensätzlich. Nach einigen Quellen werden die beiden fehlgefalteten Formen von  $\alpha$ 1-AT,  $\alpha$ 1-ATZ und PIZ durch die Inhibition der ER-Glucosidasen stabilisiert [29, 93, 94]. Es gibt jedoch auch Quellen, die eine Erhöhung der Degradationsgeschwindigkeiten von  $\alpha$ 1-ATZ und  $\beta$ -Sekretase nach der Applikation von Glucosidaseinhibitoren beschreiben [32, 92, 94, 95]. Des Weiteren liegen Untersuchungsergebnisse mit missgefalteten Immunglobulin Untereinheiten, Thyroglobulin und einer Protein C Variante vor, die keinen Effekt erkennen lassen [30, 91]. Zu diesen konträren Ergebnissen sind folgende Anmerkungen zu machen:

- In den zitierten Versuchsergebnissen wurde zur Inhibition der ER-Glucosidasen I und II häufig Castanospermin (Cst) verwendet. Obwohl für DNM und Cst gleichsam eine inhibitorische Wirkung auf die beiden ER-Glucosidasen beschrieben wird, wurden widersprüchliche Einflussnahmen auf die Degradationsgeschwindigkeit von  $\alpha$ 1-AT-Proteinen gefunden. DNM und Cst verursachten sowohl unterschiedliche [94], als auch identische [30, 32] Veränderungen der Abbauraten. Daher können die Ergebnisse der Glucosidasehemmung mit Cst und DNM nicht vorbehaltlos miteinander verglichen werden.
- Bei vielen der beschriebenen Versuche wurde untersucht wie Glykoproteine mit einer  $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$  Struktur prozessiert werden, daher wurden die ER Glucosidasen I und II schon vor der radioaktiven Markierung inhibiert [29, 30, 32, 91, 94, 95]. Diese Ergebnisse können nicht mit den hier vorgestellten Resultaten verglichen werden, da bei den Versuchen die dieser Arbeit zugrunde liegen, die Inhibition der Glucosidasen mit Beginn des „chase“, also im Anschluss an die Markierung, erfolgte.

Welche Erklärungsmöglichkeit gibt es für die beschleunigte Degradation der fehlgefalteten hASA-Proteine durch die Behandlung mit DNM? Wie aus Abbildung 3 hervorgeht, werden die ER-Glucosidasen I und II durch DNM inhibiert. DNM wurde nach einem zweistündigen „pulse“, mit dem Einleiten des „chase“ zu den Zellen gegeben. Zu diesem Zeitpunkt hat vermutlich der größte Teil der markierten hASA-Proteine die Prozessierung durch die ER-Glucosidase I bereits durchlaufen und besitzt keine  $\text{Glc}_3\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$  Zuckerseitenketten mehr. Aufgrund der schnellen Umsetzung der  $\text{Glc}_2\text{-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$  Seitenketten durch die ER-Glucosidase II zu  $\text{Glc-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$ , ist eine Zuckerstruktur mit zwei Glucoseresten vermutlich selten [20, 21]. Folglich hätte der größte Teil der Proteine beim Einleiten des „chase“ eine  $\text{Glc-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$  oder  $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2$  Struktur. Untersuchungen zur Aufklärung dieser Zuckerstrukturen werden derzeit durchgeführt. Da die untersuchten aminosäuresubstituierten hASA-Proteine Fehlfaltungen aufweisen [82], dienen

die Proteine mit einer  $\text{Man}_9\text{-GlcNAc}_2$  Struktur möglicherweise auch als Substrat für die GT. Durch die Reglucosylierung erlangen sie wieder eine  $\text{Glc-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$  Struktur. Erfolgt diese Reaktion während des „chase“ unter DNM, ist eine anschließende Deglucosylierung durch die ER-Glucosidase II nicht mehr möglich. Das Resultat wäre eine rasche Abnahme der glucosefreien Zuckerstrukturen und ein Anstieg der  $\text{Glc-Man}_9\text{-GlcNAc}_2$  Struktur. Untersuchungen zur Feststellung einer Reglucosylierung der hASA durch die GT sind geplant.

Es ist anzunehmen, dass eine Inhibition der ER-Glucosidasen I und II durch DNM ein erhöhtes Aufkommen von hASA-Proteinen mit einer  $\text{Glc}_{1-3}\text{-Man}_{8-9}\text{-GlcNAc}_2$  Struktur im ER begünstigt. Die Feststellung, dass es zu einer Beschleunigung der Degradation nach der Inhibition der ER-Glucosidasen I und II kommt, lässt daher die Schlussfolgerung zu, dass glucosyierte Zuckerseitenketten zur Einleitung der Degradation der untersuchten Proteine förderlich sind, ggf. sogar eine Notwendigkeit darstellen. Untersuchungen mit einer fehlgefalteten Form von  $\alpha 1\text{-AT}$  haben gezeigt, dass die beschleunigte Degradation durch Cst oder DNM bei gleichzeitiger Inhibition des Proteasoms mit Lc gestoppt wird und die Proteine stabilisiert werden [32]. Dies spricht dafür, dass die glucosyierte Oligosaccharide im Rahmen der proteasomalen Degradation eine wichtige Rolle einnehmen.

Proteininstabilisierende Effekte nach einer ER  $\alpha 1,2\text{-Mannosidase}$  Inhibition durch DMM werden ebenfalls in der Literatur beschrieben [29, 30, 32, 91, 93-95], nicht aber ein degradationsbeschleunigender Effekt, wie er im Fall von Tyr201Cys beobachtet wird. Nach dem von Spiro et al. entwickelten Modell ist die Erzeugung des  $\text{Man}_8\text{-GlcNAc}_2$  Strukturisomeren C durch die ER  $\alpha 1,2\text{-Mannosidase}$  II für eine nicht-proteasomale Degradation maßgeblich (s. Abbildung 8) [22]. Die Erzeugung des  $\text{Man}_8\text{-GlcNAc}_2$  Strukturisomeren B durch die ER  $\alpha 1,2\text{-Mannosidase}$  I leitet die proteasomale Degradation ein (Abbildung 8) [22]. Dass DMM die ER  $\alpha 1,2\text{-Mannosidase}$  II inhibiert ist allgemein akzeptiert, dagegen wird die Inhibition der ER  $\alpha 1,2\text{-Mannosidase}$  I durch DMM noch kontrovers diskutiert [22, 96]. Aus den Ergebnissen, die in Abschnitt 5.1.1.3 beschrieben werden, geht eindeutig hervor, dass DMM eine durch Kif inhibierte Mannosidase nicht inhibiert. DMM inhibiert offensichtlich nur eine Mannosidase die vollständig deglucosyierte N-Glykane demannosyliert. Eine Inhibition der ER  $\alpha 1,2\text{-Mannosidase}$  I durch DMM ist demnach mit sehr großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen (detaillierte Ergebnisinterpretation s. u.). Daraus folgt, dass die Proteininstabilisierung mit DMM nur auf der Inhibition der ER  $\alpha 1,2\text{-Mannosidase}$  II beruht. Da diese Mannosidase die nicht-proteasomale Degradation einleitet, ist davon auszugehen, dass die

aminosäuresubstituierten hASA-Proteine Pro377Leu, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu parallel proteasomal und nicht-proteasomal degradiert werden (s. Abschnitt 5.1.1.2).

Schwierig ist die Interpretation des destabilisierenden Einflusses von DMM auf das hASA-Protein Tyr201Cys.

Es ist bekannt, dass die Aminosäuresubstitutionen in der Primärstruktur der hASA zu unterschiedlichen strukturellen Veränderungen der Proteine führen [82]. Aus biochemischer Sicht können die untersuchten Proteine dahingehend klassifiziert werden, ob sie noch eine Restaktivität aufweisen, im ER reteniert werden, unterschiedliche Epitope für mAK ausbilden und/oder zum Verlust einer der drei Oligosaccharid-Seitenketten führen. Der Austausch einzelner Aminosäuren kann also ein breites Spektrum an Veränderungen bewirken.

Unter Einbezug der Modellvorstellung von Spiro et al. (s. Abbildung 3) und unter der Annahme, dass die aminosäuresubstituierten hASA-Proteine unabhängig voneinander sowohl proteasomal als auch nicht-proteasomal degradiert werden können, lässt sich folgende Hypothese entwickeln. Beide Degradationswege haben bei identisch gewählten Konditionen (z.B. Temperatur, Medium, CO<sub>2</sub> usw.) jeweils ihre spezielle Kinetik. Die Variable bei der Untersuchung verschiedener hASA-Proteine ist dann die Proteinstruktur. Da DMM Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit von Tyr201Cys nimmt, kann davon ausgegangen werden, dass das Protein unter normalen physiologischen Bedingungen nicht-proteasomal und wie zuvor diskutiert, gleichzeitig auch proteasomal abgebaut wird. Beide Degradationswege stehen prinzipiell für das Protein solange zu Verfügung, bis eine der beiden ER α1,2-Mannosidasen eines der beiden Man<sub>8</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> Strukturisomere erzeugt. Wenn nun die Abbaugeschwindigkeit durch den nicht-proteasomalen Degradationsweg deutlich langsamer als die proteasomale Degradation ist, steht im Fall einer ER α1,2-Mannosidase II Inhibition, mehr Substrat für den schnelleren, proteasomalen Degradationsweg zur Verfügung und eine höhere Degradationsrate wird festgestellt.

Die zuvor beschriebene stabilisierende Wirkung von DMM auf die aminosäuresubstituierten hASA-Proteine Pro377Leu, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu könnte dadurch erklärt werden, dass diese Proteine aufgrund ihrer Struktur vergleichsweise schneller nicht-proteasomal degradiert werden. Eine Inhibition des schnelleren Abbauweges führt demnach zu der beobachteten Stabilisierung.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisinterpretation wurde folgende Modellvorstellung entwickelt. Aminosäuresubstituierte defekte hASA-Proteine werden durch zwei verschiedene, parallel ablaufende Degradationswege abgebaut, wobei die Kinetik für jeden der Abbauwege von Protein zu Protein, durch unterschiedliche Proteinstrukturen bedingt, variiert. Diese

Vorstellung basiert noch auf der Annahme, dass die Degradation eine gerichtete Abfolge von Prozessierungsschritten ist. Der Calnexin/Calreticulin Zyklus und die damit in Verbindung stehende Reglucosylierung von Proteinen durch die GT wurden bisher nicht in die Entwicklung des Modells mit einbezogen. Neuere Untersuchungen mit fehlgefalteten RNase-Proteinen haben gezeigt, dass eine Reglucosylierung der N-Glykane durch die GT bevorzugt in räumlicher Nähe zur Fehlfaltung erfolgt [28]. Da es keine Daten über die dreidimensionale Struktur der hASA-Proteine Pro377Leu, Thr274Met, Asp255His, Pro136Leu und Tyr201Cys gibt, kann nur die Anzahl der Aminosäuren zwischen der jeweils ausgetauschten Aminosäure und der nächstliegenden Oligosaccharid-Seitenkette aufgrund der Primärstruktur ermittelt werden. Zur Verbesserung der Übersicht sind diese in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6: Anzahl der Aminosäuren die zwischen den glykosylierten Asparaginen und den substituierten Aminosäuren liegen**

	Pro136Leu	Tyr201Cys	Asp255His	Thr274Met	Pro377Leu
Asn158	21	42	96	115	218
Asn184	47	16	70	99	192
Asn350	213	148	94	75	—

Ein Vergleich der Abstände zeigt, dass bei Tyr201Cys der geringste Abstand, mit nur 16 Aminosäuren zwischen Oligosaccharid und Aminosäuresubstitution, vorliegt. Die unmittelbare räumliche Nähe zwischen der Fehlfaltung und einem potentiell reglucosylierbaren Oligosaccharid ist damit gegeben. Bei Pro136Leu befinden sich 21 Aminosäuren zwischen N-Glykan und ausgetauschter Aminosäure. Zwischen den relevanten Positionen von Asp255His, Thr274Met und Pro377Leu liegen 70 oder weit mehr Aminosäuren. Mit dieser Hypothese zur Reglucosylierung der hASA-Proteine lässt sich die beschleunigte Degradation von Tyr201Cys bei der Mannosidaseinhibition mit DMM erklären. Wenn die  $\alpha$ 1,2-Mannosidase II inhibiert wird, akkumulieren Polypeptide mit einer Man<sub>9</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> Struktur, einer potentiellen GT Substrat Struktur (s. Abbildung 28). Wird Tyr201Cys im Vergleich zu den anderen drei Proteinen bevorzugt durch die GT reglucosyliert, steigt nun die Wahrscheinlichkeit der glucosylierungsabhängigen, proteasomalen Degradation für dieses Polypeptid ungleich an. Es kommt zu der beobachteten, beschleunigten Degradation von Tyr201Cys. Dagegen werden, sofern überhaupt, die anderen Proteine nur selten reglucosyliert und damit erneut für diesen Degradationsweg zugänglich.

Dies führt letztlich zu der beobachteten Stabilisierung. Um diese Hypothese zu bestätigen, müssen weitere Untersuchungen zur Reglucosylierung der hASA-Proteine durch die GT durchgeführt werden.

Um einen besseren Einblick in das Zusammenspiel der beiden Degradationsprozesse zu erhalten, erfolgten weitere Untersuchungen (Abschnitt 5.1.1.3). Hierbei wurden die bisher nur einzeln verwendeten Glykosidaseinhibitoren DMM, DNM und Kif in den Kombinationen DMM/DNM, DMM/Kif und DNM/Kif eingesetzt. Diese Versuche wurden mit den aminosäuresubstituierten hASA-Proteinen Pro377Leu, Thr274Met, Asp255His und Tyr201Cys durchgeführt.

In Zellen, die während der „chase“ Phase mit DMM/DNM behandelt werden, erfolgt eine ähnlich beschleunigte Degradation der hASA-Proteine wie bei einer Inkubation mit DNM. Der stabilisierende Effekt von DMM auf die Proteine Pro377Leu, Thr274Met und Asp255His wird offensichtlich unterdrückt. Dass die stabilisierende Wirkung von DMM auf fehlgefaltete Proteine durch die gleichzeitige Inhibition der ER-Glucosidasen I und II unterdrückt werden kann, wird auch bei Untersuchungen mit fehlgefalteten  $\alpha$ 1-AT Proteinen und Thyroglobulin festgestellt [32, 91, 95]. Unter Einbezug der Erklärung für den destabilisierenden Effekt von DNM kann als Ursache für dieses Versuchsergebnis angenommen werden, dass für eine Demannosylierung durch die ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase II eine glucosefreie Oligosaccharid-Seitenkettenstruktur notwendig ist.

Weitere Ergebnisse resultieren aus der gleichzeitigen Behandlung der Zellen mit DNM und Kif. Ähnlich wie bei der alleinigen Behandlung mit Kif, wird eine deutliche Reduktion der Degradationsgeschwindigkeit festgestellt. Auch aus der Literatur ist bereits bekannt, dass bei gleichzeitiger Inhibition der ER-Glucosidasen I und II durch Cst und der ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase I durch Kif, ein stabilisierender Effekt auf fehlgefaltete Formen der Proteine Thyroglobulin, Protein C und Ig Ketten auftritt [30, 91].

Mit diesen Ergebnissen können die bisherigen Modellvorstellungen gefestigt und präzisiert werden. Zunächst wird deutlich, dass durch Kif und DMM mindestens zwei unterschiedliche ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidasen inhibiert werden. Wie oben bereits ausgeführt, inhibiert DMM die ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase II, welche nur glucosefreie Oligosaccharid-Seitenketten demannosyliert. Kif hingegen kann offensichtlich eine ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase inhibieren, welche glucosyierte und, wie *in vitro* Untersuchungen zeigen [37], deglucosyierte Oligosaccharid-Seitenketten demannosyliert. Aus diesen Resultaten geht klar hervor, dass mit DMM nicht die von Kif inhibierte ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase I inhibiert wird. Der Rückschluss, dass Kif auch die von DMM inhibierte ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase II inhibiert, kann jedoch nicht

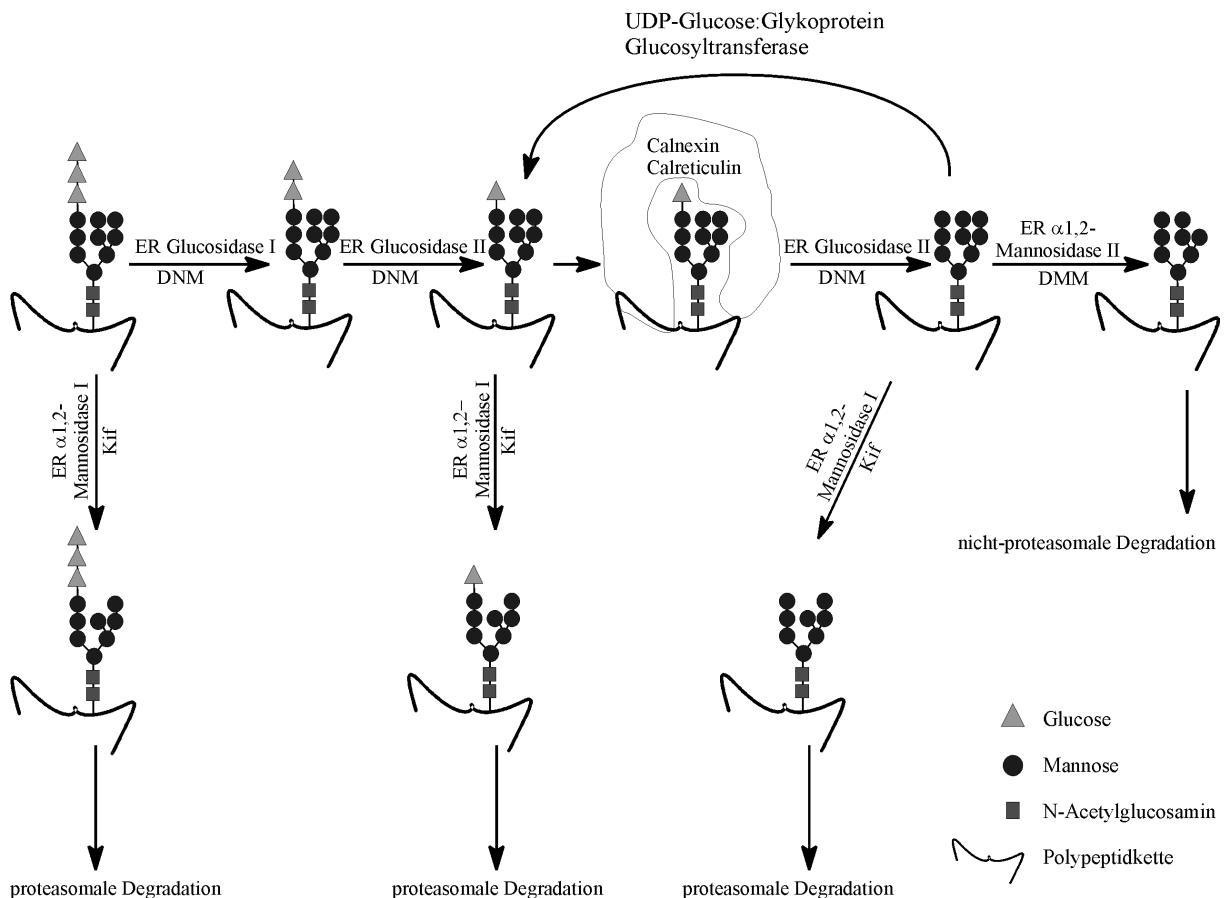
gezogen werden. Des Weiteren wird bestätigt, dass die Demannosylierung zu einer  $\text{Glc}_{0-3}\text{-Man}_8\text{-GlcNAc}_2$  Struktur immer eine notwendige Voraussetzung für einen Proteinabbau im Rahmen des ERAD ist. Dies betrifft die proteasomale sowie die nicht-proteasomale Degradation. Für beide Abbauprozesse scheint es unterschiedliche, nacheinander greifende Qualitätskontrollmechanismen zu geben. Die Einleitung der proteasomalen Degradation ist mit glucosylierten Oligosaccharid-Seitenketten, welche unmittelbar nach der Translokation, bis zur Abspaltung der dritten Glucose durch die ER Glucosidase II vorliegen, möglich. Damit ist die proteasomale Degradation der erste mögliche Abbauprozess für fehlgefaltete Proteine. Der zeitliche Rahmen, in dem ein Protein für den proteasomalen Abbau greifbar ist, wird zudem mit einer Reglucosylierung durch die GT vergrößert. Wenn eine Oligosaccharid-Struktur missgefalteter Proteine vollständig deglucosyliert ist, kann je nach Demannosylierung die proteasomale oder nicht-proteasomale Degradation eingeleitet werden.

Für die Hypothese, dass zumindest einfach glucosylierte Oligosaccharide ein Substrat der ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase I sind, spricht auch der folgende Befund. Bei der Überexpression der ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase I wurden an fehlgefaltetem  $\alpha$ 1-AT  $\text{Glc}_1\text{-Man}_8\text{-GlcNAc}_2$  Oligosaccharid-Seitenketten nachgewiesen [35].

Bei den Doppelinhhibitionen durch DMM/DNM und DNM/Kif waren die Versuchsergebnisse nicht voraussagbar. Die proteinstabilisierende Wirkung durch die gleichzeitige Inhibition der ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidasen I und II mit DMM/Kif für die Proteine Pro377Leu, Thr274Met und Asp255His war aber zu erwarten. Beide Inhibitoren alleine bewirken bereits einheitlich eine Verzögerung der Proteolyse durch die Blockade jeweils eines Abbauweges. Folglich muss es auch zur Proteinakkumulation kommen, wenn beide Wege unterbrochen werden.

Ein stabilisierender Effekt durch DMM/Kif für Tyr201Cys kann mit der entwickelten Hypothese dadurch erklärt werden, dass, ebenso wie für die anderen hASA-Proteine, beide Degradationswege blockiert wurden.

Zur Veranschaulichung des entwickelten Modells ist dieses in Abbildung 28 in Anlehnung an Abbildung 2 und Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 28: Modell zur Prozessierung von N-Glykanen im ER**

In Abb. 28 ist ein Modell zur Prozessierung von N-Glykanen an missgefalteten Proteinen dargestellt, welches mit Hilfe von Literaturdaten und den in dieser Arbeit erhaltenen Resultaten entwickelt wurde. Nach diesem Modell können missgefaltete Proteine mit einer Glc<sub>3</sub>-Man<sub>9</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>, Glc<sub>1</sub>-Man<sub>9</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> oder Man<sub>9</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> Struktur der proteasomalen Degradation zugeführt werden. Die Initiierung erfolgt jeweils durch die ER α1,2-Mannosidase I, welche durch Kifunensin (Kif) inhibiert werden kann. Mit der Glc<sub>1</sub>-Man<sub>9</sub>-GlcNAc<sub>2</sub> Struktur dienen die Proteine als Substrat für den Calnexin/Calreticulin Zyklus. Infolge der Deglucosylierung durch die ER Glucosidase II (durch Deoxymannojirimycin (DNM) inhibierbar) werden die Proteine von den Chaperonen freigesetzt. Nun können die Proteine entweder durch die GT im Calnexin/Calreticulin Zyklus verbleiben oder sie werden der proteasomalen bzw. nicht-proteasomalen Degradation zugeführt. Letztere wird durch die ER α1,2-Mannosidase II initiiert (durch Deoxymannojirimycin (DMM) inhibierbar).

Für die oben angeführte Hypothese, dass einfach glucosyierte Zuckerseitenketten fehlgefaltete Glykoproteine in die Degradation leiten, sprechen des Weiteren noch folgende Überlegungen. Einfach glucosyierte Zuckerseitenketten sind das Erkennungssignal für den Calnexin/Calreticulin Zyklus. Aufgrund derartiger Oligosaccharid-Seitenketten wird also signalisiert, dass diese Proteine nicht ihre korrekte Konformation ausgebildet haben; deshalb der Versuch, mit Chaperonen die richtige Strukturentwicklung aktiv zu unterstützen. Mit dieser Markierung wäre es einfach, falsch strukturierte Proteine parallel oder in Ankopplung zum Calnexin/Calreticulin Zyklus zu degradieren. Als Bindeglied in einem solchen

Degradationsweg kommt das ER Lektin „ER degradation-enhancing  $\alpha$ -mannosidase-like protein“ (EDEM) in Betracht, welches eine große Sequenzhomologie zu Klasse I  $\alpha$ 1,2-Mannosidasen aufweist [22, 97]. Es ist bekannt, dass EDEM an fehlgefaltetes  $\alpha$ 1-AT bindet und im Fall einer Überexpression die Degradationsgeschwindigkeit erhöht [98, 99]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die glucosylierte Form eines Amyloid-bildenden Proteins im Fall einer EDEM Überexpression schneller degradiert wird als die deglucosylierte Form [100].

#### ***6.1.1 Therapeutischer Ansatz in der ER Qualitätskontrolle***

Durch die Inhibition der ER-Glucosidasen I und II oder der ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidasen I und II mit Cst, Kif oder DMM kann die fehlgefaltete Form von  $\alpha$ 1-AT,  $\alpha$ 1-ATZ, die eigentlich im ER reteniert und von dort der Degradation zugeführt wird, von kultivierten Zellen sezerniert werden [94]. Allerdings ist die Funktionalität der sezernierten  $\alpha$ 1-ATZ Proteine gegenüber  $\alpha$ 1-AT reduziert. Ein ähnlicher Befund mit den im ER retenierten hASA-Proteinen könnte einen therapeutischen Ansatzpunkt für die MLD darstellen - auch wenn die exprimierten Proteine eine im Vergleich zur wtASA reduzierte Sulfataseaktivität aufweisen. Aus diesem Grund wurden, wie in Abschnitt 5.1.1.4 beschrieben, Zellen in Gegenwart von NH<sub>4</sub>Cl mit Kif behandelt. Wie die Ergebnisse zeigen, kommt es zwar bei den mit Kif und NH<sub>4</sub>Cl behandelten Zellen zu einer Sekretion der untersuchten hASA-Proteine, die Sekretionsraten sind aber, im Vergleich zu den in den Zellen nachgewiesenen Mengen an hASA-Protein, sehr gering. Unter der Einwirkung von Kif kann demnach nur ein sehr geringer Teil der exprimierten Proteine die ER Qualitätskontrolle passieren. Diese Menge scheint aber, im Vergleich zu den nun im ER akkumulierenden Proteinmengen, zu gering zu sein. Der Erfolg eines solchen Ansatzes hängt maßgeblich von der Fähigkeit der inaktiven hASA-Proteine ab, Sulfataseaktivität zu entwickeln. In einem anderen Versuchsansatz wurde daher die Sulfataseaktivität in einem Zelllysat von mit wtASA und HA-Thr274Met coexprimierenden Zellen gemessen, die 7 h vor der Lyse mit Kif behandelt wurden. Die zu erwartende Stabilisierung der hASA-Proteine war im Westernblot deutlich zu erkennen, eine Steigerung der Sulfataseaktivität war jedoch nicht festzustellen (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus den genannten Gründen wurde dieser Therapieansatz nicht weiter verfolgt.

## 6.2 Degradation der aminosäuresubstituierten hASA-Proteine

Wie unter 6.1 diskutiert, ist es möglich, dass die untersuchten aminosäuresubstituierten hASA-Proteine, basierend auf dem Modell von Spiro et al., parallel proteasomal und nicht-proteasomal degradiert werden [22]. Untersuchungen an  $\alpha 1$ -AT, PIZ und den unverknüpften Ig Ketten  $\mu$  und J haben gezeigt, dass Tyrosin-Phosphatasen in einen nicht-proteasomalen ERAD-Prozess involviert sind [29, 30]. In den durchgeföhrten Versuchen konnte die Degradationsgeschwindigkeit mit den Phosphataseinhibitoren PAO und SOV reduziert werden. Um die These der zwei gleichzeitig stattfindenden Degradationsprozesse für die hASA zu verifizieren, wurden daher „pulse-chase“-Versuche mit diesen beiden Inhibitoren durchgeföhr. Mit den Versuchen sollte zudem nach weiteren potentiellen Unterschieden bei der Degradation der sieben aminosäuresubstituierten hASA-Proteine gesucht werden. Anzumerken ist, dass die in den Versuchen (s. Abschnitt 5.1.2) eingesetzten Konzentrationen von PAO und SOV weit unter den in der Literatur verwendeten Konzentrationen lagen. Die behandelten Zellen zeigen bei den angegebenen Konzentrationen bereits eine Stunde nach Inkubationsbeginn morphologische Auffälligkeiten (Daten wurden nicht gezeigt).

Wie die Ergebnisse aus Abschnitt 5.1.2 zeigen, ist eine Reduktion der Degradationsgeschwindigkeit durch die Inhibition des Proteasoms mit Lc bei allen sieben Proteinen feststellbar. Ein Vergleich der Stabilisierungseffizienzen der einzelnen hASA-Proteine durch Lc zeigt deutliche Unterschiede. Außerdem fällt auf, dass keines der Proteine durch Lc zu 100% stabilisiert wird. Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass es unabhängig von dem jeweils verwendeten proteasomalen Inhibitor nie gelungen ist, zu degradierende Proteine 100%ig zu stabilisieren [51]. Um eine unvollständige Inhibition des Proteasoms dennoch auszuschließen, wurden Versuche mit unterschiedlichen Lc Konzentrationen durchgeföhr. In keinem der Versuche konnte eine Steigerung der Stabilisierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Bei niedrigen Expressionsraten konnte in Vorversuchen nach einem 8 h „chase“ mit Lc keine Stabilisierung nachgewiesen werden. Hierbei ist zu bedenken, dass in keinem der im Rahmen dieser Arbeit durchgeföhrten, aber auch in keinem der publizierten Versuche, eine 100%ige Blockierung des Abbaus durch Lc erreicht werden konnte. Das heißt, dass bei niedrigen Expressionsraten nach einem 8 h „chase“ die untersuchten Proteine sowohl mit, als auch ohne Lc komplett degradiert werden. Als weiterer, im Einklang mit allen bisherigen Ergebnissen stehender Erklärungsansatz ist wieder der parallele nicht-proteasomale Degradationsweg, der eine vollständige Stabilisierung mit Lc unmöglich macht, anzuführen. Die Aussage, dass alle

sieben hASA-Proteine offensichtlich proteasomal degradiert werden, kann mit diesen Resultaten verifiziert werden.

Wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, wurde mit keinem der anderen verwendeten Inhibitoren ein stabilisierender Effekt nachgewiesen. Allerdings war dies bei Lp und OA, die zur Kontrolle eingesetzt wurden, auch nicht zu erwarten. Bisher ist kein nicht-proteasomaler Degradationsweg charakterisiert, durch den unterschiedliche fehlgefaltete Proteine abgebaut werden. Derzeit sind nur individuelle, von Protein zu Protein verschiedene Abbauprozesse bekannt [51], daher sind PAO und SOV nicht die Ultima ratio zur Untersuchung für diesen Abbauweg. Die Gewichtung dieser Ergebnisse sollte somit nicht zu hoch sein, da immer noch die Rückschlüsse zu bedenken sind, die aus den Versuchen aus Abschnitt 5.1.1.2 und 5.1.1.3 gezogen werden können.

### ***6.3 Assoziation der hASA-Proteine im ER***

Protein-Protein Assoziationen tragen zur Aufrechterhaltung vieler Stoffwechselvorgänge im Organismus bei. Sie sind vor allem für die Funktion von zahlreichen regulatorischen Prozessen, Erkennungsmechanismen und der Signaltransduktion notwendig [101].

Aufgrund von Röntgenkristallstrukturuntersuchungen und Gelfiltrations-Versuchen ist bekannt, dass die wtASA in neutraler Lösung in Form von Homodimeren vorliegt. Wird der pH-Wert abgesenkt, formieren sich im sauren Milieu homooktamere Komplexe, wobei diese aus je vier dimeren Untereinheiten aufgebaut sind [71, 72, 89, 102].

Bisher wurde angenommen, dass die wtASA im ER während der voranschreitenden Prozessierung Dimere bildet, die letztlich bis zum Erreichen der Lysosomen bestehen bleiben. Das bedeutet, dass die wtASA den Transport zum Golgi-Apparat, die Phosphorylierung im cis-Golgi-Netzwerk, die M6P-Rezeptor Bindung und den anschließenden M6P-Rezeptor gesteuerten vesikulären Transport zu den Endosomen [53, 69, 70, 83], in Form der im ER gebildeten Dimere durchläuft. Nach der pH-Wert-abhängigen Dissoziation von den Rezeptoren, assoziieren die Dimere aufgrund des weiter sinkenden pH-Wertes miteinander. Schließlich liegen sie im Lysosom als Oktamere vor.

Ausgehend von den geschilderten Ergebnissen und Annahmen, wurden Untersuchungen durchgeführt, die detaillierte Informationen über die Dimerisierung der hASA innerhalb des ER liefern sollten. Um Versuchsergebnisse zu erhalten, die sich mit Blick auf die angeführte Fragestellung interpretieren lassen, ist es notwendig, Proteinsignale von Proteinen die miteinander assoziieren, voneinander unterscheiden zu können. Aus diesem Grund wurde, wie in Abschnitt 5.2.1 beschrieben, die hASA C-terminal mit einem HA-Epitop fusioniert. Durch

das Anfügen des HA-Epitops kann aus Lysaten von Zellen, welche die markierte und nicht markierte hASA coexprimierten, gezielt das markierte Protein immunpräzipitiert werden. Da das HA-markierte Protein einen Massenunterschied von 1 kDa im Vergleich zu der nicht markierten Form aufweist, kommt es zu einem differenzierten Laufverhalten in der SDS-PAGE. Hierdurch ist eine einfache Zuordnung der Proteinsignale im Westernblot und der Autoradiographie möglich.

Es ist bekannt, dass Proteine, die mit einem zusätzlichen Epitop markiert werden, ihre ursprünglichen physiologischen Eigenschaften stark verändern können. Aus diesem Grund musste zuerst sichergestellt werden, dass das HA-Epitop keine wesentlichen Eigenschaften wie z.B. die Sulfataseaktivität oder die Lokalisierung der wtASA-HA im Lysosom verändert. Wie unter 5.2.1.1 und 5.2.1.2 beschrieben, wurden Versuche durchgeführt, die dies bestätigen sollten. Ein Vergleich der Sulfataseaktivitäten zeigt, dass die wtASA-HA eine um ca. 25% höhere Aktivität aufweist. Da sich diese leicht erhöhte Aktivität reproduzierbar nachweisen lässt, kann eine strukturelle Veränderung der wtASA-HA gegenüber der wtASA durch das HA-Epitop nicht ausgeschlossen werden.

Aus den Immunpräzipitationen (Abbildung 13) geht hervor, dass nur ein Teil der exprimierten wtASA-HA mit dem mAK gegen das HA-Epitop präzipitiert werden kann. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass im C-terminalen Bereich während der Proteinprozessierung noch eine Modifikation durchgeführt wird. Entweder wird das HA-Epitop proteolytisch entfernt, oder es ist in Folge einer Konformationsänderung nicht mehr für den HA-mAK zugänglich. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass unter nativen Bedingungen präzipitiert wurde. Um zu prüfen, in welchem zeitlichen Rahmen das HA-Epitop „verschwindet“, wurden Versuche durchgeführt, bei denen die Zellen aufgrund einer NH<sub>4</sub>Cl Behandlung die wtASA-HA-Proteine ins Medium sezernierten (Abschnitt 5.2.1.2). In Abbildung 14 wird gezeigt, dass die ASA nur aus dem Zelllysat durch den HA-mAK präzipitiert werden kann. Aus dem Medium ist die Präzipitation mit dem mAK jedoch nicht möglich. Da die Konditionen der Präzipitation mit dem mAK mit denen des Versuches zuvor übereinstimmten, geht aus dem Ergebnis der Nachpräzipitation mit einem polyklonalen Antiserum hervor, dass noch eine größere Menge an ASA-Proteinen im Zelllysat und Medium vorhanden war.

Zusammenfassend lassen sich diese Ergebnisse wie folgt interpretieren. Die wtASA-HA-cDNA wurde vollständig transkribiert und translatiert. Durch den M6P-Rezeptor initiierten vesikulären Transport erreicht das exprimierte Protein die Lysosomen und ist

enzymatisch aktiv. Vor dem vesikulären Transport erfolgt aber offensichtlich noch eine Modifikation, in deren Folge der mAK das HA-Epitop nicht mehr binden kann.

In den bisherigen Versuchen wurde, wie bereits erwähnt, unter nativen Bedingungen präzipitiert. Sollte das HA-Epitop aufgrund einer Konformationsänderung nicht mehr durch den mAK detektierbar sein, müsste dies unter denaturierenden Bedingungen wieder möglich werden. Daher wurde, wie am Ende von Abschnitt 5.2.1.2 beschrieben, ein Immunpräzipitat aus dem Medium von NH<sub>4</sub>Cl behandelten Zellen, welche wtASA-HA exprimierten, mit einem polyklonalen Antiserum hergestellt. Dieses Präzipitat wurde im Westernblot mit dem HA-mAK untersucht. Im Ergebnis zeigt sich, dass die sezernierte hASA noch mit dem HA-Epitop markiert ist. Es ist also davon auszugehen, dass es während der Prozessierung innerhalb des ER oder Golgi-Apparats zu einer Konformationsänderung kommt, bei welcher das HA-Epitop so umgelagert wird, dass es nicht mehr von dem mAK gebunden werden kann. Eine Analyse der Ergebnisse aus Abschnitt 5.2.6.1 zeigt, dass die HA markierte Form der wtASA aus dem Zellysat fast quantitativ durch den HA-mAK präzipitiert werden kann. Der Nachweis auf dem „Blot“ erfolgte wie zuvor, unter denaturierenden Bedingungen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass das HA-Epitop noch während des vesikulären Transportes in die Lysosomen vorhanden ist.

Aufgrund der geschilderten Resultate ist davon auszugehen, dass das wtASA-HA-Protein nahezu die gleichen physiologischen Eigenschaften aufweist, wie das unmarkierte Protein. Aus diesem Grund ist es ein gutes Modell zur Untersuchung von Assoziationen innerhalb des ER.

In Abschnitt 5.2.2 wurden Untersuchungen bezüglich der Dimerisierung von wtASA-HA mit den hASA-Proteinen Asp335Val, Gly86Asp, Pro377Leu, Tyr201Cys, Thr274Met, Asp255His und Pro136Leu durchgeführt. Zur Kontrolle wurden Versuche auch mit den HA markierten Proteinen Asp335Val, Gly86Asp, Thr274Met, Asp255His sowie Pro136Leu und der nicht markierten PD-ASA der hASA gemacht. Wie aus den Ergebnissen (Abbildung 16 und Abbildung 17) ersichtlich ist, wurde in allen Versuchsansätzen bei der Präzipitation der HA markierten ASA, die nicht markierte Form der ASA copräzipitiert. Da die nicht markierten Proteine nicht von dem HA-mAK präzipitiert werden konnten, lassen diese Resultate auf eine Assoziation der nicht markierten mit den markierten Proteinen schließen. Bemerkenswert ist außerdem, dass alle fehlgefalteten hASA-Proteine, welche im ER reteniert werden, mit der wtASA assoziieren konnten.

Bei einem quantitativen Vergleich der Banden in Abbildung 16 fällt zudem auf, dass anders als in Abbildung 17, die Menge der präzipitierten wtASA-HA geringer war, als die der

copräzipitierten ASA. Da der Met-Gehalt aller untersuchten hASA-Proteine, mit Ausnahme von Thr274Met, identisch ist und die Plasmide zu gleichen Teilen bei der Zelltransfektion eingesetzt wurden, kann von einem äquivalenten Markierungsgrad durch [<sup>35</sup>S]-Met ausgegangen werden. Daraus folgt, dass ein HA-markiertes, präzipitiertes Protein an mehr als ein nicht markiertes Protein assoziiert sein muss. Die präzipitierten Proteinkomplexe bestanden demnach aus mehr als zwei hASA Untereinheiten. Um die Größe des Komplexes zu analysieren, wurden wie unter 5.2.3 beschrieben, Untersuchungen mit unterschiedlichen Konzentrationen der cotransfizierten Plasmide durchgeführt. Bei einer abnehmenden Expression der markierten ASA und einer steigenden Expression der nicht markierten ASA wurde gezeigt, dass das Verhältnis von markiertem zu nicht markiertem Protein bis zu 1:4,8 möglich war. Demnach kann ein Proteinkomplex bis zu der Größe eines Hexamers nicht ausgeschlossen werden. Ob alle Komplexe eine einheitliche Größe aufweisen, kann aufgrund der Resultate nicht gesagt werden. Die Ergebnisse lassen auch keine Rückschlüsse darüber zu, inwieweit es sich um einen nur aus ASA-Proteinen bestehenden Komplex handelt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die ASA modifizierenden Enzyme wie FGE oder Chaperone, zumindest zeitweise, Teil dieses Komplexes sind.

Um den Zeitpunkt der Oligomerisierung während der Protein-Biosynthese zu untersuchen, wurden Immunpräzipitationen nach einem „pulse“ von 10 min durchgeführt (Abschnitt 5.2.4). Aus Abbildung 19 geht hervor, dass die Copräzipitation von nicht HA markierter hASA bereits nach einem 10 min „pulse“ möglich ist. Auch hier lassen die Verhältnisse der Bandenintensität darauf schließen, dass die präzipitierten Komplexe aus mehr als 2 Untereinheiten bestanden.

Zusammenfassend kann also davon ausgegangen werden, dass die hASA im ER, unmittelbar nach der Translokation, zu Komplexen assoziiert. Diese bestehen aus mehr als 2 hASA Untereinheiten, weshalb die hASA innerhalb des ER möglicherweise gar nicht als Dimer in Erscheinung tritt. Einige Epitope die von struktursensitiven, monoklonalen hASA Antikörpern erkannt werden, bilden sich erst 15 – 20 min nach der Proteinbiosynthese aus [82]. Vor diesem Zeitpunkt konnte aber bereits die Komplexbildung nachgewiesen werden. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass die untersuchten aminosäuresubstituierten hASA-Proteine deutliche Strukturdefizite im Vergleich zur wtASA aufweisen [82]. Hervorzuheben ist noch einmal, dass das hASA-Polypeptid Thr274Met keines der Epitope ausbildet, welche von den monoklonalen Antikörpern erkannt werden. Alle aminosäuresubstituierten hASA-Proteine können dennoch mit der wtASA und der PD-ASA assoziieren. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Assoziation zu einem

Zeitpunkt erfolgt, zu dem die strukturelle Entwicklung der hASA noch nicht abgeschlossen sein kann. Daher stellt sich die Frage, inwieweit die Assoziation überhaupt von der Sekundär- oder Tertiärstruktur der hASA abhängt.

#### ***6.4 Schicksal der hASA-Proteine, welche in einem heterogenen Oligomer miteinander assoziiert sind***

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ein proteasomaler Abbau der untersuchten aminosäuresubstituierten hASA-Proteine stattfindet. Aufgrund der weiteren Ergebnisse ist davon auszugehen, dass parallel zum proteasomalen Abbau auch eine nicht-proteasomale Degradation erfolgt. Beide Prozesse sind Teil des ERAD. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die wtASA unmittelbar nach der Proteinbiosynthese mit allen fehlgefalteten hASA-Proteinen innerhalb des ER, heterooligomere Komplexe bilden kann. Daraus resultiert die Frage, ob das Schicksal der Proteine in einem heterogenen Komplex verändert wird.

In der Literatur werden Oligomere beschrieben, die sich aus richtig- und fehlgefalteten Proteinuntereinheiten zusammensetzen, wie z. B. der aminosäuresubstituierte Ammonium-Transporter LeAMT1;1, G458D, der funktionell inaktiv ist. Coexpressionsversuche mit dem wt-Transporter zeigten einen dominant negativen Effekt [103]. Als Ursache werden heteromere Komplexe vermutet. Ein weiteres Beispiel stellt das Ferrochelatase-Gen dar. Patienten die auf einem Allel dieses Gens eine Punktmutation aufweisen, welche zum Aminosäureaustausch (I186T oder M267I) führt, haben eine auf 20 – 30 % reduzierte Enzymaktivität. Diese Reduktion beruht auf der Bildung von strukturell defekten Heterodimeren [104]. Eine strukturelle Veränderung der Dimere führt des Weiteren zu einer verminderten spezifischen Aktivität, einer verminderten Expression und einer instabilen Struktur. Durch letztere verursacht eine Temperaturerhöhung auf 42° C den vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität. Eine Mutation auf dem Anionen-Austauscher AE1 Gen, führt zur Expression einer trunkierten Form des Proteins. Untersuchungen mit wt coexprimierenden Zellen haben gezeigt, dass das wt-Protein durch die Assoziation mit dem trunkierten Protein im prä-medialen Golgi-Apparat reteniert wurde [105]. Zwei Mutationen in Genen von Wnt Rezeptoren der Frizzled (Fz) Familie führen dazu, dass bei heterozygoten Patienten die wt-Proteine im ER reteniert werden [106]. Dadurch kommt es zu einer erheblichen Beeinflussung der Signaltransduktion. Bei allen geschilderten Beispielen kommt es zu dominant negativen Effekten aufgrund der Mutationen.

Im Fall der aminosäuresubstituierten hASA-Proteine ist bisher kein dominant negativer Effekt bekannt. Aus den Ergebnissen in Abschnitt 5.2.5.1 (Abbildung 20) geht jedoch hervor, dass

alle untersuchten aminosäuresubstituierten hASA-Proteine, inklusive der beiden das ER verlassenden hASA-Proteine (Arg84Gln und Arg370Trp), einen negativen Effekt auf die Sulfataseaktivität der wtASA ausüben. In allen coexprimierenden Zellen wurde die Enzymaktivität um ca. 50 % reduziert.

Als Ursache für den Aktivitätsverlust können zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden, wobei in beiden Fällen fehlgefaltete hASA-Proteine, welche mit wtASA-Untereinheiten assoziiert sind, den Verlust der enzymatischen Aktivität verursachen. Die eine Möglichkeit wäre, dass die wtASA-Untereinheiten gemeinsam mit den fehlgefalteten Proteinen durch ERAD abgebaut werden. Die zweite besteht darin, dass die wtASA-Untereinheiten während dieser Assoziation, aufgrund sterischer Hinderungen im Komplex oder inhibitorischer Effekte, nicht mehr vollständig prozessiert werden können und dadurch enzymatisch inaktiv sind. In diesem Fall wäre eine verstärkte Degradation innerhalb des Lysosoms denkbar, da auch fehlgefaltete hASA-Proteine, welche das ER verlassen können, im Lysosom eine wesentlich geringere Halbwertszeit haben als wtASA [71]. Quantitativ würde in diesem Fall die wtASA-Proteinmenge, welche das ER verlässt, durch die Assoziation nicht beeinträchtigt.

Um die Ursache für den Aktivitätsverlust zu analysieren, wurden Zellen unter dem Einfluss von NH<sub>4</sub>Cl untersucht. Mit dem Versuchspraktokoll, wie in Abschnitt 5.2.5.2 beschrieben, ist es möglich, eine quantitative Aussage über im ER retenierte und degradierte Proteinmengen zu machen. Wenn man die Sekretionsraten des Kontrollexperiments (Zellen die nur mit wtASA transfiziert wurden) auf 100 % festlegt, geht aus den Ergebnissen hervor, dass bei einer Coexpression von wtASA und Pro377Leu ca. 50% weniger wtASA in den Kulturüberstand sezerniert wurde (Abbildung 23). Da die wtASA aufgrund der NH<sub>4</sub>Cl Behandlung nicht in den Zellen akkumulieren konnte, wurde sie offensichtlich aufgrund der Assoziation mit Pro377Leu degradiert. Die zuvor gemessene verringerte Sulfataseaktivität ist also auf eine frühzeitige Degradation und die daraus resultierende quantitative Reduktion der enzymatisch aktiven wtASA-Proteine zurückzuführen. Die Degradationsgeschwindigkeit von Pro377Leu in Zellen die nur Pro377Leu exprimierten, ist identisch mit der von Zellen, die wtASA und Pro377Leu coexprimierten (Abbildung 22). Hieraus folgt, dass die wtASA unter den gewählten Versuchsbedingungen keinen positiven, stabilisierenden Effekt auf Pro377Leu hat.

Für die Cotransfektionen in den unter Abschnitt 5.2.5.2 beschriebenen Versuchen, wurden äquivalente Plasmidkonzentrationen verwendet. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die Expressionsraten von wtASA und Pro377Leu gleich hoch waren. Dies geht auch aus den

Bandenintensitäten in Abbildung 21 hervor (unterer Bereich). Wie in Abschnitt 5.2.3 gezeigt wurde, sind auch die aus den beiden hASA-Proteinen entstehenden Komplexe unter diesen Bedingungen gleichmäßig mit beiden Proteinen besetzt. Aus diesem Grund wurde geprüft, ob fehlgefaltete Untereinheiten in einem überwiegend aus wtASA aufgebauten Komplex erkannt und degradiert werden können. Es ist denkbar, dass diese Untereinheiten in einem solchen Komplex abgeschirmt das ER in Richtung der Lysosomen verlassen könnten. Eine hohe Selektivität und Effizienz des zellulären Qualitätskontrollsysteins konnte bereits an heterodimeren RNase B Proteinen gezeigt werden [26]. Bei diesen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die GT ausschließlich die fehlgefalteten Untereinheiten reglucosyliert. Denkbar wäre aber auch, dass in einem überwiegend aus wtASA bestehenden Komplex, eine fehlgefaltete Untereinheit durch starke Wechselwirkungen stabilisiert wird und dadurch die korrekte Struktur ausbilden kann. Aus Abbildung 24 (Abschnitt 5.2.5.3) geht eindeutig hervor, dass das Kontrollsysteem hoch selektiv arbeitet, da Pro377Leu vollständig innerhalb der Zelle degradiert wurde und nicht im Medium nachgewiesen werden konnte. Ob die Degradationsraten und Geschwindigkeiten der wtASA unter diesen Bedingungen im Vergleich zu Abschnitt 5.2.5.2 verändert sind, wurde bisher noch nicht untersucht.

Nachdem aufgeklärt ist, wie die fehlgefalteten hASA-Proteine einen negativen Effekt auf die wtASA ausüben, stellt sich die Frage nach der Ursache für die Degradation der wtASA. Im Verlauf der Immunpräzipitation wird das Präzipitat unter anderem mit einem SDS-haltigen Waschpuffer (Neufeldpuffer) und einer hochkonzentrierten Salzlösung (1,5 M KCl) behandelt. Dennoch bleiben die heteromeren Proteinkomplexe unter diesen Bedingungen beständig. Daraus geht hervor, dass die Wechselwirkungen, die diese Komplexe zusammenhalten, recht stark sein müssen. Es ist daher denkbar, dass die wtASA in Folge der Assoziation mit fehlgefalteten Untereinheiten in die Degradation gezwungen wird. Dieser Möglichkeit steht aber der Umstand entgegen, dass Proteine, die zur Degradation das ER verlassen müssen, durch den Sec61-Komplex oder Derlin-1 Retrotranslokator ins Cytosol gelangen [42, 43, 45, 46, 107-109]. Messungen des Sec61-Komplex Porendurchmessers lassen jedoch vermuten, dass Proteinkomplexe nicht in assoziierter Form aus dem ER retrotransloziert werden können [110, 111]. Vor einer Retrotranslokation müssten die Proteinkomplexe folglich in ihre Untereinheiten zerlegt werden. Wird ein Komplex mit richtig gefalteten Untereinheiten zerlegt, könnten diese eventuell wieder in den normalen Prozessierungsablauf integriert werden, was aber offensichtlich nicht der Fall ist. Dies führte zu der Annahme, dass die fehlgefalteten Untereinheiten bei der wtASA

Strukturveränderungen bewirken. Derartige Veränderungen könnten dazu führen, dass die wtASA letztlich als fehlgefaltet erkannt und somit für die Degradation markiert wird.

Um diesen Hypothesen nachzugehen, wurden zwei experimentell unterschiedliche Ansätze gewählt. Im ersten Versuchsansatz wurde die spezifische Aktivität der HA markierten wtASA bestimmt. Aufgrund der bisher erhaltenen Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die wtASA-HA mit dem HA-mAK maximal bis zu dem Zeitpunkt präzipitiert werden kann, an dem das Protein die Lysosomen erreicht. Die Quantität der präzipitierten wtASA-HA ist somit von deren Expression und deren Degradation, nicht aber von deren Akkumulation in den Lysosomen abhängig. Die Menge der präzipitierten wtASA-HA aus Zellen die nur wtASA-HA exprimieren und solchen, die eine aminosäuresubstituierte hASA coexprimieren, müsste sich daher ca. um den Faktor 2 unterscheiden (in Anlehnung an die 50%ige Reduktion der Sekretion, Abschnitt 5.2.5.2). Aus den Messwerten der präzipitierten Menge der wtASA-HA und der im Präzipitat enthaltenen Sulfataseaktivität ließ sich, wie in Abschnitt 5.2.6.1 durchgeführt, die spezifische Sulfataseaktivität berechnen. Wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, war diese bei cotransfizierten Zellen mit 51 - 70% (Abbildung 25) deutlich niedriger, als die der Kontrollzellen. Für die ermittelte Reduktion könnte eine Strukturveränderung der wtASA verantwortlich sein, da die Enzymaktivität maßgeblich von der Proteinstruktur abhängt. Strukturelle Veränderungen sind schließlich auch die Ursache für die fehlende Aktivität der untersuchten aminosäuresubstituierten hASA-Proteine. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die fehlgefalteten Untereinheiten einen inhibitorischen Effekt auf Enzyme, die zur Prozessierung der wtASA nötig sind, ausüben (z.B. FGE). Dadurch würde die Reifung der wtASA zu einem aktiven Enzym beeinträchtigt und die spezifische Aktivität reduziert werden. Die in diesem Versuchsansatz gefundene Reduktion der spezifischen Aktivität kann also nur als Indiz dafür gewertet werden, dass die wtASA durch die Assoziation mit fehlgefalteten Untereinheiten selbst als fehlgefaltete Untereinheit weiterprozessiert und letztlich degradiert wird.

Im zweiten Versuchsansatz wurde die Epitopentwicklung der mit Thr274Met-HA assoziierten wtASA untersucht (Abschnitt 5.2.6.2). Für Strukturuntersuchungen an der hASA stehen mehrere monoklonale Antikörper zur Verfügung [83]. Mit Hilfe dieser Antikörper, die jeweils unterschiedliche Epitope ausschließlich an der nativen Form der hASA erkennen, konnte ein zeitlicher Verlauf der Epitopausbildung gezeigt werden [82]. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete mAK bindet an ein Epitop, das unmittelbar nach der Translokation der wtASA ins ER Lumen gebildet wird. Thr274Met bildet dieses Epitop nicht aus [82]. Aufgrund der Annahme, dass Thr274Met-HA in wtASA coexprimierenden Zellen mit wtASA assoziiert,

sollte es möglich sein, Thr274Met-HA mit dem verwendeten mAK über die wtASA copräzipitieren zu können. Dies gelänge aber nur unter der Voraussetzung, dass die wtASA das entsprechende Epitop ausbildet, wie es in den Kontrollversuchen auch erfolgte. Da es nicht möglich war, das HA-Epitop des aminosäuresubstituierten Proteins im Westernblot nachzuweisen (s. Abbildung 26), kann die wtASA dieses Epitop im Falle einer Assoziation mit Thr274Met-HA offensichtlich nicht ausbilden.

Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse verdeutlicht die resultierenden Folgen einer Komplexbildung von wtASA mit aminosäuresubstituierten hASA-Proteinen. Die Ausbildung eines sich sehr früh in der Reifungsphase der wtASA entwickelnden Epitops, erfolgt durch die Assoziation nicht mehr. Aufgrund der Wechselwirkungen zwischen fehlgefalteten hASA-Proteinen und der wtASA wird die normale Strukturentwicklung der wtASA somit gehemmt, welches auch durch die Abnahme der spezifischen Aktivität bestätigt wird. Alle Indizien deuten daher stark darauf hin, dass die wtASA aufgrund dieser Konformationsveränderung im oligomeren Komplex durch das ER Qualitätskontrollsystem als missgefaltetes Protein detektiert und durch ERAD abgebaut wird. Die proteasomale Degradation der fehlgefalteten Proteine wurde in dieser Arbeit nachgewiesen. Es ist daher zu erwarten, dass auch die wt Untereinheiten in einem heterogenen Komplex, zumindest teilweise, im Proteasom degradiert werden. Mit dem Ergebnis, dass Pro377Leu assoziierte wtASA durch Lc in „pulse-chase“-Versuchen stabilisiert wurde, wird diese Annahme bestätigt (Abschnitt 5.2.7). Lc konnte, wie bei allen untersuchten fehlgefalteten Proteinen, auch bei der wtASA keine vollständige Stabilisierung bewirken. Das lässt darauf schließen, dass die wtASA möglicherweise parallel durch zwei Abbauprozesse degradiert wird, proteasomal und nicht-proteasomal. Bisher konnte noch nicht nachgewiesen werden, dass die aminosäuresubstituierten hASA-Proteine vor der proteasomalen Degradation ubiquitiniert werden. Wäre dies der Fall, würde der Nachweis, dass auch die assoziierte wtASA ubiquitiniert wird, diese Thesen beweisen.

## 7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an 9 hASA-Proteinen durchgeführt, um detaillierte Informationen über deren Prozessierung, Qualitätskontrolle und Assoziation zu Oligomeren innerhalb des endoplasmatischen Reticulums zu erhalten. 7 dieser Proteine weisen aufgrund von Punktmutationen jeweils eine Aminosäuresubstitution auf, die zur Retention der Proteine im ER und zu deren frühzeitigen Degradation führen. Bei den beiden anderen Proteinen, welche in den Lysosomen lokalisiert und enzymatisch aktiv sind, handelt es sich um die Wildtyp-, bzw. pseudodefiziente-Form der hASA.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass der Degradation der 7 im ER retenierten Proteine eine Prozessierung der Oligosaccharid-Seitenketten vorausgeht. Eine Inhibition der Glucosidasen I und II erhöht die Degradationsraten aller 7 Proteine, die Inhibition der ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase I reduziert die Abbaugeschwindigkeiten der 7 Proteine. Im Gegensatz zu diesen jeweils uniformen Effekten, führt die Inhibition der ER  $\alpha$ 1,2-Mannosidase II bei 4 von 5 untersuchten Proteinen zu einer Reduktion und bei einem Protein zu einer Beschleunigung der Degradationsgeschwindigkeit. Daraus resultiert die Annahme, dass die Proteine vor der Degradation nicht einheitlich prozessiert werden. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass alle 7 Proteine im Rahmen des „ERAD“ proteasomal abgebaut werden. Ein nicht-proteasomaler Degradationsweg konnte nicht direkt nachgewiesen werden, es sprechen jedoch einige Hinweise dafür. Da die erzielten Resultate nur teilweise mit den bisherigen Modellvorstellungen zur Prozessierung der Oligosaccharid-Seitenketten im Rahmen der Protein-Qualitätskontrolle erklärt werden konnten, wurden innerhalb dieser Arbeit einige Änderungen des bestehenden Modells postuliert.

Die Untersuchungsergebnisse zur Assoziation der hASA haben gezeigt, dass diese unmittelbar nach der Translokation ins ER-Lumen erfolgt und nicht an die endgültige Konformation gebunden ist. Selbst aminosäuresubstituierte Proteine, die im Vergleich zur wtASA starke Strukturdefizite aufweisen, assoziieren zu einem oligomeren Komplex. Nach den bisherigen Ergebnissen handelt es sich dabei um ein Hexamer. Im Falle einer Heterooligomerbildung üben alle im ER retenierten aminosäuresubstituierten hASA-Proteine einen negativen Effekt auf die Wildtyp-Form aus. Dieser äußert sich durch eine reduzierte Sulfataseaktivität innerhalb der Zellen und wird durch eine vorzeitige Degradation der wtASA gemeinsam mit den fehlgefalteten Proteinen bewirkt. Als Ursache für diesen Effekt konnten strukturelle Defizite an den Wildtyp-Proteinen festgestellt werden, welche direkt durch die Wechselwirkungen mit den fehlgefalteten Proteinen hervorgerufen werden könnten, oder

durch ein Zurückhalten der Wildtyp-Proteine in Bereichen des ER, welche die für die weitere Reifung notwendigen Enzyme nicht beinhalten.

## 8. Literatur

- 1 Walter P. and Johnson A. E. (1994) Signal sequence recognition and protein targeting to the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* **10**, 87-119
- 2 Walter P., Gilmore R. and Blobel G. (1984) Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* **38**, 5-8
- 3 Meyer D. I., Krause E. and Dobberstein B. (1982) Secretory protein translocation across membranes-the role of the "docking protein". *Nature* **297**, 647-650
- 4 Weng S. and Spiro R. G. (1996) Endoplasmic reticulum kifunensine-resistant alpha-mannosidase is enzymatically and immunologically related to the cytosolic alpha-mannosidase. *Arch Biochem Biophys* **325**, 113-123
- 5 Kornfeld R. and Kornfeld S. (1985) Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**, 631-664
- 6 Nilsson I. M. and von Heijne G. (1993) Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **268**, 5798-5801
- 7 Helenius A. (1994) How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **5**, 253-265
- 8 Parodi A. J. (2000) Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem* **69**, 69-93
- 9 Spiro R. G. (2000) Glucose residues as key determinants in the biosynthesis and quality control of glycoproteins with N-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* **275**, 35657-35660
- 10 Cabral C. M., Liu Y. and Sifers R. N. (2001) Dissecting glycoprotein quality control in the secretory pathway. *Trends Biochem Sci* **26**, 619-624
- 11 Lehrman M. A. (2001) Oligosaccharide-based information in endoplasmic reticulum quality control and other biological systems. *J Biol Chem* **276**, 8623-8626
- 12 Ellgaard L., Molinari M. and Helenius A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**, 1882-1888
- 13 Klausner R. D. and Sitia R. (1990) Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell* **62**, 611-614
- 14 Bonifacino J. S. and Lippincott-Schwartz J. (1991) Degradation of proteins within the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 592-600
- 15 Werner E. D., Brodsky J. L. and McCracken A. A. (1996) Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13797-13801
- 16 Kopito R. R. (1997) ER quality control: the cytoplasmic connection. *Cell* **88**, 427-430

- 17 Jarosch E., Lenk U. and Sommer T. (2003) Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Int Rev Cytol* **223**, 39-81
- 18 Lucocq J. M., Brada D. and Roth J. (1986) Immunolocalization of the oligosaccharide trimming enzyme glucosidase II. *J Cell Biol* **102**, 2137-2146
- 19 Spiro R. G. (2000) Processing enzymes involved in the deglycosylation of N-linked oligosaccharides of glycoproteins: glucosidase I and II and endomannosidase. In *Carbohydrates in Chemistry and Biology* (Ernst B., Hart G. W. and Sinay P., eds.), pp. 65-79, Wiley, Weinheim
- 20 Kornfeld S., Li E. and Tabas I. (1978) The synthesis of complex-type oligosaccharides. II. Characterization of the processing intermediates in the synthesis of the complex oligosaccharide units of the vesicular stomatitis virus G protein. *J Biol Chem* **253**, 7771-7778
- 21 Hubbard S. C. and Robbins P. W. (1979) Synthesis and processing of protein-linked oligosaccharides in vivo. *J Biol Chem* **254**, 4568-4576
- 22 Spiro R. G. (2004) Role of N-linked polymannose oligosaccharides in targeting glycoproteins for endoplasmic reticulum-associated degradation. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1025-1041
- 23 Spiro R. G., Zhu Q., Bhoyroo V. and Soling H. D. (1996) Definition of the lectin-like properties of the molecular chaperone, calreticulin, and demonstration of its copurification with endomannosidase from rat liver Golgi. *J Biol Chem* **271**, 11588-11594
- 24 Ware F. E., Vassilakos A., Peterson P. A., Jackson M. R., Lehrman M. A. and Williams D. B. (1995) The molecular chaperone calnexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. *J Biol Chem* **270**, 4697-4704
- 25 Helenius A., Trombetta E. S., Hebert D. N. and Simons J. F. (1997) Calnexin and calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends Cell Biol.* **7**, 193-200
- 26 Ritter C. and Helenius A. (2000) Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *Nat Struct Biol* **7**, 278-280
- 27 Trombetta S. E. and Parodi A. J. (1992) Purification to apparent homogeneity and partial characterization of rat liver UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. *J Biol Chem* **267**, 9236-9240
- 28 Ritter C., Quirin K., Kowarik M. and Helenius A. (2005) Minor folding defects trigger local modification of glycoproteins by the ER folding sensor GT. *Embo J* **24**, 1730-1738
- 29 Cabral C. M., Choudhury P. and Sifers R. N. (2000) Processing by endoplasmic reticulum mannosidases partitions a secretion-impaired glycoprotein into distinct disposal pathways. *J Biol Chem* **275**, 25015-25022
- 30 Fagioli C. and Sitia R. (2001) Glycoprotein quality control in the endoplasmic reticulum. Mannose trimming by endoplasmic reticulum

- mannosidase I times the proteasomal degradation of unassembled immunoglobulin subunits. *J Biol Chem* **276**, 12885-12892
- 31 Helenius A. and Aebi M. (2004) Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* **73**, 1019-1049
- 32 Liu Y., Choudhury P., Cabral C. M. and Sifers R. N. (1999) Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome. *J Biol Chem* **274**, 5861-5867
- 33 Ermonval M., Kitzmuller C., Mir A. M., Cacan R. and Ivessa N. E. (2001) N-glycan structure of a short-lived variant of ribophorin I expressed in the MadIA214 glycosylation-defective cell line reveals the role of a mannosidase that is not ER mannosidase I in the process of glycoprotein degradation. *Glycobiology* **11**, 565-576
- 34 Frenkel Z., Gregory W., Kornfeld S. and Lederkremer G. Z. (2003) Endoplasmic reticulum-associated degradation of mammalian glycoproteins involves sugar chain trimming to Man6-5GlcNAc2. *J Biol Chem* **278**, 34119-34124
- 35 Hosokawa N., Tremblay L. O., You Z., Herscovics A., Wada I. and Nagata K. (2003) Enhancement of endoplasmic reticulum (ER) degradation of misfolded Null Hong Kong alpha1-antitrypsin by human ER mannosidase I. *J Biol Chem* **278**, 26287-26294
- 36 Kitzmuller C., Caprini A., Moore S. E., Frenoy J. P., Schwaiger E., Kellermann O., Ivessa N. E. and Ermonval M. (2003) Processing of N-linked glycans during endoplasmic-reticulum-associated degradation of a short-lived variant of ribophorin I. *Biochem J* **376**, 687-696
- 37 Herscovics A., Romero P. A. and Tremblay L. O. (2002) The specificity of the yeast and human class I ER alpha 1,2-mannosidases involved in ER quality control is not as strict previously reported. *Glycobiology* **12**, 14G-15G
- 38 Lederkremer G. Z. and Glickman M. H. (2005) A window of opportunity: timing protein degradation by trimming of sugars and ubiquitins. *Trends Biochem Sci* **30**, 297-303
- 39 McCracken A. A. and Brodsky J. L. (2003) Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD). *Bioessays* **25**, 868-877
- 40 Kostova Z. and Wolf D. H. (2003) For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *Embo J* **22**, 2309-2317
- 41 Tsai B., Ye Y. and Rapoport T. A. (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 246-255
- 42 Wiertz E. J., Tortorella D., Bogyo M., Yu J., Mothes W., Jones T. R., Rapoport T. A. and Ploegh H. L. (1996) Sec61-mediated transfer of a

- membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**, 432-438
- 43 Pilon M., Schekman R. and Romisch K. (1997) Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *Embo J* **16**, 4540-4548
- 44 Plemper R. K. and Wolf D. H. (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci* **24**, 266-270
- 45 Lilley B. N. and Ploegh H. L. (2004) A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* **429**, 834-840
- 46 Ye Y., Shibata Y., Yun C., Ron D. and Rapoport T. A. (2004) A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* **429**, 841-847
- 47 Urade R., Takenaka Y. and Kito M. (1993) Protein degradation by ERp72 from rat and mouse liver endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **268**, 22004-22009
- 48 Moriyama T., Sather S. K., McGee T. P. and Simoni R. D. (1998) Degradation of HMG-CoA reductase in vitro. Cleavage in the membrane domain by a membrane-bound cysteine protease. *J Biol Chem* **273**, 22037-22043
- 49 Spiro M. J. and Spiro R. G. (2001) Release of polymannose oligosaccharides from vesicular stomatitis virus G protein during endoplasmic reticulum-associated degradation. *Glycobiology* **11**, 803-811
- 50 Mancini R., Aebi M. and Helenius A. (2003) Multiple endoplasmic reticulum-associated pathways degrade mutant yeast carboxypeptidase Y in mammalian cells. *J Biol Chem* **278**, 46895-46905
- 51 Schmitz A. and Herzog V. (2004) Endoplasmic reticulum-associated degradation: exceptions to the rule. *Eur J Cell Biol* **83**, 501-509
- 52 Fayadat L., Siffroi-Fernandez S., Lanet J. and Franc J. L. (2000) Degradation of human thyroperoxidase in the endoplasmic reticulum involves two different pathways depending on the folding state of the protein. *J Biol Chem* **275**, 15948-15954
- 53 Yaghootfam A., Schestag F., Dierks T. and Gieselmann V. (2003) Recognition of arylsulfatase A and B by the UDP-N-acetylglucosamine:lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-phosphotransferase. *J Biol Chem* **278**, 32653-32661
- 54 Kornfeld S. and Mellman I. (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol* **5**, 483-525
- 55 von Figura K. and Hasilik A. (1986) Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem* **55**, 167-193
- 56 von Figura K. (1991) Molecular recognition and targeting of lysosomal proteins. *Curr Opin Cell Biol* **3**, 642-646

- 57 Stang E., Kindberg G. M., Berg T. and Roos N. (1990) Endocytosis mediated by the mannose receptor in liver endothelial cells. An immunocytochemical study. *Eur J Cell Biol* **52**, 67-76
- 58 von Figura K. (1990) [Mannose-6-phosphate receptors: their role in the transport of lysosomal proteins]. *Naturwissenschaften* **77**, 116-122
- 59 Eto Y. and Ohashi T. (2000) Gene therapy/cell therapy for lysosomal storage disease. *J Inherit Metab Dis* **23**, 293-298
- 60 Braun M., Waheed A. and von Figura K. (1989) Lysosomal acid phosphatase is transported to lysosomes via the cell surface. *Embo J* **8**, 3633-3640
- 61 Stein C., Gieselmann V., Kreysing J., Schmidt B., Pohlmann R., Waheed A., Meyer H. E., O'Brien J. S. and von Figura K. (1989) Cloning and expression of human arylsulfatase A. *J Biol Chem* **264**, 1252-1259
- 62 Kreysing J., von Figura K. and Gieselmann V. (1990) Structure of the arylsulfatase A gene. *Eur J Biochem* **191**, 627-631
- 63 Dierks T., Lecca M. R., Schmidt B. and von Figura K. (1998) Conversion of cysteine to formylglycine in eukaryotic sulfatases occurs by a common mechanism in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* **423**, 61-65
- 64 Dierks T., Miech C., Hummerjohann J., Schmidt B., Kertesz M. A. and von Figura K. (1998) Posttranslational formation of formylglycine in prokaryotic sulfatases by modification of either cysteine or serine. *J Biol Chem* **273**, 25560-25564
- 65 Dierks T., Schmidt B., Borissenko L. V., Peng J., Preusser A., Mariappan M. and von Figura K. (2003) Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme. *Cell* **113**, 435-444
- 66 Dierks T., Schmidt B. and von Figura K. (1997) Conversion of cysteine to formylglycine: a protein modification in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11963-11968
- 67 Schmidt B., Selmer T., Ingendoh A. and von Figura K. (1995) A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* **82**, 271-278
- 68 Gieselmann V., Schmidt B. and von Figura K. (1992) In vitro mutagenesis of potential N-glycosylation sites of arylsulfatase A. Effects on glycosylation, phosphorylation, and intracellular sorting. *J Biol Chem* **267**, 13262-13266
- 69 Sommerlade H. J., Selmer T., Ingendoh A., Gieselmann V., von Figura K., Neifer K. and Schmidt B. (1994) Glycosylation and phosphorylation of arylsulfatase A. *J Biol Chem* **269**, 20977-20981
- 70 Sommerlade H. J., Hille-Rehfeld A., von Figura K. and Gieselmann V. (1994) Four monoclonal antibodies inhibit the recognition of arylsulphatase A by the lysosomal enzyme phosphotransferase. *Biochem J* **297 (Pt 1)**, 123-130

- 71 von Bulow R., Schmidt B., Dierks T., Schwabauer N., Schilling K., Weber E., Uson I. and von Figura K. (2002) Defective oligomerization of arylsulfatase a as a cause of its instability in lysosomes and metachromatic leukodystrophy. *J Biol Chem* **277**, 9455-9461
- 72 Lukatela G., Krauss N., Theis K., Selmer T., Gieselmann V., von Figura K. and Saenger W. (1998) Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry* **37**, 3654-3664
- 73 O'Brien J. S. and Sampson E. L. (1965) Lipid composition of the normal human brain: gray matter, white matter, and myelin. *J Lipid Res* **6**, 537-544
- 74 Fischer G. and Jatzkewitz H. (1977) The activator of cerebroside sulphatase. Binding studies with enzyme and substrate demonstrating the detergent function of the activator protein. *Biochim Biophys Acta* **481**, 561-572
- 75 von Figura K., Gieselmann V. and Jaeken J. (2001) Metachromatic leukodystrophy. In *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D., Childs B., Kinzler K. W. and Vogelstein B., eds.), pp. 3695-3724, McGraw-Hill, New York
- 76 Toda K., Kobayashi T., Goto I., Ohno K., Eto Y., Inui K. and Okada S. (1990) Lysosulfatide (sulfogalactosylsphingosine) accumulation in tissues from patients with metachromatic leukodystrophy. *J Neurochem* **55**, 1585-1591
- 77 Kafert S., Heinisch U., Zlotogora J. and Gieselmann V. (1995) A missense mutation P136L in the arylsulfatase A gene causes instability and loss of activity of the mutant enzyme. *Hum Genet* **95**, 201-204
- 78 Hess B., Kafert S., Heinisch U., Wenger D. A., Zlotogora J. and Gieselmann V. (1996) Characterization of two arylsulfatase A missense mutations D335V and T274M causing late infantile metachromatic leukodystrophy. *Hum Mutat* **7**, 311-317
- 79 Hermann S., Schestag F., Polten A., Kafert S., Penzien J., Zlotogora J., Baumann N. and Gieselmann V. (2000) Characterization of four arylsulfatase A missense mutations G86D, Y201C, D255H, and E312D causing metachromatic leukodystrophy. *Am J Med Genet* **91**, 68-73
- 80 Marcao A., Simonis H., Schestag F., Sa Miranda M. C. and Gieselmann V. (2003) Biochemical characterization of two (C300F, P425T) arylsulfatase a missense mutations. *Am J Med Genet A* **116**, 238-242
- 81 von Figura K., Steckel F. and Hasilik A. (1983) Juvenile and adult metachromatic leukodystrophy: partial restoration of arylsulfatase A (cerebroside sulfatase) activity by inhibitors of thiol proteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 6066-6070
- 82 Poepel P., Habetha M., Marcao A., Bussow H., Berna L. and Gieselmann V. (2005) Missense mutations as a cause of metachromatic

- leukodystrophy. Degradation of arylsulfatase A in the endoplasmic reticulum. *Febs J* **272**, 1179-1188
- 83 Schierau A., Dietz F., Lange H., Schestag F., Parastar A. and Gieselmann V. (1999) Interaction of arylsulfatase A with UDP-N-acetylglucosamine:Lysosomal enzyme-N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase. *J Biol Chem* **274**, 3651-3658
- 84 Lal A., Pang P., Kalekar S., Romero P. A., Herscovics A. and Moremen K. W. (1998) Substrate specificities of recombinant murine Golgi alpha1, 2-mannosidases IA and IB and comparison with endoplasmic reticulum and Golgi processing alpha1,2-mannosidases. *Glycobiology* **8**, 981-995
- 85 Bischoff J., Liscum L. and Kornfeld R. (1986) The use of 1-deoxymannojirimycin to evaluate the role of various alpha-mannosidases in oligosaccharide processing in intact cells. *J Biol Chem* **261**, 4766-4774
- 86 Rizzolo L. J. and Kornfeld R. (1988) Post-translational protein modification in the endoplasmic reticulum. Demonstration of fatty acylase and deoxymannojirimycin-sensitive alpha-mannosidase activities. *J Biol Chem* **263**, 9520-9525
- 87 Chang P. L., Ameen M., Yu C. Z. and Kelly B. M. (1988) Effect of ammonium chloride on subcellular distribution of lysosomal enzymes in human fibroblasts. *Exp Cell Res* **176**, 258-267
- 88 Seglen P. O. (1983) Inhibitors of lysosomal function. *Methods Enzymol* **96**, 737-764
- 89 Lewinski K., Chruscz M., Ksiazek D. and Laidler P. (2000) Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a new crystal form of arylsulfatase A isolated from human placenta. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56 (Pt 5)**, 650-652
- 90 Takakusaki Y., Hisayasu S., Hirai Y. and Shimada T. (2005) Coexpression of Formylglycine-Generating Enzyme Is Essential for Synthesis and Secretion of Functional Arylsulfatase A in a Mouse Model of Metachromatic Leukodystrophy. *Hum Gene Ther*
- 91 Tokunaga F., Brostrom C., Koide T. and Arvan P. (2000) Endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of misfolded N-linked glycoproteins is suppressed upon inhibition of ER mannosidase I. *J Biol Chem* **275**, 40757-40764
- 92 Molinari M., Galli C., Piccaluga V., Pieren M. and Paganetti P. (2002) Sequential assistance of molecular chaperones and transient formation of covalent complexes during protein degradation from the ER. *J Cell Biol* **158**, 247-257
- 93 Cabral C. M., Liu Y., Moremen K. W. and Sifers R. N. (2002) Organizational diversity among distinct glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation programs. *Mol Biol Cell* **13**, 2639-2650
- 94 Marcus N. Y. and Perlmutter D. H. (2000) Glucosidase and mannosidase inhibitors mediate increased secretion of mutant alpha1 antitrypsin Z. *J Biol Chem* **275**, 1987-1992

- 95 Liu Y., Choudhury P., Cabral C. M. and Sifers R. N. (1997) Intracellular disposal of incompletely folded human alpha1-antitrypsin involves release from calnexin and post-translational trimming of asparagine-linked oligosaccharides. *J Biol Chem* **272**, 7946-7951
- 96 Herscovics A. (1999) Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1473**, 96-107
- 97 Oda Y., Hosokawa N., Wada I. and Nagata K. (2003) EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* **299**, 1394-1397
- 98 Mast S. W., Diekman K., Karaveg K., Davis A., Sifers R. N. and Moremen K. W. (2005) Human EDEM2, a novel homolog of family 47 glycosidases, is involved in ER-associated degradation of glycoproteins. *Glycobiology* **15**, 421-436
- 99 Hosokawa N., Wada I., Hasegawa K., Yorihuzi T., Tremblay L. O., Herscovics A. and Nagata K. (2001) A novel ER alpha-mannosidase-like protein accelerates ER-associated degradation. *EMBO Rep* **2**, 415-422
- 100 Molinari M., Calanca V., Galli C., Lucca P. and Paganetti P. (2003) Role of EDEM in the release of misfolded glycoproteins from the calnexin cycle. *Science* **299**, 1397-1400
- 101 Gavin A. C., Bosche M., Krausn R., Grandi P., Marzioch M., Bauer A., Schultz J., Rick J. M., Michon A. M., Cruciat C. M., Remor M., Hofert C., Schelder M., Brajenovic M., Ruffner H., Merino A., Klein K., Hudak M., Dickson D., Rudi T., Gnau V., Bauch A., Bastuck S., Huhsk B., Leutwein C., Heurtier M. A., Copley R. R., Edelmann A., Querfurth E., Rybin V., Drewes G., Raida M., Bouwmeester T., Bork P., Seraphin B., Kuster B., Neubauer G. and Superti-Furga G. (2002) Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* **415**, 141-147
- 102 Vagedes P., Saenger W. and Knapp E. W. (2002) Driving forces of protein association: the dimer-octamer equilibrium in arylsulfatase A. *Biophys J* **83**, 3066-3078
- 103 Ludewig U., Wilken S., Wu B., Jost W., Obrdlik P., El Bakkoury M., Marini A. M., Andre B., Hamacher T., Boles E., von Wieren N. and Frommer W. B. (2003) Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1 NH4 uniporters. *J Biol Chem* **278**, 45603-45610
- 104 Ohgari Y., Sawamoto M., Yamamoto M., Kohno H. and Taketani S. (2005) Ferrochelatase consisting of wild-type and mutated subunits from patients with a dominant-inherited disease, erythropoietic protoporphyrria, is an active but unstable dimer. *Hum Mol Genet* **14**, 327-334
- 105 Quilty J. A., Cordat E. and Reithmeier R. A. (2002) Impaired trafficking of human kidney anion exchanger (kAE1) caused by hetero-oligomer formation with a truncated mutant associated with distal renal tubular acidosis. *Biochem J* **368**, 895-903

- 106 Kaykas A., Yang-Snyder J., Heroux M., Shah K. V., Bouvier M. and Moon R. T. (2004) Mutant Frizzled 4 associated with vitreoretinopathy traps wild-type Frizzled in the endoplasmic reticulum by oligomerization. *Nat Cell Biol* **6**, 52-58
- 107 Plemper R. K., Bohmler S., Bordallo J., Sommer T. and Wolf D. H. (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature* **388**, 891-895
- 108 Plemper R. K., Egner R., Kuchler K. and Wolf D. H. (1998) Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J Biol Chem* **273**, 32848-32856
- 109 Zhou M. and Schekman R. (1999) The engagement of Sec61p in the ER dislocation process. *Mol Cell* **4**, 925-934
- 110 Hamman B. D., Chen J. C., Johnson E. E. and Johnson A. E. (1997) The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40-60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* **89**, 535-544
- 111 Van den Berg B., Clemons W. M., J., Collinson I., Modis Y., Hartmann E., Harrison S. C. and Rapoport T. A. (2004) X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* **427**, 36-44

***Erklärung:***

Hiermit versichere ich, Peter Poeppel, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Ferner erkläre ich, die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben.

Bonn, März 2006

Peter Poeppel

***Veröffentlichungen***

Schestag F., Yaghootfam A., Habetha M., Poeppel P., Dietz F., Klein R. A., Zlotogora J. and Gieselmann V. (2002) The functional consequences of mis-sense mutations affecting an intra-molecular salt bridge in arylsulphatase A. Biochem J **367**, 499-504

Poeppel P., Habetha M., Marcao A., Bussow H., Berna L. and Gieselmann V. (2005) Missense mutations as a cause of metachromatic leukodystrophy. Degradation of arylsulfatase A in the endoplasmic reticulum. Febs J **272**, 1179-1188

***Konferenzbeitrag:***

Habetha M., Berna L., Poeppel P. and Gieselmann V. (2001) Folding intermediates in early biosynthesis stages of arylsulfatase A and correlation with structural propertier of various mutant arylsulfatase A. 13<sup>th</sup> ESGLD Workshop, Woudschoten: pp100

## **Danksagungen**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. V. Gieselmann für die Überlassung des interessanten Themas, die hervorragende Betreuung und die intensiven Diskussionen, die zahlreiche neue Anregungen brachten.

Herrn Prof. Dr. J Höhfeld danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates dieser Arbeit.

Für die vielen anregenden Diskussionen und zahlreichen Tipps möchte ich mich bei meinen Kollegen Dr. Sebastian Franken und Dr. Christof Völker bedanken.

Bei Herrn Detlef Forst möchte ich mich für die Umsetzung und Verbesserung meiner Konstruktionspläne zum Bau der Gerätschaften zur rationellen Durchführung von Immunpräzipitationen bedanken.

Für das fleißige Korrekturlesen der Dissertation möchte ich mich bei Frau Dipl. Biol. Michaela Kalmes und Frau Ute Marion Poeppel bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen anderen Personen, die mit Tipps und Anregungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter die mich stets unterstützt hat.