

*Glykosylierungsstellen-spezifische Analytik der Oligosaccharide
rekombinant hergestellter humaner Arylsulfatase A,
produziert in verschiedenen Zelllinien*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Stephan Schröder

aus

Weimar

Bonn 2008

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

1. Referent: Prof. Dr. V. Gieselmann

2. Referent: Prof. Dr. K. Sandhoff

Tag der Promotion: 08.Mai 2008

Diese Promotion ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

1	Einleitung	1
1.1	Proteinglykosylierung	1
1.2	Die Biosynthese der Oligosaccharide	2
1.3	Glykoproteinfaltung	5
1.4	Der Calnexin/Calreticulin Zyklus	5
1.5	ER-assoziierte Degradation (ERAD)	6
1.6	Mannose-6-Phosphat Rezeptoren und intrazelluläre Sortierung lysosomaler Proteine	8
1.7	Humane Arylsulfatase A (hASA)	11
1.8	Metachromatische Leukodystrophie	12
1.9	Formylglycin – eine posttranslationale Modifikation von Sulfatasen	12
2	Zielsetzung	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Chemikalien	16
3.2	Geräte	16
3.3	Standardlösungen	18
3.4	Verbrauchsmaterialien	21
3.5	Bakterien	21
3.6	Silanisieren von Glas- und Plastikmaterial	21
3.7	Bestimmung der Proteinkonzentration	21
3.8	DNA-Sequenzierung	22
3.9	In vitro Mutagenese des MPR 300	22
3.9.1	Oligonukleotide	22
3.9.2	Vektor	23
3.10	Erzeugen stabiler Zelllinien	25
3.11	Bindung von rhASA an das MPR300-Konstrukt	26
3.12	Kultivierung von hASA-überexprimierenden Zellen und Vorbereitung der Überstände	26
3.13	Aufreinigung monoklonaler Antikörper	27
3.14	Affinitätschromatographie mittels der Anti-hASA-Säule	27
3.15	Gewinnung von zellulärer ASA	28
3.16	Messung enzymatischer Aktivitäten	28
3.16.1	Bestimmung der Arylsulfatase A-Aktivität	28
3.16.2	Bestimmung der β -Hexosaminidase-Aktivität:	29
3.16.3	Bestimmung der lysosomalen sauren Phosphatase-Aktivität	29
3.16.4	Bestimmung der Sialidase-Aktivität im Zellüberstand	29
3.16.5	Bestimmung der Fukosidase-Aktivität im Zellüberstand	30
3.16.6	Bestimmung der α -Mannosidase-Aktivität im Zellüberstand	30
3.17	Bestimmung der hASA durch indirekten ELISA	30
3.18	Reinigung von Oligosacchariden	31
3.19	Fluoreszenzmarkierung von Oligosacchariden	32
3.20	Partielle saure Hydrolyse von Dextran	32
3.21	ASA-Trypsin-Verdau	33
3.22	HPLC	33
3.22.1	Entsalzung	33
3.22.2	Gelchromatographie	33
3.22.3	RP-HPLC	33
3.22.4	Fluoreszenzprofile	34
3.23	Verdau der Oligosaccharide mit Exoglykosidasen	35
3.23.1	α -L-Fukosidase	35
3.23.2	α -Mannosidase	35
3.23.3	Sialidase	35
3.23.4	β -N-Acetylhexosaminidase	36
3.23.5	β -Galaktosidase	36
3.23.6	Phosphatase	36
3.24	Edman Sequenzierung	36
3.25	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	36

4	Ergebnisse	38
4.1	Glykosylierungsstellen-spezifische Analytik der Oligosaccharide von hASA	38
4.1.1	Strategie zur Analyse der Oligosaccharidseitenketten der hASA	38
4.1.2	Trennung der tryptischen Peptide der hASA	40
4.1.3	Trennung von Glykosylierungsstelle 1 und 2 der hASA	43
4.1.4	Aufreinigung und Markierung der Oligosaccharide	45
4.1.5	Dextranstandard zur Ermittlung der Glukose Einheiten (GU, glucose units)	46
4.1.6	Standardoligosaccharide	49
4.1.7	Nachweisgrenze von 2-Aminobenzamid markierten Oligosacchariden	52
4.2	Glykosylierungsstellen-spezifische Analytik der Oligosaccharide von hASA, sezerniert von BHK-Zellen	53
4.3	Glykosylierungsstellen-spezifische Analytik der Oligosaccharide von hASA, sezerniert von CHO-Zellen	61
4.4	Glykosylierungsstellen-spezifische Analytik der Oligosaccharide von hASA, sezerniert von CHO-Zellen, kultiviert in einem Bioreaktor	65
4.5	Analytik der Oligosaccharide von hASA, isoliert aus CHO-Zellen	69
4.6	Glykosylierungsstellen-spezifische Analytik der Oligosaccharide von hASA, sezerniert von HT1080-Zellen	71
4.7	Enzymaktivitäten im Medium von kultivierten Zellen	74
4.7.1	Enzymaktivitäten im Medium von CHO-Zellen	74
4.7.2	Enzymaktivitäten im Medium von BHK-Zellen	75
4.7.3	Enzymaktivitäten im Medium von HT1080-Zellen	76
4.7.4	Vergleich der Enzymaktivitäten in verschiedenen Zelllinien	77
4.8	Degradation der Oligosaccharide der ASA in konditioniertem Medium	79
4.9	Bindung von rhASA an MPR 300	82
4.10	Bestimmung des Verhältnisses von Formylglycin zu Cystein an Position 69 der rhASA mittels MALDI-TOF-MS	88
5	Diskussion	93
5.1	Glykosylierungsstellen-spezifische Analytik der Oligosaccharide von hASA aus verschiedenen Zelllinien	93
5.2	Glykosylierungsmuster der ASA, produziert in verschiedenen Zelllinien	97
5.3	Enzymaktivitäten im Medium von kultivierten Zellen	101
5.4	Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf das Glykosylierungsmuster der hASA	104
5.5	Glykosylierungsmuster von lysosomaler CHO-hASA	109
5.6	Bindung von ASA an MPR300	109
5.7	Bestimmung des Formylglycin-/Cystein-Verhältnis hASA durch MALDI-TOF-MS	111
6	Zusammenfassung	113
7	Literaturverzeichnis	114
	Erklärung	124
	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
	Veröffentlichungen	125
	Danksagung	126

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
AS	Aminosäure
as	antisense
ASA	Arylsulfatase A
BHK21-Zellen	Baby Hamster Nierenzellen 21
BR	Bioreaktor
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHO-Zellen	Chinese hamster ovary-Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Endo H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERAD	Endoplasmatic reticulum associated degradation
ERGIC	Endoplasmatisches Reticulum-Golgi intermediate compartment
FGE	C _a -Formylglycin-Generierendes Enzym
Fgly	Formylglycin
FKS	fötales Kälberserum
Fuk	Fukose
G1/2/3	Glykosylierungsstelle 1/2/3
G6P	Glukose-6-Phosphat
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GT	UDP-Glc: Glykoprotein Glukosyltransferase
GU	Glukoseeinheiten
h	Stunde
hASA	Humane Arylsulfatase A
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IGFR	Insuline like growth factor receptor
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo-Dalton
Lsg	Lösung
M	Molarität
M6P	Mannose-6-Phosphat
mAK	Monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix assisted Laser Desorption/Ionization
Man	Mannose
max.	Maximal
ME	2-Mercaptoethanol
min	Minute
MLD	metachromatische Leukodystrophie
MPR	Mannose-6-Phosphat Rezeptor
MS	Massenspektrometer
MSD	Multiple Sulfatase Defizienz
OD	Optische Dichte
OST	Oligosaccharyltransferase
p.A.	Pro Analysis
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PCR	Polymerase Kettenreaktion
s	Sense
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sial	Sialinsäure
SPE	Solid phase extraction
SRP	Signal recognition particle
Strep	Streptomycin
SUMF	Sulfatase-modifizierender Faktor
TGN	<i>Trans</i> -Golgi-Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
TOF	Time of flight
v/v	Verhältnis der Volumina
w/v	Verhältnis: Gewicht zu Volumen
wtASA	Wildtyp-Arylsulfatase
ZK	Zellkultur

1 Einleitung

1.1 Proteinglykosylierung

Mehr als die Hälfte aller eukaryontischer Proteine sind Glykoproteine, von denen wiederum ca. 90 % N-gebundene Glykane tragen [Apweiler, 1999]. Das Molekulargewicht N-gebundener Oligosaccharide kann bis zu 3 kDa betragen, weshalb - gerade bei mehrfach glykosylierten Proteinen - der Anteil der Glykane an der Gesamtmasse eines Glykoproteins erheblich sein kann.

Die N-gebundenen Oligosaccharide dieser Proteine haben verschiedene Funktionen. Sie:

- erhöhen die Löslichkeit im wässrigen Milieu,
- sichern die korrekte Faltung des Proteins,
- stabilisieren das Protein gegenüber Degradation und Proteolyse und regulieren somit den Proteinumsatz,
- tragen zur Immunantwort bei,
- bestimmen (zusammen mit anderen funktionellen Gruppen) die Ladung und den isoelektrischen Punkt des Proteins,
- fungieren als Ligand für Glykan-bindende Proteine (Lektine) und
- vermitteln die Wechselwirkung mit Pathogenen.

Die Halbwertszeit einiger Glykoproteine wird durch die Struktur der Oligosaccharide bestimmt. Beispielsweise können endständige Sialinsäurereste durch die Aktivität von Sialidasen entfernt werden. Dadurch entstehen Glykoproteine, die durch den Asialoglykoproteinrezeptor erkannt und durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden können [Ashwell, 1982].

Die extrem kurze Halbwertszeit des thrombolytischen Medikamentes t-PA (tissue-type plasminogen activator) beruht auf der Bindung des mannosereichen Glykananteils an einen hepatischen Mannoserezeptor [Lucore, 1988]. Sulfatierte Glykoprotein hormone, wie das Luteinisierungshormon (LH), werden aufgrund des endständigen $\text{SO}_4\text{-4GalNAc}\beta\text{1}$ von einem Rezeptor der Kupfferschen Sternzellen aus dem Blutkreislauf entfernt [Drickamer, 1991].

Es gibt Hinweise darauf, dass eine veränderte Glykosylierung in malignen Zellen das Metastasierungsverhalten beeinflusst. Bei Mamma-Karzinom-Zellen wurde nachgewiesen, dass eine α 2-8-Polysialylierung zu einer verminderten Zell-Zell-Adhäsion beiträgt und damit die Infiltration in das umliegende Gewebe gefördert wird [Martersteck, 1996].

Viren, Bakterien und Parasiten binden spezifisch an bestimmte Kohlenhydratstrukturen der Zielzelle [Varki, 1992]. Beispielsweise bindet das Influenza-Virus A an Neu5Ac α 2-6Gal, während Influenza-Virus B an Neu5Ac α 2-3Gal bindet [Schauer, 1985].

Oligosaccharide können die immunogene Wirkung von Glykoproteinen beeinflussen, indem sie antigene Bereiche des Proteins maskieren. Andererseits können sie auch selbst antigen wirken [Feizi, 1987]. Das bekannteste Beispiel dafür sind die Kohlenhydratdeterminanten des Blutgruppen-ABO-Systems.

Die Glykane liegen im wässrigen Milieu auf der Oberfläche des Proteins. Sie bilden flexible, hydratisierte verzweigte Seitenketten. Sie liegen vornehmlich in Bereichen, in denen sich die Sekundärstruktur des Proteins ändert [Petrescu, 2004]. Durch diese Eigenschaften bestimmen sie maßgeblich die Oberflächenstruktur des Proteins, sind aber auch ein ideales Angriffsziel für Enzyme. Sie sind Angriffspunkt für intensive Modifizierungsreaktionen, die zu lokal begrenzten unterschiedlichen Proteineigenschaften führen. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Glykane an einer Glykosylierungsstelle wird als Mikroheterogenität bezeichnet. Sie spielt bei Prozessen wie der Entwicklung und Differenzierung von Zellen aber auch für die Physiologie und bei Krankheiten eine entscheidende Rolle. Die Mikroheterogenität, also die unterschiedliche Ausbildung bzw. Prozessierung der Oligosaccharide an einer bestimmten Glykosylierungsstelle, wird überlagert durch die variable Belegung von Glykosylierungsstellen im Protein. Ein Glykosylierungsmotiv kann entweder immer ignoriert werden, immer belegt sein oder auch variabel genutzt werden [Apweiler, 1999]. Diese Varianz der Proteinglykosylierung wird als Makroheterogenität bezeichnet.

1.2 Die Biosynthese der Oligosaccharide

Die Biosynthese von Glykoproteinen findet im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat statt. Im ER wird die Kernstruktur der Oligosaccharide kovalent an die

Polypeptidkette gebunden und an den Glykanen finden erste Modifizierungs- und Übertragungsreaktionen statt. Nach der korrekten Faltung und Oligomerisierung des Glykoproteins wird dieses zum Golgi-Apparat gebracht, wo weitere Modifizierungen der N-gebundenen Glykane stattfinden.

Die vorgefertigte Oligosaccharidgrundstruktur wird im Lumen des ER *en bloc* auf das Protein übertragen. Diese Struktur besteht in nahezu allen Eukaryonten aus drei Glukose-, neun Mannose- und zwei N-Acetylglukosaminresten ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$, s. Abb. 1). Die Biosynthese beginnt auf der zytoplasmatischen Seite des ER's mit der Übertragung von N-Acetylglukosamin-1-Phosphat auf den Lipid-Träger Dolicholphosphat. Dabei wird UDP-GlcNAc zu UMP und P_i gespalten. Anschließend werden schrittweise ein weiterer GlcNAc-Rest und fünf Mannose-Einheiten übertragen. Die so generierte $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Struktur wird dann durch eine ATP-unabhängige, bidirektional arbeitende Flippase zur lumenalen Seite des ER's transloziert [Hirschberg, 1987]. Auf der lumenalen Seite werden vier weitere Mannose- und drei Glucose-Einheiten addiert. Jede dieser Additionsreaktionen wird katalysiert durch eine Glykosyltransferase, die hochspezifisch für das jeweilige Substrat ist, so dass geschlussfolgert werden kann, dass die Biosynthese der verzweigten Oligosaccharide linear ist, bzw. schrittweise erfolgt [Burda, 1999].

Die Addition der letzten Glukoseeinheit (n in Abb. 1) ist der letzte Schritt, bevor die Oligosaccharyltransferase (OST), zusammen mit Immunglobulin-bindenden Proteinen (z.B.: BiP), Calnexin und möglichen weiteren Faktoren die fertige $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Struktur auf die naszierende Polypeptidkette überträgt. Die in das Lumen des ER's eindringende Polypeptidkette wird von der OST bezüglich der Glykosylierungssequenz Asn-X-Ser/Thr (Sequon) abgerastert. Das X steht dabei für eine beliebige Aminosäure außer Prolin. An dem noch immer ungefalteten Polypeptid knüpft die OST eine N-glykosidische Bindung zwischen der o.g. Oligosaccharidstruktur und der Seitenkette des Asparagins. Der Oligosaccharidtransfer erfordert die Bildung einer Schleife in der Polypeptidkette. Dadurch wird die Hydroxylgruppe des benachbarten Serins bzw. Threonins in räumliche Nähe zum Amid des Asparagins gebracht, wodurch die Nucleophilie des Amids erhöht und der Transfer ermöglicht wird [Bause, 1983; Imperiali, 1992]. Das erklärt auch den Befund, dass das X in der Konsensussequenz für eine beliebige Aminosäure, außer Prolin steht, da Prolin die Bildung der Schleife verhindert.

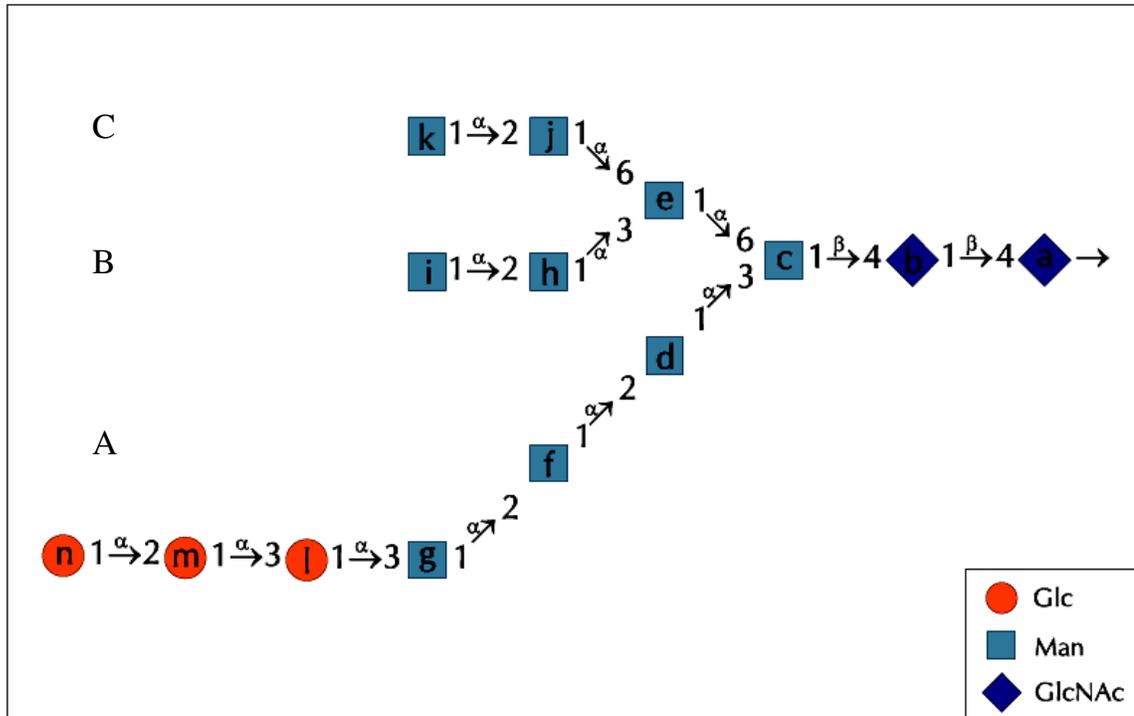


Abb. 1: Struktur des Oligosaccharids, das bei der N-Glykosylierung von Proteinen im ER übertragen wird. Die Kernstruktur besteht aus insgesamt 14 Monomeren: 3 Glukoseresten (Kreise), 9 Mannoseresten (Quadrate) und 2 N-Acetylglukosaminen (Rauten). Jedes Monomer ist mit einem Buchstaben gekennzeichnet (a-n). Die Zahlen zwischen den Monomeren geben das jeweilige C-Atom an, über das die Monomere verknüpft sind, der griechische Buchstabe über den Zahlen beschreibt die Stellung des anomeren C-Atoms. Die drei Verzweigungen der Oligosaccharidstruktur sind mit den Buchstaben A, B, C gekennzeichnet.

Die terminale α -1,2-verknüpfte Glukose (n in Abb. 1) in der lipidverankerten $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Struktur ist entscheidend für die Erkennung durch die OST. Der limitierende Faktor für die Glykosylierungsrate ist die Verfügbarkeit des dolicholgebundenen Oligosaccharids. In *in vitro* Versuchen konnte allerdings gezeigt werden, dass die OST im Falle der völligen Abwesenheit der $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ -Struktur auch verkürzte Oligosaccharidstrukturen übertragen kann [Kelleher, 2001].

Nicht jede Glykosylierungssequenz wird glykosyliert. Eine Analyse von gut untersuchten Glykoproteinen in der Swiss-Prot Datenbank ergab, dass ca. 2/3 aller Erkennungssequenzen glykosyliert werden [Apweiler, 1999; Petrescu, 2004]. Warum einige Erkennungssequenzen immer, andere nie, wieder andere partiell glykosyliert werden ist noch weitgehend unverstanden. Verschiedene Faktoren werden dafür verantwortlich gemacht, so z.B. nicht nur die Aminosäure in der Mitte des Sequons sondern auch angrenzende Aminosäuren, die Stelle der Erkennungssequenz in der Polypeptidkette, der Status der Proteinfaltung, die Verfügbarkeit von Dolichol-Vorstufen und die Verfügbarkeit von fertig prozessierten Oligosaccharidstrukturen.

1.3 Glykoproteinfaltung

Die Faltung der Glykoproteine beginnt mit dem Eintritt der Polypeptidkette durch den Translokationskomplex in das Lumen des ER's. Im Gegensatz zu Proteinen im Zytosol benötigen die meisten Proteine, die sich im ER falten, Disulfidbrücken [Wacker, 2002; Chen, 1995; Daniels, 2003]. Die Disulfidbrücken werden durch einen Oxidationsprozess gebildet, der durch eine Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase katalysiert wird [Fassio, 2002]. Abgeschlossen wird der Faltungsprozess oftmals durch die Oligomerisierung von mehreren Untereinheiten.

An der Faltung der Glykoproteine sind die N-gebundenen Glykane nicht direkt beteiligt, sie ermöglichen aber die Bindung der Glykoproteine an verschiedene Lektine im ER. Die N-gebundenen Glykane fungieren dabei als Sortierungssignal, das von der Zelle mehrfach modifiziert wird, um den Faltungsstatus des Proteins zu dokumentieren.

1.4 Der Calnexin/Calreticulin Zyklus

Die ersten Modifizierungsreaktionen der ER-lokalisierten Qualitätskontrolle sind die Abspaltung der endständigen Glukose (n in Abb. 1) durch die membranständige ER-Glukosidase I und der folgenden Glukose (m in Abb. 1) durch die im ER-Lumen lokalisierte ER-Glukosidase II. Die Abspaltung der äußeren beiden Glukosen, ermöglicht die Bindung an die Chaperone Calnexin und Calreticulin und verhindert gleichzeitig die Aggregation und Ausschleusung des fehlgefalteten Proteins aus dem ER. Nach der Bindung wird das Protein einer Thiol-Disulfid-Oxidoreduktase (ER protein 57, Erp57) präsentiert, die die Ausbildung der Disulfidbrücken sicherstellt. Die Abspaltung der letzten Glukoseeinheit (l in Abb. 1), ebenfalls durch die ER-Glukosidase II führt zur Dissoziation des Proteins von den Chaperonen. Die ER-Glukosidase II ist ein lösliches Enzym, das aus zwei Untereinheiten besteht. Es konnte gezeigt werden, dass die aktiven Zentren zur Abspaltung der beiden Glukosen zwar räumlich getrennt, aber auf der selben Untereinheit lokalisiert sind. [Trombetta, 2001; Spiro, 2000]. Nach Abspaltung der letzten Glukose werden korrekt gefaltete Proteine durch verschiedene Lektine wie z.B. ERGIC-53 (ER-Golgi intermediate compartment), VIP36 (vesicular integral protein 36) und/oder VIPL (VIP36-like protein) gebunden und aus dem ER geschleust. Fehlgefaltete Proteine werden von einem löslichen Enzym, der UDP-Glc: Glykoprotein Glukosyltransferase (GT) erkannt

und reglykosyliert. Die Frage, wie ein Protein den Faltungsstatus eines anderen Proteins erkennen kann, kann bis heute nur in Ansätzen beantwortet werden. Wahrscheinlich präsentieren fehlgefaltete Proteine grössere hydrophobe Bereiche in der Nähe der Glykane. Versuche mit Glykopeptiden haben gezeigt, dass die hydrophoben Bereiche mindestens 12 Aminosäuren lang sein müssen und sowohl auf der N- als auch C-terminalen Seite der Oligosaccharide liegen können [Taylor, 2003]. Die Reglykosylierung ermöglicht eine erneute Bindung an Calnexin bzw. Calreticulin und der Zyklus kann wieder durchlaufen werden, bis das Protein korrekt gefaltet und ggf. oligomerisiert ist. Kann die korrekte Tertiärstruktur trotzdem nicht ausgebildet werden, spaltet die ER α 1,2-Mannosidase I die endständige Mannose im Oligosaccharidast B (i in Abb. 1) ab. Diese Man₈-Struktur wird von dem lektinartigen Protein EDEM (ER degradation enhancing α -Mannosidase-like protein) erkannt, was zur Ausschleusung des fehlgefalteten Glykoproteins aus dem ER durch den Translokonzusammenbau führt. Damit wird das Protein der ER-assoziierten Degradation (ERAD) zugeführt.

1.5 ER-assoziierte Degradation (ERAD)

Der Abbauprozess im ER umfasst drei getrennte Schritte: die Erkennung eines Glykoproteins als fehlgefaltet, den Transport des Proteins ins Zytoplasma und die anschließende ubiquitin-abhängige Degradation durch das Proteasom.

Die Erkennung eines fehlgefalteten Proteins bringt das Problem mit sich, dass zwischen einem Proteinintermediat, das sich sozusagen auf dem Weg zur richtigen Faltung befindet und einem tatsächlich fehlgefalteten Protein unterschieden werden muss. Gelöst wird dieses Problem durch die zeitverzögerte Degradation („Timer-Hypothese“). Der Degradation geht eine Verzögerungs-Phase von 30-90 min voran, das ist ungefähr die Zeitspanne, die der o.g. α 1,2-Mannosidase I für die Demannosylierung der Mannoseeinheit i in Abb. 1 zugeschrieben wird. Schafft ein fehlgefaltetes Protein nicht innerhalb dieser Zeitspanne die korrekte Konformation zu erhalten wird das Signal zur Degradation gesetzt. Lektine wie EDEM (ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein) binden das Protein und leiten es zum Retrotranslokonzusammenbau Sec61. Zum genauen Mechanismus der Translokation bzw. Dislokation gibt es mehrere Hypothesen, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll [z.B.: Plemper, 1997; Walter, 2001; Wang, 1999; Xie, 2000].

Es soll aber herausgestellt werden, wie das Signal - die Polyubiquitinierung - zur proteasomalen zytosolischen Degradation gesetzt wird. Ubiquitin ist ein in allen Eukaryonten hoch konserviertes lösliches Protein von 76 AS Länge. Die Kopplung erfolgt über das C-terminale Glycin des Ubiquitins mit dem N-Terminus bzw. den ϵ -NH₂-Gruppen des abzubauenen Proteins. Wahrscheinlich wird noch während der Retrotranslokation die Proteinkette von Ubiquitin aktivierendem Enzym (Uba I, E1), Ubiquitin konjugierenden (Ubc's, E2) und ligierenden Enzymen polyubiquitiniert. Es kann davon ausgegangen werden, dass die räumlich ausgedehnte Markierung gleichzeitig ein Zurückgleiten des Proteins ins ER verhindert. Die polyubiquitinierten Substrate werden schließlich vom 26S Proteasom, einem zylindrischen Protease-Komplex hydrolysiert [Jarosch, 2002; Hershko, 1998].

Beim Übergang vom rauhen endoplasmatischen Retikulum (rER) hin zum Golgi durchlaufen die Glykoproteine ein tubulovesikuläres Intermediärkompartiment das ERGIC (endoplasmic reticulum – golgi intermediate compartment) abgekürzt wird, bevor sie den *cis*-Golgi erreichen. Im *cis*-Golgi schließlich trennen sich die Wege von sekretorischen und lysosomalen Glykoproteinen. Die Oligosaccharidseitenketten der sekretorischen Proteine werden zu Oligosacchariden des komplexen Typs umgebaut. Lysosomale Proteine können sowohl komplexe als auch mannosereiche Oligosaccharide tragen, erhalten aber ein Mannose-6-Phosphat (M6P)-Signal an einem mannosereichen Ast.

Die Prozessierung der Oligosaccharide zum komplexen Typ erfolgt im medialen- und *trans*-Golgi. Nach der Verkürzung der mannosereichen Strukturen durch die ER- bzw. Golgi- α -Mannosidase auf eine Man₅GlcNac₂-Struktur erfolgt die Übertragung einer N-Acetylglukose (GlcNAc) durch die GlcNAc-Transferase I. Die entstandene GlcNAcMan₅GlcNAc₂ Struktur ist wiederum Substrat für die Golgi α -Mannosidase II, die eine α 1,3- und eine α 1,6-gebundene Mannose entfernt, so dass die Golgi-Kernstruktur GlcNAcMan₃GlcNAc₂ entsteht. Diese Struktur kann durch mehrere verzweigte GlcNAc erweitert werden, so dass zwei-, drei- oder vier-antennäre Oligosaccharide möglich sind. Die Übertragung von Galaktosen, N-Acetylgalaktosen, Fukosen, weiteren N-Acetylglukosen und Sialinsäuren durch die entsprechenden Transferasen erklärt die enorme Vielfalt, die bei Oligosacchariden vom komplexen Typ gefunden wird [Moremen, 1994].

Der evolutionäre Ursprung der ER-Glykosylierung kann helfen, die Funktion von Glykanen zu verstehen. Vergleichbare Prozesse der Glykosylierung und Strukturen finden sich z.B. in der Zellwand Gram-negativer Bakterien wie *Campylobacter jejuni* und in der äußeren Schicht der Zellwand von Archaeobakterien [Wacker, 2002; Young, 2002]. Selbst in Archaeobakterien wird der zu übertragende Oligosaccharidrest an der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran an dem Lipidträger Dolicholphosphat bzw. Dolicholpyrophosphat synthetisiert und nach der Translokation durch die Plasmamembran enzymatisch auf ein Protein an der Oberfläche der Plasmamembran übertragen. Die Konsensussequenz ist ebenfalls identisch mit der in höheren Organismen [Lechner, 1989]. Die Oligosaccharidstruktur $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$, die noch auf der zytoplasmatischen Seite synthetisiert wird kann als der archaische Vorläufer aller Asparagin-gekoppelter Glykanstrukturen angesehen werden, die auf Proteine übertragen werden. Die Erweiterung dieser Struktur durch die lumenale Addition vier weiterer Mannose- und drei Glukosereste kann als strukturelle Erweiterung durch die eukaryontische Evolution gesehen werden. Dieser Sichtweise entspricht auch die Tatsache, dass die äußeren Mannose- bzw. Glukosereste, die der Man_5 -Struktur zugefügt werden als Signal für den Calnexin-/Calreticulinzyklus dienen bzw. für die Markierung von Proteinen während der Qualitätskontrolle benutzt werden, die der Degradation zugeführt werden sollen. Prozesse der Qualitätskontrolle, die einen Lektinzyklus beinhalten sind in prokaryontischen Organismen aber noch nicht vorhanden [Weerapana, 2006].

1.6 Mannose-6-Phosphat Rezeptoren und intrazelluläre Sortierung lysosomaler Proteine

Die löslichen lysosomalen Glykoproteine erhalten noch im *cis*-Golgi ihre M6P-Erkennungssignale zur lysosomalen Sortierung und sind somit in der Lage, den Transportweg sekretorischer Proteine zu verlassen [Pohlmann, 1982; Hasilik, 1981].

Das Enzym UDP-*N*-Acetylglukosamin:lysosomales Enzym *N*-Acetylglukosamin-1-phosphotransferase (GlcNAc-Phosphotransferase, EC 2.7.8.17) überträgt *N*-Acetyl-Glukosamin-1-Phosphate bei mannosereichen Strukturen auf das C6-Atom von ein bis max. zwei Mannoseresten. Die *N*-Acetylglukosamin-1-phosphodiester- α -*N*-Acetylglukosaminidase (Phosphodiesterase oder „*uncovering Enzym*“, EC 3.1.4.45) spaltet anschließend die endständigen *N*-Acetyl-Glukosamine ab, wodurch Mannose-6-Phosphate

(M6P) entstehen. Das nun freigelegte M6P-Signal ermöglicht im *trans*-Golgi die Bindung der lysosomalen Enzyme an zwei unterschiedliche M6P-Rezeptoren (MPR) und ihren vesikulären Transport über das endosomale Kompartiment hin zum Lysosom.

Bei den zwei M6P-Rezeptoren, die in Säugerzellen nachgewiesen werden konnten, handelt es sich zum Einen um den MPR 46, einen Kationen-abhängigen Rezeptor mit einem Molekulargewicht von 46 kDa [Hoflack, 1985], und andererseits um den MPR 300, einen Kationen-unabhängigen Rezeptor mit einem Molekulargewicht von ca. 300 kDa [Sahagian, 1981]. Beide Rezeptoren sind Typ I Membran-integrale Glykoproteine, die im Wesentlichen drei Strukturdomänen besitzen: eine N-terminale extrazytoplasmatische Domäne, eine Transmembrandomäne und eine C-terminale zytoplasmatische Domäne. Die extrazellulären Domänen beider Rezeptoren weisen hohe Homologie auf. Sie bestehen aus Wiederholungen einer Einheit aus 140 Aminosäuren. Der MPR 46 weist eine solche Einheit, der MPR 300 weist 15 solcher Einheiten auf. Der MPR 46 enthält eine M6P-Bindungsdomäne, der MPR 300 enthält zwei solcher Bindungsdomänen [Lobel, 1987; Lobel, 1988]. Dadurch kann er zwei M6P-Moleküle zur gleichen Zeit binden oder ein Molekül, das zwei Phosphomonoester trägt. Die Dissoziationskonstanten (K_D) für diese Moleküle unterscheiden sich deutlich: M6P hat eine K_D von $7 * 10^{-6}$ mol/l, Oligosaccharide mit zwei Phosphomonoestern haben eine K_D von $2 * 10^{-9}$ mol/l [Tong, 1989].

Als die Sequenz des humanen insulinähnlichen Wachstumsfaktor II (IGF II) Rezeptors kloniert wurde [Morgan, 1987] stellte man fest, dass die Sequenz mit der des Kationen-unabhängigen MPR 300 übereinstimmte. Spätere Untersuchungen zeigten, dass das Protein räumlich getrennte Bindungsdomänen für die beiden unterschiedlichen Liganden (M6P und IGF II) hat, da es beide zur gleichen Zeit binden kann [Tong, 1988; Waheed, 1988]. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass die Bindung eines Liganden die Bindung des anderen beeinflusst [Kiess, 1989].

Die Bindung der mit M6P-markierten Glykoproteine an die zwei Rezeptoren (MPR 46 und MPR 300) erfolgt mit unterschiedlichen Affinitäten und pH-Optima [Hoflack, 1987; Tong, 1989]. Der MPR 46 bindet lysosomale Enzyme im Golgi optimal bei pH 6,5 und ist im Gegensatz zum MPR 300 nicht in der Lage bei pH 7,4 an der Plasmamembran mit lysosomalen Enzymen zu interagieren [Storch, 2005].

MPR-Ligand-Komplexe aus dem *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) werden über Clathrin-beschichtete Vesikel zu den frühen oder späten Endosomen transportiert [Griffiths, 1988]. Nach dem Verlust der Clathrinhülle fusionieren die Vesikel mit dem Kompartiment, in

dem es aufgrund des sauren pH Wertes zu einer Dissoziation des Liganden vom Rezeptor kommt. Die Liganden, d.h. die mit M6P-markierten Glykoproteine, werden dephosphoryliert und wahrscheinlich durch Transportvesikel in die Lysosomen sortiert. Die MPR können zum TGN rezirkulieren, wo sie für eine neue Transportrunde zur Verfügung stehen [v. Figura, 1986; Le Borgne, 1998]. In den Lysosomen selbst sind keine Mannosephosphat-Rezeptoren nachweisbar [Kornfeld, 1989].

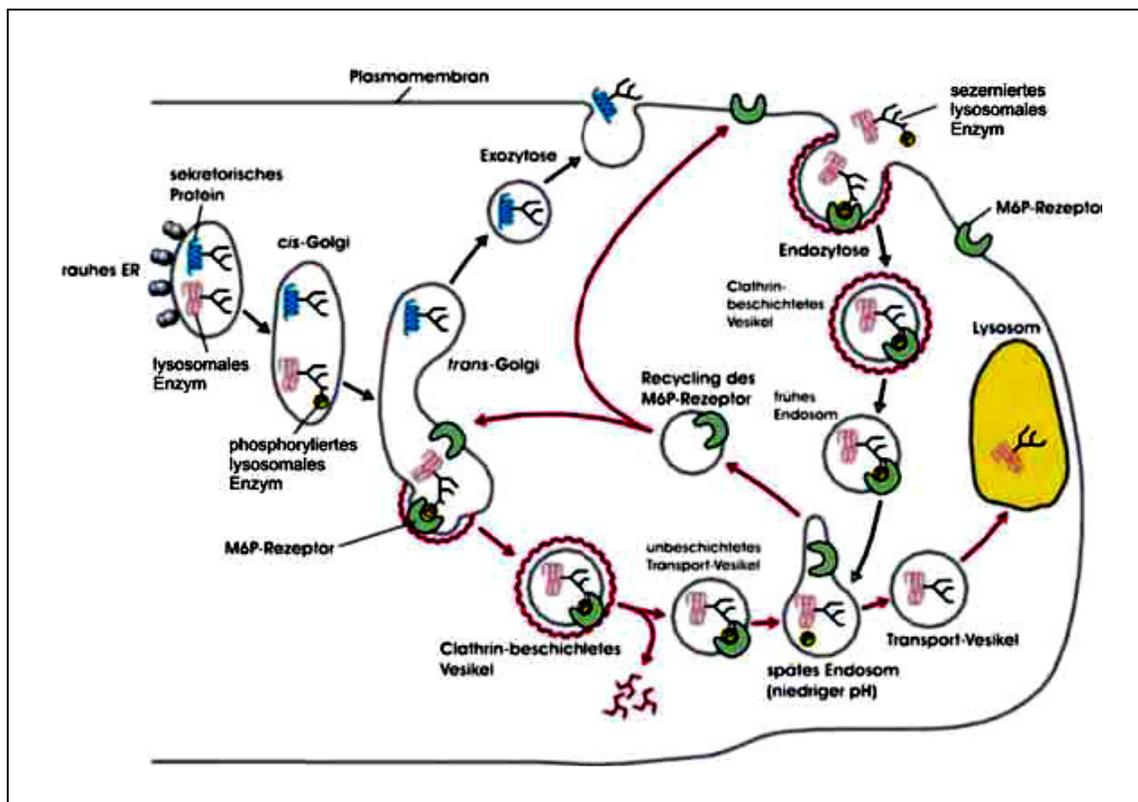


Abb. 2: **Transportwege lysosomaler Enzyme.**

Das im *cis*-Golgi phosphorylierte Enzym bindet im *trans*-Golgi an M6P-Rezeptoren und wird über vesikulären Transport zum Endosom geschleust. Dort dissoziiert der Rezeptor-Ligand-Komplex auf Grund des niedrigen pH-Wertes. Das freie lysosomale Enzym wird über ein Transport-Vesikel zum Lysosom geleitet. Der freie MPR kann zum *trans*-Golgi rezirkulieren oder an die Plasmamembran geschleust werden. Dort kann er sezernierte lysosomale Enzyme über M6P binden, die durch Rezeptor-vermittelte Endozytose ebenfalls ins Endosom geschleust und dort frei gesetzt werden (Entnommen aus: Molecular Cell Biology, 4th Edition, Lodish et al., 2000).

Ein gewisser Anteil (5-20 %) der lysosomalen Enzyme entgeht der lysosomalen Sortierung am TGN und wird in den Extrazellulärraum sezerniert. Die Überexpression des MPR 46 führt zu einer erhöhten Sekretion von lysosomalen Enzymen [Chao, 1990].

Die Tatsache, dass die sezernierten Enzyme an den membranständigen MPR 300 über M6P binden und über den Endozytoseweg zu den Lysosomen transportiert werden können (s. Abb. 2) spricht dafür, dass das Signal zur lysosomal-endosomal Sortierung (M6P) auch auf die Oligosaccharidseitenketten der Proteine übertragen wurde, die in den Extrazellulärraum sezerniert werden.

Obwohl der MPR 300, als auch der MPR 46 in der Plasmamembran nachgewiesen werden können, ist nur der MPR 300 zur Endozytose von M6P-markierten Glykoproteinen in der Lage [Stein, 1987].

1.7 Humane Arylsulfatase A (hASA)

Die humane ASA ist ein lösliches lysosomales Glykoprotein mit einer Länge von 507 Aminosäuren. Die ersten 18 N-terminalen Aminosäuren dienen als Signalpeptid für den Import ins ER. In der Polypeptidkette der hASA befinden sich drei potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn158, Asn184 und Asn350 [Stein, 1989].

Im aktiven Zentrum befindet sich ein konserviertes Cystein, das durch das C α -Formylglycin-generierende Enzym (FGE) zu einem Aldehyd umgesetzt wird [Dierks, 2003]. Die ASA liegt als 62 kDa schweres Polypeptid vor. Zu einem kleinen Anteil kann auch ein proteolytisch prozessiertes 57 kDa Polypeptid nachgewiesen werden.

Die Arylsulfatase A katalysiert die hydrolytische Spaltung von 3-O-Sulfogalaktosylhaltigen Glykolipiden. Die quantitativ bedeutsamste Substanz ist das Glycosphingolipid Galaktosylceramid-3-sulfat (Sulfatid), welches sich außer in den Nieren (vor allem in den distalen Tubuli), der Gallenblase und Gallengangsepithelien insbesondere in den Myelinscheiden des zentralen und des peripheren Nervensystems findet (Überblick in von Figura, 2001).

Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit wird das 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 [Fischer, 1977].

1.8 Metachromatische Leukodystrophie

Die metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine autosomal rezessiv vererbte lysosomale Speichererkrankung. Sie wird durch die Defizienz der ASA verursacht und führt zur Akkumulierung von Sulfatid in verschiedenen Organen, myelinisierenden Zellen (Schwann-Zellen und Oligodendrocyten), einigen Neuronen und epithelialen Zellen. [Jatzkewitz, 1970]. Während die Funktion peripherer Organe bei MLD-Patienten weitgehend unbeeinträchtigt ist, wird das Nervensystem durch eine progrediente Demyelinisierung schwer geschädigt, an deren Folge die Betroffenen sterben.

Ob allerdings die Sulfatidspeicherung ursächlich für die Demyelinisierung ist, ist unbekannt. In diesem Zusammenhang wird auch das zytotoxische Lysosulfatid, welches im Gewebe von MLD-Patienten in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen wurde, als pathogener Faktor diskutiert [Toda, 1990].

1.9 Formylglycin – eine posttranslationale Modifikation von Sulfatasen

Eukaryotische Sulfatasen werden posttranslational in ihrem aktiven Zentrum an einem Cysteinrest zu C α -Formylglycin (FGly) modifiziert [Schmidt, 1995]. Diese Modifikation findet im ER statt und ist essentiell für die katalytische Aktivität [Lukatela, 1998; v. Figura, 1998; Dierks, 2001]. Diese posttranslationale Modifikation ist stark konserviert und findet sich in allen 15 bislang bekannten Sulfatasen (Bsp.: ER-, Golgi-, Zelloberflächen- und lysosomale Sulfatasen) [Diez-Roux, 2005].

Mutationen im Sulfatase-modifizierenden Faktor (SUMF), dem Gen, das das Formylglycin Generierende Enzym (FGE) codiert, führen zur sog. Multiplen Sulfatase Defizienz (MSD), einer seltenen aber schwerwiegenden Erbkrankheit, die durch die Synthese von katalytisch inaktiven Sulfatasen gekennzeichnet ist. Die MSD führt bei Kindern in der Regel im ersten Lebensjahrzehnt zum Tod, bei einem schwerwiegenden Verlauf der Krankheit sterben die Patienten bereits im ersten Lebensjahr [Hopwood, 2001; Dierks, 2003; Cosma, 2003].

Bei der Arylsulfatase A, dem Enzym, dessen Defekt zur MLD führt, wird das Cystein an Aminosäureposition 69 zu FGly modifiziert. Dieses Cystein sitzt im aktiven Zentrum der Sulfatase. Es konnte gezeigt werden, dass in Fibroblasten von MSD-Patienten die fehlende

ASA-Aktivität auf das Fehlen der Cystein-Modifikation zum FGly an Position 69 zurückzuführen ist [Dierks, 2003].

Andererseits konnte die spezifische Aktivität der ASA durch die Coexpression des Formylglycin-Generierenden Enzyms um das 70-fache gesteigert werden [Takakusaki, 2005]. Dieser Effekt ist allerdings stark von der verwendeten Zelllinie abhängig. Bei Zelllinien, die Sulfatasen mit einem hohen Modifizierungsgrad des Cysteins im aktiven Zentrum exprimieren, sind die erzielbaren Steigerungsraten der Aktivität durch die Coexpression des Formylglycin Generierenden Enzyms geringer.

Diese beiden Befunde zeigen aber, dass die Modifikation des Cysteins zum FGly im aktiven Zentrum der ASA ein essentieller und limitierender Faktor für die Sulfataseaktivität ist. Gleichzeitig scheint ein direkter Zusammenhang zwischen dem Grad der Modifikation (dem Verhältnis FGly/Cys) und der spezifischen Aktivität der ASA zu bestehen.

Bis jetzt konnte nicht geklärt werden, ob die Cystein-Modifikation tatsächlich als Aldehyd oder als ein Derivat im intakt gefalteten Protein vorliegt. Lediglich das isolierte Peptid, das die Modifikation trägt, hat alle Eigenschaften eines Aldehyds. Die Röntgenkristallstruktur-Untersuchungen (bei 2,1 Å) am Protein zeigten allerdings eine erhöhte Elektronendichte an Position 69, die auf ein Aldehydhydrat (geminales Diol) zurückgeführt wurde. Diese Struktur soll sich über die Koordination einer Hydroxyfunktion zu Mg^{2+} stabilisieren, das sich ebenfalls im aktiven Zentrum der ASA befindet. Nach einer anderen Arbeit, in der ASA kristallisiert wurde, befindet sich allerdings nicht Mg^{2+} sondern Ca^{2+} im aktiven Zentrum [Chruszcz, 2003]. Der Mechanismus der Stabilisierung bleibt dadurch aber unverändert.

Die andere Hydroxygruppe wird durch die dreidimensionale Struktur des Proteins über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Imidazolring des Histidins 125 stabilisiert [Baker, 1992; Lukatela, 1998].

Durch die Denaturierung des Proteins geht allerdings die direkte Nachbarschaft des His 125 zum postulierten Aldehydhydrat durch den Verlust der dreidimensionalen Proteinstruktur verloren und das nicht weiter stabilisierte Aldehydhydrat reagiert weiter zum Aldehyd (Abb.3).

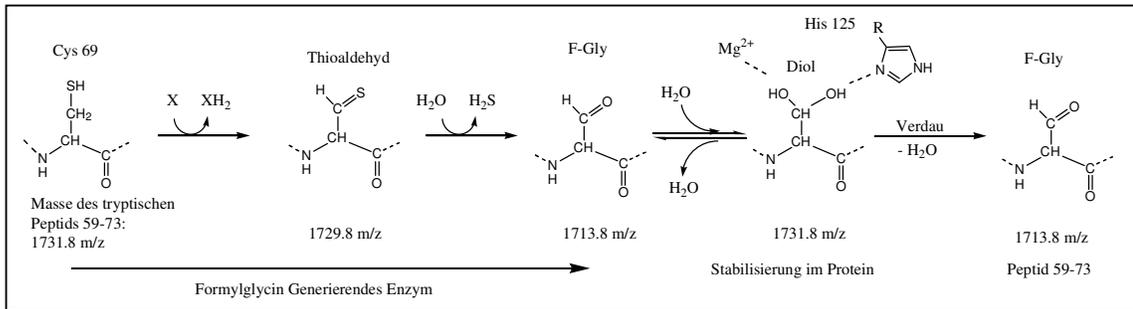


Abb. 3: Die Modifikation des Cysteins 69 der ASA durch das Formylglycin Generierende Enzym (FGE). Gezeigt ist die Stabilisierung des Aldehydhydrates im Protein durch Mg^{2+} und His 125 und die Reaktion zurück zum FGly, verursacht durch den Verlust der dreidimensionalen Struktur während eines Verdau. Abgebildet sind ausserdem die berechneten m/z Werte für das tryptische Peptid 59-73 (modifiziert nach v. Figura, 1998).

2 Zielsetzung

Die hASA besitzt drei N-Glykosylierungsstellen (Asn 158, 184, 350). Es ist bekannt, dass die Oligosaccharidseitenketten unterschiedlich prozessiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Oligosaccharidstrukturen der drei Glykosylierungsstellen der hASA getrennt voneinander analysiert werden.

Die Aufgabenstellung dabei war, ein nicht-selektives Verfahren zu entwickeln, das so sensitiv ist, dass die benötigten ASA-Mengen in einem überschaubaren Zeitrahmen zu produzieren waren.

Da bekannt ist, dass verschiedene Zelllinien sich hinsichtlich des Glykosylierungsmusters von Glykoproteinen unterscheiden, sollte hASA in unterschiedlichen Zellen überexprimiert werden, um die Strukturen der Oligosaccharidseitenketten der ASA, die aus verschiedenen Zelllinien stammt, zu vergleichen.

Es ist ausserdem bekannt, dass das Glykosylierungsmuster stark von den Kultivierungsbedingungen der verwendeten Zellen abhängt. Um diesen Punkt zu beleuchten stand der Analytik eine ASA-Charge zur Verfügung, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen aufgereinigt wurde, die in einem Bioreaktor kultiviert wurden und eine, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen aufgereinigt wurde, die in Zellkulturschalen in einem Brutschrank kultiviert wurden.

Hinter den untersuchten Punkten steht die Fragestellung, die im Rahmen dieser Arbeit nur z.T. bearbeitet werden kann, wie durch die geeignete Wahl der Produktionszelllinien und der Kultivierungsbedingungen das Glykosylierungsmuster von Glykoproteinen verändert und gesteuert werden kann.

3 Material und Methoden

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.

3.2 Geräte

Stromversorgung	Power Supply ST305	Life Technologies
Gelkammer		Eigenbau
UV-Handlampe		Konrad Bender
Digital pH-Meter	761 Calimatic	Knick
Eismaschine		Ziegra, Scotsman
Fluoreszenzscanner	Odyssey	Li-Cor
FPLC		Pharmacia
Fraktionssammler	F-100	Pharmacia
Gefrierschrank -20°C		AEG
Gefrierschrank -80°C	Ultra low	Sanyo
Elektrophorese und Westernblot:		
Stromversorgung	Power Pac 200	BioRad
Geltrockner	SGD 2000	Savant
Elektrophoresekammer klein	Mini Protean 3 Gelkammer	BioRad
Elektrophoresekammer groß	Proteax Xi	Bio Rad
Nass-Blot-System		Bio Rad
Heizblock	Dry Block Heater	STAR LAB
Kühlung		Bio Rad

Semi Dry Westernblot	Transblot SD Cell	Bio Rad
Filme	Biomax MR	Kodak
Filmentwickler-Automat	Curix 60	Agfa
Kühlschrank		AEG
Magnetrührer	Kombimag Red	Janke & Kunkel
Mikrowelle		Sharp
Mikroplatereader	GENios	TECAN
Mikroskope:		
Lichtmikroskop	TELAVAL 31	ZEISS
Fluoreszenzmikroskop		ZEISS
HPLC-Anlagen	Smart	Pharmacia
	Bio-Tek	Kontron
Fluoreszenzdetektor	FP-2020 Plus	Jasco
Fluoreszenzspektrometer	FP-6200	Jasco
Säulenofen	Jetstream 2	Techlab
PCR-Gerät	T3 Thermocycler	Biometra
	Thermo-Cycler Gene Amp Modell 9600	Perkin Elmer
Schüttelinkubator		New Brunswick Scientific
Sequenzierer	Genetic Analyser 310	Applied Biosystems
Spektralphotometer	DU 640	Beckmann
Über-Kopf-Schüttler	Rotamix RM1	Elmi
Ultraschallbad		Branson
Ultraschallstab	UP50H	Hielscher
Vortexer	2x ³	UniEquip
Analysenwaage	CP 124S-OCE	Sartorius
Waage	PC 4400	Mettler
Zellkultur:		
Kühlschrank		AEG
Sterilbank Labgard class II, TypA/B3		Nuaire
Zählkammer für eukaryonte Zellen		Neubauer

Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q plus	Millipore
Wasserbad	1083	GFL
Zentrifugen:		
Tischzentrifuge	54 15 D	Eppendorf
Kühlzentrifuge klein	Z233 MK	Hermle
Kühlzentrifuge groß	Rotoren: F34-6-38 A-4-62 (Schwingrotor)	Eppendorf

3.3 Standardlösungen

Alle verwendeten Lösungen wurden nach Vorschrift aus dem Laborhandbuch von Sambrook et al. (1989) angesetzt.

3 M Na-Acetat:	18 ml Eisessig wurden mit 60 ml H ₂ O bidest. versetzt, der pH-Wert mit 10 N NaOH eingestellt und das Volumen auf 100 ml aufgefüllt.
DEPC-H ₂ O:	bidest. H ₂ O wurde mit 0,1 % DEPC gemischt, über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen und autoklaviert.
10 x PBS:	0,1 M Na-Phosphat 1,5 M NaCl 13,8 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O mit bidest. H ₂ O auf 200 ml auffüllen (=0,5 M) (pH-Wert 4,6) 35,5 g Na ₂ HPO ₄ mit bidest. H ₂ O auf 500 ml auffüllen (= 0,5 M) (pH-Wert 9,0) 0,5 M NaH ₂ PO ₄ zu 0,5 M Na ₂ HPO ₄ solange zugeben, bis pH-Wert 7,4 erreicht ist. Für 2 l 10 x PBS wurden 400 ml 0,5 M Na-Phosphat Puffer pH 7,4 und 600 ml 5 M NaCl-Lösung mit bidest. H ₂ O auf 2000 ml aufgefüllt.
RCM-Puffer:	6 M guanidine hydrochloride 0,4 M Tris HCl pH 8.6 10 mM EDTA
10 % SDS:	10 g Natriumdodecylsulfat wurden in 100 ml bidest. H ₂ O bei 65°C gelöst und sterilfiltriert.
20 x SSC:	175,3 g NaCl und 88,2 g Na-Citrat wurden in 800 ml bidest. H ₂ O gelöst. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,0 eingestellt, das Volumen auf 1000 ml aufgefüllt und autoklaviert.

1 M Tris/HCl	121,1 g Tris wurden in 800 ml H ₂ O bidest. gelöst, der pH-Wert mit konzentrierter HCl auf den gewünschten Wert zwischen 7,2 und 9,0 eingestellt und das Volumen auf 1 l aufgefüllt.
50 x TAE:	2,5 M Tris 100 mM EDTA 1 M Natriumacetat mit Eisessig auf pH 8,0 eingestellt.
Puffer D	4 M Guanidinisothiocyanat (GIT) 25 mM Natriumcitrat pH 7 0,5 % Natrium-N-Lauryl-Sarcosyl 0,1 M 2-mercaptoethanol (ME)
2 M Na-Acetat	in bidest. H ₂ O gelöst; für mRNA-Isolierung mit pH-Papier auf pH 4 eingestellt
8 % PFA	in 1x PBS unter Erhitzen und Zugabe von NaOH gelöst
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris pH 6,8
10 x SDS Laufpuffer	30,3 g Tris-Base 144,0 g Glycin 10 g SDS auf 1 Liter mit destilliertem Wasser auffüllen
4 x Probenpuffer	8 % SDS 40 % Glycerol 240 mM Tris-HCl pH 6,8 4 % Bromphenolblau 4 % β-ME
Coomassie-Blau-Lösung	1,25 g Coomassie Brilliant Blau R 250 450 ml Methanol/Wasser 1:1 50 ml Eisessig auf 500 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt
Entfärber	30 % Methanol 10 % Eisessig in destilliertem Wasser angesetzt
50 mM NH ₄ -Formiat	940 µl Ameisensäure (p.A.) wurden in 490 ml H ₂ O gelöst, mit Ammoniak auf pH 4,4 eingestellt und auf 500 ml aufgefüllt
Blotpuffer	48 mM Tris-Base 39 mM Glycin 0,037 % SDS 20 % Methanol

10 x TBS	100 ml 1 M Tris pH 8,0 300 ml 5 M NaCl auf 1 l mit destilliertem Wasser pH 8,0
10 x TE	100 mM Tris/HCl (pH 7,6) 10 mM EDTA
0,5 M EDTA	186,12 g Ethylendiamintetraessigsäure wurden in 800 ml H ₂ O bidest. gelöst, der pH-Wert mit etwa 20 g NaOH auf pH 8,0 eingestellt und das Volumen auf 1 l aufgefüllt.
Ponceau-Gebrauchslösung	0,2 % Ponceau S 3 % Trichloressigsäure
TBS/T	1 x TBS + 0,5% Tween
Waschpuffer (Bakterien)	100 mM Hepes pH 6,7 50 mM MgCl ₂ 15 mM CaCl 250 mM KCl
Lysispuffer (Bakterien)	10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 140 mM NaCl 0,5 mg/ml Lysozym 1 U/ml DNase 1 1 mM Pefablock 2 µg/ml Leupeptin 2 µg/ml Pepstatin
HEPES-Puffer (HB)	10 mM HEPES pH 7,4 150 mM NaCl 2 mM PMSF 1 µg/ml Leupeptin 1 µg/ml Pepstatin Phosphataseinhibitoren 2 mM EDTA 0,5 mM DTT 5 % Glycerol 0,1 % TX-100 Der Puffer wurde mit bidest. H ₂ O angesetzt.
Puffer B	50 mM NaPO ₄ 300 mM NaCl 500 mM Imidazol 50 mM EDTA
Puffer A	50 mM NaPO ₄ 300 mM NaCl 20 mM Imidazol

LB-Medium	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefe Extrakt 10 g NaCl in 1000 ml bidest. H ₂ O gelöst; pH 7,5; autoklaviert.
Agarplatten	LB-Medium 1,5 % Agar Lösung autoklaviert auf ca. 50°C abgekühlt und in Petrischalen gegossen.
Zur Bakterienselektion	wurde dem LB-Medium und den Agar-Platten Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml bzw. Kanamycin in einer Konzentration von 50 µg/ml zugefügt.

3.4 Verbrauchsmaterialien

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

3.5 Bakterien

Escherichia coli DH5 α , Genotyp: *F'endA1 hsdR17(rk-mk+) supE44 thi-1 recA1 GyrA (Nal^r) relA1 Δ (lacZYA-argF)u169(m80lacZ Δ M15)*, New England Biolabs (Schwalbach).

3.6 Silanisieren von Glas- und Plastikmaterial

Alle für die Oligosaccharidanalytik verwendeten Gefäße wurden mit einer Lösung von 2 % (v/v) Trimethyl-Chlorsilan in Chloroform silanisiert. Die Gefäße wurden mit der Silanisierungslösung gefüllt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Gefäße mit Ethanol 2 x gewaschen, gründlich mit H₂O gespült und getrocknet.

3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden mit dem RC DC Protein Assay der Fa. Bio-Rad bestimmt. Dazu wurde eine BSA-Verdünnungsreihe (0; 0,2; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 und 10 mg/ml) in dem Puffer angesetzt, in dem die Probe gelöst war. Die Messung wurde in 96-well Platten

durchgeführt. 20 µl Standard bzw. Probe (ggf. verdünnt) wurden zu 20 µl Reagenz A* (2 % Reagenz S in Reagenz A (v/v), frisch angesetzt) und 200 µl Reagenz B pipettiert. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurde die OD₇₅₀ gemessen.

3.8 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden mit dem Big-Dye-Terminator Kit (Version 1.1) der Fa. Applied Biosystems durchgeführt. Zur Sequenzierungs-PCR wurde folgender Ansatz zusammen pipettiert:

200 ng	Template
1 µl	Sequencing Puffer
5 pmol	Primer
2 µl	Terminator Ready Reaction Mix
ad 10 µl	H ₂ O

Die DNA wurde mit folgendem Temperaturprogramm amplifiziert:

1. 2 min 96 °C	initiale Denaturierung
2. 10 s 96 °C	Denaturierung
3. 5 s 50 °C	Annealing
4. 4 min 60°C	Extension (go to 2.; 25x)
5. unendl. 4°C	

Die DNA wurde mit Ethanol gefällt, getrocknet und zur Sequenzierung in 25 µl deionisiertem Formamid aufgenommen.

3.9 *In vitro* Mutagenese des MPR 300

3.9.1 *Oligonukleotide*

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der MWG Biotech (Ebersberg) in lyophilisierter Form bezogen. Sie wurden zur Herstellung des löslichen *insuline like growth factors II receptors* (IGFR, synonym MPR 300), sowie des IGFR ohne Internalisierungssignal verwendet. Die Stammkonzentrationen wurden zur Lagerung bei -20° C jeweils auf 100 pmol/µl mit TE-Puffer eingestellt.

Oligonukleotide zur Herstellung des löslichen IGFR (Stopsignal vor der Transmembrandomäne + AvrII-Schnittstelle): 7967 as

5`-d GCACCGCCCTAGGTTACTGGCTCCGTTCTGACAGC -3` (as)

Oligonukleotide zur Herstellung des IGFR ohne Internalisierungssignal (Stopsignal hinter der Transmembrandomäne + AvrII-Schnittstelle): 8065 as

5`-d CTACAGCAAGTGGTCCTAGGCTATATCACTGTTTCCCTCC -3` (as)

Beide Mutageneseprimer wurden jeweils für eine PCR mit folgendem Oligonucleotid, das vor der BstBI-Schnittstelle liegt, verwendet: 6335

5`-GCATTTCAACTACACCTCGCTCATC-3` (s)

3.9.2 Vektor

Für die Klonierung des humanen insuline-like growth factor II receptor (IGF II receptor) wurde als Ursprungsvektor der pcDNA 3.1/ Hygro(-) Expressionsvektor (Invitrogen) verwendet. In diesen wurde die cDNA des IGFIIR (MPR300) inkloniert. Die Vektorkarte mit der cDNA des IGF II Rezeptors (MPR 300) ist in Abbildung 4 dargestellt. Gezeigt ist weiterhin die Transmembrandomäne (TMD) des IGFR, sowie die Schnittstellen der Restriktionsenzyme BstBI und AvrII, über die die mutierten Bereiche inkloniert wurden, sowie die Antibiotikaresistenzkassetten AmpR und HygroR.

Durch *in vitro* Mutagenese des IGF II Rezeptors wurden zwei Konstrukte hergestellt. Ein Konstrukt bei dem ein Stoppcodon vor die Transmembrandomäne und eines bei dem ein Stoppcodon hinter der Transmembrandomäne eingeführt wurde. Dazu wurden die oben aufgeführten Oligonukleotide 6335, 7967as und 8065as verwendet.

Der Primer 6335 (die Nummern beschreiben die Position im pcDNA-Vektor) liegt in 5` Richtung (upstream) vor einer BstBI-Schnittstelle (Position 6432). BstBI schneidet im verwendeten Vektor genau einmal (single cutter).

Der Primer 7967as fügt ein Stoppcodon vor der Transmembrandomäne (Position 7987) und zusätzlich eine AvrII-Schnittstelle (7990) ein. Der Primer 8065as fügt ein Stoppcodon hinter der Transmembrandomäne (an Pos. 8082) und ebenfalls eine AvrII-Schnittstelle (8085) ein.

AvrII ist, wie BstBI, ebenfalls ein single cutter im verwendeten Vektor. Die Schnittstelle liegt im nicht-codierenden Bereich zwischen dem Ampicillinresistenz-Gen und dem Gen für den MPR300.

Zur *in vitro* Mutagenese wurden die Primerpaare: 6335 mit 7967as bzw. 6335 mit 8065as eingesetzt. Diese ergeben nach der PCR ein Produkt von 1640 bp bzw. 1770 bp. Die Fragmente wurden nach Gelreinigung einem Doppelverdau unterworfen mit den Enzymen BstBI und AvrII (Bezeichnung bei Fermentas: Bsp119 I und XmaJ I). Nach erneuter Gelreinigung wurden die Fragmente in den mit den o.g. Enzymen geschnittenen Vektor

ligiert. Dabei wurden die Inserts in einem 10-fachen molaren Überschuss eingesetzt. Mittels Hitzeschocktransformation wurde das Produkt in die Bakterien eingebracht.

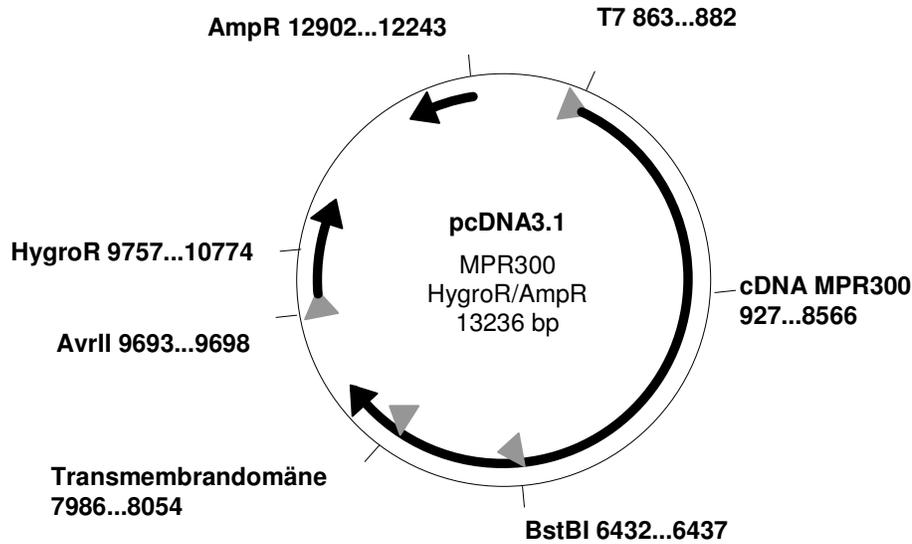


Abb.4: Karte des Vektors pcDNA3.1, in den die cDNA des MPR300 inkloniert wurde.

Die Bakterienkultur wurde auf LB Amp Platten ausgestrichen. Aus den erhaltenen Klonen wurde mittels Minipräp die DNA isoliert. Charakterisiert wurden die Klone durch den Doppelverdau der DNA mit Bsp 119 I und XmaJ I. Die DNA der so erhaltenen positiven Klone wurde anschließend sequenziert.

Abbildung 5 zeigt die wt-Sequenz der Transmembrandomäne (TMD), sowie die Sequenz des Klons 2-18, der ein Stoppsignal hinter der TMD enthält und die Sequenz des Klons 1-2, der ein Stoppsignal vor der TMD enthält.

	7947		→ Transmembrandomäne →		
wt	GGCTGTCAGA	ACGGAGCCAG	GCAGTCGGCG	CGGTGCTCAG	CCTGCTGCTG
	7947		→ Transmembrandomäne →		
2-18	GGCTGTCAGA	ACGGAGCCAG	GCAGTCGGCG	CGGTGCTCAG	CCTGCTGCTG
	7947		stop <u>AvrII</u> 9693→		
1-2	GGCTGTCAGA	ACGGAGCCAG	TAACTAGGC	TTTTGCAAAA	AGCTCCCGGG
	7997				
wt	GTGGCGCTCA	CCTGCTGCCT	GCTGGCCCTG	TTGCTCTACA	AGAAGGAGAG
	7997				
2-18	GTGGCGCTCA	CCTGCTGCCT	GCTGGCCCTG	TTGCTCTACA	AGAAGGAGAG
	9719				
1-2	AGCTTGATA	TCCATTTTCG	GATCTGATCA	GCACGTGATG	AAAAAGCCTG

	8047				
wt	GGAGGGAAAC	AGTGATAAGT	AAGCTGACCA	CTTGCTGTAG	GAGAAGTTCC
	8047	stop	<u>A</u> vr II 9693→		
2-18	GGAGGGAAAC	AGTGATA TAG	C <u>CT</u> AGGCTTT	TGCAAAAAA	GCTCCCGGGA
	9769				
1-2	AACTCACCGC	GACGTCTGTC	GAGAAGTTTC	TGATCGAAAA	GTTCGACAGC

Abb. 5: DNA-Sequenz der Transmembrandomäne (TMD) des IGF II Rezeptors und der erzeugten Klone mit Stoppsignal vor (1-2) und hinter (2-18) der TMD.

3.10 Erzeugen stabiler Zelllinien

BHK-21 Zellen wurden mit dem Konstrukt des MPR300 ohne Internalisierungssignal (Stoppsignal hinter TMD, Klon 2-18) transfiziert. Gleichzeitig wurde das Plasmid P9, das eine Neomycinresistenzkassette enthält mit 1/10 der molaren Menge des Konstruktplasmids kotransfiziert. Alle 24h wurde das Medium gewechselt. 48 h nach der Transfektion wurde das Medium auf 100 µg/ml Neomycin (G-418) eingestellt und alle 24 h um 100 µg/ml erhöht, so dass nach 11 Tagen eine Neomycinkonzentration von 1 mg/ml erreicht wurde. Um den Selektionsdruck weiter zu erhöhen befand sich zusätzlich ab 48 h nach der Transfektion eine konstante Menge von 100 µg/ml Hygromycin im Medium. 13 Tage nach der Transfektion wurden 45 Klone gepickt und in eine 48 well Platte überführt. Die Klone wurden mit 500 µg/ml Neomycin und 100 µg/ml Hygromycin bis zur Konfluenz kultiviert. Zur Bestimmung der Expressionshöhe der Klone wurden diese trypsinisiert und auf eine Replikaplatte überführt.

Die Auswahl der positiven Klone erfolgte über die Messung der Bindungsmenge von α-Galaktosidase an der Zelloberfläche. Dazu wurden das Medium abgenommen und die wells mit PBS pH 7,4 gewaschen. Pro well wurden 5 µg α-Galaktosidase in 500 µl PBS zugegeben und für 1h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 mal mit je 1 ml PBS gewaschen, bevor mit 250 µl Na-Citrat pH 4,5 die gebundene α-Galaktosidasemenge eluiert wurde. Das Eluat wurde für 20h mit 200µl α-Galaktosidase-Substrat inkubiert. Die gemessenen Absorptionswerte wurden auf die β-Hexosaminidaseaktivität im Zellüberstand der Klone normiert.

CHO-Zellen wurden mit dem hASA-pBEH-Plasmid und dem Plasmid P9, das eine Neomycinresistenzkassette enthält, mit 1/10 der molaren Menge des ASA-Plasmids kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde das Medium auf 500 µg/ml Neomycin eingestellt. Diese Konzentration wurde konstant gehalten und das Medium alle 2 Tage

gewechselt. Nach 14 Tagen wurden 40 Klone ausgewählt, in die Vertiefungen einer 28 well Platte überführt, bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend die ASA-Aktivität im Zellkulturüberstand gemessen und auf die β -Hexosaminidaseaktivität im Überstand relativiert.

3.11 Bindung von rhASA an das MPR300-Konstrukt

Für die Bindungsstudien wurde die Zelllinie BHK II D5 verwendet. Diese exprimiert den MPR ohne Internalisierungssignal. Auf 4 Vertiefungen einer 6 well Platte wurden 5×10^5 Zellen BHK II D5 ausgesät und auf 2 Vertiefungen 5×10^5 Zellen BHK 21 wt. Die Zellzahlen verstehen sich als Angaben pro Vertiefung der Platten.

Nach 24 h Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen, die Platte auf Eis gestellt und die Zellen mit je 2 ml TBS pH 7,4 mit 5 mg/ml BSA gewaschen. Jede Vertiefung wurde mit 6 μ g rhASA (aus verschiedenen Zelllinien) in 1 ml TBS pH 7,4 mit 20 μ l 10 mM Glukose-6-Phosphat (G6P) für 1 h auf Eis bei sehr leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und jedes well viermal mit 2 ml TBS pH 7,4 gewaschen. Die gebundene rhASA von zwei BHK II D5 wells und von einem well mit BHK wt Zellen wurde mit 200 μ l 10 mM Glukose-6-Phosphat eluiert, die ASA der restlichen wells wurde mit 200 μ l 10 mM Mannose-6-Phosphat eluiert. Die Zellen wurden hiernach lysiert und der Proteingehalt wurde gemessen. Die ASA-Aktivität der Auftragslösung, des Überstand, der Waschschrte und der Eluate wurde nach Zentrifugation bei 1000 g für 5 min bestimmt. Die Inkubationszeit für die Eluate betrug dabei 3 h.

3.12 Kultivierung von hASA-überexprimierenden Zellen und Vorbereitung der Überstände

Folgende Zelllinien wurden zur Produktion von rhASA verwendet: BHK MPR46-hASA, CHO D8-hASA und HT1080-hASA. Diese Linien sezernieren unter geeigneten Kultur-Bedingungen hASA in das Medium. Dabei variieren die Konzentrationen der ASA von 100 μ g/l für die CHO-Zelllinie bis zu 5 mg/l für die HT1080 Zelllinie.

Die Zellen wurden in T175-Zellkulturflaschen in DMEM/5% FCS bis zur Konfluenz angezogen und dann mit DMEM/1% FCS weiterkultiviert. Der Zellüberstand wird alle 3-4 Tage geerntet, vereinigt und die darin enthaltenen Proteine mit 50 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt. Nach einer 8,000 rpm-Zentrifugation (GS3-Rotor) bei 4°C für 30 min wird der

Überstand dekantiert und das Pellet in 1/10 Volumen TBS pH 7,2 gelöst. Die Lösung wird bei 4°C fünfmal für je 5 Stunden gegen 1 x TBS pH 7,2 dialysiert (cut off: 15000 Da) und das Dialysat durch einen 0,2 µm Filter filtriert.

3.13 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Zur Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern wurden die gesammelten Überstände der Hybridomazelllinie 19-16-3 (Anti-hASA) aufgetaut, bei 16.000 g für 15 min zentrifugiert und der abgenommene Überstand filtriert (Porendurchmesser 0,2 µm). Mit Hilfe einer FPLC-Anlage wurde der aufbereitete Überstand über eine Protein A-Sepharose Säule (Amersham) gegeben. Anschließend wurde 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. Der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen wurde bestimmt und die Proteine der Fraktionen, die einen Proteingehalt über 0,2 mg/ml aufwiesen, wurden mittels diskontinuierlicher 10%iger SDS-PAGE und anschließender Coomassie® Brillantblau Färbung untersucht. Fraktionen, die nur die leichte und schwere Antikörper-Kette enthielten wurden mit NaN₃ (Endkonzentration 0,02 %) versetzt und bei 4° C gelagert, oder mit 50 % Glycerol versetzt und bei -20° C gelagert.

Die auf diese Art gewonnenen Antikörperfraktionen wurden in einem Standardverfahren mit Hilfe des Cross-Linkers DMP (Dimelin-Pimelimidat) an Protein A beads gekoppelt.

3.14 Affinitätschromatographie mittels der Anti-hASA-Säule

Die Antikörpersäule wurde mit 50 ml 1 x TBS equilibriert und mit 150-200 ml des vorbereiteten Überstandes (ca. 5-10 mg hASA-Gehalt) beladen. Nach zwei Waschschritten mit je 10 ml 1 x TBS pH 7,2 (ca. 15-faches Säulenvolumen) erfolgt die Elution mit 15 ml 2,8 M MgCl₂ in 0,1 M NaAc pH 4,5. Das Eluat wird in 1,5 ml-Fractionen in 2 ml Eppendorfgefäßen aufgefangen, in denen zur Neutralisation je 900 µl 50 mM Tris-HCl pH 9 vorgelegt wurden.

Die Dialyse gegen TBS pH 7,2 und das Einengen des Eluatpools (Gesamtvolumen etwa 4-5 ml) in der Ultrahülse liefert schließlich die aufgereinigte humane ASA in einer Konzentration von 2-4 mg/ml.

3.15 Gewinnung von zellulärer ASA

Die CHO-hASA-Zellen, die zur Ernte der sezernierten ASA dienen, wurden in 20 T175 Flaschen kultiviert. Die Zellen wurden abgeschabt und in mit Proteaseinhibitoren supplementiertem PBS aufgenommen. Die Zellen wurden mit einem Ultraschallstab (50 Watt Leistung bei einer Frequenz von 30 kHz) aufgeschlossen (5 min auf Eis). Anschließend wurde die Lösung bei 16.000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vor dem Auftrag auf die Anti-hASA-Affinitätssäule durch einen 0,2 µm Filter filtriert.

3.16 Messung enzymatischer Aktivitäten

Geeignete Volumina von Zelllysaten (20-40 µl) und Zell-Überständen (100-200 µl) wurden mit 200-400 µl Substratlösung versetzt und 0,5-4 h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5-2 ml der Stop-Lösung beendet und die Absorption (Optische Dichte, OD) in einem Beckman DU640 Spektrophotometer bei der angegebenen Wellenlänge gemessen.

3.16.1 Bestimmung der Arylsulfatase A-Aktivität

Substrat-Lösung	10 mM para-Nitrocatecholsulfat 10% (w/v) NaCl in 0,5 M Na-Acetat pH 5,0
Stop-Lösung	1 M NaOH
Messung der OD bei:	515 nm ($\epsilon=12400 \text{ cm}^2/\text{mmol}$)

Enzymaktivitätsberechnung

Die ASA-Aktivität wurde nach folgender Berechnung ermittelt und auf den Gehalt pro mg Gesamtprotein der jeweiligen Probe bezogen.

$$\frac{\text{Assay-Vol. / ml} \times 1000}{\frac{\text{mol. Extinktionskoeffizient}}{1000} \times \text{Proben-Vol. / ml} \times \text{min}} \times OD_{515} = \text{mU / ml}$$

3.16.2 Bestimmung der β -Hexosaminidase-Aktivität:

Substrat-Lösung	10 mM para-Nitrophenyl-N-acetyl-2- β -D-Glukosaminid 0,2% (w/v) BSA 0,04% (w/v) Na-Azid in 0,1 M Na-Citrat pH 4,6
Stop-Lösung	0,4 M Glycin/NaOH pH 10,4
Messung der OD bei:	405 nm ($\epsilon=18500 \text{ cm}^2/\text{mmol}$)

Die Berechnung der Enzymaktivität der β -Hexosaminidase A erfolgte analog zur Arylsulfatase A.

3.16.3 Bestimmung der lysosomalen sauren Phosphatase-Aktivität

Substrat-Lösung	10 mM para-Nitrophenylphosphat 0,2% (w/v) BSA 0,04% (w/v) Na-Azid in 0,1 M Na-Citrat pH 4,6
Stop-Lösung	0,4 M Glycin/NaOH pH 10,4
Messung der OD bei:	405 nm ($\epsilon=18500 \text{ cm}^2/\text{mmol}$)

Die Berechnung der Enzymaktivität der sauren Phosphatase erfolgte analog zur Arylsulfatase A. Zur Bestimmung der Phosphataseaktivität im Zellkulturüberstand wurde das Substrat nicht gepuffert. Es wurde beim jeweiligen pH Wert des konditionierten Zellmediums gemessen.

3.16.4 Bestimmung der Sialidase-Aktivität im Zellüberstand

Als Substrat wurde das Natriumsalz der 2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-Acetylneuramsäure- (Sigma-Aldrich, M8639) eingesetzt. Davon wurde eine 4 mM Lösung in Reinstwasser hergestellt. Um den pH Wert des konditionierten Zellüberstandes zu übernehmen, wurde der Versuchsansatz nicht gepuffert. Das pH Optimum der Neuraminidase liegt bei pH 5,5. 25 μ l des Substrates wurden mit 50 μ l des zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung abgenommenen konditionierten Mediums gemischt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und die Reaktion mit 900 μ l 0,2 M Glycin/NaOH pH 10,4 abgestoppt. Anschließend wurden die Ansätze für 15 min bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand in frische Reaktionsgefäße überführt. Um die Autohydrolyse des Substrats zu berücksichtigen

wurde bei jedem Test eine Kontrolle ohne Enzym mitgeführt. Die Ansätze wurden ggf. mit Reinstwasser verdünnt (bis zu VF 100). Die Messung der Fluoreszenz erfolgte in Quarzglasküvetten bei einer Anregungswellenlänge von 362 nm. Detektiert wurde die Emission bei 448 nm. Die Bestimmung der Sialidase-Aktivität erfolgte über die Erstellung einer Kalibriergerade durch Fluoreszenzmessung mit bekannter Konzentration an 4-Methylumbelliferon (Konzentrationsbereich: 1 pmol/ml – 1 nmol/ml).

3.16.5 Bestimmung der Fukosidase-Aktivität im Zellüberstand

Substrat-Lösung	10 mM 4-Nitrophenyl α -L-Fukopyranosid (Sigma-Aldrich, N3628) 0,2% (w/v) BSA 0,04% (w/v) Na-Azid
Stop-Lösung	0,4 M Glycin/NaOH pH 10,4
Messung der OD bei:	405 nm ($\epsilon=18500 \text{ cm}^2/\text{mmol}$)

Die Berechnung der Enzymaktivität der Fukosidase erfolgte analog zur Arylsulfatase A.

3.16.6 Bestimmung der α -Mannosidase-Aktivität im Zellüberstand

Substrat-Lösung	10 mM 4-Nitrophenyl α -D-Mannopyranosid (Fluka, 73726) 0,2% (w/v) BSA 0,04% (w/v) Na-Azid
Stop-Lösung	0,4 M Glycin/NaOH pH 10,4
Messung der OD bei:	405 nm ($\epsilon=18500 \text{ cm}^2/\text{mmol}$)

Die Berechnung der Enzymaktivität der α -Mannosidase erfolgte analog zur Arylsulfatase A.

3.17 Bestimmung der hASA durch indirekten ELISA

Dieses Verfahren zur selektiven Quantifizierung von humaner ASA ermöglicht die Detektion mit einer Nachweisbarkeitsgrenze unter 50 pg hASA.

Beschichtungspuffer	25 mM	Tris/HCl pH 7,0
Waschpuffer	0,1% (w/v)	Triton-X-100 in PBS
Blotto	5% (w/v)	Milchpulver
	0,02% (w/v)	Triton-X-100 in PBS

Substratpuffer	ABTS-Substratpuffer von Boehringer-Mannheim (Herstellerprotokoll)
ABTS-Reagenz	1 mg ABTS / ml Substratpuffer

Das Beschichten von ELISA-96-Wellplatten erfolgte über Nacht bei 4°C mit 0,125 µg Anti-hASA-Antikörpern (Maus-anti-hASA monoklonaler Antikörper, 19-16-3) in 200 µl Beschichtungspuffer pro Vertiefung. Anschließend wurden die Platten mit 300 µl Beschichtungspuffer pro Vertiefung gewaschen und wie folgt weiter behandelt:

Inkubation	Verwendete Lösung	Vol (µl / Well)	Zeit	Bemerkung
Absättigen	Blotto	200	30 min	RT
Antigen	Standards und Proben	5-100 (ad 200 in Blotto)	1,5 h	37°C/Schüttler
2. Antikörper	Anti-hASA Serum (polyklonal), BE#3 1/2000 in Blotto	50	60 min	37°C
3. Antikörper	Peroxidase-anti-Kaninchen- Antikörper 1/2000 in Blotto	50	45 min	37°C
ABTS-Reagenz	1 mg ABTS / ml Substratpuffer	50-100	20 min	RT

Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Platten dreimal mit je 300 µl Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen. Nach dem Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen wurde in jede Vertiefung 100 µl Blotto vorgelegt sowie die Standards und Proben einpipettiert. Das Gesamtvolumen bei diesem Inkubationsschritt wurde in Abhängigkeit vom Probenvolumen mit Blotto auf 200 µl aufgefüllt. Die zu bestimmende hASA-Konzentration wurde im Vergleich mit einer Kalibriergeraden ermittelt. Dazu wurden definierte hASA-Mengen in bestimmte Wells einpipettiert und mit Probenpuffer auf 200 µl aufgefüllt. Die Absorptionmessung wurde im Dual Mode bei 405 nm und einer Referenzwellenlänge bei 505 nm durchgeführt.

3.18 Reinigung von Oligosacchariden

Verwendet wurde Carbograph SPE (solid phase extraction) Material der Firma Alltech (Deerfield, Illinois). Handelsüblich sind 4 bzw. 8 ml Spritzen, die mit 150 bzw. 300 mg des Materials gefüllt sind. Diese wurden entleert und das Carbograph-Material in einem 2 ml

Eppendorfgefäß in Wasser aufgeschlemmt. Vor der ersten Benutzung wurde das Material der Reihe nach mit 1 N NaOH, H₂O (3x), 70 % Acetonitril mit 0,1 % TFA, 25 % Acetonitril mit 0,05 % TFA, 25 % Acetonitril und 3x mit H₂O gewaschen (jeweils 1ml zugeben, vortexen, zentrifugieren, Überstand verwerfen). Gelagert wurde das Material in Wasser. Zur Reinigung von Oligosacchariden wurden von dem so präparierten Material ca. 10 µl in eine 200 µl Pipettenspitze mit Fritte (Safeguard, Eppendorf, Deutschland) gefüllt. Diese Spitze wurde durch den Deckel eines 2 ml Eppendorfgefäßes gesteckt, an das über eine Kanüle eine Pumpe angeschlossen wurde. Die Fließgeschwindigkeit wurde durch das Zuhalten eines zweiten Loches im Reaktionsgefäß auf max. 1 Tropfen/Sekunde eingestellt. Die Proben wurden auf das Säulenbett pipettiert, und mit 200 µl Wasser gewaschen. Anschließend wurden die neutralen Oligosaccharide mit 200 µl 25 % ACN und die sauren bzw. geladenen Oligosaccharide mit 75 % ACN mit 0,1 % TFA eluiert. Die Eluate wurden anschließend von evtl. coeluierten Carbographpartikeln befreit, indem sie mit einem 0,45 µm Pipettenaufsatzfilter (Milipore HV) filtriert wurden.

3.19 Fluoreszenzmarkierung von Oligosacchariden

Die Oligosaccharide wurden in einem 0,5 ml PCR-Gefäß in einer Speed Vac getrocknet. Als Lösungsmittel wurde frisch angesetzt: 60 µl Eisessig + 350 µl DMSO (beides wasserfrei). In 200 µl dieser Lösung wurden 20 mg 2-Aminobenzamid (p.A., Merck, Deutschland) gelöst. Davon wurden 10 µl zur getrockneten Glykanprobe gegeben. Diese wurde bei 80°C für eine Stunde inkubiert. Im o.g. Lösungsmittel wurden 12 mg NaCNBH₃ gelöst und davon 10 µl zur Probe gegeben. Diese wurde für weitere 30 min bei 80°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe bis zur Weiterverarbeitung bei -18°C gelagert.

Die beschriebene Methode eignet sich zur Markierung von bis zu 25 nmol Oligosacchariden.

3.20 Partielle saure Hydrolyse von Dextran

10 mg Dextran (Pharmacia, MW 10000 Da) wurden in 0,5 ml 1 N Essigsäure gelöst und für 30 min bei 95°C inkubiert. Die Probe wurde anschließend in der Speed Vac bis zur Trockne eingengt.

3.21 ASA-Trypsin-Verdau

100 µg ASA-Protein wurde in der speed vac bis zur trockne eingengt und in 125 µl RCM-Puffer aufgenommen. Das Reaktionsgefäß wurde nach jedem Pipettierschritt mit Argon gefüllt. Die Probe wurde für ca. 30 s auf einem Vortexer geschüttelt. Anschliessend wurde die Lösung für 1 min ins Ultraschallbad gestellt. Zu der Lösung wurden 37,5 µl 1M DTT-Lsg. gegeben. Die Reduktionsreaktion erfolgte für 10 min bei 95°C. Zur erkalteten Probe wurden 37,5 µl 1M Iodacetamid gegeben und für 1 h im Dunkeln inkubiert.

3.22 HPLC

3.22.1 Entsalzung

Zur Entsalzung von reduziertem und alkyliertem Protein wurde eine Schnellentsalzungssäule (FD, PC 3,2/10, Pharmacia) verwendet. Diese wurde mit dem erforderlichen Verdau-puffer bei einer Flußrate von 250 µl/min betrieben. Detektiert wurde die Probe bei einer Wellenlänge von 214 nm und 280 nm.

3.22.2 Gelchromatographie

Zur Reinigung fluoreszenzmarkierter Oligosaccharide (sowohl nach der Markierungsreaktion mit dem Fluorophor, als auch nach jedem Verdau mit Exoglykosidasen) wurde eine Superdex Peptide (Precision Column (PC), 3,2/30, Pharmacia, LKB, Uppsala, Schweden) verwendet. Diese wurde bei einer Flußrate von 50 µl/min mit H₂O betrieben. Detektiert wurden die markierten Oligosaccharide bei einer Wellenlänge von 320 nm. Zur Detektion von Verunreinigungen (Peptide, Salze) wurden zusätzlich die Absorptionen bei 280 nm und 214 nm aufgezeichnet.

3.22.3 RP-HPLC

Zur Separation der Peptide (aus AspN bzw. tryptischem Verdau) wurde eine Jupiter Proteo RP C12 Säule (4 µm, 90 Å, 150 x 2 mm) der Firma Phenomenex (Torrance, Ca, USA) verwendet. Diese Säule konnte durch selbstgefertigte Adapter auf dem Smart-HPLC-System Pharmacia) betrieben werden. Die Eluenten waren A: Wasser mit 0,1 % TFA und B:

Acetonitril mit 0,085 % TFA. Der Gradient war 0-40 % B in 40 min bei einer Flußrate von 250 µl/min. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 214 nm und 280 nm.

Zur Trennung der beiden Peptide mit Formylglycin bzw. Cystein an Position 69 der Arylsulfatase A wurde der Gradient auf 26-43 % B in 30 min abgeflacht.

3.22.4 Fluoreszenzprofile

Zur Erstellung der Oligoprofile mit fluoreszenzmarkierten Oligosacchariden kam eine TSK-Gel Amide-80 Säule (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Germany) zum Einsatz (25 cm x 4,6 mm, 5 µm). Die fluoreszenzmarkierten Oligosaccharide wurden vor der Injektion getrocknet und im Startpuffer (30 % B) aufgenommen. Die Eluenten waren A: Acetonitril und B: 50mM Ammoniumformiat, pH 4,4. Zur Separation wurde der Anteil von 30 % B auf 50 % B in 75 min, bei einer Flußrate von 400 µl/min erhöht. Diese Säule wurde betrieben auf einer HPLC-Anlage der Firma Bio-Tek System 525 (Kontron, Germany), zusammen mit einem Dioden Array Detektor 540+ (Kontron). Die Säule wurde in einem Säulenofen (Jetstream 2, Techlab, Erkerode, Germany) auf 30°C temperiert. Als Fluoreszenz-Detektor kam ein FP 2020 Plus (Jasco, Groß-Umstadt, Germany) zum Einsatz. Die Grundeinstellungen waren: gain 1000, response 5 s, attenuator 16. Für die Detektion 2-Aminobenzamid-markierter Oligosaccharide wurde eine Anregungswellenlänge von 320 nm und eine Emissionswellenlänge von 420 nm gewählt.

Die fluoreszenzmarkierten, getrockneten Oligosaccharide wurden in mehrere Aliquots unterteilt. Ein Aliquot wurde zur Erstellung des Grundprofils in 50 µl Acetonitril/50 mM Ammoniumformiat pH 4,4 (7/3, v/v) aufgenommen. Dieses wurde über eine Amid-Normalphasen-HPLC aufgetrennt und mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm und einer Emissionswellenlänge von 420 nm detektiert. Ein ausreichend hohes Signal wurde erhalten, wenn eine Oligosaccharidmenge eingesetzt wurde, die aus der Ausgangsmenge von 20-50 µg Protein isoliert wurde. Mit der eingesetzten Menge von 500 µg ASA konnten demnach für die Oligosaccharide von jeder der drei Glykosylierungsstellen 10-20 HPLC-Läufe durchgeführt werden. Die restlichen Aliquots wurden für die Verdauungsschritte mit den Exoglykosidasen eingesetzt. Dazu wurden 2 Aliquots zusammengefasst, dem entsprechenden Verdauung unterworfen und erneut über eine Superdex Peptide Gelchromatographiesäule gereinigt. Mit den gepoolten 320 nm-Fractionen im Elutionsbereich um 2 ml wurde wie zur Erstellung des Grundprofils verfahren.

3.23 Verdau der Oligosaccharide mit Exoglykosidasen

Die gereinigten, fluoreszenzmarkierten Oligosaccharide wurden derart in Aliquots unterteilt, dass ein Aliquot bei den o.g. Einstellungen am Fluoreszenzdetektor eine Signalstärke von 1000 mV erzeugt. Die Aliquots wurden in der Speed Vac getrocknet. Bei der Komplettaufarbeitung von 500 µg ASA standen so mindestens 10 Aliquots pro Glykosylierungsstelle zur Verfügung.

Die Nachweisgrenze von gereinigten fluoreszenzmarkierten Oligosaccharidstandards liegt mit dieser Methode im zweistelligen fmol-Bereich. Daraus folgt, dass die eingesetzte Menge der Oligosaccharide für die Exoglykosidase-Verdaue im unteren pmol-Bereich liegt.

Nach dem Exoglykosidase-, bzw. Phosphatase-Verdau wurden die Ansätze in der Speed Vac bis zur Trockne eingengt. Anschließend wurden sie über eine Gelfiltration aufgereinigt und erneut getrocknet. Getrocknet und bei -18°C gelagert sind die Proben für mehrere Monate stabil. Diese Aliquots wurden erst direkt vor der Separation auf der Amid-HPLC-Säule im Startpuffer aufgenommen und analysiert.

3.23.1 α -L-Fukosidase

Ein Aliquot von jeder Glykosylierungsstelle wurde in 60 µl 20 mM Natriumacetat pH 5,5 aufgenommen. Dazu wurden 10 µl α -L-Fukosidase (Sigma-Aldrich, F 5884, bovine kidney, 1 mU/µl) gegeben. Zusätzlich wurden 10 µl D (+) Mannose (18 mg/ml) als Inhibitor der Mannosidase-Fremdaktivität des Enzyms zugegeben. Inkubiert wurde ü.N. bei 37°C.

3.23.2 α -Mannosidase

Ein Aliquot von jeder Glykosylierungsstelle wurde in 76 µl 20 mM Natriumacetat pH 5,5 aufgenommen und 4 µl α -Mannosidase (Sigma-Aldrich, M7257, jack beans, 10 mU/µl) zugegeben. Inkubiert wurde ü.N. bei 37°C.

3.23.3 Sialidase

Ein Aliquot von jeder Glykosylierungsstelle wurde in 25 µl Sialidase (Roche, 1080725, vibrio cholera, 25 mU) aufgenommen. Diese Sialidase hat Aktivität für α -2-3, 2-6 und 2-8 gebundene Sialinsäuren. Inkubiert wurde ü.N. bei 37°C.

3.23.4 β -N-Acetylhexosaminidase

Ein Aliquot von jeder Glykosylierungsstelle wurde in 46,5 μ l 20 mM Natriumacetat pH 5,5 aufgenommen. Dazu wurden 3,5 μ l β -N-Acetylhexosaminidase (Sigma-Aldrich, A-2415, bovine kidney, 100 mU) gegeben. Inkubiert wurde ü.N. bei 37°C.

3.23.5 β -Galaktosidase

Ein Aliquot von jeder Glykosylierungsstelle wurde in 4,5 μ l 50 mM Natriumphosphat pH 6,3 aufgenommen. Dazu wurden 0,5 μ l β -Galaktosidase (750 mU) gegeben. Inkubiert wurde ü.N. bei 37°C.

3.23.6 Phosphatase

Ein Aliquot von jeder Glykosylierungsstelle wurde in 5 μ l 10x Puffer (0,1 M Tris HCl pH 8, 0,1 m CaCl₂) aufgenommen. Dazu wurden 2,2 μ l alkalischer Phosphatase (Sigma, P-4252, 1 unit) gegeben. Der Ansatz wurde auf 50 μ l mit H₂O aufgefüllt und ü.N. bei 37°C inkubiert.

3.24 Edman Sequenzierung

Die Edman Sequenzierungen wurden freundlicherweise von Dr. Bernhard Schmidt (Universität Göttingen) durchgeführt. Zum Einsatz kam ein Procise cLC Proteinsequenzierer (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland), der nach Standardprotokollen gemäß Herstellerempfehlungen betrieben wurde.

3.25 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF-Massenspektren wurde mit einem Voyager-DE STR BioSpectrometry Gerät (Applied Biosystems, USA), das mit einem 337 nm Stickstofflaser ausgestattet war, aufgezeichnet.

Peptid- und Oligosaccharidmessungen wurden manuell im positiven Reflektormodus bei 25 kV Beschleunigungsspannung, mit 68 % Gitterspannung und 275 ns Zeitverzögerung

durchgeführt. Jedes Spektrum wurde aus 300 Laserschüssen gemittelt. Kalibriert wurde mit einem externe Peptid- bzw Oligosaccharidstandard.

Proteinmessungen wurden manuell im positiven Linearmodus bei 25 kV Beschleunigungsspannung, mit 90,5 % Gitterspannung und 300 ns Zeitverzögerung durchgeführt. Jedes Spektrum wurde aus 300 Laserschüssen gemittelt. Kalibriert wurde mit einem externen Proteinstandard.

4 Ergebnisse

4.1 Glykosylierungsstellen-spezifische Analytik der Oligosaccharide von hASA

4.1.1 Strategie zur Analyse der Oligosaccharidseitenketten der hASA

Wie in der Einleitung dargelegt besitzt die Arylsulfatase A (ASA) drei N-Glykosylierungsstellen; an Position 158, 184 und 350 der Aminosäuresequenz. Zur seitenspezifischen Analyse der Oligosaccharidketten der hASA wurde das Protein nach Reduktion, Alkylierung und einem Entsalzungsschritt mit Trypsin verdaut. Anschließend wurden die Peptide chromatographisch getrennt. Dieser Schritt lieferte ein Peptid auf dem die Glykosylierungsstellen 1 und 2 (G1/2) zusammen liegen und eines mit der Glykosylierungsstelle 3 (G3). Das Peptid, das die Glykosylierungsstellen G1 und G2 enthält wurde mit der Endoproteinase AspN nachverdaut (AspN schneidet zwischen G1 und G2) und die erhaltenen Peptide wurden erneut chromatographisch getrennt. Von den so separierten Glykosylierungsstellen 1, 2 und 3 wurden die Oligosaccharidseitenketten mit dem Enzym: Peptid: N-Glycosidase F (PNGaseF) abgetrennt und über selbstgepackte Carbographsäulen gereinigt. Nach diesem Schritt erfolgte die Vermessung der Oligosaccharide mittels MALDI-TOF-MS. Anschließend wurden die Oligosaccharide mit dem Fluorophor 2-Aminobenzamid markiert und durch chromatographische Trennung auf einer Amid-HPLC-Säule wurde ein Fluoreszenzprofil von jeder Glykosylierungsstelle erstellt. Um die Oligosaccharidstrukturen zweifelsfrei zu bestimmen, wurden mehrere Fluoreszenzprofile nach der Inkubation mit verschiedenen Exoglykosidasen aufgenommen. Eine Übersicht über die angewendete Strategie gibt Abbildung 6. Im Folgenden soll auf einige wesentliche Schritte der vorgestellten Strategie genauer eingegangen werden.

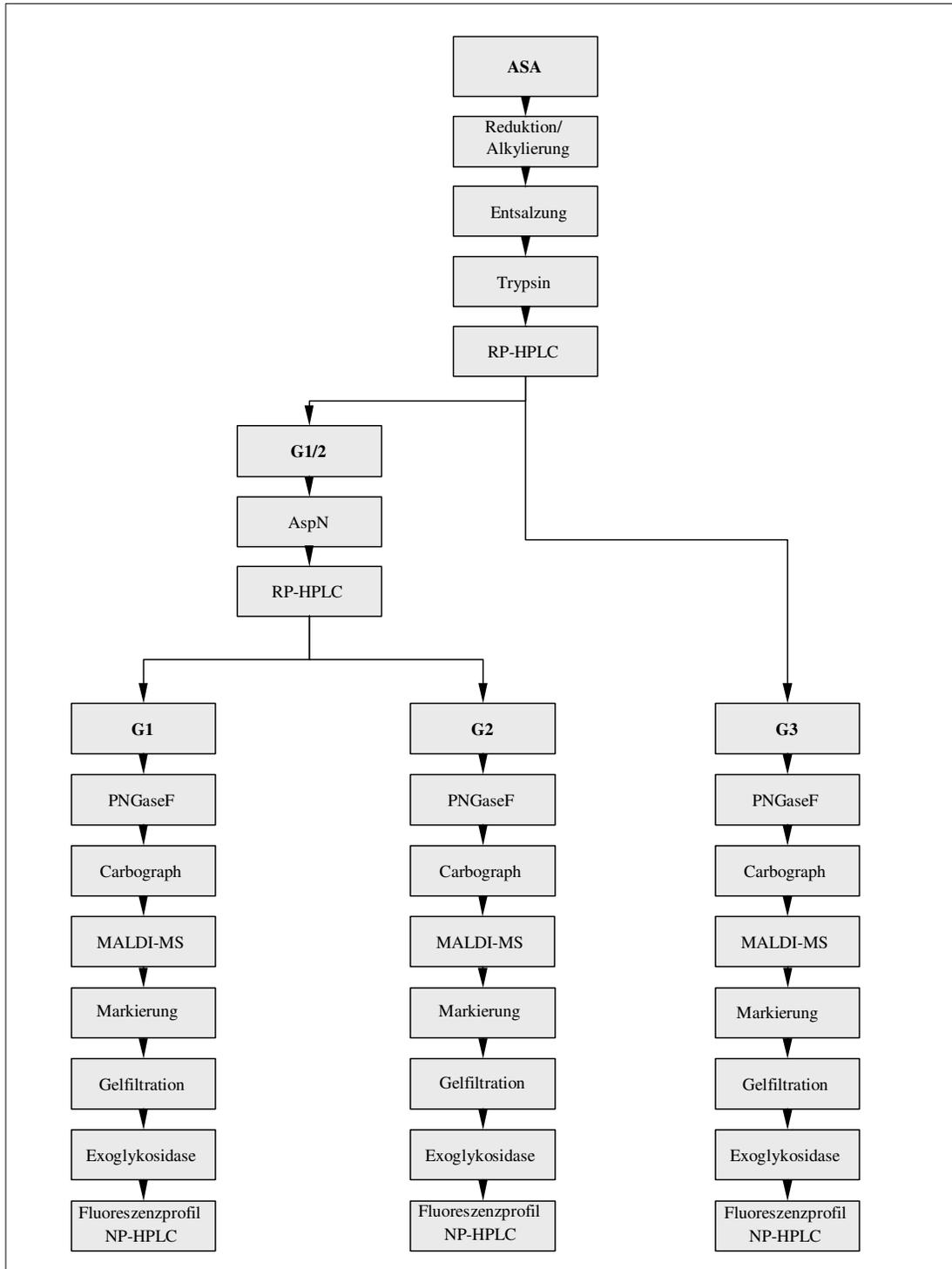


Abb. 6: Übersichtsschema, das die Abfolge der Schritte bei der Analyse der Oligosaccharide der drei Glykosylierungsstellen (G1, G2, G3) der hAsA zeigt.

Nach Reduktion und Alkylierung der ASA erfolgte der erste enzymatische Schritt, der Verdau mit der Endoproteinase Trypsin. Die Verdaupeptide wurden massenspektrometrisch mit einem MALDI-TOF-MS detektiert. Abbildung 7 zeigt ein typisches Spektrum für diesen Verdau.

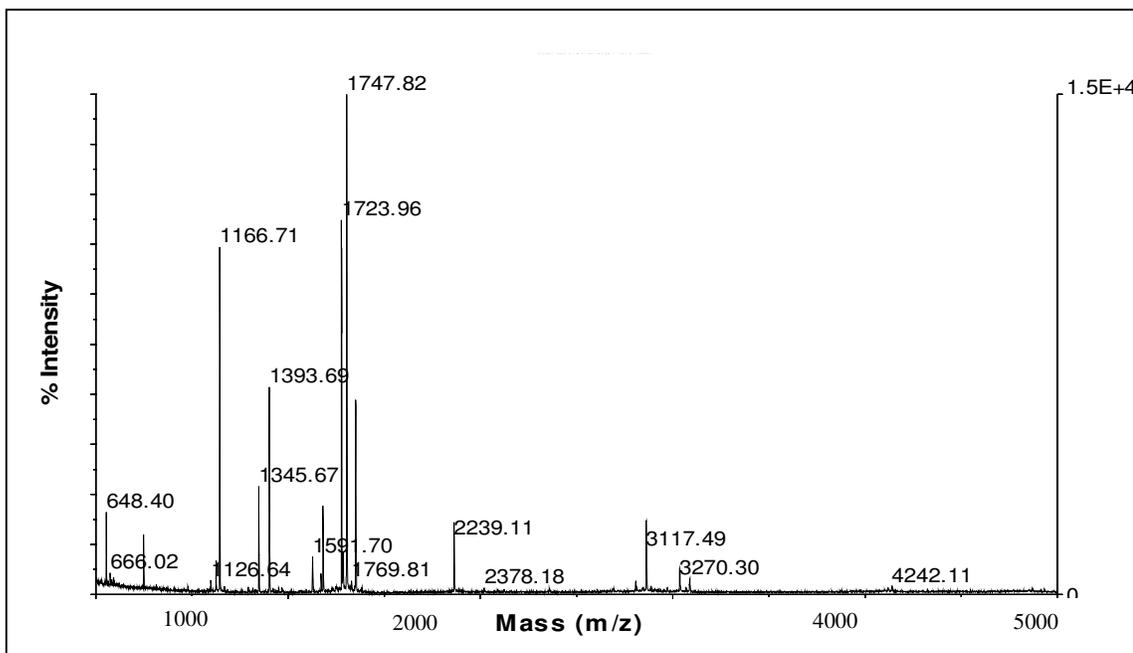


Abb. 7: MALDI-TOF-Massenspektrum des Trypsinverdaus der hArylsulfatase A. Aufgetragen ist die relative und absolute Intensität der Peaks, die in dem Bereich von 640 bis 5000 m/z detektiert wurden.

Die Qualität des Verdaus wurde mit dem Programm: MS Fit, das unter der Internet-Adresse: <http://prospector.ucsf.edu/> frei zugänglich ist, bestimmt. Dazu wurden die massenspektrometrisch detektierten Signale mit denen eines theoretischen Verdaus der ASA (Accession No P15289) verglichen und die Sequenzabdeckung bestimmt. Die ermittelten Werte für die Sequenzabdeckung lagen üblicherweise zwischen 30% und 40%. Ein Wert für die Sequenzabdeckung im o.g. Bereich, sowie die Detektion der Peptide, die die glykosylierten Peptide flankieren (939 m/z, 1639 m/z, 1747 m/z und 2239 m/z) bildeten eine verlässliche Grundlage für die weitere Analytik.

4.1.2 Trennung der tryptischen Peptide der hASA

Die tryptischen Peptide wurden mittels RP-HPLC getrennt. Die Abbildung 8 zeigt ein typisches Absorptionschromatogramm, das bei einer Wellenlänge von 214 nm aufgenommen

wurde. Das gezeigte Chromatogramm gehört zu der aus CHO-Zellen isolierten hASA. Die Chromatogramme für die hASA, die aus anderen Zelllinien stammte waren praktisch deckungsgleich mit dem abgebildeten. Sie zeigten einen zeitlichen Versatz von maximal 2 min.

Durch den massenspektrometrischen Vergleich von Aliquots aller Fraktionen (1 Fraktion/min) vor und nach der Abspaltung der Oligosaccharidseitenketten durch das Enzym PNGaseF wurden die Elutionszeiten der Glykopeptide bestimmt. Sie betragen unter den gewählten Bedingungen ca. 40 min für das Peptid mit den Glykosylierungsstellen 1 und 2 (G1/2) und ca. 48 min für das Peptid mit der Glykosylierungsstelle 3 (G3). Die relevanten Peaks sind in den Abbildungen mit Pfeilen markiert.

Bei den ASA-Proben, die aus anderen Zellen isoliert wurden, konnten, auch bei einer zeitlichen Verschiebung des Chromatogramms, die relevanten Fraktionen schnell aufgrund der hohen Vergleichbarkeit des Elutionsprofils identifiziert werden.

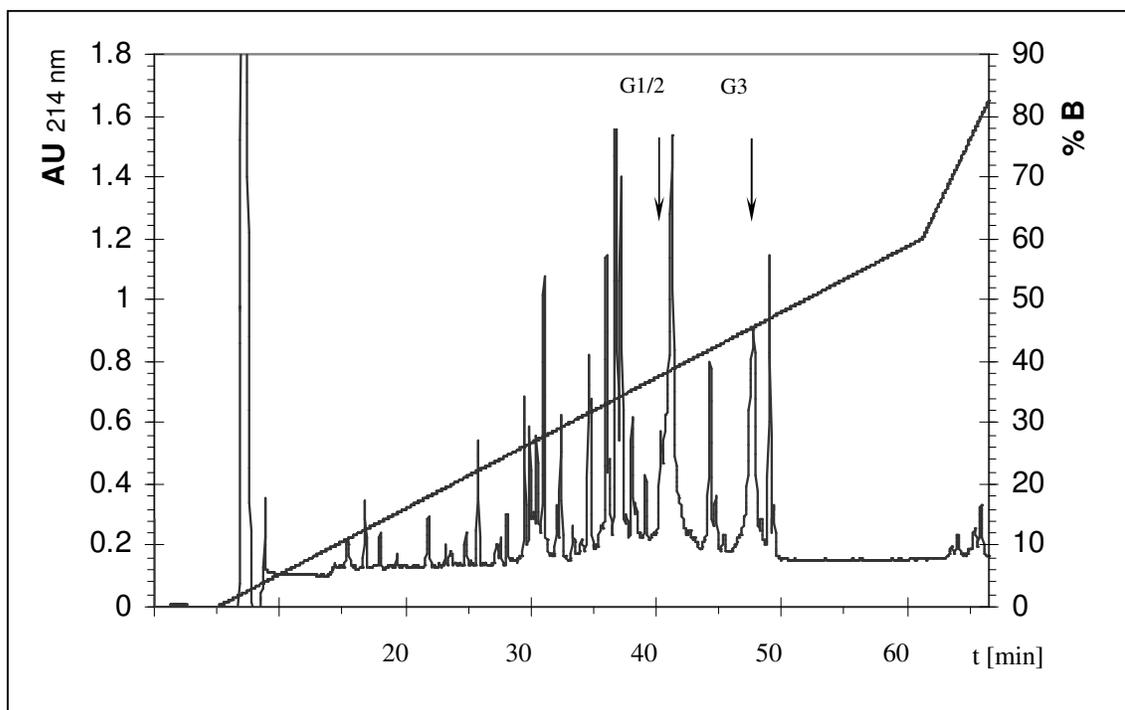


Abb. 8: RP-Chromatogramm des Trypsinkomplettverdaus von CHO-ASA. Dargestellt ist die Absorption bei einer Wellenlänge von 214 nm in Abhängigkeit von der Laufzeit. Außerdem ist der prozentuale Anteil des Eluenten B am Laufmittel zu sehen. Die Pfeile im Chromatogramm markieren die Fraktionen, in denen die Peptide mit den Glykosylierungsstellen 1 und 2 bzw. 3 massenspektrometrisch detektiert wurden.

Das Eluat des HPLC-Laufs wurde fraktioniert. Aus jeder Fraktion wurde ein Aliquot mittels MALDI-TOF-MS vor und nach der Deglykosylierung mit PNGaseF vermessen. In den in Abb. 8 markierten Fraktionen konnten nach dem Verdau mit PNGaseF Massen detektiert werden, die mit denen für die deglykosylierten Peptide berechneten Massen der ASA

übereinstimmen. Die folgenden Abbildungen zeigen die Massenspektren der Fraktionen, die in der Abbildung 8 markiert sind nach der Deglykosylierung mit PNGaseF.

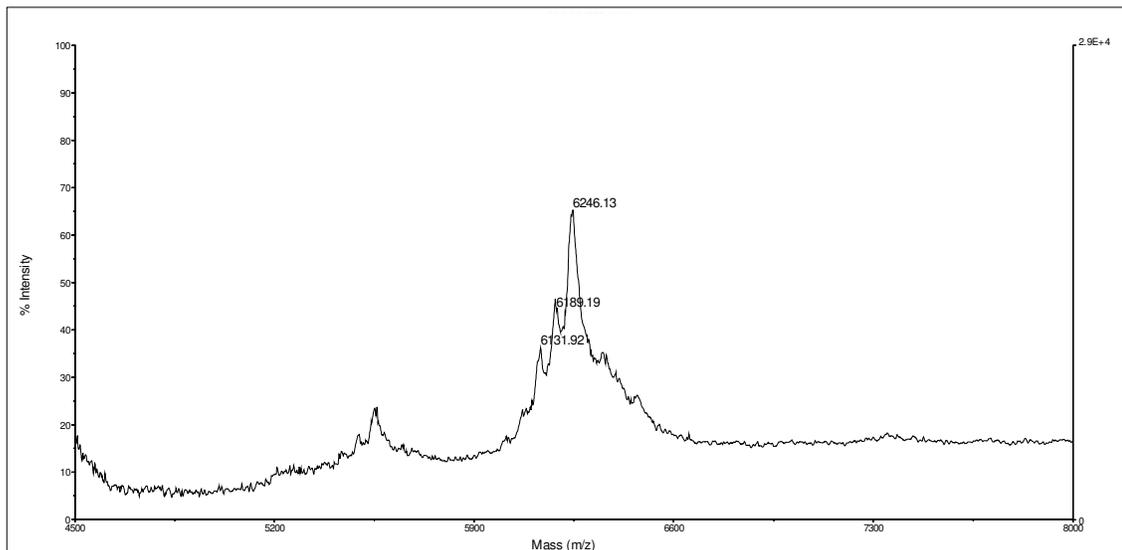


Abb. 9: MALDI-TOF-Massenspektrum der in Abb. 8 mit G 1/2 markierten Fraktion nach Deglykosylierung mit PNGaseF. Das Spektrum wurde im Linearmodus aufgezeichnet. Nach der Deglykosylierung ist das tryptische Peptid der ASA mit dem Massenverhältnis 6246,13 m/z nachweisbar. Dieses Peptid der ASA enthält die Aminosäuren 144-200 mit 4 carboxymethylierten Cysteinen. Die Peaks mit den Massenverhältnissen 6189 bzw. 6131 m/z stehen für das gleiche Peptid mit 3 bzw. 2 carboxymethylierten Cysteinen. Das berechnete Massenverhältnis des Hauptpeaks beträgt 6246,17 m/z. Dabei wurde berücksichtigt, dass die Masse des Peptids durch die Deglykosylierung mit PNGaseF um 1 Da ansteigt, da bei dem Verdau Asparagin zu Aspartat umgesetzt wird.

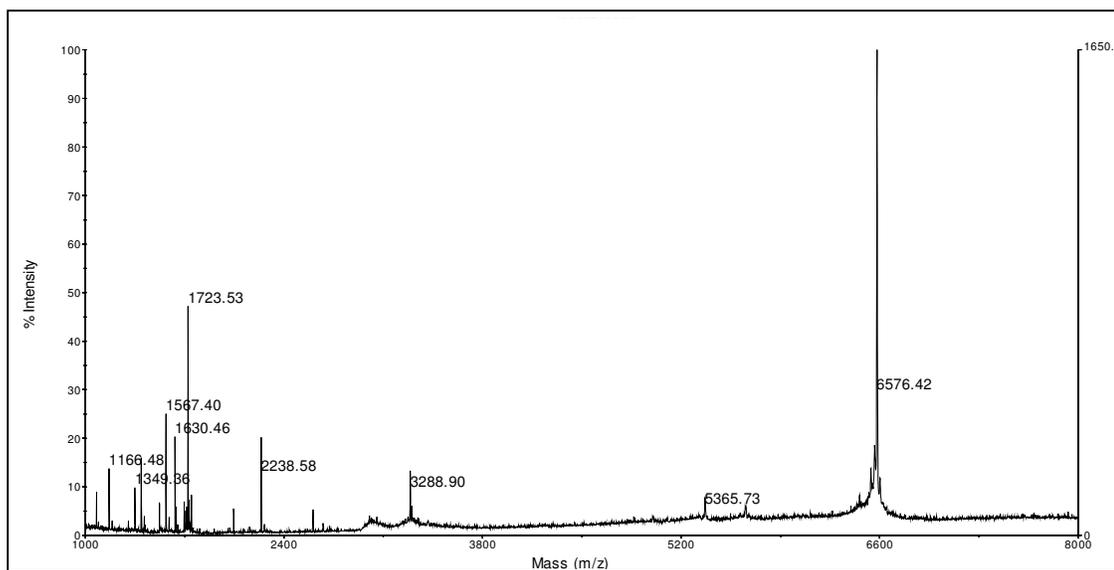


Abb. 10: MALDI-TOF-Massenspektrum der in Abb. 8 mit G 3 markierten Fraktion nach Deglykosylierung mit PNGaseF. Nach der Deglykosylierung ist das tryptische Peptid der ASA mit dem Massenverhältnis 6576 m/z nachweisbar. Dieses Peptid enthält die Aminosäuren 303-367. Das berechnete Massenverhältnis beträgt 6576,49 m/z. Dabei wurde berücksichtigt, dass die Masse des Peptids durch die Deglykosylierung mit PNGaseF um 1 Da ansteigt, da Asparagin zu Aspartat umgesetzt wird.

4.1.3 Trennung von Glykosylierungsstelle 1 und 2 der hASA

Die Fraktionen, in denen das tryptische Peptid 144-200 mit den Glykosylierungsstellen 1 bei Aminosäure 158 und Glykosylierungsstelle 2 bei Aminosäure 184 massenspektrometrisch detektiert werden konnte, wurden vereint (in der Abbildung 8 zwischen 38 und 42 min), umgepuffert und mit der Endoproteinase AspN verdaut. Die dabei entstehenden Peptide umfassen die Aminosäuren 152-168 (G1) bzw. 173-200 (G2). Diese wurden mittels RP-HPLC voneinander getrennt. Das aufgezeichnete Chromatogramm bei der Wellenlänge von 214 nm ist in Abbildung 11 gezeigt.

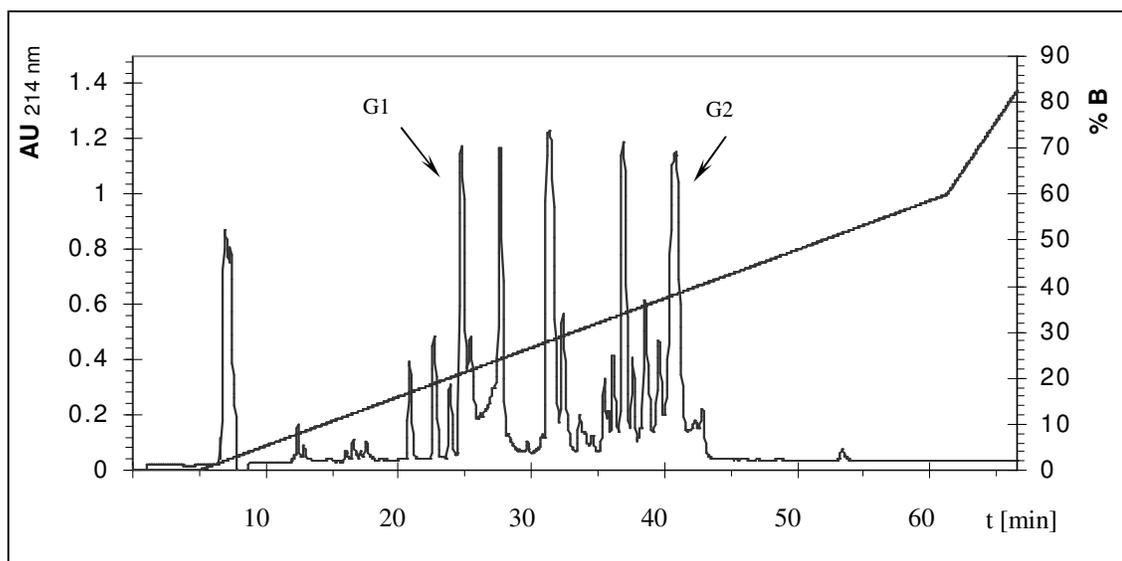


Abb. 11: RP-Chromatogramm des AspN-Verdau des tryptischen Peptids mit der Glykosylierungsstelle 1 und 2 der ASA. Dargestellt ist die Absorption bei 214 nm über der Laufzeit. Außerdem ist der prozentuale Anteil des Eluenten B am Laufmittel zu sehen. Die Pfeile im Chromatogramm markieren die Fraktionen, in denen die Peptide mit den Glykosylierungsstellen 1 bzw. 2 massenspektrometrisch detektiert werden konnten.

Der HPLC-Lauf wurde fraktioniert und aus jeder Fraktion wurde ein Aliquot mittels MALDI-TOF-MS vor und nach der Deglykosylierung mit PNGaseF vermessen. Die folgenden Abbildungen zeigen die Massenspektren der Fraktionen, die in der Abbildung 11 markiert sind nach der Deglykosylierung mit PNGaseF. In diesen Fraktionen wurden nach der Deglykosylierung die Massen der Glykopeptide detektiert, die mit denen übereinstimmen, die für den Dreifach-Verdau von ASA mit Trypsin, AspN und PNGaseF berechnet wurden.

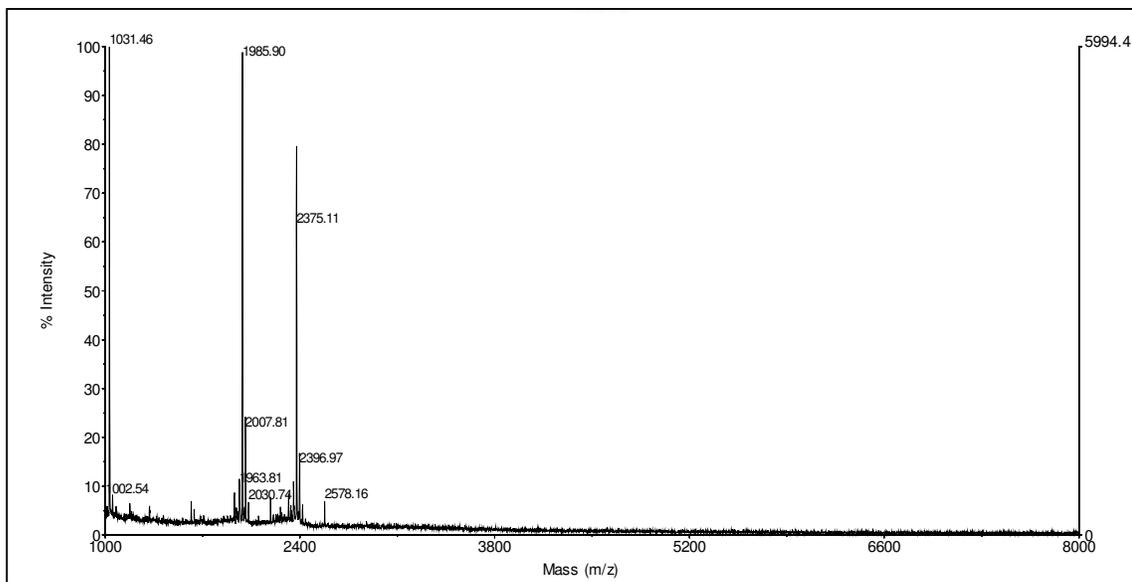


Abb. 12: MALDI-TOF-Massenspektrum der in Abb. 11 mit G 1 markierten Fraktion nach Deglykosylierung mit PNGaseF. Nach der Deglykosylierung ist das Peptid als Natriumaddukt mit dem Massenverhältnis 1985,9 m/z mit 3 carboxymethylierten Cysteinen nachweisbar. Dieses Peptid enthält die Aminosäuren 152-168. Das berechnete Massenverhältnis beträgt 1985,78 m/z. Der Peak mit dem Massenverhältnis 2375,11 m/z steht für das deglykosylierte Peptid mit den Aminosäuren 152-172. Dieses Peptid enthält ebenfalls die Glykosylierungsstelle 1. Es trägt durch die Trypsin-Fehlpaltstelle insgesamt 4 Cysteine, die alle carboxymethyliert vorliegen. Das berechnete Massenverhältnis beträgt als Natriumaddukt 2374,9 m/z. Bei den Massenangaben wurde berücksichtigt, dass die Masse der Peptide durch die Deglykosylierung mit PNGaseF um 1 Da ansteigt.

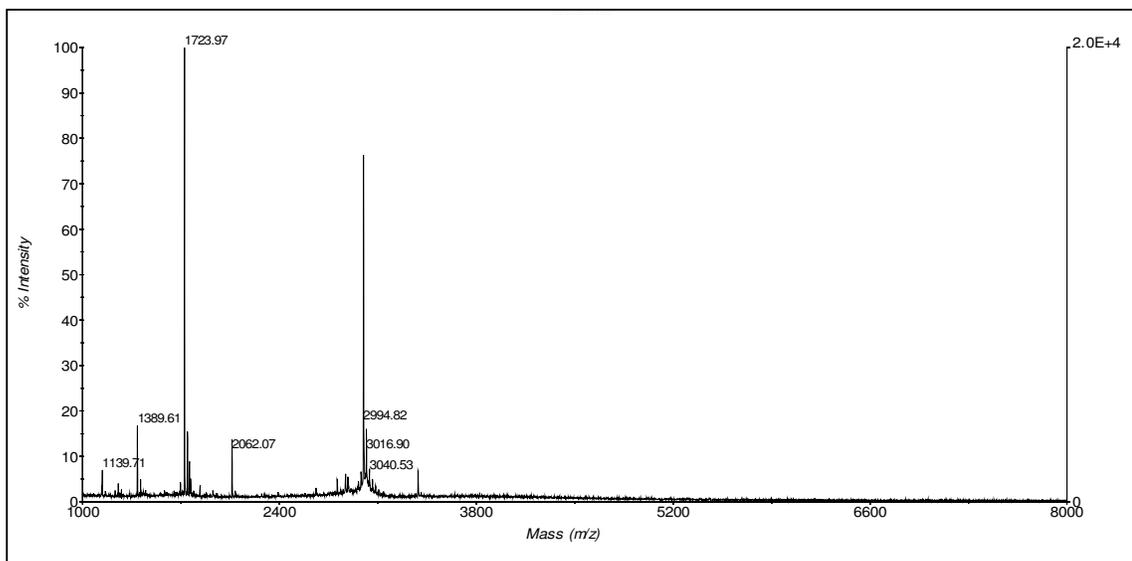


Abb. 13: MALDI-TOF-Massenspektrum der in Abb. 11 mit G 2 markierten Fraktion nach Deglykosylierung mit PNGaseF. Nach der Deglykosylierung ist das Peptid der ASA mit dem Massenverhältnis 2994,8 m/z nachweisbar. Dieses Peptid enthält die Aminosäuren 173-200. Das berechnete Massenverhältnis beträgt 2994,65 m/z, dabei wurde berücksichtigt, dass die Masse des Peptids durch die Deglykosylierung mit PNGaseF um 1 Da ansteigt.

Zur Bestimmung der Elutionszeiten der Glykopeptide wurde ein Aliquot von jeder Fraktion (1 Fraktion/min) massenspektrometrisch vor und nach der Abspaltung der

Oligosaccharidseitenketten durch das Enzym PNGaseF untersucht. Die Elutionszeiten betragen unter den gewählten Bedingungen ca. 25 min für Glykosylierungsstelle 1 und ca. 40 min für Glykosylierungsstelle 2. Das tryptische Glykopeptid 1/2 konnte in keiner Fraktion detektiert werden, was für einen vollständigen Verdau mit AspN spricht. Die hohe Reproduzierbarkeit des Elutionsprofils auch mit den anderen untersuchten ASA-Chargen erlaubte eine zuverlässige Zuordnung der Glykopeptide zu den Fraktionen.

4.1.4 Aufreinigung und Markierung der Oligosaccharide

Die isolierten Glykopeptide mit den N-Glykosylierungsstellen 1, 2 und 3 an Aminosäureposition 158, 184 bzw. 350 wurden zur Freisetzung der Oligosaccharide mit dem Enzym Peptid: N-Glykosidase F (PNGaseF) behandelt. Darauf folgte ein Reinigungsschritt über selbstgepackte Carbograph-Säulchen, um Salzreste, das Enzym und die deglykosylierten Peptide von den freigesetzten Zuckern abzutrennen. Dieser zusätzliche Reinigungsschritt reduziert die Menge an Aminogruppen-tragenden Molekülen, die bei der anschließenden Markierungsreaktion (reduktive Aminierung) mit den Zuckern zu Glycosylaminen reagieren können.

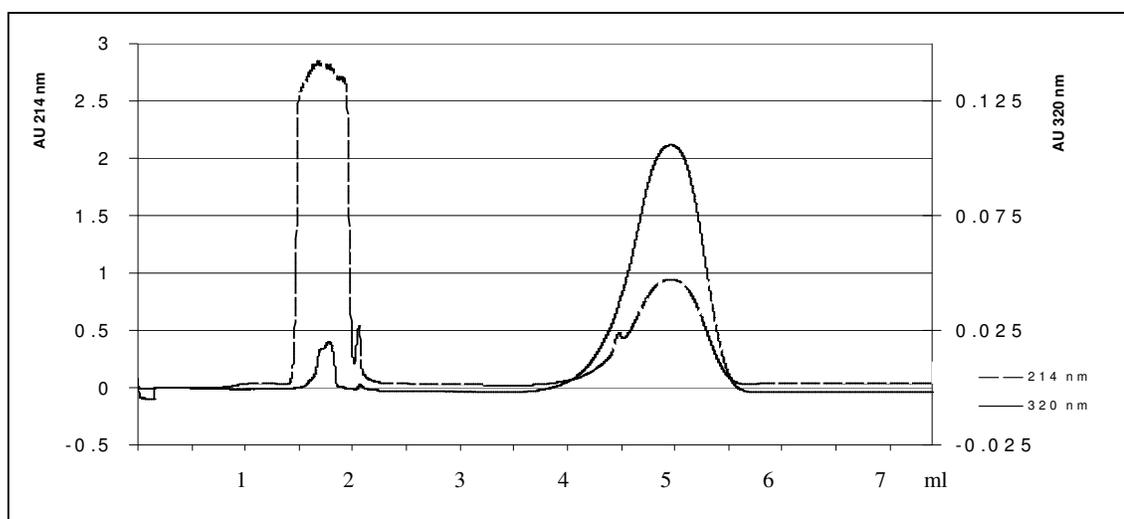


Abb 14: Gelfiltration zur Abtrennung des überschüssigen Fluorophors von fluoreszenzmarkierten Oligosacchariden. Gezeigt sind die Absorptionen bei einer Wellenlänge von 214 nm und 320 nm über dem Laufmittelvolumen.

Die von den Carbograph-Säulen eluierten Oligosaccharide wurden in der Speed Vac getrocknet und mit dem Fluorophor 2-Aminobenzamid markiert. Das überschüssige Fluorophor sowie das Reduktionsmittel wurden mittels Gelfiltration von der markierten Probe

abgetrennt. Die Elution des markierten Oligosaccharids wurde bei einer Wellenlänge von 320 nm verfolgt. Abbildung 14 zeigt exemplarisch den Absorptionsverlauf bei 214 nm und 320 nm. Unter den gewählten Bedingungen eluierten die fluoreszenzmarkierten Oligosaccharide im Bereich von 1,8 ml und der Fluorophorüberschuss bei ca. 5 ml Laufmittel. Die Oligosaccharid-Fractionen wurden gepoolt und vor der weiteren Analyse intensiv in der Speed Vac getrocknet.

4.1.5 Dextranstandard zur Ermittlung der Glukose Einheiten (GU, glucose units)

Durch den Vergleich der Elutionszeiten der Peaks der Probe mit denen eines hydrolysierten Dextranstandards ist es möglich die Probenpeaks einer wahrscheinlichen Struktur zuzuordnen. Um die Strukturvorhersage abzusichern ist die Aufnahme weiterer Chromatogramme nach der Inkubation der Probe mit verschiedenen Exoglykosidasen nötig. Zur Erstellung eines Dextranstandards wurde Dextran sauer hydrolysiert und ebenfalls mit 2-Aminobenzamid markiert. Nach der Aufarbeitung durch eine Gelfiltration wurde ein Fluoreszenzprofil des Standards, wie oben beschrieben, aufgezeichnet. Abbildung 15 zeigt ein typisches Chromatogramm für einen Dextranstandardlauf unter den angegebenen Bedingungen. Die Elutionszeiten der Glucose Units (GU) – diese bezeichnen die Anzahl der Glukosemonomere - wurden mittels MALDI-MS-TOF überprüft, um der gemessenen Elutionszeit einen relativen GU-Wert zuzuordnen.

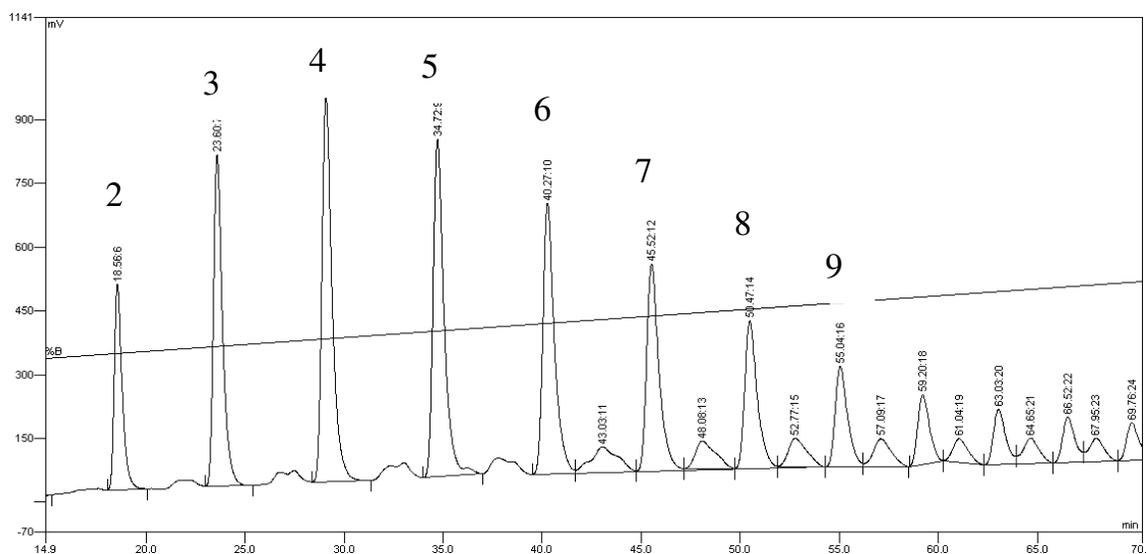


Abb. 15: Fluoreszenzsignal von partiell hydrolysiertem Dextran, das mit Aminobenzamid markiert und auf einer Amid-HPLC-Säule aufgetrennt wurde. Aufgetragen ist das Fluoreszenzsignal, das bei einer Wellenlänge von 420 nm, nach Anregung bei 320 nm, detektiert wurde über der Laufzeit der Trennung. Die Zahlen über den Peaks geben die Anzahl der Glukoseeinheiten (GU) an.

Die Elutionszeiten variierten, wahrscheinlich durch minimale Veränderungen in der Pufferzusammensetzung, um bis zu 3 min. Deshalb wurde nach maximal fünf Fluoreszenzprofilen jeweils erneut ein Dextranstandard-Chromatogramm aufgezeichnet. Jedes Chromatogramm des Dextranstandards für sich zeigte eine sehr hohe Linearität ($R^2 > 0,99$) zwischen den GU-Werten und der Elutionszeit, wie das Chromatogramm in Abbildung 15 beispielhaft zeigt.

Zum Umrechnen der Elutionszeiten des Dextranstandards in Glukose Einheiten (GU) wurden diese in einem Exceldiagramm über die Zeit aufgetragen. Die erhaltene lineare Beziehung zwischen Elutionszeit und GU erlaubte eine schnelle Umrechnung der Elutionszeiten der Peaks der Proben in GU (vergl. Abb. 16).

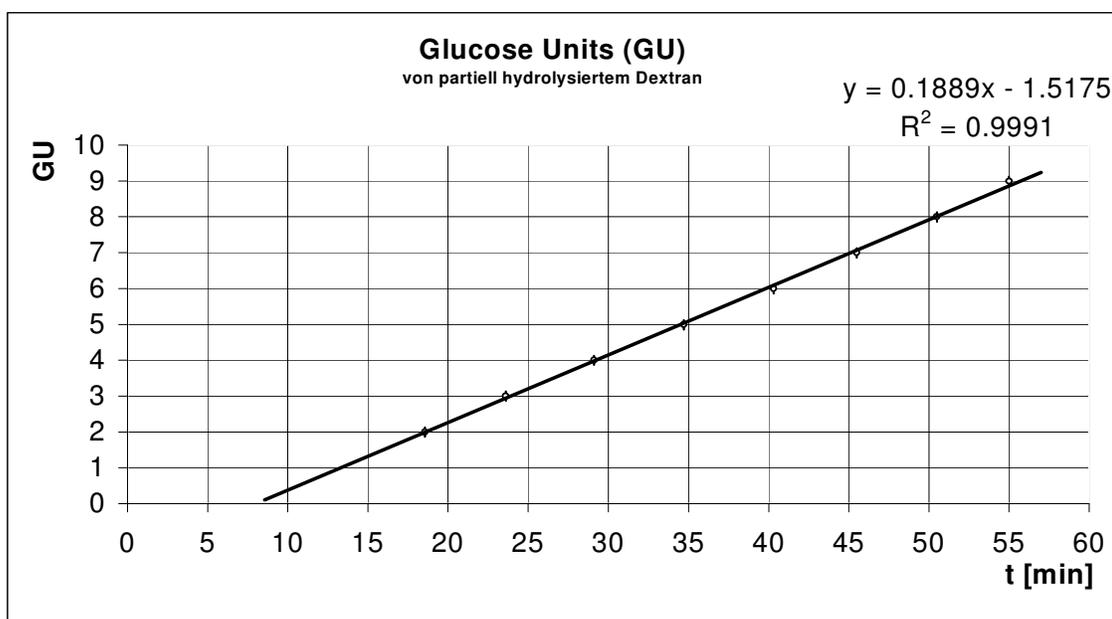


Abb. 16: Diagramm, in dem die Elutionszeiten von hydrolysiertem, mit 2-Aminobezamid markiertem Dextran den zugehörigen Glucose Units (GU) zugeordnet wurden.

Anhand der ermittelten Geradengleichung wurde für die Elutionszeiten der Peaks aus den Fluoreszenzprofilen der Oligosaccharide ein relativer GU-Wert berechnet. Dieser Wert diente zur Bestimmung der Oligosaccharidstruktur anhand von Tabelle 1.

Struktur	Zusammensetzung					GU
	GlcNAc	Hex	Fuc	Sial	Ph	
Hex ₁	2	1	-	-	-	2,41
Hex ₂	2	2	-	-	-	2,96
FucHex ₁	2	2	1	-	-	3,40
Hex ₂ B	3	2	-	-	-	3,80
Hex ₃	2	3	-	-	-	4,26
FucHex ₂	2	3	1	-	-	4,78
Hex ₄	2	4	-	-	-	5,22
FucHex ₄	2	4	1	-	-	5,66
FucA ₂	4	3	1	-	-	5,79
Hex ₃ A ₁ G ₁	3	4	-	-	-	5,90
Hex ₅	2	5	-	-	-	6,12
FucHex ₅	2	5	1	-	-	6,56
FucA ₂ G ₁	4	4	1	-	-	6,94
Hex ₆	2	6	-	-	-	7,01
A ₂ G ₂	4	5	-	-	-	7,23
FucHex ₆	2	6	1	-	-	7,45
FucA ₂ G ₂	4	5	1	-	-	7,57
Hex ₇	2	7	-	-	-	7,86
FucHex ₇	2	7	1	-	-	8,30
Hex ₈	2	8	-	-	-	8,82
FucHex ₈	2	8	1	-	-	9,26
Hex ₇ Ph ₂	2	7	-	-	2	9,42
Hex ₇ Ph ₂ Sial	2	7	-	1	2	9,97

Tabelle 1: Oligosaccharidstrukturen und deren Elutionszeiten unter den angegebenen Bedingungen der Amid-HPLC, ausgedrückt in Glucose Units (GU), [nach Guile, 1996; Arnold, 2004 und eigene Daten].

GlcNAc: N-Acetyl-Glukose; Hex: Hexose; Fuc: Fukose; Sial: Sialinsäure; Ph: Phosphat.

Bei der Abkürzung der Struktur der Oligosaccharide hat sich folgende Nomenklatur durchgesetzt, die auch in der Tabelle 1 verwendet wurde: A_X gibt die Anzahl der Verzweigungen an der Trimannosylkernstruktur an (A₂ steht z.B. für biantennäre Strukturen), Hex_X gibt an, wieviele Hexosereste insgesamt an die zwei inneren N-Acetylglucosamine der Trimannosylkernstruktur gekoppelt sind, Fuc steht für einen Fukoserest, der α 1-6 an den inneren N-Acetylglucosaminrest geknüpft ist, B steht für bisecting (d.h. eine GlcNAc, die β 1-4 an den inneren Mannoserest verknüpft ist), G_X steht für gekoppelte Galaktosereste, wobei das X deren Anzahl angibt, Sial_X steht für die Anzahl (X) an Sialinsäureresten.

4.1.6 Standardoligosaccharide

Als Standard für Oligosaccharide des mannosereichen Typs dienen die N-Glykane des Proteins: RNase B. RNase B wurde mit PNGaseF inkubiert und die Oligosaccharide wurden wie beschrieben gereinigt und mit 2-Aminobenzamid markiert. Das Fluoreszenzprofil der Glykane zeigt Abbildung 17. Das Protein RNase B hat eine N-gebundene Oligosaccharidseitenkette, die ausschließlich Glykane des Man₅ – Man₉ Typs sind. Es ist bekannt, dass die Man₇-Struktur 3 Isoformen aufweist [Kawasaki, 1999]. Diese können im Fluoreszenzprofil gut beobachtet werden (Abb. 17 A). Nach der Inkubation mit α -Mannosidase (Jack Bean) wurde erneut ein Fluoreszenzprofil aufgenommen (Abb. 17 B).

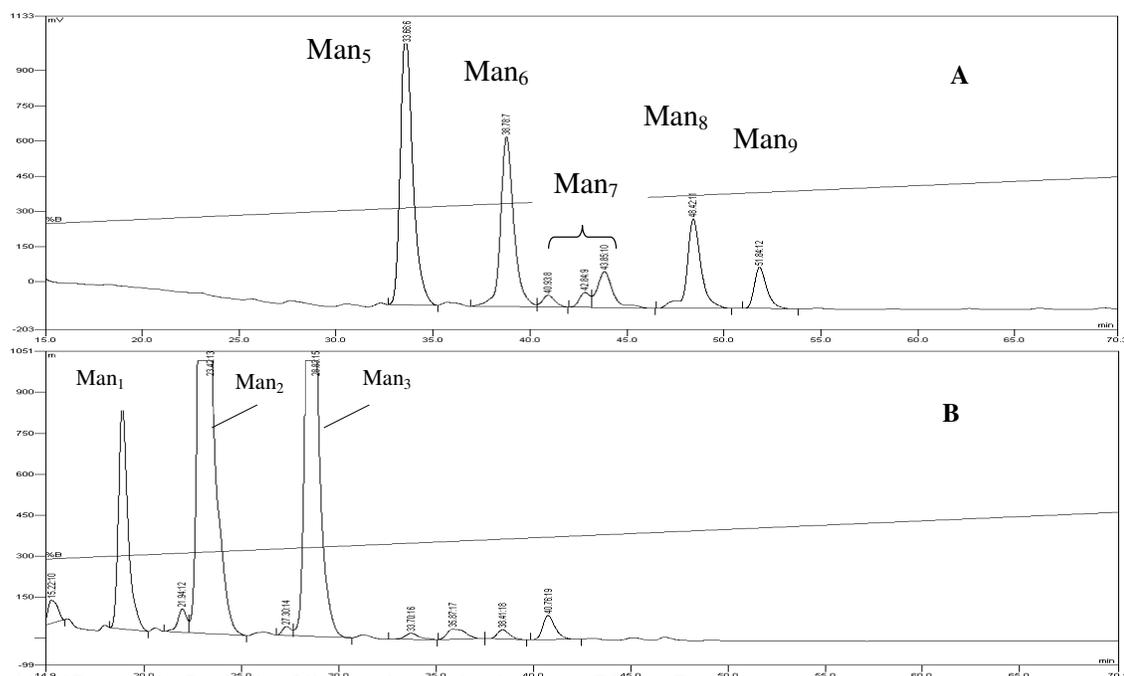


Abb.17: A Profil der Oligosaccharidseitenkette von RNase B.
 B Profil der Oligosaccharidseitenkette von RNase B nach Inkubation mit α -Mannosidase.
 Aufgetragen ist die Intensität der Fluoreszenz über der Laufzeit der HPLC-Trennung. Die Peakbeschriftung orientiert sich an der Nomenklatur von Tabelle 1. Da bekannt ist, dass RNaseB ausschließlich Oligosaccharide vom mannosereichen Typ trägt, wurde das Kürzel Hex_x durch Man_x ersetzt.

Als Standard für komplexe hochgradig sialysierte Oligosaccharide dienen die Asn-gebundenen Glykane des Fetuins. Fetuin besitzt drei N-glykosidisch gebundene Oligosaccharidseitenketten, die 1, 2 oder 3 Sialinsäurereste tragen [Green, 1988]. Diese wurden mit PNGaseF vom Protein abgetrennt, aufgereinigt und wie beschrieben markiert. Anschließend wurde ein Fluoreszenzprofil aufgezeichnet (Abb. 18 A). Ein zweites Profil wurde nach Inkubation mit Sialidase (*vibrio cholera*) aufgenommen (Abb. 18 B).

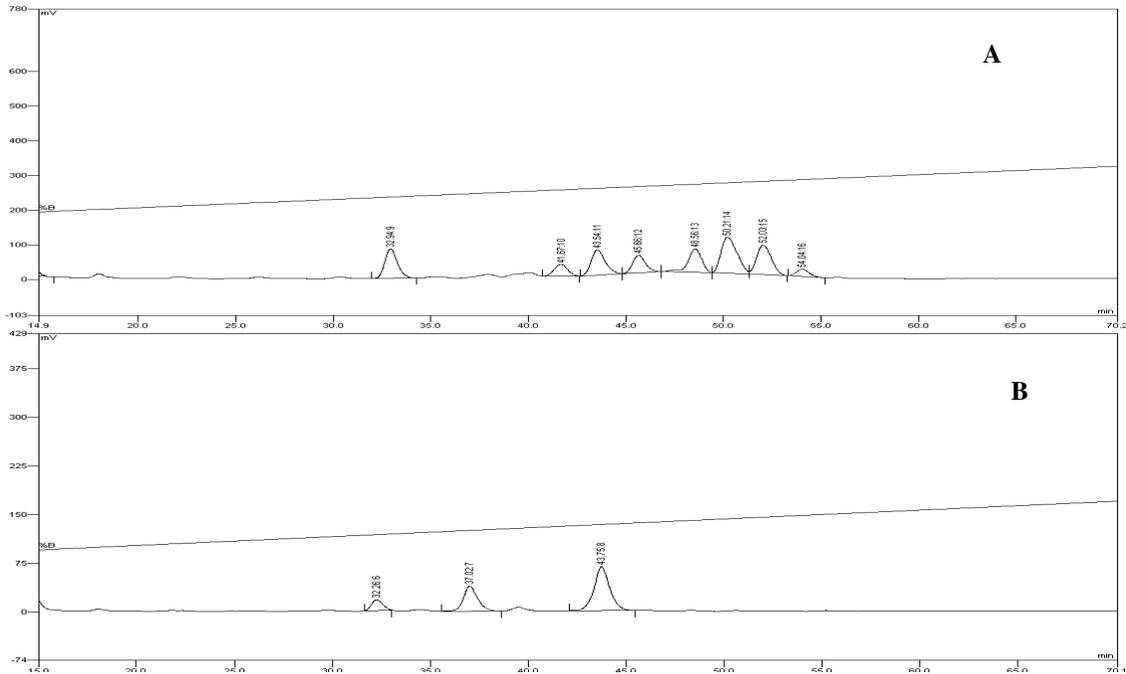


Abb.18: A Profil der Oligosaccharidseitenkette von Fetuin.
 B Profil der Oligosaccharidseitenkette von Fetuin nach Inkubation mit Sialidase.
 Aufgetragen ist die Intensität der Fluoreszenz über der Laufzeit der HPLC-Trennung.
 Untersucht wurden nur die Asparagin-gebundenen Oligosaccharide des Fetuins.

Als Standard zur Charakterisierung des Laufverhaltens von phosphorylierten Glykanen bzw. deren dephosphorylierten Analoga diente Phosphomannan. Phosphomannan ist ein Polysaccharid, das aus der Zellwand verschiedener Hefen isoliert werden kann. Das hier verwendete Phosphomannan wurde isoliert aus der Hefe *Hansenula holstii* und wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Vito Ferro (Progen Industries), Australien.

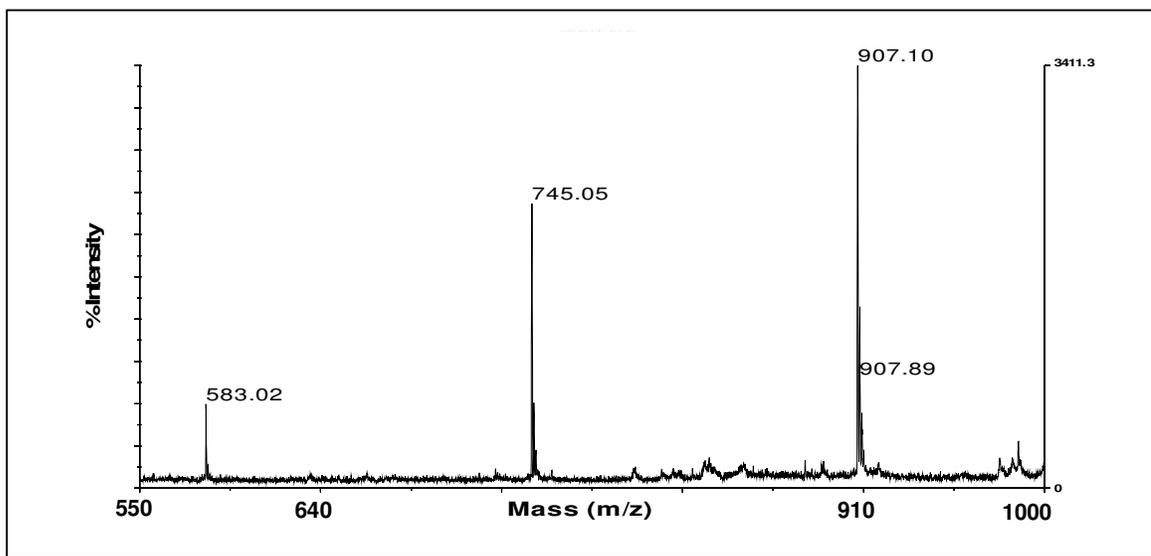


Abb.19: MALDI-TOF-Massenspektrum des verwendeten Phosphomannans; aufgenommen im Negativ-Ionen-Modus. Die Peaks 583/745/907 m/z stehen für Strukturen, bestehend aus 3/4/5 Mannosemonomeren mit jeweils einem Phosphatrest.

Es besteht aus 2 – 5 Mannosemonomeren, die α 1-3 glykosidisch verknüpft sind und an C₆ am nicht-reduzierenden Ende eine Phosphatgruppe tragen [Ferro, 2001]. Das Massenspektrum zeigte die erwarteten Massen für die Strukturen mit 3, 4 bzw. 5 Mannosemonomeren mit jeweils einer Phosphatgruppe. Es konnten keine unphosphorylierten Strukturen detektiert werden (vergl. Abb. 19).

Vom Phosphomannan wurde ebenfalls, nach Markierung mit 2-Aminobenzamid, ein Fluoreszenzprofil aufgezeichnet (Abb. 20 A) und eines nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase (Abb. 20 B).

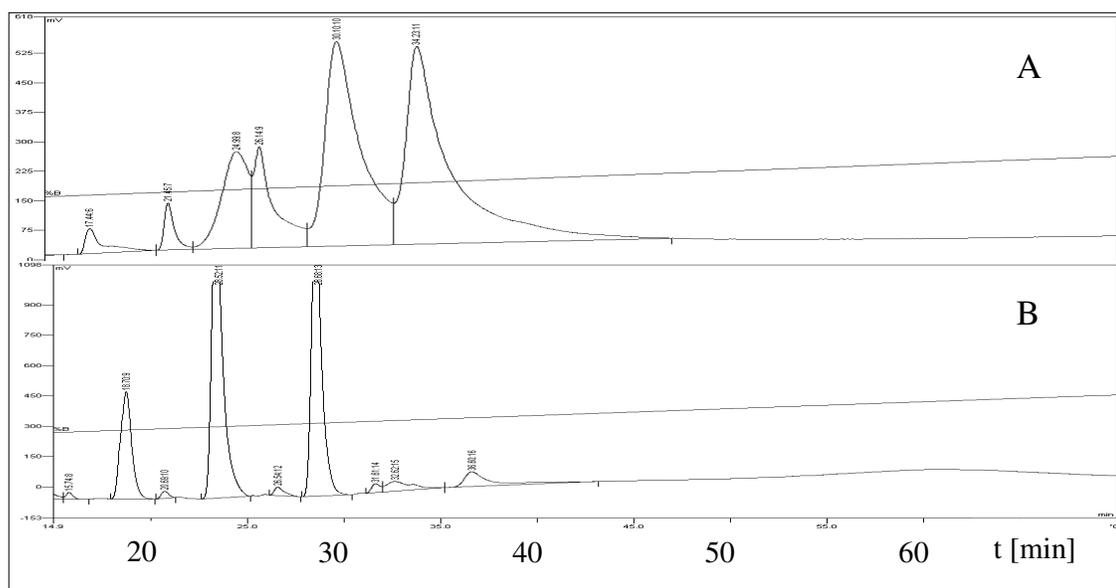


Abb. 20: A Fluoreszenzprofil des Phosphomannans.
 B Fluoreszenzprofil des Phosphomannans nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase.
 Beide Teilabbildungen zeigen die Intensität des Fluoreszenzsignals über der Trennzeit auf einer Normalphasen-HPLC. Man beachte, dass die Peaks nach Abspaltung der Phosphatgruppe (B) deutlich schärfer werden und ca. 5 Minuten früher eluieren. Die gestrichelte Linie markiert den Gradienten der wässrigen Phase.

Die Phosphatgruppe führt zu einem starken, charakteristischen Tailing der Peaks auf der Amidsäule. Dies verschwindet nach Phosphatasebehandlung völlig. Die dephosphorylierten Strukturen eluieren ca. 6 min früher im Vergleich zu den phosphorylierten Analoga. Dies wurde bei der Kalkulation der Glucose Units für phosphorylierte Oligosaccharide berücksichtigt (vergl. Tab. 1).

4.1.7 Nachweisgrenze von 2-Aminobenzamid markierten Oligosacchariden

Um die Nachweisgrenze von fluoreszenzmarkierten Oligosacchariden zu bestimmen, wurde eine definierte Menge eines Standardglykans (Maltoheptaose) mit 2-Aminobenzamid markiert und durch Gelfiltration aufgereinigt. Die markierte Maltoheptaose wurde auf einer RP18-Säule mit einem Acetonitrilgradienten (0-100 % in 5 min) eluiert. Diese vergleichsweise kurzen Laufzeiten waren möglich, da nicht die chromatographische Trennung im Vordergrund stand. Die Probe wurde so weit verdünnt bis ein Signal gerade noch detektierbar war.

Der Peak im gezeigten Chromatogramm (Abb. 21) entspricht einer Menge von 8,67 fmol Maltoheptaose, die mit 2-Aminobenzamid markiert wurde. Es ist zu beachten, dass die Signalstärke über 100 mV liegt, d.h. bei der üblichen Peakdefinition des Verhältnisses von Signal zu Rauschen > 3 liegt das Detektionslimit sogar im Subfemtomolbereich.

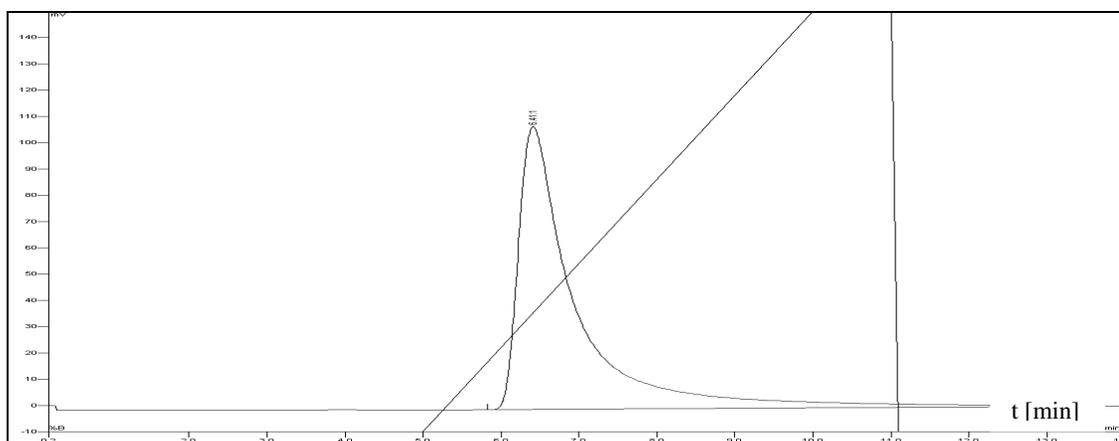


Abb. 21: Fluoreszenzsignal von 2-Aminobenzamid markierter Maltoheptaose. Injektionsmenge: 8,67 fmol. Aufgetragen ist die Intensität der Fluoreszenz über der Laufzeit der HPLC-Trennung

Bei diesem Versuch muss allerdings berücksichtigt werden, dass es sich bei dem verwendeten Glykan um ein gekauftes Standardsaccharid handelte, d.h. es entfielen die Schritte der enzymatischen Freisetzung vom Protein und die Aufreinigung des Glykans vor der Markierung. Die Ausbeutefaktoren dieser Schritte sind unbekannt. Die Nachweisgrenze für Oligosaccharide isoliert aus Glykoproteinen dürfte dadurch aber wesentlich höher liegen.

4.2 Glykosylierungsstellen-spezifische Analytik der Oligosaccharide von hASA, sezerniert von BHK-Zellen

Die Abbildung 22 zeigt das Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 1 der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde. Die Hauptkomponenten eluieren bei 6,25/7,23 und 8,09 GU und entsprechen einer Hex₅-/Hex₆- und Hex₇-Struktur. Diese Strukturen haben zusammen genommen einen Anteil an der Glykosylierungsstelle 1 der BHK-ASA von 85,3 %. Bei den Peaks, die jeweils ca. 0,5 GU später eluieren handelt es sich um die fukosylierten Analoga.

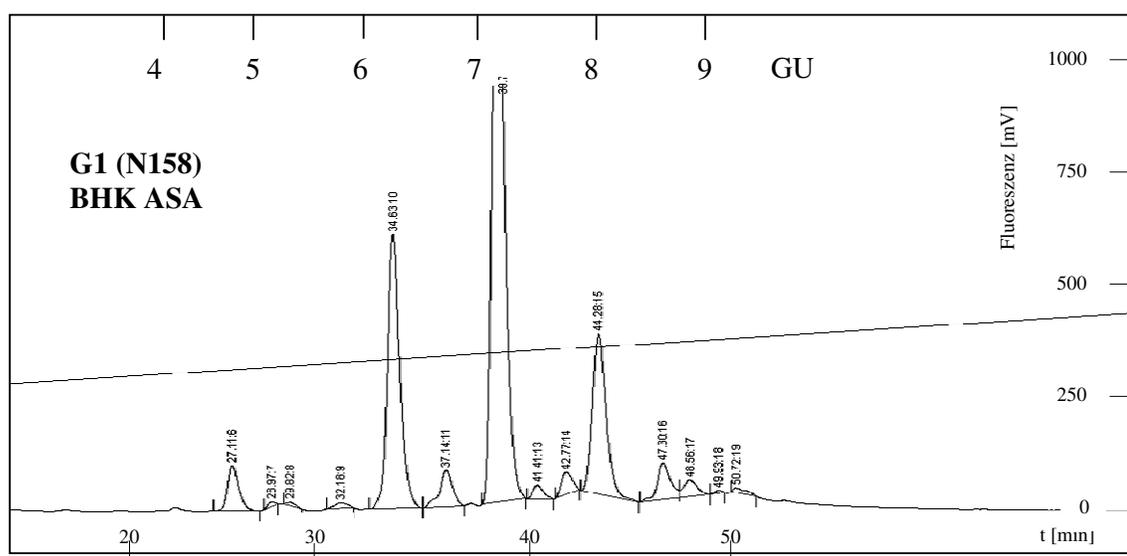


Abb. 22: Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 1 der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde. Aufgetragen sind die Intensitäten der Fluoreszenz über der Elutionszeit, sowie die relativen Glukoseeinheiten (GU).

Die Oligosaccharide wurden anschließend mit den Exoglykosidasen Neuraminidase, α -L-Fukosidase, α -Mannosidase, und mit alkalischer Phosphatase inkubiert. Nach Aufreinigung der so behandelten Proben wurde für jedes Aliquot ein Fluoreszenzprofil aufgenommen. Die Profile sind in Abbildung 23 dargestellt. Aus den Fluoreszenzprofilen nach Inkubation mit den genannten Exoglykosidasen kann gefolgert werden, dass es sich bei den Hauptkomponenten um Man₅-/Man₆-/Man₇-Strukturen handelt, da die Peaks nach α -Mannosidaseinkubation fast vollständig einrücken. Nach Inkubation mit α -L-Fukosidase sind die Peaks, die zwischen den Hauptpeaks eluieren, nicht mehr nachzuweisen. Diese Peaks repräsentieren fukosylierte Strukturen vom mannosereichen Typ. Nach der Inkubation mit den restlichen Enzymen ist keine nennenswerte Verschiebung des Spektrums zu verzeichnen, d.h.

die Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 1 sind weder vom komplexen noch vom hybriden Typ. Sie sind nicht phosphoryliert.

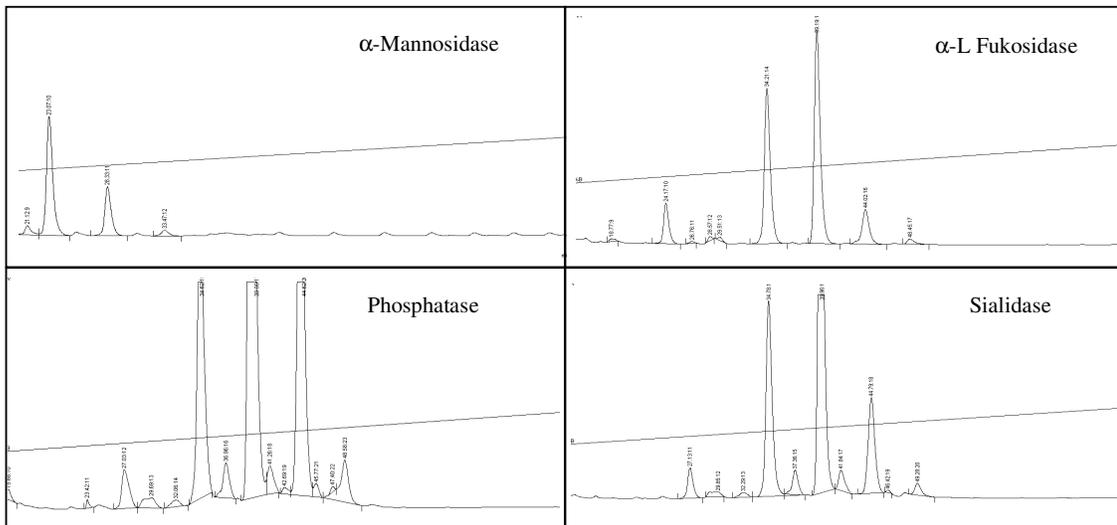


Abb. 23: Fluoreszenzprofile der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 1 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde nach Inkubation mit den in der Abbildung angegebenen Exoglykosidasen bzw. alkalischer Phosphatase.

Nach Aufreinigung der Oligosaccharide durch selbstgepackte Carbographsäulen, vor der Markierung mit dem Fluorophor, wurde ein MALDI-TOF-MS Spektrum aufgenommen. Abbildung 24 zeigt das Massenspektrum der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 1 der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde. In der Abbildung sind die gefundenen Zuckerstrukturen symbolisch dargestellt. Das Massenspektrum ist von der Verteilung der Peaks fast deckungsgleich mit dem Fluoreszenzprofil, das nach der Fluoreszenzmarkierung der Oligosaccharide und Trennung durch Normalphasen-HPLC aufgezeichnet werden konnte (vgl. Abb. 22).

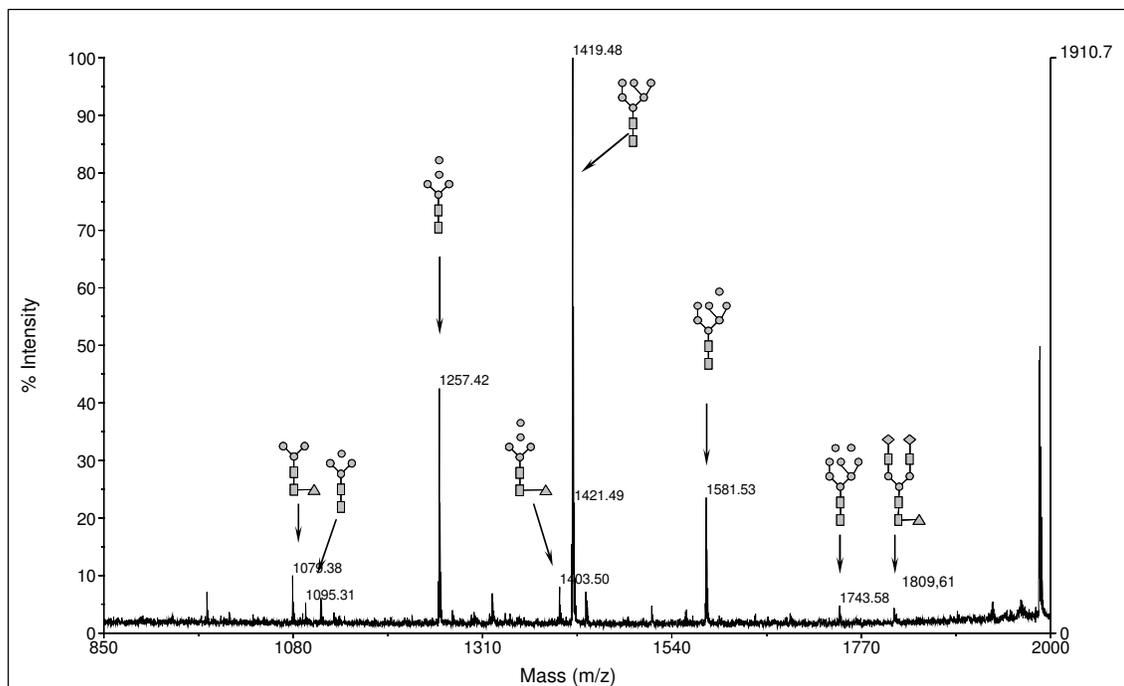


Abb. 24: MALDI-TOF-MS-Spektrum der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 1, von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereingt wurde. Den detektierten Peaks wurden Oligosaccharidstrukturen zugeordnet. Die Symbole stehen für:

- | | |
|----------------------|-------------|
| ■ N-Acetylglucosamin | ● Hexose |
| ▲ Fucose | ◆ Galaktose |

Das Profil des MALDI-TOF-Spektrums zeigt hohe Übereinstimmung mit dem Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 1. Hauptkomponenten sind auch hier Hex₅-/Hex₆- und Hex₇, die z.T. fukosyliert sind. Es kann auch ein Peak detektiert werden, der für eine komplexe Struktur steht (1809,6 m/z). Diese Struktur ist nur im MALDI-TOF-Massenspektrum nachweisbar. Der Anteil der Peakfläche an der Gesamtfläche aller Oligosaccharidpeaks der Glykosylierungsstelle 1 liegt bei < 1%.

Die fukosylierten Strukturen Man₆F und Man₇F sind nur im Fluoreszenzprofil nachweisbar.

Die Abbildung 25 zeigt das Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 2 der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde. Die Hauptkomponenten eluieren bei 4,61/6,55 und 7,49 GU und entsprechen einer Hex₃-/Hex₅- und Hex₆-Struktur. Diese Strukturen haben zusammen genommen einen Anteil an der Glykosylierungsstelle 2 von ca. 73 %.

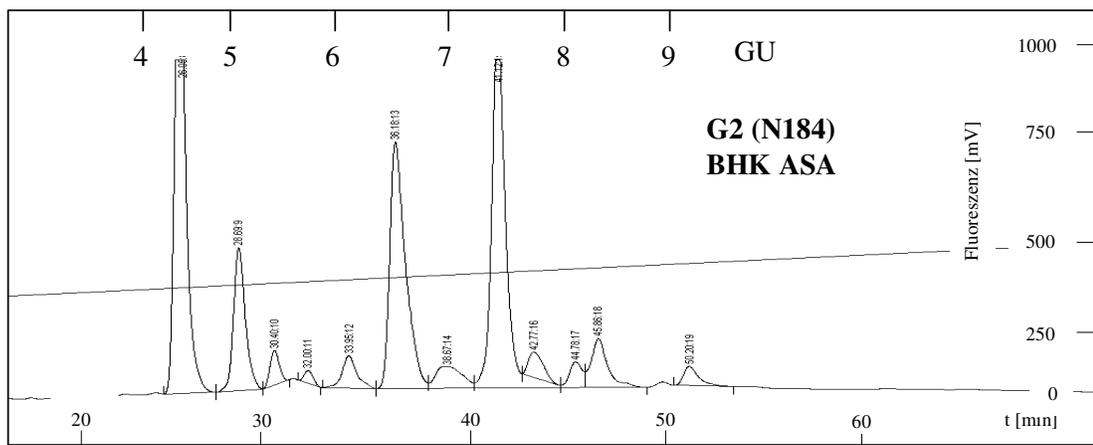


Abb. 25: Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 2 der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde. Aufgetragen sind die Intensitäten der Fluoreszenz über der Elutionszeit, sowie die relativen Glukoseeinheiten (GU).

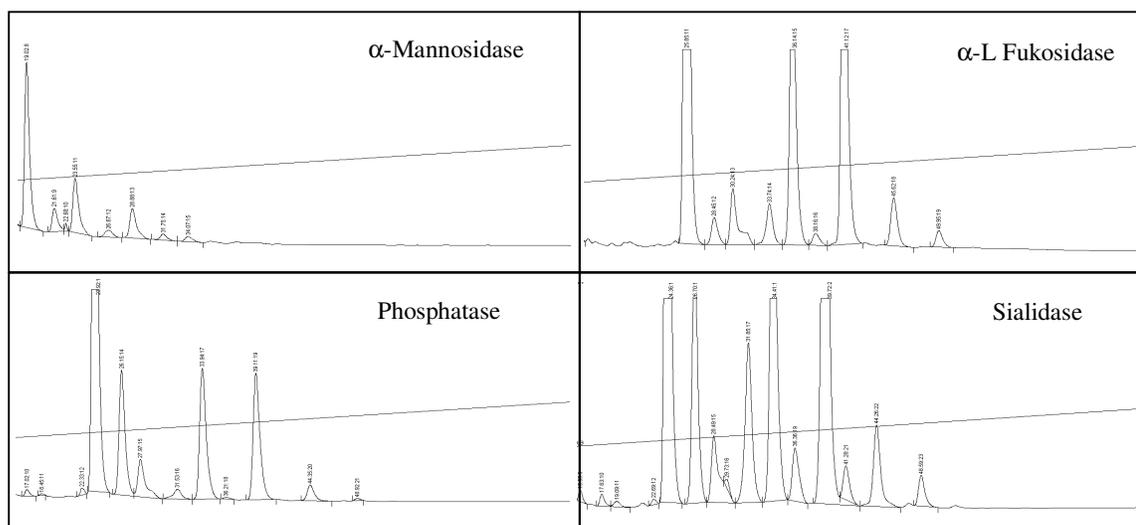


Abb. 26: Fluoreszenzprofile der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 2 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde nach Inkubation mit den in der Abbildung angegebenen Exoglykosidasen bzw. alkalischer Phosphatase.

Der Verdau mit α -Mannosidase zeigt, dass die Mehrheit der Oligosaccharide vom mannoreichen Typ ist. Nach Inkubation mit α -Fukosidase verringert sich der Anteil der Zwischenpeaks. Die anderen Enzyme zeigen keine nennenswerte Verschiebung. Bei den

Hauptstrukturen handelt es sich um Man₃-/Man₅- und Man₆, die z.T. fukosyliert sind. Die Strukturen sind – bis auf Spuren - weder vom komplexen noch vom hybriden Typ. Sie sind nicht phosphoryliert.

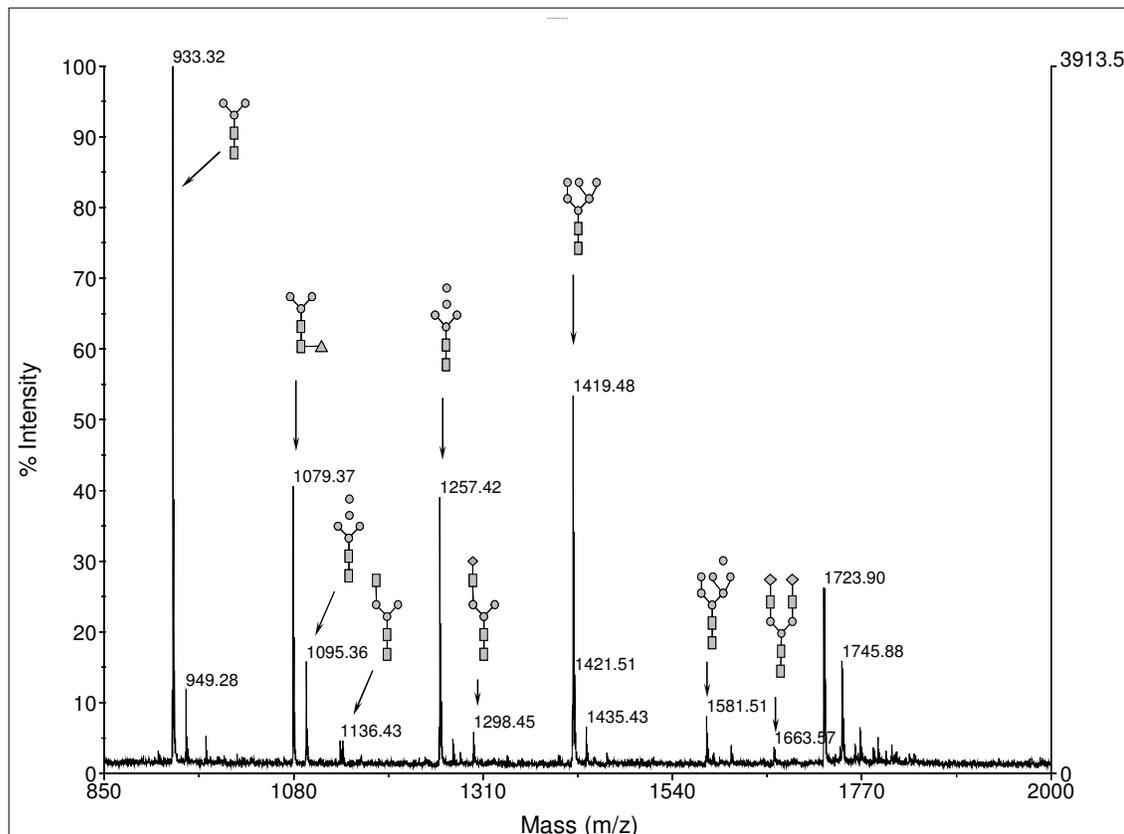


Abb. 27: MALDI-TOF-MS-Spektrum der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 2, von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereingt wurde. Den detektierten Peaks wurden Oligosaccharidstrukturen zugeordnet (zur Legende der Symbole s. Abb. 24).

Das Profil des MALDI-TOF-Spektrums zeigt hohe Übereinstimmung mit dem Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 2. Hauptkomponenten sind auch hier Hex₃-/Hex₅- und Hex₆, die z.T. fukosyliert sind. Es können auch Peaks detektiert werden, die für hybride (1298,45 m/z) bzw. komplexe (1663,57 m/z) Strukturen stehen. Diese haben aber nur einen geringen Anteil an der Gesamtfläche aller Peaks. Die fukosylierten Strukturen Man₄F, Man₅F und Man₆F und die Struktur Man₈ sind nur im Fluoreszenzprofil nachweisbar.

Die Abbildung 28 zeigt das Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 3 der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde. Die Hauptkomponenten eluieren bei 6,2 und 7,2 GU und entsprechen einer Hex₅- und Hex₆-Struktur. Diese Strukturen haben zusammen genommen einen Anteil an den Oligosacchariden der Glykosylierungsstelle 3 der BHK-ASA von ca. 60 %.

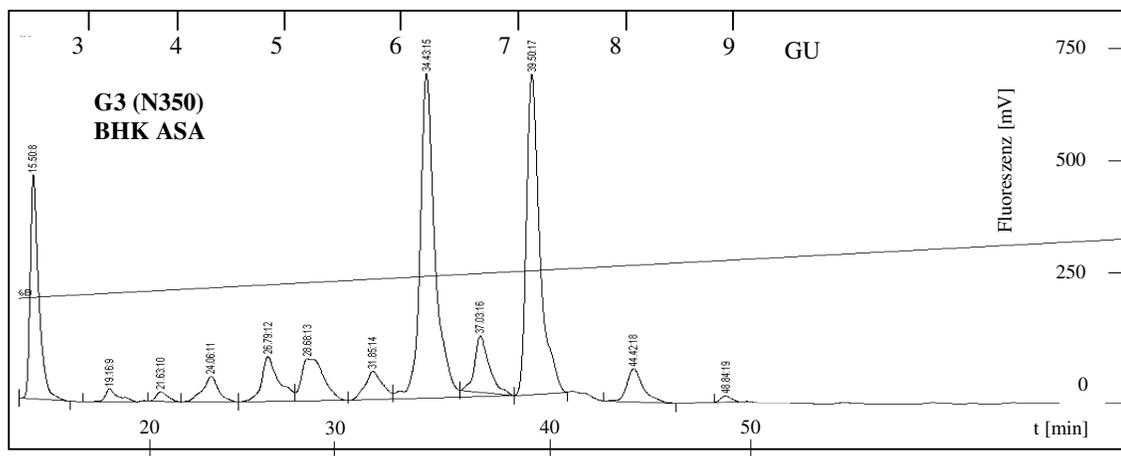


Abb. 28: Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 3 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde. Aufgetragen sind die Intensitäten der Fluoreszenz über der Elutionszeit, sowie die relativen Glukoseeinheiten (GU).

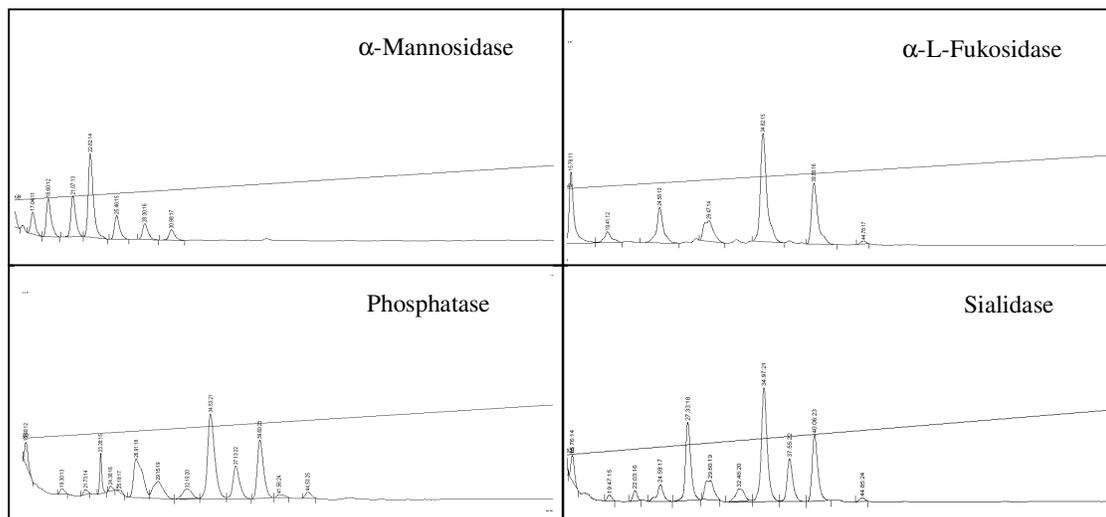


Abb. 29: Fluoreszenzprofile der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 3 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde nach Inkubation mit den in der Abbildung angegebenen Exoglykosidasen bzw. alkalischer Phosphatase.

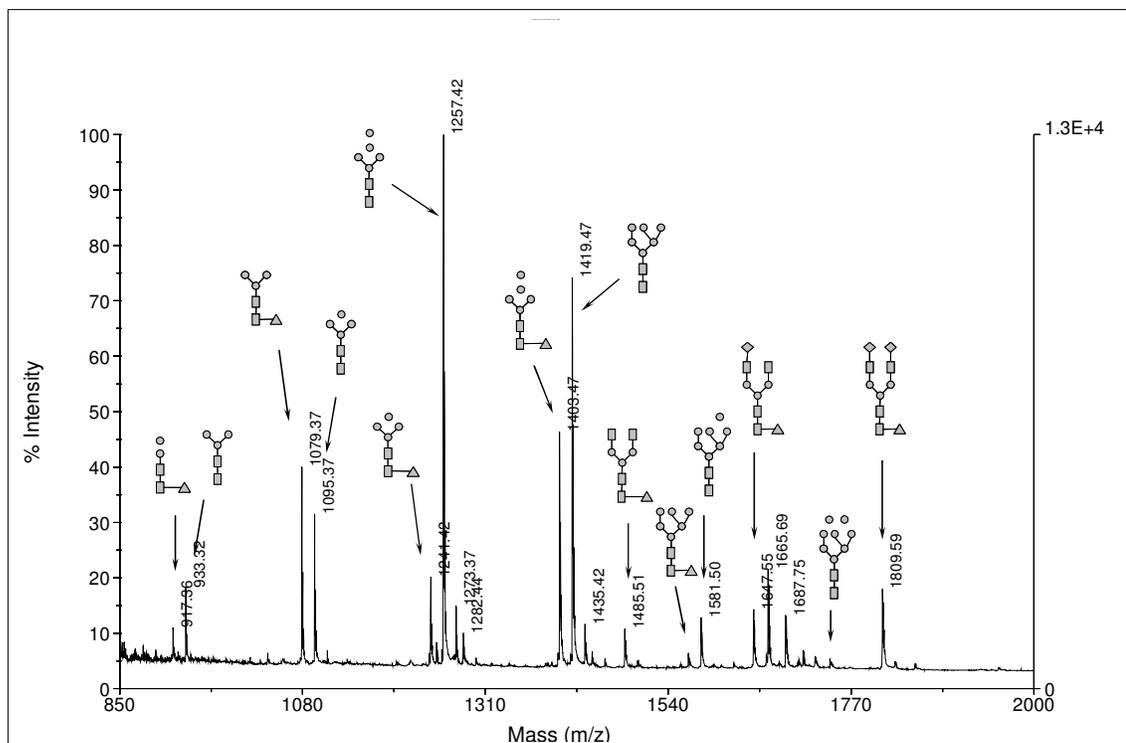


Abb. 30: MALDI-TOF-MS-Spektrum der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 3, von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgeringt wurde. Den detektierten Peaks wurden Oligosaccharidstrukturen zugeordnet (zur Legende der Symbole s. Abb. 24).

Das Fluoreszenzprofil und das MALDI-TOF-Spektrum zeigen gute Übereinstimmung. Aus den Fluoreszenzprofilen nach Exoglykosidase-Inkubation kann gefolgert werden, dass es sich bei den Hauptpeaks um Man₁-/Man₅- und Man₆-Strukturen handelt, die z.T. fukosyliert sind. Die Man₁-Struktur kann im MALDI-TOF-Spektrum nicht nachgewiesen werden.

Auf der folgenden Seite sind die Werte aus der MALDI-TOF- und Fluoreszenz-Analyse tabellarisch zusammengefasst. Die Verteilung der Zuckerstrukturen in % wurde aus den Peaks der jeweiligen Fluoreszenzgrundprofile nach Peakintegration berechnet.

Die fukosylierte Struktur Man₇F und die Strukturen Man₁ und Man₂ sind nur im Fluoreszenzprofil nachweisbar.

4. Ergebnisse

Nr.	Zusammensetzung			Masse [m/z]				GU-Werte				Verteilung [%]		
				gemessen			kalk.	gemessen			kalk.			
	GlcNAc	Hex	Fuc	G1	G2	G3		G1	G2	G3		G1	G2	G3
1	2	1		-	-	-	609,21	-	-	2,59	2,41	-	-	12,43
2	2	2		-	-	-	771,27	-	-	3,29	2,96	-	-	1,07
3	2	2	1	-	-	917,27	917,32	-	-	3,77	3,40	-	-	0,69
4	2	3		-	933,32	933,30	933,32	-	4,61	4,23	4,26	-	24,89	2,58
5	2	3	1	1079,38	1079,37	1079,37	1079,38	4,81	5,12	4,75	4,78	3,14	9,15	5,06
6	2	4		-	1095,36	1095,36	1095,37	-	5,44	5,11	5,22	-	1,73	6,08
7	3	2		-	1136,43	-	1136,39	-	-	-	-	-	-	-
8	3	4		-	1298,45	-	1298,45	-	-	-	-	-	-	-
9	2	4	1	-	-	1241,42	1241,43	-	5,75	5,72	5,66	-	0,6	3,23
10	2	5		1257,42	1257,42	1257,43	1257,42	6,25	6,55	6,21	6,12	21,19	21,07	32,03
11	2	5	1	1403,50	-	1403,47	1403,48	6,73	7,02	6,71	6,56	2,93	3,13	5,37
12	2	6		1419,48	1419,48	1419,47	1419,47	7,23	7,49	7,18	7,01	48,5	27,11	27,66
13	4	3	1	-	-	1485,51	1485,53	-	-	-	-	-	-	-
14	2	6	1	-	-	1565,48	1565,53	7,68	7,81	-	7,45	2,44	2,07	-
15	2	7		1581,53	1581,51	1581,49	1581,53	8,09	8,39	8,12	7,86	15,62	4,37	3,48
16	4	4	1	-	-	1647,55	1647,59	-	-	-	-	-	-	-
17	4	5		-	1663,57	-	1663,58	-	-	-	-	-	-	-
18	2	7	1	-	-	-	1726,99	8,67	-	-	8,30	2,89	-	-
19	2	8		1743,59	-	1743,52	1743,58	8,91	9,23	8,96	8,82	1,33	1,57	0,31
20	4	5	1	1809,67	-	1809,59	1809,64	-	-	-	7,57	-	-	-
nicht-identifizierte Peaks												1,96	4,31	0,01
Fukosylierungsgrad												6,07	14,95	14,35

Tabelle 2: Zusammenstellung der MS-Daten und GU-Werte für die Oligosaccharide der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde. Die angegebene Zusammensetzung der Oligosaccharide wurde aus den ermittelten GU-Werten des Grundspektrums und denen nach Exoglykosidase-Inkubation bestimmt. Die prozentuale Verteilung der Oligosaccharidstrukturen wurde aus der Integration der Peaks der Fluoreszenzgrundprofile berechnet.

4.3 Glykosylierungsstellen-spezifische Analytik der Oligosaccharide von hASA, sezerniert von CHO-Zellen

Es wurde eine CHO-Zelllinie generiert, die hASA stabil exprimiert. Diese Zellen wurden unter klassischen Zellkulturbedingungen (T175 Flaschen, 37°C, 5 % CO₂-Atmosphäre im Inkubator) kultiviert und aus den gesammelten Überständen des abgenommenen Mediums wurde ASA affinitätsgereinigt. Diese ASA wird, zur Abgrenzung der im Bioreaktor kultivierten CHO Zellen (BR CHO), im Folgenden als ZK CHO ASA bezeichnet. Mit der so gewonnenen ASA wurden die beschriebenen Versuche zur Analyse der Oligosaccharidseitenketten durchgeführt. Die Abbildungen 31 – 36 zeigen die Fluoreszenzgrundspektren und die Spektren nach Inkubation mit verschiedenen Exoglykosidasen.

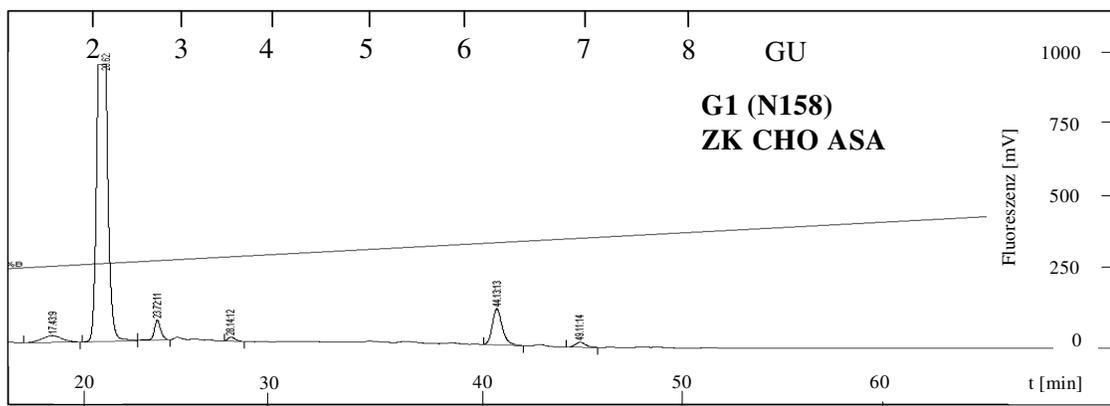


Abb. 31: Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 1 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO Zellen affinitätsgereinigt wurde. Aufgetragen sind die Intensitäten der Fluoreszenz über der Elutionszeit, sowie die relativen Glukoseeinheiten (GU).

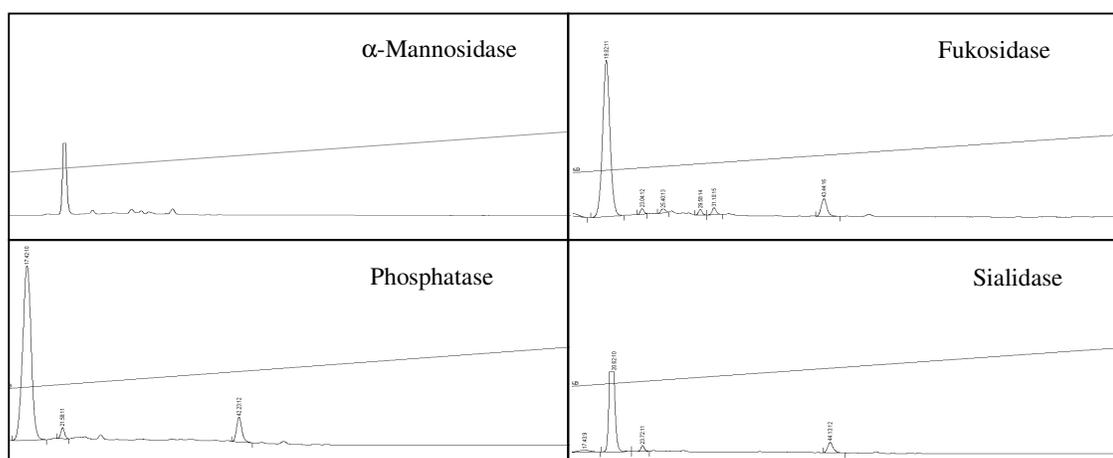


Abb. 32: Fluoreszenzprofile der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 1 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen aufgereinigt wurde, nach der Inkubation mit den in der Abbildung angegebenen Exoglykosidasen bzw. alkalischer Phosphatase.

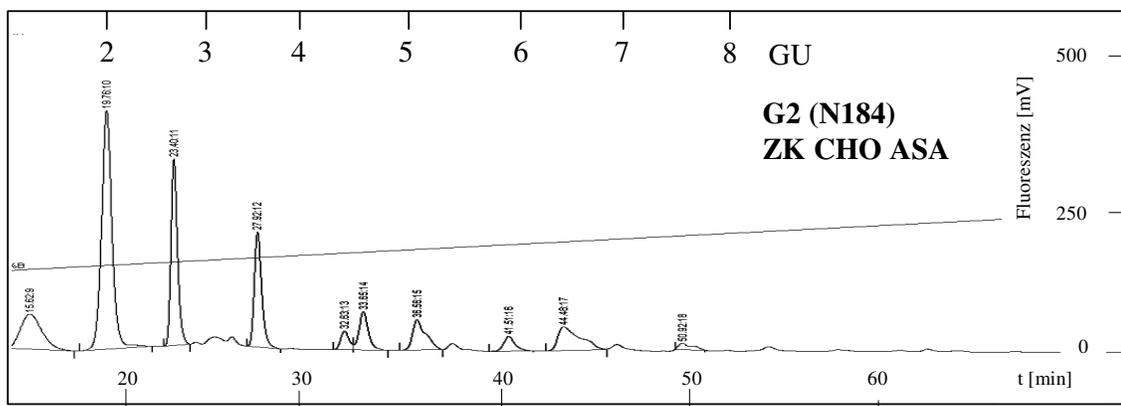


Abb. 33: Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 2 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO Zellen affinitätsgereinigt wurde. Aufgetragen sind die Intensitäten der Fluoreszenz über der Elutionszeit, sowie die relativen Glukoseeinheiten (GU).

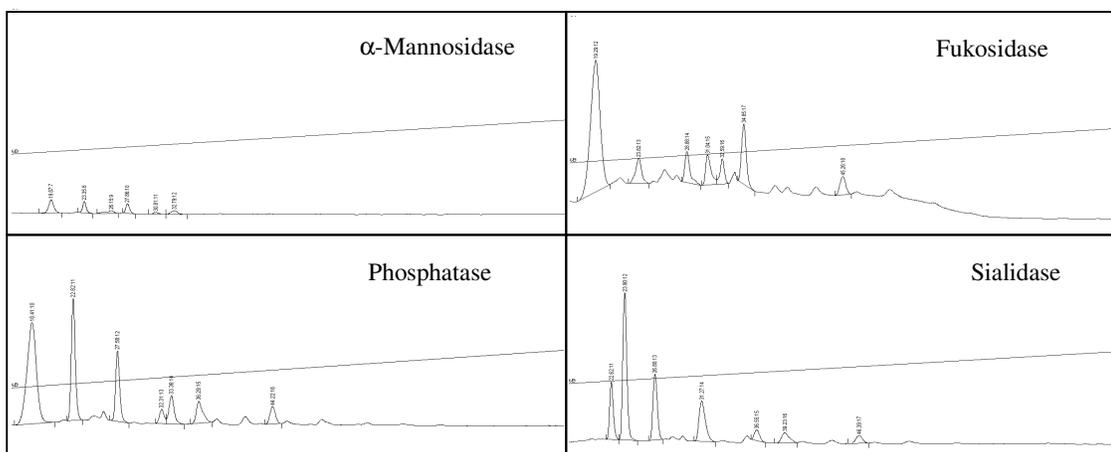


Abb. 34: Fluoreszenzprofile der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 2 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen aufgereinigt wurde, nach der Inkubation mit den in der Abbildung angegebenen Exoglykosidasen bzw. alkalischer Phosphatase.

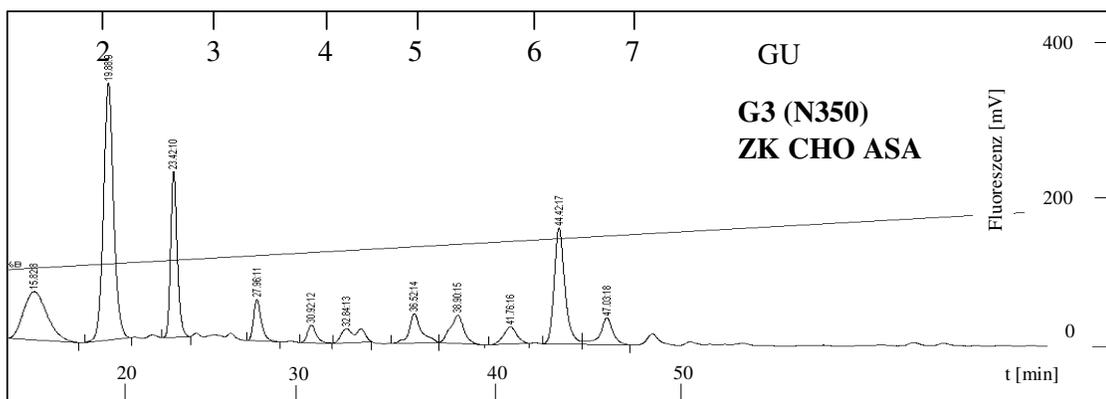


Abb. 35: Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 3 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO Zellen affinitätsgereinigt wurde. Aufgetragen sind die Intensitäten der Fluoreszenz über der Elutionszeit, sowie die relativen Glukoseeinheiten (GU).

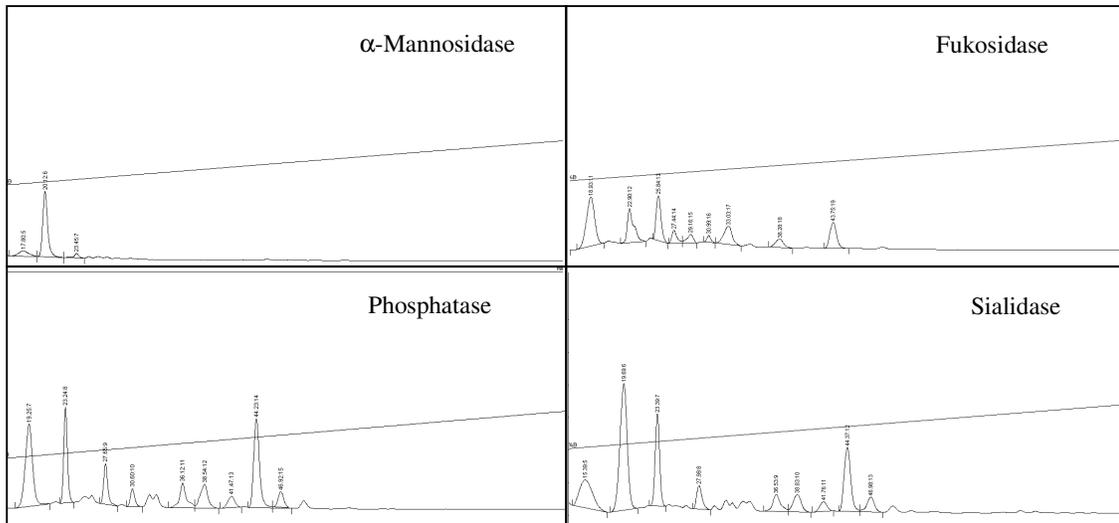


Abb. 36: Fluoreszenzprofile der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 3 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen aufgereinigt wurde, nach der Inkubation mit den in der Abbildung angegebenen Exoglykosidasen bzw. alkalischer Phosphatase.

Die Hauptkomponente an Glykosylierungsstelle 1 ist auffallend kurz (2,2 GU). Sie ist durch die Inkubation mit α -Mannosidase nicht zu beeinflussen. Es handelt sich um eine Zuckerstruktur, die nur aus den beiden inneren N-Acetylglukosen zusammengesetzt ist. Sie macht mehr als 80 % der Strukturen an Glykosylierungsstelle 1 aus. Die anderen getesteten Enzyme zeigten keinen Einfluss auf das Fluoreszenzprofil. Es konnte keine Fucose nachgewiesen werden.

Die Zuckerstrukturen an Glykosylierungsstelle 2 sind ebenfalls sehr kurz. Hauptstruktur ist auch hier eine Struktur, die nur aus den beiden inneren N-Acetylglukosen zusammengesetzt ist. Der Fukosylierungsgrad beträgt ca. 8 %.

Die Zuckerstrukturen an Glykosylierungsstelle 3 zeigen ein ähnliches Bild. Hauptstruktur ist auch hier eine Struktur, die nur aus den beiden inneren N-Acetylglukosen zusammengesetzt. Der Fukosylierungsgrad beträgt ca. 14 %.

Zusammengefasst sind die Daten in Tabelle 3.

Nr.	Zusammensetzung					GU-Werte				Verteilung [%]		
	GlcNAc	Man	Fuc	Sial.	Ph	G1	G2	G3	Exp.	G1	G2	G3
0	2	-	-	-	-	2,19	1,95	2,06	1,83	84,30	36,89	32,04
1	2	1	-	-	-	2,72	2,61	2,66	2,41	2,50	17,03	13,65
2	2	1	1	-	-	-	-	-	2,96	-	-	-
3	2	2	-	-	-	-	3,43	3,44	3,30	-	12,49	4,02
4	2	2	1	-	-	-	-	3,94	3,80	-	-	1,87
5	2	3	-	-	-	-	4,3	4,27	4,26	-	5,11	3,29
6	2	3	1	-	-	-	4,89	4,89	4,78	-	5,82	4,33
7	2	4	-	-	-	-	5,22	5,29	5,22	-	0,57	4,60
8	2	4	1	-	-	-	5,74	5,78	5,66	-	1,7	2,84
9	2	5	-	-	-	6,19	6,25	6,23	6,12	7,40	7,52	15,28
10	2	5	1	-	-	-	6,74	6,68	6,56	-	0,43	4,19
11	2	6	-	-	-	7,03	7,34	-	7,01	1,05	0,85	-
12	2	6	1	-	-	-	-	-	7,45	-	-	-
13	2	7	-	-	-	-	8,14	-	7,86	-	0,54	-
14	2	7	1	-	-	-	-	-	8,30	-	-	-
15	2	8	-	-	-	-	-	-	8,82	-	-	-
16	2	8	1	-	-	-	-	-	9,26	-	-	-
17	2	7	-	-	2	-	-	-	9,42	-	-	-
18	2	7	-	1	2	-	-	-	9,97	-	-	-
nicht-identifizierte Peaks										4,75	11,05	13,90
Gesamtfukosylierungsgrad										0,00	7,95	13,23

Tabelle 3: Zusammenstellung der GU-Werte, der daraus resultierenden Oligosaccharid-Zusammensetzung und der prozentualen Verteilung der Oligosaccharide von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen affinitätsgereinigt wurde, die unter klassischen Zellkulturbedingungen kultiviert wurden. Die prozentuale Verteilung der Oligosaccharidstrukturen wurde aus der Integration der Peaks der Oligosaccharidprofile berechnet.

4.4 Glykosylierungsstellen-spezifische Analytik der Oligosaccharide von hASA, sezerniert von CHO-Zellen, kultiviert in einem Bioreaktor

Die Abbildung 37 zeigt das Fluoreszenzprofil für die Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 1 der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO Zellen isoliert wurde, die in einem Bioreaktor kultiviert wurden. Die Hauptkomponente eluiert bei 7,45 GU Sie entspricht einer Hex₆-Struktur, die fukosyliert ist (vergl. Tabelle 4). Alle auftretenden Peaks wurden über die relativen Elutionszeiten (GU) und durch die Exoglykosidaseverdaue charakterisiert. Es wurden Profile aufgenommen für die Proben von jeder Glykosylierungsstelle nach Behandlung mit Neuraminidase, α -L-Fucosidase, α -Mannosidase, β -N-Acetylhexosaminidase, β -Galaktosidase, und mit alkalischer Phosphatase.

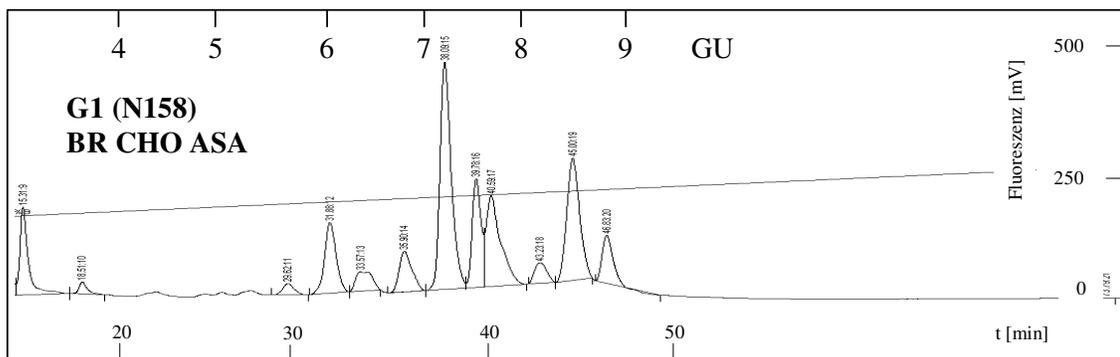


Abb. 37: Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 1 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen aufgereinigt wurde, die in einem Bioreaktor kultiviert wurden. Aufgetragen sind die Intensitäten der Fluoreszenz über der Elutionszeit, sowie die relativen Glukoseeinheiten (GU).

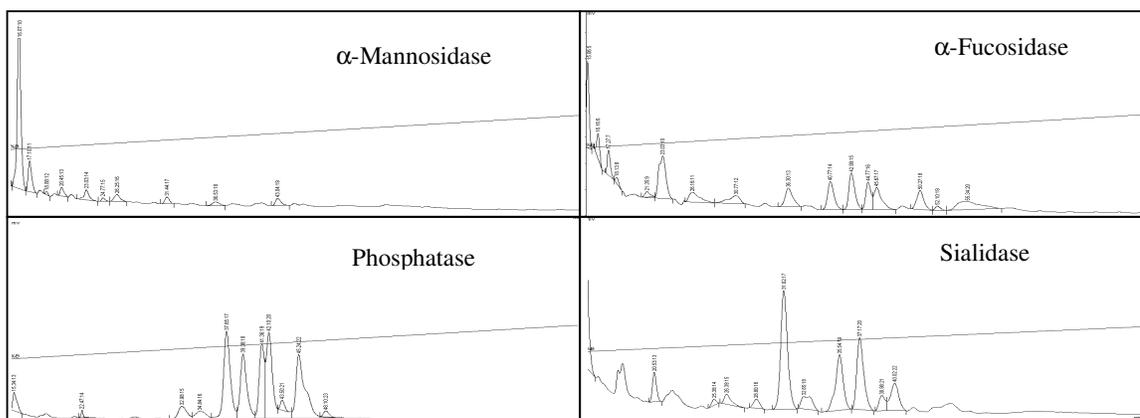


Abb. 38: Fluoreszenzprofile der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 1 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen aufgereinigt wurde, die in einem Bioreaktor kultiviert wurden nach Inkubation mit den in der Abbildung angegebenen Exoglykosidasen bzw. alkalischer Phosphatase.

Gezeigt sind die Profile nach Inkubation mit den Enzymen, die eine Peakverschiebung zum Grundprofil zur Folge hatten. Die Exoglykosidaseprofile zeigen, dass der Großteil der Oligosaccharidstrukturen vom mannosereichen Typ ist. Die Oligosaccharide sind z.T. fukosyliert. Bei der Fukosylierung handelt es sich um Core-Fukosylierung, da keine weiteren N-Acetylglukosamine detektiert werden konnten. Bei der Hauptstruktur der Glykosylierungsstelle 1 handelt es sich um Man₆ mit einer Fukose.

Die Abbildung 39 zeigt das Fluoreszenzprofil für die Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 2 der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO Zellen isoliert wurde, die in einem Bioreaktor kultiviert wurden. Die Hauptkomponente eluiert bei 6,07 GU und entspricht einer Hex₅-Struktur. Diese Struktur hat an G2 einen Anteil von 47,7 %.

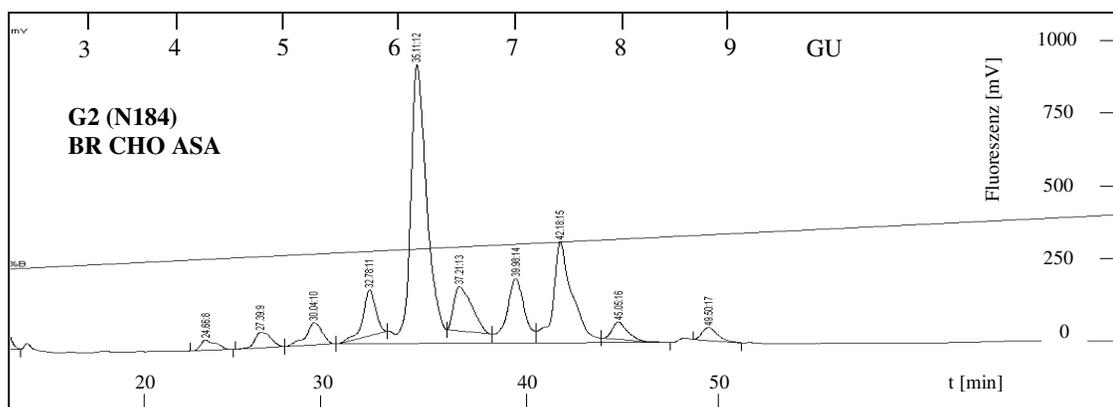


Abb. 39: Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 2 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen aufgereinigt wurde, die in einem Bioreaktor kultiviert wurden. Aufgetragen sind die Intensitäten der Fluoreszenz über der Elutionszeit, sowie die relativen Glukoseeinheiten (GU).

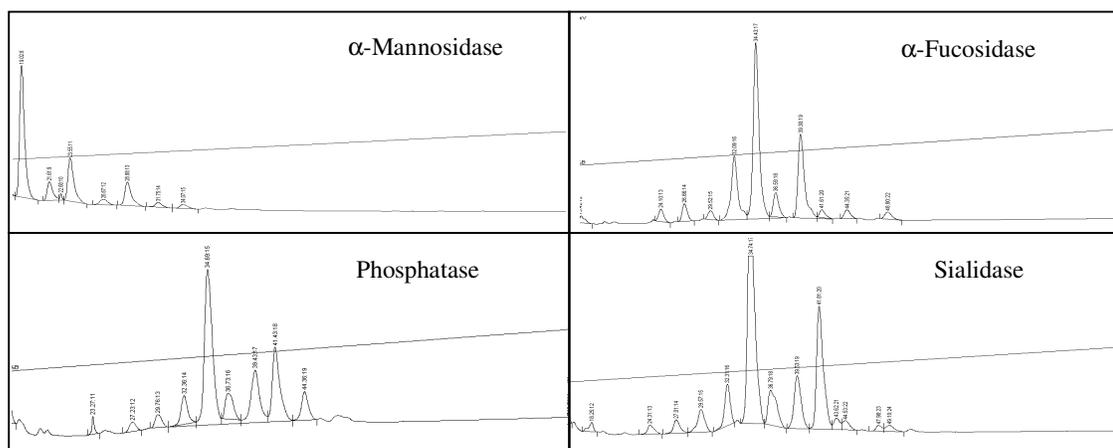


Abb. 40: Fluoreszenzprofile der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 2 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen aufgereinigt wurde, die in einem Bioreaktor kultiviert wurden nach der Inkubation mit den in der Abbildung angegebenen Exoglykosidasen bzw. alkalischer Phosphatase.

Die Abbildung 41 zeigt einen Ausschnitt aus dem Fluoreszenzprofil der Glykosylierungsstelle 3 der ASA, die in hASA überexprimierenden CHO-Zellen produziert wurde, die in einem Bioreaktor kultiviert wurden. Die Hauptkomponente eluiert bei 7,84 GU und entspricht einer Hex₇-Struktur. Diese Struktur hat an G3 einen Anteil von 43,7 %.

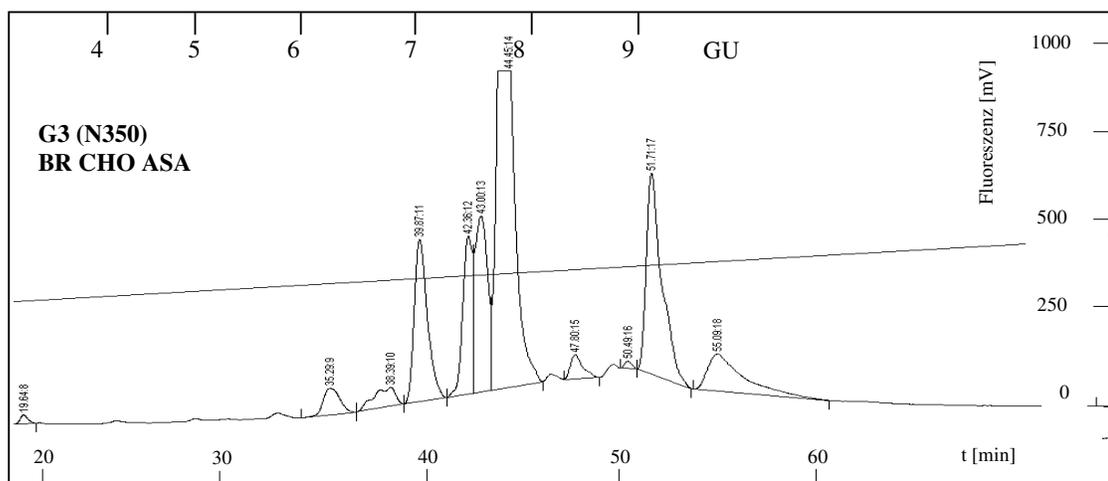


Abb. 41: Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 3 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen aufgereinigt wurde, die in einem Bioreaktor kultiviert wurden. Aufgetragen sind die Intensitäten der Fluoreszenz über der Elutionszeit, sowie die relativen Glukoseeinheiten (GU).

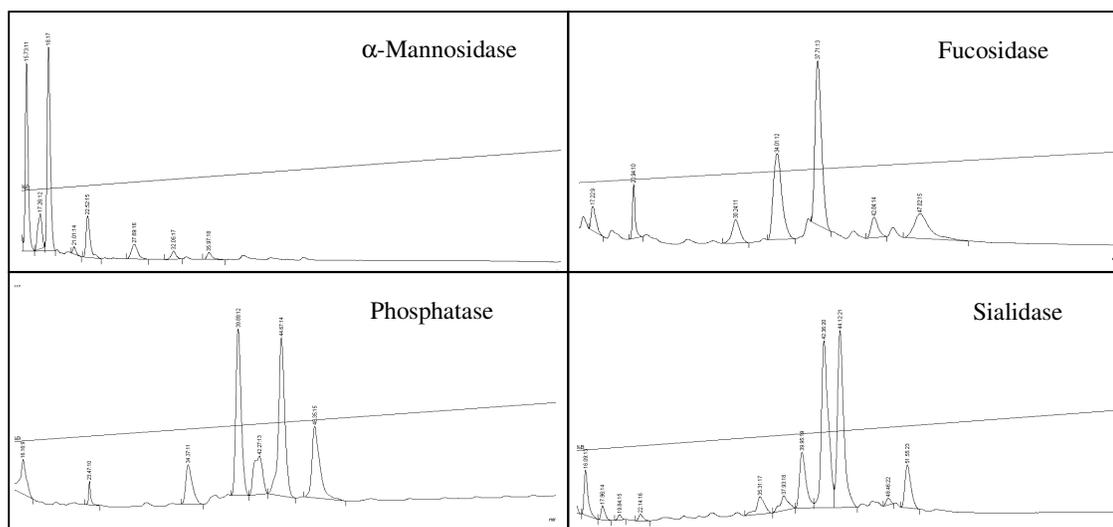


Abb. 42: Fluoreszenzprofile der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 3 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen aufgereinigt wurde, die in einem Bioreaktor kultiviert wurden nach der Inkubation mit den in der Abbildung angegebenen Exoglykosidasen bzw. alkalischer Phosphatase.

Die Peaks der Hauptspektren wurden integriert, um die prozentuale Verteilung der Oligosaccharidstrukturen zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Nr.	Zusammensetzung					GU-Werte				Verteilung [%]		
	GlcNAc	Man	Fuc	Sial.	Ph	G1	G2	G3	Exp.	G1	G2	G3
1	2	1		-	-	-	-	-	2,41	-	-	-
2	2	2		-	-	-	-	-	2,96	-	-	-
3	2	2	1	-	-	-	-	-	3,40	-	-	-
4	2	3		-	-	-	4,11	-	4,26	-	1,45	-
5	2	3	1	-	-	-	4,62	-	4,78	-	2,23	-
6	2	4		-	-	-	5,12	-	5,22	-	3,30	-
7	2	4	1	-	-	-	5,64	-	5,66	-	5,21	-
8	2	5		-	-	5,92	6,07	6,11	6,12	9,28	47,71	2,12
9	2	5	1	-	-	6,27	6,47	6,69	6,56	3,63	7,16	2,05
10	2	6		-	-	6,76	6,99	6,98	7,01	5,96	10,13	10,41
11	2	6	1	-	-	7,19	7,41	7,56	7,45	28,78	18,64	18,32
12	2	7		-	-	7,61	7,95	7,84	7,86	25,96	2,34	43,69
13	2	7	1	-	-	8,24	-	8,47	8,30	2,82	-	1,45
14	2	8	-	-	-	8,59	8,79	8,98	8,82	17,86	1,79	0,24
15	2	8	1	-	-	8,97	-	-	9,26	5,69	-	-
16	2	7	-	-	2	-	-	9,21	9,42	-	-	15,27
17	2	7	-	1	2	-	-	9,85	9,97	-	-	6,44
nicht-identifizierte Peaks										0,02	0,04	0,01
Gesamtfukosylierungsgrad										33,66	33,24	21,82

Tabelle 4: Zusammenstellung der GU-Werte für die ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen aufgereinigt wurde, die in einem Bioreaktor kultiviert wurden. Die prozentuale Verteilung der Oligosaccharidstrukturen wurde aus der Integration der Peaks der Oligosaccharidprofile berechnet.

Die Oligosaccharide der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen aufgereinigt wurde, die in einem Bioreaktor kultiviert wurden zeigen eine andere Zusammensetzung verglichen mit den Oligosacchariden der ASA, die in BHK-Zellen produziert wurde. Auch hier finden sich fast nur mannosereiche Oligosaccharide von Man₅ – Man₈, die aber einen wesentlich höheren Fukosylierungsgrad aufweisen (G1: 34 %, G2: 33 % und G3: 22 %). Außerdem können an G3 sialisierte und phosphorylierte Oligosaccharide nachgewiesen werden. Die sialisierten Strukturen machen knapp 6 %, die phosphorylierten ca. 22 % der Oligosaccharide an G3 aus. Die phosphorylierten Strukturen tragen 2 Phosphomonoester wie Bindungsstudien am Mannosephosphatrezeptor-Konstrukt zeigen (vergl. Kap. 4.9).

4.5 Analytik der Oligosaccharide von hASA, isoliert aus CHO-Zellen

Die CHO-Zellen, die hASA überexprimieren wurden aufgeschlossen und die zelluläre ASA wurde affinitäts gereinigt. Die so gewonnene ASA-Menge war zwar ausreichend für die Analytik der Oligosaccharidseitenketten, allerdings konnte diese nicht seitenspezifisch durchgeführt werden. Die Ausbeute betrug ca. $5 \mu\text{g ASA/m}^2$ von dicht bewachsenen Zellkulturschalen. In Abbildung 43 ist das Fluoreszenzgrundprofil der drei Oligosaccharidseitenketten der affinitäts gereinigten ASA aus hASA überexprimierenden CHO Zellen gezeigt.

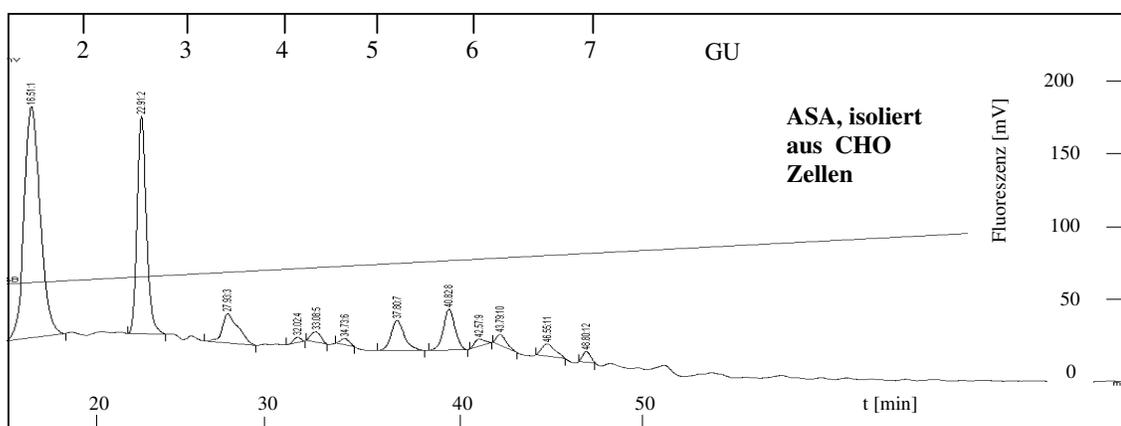


Abb. 43: Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide von ASA, die aus den Zellen von hASA überexprimierenden CHO-Zellen affinitäts gereinigt wurde. Aufgetragen sind die Intensitäten der Fluoreszenz über der Elutionszeit, sowie die relativen Glukoseeinheiten (GU).

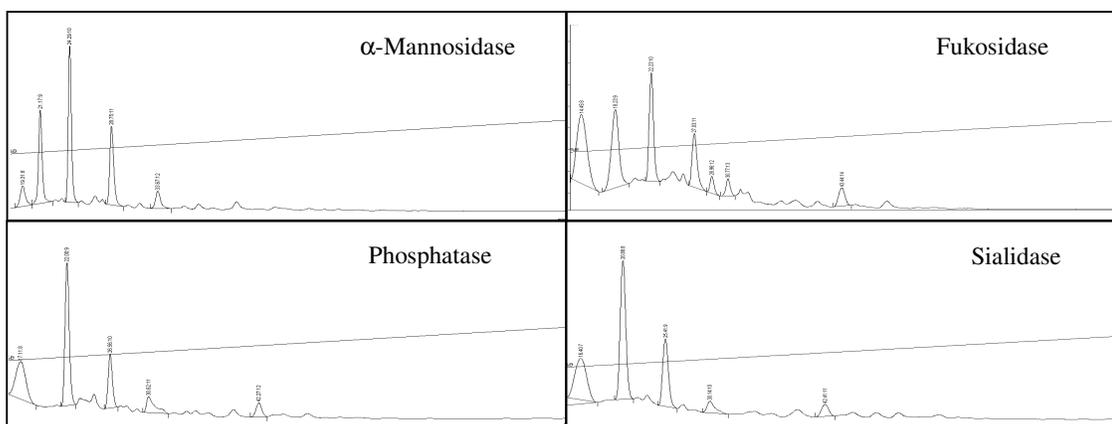


Abb. 44: Fluoreszenzprofile der Oligosaccharide von ASA, die von hASA überexprimierenden CHO-Zellen affinitäts gereinigt wurde, nach der Inkubation mit den in der Abbildung angegebenen Exoglykosidasen bzw. alkalischer Phosphatase.

Das Fluoreszenzprofil wird nicht durch die Inkubation mit α -Fukosidase beeinflusst. Das Spektrum verringert sich nach der Inkubation mit Galaktosidase und Hexosaminidase in der Intensität. Die Verteilung der Peaks bleibt aber weitestgehend unbeeinflusst. Nach α -Mannosidase Inkubation verringert sich der Anteil der Peaks mit größeren Elutionszeiten. Die Hauptstrukturen eluieren bei 1,5 bzw. 2,6 GU. Es handelt sich um Strukturen mit einer GlcNAc bzw. $(\text{GlcNAc})_2\text{Man}_1$. Die Auswertung der Fluoreszenzprofile ist in Tabelle 5 zusammengestellt.

Nr.	Zusammensetzung					GU-Werte		Verteilung [%]
	GlcNAc	Man	Fuc	Sial.	Ph	G 1/2/3	Exp.	
1	1	-	-	-	-	1,49	1,51	48,40
2	2	-	-	-	-	-	1,83	-
3	2	1	-	-	-	2,58	2,41	26,20
4	2	1	1	-	-	--	2,96	-
5	2	2	-	-	-	-	3,30	-
6	3	2	-	-	-	3,87	3,80	5,90
7	2	3	-	-	-	4,29	4,26	1,31
8	2	3	1	-	-	-	4,78	-
9	2	4	-	-	-	5,11	5,22	5,21
10	3	4	-	-	-	5,82	5,90	6,23
11	2	5	-	-	-	6,13	6,12	1,36
12	2	5	1	-	-	6,60	6,56	2,12
13	2	6	-	-	-	6,98	7,01	1,07
14	2	6	1	-	-	-	7,45	-
15	2	7	-	-	-	-	7,86	-
16	2	7	1	-	-	-	8,30	-
17	2	8	-	-	-	-	8,82	-
18	2	8	1	-	-	-	9,26	-
19	2	7	-	-	2	-	9,42	-
20	2	7	-	1	2	-	9,97	-
nicht-identifizierte Peaks								2,2
Gesamtfukosylierungsgrad								2,12

Tabelle 5: Zusammenstellung der GU-Werte, der daraus resultierenden vermutlichen Oligosaccharidzusammensetzung und der prozentualen Verteilung der Strukturen für die ASA, die aus hASA überexprimierenden CHO-Zellen affinitätsgereinigt wurde. Die prozentuale Verteilung der Oligosaccharidstrukturen wurde aus der Integration der Peaks der Oligosaccharidprofile berechnet.

4.6 Glykosylierungsstellen-spezifische Analytik der Oligosaccharide von hASA, sezerniert von HT1080-Zellen

In diesem Versuchsteil wurden die Oligosaccharide von ASA seitenspezifisch analysiert, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden HT1080 Zellen affinitätsgereinigt wurde. Die Oligosaccharide wurden zur Interpretation der Peaks mit den Enzymen Neuraminidase, α -L-Fucosidase, α -Mannosidase, β -N-Acetylhexosaminidase, β -Galaktosidase, und alkalischer Phosphatase inkubiert. Nach Aufreinigung der Proben wurde für jedes Aliquot ein Oligosaccharidprofil aufgenommen (Daten nicht gezeigt).

Die drei Glykosylierungsstellen ergaben folgende Grundprofile der Oligosaccharide:

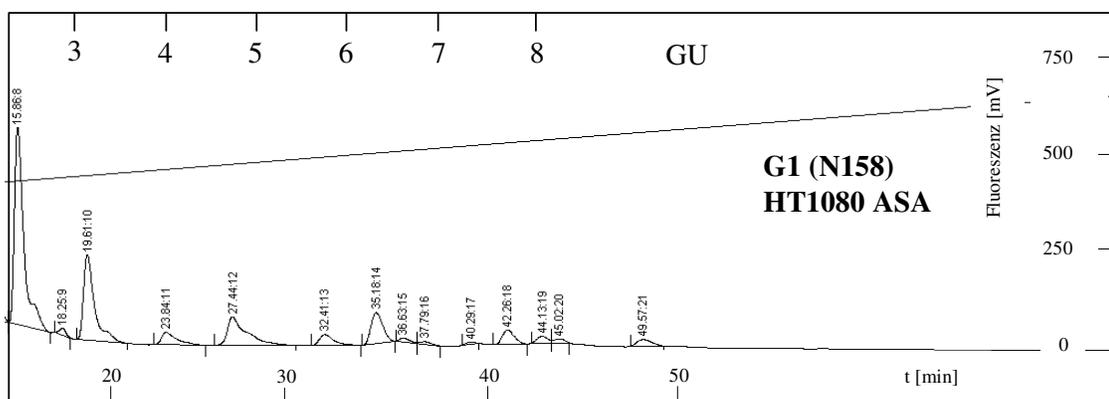


Abb. 45: Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 1 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden HT1080 Zellen affinitätsgereinigt wurde. Aufgetragen sind die Intensitäten der Fluoreszenz über der Elutionszeit, sowie die relativen Glukoseeinheiten (GU).

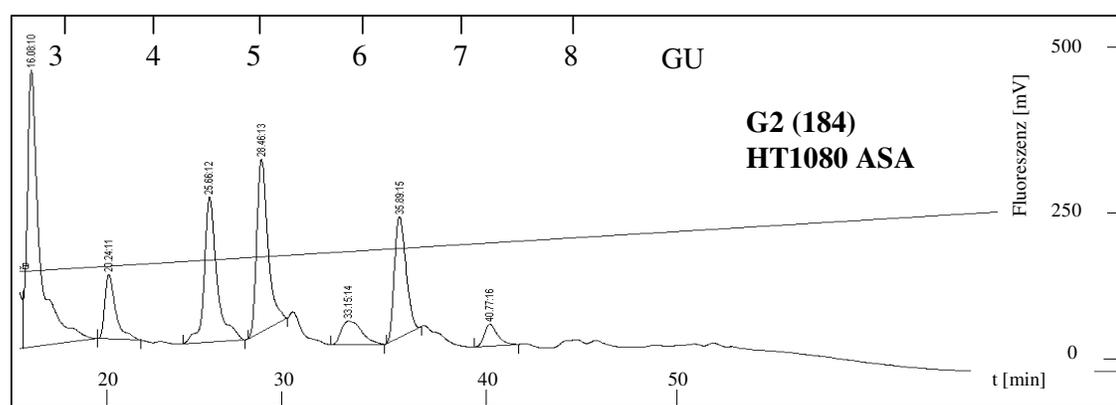


Abb. 46: Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 2 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden HT1080 Zellen affinitätsgereinigt wurde. Aufgetragen sind die Intensitäten der Fluoreszenz über der Elutionszeit, sowie die relativen Glukoseeinheiten (GU).

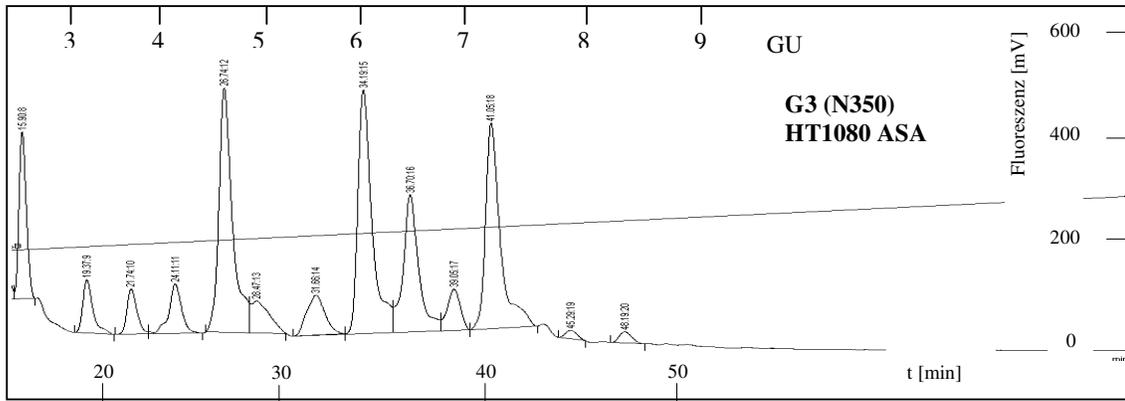


Abb. 47: Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 3 von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden HT1080 Zellen affinitätsgereinigt wurde. Aufgetragen sind die Intensitäten der Fluoreszenz über der Elutionszeit, sowie die relativen Glukoseeinheiten (GU).

Aus den Fluoreszenzprofilen ist deutlich zu sehen, dass die Oligosaccharide an Glykosylierungsstelle 1 die geringste Länge haben. Die größte Vielfalt an Strukturen ist an Glykosylierungsstelle 3 zu erkennen. Alle Spektren vereinfachen sich deutlich nach der Inkubation mit α -Mannosidase. Das bedeutet, dass der Großteil der Oligosaccharide vom mannosereichen Typ ist. Verglichen mit den Oligosacchariden von ASA, die mit anderen Zelllinien produziert wurde, sind die Strukturen kurz. Die Hauptstruktur an Glykosylierungsstelle 1 und 2 ist Man_1 , an Glykosylierungsstelle 3 Man_5 . Der Fukosylierungsgrad an Glykosylierungsstelle 1 (20,4 %) und an Glykosylierungsstelle 3 (31 %) ist relativ hoch. Die Ergebnisse sind zusammengefasst in Tabelle 6.

Nr.	Zusammensetzung					GU-Werte				Verteilung [%]		
	GlcNAc	Man	Fuc	Sial.	Ph	G1	G2	G3	Exp.	G1	G2	G3
1	2	1		-	-	2,61	2,65	2,60	2,41	40,60	33,18	7,10
2	2	1	1	-	-	3,06	-	-	2,96	0,80	-	-
3	2	2		-	-	3,30	3,44	3,28	3,30	20,60	6,70	3,20
4	2	2	1	-	-	-	-	3,73	3,80	-	-	2,60
5	2	3		-	-	4,10	4,47	4,18	4,26	4,30	17,70	3,70
6	2	3	1	-	-	4,80	-	4,67	4,78	11,90	-	19,50
7	2	4		-	-	-	5,00	5,00	5,22	-	20,50	3,50
8	2	4	1	-	-	5,75	-	5,60	5,66	3,60	-	4,30
9	2	5		-	-	6,28	5,89	6,09	6,12	8,00	4,50	20,60
10	2	5	1	-	-	6,56	6,40	6,57	6,56	1,60	13,20	12,50
11	2	6		-	-	-	-	7,14	7,01	-	-	3,20
12	2	6	1	-	-	-	7,34	7,39	7,45	-	2,70	18,10
13	2	7		-	-	7,60	-	7,90	7,86	3,70	-	0,23
14	2	7	1	-	-	8,15	-	8,20	8,30	2,50	-	0,57
15	2	8	-	-	-	9,01	-	8,75	8,82	2,1	-	0,81
16	2	8	1	-	-	-	-	-	9,26	-	-	-
17	2	7	-	-	2	-	-	-	9,42	-	-	-
18	2	7	-	1	2	-	-	-	9,97	-	-	-
nicht-identifizierte Peaks										0,30	1,52	0,09
Gesamtfukosylierungsgrad										20,40	2,70	31,17

Tabelle 6: Zusammenstellung der GU-Werte, der daraus resultierenden vermutlichen Oligosaccharidzusammensetzung und der prozentualen Verteilung der Strukturen für die Oligosaccharide der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden HT1080-Zellen affinitätsgereinigt wurde. Die prozentuale Verteilung der Oligosaccharidstrukturen wurde aus der Integration der Peaks der Oligosaccharidgrundprofile berechnet.

4.7 Enzymaktivitäten im Medium von kultivierten Zellen

In den folgenden Experimenten wurde die Aktivität von verschiedenen Enzymen in konditioniertem Medium bestimmt. Es wurden die Enzyme untersucht, die in der Lage sind, Oligosaccharidseitenketten von Proteinen zu modifizieren. Dazu wurden die hASA überexprimierenden Zelllinien (BHK-hASA-MPR46, CHO-hASA, HT1080-hASA) verwendet, die für die Gewinnung der ASA eingesetzt wurden, die zur Analytik der Oligosaccharidseitenketten benutzt wurde. Die Zellen wurden derart in 175 cm² T-Flaschen ausgesät, dass sie bereits nach Anheftung an die Oberfläche der Zellkulturflasche (nach ca. 4 h) zu > 90 % konfluent waren. Die Zellen wurden für acht Tage bei idealen Wachstumsbedingungen kultiviert ohne das Medium zu wechseln, wobei täglich eine Probe des Zellkulturmediums entnommen wurde. In der entnommenen Probe wurde der pH Wert gemessen und die Aktivität der folgenden Enzyme bei dem gemessenen pH Wert bestimmt: Arylsulfatase A, Phosphatase, β -Galaktosidase, α -D-Sialidase, α -L-Fukosidase, α -Mannosidase.

4.7.1 Enzymaktivitäten im Medium von CHO-Zellen

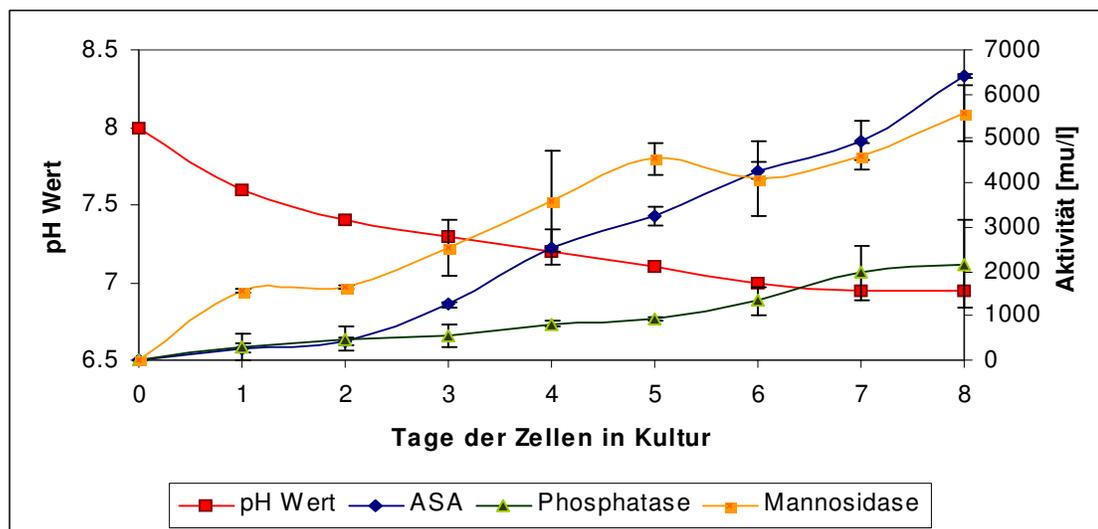


Abb. 48: Gemessene Aktivitäten von Arylsulfatase A (ASA), Phosphatase und α -Mannosidase im Medium von CHO-ASA-Zellen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Die Aktivitäten der Enzyme wurden bei dem pH Wert gemessen, der zum Erntezeitpunkt im Medium gemessen wurde. Der Verlauf des pH-Werts ist ebenfalls in der Graphik dargestellt.

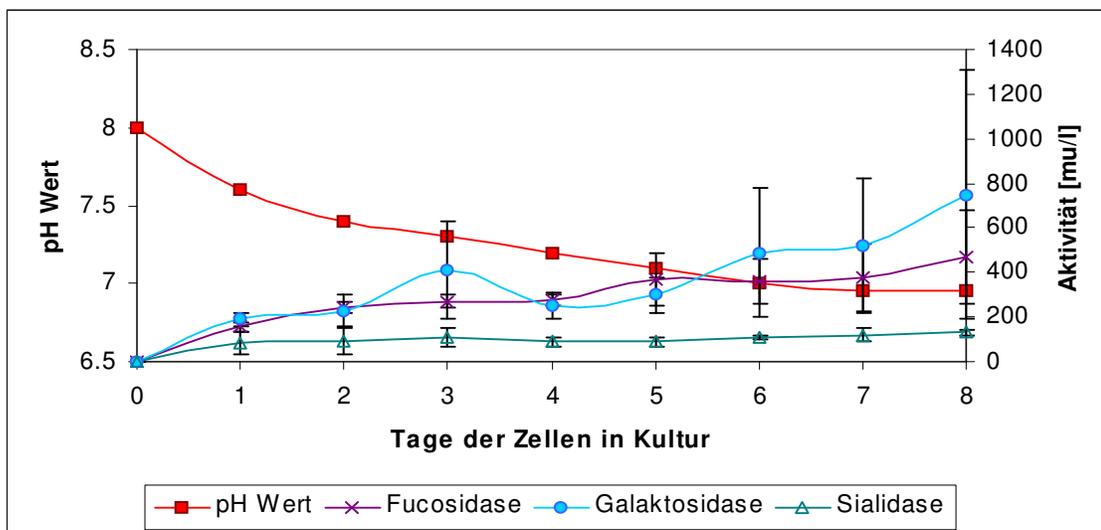


Abb. 49: Gemessene Aktivitäten von α -L-Fucosidase, α -D-Sialidase und β -Galaktosidase im Medium von CHO-ASA-Zellen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Die Aktivitäten der Enzyme wurden bei dem pH Wert gemessen, der zum Erntezeitpunkt im Medium gemessen wurde. Der Verlauf des pH-Werts ist ebenfalls in der Graphik dargestellt.

Alle Enzyme haben messbare Aktivitäten. Auch nachdem der pH Wert sich auf etwa pH 7 eingestellt hat steigen die Aktivitäten weiter an. Sie liegen zwischen 100 mU/l (Sialidase) und 6000 mU/l (Phosphatase).

4.7.2 Enzymaktivitäten im Medium von BHK-Zellen

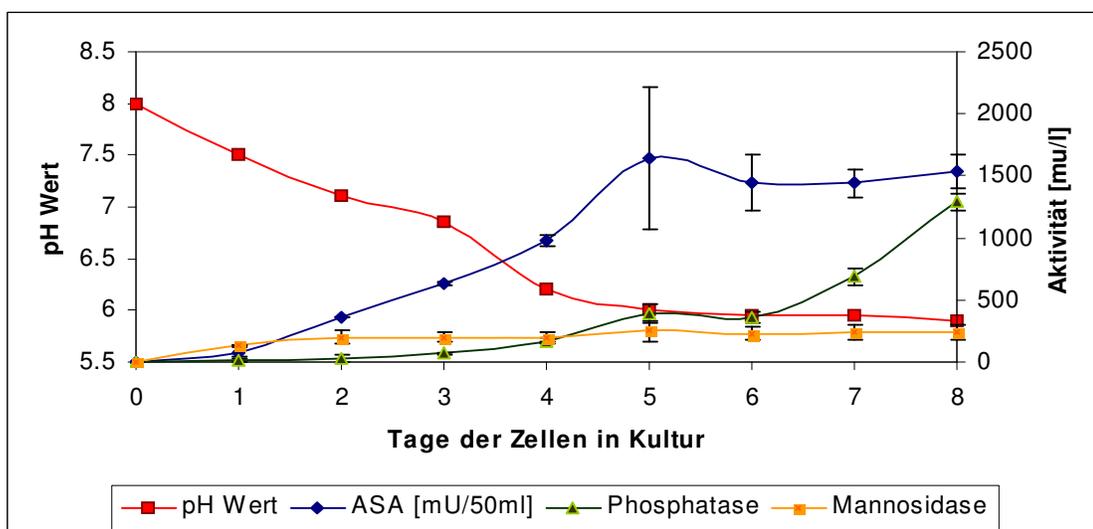


Abb. 50: Gemessene Aktivitäten von Arylsulfatase A (ASA), Phosphatase und α -Mannosidase im Medium von BHK-ASA-MPR46-Zellen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Die Werte für die ASA-Aktivität wurden aufgrund der hohen Aktivität durch 50 geteilt. Die Aktivitäten der Enzyme wurden bei dem pH Wert gemessen, der zum Erntezeitpunkt im Medium gemessen wurde. Der Verlauf des pH-Werts ist ebenfalls in der Graphik dargestellt.

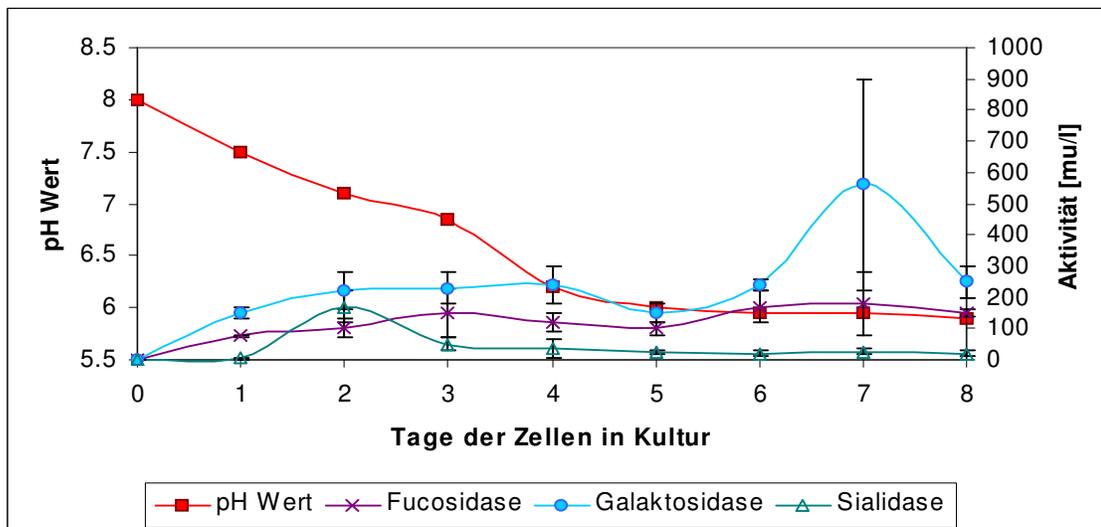


Abb. 51: Gemessene Aktivitäten von α -L-Fucosidase, α -D-Sialidase und β -Galaktosidase im Medium von BHK-ASA-MPR46-Zellen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Die Aktivitäten der Enzyme wurden bei dem pH Wert gemessen, der zum Erntezeitpunkt im Medium gemessen wurde. Der Verlauf des pH-Werts ist ebenfalls in der Graphik dargestellt.

Die Sialidase-Aktivität ist kaum nachweisbar. Die Aktivitäten sind deutlich geringer im Vergleich zu den, die im Medium von CHO-Zellen gemessen wurden. Sie liegen zwischen 100 mU/l (Fucosidase) und 1500 mU/l (Phosphatase).

4.7.3 Enzymaktivitäten im Medium von HT1080-Zellen

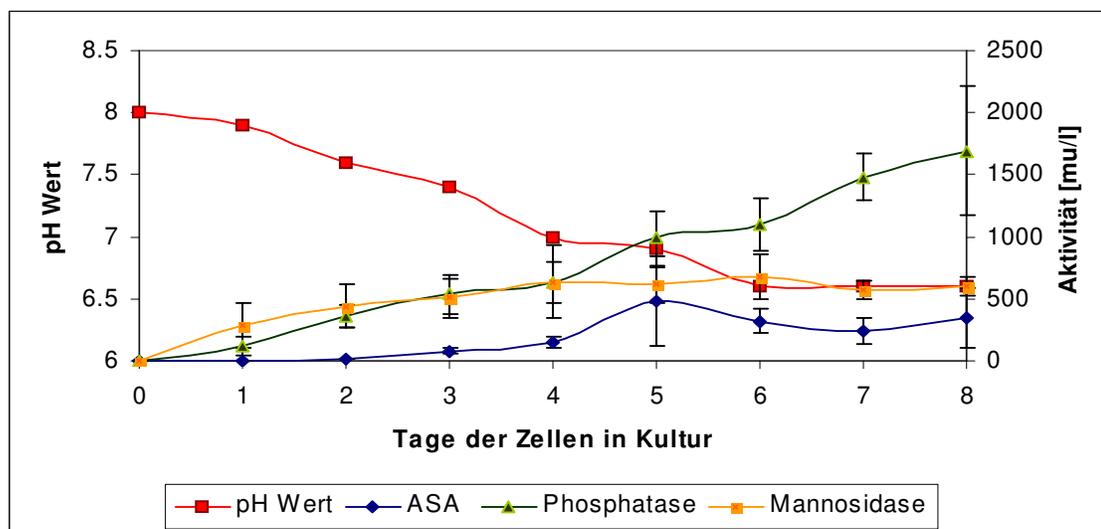


Abb. 52: Gemessene Aktivitäten von Arylsulfatase A (ASA), Phosphatase und α -Mannosidase im Medium von HT1080-ASA-Zellen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer.

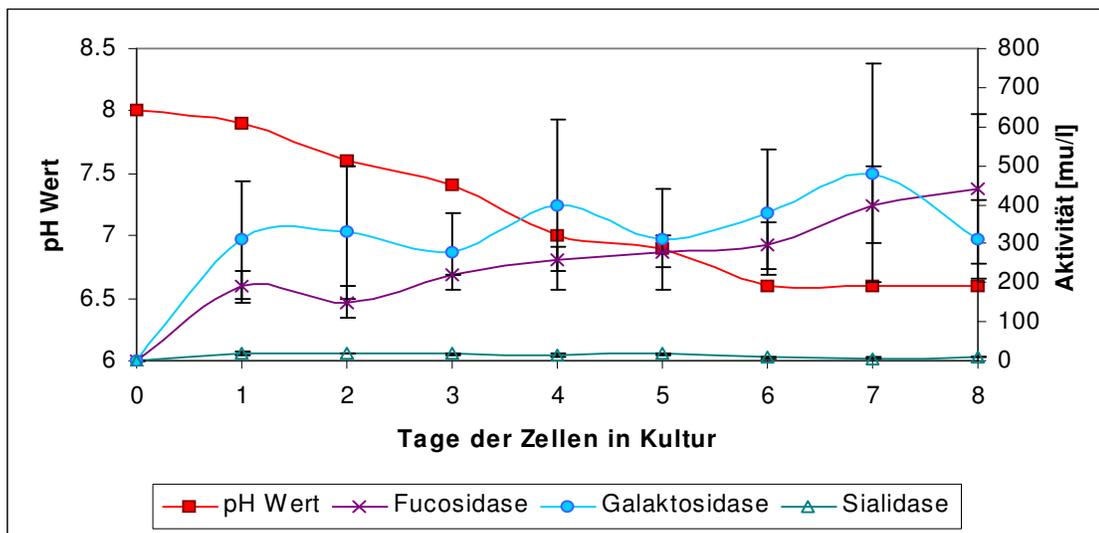


Abb. 53: Gemessene Aktivitäten von α -L-Fucosidase, α -D-Sialidase und β -Galaktosidase im Medium HT1080-Zellen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Die Aktivitäten der Enzyme wurden bei dem pH Wert gemessen, der zum Erntezeitpunkt im Medium gemessen wurde. Der Verlauf des pH-Werts ist ebenfalls in der Graphik dargestellt.

Die Aktivitäten sind deutlich geringer im Vergleich zu den, die im Medium von CHO-Zellen gemessen wurden. Eine Sialidase-Aktivität ist nicht nachweisbar. Die Aktivitäten für die anderen Enzyme liegen zwischen 300 mU/l (Galaktosidase) und 1500 mU/l (Phosphatase).

4.7.4 Vergleich der Enzymaktivitäten in verschiedenen Zelllinien

Die Aktivitäten der betrachteten Enzyme im Medium der Zelllinien BHK-ASA, CHO-ASA und HT1080-ASA zeigen deutliche Unterschiede im Verlauf der Kultivierung der Zellen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Aktivitäten der Enzyme zum selben Zeitpunkt nach Beginn der Kultivierung der Zellen in einer Graphik gegenübergestellt (Abb. 54).

Die Mannosidase-Aktivität im Medium der BHK-Zellen ist beispielsweise 16fach geringer als im Medium der CHO-Zellen.

Es ist bemerkenswert, dass für die ASA, die aus dem Medium der CHO-ASA-Zellen affinitätsgereinigt wurde, die kürzesten Oligosaccharidstrukturen gefunden wurden. In diesem Medium wurde gleichzeitig die größte Aktivität an Zucker-modifizierenden Enzymen gemessen. Umgekehrt wurden die längsten Oligosaccharidstrukturen der ASA in dem Medium von BHK-ASA-Zellen gefunden; in diesem Medium wurde die geringste Aktivität an Zucker-modifizierenden Enzymen gemessen.

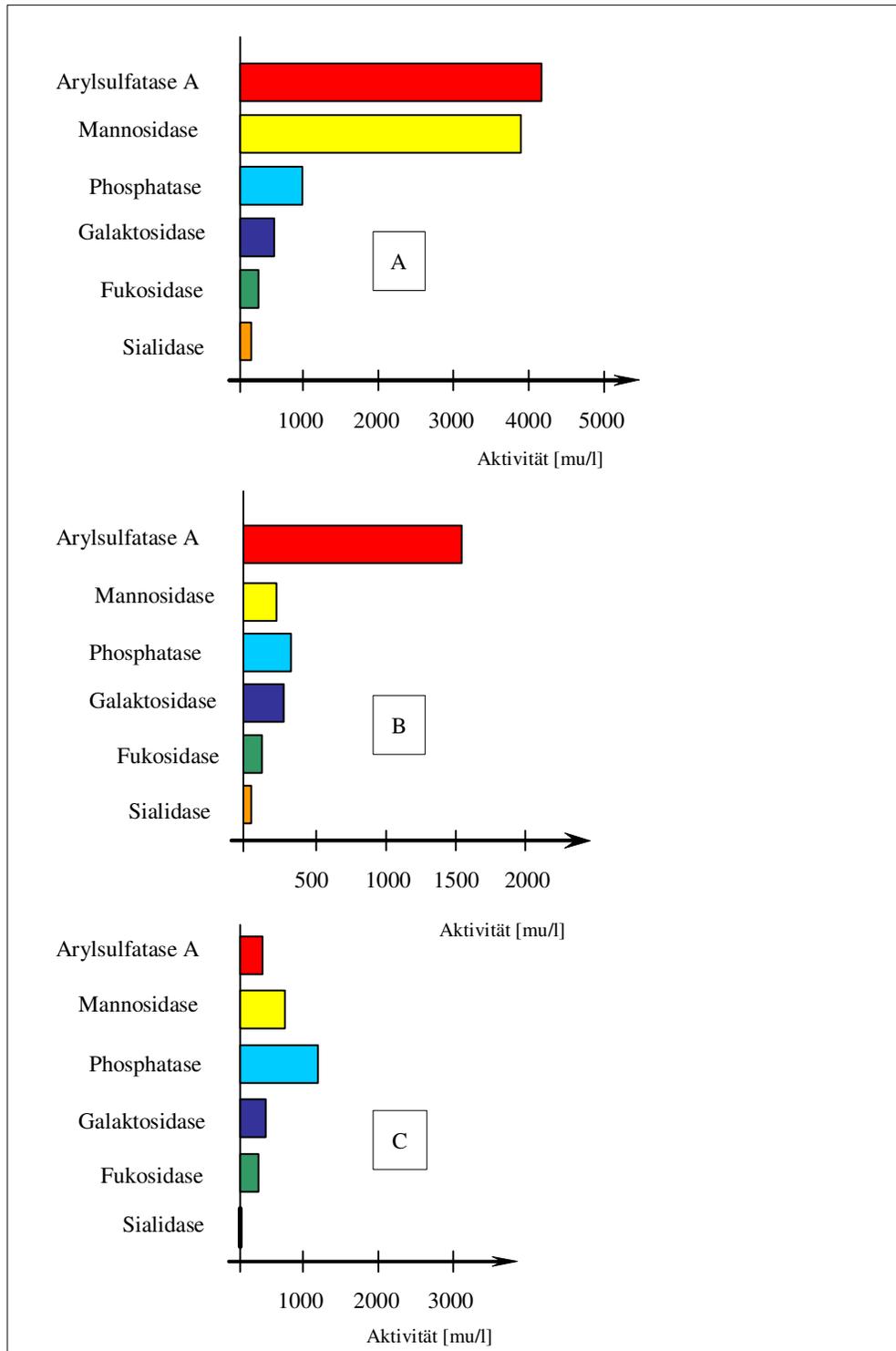


Abb. 54: Aktivitäten der Enzyme Arylsulfatase A (ASA), α -Mannosidase, Phosphatase, β -Galaktosidase, α -L-Fukosidase und α -D-Sialidase 6 Tage nach Beginn der Kultivierung im Medium von:

A: CHO-ASA-Zellen;

B: BHK-ASA-Zellen und

C: HT1080-ASA-Zellen.

Die Werte für die ASA-Aktivität in B wurden aufgrund der hohen Aktivität durch 50 geteilt.

Die Aktivitäten der aufgeführten Enzyme wurden bei dem pH Wert bestimmt, der zum Zeitpunkt der Probenahme im Medium vorlag. Der pH Wert betrug für A 5,95; für B 7,0 und für C 6,6.

4.8 Degradation der Oligosaccharide der ASA in konditioniertem Medium

Um zu überprüfen, ob die Oligosaccharide der ASA als Substrat für die Enzyme, die im Medium von kultivierten Zellen gefunden wurden, fungieren kann, wurde ASA in dem Medium inkubiert, in dem zuvor CHO Zellen kultiviert wurden. Es wurden CHO-ASA Zellen für 11 Tage ohne Mediumwechsel inkubiert. In diesem Medium wurde ASA, die nachweislich phosphoryliert ist (vergl. Tab. 4) für 12 h inkubiert. Mit dieser ASA wurden Bindungsstudien am Mannosephosphat Rezeptor-Konstrukt durchgeführt, die im folgenden Abschnitt detailliert erläutert werden. Es zeigte sich, dass die so behandelte ASA, im Gegensatz zu ASA, die in frischem Zellkulturmedium inkubiert wurde, nicht mehr an das Konstrukt bindet. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die ASA in Zell-konditioniertem Medium dephosphoryliert wird.

In einem weiteren Versuch wurden die Oligosaccharide der ASA untersucht, die in dem von CHO Zellen konditionierten Medium inkubiert wurde. Dazu wurden CHO-ASA Zellen für 8 Tage ohne Mediumwechsel kultiviert. Diese Zellen wurden gewählt, weil im Medium die höchste Aktivität von Zucker-modifizierenden Enzymen gemessen wurde und die ASA aus dem Medium dieser Zellen die kürzesten Oligosaccharidseitenketten aufwies.

Vom Medium wurden 2 ml abgenommen und mit 100 µg ASA, die aus dem Medium von ASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde versetzt. In 2 ml Medium der CHO-ASA-Zellen befinden sich zum Erntezeitpunkt ca. 200 ng CHO-ASA. Für die Auswertung des Versuchs wurde angenommen, dass diese Menge CHO-ASA auf die später analysierte BHK-ASA (100 µg) keinen Einfluss hat. Der Ansatz wurde für 4 Tage bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde die gleiche ASA Charge der BHK-ASA in frischem Zellkulturmedium für ebenfalls 4 Tage bei 37°C inkubiert. Die ASA wurde anschließend affinitätsgereinigt und die Oligosaccharidseitenketten wurden wie beschrieben analysiert, allerdings wurde die Analytik nicht seitenspezifisch durchgeführt. Abb. 55 A zeigt das Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK Zellen affinitätsgereinigt wurde und anschließend in frischem Zellkulturmedium inkubiert wurde. Die Abb. 55 B zeigt das Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide von ASA, die aus hASA überexprimierenden BHK Zellen affinitätsgereinigt wurde nach Inkubation der ASA in von CHO Zellen konditioniertem Medium.

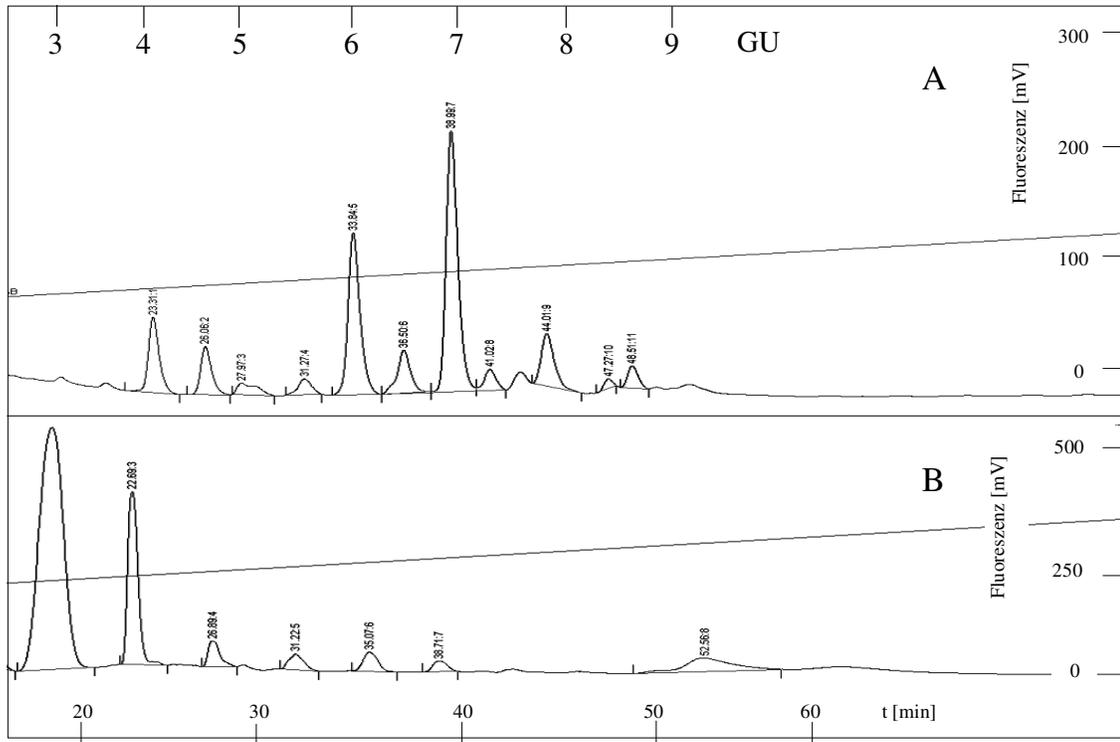


Abb 55: A: Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide von ASA, die aus hASA überexprimierenden BHK Zellen affinitätsgereinigt wurde nach Inkubation der ASA in frischem Medium.
 B: Fluoreszenzprofil der Oligosaccharide von ASA, die aus hASA überexprimierenden BHK Zellen affinitätsgereinigt wurde nach Inkubation der ASA in von CHO Zellen konditioniertem Medium.
 Aufgetragen sind die Intensitäten der Fluoreszenz über der Elutionszeit, sowie die relativen Glukoseeinheiten (GU). Die Einheiten der Zeit und der Glukoseeinheiten (GU) gelten für die Abbildungen A und B.

Nr.	Zusammensetzung					GU-Werte			Verteilung [%]	
	GlcNAc	Man	Fuc	Sial.	Ph	Exp.	A	B	A	B
1	1	-	-	-	-	1,51	-	1,69	-	-
2	2	-	-	-	-	1,83	-	-	-	-
3	2	1	-	-	-	2,41	-	2,52	-	63,1
4	2	1	1	-	-	2,96	-	-	-	-
5	2	2	-	-	-	3,30	-	3,24	-	19,5
6	3	2	-	-	-	3,80	-	-	-	-
7	2	3	-	-	-	4,26	4,03	4,14	9,4	3,3
8	2	3	1	-	-	4,78	4,52	-	6,2	-
9	2	4	-	-	-	5,22	4,98	4,95	2,6	2,5
10	2	4	1	-	-	5,66	5,52	-	2,4	-
11	2	5	-	-	-	6,12	5,93	5,56	21,7	2,9
12	2	5	1	-	-	6,56	6,50	-	6,6	-
13	2	6	-	-	-	7,01	6,85	-	34,5	1,6-
14	2	6	1	-	-	7,45	7,22	-	2,9	-
15	2	7	-	-	-	7,86	7,79	-	7,9	-
16	2	7	1	-	-	8,30	8,41	-	0,8	-
17	2	8	-	-	-	8,82	8,62	-	2,6	-
18	2	8	1	-	-	9,26	-	-	-	-
19	2	7	-	-	2	9,42	-	-	-	-
20	2	7	-	1	2	9,97	-	-	-	-
nicht-identifizierte Peaks									2,5	6,9
Gesamtfukosylierungsgrad									18,9	0

Tabelle 7: Zusammenstellung der GU-Werte, der daraus resultierenden vermutlichen Oligosaccharid-zusammensetzung und der prozentualen Verteilung der Strukturen für die Oligosaccharide der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde, nachdem diese in frischem Medium inkubiert wurde (A) und nachdem diese in von CHO-ASA-Zellen konditioniertem Medium inkubiert wurde (B).

4.9 Bindung von rhASA an MPR 300

Wie im Methodenteil erläutert wurde ein Konstrukt des MPR 300 kloniert, das kein Internalisierungssignal mehr enthält (Stopsignal hinter der Transmembrandomäne). Mit diesem Konstrukt wurden BHK-Zellen stabil transfiziert. Die erhaltenen Klone wurden über ihr Bindungsvermögen von β -Galaktosidase selektiert. Der Klon, mit dem nach dem Screening weitergearbeitet wurde, trägt die Bezeichnung BHK II D5 und diente als Grundlage für die nachstehend beschriebenen Versuche.

Die Nukleotidsequenz des IGFR ist in der NCBI-Datenbank unter der Nummer NM 000876, die Aminosäuresequenz unter P11717 gelistet. In älteren Veröffentlichungen [Oshima, 1988] ist zwar die gleiche Nucleotidsequenz publiziert aber eine abweichende Aminosäuresequenz. Dort wurde das Triplet CAG an Position 7060 (direkt vor der Transmembrandomäne) als Aspartat (D) statt als Glutamin (Q) übersetzt. Durch die Sequenzierung des nicht übereinstimmenden Bereichs konnte die bei NCBI publizierte Sequenz bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Zur immunzytochemischen Darstellung des membranständigen Mannosephosphatrezeptors wurden BHK wt und BHK II D5 Zellen fixiert und mit MPR-Antikörper inkubiert, der mit einem Alexa 488 markierten zweiten Antikörper sichtbar gemacht wurde. Es zeigte sich bei den BHK II D5 Zellen eine deutlich intensivere Färbung als bei BHK wt Zellen (Abb. 56). In der unteren Reihe (c-e) wurden dieselben fünf BHK II D5 Zellen in drei verschiedenen Ebenen aufgenommen, um die Markierung der Zelloberfläche zu verdeutlichen.

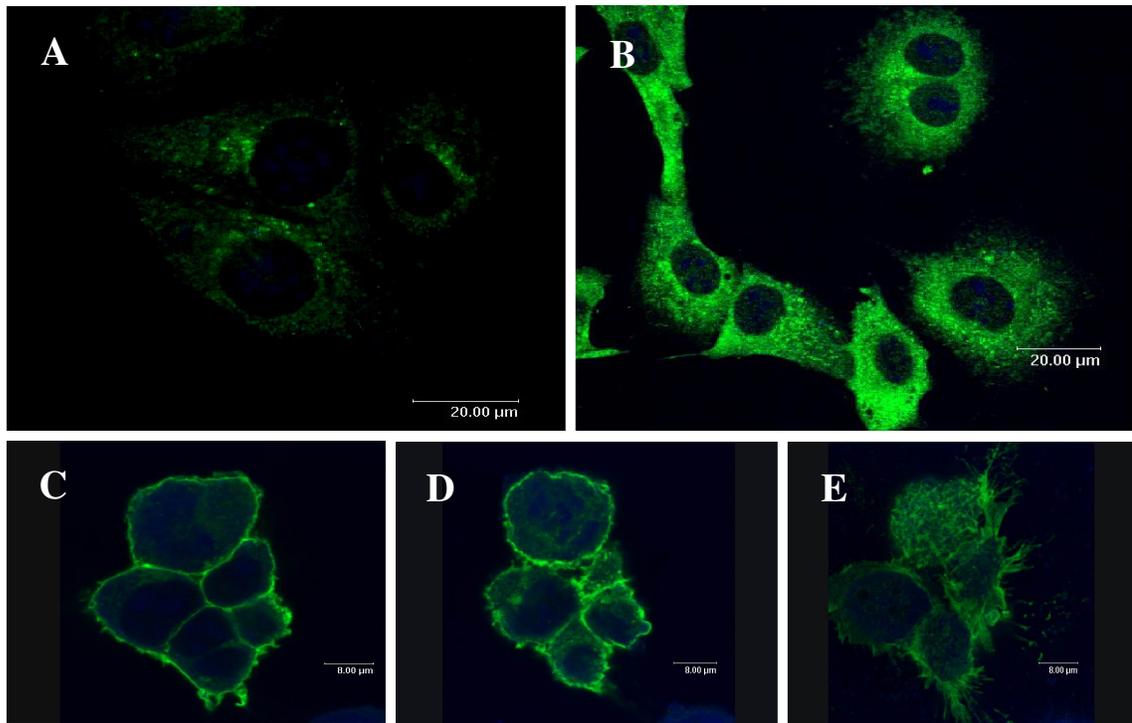


Abb. 56: Immunfluoreszenznachweis des membranständigen MPR in BHK II D5 Zellen. Als erster Antikörper wurde Kaninchen anti-MPR300 verwendet. Der zweite AK war ein Alexa 488-markierter Ziegen-anti-Kaninchen (grün). Die Zellkerne wurden mit Toto-3-iodide 642/660 (blau) angefärbt. In Abb. 56 A sind BHK wt Zellen zu sehen. In B sind BHK II D5 Zellen abgebildet. Die Abbildungen 56 c-e zeigen BHK II D5 Zellen in drei unterschiedlichen Ebenen.

Ziel der folgenden Versuche war es, die Menge an Arylsulfatase A zu ermitteln, die an die, auf der Oberfläche dieser Zellen überexprimierten Mannosephosphatrezeptoren binden kann. Dazu wurden die Zellen auf 10 cm Schalen ausgesät und mit unterschiedlichen Mengen an ASA inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die gebundene ASA mit Mannose-6-Phosphat (M6P) vom Rezeptor kompetitiv verdrängt. Die Quantifizierung der ASA erfolgte über die Messung der Aktivität des eluierten Enzyms.

Da zur Verdrängung der ASA vom MPR M6P in millimolaren Konzentrationen eingesetzt wurde, wurde in einem Vorversuch die Frage geklärt, ob M6P in den verwendeten Konzentrationen Einfluß auf die Aktivität der Sulfatase hat, da bekannt ist, dass Phosphate in diesen Konzentrationen die Aktivität der ASA inhibieren. Dazu wurde ASA mit p-Nitrocatecholsulfat und 10 mM M6P inkubiert. Es zeigten sich keine Verluste der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ohne M6P (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Vorversuch wurde die Bindungsfähigkeit von ASA der Zelllinie BHK II D5 im Vergleich zu BHK wt Zellen quantifiziert. Es zeigten sich Steigerungen der Bindungsfähigkeit von ASA um den Faktor 40 (Daten nicht gezeigt).

Zur Charakterisierung der Bindungsart, wurde die Spezifität der Bindung betrachtet, indem BHK II D5 Zellen mit ASA, die nachgewiesenermaßen phosphoryliert ist, inkubiert wurden. Die Verdrängung vom MPR erfolgte einmal mit Mannose-6-Phosphat und in einer zweiten Versuchsreihe mit Glucose-6-Phosphat (G6P). In dem Eluat wurde die enzymatische Aktivität der ASA gemessen. Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 57 graphisch dargestellt.

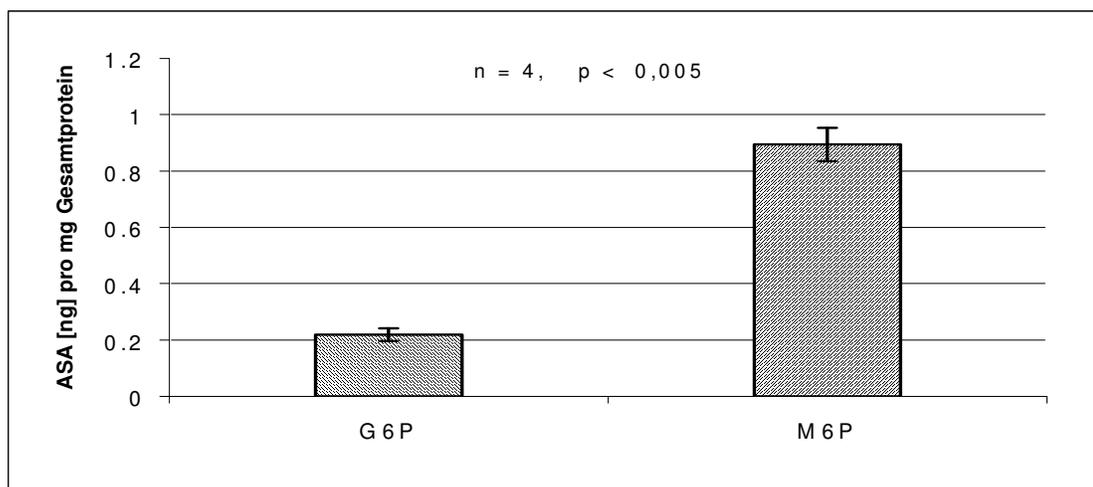


Abb. 57: Verdrängung von BR CHO-ASA vom Mannosephosphatrezeptor der Zelllinie BHK II D5 mit G6P bzw. M6P. Dargestellt sind die Mengen an ASA pro mg Gesamtprotein. Die eluierten ASA Mengen wurden photometrisch bestimmt. Das Ergebnis wurde in die Gesamtmenge an ASA umgerechnet. Dieses Ergebnis wurde auf den Gesamtproteingehalt der Zellen normiert.

Dieser Versuch wurde auf Platten mit einer Zellwachstumsfläche von 12 cm², spätere Versuche auf 78 cm² Schalen durchgeführt. Als 0-Wert diente bei diesem Versuch die Verdrängung von ASA mit TBS pH 7,5 von BHK II D5 Zellen. Es zeigte sich, dass auch Glucose-6-Phosphat ASA von der Zelloberfläche freisetzen kann, die Elution mit Mannose-6-Phosphat aber zu Werten führt, die um den Faktor 4,5 höher sind. Die Steigerung der Elution mit M6P gegenüber der mit G6P ist statistisch signifikant ($p < 0,005$).

Zur weiteren Charakterisierung der Bindungsart der ASA an die BHK II D5 Zellen, wurde ASA, die nachweislich phosphoryliert ist durch alkalische Phosphatase dephosphoryliert und deren Bindung an den MPR im Vergleich zu nicht behandelter ASA (hier mit wt ASA abgekürzt) untersucht. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die gewählten Bedingungen zur Dephosphorylierung nahezu 100 % dephosphorylierte ASA liefern und dephosphorylierte ASA keine verringerte Aktivität aufweist. Das Ergebnis der Aktivitätsmessung der Eluate ist in Abb.58 dargestellt (umgerechnet auf ng ASA/mg

Gesamtprotein). Es zeigte sich eine statistisch signifikante Abnahme ($p < 0,08$) der Bindungsmenge von dephosphorylierter ASA gegenüber wtASA.

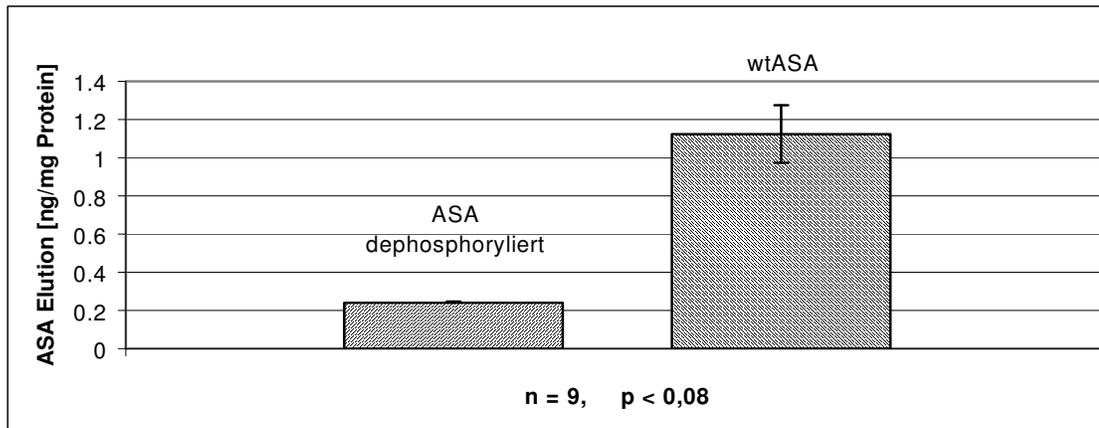


Abb. 58: Bindung von dephosphorylierter ASA und wtASA an BHK II D5 Zellen. Eluiert wurde mit Mannose-6-Phosphat. Die Menge von ASA im Eluat wurde enzymatisch bestimmt und auf den Gesamtproteingehalt der Zellen normiert.

Nach diesen Versuchen, die Aussagen zur Spezifität und Kompetitierbarkeit der Rezeptorbindung erlauben, sollte überprüft werden, ob phosphorylierte ASA auch durch die Inkubation in konditioniertem Medium dephosphoryliert werden kann. Dazu wurde ASA, wie in Abschnitt 4.8 erläutert, die nachweislich phosphoryliert ist (vergl. Tab. 4) in dem Medium inkubiert, in dem zuvor CHO Zellen kultiviert wurden. Die ASA wurde nach 12 h Inkubationszeit aus diesem Medium affinitätsgereinigt. Mit dieser ASA wurden BHK II D5 Zellen inkubiert. Nach mehreren intensiven Waschschritten wurde die gebundene Menge ASA mit M6P von der Zelloberfläche eluiert. Die Menge der gebundenen ASA wurde enzymatisch bestimmt. Als Kontrolle wurde die ASA, die nachweislich phosphoryliert ist in unkonditioniertem Medium für ebenfalls 12 h inkubiert.

Bei diesem Versuch zeigte sich, dass die Menge an ASA, die an die Zellen gebunden werden kann abnimmt, wenn die ASA in konditioniertem Medium inkubiert wurde. Aber auch nach Inkubation der ASA in unkonditioniertem Medium (frisches Medium mit 1,5 % FKS) verringert sich die Menge, die an die Zellen binden kann, im Vergleich zu unbehandelter ASA. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in Abb. 59 dargestellt.

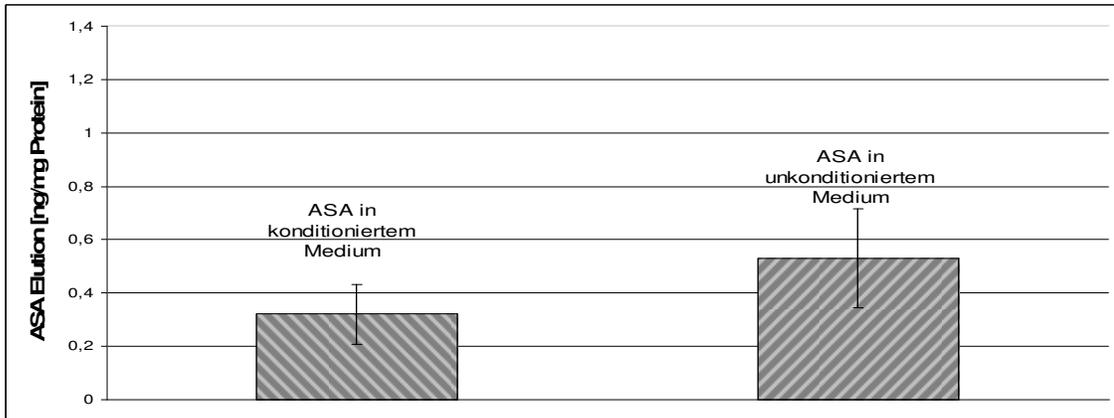


Abb. 59: Bindung von ASA, die für 12 Stunden in Medium inkubiert wurde, das von CHO-Zellen für 11 Tage konditioniert wurde im Vergleich zu ASA, die für 12 Stunden in unkonditioniertem Medium inkubiert wurde. Dargestellt ist die Menge an ASA, die von den Zellen BHK II D5 mit M6P eluiert werden konnte. Die Menge im Eluat wurde enzymatisch bestimmt und auf den Gesamtproteingehalt der inkubierten Zellen normiert.

Durch die folgenden Versuche sollte der Phosphorylierungsgrad der aus verschiedenen Zellen aufgereinigten ASA bestimmt und verglichen werden.

Dazu wurden BHK II D5 Zellen auf 10 cm Schalen (10^6 Zellen/Schale) ausgesät und nach 24 h mit verschiedenen Mengen von ASA inkubiert. Nach mehreren intensiven Waschschritten wurde die ASA mit M6P eluiert und die eluierte Menge enzymatisch bestimmt. Ziel war es, den Bereich zu ermitteln, in dem eine lineare Beziehung zwischen der Auftragsmenge und der Elutionsmenge der ASA existiert.

Die Abbildung 60 A-D zeigt das Ergebnis für die verschiedenen ASA-Chargen.

Nur mit der ASA, die aus dem Medium von CHO-Zellen aufgereinigt wurde, die in einem Bioreaktor kultiviert wurden, konnte eine Abhängigkeit der Elutionsmenge von der Auftragsmenge gemessen werden (Abb. 60 B).

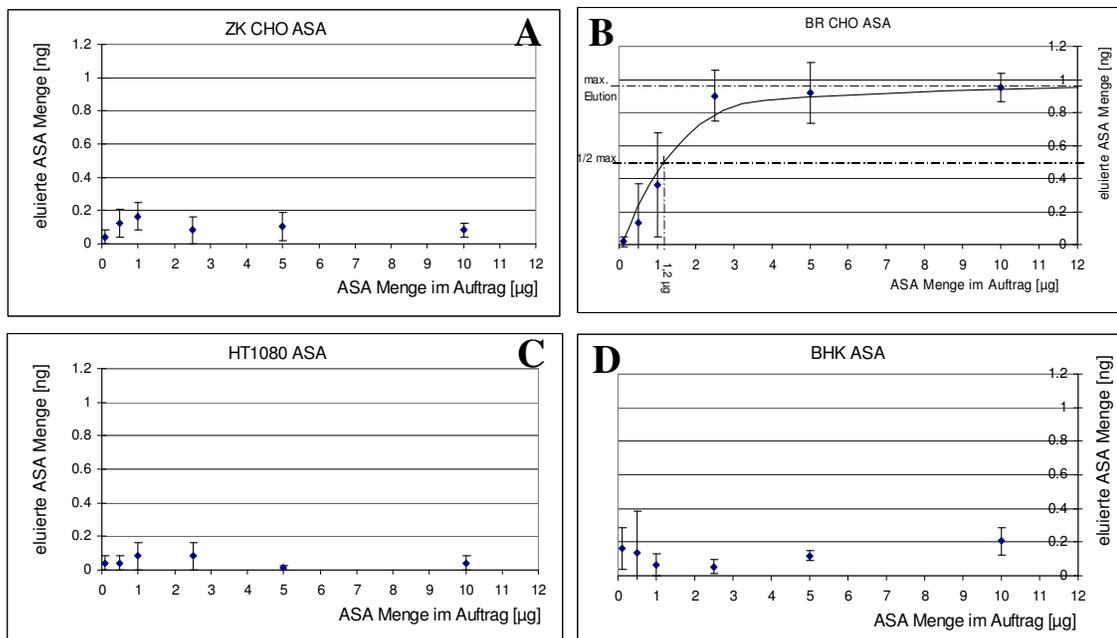


Abb. 60: Arylsulfatasen aus verschiedenen Zellsystemen wurden in unterschiedlichen Mengen an BHK II D 5 Zellen gebunden und mit Mannose-6-Phosphat eluiert. Dargestellt ist die Menge an ASA, die von den Zellen eluiert werden kann in Abhängigkeit der Auftragsmenge. Die gebundene ASA-Menge wurde über die Aktivität bestimmt. Abb. 60 A zeigt die Elutionsmengen für ASA, isoliert aus Mediumsüberständen von CHO Zellen, die in Zellkulturschalen (ZK) kultiviert wurden, B für ASA, isoliert aus dem Medium von CHO Zellen, die in einem Bioreaktor (BR) kultiviert wurden, C zeigt die Elutionsmengen für ASA, die aus dem Medium von HT 1080 Zellen isoliert wurde die in Zellkulturschalen kultiviert wurden und C zeigt die Elutionsmengen für ASA, die aus dem Medium von BHK Zellen isoliert wurde die in Zellkulturschalen kultiviert wurden.

Zur Berechnung der Dissoziationskonstante K_D wurde in der Abbildung 60 B die Auftragsmenge der ASA bei halbmaximaler Sättigung bestimmt. Diese liegt bei 1,2 μg ASA in einem Auftragsvolumen von 2 ml. Bei dem Molekulargewicht der ASA von etwa 60000 g/mol ergeben sich daraus 10 nmol/l ASA-Auftrag bei halbmaximaler Sättigung. Der Phosphorylierungsgrad der Bioreaktor-ASA wurde auf ca. 20 % bestimmt (vergl. Tabelle 4). Daraus folgt für K_D ein Wert von $2 \cdot 10^{-9}$ mol/l.

Die Dissoziationskonstanten für M6P und für mannosereiche Oligosaccharide mit zwei Phosphomonoestern vom Mannosephosphatrezeptor unterscheiden sich deutlich. M6P hat eine K_D von $7 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Mannosereiche Oligosaccharide mit zwei Phosphomonoestern haben eine K_D von $2 \cdot 10^{-9}$ mol/l [Tong, 1989].

4.10 Bestimmung des Verhältnisses von Formylglycin zu Cystein an Position 69 der rhASA mittels MALDI-TOF-MS

Der Analyse zugänglich waren sechs unterschiedliche rhASA Chargen, die spezifische Aktivitäten von 8,8 – 112 units/mg aufwiesen. 100 µg jeder Charge wurden nach Reduktion und Alkylierung der Cysteine mit Trypsin verdaut und mittels RP-HPLC aufgetrennt. Abb. 60 zeigt ein typisches Chromatogramm eines solchen tryptischen Komplettverdaus. Der HPLC-Lauf wurde fraktioniert (1 Fraktion/min) und jede Fraktion wurde mittels MALDI-TOF-MS vermessen.

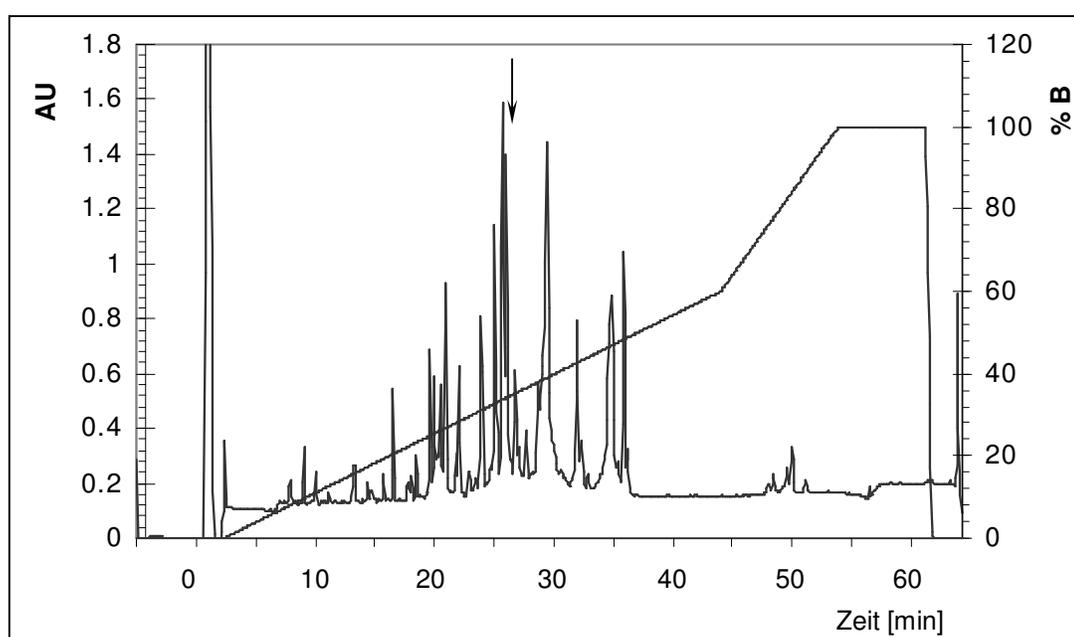


Abb. 60: RP-HPLC Chromatogramm des tryptischen Verdaus von hASA, detektiert bei einer Wellenlänge von 214 nm. Das Cys 69 Peptid 59-73 (Carbamidomethyliert) eluiert zusammen mit dem Fgly 69 Peptid 59-73 nach ca. 25 min, was ungefähr 35 % des Laufmittels B entspricht. Die Fraktion, in der die beiden Peptide eluieren, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Bei ca. 35 % Acetonitril eluiert sowohl das Peptid 59-73 mit Cystein an Position 69, als auch das Peptid 59-73 mit FGly an Position 69. Das Massenspektrum dieser Mischfraktion wurde direkt zur Ermittlung des Verhältnisses von FGly zu Cys an Position 69 benutzt.

Die ASA-Charge mit einer spezifischen Aktivität von 8,8 U/mg zeigte ein Verhältnis des tryptischen Peptids 59-73 mit alkyliertem Cystein an Position 69 (1788,9 m/z) zu dem Peptid 59-73 mit Formylglycin an Position 69 (1713,8 m/z) von 0,34 (Verhältnis der Peakhöhen im MALDI-TOF-Spektrum) (Abb. 61).

Die ASA-Charge mit einer spezifischen Aktivität von 112 U/mg zeigte ein Verhältnis dieser beiden Peaks von 1,68.

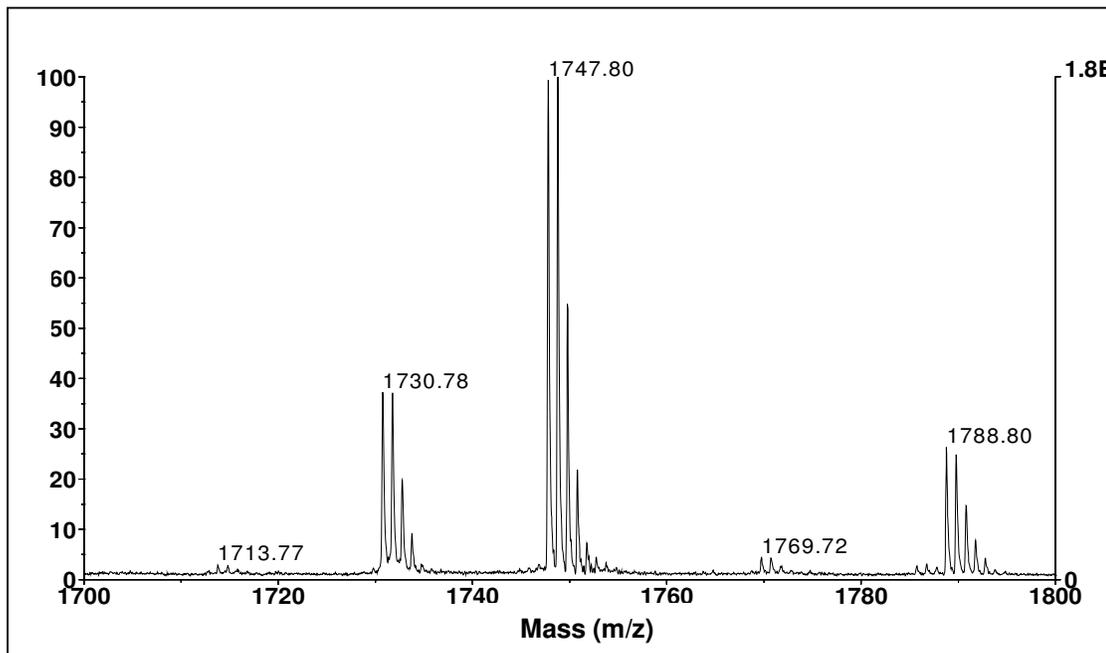


Abb. 61: MALDI-TOF-Massenspektrum des tryptischen Verdaus der hASA Charge, die eine Aktivität von 8,8 U/mg aufwies. Das Verhältnis von Formylglycin zu Cystein an Position 69 (Peaks 1713.77/1788.8 m/z) beträgt 0,34 durch Vergleich der Peakhöhen bzw. 0,265. Durch Vergleich der Peakflächen.

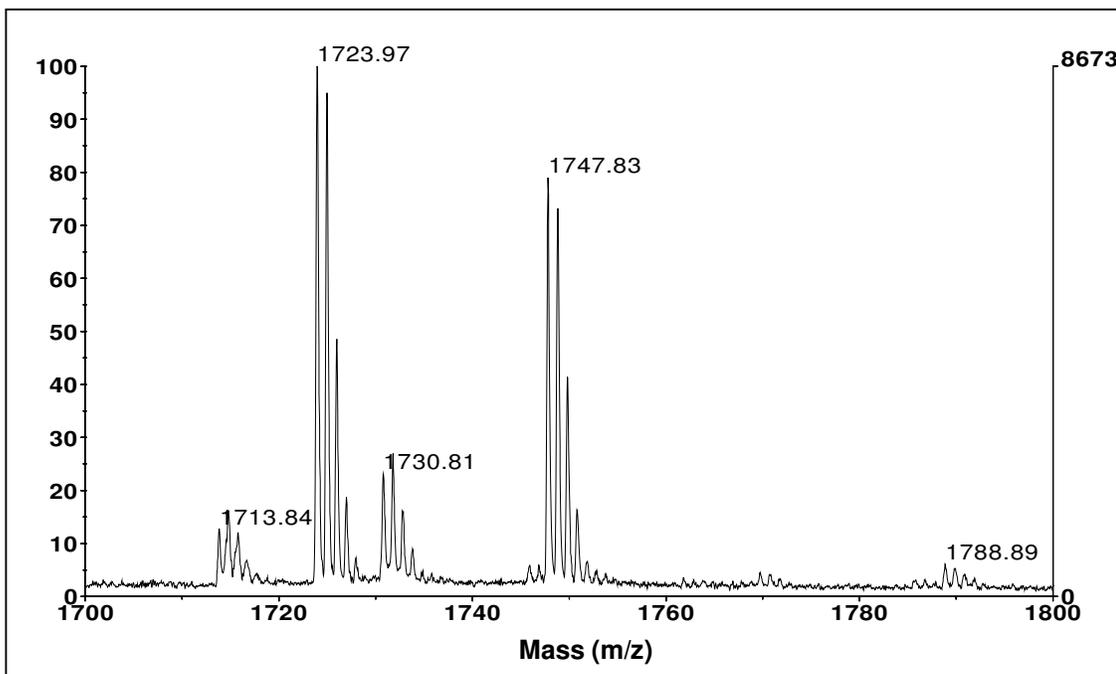


Abb. 62: MALDI-TOF-Massenspektrum des tryptischen Verdaus der hASA Charge, die eine Aktivität von 112 U/mg aufwies. Das Verhältnis von Formylglycin zu Cystein an Position 69 (Peaks 1713.84/1788.89 m/z) beträgt 1,68 durch Vergleich der Peakhöhen bzw. 1,06 durch Vergleich der Peakflächen.

Die MALDI-TOF-MS-Spektren des tryptischen Verdaus der unterschiedlichen ASA-Chargen zeigen eine deutliche Zunahme des Verhältnisses des Peptides 59-73 mit FGly (1713,8 m/z) und dem Peptid 59-73 mit alkyliertem Cys 69 (1788,8 m/z) mit zunehmender spezifischer Aktivität der Chargen. Die gezeigten Spektren repräsentieren die Charge mit der geringsten (Abb. 61) und der höchsten (Abb. 62) spezifischen Aktivität.

Zur Bestimmung des FGly-/Cys-Verhältnisses via MALDI-TOF-MS ist es erforderlich, dass die Alkylierungsreaktion quantitativ abläuft. Die Effizienz der Alkylierung wurde mit dem tryptischen Peptid 292-299 (762,4 m/z) überprüft. Es enthält ein Cystein. Nach Carbamidomethylierung konnte nur das alkylierte Peptid im MALDI-TOF-Spektrum detektiert werden (819,4 m/z, Daten nicht gezeigt).

Zur Bestimmung des FGly-/Cys-Verhältnisses durch einen Edman-Abbau ist eine Trennung der beiden zu sequenzierenden Peptide erforderlich. Deshalb wurde die Mischfraktion einer zweiten RP-HPLC Chromatographie unterworfen, bei der der Acetonitrilgradient stark abgeflacht wurde. Ein Chromatogramm einer solchen Rechromatographie zeigt Abbildung 63.

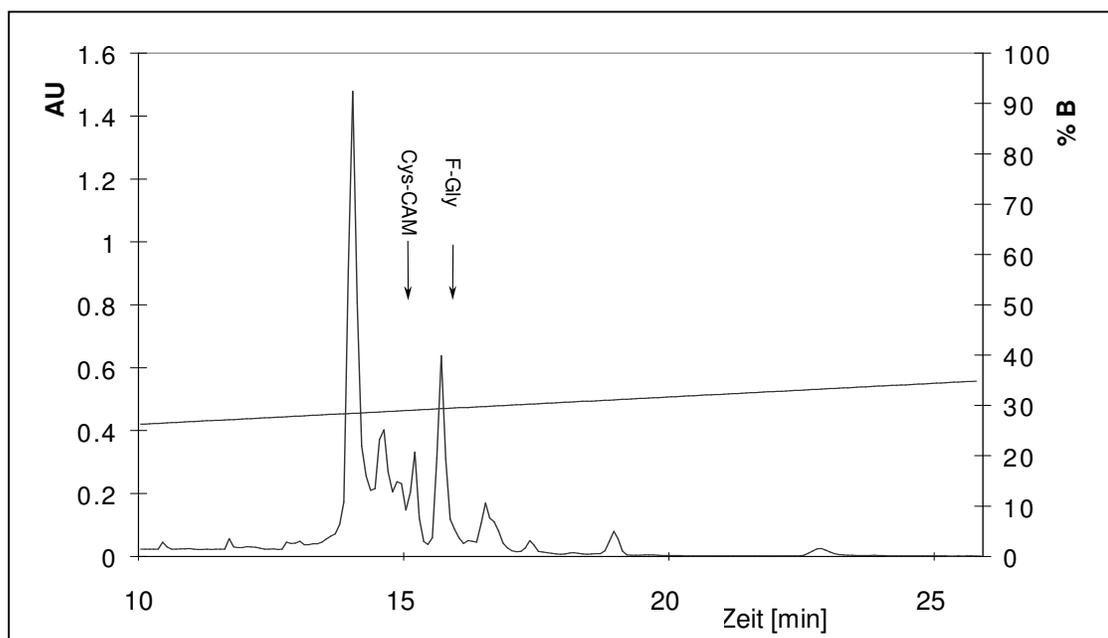


Abb. 63: Rechromatographie der Fraktionen der RP-HPLC des Komplettverdaus von hASA (s. Abb. 60), die die beiden tryptischen Peptide 59-73 enthielten, detektiert bei einer Wellenlänge von 214 nm. Der flachere Gradient des Eluenten B führt zu einer vollständigen Trennung der beiden tryptischen Peptide 59-73. Das Peptid mit der Carbamidomethylierung an Cys 69 konnte bei ca. 15 min, das mit der Formylglycinmodifikation an Pos 69 nach ca. 17 min detektiert werden. Die relevanten Fraktionen sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Die Fraktionen der Rechromatographie wurden mittels MALDI-TOF-MS charakterisiert. Es zeigte sich, dass eine vollständige Trennung der Peptide mit FGly bzw. Cys an Position 69 erreicht wurde. Diese beiden Fraktionen wurden isoliert und einem Edman-Abbau unterworfen.

Eine Übersicht über die gefundenen Verhältnisse von Cystein zu Formylglycin an Position 69 – ermittelt durch Edman-Abbau bzw. den Vergleich der MALDI-TOF-Peakhöhen/-flächen - bei den untersuchten ASA-Chargen in Korrelation zur spezifischen Aktivität dieser Chargen gibt Tabelle 8. Die Abbildung 64 A-C zeigt diese Werte in graphischer Form.

ASA-Charge	Spez. Aktivität [U/mg]	FGly69-/Cys69 – Verhältnis ermittelt durch:		
		Edman-Abbau	MALDI-Peakhöhe	MALDI-Peakfläche
1	8.8	0,03	0,34	0,265
2	18	0,04	0,31	0,051
3	38.2	0,06	0,27	0,077
4	62	-	0,54	0,42
5	106	0,03	0,85	0,58
6	112	0,1	1,68	1,06

Tabelle 8: Übersicht über die 6 untersuchten ASA-Chargen mit den spez. Aktivitäten im Vergleich zu dem FGly- zu Cystein-Verhältnis ermittelt durch Edman-Abbau, die MALDI-TOF Peakhöhe bzw. MALDI-TOF Peakfläche. Für die ASA-Charge Nr. 4 wurde kein Edman-Abbau durchgeführt.

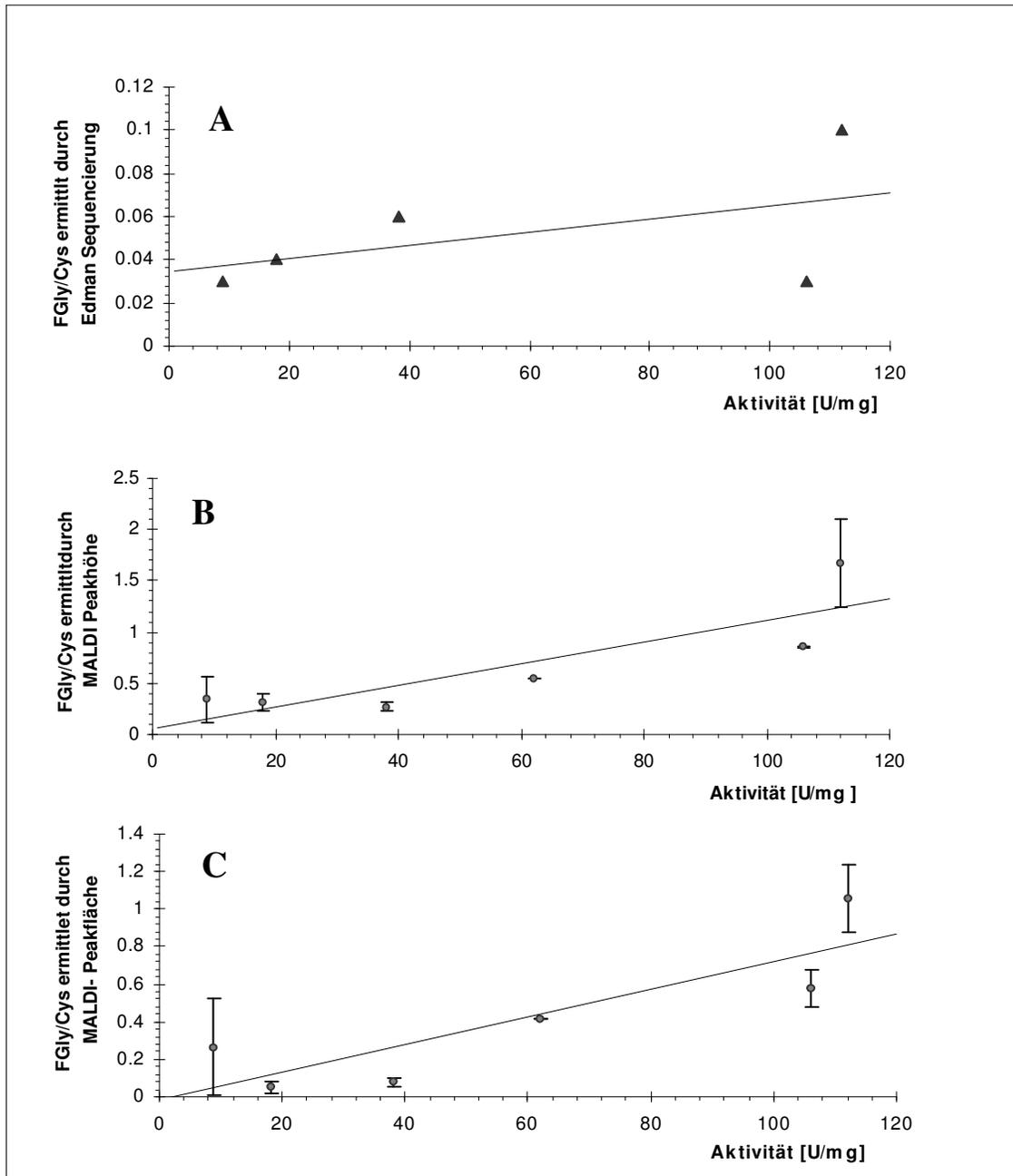


Abb. 64: Graphische Darstellung der Beziehung zwischen der spezifischen Aktivität der untersuchten ASA-Chargen und dem Verhältnis von FGly/Cys. Das FGly/Cys-Verhältnis wurde ermittelt durch **A**: Edman-Sequenzierung, **B**: Vergleich der MALDI-TOF-Peakhöhen, **C**: Vergleich der MALDI-TOF-Peakflächen. (Das FGly/Cys-Verhältnis, ermittelt durch MALDI-TOF-MS, wurde dreimal bestimmt, aufgetragen sind die Mittelwerte der Messungen, die Ausgleichsgerade ist linear angepasst).

5 Diskussion

5.1 Glykosylierungsstellen-spezifische Analytik der Oligosaccharide von hASA aus verschiedenen Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden die Oligosaccharidseitenketten der humanen Arylsulfatase A (hASA) seitenspezifisch analysiert. Es wurden ASA-Chargen untersucht, die mit verschiedenen hASA überexprimierenden Zelllinien (BHK-ASA-MPR46, HT1080, CHO-ASA) produziert wurden. Die ASA aus den verschiedenen Zelllinien zeigt deutliche Unterschiede im Glykosylierungsmuster. Die Oligosaccharide sind größtenteils vom mannosereichen Typ und z.T. fukosyliert, unterscheiden sich aber deutlich in der Anzahl an Mannosemonomeren. Der Fukosylierungsgrad reicht von 0 % bis 30 %.

Es zeigten sich auch deutliche Unterschiede, vergleicht man die einzelnen Glykosylierungsstellen einer ASA-Charge. Die Oligosaccharide variieren je nach Glykosylierungsstelle in der Anzahl der Mannoseeinheiten und im Fukosylierungsgrad. Ein weiterer Befund ist, dass phosphorylierte und sialisierte Oligosaccharidstrukturen auf die Glykosylierungsstelle 3 beschränkt sind.

Außerdem wurden die Oligosaccharide von zwei ASA-Chargen verglichen, die beide aus dem Medium von CHO Zellen aufgereinigt wurden, die aber entweder in einem Bioreaktor oder in Zellkulturschalen kultiviert wurden. Die deutlichen Unterschiede hierbei zeigen, dass die Kultivierungsbedingungen einen großen Einfluss auf die Oligosaccharidseitenketten der ASA haben.

Zusätzlich wurden die Oligosaccharide von ASA, die aus den Zellen von hASA überexprimierenden CHO-Zellen affinitätsgereinigt wurde, analysiert. Das Glykosylierungsmuster dieser zellulären ASA zeigt ein völlig anderes Bild, als das der ASA, die in das Medium sezerniert wird.

In Abbildung 7 ist ein typisches Massenspektrum eines tryptischen Verdaus der Arylsulfatase A (ASA) gezeigt. Bei einem Datenbank-gestützten Abgleich mit im Internet frei verfügbaren Programmen (z.B. MS-digest, expasy, mascot) der detektierten Peakmassen mit den bekannten Massen eines tryptischen Verdaus der ASA, wurden Werte von ca. 40 % für die Sequenzabdeckung erreicht. Diese Werte vermitteln den Eindruck eines unvollständigen Verdaus; es muss aber berücksichtigt werden, dass die glykosylierten Peptide der ASA aufgrund ihrer Modifikation nicht in die Berechnung

dieses Wertes einfließen. Diese Peptide überspannen bei einem tryptischen Verdau der ASA einen Bereich von ca. 20% aller Aminosäuren. Hinzu kommen weitere Modifikationen, wie beispielsweise die Modifikation des Cysteins 69 zu Formylglycin und die C-terminale Verkürzung des Vorläuferproteins, die in der Datenbank unberücksichtigt bleiben, so dass auch theoretisch eine Sequenzabdeckung von 100 % nicht erreicht werden kann.

Nach einem tryptischen Verdau war eine massenspektrometrische Detektion der ASA als Gesamtprotein nicht mehr möglich. Ein Wert für die Sequenzabdeckung im o.g. Bereich, bildete eine verlässliche Grundlage zur Beurteilung der Qualität des tryptischen Verdaus. Entscheidend für die weitere Analytik war die massenspektrometrische Detektion der Peptide, die die glykosylierten Peptide flankieren (939 m/z, 1639 m/z, 1747 m/z und 2239 m/z).

Glykosylierungsstelle 1 und 2 (N158, N184) liegen nah beieinander und werden durch einen tryptischen Verdau nicht getrennt. Aus diesem Grund wurde das tryptische Peptid, das die Glykosylierungsstelle 1 und 2 zusammen trägt, nach der Trennung von den anderen Peptiden durch eine RP HPLC isoliert und einem AspN-Verdau unterworfen. Theoretisch wäre der tryptische Verdau demnach ein verlustbehafteter überflüssiger Schritt. Allerdings zeigte sich, dass ein direkter AspN-Verdau des Proteins zu einer wesentlich schlechteren Sequenzabdeckung führt und viele Peptide mit Fehlsplattstellen erzeugt, die im MALDI-TOF *mass fingerprint* schwerer auswertbar sind. Außerdem kommt es zu Ausbeuteverlusten, da die gesuchten Peptide durch ungenutzte enzymatische Schnittstellen ein unterschiedliches Laufverhalten bei der Chromatographie zeigen und dadurch zu verschiedenen Zeiten eluieren.

Insgesamt führte dieser zusätzliche Schritt des tryptischen Verdaus sogar zu höheren Ausbeuten an den gesuchten Peptiden, die die Glykosylierungsstellen 1, 2 bzw. 3 tragen. In diesem Zusammenhang soll darauf hingewiesen werden, dass die ASA im Bereich der Glykosylierungsstelle 1 und 2 insgesamt vier Cysteine trägt (Aminosäure 156, 161, 168, 172), die zwei Disulfidbrücken ausbilden (156-172 und 161-168) [Lukatela, 1998]. Diese Proteinfaltung erschwert den enzymatischen Verdau der ASA mit Endoproteinasen, wenn das Protein nicht denaturiert und die Cysteine nicht vollständig alkyliert vorliegen.

Wenn eine Glykosylierungsstelle der Arylsulfatase A variabel bzw. nie benutzt würde, müsste bei der massenspektrometrischen Analyse der RP-Chromatographie-Fractionen nach Trypsin- bzw. AspN-Verdau ein Peak zu detektieren sein, der der Masse des

deglykosylierten Peptids entspricht. Es wurden immer alle Fraktionen der RP Chromatographie des Trypsinverdaus, und auch die des anschließenden AspN-Verdaus, massenspektrometrisch analysiert. In keinem der Fälle konnte die Masse eines deglykosylierten Peptids nachgewiesen werden. Dieser Befund, dass die drei N-Glykosylierungsstellen der Arylsulfatase A immer durch die Oligosaccharyltransferase erkannt und auch benutzt werden, steht in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen zur Glykosylierung der ASA [Sommerlade, 1994].

Zur weiteren Untersuchung der Oligosaccharide wurden diese mittels PNGaseF vom Peptid freigesetzt. Dieser enzymatische Schritt ist nicht selektiv. Es werden sowohl mannosereiche als auch hybride und komplexe Oligosaccharide von der Proteinkette freigesetzt. Einzige Ausnahme bilden Oligosaccharide, die eine α 1-3 verknüpfte Fukose an der Asparagin gebundenen N-Acetylglukose tragen. Diese Modifikation ist allerdings bis jetzt nur in einigen Pflanzen nachgewiesen worden [Tretter, 1991]. Bei der massenspektrometrischen Analyse der deglykosylierten Peptide ist darauf zu achten, dass das Asparagin in der Polypeptidkette zu Aspartat desaminiert wird (Ammoniak wird frei), wodurch sich die Peptidmasse um 1 Da erhöht.

Nachdem die Oligosaccharide mit dem Fluorophor 2-Aminobenzamid markiert und aufgereinigt wurden, wurde ein erstes Oligosaccharidfluoreszenzprofil aufgenommen. Dazu wurde die Probe mit einer Normalphasen Amid-Chromatographiesäule getrennt und das Fluoreszenzsignal aufgezeichnet (λ_{Ex} 320 nm, λ_{Em} 420 nm). Das Trennprinzip wird bestimmt durch hydrophile Interaktionen der polaren stationären Phase mit dem Analyten. Die Elutionskraft wird durch einen steigenden wässrigen Anteil in der mobilen Phase erhöht. Da Oligosaccharide i.d.R. mit zunehmender Anzahl von Monomeruntereinheiten auch eine größere Anzahl an Hydroxygruppen besitzen, steigen auch die Elutionszeiten mit der Größe der Oligosaccharide (Anzahl an Monomeren). Diese simple Regel gilt nur für unmodifizierte Oligosaccharide. Ungewöhnlich verzweigte Oligosaccharide weichen z.T. stark davon ab. Entscheidend für die Laufzeit ist nicht die bloße Anzahl an Hydroxyfunktionen eines Oligosaccharids, sondern die Anzahl an Hydroxyfunktionen, die mit der stationären Phase wechselwirken können. Das erklärt den Befund, dass die Addition einer N-Acetylglukose, die β 1-4 an die innere Mannose der Kernstruktur verknüpft ist (bisecting GlcNAc) einen geringeren Anstieg der Elutionszeit mit sich bringt als die Verknüpfung an einem der äußeren Arme (vergl. Tabelle 1).

Bei dem verwendeten pH Wert der mobilen Phase von pH 4,4 ist die stationäre Phase neutral, wodurch Ionenaustauscher-Effekte minimiert werden. Dadurch ist es möglich, geladene (z.B. phosphorylierte, sulfatierte, sialisierte) Oligosaccharide zusammen mit Neutralzuckern aufzutrennen.

Zur Umrechnung der Elutionszeiten in relative Glukose-Einheiten (GU) wurde nach max. fünf aufgezeichneten Oligosaccharidprofilen ein Dextranstandard injiziert. Die Umrechnung in relative Einheiten erlaubt die Zuordnung der detektierten Peaks zu Oligosaccharidstrukturen anhand von publizierten Tabellen [Bigge, 1995; Guile, 1996]. Die auf diesem Weg vorausgesagten Strukturen, wurden nach erneuter Aufzeichnung eines Fluoreszenzprofils nach Inkubation mit Oligosaccharid-modifizierenden Enzymen (Exoglykosidasen, Phosphatase) abgesichert.

Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt im unteren Femtomolbereich (vergl. Abb. 21). Damit ist diese Methode sensitiver als der Nachweis mittels MALDI-TOF-MS, der zudem den Nachteil hat selektiv zu sein (beispielsweise werden phosphorylierte Strukturen im positiven Ionen-Modus mit einer geringeren Effizienz ionisiert und sind damit schlechter nachweisbar) [Klemm, 2004].

Darüber hinaus ist durch die Integration der Fluoreszenzsignale eine exakte Bestimmung der prozentualen Verteilung der detektierten Peaks möglich. Bei einem massenspektrometrischen Nachweis mittels MALDI-TOF-MS ist eine relative Quantifizierung zwar zwischen Oligosacchariden vom gleichen Typ (Bsp.: Man₃ – Man₈) möglich, nicht aber zwischen Oligosacchariden, die sich hinsichtlich ihrer funktionellen Gruppen unterscheiden [Harvey, 1999].

Als Standardsubstanz für phosphorylierte Oligosaccharide diente ein Polysaccharid, das aus der Zellwand der Hefe *Hansenula holsii* isoliert wurde und freundlicherweise von Vito Ferro zur Verfügung gestellt wurde. Es besteht aus 2 – 5 Mannosemonomeren, die α 1-3 glykosidisch verknüpft sind und an C₆ am nicht-reduzierenden Ende eine Phosphatgruppe tragen [Ferro, 2001]. Massenspektrometrisch konnte keine nicht-phosphorylierte Struktur nachgewiesen werden und auch das Fluoreszenzprofil deutet darauf hin, dass der Phosphorylierungsgrad annähernd 100 % ist (Abb. 19 und 20 A).

Nach der Inkubation mit alk. Phosphatase ist weder massenspektrometrisch noch im Fluoreszenzprofil eine phosphorylierte Struktur nachweisbar. Die Elutionszeiten der Fluoreszenzpeaks verringern sich um ca. 6 min., was etwa einer relativen Glukoseeinheit entspricht. Dies wurde bei der Kalkulation der Tabelle 1 eingerechnet, um die

Elutionszeiten phosphorylierter Oligosaccharide zu bestimmen, die in den publizierten Tabellen nicht berücksichtigt sind [Guile, 1996]. Sehr markant ist das Peaktailing der phosphorylierten Strukturen, das auch bei phosphorylierten N-Glykanen wieder gefunden wurde und als Indiz für phosphorylierte bzw. geladene Glykane gelten kann.

5.2 Glykosylierungsmuster der ASA, produziert in verschiedenen Zelllinien

Frühere Untersuchungen zur Glykosylierung der ASA zeigen, dass alle drei Glykosylierungsstellen benutzt werden und die Oligosaccharide zum größten Teil vom mannosereichen Typ sind, da über 90 % der Oligosaccharide der ASA durch den Enzymverdau mit EndoH entfernt werden können [Sommerlade, 1994]. Das Enzym Endo- β -N-Acetylglucosaminidase H (Endo H) hydrolysiert alle mannosereichen Oligosaccharide (auch mit Corefukosylierung), vorausgesetzt sie haben folgende Struktur: Man α 1-3Man α 1-6Man β 1-4GlcNAc [Foddy, 1986]. Das Fehlen des Man α 1-3 Restes an Man α 1-6 ist ein Charakteristikum komplexer Zucker (und einiger weniger Zuckerstrukturen des hybriden Typs), weshalb geschlussfolgert wurde, dass max. 10 % der Oligosaccharide der ASA vom komplexen bzw. hybriden Typus sind. Nach metabolischer ^{32}P -Markierung konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung auf die Oligosaccharidseitenketten der Glykosylierungsstellen 1 und 3 beschränkt ist [Sommerlade, 1994]. In einer anderen Arbeit wird beschrieben, dass eine ASA-Mutante, die nur die Glykosylierungsstelle 2 enthält, korrekt gefaltet und z.T. auch ins Lysosom transportiert wird. Der Transport ins Lysosom impliziert die Phosphorylierung an der Glykosylierungsstelle 2. Dieser Befund deutete auf eine hohe Flexibilität der Phosphotransferase hin. Möglicherweise ist die Phosphorylierung der Oligosaccharide an G2 weniger effizient als die an G1 bzw. G3 [Gieselmann, 1992]. Cantor und Kornfeld (1992) konnten zeigen, dass für die Bindung der UDP-N-Acetylglucosamin: lysosomales Enzym-N-Acetylglucosamin-1-Phosphotransferase (kurz: Phosphotransferase) an das lysosomale Glykoprotein Cathepsin D eine Erkennungsstelle im Protein ausreicht, um Oligosaccharide an verschiedenen Stellen im Protein zu phosphorylieren. Es ist aber auch denkbar, dass die Glykosylierungsstelle 1 der ASA zuerst phosphoryliert wird und dadurch eine weitere Phosphorylierung an G2 aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Glykosylierungsstellen behindert ist. Bei der Betrachtung der vorliegenden Daten scheint es auch möglich, dass alle drei Glykosylierungsstellen der

ASA phosphoryliert werden und der Grad der gefunden Phosphorylierung von den Kultivierungsbedingungen der Zellen und der Art der Aufarbeitung des Proteins abhängt.

Abbildung 22 zeigt das Fluoreszenzgrundprofil der Glykosylierungsstelle 1 (G1) der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde. Die Hauptstrukturen sind mannosereiche Oligosaccharide. Die Struktur Man₆ hat einen Anteil von fast 50 %, die Strukturen Man₅-/Man₆- und Man₇ haben zusammen genommen einen Anteil von >85 % an der Glykosylierungsstelle 1. Das MALDI-TOF-MS-Spektrum (Abb. 24) der Oligosaccharide der Glykosylierungsstelle 1 bestätigt diese Strukturen und zeigt eine identische Verteilung. Zusätzlich ist noch ein Massenpeak vorhanden, der einem Glykan vom komplexen Typ zugeordnet werden kann (GlcNAc₄Hex₅Fuc – 1809,6 m/z). Diese Struktur hat einen rechnerischen GU-Wert von 7,57. Bei dieser relativen Elutionszeit ist auch im Fluoreszenzprofil ein Peak detektierbar. Nach Inkubation mit α -L-Fucosidase verringert sich die rel. Elutionszeit dieses Peaks auf 7,23 GU. Diese Verschiebung konnte nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich ist der gesuchte Peak nach Exoglykosidase-Inkubation, und der damit einhergehenden Verringerung des Gesamtsignals, nicht mehr vom Grundlinienrauschen zu unterscheiden, da er anteilig deutlich weniger als 2 % der Oligosaccharide von G1 ausmacht, wie dem Grundprofil zu entnehmen ist. Wegen dieser Unsicherheit wurde dieser Peak als nicht-identifizierbar gewertet.

Dieses Beispiel veranschaulicht ein Problem, das bei der verwendeten Methode auftreten kann. Eine zweifelsfreie Zuordnung der Peaks aus dem Fluoreszenz-Grundprofil ist nur möglich durch die zusätzlichen Informationen, die nach Exoglykosidase-Inkubationen erhalten werden. Signale, die aber im Grundprofil nur einen geringen Anteil am Gesamtsignal ausmachen, sind nach Exoglykosidase-Inkubation schwer zu identifizieren, da sie durch die Verringerung des Signals nach diesem zusätzlichen Schritt schwer nachzuweisen sind oder zusammen mit einem Peak eluieren, dessen Flächenvergrößerung durch die Coelution prozentual gering ausfällt.

Aufgrund dieses Umstands wurde auf eine Bestimmung des Anteils dieser Struktur verzichtet. Stattdessen wurden die fraglichen Peaks in den abgebildeten Tabellen unter der Rubrik: nicht-identifizierte Peaks zusammen gefasst. Sie haben i.d.R. einen Anteil von weniger als 2 %.

Die Glykosylierungsstelle 2 (G2) der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde, zeigt ein anderes

Fluoreszenzprofil. Es dominieren auch hier mannosereiche Glykane die z.T. fukosyliert sind (ca. 15 %). Die Hauptstruktur ist ebenfalls Man₆ mit einem Anteil von ca. 27 %, allerdings hat auch die Oligosaccharidkernstruktur Man₃ einen erheblichen Anteil (ca. 25 %) an den Glykanen von G2.

Die Glykosylierungsstelle 3 (G3) zeigt, verglichen mit G1 und G2, die größte Heterogenität der Oligosaccharide. Hauptstrukturen sind auch hier Man₅- und Man₆, die zusammen ca. 60 % Anteil an den Oligosacchariden der G3 haben. Daneben sind aber auch einige kurzkettige Oligosaccharide nachweisbar (Man₃/Man₄, die z.T. fukosyliert sind). Außerdem wurde eine Struktur gefunden, die aus 2 N-Acetylglukosen und einer Hexose besteht. Sie hat einen Anteil von >12 % an G3. Sie kann nicht durch die Biosynthese bzw. Prozessierung der N-Glykane erklärt werden.

Nach Einwirken der α -Mannosidase I des cis-Golgi und der α -Mannosidase II-Aktivität des medialen Golgi entsteht ein Oligosaccharid mit fünf Mannoseresten, das nach Übertragung einer N-Acetylglukoseeinheit um zwei weitere Mannosereste verkürzt wird, so dass eine Oligosaccharidstruktur erzeugt wird, die aus insgesamt 3 N-Acetylglukosen und 3 Mannosen besteht. Diese Struktur ist Substrat für eine Fukosyltransferase und eine N-Acetylglukosetransferase des medialen Golgi und ist somit die Oligosaccharidstruktur, die die geringste Anzahl an Monomeren trägt [Lehmann, 1998]. Die nachgewiesene Struktur von 2 N-Acetylglukosen und einer Hexose kann deshalb nur als Degradationsprodukt nach der Golgi-Prozessierung erklärt werden.

Lysosomale Glykoproteine erhalten an der Man₈-Struktur, die in den cis-Golgi eintritt ein Phosphatsignal an einem oder an zwei Mannoseresten und sind dadurch gegen die weitere Prozessierung durch Mannosidasen geschützt. Lysosomale Glykoproteine mit mehreren N-Glykosylierungsstellen können an einer Glykosylierungsstelle phosphoryliert werden, wodurch das lysosomale targeting bereits eingeleitet ist. Bis das Glykoprotein aber von einem Mannosephosphatrezeptor im trans-Golgi Netzwerk gebunden wird, können die anderen Glykosylierungsstellen weiter prozessiert werden, d.h. an einem lysosomalen Protein können sowohl mannosereiche phosphorylierte, als auch komplexe Oligosaccharide auftreten [Fukuda, 1993]. Es wurden auch hybride Strukturen beschrieben, die an einem Ast des Oligosaccharidbaums M6P und am anderen komplexe Oligosaccharide tragen [von Figura, 1986].

Das MALDI-TOF-MS-Spektrum der Glykosylierungsstelle 3 der ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK Zellen affinitätsgereinigt wurde, zeigt im

MALDI-TOF-Massenspektrum (Abb. 30) einen Peak bei 917,4 m/z, der wahrscheinlich für die Struktur GlcNAc₂Man₂F steht. Diese Struktur kann ebenfalls nicht durch die Prozessierung in ER und Golgi erklärt werden. Die gefundenen Strukturen sind wahrscheinlich Produkt lysosomaler Degradation oder Degradation im Medium nach Sezernierung des Glykoproteins.

Die Frage, wie es überhaupt zur sog. Mikroheterogenität von Glykoproteinen kommt, wird i.d.R. durch den sich verzweigenden, komplizierten Biosyntheseweg der N-Glykane erklärt. Verschiedene Strukturen repräsentieren verschiedene Stufen dieses Prozessierungsweges, bei dem einige Glykoproteine in der Lage sind, der vollständigen Prozessierung der N-Glykane zu entgehen, indem sie den Weg vorzeitig verlassen [Lehmann, 1998].

Die Gründe dafür können artifiziell sein. Oftmals wird bei den Kultivierungsbedingungen der Glykoprotein-produzierenden Zellen wenig Augenmerk auf die Vitalität der Zellen gelegt. Zugunsten der Ausbeute werden die Zellen lange in Kultur gehalten und das Medium wird erst gewechselt, wenn einige Zellen bereits abgestorben oder lysiert sind. Dadurch können Glykoproteine freigesetzt werden, die am Anfang des Biosyntheseweges der Oligosaccharide stehen. Es können aber auch Glykosidasen freigesetzt werden, die die Oligosaccharide der sezernierten Glykoproteine degradieren [Gramer, 1994; Warner, 1993].

Die freigesetzten Glykosidasen sind wahrscheinlich lysosomalen Ursprungs, können aber auch aus dem Zytoplasma der lysierten Zellen stammen. Für einige Glykosidasen wurden zytosolische und sogar Golgi-lokalisierte Varianten beschrieben (z.B. β -Galaktosidase, Sialidase) [Conzelmann, 1987]. Im Überstand von CHO-Zellen wurden Glykosidasen gefunden, die in einem sehr breiten pH-Bereich Aktivität zeigen [Gramer, 1993]. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist, dass es sich bei den Glykosidasen im Zellüberstand um ein Gemisch aus lysosomalen und zytosolischen Enzymen handelt.

Der Vergleich der Oligosaccharide der ASA-Chargen, die beide aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen aufgereinigt wurde, die aber entweder in Zellkulturschalen oder in einem Bioreaktor kultiviert wurden zeigt, dass die Kultivierungsbedingungen einen enormen Einfluss auf das Glykosylierungsmuster haben. Bemerkenswert ist der Befund, dass phosphorylierte Oligosaccharide nur an der ASA nachgewiesen werden konnten, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen aufgereinigt wurde, die in einem Bioreaktor kultiviert wurden. Nur bei der

Glykosylierungsstelle 3 dieser ASA-Charge ist nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase eine Verschiebung der Peaks im Vergleich zum Grundprofil erkennbar. Die fehlende Phosphorylierung bei der ASA, die in BHK-Zellen produziert wurde ist auch deshalb bemerkenswert, weil die verwendete BHK-Zelllinie zur ASA-Produktion cotransfiziert ist mit der cDNA der hArylsulfatase A (hASA) und der des Mannosephosphatrezeptors 46 (MPR46). Es wurde gezeigt, dass im Medium dieser Zellen eine deutlich höhere Konzentration an ASA nachweisbar ist als bei Verwendung einer BHK-Zelllinie, die allein mit ASA-cDNA transfiziert wurde. Es wird daher angenommen, dass ein Anteil der produzierten ASA nicht ins Lysosom geleitet, sondern direkt aus der Zelle ausgeschleust wird [Chao, 1990]. Diese Annahme zieht den Schluss nach sich, dass diese ASA phosphoryliert die Zelle verlässt und demnach erst im Medium dephosphoryliert wird.

5.3 Enzymaktivitäten im Medium von kultivierten Zellen

Die Überlegung, dass die ASA die Zelle phosphoryliert verlässt und erst im Medium dephosphoryliert wird, war Anlass dazu, im Medium der verwendeten Zelllinien die Aktivitäten von verschiedenen Oligosaccharid-modifizierenden Enzymen zu bestimmen. Dazu wurde während der Kultivierungszeit der Zellen täglich eine Mediumsprobe abgenommen und die Aktivität der Arylsulfatase A, Phosphatase, β -Galaktosidase, α -D-Sialidase, α -L-Fukosidase und α -Mannosidase bestimmt. Die Aktivität der Enzyme wurde bei dem im Medium gemessenen pH Wert bestimmt.

Alle diese Enzyme haben in den Medien der verschiedenen Zellen nachweisbare Aktivitäten. Die Enzymaktivitäten steigen mit der Dauer der Kultivierungszeit. Die Ursache dafür ist zum einen, dass der pH-Wert im Laufe der Kultivierung absinkt und man sich sozusagen dem pH-Optimum der Enzyme nähert. Andererseits steigen die Aktivitäten der untersuchten Enzyme weiter an, nachdem der pH Wert sich auf einen Minimalwert eingependelt hat. Das spricht dafür, dass durch die vermehrte Zelllyse lysosomale und zytosolische Enzyme ins Medium gelangen. Insbesondere im Medium der CHO-Zellen wurden z.T. sehr hohe Enzymaktivitäten gemessen. Umgerechnet bedeutet beispielsweise die Phosphatase-Aktivität von 1 unit/l, dass 60 mg ASA/min*1 dephosphoryliert werden können (bei einem Phosphorylierungsgrad von 100 %). Bei den erhaltenen Konzentrationen der ASA von max. 5 mg/l und einer Standzeit von mindestens drei Tagen

bis zur Ernte, ist es somit sehr wahrscheinlich, dass die ASA im Zellkulturmedium komplett dephosphoryliert wird.

Oligosaccharide werden zwar im hydrophilen Milieu auf der Oberfläche des Glykoproteins präsentiert und sollten somit gut zugänglich für Enzyme sein, die gemessenen Enzymaktivitäten werfen aber die Frage auf, in wieweit die Oligosaccharide bzw. die Phosphatgruppe des M6P der ASA tatsächlich als Substrat für die Enzyme fungieren können. Um diese Frage zu beantworten, wurde ASA, die nachweislich phosphoryliert ist (aus CHO-Zellen, die im Bioreaktor kultiviert wurden (vergl. Tab 4)), für 12 h im Medium inkubiert, in dem 8 Tage lang CHO-Zellen kultiviert wurden. Diese ASA war im Gegensatz zur Ausgangs-ASA nicht mehr in der Lage am Mannosephosphatrezeptor-Konstrukt zu binden.

Ein anderer Befund deutet darauf hin, dass nicht nur die Phosphatase sondern auch die Mannosidase die Oligosaccharide der ASA im Medium unter den Kultivierungsbedingungen der Zellen als Substrat akzeptiert:

Die ASA, die aus dem Medium von CHO-Zellen affinitätsgereinigt wurde, die in Zellkulturschalen kultiviert wurden, zeigte die kürzesten Oligosaccharidseitenketten. Die um den Faktor 16 gesteigerte Aktivität der α -Mannosidase im Medium von CHO-Zellen im Vergleich zum Medium von BHK-Zellen liefert einen guten Hinweis darauf, dass die Aktivitäten der Glykosidasen im Medium ursächlich für die Degradation der Oligosaccharide sind.

In einer anderen Arbeit, in der die Glykosylierung der ASA analysiert wurde, wurden ausschließlich mannosereiche Oligosaccharide gefunden, die z.T. fukosyliert sind. Die untersuchte ASA wurde aus humaner Plazenta isoliert, weshalb das Glykosylierungsmuster nicht mit den vorgenannten Arbeiten vergleichbar ist. Die Analyse wurde nicht seitenspezifisch durchgeführt. Gefunden wurden sehr kurze z.T. fukosylierte Oligosaccharidstrukturen (Man_4 , Man_3F) bis hin zu mannosereichen längeren Strukturen, die ebenfalls z.T. fukosyliert sind (Man_8 , Man_7F) [Hoja-Lukowicz, 2000].

Besonders der Befund der kurzen fukosylierten Oligosaccharide vom mannosereichen Typ ist schwer zu erklären. Die Fukosyltransferase ist ein Enzym des medialen Golgi und überträgt Fukose ausschließlich auf Oligosaccharide vom komplexen oder hybriden Typ [Kornfeld, 1985]; sie benötigt mindestens ein β 1,2GlcNAc-Rest an der α 1,3 verknüpften Mannose der Kernstruktur. Es konnte aber gezeigt werden, dass in einer GlcNAc-Transferase I defizienten CHO-Zelllinie, die nicht in der Lage ist komplexe oder hybride

Asn-gebundene Oligosaccharide zu synthetisieren, kernfukosylierte Oligosaccharide nachweisbar sind. Die Fukosyltransferase hat zu kurzen mannosereichen Oligosacchariden eine 10-20 fach verringerte Affinität, verglichen mit komplexen Oligosacchariden, so dass kurze fukosylierte Strukturen in CHO wt Zellen deutlich unterrepräsentiert sein sollten, da die Fukosyltransferase mit der GlcNAc Transferase I um das Substrat konkurriert. Tatsächlich konnten in CHO wt Zellen diese Strukturen nicht nachgewiesen werden. Auch die Möglichkeit einer Degradation der Oligosaccharide nach der Modifikation durch die GlcNAc-Transferase, Fukosylierung und anschließender Degradation durch eine β -Hexosaminidase wird diskutiert. Diese kann entweder lumenaler Natur sein oder durch Zelllyse bei der Aufarbeitung in Kontakt mit den Glykoproteinen gekommen sein [Lin, 1994].

Auch bei einigen anderen lysosomalen Enzymen wurden Fukosylierungen der Asn-gebundenen N-Acetylglukose an mannosereichen Oligosacchariden beschrieben (Cathepsin B und H [Taniguchi, 1985], Cathepsin D [Takahshi, 1983], β -Glucuronidase [Howard, 1982], α -Mannosidase [Kozutsumi, 1986].

Alle diese Enzyme haben einen hohen Anteil an mannosereichen langkettigen Oligosacchariden (Man₆-Man₉), aber nur Man₅- oder kürzere Strukturen sind fukosyliert.

In der Arbeit zur Oligosaccharidanalytik der ASA, isoliert aus humaner Plazenta [Hoja-Lukowicz, 2000] wurde zum ersten Mal von mannosereichen fukosylierten Oligosacchariden der Länge Man₆ und Man₇ berichtet. Die Autoren postulieren zwei Möglichkeiten: 1. Man₈- und Man₉-Strukturen werden noch im ER fukosyliert, anschließend phosphoryliert und zum Lysosom geleitet. Das würde bedeuten, dass ER- α 1,2-Mannosidase und die α 1,6-Fukosyltransferase um das gleiche Substrat konkurrieren oder 2. die Golgi- α 1,2-Mannosidase I ist erst im medialen Golgi aktiv und die α 1,6-Fukosyltransferase im cis Golgi. Diese würde die in den cis Golgi eintretende Man₈-Struktur fukosylieren, die anschließend phosphoryliert und zum Lysosom geleitet wird. Dadurch würde das Glykoprotein für weitere Modifikationen der Oligosaccharide durch prozessierende Enzyme im Golgi-Apparat nicht mehr zur Verfügung stehen.

Bei beiden möglichen Wegen kann die beobachtete fukosylierte Man₆-Struktur aber nicht als Degradationsprodukt fukosylierter bzw. komplexer Strukturen gesehen werden, da diese nicht so viele Mannosereste tragen.

Die detektierten kurzen fukosylierten Strukturen (Man₃₋₅F) können ebenfalls durch die Konkurrenz von α 1,6-Fukosyltransferase und α 1,2-Mannosidase I im ER erklärt werden. Die Möglichkeit, der Degradation durch lysosomale Enzyme, die sich an die beschriebenen

Prozesse der Fukosyltransferase auf mannosereiche Oligosaccharide anschließt, wird von den Autoren ebenfalls diskutiert.

Nicht verwunderlich ist, dass bei der zitierten Arbeit nur mannosereiche und keine geladenen (phosphorylierten, sialisierten) Oligosaccharide detektiert wurden. Die Analytik der Oligosaccharide beschränkte sich auf die MALDI-TOF-MS Messung nach einem Verdau der ASA auf der Western Blot Membran mit PNGaseF. Die Oligosaccharide wurden anschließend mit Kationen- und Anionenaustauschern aufgereinigt. Bei diesem Reinigungsschema werden geladene Oligosaccharide abgereichert. Ein MALDI-TOF-Massenspektrum wurde nur im positiven Ionenmodus aufgenommen, indem phosphorylierte Strukturen kaum nachzuweisen sind [Klemm, 2004]. Darüber hinaus war die verwendete Auswahl an Exoglykosidasen unvollständig (α -Fukosidase, α -Mannosidase, β -N-Acetylglucosaminidase). Trotz dieser Kritikpunkte zeigen die Ergebnisse, dass die Asn-gebundenen mannosereichen Oligosaccharide der Länge Man₇₋₈ der ASA der α 1,6-Fukosyltransferase als Substrat dienen können. Kurzkettige mannosereiche fukosylierte Strukturen können somit als Abbauprodukt von fukosylierten hybriden, komplexen oder mannosereichen Oligosacchariden betrachtet werden.

5.4 Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf das Glykosylierungsmuster der hASA

Es ist bekannt, dass die Kultivierungsbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung der Protein-gebundenen Oligosaccharide haben. Es wurde gezeigt, dass ein Glukosemangel im Kultivierungsmedium von BHK-21 Zellen das Verhältnis von glykosyliertem/deglykosyliertem Interleukin-MU33 erniedrigt [Gawlitzeck, 1995].

Es wird vermutet, dass das unterschiedliche Glykosylierungsmuster des Proteins: tissue plasminogen Activator (t-PA), das von zwei Gruppen unabhängig voneinander in CHO-Zellen produziert wurde, sowohl durch unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen der Zellen, als auch durch unterschiedliche Aufarbeitungs- und Analyseprotokolle, bzw. mit der Degradation der Oligosaccharide nach der Sezernierung des Proteins zu erklären ist [Gramer, 1993; Parekh, 1989; Spellman, 1989].

Durch die Gabe von 10 mM Ammoniumchlorid zum Medium von Plasmazellen konnte die Sialyltransferase des distalen Golgi komplett inhibiert werden. Die untersuchten Immunglobuline dieser Zellen wurden sekretiert, zeigten aber keine Sialisierung der

Oligosaccharidseitenketten. Es wird vermutet, dass dieser Effekt auf die Erhöhung des pH Wertes der intrazellulären Kompartimente (trans-/distal-Golgi) zurückzuführen ist [Thorens, 1986]. In einer anderen Untersuchung wurde der Gehalt an Ammoniumchlorid im Medium von CHO-Zellen während der Kultivierung auf 15 mM erhöht. Es zeigte sich ein um 40 % geringerer Gehalt an terminalen Galaktose- und Sialinsäureresten. In dieser Studie wurden aber auch β -Galaktosidase- und Sialidaseaktivitäten im Medium nachgewiesen, so dass auch die Möglichkeit der Degradation der endständigen Zucker nicht ausgeschlossen werden kann [Gawlitzeck, 2000].

Aber auch die verwendete Zelllinie hat einen entscheidenden Einfluss auf die Oligosaccharidzusammensetzung. Es ist bekannt, dass CHO-Zellen keine α 2,6-Sialyltransferase besitzen, wodurch ausschließlich α 2,3-verbundene terminale Sialinsäuren zu erwarten sind [Lee, 1989]. Außerdem besitzen CHO-Zellen keine α 1,3-Fukosyltransferase (periphere α 1,3Fuc-GlcNAc sind beispielsweise ein bekanntes Motiv des humanen Thyroid-Stimulations-Hormons (TSH)) [Potvin, 1990] und sind nicht in der Lage GalNAc zu sulfatieren (eine Modifikation, die bei versch. Glykoprotein-Hormonen gefunden wurde) [Smith, 1992]. Hinsichtlich der Übereinstimmung des Glykosylierungsapparates mit humanen Zelllinien sind andere Zelllinien nicht so genau untersucht. Mauszelllinien sind in der Lage sulfatierte Zucker zu synthetisieren und besitzen, wie humane Zelllinien, eine α 2,3- und α 2,6-Sialyltransferase [Pfeiffer, 1992]. Sie besitzen aber ein zusätzliches α 1,3-Galaktosyltransferase-Gen, wodurch Oligosaccharide erzeugt werden können, die im Menschen als potentielle Antigene wirken können [Joziase, 1992].

Allerdings wird auch die Verwendung von immortalisierten humanen Zelllinien bzw. humanen Tumorzelllinien zur Glykoproteinproduktion als problematisch gesehen, da eine Veränderung des Glykosylierungsmusters im Vergleich zum Wildtyp dieser Zellen festgestellt wurde [Alhadeff, 1989; Sell, 1990; Yamashita, 1989].

Oftmals wird versucht, durch die Verwendung genetisch veränderter Zelllinien eine höhere Homogenität der Oligosaccharide zu erreichen. Beispielsweise wurde in CHO-Zellen die α 2,3-Sialyltransferase überexprimiert, was zu einem Gehalt von >90 % endständiger Sialinsäure an den Oligosaccharidseitenketten der sekretierten Glykoproteine führte. Die hochgradig sialisierten Glykoproteine zeigten eine signifikant höhere Verweildauer im Serum eines Kaninchenmodells für Pharmakokinetiken [Weikert, 1999].

Ein generelles Problem ist, dass bei der Produktionszelllinie i.d.R. die ausgewählt wird, die die größte Konzentration des gewünschten Proteins erzeugt. Dadurch kann es zu Überexpressionseffekten kommen, die sich darin ausdrücken, dass der Glykosylierungsapparat der Zelle nicht mehr in der Lage ist, die Oligosaccharide vollständig zu synthetisieren bzw. zu trimmen. Als Resultat werden Glykoproteine mit veränderter Mikroheterogenität erhalten [Hahn, 1992]. Die Kombination von Überexpression und Mediumsmangelbedingungen kann sogar zu einer Veränderung der Makroheterogenität (Glykosylierungsstellen werden nicht benutzt) der Oligosaccharide führen [Jenkins, 1994].

Die analysierte ASA, die in der vorgelegten Arbeit ein Glykoprotein repräsentiert, das im industriellen Maßstab hergestellt wurde, war ein Geschenk der Firma Zymenex. Leider ist wenig über die Kultivierungsbedingungen bekannt, außer dass die Zellen, die das rekombinante Enzym produzieren in einem Bioreaktor kultiviert wurden. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass die Zellen, im Gegensatz zur Kultivierung in Petrischalen, bei einem konstanten pH Wert gehalten wurden. Bei diesem pH Wert, der üblicherweise zwischen pH 7 und pH 7,5 liegt, haben lysosomale Enzyme eine deutlich geringere Aktivität als bei den pH Werten, die bei der Ernte im Medium von CHO-Zellen, die in Petrischalen kultiviert wurden, gemessen wurden (bis pH 5,95). Beispielsweise reduzieren sich die Aktivitäten der β -Galaktosidase und die der β -Hexosaminidase bei einer Erhöhung des pH Wertes von pH 6 auf pH 7 um 50% [Gramer, 1993]. Zur industriellen Produktion rekombinanter Proteine werden Perfusionsbioreaktoren oder Hohlfaser-Module eingesetzt. Bei beiden Systemen sind die Zellen auf einem Zellkulturträger immobilisiert. In einem Perfusionsbioreaktor wird aufgrund der hohen Zelldichte die Perfusionsrate üblicherweise so eingestellt, dass pro Tag ein Reaktorvolumen getauscht wird. Im Falle des Hohlfaser-Moduls werden die Zellen mit Medium überströmt, das nach dem Durchlaufen des Moduls mit dem Zielprotein angereichert ist. Bei beiden Verfahren wird das Medium anschließend sofort gekühlt bzw. aufgearbeitet [Ryll, 1990].

Bei der Produktion der ASA mit Zellen, die auf Zellkulturschalen wachsen, wurde das Medium zweimal pro Woche getauscht. Das geerntete Medium wurde anschließend umgehend aufgearbeitet, allerdings sind die Verweilzeiten der sezernierten Proteine im konditionierten Medium deutlich länger, als bei den Bioreaktorsystemen.

Säugerzellen besitzen endogene Glykosidasen [Conzelmann, 1987], die nach Freisetzung ins Kultivierungsmedium für die Heterogenität der Oligosaccharidseitenketten verantwortlich sein können. Die Aktivitäten der folgenden Enzyme konnten im Überstand von CHO-Zellen gemessen werden: Sialidase, β -Galaktosidase, β -Hexosaminidase und Fukosidase. Bei einem pH-Wert im Medium von pH 7 wurden z.T. noch bemerkenswerte Restaktivitäten (Fukosidase 90 %, Sialidase 50 %, (bezogen auf die Aktivität bei pH 5,5)) gemessen [Gramer, 1993]. In wieweit freigesetzte Enzyme für die beobachtete Heterogenität der Glykoproteine, die aus dem Medium von Zellen aufgereinigt werden, verantwortlich sind, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Aus dem Medium von CHO-Zellen wurde eine α -L-Fukosidase isoliert, die ein pH-Optimum im Bereich um pH 5 hat. Diese Fukosidase war in der Lage auch bei pH 7 Fukose von den Oligosacchariden 3-Fukosyllaktose, Fuc- α 1,6-GlcNAc und von den isolierten Oligosaccharide von gp120 zu hydrolysieren. Eine Fukosehydrolyse der intakten Glykoproteinen gp120 und CD4 konnte allerdings nicht beobachtet werden [Gramer, 1994]. Ebenfalls aus dem Medium von CHO Zellen konnte eine lösliche Sialidase isoliert werden, die eine Reihe Sialinsäure-konjugierter Substrate degradieren kann, darunter Glykoproteine, Oligosaccharide und Ganglioside [Warner, 1993].

In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Oligosaccharide der ASA den zuckermodifizierenden Enzymen, die im Medium von kultivierten Zellen nachgewiesen werden konnten, als Substrat dienen können. Nach der Inkubation von ASA, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK-Zellen affinitätsgereinigt wurde in von CHO-Zellen konditioniertem Medium, zeigte sich eine deutliche Verkürzung der Oligosaccharidseitenketten gegenüber der Kontrolle (Abb. 55 A/B). Die Hauptstruktur verkürzte sich von Man₆ auf Man₁. Fukosereste waren nicht mehr nachweisbar. Als Kontrolle wurde dieselbe ASA-Charge in frischem Zellkulturmedium inkubiert. Dabei zeigte sich keine Verkürzung der Oligosaccharidketten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ASA, die nachgewiesenermaßen phosphorylierte Oligosaccharide trägt in konditioniertem Zellkulturmedium dephosphoryliert wird. Die im konditionierten Medium inkubierte ASA war nicht mehr in der Lage an das MPR300 Konstrukt zu binden (vergl. Abb. 59). Allerdings war auch die Bindungsmenge der Kontroll-ASA (inkubiert in unkonditioniertem Medium mit 1,5 % FKS) geringer im Vergleich zu völlig unbehandelter phosphorylierter ASA (Abb. 58). Ursache dafür könnte die Basalaktivität von Phosphatasen in mit FKS-supplementiertem Medium sein. Diese Befunde belegen

dennoch, dass die Oligosaccharide der ASA, nach der Sezernierung des Glykoproteins, durch im Zellkulturmedium vorhandene Glykosidasen degradiert werden.

Die Konsequenz der Befunde, dass die Oligosaccharide eines Glykoproteins je nach Kultivierungsbedingungen und Wahl der Produktionszelllinien eine große Varianz aufweisen ist, dass bei der Produktion eines Glykoproteins Augenmerk darauf zu legen ist, dass:

- der Produktions- und Aufarbeitungsprozesse standardisiert werden,
- direkt nach der Ernte Enzyme inaktiviert werden (beispielsweise durch Kühlung oder Salzfällung),
- der pH Wert während der Produktion konstant gehalten wird,
- die Zellen derart kultiviert werden, dass sie möglichst nicht lysieren (Erntezeiträume verkürzen).

Ein anderer Ansatz zur Erhöhung der Produkthomogenität ist die Zugabe von Inhibitoren zum Zellkulturmedium. Günstig sind Inhibitoren, die verhindern, dass die äußeren Strukturen der Oligosaccharide enzymatisch angegriffen werden wodurch die komplette Oligosaccharidstruktur geschützt ist (Bsp. Deoxyneuraminsäure, M6P). Möglich ist auch Antikörper gegen Glykosidasen oder Substrate bzw. Substratanaloga auf Säulen zu immobilisieren über die das Zellkulturmedium gepumpt wird, wodurch die Enzyme aus dem Medium entfernt werden. Eine Möglichkeit Sialinsäure auf einer festen Säulenphase zu immobilisieren ist beschrieben in van Dessel, 1984. Diese Säulen können in regelmäßigen Abständen erhitzt werden, wodurch die Enzyme inaktiviert werden.

Ebenfalls beschrieben ist die Verwendung von Glykosidase knock out Zelllinien bzw. Zelllinien mit verminderten Glykosidaseaktivitäten zur Produktion von Glykoproteinen [Gramer, 1995] oder Zelllinien, die durch RNA Interferenz den level der Glykosidasen reduzieren [Ngantung, 2006]. Die zitierten Arbeiten zielen auf die Aktivität der Sialidase, da die Sialinsäure als endständiger Zucker von besonderer Bedeutung für die Stabilität der Oligosaccharide ist. In beiden Arbeiten konnte der Anteil der Sialinsäure an Oligosacchariden der Glykoproteine erhöht werden.

5.5 Glykosylierungsmuster von lysosomaler CHO-hASA

In der vorliegenden Arbeit wurde auch das Glykosylierungsmuster der ASA untersucht, die aus hASA überexprimierenden CHO Zellen gereinigt wurde (s. Kap. 4.5). Diese Analytik wurde nicht seitenspezifisch durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Oligosaccharide dieser ASA sehr kurz sind. Fast 50 % der Glykane bestehen nur noch aus einem N-Acetylglukosemonomer und der Fukosylierungsgrad ist sehr gering (ca. 2 %). Dieser Befund spricht deutlich für lysosomale Degradation. Die Oligosaccharide von Glykoproteinen werden im Lysosom bidirektional, also gleichzeitig vom reduzierenden und nicht-reduzierenden Ende abgebaut [Abraham, 1983]. Der erste Schritt der lysosomalen Degradation der Oligosaccharide vom nicht-reduzierenden Ende ist die Entfernung aller Fukosereste durch die lysosomale α -L-Fukosidase [Johnson, 1991]. Der gefundene geringe Fukosylierungsgrad spricht dafür, dass die aufgereinigte ASA größtenteils aus dem Lysosom aufgereinigt und die Degradation der Oligosaccharide bereits eingeleitet wurde. Die nächsten Schritte der Degradation sind der sukzessive Abbau der Oligosaccharide vom nicht-reduzierenden Ende durch lysosomale Exoglykosidasen. Durch die Abspaltung der Fukose ist auch die direkte Hydrolyse der Asparagin-N-Acetylglucosamin-Bindung durch die Glycosylasparaginase möglich. Dieses Enzym spaltet die innere N-Acetylglucose aber nur, wenn das Protein soweit degradiert ist, das am Asparagin freie α -Amino und α -Carboxygruppen sind [Aronson, 1999]. Das bedeutet, dass keine komplette deglykosylierte ASA zu erwarten ist. Die gefundenen kurzen Strukturen sprechen für intensive lysosomale Degradation durch α -L-Fukosidase, α -Mannosidase, β -Mannosidase und β -Hexosaminidase.

5.6 Bindung von ASA an MPR300

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden stabil transfizierte BHK Zellen generiert, die ein Konstrukt des humanen insuline-like growth factor II Receptors (synonym: Mannosephosphatrezeptor - MPR 300) auf der Zelloberfläche überexprimieren und nicht zur Internalisierung des Rezeptors in der Lage sind.

Dass die Signalbindungsstelle für die Internalisierung des MPR 300 im mittleren Bereich der zytoplasmatischen Domäne liegt, konnte schon kurz nach der Klonierung des

Rezeptors gezeigt werden [Lobel, 1989]. Später wurde gezeigt, dass die Sequenz Tyr-Lys-Tyr-Ser-Lys-Val in Position 24-29 des 163 Aminosäure langen zytoplasmatischen Bereiches für die Signalbindung verantwortlich ist. Diese Sequenz findet sich in der zytoplasmatischen Domäne einer Vielzahl Membran-gebundener Rezeptoren, die ebenfalls zur schnellen Internalisierung fähig sind [Canfield, 1991]. Der Aminosäureaustausch des Tyr24 durch eine nicht-aromatische Aminosäure führt bereits zu einem Rezeptor, der Liganden mit gleicher Affinität wie der wtMPR bindet aber bei dem keine Internalisierung mehr nachweisbar ist [Jadot, 1992]. Bei dem, für die vorliegende Arbeit generierten Konstrukt wurde ein Stoppsignal hinter den Membrananker der Transmembrandomäne vor der Aminosäure 24 der zytoplasmatischen Domäne eingefügt. Mit der damit stabil transfizierten Zelllinie wurden Bindungsstudien von ASA durchgeführt. Diese Versuche zeigen, dass die Bindung mit Mannose-6-Phosphat kompetitierbar ist (Abb. 57). Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die Bindung spezifisch für phosphorylierte Mannose ist. Dephosphorylierte ASA konnte nicht an die Zellen binden (Abb. 58).

Nach diesen Versuchen, die die Art der Bindung charakterisieren, wurden die unterschiedlichen ASA-Chargen, die hinsichtlich ihrer Oligosaccharidzusammensetzung analysiert wurden, in unterschiedlichen Mengen auf den Zellen inkubiert. Die gebundene ASA-Menge wurde enzymatisch bestimmt. Es zeigte sich, dass die ASA-Chargen, für die bei der Oligosaccharidanalytik keine Mannosephosphorylierung nachgewiesen wurde, auch nicht an den Zellen binden können. Dieser Befund bestätigt die durchgeführte Oligosaccharidanalytik hinsichtlich der Mannosephosphorylierung.

Nur die ASA-Charge, die aus dem Medium von hASA überexprimierenden CHO-Zellen gereinigt wurde, die in einem Bioreaktor kultiviert wurden, konnte an die Zellen binden. Für eine dicht bewachsene 10 cm Schale reichte eine ASA Menge von ca. 2 µg zur Rezeptorsättigung aus. Die Auftragsmenge, die für eine halbmaximale Rezeptorsättigung nötig ist wurde zu 1,2 µg bestimmt. Unter Berücksichtigung eines bei der Oligosaccharidanalytik gemessenen Phosphorylierungsgrades von 20 % (vergl. Tab. 4) ergibt sich damit eine Dissoziationskonstante K_D von $2 * 10^{-9}$ mol/l.

Die Dissoziationskonstanten für Man-6-Phosphat und für mannosereiche Oligosaccharide mit zwei Phosphomonoestern vom Mannosephosphatrezeptor unterscheiden sich deutlich: M6P hat eine K_D von $7 * 10^{-6}$ M. Mannosereiche Oligosaccharide mit zwei Phosphomonoestern haben eine K_D von $2 * 10^{-9}$ M [Tong, 1989].

Die gemessene K_D von $2 * 10^{-9}$ M deutet daraufhin, dass der überwiegende Teil der phosphorylierten ASA zwei Phosphomonoester trägt.

5.7 Bestimmung des Formylglycin-/Cystein-Verhältnis hASA durch MALDI-TOF-MS

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurde das Verhältnis von Cystein zu Formylglycin an Aminosäureposition 69 bei ASA-Chargen mit unterschiedlicher spezifischer Aktivität massenspektrometrisch detektiert. Die entwickelte Methode erlaubt die einfache und schnelle Bestimmung des Modifizierungsgrades des Cys 69 der ASA.

Alle Cysteine der ASA wurden vor dem tryptischen Verdau aus zwei Gründen reduziert und alkyliert. Zum einen wird dadurch die Qualität des tryptischen Verdau stark verbessert, zum anderen erhält man dadurch eine größere Distanz im Massenspektrum des Peaks 1730,807 m/z, der zu dem tryptischen Peptid 371-384 nach zyklischer Desaminierung des N-terminalen Glutamins zu pyro-Glutamat gehört zu dem Peak 1731,842 m/z, der das Peptid 59-73 mit unmodifiziertem Cystein repräsentiert.

Das tryptische Peptid 371-384 (1747,8 m/z) ist der dominierende Peak in einem MALDI-TOF-MS Spektrum tryptisch verdauter hASA. Kleinste Mengen dieses Peptids sind massenspektrometrisch und auch per UV Detektion gut nachweisbar. Dieses Peptid ist in allen HPLC-Fraktionen zu finden, die die gesuchten Peptide enthalten mit FGly und Cys-Cam. Aus diesem Grund war es nicht möglich das FGly-/Cys-Verhältnis aus der Integration der UV-Peaks im Chromatogramm zu bestimmen.

Für die Edman-Sequenzierung ist es erforderlich, dass das Peptid mit FGly von dem mit Cys-Cam vollständig getrennt ist. Das Problem dabei ist die strukturelle Ähnlichkeit der beiden Analyten. Die Hydrophobizität ist nahezu identisch, da sie sich nur in der funktionellen Gruppe einer Aminosäure unterscheiden. Wenn die Trennung auf der RP Chromatographiesäule nicht vollständig ist, erhält man verfälschte Werte beim Edman-Sequenzieren, da man nicht bis zur modifizierten Aminosäure sequenzieren kann, da C-terminal vorher ein Prolin liegt, an dem die Sequenzierung abbricht. Nach der Bestätigung der richtigen Sequenz der ersten Zyklen, werden also die Peaks vergleichbarer Zyklen ins Verhältnis gesetzt.

Für die analysierten ASA Proben wurden per MALDI-TOF-MS FGly-/Cys-Verhältnisse bestimmt, die von 0,03 (Probe 1) bis 0,11 (Probe 5) reichen. Dies entspricht einem Modifizierungsgrad des Cysteins 69 zu FGly von 3 bis 11 %.

Die Edman Sequenzierung lieferte Werte des FGly-/Cys- Verhältnisses von 0,1 (Probe 1) bis 2,1 (Probe 5). Das entspricht einem Modifizierungsgrad des Cysteins 69 zu FGly von 10 bis 67 %.

Das vorgestellte MALDI-TOF-Verfahren hat den Nachteil, dass es nicht quantitativ ist. Es ist aber wesentlich schneller als der Edman Abbau, da die HPLC Trennung nicht nötig ist und es ist sehr gut geeignet um unterschiedliche ASA-Chargen miteinander zu Vergleichen. Die mittels MALDI-TOF-MS gemessenen Werte für das FGly-/Cys-Verhältnis korrelieren gut mit der spezifischen Aktivität der verschiedenen hASA-Chargen, die untersucht wurden (Abb. 64).

6 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Oligosaccharidseitenketten der drei N-Glykosylierungsstellen der hASA unterschiedlich strukturiert sind. Die Oligosaccharidstrukturen sind überwiegend vom mannosereichen Typ und z.T. fukosyliert. Sie unterscheiden sich hinsichtlich der Anzahl der Mannoseeinheiten und dem Fukosylierungsgrad. Eine Phosphorylierung konnte nur an Glykosylierungsstelle 3 (N350) nachgewiesen werden. Der Anteil an hybriden oder komplexen Oligosaccharidstrukturen liegt unter 5 %.

Die Arbeitsergebnisse zeigen weiterhin, dass die verwendete Zelllinie zur Produktion der hASA einen entscheidenden Einfluss auf das Glykosylierungsmuster des Glykoproteins hat. Die ASA wurde aus dem Medium von hASA überexprimierenden BHK, CHO und HT1080 Zellen aufgereinigt. Die Oligosaccharide unterscheiden sich in dem Fukosylierungsgrad und der Länge der Strukturen. Sie sind überwiegend vom mannosereichen Typ.

Der Vergleich der Oligosaccharide von zwei hASA-Chargen, die beide in CHO-Zellen produziert wurden, die aber entweder in einem Bioreaktor oder in Zellkulturschalen kultiviert wurden, zeigt, dass die Kultivierungsbedingungen das Glykosylierungsmuster stark beeinflussen. Die Oligosaccharide der ASA, die in den CHO-Zellen produziert wurde, die in Zellkulturschalen kultiviert wurden sind extrem verkürzt und zeigen keine Phosphorylierung. In dem Überstand dieser Zellen wurden hohe Aktivitäten an Glykosidasen gemessen, die wahrscheinlich lysosomalen Ursprungs sind. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Prozessierung der Oligosaccharide nach der Sezernierung des Glykoproteins in das Zellkulturmedium nicht abgeschlossen ist.

7 Literaturverzeichnis

Abraham D, Blakemore WF, Jolly RD, Sidebotham R, Winchester B. The catabolism of mammalian glycoproteins. Comparison of the storage products in bovine, feline and human mannosidosis. *Biochem J.* 1983; 215(3): 573-9.

Alhadeff JA. Malignant cell glycoproteins and glycolipids. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1989; 9(1): 37-107.

Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1473(1): 4-8.

Arnold JN, Radcliffe CM, Wormald MR, Royle L, Harvey DJ, Crispin M, Dwek RA, Sim RB, Rudd PM. The Glycosylation of Human Serum IgD and IgE and the Accessibility of Identified Oligomannose Structures for Interaction with Mannan-Binding Lectin1. *J. of Immunology.* 2004; 173: 6831–6840.

Aronson NN Jr. Aspartylglycosaminuria: biochemistry and molecular biology. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1455(2-3): 139-54.

Ashwell G, Harford J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu. Rev. Biochem.* 1982; 51: 531-554.

Baker AD, Engel R. *Organic Chemistry.* 1992; West Publishing Co., St. Paul.

Bause E. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J.* 1983; 209(2): 331-6.

Bergman LW, Kuehl WM. Formation of an intrachain disulfide bond on nascent immunoglobulin light chains. *J Biol Chem.* 1979; 254(18): 8869-76.

Bigge JC, Patel TP, Bruce JA, Goulding PN, Charles SM, Parekh RB. Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid. *Anal Biochem.* 1995; 230(2): 229-38.

Burda P, Jakob CA, Beinhauer J, Hegemann JH, Aebi M. Ordered assembly of the asymmetrically branched lipid-linked oligosaccharide in the endoplasmic reticulum is ensured by the substrate specificity of the individual glycosyltransferases. *Glycobiology.* 1999; 9(6): 617-25.

Canfield WM, Johnson KF, Ye RD, Gregory W, Kornfeld S. Localization of the signal for rapid internalization of the bovine cation-independent mannose 6-phosphate/ insulin-like growth factor-II receptor to amino acids 24-29 of the cytoplasmic tail. *J Biol Chem.* 1991; 266(9): 5682-8.

Cantor AB, Kornfeld S. Phosphorylation of Asn-linked oligosaccharides located at novel sites on the lysosomal enzyme cathepsin D. *J Biol Chem.* 1992; 267(32): 23357-63.

Chao HH, Waheed A, Pohlmann R, Hille A, von Figura K. Mannose 6-phosphate receptor dependent secretion of lysosomal enzymes. *EMBO J.* 1990; 9(11): 3507-13.

- Chen W, Helenius J, Braakman I, Helenius A. Cotranslational folding and calnexin binding during glycoprotein synthesis. *Proc Natl Acad Sci.* 1995; 92(14): 6229-33.
- Chruszcz M, Laidler P, Monkiewicz M, Ortlund E, Lebioda L, Lewinski K. Crystal structure of a covalent intermediate of endogenous human arylsulfatase A. *J Inorg Biochem.* 2003; 96(2-3): 386-92.
- Conzelmann E, Sandhoff K. Glycolipid and glycoprotein degradation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1987; 60: 89-216.
- Cosma MP, Pepe S, Annunziata I, Newbold RF, Grompe M, Parenti G, Ballabio A. The multiple sulfatase deficiency gene encodes an essential and limiting factor for the activity of sulfatases. *Cell.* 2003; 113(4): 445-56.
- Daniels R, Kurowski B, Johnson AE, Hebert DN. N-linked glycans direct the cotranslational folding pathway of influenza hemagglutinin. *Mol Cell.* 2003; 11(1): 79-90.
- Dierks T, Schmidt B, Borissenko LV, Peng J, Preusser A, Mariappan M, von Figura K. Multiple sulfatase deficiency is caused by mutations in the gene encoding the human C(alpha)-formylglycine generating enzyme. *Cell.* 2003; 113(4): 435-44.
- Dierks T. Cysteine-modifying enzyme. *Encyclopedia of Molecular Medicine* (Creighton, T. E., Ed.), 2001; J. Wiley, New York, 974-976.
- Diez-Roux G, Ballabio A. Sulfatases and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005; 6: 355-79.
- Drickamer K. Clearing up glycoprotein hormones. *Cell.* 1991; 67: 1029-32.
- Fassio A, Sitia R. Formation, isomerisation and reduction of disulphide bonds during protein quality control in the endoplasmic reticulum. *Histochem Cell Biol.* 2002; 117(2): 151-7.
- Feizi T, Childs RA. Carbohydrates as antigenic determinants of glycoproteins. *Biochem. J.* 1987; 245: 1-11.
- Ferro V, Fewings K, Palermo MC, Li C. Large-scale preparation of the oligosaccharide phosphate fraction of *Pichia holstii* NRRL Y-2448 phosphomannan for use in the manufacture of PI-88. *Carbohydrate Research.* 2001; 332: 183-9.
- Fischer G, Jatzkewitz H. The activator of cerebroside sulphatase. Binding studies with enzyme and substrate demonstrating the detergent function of the activator protein. *Biochim Biophys Acta.* 1977; 481(2): 561-72.
- Foddy L, Feeney J, Hughes RC. Properties of baby-hamster kidney (BHK) cells treated with Swainsonine, an inhibitor of glycoprotein processing. Comparison with ricin-resistant BHK-cell mutants. *Biochem J.* 1986; 233(3): 697-706.
- Fukuda M, Kobata A. *Glycobiology – A Practical Approach.* 1993; Oxford University Press, Oxford.

- Gawlitzeck M, Ryll T, Lofgren J, Sliwkowski MB. Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: degradative versus biosynthetic mechanisms. *Biotechnol Bioeng.* 2000; 68(6): 637-46.
- Gawlitzeck M, Conradt HS, Wagner R. Effect of different cell culture conditions on the polypeptide integrity and N-glycosylation of a recombinant model protein. *Biotech Bioeng.* 1995; 46: 536-544.
- Gieselmann V, Schmidt B, von Figura K. In vitro mutagenesis of potential N-glycosylation sites of arylsulfatase A. Effects on glycosylation, phosphorylation, and intracellular sorting. *J Biol Chem.* 1992; 267(19): 13262-6.
- Gramer MJ, Goochee CF. Glycosidase activities in Chinese hamster ovary cell lysate and cell culture supernatant. *Biotechnol Prog.* 1993; 9(4): 366-73.
- Gramer MJ, Goochee CF, Chock VY, Brousseau DT, Sliwkowski MB. Removal of sialic acid from a glycoprotein in CHO cell culture supernatant by action of an extracellular CHO cell sialidase. *Biotechnol.* 1995; 13(7): 692-8.
- Gramer MJ, Schaffer DV, Sliwkowski MB, Goochee CF. Purification and characterization of alpha-L-fucosidase from Chinese hamster ovary cell culture supernatant, *Glycobiology.* 1994; 4(5): 611-6.
- Green ED, Adelt A, Baenzinger JU. The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz ¹H NMR spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 1988; 34(5): 18253-68.
- Guile GR, Rudd PM, Wing DR, Prime SB, Dwek RA. A rapid high-resolution high-performance liquid chromatographic method for separating glycan mixtures and analyzing oligosaccharide profiles. *Anal. Biochem.* 1996; 240: 210-26.
- Hahn TJ, Goochee CF. Growth-associated glycosylation of transferrin secreted by HepG2 cells. *J Biol Chem.* 1992; 267(33): 23982-7.
- Harvey D. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Carbohydrates. *Mass Spectrometry Reviews.* 1999; 18: 349-451.
- Hasilik A, von Figura K. Oligosaccharides in lysosomal enzymes. Distribution of high-mannose and complex oligosaccharides in cathepsin D and beta-hexosaminidase. *Eur J Biochem.* 1981, 121(1), 125-29.
- Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998; 67: 425-79.
- Hirschberg CB, Snider MD. Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem.* 1987; 56: 63-87.
- Hoflack B, Fujimoto K, Kornfeld S. The interaction of phosphorylated oligosaccharides and lysosomal enzymes with bovine liver cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem.* 1987; 262(1): 123-29.

- Hoflack, B., Kornfeld, S. Purification and characterization of a cationdependent mannose 6-phosphate receptor from murine P388D1 macrophages and bovine liver. *J Biol Chem.* 1985; 260(22): 12008-14.
- Hoja-Lukowicz D, Ciolczyk D, Bergquist J, Litynska A, Laidler. High-mannose-type oligosaccharides from human placental arylsulfatase A are core fucosylated as confirmed by MALDI MS. *Glycobiology.* 2000;10(6): 551-7.
- Hopwood JJ, Ballabio A. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Valle, D., and Sly, W. S., eds). 2001; McGraw-Hill, New York: 3725-3732.
- Howard DR, Natowicz M, Baenziger JU. Structural studies of the endoglycosidase H-resistant oligosaccharides present on human beta-glucuronidase. *J Biol Chem.* 1982; 257(18): 10861-8.
- Imperiali B, Shannon KL, Rickert KW. Role of peptide conformation in asparagine-linked glycosylation. *J. Am. Chem. Soc.* 1992, 114: 7944.
- Jatzkewitz H, Mehl E, Sandhoff K. Blocks in the catabolism of sulphatides and gangliosides as a cause of human neurological diseases. *Biochem J.* 1970;117(2): 6P-8P.
- Jadot M, Canfield WM, Gregory W, Kornfeld S. Characterization of the signal for rapid internalization of the bovine mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor-II receptor. *J Biol Chem.* 1992; 267(16): 11069-77.
- Jarosch E, Taxis C, Volkwein C, Bordallo J, Finley D, Wolf DH, Sommer T. Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol.* 2002; 4(2): 134-9.
- Jenkins N, Curling MA. Glycosylation of recombinant proteins: problems and prospects, *Enzyme Microb Technol.* 1994; 16(5): 354-64.
- Johnson SW, Alhadeff JA. Mammalian alpha-L-fucosidases. *Comp Biochem Physiol B.* 1991; 99(3): 479-88.
- Joziase DH, Shaper NL, Kim D, Van den Eijnden DH, Shaper JH. Murine alpha 1,3-galactosyltransferase. A single gene locus specifies four isoforms of the enzyme by alternative splicing. *J Biol Chem.* 1992; 267(8): 5534-41.
- Kawasaki N, Ohta M, Hyuga S, Hashimoto O, Hayakawa T. Analysis of carbohydrate heterogeneity in a glycoprotein using liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 1999; 269: 297-303.
- Kelleher DJ, Karaoglu D, Gilmore R. Large-scale isolation of dolichol-linked oligosaccharides with homogeneous oligosaccharide structures: determination of steady-state dolichol-linked oligosaccharide compositions. *Glycobiology.* 2001; 11(4): 321-33.

Kiess W, Thomas CL, Greenstein LA, Lee L, Sklar MM, Rechler MM, Sahagian GG, Nissley SP. Insulin-like growth factor-II (IGF-II) inhibits both the cellular uptake of beta-galactosidase and the binding of beta-galactosidase to purified IGF-II/mannose 6-phosphate receptor. *J Biol Chem.* 1989; 264(8): 4710-4.

Klemm C, Schroder S, Gluckmann M, Beyermann M, Krause E. Derivatization of phosphorylated peptides with S- and N-nucleophiles for enhanced ionization efficiency in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2004; 18(22): 2697-705.

Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem.* 1985; 54: 631-64.

Kornfeld S, Mellman I. The biogenesis of lysosomes. *Annu Rev Cell Biol.* 1989; 5: 483-525.

Kozutsumi Y, Nakao Y, Teramura T, Kawasaki T, Yamashina I, Mutsaers JH, van Halbeek H, Vliegthart JF. Structures of oligomannoside chains of alpha-mannosidase from porcine kidney. *J Biochem.* 1986; 99(4) :1253-65.

Le Borgne, R., Alconada, A., Bauer, U., Hoflack, B. The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J Biol Chem.* 1998; 273: 29451-61.

Lee EU, Roth J, Paulson JC. Alteration of terminal glycosylation sequences on N-linked oligosaccharides of Chinese hamster ovary cells by expression of beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase. *J Biol Chem.* 1989; 264(23): 13848-55.

Lehmann J. Carbohydrates – Structure and Biology. 1998, Georg Thieme Verlag, Stuttgart-New York.

Lin AI, Philipsberg GA, Haltiwanger RS. Core fucosylation of high-mannose-type oligosaccharides in GlcNAc transferase I-deficient (Lec1) CHO cells. *Glycobiology.* 1994; 4(6): 895-901.

Lobel P, Dahms NM, Kornfeld S. Cloning and sequence analysis of the cation-independent mannose 6-phosphat receptor. *J Biol Chem.* 1988; 253: 2563-2570.

Lobel P, Fujimoto K, Ye RD, Griffiths G, Kornfeld S. Mutations in the cytoplasmic domain of the 275 kd mannose 6-phosphate receptor differentially alter lysosomal enzyme sorting and endocytosis. *Cell.* 1989; 57(5): 787-96.

Lodish et al. *Molecular Cell Biology.* 2000, 4th Edition, Freeman, New York.

Lucore CL, Fry ET, Nachowiak BA, Sobel BE. Biochemical determinants of clearance of tissue-type plasminogen activator from the circulation. *Circulation.* 1988; 77: 906-914.

Lukatela G, Krauss N, Theis K, Selmer T, Gieselmann V, von Figura K, Saenger W. 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.* 1998; 37(11): 3654-64.

Martersteck CM, Kerdersha NL, Drapp DA, Tsui TG, Colley KJ. Unique α 2-8-polysialylated glycoproteins in breast cancer and leukemia cells. *Glycobiology* 1996; 6: 289-301.

Moremen KW, Trimble RB, Herscovics A. Glycosidases of the asparagine-linked oligosaccharide processing pathway. *Glycobiology*. 1994; 4(2): 113-125.

Morgan DO, Edman JC, Standring DN, Fried VA, Smith MC, Roth RA, Rutter WJ. Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature*. 1987; 329: 301-7.

Ngantung FA, Miller PG, Brushett FR, Tang GL, Wang DI. RNA interference of sialidase improves glycoprotein sialic acid content consistency. *Biotechnol Bioeng*. 2006; 95(1): 106-19.

Oshima A, Nolan CM, Kyle JW, Grubb JH, Sly WS. The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Cloning and sequence of the full-length cDNA and expression of functional receptor in COS cells. *J Biol Chem*. 1988; 263(5): 2553-62.

Parekh RB, Dwek RA, Rudd PM, Thomas JR, Rademacher TW, Warren T, Wun TC, Hebert B, Reitz B, Palmier M. N-glycosylation and in vitro enzymatic activity of human recombinant tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells and a murine cell line. *Biochemistry*. 1989; 28(19): 7670-9.

Petrescu AJ, Milac AL, Petrescu SM, Dwek RA, Wormald M. Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites: implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology*. 2004; 14(2): 103-14.

Pfeiffer G, Strube KH, Geyer R. Biosynthesis of sulfated glycoprotein-N-glycans present in recombinant human tissue plasminogen activator. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; 189(3): 1681-5.

Plempner RK, Bohmler S, Bordallo J, Sommer T, Wolf DH. Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature*. 1997; 388: 891-5.

Pohlmann R, Waheed A, Hasilik A, von Figura K. Synthesis of phosphorylated recognition marker in lysosomal enzymes is located in the cis part of Golgi apparatus. *J Biol Chem*. 1982; 257(10): 5323-5.

Pohlmann R, Nagel G, Schmidt B, Stein M, Lorkowski G, Krentler C, Cully J, Meyer HE, Grzeschik KH, Mersmann G, Hasilik A, von Figura K. Cloning of a cDNA encoding the human cation-dependent mannose 6-phosphate receptor: Cloning, expression, and homology to the 215 kd mannose 6-phosphate receptor. *Cell*. 1987; 50: 81-185.

Potvin B, Kumar R, Howard DR, Stanley P. Transfection of a human alpha-(1,3) fucosyltransferase gene into Chinese hamster ovary cells. Complications arise from activation of endogenous alpha-(1,3) fucosyltransferases. *J Biol Chem*. 1990; 265(3): 1615-22.

Rommerskirch W, von Figura K. Multiple sulfatase deficiency: catalytically inactive sulfatases are expressed from retrovirally introduced sulfatase cDNAs. *Proc Natl Acad Sci*. 1992; 89(7): 2561-5.

Ryll T, Lucki-Lange M, Jager V, Wagner R. Production of recombinant human interleukin-2 with BHK cells in a hollow fibre and a stirred tank reactor with protein-free medium. *J Biotechnol.* 1990; 14(3-4): 377-92.

Sahagian GG, Distler J, Jourdian GW. Characterization of a membrane-associated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl residues of bovine testicular beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci.* 1981; 78(7); 4289-93.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 1989; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schauer R. Sialic acids and their role as biological masks. *Trends Biochem. Sci.* 1985; 10: 357-360.

Schmidt B, Selmer T, Ingendoh A, von Figura K. A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell.* 1995; 82(2): 271-8.

Sell S. Cancer-associated carbohydrates identified by monoclonal antibodies. *Hum. Pathol.* 1990; 21: 1257-1263.

Smith PL, Skelton TP, Fiete D, Dharmesh SM, Beranek MC, MacPhail L, Broze GJ Jr, Baenziger JU. The asparagine-linked oligosaccharides on tissue factor pathway inhibitor terminate with SO₄-4GalNAc beta 1, 4GlcNAc beta 1,2 Mana alpha. *J Biol Chem.* 1992; 267(27): 19140-6.

Sommerlade HJ, Selmer T, Ingendoh A, Gieselmann V, von Figura K, Neifer K, Schmidt B. Glycosylation and phosphorylation of arylsulfatase A. *J Biol Chem.* 1994; 269(33): 20977-81.

Spellman MW, Basa LJ, Leonard CK, Chakel JA, O'Connor JV, Wilson S, van Halbeek H. Carbohydrate structures of human tissue plasminogen activator expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1989; 264(24): 14100-11.

Spiro RG. Processing enzymes involved in the deglycosilation of N-linked oligosaccharides of glycoproteins: glucosidase I and II and endomannosidase. *Carbohydrates in Chemistry and Biology* (Ernst B., Hart G. W. and Sinay P. eds.); Wiley, Weinheim: 65-79.

Stein C, Gieselmann V, Kreysing J, Schmidt B, Pohlmann R, Waheed A, Meyer HE, O'Brien JS, von Figura K. Cloning and expression of human arylsulfatase A. *J Biol Chem.* 1989; 264(2): 1252-9.

Stein M, Zijderhand-Bleekemolen JE, Geuze H, Hasilik A, von Figura K. Mr 46,000 mannose 6-phosphate specific receptor: its role in targeting of lysosomal enzymes. *Embo J.* 1987; 6(9): 2677-2681.

Storch, S, Braulke T. Transport of lysosomal Enzymes, in *Lysosomes.* 2005; Saftig/Eurekah, Landes Bioscience..

Takahashi T, Schmidt PG, Tang J. Oligosaccharide units of lysosomal cathepsin D from porcine spleen. Amino acid sequence and carbohydrate structure of the glycopeptides. *J Biol Chem.* 1983; 258(5): 2819-30.

Takakusaki Y, Hisayasu S, Hirai Y, Shimada T. 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.* 2005; 16(8): 929-36.

Taniguchi T, Mizuochi T, Towatari T, Katunuma N, Kobata A. Structural studies on the carbohydrate moieties of rat liver cathepsins B and H. *J Biochem.* 1985; 97(3): 973-6.

Taylor SC, Thibault P, Tessier DC, Bergeron JJ, Thomas DY. Glycopeptide specificity of the secretory protein folding sensor UDP-glucose glycoprotein:glucosyltransferase. *EMBO Rep.* 2003; 4(4): 405-11.

Thorens B, Vassalli P. Chloroquine and ammonium chloride prevent terminal glycosylation of immunoglobulins in plasma cells without affecting secretion. *Nature.* 1986; 321 :618-20.

Toda K, Kobayashi T, Goto I, Ohno K, Eto Y, Inui K, Okada S. Lysosulfatide (sulfogalactosylsphingosine) accumulation in tissues from patients with metachromatic leukodystrophy. *J Neurochem.* 1990; 55(5): 1585-91.

Tong PY, Gregory, W, Kornfeld, S. Ligand Interactions of the Cation-independent Mannose 6-Phosphate Receptor. *J Biol Chem.* 1989; 264: 7962-69.

Tong PY, Kornfeld S,
Ligand interactions of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. Comparison with the cation-independent mannose 6-phosphate receptor,
J Biol Chem., 1989, 264(14), 7970-75.

Tong PY, Tollefsen SE, Kornfeld S. The cation-independent mannose 6-phosphate receptor binds insulin-like growth factor. *J Biol Chem.* 1988; 263(6): 2585-8.

Tretter V, Altmann F, Marz L. Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1-3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *Eur J Biochem.* 1991; 199(3): 647-52.

Trombetta ES, Fleming KG, Helenius A. Quaternary and domain structure of glycoprotein processing glucosidase II. *Biochemistry.* 2001; 40(35): 10717-22.

Van Dessel G, De Wolf M, Lagrou A, Hilderson H, Dierick W. Characterization, purification, and subcellular localization of bovine thyroid sialidases. *J Biochem.* 1984; 96(4): 937-47.

Varki A. Diversity in sialic acids. *Glycobiology.* 1992; 2: 25-40.

von Figura K, Gieselmann V, Jaeken J. Metachromatic leukodystrophy. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* 2001; 8th edition. McGraw-Hill, New York: 3695-724.

von Figura K, Hasilik A. Lysosomal enzymes and their receptors. *Annu Rev Biochem.* 1986; 55: 167-93.

von Figura K, Schmidt B, Selmer T, Dierks T. A novel protein modification generating an aldehyde group in sulfatases: its role in catalysis and disease. *BioEssays.* 1998; 20(6): 505-10.

- Wacker M, Linton D, Hitchen PG, Nita-Lazar M, Haslam SM, North SJ, Panico M, Morris HR, Dell A, Wren W, Aebi M. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer into *E. coli*. *Science*. 2002; 298: 1790-3.
- Waheed A, Braulke T, Junghans U, von Figura K. Mannose 6-phosphate/insulin like growth factor II receptor: the two types of ligands bind simultaneously to one receptor at different sites. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988; 152(3): 1248-54.
- Walter J, Urban J, Volkwein C, Sommer T. Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p. *EMBO J*. 2001; 20(12): 3124-31.
- Wang Q, Chang A. Eps1, a novel PDI-related protein involved in ER quality control in yeast. *EMBO J*. 1999; 18(21): 5972-82.
- Warner TG, Chang J, Ferrari J, Harris R, McNerney T, Bennett G, Burnier J, Sliwkowski MB. Isolation and properties of a soluble sialidase from the culture fluid of Chinese hamster ovary cells. *Glycobiology*. 1993; 3(5): 455-63.
- Weerapana E, Imperiali B. Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology*. 2006; 16(6): 91R-101.
- Weikert S, Papac D, Briggs J, Cowfer D, Tom S, Gawlitzek M, Lofgren J, Mehta S, Chisholm V, Modi N, Eppler S, Carroll K, Chamow S, Peers D, Berman P, Krummen L. Engineering Chinese hamster ovary cells to maximize sialic acid content of recombinant glycoproteins. *Nat Biotechnol*. 1999; 17(11): 1116-21.
- Weiss P, Ashwell G. The asialoglycoprotein receptor: properties and modulation by ligand. *Prog Clin Biol Res*. 1989; 300: 169-84.
- Xie Y, Varshavsky A. Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci*. 2000; 97(6): 2497-502.
- Ymashita K, Koide N, Endo T, Iwaki Y, Kobata A. Altered glycosylation of serum transferrin of patients with hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem*. 1989; 264(5): 2415-23.
- Young NM, Brisson JR, Kelly J, Watson DC, Tessier L, Lanthier PH, Jarrell HC, Cadotte N, St Michael F, Aberg Szymanski CM. Structure of the N-linked glycan present on multiple glycoproteins in the Gram-negative bacterium, *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem*. 2002; 277(45): 42530-9.

Erklärung

Hiermit versichere ich, Stephan Schröder, 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, Januar 2008

Stephan Schröder

Veröffentlichungen

Klemm C, Schroder S, Gluckmann M, Beyermann M, Krause E. Derivatization of phosphorylated peptides with S- and N-nucleophiles for enhanced ionization efficiency in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2004; 18(22): 2697-705.

Matzner U, Herbst E, Khalaj Hedayati K, Lüllmann-Rauch R, Wessig C, Schröder S, Eistrup C, Möller C, Fogh J, Gieselmann V. Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. *Human Molecular Genetics*, 2005, 14, 9: 1139-52.

Schröder S, Gieselmann V. Techniques for the site-specific analysis of the oligosaccharide structures of rhASA. Posterpräsentation, 3rd Glycan Forum, Berlin, Feb. 2007.

Schröder S, Matzner U, Mattes F, Gieselmann V. Site-specific analysis of the oligosaccharides of human Arylsulfatase A produced in different cell-lines. *Manuskript in Bearbeitung.*

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. V. Gieselmann für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung. Desweiteren möchte ich mich für sein stetes Interesse und für die ständige Ansprechbarkeit und Hilfsbereitschaft bedanken.

Herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. Sandhoff für die Übernahme des Koreferates, die es mir ermöglicht hat, meine Arbeit in der Medizinischen Fakultät anzufertigen.

Für die Unterstützung bei allen technischen Problemen möchte ich mich besonders bei Herrn Werner Tomberg und Norbert Rösel bedanken.

Der gesamten Besetzung des „Männerlabors“ gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme und für die vielen erheiternden Diskussionen. Besonders hervorheben möchte ich die Herren Yaghootfam und Matzner, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Danken möchte ich allen festangestellten Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden am Institut, die meine Zeit in Bonn auch abseits der Wissenschaft zu einer wichtigen Station für mich gemacht haben.

Gedankt sei meiner Freundin für das Vertrauen das sie in mich setzt.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meinen Eltern, ohne deren bedingungslose Unterstützung diese Arbeit undenkbar gewesen wäre.