

**Strukturelle und molekulare Charakterisierung  
des Asialoglykoprotein-Rezeptors aus humaner Leber**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades

**„Doktor der Naturwissenschaften“**

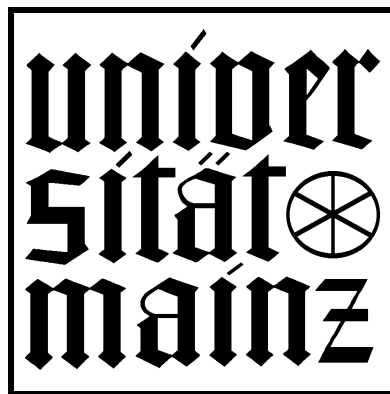
dem Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Johannes Gutenberg - Universität Mainz

vorgelegt von

**Thomas Schreiter**

geboren in Limburg / Lahn

Mainz 2001



Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

19. März 2002

## **Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis.....	1
1. Einleitung.....	4
1.1 Aufbau und Funktion der Leber.....	4
1.2 Ein Rezeptor für Asialoglykoproteine.....	6
1.3 Biosynthese und Heterooligomerisierung des ASGPR.....	7
1.4 Der Endozytose-Zyklus.....	10
1.5 Die funktionellen Abschnitte des Rezeptors.....	12
1.5.1 Der cytoplasmatische Teil.....	13
1.5.2 Das Membran-durchspannende Segment.....	16
1.5.3 Der extrazelluläre Bereich.....	18
1.5.4 Besonderheiten bei H2.....	20
1.6 Die Regulation der Rezeptor-Expression.....	22
1.7 Pathophysiologische und diagnostische Bedeutung des ASGPR.....	25
1.8 Zielsetzung der Arbeit.....	26
2. Material.....	28
2.1 Geräte.....	28
2.2 Verbrauchsmaterial.....	29
2.3 Chemikalien.....	30
2.3.1 Allgemeine Stoffe.....	30
2.3.2 Spezielle Verbindungen.....	31
2.4 Gewebeproben und Patientenserum.....	33
3. Methoden.....	34
3.1 Proteinchemische Methoden.....	34

3.1.1 Präparation des Asialoglykoprotein-Rezeptors aus humaner Leber .....	34
3.1.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	35
3.1.3 Silberfärbung von Proteinen nach der SDS-PAGE .....	36
3.1.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose und ihre Anfärbung.....	37
3.1.5 2D-Elektrophorese.....	38
3.1.6 Umpuffern der ASGPR-Präparation für nachfolgende Modifikationen .....	40
3.1.7 Auftrennung Disulfidbrücken-sensitiver Untereinheiten des ASGPR.....	40
3.1.8 ELISA-Untersuchung der Fraktionen von gebundenen und nicht-gebundenen Untereinheiten .....	41
3.1.9 Größenausschluß-Chromatographie (SEC) des ASGPR und seiner modifizierten Untereinheiten.....	41
3.1.10 Deglykosylierung des ASGPR mit Peptid-N-Glykosidase F ( PNGase F ).....	42
3.1.11 Behandlung des ASGPR mit Exoglykosidasen .....	42
3.1.12 Digoxigenin-Markierung von Asialofetuin .....	42
3.1.13 Laktose-Präzipitation für Western-Blot .....	43
3.1.14 Präparation von rekombinant exprimiertem H1 .....	43
3.1.15 Enzymimmunoassay zur Bestimmung von ASGPR-Antikörpern in humanem Serum.....	44
3.2 Methoden für die Zellkultur.....	45
3.2.1 Kultivierung von adhärennten Zellen.....	45
3.2.2 Kultivierung großer Zellmengen für die Proteingewinnung .....	46
3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	47
3.2.4 Untersuchung der ASGPR-Expression mittels Durchflußzytometrie (FACS).....	47
3.2.5 Lyse von kultivierten Zellen.....	48
3.3 Molekularbiologische Methoden .....	49
3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung linearisierter DNA.....	49
3.3.2 Fest- und Flüssig-Medien für die Bakterienkultur .....	49
3.3.3 Kompetenzinduktion von Bakterien.....	50
3.3.4 Amplifikation eines DNA-Abschnitts mittels PCR.....	51
3.3.5 Restriktionsschnitt von DNA-Proben für die Ligation.....	52
3.3.6 Ligation und Transfektion von chemikompetenten E.coli .....	52
3.3.7 Ausplattieren transfizierter Bakterien und Isolieren von Kolonien für Übernachtskulturen.....	53
3.3.8 Darstellung von DNA im kleinen Maßstab (Mini-Prep).....	54
3.3.9 Überprüfung des korrekten Inserteinbaus mittels Restriktionsverdau und PCR.....	54

3.3.10 Darstellung von DNA in größerem Maßstab (Maxi-Prep).....	55
3.3.11 Transfektion von Säugerzelllinien nach der Calciumphosphatpräzipitationsmethode .....	56
3.3.12 Herstellung und Klonierung einer stabilen, ASGPR-exprimierenden Zelllinie.....	57
4. Ergebnisse .....	58
4.1 Präparation und Charakterisierung des humanen ASGPR aus normaler Leber .....	58
4.2 Charakterisierung des humanen ASGPR aus maligne transformierten Leberzellen .....	64
4.3 Rekombinante Darstellung der Untereinheiten des humanen ASGPR.....	68
4.3.1 Einbau der cDNA der ASGPR-Untereinheiten in einen Vektor .....	68
4.3.2 Transiente Expression beider Untereinheiten in cos7-Zellen .....	70
4.3.3 Stabile Expression beider Untereinheiten in 293-Zellen.....	71
4.4 Nachweis von Antikörpern gegen den ASGPR in Patientenseren mit einer rekombinant exprimierten Untereinheit H1 .....	74
5. Diskussion .....	77
5.1 Betrachtungen zu Präparation und Oligomerisierung des normalen ASGPR .....	77
5.2 Betrachtung der Unterschiede im ASGPR aus maligne transformierten Zellen.....	82
5.3 Betrachtung der rekombinanten Darstellung der Untereinheiten des ASGPR.....	83
5.4 Betrachtungen zum Nachweis von Antikörpern gegen den ASGPR durch rekombinantes H1 .....	85
6. Zusammenfassung .....	88
7. Verzeichnis der Abkürzungen.....	90
8. Verzeichnis der Abbildungen.....	92
9. Literaturverzeichnis.....	94
10. Publikationen.....	102

## **1. Einleitung**

### **1.1 Aufbau und Funktion der Leber**

Die Leber zählt zu den größten Organen des Organismus. Sie besteht zu etwa 70% aus den Leberparenchymzellen oder Hepatozyten. Die meisten der heute bekannten Reaktionen des Intermediärstoffwechsels laufen dort ab. Nach der Nahrungsaufnahme werden die im Magen-Darm-Trakt freigesetzten Nährstoffe, Vitamine und Elektrolyte von ihr aufgenommen und größtenteils gespeichert (sog. Resorptionsphase). Während der nachfolgenden Hungerphase werden die gespeicherten Stoffe in den Blutkreislauf abgegeben und so den anderen Organen zur Deckung ihres Energiebedarfs zur Verfügung gestellt.

Die Leber ist das zentrale Organ der *Glucosehomöostase*. Während der Resorptionsphase werden angelieferte Kohlenhydrate zu Glucose umgewandelt und als Glykogen gespeichert. In der Hungerphase wird durch Glykogenolyse Glykogen zu Glucose hydrolysiert und in die Lebervene abgegeben. Darüberhinaus besitzt die Leber die Fähigkeit zur Gluconeogenese aus Nicht-Kohlenhydraten wie glucogenen Aminosäuren, Glycerin oder Laktat.

Die Leber ist zentrales Organ für den Umbau, Abbau und Aufbau der verschiedensten *Lipide*. Im Verlauf der Resorptionsphase besteht die Hauptfunktion in der Biosynthese von Triacylglyceriden, Phosphoglyceriden und Sphingolipiden aus den vorkommenden Kohlenhydraten und Lipiden sowie im Aufbau und der Sekretion von VLDL-Lipoproteinen. Während der Hungerphase deckt die Leber ihren eigenen Energiebedarf fast vollständig durch Fettsäureoxidation. Zusätzlich werden Fettsäuren in Ketonkörper umgewandelt und für extrahepatische Gewebe in den Blutkreislauf abgegeben. Neben Fettsäuren werden auch HDL- und LDL-Lipoproteine von der Leber abgebaut.

Die Leber ist weiterhin das zentrale Organ des *Aminosäure- und Proteinstoffwechsels*. Durch Verdauung der mit der Nahrung aufgenommenen Proteine entstehen Aminosäuren, die in der Leber durch Desaminierung und Transaminierung in andere Aminosäuren umgewandelt werden und dann der Proteinbiosynthese zur Verfügung stehen. Die Leber synthetisiert eine große Zahl von Proteinen des Blutplasmas, wie z.B. die meisten Blutgerinnungsfaktoren, die Proteine der Fibrinolyse, Proteaseinhibitoren, Transportproteine sowie alle bekannten Akute-Phase-Proteine. Die Hungerphase ist durch eine gesteigerte Proteolyse der extrahepatischen Gewebe gekennzeichnet. Die Leber nimmt die freigesetzten Aminosäuren auf und führt eine Transaminierung durch. Der Kohlenstoffanteil der ketogenen Aminosäuren wird direkt dem Energiestoffwechsel zugeführt, während derjenige der glucogenen Aminosäuren für die in dieser Situation notwendige Gluconeogenese verwendet wird. Der

bei diesen Reaktionen freiwerdende Ammoniak wird durch Umwandlung in Harnstoff unschädlich gemacht und über die Nieren ausgeschieden.

Der *Harnstoffzyklus* ist ausschließlich in den Leberparenchymzellen lokalisiert und dient neben der Entsorgung des Ammoniaks auch zur Regulierung des Säure-Base-Haushalts. Im Verlauf der Harnstoffsynthese werden große Mengen  $\text{HCO}_3^-$  fixiert; beim Abfallen des pH-Wertes im extrazellulären Raum wird die Harnstoffbildung reduziert, damit nicht gebundenes  $\text{HCO}_3^-$  die drohende Acidose korrigieren kann. Der durch die Reduzierung der Harnstoffsynthese mögliche Anstieg der Ammoniak-Konzentration wird dadurch aufgefangen, daß  $\text{NH}_3$  als Glutamin fixiert wird. Die hierfür notwendige Glutaminsynthetase ist nur in einer kleinen perivenösen Zellpopulation des Leberacinus vorhanden (Abb. 1). Dies zeigt den auf höchste Funktionalität ausgerichteten Aufbau der Leberstrukturen. Den Acinus als funktionelle Einheit des Leberparenchyms kann man sich als Wagenrad vorstellen, dessen Nabe die Zentralvene bildet und das in der Peripherie sechs Portalfelder besitzt, die über Hepatozyten-Schichten wie Speichen miteinander verbunden sind.

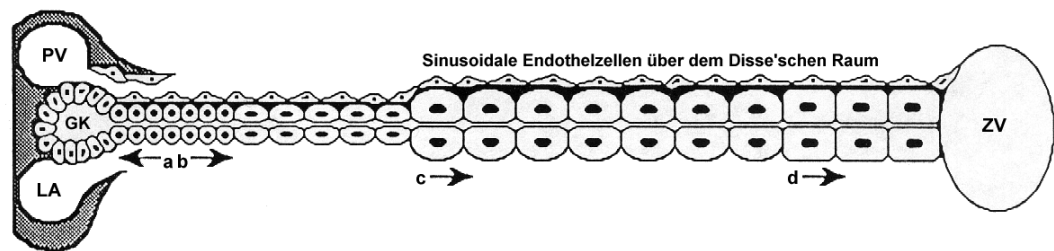


Abb. 1: Modell zum Differenzierungsgrad der Hepatozyten: Ein sog. Portalfeld wird gebildet aus den Verzweigungen der Portalvene (PV), des Gallengangskanals (GK) und der Leberarterie (LA). Die kleinen Zellen zwischen den Parenchymplatten und den Gallengängen werden als Stammzellen postuliert, die sich entweder zu Gallengangszellen (a) oder zu Hepatozyten (b) differenzieren können. In Richtung der Zentralvene (ZV) nimmt der Reifungsgrad der Hepatozyten stetig zu (c), um schließlich die volle Differenzierung zu erreichen (d). Die Nährstoffe werden über die Portalvene aus dem Darmtrakt direkt zur Leber befördert, das verarbeitete Blut verläßt die Leber über die Zentralvene (modifiziert aus Reid et al., 1992).

Eine weitere wichtige Funktion der Leber ist die Durchführung von *Biotransformationsreaktionen*. Hierbei werden apolare, lipophile Verbindungen durch Verknüpfung mit polaren oder geladenen Molekülen in wasserlösliche umgewandelt, um dann ins Plasma oder in die Gallenflüssigkeit abgegeben und über die Nieren oder den Darm ausgeschieden zu werden. Die größte Enzymaktivität für diese Reaktionen befindet sich im glatten Endoplasmatischen Reticulum (ER).

Die Leber nimmt auch ganze Proteine aus dem Plasma auf und führt sie dem *lysosomalen Abbau* zu. Ein hierbei wichtiger Rezeptor, der desialinierte Glykoproteine erkennt und diese internalisiert, wird in dieser Arbeit näher untersucht.

Der Hepatozyt ist eine *hoch polarisierte epitheliale Zelle* (Abb. 2). Die basale Membran wird hier auch sinusoidal genannt. Die apikale Membran umspannt einen Kanal zwischen zwei Hepatozyten, der die Gallenkapillare bildet. Diese sog. biliäre canaliculäre Membran enthält die für die *Gallebildung* wichtigen Transportsysteme. Gallensäuren sind Abbauprodukte des Cholesterin-Stoffwechsels der Hepatozyten und werden in die Gallenflüssigkeit abgegeben. Über den Intestinaltrakt durchlaufen sie zu einem erheblichen Teil einen enterohepatischen Kreislauf. Sie werden Natrium-abhängig durch die sinusoidale Membran wieder aufgenommen und durch die Zelle transportiert.

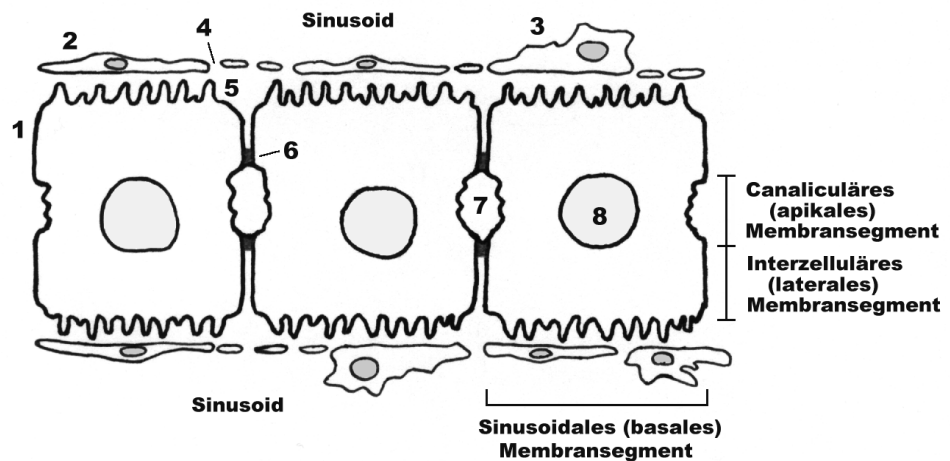


Abb. 2: Aufbau der Hepatozytenstruktur: Die Hepatozyten (1) werden von Endothelgewebe umgeben, das aus den sinusoidalen (2) und den Kupffer-Zellen (3) besteht. Zwischen den Zellen und ihren Ausläufern befinden sich Öffnungen (fenestrae, 4), über die Stoffe aus dem Blutkreislauf in den *Disse'schen Raum* (5) und so zur basalen und lateralen (meistens zu basolateral zusammengefaßt) Membran des Hepatozyten gelangen können. Diese wird durch *tight junctions* (6) undurchlässig von der apikalen Membran abgetrennt. Dadurch wird ein Kanal geformt (7), der den Gallengang bildet. Die apikale Membran wird daher auch canaliculär genannt. (8) stellt den Zellkern dar. Es sei darauf hingewiesen, daß jeder Hepatozyt im Vergleich zur einfachen Epithelzelle *zwei* basale und *zwei* apikale Membranabschnitte besitzt (modifiziert aus Löffler und Petrides, 1997).

In der Canaliculus-Membran existieren zwei Transportsysteme für Gallensäuren, von denen eines durch das Membranpotential angetrieben wird und eines ATP-abhängig ist. Daraus ergibt sich eine Anreicherung der Gallensäuren in der Lebergalle um mehrere Größenordnungen. Die Zunahme der Osmolalität in der primären Gallenflüssigkeit führt dazu, daß Wasser und Elektrolyte passiv nachströmen, wodurch die *Gallensekretion* zustande kommt.

## 1.2 Ein Rezeptor für Asialoglykoproteine

Der Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGPR) wurde ursprünglich bei Studien über den Metabolismus von Serumglykoproteinen entdeckt (Morell et al., 1968). Es wurde beobachtet, daß sie nach Abspaltung der terminalen Sialinsäuren eine drastisch verkürzte Überlebensdauer im Blutkreislauf haben. Ein spezieller



Rezeptor auf Leberzellen konnte für die Entfernung von Asialoglykoproteinen aus dem Umlauf verantwortlich gemacht werden. Die Erkennung verläuft über terminale Galaktose-Moleküle, die nach Abspaltung der Sialinsäuren zugänglich werden. Dieses Phänomen wurde zuerst mit desialinisiertem Ceruloplasmin gezeigt. Die Annahme, daß terminale Galaktose-Einheiten die Erkennungsstruktur für den ASGPR darstellen, wurde durch weitere Experimente bestätigt: Sowohl die Modifikation der Galaktose durch Behandlung von Asialoceruloplasmin mit Galaktose-Oxidase als auch die Abspaltung mit  $\beta$ -Galaktosidase führten zu einer deutlichen Erhöhung der Überlebenszeiten im Kreislauf. Den gleichen Effekt hatte der Wiedereinbau der Sialinsäuren mittels einer Sialyltransferase. Dieses Verhalten wurde danach auch bei vielen anderen sialinisierten Glykoproteinen beobachtet und ließ so ein allgemein gültiges Prinzip zur Entfernung bestimmter Proteine aus dem Blut erkennen.

Die Bindungsaktivität für Asialoglykoproteine wurde später in Membranfraktionen von Rattenleber (Pricer und Ashwell, 1971) und in Detergenz-haltigen Lysaten von Kaninchenleber untersucht (Morell und Scheinberg, 1972). Durch Immobilisierung eines Asialoglykoproteins an einer Sepharose-Matrix konnte der Rezeptor mittels Affinitätschromatographie schließlich in reiner Form gewonnen werden (Hudgin et al., 1974). Es folgten die Bestimmung von chemischen und physikalischen Eigenschaften des Rezeptors aus Kaninchenleber (Kawasaki und Ashwell, 1976) und die Isolierung des ASGPR aus anderen Spezies sowie die Ermittlung von weiteren natürlichen Liganden (Übersichten in Ashwell und Harford, 1982; Harford und Ashwell, 1982). Von Bedeutung waren außerdem die immunologische Bestimmung der *transmembranen* Natur des Rezeptors (Harford und Ashwell, 1981) sowie die Möglichkeit, durch Antikörper gegen den ASGPR die Ligandenbindung zu inhibieren (Harford et al., 1982).

### **1.3 Biosynthese und Heterooligomerisierung des ASGPR**

Die Entdeckung des Rezeptors in der humanen Hepatomzelllinie HepG2 (Schwartz et al., 1981) erlaubte die einfachere Bestimmung von Internalisierungskinetiken (Schwartz et al., 1982) sowie die ausführliche Untersuchung der Biosynthese des humanen ASGPR unter Zellkulturbedingungen (Schwartz und Rup, 1983). Ein polyklonaler Antikörper gegen den ASGPR, der spezifisch die Bindung von  $^{125}\text{J}$ -markiertem ASOR an die Oberfläche von HepG2-Zellen inhibiert, wurde verwendet, um  $^{35}\text{S}$ -markierten Rezeptor zu präzipitieren. Der native Rezeptor erschien mit einem Molekulargewicht von 46kD. Bei Verlaufsexperimenten trat zuerst ein 40kD großer Precursor auf, der mit einer Halbwertszeit von 45min in die endgültige Form überging. Der Precursor war sensitiv gegenüber Endo-H-Behandlung und wurde

resistent zeitgleich mit dem Erscheinen des fertigen 46kD-Rezeptors, was mit der Konvertierung aller High-Mannose-Glykanstrukturen in den Komplex-Typ im Golgi-Apparat zu erklären ist. <sup>3</sup>H-markierte Formen von Galaktose und Glucosamin wurden nach 6-stündiger Inkubation ausschließlich in der endgültigen 46kD-Rezeptorform gefunden, [<sup>3</sup>H]-Mannose sowohl im 46kD-Endprodukt als auch im 40kD-Precursor. Der Rezeptor wurde in Gegenwart von ausreichend Tunicamycin, einem Inhibitor der Protein-Glykosylierung, mit einem Molekulargewicht von 34kD synthetisiert, bei unzureichender Menge an Tunicamycin ergaben sich Zwischenprodukte von 34, 37, 40 und 46kD. Hieraus kann auf zwei Glykosylierungsstellen im nativen Rezeptor geschlossen werden. Neu synthetisierter Rezeptor erschien zuerst nach 30-45min an der Zelloberfläche, nach 90min befand sich die maximale Rezeptoranzahl an der Plasmamembran. Es wurde ausschließlich die 46kD-Form an der Zelloberfläche gefunden, die Halbwertszeit hierfür betrug 45-60min. Nach etwa 20h war die Hälfte der Rezeptor-spezifischen Radioaktivität verschwunden, woraus sich eine mittlere Lebenszeit von 30h errechnete ( $t_{1/2} / \ln 2$ ). Ein Rezeptormolekül kann somit bei hoher Endozytoserate (7,5min für einen Zyklus bei Anwesenheit von 20µg Asialofetuin/ml; Schwartz et al., 1982) etwa 250 Liganden bis zu seinem Abbau in die Zelle befördern. Die Lebenszeit des ASGPR wurde auch durch die Gegenwart von 200µg Asialofetuin/ml nicht beeinflusst. Die Halbwertszeit von neu synthetisiertem ASGPR bis zum Erreichen der Zelloberfläche betrug 45-60min, diejenige bis zur Endo-H-Resistenz (Erreichen des Golgi) wurde ebenfalls auf 45-60min bestimmt, woraus auf raschen Transport vom Golgi-Kompartiment zur Plasmamembran geschlossen werden konnte. Die zeitlichen Abläufe für Synthese und intrazellulären Transport war denen ähnlich, die für Synthese und Sekretion zahlreicher Serumproteine in Ratten- und humanen Hepatom-Zelllinien gefunden wurden.

Die Sequenz der Untereinheit H1 wurde durch Klonierung der cDNA aus einer Gen-Bank der Zelllinie HepG2 ermittelt (Spiess et al., 1985). Es zeigte sich eine Homologie zur analogen Untereinheit RHL-1 des Ratten-ASGPR von 80% (Drickamer et al., 1984). Man fand außerdem eine zweite Untereinheit H2, die bezüglich der Protein-Sequenz eine Homologie von 58% zu H1 aufwies (Spiess und Lodish, 1985). Die Homologie von H2 mit den analogen RHL-2/3 des Ratten-ASGPR wurde auf 67% bestimmt. Die größere Übereinstimmung vergleichbarer Untereinheiten verschiedener Spezies weist darauf hin, daß sich im Verlauf der Evolution die Gene für beide Rezeptor-Untereinheiten bildeten, bevor sich Primaten und Nagetiere trennten.

Nach der Entdeckung einer zweiten Untereinheit wurde auch deren Biosynthese mit einem spezifischen Antikörper in <sup>35</sup>S-markierten HepG2-Zellen untersucht (Bischoff und Lodish, 1987). H2 tauchte zuerst als 43kD großer Precursor mit drei Oligosacchariden vom High-Mannose Typ auf und wurde dann zum 50kD Endprodukt mit ausschließlich Komplex-Typ Glykosylierung prozessiert. Die zeitlichen Abläufe sind denen von H1 ähnlich. Durch Trypsin- und Neuraminidase-Behandlung bei 4 und 12°C konnte

festgestellt werden, dass etwa 50-60% von H1 und H2 an der Zelloberfläche zu finden waren. Weiterhin wurden in 1h bei 37°C alle H2-Moleküle von Neuraminidase desialinisiert, was darauf hinweist, dass auch der intrazelluläre Pool kontinuierlich Zugang zur Zellmembran hat. Für die korrekte Faltung der beiden Untereinheiten im ER sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen notwendig (Lodish et al., 1992).

Der ASGPR aus humaner Leber wird aus zwei Untereinheiten H1 und H2 gebildet, die nicht kovalent miteinander assoziiert sind. Das genaue Verhältnis ist bisher nicht bekannt, es läßt sich auf 4-6:1 schätzen. Die Quervernetzung der Rezeptor-Untereinheiten aus der Ratte führte zu Homooligomeren von RHL-1 und RHL-2/3, die bis zur Größe von Hexameren in Detergenz-haltiger Lösung reichten und der von Trimeren in Membranen (Halberg et al., 1987). Der humane Rezeptor in HepG2-Zellen bildete nach Quervernetzung dagegen nur gemischte Dimere und Trimere aus H1 und H2 (Bischoff et al., 1988). Wenn versucht wurde, den Rezeptor in HepG2-Zellen durch Quervernetzung mit einem Antikörper gegen H1 oder H2 abzubauen, wurden beide Polypeptide immer gemeinsam internalisiert und degradiert (Bischoff et al., 1988). Dies legt nahe, daß beide Untereinheiten in der Zellmembran in heterooligomeren Komplexen assoziiert sind. In ähnlicher Weise präzipitierten peptidspezifische Antiseren gegen RHL-1 oder RHL-2/3 jeweils alle drei Formen des Ratten-ASGPR aus jodinierten Hepatozyten (Sawyer et al., 1988).

Die Verfügbarkeit der cDNA beider Untereinheiten ließ auch die rekombinante Darstellung des humanen ASGPR und die Mutation bestimmter Aminosäuren oder Proteinbereiche zu, um deren Einfluß auf Funktion und Expression des Rezeptors zu untersuchen.

Die rekombinante Expression des kompletten Rezeptors wurde zuerst in Maus-Fibroblasten (Zelllinie NIH3T3) untersucht (Shia und Lodish, 1989). Dabei wurde festgestellt, daß die beiden Untereinheiten unterschiedliche Wege gehen, wenn sie einzeln exprimiert werden. Bei H1 erschien zunächst der 40kD-Prekursor, der nach 5h vollständig in die 46 kD Endform übergegangen war; bei H2 wurde ebenfalls ein 43kD Zwischenprodukt synthetisiert, das aber sofort wieder abgebaut und nicht zum 50kD Endprodukt prozessiert wurde. Wurden H1 und H2 gemeinsam exprimiert, so fand auch bei H2 eine vollständige Glykosylierung und ein Transport zur Zellmembran statt. Durch Einwirkung von Trypsin auf intakte Zellen konnte gezeigt werden, daß etwa 50% beider Untereinheiten membranständig und der andere Teil intrazellulär vorlag. Durch Ligandbindungsassays mit  $^{125}\text{J}$ -markiertem ASOR wurde eine Aufnahme von 274pg ASOR pro mg H1 und H2 transfizierten Zellen gefunden, vergleichbar mit 132pg ASOR pro mg HepG2-Zellen aufgrund der dort geringeren Rezeptorexpression. Nur mit H1 transfizierte Fibroblasten zeigten keine spezifische Bindung von ASOR. H1 benötigte also zur vollständigen Funktionalität die Heterooligomerisierung mit H2, während H2 ohne die Assoziation mit H1 im ER erst gar nicht an die Zellmembran befördert wurde. Endozytose und Recycling von H1 findet dagegen auch ohne die Oligomerisierung mit H2 statt (Geffen et al., 1989). Der Transport vom trans-Golgi Netzwerk zur

Plasmamembran erfolgt wahrscheinlich durch Endosomen und nicht über normale sekretorische Vesikel (Leitinger et al., 1995).

### 1.4 Der Endozytose-Zyklus

Die Rezeptor-vermittelte Endozytose ist ein verbreiteter Mechanismus zur Aufnahme von Makromolekülen in eine Zelle. Der ASGPR diente aufgrund seiner starken Expression als Modellmolekül zur Untersuchung des Ablaufs der Endozytose (Übersichten in Breitfeld et al., 1985 und Spiess, 1990). Es existieren verschiedene Klassen von Endozytose-Rezeptoren: Transzytose-Rezeptoren (z.B. für poly(Ig)) bleiben auf ihrem Weg durch die Epithelzelle an ihren Liganden gebunden, einige Hormon-Rezeptoren (z.B. für EGF) werden mit ihren Liganden zu Lysosomen befördert und dort beide abgebaut.

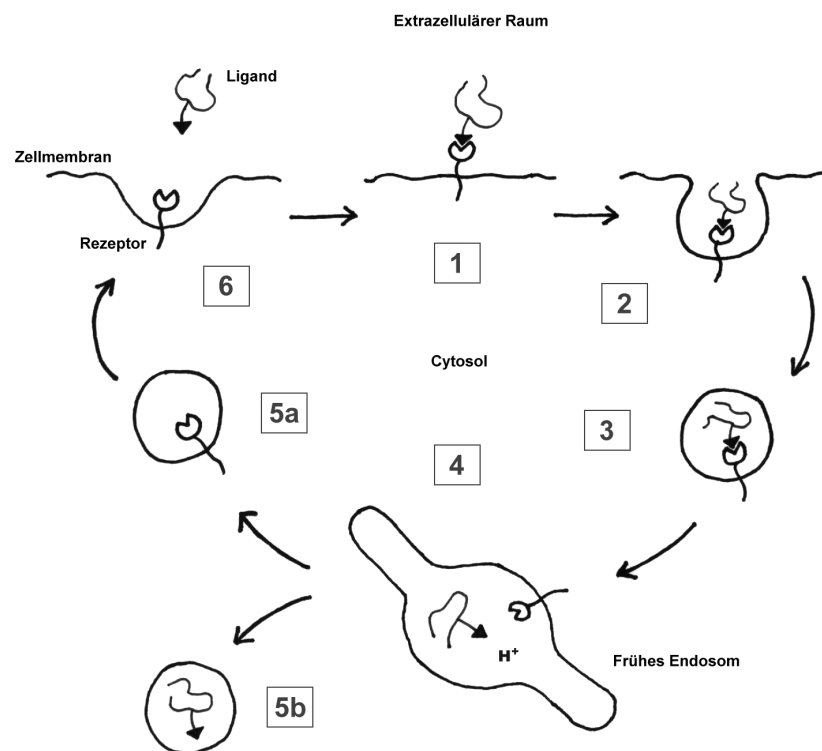


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung des Endozytose-Zyklus: 1) Bindung des Liganden an den Rezeptor, 2) Ansammlung von Rezeptor-Ligand Komplexen in coated pits, 3) Abschnürung von Vesikeln und Transport der Komplexe zum frühen Endosom, 4) Verschmelzung der Vesikel mit dem Endosom und Abspaltung des Liganden durch eine saure Umgebung, 5a) Abspaltung von Vesikeln mit freiem Rezeptor zur Wiederverwendung, 5b) Abspaltung von Vesikeln mit Liganden zum lysosomalen Abbau, 6) Verschmelzung der Recycling-Vesikel mit der Zellmembran

Beim ASGPR sammeln sich die Rezeptor-Moleküle nach der Bindung des Liganden zunächst in Clathrin-beschichteten Vesikeln an, den sog. coated pits, die sich von der Zellmembran abschnüren und ins Cytoplasma wandern. Danach erfolgt eine Verschmelzung der Vesikel mit Endosomen, in denen durch ein saures pH-Milieu die Liganden vom Rezeptor abgespalten werden. Die Liganden werden anschließend dem lysosomalen Abbau zugeführt, während der ASGPR wieder in Vesikeln gesammelt und an die Zellmembran zurücktransportiert wird (Abb. 3).

Bei Messungen der Affinität verschiedener Liganden wurde herausgefunden, daß ein vierfach verzweigtes Oligosaccharid vom Komplex-Typ, wie es im Asialoorosomukoid vorkommt (Abb. 4, nach Kornfeld et al., 1978), die stärkste Bindung an den Rezeptor-Komplex aufweist. Die Affinität der analogen dreifach verzweigten Kohlenhydratstruktur, wie man sie bei Serumproteinen häufig findet, ist nur wenig geringer (Lee et al., 1983; Rice et al., 1990). Synthetische Oligosaccharid-Cluster mit einer größeren Galaktose-Dichte als in natürlichen Liganden führen zu einer vermehrten Anzahl an Bindungsstellen, werden jedoch nicht mit höherer Affinität gebunden (Lee et al., 1984; Hardy et al., 1985). Das absolut notwendige Strukturmerkmal ist eine axiale OH-Gruppe am C4-Atom des terminalen Zuckers (Sarker et al., 1979), daneben konnte gezeigt werden, daß fünf Gruppen eines Galaktopyranosid-Ringes die Fähigkeit besitzen, mit der Rezeptor-Bindungsstelle zu interagieren (Lee et al., 1982).

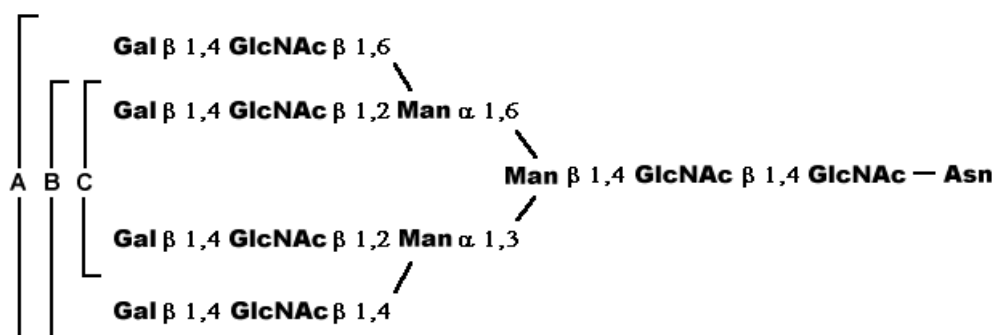


Abb. 4: Aufbau der Kohlenhydrat-Grundstrukturen vom Komplex-Typ (ohne endständige Sialinsäuren): A stellt eine vierfach-, B eine dreifach- und C eine zweifach-verzweigte Seitenkette dar

Die Ausbildung der Clathrin-Beschichtung oder -Polymerisation leitet die Abschnürung von Vesikeln ein. Clathrin wird aus sog. löslichen Triskelionen gebildet, die jeweils aus drei schweren und drei leichten Ketten bestehen und sich auf cytosolischer Seite zu Polyhedralkäfigen zusammenfügen (Pearse, 1987). Sog. Adapter- oder Assembly-Proteine (APs) vermitteln die Interaktion von Rezeptoren mit Clathrin. Es existieren zwei Klassen von APs: AP-1 kommen in Clathrin-beschichteten Membranen vor, die sich vom trans-Golgi abschnüren; AP-2 sind mit den entsprechenden Vesikeln aus Plasmamembranen assoziiert. Der AP-2 Plasmamembran-Komplex ist ein Tetramer, das aus zwei 100kD-Proteinen ( $\alpha$  und  $\beta$ ) sowie zwei kleineren Polypeptiden mit Molekulargewichten von 50kD und 17kD gebildet wird. Die

100kD-Proteine sind für die korrekte Clathrin-Polymerisierung notwendig und interagieren mit dem cytoplasmatischen Teil der Rezeptoren. Sie werden auch Adaptine genannt. Die Mitwirkung von AP-Komplexen bei der Endozytose wurde zuerst beim Mannose-6-phosphat (M6P)-Rezeptor gezeigt: Der cytoplasmatische Teil des M6P-Rezeptors bindet sowohl an AP-1 als auch an AP-2 Komplexe, während dagegen der analoge Bereich des LDL-Rezeptors spezifisch mit dem AP-2 Komplex assoziiert ist. Durch Mutation der zwei relevanten Tyrosine beim M6P-Rezeptor zu nicht-aromatischen Aminosäuren wurde die Bindungsfähigkeit an AP-2 Komplexe, aber nicht an AP-1 Komplexe eliminiert, was auf verschiedene Bindungsstellen für jede Klasse der AP-Komplexe hinweist. Bezüglich des ASGPR konnte gezeigt werden, daß isolierter humaner Rezeptor an ein 100kD-Protein in einer aufgetrennten Präparation von AP-2 Komplexen bindet, bei dem es sich um das  $\beta$ -Adaptin handelt (Beltzer und Spiess, 1991). Mit dem 15-fachen Überschuß eines Fusionsproteins, das die ersten 30 Aminosäuren der Untereinheit H1 enthält, konnte die Rezeptor-Bindung an den AP-2 Komplex um 50% inhibiert werden. Die Notwendigkeit dieser hohen Menge wurde so gedeutet, daß entweder die Konformations- oder Sequenz-Information im Fusionsprotein unzureichend war, oder daß eine mehrfache Rezeptor-Adaptin Wechselwirkung notwendig ist, um eine Bindung mit hoher Affinität zu erhalten. Dies wird durch die Oligomerbildung des ASGPR *in vivo* gewährleistet, während das Fusionsprotein nur als Monomer vorlag.

### **1.5 Die funktionellen Abschnitte des Rezeptors**

Beide humanen Rezeptor-Untereinheiten bestehen aus einem kurzen, cytoplasmatischen Teil von 39-58 Aminosäuren, einem hydrophoben, etwa 20 Aminosäuren umfassenden Membran-durchspannenden Segment und einem großen außerzellulären Bereich von 225-233 Aminosäuren. Eine mögliche Struktur der überwiegend vorhandenen Untereinheit H1 unter Berücksichtigung der Disulfidbrücken ist in Abbildung 5 gezeigt. Dabei wurden auch die beiden Glykosylierungsstellen sowie potentielle Phosphorylierungs-Seitenketten dargestellt. Die Untereinheit H2 besitzt eine Homologie von 58% zu H1 in der Primärstruktur. Die Ausbildung der Disulfidbrücken erfolgt analog zu H1. Es existieren bei H2 außerdem eine dritte Glykosylierungsstelle in der Nähe des C-terminalen Endes und eine Splice-Variante, bei der ein 19aa großes Insertionspeptid hinter Position 22 im cytoplasmatischen Teil eingefügt ist.

1.5.1 Der cytoplasmatische Teil

Im cytoplasmatischen Teil befinden sich die Erkennungssequenzen für die Endozytose und die Sortierung zur basolateralen Membran: Ein Tyrosin-Rest an Position 5 hat entscheidenden Einfluß auf beide Vorgänge. Die Mutation von Tyrosin 5 zu Alanin bewirkt eine Absenkung der Endozytoserate auf ein Viertel, der Austausch zu Phenylalanin verändert sie dagegen nur unwesentlich (Fuhrer et al., 1991). Die beschriebene Phosphorylierung dieses Tyrosinrestes (Fallon, 1990) scheint daher für die Endozytose nicht notwendig. Inhibitoren der Tyrosin-Kinase führten jedoch zu einer Absenkung der Endozytose-Rate (Fallon et al., 1994). Durch Zugabe von Phorbolestern, welche die Aktivität der Protein Kinase C steigern, entstand ein intrazellulärer Pool von Rezeptoren, der vermutlich durch Inhibierung des Rezeptor-Recycling verursacht wurde (Fallon und Schwartz, 1988). Die funktionelle Austauschbarkeit von Tyrosin durch Phenylalanin wurde auch beim Transferrin- und M6P-Rezeptor gezeigt. Das Internalisierungsmotiv des ASGPR weicht zwar vom üblichen, zuerst für den LDL-Rezeptor definierten (NPXY), ab, paßt aber zu einem Motiv, das aus Sequenz-Vergleichen und Mutationsanalysen anderer Rezeptoren (z.B. für Transferrin) abgeleitet wurde: Aromatischer Rest – X – X – großer hydrophober Rest (bei H1: YQDL; Übersicht in Cascato und Spiess, 1996).

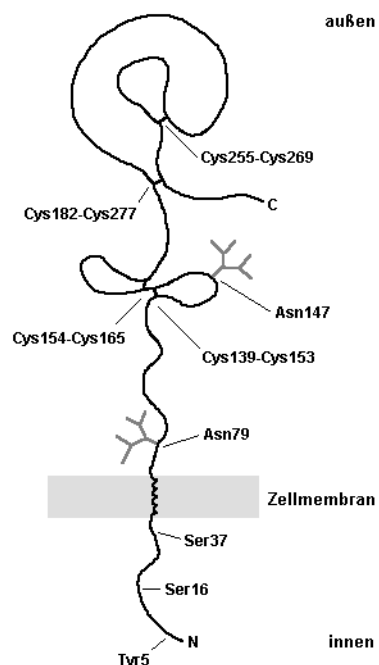


Abb. 5: Modell der Untereinheit H1. Berücksichtigt wurden die Lage der Disulfidbrücken, der Glykosylierungsstellen, potentieller Phosphorylierungs-Seitenketten sowie des Transmembran-segments

Außer Tyrosin können auch Serin-Reste phosphoryliert werden. Die Phosphorylierungsstellen wurden bei Mutanten, deren Serine bis auf eines gegen Alanin oder Glycin ausgetauscht waren, durch transiente Transfektion von *cos7* Zellen identifiziert (Geffen et al., 1991). Es zeigte sich, daß in H1 sowohl Serin 16

als auch Serin 37 potentielle Phosphorylierungsstellen bildeten, in H2 jedoch nur Serin 12. Die Phosphorylierung von H2 war etwa zehn Mal stärker als die von H1, daher mußte bei H1 die Phosphorylierung durch Zugabe von Phorbolestern aktiviert werden. Mutanten, bei denen alle cytoplasmatischen Serin-Reste ausgetauscht waren (in H1 Ser<sup>16</sup>→Gly und Ser<sup>37</sup>→Ala, in H2 Ser<sup>12</sup>→Gly, Ser<sup>13</sup>→Ala und Ser<sup>55</sup>→Ala), wurden stabil in Fibroblasten exprimiert. Bei Zellen, die allein die H1-Mutante exprimierten, zeigte sich keine Veränderung der Rezeptorverteilung zwischen Zellinnern und Zellmembran und auch keine Veränderung der Internalisierungsrate gegenüber einer Zelllinie, die den Wildtyp exprimiert. Bei stabilen Transfektanten, die H1 und H2 ohne cytoplasmatische Serinreste exprimierten, wurden Endozytose- und Degradationsraten von <sup>125</sup>J-ASOR wie bei Wildtyp-exprimierenden Zellen gefunden. Die Notwendigkeit der Phosphorylierung von Serin-Seitenketten für die Endozytose konnte so ausgeschlossen werden.

Neben der Endozytoserate wird auch die basolaterale Oberflächenexpression durch Mutationen in diesem Proteinbereich verändert. Dies wurde in Madine-Darby canine kidney (MDCK) Zellen als Modellsystem untersucht, bei denen polarisierte Expression *in vitro* möglich ist. Die Transfektion mit den heterooligomeren Untereinheiten von Mensch oder Ratte führte jeweils zum korrekten Transport des Rezeptors an die basolaterale Membran (Wessels et al., 1989; Graeve et al., 1990). In ähnlicher Weise ergab die Transfektion von H1 allein eine ausschließlich basolaterale Expression. Der Austausch von Tyrosin 5 zu Alanin führte zu einer gleichmäßigen Verteilung von H1 an der basolateralen und der apikalen Membran, ebenso die Deletion der Aminosäuren 4-11 (Geffen et al., 1993). Pulse-chase Untersuchungen zeigten unpolarierten Transport bereits auf der Ebene des trans-Golgi, was eine Transzytose von einer Oberfläche zur anderen unwahrscheinlich macht. Im Vergleich dazu wurden andere Endozytose-Proteine, denen das Sortierungssignal fehlte, vollständig zur apikalen Membran transportiert. Die bisher identifizierten basolateralen Sortierungssignale sind alle dominant über die apikalen. Es bleibt zu klären, inwieweit die unpolare Sortierung der H1-Mutanten das Ergebnis eines Ausgleichs von schwachen apikalen und basolateralen Signalen war oder der vorbestimmte Weg eines Proteins, dem entscheidende Zieloberflächen-Signale fehlten. Weitere Deletions- und Punktmutationen, die die Internalisierungsrate nicht wesentlich beeinflussten, hatten auch keinen Einfluß auf die basolaterale Expression. Dies zeigt die enge Verwandtschaft zwischen Signalen für Endozytose und basolaterale Sortierung, die auch bei anderen Proteinen gefunden wurde.

Die Koexpression von H1 mit der Tyrosin 5-zu-Alanin Mutation und Wildtyp H2 bewirkte eine ausschließlich basolaterale Sortierung des Rezeptors (Fuhrer et al., 1994). Dies bedeutet, daß H2 Signale für den basolateralen Transport besitzt oder durch die Assoziierung beider Untereinheiten ein solches entsteht. Die Mutation von Phenylalanin 5 in H2 zu Alanin hat dagegen keinen Einfluß auf die basolaterale Expression, was darauf hinweist, daß dieser aromatische Rest anders als bei H1 kein



wesentlicher Bestandteil des Signals ist. Weiterhin wurde ein chimeres Protein aus den zehn aminoterminalen Resten von H2 und dem Rest von H1 in transfizierten Fibroblasten nicht effizient endozytiert. H2 trägt somit wesentlich zur basolateralen Sortierung des heterooligomeren Rezeptor-Komplexes bei, während das Endozytose-Signal ausschließlich in H1 vorhanden ist. Dies wurde unterstützt durch Messung der lateralen Mobilität der Untereinheiten in der Zellmembran (Katzir et al., 1994). Stärkere Wechselwirkung mit den coated pits führt zu einer Absenkung der Mobilität. Es zeigte sich, daß H2 eine höhere Mobilität ohne Oligomerisierung mit H1 aufwies und daß die Mobilität von H1 mit Tyrosin 5-Mutation nach Komplexbildung mit H2 stärker abnahm als die von Wildtyp H1.

Außerdem wurde untersucht, ob das basolaterale Sortierungssignal nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend ist (Übersicht in Cescato und Spiess, 1996). Aminopeptidase N ist ein integrales apikales Oberflächenprotein mit Typ II Orientierung. In MDCK Zellen wird es vom trans-Golgi direkt zur apikalen Oberfläche transportiert, das apikale Sortierungssignal wurde in der außerplasmatischen Region lokalisiert. Ein Fusionsprotein aus dem cytoplasmatischen Teil von H1 und dem Transmembran- und extrazellulären Bereich von Aminopeptidase N (H1-APN) wurde überraschenderweise vollständig zur apikalen Membran transportiert, was nahelegt, daß entweder das cytoplasmatische Sortierungssignal von H1 nicht ausreicht für basolaterale Expression oder rezessiv ist zum apikalen Signal von Aminopeptidase N. Im Gegensatz dazu wurde TFR-APN, ein analoges Fusionsprotein aus den gleichen Bereichen von Aminopeptidase N und dem cytoplasmatischen Teil des Transferrin-Rezeptors, spezifisch zur basolateralen Oberfläche transportiert. Wie der ASGPR ist der Transferrin-Rezeptor ein konstitutiver Transportrezeptor der basolateralen Zellmembran mit einem Tyrosin-abhängigen Endozytosesignal. Die basolaterale Sortierung scheint außerdem eine weitere Determinante zu erfordern, da eine Deletionsmutante von TFR-APN, der das Internalisierungssignal fehlte, immernoch größtenteils zur basolateralen Oberfläche transportiert wurde. Eine andere Erklärung für die apikale Expression von H1-APN wäre der Oligomerisierungsstatus der Fusionsproteine. H1-APN und TFR-APN lagen als Dimere vor wie Aminopeptidase N und der Transferrin-Rezeptor. Im Gegensatz dazu bilden der ASGPR und H1 allein mindestens Trimere. Das Sortierungs-Signal in H1 könnte nur bei einer höheren Valenz funktionieren. Immunfluoreszenz- und biochemische Studien haben außerdem qualitativ gezeigt, daß H1-APN und TFR-APN internalisiert wurden. Der Einfluß des Oligomerisierungsstatus wurde in einer neueren Arbeit untersucht (Renold et al., 2000). Ein Fusionsprotein aus der H1-Signalsequenz und der TM- und exoplasmatischen Domäne von Influenza Neuraminidase lag als Tetramer vor und bewirkte in MDCK-Zellen den vollständigen Transport zur basolateralen Oberfläche. Die Wertigkeit von basolateralen Signalsequenzen leistet demnach einen entscheidenden Beitrag bei der polarisierten Sortierung, sie sind nicht automatisch dominant über apikale Signalsequenzen.

### 1.5.2 Das Membran-durchspannende Segment

Das hydrophobe, Membran-durchspannende Segment dient zum einen der Verankerung des Proteins in der Zellmembran, hat zum anderen aber gleichzeitig die Funktion einer internen Signalsequenz für das *Signal Recognition Particle* (SRP) während der Biosynthese. Nach der Anlagerung des Ribosoms an die mRNA und dem Beginn der Proteinsynthese wird diese gestoppt, sobald das SRP sich an eine entsprechende Sequenz im Protein anlagern kann. Der mRNA-Ribosomen Komplex wandert dann zum ER, wo das SRP an seinen Rezeptor in der ER-Membran andockt und die Translokation des Proteins durch die Membran veranlaßt. Bei integralen Membranproteinen, deren N-Terminus nach außen und C-Terminus nach innen ausgerichtet ist (Typ I), befindet sich die Signalsequenz (18-25 Aminosäuren) am Anfang des Proteins und wird nach Einschleusung in das ER durch eine Peptidase abgespalten. Bei Typ II-Membranproteinen, deren N-terminales Ende ins Cytoplasma und deren C-terminales Ende nach außen gerichtet ist, existiert eine interne Signalsequenz, die nach dem Einbau in die ER-Membran erhalten bleibt und als Membran-Verankerung dient (Abb. 6).

Deletionsmutanten der Untereinheit H1, bei denen die amino-terminale Region bis zu Aminosäure 59 oder nur der Membran-durchspannende Bereich von Rest 34-67 fehlten, wurden bei in vitro-Translationen in einem zellfreien System weder in Mikrosomen eingebaut noch glykosyliert (Spiess und Lodish, 1986). Wurde die aminoternale Region bis AS 67 oder nur der Membran-durchspannende Bereich mit dem C-terminalen Bereich eines cytoplasmatischen Proteins gekoppelt, so erfolgte Einbau und Glykosylierung des Fusionsproteins, was auf die hinreichende Bedeutung dieses Abschnitts hinwies. Darüberhinaus wurde beobachtet, daß ein Teil des letzteren Glykoproteins kleiner war, was auf die Abspaltung des Membran-durchspannenden Segments hindeutete. Dieses wird also wie eine spaltbare Signalsequenz behandelt, sobald es endständig ist. Das gleiche Phänomen wurde beobachtet, wenn die ersten 37 Aminosäuren von H1 deletiert wurden (Schmid und Spiess, 1988). Die genaue Spaltstelle wurde durch Edman-Abbau von [<sup>3</sup>H]Leucin markiertem Protein zwischen Gly<sup>60</sup> und Ser<sup>61</sup> am carboxyterminalen Ende des Membran-durchspannenden Segments ermittelt.

Der cytosolische Bereich von H1 schien also die Abspaltung der internen Signalsequenz zu verhindern. Wurde diese Sequenz (bis AS 37) dagegen vor die spaltbare Signalsequenz des Influenza Virus Hämagglutinin (IVH) gesetzt, so wurde diese vollständig abgespalten, obwohl sie im Inneren lag. IVH ist ein gut charakterisiertes Membran-Protein mit einem Signalpeptid von 15 AS Länge. Wurde diese Sequenz statt des Membran-durchspannenden Segments von AS 38-59 in H1 eingebaut, so erfolgte im in vitro-Translationssystem eine Einschleusung in die ER-Membran mit nachfolgender Abspaltung. Die Art

der Signalsequenz und dessen Wechselwirkung mit dem flankierenden aminoterminalen Bereich spielt somit eine entscheidende Rolle bei der Membranverankerung von Typ II - Membranproteinen.

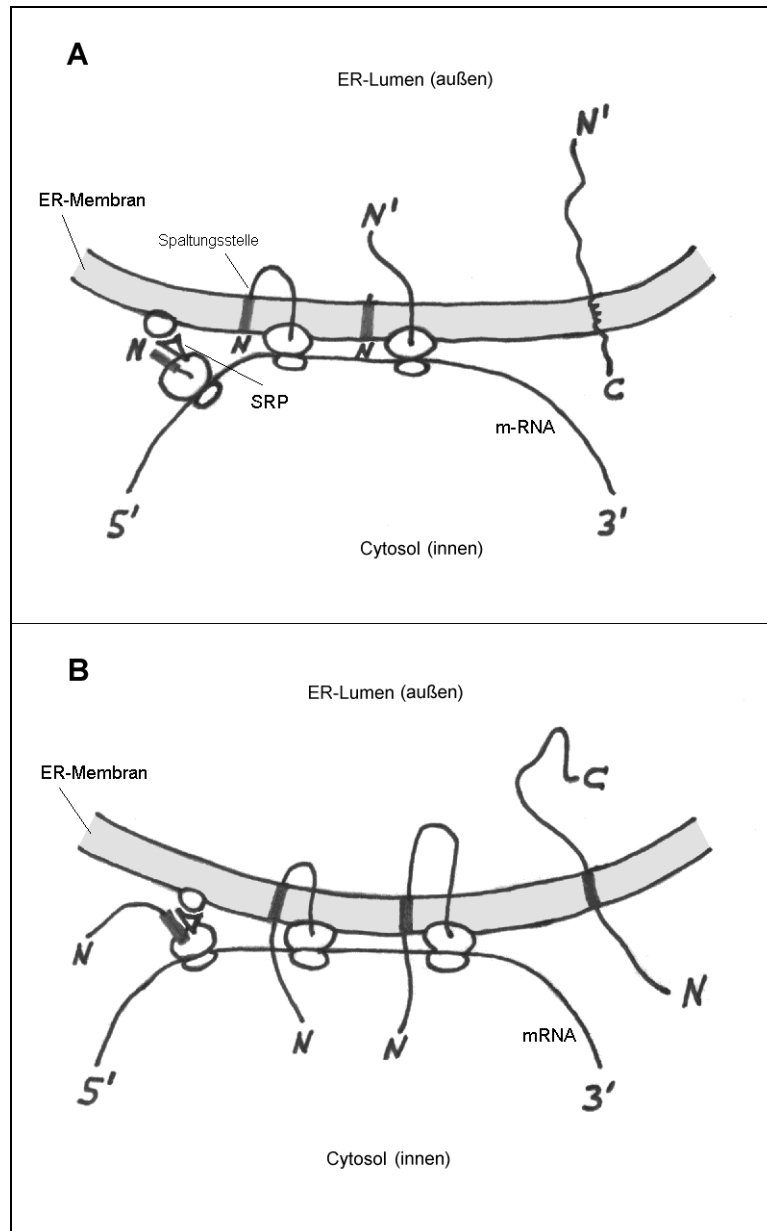


Abb. 6: Schematischer Ablauf der Entstehung von Typ I (A) und Typ II (B) Membranproteinen: Nach Bindung des SRP an das Docking-Protein in der ER-Membran erfolgt die Fortsetzung der Proteinbiosynthese direkt in das Lumen des ER. Bei N out - C in Orientierung (Typ I) wird anschließend die Signalsequenz abgespalten und ein neues N-terminales Ende generiert (N'). Die Verankerung in der Membran wird durch eine weitere hydrophobe Sequenz im Inneren des Proteins übernommen. Bei N in - C out Orientierung (Typ II) wird die Signalsequenz nicht abgespalten und dient als Membranverankerung. Das ursprüngliche N-terminale Ende bleibt erhalten und ist daher zum Cytosol hin ausgerichtet (modifiziert aus Wickner und Lodish, 1985).

Weiterhin wurden Deletionsanalysen an der Membran-durchspannenden Sequenz von H1 im *in vitro* Translationssystem durchgeführt, um die Insertionseffizienz in die ER-Membran und die Stabilität der Verankerung zu untersuchen (Spiess und Handschin, 1987). Es wurde gezeigt, daß ein 10-12 AS langes hydrophobes Teilstück ausreicht für die Bindung des SRP, aber nicht für die Einschleusung in das ER. Die Stabilität der Verankerung des Rezeptor-Proteins in der Membran war dagegen bereits beeinträchtigt, wenn zwei Aminosäuren am aminoterminalen Ende des Membran-durchspannenden Segments entfernt wurden. Ein solches Konstrukt ließ sich zu 50% mit stark alkalischer Lösung aus der Membranfraktion herauslösen, während das Wildtyp-Protein unter diesen Bedingungen mit der Membran verbunden blieb. Für eine stabile Verankerung des Rezeptors in der Membran ist somit ein hydrophobes Segment von etwa 19 AS notwendig, was der Dicke des apolaren Kerns der Lipid-Doppelschicht entspricht.

### *1.5.3 Der extrazelluläre Bereich*

Der extrazelluläre Bereich bildet den größten Teil des Rezeptors. Dort gibt es eine 80 AS große Spacer-Sequenz und die etwa 150 AS umfassende Kohlenhydrat-Erkennungsdomäne (carbohydrate recognition domain, CRD). Die Spacer-Sequenz dient wahrscheinlich als Abstandhalter zwischen CRD und Zellmembran; außerdem wird sie für die Oligomerisierung der Untereinheiten untereinander verantwortlich gemacht (Beavil et al., 1992). Die CRD wurde ursprünglich durch partielle Proteolyse des Rezeptors aus Ratten- und Hühnerleber entdeckt (Chiacchia und Drickamer, 1984). Dieses Bruchstück am C-terminalen Ende war noch in der Lage, selektiv an Kohlenhydrat-beladene Affinitätssäulen zu binden. Obwohl der Rezeptor aus Hühnerleber terminale N-Acetylglucosamin- und der aus Rattenleber terminale N-Acetylgalaktosamin-Moleküle erkennt, wiesen die beiden Proteine beim Vergleich der Primärstrukturen innerhalb der CRD die höchste Homologie auf. Dies ließ den Schluß zu, dass die gemeinsamen Elemente beider Domänen für die Formung einer Erkennungsregion für Kohlenhydrate verantwortlich sind. Mittlerweile wurden die mit der CRD des ASGPR verwandten Lektine in einer eigenen Gruppe zusammengefasst. Wichtigstes Merkmal dieser Art von Lektinen ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der Ligandenbindung, weshalb sie C-Typ Lektine genannt wurden. Außerdem ist ein pH-Wert oberhalb von 6,5 notwendig. Vergleichbare Sequenzen wurden ebenso in den CRDs von anderen Kohlenhydrat-erkennenden Proteinen (auch nicht membranständigen) gefunden (Drickamer, 1988). Sie zeichnen sich durch die Anwesenheit von 18 invarianten Aminosäuren innerhalb der meist 130 AS großen Domäne aus, daneben findet man eine gleichbleibende Plazierung von Cystein-Resten, die zur Ausbildung von Disulfid-Brücken beitragen. Nach Entschlüsselung des jeweiligen Gens der Rezeptoren

aus Ratten- und Hühnerleber (Leung et al., 1985; Bezouska et al., 1991) konnte erkannt werden, daß beide CRDs aus drei Exons gebildet werden und evolutionsbezogen Homologe darstellen. Dies war insofern interessant, da die Saccharidbindungsspezifität des Rezeptors aus Hühnerleber eher einer anderen Gruppe von Calcium-abhängigen Lektinen ähnelt, zu der Mannose-bindende Proteine gehören. So kann man sich die Entstehung unterschiedlicher Kohlenhydratspezifitäten durch Mutation und Kombination der entsprechenden Exons erklären.

Weitere Erkenntnisse zur Spezifität für Galaktose wurden durch Mutations-Studien bei einer homologen CRD erhalten. Die Änderung dreier Aminosäuren in der Primärstruktur des löslichen Mannose-bindenden Proteins (MBP) aus Rattenserum (Glu<sup>185</sup> → Gln, Asp<sup>187</sup> → Asn, His<sup>189</sup> → Trp) reichte aus, um aus der Mannose-bindenden eine Galaktose-bindende CRD zu machen (Iobst und Drickamer, 1994). Hohe Selektivität für Galaktose wurde durch die Einführung einer Glycin-reichen Sequenz von fünf AS aus der CRD des ASGPR erreicht, die die Mobilität eines Tryptophan-Moleküls einzuschränken scheint, dessen aromatischer Rest mit dem Galaktose-Ring wechselwirkt. Um eine höhere Affinität für GalNAc gegenüber Galaktose zu erreichen, wie es beim ASGPR der Fall ist, war der Einbau eines Histidin-Moleküls analog zum Rest 256 im ASGPR notwendig. Dieser scheint direkt mit der Methylgruppe der Acetyl-Seitenkette zu interagieren, und die Mutation eines nahestehenden, stabilisierenden Serin-Restes zu Valin führte zu einer veränderten Orientierung des Imidazol-Restes und zum Verlust der GalNAc-Spezifität (Kolatkar et al., 1998). Mutations-Analysen an der CRD-4 des Makrophagen Mannose-Rezeptors und <sup>1</sup>H-NMR Untersuchungen mit verschiedenen Methylglykosiden haben ebenfalls die Wechselwirkung eines aromatischen Restes mit dem Zucker-Ring während der Bindung gezeigt (Mullin et al., 1997).

Neueste Ergebnisse haben die Aminosäuren identifiziert, die für die pH-Abhängigkeit der Ligandenbindung verantwortlich sind (Wragg und Drickamer, 1999). Änderungen an den Resten His<sup>256</sup>, Asp<sup>266</sup> und Arg<sup>270</sup> führten zu einer Verringerung der Affinität für Ca<sup>2+</sup>, so dass Liganden bei physiologischem pH-Wert freigesetzt würden. Der analoge Einbau von Histidin und Asparaginsäure in die entsprechenden Positionen der oben erwähnten Galaktose-bindenden CRD des MBP aus Rattenserum führte zu einer Änderung des notwendigen pH für die halb-maximale Ligandenbindung und bestätigt die Rolle dieser Aminosäuren für die Formung eines pH-sensitiven Bereichs für Ca<sup>2+</sup> und Liganden-Bindung. Inzwischen konnte in Kristallstrukturanalysen der modifizierten MBP-CRD die genaue Wechselwirkung des Histidin-Restes 202 mit der 2-Acetamidomethylgruppe des gebundenen Zuckers N-Acetylgalaktosamin gezeigt werden (Feinberg et al., 2000). Die Histidin-Seitenkette ist außerdem Bestandteil eines Netzwerkes mit den nahe beieinander liegenden Aminosäuren Asp<sup>212</sup>, Asn<sup>216</sup> und Tyr<sup>218</sup>, die ein Wassermolekül in eine Position für Wasserstoffbrückenbindung mit der Amid-Gruppe des Zuckers bringen. Ebenso könnte dieses Netzwerk den pKa von His<sup>202</sup> beeinflussen, dessen Protonierung

die Wechselwirkung mit einem Asparaginrest unterbrechen würde, der als Ligand für  $\text{Ca}^{2+}$  und den Zucker dient.

Während die modifizierte CRD des gut charakterisierten Mannose-bindenden Proteins eine funktionelle Imitation des ASGPR darstellt, konnte auch die CRD der humanen Rezeptor-Untereinheit H1 selbst der Kristallstrukturanalyse unterzogen werden (Meier et al., 2000). Die Aminosäuren 148-291 wurden mit einem Start-Methionin bakteriell exprimiert, über eine Galaktose-Sepharose Matrix aufgereinigt und in Gegenwart von Laktose und  $\text{Ca}^{2+}$  auskristallisiert. Man fand die erste CRD, bei der drei Calcium-Ionen in die Struktur integriert sind. Es sind drei  $\beta$ -Faltblatt-Bereiche, die aus sechs langen und zwei kurzen  $\beta$ -Strängen gebildet werden, zwei  $\alpha$ -Helices aus jeweils 10-11 Aminosäuren sowie fünf Loops vorhanden, die die funktionelle Region des Proteins repräsentieren. Die Ergebnisse können außerdem die Konversion von MBP zu ASGPR-ähnlicher Ligandenspezifität erklären.

#### 1.5.4 Besonderheiten bei H2

Bei der Untereinheit H2 wurden aus einer HepG2-Genbank zuerst zwei cDNA-Formen entdeckt, die sich durch eine 15 Nukleotide große Insertion (sog. Miniexon) unterschieden, die das Produkt alternativen Splicings darstellten. Sie wurden H2a (mit Insertion) und H2b genannt (Abb. 7). Dieses Miniexon kodiert für fünf Aminosäuren hinter dem Membran-durchspannenden Segment auf der extrazellulären Seite. Sie bewirkt eine vermutlich Konformationsänderung des Proteins, wodurch der Bereich davor durch eine Peptidase in der ER-Membran spaltbar gemacht wird. Dies konnte dadurch gezeigt werden, dass ein ähnlicher Effekt zu beobachten war, wenn statt dem Mini-Insert Aminosäuren wie Glycin oder Prolin eingebaut wurden, die großen Einfluß auf die Konformation eines Proteins haben (Yuk und Lodish, 1993).

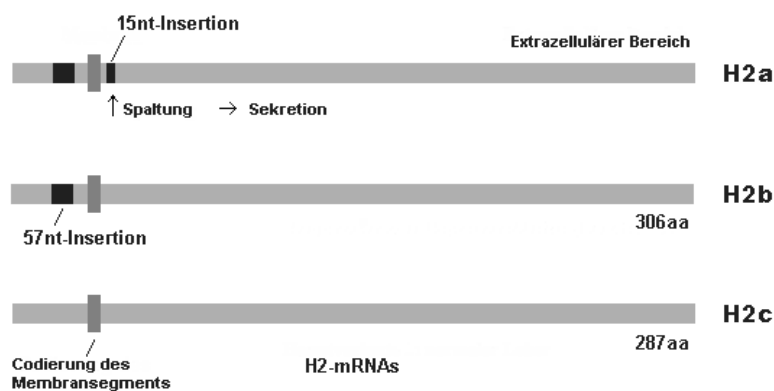


Abb. 7: Schematische Darstellung der Splice-Varianten von H2

H2b bildet etwa 92% der H2-mRNA in HepG2-Zellen. Wurde es in Maus-Fibroblasten ohne die Untereinheit H1 transfiziert, so erreichten 30-50% des exprimierten Proteins die Zelloberfläche, während der Rest im ER oder einem anderen pre-Golgi Kompartiment zurückblieb und abgebaut wurde. H2a wurde dagegen vollständig im ER zurückgehalten. Wurden Maus-Fibroblasten mit einem in Virionen gepackten retroviralen Vektor infiziert, der die H2a-cDNA enthielt, so exprimierten 70% der erhaltenen Klone H2b und 30% H2a, d.h. das Miniexon konnte auch nachträglich noch herausgesplitt werden (Lederkremer und Lodish, 1991).

In stabil exprimierenden Maus-Fibroblasten wurde der Werdegang von H2a genauer untersucht (Amara et al., 1989). 30min nach Versuchsbeginn begann der Abbau von H2, wobei ein 35kD Zwischenprodukt identifiziert wurde, bei dem es sich um die extrazelluläre Domäne von H2 handelte. Nach 90min waren sowohl noch vorhandenes intaktes H2 als auch das 35kD-Fragment Endo-H sensitiv, woraus ein Transport zum Golgi-Apparat ausgeschlossen werden konnte. Stoffe, die den lysosomalen Abbau behindern, hatten keinen Einfluß auf die Degradation von H2. Eine Herabsetzung der Inkubationstemperatur auf 18-20°C verlangsamte den Abbau dagegen dramatisch und hatte eine intrazelluläre Anhäufung von H2 zur Folge. Später konnte gezeigt werden, daß zum Abbau des H2a-Fragments kein vesikulärer Transport notwendig ist und er im ER selbst stattfindet (Wikström und Lodish, 1992, 1993).

Wurde H2b in Maus-Fibroblasten exprimiert, so gelangten etwa 50% des synthetisierten Proteins an die Zelloberfläche, während der andere Teil trotz fehlendem Mini-Inserts im ER zurückblieb und abgebaut wurde. Die endoproteolytische Spaltung im ER konnte durch bestimmte Protease-Inhibitoren blockiert werden, die aber den Weitertransport zum Golgi-Kompartiment nicht behinderten (Wikström und Lodish, 1991). Die Hälfte des H2b, die im ER zurückgehalten wurde, verblieb auch dort, wenn die proteolytische Spaltung blockiert wurde. Der Teil des Proteins, der für den Transport zur Golgi-Region vorgesehen ist, lässt sich also nicht vergrößern, wenn der Abbau des anderen verhindert wird.

Die Inhibierung des proteosomalen Abbaus führte in einem anderen Ansatz zur Anhäufung von korrekt gefaltetem H2a im ER, daneben wurde ein Anteil von Selbstassoziation bei H2-Molekülen beobachtet (Ayalon-Soffer et al., 1999). Während diese Homo-Oligomere von H2b akkumulierten, wurden die von H2a degradiert. Es wurde weiterhin die effiziente Translokation von H2a in das ER nachgewiesen. Die Zurückhaltung im ER ist somit keine Folge von inkorrekt gefalteter Translokation und kann nicht durch Homo-Oligomerisierung verhindert werden.

Mit einem spezifischen Antikörper gegen das Mini-Insert konnte später gezeigt werden, dass die im ER abgespaltene Ektodomäne aus H2a von HepG2-Zellen zum Teil ins Medium abgegeben wird (Tolchinsky et al., 1996). Die Mini-Insertion scheint daher die Funktion des Transmembran-Segments eines Typ II-

Membranproteins zu regulieren, entweder als Signal-Verankerungssequenz (H2b) oder als abzuspaltende Signalsequenz, die ein sekretiertes Produkt ergibt (H2a).

Wurde die Mini-Insertion an entsprechender Stelle in H1 eingebaut, so erfolgte in Maus-Fibroblasten ebenfalls die Zurückhaltung im ER, aber kein Abbau (Shenkman et al., 1997). H1 mit Mini-Insert verblieb im ER mit Glykosylierung vom High-Mannose-Typ, die Faltung erschien dagegen nicht anders als bei Wildtyp H1. Die Sequenz des Mini-Inserts (EGHRG) stellte hier nur ein Signal für das Verbleiben im ER dar, so dass die Determinante für die Degradation in H2a an anderer Stelle sitzen muß. Die Kotransfektion dieses H1 mit H2a führte überraschenderweise zu Golgi-Prozessierung und Oberflächenexpression beider assoziierter Proteine, die Kotransfektion mit H2b nur in deutlich geringerem Ausmaß (Shenkman et al., 2000). In ähnlicher Weise wurde H2a stabilisiert durch die Kotransfektion von H1 mit Mini-Insert und nicht von Wildtyp H1. Bei zwei assoziierten Proteinen scheint also durch die Anwesenheit des Signals für die Zurückhaltung im ER in beiden Untereinheiten der gegenseitige Effekt neutralisiert zu werden.

In normaler Leber wurde eine weitere Splice-Variante von H2 gefunden (Abb. 7, hier H2c genannt), bei der das Miniexon fehlte, aber auch eine 57 Nukleotide große Insertion im cytoplasmatischen Bereich (Paietta et al., 1992a). Der Einfluß dieser zwei Segmente auf die H2-Prozessierung wurde nach Expression in Rat-6-Fibroblasten untersucht (Paietta et al., 1992b). Konstrukte mit dem 15-Nukleotid Insert wurden intrazellulär zurückgehalten und unabhängig von der Anwesenheit des 57-Nukleotid Segments abgebaut. Von den Proteinen aus den Klonen ohne die 15-Nukleotid-Region wurde nur ein Teil durch den trans-Golgi prozessiert und an die Zelloberfläche geschleust. Die Anwesenheit der 57-Nukleotid Sequenz war für die Phosphorylierung des Proteins notwendig. Phosphorylierung von Serin-Seitenketten wurde in der Endo H-sensitiven und in der reifen Form der H2-Proteine gefunden. Da die 57-Nukleotid Sequenz keine Kodierung für Serin-Reste enthält, stellt sie ein regulatorisches Element für die post-translationale Modifizierung dar. Deletion dieses Segments mit fünf positiv geladenen Aminosäuren cis-ständig zur Transmembran-Domäne könnte die Sekundärstruktur und damit die Oligomerisierung der Untereinheiten verändern, ähnlich dem Effekt von Mutationen in der Transmembran-Region der  $\alpha$  und  $\beta$  Ketten des T-Zell Rezeptors.

### **1.6 Die Regulation der Rezeptor-Expression**

Wurden HepG2-Zellen in Nährmedium mit dialysiertem FCS kultiviert, fand eine markante Reduzierung des gesamten ASGPR-Levels nach 72h statt (Collins et al., 1988). Die Zugabe von 10mM Biotin zum



Medium stellte die volle Expression des Rezeptors wieder her, und zwar mit Ligandbindungscharakteristiken und Untereinheitenzusammensetzung vergleichbar mit denen von isoliertem Rezeptor aus normaler Leber. Biotin bewirkt einen Anstieg von Membran-assoziiierter Guanylat-Zyklase, was eine potentielle Rolle von cGMP bei der Regulierung der ASGPR-Expression vermuten ließ. Die Zugabe von Membran-durchgängigem 8-Brom-cGMP zu Biotin-freiem Medium führte zur Wiederherstellung sowohl der Zelloberflächen- als auch der gesamten Rezeptor-Bindungsaktivität (Stockert und Morell, 1990). cGMP bewirkte also keine Änderung der Rezeptorverteilung oder Remodulierung der Plasmamembran. Die Induzierung von intrazellulärem cGMP durch den sog. atrial natriuretic factor oder Stickoxid erhöhte die Menge an radioaktiv markiertem Rezeptor in der Immunpräzipitation, was auf eine erhöhte Biosyntheserate schließen ließ. Northern Blot - Untersuchungen zeigten dagegen keine Änderung bei der Anzahl von Gen-Transkripten an. Die posttranskriptionale Regulierung der ASGPR-Expression durch cGMP ist aber verbunden mit einem Shift der mRNAs von H1 und H2 von der Ribonukleoprotein-Fraktion zum Translations-aktiven, Membran-assoziierten Polysomen-Pool, was durch Sucrose-Gradienten Zentrifugation gezeigt werden konnte (Stockert et al., 1992). Verantwortlich gemacht werden für die Vermittlung der cGMP-Translationskontrolle konnte ein cytoplasmatisches Protein, das mit einer 37 Nukleotid - Erkennungssequenz in der 5'-nicht kodierenden Region der H2b-mRNA wechselwirkt (Stockert und Ren, 1997). Dieses Protein wurde später als die  $\alpha$ -COP Untereinheit des Coatomers COPI identifiziert, das normalerweise mit dem Membranverkehr im trans-Golgi Netzwerk assoziiert ist (de la Vega und Stockert, 1999). Durch Immunoblot-Analysen konnte die Anwesenheit einer zweiten Untereinheit,  $\beta$ -COP, nachgewiesen werden. Antikörper-vermittelte Gel-Shift Experimente bestätigten den Komplex aus beiden Untereinheiten als RNA-bindenden Faktor. Depletionsversuche mit dem Antikörper gegen  $\beta$ -COP zeigten, daß das Coatomer das einzige Protein ist, das an die 5'-nicht kodierende Region der ASGPR-mRNA aus Lebercytosol bindet.

Inzwischen wurde auch eine Biotin- bzw. cGMP-abhängige Expression des Insulin-Rezeptors gefunden. Durch Zugabe eines Inhibitors einer cGMP-abhängigen Protein-Kinase konnte die Biotin-vermittelte Induktion beider Rezeptoren verhindert werden (de la Vega und Stockert, 2000). Biotin-Rückgabe in depletiertes Medium führte darüber hinaus zu einer Hyperphosphorylierung von  $\alpha$ -COP, die bei gleichzeitiger Zugabe des Protein-Kinase Inhibitors nicht auftrat. Dies läßt darauf schließen, daß die Expression sowohl des Insulin- als auch des ASGP-Rezeptors durch eine Phosphorylierungsreaktion im Rahmen einer cGMP Signal-Transduktionskaskade gesteuert wird.

Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von 8-Brom-cAMP zu HepG2-Zellen zu einer Reduzierung der ASGPR-Expression auch in Biotin-haltigem Medium (Stockert, 1993). Dies hatte nach Einschätzung der

steady-state Levels von H1- und H2-bezogener mRNA in Northern Blot - Analysen seine Ursache in der Abnahme der Anzahl an Gen-Transkripten. Durch eine Kombination von run-on und mRNA-Umsatz Untersuchungen konnte vermutet werden, daß die Reduzierung der ASGPR-relevanten mRNA eine Folge ihrer Destabilisierung durch 8-Brom-cAMP war. Während cGMP also die Translationsrate des Rezeptors beeinflusst, bewirkt cAMP zumindest teilweise eine Destabilisierung der mRNA beider Untereinheiten (Übersicht in Stockert, 1995).

Neben den sog. second messenger Substanzen haben auch Cytokine Einfluß auf Synthese und Funktion des ASGPR. TNF  $\alpha$ , Interferon  $\alpha$  und  $\gamma$  sowie IL-2 bewirken eine fast vollständige Verhinderung der Aufnahme von Asialoglykoproteinen nach 24h Inkubation (Treichel et al., 1994b). Entsprechende Konzentrationen an IL-1 und IL-6 hatten dagegen keinen Einfluß auf die Funktion des Rezeptors.

Auch ein Überschuß an Galaktose- oder GalNAc-präsentierenden Liganden im Medium hatte einen negativen Einfluß auf die Bindungsaktivität des Rezeptors an der Oberfläche von HepG2-Zellen (Steer et al., 1987). Die Anzahl der membranständigen ASGPR-Moleküle blieb dagegen konstant, wie durch die Reaktivität mit einem Antikörper gegen ASGPR nachgewiesen werden konnte. Die Bindung von Transferrin und Insulin an ihre Rezeptoren war unter diesen Bedingungen ebenfalls unverändert. Bei dem Effekt spielte eine defekte Sialinisierung der Rezeptor-Moleküle eine Rolle, da unter dem Einfluß überschüssiger Liganden eine Abnahme des Sialinsäure-Anteils um 15% festgestellt wurde. Die teilweise Desialinisierung membranständigen Rezeptors durch Neuraminidase hatte den gleichen Effekt auf die ASGPR-Bindungsaktivität wie ein Überangebot an Liganden (Weiss und Ashwell, 1989). Eine Behandlung der Zellen mit Galaktose-Oxidase konnte die Funktion des Rezeptors teilweise wiederherstellen.

Der Glukose-Gehalt im Medium von HepG2-Zellen hatte ebenfalls einen modulierenden Effekt auf den ASGPR (Weiss et al., 1994). Die Bindung von ASOR an die Zelloberfläche stieg von 20ng/mg Zellprotein auf 40ng/mg, wenn die Glukose-Konzentration von 10 auf 50mg/dl erhöht wurde. Der hochregulierende Effekt konnte durch Pyruvat, einem Produkt des Glukose-Metabolismus, nachgeahmt werden und wurde zerstört durch 2-Deoxyglukose, einem Inhibitor des Glukose-Metabolismus, und durch Cycloheximid, einem Inhibitor der Protein-Synthese. Es wurde eine Zunahme der Anzahl an Bindungsstellen und eine Verdreifachung der Bindungsaffinität festgestellt, während die Antikörperbindung gleich blieb, was auf eine unveränderte Rezeptoranzahl hinwies. Die Spezifität des Glukose-Effekts konnte dadurch gezeigt werden, dass die Bindung von Insulin und Transferrin an ihre Rezeptoren unberührt blieb. Diese Befunde könnten bedeuten, dass steigende Glukose-Konzentrationen stille oder nicht-funktionelle Rezeptoren aktivieren oder die Stöchiometrie der Ligandenbindung pro Rezeptorkomplex erhöhen. Glukose könnte damit eine wichtige Rolle bei der hepatischen Homöostase durch die Regulation des ASGPR spielen.

## 1.7 Pathophysiologische und diagnostische Bedeutung des ASGPR

Der ASGPR als leberspezifisches Protein spielt auch bei entzündlichen Erkrankungen der Leber eine wichtige Rolle. Über zirkulierende Autoantikörper gegen Antigene im sog. leber-spezifischen Membran-Lipoprotein Komplex (LSP) wurde ausführlich berichtet (Jensen et al., 1978; Manns et al., 1980). Später wurde der ASGPR als Bestandteil des LSP identifiziert (McFarlane et al., 1984) und Studien über die Beziehung zwischen Anti-ASGPR Antikörpern und klinischen, serologischen und histologischen Befunden von Patienten mit akuten und chronischen Lebererkrankungen durchgeführt. Anti-ASGPR Antikörper wurden in über 80% von Patienten mit chronisch-aktiver Autoimmun-Hepatitis (AI-CAH), über 70% mit Hepatitis B-assoziiierter CAH und etwa 20% mit Primär biliärer Zirrhose (PBC) gefunden (McFarlane et al., 1986; Treichel et al., 1990). Die Titer der Antikörper bei AI-CAH korrelierten mit der periportalen Entzündungsaktivität, die durch Infiltration von Lymphozyten in das Leber-Biopsie-Gewebe überprüft wurde. Die Titer der Antikörper bei HBV-CAH waren dagegen eher niedriger. Die Anti-ASGPR Titer bei AI-CAH verminderten sich stark, sobald eine immunsuppressive Therapie eingeleitet worden war (Treichel et al., 1993). Es wurde keine Beziehung zwischen Anti-ASGPR Antikörpern oder deren Titern und anderen Autoimmun-Antikörpern wie gegen glatte Muskulatur (ASMA) oder gegen Kernantigene (ANA) gefunden. Während die Titer der Anti-ASGPR Antikörper mit der Entzündungsaktivität anstiegen, wurde keine Übereinstimmung mit den Werten der Aminotransferasen oder des Bilirubin im Serum entdeckt. Da hingegen Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis A oder Non A - Non B Hepatitis mit einem größeren Ausmaß an Zerstörung von Lebergewebe (nach biochemischen Kriterien) Anti-ASGPR negativ waren, reflektiert dieser Autoantikörper nicht nur einen Leberzellschaden, sondern hat eher fundamentalen Einfluß auf die Pathogenese.

Dies wurde unterstützt durch zwei Studien, in denen T-Zellen von AI-CAH Patienten eine Sensibilisierung gegen den ASGPR zeigten und einen genetisch bestimmten, aber nicht HLA-bezogenen Defekt in der antigen-spezifischen T-Zell Subpopulation aufwiesen, die die Autoimmun-Antwort kontrolliert (Löhr et al., 1990). In einer anderen Studie wurde gezeigt, daß sich etwa 1/3 der peripheren Blut-Lymphozyten (PBL) von Patienten mit chronischer Autoimmun-Hepatitis oder mit PBC durch gereinigten humanen ASGPR zur Proliferation anregen ließen, während dies bei keinem der PBL von Patienten mit chronisch-viraler Hepatitis oder von gesunden Blutspendern gelang (Löhr et al., 1992).

Die Verteilung des ASGPR auf der Hepatozytenoberfläche kann darüberhinaus bei zirrhotischem Umbau der Leber verändert sein. So wurde der Rezeptor in Autopsie-Lebern bei 96% von Patienten ohne Leberschaden fast ausschließlich in der sinusiodalen und kaum in der canaliculären Membran exprimiert, während er bei 67% von Patienten mit einer Zirrhose auch deutlich entlang der canaliculären Oberfläche gefunden wurde, mit einem entsprechenden Verlust auf der sinusoidalen Seite (Burgess et al., 1992).

Diese Veränderung führte zu einer verminderten Aufnahme von Asialoglykoproteinen aus dem Plasma. In hepatozellulären Karzinomen oder Metastasen in der Leber war die Rezeptor-Aktivität sogar kaum nachweisbar und im Tumor-umgebenden Gewebe deutlich herabgesetzt (Sawamura et al., 1984). Die Asialoglykoprotein-Level im Serum verhielten sich proportional zur Größe des Tumors. Mit Hilfe eines radioaktiv-markierten Liganden lassen sich die funktionellen Bereiche in einer geschädigten Leber nach Aufnahme durch den ASGPR szintigraphisch *in vivo* darstellen (Virgolini et al., 1992).

Unter Beteiligung des ASGPR können auch Wirkstoffe spezifisch in die Leberzelle eingeschleust werden. Viele chronische Träger des Hepatitis B-Virus sprechen nicht auf Interferon (IFN)-Behandlung an, vermutlich aufgrund stark reduzierter Expression des IFN-Rezeptors in der Leber. Durch Desialinisierung von IFN- $\beta$  konnte eine Bindungsstelle für den ASGPR geschaffen werden (Eto und Takahashi, 1999). Asialo-IFN- $\beta$  bewirkte eine stärkere Inhibierung der HBV-Produktion in HBV-transfizierten HepG2-Zellen als konventionelles IFN- $\alpha$  oder IFN- $\beta$ . Auch die Konzentration von 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase, einem Indikator der IFN-Aktivität, war bei Verwendung von Asialo-IFN- $\beta$  signifikant höher als bei normalem IFN- $\beta$ .

Andere Versuche wiesen darauf hin, daß der ASGPR eine Rolle bei der Einschleusung des Hepatitis B-Virus in die Leberzelle spielt. Es konnte gezeigt werden, daß Virus-Partikel, die aus dem Serum von HBV-infizierten Patienten gewonnen wurden, sowohl an isolierten, Festphasen-gebundenen Rezeptor als auch an die ASGPR-exprimierenden Zelllinien HepG2 und Huh7 binden (Treichel et al., 1994a). Die Bindung war durch ASGPR-Liganden und Anti-ASGPR Immunglobulin inhibierbar. Weiterhin wurden in präparierten Viruspartikeln nach Auftrennung in der SDS-PAGE bestimmte Bindungsstellen für biotinierten Rezeptor nachgewiesen (Treichel et al., 1997). Die Aminosäuren-Analyse der ausgeschnittenen Bande wies auf die leichte Kette eines Immunglobulins hin. Es ist daher vorstellbar, daß am Virus anhaftende Antikörper die Bindung an den Hepatozyten und so die Aufnahme in die Zelle vermitteln.

### **1.8 Zielsetzung der Arbeit**

Die Ziele der Arbeit waren

- die Untersuchung der natürlichen Struktur von funktionellem ASGPR aus normalem humanen Lebergewebe
- der Vergleich von ASGPR aus normalem Lebergewebe mit dem aus maligne transformierten Leberzellen

- die rekombinante Expression möglichst naturgetreuer Rezeptor-Untereinheiten
- die Überprüfung der Eignung einer rekombinant exprimierten Untereinheit zum Nachweis von Antikörpern gegen den ASGPR in Patientenseren

Die Untersuchung der natürlichen Struktur des ASGPR sollte hinsichtlich des Oligomerisierungsstatus der Untereinheiten und dem funktionellen Verhalten der Heteromere unter nativen Bedingungen erfolgen. Mögliche Faktoren, die die Funktionalität, also die Fähigkeit zur Bindung von Galaktose-präsentierenden Molekülen, und die Assoziierung der Untereinheiten beeinflussen, sollten ermittelt werden.

Der Vergleich von ASGPR aus normalen und maligne transformierten Leberzellen sollte vor dem Hintergrund erfolgen, daß bisher fast alle Erkenntnisse über den humanen ASGPR aus HepG2-Zellen oder in vitro-Translationssystemen stammen. Hierzu sollten der funktionelle Rezeptor aus den beiden bisher bekannten humanen Hepatomzelllinien HepG2 und Huh7 und der aus normalem Lebergewebe miteinander verglichen werden. Es sollten Versuche zu einer möglichen veränderten Expression oder Oligomerisierung beider Untereinheiten im Vordergrund stehen.

Schließlich sollte die rekombinante Darstellung beider Untereinheiten unabhängig voneinander in einer Zelllinie möglichst humanen Ursprungs angestrebt werden. Dies könnte weitere Erkenntnisse darüber ergeben, welchen Beitrag jeweils eine Untereinheit allein zur Funktionalität und zum Oligomerisierungsstatus des Gesamt Rezeptors liefert. Die (einfachere) Expression in Bakterien oder in vitro-Translationssystemen führt aufgrund fehlender eukaryontischer Prozessierung des Proteins nicht zu vollständig funktionellem Rezeptor und sollte daher nicht als Modell für das natürliche Verhalten der ASGPR-Untereinheiten herangezogen werden.

Zuletzt sollte ein Vergleich der Reaktivität von Anti-ASGPR positiven Patientenseren mit rekombinant exprimiertem H1 gegenüber dem kompletten Rezeptor aus humanem Lebergewebe durchgeführt werden. Aufgrund der höheren Verfügbarkeit von H1 gegenüber H2 wurde erwartet, daß die meisten positiven Seren ihre Antikörper auch gegen dieses Antigen entwickelt haben. Bei genügend hoher Übereinstimmung der Reaktivitäten wäre die Einführung eines kalibrierten Tests zum Nachweis von Antikörpern gegen den ASGPR möglich, da man unabhängig von der Verfügbarkeit humanen Lebergewebes wird.

## **2. Material**

### **2.1 Geräte**

Sterilbank	DLF BSS6, Clean Air, Woerden
Membranpumpe	N035.3 AN.18, KNF Neuberger, Freiburg
Begasungsbrutschrank	CO <sub>2</sub> -Auto-Zero B5061, Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	TMS, Nikon, Düsseldorf
Wasserbäder	1003, GfL, Burgwedel 1002, GfL, Burgwedel
Tischzentrifugen	Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau Mikroliter 2025, Hettich, Tuttlingen 2K15, Sigma, Osterode / Harz 5810R, Eppendorf, Hamburg Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau
Highspeed-Zentrifuge	RC2-B, Sorvall / DuPont, Bad Homburg v.d.H. Rotoren SS34 und GSA
Ultraspeed-Zentrifuge	L5-50, Beckmann, München; Rotor SW28
Bakterieninkubator	v40b, Memmert, Schwabach
Bakterien-Kreisschüttler	G25, New Brunswick Scientific Co, Edison / NJ, USA
Dampfsterilisator	Varioklav 500, H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Heißluftsterilisator	UT12, Heraeus, Hanau
Speedvac	Univapo 100H, Uniequip, Martinsried
Elisa-Meßgeräte	Titertek Multiskan Plus, Labsystems, Frankfurt Lambda E (ELX800G), MWG-Biotech, Ebersberg
Photometer	Ultrospec II, Pharmacia-Biotech, Freiburg
Homogenisator	Ultra-Turrax T25, IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.
Spannungsgeräte	250/2.5, Biorad, München Desatronic 2000/300, Desaga, Heidelberg PP3000, Biometra, Göttingen
Protein-Gelkammer	Mini Protean II, Biorad, München
Proteintransferkammer	Fastblot B33, Biometra, Göttingen
DNA-Gelkammern	DNA Subcell, Biorad, München HB-B1A, MWG-Biotech, Ebersberg
pH-Meter	CG837, Schott-Geräte, Hofheim / Taunus
Mikroliterpipetten	1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl, Eppendorf, Hamburg 0,1-2µl, Pipetman P2, Abimed, Langenfeld
Pipettierhilfen	Pipetus Akku, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt

## Material

---

Waagen	2116, Sartorius-Werke, Göttingen B6, Spoerhase AG, Gießen
Mischgerät	VF2, IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.
Magnetrührer	Combimag RET, IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.
Horizontalschüttler	Vibrax-VXR, IKA-Labortechnik, Staufen i.Br.
Überkopfschüttler	Reax2, Heidolph, Kelheim
Ultraschallbad	Sonorex RK102, Bandelin, Berlin
IEF-Elektrophoresekammer	Desaphor VC, Desaga, Heidelberg
PCR-Gerät	Mastercycler 5330, Eppendorf, Hamburg
FACS-Meßgerät	FACScan, Becton-Dickinson, Heidelberg
Chromatographie-Anlage	SMART-System, Pharmacia-Biotech, Freiburg
Geldokumentation	Eagle Eye Video System, Stratagene, Amsterdam / NL

## 2.2 Verbrauchsmaterial

Meßzylinder 100, 250, 500, 1000 ml	Schott Glaswerke, Mainz
Bechergläser 250, 400, 600 ml	Schott Glaswerke, Mainz
Erlenmeyerkolben 100, 300, 500 ml	Schott Glaswerke, Mainz
Glasflaschen mit Schraubdeckel 1, 2 l	Schott Glaswerke, Mainz
Glasflaschen mit Schraubdeckel 100, 500 ml	Biochrom KG, Berlin
Sterilpipetten 1, 2, 5, 10, 25, 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
2µl	Abimed, Langenfeld
Spitzbodenzentrifugenröhrchen 15, 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5 / 1,5 / 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Einmalspritzen 2, 5, 10 ml	Braun, Melsungen
96-Loch Elisa-Flachbodenplatte	Costar Europe, Badhoevedorp / NL
6- & 24-Loch Zellkulturplatte	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen 25, 75, 175 cm <sup>2</sup>	Greiner, Frickenhausen
Wannenstapel, 10 Böden	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Petrischalen Ø 10cm	Greiner, Frickenhausen
Sterilfiltrationseinheit 115 ml	Nalge Company, Rochester / NY, USA
Rundbodenröhrchen 12 x 75mm PP	Falcon, Heidelberg
Nitrocellulose	Schleicher & Schuell, Dassel
Rundbodenröhrchen 13 x 100 mm PS	Falcon, Heidelberg
Kryoröhrchen	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden

## 2.3 Chemikalien

### 2.3.1 Allgemeine Stoffe

ABTS	Serva, Heidelberg
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Aminoethylbenzylsulfonylfluorid (AEBSF)	Gerbu, Gaiberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bis-Acrylamid	Serva, Heidelberg
Bis-Tris	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Borsäure	Merck, Darmstadt
5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Gerbu, Gaiberg
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
CAPS	Serva, Heidelberg
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Riedel-de Haën AG, Seelze
Ethanol 99%	Riedel-de Haën AG, Seelze
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gelatine-Pulver	Riedel-de Haën AG, Seelze
Glucose 70%	Braun, Melsungen
Glycerin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Harnstoff	Merck, Darmstadt
HEPES	Serva, Heidelberg
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumcarbonat	Merck, Darmstadt
Lubrol	Serva, Heidelberg
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
MES	Serva, Heidelberg
Methanol	Riedel-de Haën AG, Seelze
Natriumacetat	Merck, Darmstadt



## Material

---

Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Gerbu, Gaiberg
NP40	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
o-Phenylendiamin, Dihydrochlorid (OPD)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Polyethylenglykol 8000	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Polyvinylpyrrolidon 40.000 (PVP)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva, Heidelberg
Salzsäure 32%	Merck, Darmstadt
Serva Blue G	Serva, Heidelberg
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
TEMED	Biorad, München
Tricin	Serva, Heidelberg
Trichloressigsäure	Merck, Darmstadt
Trinatriumzitat	Merck, Darmstadt
Tris(hydroxyethyl)-aminomethan (TRIS)	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30%	Merck, Darmstadt
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

### 2.3.2 Spezielle Verbindungen

$\beta$ -N-Acetylhexosaminidase, Jack Bean	Oxford GlycoSystems, Abingdon / UK
Agarose-Pulver	Pharmacia-Biotech, Freiburg
Ampholine	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Anti-Digoxigenin, AP-konjugiert	Boehringer, Mannheim
Anti-Human-IgG,A,M-Biotin-konjugiert	Dianova GmbH, Hamburg
Anti-Kaninchen-IgG, AP-konjugiert	Boehringer, Mannheim
Anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-konjugiert	Boehringer, Mannheim
Anti-Kaninchen-IgG, FITC-konjugiert	Dianova GmbH, Hamburg
Asialofetuin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit / MI, USA

## Material

---

Bacto-Trypton	Difco Laboratories, Detroit / MI, USA
Bakterienstamm INV $\alpha$ F'	Invitrogen, Groningen / NL
Coomassie Plus – Proteinassay	Perbio Science, Bonn
Digoxigenin, NHS-Ester	Boehringer, Mannheim
DMEM, 4,5g Glucose/l	Life Technologies, Karlsruhe
DNA-Längenstandards	Boehringer, Mannheim
Eco RI	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin
$\beta$ -Galaktosidase, Bovine Testes	Boehringer, Mannheim
Geneticin	Life Technologies, Karlsruhe
L-Glutamin 0,2M	Biochrom KG, Berlin
Hefe-Extrakt	Difco Laboratories, Detroit / MI, USA
Kanamycin	Boehringer, Mannheim
$\alpha$ -Lactose-Agarose-Gel	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
$\alpha$ -Lactose-Polygalaktose-Gel	Medac, Hamburg
Leupeptin	Boehringer, Mannheim
$\alpha$ -Mannosidase, Jack Bean	Oxford GlycoSystems, Abingdon / UK
Natriumpyruvat 0,1M	Biochrom KG, Berlin
Not I	Boehringer, Mannheim
PBS, Pulver für 10 l	Biochrom KG, Berlin
Penicillin-Streptomycin (10.000U-10.000 $\mu$ g/ml)	Life Technologies, Karlsruhe
Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F)	Boehringer, Mannheim
Pfu-DNA-Polymerase	Stratagene, Amsterdam / NL
Phosphatase (CIP)	Boehringer, Mannheim
Plasmid pcDNA3.1	Invitrogen, Groningen / NL
Plasmid pUC19	Life Technologies, Karlsruhe
Protein-Größenstandards	Biorad, München
Pst I	Boehringer, Mannheim
RCA, Digoxigenin-konjugiert	Boehringer, Mannheim
RPMI 1640	Biochrom KG, Berlin
Sal I	Boehringer, Mannheim
Sialidase, Arthrobacter Ureafaciens	Boehringer, Mannheim
SNA, Digoxigenin-konjugiert	Boehringer, Mannheim
Streptavidin, Peroxidase-konjugiert	Dianova GmbH, Hamburg
Superose 12	Pharmacia-Biotech, Freiburg
T4-Ligase	Boehringer, Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim

0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA in PBS	Biochrom KG, Berlin
Trypanblau (0,4% in PBS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Antikörper gegen synthetische Peptide:

EGPGTRRLNPRRGN (14aa des Insertionspeptids, siehe 1.5.4) oder

NH<sub>2</sub> – GluGlyProGlyThrArgArgLeuAsnProArgArgGlyAsn – COOH

Der Antikörper gegen das Insertionspeptid wurde von der Firma Eurogentec, Seraing / BE angefertigt.

Der Antikörper gegen den gesamten Rezeptor und die peptidspezifischen Antikörper gegen H1 und H2 (Stockert und Morell, 1990) wurden von Richard Stockert, Albert-Einstein College / New York, zur Verfügung gestellt.

Primer für die Amplifizierung der H1-cDNA:

Forward        GTT GAA TTC GCC AGC CCT ATC ATG ACC AAG GAG

Reverse        ATA TGC GGC CGC CTC TAT TTA AAG GAG AGG TGG CTC

Primer für die Amplifizierung der H2-cDNA:

Forward        ATT GAA TTC CCG GGC CCC ATC ATG GCC AAG GAC

Reverse        ATA TGC GGC CGC TTA TCA GGC CAC CTC GCC GGT

Die Synthesen der Primer wurden von der Firma Pharmacia-Biotech, Freiburg, durchgeführt.

## 2.4 Gewebeproben und Patientenserum

Humanes Lebergewebe wurde von Organspendern bezogen, deren Leber für die Transplantation nicht verwendet wurde. Seren mit Anti-ASGPR Antikörpern stammten aus einer Serumbank, die aus Patienten der I. Med. Klinik der Uniklinik Mainz und der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie des Uniklinikums Essen angelegt worden war. Die überwiegend aufgetretenen Erkrankungen waren AIH, Hepatitis B und C, jeweils mit und ohne Zirrhose, PBC sowie Leberzirrhosen ethyltoxischer und unklarer Genese.

### **3. Methoden**

#### **3.1 Proteinchemische Methoden**

##### *3.1.1 Präparation des Asialoglykoprotein-Rezeptors aus humaner Leber*

Stammlösungen:           5M NaCl  
                              1M Tris pH 7,3 (HCl)  
                              1M CaCl<sub>2</sub>  
                              1M Na-Acetat pH 5,3 (Essigsäure)  
                              10% Lubrol  
                              1,9mg/ml Aprotinin

Gebrauchslösungen:

2x Lysispuffer:           2,5M NaCl  
                              0,1M Tris-HCl  
                              0,1M CaCl<sub>2</sub>  
                              1 mM PMSF (gelöst in 0,2ml Methanol)  
                              50µl Aprotinin für 50ml (entsprechen 0,5 TIU)

Waschpuffer I:           1,25M NaCl  
                              0,05M Tris-HCl  
                              0,05M CaCl<sub>2</sub>  
                              0,25% Lubrol

Waschpuffer II:         1,25M NaCl  
                              0,05M Tris-HCl  
                              0,05M CaCl<sub>2</sub>  
                              0,05% Lubrol

Elutionspuffer:         1,25M NaCl  
                              0,02M Na-Acetat  
                              0,05% Lubrol

6-8g Leber werden mit einem Skalpell zerkleinert und in 50ml 2x Lysispuffer in einem Homogenisator suspendiert. Anschließend werden 10ml 10% Lubrol und 50ml Wasser zugegeben und 1h auf Eis gerührt. Man zentrifugiert 30min bei 100.000\*g und 4°C, versetzt den Überstand mit 5ml 1M CaCl<sub>2</sub> und rührt 30min auf Eis. Es wird noch einmal 30min bei 4°C und 100.000\*g zentrifugiert und der Überstand mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt.

Erste Affinitätschromatographie:

Eine FPLC-Säule (10mm ID) mit 8ml Laktose-Agarose-Gel wird mit 20ml Waschpuffer I equilibriert (1,2ml/min) und das Leberlysat aufgegeben. Man wäscht mit 28ml Waschpuffer I und löst den Rezeptor mit Elutionspuffer von der Säule (1,0ml/min); gesammelt wird von etwa 6 bis 10ml. Das Eluat wird mit 2ml 1M Tris-HCl und 1ml 1M CaCl<sub>2</sub> versetzt und einer zweiten Affinitätschromatographie zugeführt.

Zweite Affinitätschromatographie:

Eine FPLC-Säule (5mm ID) mit 0,8ml Laktose-Polygalaktose-Gel wird mit 4ml Waschpuffer II equilibriert (0,6ml/min) und das Eluat der ersten Aufreinigung aufgegeben. Man wäscht mit 5ml Waschpuffer II und eluiert mit Elutionspuffer (0,4ml/min) nach dem Detektorsignal.

### 3.1.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Stammlösungen:

SDS:	20% SDS
Acrylamid:	48% Acrylamid 1,2% Bis-Acrylamid
Gelpuffer:	3M Tris pH 8,45 (HCl) 0,3% SDS
APS:	10% APS

Gebrauchslösungen:

Kathodenpuffer:	0,1M Tris pH 8,25 0,1M Tricin 0,1% SDS
Anodenpuffer:	0,2M Tris pH 8,9 (HCl)
Gelpuffer	3M Tris pH 8,45 (HCl) 0,3% SDS
Probenpuffer (2x)	20% Glycerin 8% SDS 0,1% Serva Blue G 0,2M Tris-HCl pH 6,8

10% Gellösung (Trenngel)	13,33% Glycerin 1M Tris pH 8,45 0,1% SDS 10% Acrylamid 0,25% Bisacrylamid
Stackergel (Sammelgel)	0,75M Tris pH 8,45 0,08% SDS 4,6% Acrylamid 0,12% Bisacrylamid

Für ein Gel von 0,75mm Dicke werden 5ml Gellösung mit 5µl Temed und 50µl 10% APS zur Polymerisation gebracht. Auf dieses Trenngel wird ein Sammelgel gegossen, das aus 1ml Sammelgellösung, 1,5µl Temed und 15µl 10% APS angesetzt wird. Die Probenlösung wird mit dem gleichen Volumen Probenpuffer vermischt und in die ausgesparten Löcher im Sammelgel aufgetragen. Man läßt sie bei 30V ins Sammelgel einwandern und trennt die Proteine anschließend bei 70V bis zur gewünschten Auflösung auf.

### *3.1.3 Silberfärbung von Proteinen nach der SDS-PAGE*

Stammlösungen:	60% Trichloressigsäure (TCA) 10% Essigsäure 12% Ammoniumperoxodisulfat (APS), aliquotiert in 0,5ml bei -20°C 0,2% Silbernitrat 37% Formaldehyd
----------------	--

Die Gebrauchslösungen werden erst kurz vor Benutzung in einem Arbeitsvolumen von 100ml für zwei Gele angesetzt.

Die Gele werden zunächst 20min in 12% TCA / 50% Methanol geschüttelt, anschließend 10min in 5% Essigsäure / 10% Ethanol. Es folgen Inkubationen in 0,06% APS für 10min und in 0,1% Silbernitrat für 20min. Zur Entwicklung der Banden wird das Gel zuerst kurz in H<sub>2</sub>O geschwenkt und anschließend in 2% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / 0,018% Formaldehyd. Bei der gewünschten Bandenstärke wird die Reaktion mit 2% Essigsäure gestoppt.

Die Gele wurden zur langfristigen Lagerung in einem Geltrockner auf Filterpapier getrocknet.

### 3.1.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose und ihre Anfärbung

Transferpuffer	0,01M CAPS pH 10,0 (NaOH) 10% Methanol
PBS pH 7,4	137mM NaCl 2,7mM KCl 6,5mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
TBS	0,05M Tris pH 7,5 (HCl) 0,15M NaCl
TPBS / TTBS	0,05% Tween 20 in PBS / TBS
Entwickler AP	0,1M Tris pH 9,5 (HCl) 0,1M NaCl 5mM MgCl <sub>2</sub>
Für 10ml:	50µl NBT-Stammlösung (4% in 70% DMF) 50µl BCIP-Stammlösung (8% in DMF)
Entwickler HRP	10mg DAB in PBS mit 20µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Die Gele werden in einem Semidry-Blotter auf ein etwas größer zugeschnittenes Stück Nitrozellulose gelegt, als Pufferreservoir dienen jeweils zwei mit Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere darunter und darüber. Der Proteintransfer erfolgt bei 140mA pro Gel für 80min.

Zur Weiterbehandlung werden zunächst unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgeblockt. Dies geschieht mit 0,5% Gelatine in PBS für die Anfärbung mit Antikörpern oder 1% PVP in TBS bei Lektinen. Diese Inkubation wird bei 37°C für 1h oder 4°C ON durchgeführt. Die Inkubations- und Waschschrte erfolgen bei Antikörpern im PBS-Puffersystem, bei Lektinen und ASGPR-Liganden im TBS-Puffersystem. Für den Ligandbindungstest wird den Puffern 50mM CaCl<sub>2</sub> zugesetzt.

Die Membran wird nach dem Blocken für mindestens 1h mit dem Antikörper oder Lektin/ Liganden in der unten angegebenen Verdünnung auf dem Überkopfschüttler bei RT inkubiert. Man wäscht zweimal mit TPBS bzw. TTBS und einmal mit PBS oder TBS. Der Zweitantikörper gegen den Erstantikörper bzw. einen Marker auf dem Lektin/ Liganden wird ebenfalls 1h bei RT inkubiert. Es wird wieder mit den entsprechenden Puffern gewaschen. Die Lösungen für die Farbentwicklung werden kurz vor Gebrauch zusammengemischt und die Membran bis zur gewünschten Bandenstärke ohne Schütteln hineingelegt, der Abbruch der Reaktion erfolgt in H<sub>2</sub>O.

Verdünnung der Antikörper und Lektine:

Anti Gesamt-ASGPR (Kaninchenserum)	1:2000
Anti H1 (Kaninchenserum)	1:500
Anti H2 (Kaninchenserum)	1:200
Anti-Insertionspeptid (Kaninchenserum)	1:500
SNA, Digoxigenin-konjugiert	1:800
RCA, Digoxigenin-konjugiert	1:500
AF, Digoxigenin-konjugiert	1:100
Anti-Kaninchen-IgG, AP-konjugiert	1:1000
Anti-Kaninchen-IgG, HRP-konjugiert	1:1000
Anti-Digoxigenin, AP-konjugiert	1:1000

### 3.1.5 2D-Elektrophorese

Stammlösungen:

30% Acrylamid	28,4% Acrylamid 1,6% Bis-Acrylamid
8M Harnstoff	
10% NP40	
40% Ampholinlösung	

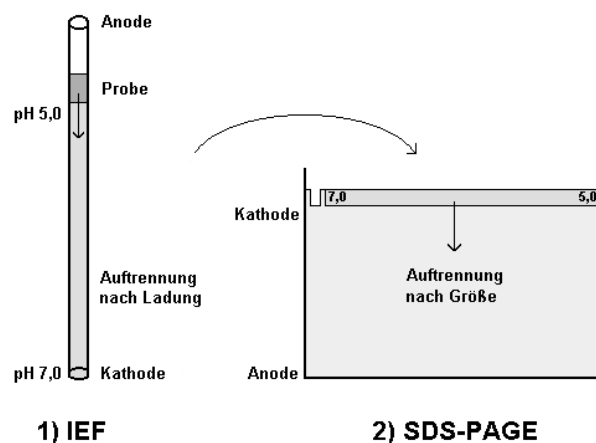
Gebrauchslösungen:

Gelmischung	4% Acrylamid 9M Harnstoff 2% NP40
IEF-Lysispuffer	9,5M Harnstoff 2% NP40 2% Ampholinlösung
Overlay-Lösung (4x)	7M Harnstoff 5% NP40 1% Ampholinlösung
Kathodenpuffer	100mM Bis-Tris (pH10,3)
Anodenpuffer	100mM MES (pH 2,9)



Die zweidimensionale Gelelektrophorese besteht aus einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) und einer anschließenden SDS-PAGE im rechten Winkel zur ersten Auftrennung (Abb. 8). Die IEF wird in Glasröhrchen von etwa 1mm Durchmesser durchgeführt, die an beiden Enden offen sind, so daß von der einen Seite das flüssige Gel eingespritzt und von der anderen die Probe auf die polymerisierte Matrix gegeben werden kann. 4,75ml der auf RT abgekühlten Gelmischung werden mit 250µl Ampholinlösung, 7µl TEMED sowie 10µl 10% APS versehen, gemischt und mit einer 5ml-Spritze durch eine Gießvorrichtung, die zwölf Glasröhrchen versorgt, bis zu einer Höhe von 9,5cm gedrückt. Zur Vermeidung von Luftblasen werden 20µl 8M Harnstoff auf die Oberfläche gegeben. Die Probe (in einem Volumen von etwa 10µl) wird mit 1µl 10% NP40 und 20µl IEF-Lysispuffer versehen, 3min mit Ultraschall behandelt und 3min bei 10000 Upm zentrifugiert. Die Glasröhrchen werden nach Entfernung der Harnstofflösung in die Elektrophorese-Apparatur eingespannt, ohne daß sie in den Anodenpuffer eintauchen. Danach wird die vorbereitete Probe aufgetragen und mit 20µl Overlay-Lösung (1:4 mit H<sub>2</sub>O verdünnt) überschichtet. Das Röhrchen wird dann ganz mit Anodenpuffer gefüllt und vollständig unter die Pufferoberfläche geschoben. Der Lauf wird 30min bei 100mA, 30min bei 200mA, über Nacht bei 300mA und schließlich 1h bei 800mA durchgeführt\*. Die Röhrchen werden dann bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Der Gelwurm wird dazu nach dem Auftauen mit einer Pipette und Wasser aus dem Röhrchen auf ein Stück Alu-Folie gedrückt.

Abb. 8: Prinzip der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese



Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgt wie in 3.1.2 beschrieben, außer daß aufgrund des Gelwurmdurchmessers der IEF 1,5mm dicke Gele verwendet werden müssen. Hierzu werden 8ml 10% Gellösung mit 8µl TEMED sowie 80µl 10% APS zur Polymerisation gebracht. Entsprechend wird ein Sammelgel aus 1,5ml Stackerlösung, 2µl TEMED und 20µl 10% APS gegossen. Der Kamm besteht aus einer kleinen Tasche für einen Größen-Standard und einer breiten Aussparung, in die der Gelwurm

\* Die IEF wurde von \_\_\_\_\_ durchgeführt.

hineingelegt wird. Damit der Gelwurm nach Zugabe des Kathodenpuffers nicht aufschwimmt, muß er in der Vertiefung fixiert werden. Dazu werden 0,5ml 10% Gellösung mit 1µl TEMED und 10µl 10% APS vermischt und vorsichtig auf den Gelwurm pipettiert. Nach Einbau des Gels in die Elektrophoresekammer und Einfüllen des Kathodenpuffers werden noch 10µl 2xProbenpuffer über die gesamte Gelwurmlänge verteilt aufgegeben, um eine deutliche Lauffront zu sehen. Die Elektrophorese wird anschließend mit 30V gestartet, bis der Probenpuffer in das Trenngel eingewandert ist, und dann über Nacht bei 20V durchgeführt.

Die Silberfärbung erfolgt wie in 3.1.3 beschrieben, außer daß die Inkubationszeiten jeweils verdoppelt und 200ml Entwicklerlösung pro Gel verwendet werden, die in drei Portionen eingesetzt wird. Der Transfer auf Nitrozellulose wird wie in 3.1.4 durchgeführt, wobei die Laufzeit auf 90min verlängert wird.

### *3.1.6 Umpuffern der ASGPR-Präparation für nachfolgende Modifikationen*

Für die Modifikation des ASGPR mit bestimmten Enzymen war eine Umpufferung notwendig. Hierzu wurde eine FPLC-Säule (10mm ID) mit 10cm Gelbetthöhe Superose 12 mit dem gewünschten Zielpuffer konditioniert. Eine ASGPR-Präparation wurde anschließend mit einem Fluß von 0,8ml/min darüber aufgetrennt. Das Gelbettvolumen wurde gerade so groß gewählt, dass Protein und Salze gut voneinander separiert waren. Der Rezeptor wurde beim Auftreten des Peaks gesammelt (ca. 2,2ml) und abschließend durch Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum aufkonzentriert.

### *3.1.7 Auftrennung Disulfidbrücken-sensitiver Untereinheiten des ASGPR*

Eine ASGPR-Präparation wurde mit 0,2ml 1M Tris-HCl pH 7,2 neutralisiert und mit 60µl 2-Mercaptoethanol sowie 20µl Aprotinin versetzt und 1h auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 50µl 1M CaCl<sub>2</sub> wurde der gesamte Ansatz über die Laktose-Polygalaktose-Säule aus 3.1.1 aufgetrennt. Die Lösung wurde dabei mittels einer 2ml-Probenschleife bei einem Fluß von 0,5ml/min mit dem Waschpuffer aufgetragen. Es wurden Fraktionen von 0,5ml Größe gesammelt. Nach 10 Minuten wurde auf Elutionspuffer umgestellt und weitere 10 Minuten fortgefahren. Die proteinhaltigen Fraktionen des Durchlaufs (nicht-gebundener bzw. inaktiver Anteil) sowie des Eluats (gebundener bzw. aktiver Anteil) wurden vereinigt und durch Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum aufkonzentriert.

### 3.1.8 ELISA-Untersuchung der Fraktionen von gebundenen und nicht-gebundenen Untereinheiten

Blocklösung	1% Gelatine in PBS
Substratpuffer	0,05M NaHPO <sub>4</sub> / 0,025M Zitronensäure pH 5,0
Substratlösung	1 Tablette OPD gelöst in 10ml Substratpuffer mit 5µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Stopplösung	3N HCl

Da 2-Mercaptoethanol bei 280nm eine beträchtliche Eigenabsorption aufweist, wurden die Fraktionen aus 3.1.7 zusätzlich im ELISA mit einem ASGPR-spezifischen Antikörper untersucht, um den tatsächlichen Proteingehalt anschaulicher darstellen zu können. Hierzu wurden 25µl von jeder Fraktion zu 25µl PBS in jeweils zwei Löcher einer 96-Loch-Platte gegeben. Dieses Coaten des Proteins an die Platte geschah in 2h bei RT. Danach wurden unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von 0,25ml 1% Gelatine in PBS pro Loch ON bei 4°C geblockt. Nach Entleeren der Platte wurden die Löcher dreimal mit TPBS gewaschen und der Anti-Gesamt-ASGPR in einer Verdünnung von 1:1000 in Blocklösung und einem Volumen von 50µl pro Loch 1h bei RT inkubiert. Danach wurde viermal mit TPBS gewaschen und mit einem HRP-markierten Anti-Kaninchen-IgG in einer Verdünnung von 1:1000 in Blocklösung und einem Volumen von 50µl pro Loch ebenfalls 1h bei RT inkubiert. Es wurde viermal mit TPBS und einmal mit PBS gewaschen. Die Farbentwicklung erfolgte durch Zugabe von 50µl Substratlösung pro Loch. Nach gewünschter Farbintensität wurde die Reaktion durch Zugabe von 50µl Stopplösung abgebrochen und bei 492nm im ELISA-Reader vermessen.

### 3.1.9 Größenausschluß-Chromatographie (SEC) des ASGPR und seiner modifizierten Untereinheiten

Zur Größenausschluß-Chromatographie wurde eine FPLC-Säule (10mm i.d.) mit Superose 12 bis zu einer Gelbetthöhe von 27,5cm gefüllt. Als Eichproteine wurden Rinderserumglobulin (BSG, 150kD), Rinderserumalbumin (BSA, 66,2kD), Ovalbumin (OVA, 45kD) und Lysozym (14,4kD) verwendet. Die Proben wurden mittels einer 100µl-Probenschleife mit PBS als Laufpuffer bei einem Fluß von 0,4ml/min über die Säule gegeben.

### *3.1.10 Deglykosylierung des ASGPR mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F)*

Eine Präparation ASGPR wurde mit 0,05M NaCl / 0,02M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,0 / 0,01% Lubrol umgepuffert und auf 300µl aufkonzentriert. Der Rezeptor wurde 5min bei 100°C denaturiert, mit 4U PNGase F sowie 5µg Leupeptin versehen und 24h bei 37°C inkubiert.

### *3.1.11 Behandlung des ASGPR mit Exoglykosidasen*

Eine Präparation ASGPR wurde mit 0,05M NaCl / 0,02M Na-Citrat pH 5,0 / 0,01% Lubrol umgepuffert und auf 300µl aufkonzentriert. Es wurden 5µg Leupeptin, 5µl Aprotinin (siehe 3.1.1) sowie die unten angegebenen Mengen der gewünschten Exoglykosidasen hinzugegeben und 12-36h bei 37°C inkubiert.

0,4µl (4mU) Sialidase (Arthrobacter Ureafaciens)  
4µl (20mU) β-Galaktosidase (Bovine Testes)  
3µl (150mU) β-N-Acetylhexosaminidase (Jack Bean)  
1µl (100mU) α-Mannosidase (Jack Bean), 12µl 1M ZnCl<sub>2</sub>

### *3.1.12 Digoxigenin-Markierung von Asialofetuin*

Dig-NHS                      1mg/ 50µl DMSO

1mg Asialofetuin (AF) wurden in 500µl 20mM NaHPO<sub>4</sub> / 150mM NaCl pH 8,5 gelöst und 15µl der Dig-NHS Lösung hinzugegeben. Es wurde 3h bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Zur Inaktivierung überschüssigen Markierungsagens wurden anschließend 100µl einer 1M Tris-HCl (siehe 3.1.1) zugesetzt und 30min bei RT inkubiert. Das Protein wurde schließlich über Superose 12 (siehe 3.1.6) in TBS (3.1.4) umgepuffert und das gesammelte Peakvolumen (ca. 1,3ml) in 100µl-Portionen bei -20°C gelagert.

### 3.1.13 Laktose-Präzipitation für Western-Blot

Blocklösung B	0,5M NaCl 0,05M Tris pH 7,5 (HCl) 0,05M CaCl <sub>2</sub> 0,2% BSA
Waschpuffer (TBS+)	0,15M NaCl 0,05M Tris pH 7,5 (HCl) 0,05M CaCl <sub>2</sub>

Ähnlich der Präparation des ASGPR aus humaner Leber ließ sich funktionaler Rezeptor in kleinsten Mengen aus Lysaten von ASGPR-exprimierenden Zellen nachweisen. Hierzu wurden etwa 60µl Laktose-Gel-Suspension zweimal mit 500µl Blocklösung B gewaschen, wobei man den Puffer einige Minuten auf das Gel einwirken ließ. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Lysat aus einer 75cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflasche oder 10cm-Petrischale (etwa 200µl) und das gleiche Volumen Blocklösung B hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte 1h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler. Die Suspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Gelmatrix noch zweimal mit 500µl Blocklösung B sowie einmal mit 500µl TBS+ gewaschen. Danach wurden 25µl Probenpuffer aus 3.1.2 hinzugegeben und 5min in einem Ultraschallbad inkubiert. Der Gelrest wurde abzentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C gelagert. Es folgte die Auftrennung in einer SDS-PAGE und der Nachweis des funktionalen Rezeptors im Western-Blot mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR.

### 3.1.14 Präparation von rekombinant exprimiertem H1

Die Aufreinigung der Untereinheit H1 aus stabil transfizierten HEK293-Zellen erfolgte analog des Rezeptors aus humanem Lebergewebe wie in 3.1.1 beschrieben. Die FPLC-Säule wurde nur mit 1,6ml Laktose-Agarose Matrix gefüllt, entsprechend konnten die angegebenen Volumina für Waschen und Eluieren verkleinert werden. Das Lysat aus 3.2.2 wurde mit einer Flußrate von 0,8ml/min über die Säule gegeben, gefolgt von etwa 10ml Waschpuffer I mit 1,2ml/min. Es wurde mit einer Flußrate von 1,0ml/min eluiert und die Säule anschließend mit 10ml Elutionspuffer und 10ml dest. Wasser gewaschen, um unspezifisch gebundene DNA-Fragmente abzulösen. Die zweite Affinitätschromatographie war identisch mit der für den ASGPR aus normaler Leber.

Eine Proteinbestimmung im Eluat wurde mit dem Coomassie Plus - Assay nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Referenzproteine wurden BSA und Fetuin verwendet.

### *3.1.15 Enzymimmunoassay zur Bestimmung von ASGPR-Antikörpern in humanem Serum*

Blocklösung	1,2% Gelatine in PBS
Substratpuffer	0,1M Zitronensäure pH 5,0
Substratlösung	15mg ABTS in 5ml Substratpuffer mit 25µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

Die Antigene (Wildtyp-ASGPR oder rekomb. H1) werden mit einer Konzentration von etwa 2ng/µl im üblichen Arbeitsvolumen von 50µl/ Loch für 1h bei RT in einer 96-Loch Platte gecoatet. Für jedes Serum wird zusätzlich eine Bestimmung der unspezifischen Wechselwirkungen mit der Blocklösung vorgenommen, die entsprechenden Löcher werden während des Coatings mit PBS versehen. Die Platte wird geleert und mit 250µl Blocklösung je Loch für 30min bei RT versehen. Anschließend wäscht man viermal mit TPBS und fügt die Seren in einer 1:100 Verdünnung mit PBS hinzu. Nach einer Inkubation von 45min bei RT wird viermal mit TPBS gewaschen und der Biotin-markierte Anti-Human IgG+A+M Zweitantikörper in 1:2000 Verdünnung mit PBS hinzugegeben. Man inkubiert wieder 45min bei RT und wäscht viermal mit TPBS. Peroxidase-markiertes Streptavidin wird schließlich als Drittantikörper ebenso in 1:2000 Verdünnung mit PBS für 45min bei RT hinzugefügt. Die Platte wird zuletzt viermal mit TPBS gewaschen und mit der Substratlösung versehen. Nach 5-10min Farbentwicklung wird die optische Dichte bei 405nm gemessen.

Für die Auswertung wird jeweils der Mittelwert der Doppelbestimmungen errechnet und der Hintergrund vom Antigen-spezifischen Wert abgezogen. Zur Cut-Off Festlegung werden immer drei Negativseren mitgetestet, die einen Wert beschreiben, der um die zweifache Standardabweichung über dem Mittelwert der optischen Dichten von 20 Normalpatienten liegt.

### 3.2 Methoden für die Zellkultur

Stammlösungen:           200 mM L-Glutamin  
                                  100 mM Natriumpyruvat  
                                  10000 U/ml Penicillin / 10000 µg/ml Streptomycin  
                                  70% Glucose  
                                  8% Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)  
                                  0,05% Trypsin / 0,02% EDTA in PBS  
                                  37% Formaldehyd

Gebrauchslösungen:

Kulturmedien

für HEK293                500ml RPMI 1640, supplementiert mit  
                                  5% FCS  
                                  2mM L-Glutamin  
                                  1mM Natriumpyruvat  
                                  40U Penicillin  
                                  40µg Streptomycin  
                                  0,28% Glucose

für HepG2 / Huh7        500ml DMEM, supplementiert mit  
                                  10% FCS  
                                  2mM L-Glutamin  
                                  1mM Natriumpyruvat  
                                  40U Penicillin  
                                  40µg Streptomycin

PBS-EDTA (PBE)        EDTA in PBS

Ablösepuffer            0,01% Trypsin in 0,1% PBE

Einfriermedium         10% DMSO in Kulturmedium

Fixierlösung            1% Formaldehyd in PBS

#### 3.2.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Alle Lösungen wurden steril gehalten oder bei Notwendigkeit durch eine 0,2µm Filtrationseinheit sterilfiltriert. Das FCS wurde vor Gebrauch 1h bei 56°C hitzeinaktiviert, anschließend mit den anderen Zusätzen versehen und in Aliquots bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden in Gewebekulturflaschen in

einem Brutschrank bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit gehalten. Für eine typische Kulturfläche von 75cm<sup>2</sup> wurden 10ml Medium verwendet, bei größeren Flaschen entsprechend mehr. Einmal pro Woche wurden die Zellen so weit verdünnt, daß sie innerhalb der nächsten sieben Tage eine Konfluenz von bis zu 95% erreichten. Vor dem Ablösen der Zellen wurde zunächst das Medium entfernt und mit 6ml PBS gewaschen. Danach wurde mit 3ml Trypsin / EDTA für 5-10min bei 37°C inkubiert. Die Reaktivität des Enzyms wurde durch Zugabe von 2ml Medium gestoppt und die Zellsuspension bei 800UpM 2min zentrifugiert. Das Pellet wurde in wenig Medium aufgenommen und die benötigte Zellmenge in eine neue Kulturflasche ausgesät.

War eine intakte Zelloberflächenstruktur notwendig, wurde mit 5ml PBE für 10-15min bei 37°C abgelöst. Anschließend wurde die Kulturfläche mit 2ml PBS nachgespült und die Suspension wie oben zentrifugiert. Die Weiterbehandlung erfolgte wie in 3.2.5 (Lyse von kultivierten Zellen) oder 3.2.4 (Durchflußzytometrie) beschrieben.

### *3.2.2 Kultivierung großer Zellmengen für die Proteingewinnung*

Für die Kultivierung großer Mengen adhärenter Zellen zur Gewinnung ausreichender Mengen von rekombinantem Protein wurden Wannenstapel („Zellfabriken“) verwendet. Dort sind in einem rechteckigen Behälter zehn Kulturböden mit einer Gesamtfläche von 6320cm<sup>2</sup> übereinander angeordnet, die in zwei Kanten über durchlässige Röhren miteinander verbunden sind. Für die Aussaat in einen Wannenstapel wurden die Zellen aus vier T<sub>175</sub>-Kulturflaschen mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit 1000ml Medium eingebracht. Nach einer Woche Kulturzeit wurde das Medium entfernt und mit 500ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 400ml 0,2% PBE abgelöst, das 15min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde 5min bei 1200UPM zentrifugiert. In einem zweiten Durchgang mit dem gleichen Volumen PBE wurden zurückgebliebene Zellen herausgelöst und noch einmal zentrifugiert. Die Pellets wurden in einem 50ml Röhrchen vereinigt, mit TBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden zuletzt mit 25ml des in 3.2.5 erwähnten Puffers lysiert und 20min auf Eis inkubiert. Zur Zerstörung genomischer DNA wurde das Lysat viermal durch eine 20G-Kanüle gezogen und anschließend 20min bei 15.000UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur weiteren Verarbeitung (s. 3.1.14) bei -20°C gelagert. Die Zellfabrik wurde anschließend mit einem Liter dest. Wasser gereinigt, danach mit 500ml PBS gewaschen und wieder mit Zellen versehen. Wegen der Wiederverwendung des Kultivierungsgefäßes besteht erhöhte Kontaminationsgefahr, was beim Arbeiten mit Wannenstapeln stets berücksichtigt werden muss.



### *3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen*

Um Zellen langfristig zu konservieren, können sie bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Hierzu wurden die trypsinisierten Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt und das zentrifugierte Pellet in so viel eiskaltem Einfriermedium aufgenommen, daß sich eine Zellkonzentration von 1,5-3 Millionen/ml ergab. Die Lösung wurde dann schnell in 1ml-Aliquots auf sterile Kryoröhrchen verteilt, für mindestens 24h bei  $-78^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen solange bei RT stengelassen, bis sich Flüssigkeit am Rand abzeichnete. Daraufhin wurde der Inhalt in eine Gewebekulturflasche mit 10ml Medium geschüttet und diese geschwenkt, bis der gefrorene Zellklumpen aufgelöst war. Anschließend ließ man die Zellen für einige Stunden anheften und wechselte dann das Medium.

### *3.2.4 Untersuchung der ASGPR-Expression mittels Durchflußzytometrie (FACS)*

Prinzip der Durchflußzytometrie:

Mit dieser Methode können membranständige Moleküle einer Zelle durch entsprechende Antikörper nachgewiesen werden, wodurch eine Fluoreszenzmarkierung der Zelloberfläche erfolgt. Bei der direkten Markierung befindet sich der fluoreszierende Farbstoff am Antikörper gegen das zu untersuchende Molekül selbst, während er bei der indirekten Markierung an einen Sekundärantikörper gekoppelt ist, der an den ersten bindet. Als fluoreszierende Farbstoffe finden Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) Verwendung. Beide Farbstoffe sind bei 488nm anregbar; das Emissionsmaximum von FITC liegt bei 525nm, das von PE bei 575nm. Somit läßt sich auch die Expression zweier verschiedener Moleküle auf der Zelloberfläche gleichzeitig nachweisen.

Für die Messung wird die Zellsuspension durch eine Düse soweit vernebelt, daß die Zellen einzeln von einem Detektor erfaßt werden können. Mit einem Laser der notwendigen Wellenlänge wird die Fluoreszenz angeregt. Gemessen werden neben der Fluoreszenzintensität auch das Vorwärtsstreulicht (FSC) und das Seitwärtsstreulicht (SSC). Das FSC ist ein Maß für die Größe einer Zelle, das SSC für ihre Granularität. Jede einzelne Zelle erscheint dadurch bei der Messung als Punkt in einem FSC/SSC-Diagramm (Dot-Blot). Zellbruchstücke liegen in der Nähe des Achsenursprungs, während Zellaggregate diffus am anderen Ende der FSC-Skala auftauchen. Durch das Eingrenzen einer Region in diesem Diagramm läßt sich die Population bestimmen, die bei der Erfassung der Fluoreszenzintensität berücksichtigt werden soll. Dies wird schließlich in einem Histogramm dargestellt, in dem die Zellzahl

gegen die Intensität (FL1 für FITC, FL2 für PE) aufgetragen ist. Je weiter rechts ein Peak auftritt, desto größer die Dichte des untersuchten Moleküls auf der Zelloberfläche. Nicht exprimierende Zellen ergeben einen Peak nahe dem Ursprung. Durch das Setzen eines Markers zwischen Positiv- und Negativ-Peak (bei guter Abgrenzung) oder durch den Vergleich des Flächeninhalts des Positiv-Peaks mit und ohne Negativ-Anteil (bei Ineinanderlaufen der Peaks) läßt sich eine Prozentzahl bestimmen, die ein Maß für die Expression des untersuchten Moleküls darstellt. Pro Messvorgang wurden jeweils 6000 Zellen erfaßt.

Durchführung der Fluoreszenzmarkierung:

Die Zellen wurden wie in 3.2.1 beschrieben mit PE abgelöst und anschließend mit PBS auf eine Konzentration von 200.000/ml eingestellt. Pro Ansatz wurden 2ml Zellsuspension in ein 12x75mm PP-Rundbodenröhrchen gegeben und 4min bei 1400UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und die Zellen mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR oder mit Normalkaninchenserum (jeweils 1:200 in 100µl Kulturmedium verdünnt) für 30min bei 4°C inkubiert. Die Ansätze wurden dann mit jeweils 2ml PBS gewaschen und wie vorher zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit einem FITC-konjugierten Anti-Kaninchen IgG (1:800 in 100µl Kulturmedium) 30min bei 4°C inkubiert. Es wurde wieder mit jeweils 2ml PBS gewaschen, zentrifugiert und abdekantiert. Die Zellen wurden schließlich mit 500µl Fixierlösung resuspendiert und bis zur Messung bei 4°C gelagert.

### *3.2.5 Lyse von kultivierten Zellen*

Lysepuffer	0,5M NaCl
	0,05M Tris pH 7,3 (HCl)
	0,05M CaCl <sub>2</sub>
	0,5% Lubrol
	0,01M AEBSF
	20µl Aprotinin für 10ml

Die mit intakter Oberflächenstruktur abgelösten Zellen aus 3.2.1 wurden durch Zentrifugation von 2min bei 1000UpM vom PBS befreit und mit 1ml TBS in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer zweiten Zentrifugation bei gleichen Bedingungen wurden 225µl Lysepuffer hinzugefügt und kräftig durchgemischt. Das Vial wurde 60min auf Eis mit gelegentlichem Durchmischen inkubiert. Das Lysat wurde 20min bei 14.000UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung linearisierter DNA

Laufpuffer TBE pH 8,3	0,892M Tris 0,890M Borsäure 0,025M EDTA
Ethidiumbromid	10mg/ml
DNA-Probenpuffer (3x)	0,08% Bromphenolblau 15% Glycerin

Die Auftrennung von DNA wurde in 1%igen Agarose-Gelen durchgeführt. Da jedes Nukleotid aufgrund des Phosphatrestes negativ geladen ist, wandert DNA im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von ihrer Größe ab, da kleinere Moleküle das Gel schneller durchqueren können als größere. Zur Detektion der DNA wurden dem Gel und dem Laufpuffer Ethidiumbromid zugesetzt, das sich in die DNA einlagert und durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Für bis zu zehn Proben wurde eine kleine Elektrophoresekammer verwendet, bei der etwa 40ml Gel notwendig waren, für bis zu 30 Proben war ein Gelbett von 120ml erforderlich. Die Agarose wurde jeweils durch Erhitzen in TBE-Puffer aufgelöst, nach dem Abkühlen auf unter 60°C mit dem Ethidiumbromid (1µg/ml) versehen und auf den Gelträger gegossen unter Aussparung der Probenaufggabelöcher. Nach dem Erstarren wurden die mit dem Probenpuffer versehenen DNA-Proben aufgetragen und die Elektrophorese bei 70-80V bis zur gewünschten Laufweite durchgeführt. Die Banden wurden durch UV-Licht der Wellenlänge 302nm sichtbar gemacht und anschließend digital erfaßt.

#### 3.3.2 Fest- und Flüssig-Medien für die Bakterienkultur

LB-Medium pH 7,2 (NaOH)	1,0% Bacto-Trypton 0,5% Hefe-Extrakt 1,0% NaCl
LB-Agar	1,2% Bacto-Agar in LB-Medium
Ampicillin	100mg/ml in H <sub>2</sub> O
Kanamycin	50mg/ml in H <sub>2</sub> O

Zur Kultivierung von Einzelkolonien wurde eine Bakteriensuspension auf festen Nährböden (LB-Agar) ausgestrichen. Zur Herstellung dieser Böden wurde die benötigte Agar-Menge zum LB-Medium gegeben und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurde Ampicillin zu einer Endkonzentration von 60µg/ml oder Kanamycin zu einer Endkonzentration von 25µg/ml hinzugefügt und jeweils 12ml dieses Nährmediums auf eine 10cm Petrischale verteilt. Die gegossenen LB-Agar-Schalen wurden bis zu ihrer Verwendung bei 4°C gelagert. Zum Ausplattieren einer Bakteriensuspension wurden 100-200µl auf den festen, auf RT vorgewärmten Nährboden pipettiert und mit einer zurechtgebogenen Pasteur-Pipette gleichmäßig verteilt. Die Schalen wurden zur Kultivierung der Einzelkolonien über Nacht auf dem Kopf in einem 37°C-Brutschrank inkubiert. Die Bakterien einer Einzelkolonie wurden am nächsten Tag mit einer Pipettenspitze gepickt und in ein PP-Röhrchen mit 5ml LB-Medium mit dem notwendigen Antibiotikum gegeben. Die Vermehrung der Bakterien wurde in einem Kreisschüttler bei 37°C mit 220UpM durchgeführt.

### 3.3.3 Kompetenzinduktion von Bakterien

Medium A	LB-Medium 0,01M MgSO <sub>4</sub> 0,2% Glucose
----------	--

Medium B	LB-Medium 36% Glycerin 12% PEG 8000 0,01M MgSO <sub>4</sub>
----------	--

Damit Bakterien DNA aufnehmen können, muß ihre Membran durchlässig gemacht werden. Nach der Prozedur bezeichnet man sie als „kompetent“ bzw. „chemikompetent“.

Aus einem Glycerinstock INV αF' wurden 5ml LB-Medium angeimpft und über Nacht im Kreisschüttler bei 37°C mit 220UpM amplifiziert. Am nächsten Tag wurden 100ml Medium A mit 1ml der Übernachtskultur versehen und das Wachstum der Bakterien photometrisch verfolgt. Bei einer OD von 0,3 bis 0,35 bei 600nm wurde die Suspension 10min auf Eis gestellt und anschließend 10min bei 4°C mit 6000UpM in der Highspeed-Zentrifuge pelletiert. Die Bakterien wurden vorsichtig mit 1ml eiskaltem Medium A resuspendiert und mit 5ml Medium B vermischt. Es wurden Portionen von jeweils 100µl auf 2ml-Reaktionsgefäße verteilt und bei -80°C gelagert. Die Effizienz der Kompetenzinduktion wurde in

colony forming units (cfu) pro µg eingesetzter DNA angegeben. Sie wurde ermittelt durch Transfektion mit dem Plasmid pUC19 (Monomer) und Auszählen der erhaltenen Kolonien nach der Formel

$$\text{cfu}/\mu\text{g} = C \times V / M \times 10^6$$

mit den Parametern:

C	Anzahl der erhaltenen Kolonien
V	Verdünnungsfaktor beim Ausplattieren
M	Masse des eingesetzten Plasmids in pg

Kommerziell erhältliche kompetente Bakterien erreichen cfu-Werte von  $10^7$  bis  $10^9$ ; die cfu-Werte der nach dieser Methode hergestellten Bakterien lagen bei etwa  $5 \cdot 10^6$ .

### 3.3.4 Amplifikation eines DNA-Abschnitts mittels PCR

Um einen DNA-Abschnitt in einen Vektor einzubinden, ist ein zwei- bis vierfacher Überschuß des DNA-Doppelstrangs gegenüber dem aufgeschnittenen Vektor notwendig. Hierzu muß eine PCR mit hoher Ausbeute durchgeführt werden, was durch große Zyklenzahl und Erhöhung der eingesetzten Primerkonzentration gewährleistet wird. Außerdem wurde eine Polymerase verwendet, die eine größere Zuverlässigkeit beim Nukleotideinbau gegenüber der üblichen TAQ-Polymerase aufweist, was durch ein nachträgliches Kontrollieren der Komplementarität („proofreading“) ermöglicht wird.

PCR-Ansatz:

0,4µl PFU-Polymerase (2,5U/µl)  
5µl 10x Pfu-Puffer  
5µl Forward-Primer (2µM)  
5µl Reverse-Primer (2µM)  
1µl dNTP-Mix (je Nukleotid 10mM)  
50pg Vektor  
34µl H<sub>2</sub>O

PCR-Ablauf:

95°C 5min  
32 Zyklen      95°C 60sek  
                  60°C 60sek  
                  72°C 90sek  
72°C 10min

Der PCR-Ansatz wurde anschließend mit dem PCR-Purification-Kit von Qiagen gereinigt. Dabei wurden 40µl der Lösung zunächst mit 200µl Puffer PB verdünnt und über eine kleine Matrix gegeben, die das PCR-Produkt bindet. Es wurde zweimal mit 300µl Puffer PE gewaschen und mit 40µl H<sub>2</sub>O eluiert. Die Probe konnte bei -20°C längere Zeit gelagert werden.

### 3.3.5 Restriktionsschnitt von DNA-Proben für die Ligation

Damit die Enden des DNA-Doppelstrangs von PCR-Produkt und Vektor zusammenpassen, müssen beide vor der Ligation mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten werden. Die Verwendung von verschiedenen Restriktionsschnittstellen für 5'- und 3'-Ende des DNA-Abschnitts gewährleistet den Einbau in der richtigen Orientierung (bidirektionale Ligation). Nach der Reaktion werden die Lösungen auf 75°C erhitzt, um die Enzyme zu deaktivieren.

Ansatz:

- 18µl Gereinigtes PCR-Produkt
- 2µl 10x Puffer H
- 1µl EcoRI (10U/µl)
- 1µl Not I (10U/µl)
  
- 1µl Vektor pcDNA3 aus Maxi-Prep (1µg/µl)
- 2µl 10x Puffer H
- 14µl H<sub>2</sub>O
- 0,5µl EcoRI (10U/µl)
- 0,5µl Not I (10U/µl)

Ablauf: 3h bei 37°C, 5min bei 75°C

### 3.3.6 Ligation und Transfektion von chemikompetenten *E.coli*

SOC-Medium

- 2% Bacto-Trypton
- 0,5% Hefe-Extrakt
- 0,05% NaCl
- 2,5mM KCl
- 10mM MgCl<sub>2</sub>
- 20mM Glucose

Bei der Ligation werden zusammenpassende Enden zweier DNA-Doppelstränge durch ein Enzym (Ligase) miteinander verbunden. Wurde der Vektor beim Restriktionsverdau unvollständig, d.h. nur von einem Enzym aufgeschnitten, ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, daß die beiden Enden durch die Ligase wieder verbunden werden (Religation); der Einbau des PCR-Produkts ist dort nicht möglich. Um das Ausmaß der Religationen abschätzen zu können, wurde ein Ligationsansatz mit Wasser statt PCR-Produkt durchgeführt. Die Kolonien aus diesem Ansatz bildeten den „Hintergrund“ der Ligation.

Ansatz:                    1µl Geschnittener Vektor  
                              1µl 10x Ligationspuffer  
                              1,5µl T4-Ligase (1U/µl)  
                              8µl H<sub>2</sub>O oder geschnittenes PCR-Produkt

Ablauf:                    15h bei 15°C

Zwei 100µl-Aliquots tiefgefrorener chemikompetenter E.coli-Bakterien (INVαF') werden in Eis aufgetaut. Die Ligationsansätze wurden auf zwei Portionen in die Suspension eingerührt, wobei zur Vermeidung von Scherkräften darauf geachtet wurde, die Bakterien nicht mit der Pipette hoch und runter zu ziehen. Die Ansätze blieben 30min im Eis stehen und wurden dann 30-50sek in ein 42°C warmes Wasserbad gehalten. Anschließend ließ man sie 2min im Eis stehen und fügte dann 400µl SOC-Medium bei RT hinzu.

### *3.3.7 Ausplattieren transfizierter Bakterien und Isolieren von Kolonien für Übernachtskulturen*

Von der Lösung mit dem SOC-Medium aus 3.3.6 wurden 200µl auf einer LB-Agar Platte verteilt, die 50µg/ml Ampicillin enthielt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C auf dem Kopf stehend inkubiert. Die Anzahl von zu pickenden Kolonien richtete sich nach dem Ausmaß der Religationen. War die Hintergrundplatte leer, konnte davon ausgegangen werden, daß in den meisten Kolonien aus dem Ansatz mit PCR-Produkt der gewünschte DNA-Abschnitt eingebaut worden war. Von einer Kolonie wurde jeweils etwas mit einer Pipettenspitze weggenommen und in 5ml LB-Medium mit 60µg/ml Ampicillin gegeben. Man inkubierte 12h bei 37°C auf einem Kreisschüttler.

### 3.3.8 Darstellung von DNA im kleinen Maßstab (Mini-Prep)

DNA-Puffer                      10mM Tris pH 8,5 (HCl)

Die Präparation von Plasmid-DNA in kleineren Mengen (etwa 5 µg) wurde mit dem Plasmid Spin Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Dabei wurden die Bakterien aus 4ml Suspension zunächst in 2ml Reaktionsgefäße pelletiert und mit 250µl des Puffers P1 resuspendiert, dem RNase beigefügt ist. Nach dem Lysieren mit 250µl der SDS-haltigen Lösung P2 wurden die Proteine mit 350µl Puffer N3 ausgefällt, zentrifugiert und der Überstand über eine DNA-bindende Matrix gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit je 300µl des Puffers PE, der 70% Ethanol enthält, wurde die Matrix trocken zentrifugiert und die DNA mit 100µl des DNA-Puffers eluiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

### 3.3.9 Überprüfung des korrekten Inserteinbaus mittels Restriktionsverdau und PCR

Zur Überprüfung, ob eine Ligation und die anschließende Klonierung erfolgreich war, kann man entweder eine Restriktionschnittstelle verwenden, die durch das Insert neu in den Vektor hineingekommen ist, oder mit den bei der Amplifizierung der cDNA verwendeten Primer eine PCR durchführen. Bei positivem Ergebnis der PCR zeigt die richtige Größe des Produktes gleichzeitig an, daß die kodierende DNA vollständig eingebaut wurde. Für den Restriktionsverdau wählt man sinnvollerweise eine Schnittstelle, die in der cDNA nur einmal vorkommt, so daß bei richtigem Einbau nach der enzymatischen Spaltung genau ein Bruchstück mehr auftritt. Ist eine solche Schnittstelle nicht vorhanden, kann auch ein Restriktionsenzym verwendet werden, das den Vektor mindestens zweimal und im Insert gar nicht schneidet. Das Bruchstück, welches die MCS enthält, wird bei richtigem Einbau der cDNA ein entsprechend vergrößertes Molekulargewicht aufweisen.

Ansatz für den Restriktionsverdau:

1µl aus Miniprep  
1µl 10x Puffer  
3U Restriktionsenzym (Sal I, Pst I)  
8µl H<sub>2</sub>O

Ablauf:                              3h bis ON bei 37°C



Ansatz für die PCR:

1µl aus Miniprep  
1µl Forward-Primer (2µM)  
1µl Reverse-Primer (2µM)  
1µl dNTP-Mix (je Nukleotid 10mM)  
5µl 10x Taq-Puffer  
0,2µl Taq-Polymerase (5U/µl)  
41µl H<sub>2</sub>O

Ablauf:

95°C 5min  
16 Zyklen      95°C 60sek  
                  60°C 60sek  
                  72°C 90sek  
72°C 10min

### *3.3.10 Darstellung von DNA in größerem Maßstab (Maxi-Prep)*

Die Präparation von Plasmid-DNA in größeren Mengen (bis 500µg) wurde mit dem Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Aus einer Übernachtskultur in 5ml LB-AMPI werden 50µl zur Beimpfung von 125ml LB-Ampi verwendet. Nach etwa 16h Inkubation bei 37°C auf dem Kreisschüttler wurden die Bakterien bei 6000UpM und 4°C für 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit 10ml Puffer P1 resuspendiert, bis keine Klumpen mehr vorhanden waren. Es wurde 10ml Puffer P2 hinzugegeben, das Gefäß einige Male geschwenkt und 5min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 10ml gekühltem Puffer P3 und einigem Schütteln wurde das Lysat 20min auf Eis stengelassen. Es wurde dann 30min bei 12.000UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit der DNA wurde anschließend über einen angefeuchteten Faltenfilter gegeben, um alle Reste des Niederschlags zu entfernen. Zur gleichen Zeit wurde ein Qiagen-Tip 500, der eine Säule mit Anionenaustauschermatrix enthielt, mit 10ml Puffer QBT äquilibriert. Das Filtrat wurde danach über die Matrix laufen gelassen und die Säule zweimal mit je 30ml Puffer QC gewaschen. Die DNA wurde mit 15ml Puffer QF von der Säule eluiert und durch Zugabe von 10,5ml Isopropanol gefällt. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation bei 15.000UpM und 4°C für 30min pelletiert. Das Pellet wurde mit 2ml 99%igem Ethanol gewaschen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Es wurde 20min bei 14.000UpM und 4°C zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet im Vakuum getrocknet. Die DNA-Präparation wurde dann in 100µl DNA-Puffer aufgelöst. Mit einem Photometer wurden DNA-Konzentration K und der Reinheitsquotient Q bestimmt nach der Formel:

$$K [\text{ng}/\mu\text{l}] = E_{260} * V * 50$$

$$Q = E_{260} / E_{280}$$

mit den Parametern

$E_{\lambda}$  Gemessene Extinktion bei der angegebenen Wellenlänge

V Verdünnungsfaktor der Probe

1cm Küvettenbreite

Die Lösung wurde anschließend mit Wasser so verdünnt, daß sich eine Konzentration von  $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ergab.

### 3.3.11 Transfektion von Säugerzelllinien nach der Calciumphosphatpräzipitationsmethode

Nährmedium            500ml DMEM, supplementiert mit  
                                  8% FCS  
                                  2mM L-Glutamin  
                                  40U Penicillin  
                                  40 $\mu$ G Streptomycin

2x HBS                    280mM NaCl  
 pH 7,1                    50mM HEPES  
                                  1,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

TE                        10mM Tris  
 pH 8,0                    1mM EDTA

CaCl<sub>2</sub>                    1M CaCl<sub>2</sub>

CTE-Puffer            250mM CaCl<sub>2</sub>  
                                  0,9mM Tris  
                                  0,09mM EDTA

Um den ASGPR vollständig zu exprimieren, ist es aufgrund der Glykosylierung notwendig, die klonierten cDNAs in eine Säugerzelle einzuschleusen. Für die transiente Expression wurden Cos7-Zellen verwendet, für die stabile Expression waren 293-Zellen besser geeignet. Bei der transienten Transfektion verbleibt das Plasmid im Zytosol und wird bei der Zellteilung normalerweise nicht berücksichtigt. Die Expression des Proteins beschränkt sich auf einen Zeitraum von 2-4 Tagen. Die Anwesenheit eines speziellen Replikations-ursprungs im verwendeten Vektor erlaubt in Verbindung mit Cos7-Zellen jedoch

auch eine episomale DNA-Amplifikation und setzt daher keinen Einbau des Plasmids in das Genom beim Zusatz eines Selektionsmediums voraus. Zur Herstellung stabiler Transfektanten wurden deshalb 293-Zellen verwendet, die darüberhinaus auch eine deutlich schwächere Eigen-Resistenz gegenüber dem Selektionsmedium zeigten.

Eine nahezu konfluent gewachsene Kulturflasche Cos7- oder 293-Zellen wurde am Tag vor der Transfektion 1/5 verdünnt in DMEM-Nährmedium ausgesetzt. Zur transienten Transfektion wurden für eine große Kulturflasche (175cm<sup>2</sup>) 80µg Plasmid-DNA eingesetzt. Der CTE-Puffer wurde jeweils frisch aus den sterilen Stammlösungen angesetzt, die benötigte Menge Plasmid-DNA aus einer Maxi-Prep hinzugefügt und unter ständigem Durchmischen das 2x HBS hinzugetropft. Die Suspension mit dem DNA-Präzipitat wurde 30min bei RT stehengelassen und dann zum Nährmedium der Zellen geschüttet. Nach 12-16h wurden die transfizierten Zellen mit PBE abgelöst (siehe 3.2.1) und in eine 10cm-Petrischale mit RPMI-Nährmedium ausgesetzt. Nach weiteren 48h wurden die Zellen wieder mit PBE abgelöst und die Expression der ASGPR-Untereinheiten mittels Durchflußzytometrie (siehe 3.2.4) oder durch Laktose-Präzipitation (siehe 3.2.5, 3.1.13) untersucht.

### *3.3.12 Herstellung und Klonierung einer stabilen, ASGPR-exprimierenden Zelllinie*

Selektionsmedium      2mg Geneticin (45% Aktivität) / ml Kulturmedium (siehe 3.2.1)

War eine stabile Transfektion angestrebt, wurden 30µg Plasmid-DNA für eine mittlere Kulturflasche (75cm<sup>2</sup>) eingesetzt. Der Ablauf der Transfektion entsprach dem der transienten bis 48h nach dem Umsetzen in eine Petrischale. Die Zellen wurden dann mit dem Selektionsmedium versetzt, welches nach 24h und danach etwa alle fünf Tage erneuert wurde. Nach zwei bis drei Wochen, sobald sich Zellinseln gebildet hatten, wurden mit einer 100µl-Pipettenspitze aus 24 Kolonien jeweils Zellen gepickt und auf eine 24-Loch-Platte verteilt. Zellen, die im Selektionsmedium heranwuchsen, wurden mittels Durchflußzytometrie auf die Expression der ASGPR-Untereinheiten untersucht. Beim erwünschten Ergebnis wurden die entsprechenden Zellen zunächst in 6-Loch-Platten umgesetzt und nach ausreichender Vermehrung in eine 10cm Petrischale. Aus den auftretenden Zellinseln wurden ein zweites Mal Zellen herausgepickt und in eine 24-Loch-Platte verteilt. Es wurde dann verfahren wie nach der ersten Klonierung. 293-Transfektanten, die über einen längeren Zeitraum eine gleichbleibend hohe Expression zeigten, wurden aus der 6-Loch-Platte schließlich in 75cm<sup>2</sup> Kulturflaschen überführt und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Präparation und Charakterisierung des humanen ASGPR aus normaler Leber

Funktioneller ASGPR zeichnet sich durch die Fähigkeit aus, an Galaktose zu binden. Diese innerhalb der Leberzelle einmalige Eigenschaft wurde zur Isolierung des Rezeptors aus lysiertem Lebergewebe genutzt (Treichel et al., 1995). An einen Agarose-Träger gebundene Laktose wurde als Matrix für die Affinitätschromatographie verwendet. Dieses Gel ist kommerziell verfügbar und zeigt aufgrund seiner chemischen Stabilität kaum Verschleißerscheinungen beim Kontakt mit Zellysaten. Mit dieser verbesserten Präparationsmethode konnte der Asialoglykoprotein-Rezeptor aus humanem Lebergewebe mit großer Ausbeute und hoher Reinheit gewonnen werden. Der Rezeptor bleibt als einziges Molekül an dem Affinitätsgel hängen und konnte daher ohne Gradient eluiert werden. Während einer zweiten Affinitätschromatographie, bei der die Laktose an Polygalaktose gebunden war, konnte der Rezeptor stark aufkonzentriert werden, da das Trägermaterial selbst zusätzlich als Ligand diente. Eine gelelektrophoretische Auftrennung von funktionellem ASGPR ist in Abbildung 9 dargestellt.

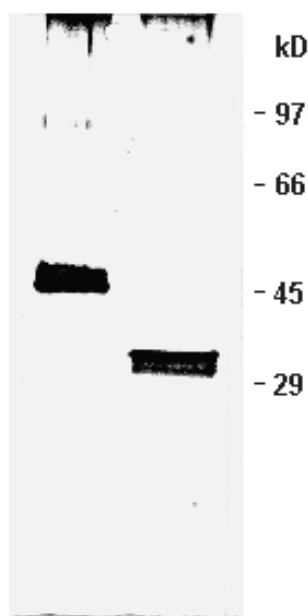


Abb. 9: Silbergefärbte SDS-PAGE Auftrennung des humanen ASGPR, links nativ, rechts deglykosyliert

Man sieht eine Hauptbande bei etwa 46kD, die der Untereinheit H1 entspricht, und eine zweite, schwächere Bande bei etwa 50kD, die der Untereinheit H2 zuzuordnen ist. Nach Deglykosylierung mit N-Glykosidase F erscheint die Hauptbande bei 34kD, eine schwächere bei 32kD. Aufgrund der Veränderungen des Molekulargewichts läßt sich der Glykosidanteil des Rezeptors auf etwa 28% berechnen.

O-Glykosylierung wurde schon früher ausgeschlossen, da bei der qualitativen Kohlenhydratzusammensetzung kein GalNAc gefunden wurde (Baenziger und Maynard, 1980). Der deglykosylierte Rezeptor zeigte außerdem keine Reaktion mehr mit den Lektinen SNA und RCA.

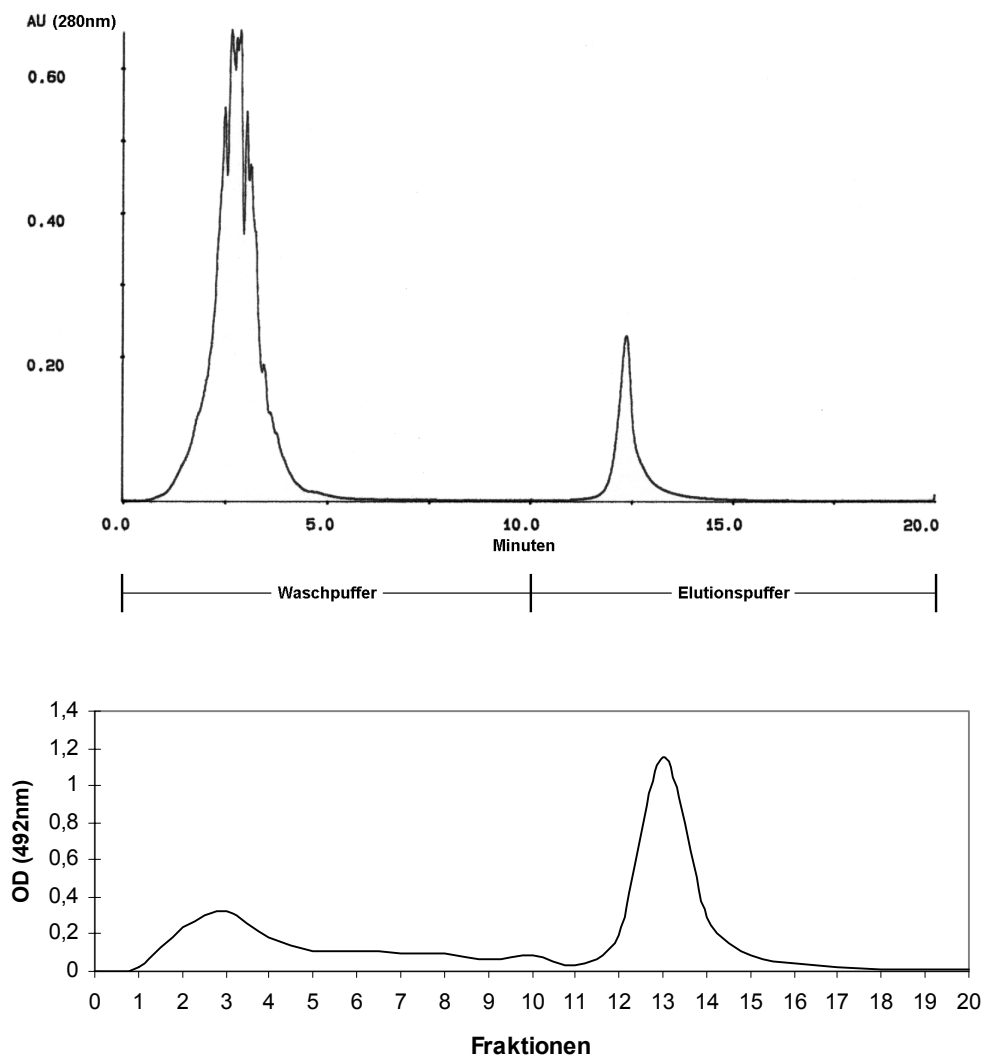


Abb. 10: Chromatogramm von reduziertem normalem ASGPR (oben). Da 2-Mercaptoethanol bei 280nm eine erhebliche Eigenabsorption besitzt, wurde ein Leerlauf mit dem Reduzierungspuffer ohne Protein gemacht und vom Originalchromatogramm abgezogen. Die genauere Proteinverteilung in nicht-aktivem und aktivem Anteil gibt jedoch die Untersuchung der Fraktionen im Elisa mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR wieder (unten).

Die in Abbildung 9 gezeigte Auftrennung wurde unter denaturierenden, aber nicht reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Das separate Auftreten der Monomere beider Untereinheiten weist darauf hin, daß keine kovalente Verbindung durch Disulfidbrücken zwischen ihnen vorliegt. Die intramolekularen Disulfidbrücken haben jedoch Einfluß auf die Funktionalität des Rezeptors, wie in Abbildung 10 dargestellt wird.

Nach Inkubation funktionellen Rezeptors mit 5% 2-Mercaptoethanol und anschließender Affinitätschromatographie mit Laktose-Gel konnte eine Fraktion gewonnen werden, die nicht mehr an Galaktose bindet, d.h. ihre Aktivität verloren hat, und eine zweite, die trotz der Gegenwart des Reduktionsmittels weiterhin an die Säule bindet. Die beiden Fraktionen wurden hinsichtlich der Zusammensetzung der Rezeptor-Untereinheiten untersucht. Abbildung 11 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung von nicht-aktiver und aktiver Fraktion. Der Antikörper gegen H1 (Abb. 11 A/B) zeigt, daß diese Untereinheit zu etwa gleichen Teilen in Durchlauf und Eluat vorliegt. Die Untereinheit H2 ist dagegen in der nicht-aktiven Fraktion angereichert (Abb. 11 C/D). Die Funktionalität von H2 oder die eines heterooligomeren Komplexes beider Untereinheiten ist daher mit dem Vorhandensein intakter Disulfidbrücken verknüpft.

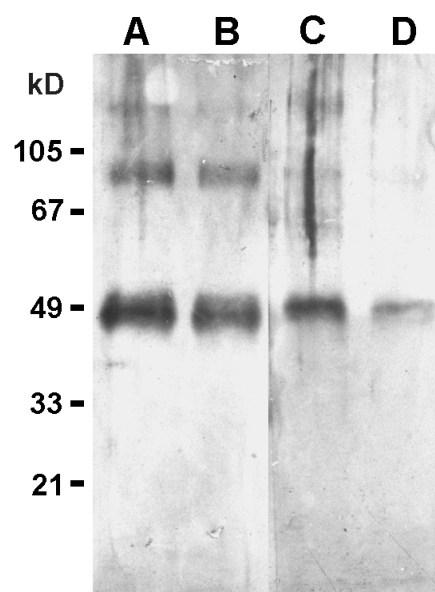


Abb. 11: SDS-PAGE von nicht-aktiver (A, C) und aktiver Fraktion (B, D), jeweils angefärbt mit einem peptidspezifischen Antikörper gegen H1 (A, B) oder gegen H2 (C, D)

Neben den intramolekularen Disulfidbrücken ist auch die vollständige Glykosylierung entscheidend für die Funktionalität des Rezeptors. Das Entfernen der terminalen Sialinsäuren durch eine Sialidase führte zum Totalverlust der Aktivität von isoliertem, in der SDS-PAGE aufgetrenntem ASGPR, wie in Abb. 12 zu erkennen ist. Neben der Silberfärbung, die die gleiche aufgetragene Menge beider Proteine anzeigt (12

A/B), wurden nativer und Asialo-ASGPR mit dem Lektin SNA behandelt, das die weitgehende Abwesenheit von Sialinsäuren nachweist (12 B/D). Der natürliche ASGPR-Ligand Asialofetuin reagierte danach nicht mehr mit dem Rezeptor (12 E/F).

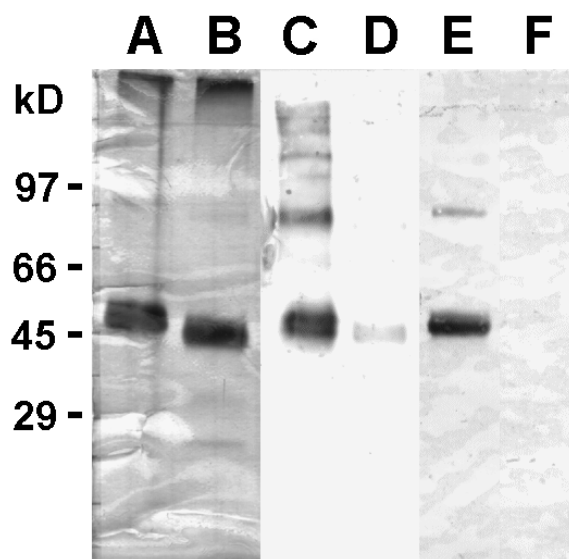


Abb. 12: SDS-PAGE-Auftrennung von nativem (A,C,E) und desialiniertem (B,D,F) ASGPR, silbergefärbt (A,B), mit dem Lektin SNA nachgewiesen (C,D) und mit Digoxigenin-markiertem Asialofetuin behandelt (E,F)

Es wurde außerdem beobachtet, daß bei schrittweiser Behandlung des ASGPR mit Exoglykosidasen die in der SDS-PAGE auftretende Größe nicht in dem zu erwartenden Ausmaß abnimmt (Abb. 13). Wurden alle äußeren Zuckerreste bis zur Kernglykosylierung entfernt (vgl. Abb. 4), so liegt das Molekulargewicht immer noch etwa 8kD über dem des mit PNGase F deglykosylierten Rezeptors (13F).

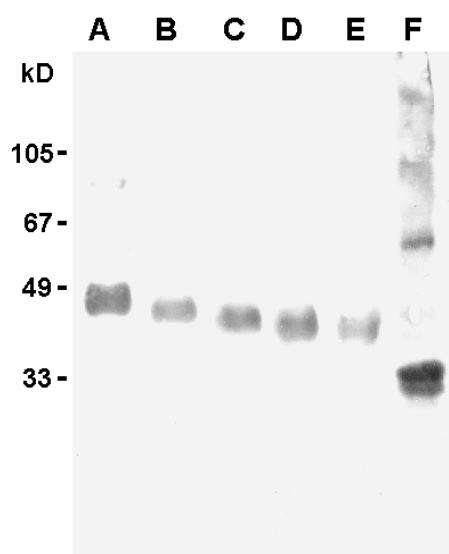


Abb. 13: Behandlung des ASGPR mit Exoglykosidasen, Anfärbung mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR; A: Nativer ASGPR, B: Sialidase-behandelt, C: B +  $\beta$ -Galaktosidase, D: C +  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase, E: D +  $\alpha$ -Mannosidase, F: A + PNGase F

Die Auftrennung des Rezeptors in der SDS-PAGE führte überwiegend zu denaturiertem Protein, es sind jedoch in den meisten Gelen noch Dimer- und Trimer-Banden zu sehen. Zur Untersuchung des natürlichen Assoziationsstatus der beiden Untereinheiten in gelöstem funktionellen ASGPR wurde daher auch eine nicht denaturierende Auftrennung mittels Größenausschlußchromatographie (GPC) durchgeführt (Abb. 14).

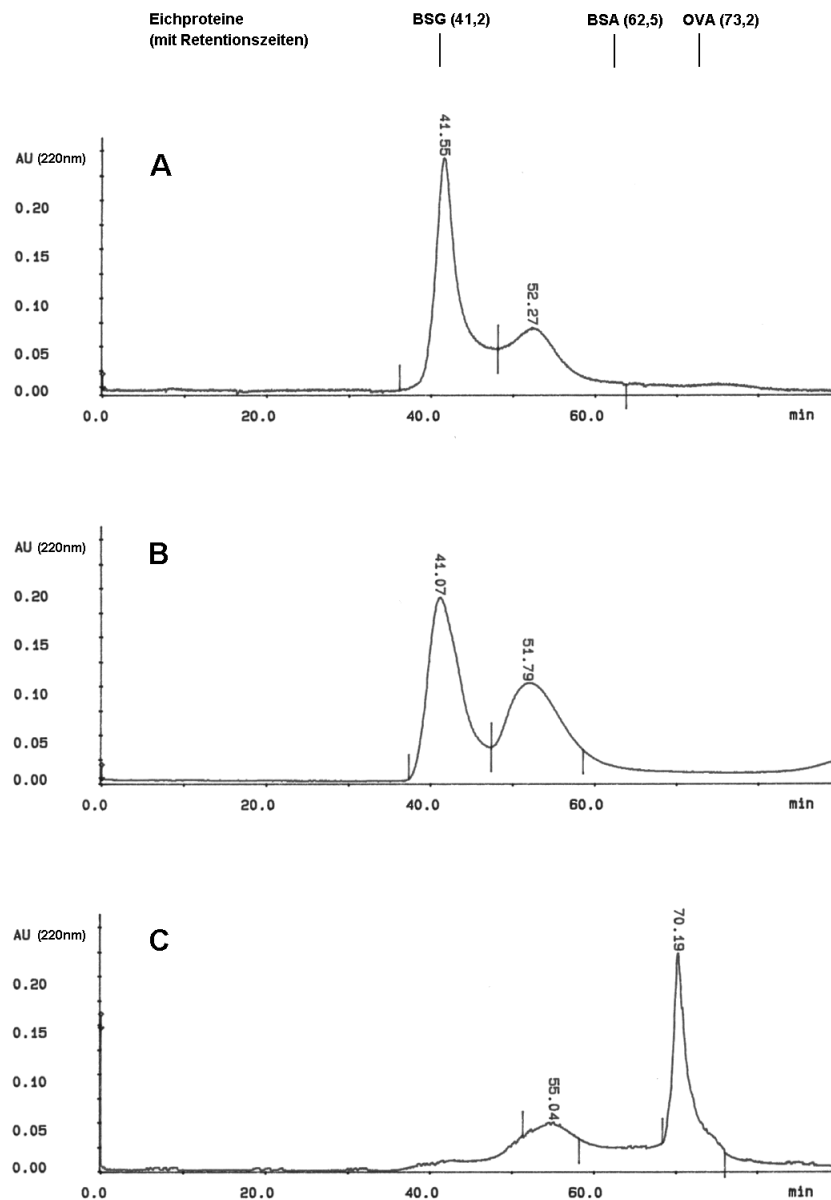


Abb. 14: Chromatogramme der Größenausschlußchromatographie von nativem, funktionellen Rezeptor (A), nach Behandlung mit 5% 2-Merkaptoethanol für 1h auf Eis (B) und nach 10min Erhitzen bei 80°C in 10% SDS (C). Die Läufe wurden in einer 300x10mm i.d. Superose12-Matrix bei einem Fluß von 0,4ml/min mit PBS als Fließmittel durchgeführt. Als Eichproteine wurden Rinderserumglobulin (BSG, 150kD), Rinderserumalbumin (BSA, 66,2kD), Ovalbumin (OVA, 45kD) und Lysozym (14,4kD; 98,8min) verwendet.



Beim unbehandelten, nativen Rezeptor (14A) sind Trimere der Hauptbestandteil, daneben existieren auch kleine Mengen an Dimeren, aber keine Monomere. Die Aufspaltung der Disulfidbrücken mit 2-Mercaptoethanol führte zu einer Erhöhung des Dimeranteils, jedoch nicht zur Bildung von Monomeren (14B). Nach dem Kochen des Rezeptors in 10% SDS wurden erwartungsgemäß hauptsächlich Monomere neben einem kleinen Rest von Dimeren (14C) gefunden.

Die zweidimensionale Auftrennung eines Proteinkomplexes erlaubt neben der Ermittlung von Größenunterschieden auch die Bestimmung der Ladungsverteilung innerhalb der Untereinheiten. Eine vorausgehende isoelektrische Fokussierung (IEF) trennt Proteine nach ihrer Nettoladung auf, die nachfolgende SDS-PAGE gibt die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine wieder.

Der humane ASGPR wurde in nativer und deglykosylierter Form zweidimensional aufgetrennt und anschließend bezüglich H1 und H2 untersucht. In Abbildung 15 sind silbergefärbte SDS-PAGE-Gele von nativem, funktionellen ASGPR vor und nach Deglykosylierung mit PNGase F dargestellt. Abbildung 16 zeigt Western-Blots der gleichen Proben, die mit dem peptidspezifischen H1-Antikörper durchgeführt wurden. Der native ASGPR wird aus einer Wolke von mehreren H1-Proteinen gebildet (Abb. 16A). Nach Deglykosylierung lassen sich vier diskrete Punkte erkennen (Abb. 16B).

Die Untersuchung mit dem H2-spezifischen Antikörper führt zu fünf Punkten beim nativen ASGPR, die sich nach Deglykosylierung auf zwei reduzieren (Abb. 17).

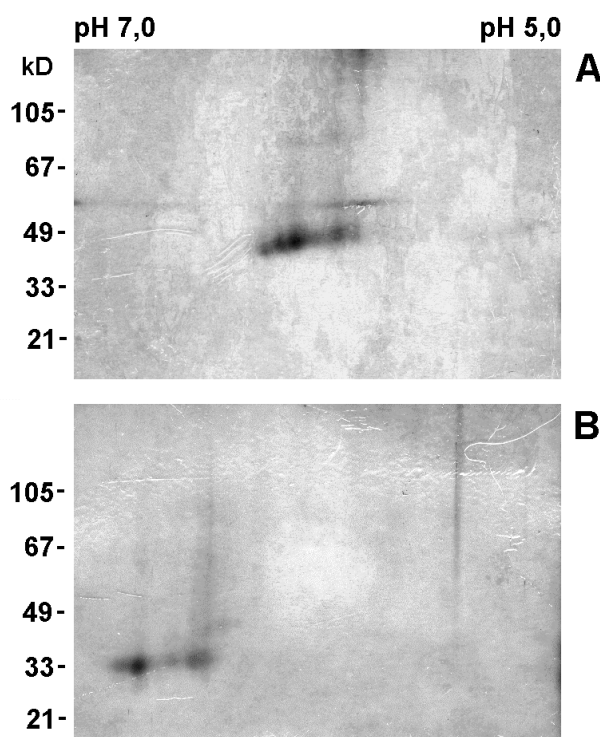


Abb. 15: Silbergefärbte, zweidimensionale Auftrennung von funktionellem ASGPR aus humaner Leber in nativer (A) und deglykosylierter Form (B)

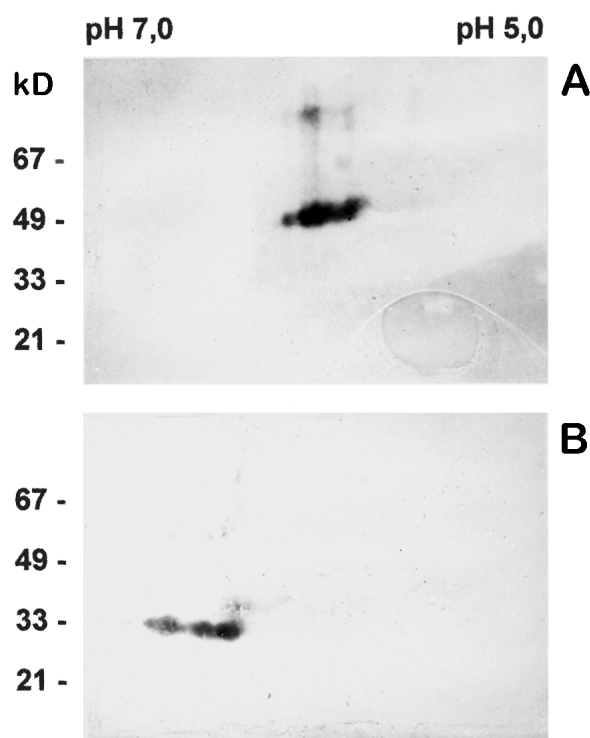


Abb. 16: Zweidimensionale Auftrennung von funktionellem humanen ASGPR aus normaler Leber, nativ (A) und deglykosyliert (B), gefärbt mit einem Antikörper gegen H1

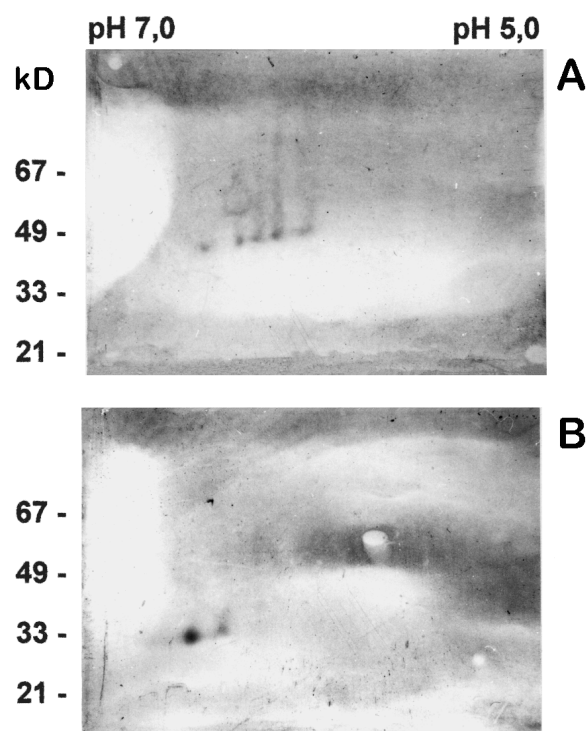


Abb. 17: Zweidimensionale Auftrennung von funktionellem humanen ASGPR aus normaler Leber, nativ (A) und deglykosyliert (B), gefärbt mit einem Antikörper gegen H2

#### 4.2 Charakterisierung des humanen ASGPR aus maligne transformierten Leberzellen

Ähnlich wie aus normaler Leber ließ sich ASGPR aus den kultivierten Zelllinien HepG2 und Huh7 isolieren. Abbildung 18 zeigt eine SDS-PAGE Auftrennung der drei ASGPR-Arten mit anschließender Detektion durch das Lektin SNA nach dem Transfer auf Nitrozellulose. Dieses erkennt 2,6-verknüpfte, terminale Sialinsäuren in Glykoproteinen und zeigt somit eine intakte Glykosidstruktur an, die für die Funktionalität des ASGPR essentiell ist. Es ist zu sehen, daß der Rezeptor aus HepG2-Zellen um etwa 6kD, der aus Huh7-Zellen etwa 4kD größer erscheint als ASGPR aus normaler humaner Leber.

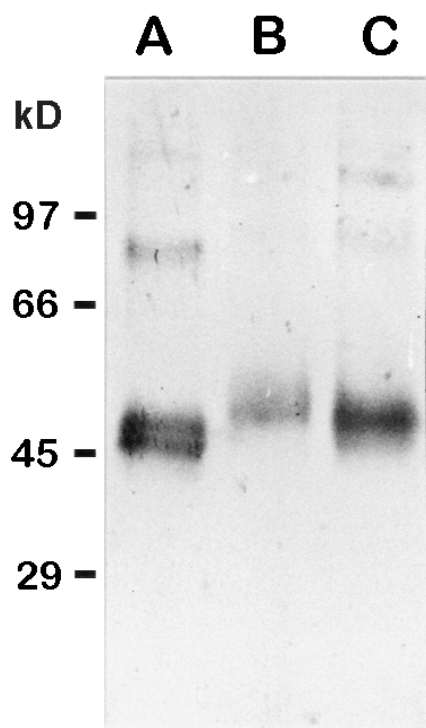


Abb. 18: Mit dem Lektin SNA angefärbte SDS-PAGE-Auftrennung von funktionellem ASGPR aus normaler Leber (A), aus Hep G2-Zellen (B) und aus Huh7-Zellen (C)

Ausgehend von diesem Befund wurden die drei ASGPR-Arten deglykosyliert und hinsichtlich der beiden Untereinheiten miteinander verglichen. In Abbildung 19 wurden die resultierenden sechs Rezeptor-Formen mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR detektiert, um zu zeigen, daß vergleichbare Mengen eingesetzt wurden.

Abbildung 20 zeigt die Untersuchung mit dem H1-spezifischen Antikörper. Es ist zu erkennen, daß die unterschiedlichen Molekulargewichte bei H1 durch einen anderen Glykosylierungsgrad der beiden ASGPR-Arten aus den Hepatomzelllinien herrühren. Man sieht außerdem, daß die Banden von H1 in ASGPR aus HepG2-Zellen deutlich schwächer ausfallen.

Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse bezüglich der Untereinheit H2. Hier ist zu erkennen, daß die Molekulargewichte beider ASGPR-Arten aus den Hepatomzelllinien auch nach Deglykosylierung noch differieren. H2 in funktionellem ASGPR aus HepG2- und Huh7-Zellen unterscheidet sich also entweder auf Proteinebene oder durch eine andere posttranslationale Modifizierung als die Glykosylierung von funktionellem ASGPR aus normaler Leber.

Abb. 19: SDS-PAGE-Auftrennung von funktionellem ASGPR aus normaler Leber (A, B), aus HepG2-Zellen (C, D) und aus Huh7-Zellen (E, F), jeweils nativ (A, C, E) und deglykosyliert (B, D, F), angefärbt mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR

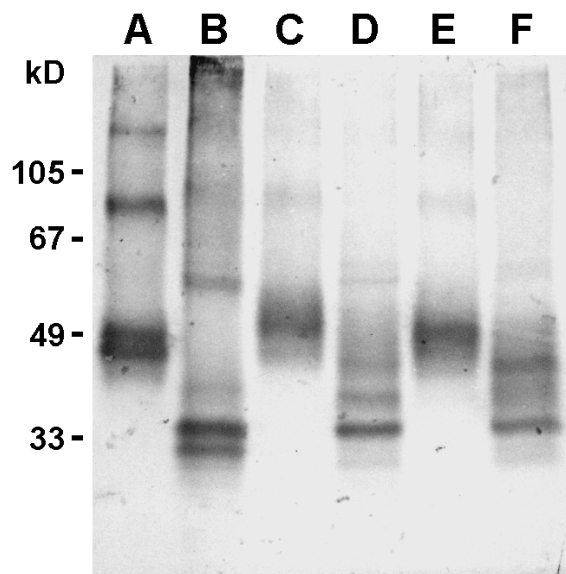


Abb. 20: SDS-PAGE-Auftrennung von funktionellem ASGPR aus normaler Leber (A, B), aus HepG2-Zellen (C, D) und aus Huh7-Zellen (E, F), jeweils nativ (A, C, E) und deglykosyliert (B, D, F), angefärbt mit dem Antikörper gegen die Untereinheit H1

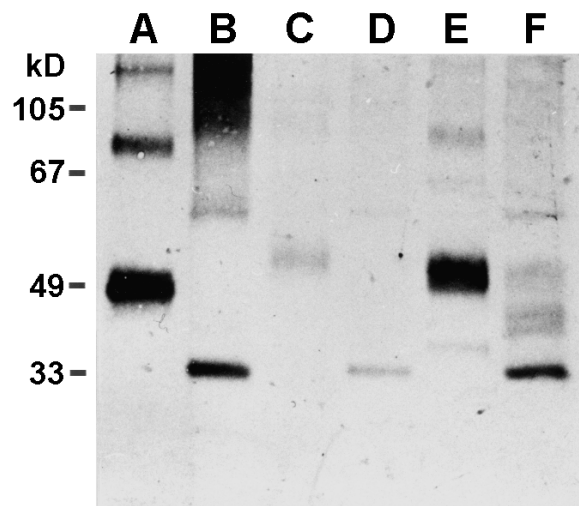
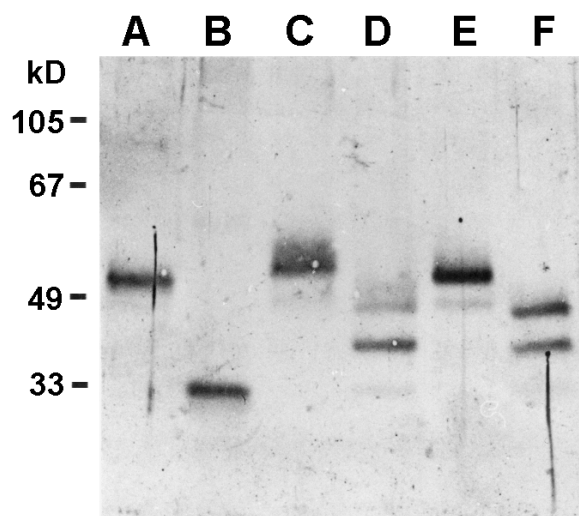


Abb. 21: SDS-PAGE-Auftrennung von funktionellem ASGPR aus normaler Leber (A, B), aus HepG2-Zellen (C, D) und aus Huh7-Zellen (E, F), jeweils nativ (A, C, E) und deglykosyliert (B, D, F), angefärbt mit dem Antikörper gegen die Untereinheit H2



Auch in der zweidimensionalen Darstellung sind Unterschiede zwischen ASGPR aus normaler Leber und dem aus Hepatomzellen auszumachen. Abbildung 22 zeigt eine silbergefärbte Auftrennung und einen Western-Blot mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR des funktionellen Rezeptors aus normaler Leber. Abbildung 23 zeigt die gleiche Darstellung für ASGPR aus HepG2-Zellen. Während beim ASGPR aus normaler Leber wie schon bei H1 gezeigt eine Wolke mit vielen Punkten zu sehen ist, erscheint der aus HepG2-Zellen isolierte Rezeptor mit nur einem einzigen Punkt.

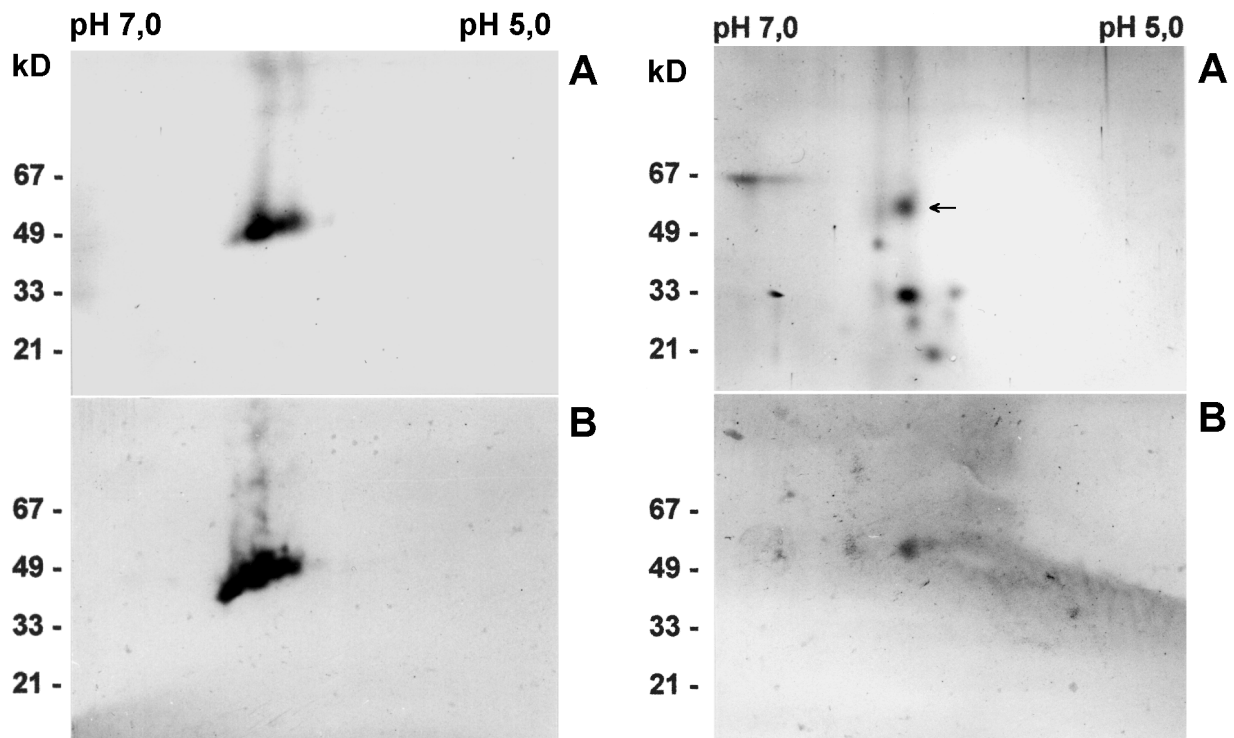


Abb. 22: Zweidimensionale Auftrennung von funktionellem ASGPR aus normaler Leber, silbergefärbt (A) und mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR angefärbt (B)

Abb. 23: Zweidimensionale Auftrennung von funktionellem ASGPR aus HepG2-Zellen, silbergefärbt (A) und mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR angefärbt (B)

Durch mRNA-Isolierung und Sequenzierung der umgeschriebenen cDNA aus HepG2-Zellen innerhalb unserer Arbeitsgruppe sowie aus früheren Publikationen waren verschiedene Splice-Varianten der Untereinheit H2 bekannt. Es existiert ein 19 Aminosäuren großes Insert im cytoplasmatischen Bereich. Um zu überprüfen, inwieweit diese Insertion auch in exprimiertem H2 vorhanden ist, wurde ein Antikörper gegen ein 14 Aminosäuren großes Peptid innerhalb der Insertion entwickelt. Abbildung 24 zeigt eine silbergefärbte SDS-PAGE Auftrennung und den zugehörigen Western-Blot mit dem Antikörper gegen das Insertionspeptid von ASGPR aus normaler Leber und dem aus Huh7-Zellen. Es ist

deutlich zu erkennen, daß bei der gleichen aufgetragenen Menge die Untereinheit H2 mit der Insertion in ASGPR aus normaler Leber nur in Spuren vorkommt, während sie im ASGPR aus Huh7-Zellen in größerem Ausmaß vorhanden ist.

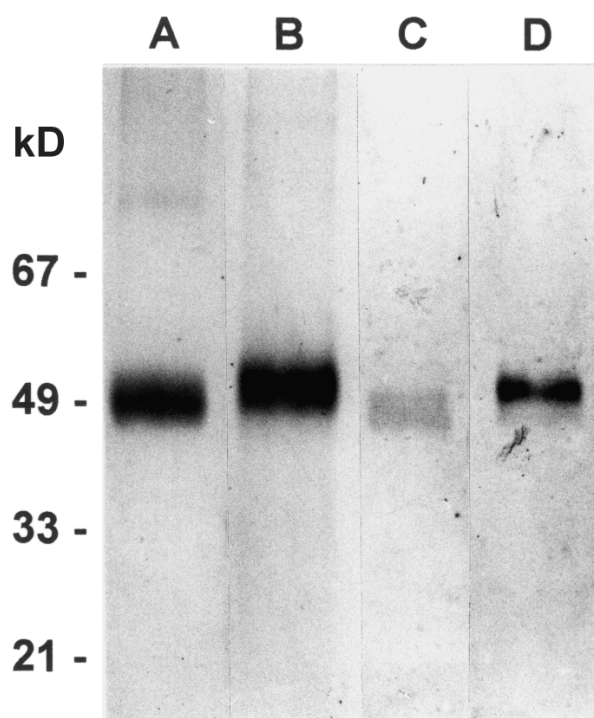


Abb. 24: SDS-PAGE Auftrennung von funktionellem ASGPR aus normaler Leber (A,C) und aus Huh7-Zellen (B,D); die Spuren A und B sind silbergefärbt, die Spuren C und D wurden geblottet und mit dem Antikörper gegen das Insertionspeptid behandelt.

### 4.3 Rekombinante Darstellung der Untereinheiten des humanen ASGPR

#### 4.3.1 Einbau der cDNA der ASGPR-Untereinheiten in einen Vektor

Die cDNAs beider Untereinheiten des humanen ASGPR wurden jeweils über die Eco RI und Not I - Schnittstellen des Expressionsvektors pcDNA3 eingebaut. Die notwendigen Sequenzen wurden mit Hilfe der PCR-Primer an die cDNA angehängt, zusätzlich wurde eine Leader-Sequenz (Kozak-Sequenz; Kozak, 1987) von zwölf Nukleotiden vor dem ATG-Codon übernommen, die der Erhöhung der Expressionsrate dient. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Abschnitt 2.3.2 aufgeführt. In Abbildung 25 ist der Aufbau der Vektoren für beide Untereinheiten schematisch mit den Schnittstellen

dargestellt, die zur Überprüfung des korrekten Inserteinbaus benutzt wurden. Abbildung 26 zeigt den Restriktionsverdau der klonierten Plasmide durch Sal I und Pst I mit den erwarteten Veränderungen gegenüber dem Vektor ohne Insert.

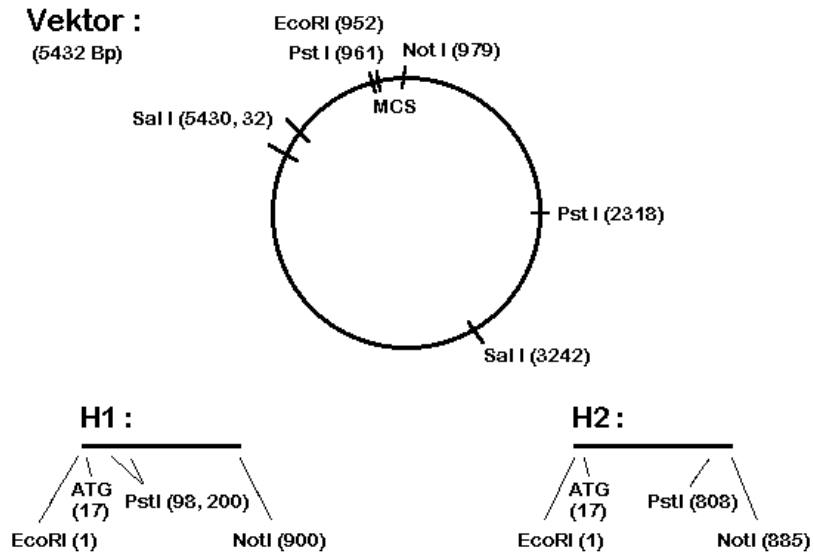


Abb. 25: Verwendete Restriktionsschnittstellen im Vektor und den cDNAs

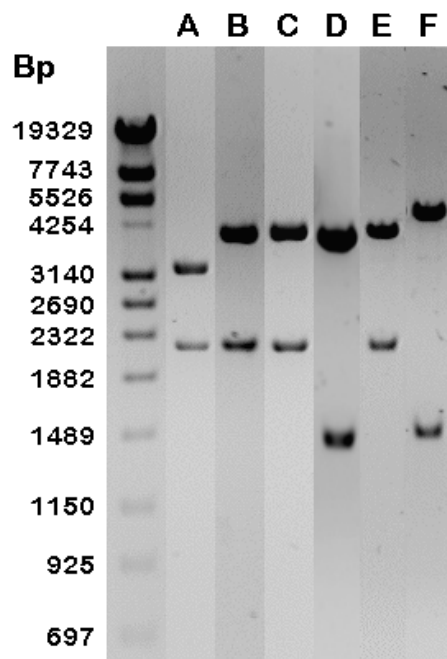


Abb. 26: Restriktionsschnitte mit Sal I (A,B,C) und Pst I (D,E,F) des Vektors ohne Insert (A,D), des Vektors mit H1 (B,E) und des Vektors mit H2 (C,F)

Weiterhin wurden die PCR und die Sequenzierung mit den Eco RI- / Not I-Primern (Abschnitt 2.3.2) zur Qualitätskontrolle der hergestellten Plasmide durchgeführt.

4.3.2 Transiente Expression beider Untereinheiten in *cos7*-Zellen

Die Membranständigkeit der exprimierten Untereinheiten wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie überprüft. Abbildung 27 zeigt FACS-Messungen von transient transfizierten *cos7* - Zellen mit H1, die mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR und Normal-Kaninchenserum als Negativkontrolle durchgeführt wurden. Der Anteil an positiven Zellen betrug 20,5%. Abbildung 28 zeigt die analogen Messungen für die Untereinheit H2. Hier betrug der Anteil positiver Zellen 11,3%.

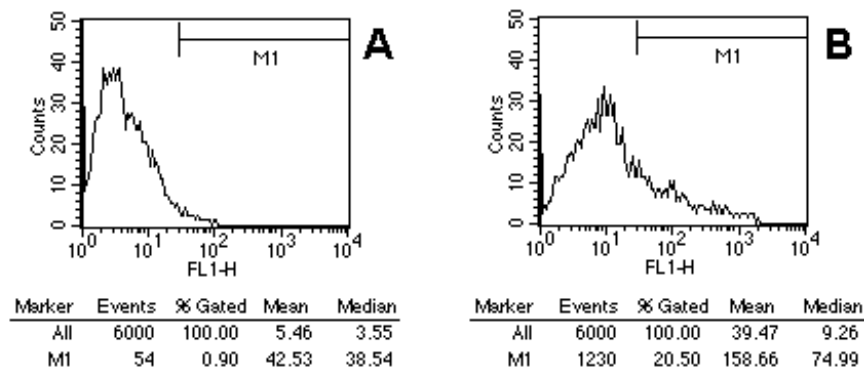


Abb. 27: Durchflußzytometrische Untersuchung von *cos7*-Zellen mit Normalkaninchenserum (A) und mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR (B) 60h nach transienter Transfektion mit H1

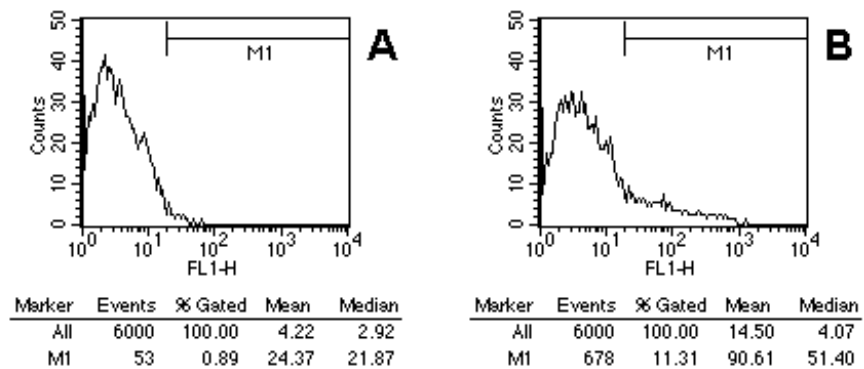


Abb. 28: Durchflußzytometrische Untersuchung von *cos7*-Zellen mit Normalkaninchenserum (A) und mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR (B) 60h nach transienter Transfektion mit H2



Die Funktionalität der exprimierten Untereinheiten wurde über ihre Bindungsfähigkeit an Laktose-Agarose nachgeprüft. Aufgrund der geringen Proteinmengen wurde das Gel nicht in eine Säule gepackt, sondern lose dem Lysat hinzugefügt, durch Zentrifugation gewaschen und der Rezeptor mit dem SDS-PAGE-Probenpuffer (3.1.2) im Ultraschallbad eluiert. In dem anschließend durchgeführten Western-Blot wurden die Untereinheiten dann mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR nachgewiesen (Abb. 29). Die Untereinheit H1 (Spur A) zeigt das gleiche Bandenmuster aus Monomeren, Dimeren und Trimeren wie funktioneller ASGPR aus normaler Leber (Spur D), was darauf schließen läßt, daß die Aktivität des gesamten Rezeptor-Komplexes wesentlich von dieser Untereinheit bestimmt wird. Bei H2 dagegen (Spur B) sind neben Dimeren und Trimeren hauptsächlich Tetramere zu erkennen. Die Tatsache, daß in der denaturierenden Umgebung der SDS-PAGE bei H2 keine Monomere auftreten, deutet auf eine höhere Stabilität der Homooligomer-Komplexe dieser Untereinheit gegenüber H1 hin und läßt vermuten, daß H2 wesentlich zur Stabilität der natürlichen Rezeptor-Komplexe beiträgt.

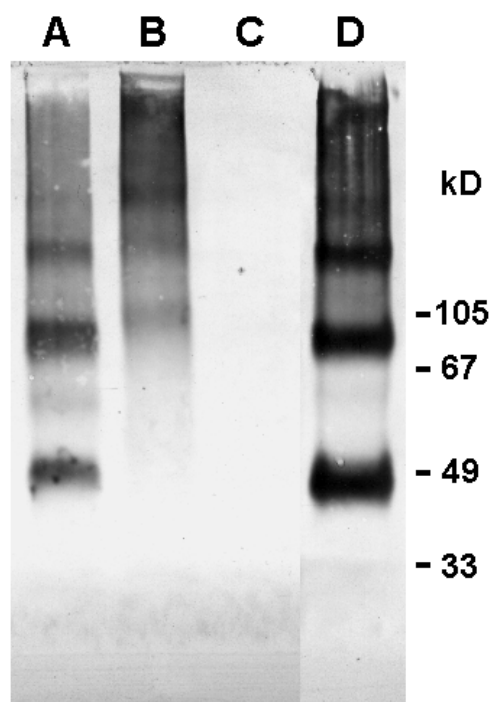


Abb. 29: Western-Blot mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR nach Isolierung von funktionellen Rezeptor-Komplexen über eine Laktose-Agarose-Matrix aus dem Lysat von H1-transfizierten (A), aus H2-transfizierten (B) und aus nicht-transfizierten (C) *cos7* - Zellen sowie aus einer Lösung von isoliertem ASGPR aus normaler Leber (D)

#### 4.3.3 Stabile Expression beider Untereinheiten in 293-Zellen

Die stabile Expression eines Proteins erlaubt die Isolierung größerer Mengen und so besser reproduzierbare Untersuchungen. Für diesen Zweck wurde die Zelllinie HEK293, welche humanen Ursprungs ist, verwendet.

Die Abbildungen 30 und 31 zeigen die Membranständigkeit der exprimierten Untereinheiten mit Hilfe der Durchflußzytometrie. Die Messungen wurden wie bei den cos7 - Zellen mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR und Normal-Kaninchenserum als Negativkontrolle durchgeführt. Der Anteil positiver Zellen betrug für den H1-Klon fast 94% (Abb. 30) und für den verwendeten H2-Klon 92% (Abb. 31).

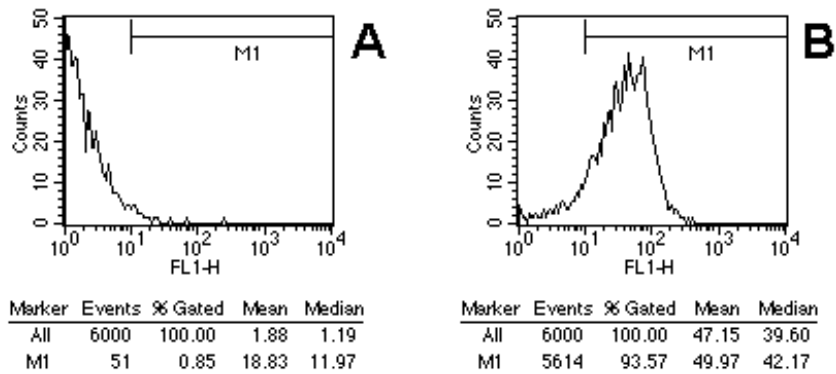


Abb. 30: Durchflußzytometrische Untersuchung von stabil mit H1 transfizierten HEK293 - Zellen mit Normalkaninchenserum (A) und mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR (B)

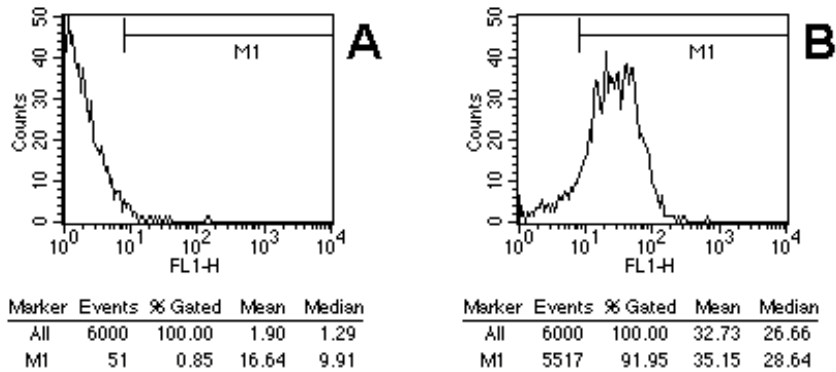


Abb. 31: Durchflußzytometrische Untersuchung von stabil mit H2 transfizierten HEK293 - Zellen mit Normalkaninchenserum (A) und mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR (B)

Die Funktionalität der exprimierten Untereinheiten wurde wie bei den cos7 - Zellen über ihre Bindungsfähigkeit an eine Laktose-Agarose-Matrix überprüft (Abb. 32). Erwartungsgemäß zeigt die Untereinheit H1 (Spur C) das gleiche Bandenmuster wie isolierter ASGPR aus normaler Leber (Spur A), aufgrund des höheren Anteils positiver Zellen erhält man aus der gleichen Zellmenge ein stärkeres Signal als bei den transient-transfizierten cos7 - Zellen. Bezüglich der Untereinheit H2 sind jedoch Unterschiede

zu erkennen. Ein klares Bandenmuster aus Dimeren, Trimeren und Tetrameren ist nicht auszumachen, die auftretenden Banden deuten vielmehr auf unspezifische Wechselwirkungen hin. Wie bereits in Abbildung 12 gezeigt, ist die vollständige Glykosylierung eine Voraussetzung für die Funktionalität des Rezeptors. Daher wurden die Proben zusätzlich mit dem Lektin SNA untersucht. Abbildung 33 zeigt in Spur D zwei schwache Signale (Pfeile), die H2-Dimeren und -Trimeren zugeordnet werden können. Die entsprechenden Banden wurden in Abb. 32 mit Pfeilen markiert.

Abb. 32: Western-Blot mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR nach Isolierung von funktionellen Rezeptor-Komplexen über eine Laktose-Agarose-Matrix aus dem Lysat von nicht-transfizierten (B), stabil mit H1-transfizierten (C) und stabil mit H2-transfizierten (D) HEK293 - Zellen sowie aus einer Lösung von isoliertem ASGPR aus normaler Leber (A)

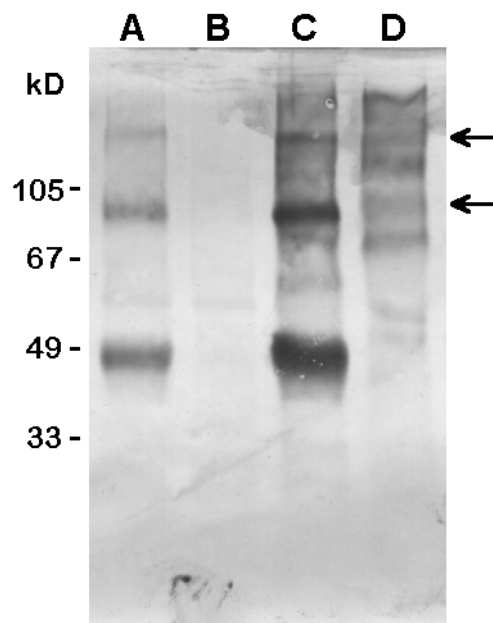
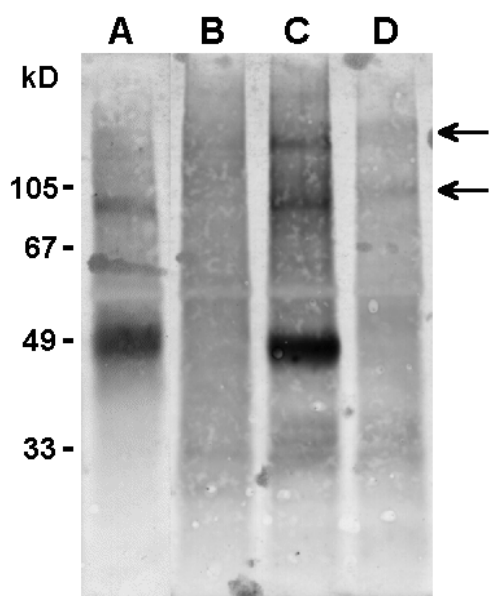


Abb. 33: Nachweis terminaler Sialinsäuren mit dem Lektin SNA nach Isolierung von funktionellen Rezeptor-Komplexen über eine Laktose-Agarose-Matrix aus dem Lysat von nicht-transfizierten (B), stabil mit H1-transfizierten (C) und stabil mit H2-transfizierten (D) HEK293 - Zellen sowie aus einer Lösung von isoliertem ASGPR aus normaler Leber (A)



#### 4.4 Nachweis von Antikörpern gegen den ASGPR in Patientenseren mit einer rekombinant exprimierten Untereinheit H1

Rekombinant exprimiertes H1 wurde aus einer stabil transfizierten HEK293-Zelllinie in ausreichender Menge und Reinheit gewonnen, um es in einem Enzymimmunoassay (EIA) als Antigen zur Bestimmung von Antikörpern gegen den ASGPR einsetzen zu können. Abb. 34 zeigt die Reinheit des Eluats nach der zweiten Affinitätschromatographie in einer silbergefärbten SDS-PAGE Auftrennung (Spur A). Die immunologische Spezifität ist in Spur B mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR dargestellt. Aus der Bande im Gel sowie aus der Fläche unter dem Elutionspeak läßt sich abschätzen, wie stark die Lösung im Vergleich zum kompletten Rezeptor aus normaler Leber verdünnt werden muß. Pro EIA-Platte wurden eine Positiv- und drei Negativkontrollen sowie zwölf Patientenseren aufgetragen.

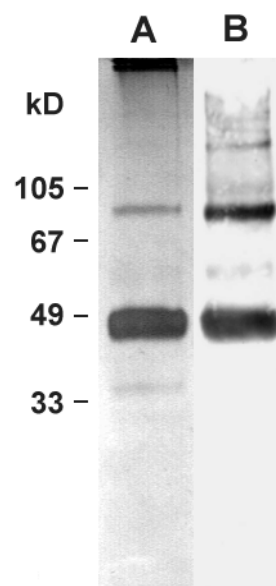


Abb. 34: Silbergefärbte SDS-PAGE Auftrennung von aufgereinigtem, rekombinanten H1 (A) und immunologischer Nachweis mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR (B)

Die Mittelwerte der Doppelbestimmung der optischen Dichten für die Reaktivität mit dem rekombinanten Antigen wurden von denen mit dem natürlichen Antigen abgezogen und die prozentuale Abweichung von der optischen Dichte der Reaktivität mit dem natürlichen Antigen berechnet. In Abbildung 35 sind die Werte in 10% - Schritten mit der Anzahl der jeweiligen Seren aufgetragen. Unerwarteterweise war nur ein Serum von 178 getesteten (0,6%) negativ mit dem rekombinanten H1. Insgesamt lagen die optischen Dichten bei 126 Seren (70,8%) unterhalb und bei 52 Seren (29,2%) oberhalb von denen des natürlichen Antigens. Bei 170 Seren (95,5%) waren die Abweichungen im Bereich von  $\pm 15\%$ . Das rekombinante Antigen weist also genügend immunologische Gemeinsamkeiten mit dem kompletten Rezeptor aus normaler Leber auf.

Im nächsten Schritt wurden die Titer von 35 ausgewählten Seren auf beiden Antigenen miteinander verglichen. Dazu wurden die Seren jeweils auf die Hälfte verdünnt (1:200, 1:400, 1:800 etc.); der Titer gibt dann die größte noch positive Verdünnung des Serums an. In Abbildung 36 sind die Ergebnisse

zusammengestellt. Auch hier zeigte sich Übereinstimmung bei 23 Seren (65,7%), die anderen 12 (34,3%) lagen aber nur eine Verdünnungsstufe darunter oder darüber.

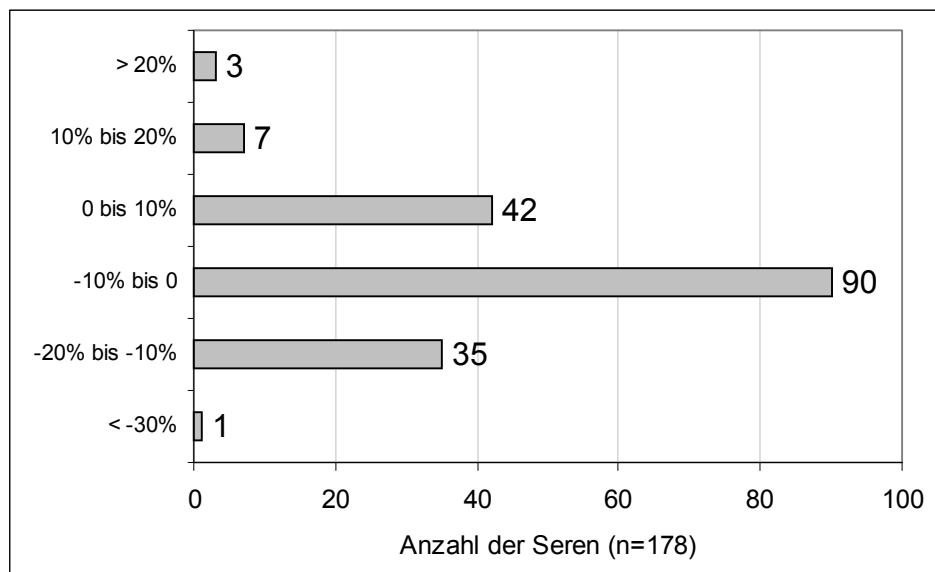


Abb. 35: Abweichungen der optischen Dichten von Antikörper-Reaktivitäten mit rekombinantem H1 von denen mit komplettem Rezeptor aus normaler Leber

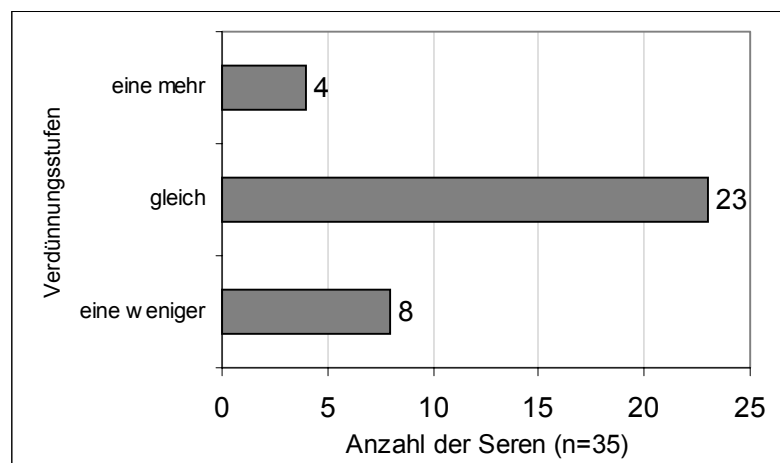


Abb. 36: Vergleich der Titer von Anti-ASGPR positiven Seren mit rekombinantem H1 und komplettem Rezeptor aus normaler Leber

Da im Patientenserum eine polyklonale Immunantwort vorliegt, mußte auch überprüft werden, ob das rekombinante Antigen alle Epitope der Antikörper gegen den ASGPR enthält. Hierzu wurde versucht, die Reaktivität des Serums mit dem natürlichen Antigen durch Zugabe von rekombinantem Antigen zu hemmen. Die 1:100 vorverdünnten Seren wurden dafür mit steigenden Volumina aus der Lösung des präparierten H1 versehen und vor der Aufgabe auf die EIA-Platte 15min inkubiert. Zur Bestimmung der vorliegenden H1-Konzentrationen wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Es ist bekannt, daß stark (N-) glykosylierte Proteine bei den meisten Protein-Assays zu einen deutlich verringerten Wert gegenüber einem BSA-Standard führen. In Abbildung 37 sind die

Kalibrierungsgeraden von BSA und Fetuin in Abhängigkeit von der Konzentration aufgetragen. Die optischen Dichten bei 595nm erreichten im Bereich kleiner Konzentrationen des Glykoproteins nur einen Wert von einem Drittel gegenüber BSA. Da der ASGPR ebenfalls stark glykosyliert ist, wurde Fetuin als Referenz herangezogen.

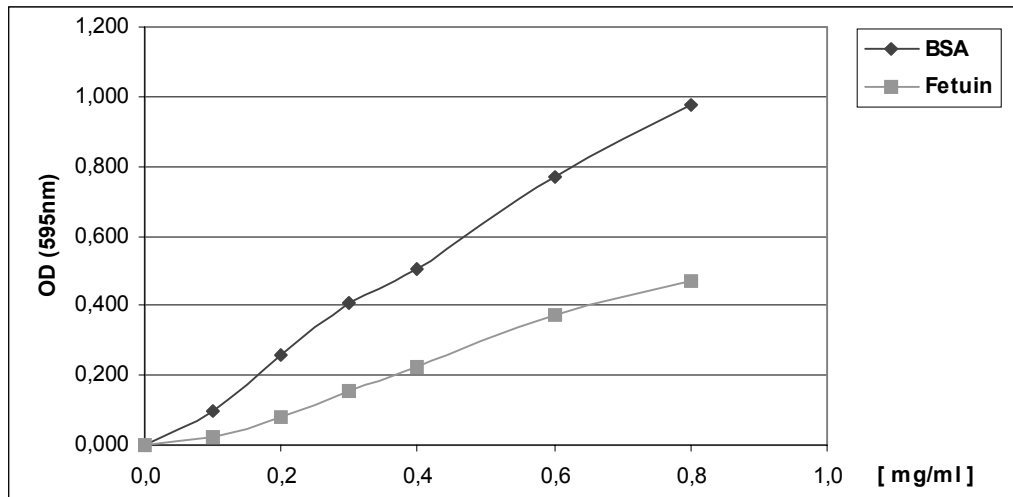


Abb. 37: Vergleich der optischen Dichten von BSA und Fetuin beim Proteinbestimmungsassay nach Bradford

Abbildung 38 zeigt die Inhibierungskurven zweier repräsentativer Seren in Abhängigkeit von der zugesetzten H1-Konzentration. Serum 1 stammte von einer Patientin mit AIH und weist einen linearen Abfall der Reaktivität mit dem natürlichen Antigen in Anwesenheit des rekombinanten auf, wie es für die meisten Seren zutrif. Serum 2 stammte von einer Patientin mit ethyltoxischer Leberzirrhose und fällt zunächst etwas flacher ab, bevor es sich schließlich auch ganz inhibieren ließ. Die Reaktivität mit dem kompletten Rezeptor aus normaler Leber konnte bei allen 15 getesteten Seren bei einer H1-Konzentration von 21ng/μl vollständig blockiert werden.

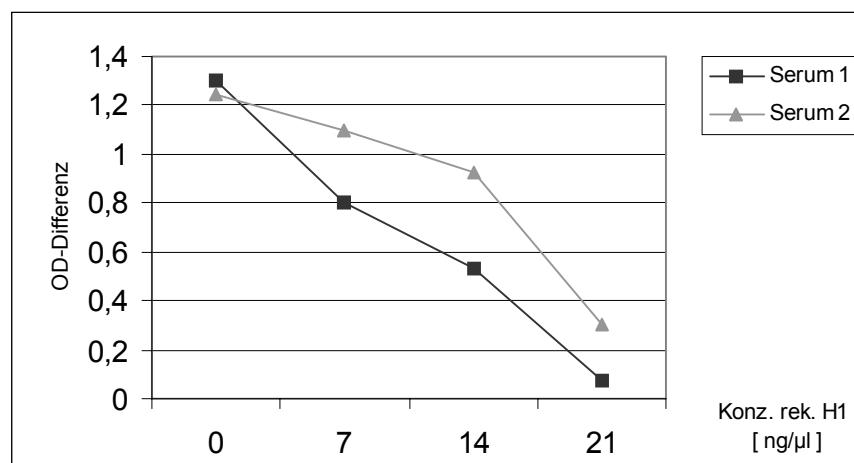


Abb. 38: Inhibierung der Reaktivität zweier repräsentativer Seren mit ASGPR durch Zusatz von rekombinantem H1. Der Cut-Off lag bei einem OD-Wert von 0,47. Für die Bestimmung des Proteingehalts wurde Fetuin als Standard verwendet.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Betrachtungen zu Präparation und Oligomerisierung des normalen ASGPR**

In der vorliegenden Arbeit wurde der humane Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGPR) aus normaler Leber in funktioneller Form isoliert und biochemisch charakterisiert. Durch die Etablierung einer verbesserten Präparationsmethode konnte der Rezeptor mit hoher Ausbeute und großer Reinheit gewonnen werden (Treichel et al., 1995). Dadurch waren Versuche möglich, die aufgrund hohen Materialverbrauchs bisher nicht machbar waren oder die den Einsatz radioaktiv markierter Proben erforderten.

Die Wahl der Matrix für die Präparation von Glykoproteinen spielt eine entscheidende Rolle für den Grad der Reinheit und die Erhaltung ihrer biologischen Aktivität. Glykosylierte Proteine, insbesondere bei Anwesenheit von Sialinsäuren, neigen dazu, unspezifische Wechselwirkungen mit den OH-Gruppen der Matrix einzugehen, was zu Peakverbreiterungen und Problemen bei der Elution führen kann. Nur die Verwendung einer Agarose-basierten stationären Phase war für die Aufreinigung des ASGPR geeignet. Der verwendete Ligand für die Affinitätsbindung (Laktose) stellt ein relativ einfaches Molekül dar, das beim Kontakt mit allen Proteinen eines Zelllysates im Vergleich mit einem früher beschriebenen Sepharose-gekoppelten Asialoglykoprotein als Liganden (Baenziger und Maynard, 1980) nicht degeneriert und auch bei mehrfacher Benutzung reproduzierbare Ergebnisse lieferte. Bei rekombinanter Expression der beiden Untereinheiten wurde zwar gezeigt, dass die Bindung an Galaktose allein noch nicht das Vorhandensein einer hochaffinen Bindungsstelle für ein drei- oder vierfach-verzweigtes Glykoprotein bedeutet (Shia und Lodish, 1989), jedoch kann umgekehrt gesagt werden, dass ein hochaffiner funktioneller Rezeptor aus natürlichem Gewebe auf jeden Fall an Laktose binden sollte. Die Isolierung von ausschließlich funktionellem ASGPR erlaubt so die Untersuchung von Oligomeren der Untereinheiten H1 und H2, die auch tatsächlich in der Lage sind, Asialoglykoproteine zu binden. Die Größenausschluß-Chromatographie und die Umpufferung konnten am besten in der Superose-Matrix durchgeführt werden, da hier im Vergleich zu Sephadex nur wenig Verluste an Protein festzustellen waren.

Der aufgereinigte funktionelle Rezeptor erschien in der silbergefärbten SDS-PAGE mit einer Doppelbande bei 46 und 50kD, die deglykosylierte Form mit einer Doppelbande bei etwa 32 und 34kD (Abb. 9), was die bisherigen Befunde mit immunologisch nachgewiesenem radioaktiv markierten Rezeptor aus HepG2-Zellen bestätigte. Der Anteil der Glykosylierung am Molekulargewicht würde demnach 28% betragen. Die in der SDS-PAGE sichtbare Größe stellt ein scheinbares Molekulargewicht

dar, da die Proteine vom SDS in kugelförmigen Mizellen eingeschlossen werden, bei denen die apolare Kette nach innen und der geladene Kopf nach außen gerichtet ist und somit alle Molekülen eine der Größe entsprechende Nettoladung erhalten. Je globulärer (oder kompakter) ein Protein gefaltet ist, desto genauer gibt demnach die in der SDS-PAGE erscheinende Größe sein genaues Molekulargewicht wieder. Ist die kugelförmige Faltung auch unter denaturierenden Bedingungen nicht möglich, so wird das Protein größer erscheinen, als es tatsächlich ist. Bei schrittweisem Glykosidabbau mit spezifischen Exoglykosidasen beim ASGPR wurde beobachtet, dass das in der SDS-PAGE erscheinende Molekulargewicht nicht in dem Ausmaß abnahm, wie es dem Anteil von N-Acetylneuraminsäure, Galaktose und N-Acetylglukosamin entsprechen würde (Abb. 13). Der Rezeptor mit noch vorhandener Kernglykosylierung [(GlcNAc)<sub>2</sub>-Man<sub>3</sub>] lag immer noch etwa 7kD über dem des deglykosylierten ASGPR. Dies würde dafür sprechen, dass die Kohlenhydrat-Seitenketten einen erheblichen Einfluß auf die Konformation des Rezeptors haben, während in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, dass der deglykosylierte Rezeptor *in vitro* keine *funktionellen* Einschränkungen aufwies (Breitfeld et al., 1984).

Behandelte man den isolierten ASGPR mit reduzierenden Agentien wie 2-Mercaptoethanol, so ließ sich eine Aufteilung in funktionelle und nicht-funktionelle Einheiten beobachten (Abb. 10). Bei einer Auftrennung über die auch bei der Präparation verwendete Polygalaktose-Laktose Matrix blieb ein Teil auch weiterhin hängen (funktionell), während der andere in der durchlaufenden Fraktion zu finden war (nicht-funktionell). Untersuchungen mit peptid-spezifischen Antikörpern hinsichtlich der Verteilung der Untereinheiten in den beiden Fraktionen ergaben, dass H2 bei den nicht-funktionellen Einheiten angereichert war, während H1 zu gleichen Teilen in funktioneller und nicht-funktioneller Fraktion gefunden werden konnte (Abb. 11). In der Größenausschlußchromatographie wurde weiterhin beobachtet, dass in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol nur Trimere und Dimere, aber keine Monomere auftraten (Abb. 14B). Diese Ergebnisse lassen sich so deuten, dass Homooligomere von H1 existieren, auf die das reduzierende Agens keinen Einfluß zu haben scheint, und Heterooligomere aus H1 und H2, die als Ganzes ihre Funktionalität verlieren, sobald die Disulfidbrücken eines Bestandteils (H2) aufgespalten werden. Die vollständige Trennung von H1 und H2 war bei diesem Experiment nicht möglich, wie es bei den Untereinheiten des Ratten-ASGPR beobachtet wurde (Halberg et al., 1987).

Bezüglich einer der vier Disulfidbrücken von H2 wurde nach Transfektion in Maus-Fibroblasten die interessante Beobachtung gemacht, daß sie die korrekte Faltung des Proteins teilweise behinderte. Wurden die Cysteine der äußeren drei Disulfidbrücken jeweils paarweise gegen Alanin ausgetauscht, so fand keine richtige Faltung statt und es erfolgte der rasche Abbau der mutierten Proteine im ER (Yuk und Lodish, 1995). Wurden dagegen die Cysteine der der Zellmembran am nächsten liegenden Disulfidbrücke (vgl. H1-Struktur, Abb. 5) zu Alanin mutiert, so gelangten etwa 20% des neu



synthetisierten Proteins zur Zellmembran, und zwar schneller als Wildtyp H2. Die restlichen 80% wurden im ER degradiert, und zwar ebenfalls schneller als das natürliche H2. Die beobachteten Ergebnisse wurden dort so interpretiert, daß der ASGPR als stark exprimiertes Protein einer hochfeinen Regulierung des Turnovers bedarf, die durch das Vorhandensein einer destabilisierenden Disulfidbrücke erzielt werden könnte.

Die Funktionalität des Rezeptors ist auch von einer intakten Glykosidstruktur abhängig. Eine Entfernung der terminalen Sialinsäuren führte zur vollständigen Inaktivierung der Ligandenbindung, da sich der Rezeptor wahrscheinlich selbst erkennt und so die Bindungsstellen blockiert (Abb. 12F). In einem Experiment mit markiertem Asialofetuin konnte auch gezeigt werden, dass der ASGPR nach Auftrennung in der denaturierenden SDS-PAGE auf Höhe der Monomer-Bande noch funktionelle Aktivität aufwies (Abb. 12E).

Die Auftrennung des nativen Rezeptors in der nicht-denaturierenden Größenausschluß-Chromatographie zeigte die Assoziation der Untereinheiten nach Isolation in Lösung. Es waren ausschließlich Trimere und Dimere vorhanden (Abb. 14A), auch in Gegenwart reduzierender Agentien treten mehr Dimere, aber keine Monomere auf (Abb. 14B), was darauf hinwies, dass die Ausbildung von Disulfidbrücken keine Notwendigkeit für die Oligomerisierung der Untereinheiten ist. Die beobachtete Bildung von Hexameren (Steer et al., 1981) könnte eine in Lösung weniger stabile, aber in vivo durch die Umgebung der Zellmembranproteine mögliche hochfunktionelle Anordnung der Trimere darstellen.

Bei rekombinanter Expression beider Untereinheiten in Mausfibroblasten wurden Rückschlüsse auf die Oligomerisierung über die Einschränkung ihrer lateralen Mobilität gezogen (Henis et al., 1990). Eine Untereinheit wurde durch Quervernetzung mit spezifischen IgG-Molekülen immobilisiert, die jeweils andere mit einem fluoreszierenden monovalenten Fab'-Fragment angefärbt. Die laterale Diffusion wurde bei 12°C bestimmt, um Internalisierung zu vermeiden. Es zeigte sich, dass bei HepG2-Zellen die Immobilisierung einer Untereinheit eine Immobilisierung der anderen im gleichen Ausmaß zur Folge hatte. Dies wies darauf hin, dass alle mobilen H1- und H2-Moleküle in stabilen Heterooligomeren vorlagen. Bei den transfizierten Zellen führte die Immobilisierung von H2 zu der von H1 im gleichen Umfang, während die Immobilisierung von H1 den mobilen Anteil von H2 nur um 2/3 reduzierte. Dies würde bedeuten, dass 1/3 der H2-Population unabhängig von H1 wäre. Es wurde über die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität außerdem ermittelt, dass das Verhältnis von H1 zu H2 auf der Oberfläche von HepG2-Zellen etwa 3:1, auf der von den transfizierten Zellen ungefähr 1:1 betrug. Diese Zellen exprimierten demnach einen Überschuß an H2-Molekülen. Aufgrund der Ergebnisse wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem drei H1-Moleküle einen Trimer-Kern bilden, der mit ein, zwei oder drei H2-Molekülen eine hochaffine Bindungsstelle bilden kann.

Dies würde auch mit Beobachtungen beim ASGPR aus Rattenleber in Einklang stehen. Beim Crosslinking von markierten Liganden mit dem Rezeptor in Lösung wurden die Untereinheiten proportional zu ihrer Verfügbarkeit mit dem Liganden verknüpft, d.h. RHL1, das zu etwa 70% den Rezeptor bildet, war wesentlich stärker markiert als die beiden weniger vorhandenen Untereinheiten RHL2 oder RHL3. Beim gleichen Versuch auf Zellmembranen von Ratten-Hepatozyten wurden dagegen RHL2 und RHL3 verhältnismäßig stärker markiert, so daß RHL1 in der natürlichen Umgebung teilweise maskiert zu sein schien (Lee und Lee, 1987). Vergleichbares konnte auch in einem anderen Experiment beobachtet werden, bei dem durch chemisches Crosslinking 1:1 Addukte von ASOR mit den Rezeptor-Untereinheiten in der Membran von isolierten Ratten-Hepatozyten hergestellt wurden (Herzig und Weigel, 1989). Die Rezeptor-Ligand Komplexe wurden danach sowohl mit einem Rezeptor- als auch mit einem Ligand-spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Man fand bei RHL-2/3 ein Verhältnis von freien zu ASOR-gebundenen Untereinheiten von 0,5 zu 1, während es bei RHL-1 10 zu 1 betrug. Aufgrund dieser Befunde wurde als Modell für den nativen Rezeptor ein Heterohexamer vorgeschlagen, das aus vier Untereinheiten RHL-1 und zwei Untereinheiten RHL-2 und / oder RHL-3 besteht. Darüberhinaus wurde entdeckt, daß ein Antikörper gegen RHL2/3, der nicht mit RHL1 reagierte, trotzdem in der Lage war, die Ligandenbindung an Hepatozytenmembranen zu verhindern (Zeng et al., 1998). RHL1 und RHL2/3 scheinen somit grundsätzlich miteinander assoziiert zu sein, obwohl RHL1 in transfizierten Zellen gegenüber Galaktose-reichen Zielstrukturen auch allein als Rezeptor fungieren konnte (Braiterman et al., 1989) und die aus Rattenleber isolierten Untereinheiten sich als unabhängige Galaktose-bindende Proteine darstellten (Halberg et al., 1987).

In einem anderen Ansatz wurden die Oligomerisierungsdomänen von H1 und H2 in Bakterien exprimiert und ihr Assoziierungsverhalten untersucht (Bider et al., 1996). Der Bereich zwischen Transmembransegment und der CRD wurde als der für die Heteromerbildung notwendige Abschnitt der Untereinheiten ermittelt, indem man ein mutiertes H1, dem ein Teil der cytosolischen Aminosäuren (4-33) fehlte und das allein nicht zur Zelloberfläche gelangte (Wahlberg et al., 1995), mit H2-Mutanten in MDCK-Zellen coexprimierte. Es zeigte sich, dass das Vorhandensein des extrazellulären Bereichs von H2 ausreichte, um mit dem mutierten H1 zu assoziieren und so den Transport zur Zelloberfläche zu ermöglichen. Die etwa 80 AS großen Domänen von H1 und H2 (H1S und H2S) wurden an den Enden mit Cystein-Resten versehen, um durch die Ausbildung von Disulfidbrücken das Ausmaß der Oligomerisierung bestimmen zu können. H1S allein bildete Homo-Trimere, während H2S allein exprimiert zu Homo-Tetrameren oligomerisierte. Beim Vermischen beider Fragmente, mit einem Überschuß von H1S, wie es bei HepG2-Zellen gefunden wurde, ergaben sich überwiegend 2:2 Hetero-Tetramere. Inwieweit dieses Ergebnis die natürliche Situation des Rezeptors in vivo wiederspiegelt, kann nicht gesagt werden, da einerseits die benachbarte CRD, andererseits aber auch die überwiegend in der

Oligomerisierungsdomäne stattfindende Glykosylierung sehr wahrscheinlich sterische und konformationelle Einflüsse auf die Assoziierung haben und in diesem Expressionssystem fehlten.

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass sich eine Heterogenität in der Oligomerisierung der Untereinheiten nachweisen ließ (Bider et al., 1998). Bei HepG2-Zellen wurde beobachtet, daß ohne Ligand H1 mit einer Rate von 8% / min und H2 mit 4% / min internalisierte, was mit einer homogenen Rezeptorpopulation nicht vereinbar war. Durch Bindung eines Liganden verdoppelten sich die Internalisierungsraten von beiden Untereinheiten auf 16% bzw. 8% / min, was bestätigte, daß beide Teil des Liganden-bindenden Rezeptorkomplexes waren. Darüber hinaus zeigten beide Untereinheiten eine niedrigere Internalisierungsrate als der Ligand selbst, was dafür sprach, daß sowohl H1 als auch H2 ebenso in anderen Komplexen vorhanden waren, die Liganden weder binden noch endozytieren. Wie im vorigen Absatz aufgeführt, müssten 2:2-Heteromere als die potentiell Liganden-bindenden Oligomere gelten, da früher bereits gezeigt wurde, daß zwei Galaktose-Moleküle eines dreifach-verzweigten Glykans mit H1 interagieren und das dritte mit H2. Die andere dort gehäuft aufgetretene Zusammensetzung von 1:3-Tetrameren müsste dann zu denjenigen Rezeptorkomplexen gehören, die zwar internalisiert werden, aber nicht an der Ligandenbindung teilnehmen, da hier nur ein H1-Molekül zur Verfügung steht. 2:2-Komplexe könnten außerdem effizienter endozytiert werden als die 1:3-Komplexe, da zwei H1-Endozytosesignale vorhanden sind und früher gezeigt wurde, daß H2 nicht wesentlich zur Internalisierung beiträgt (Fuhrer et al., 1994). Dies würde dann auch die niedrigere Gesamt-Internalisierungsrate von H2 erklären, da in den 1:3-Komplexen mehr H2 gebunden ist.

In einer zweidimensionalen Auftrennung von Proteinen können neben Unterschieden im Molekulargewicht auch Abweichungen der isoelektrischen Punkte ermittelt werden. Die in dieser Arbeit durchgeführte 2D-Auftrennung des humanen ASGPR erbrachte eine unerwartet hohe Anzahl an Unterformen der Untereinheiten (Abb. 15A, 16A, 17A). Da Sialinsäuren eine Ladung aufweisen und ein unterschiedlicher Gehalt in den Proteinen leicht zu verschiedenen isoelektrischen Punkten führen kann, wurde ebenso die deglykosylierte Form des Rezeptors untersucht (Abb. 15B, 16B, 17B). Bei H2 fanden sich zwei Formen, die durch mögliche Phosphorylierung der Untereinheit an einem Serin-Rest erklärt werden könnten (Geffen et al., 1991; Paietta et al., 1992b). Die Phosphorylierung eines Serin-Restes in H1 wurde dagegen als äußerst schwach angegeben und musste erst durch die Zugabe von Phorbol-Estern angeregt werden, ist also vermutlich unter physiologischen Bedingungen kaum vorhanden. Die Phosphorylierung des Tyrosin-Restes im Endozytose-Signal muß dagegen in Betracht gezogen werden, jedoch würde das nur zwei der vorhandenen vier Punkte erklären. Der beschriebene Einbau von Fettsäuren in den ASGPR (Zeng et al., 1995) bringt ebenfalls keine zusätzliche Ladung in das Protein, da die geladene Säuregruppe durch Veresterung mit der -SH-Gruppe eines Cystein-Restes verschwindet.

Möglich wären andere posttranslationale Modifikationen von H1, die bisher nicht bekannt sind, oder Mutationen von geladenen Aminosäuren, die das Vorhandensein unterschiedlicher Primärstrukturen bei H1 bedeuten würden.

## **5.2 Betrachtung der Unterschiede im ASGPR aus maligne transformierten Zellen**

Die Untersuchung von isoliertem humanen ASGP-Rezeptor beschränkte sich bisher weitgehend auf Präparationen aus den Zelllinien HepG2- und Huh7. Mit der hier verwendeten Präparationsmethode wurde daher auch ASGPR aus diesen maligne transformierten Zellen isoliert und mit dem aus normalem Lebergewebe verglichen. Es zeigte sich nach Auftrennung in der SDS-PAGE und Anfärbung mit dem Lektin SNA, dass sich die Molekulargewichte der drei ASGPR-Arten unterscheiden (Abb. 18). ASGPR aus HepG2-Zellen erschien 6kD, der aus Huh7-Zellen 4kD größer als ASGPR aus normaler Leber. Daraufhin wurden die drei Rezeptor-Arten in nativer und deglykosylierter Form auf die Untereinheiten hin untersucht (Abb. 19, 20, 21) Es ergab sich, dass die Unterschiede bei H1 auf einen höheren Grad der Glykosylierung zurückzuführen waren, da nach Deglykosylierung die Molekulargewichte der drei ASGPR-Arten identisch erschienen (Abb. 20). Beim Rezeptor aus HepG2-Zellen konnte zusätzlich beobachtet werden, dass der Antikörper gegen H1, der ja eine Peptidsequenz am C-terminalen Ende erkennt, nur schwach reagierte. Da die entsprechende Bande im Blot dem Anti Gesamt-ASGPR in normaler Stärke erschien (Abb. 19), könnte man annehmen, dass eine Modifizierung am C-terminalen Ende vorliegt, die die Erkennung durch den Antikörper erschwerte. Ähnliches wurde auch für eine sekretierte Form von H2 berichtet (Tolchinsky et al., 1996). Bezüglich der Untereinheit H2 zeigten sich auch nach Deglykosylierung noch erhebliche Unterschiede im Molekulargewicht sowohl bei HepG2- als auch bei Huh7-Zellen, und zwar in Form von zwei Banden bei etwa 40 und 46kD (Abb. 21). Da die größere der beiden Banden noch schwache Reaktivität mit dem Lektin RCA aufwies (nicht gezeigt), war hier die Deglykosylierung nicht vollständig. Dies ist insofern ungewöhnlich, dass die Deglykosylierung bei H2 aus normaler Leber unter gleichen Bedingungen vollständig ablief. Das veränderte Reaktionsverhalten des verwendeten Enzyms N-Glykosidase F könnte durch erschwerten Zugang der Kohlenhydrat-Seitenketten infolge posttranslationaler Modifikationen im Protein erklärt werden. Die kleinere der beiden Banden erwies sich jedoch frei von terminaler Galaktose. Dies könnte ebenso die Folge einer posttranslationalen Prozessierung von H2 sein, durch die Moleküle in das Protein hineingebracht werden, die eine erhebliche konformationelle Veränderung und so das in der SDS-PAGE beobachtete Molekulargewicht überproportional größer erscheinen lassen. Theoretisch wäre auch eine

tatsächlich veränderte Primärstruktur von H2 denkbar, die aber wahrscheinlich aufgrund der Forschungen im molekularbiologischen Bereich schon entdeckt worden wäre. Die bereits bekannte Insertion von 19 Aminosäuren im cytoplasmatischen Abschnitt von H2 entspricht nur einer Größe von 2kD, sofern sie nicht zu einer erheblichen Veränderung der Konformation des Proteins führt.

Gegen ein 14 AS-Peptid aus dieser Insertion wurde anschließend ein Antikörper generiert. Beim Vergleich von nativem ASGPR aus normaler Leber und aus Huh7-Zellen bezüglich des Insertionspeptids zeigte sich, dass die Insertion in ASGPR aus Huh7-Zellen sehr stark vorhanden war, sich dagegen im Rezeptor aus normaler Leber nur Spuren nachweisen ließen (Abb. 24). Dies bedeutet eine veränderte Expression des ASGPR in maligne transformierten Zellen. Die funktionellen Fähigkeiten des Rezeptors scheinen dadurch zwar nicht beeinträchtigt zu sein, jedoch könnten die immunologischen Eigenschaften verändert worden sein. Dies würde eine wichtige Rolle spielen, falls der ASGPR Zielantigen für Zellen des Immunsystems im Blutkreislauf ist, oder bei Zell-Zell Interaktionen der Hepatozyten untereinander, die für die Proliferation von Bedeutung sein könnten.

In der zweidimensionalen Auftrennung von ASGPR aus HepG2-Zellen zeigte sich nur ein einziger immunologisch-relevanter Punkt (Abb. 23) gegenüber einer Wolke aus vielen Punkten beim ASGPR aus normaler Leber (Abb. 22). Auch hier war somit eine deutlich veränderte Expressionsform des Rezeptors in maligne transformierten gegenüber normalen Zellen festzustellen. Es sei aber darauf hingewiesen, dass der Proteinbedarf für die 2D-Auftrennung relativ hoch ist und dass bei Präparationen aus Zellkulturen die gewonnenen Mengen nicht mit denen aus Lebergewebe vergleichbar waren.

### **5.3 Betrachtung der rekombinanten Darstellung der Untereinheiten des ASGPR**

Die Untereinheiten H1 und H2 wurden schließlich in zwei Säugerzelllinien rekombinant dargestellt. Dazu wurden die kompletten cDNAs in einen geeigneten Vektor kloniert und amplifiziert. Die Transfektion wurde mit dem Calcium-Präzipitationsverfahren durchgeführt. Die Expression erfolgte zunächst transient in cos7-Zellen. Die Membranständigkeit des exprimierten Proteins wurde mittels Durchflußzytometrie mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR überprüft (Abb. 27, 28). Es ergab sich für H1 ein Wert von 20,5% und für H2 von 11,3%, jeweils gegen Normalkaninchenserum als Negativkontrolle. Diese Werte sprechen für eine geringe Transfektionseffizienz mit der gewählten Methode. Da mittelfristig die Generierung stabiler Klone angestrebt war, wurde keine Optimierung für die transiente Transfektion vorgenommen. Für die weiteren Experimente war die exprimierte Proteinmenge ausreichend.

Die Zellen wurden 48h nach dem Auswechseln des Transfektionsmediums abgelöst und in einem Puffer mit Detergenz und  $\text{Ca}^{2+}$ -Salz lysiert, um die funktionellen Einheiten zu untersuchen. Dazu wurde eine adäquate Menge Laktose-Agarose mit dem Lysat inkubiert, gewaschen und das adsorbierte Protein mittels Ultraschall abgelöst. Nach der Auftrennung in der SDS-PAGE wurde ein Western-Blot mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR durchgeführt. Allein in cos7-Zellen exprimiertes H1 zeigte das gleiche Bandenmuster wie isolierter ASGPR aus humaner Leber in Form von überwiegend Monomeren neben Di- und Trimeren (Abb. 29). Dies weist darauf hin, dass die funktionellen Eigenschaften hauptsächlich von H1 gebildet werden. Bei dem in cos7-Zellen exprimierten H2-Protein wurden dagegen neben Di- und Trimeren überwiegend Tetramere gefunden. Die Assoziierung der Moleküle muß also so stark sein, dass auch im denaturierenden Milieu der SDS-PAGE kein Zerfall zu Monomeren stattfindet. Es wäre also möglich, dass H2 wesentlich zur Stabilität der Heterooligomere in der Zellmembran beiträgt.

Zur Produktion größerer Mengen an rekombinanten Proteinen wurden anschließend stabile Klone von H1 und H2c in der Zelllinie HEK293 generiert. Die Selektion der transfizierten Zellen erfolgte mit Geneticin (G418), die erhaltenen Transfektanten wurden zweimal subkloniert, um bessere Klonierungsergebnisse zu erzielen. Die erhaltenen Klone wurden über einen Zeitraum von drei bis vier Monaten regelmäßig mittels Durchflußzytometrie auf die membranständige Expression der ASGPR-Untereinheiten untersucht. Im Falle von H2c wurden aus anfänglich 11 positiven Primärklonen jeweils 6 neue Kolonien isoliert. Von diesen 66 konnten 41 vermehrt werden, von denen nur 23 ausreichend positiv waren. Lediglich 5 Klone wiesen eine konstant hohe Proteinexpression über einen längeren Zeitraum auf. Die beiden für die weiteren Versuche verwendeten Klone erreichten schließlich in der Durchflußzytometrie Werte von 93,6% bei H1 und 92,0% bei H2 (Abb. 30, 31).

Die funktionellen Untersuchungen der Untereinheiten wurde wie bei den cos7-Zellen mittels Laktose-Präzipitation durchgeführt (Abb. 32). Auch hier zeigte sich bei H1 ein Bandenmuster aus Monomeren, Di- und Trimeren wie bei ASGPR aus normaler Leber. Die exprimierten H2-Moleküle wiesen dagegen nur eine schwache Reaktivität mit der Laktose auf, was auf eine verminderte Funktionalität schließen ließ. Der Oligomerisierungsstatus konnte aus dem Western-Blot nicht erkannt werden, da vier Banden im Bereich der Di- und Trimere zu erkennen waren. Auch hier bildeten sich wie bei den cos7-Zellen keine Monomere. Da die Funktionalität des Rezeptors mit der vollständigen Glykosylierung zusammenhängt, wurde ein weiterer Blot zur Identifizierung terminaler Sialinsäuren durchgeführt (Abb. 33). Dabei zeigte sich bei H1 eine Anfärbung aller drei vorher beobachteten Banden, während bei H2 zwei sehr schwache Banden bei den Di- und Trimeren zu erkennen waren. Die zusätzlichen Banden bei der Detektion mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR könnten demnach nicht sialinisierte H2-Einheiten darstellen. Die verminderte Funktionalität der allein exprimierten H2c-Moleküle könnte also zum einen auf die Selbsterkennung unvollständig glykosylierter Proteine zurückzuführen sein, zum anderen könnte H2

allein aufgrund der von H1 verschiedenen Primärstruktur weniger Affinität zu Galaktose haben. In der Tat unterscheiden sich zwei von drei der für die pH-Abhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$  - und Ligandenbindung verantwortlichen Aminosäuren in H2 von H1 (Wragg und Drickamer, 1999).

Eine wichtige Beobachtung ist auch, dass H2 von verschiedenen Zellarten unterschiedlich exprimiert wurde. Das Auffinden von hauptsächlich Tetrameren in cos7-Zellen und die schwachen Di- und Trimerbanden bei HEK293-Zellen weisen auf verschiedene Prozessierung dieser Moleküle hin. Auch für H1 wurde nach Expression in cos 7-Zellen ein anderes Ligandenbindungsverhalten beobachtet. Während in Maus-Fibroblasten bei Abwesenheit von H2 kein hoch-affiner Rezeptor von H1 allein gebildet werden konnte (Shia und Lodish, 1989), konnte in cos 7-Zellen die hoch affine Bindung von ASOR und AF durch H1 allein festgestellt werden (Bider et al., 1995). Sowohl die posttranslationale Modifizierung als auch die Expressionsstärke haben wahrscheinlich einen entscheidenden Einfluß auf die Funktionalität der Rezeptoruntereinheiten. Viele Erkenntnisse über die Bedeutung einzelner Aminosäuren oder bestimmter Bereiche innerhalb der beiden Untereinheiten wurden durch die Expression mutierter Proteine in Zelllinien oder zellfreien Expressionssystemen gewonnen (vgl. Einleitung Abschnitt 1.5). Bei der Einschätzung der Funktionalität des gesamten Moleküls sollte jedoch in Betracht gezogen werden, inwieweit die Expression in der jeweiligen Zelllinie die natürliche Situation im normalen Hepatozyten widerspiegelt.

Ein H2-Molekül, das durch eine Modifizierung stärker an der Ligandenbindung beteiligt ist, könnte zum Beispiel die Ursache dafür sein, dass Liganden im Zellinnern nicht vom Rezeptorkomplex gelöst und dann wieder ausgeschleust werden, wie es bei Ratten-Hepatozyten beobachtet wurde (Townsend et al., 1984). Da sowohl H2b als auch H2c Varianten sind, die natürlicherweise in normaler Leber zu finden sind, könnte über die Expression der einen oder anderen H2-Form ein feinregulatorisches Instrument zur Regelung der Aufnahme und Weiterverarbeitung von Asialoglykoproteinen aus dem Blutkreislauf zur Verfügung stehen. Dies wurde dann von maligne transformierten Zellen in eine Richtung verschoben, die es erlaubt, weniger Leistung für den umgebenden Organismus zu erbringen.

#### **5.4 Betrachtungen zum Nachweis von Antikörpern gegen den ASGPR durch rekombinantes H1**

Die Bestimmung von Antikörpern gegen den ASGPR in Patientenseren erfordert bis jetzt die Präparation des Rezeptors aus Lebergewebe. Dies erschwert die Einführung eines allgemein erhältlichen, kalibrierten Tests und beschränkt den Nachweis dieser Antikörper auf sog. „in house“ - Assays. Die Herstellung eines gleichwertigen rekombinanten Antigens ist deshalb erstrebenswert.

Es war durch mündliche Berichte aus anderen Arbeitsgruppen bereits bekannt, dass bakteriell exprimiertes H1 keine Reaktivität mit Anti-ASGPR Antikörpern zeigte. Auch vor dem Hintergrund, dass etwa 90% der im EIA positiven Seren auf denaturiertem Rezeptor im Western-Blot negativ sind, schien eine möglichst naturgetreue Darstellung mit dem Erhalt von Konformationsepitopen notwendig. Die Zelllinie HEK293 sollte aufgrund ihres humanen Ursprungs für die geforderten Proteineigenschaften geeignet sein.

Die Kultivierung großer Mengen adhärenter Zellen zur Herstellung von Bulk-Proteinmengen wird durch Verwendung von Wannenstapeln (auch Zellfabriken genannt) weit genug vereinfacht, wegen der Wiederverwendung des jeweils gleichen Gefäßes für die Aussaat werden jedoch höhere Ansprüche an kontaminationsfreies Arbeiten gestellt als beim Einmalgebrauch von Zellkulturflaschen. Die kontinuierliche Expression des transfizierten Proteins sollte durch die Verwendung eines Selektionsmarkers (Geneticin) zwar gewährleistet sein, es finden jedoch immer wieder Veränderungen statt, nach denen die Zellen zwar noch resistent sind, aber kein rekombinantes H1 mehr exprimieren.

Nach dem Ablösen und Sammeln der Zellen in einem Pellet können sie genau wie humanes Lebergewebe lysiert und durch High-Speed Zentrifugation von Zelltrümmern getrennt werden. Das Zerkleinern des Gewebes mit einem Ultra-Homogenisator entfällt hier. Bei der Aufreinigung über Affinitätschromatographie können jedoch Schwierigkeiten wegen des größeren DNA-Gehalts der HEK293-Zellen auftreten, die unspezifisch an die Matrix binden. Dieses Problem konnte durch Herabsetzen der NaCl-Konzentration in den Puffern oder einem zusätzlichen Waschschriff mit Wasser nach dem Eluieren gelöst werden, da die Säule ja mehrfach verwendet wurde.

Das gereinigte rekombinante Protein konnte dann im Enzymimmunoassay zusammen mit dem kompletten Rezeptor aus normaler Leber eingesetzt werden. Die Konzentrationsabschätzung der einzusetzenden Lösungen wurde über silbergefärbte SDS-PAGE und Bradford-Proteinbestimmung durchgeführt, wobei absolute Werte wegen Fehlens des richtigen Referenzproteins mit der notwendigen Vorsicht angesehen werden sollten. Die anti-ASGPR positiven Seren wurden aus einer Serumbank entnommen. Beim Vergleich der optischen Dichten von 178 ausgetesteten Seren ergab sich überraschenderweise, dass alle außer einem (99,4%) auch mit der rekombinanten Untereinheit H1 positiv waren. Bei 170 (95,5%) dieser Seren lagen die Abweichungen im Bereich von  $\pm 15\%$  der Werte, bei 132 (74,2%) im Bereich von  $\pm 10\%$ , bei 174 (97,8%) im Bereich von  $\pm 20\%$ . Seren, die durch mehrfache Auf- und Abtauzyklen oder Langzeitlagerung ihre ASGPR-Reaktivität verloren hatten, waren auch mit dem rekombinanten H1 negativ. Die Bestimmung der Titer bei einer kleineren Gruppe von 35 Seren zeigte, dass 23 (65,7%) in der gleichen Verdünnungsstufe negativ wurden, bei den restlichen 12 (34,3%) war es eine Stufe niedriger oder höher. Es kann somit gesagt werden, dass rekombinant exprimiertes H1 die



richtigen Konformationsepitope besitzt und daher prinzipiell geeignet ist, den kompletten Rezeptor aus normaler Leber zu ersetzen.

Ob das rekombinante Protein auch alle Epitope der polyklonalen Autoantikörper in den Patientenseren abdeckt, kann durch die Inhibierung der Reaktivität mit dem kompletten Rezeptor durch rekombinantes H1 überprüft werden. Dazu wurden die verdünnten Seren vor der Aufgabe auf die EIA-Platte 15min mit verschiedenen H1-Konzentrationen inkubiert. Bei allen der 15 getesteten Seren verschwand die Reaktivität mit dem ASGPR aus normaler Leber nach Zugabe von maximal 21ng/µl rekombinantes H1. Aus diesen Ergebnissen geht klar hervor, dass die antigenen Stellen des ASGPR hauptsächlich in der Untereinheit H1 lokalisiert sind. Da die Inhibierungsexperimente mehr rekombinantes Protein benötigen als das Screening, mußte die Zahl der hier untersuchten Seren bisher gering bleiben. Unterschiede in der notwendigen Inhibierungskonzentration für verschiedene Seren können daher noch nicht als krankheitsspezifisch angesehen werden.

Die Verwendung von Zelllinien, die natürlicherweise ASGPR exprimieren, wie HepG2 und Huh7, als Quelle für die Gewinnung großer Proteilmengen erwies sich bei eigenen Versuchen als wenig erfolgreich, da die ASGPR-Expression bei der Kultivierung im Wannenstapel stark schwankte und der DNA-Gehalt noch viel höher war als bei den HEK293-Zellen. Man kann jedoch auch den membranständigen Rezeptor direkt verwenden, wenn man die Patientenseren mit den Zellen inkubiert und die Reaktivität unter Verwendung des entsprechenden Zweitantikörpers durchflußzytometrisch bestimmt. Da diese Zelllinien humanen Ursprungs sind, ist mit einem hohen Hintergrund an unspezifischer Wechselwirkung zu rechnen. Diese Schwierigkeiten scheinen in einer aktuellen Veröffentlichung überwunden (Sasaki et al., 2001), in der die klinische Signifikanz von Autoantikörpern gegen die Hepatozytenmembran aufgezeigt wurde. In zwei Gruppen von Patienten mit AIH wurde bei 37,5% der Seren mit niedrigen GPT-Werten eine positive Reaktivität mit HepG2-Zellen beobachtet und bei 95% der Seren mit hohen GPT-Werten. In einer dritten Gruppe von Patienten mit chronischer Hepatitis C lag die positive Rate bei 33,3%. Hieraus konnte noch einmal der Zusammenhang des Auftretens von ASGPR-Antikörpern und dem Ausmaß der entzündlichen Erkrankung der Hepatozyten dargestellt werden, wie dies auf anderem Wege früher schon gezeigt wurde (McFarlane et al., 1986). Die direkte Abhängigkeit von der Zellkultur und der notwendige Einsatz eines Durchflußzytometers machen diese Methode für das Routine-Screening aber wenig attraktiv.

Abschließend kann gesagt werden, dass mit dem Nachweis der Gleichwertigkeit der Reaktivität des rekombinanten H1 mit der des kompletten Rezeptors aus normaler Leber die Möglichkeit zur Etablierung eines kalibrierten, allgemein erhältlichen Assays zur Bestimmung von Antikörpern gegen den ASGPR in Patientenseren gegeben ist.

## **6. Zusammenfassung**

Der Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGPR) ist ein integraler Bestandteil der Leberzellmembran und vermittelt die Endozytose von zirkulierenden Asialoglykoproteinen. Der humane ASGPR besteht aus den zwei bekannten Untereinheiten H1 und H2, die in ihrer Primärstruktur eine Homologie von 58% aufweisen. Die Rezeptor-Untereinheiten werden zusammengesetzt aus einem kurzen, 40-59 Aminosäuren langen cytoplasmatischen Teil, einem 20 Aminosäuren zählenden Membran-durchspannenden Segment und einem großen extrazellulären Bereich mit 228 (H2) bzw. 231 (H1) Aminosäuren, der die Kohlenhydrat-Bindungsstelle sowie zwei (H1) bzw. drei (H2) N-Glykosylierungsstellen enthält. Mit rekombinanten Expressionsanalysen war schon gezeigt worden, daß die hoch-affine Bindung von Asialoglykoproteinen erst durch die Assoziierung der Untereinheiten zu Heterooligomeren ermöglicht wird, deren genaue Zusammensetzung bisher noch nicht bekannt ist. Bei Crosslinking-Experimenten in ASGPR-exprimierenden Lebertumor-Zelllinien wurden immer Dimere und Trimere aus beiden Untereinheiten gefunden. Das Verhältnis von H1 zu H2 kann aus den meisten der bisher durchgeführten Arbeiten auf etwa 5:1 geschätzt werden.

In dieser Arbeit war es durch eine verbesserte Präparationsmethode nun möglich, funktionellen ASGPR aus normaler humaner Leber mit ausreichender Menge zu gewinnen, um ihn in nativer Form proteinchemisch untersuchen zu können. In der denaturierenden SDS-PAGE erschien der Hauptteil der Rezeptor-Untereinheiten als Monomere bei 46kD (H1) und bei 50kD (H2), schwache Banden von Dimeren und Trimeren waren jedoch bei 90 und 140kD erkennbar. Nach Deglykosylierung mit N-Glykosidase F erhielt man Banden bei 34 und 32kD, wonach der Glykosidanteil etwa 28% betrug. In der nicht-denaturierenden Größenausschluß-Chromatographie wurden im nativen ASGPR als Hauptbestandteil Trimere mit einem großen Anteil an Dimeren beobachtet. Nach Erhitzen des Rezeptors in Gegenwart von SDS wurden ausschließlich Monomere gefunden. Nach Aufspaltung der intramolekularen Disulfid-Brücken mit 2-Mercaptoethanol konnten funktionell eine aktive und eine nicht-aktive Fraktion voneinander getrennt werden. Die Untereinheit H2 war in der nicht-aktiven Fraktion angereichert, während sich H1 zu etwa gleichen Teilen in aktiver und nicht-aktiver Fraktion befand. In der Größenausschluß-Chromatographie wurden beim reduzierten ASGPR Trimere und Dimere zu annähernd gleichen Teilen beobachtet.

Nach isoelektrischer Fokussierung und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung wurde herausgefunden, daß der funktionelle Rezeptor aus mehreren Isotypen mit unterschiedlichen pI-Werten besteht. Durch Deglykosylierung konnte gezeigt werden, daß auf Proteinebene vier verschiedene Formen von H1 mit gleichem Molekulargewicht und zwei Formen von H2 existieren.

Beim Vergleich von funktionellem ASGPR aus normaler humaner Leber und den hepatischen Tumorzelllinien HepG2 und Huh7 wurde entdeckt, daß der Rezeptor aus HepG2-Zellen in der SDS-PAGE um etwa 6kD, aus Huh7-Zellen um etwa 4kD größer erscheint als ASGPR aus normaler Leber.

Nach Deglykosylierung konnte festgestellt werden, daß die Größenunterschiede bei H1 auf einen höheren Glykosylierungsgrad zurückzuführen waren, während H2 auch auf Proteinebene ein größeres Molekulargewicht aufwies. Darüberhinaus wurde beobachtet, daß der Nachweis von H1 in HepG2-Zellen gegenüber den anderen beiden untersuchten Zellarten deutlich schwächer ausfiel.

Hinsichtlich der Untereinheit H2 waren zwei zusätzliche Varianten bekannt, die sich durch ein 57bp großes Insert im cytoplasmatischen Bereich und ein 15bp großes Insert direkt hinter dem Membrandurchspannendem Abschnitt auszeichneten. Ein Antikörper gegen ein Oligopeptid, das innerhalb der 57 Nukleotide großen Insertion kodiert war, zeigte, daß die Expression von H2 mit der Insertion in Huh7-Zellen deutlich erhöht ist, während mit funktionellem ASGPR aus normaler Leber nur eine sehr schwache Reaktion beobachtet werden konnte. Die zweidimensionale Auftrennung von ASGPR aus HepG2-Zellen ergab nur einen einzigen Punkt im Vergleich zu einer Wolke beim ASGPR aus normaler Leber.

Die membranständige Expression rekombinanter Formen von H1 und H2 ohne beide Insertionen in cos7- und 293-Zellen konnte mittels Durchflußzytometrie nachgewiesen werden. Die Präparation von funktionellem H1 führte bei beiden Zelllinien zum gleichen Bandenmuster wie beim natürlichen ASGPR aus normaler Leber. Funktionelles H2 war nur aus transfizierten cos7-Zellen hauptsächlich in Form von Tetrameren zu gewinnen; in 293-Zellen exprimiertes H2 zeigte keine feststellbare Bindung an Laktose-Agarose.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen auf, daß ASGPR aus maligne transformierter Leber sich sowohl in Primärstruktur als auch in der posttranslationalen Prozessierung von ASGPR aus normaler Leber unterscheidet. Da die bisherigen Kenntnisse über den humanen ASGPR vorwiegend aus HepG2-Zellen stammen, sind sie nicht ohne weiteres auf die natürliche Situation in gesunder Leber übertragbar.

Die Präparation von gereinigtem rekombinant exprimierten H1 aus den stabil transfizierten 293-Zellen ermöglichte schließlich die Ermittlung der Reaktivität dieses Antigens mit Anti-ASGPR positiven Patientenseren in einem EIA. Bei 95,5% der 178 eingesetzten Seren lagen die Abweichungen der optischen Dichten mit dem rekombinanten H1 in einem Bereich von  $\pm 15\%$  gegenüber denen mit dem kompletten Rezeptor aus normaler Leber. Bei einer Bestimmung der Titer von 35 Seren traten keine Abweichungen von mehr als einer Verdünnungsstufe auf. Die Reaktivität mit dem ASGPR aus normaler Leber ließ sich in den getesteten 15 Fällen durch Inkubation des vorverdünnten Serums mit maximal 21ng/ $\mu$ l rekombinanten H1 vollständig inhibieren. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die antigenen Stellen des ASGPR aus normaler Leber hauptsächlich in H1 lokalisiert sind und dass vollständig prozessiertes H1 beim Nachweis von Antikörpern in Patientenseren den kompletten Rezeptor aus humanem Lebergewebe ersetzen kann.

## 7. Verzeichnis der Abkürzungen

aa	amino acids
ABTS	2,2'-Azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) * Diammoniumsalz
AEBSF	p-Aminoethylbenzolsulfonsäure
AF	Asialofetuin
AIH	Autoimmunhepatitis
ANA	Anti Nuclear Antibodies
AP	Alkalische Phosphatase
APN	Aminopeptidase N
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ASGPR	Asialoglykoprotein-Rezeptor
ASMA	Anti Smooth Muscle Antibodies
ASOR	Asialoorosomukoid
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat * p-Toluidin-Salz
Bis-Tris	Bis(2-Hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)-methan
bp	base pairs, Basenpaare
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
CAH	chronic active hepatitis
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
cDNA	complementary DNA, umgeschriebene mRNA
CIP	calf intestine phosphatase
CRD	carbohydrate recognition domain
CTE	Puffer mit CaCl <sub>2</sub> , Tris und EDTA
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
Dig-NHS	Digoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocapronsäure-N-hydroxy-succinimidester
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetraacetat
EIA	Enzymimmunoassay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HBS	HEPES-gepufferte Salzlösung
HBV	Hepatitis B-Virus
HDL	high density lipoproteins
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HRP	Horseradish-Peroxidase
i.d.	inner diameter
IVH	Influenza Virus Hämagglutinin
kD	Kilo-Dalton
LDL	low density lipoproteins

## Abkürzungen

---

M6P	Mannose-6-phosphat
MBP	mannose binding protein
MCS	multiple cloning site, Bereich mit vielen Restriktionsschnittstellen
MDCK	Madine-Darby canine kidney
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
OPD	o-Phenylendiamin * Dihydrochlorid
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
nt	Nukleotide
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBC	primary biliary cirrhosis
PBE	PBS mit EDTA
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
RCA	Ricinus Communis Agglutinin
RHL	rat hepatic lectin, ASGPR der Rattenleber
SEC	size exclusion chromatography
SNA	Sambucus Nigra Agglutinin
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumlaurylsulfat
SRP	signal recognition particle
TBE	Puffer mit Tris, Borsäure und EDTA
TBS	TRIS-gepufferte Salzlösung
TE	Puffer mit Tris und EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFR	Transferrin-Rezeptor
TIU	trypsin inhibitor units
Tricin	N-Tris(hydroxymethyl)-methylglycin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VLDL	very low density lipoproteins

## **8. Verzeichnis der Abbildungen**

Abb. 1: Modell zum Differenzierungsgrad der Hepatozyten	Seite 5
Abb. 2: Aufbau der Hepatozytenstruktur	Seite 6
Abb. 3: Vereinfachte Darstellung des Endozytose-Zyklus	Seite 10
Abb. 4: Aufbau der Kohlenhydrat-Grundstrukturen vom Komplex-Typ	Seite 11
Abb. 5: Modell der Untereinheit H1	Seite 13
Abb. 6: Schematischer Ablauf der Entstehung von Membranproteinen	Seite 17
Abb. 7: Schematische Darstellung der Splice-Varianten von H2	Seite 20
Abb. 8: Prinzip der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese	Seite 39
Abb. 9: Silbergefärbte SDS-PAGE Auftrennung des humanen ASGPR, nativ und deglykosyliert	Seite 58
Abb. 10: Chromatogramm von reduziertem ASGPR, ELISA-Messung der Proteinverteilung in den Fraktionen	Seite 59
Abb. 11: SDS-PAGE von nicht-aktiver und aktiver Fraktion, jeweils angefärbt mit einem peptidspezifischen Antikörper gegen H1 oder gegen H2	Seite 60
Abb. 12: SDS-PAGE-Auftrennung von nativem und desialiniertem ASGPR, silbergefärbt, mit dem Lektin SNA nachgewiesen und mit Digoxigenin-markiertem Asialofetuin behandelt	Seite 61
Abb. 13: Behandlung des ASGPR mit Exoglykosidasen, Anfärbung mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR	Seite 61
Abb. 14: Chromatogramme der Größenausschlußchromatographie von nativem, funktionellen sowie reduziertem und denaturiertem Rezeptor	Seite 62
Abb. 15: Silbergefärbte, zweidimensionale Auftrennung von funktionellem ASGPR aus humaner Leber in nativer und deglykosylierter Form	Seite 63
Abb. 16: Zweidimensionale Auftrennung von funktionellem humanen ASGPR aus normaler Leber, nativ und deglykosyliert, gefärbt mit einem Antikörper gegen H1	Seite 64
Abb. 17: Zweidimensionale Auftrennung von funktionellem humanen ASGPR aus normaler Leber, nativ und deglykosyliert, gefärbt mit einem Antikörper gegen H2	Seite 64
Abb. 18: Mit dem Lektin SNA angefärbte SDS-PAGE-Auftrennung von funktionellem ASGPR aus normaler Leber, aus Hep G2-Zellen und aus Huh7-Zellen	Seite 65
Abb. 19: SDS-PAGE-Auftrennung von funktionellem ASGPR aus normaler Leber, aus HepG2-Zellen und aus Huh7-Zellen, jeweils nativ und deglykosyliert, angefärbt mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR	Seite 66
Abb. 20: SDS-PAGE-Auftrennung von funktionellem ASGPR aus normaler Leber, aus HepG2-Zellen und aus Huh7-Zellen, jeweils nativ und deglykosyliert, angefärbt mit dem Antikörper gegen die Untereinheit H1	Seite 66
Abb. 21: SDS-PAGE-Auftrennung von funktionellem ASGPR aus normaler Leber, aus HepG2-Zellen und aus Huh7-Zellen, jeweils nativ und deglykosyliert, angefärbt mit dem Antikörper gegen die Untereinheit H2	Seite 66
Abb. 22: Zweidimensionale Auftrennung von funktionellem ASGPR aus normaler Leber, silbergefärbt und mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR angefärbt	Seite 67

- Abb. 23: Zweidimensionale Auftrennung von funktionellem ASGPR aus HepG2-Zellen, silbergefärbt und mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR angefärbt Seite 67
- Abb. 24: SDS-PAGE Auftrennung von funktionellem ASGPR aus normaler Leber und aus Huh7-Zellen, silbergefärbt und mit dem Antikörper gegen das Insertionspeptid behandelt Seite 68
- Abb. 25: Verwendete Restriktionsschnittstellen im Vektor und den cDNAs Seite 69
- Abb. 26: Restriktionsschnitte mit Sal I und Pst I des Vektors ohne Insert, des Vektors mit H1 und des Vektors mit H2 Seite 69
- Abb. 27: Durchflußzytometrische Untersuchung von cos7-Zellen mit Normalkaninchenserum und mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR 60h nach transienter Transfektion mit H1 Seite 70
- Abb. 28: Durchflußzytometrische Untersuchung von cos7-Zellen mit Normalkaninchenserum und mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR 60h nach transienter Transfektion mit H2 Seite 70
- Abb. 29: Western-Blot mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR nach Isolierung von funktionellen Rezeptor-Komplexen über eine Laktose-Agarose-Matrix aus dem Lysat von H1-transfizierten, aus H2-transfizierten und aus nicht-transfizierten cos7 - Zellen sowie aus einer Lösung von isoliertem ASGPR aus normaler Leber Seite 71
- Abb. 30: Durchflußzytometrische Untersuchung von stabil mit H1 transfizierten HEK293 - Zellen mit Normalkaninchenserum und mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR Seite 72
- Abb. 31: Durchflußzytometrische Untersuchung von stabil mit H2 transfizierten HEK293 - Zellen mit Normalkaninchenserum und mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR Seite 72
- Abb. 32: Western-Blot mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR nach Isolierung von funktionellen Rezeptor-Komplexen über eine Laktose-Agarose-Matrix aus dem Lysat von nicht-transfizierten, stabil mit H1-transfizierten und stabil mit H2-transfizierten HEK293 - Zellen sowie aus einer Lösung von isoliertem ASGPR aus normaler Leber Seite 73
- Abb. 33: Nachweis terminaler Sialinsäuren mit dem Lektin SNA nach Isolierung von funktionellen Rezeptor-Komplexen über eine Laktose-Agarose-Matrix aus dem Lysat von nicht-transfizierten, stabil mit H1-transfizierten und stabil mit H2-transfizierten HEK293 - Zellen sowie aus einer Lösung von isoliertem ASGPR aus normaler Leber Seite 73
- Abb. 34: Silbergefärbte SDS-PAGE Auftrennung von aufgereinigtem, rekombinanten H1 und immunologischer Nachweis mit dem Antikörper gegen Gesamt-ASGPR Seite 74
- Abb. 35: Abweichungen der optischen Dichten von Antikörper-Reaktivitäten mit rekombinanten H1 und komplettem Rezeptor aus normaler Leber Seite 75
- Abb. 36: Vergleich der Titer von Anti-ASGPR positiven Seren mit rekombinanten H1 und komplettem Rezeptor aus normaler Leber Seite 75
- Abb. 37: Vergleich der optischen Dichten von BSA und Fetuin beim Proteinbestimmungsassay nach Bradford Seite 76
- Abb. 38: Inhibierung der Reaktivität zweier repräsentativer Seren mit ASGPR durch Zusatz von rekombinanten H1 Seite 76

## 9. Literaturverzeichnis

- Amara J.F., Lederkremer G.Z. and Lodish H.F.: „Intracellular Degradation of Unassembled Asialoglycoprotein Receptor Subunits: a Pre-Golgi, Nonlysosomal Endoproteolytic Cleavage” (1989), *J. Cell Biol.* 109, 3315-3324
- Ashwell, Gilbert and Harford, Joe: „Carbohydrate-specific Receptors of the Liver” (1982), *Ann. Rev. Biochem.* 51, 531-554
- Ayalon-Soffer M., Kamhi-Nesher S. and Lederkremer G.Z.: „Folding and self-assembly do not prevent ER retention and proteasomal degradation of asialoglycoprotein receptor H2a” (1999), *FEBS Lett.* 460, 112-116
- Baenziger, Jacques U. and Maynard, Yvonne: „Human Hepatic Lectin” (1980), *J. Biol. Chem.* 255, 4607-4613
- Beavil A.J., Edmeades R.L., Gould H.J. and Sutton B.J.: „ $\alpha$ -Helical Coiled-Coil Stalks in the Low-Affinity Receptor for IgE (Fc $\epsilon$ RII/CD23) and Related C-Type Lectins” (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 753-757
- Beltzer, James P. and Spiess, Martin: „In vitro binding of the asialoglycoprotein receptor to the  $\beta$  adaptin of plasma membrane coated vesicles” (1991), *EMBO J.* 10, 3735-3742
- Bezouska K., Crichlow G.V., Rose J.M., Taylor M.E. and Drickamer K.: „Evolutionary Conservation of Intron Position in a Subfamily of Genes Encoding Carbohydrate-recognition Domains” (1991), *J. Biol. Chem.* 266, 11604-11609
- Bider M.D., Cescato R., Jenö P. and Spiess M.: „High-affinity ligand binding to subunit H1 of the asialoglycoprotein receptor in the absence of subunit H2” (1995), *Eur. J. Biochem.* 230, 207-212
- Bider M.D., Wahlberg J.M., Kammerer R.A. and Spiess M.: „The Oligomerization Domain of the Asialoglycoprotein Receptor Preferentially Forms 2:2 Heteromers in Vitro” (1996), *J. Biol. Chem.* 271, 31996-32001
- Bider M.D. and Spiess M.: „Ligand-induced endocytosis of the asialoglycoprotein receptor: evidence for heterogeneity in subunit oligomerization” (1998), *FEBS Lett.* 434, 37-41
- Bischoff, Joyce and Lodish, Harvey F.: „Two Asialoglycoprotein Receptor Polypeptides in Human Hepatoma Cells” (1987), *J. Biol. Chem.* 262, 11825-11832
- Bischoff J., Libresco S., Shia M.A. and Lodish H.F.: „The H1 and H2 polypeptides associate to form the asialoglycoprotein receptor in human hepatoma cells” (1988), *J. Cell Biol.* 106, 1067-1074
- Braiterman L.T., Chance S.C., Porter W.R., Lee Y.C., Townsend R.R., Hubbard A.L.: „The Major Subunit of the Rat Asialoglycoprotein Receptor Can Function Alone as a Receptor” (1989), *J. Biol. Chem.* 264, 1682-1688
- Breitfeld P.P., Rup D. and Schwartz A.L.: „Influence of the N-linked Oligosaccharides on the Biosynthesis, Intracellular Routing and Function of the Human Asialoglycoprotein Receptor” (1984), *J. Biol. Chem.* 259, 10414-10421
- Breitfeld P.P., Simmons C.F. jr, Strous G.J.A.M., Geuze H.J. and Schwartz A.L.: „Cell Biology of the Asialoglycoprotein Receptor System: A Model of Receptor-Mediated Endocytosis” (1985), *Int. Rev. Cyt.* 97, 47-95



- Burgess J.B., Baenziger J.U. and Brown W.R.: „Abnormal Surface Distribution of the Human Asialoglycoprotein Receptor in Cirrhosis” (1992), *Hepatology* 15, 702-706
- Cescato, Renzo and Spiess, Martin: „The signals for endocytosis and polarized sorting of the hepatic asialoglycoprotein receptor” (1996), *Z. Gastroenterology* 34, 89-91
- Chiacchia, Kenneth B. and Drickamer, Kurt: „Direct Evidence for the Transmembrane Orientation of the Hepatic Glycoprotein Receptors” (1984), *J. Biol. Chem.* 259, 15440-15446
- Collins J.C., Paietta E., Green R., Morell A.G., Stockert R.J.: „Biotin-dependent Expression of the Asialoglycoprotein Receptor in HepG2” (1988), *J. Biol. Chem.* 263, 11280-11283
- De La Vega Luis A. and Stockert R.J.: „The cytoplasmic coatmer protein COPI. A potential translational regulator” (1999), *J. Biol. Chem.* 274, 31135-31138
- De La Vega Luis A. and Stockert R.J.: „Regulation of the insulin and asialoglycoprotein receptors via cGMP-dependent protein kinase” (2000), *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C2037-C2042
- Drickamer Kurt: „Two Distinct Classes of Carbohydrate-recognition Domains in Animal Lectins” (1988), *J. Biol. Chem.* 263, 9557-9560
- Drickamer K., Mamon J.F., Binns G. and Leung J.O.: „Primary Structure of the Rat Liver Asialoglycoprotein Receptor: Structural Evidence for Multiple Polypeptide Species” (1984), *J. Biol. Chem.* 259, 770-778
- Eto T. and Takahashi H.: „Enhanced inhibition of hepatitis B virus production by asialoglycoprotein receptor-directed interferon” (1999), *Nat. Med.* 5, 577-581
- Fallon, Robert J. and Schwartz, Alan L.: „Asialoglycoprotein Receptor Phosphorylation and Receptor-mediated Endocytosis in Hepatoma Cells” (1988), *J. Biol. Chem.* 263, 13159-13166
- Fallon Robert J.: „Tyrosine Phosphorylation of the Asialoglycoprotein Receptor” (1990), *J. Biol. Chem.* 265, 3401-3406
- Fallon R.J., Danaher M., Saylor R.L. and Saxena A.: „Defective Asialoglycoprotein Receptor Endocytosis Mediated by Tyrosine Kinase Inhibitors: Requirement for a Tyrosine in the Receptor Internalization Signal” (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 11011-11017
- Feinberg H., Torgersen D., Drickamer K. and Weis W.I.: „Mechanism of pH-dependent N-acetylgalactosamine binding by a mimic of the hepatocyte asialoglycoprotein receptor” (2000), *J. Biol. Chem.* 275, 35176-35184
- Fuhrer Christian, Geffen Iris and Spiess Martin: „Endocytosis of the ASGP Receptor H1 Is Reduced by Mutation of Tyrosin-5 But Still Occurs via Coated Pits” (1991), *J. Cell Biol.* 114, 423-431
- Fuhrer C., Geffen I., Huggel K. and Spiess M.: „The Two Subunits of the Asialo-glycoprotein Receptor Contain Different Sorting Information” (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 3277-3282
- Geffen I., Wessels H.P., Roth J., Shia M.A. and Spiess M.: „Endocytosis and recycling of subunit H1 of the asialoglycoprotein receptor is independent of oligomerisation with H2” (1989), *EMBO J.* 8, 2855-2861
- Geffen Iris, Fuhrer Christian and Spiess Martin: „Endocytosis by the asialoglycoprotein receptor is independent of cytoplasmic serine residues” (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8425-8429

- Geffen I., Fuhrer C., Leitinger B., Weiss M., Huggel K., Griffiths G. and Spiess M.: „Related Signals for Endocytosis and Basolateral Sorting of the Asialoglycoprotein Receptor” (1993), *J. Biol. Chem.* 268, 20772-20777
- Graeve L., Patzak A., Drickamer K. and Rodriguez-Boulan E.: „Polarized Expression of Functional Rat Liver Asialoglycoprotein Receptor in Transfected Madin-Darby Canine Kidney Cells” (1990), *J. Biol. Chem.* 265, 1216-1224
- Halberg D.F., Wager R.E., Farrell D.C., Hildreth J. IV, Quesenberry M.S., Loeb J.A., Holland E.C., Drickamer K.: „Major and Minor Forms of the Rat Liver Asialoglycoprotein Receptor Are Independent Galactose-binding Proteins” (1987), *J. Biol. Chem.* 262, 9828-9838
- Hardy M.R., Townsend R.R., Parkhurst S.M. and Lee Y.C.: „Different Modes of Ligand Binding to the Hepatic Galactose / N-Acetylgalactosamine-Specific Lectin on the Surface of Rabbit Hepatocytes” (1985), *Biochemistry* 24, 22-28
- Harford, Joe and Ashwell, Gilbert: „Immunological evidence for the transmembrane nature of the rat liver receptor for asialoglycoproteins” (1981), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1557-1561
- Harford, Joe and Ashwell, Gilbert: „The Hepatic Receptor for Asialoglycoproteins” (1982), *The Glycoconjugates Vol. IV*, 27-55
- Harford J., Lowe M., Tsunoo H. and Ashwell G.: „Immunological Approaches to the Study of Membrane Receptors” (1982), *J. Biol. Chem.* 257, 12685-12690
- Henis Y.I., Katzir Z., Shia M.A. and Lodish H.F.: „Oligomeric Structure of the Human Asialoglycoprotein Receptor: Nature and Stoichiometry of Mutual Complexes Containing H1 and H2 Polypeptides Assessed by Fluorescence Photobleaching Recovery” (1990), *J. Cell Biol.* 111, 1409-1418
- Herzig, Maryanne C.S. and Weigel, Paul H.: „Synthesis and Characterization of N-Hydroxysuccinimide Ester Chemical Affinity Derivatives of Asialoorosomucoid that covalently cross-link to Galactosyl Receptors on Isolated Rat Hepatocytes” (1989), *Biochemistry* 28, 600-610
- Hudgin R.L., Pricer W.E. jr., Ashwell G., Stockert R.J., Morell A.G.: „The Isolation and Properties of a Rabbit Liver Binding Protein Specific for Asialoglycoproteins” (1974), *J. Biol. Chem.* 249, 5536-5543
- Iobst, Susanne T. and Drickamer, Kurt: „Binding of Sugar Ligands to Ca<sup>2+</sup>-dependent Animal Lectins: II. Generation of High-Affinity Galactose Binding by Site-Directed Mutagenesis” (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 15512-15519
- Jensen D.M., McFarlane I.G., Portmann B.S., Eddleston A.L.W.F. and Williams R.: „Detection of antibodies directed against a liver-specific membrane lipoprotein in patients with acute and chronic active hepatitis” (1978), *New Engl. J. Med.* 299, 1-7
- Katzir Z., Nardi N., Geffen I., Fuhrer C. and Henis Y.I.: „Dynamic Interactions of the Asialoglycoprotein Receptor Subunits with Coated Pits: Enhanced Interactions of H2 following Association with H1” (1994), *J. Biol. Chem.* 269, 21568-21575
- Kawasaki, Toshisuke and Ashwell, Gilbert: „Chemical and Physical Properties of an Hepatic Membrane Protein that Specifically Binds Asialoglycoproteins” (1976), *J. Biol. Chem.* 251, 1296-1302

- Kolatkar A.R., Leung A.K., Isecke R., Brossmer R., Drickamer K. and Weis W.I.: „Mechanism of N-Acetylgalactosamine Binding to a C-type Animal Lectin Carbohydrate-recognition Domain” (1998), J. Biol. Chem. 273, 19502-19508
- Kornfeld S., Li E. and Tabas I.: „The Synthesis of Complex-type Oligosaccharides: II. Characterization of the processing intermediates in the synthesis of the complex oligosaccharide units of the vesicular stomatitis virus G protein” (1978), J. Biol. Chem. 253, 7771-7778
- Kozak M.: „An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs”, (1987), Nucleic Acids Res. 15, 8125-8148
- Laird V. and Spiess M.: „A novel assay to demonstrate an intersection of the exocytic and endocytic pathways at early endosomes” (2000), Exp. Cell Res. 260, 340-345
- Lederkremer, Gerardo Z. and Lodish, Harvey F.: „An Alternatively Spliced Miniexon Alters the Subcellular Fate of the Human Asialoglycoprotein Receptor H2 Subunit” (1991), J. Biol. Chem. 266, 1237-1244
- Lee R.T., Meyer R.T. and Lee Y.C.: „Further studies on the binding characteristics of the rabbit liver galactose / N-acetylgalactosamine specific lectin“ (1982), Biochemistry 21, 6292-6298
- Lee Y.C., Townsend R.R., Hardy M.R., Lönngren J., Arnarp J., Haraldsson M. and Lönn H.: „Binding of Synthetic Oligosaccharides to the Hepatic Gal / GalNAc Lectin” (1983), J. Biol. Chem. 258, 199-202
- Lee R.T., Lin P. and Lee Y.C.: „New Synthetic Cluster Ligands for Galactose / N-Acetylgalactosamine-Specific Lectin of Mammalian Liver” (1984), Biochemistry 23, 4255-4261
- Lee, Reiko T. and Lee, Yuan Chuan: „Affinity Labeling of the Galactose / N-Acetylgalactosamine-Specific Receptor of Rat Hepatocytes: Preferential of One of the Subunits” (1987), Biochemistry 26, 6320-6329
- Leitinger B., Hille-Rehfeld A. and Spiess M.: „Biosynthetic Transport of the Asialoglycoprotein Receptor H1 to the Cell Surface Occurs via Endosomes” (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 10109-10113
- Leung J.O., Holland E.C. and Drickamer K.: „Characterisation of the Gene Encoding the Major Rat Liver Asialoglycoprotein Receptor” (1985), J. Biol. Chem. 260, 12523-12527
- Lodish H.F., Kong N. and Wikström L.: „Calcium is Required for Folding of Newly Made Subunits of the Asialoglycoprotein Receptor within the Endoplasmic Reticulum” (1992), J. Biol. Chem. 267, 12753-12760
- Löffler, Georg und Petrides, Petro E.: „Biochemie und Pathobiochemie“, Springer-Verlag 1997, Kapitel 35
- Löhr H., Treichel U., Poralla T., Manns M., Meyer zum Büschenfelde K.H. and Fleischer B.: „The Human Hepatic Asialoglycoprotein Receptor is a Target Antigen for Liver-infiltrating T cells in Autoimmune Chronic Active Hepatitis and Primary Biliary Cirrhosis“ (1990), Hepatology 12, 1314-1320
- Löhr H., Treichel U., Poralla T., Manns M., Meyer zum Büschenfelde K.H. and Fleischer B.: „Liver-infiltrating T helper cells in autoimmune chronic active hepatitis stimulate the production of auto-antibodies against the human asialoglycoprotein receptor *in vitro*” (1992), Clin. Exp. Immunol. 88, 45-49
- Manns M., Meyer zum Büschenfelde K.H. and Hess G.: „Autoantibodies against liver-specific membrane lipoprotein in acute and chronic liver diseases: Studies on organ-, species- and disease-specificity” (1980), Gut 21, 955-961

- McFarlane I.G., McFarlane B.M., Major G.N., Tolley P. and Williams R.: „Identification of the hepatic asialoglycoprotein receptor as a component of liver-specific membrane lipoprotein (LSP)” (1984), *Clin. Exp. Immunol.* 55, 347-354
- McFarlane B.M., McSorley C.G., Vergani D., McFarlane I.G. and Williams R.: „Serum Autoantibodies Reacting with the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor Protein (Hepatic Lectin) in Acute and Chronic Liver Disorders” (1986), *J. Hepat.* 3, 196-205
- Meier M., Bider M.D., Malashkevich V.N., Spiess M. and Burkhard P.: „Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of the H1 subunit of the asialoglycoprotein receptor” (2000), *J. Mol. Biol.* 300, 857-865
- Morell, Anatol G. and Scheinberg, I. Herbert: „Solubilization of hepatic binding sites for asialoglycoproteins” (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 808-815
- Morell A.G., Irvine R.A., Sternlieb I., Scheinberg I.H. and Ashwell G.: „Physical and chemical studies on ceruloplasmin: V. Metabolic studies on sialic acid-free ceruloplasmin in vivo” (1968), *J. Biol. Chem.* 243, 155-159
- Mullin N.P., Hitchen P.G. and Taylor M.E.: „Mechanism of Ca<sup>2+</sup> and Monosaccharide Binding to a C-type Carbohydrate-recognition Domain of the Macrophage Mannose Receptor” (1997), *J. Biol. Chem.* 272, 5668-5681
- Paietta E., Stockert R.J. and Racevskis J.: „Differences in the Abundance of Variably Spliced Transcripts for the Second Asialoglycoprotein Receptor Polypeptide, H2, in Normal and Transformed Human Liver” (1992a), *Hepatology* 15, 395-402
- Paietta E., Stockert R.J. and Racevskis J.: „Alternatively Spliced Variants of the Human Hepatic Asialoglycoprotein Receptor, H2, Differ in Cellular Trafficking and Regulation of Phosphorylation” (1992b), *J. Biol. Chem.* 267, 11078-11084
- Pearse Barbara M.F.: „The EMBO Medal Review: Clathrin and coated vesicles” (1987), *EMBO J.* 6, 2507-2512
- Pricer, William E. jr. and Ashwell, Gilbert: „The Binding of Desialylated Glycoproteins by Plasma Membranes of Rat Liver” (1971), *J. Biol. Chem.* 246, 4825-4833
- Reid L.M., Fiorino A.S., Sigal S.H., Brill S. and Holst P.A.: „Extracellular matrix gradients in the space of Disse: Relevance to liver biology” (1992), *Hepatology* 15, 1198-1203
- Renold A., Cescato R., Beuret N., Vogel L.K., Wahlberg J.M., Brown J.L., Fiedler K. and Spiess M.: „Basolateral sorting signals differ in their ability to redirect apical proteins to the basolateral cell surface” (2000), *J. Biol. Chem.* 275, 9290-9295
- Rice K.G., Weisz O.A., Barthel T., Lee R.T. and Lee Y.C.: „Defined Geometry of Binding between Triantennary Glycopeptide and the Asialoglycoprotein Receptor of Rat Hepatocytes” (1990), *J. Biol. Chem.* 265, 18429-18434
- Sarker M., Liao J., Kabat E.A., Tanabe T. and Ashwell G.: „The binding site of rabbit hepatic lectin” (1979), *J. Biol. Chem.* 254, 3170-3174

- Sasaki M., Yamauchi K., Tokushige K., Isono E., Komatsu T., Zeniya M., Toda G. and Hayashi N.: „Clinical significance of autoantibody to hepatocyte membrane antigen in type 1 autoimmune hepatitis” (2001), *Am. J. Gastroenterol.* 96, 846-851
- Sawamura T., Nakada H., Hazama H., Shiozaki Y., Sameshima Y. and Tashiro Y.: „Hyperasialoglycoproteinemia in Patients with Chronic Liver Diseases and/ or Liver Cell Carcinoma” (1984), *Gastroent.* 87, 1217-1221
- Sawyer J.T., Sanford J.P. and Doyle D.: „Identification of a Complex of the Three Forms of the Rat Liver Asialoglycoprotein Receptor” (1988), *J. Biol. Chem.* 263, 10534-10538
- Schmid, Stefanie R. and Spiess, Martin: „Deletion of the Amino-terminal Domain of Asialoglycoprotein Receptor H1 Allows Cleavage of the Internal Signal Sequence” (1988), *J. Biol. Chem.* 263, 16886-16891
- Schwartz A.L., Fridovich S.E., Knowles B.B. and Lodish H.F.: „Characterization of the Asialoglycoprotein Receptor in a Continuous Hepatoma Line” (1981), *J. Biol. Chem.* 256, 8878-8881
- Schwartz A.L., Fridovich S.E. and Lodish H.F.: „Kinetics of Internalization and Recycling of the Asialoglycoprotein Receptor in a Hepatoma Cell Line” (1982), *J. Biol. Chem.* 257, 4230-4237
- Schwartz, Alan L. and Rup, Diane: „Biosynthesis of the Human Asialoglycoprotein Receptor” (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 11249-11255
- Shenkman M., Ayalon M. and Lederkremer G.Z.: „Endoplasmic reticulum quality control of asialoglycoprotein receptor H2a involves a determinant for retention and not retrieval” (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11363-11368
- Shenkman M., Ehrlich M. and Lederkremer G.Z.: „Masking of an endoplasmic reticulum retention signal by its presence in the two subunits of the asialoglycoprotein receptor” (2000), *J. Biol. Chem.* 275, 2845-2851
- Shia, Michael A. and Lodish, Harvey F.: „The two subunits of the human asialoglycoprotein receptor have different fates when expressed alone in fibroblasts” (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1158-1162
- Spiess M., Schwartz A.L. and Lodish H.F.: „Sequence of Human Asialoglycoprotein Receptor cDNA” (1985), *J. Biol. Chem.* 260, 1979-1982
- Spiess, Martin and Lodish, Harvey F.: „Sequence of a second human asialoglycoprotein receptor: Conservation of two receptor genes during evolution” (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6465-6469
- Spiess, Martin and Lodish, Harvey F.: „An Internal Signal Sequence: The Asialoglycoprotein Receptor Membrane Anchor” (1986), *Cell* 44, 177-185
- Spiess, Martin and Handschin, Corinne: „Deletion analysis of the internal signal-anchor domain of the human asialoglycoprotein receptor H1” (1987), *EMBO J.* 6, 2683-2691
- Spiess Martin: „The Asialoglycoprotein Receptor: A Model for Endocytic Transport Receptors” (1990), *Biochemistry* 29, 10009-10018
- Steer C.J., Kempner E.S. and Ashwell G.: „Molecular size of the hepatic receptor for asialoglycoproteins determined in situ by radiation inactivation” (1981), *J. Biol. Chem.* 256, 5851-5856

- Steer C.J., Weiss P., Huber B.E., Wirth P.J., Thorgeirsson S.S. and Ashwell G.: „Ligand-induced Modulation of the Hepatic Receptor for Asialoglycoproteins in the Human Hepatoblastoma Cell Line, Hep G2” (1987), *J. Biol. Chem.* 262, 17524-17529
- Stockert, Richard J. and Morell, Anatol G.: „Second Messenger Modulation of the Asialoglycoprotein Receptor” (1990), *J. Biol. Chem.* 265, 1841-1846
- Stockert Richard J., Paietta Elisabeth, Racevskis Janis and Morell Anatol: „Posttranscriptional Regulation of the Asialoglycoprotein Receptor by cGMP” (1992), *J. Biol. Chem.* 267, 56-59
- Stockert Richard J.: „Regulation of the Human Asialoglycoprotein Receptor by cAMP” (1993), *J. Biol. Chem.* 268, 19540-19544
- Stockert Richard J.: „The Asialoglycoprotein Receptor: Relationships Between Structure, Function and Expression” (1995), *Physiol. Rev.* 75, 591-609
- Stockert, Richard J. and Ren, Qing: „Cytoplasmic Protein mRNA Interaction mediates cGMP-modulated Translational Control of the Asialoglycoprotein Receptor” (1997), *J. Biol. Chem.* 272, 9161-9165
- Tolchinsky S., Yuk M.H., Ayalon M., Lodish H.F. and Lederkremer G.Z.: „Membrane-bound Versus Secreted Forms of Human Asialoglycoprotein Receptor Subunits: Role of a Juxtamembrane Pentapeptide” (1996), *J. Biol. Chem.* 271, 14496-14503
- Townsend R.R., Wall D.A., Hubbard A.L. and Lee Y.C.: „Rapid release of galactose-terminated ligands after endocytosis by hepatic parenchymal cells: Evidence for a role of carbohydrate structure in the release of internalized ligand from receptor” (1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 466-470
- Treichel U., Poralla T., Hess G., Manns M., Meyer zum Büschenfelde K.H.: „Autoantibodies to Human Asialoglycoprotein Receptor in Autoimmune-type Chronic Hepatitis” (1990), *Hepatology* 11, 606-612
- Treichel U., Gerken G., Rossol S., Rothhauwe H.W., Meyer zum Büschenfelde K.H., Poralla T.: „Autoantibodies against the human asialoglycoprotein receptor: Effects of therapy in autoimmune and virus-induced active hepatitis” (1993), *J. Hepatology* 19, 55-63
- Treichel U., Meyer zum Büschenfelde K.H., Stockert R.J., Poralla T. and Gerken G.: „The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers” (1994a), *J. Gen. Virol.* 75, 3021-3029
- Treichel U., Paietta E., Poralla T., Meyer zum Büschenfelde K.H. and Stockert R.J.: „Effects of Cytokines on Synthesis and Function of the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor” (1994b), *J. Cell. Phys.* 158, 527-534
- Treichel U., Schreiter T., Meyer zum Büschenfelde K.H. and Stockert R.J.: „High-Yield Purification and Characterization of Human Asialoglycoprotein Receptor” (1995), *Prot. Expr. Purif.* 6, 251-255
- Treichel U., Meyer zum Büschenfelde K.H., Dienes H.P. and Gerken G.: „Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells” (1997), *Arch. Virol.* 142, 493-498
- Virgolini I., Müller C., Höbart J., Scheithauer W., Angelberger P., Bergmann H., O’Grady J. and Sinzinger H.: „Liver Function in Acute Viral Hepatitis as Determined by a Hepatocyte-specific Ligand: <sup>99m</sup>Tc-Galactosyl-Neoglycoalbumin” (1992), *Hepatology* 15, 593-598

- Wahlberg J.M., Geffen I., Reymond F., Simmen T. and Spiess M.: „trans-Golgi retention of a plasma membrane protein: mutations in the cytoplasmic domain of the Asialoglycoprotein Receptor subunit H1 result in trans-Golgi retention” (1995), *J. Cell Biol.* 130, 285-297
- Wessels H.P., Geffen I. and Spiess M.: „A hepatocyte-specific basolateral membrane protein is targeted to the same domain when expressed in Madin-Darby canine kidney cells” (1989), *J. Biol. Chem.* 264, 17-20
- Weiss, Peretz and Ashwell, Gilbert: „Ligand-induced Modulation of the Hepatic Receptor for Asialoglycoproteins” (1989), *J. Biol. Chem.* 264, 11572-11574
- Weiss P., Ashwell G., Morell A.G. and Stockert R.J.: „Modulation of the Asialoglycoprotein Receptor in Human Hepatoma Cells: Effect of Glucose” (1994), *Hepatology* 19, 432-439
- Wickner, William T. and Lodish, Harvey F.: „Multiple Mechanisms of Protein Insertion Into and Across Membranes” (1985), *Science* 230, 400-407
- Wikström, Lilian and Lodish, Harvey F.: „Nonlysosomal, pre-Golgi Degradation of Unassembled Asialoglycoprotein Receptor Subunits: A TLCK- and TPCK-sensitive Cleavage within the ER” (1991), *J. Cell Biol.* 113, 997-1007
- Wikström, Lilian and Lodish, Harvey F.: „Endoplasmic Reticulum Degradation of a Subunit of the Asialoglycoprotein Receptor in Vitro” (1992), *J. Biol. Chem.* 267, 5-8
- Wikström, Lilian and Lodish, Harvey F.: „Unfolded H2b Asialoglycoprotein Receptor Subunit Polypeptides Are Selectively Degraded within the Endoplasmic Reticulum” (1993), *J. Biol. Chem.* 268, 14412-14416
- Wragg, Stephanie and Drickamer, Kurt: „Identification of Amino Acid Residues that Determine pH Dependence of Ligand Binding to the Asialoglycoprotein Receptor during Endocytosis” (1999), *J. Biol. Chem.* 274, 35400-35406
- Yuk, Ming Huam and Lodish, Harvey F.: „Two Pathways for the Degradation of the H2 Subunit of the Asialoglycoprotein Receptor in the Endoplasmic Reticulum” (1993), *J. Cell Biol.* 123, 1735-1749
- Yuk, Ming Huam and Lodish, Harvey F.: „Enhanced Folding and Processing of a Disulfide Mutant of the Human Asialoglycoprotein Receptor H2b Subunit” (1995), *J. Biol. Chem.* 270, 20169-20176
- Zeng, Fu-Yue and Weigel, Paul H.: „Fatty Acylation of the Rat and Human Asialoglycoprotein Receptors: A conserved cytoplasmic Cysteine Residue is acylated in all Receptor Subunits” (1996), *J. Biol. Chem.* 271, 32454-32460
- Zeng F.Y., Oka J.A. and Weigel P.H.: „A Specific Antibody to the Carbohydrate Recognition Domain of the Asialoglycoprotein Receptor RHL1 Subunit Does Not React with RHL2/3 but Blocks Ligand Binding” (1998), *Biochem. Biophys. Res. Com.* 249, 236-240

## **10. Publikationen**

### **Poster:**

Schreiter T, Treichel U, Stockert RJ und Meyer zum Büschenfelde KH: „Präparation und funktionelle Charakterisierung des humanen Asialoglykoprotein Rezeptors in normaler Leber und Vergleich zu Hepatomzellen“, GASL-Meeting Jan 1995, München

Schreiter T, Treichel U, Stockert RJ and Meyer zum Büschenfelde KH: „The Expression and Composition of the Human Asialoglykoprotein Receptor is Altered in Malignant Liver Cells“, EASL-Tagung Aug 1995, Kopenhagen

Treichel U, Schreiter T, Trippler M, Stockert RJ, Meyer zum Büschenfelde KH und Gerken G: „Alterierte Struktur des humanen Asialoglykoprotein Rezeptors in maligne transformierten Leberzellen“, GASL-Meeting Jan 1996, Hamburg

Treichel U, Schreiter T, Tassopoulos N, Meyer zum Büschenfelde KH und Gerken G: „Zur Bedeutung des Nachweises zirkulierender Autoantikörper bei 257 Patienten mit akuter Hepatitis“, GASL-Meeting Jan 1996, Hamburg

Schreiter T, Treichel U, Stockert RJ and Meyer zum Büschenfelde KH: „The Expression and Composition of the Human Asialoglykoprotein Receptor is Altered in Malignant Liver Cells“, GBCh-Tagung Sep 1996, Leipzig

Auth M, Woitaschek D, Beste M, Blaheta RA, Weber S, Joplin R, Schreiter T, Treichel U, Oldhafer KJ, Voit T and Markus BH: „Coculture of normal human hepatocytes with intrahepatic biliary epithelial cells improves long-term differentiated metabolic and synthetic function *in vitro*“, AASLD-Tagung Okt 2000, Dallas (USA)

Schreiter T, Liu C, Gerken G and Treichel U: „Detection of circulating autoantibodies directed against the asialoglykoprotein receptor with a recombinantly expressed subunit H1“, AASLD-Tagung Nov 2001, Dallas (USA)

Liu C, Schreiter T, Dahmen U, Auth M, Gerken G and Treichel U: „Cyclosporine A or FK-506 does not promote proliferation of human-derived intrahepatic biliary epithelial cells“, AASLD-Tagung Nov 2001, Dallas (USA)

Schreiter T, Liu C, Gerken G und Treichel U: „Bestimmung zirkulierender Autoantikörper gegen den humanen Asialoglykoprotein-Rezeptor mit einer rekombinant exprimierten Untereinheit H1“, angenommen für das GASL-Meeting Jan 2002, Leipzig

Liu C, Schreiter T, Dirsch O, Gerken G, Broelsch CE und Treichel U: „Identifizierung von Leberstammzellen aus Kulturen von humanen intrahepatischen biliären Epithelzellen (BEC)“, angenommen für das GASL-Meeting Jan 2002, Leipzig

### **Artikel:**

Treichel U, Schreiter T, Meyer zum Büschenfelde KH, Stockert RJ: „High-Yield Purification and Characterization of Human Asialoglycoprotein Receptor“ (1995), Prot. Expr. Purif. 6, 251-255

Wittig BM, Treichel U, Blaheta R, Schreiter T, Schwarting A, Meyer zum Büschenfelde KH, Mayet W: „Soluble E-selectin enhances intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in human tumor cell lines“ (1997), Exp. Cell Res. 237, 364-370