

**Regulation der O-Glykosylierung in
GlcNAc/GalNAc-Epimerase-defizienten
CHO-Mutanten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Regine Bölinger
aus Köln

Köln 2005

Berichterstatter: Prof. Dr. F.-G. Hanisch

Prof. Dr. D. Schomburg

Tag der Disputation: 6. Juli 2005

Danksagung

Herrn Prof. Dr. F.-G. Hanisch möchte ich für die Betreuung, fachliche Anregung, Anleitungen und seine ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Herrn Prof. Dr. D. Schomburg danke ich für die freundliche Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen und Herrn Prof. Dr. R. Strey für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Herrn Prof. Dr. M. Paulsson danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes im Zentrum für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln.

Für die zahlreichen, wertvollen Tipps ein herzliches Dankeschön an Dr. Tilo Schwientek.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und die harmonische Arbeitsatmosphäre, insbesondere bei Mirko von Elstermann für das unermüdliche Korrekturlesen meiner Arbeit und die stete Hilfe bei Computerproblemen.

1. Einleitung	5
1.1 N- und O-Glykane	5
1.2 Mucine	6
1.2.1 MUC1	9
1.2.1.1 Bezeichnungen für MUC1	11
1.2.1.2 O-Glykanprofile des MUC1	11
1.2.1.3 Vorkommen des MUC1	12
1.2.1.4 MUC1 und das Immunsystem	13
1.2.2 Struktur und Biosynthese der Mucin-typischen O-Glykane	14
1.2.2.1 Biosynthese des MUC1	17
1.2.2.2 Biologische Funktionen des MUC1	17
1.2.2.3 Biologische Funktionen des MUC1 in Krebszellen	18
1.2.3 MUC4	19
1.3 Glykosyltransferasen	20
1.3.1 Die Ortsspezifität der O-Glykosylierung des Mucin-Typs	23
1.4 IdID-Zellen: Das zelluläre Modell defizienter O-Glykosylierung	25
1.5 Aufgabenstellung	27
2. Material und Methoden	28
2.1 Kultivierung von Zelllinien	28
2.1.1 Zellen	28
2.1.2 Dauerkultur	29
2.1.3 Transfektion und Selektion von CHO- und IdID-Zellen	29
2.2 Proteinchemische Methoden	29
2.2.1 Aufreinigung des rekombinant exprimierten MUC1-S bzw. MUC4-S durch Affinitätschromatographie	29
2.2.2 Aufreinigung der Fusionsproteine durch Umkehrphasen-HPLC	31
2.2.3 SDS-Polyacrylamidgel (PAGE)	31
2.2.3.1 Coomassiefärbung	32
2.2.3.2 Silberfärbung	32
2.2.4 Western-Blot	32
2.2.5 Lektin-Blot	33
2.2.6 DAB-Färbung	34
2.2.7 Nachweis von Glykokonjugaten auf Elektroblots	34
2.2.8 Mikrosomenpräparation der core2-Transferase	34
2.2.8.1 Aktivitätstest	35
2.3 Methoden zur quantitativen O-Glykoprofilierung	36
2.3.1 Methylierung und β -Eliminierung von O-Glykanen (nicht-reduktive Eliminierung)	36
2.3.2 Reduzierende Eliminierung mit NaBH ₄	36
2.3.3 Freisetzung der O-Glykane durch Hydrazinolyse	37
2.3.3.1 Fluoreszenzmarkierung der freigesetzten Oligosaccharide	37
2.3.3.2 Bestimmung der Oligosaccharidstruktur durch Exoglykosidase-Spaltung der Fluoreszenz-markierten Glykane	38
2.3.3.3 Normalphasen-HPLC 2-AB-markierter Oligosaccharide	38
2.4 In vitro O-Glykosylierung	38
2.4.1 In vitro Studien mit rekombinanten ppGalNAc-Transferasen	38
2.4.2 In vitro Studien mit rekombinanter GlcNAc-Transferase-T3	39
2.4.3 ZipTip-C ₁₈ -Peptidaufreinigung	39
2.5 MALDI-TOF-Massenspektrometrie	39
2.6 Molekularbiologische Arbeiten	40
2.6.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA	40
2.6.2 Restriktionsverdau von DNA	40
2.6.3 Transformation	40
2.6.4 Präparation der DNA	41
2.6.5 Agarosegelelektrophorese zur Analyse von DNA-Fragmenten	41
2.6.6 RNA-Präparation	42
2.6.7 Generierung der cDNA	42
2.6.8 PCR (Polymerase Chain Reaction)	42

3. Ergebnisse	43
3.1 <i>In vivo</i> O-Glykosylierung in zellulären Modellen	43
3.1.1 <i>Isolierung und Aufreinigung von MUC1-S/MUC4-S Fusionsproteinen aus Zellüberstand</i>	44
3.1.2 <i>Expression des MUC4-S</i>	45
3.1.2.1 <i>Expression des MUC4-S in T-47D-Zellen</i>	45
3.1.2.2 <i>Expression des MUC4-S Fusionsproteins in CHO-Zellen</i>	47
3.1.2.3 <i>Expression des MUC4-S Fusionsproteins in Id1D-Zellen</i>	48
3.1.3 <i>Expression des MUC1-S</i>	50
3.1.3.1 <i>Expression des MUC1-Fusionsproteins MUC1-S in CHO-Zellen</i>	50
3.1.3.2 <i>Expression des MUC1-S-Fusionprotein in Id1D-Zellen</i>	51
3.1.3.3 <i>Expression des MUC1-S in Id1D-Zellen unter variierender Zuckersupplementierung</i> .	53
3.1.3.4 <i>Koexpression des MUC1-S und der C2GnT3 in CHO-Zellen</i>	57
3.1.3.5 <i>Koexpression des MUC1-S mit C2GnT3 in Id1D-Zellen</i>	62
3.1.4 <i>O-Glykanprofilierung der 2-Aminobenzamid-markierten O-Glykane durch HPLC</i>	66
3.1.5 <i>O-Glykanprofilierung der 2-Aminobenzamid-markierten O-Glykane nach Neuraminidaseverdau durch HPLC</i>	72
3.2.1 <i>Einfluss sialylierter O-Glykane auf die Initiation der O-Glykosylierung durch Polypeptid: GalNAc-Transferasen T1 und T2</i>	75
3.2.2 <i>Beeinflusst sialyl-T die core2-Synthese in benachbarten Positionen?</i>	82
4. Diskussion	84
4.1 <i>Aufklärung von Regulationsmechanismen der O-Glykan Core-Biosynthese auf rekombinanten MUC1 Glykosylierungssonden in vivo</i>	84
4.2 <i>In vitro</i> -Studien zur Aufklärung kompetitiver Effekte in der O-Glykan-Biosynthese	92
4.2.1 <i>Einfluss der sialyl-T-Struktur auf die core2-Synthese in benachbarten Positionen</i>	92
4.2.2 <i>Einfluss sialylierter O-Glykane (sialyl-T) auf die Initiation durch ppGalNAc-Transferasen-T1 und -T2 (Nachbareffekte)</i>	93
5. Zusammenfassung	95
6. Literatur	98
Kurzzusammenfassung	125
Abstract	126
Erklärung	127
Curriculum Vitae	128

Abkürzungsverzeichnis

2-AB	<u>2</u> - <u>A</u> minobenzamid
AS	<u>A</u> minosäure
Asn	<u>A</u> sparagin
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
Bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aare
cDNA	<u>c</u> omplementary <u>D</u> N <u>A</u> /komplementäre DNA
CHO	<u>C</u> hinese <u>h</u> amster <u>o</u> vary
dd	<u>d</u> oppelt <u>d</u> estilliert
DMEM	<u>D</u> ulbecco´s <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid
DNA	<u>D</u> esoxyribonucleic <u>a</u> cid/Desoxyribonukleinsäure
EDTA	<u>E</u> thylendiamin- <u>t</u> etra <u>a</u> acetat
FCS	<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum/ Fötales Kälberserum (FKS)
Gal	<u>G</u> alactose
GalNAc	<u>N</u> - <u>A</u> cetyl <u>g</u> alactosamin
Gal-1P	<u>G</u> alactose-1- <u>P</u> hosphat
GlcNAc	<u>N</u> - <u>A</u> cetyl <u>g</u> lucosamin
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography
kDa	<u>K</u> ilo- <u>D</u> alton (1000 g/mol)
LDL	<u>l</u> ow <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein
MALDI	<u>M</u> atrix- <u>a</u> ssisted <u>L</u> aser- <u>D</u> esorption/ <u>I</u> onisation/ Matrix-unterstützte Laser-Desorption/ Ionisation
MS	<u>M</u> assenspektrometrie
MUC1-S	<u>s</u> ezerniertes <u>MUC1</u>
PAGE	<u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> ele <u>e</u> ktrophorese
PBS	<u>P</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>S</u> aline/Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction/Polymerase Kettenreaktion
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfat/Natriumdodecylsulfat
Ser	<u>S</u> erin
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> acetat- <u>E</u> DTA-Puffer
TBS	<u>T</u> ris- <u>b</u> uffered <u>S</u> aline/Tris-gepufferte NaCl-Lösung
TEMED	<u>T</u> etramethylethylendiamin
TFA	<u>T</u> ri <u>f</u> luoro <u>a</u> cetic acid/Tri-Fluoressigsäure
Thr	<u>T</u> hreonin

TOF	<u>T</u> ime- <u>o</u> f- <u>f</u> light (Flugzeit)
UDP-GalNAc	<u>U</u> ridin <u>d</u> iphosphatidyl- <u>N</u> - <u>A</u> cetyl <u>g</u> alactosamin
UDP- GlcNAc	<u>U</u> ridin <u>d</u> iphosphatidyl- <u>N</u> - <u>A</u> cetyl <u>g</u> lucosamin
UTP	<u>U</u> ridin <u>t</u> riphosphat
VNTR	<u>v</u> ariable <u>n</u> umber of <u>t</u> andem <u>r</u> epeats/ variable Anzahl an Tandemrepeats

1. Einleitung

1.1 N- und O-Glykane

Oligosaccharide auf Proteinen haben vielfältige Rollen in der Faltung, Stabilität von Proteinen und bei Erkennungsprozessen auf molekularer Ebene.

Man unterscheidet zwei abundante Formen der Glykosylierung: die N-Glykosylierung über β -GlcNAc, die an der Aminogruppe von Asparagin stattfindet, von der O-Glykosylierung über α -GalNAc an den Hydroxylgruppen der Aminosäuren Serin und Threonin.

Die Synthese von N-Glykanen beginnt durch Transfer von Mannose-reichen Glykanen (2 GlcNAc-, 9 Mannose-, 3 Glucose-Resten auf einem Trägerlipid) auf einen spezifischen Asparaginrest der wachsenden Polypeptidkette im endoplasmatischem Retikulum (ER). Ein Asparaginrest kann ein Oligosaccharid nur aufnehmen, wenn er Teil einer Asn-X-Ser oder Asn-X-Thr-Sequenz und sterisch für die Transferase zugänglich ist. Die Oligosaccharidkette wird im Golgi weiter prozessiert (Stryer, 1999). Zur Qualitätskontrolle beim Export aus dem ER bleiben N-gebundene Glykoproteine solange an die Chaperone Calnexin und Calreticulin gebunden, bis eine vollständige Faltung erreicht ist (Trowbridge et al., 1998). Für die Erkennung und den richtigen Transport werden N-Glykane auf löslichen lysosomalen Proteinen durch Mannose-6-Phosphat-Markierung terminal modifiziert (Kornfeld, 1987). Des Weiteren spielen N-Glykane von einigen löslichen Proteinen auch eine Rolle beim Transport zur apikalen Oberfläche von Epithelzellen (Scheiffele et al., 1995).

Die O-Glykosylierung findet im *cis*- bis *trans*-Golgi statt (Brockhausen, 1999), wobei keine spezifische Peptidsequenz im Sinne eines Sequons bekannt ist. Auch über die Funktion von O-Glykanen auf Glykoproteinen ist weniger als bei N-Glykanen bekannt, allerdings gilt für viele Proteine, dass sie durch O-Glykane vor proteolytischer Degradation geschützt werden. Cluster von O-Glykanen können als apikale Signale sowohl für die transmembrane als auch für die lösliche Form des Neurotrophin-Rezeptors fungieren (Yeaman et al., 1997). Des Weiteren können spezifische O-Glykane auf leukocytären Mucinen als interzelluläre Liganden für Moleküle wie z.B. Selektine wirken (Rosen et al., 1994).

1.2 Mucine

Der Begriff Mucin bezog sich in den 70er Jahren ausschließlich auf die wichtigsten Glykoprotein-Komponenten des sezernierten Mukus an der Oberfläche von glandulären Epithelzellen. Typische Merkmale der Mucine sind: ein hoher Gehalt an Kohlenhydraten (über 50 % des Molekulargewichtes), hohe Schwebedichte in der isopyknischen Dichtegradientenzentrifugation und ein Threonin- bzw. Serin-reiches Peptidgerüst für die Addition O-gebundener Oligosaccharide. Das strukturelle Modell der dichten, hydrophilen, negativ geladenen Glykane passte zur Funktion der Mucine, die hauptsächlich an der Ausbildung eines viskoelastischen Gels zum physikochemischen Schutz der epithelen Oberfläche beteiligt sind.

In den 80er Jahren wurde bekannt, dass Mucine wesentlich komplexer glykosyliert sind, als zuvor angenommen (Lamblin et al., 1984; Hanisch et al., 1985, 1986; Hounsell et al.; 1985, 1989; Mutsaers et al., 1986). Durch Magnani et al. (1983), Hilkens et al. (1984), Burchell et al. (1987) wurden Tumor-assoziierte Epitope auf Mucinen als Immun-*Targets* auf malignen Zellen und in ihren Sekreten identifiziert.

Als charakteristisches Merkmal von Mucinen gilt die *tandem repeat* (TR) Domäne. *Splicing*-Formen des Mucins jedoch, wie MUC1/Y, enthalten keine TR-Domäne. Daher gibt es zwei strukturelle Definitionen von Mucinen: 1) Mucine mit einer TR-Domäne, die sich durch eine dichte O-Glykosylierung auszeichnen und 2) Mucine im erweiterten Sinne, welche durch das generelle Merkmal charakterisiert werden, dass sie O-gebundene Glykane in Serin- und Threonin-reichen Clustern exprimieren (Baldus et al., 2004).

Im Allgemeinen ist die O-glykosylierte TR-Region weder bezüglich der Größe noch der Aminosäuresequenz zwischen den Species konserviert. Jedoch sind die flankierenden amino- und carboxyterminalen Regionen stärker homolog und zeigen wahrscheinlich auch in Bezug auf die Funktion Ähnlichkeiten (Choudhury et al., 2000).

Es wurden 19 menschliche Mucin-Gene identifiziert: MUC1-4, MUC5B, MUC5AC; MUC6-9, MUC11-13 und MUC15-20 (Gendler et al., 1990; Swallow et al., 1987; Porchert et al., 1991; Gross et al., 1992; Pratt et al., 2000; Bobek et al., 1993; Gum

et al., 1994, 1997, 2002; Shankar et al., 1997; Toribara et al., 1997; Williams et al., 1999, 2001; Yin et al., 2001; Dufosse et al.; 1993; Lapensee et al.; 1997; Lan et al., 1990; Aubert et al., 1991; Pallesen et al.; 2002; Chen et al., 2003; Higuchi et al., 2004) (Tabelle 1). Aufgrund der Struktur werden Mucine in drei verschiedene Gruppen unterteilt: membrandurchspannende (MUC1, MUC3A MUC3B, MUC5AC, MUC5B, MUC4; MUC9, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 und MUC20), gelformende (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC8 und MUC19) und lösliche (MUC7) Mucine.

Es bestehen fundamentale Unterschiede zwischen den sekretorischen (mit Ausnahme von MUC7) und den membranständigen Mucinen, da die sekretorischen durch eine oder mehrere Von-Willebrandt-Faktoren ähnliche D-Domänen in den nicht-VNTR-(*variable number of tandem repeats*) Regionen charakterisiert werden, welche Cystein-reiche Peptide enthalten, die in die Oligomerisierung von Mucin-Monomeren und die Bildung von sekretorischen Vehikeln involviert sind (Perez-Vilar und Hill, 1999; Sadler, 1998). Membrangebundene Mucine enthalten Serin, Threonin und/oder Prolin reiche VNTR-Regionen, SEA-Module in der extrazellulären Region, epidermale Wachstumsfaktor-Domänen (EGF) (bis auf MUC1), transmembranäre und zytoplasmatische Regionen (Williams et al., 1999; Williams et al., 2001; Williams et al., 1999; Pratt et al., 2000; Gum et al., 1997; Moniaux et al., 1999; Patton et al., 1995; Carraway et al., 2000; Crawley et al., 1999).

OVGP1 (oviduktales Glykoprotein 1 = MUC9), MCAM (Melanomzell-Adhäsionsmolekül = MUC18), CD164-Ag (Sialomucin = MUC24), CAPN1 (Calpain1) und Leukosalin gehören zu den Mucin-ähnlichen Proteinen. Des Weiteren werden die Zelladhäsionsmoleküle MadCAM1 und GlyCAM1 trotz fehlender Repeatdomäne als Mucine bezeichnet (Shimizu und Shaw, 1993)

Mucin-Name	chromosomale Lokalisation	Expressionsgewebe	Literatur
Mucin 1	1q21-q24	ubiquitär	Swallow et al. (1987) Gendler et al. (1990)
Mucin 2	11p15	Gastrointestinaltrakt, Respirationstrakt	Gum et al. (1994)
Mucin 3A	7q22	Gastrointestinaltrakt	Gum et al. (1997)
Mucin 3B	7q22	Gastrointestinaltrakt	Pratt et al. (2000)
Mucin 4	3q29	Respirationstrakt	Porchet et al. (1991) Gross et al. (1992)
Mucin 5AC	11p15	Respirationstrakt, Magen	Dufosse et al. (1993)
Mucin 5B	11p15	Gallenblase	Dufosse et al. (1993)
Mucin 6	11p15.5-p15.4	Gastrointestinaltrakt	Toribara et al. (1993)
Mucin 7	4q13-q21	Speicheldrüse	Bobek et al. (1996)
Mucin 8	12q24.3	Trachea	Shankar et al. (1994)
Mucin 9	1p13	Eileiter	Lapensee et al. (1997)
Mucin 11	7q22	Gastrointestinaltrakt, Urogenitaltrakt	Williams et al. (1999)
Mucin 12	7q22	Gastrointestinaltrakt Urogenitaltrakt	Williams et al. (1999)
Mucin 13	3q13.3	Gastrointestinaltrakt	Williams et al. (2001)
Mucin 15	11p14.3	Genital- , Gastrointestinaltrakt, lymphatische Organe	Pallesen et al. (2002)
Mucin 16	19p13.3	Ovarien	Yin et al. (2001)
Mucin 17	7q22	Gastrointestinaltrakt	Gum et al. (2002)
Mucin 19	12q12	Trachea Speicheldrüse	Chen et al. (2003)
Mucin 20	3q29	Niere, Plazenta, Lunge, Prostata, Leber, Dickdarm	Higuchi et al. (2004)

Tabelle 1: Übersicht über derzeit identifizierte Mucine.

Jedem Mucin wurden die chromosomale Lokalisation und das Expressionsgewebe zugeordnet.

1.2.1 MUC1

Shimizu und Yamauchi (1982) identifizierten als erste das Glykoprotein als ein an Serin, Threonin, Prolin, Glycin und Alanin reiches Protein in einer Fraktion aus Milchfettkugelmembran.

Das MUC1-Mucin ist ein Typ 1-transmembranständiges Glykoprotein, welches in den meisten Epithelzellen (Zotter et al., 1988) und einigen Subpopulationen von Lymphozyten (Agrawal et al., 1998; Dent et al., 1999) exprimiert wird.

Die mature Form des MUC1 besteht aus zwei Einheiten, die durch ER-Prozessierung auf proteolytischem Wege von einem gemeinsamen Vorläuferpeptid abstammen und einen heterodimeren Komplex bilden (Abbildung 1). Die kleinere Untereinheit besteht aus einer C-terminalen, zytoplasmatischen Domäne, der membrandurchspannenden Domäne und einer kurzen extrazellulären Sequenz, die nicht kovalent mit der größeren extrazellulären Untereinheit verbunden ist (Ligtenberg et al., 1992).

Diese extrazelluläre Domäne besteht aus 20-120 Tandemrepeats (Gendler et al., 1990, Gendler et al. 1991) mit je 20 Aminosäuren (PDTRPAPGSTAPPAHGVTS_A), wobei jedes Ikosapeptid 3 Threonine und 2 Serine enthält, die O-Glykane tragen können (Hanisch et al., 1989, Hull et al., 1989, Lloyd et al., 1996). Obwohl jede dieser Positionen *in vivo* O-glykosyliert werden kann, variiert die durchschnittliche Dichte der Glykane unter den MUC1-Glykoformen. Tandemrepeat-Glykopeptide von MUC1 in Brustmilch (Müller et al., 1997) oder von der Brustkarzinomzelllinie T-47D (Müller et al., 1999) enthalten durchschnittlich 2,6 bzw. 4,8 Glykane pro Tandemrepeat. In der VNTR-Region fanden Engelmann et al. (2001) Hinweise auf Sequenzvariationen. In den Gewebeproben wurde ein Austausch von Prolin in der Position 13 der Tandemrepeat-Sequenz PDTRPAPGSTAPPAHGVTS_A gegen Glutamin, Alanin oder Threonin festgestellt. Des Weiteren waren Asparaginsäure (D) und Threonin (T) des immundominanten Epitopes APDTR konzentriert gegen Glutaminsäure (E) und Serin (S) ausgetauscht worden. Die VNTR-Domäne wird durch degenerierte Repeats mit weniger Glykosylierungspositionen flankiert. Zusätzlich besitzt MUC1 auch fünf übereinstimmende N-Glykosylierungspositionen in C-terminalen Sequenzen der Ektodomäne und in der Nähe der Transmembrandomäne.

Die carboxyterminale, zytoplasmatische Domäne besteht aus 69 Aminosäureresten, wovon sieben Tyrosinreste sind, die z. T. phosphoryliert werden können (Zrihan-Licht et al., 1994, Pandey et al., 1995). Die Phosphorylierung von Tyrosin, welches von der Membran am weitesten entfernt ist, fördert die Interaktion mit der SH2-Domäne des Adapterproteins Grb2 (Pandey et al., 1995), welches Proteine wie das Sos-Austauschprotein von Ras (Chardin et al., 1993; Egan et al., 1993) oder die PRD-Domäne der GTPase Dynamin binden kann (Barylko et al., 1998).

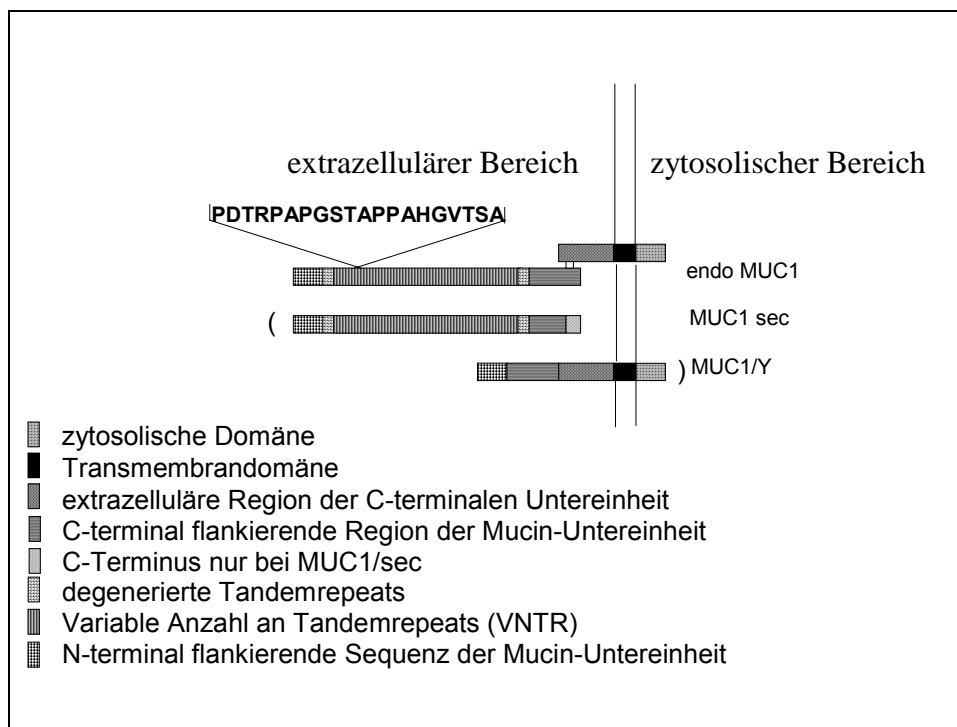


Abbildung 1: Struktur und Isoformen des MUC1

(Modifiziert nach Hanisch und Müller, 1999)

Lösliches MUC1 wurde in menschlicher Milch (Patton, 2001; Peterson et al., 2001) und in sehr geringen Mengen im Serum von gesunden Männern und Frauen gefunden (Croce et al., 2001; McGuckin et al., 1994).

Diese sekretorische Form (MUC1-Sec) könnte eine *splicing*-Variante darstellen, der die transmembranäre und die zytosolische Sequenz fehlt. Die C-terminale Sequenz weicht vom membranären MUC1 ab (Wreschner et al., 1990). Es besteht auch die Möglichkeit, dass MUC1 von der Oberfläche von Zellen durch proteolytische Spaltung freigesetzt wird (Hilkens et al., 1991). TACE (*tumor necrosis factor- α* (*TNF- α*)) könnte als Protease für die Spaltung verantwortlich sein (Thathiah et al., 2003).

Obermair et al. (2002) beschrieben weitere *splicing*-Varianten, die Isoformen MUC1-A, -B, -C und -D, welche verschiedene *splice* Akzeptorpositionen beim Übergang von Intron 1 zu Exon 2 haben. Einigen *splicing*-Varianten (MUC/Y, MUC/X und MUC/Z) fehlt die VNTR Region. MUC1/Y dient als Bindungspartner für eine andere MUC1 Gen-*splice* Variante und zwar dem sekretierten MUC1/SEC, welches keine Transmembrandomäne, dafür jedoch eine 3'-terminale Sequenz mit Teilen des Intron 2 besitzt (Baruch et al., 1999). MUC1/Y-Transkripte und -Protein wurden vorwiegend in Brustkrebsgewebe gefunden (Zirhan-Licht et al., 1994). MUC/X (Baruch et al., 1997) und MUC/Z (Oosterkamp et al., 1997) wurden in Krebszelllinien beschrieben.

1.2.1.1 Bezeichnungen für MUC1

MUC1 ist mit einer Anzahl von Mucinantigenen identisch, die in verschiedenen Geweben und Sekreten charakterisiert wurden: EMA (epitheliales Membranantigen, Ormerod et al., 1981), PAS-0 (*periodic acid-schiff's*, Shimizu et al., 1982), DUPAN-2 (Metzgar et al., 1982), PUM (*Peanut-Lektin* reaktives urinäres Mucin, Karlsson et al., 1983), CA1 (Krebsantigen, Bramwell et al., 1983), NPOP (nicht-penetrierendes Glykoprotein, Ceriani et al., 1983), NCRC11-Antigen (Ellis et al., 1984), Epitektin (Harris, 1984), H23-Antigen (Keydar et al., 1989), PEM (polymorphes epitheliales Mucin, Gendler et al., 1988), SGA (Talgdrüsen-Antigen, de Kretser et al., 1985); MAM-6 (Hilkens et al., 1986), Episialin (Ligtenberg et al., 1990) und DF3-Antigen (Kufe et al., 1984).

1.2.1.2 O-Glykanprofile des MUC1

Es ist bekannt, dass Mucine von unterschiedlichen Organen und Geweben verschiedene Muster von O-Glykosylierungen besitzen.

Bisher wurde das O-Glykanprofil von MUC1 Glykoformen in Brustmilch, Urin und Brustkrebszelllinien untersucht. Das O-Glykanprofil von MUC1 in Muttermilch wird durch auf *core2*-basierende, lineare oder verzweigte Polylactosaminylketten dominiert, welche mit bis zu drei Fucoseresten substituiert sind (Hanisch et al., 1989). Mono- und disialylierte Strukturen sind ebenfalls vorhanden, sie machen aber nur 25 % der Glykane aus (Hanisch et al., 1990). MUC1 im Urin hingegen besitzt

kürzere neutrale und saure Glykane, welche auf *core1* und *core2* basieren (Bhavanandan et al., 1998).

Die Glykoformen in Krebszelllinien wie T-47D (Hanisch et al., 1996), BT20 (Hull et al., 1989) oder anderen Brustkarzinomzelllinien (Lloyd et al., 1996) enthalten verkürzte Strukturen wie *core*-GalNAc, das *core1*-Disaccharid Gal(β 1-3)GalNAc als auch seine mono- und disialylierten Derivate.

Es wurde gezeigt, dass im Brustkrebs nicht nur eine abnorme Glykosylierung vorliegt (Lloyd et al. 1996, Hanisch et al. 1996), welche zur Addition von kürzeren O-Glykanen führt, sondern dass es auch zu einer Exposition von Peptidepitopen in den Tandemrepeat-Domänen kommt, welche normalerweise durch Glykosylierung maskiert sind; darüber hinaus beobachtet man auch, dass neue Kohlenhydratepitope auftreten.

Nicht nur die Art, sondern auch die Dichte der O-Glykane, die an MUC1 addiert werden, ist im Brustkrebs verändert (Müller et al., 1999). Daraus folgt, dass die mit Krebs assoziierten Glykoproteine sich hinsichtlich ihrer Antigenität und Immunogenität von den normalen Mucinen unterscheiden (Burchell, J. M. et al, 1993). Dieser Unterschied in der Antigenität kann durch den Antikörper SM3 (Burchell et al., 1987, Girling et al., 1989) demonstriert werden, welcher selektiv ein Epitop des *Core*-Proteins erkennt. Dieses Epitop wird in der Tandemrepeat-Domäne des mit Krebs assoziierten MUC1-Mucin exponiert (Burchell et al., 1989), im Normalgewebe aber durch Glykosylierung weitgehend maskiert.

1.2.1.3 Vorkommen des MUC1

MUC1 ist normalerweise auf der apikalen Oberfläche der meisten polarisierten, epithelialen Gewebe des Respirationstraktes, des Urogenitaltraktes und des Verdauungstraktes präsent. Überexprimiert wird MUC1 in Adenokarzinomen von Brust, Lunge, Dickdarm, Bauschspeicheldrüse, Magen, Prostata und Eierstock. Die epithelialen Zellen unterliegen einer malignen Transformation. Sie verlieren die normale apikal-basolaterale Polarität und beginnen MUC1 auf der gesamten Zelloberfläche zu exprimieren. Auch die MUC1-Expressionsrate ist erhöht und eine lösliche Form von MUC1 kann im Serum von Krebspatienten gefunden werden.

1.2.1.4 MUC1 und das Immunsystem

MUC1-Mucin bzw. die Peptidepitope seiner *repeat*-Domäne sind ein *Target*-Antigen für die Immuntherapie von Brustkrebs und anderen Karzinomen, da das mit Krebs assoziierte Mucin überexprimiert und abweichend glykosyliert wird (Taylor-Papadimitriou et al, 1999).

Die Überexpression von zellulärem MUC1 in Brustkrebs korreliert mit einer schlechten Prognose für den Patienten (Ceriani et al., 1992). Der Grund für diese zelluläre Akkumulation ist nicht bekannt. Es gibt aber Hinweise, dass die subzelluläre Verteilung von MUC1 in Tumorzellen ein Resultat der veränderten Endocytose ist, welche durch eine abweichende Glykosylierung verursacht wird (Altschuler et al., 2000).

Humorale und zelluläre Immunantworten wurden sowohl bei Krebspatienten (Kotera et al., 1994; Barnd et al., 1989; Hilkens et al., 1986), Gesunden (Hilkens et al., 1986) als auch bei Schwangeren (Agrawal et al, 1995) gefunden. Diese natürlichen Immunantworten reichen zur Bekämpfung des fortschreitenden Krebses nicht aus, jedoch könnte eine Vakzine, die auf MUC1 abgeleiteten Peptiden basiert, von therapeutischem Vorteil sein.

Von Mensdorff-Pouilly et al. (2000) demonstrierten, dass natürliche Anti-MUC1 Antikörper im Serum von Brustkrebspatienten Präferenzen für GalNAc-substituierte MUC1-Peptide zeigen und erbrachten damit einen Hinweis auf die Bedeutung von MUC1-Glykopeptiden in der Immunantwort gegen natürliche Glykoformen des Mucins. Vor kurzem wurde ein Anti-MUC1-Antikörper-Interleukin-2 Fusionsprotein generiert, welches mit der gleichen Spezifität wie der monoklonale Antikörper C595 an MUC1-positive Tumorzellen bindet. Nach der Bindung an MUC1 stimuliert das Fusionsprotein NK-Zellen und die Proliferation von Lymphozyten *in vitro* (Heuser et al., 2003).

In früheren Arbeiten wurden unglykosylierte MUC1-Peptide bezüglich ihrer Immunantwort in Menschen untersucht (Karanikas et al., 1997; Goydos et al., 1996). Hinsichtlich ihrer Prozessierung in dendritischen Zellen wurden glykosylierte MUC1-Peptide von Hanisch et al. (2003) *in vitro* untersucht. Dabei ergab sich, dass die O-Glykosylierung des MUC1 in dendritischen Zellen die Prozessierung dieses Glykoproteins kontrolliert, indem die Proteolyse der Thr3-Ser4 Peptidbindung

verhindert wird. Daher ist die O-Glykosylierung für das inerte Verhalten von tumor-assoziierten MUC1-Glykoformen durch Maskierung der *cleavage site* verantwortlich.

1.2.2 Struktur und Biosynthese der Mucin-typischen O-Glykane

Die komplexen Oligosaccharide auf Proteinen können in drei Regionen aufgeteilt werden:

- 1) core-Region: Sie wird durch die innersten zwei oder drei Glykane gebildet, die direkt mit dem Peptid verbunden sind.
- 2) backbone-Region: Sie sorgt für eine Elongation der Kette
- 3) periphere Strukturen: Sie weisen große strukturelle Komplexität auf (Abbildung 2). Diese komplexen, peripheren Glykanstrukturen liegen den Blutgruppen und anderen Antigenen zugrunde.

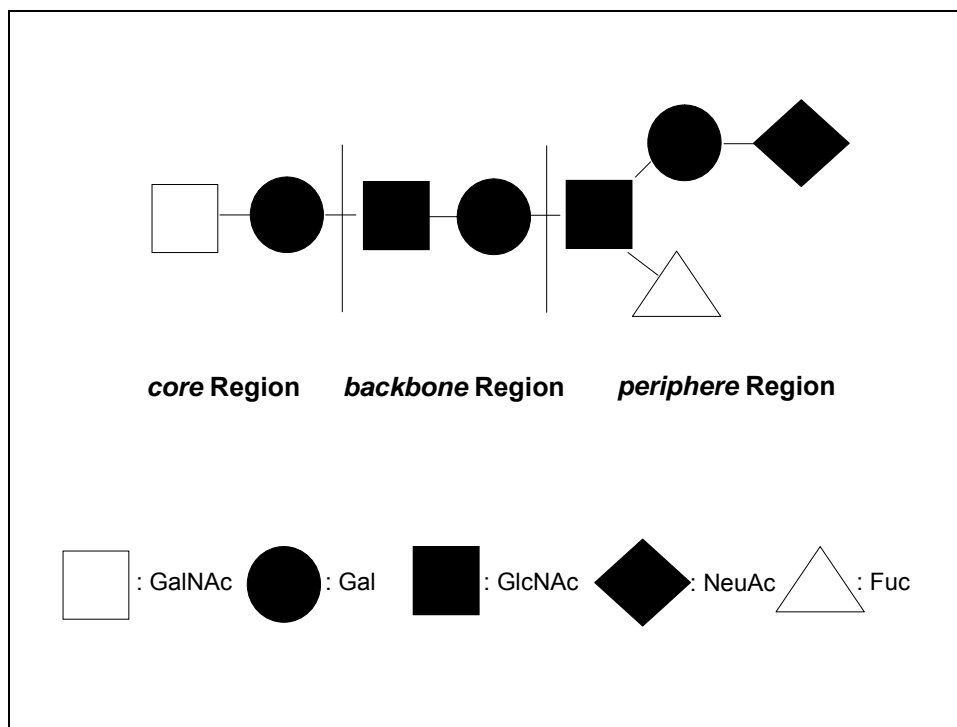


Abbildung 2: Strukturelle Elemente der mucintypischen O-Glykosylierung.

Durch die Übertragung eines N-Acetylgalactosamin-Restes auf die Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin wird der erste Schritt der Biosynthese der O-Glykane des

Mucin-Typen eingeleitet. Die derzeit 15 Mitglieder der Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyl-Transferasen, die obige Reaktion katalysieren, werden zellspezifisch exprimiert und zeigen eine Selektivität bezüglich der Aminosäuresequenz (Schwientek et al., 2002). Einfluss auf die O-Glykosylierung hat auch die Aminosäuresequenz in der Umgebung und die vorausgegangenen Glykosylierungen des Peptidsubstrates (Hanisch et al., 2001).

Bisher gibt es acht core-Strukturen in eukaryontischen Glykoproteinen, die alle auf dem core- α -GalNAc-Rest (Tn-Antigen) basieren. An diesen Rest kann in den Positionen C3, C6 oder an beiden gleichzeitig Monosaccharide addiert werden, wobei β -Galactose an C3, β -GlcNAc an C3 und/bzw. oder C6 sowie α -GalNAc an C3 oder C6 substituiert werden kann. In humanen Geweben treten am häufigsten core1 (Gal β 1-3GalNAc-Ser/Thr), auch Thomson-Friedenreich-Antigen genannt, und core2 (Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-Ser/Thr) Strukturen auf, welche ubiquitär exprimiert werden (van Halbeek et al., 1985; Brockhausen, 1999). Core3 (GlcNAc β 1-3GalNAc) und core4 (GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc) zeigen eine eingeschränkere, organ-spezifische Expression. Sie sind in den Bronchien (Breg et al., 1988), im Gastrointestinaltrakt (Podolski, 1985) und fetalen Mucinen (Hounsell et al., 1985, 1989; Hanisch und Peter-Katalinic, 1992) enthalten. Core5-8 treten eher selten auf. Core5 (GalNAc α 1-3GalNAc) kommt in fetalen Mucinen im Meconium (Hounsell et al., 1985) und rektalen Adenokarzinomen (Kurosaka et al., 1983) vor. Im Meconium (Hounsell et al., 1985) und gastrischen Karzinomen (Yamashita et al., 1994) wird core6 detektiert. Die core7-Struktur (GalNAc α 1-6GalNAc) ist Bestandteil des Rindersubmaxillar-Mucins (Chai et al., 1992) und die core8-Struktur (Gal α 1-3GalNAc) tritt im Bronchialschleim auf (van Halbeek, 1994). Durch die Addition von N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und anderen O-acetylierten Sialinsäuren, die α 2-6 an GalNAc gebunden werden, entstehen weitere komplexe Strukturen (Reuter et al., 1983) (Abbildung 3). Neu5Gc wird beim Menschen nur in fetalen und malignen Geweben gefunden.

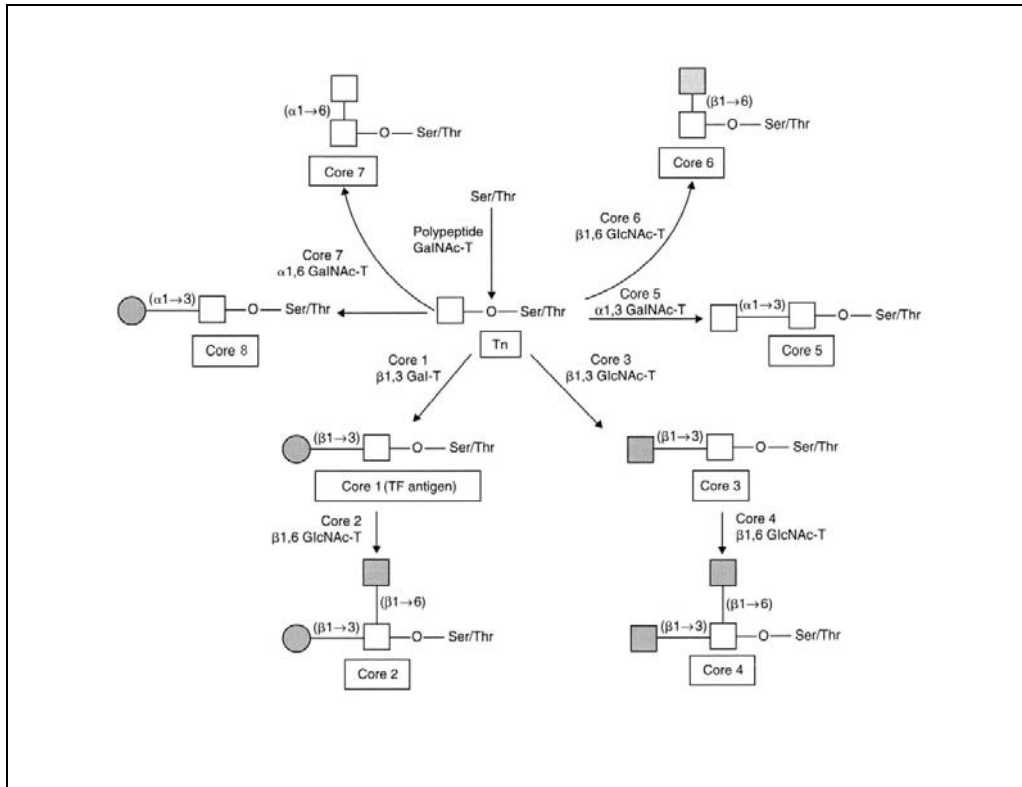


Abbildung 3: Synthese der core-Strukturen 1-8 mit folgender Bedeutung der Symbole:



Modifikation nach Brooks et al. (2002)

Die backbone-Region entsteht durch die Addition des Disaccharids Gal β 1-3GlcNAc (Typ 1) bzw. Gal β 1-4GlcNAc (Typ 2), welches in einer β 1-3 Bindung vorliegt und lineare oder über C6 der Gal verzweigte Polylactosaminketten ausbilden kann. Die linearen Ketten werden als i-Antigene und die verzweigten als I-Antigene bezeichnet.

Die nachfolgende periphere Strukturdomäne ist komplex. Auffallend ist, dass die terminalen Monosaccharide Fucose und N-Acetylneuraminsäure über α -glykosidische Bindungen verknüpft sind. Die strukturelle Variabilität nimmt durch Modifikationen der Neuraminsäure durch N-Acetylierung, N-Glycolylierung oder O-Acetylierung an verschiedenen Positionen zu. Es können bis zu 20 Monosaccharide miteinander verbunden sein (Kornfeld, R. und Kornfeld, A.; 1990). Die Art der Glykosylierung ist abhängig von den vorhandenen Glykosyltransferasen im Golgi, von ihrem kompetitiven Verhalten und könnte genetischem Polymorphismus unterliegen (Hanski et al., 1992; Brockhausen, 1999; Baldus und Hanisch, 2000).

1.2.2.1 Biosynthese des MUC1

An das neu synthetisierte Protein werden während seiner Synthese im endoplasmatischem Retikulum (ER) in der Nähe der transmembranären Region N-Glykane addiert. Danach wird MUC1 im ER proteolytisch innerhalb der SEA-Domäne gespalten (Hilkens und Buijs, 1988). Die beiden Produkte bleiben nicht-kovalent assoziiert (Ligtenberg et al., 1992). Die proteolytische Schnittstelle wurde von Parry et al. (2001) stromaufwärts der transmembranären Domäne identifiziert. Nach der Spaltung werden die N-Glykane im Golgi in komplexe N-Glykane überführt und die O-Glykosylierung wird initiiert. Dadurch steigt das apparente Molekulargewicht des Mucins erheblich (Hilkens und Buijs, 1988). Die O-Glykane werden zum Teil sialyliert bevor sie den Golgi verlassen. Unvollständig und vollständig sialyliertes MUC1 wird an der Oberfläche exprimiert (Litvinov und Hilkens, 1993). Litvinov und Hilkens (1993) zeigten anhand des membranären MUC1, dass die vollständige Sialylierung durch wiederholte Reinternalisierung über Clathrin-vermittelte Endocytose und nachfolgende Sialylierung im trans-Golgi entsteht. Vollständige Sialylierung von MUC1 findet man auf der Oberfläche von normalen Zellen, während auf Tumorzellen MUC1 aus einer Kombination von vollständig und unvollständig sialylierten Molekülen besteht. Es wird vermutet, dass dieser Zustand von dem vermehrten Vorkommen von MUC1 auf Tumorzellen und/oder einer geringeren Effizienz des Sialylierungsprozesses verglichen mit normalen Zellen herrührt (Litvinov und Hilkens, 1993).

1.2.2.2 Biologische Funktionen des MUC1

MUC1 kann durch seine O-Glykane Pathogene über deren Kohlenhydrat-spezifische Adhesine an die epitheliale Oberfläche binden (DeSouza et al., 1999; Lillehoj et al., 2001; Schroten et al., 1992, Yoken et al., 1992). Insofern stellt es als membran-gebundenes Mucin den spezifischen Liganden bzw. Rezeptor bakterieller Invasionsprozesse dar, andererseits kann es als sezerniertes oder abgeschildertes Mucin Pathogene an der Kontaktaufnahme mit der epithelialen Zelloberfläche hindern. Somit beeinflusst MUC1 die Zell-Zell-Kommunikation durch Regulation von Adhäsions- und Anti-Adhäsionsprozessen (Roussel, 1996). Die Blockierung der Adhäsion wird wahrscheinlich durch die sterische Konformation ausgeübt (Ligtenberg

et al., 1992, Hilkens et al., 1992). Ein Beispiel für Adhäsion ist die Wechselwirkung zwischen den Kohlenhydrat-Antigenen auf MUC1 (sialyl Lewis-x, -a) und dem Adhäsionsmolekül E-Selektin (Hanski et al., 1993).

MUC1 kann die Zell-Zell-Adhäsion auch durch intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen: Der zytosolische Bereich von MUC1 besitzt sieben Tyrosinreste, die phosphoryliert werden können (Wreschner et al., 1990), Bindungsstellen für Proteine und Kinasen, die SH2-Domänen besitzen (Spicer et al., 1995) und ein Bindungsmotiv für das Protein β -Catenin, welches in die src- und wnt-Signalkaskade involviert ist (Yamamoto et al., 1997). Neben β -Catenin interagiert MUC1 auch mit der Glykogen Synthase Kinase (GSK3 β) (Li et al., 1998), mit der c-Src-Kinase (Gonzalez-Guerrico et al., 2002; A. Li et al., 2001; Y. Li et al., 2001) und mit den erbB Rezeptoren 1-4.

Die Bindung an β -Catenin, das in der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion involviert ist, wird durch die Phosphorylierung (c-src Tyrosinkinase) eines zytosolischen MUC1-Motives beeinflusst. Eine stärkere Bindung entsteht durch Phosphorylierung, die durch die Proteinkinase C δ (Ren et al., 2002) vermittelt wird, eine schwächere Bindung hingegen durch die GSK3 β (Li et al., 1998). In vielen Myelom-Zellen induziert Interleukin-7 (IL-7) eine Bindung von MUC1 an Lyn Tyrosinkinase, was in einer stärkeren Phosphorylierung des MUC1 resultiert und in einer Induktion der Bindung von MUC1 an β -Catenin (Li et al., 2003). Auch Wechselwirkungen zwischen γ -Catenin und MUC1 sind bekannt (Li et al. 2003b). Die verstärkte Phosphorylierung des MUC1 wird in Zusammenhang mit der Tumorzelladhäsion gebracht (Quin und McGuckin, 2000). Bei adhätierenden Zellen sinkt die MUC1-Phosphorylierung. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Tandemrepeat-Domäne des MUC1 von Tumoren an die Domäne 1 des endothelialen, interzellulären Adhäsionsmoleküls 1 ICAM-1 bindet (Hayashi et al., 2001).

1.2.2.3 Biologische Funktionen des MUC1 in Krebszellen

MUC1 wird auf der apikalen Oberfläche der meisten epithelialen Zellen exprimiert. Es

wird dagegen über die ganze Oberfläche der meisten Adenokarzinomzellen überexprimiert. Das Glykoprotein trägt u.a. zum Tumorwachstum bei, indem es die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion beeinflusst (Ciborowski und Finn, 2002; Ligtenberg et al., 1990; Wesseling et al., 1995, 1996). MUC1 kann ebenfalls die Funktion von kürzeren Adhäsionsmolekülen auf Tumorzellen durch seine extreme Moleküllänge und starre Struktur behindern und als anti-adhäsives Molekül fungieren. Das könnte die Korrelation zwischen der MUC1-Expression und dem wachsenden metastatischen Potential betroffener Krebszellen erklären. Auf der anderen Seite bindet MUC1 durch die Kohlenhydratreste und sein Peptidrückgrat an Adhäsionsmoleküle, was für die Tumorzell-Migration wichtig ist (McDermott et al., 2001; Regimbald et al., 1996; Tomlinson et al., 2000). Durch Wechselwirkung zwischen präsentierten Kohlenhydrat-Antigenen (sialyl Lewis-x, sialyl-Lewis-a) auf MUC1 und spezifischen Adhäsionsmolekülen z.B. Selektinen wird der Prozess der Metastasierung von Tumorzellen beeinflusst (Hanski et al., 1993). Daher werden die Kohlenhydratstrukturen sialyl-Lewis-x und sialyl-Lewis-a unter anderem zur Beurteilung der Tumorprogression herangezogen (Baldus et al., 2002 a, b). Des Weiteren verhindert MUC1 die Bindung von natürlichen Killerzellen an die Tumorzelle, unterdrückt die T-Zellfunktion und beeinflusst die Funktion dendritischer Zellen als antigen-präsentierende Zellen (Agrawal et al., 1998; Fung und Longenecker, 1991, van de Weil, van Kemenade et al., 1993; Zhang et al., 1997).

1.2.3 MUC4

MUC4 wurde aus der menschlichen Luftröhre und dem menschlichen Bauchspeicheldrüsenkrebs kloniert; die cDNA Sequenz ist bekannt (Nollet et al., 1998; Moniaux et al., 1999; Choudhury et al, 2000a).

Bei MUC4 handelt es sich um ein heterodimeres Protein mit einer großen Mucin-typischen Untereinheit und einer membranverbundenen Untereinheit, welche drei EGF ähnliche Domänen besitzt. Der NH₂-Terminus des MUC4 besteht aus 27 Signalpeptidresten und einer ausgedehnten Domäne, die in ihrer Länge von 3285-7285 Aminosäurereste variiert, und zwar in Abhängigkeit von einem dem MUC1 ähnlichen Längenpolymorphismus. Die *Repeat*-Einheit der VNTR-Domäne umfasst 16 Aminosäuren (Abbildung 4).

Der Carboxyterminus des MUC4 codiert 12 verschiedene Domänen, die aus zwei Cystein-reichen Domänen, drei epidermalen Wachstumsfaktor- (EGF-) ähnlichen Domänen, zwei an N-Glykosylierungspositionen reichen Regionen, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne bestehen (Moniaux et al., 1999). Wie das MUC1 handelt es sich um ein Typ1-Transmembranprotein, das dem Rattenmucin ASGP-1 und ASGP-2 entspricht.

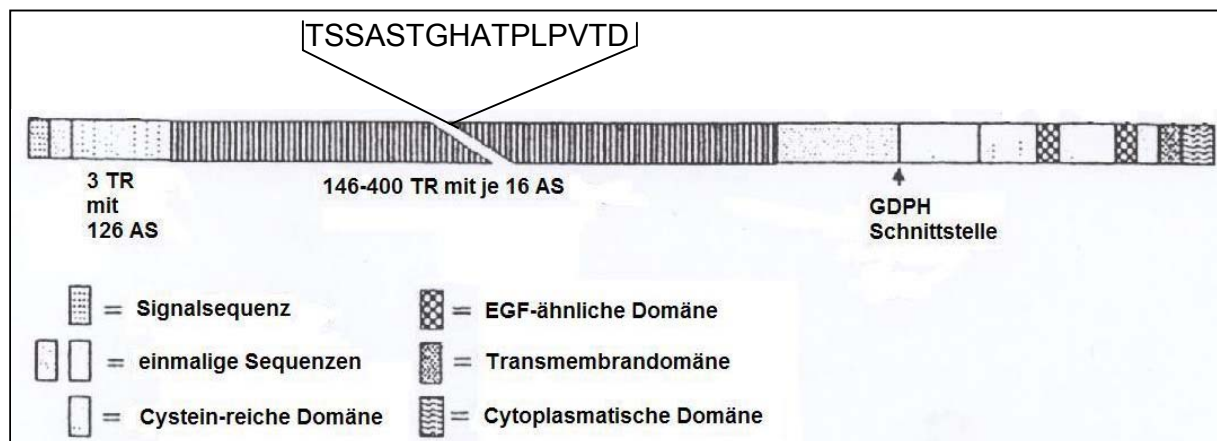


Abbildung 4: Struktur von MUC4

(Modifiziert nach Carraway, 2000)

Im normalen Gewebe wird dieses Mucin im Magen, Eierstock, Speicheldrüse, Dickdarm, Lunge, Luftröhre, Uterus und der Prostata gebildet (Audie et al., 1993; Buisine et al., 1999; Gipson et al., 1999; Reid et al., 1998). Bei bestimmten Lungenkrebsarten z. B. Großzellkarzinom wird MUC4 überexprimiert (Nguyen et al., 1996). In großen Mengen wird MUC4 im menschlichen Bauchspeicheldrüsenkrebs exprimiert (Kim et al., 1999; Balague et al., 1994; Hollingsworth, 1994, Buisine et al., 2000; Nguyen et al., 1996), aber nicht in der gesunden Bauchspeicheldrüse. Auch MUC1 und MUC2 werden im Bauspeicheldrüsenkrebs hochreguliert (Andrianifahanana et al., 2001).

Choudhury et al., (2004) postulierten einen Zusammenhang zwischen dem Cytokin TGF β 2 und der MUC4-Expression. Die MUC4-Expression, Morphologie und Metastasierung von menschlichem Bauchspeicheldrüsenkrebs wird danach durch die lokale Mikroumgebung reguliert. Dabei könnte TGF β 2 als Übergangsregulator dieser Funktion dienen.

1.3 Glykosyltransferasen

Die Analyse der O-Glykane aus laktierendem, humanem Brustepithel zeigt, dass die Oligosaccharide, welche an das normale Mucin addiert werden, auf *core2*-Strukturen basieren (Hanisch et al., 1989), während im Tumor-assoziierten Mucin kürzere, auf *core1*-basierende Strukturen dominieren können (Lloyd et al., 1996, Hanisch et al., 1996, Hull et al., 1989). Sekretorische Formen des endogenen Mucins und sekretorische Fusionsproteine, die in Brustkarzinomzelllinien exprimiert werden, zeichnen sich jedoch durch eine Dominanz der *core2*-Glykane aus (Müller et al., 2002).

Core1 (Gal β 1,3GalNAc-Ser/Thr) kann ein Substrat für Enzyme sein, die N-Acetylglucosamin (GlcNAc) in einer β 1,6-Bindung an N-Acetylgalactosamin (GalNAc) addieren und somit *core2*-Strukturen bilden, aber auch für Sialyltransferasen, die Sialinsäure in einer α 2,3-Bindung an Galactose (Gal) addieren. Durch die Bildung von *core2* entsteht eine Kettenverzweigung, die durch Addition von Lactosamin-Einheiten verlängert werden kann, wohingegen durch die Addition einer Sialinsäure die weitere Elongation der Glykankette beendet wird (Dalziel et al., 2001). Spezifische Glykosyltransferasen sind nicht auf bestimmte Golgi-Kompartimente beschränkt, sondern zeigen eine diffuse Verteilung auf den cis- bis trans-Golgi (Rottger et al., 1998).

Die meisten glykosidischen Bindungen können durch mehrere Isoenzyme einer Glykosyltransferase-Gruppe gebildet werden, wobei diese verschiedene kinetische Eigenschaften, Expressionsmuster und unterschiedliche mögliche subzelluläre Verteilungen aufweisen. So kann an die Galactose in *core1* durch mehrere Transferasen Sialinsäure in einer α 2,3-Bindung gebunden werden (Tsuji et al., 1996). α 3GalST-I spielt eine bedeutende Rolle in der Sialylierung von *core1*-Strukturen auf MUC1 in der Brust (Gillespie et al., 1992, Kono et al., 1997, Recchi et al., 1998). In Zelllinien von Brustkarzinomen und in resektierten Brusttumoren wurde eine erhöhte Aktivität der α 3GalST-I gefunden (Whitehouse et al., 1997; Burchell et al., 1999).

Drei Isoformen der *core2*-GlcNAc-Transferasen (C2GnTs) können *core2*-Trisaccharide bilden, jedoch zeigen sie unterschiedliche Expressionsmuster im Gewebe. Die Enzyme C2GnT1 und C2GnT3 katalysieren nur die Reaktion von *core1* zu *core2* (Bierhuizen et al., 1992; Schwientek et al., 2000). C2GnT2 oder C2/4GnT hingegen kann neben der *core2* Bildung aus *core1* auch *core4* aus *core3* generieren (Schwientek et al., 1999; Yeh et al., 1999). Ihre Aktivität kann in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden (Schachter und Brockhausen, 1992). C2GnT1 wird

im normalem Brustgewebe exprimiert, aber auch in erhöhtem Maß bei Leukämie, Lungen- und Dickdarmkarzinomen und Immunschwächeerkrankungen wie z.B. AIDS (Dalziel et al., 2001; Fukuda et al., 2002). C2GnT3 wird verstärkt im Thymus, in anderen Geweben jedoch eher selten exprimiert (Dalziel et al., 2001).

Obwohl die Aktivität der C2GnT1 in den meisten Brustkrebszelllinien vermindert oder nicht messbar ist (Brockhausen et al., 1995, Whitehouse et al., 1997), kann eine größere Menge an mRNA, die dieses Enzym codiert, in den wichtigsten Brustkrebsarten gefunden werden (Burchell et al., 1999). Gleichzeitig steigt in diesen Geweben die Expression für $\alpha 3$ GalST-I-mRNA an (Burchell et al., 1999). Die Höhe der mRNA-Expression, die für $\alpha 3$ GalST-I codiert, korreliert negativ mit der Zugänglichkeit des SM3-Epitops und positiv mit dem Tumorgrad (Burchell et al., 1999). Eine starke Expression von C2GnT1 führt zu einer sterischen Maskierung des SM3 Peptidepitops in MUC1 (Burchell et al., 1993, Beum et al., 1999). *In vitro* wurde gezeigt, dass die von C2GnT-Transferasen katalysierte *core2*-Bildung durch $\alpha 2,3$ Sialylierung von *core1* inhibiert wird (Kuhns et al., 1993; Brockhausen et al., 1998; Brockhausen et al., 1999). Zusammenfassend kann behauptet werden, dass die Überexpression der $\alpha 3$ GalST-I dem einfachen Glykosylierungsmuster des MUC1 auf Brustkarzinomzellen zugrunde liegt, das durch eine Dominanz sialylierter *core1*-Strukturen gekennzeichnet ist.

Auch wenn C2GnT1 vorwiegend im cis- und $\alpha 3$ GalST-I im medialen und trans-Golgi exprimiert werden, ist das $\alpha 3$ GalST-Enzym in der Lage, effektiv mit C2GnT1 um das *core1*-Substrat *in vivo* zu konkurrieren, wenn die Sialyltransferase stark exprimiert wird (Dalziel et al., 2001).

Neuere Studien (Müller et al., 2002) zeigten jedoch, dass das Glykosylierungsprofil in Brustkrebszelllinien kein generelles Muster besitzt. Fusionsproteine in T-47D exprimieren ausschließlich sialylierte *core1*-Strukturen. Bei MCF-7, MDA-MB-231 und ZR-75-1 Zellen hingegen wurden auf *core2* basierende Glykane gefunden, welche mit $\alpha 3$ -gebundener Sialinsäure (MDA-MB2331, ZR75-1) oder $\alpha 2/3$ -gebundener Fucose (MCF-7) substituiert sind. Endogenes MUC1 aus Zellüberständen der Tumorzellen zeigen das gleiche Glykosylierungsprofil wie die rekombinanten Proben, so dass Fusionsproteine die authentischen O-Glykosylierungsprofile auf Zellen reflektieren. Des Weiteren widerspricht den bisherigen Befunden auch, dass die O-Glykosylierungsdichte von rekombinanten MUC1 Proben, welche in Brustkrebszelllinien exprimiert werden, generell höher sind

als auf Muttermilch-MUC1. Jedoch sind die Brustkrebs-assoziierten Glykane kürzer verglichen mit denen in der Milch. Diese Kettenverkürzungen könnten von einer reduzierten Aktivität der C2GnT oder von einer gesteigerten Aktivität der α 3GalST herrühren, so dass ein biosynthetischer Stopp eingeführt wird (Hanisch et al., 2002). Die abweichenden Befunde mit Tumorzelllinien könnten damit erklärt werden, dass sie entweder den authentischen Glykosylierungsstatus in Tumoren nur unzureichend reflektieren oder dass sekretorische Glykoproteine anderen Glykosylierungsmechanismen unterliegen als membranständige Isoformen (Engelmann et al., unveröffentlichte Ergebnisse).

1.3.1 Die Ortsspezifität der O-Glykosylierung des Mucin-Typs

Im Gegensatz zur N-Glykosylierung, für deren Initiation die Anwesenheit der Sequenz Asn-Xxx-Ser/Thr (Xxx: alle Aminosäuren außer Prolin und Aspartat) benötigt wird (Marshall, 1972), ist für die O-Glykosylierung keine spezifische Peptidsequenz im Sinne eines Sequons bekannt.

Folgende vier Parameter beeinflussen und bestimmen die O-Glykosylierung:

1. Die Verfügbarkeit von UDP-GalNAc:Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyl-Transferasen (ppGalNAc-Ts), die eine Ortsselektivität zeigen und organ-spezifisch exprimiert werden.
2. Die Aminosäuresequenz, die sich in der Umgebung möglicher Glykosylierungspositionen befindet und eine Bindung der Transferasen fördert oder verhindert.
3. Posttranslationale Modifikationen des Peptidsubstrates einschließlich vorangehender Glykosylierungen mit GalNAc oder *core*-Strukturen, die Einfluss auf benachbarte Glykosylierungspositionen haben.
4. Die Faltung der Polypeptidkette in Sekundär- oder Tertiärstrukturen, die eine potentielle Glykosylierungsposition unerreichbar machen (Hanisch, 2001).

Es wurden bis heute 15 Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferasen (ppGalNAc) beschrieben (Clausen et al., 1996; Bennett et al., 1998; Ten Hagen et al., 1999), welche verschiedene, manchmal jedoch überlappende Substratspezifitäten zeigen (Wandall et al., 1997; Hanisch et al., 1999).

Für die ppGalNAc-Transferasen ist bekannt, dass jede von ihnen bestimmte

Glykosylierungspositionen bevorzugt (Wandall et al., 1997). ppGalNAc-T1 bevorzugt sowohl Threonin in VTSA als auch Serin und Threonin in GSTA der MUC1-TR-Sequenz (Wandall et al., 1997; Hanisch et al., 1999). ppGalNAc-T2 glykosyliert Threonin in GSTA schneller als ppGalNAc-T1, jedoch weniger effizient das Threonin in VTSA und Serin in GSTA. Die verbleibenden Positionen (Serin in VTSA und Threonin in PDTR), die von beiden Enzymen nicht glykosyliert werden, können von der ppGalNAc-T4 Transferase als Substrat genutzt werden (Bennett et al., 1998). Jede Enzym-Isoform scheint gewisse Konformationen der Peptidregion, die eine mögliche Glykosylierungsstelle flankiert, zu bevorzugen. ppGalNAc-T1 erkennt ein ausgedehntes Rückgrat, Polyprolin II-Helix-ähnliche Konformationen werden durch ppGalNAc-T2 erkannt, wohingegen ppGalNAc-T4 eine gefaltete, γ -turn ähnliche Struktur bevorzugt (Kinarsky et al., 2003).

Bisher ist zwar keine spezifische Aminosäuresequenz bekannt, die als O-Glykosylierungs-*Target* dient; Aminosäuren in benachbarten Peptidregionen haben jedoch einen entscheidenden Einfluss (Elhammer et al., 1999).

Ein weiterer Einfluss auf die O-Glykosylierung ist durch epigenetische Regulationsmechanismen gegeben: Dies bedeutet, dass ppGalNAc-Ts mit core-Glykan-bildenden Glykosyltransferasen bei der Glykosylierung eines Peptidsubstrates konkurrieren (Hanisch et al., 1999). Es ist bekannt, dass eine GalNAc-Substitution die Glykosylierung benachbarter Stellen fördern kann. Ein Beispiel hierfür ist die Aktivierung der ppGalNAc-T4 und anderer Isoformen, durch deren Lektindomäne ein positiv regulatorischer Mechanismus induziert wird (Hanisch et al., 1999; Bennett et al., 1998).

Core1-Disaccharide andererseits können die GalNAc-Addition in benachbarten Stellen blockieren. Eine Folge dieser kompetitiven Mechanismen ist eine geringere Dichte der Glykosylierung. Die antagonistischen Effekte von GalNAc und Gal β 1-3GalNAc könnten daher einem regulatorischen Mechanismus unterliegen, der auf der Konkurrenz zwischen der initiierenden O-Glykosylierung und der core-Glykansynthese im Golgi basiert. Ein Zusammenhang zwischen Glykosylierungsdichte und Elongation der Glykane kann anhand von MUC1 erkannt werden: In Brustepithelzellen werden lange Glykane mit einer geringen Dichte gefunden (Müller et al., 1997), wohingegen in Brustkrebs kurze, sialylierte Glykanketten in hoher Dichte dominieren (Müller et al., 1999).

O'Connell und Tabak (1993) zeigten *in vitro*, dass Peptide, die stabile α -Helices

bilden, schlechte Substrate für ppGalNAc-Ts sind. Hydroxylgruppen von Serin/Threonin im Inneren des Proteins sind sterisch gehindert und können von Enzymen nicht erreicht werden.

Durch *in vitro* Studien gewonnene Erkenntnisse können für die Voraussagen der Orte einer *in vivo*-Glykosylierung verwendet werden, wie für die Transferase ppGalNAc-T3 und eine spezifische Akzeptorposition im HIV-gp120-Protein bestätigt wurde (Nehrke et al., 1998).

1.4 IdID-Zellen:

Das zelluläre Modell defizienter O-Glykosylierung

IdID-Zellen, Mutanten der CHO (*C*hinese *h*amster *o*vary) Zelle, zeigen keine LDL (low density lipoprotein)-Rezeptor-Aktivität, solange sie nicht mit anderen Zellen oder in hoher Serum-Konzentration kultiviert werden (Krieger, 1983). Diese Reversibilität unterscheidet sie von den Zelllinien IdIA, IdIB und IdIC (Kingsley et al., 1986). IdID-Zellen besitzen eine defekte UDP-Galactose (UDP-Gal) und UDP-N-Acetylgalactosamin (UDP-GalNAc) 4-Epimerase, so dass sie ohne Supplementierung mit GalNAc (Gal) keine O-Glykane bilden können. Ein ähnlicher Enzymmangel beim Menschen kann eine schwere Form von Galactosämie hervorrufen (Holton et al., 2001).

Die defekte Epimerase ist nicht nur Ursache einer eingeschränkten Glykosylierung, sondern auch für die Bildung eines abnormen, Glykosylierungs-defizienten LDL-Rezeptors verantwortlich (Kingsley et al, 1986). Der Mangel an O-gebundenen Glykanen verursacht entweder eine Retention des Rezeptors im Golgi oder eine transiente Oberflächenexpression, der eine beschleunigte Endocytose und intrazelluläre Akkumulation folgen (Kozarsky et al., 1988; Remaley et al, 1991; Reddy et al, 1999).

Durch exogen zugegebene Galactose (Gal) und N-Acetylgalactosamin (GalNAc) kann dieser Phänotyp korrigiert werden. Die Behandlung von IdID-Zellen mit Galactose korrigiert die Defekte der N-gebundenen Kohlenhydrate vollständig. GalNAc ist der Schlüsselzucker, der eine zumindest rudimentäre O-Glykosylierung erlaubt. Die Behandlung von IdID-Zellen mit GalNAc führt zum Teil zur Aufhebung der biologischen Effekte, die durch den Defekt in der Synthese der O-Glykosylierung

induziert werden, und führt zu einer Stabilisierung und Aktivierung des LDL-Rezeptors. Es wird vermutet, dass durch Zugabe von Galactose zu den GalNAc behandelten Zellen eine sowohl vollständige O-gebundene Zuckerstruktur als auch ein vollständig aktiver LDL-Rezeptor hergestellt werden kann (Kingsley et al., 1986). Das Glykosylierungsprofil sollte dann dem des Wild-Typ (CHO-Zellen) entsprechen, welches durch kurzkettige *core1*-Strukturen und deren sialylierte Derivate gekennzeichnet ist (Bäckström et al., 2003). Obwohl CHO-Zellen das Gen für C2GnT besitzen, sind sie nicht in der Lage, *core2*-Glykane zu bilden. Datti und Dennis (1992) zeigten, dass CHO-Zellen, die mit Natriumbutyrat behandelt wurden, einen starken Anstieg an *core2* GlcNAc-T Aktivität zeigten. Die Behandlung mit Butyrat bewirkte eine *de novo* Transkription bzw. Translation sowie Aktivierung von Proteinkinasen und wurde in Zusammenhang mit Änderungen der kinetischen Eigenschaften des Enzymes gebracht. Neben den CHO-Zellen sind auch T-47D-Zellen dafür bekannt, dass sie keine O-Glykane mit *core2*-Strukturen synthetisieren.

Die Zugabe von GalNAc ins Medium von IdID-Zellen sollte eine fast normale Oberflächenexpression rekombinanter, sezernierter MUC1-Fusionsproteine (MUC1-S) mit verkürzten O-Glykanen verursachen. Das Konstrukt MUC1-S wurde bereits von Müller et al. (2002) verwendet. Es gibt Hinweise, dass die Endocytose rekombinanter MUC1-Sonden in IdID-Zellen bei ausschließlicher GalNAc-Zugabe gesteigert wird und die betreffende Glykoform nicht nur an der Oberfläche exprimiert wird (membranäres Konstrukt), sondern auch in den Zellen akkumuliert. Die zunehmende Endocytose von MUC1 mit wahrscheinlich unvollständigen O-Glykanen kann damit erklärt werden, dass über lektin-vermittelte Endocytose reinternalisiert wird (Altschuler et al., 2000). Altschuler et al. zeigten auch, dass die MUC1-Endocytose durch Clathrin vermittelt wird und Dynamin-abhängig ist. Durch Endocytose internalisiertes MUC1 kann bis zur vollständigen Glykosylierung (Addition von Sialinsäure) mehrfach rezykliert werden (Litvinov et al., 1993). Die reifen Glykoformen des Mucins können auf der Zelloberfläche verbleiben oder durch unbekannte Mechanismen (*Shedding*) von der Zellmembran freigesetzt werden (Litvinov et al., 1993).

1.5 Aufgabenstellung

Da die O-Glykanbiosynthese durch sukzessive Addition der Monosaccharid-Bausteine erfolgt, liegt die Vermutung nahe, dass einzelne enzymatische Schritte auf der Initiations- bzw. Elongationsebene in kompetitiven Beziehungen stehen und damit über den Peptidsequenz-Kontext hinaus als epigenetische Parameter regulatorischen Einfluss auf Ort und Struktur der Glykane ausüben. Für die vorliegende Promotionsarbeit wurden folgende Ziele gesetzt:

(1) Durch Einsatz sezernierter, rekombinanter Glykosylierungs sonden (MUC1, MUC4) in CHO-Zellen und Glykosylierungs-defizienten Derivaten (IdID) bzw. in menschlichen Karzinomzellen mit einem C2GnT-Defekt (T-47D) sollte Einblick in die *in vivo*-Regulation der O-Glykanbiosynthese in C2GnT3-kotransfizierten Zellen erhalten werden.

(2) Die Erkenntnisse aus *in vivo*-Studien sollten durch Untersuchungen *in vitro* ergänzt werden, für die chemisch oder enzymatisch hergestellte Glykopeptide und eine Serie ppGalNAc-Transferasen sowie *core*-spezifische Glykosyltransferasen zur Verfügung standen.

2. Material und Methoden

2.1 Kultivierung von Zelllinien

2.1.1 Zellen

Die Zelllinie T-47D stammt aus einem humanen, duktalem Brustkarzinom und wurde von der ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, USA) bezogen. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640 Medium mit Glutamax I (mit 2g/l Glucose), bovines Insulin (10 mg/ml, Sigma, Deisenhofen), 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS, Gibco, Karlsruhe), Penicillin (100 U/ml, Gibco) und Streptomycin (100 µg/ml, Gibco).

CHO-(*Chinese hamster ovary*) und IdID-(*low density lipoprotein*) Zellen wurden von Prof. H. Clausen, School of Dentistry, Kopenhagen, Dänemark, zur Verfügung gestellt und in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)/ Ham's F12 1:1 mit Glutamax I, 3% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS, Gibco), Penicillin (100 U/ml Gibco) und Streptomycin (100 µg/ml, Gibco) kultiviert. Bei Bedarf wurden dem Medium 1 mM GalNAc bzw. 1 mM GalNAc und 0,1 mM Gal zugesetzt. Alle Kulturen wurden in Zellkulturflaschen als Monolayer bei feuchter Atmosphäre unter 5% CO₂ bei 37 °C gezüchtet. Nach 3 Tagen wurden die Zellen entweder mit sterilem PBS (pH 7,4, Gibco) gewaschen und neues Medium zugegeben oder, wenn sie konfluent gewachsen waren, nach dem Waschen mit Accutase (PAA Laboratories, Cölbe) in PBS abgelöst. Durch Zugabe von Komplettmedium nach 5 min wurde die Reaktion abgestoppt, die Zellsuspension 5 min bei 180 g abzentrifugiert und die Zellen im Verhältnis 1:5 wieder ausgesät.

Die Insektenzellen Sf9 und HIV wurden in TNM-FH Insektenmedium (Sigma) mit 10% FKS und 0,005% Gentamicin (Sigma) bei feuchter Atmosphäre und 27°C kultiviert.

2.1.2 Dauerkultur

Die abgelösten und gewaschenen Zellen wurden im Einfriermedium (80% Kulturmedium, 10% FKS, 10% DMSO, bei Insektenzellen: 7% Kompletmedium, 1% DMSO (Sigma), 2% FKS) resuspendiert, jeweils 1ml in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) aliquotiert, erst für 24 h bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Beim Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad zügig bei 37 °C erwärmt. Nach Zugabe von Medium und Zentrifugation wurden die Zellen wieder in Kompletmedium resuspendiert.

2.1.3 Transfektion und Selektion von CHO- und IdID-Zellen

Die Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion 30-50% konfluent. 300 µl Medium (ohne FKS und Antibiotika) wurde mit 10 µg DNA 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 60 µl des Transfektionsreagenzes (Superfect, Qiagen, Hilden) wurde die Lösung 2 min bei 180 x g zentrifugiert und weitere 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit Medium gewaschen. Zum Transfektionsreagenz wurde 2,6 ml Medium pipettiert und für 5 h bei 37°C im Brutschrank (Binder, Tuttlingen) auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit Medium gewaschen und für 24 h in Medium mit FKS und Antibiotika aufgenommen. Zur Selektion transfizierter Zellen wurde dann 5 µg/ml Puromycin (Sigma), bei der Transfektion mit C2GnT3 zusätzlich 400 µg/ml Geneticin (Sigma) hinzugefügt. Nach circa einer Woche konnte die Expression von Fusionsproteinen im *Western-Blot* mit spezifischen Antikörpern überprüft werden.

2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.1 Aufreinigung des rekombinant exprimierten MUC1-S bzw. MUC4-S durch Affinitätschromatographie

Durch die His6-Sequenz können die Fusionsproteine über eine Ni-NTA-Agarose-Matrix (Qiagen) isoliert werden. Nickel interagiert mit 4 von 6 koordinativen Bindungsstellen mit Nitrilotriessigsäure, die beiden weiteren binden an den His-Tag des Fusionsproteins. PD10-Säulen (Amersham Biosciences, Braunschweig) wurden mit 3 ml Ni-NTA-Agarose gefüllt und anschließend mit Waschpuffer 2 (20 mM

NaH₂PO₄, pH 6,5) äquilibriert. Bevor das Zellysate über die Säule gegeben werden konnte, wurde 600 ml Überstand über Nacht bei 4°C gegen dH₂O dialysiert und anschließend das Volumen durch Zugabe von 6,5% Ethanol, 6,5% 10x Puffer (0,5 M NaH₂PO₄, 2 M NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8), 0,01% β-Mercaptoethanol und 22% ddH₂O verdoppelt. Der aufbereitete Überstand wurde dann 30 min bei 9500 Upm und 4°C zentrifugiert (Sorval RC 5C plus, Beckman) und anschließend filtriert (0,2 µm Filter, Schleicher & Schüll, Dassel).

Nachdem das Lysat zweimal über die Ni-NTA-Agarose Matrix-Säule gegeben wurde, wurde die Säule mit 30 ml Waschpuffer 1 (50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 5 mM β-Mercaptoethanol, 10% Ethanol, pH 6,5), 10 ml Waschpuffer 2 (20 mM NaH₂PO₄, pH 6,5), 10 ml Waschpuffer 3 (20 mM NaH₂PO₄, pH 6,8, 20% Acetonitril) gewaschen. Mit 0,1% TFA/ddH₂O wurden die Fusionsproteine in zehn 1,5 ml Fraktionen eluiert (Abbildung 5). Um die Fraktionen auf MUC1-S/MUC4-S zu testen, wurden jeweils 2% abgenommen und zuzüglich der 500 µl Aliquots des Durchflusses und der verschiedenen Waschpuffer in der Vakuumzentrifuge (Heto, Thermo Elektron Corporation, Dreieich) getrocknet und nach Aufnahme in Probenpuffer im Immunblot getestet.

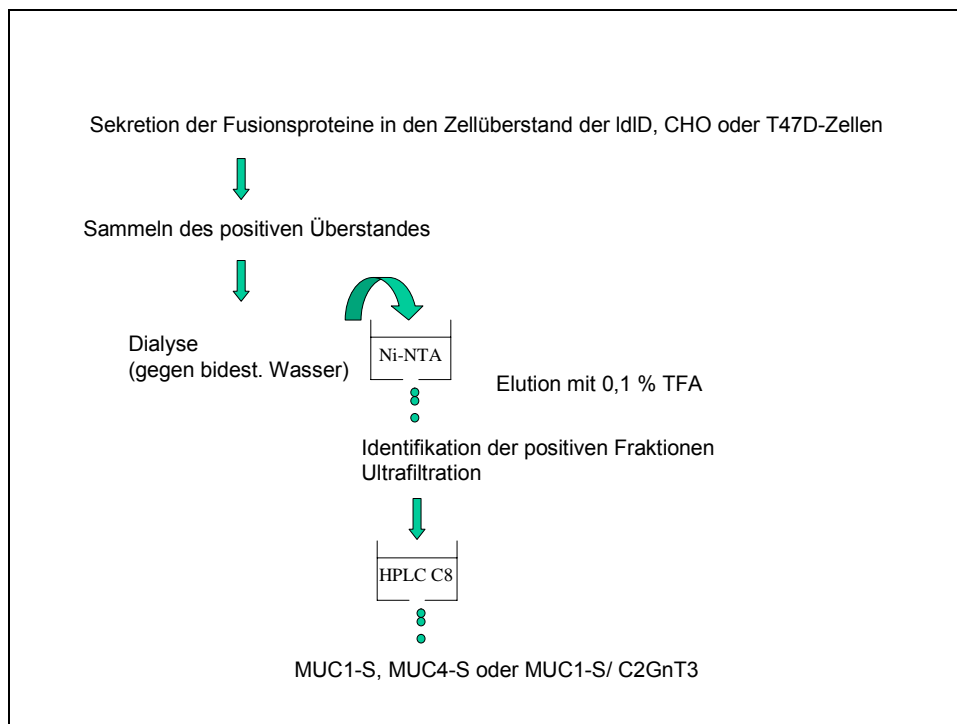


Abbildung 5: Strategie zur Isolierung und Aufreinigung von Fusionsproteinen aus dem Überstand von Zelllinien.

2.2.2 Aufreinigung der Fusionsproteine durch Umkehrphasen-HPLC

Durch Umkehrphasen-HPLC (Beckman Gold System, München) mit einer C₈ Säule oder C₄ Säule (Vydac, MZ Analystechnik, Mainz) wurden die nach der Nickelchelate-Affinitätschromatographie isolierten Fusionsproteine weiter aufgereinigt. Hierzu wurden die getrockneten Proben in 100 µl 0,1% TFA/ddH₂O gelöst und dann auf die Säule aufgetragen. Der lineare Gradient wurde von 10% Puffer B (80% Acetonitril in 0,1% TFA/ddH₂O), 90 % Puffer A (2% Acetonitril (Aldrich) in 0,1% TFA (Sigma)/ddH₂O) auf 100 % Puffer B in 30 Minuten bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min gefahren. Die UV-Detektion erfolgte bei 214 nm (Shimadzu RF-10A XL, Duisburg).

Die positiven HPLC-Fractionen wurden mit Hilfe des Immunblots detektiert.

2.2.3 SDS-Polyacrylamidgel (PAGE)

Die SDS-PA-Gelelektrophorese wurde nach Lämmli (1979) mit dem Mini-Protean II-Gelelektrophoresesystem von BioRad (München) durchgeführt. Hierbei wurde für die Analyse von His6-Myc-MUC-Fusionsproteinen 12,5%ige Trenngele und 3%ige Sammelgele nach folgender Zusammensetzung verwendet:

Komponenten (ml)	Trenngel 12,5%	Sammelgel 3%
ddH ₂ O	3,2	6,4
0,5 Tris-HCl, pH 6,8 (4x)	2,5	-
1,5 Tris-HCl, pH 6,8 (4x)	-	2,5
30% Acrylamidlösung, 0,8% Bisacrylamid	4,2	1,0
10% SDS	0,01	0,01
10% Ammoniumpersulfat	0,05	0,05
TEMED	0,005	0,01

Tabelle 2: Zusammensetzung (Volumenprozent) des SDS-Polyacrylamidgels

Die in der Vakuumzentrifuge getrockneten Proben wurden im reduzierenden Probenpuffer 10 min bei 95°C gelöst und anschließend auf das Gel geladen. Für die Elektrophorese in einer Semi Dry-Transferzelle (BioRad, München) im

Elektrophoresepuffer wurde eine Spannung von 200 Volt für circa 40 min gewählt. Die Bestimmung des Molekulargewichtes der Fusionsproteine erfolgte durch Coelektrophorese des *low molecular marker* (Sigma).

Zusammensetzung von Proben- und Elektrophoresepuffer:

Probenpuffer(5x): 2% SDS, 10% Glycerin, 0,04% Bromphenolblau,
 62,5 mM Tri-HCl (pH6,8), 5% β -Mercaptoethanol

Elektrophoresepuffer (10x): 0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1% SDS, (pH 8,3)

2.2.3.1 Coomassiefärbung

Durch das Schütteln der SDS-Polyacrylamidgele in Coomassie Brilliant Blue G250-Lösung (50% Methanol, 12% Essigsäure, 0,04% Servablau G-250) wurden Proteinbanden blau gefärbt. Die Entfärbungslösung (40% Methanol, 5% Essigsäure) wurde anschließend zur Klärung des Hintergrundes verwendet.

2.2.3.2 Silberfärbung

SDS-Polyacrylamidgele wurden für 1 h im Fixierer (50% Ethanol, 12% Essigsäure, 0,05% Formaldehyd) inkubiert, danach dreimal für 20 min in 50% Ethanol gewaschen und mit 0,2% Na₂SO₃ vorbehandelt. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser erfolgte die Färbung mit 0,2% Silbernitrat und 0,075% Formaldehyd. Die Proteinbanden wurden nach zweimaligem Schwenken mit Wasser durch Entwicklung mit 6% NaHCO₃, 0,05% Formaldehyd, 0,04% Na₂SO₃ sichtbar. Die Reaktion wurde mit 50 % Methanol und 12% Essigsäure abgestoppt.

2.2.4 Western-Blot

Die Proteine aus den Polyacrylamid-Gelen wurden im *Semi-Dry*-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA 83, Schleicher & Schüll) transferiert. Hierfür wurde Towbinpuffer in einer *Semi Dry*-Transferzelle (BioRad Trans-Blot SD) bei 2 mA/cm² für 40 min verwendet. Die Position der Markerbanden wurden mit 10% Ponceau-S-Lösung sichtbar gemacht, mit Bleistift nachgezeichnet und die Membran

in destilliertem Wasser entfärbt. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte 1h bei RT in Abhängigkeit vom verwendeten Primärantikörper mit 5% Milchpulver/TBS-Tween 20 bei Anti-MUC1-Ig C595 (M. Price, Cancer Research Laboratory, University of Nottingham, Notts. UK; 1 µg/ ml) und Anti-Myc-Ig (Invitrogen, Karlsruhe, 0,2 µg/ml) oder 5% BSA/TBS-Tween bei Anti-His-IG (Qiagen, 0,2 µg/ ml). Die Inkubationszeit für den Primärantikörper betrug ebenfalls 1h bei RT. Nach mehrfachem Waschen der Membran mit TTBS wurde sie mit dem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper (Kaninchen-Anti-Maus-Ig, 1: 2000, DAKO, Hamburg) 1h bei RT inkubiert und anschließend mit TBS gewaschen. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit dem ECL-System, bei dem die Membran bei RT mit einer 1:1 Lösung aus *Luminol Enhancer Solution* und *Lumi-Light Stable Peroxidase Solution* (Roche, Mannheim) 5 min benetzt wurde. Durch Auflegen eines Röntgenfilms (Fuji, Düsseldorf) wurden die proteingebundenen Antikörper detektiert.

10% Ponceau-S-Lösung: 0,2% Ponceau S (Merck, Darmstadt) in 3% TCA/H₂O
(Fluka, Seelze)

Towbinpuffer: 39 mM Glycerin, 48 mM Tris, 10% Methanol

TTBS: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl,
0,01% Tween20

2.2.5 Lektin-Blot

Nach dem Blotten auf die Nitrocellulosemembran wurden die freien Bindungsstellen mit 5% BSA/TTBS für 1h geblockt. Es folgte die Zugabe des spezifischen Immundetektors, welcher ein biotinyliertes Lektin ist (PNA und ECA jeweils 1: 200 in 0,5% BSA/TTBS). Mit PNA (*Arachis-hypogaeae*-Agglutinin) kann die *core1* Struktur erkannt werden, durch ECA (*Erythrina-cristagalli*-Agglutinin) wird der Hinweis auf eine *core2* Struktur gegeben. Nach dem Waschen mit TTBS (1x 15 min, 1x 10 min, 1x 5 min) wurde die Membran mit dem Detektionsreagenz (Streptavidin-POD-conjugate, Roche, 1:2000 in TTBS) inkubiert und anschließend in TTBS, TBS und Wasser geschwenkt. Die Detektion erfolgte mittels DAB (3,3'-Diaminobenzidin, Sigma)-Färbung.

2.2.6 DAB-Färbung

Die Lösung besteht aus 1,5 mM DAB in DMSO, 0,01% Wasserstoffperoxid, 1M Tris-HCl (pH: 7,4) und 70% doppelt destilliertem (dd) H₂O. Die Proteinbanden färbten sich nach 10 minütiger Inkubation bräunlich.

2.2.7 Nachweis von Glykokonjugaten auf Elektrobots

Nachdem die Glykoproteine auf die Nitrocellulosemembran geblottet worden waren, konnten die protein-gebundenen Glykane mittels eines DIG-*Glycan Detection Kit* (Roche) detektiert werden. Hierbei werden die Hydroxylgruppen der Zucker mit Perjodat zu Aldehyden oxidiert, an welche kovalent Digoxigenin 3-O-Succinyl-Aminocaprinsäure-hydrazid gekoppelt wird. Durch einen DIG-spezifischen Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase konjugiert ist, können die Glykane nachgewiesen werden.

2.2.8 Mikrosomenpräparation der core2-Transferase

Nach Ablösen der Zellen aus den Kulturflaschen wurden diese bei 1000 x g abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Die Zellmasse (ca. 0,28 g) wurde mit 500 µl Aufschlusspuffer (100 mM MES (Sigma) pH 6,5, 0,25 M Saccharose (Sigma), 1 mM EDTA (Fluka), Protease-Inhibitor (Complete Mini, Roche) versetzt und bei 4°C mit einem Homogenisator aufgeschlossen. Die Suspension wurde anschließend bei 3000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde einer erneuten Zentrifugation bei 15000 x g für 10 min bei ebenfalls 4°C unterworfen. Das *Pellet* wurde in 100 mM MES, pH 6,5, 1 mM EDTA und 1% NP-40 aufgenommen. Die Suspension wurde für eine Stunde bei 120000 g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert und der Überstand zusammen mit den anderen Fraktionen einem Aktivitätstest unterzogen.

2.2.8.1 Aktivitätstest

Die verschiedenen C2GnT2 bzw. -T3 benötigen unterschiedliche Bedingungen.

Für den Aktivitätstest der C2GnT2 wurde folgender Ansatz gewählt:

5 µl 1 M MES pH 7,5

5 µl 100 mM EDTA (pH 7)

5 µl 50 mM *core1* (Benzyl-2-Acetamid-2-Desoxy-3-O-D-Galactose) (Sigma)

2 µl 3-5 mM UDP*GlcNAc (5000-8000 cpm/ mmol) (Amersham)

13 µl dd H₂O

und 20 µl des Zellüberstandes wurde 2 h bei 37°C im Schüttler inkubiert und die Reaktion mit 450 µl kaltem ddH₂O abgestoppt.

Das überschüssige UDP*GlcNAc wurde durch die Aufreinigung über eine Dowex-Säule (1X8, 50-100 *mesh hydrogen form*, BioRad) entfernt und die verbleibende Aktivität, die ein Maß für die Übertragung von GlcNAc auf *core1* (Bildung der *core2*-Struktur) bzw. ein Maß für die Aktivität der C2GnT2 ist, bestimmt. Die Säulen wurden zweimal mit je 250 ml ddH₂O gewaschen, mit dem Eluat vereinigt und 500 µl davon zusammen mit 3,5 ml Szintillationslösung (Diisopropylnaphthalin, Zinsser Analytic, Frankfurt) zur Detektion verwendet.

Für die C2GnT3 (20 µl Zellüberstand) wurden

5 µl 1 M MES pH 6,5

5 µl 50 mM *core1* (Benzyl-2-Acetamido-2-Desoxy-3-O-D-Galactose)

1 µl 3-5 mM UDP*GlcNAc (5000-8000 cpm/mmol)

5 µl 1% NP40 (Fluka)

14 µl dd H₂O

zusammenpipettiert und die Reaktion nach einer Inkubationszeit von 1h bei 37°C mit 450 µl kaltem ddH₂O abgestoppt. Die Aufreinigung erfolgte wie oben.

2.3 Methoden zur quantitativen O-Glykoprofilierung

2.3.1 Methylierung und β -Eliminierung von O-Glykanen (nicht-reduktive Eliminierung)

10-50 μ g entsalzter Glykoproteine wurden in der Speedvac vor- und im Exsikkator (über P₂O₅, KOH) nachgetrocknet. Da die nachfolgende Reaktion unter einer Argon-Atmosphäre durchgeführt wurde, wurde der Exsikkator mit Argon belüftet. Mit 20 μ l DMSO wurden die Glykoproteine wieder in Lösung gebracht und mit 10 μ l Methyljodit (Fluka, Seelze) und 20 μ l DMSO-NaOH-Suspension (Anumula, 1992) 18 h bei RT inkubiert. Die methylierten Glykane wurden in 0,3 ml Chloroform und mit 0,2 ml Wasser mehrfach extrahiert. Die Chloroformphase wurde anschließend unter leichtem Stickstoffstrom bei 40 °C getrocknet. Hierbei entstand ein bräunlicher Rückstand. Die Glykane konnten anschließend in Methanol aufgenommen und mit MALDI-TOF-Massen-spektrometrie analysiert werden.

2.3.2 Reduzierende Eliminierung mit NaBH₄

10-30 μ g O-Glykoproteine wurden mit 0,05 M NaOH und 0,5 M NaBH₄ bei 50 °C 18 h inkubiert. Die Reaktion wurde bei 4°C durch Zugabe von 1 μ l Essigsäure abgestoppt. Zur Entsalzung wurde die Probe 5 min mit dem Kationenaustauscher Dowex 50WX8 (BioRad, München) im Batch-Verfahren inkubiert und mit Wasser eluiert. Nach dem Trocknen in der Vakuumzentrifuge wurde die Probe fünffach mit 1% essigsäurehaltigem Methanol aufgenommen und unter einem Stickstoffstrom getrocknet, um Boratmethylester abzudestillieren. Im letzten Schritt wurde mit einer Säule aus graphitisiertem Kohlenstoff (Alltech, Unterhaching) entsalzt. Zur Aktivierung der Säule wurde 2 ml 80% Acetonitril in 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) verwendet, nach der Äquilibration mit Wasser wurde die Probe aufgetragen mit 2 ml Wasser gewaschen und mit 2 ml 0,1% trifluoressigsäurehaltigem 20 % Acetonitril eluiert.

2.3.3 Freisetzung der O-Glykane durch Hydrazinolyse

Zwischen 10-50 µg salzfreies Fusionsprotein wurde erst in der Vakuumzentrifuge und dann im Exsikkator mit P₂O₅ und KOH für 48 h getrocknet, da die Hydrazinolyse unter wasserfreien Bedingungen durchgeführt werden muss. Das Glykoprotein wurde dann mit 100 µl wasserfreiem Hydrazin (Glyko, Novato, USA) in einer Glaspipette unter Argon resuspendiert und 5 h bei 60 °C in einem Trockenschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert. Die Entfernung von Hydrazin gelang durch Evaporation unter reduziertem Druck in einem Exsikkator. Zur N-Reacetylierung wurde die Probe mit 30 µl einer gesättigten NaHCO₃-Lösung und 2 µl Essigsäureanhydrid versetzt, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zum Entsalzen der Probe wurde 60 µl Ionenaustauscherharz (Dowex 50W-X8 200-400 *mesh hydrogen form*, BioRad) verwendet und der Ansatz damit 5 Minuten inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert, der Überstand abgenommen und der Rückstand zweimal mit 120 µl Wasser für je 2 min gewaschen, alle Überstände vereinigt und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

2.3.3.1 Fluoreszenzmarkierung der freigesetzten Oligosaccharide

Die Glykane wurden mit 2-Aminobenzamid (2-AB, Fluka) nach Bigge et al. (1995) für die Fluoreszenz-HPLC markiert. Dazu wurde zu den getrockneten Oligosaccharidproben in 0,5 ml Reaktionsgefäßen 2 µl 1M 2-Aminobenzamid in Essigsäure sowie 3 µl 2 M NaCNBH₄ (Sigma) in DMSO hinzupipettiert und 2 h bei 60°C inkubiert. Die nicht umgesetzten Reagenzien wurden durch Papier-Chromatographie (Schleicher & Schüll) in n-Butanol/Ethanol/Wasser (4:1:1, v/v/v) bei Raumtemperatur für 45 min entfernt. Das Chromatographieblatt wurde im Exsikkator 2 h getrocknet, die Auftragungspunkte ausgeschnitten, zerkleinert und über Nacht bei 4°C in 500 µl Wasser zur Elution der Glykane gelagert. Nach Zentrifugation bei 2000 Upm für 5 min durch eine Membran (0,2 µm Porengröße) wurden die markierten Glykanen filtriert. Die freigesetzten Oligosaccharide wurden bei -20 °C gelagert.

2.3.3.2 Bestimmung der Oligosaccharidstruktur durch Exoglykosidase-Spaltung der Fluoreszenz-markierten Glykane

50 µl der 2AB-markierten Glykane wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und über Nacht bei 37 °C mit 5 U Neuraminidase (spaltet die α2,3 Sialylbindung, NEB, Frankfurt), 5 U Hexosaminidase oder mit 5 U α- 1,2 Fucosidase (NEB) in 50 mM Natriumcitratpuffer (pH 4,5) inkubiert. Die Proben wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in Acetonitril/Wasser (3:1, v/v) gelöst. Die Analyse erfolgte auf einer HPLC-Workstation (Beckman Gold System, München).

2.3.3.3 Normalphasen-HPLC 2-AB-markierter Oligosaccharide

50 µl der markierten Proben wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 20 µl Acetonitril/Wasser (3:1/ v/v) gelöst. Die Auftrennung erfolgte auf einer Aminophasensäule (Asotec NH₂ polymer, 5µm, 4,6 x 250 mm, Alltech, Unterhaching) in einem linearen Gradienten von 80 % Acetonitril, 20 % 250 mM NH₄HCO₂ (pH 4,4) bis 40% Acetonitril, 60% 250 mM NH₄HCO₂ (pH 4,4) in 80 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Das Anregungsspektrum lag bei 330 nm und die Emissionswellenlänge bei 420 nm.

2.4 In vitro O-Glykosylierung

2.4.1 In vitro Studien mit rekombinanten ppGalNAc-Transferasen

2 µg der synthetischen Peptide A4st, A10st, A13st und A14st (Abbildung 45) wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Proben wurden in einem 20 µl Ansatz mit 14,7 µl Reaktionspuffer (25 mM Cacodylat, pH 7,4, 10 mM MnCl₂ resuspendiert und mit jeweils 0,8 µl rekombinanter GalNAc-Transferasen T1, T2 oder T1 und T2 und 200 µM UDP-GalNAc (Sigma) für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach weiterer Zugabe der gleichen Menge an Cosubstrat und Enzym wurden die Proben für weitere 24 h inkubiert. Vor der Analyse durch Massenspektrometrie wurden die Proben aufgrund ihres Salzgehaltes entweder 1:20 in 0,1% TFA verdünnt oder durch Zip-Tip-C₁₈-Spitzen aufgereinigt.

2.4.2 In vitro Studien mit rekombinanter GlcNAc-Transferase-T3

2 µg des Peptids A14st wurden mit 100 mM MES (pH 6,5, Sigma), 10 mM EDTA (pH 7, Sigma), 2 mM UDP-GlcNAc, 5 µl GlcNAc-Transferase-T3 und 72% ddH₂O 16 h bei 37 °C inkubiert. Vor der Analyse durch Massenspektrometrie wurden die Proben aufgrund ihres Salzgehaltes entweder 1:20 in 0,1% TFA verdünnt oder durch das Aufziehen in Zip-Tip-Spitzen aufgereinigt.

2.4.3 ZipTip-C₁₈-Peptidaufreinigung

Zip-Tip-Spitzen (C₁₈) können für die Entsalzung von Peptiden und Proteinen mit einem geringen Molekulargewicht verwendet werden. Die Pipettenspitzen werden zweimal mit 50% Acetonitril in Wasser aktiviert und anschließend dreimal mit 0,1% TFA in Wasser äquilibriert. Die Probe lag in 0,1% TFA vor und wurde zehnmal die Zip-Tip Spitze aufgezogen. Nach dem Waschen mit 0,1% TFA in Wasser wurden die Peptide mit 80% Acetonitril in 0,1% TFA eluiert.

2.5 Maldi-TOF-Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie der Peptide und Glykopeptide wurde auf einem REFLEX IV Massenspektrometer (Bruker Daltonik, Bremen) mit einem Stickstofflaser ($\lambda = 337$ nm) und positiver Ionendetektion im Reflektronmodus im ZMMK (Zentrum für Molekulare Medizin, Köln) durchgeführt. 1,4 µl DHB-Lösung (2,5 Dihydroxybenzoesäure 40 mg/ml, Bruker Daltonics) in Acetonitril/0,1% TFA (2:1, v/v) wurde auf ein *Target* aufgetragen. Dazu wurden 0,7 µl der Probe pipettiert, gemischt und die Probe getrocknet.

2.6 Molekularbiologische Arbeiten

2.6.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA

Die DNA-Probe wurde im Verhältnis 1:100 mit dH₂O verdünnt und die optische Dichte photometrisch bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Die Berechnung der Konzentration erfolgt in Abhängigkeit von der gewählten Verdünnung und dem Faktor 50 (µg/ml) für ds-DNA in einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke. Reine DNA sollte einen Quotienten (Absorption bei 260 nm/ Absorption bei 280 nm) zwischen 1,8 und 2 vorweisen. Ein Wert unter 1,8 weist auf Protein- und ein Wert über 2 auf RNA-Kontamination hin.

2.6.2 Restriktionsverdau von DNA

Durch die verschiedenen Restriktionsendonukleasen EcoR1, BamHI und BglII wurde DNA unter angegebenen Bedingungen bei 37°C 2h oder über Nacht enzymatisch gespalten. Die einzusetzenden Mengen richten sich nach der generellen Regel, dass 1 µg DNA von 1 U Enzym innerhalb einer Stunde verdaut wird.

2.6.3 Transformation

1 µl DNA-Lösung wurde zu 50 µl kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurden die Bakterien für 45 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und anschließend 2 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 950 µl LB-Medium wurde die Suspension 1h bei 37°C und 225 Upm in einem Schüttler inkubiert. Die Suspension wurde hiernach bei 3000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das *Pellet* auf ampicillinhaltigen (200 mg/ml) LB- Agarplatten (*LB-broth base Agar*, Gibco) ausgestrichen. Diese Platten wurden über Nacht bei 37°C in den Brutschrank gelegt. Sie können bei 4°C bis zu 14 Tage gelagert werden.

2.6.4 Präparation der DNA

Einzelne Klone auf den bewachsenen Agarplatten wurden gepickt und mit ampicillinhaltigem (50 µg/ml) LB-Medium von Gibco (5 ml bei Minipräparation und 25 ml bei Midipräparation) bei 37°C und 225 Upm im Schüttler inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Anleitung eines kommerziell erhältlichen Kits (Qiagen, Hilden). Für eine Langzeitlagerung wurden Bakterienkulturen mit Glycerin im Verhältnis 1:1 (v/v) versetzt und bei -20°C gelagert. Diese Stammkultur konnte beim Auftauen 1:500 oder 1:1000 verdünnt und dann auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen werden.

2.6.5 Agarosegelelektrophorese zur Analyse von DNA-Fragmenten

Die Größe von DNA-Fragmenten im Bereich von 1000-10000 bp konnte über eine elektrophoretische Auftrennung in 1,2%igen Agarosegelen bestimmt werden. Die Agarose (PeqLab, Erlangen) in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,2) wurde in der Mikrowelle kurz aufgeköcht und anschließend 1 µg/ml Ethidiumbromid (Invitrogen, Karlsruhe) hinzugegeben. Nach 30 min festigte sich die Gellösung und konnte mit den DNA-Proben, die vorher mit Probenpuffer versetzt worden waren, in einer Elektrophoresekammer (BioRAD Mini-Sub Cell GT) beladen werden. Zur Bestimmung der Größe wurden 100 bp und 1000 bp DNA-Marker (PeqLab, Erlangen) verwendet. Die elektrophoretische Trennung wurde durch das Anlegen einer Spannung von 80 V für 60 min erreicht. Die Identifizierung der DNA-Banden erfolgte auf einem UV-Transilluminator (MWG-Biotech, Ebersberg). Zur Isolierung der DNA-Fragmente wurden die Banden ausgeschnitten und mittels eines kommerziellen Kits (QiaEx II Agarose Gel Extraction Kit, Qiagen) aus den Agarosegelen eluiert.

2.6.6 RNA-Präparation

Um den Erfolg der Kotransfektion der IdID MUC1-S-Zellen mit dem Gen für die *core2*-Transferase 3 zu testen, wurde RNA aus IdID-MUC1-S *core2*-Zellen nach Anleitung eines RNA-Kits (Qiagen) isoliert.

2.6.7 Generierung der cDNA

2 µg RNA wurde nach Anleitung eines Kits (Qiagen) durch reverse Transkription in cDNA überführt und durch PCR amplifiziert.

2.6.8 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Für den Ansatz wurden folgende Komponenten gemischt:

DNA (Template)	1 µl (~ 1 ng)
1,25 mM dNTP	5 µl (PeqLab)
10x Thermo Pol-Puffer	2,5 µl (NEB)
Primer 1 25 pmol/ µl	0,5 µl (Biotex GmbH, Berlin)
	0,5 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl (Roche)
MQ	15 µl

Die Amplifikation erfolgte im DNA-Thermo-Cycler (Hybaid MBS, Heidelberg).

3. Ergebnisse

3.1 *In vivo* O-Glykosylierung in zellulären Modellen

IdID-Zellen, deren UDP-GlcNAc/GalNAc-Epimerase defekt ist, sollten durch Supplementierung von GalNAc in der Lage sein, verkürzte O-Glykane zu bilden (Initiierung der O-Glykosylierung). Eine Elongation dieser O-Glykane sollte bei zusätzlicher Gal-Supplementierung möglich sein. Des Weiteren sollten die Zellen eine *core2*-Defizienz zeigen. Somit kann durch Zugabe von Zuckern und Kotransfektion mit C2GnT3 (Gen für die *core2-Transferase*) die O-Glykosylierung gezielt beeinflusst werden. Auch T-47D-Zellen, die ebenfalls eine *core2*-Defizienz aufweisen, sollten durch Kotransfektion mit C2GnT3 ein verändertes Glykanprofil erhalten.

Als Glykosylierungssonden wurden MUC1-S- und MUC4-S-Konstrukte verwendet, die im pCEP-PU-Vektor rekombinant in Säugerzelllinien exprimiert werden können. (Kohfeld et al., 1997). Jedes Konstrukt enthielt eine Signalpeptidsequenz des extrazellulären Proteins BM40, eine His₆-Sequenz für die Affinitätschromatographie der sekretorischen Fusionsproteine, die wie die myc-Sequenz auch zur Detektion im *Western-Blot* dienen konnte und sechs MUC1-Tandemrepeats mit je 20 Aminosäuren bzw. zehn MUC4-Tandemrepeats mit je 16 Aminosäuren (Abbildung 6). Die Zelllinien CHO und IdID wurden mit beiden Konstrukten, T-47D nur mit MUC4-S transfiziert.

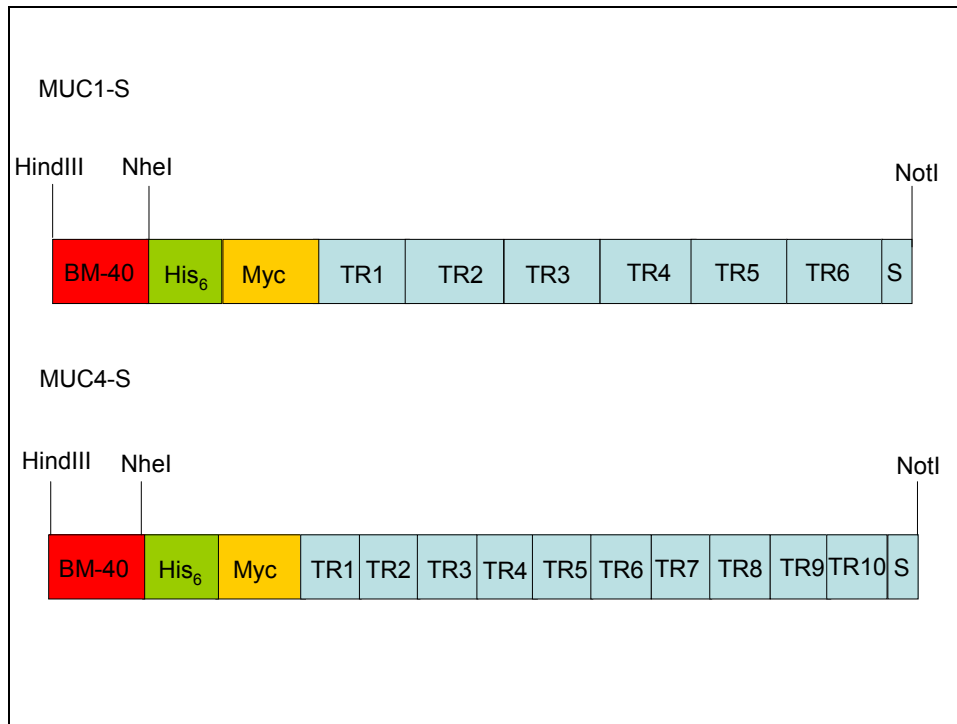


Abbildung 6: Primärstrukturen der MUC1-S und MUC4-S-Glykosylierungssonden.

Jedes Konstrukt enthielt die Signalpeptidsequenz des Bindegewebsproteins BM-40, einen His₆-Tag zur Isolierung über eine Ni-NTA-Säule und eine myc-Sequenz zur Detektion im *Western-Blot*. Darüber hinaus enthielt MUC1-S sechs Tandemrepeats mit je 20 Aminosäuren und MUC4-S zehn Tandemrepeats mit je 16 Aminosäuren. (S.: *spacer*)

3.1.1 Isolierung und Aufreinigung von MUC1-S/MUC4-S Fusionsproteinen aus Zellüberstand

Im ersten Schritt wurde der Zellüberstand (ca. 600 ml) transfizierter Zellen gegen bidestilliertes Wasser dialysiert. Mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie wurden die Fusionsproteine isoliert und mit 0,1% TFA eluiert. Nach Identifizierung der MUC1-S-Fractionen mit Anti-MUC1-Antikörper (C595) und MUC4-S-Fractionen mit Anti-His-Antikörper im Immunblot wurden die positiven Fractionen durch Ultrafiltration eingeeengt und über eine C₄- oder C₈-Säule mittels Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt. MUC1-S- bzw. MUC4-S-haltige HPLC-Fractionen wurden im Immunblot identifiziert (Abbildung 6). Die Quantifizierung erfolgte durch Integration der Signalflächen und Vergleich mit einem externen Standardprotein.

3.1.2 Expression des MUC4-S

3.1.2.1 Expression des MUC4-S in T-47D-Zellen

Da bereits Müller et al. (1999) das Glykosylierungsprofil von MUC1-S in T-47D-Zellen analysiert hatten, lag der Focus dieser Arbeit auf der Expression von MUC4-S in diesen Zellen. Ein Expressionstest des Zellüberstandes nach Transfektion von

T-47D mit MUC4-S ergab ein positives Signal im *Dotblot* (Abbildung 7), wobei mit einem Anti-His-Antikörper, der gegen den His-Tag des MUC4-S-Konstruktes gerichtet ist, gearbeitet wurde.

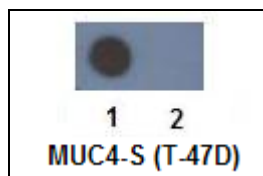


Abbildung 7: *Dotblot* zum Nachweis der Expression von MUC4-S in T-47D-Zellen.

Der aufkonzentrierte Überstand wurde mit einem Anti-His-Antikörper detektiert.

Nach Nickelchelate-Affinitätsaufreinigung zur Isolierung des Fusionsproteins wurde ein *Western-Blot* durchgeführt. Dieser Immunblot zeigte ein schwaches Signal in Fraktion 2 bei einem apparenten Molekulargewicht von circa 70 kDa (Abbildung 8).

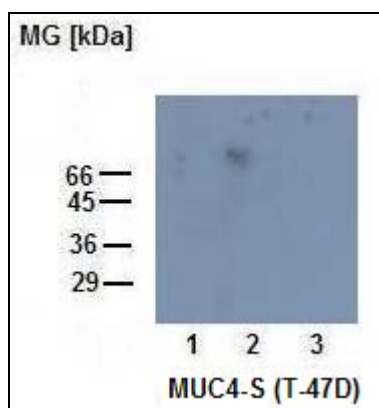


Abbildung 8: *Western-Blot* zum Nachweis des MUC4-S-Fusionsproteins aus Zellüberstand mit dem Anti-His-Antikörper.

1,2,3: Fraktionszahl

Fraktion 2 wurde durch Umkehrphasen-HPLC auf einer C₄-Säule gereinigt. Ein schwach positives Signal konnte für *Peak 2* mit einer Retentionszeit von 20 min nachgewiesen werden (Abbildung 9). Die schwache Expression des MUC4-S (< 10 µg/L Überstand) machte Analysen der O-Glykanprofile unmöglich.

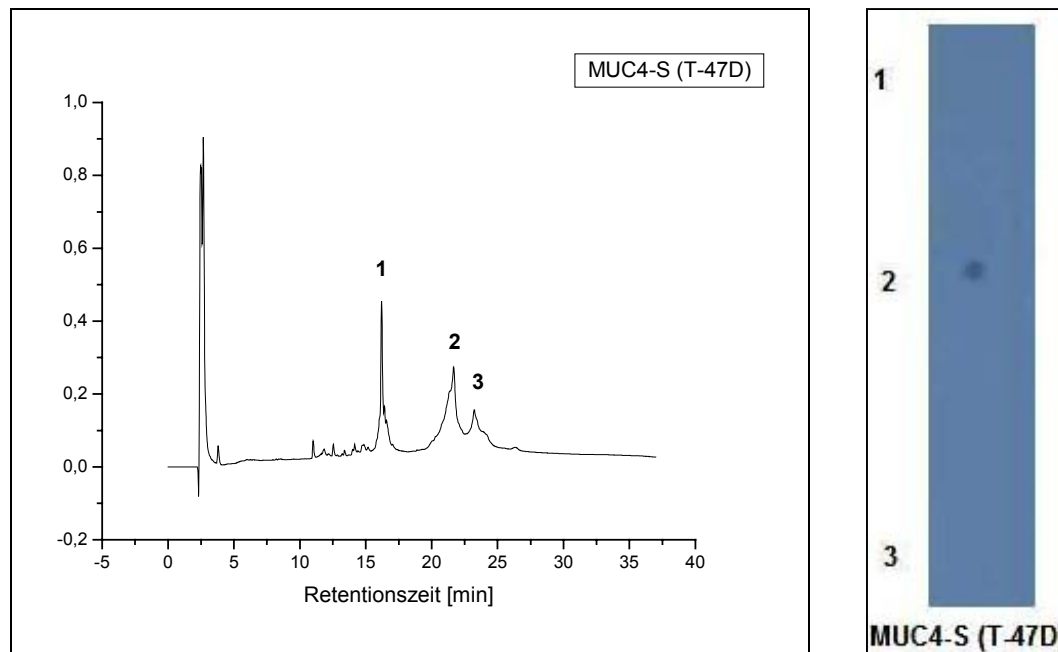


Abbildung 9: Umkehrphasen-HPLC zur Aufreinigung von MUC4-S (T-47D).

Diese Aufreinigung über Umkehrphasen-HPLC erfolgte im Anschluss an die Affinitätschromatographie. Im *Dotblot* rechts wurden nach Chromatographie drei Fraktionen auf MUC4-S mittels Anti-His-Antikörper getestet, wobei nur im Falle der Fraktion zwei mit der Retentionszeit von 20 min ein positives Signal detektierbar war.

Von allen drei Fraktionen wurden Aliquots abgenommen und in einem *Western-Blot* auf die Anwesenheit von Glykoproteinen untersucht. Mit Hilfe des *Glykan Detection Kit* konnte gezeigt werden, dass nur Fraktion 2 glykosyliertes Protein enthält, dessen apparente Molekülmasse mit der des MUC4-S übereinstimmt (Abbildung 10).

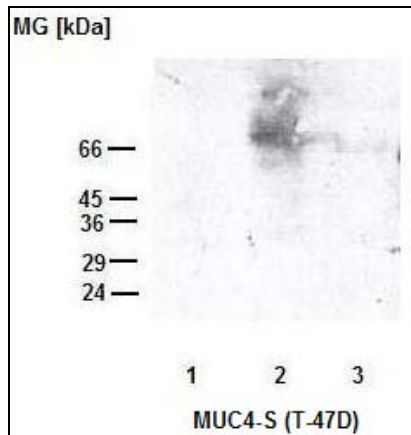


Abbildung 10: Nachweis von Glykoproteinen durch Western-Blot-Analysen der HPLC-Fractionen.

Die HPLC aufgereinigten Proben (Fraktionen 1-3) wurden nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auf Nitrocellulose geblottet und anschließend der Zuckernachweis mit dem DIG *Glycan Detection Kit* durchgeführt. Nur in Fraktion 2 konnte eine positive Färbung bei 70 kDa festgestellt werden.

3.1.2.2 Expression des MUC4-S Fusionsproteins in CHO-Zellen

Hinweise auf eine schwache Expression von MUC4-S in CHO-Zellen konnten in *Dot blot*-Analysen mit Anti-His-Antikörper erhalten werden (Abbildung 11).



Abbildung 11: Nachweis der Expression von MUC4-S in CHO-Zellen (Fraktion 1) mittels *Dot blot*.

Zur Detektion wurde ein Anti-His-Antikörper verwendet. Die Färbeintensitäten deuteten auf eine nur schwache Expression des MUC4-S hin.

Trotz der schwachen Expression wurde mit einer Überstandsmenge von 600 ml versucht, das Fusionsprotein mit Ni-NTA-Agarose (Affinitätschromatographie) zu isolieren. Der daran anschließende *Dot blot* erbrachte auch nach Anreicherung nur ein schwaches Signal in der Fraktion 2 (Abbildung 12). Der Nachweis des Fusionsproteins im *Western-Blot* gelang nicht. Das MUC4-S-Konstrukt wurde auch in verschiedene andere Krebszelllinien eingebracht, auch bei diesen Zellen, die für eine hohe Expressionsrate bekannt sind, gelang eine Detektion des Konstruktes nicht. Durch Sequenzierung des Konstruktes konnten keine möglichen Fehler

aufgedeckt werden.

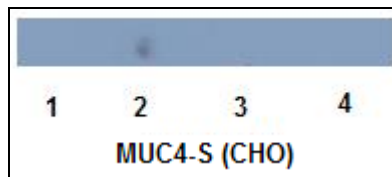


Abbildung 12: Immunblot zum Nachweis von MUC4-S Fusionsprotein im Zellüberstand von CHO-Zellen.

Zur Detektion im *Dotblot* wurde ein Anti-His-Antikörper verwendet. In Fraktion 2 konnte ein schwachpositives Signal identifiziert werden.

3.1.2.3 Expression des MUC4-S Fusionsproteins in IdID-Zellen

Nach erfolgreicher Transfektion der Zellen (*Dotblot*) (Abbildung 13) wurde der Überstand wiederum über Affinitätschromatographie gereinigt und das Eluat im *Dotblot* auf MUC4-S-Expression mit dem Anti-His-Antikörper untersucht. In der Fraktion 2 konnte ein positives Signal detektiert werden (Abbildung 14).

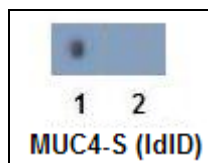


Abbildung 13: *Dotblot* zum Nachweis der Expression von MUC4-S in IdID-Zellen (Fraktion 1). MUC4-S in aufkonzentriertem Überstand wurde mit einem Anti-His-Antikörper detektiert.



Abbildung 14: Immunchemischer Nachweis des MUC4-S Fusionsproteins im Zellüberstand.

Nach Affinitätschromatographie wurde das Eluat mit Anti-His-Antikörper auf MUC4-S im *Dotblot* untersucht und die 2. Fraktion als positiv identifiziert.

Die positive Fraktion wurde durch Umkehrphasen-HPLC auf einer C₄-Säule weiter aufgereinigt und der MUC4-S positive *Peak* (*Peak* 1), welcher ca. 45 µg (Gesamtmenge etwa 200 µg) entspricht, in einem weiteren *Dotblot* identifiziert. Mit dieser Probe wurde ein *Western-Blot*, ebenfalls mit dem Anti-His-Antikörper, durchgeführt. Das Molekulargewicht von MUC4-S lag bei circa 40 kDa (Abbildung

15). Da das nicht glykosylierte Fusionsprotein ein berechnetes Molekulargewicht von 22 kDa haben sollte und die Zellen ohne Zusatz von Gal und GalNAc gezogen wurden, scheint die Biosynthese der O-Glykane in IdID-Zellen - wenn auch eingeschränkt - zu funktionieren.

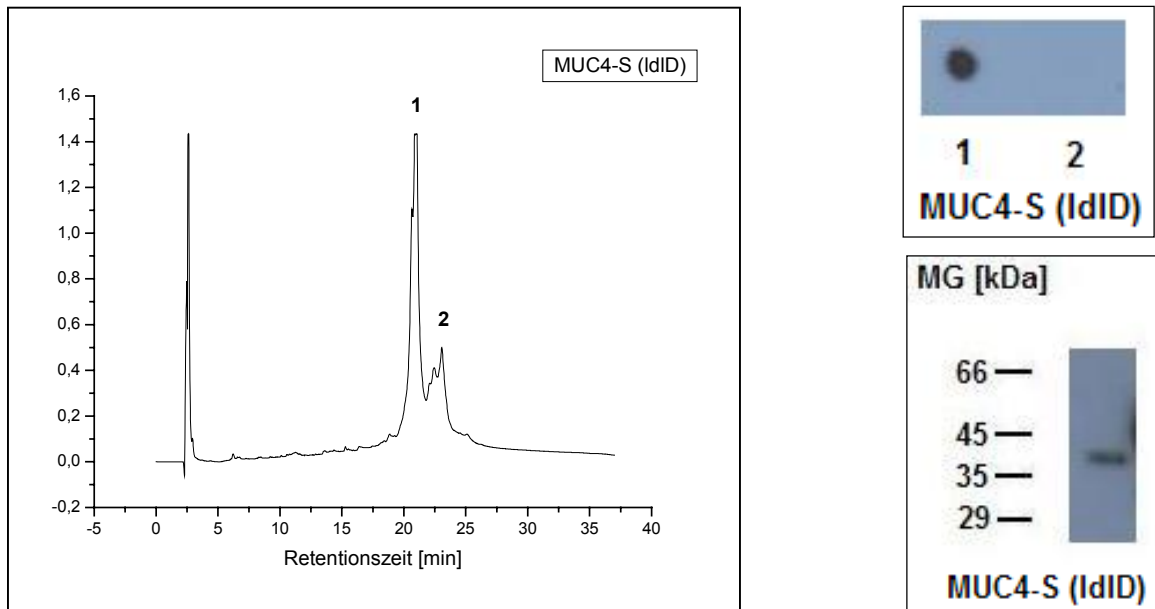


Abbildung 15: HPLC-Aufreinigung des MUC4-S-Fusionproteins aus IdID-Zellen.

Das Fusionsprotein wurde auf einer C₄-Säule durch Umkehrphasen-Chromatographie aufgereinigt. Der *Peak* mit der Retentionszeit von 20 min konnte im *Western-* und im *Dotblot* mit Anti-His-Antikörper als positiv (MUC4-S enthaltend) verifiziert werden.

Der Versuch einer Glykanprofilierung durch Hydrazinolyse und Normalphasen HPLC der 2AB-markierten Oligosaccharide verlief ergebnislos. Die rudimentäre Glykosylierung, auf die der *Western-Blot* hindeutet, konnte hiermit nicht nachgewiesen werden.

3.1.3 Expression des MUC1-S

3.1.3.1 Expression des MUC1-Fusionsproteins MUC1-S in CHO-Zellen

Die Effizienz der Transfektion von CHO-Zellen mit MUC1-S wurde durch *Western-Blot*-Analysen mit dem Anti-MUC1-Antikörper (C595) demonstriert. Das apparente Molekulargewicht der Proteinbande lag bei etwa 60 kDa (Abbildung 16).

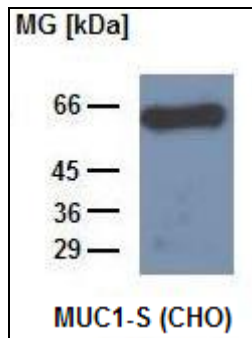


Abbildung 16: Immunchemischer Nachweis MUC1-S-Expression in CHO-Zellen.

MUC1-S in aufkonzentriertem Zellüberstand wurde im Immunblot durch Anti-MUC1-Antikörper (C595) nachgewiesen.

Nach Anreicherung des Oligo-His-markierten Fusionsproteins über Ni-Affinitätschromatographie wurde in Fraktion 2 eine schwache Bande im Immunblot mit Anti-MUC1-Antikörper detektiert (Abbildung 17). Diese Fraktion wurde über C₄-HPLC weiter aufgereinigt und das Eluat im *Dot blot* auf MUC1-S-positive Fraktionen getestet. Die Hauptmenge des MUC1-S-Proteins lag in *Peak 2* vor, der trotz geringerer UV-Absorption im HPLC-Chromatogramm ein stärkeres Immun-Signal ergab (Abbildung 18). Die generierte Menge des Fusionsproteins war nicht ausreichend, um ein Glykanprofil zu erstellen.

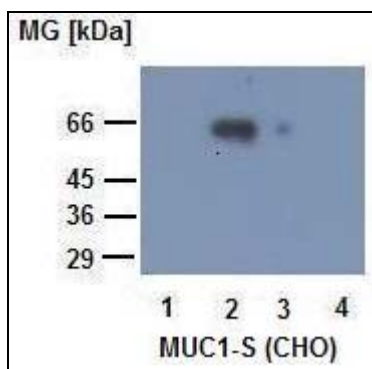


Abbildung 17: Immunblot zur Detektion des MUC1-S Fusionsproteins aus CHO-Zellen.

Zur Anreicherung des Proteins aus dem Überstand wurde eine Ni-Chelat-Affinitätschromatographie durchgeführt und das Eluat im *Western-Blot* mit Anti-MUC1-Antikörper (C595) untersucht.

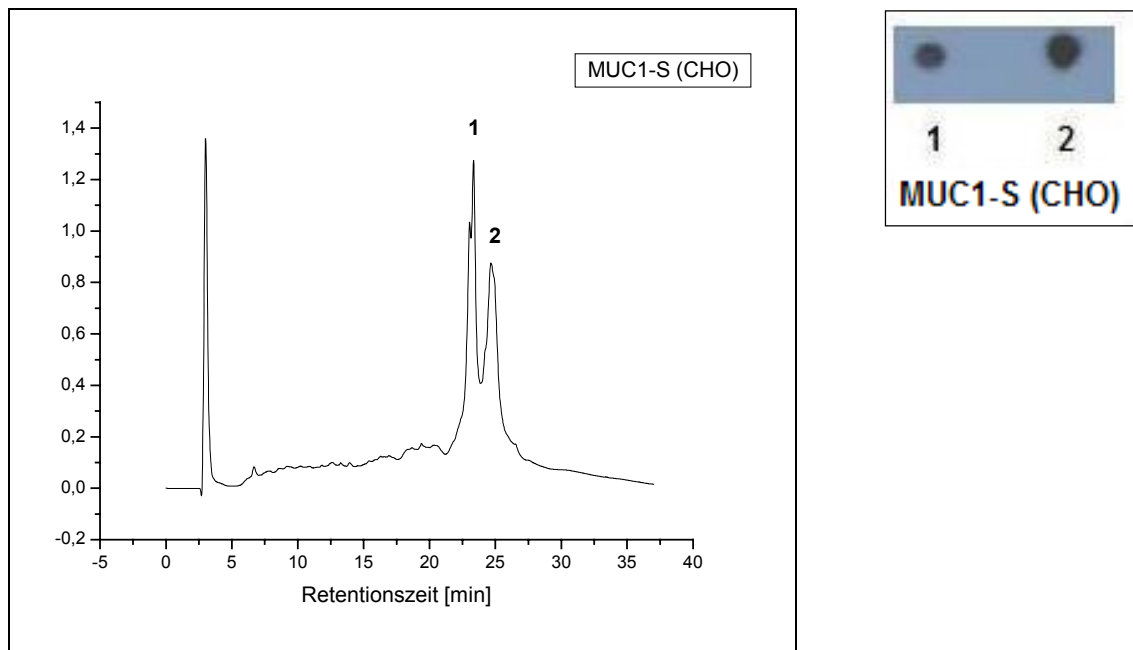


Abbildung 18: Umkehrphasen-HPLC zur Aufreinigung des MUC1-S-Fusionsproteins und Immunblot zur Detektion von MUC1-S.

Die Chromatographie erfolgte auf einer C_4 -Säule. Die Fraktionen des Eluates mit den Retentionszeiten 23 und 24 min wurden im Dotblot mit Anti-MUC1-Antikörper getestet.

3.1.3.2 Expression des MUC1-S-Fusionprotein in IdID-Zellen

Nach Transfektion der IdID-Zellen mit dem MUC1-S-Expressionsvektor (keine Zuckersupplementierung) wurde in einem Western-Blot mit dem monoklonalen Anti-MUC1-Antikörper (C595) das Fusionsprotein mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 29 kDa identifiziert (Abbildung 19). Auch in diesem Falle war, wie schon für MUC4-S beobachtet, das apparente Molekulargewicht gegenüber dem berechneten (20 kDa) zu größeren Massen verschoben, was abermals auf eine rudimentäre O-Glykosylierung hinweist. Dieses könnte mit einem nicht vollständigen Defekt der UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc-Epimerase in Zusammenhang stehen.

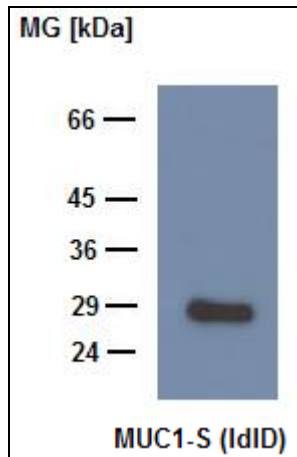


Abbildung 19: Immunchemischer Nachweis der MUC1-S-Expression in IdID-Zellen.

Das Fusionsprotein wurde mit dem monoklonalen Anti-MUC1-Antikörper bei etwa 29 kDa detektiert.

Nach Aufreinigung über eine Ni-NTA Agarose-Matrix wurden Fusionsproteine im Western-Blot (C595) in den Spuren 2-8 nachgewiesen (Abbildung 20).

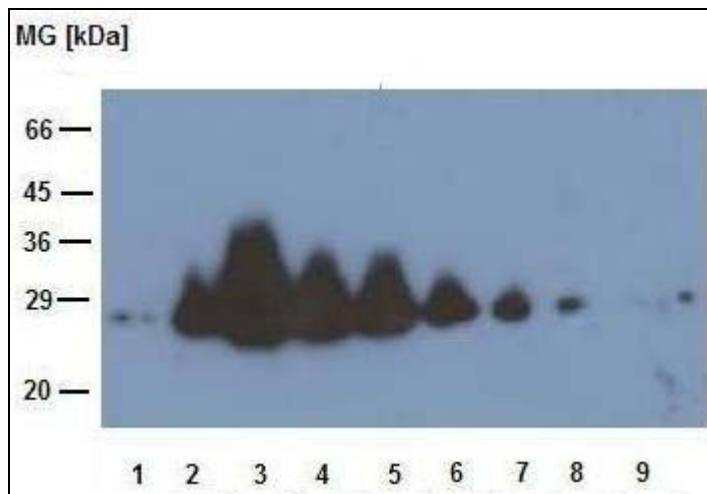


Abbildung 20: Western-Blot unter Verwendung des monoklonalen Anti-MUC1-Antikörpers (C595) zur Detektion von MUC1-S aus IdID-Zellen.

Nach Affinitätschromatographie konnte in den Fraktionen 2-8 MUC1-S-Fusionsprotein detektiert werden.

Zur weiteren Aufreinigung wurden die MUC1-S positiven Fraktionen vereinigt, in einer Vakuumzentrifuge eingeeengt und mittels Umkehrphasen-Chromatographie auf einer C₄-Säule aufgereinigt. Die Peaks mit den Retentionszeiten 14 min und 15 min (insgesamt ca. 150 µg) konnten anschließend im Dotplot mit Anti-MUC1-Antikörper (C595) als MUC1-S-positiv verifiziert werden. Die stärkere UV-Absorption in Fraktion 2 entsprach dem stärkeren Signal im Dotplot (Abbildung 21). Obwohl diese

Probe in Abwesenheit exogen zugegebener Zucker wie GalNAc oder Gal generiert wurde und eine O-Glykosylierung nicht möglich sein sollte, wurde versucht, ein Glykanprofil zu erstellen. Das Ergebnis war, wie schon im Falle des MUC4-S negativ, so dass die Annahme einer rudimentären O-Glykosylierung vorläufig spekulativ bleibt.

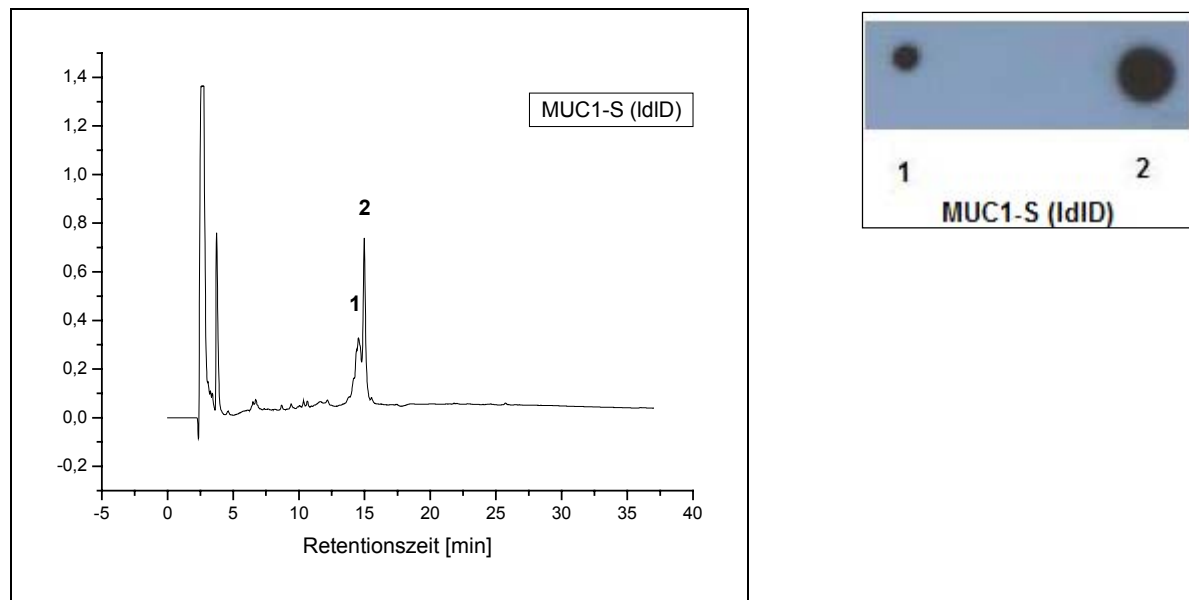


Abbildung 21: Umkehrphasen-HPLC des MUC1-S-Fusionsproteins aus IdID-Zellen und anschließende Identifizierung MUC1-S positiver Fraktionen im Dot blot.

Die Peaks mit den Retentionszeiten 14 min und 15 min konnten im Dot blot als MUC1-S positiv identifiziert werden.

3.1.3.3 Expression des MUC1-S in IdID-Zellen unter variierender Zuckersupplementierung

Da eine Expression der MUC1-S in IdID-Zellen bestätigt werden konnte (siehe oben), wurden IdID-Zellen mit variierender Zuckersupplementierung gezogen, um Einflüsse auf die O-Glykosylierung durch Profilierungsanalysen zu erfassen. Im Einzelnen wurden die Zellen mit folgenden Zuckern kultiviert: 1) 1mM GalNAc und 0,1 mM Gal 2) 0,5 mM GalNAc und 0,05 mM Gal 3) 1 mM GalNAc oder 4) 0,5 mM GalNAc. Im Western-Blot konnte bei allen vier Proben eine Molekulargewichtsverschiebung von 29 auf 40-80 kDa festgestellt werden (Abbildung 22) Jede der Proben zeigte eine Größenverteilung, die auf eine heterogene Glykosylierung hinwies, was für Mucine typisch ist. Die durch GalNAc-Supplementierung gewonnenen Proben zeigten ein geringeres Molekulargewicht als jene, die mit Gal und GalNAc kultiviert worden

waren. Dieses Ergebnis stimmt mit der Erwartung überein, dass bei Supplementierung mit beiden Zuckern komplexere Glykane gebildet werden. Die Mengen der jeweiligen Zuckerzusätze schienen, nach den apparenten Molekülmassen zu urteilen, keinen großen Einfluss zu haben. Der Western-Blot in Abbildung 22 zeigt in der ersten Spur eine MUC1-S-Probe, die durch die Zusätze von 1 mM GalNAc und 0,1 mM Gal generiert wurde. Die extreme Molekulargewichtsverteilung kann durch Überladung im Zusammenwirken mit Eigenschaften des Detektionssystems erklärt werden.

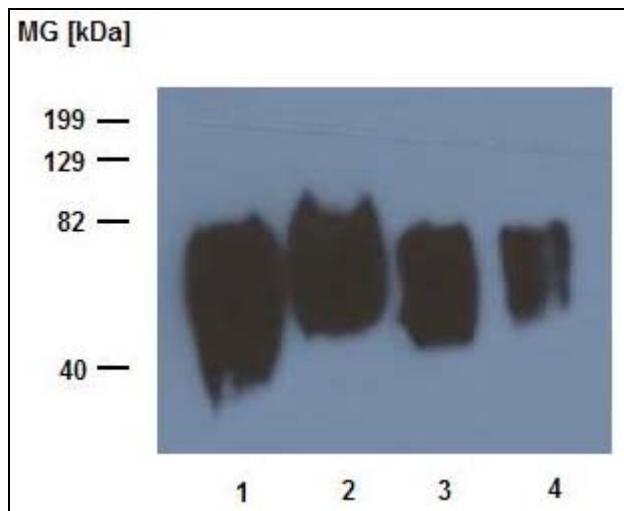


Abbildung 22: Immunchemischer Nachweis des MUC1-S Fusionsproteins aus IdID-Zellen, die unter variierender Zuckersupplementierung gezogen worden waren.

Für diesen *Western-Blot* wurde der Anti-MUC-Antikörper (C595) verwendet. Spur 1: Inkubation der Zellen mit 1 mM GalNAc und 0,1 mM Gal, Spur 2: mit 0,5 mM GalNAc und 0,05 mM Gal, Spur 3: mit 1 mM GalNAc und Spur 4: mit 0,5 mM GalNAc.

Die Überstände aller vier Kultivierungsansätze wurden zur Isolierung der MUC1-S-Fusionsproteine über eine Ni-NTA-Agarose-Säule gegeben. Im darauffolgenden Western- oder Dotblot wurden die Eluate wiederum mit dem Anti-MUC1-Antikörper auf die Anwesenheit von MUC1-S untersucht. Bei Probe 1 konnten die Fraktionen 1-4, bei der Probe 2 die Fraktionen 1-5, bei der Probe 3 die Fraktionen 2-5 und bei der Probe 4 die Proben 1-5 als MUC1-S positiv getestet werden (Abbildung 23).

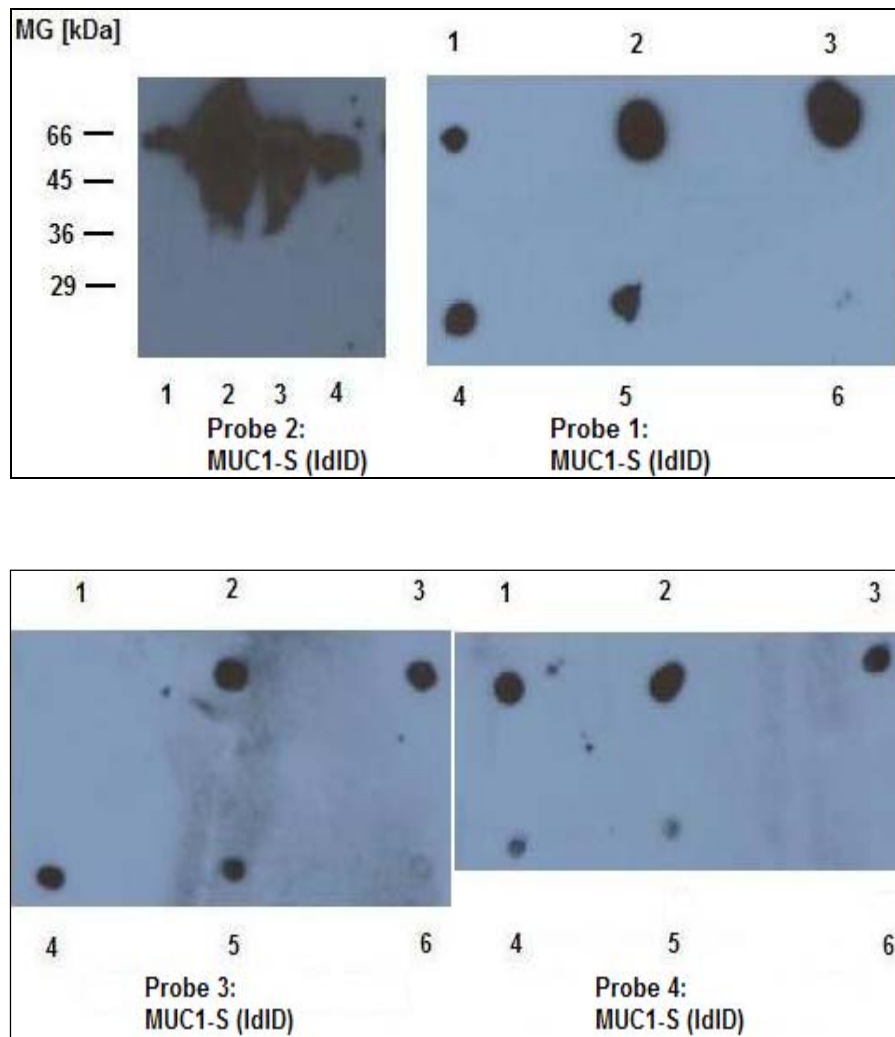


Abbildung 23: Immunchemischer Nachweis des MUC1-S-Fusionsproteins nach Ni-Chelat-Affinitätsreinigung.

Für den *Western-Blot* als auch die *Dotblots* wurde der Anti-MUC1-Antikörper (C595) verwendet. Die Kultivierung der IdID-Zellen fand unter Zugabe unterschiedlicher Mengen an Gal und GalNAc statt.

Die positiven Fraktionen wurden jeweils vereinigt, in einer Vakuumzentrifuge eingengt und mittels Umkehrphasen-Chromatographie auf einer C4-Säule aufgereinigt. Die Umkehrphasen-HPLC-Diagramme zeigten einen Peak mit der Retentionszeit von 14 min für die Proben 1 und 2 und drei verschiedene Peaks mit den Retentionszeiten 14 min, 20 min und 22 min für die Proben 3 und 4 (Abbildungen 24, 25). Die alleinige Zugabe von GalNAc führte zu einer stärker heterogenen Glykanverteilung im HPLC-Diagramm. Die Peaks mit den Retentionszeiten 20 und 22 min wiesen auf eine unpolare, unterglykosylierte Species hin. Eine Kontamination, die von bovinem Kälberserum (FKS) herrührt, konnte ausgeschlossen werden, da für die beiden Proben, die unter Zusatz von Gal und GalNAc generiert wurden, das

gleiche FKS verwendet wurde. Die generierte Menge der Probe IdID MUC1-S 1 wurde auf ca. 200 µg geschätzt, die der Probe IdID MUC1-S 2 auf 30 µg, die der Probe IdID MUC1-S 3 auf 200 µg und die der Probe IdID MUC1-S 4 auf 100 µg.

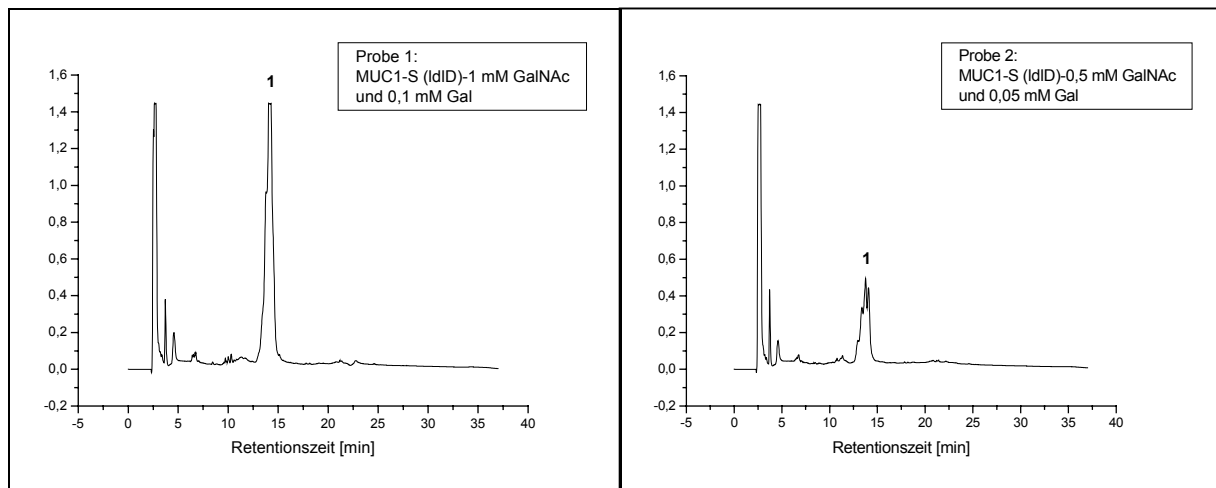


Abbildung 24: Umkehrphasen-HPLC der MUC1-S Proben (IdID) unter Gal/GalNAc-Zusatz

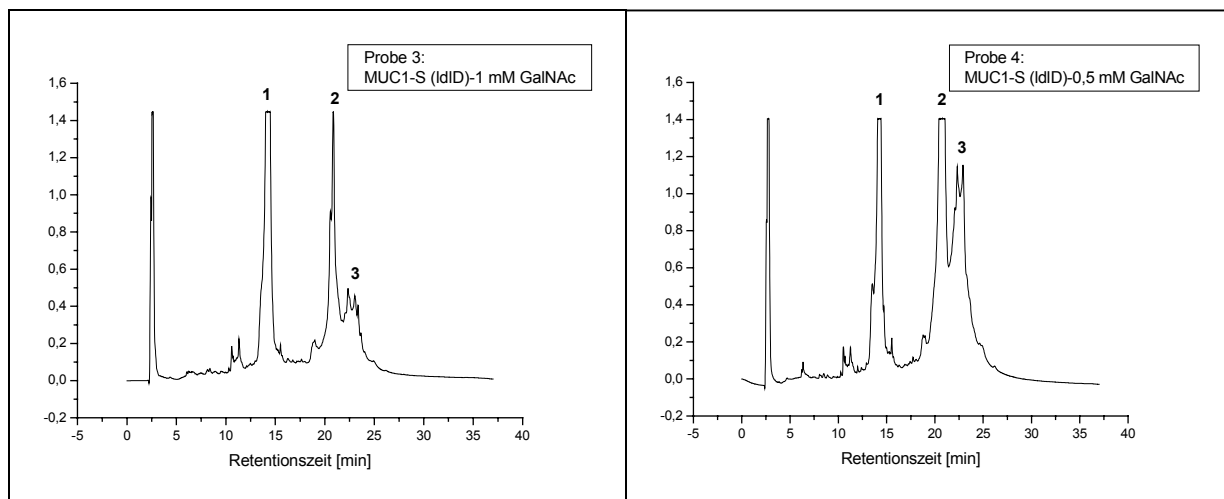


Abbildung 25: Umkehrphasen-HPLC der MUC1-S-Proben (IdID) unter GalNAc-Zusatz

Die Proben 1 und 2 zeigten im HPLC-Diagramm nur einen *Peak* mit der Retentionszeit von 14 min. Die Proben 3 und 4 zeigten drei Signale mit den Retentionszeiten 14 min, 20 min und 22 min.

Die gesammelten HPLC-Fractionen wurden im Dotblot auf MUC1-S getestet. Alle Fractionen waren MUC1-S-positiv. Die Fraction 1 der Probe 3 zeigt das stärkste positive Signal verglichen mit den anderen Fractionen der gleichen Probe, wohingegen die Fraction 2 der Probe 4 am stärksten war (Abbildung 26).

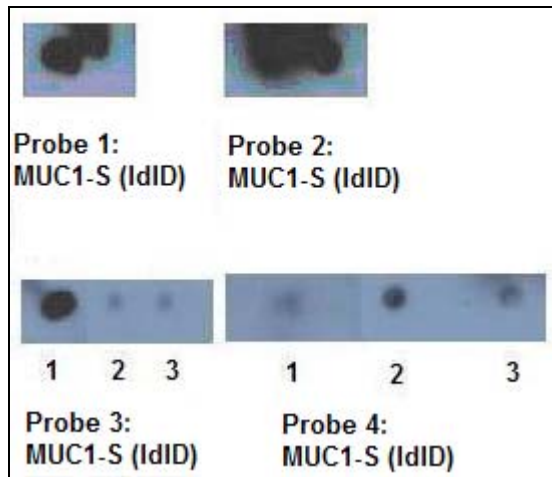


Abbildung 26: Immunchemischer Nachweis von MUC1-S in den Fraktionen nach Umkehrphasen-HPLC Aufreinigung.

Alle Fraktionen zeigten unter Verwendung des Anti-MUC1-Antikörpers (C595) eine positive Reaktion. Die Mengen waren in den einzelnen Fraktionen unterschiedlich.

3.1.3.4 Koexpression des MUC1-S und der C2GnT3 in CHO-Zellen

CHO (MUC1-S)-Zellen wurden mit dem Gen für die *core2-Transferase3* (C2GnT3) kotransfiziert. C2GnT3 ist ein Typ II Membranprotein, welches vorwiegend im Thymus exprimiert wird (Taniguchi et al., 2002). Dieses Golgi-Enzym addiert GlcNAc an *core1* O-gebundene Glykane (Gal β 1-3GalNAc) und bildet damit *core2*-Strukturen (Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc). Der Erfolg der Kotransfektion wurde mit Hilfe des *Primer*-Paares TSHC 86/TSHC 101 und der zell-spezifischen cDNA durch PCR überprüft. Im Agarosegel wurde das gesuchte Fragment bei 480 bp nachgewiesen (Abbildung 27).

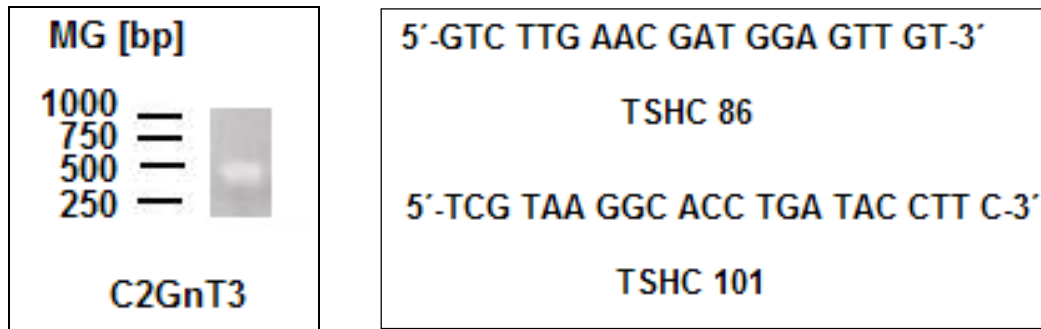


Abbildung 27: 1,2 % Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis von C2GnT3.

Mit Hilfe des Primerpaares TSHC 86/TSHC 101 konnte nach Präparation der RNA aus den kotransfizierten Zellen und Generierung der cDNA durch reverse Transkription das gesuchte Segment des C2GnT3-Gens nachgewiesen werden.

Die zweite Kontrolle bestand in einem enzymatischen Test zum Nachweis der C2GnT3-Aktivität in CHO-abgeleiteten Mikrosomen (Abbildung 28).

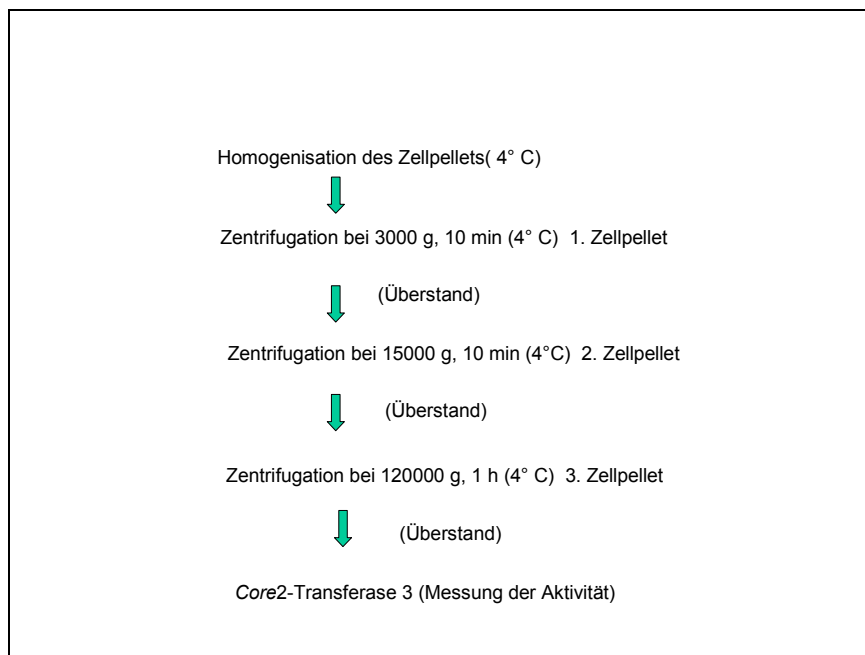


Abbildung 28: Zentrifugationsschritte zur Präparation von Mikrosomen aus CHO/IdID-Zellen

Hierzu wurden die Enzympräparationen mit *core1* (Benzyl-2-Acetamid-2-Desoxy-3-O-D-Galactose) und radioaktivem UDP*GlcNAc umgesetzt, die Reaktionsansätze zur Entfernung des überschüssigen Cosubstrates über einen Dowex-Anionenaustauscher aufgereinigt und die im Eluat verbliebene Radioaktivität, die ein Maß für substrat-gebundenes GlcNAc ist, vermessen. Als Kontrolle diente ein

entsprechendes Enzympräparat aus nicht-kotransfizierten Zellen. Es zeigte sich trotz zum Teil relativ hohem Hintergrund (Kontrolle), dass die Kotransfektion mit C2GnT3 erfolgreich war (Tabelle 3).

Die Wahrscheinlichkeit einer Überlastung der Dowex-Säule im Aufreinigungsschritt, wodurch überschüssiges UDP-*GlcNAc durchlief, ist eher gering.

	CHO MUC1-S mit C2GnT3 [dpm]	CHO MUC1-S [dpm]
1. Pellet	3676	1800
2. Pellet	796	317
3. Pellet	321	200
Überstand	330	150

Tabelle 3: Aktivitätstests der Fraktionen zur Detektion von C2GnT3.

Die Umsetzung erfolgte mit *core1* und UDP-*GlcNAc, anschließender Aufreinigung über Dowex Anionenaustauscher und Detektion im Szintillationszähler.

Es wurde versucht, die Koexpression des Fusionsproteins MUC1-S und einer funktionellen C2GNT3 in CHO-Zellen durch *Western-Blot*-Analysen zu demonstrieren. Da die Synthese von *core2*-Strukturen die Ausbildung komplexer und größerer Glykane ermöglicht, sollte von einer Größenverschiebung zu höheren, apparenten Molekulargewichtswerten für das MUC1-S/C2GnT3 (CHO) gegenüber MUC1-S (CHO) und MUC1-S (IdID) auszugehen sein. Es konnte jedoch keine offensichtliche Molekulargewichtsverschiebung festgestellt werden, da sich in allen Fällen eine heterogene Molekulargewichtsverteilung zwischen 50-80 kDa ergab (Abbildung 29). Diese Beobachtung ist typisch für Mucine aufgrund ihrer heterogenen Glykanverteilung. Das Molekulargewicht von MUC1-S aus IdID-Zellen ohne Zuckerezusatz lag mit 25-40 kDa deutlich unterhalb der anderen Proben.

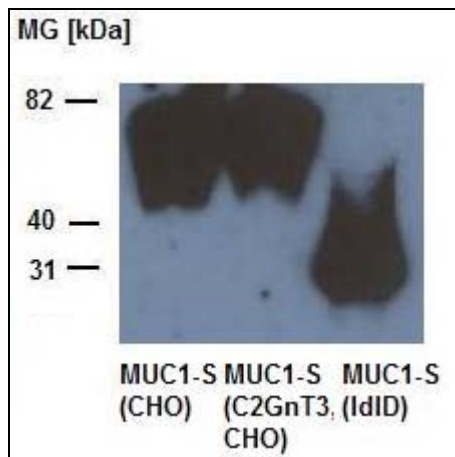


Abbildung 29: Vergleich der apparenten Molekulargewichte von MUC1-S (C2GNT3, CHO), MUC1-S (CHO) und MUC1-S (IdID, ohne Zuckerzusatz) im *Western-Blot*.

Zur Detektion im *Western-Blot* wurde der Anti-MUC1-Antikörper (C595) verwendet.

Die Isolierung der MUC1-S-Fusionsproteine erfolgte wie zuvor über Ni-Chelat-Affinitätschromatographie. Der anschließende *Western-Blot* mit monoklonalem Anti-MUC1-Antikörper (C595) zeigte MUC1-S-positive Signale in den Fraktionen 2-7 (Abbildung 30).

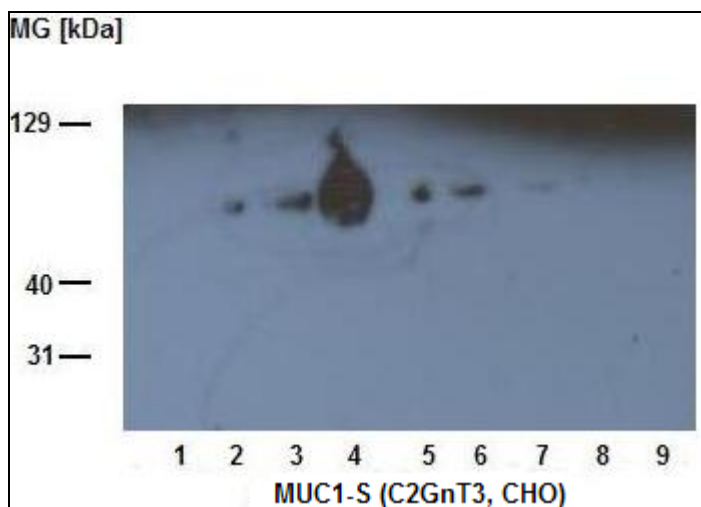


Abbildung 30: Immunblot des MUC1-S (C2GNT3, CHO) aus Zellüberstand

Die positiven Fraktionen wurden vereinigt, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend über eine C_4 -Säule mittels Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt.

MUC1-S-positive *Peaks* (Fraktionen 1 und 2), die bei 18 min und 18,5 min eluiert wurden, konnten mit schwachen Banden im *Western-Blot* detektiert werden (Abbildungen 31 und 32).

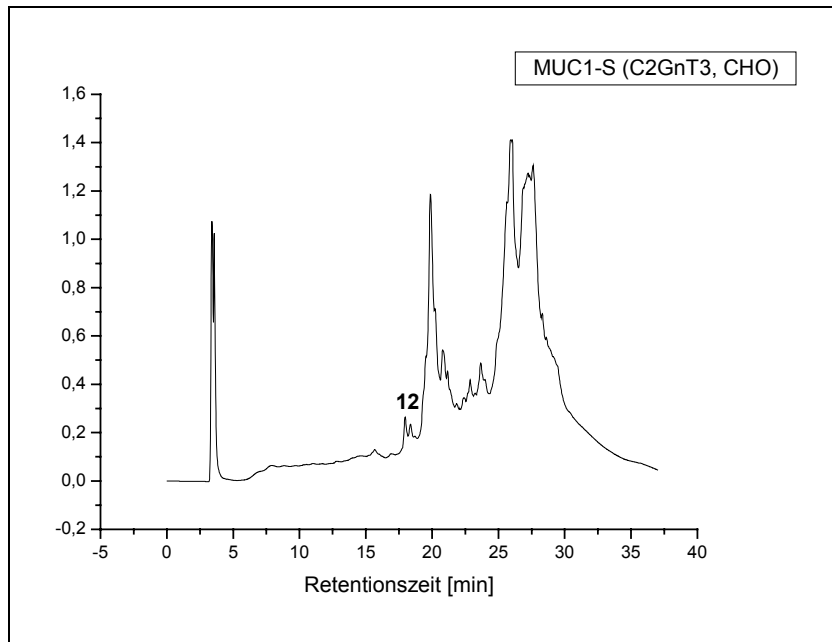


Abbildung 31: C₄-Umkehrphasen-HPLC des MUC1-S (C2GnT3, CHO) nach Affinitätschromatographie.

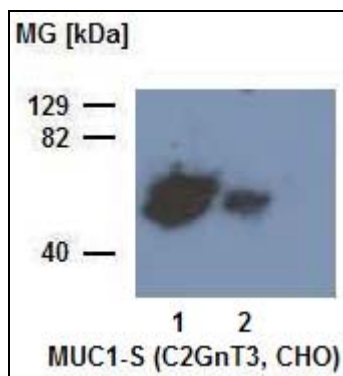


Abbildung 32: Immunblot der HPLC-gereinigten Fraktionen.

Mit dem monoklonalen Anti-MUC-Antikörper (C595) konnten die *Peaks* mit den Retentionszeiten 18 und 18,5 min (Fraktion 1 und 2) im *Western-Blot* als MUC1-S-positiv identifiziert werden.

Die geschätzte Ausbeute des Fusionsproteins erlaubte keine weitergehenden Analysen des O-Glykosylierungsprofils.

3.1.3.5 Koexpression des MUC1-S mit C2GnT3 in IdID-Zellen

Ebenso wie bei der Kotransfektion der CHO Zellen musste auch im Falle der IdID-Zellen die erfolgreiche Expression von C2GnT3 überprüft werden.

Nach Isolierung der RNA kotransfizierter IdID-Zellen wurde die korrespondierende cDNA hergestellt und mit diesem *Template* und den *Primern* TSHC 86 und TSHC 101 (siehe auch Abbildung 25) das C2GnT3-Gen in einer PCR amplifiziert. Das erwartete Fragment mit 480 bp wurde anschließend in einem 1,2%igen Agarosegel nachgewiesen (Abbildung 33).

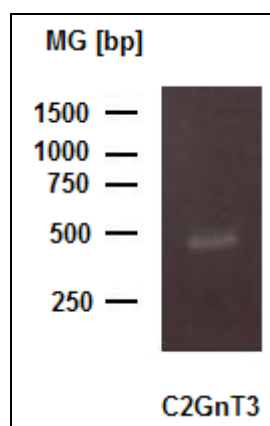


Abbildung 33: 1,2% Agarosegelelektrophorese des C2GnT3-PCR-Produktes.

Die Mikrosomenpräparation analog zu der aus CHO-Zellen (siehe Abbildung 28) und der anschließende Aktivitätstest, bei dem das *core1*-Substrat (Benzyl-2-Acetamid-2-Desoxy-3-O-D-Galactose) mit radioaktivem UDP*GlcNAc zu *core2* umgesetzt wurde, zeigte eine erfolgreiche Kotransfektion an (Tabelle 4).

	IdID MUC1-S mit C2GnT3 [dpm]	IdID MUC1-S [dpm]
1. Pellet	9406	2447
2. Pellet	4321	210
3. Pellet	570	193
Überstand	609	223

Tabelle 4: Radiometrische Analyse der *core2*-Synthese.

Es wurde versucht, die kotransfizierten IdID-Zellen, MUC1-S (C2GnT3), wie zuvor die einfach transfizierten ohne Zusatz von GalNAc oder Gal/GalNAc zu kultivieren. Nach wenigen Tagen jedoch waren die Zellen nicht mehr in der Lage, MUC1-S zu sezernieren. Auch eine wiederholte Transfektion erbrachte keine Verbesserung der MUC1-S-Expressionseffizienz.

Da es sich bei IdID-Zellen um Mutanten handelt, die aufgrund ihres Defektes der UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc-Epimerase im Vergleich zur ursprünglichen CHO-Zelllinie „geschwächt“ sind, beeinträchtigte eine mehrfache Transfektion verbunden mit Mangelbedingungen die Expression der MUC1-S-Fusionsproteine. Es konnte daher kein Glykanprofil für MUC1-S (C2GnT3, IdID) erstellt werden, das bei fehlender Zuckersupplementierung exprimiert wird. Im Weiteren wurden kotransfizierte Zellen mit Gal und GalNAc supplementiert und 600 ml Überstand gesammelt. Anschließend wurde die Zuckersupplementierung auf 1 mM GalNAc reduziert und abermals der Überstand gesammelt. Die Expression des Fusionsproteins wurde fortlaufend durch *Western-Blot*-Analysen überprüft. Wie bei den Proben der einfach transfizierten Zelllinien mit Zugabe von Zuckern konnte eine über einen größeren Massenbereich streuende Molekulargewichtsverteilung festgestellt werden. Das Molekulargewicht der Probe, die unter Zusatz beider Zucker generiert worden war, lag zwischen 31-60 kDa. Das Molekulargewicht der exprimierten MUC1-S-Fusionsproteine bei GalNAc-Supplementierung lag wesentlich tiefer zwischen 31 und 45 kDa (Abbildung 34).

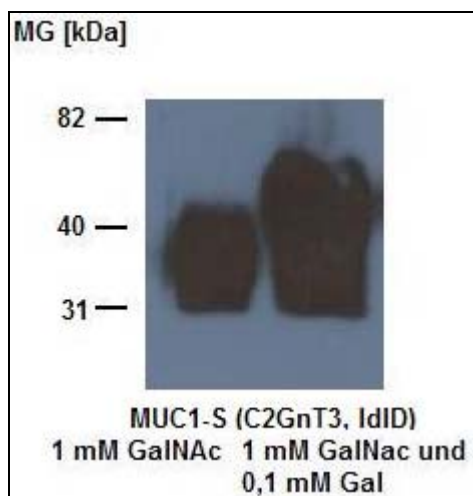


Abbildung 34: Immunchemischer Nachweis von MUC1-S in C2GNT3 kotransfizierten IdID-Zellen, die unter Zusatz von a) 1 mM GalNAc und 0,1 mM Gal oder b) 1 mM GalNAc gezogen wurden.

Für die Detektion der Proben wurde monoklonaler Anti-MUC1-Antikörper (C595) verwendet.

Die MUC1-S-Fusionsproteine wurden wie zuvor durch Affinitätschromatographie angereichert und die Eluate im *Dot blot* mit Anti-MUC1-Antikörper (C595) getestet (Abbildung 35). Beide Proben zeigten eine starke Expression von MUC1-S Fusionsproteinen in IdID-Zellen. Für die Probe a) (IdID mit 1 mM GalNAc und 0,1 mM

Gal) konnten die Fraktionen 1-15, für die Probe b) (IdID mit 1 mM GalNAc) die Fraktionen 1-12 als MUC1-S-positiv getestet werden.

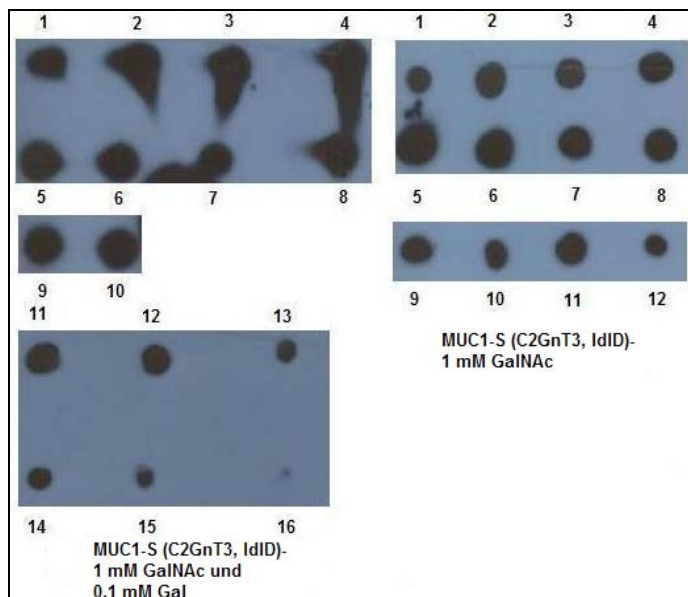


Abbildung 35: Immunchemischer Nachweis von MUC1-S in mit C2GnT3 kotransfizierten IdID-Zellen.

Mittels Anti-MUC1-Antikörper (C595) wurde nach Affinitätschromatographie in den Eluaten von den Proben a) (Fraktionen 1-15) und b) (Fraktionen 1-12) MUC1-S nachgewiesen.

Die Umkehrphasen-HPLC-Analyse zeigte sowohl im Falle der Probe a) als auch der Probe b) einen *Peak* mit der Retentionszeit von 18 min (Abbildungen 36 und 37). Im Gegensatz zur Probe MUC1-S (IdID)-GalNAc konnte nach der Kotransfektion keine heterogene Größen- bzw. Polaritätsverteilung aus dem Chromatogramm abgelesen werden. Beide *Peaks* wurden im anschließenden Immunblot als MUC1-S-positiv identifiziert. Die hergestellte Menge an MUC1-S wurde in beiden Proben auf ca. 1 mg geschätzt.

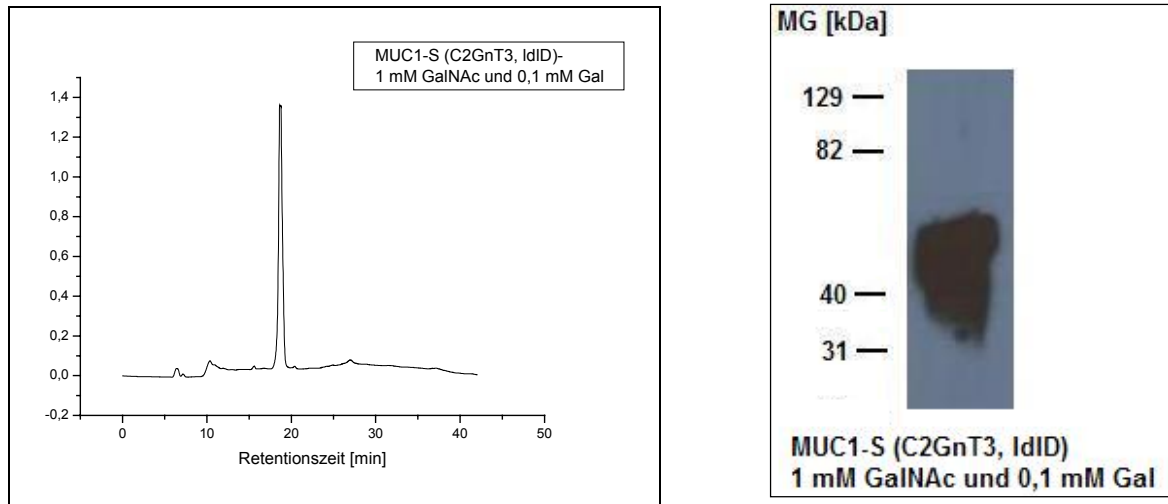


Abbildung 36: Umkehrphasen-HPLC des MUC1-S (C2GnT3, IdID)-1 mM GalNAc und 0,1 mM Gal.

Nach Isolierung aus dem Zellüberstand durch Affinitätschromatographie wurde die Probe durch Umkehrphasen-HPLC auf einer C₈-Säule gereinigt. Der *Peak* mit der Retentionszeit von 18 min konnte im *Western-Blot* als MUC1-S-positiv nachgewiesen werden.

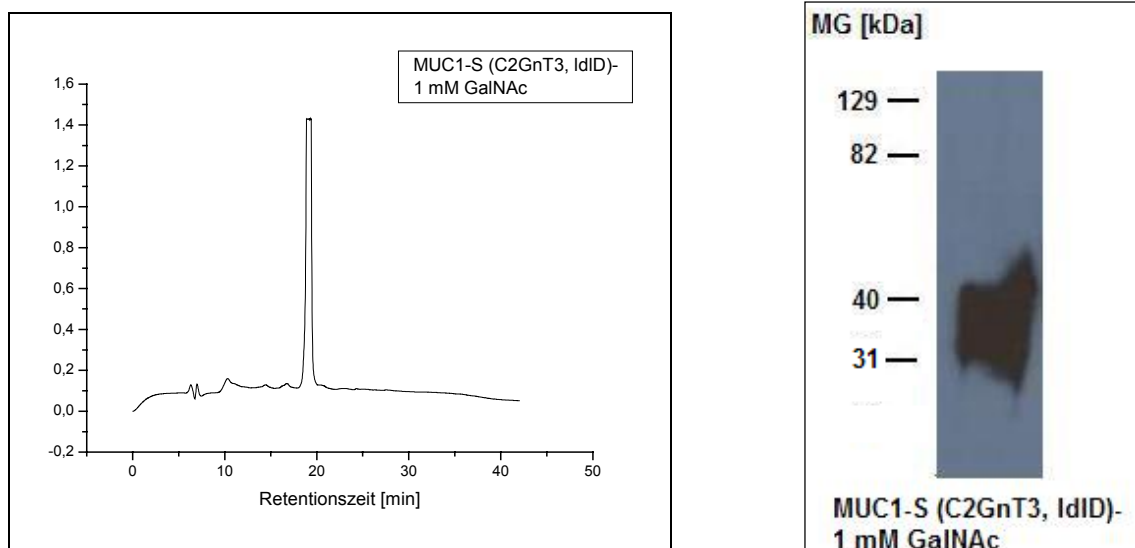


Abbildung 37: Umkehrphasen-HPLC des MUC1-S (C2GnT3, IdID)-1 mM GalNAc.

Nach Isolierung aus dem Zellüberstand durch Affinitätschromatographie wurde die Probe durch Umkehrphasen-HPLC auf einer C₈-Säule gereinigt. Der *Peak* mit der Retentionszeit von 18 min konnte im *Western-Blot* als MUC1-S-positiv nachgewiesen werden.

3.1.4 O-Glykanprofilierung der 2-Aminobenzamid-markierten O-Glykane durch HPLC

Durch wasserfreie Hydrazinolyse wurden O-Glykane als reduzierende Zucker vom Fusionsprotein gelöst. Im Anschluss wurden die Proben re-N-acetyliert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2-Aminobenzamid markiert. Die markierten Zucker wurden auf einer Aminophasen-Säule durch Normalphasen-HPLC aufgetrennt. Für die Identifizierung wurden die Retentionszeiten von Standard-Glykanen zugrunde gelegt und die Retentionszeitverschiebung nach Einwirkung von Exoglykosidasen wie α 3,6-Neuramidase, α 2-Fucosidase und β -Hexosaminidase genutzt. Einzelne Strukturen wurden zur Absicherung massenspektrometrisch vermessen (MALDI-MS).

Die Quantifizierung der Signalstärken erfolgte durch Flächen-Integration. Die HPLC-Glykane wurden im Chromatogramm mit Nummern versehen, den in Tabellen 5-8 registrierten Strukturen zugeordnet und quantifiziert. Aufgrund der geringen Glykanausbeuten der Proben 2 und 4 konnte kein auswertbares Profil aufgezeichnet werden. Deshalb wurden nur die Proben 1 und 3 weiter untersucht. Wie erwartet, konnten in beiden Chromatogrammen keine *core2*-Species (entspricht *Peak 2* im HPLC-Profil) identifiziert werden (Abbildungen 38 und 39). In beiden Chromatogrammen tritt ein *Peak* mit der Retentionszeit von 25 min auf. Um eine mögliche *core2*-Zuckerstruktur, die eine ähnliche Retentionszeit aufweist, auszuschließen, wurde ein Teil der Probe mit der Exoglykosidase β -Hexosaminidase inkubiert und dann erneut chromatographiert.

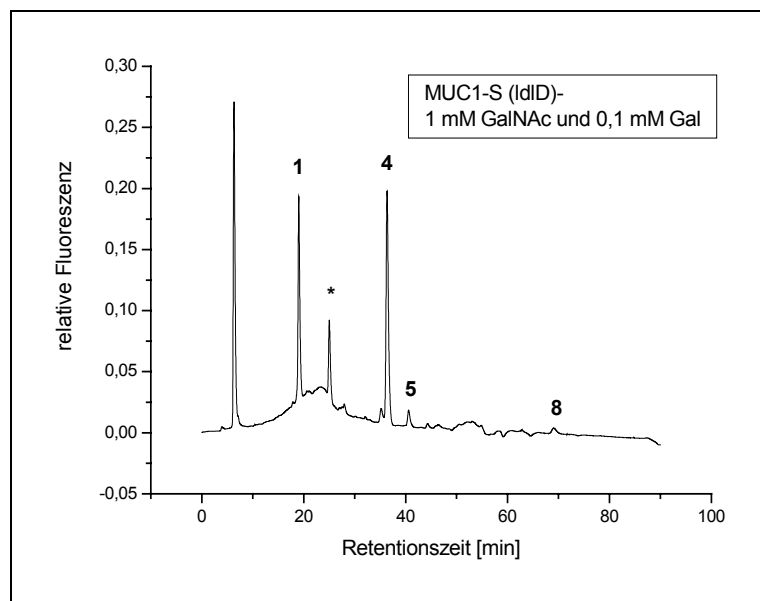


Abbildung 38: Normalphasen-HPLC des MUC1-S (IdID)-1 mM GalNAc und 0,1 mM Gal.

Nach Hydrazinolyse und Markierung mit 2-Aminobenzamid wurden die O-Glykane durch Normalphasen-HPLC aufgetrennt. Die nummerierten Glykanpeaks wurden in der Tabelle 5 bezüglich ihrer strukturellen Identität und Quantität aufgelistet.

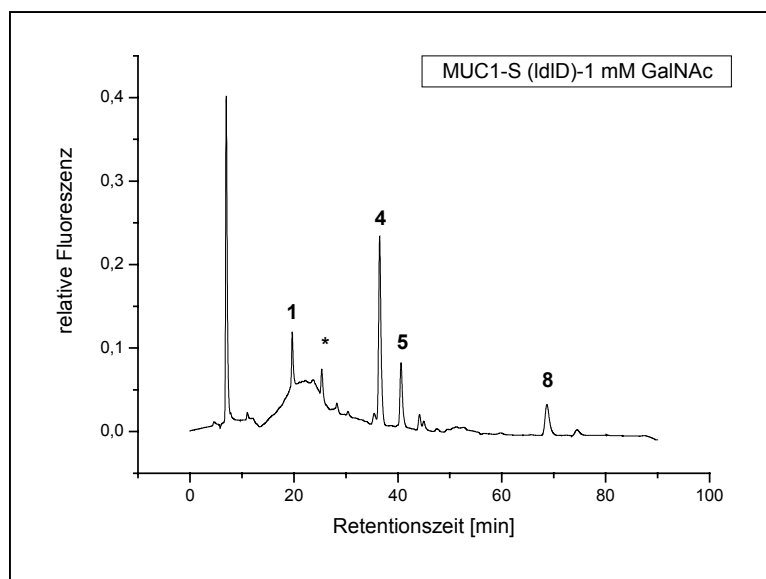


Abbildung 39: Normalphasen-HPLC des MUC1-S (IdID)-1 mM GalNAc.

Nach Hydrazinolyse und Markierung mit 2-Aminobenzamid wurden die O-Glykane durch Normalphasen-HPLC aufgetrennt. Die nummerierten Glykanpeaks wurden in der Tabelle 6 bezüglich ihrer strukturellen Identität und Quantität aufgelistet.

Ein Vergleich der Chromatogramme vor und nach Behandlung mit β -Hexosaminidase zeigte, dass der markierte Peak „*“ kein core2-Trisaccharid (GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc) ist, da kein Abbau des Zuckers eingetreten war und sich der relative Anteil des core1-Disaccharids nicht erhöhte (Abbildung 40).

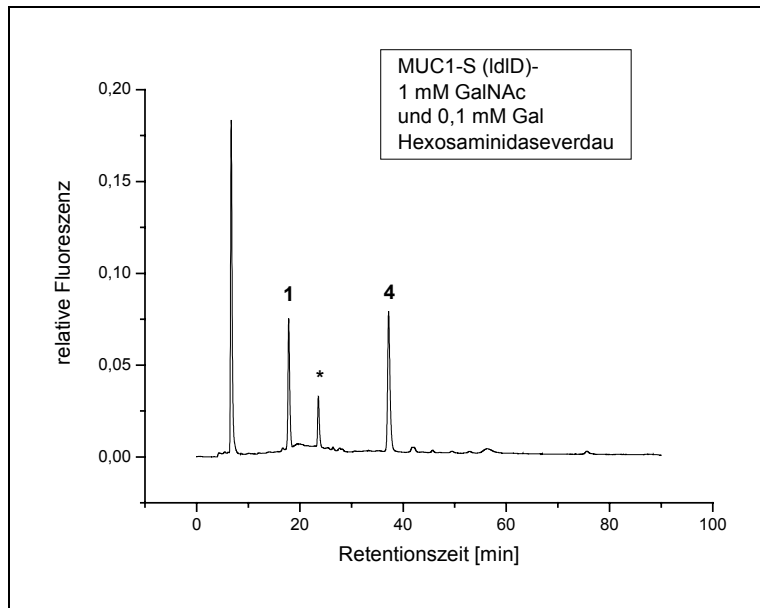


Abbildung 40: Normalphasen-HPLC der O-Glykane des MUC1-S (IdID)-1 mM GalNAc und 0,1 mM Gal nach Behandlung mit β -Hexosaminidase.

Der mit * gekennzeichnete *Peak* ist nach Einwirkung der Exoglykosidase noch vorhanden und kann somit nicht von einer *core2*-Struktur mit terminalem GlcNAc herrühren.

IdID (MUC1-S)-Zellen besitzen, wie Wildtyp CHO-Zellen, ein Glykosylierungsprofil, welches keine *core2*-Strukturen, aber eine dominante Expression sialylierter *core1*-Strukturen zeigt. Bei Supplementierung der Zellen mit GalNAc dominierte im Glykopprofil Sialyl-3-*core1* (Sialyl-3-T) NeuAca2-3Gal β 1-3GalNAc (50%), im geringeren Umfang wurden Sialyl-6-*core1* NeuAca2-6(Gal β 1-3)GalNAc (19%) und Disialyl-*core1* NeuAca2-6(NeuAca2-3Gal β 1-3)GalNAc (16%) festgestellt. Nur 10% an *core1* (Gal β 1-3GalNAc) wurden detektiert, daneben eine geringere Menge möglicherweise fucosylierter Glykane (6%). Die mature Glykoform der MUC1-S Specie in IdID-Zellen (MUC1-S(IdID)-GalNAc/Gal supplementiert) zeigte ebenfalls vorwiegend Sialyl-3-*core1* (51%), jedoch einen höheren Anteil an *core1* (31%) verglichen mit MUC1-S (IdID, GalNAc supplementiert). Dafür nahm der Anteil an sialylierten Strukturen, Sialyl-6-*core1* (von 19% auf 3%) und Disialyl-*core1* (von 16% auf 2%) stark ab. Eine Glykankomponente mit der relativen Retention von 1,3 gegenüber dem *core1*-Disaccharid könnte ein Fucose-Derivat darstellen (Tabellen 5 und 6).

Das Glykopprofil der Kotransfektanten (Abbildung 41), die mit GalNAc und Gal supplementiert wurden, zeigte zusätzlich dominante *core2*-Strukturen: *core2*-Tetrasaccharid Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc (30%), Sialyl-3-*core2*

NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc (23%) und Disialyl-*core*2 NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(NeuAc α 2-3Gal β 1-3)GalNAc (1,5%). Die Sialyl-6-*core*1 Synthese (1,6%) wurden unterdrückt, was durch die direkte Konkurrenz von α 6GalNAcST mit C2GnT3 um die gleiche Substratposition zu begründen ist (Abbildung 41). Eine indirekte Konkurrenz zwischen C2GnT3 und α 3GalST konnte auch nachgewiesen werden (Abnahme nach Kotransfektion von 51,1% auf 40,3%). Der Anteil an *core*1 (von 31% auf 2,8%) verringerte sich stark. Dieser Verlust war eine Folge der Bildung von *core*2-Strukturen.

Das Expressionsprofil der Probe MUC1-S (C2GnT3, IdID)-GalNAc zeigte keine Expression von *core*2. Das O-Glykosylierungsprofil wies hauptsächlich Sialyl-3-*core*1 auf (60%). Daneben wurden auch Disialyl-*core*1 (21%), *core*1 (14%) und 5% Sialyl-6-*core*1 gefunden. Auffallend war die starke Abnahme von Sialyl-6-*core*1 nach der Kotransfektion (von 19% auf 5%), wohingegen *core*1, Sialyl-3-*core*1 und Disialyl-*core*1 nach der Kotransfektion zunahmen (Tabellen 5 und 6).

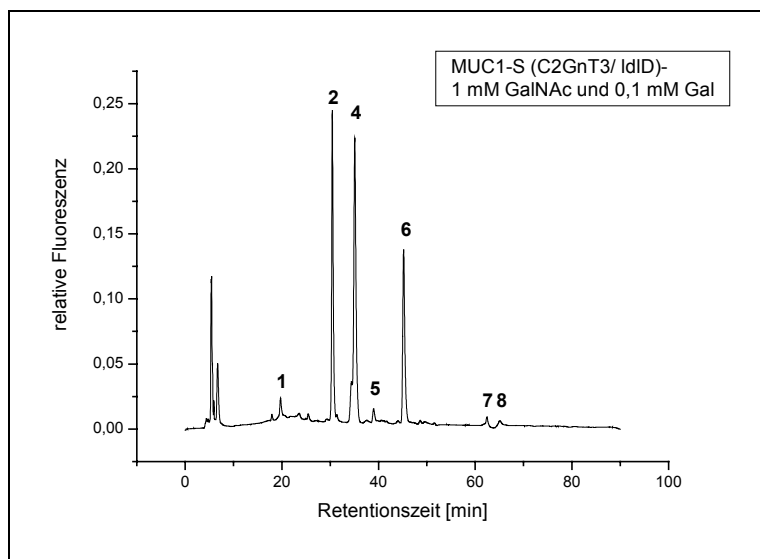


Abbildung 41: O-Glykane von MUC1-S (C2GnT3, IdID)- 1 mM GalNAc und 0,1 mM Gal.

Die durch Hydrazinolyse freigesetzten und mit 2-Aminobenzamid markierten Glykane wurden durch Normalphasen-HPLC aufgetrennt. Die relative Quantität und die Identität der einzelnen *Peaks* ergeben sich aus den Tabellen 5 und 6.

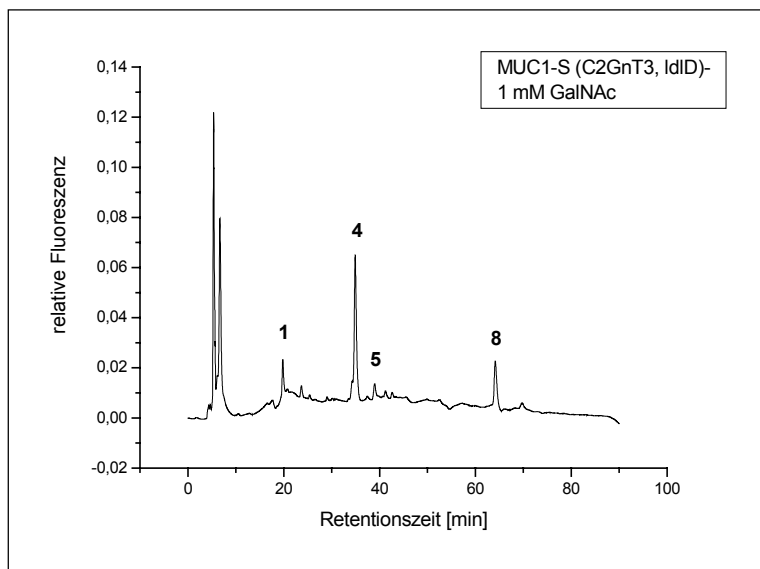


Abbildung 42: O-Glykane von MUC1-S (C2GnT3, IdID)- 1 mM GalNAc.

Die durch Hydrazinolyse freigesetzten und mit 2-Aminobenzamid markierten Glykane wurden durch Normalphasen-HPLC aufgetrennt. Die relative Quantität und die Identität der einzelnen Peaks ergeben sich aus den Tabellen 5 und 6.

Kohlenhydratstruktur	HPLC-Peak	relative Mengen [%] MUC1-S (IdID)	
		1 mM GalNAc und 0,1 mM Gal	C2GnT3 1 mM GalNAc und 0,1 mM Gal
Gal (β1-3)-GalNAc	1	31,1	2,8
unbekannt	-	12,8	-
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc Gal(β1-3)	2		29,8
NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc	4	51,1	40,3
NeuAc(α2-6) GalNAc Gal(β1-3)	5	2,9	1,6
NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc Gal (β1-3)	6	-	22,8
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)			
NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)	7	-	1,5
NeuAc(α2-6) GalNAc NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)	8	2,1	1,2

Tabelle 5: Strukturelle Identität und relative Quantität der O-Glykane des MUC1-S (IdID)- 0,1 mM Galactose (Gal) und 1 mM N-Acetylgalactosamin (GalNAc).

Kohlenhydratstruktur	HPLC-Peak	relative Mengen [%] MUC1-S (IdID)	
		1 mM GalNAc	C2GnT3 1 mM GalNAc
Gal(β1-3)-GalNAc	1	9,7	14,1
unbekannt	-	5,5	-
NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc	4	50,1	59,6
NeuAc(α2-6) GalNAc Gal(β1-3)	5	18,9	5,1
NeuAc(α2-6) GalNAc NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)	8	15,9	21,3

Tabelle 6: Strukturelle Identität und relative Quantität der O-Glykane des MUC1-S (IdID)-1 mM N-Acetylgalactosamin (GalNAc).

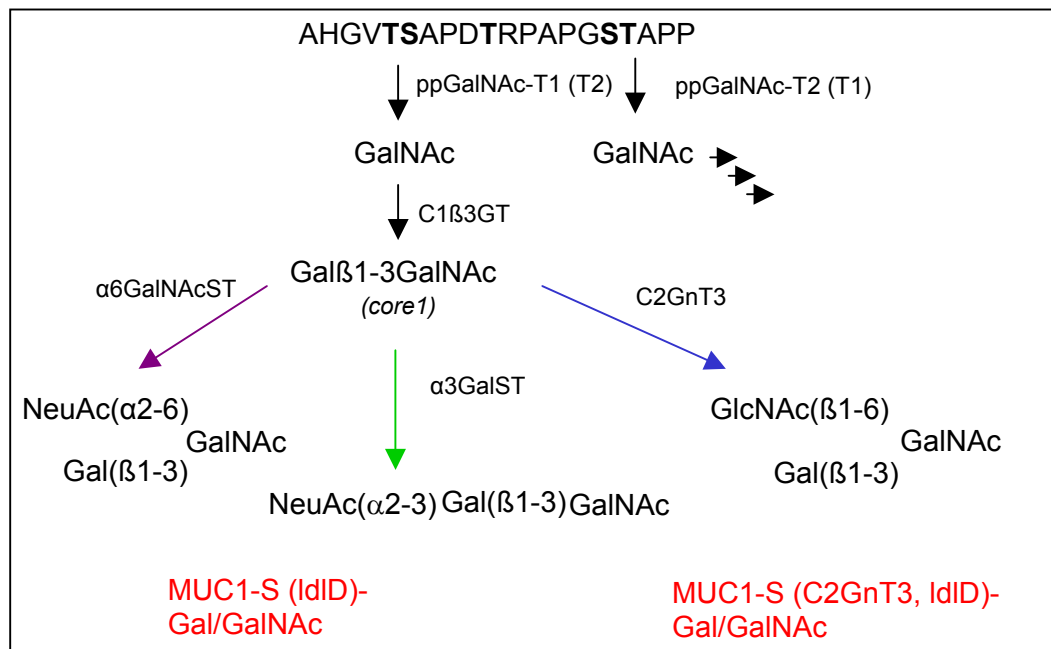


Abbildung 43: Konkurrenz der Sialyltransferasen α3GalST und α6GalNAcST mit C2GnT3.

Die Kofektion der Zellen mit C2GnT3 veränderte nur das Glykanprofil des MUC1-S (IdID)-Gal und GalNAc. Hierbei trat eine direkte Konkurrenz zwischen C2GnT3 und α6GalNAcST auf. Eine indirekte Konkurrenz zwischen C2GnT3 und α3GalST konnte auch nachgewiesen werden.

3.1.5 O-Glykanprofilierung der 2-Aminobenzamid-markierten O-Glykane nach Neuraminidaseverdau durch HPLC

Die 2-Aminobenzamid (AB)- markierten Glykane wurden mit Neuraminidase, die α -2-3, α -2-6 und α -2-8 gebundene N-Acetyl-Neuraminsäurereste hydrolysiert, über Nacht inkubiert. Dadurch wurde der saure Zucker quantitativ entfernt. Nach Auftrennung der Glykane über Normalphasen-HPLC konnte für IdID (MUC1-S)-Zellen nur noch die *core*1-Struktur nachgewiesen werden, da mono- und disialylierte Glykane abgebaut worden waren (Abbildung 42). Daneben wurde sowohl in der Probe 1 als auch in der Probe 3 eine Glykankomponente „*“ gefunden, deren Struktur nicht aufgeklärt werden konnte (Tabellen 7 und 8, Abbildung 42).

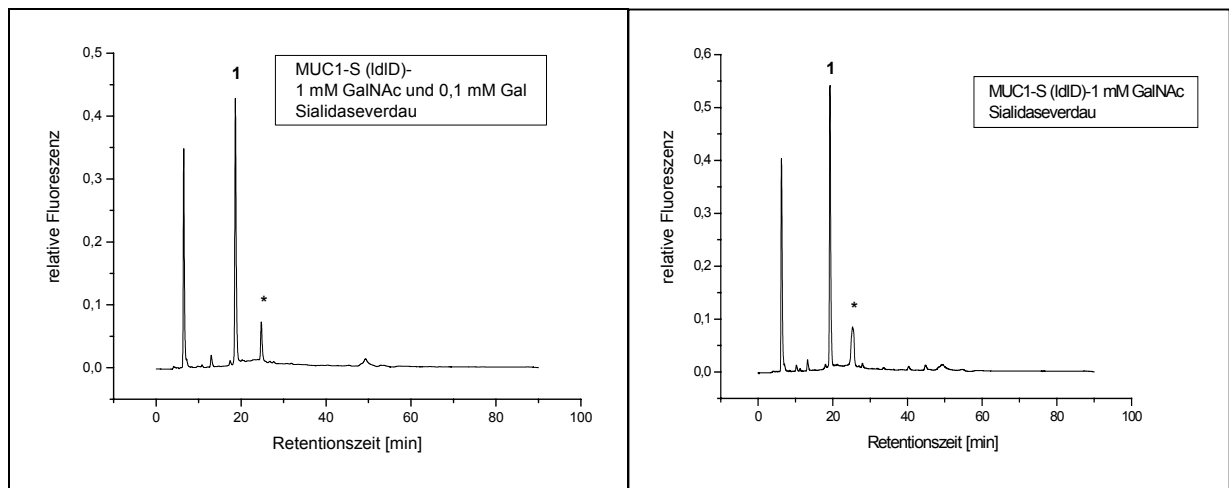
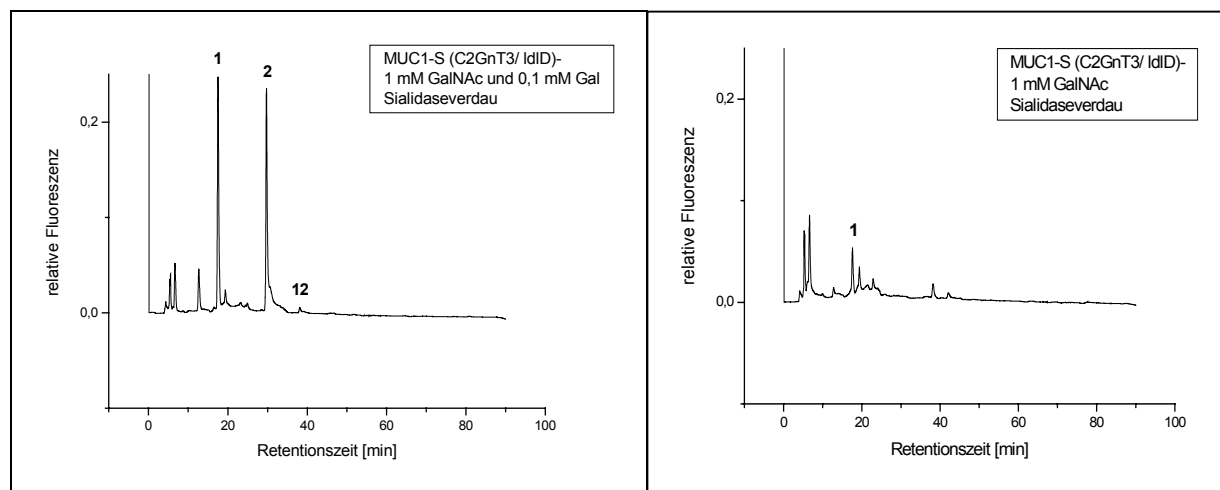


Abbildung 42: Chromatogramme der O-Glykane nach Sialidaseverdau.

Die Desialylierung der 2AB-Glykane mit Sialidase führte zur Degradation mono- und disialylierter Glykane. *Peak* 1 im Chromatogramm zeigt die *core*1 Struktur, * ist vermutlich eine fucosylierte Spezies.

Das Glykopprofil auf MUC1-S (C2GnT3, IdID)-GalNAc/Gal zeigte ein Verhältnis von *core*1/*core*2 von 1 (Tabelle 7, Abbildung 43). Das Hexasaccharid Gal(β 1-3/4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-6)GalNAcGal(β 1-3) (*Peak* 12, Abbildung 43), welches auf *core*2 basiert, wurde erst nach Sialidaseverdau sichtbar, da es durch saure Glykane mit der gleichen Retentionszeit überlagert wurde.

Die mit GalNAc supplementierte Probe wies nach Behandlung mit Sialidase wie erwartet *core*1 auf (Abbildung 43, Tabelle 8). Die Identität der weiteren *Peaks* konnte mit MALDI-TOF-MS-Analysen nicht geklärt werden, es könnte sich daher auch um Verunreinigungen handeln.


Abbildung 43: Chromatogramme der O-Glykane nach Behandlung mit Sialidase.

Die durch Hydrazinolyse freigesetzten und mit 2-Aminobenzamid markierten Glykane wurden mit Sialidase verdaut und anschließend durch Normalphasen-HPLC aufgetrennt. Die relative Quantität und die Identität der einzelnen Peaks ergeben sich aus Tabelle.

Kohlenhydratstruktur	HPLC-Peak	relative Mengen [%]	
		MUC1-S (IdID) Sialidaseverdau 1 mM GalNAc und 0,1 mM Gal	C2GnT3 1 mM GalNAc und 0,1 mM Gal
Gal (β1-3)GalNAc	1	85,8	49,5
unbekannt	*	14,2	-
Gal(β 1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc Gal(β1-3)	2	-	49,4
NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc	4	-	-
NeuAc(α2-6) GalNAc Gal(β1-3)	5	-	-
NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc Gal (β1-3)	6	-	-
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)	7	-	-
NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)	8	-	-
Gal(β1-3/4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc Gal(β1-3/4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-3) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc Gal(β1-3/4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-3)	12	-	1,1

Tabelle 7: O-Glykanprofil des MUC1-S (IdID)- 1 mM GalNAc und 0,1 mM Gal nach der Behandlung mit Neuraminidase. Für die Quantifizierung wurden die Peak-Flächen integriert. Durch die Kotransfektion mit C2GnT3 konnte nach Abbau von mono- und disialylierten Glykanen neben

core1-Disaccharid auch core2-Tetrasaccharid identifiziert werden.

Kohlenhydratstruktur	HPLC- Peak	relative Mengen [%]	
		MUC1-S (IdID) 1 mM GalNAc	Sialidaseverdau C2GnT3 1 mM GalNAc
Gal (β1-3)-GalNAc	1	74,91	100
unbekannt	*	25,09	-
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc Gal(β1-3)	2	-	-
NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc	4	-	-
NeuAc(α2-6) GalNAc Gal(β1-3)	5	-	-
NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc Gal (β1-3)	6	-	-
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)			
NeuAc(α2-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)	7	-	-
NeuAc(α2-6) GalNAc NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)	8	-	-

Tabelle 8: O-Glykane des MUC1-S (IdID)- 1 mM GalNAc nach der Behandlung mit Neuraminidase.

Für die Quantifizierung wurden die Peak-Flächen integriert. Sowohl bei der einfach transfizierten als auch der mit C2GnT3 kotransfizierten Probe konnte vorwiegend core1 gefunden werden.

3.2.1 Einfluss sialylierter O-Glykane auf die Initiation der O-Glykosylierung durch Polypeptid: GalNAc-Transferasen T1 und T2

GalNAc-Transferasen übertragen GalNAc auf Serin oder Threonin einer Polypeptidkette und initiieren damit die O-Glykosylierung. Bisher ist bekannt, dass sich eine vorherige Substitution des Substratpeptids mit GalNAc im Falle der rekombinanten UDP-GalNAc:Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferase 4 (ppGalNAc-T4) und teilweise auch ppGalNAc-T2 positiv auf die Glykosylierung benachbarter Stellen auswirken kann. Der Aktivierungseffekt entsteht vermutlich durch Interaktion des Substrat-GalNAc mit der Lektindomäne in der C-terminalen Region der Transferase (Hanisch et al., 1999; Bennett et al., 1998).

Hingegen zeigt die Glykosylierung des Substratpeptids mit *core*1-Disacchariden hemmende Effekte. Bei einer komplexeren Glykosylierung mit Sialinsäuren könnte sich der negative Einfluss verstärken.

ppGalNAc-T1 und ppGalNAc-T2 zeigen nicht die gleiche Glykosylierungsabhängigkeit wie ppGalNAc-T4. Für die *in vitro* Glykosylierung wurden die Peptide A4st, A10st, A13st und A14st eingesetzt (Abbildung 44) und mit ppGalNAc-T1 und/oder -T2 inkubiert.

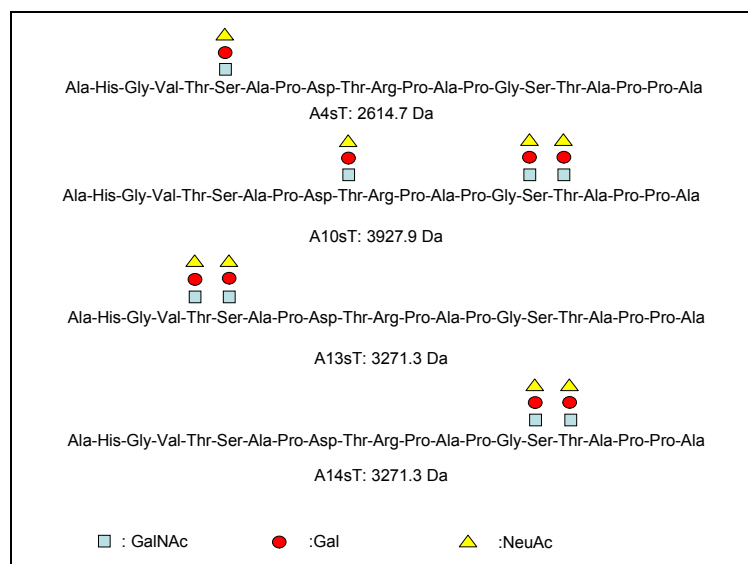


Abbildung 44: Strukturen der eingesetzten synthetischen Glykopeptide A4sT, A10sT, A13sT und A14sT.

Diese 21meren Peptide decken die Aminosäuresequenz eines MUC1-Tandemrepeats ab und unterscheiden sich in der Anzahl (1-3) der Trisaccharide (GalNAc-Gal-NeuAc) als auch in der Position (5) der Glykane auf der Peptidkette.

Nach 48stündiger Inkubation der Peptide mit den ppGalNAc-T1 oder ppGalNAc-T2 in Anwesenheit von UDP-GalNAc als Cosubstrat wurden die Proben über Zip-Tip-C₁₈-Säulen aufgereinigt und durch MALDI-TOF-MS analysiert. Die Auswertung ergab, dass auf allen Peptiden zusätzlich GalNAc addiert worden war (angezeigt durch das Masseninkrement + 203). ppGalNAc-T1 und ppGalNAc-T2 glykosylierten die Peptide in unterschiedlichem Maße. A14st wurde mit ppGalNAc-T1 stärker umgesetzt als mit ppGalNAc-T2. Es ist bekannt, dass ppGalNAc-T1 Threonin im VTSA-Motiv bevorzugt, wohingegen die Präferenz von ppGalNAc-T2 bei Threonin des GSTA-Motivs liegt (Wandall et al., 1997; Hanisch et al., 1999) (Abbildung 45).

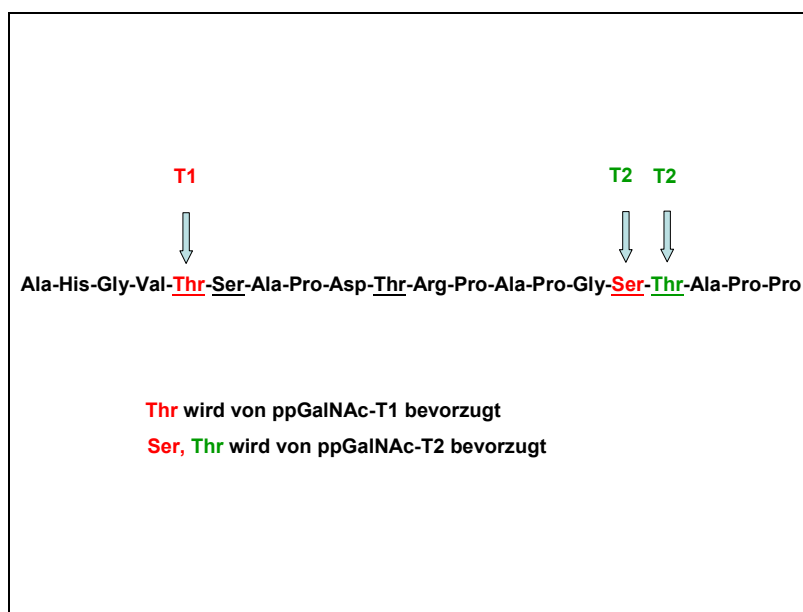


Abbildung 45: Unterschiedliche Präferenzen des Glykosylierungsortes von ppGalNAc-T1 und ppGalNAc-T2.

Es zeigte sich, dass die Initiationsereignisse nicht von der vorausgehenden Glykosylierung abhängig sind, da an alle Glykopeptide, unabhängig von der Struktur, GalNAc addiert werden konnte. Abweichungen der theoretischen, monoisotopischen Molekülmassen von den gemessenen Signalen rührten von der ungenauen Eichung des MALDI-TOF-MS her.

Da das Substrat A14sT an Serin und Threonin des GSTA-Motivs glykosyliert war, konnte nur Threonin des VTSA-Motivs glykosyliert werden. An alle drei Formen des Peptidsubstrates A14sT (asialo, monosialo, disialo), die in dem eingesetztem Gemisch vorlagen, konnte GalNAc addiert werden. Da ppGalNAc-T1 das VTSA-Motiv effektiver glykosyliert, war die Menge an Produkt größer als bei ppGalNAc-T2

(Abbildungen 46 und 47, Tabelle 9). Im Falle von A13sT war das Ergebnis entsprechend umgekehrt: Die Glykosylierungen des Substrates befanden sich im VTSA-Motiv, so dass zur weiteren Glykosylierung nur das GSTA-Motiv zur Verfügung stand. Daher war zu erwarten, dass ppGalNAc-T2 höhere Umsatzraten aufweisen würde als ppGalNAc-T1 (Abbildungen 48 und 49, Tabelle 10). Addition von GalNAc fand an der asialo, monosialo und disialo-Form von A13sT statt. Ähnliche Beobachtungen in Abhängigkeit der Glykosylierung des Substrats konnten auch bei den Glykopeptiden A10sT und A4sT gemacht werden (Abbildungen 50-53, Tabellen 11, 12). A4sT war das einzige Peptid, bei dem zwei GalNAc-Reste addiert wurden. Das könnte vermutlich daran liegen, dass das Glykopeptid als einziges monosubstituiert war.

T1 und T2 werden also durch vorangehende, komplexe Glykosylierung (sialyl-T) nicht inhibiert, d. h. eine weitere Aufglykosylierung (*follow-up glycosylation*) ist möglich. Litvinov und Hilkens (1993) zeigten ebenfalls, dass membranäres, unvollständig sialyliertes MUC1 exprimiert und anschließend mehrfach rezykliert und vollständig sialyliert wird.

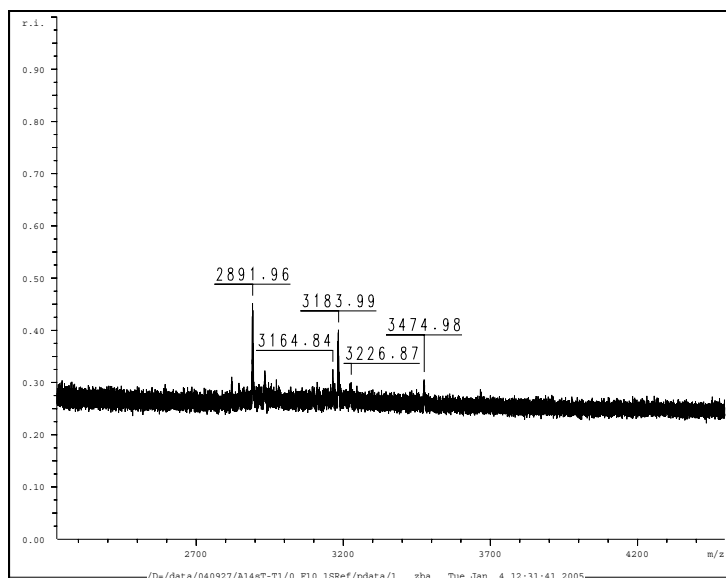


Abbildung 46: MALDI-TOF-MS Analyse nach Inkubation von A14sT mit ppGalNAc-T1.

Pseudomolekülon MH ⁺ Monoisotopische Masse (m/z)	Theoretische Pseudo- Molekülonen MH ⁺ Monoisotopisch	Zuordnung der Signale
2889, 9	2891, 9	A14sT – 2 NeuAc + GalNAc
3180, 9	3183, 2	A14sT- NeuAc + GalNAc
3268, 7	3271, 3	A14sT
3473, 2	3474, 5	A14sT + GalNAc

Tabelle 9: Identifizierung der Glykopeptide und Vergleich mit den berechneten Signalen.

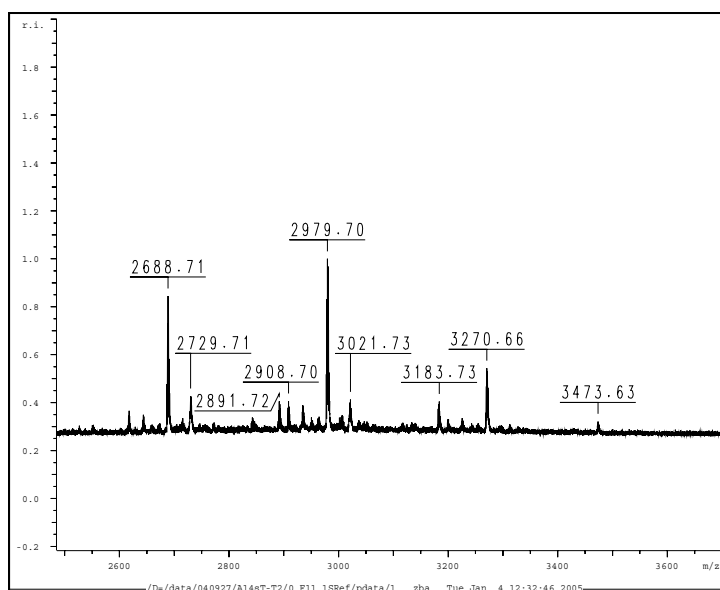


Abbildung 47: MALDI-TOF-MS Analyse nach Inkubation von A14sT mit ppGalNAc-T2.

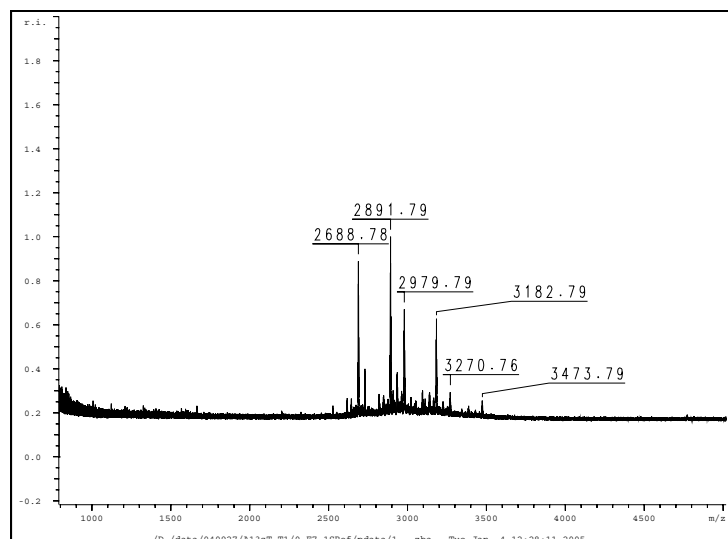


Abbildung 48: MALDI-TOF-MS Analyse nach Inkubation von A13sT mit ppGalNAc-T1.

Pseudomolekülon MH^+ Monoisotopische Masse (m/z)	Theoretische Pseudo- Molekülonen MH^+ Monoisotopisch	Zuordnung der Signale
2889, 8	2891, 9	A13sT -2 NeuAc + GalNAc
3180, 8	3183, 2	A13sT- NeuAc + GalNAc
3269, 7	3271, 3	A13sT
3472, 8	3474, 5	A13sT + GalNAc

Tabelle 10: Identifizierung der Glykopeptide und Vergleich mit den berechneten Signalen.

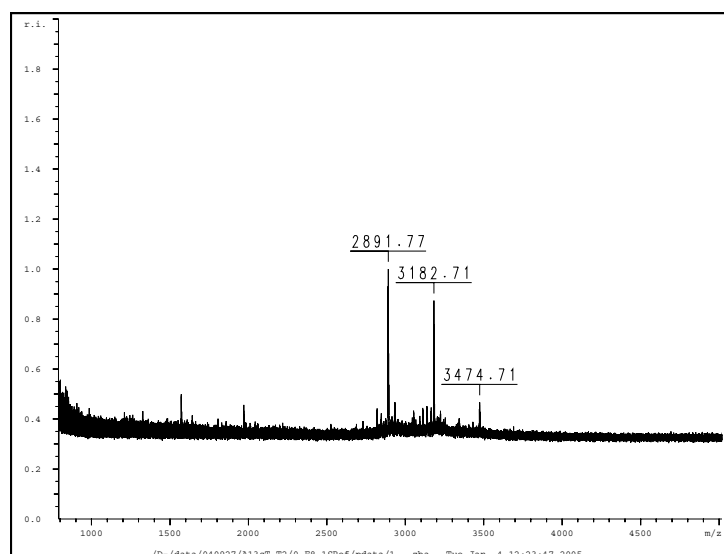


Abbildung 49: MALDI-TOF-MS Analyse nach Inkubation von A13sT mit ppGalNAc-T2.

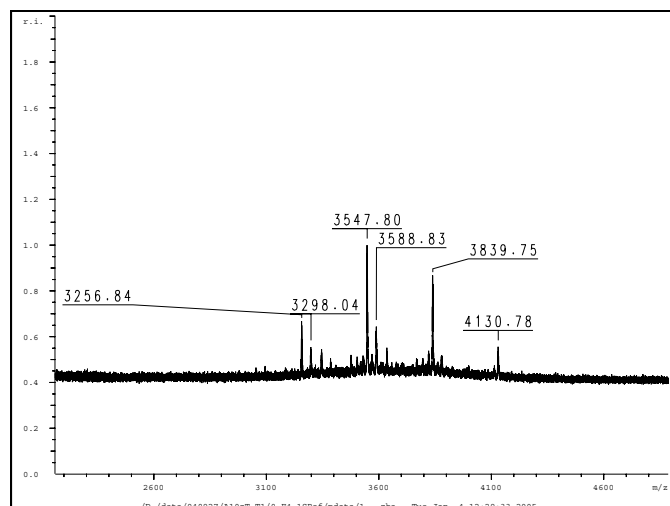


Abbildung 50: MALDI-TOF-MS Analyse nach Inkubation von A10sT mit ppGalNAc-T1.

Pseudomolekülion MH ⁺ Monoisotopische Masse (m/z)	Theoretische Pseudo- Molekülionen MH ⁺ Monoisotopisch	Zuordnung der Signale
3254, 7	3257, 2	A10sT – 3 NeuAc + GalNAc
3343, 8	3345, 3	A10sT - 2 NeuAc
3545, 9	3548, 5	A10sT - 2 NeuAc + GalNAc
3634, 8	3636, 6	A10sT - NeuAc
3836, 9	3839, 8	A10sT -NeuAc + GalNAc
3926, 6	3927, 9	A10sT
4128, 7	4131, 1	A10sT + GalNAc

Tabelle 11: Identifizierung der Glykopeptide und Vergleich mit den berechneten Signalen.

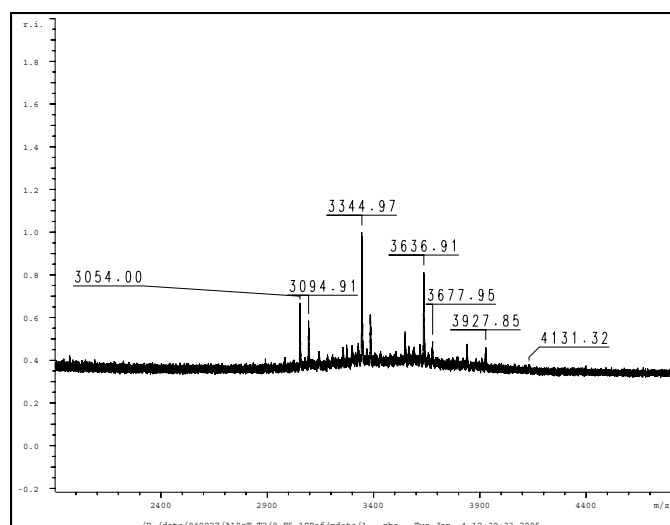


Abbildung 51: MALDI-TOF-MS Analyse nach Inkubation von A10sT mit ppGalNAc-T2.

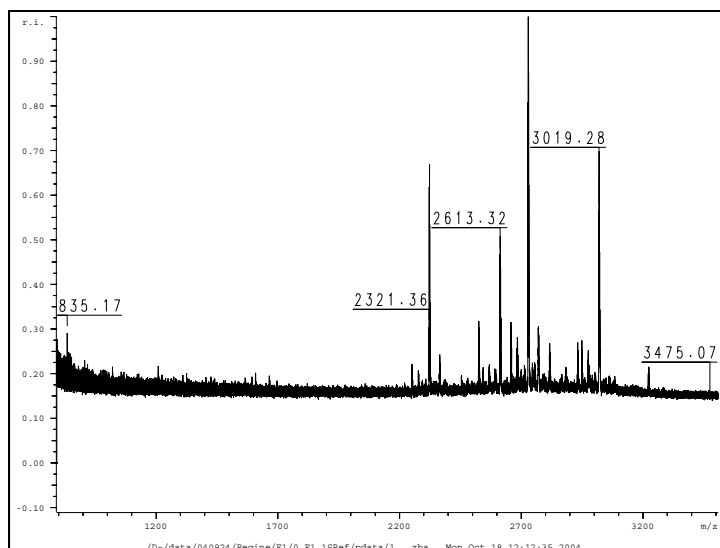


Abbildung 52: MALDI-TOF-MS Analyse nach Inkubation von A4sT mit ppGalNAc-T1.

Pseudomolekülon MH^+ Monoisotopische Masse (m/z)	Theoretische Pseudo- Molekülonen MH^+ Monoisotopisch	Zuordnung der Signale
2321, 4	2323, 4	A4sT - NeuAc
2524, 9	2526, 6	A4sT- NeuAc + GalNAc
2612, 9	2614, 7	A4sT
2728, 9	2729, 8	A4sT – NeuAc + 2 GalNAc
2815, 9	2817, 9	A4sT + GalNAc
3019, 9	3021, 1	A4sT + 2 GalNAc

Tabelle 12: Identifizierung der Glykopeptide und Vergleich mit den berechneten Signalen.

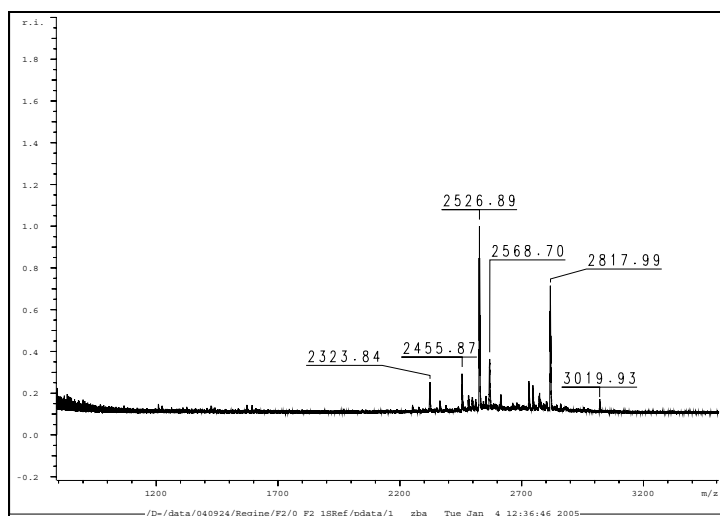


Abbildung 53: MALDI-TOF-MS Analyse nach Inkubation von A4sT mit ppGalNAc-T2.

Neben den erwarteten Signalen in den Spektren wurden solche registriert, die auf Unreinheiten der Ausgangspeptide zurückgehen. Jedes Substrat bestand aus einer Mischung unterschiedlich stark sialylierter Glykopeptide. Einige Spektren zeigten auch die acetylierte Vorstufe der Glykopeptide, deren De-O-Acetylierung nach Abschluss der Synthese nicht vollständig gelang.

3.2.2 Beeinflusst sialyl-T die core2-Synthese in benachbarten Positionen?

Mit diesem Experiment sollte geklärt werden, welchen Einfluss partiell elongierte Glykane wie sialyl-T auf die Synthese von core2-Strukturen in benachbarten Positionen ausüben.

Das Glykopeptid A14st war, wie oben erwähnt, ein heterogenes Gemisch aus asialo-, monosialo- und disialo-Komponenten. Darüber hinaus stand die abgetrennte monosialo-Komponente des Glykopeptids A14st zur Verfügung. Hierbei konnte zwischen den beiden unterschiedlichen Strukturen des A14st-NeuAc nicht unterschieden werden (Abbildung 54).



Abbildung 54: Strukturen der eingesetzten synthetischen Glykopeptide A14st-NeuAc

Das core1-Disaccharid (Gal β 1-3GalNAc) des Monosialylglykopeptids stellt das erwartete Substrat für C2GnT3 dar. Nach 16h Inkubation mit C2GnT3 wurden die

Produkte durch MALDI-TOF-MS-Analyse untersucht. Das Signal bei 3183 wies auf die Addition von einem GlcNAc-Rest (N-Acetylglucosamin) hin (Abbildung 55, Tabelle 13). Daraus kann geschlossen werden, dass negative Einflüsse komplexerer Glykane wie des sialylierten Trisaccharids auf die core2-Synthese in benachbarten Positionen keine große Rolle spielen.

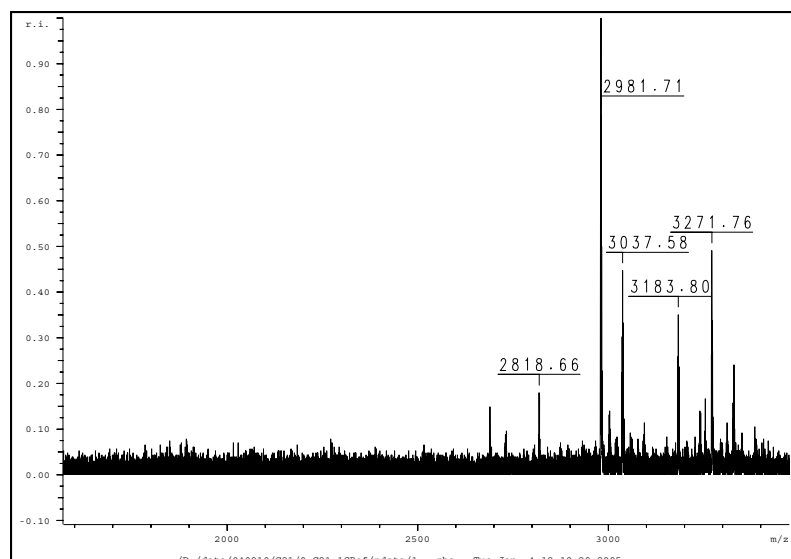


Abbildung 55: MALDI-TOF-MS Analyse nach Umsetzung der Monosialyl-Komponente von A14st mit C2GnT3.

Das Signal bei 3183 wies trotz vorhandener Sialylgruppe auf die Addition von GlcNAc hin.

Pseudomolekulare Ionen MH^+ Hauptsignal (m/z)	Theoretische Pseudo- Molekülionen MH^+ Monoisotopisch	Zuordnung der Signale
2979, 8	2980, 0	A14sT – NeuAc (MSP)
3182, 7	3183, 2	A14sT- NeuAc + GlcNAc
3270, 8	3271, 3	A14sT

Tabelle 13: Identifizierung der Glykopeptide und Vergleich mit den berechneten Signalen.

4. Diskussion

4.1 Aufklärung von Regulationsmechanismen der O-Glykan Core-Biosynthese auf rekombinanten MUC1 Glykosylierungssonden *in vivo*

Die O-Glykosylierung von Mucinen wurde bereits für eine Anzahl von Organen und gewebs-spezifischen Sekreten untersucht. Glykane auf laktierendem, humanem Brustepithel beruhen auf *core1* und *core2*-basierenden Polylactosaminen mit einem hohen Anteil an Fucose (Hanisch et al., 1989, 1990). Andere Mucine wie die des bronchialen Epithels exprimieren *core3*- und *core4*-basierende Strukturen (Breg et al., 1988). Im Dickdarm scheint *core3* die Hauptkomponente zu sein (Podolski, 1985a, 1985b). Weitere organ-spezifische Merkmale entstehen durch die Kettenlänge und Verzweigungsmuster der Polylactosamin-Ketten. In maligne transformierten Zellen kann sich das Glykosylierungsprofil ändern. Ein Beispiel hierfür ist die Veränderung der O-Glykosylierung auf einigen Brustkrebszelllinien (z.B. T-47D) von *core2*-basierenden Polylactosaminen (laktierendes, humanes Brustepithel) zu dominierenden sialylierten *core1*-Strukturen. Der Grund hierfür ist die starke Reduzierung oder Abwesenheit der C2GnT-Aktivität (Brockhausen et al., 1995). Die Vorläuferstrukturen GalNAc und Gal β 1-3GalNAc akkumulieren und können von α 6GalNAcST oder durch die überexprimierte α 3GalST sialyliert werden. Mit diesem Schritt wird ein biosynthetisches Stop-Signal eingeführt, da eine weitere Elongation und somit auch die *core2*-Bildung durch C2GnT blockiert werden. Während α 6GalNAcST und C2GnT um die gleiche Substratposition konkurrieren, blockiert α 3GalST an der terminalen Galactose (indirekte Konkurrenz). Entgegen den Erwartungen sezernieren einige Mammakarzinomzelllinien Mucine bzw. MUC1-Sonden, deren Glykane überwiegend auf *core2*-Trisacchariden basieren wie MCF-7, ZR75-1, und MDA-MB231 (Müller et al., 2002). Eine Erklärung lieferten jüngste Erkenntnisse an Zellmodellen unter Einsatz membranständiger MUC1-Sonden (Engelmann et al., eingereicht), nach denen die O-Glykosylierung nicht nur vom Zelltyp und dem Differenzierungszustand, sondern auch vom „Trafficking“ des Glykoproteins abhängig ist. Die Konkurrenz von Glykosyltransferasen auf Initiations- bzw. Elongationsebene kann als epigenetischer Parameter neben der Peptidsequenz

einen regulatorischen Einfluss auf die Orte der Glykosylierung und die Struktur der Glykane ausüben.

In vitro wurde gezeigt, dass die von C2GnT-Transferasen katalysierte *core2* Synthese durch eine vorangehende α 2,3 Sialylierung der *core1*-Galactose inhibiert wird (Kuhns et al., 1993; Brockhausen et al., 1998; Brockhausen et al., 1999).

Um diese Theorie *in vivo* zu untersuchen, wurde ein zelluläres Modell gewählt, das einerseits keine funktionelle C2GnT exprimiert und andererseits Möglichkeiten der Einflussnahme auf den Glykosylierungsstatus bietet. Durch Kotransfektion einer rekombinanten C2GnT sollte in diesen Zellen eine direkte Konkurrenz zwischen der *core2*-Glykosyltransferase 3 (C2GnT3) und der Sialyl-6-*core1*-Transferase (α 6GalNAcST) und eine indirekte Konkurrenz von C2GnT3 mit Sialyl-3-*core1*-Transferase (α 3GalST) nachgewiesen werden.

IdID-Zellen sind durch ein defektes UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc-Epimerase-Gen (CHO-IdID-Zellen) gekennzeichnet und ermöglichen damit eine externe Kontrolle der O-Glykosylierung durch Zuckersupplementierung. Die O-Glykosylierungs-defizienten Zellen sind ohne externe Zugabe von Gal und GalNAc nicht in der Lage, Proteine mit O-Glykanen zu exprimieren (Abbildungen 56, 57). Über Wiederverwertungsreaktionen (*salvage pathway*) jedoch können exogen zugegebene Zucker wie Gal und GalNAc in die Zuckernukleotide UDP-Gal bzw. UDP-GalNAc umgewandelt und in die Golgi-Kompartimente transportiert werden und stehen dann für die Addition an Glykoproteine zur Verfügung.

Die defekte Epimerase ist nicht nur Ursache einer eingeschränkten Glykosylierung, sondern auch für die Bildung eines abnormen, Glykosylierungs-defizienten LDL-Rezeptors verantwortlich (Kingsley et al., 1986). Der Mangel an O-gebundenen Glykanen verursacht entweder eine Retention des Rezeptors im Golgi oder eine transiente Oberflächenexpression, der eine beschleunigte Endocytose und intrazelluläre Akkumulation folgt (Kozarsky et al., 1988; Remaley et al., 1991; Reddy et al., 1999).

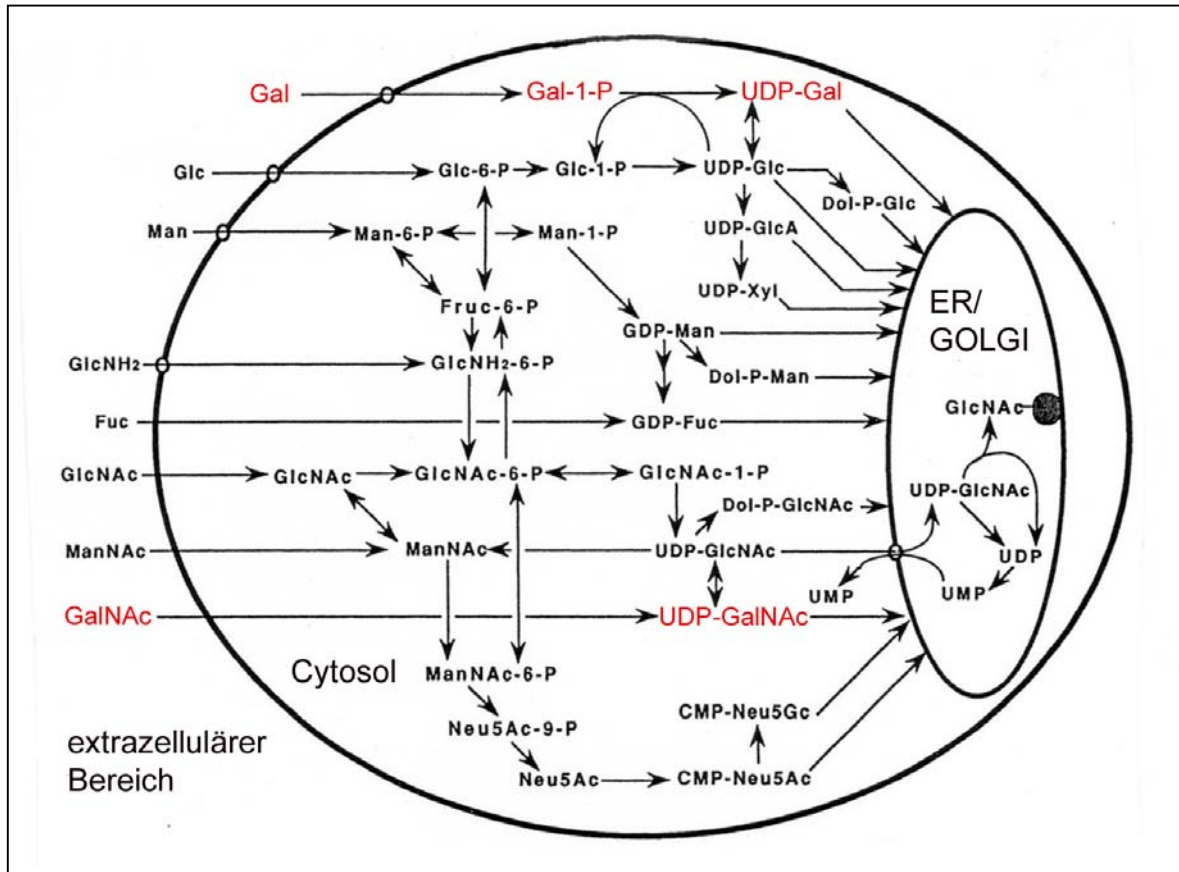


Abbildung 56: Metabolismus der Monosaccharide und ihrer aktivierten Derivate.

Die Zuckernukleotide sind die Donorgruppen für die Addition von Glucose, Galactose, Mannose, Fucose, N-Acetylglucosamin, N-Acetylgalactosamin und Sialinsäurereste an die Kohlenhydratkette von Glykolipiden, Glykoproteinen und Proteoglykanen (Schachter und Roseman, 1980). Unter normalen Bedingungen der Kultivierung werden die Zuckernukleotide aus Glucose synthetisiert (Schachter und Rodén, 1973). Über Wiederverwertungsreaktionen (*salvage pathway*) können aus exogenem Gal und GalNAc UDP-Gal und UDP-GalNAc synthetisiert werden. (Modifikation nach Varki, 1994)

Neben dem Defekt der UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc-Epimerase ist auch die Umwandlung von UDP-Glc in UDP-Gal betroffen. Im Gegensatz zur Epimerase der Säugetiere wirkt sich dieser Defekt bei *E. coli* nur auf die Konvertierung von UDP-Galactose in UDP-Glucose aus (Thoden et al., 2001). Aufgrund des Einflusses der Epimerase auf alle vier UDP-Zucker (z. B. bei CHO-Zellen) wird diesem Enzym eine Schlüsselrolle im Sinne eines Kontrollpunktes zugeordnet. Dadurch wird das Mengenverhältnis der Schlüsselsubstrate (UDP-Glc/UDP-Gal und UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc), die für die Synthese von Glykogen, Glycosaminylglykanen, Proteoglykanen, Glykoproteinen und Glykolipiden benötigt werden, kontrolliert (Schulz et al., 2005). Beim Menschen wird eine Störung der Epimerase als

Galactosamie bezeichnet und beschränkt sich in den meisten Patienten auf weiße und rote Blutzellen (Holton et al., 2001). Die schwere Form von Galactosamie führt unter anderem zur mentalen Defizienz. Selbst die stärker betroffenen Patienten haben keine völlige Epimerasedefizienz (Wohlers et al., 1999; Wohlers und Fridovich-Keil, 2000; Kingsley et al., 1986). Obwohl die Basis für dieses biochemische und klinische Spektrum des Epimerasedefektes unbekannt bleibt, zeigen Studien der entsprechenden Sequenzen signifikante Variabilitäten (Quimby et al., 1997, Wohlers et al., 1999; Wohlers und Fridovich-Keil, 2000; Henderson et al., 2001; Wasilenko et al., 2004).

Die vorliegende Arbeit sollte unter anderem zeigen, dass die Anwesenheit von GalNAc in IdID-Zellen eine Initiierung der O-Glykosylierung durch endogene Polypeptid:GalNAc-Transferasen (ppGalNAc-Ts) ermöglicht, während der Zusatz von Gal eine *core1*-Synthese erlauben sollte. Abweichend von diesen Erwartungen synthetisieren IdID-Zellen nach den in dieser Arbeit referierten Befunden verkürzte O-Glykane, die tumorassoziierten O-Glykan-Formen, mono- und disialylierte *core1*-Strukturen, entsprechen auch dann, wenn sie nur mit GalNAc supplementiert werden. Das Glykanprofil von IdID-Zellen in Anwesenheit von Gal und GalNAc sollte dem der Wildtyp-CHO-Zellen entsprechen. Hierbei war entscheidend, dass Galactose in einer Konzentration unter 0,125 mM eingesetzt wurde, da es sonst zu einer Beeinträchtigung des Wachstums kommt (Krieger et al., 1989), die auf eine Akkumulation an Gal-1P und UDP-Gal zurückzuführen ist. Letzteres führt zur Erschöpfung des UDP-Pools und damit an Uridin. UTP wird für die Synthese von UDP-Glc und UDP-GlcNAc benötigt und steht damit nicht mehr für die reguläre N-/O-Glykosylierung zur Verfügung. Die Galactosesensibilität ist unabhängig von der UDP-GalNAc-Defizienz und daher unabhängig von O-Glykosylierungsdefekten. Durch Supplementierung von Uridin kann die Galactose-spezifische Sensibilität aufgehoben werden (Schulz et al., 2005).

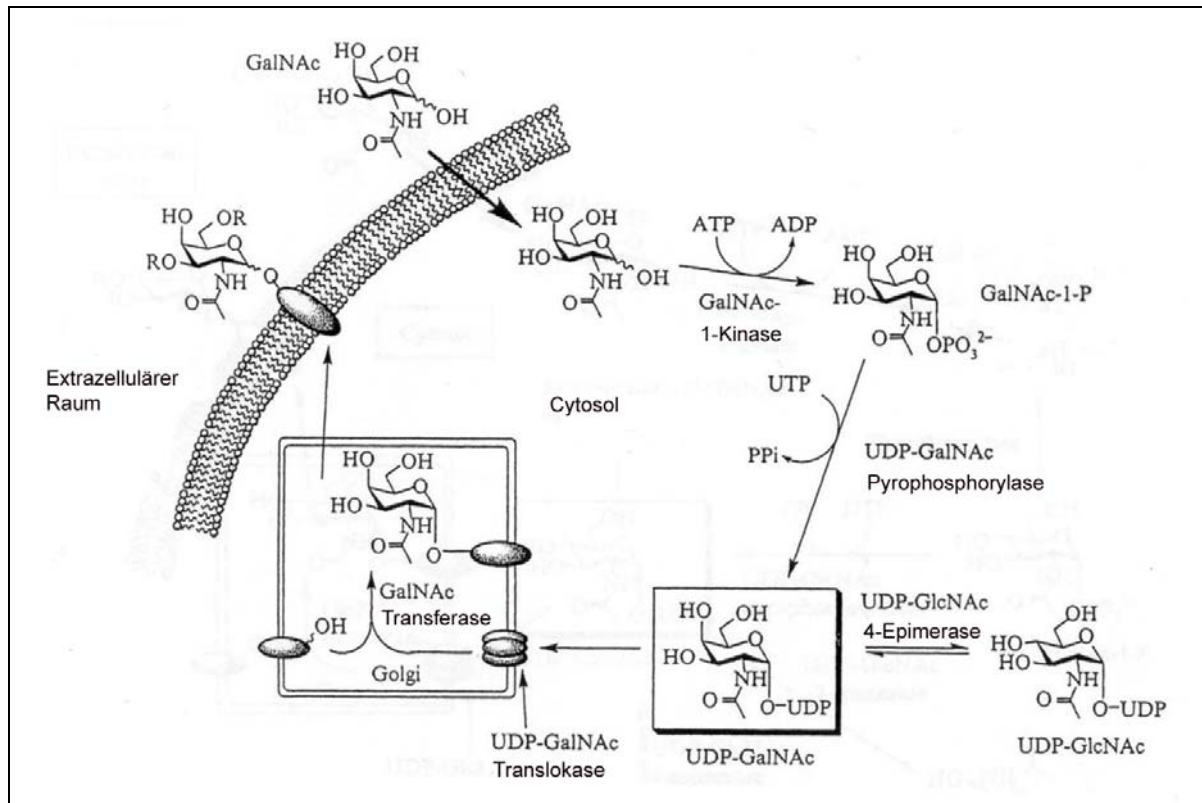


Abbildung 57: N-Acetylgalactosamin (GalNAc) salvage pathway und UDP-GalNAc Biosynthese.

GalNAc wird durch die Zellen aufgenommen und mittels GalNAc-1-Kinase phosphoryliert. GalNAc-1-Phosphat (GalNAc-1-P) wird durch die UDP-GalNAc Pyrophosphorylase in UDP-GalNAc umgewandelt. UDP-GalNAc wird in die Golgi-Kompartimente transportiert und in Glykokonjugaten inkorporiert. Die UDP-GlcNAc-4-Epimerase verbindet die GalNAc und GlcNAc Stoffwechselwege. In IdID-Zellen ist diese Epimerase defekt.

Modifikation nach Luchansky et al., 2003

In unseren Experimenten zeigte der *Western-Blot* von Glykoproteinen aus IdID-Zellen, die mit MUC1-S transfiziert, jedoch ohne Supplementierung von Zuckern kultiviert wurden, eine Bande bei etwa 29 kDa. Da das Fusionsprotein normalerweise ein Molekulargewicht von 20 kDa haben sollte, könnte die Bande bei 29 kDa ein Hinweis auf eine rudimentäre Glykosylierung sein. Die aus Zellüberständen isolierbare Menge war jedoch nicht ausreichend, um das Glykanprofil des MUC1-S (IdID)-ohne Zuckersupplementierung zu erstellen.

Eine Supplementierung mit GalNAc und Gal im *Western-Blot* führte aufgrund der rekonstituierten O-Glykosylierung zu einer apparenten Molekulargewichtverschiebung von 29 kDa auf 40-80 kDa.

Die erfolgreiche Kotransfektion mit C2GnT3 konnte sowohl durch Nachweis des Gens als auch durch einen enzymatischen Test unter Einsatz eines Mikrosomenpräparates nachgewiesen werden. Der hohe Hintergrund deutete auf die

endogene Existenz von *core2*-Transferase hin, welche auch bereits beschrieben wurde (Datti und Dennis, 1992). Nach der Kotransfektion mit C2GnT3 konnte für MUC1-S (C2GnT3, IdID)-GalNAc ein apparentes Molekulargewicht zwischen 31-45 kDa und für MUC1-S (C2GnT3, IdID)-Gal/GalNAc eines zwischen 31-60 kDa gemessen werden. Die Molekulargewichte der Glykoproteinbanden liegen damit nach Kotransfektion unterhalb derer der nicht kotransfizierten Proben, was unter Umständen auf eine verminderte Glykandichte unter dem Einfluss der *core2*-Synthese zurückgeht. Diese Proben sind hinsichtlich ihrer Glykosylierung vergleichbar mit Milch-MUC1, welches für die Expression von *core2*-Strukturen und eine niedrige Glykandichte bekannt ist (Müller et al., 1997). Auf Karzinom-assoziiertem MUC1 (T-47D) hingegen wurde eine hohe Glykandichte und die Abwesenheit von *core2*-Strukturen gefunden (Müller et al., 1999).

Hinweise auf eine schwache Glykosylierung bei fehlender Zuckersupplementierung ergab auch der *Western-Blot* für MUC4-S (IdID). Das Fusionsprotein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 22 kDa, im *Western-Blot* jedoch konnte eine Bande bei 40 kDa detektiert werden. Auch hier gelang das Erstellen eines Glykanprofils auf Grund zu geringer Glykanmengen nicht. Die Immunblots sowohl der MUC1- als auch der MUC4-Sonde, die in Abwesenheit von Zuckern in IdID-Zellen kultiviert wurden, zeigen durch die unerwarteten Verschiebungen zu höheren Molekulargewichten möglicherweise eine nicht völlig ausgeschaltete UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc-Epimerase an. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, dass Glykane aus Serumglykoproteinen aufgenommen worden waren.

Die mangelhaften Ausbeuten bei Proben, die ohne Supplementierung von Zuckern generiert wurden, könnten direkt mit der Unterglykosylierung des Fusionsproteins in Zusammenhang stehen (Proteolyse-sensibilität). Dagegen kommen Mechanismen einer Reinternalisierung, wie sie für Membranglykoproteine beschrieben wurden, als Erklärung nicht in Frage. Die Abhängigkeit der Membran-Expression von der O-Glykosylierung wurde durch Remaley et al. (1991) aufgezeigt. Unter Verwendung des Sialoglykoproteins Glycophorin A in IdID-Zellen in Abwesenheit von Zuckern konnte nur eine schwache Oberflächenexpression nachgewiesen werden. Bereits die Kultivierung in Anwesenheit von GalNAc und damit die Bildung von verkürzten Glykanen, führt zu einer starken Expression (Remaley et al., 1991). Auch z. B. die Sekretion von salz-abhängiger Lipase in der Bauchspeicheldrüse (bile salt-dependent lipase, BSDL) von Ratten ist abhängig von der O-Glykosylierung

(Bruneau et al., 1997). Aufgrund des O-Glykosylierungsdefektes in IdID-Zellen wird nur eine geringe Menge an BSDL sekretiert, was auf eine intrazelluläre Degradation von BSDL hinweisen könnte (Bruneau et al., 1997).

Das O-Glykanprofil von MUC1-S (IdID)-GalNAc/Gal zeigte vorwiegend sialylierte *core1* Trisaccharide (Sialyl-3-*core1* NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc, 50 %) und war daher vergleichbar mit dem der Wildtyp-Zellen (CHO-Zellen, Bäckström et al., 2003). Auch MUC1-S (IdID)-GalNAc war entgegen den Erwartungen durch eine dominante Expression sialylierter *core1*-Strukturen gekennzeichnet. Die Zugabe von GalNAc dürfte weder zu *core1* (Gal β 1-3GalNAc) noch zu dessen sialylierten Derivaten führen, da keine Galactose im Stoffwechsel vorhanden sein sollte. Daher ist unter Umständen davon auszugehen, dass die defekte UDP-Glucose/UDP-Galactose-4-Epimerase (entspricht UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc Epimerase) eine geringe Restaktivität aufweist oder dass Zucker der Serumglykoproteine (FKS) als Galactosequelle fungieren. Der relative Anteil an *core1* Gal β 1-3-GalNAc nahm von 9,7% bei GalNAc-Supplementierung auf 31% bei Gal und GalNAc-Supplementierung zu, was durch das zusätzliche Angebot an Gal im Medium zu erklären ist. Allerdings nahm der Anteil an Sialyl-6-*core1* (NeuAc α 2-6(Gal β 1-3)GalNAc, von 19% auf 3%) und Disialyl-*core1* (NeuAc α 2-6(NeuAc α 2-3Gal β 1-3)GalNAc, von 16% auf 2%) verglichen mit der GalNAc-Probe stark ab.

Kennzeichnend für das Profil der C2GnT3-Kotransfektanten bei Supplementierung mit Gal und GalNAc war das *core2*-Tetrasaccharid Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc (29,8%), das Sialyl-3 *core2*-Derivat NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc (22,8%) und das Disialyl-*core2*-Derivat NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(NeuAc(2-3)Gal β 1-3)GalNAc (1,5%). Bei der Bildung von *core2*-Strukturen wird ein N-Acetylglucosaminyrest an C6 des GalNAc in der *core1*-Struktur übertragen. Kompetitiv kann an die Galactose der *core1*-Struktur Sialinsäure durch α 3GalST addiert werden. Einen Hinweis auf eine Konkurrenz zwischen C2GnT3 und α 3GalST lieferte die Abnahme von Sialyl-3-*core1* nach Kotransfektion (von 51,1% auf 40,3%). Auch eine direkte Konkurrenz aufgrund einer Konkurrenz um die gleiche Substratposition zwischen C2GnT3 und α 6GalNAcST konnte durch eine Abnahme des Sialyl-6-T (von 2,9% auf 1,6%) gezeigt werden.

Durch Synthese von *core2*-Strukturen wird eine Verlängerung der Kohlenhydratkette gefördert, während die Addition einer Sialinsäure die Verlängerung der

Kohlenhydratketten stoppt. Die *core2*- β 1,6 N-Acetylglucosaminyltransferase dominiert im *cis*-Golgi, während eine geringere Expression im medialen/trans-Golgi detektiert wird. Die *core1*- α 2,3 Sialyltransferase hingegen ist vorwiegend im medialen/trans-Golgi nachweisbar; im *cis*-Golgi ist die Expression geringfügig (Dalziel et al., 2001). Deshalb wäre theoretisch die Möglichkeit gegeben, dass *in vivo* keine Konkurrenz zwischen den genannten Glykosyltransferasen stattfindet.

Das O-Glykanprofil bei Reduzierung auf alleinige GalNAc-Supplementierung der Kotransfektanten war von Sialyl-3-*core1* (59,6%) dominiert und zeigte einen hohen Anteil an Disialyl-*core1* (21,3%) und *core1* (14,1%).

Überraschenderweise konnten in diesem Profil keine *core2*-Strukturen identifiziert werden. Eine fehlende *core1*-Synthese kann nicht als Erklärung dienen, denn aus dem Glykanprofil der MUC1-S-transfizierten Zellen konnte die Bildung von *core1*-Strukturen nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung könnte der niedrige Gal-Pool in IdID-Zellen sein, welcher entweder durch FKS oder eine Restaktivität der Epimerase entstanden ist. Eine Erklärungsmöglichkeit für den Befund, dass bei GalNAc-Supplementierung trotz gebildeter *core1*-Strukturen kein *core2* nachweisbar ist, beruht auf kompetitiven Einflüssen. Aufgrund einer geringen Menge an *core1*-Substrat könnten die Sialyltransferasen vermutlich stärker exprimierte α 3GalST und α 6GalNAcST mit C2GnT3 um das Substrat konkurrieren. Im Falle der Gal/GalNAc-Supplementierung wäre dann genügend *core1*-Substrat vorhanden und eine mögliche Konkurrenz nicht mehr so offensichtlich.

Der Vergleich mit den nicht kotransfizierten Zellen ergab eine Zunahme an *core1* und Sialyl-3-*core1* als auch eine Abnahme an Sialyl-6-T und Disialyl-*core1* in den Kotransfektanten. Diese Schwankungen sind nicht direkt erklärbar, da der einzige Unterschied in der Kotransfektion mit C2GnT3 lag, welcher im Falle der GalNAc-supplementierten Zellen zu keinerlei Veränderungen des O-Glykanprofils führen sollte. Bemerkenswert im O-Glykanprofil der Kotransfektanten ist grundsätzlich die Existenz von *core1* und *core1*-Derivaten, wie Sialyl-3-*core1* und Disialyl-*core1*. Alle drei Strukturen sollten in IdID-Zellen wie bei den einfach transfizierten Zellen in Abwesenheit von Gal nicht entstehen. Auch dieses Profil kann als ein Hinweis auf eine nicht ganz ausgeschaltete UDP-GlcNAc/GalNAc-Epimerase gedeutet werden. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass die im Medium enthaltenen Glykoproteine des FKS als Galactosequelle dienen. Auch Huang und Snider (1993) vermuten, dass IdID-Zellen aus Glykoproteinen im Serum Glykane beziehen können.

Bruneau et al. (1997) beobachteten jedoch, dass auch bei Kultivierung von IdID-Zellen mit 0,5% FKS ein Einbau von Galactose erfolgt und somit O-Glykoproteine, die sekretiert werden, unabhängig von den Zellkulturbedingungen galactosyliert sein könnten. Remaley et al. (1991) zeigten weiterhin, dass IdID-Zellen bereits bei Supplementierung mit Gal zur O-Glykosylierung befähigt sind. Somit stellen IdID-Zellen kein sicheres Modell zur Untersuchung der Regulation der O-Glykosylierung dar, es sei denn, die Hypothese eines nicht vollständigen Epimerase-Ausfalles könnte widerlegt werden. In diesem Fall wäre eine externe Galactose-Aufnahme unter serumfreien Bedingungen auszuschließen.

4.2 *In vitro*-Studien zur Aufklärung kompetitiver Effekte in der O-Glykan-Biosynthese

4.2.1 Einfluss der sialyl-T-Struktur auf die core2-Synthese in benachbarten Positionen

Bisher ist bekannt, dass spezifische Glykosyltransferasen wie die Polypeptide GalNAc-T nicht auf bestimmte Golgi-Kompartimente beschränkt sind, sondern eine diffuse Verteilung auf den cis- bis trans-Golgi zeigen (Rottger et al., 1998). Jedoch geht man davon aus, dass C2GnT1 vorwiegend im cis- und α 3GalST-I im medialen- und trans-Golgi exprimiert werden. Trotzdem ist α 3GalST in der Lage, effektiv mit C2GnT1 um das *core1* Substrat *in vivo* zu konkurrieren, wenn die Sialyltransferase stark exprimiert wird (Dalziel et al., 2001). *In vitro* wurde gezeigt, dass die von C2GnT-Transferasen katalysierte *core2* Bildung durch vorangehende α 2,3 Sialylierung von *core1* inhibiert wird (Kuhns et al., 1993; Brockhausen et al., 1998; Brockhausen et al., 1999).

Die Fragestellung hinter dieser Untersuchung ergab sich aus der Vermutung, dass bereits vorhandene sialyl-T-Strukturen die Aktivität der C2GnT3 in benachbarten Positionen des Peptidsubstrates negativ beeinflussen können. Das Monosialoprodukt des synthetischen Glykopeptids A14sT AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA, glykosyliert mit Gal-GalNAc und NeuAc-Gal-GalNAc (Abbildung 54) wurde mit der *core2*-Transferase-T3 (C2GnT3) umgesetzt. Auf Grund des gefundenen Massensignals bei m/z 3183 im MALDI-MS-

Spektrum konnte die Addition von GlcNAc nachgewiesen werden. Sialyl-T in räumlicher Nachbarschaft potentieller Glykosyltransferasen-Substrate hat demnach keinen vollständig inhibierenden Einfluss auf die Elongation der T-Struktur durch C2GnT3.

4.2.2 Einfluss sialylierter O-Glykane (sialyl-T) auf die Initiation durch ppGalNAc-Transferasen-T1 und -T2 (Nachbareffekte)

Von ppGalNAc-T4 ist bekannt, dass GalNAc-Substituenten des Peptidsubstrates die Aktivität der Transferase stark positiv beeinflussen. Vermutlich interagiert vorhandenes GalNAc mit der Lektindomäne in der C-terminalen Region der Transferase (Hanisch et al., 1999; Brockhausen et al., 1996).

Core1-Disaccharide hingegen zeigen einen negativen Einfluss auf die Initiierung der Glykosylierung durch ppGalNAc-T4. Diese antagonistischen Effekte könnten im Sinne einer Competition zwischen der initiierenden O-Glykosylierung und der core-Glykansynthese eine Rolle im Golgi spielen. Damit könnte die Aktivität der Glykosyltransferasen Einfluss auf die Dichte der O-Glykosylierung auf Peptiden nehmen. Ein Beispiel hierfür sind die langen Glykanketten geringer Dichte auf MUC1-S in Brustmilch (Müller et al., 1997) verglichen mit den kurzen sialylierten Ketten hoher Dichte im Brustkrebs (Müller et al., 1999).

Es gibt Hinweise, dass die ppGalNAc-T1 und -T2 weniger distinkt im Golgi lokalisiert sind (Nilsson et al., 1993) und Initiationsreaktionen auch zu einem späteren Stadium erfolgen können. Somit stellt sich die Frage, ob sialylierte Glykane, wie sie im trans-Golgi entstehen, Einfluss auf die Initiation der O-Glykosylierung haben. Hierfür wurden die Glykopeptide A4sT, A10sT, A13sT und A14sT als *in vitro*-Substrate verwendet, die unterschiedliche Glykoformen (sialyl-T) der gleichen MUC1-Repeatsequenz darstellen. Durch Umsatz mit ppGalNAc Transferasen 1 und 2 sollte der ortsspezifische Einfluss der Glykosylierung in verschiedenen Positionen der MUC1-Sequenz untersucht werden. Dabei sollte sich auch der Umstand auswirken, dass die Transferasen unterschiedliche Orts-Präferenzen aufweisen: Während ppGalNAc-T1 vorwiegend Threonin des VTSA-Motivs glykosyliert, bevorzugt ppGalNAc-T2 Serin und Threonin im GSTA-Motiv. Der Grund hierfür liegt in den Konformationen der Peptidregion, welche eine mögliche Glykosylierungsstelle

flankieren. ppGalNAc-T1 erkennt ausgedehnte Peptidkonformationen, wohingegen ppGalNAc-T2 Polyprolin Typ II-helikale Konformationen bevorzugt (Kinarsky et al., 2003). Demnach konnte angenommen werden, dass ppGalNAc-T1 stärker die Glykopeptide A14sT und A10sT glykosyliert, während ppGalNAc-T2 höhere Umsatzraten bei den Glykopeptiden A13sT und A4sT zeigen sollte. Diese Erwartungen wurden weitgehend bestätigt. Insgesamt zeigte sich, dass sialyl-T in verschiedenen Positionen des MUC1-Repeatpeptids keinen vollständig inhibitorischen Effekt auf nachfolgende Initiationsereignisse hat. Diese Erkenntnisse aus *in vitro*-Versuchen könnten wichtige Erklärungshilfen bei der Interpretation von Rezyklisierungsexperimenten sein, die gezeigt haben, dass membranständige MUC1-Glykosylierungs sonden bei mehrfacher Rezyklisierung durch das Trans-Golgi-Netzwerk eine weitergehende Glykosylierung erfahren (Engelmann et al., eingereicht). Die Rezyklisierung von membranären Glykoproteinen wurde unter anderem auch von Huang und Snider (1993) bewiesen. Hierbei lag der Focus auf dem Kompartiment im Golgi, welches Galactosyltransferase enthält. Des Weiteren zeigten die Autoren, dass die rezyklierten Glykoproteine erst ein trans-Kompartiment mit Galactosyltransferase erreichen und anschließend in ein trans-Kompartiment mit Sialyltransferase transportiert werden. 12-25% der membranären Glykoproteine im trans-Golgi-Kompartiment, welches Galactosyltransferase enthält, werden rezykliert.

Auch *in vitro* scheint eine vorliegende O-Glykosylierung, zumindest im Falle der ubiquitären ppGalNAc-T1 und-T2, keinen vollständig inhibierenden Effekt auf benachbarte Initiationsreaktionen zu haben. Da ppGalNAc-T1 und ppGalNAc-T2 nicht auf den cis-Golgi beschränkt sind, sondern eine breite Verteilung über das gesamte Golgi-System aufweisen, ist anzunehmen, dass auch im trans-Golgi GalNAc an das Peptidsubstrat addiert wird.

5. Zusammenfassung

Durch Expression der MUC1-Glykosylierungssonde (MUC1-S) in IdID-Zellen konnte die O-Glykosylierung unter differentiellen Supplementierungsbedingungen *in vivo* untersucht werden. Die aus Kulturüberständen über Ni-Chelat-Affinitätschromatographie isolierten Fusionsproteine wurden durch Umkehrphasen-HPLC gereinigt und im Western-Blot analysiert. Die Glykane der Fusionsproteine wurden durch Hydrazinolyse freigesetzt, mit 2-Aminobenzamid markiert und auf einer Aminophasen-Säule aufgetrennt, um quantitative O-Glykanprofile zu registrieren.

Das Glykosylierungsprofil der CHO-abgeleiteten IdID-Zellen war durch dominante Expression sialylierter core1-Strukturen, im Besonderen der Hauptkomponente NeuAca α 2-3Gal β 1-3GalNAc gekennzeichnet, und ähnelte damit dem der Wildtyp CHO-Zellen. Das Auftreten von core1-Strukturen (Gal β 1-3GalNAc, NeuAca α 2-3Gal β 1-3GalNAc, NeuAca α 2-6(Gal β 1-3)GalNAc und NeuAca α 2-6(NeuAca α 2-3Gal β 1-3)GalNAc) bei GalNAc-Supplementierung entspricht nicht den Erwartungen, da ein vollständiger Ausfall der UDP-Glc/GlcNAc:UDP-Gal/GalNAc-Epimerase keine Gal-Synthese ermöglichen sollte. Gegenüber Fusionsproteinen GalNAc-supplementierter Zellen verringerte sich der Sialylierungsgrad bei Supplementierung mit Gal und GalNAc.

Nach Kotransfektion mit C2GnT3 konnte bei Supplementierung mit Gal und GalNAc eine Veränderung im O-Glykosylierungsprofil festgestellt werden, da als Hauptkomponente das core2-Tetrasaccharid Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)GalNAc und dessen Sialyl-3-Derivat auftraten. Durch indirekte Konkurrenz zwischen C2GnT3 und α 3GalST bzw. durch direkte Konkurrenz zwischen C2GnT3 und α 6GalNAcST konnte eine Abnahme der Trisaccharide Sialyl-3-core1 bzw. Sialyl-6-core1 erklärt werden. Somit konnte *in vivo* das Ergebnis einer *in vitro* Studie verifiziert werden, die eine Konkurrenz zwischen α 3GalST und C2GnT postuliert hatte (Kuhns et al., 1993; Brockhausen et al., 1998; Brockhausen et al., 1999). Nach Desialylierung konnte für MUC1-S (IdID, C2GnT3) ein Verhältnis zwischen core2/core1 von 1/1 nachgewiesen werden. Die Kotransfektanten unter GalNAc-Supplementierung bildeten trotz vorhandener T-Struktur (core1) kein core2. Hierfür könnte es zwei Erklärungen

geben: Zum einen könnte der Gal-Pool durch die Bildung von core1 erschöpft sein. Zum anderen könnte ein kompetitiver Einfluss der Sialyltransferasen $\alpha 3$ GalST und $\alpha 6$ GalNAcST gegeben sein.

Nicht nur durch das Auftreten von core1-Strukturen in der GalNAc-supplementierten Probe sondern auch durch Western-Blots verdichtete sich die Vermutung, dass die UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc-Epimerase in den IdID-Zellen nicht völlig defekt ist. Das Fusionsprotein MUC1-S sollte ohne Zuckerzusatz im Western-Blot ein Molekulargewicht von 20 kDa haben. Es wurde aber ein Molekulargewicht von 29 kDa detektiert. Nach Supplementierung mit GalNAc oder GalNAc und Gal konnte für MUC1-S eine Molekulargewichtsverschiebung zu höheren apparenten Massen zwischen 31 und 60 kDa im Immunblot nachgewiesen werden. Auch im Falle des MUC4-S, das ohne Supplementierung der IdID-Zellen mit Zucker generiert worden war, wurde ein zu hohes apparentes Molekulargewicht gemessen: Anstatt 20 kDa wurde das Fusionsprotein bei 40 kDa nachgewiesen. Da die Synthese von Gal aus Glc bzw. GalNAc aus GlcNAc nicht erfolgen sollte, müssen entweder alternative Biosynthesewege, externe Aufnahme der Zucker aus Serumglykoproteinen des FKS oder eine Restaktivität der Epimerase vermutet werden. Um die Restaktivität der Epimerase zu untersuchen, könnten IdID-Zellen in serumfreien Medium kultiviert werden und mit ^{14}C -Glc supplementiert werden. Durch Autoradiographie von SDS-Gelen würde ein nachgewiesener Einbau von ^{14}C -Gal in das Fusionsprotein die Theorie der Restaktivität der Epimerase bestätigen.

Für in vitro Glykosylierungsstudien standen Glykopeptide zur Verfügung, die der Aminosäuresequenz eines MUC1-Tandemrepeats entsprachen und sialyl-T in unterschiedlicher Zahl und in verschiedenen Positionen trugen. Um den Einfluss der sialyl-T-Struktur auf die GalNAc-Addition zu untersuchen, wurden die Glykopeptide mit ppGalNAc-T1 und ppGalNAc-T2 inkubiert. Wie erwartet, bevorzugte GalNAc-T1 hierbei Threonin im VTSA-Motiv und GalNAc-T2 Threonin im GSTA-Motiv. Bei allen Proben konnte eine GalNAc-Addition trotz benachbarter sialyl-T-Glykosylierung nachgewiesen werden. Die vorherige Glykosylierung hatte keinen vollständig inhibierenden Einfluss auf die Initiation der O-Glykosylierung in proximalen Positionen. Auch die core2-Synthese wurde nicht durch Nachbareffekte der sialyl-T-Struktur beeinträchtigt. Übertragen auf in vivo-Experimente (Engelmann et al,

eingereicht) bedeutet das, dass die Rezyklisierung von Glykoproteinen zu einer weiteren Aufglykosylierung im Sinne einer dichteren und komplexeren O-Glykosylierung führen kann.

6. Literatur

Agrawal, B.; Reddish, M.; Krantz, M. J.; Longenecker, M. B. (1995)

Does pregnancy immunize against breast cancer?

Cancer Res. **55**: 2257-2261

Agrawal, B.; Krantz, M.J.; Parker, J.; Longenecker, B.M. (1998)

Expression of MUC1 mucin on activated human T cells: implications for a role of MUC1 in normal immune regulation.

Cancer Res. **58**: 4079-4081

Agrawal, B.; Krantz, M.J.; Reddish, M.A.; Longenecker, B.M. (1998b)

Cancer-associated MUC1 mucin inhibits human T-cell proliferation, which is reversible by IL-2.

Nat. Med. **4**: 43-49

Altschuler, Y.; Kinlough C. L.; Poland, P.A.; Bruns, J. B.; Apodaca, G.; Weisz, O. A.; Hugheey, R. P. (2000)

Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state.

Mol. Biol. Cell **11**: 819-31

Anumula, K.R., Taylor, P.B. (1992)

A comprehensive procedure for preparation of partially methylated alditol acetates from glycoprotein carbohydrates.

Anal. Biochem. **203**: 101-108

Asker, N.; Axelsson, M.A., Olofsson, S.O. (1998)

Human MUC5AC mucin dimerized in the rough endoplasmatische reticulum, similarly to the MUC2 mucin.

Biochem. J. **335**: 381-7

Aubert, J.P.; Porchet, N.; Crepin, M.; Duterque-Coquillaud, M.; Vergnes, G.; Mazzuca, M.; Debuire, B.; Petitprez, D.; Degang, P. (1991)

Evidence for different human tracheobronchial mucin peptides deduced from nucleotide cDNA sequences.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **5**: 178-185

Audie, J.P.; Janin, A.; Porchet, N., Copin, M.C.; Gosselin, B.; Aubert, J.P. (1993)

Expression of human mucin genes in respiratory, digestive, and reproductive tracts ascertained by *in situ* hybridization.

J. Histochem. Cytochem. **41**: 1479-1485

Balague, C.; Gambus, G.; Carrato, C.; Porchet, N.; Aubert, J.P.; Kim, Y.S.; Real, F.X. (1994)
Altered expression of MUC2, MUC4, and MUC5 mucin genes in pancreas tissues and cancer cell lines.

Gastroenterology **106**: 1054-1061

Bäckström, M.; Link, T.; Olson, F.J.; Karlsson, H.; Graham, R.; Picco, G.; Burchell, J.; Taylor-Papadimitriou, J.; Noll, T.; Hansson, G.C. (2003)

Recombinant MUC1 mucin with a breast cancer-like O-glycosylation produces in large amounts in Chinese-hamster ovary cells.

Biochem. J. **376**: 677-686

Baldus, S.E.; Hanisch, F.-G. (2000)

Biochemistry and pathological importance of mucin-associated antigens in gastrointestinal metaplasia.

Adv. Cancer Res. **79**: 201-248

Baldus, S.E.; Engelmann, E.; Hanisch, F.-G. (2004)

MUC1 and the MUCs: A Family of human Mucins with impact in cancer biology.

Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. **41**: 189-231

Baldus, S.E.; Hanisch, F.-G.; Putz, C.; Flucke, U.; Monig, S.P.; Schneider, P.M.; Thiele, J.; Holscher, A.H.; Dienes, H.P. (2002)

Immunoreactivity of Lewis blood group and mucin peptide core antigens: correlations with grade of dysplasia and malignant transformation in the colorectal adenoma-carcinoma sequence.

Histol. Histopathol. **17**: 191-198

Baldus, S.E.; Monig, S.P.; Hanisch, F.G.; Zirbes, T.K.; Flucke, U.; Oelert, S.; Zilkens, G.; Madejczik B.; Thiele, J.; Schneider, P.M.; Holscher, A.H.; Dienes, H.P. (2002)

Comparative evaluation of the prognostic value of MUC1, MUC2, sialyl-Lewis (a) and sialyl-Lewis (x) antigens in colorectal adenocarcinoma.

Histopathology **40**: 440-449

Barnd, D. L.; Lan, M. S.; Metzgar, R. S.; Finn, O. J. (1989)

Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 7159-7163

Baruch, A.; Hartmann, M.; Yoeli, M. (1999)

The breast cancer-associated MUC1 gene generates both a receptor and its cognate binding protein.

Cancer Res. **59**: 1552-1561

Baruch, A.; Hartmann, M.; Zrihan-Licht, S.; Greestein, S.; Burstein, M.; Keydar, I.; Weiss, M.; Smorodinsky, N.; Wreschner, D.H. (1997)

Preferential expression of novel MUC1 tumor antigen isoforms in human epithelial tumors and their tumor-potentiating functions.

Int. J. Cancer **71**: 741-749

Barylko, B., Binns, D.; Lin, K.-M., Atkinson, M. A. L.; Jameson, D. M.; Yin, H. L.; Albanesi, J. P. (1998)
Synergistic activation of dynamin GTPase by Grb2 and phosphoinositides.

J. Biol. Chem. **273**: 3791-3797

Bennett, E.P.; Hassan, H.; Mandel, U.; Mirgorodskay, E.; Roepstorff, P.; Burchell, J.; Taylor-Papadimitriou, J.; Hollingsworth, M.A.; Merckx, G.; Van Kessel, A.G.; Eierg, H.; Steffensen, R.; Clausen, H. (1998)

Cloning of human UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that complements other GalNAc-transferases in complete O-glycosylation of the MUC1 tandem repeat.

J. Biol. Chem. **273**: 30472-30481

Bennett, E.P., Hassan, H.; Mandel, U. (1999)

Cloning and characterization of a close homologue of human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamin: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-T3, designated GalNAc-T6: Evidence for genetic but not functional redundancy.

J. Biol. Chem. **274**: 25362-70

Beum, P. V.; Singh, J.; Burdick, M.; Hollingsworth, M. A.; Cheng, P. (1999)

Expression of core 2 beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase in a human pancreatic cancer cell line results in altered expression of MUC1 tumor-associated epitopes.

J. Biol. Chem. **274**: 24641-24648

Bierhuizen, M. F. A.; Fukuda, M. (1992)

Expression cloning of a cDNA encoding UDP-GlcNAc: Gal beta 1-3-GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc) beta 1-6 GlcNAc transfer by gene transfer into CHO cells expressing polyoma large tumor.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **89**: 9326-9330

Bigge, J.C.; Patel, T.P.; Bruce, J.A.; Goulding, P.N.; Charles, S.M.; Parekh, R.B. (1995)

Non-selective and efficient fluorescent labelling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid.

Anal. Biochem. **230**: 229-38

Bhavanandan, B.H.; Zhu, Q.; Yamakami, K.; Dilulio, N.A.; Nair, S.; Capon, C.; Lemoine, J.; Fournet, B (1998)

Purification and characterisation of the MUC1 mucin-type glycoprotein, epitectin, from human urine: structures of the major oligosaccharide alditols.

Glycoconj. J. **15**: 37-49

Bobek, L.A.; Tsai, H.; Biesbrock, A.R.; Levine, M.J. (1993)

Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin.

J. Biol. Chem. **268**: 20563-20569

Bramwell, M.E.; Bhananandan, V.P.; Wiseman, G.; Harris, H. (1983)

Structure and function of the CA antigen.

Br. J. Cancer **48**: 177-83

Breg, J.; van Halbeek, H.; Vliegthart, J.F.G.; Klein, A.; Lamblin, G.; Roussel, P. (1988)

Primary structures of neutral oligosaccharides derived from respiratory mucus glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis, determined by combination of 500- MHz 1-H-NMR spectroscopy and quantitative sugar analysis.

Eur. J. Biochem. **171**: 643-654

Brockhausen, I.; Yang, J.; Burchell, J. M.; Whitehouse, C.; Taylor-Papadimitriou, J. (1995)

Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells.

Eur. J. Biochem. **233**: 607-617

Brockhausen, I.; Toki, D.; Brockhausen, J. (1996)

Specificity of O-glycosylation by bovine colostrums UDP-GalNAc: Polypeptide alpha-N-acetylgalactosaminyltransferase using synthetic glycopeptide substrates.

Glycoconj J. **13**: 849-56

Brockhausen, I.; Schutzbach, J.; Kuhns, W. (1998)

Glycoproteins and their relationship to human disease.

Acta Anat. **161**: 36-78

Brockhausen, I. (1999)

Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells.

Biochem. Biophys. Acta **1473**: 67-95

Brooks, S.A.; Dwek, M.V.; Schumacher, U. (2002)

Functional and Molecular Glycobiology.

BIOS Scientific Publishers Limited: 94

Bruneau, N.; Nganga, A.; Fisher, E.A.; Lombardo, D. (1997)

O-glycosylation of C-terminal tandem-repeated sequences regulates the secretion of rat pancreatic bile salt-dependent lipase.

J. Biol. Chem. **272**: 27353-27361

Buisine, M.P.; Devisme, L.; Copin, M.C.; Durand-Reville, M.; Gosselin, B.; Aubert, J.P.; Porchet, N. (1999)

Developmental mucin gene expression in the human respiratory tract.

Am. J. Respir. Cell. Biol. **20**: 209-218

Buisine, M.P.; Devisme, L., Maunoury, V., Deschodt, E.; Gosselin, B.; Copin, M.C.; Aubert, J.P., Porchet, N. (2000)

Developmental mucin gene expression in the gastroduodenal tract and accessory digestive glands. I. Stomach. A relationship to gastric carcinoma.

J. Histochem. Cytochem. **48**: 1657-1666

Burchell, J. M.; Gendler, S.; Taylor-Papadimitriou, J.; Girling, A.; Lewis, A.; Millis, R.; Lampont, D. (1987)

Development and characterisation of breast cancer reactive monoclonal antibodies directed to the core protein of the human milk mucin.

Cancer Res. **47**: 5476-5482

Burchell, J.; Taylor-Papadimitriou, T.; Boshell, M.; Gendler, S.; Duhig, T. (1989)

A short sequence, within the amino acid tandem repeat of a cancer-associated mucin, contains immunodominant epitopes.

J. Cancer. **44**: 691-696

Burchell, J. M.; Taylor-Papadimitriou, J. (1993)

Effect of modification of carbohydrate side chain on the reactivity of antibodies with core-protein epitopes of the MUC1 gene product.

Epithelial Cell Biol. **2**: 155-162

Burchell, J. M.; Poulsom, R.; Hanby, A.; Whitehouse, C.; Cooper, L.; Clausen, H.; Miles, D., Taylor-Papadimitriou, J. (1999)

A 2,3 sialyltransferase ST3Gal I is elevated in primary breast carcinomas.

Glycobiology **9**: 1307-1311

Carraway, K.L.; Price-Schiavi, S.A.; Komatsu, M. (2000)

Multiple facets of sialomucin complex/MUC4, a membrane mucin and erbb2 ligand, in tumors and tissues (Y2K update).

Front. Biosci **5**: D95-D107

Ceriani, R.L.; Peterson, J.A.; Lee, J.Y.; Moncada, R.; Blank, E.W. (1983)

Characterization of cell surface antigens of human mammary epithelial cells with monoclonal antibodies prepared against human milk fat globule.

Somat. Cell. Mol. Genet. **9**: 415-27

Ceriani, R. L.; Chan, C. M.; Baratta, F. S.; Ozzello. L.; DeRosa, C. M.; Habif, D. V. (1992)

Levels of expression of breast epithelial mucin detected by monoclonal antibody BrE-3 in breast-cancer prognosis.

Int. J. Cancer **51**: 343-354

Chai, W.; Hounsell, E.F.; Cashmore, G.C.; Rosankiewicz, J.R.; Bauer, C.J.; Feeney, J.; Feizi, T.; Lawson, A.M. (1992)

Neutral oligosaccharides of bovine submaxillary mucin.

Eur. J. Biochem. **203**: 257-268

Chardin, P.; Chamonis, J. H., Gale, N. W., Van Aelst, L. Scholessinger, J.; Wiggler, M. H.; Bar-Sagi, D. (1993)

Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2

Science **260**: 1338-1343

Choudhury, A.; Moniaux, N.; Winpenny, J.P.; Hollingsworth, M.A.; Aubert, J.-P.; Batra, S.K. (2000)

Human MUC4 Mucin cDNA and its variants in Pancreatic Carcinoma.

J. Biochem. **128**: 233-243

Choudhury, A.; Moniaux, N.; Ulrich, A.B.; Schmied, B.M.; Standop, J.; Pour, P.M.; Gendler, M.A.; Hollingsworth, M.A.; Aubert, J.-P.; Batra, S.K. (2004)

MUC4 mucin expression in human pancreatic tumours is affected by organ environment: The possible role of TGF β 2.

British Journal of Cancer **90**: 657-664

Clausen, H., Bennett, E.P. (1996)

A family of UDP-GalNAc:Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation.

Glycobiology **6**: 635-46

Crawley S.C.; Gum, J.R.; Hicks, J.W. (1999)

Genomic organization and structure of the 3' region of human MUC3: Alternative splicing predicts membrane-bound and soluble forms of the mucin.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **263**: 728-36

Croce, M.V.; Isla-Larrain, M.T.; Price, M.R.; Segal-Eiras, A. (2001)

Detection of circulating mammary mucin (MUC1) and MUC1 immune complexes (Muc-CIC) in healthy women.

Int. J. Biol. Markers **16**: 112-120

Dalziel, M.; Whitehouse, C.; McFarlane, I.; Brockhausen, I.; Geschmeissner, S.;

Schwientek, T.; Clausen, H.; Burchell, J. M.; Taylor-Papadimitriou, J. (2001)

The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I Glycosyltransferases determine O-glycan structures and Expression of a tumor-associated epitope on MUC1.

J. Biol. Chem. **276 (14)**: 11007-11015

Datti, A.; Dennis, J.W. (1992)

Regulation of UDP-GlcNAc: Gal β 1-3GalNAc-R β 1-6-N-Acetylglucosaminyltransferase (GlcNAc to GalNAc) in Chinese Hamster Ovary Cells.

J. Biol. Chem. **268 (8)**: 5409-5416

De Kretser, D.A.; Thorne, H.J.; Jacobs, D.J.; Jose, D.G. (1985)

The sebaceous gland antigen defined by the OM-1 monoclonal antibody is expressed at high density on the surface of ovarian carcinoma cells.

Eur. J. Cancer Clin. Oncol. **9**: 1019-35

Dent, G.A.; Civalier, C.J.; Brecher, M.E.; Bentley, S.A. (1999)

MUC1 expression in hematopoietic tissues.

Am. J. Clin. Pathol. **111**: 741-747

Dufosse, J.; Porchet, N.; Audie, J.P.; Guyonnet, D.V.; Laine, A.; Van-Seuningen, I.; Marrakchi, S., Degand, P.; Aubert, J.P. (1993)

Degenerate 87-base-pair tandem repeats create hydrophobic altering domains in human mucin peptides mapped to 11p15.

Biochem. J. **293**: 329-337

DeSouza, M.M.; Surveyor, G.A.; Price, R.E.; Julian, J.; Kardon, R.; Zhou, X.; Gendler, S.; Hilkens, J.; Carson, D.D. (1999)

MUC1/episialin: a critical barrier in the female reproductive tract.

J. Reprod. Immunol. **45**: 127-158

Egan, S. E., Giddings, B. W.; Brooks, M. W.; Buday, L.; Sizeland, A. M.; Weinberg, R. A. (1993)
Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation.

Nature **363**: 45-51

Elhammer, A.P.; Kezdy, F.J.; Kurosaka, A. (1999)

The acceptor specificity of UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases.

Glycoconj. J. **16**: 171-180

Ellis, I.Q.; Robins, R.A.; Elstron, C.W.; Blamey, R.W.; Ferry, B.; Baldwin, R.W. (1984)

A monoclonal antibody, NCRC-11, raised to human breast carcinoma 1. Production and immunohistological characterization.

Histopathology **3**: 510-16

Engelmann, K.; Baldus, S.E.; Hanisch, F.-G. (2001)

Identification and topology of variant sequences within individual repeat domains of the human epithelial tumor mucin MUC1.

J. Biol. Chem. **276**: 27764-27769

Fontenot, J.D.; Tjandra, N.; Bu, D.; Ho, C.; Montelaro, R.C.; Finn, O.J. (1993)

Biophysical characterisation of one-, two-, and three-tandem repeats of human mucin (muc-1) protein core.

Cancer Res. **53**: 5386-5394

Fontenot, J.D.; Mariappan, S.V.; Catasti, P.; Domenech, N.; Finn, O.J.; Gupta, G. (1995)

Structure of a tumor associated antigen containing a tandemly repeated immunodominant epitope.

J. Biomol. Struct. Dyn. **13**: 245-260

Fukuda, M.; Schwientek, T.; Clausen, H. (2002)

Core2 β 6-N-Acetylglucosaminyltransferase-I and -III

Handbook of Glycosyltransferases and related genes: 133-142

Gendler, S.J.; Taylor-Papadimitriou, J.; Duhig, T.; Rothbard, J., Burchell, J. (1988)

A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made of tandem repeats.

J. Biol. Chem. **263**: 12820-23

Gendler, S. J.; Lancaster, C. A.; Taylor-Papadimitriou, J.; Duhig, T.; Peat, N.; Burchell, J.; Pemberton, L.; Lalani, E. N.; Wilson, D. (1990)

Molecular cloning and expression of the human tumor-associated polymorphic epithelial mucin.

J. Biol. Chem. **268**: 3801-3804

Gendler, S., J.; Spicer, A. P.; Lalani, E. N.; Duhig, T.; Peaat, N.; Burchell, J.; Pemberton, L.; Boshell, M.; Taylor-Papadimitriou, J. (1991)

Structure and biology of a carcinoma-associated mucin, MUC1.

Am. Rev. Resp. Dis. **144**: 42-47

Gipson, I.K.; Spurr-Michaud, S.; Moccia, R.; Zhan, Q.; Toribara, N.; Ho, S.B.; Gargiulo, A.R.; Hill, J.A. (1999)

MUC4 and MUC5B transcripts are prevalent mucin messenger ribonucleic acids of human endocervix.

Biol. Reprod. **60**: 58-64

Gillespie, W.; Kelm, S., Paulson, J. C. (1992)

Cloning and expression of the Gal beta 1,3 GalNAc alpha 2,3-sialyltransferase.

J. Biol. Chem. **267**: 21004-21010

Girling, A.; Bartkova, J.; Burchell, J.; Gendler, S.; Gillett, C.; Taylor-Papadimitriou, T. (1989)

A core protein epitope of the polymorphic epithelial mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas.

Int. J. Cancer **43**: 1072-1076

Goldstein, J.L.; Brown, M. S.; Anderson, R. G. W.; Russell, D. W.; Schneider, W. J. (1985)

Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system.

Ann. Rev. Cell Biol. **1**: 1-39

Gonzalez-Guerrico, A.M.; Cafferata, E.G.; Radrizzani, M.; Marcucci, F.; Grunenert, D.; Pivetta, O.H.; Favalaro, R.R.; Laguens, R.; Perrone, S.V.; Gallo, G.C.; Santa-Coloma, T.A. (2002)

Tyrosine kinase c-Src constitutes a bridge between cystic fibrosis transmembrane regulator channel failure and MUC1 overexpression in cystic fibrosis.

J. Biol. Chem. **277**: 17239-17247

Goydos, J.S.; Elder, E.; Whiteside, T.L.; Finn, O.J.; Lotze, M.T. (1996)

A phase I trial of a synthetic mucin peptide vaccine. Induction of specific immune reactivity in patients with adenocarcinoma.

J. Surg. Res. **63**: 298-304

Gross, M.S.; Guyonnet-Duperat, V.; Porchet, N.; Bernheim, A.; Aubert, J.P.; Nguyen, V.C. (1992)
MUC4 gene: regional assignment (3q29) and RFLP analysis.
Ann. Genet. **35**: 21-26

Gum, J.R.J.; Hicks, J.W.; Toribara, N.W.; Siddiki, B.; Kim, Y.S. (1994)
Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro- von Willebrandt factor.
J. Biol. Chem **269**: 2440-2446

Gum, J.R. J.; Ho, J.J.; Pratt, W.S.; Hicks, J.W.; Hill, A.S.; Vinall, L.E.; Robertson, A.M.; Swallow, D.M.; Klim, Y.S. (1997)
MUC3 human intestinal mucin. Analysis of gene structure, the carboxyl terminus, and a novel upstream repetitive region.
J. Biol. Chem **272**: 26678-26686

Gum, Jr.; Crawley, S.C.; Hicks J.W.; Szymkowski, D.E.; Kim, Y.S. (2002)
MUC17, a novel membrane-tethered mucin.
Biochem. Biophys. Res. Commun **291**: 466-475

Hanisch, F.-G; Egge, H.; Peter-Katalinic, J.; Uhlenbruck, G.; Dienst, C.; Fangmann, R. (1985)
Primary structures and Lewis blood-group-dependent expression of major sialylated saccharides from mucus glycoproteins of human seminal plasma.
Eur. J. Biochem. **152**: 343-351

Hanisch, F.-G.; Egge, H.; Peter-Katalinic, J.; Uhlenbruck, G. (1986)
Primary structures of major sialyl-saccharides alditol from human amniotic mucins expressing the tumor associated sialyl-Lewis x antigenic determinant.
FEBS Lett. **200**: 42-46

Hanisch, F.-G. ; Uhlenbruck, G.; Peter-Katalinic, J.; Egge, H.; Dabrowski, J.; Dabrowski, U. (1989)
Structures of neutral O-linked polylactosaminoglycans on human skim milk mucins. A novel type of linearly extended poly- N-acetyllactosamine backbone with Gal beta (1-4) GlcNAc beta (1-6) repeating units.
J. Biol. Chem. **264**: 872-883

Hanisch, F.-G.; Peter-Katalinic, J.; Egge, H.; Dabrowsky, U.; Uhlenbruck, G. (1990)
Structures of acidic O-linked polylactosaminoglycans on human skim milk mucins.
Glycoconj. J. **7**: 525-543

Hanisch, F.-G.; Peter-Katalinic, J. (1992)

Structural studies on fetal mucins from amino fluid: core typing of short-chain O-linked glycans.

Eur. J. Biochem. **205**: 527-535

Hanisch, F.-G.; Stadie, T. R.; Deutzmann, F.; Peter-Katalinic, J. (1996)

MUC1 glycoforms in breast cancer cells: cell line T-47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation.

Eur. J. Biochem. **236**, 318-327

Hanisch F.-G.; Müller, S.; Hassan, H.; Clausen, H.; Zachara, N.; Gooley, A.A.; Paulsen, H.; Alving, K.; Peter-Katalinic, J (1999)

Dynamic epigenetic regulation of initial O-glycosylation by UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases.

J. Biol. Chem. **274**: 9946-9954

Hanisch, F.-G.; Reis, C.A.; Clausen, H.; Paulsen, H. (2001)

Evidence for glycosylation-dependent activities of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases GalNAc-T2 and -T4 on mucin glycopeptides.

Glycobiology **11** (9): 731-740

Hanisch, F.-G. (2001)

Mucin-Type-O-Glycosylation.

Biol. Chem. **382**: 143-149

Hanisch, F.G.; Schwientek, T.; Von Bergwelt-Baildon, M.S.; Schultze, J.L.; Finn, O. (2003)

O-linked glycans control glycoprotein processing by antigen-presenting cells: a biochemical approach to the molecular aspects of MUC1 processing by dendritic cells.

Eur. J. Immunol. **33**: 3242-3254

Hanski, C.; Hanisch, F.-G.; Riecken, E.O. (1992)

Alteration of mucin-bound carbohydrate moieties in malignant transformation of colonic mucosa.

Cancer J. **5**: 332-342

Harris, H. (1984)

The carapace of the cancer cell.

J.R. Coll. Physicians London **18**: 161-65

Hayashi, T.; Takahashi, T.; Motoya, S. (2001)

MUC1 mucin core protein binds to the domain 1 of ICAM-1.

Digestion **63**: 87-92

Henderson, J.M.; Huguenin, S.M.; Cowan, T.M.; Fridovich-Keil, J.L. (2001)

A PCR-based method for detecting known mutations in the human UDP galactose-4'-epimerase gene associated with epimerase-deficiency galactosaemia.

Clinical Genetics **60**: 350-355

Heuser, C.; Ganser, M.; Hombach, A.; Brand, H.; Denton, G.; Hanisch, F.-G.; Abken, H. (2003)

An anti-MUC1-antibody-interleukin-2 fusion protein that activates resting NK cells to lysis of MUC1-positive tumour cells.

British Journal of Cancer **89**: 1130-1139

Hilkens, J.; Buijs, F.; Hilgers, J.; Hageman, P.; Calafat, J.; Sonnenberg, A.; van der Valk, M. (1984)

Monoclonal antibodies against human milk-fat globule membranes detecting differentiation antigen of the mammary gland and its tumors.

Int. J. Cancer **34**: 197-206

Hilkens, J.; Buijs, F. (1988)

Biosynthesis of MAM-6, an epithelial sialomucin. Evidence for involvement of a rare proteolytic cleavage step in the endoplasmic reticulum.

J. Biol. Chem. **263**: 4215-4222

Hilkens, J.; Kroezen, V.; Bonfrer, J. M.; De Jong-Bakker, M. Bruning, P. F. (1986)

MAM-6 antigen, a new serum marker for breast cancer monitoring.

Cancer Res. **46**: 2582-2587

Hilkens, J.; Ligtenberg, M.J.; Litvinov, S.; Vos, H.L.; Gennissen, A.M.C.; Buys, F.; Hageman, P. (1991). In: „Breast Epithelial Antigens: Molecular Biology to Clinical Application“(R.L. Ceriani, Ed.), pp. 25-34. Plenum Press, New York.

Hollingsworth, M.A.; Strawhecker, J.M.; Caffrey, T.C.; Mack, D.R. (1994)

Expression of MUC1, MUC2, MUC3 and MUC4 mucin mRNA in human pancreatic and intestinal tumor cell lines.

Int. J. Cancer **57**: 198-203

Holton, J. B., Gillet, M.G.; Tyfield, L.A. (2001)

In: *Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Edition Ed.: 1553-1587

Hounsell, E.F.; Lawson, A.M.; Feeney, J.; Gooi, H.C.; Pickering, N.J.; Stoll, M.S.; Lui, S.C.; Feizi, T. (1985)

Structural analysis of the O-glycosidically linked *core*-region oligosaccharides of human meconium glycoproteins, which express oncofetal antigens.

Eur.J.Biochem. **148**: 367-377

Hounsell, E.F.; Lawson, A.M.; Stoll, M.S.; Kane, D.P.; Cashmore, G.C.; Carruthers, R.A.; Feeney, J.; Feizi, T. (1989)

Characterisation by mass spectrometry and 500-MHz proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of penta- and hexasaccharide chains of human fetal gastrointestinal mucins (meconium glycoproteins)

Eur. J. Biochem. **186**: 597-610

Huang, K.M.; Snider, M.D. (1993)

Glycoprotein recycling to the galactosyltransferase compartment of the Golgi complex.

J. Biol. Chem. **268**: 9302-9310

Hull, S. R.; Bright, A.; Carraway, K. L.; Abe, M.; Hayes, D. F.; Kufe, D. (1989)

Oligosaccharide differences in the DF3 sialomucin antigen from normal human milk and the BT-20 human breast carcinoma cell line.

Cancer Commun. **1**: 261-267

Karanikas, V.; Hwang, L. A.; Pearson, J.; Ong, C. S.; Apostolopoulos, V.; Vaughan, H.; Xing, P. X.; Jamieson, G.; Pietersz, G.; Tait, B.; Broadbent, R.; Thynne, G.; McKenzie, I. F. C. (1997)

Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunized with mannan-MUC1 fusion protein.

J. Clin. Invest. **100**: 2783-2792

Karlsson, S.; Swallow, D.M.; Griffiths, B.; Corney, G.; Kopkinson, D.A. (1983)

A genetic polymorphism of a human urinary mucin.

Ann. Hum. Genet. **47**: 263-69

Kemperman, H.; Wijnands, Y.; Wesseling, J. (1994)

The mucin epiglycanin on TA3/Ha carcinoma cells prevent alpha 6-beta 4-mediated adhesion to laminin and kalinin and E-cadherin-mediated cell-cell interaction.

J. Cell Biol. **127**: 2071-80

Keydar, I.; Chou, C.S.; Hareuveni, M., Tsarfaty, I.; Sahar, E. (1989)

Production and characterization of monoclonal antibodies identifying breast tumor-associated antigens.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**: 1362-66

Kim, Y.S.; Gum, J.R.; Crawley, S.C.; Deng, G.; Ho, J.J. (1999)

Mucin gene and antigen expression in biliopancreatic carcinogenesis.

Ann. Oncol. **10**: 51-55

Kinarsky L.; Suryanarayanan, G.; Prakash, O. (2003)

Conformational studies on the MUC1 tandem repeat glycopeptides: Implication for the enzymatic O- glycosylation of the mucin protein core.

Glycobiology **13**: 929-39

Kingsley, D. M.; Kozarsky, Hobbie, L.; Krieger, M. (1986)

Reversible defects in O-linked glycosylation and LDL receptor expression in an UDP-Gal/UDP-GalNAc 4-epimerase deficient mutant.

Cell **44**: 749-759

Kingsley, D.M.; Krieger, M.; Holton, J.B. (1986)

Structural and function of low-density-lipoprotein receptors in epimerase-deficient galactosaemia.

N. Engl. J. Med **314**: 1257-1258

Kono, M.; Ohyama, Y.; Lee, Y. C.; Hamamoto, T.; Kojima, N.; Tsuji, S. (1997)

Mouse beta-galactoside alpha 2,3 – sialyltransferases: comparison of *in vitro* substrate specificities and tissue specific expression.

Glycobiology **7**: 469-479

Kornfeld, S. (1987)

Trafficking of lysosomal enzymes.

FASEB J. **1**: 462-468

Kornfeld, R.; Kornfeld, S. (1990)

Structure of glycoproteins and their oligosaccharide unit.

Lennarz, W.J.: The biochemistry of glycoproteins and proteoglycans.

Plenum Press, New York pp 1-34

Kotera, Y.; Fontenot, D. J.; Piecher, G.; Metzgar, R. S; Finn, O. J. (1994)

Humoral immunity against a tandem repeat epitope of human mucin MUC1 in sera from breast, pancreatic and colon cancer patients.

Cancer Res. **54**: 2856-2860

Krieger, M. (1983)

Complementation of mutations in the LDL pathway of receptor-mediated endocytosis by cocultivation of LDL receptor-defective hamster cell mutants.

Cell **33**: 413-422

Krieger, M.; Reddy, P.; Kozarsky, K.; Kingsley, D.; Hobbie, L.; Penman, M. (1989)

Analysis of the synthesis, intracellular sorting, and function of glycoproteins using a mammalian cell mutant with reversible glycosylation defects.

Methods in Cell Biology **32**: 57-84

Kufe, D.; Inghirami, G.; Abe, M.; Hayes, D.; Justi-Wheeler, H.; Schlom, J. (1984)

Differential activity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumours.

Hybridoma **3**: 223-32

Kuhns, W.; Rutz, V.; Paulsen, H.; Matta, K. L.; Baker, M. A.; Barner, M.; Granovsky, M.; Brockhausen (1993)

Processing O-glycan core 1, Gal beta 1-3GalNAc alpha-R. Specificities of core 2, UDP-GlcNAc: Gal beta 1-3 GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc) beta 6- N-acetylglucosaminyltransferase and CMP-sialic acid: Gal beta 1-3GalNAc R alpha 3-sialyltransferase.

Glycoconjugate J. **10**: 381-394

Kurosaka, A.; Nakajima, H., Funakoshi, I.; Matasuyama, M.; Nagayo, T.; Yamashina, I. (1983)

Structures of the major oligosaccharides from human rectal adenocarcinoma glycoprotein.

J. Biol. Chem. **258**: 11594-11598

Lamblin, G.; Boersma, A.; Lhermitte, M.; Roussel, P.; Mutsaers, J.H., van Halbeek, H., Vliegthardt, J.F. (1984)

Further characterisation, by combined high-performance liquid chromatography/¹H-NMR approach, of the heterogeneity displayed by the neutral carbohydrate chains of human bronchial mucins.

Eur. J. Biochem. **143**: 227-236

Lämmli, U. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature **227**: 680

Lan, MS.; Batra, S.K.; Qi, W.N.; Metzgar, R.S.; Hollingsworth, M.A. (1990)

Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA.

J. Biol. Chem. **265**: 15294-15299

Lapensee, L.; Paquette, Y.; Bleau, G. (1997)

Allelic polymorphism and chromosomal localization of the human oviductin gene (MUC9).

Fertil. Steril. **68**: 702-708

Li, A.; Goto, M.; Horinouchi, M.; Tanaka, S.; Imai, K.; Kim, Y.S.; Sato, E.; Yonezawa, S. (2001)

Expression of MUC1 and MUC2 mucins and relationship with cell proliferative activity in human colorectal neoplasia.

Pathol. Int. **51**: 853-860

Li, D. Gallup, M.; Fran, N.; Szymkowski, D.E.; Basbaum, C.B. (1998)

Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human MUC5AC mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts.

J. Biol. Chem. **273**: 6812-6820

Li, Y.; Chen, W.; Ren, J. (2003)

DF3/MUC1 Signalling in multiple mycelia cells is regulated by interleukin-7.

Cancer Biol. Ther. **2**: 187-193

Li, Y.; Ren, J.; Yu, W.; Li, Q.; Kuwahara, H.; Yin, L.; Carraway, K.L.; Kufe, D. (2001)

The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin.

J. Biol. Chem. **276**: 35239-35242

Li, Y.; Yu, W.H.; Ren, J. (2003b)

Heregulin targets gamma-catenin to the nucleolus by a mechanism dependent on the DF3/MUC1 oncoprotein.

Mol. Cancer Res. **1**: 765-775

Ligtenberg, M.J.L.; Vos, H.L.; Gennissen, A.M.C.; Hilkens, J. (1990)

Episialin, a carcinoma-associated mucin, is generated by a polymorphic gene encoding splice variants with alternative amino termini.

J. Biol. Chem. **265**: 5573-78

Ligtenberg, M.J.L.; Kruishaar, L.; Buijs, F.; van Meijer, M.; Litvinov, S.V.; Hilkens, J. (1992)

Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor.

J. Biol. Chem. **267**: 6171-6177

Lillehoj, E.P.; Hyun, S.W.; Kim, B.T.; Zhang, X.G.; Lee, D.I.; Rowland, S.; Kim, K.C. (2001)

MUC1 mucins on the cell surface are adhesive sites for *Pseudomonas aeruginosa*.

Am. J. Physiol. Lung, Cell. Mol. Physiol. **289**: L181-187

Litvinov, S.V.; Hilkens, J. (1993)

The epithelial sialomucin, episialin, is sialylated during recycling

J. Biol. Chem. **268**: 21364-21371

Lloyd, K.O.; Burchell, J.; Kudryashov, V.; Yin, B. W. T.; Taylor-Papadimitriou, J. (1996)

Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC1 mucin from normal breast epithelial cell lines and carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells.

J. Biol. Chem. **271**: 33325-33334

Luchansky, S.J.; Hang, H.C.; Saxon, E.; Grunwell, J.R.; Yu, C.; Dube, D.H.; Bertozzi, C.R. (2003)

Constructing azide-labeled cell surfaces using polysaccharide biosynthesis pathways.

Methods in enzymology **362**: 249-272

Magnani, J.L.; Steplewski, Z.; Koprowski, H.; Ginsburg, V. (1983)

Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin.

Cancer Res. **43**: 5489-5492

Marshall, R.D. (1972)

Glycoproteins

Annu. Rev. Biochem. **41**: 673-702

McDermott, K.M.; Crocker, P.R.; Harris, A.; Burdick, M.D.; Hinoda, Y.; Hayashi, T., Imai, K.; Hollingsworth, M.A. (2001)

Overexpression of MUC1 reconfigures the binding properties of the tumor cells.

Int. J. Cancer **94**: 783-791

McGuckin, M.A.; Devine, P.L.; Ramm, L.E., Ward, B.G. (1994)

Factors effecting the measurement of tumor-associated MUC1 mucins in serum.

Tumour Biol. **15**: 33-44

Meerzaman, D.; Xing, P.X.; Kim, K.C. (2000)

Construction and characterisation of a chimeric receptor containing the cytoplasmatic domain of MUC1 mucin.

Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. **278**: L625-629

Metzgar, R.S.; Gaillard, M.T.; Levine, S.J.; Tuck, F.L.; Bossen, E.H.; Borowitz, M.J. (1982)

Antigens of human pancreatic adenocarcinoma cells defined by murine monoclonal antibodies.

Cancer Res. **42**: 601-8

Moniaux, N.; Escande, F.; Porchet, N.; Aubert, J.P. ; Batra, S.K. (2001)

Structural organization and classification of the human mucin genes.

Front Biosci. **6**: 1192-1206

Moniaux, N.; Nollet, S.; Porchet, N (1999)

Complete sequence of the human mucin MUC4: A putative cell membrane-associated mucin.

Biochem. J. **338**: 325-33

Müller, S.; Goletz, S.; Packer, N.; Gooley, A.; Lawson, A.M.; Hanisch, F.-G. (1997)

Localization of O-glycosylation sites on glycopeptide fragments from lactation-associated MUC1.

J. Biol. Chem. **272**: 24780-24793

Müller, S.; Alving, K.; Peter-Katalinic, J.; Zachara, N.; Googley, A. A.; Hanisch, F. G. (1999)

High density O-glycosylation on tandem repeat peptide from secretory MUC1 of T-47D breast cancer cells.

J. Biol. Chem. **274**: 18165-18172

Müller, S.; Hanisch, F.-G. (2002)

Recombinant MUC1 Probe authentically reflects cell-specific O-glycosylation profiles of endogenous breast cancer Mucin.

J. Biol. Chem. **277**: 26103-26112

Mutsaers, J.H.; van Halbeek, H.; Vliegthardt, J.F., Wu, A.M.; Kabat, E.A. (1986)

Typing of *core* and backbone domains of mucin-type oligosaccharides from human ovarian-cyst glycoprotein by 500-MHz ¹H-NMR spectroscopy.

Eur. J. Biochem. **157**: 139-146

Nehrke, K.; Hagen, F.K.; Tabak, L.A. (1998)

Isoform-specific O-glycosylation by murine UDP-GalNAc:polypeptide N-acetyl-galactosaminyl-transferase-T3, in vivo.

Glycobiology **8**: 367-371

Nguyen, P.L., Niehans, G.A.; Cherwitz, D.L.; Kim, Y.S.; Ho, S.B. (1996)

Membrane-bound (MUC1) and secretory (MUC2, MUC3 and MUC4) mucin gene expression in human lung cancer.

Tumour Biol. **17**: 176-192

Nilsson, T.; Pypaert, M.; Hoe, M.H.; Slusarewicz, P.; Berger, E.G.; Warren, G. (1993)

Overlapping distribution of two glycosyltransferases in the Golgi apparatus of HeLa cells.

J. Cell Biol. **120**: 5-13

Obermair, A.; Schmid, B.C.; Packer, J. (2002)

Expression of MUC1 splice variants in benign and malignant ovarian tumours.

Int. J. Cancer **100**: 166-171

Oosterkamp; H.M., Scheiner, L.; Stefanova, M.C.; Lloyd, K.O.; Finstad, C.L. (1997)

Comparison of MUC1 mucin expression in epithelial and non-epithelial cancer cell lines and demonstration of a new short variant form (MUC-1/Z).

Int. J. Cancer **72**: 87-94

Ormerod, M.G.; Monaghan, P.; Easty, D.; Easty, G.C. (1981)

Asymmetrical distribution of epithelial membrane antigen on the plasma membranes of human breast cell lines in culture.

Diag. Histopath. **4**: 89-93

Pallesen, L.T.; Berglund, L.; Rasmussen, L.K.; Petersen, T.E.; Rasmussen, J.T. (2002)

Isolation and characterisation of MUC15, a novel cell membrane-associated mucin.

Eur. J. Biochem. **269**: 2755-63

Pandey, P.; Kharbanda, S.; Kufe, D. (1995)

Association of the DF3/MUC1 breast cancer antigen with Grb2 and the Sos/Ras exchange protein

Cancer Res. **55**: 4000-4003

Patton, S. (2001)

MUC1 and MUC-X, epithelial mucins of breast and milk.

Adv. Exp. Med. Biol. **501**: 35-45

Patton, S.; Gendler, S.J.; Spicer, A.P. (1995)

The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues.

Biochim. Biophys. Acta **1241**: 407-23

Perez-Vilar, J.; Hill, R.L. (1999)

The structure and assembly of secreted mucins.

J. Biol. Chem. **274**: 31751-4

Peterson, J.A.; Scallan, C.D.; Ceriani, R.L.; Hamosh, M. (2001)

Structural and functional aspects of the three major glycoproteins of the human milk fat globule membrane.

Adv. Exp. Med. Biol. **501**: 179-187

Podolski, D.K. (1985a)

Oligosaccharides structures of human colonic mucin.

J. Biol. Chem. **260**: 8262-8271

Podolski, D.K. (1985b)

Oligosaccharides structures of isolated human colonic mucin species.

J. Biol. Chem. **260**: 15510-15515

Porchet, N.; Nguyen, V.C.; Dufosse, J.; Audie, J.P.; Guyonnet-Duperat, V. ; Gross, M.S. ; Denis, C. ; Degrand, P.; Bernheim, A.; Aubert, J.P. (1991)

Molecular cloning and chromosomal localization of a novel human trachea-bronchial mucin cDNA containing tandemly repeated sequences of 48 base pairs.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **175**: 414-422

Pratt, W.S.; Crawley, S.; Hicks, J.; Ho, J.; Nash, M.; Kim, Y.S.; Gum, J.R.; Swallow, D.M. (2000)

Multiple transcripts of MUC3: evidence for two genes, MUC3A und MUC3B.

Biophys. Res. Commun. **275**: 916-23

Quimby, B.B. ; Alano, A.; Almashanu, S.; DeSandro, A.M.; Cowan, T.M.; Fridovich-Keil, J.L. (1997)

Characterisation of two mutations associated with epimerase-deficiency galactosaemia by use of a yeast expression system for human UDP-galactose-4-epimerase.

Am.J. Hum. Gen. **61**: 590-598

Quin, R.J.; McGuckin, M.A. (2000)

Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the MUC1 mucin correlates with changes in cell-cell adhesion.

Int. J. Cancer **87**: 499-506

Recchi, M. A., Hebbar, M.; Harduin-Lepers, A.; Peyrat, J. P.; Delannoy, P (1998)

Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction assessment of sialyltransferase expression in human breast cancer.

Cancer Res **58**: 4066-4070

Regimbald, L.H.; Pilarski, L.M.; Longenecker, B.M.; Reddish, M.A.; Zimmermann, G.; Hugh, J.C. (1996)

The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer.

Cancer Res. **56**: 4244-4249

Reid, C.J.; Harris, A. (1998)

Development expression of mucin genes in the human gastrointestinal system.

Gut **42**: 220-226

Remaley, A.T.; Ugorski, M.; Wu, N.; Litzky, L.; Burger, S.R.; Moore, J.S.; Fukuda, M.; Spitalnik, S.L. (1991)

Expression of human Glycophorin A in wild type and glycosylation-deficient Chinese hamster ovary cells.

J. Biol. Chem. **266**: 24176-24183

Ren, J.; Li, Y.; Kufe, D. (2002)

Protein kinase C delta regulates function of the DF3/MUC1 carcinoma antigen in beta-catenin signalling.

J. Biol. Chem. **277**: 17616-17622

Reuter, G.; Pfeil, R.; Stoll, S.; Schaurer, R.; Kamerling, J.-P.; Versluis, C.; Vliegenhart, J.F. (1983)

Identification, of a new sialic acid derived from glycoprotein of bovine submandibular gland.

Eur. J. Biochem. **134**: 139-143

Rosen, S. D.; Bertozzi, C. R. (1994)

The selectins and their ligands.

Curr. Opin. Cell Biol. **6**: 663-673

Rottger, S.; White, J.; Wandall, H. H.; Olivio, J. C.; Stark, A.; Bennett, E. P.; Whitehouse, C.; Berger, E. G.; Clausen, H.; Nilson, T. (1998)

Localisation of three human polypeptide GalNAc-transferases in HeLa cells suggests initiation of O-linked glycosylation throughout the Golgi apparatus.

J. Cell Sci. **111**: 45-60

Roussel, P.; Lambin, G. (1996)

Glykoproteins and Disease.

New Comprehensive Biochem. **30**: 351

Sadler, J.E. (1998)

Biochemistry and genetics of von Willebrandt factor.

Annu. Rev. Biochem. **67**: 395-424

Schachter und Rodén (1973)

The biosynthesis of animal glycoproteins. In *Metabolic Conjugation and Metabolic Hydrolysis*.

W.H. Fishman (New York: Academic Press) 2-149

Schachter und Roseman (1980)

Mammalian glycosyltransferases: their role in the synthesis and function of complex carbohydrates and glycolipids.

In: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. W.J.Lenarz (New York: Plenum Press) 8-160.

Scheiffele, P.; Preränen, J.; Simons, K. (1995)

N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells.

Nature **378**: 96-98

Schroeder, J.A.; Thompson, M.C.; Gardner, M.M.; Gendler, S.J. (2001)

Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlate with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland.

J. Biol. Chem. **276**: 13057-13064

Schroten, H; Hanisch, F.-G.; Plogmann, R.; Hacker, J; Uhlenbruck, G.; Nobis-Bosch, R.; Wahn, V. (1992)

Inhibition of adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective function of mucins in the non-immunoglobulin fraction.

Infect. Immun. **60**: 2893-2899

Schulz, J.M.; Ross, K.L.; Malmstrom, K.; Krieger, M.; Fridovich-Keil (2005)

Mediators of Galactose sensitivity in UDP-Galactose 4'-epimerase impaired mammalian cells.

J. Biol. Chem. Print in process

Shimizu, M.; Yamauchi, K. (1982)

Isolation and characterisation of mucin-like glycoprotein in human milk fat globule membrane.

J. Biochem. (Tokyo) **91**: 515-524

Schwientek, T.; Nomoto, M.; Levery, S. B.; Merx, G.; Geurts van Kessel, A. G.; Bennet, E. P.; Hollingsworth, M. A.; Clausen, H. (1999)

Control of O-glycan branch formation. Molecular cloning of human cDNA encoding a novel beta 1,6-N-acetylglucosaminyltransferase forming core 2 and core 4.

J. Biol. Chem. **274**: 4504-4512

Schwientek, T.; Yeh, J. S.; Levery, S. B.; Keck, B.; Merx, G.; van Kessel, A. G.; Fukuda, M.; Clausen, H. (2000)

Control of O-glycan branch formation. Molecular cloning and characterisation of a novel thymus-associated core 2 beta1,6-n-acetylglucosaminyltransferase.

J. Biol. Chem. **275**: 11106-11113

Schwientek, T.; Bennett, E.P.; Flores, C.; Thacker, J.; Hollman, M.; Reis, C.A.; Behrens, J.; Mandel, U.; Keck, B.; Schafer, M.A.; Hazemann, K.; Zubarev, R.; Roepstorff, P.; Hollingsworth, M.A.; Clausen, H. (2002)

Functional conservation of subfamilies of putative UDP-N-acetylgalactosamine: Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases in drosophila, *C. elegans* and mammals: One subfamily comprised of 1(2) 35Aa is essential in drosophila.

J. Biol. Chem. **277**: 22623-38

Shankar, V.; Pichan, P.; Eddy, R.L.J.; Tonk, V.; Nowak, N.; Sait, S.N.; Shows, T.B.; Schultz, R.E.; Gotway, G.; Elkins, R.C.; Gilmore, M.S.; Sachdev, G.P. (1997)

Chromosomal localization of a human mucin gene (MUC8) and cloning of the cDNA corresponding to the carboxy terminus.

Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. **16**: 232-241

Sheehan, J.K.; Thornton, D.J.; Howard, M. (1996)

Biosynthesis of the MUC2 mucin: Evidence for a slow assembly of fully glycosylated units.

Biochem. J. **315**: 1055-60

Shimizu, Y.; Shaw, S. (1993)

Cell adhesion: Mucins in the mainstream.

Nature **366**: 630-631

Shimizu, M.; Yamauchi, K. (1982)

Isolation and characterization of mucin-like glycoproteins in human milk fat globule membranes.

J. Biochem. **91**: 515-24

Stryer, Lubert (1999)

Biochemie 4. Auflage

Spektrum Akademischer Verlag

Swallow, D.M.; Gendler, S.; Griffiths, B.; Kearney, A.; Povey, S.; Sheer, D.; Palmer, R.W.; Taylor-Papadimitriou, J. (1987)

The hypervariable gene locus PUM, which codes for the tumour associated epithelial mucins, is located on chromosom 1, within the region 1q21-q24.

Ann. Hum. Genet. **51**: 289-294

Taylor-Papadimitriou, J.; Burchell. J.; Miles, D. W.; Daziel, M. (1999)

MUC1 and cancer.

Biochim. Biophys. Acta **1455**: 301-313

Ten Hagen, K.G.; Tetaert, D.; Hagen, F.K. (1999)

Characterization of an UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that displays glycopeptide N-acetylgalactosaminyltransferase activity.

J. Biol. Chem. **274**: 27867-74

Thathiah, A.; Blobel, C.P.; Carson, D.D. (2003)

Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding.

J. Biol. Chem. **278**: 3386-3394

Thoden, J.B., Wohlers, T.M.; Fridovich-Keil, J.L., Holden, H.M. (2001)

Human UDP-galactose 4-epimerase accommodation of the UDP-N-acetylglucosamine within the active site.

J. Biol. Chem. **276**. 15131-15136

Tomlinson, J.; Wang, J. L.; Barsky, S.H.; Lee, M.C.; Bischoff, J.; Nguyen, M. (2000)

Human colon cancer cells express multiple glycoprotein ligands for E-selectin.

Int. J. Oncol. **16**: 347-353

Toribara, N.W.; Ho, S.B.; Gum, J.R. Jr.; Lau, P.; Kim, Y.S. (1997)

The carboxyl-terminal sequence of the human secretory mucin, MUC6.

Analysis of the primary amino acid sequence.

J. Biol. Chem. **272**: 16398-16403

Trowbridge, I. S.; Helenius, A. (1998)

Lectins as chaperones in glycoprotein folding.

Curr. Opin. Struct. Biol. **8**: 587-592

Tsuji, S.; Datta, A. K.; Paulson, J. C. (1996)

Systematic nomenclature for sialyltransferases.

Glycobiology **6**: 5-14

Van de Wiel-van Kemenade, E.; Ligtenberg, M.J.; de Boer, A.J.; Buijs, F.; Vos, H.L.; Melief, C.J.; Hilkens, J.; Figdor, C.G. (1993)

Episialin (MUC1) inhibits cytotoxic lymphocyte-target cell interaction.

J. Immunol. **151**: 767-776

Van Halbeek, H.; Vliegthart, J.F.G.; Fiat, A.M.; Jolles, P. (1985)

Isolation and structural characterization of the smaller-size oligosaccharides from desialylated human kappa-casein. Establishment of a novel type of core for a mucin-type carbohydrate chain.

FEBS Lett. **187**:81-88

Von Mensdorff-Pouilly, S.; Petrakou, E.; Kenemans, P.; van Uffelen, K.; Verstraeten, A.A.; Snijdwint, F.G.M.; van Kamp, G.J.; Schol, D.J.; Reis, C.A.; Price, M.R.; Livingston, P.O.; Hilgers, J. (2000)

Reactivity of natural and induced human antibodies to MUC1 mucin with peptides and n-acetylgalactosamine (GalNAc) peptides.

Int. J. Cancer **86**: 702-712

Varki, A. (1994)

Radiolabeling of Glycoconjugates

Methods Enzymol. **230**: 18

Wandall, H.H.; Hassan, M.; Mirgorodskaya, E.; Kristensen, A.K.; Roepstorff, P.; Bennett, E.P.; Nielsen, P.A.; Hollingsworth, M.A.; Burchell, J.; Taylor-Papadimitriou, J.; Clausen, H. (1997)

Substrate specificities of three members of the human UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferase family, GalNAc-T1, -T2, and -T3.

J. Biol. Chem. **272**: 23503-23514

Wasilenko, J., Lucas, M., Thoden, J., Holden, H.; Fridovich-Keil, J.L. (2004)

Functional characterisation of the K2572 and G319E-hGALE alleles found in patients with ostensibly, peripheral epimerase deficiency galactosaemia.

Mol. Gen. Metab. **84**: 32-38

Wessling, J.; van der Valks, S.W.; Vos, H.L. (1995)

Episialin (MUC1) overpression inhibits integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix components.

J. Cell Biol. **129**: 255-265

Whitehouse, C.; Burchell, J.; Geschmeissner, S.; Brockhausen, I.; Loyed, K. O.; Taylor-Papadimitriou, J. (1997)

A transfected sialyltransferase that is elevated in breast cancer and localizes to the medial/trans-Golgi apparatus inhibits the development of *core-2*-based O-glycans.

J. Cell Biol. **137**: 1229-1241

Williams, S.J.; McGuckin, M.A.; Gotley, D.C.; Eyre, H.J.; Sutherland, G.R.; Anatalis, T.M. (1999)

Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display.

Cancer Res. **59**: 4083-4089

Williams, S.J.; Munster, D.J.; Quinn, R.J. (1999)

The MUC3 gene encodes a transmembrane mucin and is alternatively spliced.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **261**: 83-9

Williams, S.J.; Wreschner, D.H.; Tran, M.; Eyre, H.J.; Sutherland, G.R.; McGuckin, M.A. (2001)

MUC13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells.

J. Biol. Chem. **276**: 18327-18336

Wohlens, T.M.; Christacos, N.C.; Harreman, M.T.; Fridovich-Keil, J.L. (1999)

Identification and characterisation of a mutation, in the human UDP-galactose-4-epimerase gene, associated with generalized epimerase-deficiency galactosaemia.

Am J. Hum. Gen. **64**: 462-470

Wohlens, T.M.; Fridovich-Keil, J.L. (2000)

Studies of the V94M-substituted human UDP-Galactose-4-epimerase enzyme associated with generalized epimerase-deficiency galactosaemia.

J. Inher. Metab. Dis. **23**: 713-729

Wreschner, D.H.; Hareuveni, M.; Tsarfaty, I.; Smorodinsky, N.; Horev, J.; Zaretsky, J.; Kotkes, P., Weiss, M.; Lathe, R.; Dion, A. (1990)

Human epithelial tumor antigen cDNA sequences. Differential splicing may generate multiple protein forms.

Eur. J. Biochem. **189**: 463-473

Yamamoto, M.; Bharti, A.; Li, Y.; Kufe, D. (1997)

Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion.

J. Biol. Chem. **272**: 12492-12494

Yamashita, Y.; Chung, Y.S.; Sawada, T.; Kondo, Y.; Hirayama, K.; Inui, A.; Nakata, B.; Okuno, M., Horie, R.; Saito, T. (1994)

A new cancer-associated antigen defined by a monoclonal antibody against a synthetic carbohydrate chain.

Int. J. Cancer **58**: 349-355

Yeaman, C. ; Le Gall, A. H. ; Baldwin, A. N.; Monlauzeur, L. ; Le Bivic, A. ; Rodriguez-Boulan, E. (1997)

The O-glycosylated stalk domain is required for apical sorting of neurotrophin receptors in polarized MDCK cells.

J. Cell Biol. **139**: 929-940

Yeh, J. C.; Ong, E.; Fukuda, M. (1999)

Molecular cloning and expression of a novel beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase that forms core 2, core 4, and I branches

J. Biol. Chem. **274**: 3215-3221

Yin, B.W.; Lloyd, K.O. (2001)

Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16.

J. Biol. Chem. **276**: 27371-27375

Yolken, R.H.; Peterson, J.A.; Vonderfecht, S.L.; Fouts, E.T.; Midthun, K.; Newburg, D.S. (1992)

Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis.

J. Clin. Invest. **90**: 1984-1991

Zhang, K.; Sikut, R.; Hansson, G.C. (1997)

A MUC1 mucin secreted from a colon carcinoma cell line inhibits target cell lysis by natural killer cells.

Cell. Immunol. **176**: 158-165

Zrihan-Licht, S.; Baruch, A.; Elroy-Stein, O.; Keydar, I.; Wreschner, D. H. (1994)

Tyrosine phosphorylation of the MUC1 breast cancer membrane proteins cytokine receptor-like molecules.

FEBS Lett. **356**: 130-136

Zotter, S.; Hagemann, P.C.; Lossnitzer, A.; van den Tweel, J.; Mooi, W.J.; Hilgers, J.M. (1988)

Monoclonal antibodies to epithelial sialomucins recognize epitopes at different cellular sites in adenolymphomas of the parotid gland.

Int. J. cancer Suppl. **3**: 38-44

Kurzzusammenfassung

Aufgrund der sukzessiven Addition von Monosaccharid-Bausteinen wird vermutet, dass neben der Peptidsequenz auch epigenetische Parameter wie die Competition zwischen enzymatischen Schritten bei der Initiation und der Elongation von O-Glykanen einen Einfluss auf den Ort und die Struktur der Glykane ausüben. Durch die rekombinante Glykosylierungssonde MUC1 in IdID-Zellen, die durch eine defekte UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc-Epimerase gekennzeichnet sind, konnte extern die O-Glykosylierung durch Supplementierung mit GalNAc (Initiation der O-Glykosylierung) und Gal und GalNAc (Elongation) beeinflusst werden. Durch Kotransfektion der core2 defizienten Zellen mit der core2 spezifischen GlcNAc-Transferase (C2GnT3) konnten Einflüsse der core2-Synthese auf das O-Glykosylierungsprofil der MUC1-Sonde in IdID-Zellen untersucht werden. In dem O-Glykosylierungsprofil nicht kotransfizierter IdID-Zellen dominierten sialylierte core1-Trisaccharide vergleichbar mit dem Glykanprofil der Wildtyp-CHO-Zellen. Durch die Koexpression mit C2GnT3 konnten core2-Strukturen (bei Supplementierung mit Gal und GalNAc) detektiert werden. Wie erwartet konkurrierte die α 6-Sialylierung von core1 (Gal-GalNAc) direkt mit der Addition von GlcNAc durch C2GnT3. Auch eine indirekte Competition zwischen α 3-Sialyltransferase und C2GnT3 konnte nachgewiesen werden. Bei partieller Supplementierung mit GalNAc konnten die kotransfizierten Zellen keine core2-Strukturen bilden. Das Vorhandensein von core1 in Zellen, die nicht mit Gal supplementiert wurden, könnte ein Hinweis auf eine teilweise funktionierende Epimerase sein, wobei auch die Möglichkeit einer Aufnahme von Gal aus Serumglykoproteinen des FKS nicht aufgeschlossen werden kann.

In vitro Studien zeigten, dass Peptidsubstrate mit komplexer O-Glykosylierung (sialyl-T) sowohl eine weitere Initiation in benachbarten Positionen erlauben als auch die Synthese von core2-Strukturen. Diese Erkenntnisse könnten Bedeutung für die Aufglykosylierung von Membranglykoproteinen haben, die durch das Trans-Golgi-Netzwerk rezyklisieren.

Abstract

O-glycan biosynthesis proceeds by sequential addition of monosaccharides. Hence a competition between the glycosyltransferases involved in initiation and elongation of the glycan chains can be anticipated. To get insight into the regulation of the *in vivo* O-glycosylation a recombinant MUC1-probe expressed in IdID-cells, which lack UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc epimerase was used. The O-glycan formation in IdID-cells can be controlled by medium supplementation with GalNAc (initiation of O-glycans) or GalNAc and Gal (elongation of the glycans). In order to elucidate a competition of the core2GnT3 with the core1-specific α 3- or α 6-sialyltransferases (α 6GalNAcST) IdID-cells were cotransfected with the respective glycosyltransferase gene to form core2-glycans. The secretory MUC1 fusion protein was isolated by affinity chromatography and by rpHPLC and analysed for alterations of the O-glycosylation profiles. The glycans were liberated by hydrazinolysis, labelled with 2-aminobenzamide and separated on a polymeric amino-phase column. The profiles of fusion protein from non-cotransfected and cotransfected IdID-cells differed significantly with respect to qualitative and quantitative aspects. MUC1 probes from cotransfectants in the presence of GalNAc and Gal displayed *de novo* core2 formation and a decrease of Gal β 1-3(NeuAc α 2-6)GalNAc, in accordance with the expected competition between C2GnT3 and α 6GalNAcST for the same substrate position. Core2 formation also competed with α 3GalST-activity. On partial supplementation, with GalNAc only, the cotransfected cells are unable to form core2 structures. The formation of core1 in UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc epimerase defective cells, which were not supplemented with Gal, remains unexplained and may indicate that the epimerase is partially functional. This assumption is supported by observation that IdID-cells in the absence of supplementing sugars were able to partially O-glycosylate the MUC1 probe.

The findings from *in vivo* studies were completed by *in vitro* studies with synthetic glycopeptides, which indicated that the sialyl-T-structure has no significant inhibitory effect on vicinal/proximal elongation by core2-transferase T3 or initiation by ppGalNAc-T1/T2. These results from *in vitro* experiments could explain *in vivo* studies which showed that membrane-bound MUC1 is recycled several times to reach complete glycosylation.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen - die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt hat; dass sie – abgesehen von unten angegebene Teilpublikation – noch nicht veröffentlicht ist, sowie, dass ich eine Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. F.-G. Hanisch betreut worden.

Köln, 27.4.2005

Poster:

Regine Bölinger, Tilo Schwientek, F.-G. Hanisch

Regulation of protein O-glycosylation *in vivo*: Studies in CHO-IdID cells with defective UDP-GlcNAc/UDP-GalNAc epimerase

Curriculum Vitae

Name: Regine Bölinger

Geburtsdatum: 06.12.1974

Geburtsort: Köln

Schulausbildung:

1981-1985 Grundschule Neuboddenberg, Leverkusen

1985-1994 Ophovener Gymnasium, Leverkusen

Juni 1994 Abitur

Studium:

1994-2001 Studium an den Universitäten Köln, München und Bonn

April 1997 Vordiplom

Februar 2000 Diplomprüfungen

März 2000 -März 2001 Diplomarbeit im biochemischen Arbeitskreis von Prof. K. Sandhoff, Universität Bonn

Thema: „Wirkung potentieller Inhibitoren auf den Sphingolipidstoffwechsel von *Saccharomyces cerevisiae*“

Oktober 2001- Promotionsarbeit im Arbeitskreis von

Juli 2005 Prof. Dr. F.-G. Hanisch, Institut für medizinische Biochemie II, Köln

Thema: „Regulation der O-Glykosylierung in GlcNAc/GalNAc-Epimerase-defizienten CHO-Mutanten“

Oktober 2001- wissenschaftliche Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe

Dezember 2004 Molekulare Glykobiologie, Prof. Dr. F.-G. Hanisch, Köln