

Studien zur Initiation der O-Mannosylierung in Dystroglykan

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



Vorgelegt von
Isabelle Florence Breloy
aus Düsseldorf

Köln, November 2006

Diese Arbeit wurde an der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln im Institut für Biochemie II unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. F.-G. Hanisch angefertigt.

Betreuung der Arbeit und Erstellung des Erstgutachtens:

Prof. Dr. rer. nat. Franz-Georg Hanisch
Institut für Biochemie II
der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Erstellung des Zweitgutachtens:

Prof. Dr. rer. nat. Albrecht Berkessel
Institut für Organische Chemie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln

Prüfungsvorsitz:

Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Strey
Institut für Physikalische Chemie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln

Tag der Disputation:

16. Februar 2007

Zusammenfassung

1. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die seltene Modifikation der Protein-O-Mannosylierung in Säugetieren nicht Sequon-abhängig ist, sondern durch eine N-terminale regulatorische Sequenz kontrolliert wird. Auf einer Serie rekombinanter Glykosylierungssonden, basierend auf kurzen Abschnitten der Muzindomäne des *in vivo* O-mannosylierten Proteins α -Dystroglykan, wurde eine Modifizierung mit O-Mannosyl-Glykanen abhängig von N-terminalen Peptidregionen beobachtet. Eine Strukturanalyse zeigte die Modifizierung O-mannosylierter Sonden mit sialylierten Glykanen des Muzintyps sowie mit dem O-Mannose-Tetrasaccharid Sia2-3Gal1-4GlcNAc1-2Man-ol an. Es konnte gezeigt werden, dass sich die O-Mannosyl-Glykane unter anderem auf einem Abschnitt im N-terminalen Bereich der Muzindomäne befinden. Bei Abwesenheit der N-terminalen Sequenzen werden diese O-Mannosylierungsstellen mit Glykanen des Muzintyps modifiziert. Versuche zur O-Glykosylierung *in vitro* bestätigen, dass synthetische Peptide mit O-Mannosylierungsstellen als *Target* für die Polypeptid-N-Acetylgalaktosaminyltransferasen dienen, nicht jedoch für die Protein-O-Mannosyltransferasen. Möglicherweise regulatorisch wirkende Sequenzabschnitte des humanen α -Dystroglykans führten bei der Fusion mit einem muzintyp-glykosylierten Protein (MUC1) jedoch nicht zu einer Veränderung dessen Glykosylierungsprofils.

2. In *D. melanogaster* ist eine Protein-O-Mannosylierung trotz aktiver Protein-O-Mannosyltransferasen bisher ebenso unbekannt wie das Glykosylierungsprofil des *Drosophila*-Dystroglykans. Wir konnten zeigen, dass die isolierte Muzindomäne des *Drosophila*-Dystroglykans, rekombinant exprimiert in EBNA-293- und C₂F₃-Zellen, keine Informationen zur O-Mannosylierung trägt sondern mit Glykanen des Muzintyps glykosyliert wird. Der extrazelluläre Abschnitt des Proteins, exprimiert in Schneider 2-Zellen, ist trotz potentieller N-Glykosylierungsstellen ausschließlich O-glykosyliert. Die Glykane sind neben der in *D. melanogaster* bekannten *core1*-Struktur aus einem acidischen Trisaccharid der Struktur HexA1-3Gal-1-3GalNAc-ol sowie möglicherweise nicht-elongierter Mannose zusammengesetzt, wobei die beiden letztgenannten Strukturen zum erstenmal in *D. melanogaster* nachgewiesen wurden.

Abstract

1. In this work we showed that the rare modification of protein-O-mannosylation in mammals is apparently not sequon-dependent, but controlled by an upstream trigger sequence. A series of recombinant glycosylation probes, based on the mucin domain of α -dystroglycan and upstream sequences, showed a modification by O-mannose-glycans that was dependent on these N-terminal peptide regions. Structural analysis identified sialylated mucin-type glycans and the O-mannose tetrasaccharide Sia2-3Gal1-4GlcNAc1-2Man-ol on O-mannosylated glycosylation probes. We could show that the majority of the O-mannose glycans is localized in the N-terminal part of the mucin domain. Absence of N-terminal sequences leads to a modification of these O-mannosylation sites by mucin-type glycans. In addition, synthetic peptides with potential O-mannosylation sites *in vivo*, were shown to be modified with N-acetylgalactosamine *in vitro*, but not with mannose. Amino acid sequences of α -dystroglycan, which were identified as potentially regulatory, do in contrary not change the glycosylation profile of a usually mucin-type glycosylated protein (MUC1) when cloned to a hybrid fusion-protein.

2. Protein-O-mannosylation in *D. melanogaster* is similarly unexplored as the glycosylation profile of *Drosophila*-dystroglycan, although protein-O-mannosyl-transferases were identified and are known to be active. We could show that the isolated mucin domain of *Drosophila*-dystroglycan, recombinantly expressed in EBNA-293- and C₂F₃-cells, does not hold any information for O-mannosylation, but is modified with mucin-type glycans. The extracellular part of the protein, expressed in Schneider 2-cells, is in spite of potential N-glycosylation sites, exclusively O-glycosylated. The glycans are composed of the well-known *core1*-structure, an acidic trisaccharide of the structure HexA1-3Gal1-3GalNAc and possibly non-elongated mannose. The latter two structures were identified in *D. melanogaster* for the first time.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Zusammenfassung.....	I
II.	Abstract.....	II
1.	EINLEITUNG	1
1.1	Glykoproteine.....	1
1.2	N-Glykane.....	2
1.3	O-Glykane.....	4
1.3.1	Die Muzintyp O-Glykosylierung.....	5
1.3.1.1	MUC1, ein ubiquitär vorkommendes Protein der Muzinfamilie.....	8
1.3.2	Die O-Mannose-Modifikation.....	9
1.3.2.1	Die Biosynthese der O-Mannose Glykane.....	10
1.3.2.2	α -Dystroglykan, ein O-mannosyliertes Protein in Säugern.....	12
1.3.2.3	Kongenitale Muskeldystrophien des Menschen aufgrund anomaler O-Mannosylierung.....	16
1.4	Vorkommen und Struktur von O-Glykanen in dem Modell-Organismus <i>Drosophila melanogaster</i>	18
1.4.1	O-Mannosyltransferasen in <i>D. melanogaster</i>	18
1.4.2	<i>D. melanogaster</i> Dystroglykan.....	19
1.5	Zielsetzung.....	21
2.	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Material.....	23
2.2	Molekularbiologische Arbeiten.....	27
2.2.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
2.2.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	30
2.2.4	Ligation.....	30
2.2.5	Agarosegelelektrophorese.....	30
2.2.6	Transformation und Amplifikation von Plasmiden.....	31
2.2.7	Plasmidpräparation aus Bakterien.....	31
2.2.8	Klonierung von Glykosylierungssonden auf Basis der Muzindomäne des humanen α -Dystroglykans.....	32
2.2.9	Klonierung von Fusionsproteinen aus humanem α -Dystroglykan und MUC1.....	32
2.2.10	Klonierung der Muzindomäne und des extrazellulären Abschnitts des <i>D. melanogaster</i> Dystroglykans.....	33
2.2.11	DNA Sequenzierung.....	33
2.3	Zellkulturarbeiten.....	34
2.3.1	Zelllinien.....	34
2.3.2	Transfektion und Selektion von Zellen.....	35
2.3.3	Proteingewinnung aus transfizierten Zellen.....	36
2.3.4	Baculovirus-induzierte Proteinexpression.....	36
2.4	Proteinchemie.....	37
2.4.1	Aufreinigung der Fusionsproteine.....	37
2.4.1.1	Nickelchelat-Affinitätschromatographie.....	37
2.4.1.2	Umkehrpasen-HPLC.....	38
2.4.1.3	Gelpermeationschromatographie.....	38
2.4.2	SDS-PAGE nach Laemmli.....	39
2.4.3	Immunoblotting.....	39

2.4.4	EDMAN Sequenzierung	40
2.4.5	Endoproteinase-Spaltungen	40
2.4.6	Exoglykosidase-Spaltungen	41
2.4.7	Chemische Desialylierung mit verdünnter Trifluoressigsäure	41
2.4.8	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	41
2.4.9	ESI-MS/MS Analysen von Glykopeptiden.....	42
2.5	Methoden zur Glykanprofilierung.....	43
2.5.1	Nachweis von Glykokonjugaten mittels eines Immunoassays	43
2.5.2	Enzymatische Freisetzung N-gebundener Glykane mit PNGase F ...	43
2.5.3	Nichtreduzierende Freisetzung O-gebundener Oligosaccharide.....	44
2.5.4	Reduktive β -Eliminierung O-gebundener Oligosaccharide.....	44
2.5.5	Permethylierung von Glykan-Alditen	44
2.5.6	HPLC-Analyse fluoreszenzmarkierter Oligosaccharide.....	45
2.5.7	Monosaccharidkompositionsanalysen mittels GC/MS	46
2.5.8	ESI-MS Massenspektrometrie der methylierten Glykane.....	46
2.5.9	GC/MS Analyse partiell methylierter Alditolacetate	47
2.6	<i>In silico</i> Analysen.....	48
2.7	<i>In vitro</i> Glykosylierung	48
2.7.1	Protein-O-Mannosylierung <i>in vitro</i>	49
2.7.2	Modifizierung mit O-N-Acetylgalaktosamin <i>in vitro</i>	51
3.	ERGEBNISSE	52
3.1	Untersuchungen zur Aminosäuresequenzabhängigkeit der Protein-O-Mannosylierung in Säugetieren	52
3.1.1	Generierung von Glykosylierungs sonden auf Basis von humanem α -Dystroglykan (α -DG) und von Fusionsproteinen aus α -DG und MUC1	52
3.1.1.1	Generierung der cDNA-Konstrukte und rekombinante Expression in EBNA-293 Zellen	55
3.1.1.2	Aufreinigung der Proteine aus dem Zellüberstand	57
3.1.2	Erstellen des Glykosylierungsprofils der aufgereinigten Proteine.....	61
3.1.2.1	Monosaccharidanalyse mittels GC/MS.....	61
3.1.2.2	Identifizierung des <i>core</i> -Zuckers mittel GC/MS	65
3.1.2.3	MALDI-TOF-MS-Analyse von hDGFusion2	68
3.1.2.4	Analyse der methylierten Glykan-Aldite mittels ESI-MS.....	71
3.1.2.5	Methylierungsanalyse zur Identifikation des Substitutionsmusters der Glykane	79
3.1.2.6	Identifikation der glykosylierten Aminosäuren	82
3.1.2.7	<i>In vitro</i> Glykosylierung synthetischer Peptide auf Basis der Aminosäure- sequenz des humanen α -Dystroglykans	83
3.2	Untersuchungen zur O-Glykosylierung des Proteins Dystroglykan aus <i>D. melanogaster</i>.....	86
3.2.1	Rekombinante Expression der Muzindomäne und des extrazellulären Abschnitts	86
3.2.1.1	Generierung der cDNA-Konstrukte und rekombinante Expression in verschiedenen Zelllinien.....	88
3.2.1.2	Aufreinigung der Proteine aus dem Zellüberstand	90
3.2.2	Erstellen des Glykosylierungsprofils der aufgereinigten Proteine.....	92
3.2.2.1	Monosaccharidanalyse und Identifizierung des <i>core</i> -Zuckers mittels GC/MS.....	94

3.2.2.2	Normalphasen-HPLC der Glykane des Proteins dDG1 aus EBNA-293-Zellen.....	97
3.2.2.3	MALDI-TOF-MS-Analyse des Proteins dDGextra.....	99
3.2.2.4	ESI-MS/MS-Analyse der permethylierten Glykane des Proteins dDGextra.....	101
3.2.2.5	Methylierungsanalyse des Proteins dDGextra.....	103
4.	DISKUSSION.....	105
4.1	Die Aminosäuresequenzabhängigkeit der Protein-O-Mannosylierung in Säugetieren.....	105
4.1.1	Die Protein-O-Mannosylierung ist N-terminal kontrolliert.....	107
4.1.2	Die identifizierten Glykanstrukturen entsprechen den endogenen Strukturen.....	109
4.1.3	Die Ortsspezifität der O-Mannosylierung.....	111
4.1.4	Chimäre Fusionsproteine aus α -Dystroglykan und MUC1 werden nicht O-mannosyliert.....	112
4.1.5	Für die Protein-O-Mannosylierung existiert keine stringente Konsensussequenz.....	114
4.2	Das Glykosylierungsprofil des Proteins Dystroglykan aus <i>D. melanogaster</i>.....	115
4.2.1	Die Muzindomäne des Dystroglykans enthält keine Information zur O-Mannosylierung.....	116
4.2.2	<i>Drosophila</i> -Dystroglykan ist ausschließlich O-glykosyliert.....	117
4.2.3	Identifikation des <i>core</i> -Zuckers der Glykane der extrazellulären Domäne.....	118
4.2.4	<i>Drosophila</i> -Dystroglykan ist mit acidischen O-Glykanen einer bisher unbekanntem Struktur modifiziert.....	119
5.	LITERATURVERZEICHNIS.....	121
6.	ANHANG.....	133
6.1	DNA- und Aminosäuresequenzen modifizierter Vektoren.....	133
6.2	DNA- und Aminosäuresequenzen rekombinant exprimierter Proteine.....	134
6.3	HPLC-Chromatogramme der Glykosylierungs sonden.....	142
6.4	GC/MS-Chromatogramme und EI-spektren von Standards und rekombinanten Proteinen.....	143
6.5	ESI-Spektren.....	153
6.6	GC/MS-Chromatogramme partiell methylierter Alditol-Acetate ...	154
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	156
	Danksagung.....	VI
	Erklärung.....	VII
	Lebenslauf.....	VIII

1. EINLEITUNG

1.1 Glykoproteine

Die posttranslationale Glykosylierung von Proteinen ist eine häufig vorkommende Modifikation in Eukaryonten. Die biologischen Funktionen der Glykane sind vielfältig. Sie reichen von einer Stabilisierung der Proteinkonformationen bis hin zu glykanvermittelten Protein-Protein Interaktionen. Wichtige Rollen spielen Glykane z. B. bei der Fruchtbarkeit, Hormonaktivität, Zellvermehrung- und Organisation sowie im Immunsystem und bei Entzündungsprozessen. Obwohl in den meisten Organismen viele Proteine und Lipide glykosyliert sind, wurden die vielfältigen Funktionen dieser Modifikation erst in den letzten Jahren bekannt.

Anzahl und Monosaccharidkomposition der Glykane variieren ebenso stark wie ihre Funktionen. In vielen Proteinen ist nur ein Teil aller potentiellen Stellen glykosyliert. Anzahl und Struktur der Glykane sind in erster Linie abhängig von der Anwesenheit verschiedener konkurrierender Glykosyltransferasen. Zur Zeit sind über 300 humane Glykosyltransferasen mit teilweise überlappenden Substratspezifitäten und variablen Expressionmustern bekannt. Glykosylierung ist somit nicht nur proteinspezifisch, sondern in gleichem Maße spezies-, gewebs-, zelltyp- und entwicklungsspezifisch (Brooks, 2004).

In prokaryontischen Organismen weist der Mechanismus der Glykosylierung aufgrund unterschiedlicher Zellorganisation starke Unterschiede zu dem der Eukaryonten auf. Auch Struktur und Monosaccharidzusammensetzung der Glykane sind nur selten vergleichbar.

Glykane werden zunächst nach der Bindung des Glykans an die Proteinkette klassifiziert. Die N-Glykane sind β -N-glykosidisch über die Seitenkette der Aminosäure Asparagin an das Proteingerüst gebunden. O-Glykane werden α -O-glykosidisch an die Seitenkette von Serin oder Threonin, selten auch an Hydroxylysin gebunden. Eine β -O-glykosidische Bindung ist bekannt von den Proteoglykanen (β -O-Xylose), der cytoplasmatischen Glykosylierung mit N-Acetylglukosamin und der Modifikation von Blutgerinnungsfaktoren mit

Glukose. Selteneren Formen der Glykosylierung sind die C-Mannosylierung an der Aminosäure Tryptophan, die Verankerung von Glykanen an Glykosylphosphatidylinositol in der Cytoplasmamembran über Phosphoethanolamin und die Glykosylierung von proteingebundenen Phosphatresten, genannt Phosphoglykosylierung. Ein Protein kann simultan mit verschiedenen Glykanen modifiziert sein. Häufig zu beobachten ist eine Modifikation sowohl mit N- als auch mit O-Glykanen, wobei sich diese beiden Arten der Glykosylierung sowohl in der Struktur der Glykane als auch in ihrer Biosynthese grundlegend unterscheiden.

1.2 N-Glykane

Die Biosynthese der N-Glykane beginnt cotranslational im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Im ersten Schritt wird eine verzweigte Oligosaccharidvorstufe auf dem Isoprenederivat Dolicholphosphat synthetisiert. Dieses ist in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums integriert und zunächst zum Cytosol ausgerichtet. Nach Addition der ersten sieben Zucker im Cytosol katalysiert das Enzym Flippase die Ausrichtung des Lipids und der Zuckerkette zum Lumen des Endoplasmatischen Retikulums. Hier werden noch weitere Zucker addiert bevor die Oligosaccharidtransferase den Transfer der fertigen Oligosaccharidvorstufe auf ein Asparagin des Proteins katalysiert (Abb. 1).

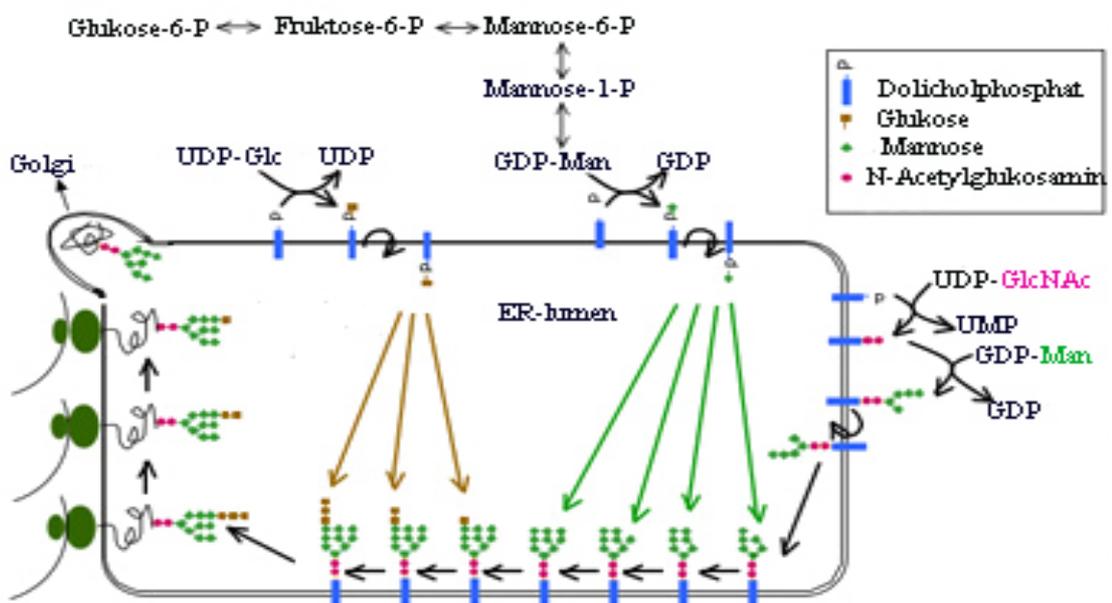


Abb. 1:
Die Biosynthese der N-Glykane im Endoplasmatischen Retikulum.

Eine notwendige Voraussetzung für diesen Transfer ist die Konsensussequenz Asn-Xaa-Ser/Thr (wobei Xaa eine beliebige Aminosäure ungleich Prolin ist) innerhalb der Aminosäuresequenz des translatierten Proteins.

Im Golgi-Apparat wird diese Glykanstruktur sowohl durch Glykosidasen als auch durch Glykosyltransferasen verändert. Erst hier findet eine proteinspezifische Modifikation der Glykane statt. Zunächst werden die Glukosemoleküle abgespalten. Dieser Schritt initiiert die Bindung von Chaperonen (Brook, 2004). In den folgenden Schritten können weitere Monosaccharide sowohl addiert als auch abgespalten werden.

Je nach Elongation der Mannose wird das Glykan weiter klassifiziert. Man unterscheidet zwischen dem Mannosereichen-Typ, dem Komplex-Typ und dem Hybrid-Typ (Abb. 2 - 4).

Die unterschiedlichen Typen entstehen abhängig von der Proteinkonformation und der Verfügbarkeit der benötigten Enzyme. Durch den Einbau weiterer Verzweigungen bis hin zu pentaantennären Strukturen wird trotz gleicher Grundstruktur eine große Vielfalt an N-Glykanen ermöglicht.

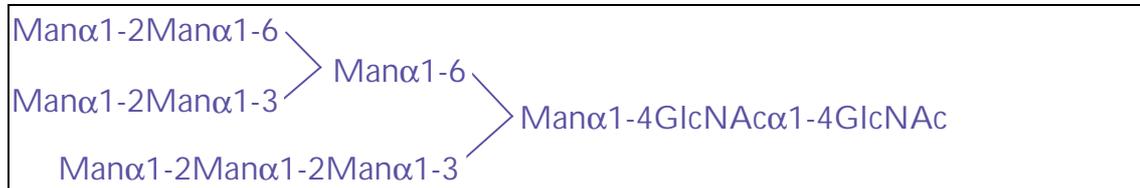


Abb. 2:
Aufbau des Mannosereichen-Typs der N-Glykane.

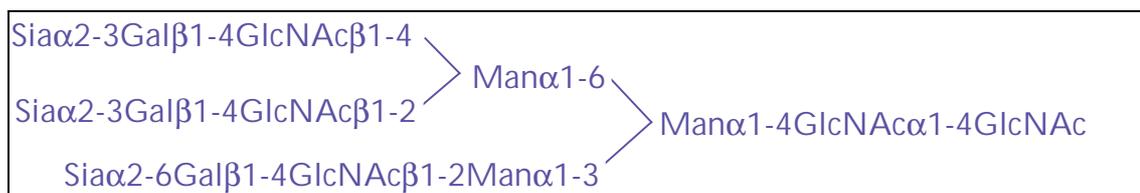


Abb. 3:
Aufbau des Komplex-Typs der N-Glykane.

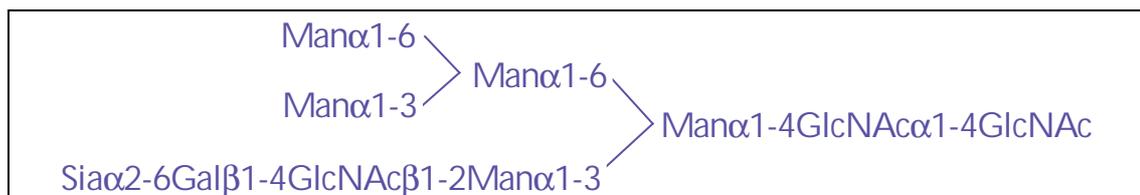


Abb. 4:
Aufbau des Hybrid-Typs der N-Glykane.

1.3 O-Glykane

O-Glykane unterscheiden sich aufgrund ihrer Biosynthese wesentlich stärker voneinander als N-Glykane. Im Gegensatz zu der N-Glykosylierung findet die O-Glykosylierung nicht durch Addition einer Oligosaccharidvorstufe, sondern durch Addition einzelner aktivierter Monosaccharide statt. Glykosidasen sind an diesem Prozess nicht beteiligt. Während alle N-Glykane das gleiche Grundgerüst aufweisen, können bei den O-Glykanen verschiedene Monosaccharide als *core* Zucker eingebaut werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Die häufigsten Typen der O-Glykosylierung und ihr Vorkommen im Organismus

core Monosaccharid	Vorkommen (Beispiele)
N-Acetylgalaktosamin (α -gebunden)	extrazelluläre und membrangebundene Proteine, z.B. Muzine
N-Acetylglukosamin (β -gebunden)	Cytoplasmatische- und Kernproteine z.B. Nukleoporin
Xylose (α -gebunden)	Glykosaminoglykanketten der Proteoglykane
Galaktose (α - an Hydroxylysin gebunden)	Kollagen, Kollagen-Domänen
Glukose (β -gebunden)	Blutgerinnungsfaktoren
Fukose (α -gebunden)	Epidermale Wachstumsfaktoren, z.B. Notch
Mannose (α -gebunden)	Zellwandproteine bei Hefe und Pilzen α -Dystroglykan in Säugetieren
Arabinose (α - an Hydroxyprolin gebunden)	Pflanzen z.B. Extensine und Lektine

Ungleich der N-Glykosylierung beginnt die Biosynthese der O-Glykane nicht bei allen genannten O-Glykosylierungsformen im Endoplasmatischen Retikulum. Auf N-Acetylgalaktosamin aufbauende Glykane werden erst im Golgi-Apparat synthetisiert, während die Modifikation mit N-Acetylglukosamin ein dynamischer Prozess ist und im Cytosol stattfindet.

1.3.1 Die Muzintyp O-Glykosylierung

Die Muzintyp Glykosylierung ist die häufigste Form der O-Glykosylierung. Die Biosynthese dieser Modifikation findet ausschließlich im Golgi-Apparat statt und beginnt mit der Addition von N-Acetylgalaktosamin an Serin oder Threonin im *cis*-Golgi. Katalysiert wird diese Reaktion von einer der ca. 20 UDP-GalNAc:Polypeptid α -N-Acetylgalaktosaminyltransferasen (ppGalNAc-T). Bei der Elongation der Glykane im *cis*- bis *trans*-Golgi sind die entsprechenden Transferasen in einem Gradienten über den gesamten Golgi-Apparat verteilt (Abb. 5).

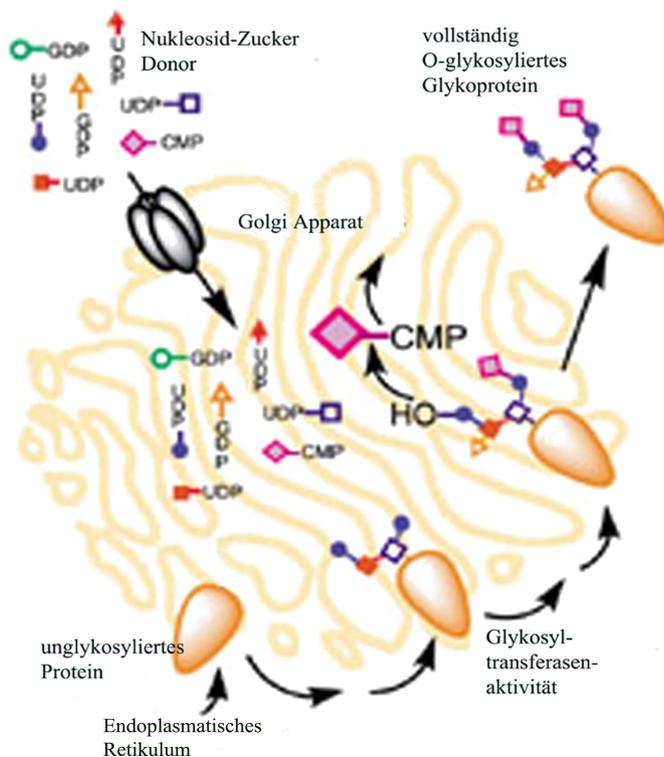


Abb. 5:
Die Biosynthese der O-GalNAc-Glykane im Golgi (nach Yarema, 2001).

Eine strikte Sequenzabhängigkeit der O-GalNAc-Modifikation ist nicht bekannt, jedoch können durch Sequenzvergleiche bevorzugte Glykosylierungsstellen vorhergesagt werden (Chou, 1995; Elhammer, 1993; Hansen 1996). Prolin an den Positionen -1 und +3 begünstigt die Glykosylierung, geladene Aminosäuren an diesen Positionen verhindern eine Glykosylierung weitgehend. Grundlage hierfür scheint die durch Prolin begünstigte Ausbildung von β -Schleifen- und β -Faltblatt-Strukturen zu sein, welche eine Exposition der betreffenden Aminosäuren zur Folge hat (O'Connell, 1992; Wilson, 1991).

Je nach Elongation des N-Acetylgalaktosamins unterteilt man die O-GalNAc Glykosylierung in acht *core*-Strukturen (Abb. 6). Die meisten Glykane basieren auf den Strukturen *core1* und *core2*. Die Glykanketten bestehen aus den Monosacchariden N-Acetylglukosamin, N-Acetylgalaktosamin und Galaktose in variabler Zusammensetzung. Als terminale Gruppen werden häufig Sialinsäuren, Fukose oder Sulfatester eingebaut (Hanisch, 1985, 1986; Hounsell; 1985, 1989; Lamblin, 1984; Mutsaers, 1986).

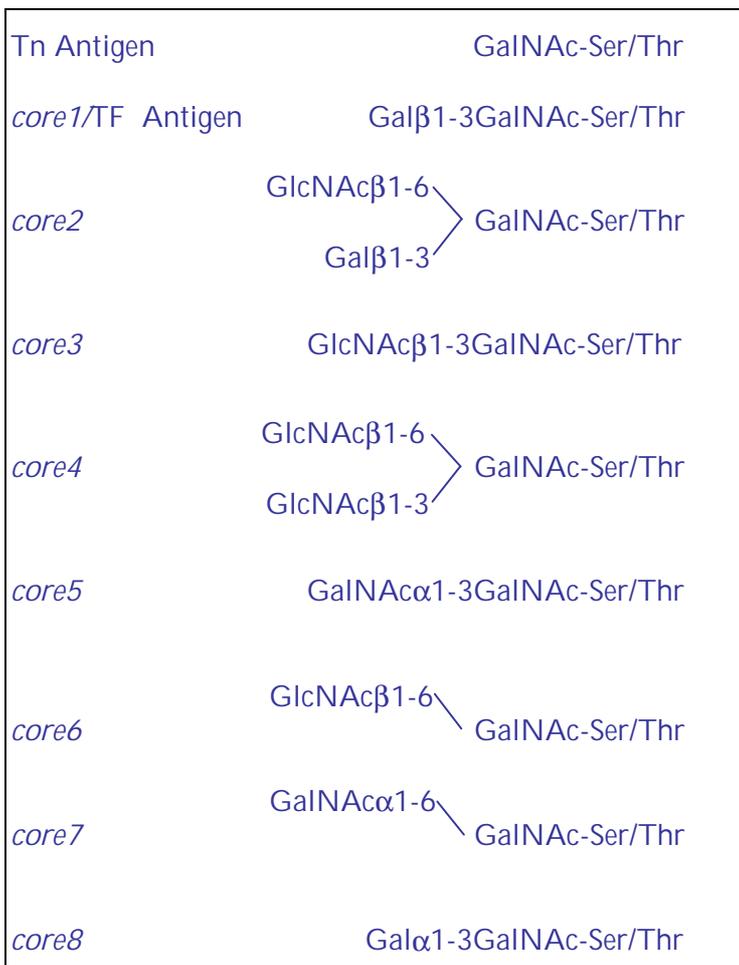


Abb. 6: Die acht *core*-Strukturen der Muzintyp Glykosylierung, aufbauend auf O-GalNAc, genannt Tn-Antigen. *Core1* wird häufig auch als TF- oder Thomson-Friedenreich-Antigen bezeichnet.

Die O-GalNAc-Glykosylierung ist in besonders ausgeprägter Form auf Muzinen zu beobachten und wird deshalb auch „Muzintyp Glykosylierung“ genannt. Muzine sind große sezernierte- oder extrazelluläre membrangebundene Proteine, wobei die sezernierten Muzine häufig über Disulfidbrücken vernetzt sind. Ein Charakteristikum der Muzine sind die *Tandemrepeat*-Domänen, eine sich

wiederholende Abfolge von mehreren Aminosäuren. Die charakteristische hohe Dichte der Glykanketten ist ein Resultat der Anhäufung von Serin, Threonin und Prolin in diesen Domänen. Häufig ist jede dritte Aminosäure glykosyliert (Abb. 7). Die *core 1* oder *core 2* Grundstrukturen weisen abhängig von Gewebe- und Zelltyp eine Länge von maximal 20 Zuckerresten auf. Es sind über 100 verschiedene Glykanstrukturen auf Muzinen bekannt. Häufig vertreten sind wiederholte Gal β 1-4GlcNAc Einheiten der linearen Poly-N-Acetyllaktosaminketten (i-Antigen). Über β 1-6 Bindungen können zusätzliche Verzweigungen der Glykane gebildet werden (I-Antigen). Bei vollständiger Glykosylierung übersteigt das Gewicht der zumeist innerhalb dieser Domänen angehefteten O-Glykane häufig das Gewicht der unmodifizierten Aminosäurekette. Die darin begründete starke Hydrophililität der Muzine ermöglicht es ihnen, große Mengen Wasser zu binden. Viele Muzine werden von Epithelzellen sekretiert, wo sie ein viskoelastisches Gel und damit eine physikochemische sowie immunologische Barriere ausbilden.

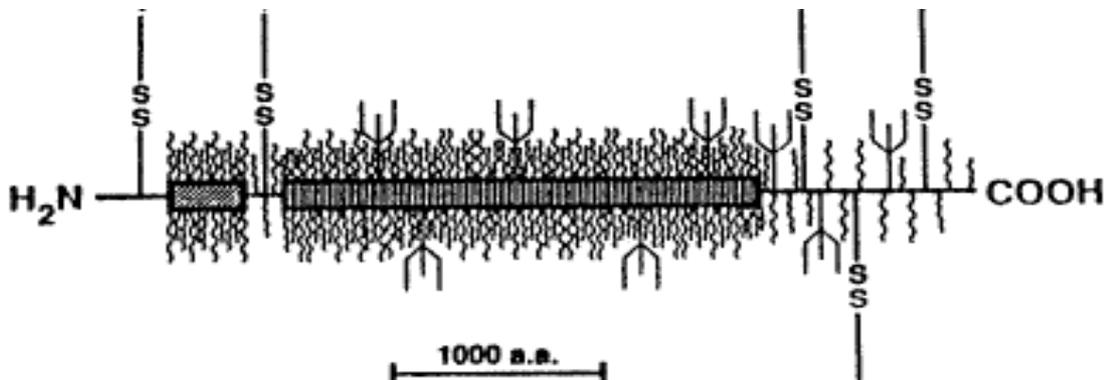


Abb. 7:
Schematische Darstellung eines glykosylierten Muzins (Muzin2, aus *Essentials of Glycobiology*)

Serin- und Threonin-reiche Domänen ohne *Tandemrepeats* sind auch von anderen Proteinen bekannt. Da diese Domänen häufig ebenfalls mit Muzintyp-Glykanen modifiziert sind, werden sie als Muzindomänen bezeichnet.

1.3.1.1 MUC1, ein ubiquitär vorkommendes Protein der Muzinfamilie

Das Mucin1 (MUC1) der 20 bekannten humanen Muzine ist ein Transmembranprotein, welches von den Epithelzellen zahlreicher Organe sowie einigen Lymphozytenspezies exprimiert wird und in die Zell-Zell-Kommunikation involviert ist (Roussel, 1996). Das Protein besteht aus zwei Einheiten, welche posttranslational aus einem Vorläuferprotein gespalten werden. Die kleinere Untereinheit wird aus der Transmembransequenz des Proteins sowie der cytosolischen Domäne und einer kurzen extrazellulären Domäne gebildet. Diese ist nicht-kovalent an die größere, ausschließlich extrazellulär lokalisierte Untereinheit gebunden (Abb. 8 und Ligtenberg, 1992). Die extrazelluläre Untereinheit enthält die für Muzine charakteristische hoch glykosylierte *Tandemrepeat*- Domäne (*variable number of tandem repeats*, VNTR). Diese VNTR-Domäne des MUC1 setzt sich aus 20 bis 120 Wiederholungen der weitgehend konservierten Aminosäuresequenz PDTRPAPGSTAPPAHGV TSA zusammen. Jeder dieser *Tandemrepeats* ist durchschnittlich mit 3 – 4 Glykanen modifiziert (Abb. 8; Müller, 1999; Hanisch 1989).

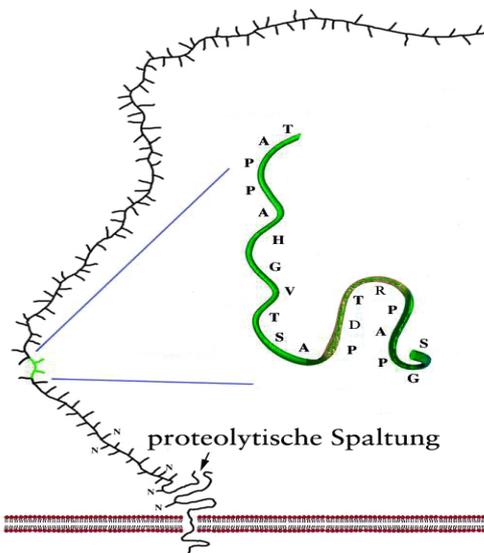


Abb. 8:
Lokalisation, Tertiärstruktur und Glykosylierung des MUC1 Proteins an der Zellmembran. Der grün markierte Bereich stellt eine *Tandemrepeat* Domäne dar, die Aminosäuresequenz dieser Domäne ist zusätzlich in Vergrößerung dargestellt (nach „The ISOBM Network“).

Die ausgeprägte Glykosylierung der VNTR-Domäne bedingt eine unflexible, gestreckte Struktur und eine hohe Schwebedichte. Die Glykane dieser Domäne beeinflussen sowohl durch direkte Wechselwirkungen als auch durch sterische Hinderung Adhäsions- und Anti-Adhäsionsprozesse der MUC1 exprimierenden Zellen (Hanski, 1993; Ligtenberg, 1992).

1.3.2 Die O-Mannose-Modifikation

Die Protein-O-Mannosylierung ist eine essentielle Form der Glykosylierung in Hefen und Pilzen. Die O-Mannosyl-Glykane dieser Organismen bestehen aus α 1-2 gebundenen Ketten, deren typischerweise fünf Mannosereste linear miteinander verbunden werden. Insbesondere die Proteine der Zellwand sind stark mit O-Mannosyl-Glykanen modifiziert. Fehlende O-Mannosylierung dieser Proteine führt zu mechanischer Instabilität der Zellwand und einer dadurch bedingten Wachstumshemmung.

In Säugetieren wurden erste Hinweise auf eine O-Mannosylierung von Proteinen in chondroitinsulfathaltigen Proteoglykanen des Gehirns entdeckt (Finne, 1979). Bis heute wurden O-Mannosyl-Glykane in verschiedenen Glykoprotein- und Proteoglykanfraktionen des Gehirns, des Nervensystems und der Skelettmuskulatur gefunden.

Die O-Mannosyl-Glykane auf Säugerproteinen bestehen nicht aus linearen Mannoseketten, sondern aus komplexen und z. T. verzweigten Strukturen. Ungefähr 30 % aller Alkali-labilen Glykane aus den Glykopeptiden des Hirns verschiedener Spezies weisen Mannose als *core* Zucker auf (Chai, 1999). Bisher wurden Di- bis Heptasaccharide gefunden (Abb. 9), darunter Glykane vom Lewis-X-Typ (Abb. 9, Struktur 3; Smalheiser, 1998) sowie Glykane mit dem HNK-1 Epitop $\text{HSO}_3\text{-3GlcA}\beta\text{1-3Gal}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-2Man}$ (Yuen, 1997).

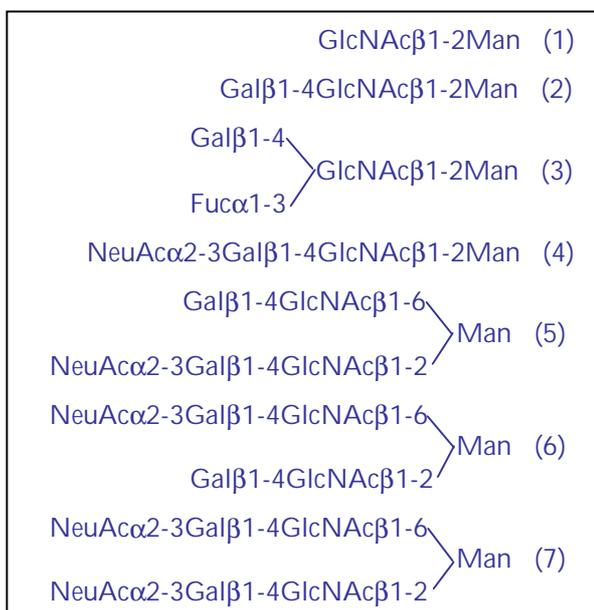


Abb. 9:
Aufbau und Monosaccharidkomposition der auf Glykopeptiden aus Gehirn gefundenen O-Mannosyl-Glykane (Chai, 1999).

Das einzige ausreichend charakterisierte O-mannosylierte Protein ist α -Dystroglykan, die extrazelluläre Komponente des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes (Endo, 1999).

1.3.2.1 Die Biosynthese der O-Mannose Glykane

Die Biosynthese der O-Mannosyl-Glykane der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beginnt cotranslational im Endoplasmatischen Retikulum (Abb. 10). Wie in der N-Glykosylierung ist der Zuckerdonor der Protein-O-Mannosyltransferasen ein Dolicholphosphat-Derivat. Zunächst wird Dolicholphosphat-Mannose (Dol-P-Man) von dem Enzym Dolicholphosphat-D-Mannose:Protein O-D-mannosyltransferase aus dem Lipid Dolicholphosphat und GTP-Mannose synthetisiert. Danach erfolgt der Transfer von Mannose auf das naszierende Protein im Endoplasmatischen Retikulum durch eine Familie von Protein-O-Mannosyltransferasen (PMTs) (Strahl-Bolsinger, 1991). Die Verlängerung dieser *core*-Mannose findet hauptsächlich im cis- und trans-Golgi durch die Mannosyltransferasen-Unterfamilien KTR und MNN1 statt. Die Enzyme dieser Familien sind ebenfalls in die Elongation der N-Glykane involviert (Abb. 10 und Herscovics, 1993).

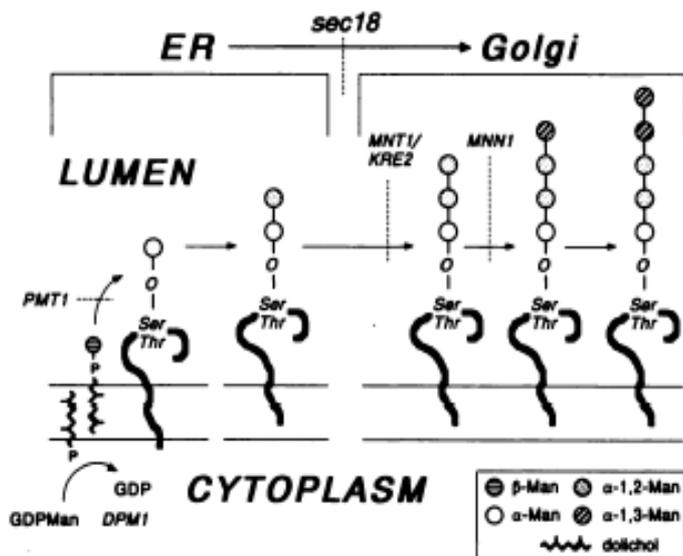


Abb. 10:
Initiierung und Elongation der Protein-O-Mannosylierung in *S. cerevisiae* (aus Herscovics, 1993).

Bei allen bekannten Protein-O-Mannosyltransferasen handelt es sich um integrale Membranproteine der ER-Membran mit mehreren Transmembrandomänen

(Willer, 2002). Alle bekannten Enzyme sind hochgradig konserviert und können in drei Unterfamilien unterteilt werden, PMT1, PMT2 und PMT4. In *S. cerevisiae* sind sieben Mannosyltransferasen bekannt, deren Funktion *in vivo* für die Transferasen ScPmt1p-4p und ScPmt6p gezeigt wurde.

Die Vitalität der Hefe wird erst bei simultaner Zerstörung aller den Unterfamilien PMT1/PMT2 oder PMT4 zugehörigen Transferasen beeinträchtigt (Strahl-Bolsinger, 1993; Gentzsch, 1996). Dies zeigt, dass sowohl Substratspezifität als auch Expressionsmuster der Enzyme einer Familie überlappen. Eine maximale Transferaseaktivität wird erst durch Komplexbildung der Enzyme erreicht. Interaktionen zwischen Transferasen der Unterfamilien PMT1 und PMT2 sind bekannt, während Transferasen der PMT4-Familie homomere Komplexe bilden (Girrbach, 2003).

In Säugetieren sind nur zwei Homologe zu den oben genannten Protein-O-Mannosyltransferasen bekannt. POMT1 kann der PMT4 Unterfamilie zugeordnet werden, POMT2 der PMT2 Familie.

Eine Mannosyltransferaseaktivität dieser Enzyme konnte bisher in EBNA-293-Zellen nachgewiesen werden. Die Versuchsbedingungen weisen auf eine Initiierung der O-Mannosylierung im Endoplasmatischen Retikulum mit Dolicholphosphat-Mannose als Zuckerdonor hin (Manya, 2004; Ichimiya, 2004). Ein Anstieg der Transferaseaktivität in HEK-293T (= EBNA-293) Zellen konnte erst bei rekombinanter Coexpression beider Transferasen gezeigt werden (Manya, 2004). Mittels Coimmunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass POMT1 und POMT2 einen physischen und funktionellen Heterokomplex ausbilden (Akasaka-Manya, 2006).

Die Elongation der O-Mannosyl-Glykane in Wirbeltieren wird durch POMGnT1, eine β 1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase, katalysiert (Takahashi, 2001). Die Topologie dieses Enzyms als Transmembranprotein vom Typ II mit DXD-Motif deutet auf eine Lokalisation im Golgi-Apparat (Yoshida, 2001; Zhang, 2002). POMGnT1 ist nur in Wirbeltieren konserviert, in anderen Organismen wurden bisher keine Homologe gefunden.

1.3.2.2 α -Dystroglykan, ein O-mannosyliertes Protein in Säugern

α -Dystroglykan (α -DG) ist die extrazelluläre Komponente des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes. In Wirbeltieren ist dieser Transmembrankomplex in allen Geweben exprimiert. Eine besonders stark ausgeprägte Expression wird in Nerven-, Hirn-, Epithel-, und Muskelzellen beobachtet. Der Komplex verbindet physisch das Cytoskelett der Zelle mit den Proteinen der extrazellulären Matrix (Abb. 11). α -Dystroglykan besitzt eine deutliche Affinität zu mehreren Proteinen der extrazellulären Matrix. Bekannte Bindungspartner sind Laminin (Ervasti, 1993), Neurexin (Sugita, 2001), Agrin (Sugiyama, 1994) und Perlekan (Talts, 1999). Ebenso binden verschiedene Viren und Bakterien an α -Dystroglykan (Henry, 1999). Die biologischen Funktionen von α -Dystroglykan sind noch nicht vollständig geklärt. Neben der Ausbildung des Kontaktes zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix ist α -Dystroglykan in vielen Geweben verantwortlich für die Morphogenese der Reicherts-Membran (Williamson, 1997) und die Polarisierung von Epithelzellen (Henry, 1998).

Das Protein ist C-terminal durch eine starke nichtkovalente Bindung mit dem N-Terminus von β -Dystroglykan (β -DG) an der Zellmembran verankert (Sciandra, 2001). β -Dystroglykan ist die Transmembrankomponente des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes. Das Protein mit einer Transmembrandomäne (Typ I) bindet extrazellulär N-terminal an α -Dystroglykan und intrazellulär C-terminal an Dystrophin, welches wiederum direkt an das Aktin-Cytoskelett bindet (Abb. 11).

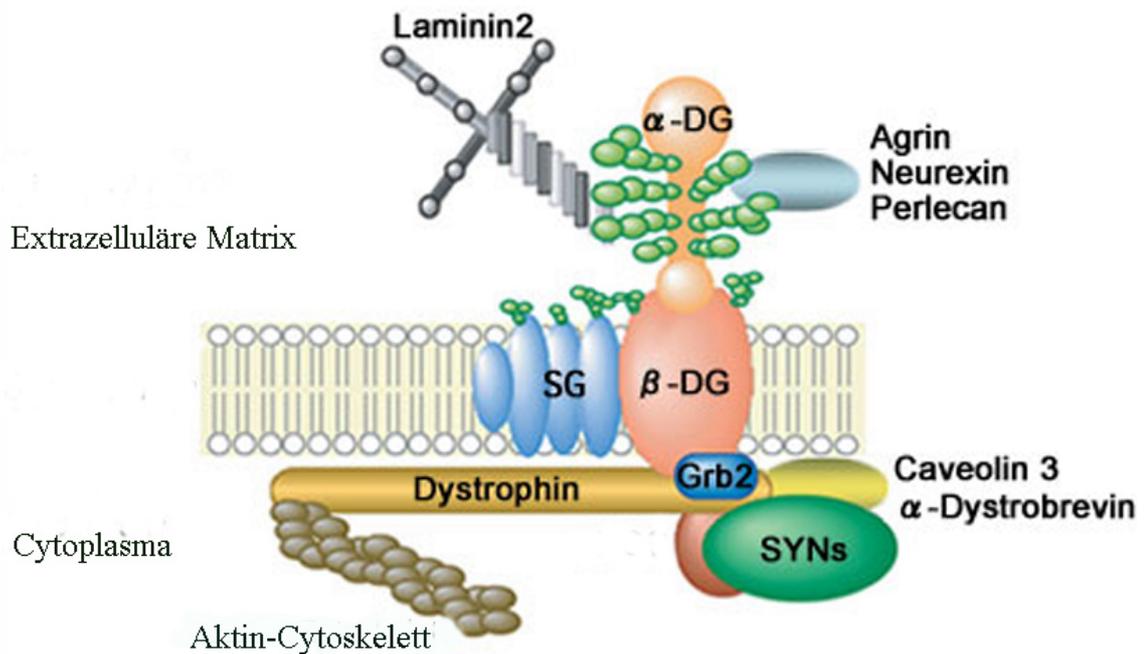


Abb. 11:
Schematische Darstellung des Dystrophin-Glykoprotein-Komplex in der Zellmembran von Säugern (modifiziert nach Endo) (SG: Sarcoglykan; SYN: Syntrophin)

Beide Dystroglykane sind als einziges Gen im Genom kodiert (*Dag1*) und werden in Säugern posttranslational im Endoplasmatischen Retikulum gespalten (Abb. 12; Ibraghimov-Beskrovnaya, 1992; Holt, 2000; Esapa, 2003).

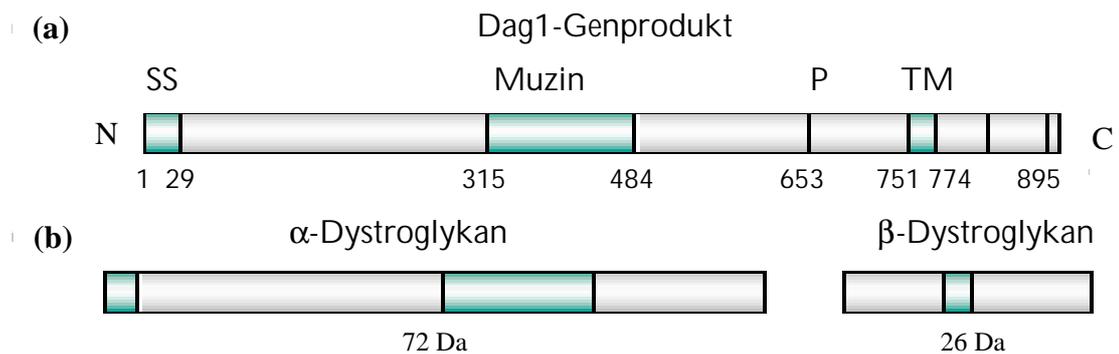


Abb.12:
Der Aufbau der Dystroglykane. (a) zeigt das Produkt des Dag1-Gens, ein einzelnes Polypeptid aus 895 Aminosäuren. (b) zeigt α - und β -Dystroglykan im maturen Stadium. (SS: Signalpeptid zur Insertion ins Endoplasmatischen Retikulum, Muzin: Muzindomäne, P: Stelle der posttranslationalen Spaltung, TM: Transmembrandomäne des β -Dystroglykans) (nach Winder, 2001)

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in kultivierten Epithel- und Tumorzellen der globuläre N-Terminus des α -Dystroglykans durch die Metalloprotease Furin als ein 41 kDa großes Peptid abgespalten wird. Die Funktion und das ubiquitäre Vorkommen dieses sekretorischen *CN*-Dystroglykans *in vivo* sind bisher unbekannt (Singh, 2004).

α -Dystroglykan besteht im maturen Stadium aus zwei globulären Domänen welche durch eine Serin/Threonin reiche Muzindomäne verbunden sind. Diese gestreckte Muzindomäne ist stark O-glykosyliert mit O-Mannosyl-Glykanen als Hauptkomponente (Abb. 13).

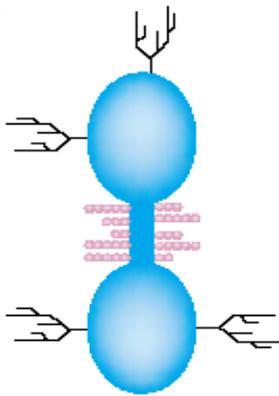


Abb. 13:
Schematische Darstellung des glykosylierten α -Dystroglykans. Die rosa Kugeln repräsentieren die O-Glykane, die schwarzen Zweige die N-Glykane. Das Peptidrückrat ist in blau dargestellt. (Nach Winder, 2001)

Auf α -Dystroglykan aus Hirn- und Nervenzellen wurde ein Tetrasaccharid mit der Struktur Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man (Abb. 9, Struktur 4) als Hauptkomponente identifiziert (Chiba, 1997; Sasaki, 1998). Terminaler Zucker kann sowohl N-Acetylneuraminsäure als auch N-Glykolyneuraminsäure sein (Ervasti, 1997). Auf dem gesamten Protein werden zusätzlich N-Glykane mit einem Gesamtgewicht von 4 kDa (Abb. 13 und Ervasti, 1991) und Glykane des Muzintyps mit der *core1*-Struktur Gal β 1-3GalNAc α -O gefunden (Sasaki, 1998). Eine Gewebsspezifität der Glykosylierung ist anzunehmen. Während das Apoprotein ein Molekulargewicht von 72 kDa aufweist, ist das vollständig glykosylierte Protein durchschnittlich doppelt so schwer. Das α -Dystroglykan der Skelettmuskulatur trägt mit einem Gewicht von ca. 156 kDa deutlich mehr Glykane als das 120 kDa schwere Protein aus Nervenzellen (Henry, 1999). Auf dem Protein aus Muskelzellen wurde neben dem Tetrasaccharid eine Lewis-X-Struktur, 3-gebunden an *core*-Mannose, identifiziert (Smalheiser, 1998).

Terminales N-Acetylgalaktosamin sowie das HNK-1 Epitop werden nur auf α -Dystroglykan aus Hirn und Nerven exprimiert (Smalheiser, 1995; Yamada, 1996; Ervasti, 1997). Ebenfalls weist α -Dystroglykan aus verschiedenen Geweben eine unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen Laminin-Isoformen auf. Zum Beispiel bindet Laminin 10/11 bevorzugt an α -Dystroglykan aus Gehirn (McDearmon, 2006).

Als Bindungspartner für die meisten Proteine der extrazellulären Matrix werden die O-Mannosyl-Glykane der Muzindomäne angesehen (Chiba, 1997; Smalheiser, 1998). In diesem Zusammenhang ist hauptsächlich die Interaktion mit Laminin charakterisiert worden. Die vollständige Deglykosylierung von α -Dystroglykan führt zu einem Verlust der Affinität zu seinen Liganden, während eine selektive Abspaltung der N-Glykane keine Auswirkungen zeigt (Ervasti, 1993). Unerklärlicherweise inhibiert die Abspaltung von N-Acetylneuraminsäure die Bindung an Laminin-1 und -2 in Nervenzellen, nicht jedoch im Muskel (Ervasti, 1993; Yamada, 1996). Neuere Forschungen haben gezeigt, dass auch O-Mannosyl-Glykane mit dem selten vorkommenden α -gebundenen N-Acetylglukosamin für die Bindung an Laminin-1 verantwortlich sein könnten (Combs, 2005; Smalheiser, 1998). Ebenso scheint eine Abhängigkeit der Glykosylierung und Bindungsspezifität vom Gewebetyp vorzuliegen (McDearmon, 2006; Martin, 2003).

Ein Zusammenhang zwischen verminderter Expression von funktionalem α -Dystroglykan und der Entwicklung von Tumoren wird ebenfalls vermutet. Hier korreliert der Verlust mit einer höheren Malignität des Tumors (Sgambato, 2005). Die Ursache für die fehlende Detektion von α -Dystroglykan durch glykanepitop-spezifische α -Dystroglykan Antikörper in Tumorzellen wird jedoch weitgehend kontrovers diskutiert. Als Ursache könnte sowohl reduzierte Expression als auch fehlende Bindungsmöglichkeit an β -Dystroglykan durch erhöhte Proteaseaktivität in Frage kommen (Zhong, 2006). Eine plausible Erklärung ist ebenfalls eine mangelhafte Antikörperdetektion der Glykanepitop-spezifischen Antikörper aufgrund reduzierter Glykosylierung (Singh, 2004). Möglicherweise liegt auch eine Abhängigkeit des Mechanismus vom Zell- oder Tumortyp vor (Sgambato, 2005).

1.3.2.3 Kongenitale Muskeldystrophien des Menschen aufgrund anomaler O-Mannosylierung

Kongenitale Muskeldystrophien sind autosomal-rezessiv vererbte Muskel-erkrankungen, welche zu einer fortschreitenden Abnahme der Muskelmasse führen. Es sind mehr als 30 verschiedene klinische Ausprägungen bekannt. Dabei sind die Schweregrade der Muskelpathologie und der physischen Behinderung sowie der Anstieg der Kreatinkinase im Serum variabel. Bei stark ausgeprägten Typen findet man zusätzlich zu mentaler Retardierung auch verschiedene Missbildungen des Gehirns und der Augen. Die Lebenserwartung reicht je nach Ausprägung von wenigen Wochen bis zu mehreren Jahrzehnten.

Auslöser für diese Krankheiten ist die Fehlbildung einzelner oder mehrerer Komponenten des Dystrophin-Glykoproteinkomplexes oder seiner Bindungs-partner. Dies führt zu einem Verlust der Verbindung zwischen dem Cytoskelett der Zelle und den Proteinen der extrazellulären Matrix. Die Ursachen für die unterschiedlichen Ausprägungen der Krankheit sind in den Funktionen des betroffenen Proteins zu suchen sowie den Möglichkeiten der Zelle, die Funktion des betroffenen Proteins durch Überexpression anderer Proteine zu kompensieren. Mutationen auf dem Gen für Dystroglykan konnten im Menschen bisher nicht nachgewiesen werden. Mäuse ohne ein intaktes *Dag1* Gen sind nicht lebensfähig (Williamson, 1997; Henry, 1998). Defekte in der Glykosylierung von α -Dystroglykan sind dagegen bekannt und führen zu verschiedenen Muskel-dystrophien, den Dystroglykanopathien (Michele, 2002; Muntoni, 2002; Martin, 2005). Auslöser sind nicht exprimierte oder nicht-funktionale Glykosyl-transferasen (Abb. 13).

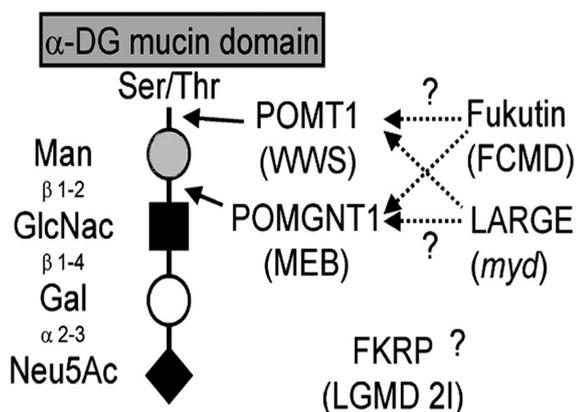


Abb.14:

Defekte O-Mannosylierung des α -Dystroglykans wird in Zusammenhang mit verschiedenen Muskeldystrophien gebracht. Mutationen auf den Genen für Glykosyltransferasen sind wahrscheinlich die Ursache (aus Michele, 2003) (POMT1: Protein-O-Mannosyltransferase1, POMGnT1: Protein-O-Mannose-GlcNac-Transferase, WWS: *Walker-Warburg-Syndrom*, MEB *Muscle-Eye-Brain-Disease*, FCMD: *Fukuyama kongenitale Muskeldystrophie*)

Muskelbiopsien von erkrankten Personen zeigen eine deutliche Reduktion des Molekulargewichtes von α -Dystroglykan und der Bindungsaffinität der glykanspezifischen Antikörper IIH6 und VIA4-1. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in dem Gen für POMGnT1 verantwortlich für *Muscle-eye-brain-disease* (MEB) sind (Yoshida, 2001). Mutationen in POMT1 oder POMT2 können das *Walker-Warburg Syndrom* (WWS) auslösen, eine der am stärksten ausgeprägten Muskeldystrophien (Beltran-Valero, 2002; Akasaka-Manyá, 2006). Es wurden auch WWS Patienten mit Mutationen in Fukutin, FKRP oder POMGnT1 gefunden. Bei mehr als 50% aller WWS Patienten wurde das verantwortliche Gen noch nicht identifiziert. Dies zeigt deutlich, dass die Dystroglykanopathien keine klinisch distinkten Krankheiten sind, welche durch Mutationen in einem bestimmten Gen ausgelöst werden. Stattdessen weisen die Dystroglykanopathien überlappende Phänotypen auf. Dystrophien, welche in klinischer Hinsicht verschieden erscheinen, können gleiche Gendefekte als Ursache haben und umgekehrt (Abb. 14 und Martin, 2005).

Krankheit	Gen
FCMD	Fukutin
WWS	POMT1 POMT2 Fukutin FKRP POMGnT1
MDC1C	FKRP
LGMD2IFKRP	
MDC1D LARGE	
MEB	POMGnT1 FKRP POMT1
Autistische Symptome	POMGnT1

Abb. 15:
Gegenüberstellung der Dystroglykanopathien und der Gene, durch deren Mutation die Krankheit ausgelöst werden kann (Martin, 2005).

1.4 Vorkommen und Struktur von O-Glykanen in dem Modell-Organismus *Drosophila melanogaster*

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* dient häufig als Modellorganismus zur Aufklärung grundlegender zellulärer Funktionen. Obwohl das Genom der Fruchtfliege bereits vollständig sequenziert wurde, ist über die Glykosylierung in diesem Organismus sehr wenig bekannt. Homologien mit bekannten Glykosyltransferasen aus Säugern sind nicht selten, aber eine Aktivität *in vivo* wurde bisher nur für wenige dieser Genprodukte demonstriert. In *D. melanogaster* sind mit ca. 100 Enzymen deutlich weniger Glykosyltransferasen bekannt als im Menschen (ca. 300 bekannte Glykosyltransferasen).

Auch die Struktur der Glykane ist noch nicht erschöpfend erforscht. Die N-Glykane ähneln sowohl im Aufbau als auch in der Biosynthese den N-Glykanen der Säugetiere. Meistens wird der mannosereiche Typ synthetisiert (Seppo, 2000). Bei den O-Glykanen sind die Unterschiede signifikanter. Bisher wurden lediglich Fukose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglucosamin als *core* Zucker der O-Glykane in *D. melanogaster* gefunden. Die Muzintyp O-Glykane bestehen aus sehr kurzen Oligosaccharidketten, wobei bislang nur Tn und T1/*core1* Strukturen beschrieben wurden (Kramerov, 1996). Eine Elongation der *core1*-Strukturen ist nicht bekannt (Seppo, 2000).

Die Addition von Sialinsäure als terminaler Zucker in Insekten ist nur von wenigen Proteinen bekannt. Im Embryonalstadium werden N-Glykane durch N-Acetylneuraminsäure terminiert (Dennis 1987; Schauer, 2001; Seppo, 2000). Die einzige klonierte N-Acetylneuraminsäuretransferase ist lediglich im Gehirn der adulten Fliege, sowie schwach in allen Geweben des Larven- und Puppenstadiums exprimiert (Viswanathan, 2006).

1.4.1 O-Mannosyltransferasen aus *D. melanogaster*

In *D. melanogaster* sind zwei O-Mannosyltransferasen (dPOMT1 bzw. *rt* und dPOMT2) bekannt, welche ubiquitär exprimiert werden. Beide Transferasen wurden aufgrund ihrer Homologien zu den humanen Transferasen gefunden und können den gleichen Familien zugeordnet werden. Wie in Säugern bilden die

beiden Enzyme bei Coexpression einen funktionellen Komplex und katalysieren *in vitro* die O-Mannosylierung von humanem α -Dystroglykan (Ichimiya, 2004). Es ist nicht bekannt, welche *D. melanogaster* Proteine von dPOMT1 und dPOMT2 *in vivo* modifiziert werden.

Mutationen in den *D. melanogaster* Mannosyltransferasen führen zu Muskel-dystrophie-ähnlichen Phänotypen. Mutationen in dPOMT1 führen zu einem *rotated abdomen (rt)*, Mutationen in dPOMT2 zu *twisted (tw)* Phänotypen. Beide *D. melanogaster* Mutanten weisen verschiedene Muskeldefekte, darunter ein verdrehtes Abdomen, auf. Zusätzlich sind reduzierte Fertilität sowie eine reduzierte Lebenserwartung zu beobachten (Jurado, 1999; Willer, 2002). Dies lässt sich als weiterer Hinweis auf die Rolle der O-Mannose-Glykane als Vermittler von Protein-Protein Interaktionen ansehen. (Ichimya, 2004; Jurado, 1999; Lyalin, 2006).

1.4.2 *D. melanogaster* Dystroglykan

Der Dystrophin-Glykoprotein-Komplex ist in *D. melanogaster* in reduzierter Komplexität exprimiert. Alle Hauptkomponenten sind exprimiert, aber es werden z.B. anstatt fünf Syntrophinen in Säugern nur zwei *D. melanogaster*-Homologe exprimiert. Bei den funktionellen Regionen ist dagegen eine hochgradige Konservierung zu beobachten, insbesondere bei Sequenzen, welche Protein-Protein Interaktionen vermitteln. Die Funktion des Komplexes scheint dadurch ebenfalls weitgehend konserviert zu sein (Greener, 2000).

Obwohl α - und β -Dystroglykan in Säugern eine wichtige Rolle spielen, weist das entsprechende Protein aus *D. melanogaster* nur geringe Homologien auf. Das *Dag1* Genprodukt wird in *D. melanogaster* nicht posttranslational in α - und β -Dystroglykan geschnitten, sondern liegt im maturen Stadium als Transmembranprotein vor (Deng, 2003). Die einzige auffällige Übereinstimmung zwischen den Dystroglykanen beider Organismen ist eine Muzindomäne im mittleren Abschnitt des extrazellulären Bereichs. Die Funktion im Organismus scheint trotz der geringen Homologie weitgehend konserviert. Dystroglykan ist in *D. melanogaster* verantwortlich für die Polarisierung der Epithelzellen und der Oozyte. Möglicherweise wird die Funktion des Proteins als Signaltransduktor zwischen

Zelle und extrazellulärer Matrix nicht von der Primärstruktur gewährleistet (Deng, 2003).

Der Muskeldystrophie-ähnliche Phänotyp bei O-Mannosyltransferase defizienten Fliegen ergibt erste spekulative Hinweise auf eine O-Mannosylierung des *D. melanogaster* Dystroglykans. Das Gen für POMGnT1, welches die Elongation der *core*-Mannose katalysiert, ist in *D. melanogaster* nicht konserviert. Deshalb wird die *core*-Mannose wahrscheinlich nicht zu dem aus Säugern bekannten Tetrasaccharid verlängert (Ichimiya, 2004).

1.5 Zielsetzung der Promotionsarbeit

1)

Der Schwerpunkt der Arbeit sollte die Fragestellung sein, ob die O-Mannosylierung in Säugetieren sequon-abhängig ist bzw. welche strukturellen Voraussetzungen auf der Ebene der Proteinprimärstruktur gegeben sein müssen, um O-Mannosylierung zu initiieren. Dieser Frage sollte mit Hilfe von rekombinanten, humanen α -Dystroglykan-Sonden nachgegangen werden, dem einzigen strukturell charakterisierten O-mannosylierten Protein in Säugetieren.

- a) Um Targetsequenzen für diese Proteinmodifikation zu identifizieren, sollten Partialsequenzen des humanen α -Dystroglykans rekombinant exprimiert werden. Durch Kombination verschiedener massenspektrometrischer Methoden sollte das individuelle Glykosylierungsprofil dieser Sonden erstellt werden, wobei im Kontext der Protein-O-Mannosylierung von Bedeutung war, ob die Sonden O-Mannose-Glykane tragen und welche Struktur diese haben.
- b) Anhand O-mannosylierter Sonden sollte mittels ESI-MS/MS Messungen mit CID- und ETD-Fragmentierungen weiterhin die Ortsspezifität der O-Mannosylierung untersucht werden.
- c) Bei sequon-unabhängiger O-Mannosylierung sollten hDG-Hybrid-Konstrukte rekombinant exprimiert werden, in denen regulatorische Sequenzabschnitte des Dystroglykans mit mucin-typischen Repeat-Domänen des MUC1 in einem chimären Fusionsprotein zusammengebracht wurden. Es sollte untersucht werden, ob durch diese Fusion das O-Glykosylierungsprofil des MUC1 in Richtung auf eine paradoxe O-Mannosylierung des Mucins verändert werden kann, das normalerweise ausschließlich mucin-typische O-Glykane trägt.
- d) Durch eine *in vitro* durchgeführte O-Mannosylierung synthetischer Peptide sollte die Existenz einer strikten Konsensussequenz für die Protein-O-Mannosylierung untersucht werden. Die Peptide sollten anhand der Ergebnisse des Teilversuches a) generiert werden.

2)

Im zweiten Teil der experimentellen Arbeiten sollte die Glykosylierung des Dystroglykan aus *Drosophila melanogaster* untersucht werden. Über dieses Protein ist, im Gegensatz zu dem humanen Orthologen, bezüglich einer Modifikation mit Glykanen nichts bekannt. Als erstes sollte untersucht werden, ob die reine Muzindomäne bei rekombinanter Expression O-mannosyliert wird. Bei negativem Befund sollte das Glykosylierungsprofil des gesamten Proteins erstellt werden, wobei zunächst analysiert werden musste, ob das Protein O- oder N-glykosyliert ist. Bei einer Modifikation mit O-Glykanen sollte analysiert werden ob das Protein, analog zu dem humanen α -Dystroglykan, O-Mannosyliert ist. Zusätzlich sollte die Struktur der O-Glykane des *Drosophila*-Dystroglykans identifiziert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Chemikalien wurden von den Firmen Merck Eurolab GmbH oder Sigma-Aldrich bezogen und besaßen den Reinheitsgrad ‚pro analysi‘. Alle Lösungen und Reaktionen wurden mit Millipore-Wasser (Milli-Q PF Plus System, Millipore Corp.) bei Raumtemperatur (RT) angesetzt. Abweichungen von diesen Angaben sind im Text vermerkt.

a) Puffer und Lösungen

Blaumarker (6x):	40% (v/v) Glycerin 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanolblau FF
Elektrophoresepuffer (pH 8,3) für SDS-PAGE:	0,025 M Tris(hydroxymethyl)-aminomethan 0,192 M Glycin 0,1% (w/v) SDS
Ni-NTA Elutionspuffer:	20 mM EDTA 200 mM Imidazol
Ni-NTA Puffer 1 (pH 8,0):	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol
Ni-NTA Puffer 2 (pH 8,0):	50 mM NaH ₂ PO ₄ 300 mM NaCl 10 mM Imidazol 5 mM β-Mercaptoethanol 10% (v/v) Ethanol

Ni-NTA Puffer 3 (pH 6,5):	20 mM NaH ₂ PO ₄
Ni-NTA Puffer 4:	80% (v/v) Ni-NTA Waschpuffer 2 20% (v/v) Acetonitril
Probenpuffer (reduzierend, 5x):	0,2% (w/v) SDS 10% (v/v) Glycerin 0,05% (w/v) Bromphenolblau 0,0625 M Tris-HCl (pH6,8) 5% (v/v) β-Mercaptoethanol
TAE (pH 8,2):	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
TBS (pH 7,4):	0,02 M Tris-HCl 0,15 M NaCl
TBST:	TBS + 0,1% (v/v) Tween 20
Towbinpuffer:	39 mM Glycerin 48 mM Tris 10% (v/v) Methanol

b) Protein- und DNA-Marker

100 bp DNA Leiter (NEB)

1000 bp DNA Leiter (PeqLab)



Abb. 16:
Darstellung des 100 bp und 1000 bp DNA Leiters, entnommen den Katalogen des jeweiligen Herstellers (bp: Basenpaare).

Kaleidoscope Prestained Standard (BioRad)

Protein	Farbe	M _w (kDa)
Myosin	blau	217,0
β-Galaktosidase	magenta	126,0
BSA	grün	73,0
Carboanhydrase	violett	43,5
Trypsininhibitor (Soja)	orange	31,6
Lysozym	rot	18,0
Aprotinin	blau	7,5



Abb. 17:
Darstellung des verwendeten Proteinstandards mit Angabe des Molekulargewichtes (M_w). Die Abbildung ist dem Katalog des Herstellers entnommen (kDa: kiloDalton).

c) Primärantikörper**Verdünnung**

Anti-StrepII, Maus IgG
(IBA)

1:5000 in 5% BSA

Anti-His₅, Maus IgG
(Qiagen)

0,2 µg/ml in 5% BSA

Anti-V5, Maus IgG
(Invitrogen)

0,2 µg/ml in 5% Milchpulver

Anti-MUC1, Maus IgG (C595)
(Dr. G. Denton, University of Nottingham, UK)

1 µg/ml in 5% Milchpulver

d) Sekundärantikörper

Kaninchen-Anti-Maus-IgG (Peroxidase-konjugiert)
(DAKO)

1:2000 in 1% Milchpulver

e) Vektoren

Tabelle 2:
Zusammenstellung der Eigenschaften der verwendeten Expressions- und Kloniervektoren.

Vektor	Resistenz	Promoter	Sekretions-signal	Tags	Herkunft
pBluescript KS	Ampicillin	T3/T7	-	-	Stratagene
pCoBlast	Ampicillin Blasticidin	<i>D. melanogaster</i> copia	-	-	Invitrogen
pMT/BiP/V5-His	Ampicillin	Metallothionein, Induktion mit CuSO ₄	BiP	V5, His ₆	Invitrogen
pAc5.1/V5-His	Ampicillin	<i>D. melanogaster</i> Aktin C5	-	V5, His ₆	Invitrogen
pCep-Pu V27	Ampicillin, Puromycin	CMV	BM40	His ₈	PCEP4 modifiziert durch Kohfeldt, 1997
pCep-Pu V59				StrepII His ₈	
pAcGP67	Ampicillin	Baculovirus polyhedrin	gp67	-	BD Biosciences,

2.2 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle Amplifikationen der DNA Matrizen wurden in dem *DNA-Thermo-Cycler* der Firma Hybaid MBS durchgeführt.

Reaktionsansatz	25 µl
cDNA-Matrize	1 ng
dNTP-Lösung (25 mM)	6,25 pmol (Matrize < 3kb) 10 pmol (Matrize > 3kb)
<i>sense</i> Primer	25 pmol
<i>antisense</i> Primer	25 pmol
Polymerase-Puffer (10x)	2,5 µl
Polymerase	1 U
H ₂ O	

Für kurze Matrizen unter 2000 bp wurde die *Taq*-DNA Polymerase verwendet, ansonsten die *expand High Fidelity* Polymerase (beide von Roche) mit den vom Hersteller beigefügten MgCl₂-haltigen Puffern.

Reaktionszyklen

Zyklen	Temperatur	Dauer
1x	95°C	20 sec
30x	95°C	20 sec
	55 - 68°C	20 sec
	72°C (<i>Taq</i>) / 68°C (<i>High Fidelity</i>)	20 sec – 3 min
1x	72°C (<i>Taq</i>) / 68°C (<i>High Fidelity</i>)	5 min
Ende	4°C	

Die Elongationszeit wurde in Abhängigkeit von der Länge der DNA-Matrize gewählt. Pro 1000 bp wurde 1 min Elongationszeit benötigt. *Annealing*-temperaturen wurden für jedes Primerpaar empirisch ermittelt. Reinheit und Größe der PCR Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (siehe 2.2.5). Für einen Restriktionsverdau wurden die amplifizierten DNA-Fragmente mit Hilfe des QIAquick® PCR *Purification Kit* (Qiagen) entsalzt.

DNA-Primer

Alle Primer wurden von der Firma BioTeZ nach Vorgabe der DNA-Sequenz synthetisiert.

Tabelle 3:
Primer zur Generierung der DNA-Abschnitte der Glykosylierungssonden (DG: Dystroglykan).

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Schnittstelle	Gen/Vektor
hDG5'1, sense	A CTG CTA GCA ATG TCT GCT CAG CTT G	NheI	humanes α -DG
hDG5'1/V59, sense	A CGG AAT TCA ATG TCT GCT CAG CTT G	EcoRI	humanes α -DG
hDG3'1/V59+ Tags, antisense	C GAG ATC TTA TCA TGT CTG GAT C	BglII	humanes α -DG
hDG5'2, sense	A CTG CTA GCC ATT GCT CCT CCA AC	NheI	humanes α -DG
hDG5'3, sense	A CTG CTA GCT GGC ACC ACA GTT C	NheI	humanes α -DG
hDG3'0, antisense	TGA AGA TCT TGG AGG AGC AAT G	BglII	humanes α -DG
hDG3'1, antisense	TGA AGA TCT CAG CTT GTC AGT GGT G	BglII	humanes α -DG
hDG3'2, antisense	TGA AGA TCT GGT GAT GGA AAC	BglII	humanes α -DG
hDG3'3, antisense	TGA AGA TCT GTC AAT ATG GTT CTT G	BglII	humanes α -DG
hDG3'4, antisense	TGA AGA TCT AGC AAC TGC AGT AGG CTC	BglII	humanes α -DG

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Schnittstelle	Gen/Vektor
hDGFusion1, antisense	AGC GAT ATC AAT GGCTGGAGA	EcoRV	humanes α -DG
hDGFusion2, antisense	AGC GAT ATC TGA CAC CCG AGT	EcoRV	humanes α -DG
dDG5'1, sense	CGA GGA TCC TCG ATG TCC GCT CGC G	BamHI	<i>D.melanogaster</i> DG
dDG3'1, antisense	CGA CTC GAG CTG CGG TTC CAT GTA GTC G	XhoI	<i>D.melanogaster</i> DG
dDG5'1 für pCep-Pu, sense	CG AGC TAA GCA TCC TCG ATG TCC GCT C	NheI	<i>D.melanogaster</i> DG
dDG5'extra, sense	CT AGC GGC CGC ATG AGA TTC CAG TGG TTC	NotI	<i>D.melanogaster</i> DG
dDG3'extra, antisense	CA TGC GGC CGC GCC GAA AGA GGA CTT ATG T	NotI	<i>D.melanogaster</i> DG
pMT Taqs pCep-Pu, antisense	CG AGG ATC CGA GGC TGA TCA GCG	BamHI	pMT/BiP/V5-His A
pMT Taqs pAcGP67, antisense	CG AGA ATT CGA GGC TGA TCA GCG	EcoRI	pMT/BiP/V5-His

Tabelle 4:
Sequenzierungsprimer zur Überprüfung der DNA-Sequenz (DG: Dystroglykan).

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Gen/Vektor
T7, sense	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C	pBluescript
T3, antisense	AAT ACG ACT CAC TAT AGG	pBluescript
BGH reverse, antisense	T AGA AGG CAC AGT CGA GG	pAc5.1/V5-His
pCep-Pu reverse, antisense	GATGA GTTTGGACAA ACCAC	pCep-Pu
hDGas, antisense	TC AGT TGA AGG CGT TGC TGG	humanes α -DG
MUC13', sense	T CAT GGT GTG ATG AAG GA	MUC1
MUC13', antisense	TC CTT CAT CAC ACC ATG A	MUC1
dDG2, sense	GAT GGC ACC ATT GGC GCT TTG	<i>D. melanogaster</i> DG
dDG3, sense	C GTT GAT TTG GAT GAG CAA G	<i>D. melanogaster</i> DG

Bezeichnung	Sequenz 5´ - 3´	Gen/Vektor
dDG5, sense	G ACC ATT AAC CAC GAG ATC AG	<i>D. melanogaster</i> DG
dDG6, sense	CG GAT ACC TTC TAT GAT GCG	<i>D. melanogaster</i> DG
dDGas1, antisense	G ATG ATG TGG TGG CTA GGC	<i>D. melanogaster</i> DG
dDGas2, antisense	C ACT GTG TGG ATC GTG TG	<i>D. melanogaster</i> DG
dDGas3, antisense	GAA CGT GAT CAT GTA ATC	<i>D. melanogaster</i> DG
dDGas4, antisense	CTT CTC CTC GTA CTC GTC	<i>D. melanogaster</i> DG
dDGas5, antisense	CAC AAC CAC CGA TGG TGG TG	<i>D. melanogaster</i> DG
dDGas6, antisense	GG CGA CAC ATA TGG CGG TG	<i>D. melanogaster</i> DG

2.2.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Enzymatische Restriktionsspaltungen von DNA mit den Restriktionsendonukleasen BamHI, BglIII, EcoRI, EcoRV, NheI, NotI und XhoI (alle von *New England Biolabs*) wurden nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Die Inkubationsdauer betrug 90 min bei 37 °C in den jeweiligen mitgelieferten Puffern.

2.2.4 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit der T4-Ligase von *New England Biolabs* nach Vorschrift des Herstellers durchgeführt. Religation des Vektors bei ungerichteter Ligation wurde mittels Dephosphorylierung inhibiert. Hier wurde die *Antarctic Phosphatase* (*New England Biolabs*) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Die Vollständigkeit der Restriktionsspaltungen, sowie Größe und Reinheit der DNA nach PCR, wurden über eine elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente in Agarosegelen (1 %) bestimmt. Die DNA-Proben wurden mit einem 6x-Blaumarker eingestellt. Die Agarose (PeqLab) wurde durch Erhitzen in einer Mikrowelle in TAE-Puffer gelöst und mit 1 µg/ml Ethidiumbromid (Invitrogen)

versetzt. Nach Erstarren des Gels in einem *Sub-Cell GT UV-Transparent Mini-Gel Tray* (BioRAD) erfolgte die Trennung bei 80 Volt Gleichspannung in der *Mini-Sub Cell GT* Elektrophoresekammer (BioRAD). Als Größenstandard wurde ein 100 bp (NEB) oder ein 1000 bp DNA-Marker (PegLab) verwendet. Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte auf einem UV-Transilluminator (MWG-Biotech).

Eine Separation der DNA von Salz und Enzymen nach einer Restriktionsspaltung erfolgte ebenfalls über eine Gelelektrophorese. In diesem Fall wurden die DNA-Fragmente nach der Auftrennung mit dem QIAquick® *Gel Extraction Kit* (Qiagen) aus dem Agarosegel eluiert.

2.2.6 Transformation und Amplifikation von Plasmiden

Die Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Bakterien vom Stamm DH5α (*Subcloning efficiency*, Invitrogen) mit Plasmiden erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983, modifiziert).

Die Bakterien wurden aliquotiert bei -80 °C gelagert. Jeweils 50 µl kompetente Bakterien wurden mit 1 ng DNA transformiert. Nach Zugabe der DNA wurden die Bakterien 30 min auf Eis inkubiert bevor sie einem Hitzeschock von 1 min bei 42°C im Wasserbad ausgesetzt wurden. Folgend auf 1 min Abkühlung auf Eis wurden die Bakterien zur Regeneration in 900 µl LB-Medium (Gibco) 30 min bei 37°C inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Agarplatten (*LB-broth base Agar*, Gibco) mit Ampicillin (200 mg/ml) ausgestrichen. Wachstum der Kolonien erfolgte über Nacht bei 37°C. Die Klone wurden vereinzelt und in ampicillinhaltigem (50 µg/ml) Flüssigmedium (Gibco) bei 37°C und 225 Upm für 9-10 Stunden amplifiziert.

2.2.7 Plasmidpräparation aus Bakterien

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *Plasmid Mini Kits* oder des *Plasmid Midi Kits* der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers. Die reine DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

Die Ausrichtung und die Existenz des *Inserts* wurde mittels PCR mit jeweils einem insertspezifischen und einem vektorspezifischen Primer überprüft (siehe 2.2.1)

2.2.8 Klonierung von Glykosylierungs sonden auf Basis der Muzin- domäne des humanen α -Dystroglykans

Zur rekombinanten Expression verschiedener Glykosylierungs sonden, basierend auf dem humanen α -Dystroglykan, wurde der EST Klon 7309805 (Invitrogen) verwendet. Die gewünschten DNA-Abschnitte wurden mittels PCR amplifiziert und simultan mit den Restriktionsschnittstellen NheI (3') und BglII (5') versehen (Genaue Sequenzangaben im Ergebnisteil). Nach der entsprechenden Restriktionspaltung der DNA und des eukaryontischen Expressionsvektors pCEP-Pu (V59) (gespalten mit NheI und BamHI) wurden Insert und Vektor ligiert und in *E. coli*-Bakterien transformiert. Der Vektor pCEP-Pu ist in Bakterien durch die Ampicillin-Resistenz und in EBNA-293-Zellen durch die Puromycin-Resistenz selektionierbar. Das integrierte BM-40-Signal-peptid führt zur Sekretion der exprimierten Proteine.

Ligation, Transformation und Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach oben genannten Standardprotokollen.

2.2.9 Klonierung von Fusionsproteinen aus humanem α -Dystro- glykan und MUC1

Zur Generierung der Fusionsproteine hDGFusion1 und hDGFusion2 wurden zwei Abschnitte des humanen α -Dystroglykans mittels PCR aus dem EST Klon 7309805 (Invitrogen) amplifiziert. Die Restriktionsspaltstellen NheI und EcoRV wurden simultan addiert. Weiterhin wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRV und BamHI die DNA der *Tandemrepeat*-Domäne des MUC1-S Konstruktes (Müller, 2002) isoliert. Beide DNA-Abschnitte wurden in einem Schritt mit den Restriktionsspaltstellen EcoRV, NheI und BamHI/BglII in den Expressionsvektor pCEP-PU (V59) kloniert.

2.2.10 Klonierung der Muzindomäne und des extrazellulären

Abschnitts des *D. melanogaster* Dystroglykans

Zur rekombinanten Expression des *D. melanogaster* Dystroglykans wurde der EST Klon LD 33152 (Invitrogen) des *Berkeley D. melanogaster Genome Project* verwendet. Die DNA der Muzindomäne (dDG1), sowie des extrazellulären Abschnitts (dDGextra) des Proteins, wurden mittels PCR amplifiziert und mit Restriktionsspaltstellen versehen (dDG1: 5' BamHI, 3' XhoI, dDGextra: 5'/3' NotI). Die DNA wurde nach Subklonierung in dem Vektor pBluescript über die jeweiligen Restriktionsspaltstellen in den entsprechenden Expressionsvektor kloniert. Für dDG1 wurde der Vektor pMT/BiP/V5-His mit BglII und XhoI gespalten, für dDGextra der Vektor pAc5.1/V5-His mit NotI.

Die Glykosylierungssonde dDG1 wurde zusätzlich in den Baculovirus Expressionsvektor pAcGP67 kloniert. Hierfür wurde die Sonde gemeinsam mit den Tags V5 und 6His aus dem pMT/BiP/V5-His Vektor per PCR amplifiziert und wie oben mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen BamHI (5') und EcoRI (3') nach Subklonierung in pBluescript in den Expressionsvektor pAcGP67 kloniert.

Für die Expression in Säugerzellen wurde die Glykosylierungssonde dDG1 in pCep-Pu + BM40 (V27) kloniert. Hierfür wurde die Sonde gemeinsam mit den Tags V5 und His₆ per PCR aus dem pMT/BiP/V5-His Vektor amplifiziert und über die Restriktionsspaltstellen NheI (5') und BamHI (3') direkt in den Expressionsvektor kloniert.

2.2.11 DNA Sequenzierung

Alle Konstrukte wurden vor der Transfektion auf Mutationen überprüft. DNA-Sequenzierungen wurden beim ZMMK-Servicelabor in Auftrag gegeben. Für die Reaktion wurden entweder universelle plasmid- oder interne insertspezifische Primer und 300 ng Plasmid-DNA in Kombination mit dem *Abi Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer Applied Biosystems) verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden mit einem *Abi Prism 377 Automated Sequencer* (Perkin Elmer Applied Biosystems) analysiert.

2.3 Zellkulturarbeiten

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Glasgeräte wurden vor Gebrauch autoklaviert, Kunststoffmaterialien waren steril verpackt und wurden nach einmaligem Gebrauch entsorgt. Lösungen und Puffer wurden entweder durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen (75 oder 150 cm², Renner GmbH) in einer wassergesättigten Atmosphäre. Die Zellen wurden jeden dritten Tag vereinzelt und mit frischem Zellkulturmedium versehen. Ablösen der Zellen erfolgte durch Trypsin/EDTA (Säugerzellen) oder mechanisch (Insektenzellen). Alle Reagenzien deren Herkunft nicht weiter benannt wird, wurden von Gibco (Invitrogen) bezogen.

2.3.1 Zelllinien

EBNA-293 (embryonale humane Nierenzellen, Invitrogen)

C₂F₃ (Maus Muskelmyoblasten, Dr. Ursula Hartmann, Zentrum für Biochemie, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln)

Schneider 2 (S2) (*D. melanogaster melanogaster*, Dr. Stephen Cohen, EMBL Heidelberg)

Sf9 (*Spodoptera frugiperda*, Prof. Dr. Martin Scheffner, Universität Konstanz)

High Five (*Trichoplusia ni*, Prof. Dr. Monique Aumailley, Zentrum für Biochemie, Medizinische Fakultät der Universität zu Köln)

Die Säugerzelllinien wurden in Dulbeccos minimal essential Medium (DMEM, Biochrom) bei 37°C und 7,5% CO₂ kultiviert. Das Medium war mit 5% (EBNA-293) oder 20% (C₂F₃) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) sowie Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) versetzt.

Schneider S2 Zellen wurden bei 27°C serumfrei kultiviert in Drosophila-SFM Medium (Gibco), versetzt mit L-Glutamin (18 mM), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml).

Die Nachtfalterzellen Sf9 und High five wurden bei 27°C in TNM-FH Insektenmedium (Sigma-Aldrich) mit 10% FKS und 0,005% Gentamicin (Sigma-Aldrich) kultiviert.

2.3.2 Transfektion und Selektion von Zellen

Alle Transfektionen von Zellen wurden nach dem Prinzip der Cotransfektion mit kationischen Liposomen durchgeführt. Hierbei bildet ein kationisches Lipid in wässriger Lösung Liposomen aus, die mit freier DNA spontan stabile Komplexe ausbilden, welche an die Zelloberfläche binden. Die Lipide verschmelzen mit der Zellmembran und die DNA wird in das Cytoplasma freigesetzt.

Die Säugerzellen wurden nach Herstellervorgaben bei 40-50% Konfluenz Superfect® (Qiagen) transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde durch Zugabe von 5 µg/ml Puromycin (Sigma-Aldrich) zum Wachstumsmedium ein Selektionsdruck ausgeübt. Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte unter andauerndem Selektionsdruck bei gleicher Puromycin-Konzentration.

S2-Zellen wurden mit Cellfectin® nach Vorschrift des Herstellers transfiziert. Die Generierung stabil transfizierter Zelllinien erfolgte mittels Cotransfektion des Selektionsvektors pCoBlast in einem Verhältnis von 1:20. 24 Stunden nach der Transfektion wurde Selektionsdruck durch 20 µg/ml Blastidin im Wachstumsmedium mit 2% FKS ausgeübt. Nach Beendigung der Selektion wurden die Zellen wieder auf serumfreies Medium adaptiert.

2.3.3 Proteingewinnung aus transfizierten Zellen

Bei allen verwendeten Konstrukten enthielt entweder die DNA des Vektors oder des Inserts ein Sekretionssignal. Nach erfolgter Selektion wurde der Zellüberstand zur Proteingewinnung gesammelt.

Bei S2-Zellen, transfiziert mit dem Vektor pMT/BiP/V5-His, wurde die Proteinexpression durch 100 mM CuSO₄ induziert. Der proteinhaltige Zellkulturüberstand wurde 72 Stunden nach Induktion gesammelt.

Zellen und Zellbestandteile wurden jeweils durch 5 min Zentrifugation bei 1000 x g abgetrennt.

2.3.4 Baculovirus-induzierte Proteinexpression

Die Insertion der DNA in das Baculovirus-Genom wurde durch homologe Rekombination zwischen dem Vektor pAcGP67 und der Baculogold[®] Baculovirus DNA (BD Biosciences) mittels Cotransfektion in Sf9-Zellen erreicht. Pro Transfektion wurden 1 x 10⁶ Zellen in 2 ml TNM-FH Wachstumsmedium verwendet. 3 µg Plasmid- und 0,5 µg Virus-DNA wurden gemischt und nach 5 min Inkubation in 100 µl *Grace*-Insektenmedium aufgenommen. 10 µl CellFectin[®] (Invitrogen) wurden mit 100µl *Grace*-Insektenmedium vermischt und zu der DNA-Lösung gegeben. Nach 45 min Inkubation wurden weitere 800 µl Medium zugegeben. Sf9 Zellen wurden mit *Grace*-Insektenmedium gewaschen und 5 Stunden im Transfektionsmedium inkubiert. Infizierte Zellen produzierten anschließend unter Einstellen des Zellwachstums sowohl den rekombinanten Baculovirus als auch das Fusionsprotein. Nach 72 Stunden Inkubation in TNM-FH Wachstumsmedium wurde der virushaltige Zellüberstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei + 4°C gelagert.

Der Titer dieses Virusstocks wurde durch zwei aufeinander folgende Amplifikationen erhöht. Hierfür wurde der Virusstock 1:50 bis 1:400 in Wachstumsmedium verdünnt und zu jeweils 1x10⁶ Sf9-Zellen gegeben. Nach 72 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die relative Konzentration des exprimierten Proteins mittels eines Immunoblots bestimmt. Der virushaltige Überstand mit der höchsten Konzentration wurde für die zweite Amplifikation verwendet. Die Produktion des Fusionsproteins erfolgte durch Infektion von High

five Zellen mit dem höchstkonzentrierten Überstand der 2. Amplifikation in einer Verdünnung von 1:200. Der Überstand wurde jeweils 72 Stunden nach erfolgter Infektion geerntet.

2.4 Proteinchemie

2.4.1 Aufreinigung der Fusionsproteine

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte mit Ausnahme der Umkehrphasen-HPLC-Chromatographie bei 4°C oder auf Eis. Gelagert wurden die Proteine bei -20°C.

2.4.1.1 Nickelchelate-Affinitätschromatographie

Mit Hilfe des His-Tags wurden die Fusionsproteine über eine Ni-NTA-Agarose Matrix (Qiagen) aufgereinigt. Nickel interagiert mit 4 der 6 koordinativen Bindungsstellen der Nitrilotriessigsäure, die beiden weiteren interagieren mit dem His-Tag des Fusionsproteins.

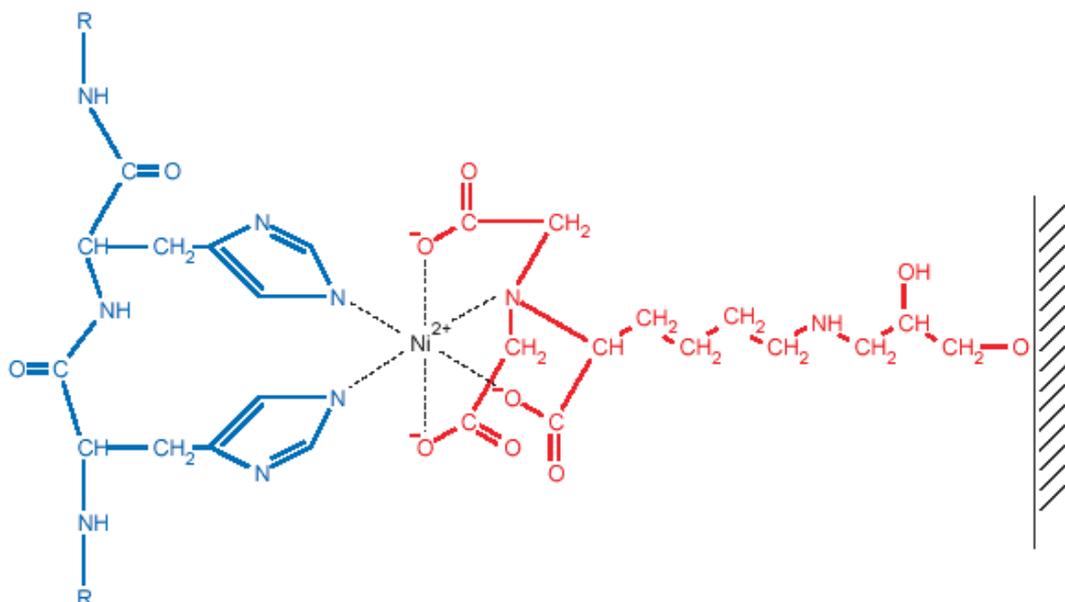


Abb.18:
Interaktionen zwischen dem His-Tag und der Ni-NTA Matrix (aus *The QIAexpressionist* 06/2003, Qiagen).

500 ml Zellkulturüberstand, welcher das jeweilige Fusionsprotein enthielt, wurde zweimal gegen 5 l Ni-NTA Puffer 1 dialysiert. Ionenstärke und pH des Zellkulturüberstandes wurden auf 50 mM Natriumphosphat (pH 8,0), 200 mM Natriumchlorid, 1 mM Imidazol, 2 mM 2-Mercaptoethanol und 10 % (v/v) Ethanol eingestellt. Ausgefallene Bestandteile wurden 30 min bei 9500 x g und + 4 °C pelletiert (Sorvall RC 5C plus, Beckmann). 5 ml Ni-NTA Agarose in einer PD10-Säule (Amersham Biosciences) wurden mit 15 ml Ni-NTA Puffer 1 äquilibriert und zweimal zirkulierend mit dem Überstand der Zentrifugation beladen. Die Ni-NTA Matrix wurde mit jeweils 50 ml Ni-NTA Puffer 1-4 gewaschen und mit 20 ml Ni-NTA Elutionspuffer eluiert. Fraktionen zu je 4 ml wurden gesammelt. Positive Fraktionen wurden durch Immunoblots mit anti-StrepII oder anti-V5 identifiziert, vereinigt und mittels Ultrafiltration (Amicon Centriprep Ultracel YM-10 Da, Millipore) eingengt.

2.4.1.2 Umkehrphasen-HPLC

Weitere Aufreinigung der Proteine (mit Ausnahme des Proteins dDGextra) erfolgte mittels Umkehrphasen-HPLC (*System Gold workstation*, Beckman) über eine C8-Säule (Vydac, MZ Analystechnik). Die Proteine wurden in einem Gradienten von 2 – 80% Acetonitril in 0,1% wässriger TFA bei einer Flussrate von 0,5 ml/min während 30 min eluiert und bei 214 nm (Shimadzu RF-10A XL) unter graphischer Darstellung der Daten am PC (Beckman *Nouveau software*) detektiert. Alle Peaks wurden separat gesammelt und mit Hilfe von Immunoblots mit anti-StrepII oder anti-V5 identifiziert.

2.4.1.3 Gelpermeationschromatographie

Die weitere Aufreinigung des Fusionsproteins dDGextra aus S2-Zellen erfolgte über das ÄKTA-FPLC System (Amersham Biosciences) mit einer Gelfiltrations-säule (Superdex 200 HR10/30). Als Puffer wurde 50 mM NH_4HCO_3 mit einer Flussrate von 0,5 ml/min verwendet. Die eluierten Proteine wurden bei 280 nm detektiert und die Chromatogramme wurden graphisch am PC mit Hilfe der Software *Unicorn 4.01* dargestellt.

2.4.2 SDS-PAGE nach Laemmli

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde nach Laemmli (1979) durchgeführt. Verwendet wurde das Mini-Protean II-Gelelektrophoresesystem von BioRad. Für die Proteinanalyse wurden 5 - 12,5 %ige Trenngele und 3 %ige Sammelgele verwendet (Tabelle 5).

Tabelle 5:
Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele.

	Trenngel 5%	Trenngel 10%	Trenngel 12,5%	Sammelgel 3%
H ₂ O	5,7 ml	3,2 ml	4,1 ml	6,2 ml
1,5 Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
0,5 Tris-HCl pH 6,8	-	-	-	2,5 ml
29% Acrylamid 1% Bisacrylamid	1,7 ml	3,3 ml	4,2 ml	1,2 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	0,005 ml	0,005 ml	0,005 ml	0,01 ml

Die Proteinproben wurden mit reduzierendem Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei 200 Volt für 30 min im Elektrophoresepuffer. Die Proteingele wurden entweder Silber gefärbt (Blum, 1987) oder für Immunoblots verwendet (siehe 2.4.3). Das Molekulargewicht der Proteine wurde in beiden Fällen durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard ermittelt.

2.4.3 Immunoblotting

Die Proteine der SDS-Polyacrylamidgele wurden im *semi-dry* Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran (Protan BA 83, Schleicher & Schüll) transferiert. Verwendet wurde eine *Semi Dry*-Transferzelle (Trans-Blot SD, BioRad). Der Transfer erfolgte über 60 min bei 2mA/cm² in Towbin-Puffer. Unspezifische

Bindungsstellen der Membran wurden anschließend während 2 Stunden mit 5 % Milchpulver oder 5 % BSA in TBST geblockt (Abhängig vom Primärantikörper). Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte über Nacht bei 4°C in 5 % Milchpulver oder 5 % BSA in TBST. Nach mehrfachem Waschen wurde die Membran 2 Stunden bei Raumtemperatur mit einem Peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Nach wiederholtem Waschen der Membran in TBST, TBS und H₂O erfolgte die Visualisierung der Immunreaktivität mittels einer Chemilumineszenzlösung (*Enhanced Chemiluminescence*, Roche). Ausgesendete Lichtsignale wurden auf einem Röntgenfilm (Fuji) exponiert. Die Expositionsdauer variierte in Abhängigkeit von der Stärke der Proteinbanden. Um qualitativ das Vorkommen eines bestimmten Proteins in einer Lösung nachzuweisen wurde das Dot-Blot-Verfahren angewendet. Hierzu wurden 1,5 bis 6 µl der zu analysierenden Lösung auf eine begrenzte Fläche einer Nitrozellulosemembran (Protan BA 83, Schleicher & Schüll) getropft. Mit der Membran wurde nach Trocknung wie oben verfahren.

2.4.4 EDMAN Sequenzierung

EDMAN-Sequenzierungen wurden beim ZMMK-ServiceLabor (Zentrale Bioanalytik) in Auftrag gegeben und erfolgten vollautomatisch auf einem Precise Sequenziergerät der Firma Applied Biosystems. Die Analyse erfolgte mittels eines Aminosäurestandards und der Software *Modell 610 A Data Analysis Programm Version 1.2.1* (Applied Biosystems).

2.4.5 Endoproteinase-Spaltungen

Die Spaltung von Proteinen hinter Arginin und Prolin mit Trypsin (Promega Aldrich) erfolgte während 16 Stunden bei 37°C in 0,1 M NH₄HCO₃ (pH 8,0). Die Spaltung hinter Glutamat mit V8-Protease (= GluC, Sigma-Aldrich) erfolgte unter den gleichen Bedingungen. Der Puffer wurde anschließend mittels Vakuumzentrifugation entfernt. Zur Spaltung hinter Aspartat und Glutamat erfolgte der Ansatz mit V8 in 0,1 M NaH₂PO₄ (pH 8,0). Der Phosphatpuffer wurde mittels C18-*Zip-Tip* (Millipore) nach Herstellerangaben aus dem Reaktionsansatz entfernt.

Eine Trennung der Peptide erfolgte mittels Umkehrphasen-HPLC (*System Gold workstation*, Beckman) über eine C18 Ultrasphere-Säule (4,6 mm x 4,5 cm, Beckman). Die Proteine wurden in einem Gradienten von 4,8 – 21% Acetonitril in 0,1% wässriger TFA während 62 min bei einer Flussrate von 0,3 ml/min eluiert und bei 214 nm (Shimadzu RF-10A XL) unter graphischer Darstellung der Daten am PC (Beckman *Nouveau software*) detektiert.

2.4.6 Exoglykosidase-Spaltungen

Alle Exoglykosidasespaltungen wurden während 24 Stunden bei 37°C in 50 mM Natriumcitrat durchgeführt. Die Exoglykosidasespaltung des humanen α -Dystroglykans erfolgte bei pH 6,0 mit Neuraminidase, bei pH 4,5 mit β -Galaktosidase und bei pH 4,8 mit β -N-Acetylhexosaminidase.

Acetylneuraminyldihydrolase (Neuraminidase), kloniert von *Clostridium perfringens* und überexprimiert in *E. coli* (NEB), hydrolysiert α (2-3,6 und 8) gebundene N-Acetylneuraminsäure optimal bei pH 6,0.

β -Galaktosidase aus *Jack Bean* (GLYKO) hydrolysiert β (1-3,4 und 6) gebundene Galaktose optimal bei pH 4 - 5.

β -N-Acetylhexosaminidase aus *Jack Bean* (GLYKO) hydrolysiert β (1-2,3,4 und 6) gebundenes N-Acetylgalaktosamin optimal bei pH 3,5 - 4 und N-Acetylglukosamin bei pH 5 - 6. Beide Zucker werden zu gleichen Raten bei pH 4,5 hydrolysiert.

2.4.7 Chemische Desialylierung mit verdünnter Trifluoressigsäure

Durch einstündige Inkubation des Proteins in wässriger 0,1 M TFA bei 80 °C wurden die terminalen Sialinsäuren abgespalten.

2.4.8 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Matrix-assisted-laser-desorption/ionisation time-of-flight-Massenspektrometrie von Peptiden wurde auf einem REFLEX IV Massenspektrometer (Bruker Daltonics) mit einem Stickstofflaser ($\lambda = 337$ nm) und positiver Ionendetektion durchgeführt. Als Matrix wurde 2,5 Dihydroxybenzoesäure (Bruker Daltonics)

(40 mg/ml in 0,1% TFA) auf einem Edelstahl $target$ verwendet. Die Spektren wurden mit Hilfe der Software *Flex Analysis* analysiert.

2.4.9 ESI-MS/MS Analysen von Glykopeptiden

Die Elektrospray-Ionisations Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS) Analysen wurden von Dr. M. Macht (Bruker Daltonics, Bremen) auf einem HCT-Ultra-Ionenfallen-Massenspektrometer (mit ETD-Option) durchgeführt.

Die Proteine wurden entweder vor der tryptischen Proteinspaltung mit Exoglykosidasen behandelt (siehe 2.4.6) und über eine Umkehrphasen-HPLC gereinigt, oder nachher chemisch desialyliert (siehe 2.4.7). Die Messung erfolgte als LC-MS/MS bei der die Peptide *online* über eine nanoLC-Anlage (Dionex/LC-Packings Ultimate) mit einer PepMap C18-Säule (300 μ m x 5 mm) in einem H₂O/ Acetonitril Gradienten aufgetrennt wurden. Die massenspektrometrische Messung erfolgte nach Versprühung unter Hochspannung mittels Ionenfallen-MS und Tandem-MS. Der Scanbereich lag bei m/z 300 – 2500 bei MS und m/z 100 – 3000 bei MS/MS Messungen, die Scangeschwindigkeit betrug jeweils 8100 amu/sec. Nach jedem MS Scan wurden MS/MS Spektren für drei Vorläuferionen generiert welche alternierend stoßinduzierter Fragmentierung (collision induced decomposition, CID)-Fragmentierung (Stoßgas Helium) und Elektronentransfer Dissoziation (ETD)-Fragmentierung (Methan/ Fluoranthen) unterworfen wurden. Bei der CID-Fragmentierung erfolgt die Spaltung des Moleküls an der labilsten Stelle, bevorzugt demnach an der Modifikationsstelle. Bei der radikalisch ausgelösten ETD-Fragmentierung dagegen erfolgt keine Energieverteilung im Molekül, woraus eine statistische Verteilung der Spaltungen am Peptidrückrat beruht.

Um spezifisch nach O-mannosylierten Peptiden zu suchen erfolgte zunächst ein Lauf zur Generierung reiner CID-Fragmentierungsdaten, in denen mittels *extracted ion* Chromatogrammen (EIC) nach charakteristischen Fragmentionen (m/z 162: Hex, m/z 366: HexHexNAc, m/z 528: Hex₂HexNAc) gesucht wurde. In einem zweiten Lauf wurden dann die MS/MS-Spektren von interessanten Vorläuferionen nach Anpassung der Akquisitionparameter gemessen.

2.5 Methoden zur Glykanprofilierung

2.5.1 Nachweis von Glykokonjugaten mittels eines Immunoassays

Proteine können nach Auftrennung mittels SDS-PAGE und Immobilisation auf einer Membran (PVDF) mittels Immunoblot unspezifisch auf gebundene Zucker getestet werden.

Der Nachweis beruht auf dem Prinzip der spezifischen Anfärbung von benachbarten Hydroxylgruppen der Zucker nach Perjodat-Oxidation zu Aldehyden. Digoxigenin bindet kovalent an die generierten Aldehyde. Die markierten Glykoproteine können anschließend mit einem Digoxigenin-spezifischen Antikörper, konjugiert mit alkalischer Phosphatase, nachgewiesen werden. Der Nachweis wurde mit dem DIG Glycan Detection Kit von Roche nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.5.2 Enzymatische Freisetzung N-gebundener Glykane mit PNGase F

Die De-N-Glykosylierung mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF, NEB) für die SDS-Gelchromatographie erfolgte nach Angaben des Herstellers mit den mitgelieferten Puffern. Maximal 20 µg Glykoproteine wurden 10 min bei 100 °C mit 0,5 % SDS und 1 % β-Mercaptoethanol denaturiert. Die optimalen Konditionen für das Enzym wurden mit 0,05 M Natriumphosphat pH 7,5 eingestellt, das SDS wurde mit 1 % NP-40 inhibiert. Die De-N-Glykosylierung erfolgte innerhalb 1 Stunde nach Zugabe von 10 000 U (1 µl) PNGaseF bei 37 °C. Zur Analyse der N-Glykane mittels GC/MS wurde der Verdau des Proteins mit PNGaseF nach vorhergehender Endoproteinasespaltung mit Trypsin in 0,1 M NH_4HCO_3 während 16 Stunden bei 37 °C durchgeführt.

Eine Abtrennung der freigesetzten N-Glykane von dem Protein erfolgte über eine SepPak-C18 Säule (100 mg, Baker). Die Protein/Glykanlösung wurde nach dem Aktivieren der Säule durch 80 % Acetonitril mit 0,1 % TFA, gefolgt von 0,1 % TFA in 100 µl 0,1 % TFA aufgetragen. Die Glykane wurden mit 900 µl 0,1 % TFA eluiert.

2.5.3 Nichtreduzierende Freisetzung O-gebundener Oligosaccharide

Eine nichtreduzierende Freisetzung der Oligosaccharide erfolgte nach der Methode von Patel und Parekh (1994) mit wasserfreiem Hydrazin. Unter trockenem Argon wurden 10 µg vollständig trockenes und salzfreies Protein 5 h bei 60 °C in 50 µl wasserfreiem Hydrazin (Glyko) inkubiert. Nach Entfernung des Hydrazin im Exsikkator erfolgte die Re-N-Acetylierung mit 30 µl 2 mM Essigsäureanhydrid in gesättigter wässriger NaHCO₃-Lösung innerhalb von 15 min auf Eis. Die Probe wurde mit 60 µl Ionenaustauscherharz (Dowex 50W-X8 200-400 *mesh hydrogen form*, BioRad) im *Batch*-Verfahren entsalzt. Das Ionenaustauscherharz wurde zweimal mit Wasser nachgewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und eingeeengt.

2.5.4 Reduktive β-Eliminierung O-gebundener Oligosaccharide

10 bis 30 µg des reinen Glykoproteins wurden getrocknet und mit 20 µl NaBH₄ (0,5 M) in NaOH (50 mM) 18 Stunden bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl Essigsäure abgestoppt und mit 50 µl Dowex 50WX8 (BioRad) im *Batch*-Verfahren entsalzt. Die Oligosaccharide wurden bei 40°C im Stickstoffstrom getrocknet und zweifach mit Ethanol gewaschen. Die Boratmethylester wurden unter den gleichen Bedingungen durch mehrfaches Verdampfen mit 0,1% Essigsäure in Methanol entfernt.

Falls eine Abtrennung der freigesetzten O-Glykane von dem Protein nötig war erfolgte dies über eine SepPak-C18 Säule (100 mg, Baker). Das Protein wurde nach dem Aktivieren der Säule durch 80 % Acetonitril mit 0,1 % TFA, gefolgt von 0,1 % TFA in 500 µl 0,1 % TFA aufgetragen. Der Durchfluss enthielt die hydrophilen Glykane.

2.5.5 Permethylierung von Glykan-Alditen

Alle Schritte der Permethylierung bis zu der Neutralisation wurden wasserfrei in einer Argon-Atmosphäre durchgeführt. Die getrockneten wasserfreien Glykane wurden in 50 µl wasserfreiem DMSO suspendiert. Nach Zusatz von 50 µl DMSO-NaOH-Suspension (Anumula, 1992) wurde der Ansatz 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 20 µl Methyljodid (Fluka) zu

der gefrorenen Lösung gegeben. Nach weiteren 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde mit 40 µl Essigsäure (1 M) neutralisiert. Die methylierten Glykane wurden mit 0,3 ml Chloroform/ 0,2 ml Wasser extrahiert und mehrfach mit 0,2 ml Wasser gewaschen. Die Chloroformphase wurde unter Stickstoff eingetrocknet.

2.5.6 HPLC-Analyse fluoreszenzmarkierter Oligosaccharide

a) Fluoreszenzmarkierung freier Oligosaccharide

Die trockenen, nichtreduzierten Oligosaccharide (siehe 2.5.3) wurden mit 1 M 2-Aminobenzamid (2-AB, Fluka) in Essigsäure und 2 M NaCNBH₃ in DMSO im Verhältnis 2:3 inkubiert (Bigge et al. 1995). Nach 2 Stunden bei 60°C wurde überschüssiges Markierungsreagenz durch Papierchromatographie (Schleicher & Schüll) mit n-Butanol/ Ethanol/ Wasser (4:1:1, v/v/v) entfernt. Die Glykane, welche unter den gegebenen Bedingungen nicht migrieren, wurden mit Wasser aus dem Chromatographiepapier eluiert (20 Stunden, 4°C). Die freigesetzten Oligosaccharide wurden durch Filtrierung von dem Chromatographiepapier getrennt.

b) Normalphasen-HPLC

Die fluoreszenzmarkierten Oligosaccharide wurden in Acetonitril/Wasser (3:1) aufgenommen und chromatographisch analysiert (Geräteparameter siehe 2.3.1). An eine Aminophasensäule (Astec NH₂ polymer, 5µm, 4,6 x 250 mm, Alltech) wurde ein linearer Gradient von 80 bis 40% Acetonitril in 250 mM NH₄HCO₂ (pH 4,4) angelegt. Die Glykane eluierten während 80 min bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Die 2-AB-markierten Glykane wurden mit Licht der Wellenlänge 330 nm angeregt und bei 420 nm detektiert (RF-10AXL Fluoreszenzdetektor, Shimadzu).

2.5.7 Monosaccharidkompositionsanalysen mittels GC/MS

a) Methanolyse von Glykanen

5 µg des Glykoproteins oder der Oligosaccharide wurden getrocknet und mit 100 µl methanolischer HCl 16 Stunden bei 70°C unter Argon inkubiert. Die methanolische HCl wurde im Stickstoffstrom entfernt.

Re-N-Acetylierung erfolgte unter Argon innerhalb 30 min bei Raumtemperatur mit 50 µl Methanol, 5 µl Pyridin und 5 µl Essigsäureanhydrid. Die Reaktionslösung wurde ebenfalls im Stickstoffstrom entfernt.

b) Trimethylsilylierung der Monosaccharide

Zur Verbesserung der gaschromatographischen Trenneigenschaften wurden die Methylester der Monosaccharide mit N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluor-acetamid (MSTFA) (Macherey-Nagel) während 10 min bei 70°C derivatisiert.

c) GC/MS-Analysen trimethylsilylierter Monosaccharide

Die trimethylsilylierten Monosaccharide wurden auf einem Fison MD800 (Thermon Electron) über eine 15 m RTX5-SILMS Säule (Restek) aufgetrennt und massenspektrometrisch analysiert. Nach einer initialen Temperatur von 100°C für 1 min wurde ein Temperaturgradient bis 260°C mit einem Anstieg von 6°C/min angelegt. Die Ionisierung der Monosaccharide erfolgte durch Elektronenbeschuss (70 eV). Die positiv geladenen Monosaccharidfragmente wurden mit 1 *Scan* pro Sekunde bei 400 Volt und in einem Massenbereich von 100 - 700 Dalton detektiert.

2.5.8 ESI-MS Massenspektrometrie der methylierten Glykane

ESI-MS/MS Spektren der methylierten Glykane wurden beim ZMMK-Service-labor in Auftrag gegeben. Die Daten wurden auf einem Q-Tof 2 Quadrupol *time of flight* Massenspektrometer (Waters) generiert. Ionisation der Probe (gelöst in 80 % Methanol, 1 % Essigsäure) erfolgte nach Injektion in eine statische Nanospray Kapillare unter Atmosphärendruck. Die erste Ionisierungsspannung betrug 0,7 kV, die zweite 30 bis 40 V.

2.5.9 GC/MS Analyse partiell methylierter Alditolacetate

a) Hydrolyse

Die permethylierten Glykane wurden getrocknet und in 100 µl 2M TFA in Wasser aufgenommen. Nach 2 Stunden Inkubation bei 121 °C wurden die hydrolysierten Glykane im Stickstoffstrom in Gegenwart von Ethanol als Azeotrop-Gemisch eingetrocknet.

b) Reduktion

Die Monosaccharide wurden in 100 µl Bordeuterid (10 mg/ml) in 2 M Ammoniak aufgenommen und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zerstörung des überschüssigen Hydrids mit Essigsäure und Eintrocknen des Reaktionsgemisches im Stickstoffstrom wurden die Boratmethylester durch mehrfache Codestillation mit 100 µl Essigsäure (0,1 %) in Methanol entfernt.

c) Acetylierung

Die Acetylierung erfolgte während 1 Stunde bei 100 °C in 100 µl Essigsäureanhydrid. Nach Eintrocknen der Reaktionsmischung im Stickstoffstrom wurden die partiell methylierten Alditacetate mit 0,3 ml Chloroform extrahiert und mehrfach mit 0,2 ml Wasser gewaschen. Die Chloroformphase wurde im Stickstoffstrom eingeeengt.

d) GC/MS Analyse

Die GC/MS-Analyse erfolgte auf einem Fison MD800 (Thermon Electron) über eine 15 m RTX5-SILMS Säule (Restek).

Nach einer initialen Temperatur von 60 °C für 1 min wurde ein Temperaturgradient bis 100 °C mit einem Anstieg von 40 °C/min angelegt, gefolgt von einem Anstieg bis 280 °C mit 10 °C/min. Die Ionisierung der Monosaccharide erfolgte durch Elektronenbeschuss bei 70 eV. Die positiv geladenen Monosaccharidfragmente wurden mit 1 *Scan* pro Sekunde bei 400 Volt und in einem Massenbereich von 100 - 450 Dalton detektiert.

2.6 *In silico* Analysen

Das theoretische Molekulargewicht (M_w) und der isoelektrische Punkt (pI) der rekombinanten Proteine wurden mit dem *ExPASy Compute Mw/pI Tool* ermittelt. Die Transmembrandomäne des *Drosophila* Dystroglykans wurde von dem *TMHMM Server* v. 2.0 vorhergesagt, potentielle N-Glykosylierungsstellen von dem *NetNGlyc 1.0 Server*. Sekundärstrukturen wurden von dem *PredictProtein Server* vorhergesagt

2.7 *In vitro* Glykosylierung

Für die *in vitro* Glykosylierung wurden von der Firma *Peptides and Elephants* synthetische Peptide aus jeweils 15 Aminosäuren auf Basis der Aminosäuresequenz der Glykosylierungssonde hDG8 hergestellt. Die Aminosäuren 1 – 9 überlappten jeweils mit der Sequenz des vorhergehenden Peptids, die Aminosäuren 7-15 jeweils mit denen des folgenden Peptids. Die Peptide wurden mittels Umkehrphasen-HPLC (*System Gold workstation*, Beckman) über eine *Prevail C18-Säule* (5 μ , Alltech) gereinigt. Die Proteine wurden in einem Gradienten von 4,8 – 21% Acetonitril in 0,1% wässriger TFA während 72 min bei einer Flussrate von 2 ml/min eluiert und bei 214 nm (Shimadzu RF-10A XL) unter graphischer Darstellung der Daten am PC (Beckman *Nouveau software*) detektiert. Die Peptide wurden anschließend mittels MALDI-TOF-MS bezüglich Reinheit und Molekulargewicht analysiert.

Tabelle 6:
Zusammenstellung aller verwendeten synthetischen Peptide und deren berechnetes Molekulargewicht in Dalton (Da).

Nummer	Aminosäuresequenz	Molekulargewicht (Da)
1	AIAPPTETMAPPVRD	1565
2	ETMAPPVRDPVPGKP	1590
3	VRDPVPGKPTVTIRT	1635
4	GKPTVTIRTRGAI IQ	1610
5	IRTRGAI IQTPTLGP	1593

Nummer	Aminosäuresequenz	Molekulargewicht (Da)
6	IIQTPTLGP IQPTRV	1633
7	LGPIQPTRVSEAGTT	1524
8	TRVSEAGTTVPGQIR	1570
9	GTTVPGQIRPTMTIP	1568
10	QIRPTMTIPGYVEPT	1702
11	TIPGYVEPTAVATPP	1512
12	EPTAVATPPTTTTKK	1542
13	TPPTTTTKKPRVSTP	1611
14	TKKPRVSTPKPATPS	1594
15	STPKPATPSTDSTTT	1491
16	TPSTDSTTTTTRRPT	1622
17	TTTTTRRPTKKPRTP	1741
18	RPTKKPRTPRPVPRV	1784
19	RTPRPVPRVTTK VSI	1706
20	VPRVTTKVSITRSLV	1655

2.7.1 Protein-O-Mannosylierung *in vitro*

a) Isolierung der Partikulärfraction

Die Isolierung der Partikulärfraction aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte nach dem Protokoll von Girrbach (2000). *S. cerevisiae* wurde in flüssigem YPD Medium (Clontech) bei 30 °C bis zu einer Zelldichte von ca. 2×10^7 Zellen/ml in einem Schüttler kultiviert. Die Zellen wurden 5 min bei 2000 x g abzentrifugiert und mit 50 mM Tris/Cl (pH 7,5) mit 0,3 mM MgCl₂ gewaschen. Das Pellet wurde in 200 µl des gleichen Puffers aufgenommen und mit den Proteaseinhibitoren PMSF (1 mM), Benzamidin (1 mM), TLCK (0,25 mM), TPCK (50 µg/ml), Antipain (1 µg/ml), Leupeptin (1 µg/ml) und Pepstatin A (1 µg/ml) versetzt. Der Aufschluss erfolgte durch mehrmaliges Vortexen mit

200 µl Glaskugeln (HCl gewaschen) bei 4 °C. Die Zellwände wurden durch 5 min Zentrifugation bei 3000 x g pelletiert. Die Partikulärfraction wurde aus dem Überstand durch 30 min Zentrifugation bei 48 000 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 50 mM Tris/Cl (pH 7,5) mit 7,5 mM MgCl₂ und 15% Glycerol aufgenommen und in flüssigem Stickstoff gelagert.

b) Präparation der Mikrosomenmembran aus C₂F₃ Zellen

Konfluente C₂F₃-Zellen aus einer T150 Zellkulturflasche wurden mit Hilfe eines Zellschabers geerntet und mit PBS (Gibco) gewaschen. Die Zellen wurden in 10 mM Tris/Cl (pH 7,4) mit 1 mM EDTA und 250 mM Sukrose homogenisiert. Zusätzlich wurden die Proteaseinhibitoren Pepstatin A (3 µg/ml), Leupeptin (1 µg/ml), Benzamidin-HCl (1 mM), PMSF (1 mM) und DTT (1 mM) zugesetzt. Die Zellwände wurden während 10 min bei 900 x g pelletiert. Die Mikrosomenmembran wurde aus dem Überstand während einstündiger Zentrifugation bei 100 000 x g pelletiert und direkt weiterverarbeitet.

c) Herstellung von Dolicholphosphatmannose

Die Herstellung von Dolicholphosphatmannose beruht auf einem Protokoll von Sharma (1974). 3,5 nmol C95-Dolicholphosphat (Larodan) in 10 µl Aceton wurden mit dem gleichen Volumen 0,1 M MgEDTA versetzt und im Stickstoffstrom eingetrocknet. Ionenstärke und pH wurden auf eine Endkonzentration von 14 mM Tris/Cl 7,4; 8 mM MgCl₂ und 0,17 % Triton X 100 eingestellt, bevor die Suspension mit 0,045 mM GDP-Mannose und 0,06 mg Protein der Partikulärfraction versetzt wurde. Der Transfer der Mannose auf das Dolicholphosphat erfolgte während 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Lipid durch eine Chloroform/ Methanol-Extraktion (3:2) extrahiert, unter Stickstoff getrocknet und in Chloroform aufgenommen.

Die Kontrolle der Reaktion erfolgte durch eine Veränderung des Laufverhaltens in der Dünnschichtchromatographie auf Nano-Silikat-Platten mit Fluoreszenzbeschichtung (Macherey-Nagel). Als Laufmittel wurde eine Mischung aus Chloroform/ Methanol/ Wasser in einem Verhältnis von 66:24:4 eingesetzt.

d) Transfer von Mannose auf ein synthetisches Peptid

Die O-Mannosylierung *in vitro* erfolgte nach Many (2004) mit leichten Modifikationen. 100 nM Dol-P-Man, 80 µg Mikrosomenmembranfraktion und 10 µg des jeweiligen Peptids in einem Puffer aus 20 mM Tris/Cl (pH 8,0), 2 mM 2-Mercaptoethanol und 0,5 % Octyl-β-D-thioglycosid wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl über Nacht bei 22 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 0,1 % TFA in Wasser abgestoppt und Lipide der Mikrosomenmembranfraktion wurden durch 10 min Zentrifugation bei 10.000 x g abgetrennt. Die Peptide konnten anschließend unmittelbar mittels MALDI-MS analysiert werden.

2.7.2 Modifizierung mit O-N-Acetylgalaktosamin *in vitro*.

5 µg eines synthetischen Peptids in 15 µl 25 mM Cacodylat (pH 7,5) mit 10 mM MnCl₂ wurden mit 200 µM UDP-GalNAc (Sigma) versetzt und 24 Stunden mit 2,5 µl der rekombinanten GalNAc-Transferasen rGalNAc-T1 und -T2 (Clausen 1996; Hanisch, 2001) bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl 0,1 % TFA in Wasser abgestoppt. Jeweils 1 µl des Reaktionsansatzes wurden mittels MALDI-MS analysiert.

Als Positivkontrolle wurde das synthetische Peptid *TAP25* mit der Aminosäuresequenz TAPPAHGVTSAPDTPAPGSTAPPA und einem Molekulargewicht von 2324 Dalton verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen zur Aminosäuresequenzabhängigkeit der Protein-O-Mannosylierung in Säugetieren

3.1.1 Generierung von Glykosylierungs sonden auf Basis von humanem α -Dystroglykan (α -DG) und von Fusionsproteinen aus α -DG und MUC1

Alle in diesem Abschnitt beschriebenen Proteine wurden rekombinant in EBNA-293-Zellen exprimiert. Der hierbei verwendete Expressionsvektor pCEP-PU + BM40 (V59) enthielt N-terminal das Signalpeptid BM40 als Sekretionsmediator und C-terminal einen His₈- sowie einen StrepII-Tag (Abb. 22).

a) Glykosylierungs sonden

Es wurden insgesamt acht Glykosylierungs sonden auf Basis der Muzindomäne des humanen α -Dystroglykans kloniert. Die Glykosylierungs sonde hDG1 umfasste die Muzindomäne sowie einige flankierende Aminosäuren (Abb. 19).

1	MRMSVGLSLL	LPLWGRTFLL	LLSVVMAQSH	WPSEPSEAVR	WENQLEASM
51	HSVLSDLHEA	VPTVVGIPDG	TAVVGRSFRV	TIPTDLIASS	GDI IKVSAAG
101	KEALPSWLHW	DSQSHTLEGL	PLDTDKGVHY	ISVSATRLGA	NGSHIPQTSS
151	VFSIEVYPED	HSELQSVRTA	SPDPGEVVSS	ACAADEPVTV	LTVILDADLT
201	KMTPKQRIDL	LHRMRSFSEV	ELHNMKLV PV	VNNRFLFDMSA	FMAGPGNAKK
251	VVENGALLSW	KLGC SLNQNS	V PDIHGVEAP	AREGAMSAQL	GYPVVGWHIA
301	NKKPPLPKRV	RRQIHATPTP	VT AIGPPTTA	IQEPPSRIVP	TPTSPA IAPP
351	TETMAPPVRD	PVPGKPTVTI	RTRGAI IQTP	TLGPIQPTRV	SEAGTTVPGQ
401	IRPTMTIPGY	VEPTAVATPP	TTTTKKPRVS	TPKPATPSTD	STTTTTRRPT
451	KKPRTPRPVP	RVTTKVSITR	LETASPPTRI	RTTTSGVPRG	GEPNQRPELK
501	NHIDRVDAWV	GT YFEVKIPS	DTFYDHEDTT	TDK LKLTLKL	REQQLVGEKS
551	WVQFNSNSQL	MYGLPDSSHV	GKHEYFMHAT	DKGGLSAVDA	FEIHVHRRPQ
601	GDRAPARFKA	KFVGDPALVL	NDIHKKIALV	KKLAFAFGDR	NCSTITLQNI
651	TRGSIVVEWT	NNTLPLEPCP	KEQIAGLSRR	IAEDDGKPRP	AFSNALEPDF
701	KATSITVTGS	GSCRHLQFIP	VVPPRRVPSE	APPTEVPDRD	PEKSEDDVY
751	LHTVIPAVVV	AAILLIAGII	AMICYRKKRK	GKLTLEDQAT	FIKKGVP IIF
801	ADELDDSKPP	PSSSMPLILQ	E EKAPLPPPE	YPNQSVPETT	PLNQDTMGEY
851	TPLRDEDPNA	PPYQPPPPFT	APMEGKGSRP	KNMTPYRSPP	PYVPP

Abb. 19:

Aminosäuresequenz des humanen α -Dystroglykan. Die Sequenz der größten rekombinant exprimierten Glykosylierungs sonde (hDG1) ist in blauer Schrift dargestellt.

Die anderen sieben Glykosylierungssonden, hDG5 - hDG11, umfassten verschiedene Teilstücke der Sonde hDG1 (Abb. 20).

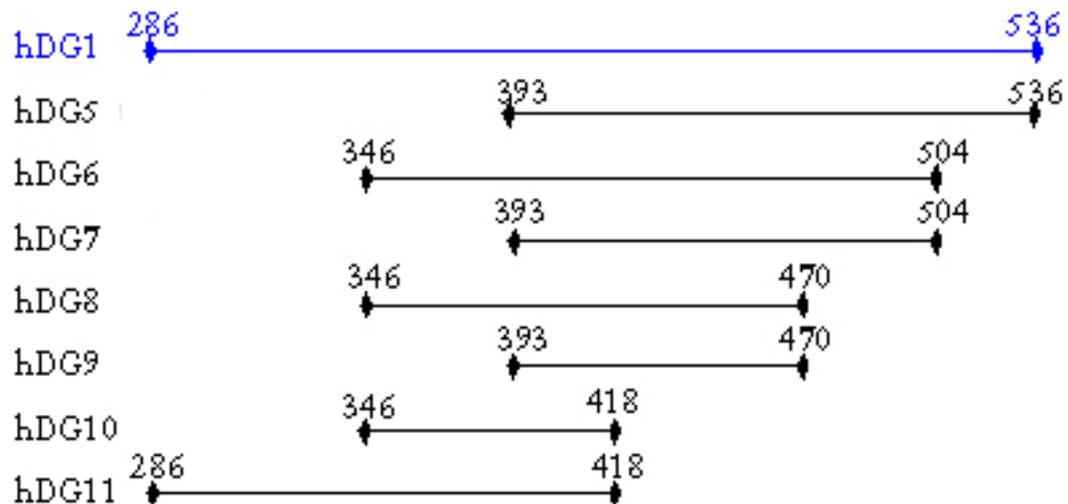


Abb. 20:
Aminosäureabschnitte aller rekombinant exprimierten Glykosylierungssonden der Muzindomäne des humanen α -Dystroglykans. Die größte exprimierte Sonde, hDG1, welche die gesamte Muzindomäne abdeckt, ist in blau dargestellt.

b) chimäre Fusionsproteine

Aufgrund der Glykosylierungsprofile der in a) beschriebenen Glykosylierungssonden wurden die Aminosäureabschnitte 286 – 346 und 286 – 393 des humanen α -Dystroglykans zusätzlich für die Generierung von Fusionsproteinen verwendet (Abb. 21).

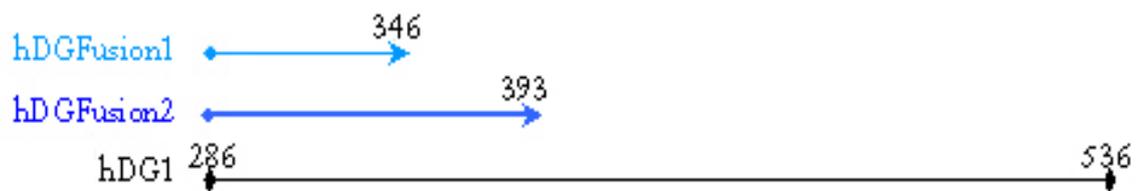


Abb. 21:
Für die Fusionsproteine ausgewählte Abschnitte des humanen α -Dystroglykans, in Vergleich mit der Glykosylierungssonde hDG1.

Die Fusionsproteine bestanden aus dem jeweiligen N-terminalen Abschnitt des humanen α -Dystroglykans und der C-terminalen *tandemrepeat*-Domäne (*variable number of tandem repeats*, VNTR) eines Muzins (MUC1, Abb. 22).

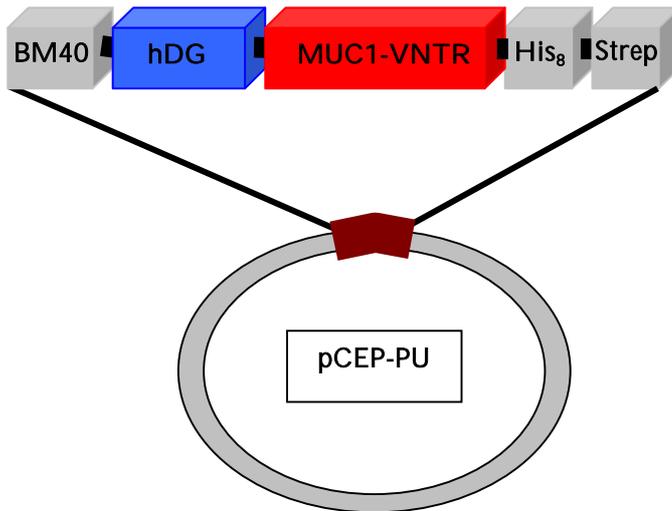


Abb. 22:
Aufbau der Fusionsproteine aus humanem α -Dystroglykan und MUC1. Die Proteine wurden in den Vektor pCEP-PU + BM40 (V59) kloniert. Dieser enthielt neben dem N-terminalen BM40 Signalpeptid C-terminal einen His₈- sowie einen StrepII-Tag.

Das Protein MUC1-S entspricht dem extrazellulären Abschnitt des humanen MUC1 (Müller, 2002 und Abschnitt 1.3.1.1). MUC1-S enthält eine VNTR-Domäne mit sechs konservierten *tandem repeats* (Abb. 23). Diese werden stark O-glykosyliert, wobei die O-Glykane ausschließlich vom Muzintyp sind. Bei rekomanter Expression in EBNA-293 Zellen wurden sialylierte *core1* und *core2* Strukturen beobachtet (Engelmann, 2005).

1			M R A W I	F F L L C
11	L A G R A	L A A P L	V H H H H	H H G P L
31	V A S N E	Q K L I S	E E D L A	S M T G G
51	Q Q M G R	D I E G R	G L A P Y	A L K E M
71	A P P A H	G V T S A	P D T R P	A P G S T
91	A P A A H	G V T S A	P E S R P	A P G S T
111	A P P A H	G V T S A	P D T R P	A P G S T
131	A P P A H	G V T S A	P D T R P	A P G S T
151	A P A A H	G V T S A	P D T R P	A P G S T
171	A P Q A H	G V T S A	P D T R P	A P G S T
191	A P P A H	G V M K E	A L P Y P	R P L E A
161	G K A G S	R H D K I	H	

Abb. 23:
Aminosäuresequenz des Proteins MUC1-S. Mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen EcoRV und BamHI wurde die VNTR-Domäne (fett markiert) zur Klonierung der Fusionsproteine isoliert. Der für die Fusionsproteine verwendete Abschnitt ist in roter Schrift dargestellt.

Anhand der Glykosylierung der VNTR-Domäne sollte überprüft werden, ob der jeweilige Abschnitt des humanen α -Dystroglykans eine Aminosäuresequenz mit ausreichender Information zur O-Mannosylierung des gesamten Proteins enthält.

3.1.1.1 Generierung der cDNA-Konstrukte und rekombinante

Expression in EBNA-293 Zellen

Die cDNA des humanen α -Dystroglykans wurde mittels PCR aus dem EST Klon 7309805 (Invitrogen) generiert. Die flankierenden Primer sind in Tabelle 7 angegeben. Mit Hilfe der Primer wurde das Amplikon der Glykosylierungsstellen zusätzlich mit den Restriktionsschnittstellen NheI (5') und BglII (3') versehen, das Amplikon der Fusionsproteine mit den Schnittstellen NheI (5') und EcoRV (3'). Länge und Reinheit der aufgereinigten cDNA-Fragmente wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft (Tabelle 7 und Abb. 24).

Tabelle 7:

cDNA-Abschnitte, Länge und flankierende Primer der cDNA Abschnitte hDG1 – hDG10 des humanen α -Dystroglykans. Die Angaben sind bezogen auf die mRNA-Sequenz des Dag1 Gens. Translation von α -Dystroglykan beginnt bei Basenpaar 351. (bp: Basenpaare).

Bezeichnung	Primer	cDNA-Abschnitt (bp)	Länge (bp)
hDG1	hDG5'1 + hDG3'1	1211 – 1958	747
hDG5	hDG5'3 + hDG3'1	1530 – 1958	428
hDG6	hDG5'2 + hDG3'2	1389 – 1865	476
hDG7	hDG5'3 + hDG3'2	1530 – 1865	335
hDG8	hDG5'2 + hDG3'3	1389 – 1753	364
hDG9	hDG5'3 + hDG3'3	1530 - 1753	223
hDG10	hDG5'2 + hDG3'4	1389 – 1604	215
hDG11	hDG5'1 + hDG3'4	1211 - 1604	393
hDGFus1	hDG5'1 + hDGFus1	1211 – 1396	185
hDGFus2	hDG5'1 + hDGFus2	1211 – 1529	318

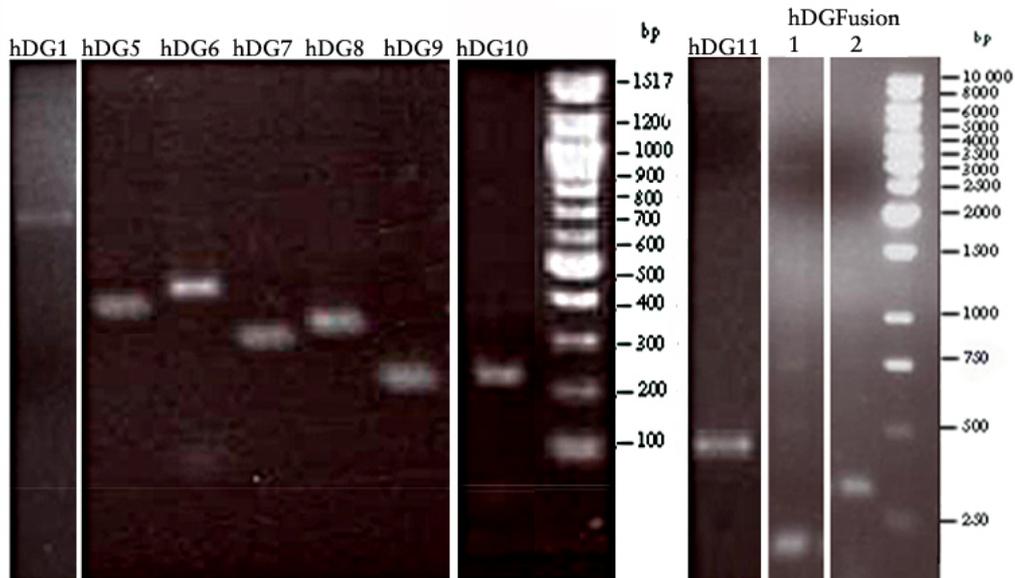


Abb. 24:
Mittels PCR amplifizierte cDNA der Abschnitte hDG1, hDG5 – hDG11 und hDGFusion1 – 2 des humanen α -Dystroglykan. Die entsalzte cDNA wurde über 1 %ige Agarosegele aufgetrennt, Größe und Reinheit wurden durch Vergleich mit einem cDNA-Standard überprüft.

Die 472 Basenpaare lange cDNA der VNTR-Domäne des MUC1-S wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRV und BamHI isoliert und ebenfalls über ein Agarosegel aufgereinigt (Abb. 25).

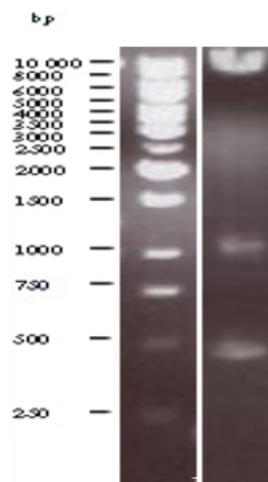


Abb. 25:
Restriktionsverdau des MUC1-S Konstruktes. Die unterste Bande bei 472 bp ist die VNTR-Domäne, die oberen beiden Banden bei 1013 bp und 10 000 bp stammen von dem Vektor pCEP-PU und der DNA der N- und C-Termini.

Die cDNA der Glykosylierungs sonden hDG1 und hDG5 - 11 wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI/BglII und NheI in den Vektor pCEP-PU + BM40 (V59) kloniert und in *E. coli* Bakterien vom Stamm DH5 α amplifiziert. Die cDNA-Fragmente des humanen α -Dystroglykans sowie des MUC1-S wurden

simultan über die Restriktionsschnittstellen NheI (5'), EoRV (Mitte) und BamHI/BglII (3') in den Vektor kloniert und amplifiziert.

Nach Sequenzierung der cDNA wurden die mutationsfreien Konstrukte in EBNA-293-Zellen transfiziert.

3.1.1.2 Aufreinigung der Proteine aus dem Zellüberstand

Jeweils 500 ml Zellüberstand transfizierter Zellen wurde gesammelt und mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie vorgereinigt. Die eluierten Fraktionen wurden auf StreptII-Immunoreaktivität getestet. Positive Fraktionen wurden vereinigt, durch Ultrafiltration eingengt und mittels Umkehrphasen-HPLC über eine C8-Säule vollständig aufgereinigt. Alle Proteine zeigten aufgrund heterogener Glykosylierung keine scharfen Signale in den Chromatogrammen (Abb. 26 - 27 und 96 im Anhang). Aus ungeklärten Ursachen lagen die Proteine hDG1 und hDG11 nach der Nickelchelate-Affinitätschromatographie in sehr geringer Konzentration vor.

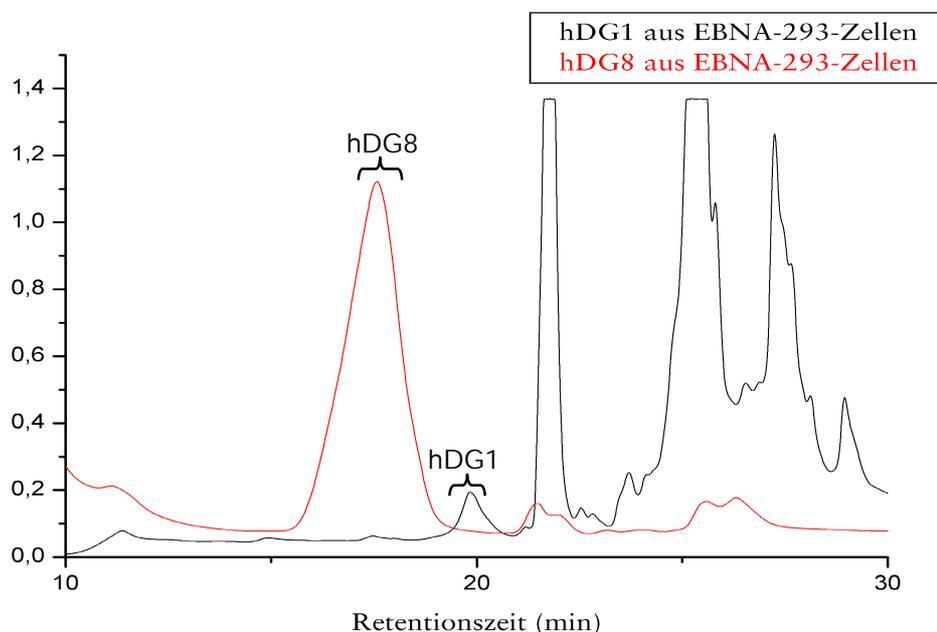


Abb. 26:
Chromatogramme der HPLC-Aufreinigungen am Beispiel der Proteine hDG1 und hDG8. hDG1 eluierte bei 19 - 20 min Retentionszeit, hDG8 bei 15 - 18 min. Die Chromatogramme aller anderen Sonden werden im Anhang gezeigt.

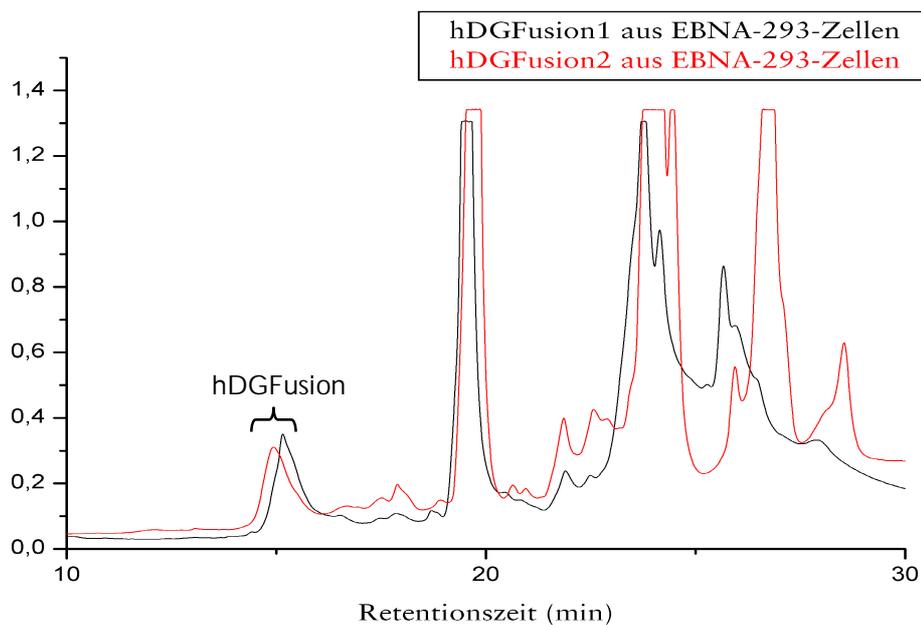


Abb. 27:
Chromatogramme der HPLC-Aufreinigungen der Fusionsproteine, welche jeweils bei 14 – 15 min Retentionszeit eluierten.

Die Fraktionen der HPLC wurden gesammelt, eingengt und elektrophoretisch (SDS-PAGE, 10%) analysiert. Mittels Immunoblot wurde ermittelt, welches Signal des HPLC-Profiles das rekombinante Protein enthielt (Abb. 28). Die Reinheit der rekombinanten Proteine wurde durch Silberfärbung des SDS-Polyacrylamidgels überprüft (Abb. 29). Von allen Proteinen werden die Fraktionen gezeigt, welche ausschließlich das rekombinante Protein enthielten. Die Proteine zeigten aufgrund ihrer Glykosylierung eine starke Massenheterogenität.

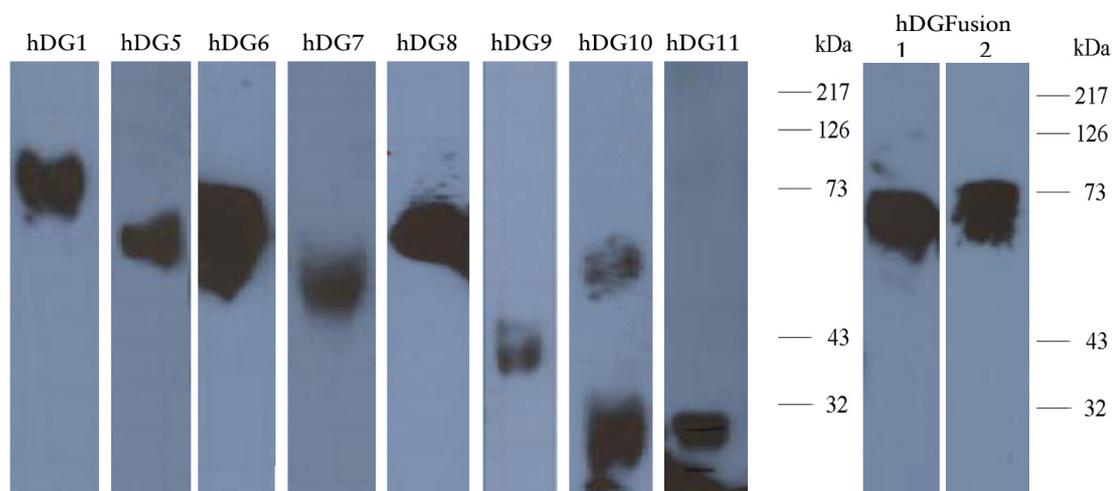


Abb. 28:
Immunoblots der rekombinanten Proteine nach Aufreinigung mittels Umkehrphasen-HPLC mit dem StrepII-Antikörper. (kDa: kiloDalton)

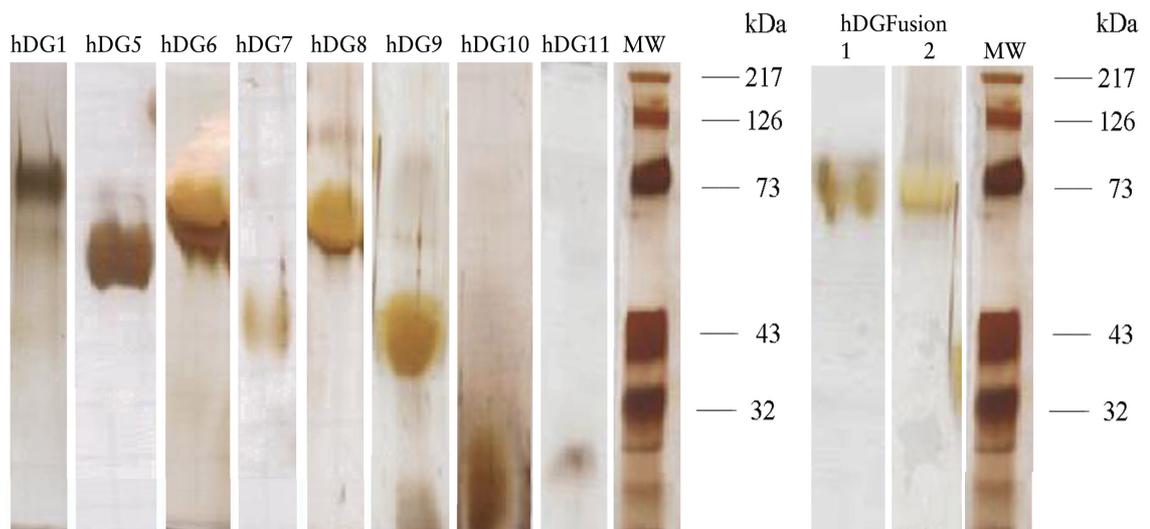


Abb. 29:
Silber gefärbte SDS-Gele (10 %) der rekombinanten Proteine nach Aufreinigung mittels Umkehrphasen-HPLC. (MW: Molekulargewichtsstandard, kDa: kiloDalton)

Am willkürlichen Beispiel des Proteins hDG8 wurde die Aminosäuresequenz APLAAIAPPTE des N-Terminus zusätzlich über eine N-terminale Ansequenzierung mittels Edman-Abbau bestätigt (Abb. 30).

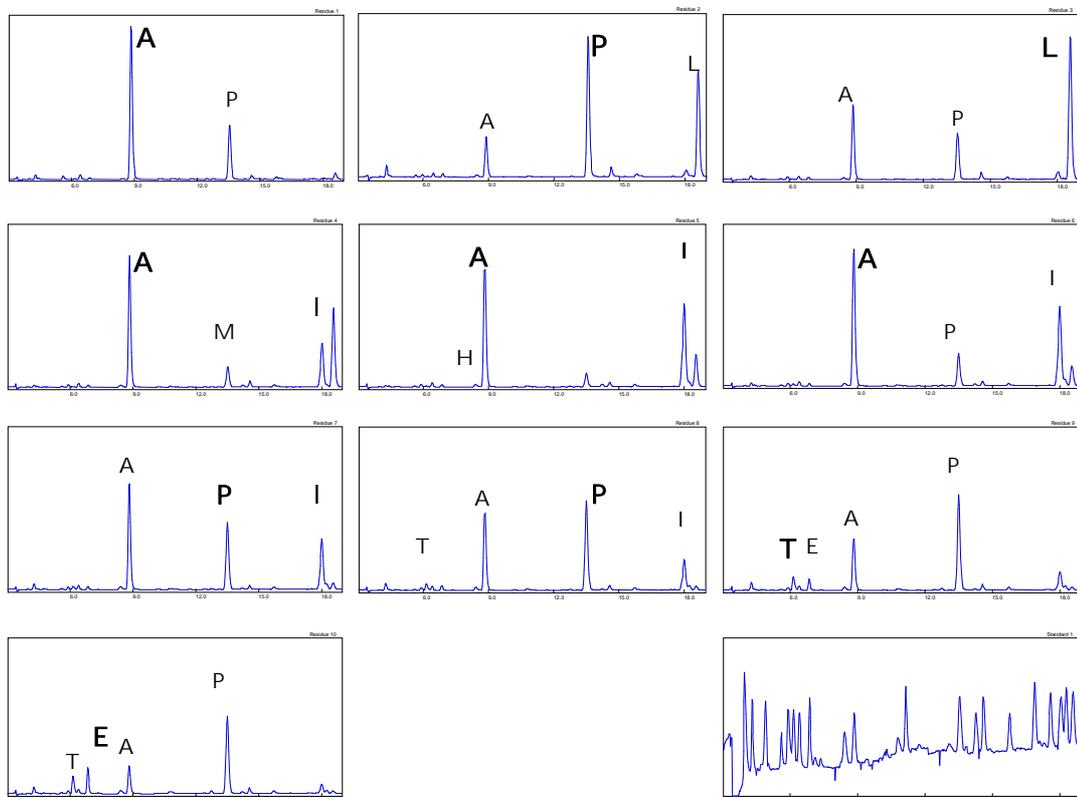


Abb. 30:
Ergebnisse der Edman-Sequenzierung des Proteins hDG8. Das letzte Chromatogramm zeigt den parallel aufgetragenen Aminosäurestandard. Die erwartete Aminosäuresequenz APLAAIAPPTE am N-Terminus des rekombinanten Proteins konnte bestätigt werden.

Alle HPLC-Fractionen, welche ausschließlich das rekombinante Protein enthielten, wurden vereinigt, mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge eingetrocknet und in Millipore-Wasser aufgenommen. Für die weitere Charakterisierung des Proteins wurde die Lösung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Nach einer Retentionszeit von 22 - 23 Minuten war in allen HPLC-Chromatogrammen ein Signal zu beobachten, welches ebenfalls StrepII-Immunoaktivität zeigte. Um zu ermitteln, ob die Proteine dieses Signals Abbauprodukte oder Aggregate der rekombinanten Proteine waren, wurde Zellüberstand untransfizierter Zellen aufgereinigt. Hier wurde dieses Signal ebenfalls beobachtet (Abb. 31). Die Proteine dieses Signals stammten somit entweder aus den EBNA-293-Zellen oder aus dem verwendeten FKS.

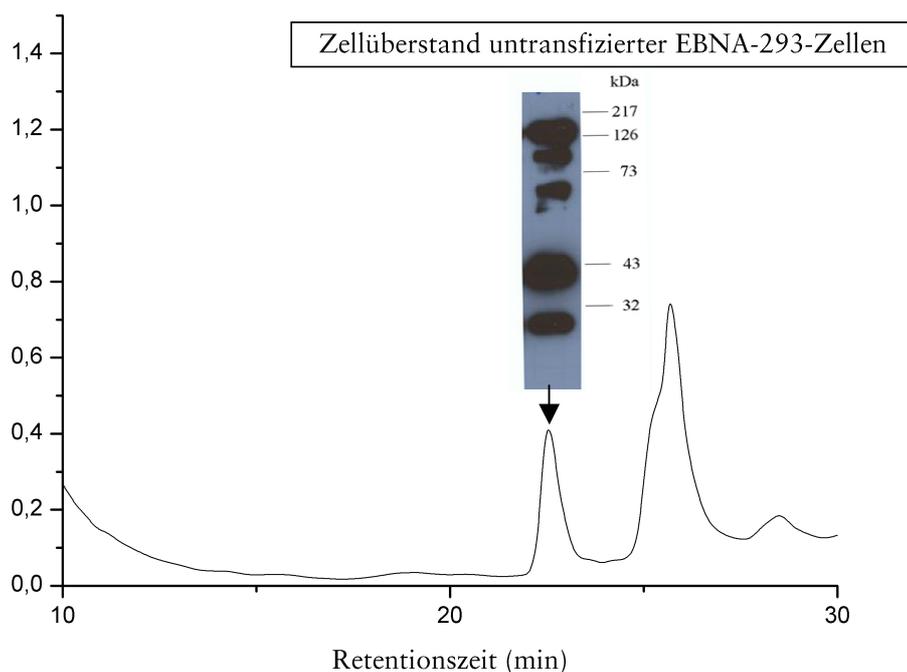


Abb. 31:
HPLC-Chromatogramm von Zellüberstand untransfizierter EBNA-293-Zellen nach Vorreinigung mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie. Das StrepII-immunoreaktive Signal bei Minute 22 - 23 sowie dessen Immunoblot sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

3.1.2 Erstellen des Glykosylierungsprofils der aufgereinigten Proteine

Eine Sequenzanalyse ergab, dass alle Proteine keine N-Glykosylierungsstellen besaßen. Somit konnte bei den folgenden Analysen davon ausgegangen werden, dass alle Monosaccharide bzw. Glykane O-glykosidisch an das Apoprotein gebunden waren.

3.1.2.1 Monosaccharidanalyse mittels GC/MS

Von allen aufgereinigten Glykosylierungs sonden wurde eine qualitative Analyse der Monosaccharide durchgeführt. Die Monosaccharide wurden zunächst mittels Methanolyse freigesetzt und re-N-acetyliert. Nach Derivatisierung der freien Hydroxylgruppen mit MSTFA wurden die Trimethylsilylester direkt in der GC/MS vermessen. Die Monosaccharide wurden anhand ihres Fragmentierungsmusters in der *Electron-Impact* (EI) Massenspektrometrie (Abb. 98 - 101 im Anhang) sowie über ihre Retentionszeit (Tabelle 8 und Abb. 97 im Anhang) mit Hilfe externer Standards identifiziert. Durch die Verwendung einer neuen Säule ab März 2006 verschoben sich die Retentionszeiten um ca. 0,5 Minuten.

Um in komplexen Chromatogrammen spezifisch nach einzelnen Zuckertypen zu suchen, wurde die charakteristische Massenspur des jeweiligen Zuckertyps aus dem Gesamtionenstrom (*total ion current, TIC*) gefiltert und als massenselektives Chromatogramm dargestellt (Tabelle 8). Doppelte Signale sind durch das Vorliegen von α - und β -Anomeren bedingt. Signale der furanoiden Isomere, welche nur einen sehr geringen Anteil darstellten (nicht gezeigt), wurden in der qualitativen Analyse nicht berücksichtigt.

Tabelle 8:

Durchschnittliche Retentionszeiten der trimethylsilylierten Monosaccharide auf der alten und der neuen GC-Säule. Eine leichte Variation der Retentionszeiten ist abhängig von den Injektionsbedingungen. Zusätzlich ist für jedes Monosaccharid die charakteristische Massenspur angegeben.

Monosaccharid	Retentionszeit alte Säule (min)	Retentionszeit neue Säule (min)	charakteristische Massenspur (m/z)
Fukose	nicht gemessen	9,7 + 10,1	204
Mannose	13,3 + 13,7	12,9 + 13,3	204
Galaktose	14,2 + 14,7	13,7 + 14,2	204

Monosaccharid	Retentionszeit alte Säule (min)	Retentionszeit neue Säule (min)	charakteristische Massenspur (m/z)
Glukose	15,1 + 15,4	14,8 + 15,1	204
GalNAc	18,2	17,7	173
GlcNAc	18,7	18,2	173
Fukitol	nicht gemessen	12,9	319
Mannitol	15,9	15,5	319
Glukitol (Sorbitol)	16,0	15,6	319
GalNAc-ol	18,5	18,0	378
GlcNAc-ol	18,7	18,3	378
Sialinsäure	23,2	22,8	298

In den Chromatogrammen der trimethylsilylierten (TMS) Monosaccharide der Glykosylierungs sonden hDG1, hDG6, hDG8, hDG10 und hDG11 war Mannose, Galaktose, N-Acetylglukosamin, N-Acetylgalaktosamin und Sialinsäure identifizierbar (Abb. 32 und 102 - 105 im Anhang). Die Chromatogramme der Glykane der Sonden hDG5, hDG7 und hDG9 zeigten die gleichen Monosaccharide mit Ausnahme der Mannose (Abb. 33 und 106 - 107 im Anhang). Die EI-MS Spektren bestätigten diese Ergebnisse. Als Verunreinigung durch Staub oder Pollen in der Luft war in einigen Spektren Glukose zu beobachten. Das Vorkommen von Sialinsäure ist in dem Kontext dieser Arbeit nicht von Bedeutung und wird deshalb in den Abbildungen nicht gezeigt.

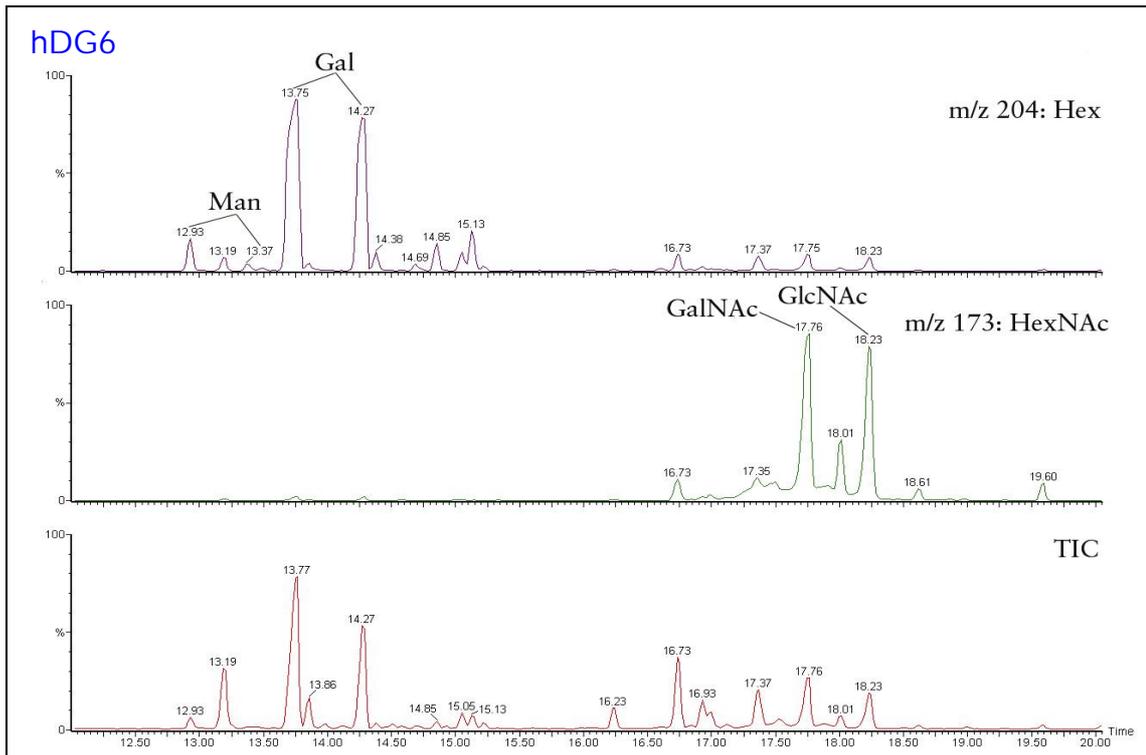


Abb. 32:

Chromatogramm der TMS-derivatisierten Monosaccharide des Proteins hDG6 mit den charakteristischen Massenspuren für Hexosen (Hex) und N-Acetylhexosamine (HexNAc). Erkennbar ist eine Monosaccharidkomposition aus Mannose (Man), Galaktose (Gal), N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) und N-Acetylglucosamin (GlcNAc).

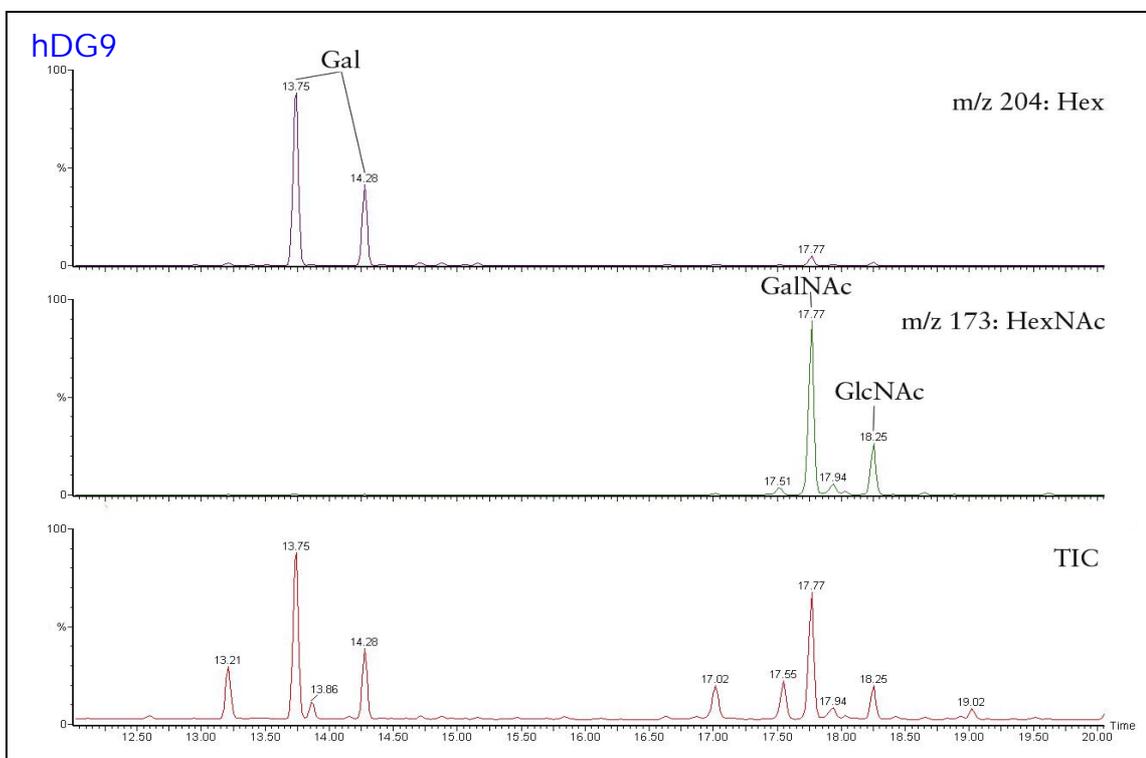


Abb. 33:

Chromatogramm der TMS-derivatisierten Monosaccharide des Proteins hDG9. Erkennbar ist eine Monosaccharidkomposition aus Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglucosamin.

Die Monosaccharidanalysen der rekombinanten Fusionsproteine wurden mit den parallel durchgeführten Analysen des Proteins MUC1-S verglichen. Dieses war ebenfalls in EBNA-293-Zellen exprimiert worden und wies Glykane des Muzintyps mit *core1* und *core2* Strukturen auf (Müller, 2002; Engelmann, 2005). MUC1-S, hDGFusion1 und hDGFusion2 zeigten eine identische Monosaccharidkomposition aus Sialinsäure, Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglukosamin (Abb. 34 und 108 - 109 im Anhang).

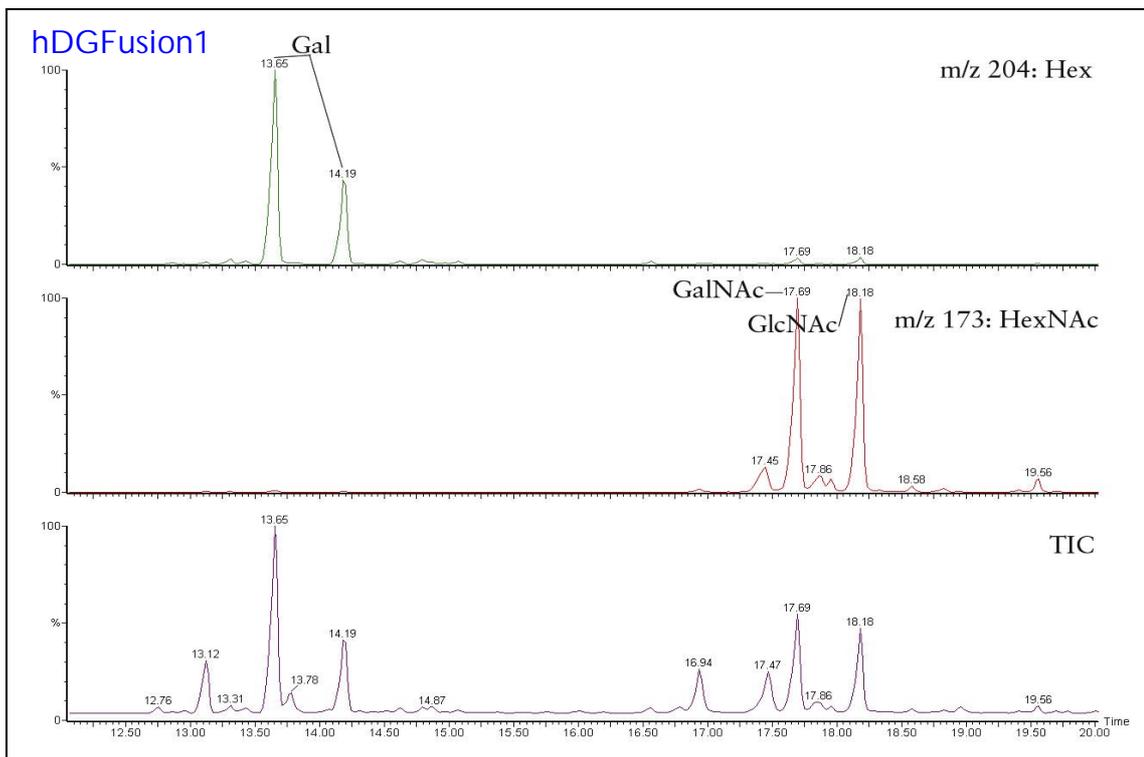


Abb. 34:
Chromatogramm der TMS-derivatisierten Monosaccharide des Proteins hDGFusion1. Identifizierbar sind Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglukosamin. Das Chromatogramm von hDGFusion2 war identisch (Abb. 109 im Anhang).

3.1.2.2 Identifizierung des *core* Zuckers mittels GC/MS

Zur Identifikation des *core* Zuckers wurden die Glykane vor der Methanolyse durch reduzierende β -Eliminierung vom Protein abgespalten. Der dadurch reduziert vorliegende *core* Zucker kann sowohl durch ein verändertes Fragmentierungsmuster (Abb. 100 - 101 im Anhang), als auch durch eine veränderte Retentionszeit identifiziert werden (Tabelle 8). Glukitol (Sorbitol) war bei dieser Methode immer zu beobachten und ist als Verunreinigung anzusehen. Die Chromatogramme zeigten, dass die Sonden hDG1, hDG6, hDG8, hDG10 und hDG11 sowohl mit *core*-Mannose als auch mit *core*-N-Acetylgalaktosamin modifiziert waren (Abb. 35 und 110 - 113 im Anhang). Die Glykane der Sonden hDG5, hDG7 und hDG9 dagegen trugen ausschließlich N-Acetylgalaktosamin am reduzierenden Ende (Abb. 36 und 114 - 115 im Anhang). Eine genaue Quantifizierung der reduzierten Monosaccharide wurde nicht vorgenommen, die Chromatogramme deuten jedoch auf ein Überwiegen von *core*-N-Acetylgalaktosamin bei den Sonden hDG1, hDG6, hDG8 und hDG10 hin.

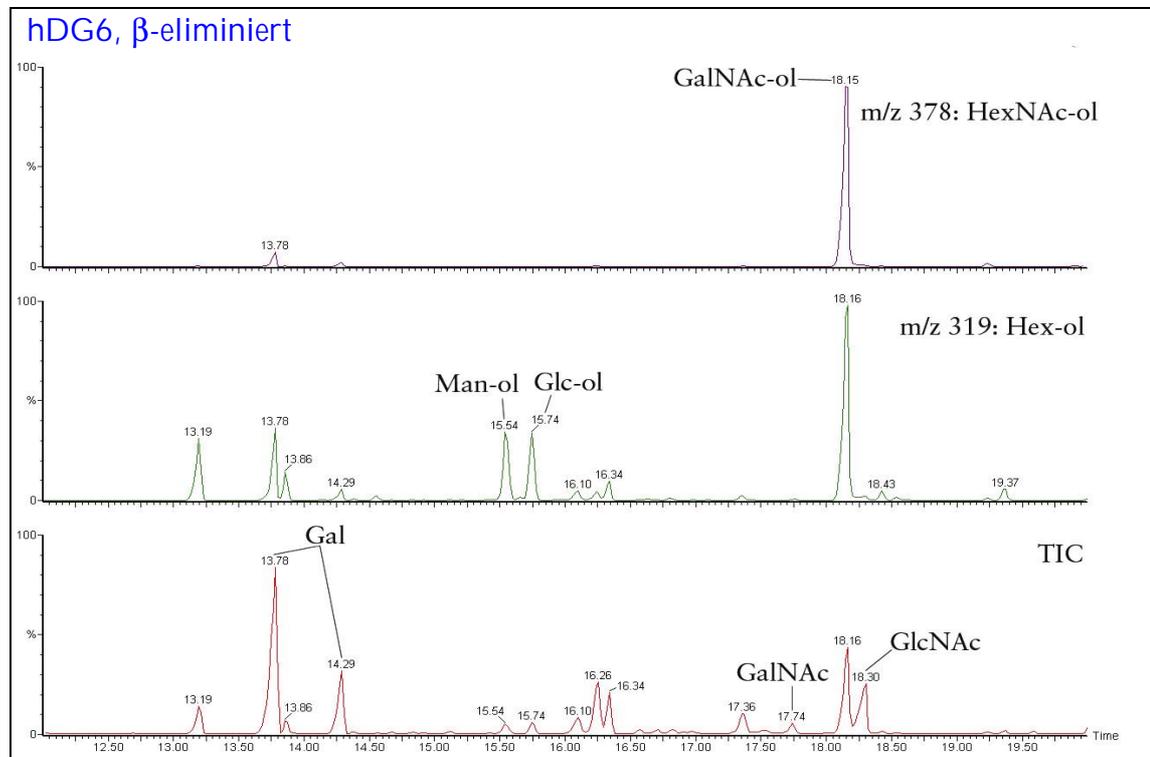


Abb. 35:

Chromatogramm der TMS-derivatisierten Monosaccharide des Proteins hDG6 nach β -Eliminierung. Die Massenspuren für reduzierte Hexosen (Hex-ol) und N-Acetylhexosamine (HexNAc-ol) zeigten Mannitol (Man-ol) und N-Acetylgalaktosaminitol (GalNAc-ol). Sorbitol (Glc-ol) war als Verunreinigung vorhanden.

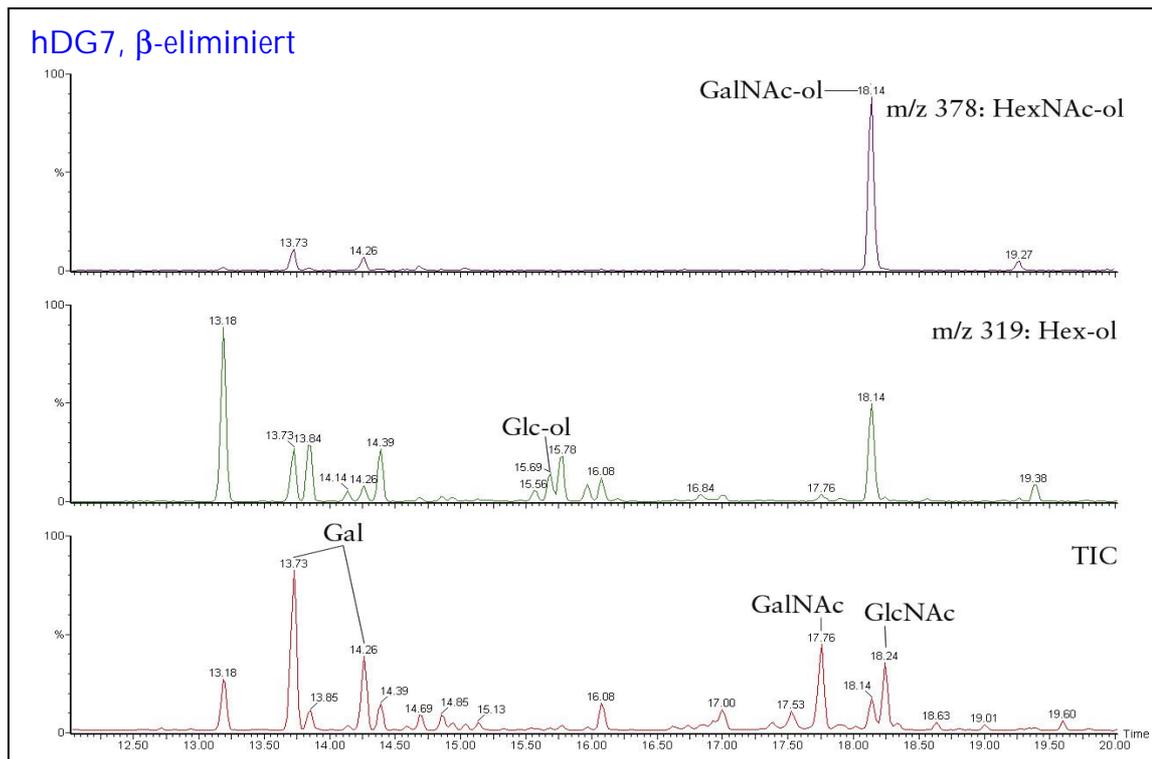


Abb. 36:

Chromatogramm der TMS-derivatisierten Monosaccharide des Proteins hDG7 nach β -Eliminierung. Die Massenspuren für reduzierte Zucker zeigten N-Acetylgalaktosaminol, jedoch kein Mannitol.

Glukose und Sorbitol traten bei jeder β -Eliminierung als Verunreinigung auf. Im Basischen können Mannose und Glukose über die acyclische Konfiguration aus dem jeweils anderen Epimer durch Umlagerung entstehen. Um eine unspezifische Detektion von Mannose auszuschließen, wurde MUC1-S entweder mit Mannose (a) oder mit Glukose (b) versetzt. Das Protein-Zucker-Gemisch wurde einer reduzierenden β -Eliminierung mit anschließender Methanolyse unterworfen und die Monosaccharide wurden trimethylsilyliert. Neben den Monosacchariden der Glykane (N-Acetylgalaktosaminol, N-Acetylglukosamin und Galaktose) war eine Verunreinigung durch Glukose und Sorbitol im Chromatogramm des Versuchs (a) zu beobachten, nicht jedoch von Mannitol in dem Versuch (b) (Abb. 37). Eine unspezifische Detektion von Mannitol oder Mannose durch Isomerisierung kann somit ausgeschlossen werden.

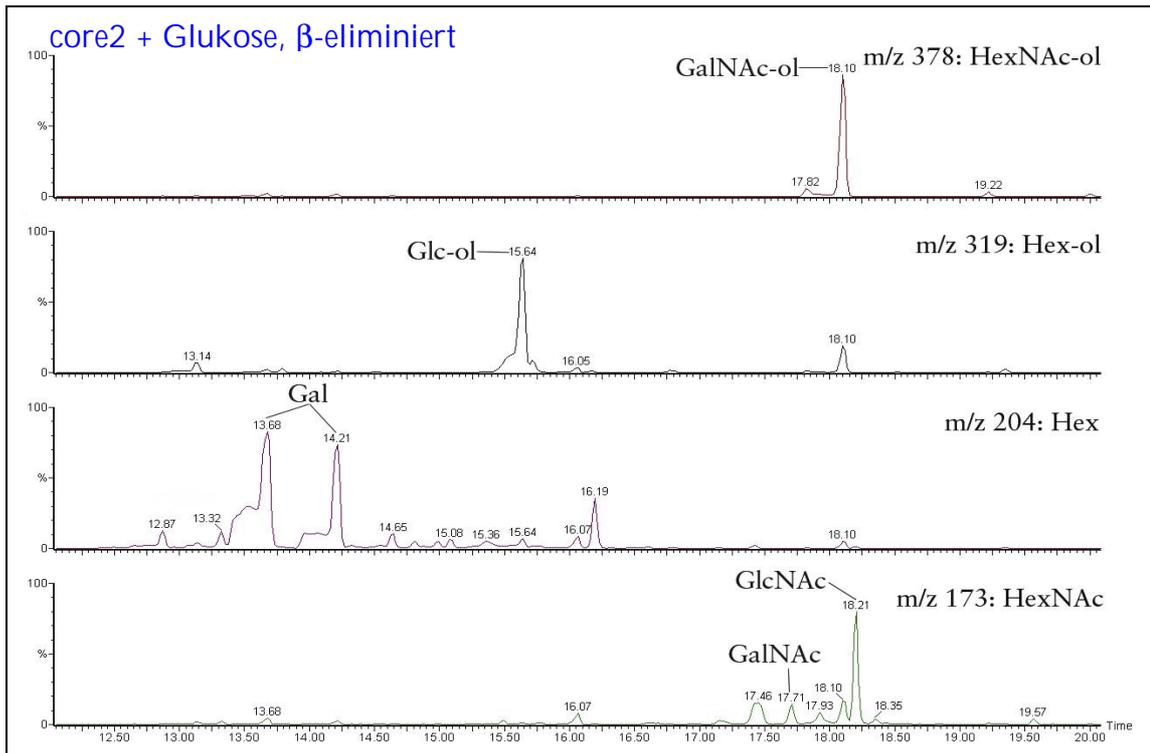


Abb. 37:

Chromatogramm von TMS-derivatisierten *core2* Glykanen, versetzt mit Glukose, nach β -Eliminierung und Methanolyse. Neben den Monosacchariden der Glykane (N-Acetylgalaktosaminol, N-Acetylglukosamin und Galaktose) war lediglich Glukitol und kein durch Umlagerung entstandenes Mannitol detektierbar.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der GC/MS Analysen der Sonden hDG5, hDG7 und hDG9 eine Monosaccharidkomposition aus Sialinsäure, Galaktose, N-Acetylglukosamin und N-Acetylgalaktosamin, mit N-Acetylgalaktosamin am reduzierenden Ende (Muzintyp). Die anderen Sonden, hDG1, hDG6, hDG8, hDG10 und hDG11 enthielten zusätzlich Mannose, welche auch als *core* Zucker identifiziert wurde. Die Anzahl der Glykane des Muzintyps schien dabei deutlich zu überwiegen (Abb. 39).

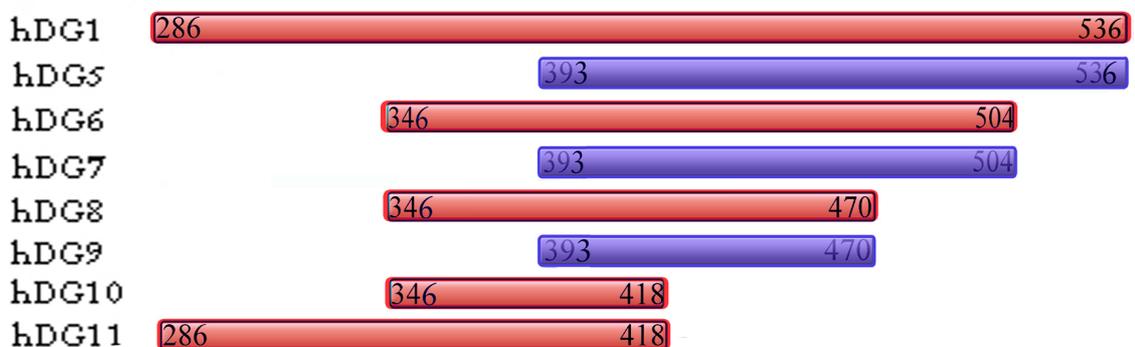


Abb. 39:

Zusammenfassung der Ergebnisse der Monosaccharidanalysen der Glykosylierungssonden hDG1 und hDG5 – 11 mittels GC/MS. Blaue Balken stellen Proteine dar, welche mit Glykanen des Muzintyps modifiziert sind, rote Balken Proteine, welche zusätzlich O-Mannosyl-Glykane tragen.

3.1.2.3 MALDI-TOF-MS Analyse von hDGFusion2

Das Fusionsprotein hDGFusion2 wurde proteolytisch mit Trypsin gespalten. Die Peptide wurden über eine Umkehrphasen-HPLC isoliert und mittels MALDI-TOF-MS analysiert (Abb. 39).

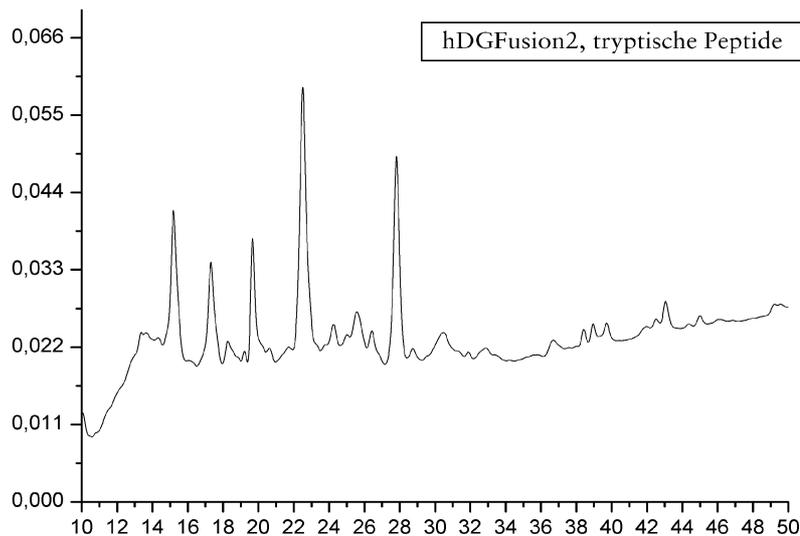


Abb. 39:
Chromatogramm der Umkehrphasen-HPLC des mit Trypsin gespaltenen Proteins hDGFusion2. Von Minute 10 - 47 wurden die Fraktionen (jeweils zwei Minuten) gesammelt und separat analysiert.

Die Peptide der VNTR Domäne konnten in der Fraktion 4 (Minute 16 –17) als mit vier und fünf N-Acetylhexosaminen glykosyliert identifiziert werden. Das jeweils erste Signal des Triplets entsprach den Aminosäuresequenzen PAPGSTAPAAHGVTSAPD/ET/SR (Aminosäuren 200 – 219 und 140 – 159). Das zweite Signal entsprach der Aminosäuresequenz PAPGSTAPPAHGVTSAPDTR (Aminosäuren 160 – 179 und 180 – 199) und das dritte der Aminosäuresequenz PAPGSTAPQAHGVTSAPDTR (Aminosäuren 220 – 239) (Abb. 40).

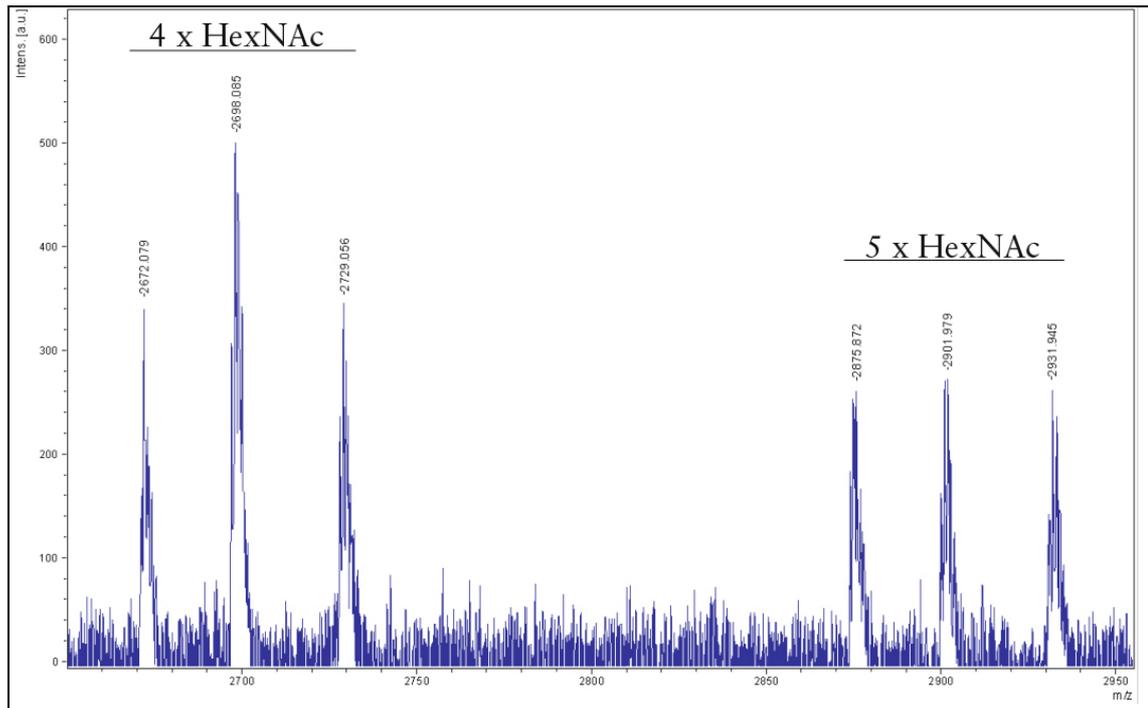


Abb. 40:
Ausschnitt des MALDI-TOF-MS-Spektrums der Fraktion 4 (Minute 16 – 17) des mit Trypsin gespaltenen Proteins hDGFusion2. Zu sehen war die VNTR-Domäne des MUC1, glykosyliert mit 4 und 5 N-Acetylhexosaminen.

Weiterhin waren mehrfach Massendifferenzen zu beobachten, welche der Glykosylierung mit Hexosen (m/z 162) und N-Acetylhexosaminen (m/z 203) entsprachen (Abb. 41 und 42). Die beobachteten Massen konnten jedoch aufgrund der Komplexität der Spektren keinem Peptid zugeordnet werden.

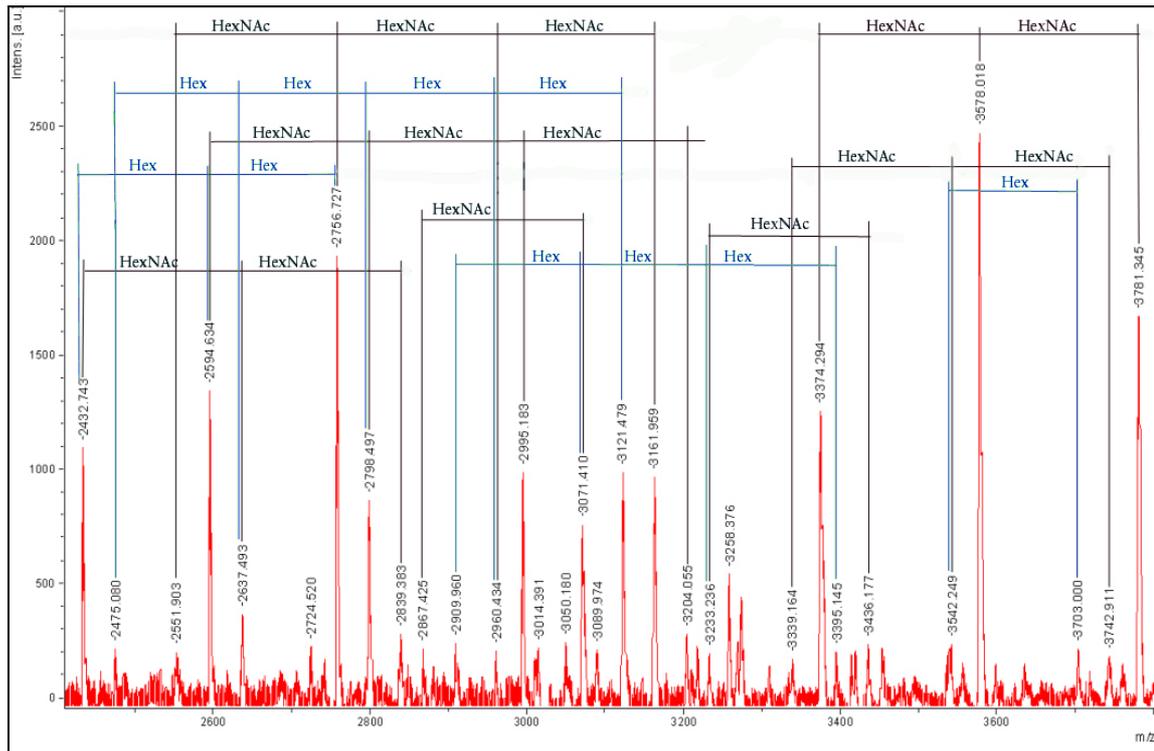


Abb. 41: Ausschnitt des MALDI-TOF-MS-Spektrums der Fraktion 13 (Minute 34 – 35) des mit Trypsin gespaltenen Proteins hDGFusion2. Man erkennt mehrfach Inkremente von Hexosen und N-Acetylhexosaminen.

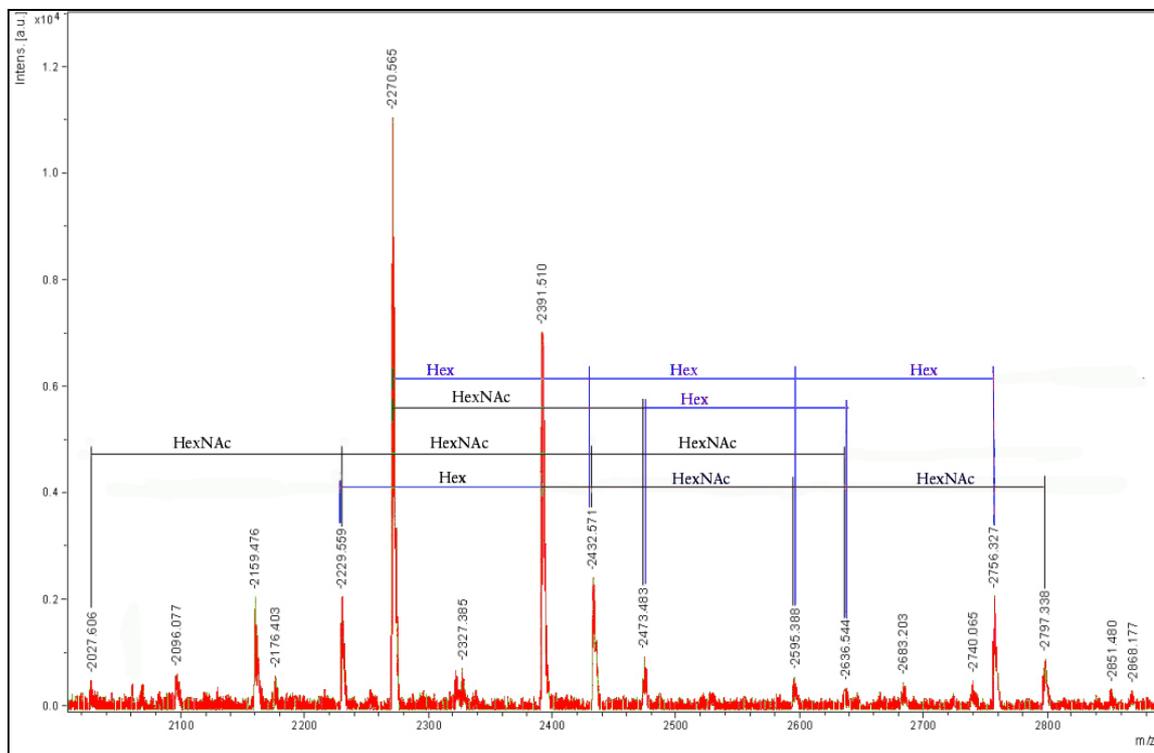


Abb.42: Ausschnitt des MALDI-TOF-MS-Spektrums der Fraktion 14 (Minute 32 – 33) des mit Trypsin gespaltenen Proteins hDGFusion2. Man erkennt mehrfach Inkremente von Hexosen und N-Acetylhexosaminen.

3.1.2.4 Analyse der methylierten Glykan-Aldite mittels ESI-MS/MS

Mit Hilfe von Elektronensprayionisations-Tandem-Massenspektrometrie sollte die Struktur der O-Mannosyl-Glykane analysiert werden.

Hierfür wurden die Glykane der nicht O-mannosylierten Sonde hDG5 als negativ-Kontrolle und die der O-mannosylierten Sonden hDG1, hDG6, hDG10 und hDG11 durch reduktive β -Eliminierung vom Proteingerüst gespalten, permethyliert und mittels ESI-MS analysiert. Alle beobachteten Ionen der MS-Spektren sowie die zugehörigen Fragmentationen und einige mögliche Strukturen sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Unerklärlicherweise sind die Massen der O-Mannosyl-Glykane in den MS-Spektren nur in sehr geringer Intensität zu sehen.

Tabelle 9:

Im ESI-Massenspektrum identifizierte relative Ionenmassen und die Pseudomolekülionen bzw. Fragmentationen. In der rechten Spalte sind mögliche Strukturen von Muzin-Typ-Glykanen oder O-Mannosyl-Glykanen angegeben. Strukturen der O-Mannosyl-Glykane sind fett hervorgehoben.

Masse (m/z)	zugehöriges Fragmention	mögliche Strukturen
344	NeuAc ⁺ - Methanol	NeuAc ⁺ - Methanol
376	NeuAc ⁺	NeuAc ⁺
464	(Hex ₁ HexNAc ₁) ⁺	Gal-GlcNAc⁺ Gal-GalNAc ⁺
512	(Hex ₁ HexNAc ₁)-ol+H ⁺	GlcNAc-Man-ol+H⁺ Gal-GalNAc-ol+H ⁺ (<i>core1</i>)
534	(Hex ₁ HexNAc ₁)-ol+Na ⁺	GlcNAc-Man-ol+Na⁺ Gal-GalNAc-ol+Na ⁺ (<i>core1</i>)
716	(Hex ₂ HexNAc ₁)-ol+H ⁺	Gal-GlcNAc-Man-ol+H⁺
738	(Hex ₂ HexNAc ₁)-ol+Na ⁺	Gal-GlcNAc-Man-ol+Na⁺
825	(NeuAc ₁ Hex ₁ HexNAc ₁) ⁺	NeuAc-Gal-GlcNAc⁺ NeuAc-Gal-GalNAc ⁺
873	(NeuAc ₁ Hex ₁ HexNAc ₁)-ol+H ⁺	NeuAc-Gal-GalNAc-ol+H ⁺ (<i>core1</i>)
895	(NeuAc ₁ Hex ₁ HexNAc ₁)-ol+Na ⁺	NeuAc-Gal-GalNAc-ol+Na ⁺ (<i>core1</i>)
961	(Hex ₂ HexNAc ₂)-ol+H ⁺	Gal-(Gal-GlcNAc-)GalNAc-ol+H ⁺ (<i>core2</i>)
983	(Hex ₂ HexNAc ₂)-ol+Na ⁺	Gal-(Gal-GlcNAc-)GalNAc-ol+Na ⁺ (<i>core2</i>)
1077	(NeuAc ₁ Hex ₂ HexNAc ₁)-ol+H ⁺	NeuAc-Gal-GlcNAc-Man-ol+H⁺

Masse (m/z)	zugehöriges Fragmention	mögliche Strukturen
1099	(NeuAc ₁ Hex ₂ HexNAc ₁)-ol+Na ⁺	NeuAc-Gal-GlcNAc-Man-ol+Na⁺
1234	(NeuAc ₂ Hex ₁ HexNAc ₁)-ol+H ⁺	NeuAc-Gal-(NeuAc)-GalNAc-ol+H ⁺ (<i>core1</i>)
1256	(NeuAc ₂ Hex ₁ HexNAc ₁)-ol+Na ⁺	NeuAc-Gal-(NeuAc)-GalNAc-ol+Na ⁺ (<i>core1</i>)
1322	(NeuAc ₁ Hex ₂ HexNAc ₂)-ol+H ⁺	NeuAc-Gal-(Gal-GlcNAc-)GalNAc-ol+H ⁺ (<i>core2</i>)
1344	(NeuAc ₁ Hex ₂ HexNAc ₂)-ol+Na ⁺	NeuAc-Gal-(Gal-GlcNAc-)GalNAc-ol+Na ⁺ (<i>core2</i>)

In dem MS-Spektrum der Glykosylierungssonde hDG5 konnten Glykane des Muzintyps der Strukturen *core1* und *core2* identifiziert werden (Abb. 43 und 44). Anhand der MS/MS-Spektren konnte zusätzlich verifiziert werden, dass die Glykane vom Muzintyp waren und *core1*- sowie *core2*-Strukturen aufwiesen (Abb. 45).

<i>core1</i> ,	Galβ1-3GalNAc-Ser/Thr	m/z 512
<i>core1</i> , monosialyliert	Siaα2-3Galβ1-3GalNAc-Ser/Thr	m/z 873
<i>core1</i> , disialyliert	$\begin{array}{l} \text{Sia}\alpha\text{2-6} \\ \text{Gal}\beta\text{1-3} \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \text{GalNAc-Ser/Thr} \end{array} \right.$	m/z 1234
<i>core2</i>	$\begin{array}{l} \text{Gal}\beta\text{1-4GlcNAc}\beta\text{1-6} \\ \text{Gal}\beta\text{1-3} \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \text{GalNAc-Ser/Thr} \end{array} \right.$	m/z 961
<i>core2</i> , monosialyliert	$\begin{array}{l} (\text{Sia}\alpha\text{2-3})\text{GlcNAc}\beta\text{1-6} \\ (\text{Sia}\alpha\text{2-3})\text{Gal}\beta\text{1-3} \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \text{GalNAc-Ser/Thr} \end{array} \right.$	m/z 1322

Abb. 43:
Strukturen und Massen der Glykane des Muzintyps, welche auf der Glykosylierungssonde hDG5 identifiziert wurden.

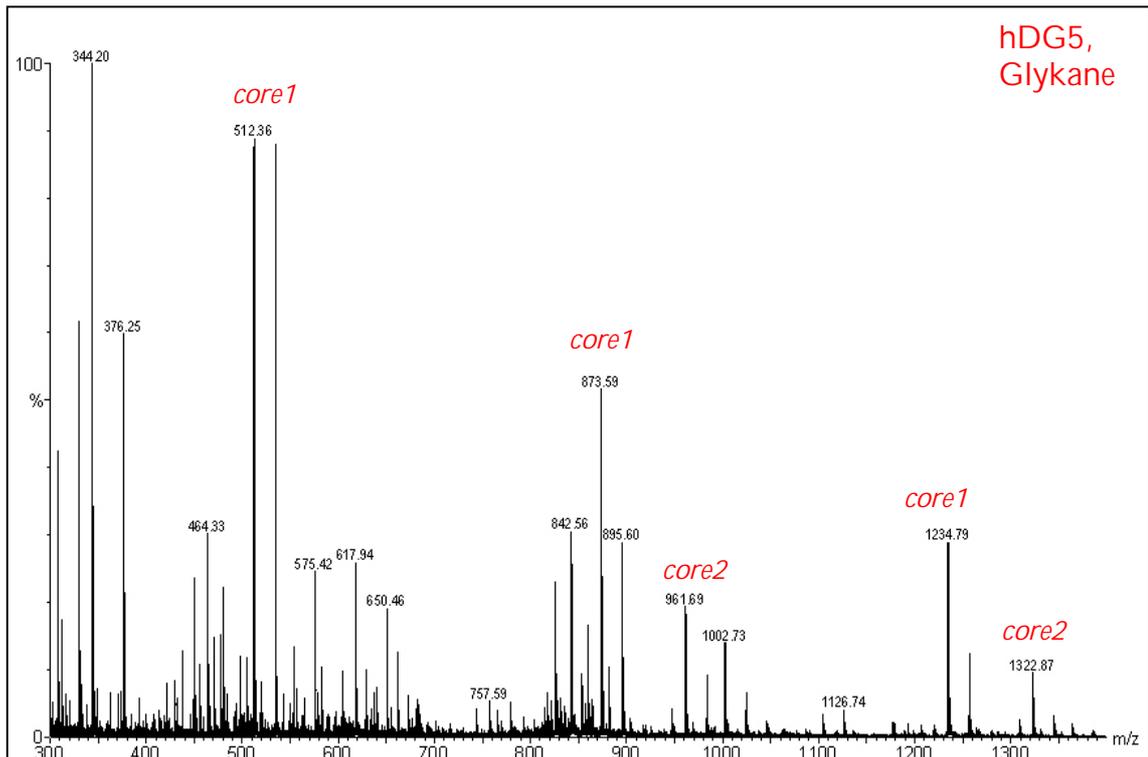


Abb. 44:
ESI-MS-Spektrum der methylierten Glykane der Sonde hDG5. Alle Massen dieses Spektrums sind typisch für Glykane des Muzintyps.

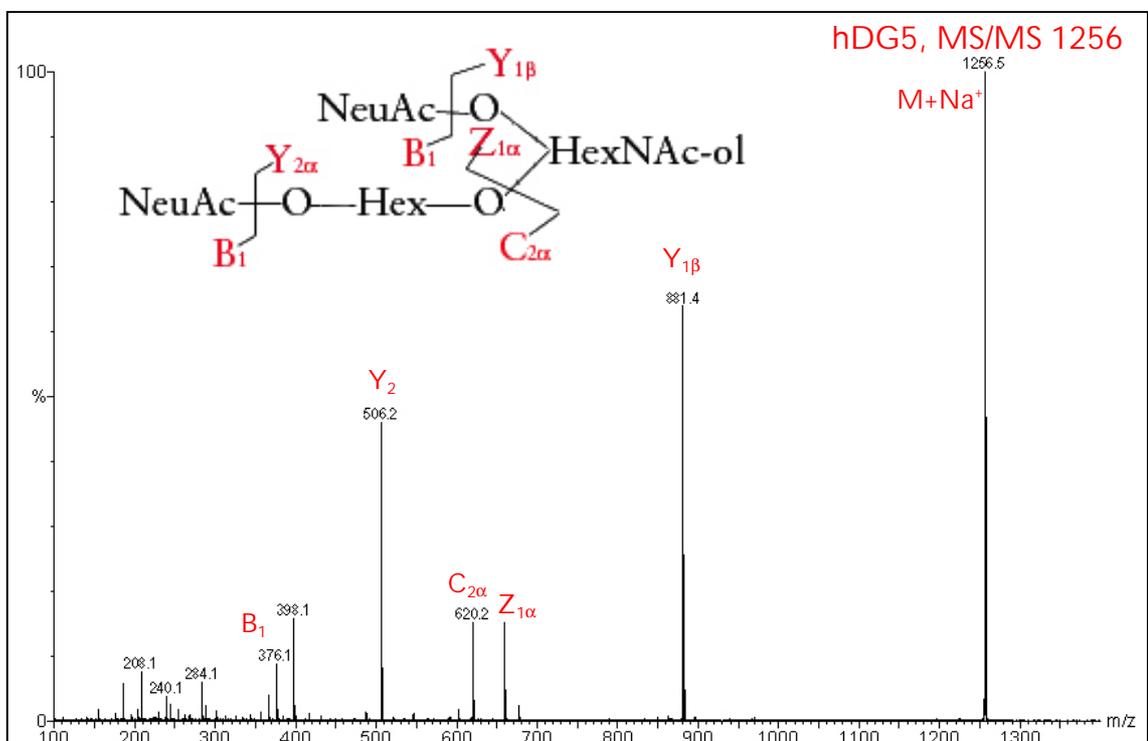


Abb. 45:
ESI-MS/MS-Spektrum von m/z 1256 des Proteins hDG5. Identifizierbar waren Ionen des disialylierten *core7*-Glykans NeuAc-Hex-(NeuAc)-HexNAc-ol.

In den Massenspektren der permethylierten Glykane der Glykosylierungs sonden hDG6 und hDG10 waren zusätzlich O-Mannosyl-Glykane identifizierbar (Tabelle 9, Abb. 46 und Abb. 117 im Anhang). Das O-Mannose-Tetrasaccharid NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man-ol (M: 1076 Da) sowie dessen desialylierte Form Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man-ol (M: 715 Da) konnten identifiziert werden. Die Massen der Glykane vom Muzintyp sind in dem Spektrum quantitativ stärker vertreten.

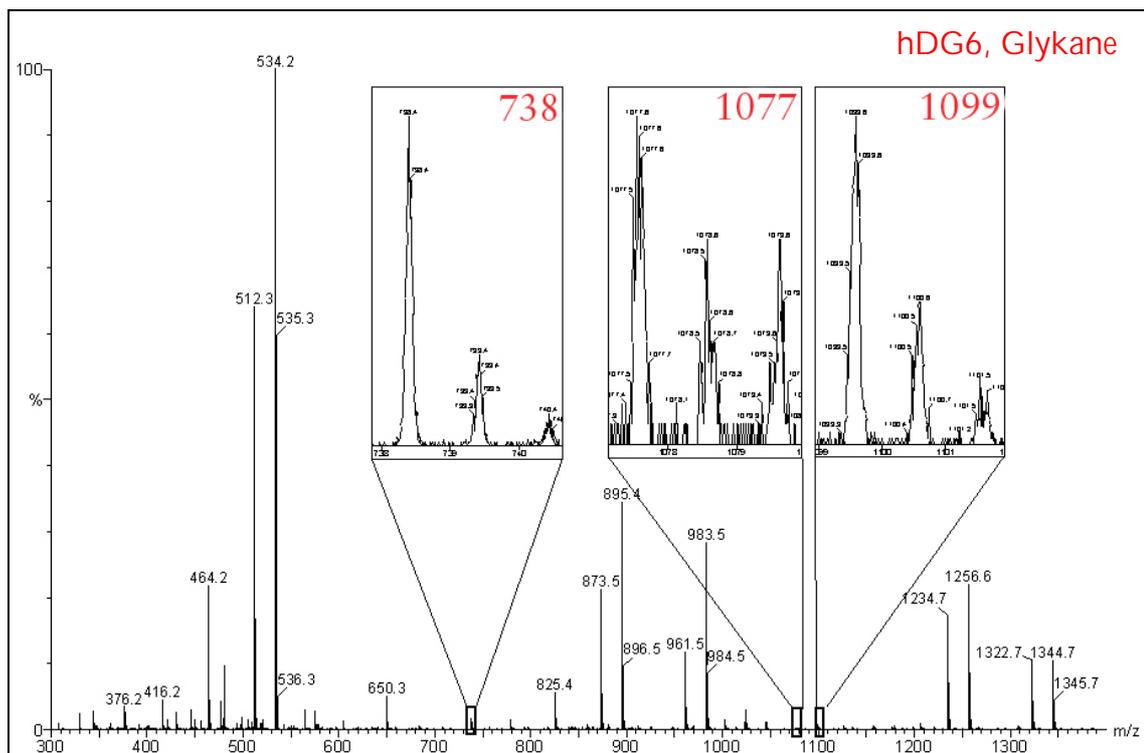


Abb. 46:

ESI-MS-Spektrum der methylierten Glykane des Proteins hDG6. Die dominanten Signale sind auf Ionen von Muzintyp-Glykanen zurückzuführen. In den Vergrößerungen sind die Massen des Molekülions des O-Mannose-Tetrasaccharids ($M+H^+$: m/z 1077; $M+Na^+$: m/z 1099) sowie dessen desialylierter Form ($M+Na^+$: m/z 738) zu erkennen.

Mit Hilfe der MS/MS Spektren konnte verifiziert werden, dass es sich bei den Massen m/z 738, 1077 und 1099 um Molekülionen des O-Mannose-Tetrasaccharids handelte (Abb. 47 – 50). Das MS/MS Spektrum bei m/z 1077 zeigte die B_1 und B_3 Ionen des Moleküls sowie deren Massen nach Abspaltung von Methanol (Abb. 48). Das MS/MS Spektrum bei m/z 1099 zeigte die A_2 und B_3 Ionen des Natriumadduktes (Abb. 49). In dem MS/MS-Spektrum bei m/z 738 war das Natriumaddukt des B_2 Ions identifizierbar (Abb. 50).

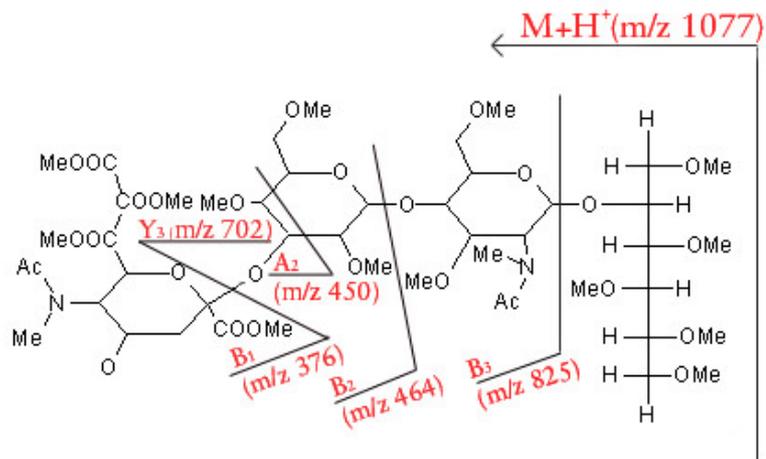


Abb. 47:
Fragmentierungsschema des permethylierten O-Mannose Tetrasaccharids.

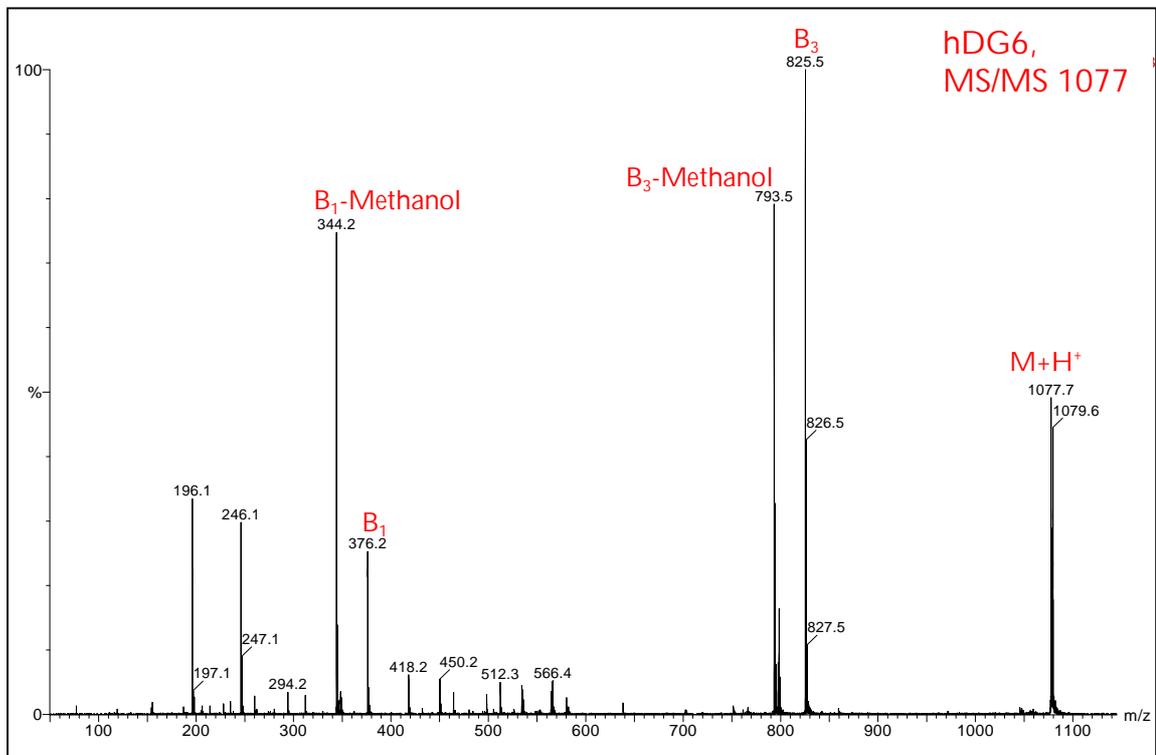


Abb. 48:
ESI-MS/MS Spektrum des Molekülions bei $m/z\ 1077$. Zu sehen sind die B_1 und B_3 -Ionen des Molekülions sowie deren Massen nach Abspaltung von Methanol ($- m/z\ 32$).

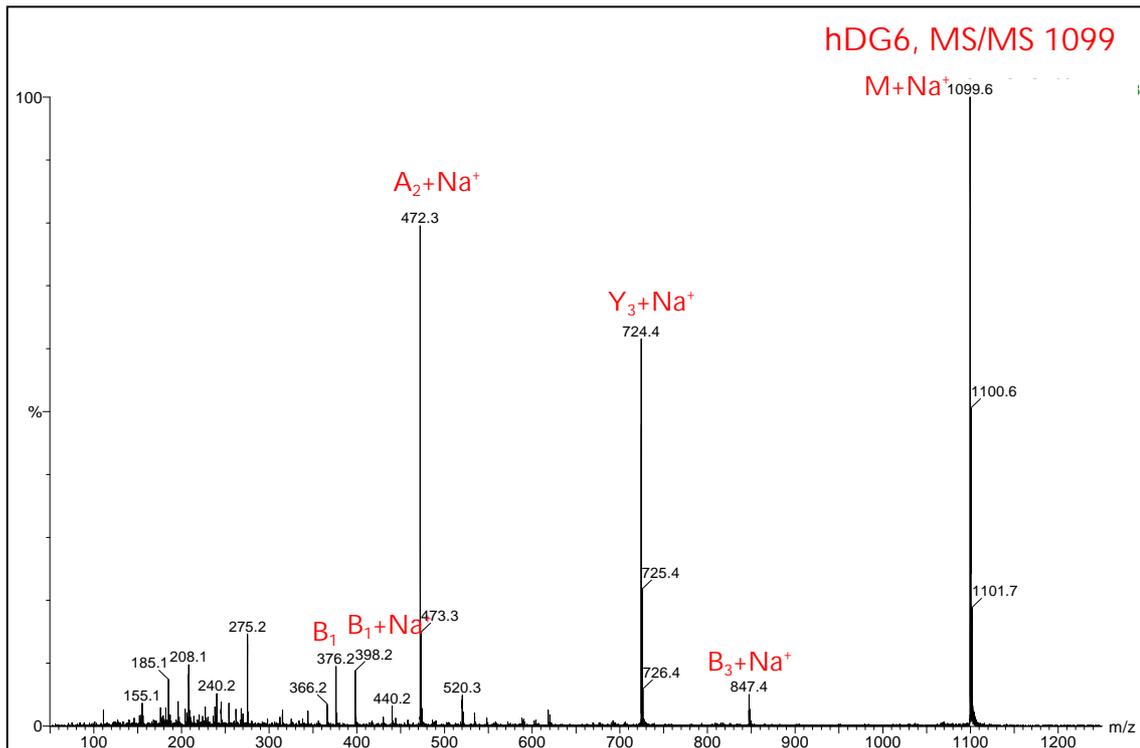


Abb. 49:
ESI-MS/MS Spektrum des Natriumadduktes des Molekülions bei m/z 1099. Zu sehen sind A, B und Y-Ionen.

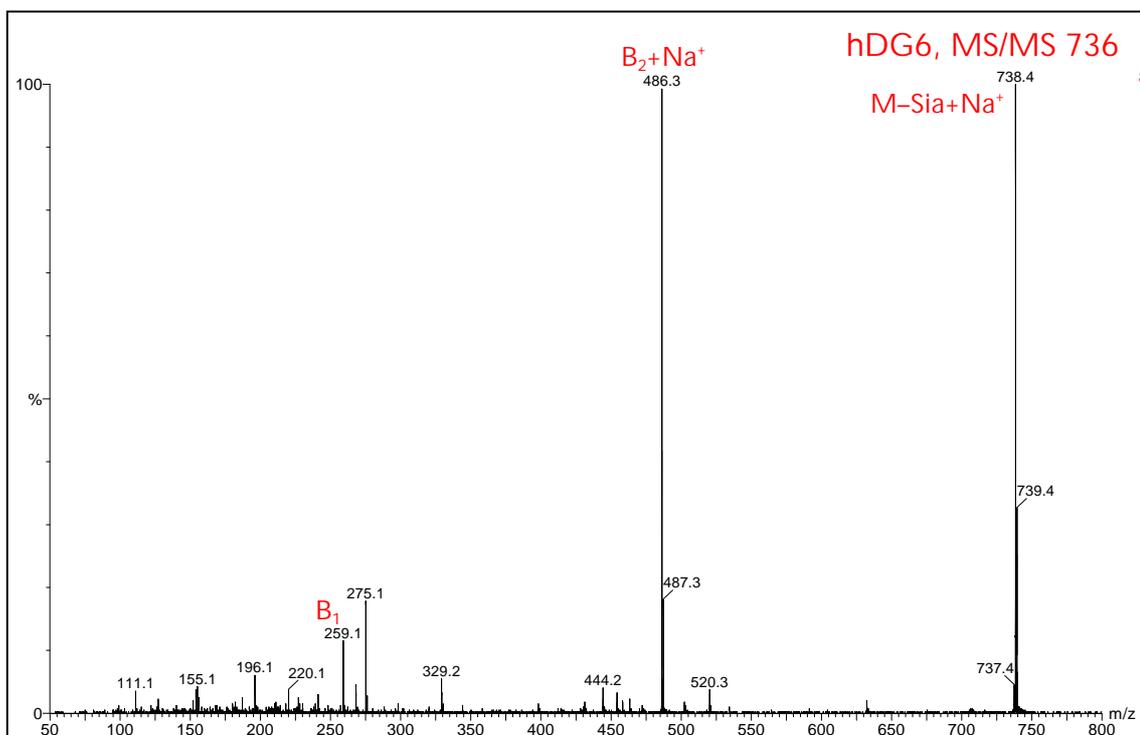


Abb. 50:
ESI-MS/MS Spektrum des Signals bei m/z 738, welches dem Natriumaddukt des Trisaccharid-Molekülions entspricht. Zu sehen sind die Natriumaddukte der B₁ und B₂ Ionen. Die Nummerierung der Fragmente ist auf das nicht-sialylierte Trisaccharid bezogen.

In dem ESI-MS-Spektrum der methylierten Glykane der Sonden hDG1 und hDG11 waren keine deutlichen Signale zu erkennen, deren Massen dem Molekölion des Tetrasaccharids entsprachen (Abb. 50 und 118 im Anhang). Die MS/MS-Spektren bei m/z 716, 738, 1077 und 1099 zeigten jedoch typische Fragmentierungen des O-Mannose-Tetrasaccharids (nicht gezeigt).

In dem Spektrum der Sonde hDG11 waren zusätzlich die ansonsten sehr dominanten Signale der Massen m/z 961, 983, 1322 und 1344 von den *core2*-Strukturen kaum vorhanden. Deutlich identifizierbar waren nur die Signale der *core1*-Strukturen (Abb. 51).

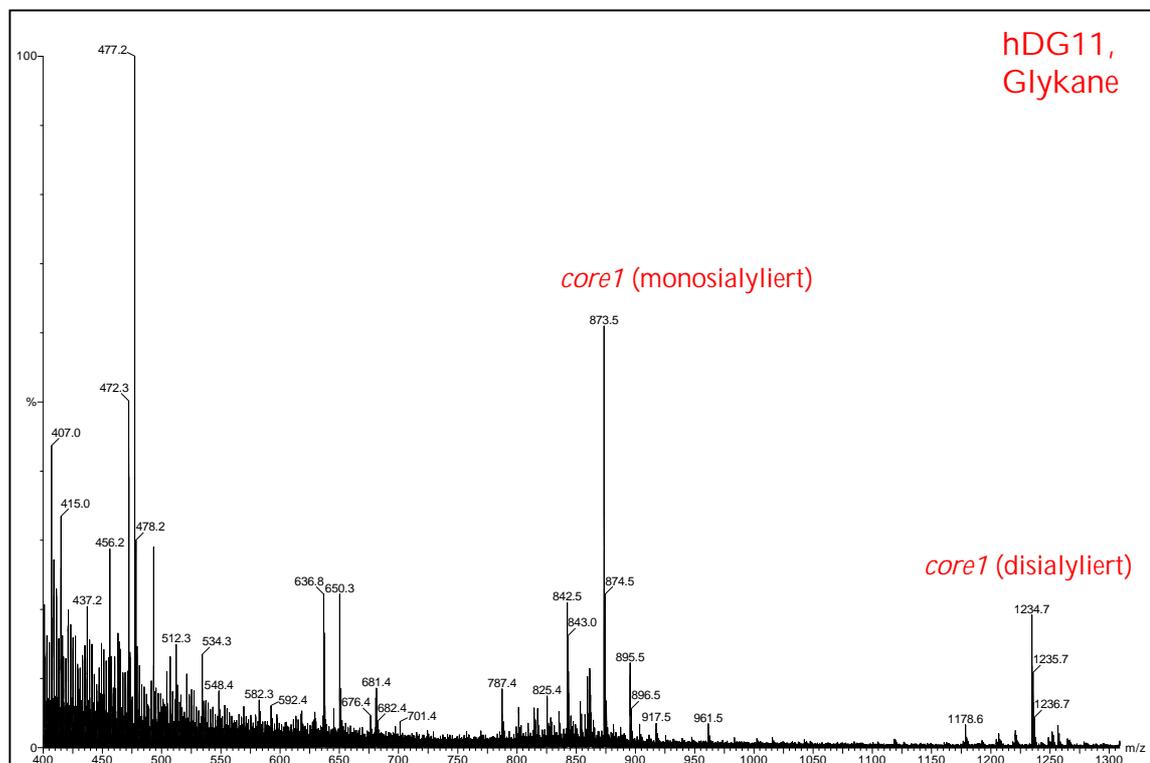


Abb. 51:

ESI-MS-Spektrum der methylierten Glykane des Proteins hDG11. Es waren keine Massen zu erkennen, welche dem Molekölion des O-Mannose-Tetrasaccharids entsprechen, aber auch die typischen Massen der *core2*-Strukturen fehlen. Deutlich identifizierbar waren lediglich die Massen m/z 512, 873 und 1234 der *core1*-Strukturen.

Bei der Analyse der permethylierten Oligosaccharide des Proteins hDGFusion2 wurden erneut die Glykane des Muzintyps des MUC1-S-Proteins als Referenz verwendet. Die Spektren waren qualitativ identisch mit dem Spektrum der MUC1-S-Glykane (Abb. 52 und 116 im Anhang).

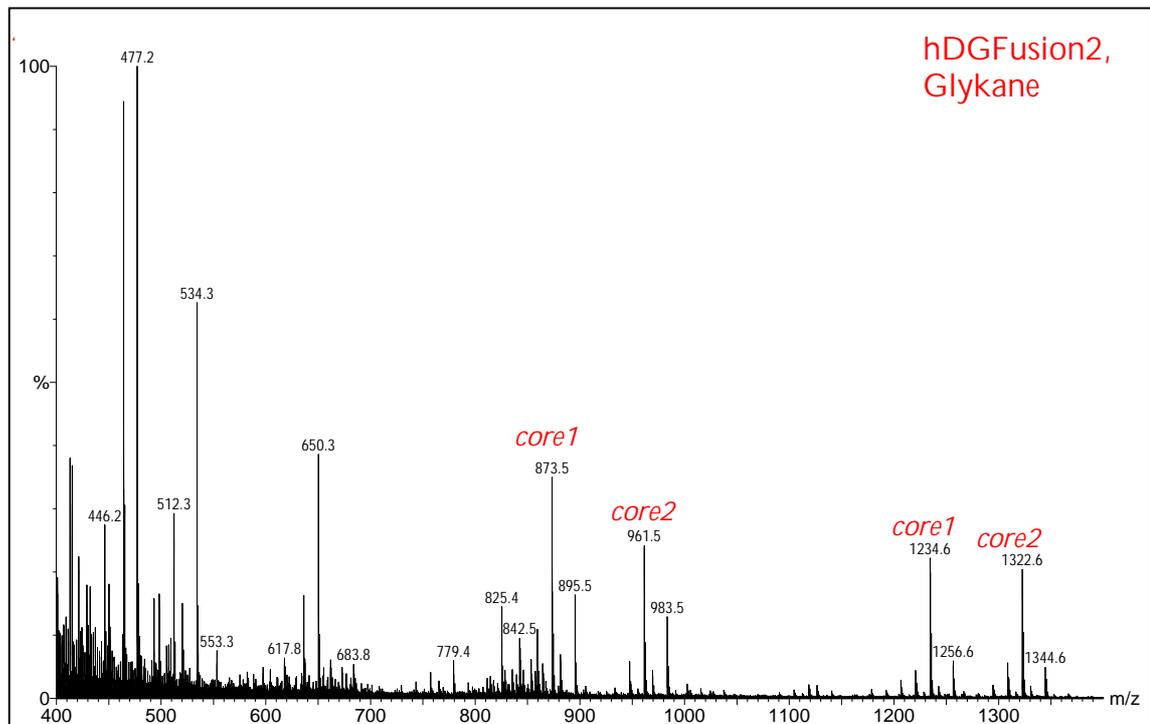


Abb. 51:

ESI-Spektrum der permethylierten Glykane des Proteins hDGFusion2. Identifizierbar waren die typischen Ionen der core1 (m/z 873, 895, 1234 und 1256) und core2 (m/z 961, 983, 1322 und 1344) Glykane, sowie die Ionen des Fragmentes HexHexNAc-ol (m/z 512 und 534).

3.1.2.5 Methylierungsanalyse zur Identifikation des Substitutionsmusters der Glykane

Um das Substitutionsmuster der Glykane zu analysieren, wurden die permethylierten Oligosaccharide sauer hydrolysiert und die Monosaccharide reduziert, wobei Natriumborodeuterid verwendet wurde, um symmetrische Substitutionen zu vermeiden. Hydroxylgruppen, welche vor der Hydrolyse in Bindungen involviert waren, wurden vor der GC/MS-Analyse acetyliert. Der Zuckertyp wurde durch einen Vergleich der Retentionszeiten mit einem Standard identifiziert (Abb. 120 im Anhang), das Substitutionsmuster anhand der EI-Spektren.

Es wurden sowohl Glykane einer ausschließlich Muzintyp-glykosylierten Sonde (Glykane der Glykosylierungssonde hDG5, Abb. 53), als auch von Sonden, welche zusätzlich mit O-Mannosyl-Glykanen modifiziert waren (Glykane der Glykosylierungssonden hDG6 und hDG10, Abb. 54 und 121 im Anhang) analysiert. In allen Chromatogrammen erkannte man deutlich die Monosaccharide von Glykanen des Muzintyps mit N-Acetylgalaktosaminol als *core*-Zucker. Es waren weiterhin Monosaccharide von *core1* (Gal β 1-3GalNAc-ol) und *core2* (Gal β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc-ol) Strukturen, sowie von deren sialylierten Derivaten identifizierbar.

Der Unterschied zwischen den Glykosylierungsmustern der Sonden zeigte sich in einem schwachen Signal bei der Retentionszeit 8,6 Minuten für Glykane der Sonden hDG6 und hDG10. Mit Hilfe des EI-Spektrums (Abb. 55) sowie eines Standards (Abb. 119 im Anhang), konnte 2-substituiertes Mannitol identifiziert werden. In den Chromatogrammen der Sonden hDG6 und hDG10 waren somit zusätzlich alle Monosaccharide des O-Mannose-Tetrasaccharids NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man-ol identifizierbar.

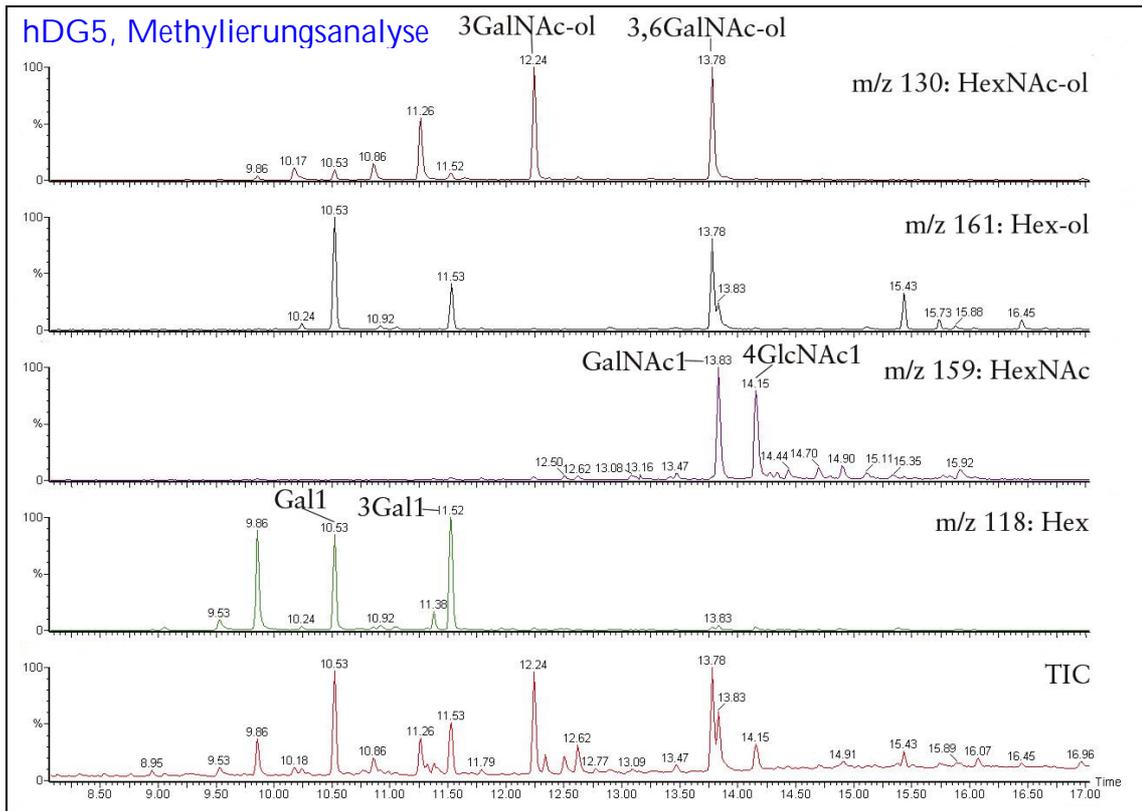


Abb. 53:

GC/MS Chromatogramm der partiell methylierten Alditacetate der Glykane der Sonde hDG5. Identifizierbar waren alle Monosaccharide von Glykanen des Muzintyps.

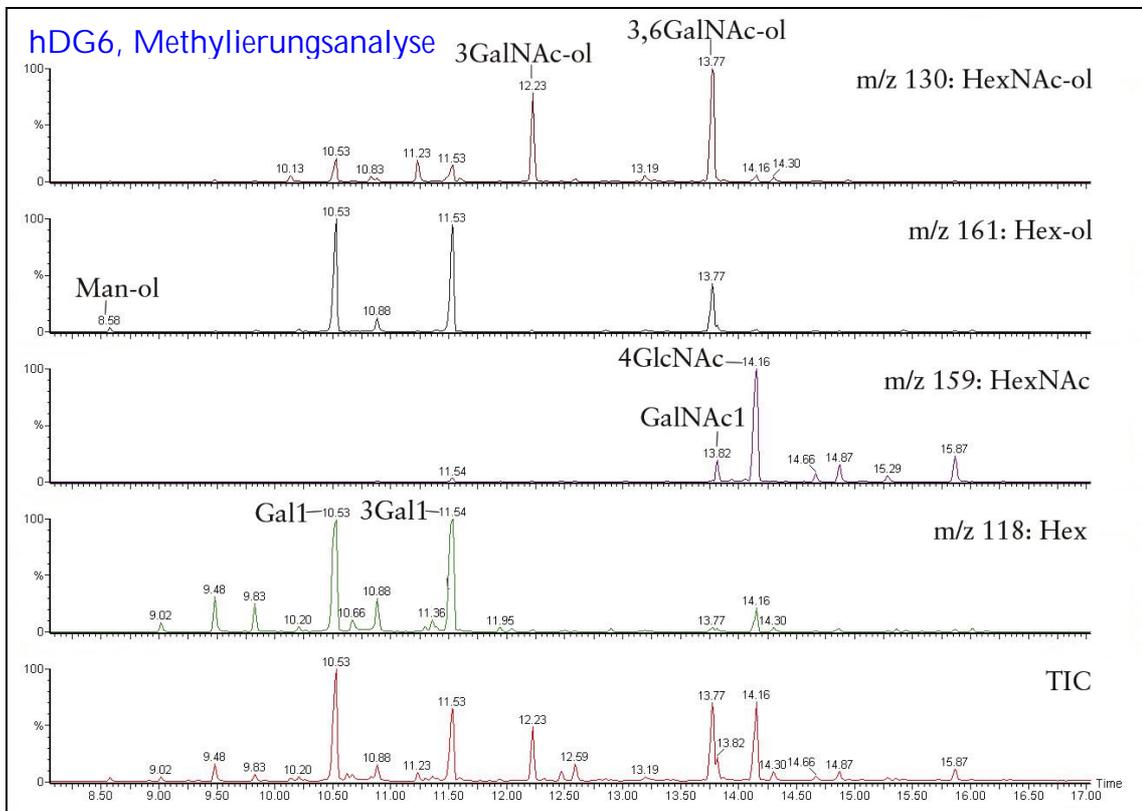


Abb. 54:

GC/MS Chromatogramm der partiell methylierten Alditacetate der Glykane der Sonde hDG6. Identifizierbar waren Monosaccharide von Glykanen des Muzintyps und des O-Mannose Tetrasaccharids.

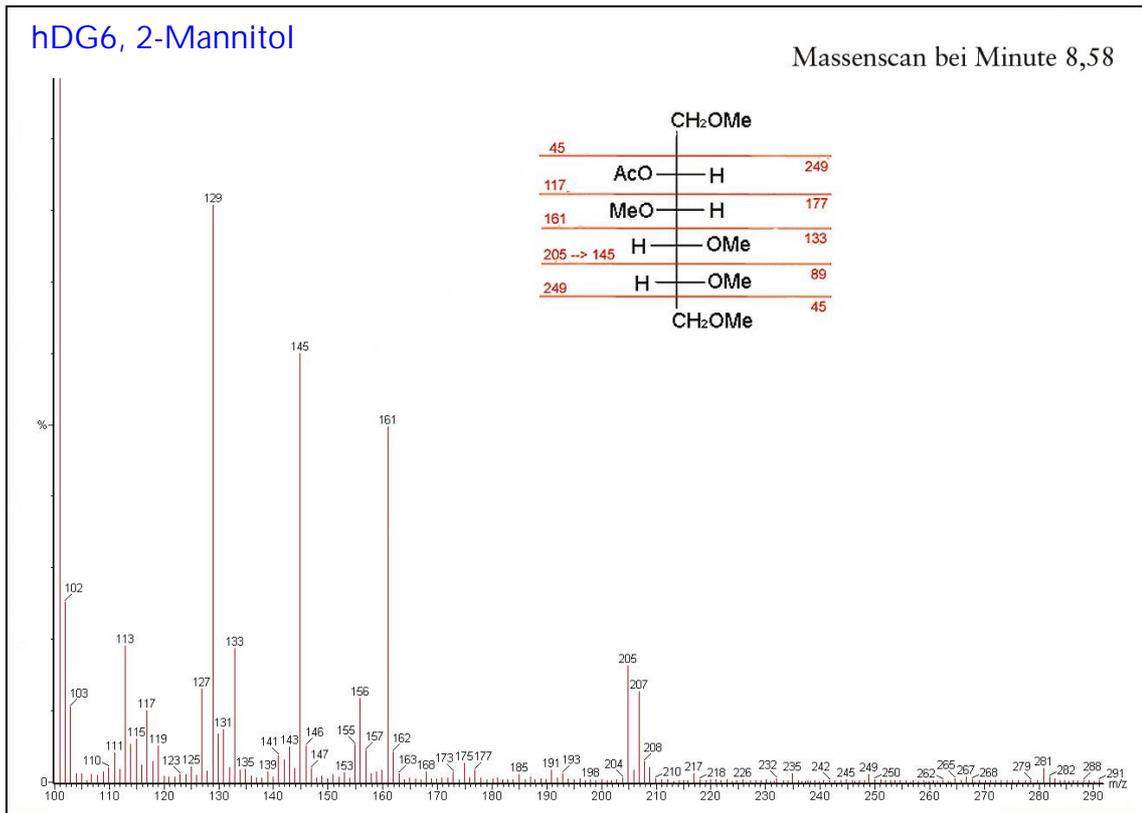


Abb. 55:

EI-Spektrum des Signals von 2-substituiertem Mannitol bei 8,6 Minuten aus dem Chromatogramm der partiell methylierten Alditacetate der Glykane von hDG6. Zusätzlich eingefügt ist das theoretische Fragmentierungsschema.

In dem Chromatogramm der Sonde hDG1 konnte, ebenso wie in dem ESI-Spektrum, kein Mannitol identifiziert werden, stattdessen jedoch terminale Mannose bei einer Retentionszeit von 10,2 Minuten (Abb. 56). Eine Retentionszeit von 10,5 min entspricht terminaler Galaktose. Das Signal bei 10,2 min konnte anhand des verwendeten Standards zunächst nicht zugeordnet werden, deutet aber aufgrund der identischen EI-Spektren und der verkürzten Retentionszeit auf eine terminale Mannose. Alle anderen identifizierten Monosaccharide waren identisch mit den Monosacchariden der Sonde hDG5.

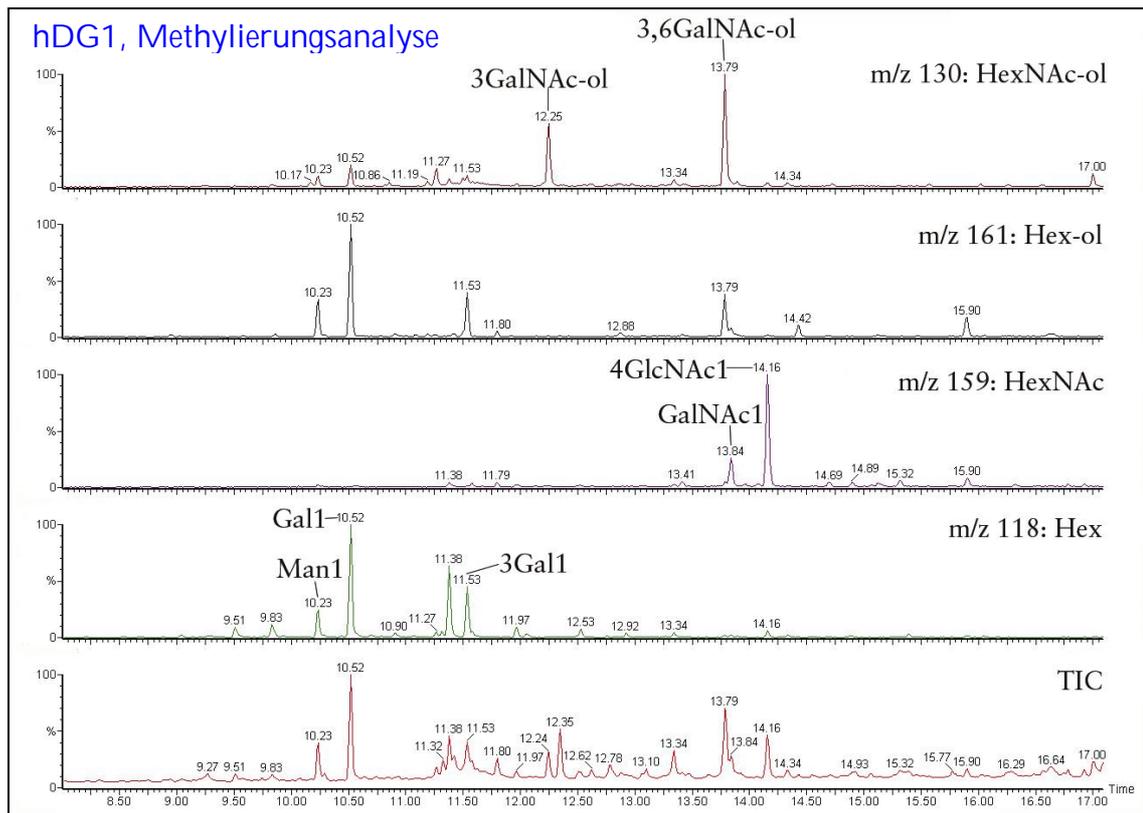


Abb. 56:

GC/MS Chromatogramm der partiell methylierten Alditacetate der Glykane von hDG1. Identifizierbar waren Monosaccharide von Glykanen des Muzintyps. Anstatt von 2-substituiertem Mannitol war terminale Mannose identifizierbar.

3.1.2.6 Identifikation der glykosylierten Aminosäuren

Anhand der Glykosylierungssonde hDG6 sollte mittels ESI-MS/MS auf einem HCT-Ultra mit ETD-Technologie die Ortsspezifität der Protein-O-Mannosylierung untersucht werden. Das Protein wurde vor der Analyse mit Exoglykosidasen behandelt (Abschnitt 2.4.6) und mit Trypsin gespalten. Mit Hilfe von alternierenden CID- und ETD-Fragmentierungen konnten dabei O-Mannosyl-Glykane auf der Partialsequenz VSEAGTTVPGQIRPTMTIPGYVEPTAVAT PPTTTTCKPRVSTPKP identifiziert werden, welche den Aminosäuren 390 - 429 entspricht. Die Fragmentierungsmuster zeigten auf den 13 O-Glykosylierungsstellen eine Monosaccharidzusammensetzung aus fünf bis sieben Hexosen, jeweils gemeinsam mit zwei bis vier N-Acetylhexosaminen. Das deutliche Überwiegen von Hexosen deutet auf eine Modifizierung mit dem O-Mannosyl-Tetrasaccharid hin, das durch enzymatische Spaltung der Sialinsäuren, der Galaktose und des N-Acetylglucosamins weitgehend als Monosaccharid vorliegen sollte. Dieses Peptid

ist in allen Glykosylierungssonden vorhanden, lediglich bei den Sonden hDG10 und hDG11 sind die C-terminalen 11 Aminosäuren nicht exprimiert. Auch Sonden, welche *in vivo* nicht O-manno-syliert wurden, enthalten mit Ausnahme der drei N-terminalen Aminosäuren VSE das vollständige Peptid (Abb. 57).

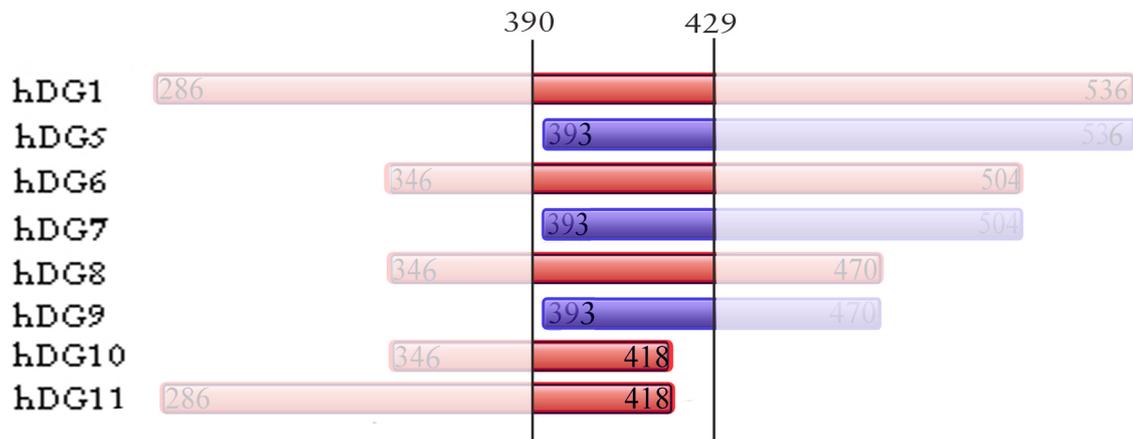


Abb. 57:

Lokalisation der O-Mannosylierung auf α -Dystroglykan. Das O-mannosylierte Peptid entspricht den Aminosäuren 390 – 429.

Mehrere andere Peptide der Sonde hDG6 weisen ein gleiches Verhältnis von Hexosen zu N-Acetylhexosaminen auf. Hier konnte noch nicht geklärt werden, ob diese Glykane ebenfalls O-Mannosyl-Glykanen oder Glykanen vom Muzintyp entsprechen.

3.1.2.7 *In vitro* Glykosylierung synthetischer Peptide auf Basis der Aminosäuresequenz des humanen α -Dystroglykans

Synthetische Peptide aus jeweils 15 Aminosäuren, synthetisiert auf Basis der Aminosäuresequenz der Glykosylierungssonde hDG8, wurden *in vitro* auf ihre Substratqualitäten für die Protein-O-Mannosyltransferasen 1 und 2 und die Polypeptid-N-Acetylgalaktosaminyltransferasen (pGalNAc-T) 1 und 2 getestet. Um möglichst viele Aminosäurekombinationen abzudecken, überlappten sich die Aminosäuren 1 bis 9 mit dem jeweils vorhergehenden Peptid, die Aminosäuren 7 – 15 mit dem jeweils folgenden. Die Peptide wurden mittels Umkehrphasen-HPLC gereinigt und massenspektrometrisch mit MALDI-TOF überprüft.

Um die Protein-O-Mannosyltransferasenaktivität zu analysieren wurde jeweils ein Peptid mit den Mikrosomenmembranen von C₂F₃-Zellen inkubiert, welche die

Mannosyltransferasen enthalten. Zugesezt wurde außerdem Detergenz und Dolicholphosphat-Mannose. Eine Analyse der Peptide nach der enzymatischen Reaktion mittels MALDI-TOF-MS zeigte bei keinem Peptid eine Inkorporation von Mannose (Tabelle 10). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Many (2004) diente keines der Peptide als Target für den O-Mannosyltransferase-Komplex POMT1/ POMT2, obwohl das Protein, auf dessen Basis die Peptide synthetisiert wurden, mit O-Mannosyl-Glykanen modifiziert wurde.

Zur Analyse der pGalNAc-Transferasen wurde jeweils ein Peptid mit den rekombinant exprimierten Enzymen versetzt. Als aktivierter Zucker wurde hier UDP-GalNAc eingesetzt, als Cofaktor Mn^{2+} -Ionen. Hier zeigten die MALDI-TOF-MS Analysen eine Inkorporation von N-Acetylgalaktosamin bei allen Peptiden mit Ausnahme des C-terminalen Peptids (Nr. 20). Bei den Peptiden 3, 4 und 8 waren die Glykoformen nur schwach sichtbar, bei den Peptiden 10 und 12 dagegen war eine nahezu quantitative Glykosylierung zu beobachten (Tabelle 10). Die O-Mannosylierungsstellen *in vivo* werden somit *in vitro* von den ubiquitären pGalNAc-Transferasen 1 und 2 glykosyliert.

Tabelle 10:

Eingesetzte synthetische Peptide und die Anzahl der O-GalNAc-Targetsequenzen. Bei den Peptiden 3, 4 und 8 waren die Glykoformen nur schwach sichtbar, bei den Peptiden 10 und 12 dagegen war eine nahezu quantitative Glykosylierung zu beobachten.

Peptidnummer	Aminosäuresequenz des Peptids	Anzahl inkorporierter O-GalNAc-Reste
1	AIAPPTETMAPPVRD	1
2	ETMAPPVRDPVPGKP	1
3	VRDPVPGKPTVTIRT	1
4	GKPTVTIRTRGAI IQ	1
5	IRTRGAI IQTPTLG	1
6	IIQPTLGP IQPTRV	2
7	LGPIQPTRVSEAGTT	1
8	TRVSEAGTTVPGQIR	1

Peptidnummer	Aminosäuresequenz des Peptids	Anzahl inkorporierter O-GalNAc-Reste
9	GTTVPGQIRPTMTIP	2
10	QIRPTMTIPGYVEPT	1
11	TIPGYVEPTAVATPP	2
12	EPTAVATPPTTTTCK	3
13	TPPTTTTCKPRVSTP	1
14	TKKPRVSTPKPATPS	1
15	STPKPATPSTDSTTT	2
16	TPSTDSTTTTTRRPT	1
17	TTTTTRRPTKKPRT	1
18	RPTKKPRTPRPVPRV	1
19	RTPRPVPRVTTKVSI	1
20	VPRVTTKVSIIRSLV	0

3.2 Untersuchungen zur O-Glykosylierung des Proteins Dystroglykan aus *D. melanogaster*

3.2.1 Rekombinante Expression der Muzindomäne und des extra- zellulären Abschnitts

Um einen Überblick über das Glykosylierungsprofil zu erhalten, wurden sowohl die Muzindomäne (dDG1) als auch der extrazelluläre Teil (dDGextra) des Dystroglykan aus *D. melanogaster* rekombinant exprimiert und analysiert. In Abbildung 58 ist die vollständige Aminosäuresequenz des maturen Transmembranproteins dargestellt. Das Protein dDGextra umfasst den gesamten extra-zellulären Abschnitt des Proteins, das Protein dDG1 umfasst die Muzindomäne.

1	MRFQWFLSAS	ASLSLFLLLD	FVWVIHGERD	FNV N DSQVPV	IEPKDVPAYK
51	QDPYVTELM	CQNTPSEIVL	SLLLKKHDWS	ELTATKRAHV	QAKLAKFFAI
101	PKEFISLDSV	SKRELRSMHK	LAMRKGKGN	KNIETLNRRRL	GRASFMIKCG
151	PSYFVMGEPI	AKQIAHQMKD	GTIGALTEEN	FGLWFIWRKE	LKSRSNRKR
201	QSESGADED	DYDYGDDDEE	VAEPSTEVPP	VTTHAHRHHH	GALEVSEKIV
251	SPESVSSSAV	PLVPDVEEEI	EESVSKLESV	ISKTIENTKN	IKELPVLGEA
301	DDGEDEEEVE	LQQLGVPLAA	EIVPDETTSA	AATRATAMVK	PVDLDEQEIS
351	VDGAVPAID	VEASATPTPS	MSARETQKPF	SPYDATSSVS	SSFSPPVASIA
401	SGSEAGEDST	SVSTPHLSPA	NSPTVMPTTEL	DRNGLATTSS	SSSSSASPPP
451	SSSVPTQATQ	PTTSASSFSS	SSSTTTTSTT	ATVSTTTTAS	STATTTTTTTT
501	TLSESPKEGG	EPDAISSGNN	SLANNELSTP	ATPTSSVATT	TASTPESSSI
551	SSNFVSTDYM	EPQPEENSPP	IIKTRLQKLA	VTSGKAFTFH	VLPETFYDAE
601	DQGNLRLALT	DKDGHELMAN	SWLQFNADKR	ELYGLPLDDT	VSRWQYRLSA
651	TDSG N ASVTE	TVEISVQQHR	AVRTINHEIS	VFVRINEKPG	HNIDWQLKLI
701	NAVARTLDDS	TNSAVVVREI	RQTPHDPHSA	TFVYF N ETLP	TSECPEKELK
751	DI IARLDANR	LSDLVQPQLG	IKSITGQLIG	SCQKDLTQVK	PTQHMTKNVP
801	PMPRNQVDRV	NASLGQLLVY	KVPADTFYDA	NDNQLTLTLK	TRDHLELSPR
851	HWLQFDSKNE	EFYGIKSGD	IGSEEYLLVA	EDSGGLSAHD	ALVVVVSPAP
901	KRDFGFFKA	YLSIKHERFN	ADLQRKFVER	VAKLNGDPTT	GQIQIRSITT
951	HHSDGTIVN	FYNTTLYRKH	NSCREKEVAM	TRSVYLNSDL	SLREAARAL
1001	GPEL NLT NFS	VVPFSICHHT	ENIDTNQLDY	IPSRPEEPH	KSSFGEYMI
1051	TFVWPVIVIV	AMLVAASIIA	CCLHWCRQRS	GKMELGDEEE	RKSFRAKGIP
1101	VIFQDEYEEK	PEIGNKSPVI	LKDEKPPLLP	PSYNTSNMNG	DNDVDDYVPP
1151	PSVVVGGREV	RGKSPATPSY	RKPPPYVSP		

Abb. 58:

Die Aminosäuresequenz von Dystroglykan aus *D. melanogaster*. Die Aminosäuresequenz des rekombinant exprimierten Proteins dDGextra ist mit blauer Schrift hervorgehoben, die Sequenz des Proteins dDG1, welches die Muzindomäne umfasst, ist zusätzlich fett markiert. Potentielle N-Glykosylierungsstellen sind rot und fett markiert, die *in silico* (TMHMM Server v. 2.0) ermittelte Transmembrandomäne ist rot und kursiv markiert. Der intrazelluläre Teil des Proteins ist in schwarzer Schrift dargestellt.

Die cDNA des Proteins dDGextra wurde in den Expressionsvektor pAc5.1/V5-His kloniert und in *D. melanogaster* Schneider 2-Zellen (S2) exprimiert (Abb. 59).

Die cDNA des Proteins dDG1 wurde in drei verschiedene Vektoren unterschiedlicher Expressionssysteme kloniert. Aus dem Vektor pMT/BiP/V5-His zur Expression in S2-Zellen wurde die cDNA in die Vektoren pAcGP67 des Baculovirus Expressionssystems und pCEP-PU + BM40 (V27) zur eukaryontischen Expression kloniert. Die *Tags* V5 und His₆ wurden hierbei aus dem ersten Vektor (pMT/BiP/V5-His) übernommen (Details in Abb. 59 und Abschnitt 2.2.10).

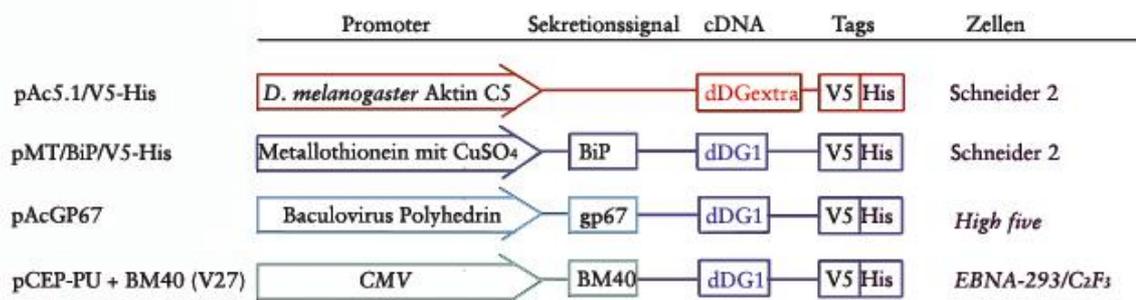


Abb. 59:

Übersicht über die verwendeten Expressionssysteme. Die *Tags* V5 und His₆ für die dDG1-cDNA wurden aus dem pMT/BiP/V5-His Vektor übernommen.

Beide Proteine sollten rekombinant in S2-Zellen exprimiert werden. Nach Transfektion der cDNA der Muzindomäne (dDG1) verloren die S2-Zellen jedoch wiederholt aus ungeklärten Ursachen den Expressionsvektor. Die DNA wurde daraufhin mit den *Tags* V5 und His₆ in einen Vektor des Baculovirus-Expressionssystems kloniert. Das Protein wurde durch den Baculovirus in den Nachtfalterzellen *Spodoptera frugiperda* (Sf9) und *Trichoplusia ni* (*High five*) exprimiert, zeigte jedoch bereits bei Analyse des Zellüberstandes Anzeichen von Degradation. Es war demnach auch nicht möglich, das rekombinante Protein aus Zellüberständen aufzureinigen. Abbildung 60 zeigt den Versuch, das rekombinante Protein aus *High five*-Zellen mittels Nickelchelat-Affinitätschromatographie und Umkehrphasen-HPLC aufzureinigen. Das Protein eluierte in einem großen Zeitbereich und ohne erkennbare Aufreinigung von der C8-HPLC-Säule. Eine weitere Charakterisierung wurde deshalb nicht durchgeführt.

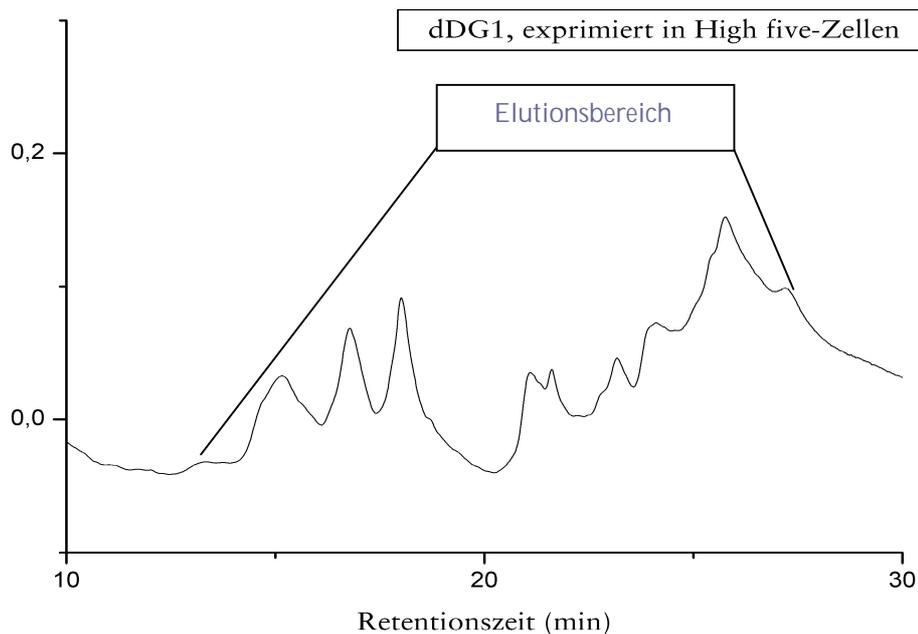


Abb. 60:
HPLC Chromatogramm des Proteins dDG1, exprimiert in *High five*-Zellen. Der entsprechende Immunoblot zeigte, dass das Protein heterogen zwischen 12 und 28 min von der Säule eluierte.

Aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten bei der Expression in Insektenzellen wurde die cDNA der Muzindomäne (dDG1) mit den Tags V5 und His₆ in den eukaryontischen Expressionsvektor pCEP-PU + BM40 (V27) kloniert. Das Protein wurde in den Zelllinien EBNA-293 (Human) und C₂F₃ (Maus) rekombinant exprimiert. Alle folgenden Ergebnisse beziehen sich demzufolge auf die Proteine dDGextra aus S2-Zellen oder dDG1 aus EBNA-293- oder C₂F₃-Zellen.

3.2.1.1 Generierung der cDNA-Konstrukte und rekombinante

Expression in verschiedenen Zelllinien

Die cDNA beider Proteine wurde mittels PCR aus dem EST Klon LD 33152 (Invitrogen) des *Berkeley D. melanogaster Genome Project* generiert. Die Restriktionsschnittstellen BamHI (5') und XhoI (3') (dDG1) bzw. NotI (5'/3') (dDGextra) wurden mit Hilfe der flankierenden Primer eingefügt. Länge und Reinheit der aufgereinigten cDNA-Fragmente wurde durch Agarosegelelektrophorese überprüft (Tabelle 11 und Abb. 61).

Tabelle 11:

DNA-Abschnitte, Länge und flankierende Primer der exprimierten *D. melanogaster* Proteine. Die Angaben sind auf die mRNA-Sequenz des Dystroglykan Gens bezogen. In der letzten Spalte ist der Expressionsvektor angegeben, in welchen der jeweilige cDNA-Abschnitt kloniert wurde. (bp: Basenpaare)

Bezeichnung der cDNA	Bezeichnung der Primer	cDNA-Abschnitt (bp)	Länge (bp)	Vektor
dDGextra	dDG5'extra + dDG3'extra	1 – 3135	3135	pAc5.1/V5-His
dDG1	dDG5'1 + dDG3'1	1113 - 1689	576	pMT/BiP/V5-His
dDG1	dDG5'1 + pMT Tags pAcGP67	s.o.	s.o.	pAcGP67
dDG1	dDG5'1 für pCep-Pu + pMT Tags pCep-Pu	s.o.	s.o.	pCep-Pu V27

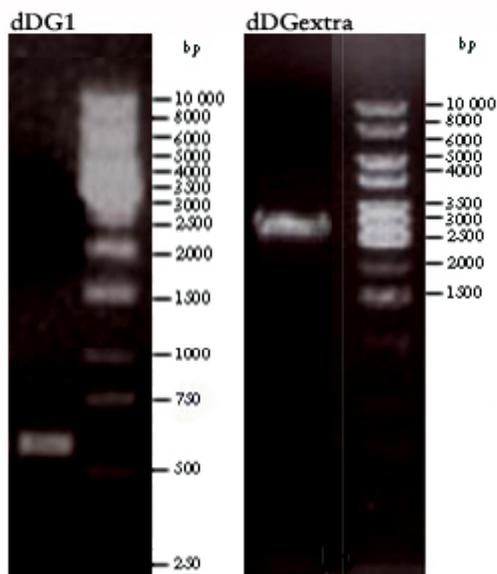


Abb. 61:

Mittels PCR amplifizierte cDNA. Links ist die cDNA des dDG1 Konstruktes abgebildet, rechts die cDNA des dDGextra Konstruktes. Die entsalzte DNA wurde über 1%ige Agarosegele aufgetrennt. Die Größe der amplifizierten DNA wurde durch Vergleich mit einem DNA-Standard ermittelt.

Die cDNA des extrazellulären Abschnitts (dDGextra) wurde über die Restriktionsschnittstelle NotI in den Vektor pBluescript subkloniert. Nach Sequenzierung wurde das mutationsfreie Konstrukt über die gleiche Restriktionsschnittstelle in den Expressionsvektor pAc5.1/V5-His kloniert und in die *D. melanogaster* Zelllinie S2 transfiziert. Die Sekretion der exprimierten Proteine erfolgte über das endogene Sekretionssignal des *Drosophila* Dystroglykans am N-Terminus des Proteins.

Die cDNA der Muzindomäne (dDG1) wurde über die Restriktionsschnittstellen BamHI und XhoI in den Vektor pBluescript subkloniert. Nach Sequenzierung wurde das mutationsfreie Konstrukt in den Expressionsvektor pMT/BiP/V5-His kloniert. Aus diesem Vektor wurde die Sonde inklusive der *Tags* V5 und His₆ per PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pCep-Pu + BM40 (V27) kloniert (genauere Angaben zur Klonierungsstrategie in Abschnitt 2.2.10). Die Expression des Proteins erfolgte in den eukaryontischen Zelllinien EBNA-293 und C₂F₃.

3.2.1.2 Aufreinigung der Proteine aus dem Zellüberstand

Der Zellüberstand der Proteine dDG1 aus EBNA-293- sowie C₂F₃-Zellen und dDGextra aus S2-Zellen wurde mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie vorgereinigt. Nach der Elution wurden alle V5-immunoreaktiven Fraktionen vereinigt und durch Ultrafiltration eingeeengt. Das Protein dDG1 aus C₂F₃- und EBNA-293-Zellen wurde mittels Umkehrphasen-HPLC über eine C8 Säule vollständig aufgereinigt. Beide Proteine zeigten, bei einem weitgehend identischen Profil, keine scharfen Signale. Insbesondere das Protein aus C₂F₃-Zellen wies nach der Nickelchelate-Affinitätschromatographie eine sehr geringe Konzentration auf (Abb. 61).

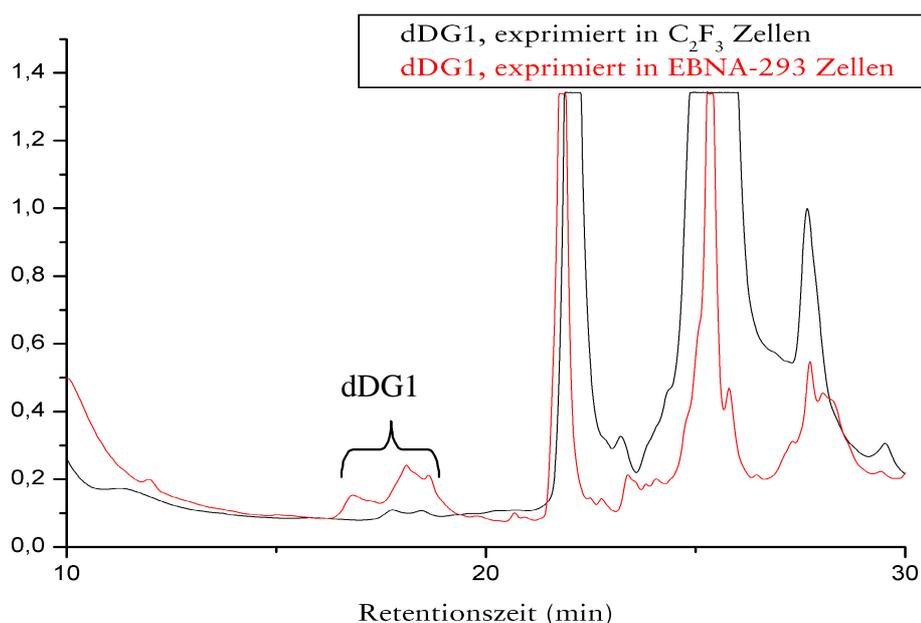


Abb. 62:
Chromatogramme der HPLC-Aufreinigungen des Proteins dDG1 aus C₂F₃ und EBNA-293 Zellen. Das rekombinante Protein eluierte bei einer Retentionszeit von 16 – 19 Minuten.

Mit Hilfe eines Immunoblots wurde die Identität des rekombinanten Proteins bestätigt. Die Reinheit des Proteins aus EBNA-293-Zellen wurde durch eine Silberfärbung eines Polyacrylamidgels überprüft (Abb. 63). Aufgrund geringer Ausbeuten des Proteins aus C₂F₃-Zellen wurden alle folgenden Analysen, wenn nicht anders vermerkt, mit dem Protein aus EBNA-293-Zellen durchgeführt.

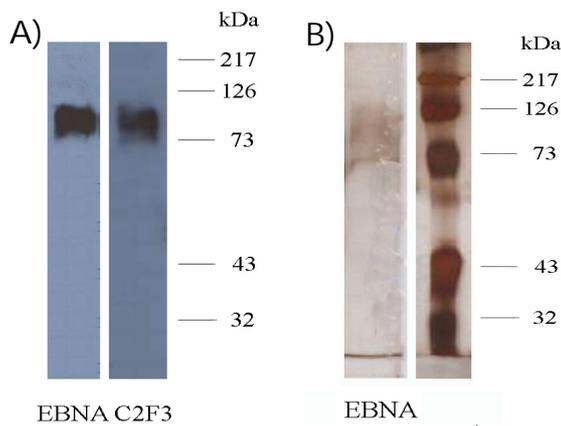


Abb. 63:
Das rekombinante Protein dDG1 nach HPLC-Aufreinigung, aufgetrennt über ein SDS Polyacrylamidgel (10 %).

A) Detektion mittels Immunoblot mit V5-Antikörper.
B) Silberfärbung

Eine vollständige Aufreinigung des Proteins dDGextra durch Umkehrphasen-HPLC war nicht möglich. Das Protein konnte unter den Standardbedingungen nicht im Eluat einer C8 Säule identifiziert werden. Die serumfreie Expression in S2-Zellen ermöglichte jedoch eine weitere Aufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) auf einer Äkta-FPLC-Anlage (Abb. 64).

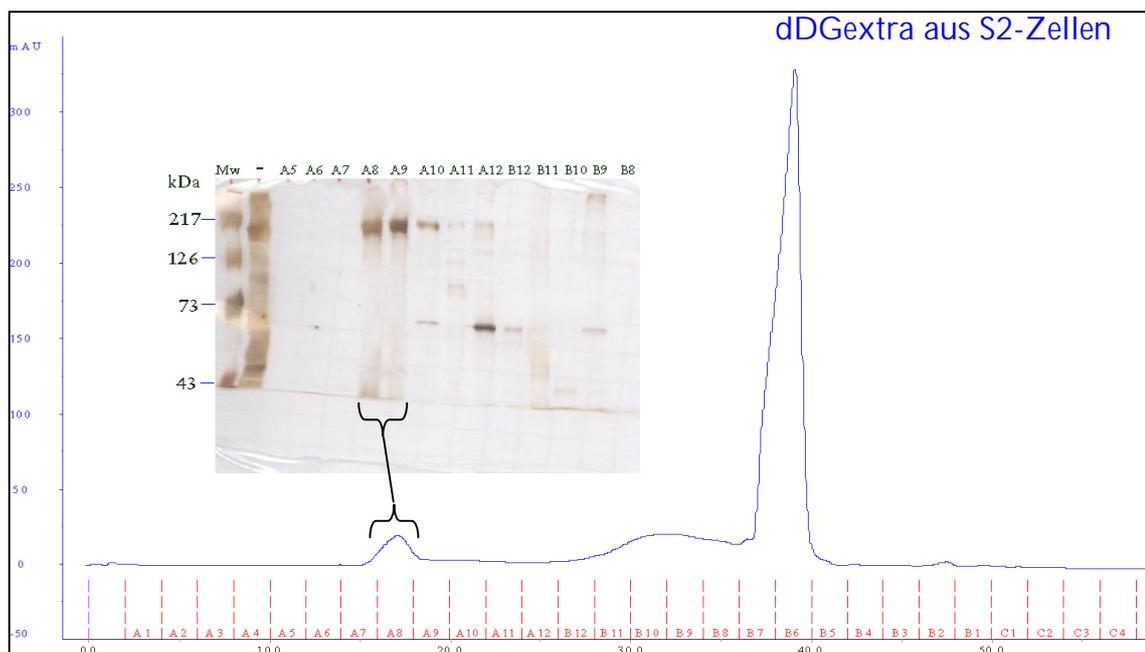


Abb. 64:
GPC-Chromatogramm des Proteins dDGextra. Die Identifikation der positiven Fraktionen A8 und A9 erfolgte mittels SDS-PAGE (7,5 %) und Silberfärbung. An der oberen Kante des SDS-Gels sind die geladenen Fraktionen angezeigt. Die erste Spur (-) zeigt das Protein vor der Aufreinigung.

Die Fraktionen A8 und A9 wurden vereinigt. Die Identität des Proteins wurde zusätzlich durch einen V5-Immunoblot bestätigt (Abb. 65).

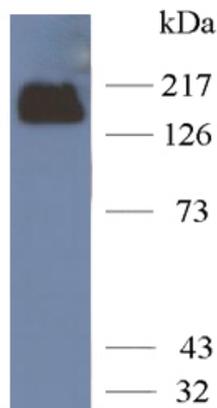


Abb. 65:
Immunoblot der vereinigten GPC-Fraktionen A8 und A9 des Proteins dDGextra mit dem V5-Antikörper nach Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel (10 %).

3.2.2 Erstellen des Glykosylierungsprofils der aufgereinigten Proteine

Aufgrund der für Glykoproteine untypisch geringen Massenheterogenität der Proteine (vergleiche Abb. X und X) wurde zunächst mit Hilfe des *DIG Glykan Detection Kits* bestätigt, dass sowohl dDG1 als auch dDGextra glykosyliert sind (Abb. 66).

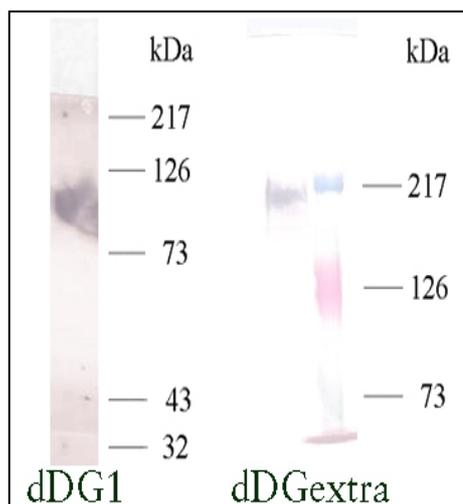


Abb. 66:
Nachweis der Glykane auf elektrotransferierten Proteinen mittels *DIG Glykan Detection Kit*. Das Protein dDG1 wurde zuvor über ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, das Protein dDGextra über ein 5 %iges. Die unterschiedliche Hintergrundfärbung ist durch verschieden lange Lagerungszeiten und Alterungsprozesse der Blotmembran als auch durch ungenügendes Abstoppen bedingt.

Im Gegensatz zu den Konstrukten des humanen α -Dystroglykans und des Proteins dDG1 enthielt die Aminosäuresequenz des Proteins dDGextra neun N-Glykosylierungsstellen. Fünf dieser Asparagine wurden von *Net-N-Glyc* als potentiell glykosyliert identifiziert (Abb. 58). Durch Behandlung mit Peptid-N-GlykosidaseF

sollten vorhandene N-Glykane enzymatisch abgespalten werden. Ein Vergleich der Molekulargewichte vor und nach der enzymatischen Reaktion zeigte bei dem ausschließlich O-glykosylierten Protein dDG1 erwartungsgemäß keine Veränderung. Bei dem Protein dDGextra war das Ergebnis nicht eindeutig. Auf dem Polyacrylamidgel ist eine leichte Reduktion des Molekulargewichtes erkennbar, die jedoch auch in der erhöhten Salzkonzentration der Auftragslösung nach dem Verdau begründet sein könnte (Abb. 67).

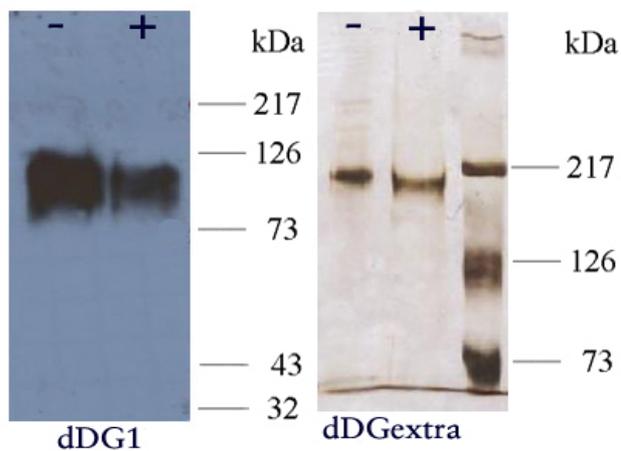


Abb. 67:
Die rekombinanten Proteine dDG1 und dDGextra vor (-) und nach (+) PNGaseF-Verdau. dDG1 wurde über ein 10 %iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, geblottet und mit dem V5-Antikörper detektiert. dDGextra wurde über ein 5 %iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Silber gefärbt.

3.2.2.1 Monosaccharidanalyse und Identifizierung des *core*-Zuckers mittels GC/MS.

Von den aufgereinigten Proteinen wurde eine Analyse der trimethylsilylierten Monosaccharide mittels GC/MS durchgeführt (genaue Beschreibung in Abschnitt 3.1.2.1). Die Monosaccharidanalyse des Proteins dDG1 aus EBNA-293- und aus C₂F₃-Zellen zeigte eine Glykosylierung mit Sialinsäure, Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglukosamin (Abb. 68). Diese Komposition weist auf eine Glykosylierung vom Muzintyp hin.

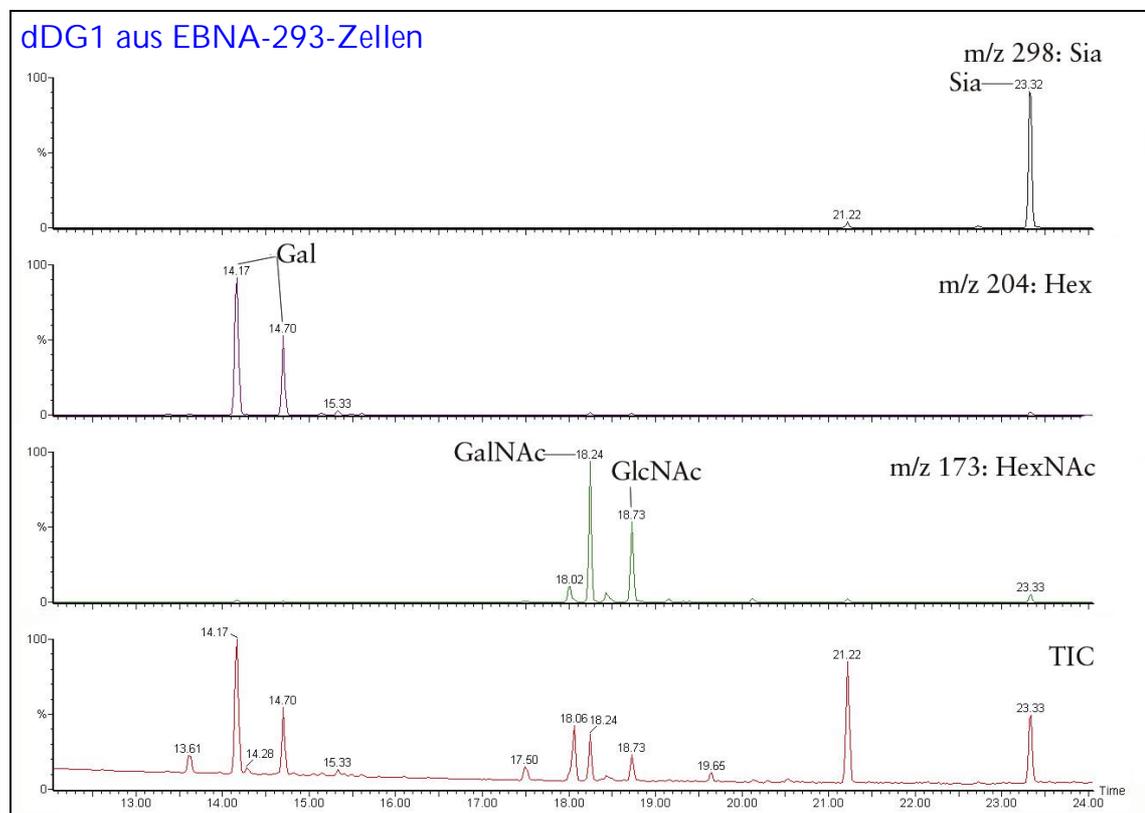


Abb. 68:

GC/MS Chromatogramm des in EBNA-293-Zellen exprimierten Proteins dDG1. Das Chromatogramm zeigt eine Monosaccharidkomposition aus Sialinsäure (Sia), Galaktose (Gal), N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) und N-Acetylglukosamin (GlcNAc). (Hex: Hexose, HexNAc: N-Acetylhexosamin, TIC: Gesamtionenstrom/ *total ion current*)

Das Protein dDGextra aus S2-Zellen enthielt mehrere N-Glykosylierungsstellen, und auch der Verdau mit PNGaseF ergab kein eindeutiges Ergebnis. Die durch Methanolyse freigesetzten Monosaccharide O- und N-glykosidisch gebundener Glykane wiesen eine Komposition aus Mannose, Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglukosamin auf (Abb. 69). Es waren quantitativ im

TIC (Gesamtionenstrom/ *total ion current*) weniger N-Acetylhexosamine als Hexosen zu beobachten. Sialinsäure war erwartungsgemäß nicht zu detektieren (nicht gezeigt). In der Gelpermeationschromatographie wurde die Proteinlösung vermutlich stark mit Glukose aus dem Dextran des Superdexgels verunreinigt.

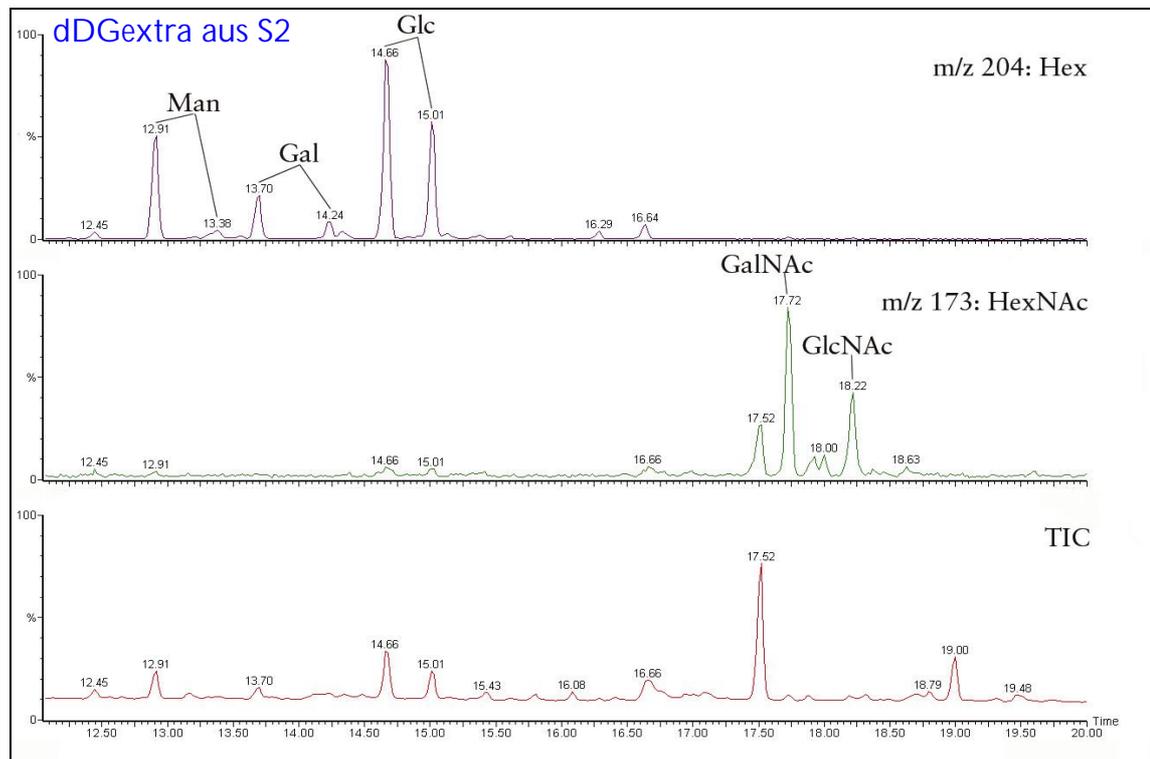


Abb. 69:

GC/MS Chromatogramm des Proteins dDGextra, exprimiert in S2-Zellen. Das Chromatogramm zeigt eine Monosaccharidkomposition aus Mannose, Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglukosamin an. Glukose (Glc) ist als starke Verunreinigung zu sehen.

Um zwischen O- und N-glykosidisch gebundenen Glykanen zu unterscheiden, mussten diese vor der Methanolyse separiert werden. Die O-Glykane wurden spezifisch mittels β -Eliminierung freigesetzt, die N-Glykane in einem getrennten Ansatz mittels PNGaseF. Eine Separation der freigesetzten Glykane von dem Protein erfolgte in beiden Fällen vor der unspezifischen Methanolyse über eine Festphasenextraktion. Das GC/MS-Chromatogramm der Monosaccharide nach der Enzymbehandlung zeigte, dass durch PNGaseF keine N-Glykane freigesetzt wurden (nicht gezeigt).

Das Chromatogramm der β -eliminierten O-Glykane bestätigte dagegen, dass alle Monosaccharide, welche in Abb. 69 identifiziert wurden, O-glykosidisch an das Apoprotein gebunden waren. Als *core*-Zucker konnte ausschließlich Mannitol identifiziert werden (Abb. 70).

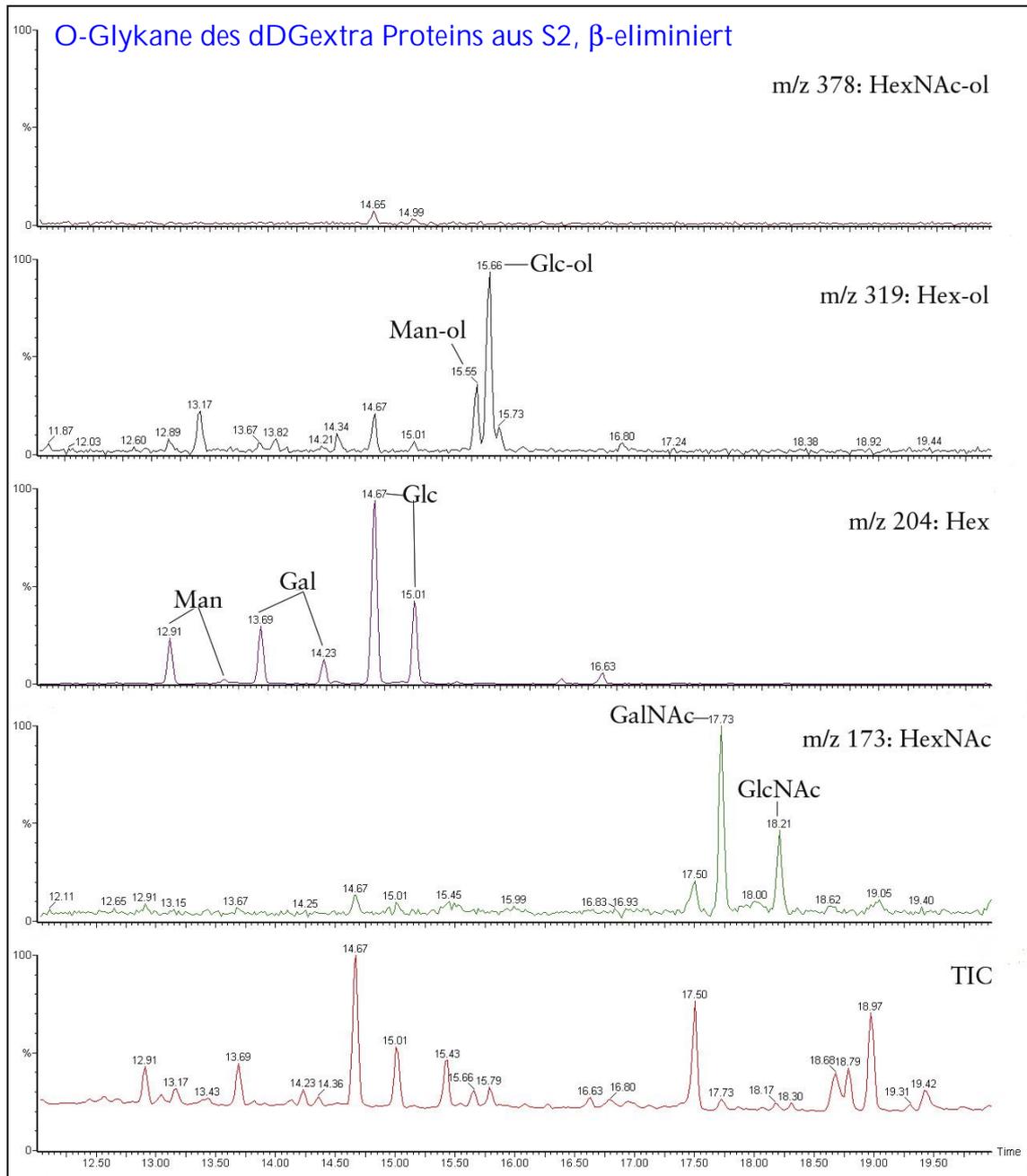


Abb. 70:

GC/MS der O-Glykane des Proteins dDGextra. Das Chromatogramm zeigt eine Monosaccharidkomposition aus Mannose, Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglukosamin. Als reduzierter Zucker wird Mannitol (Man-ol) detektiert. Glukose und Sorbitol (Glc-ol) sind als Verunreinigungen erkennbar. (HexNAc-ol: N-Acetylhexosaminitol, Hex-ol: Hexitol)

3.2.2.2 Normalphasen-HPLC der Glykane des Proteins dDG1 aus EBNA-293-Zellen

Die Monosaccharidkomposition aus Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglukosamin (Abschnitt 3.2.2.1) des Proteins dDG1 weist auf eine Glykosylierung vom Muzintyp hin. Um dies zu bestätigen, wurden die O-Glykane mittels Hydrazinolyse nichtreduzierend freigesetzt und am reduzierenden Ende mit dem Fluorophor 2-Aminobenzamid markiert. Die markierten Glykane wurden über eine Normalphasen-HPLC getrennt. Das Elutionsprofil wurde anschließend mit dem Profil der Glykane des MUC1-Proteins, ebenfalls aus EBNA-293-Zellen, verglichen. MUC1 ist bekanntermaßen mit Glykanen vom Muzintyp glykosyliert, welche sowohl *core1* als auch *core2* Strukturen aufweisen. Die deutliche Übereinstimmung der Chromatogramme bestätigte, dass dDG1 mit identischen Glykanen vom Muzintyp glykosyliert war (Abb. 71).

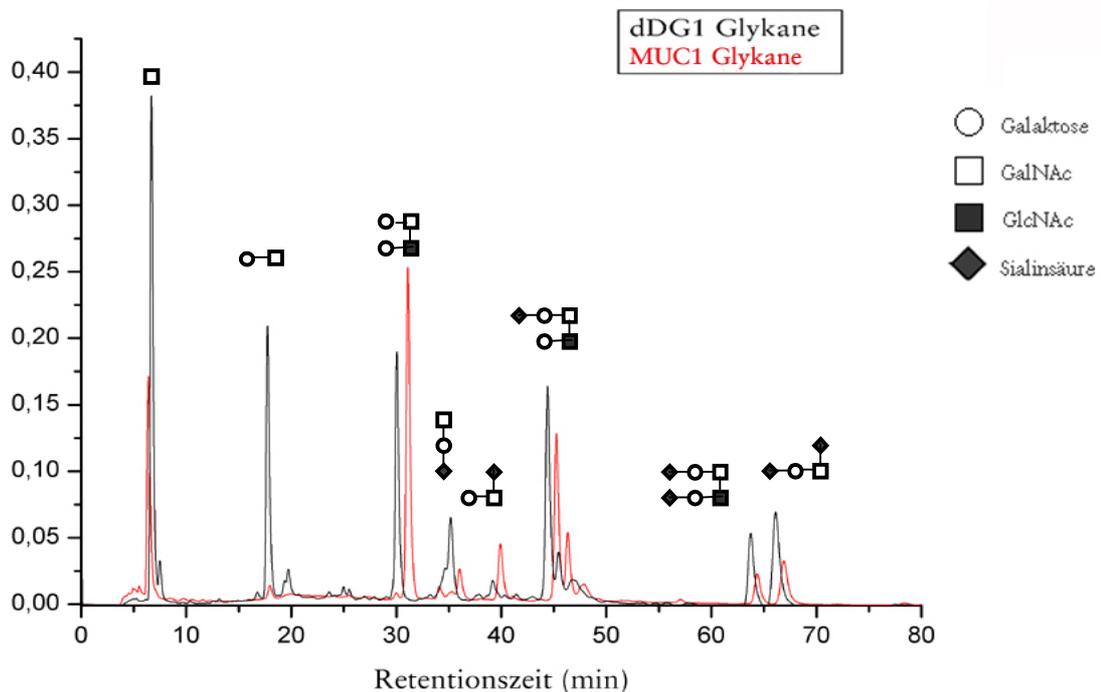


Abb. 71:
Normalphasen-HPLC Chromatogramm der 2-AB-markierten Glykane von dDG1 aus EBNA-293-Zellen (schwarz) im Vergleich mit den Muzintyp-Glykanen des MUC1 aus EBNA-293-Zellen (rot).

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die Glykane des Proteins dDG1 vor der Hydrazinolyse zusätzlich mit Sialidase verdaut. Bei einem Vergleich der Chromatogramme ist zu sehen, dass Signale, hinter denen eine sialylierte Struktur vermutet wurde, deutlich reduziert wurden (Abb. 72).

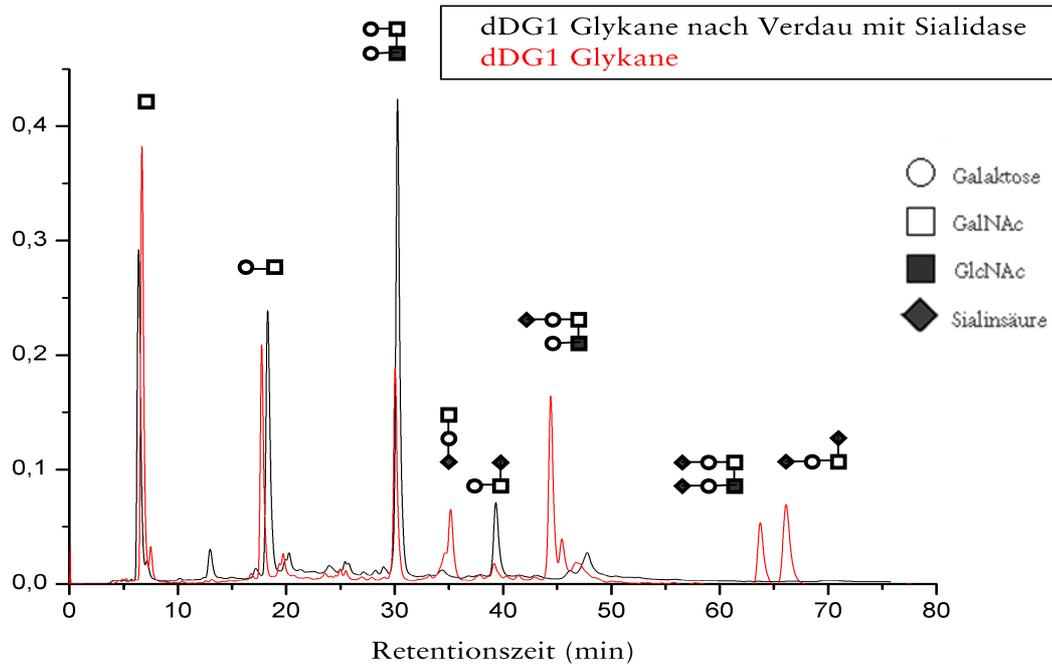


Abb. 72:
Normalphasen-HPLC Chromatogramme der 2-AB-markierten Glykane von dDG1 aus EBNA-293-Zellen vor (rot) und nach (schwarz) dem Verdau mit Sialidase.

3.2.2.3 MALDI-TOF-MS Analysen des Proteins dDGextra

Das Protein dDGextra wurde in getrennten Ansätzen sowohl mit der Endoprotease V8 in Phosphatpuffer als auch mit Trypsin gespalten. Bei der Analyse der so erhaltenen Peptide mittels MALDI-MS konnten in beiden Ansätzen viele unglykosylierte Peptide identifiziert werden (Abb. 73). Bei der Spaltung mit Trypsin zeigte sich ein Triplet mit einer Massendifferenz von m/z 126 - 128 zu den unmodifizierten Peptiden (Abb. 73). Diese Massendifferenz lässt sich keiner bekannten Proteinmodifikationen zuordnen.

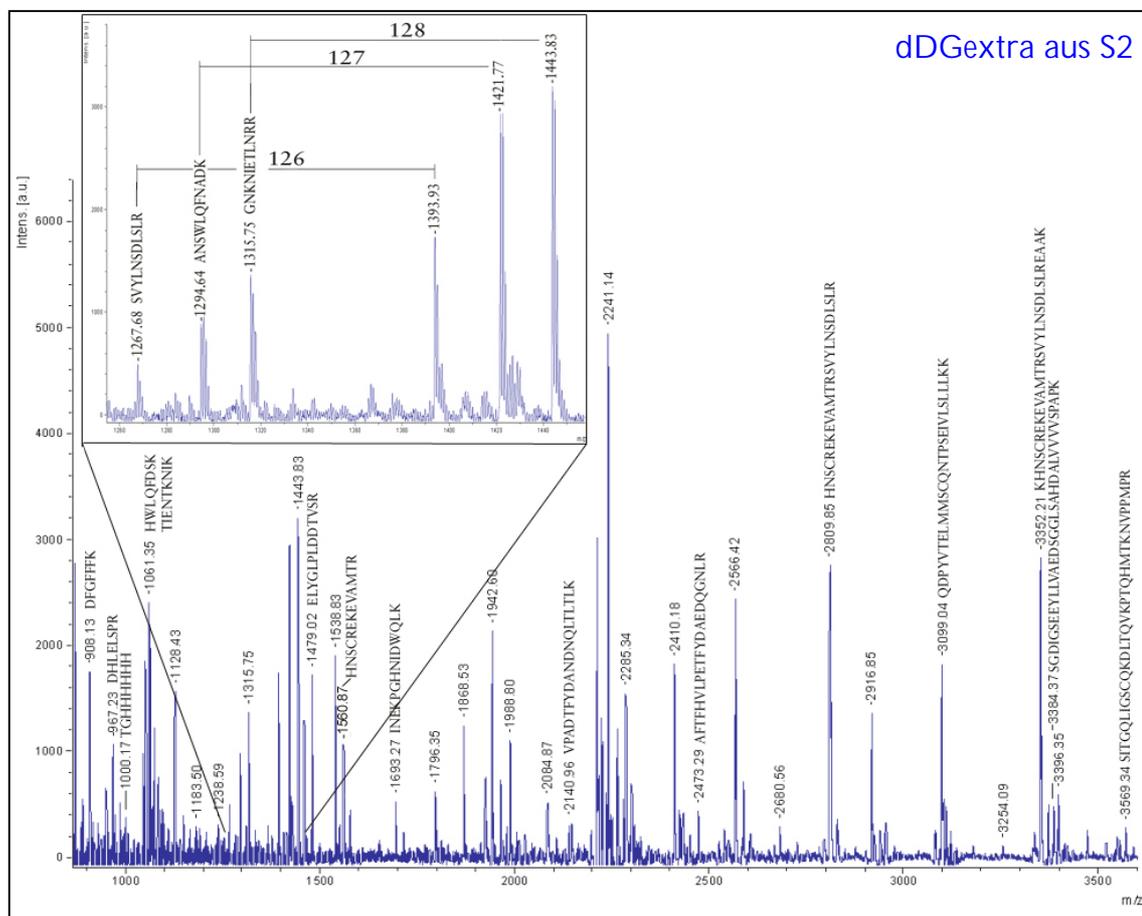


Abb. 73:

MALDI-TOF-Spektrum des Proteins dDGextra nach Spaltung mit Trypsin. Es sind viele nicht-glykosylierte Peptide identifizierbar. In der Vergrößerung sind zwei Signal-Triplets zu sehen, die sich durch Massendifferenzen von m/z 126 – 128 unterscheiden.

Die Spektren der mit V8 gespalteten Peptide weisen im höheren Massenbereich einige Signale mit Massendifferenzen von m/z 162 (Hexose), seltener mit solchen von m/z 203 (N-Acetylhexosamin) auf (Abb. 74).

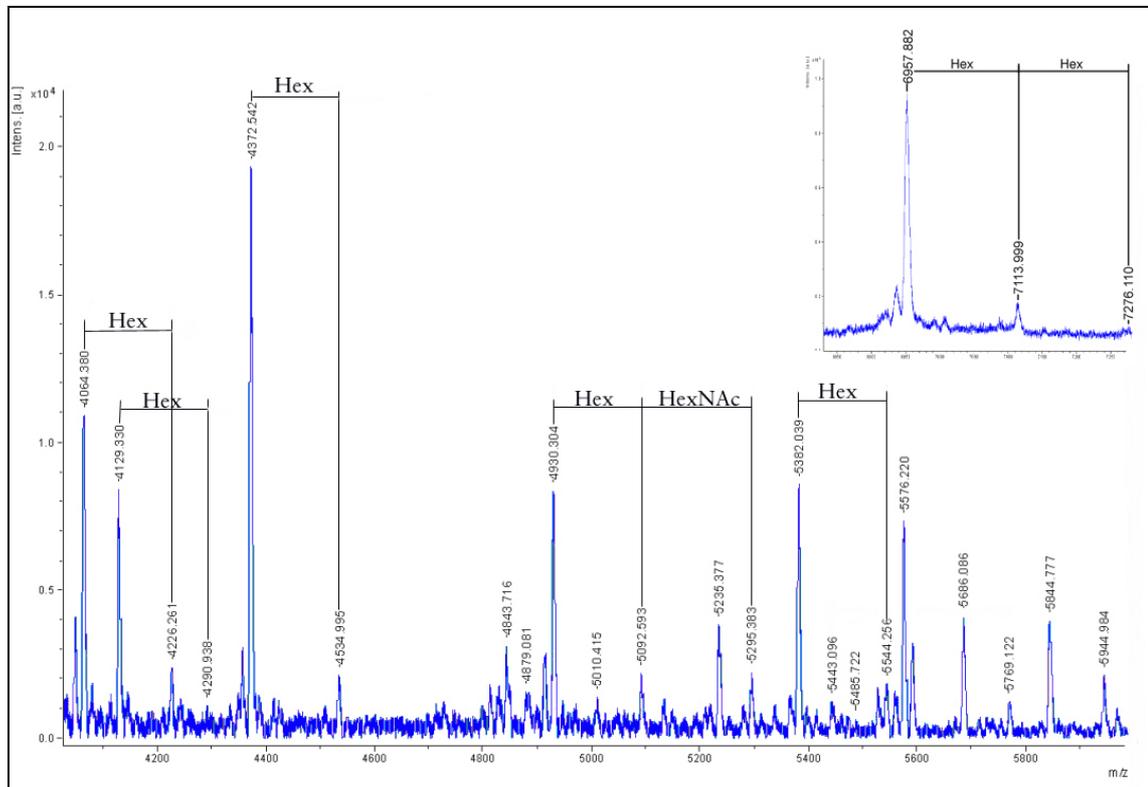


Abb.74:

Ausschnitt aus dem MALDI-TOF-Spektrum des Proteins dDGextra nach Spaltung mit V8. Im hier gezeigten höheren Massenbereich erkennt man mehrfach Signale mit Massendifferenzen, welche Hexosen, seltener N-Acetylhexosaminen entsprechen.

Durch einen Abgleich der MALDI-TOF-Spektren beider proteolytischen Spaltungen konnte gezeigt werden, welche Bereiche des Proteins glykosyliert sind. Glykosylierte Peptide finden sich insbesondere im mittleren Teil des Proteins (Abb. 75). Über das Glykosylierungsprofil der Muzindomäne (Aminosäuren 430 – 505) kann keine Aussage getroffen werden, da diese von keiner spezifischen Protease gespalten wird. Weder die unmodifizierte Muzindomäne mit der theoretischen Masse von 7130 Da, noch Glykoformen dieses Peptids konnten detektiert werden.

1	<u>MRFQWFLSAS</u>	<u>ASLSLFLLLD</u>	<u>FVVWIHGGERD</u>	<u>FNVNDSQVPV</u>	<u>IEPKDVPAYK</u>
51	<u>QDPYVTE</u> LMS	CQNT <u>PSEIVL</u>	<u>SLLLKKHDWS</u>	<u>ELTATKRAHV</u>	<u>QAKLAKFFAI</u>
101	<u>PKEFI</u> SLDSV	SKRE <u>LRSMHK</u>	<u>LAMRKGKGN</u>	<u>KNIE</u> TLNRRL	<u>GRASFMI GCG</u>
151	<u>PSYFVMGEPI</u>	<u>AKQIAHQMKD</u>	GTIGALTEEN	<u>FGLWFIWRKE</u>	<u>LKSRSNRKR</u>
201	<u>QSEGS</u> GADED	<u>DYDYGDDDEE</u>	<u>VAEPSTEVPP</u>	<u>VTTHAHRHHH</u>	<u>GALEVSEKIV</u>
251	<u>SPESVSSSAV</u>	<u>PLVPDVEEEI</u>	<u>EESVSKLESV</u>	ISKTIENTKN	<u>IKELPVLGEA</u>
301	<u>DDGEDEEEVE</u>	<u>LQQLGVPLAA</u>	<u>EIVPDETTSA</u>	<u>AATRATEMVK</u>	<u>PVDLDEQEIS</u>
351	<u>VDSGAVPAID</u>	<u>VEA</u> SATPTPS	MSARETQKPF	SPYDATSSVS	SSFSPVASIA
401	SGSE <u>EAGEDST</u>	<u>SVSTPHLSPA</u>	<u>NSPTVMPTTEL</u>	<u>DRNGLATTSS</u>	<u>SSSSSASPPP</u>
451	<u>SSSVPTQATQ</u>	<u>PTTSASSFSS</u>	<u>SSSTTTTSTT</u>	<u>ATVSTTTTAS</u>	<u>STATTTTTTTT</u>
501	<u>TLSESPKEGG</u>	<u>EPDAISSGNN</u>	<u>SLANNELSTP</u>	ATPTSSVATT	TASTPESSSI
551	SSNFVSTDYM	EPQPEENSPP	IIKTRLQKLA	VTSGKAFTFH	VLPETFYDAE
601	<u>DQGNLRLALT</u>	<u>DKDGHELKAN</u>	<u>SWLQFNADKR</u>	<u>ELYGLPLDDT</u>	<u>VSRWQYRLSA</u>
651	<u>TDSGNA</u> SVTE	TVEISVQQHR	AVRTINHEIS	<u>VFVRINEKPG</u>	<u>HNIDWQLKLI</u>
701	<u>NAVARTLDDS</u>	<u>TNSAVVVREI</u>	<u>RQTPHDPHSA</u>	<u>TFVYFNETLP</u>	<u>TSECEPEKELK</u>
751	<u>DI IARLDANR</u>	<u>LSDLVQPQLG</u>	<u>IKSITGQLIG</u>	<u>SCQKDLTQVK</u>	<u>PTQHMTKNVP</u>
801	<u>PMPRNQVDRV</u>	<u>NASLGQLLVY</u>	<u>KVPADTFYDA</u>	<u>NDNQ</u> LTLLK	TRD <u>HLELSPR</u>
851	<u>HWLQFDSKNE</u>	<u>EFYGIPKSGD</u>	<u>IGSEEYLLVA</u>	<u>EDSGGLSAHD</u>	<u>ALVVVVSPAP</u>
901	<u>KRDFGFFKA</u>	<u>YLSIKHERFN</u>	<u>ADLQRKFVER</u>	<u>VAKLNGDPTT</u>	<u>GQIQIRSITT</u>
951	<u>HHSDSGTIVN</u>	<u>FYNTTLYRKH</u>	<u>NSCREKEVAM</u>	<u>TRSVYLNSDL</u>	<u>SLREAAKRAL</u>
1001	<u>GPELNLTNFS</u>	<u>VVPFSICHHT</u>	<u>ENIDTNQLDY</u>	<u>IPSRPEEPH</u>	<u>KSSFGAAARG</u>
1051	<u>HPFEGPIPNP</u>	<u>LLGLDSTRTG</u>	<u>HHHHH</u>		

Abb. 75:

Glykosylierungsprofil des extrazellulären Bereichs des Dystroglykans aus *D. melanogaster*. Glykosylierte Bereiche sind blau markiert. Unterstrichene Bereiche wurden in den MALDI-MS Spektren nur unglykosyliert identifiziert. Die kursiv markierte Muzindomäne wird von keiner Protease gespalten und konnte deshalb nicht analysiert werden.

3.2.2.4 ESI-MS/MS Analyse der permethylierten Glykane des Proteins

dDGextra

Mittels ESI-MS/MS der permethylierten Glykanaldite sollte die Struktur der Glykane genauer charakterisiert werden. Die niedrigen Massen im ESI-Spektrum zeigten dabei, dass das Protein nur mit kurzen, aus maximal drei Monosacchariden zusammengesetzten Glykanen modifiziert sein konnte. In dem Spektrum waren die Ionen m/z 512 und 534 identifizierbar, welche der *core1*-Struktur ((HexHexNAc)-ol ($M+H^+$ und $M+Na^+$)) entsprechen (Vergleiche Tabelle 9 in Abschnitt 3.1.2.4). Das Signal der relativen Masse m/z 730,5 entspricht einem Trisaccharid aus Uronsäure (HexA), Hexose und N-Acetylhexosamin (Abb. 76).

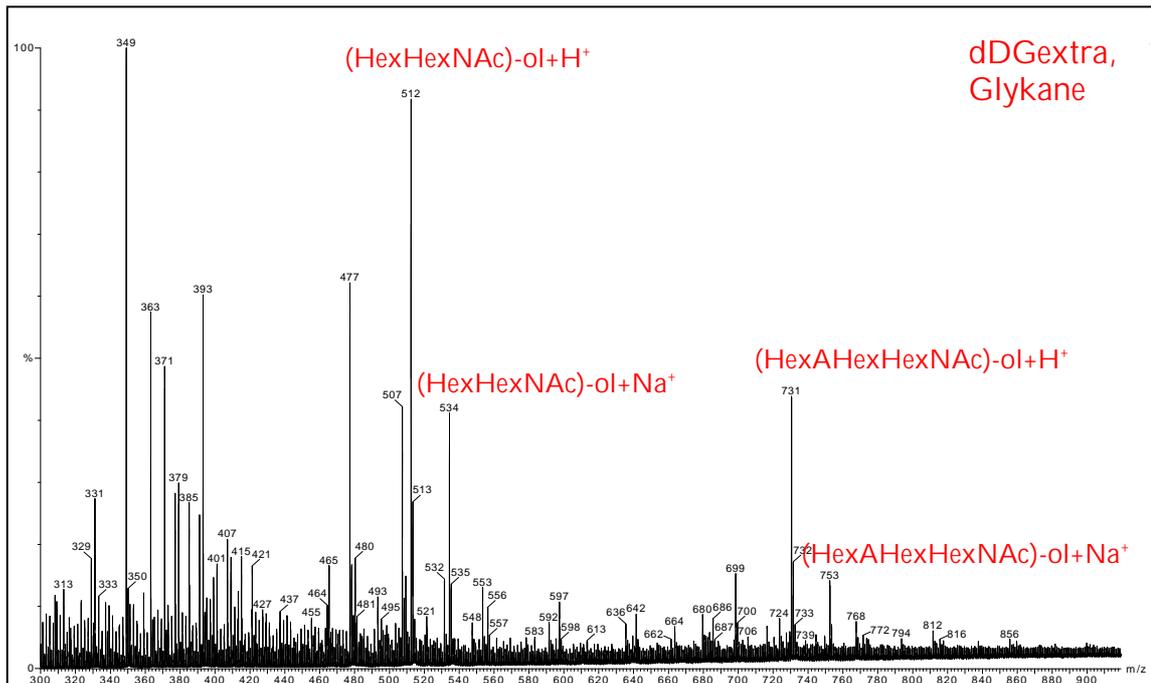


Abb. 76:

ESI-MS Spektrum des Proteins dDGextra. Es sind die Molekülonen (HexHexNAc)-ol (m/z 512 ($M+H^+$) und 534 ($M+Na^+$)) und (HexAHexHexNAc)-ol (m/z 730,5 ($M+H^+$) und 752,5 ($M+Na^+$)) identifizierbar.

Das MS/MS-Spektrum bei m/z 512 zeigte, im Gegensatz zu den Ergebnissen der Monosaccharidanalyse, N-Acetylhexosaminitol (Z_1 : m/z 276, Y_1 : m/z 294 \rightarrow 262), das mit einer Hexose verlängert wird (B_1 : m/z 219 \rightarrow 187). Das methylierte Glykanion wies demnach die Struktur HexHexNAc-ol ($M+H^+$) auf (Abb. 77).

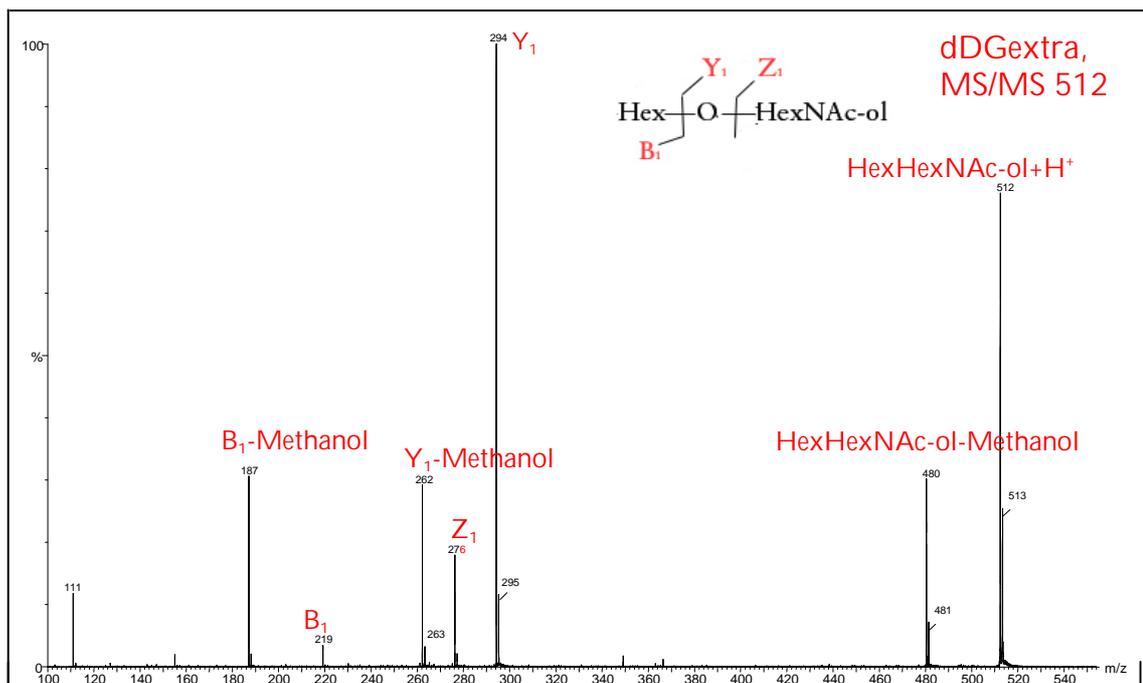


Abb. 77:

MS/MS-Spektrum bei m/z 512 sowie das Fragmentierungsschema des Molekülonen HexHexNAc-ol, dessen B-, Y- und Z-Ionen identifizierbar waren.

In dem MS/MS-Spektrum bei m/z 730,5 konnte N-Acetylhexosaminitol (Z_1 : m/z 276, Y_1 : 294 \rightarrow 262), verlängert mit einer Hexose und terminaler Uronsäure (B_1 : m/z 233 \rightarrow 201) identifiziert werden (Abb. 78).

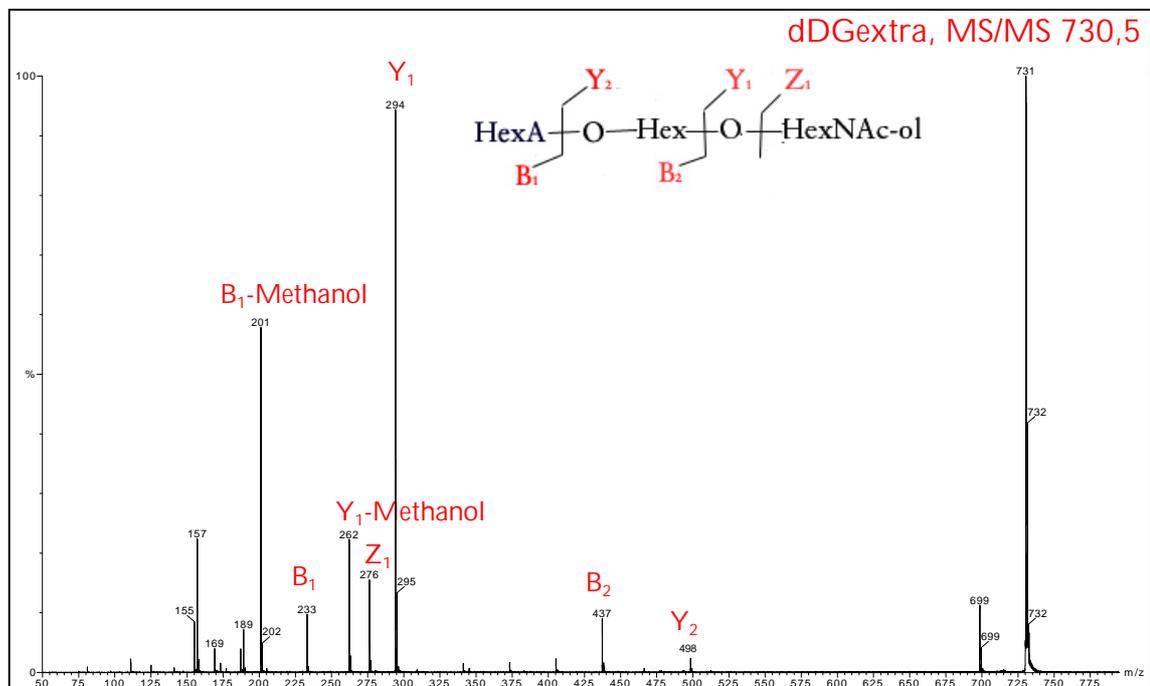


Abb. 78:

MS/MS-Spektrum des Molekülions m/z 730,5. Identifizierbar waren die B-, Y- und Z-Ionen eines Trisaccharids mit terminaler Uronsäure.

Eine Uronsäure konnte in Monosaccharidanalysen nicht identifiziert werden. Auch ein Standard aus Hyaluronsäure (GlcAGalNAc) zeigte im GC/MS-Chromatogramm nur ein schwaches Signal des N-Acetylglukosamins (nicht gezeigt).

3.2.2.5 Methylierungsanalyse des Proteins dDGextra

Um die Struktur der Glykane des Proteins dDGextra weiter aufzuklären, wurden die permethylierten Oligosaccharide hydrolysiert, acetyliert und mittels GC/MS analysiert (Details zur Methode in Abschnitt 3.1.2.5).

Wie bei der Analyse der TMS-derivatisierten Monosaccharide ist bei einem Vergleich der Signalintensitäten im TIC erkennbar, dass die Hexosen gegenüber den N-Acetylhexosaminen deutlich überwiegen. Die Uronsäure war, auch als

Standard, nicht in der Methylierungsanalyse detektierbar. Als reduzierter Zucker wurde N-Acetylhexosaminitol identifiziert (12,24 min). In der Spur der N-Acetylhexosamine konnte lediglich 4-substituiertes N-Acetylglukosamin identifiziert werden. Das dominante Signal bei 15,10 min konnte weder bezüglich der Retentionszeit noch bezüglich des Fragmentierungsmusters einem bekannten Monosaccharid zugeordnet werden. Das dominante Signal bei Minute 11,39 in der Spur der Hexosen stammte von 4-substituierter Glukose, und war somit wahrscheinlich eine Verunreinigung von der GPC (Vergleiche Monosaccharidanalyse). Weiterhin konnte Galaktose 3-substituiert identifiziert werden (Minute 11,54). Als terminale Zucker konnten Galaktose (Minute 10,5) und Mannose (Minute 10,3) identifiziert werden (Abb. 79).

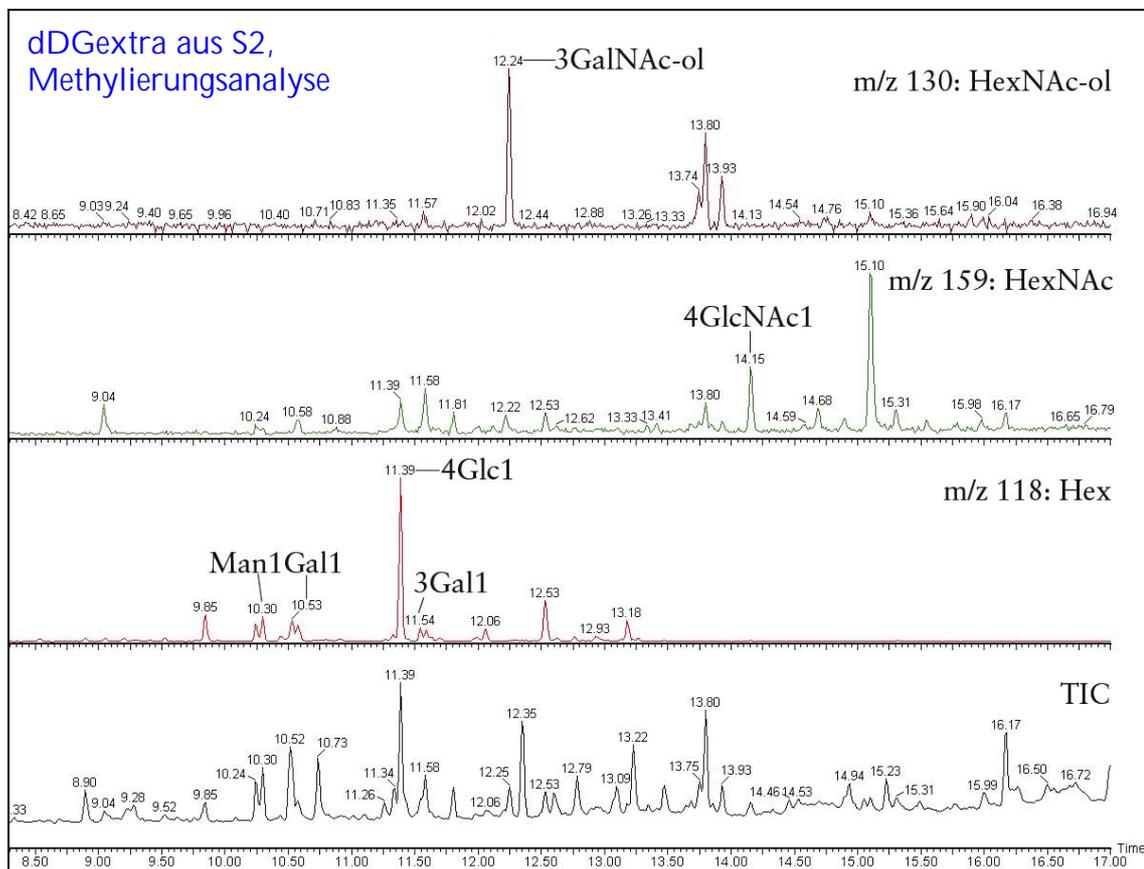


Abb. 79:

GC/MS-Chromatogramm der partiell methylierten Alditacetate des Proteins dDGextra. Es konnten 3-substituiertes N-Acetylgalaktosaminitol, 4-substituiertes N-Acetylglukosamin, 3-substituierte Galaktose, 4-substituierte Glukose sowie terminale Galaktose und Mannose identifiziert werden.

4. DISKUSSION

4.1 Die Aminosäuresequenzabhängigkeit der Protein-O-Mannosylierung in Säugetieren

Die Protein-O-Mannosylierung ist in Säugetieren eine sehr selten vorkommende und wenig untersuchte Proteinmodifikation. Die humanen Protein-O-Mannosyltransferasen POMT1 und POMT2 sind im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und katalysieren die Reaktion Dolicholphosphat-Man \rightarrow Man-O-Ser/Thr (Manya, 2004; Ichimiya, 2004). POMT1 und POMT2 bilden einen funktionalen Heterokomplex (Akasaka-Manya, 2006), dessen Aktivität in EBNA-293-Zellen *in vitro* gezeigt werden konnte (Manya, 2004). Als Glykosylierungs-sonde wurde bei dieser Reaktion bakteriell exprimiertes humanes α -Dystroglykan eingesetzt. Durch welche Elemente des Apoproteins die Transferasen aktiviert werden ist jedoch noch nicht bekannt.

Die Tatsache, dass α -Dystroglykan das einzige strukturell charakterisierte O-mannosylierte Protein in Säugetieren ist, erschwert eine Analyse der Aminosäuresequenz- oder Strukturabhängigkeit der Protein-O-Mannosylierung. Die Identifikation essentieller Strukturelemente durch Sequenzvergleiche ist in diesem Fall nicht möglich.

In dieser Dissertation wurde die Strukturabhängigkeit der Protein-O-Mannosylierung auf Basis der Primärstruktur deshalb mit Hilfe von rekombinant exprimierten Glykosylierungs sonden analysiert. Die Sonden basierten auf verschiedenen Abschnitten des humanen α -Dystroglykans, wobei die Abschnitte so gewählt wurden, dass sie verschiedene Teile der Muzindomäne sowie deren flankierende Aminosäureabschnitte enthielten. Die größte Sonde (hDG1) enthielt die vollständige Muzindomäne, die anderen sieben Sonden umfassten unterschiedliche Teilstücke dieser Sonde (Abb. 80).

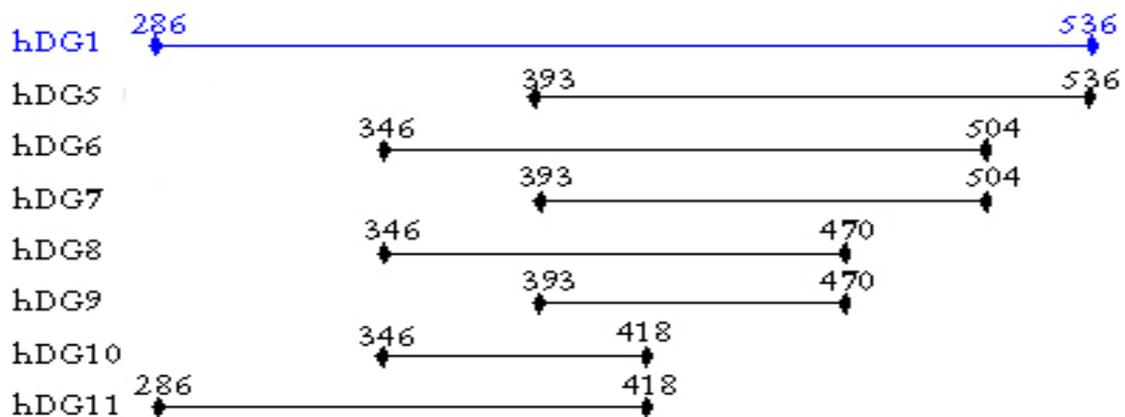


Abb. 80:

Aminosäureabschnitte aller rekombinant exprimierten Glykosylierungssonden der Muzindomäne des humanen α -Dystroglykans. Die größte exprimierte Sonde, hDG1, welche die gesamte Muzindomäne und weitere ca. 100 N-terminal gelegene AS abdeckt, ist blau dargestellt.

Die berechnete Aminosäurekomposition der Sonde hDG1 ist in Tabelle 12 zusammengestellt. Die starke Anhäufung von Prolin, Serin und Threonin ist typisch für eine Muzindomäne. Ungewöhnlich dagegen ist das häufige Vorkommen der basischen Aminosäuren Arginin und Lysin, wodurch der isoelektrische Punkt aller Sonden bei ca. pH 11 liegt.

Tabelle 12:

Prozentuale Aminosäurezusammensetzung der Glykosylierungssonde hDG1. Alle ungewöhnlich häufig vorkommenden Aminosäuren sind mit blauer Schrift hervorgehoben (Angaben in %).

A: 6.4	C: 0.0	D: 2.9	E: 3.6	F: 1.1
G: 5.0	H: 4.6	I: 5.7	K: 5.4	L: 2.9
M: 1.1	N: 1.1	P: 16.8	Q: 2.9	R: 8.2
S: 5.4	T: 17.1	V: 7.5	W: 1.1	Y: 1.4

Alle Glykosylierungssonden wurden mit den Tags StrepII und His₈ markiert und als sekretorische Proteine rekombinant in EBNA-293-Zellen exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie und Umkehrphasen-HPLC. Die Proteine hDG1 und hDG11, welche bei der Aminosäure 286 begannen, wiesen nach der Affinitätschromatographie eine deutlich geringere Konzentration als alle anderen rekombinanten Proteine auf. Ob dies durch eine geringere Expression oder durch eine schlechtere Exposition des His₈-Tags begründet war, wurde nicht untersucht.

4.1.1 Die Protein-O-Mannosylierung ist N-terminal kontrolliert

Nach der vollständigen Aufreinigung wurde das individuelle Glykosylierungsprofil aller Sonden erstellt. Als erstes wurde die Monosaccharidkomposition der TMS-derivatisierten Monosaccharide mittels GC/MS durchgeführt. Sonden, deren N-Termini mit der Aminosäure 392 starteten (hDG5, hDG7 und hDG9), waren mit Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglukosamin modifiziert. Im Monosaccharidpool aller anderen Glykosylierungs sonden konnte zusätzlich Mannose identifiziert werden.

Der *core*-Zucker wurde durch eine Freisetzung der Glykane mittels β -Eliminierung ermittelt. Die Glykane der Sonden hDG5, hDG7 und hDG9 wiesen N-Acetylgalaktosamin am reduzierenden Ende auf, waren also ausschließlich vom Muzintyp. Die Sonden hDG1, hDG6, hDG8, hDG10 und hDG11 waren dagegen zusätzlich mit Glykanen modifiziert welche Mannose am reduzierenden Ende trugen (Abb. 81).

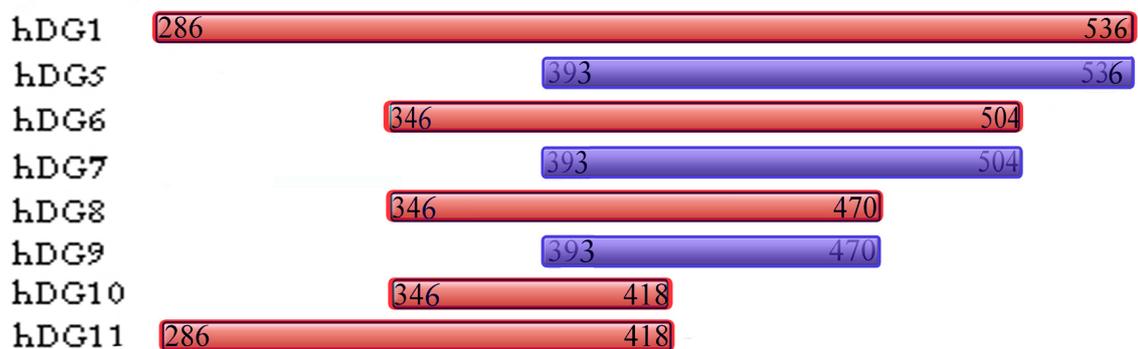


Abb. 81:

Zusammenfassung der Ergebnisse der GC/MS-Analysen der Glykosylierungs sonden hDG1 und hDG5 – 11. Rote Balken symbolisieren Sonden, welche mit O-Mannosyl-Glykanen sowie Glykanen des Muzintyps modifiziert waren. Blaue Balken symbolisieren Sonden, welche nur mit Glykanen des Muzintyps glykosyliert waren.

Sonden, welche bei der Aminosäuresequenz 286 oder 346 begannen, waren sowohl mit O-Mannosyl-Glykanen als auch mit Glykanen des Muzintyps modifiziert. Sonden, welche bei der Aminosäure 393 begannen, waren dagegen nur mit Glykanen des Muzintyps modifiziert. Dies deutet auf N-terminale Kontrolle der O-Mannosylierung durch eine regulatorische Sequenz hin, welche den POMT1/POMT2 Komplex aktiviert und zu einer O-Mannosylierung des gesamten Apoproteins führt.

Eine wichtige Rolle des N-Terminus postulierten Kanagawa *et. al.* bereits 2004. In dieser Arbeit wurde die Bindung von verschiedenen Abschnitten des α -Dystroglykans an Laminin untersucht, welcher über die O-Mannosyl-Glykane erfolgt. Anhand von Deletionskonstrukten und rekombinant exprimierten Proteinen wurde eine essentielle Rolle der Aminosäuren 29 – 408 und somit des gesamten N-Terminus sowie der N-terminalen Hälfte der Muzindomäne gezeigt (Abb. 82).

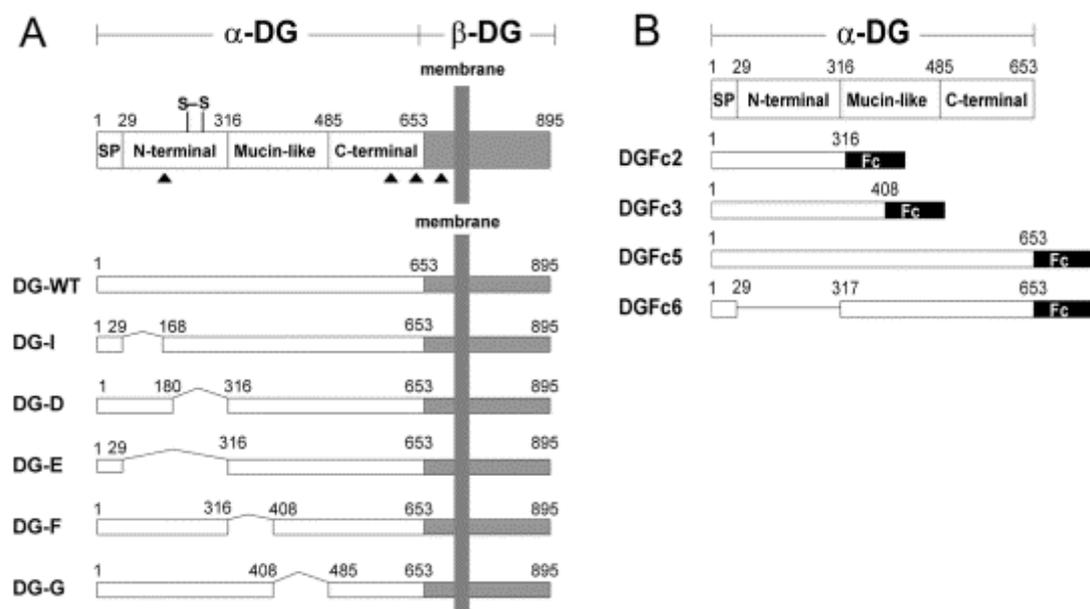


Abb. 82:

Von Kanagawa *et. al.* generierte Deletionskonstrukte (A) und rekombinante Proteine (B) des α -Dystroglykans. (SP: Signalpeptid zur Sekretion, Mucin-like: Muzindomäne, S-S: Disulfidbrücke, ▲: potentielle N-Glykosylierungsstelle)

Nur DG-WT- und DG-G-exprimierende Zellen und nur die rekombinanten Proteine DGFc3 und DGFc5 waren in der Lage, Laminin zu binden und von einem Glykanepitop-spezifischen Antikörper detektiert zu werden.

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die O-Mannosylierung des α -Dystroglykans bereits durch kleinere Abschnitte initiiert wird. Die Deletionskonstrukte DG-I, DG-D und DG-E sowie das rekombinante Protein DGFc6 sollten mit O-Mannosyl-Glykanen modifiziert werden. Im Zusammenhang implizieren diese Ergebnisse, dass zur Bindung von Laminin, abgesehen von der O-Mannosylierung, noch weitere Faktoren notwendig sind.

4.1.2 Die identifizierten Glykanstrukturen entsprechen den endogenen Strukturen

Die Glykosylierung des α -Dystroglykans ist weitgehend gewebeabhängig. Die Hauptkomponente in allen diesbezüglich untersuchten Geweben sind O-Mannosyl-Glykane der Struktur Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man (Chiba, 1997; Sasaki, 1998). Zusätzlich wurden in Hirn- und Nervengewebe in geringeren Anteilen auch O-Mannosyl-Glykane mit der Lewis-X-Struktur (Smalheiser, 1998) und dem HNK1-Epitop (Smalheiser, 1995; Yamada, 1996; Ervasti, 1997) identifiziert. Weiterhin wird α -Dystroglykan mit Glykanen des Muzintyps der *core1*-Struktur und mit wenigen N-Glykanen modifiziert (Sasaki, 1998; Endo, 1999).

Die genaue Struktur der O-Mannosyl-Glykane und auch der Glykane des Muzintyps wurde nach Permethylierung für die Sonden hDG1, hDG5, hDG6, hDG10 und hDG11 mittels ESI-MS/MS identifiziert. Anhand der Sonde hDG5 wurde gezeigt, dass die Glykane des Muzintyps der Glykosylierungs sondensialylierte *core1*- und *core2*-Strukturen aufwiesen. Dies entspricht dem zelltypischen Glykosylierungsprofil sekretierter Proteine aus EBNA-293-Zellen (Engelmann, 2005; Wuttke, 2001). An den Beispielen der Sonden hDG6 und hDG10 konnten neben den oben genannten Glykanen des Muzintyps auch die auf endogenem α -Dystroglykan vorkommenden O-Mannosyl-Glykane Sia-Gal-GlcNAc-Man-ol und Gal-GlcNAc-Man-ol identifiziert werden. Die Sonden hDG1 und hDG11 wiesen in der Monosaccharidanalyse die gleiche Monosaccharidkomposition auf wie hDG6, trotzdem sah man keine Signale der O-Mannosyl-Glykane im ESI-Übersichtsspektrum. MS/MS-Spektren bei den entsprechenden Massen zeigten jedoch schwache Fragmentierungsmuster dieser Glykane. Eine weitere Besonderheit zeigte die Sonde hDG11 bezüglich der Glykane des Muzintyps. Ungewöhnlicherweise wurden hier lediglich *core1* Glykane identifiziert. In früheren Publikationen (Sasaki, 1998) konnte zwar gezeigt werden, dass die Glykane des Muzintyps auf endogenem α -Dystroglykan aus Muskelgewebe ausschließlich die *core1*-Struktur aufweisen, normalerweise wird jedoch angenommen, dass die Ausbildung der *core2*-Struktur bei sekretierten Proteinen vom Zelltyp abhängig ist. Wieso diese Veränderung des

Glykosylierungsprofils nur bei der Sonde hDG11 auftritt, obwohl diese in dem gleichen Vektor und unter den gleichen Bedingungen exprimiert wurde, muss in weiteren Studien untersucht werden.

Die Substitutionsmuster der Monosaccharide wurden durch eine Methylierungsanalyse ermittelt. Für die Methylierungsanalysen der Sonden hDG1, hDG5, hDG6 und hDG10 wurden permethylierte Glykane der in die partiell methylierten Alditacetate überführt. Durch die Elongation der *core*-Mannose mit 3-Galaktose und 4-N-Acetylglukosamin, beides Strukturen, welche auch in Glykanen des Muzintyps vorkommen, war das einzige Erkennungsmerkmal der O-Mannosyl-Glykane das Signal des 2-substituierten Mannitols. Dieses wurde in den Chromatogrammen der Glykane der Sonden hDG6 und hDG10 beobachtet. Es wurden nur bereits bekannte Glykanstrukturen identifiziert (Abb. 83).

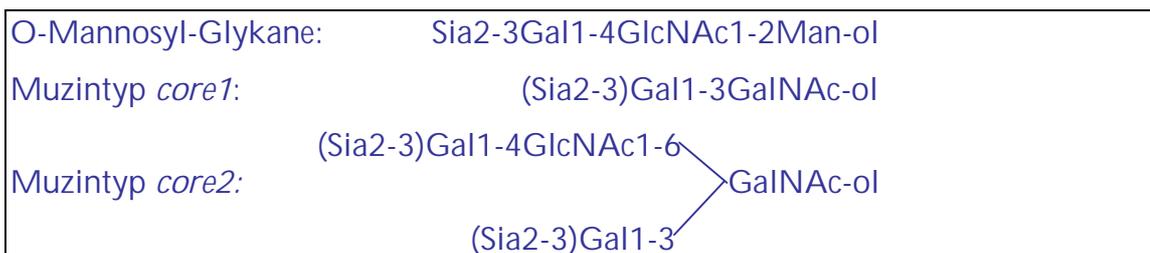


Abb. 83:

Zusammenstellung aller auf den Glykosylierungs sonden identifizierten Glykanstrukturen.

Die Sonde hDG1 zeigte hier wiederum eine Besonderheit durch die Detektion von terminaler Mannose anstatt 2-substituiertem Mannitol. Möglicherweise wurde die *core*-Mannose der Sonden hDG1 und hDG11 nicht verlängert, sodass diese nicht in der ESI-MS-Analyse detektiert werden konnte. Wieso *core*-Mannose nicht elongiert wurde und in der Methylierungsanalyse nicht reduziert vorlag, konnte noch nicht geklärt werden.

Es wurde in keiner der Analysen eine exakte Quantifizierung der Glykane vorgenommen. Auffällig war jedoch, dass der Anteil an O-Mannosyl-Glykanen in den ESI-Spektren und der Methylierungsanalyse deutlich geringer zu sein schien, als in den Monosaccharidanalysen. Sowohl die ESI-MS-Analyse als auch die Methylierungsanalyse beruht auf einer Permethylierung der Glykane. Möglicherweise muss diese Methode zur Analyse von Glykanen, welche auf Mannose als *core* Zucker aufgebaut sind, optimiert werden.

4.1.3 Die Ortsspezifität der O-Mannosylierung

Genauere Aussagen über die Ortsspezifität der O-Mannosylierung auf α -Dystroglykan wurden bisher nicht gemacht, obwohl bekannt ist, dass hauptsächlich die Muzindomäne, der gestreckte mittlere Abschnitt des Proteins, mit O-Glykanen modifiziert ist (Winder, 2001). Anhand der Glykosylierungssonde hDG6 konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Partialsequenz VSEAGTTVPGQIRPTM TIPGYVEPTAVATPPTTTTCKPR O-Mannosyl-Glykane trägt. Von den 13 O-Glykosylierungsstellen dieses tryptischen Peptids könnten aufgrund massenspektrometrischer Kompositionsdaten drei bis sieben mit Mannoseresten modifiziert sein. Das identifizierte Peptid ist in allen exprimierten Glykosylierungs sonden enthalten, auch in den Sonden, welche *in vivo* nicht O-mannosyliert wurden (Abb. 84). Sonden, welche O-mannosyliert wurden, besitzen lediglich einen weiter N-terminal gelegenen Terminus. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Protein-O-Mannosylierung nicht Sequon-abhängig ist, sondern von einer N-terminalen, regulatorischen Sequenz kontrolliert wird, welche sich in dem Bereich der Aminosäuren 346 – 393 befindet.

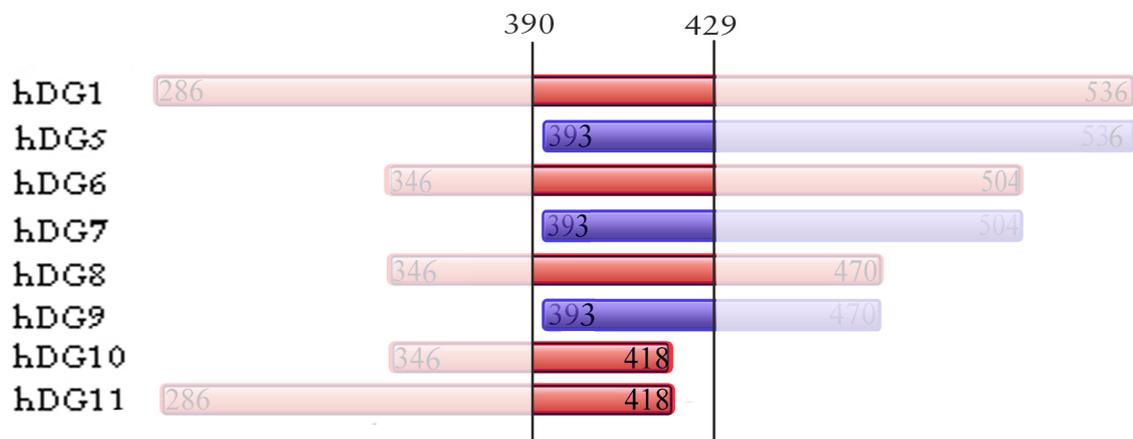


Abb. 84:

Lokalisation der O-Mannosylierung auf α -Dystroglykan. Das O-mannosylierte Peptid entspricht den Aminosäuren 390 – 429.

4.1.4 Chimäre Fusionsproteine aus α -Dystroglykan und MUC1

werden nicht O-mannosyliert

Anhand der Glykosylierungsprofile der Sonden hDG1 und hDG5 – hDG11 wurde eine N-terminale Kontrolle der Protein-O-Mannosyltransferasenaktivität vermutet. Demnach sollte N-terminal von der Muzindomäne des α -Dystroglykans eine regulatorische Sequenz lokalisiert sein, welche zu einer Aktivierung der Protein-O-Mannosyltransferasen und somit zu einer O-Mannosylierung der Muzindomäne führt. Bei einer ausschließlichen Kontrolle der O-Mannosylierung durch diese regulatorische Sequenz wäre neben deren Anwesenheit das Vorhandensein exponierter Serin- oder Threoninseitenketten ausreichend für eine O-Mannosylierung eines Proteins. Die Fusion einer regulatorischen Sequenz mit einem normalerweise Muzintyp-glykosylierten Protein (MUC1-S) zu einem chimären Fusionsprotein sollte zu einer paradoxen O-Mannosylierung der MUC1-*Repeat*sequenz führen.

Diese Theorie sollte mit Hilfe der Muzindomäne des rekombinanten Proteins MUC1-S überprüft werden. MUC1-S ist ähnlich dem extrazellulären Abschnitt des humanen Muzin1 aufgebaut. Die Muzindomäne besteht aus sechs *Tandemrepeats* (VNTR), welche normalerweise mehrfach mit Glykanen des Muzintyps glykosyliert werden. Aufgrund der Glykosylierungsprofile der Sonden wurden die Aminosäureabschnitte 286 - 346 und 286 - 393 des humanen α -Dystroglykans vor den N-Terminus der VNTR-Domäne des MUC1-S kloniert (Abb. 85).

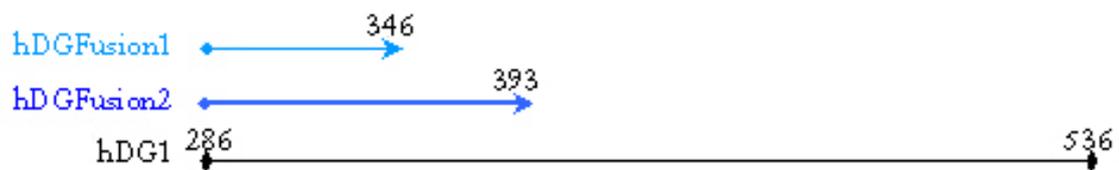


Abb. 85:

Für die Fusionsproteine ausgewählte Abschnitte des humanen α -Dystroglykans im Vergleich mit der Glykosylierungssonde hDG1.

Bereits in der Monosaccharidanalyse mittels GC/MS wurde jedoch keine Mannose, sondern nur Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglukosamin identifiziert. Die ESI-Spektren bestätigten eine Glykosylierung vom Muzintyp mit *core1*- und *core2*-Strukturen. Mittels MALDI-TOF-MS konnte gezeigt werden, dass die Fusionsproteine sehr stark glykosyliert waren. Jeder *Tandemrepeat* war mit vier oder fünf Glykanen modifiziert. Eine genauere Aussage zur Lokalisation dieser Glykane war jedoch aufgrund der hohen Komplexität der Spektren nicht möglich.

Beide verwendeten Aminosäureabschnitte des α -Dystroglykans tragen somit keine ausreichenden Informationen zur Aktivierung des POMT1/POMT2 Komplexes. Möglicherweise endet die regulatorische Sequenz nicht bei Aminosäure 392, sondern geht darüber hinaus. Diese Erklärung wird durch die Ergebnisse von Kanagawa *et. al.* unterstützt, welche eine Laminin-Bindung und somit eine O-Mannosylierung einer rekombinanten Proteins, basierend auf α -Dystroglykan, zeigen, das bei der Aminosäure 408 endet (Abb. 82).

Eine weitere Erklärung für diese Ergebnisse wäre die Bedeutung von bisher unidentifizierten Strukturelementen für POMT1/POMT2, welche durch die VNTR-Domäne des MUC1 nicht gegeben sind. Der stark basische isoelektrische Punkt der Muzindomäne könnte hier eine entscheidende Rolle spielen.

4.1.5 Für die Protein-O-Mannosylierung existiert keine stringente Konsensussequenz

Auf Basis der Glykosylierungssonde hDG8 wurden Peptide synthetisiert, welche für *in vitro* Glykosylierungsstudien verwendet wurden. Die Sonde hDG8 wurde bei rekombinanter Expression sowohl mit Glykanen des Muzintyps als auch mit O-Mannosyl-Glykanen modifiziert. Die 15-meren Peptide wurden überlappend synthetisiert, so dass keine Peptidregionen durch Randeffekte betroffen sein konnten. Sowohl die Aktivität des O-Mannosyltransferasenkomplexes als auch die der ubiquitären Polypeptid-N-Acetylgalaktosaminyltransferasen (pGalNAc-T) 1 und 2 auf diesen Peptiden wurde untersucht.

MALDI-MS Analysen der Peptide zeigten keine Inkorporation von Mannose nach Inkubation mit dem Protein-O-Mannosyltransferase-Komplex. Keines der synthetischen Peptide trug somit eine spezifische Konsensussequenz für den Protein-O-Mannosyltransferasenkomplex. Dies ergänzt frühere Versuche zur O-Mannosylierung synthetischer Peptide (Manya, 2004). Durch Verlängerung der synthetischen Peptide, sowie strategisches Austesten aller möglichen Aminosäurekombinationen, kann jetzt mit Sicherheit behauptet werden, dass für die Protein-O-Mannosylierung keine stringente Konsensussequenz existiert.

Eine Bestätigung für das Fehlen einer solchen Sequenz ist die Aktivität der pGalNAc-Transferasen auf den putativen O-Mannosylierungsstellen der Peptide. Mit Ausnahme des C-terminalen Peptids war bei allen Peptiden eine Inkorporation von N-Acetylgalaktosamin zu beobachten. Unmodifizierte O-Mannosylierungsstellen können demnach im Golgi-Apparat von den pGalNAc-Transferasen 1 und 2 glykosyliert werden. Dies bestätigt frühere Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass α -Dystroglykan in dystrophischen Hühnern mit deutlich mehr Glykanen des Muzintyps glykosyliert ist als in gesunden Hühnern (Saito, 2005).

4.2 Das Glykosylierungsprofil des Proteins Dystroglykan aus *D. melanogaster*

Dystroglykan aus *D. melanogaster* (dDG) weist nur geringe Aminosäuresequenz Homologien zu dem entsprechenden Protein aus Säugern auf. Deutlich zeigt sich dies insbesondere in der Tatsache, dass das Protein nicht posttranslational gespalten wird, sondern im maturen Stadium als Transmembranprotein vorliegt (Deng, 2003). Eine auffällige Übereinstimmung zu α -Dystroglykan aus Säugern ist die Muzindomäne im mittleren Abschnitt des extrazellulären Bereichs. Die typische Anhäufung von Serin und Threonin ist in *Drosophila*-Dystroglykan weitaus stärker ausgeprägt, die in humanem α -Dystroglykan beobachtete ungewöhnliche Anhäufung basischer Aminosäuren ist dagegen nicht zu beobachten.

Über eine Glykosylierung des *Drosophila*-Dystroglykans ist bis heute nichts bekannt. Zwei bisher gemachte Beobachtungen sprechen für eine O-Mannosylierung des Dystroglykans, analog zu seinem Ortholog aus Säugern. Zunächst ist die Funktion des Proteins als Signaltransduktor konserviert (Deng, 2003). Diese Funktion wird bei α -Dystroglykan aus Säugern hauptsächlich über eine Bindung der Proteine der extrazellulären Matrix an die O-Mannosyl-Glykane ausgeübt (Ichimya, 2004; Jurado, 1999; Lyalin, 2006).

Weiterhin ist bekannt, dass in *D. melanogaster* zwei Protein-O-Mannosyltransferasen (dPOMT1/dPOMT2) exprimiert werden. *In vitro* konnte die Aktivität dieser Transferasen bereits gezeigt werden, wobei humanes α -Dystroglykan als Glykosylierungssonde eingesetzt wurde (Ichimya, 2004). Mutationen in dPOMT1 oder dPOMT2 führen zu Muskeldystrophie-ähnlichen Symptomen (Jurado, 1999; Willer, 2002). Dies impliziert, dass Defekte in der O-Mannosylierung unidentifizierter Proteine in *D. melanogaster* ähnliche Auswirkungen haben wie Defekte in der O-Mannosylierung von α -Dystroglykan in Menschen.

4.2.1 Die Muzindomäne des Dystroglykans enthält keine Information zur O-Mannosylierung

Initial sollte die Muzindomäne des Dystroglykan rekombinant exprimiert werden, um zu untersuchen, ob dieser Proteinabschnitt Informationen zur Protein-O-Mannosylierung enthält. Das Protein konnte aus ungeklärten Ursachen nicht in Insektenzellen exprimiert werden. Schneider 2-Zellen verloren den Expressionsvektor kurz nach der Transfektion und *High five*-Zellen exprimierten ein Protein, welches bereits im Zellkulturüberstand degradiert war. Im Gegensatz dazu konnte das Protein problemlos in den eukaryontischen Zelllinien EBNA-293 und C₂F₃ exprimiert werden.

Es wurde bereits gezeigt, dass humanes α -Dystroglykan durch die Protein-O-Mannosyltransferasen aus *D. melanogaster* O-mannosyliert wird (Ichimiya, 2004). Dies deutet auf eine Konservierung der Information zur Aktivierung der O-Mannosyltransferasen von Insekten zu Säugetieren. Wenn die Muzindomäne des Dystroglykans aus *D. melanogaster* die entsprechende Information enthalten würde, sollte sie demzufolge auch bei Expression in eukaryontischen Zellen O-mannosyliert werden. Das Glykanprofil des gereinigten Proteins zeigte jedoch eindeutig eine Glykosylierung vom Muzintyp. In der Monosaccharidanalyse mittels GC/MS konnten Galaktose, N-Acetylgalaktosamin, N-Acetylglukosamin und Sialinsäure identifiziert werden. Das HPLC-Chromatogramm der fluoreszenz-markierten Glykane bestätigte eine Glykosylierung mit Glykanen des Muzintyps. Das vorliegende Glykosylierungsprofil sialylierter *core1*- und *core2*-Strukturen ist typisch für sekretorische Proteine aus EBNA-293-Zellen und zeigt, dass die reine Muzindomäne keine ausreichende Information zur Mannosylierung trägt.

4.2.2 *Drosophila*-Dystroglykan ist ausschließlich O-glykosyliert

Aufgrund der Modifikation der isolierten Muzindomäne mit Glykanen des Muzintyps sollte analysiert werden, ob die vollständige extrazelluläre Domäne des Dystroglykans O-mannosyliert ist. Dies würde anzeigen, ob außerhalb der Muzindomäne gelegene Sequenzabschnitte essentiell für die Initiation der O-Mannosylierung sind. Der transmembranäre und der kurze intrazelluläre Abschnitt wurden nicht exprimiert, wodurch die Sekretion des Transmembranproteins vom Typ I mit Hilfe seines endogenen Sekretionssignals ermöglicht wurde. Im Gegensatz zu der isolierten Muzindomäne bereitete die Expression des extrazellulären Abschnitts (dDGextra) in Schneider 2-Zellen keine Probleme. Die Aufreinigung dagegen war nicht mittels Umkehrphasen-HPLC durchführbar. Das theoretisch 120 kDa große Protein dDGextra konnte nicht im Eluat der C8-Säule identifiziert werden. Entweder war es in dem verwendeten organischen Lösungsmittel bei niedrigem pH-Wert nicht stabil, oder es band zu stark an die Säulenmatrix. Die serumfreie Expression in Schneider-2 Zellen ermöglichte hier eine vollständige Aufreinigung mittels Gelpermeationschromatographie, da die Proteinlösung bereits nach der Affinitätschromatographie nur noch wenige Verunreinigungen enthielt.

Der extrazelluläre Abschnitt des Dystroglykans scheint außerhalb der Muzindomäne nur schwach glykosyliert zu sein. Bereits die Proteinbanden der SDS-PAGE zeigten keine starke Heterogenität und die glykanspezifische Färbung eines Immunoblots wurde erst nach langer Inkubation beobachtet. Bestätigend konnten in den MALDI-TOF Spektren des proteolytisch verdauten Proteins viele unglykosylierte Peptide identifiziert werden.

Das Protein enthielt fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen, die Behandlung mit PNGaseF setzte jedoch keine N-glykosidisch gebundenen Glykane frei. Dagegen war die Monosaccharidkomposition der β -eliminierten O-Glykane identisch mit der Komposition unspezifisch, mittels Methanolyse freigesetzter Glykane. In der Monosaccharidanalyse durch GC/MS wurden Mannose, Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglukosamin identifiziert, wobei die Signale der Hexosen deutlich stärker waren.

4.2.3 Identifikation des *core*-Zuckers der Glykane der extrazellulären Domäne des *Drosophila*-Dystroglykans

In den GC/MS-Analysen der reaktiv freigesetzten Monosaccharide konnte ausschließlich Mannose als *core*-Zucker identifiziert werden. Nicht-reduziert wurden zusätzlich Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglukosamin identifiziert. Nicht-reduzierte Mannose in den Chromatogrammen deutete auf Mannose, welche nicht als *core*-Zucker vorlag oder auf *core*-Mannose welche anstatt bei der β -Eliminierung erst bei der darauf folgenden nicht-reduzierenden Methanolyse freigesetzt wurde.

Sowohl bei der ESI-MS-Analyse der permethylierten Glykane als auch bei der Methylierungsanalyse wurde jedoch N-Acetylgalaktosamin als *core*-Zucker identifiziert. Die beiden letztgenannten Analysen beruhen auf einer Permethylierung der reaktiv abgespaltenen Glykane, eine Methode von der bereits in Abschnitt 4.1 vermutet wurde, dass sie nicht vollständig kompatibel mit Mannose am reduzierenden Ende ist. Eine weitere Erklärung wurde bereits von Ichimiya *et. al.* 2004 vermutet. Das Gen für POMGnT1, welches die Elongation der *core*-Mannose in Säugetieren katalysiert, ist in *D. melanogaster* nicht konserviert. Andere Glykosyltransferasen, welche einen Zucker an *core*-Mannose addieren könnten, wurden ebenfalls noch nicht identifiziert. Möglicherweise ist Dystroglykan nur mit einer einzelnen Mannose modifiziert, welche in den ESI-MS-Analysen nicht detektiert werden konnte. Die fehlende Nicht-Detektion von N-Acetylgalaktosaminitol lässt sich dagegen auf die Bedingungen der Methanolyse zurückführen, die für Hexosen optimiert wurde, Hexosamine aber nur unvollständig freisetzt.

4.2.4 *Drosophila*-Dystroglykan ist mit acidischen O-Glykanen einer bisher unbekanntem Struktur modifiziert

Bisher wurden in *D. melanogaster* nur O-Glykane der Tn (GalNAc) und der T bzw. *core1*- (Gal β 1-3GalNAc) Struktur identifiziert (Seppo, 2000). Die Modifikation von Dystroglykan mit *core1*-Strukturen konnte mittels ESI-MS gezeigt werden. Die Signale von terminaler Galaktose sowie 3-substituiertem N-Acetylgalaktosaminitol in der Methylierungsanalyse bestätigten dieses erwartete Ergebnis.

Entgegen der Literaturdaten konnte in der ESI-MS-Analyse darüberhinaus ein Trisaccharid der Struktur HexAHexHexNAC-ol identifiziert werden, dessen Sequenz eindeutig durch Fragmentationen belegt ist. Die Methylierungsanalyse zeigte hier, dass die Hexose einer 3-substituierten Galaktose und das N-Acetylhexosaminitol einem 3-substituierten N-Acetylgalaktosaminitol entsprach. Die Glukuronsäure eines Hyaluronsäure-Standards konnte weder in der Monosaccharid- noch in der Methylierungsanalyse mittels GC/MS identifiziert werden.

Die GC/MS-Chromatogramme der Methylierungsanalysen zeigten, abgesehen von den oben genannten Monosacchariden, 4-substituiertes N-Acetylglucosamin, terminale Mannose und 4-substituierte Glukose. Das dominante Signal der Glukose war wahrscheinlich eine Verunreinigung durch das Säulenmaterial der GPC, die beiden anderen Monosaccharide konnten keiner Glykanstruktur eindeutig zugeordnet werden. Terminale Mannose anstatt des erwarteten Mannitols wurde bereits in der Methylierungsanalyse der Glykosylierungssonde hDG1 beobachtet. Dies deutet möglicherweise auf eine nicht-elongierte *core*-Mannose, welche nach den angewendeten Derivatisierungsmethoden aus ungeklärten Ursachen nicht reduziert vorlag.

Die sicher identifizierten Glykanstrukturen auf Dystroglykan aus *D. melanogaster* sind in Abbildung 86 zusammengefasst.

<p>HexA1-3Gal1-3GalNAc-ol Gal1-3GalNAc-ol</p>

Abb. 86:
Identifizierte Glykanstrukturen auf *Drosophila*-Dystroglykan.

Wahrscheinlich ist das Protein zusätzlich mit nicht-elongierter Mannose modifiziert, der endgültige Beweis für diese Struktur steht jedoch noch aus.

Eine Glykosyltransferase, welche die Addition einer Uronsäure an eine *core1*-Struktur in *D. melanogaster* katalysiert ist nicht bekannt. Gezeigt wurde jedoch bereits, dass Galaktose in Glykolipiden mit einer Uronsäure modifiziert werden kann. Die häufig vorkommenden, an Ceramid gebundenen, acidischen Lipide Az₆, Az₉ und Az₂₉ besitzen alle ein nichtreduzierendes Ende der Struktur GlcAβ1-3Galβ1-3GalNAcα1 (Seppo, 2000). Diese Struktur stimmt mit der in dieser Arbeit gefundenen überein, der Beweis der Anomerie sowie die Identifikation der Uronsäure als Glukuronsäure stehen noch aus. Weiterhin werden Glykosaminoglykane nahezu aller bekannten eukaryontischen Organismen mit Glukuronsäure modifiziert. In *D. melanogaster* steht die endgültige Strukturidentifikation dieser Glykane noch aus, ein Ausfall der UDP-Glukose-Dehydrogenase ist jedoch letal (Haerry, 1997).

Das acidische Trisaccharid ähnelt strukturell dem HNK1-Epitop (HSO₃-3GlcAβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ1), welches immunologisch in *Drosophila*-Larven (Dennis, 1991) sowie auf den O-Mannosyl-Glykanen der Säugetiere nachgewiesen wurde (Yuen, 1997). In beiden Fällen ist das Apoprotein welches diese Modifikation trägt bisher unbekannt.

O-Glykane der *core1*-Struktur sind auf Proteinen aus *D. melanogaster* hinreichend als Hauptkomponente bekannt. Obwohl das O-Glykom von *D. melanogaster*-Embryonen kürzlich erst analysiert wurde (North, 2006), wurde nicht-elongierte O-gebundene Mannose hier bisher nur vermutet (Ichimiya, 2004), und eine Modifikation mit einem acidischen Trisaccharid wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt. Dies lässt auf substöchiometrisch vorkommende Glykanstrukturen schließen, welche möglicherweise spezifisch nur Dystroglykan modifizieren und eine sehr spezialisierte Funktion besitzen.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Akasaka-Manyá, K.; Manyá, H.; Nakajima, A.; Kawakita, M.; Endo, T. (2006)
Physical and functional association of human protein O-Mannosyltransferases 1 and 2
J. Biol. Chem. **281**: 19339-19345
- 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
- Baldus, S.E.; Engelmann, K.; 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
- Beltran-Valero de Bernabe, D.; Currier, S.; Steinbrecher, A.; Celli, J.; van Beusekom, E.; van der Zwaag, B.; Kayserili, H.; Merlini, L.; Chitayat, D.; Dobyns, W.B.; Cormand, B.; Lehesjoki, A.E.; Cruces, J.; Voit, T.; Walsh, C.A.; van Bokhoven, H.; Brunner, H.G. (2002)
Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome
Am. J. Hum. Genet. **71**: 1033-1043
- 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
- Bigge, J.C.; Patel, T.P.; Bruce, J.A.; Goulding, P.N.; Charles, S.M.; Parekh, R.B. (1995)
Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid
Anal Biochem. **230**: 229-238.
- Blum, H.; Beier, H.; Gross, J.H. (1987)
Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels
Electrophoresis **8**: 93-99

- 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
- Chai, W.; Yuen, C.-T.; Kogelberg, H.; Carruthers, R. A.; Margolis, R.U.; Feizi, T.; Lawson, A.M.(1999)
High prevalence of 2-mono- and 2,6-di-substituted Manol-terminating sequences among O-glycans released from brain glycopeptides by reductive alkaline hydrolysis
Eur. J. Biochem. **263**: 879-888
- Chiba, A.; Matsumura, K.; Yamada, H.; Inazu, T.; Shimizu, T.; Kusunoki, S.; Kanazawa, I.; Kobata, A.; Endo, T. (1997)
Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve α -dystroglycan: The role of a novel O-mannosyl type oligosaccharide in the binding with laminin
J. Biol. Chem. **272**: 2156-2162
- Chou, K.-C.; Zhang, C.-T.; Kézdy, F.J.; Poorman, R.A.; (1995)
A vector projection method for predicting the specificity of GalNAc-transferase
Proteins **21**: 118-126.
- 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**: 635-646
- Combs, A.C.; Ervasti, J.M. (2005)
Enhanced Laminin binding by α -dystroglycan after enzymatic deglycosylation
Biochem. J. **390**: 303-309
- Comer, F.I.; Hart, G.W. (2000)
Mini review: O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate
J. Biol. Chem. **275**: 29179-29182
- O'Connell, B.C.; Hagen, F.K.; Tabak, L.A. (1992)
The influence of flanking B.sequence on the O-glycosylation of threonine *in vitro*
J. Biol. Chem. **267**: 25010-25018

- McDearmon, E.; Combs, A.; Sekigucji, K.; Fujiwara, H.; Ervasti, J. (2006)
Brain α -dystroglycan displays unique glycoepitopes and preferential binding to laminin-10/11
FEBS Letters **580**: 3381-3385
- Deng, W.M.; Schneider, M.; Frock, R.; Castillejo-Lopez, C.; Gaman, E.A.; Baumgartner, S.; Ruohola-Baker, H. (2003)
Dystroglycan is required for polarizing the epithelial cells and the oocyte in *Drosophila*
Development. **130**: 173-184
- Dennis, R.D.; Geyer, R.; Egge, H.; Peter-Katalinic, J.; Keller, M.; Menges, H.; Wiegandt, H. (1987)
Insects: Animals without gangliosides-Preliminary Data
Springer-Verlag, Berlin Vol. H7: 351-358
- Elhammer, Å.P.; Poorman, R.A.; Brown, E.; Maggiora L.L.; Hoogerheide, J.G.; Kézdy, F.J.; (1993)
The specificity of UDP-GalNAc: Polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase as inferred from a database on *in vivo* substrates and from the *in vitro* glycosylation of proteins and peptides
J. Biol. Chem. **268**: 10029-10038
- Endo, T (1999)
O-mannosyl glycans in mammals
Biochim. Biophys. Acta. **1473**: 237-246
- Engelmann, K. (2003)
Identifizierung und Topologisierung sequenzvarianter VNTR-Repeats des MUC1 und differenzielle Glykoprofilierung sezernierter und membranständiger MUC1-Isoformen
Dissertationsschrift, Universität Leipzig
- Ervasti, J.M.; Campbell, K.P. (1991)
Membrane organisation of the dystrophin-glycoprotein complex
Cell, **66**: 1121-1131
- Ervasti, J.M.; Campbell, K.P. (1993)
A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin
J. Cell Biol. **122**: 809-823

- Ervasti, J.M.; Burwell, A.L.; Geissler, A.L. (1997)
Tissue-specific heterogeneity in alpha-dystroglycan sialoglycosylation. Skeletal muscle alpha-dystroglycan is a latent receptor for *Vicia villosa* agglutinin b4 masked by sialic acid modification
J. Biol. Chem. **272**: 22315-22321
- Esapa, C.T.; Bentham, G.R.; Schroder, J.E.; Kroger, S.; Blake, D.J. (2003)
The effects of post-translational processing on dystroglycan synthesis and trafficking
FEBS Lett. **555**: 209-216
- Finne J.; Krusius T. (1979)
Structural features of the carbohydrate units of plasma glycoproteins
Eur. J. Biochem. **102**: 583-588
- Gentzsch, M.; Tanner, W. (1996)
The *PMT* gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital
EMBO J. **15**: 5752-5759
- Girrbach, V.; Zeller, T.; Priesmeier, M.; Strahl-Bolsinger, S. (2000)
Structure-Function Analysis of the Dolichyl Phosphate-Mannose: Protein O-Mannosyltransferase ScPmt1p
J. Biol. Chem. **275**: 19288-19296
- Girrbach, V.; Strahl, S. (2003)
Members of the evolutionarily conserved PMT Family of Protein O-Mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves
J. Biol. Chem. **278**: 12554-12562
- Greener, M.J.; Roberts, R.G. (2000)
Conservation of components of the dystrophin complex in *Drosophila*
FEBS Letters **482**: 13-18
- Haltiwanger, R.S.; Lowe, J.B. (2004)
Role of Glycosylation in Development
Annu. Rev. Biochem. **73**: 491-537
- Haerry, T.E.; Heslip, T.R.; Marsh, J.L.; O'Connor, M.B. (1997)
Defects in glucuronate biosynthesis disrupt Wingless signalling in *Drosophila*
Development **124**: 3055 - 3064
- Hanahan, D.; Meselson, M. (1983)
Plasmid screening at high colony density
Methods Enzymol. **100**: 333-342

- 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 β (1-4)GlcNAc β (1-6) repeating units
J. Biol. Chem. **264**: 872-883
- 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 rGalNAc-T2 and -T4 on mucin glycopeptides
Glycobiology **11**: 731-740
- Hansen, J.E.; Lund, O.; Nielsen, J.O.; Brunak, S. (1996)
O-glycbase: a Revised Database of O-glycosylated Proteins
Nucleic Acids Res. **24**: 248-252
- 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
- Hart, G.W. (1997)
Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins
Annu. Rev. Biochem. **66**: 315-335
- Henry, M.D.; Campbell, K.P. (1998)
A role for dystroglycan in basement membrane assembly
Cell **95**: 859-870

Henry, M.D.; Campbell, K.P. (1999)
Dystroglycan inside and out
Curr. Opin. Cell biol., **11**: 602-607

Herscovics, A.; Orlean, P. (1993)
Glycoprotein biosynthesis in yeast
Biochem. Biophys. Res. Comm. **206**: 955-961

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

Holt, K.H.; Crosbie, R.H.; Venzke, D.P.; Campbell, K.P. (2000)
Biosynthesis of dystroglycan: processing of a precursor propeptide
FEBS Lett. **468**: 79-83

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

Ichimiya, T.; Many, H.; Ohmae, Y.; Yoshida, H.; Takahashi, K.; Ueda, R.; Endo, T.; Nishihara, S. (2004)
The twisted abdomen phenotype of *Drosophila* POMT1 and POMT2 mutants coincides with their heterophilic protein O-mannosyltransferase activity
J. Biol Chem. **279**: 42638-42647

Ibraghimov-Beskrovnaya, O.; Ervasti, J.M.; Leveille, C.J.; Slaughter, C.A.; Sernett, S.W.; Campbell, K.P. (1992)
Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix
Nature **355**: 696-702

Jurado, L.A.; Coloma, A.; Cruces, J. (1999)
Identification of a human homolog of the *Drosophila* rotated abdomen gene (POMT1) encoding a putative protein O-mannosyl-transferase, and assignment to human chromosome 9q34.1
Genomics **58**: 171-180.

Kanagawa, M.; Saito, F.; Kunz, S.; Yoshida-Moriguchi, T.; Barresi, R.; Kobayashi, Y.M.; Muschler, J.; Dumanski, J.P.; Michele, D.E.; Oldstone, M.B.A.; Campbell, K. (2004)

Molecular Recognition by LARGE is Essential for Expression of Functional Dystroglycan
Cell **117**: 953-964

Kramerov, A.A.; Arbatsky, N.P.; Rozovsky, Y.M.; Mikhaleva, E.A.; Poleskaya, O.O.; Gvozdev, V.A.; Shibaev, V.N. (1996)

Mucin-type glycoprotein from *Drosophila melanogaster* embryonic cells: characterization of carbohydrate component
FEBS Lett. **378**: 213-218

Kohfeldt, E.; Maurer, P.; Vannahme, C.; Timpl, R. (1997)

Properties of the extracellular calcium binding module of the proteoglycan testican
FEBS Lett. **414**: 557-561

Lämmli, U. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature **227**: 680

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

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

Lyalin, D.; Koles, K.; Roosendaal, S.D.; Repnikova, E.; Van Wechel, L.; Panin, V.M. (2006)

The twisted gene encodes *Drosophila* protein O-mannosyltransferase 2 and genetically interacts with the rotated abdomen gene encoding *Drosophila* protein O-mannosyltransferase 1
Genetics **172**: 343-353

Manya, H.; Chiba, A.; Yoshida, A.; Wang, X.; Chiba, Y.; Jigami, Y.; Margolis, R.U.; Endo, T. (2004)

Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity
Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **101**: 500-505

- Marth, J.D. (1996)
Complexity in O-linked oligosaccharide biosynthesis engendered by multiple polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases
Glycobiology **6**: 701-705
- Martin, P.T. (2005)
The Dystroglycanopathies: The new disorders of glycosylation
Semin. Pediatr. Neurol. **12**: 152-158
- Martin, P.T. (2003)
Dystroglycan glycosylation and its role in matrix binding in skeletal muscle
Glycobiology **8**: 55-66
- Mattu, T.S.; Pleass, R.J.; Willis, A.C.; Kilian, M.; Wormald, M.R.; Lellouch, A.C.; Rudd, P.M.; Woof, J.M.; Dwek, R.A. (1998)
The glycosylation and structure of human serum IgA1, Fab, and Fc regions and the role of N-glycosylation on Fc-receptor interactions
J. Biol.Chem. **273**: 2260-2272
- Michele, D.E.; Barresi, R.; Kanagawa, M.; Saito, F.; Cohn, R.D.; Satz, J.S.; Dollar, J.; Nishino, I.; Kelley, R.I.; Somer, H. (2002)
Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies
Nature **418**: 417-422
- Michele, D.E.; Campbell, K.P (2003)
Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function
J. Biol Chem. **278**: 15457-15460
- Müller S.; Alving K.; Peter-Katalinic, J.; Zachara, N.; Gooley, A.A.; Hanisch, F.-G. (1999)
High density O-glycosylation on tandem repeat peptide from secretory MUC1 of T47D 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
- Muntoni, F.; Brockington, M.; Blake, D.J.; Torelli, S.; Brown, S.C. (2002)
Defective glycosylation in muscular dystrophy
Lancet **360**: 1419-1421

- 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
- North, S.J.; Koles, K.; Hembd, C.; Morris, H.R.; Dell, A.; Panin, V.M.; Haslam, S.M. (2006)
Glycomic studies of *Drosophila melanogaster* embryos
Glycoconj J. **23**: 345-354
- Patel, T.P; Parekh, R.B. (1994)
Release of oligosaccharides from glycoproteins by hydrazinolysis
Methods Enzymol. **230**: 57 - 66
- Roussel, P.; Lambin, G. (1996)
Glykoproteins and Disease
New Comprehensive Biochem. **30**: 351
- Van Reeuwijk, J.; Brunner, H.G.; van Bokhoven, H.; (2004)
Glyc-O-Genetics of Walker-Warburg syndrome
Clin. Genet. **67**: 281-289
- Saito, F.; Blank, M.; Schröder, J.; Many, H.; Shimizu, T.; Campbell, K.P.; Endo, T.; Mizutani, M.; Kröger, S.; Matsumura, K. (2005)
Aberrant glycosylation of α -dystroglycan causes defective binding of laminin in the muscle of chicken muscular dystrophy
FEBS **579**: 2359-2363
- Sasaki, T.; Yamada, H.; Matsumura, K.; Shimizu, T.; Kobata, A.; Endo, T. (1998)
Detection of O-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle alpha-dystroglycan
Biochim. Biophys. Acta. **27**: 599-606
- Schauer, R. (2001)
The Occurrence and Significance of Sialic Acids in Insects
TIGG **13**: 507-517
- Sciandra F, Schneider M, Giardina B, Baumgartner S, Petrucci TC, Brancaccio A.
Identification of the beta-dystroglycan binding epitope within the C-terminal region of alpha-dystroglycan
Eur. J. Biochem. **268**: 4590-4597
- Seppo, A.; Moreland, M.; Schweingruber, H.; Tiemeyer, M. (2000)
Zwitterionic and acidic glycosphingolipids of the *Drosophila melanogaster* embryo
Eur. J. Biochem. **267**: 3549-3558

- Seppo, A.; Tiemeyer, M. (2000)
Function and structure of *Drosophila* glycans
Glycobiology **10**: 751-760
- Sgambato, A.; Brancaccio, A. (2005)
Thy dystroglycan complex: From biology to cancer
J. Cell. Physiol. **205**: 163-169
- Sharma, C.B.; Babczinski, P.; Lehle, L.; Tanner, W. (1974)
The Role of Dolicholmonophosphate in Glycoprotein Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*
Eur. J. Biochem. **46**: 35-41
- Singh, J.; Itahana, Y.; Knight-Krajewski, S.; Kanagawa, M.; Campbell, K.P.; Bissell, M.J.; Muschler, J. (2004)
Proteolytic enzymes and altered glycosylation modulate dystroglycan function in carcinoma cells
Cancer Res. **64**: 6152-6159
- Smalheiser, N.R.; Kim, E. (1995)
Purification of cranin, a laminin binding membrane protein. Identity with dystroglycan and reassessment of its carbohydrate moieties.
J. Biol. Chem. **270**: 15425-15433
- Smalheiser, N.R.; Haslam, S.M.; Sutton-Smith, M.; Morris, H.R.; Dell, A. (1998)
Structural analysis of sequences O-linked to mannose reveals a novel Lewis X structure in cranin (dystroglycan) purified from sheep brain
J. Biol. Chem. **273**: 23698-23703
- Van den Steen, P.; Rudd, P.M.; Dwek, R.A.; Opdenakker, G. (1998)
Concepts and Principles of O-Linked Glycosylation
Critical Rev. Biochem. and Mol. Biol. **33**: 151-208
- Strahl-Bolsinger, S.; Tanner, W. (1991)
Protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*, purification and characterization of the dolichylphosphate-D-mannose-protein O-D-mannosyltransferase
J. Biochem. **196**: 185-190
- Strahl-Bolsinger, S.; Immervoll, T.; Deutzmann, R.; Tanner, W. (1993)
PMT1, the gene for a key enzyme of protein glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **90**: 8164-8168

- Sugita, S.; Saito, F.; Tang, J.; Satz, J.; Campbell, K.; Sudhof, T.C (2001)
A stoichiometric complex of neuexins and dystroglycan in brain
J. Cell Biol. **23**: 435-445
- Sugiyama, J.; Bowen, D.C.; Hall, Z.W. (1994)
Dystroglycan binds nerve and muscle agrin
Neuron. **13**: 103-115
- Takahashi, S.; Sasaki, T.; Manya, H.; Chiba, Y.; Yoshida, A.; Mizuno, M.; Ishida, H.; Ito, F.; Inazu, T.; Kotani, N. (2001)
A new beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase that may play a role in the biosynthesis of mammalian O-mannosyl glycans
Glycobiology **11**: 37-45
- Talts, J.F.; Andac, Z.; Gohring, W.; Brancaccio, A.; Timpl, R. (1999)
Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins.
EMBO J. 1999 **18**: 863-870
- 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**: 27867-27874
- Viswanathan, K.; Tomiya, N.; Park, J.; Singh, S.; Lee, Y.C.; Palter, K.; Betenbaugh, M.J. (2006)
Expression of a functional *Drosophila melanogaster* CMP-sialic acid synthetase. Differential localization of the *Drosophila* and human enzymes
J. Biol. Chem. **281**: 15929-15940
- Willer, T.; Amselgruber, W.; Deutzmann, R.; Strahl, S. (2002)
Characterization of POMT2, a novel member of the PMT protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids
Glycobiology **12**: 771-783
- Williamson, R.A.; Henry, M.D.; Daniels, K.J.; Hrstka, R.F.; Lee, J.C.; Sunada, Y.; Ibraghimov-Beskrovnya, O.; Campbell, K.P. (1997)
Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice
Hum. Mol. Genet. **6**: 831-841
- Wilson, I.B.H.; Gavel, Y.; von Heijne, G. (1991)
Amino acid distributions around O-linked glycosylation sites
Biochem. J. **275**: 529-534

- Winder, S. J. (2001)
The complexities of α -dystroglycan
Trends in Biochem. Sci. **26**: 118-124
- Wuttke, M.; Muller, S.; Nitsche, D.P.; Paulsson, M.; Hanisch, F.-G.; Maurer, P. (2001)
Structural characterization of human recombinant and bone-derived bone sialoprotein. Functional implications for cell attachment and hydroxyapatite binding.
J. Biol. Chem. **276**: 36839-36848
- Yamada, H.; Chiba, A.; Endo, T.; Kobata, A.; Anderson, L.V.; Hori, H.; Fukuta-Ohi, H.; Kanazawa, I.; Campbell, K.P.; Shimizu, T.; Matsumura, K. (1996)
Characterization of α -dystroglycan-laminin interaction in peripheral nerve
J. Neurochem. **66**: 1518-1524
- Yamada, H.; Denzer, A.J.; Hori, H.; Tanaka, T.; Anderson, L.V.; Fujita, S.; Fukuta-Ohi, H.; Shimizu, T.; Ruegg, M.A.; Matsumura, K. (1996)
Dystroglycan is a dual receptor for agrin and laminin-2 in Schwann cell membrane
J. Biol. Chem. **271**: 23418-23423
- Yarema, K.J.; Bertozzi, C.R. (2001)
Characterizing glycosylation pathways
Genome Biol. **2**: reviews0004.1-0004.10
- Yoshida, K.; Kobayashi, H.; Manya, K.; Taniguchi, H.; Kano, M.; Mizuno, T.; Inazu, H.; Mitsuhashi, S.; Takahashi, M.; Takeuchi, M. (2001)
Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1
Dev. Cell **1**: 717-724
- Yuen, C.T.; Chai, W.; Loveless, R.W.; Lawson, A.M.; Margolis, R.U.; Feizi, T. (1997)
Brain contains HNK-1 immunoreactive O-glycans of the sulfoglucuronyl lactosamine series that terminate in 2-linked or 2,6-linked hexose (mannose)
J. Biol. Chem. **272**: 8924-8931
- Zhang, W.; Betel, D.; Schachter, H. (2002)
Cloning and expression of a novel UDP-GlcNAc: α -D-mannoside β 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase that may play a role in the biosynthesis of mammalian O-mannosyl glycans
Glycobiology **11**: 37-45
- Zhong, D.; Saito, F.; Saito, Y.; Nakamura, A.; Shimizu, T.; Matsumura, K. (2006)
Characterization of the protease activity that cleaves the extracellular domain of β -dystroglycan
Biochem. Biophys. Res. Comm. **345**: 867-871

6. ANHANG

6.1 DNA- und Aminosäuresequenzen modifizierter Expressionsvektoren

Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Aminosäuresequenz. Die Sequenzen der *Tags* sind fett und kursiv markiert, die Restriktionsschnittstellen fett. Die Sequenz des BM40-Signalpeptids sowie der BM40-untranslatierten Region ist unterstrichen.

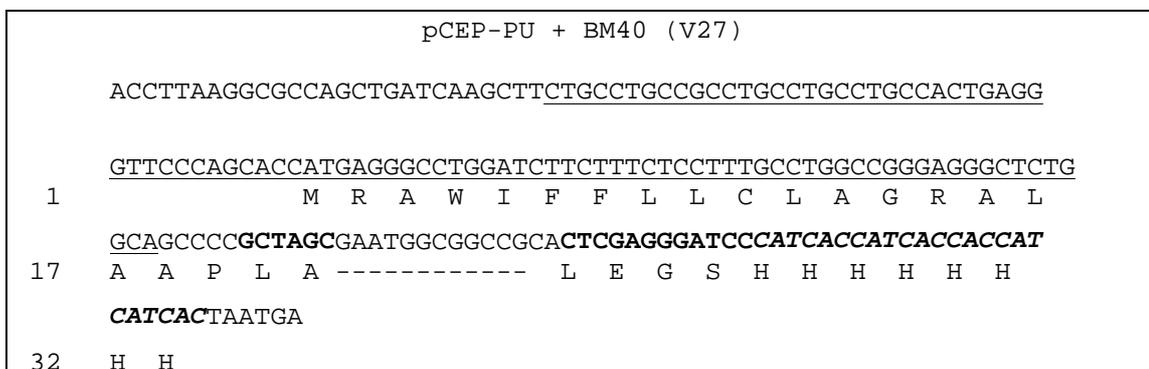


Abb. 86:

DNA- und Aminosäuresequenz der *multiple cloning side* des Vektors pCEP-PU + BM40 (V27).

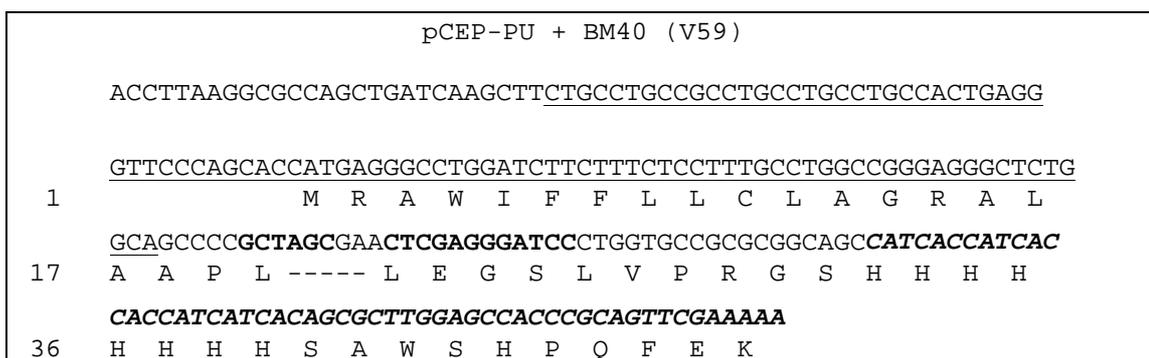


Abb. 87:

DNA- und Aminosäuresequenz der *multiple cloning side* des Vektors pCEP-PU + BM40 (V59).

6.2 DNA- und Aminosäuresequenzen der rekombinant exprimierten Proteine

Die Zahlenangaben beziehen sich auf die Aminosäuresequenz. Die Sequenzen der C-terminalen *Tags* sowie der N-terminal am Protein verbleibenden Aminosäuren des Sekretionssignals des Vektors sind in grauer Schrift dargestellt.

hDG1	
1	GCCCCGCTAGCAATGTCTGCTCAGCTTGGCTACCCTGTGGTGGGTTGGCACATCGCCAAT A P L A M S A Q L G Y P V V G W H I A N
21	AAGAAGCCCCCTCTTCCCAAACGCGTCCGGAGGCAGATCCATGCTACACCCACACCTGTC K K P P L P K R V R R Q I H A T P T P V
41	ACTGCCATTGGGCCCCCAACCACGGCTATCCAGGAGCCCCCATCCAGGATCGTGCCAACC T A I G P P T T A I Q E P P S R I V P T
61	CCCACATCTCCAGCCATTGCTCCTCCAACAGAGACCATGGCTCCTCCAGTCAGGGATCCT P T S P A I A P P T E T M A P P V R D P
81	GTTCTGGGAAACCCACGGTCACCATCCGGACTCGAGGCGCCATTATTCAAACCCCAACC V P G K P T V T I R T R G A I I Q T P T
101	CTAGGCCCCATCCAGCCTACTCGGGTGTGAGAAGCTGGCACCACAGTTCCTGGCCAGATT L G P I Q P T R V S E A G T T V P G Q I
121	CGCCCAACGATGACCATTCTGGCTATGTGGAGCCTACTGCAGTTGCTACCCCTCCCACA R P T M T I P G Y V E P T A V A T P P T
141	ACCACCACCAAGAAGCCACGAGTATCCACACCAAAACCAGCAACGCCTTCAACTGACTCC T T T K K P R V S T P K P A T P S T D S
161	ACCACCACCACGACTCGCAGGCCAACCAAGAAACCACGGACACCCCGGCCAGTGCCCCGG T T T T T R R P T K K P R T P R P V P R
181	GTCACCACCAAAGTTTCCATCACCAGATTGGAAACTGCCTCACCGCCTACTCGTATTTCG V T T K V S I T R L E T A S P P T R I R
201	ACCACCACCAGTGGAGTGCCCCGTGGCGGAGAACCCAACCAGCGCCCAGAGCTCAAGAAC T T T S G V P R G G E P N Q R P E L K N
221	CATATTGACAGGGTAGATGCCTGGGTTGGCACCTACTTTGAGGTGAAGATCCCGTCAGAC H I D R V D A W V G T Y F E V K I P S D
241	ACTTTTCATGACCATTGAGGACACCACCACTGACAAGCTGAAGAGATCCCTGGTGCCGCGC T F Y D H E D T T T D K L K R S L V P R
261	GGCAGCCATCACCATCACCACCATCATCACAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTTCGAAAAA G S H H H H H H H S A W S H P Q F E K

Abb. 88:
DNA- und Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins hDG1.

hDG5

```

1  G C C C C G C T A G C T G G C A C C A C A G T T C C T G G C C A G A T T C G C C C A A C G A T G A C C A T T C C T G G C
  A P L A G T T V P G Q I R P T M T I P G
21  T A T G T G G A G C C T A C T G C A G T T G C T A C C C C T C C C A C A A C C A C C A C C A A G A A G C C A C G A G T A
  Y V E P T A V A T P P T T T T K K P R V
41  T C C A C A C C A A A A C C A G C A A C G C C T T C A A C T G A C T C C A C C A C C A C C A C G A C T C G C A G G C C A
  S T P K P A T P S T D S T T T T T R R P
61  A C C A A G A A A C C A C G G A C A C C C C G G C C A G T G C C C C G G G T C A C C A C C A A A G T T T C C A T C A C C
  T K K P R T P R P V P R V T T K V S I T
81  A G A T T G G A A A C T G C C T C A C C G C C T A C T C G T A T T C G C A C C A C C A C C A G T G G A G T G C C C C G T
  R L E T A S P P T R I R T T T S G V P R
101  G G C G G A G A A C C C A A C C A G C G C C C A G A G C T C A A G A A C C A T A T T G A C A G G G T A G A T G C C T G G
  G G E P N Q R P E L K N H I D R V D A W
121  G T T G G C A C C T A C T T T T G A G G T G A A G A T C C C G T C A G A C A C T T T C A T G A C C A T T G A G G A C A C C
  V G T Y F E V K I P S D T F Y D H E D T
141  A C C A C T G A C A A G C T G A A G A G A T C C C T G G T G C C G C G C G G C A G C C A T C A C C A T C A C C A C C A T
  T T D K L K R S L V P R G S H H H H H H H
161  C A T C A C A G C G C T T G G A G C C A C C C G C A G T T C G A A A A A
  H H S A W S H P Q F E K

```

hDG6

```

1  G C C C C G C T A G C C G C C A T T G C T C C T C C A A C A G A G A C C A T G G C T C C T C C A G T C A G G G A T C C T
  A P L A A I A P P T E T M A P P V R D P
21  G T T C C T G G G A A A C C C A C G G T C A C C A T C C G G A C T C G A G G C G C C A T T A T T C A A A C C C C A A C C
  V P G K P T V T I R T R G A I I Q T P T
41  C T A G G C C C C A T C C A G C C T A C T C G G G T G T C A G A A G C T G G C A C C A C A G T T C C T G G C C A G A T T
  L G P I Q P T R V S E A G T T V P G Q I
61  C G C C C A A C G A T G A C C A T T C C T G G C T A T G T G G A G C C T A C T G C A G T T G C T A C C C C T C C C A C A
  R P T M T I P G Y V E P T A V A T P P T
81  A C C A C C A C C A A G A A G C C A C G A G T A T C C A C A C C A A A A C C A G C A A C G C C T T C A A C T G A C T C C
  T T T K K P R V S T P K P A T P S T D S
101  A C C A C C A C C A C G A C T C G C A G G C C A A C C A A G A A A C C A C G G A C A C C C C G G C C A G T G C C C C G G
  T T T T T R R P T K K P R T P R P V P R
121  G T C A C C A C C A A A G T T T C C A T C A C C A G A T T G G A A A C T G C C T C A C C G C C T A C T C G T A T T C G C
  V T T K V S I T R L E T A S P P T R I R
141  A C C A C C A C C A G T G G A G T G C C C C G T G G C G G A G A A C C C A A C C A G C G C C C A G A G C T C A A G A A C
  T T T S G V P R G G E P N Q R P E L K N
161  C A T A T T G A C A G T C C C T G G T G C C G C G C G G C A G C C A T C A C C A T C A C C A C C A T C A T C A C A G C
  H I D R S L V P R G S H H H H H H H H H S
181  G C T T G G A G C C A C C C G C A G T T C G A A A A A
  A W S H P Q F E K

```

Abb. 89:

DNA- und Aminosäuresequenzen der rekombinanten Proteine hDG5 und hDG6.

hDG7

```

1  G C C C C G C T A G C T G G C A C C A C A G T T C C T G G C C A G A T T C G C C C A A C G A T G A C C A T T C C T G G C
A P L A G T T V P G Q I R P T M T I P G
21  T A T G T G G A G C C T A C T G C A G T T G C T A C C C C T C C C A C A A C C A C C A C C A A G A A G C C A C G A G T A
Y V E P T A V A T P P T T T T K K P R V
41  T C C A C A C C A A A A C C A G C A A C G C C T T C A A C T G A C T C C A C C A C C A C C A C G A C T C G C A G G C C A
S T P K P A T P S T D S T T T T T R R P
61  A C C A A G A A A C C A C G G A C A C C C C G G C C A G T G C C C C G G G T C A C C A C C A A A G T T T C C A T C A C C
T K K P R T P R P V P R V T T K V S I T
81  A G A T T G G A A A C T G C C T C A C C G C C T A C T C G T A T T C G C A C C A C C A C C A G T G G A G T G C C C C G T
R L E T A S P P T R I R T T T S G V P R
101 G G C G G A G A A C C C A A C C A G C G C C C A G A G C T C A A G A A C C A T A T T G A C A G G T C C C T G G T G C C C
G G E P N Q R P E L K N H I D R S L V P
121 C G C G G C A G C C A T C A C C A T C A C C A C C A T C A T C A C A G C G C T T G G A G C C A C C C G C A G T T C G A A
R G S H H H H H H H S A W S H P Q F E
AAA
141 K

```

hDG8

```

1  G C C C C G C T A G C C G C C A T T G C T C C T C C A A C A G A G A C C A T G G C T C C T C C A G T C A G G G A T C C T
A P L A A I A P P T E T M A P P V R D P
21  G T T C C T G G G A A C C C A C G G T C A C C A T C C G G A C T C G A G G C G C C A T T A T T C A A A C C C C A A C C
V P G K P T V T I R T R G A I I Q T P T
41  C T A G G C C C C A T C C A G C C T A C T C G G G T G T C A G A A G C T G G C A C C A C A G T T C C T G G C C A G A T T
L G P I Q P T R V S E A G T T V P G Q I
61  C G C C C A A C G A T G A C C A T T C C T G G C T A T G T G G A G C C T A C T G C A G T T G C T A C C C C T C C C A C A
R P T M T I P G Y V E P T A V A T P P T
81  A C C A C C A C C A A G A A G C C A C G A G T A T C C A C A C C A A A A C C A G C A A C G C C T T C A A C T G A C T C C
T T T K K P R V S T P K P A T P S T D S
101 A C C A C C A C C A C G A C T C G C A G G C C A A C C A A G A A A C C A C G G A C A C C C C G G C C A G T G C C C C G G
T T T T T R R P T K K P R T P R P V P R
121 G T C A C C A C C A A A G T T T C C A T C A C C A G A T C C C T G G T G C C G C G G C A G C C A T C A C C A T C A C
V T T K V S I T R S L V P R G S H H H H
141 C A C C A T C A T C A C A G C G C T T G G A G C C A C C C G C A G T T C G A A A A A
H H H H S A W S H P Q F E K

```

Abb. 90:

DNA- und Aminosäuresequenzen der rekombinanten Proteine hDG7 und hDG8.

hDG9

```

1  GCCCCGCTAGCCGGCACCACAGTTCCTGGCCAGATTGCCCCAACGATGACCATTCTCTGGC
   A P L A G T T V P G Q I R P T M T I P G
41  TATGTGGAGCCTACTGCAGTTGCTACCCCTCCCACAACCACCACCAAGAAGCCACGAGTA
   Y V E P T A V A T P P T T T K K P R V T
61  TCCACACCAAAAACCAGCAACGCCTTCAACTGACTCCACCACCACCACGACTCGCAGGCCA
   S T P K P A T P S T D S T T T T T R R P
81  ACCAAGAAACCACGGACACCCCGGCCAGTCCCCCGGGTCACCACCAAAGTTTCCATCACC
   T K K P R T P R P V P R V T T K V S I T
101 AGATCCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATCACCATCACCACCATCATCACAGCGCTTGGAGC
   R S L V P R G S H H H H H H H S A W S
    CACCCGCAGTTCGAAAAA
121 H P Q F E K

```

hDG10

```

1  GCCCCGCTAGCCGCCATTGCTCCTCCAACAGAGACCATGGCTCCTCCAGTCAGGGATCCT
   A P L A A I A P P T E T M A P P V R D P
21  GTTCTGGGAAACCCACGGTCACCATCCGGACTCGAGGCGCCATTATTCAAACCCCAACC
   V P G K P T V T I R T R G A I I Q T P T
41  CTAGGCCCCATCCAGCCTACTCGGGTGTGAGAAGCTGGCACCACAGTTCCTGGCCAGATT
   L G P I Q P T R V S E A G T T V P G Q I
61  CGCCCCAACGATGACCATTCTGGCTATGTGGAGCCTACTGCAGTTGCTAGATCCCTGGTG
   R P T M T I P G Y V E P T A V A R S L V
121 CCGCGCGGCAGCCATCACCATCACCACCATCATCACAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTTC
   P R G S H H H H H H H S A W S H P Q F
    GAAAAA
141 E K

```

hDG11

```

1  GCCCCGCTAGCAATGTCTGCTCAGCTTGGCTACCCTGTGGTGGGTTGGCACATCGCCAAT
   A P L A M S A Q L G Y P V V G W H I A N
21  AAGAAGCCCCCTCTTCCCAAACGCGTCCGGAGGCAGATCCATGCTACACCCACACCTGTC
   K K P P L P K R V R R Q I H A T P T P V
41  ACTGCCATTGGGCCCCCAACCACGGCTATCCAGGAGCCCCATCCAGGATCGTGCCAACC
   T A I G P P T T A I Q E P P S R I V P T
61  CCCACATCTCCAGCCATTGCTCCTCCAACAGAGACCATGGCTCCTCCAGTCAGGGATCCT
   P T S P A I A P P T E T M A P P V R D P
81  GTTCTGGGAAACCCACGGTCACCATCCGGACTCGAGGCGCCATTATTCAAACCCCAACC
   V P G K P T V T I R T R G A I I Q T P T
101 CTAGGCCCCATCCAGCCTACTCGGGTGTGAGAAGCTGGCACCACAGTTCCTGGCCAGATT
   L G P I Q P T R V S E A G T T V P G Q I
121 CGCCCCAACGATGACCATTCTGGCTATGTGGAGCCTACTGCAGTTGCTAGATCCCTGGTG
   R P T M T I P G Y V E P T A V A R S L V
241 CCGCGCGGCAGCCATCACCATCACCACCATCATCACAGCGCTTGGAGCCACCCGCAGTTC
   P R G S H H H H H H H S A W S H P Q F
    GAAAAA
261 E K

```

Abb. 91:

DNA- und Aminosäuresequenzen der rekombinanten Proteine hDG9 – hDG11.

hDGFusion1	
1	GCCCCGCTAGCAATGTCTGCTCAGCTTGGCTACCCTGTGGTGGGTTGGCACATCGCCAAT A P L A M S A Q L G Y P V V G W H I A N
21	AAGAAGCCCCCTCTTCCCAAACGCGTCCGGAGGCAGATCCATGCTACACCCACACCTGTC K K P P L P K R V R R Q I H A T P T P V
41	ACTGCCATTGGGCCCCCAACCACGGCTATCCAGGAGCCCCCATCCAGGATCGTGCCAACC T A I G P P T T A I Q E P P S R I V P T
61	CCCACATCTCCAGCCATTGATATCGAAGGTCGTGGGCTGCCCCGTACGCCCTGAAGAGAG P T S P A I D I E G R G L A P Y A L K E
81	ATGGCCCCGCGGCCACGGCGTCACCTCCGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCC M A P P A H G V T S A P D T R P A P G S
101	ACCGCGCCCGCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGAGAGCAGGCCGGCCCCGGGCTCC T A P A A H G V T S A P E S R P A P G S
121	ACCGCCCCCCCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCC T A P P A H G V T S A P D T R P A P G S
141	ACCGCCCCCCCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCC T A P P A H G V T S A P D T R P A P G S
161	ACCGCGCCCGCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCC T A P A A H G V T S A P D T R P A P G S
181	ACCGCCCCCAAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCC T A P Q A H G V T S A P D T R P A P G S
201	ACCGCTCCTCCTGCTCATGGTGTGATGAAGGAGGCCCTGCCGTACCCGCGGCCGCTCGAG T A P P A H G V M K E A L P Y P R P L E
221	GCCGGCAAGCCGGATCCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATCACCATCACCACCATCATCAC A G K A G S L V P R G S H H H H H H H H
241	AGCGCTTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAA S A W S H P Q F E K

Abb. 92:

DNA- und Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins hDGFusion1. Die Aminosäuren des α -Dystroglykans sind blau dargestellt.

hDGFusion2	
1	GCCCCGCTAGCAATGTCTGCTCAGCTTGGCTACCCTGTGGTGGGTTGGCACATCGCCAAT A P L A M S A Q L G Y P V V G W H I A N
21	AAGAAGCCCCCTCTTCCCAAACGCGTCCGGAGGCAGATCCATGCTACACCCACACCTGTC K K P P L P K R V R R Q I H A T P T P V
41	ACTGCCATTGGGCCCCCAACCACGGCTATCCAGGAGCCCCATCCAGGATCGTGCCAACC T A I G P P T T A I Q E P P S R I V P T
61	CCCACATCTCCAGCCATTGCTCCTCCAACAGAGACCATGGCTCCTCCAGTCAGGGATCCT P T S P A I A P P T E T M A P P V R D P
81	GTTCTGGGAAACCCACGGTCACCATCCGGACTCGAGGCGCCATTATTCAAACCCCAACC V P G K P T V T I R T R G A I I Q T P T
101	CTAGGCCCCATCCAGCCTACTCGGGTGTGATATCGAAGGTCGTGGGCTGCCCCGTACG L G P I Q P T R V S D I E G R G L A P Y
121	CCCTGAAGAGAGATGGCCCCGCCGCCACGGCGTACCTCCGCCCCGGACACCAGGCCG A L K E M A P P A H G V T S A P D T R P
141	GCCCCGGGCTCCACCGCGCCCGCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGAGAGCAGGCCG A P G S T A P A A H G V T S A P E S R P
161	GCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCC A P G S T A P P A H G V T S A P D T R P
181	GCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCC A P G S T A P P A H G V T S A P D T R P
201	GCCCCGGGCTCCACCGCGCCCGCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCG A P G S T A P A A H G V T S A P D T R P
221	GCCCCGGGCTCCACCGCCCCCAAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCCG A P G S T A P Q A H G V T S A P D T R P
241	GCCCCGGGCTCCACCGCTCCTCCTGCTCATGGTGTGATGAAGGAGCCCTGCCGTACCCG A P G S T A P P A H G V M K E A L P Y P
261	CGGCCGCTCGAGGCCGGCAAGCCGGATCCCTGGTGCCGCGCGGCAGCCATCACCATCAC R P L E A G K A G S L V P R G S H H H H
281	CACCATCATCACAGCGCTTGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAA H H H H S A W S H P Q F E K

Abb. 93:

DNA- und Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins hDGFusion2. Die Aminosäuren des α -Dystroglykans sind blau dargestellt.

dDG1	
pMT/BiP	AGATCC
pAcGP67	GCGGATCTTGGA
pCEP (V27)	GCCCCGCTAGCATCCTCGATGTCCGCTCTCGAAACACAGAAGCCCTTTTCACCCTATGAC
	R S
	A D L G
1	A P L A S S M S A R E T Q K P F S P Y D
	GCCACCTCTTCGGTGTCTGTCCTCGTTCTCGCCCGTCGCATCGATTGCATCTGGCAGCGAA
21	A T S S V S S S F S P V A S I A S G S E
	GATTCAACTTCGGTGTCTGACCCCTCACCTGTCCCCAGCTAACTCACCCACGGTCATGCCC
41	A G E D S T S V S T P H L S P A N S P T
	GCTGGTGAAACAGAGCTAGACAGAAATGGCCTAGCCACCACATCATCCTCATCATCTTCA
61	V M P T E L D R N G L A T T S S S S S S
	TCCGCCTCACCTCCTCCATCGTCATCCGTTCCAACACAAGCCACTCAACCAACCACATCT
81	S A S P P P S S S V P T Q A T Q P T T S
	GCATCATCATTCTCATCATCATCATCAACAACAACAACAAGCACAACAGCAACAGTCTCA
101	A S S F S S S S S T T T T S T T A T V S
	ACAACAACAACAGCATCATCAACAGCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACA
121	T T T T A S S T A T T T T T T T T L S E
	TCGCCAAAGGAAGGAGGAGAAACCCGATGCCATCAGCAGCGGCAACAATAGCCTGGCCAAT
141	S P K E G G E P D A I S S G N N S L A N
	AATGAGCTGTCTGACGCCCGCCACGCCACATCTTCGGTGGCCACGACCACGGCATCTACT
161	N E L S T P A T P T S S V A T T T A S T
	CCGGAGTCGAGCAGCATCAGCAGCAACTTTGTCTCCACCGACTACATGGAACCGCAGCTC
181	P E S S S I S S N F V S T D Y M E P Q L
	GAGTCTAGAGGGCCCTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCGATTCT
201	E S R G P F E G K P I P N P L L G L D S
	ACGCGTACCGGTCATCATCACCATCACCAT
221	T R T G H H H H H H

Abb. 94:

DNA- und Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins dDG1 in den Expressionsvektoren pMT/BiP/V5-His, pAcGP67 und pCEP-PU + BM40 (V27). Mit Ausnahme der N-terminalen Aminosäuren ist die Sequenz identisch.

dDGextra	
	ATGAGATTCCAGTGGTTCTTATCGGCCAGTGGGAGCTTGTGCGTGTCTCTCTCGGACTTCGTCGTATGGATTACGGGAGCGGGAC
1	M R F Q W F L S A S A S L S L F L L L D F V V W I H G E R D
	TTCAATGTCAACGACTCCAGTCCCTGTAATTGAGCCAAAGGATGTGCCCGCTACAACAGGATCCGTATGTTACGGAATTGATGAGT
31	F N V N D S Q V P V I E P K D V P A Y K Q D P Y V T E L M S
	TGCCAAAATACTCCGAGTGAAATTTGCTTTTCTGTTGAAGAAGCAGACTGGAGTGGAGCTGACGGCCACGAAACGAGCTCATGTC
61	C Q N T P S E I V L S L L L K K H D W S E L T A T K R A H V
	CAGGCAAGTTGGCCAAGTCTTTGCCATACSSAAGAAATTCATTTCCCTGGATTCCGGTGTCTAAACCGGAAGTGGAGTCCATGCACAAG
91	Q A K L A K F F A I P K E F I S L D S V S K R E L R S M H K
	TTGGCCATGAGAAAAGGAGCAAGGGCAACAAGAATATCGAGACCCTGAATCGTCGCTGGGACGCGCCAGTTTCATGATCGGCTGTGGT
121	L A M R K L G K G G N K N I E T L N R R L G R A S F M I G C G
	CCAAGTACTTTGTGATGGGCAACCGATAGCCAAAGCAGATTGGCCACCAAATGAAGGATGGCACCATTGGCGCTTTGACGGAGGAGAAC
151	P S Y F V M G E P I A K Q I A H Q M K D G T I G A L T E E N
	TTGGGCTGTGGTTCATTTGGCGAAAGAAATGAAATCAAGATCAAACCGAAGCAGCTCAATCCGAGGCTCTGGTGCCGATGAAGAT
181	F G L W F I W R K E L K S R S N R K R R Q S E G S G A D E D
	GACTACGACTATGGGATGACGATGAGGAAGTTGCTGAGCCAGTACGGAAAGTCCACCAAGTACCACACATGCCCATCGACATCATCAC
211	D Y D Y G D D D E V A E P S T E V P P V T T H A H R H H H
	GGAGCGTTGGAGGTGTCGGAGAAGATAGTGTGCGCCGAATCCGTCCTCTCGTGGCTGTTCCCTCGGTTCCGGACGTTGGAGGAGGATC
241	G A L E V S E K I V S P E S V S S A V P L V P D V E E E E I
	GAAGAGCGTCTCCAAGCTGGAGTCCGTCATCAGCAAGCAGATTGAGAATACGAAGAATATTAAAGGAGTCCCGCTTCGGCGGCAAGCC
271	E E S V S K L E S V I S K T I E N T K N I K E L P V L G E A
	GACGATGGTGAAGATGAAGAGGAAGTGAAGTCAAGCAATTTGGAGTTCATTGGCCCGGAGATTGTGGCAGACGAAACCAAGCAGTCCG
301	D D G E D E E E V E L Q Q L G V P L A A E I V P D C T S A
	GCGGCCACAGTCCACGGAATGGTAAAGCCCGTTGATTGGATGAGCAAGAAATTTCCGTTGGACTCCGGCGTGTCCGGCTATCGAT
331	A A T R A T E M V K P V D L D E Q E I S V D S G A V P A I D
	TGGAGGCTCGGCCACGCCACGCCCTCGATGTCGCTCGCAACACAGAACCCCTTTTACCCTATGACGCCACCTCTTCGGTGTGCG
361	V E A S A T P T P S M S A R E T Q K P F S P Y D A T S S V S
	TCCTCGTTCGCGCGTCCGATCGATTGCATCTGGCAGCAAGCTGGTGAAGATTCAACTTCGGTGTCCGACCCCTCACCTGTCCCCAGCT
391	S S F S P V A S I A S G S E A G E D S T S V S T P H L S P A
	AACTCACCCAGGTCATGCCACAGAGCTAGACAGAAATGGCTAGCCACCACATCATCTCATCTTTCATCCGCTCACCTCTCCCA
421	N S P T V M P T E L D R N G L A T T S S S S S S A S P P P
	TCGTATCCGTTCCAACACAAGCCACTCAACCAACCACATCTGCATCATCATTCTCATCATCATCAACAACAACAACAAGCACAACA
451	S S S V P T Q A T Q P T T S A S S F S S S S S T T T T S T T
	GCAACAGTCTCAACAACAACAAGCAGTCAACAGCAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACA
481	A T T V S T T T A S S T A T T T T T T T T L S E S P K E G G
	GAACCCGATGCCATCAGCAGCGCAACAATAGCCTGGCCAATAATGAGCTGTGACGCGCCGCCACGCCACATCTTCGGTGGCCAGCACC
511	E P D A I S S G N N S L A N N E L S T P A T P T S S V A T T
	ACGGCATCTACTCCGAGTCCGAGCAGCATCAGCAGCAACTTTGTCTCCACCGACTACATGGAACCGCAGCCGGAAGAGAATAGTCCGCCC
541	T A S T P E S S S I S S N F V S T D Y M E P Q P E E N S P P
	ATCATCAAGCACGCCTGCAGAAGCTGGCTGTACATCGGGCAAGGCCTTACCTTCCATGTGTACCGGAAACGTTTTACGATGCCGAG
571	I I K T R L Q K L A V T S G K A F T F H V L P E T F Y D A E
	GATCAGGGTAAATCCTCGCCTGGCCTCACCGACAAGGATGGCCACGAGCTAAAGGCGAAGCTTTGGTGCAGTTTAAACCGCACAAGAGG
601	D Q G N L R L A L T D K D G H E L K A N S W L Q F N A D K R
	GAGCTTTATGGCCTACTCTGGACGACAGTATCCCGCTGGCAATATCGCCTGTCCGCCACGGATTCCGGCAACGCCAGTGTACCGGAA
631	E L Y G L P L D D T V S R W Q Y R L S A T D S G N A S V T E
	ACCGTGGAGATAAGTGTGAGCAGCATCGAGCGGTTAGGACCAATTACCACGAGATCAGTGTTTTTGTACGGATCAACGAGAAGCCGGTGA
661	T V E I S V Q Q H R A V R T I N H E I S V F V R I N E K P G
	CACAACATTGATTGGCAGTTGAAGCTCATTAAATGCGGTGGCCAGAACCTTGGATGACTCCACCAATTCGGCAGTGGTGGTGGTGGATC
691	H N I D W Q L K L I N A V A R T L D D S T N S A V V R E I
	CAGACCCACAGTCCACACAGTCCACCTCGTGTATTTAATGAAACGCTCCCAACAGCAGTGTCCCGAAAAGGAATTAAGGAT
721	Q T P H D P H S A T F V Y F N E T L P T S E C P E K E L K D
	ATTATTGCAGCTGGATGCCAATAGACTGAGTGAATTTGGTTCAGCCACAGCTGGGAATCAAATCTATAACAGGACAGTTAATCGGATCC
751	I I A R L D A N R L S D L V Q P Q L G I K S I T G Q L I G S
	TGTCAGAAGGATTAAGTCAAGTGAAGCCACGCAACATGACCAAGAATGTGCCTCCAATGCCACGCAACAGGTTGGATCGCGTAAAC
781	C Q K D L T Q V K P T Q H M T K N V P P M P R N Q V D V N
	GCTAGCTTGGGCCAGTGTGGTCTACAAAGTCCCGCGGATACCTTCTATGATGCGAACGACAATCAAATGACTCTTACGTTGAAAACC
811	A S L G Q L L V Y K V P A D T F Y D A N D N Q L T L T L K T
	AGGATCACCTTGAGCTTAGCCACGCACTGGCTGCAGTTCGACTCCAAGAACAAGAGTTCTATGGCAATCCGAAAAGCGGTGACATT
841	R D H L E L S P R H W L Q F D S K N E E F Y G I P K S G D I
	GGTCCGAGGAATATCTGTGGTCCGCGAAGACAGTGGTGGCCTGAGTGCCTATGATGCCCTGGTTGATGGTTAGCCAGCCGCAAAAG
871	G S E Y L L V A E D S G L S A H D A L V V V S P A P K
	CGTGACTTTGGGTTCTTCTCAAAGCGTATCTGTCTATCAAACAGGAGCTTCAATGCCGATTCGACGCGGAAGTTTGTAGAGCGTGTA
901	R D F G F F F K A Y L S I K H E R F N A D L Q R K F V E R V
	CGAAGCTGAATGGAGATCCTACTGGCCAGATCCAGATCCGTTTCGATAAACACGACACCAGACTCCGATGGCACCATAGTGAACCTTC
931	A K L N G D P T T G Q I Q I R S I T T H H D S D G T I V N F
	TACAATACGACGCTGTACAGGAAGCACAACAGTTGTGGGAGAGGAAGTGGCCATGACTAGGAGTGTCTACTAAACAGTGACACTCAGC
961	Y N T T L Y R K H N S C R E K E V A M T R S V Y L N S D L S
	CTGAGGAGGAGCCAAACCGGCTCTGGGACCCGAGCTCAAATTTGACCAACTTTTTCGGTGGTGCCTTCAGTATTTGCATCATACTGAG
991	L R E A A K R A L G P E L N L T N F S V V P F S I C H H T E
	AAATAGACACCAACCAACTTGATTATATACCTAGTCGCCGAGAGCCCTACACATAAGTCCCTTTCGGCGCGGCCGCTCGAGGTAC
1021	N I D T N Q L D Y I P S R P E E P T H K S S F G A A A R G H
	CCATTGGAAGGTAAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCTCGGTTCTCGATTCTACGCGTACCGGTTCATCATCTCCATCACCAT
1051	P F E G K P I P N P L L G L D S T R T G H H H H H H

Abb. 95:

DNA- und Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins dDGextra.

6.3 HPLC-Chromatogramme der Glykosylierungs sonden

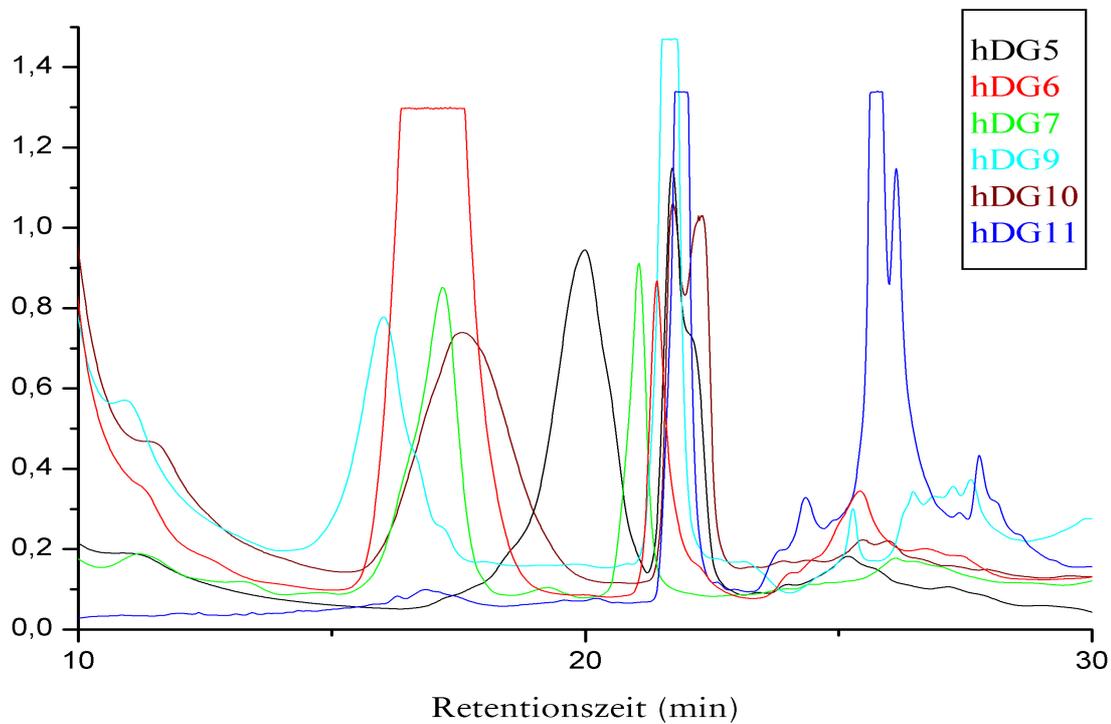


Abb. 96:
Chromatogramme der Aufreinigung der rekombinanten Proteine hDG5 - 7 und hDG9 - 11 mittels Umkehrphasen-HPLC. Die Proteine eluierten jeweils in dem Signal zwischen Minute 15 und 20.

6.4 GC/MS-Chromatogramme und EI-Spektren von Standards und rekombinanten Proteinen

Alle Monosaccharide waren trimethylsilyliert. Die unterste Spur zeigt den Gesamtionenstrom (*total ion current, TIC*). Die verschiedenen Zuckertypen wurden über die jeweils charakteristische Massenenspur identifiziert (Hexosen (Hex): m/z 204, reduzierte Hexosen (Hex-ol): m/z 319, N-Acetylhexosamine (HexNAc): m/z 173, reduzierte N-Acetylhexosamine (HexNAc-ol): m/z 378). Glukose (Glc) und Sorbitol (Glc-ol) ist in einigen Chromatogrammen, insbesondere nach Durchführung einer β -Eliminierung, identifizierbar und kann als Verunreinigung angesehen werden.

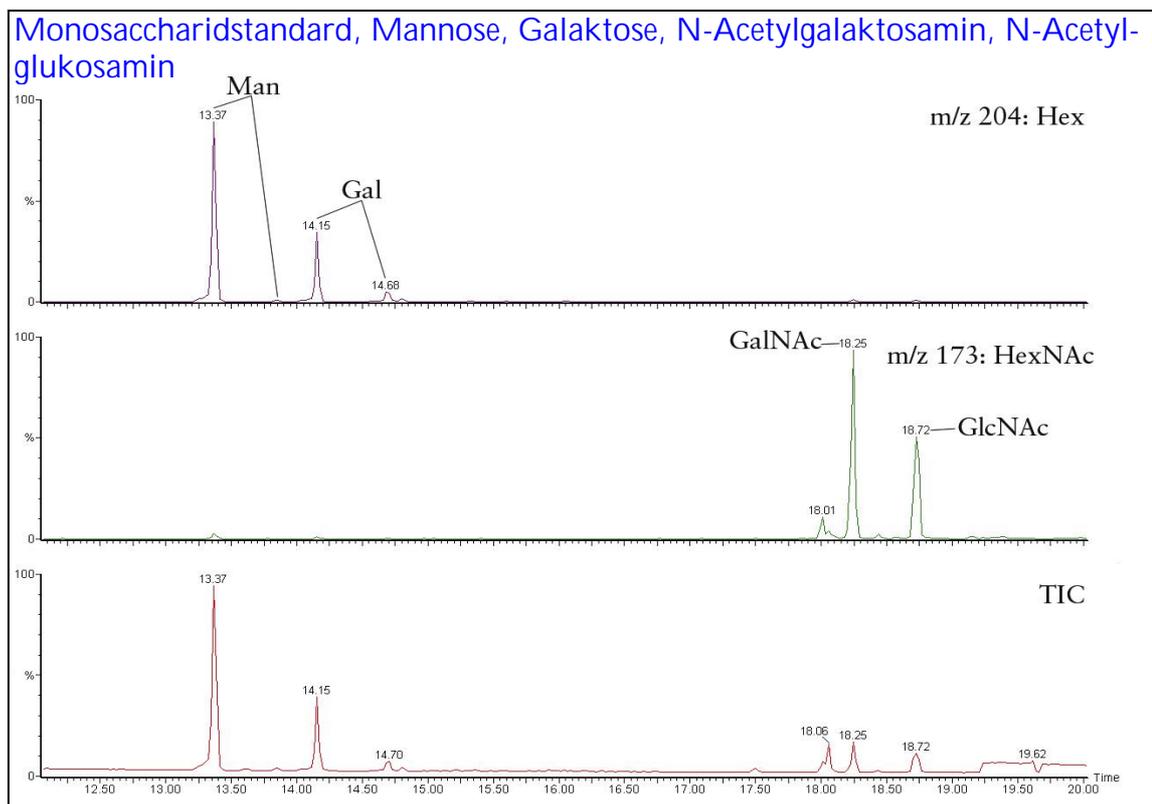


Abb. 97:
Chromatogramm eines Standards aus Mannose (Man), Galaktose (Gal), N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) und N-Acetylglukosamin (GlcNAc).

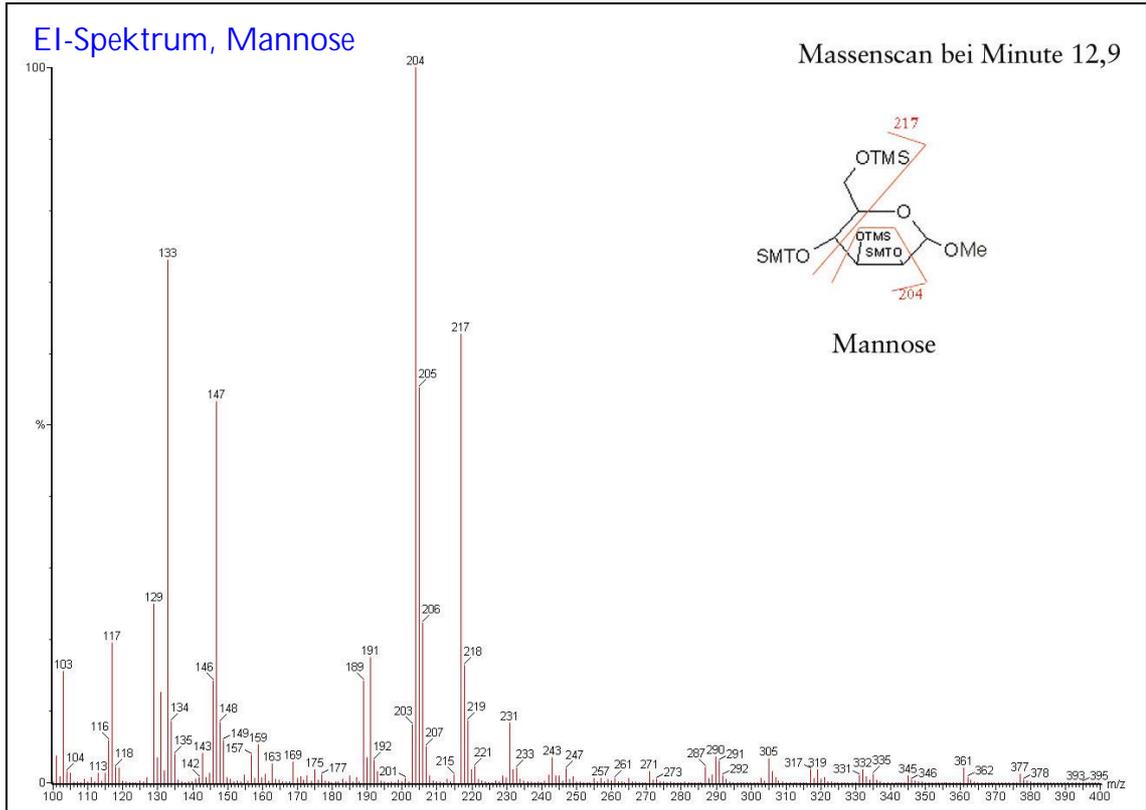


Abb. 98:
Fragmentierungsmuster einer Hexose am Beispiel von Mannose.

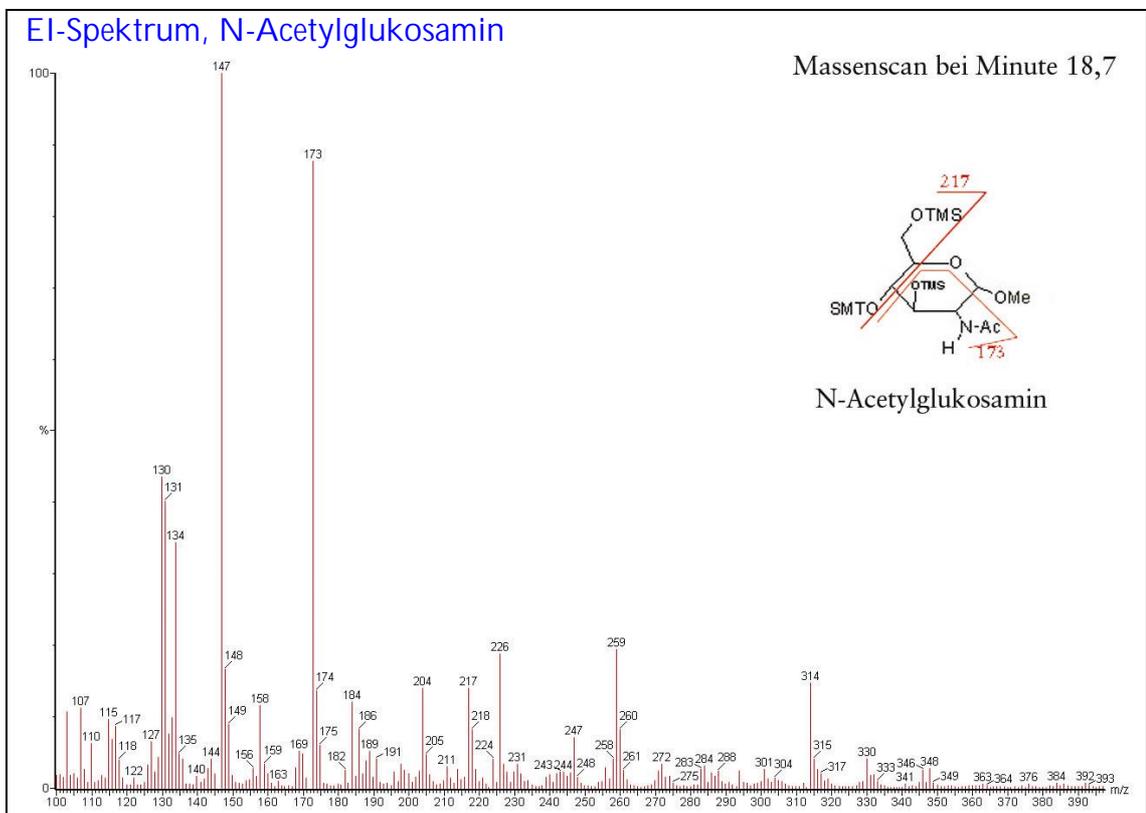


Abb. 99:
Fragmentierungsmuster eines N-Acetylhexosamins am Beispiel von N-Acetylglukosamin.

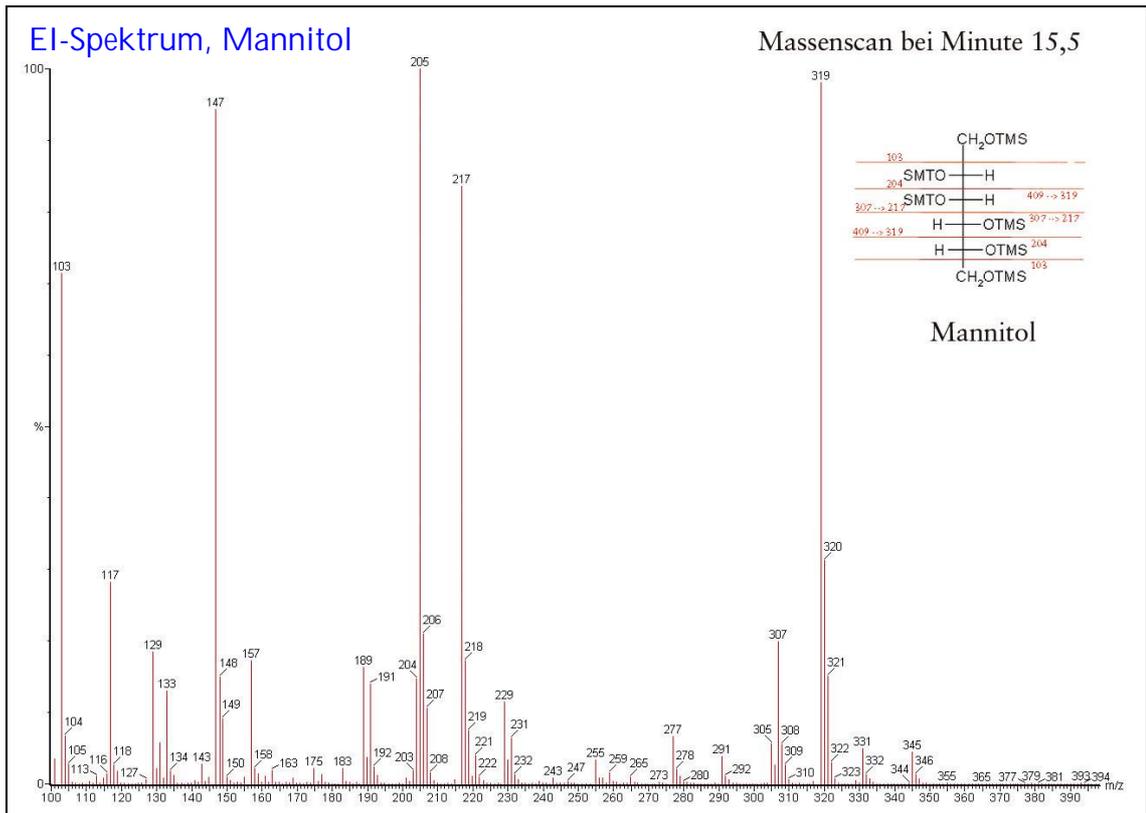


Abb. 100:
Fragmentierungsmuster eines Hexitols am Beispiel von Mannitol.

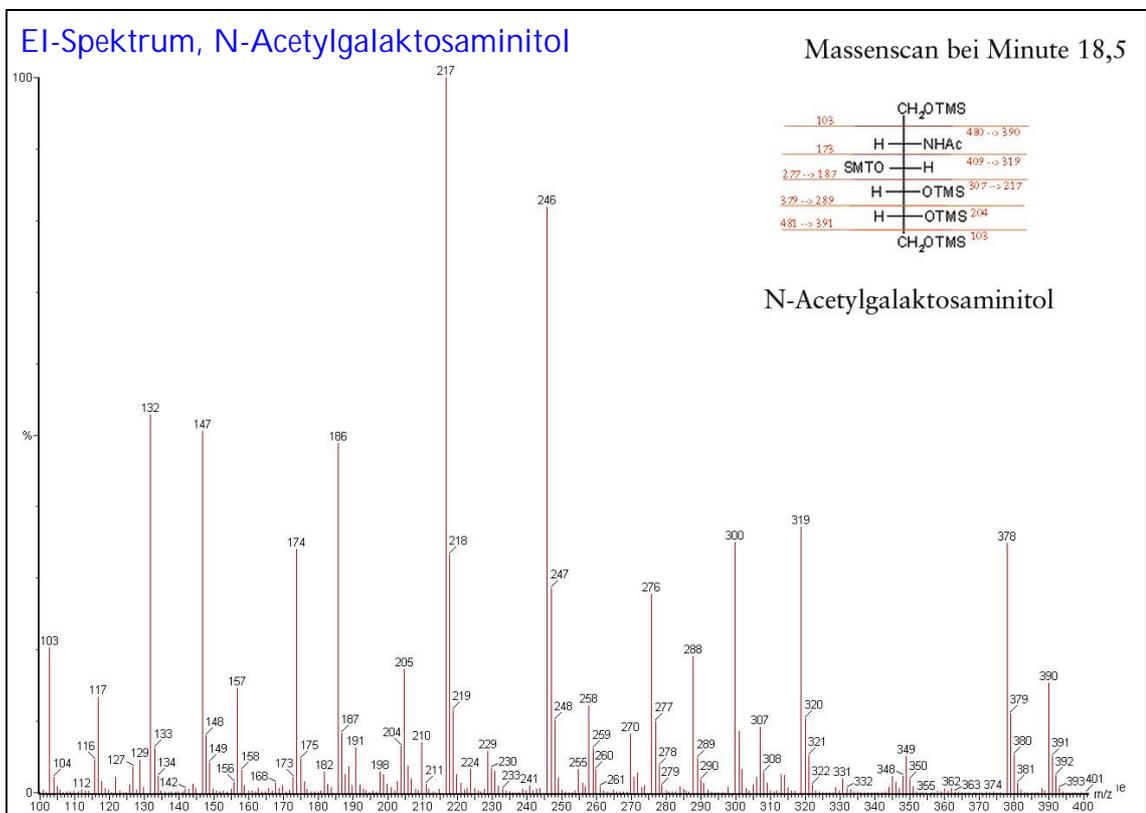


Abb. 101:
Fragmentierungsmuster eines N-Acetylhexosaminitols am Beispiel von N-Acetylgalaktosaminitol.

Die Glykosylierungs sonden hDG1, hDG8, hDG10 und hDG11 zeigten eine Monosaccharidkomposition aus Mannose (Man), Galaktose (Gal), N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) und N-Acetylglukosamin (GlcNAc).

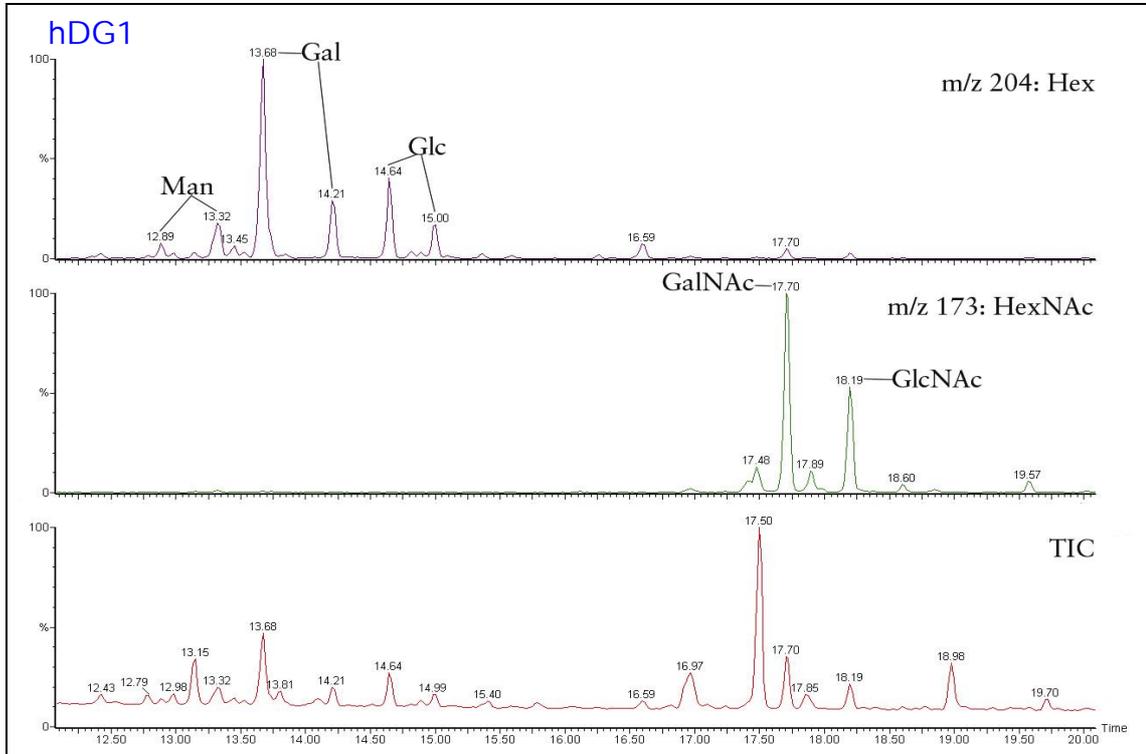


Abb. 102:
Chromatogramm der Monosaccharide des Proteins hDG1.

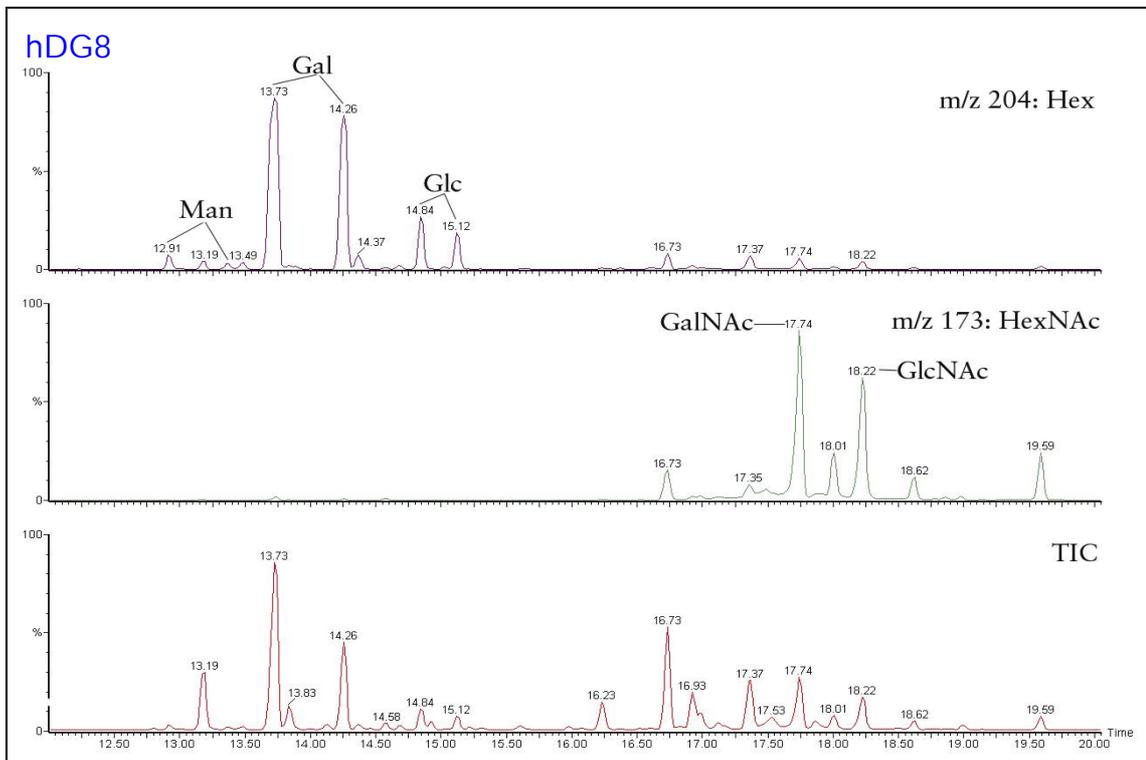


Abb. 103:
Chromatogramm der Monosaccharide des Proteins hDG8.

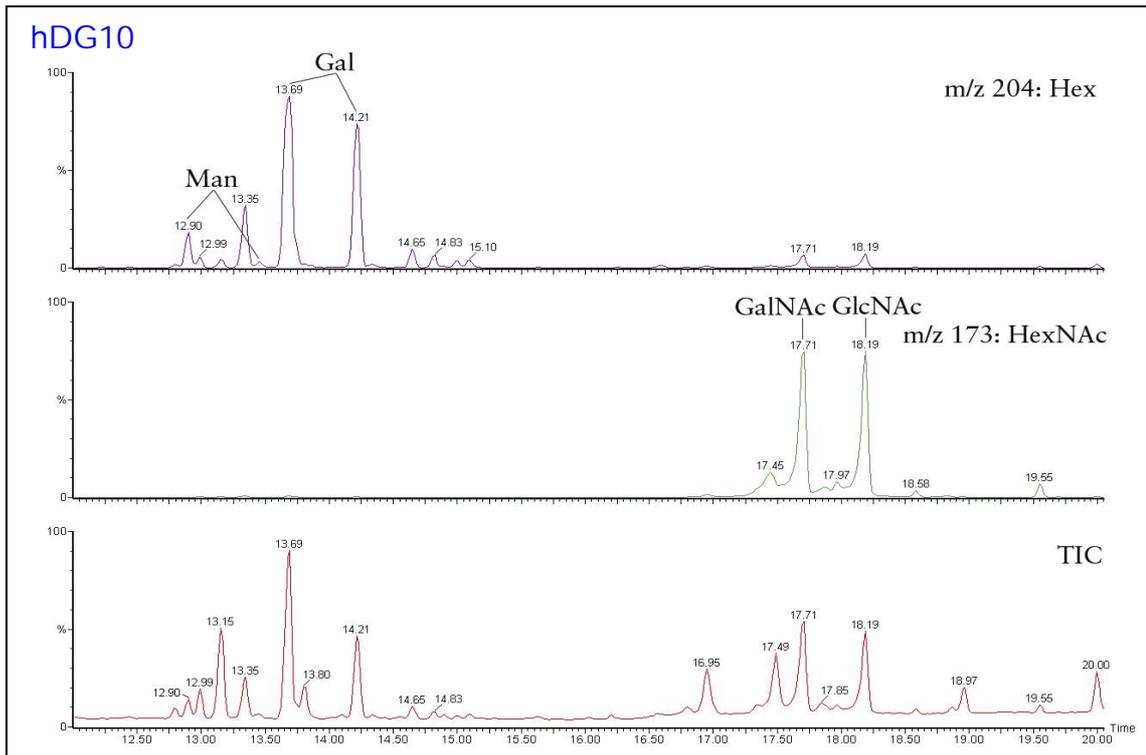


Abb. 104:
Chromatogramm der Monosaccharide des Proteins hDG10.

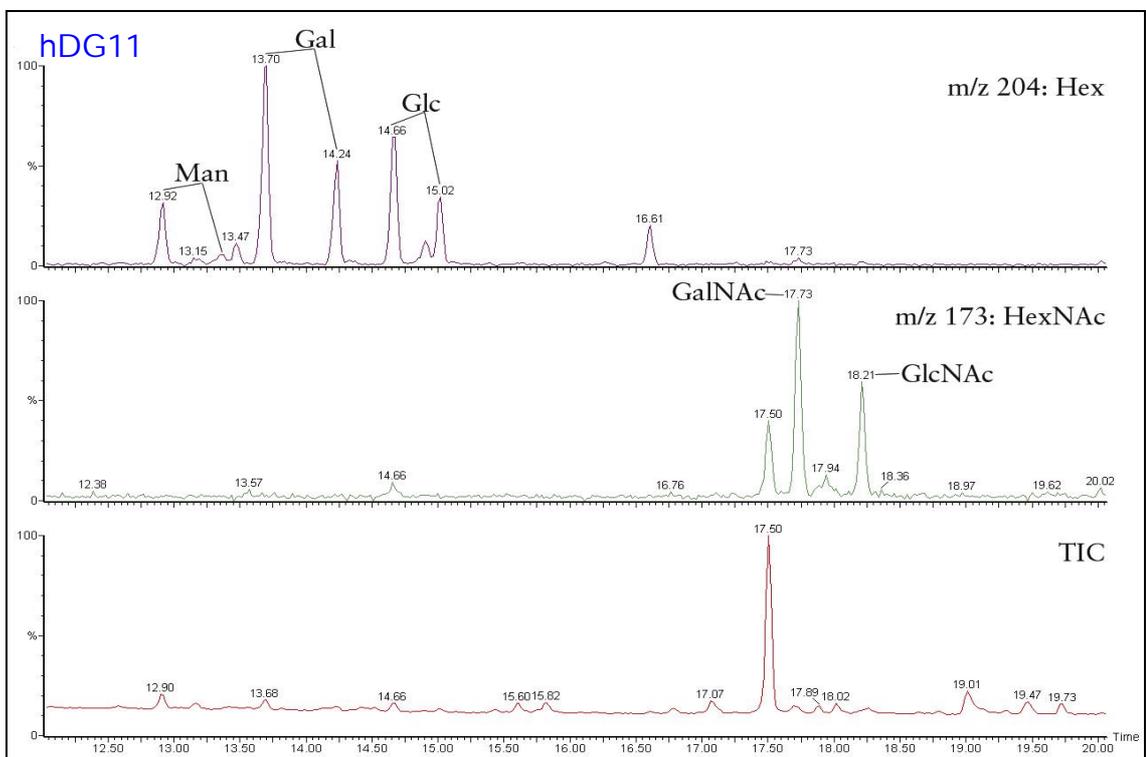


Abb. 105:
Chromatogramm der Monosaccharide des Proteins hDG11.

Die Glykosylierungs sonden hDG5, hDG7, MUC1-S und hDGFusion2 zeigten eine Monosaccharidkomposition aus Galaktose, N-Acetylgalaktosamin und N-Acetylglukosamin.

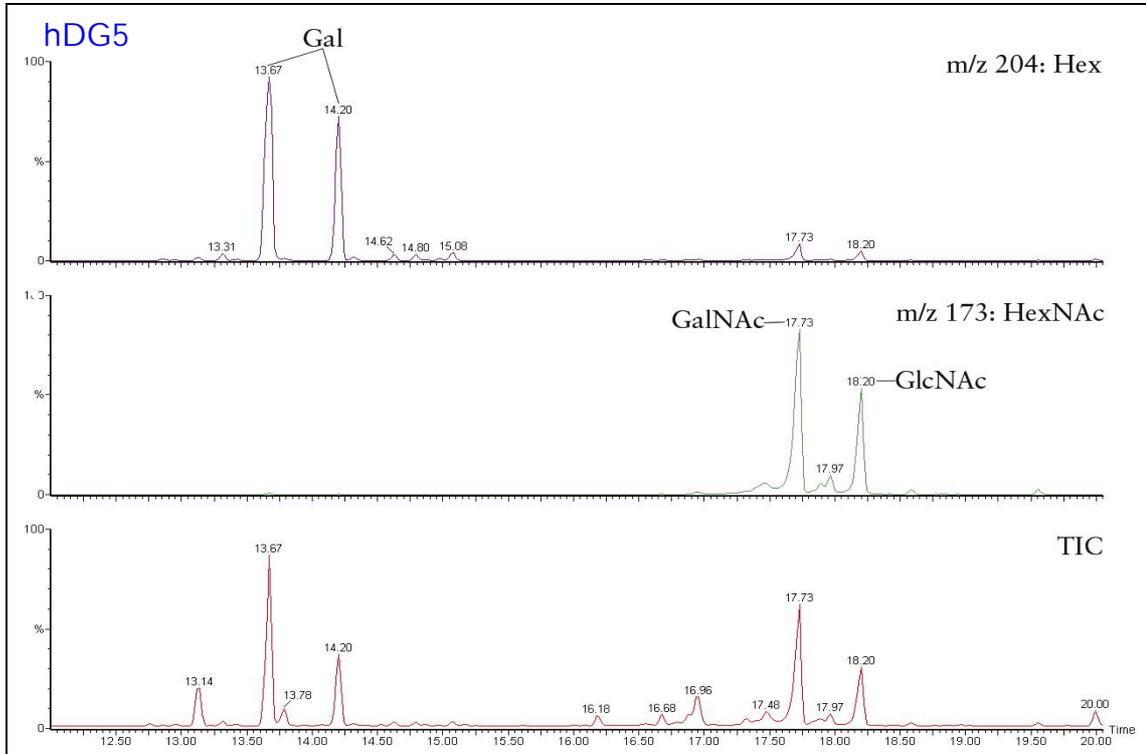


Abb. 106:
Chromatogramm der Monosaccharide des Proteins hDG5.

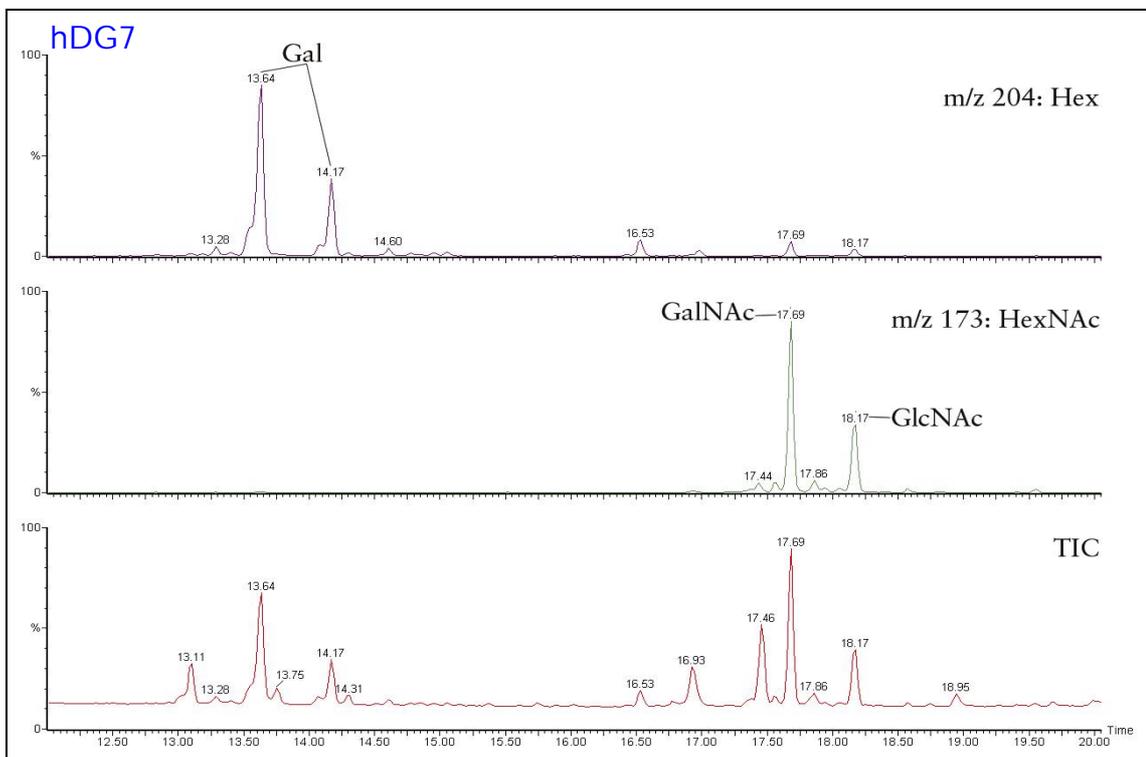


Abb. 107:
Chromatogramm der Monosaccharide des Proteins hDG7.

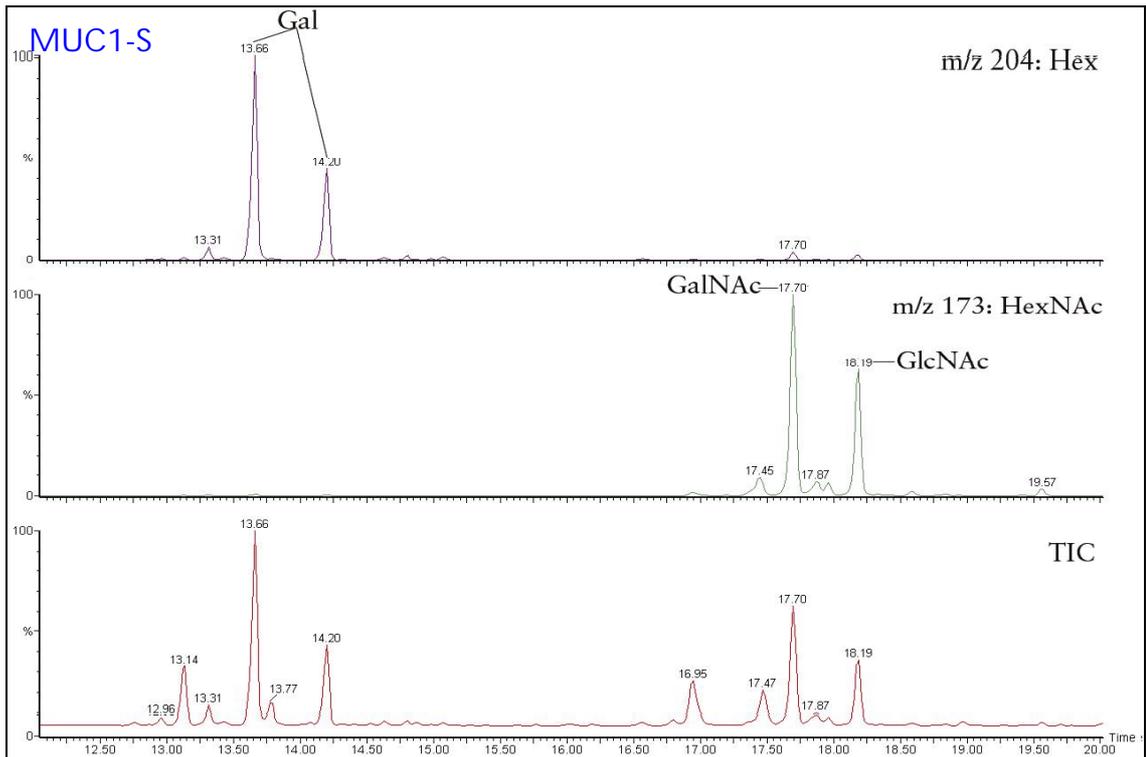


Abb. 108:
Chromatogramm der Monosaccharide des Proteins MUC1-S.

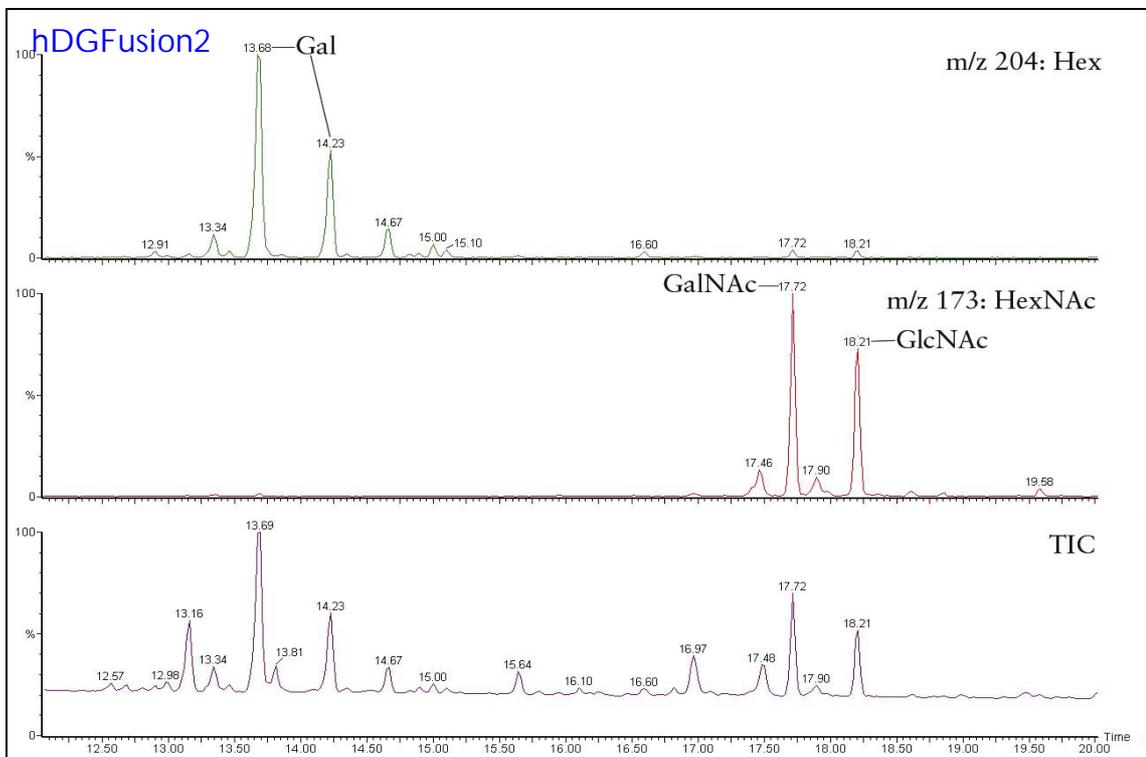


Abb. 109:
Chromatogramm der Monosaccharide des Proteins hDGFusion2.

In den Chromatogramm der Sonden hDG1, hDG8, hDG10 und hDG11 konnte nach β -Eliminierung Mannitol (Man-ol) und N-Acetylgalaktosaminitol (GalNAc-ol) identifiziert werden.

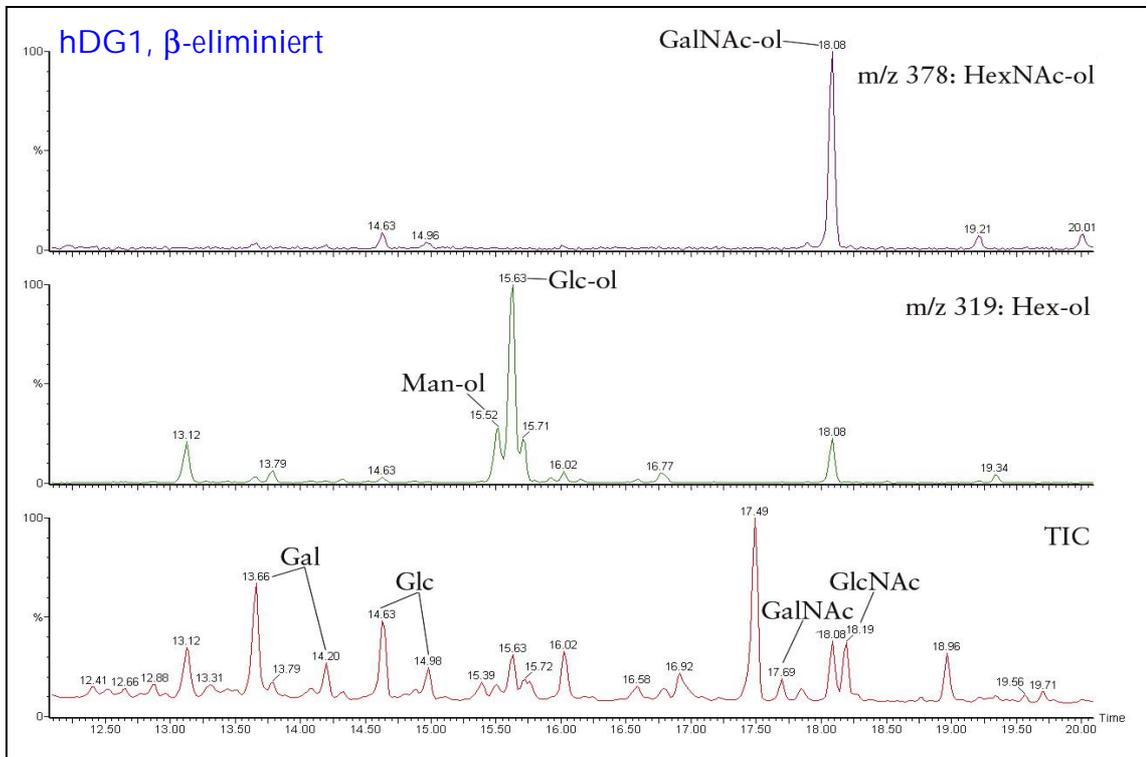


Abb. 110:
Chromatogramm der Monosaccharide des Proteins hDG1 nach β -Eliminierung.

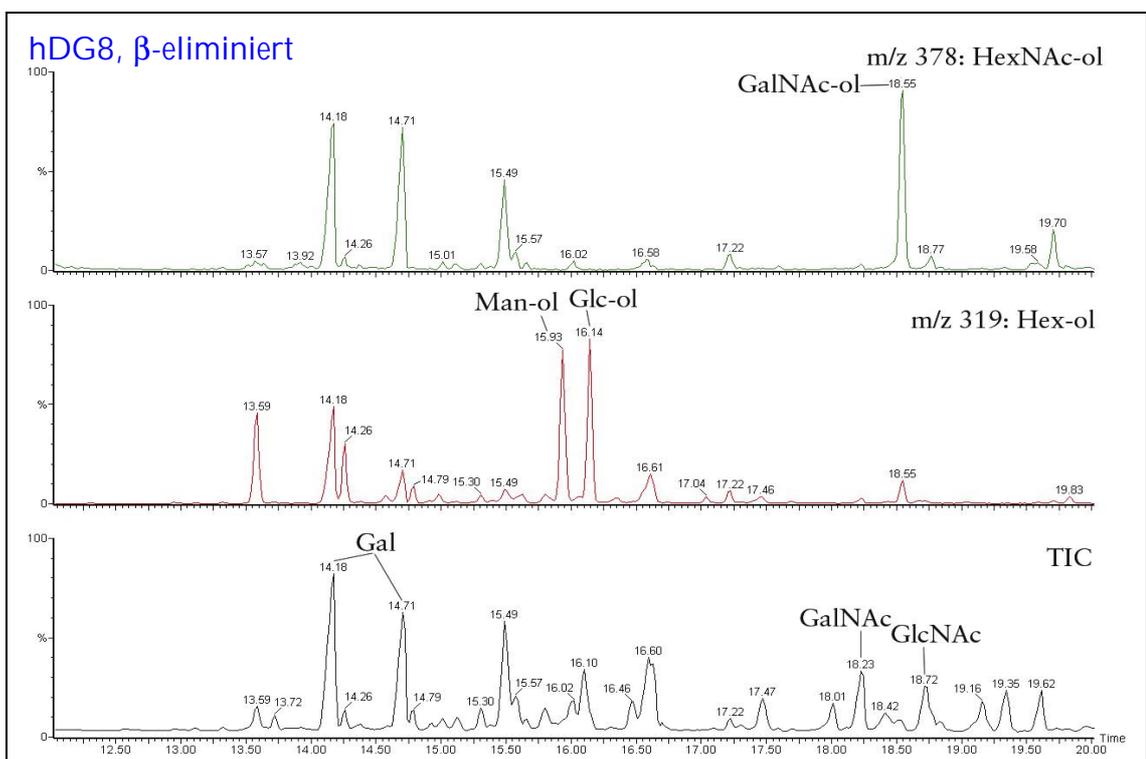


Abb. 111:
Chromatogramm der Monosaccharide des Proteins hDG8 nach β -Eliminierung.

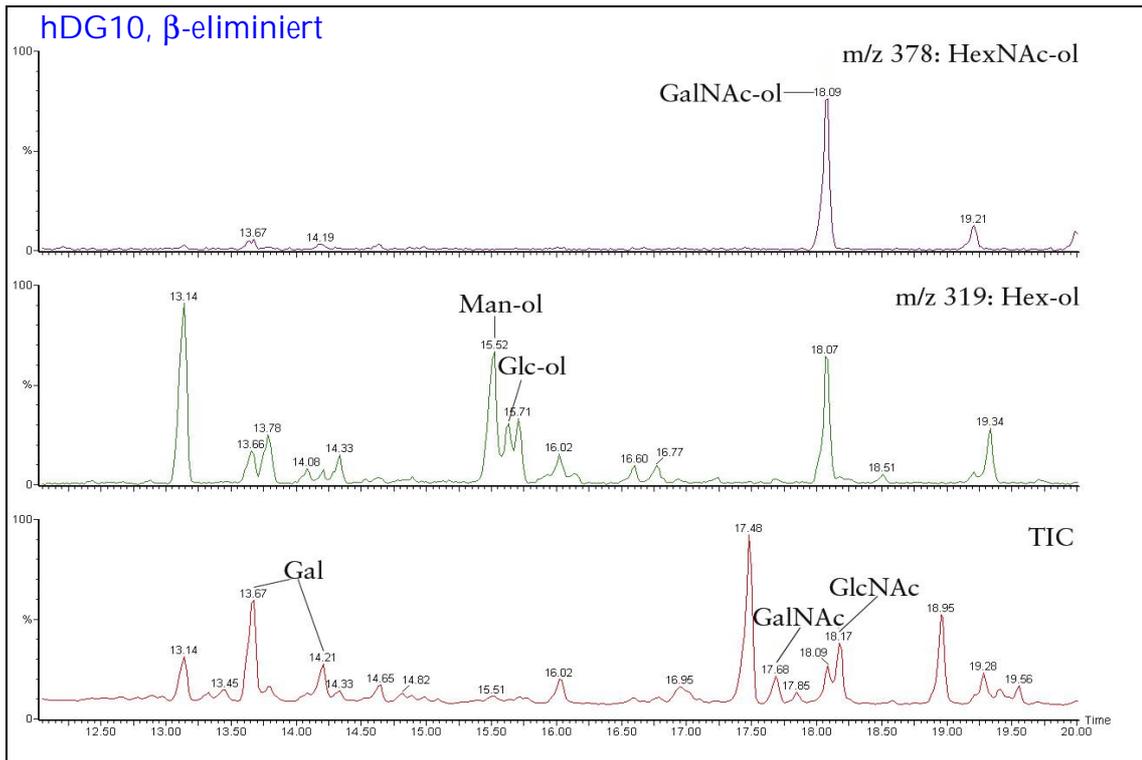


Abb. 112:
Chromatogramm der Monosaccharide des Proteins hDG10 nach β -Eliminierung.

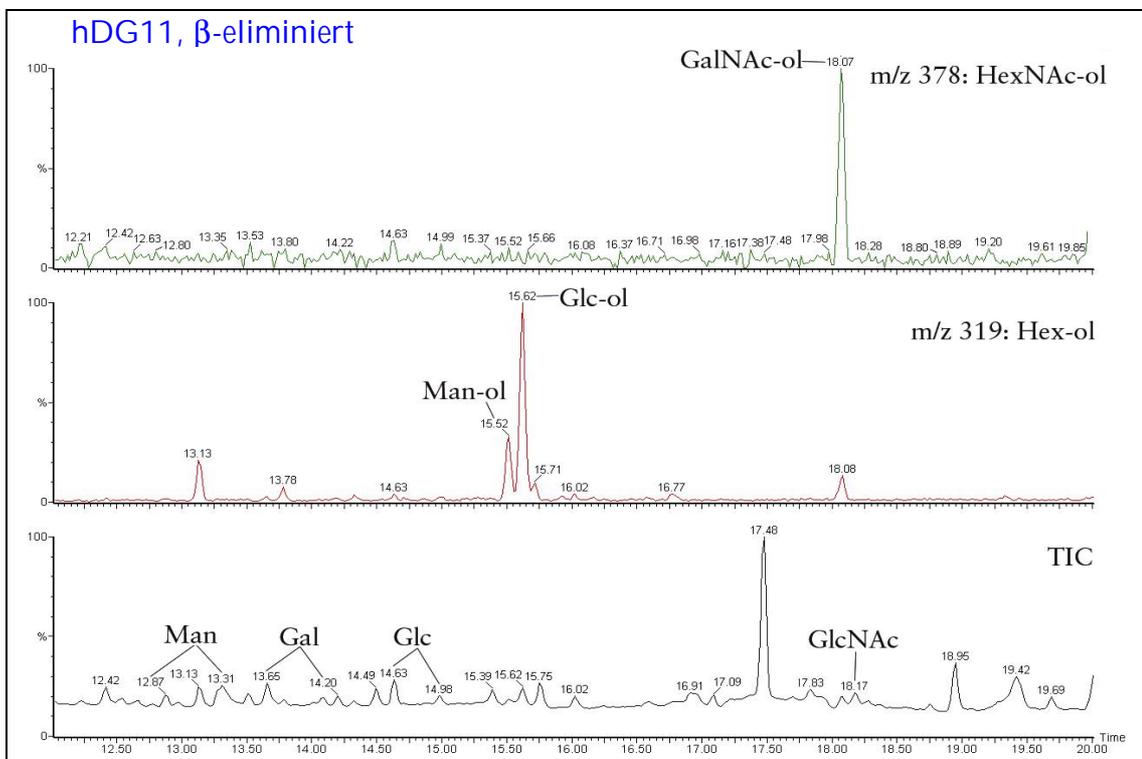


Abb. 113:
Chromatogramm der Monosaccharide des Proteins hDG11 nach β -Eliminierung.

Im Chromatogramm der Sonden hDG5 und hDG9 konnte nach β -Eliminierung nur N-Acetylgalaktosaminitol (GalNAc-ol) identifiziert werden.

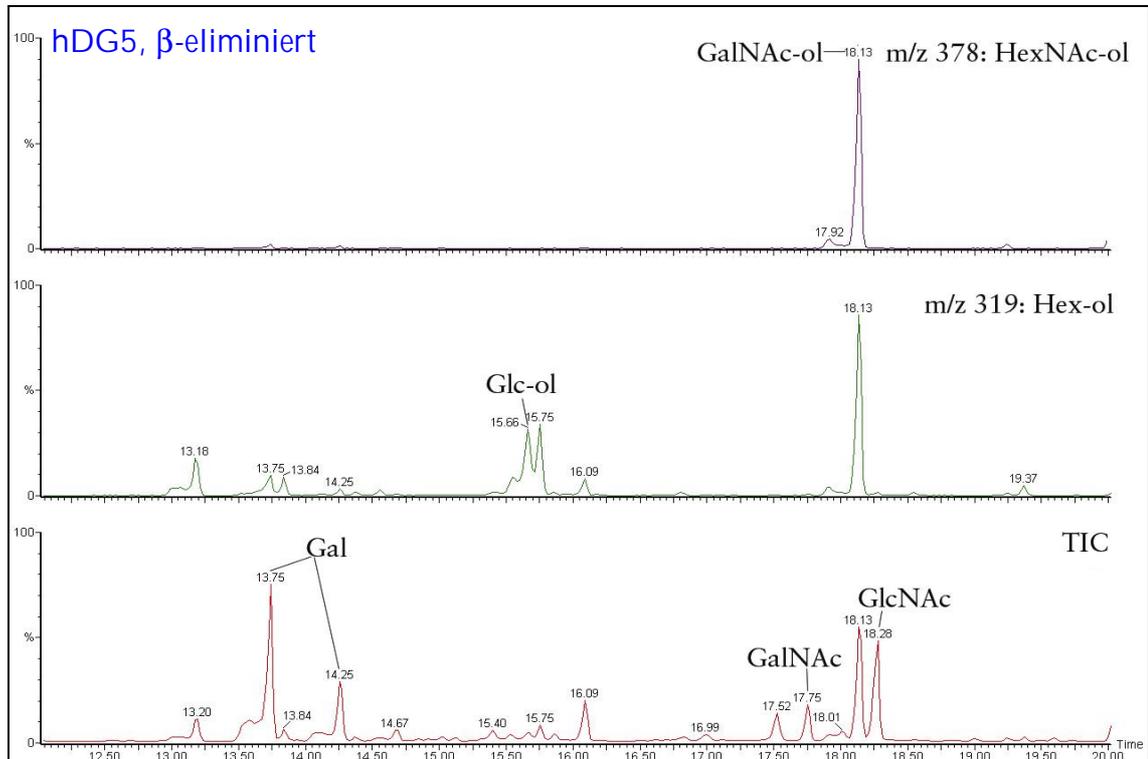


Abb. 114:
Chromatogramm der Monosaccharide des Proteins hDG5 nach β -Eliminierung.

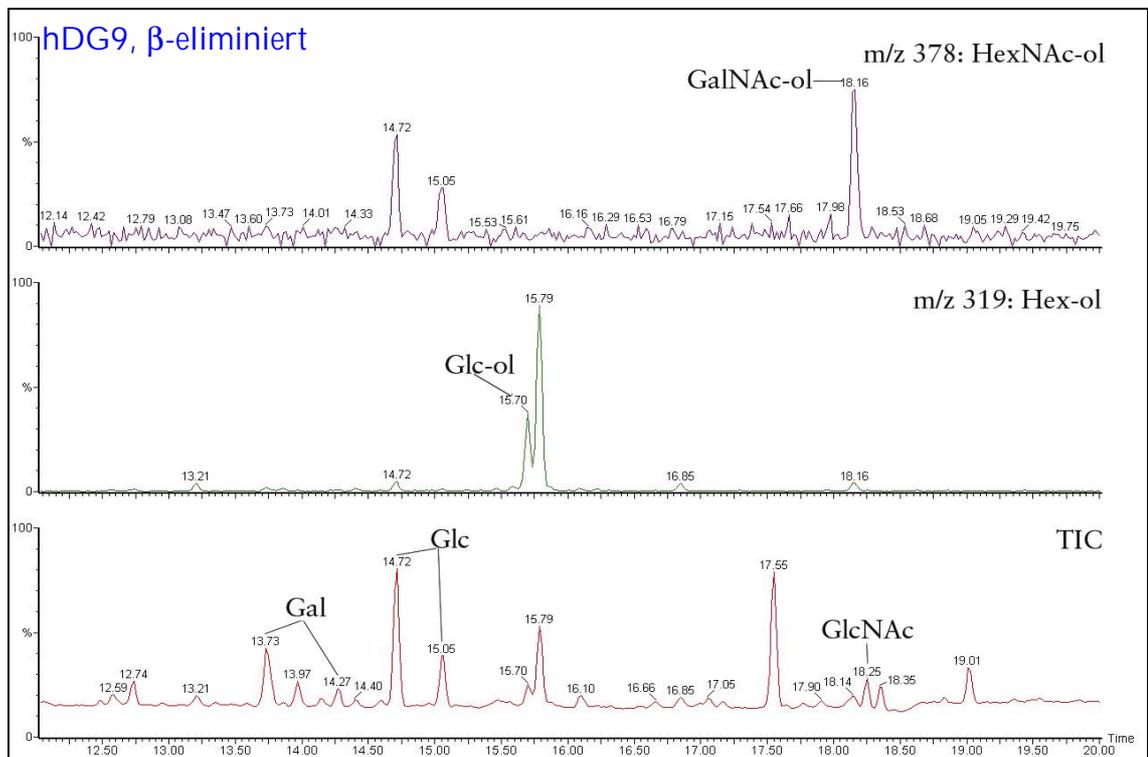


Abb. 115:
Chromatogramm der Monosaccharide des Proteins hDG9 nach β -Eliminierung.

6.5 ESI-Spektren

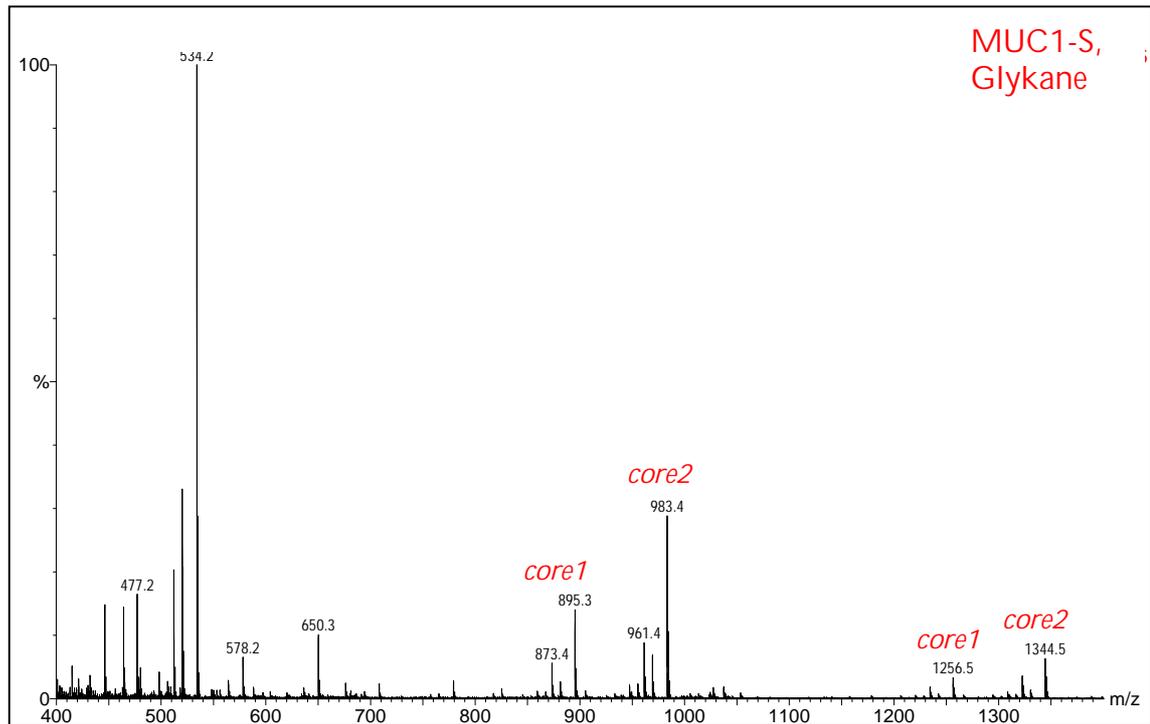


Abb. 116:

ESI-Spektrum der Muzintyp Glykane des MUC1-S. Das Spektrum wurde als Referenz für die Glykosylierungs sonden verwendet. Identifizierbar sind die typischen Ionen der core1 (m/z 512, 534, 873, 895, 1234 und 1256) und core2 (m/z 961, 983, 1322 und 1344) Strukturen.

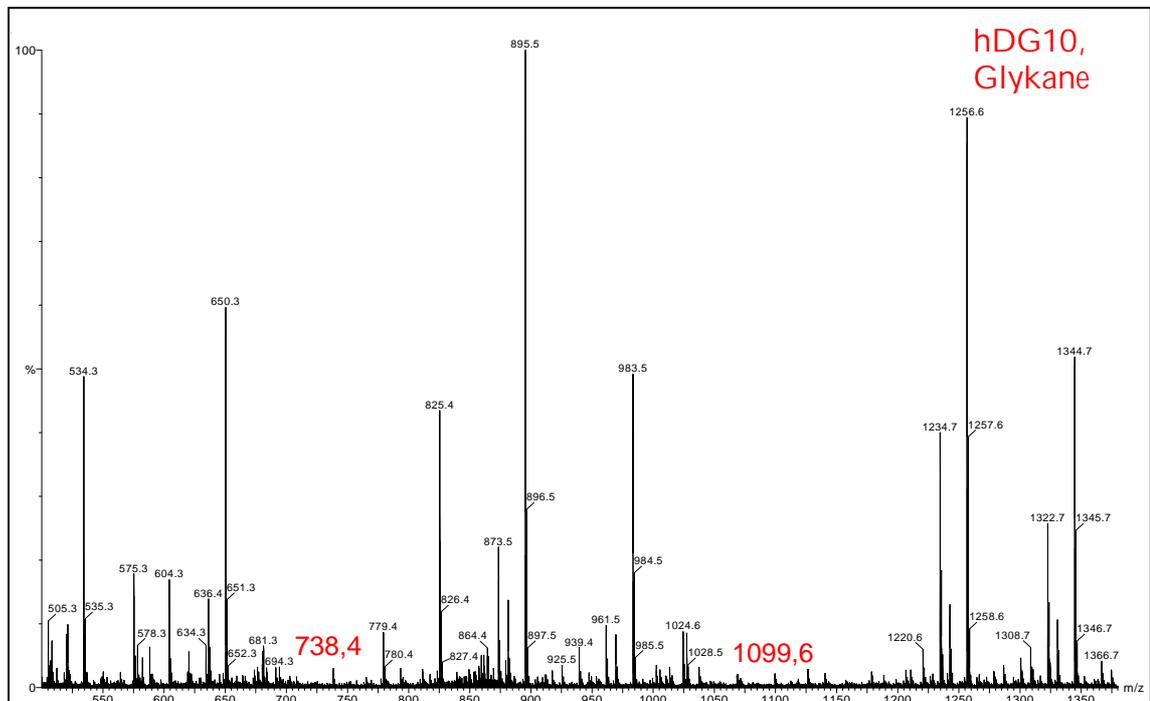


Abb. 117:

ESI-MS-Spektrum der methylierten Glykane des Proteins hDG10. Die dominanten Signale sind auf Ionen von Muzintyp-Glykanen zurückzuführen. Das Molekülion des O-Mannose-Tetrasaccharids ($M+Na^+$: m/z 1099) sowie dessen desialylierte Form ($M+Na^+$: m/z 738) sind rot hervorgehoben.

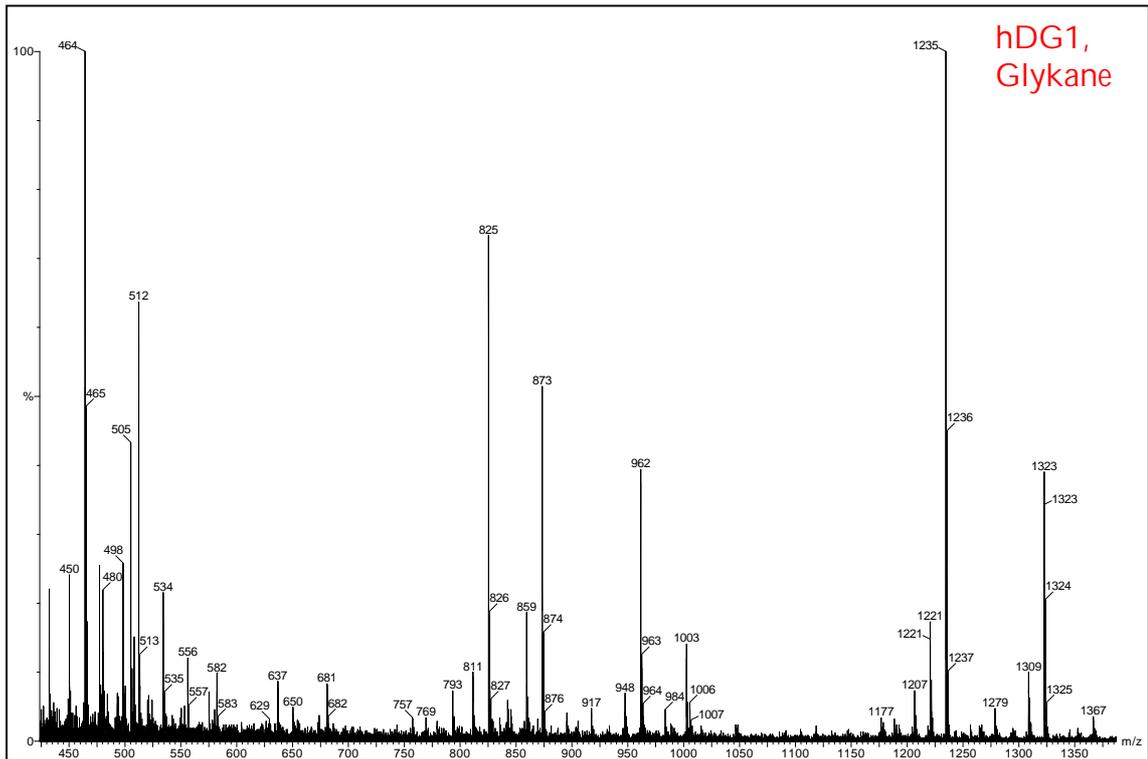


Abb. 118:

ESI-MS-Spektrum der methylierten Glykane des Proteins hDG1. Es waren keine Massen zu erkennen, welche dem Molekölion des Tetrasaccharids entsprechen, aber die Fragmentierungen der MS/MS-Spektren bei den entsprechenden Massen wiesen auf ein Vorkommen dieser Strukturen hin.

6.6 GC/MS-Chromatogramme partiell methylierter Alditol-Acetate

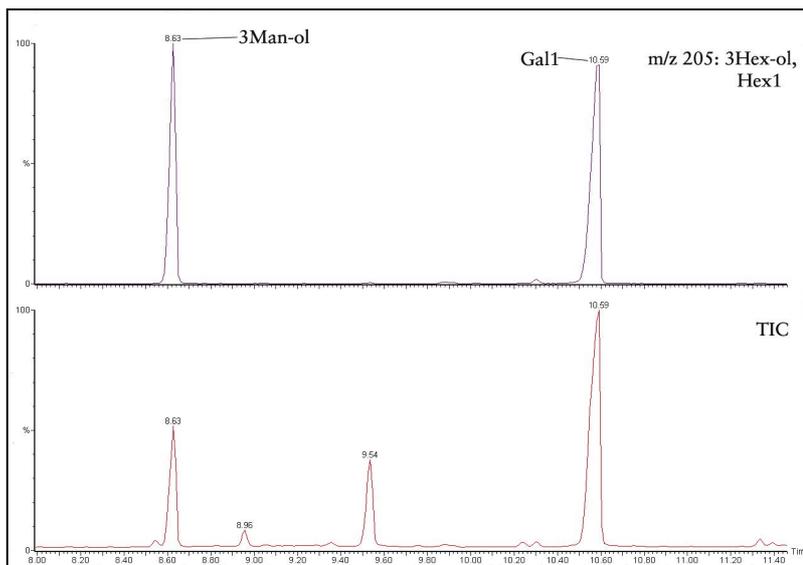


Abb. 119:

GC/MS-Chromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate des Disaccharids Gal1-3Man.

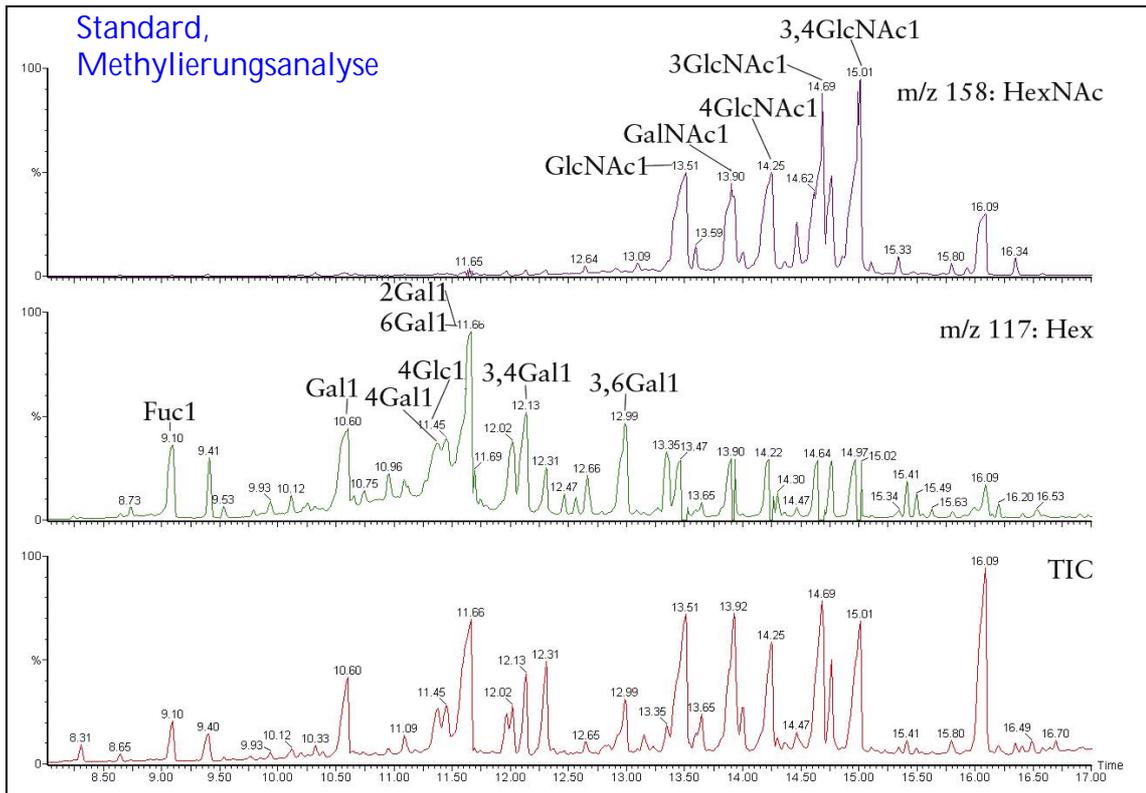


Abb. 120:
GC/MS-Chromatogramm eines Standardgemisches partiell methylierter Alditolacetate (BioCarb).

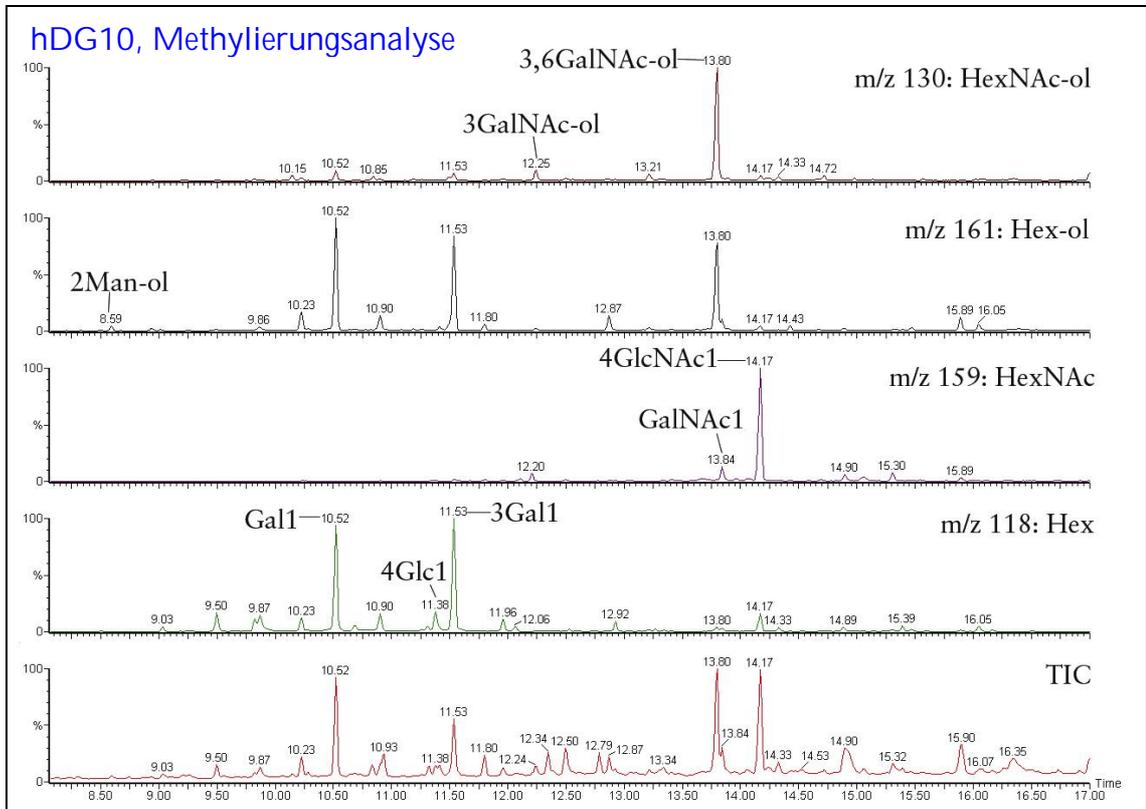


Abb. 121:
GC/MS Chromatogramm der partiell methylierten Alditolacetate der Sonde hDG10. Identifizierbar waren Monosaccharide von Glykanen des Muzintyps und des O-Mannose Tetrasaccharids.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-AB	<u>2</u> - <u>A</u> minobenzamid
Abb.	Abbildung
BSA	<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumine/ Rinderserumalbumin
bp	<u>B</u> asenpaare
CID	<u>c</u> ollision <u>i</u> nduced <u>d</u> ecomposition/ stoßinduzierte Fragmentierung
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
dDG	<u>D</u> rosophila <u>D</u> ystroglykan
DMEM	<u>D</u> ulbeccos <u>m</u> inimal <u>e</u> ssential <u>M</u> edium
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	<u>D</u> esoxyribonucleic <u>a</u> cid/ Desoxyribonukleinsäure
Dol-P-Man	<u>D</u> olicholphosphat- <u>M</u> annose
dPOMT	<i>Drosophila melanogaster</i> <u>P</u> rotein- <u>O</u> - <u>M</u> annosyl <u>t</u> ransferase
<i>E.Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	<u>E</u> thylendiamin- <u>t</u> etraacetat
ER	<u>E</u> ndoplasmatisches <u>R</u> etikulum
ESI	<u>E</u> lektronspray- <u>I</u> onisierung
ETD	<u>E</u> lektronentransfer <u>D</u> issoziation
FCMD	<u>F</u> ukuyama <u>c</u> ongenital <u>m</u> uscular <u>d</u> ystrophy/ Fukuyama kongenitale Muskeldystrophie
FKS	<u>F</u> ötales <u>K</u> älberserum
FPLC	<u>f</u> ast <u>p</u> rotein <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography
GC	<u>G</u> aschromatographie
GDP	<u>G</u> uanosindiphosphat
GTP	<u>G</u> uanosintriphosphat
hDG	<u>h</u> umanes α - <u>D</u> ystroglykan
Hex	Hexose
HexA	Uronsäure
HexNAc	N-Acetylhexosamin
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> ressure <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography/ Hochdruckflüssigkeitschromatographie

IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
kDa	<u>K</u> ilo <u>d</u> alton (1000 g/mol)
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
MEB	<u>M</u> uscle- <u>E</u> ye- <u>B</u> rain- <u>D</u> esease
min.	Minute
MS	<u>M</u> assenspektrometrie
MS/MS	tandem-Massenspektrometrie
MSTFA	N- <u>M</u> ethyl-N-trimethylsilyl- <u>t</u> rifluor <u>a</u> cetamid
MUC1-S	sezerniertes MUC1
M _w	<u>M</u> olecular <u>w</u> eight/ Molekulargewicht
MW	<u>M</u> olekulargewichtstandard
NeuAc	N- <u>A</u> cetylneuraminsäure
NTA	<u>N</u> itrilo <u>a</u> cetic acid/ Nitrioltriessigsäure
PAGE	<u>P</u> olyacrylamid- <u>G</u> eleelektrophorese
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 / Polymerasekettenreaktion
PNGaseF	<u>P</u> eptid- <u>N</u> - <u>G</u> lykosidase <u>F</u>
pl	<u>I</u> soelektrischer <u>P</u> unkt
pmt	<u>P</u> rotein- <u>O</u> - <u>M</u> annosyltransferase (aus Hefe)
POMGnT1	<u>P</u> rotein- <u>O</u> - <u>M</u> annose- <u>G</u> lc <u>N</u> Ac- <u>T</u> ransferase1
POMT	<u>P</u> rotein- <u>O</u> - <u>M</u> annosyltransferase (aus Säugern)
ppGalNAc-T	Protein-GalNAc-Transferase
rt	<i>rotated abdomen</i>
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<u>S</u> accharomyces <u>c</u> erevisiae
SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecylsulfat/Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA-Puffer
TBS	<u>T</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline/ Tris-gepufferte NaCl-Lösung
TFA	<u>T</u> ri <u>f</u> luoro <u>a</u> cetic acid/ Trifluoressigsäure
TFMSA	<u>T</u> ri <u>f</u> luor <u>m</u> ethansulfonic <u>a</u> cid/ Trifluormethansulfonsäure
TIC	<u>t</u> otal <u>i</u> on <u>c</u> urrent/ Gesamtionenstrom
TMS	<u>T</u> ri <u>m</u> ethylsilyl

TOF	<u>T</u> ime-of- <u>f</u> light/ Flugzeit
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>tw</i>	<i>twisted</i>
UDP	<u>U</u> ridin <u>d</u> iphosphat
UTP	<u>U</u> ridin <u>t</u> riphospaht
UV	<u>U</u> ltraviolett
VNTR	<u>v</u> ariable <u>n</u> umber of <u>t</u> andem <u>r</u> epeats/ variable Anzahl von Tandemrepeats
v/v	<u>V</u> olumen pro <u>V</u> olumen
w/v	<u>w</u> eight per <u>v</u> olume/ Gewicht pro Volumen
wt	<u>W</u> ildtyp
WWS	<u>W</u> alker- <u>W</u> arburg- <u>S</u> yndrom,
ZMMK	<u>Z</u> entrum für <u>m</u> olekulare <u>M</u> edizin <u>K</u> öln

Monosaccharidabkürzungen und -symbole

L-Fukose	Fuc	
D-Glukose	Glc	
D-Galaktose	Gal	
D-Mannose	Man	
D-N-Acetylglukosamin	GlcNAc	
D-N-Acetylgalaktosamin	GalNAc	
Sialinsäure (allgemein)	Sia	
D-Glukuronsäure	GlcA	

Internationaler Aminosäurecode

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

Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Hanisch für das interessante Thema meiner Dissertation, die ausgezeichnete Betreuung und die guten Arbeitsbedingungen.

Für die Übernahme des Corefarats danke ich Prof. Dr. Berkessel.

Prof. Dr. Strey danke ich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Insbesondere danke ich Dr. Tilo Schwientek für die hochinteressanten Diskussionen, die fachlichen Anregungen, die gute Zusammenarbeit und die geduldige Beantwortung meiner vielen Fragen.

Vielen Dank auch an Dr. Stefan Müller für viele äußerst hilfreiche Ratschläge und ESI-Spektren.

Den übrigen Mitarbeitern des Servicelabors, Ursula, Julia und Petra, danke ich für die vielen Sequenzierungen und ihre stete Hilfsbereitschaft.

Für die ESI-MS-Spektren der Glykopeptide danke ich Dr. Marcus Macht.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Biochemie II, insbesondere den Mitgliedern der AG Hanisch, für das gute Teamwork und die vielen netten Stunden.

Sebastian Teitz und Kirsten Ottenberg danke ich für ihre Freundschaft und die vielen netten Stunden auch außerhalb des Labors. Mirko von Elstermann danke ich dafür, dass er meinen Computer mehrfach davor bewahrt hat, aus dem Fenster geworfen zu werden. Tanja Nincovic danke ich für die gute Zusammenarbeit und die vielen netten Stunden.

Meinen Eltern danke ich dafür, dass sie mir das Chemiestudium ermöglicht haben und dass ich mich jederzeit und in jeglicher Hinsicht auf ihre Hilfe verlassen konnte.

Und vor allem: Vielen, vielen Dank an Arndt für Deine Geduld und Unterstützung!

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 vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Franz-Georg Hanisch betreut worden.

Köln, den 14. November 2006

(Isabelle Breloy)

Breloy, I.; Schwientek, T.; Hanisch, F.-G. (2005)

Target Sequences for the human O-Mannosyltransferases (POMT1/POMT2) in the mucin-like domain of α -dystroglycan

Poster; 16th Joint Meeting of the Glycobiology Society, Hannover, Germany

Breloy, I.; Schwientek, T.; Hanisch, F.-G. (2006)

Mammalian O-mannosylation is sequon-independent and cis-controlled by an upstream trigger-sequence

Poster; 17th Joint Meeting of the Glycobiology Society, Brugge, Belgium

LEBENS LAUF

Isabelle Florence Breloy

Persönliche Angaben

Geburtsdatum	23. Oktober 1977
Staatsangehörigkeit	deutsch/französisch
Geburtsort	Düsseldorf
Familienstand	ledig

Schulbildung

ú St. Hubertus Grundschule Neuss	08/1984 – 07/1988
ú Nelly-Sachs-Gymnasium Neuss	09/1988 - 06/1997

Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife

Wissenschaftlicher Werdegang

ú Studium der Chemie (Diplom) mit Spezialisierung in Biochemie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	WS 97/98 - WS 02/03
ú studentische Hilfskraft am Institut für Biochemie	10/2001 – 12/2003
ú Diplomarbeit am Institut für Biochemie	10/2002 – 03/2003

Thema der Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. Weiss: **Isolation und Versuche zur Kristallisation des Atmungsketten-Komplex I aus *Neurospora*.**

Erwerb des Diploms

ú Studium der Chemie (Promotion) Universität zu Köln	SS 03 - SS 06
ú wissenschaftl. Mitarbeiter am Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät	05/2003 – 10/2006
ú Promotion am Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät	05/2003 – 02/2007

Thema der Promotion bei Prof. Dr. F.-G. Hanisch: **Studien zur Initiation der O-Mannosylierung in Dystroglykan**