

# **Die Rolle der Rezyklisierung in der O-Glykosylierung des transmembranären Glykoproteins MUC1**

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



vorgelegt von  
Hanieh Razawi  
geboren am 10.06.1982  
in Teheran (Iran)

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. F.-G. Hanisch zwischen Mai 2006 und Juni 2009 im Institut für Biochemie II der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln angefertigt.



Betreuung der Arbeit und Erstellung des Erstgutachtens:

Prof. Dr. rer. nat. Franz-Georg Hanisch

Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Erstellung des Zweitgutachtens:

Prof. Dr. rer. nat. Siegfried Roth

Institut für Entwicklungsbiologie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln

Prüfungsvorsitz:

Prof. Dr. rer. nat. Ute Höcker

Institut für Botanik der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln

Schriefführer:

Prof. Dr. Ludwig Eichinger

Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Tag der Prüfung: 08.07.2013



## Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. F.-G. Hanisch für die freundliche und lehrreiche Betreuung dieser Doktorarbeit, die fachliche Anregung und seine ständige Diskussionsbereitschaft

Ebenfalls möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie I und II danken, die mir die Durchführung der wissenschaftlichen Arbeit ermöglichten und mir fachlich zur Seite standen.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des ZMMK Servicelabors für ihre Hilfsbereitschaft und bei meinem Kollegen Simon Staubach für die engagierte Zusammenarbeit.



*Wege entstehen dadurch, dass man sie geht.“*

*Franz Kafka*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>XIV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>XVI</b>
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>17</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>22</b>
2.1 Kohlenhydrate	22
2.2 Glykoproteine	24
2.3. Mucine	25
2.3.1 <i>Struktur und Funktionen der Mucine</i>	26
2.3.2 <i>Einteilung der Mucine</i>	28
2.3.3 <i>N-Glykane</i>	31
2.3.3.1 <i>Die Biosynthese der N-Glykane</i>	32
2.3.4 <i>O-Glykane</i>	35
2.3.4.1 <i>Die Biosynthese der O-Glykane</i>	36
2.4 MUC1	40
2.4.1 <i>MUC1 auf DNA-Ebene</i>	41
2.4.2 <i>MUC1 auf Proteinebene</i>	42
2.4.3 <i>O-Glykanprofile des MUC1</i>	44
2.4.4 <i>Biosynthese des MUC1</i>	45
2.4.5 <i>Biologische Funktionen des MUC1</i>	46
2.4.6 <i>Biologische Funktionen des MUC1 in Krebszellen</i>	48
2.4.7 <i>MUC1 und seine Interaktionsspartner</i>	50
2.5 Zelluläre Aufnahme – Endozytose und Endozytosewege	52
2.5.1 <i>Clathrin-vermittelte Endozytose</i>	53
2.5.2 <i>Lipid Raft-assoziierte Endozytose</i>	55
2.5.2.1 <i>Struktur von Lipid Rafts</i>	55
2.5.2.2 <i>Raft-assoziierte Markerproteine</i>	57
2.5.2.3 <i>Caveolin-unabhängige Endozytose</i>	57
2.5.2.3.1 <i>Exosomaler Transportweg über multivesikuläre Körper</i>	57

2.5.2.4 <i>Caveolin-abhängige Endozytose</i>	59
2.5.3 <i>Lipid Raft-unabhängige Endozytose</i>	59
2.6 Einfluss der O-Glykosylierung auf die Glykoprotein-Sortierung	61
2.6.1 <i>Einfluss der O-Glykosylierung auf die         MUC1-Sortierung für den apikalen Transport</i>	63
2.7 Zielstellung der Promotionsarbeit	64
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>66</b>
3.1. Firmenauflistung	66
3.2. Verwendete Antikörper	67
3.3. Kits	69
3.4. Verwendete Medien und Puffer	69
3.4.1 <i>Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	69
3.4.2. <i>Für E.coli</i>	69
3.4.3 <i>Sonstiges</i>	70
3.5 Protein-Marker	70
3.6. Kultivierung humaner Zelllinien	71
3.6.1. <i>Herkunft der Zellen und Kultivierungsbedingungen</i>	71
3.6.2 <i>Langzeitlagerung von Zellen</i>	72
3.6.3 <i>Auftauen</i>	72
3.6.4 <i>Transfektion und Selektion transfizierter Zellen</i>	72
3.6.5 <i>Bestimmung der Zellzahl</i>	73
3.6.6 <i>Isolierung der Exosomen aus dem Zellüberstand</i>	74
3.6.7 <i>Herstellung der Zelllysate aus den transfizierten             HEK-293 und MCF-7 Zellen</i>	74
3.7. Immunzytochemische Methoden	76
3.7.1 <i>Immunfluoreszenzfärbung von Zellen</i>	76
3.7.1.1 <i>Aufnahmen am konfokalen                     Laser-Scanning-Mikroskop                     (True Confocal Scanner Leica TCS SL, Leica)</i>	79
3.7.1.2 <i>Bildbearbeitung der                     mikroskopischen Aufnahmen</i>	80
3.7.2 <i>Oberflächen – Biotinylierung             der transfizierten MCF-7 Zellen</i>	81

3.8. Molekularbiologische Methoden	84
3.8.1 <i>Arbeiten mit Escherichia coli</i>	84
3.8.1.1 <i>Stamm</i>	84
3.8.2 <i>Klonierung und Transformation</i>	84
3.8.3 <i>Plasmid-Isolierung aus Bakterien</i>	85
3.8.4 <i>Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA</i>	85
3.8.5 <i>Generierung und Klonierung von transmembranären MUC1-Konstrukten</i>	86
3.9. Proteinbiochemische Methoden	90
3.9.1 <i>Bradford Test</i>	90
3.9.2 <i>SDS-PAGE nach Laemmli</i>	91
3.9.2.1 <i>Silberfärbung</i>	92
3.9.2.2 <i>Coomassiefärbung</i>	93
3.9.3 <i>Immunoblotting</i>	93
3.9.4 <i>Zuckernachweis in Glykokonjugaten</i>	95
3.9.5 <i>Isolierung und Aufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine</i>	95
3.9.5.1 <i>Isolierung abgeschilfterer rekombinant exprimierter Proteine aus Zellkulturüberstand</i>	95
3.9.5.2 <i>Reinigung der Konstrukte über Ni-NTA-Säulen (Nickelchelate-Affinitätschromatographie)</i>	96
3.9.5.3 <i>Aufreinigung der membran-abgeschilfteren MUC1-Konstrukte mittels Umkehrphasen-HPLC</i>	97
3.9.5.4 <i>Proteinisolierung aus dem SDS-Polyacrylamidgel Nach tryptischem Verdau</i>	98
3.10. Methoden zur Glykanprofilierung	100
3.10.1 <i>Enzymatische Freisetzung N-gebundener Glykane mit Endoglykosidase Peptid N-Glycosidase F</i>	100
3.10.2 <i>Enzymatische Freisetzung N-gebundener Glykane mit Endoglykosidase H</i>	101
3.10.3 <i>Einsatz von ER-Glykosidase-Inhibitor Deoxynojirimycin zur Blockierung des Prozessierungsweges von mannosereichen zu komplexen N-Glykanen</i>	101
3.10.4 <i>Reduktive <math>\beta</math>-Eliminierung O-gebundener Oligosaccharide</i>	103

3.10.5	<i>Permethylierung von Glykan-Alditen</i>	104
3.10.6	<i>Erstellung des Glykanprofils der membranären MUC1-Konstrukte mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight-MS)</i>	106
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse- Teil I (O-Glykosylierungsprofil der MUC1-Sonden)</b>	<b>108</b>
4.1	Klonierung, DNA-Quantifizierung und Reinheitsprüfung	108
4.2	Rekombinante Expression transmembranärer MUC1-Konstrukte in HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231	108
4.2.1	<i>Generierung und Klonierung der MUC1-Konstrukte in den Expressionsvektor</i>	109
4.2.2	<i>Membranäre Expression der MUC1-M Fusionsproteine</i>	110
4.3	Biochemische Charakterisierung der MUC1-Konstrukte	112
4.3.1	<i>Quantitative Bestimmung der abgeschilferten bzw. zellulären MUC1-M-Fusionsproteine</i>	112
4.3.2	<i>Isolierung der Exosomen aus Zellüberstand</i>	114
4.3.3	<i>Isolierung der Fusionsproteine aus Zellkulturüberstand</i>	115
4.3.4	<i>Aufreinigung der Fusionsproteine durch Umkehrphasen-HPLC</i>	117
4.3.4.1	<i>Bestimmung der apparenten Massen und der Reinheit der MUC1-Sonden durch Gelelektrophorese</i>	119
4.3.4.2	<i>Charakterisierung des O-Glykanprofils der membranären MUC1-Fusionsproteine</i>	120
4.3.4.3	<i>MALDI-TOF-MS-Analyse der Oligosaccharidaldite von MUC1-Sonden</i>	122

<b>5. Ergebnisse- Teil II (Studien zur Re-Internalisierung von MUC1-Sonden über verschiedene Endozytosewege mittels konfokaler <i>Laser-Scanning-Mikroskopie</i>)</b>	<b>128</b>
5.1. Überprüfung der Typ1-transmembranären Expression der MUC1-M-Konstrukte	128
5.2 Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisierung der MUC1-M-Sonden in transfizierten Zellen	129
5.3 Untersuchungen des Endozytoseverhaltens und der Fähigkeit zur Plasmamembran-Rezyklisierung der <i>MUC1-M-Konstrukte</i>	130
5.3.1 <i>Reinternalisierung und Resialinierung des Transmembranären MUC1 zwecks vollständiger Reifung der Glykoformen</i>	130
5.4 Rezyklisierung und Endozytose der MUC1-Sonden über Transportvesikel	132
5.4.1 <i>Clathrin-vermittelte Endozytose der MUC1-Sonden</i>	132
5.4.2 <i>Lipid Raft-assoziierte Endozytose</i>	134
5.4.2.1 <i>Caveolae-vermittelte Endozytose</i>	134
5.4.2.2 <i>Lipid-Raft-assoziierte, Caveolin-unabhängig-vermittelte Endozytose</i>	137
5.4.3 <i>Lipid Raft-unabhängige Endozytose</i>	139
5.5 Validierung alternativer Endozytosewege des MUC1 durch Verwendung spezifischer Endozytoseinhibitoren	141
5.5.1. <i>Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose</i>	141
5.5.2 <i>PP2 als Src-Kinase-Inhibitor der Caveolae-abhängig vermittelten Endozytose</i>	142
5.5.3 <i>Untersuchung der MUC1-Internalisierung mittels Konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie unter Einfluss spezifischer Endozytoseinhibitoren</i>	143
5.5.4 <i>Untersuchung zur Rezyklisierung der MUC1-M über das Endoplasmatische Retikulum</i>	146

5.5.5 <i>Recycling-Assay mittels reversibler Oberflächen–Biotinylierung</i>	148
5.5.6 <i>Analyse der N-Glykosylierung von Asn36 innerhalb der kleinen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne des MUC1</i>	150
<b>6. DISKUSSION</b>	<b>155</b>
6.1 Identifizierung und Integritätsbestimmung der MUC1- M Fusionsproteine	156
6.1.1 <i>Quantitative Bestimmung der abgeschilferten bzw. zellulären MUC1-M-Fusionsproteine</i>	157
6.2 Charakterisierung der O-Glykanstrukturen auf membranständigen MUC1-Fusionsproteinen	158
6.3 Untersuchung der N-Glykosylierung innerhalb der kleinen C-Terminalen zytoplasmatischen Domäne von MUC1-M	162
6.3.1 <i>Untersuchung der N-Glykosylierung in MUC1-M Transfizierten HEK-293 Zellen unter Einsatz von Endozytosemodulatoren</i>	164
6.3.2 <i>Die Rolle der N-Glykosylierung bei Qualitätskontrolle und Sortierung von apikalen Membranproteinen</i>	165
6.4 Untersuchungen zur MUC1-Endozytose und der Fähigkeit zur Plasmamembran-Rezyklisierung mittels konfokaler <i>Laser-Scanning</i> -Mikroskopie	167
6.4.1 <i>Endozytose und Rezyklisierung der MUC1-Sonden über alternative Transportwege in Kolokalisationsstudien unter Berücksichtigung der bereits publizierten experimentellen Daten</i>	169
6.4.2 <i>Verwendung spezifischer Endozytoseinhibitoren zur Klärung der Re-Internalisierungswege von MUC1-Sonden</i>	171

6.4.2.1 Einfluss hemmender Effekte der spezifischen Endozytoseinhibitoren auf MUC1-Internalisierung	172
6.4.3 MUC1-Endozytose in semi-quantitativer Westernblotanalyse	173
6.5 Wiedereintritt rezyklisierender MUC1-M-Sonde innerhalb Des sekretorischen Transportweges	174
6.6 Transportwege des MUC1	175
6.7 Ausblick auf Rezyklisierungsstudien durch Radio-Pulsmarkierung und Immunpräzipitation	176
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>CLXXVII</b>
<b>Abstract</b>	<b>CCVII</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>CCIX</b>
<b>Erklärung</b>	<b>CCX</b>



# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
°C	Grad Celsius
Abbildung	Abbildung
ACN	Acetonitril
a.i.	average intensity (durchschnittliche Signal-Intensität)
ApN	Aminopeptidase N
AP	Adapter Protein
APS	Ammoniumperoxydisulfat
BM-40	Basalmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 40 kDa
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
core	Kern (-struktur)
ddH <sub>2</sub> O/dH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser/ deionisiertes Wasser
d.h.	das heißt
DPP IV	Dipeptidyl-Peptidase IV
DMEM	Dulbecco's minimum essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid 5'-triphosphat
DRM	Detergenz-resistenten Membrandomänen
E	Extinktion
ECM	Extracellular Matrix Protein
E.coli	Escherichia coli
EBNA	Ebstein-Barr-Virus nukleäres Antigen
ECL	enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)
ect.	et cetera
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK2	Extracellular regulated kinase 2
FKS	Fötale Kälber Serum
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Azetylgalaktosamin
GlcNAc	N-Azetylglukosamin
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
his <sub>6</sub>	sechs aufeinanderfolgende Histidinreste
HRP	horseradish-peroxidase (Meerrettichperoxidase)
i.d.R.	in der Regel
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
m/z	Masse pro Ladung
M $\beta$ CD	Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin
mAk	monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Massenspektrometrie

MAP	mitogen-activated protein
MDCK	Madin Darby canine kidney
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
mRNA	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
MVB	multivesicular bodies
MVRA	minisatellite variant repeat analyses (Minisatelliten variante Repeat-Analyse)
Myc	Myelocytomatose
NeuAc	Neuraminsäure
n.i.	nicht identifiziert
Ni-NTA	Ni <sup>2+</sup> -nitrilotriacetic acid (Metall-Affinitätschromatografie Matrix)
NT	Nukleotid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PSD	post-source-decay
RT	Raumtemperatur
r.i.	relative intensity (relative Signal-Intensität)
sec	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	Sucrase-Isomaltase
Sos	Son of sevenless
Ta	Anlagerungs-Temperatur
Tabelle	Tabelle
TBE	Tris Borsäure-Na <sub>2</sub> EDTA
TBS	Tris-gepufferte Saline
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N'',N'- Tetramethyl-ethylendiamin
TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
TR	Tandem Repeat(s)
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
U	Unit (Einheit)
Rpm	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	ultraviolettes Licht
ü.N.	über Nacht
v	Volumen
VNTR	variable number of tandem repeats (variable Anzahl an Tandemrepeats)
vs.	versus
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
ZMMK	Zentrum Molekulare Medizin Köln

## Aminosäure-Kode

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

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der <i>Core</i> -Strukturen der N-Glykoproteine	31
Abbildung 2: Die Biosynthese der N-Glykane im ER	33
Abbildung 3: Die <i>Core</i> -Strukturen der O-Glykane von Mucinen	35
Abbildung 4: Strukturelle Elemente der O-Glykosylierung	37
Abbildung 5: Biosynthese der <i>core</i> -Strukturen	38
Abbildung 6: VNTR-Region mit 20-120 Wiederholungen	42
Abbildung 7: Bindemotive des C-terminus des MUC1	50
Abbildung 8: Wege der Endozytose	53
Abbildung 9: Clathrin- bzw. Caveolin-abhängige Endozytose	54
Abbildung 10: Schematische Darstellung von <i>Lipid Rafts</i>	55
Abbildung 11: <i>Lipid Raft</i> -abhängige Vesikelformation	56
Abbildung 12: Caveolin-unabhängige Endozytose	58
Abbildung 13: <i>Lipid Raft</i> -unabhängige Vesikelformation	60
Abbildung 14: Proteinstandard mit Angabe des Molekulargewichtes	70
Abbildung 15: Fluoreszenzinformation der optischen Schnitte	79
Abbildung 16: pCEP4 Plasmidkarte	86
Abbildung 17: Ausschnitt der MUC1-M des pCEP-PU-Vektors	87
Abbildung 18: Rezyklisierung und „ <i>Shedding</i> “ von MUC1-M	88
Abbildung 19: Generierung der mutierten MUC1-M Konstrukte	89
Abbildung 20: Endozytoseverhalten der MUC1-M Konstrukte	90
Abbildung 21: Interaktionen zwischen His-Tag und Ni-NTA Matrix	96
Abbildung 22: Deoxynojirimycin inhibiert die Glukosidase I, II	102
Abbildung 23: Mikroreaktionsglas	103
Abbildung 24: Strategien zur Reinigung der MUC1-Fusionsproteine	105
Abbildung 25: Zeichnung eines MALDI-TOF-Massenspektrometers	106
Abbildung 26: Darstellung der membranären MUC1-Fusionsproteine	109
Abbildung 27: Nachweis der Raft-assoziierten Markerproteine	111
Abbildung 28: Nachweis rekombinant exprimierter MUC1-Proteine	111
Abbildung 29: lösliche und zelluläre MUC1-Sonden	113
Abbildung 30: Nachweis der MUC1-Fusionsproteine aus Exosomen	114
Abbildung 31: Dot-Blot der MUC1-haltigen Fraktionen	116

Abbildung 32: Aufreinigung von MUC1-Sonden mittels HPLC	117
Abbildung 33: Nachweis der MUC1-Proteine aus Zellkulturüberstand	118
Abbildung 34: Nachweis von Kohlenhydratstrukturen	119
Abbildung 35: Coomassie-gefärbte MUC1-Sonden	120
Abbildung 36: O-Glykanprofilierung der MUC1-Fusionsproteine	122
Abbildung 37: Anteile der <i>core</i> -Strukturen in MUC1-Sonden	126
Abbildung 38: Immunfluoreszenz-Färbung der MUC1-Sonden	128
Abbildung 39: Immunfluoreszenz-Färbung der MUC1-Sonden	129
Abbildung 40: Immunfluoreszenz-Färbung der MUC1-Sonden	131
Abbildung 41: Kolokalisationsstudien MUC1-Sonden und Clathrin	133
Abbildung 42: Kolokalisationsstudien MUC1-Sonden und Caveolin-1	135
Abbildung 43: Kolokalisationsstudien MUC1-Sonden und Flotillin-2	138
Abbildung 44: Kolokalisationsstudien MUC1-Sonden und Galektin-3	140
Abbildung 45: Strukturformel von Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin	141
Abbildung 46: Die chemische Strukturformel von PP2	142
Abbildung 47: Inkubation der MUC1-Sonden mit Sucrose und M $\beta$ CD	143
Abbildung 48: Inkubation der MUC1-Sonden mit PP2 und M $\beta$ CD	144
Abbildung 49: Kolokalisationsstudien von MUC1-M und PDI	146
Abbildung 50: <i>Recycling-Assay</i> in MUC1-M exprimierender MCF-7	148
Abbildung 51: Charakterisierung der N-Glykoformen	151
Abbildung 52: Rezyklisierung und exosomale Abgabe von MUC1-M	156
Abbildung 53: O-Glykopprofilierungen der MUC1-M-Konstrukte	160
Abbildung 54: fünf Bindungsstellen des MUC1 für N-Glykane	162

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über derzeit identifizierte Mucine	29
Tabelle 2: Firmenauflistung	66
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Antikörper	68
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Endozytose-Inhibitoren	77
Tabelle 5: Zusammensetzung von SDS-PAGE	92
Tabelle 6a: O-Glykanprofil der HEK-293 Zellen	123
Tabelle 6b: O-Glykanprofil der MCF-7 Zellen	124
Tabelle 6c: O-Glykanprofil MDA-MB-231 Zellen	125

# 1. ZUSAMMENFASSUNG

Das humane MUC1-Mucin repräsentiert ein Glykoprotein, welches von den meisten epithelialen Zellen sowie einigen Lymphozyten-Spezies exprimiert wird. In vielen Karzinomgeweben kommt es zur Überexpression von MUC1, wobei das tumor-assoziierte Mucin gleichzeitig durch ein stark verändertes Glykosylierungsprofil charakterisiert wird. Diese Eigenschaften machen MUC1 zu einem wichtigen diagnostischen Tumorantigen und einer vielversprechenden Tumorstoffe bei der Therapie von Krebserkrankungen.

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

Bisher konnte gezeigt werden, dass das O-Glykanprofil von MUC1 in Muttermilch durch *core2*-basierende, lineare oder verzweigte Polylactosaminylketten dominiert wird, welche mit bis zu drei Fucoseresten substituiert sind (Hanisch et al., 1989). Mono- und disialylierte Strukturen sind ebenfalls vorhanden, sie machen aber nur 25 % der Glykane aus (Hanisch et al., 1990).

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

Zur Untersuchung der Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen zellulärem Trafficking und der O-Glykosylierung gibt, wurden neben dem als Referenzprotein geltenden Fusionsprotein MUC1-M zwei weitere, vom MUC1-M abgeleitete mutierte Sonden eingesetzt, wobei MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N eine stark reduzierte Endozytose über Clathrin-Vesikel und MUC1-M-CQC/AQA eine eingeschränkte Rezyklisierung durch das TGN bzw. Golgi-Kompartimente zur Plasmamembran und eine entsprechend Akkumulation in Endosomen aufwies. Die drei Konstrukte wurden jeweils rekombinant in der embryonalen Nierenzelllinie HEK-293, den Brustkarzinom-Zelllinien MCF-7 und MDA-MB-231 exprimiert.

Im Immunoblot erfolgte der Nachweis löslichen MUC1-M Fusionsproteins, das durch *Shedding* in den Kulturüberstand abgegeben und über seine

Peptidmarkierungen (Oligo-His und Myc) aufgereinigt bzw. detektiert werden konnte. Während die abgeschilferten Isoformen keine zytoplasmatische Domäne zeigten, wurden die exosomalen MUC1-M Sonden als heterodimäre Proteinkomplexe mit extrazellulärer und zytoplasmatischer Domäne nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die O-Glykosylierung membranständiger (rezyklisierender) MUC1-Glykosylierungsproben untersucht, um die gewonnenen Strukturdaten anschließend mit denen der sezernierten (nicht-rezyklisierenden) MUC1-Probe MUC1-S (Engelmann et al., 2005) zu vergleichen.

Beide Isoformen, die membranständige und die sezernierte, nutzen unterschiedliche zelluläre Glykosylierungswege, die vermutlich Einfluss auf das O-Glykosylierungsprofil der Isoformen nehmen.

Es stellte sich heraus, dass das O-Glykanprofil der beiden MUC1-M- und MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N-Sonden vorrangig von einer hohen *core1*-Expression dominiert wurde, während eine drastische Verschiebung bei der Expression von *core1* in Richtung auf *core2*-basierende Zuckerstrukturen bei MUC1-M-CQC/AQA und MUC1-S beobachtet werden konnte. Als erste wesentliche Erkenntnis dieser Studie ergab sich, dass ein Rezyklisierungsstopp bei MUC1-M-CQC/AQA und die nur einmalige Golgi-Passage der sezernierten Isoform MUC1-S eine überwiegend *core2*-basierende O-Glykosylierung zur Folge hat.

Die signifikant erhöhte terminale Sialinierung der membran-gebundenen MUC1-Glykosylierungsproben MUC1-M, MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N und MUC1-M-CQC/AQA wird vermutlich durch mehrfach wiederholtes endozytotisches Re-Internalisieren und Re-Zyklisieren durch die *trans*-Golgi-Zisterne erreicht. Dieser Mechanismus wurde für endogenes membranäres MUC1 bereits nachgewiesen.

Desweiteren lieferte die Tatsache, dass die eingeschränkte Clathrin-vermittelte Endozytose im Falle vom MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N kaum zu Änderungen des Glykosylierungsprofils gegenüber der Referenzsonde MUC1-M führte, den Hinweis, dass außer Clathrin-vermittelter Endozytose weitere intrazelluläre Transportmechanismen bei der Internalisierung von MUC1 von entscheidender Bedeutung sind, die in der Lage sind, die reduzierte Clathrin-induzierte Endozytose bei MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N zu kompensieren. Um einen möglichen Zusammenhang des N-Glykosylierungsstatus mit dem zellulären Trafficking des MUC1 und seinem exosomalen Export nachzuweisen, wurden die zellulären und



exosomalen N-Glykoformen der zytoplasmatischen MUC1-M-Endodomäne transfizierter HEK293-Zellen unter Einsatz von Inhibitoren der N-Glykanprozessierung untersucht.

Die unter Einsatz der Prozessierungs-Inhibitoren erzielten Ergebnisse belegen, dass die exosomale Glykoform Endo H-sensitiv und damit vom Hybrid- oder Oligomannose-Typ war, während das zelluläre (plasmamembranäre) MUC1-M Fusionsprotein Endo H-resistent, aber PNGase F-empfindlich war, was auf eine N-Glykosylierung vom komplexen Typ hinweist.

Die Ergebnisse belegen, dass die unterschiedliche N-Glykosylierung der exosomalen und zellulären MUC1-Isoformen mit unterschiedlicher endosomaler Sortierung zusammen hängen könnte. Nicht-prozessierte N-Glykoformen würden demnach entweder rezyklisieren, um durch weitere Golgi-Passagen eine N-Glykosylierung vom komplexen Typ zu generieren, oder es käme zu einer Elimination des Glykoproteins entweder über lysosomalen Abbau (in dieser Studie nicht untersucht) oder exosomalen Export.

Der N-Glykosylierungsstatus stellt womöglich ein sensibles regulatorisches System im Zusammenhang mit der Sortierung und Zielsteuerung apikaler plasmamembranständiger Proteine dar und kann somit den Transportmechanismus bestimmter Glykoproteine durch veränderte N-Glykosylierung beeinflussen.

Die Aufklärung der Endozytosewege und intrazellulären Transportrouten im Zusammenhang mit der MUC1-Rezyklisierung erfolgte immunzytologisch mittels Kolokalisationsstudien unter Einsatz verschiedener versikulärer Endozytose-Marker wie Anti-Clathrin, Anti-Caveolin-1 und Anti-Flotillin-2 mit Anti-MUC1. Die Untersuchungen in der konfokalen Lasermikroskopie wurden an drei Zelllinien durchgeführt (HEK-293, MCF7 und MDA-MB-231).

In allen drei mit MUC1-M, MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N und MUC1-M-CQC/AQA transfizierten Zelllinien konnte die Existenz Clathrin-vermittelter MUC1-Endozytose bestätigt werden.

Kolokalisationsstudien mit Anti-Caveolin-1 für die Caveolin-abhängige und *Raft*-assoziierte Endozytose und Anti-Flotillin-2 für die Darstellung *Lipid-Raft*-assoziiierter, Caveolin-unabhängiger Transportwege ergaben Hinweise auf die Existenz alternativer Endozytosewege des MUC1.

Weitere Evidenz für das Vorliegen alternativer Transportwege des MUC1 konnte durch gezielte Ausschaltung caveolärer oder *Raft*-assoziierter Endozytose unter Einsatz von Inhibitoren erbracht werden.

Zur Blockierung dieser Transportwege wurden spezifische Endozytoseinhibitoren eingesetzt. Hyperosmolare Konzentrationen der Sucrose unterdrückte die Clathrin-vermittelte Endozytose teilweise, während durch den Einsatz von PP2 die Bildung von Caveolae und *Raft*-assozierten Transportwegen blockiert wurde, was sich in einer Inhibition der MUC1-Endozytose in den untersuchten Zellen zeigte.

Bei gleichzeitiger Anwendung von hyperosmolarer Sucrose und PP2 wurde ein beinahe kompletter Rückgang der MUC1-Endozytose erreicht.

Trotz Ausschaltung Caveolin- und Clathrin-abhängiger Transportwege konnte dennoch eine leichte Re-Internalisierung von MUC1-M in Form vesikulärer Einschlüsse detektiert werden, die auf alternative Cholestrin-abhängige Aufnahmemechanismen schließen ließ.

Um alle *Raft*-assozierten (Caveolin- und Flotillin-abhängigen) intrazellulären Transportrouten auszuschalten, die an MUC1-Endozytose beteiligt sein können, wurde Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin verwendet, das die Endozytose durch den Cholesterinentzug der Plasmamembran verhindert.

Zusammenfassend lassen die Experimente unter Einsatz der konfokalen Lasermikroskopie einen direkten Zusammenhang zwischen MUC1-M Re-internalisierung und Caveolae- bzw. Flotillin- (*Lipid Raft*)- abhängigen, intrazellulären Transportmechanismen vermuten, die neben der bereits bekannten Clathrin-vermittelten Endozytose eine entscheidende Rolle bei der Rezyklisierung zur Plasmamembran aber auch beim Reifungsprozess des MUC1 spielen können.

Semi-quantitative Analysen der MUC1-Rezyklisierung wurden nach Oberflächenmarkierung mit einem reduktiv spaltbaren Biotinylierungsreagenz in Westernblotanalysen durchgeführt. Nach Reinternalisierung des biotinylierten MUC1 und reduktiver Spaltung auf der Oberfläche verbliebener Biotinreste erfolgte mittels Avidin eine Affinitätsanreicherung des markierten MUC1 und die immunchemische Darstellung des Proteins nach Elektrophorese und Elektrotransfer auf Blotmembranen.

Wie schon qualitativ in der konfokalen Lasermikroskopie gezeigt, ließ sich beim Einsatz der Inhibitoren einzelner Endozytosewege die jeweilige Blockierung im Westernblot durch eine entsprechende Reduktion MUC1-spezifischer Signale relativ zu denen vom „*house-keeping*“-Protein GAPDH darstellen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Ergebnisse dieser experimentellen Arbeit die Annahme unterstützen, dass das menschliche MUC1 unterschiedliche Endozytosewege nutzt und dass diese Endozytose und nachfolgende Rezyklisierung über Golgi-Kompartimente zu einer gegenüber sekretorischen Isoformen veränderten O-Glykosylierung führt. Damit sind zelluläre Transportwege des MUC1 und seine Glykosylierung voneinander wechselseitig abhängig, denn der Einfluss der O-Glykosylierung auf apikale Expression des MUC1 wurde bereits auch in anderen Studien gezeigt. Auch die N-Glykosylierung (zumindest die auf Asn36 der Endodomäne) scheint nach den Befunden dieser Arbeit zelluläres Trafficking (exosomaler Export) zu steuern.

## 2. Einleitung

### 2.1 Kohlenhydrate

Mit etwa zwei Drittel des in der Biosphäre gebundenen Kohlenstoffs stellen die Kohlenhydrate neben Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden die mengenmäßig bedeutendste der vier großen Naturstoffklassen dar. Durch die Photosynthese werden jährlich  $2 \times 10^{11}$  t D-Glukose gebildet, wovon der Großteil in Form von Mono-, Oligo- und Polysacchariden auf der Stufe der Kohlenhydrate verbleibt. Nur 5% finden Verwendung in der Synthese anderer primärer und sekundärer Metabolite (Alberts 1998).

Schon lange war bekannt, dass Kohlenhydrate nicht nur als metabolische Intermediate dienen, sondern auch als Energiespeicher in Form von Stärke in Pflanzen und Glykogen in Tieren, die schnell den Brennstoff Glukose freisetzen können (Voet et al., 1992; Schmidt et al., 1986; Nicolaou et al., 2001). Des Weiteren sind Polysaccharide weit verbreitet als strukturelle Elemente in den Zellwänden von Bakterien und Pflanzen und im Exoskelett von Arthropoden. Cellulose, der Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwände, ist die am häufigsten auftretende organische Verbindung in der Biosphäre.

Als Watson und Crick 1953 die Struktur der DNA und den Mechanismus ihrer Replikation herleiteten, gewannen die Nukleinsäuren als Informationsträger des Lebens ihre herausragende Bedeutung. Kohlenhydrate dagegen wurden aus molekularbiologischer Sicht kaum beachtet und ihre Forschung erfolgte hauptsächlich durch die Nahrungsmittel- und Papierindustrie. Erst die Entwicklung immer leistungsfähigerer chromatographischer und spektroskopischer Methoden einerseits und die Einführung moderner Verfahren zur Oligosaccharidanalytik und -synthese (Eggernberger et al., 1990; Benn et al., 1983) andererseits ermöglichten die Entdeckung und Untersuchung der Funktion komplexer Kohlenhydratstrukturen im Organismus, die häufig heterogen und nur in geringen Mengen auftreten. Es wurde erkannt, dass die meisten Proteine und Lipide einen gewissen kovalent gebundenen Anteil an Kohlenhydraten mit sehr unterschiedlichen und komplexen

Strukturen besitzen, wohingegen die Kohlenhydrate mit Energiespeicher- und Stützfunktion sehr einfach aufgebaut sind.

In den linear aufgebauten Peptiden und Nukleinsäuren kann die Information nur in der Anzahl und Sequenz der monomeren Bausteine enthalten sein, wohingegen in Kohlenhydraten zusätzlich die Position und Konfiguration der glykosidischen Bindung und das Auftreten von Verzweigungen zu einer extrem hohen Informationsdichte führen.

Es gibt  $10^{12}$  mögliche Oligosaccharid-Isomere für ein reduzierendes Hexasaccharid und die Modifikation der Kohlenhydratbausteine durch Acetyl-, Sulfat- und Phosphatgruppen führt zu einer weiteren strukturellen Diversifikation.

Oligosaccharidstrukturen liegen in der Natur meistens kovalent an Lipide oder Proteine gebunden vor. Die unter dem Begriff Glykokonjugate zusammengefassten Glykolipide und Glykoproteine stellen einen wesentlichen Bestandteil der Zellmembran dar (Feizi et al., 1985; Dwek et al., 1996; Ragupathi et al. und McGarvey et al., 1997; Davis et al., 1999), wobei der Kohlenhydratanteil immer zur extrazellulären Seite ausgerichtet ist und so als Glykokalix die Asymmetrie der Plasmamembran gewährleistet (Sharon et al., 1993). Oligosaccharide auf Proteinen haben vielfältige Rollen in der Faltung, der Stabilität von Proteinen und bei Erkennungsprozessen auf molekularer Ebene.

Eukaryotische Zellen präsentieren auf ihrer Oberfläche, abhängig vom Entwicklungsstadium, dem Zelltyp und ihrer Umgebung, eine Vielzahl von verzweigten Oligosacchariden, die wichtige Funktionen bei der Zell-Zell-Erkennung und –Wechselwirkung erfüllen (Sharon et al., 1993). Die Kohlenhydratliganden dienen als Bindungsstellen für Rezeptoren von Bakterien, Viren, Toxinen, Antikörpern, Enzymen, Lektinen und Selektinen (Gottschalk et al., 1957 und 1960; Gesner et al., 1964; Lasky et al., 1992; Paulson et al., 1985; Feizi et al., 1985).

## 2.2 Die Glykoproteine

Eine häufige posttranslationale Modifizierung in eukaryotischen Zellen ist die Glykosylierung von Proteinen.

Ein glykosyliertes Protein besteht in der Regel aus einer Reihe von Glykoformen, d.h. Proteinen mit gleicher Polypeptidsequenz aber verschiedenen Zuckermodifikationen.

Die Glykane auf Glykoproteinen sind von entscheidender Bedeutung bei einer Reihe zellphysiologischer Phänomene (Wittmann et al., 2008):

- ❖ Die Glykosylierung von Proteinen ermöglicht durch Wasserstoffbrückenbildung die Induktion und Stabilisierung der Proteinkonformation.
- ❖ Sie beeinflusst die Löslichkeit der Proteine.
- ❖ Die Glykosylierung verhindert durch Maskierung den proteolytischen Abbau des Proteins.
- ❖ Sie beeinflusst die Erkennung durch Antikörper (Paulson et al., 1982; Feizi et al., 1985; Schmidt et al., 1986)
- ❖ Die Glykosylierung mancher Rezeptoren (z.B. Insulinrezeptoren) ändert deren Affinität zu den Liganden und umgekehrt beeinflusst die Glykosylierung mancher Liganden (z.B. Thyrotropin, *human chorionic gonadotropin*) deren Affinität zum Rezeptor. Auch hängt die Aktivität bestimmter Hormone und Enzyme (z.B. *extrinsic tissue plasminogen activator*) von ihrer Glykosylierung ab (Hakomori et al., 1981).
- ❖ Die Glykosylierung eines Proteins dient als Signal für den intrazellulären Transport. Dies bedeutet, dass glykosylierte Proteine ins extrazelluläre Medium bzw. an die Zellmembran transportiert werden (Sortierung, *Trafficking*).
- ❖ Die Wechselwirkung der Zuckerketten von Membranproteinen und extrazellulärem Matrixmaterial mit Lektinen regulieren Wanderung und Verteilung bestimmter Zellen im Organismus (z.B. Lymphocyten).

Glykosyliert sind viele extrazelluläre Proteine in Serum, Harn, Speichel, Lymphe, Cerebrospinalflüssigkeit, aber auch integrale Membranproteine und Proteine, die

auf der extrazellulären Seite der Membran sitzen.

Länge, Ladung und Sequenz der Zuckerkette sind für ein bestimmtes Protein keine Konstanten, sondern hängen von Spezies, Gewebe, Alter und dem Zustand des Organismus (z.B. Krankheit, Schwangerschaft ect.) ab.

Man unterscheidet drei Arten von Glykoproteinen: N- und O-Glykoproteine und GPI-verankerte Glykoproteine (Lindhorst et al., 2000).

Komplexe Kohlenhydrate auf Glykoproteinen werden von einer Serie von Glykosyltransferasen im Endoplasmatischem Reticulum und im Golgi-Apparat synthetisiert. Des Weiteren können Glykosidasen in ER und Golgi Kohlenhydratbausteine entfernen und damit die Oligosaccharidstruktur der Glykane modifizieren (N-Glykan-Prozessierung).

## 2.3. Mucine

Mucine (lateinisch *mucus*, Schleim) sind hochmolekulare, abundante, filamentöse Glykoproteine, deren Apoprotein durch entsprechende Gene kodiert wird. Die epithelialen Mucinproteine bilden zusammen mit wenigen Lipiden große hydrierte, multimere Komplexe, die die Oberfläche glandulärer Epithelzellen mit einer gelartigen Schicht, dem Mucus, bedecken (Forstner et al., 1995).

Der Mucus besteht zu 95% aus Wasser, das mit Salzen, Lipiden, Proteinen und Glykoproteinen angereichert ist (Reid et al., 1989). Ursprünglich wurden mit dem Term „Mucine“ Glykoproteine bezeichnet, die im sezernierten Mucus entsprechender Epithelien identifiziert wurden. Nachfolgend wurden auch die von diesen Epithelien transmembranär exprimierten Glykoproteine den Mucinen zugeordnet, so dass letztlich der Term für sezernierte wie membrangebundene epitheliale Glykoproteine, welche die Charakteristika der MUC-Genfamilie erfüllen, verwendet wird (Strous et al., 1992).

### 2.3.1 Struktur und Funktionen der Mucine

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

Humane Mucingene weisen drei charakteristische Eigenheiten auf (Perez-Vilar et al., 1999). Dazu zählt eine Tandemrepeat-Domäne, die mehr als 50% der gesamten Gensequenz ausmacht, aber in ihrer Länge, der Nukleotidsequenz und der Anzahl an Wiederholungen variiert. In der VNTR (*variable number of Tandem Repeats*)-Region weist das Peptidrückgrat keine Sekundärstrukturen auf (Eckhardt et al., 1987). Die VNTR-Domäne präsentiert sich als lang gestreckte und auf Grund der starren Kohlenhydratseitenketten wenig flexible Struktur (Jentoft et al., 1991).

In vielen Mucinen wird diese Domäne durch ein einziges Exon kodiert, während die weiteren kodierenden Regionen des Gens kurz und die dazwischen liegenden Introns groß erscheinen. Charakteristisch ist der Längenpolymorphismus vieler Mucine als Resultat multipler Allele, die eine unterschiedliche Anzahl an sich wiederholenden Repeats aufweisen (Vinall et al., 1998).

Das zweite Merkmal der Mucine stellt eine Peptiddomäne mit einem hohen Prozentsatz der Aminosäuren Alanin, Glycin, Prolin und insbesondere Serin sowie Threonin dar, deren Hydroxylgruppen in O-glykosidische Verknüpfungen mit Oligosacchariden involviert sind, so dass der Gehalt an Kohlenhydraten bis zu 90% der gesamten Mucinmasse betragen kann (Verma et al., 1994).

Hunderte Oligosaccharidseitenketten können am Apomucin angeknüpft werden, wobei sich diese Ketten in ihrer Länge (von bis zu 20 Zuckerreste) sowie Zusammensetzung und Verknüpfung der Monosaccharidbausteine (neutral, sialiniert oder sulfatiert), gewebetypisch unterscheiden können.

Charakteristische strukturelle Eigenschaften der Mucine sind negativ geladene Gruppen, N-Acetylneuraminsäure- und Sulfatgruppen an den terminalen Positionen der Glykanketten.



Durch die extensive Glykosylierung vermögen Mucine in größeren Mengen Wasser zu speichern, was zum räumlichen Aufquellen des Mucinmoleküls führt und so für die gelartige Umgebung der Mucine gesorgt wird.

Die Apomucine besitzen ein Molekulargewicht von bis zu ca. 300 kDa, während die glykosylierten Mucinproteine Molekulargewichte von 300 bis 1000 kDa und eine Dichte von 1,35 - 1,50 g/cm<sup>3</sup> vorweisen (Kim et al., 1996; Rose et al., 1992).

Im Weiteren werden die Mucingene durch einen Längenpolymorphismus ausgezeichnet, wobei die mRNA-Ketten von 0,4 bis 20 kb differieren können.

Diese Heterogenität beruht auf der variablen Anzahl an Tandem Repeats (Moniaux et al., 2001). Ursprünglich wurde angenommen, dass Mucine nur eine Schutzfunktion der Epithelzelloberflächen vor körperfremden Mikroorganismen, proteolytischen Enzymen, chemischen wie physikalischen Verletzungen sowie Dehydratation einnehmen (Perez-Vilar et al., 1999) und der Lubrifikation epithelialer Oberflächen dienen, z.B. der des Gastrointestinal-, Respirations- und Reproduktionstraktes. Dies gilt vor allem für die sezernierten Gel-bildenden Mucine, die den viskosen Mucus konstituieren. Sie formieren durch die Assoziation mehrerer Proteinmonomere über Disulfidbrücken ausgedehnte Oligomere, die von den Zellen sezerniert werden und auf der apikalen Oberfläche der Epithelzellen in Form eines Mucugels verbleiben.

Die membranären Mucine sind über ihre hydrophobe Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert. Bei ihnen wurde keine Oligomerisierung beobachtet (Gendler et al., 1995). Mucinähnliche Glykoproteine können auch von nicht-epithelialen Zellen exprimiert werden. Ihnen sind Funktionen als Liganden für Selektine und die Beteiligung am Lymphozyten- „*Homing*“ zugeordnet worden (Shimizu et al., 1993).

Die O-Glykosylierung spielt eine entscheidende Rolle beim Schutz gegen Mikroorganismen, in der Annahme, dass Kohlenhydrat-spezifische Adhäsionsmoleküle auf der bakteriellen Zelloberfläche mit O-gekoppelten Glykanen der Mucine in direkten Kontakt treten können, die Pathogene eingefangen und somit Infektionen verhindert werden (Schroten et al., 1992; Yolken et al., 1992). Aufgrund von Untersuchungen zur Struktur von Mucinen ergaben sich neue mögliche Funktionen, in die sie involviert zu sein scheinen. Dazu zählen Wachstum, fetale

Entwicklung, epitheliale Proliferation und Differenzierung, Karzinogenese sowie Metastasierung. Die gestreckte Konformation der prozessierten Mucinproteine (Bramwell et al., 1986) scheint den Molekülen einen anti-adhäsiven Effekt zu verleihen. Somit werden Zell-Zell- und/oder Zell- Matrix-Interaktionen destabilisiert (Ligtenberg et al., 1992), wodurch Mucine die epitheliale Morphogenese unterstützen (Hilkens et al., 1992). Über die Expression von sialinierten und sulfatierten Lewis(x)- bzw. (a)-Antigen in den O-Glykanketten, insbesondere auf tumorassoziierten Mucinformen, scheinen die Glykoproteine durch die Bindung mit dem Zelladhäsionsmolekül E-Selektin auf aktivierten Endothelzellen in inflammatorische Prozesse involviert zu sein (Walz et al., 1990; Yuen et al., 1992).

### **2.3.2 Einteilung der Mucine**

Es wurden 19 menschliche Mucin-Gene identifiziert: MUC1-4, MUC5B, MUC5AC; MUC6-9, MUC11-13 und MUC15-20 (Gendler et al.,1990; Swallow et al., 1987; Porchet et al., 1991; Gross et al., 1992; Pratt et al., 2000; Bobek et al.,1993; Gum et al., 1994, 1997, 2002; Shankar et al., 1997; Toribara et al., 1997; Williams et al., 1999 und 2001; Yin et al., 2001; Dufosse et al., 1993; Lapensee et al., 1997; Lan et al., 1990; Aubert et al., 1991; Pallesen et al., 2002; Chen et al., 2003; Higuchi et al., 2004) (Tabelle 1).

Aufgrund der Struktur werden Mucine in drei verschiedene Gruppen unterteilt:

- ❖ Membrandurchspannende Mucine (MUC1, MUC3A MUC3B, MUC5AC, MUC5B, MUC4, MUC9, MUC11, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17 und MUC20)
- ❖ Gelformende Mucine (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC8 und MUC19)
- ❖ Lösliche Mucine (MUC7)

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

Tabelle 1: Übersicht über derzeit identifizierte Mucine.

Es bestehen fundamentale Unterschiede zwischen den sekretorischen (mit Ausnahme von MUC7) und den membranständigen Mucinen, da die sekretorischen durch eine oder mehrere Von-Willebrandt-Faktor ähnliche D-Domänen in den nicht-VNTR-(*variable number of tandem repeats*) Regionen charakterisiert werden, welche Cystein-reiche Peptide enthalten, die in die Oligomerisierung von Mucin-Monomeren und die Bildung von sekretorischen Vesikeln involviert sind (Perez-Vilar und Hill, 1999).

Membrangebundene Mucine enthalten Serin, Threonin und/oder Prolin reiche VNTR-Regionen, SEA-Module in der extrazellulären Region, epidermale Wachstumsfaktor-Domänen (EGF) (bis auf MUC1), transmembranäre und zytoplasmatische Regionen (Williams et al., 1999; Williams et al., 2001; Williams et al., 1999; Pratt et al., 2000; Gum et al., 1997; Moniaux et al., 1999; Carraway et al., 2000; Crawley et al., 1999). OVGP1 (oviduktales Glykoprotein 1), MCAM (Melanomzell-Adhäsionsmolekül = MUC18), CD164-Ag (Sialomucin = MUC24), CAPN1 (Calpain1) und Leukosalin gehören zu den Mucin-ähnlichen Proteinen. Des Weiteren werden die Zelladhäsionsmoleküle MadCAM1 und GlyCAM1 trotz fehlender Repeatdomäne als Mucine bezeichnet (Shimizu und Shaw, 1993).

### 2.3.3 N-Glykane

In N-Glykoproteinen (z. B. Synaptophysin, Ovalbumin, Transferrin) ist der Kohlenhydratanteil in der Regel durch eine N-glykosidische Bindung über N-Acetyl-D-Glucosamin (GlcNAc) mit der Amidseitengruppe von L-Asparagin (Asn) der Peptidkette verknüpft (Johansen et al. und Nuenke et al. 1961; Yamashina et al., 1962). Vereinzelt erfolgt die Anbindung in Bakterien aber auch über einen anderen Kohlenhydratbaustein. Alle N-Glykoproteine haben aufgrund ihrer Biosynthese ein als *Core-Struktur* bezeichnetes Pentasaccharid („Trimannosyl-chitobiosyl-core“) gemeinsam:

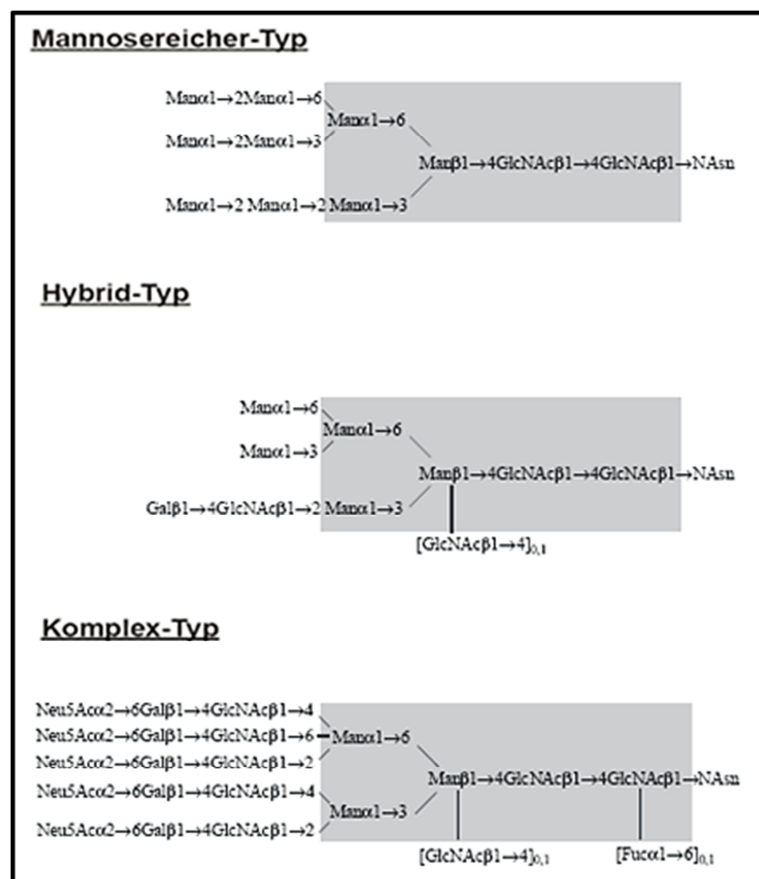


Abbildung 1: Darstellung der Core-Strukturen der N-Glykoproteine. Das in allen N-Glykanen konservierte Pentasaccharid (Core-Struktur) ist grau unterlegt (Mechref et al. 2002).

An dieser *Core*-Struktur können nun bis zu fünf weitere Kohlenhydratketten, die Antennen, gebunden sein. Entsprechend ihrer Struktur und ihres Substitutionsmusters werden die N-Glykoproteine in drei Haupttypen eingeteilt: Mannosereicher-, Komplex- und Hybrid-Typ (Montreuil et al., 1980).

Die Strukturvielfalt der N-Glykoproteine beruht also im Wesentlichen auf der Vielzahl der Saccharidbausteine, die an die *Core*-Struktur gebunden sein können, auf dem Grad der Verzweigung und auf der großen Variationsbreite der antennären Strukturen (Abbildung 1). Innerhalb dieser Klassen gibt es eine erhebliche Mikroheterogenität bezüglich der Zusammensetzung der Oligosaccharidstrukturen.

### **2.3.3.1 Die Biosynthese der N-Glykane**

Zunächst wird im ER eine allen N-Glykanen gemeinsame verzweigte Oligosaccharidvorstufe, bestehend aus drei Glukosen, neun Mannosen und zwei N-Acetylglucosaminen, von verschiedenen membranständigen Enzymen synthetisiert (Abbildung 2). Fünf dieser Monosaccharide, drei Mannosen und zwei N-Acetylglucosamine, sind in allen N-Glykanen konserviert und stellen das als *Core*-Struktur bezeichnete Pentasaccharid („Trimannosyl-chitobiosyl-core“) dar.

Die Oligosaccharidvorstufe ist über einen Pyrophosphatrest an Dolichol, ein aus 75-95 Kohlenstoffatomen bestehendes, membranständiges, ungesättigtes Lipid, gebunden und ragt in das ER-Lumen hinein. Von hier aus wird das komplette Oligosaccharid durch eine Oligosaccharidtransferase auf einen Asparaginrest innerhalb der Konsensussequenz der neu synthetisierten Polypeptidkette übertragen. Unmittelbar danach werden drei Glukosereste und ein Mannoserest entfernt.

Die weitere Prozessierung der N-Glykanketten findet im Golgiapparat statt, wo verschiedene Enzyme in den Vesikeln des cis-, mittleren- und trans-Golgi-kompartments die schrittweise terminale Entfernung und Anheftung von Monosacchariden katalysieren, wobei das Produkt der vorhergehenden Reaktion das Substrat für die nächste Reaktion darstellt. Hierbei entstehen die drei

Grundtypen von N-Glykanen (Komplex-Typ, Mannosereicher-Typ und Hybrid-Typ) in Abhängigkeit von der Konformation des Proteins und den zur Verfügung stehenden Enzymen (Abbildung 1). Bei Komplex-Typ N-Glykanen werden drei weitere Mannosereste abgespalten, ein N-Acetylglucosamin (GlcNAc) angefügt, zwei weitere Mannosereste abgespalten und an die dabei entstehende konservierte Grundstruktur weitere N-GlcNAc, Galaktosen, N-Acetylneuraminsäuren und Fucosen angefügt. Mannosereiche N-Glykane entstehen zum einen, wenn die Mannosidasen nicht mit dem Oligosaccharid reagieren können, weil es durch die Konformation der Proteindomäne nicht zugänglich ist oder wenn die entsprechenden Mannose-abspaltenden Enzyme nicht vorhanden sind.

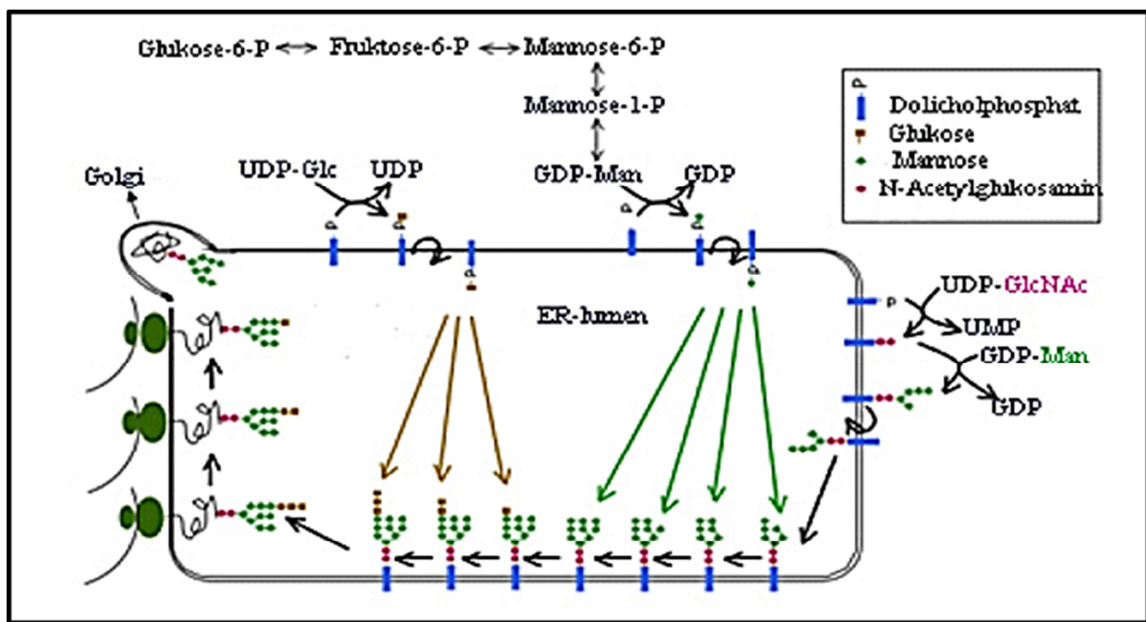


Abbildung 2: Die Biosynthese der N-Glykane im Endoplasmatischen Retikulum (Isabelle Breloy 2006).

Andererseits kann auch die nach der Abspaltung der drei Mannosereste folgende Anheftung eines N-GlcNAc fehlen, was zum Abbruch der Synthese an dieser Stelle führt, da das nachfolgende Enzym die Anwesenheit des GlcNAc als Substrat benötigt. Mannosereiche N-Glykane gleichen somit den Oligosaccharidvorstufen und Intermediaten zu Beginn der Synthese.

Hybrid-Typ N-Glykane entstehen, wenn nach der Anheftung des ersten N-GlcNAc die zwei weiteren Mannosereste nicht entfernt werden können, sodass eine weitere Verlängerung nur am Ast von N-GlcNAc stattfinden kann. An dieser Stelle des Syntheseweges kann auch ein GlcNAc in  $\beta$ 1,4-Position an die zentrale Mannose der konservierten Grundstruktur gebunden werden, wodurch dem entstehenden GlcNAc  $\beta$ 1,4-geteilten (*bisecting*) N-Glykan weitere Prozessierungsmöglichkeiten offen stehen, die letztlich zur Synthese von GlcNAc  $\beta$ 1,4-geteilten Komplex-Typ N-Glykanen führen (Kornfeld et al., 1985).

Die hohe Vielfalt der N-Glykane resultiert aus der variablen Anzahl an Seitenketten oder Antennen, die von der Pentasaccharid Grundstruktur ausgehen können, kombiniert mit den zahlreichen Variationsmöglichkeiten innerhalb dieser Antennen. In eukaryotischen Zellen treten biantennäre, 2,4-verzweigte triantennäre und tetraantennäre N-Glykane am häufigsten auf, während monoantennäre, 2,6-verzweigte triantennäre und pentaantennäre Strukturen seltener vorkommen (Yamashita et al., 1982 und 1984).

Fucosen (Fuc) sind in humanen Proteinen  $\alpha$ 1, 2 an terminale Galaktosen (Gal),  $\alpha$ 1, 3 oder  $\alpha$ 1, 4 an subterminale GlcNAc-Reste oder in  $\alpha$ 1, 6-Stellung an das mit dem Asparaginrest verknüpfte GlcNAc (core-Fucosylierung) gebunden (Staudacher et al., 1999).





O-Glykoproteine mit *Core-A*-Struktur sind in Mucinen weit verbreitet und werden deshalb auch als Mucin-Typ klassifiziert (Hashimoto et al., 1962; Bhavanandan et al., 1964). Es gibt acht verschiedene Unterstrukturen (Hanisch et al., 2000), die sich durch die Substitution des an Serin oder an Threonin gebundenen GalNAc-Restes unterscheiden (Abbildung 3). Am weitesten verbreitet ist das so genannte Thomsen-Friedenreich-Antigen (TF-Antigen) mit der Struktur Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-O-Ser/Thr. Der *Core B* tritt in Proteoglykanen des Bindegewebes auf. Es sind aber auch weitere *Core*-Strukturen bekannt, in denen andere Aminosäuren glykosyliert werden. In Kollagen tritt eine Bindung zwischen D-Galaktose und 5-Hydroxy-L-Lysin auf, in den Zellwänden höherer Pflanzen zwischen L-Arabinose und 4-Hydroxy-L-Prolin. Des Weiteren wurden O-glykosidische Bindungen von D-Man, D-Glc, D-GlcNAc, D-Gal und L-Fuc an L-Serin oder L-Threonin beobachtet. O-Glykoproteine weisen eine sehr hohe Heterogenität auf, die ihre Charakterisierung erschwert. Ein bestimmtes Glykoprotein kann N- und O-glykosyliert sein (z.B. menschliches IgD).

#### 2.3.4.1 Die Biosynthese der O-Glykane

Die komplexen Oligosaccharide auf Proteinen können in drei Regionen aufgeteilt werden (Abbildung 4):

- 1) *Core*-Region: Sie wird durch die innersten zwei oder drei Glykane gebildet, die direkt mit dem Peptid verbunden sind.
- 2) *backbone*-Region: Sie sorgt für eine Elongation der Kette
- 3) periphere Strukturen: Sie weisen große strukturelle Komplexität auf

Diese komplexen, peripheren Glykanstrukturen liegen den Blutgruppen und anderen Antigenen zugrunde.

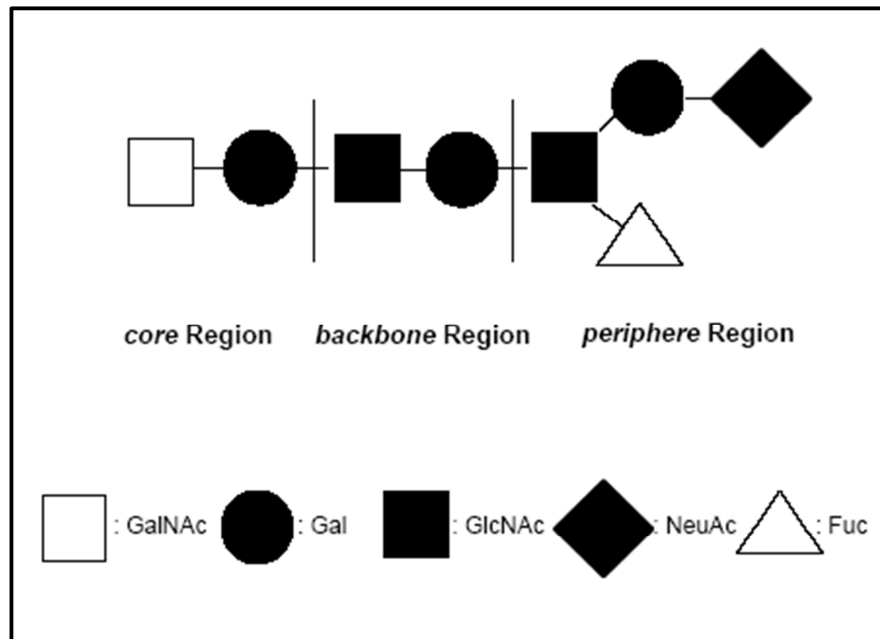


Abbildung 4: Strukturelle Elemente der mucintypischen O-Glykosylierung (Katja Engelmann 2003).

Durch die Übertragung eines GalNAc-Restes auf die Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin wird der erste Schritt der Biosynthese der O-Glykane des Mucin-Typen eingeleitet. Die derzeit 15 Mitglieder der Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyl-Transferasen, die die obige Reaktion katalysieren, werden zellspezifisch exprimiert und zeigen eine Selektivität bezüglich der Aminosäuresequenz (Schwientek et al., 2002). Einfluss auf die O-Glykosylierung hat auch die Aminosäuresequenz in der Umgebung und die vorausgegangenen Glykosylierungen des Peptidsubstrates (Hanisch et al., 2001).

Bisher gibt es acht *core*-Strukturen in eukaryontischen Glykoproteinen, die alle auf dem *core- $\alpha$ -GalNAc*-Rest (Tn-Antigen) basieren. An diesen Rest können in den Positionen C3, C6 oder an beiden gleichzeitig Monosaccharide addiert werden, wobei  $\beta$ -Gal an C3,  $\beta$ -GlcNAc an C3 und bzw. oder C6 sowie  $\alpha$ -GalNAc an C3 oder C6 substituiert werden kann.

In humanen Geweben treten am häufigsten *Core 1* (Gal $\beta$ 1-3GalNAc-Ser/Thr), auch Thomson-Friedenreich-Antigen genannt und *Core 2*-Strukturen (Gal $\beta$ 1-3(GlcNAc $\beta$ 1-6)GalNAc-Ser/Thr) auf, welche ubiquitär exprimiert werden (van Halbeek et al., 1985; Brockhausen, 1999).

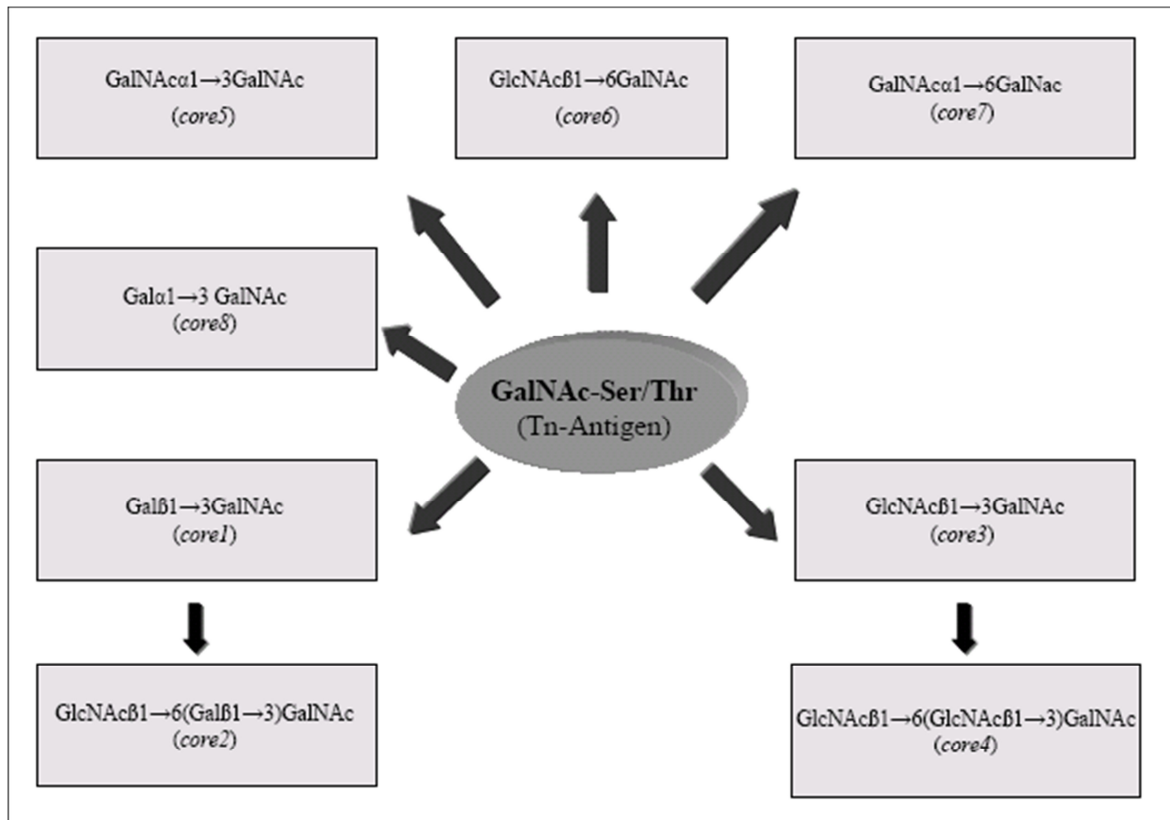


Abbildung 5: Biosynthese der core-Strukturen während der O-Glykosylierung (Katja Engelmann 2003).

Core 3 (GlcNAc $\beta$ 1-3GalNAc) und Core 4 (GlcNAc $\beta$ 1-6(GlcNAc $\beta$ 1-3)GalNAc) zeigen eine eingeschränkere, organ-spezifische Expression. Sie sind in den Bronchien (Breg et al, 1988), im Gastrointestinaltrakt (Podolski et al., 1985a,b) und fetalen Mucinen (Hounsell et al., 1985 und 1989; Hanisch und Peter-Katalinic, 1992) enthalten.

Core 5-8 treten eher selten auf. Core 5 (GalNAc $\alpha$ 1-3GalNAc) kommt in fetalen Mucinen im Meconium (Hounsell et al., 1985) und rektalen Adenokarzinomen (Kurosaka et al., 1983) vor.

Im Meconium (Hounsell et al., 1985) und gastrischen Karzinomen (Yamashita et al., 1994) wird Core 6 detektiert. Die Core 7-Struktur (GalNAc $\alpha$ 1-6GalNAc) ist Bestandteil des Rindersubmaxillaris-Mucins (Chai et al., 1992) und die Core 8-Struktur (Gal $\alpha$ 1-3GalNAc) tritt im Bronchialschleim auf (van Halbeek et al., 1994). Durch die Addition von N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) und anderen O-acetylierten Sialinsäuren, die  $\alpha$ 2-

6 an GalNAc gebunden werden, entstehen weitere komplexe Strukturen (Reuter et al., 1983) (Abbildung 5).

Neu5Gc wird beim Menschen nur in fetalen und malignen Geweben gefunden. Die backbone-Region entsteht durch die Addition des Disaccharids Gal $\beta$ 1-3GlcNAc (Typ 1) bzw. Gal $\beta$ 1-4GlcNAc (Typ 2), welches in einer  $\beta$ 1-3 Bindung vorliegt und lineare oder über C6 der Gal verzweigte Polylactosaminketten ausbilden kann. Die linearen Ketten werden als i-Antigene und die verzweigten als I-Antigene bezeichnet.

Die nachfolgende periphere Strukturdomäne ist komplex. Auffallend ist, dass die terminalen Monosaccharide Fuc und Neu5Ac über  $\alpha$ -glykosidische Bindungen verknüpft sind. Die strukturelle Variabilität nimmt durch Modifikationen der Neuraminsäure durch N-Acetylierung, N-Glycolylierung oder O-Acetylierung an verschiedenen Positionen zu.

Es können bis zu 20 Monosaccharide miteinander verbunden sein (Kornfeld, R. und Kornfeld, A.; 1990). Die Art der Glykosylierung ist abhängig von den vorhandenen Glykosyltransferasen im Golgi, von ihrem kompetitiven Verhalten und könnte genetischem Polymorphismus unterliegen (Hanski et al., 1992; Brockhausen, 1999; Baldus und Hanisch, 2000).

## 2.4 MUC1

Shimizu und Yamauchi (1982) identifizierten als erste das Glykoprotein MUC1 als ein an Serin, Threonin, Prolin, Glycin und Alanin reiches Protein in einer Fraktion aus Milchfettkugelmembranen.

Das humane epitheliale Mucin 1 ist ein Typ 1 transmembranäres Glykoprotein, das auf der apikalen Zelloberfläche glandulärer und duktaler Epithelien zahlreicher Organe, z.B. Brust, Pankreas, Lunge und Gastrointestinaltrakt (Lan et al., 1990; Gendler et al., 1990; Ligtenberg et al., 1990; Wreschner et al., 1990) sowie auf einigen Lymphozytenspezies (Agrawal et al., 1998; Dent et al., 1999) exprimiert wird. Überexprimiert wird MUC1 in Adenokarzinomen von Brust, Lunge, Dickdarm, Bauschspeicheldrüse, Magen, Prostata und Eierstock. Die epithelialen Zellen unterliegen einer malignen Transformation.

Sie verlieren die normale apikal-basolaterale Polarität und beginnen MUC1 auf der gesamten Zelloberfläche zu exprimieren. Auch die MUC1-Expressionsrate ist erhöht und eine lösliche Form von MUC1 kann im Serum von Krebspatienten gefunden werden.

Das MUC1-Mucin weist eine Vielfalt an synonym verwendeten Bezeichnungen auf. Folgende Namen werden zum Teil noch heute verwendet: MUC1, EMA (epitheliales Membran Antigen; Ormerod et al., 1981), PAS-0 (*'periodic acid-Schiff's'*; Shimizu et al., 1982), DUPAN-2 (Metzgar et al., 1982), PUM ( *Peanut-Lektin reaktives urinäres Mucin*; Karlsson et al., 1983), CA1 (Krebs- Antigen; Bramwell et al., 1983), NPOP (nicht-penetrierendes Glykoprotein; Ceriani et al., 1983), NCRC11-Antigen (Ellis et al., 1984), Epitektin (Harris et al., 1984), H23-Antigen (Keydar et al., 1989), PEM (polymorphes epitheliales Mucin; Gendler et al., 1988), SGA (Talgdrüsen-Antigen; de Kretser et al., 1985), MAM-6 (Hilkens et al., 1986), Episialin (Ligtenberg et al., 1990) und DF3-Antigen (Kufe et al., 1984). Nachfolgend wird das MUC1 eingehend beschrieben.

### 2.4.1 MUC1 auf DNA-Ebene

Das MUC1-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 1 in der Bande 1q21-q24 lokalisiert (Swallow et al., 1987). Es tritt aufgrund verschiedener Allele mit einer variablen Anzahl an tandemartig wiederholten 60 bp-Einheiten ein Längenpolymorphismus auf.

Das Gen setzt sich aus sieben Exons zusammen, die insgesamt 4,2 bis 7,0 kb genomische DNA umfassen. Das Exon 2 kodiert für die gesamte Repeat-Region. Die Größe dieser als VNTR (*Variable Number of Tandem-Repeats*)-Domäne bezeichneten Region unterliegt einem vererbten Polymorphismus und liegt allgemein zwischen 20 bis 120 Wiederholungseinheiten, in der nordeuropäischen Bevölkerung bei 40-80 *Repeats* (Gendler et al., 1988; Siddiqui et al., 1988).

Dieser Sequenzbereich ist durch einen hohen Anteil (82%) an G/C-Basenpaarung gekennzeichnet. Stromabwärts des Exons 2 ist eine alternative Spleißstelle lokalisiert, die, wird sie genutzt, zur Vergrößerung des Exons 2 um 27 Basenpaare führt.

Durch alternatives mRNA *Splicing* (oder Spleißen) des MUC1-Gens können diverse Isoformen generiert werden. Mit MUC1-Sec wird die sezernierte Variante des MUC1-Mucins bezeichnet, der die transmembranäre und die zytosolische Sequenz fehlt, die jedoch eine vom membranären MUC1 abweichende C-terminale Sequenz besitzt (Wreschner et al., 1990). Die Isoformen MUC1-A, -B, -C und -D weisen jeweils unterschiedliche Spleiß-Akzeptorstellen am Intron1-Exon2 Übergang auf (Obermair et al., 2002). Dahingegen werden die Isoformen MUC1-X, -Y und Z durch Nutzung einer Konsensus-Spleißdonor- und Spleißakzeptor-Sequenz generiert, die 5' bzw. 3' terminal zur zentralen VNTR-Region lokalisiert ist.

Diese Isoformen weisen einen dem MUC1 ähnelnden C-Terminus auf, besitzen allerdings keine VNTR-Region (Zrihan-Licht et al., 1994a). MUC1-Sec kann mit MUC1-Y interagieren, wodurch eine Tyr/Ser-Phosphorylierung von MUC1-Y ausgelöst und eine Signalkaskade initiiert werden kann (Zrihan-Licht et al., 1994b; Baruch et al., 1999).

### 2.4.2 MUC1 auf Proteinebene

Das reife Glykoprotein bildet einen stabilen heterodimeren Komplex, dessen zwei Untereinheiten von einem gemeinsamen Vorläuferprotein abgeleitet sind. Dieses wird im Endoplasmatischen Retikulum geschnitten und die beiden resultierenden Domänen reassoziieren in der Nähe der Schnittstelle. Die kleinere Untereinheit schließt die C-terminale zytoplasmatische Domäne aus 69 Aminosäuren, die hydrophobe transmembranäre Domäne aus 31 Aminosäuren und eine kurze extrazelluläre Sequenz, die nicht-kovalent mit der größeren Untereinheit des MUC1 gekoppelt ist, ein (Abbildung 6).

Diese große Untereinheit enthält die extensiv O-glykosylierte Tandem-Repeat-Domäne, die von wenigen nicht-repetitiven Domänen beidseitig flankiert ist, sowie die kurze N-terminale Domäne, die das Signalpeptid sowie eine Spleißstelle zum Generieren zweier alternativer Produkte enthält.

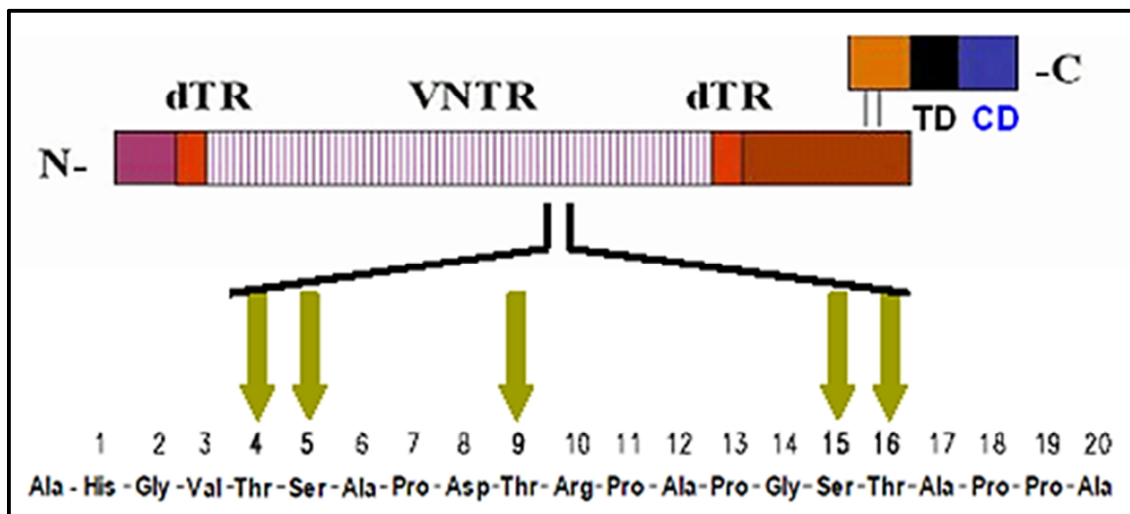


Abbildung 6: VNTR-Region (VNTR = *variable number of Tandem Repeats*) mit 20-120 Wiederholungen flankiert von zwei Regionen unterschiedlicher Sequenz dTR (degenerierte Tandem Repeats).

MUC1 mit C-terminaler Domäne sitzt fest verankert auf der Membran. Je *Tandem Repeat* gibt es fünf mögliche O-Glykosylierungsstellen.

TD = Transmembrandomäne, CD = zytosolische Domäne

Die *Tandem-Repeat*-Domäne setzt sich aus einer zwischen 20 bis zu 120 Mal tandemartig wiederholten Ikosapeptid-Sequenz mit der Abfolge PAPGSTAPPAHGVTSAPDTR zusammen.



Das repetierte Peptid weist fünf putative O-Glykosylierungspositionen auf, die in der Regel mit komplexen Glykanen substituiert sind.

Obwohl jede dieser Positionen *in vivo* O-glykosyliert werden kann, variiert die durchschnittliche Dichte der Glykane unter den MUC1-Glykoformen. Tandemrepeat-Glykopeptide von MUC1 in Brustmilch (Müller et al., 1997) oder von der Brustkarzinomzelllinie T47-D (Müller et al., 1999) enthalten durchschnittlich 2,6 bzw. 4,8 Glykane pro Tandemrepeat.

Auf Proteinebene kann diese Domäne in Abhängigkeit von der Anzahl an *Tandem Repeats* 50 bis 80% des gesamten Moleküls ausmachen. Weitere 480 Aminosäuren bilden das übrige Protein. Lange galt die Tandemrepeat-Sequenz als hoch konserviert (Gendler et al., 1990). Erst später wurden von Müller et al. (1999) durch eine Sequenzierstudie proteolytischer Fragmente der gesamten VNTR-Domäne des MUC1-Proteins erste Hinweise gefunden, dass die etablierte 20 Aminosäure-Sequenz nur eine von verschiedenen alternativen Ikosapeptiden ist. Für andere Mucinspezies, wie z.B. MUC4, MUC11, MUC12 und MUC16 wurden ebenfalls Aminosäure-Variationen innerhalb der variablen Tandemrepeat-Region beschrieben (Nollet et al., 1998; Williams et al., 1999; Yin et al., 2001).

Die VNTR-Domäne wird durch „degenerierte Repeats“ mit weniger Glykosylierungspositionen flankiert.

Die häufig in Nachbarschaft zu stark glykosylierten Domänen anzutreffende SEA-Domäne (*sperm protein-enterokinase-agrin*) weist zusätzlich fünf Sequons für putative N-Glykosylierungen und eine Schnittstelle auf, die während der ER-Prozessierung des Mucins durch autolytische Spaltung genutzt wird und zur Ausbildung eines heterodimeren Komplexes in der Plasmamembran führt.

In der VNTR-Region fanden Engelmann et al. (2001) Hinweise auf Sequenzvariationen (siehe oben). In den Gewebeproben wurde auf DNA-Ebene ein Austausch von Prolin in der Position 13 der Tandemrepeat-Sequenz PDTRPAPGSTAPPAHGVTS<sub>A</sub> gegen Glutamin, Alanin oder Threonin festgestellt. Des Weiteren waren Asparaginsäure (D) und Threonin (T) im immundominanten Epitop APDTR konzertiert gegen Glutaminsäure (E) und Serin (S) ausgetauscht worden.

Die carboxyterminale, zytoplasmatische Domäne des MUC1 besteht aus 69 Aminosäureresten, wovon sieben Tyrosinreste sind, die z. T. phosphoryliert werden können (Zrihan-Licht et al., 1994; Pandey et al., 1995). Die Phosphorylierung von Tyrosin, welches von der Membran am weitesten entfernt ist, fördert die Interaktion mit der SH2-Domäne des Adapterproteins Grb2 (Pandey et al., 1995), welches Proteine wie das SOS-Austauschprotein von Ras (Chardin et al., 1993; Egan et al., 1993) oder die PRD Domäne der GTPase Dynamin binden kann (Barylko et al., 1998).

Lösliches MUC1 wurde in menschlicher Milch (Patton, 2001; Peterson et al., 2001) und in sehr geringen Mengen im Serum von gesunden Männern und Frauen gefunden (Croce et al., 2001; McGuckin et al., 1994). Dabei könnte es sich um MUC1-sec handeln.

Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass MUC1 von der Oberfläche von Zellen durch proteolytische Spaltung (Abschilferung oder *shedding*) freigesetzt wird (Hilkens et al., 1991). TACE [*tumor necrosis factor- $\alpha$*  (*TNF- $\alpha$* )] könnte als Protease für die Spaltung verantwortlich sein (Thathiah et al., 2003).

### 2.4.3 O-Glykanprofile des MUC1

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

Bisher wurde das O-Glykanprofil von MUC1-Glykoformen in Brustmilch, Urin und Brustkrebszelllinien untersucht. Das O-Glykanprofil von MUC1 in Muttermilch wird durch auf *Core 2*-basierende, lineare oder verzweigte Polylactosaminylketten dominiert, welche mit bis zu drei Fucoseresten substituiert sind (Hanisch et al., 1989). Mono- und disialylierte Strukturen sind ebenfalls vorhanden, sie machen aber nur 25 % der Glykane aus (Hanisch et al., 1990). MUC1 im Urin hingegen besitzt kürzere neutrale und saure Glykane, welche auf *Core 1* und *Core 2* basieren (Bhavanandan et al., 1998).

Die Glykoformen in Krebszelllinien wie T-47D (Hanisch et al., 1996), BT20 (Hull et al., 1989) oder anderen Brustkarzinomzelllinien (Lloyd et al., 1996) enthalten

verkürzte Strukturen wie *Core*-GalNAc, das *Core* 1-Disaccharid Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc und auch seine mono- und disialylierten Derivate.

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

Nicht nur die Art, sondern auch die Dichte der O-Glykane, die an MUC1 addiert werden, ist im Brustkrebs verändert (Müller et al., 1999). Daraus folgt, dass die mit Krebs assoziierten Glykoproteine sich hinsichtlich ihrer Antigenität und Immunogenität von den normalen Mucinen unterscheiden (Burchell, J. M. et al, 1993).

Dieser Unterschied in der Antigenität kann durch den Antikörper SM3 (Burchell et al., 1987; Girling et al., 1989) demonstriert werden, welcher selektiv ein Epitop des *Core*-Proteins erkennt. Dieses Epitop wird in der Tandemrepeat-Domäne des mit Krebs assoziierten MUC1-Mucin exponiert (Burchell et al., 1989), im Normalgewebe aber durch Glykosylierung weitgehend maskiert.

#### **2.4.4 Biosynthese des MUC1**

An das neu synthetisierte Protein werden während seiner Synthese im Endoplasmatischem Retikulum (ER) in der Nähe der transmembranären Region N-Glykane addiert. Danach wird MUC1 im ER proteolytisch innerhalb der SEA-Domäne gespalten (Hilkens und Buijs, 1988). Die beiden Produkte bleiben nicht-kovalent assoziiert (Ligtenberg et al., 1992). Die proteolytische Schnittstelle wurde von Parry et al. (2001) stromaufwärts der transmembranären Domäne identifiziert. Nach der Spaltung werden die im ER gebildeten Mannosereiche N-Glykane im Golgi in Komplexe N-Glykane überführt. Im cis/trans-Golgi erfolgt auch die O-Glykosylierung des MUC1.

Dadurch steigt das apparente Molekulargewicht des Mucins erheblich (Hilkens und Buijs, 1988). Die O-Glykane werden zum Teil sialyliert bevor sie den Golgi verlassen. Unvollständig und vollständig sialyliertes MUC1 wird an der Oberfläche exprimiert (Litvinov und Hilkens, 1993).

Nachdem das MUC1-Protein erstmals den Golgi passiert und auf der Zelloberfläche exponiert wurde, kann der Komplex wiederholt durch Clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert (Altschuler et al., 2000) und rezykliert werden bis die endgültige Glykosylierung, charakterisiert durch die terminale Addition von Sialinsäure an die Glykanketten, im *trans*-Golgi vervollständigt ist (Litvinov et al., 1993). Das reife Mucin verbleibt sodann auf der Zelloberfläche oder wird, wahrscheinlich durch Spaltung des nicht-kovalenten Komplexes oder durch Sheddasen von der Zelle abgeschilfert (Ligtenberg et al., 1992b). Die prolinreiche Aminosäuresequenz des MUC1-Mucins (etwa 25%), die starke O-Glykosylierung der zahlreichen Serin- und Threoninreste innerhalb der Repeatdomäne und die elektrostatische Abstoßung, verursacht durch die terminale Sialinierung der i.d.R. verzweigten Kohlenhydratketten, sind für die gestreckte Konformation des MUC1-Proteins verantwortlich, das ca. 200-500 nm von der apikalen Zelloberfläche ins Lumen hinein ragt.

#### **2.4.5 Biologische Funktionen des MUC1**

MUC1 kann durch seine O-Glykane Pathogene über deren Kohlenhydrat-spezifische Adhesine an die epitheliale Oberfläche binden (DeSouza et al., 1999; Lillehoj et al., 2001; Schroten et al., 1992, Yolken et al., 1992). Insofern stellt es als membrangebundenes Mucin den spezifischen Liganden bzw. Rezeptor bakterieller Invasionsprozesse dar, andererseits kann es als sezerniertes oder abgeschilfertes Mucin Pathogene an der Kontaktaufnahme mit der epithelialen Zelloberfläche hindern.

Darüber hinaus beeinflusst MUC1 die Zell-Zell-Kommunikation durch Regulation von Adhäsions- und Anti-Adhäsionsprozessen (Roussel et al., 1996). Die

Blockierung der Adhäsion wird wahrscheinlich durch die sterische Konformation ausgeübt (Ligtenberg et al., 1992; Hilkens et al., 1992).

Ein Beispiel für Adhäsion ist die Wechselwirkung zwischen den Kohlenhydrat-Antigenen auf MUC1 (Sialyl Lewis-x, -a) und dem Adhäsionsmolekül E-Selektin (Hanski et al., 1993). MUC1 kann die Zell-Zell-Adhäsion auch durch intrazelluläre Signalkaskaden beeinflussen. Der zytosolische Bereich von MUC1 besitzt sieben Tyrosinreste, die phosphoryliert werden können (Wreschner et al., 1990) und als Bindungsstellen für Proteine und Kinasen, die SH2-Domänen besitzen (Spicer et al., 1995), aber auch als Bindungsmotiv für das Protein  $\beta$ -Catenin, welches in die src- und wnt-Signalkaskade involviert ist, dienen können (Yamamoto et al., 1997). Neben  $\beta$ -Catenin interagiert MUC1 auch mit der Glykogen-Synthase-Kinase 3- $\beta$  (Li et al., 1998), mit der c-Src-Kinase (Gonzalez-Guerrico et al., 2002; A. Li et al., 2001; Y. Li et al., 2001) und mit den erbB Rezeptoren 1-4. Die Bindung an  $\beta$ -Catenin, das in der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion involviert ist, wird durch die Phosphorylierung (c-src Tyrosinkinase) eines zytosolischen MUC1-Motives beeinflusst.

Eine stärkere Bindung entsteht durch Phosphorylierung, die durch die Proteinkinase C $\delta$  (Ren et al., 2002) vermittelt wird, eine schwächere Bindung hingegen durch die GSK3 $\beta$  (Li et al., 1998). In vielen Myelom-Zellen induziert Interleukin-7 (IL-7) eine Bindung von MUC1 an Lyn Tyrosinkinase, was in einer stärkeren Phosphorylierung des MUC1 resultiert und in einer Induktion der Bindung von MUC1 an  $\beta$ -Catenin (Li et al., 2003).

Auch Wechselwirkungen zwischen  $\gamma$ -Catenin und MUC1 sind bekannt (Li et al. 2003b). Die verstärkte Phosphorylierung des MUC1 wird in Zusammenhang mit der Tumorzelladhäsion gebracht (Quin und McGuckin, 2000). Bei adhärenen Zellen sinkt die MUC1-Phosphorylierung.

### 2.4.6 Biologische Funktionen des MUC1 in Krebszellen

Das aus Tumor-Gewebe isolierte MUC1-Mucin weist gegenüber dem korrespondierenden Mucin auf normalen Zellen auffallende Veränderungen hinsichtlich seines Expressionsmusters sowie des Glykosylierungsprofiles auf.

Es wird ein starker Expressionsanstieg des MUC1 auf den entarteten Zellen beobachtet sowie die Sezernierung von MUC1 ins Serum.

MUC1 wird nicht mehr restringiert auf der apikalen Oberfläche der Epithelzellen exponiert, sondern verteilt über die gesamte Oberfläche der Tumorzelle, die ihre Polarität verloren hat. Damit interferiert das MUC1 sowohl sterisch als auch elektrostatisch mit dem E-Cadherin, das im normalen Gewebeverband basolaterale Zell-Zell-Kontakte vermittelt. Aberrationen im Glykosylierungsprofil zeigen sich vorrangig in der *peripheren* Domäne der Kohlenhydratseitenketten, indem z.B. Blutgruppen-Antigene deletiert sind bzw. den Blutgruppen verwandte Neoantigene exprimiert werden oder eine Re-Expression fetaler Antigene sichtbar wird (Hanski et al., 1992). Einige Glykoformen wurden bereits als 'tumor-assoziierte Antigene' beschrieben (Brockhausen et al., 1995).

Als tumor-assoziiert wurden die Kohlenhydratstrukturen Sialyl-Lewis(a) und -(x), gekoppelt an MUC1 auf Tumorzellen beobachtet, die unter anderem zur Aussage über die Tumorprogression herangezogen werden (Baldus et al., 2002a, b). Die extensive Sialinierung von Lewis-Antigenen (Sialyl-Lewis a, Sialyl-Lewis x) auf metastasierenden Tumorzellen wird als molekulare Grundlage ihrer Arretierung im Endothel des Zielorgans diskutiert, wobei es zu Interaktionen mit Zelladhäsionsmolekülen (E- und P-Selektin) kommt. Diese Interaktion ist auch ein frühes Ereignis innerhalb der Leukozyten-Rekrutierung und Extravasation bei auftretender Inflammation (Varki et al., 1994). Die vermehrt MUC1-exprimierenden Tumorzellen weisen eine verringerte Aggregationsfähigkeit auf, was durch die starke Neuraminsäureaddition an die Glykanketten und die daraus resultierende Abstoßung der Zellen untereinander zu erklären ist (Ligtenberg et al., 1992a).

Auch die Expression von Blutgruppen-Antigenen auf dem zelloberflächen-gebundenen MUC1 trägt zum Adhäsionsverhalten von Tumorzellen bei, indem diese durch Mimikry den Erkennungsmechanismen des Immunsystems im

Wirtsorganismus entkommen. Anhand von immunzytochemischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass tumor-assoziiertes MUC1 unterglykosyliert, im Hinblick auf die durchschnittliche Glykankettenlänge, auftritt (Burchell et al., 1993a).

Das MUC1-Glykoprotein aus laktierendem humanem Brustepithel weist *Core 2*-Trisaccharid-basierende Polylaktosaminketten auf (Hanisch et al., 1989 und 1990). Im Tumorgewebe ist die Aktivität der *Core 2*- $\beta$ 1, 6 N-Acetylglucosaminyltransferase stark reduziert bis fehlend, so dass die *Core 2*-Struktur nicht oder nur geringfügig gebildet werden kann (Brockhausen et al., 1995), die Vorläuferstrukturen GalNAc-Ser/Thr und Gal $\beta$ 1-3GalNAc akkumulieren. Die *Core 1*-spezifischen  $\alpha$ 6- und  $\alpha$ 3-N-Acetylneuraminsäure-Transferasen verwenden diese Strukturen als ihre Substrate und addieren Neuraminsäure.

Mit Anknüpfung von Sialinsäuren ist ein biosynthetisches Stoppsignal eingeführt worden und die resultierenden verkürzten Kohlenhydratketten, NeuAc $\alpha$ 2 6(Gal $\beta$ 1-3)GalNAc und NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-3GalNAc, weisen einen hohen Grad an Sialinierung auf.

Die tumorspezifischen Veränderungen des MUC1 machen das Glykoprotein zu einem viel versprechendem Tumorantigen in der Diagnostik und Therapie (Miles et al., 1999).

Folgende charakteristische Eigenschaften liegen dem Tumorantigen MUC1 zu Grunde:

- MUC1 wird von den meisten Tumorzellen verstärkt exprimiert.
- Es weist eine veränderte Glykosylierung (verkürzte Saccharidstrukturen) auf Tumorzellen auf, was zur Präsentation kryptischer Epitope führt.
- Die Tandemrepeat-Struktur trägt die immundominanten Epitope des MUC1-Moleküls.
- Die ausgedehnte Molekülstruktur auf der Zelloberfläche beeinflusst das Immunsystem und in Tumorpatienten kann eine HLA-unrestringierte Zellerkennung ausgelöst werden, wodurch eine Therapie bei verschiedenen Individuen anwendbar wäre (Jerome et al., 1991).

### 2.4.7 MUC1 und seine Interaktionsspartner

Die funktionelle Relevanz der evolutiv hoch konservierten zytoplasmatischen Domäne des MUC1 wird durch die verschiedenen hier lokalisierten Bindungsmotive verdeutlicht (Abbildung 7).

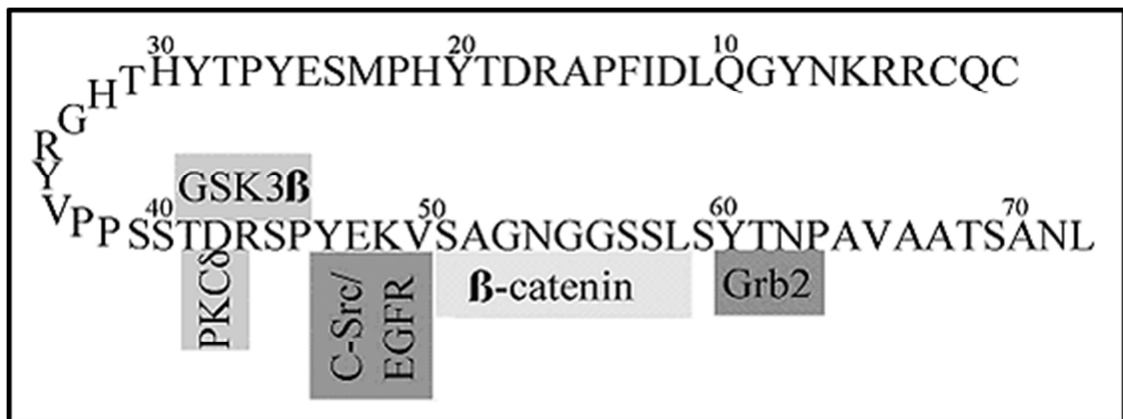


Abbildung 7: Bindemotive des C-terminus des MUC1 mittels Phosphorylierung Ser 44 von GSK3 $\beta$  an TDRSP, Tyr46 von c-Src oder EGFR (*Epidermal-Growth-Factor-Receptor*) an YEKV, Thr41 von PKC $\delta$  an TDR und Tyr60 von Grb2 an YNTP. Die Phosphorylierung an Tyr46 und Thr41 steigert die Affinität von  $\beta$ -Catenin zu SAGNGGSSLS (Yang, Hu et al. 2007)

MUC1 reguliert den Krebsfortschritt, der über den *Transforming Growth Factor- $\alpha$*  (TGF- $\alpha$ ) eingeleitet wird (Pochampalli, Bitler et al., 2007). TGF- $\alpha$  aktiviert und induziert so den Abbau des *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR).

Außerdem kann MUC1 mit EGFR Komplexe bilden und wirkt dem Abbau des Rezeptors durch Ubiquitinierung (Schroeder, Thompson et al., 2001) und Erhöhung des TGF- $\alpha$  induzierten Signals über den MAP/ERK-Signalweg (Pochampalli, Bejjani et al., 2007) entgegen.

Ein weiterer wichtiger Bindungspartner zur Signalweiterleitung über MUC1 zwischen EGFR und EGF ist das Galektin-3. N-Glykosylierung des MUC1 am C-terminalen Asparagin-36 erhöht die gemessene Menge an mRNA des Galektin-3 (Ramasamy, Duraisamy et al., 2007). Galektin-3 bindet an das N-Glykan des Asparagin-36 in der kleinen MUC1-Untereinheit und bildet eine notwendige Brücke zwischen MUC1, EGFR und den für EGF eingeleiteten Signalen. Da allerdings nicht jede Zelllinie (BT549-Zellen) im Stande ist, Galektin-3 zu exprimieren, wird



angenommen, dass eventuell andere Galektine (1, 4, 8, etc.) diese Brücke der ligandeninduzierten Signalweiterleitung bilden.

Mittels Komplexbildung mit HSP70/HSP90 wird MUC1 nach der Aktivierung des EGFR durch Heregulin (HRG) über die Aktivierung der Src-Kinase mit der äußeren Mitochondrienmembran verbunden und blockiert so stressinduzierte intrinsische Apoptose. Während MUC1 direkt an HSP70 bindet, wird die Bindung an HSP90 durch Phosphorylierung der c-Src-Kinase im YEKV-Motiv von MUC1 eingeleitet. Inhibitoren der c-Src oder des HSP90 blockieren den Einbau des MUC1 in die äußere mitochondriale Membran (Ren, Bharti et al., 2006). Ein weiterer Bindungspartner von MUC1, der mit HSP90 um die gleiche Bildungsstelle (YEKV-Motiv) konkurriert, ist  $\beta$ -Catenin. Die Bindung von  $\beta$ -Catenin an MUC1 bewirkt die Kolo-kalisierung dieser beiden Bindungspartner in den Zellkern.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass in manchen Zelllinien wie HCT116 die Plazierung von MUC1 und  $\beta$ -Catenin die Expression von Zielgenen wie Tcf (*T-cell-specific transcription factor*) und Cyclin-D1 aktiviert (Huang, Ren et al., 2003).

Durch die Bindung von  $\beta$ -Catenin an MUC1 wird ebenfalls die Phosphorylierung der Glykogen-Synthase-Kinase 3- $\beta$  (GSK3- $\beta$ ) und somit den Abbau des  $\beta$ -Catenins blockiert (Huang, Chen et al., 2005).

MUC1 spielt außerdem eine Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung über den Grb2-Sos-Ras-MEK-ERK2-Signalweg, indem MEK-Signalweg durch Tyrosinphosphorylierung am C-Terminus des MUC1 aktiviert wird (Meerzaman, Shapiro et al., 2001).

Darüber hinaus repräsentiert das tumor-assoziierte MUC1-Molekül einen spezifischen Liganden für das endotheliale interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) (Regimbald et al., 1996). Von Tumorzellen ins Serum sezerniertes MUC1 kann diese Interaktion inhibieren, ebenso wie MUC1-spezifische Antikörper, die gegen die Protein-Core-Struktur gerichtet sind.

Die bereits zuvor beschriebene Bindung von Sialyl-Lewis(x) und Sialyl-Lewis(a), mit E-Selektin sowie die Interaktion von MUC1 mit den Cateninen  $\beta$  und  $\alpha$  (Yamamoto et al., 1997), beschreiben den Einfluss des Glykoproteins auf diverse zelluläre Vorgänge, einschließlich Adhäsion, Differenzierung, Polaritätsausbildung, Migration, Proliferation und das Überleben der Zellen (Pignatelli et al., 1998).

## 2.5 Zelluläre Aufnahme - Endozytose und Endozytosewege

Das Wort Endozytose hat griechischen Ursprung (endon= innen, kytos= Höhle) und definiert die Aufnahme von Material in das Innere einer Zelle, sofern dies nicht durch einen passiven Prozess an der Zellmembran geschieht, sondern über das Ausbilden von Einstülpungen der Plasmamembran erfolgt. Die Endozytose ist an den verschiedensten zellulären Prozessen, wie der Weiterleitung neuronaler, metabolischer und proliferativer Signale, der Aufnahme vieler essentieller Nährstoffe und der Fähigkeit zur Abwehr eindringender Mikroorganismen, beteiligt (Mellman 1996).

Eine endgültige Glykosylierung vom MUC1-Protein, charakterisiert durch die terminale Addition von Sialinsäure an die Glykanketten, wird ebenfalls durch Endozytoseprozesse der Zelle erreicht.

Endozytosewege können aktuell in fünf Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 8):

- 1) Die Clathrin-vermittelte Endozytose
- 2) Lipid Raft-assoziierte Endozytose umfasst:
  - a) Caveolae-unabhängig-vermittelte Aufnahme (Flotillin-abhängig)
  - b) Caveolae-abhängig-vermittelte Endozytose
- 3) Lipid Raft-unabhängige Endozytose
- 4) Phagozytose
- 5) Makropinozytose

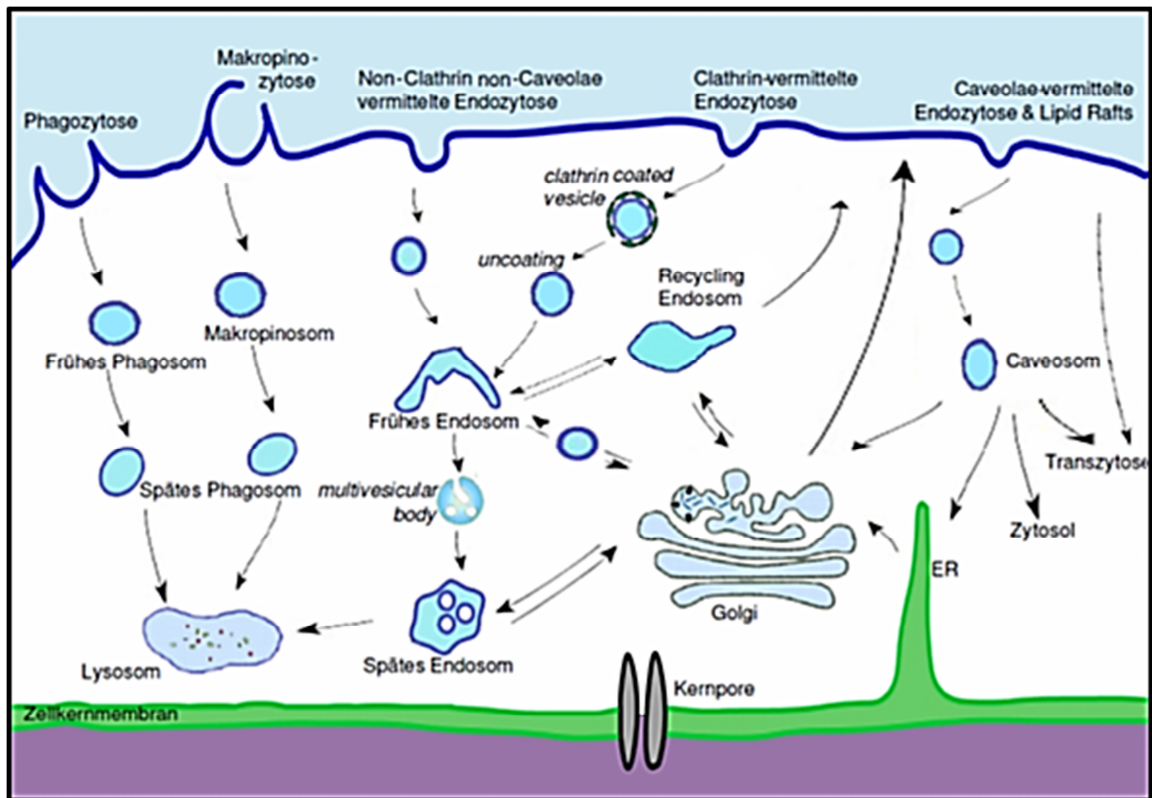


Abbildung 8: Wege der Endozytose dargestellt durch fünf mögliche Mechanismen (modifiziert nach Huth 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit werden speziell die Clathrin-vermittelte so wie Caveolin-abhängige- bzw. Caveolin-unabhängige und Lipid *Raft*-unabhängige Aufnahmewege im Zusammenhang mit der Endozytose von MUC1 hervorgehoben.

### 2.5.1 Clathrin-vermittelte Endozytose

Die bis heute am besten verstandene Form der Endozytose ist die Clathrin-vermittelte Endozytose, welche durch ihren ersten Schritt, die aktive Internalisierung von extrazellulärem Material an spezialisierten Bereichen der Plasmamembran, den so genannten *Clathrin-coated pits*, charakterisiert ist.

„*Clathrin-coated pits*“ wurden bereits 1964 als spezialisierte Regionen der Plasmamembran identifiziert (Roth und Porter 1964), die bereits leicht nach innen gekrümmt (Abbildung 9) und auf der Innenseite der Membran mit Clathrin-Makromolekülen überzogen sind (Mousavi et al. 2004).

Clathrin-vermittelte Endozytose spielt bei der Rezyklisierung des Membranmucins MUC1 eine Rolle (Altschuler et al., 2000), wobei es zur Addition von Sialinsäure an die Glykanketten des Mucins im *trans*-Golgi-Netzwerk kommt (Litvinov et al., 1993).

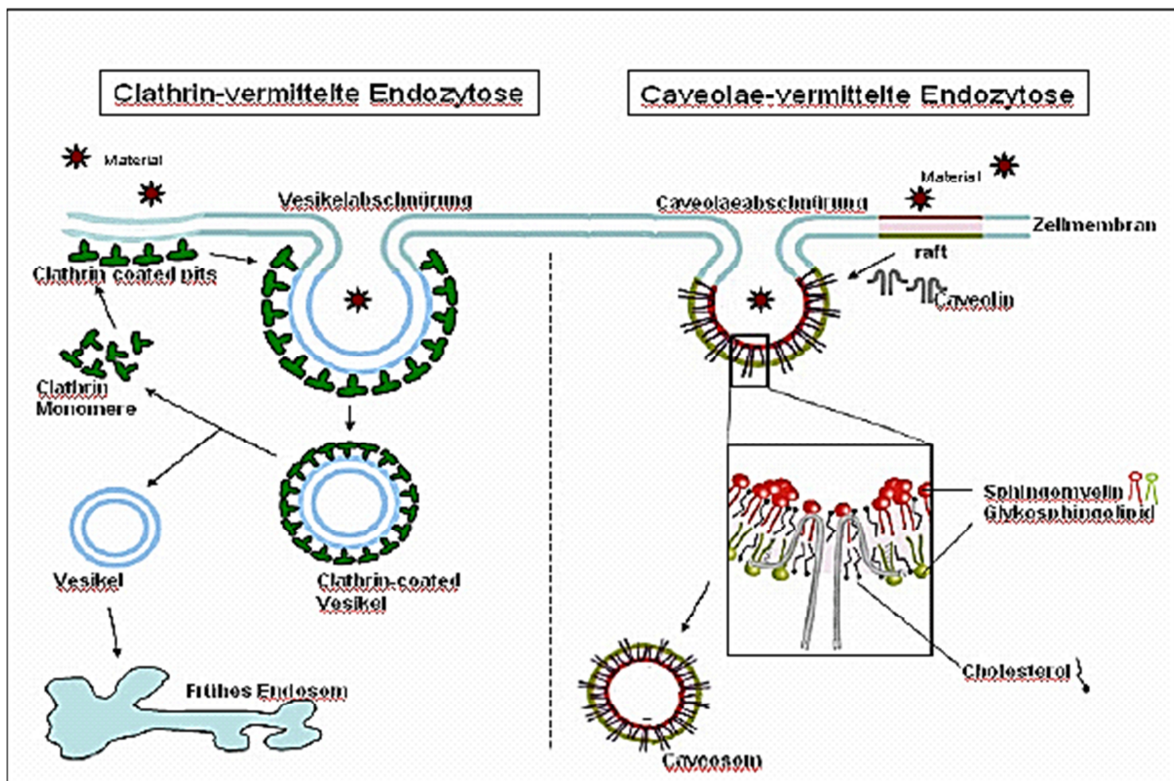


Abbildung 9: Schematische Abbildung einer Clathrin- bzw. Caveolin-abhängigen Endozytose.

Links: Bildung von *Clathrin-coated pits* bei Erkennung von Material auf der Zellmembran und Abschnürung der Clathrin-coated Vesikel. Abspaltung von Clathrin Monomeren und Rücktransport der Monomeren an die Membraninnenseite. Vesikelprozessierung zum frühen Endosom bzw. Bildung eines frühen Endosoms über mehrere Vesikel.

Rechts: Bildung von Caveolae aus *Lipid Rafts* in der Zellmembran und Abschnürung von Caveosomen (modifiziert nach Simons und Ikonen 1997).

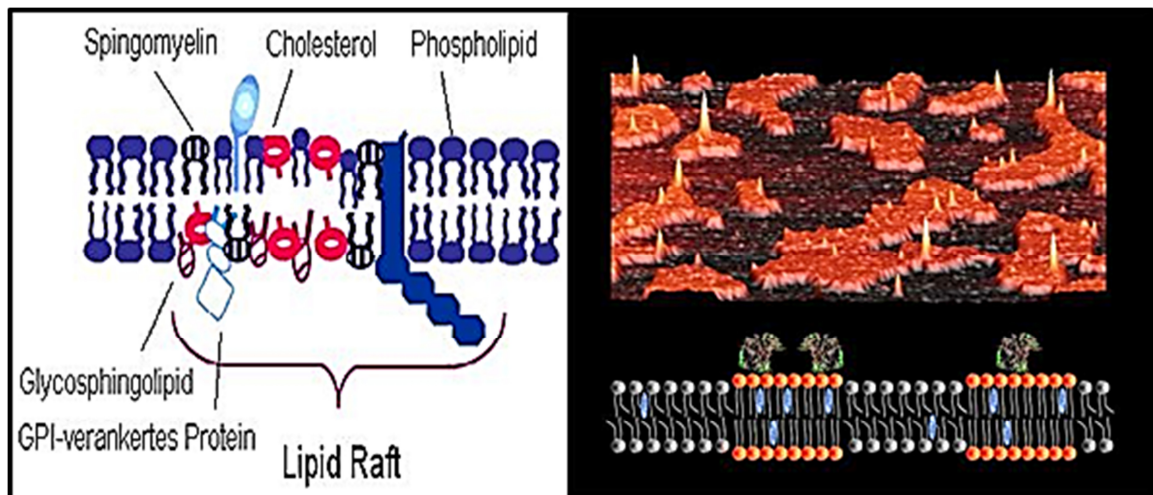
Nach Internalisierung über Clathrin-vermittelte Endozytose werden bestimmte Proteine wie MUC1 ohne Degradation über so genannte „*Recycling*“-Endosomen zurück zur Zellmembran transportiert.

## 2.5.2 Lipid Raft-assoziierte Endozytose

### 2.5.2.1 Struktur von Lipid Rafts

In Epithelzellen ist die Plasmamembran in eine apikale und eine basolaterale Domäne unterteilt, wobei letztere einen größeren Anteil an Phosphatidylcholin enthält.

Um diese ungleiche Verteilung zu erklären, wurde postuliert, dass aufgrund der unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der Lipide bereits im Golgi-Apparat Ansammlungen von Sphingolipiden und Cholesterol als Sortierstation für apikal gerichtete Proteine dienen.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung (rechts) von *Lipid Rafts*, die Plasmamembranmikrodomänen mit einem hohen Anteil an Sphingolipiden, Cholesterol und Phospholipiden mit langen gesättigten Fettsäureseitenketten sind und oft auch Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) verankerte Proteine beinhalten. Rasterkraftmikroskopaufnahme (AFM, links) von *Lipid Rafts*. Sphingomyelin Rafts: orange, Phosphatidylcholin hintergrund: schwarz, PLAP (*placental alkaline phosphatase*): gelbe Peaks. PLAP ist ein Marker für *Lipid-Rafts*, der über GPI mit dem äußeren *Leaflet* der Membran verankert ist (Saslowsky et al., 2002).

Diese Ansammlungen, die sich in ihrer Zusammensetzung von der übrigen Plasmamembran unterscheiden und resistent gegenüber nicht ionischen Detergenzien sind (Detergenz-resistenten Membrandomänen), wurden als „*Lipid Rafts*“ (engl.: Flöße) bezeichnet (Abbildung 10).

Die *Lipid Raft*-Plattformen könnten aufgrund der zunehmenden Phasenspannung an der Grenze in der Lage sein, ohne *Coat*-Proteine abzuknospen und Vesikel zu



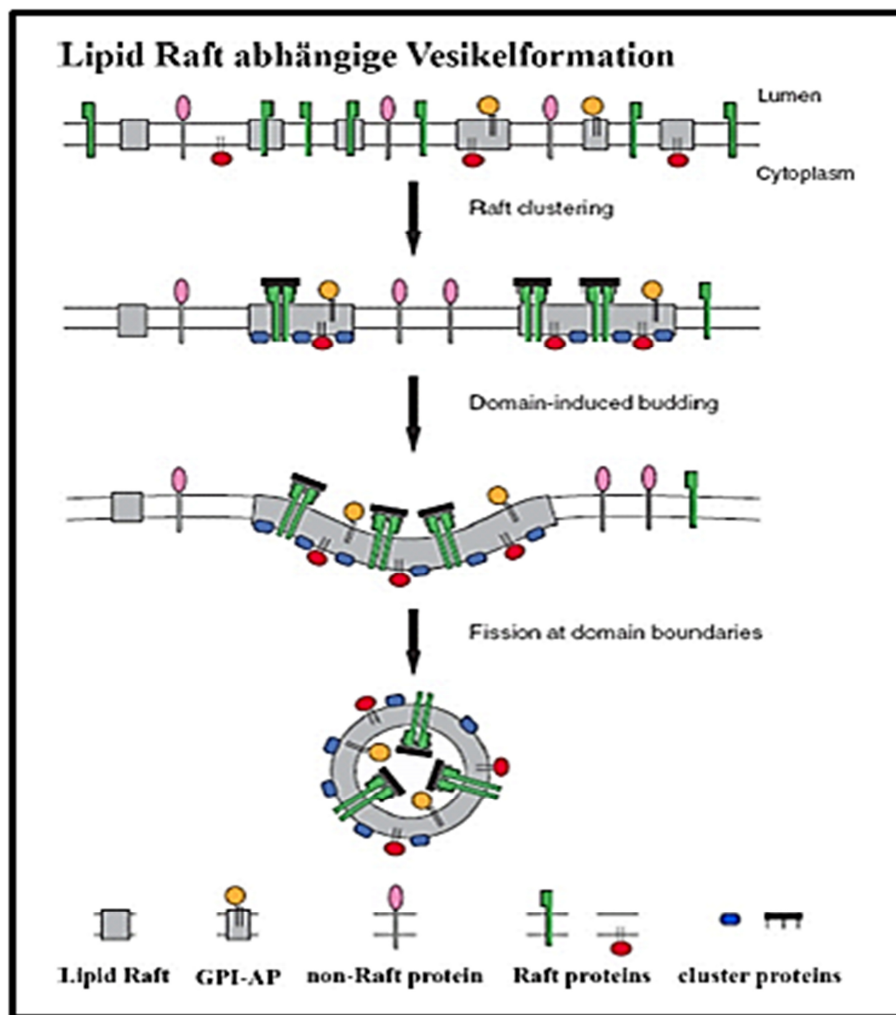


Abbildung 11: *Lipid Raft*-abhängige Vesikelformation. Proteine besitzen unterschiedliche Affinitäten zu *Lipid Rafts*. GPI-verankerte Proteine besitzen indirekt eine hohe Affinität, da der Lipid-Teil des GPI-Ankers mit *Lipid Rafts* interagiert. *Raft*-Proteine können über ihre Transmembrandomäne direkt mit *Lipid Rafts* interagieren und werden in die *Raft*-Domänen durch laterale Diffusion eingeschlossen. Nicht-*Raft*-Proteine sind nicht in der Lage mit diesen Domänen zu interagieren und werden dadurch ausgeschlossen. Durch Verschmelzen kleinerer *Raft*-Domänen und Stabilisierung durch Cluster-Proteine, entstehen *Lipid Raft*-Plattformen. Diese können durch eine zunehmende Phasenspannung zwischen den unterschiedlichen Lipiddomänen abschnüren und apikale Transportvesikel bilden (Schuck und Simons, 2004).

bilden, da dieser Zustand energetisch vorteilhafter wäre (Schuck und Simons, 2004; Hanzal-Bayer und Hancock, 2007).

Rafts wurde aufgrund der Vesikelformation (Abbildung 11) ebenfalls eine Rolle in der Sortierung von Membranproteinen, der Zelladhäsion und in Signalprozessen zugesprochen (Simons und Ikonen 1997).

### **2.5.2.2 Raft-assoziierte Markerproteine**

Neben der Caveolin-Proteinfamilie (s. 2.5.2.4) gehören die Reggie-Proteine zu den bekannten Raft-assoziierten Markerproteinen.

Reggies wurden aufgrund ihres Sedimentationsverhaltens in Dichtegradienten als Flotilline (*float*, engl: schweben) beschrieben. Dabei ist Reggie-1 identisch mit Flotillin-2 und Reggie-2 mit Flotillin-1 (Bickel et al. 1997).

Das humane Reggie-2 Gen ist 15 kB groß und in der MHC Klasse 1-Region des Chromosoms 6 lokalisiert (Edgar et al. 2001), humanes Reggie-1 ist auf Chromosom 17 lokalisiert.

Reggie-2/Flotillin1 wird in einer Vielzahl von Säugetier-Zellen exprimiert. Bezogen auf Zelllinien findet man Reggie-2 in Endothel-, Epithel-, vielen Tumorzelllinien und in glatter Muskulatur (Volonte et al. 1999; Liu et al. 2005).

Reggie-1/Flotillin 2 hingegen ist in fast allen Geweben bzw. Organen und in allen bisher untersuchten Zelllinien zu finden (Cho et al. 1995; Volonte et al. 1999) und eignet sich daher besonders gut als Raft-assoziiertes Markerprotein.

Die physiologische Funktion der Reggie-Proteine ist noch nicht verstanden. Es existieren jedoch Hinweise, die den beiden Proteinen eine Rolle in Signal- und sekretorischen Prozessen und Endozytose zusprechen.

### **2.5.2.3 Caveolin-unabhängige Endozytose**

#### **2.5.2.3.1 Exosomaler Transportweg über multivesikuläre Körper**

Der intrazelluläre Transport von Proteinen und Lipiden hängt zu einem Großteil von deren Verpackung in Vesikel, dem Transport dieser Vesikel durch die Zelle und dem Verschmelzen der Vesikel mit Membranen ab.

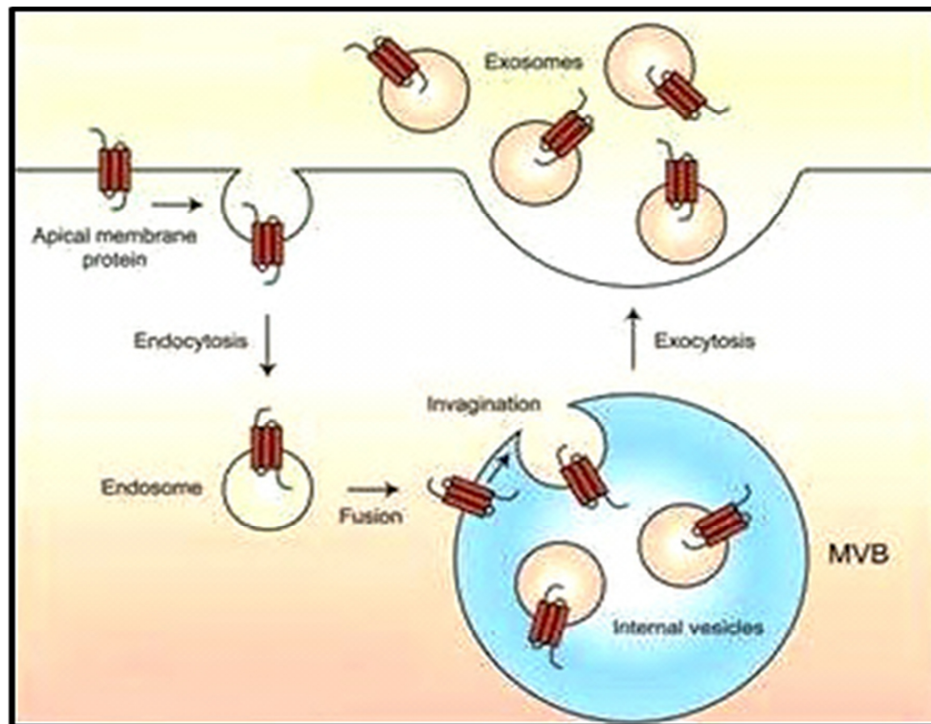


Abbildung 12: Vereinfachte schematische Darstellung des intrazellulären Transports über Caveolin-unabhängige Endozytose. Durch eine zweite Invagination der Endosomen kommt es zur Bildung von Multivesikularkörperchen (MVBs), die in ihrem Inneren Exosomen einschließen. Diese proteinhaltigen internen Vesikel werden nach Fusion des multivesikulären Körperchens mit der Plasmamembran als Exosomen endosomal Ursprungs *in vivo* und *in vitro* sezerniert. Exosomen übertragen Proteine auf Zellen durch Binden an der Zelloberfläche, Fusion mit der Plasmamembran oder Endozytose (Christoph Greb 2011).

Dabei wölben sich *Lipid Rafts*, die Signale durch die Membran transduzieren und so eine cholesterinabhängige Endozytose auslösen können, als ein Segment der Zellmembran ins Zellinnere und werden dort quasi abgeschnürt. Die durch Endozytose der *Lipid Rafts* entstehenden Vesikel werden als frühe Endosomen (30-100 nm) bezeichnet, die durch weitere Invaginationen ihrer Membranen zu den bereits erwähnten multivesikulären Körperchen (*MVB*) werden (Abbildung 12) und deren Inhalt nach Fusion mit der Zytoplasmamembran als Exosomen sezerniert wird (Février et al., 2004; Johnstone et al., 1987; Pisitkun et al., 2004; They et al., 2002a; They et al., 2002b; Vazirabadi et al., 2003).

Die aus Endosomen internalisierte Exosomen (50 bis 100 nm) transportieren so bestimmte von der Plasmamembran abgeleitete Proteine auf ihrer Oberfläche und zytosolische Proteine in ihrem Inneren (Hicke et al., 2001a; Hicke et al., 2001b;



Johnstone et al., 1987; Katzmann et al., 2001; Pisitkun et al., 2004; Thery et al., 2002a; Thery et al., 2002b; Vazirabadi et al., 2003). Cholesterol-Depletion von Zellmembranen führt dazu, dass die regulierte Exozytose zum Erliegen kommt (Lafont *et al.* 1999). Exosomen können aus Zellkulturüberständen in differenziellen Zentrifugationsschritten gefolgt von einem oder mehreren Ultrazentrifugationsschritten anreichert und durch Dichtegradientenzentrifugation in Sucrose isoliert werden.

#### **2.5.2.4 Caveolin-abhängige Endozytose**

Diese Art der Endozytose kann auch als Caveolin-vermittelte Endozytose bezeichnet werden (Conner und Schmid 2003).

Caveolae (lat.: kleine Höhlen) sind tubuläre Einstülpungen der Plasmamembran mit einem Durchmesser von 50 bis 100 nm, deren charakteristisches Protein das Caveolin ist. Die Familie der Caveoline besteht bei Säugetieren aus den drei Proteinen Caveolin-1, -2 und -3, die zu den bekanntesten *Raft*-assoziierten Markerproteinen gehören. Caveolin-1 und Caveolin-2 werden in vielen Zellen koexprimiert, wobei Caveolin-1 auf molekularer Ebene der Grundbaustein der Zelle zur Ausbildung von Caveolae darstellt (Carver et al, 2003).

Caveolin-1 kann als Hauptmarker der Caveolae mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper detektiert werden. Internalisierte Partikel (fluoreszenzmarkiert) können dann über Kolokalisationsstudien innerhalb der Zelle genau geortet werden.

#### **2.5.3 Lipid Raft-unabhängige Endozytose**

Neben den apikalen Proteinen, die mit DRMs (Detergenz-resistenten Membrandomänen) assoziiert sind, gibt es eine Reihe von apikalen Proteinen, die nicht mit DRMs assoziieren. Diese Proteine gelangen über einen *Lipid Raft*-unabhängigen Transportweg zur apikalen Membran.

Dazu zählen z.B. das intestinale Bürstensaum-Enzym LPH, das p75NTR, das gp114 (Delacour und Jacob, 2006) und das Lektin Galektin-3.

Galektin-3 (Gal-3) gehört zur Familie der Galektine, einer Gruppe von Proteinen, die  $\beta$ -galaktosidische Zucker erkennen (Barondes et al., 1984).

Gal-3 zeigt wie alle 13 bislang im Menschen identifizierten Galektine zwar die typischen Charakteristika eines zytosolischen Proteins aber dennoch konnten immunzytochemische Untersuchungen zeigen, dass extrazelluläres Gal-3 über einen alternativen Sekretionsweg freigesetzt wird.

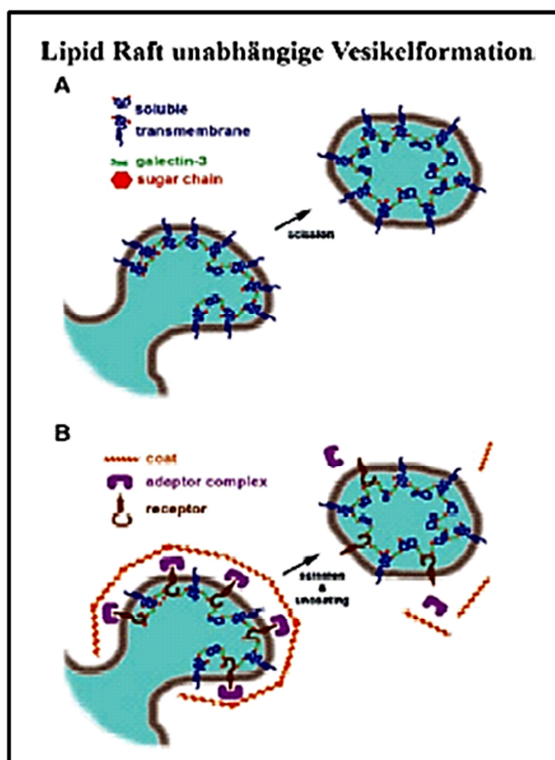


Abbildung 13: *Lipid Raft*-unabhängige Vesikelformation.  
A) Galektin-3 bindet von der luminalen Seite an Glykoproteine und führt zur Oligomerisierung der Proteine. Dieser Vorgang führt zu einer Membrankrümmung und resultiert im Abschnüren eines apikalen Transportvesikels.  
B) Galektin-3 bindet an Glykoproteine und rekrutiert Adapter Protein (AP)-Komplexe. APs rekrutieren Coat-Proteine und führen zum Abschnüren eines apikalen Transportvesikels.  
(A und B: Delacour und Jacob, 2006)

Darüber hinaus konnte im Rahmen der Analyse von Proteinkomponenten in apikalen Transportvesikeln epithelialer Zellen Galektin-3 als einer der Hauptbestandteile identifiziert werden, der mittels vermittelter Clusterung und Separierung der *Lipid Raft*-unabhängigen Glykoproteine schließlich zur Bildung eines *Lipid Raft*-unabhängigen Transportvesikels führt (Delacour et al., 2006; Delacour et al., 2007). In Abbildung 13 ist ein Modell des *Lipid Raft*-unabhängigen Transportes graphisch dargestellt.

## 2.6 Einfluss der O-Glykosylierung auf die Glykoprotein-Sortierung

Die O-Glykosylierung eines Proteins wird durch genetische und epigenetische Parameter kontrolliert. So ist bekannt, dass die z.Z. klonierten 14 humanen Polypeptid-GalNAc-Transferasen zwar keine stringente Motivabhängigkeit zeigen (Sequon), aber für vicinale Peptidsequenzen bestimmte Präferenzen aufweisen (Clausen et al. 1996; Wandall et al. 1997)

Über diese genetischen Parameter hinaus machen sich epigenetische Einflüsse in vielfältiger Weise bemerkbar:

- 1) In Abhängigkeit von der Verteilung der Glykosyltransferasen (GT) in den Subkompartimenten des cis/trans-Golgi kommt es bei Ko-Lokalisation der Enzyme zu kompetitiven Effekten. Dies gilt nicht nur für GT, die die gleiche Substratposition eines Zuckerakzeptors angreifen (z.B. ST6GalNAc-I und C2-GnT1), sondern auch im Sinne einer indirekten Konkurrenz, da sich die Addition von Monosaccharidbausteinen in bestimmten Positionen negativ (oder positiv) auf die Glykosylierung anderer Positionen des gleichen Substrates auswirken kann. Indirekte Konkurrenz in diesem Sinn ist z.B. für die Enzyme ST3Gal I und C2GnT1 beschrieben worden.
- 2) Andere indirekte Effekte sind für einzelne Isoformen der ppGalNAc-Ts (Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferasen) bekannt, die sich durch eine Lektin-vermittelte Glykosylierungsabhängigkeit ihrer Aktivierung (durch proximale GalNAc-Reste) oder ihrer Inaktivierung (durch proximale Gal-GalNAc-Reste und elongierte Glykane) auszeichnen (ppGalNAc-T4) (Dalziel et al. 2001; Bennett et al., 1998).
- 3) Für membranständige Glykoproteine kommen weitere Parameter ins Spiel, deren konkrete Einflüsse auf die Synthese der O-Glykane im Einzelnen noch nicht bekannt sind. Dazu gehören mögliche

Interaktionen mit ebenfalls membranständigen Chaperonen im Golgi und die für einige plasmamembranäre Glykoproteine beschriebene Rezyklisierung durch das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), die mit einer Resialinierung bzw. Reglykosylierung (*follow-up glycosylation*) im Sinne einer Reifung der Protein-Glykoformen einhergeht.

Beim membranären *Sorting* für die Rezyklisierung unreifer Glykoformen dürften neben zytosolischen Peptidmotiven auch extrazelluläre Glykotope und ihre spezifischen Rezeptoren eine Rolle spielen, die z.Z. aber noch nicht bekannt sind. Im Kontext der zellulären Sortierung steht auch die Frage, wie Glykoproteine mit apikaler Plasmamembran-Lokalisation im trans-Golgi sortiert werden. Auch hier scheint die O-Glykosylierung funktionell involviert zu sein und die Sortierung in *Lipid Rafts* zu vermitteln.

Experimentelle Evidenz für eine Beteiligung von O-Glykanen an der Sortierung und dem *Trafficking* zur apikalen Plasmamembran liegt für die Sucrase-Isomaltase (SI), die Aminopeptidase N (ApN) und die Dipeptidyl-Peptidase IV (DPP IV) vor (Naim et al., 1999). Die korrekte Zielsteuerung der pro-SI ist abhängig von der O-Glykosylierung einer 12 AS-Sequenz in der membranannahen „*Stalk*“-Region des Enzyms und der Membrananker-Domäne (Jacob et al., 2000). Sowohl O- als auch N-Glykosylierungen sind in der apikalen Sortierung der Dipeptidyl-Peptidase IV involviert (Alfalah et al., 2002).

### **2.6.1 Einfluss der O-Glykosylierung auf die MUC1-Sortierung für den apikalen Transport**

Auch für MUC1 liegen Erkenntnisse vor, wonach die Sortierung für apikale Plasmamembran-Lokalisation von der O-Glykosylierung abhängig zu sein scheint. Die Rezyklisierung des Transmembranmucins und seine Resialinierung wurden schon sehr früh beschrieben (Litvinov et al., 1993), doch haben erst Arbeiten der Arbeitsgruppe R.P. Hughey die zytosolischen Peptidmotive identifiziert, die bei der Endozytose membranärer MUC1-Glykoformen involviert sind (Kinlough et al., 2004). Unklar ist noch immer, ob diese Rezyklisierung nur über das TGN oder auch über frühere Kompartimente des sekretorischen Transportweges (cis/trans-Golgi) erfolgt, wie das für die DPP IV beschrieben wurde (Volz et al., 1995). Ebenfalls nicht geklärt ist die Rolle der O-Glykane in diesem Prozess. Sicher ist, dass eine unvollständige O-Glykosylierung mit verkürzten Glykanen eine verstärkte Internalisierung und Speicherung des Mucins in endozytotischen Vesikeln zur Folge hat (Altschuler et al., 2000). Für die Rezyklisierung scheint eine zweifache S-Palmitoylierung des CQC-Motivs am Übergang von der Transmembrandomäne zur zytosolischen Domäne essentiell zu sein (Huet et al., 2003).

Wir konnten zeigen (Engelmann et al., 2005), dass rezyklisierende membranäre MUC1-Fusionsproteine anders glykosyliert werden als ihre sekretorischen Gegenstücke, die den cis/trans-Golgi nur einmal passieren. Die O-Glykanprofile unterscheiden sich nicht nur im Sinne einer verstärkten Sialinierung auf membranständigen MUC1-Sonden, wie das schon früher von J. Hilkens beschrieben worden war (Litvinov et al., 1993), sondern insbesondere durch qualitativ unterschiedliche Muster der Core-Strukturen, die bislang auf struktureller Ebene noch für kein anderes Protein gezeigt wurden. Die Ergebnisse legen nahe, dass die initial generierten Glykoformen membranständiger MUC1-Sonden im Laufe ihrer Rezyklisierung durch das TGN oder Golgi-Kompartimente eine Prozessierung erfahren.

Umgekehrt kann O-Glykosylierung Signalfunktionen in der Sortierung des MUC1 übernehmen. So wird die apikale Zellsortierung nach Arbeiten von Huet et al. durch eine intakte O-Glykosylierung des Mucins vermittelt, da deren Inhibition

durch GalNAc-Bn (1-benzyl-2-acetamido-2-deoxy-  $\alpha$ -D-galactopyranoside) zu einer Akkumulation des MUC1 in Vesikeln führt (Huet et al., 2003). Diese Befunde dokumentieren insgesamt, dass *Trafficking* und O-Glykosylierung sich wechselseitig beeinflussen und ein sensibles regulatorisches System im Zusammenhang mit der Sortierung und Zielsteuerung apikaler plasmamembranständiger Proteine darstellen können (Potter et al., 2006).

## 2.7 Zielstellung der Promotionsarbeit

In Vorarbeiten (Engelmann et al., 2005) konnte Einblick in grundlegende regulatorische Prozesse der O-Glykanbiosynthese über enzymatische Kompetition und über Einflüsse des zellulären *Trafficking* gewonnen werden. Dort wurden die Generierung und Expression sekretorischer und membranständiger MUC1-Sonden in verschiedenen Epithel- bzw. Karzinomzellen beschrieben sowie die O-Glykosylierungsprofile dieser Fusionsproteine charakterisiert. Als wesentliche Erkenntnis dieser Studie ergab sich, dass die sezernierte Sonde (MUC1-S) ein qualitativ anderes Glykanprofil aufweist als die membranständige Sonde (MUC1-M). MUC1-S exprimierte vorwiegend *core2*-basierende O-Glykane, während abgeschilfertes (*Membrane-Shedding*) MUC1-M nahezu ausschließlich sialylierte *core1*-Strukturen ausstellte.

In einer weiteren Studie (Parry et al., 2006) konnte auch für endogenes, aus humaner Milch isoliertes MUC1 gezeigt werden, dass sezernierte Glykoformen ein von membranständigen distinktes Glykanmuster aufweisen. In dieser Arbeit wurden N-Glykane auf MUC1 der löslichen Milchphase mit solchen auf MUC1 der Milchfettmembranen verglichen.

Sezerniertes MUC1 wies vornehmlich Mannosereiche-Glykane und kleinere Anteile sialylierter biantennärer Komplex-Typ-Glykane auf, während membranständiges Mucin ausschließlich bi- und triantennäre Komplex-Typ-Glykane trug. Auch im Falle der N-Glykosylierung dieses Transmembranproteins scheint demnach die Rezyklisierung durch Golgi-Kompartimente eine weitere Prozessierung zu ermöglichen, so dass die nach einfacher Golgi-Passage verbleibenden Mannosereiche-Glykane sukzessive in Komplex-Typ-Glykane

überführt werden können. Diese Erkenntnisse sollten Ausgangspunkt für weitergehende Untersuchungen zur Aufklärung der zellulären Mechanismen sein, über die distinkte Glykoformen sekretorischer und membranständiger MUC1-Sonden generiert werden. Im Einzelnen sollte geklärt werden, ob:

1. die Rezyklisierung membranständiger MUC1-Sonden Ursache für die beobachteten Glykosylierungsänderungen ist.
2. die Rezyklisierung des Transmembranproteins über Clathrin-Vesikel oder alternative caveoläre Transportwege erfolgt, und wo innerhalb des sekretorischen Transportweges (ER/cis-transGolgi/TGN) der Wiedereintritt rezyklisierender MUC1-Sonden stattfindet.
3. MUC1 als Komponente spezifischer *Lipid-Rafts* sortiert wird
4. Exosomen einen Modus der Membranabschilferung und des Exports der „unreifen“ Glykosylierungsformen des Mucins darstellen.

Zur Grundlage dieser Studien gehört die Generierung einer mutierten, von MUC1-M abgeleiteten Sonde, die eine stark reduzierte Endozytose über Clathrin-Vesikel aufweisen sollte, da die AP2-bindenden Sequenzmotive in der zytosolischen Domäne des MUC1 (Y<sub>20</sub> und Y<sub>60</sub>) durch ortsspezifische Mutation ausgetauscht wurden (Kinlough et al., 2004). Hinzu kommt eine weitere mutierte MUC1-M-Sonde, deren S-Palmitoylierungsmotiv (CQC am Übergang von der Transmembrandomäne zur zytosolischen Domäne) gegen AQA ausgetauscht wurde. Diese Mutationen blockieren nicht die Endozytose des Transmembranproteins, wohl aber seine Rezyklisierung durch das TGN bzw. Golgi-Kompartimente zur Plasmamembran, so dass diese Sonde in Endosomen akkumuliert (Kinlough et al., 2006).

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Firmenauflistung

Es wurden die Chemikalien und organischen Verbindungen folgender Firmen benutzt:

Name	Standort
Alexis Biochemicals	Lörrach, Deutschland
Beckmann Instruments	München, Deutschland
Biorad	München, Deutschland
Calbiochem	Darmstadt, Deutschland
Eppendorf GmbH	Hamburg, Deutschland
Fluka	Taufkirchen, Deutschland
Millipore GmbH	Eschborn, Deutschland
New England Biolabs GmbH NEB	Frankfurt am Main, Deutschland
Nunc GmbH & Co KG	Langenselbold, Deutschland
PAA Laboratories	Cölbe, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
Roche Diagnostics GmbH	Mannheim, Deutschland
Roth	Karlsruhe, Deutschland
Sigma Aldrich	München, Deutschland
Serva	Heidelberg, Deutschland
Tpp Biochrom	Berlin, Deutschland

**Tabelle 2: Firmenauflistung**

Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad ‚pro analysi‘. Alle Lösungen und Reaktionen wurden mit Millipore-Wasser (Milli-Q PF Plus System, Millipore Corp.) bei Raumtemperatur (RT) angesetzt.



### 3.2. Verwendete Antikörper

Bezeichnung/ Konzentration	Spezifikation	Konzentration für Immunoblotting	Konzentration für Immunfluoreszenz färbung	Firma
Anti-MUC1-Ig C595 (100µg/ml)	monoklonaler Maus- Primärantikörper gegen TR- Domäne vom humanen MUC1	1,1µg/ml Verdünnt in 1% Milchpulver/TBS- Tween 20 (TTBS: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.01% Tween 20)	5 µg/ml Verdünnt in Komplettmedium mit 0.1% BSA	M. Price, Cancer Research Laboratory, University of Nottingham, Notts, UK,
Anti-MUC1-Ig (100µg/ml)	polyklonaler Kaninchen- Primärantikörper gegen Hexa-TR- Domäne vom humanen MUC1	—	10 µg/ml Verdünnt in Komplettmedium mit 0.1% BSA	Eurogentec S.A. Seraing, BL
Anti-MUC1- IgG1 Ma695 (100µg/ml)	Monoklonaler Maus- Primärantikörper gegen sialyliertes Kohlenhydrat- Epitop der TR- Domäne des humanen MUC1	—	5 µg/ml Verdünnt in Komplettmedium mit 0.1% BSA	ISOBM TD-4 International Workshop on Monoclonal Antibodies against MUC1 San Diego, USA
MUC1-H-295-IgG Sc-15333 (200µg/ml)	Polyklonaler Kaninchen- Primärantikörper gegen C- Terminus (kleine Untereinheit) vom humanen MUC1 (Aminosäuren 961-1255)	1 µg/ml Verdünnt in 1% Milchpulver/TBS- Tween 20 (TTBS: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.01% Tween 20)	4 µg/ml Verdünnt in Komplettmedium mit 0.1% BSA	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, DE
Anti-Myc-IgG1 R950-25 (1mg/ml)	monoklonaler Maus- Primärantikörper gegen c-myc Epitop (Evan, G. I., et al., 1985)	1 µg/ml Verdünnt in 1% Milchpulver/TBS- Tween 20 (TTBS: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.01% Tween 20)	—	Invitrogen life technologies, Karlsruhe, DE
Anti-Galektin-3- IgG1 Sc-25279 (200µg/ml)	monoklonaler Maus- Primärantikörper gegen das humane Galektin- 3 (Aminosäuren 1-160)	2 µg/ml Verdünnt in 1% Milchpulver/TBS- Tween 20 (TTBS: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.01% Tween 20)	4 µg/ml Verdünnt in Komplettmedium mit 0.1% BSA	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, DE
Anti-Caveolin-1- IgG Sc-894 (200µg/ml)	polyklonaler Kaninchen- Primärantikörper gegen N- Terminus vom humanen Caveolin-1	2 µg/ml Verdünnt in 1% Milchpulver/TBS- Tween 20 (TTBS: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.01% Tween 20)	4 µg/ml Verdünnt in Komplettmedium mit 0.1% BSA	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, DE

Bezeichnung/ Konzentration	Spezifikation	Konzentration für Immunoblotting	Konzentration für Immunfluoreszenz färbung	Firma
Anti-GAPDH- IgG2b (ab-9484) (100µg/ml)	monoklonaler Maus- Primärantikörper gegen GAPDH	5 µg/ml Verdünnt in 1% Milchpulver/TBS- Tween 20 (TTBS: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.01% Tween 20	—	Abcam Berlin, DE
Anti-Flotillin-2- IgG1 Sc-28320 (200µg/ml)	monoklonaler Maus- Primärantikörper gegen das humane Flotillin-2 (Aminosäuren 151-240)	2 µg/ml Verdünnt in 1% Milchpulver/TBS- Tween 20 (TTBS: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.01% Tween 20	4 µg/ml Verdünnt in Komplettmedium mit 0.1% BSA	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, DE
Anti-Clathrin- Membranvesikel X22 (6mg/ml)	monoklonaler Maus- Primärantikörper gegen die schwere Kette des Clathrins (IgG1)	—	4 µg/ml Verdünnt in Komplettmedium mit 0.1% BSA	antibodies- online GmbH, Aachen, DE
Anti-PDI ER-Marker (ab3672)	polyklonaler Kaninchen- Primärantikörper gegen PDI	—	1 µg/ml Verdünnt in Komplettmedium mit 0.1% BSA	Abcam Berlin, DE
Alexa Flour 555 Fluoreszenz markierte Esel- anti-Kaninchen IgG Antikörper 2mg/ml	polyklonaler Sekundär- antikörper gegen Kaninchen IgG (schwere Kette) und gegen alle Ig (leichte Kette)	—	2 µg/ml Verdünnt in 0.02% Triton X-100 in PBS mit 0.1% BSA	Molecular probes, invitrogen technologies, Karlsruhe, DE
Alexa Flour 488 Fluoreszenz markierte Ziege- anti-Maus IgM Antikörper 2mg/ml	polyklonaler Sekundär- antikörper gegen Maus IgM (schwere Kette)	—	2 µg/ml Verdünnt in 0.02% Triton X-100 in PBS mit 0.1% BSA	Molecular probes, invitrogen detection technologies, Karlsruhe, DE
Meerrettich- Peroxidase- konjugierter (HRP) Kaninchen Anti- Maus-IgG (1,3 g/l)	polyklonaler Sekundär- antikörper gegen Maus IgG	2 µg/ml Verdünnt in 1% Milchpulver/TBS- Tween 20 (TTBS: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.01% Tween 20	—	Dako GmbH, Hamburg, DE
Meerrettich- Peroxidase- konjugierter (HRP) Schwein Anti- Kaninchen-IgG (0,34 g/l)	polyklonaler Sekundär- antikörper gegen Kaninchen IgG	2 µg/ml Verdünnt in 1% Milchpulver/TBS- Tween 20 (TTBS: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.01% Tween 20	—	Dako GmbH, Hamburg, DE

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Antikörper

### 3.3. Kits

Name	Hersteller
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAprep Spin Midiprep Kit	Qiagen

### 3.4. Verwendete Medien und Puffer

#### 3.4.1 Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- ❖ **10% SDS:** 50 mg Dodecylsulfat-Na-Salz,  
500 ml ddH<sub>2</sub>O
- ❖ **Probenpuffer (reduzierend, 5x):** 2% SDS; 10% Glycerin,  
0,04% Bromphenolblau,  
62,5 mM Tri-HCl (pH6,8);  
5% β-Mercaptoethanol
- ❖ **Elektrophoresepuffer (10x):** 0,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1% SDS;  
(pH 8,3)

#### 3.4.2. Für E.coli

- ❖ **500 ml LB-Medium:**

5.0 g Trypton  
2.5 g *Yeast extract*  
5.0 g NaCl



in 400 ml ddH<sub>2</sub>O lösen,  
pH 7 mit 2 M NaOH einstellen,  
auf 500 ml ddH<sub>2</sub>O auffüllen.

- ❖ **500 ml LB-Medium für Agarplatten:**

5.0 g Trypton  
2.5 g *Yeast extract*  
5.0 g NaCl  
7.5 g Agarose



in 400 ml ddH<sub>2</sub>O lösen,  
pH 7 mit 2 M NaOH einstellen,  
auf 500 ml ddH<sub>2</sub>O auffüllen,  
autoklavieren und abkühlen auf ca.  
50°C und 50 µl Ampicilin (100µl/ml)

### 3.4.3 Sonstiges

- ❖ **PBS:** 6,7 mM Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>; 1,4mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,145 M NaCl pH 7.3 (20°C)
- ❖ **TBST:** 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 0,15 M NaCl;  
0,01% Tween20
- ❖ **Towbinpuffer:** 39 mM Glycerin; 48 mM Tris; 10%  
Methanol

### 3.5 Protein-Marker

Als Proteinmarker wurde der Kaleidoscope Prestained Standard von BioRad eingesetzt (s. Abbildung 14).

Protein	Farbe	M <sub>w</sub> (kDa)
Myosin	blau	217,0
• -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




Abbildung 14: Kaleidoscope Prestained Standard (BioRad).  
Darstellung des verwendeten Proteinstandards mit Angabe des Molekulargewichtes (Mw).  
Die Abbildung ist dem Katalog des Herstellers entnommen (kDa: kiloDalton).

## 3.6. Kultivierung humaner Zelllinien

### 3.6.1. Herkunft der Zellen und Kultivierungsbedingungen

Bis auf HEK-293 (embryonale humane Nierenzellen, Invitrogen) wurden alle Zelllinien, MCF-7 (Mammakarzinomzellen) und MDA-MB-231 (Mammakarzinomzellen), von der ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, USA) bezogen.

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte als Monolayer unter sterilen Bedingungen in Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> oder 150 cm<sup>2</sup>, TPP Biochrom, Berlin) mit Komplettmedium [DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA Laboratories) mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS, PAA Laboratories, Cölbe) und Penicillin (100 U/ml, PAA Laboratories) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einer wassergesättigten Atmosphäre.

Das FKS wurde zuvor unter sterilen Bedingungen durch Dreischritt-Zentrifugation [bei 1200g für 10min (Hettich-Zentrifuge), bei 10000g für 30 min (Beckmann-Zentrifuge) und zum Schluß bei 100000g für 1h in der Ultrazentrifuge (Beckmann Coulter GmbH)] von Exosomen befreit.

Alle 3 Tage wurden die adhärent wachsenden Zellen mit sterilem PBS (pH 7.4; PAA Laboratories, Cölbe) einmal gewaschen und anschließend mit frischem Komplettmedium versorgt.

Konfluente Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit sterilem PBS (PAA Laboratories) durch Trypsin/EDTA (50 mg/ml Trypsin, 20 mg/ml EDTA in PBS, PAA Laboratories), wenn sich Untersuchungen der Oberflächen-Antigene oder zellmembranständiger Peptide anschlossen, innerhalb von 3-5 min bei 37 °C abgelöst. Die Reaktion wurde mit Komplettmedium abgestoppt.

Nach dem Abzentrifugieren (Hettich-Zentrifuge) der Zellsuspension bei 180 x g für 5 min bei RT wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 bis 1:10 in neue Zellkulturflaschen überführt.

### **3.6.2 Langzeitlagerung von Zellen**

Nach dem Ablösen und Waschen der Zellen wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (s. 3.6.5) die Zellzahl bestimmt. In einer Zelldichte von etwa  $5 \times 10^6$  Zellen/ml wurden die Zellen im 6 Einfriermedium (80% Kulturmedium, 10% FKS, 10% DMSO) resuspendiert und als 1 ml Aliquots in Kryoröhrchen (Nunc) gleichmäßig ( $1^\circ\text{C}/\text{min}$ ) bei  $-80^\circ\text{C}$  in einem Kryo-Einfriergerät (Nunc-Nalgene) eingefroren, anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **3.6.3 Auftauen**

Zum Auftauen wird das Aliquot mit den Zellen rasch in einem Wasserbad ( $37^\circ\text{C}$ ) geschwenkt. Vor dem Öffnen wird die Oberfläche des zellenthaltenden Kryoröhrchens mit 70 %-igem Ethanol-Wassergemisch sterilisiert. Als Waschschrift werden die Zellen zu 5 ml Kompletmedium in ein 50 ml-Reaktionsgefäß gegeben und 5 min bei  $4^\circ\text{C}$  und 180 g (Hettich-Zentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Pellet zügig in 10 ml frisches Kompletmedium resuspendiert. Die Suspension wird in eine sterile Zellkulturflasche (Tpp Biochrom, Berlin,  $75\text{ cm}^2$ ) überführt und als Monolayer bei feuchter Atmosphäre unter 5%  $\text{CO}_2$  bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

### **3.6.4 Transfektion und Selektion transfizierter Zellen**

Die Zelllinien HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231 wurden am Tag vor der Transfektion auf  $75\text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen verdünnt gesplittet, so dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 40 bis 50% Konfluenz aufwiesen. Für jede Transfektion wurden 10ug der rekombinanten Plasmid-DNA mit 300 ul Kulturmedium ohne FKS gemischt und kurz inkubiert. Anschließend wurden 60 ul Superfect Transfektionsreagenz (Qiagen) zugegeben, abzentrifugiert (500 Rpm, 1 min, RT) und 10 min bei RT stehen gelassen. Zwischenzeitlich wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und die Zellen mit Kulturmedium ohne FKS einmal gewaschen.

Der gesamte Transfektionsansatz wurde in 2,6 ml Komplettmedium aufgenommen, gemischt und auf die Zellen gegeben. Diese wurden anschließend für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank (Binder) inkubiert, danach mit Kulturmedium ohne FKS gewaschen und in frischem Komplettmedium für 24 Stunden kultiviert.

Anschließend wurde dem Kulturmedium der transient transfizierten Zellen zur dauerhaften Expression des episomalen Transfektionsplasmides 5 g/ml Puromycin (Sigma-Aldrich) zugesetzt.

Nach etwa 14 Tagen starben die nicht transfizierten Zellen unter dem Selektionsdruck ab. Zur Überprüfung der Expression der rekombinanten transmembranären Fusionsproteine wurden die Zellen konfluenten Kulturen aufgearbeitet und im Dot-Blot-Verfahren (s. 3.9.3) mit einem Myc-spezifischen monoklonalen Antikörper (Invitrogen) getestet (s. Tabelle 3).

Aus dem Zellkultur-Überstand der konfluenten, transfizierten und FKS-Exosomen-freien Zellen wurde die Exosomen isoliert (s. 3.6.6) und der Überstand wurde nach Zusatz vom Proteaseinhibitor PMSF (1 mM, Sigma-Aldrich) bei -20 aufbewahrt.

### **3.6.5 Bestimmung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellzahl pro ml errechnet sich aus der Zahl der Zellen in den 4 großen Quadraten multipliziert mit dem sogenannten Kammerfaktor. Dieser ergibt sich aus dem Volumen der Zählkammer und beträgt  $2,5 \times 10^3$ .

### 3.6.6 Isolierung der Exosomen aus dem Zellüberstand

Unabhängig von der zellulären Quelle sedimentieren Exosomen relativ einheitlich bei  $\geq 70.000 \times g$  und lassen sich so über differenzielle Zentrifugationsschritte leicht aus Zellkulturüberständen isolieren (Théry et al., 2006). Die Exosomen wurden aus insgesamt 2L Zellüberstand der transfizierten Zellen durch eine Dreischritt-Zentrifugation isoliert:

1. 1200g     10 min (Hettich-Zentrifuge)
2. 10000g    30 min (Beckmann-Zentrifuge)
3. 10000g    30 min (Beckmann-Zentrifuge)
4. 100000g   60 min (Beckmann-Ultrazentrifuge)

Die Zentrifugationsschritte 1 bis 3 dienen hauptsächlich dazu die Zelltrümmer und andere Verunreinigungen aus dem Überstand zu pelletieren und zu verwerfen. Beim letzten Zentrifugationsschritt konnten erst die Exosomen als Pellet isoliert in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4) aufgenommen werden. Anschließend wurde das Pellet insgesamt noch dreimal mit PBS gewaschen und nach jedem Waschschrift wieder bei 100000g eine Stunde lang in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Zum Schluß wurden die Exosomen in 100  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.6.7 Herstellung der Zelllysate aus den transfizierten HEK-293 und MCF-7 Zellen

Für die Ermittlung der erfolgreichen Transfektion, der N-Glykanprofilierung und der Expressionsrate der MUC1-M-Konstrukte wurden zunächst die mit MUC1-M, MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N und MUC1-M-CQC/AQA transfizierten und konfluent gewachsenen Zellen (HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231) nach zweimaligem Waschen mit sterilem PBS (PAA Laboratories) durch Trypsin/EDTA (50 mg/ml Trypsin, 20 mg/ml EDTA in PBS, PAA Laboratories) innerhalb von 3-5 min bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  abgelöst und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen (Tpp Biochrom) überführt.



Nach Zentrifugation (5 Minuten bei 500g) und Dekantierung des Überstandes wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, anschließend im kalten Lysepuffer (250 mM Tris-HCl, 4% SDS, 2%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 10 % Glycerol, 1 mM PMSF) resuspendiert und 20 min im Ultraschall-Eiswasserbad (Milian Barnsonic 221, Genf, Schweiz) aufgeschlossen. Die Lyse von Zellen wurde in allen Fällen in Gegenwart von Proteaseinhibitoren durchgeführt, um eine Degradation des Zielproteins zu vermeiden.

Die Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (13000 x g, 30 min, 4°C) pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Die Zellzahl wurde mit Lysepuffer auf 200.000 Zellen pro ml eingestellt, indem die Menge an Lysepuffer entsprechend der vor der Zentrifugation ermittelten Zellzahl gewählt wurde.

Die gewonnenen Proteinextrakte im Überstand wurden entweder unbehandelt oder nach der Behandlung mit PNGase F (s. 3.10.1) oder Endo H (s. 3.10.2) mit SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden bei RT abgekühlt und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit Hilfe von Anti-MUC1 C595 (erkennt ein Epitop innerhalb der VNTR-Domäne) oder H-295-Antikörper (s. Tabelle 3) detektiert, der gegen ein Epitop in der zytoplasmatischen Domäne des MUC1 gerichtet ist. Die Testung der transfizierten Zellen auf die Expression von rekombinanten MUC1-Konstrukten erfolgte mittels Dot-Blot-Verfahren (s. 3.9.3) mit Anti-Myc (s. Tabelle 3).

## 3.7. Immunzytochemische Methoden

### 3.7.1 Immunfluoreszenzfärbung von Zellen

Permanox Chamberslides (Nunc, Langenselbold) wurden mit einer 1 mg/ml Poly-Lysinlösung (Serva) für 30 min bei RT inkubiert und danach mit sterilem PBS insgesamt dreimal gewaschen.

In der Zwischenzeit wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (50 mg/ml Trypsin, 20 mg/ml EDTA in PBS, PAA Laboratories) innerhalb von 3-5 min bei 37 °C gelöst und die Reaktion mit Kompletmedium abgestoppt.

Nach dem Abzentrifugieren (Hettich-Zentrifuge) der Zellsuspension bei 180 x g für 5 min bei RT wurde der Überstand abdekantiert und das Zellpellet mit 5 ml sterilem PBS gewaschen und wieder bei 180 x g für 5 min bei RT abzentrifugiert.

Das Pellet wurde anschließend in Kompletmedium gelöst und so auf die Kavitäten des Objektträgers verteilt, so dass jede Kammer etwa  $10^5$  Zellen enthielt.

Nach der Inkubation der Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen insgesamt dreimal mit sterilem PBS gewaschen. Für Endozytose-Studien der MUC1-Sonden wurden Anti-MUC1 C595, Anti-MUC1 Ma695 oder polyclonaler Kaninchen-Anti-MUC1 gegen TR-Domäne des MUC1 eingesetzt (s. Tabelle 3). Die Antikörper wurden für 1 Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Kompletmedium mit 0,1% BSA aufgetragen.

Danach wurde der Überstand abgenommen und die Zellen insgesamt dreimal für 5 min mit PBS gewaschen, um die nicht spezifisch gebundenen Antikörper auszuwaschen. Die Zellen wurden anschließend mit 2%igem Formaldehyd (Roth, Karlsruhe) pH = 7,5 für 10 min bei RT fixiert. Nach 30 minütigem Blocken freier Aldehydgruppen mit 2 %igem Glycin (Roth) in PBS (pH 7.5) bei RT und dreimaligem Waschen mit PBS, schloss sich die Permeabilisierung der Zellen mit 0,1 %iger Triton X-100 Lösung (Fluka, Taufkirchen) für 5 min bei RT an.

Endozytoseweg	Inhibitor/ Firma	Konzentration /Inkubationszeit	Kommentar	Literatur
<b>Clathrin-vermittelte Endozytose</b>	Methyl- $\beta$ - Cyclodextrin (Sigma-Aldrich)	10 mM/30 min	Blocken der Clathrin- Caveolae-abhängig u. Caveolae-unabhängig- vermittelten Endozytose durch Cholesterolverarmung	Orlandi et al. 1998
	Sucrose (Sigma-Aldrich)	0,2 M/ 1h	Blocken der Clathrin- vermittelten Endozytose durch Hypertonie und zytosolische Ansäuerung	Grady et al. 1995
<b>Caveolae- abhängig- vermittelte Endozytose</b>	PP2 [4-Amino- 5-(4- chlorophenyl)- 7-(t- butyl)pyrazolo[ 3,4- d]pyrimidine] /Calbiochem	10 $\mu$ M/ 30 min	Ein Inhibitor der Scr- Kinasefamilie, blockiert die Caveolae-abhängig- vermittelten Endozytose durch Inhibition von Caveolin-1 Phosphorylierung	Shajahan et al., 2004a, 2004b
	Methyl- $\beta$ - Cyclodextrin (Sigma-Aldrich)	10 mM/30 min	Blocken der Clathrin- Caveolae-abhängig u. Caveolae-unabhängig- vermittelten Endozytose durch Cholesterolverarmung	Orlandi et al. 1998
<b>Cholestrol- abhängig- vermittelte Endozytose</b>	Methyl- $\beta$ - Cyclodextrin (Sigma-Aldrich)	10 mM/30 min	Blocken der Clathrin- Caveolae-abhängig u. Caveolae-unabhängig- vermittelten Endozytose durch Cholesterolverarmung	Orlandi et al. 1998

**Table 4: Auflistung der verwendeten Endozytose-Inhibitoren**

Unspezifische Proteinbindungen wurden durch eine einstündige Blockierung mit 3% BSA in PBS bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die Zellen insgesamt dreimal 5 min mit 0.02% Triton X-100 in PBS (Puffer A) bei Raumtemperatur gewaschen.

Für Kolokalisationsstudien wurden die Zellen zusätzlich mit Endozytosemarkern, wie Anti-Clathrin, Anti-Caveolin-1, Anti-Flotillin-2 oder Anti-Galektin-3 (s. Tabelle 3) für eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Kompletmedium mit 0.1% BSA gefärbt,. Danach wurden die Zellen insgesamt dreimal 5 min mit 0.02% in Puffer A bei Raumtemperatur gewaschen.

Als Sekundärantikörper wurden die fluoreszenzmarkierten Anti-Maus IgM Alexa Fluor 488 und Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 555 (s. Tabelle 3) in Kompletmedium

mit 0.1% BSA eine Stunde lang bei Raumtemperatur und im Dunkeln eingesetzt. Auch nach diesem Schritt wurden die nicht spezifisch gebundenen Sekundärantikörper insgesamt dreimal für 5 min mit Puffer A im Dunkeln ausgewaschen.

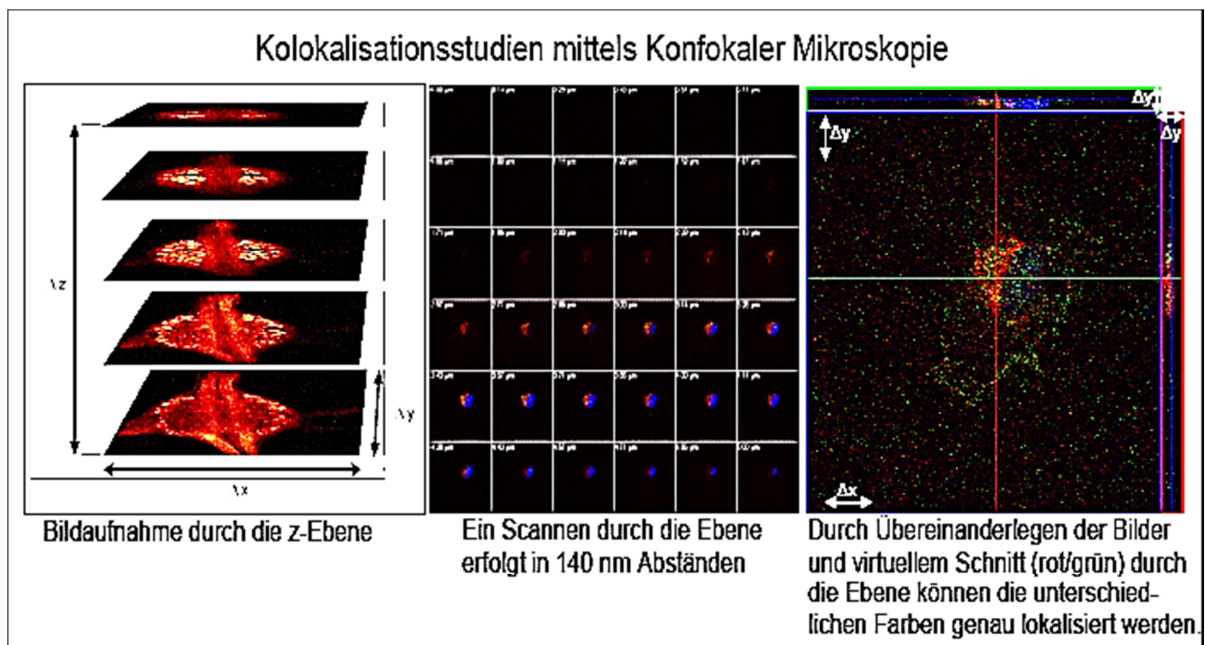
Nach dem Entfernen der Kammer wurde mit Hilfe von 3,5 µl Fluoreszenz Mounting Einbettmedium (Dako, Hamburg), welches das Ausbleichen von Fluoreszenz verhindert, das Deckglas auf dem Objektträger fixiert. Die Auswertung der fixierten und fluoreszenzmarkierten Zellen erfolgte unter einem konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskop* des Typs *True Confocal Scanner Leica TCS SL*.

Als Negativ-Kontrolle wurde bei den Proben der Primärantikörper durch Komplettmedium mit 0.1% BSA ersetzt.

Für Aufnahmeexperimente und Inhibitionsstudien der Clathrin-vermittelten oder der *Raft*-assoziierten bzw. *Raft*-unabhängigen Endozytose wurden die Zellen vor der Behandlung mit Primärantikörpern (Anti-MUC1 C595 bzw. Kaninchen-Anti-MUC1) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter sterilen Bedingungen zuerst mit den für die Zellaufnahme spezifischen Inhibitoren präinkubiert. Die Konzentration und Prä-Inkubationszeit der verschiedenen Inhibitoren sind in der Tabelle 4 aufgeführt. Die Inhibitoren wurden in den entsprechenden Konzentrationen dem Komplettmedium zugesetzt (Tabelle 4).

### 3.7.1.1 Aufnahmen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (True Confocal Scanner Leica TCS SL, Leica)

Konfokale Fluoreszenz-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) ermöglicht die Betrachtung von Zellen und Geweben in definierten optischen Schnittebenen und damit eine genauere Lokalisierung der Antigene.



**Abbildung 15:** Darstellung der Fluoreszenzinformation des Präparats aus drei Dimensionen mit Hilfe konfokaler Bilder ("optischer Schnitte"). Ein konfokales Bild beinhaltet die Information aus einer Horizontalebene innerhalb des Präparats ( $\Delta x$  und  $\Delta y$ ). Durch Heben bzw. Senken des Objektisches ( $\Delta z$ ) können konfokale Bilder aus verschiedenen Horizontalebene aufgenommen werden. Jedes Bild wird auf diese Weise analysiert, um auf Kolokalisation zu prüfen (Christian Lohr 1998).

Bei der konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskopie handelt es sich um eine Rastertechnik, bei der das Objekt punktwise von einem Laserstrahl abgetastet wird. Das Laserlicht wird über eine feine Öffnung gebündelt und durch ein Objektiv mit hoher Apertur auf das Objekt projiziert. Die vom Objekt ausgehende Strahlung (Laserlicht und Emissionsspektrum des Fluorochroms) wird durch eine hierzu spiegelbildlich angeordnete Optik aufgenommen, so daß die Brennpunkte beider Linsen genau im Objektpunkt zusammenfallen (Konfokalität). Lichtstrahlen, die außerhalb des gemeinsamen Brennpunktes liegen kommen auf diese Weise nicht zur Darstellung.

Diese sind bei nicht-konfokalen Mikroskopen zu einem großen Teil für die Unschärfe verantwortlich. Im CLSM ermöglicht das Prinzip der Konfokalität eine Fokussierung auf Bildpunkte in allen drei Dimensionen des Objekts. Die tatsächliche Dicke des Präparates kann daher bis zu 100  $\mu\text{m}$  betragen, während auf Bildebenen von ca 1  $\mu\text{m}$  Stärke fokussiert werden kann. Bei Immunfluoreszenzmarkierungen stellt allerdings die Eindringtiefe der Antikörper einen limitierenden Faktor für die Dicke des Präparates dar.

Für die Aufnahmen am konfokalen Fluoreszenzmikroskop (*True Confocal Scanner Leica TCS SL, Leica*) wurden variablere Einstellungen verwendet. Die Fluoreszenz wurde durch zwei Laser mit den Wellenlängen  $\lambda = 488 \text{ nm}$  und  $\lambda = 555 \text{ nm}$  angeregt und ebenso viele Detektoren (Photomultiplier) ermöglichten Mehrfachmarkierungen mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Abbildung 14).

Um bei Doppelfluoreszenz-Markierungen ein „Durchscheinen“ der verschiedenen Fluoreszenzfarben zu vermeiden, wurde der „*Double Track Mode*“ angewandt, d.h. jede durchzumusternde Zeile wurde alternierend mit nur einer der beiden jeweiligen Wellenlängen angeregt und das vom Objekt emittierte Licht wurde entsprechend seiner Wellenlängen aufgetrennt und auf einen Photomultiplier gespiegelt, in dem ein elektrisches Signal generiert wurde. Dieses konnte nun digital weiterverarbeitet und die einzelnen Bilder anschließend überlagert werden. Konfokale Serienschritte durch die fixierten Präparate wurden in Abständen (z-Abstand) von 250 nm bis 350 nm zwischen den einzelnen lichtoptischen Schnittebenen angefertigt. Die Schritte wurden dabei 8x bzw. 16x gemittelt. Die Pixelgröße variierte zwischen circa 300 nm x 300 nm und 70 nm x 70 nm. Die Laserpower und die Signalverstärkung wurden so gewählt, dass es in Zellen möglichst keine überbelichteten Bereiche gab.

### **3.7.1.2 Bildbearbeitung der mikroskopischen Aufnahmen**

Die im CLSM installierte *Software* ermöglicht eine Speicherung der gewonnenen Bilder im TIFF-Format. Die so erstellten Dateien können entweder die Information eines einzigen Farbkanals (s/w-Bild) oder die aller zwei Farbkanäle (RGB-Bild) enthalten. Ein Grafikbearbeitungsprogramm (z.B. *adobe Photoshop 5.0, Adobe*

*Systems*, 1998) ermöglicht in letzterem Fall die (Wieder-)Auftrennung eines zweifarbigen Bildes in seine zwei Kanäle, was bei der Untersuchung von Kollokalisierungen von Interesse ist (Pfaff et al., 1999).

Um eventuelle Fehlinterpretationen bei der zweidimensionalen Darstellungsweise des konfokalen Mikroskops zu verhindern (z.B. die falsch gewertete Kollokalisierung, durch zwei in der z-Ebene übereinander liegenden Zellen mit den selben x und y Koordinaten.), wurde stets mit Hilfe einer Bildserie entlang der z-Achse eine dreidimensionale Rekonstruktion erstellt.

### **3.7.2 Oberflächen – Biotinylierung der transfizierten MCF-7 Zellen**

Mit Hilfe von Biotinylierungsexperimenten können Proteine in der Plasmamembran und deren Endozytose und Rezyklisierung verfolgt werden.

Bei dem verwendeten Reagenz handelt es sich um einen N-Hydroxylsulfosuccinimidester des Biotins (Sulfo-NHS-SS-Biotin, Sigma- Aldrich, München, Deutschland), das unter Ausbildung einer neuen Amidbindung mit primären Aminogruppen von Proteinen reagiert und diese so mit einer Biotingruppe markiert. Die bei dem eingesetzten Biotinylierungsreagenz vorhandene Sulfonatgruppe bedingt zum einen die Wasserlöslichkeit und zum anderen verhindert sie die Membrangängigkeit der Substanz. Auf diese Weise wird gewährleistet, daß nur Oberflächenproteine mit Biotin markiert werden (Cole et al., 1987). Biotinyliertes Protein wird später mit Hilfe von Streptavidin, einem Biotin bindenden Protein, isoliert. Die Dithio-Gruppe wird später genutzt, um die Biotinylierung nicht-endozytierten Proteins reduktiv zu entfernen.

Für die Biotinylierungsexperimente wurden die mit MUC1-M transfizierten semikonfluenten MCF-7 Zellen aus einer 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche zunächst durch Trypsin/EDTA (50 mg/ml Trypsin, 20 mg/ml EDTA in PBS, PAA Laboratories) innerhalb von 3-5 min bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> unter sterilen Bedingungen abgelöst, in ein steriles 50 ml *Falcon*-Röhrchen (Tpp Biochrom) überführt und 5 min bei 180 x g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 12 ml Komplettmedium resuspendiert und à 2ml auf eine sterile 6 well Platte (Tpp Biochrom) gleichmäßig ausgesät und ü.N. bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.



Das Zellkulturmedium wurde entfernt und die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen. In jede Schale wurde 1 ml Biotinlösung (1 mg Biotin/ml PBS) gegeben und für 30 min bei 4 °C und 50 rpm auf dem Schüttler (GFL 3015, Milian, Genf, Schweiz) inkubiert. Da bei einer Temperatur von 4 °C kein Membrantransport abläuft, können nur die extrazellulären Bereiche der Plasmamembranproteine mit einer Biotinmarkierung versehen werden.

Die Biotinlösung wurde entfernt und die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 10 min im 37 °C warmen serumfreien Zellkulturmedium mit 20 mM HEPES, pH 7,5 (Roth) ohne bzw. mit Inhibitoren (Sucrose: 0.2 M, Fluka; PP2: 10 µM, Calbiochem und Methyl-β-Cyclodextrin: 10mM, Sigma-Aldrich) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> unter sterilen Bedingungen inkubiert. Während dieser 10-minütigen Rekultivierung bei 37 °C können Exo- und Endozytose ablaufen, wobei biotinylierte Plasmamembranproteine in die Endosomen gelangen.

Danach werden die Zellen dreimal mit kaltem PBS und 10 mM Natriumazid (Sigma-Aldrich) gewaschen. Natriumazid im Waschpuffer inhibiert die Endozytose sowie Quervernetzung von Zelloberflächenproteinen.

Die biotinylierten Zellproben wurden während der folgenden zwanzigminütigen 4 °C Behandlung mit 50 mM reduziertem Glutathion (Sigma-Aldrich) in 75 mM NaCl, 75 mM NaOH und 1mM EDTA mit 1% BSA vor der reduktiven Abspaltung ihrer Biotinmarkierung geschützt, während die Biotinreste von allen auf der Plasmamembran verbliebenen Proteinen entfernt werden. Nachdem die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen wurden, wurden die Glutathion-Reste durch Iodoacetamid in PBS (5 mg/ml, Sigma-Aldrich) entfernt (5 min) und die Zellen wieder dreimal mit PBS gewaschen.

Das Zellrasen wurde durch vorsichtiges Abschaben geerntet, in Lysepuffer [0.2 ml 60 mM *n*-octyl β-D-Glucopyranosid (Sigma-Aldrich), 0.1% SDS, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 150 mM NaCl und 1 mM PMSF] 20 min lang im Ultraschall-Eiswasserbad (Milian Barnsonic 221, Genf, Schweiz) lysiert und anschließend 10 min bei 14000 rpm und 4 °C abzentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen.

Der klare Überstand, der die biotinylierten Plasmamembranproteine enthielt, die während der 10-minütigen Rekultivierung internalisiert wurden und deshalb bei der anschließenden Glutathion-Behandlung vor der Abspaltung ihrer Markierung



geschützt waren, wurde mit 100 µl *Streptavidin-Sepharose high performance* (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) versetzt und ü.N. bei 4 °C auf dem Roller (CAT M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland) inkubiert.

Bei der Streptavidin-Biotin-Methode bedient man sich der sehr starken Affinität des Biotins zu dem Glykoprotein Avidin bzw. Streptavidin. Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein mit vier Bindungsstellen für Biotin. Teilweise ist es zu unspezifischen Reaktionen bei der Verwendung von Avidin gekommen, so daß man auf gentechnischem Weg ein reineres Produkt gewonnen hat, welches man Streptavidin nannte. Es wird aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert.

Sepharose-Beads wurden anschließend bei 4 °C und 13000 rpm (Eppendorf Zentrifuge 5415R, Hamburg) für 10 min zentrifugiert und mit 1 ml Waschpuffer (1% Triton X-100, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7.4 und 150 mM NaCl) gewaschen.

Die Sepharose-Beads wurde wieder bei 13000 rpm (Eppendorf Zentrifuge) und 4 °C abzentrifugiert und nach dem vollständigen Entfernen des Waschpuffers mit 50 µl SDS- Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C 5 min aufgekocht.

Nach einer Zentrifugation bei RT und 13000 rpm für 3 min wurden die Proben mit Hilfe vom SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mittels Anti-MUC1 C595 (s. Tabelle 3) detektiert.

## 3.8. Molekularbiologische Methoden

### 3.8.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

Mittelpunkt gentechnischer Arbeiten ist die Neukombination von DNA. *E. coli* dient der Amplifizierung von Plasmiden, da diese selbstständig und von dem Wirtschromosom unabhängig repliziert werden. Alle Arbeiten wurden unter sterilen bzw. semi-sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### 3.8.1.1 Stamm

Name	Genotyp
DH5 $\alpha$ :	supE44 $\Delta$ lacU169( $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

#### 3.8.2 Klonierung und Transformation

Ein 1  $\mu$ g Plasmid-DNA wurde zu 50  $\mu$ l kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen (Invitrogen) pipettiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 sec bei 42°C wurden die Bakterien für zwei Minuten auf Eis gelagert bevor dem Reaktionsansatz 950  $\mu$ l LB-Medium (bei Klonierungsvektoren) zugegeben wurden. Nach einstündiger Inkubation der Bakteriensuspension bei 37°C in einem Thermoschüttler (Eppendorf) bei 225 Rpm wurden jeweils 50, 100 und 200  $\mu$ l pro Ansatz auf ampicillinhaltigen (200 g/ml, Sigma-Aldrich) LB-Agarplatten (LB-broth base Agar, Gibco) ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend für bis zu 14 Tage bei 4°C gelagert.

### 3.8.3 Plasmid-Isolierung aus Bakterien

Von den mit Bakterienkolonien bewachsenen Agarplatten wurden Einzelkolonien gepickt und über Nacht in 5 ml (Miniprep) bzw. 25 ml (Midiprep) ampicillinhaltigem (50 g/ml) LB-Medium (Gibco) bei 37°C in einem Schüttler (225 Rpm) inkubiert. Die Aufarbeitung der Bakteriensuspension zur Isolierung der Plasmide erfolgte mit kommerziellen Kits (QIAprep Spin Mini- bzw. Midiprep Kit von Qiagen).

Die in ddH<sub>2</sub>O eluierte und quantifizierte Plasmid-DNA wurde bei -20°C aufbewahrt. Die zur Langzeitlagerung vorgesehenen transformierten Bakterienklone wurden nach der Kultivierung ü.N. im Verhältnis 1:1 (insgesamt 1800 µl) mit Glycerin (Roth, Karlsruhe) versetzt, gut gemischt und bei -20°C aufbewahrt. Nach dem Auftauen der Glycerin-Stammkultur wurde diese in einer Verdünnung von 1/1000 in LB-Medium resuspendiert und jeweils 50 µl, 100 µl und 200 µl des Reaktionsansatzes auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen.

### 3.8.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Die DNA-Probe wurde im Verhältnis 1:100 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt und die optische Dichte photometrisch bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt. Die Berechnung der Konzentration erfolgt in Abhängigkeit von der gewählten Verdünnung und dem Faktor 50 (µg/ml) für doppelsträngige DNA in einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke:

$$(\lambda_{260} - \lambda_{280}) \times 2 \times 50 \text{ [}\mu\text{g/ml]} \times \text{Verdünnungsfaktor} = c \text{ [}\mu\text{g/ml]}$$

Reine DNA sollte einen Quotienten (Absorption bei 260 nm/ Absorption bei 280 nm) zwischen 1,8 und 2 aufweisen. Ein Wert unter 1,8 weist auf Protein- und ein Wert über 2 auf RNA Kontamination hin.

### 3.8.5 Generierung und Klonierung von transmembranären MUC1-Konstrukten

Der Plasmid-Vektor pCEP-PU (Kohfeldt et al., 1997) wurde für die Expression der MUC1-Konstrukte in eukaryontischen Zellen, die den Vektor epichromosomal replizierten, verwendet.

Der pCEP-PU stellt einen modifizierten pCEP4 Vektor (Invitrogen) dar (Abbildung 16), der sich hinsichtlich des Resistenzgens, ursprünglich Hygromycin und im pCEP-PU Puromycin, unterscheidet.

Des Weiteren wurde der CMV- gegen einen RSV-Promotor ausgetauscht. In die MCS (*multiple cloning site* = multiple Klonierungsstelle) wurde neben der BM40-Signalpeptidsequenz gefolgt von einer His6-Sequenz und Myc-Sequenz eine NheI-Restriktionsenzym-Schnittstelle eingefügt.

Über die 5'-NheI- und 3'-NotI-Schnittstelle wurde ein aus sechs MUC1-Tandem Repeats bestehendes Konstrukt im Leseraster inseriert (Müller und Hanisch, 2002).

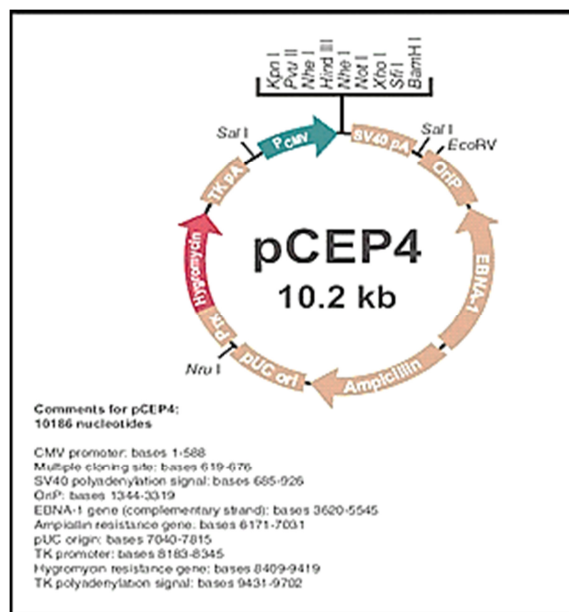


Abbildung 16: pCEP4 Plasmidkarte (Invitrogen life technologies)

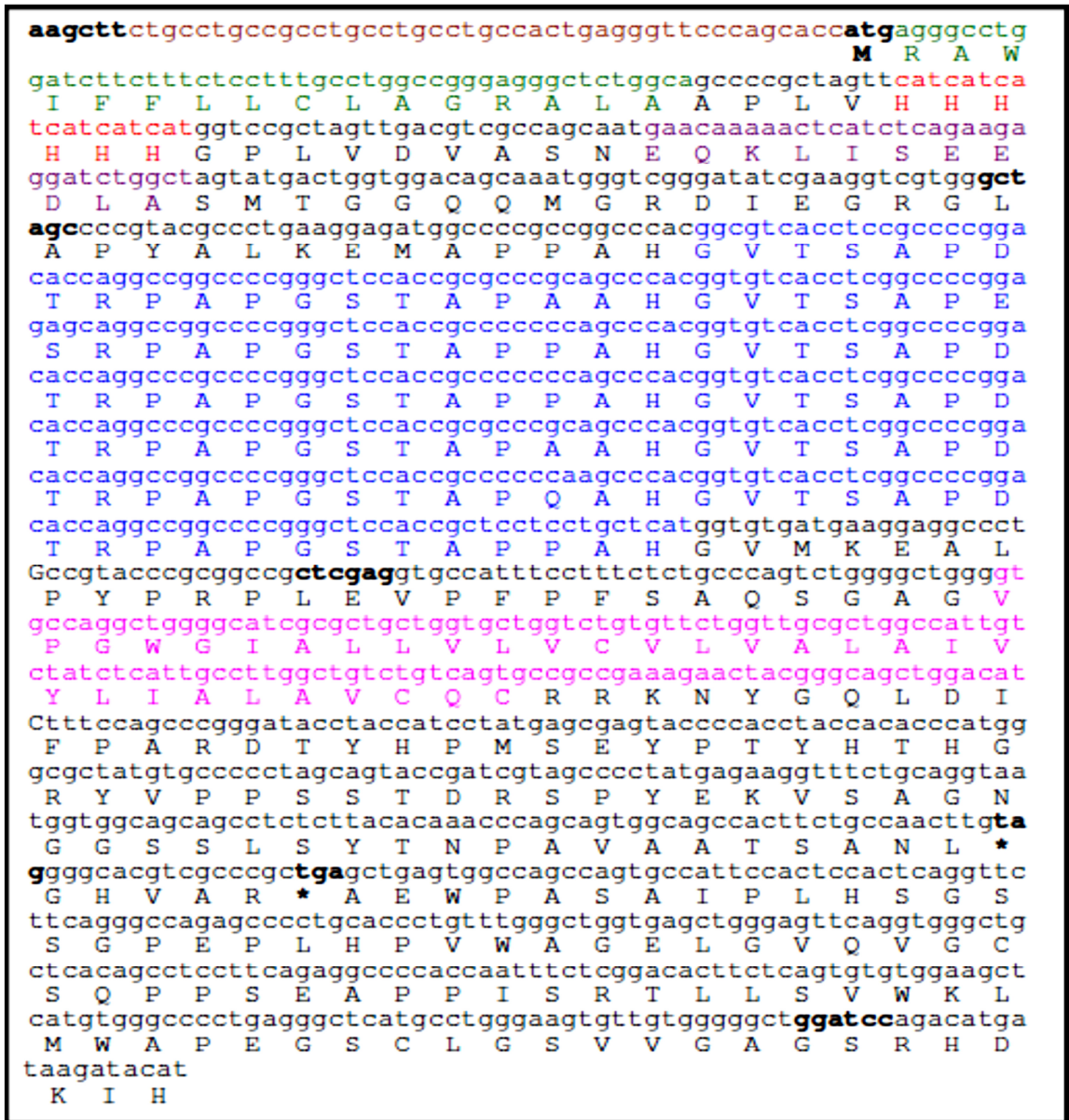


Abbildung 17: MUC1-Ausschnitt des pCEP-PU-Vektors (Engelmann et al. 2005)  
 In Kleinbuchstaben wurde die Nukleotidsequenz und komplementär dazu in Großbuchstaben die Aminosäuresequenz angegeben.  
 Restriktionsschnittstellen (HindIII: aagctt, NheI: gctagc, XhoI: ctcgag, BamHI: ggatcc), das Startkodon (atg) und Stoppkodons (tag, tga) wurden fett geschrieben.  
 Die weiteren Elemente sind wie folgt farblich gekennzeichnet: **BM-40 untranslatierte Region**, **BM-40 Signalpeptid**, **his6**, **myc**, **MUC1-Tandemrepeats** und die **Transmembrandomäne**.

MUC1-Transmembran-Element (MUC1-TM = MUC1-M) wurde durch PCR-Amplifikation des entsprechenden DNA-Sequenzbereiches aus einer cDNA (HPAF, pankreatische Tumorzelllinie) generiert und in pCEP-PU-Expressionsvektor ligiert (Abbildung 17).

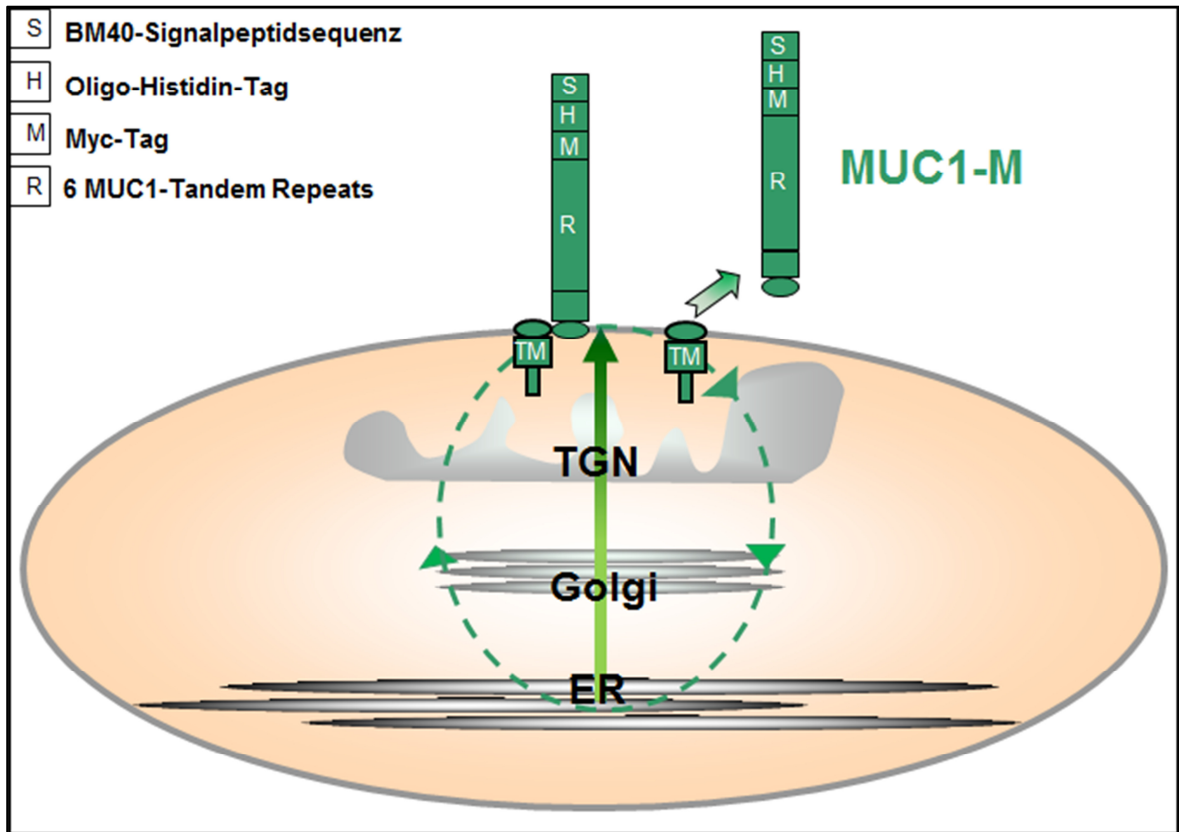


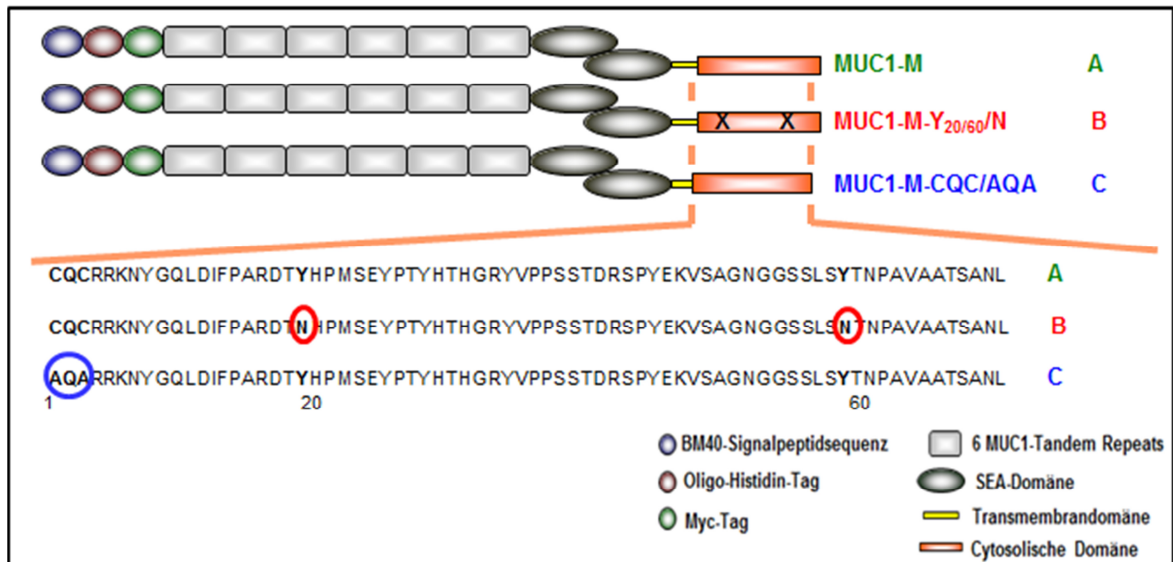
Abbildung 18: Nach dem Erreichen der Plasmamembran wird MUC1-M entweder rezykliert oder über verschiedene Mechanismen (proteolytisches „Shedding“) in den extrazellulären Raum abgegeben (Engelmann et al., 2005).

Für dieses „parentale“ MUC1-M, das neben N-terminalen Tag-Sequenzen (Oligo-His, Myc), einer Hexarepeat-Domäne und einer funktionellen SEA-Domäne, die Transmembransequenz und die hochkonservierte zytosolische Domäne des endogenen Mucins aufweist, wurde die Typ 1-transmembranäre Expression, Rezyklisierung zur Plasmamembran und das proteolytische „Shedding“ (Abschilferung der extrazellulären Domäne, s. Abbildung 18) des MUC1-M in den extrazellulären Raum bereits gezeigt (Engelmann et al., 2005).

Zwei weitere Konstrukte (MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N und MUC1-M-CQC/AQA), die neben MUC1-M im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt worden, sind mutierte von MUC1-M abgeleiteten Sonden, die uns freundlicherweise von der Kooperationspartnerin, Frau Prof. Hughey (Pittsburgh, USA) zur Verfügung gestellt worden sind (Abbildung 19). MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N sollte eine stark reduzierte Endozytose über Clathrin-Vesikel aufweisen (Abbildung 20), da die AP2-bindenden Sequenzmotive in der



zytosolischen Domäne des MUC1 (um Y<sub>20</sub> und Y<sub>60</sub>) ausgetauscht wurden (Kinlough et al., 2004).



**Abbildung 19:** Generierung der mutierten von MUC1-M abgeleiteten Konstrukte MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N und MUC1-M-CQC/AQA. Diese Mutationen wurden mit Hilfe von Mutagenese-PCR in der zytoplasmatischen Domäne von MUC1-0TR (MUC1 mit null tandem repeats) in pBS-SK(-) (Stratagene, Cedar Creek, TX) unter Verwendung von Primern mit entsprechendem Nucleotidaustausch für die Doppelmutanten CQC/AQA oder Y20N, Y60N erreicht. Nucleotidsequenzen der SEA-, Transmembran-Domäne und der zytoplasmatischen Domäne der beiden MUC1-0TR Mutanten wurden ebenfalls mittels PCR amplifiziert, mit Xho1 und BamH1 geschnitten und in MUC1-M in pCEP-PU (ebenfalls mit Xho1 und BamH1 geschnitten) hinein ligiert. MUC1-M-(CQC/AQA) und MUC1-M-(Y20/60/N) in pCEP-PU wurden zum Schluß zur Überprüfung sequenziert.

Bei der zweiten mutierten Sonde ist das S-Palmitoylierungsmotiv (CQC am Übergang von der Transmembrandomäne zur zytoplasmatischen Domäne) gegen AQA ausgetauscht. Dieser Austausch beeinflusst zwar nicht die Endozytose des Transmembranproteins wohl aber seine Rezyklisierung durch das TGN bzw. Golgi-Kompartimente zur Plasmamembran, so dass diese Sonde in Endosomen akkumuliert (Abbildung 20) (Kinlough et al., 2006).

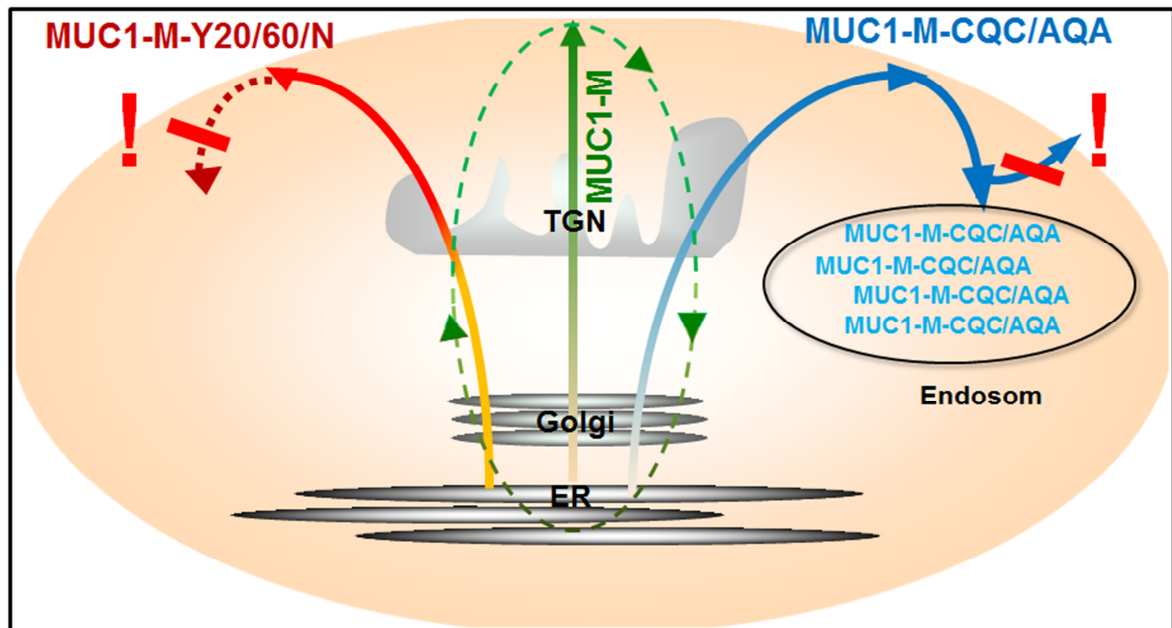


Abbildung 20: Für die authentische, dem endogenen Mucin funktionell vergleichbare MUC1-M-Sonde konnte bereits Endozytose membranständiger Spezies und ihre Rezyklisierung zur Plasmamembran demonstriert werden (grün). Das vermutlich veränderte Endozytoseverhalten der von MUC1-M abgeleiteten Sonden [MUC1-M-Y20/60/N mit eingeschränkter Clathrin-vermittelter Endozytose (rot) und MUC1-M-CQC/AQA mit verminderter Rezyklisierung (blau)] und dessen Auswirkung auf Glykosylierung und alternative Transportmechanismen sollen im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

## 3.9. Proteinbiochemische Methoden

### 3.9.1. Bradford Test

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wird ein Bradford Test durchgeführt. Er beruht auf der Farbreaktion funktioneller Gruppen der Proteine mit farbstoffbildenden Reagenzien. Die Intensität des Farbstoffes korreliert hierbei direkt mit der Konzentration der reagierenden Gruppen.

Bei einem *Bradford-Assay* werden blaue Säurefarbstoffe, die als Coomassie-Brillant-Blau bezeichnet werden, verwendet. In Gegenwart von Proteinen und in saurem Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 zu 595 nm. Grund dafür ist die Stabilisierung des Farbstoffes in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und den basischen Aminosäuren des Proteins.



Proteinbestimmungen wurden mit dem Bradford-Mikrotest durchgeführt 0,1-2µg/100µl (1-20µg/ml). In einer Multiwell-Platte (Nunc) wurde eine Eichreihe von 0,1 bis 2 µg BSA (Roth) in ein Gesamtvolumen von 100 µl inklusive 50 µl Bradfordlösung (Bradford Reagent, Sigma-Aldrich) pipettiert. Die zu messende Probe wurde in mehreren Verdünnungsstufen aufgetragen und ebenfalls mit 50 µl Bradford versehen und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 µl gebracht. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 10min wurde die Absorption bei 595nm (Magellan Software, Tecan Sunrise, Crailsheim, Deutschland) gemessen.

### **3.9.2 SDS-PAGE nach Laemmli**

Das Prinzip der Polyacrylamidgelelektrophorese besteht darin, dass Proteine von SDS, einem anionischen Detergenz, umschlossen werden. SDS wirkt denaturierend, indem es räumliche Strukturen aufbricht und die Polypeptidketten in eine gestreckte Konformation zwingt (Laemmli et al. 1970). Es lagert sich in einem Massenverhältnis von 1,4 g SDS zu 1 g Protein an. Die Eigenladung der Proteine wird abgeschirmt und eine Negativladung proportional zum Molekulargewicht eingebracht. Die Laufstrecke verhält sich annähernd linear zum Logarithmus des Molekulargewichts. Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde in einer Mini-Protean II Cell Elektrophoresekammer (BioRad) durchgeführt.

Zur Verbesserung der Bandenschärfe dient ein Sammelgel, welches über das Trenngel gegossen wird, sobald dieses fest geworden ist. Das Sammelgel wird mit Probenaschen versehen, indem man in die noch flüssige Gellösung einen Probenkamm eingeführt und nach dem Erstarren des Gels wieder entfernt.

Für die Analyse von MUC1-Fusionsproteinen wurden 10%ige Trenngele und 3,5%ige Sammelgele eingesetzt. Die Zusammensetzung der Gele aus den entsprechenden Komponenten ist der Tabelle 5 zu entnehmen.

Komponenten	Sammelgel, 3%	Trenngel, 4%	Trenngel, 10%	Trenngel, 12.5%
30% Acrylamid/ Bisacrylamid (37.5:1)	9.75	13.2	33	41.25
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	18.75	-	-	-
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	-	10	25	31.25
10% SDS	1	1	1	1
dH <sub>2</sub> O	69.45	74.75	39.95	25.45
10% APS	1	1	1	1
TEMED	0.05	0.05	0.05	0.05

**Tabelle 5: Zusammensetzung (in Volumenprozent) von Sammel- und Trenngelen für die SDS-PAGE.**

Die zu untersuchenden Proben wurden im reduzierenden SDS-Probenpuffer resuspendiert, für 10 min bei 95°C inkubiert, bei RT abgekühlt und anschließend auf das polymerisierte Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in einer Semi Dry-Transferzelle (BioRad, München) und in Elektrophoresepuffer für etwa 60 min bei 180 Volt durchgeführt.

Die Bestimmung des Molekulargewichtes der Fusionsproteine erfolgte durch Koelektrophorese des Kaleidoscope Prestained Standard (s. 3.5).

### 3.9.2.1. Silberfärbung

Nach der Elektrophorese wurden die SDS-Gele für mindestens eine Stunde in 50% Ethanol, 12% Essigsäure und 0.05% Formaldehyd fixiert und anschließend dreimal mit 50%igem Ethanol für jeweils 20 Minuten gewaschen. Danach wurden die Gele mit Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5H<sub>2</sub>O (0.2 mg/ml) vorbehandelt, dreimal kurz in Wasser geschwenkt und für 10 Minuten in AgNO<sub>3</sub> (2 mg/ml), 0.075% Formaldehyd gefärbt.

Vor dem Entwickeln der spezifischen Proteinbanden in Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (60 mg/ml), 0.05% Formaldehyd, 0.02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5H<sub>2</sub>O wurden die Gele zweimal kurz in Wasser geschwenkt. Zum Abstoppen der Reduktion wurde eine Lösung aus 50% Methanol und 12% Essigsäure verwendet. In einem Vakuum-Geltrockner (Slab Gel Dryer SE 1160, Hoefer) wurden die Gele, equilibriert in 10% Glycerin und 20% Ethanol, für drei Stunden bei 60°C unter Vakuum zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet und anschließend fotografisch dokumentiert.

### 3.9.2.2 Coomassiefärbung

Zur quantitativen Proteinbestimmung wurden die Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen durch das Schütteln in *Coomassie Brilliant Blue* G250-Lösung (50% Methanol, 12% Essigsäure, 0,04% Servablau G-250) blau gefärbt.

Der Säurefarbstoff Coomassie-Brilliantblau G250 geht eine unspezifische Bindung mit kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine ein.

Die Entfärbungslösung (40% Methanol, 5% Essigsäure) wurde anschließend so lange verwendet, bis der Hintergrund klar und die Proteinbanden blau gefärbt sichtbar wurden. In einem Vakuum-Geltrockner (Slab Gel Dryer SE 1160, Hoefer) wurden die Gele, equilibriert in 10% Glycerin und 20% Ethanol, für drei Stunden bei 60°C unter Vakuum zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet und anschließend fotografisch dokumentiert.

### 3.9.3 Immunoblotting

Im Anschluß an die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (s. 3.9.2) wurden die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Protan BA 83, Schleicher & Schuell) transferiert. Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Fusionsproteinen erfolgte mittels Semi-Dry-Blot in Towbinpuffer (39 mM Glycerin, 48 mM Tris, 20% Methanol) bei 4 mA/cm<sup>2</sup> für 40 min in einer Semi Dry-Transferzelle (BioRad Trans-Blot SD). Die Validierung des Transfers erfolgte durch Kontrolle der im Gel verbleibenden Restmenge Protein mittels Coomassie-Färbung des Gels (Nachweisgrenze) und fortführend wurde die Membran 3 min in 10% Ponceau S-Lösung (0.2% Ponceau S, w/v, Merck in 3% TCA/H<sub>2</sub>O, Fluka) gefärbt, die Positionen der Markerbanden mit Bleistift festgehalten und die Membran in TBS entfärbt.

Die Reduktion unspezifischer Bindungsstellen erfolgte in 5% Milchpulver/TBS-Tween 20 (TTBS: 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.01% Tween 20), der sich die jeweils einstündige Inkubation bei RT des Primär- und nachfolgend die des Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers (Kaninchen-anti-Maus-Ig, 1:2000, P0260 von DAKO bzw. Schwein-anti-Kaninchen-Ig, 1:3000, P0399 von DAKO, s.

Tabelle 3), immer verdünnt in 1% Milchpulver/TTBS, anschloss. Folgende Primärantikörper wurden für Immunoblotting verwendet (s. auch Tab 3):

- ⇒ **Anti-MUC1-Ig C595**
- ⇒ **Anti-MUC1-Antikörper H-295**
- ⇒ **Anti-Flotillin-2**
- ⇒ **Anti-Myc-Ig**
- ⇒ **Anti-Caveolin-1**

Zwischen jedem Inkubationsschritt wurde die Membran dreimal mit TTBS für 10 min gewaschen. Die Detektion der Proteine gelang mittels Chemilumineszenz. Dazu wurde die Membran für 5 min bei RT mit einem 1:1 Gemisch aus Lumi-Light Luminol Enhancer Solution und *Lumi-Light Stable Peroxidase Solution* (Roche) flächendeckend inkubiert und mit einem Röntgenfilm (Fuji, Düsseldorf) in einem Fotolabor bedeckt, um die proteingebundenen Antikörper zu detektieren. 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 10 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.

Alle für Immunoblotting verwendeten Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen.

### 3.9.4 Zuckernachweis in Glykokonjugaten

Der Nachweis einer Glykosylierung auf den membranständigen MUC1-Fusionsproteinen, die auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert wurden (s. 2.7.4), erfolgte mittels *DIG Glycan Detection Kit* (Roche). 5 bis 10% der Affinitätschromatografie-gereinigten MUC1-His-6 Fraktionen wurden dabei in einer Vakuumzentrifuge (Heto DNA plus, Allerød, Dänemark) getrocknet.

Laut Vorschrift wurden die Hydroxylgruppen der Zucker mit Perjodat zu Aldehydgruppen oxidiert, an welche kovalent Digoxigenin-3-O-succinyl-Aminocaprinsäure-Hydrazid gekoppelt wurde. Die markierten Glykoproteine wurden mittels SDS-PAGE (12.5% Trenngel, 3% Sammelgel) aufgetrennt, geblottet und in einem Enzym-Immunoassay mittels DIG-spezifischen Antikörpers, die mit Alkalischer Phosphatase konjugiert vorlagen, laut Herstellerangaben nachgewiesen.

### 3.9.5 Isolierung und Aufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine

Die Fusionsproteine wurden so konstruiert, dass sie spezifische Affinitätsmodule (6xHis-Sequenz, Myc-Sequenz) enthalten, über welche die Aufreinigung der rekombinant exprimierten Konstrukte mittels Affinitätschromatographie erfolgen kann.

#### 3.9.5.1 Isolierung abgeschilfterer rekombinant exprimierter Proteine aus Zellkulturüberstand

900 ml exosomenfreier Zellüberstand von transfizierten Zellen (s. 3.6.6) wurde über Nacht gegen ddH<sub>2</sub>O dialysiert und anschließend durch Zugabe von 6.5% Ethanol, 6.5% 10x Konzentrat (500 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 M NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mM PMSF) und 0.01% β-Merkaptoethanol auf ein Volumen von 1.8 Litern mit ddH<sub>2</sub>O eingestellt. Daran schloss sich die Reinigung des Überstandes auf einer mit Ni-NTA-Matrix-beladenen PD10 Säule an.

### 3.9.5.2 Reinigung der Konstrukte über Ni-NTA-Säulen (Nickelchelataffinitätschromatographie)

Die Aufreinigung der membranären his6-Myc-MUC1-Konstrukte erfolgte mittels Nickelchelataffinitätschromatographie über eine Ni-NTA Agarose Matrix (Qiagen). Nitrilotriessigsäure (NTA) benötigt vier seiner insgesamt sechs koordinativen Bindungsstellen zur Interaktion mit einem Nickel-Ion, so dass die beiden noch freien Bindungsstellen mit dem 6xHis-Modul des Fusionsproteins interagieren können (Abbildung 21).

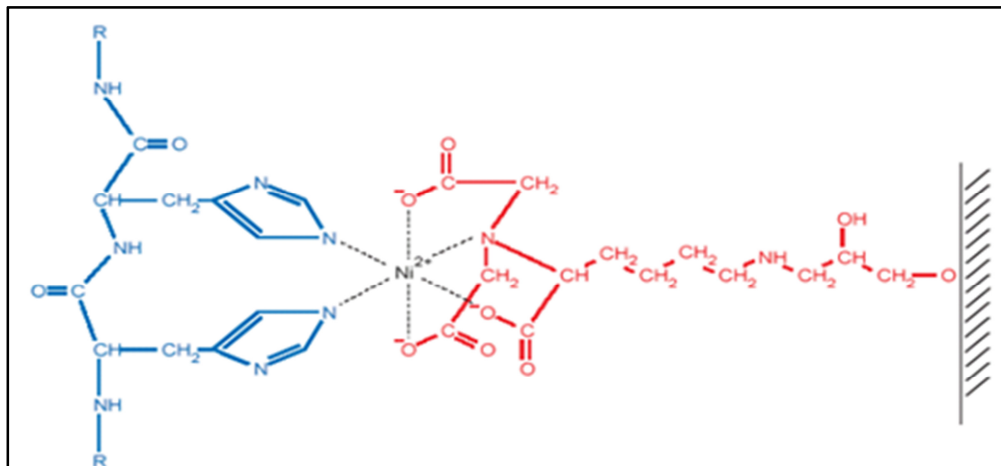


Abbildung 21: Interaktionen zwischen dem His-Tag und der Ni-NTA Matrix (The QIAexpressionist 06/2003, Qiagen).

Zur Aufreinigung der 1.8 Liter vorbereiteten Zellüberstandes wurde eine PD10-Säule mit 5 ml Ni-NTA-Agarose gefüllt und mit 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.5 equilibriert, bevor der klare Überstand zweimal über die Säule bei 4°C gegeben wurde. Danach wurde die Säule zuerst mit 30 ml Waschpuffer 1 (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 5 mM β-Merkaptoethanol, 10% Ethanol, pH 6.5), dann mit jeweils 10 ml Waschpuffer 2 (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.5) und Waschpuffer 3 (20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.8, 20% Azetonitril) gewaschen.

Die Elution erfolgte mittels Imidazol-Gradienten (10 mM Imidazol, 25 mM Imidazol, 50 mM Imidazol, 75 mM Imidazol, 100 mM Imidazol, 125 mM Imidazol, 150 mM Imidazol, 175 mM Imidazol, 200 mM Imidazol, 250 mM Imidazol) in jeweils 50 mM

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 5 mM β-Merkaptoethanol und 10% Ethanol in zehn Fraktionen à 5 ml.

Von jeder eluierten Fraktion sowie vom Durchfluss und den vereinigten Waschfraktionen wurden jeweils 10 µl im Dot-Blot-Verfahren (s. 3.9.3) mit Anti-Myc getestet.

Die positiv getesteten Fraktionen wurden vereinigt, mit Hilfe von Ultrafiltration (Amicon Centriprep Ultracel YM-10 Da, Millipore) laut Herstellerangaben eingeeengt und anschließend mittels Umkehrphasen-HPLC weiter aufgereinigt.

Alle für die Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA Agarose Matrix verwendeten Chemikalien stammen von der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland).

### **3.9.5.3 Aufreinigung der membran-abgeschilferten MUC1-Konstrukte mittels Umkehrphasen-HPLC**

Nach der Nickelchelate-Affinitätschromatographie wurden die eingeeengten MUC1-Fusionsproteine auf der Beckman Gold HPLC-Station aufgereinigt. Die Proben wurden 4:1 mit 0.1% TFA/ddH<sub>2</sub>O verdünnt und auf eine C8-Säule (Vydac MZ Analysetechnik, 2 mm x 10 cm) injiziert. Für die Umkehrphasen-HPLC wurde ein linearer Gradient von 10% Puffer B (80% Azetonitril in 0.1% TFA/ddH<sub>2</sub>O), 90% Puffer A (2% Azetonitril in 0.1% TFA/ddH<sub>2</sub>O) auf 100% Puffer B innerhalb von 30 Minuten gefahren. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0.5 ml/min und die spektrophotometrische Detektion der zu analysierenden Proben erfolgte bei 214 nm (Shimadzu RF-10A XL) unter graphischer Darstellung der Daten am Computer (Beckman Nouveau software). Alle Peaks wurden separat gesammelt und die Identität der MUC1-Fusionsproteine im Immunoblot mit Anti-MUC1-Antikörper C595 überprüft. Die jeweils positiv getesteten Fraktionen wurden vereinigt und in der Vakuumzentrifuge (Heto DNA plus, Allerød, Dänemark) getrocknet.

#### 3.9.5.4. Proteinisolierung aus dem SDS-Polyacrylamidgel nach tryptischem Verdau

Um anschließend die Reinheit der mittels Umkehrphasen-HPLC aufgereinigten MUC1-Fusionsproteine zu überprüfen, wurden die getrockneten MUC1-haltigen Proben anschließend in 100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Jeweils 5-10 µl von den Proben wurden für Silberfärbung und Nachweis von Kohlenhydraten mittels DIG Glycan Detection Kit (Roche) eingesetzt.

Da allerdings beim Überprüfen des Reinheitsgrades der Fusionsproteine eine Proteinbande der Größe von etwa 126 kDa beim Zuckernachweis mittels *DIG Glycan Detection Kit* visualisiert wurde, die als Kontamination mit dem Glykoprotein *Complement factor H (H factor 1)* aus dem FKS identifiziert werden konnte (*peptide mass fingerprinting*, ZMMK), wurden die nach Umkehrphasen-HPLC angereicherten MUC1-Fusionsproteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt, um die Glykananalyse der Coomassie-gefärbten reinen Proteine durchzuführen.

Ganze Proteine lassen sich nur sehr schwer aus einem SDS-Polyacrylamidgel eluieren. Dagegen können die Peptide enzymatisch im Gel gespaltener Proteine vergleichsweise leicht eluiert werden (Cohen et al. 1997). Der tryptische im Gel-Verdau von Proteinen ist auf Coomassie-gefärbte SDS-Polyacrylamidgele anwendbar und liefert kleine Proteinbruchstücke, die dann zur Minimierung der Gelverunreinigungen hoch konzentriert in dünnen Gelen vorliegen sollten. Die Ausbeute beim Verdau im Gel beträgt bei höheren Proteinkonzentrationen etwa 70 bis 90 % (Shevchenko et al. 1996). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass beim Verdau im Gel keine Peptide selektiv verloren gehen (Scheler et al. 1998). Eine hohe Peptidausbeute erfordert neben der optimalen enzymatischen Spaltung auch eine quantitative Extraktion der Peptide aus dem Gel.

Die angefärbten Proteinbanden, die laut Immunoblot-Analyse MUC1-Fusionsproteinen entsprachen, wurden mit einem sterilen Skalpell so eng wie möglich aus dem Gel ausgeschnitten.

Die Proteinbanden wurden insgesamt dreimal mit Acetonitril/Wasser (1:1, v/v) für jeweils eine Stunde gewaschen und anschließend in Vakkumzentrifuge getrocknet.



Die getrockneten Gelstücke wurden mit proteasehaltigem Verdauopuffer [1 µg Proteinase K (Quiagen) in 50 µl 20 mM Tris, pH 7.5, 1 mM CaCl<sub>2</sub>] ü.N. bei 65 °C inkubiert.

Die Proteinase K kann als Subtilisin-verwandte Serin-Protease klassifiziert werden und ist eine der aktivsten Endopeptidasen, die bisher bekannt sind. Die Proteinase K bietet den Vorteil, dass sie bei großem Überschuss oder langen Inkubationszeiträumen auch sogar hochglykosyliertes Proteinmaterial in freie Aminosäuren spalten kann und zeigt außerdem keine ausgesprochene Spaltungsspezifität.

Proteinase K ist über einen großen pH-Bereich (4 – 12,5) stabil. Die volle Aktivität wird in einem pH-Bereich von 6,5–9,5 über mehrere Stunden aufrechterhalten. Das Enzym zeigt bei 65°C eine zwölfmal größere Aktivität als bei 25°C. Eine rasche Denaturierung tritt jedoch über 65°C auf.

Nach dem Verdauende wurde der Überstand abpipettiert und in ein Eppendorfhütchen gegeben. Zu den feuchten Gelstückchen wurden zunächst 200 µl Wasser und danach 200 µl Acetonitril/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) zugegeben so, dass die Gelstücke von der Flüssigkeit bedeckt sind. Die Proben wurden jeweils zwei Stunden bei R.T. auf dem Roller (CAT M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland) rotiert. Nach jedem Elutionsschritt wurde der Überstand abgenommen und in das gleiche Eppendorfhütchen zum Verdauüberstand gegeben. Die abgenommenen im Eppendorfhütchen vereinigten Überstände wurden in Vakuumzentrifuge (Heto DNA plus, Allerød, Dänemark) bis zur Trockenheit eingengt.

Die extrahierten getrockneten Glykopeptide (Abbildung 32) wurden später zum Zweck der O-Glykanprofilierung reduktiv β-eliminiert (s. 3.10.4).

## 3.10. Methoden zur Glykanprofilierung

### 3.10.1 Enzymatische Freisetzung N-gebundener Glykane mit Endoglykosidase Peptid N-Glycosidase F

Die Endoglykosidase Peptid N-Glycosidase F (PNGase F) wird aus dem Kulturfiltrat von *Flavobacterium Meningosepticum* isoliert und spaltet zwischen dem inneren N-Acetylglukosamin und dem Asparagin-Rest aller Typen von asparagingebundenen N-Glykanen (*Komplex-Typ*, *Mannosereicher-Typ* und *Hybrid-Typ*, s. Abbildung 1), vorausgesetzt, daß sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe in peptidischer Bindung vorliegen.

Die De-N-Glykosylierung der isolierten Exosomen aus dem Zellkultur-Überstand (s. 3.6.6) und den Zelllysaten (s. 3.6.7) mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F, 500 000 Units/ml in 20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50% Glycerol pH 7.5, NEB) für die SDS-Gelchromatographie (s. 3.9.2) erfolgte nach Angaben des Herstellers mit den mitgelieferten Puffern.

20 µg Proteinlysate wurden 10 min bei 100 °C mit 0,5 % SDS und 1 % β-Merkaptoethanol 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.

Nach dem Verdau wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden bei RT abgekühlt und die Proteine mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mittels Anti-MUC1-Antikörper H-295 (s. Tabelle 3) detektiert.

### **3.10.2 Enzymatische Freisetzung N-gebundener Glykane mit Endoglykosidase H**

Endoglykosidase H (EndoH) schneidet Glykane zwischen den beiden inneren GlcNAc-Resten von allerdings ausschließlich Mannosereichen und manchen hybriden N-Glykanen und spaltet so die endständige Chitobiose-Einheit der N-glykosidisch gebundenen Zuckerketten, so dass nur ein Monosaccharid am Protein bleibt.

Die De-N-Glykosylierung der isolierten Exosomen aus dem Zellkultur-Überstand (s. 3.6.6) und den Zelllysaten (s. 3.6.7) mit Endo H [500 000 U/ml in 50 mM NaCl, 20mM Tris-HCL (pH 7.5), Na<sub>2</sub>EDTA, Roche, Mannheim] für die SDS Gelchromatographie (s. 3.9.2) erfolgte nach Angaben des Herstellers mit den mitgelieferten Puffern. Zunächst wurden 20 µg Proteinlysate mit 1µl 10x Glykoprotein Denaturierungspuffer (0.5% SDS, 0.4 M DTT) versetzt und 10 min bei 100 °C inkubiert (Gesamtvolumen 10 µl).

Dem bereits denaturierten Proteinlysate wurden 2µl 10x G5 Reaktionspuffer (0.5 M Natriumcitrat pH 5.5) und 3 µl Endo H zugesetzt (Gesamtvolumen 20 µl) und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Nach dem Verdau wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden bei RT abgekühlt und die Proteine mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mittels Anti-MUC1-Antikörper H-295 (s. Tabelle 3) detektiert.

### **3.10.3 Einsatz von ER-Glykosidase-Inhibitor Deoxynojirimycin zur Blockierung des Prozessierungsweges von Mannosereichen zu komplexen N-Glykanen**

Deoxynojirimycin (1,5-Dideoxy-1,5-imino-D-glucit, DNJ) ist ein Antibiotikum, das aus verschiedenen *Bacillus*-Stämmen isoliert wurde. Es ist ein Glukose-Analogon, aber mit einem Stickstoff anstelle eines Sauerstoff-Atoms im Ring. Deoxynojirimycin hemmt kompetitiv die Glukosidase I und II (Hettkamp et al., 1982) (Abbildung 22).

Um einen möglichen Zusammenhang der N-Glykosylierung mit Rezyklisierung von MUC1 zu untersuchen, wurden mit MUC1-M transfizierten HEK-293 Zellen einer 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche 24 Stunden mit 5 mM Deoxynojirimycin (Sigma-Aldrich) gelöst im Kompletmedium bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend biotinyliert (s. 3.7.2)

Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95 °C 5 min aufgeköcht und bei RT abgekühlt. Die Proteine wurden mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mittels Anti-MUC1-Antikörper C595 und H-295 (s. Tabelle 3) detektiert.

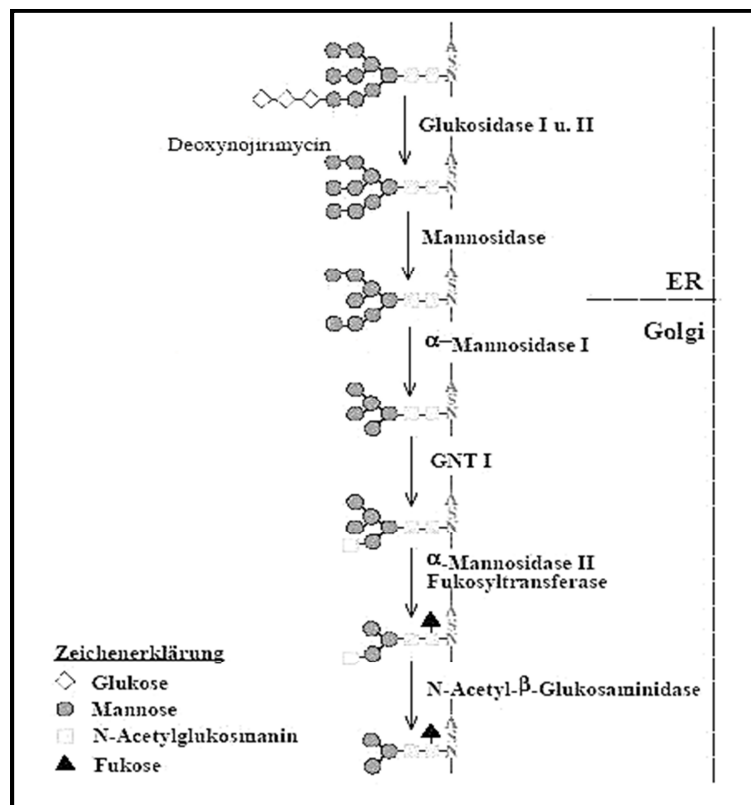


Abbildung 22: Deoxynojirimycin inhibiert die Glukosidase I, II des ER und unterbricht so die Prozessierung von N-gebundenen Oligosaccharidseitenketten (Hans Grosch 1998)  
Abkürzung GNT I: N-Acetylglucosaminyltransferase I

### 3.10.4 Reduktive $\beta$ -Eliminierung O-gebundener Oligosaccharide

Die an Serin oder Threonin gebundenen Oligosaccharide können nur mit wenigen spezifischen Enzymen abgespalten werden, die jedoch nur definierte O-Glykane erkennen und freisetzen (Abdullah et al., 1992; Sutherland et al., 1992). Aus diesem Grund sind vor allem chemische Methoden verbreitet (Edge et al., 1981; Patel et al., 1993; Greis et al., 1996; Knirel & Perepelov et al., 2002; Schulz et al., 2002; Yamada et al., 2007). Für die Versuche zur O-Glykan-Profilierung wurde die  $\beta$ -Eliminierung ausgewählt.

Durch die Reaktionsbedingungen kann es insbesondere bei der  $\beta$ -Eliminierung sogenannten *Peeling*-Reaktionen kommen, bei denen durch fortlaufende  $\beta$ -Eliminierung ein sequentieller Abbau des Glykans vom reduzierenden Ende her die Folge ist und außerdem wird eine Zerstörung von nicht Kohlenhydratsubstituenten beobachtet (Chai et al., 1997, Merry et al., 2002).

Um diese Problematik zu umgehen, wird die chemische Freisetzung der O-Glykane häufig unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Man spricht von der reduktiven  $\beta$ -Eliminierung (Parry et al., 2007).

Hier wird der endständige Monosaccharidbaustein zum Alditol reduziert. Das Peptidrückgrat wird bei der chemischen Abspaltung der Glykane teilweise oder ganz zerstört und kann daher nur in seltenen Fällen zur Charakterisierung der Glykosylierungspositionen herangezogen werden.

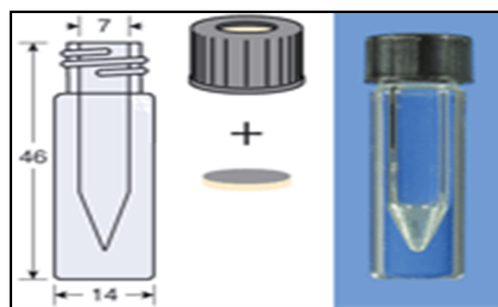


Abbildung 23: Mikroreaktionsglas (N 12-1 conic, farblos, 0,75 ml, 14 x 46 mm),  
*Macherey-Nagel, Düren*

Nach Freisetzung und Aufreinigung der O-Glykane können diese nun einer weiteren Strukturaufklärung zugeführt werden.

10 bis 30 µg des reinen getrockneten Glykoproteins wurden mit 20 µl NaBH<sub>4</sub> (0,5 M, Fluka) 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 in Mikroreaktionsgläsern (Abbildung 23) überführt, bei 40°C im Stickstoffstrom getrocknet und die Boratmethylester wurden unter den gleichen Bedingungen durch mehrfaches Verdampfen mit 0,1% Essigsäure in Methanol entfernt. Für die Permethylierung wurden die Proben ü.N. im Exsikkator getrocknet.

### **3.10.5 Permethylierung von Glykan-Alditen**

Nach der reduktiven  $\beta$ -Eliminierung werden die Glykane durch Permethylierung mit Methyljodid in Derivate mit höherer Desorption überführt, um sie mit höherer Empfindlichkeit in der MALDI-MS vermessen zu können. Vorteilhaft ist die Methylierung auch in Hinblick auf saure Sialinsäure-haltige Glykane, deren negative Ladung sich im Positiv-Ionen-Modus ungünstig auswirken würde. Außerdem wird die Ionisierbarkeit der Glykane in einem Gemisch angeglichen, so dass mit Hilfe eines internen Standards auch quantitative Aussagen getroffen werden können.

Bei der Permethylierung wird nicht nur am reduzierenden Ende des Oligosaccharides markiert, sondern es findet nach basenkatalysierter Ionisierung aller Hydroxylgruppen im Molekül eine Substitution mit dem Methylierungsreagenz statt.

Alle Schritte der Permethylierung bis auf Extraktion mittels Chloroform/Wasser wurden wasserfrei in einer Argon-Atmosphäre durchgeführt.

Den getrockneten wasserfreien Glykanen wurden 50 µl DMSO-NaOH-Suspension (Anumula et al., 1992) zugesetzt. Die Proben wurden 30 min bei Raumtemperatur und anschließend 5 min bei – 20 °C inkubiert. 20 µl Methyljodid (Fluka) wurden zu den gefrorenen Proben gegeben 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

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 und die Proben in 20 µl Methanol (Sigma) aufgenommen

(Abbildung 24). Nach Freisetzung der O-Glykane können diese nun der Strukturaufklärung mittels MALDI-TOF-MS zugeführt werden.

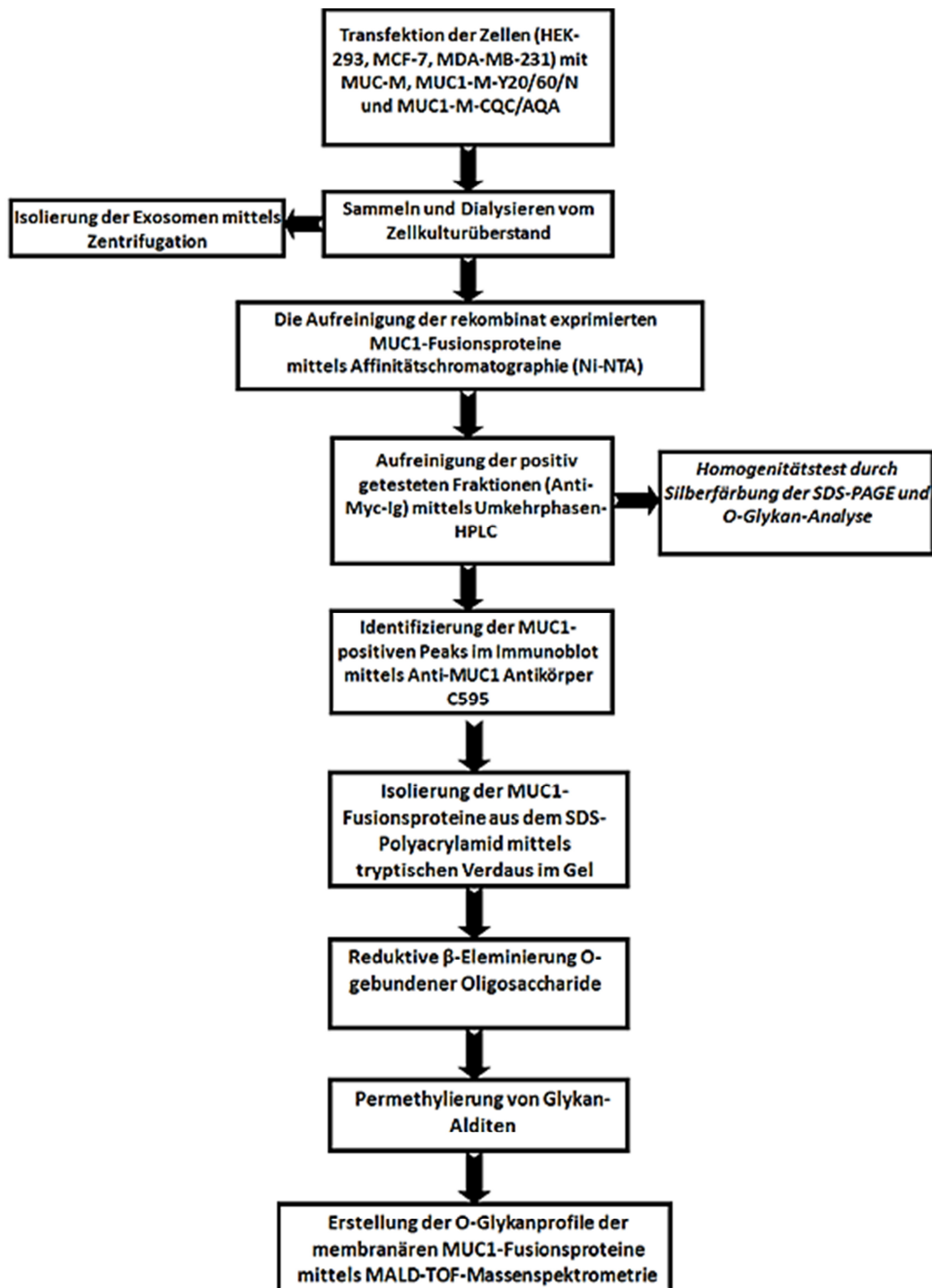


Abbildung 24: Strategien zur Reinigung der MUC1-Fusionsproteine bis zur Erstellung der O-Glykanprofile

### 3.10.6 Erstellung des Glykanprofils der membranären MUC1 Konstrukte mittels MALDI-TOF-MS (Matrix assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie)

Zur Identifikation von Zuckerstrukturen wurden die Gemische permethylierter Glykanalдите mittels *Matrix-assisted-laser-desorption/ionization-time-of-flight*-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) auf einem REFLEX IV Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen) mit einem Stickstofflaser ( $\lambda = 337 \text{ nm}$ ) und positiver Ionendetektion im Reflektronmodus im Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) vermessen.

Zur Bestimmung der Molekülmasse und Reinheit einer Probensubstanz mit Hilfe eines MALDI-TOF-Massenspektrometers (Abbildung 25) wird die Probensubstanz zuerst mit einer Matrix kokristallisiert.

Die so präparierte Probe wird in das Massenspektrometer eingefahren und im Hochvakuum mit einem Laser beschossen, dessen Energie von der Matrix absorbiert und auf die Probenmoleküle übertragen wird, wobei es zu einer Verdampfung von Matrix und Probenmolekülen kommt.

Neutrale Moleküle werden während dieses Prozesses durch die Anlagerung von einfach geladenen Ionen, wie z. B.  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  oder auch  $\text{Cl}^-$ , in sogenannte "Quasi-Molekülionen", wie z. B.  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , überführt.

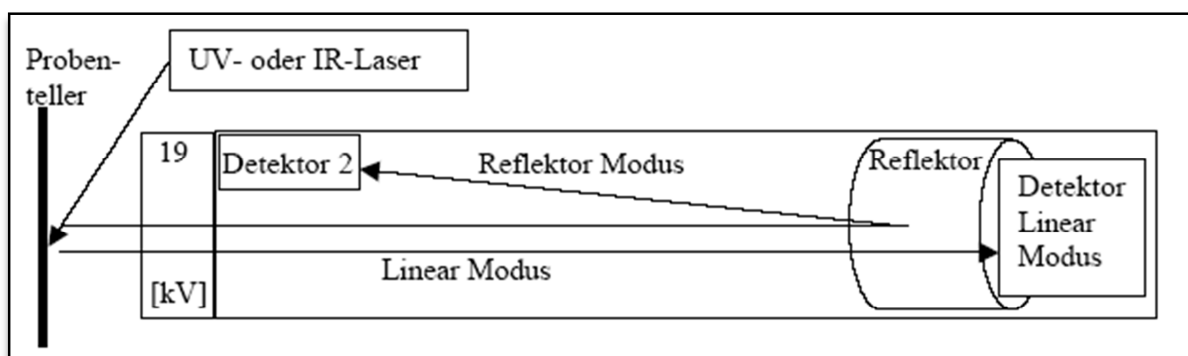


Abbildung 25: Schematische Zeichnung eines MALDI-TOF-Massenspektrometers (Chemgapedia).

Die einfach geladenen Ionen werden anschließend mit Hilfe eines elektrischen Feldes mit einer kinetischen Energie von  $19 \text{ kV}$  in ein Feld-freies, evakuiertes Rohr



gezogen. In diesem "TOF" (*time-of-flight*)-Rohr besitzen alle Moleküle eine konstante, massenabhängige Fluggeschwindigkeit, die umso größer ist, je kleiner ihre Masse ist:

$$e \cdot U = 1 \cdot 19 \text{ [kV]} = \frac{1}{2} m v^2 \implies v = \sqrt{2 \cdot 19 \text{ [kV]} / m}$$

v = Fluggeschwindigkeit  
m = Molekülmasse

Wenn das MALDI-TOF-Massenspektrometer im "linearen Modus" betrieben wird, misst ein Detektor am Ende des TOF-Rohres die Flugzeit (*Time of Flight*) der Ionen, welche von dem vorher kalibrierten Gerät in die dazugehörigen Massen umgerechnet wird.

1 µl DHB-Lösung (2,5 Dihydroxybenzoesäure 40 mg/ml, Bruker Daltonics) in Acetonitril/0,1% TFA (2:1 v/v, Sigma-Aldrich) wurde auf einen polierten rostfreien Probenteller aus Gold aufgetragen. Dazu wurden 0,5 µl der Probe pipettiert, gemischt und die Probe im Exsikkator getrocknet. Die Spektren wurden mit Hilfe der Software *Flex Analysis* analysiert.

Nach der Detektion der Proben wurden die Peakflächen integriert und das Gesamtflächenverhältnis zu den einzelnen Peakflächen bestimmt, die prozentualen Anteile der jeweiligen Peaks ermittelt und dokumentiert.

## 4. Ergebnisse- Teil I (*O*-Glykosylierungsprofil der MUC1-Sonden)

### 4.1 Klonierung, DNA-Quantifizierung und Reinheitsprüfung

Nach der Plasmidvermehrung in *E.coli* Zellen wurde die Plasmid-DNA mittels eines kommerziellen DNA-Isolierungskits *QIAprep Spin Midiprep Kit* isoliert, aufgereinigt und 10 µg für die Transfektion der HEK-293-, MCF-7- und MDA-MB-231-Zellen eingesetzt.

Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA wurden UV-Spektren im Wellenlängenbereich von 250 bis 300 nm aufgenommen.

Nach folgender Formel ließ sich die Konzentration der einzelnen Proben berechnen:

$$(\Lambda_{260} - \Lambda_{280}) \times 2 \times 50 [\mu\text{g/ml}] \times \text{Verdünnungsfaktor} = c [\mu\text{g/ml}]$$

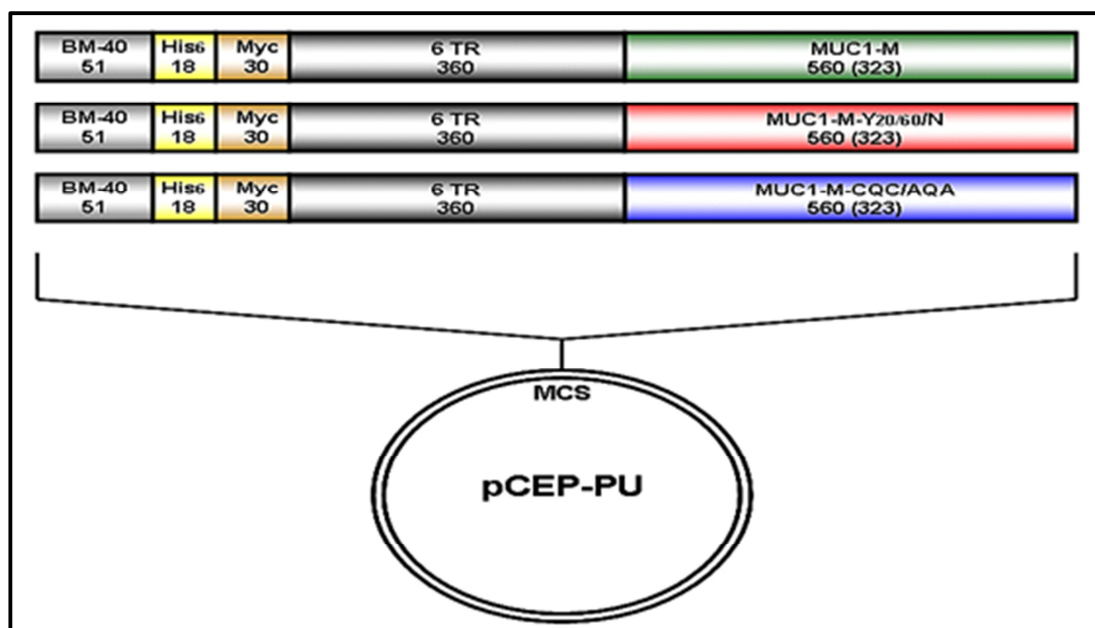
Aus den *E.coli* Zellen ließen sich im Durchschnitt zwischen 800 bis 950 µg/ml DNA isolieren. Der Reinheitsgrad der Nukleinsäuren lag bei  $1.6 \pm 0.07$ .

### 4.2 Rekombinante Expression transmembranärer MUC1-Konstrukte in HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231

Um den Einfluss der Rezyklisierung auf das Glykosylierungsprofil des endogenen MUC1 zu untersuchen, wurden neben dem Wildtyp-analogen MUC1-M zusätzlich noch mutierte Sonden (MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N und MUC1-M-CQC/AQA) generiert, die anhand eines eukaryontischen Expressionssystems rekombinant in drei verschiedenen Zelllinien (HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231) exprimiert wurden.

### 4.2.1 Generierung und Klonierung der MUC1-Konstrukte in den Expressionsvektor

Insgesamt wurden drei verschiedene Konstrukte in den Expressionsvektor pCEP-PU (Kohfeld et al., 1997) eingebracht. Die entsprechenden Fusionsproteine verfügten N-Terminal über die Signalpeptidsequenz des ECM-Proteins (Extracellular Matrix Proteins) BM-40 als Sekretionsmediator, gefolgt von einer His<sub>6</sub>-Sequenz zur Aufreinigung der Fusionsproteine über Ni-Chelat-Affinitätschromatographie, einer Myc-Sequenz zur Identifizierung des Proteins im Western-Blot, einer aus sechs nicht-konservierten MUC1-Tandemrepeats bestehenden Domäne, sowie einer funktionellen SEA-Domäne, der Transmembransequenz und der hochkonservierten zytosolischen Domäne des endogenen Mucins (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Schematische Darstellung der membranären MUC1-Fusionsproteine.** In die multiple Klonierungsstelle (MCS) des pCEP-PU-Expressionsvektors wurde jeweils die cDNA-Sequenz der MUC1-Konstrukte kloniert. Angegeben wurde die Größe der Nukleotidsequenz in bp bzw. in Klammern gesetzt die Anzahl kodierter Aminosäuren, wenn ein Teil der Nukleotidsequenz nicht translatiert wurde. Alle Konstrukte beinhalten: Signalpeptid des BM-40 Proteins (BM-40), sechsfache Histidin-Sequenz (His6), Myc-Sequenz (Myc) als Teil des Vektors, sechs nicht-konservierte Tandemrepeats aus der VNTR-Region des MUC1 Moleküls (6 TR), die MUC1-cDNA für die Transmembran-(MUC1-TM) und die zytosolische Sequenz als Teile der eingebrachten Kasette. MUC1-M-(Y20/60/N) weist einen Doppelaustausch bei Tyrosin 20 und Tyrosin 60 gegen Asparagin in der zytosolischen Domäne und MUC1-M-(CQC/AQA) zwei Punktmutation beim S-Palmitoylierungsmotiv am Übergang von der Transmembrandomäne zur zytosolischen Domäne (CQC gegen AQA) auf.

Für MUC1-M, das durch PCR-Amplifikation des entsprechenden DNA-Sequenzbereiches aus einer cDNA (HPAF, pankreatische Tumorzelllinie) generiert und in pCEP-PU-Expressionsvektor ligiert wurde, konnte bereits die Typ 1-transmembranäre Expression, Rezyklisierung zur Plasmamembran und das proteolytische „*Shedding*“ in den extrazellulären Raum gezeigt werden (Engelmann et al., 2005). Für die abgeleiteten, mutierten Sonden MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N und MUC1-M-CQC/AQA mussten die oben genannten Nachweise noch erbracht werden.

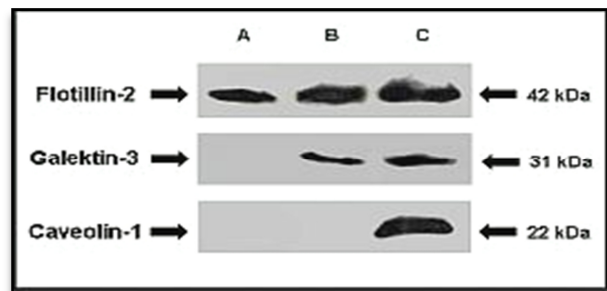
Die Generierung der Mutanten erfolgte mit Hilfe von Mutagenese-PCR in der zytoplasmatischen Domäne von MUC1 mit null tandem repeats in pBS-SK(-) unter Verwendung von Primern mit entsprechendem Nukleotidaustausch für die Doppelmutanten CQC/AQA oder Y<sub>20/60</sub>/N. Nucleotidsequenzen der SEA-, Transmembran-Domäne und der zytoplasmatischen Domäne der beiden MUC1-M-Mutanten wurden ebenfalls mittels PCR amplifiziert und in MUC1-M in pCEP-PU hinein ligiert. Nach der Klonierung dieser Sequenzbereiche in den pCEP-PU Vektor wurde durch DNA-Sequenzierung die korrekte Basenabfolge der PCR Produkte und das lückenlose Leseraster im Triplettkode bestätigt (Kinlough et al., 2004; Kinlough et al., 2006). Beide Konstrukte wurden uns freundlicherweise von der Kooperationspartnerin, Frau Prof. Hughey (Pittsburgh, USA) zur Verfügung gestellt.

#### **4.2.2 Membranäre Expression der MUC1-M Fusionsproteine**

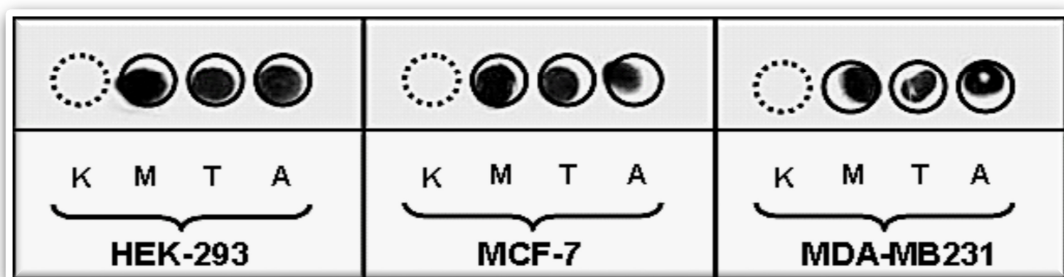
Drei verschiedene Zelllinien wurden aufgrund verschiedener zellbiologisch relevanter Eigenschaften als Expressionssysteme ausgewählt. MCF-7 Zellen wurden wegen der bekannten MUC1- und Galektin-3-Überexpression in Brusttumorgewebe bei gleichzeitig verminderter Caveolin-1-Expression (Lavie et al., 1998; Lee et al., 1998; Engelmann et al., 1999; Hurlstone et al., 1999) ausgesucht. Die embryonale, immortalisierte Nierenepithelzelllinie HEK-293 soll, basierend auf dem stabil ins Genom integrierten EBNA-1 Gens, eine erhöhte Expressionsrate für rekombinante Proteine aufweisen. Zudem exprimiert die Zelllinie kein endogenes MUC1 und weist im Unterschied zu den meisten Brusttumor-Zelllinien keine Galektin-3-Expression auf. Als dritte Zelllinie wurde die Mammaadenokarzinomzellen der Linie MDA-MB-231 ausgewählt, die im Gegensatz zu den anderen zwei Zelllinien neben

endogenem MUC1 gleichzeitig Caveolin-1 und Galektin-3 exprimieren. Außerdem weisen alle Zelllinien Reggie-1/Flotillin-2 Expression auf. Auf Proteinebene wurde die vorhandene bzw. fehlende Expression von Raft-assoziierten Markerproteinen, Caveolin-1 und Flotillin-2, bzw. vom Raft-unabhängigen Galektin-3 in allen drei Zelllinien durch SDS-PAGE und nachfolgende Immunoblot-Analyse dokumentiert (Abbildung 27).

**Abbildung 27: Immunchemischer Nachweis der Expression der Raft-assoziierten Markerproteine (Caveolin-1 und Flotillin-2) und Galektin-3 . HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen wurden lysiert, das Gesamtzell-Lysat in einem 10%igen SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und der Proteinnachweis von Flotillin-2, Caveolin-1 und Galektin-3 mittels Primärantikörper Anti-Flotillin-2, Anti-Caveolin-1 und Galektin-3 (Tabelle 3) im Immunoblot geführt. Den Literaturangaben entsprechend, konnte die Expression von Flotillin-2 in allen drei Zelllinien, von Galektin-3 in MCF-7 und MDA-MB-231 und von Caveolin-1 nur in MDA-MB-231 nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht ist durch die Markerbanden auf der rechten Seite angezeigt. HEK-293 = A, MCF-7 = B, MDA-MB-231 = C**



Die erfolgreiche Transfektion der rekombinanten Fusionsproteine wurde durch den Nachweis im Dot-Blot-Verfahren erbracht (Abbildung 28), indem konfluent wachsende Zellen lysiert und mittels Anti-Myc-Antikörper auf die Expression der Myc-Sequenz enthaltenen MUC1-Fusionsproteine überprüft wurden.



**Abbildung 28: Immunchemischer Nachweis rekombinant exprimierter MUC1-Proteine. Untransfizierte und transfizierte HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen wurden lysiert, 10 µl des Zelllysates auf eine begrenzte Fläche einer Nitrozellulosemembran getropft und der spezifische Proteinnachweis über die N-Terminal gelegene Myc-Sequenz der Fusionsproteine MUC1-M, MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N und MUC1-M-CQC/AQA durchgeführt. Mit dem Anti-Myc-Antikörper konnte ebenfalls demonstriert werden, dass nicht transfizierte Zellen keine Myc-Sequenz enthaltenen Proteine exprimierten. M = MUC1-M, T = MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N, A = MUC1-M-CQC/AQA, K = Zelllysate nichttransfizierter Zellen**

Sowohl HEK-293 Zellen als auch MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen exprimierten jeweils die MUC1-Fusionsproteine und die Expression blieb über die gesamte Kultivierungszeit konstant, solange der Selektionsdruck unter Zugabe von Puromycin zum Kulturmedium gegeben war.

## 4.3 Biochemische Charakterisierung der MUC1-Konstrukte

### 4.3.1 Quantitative Bestimmung der abgeschilferten bzw. zellulären MUC1-M-Fusionsproteine

Es sollte geklärt werden, ob die in den Kulturüberstand durch „Shedding“ abgegebenen Ektodomänen des MUC1 in Abhängigkeit vom Vorliegen mutierter Sequenzen mit unterschiedlicher Rate von der Membran abschilfern. Ausgangspunkt war die Überlegung, dass die mutierten Sonden mit eingeschränkter bzw. über alternative Wege erfolgende Endozytose (MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N) oder defekter Rezyklisierung (MUC1-M-CQC/AQA) in signifikantem Ausmaß vermindert in den Kulturüberstand abgegeben werden könnten. Ausgehend von gleichen Zellzahlen (3.6.5) wurden von jeder HEK-239 und MCF-7 Transfektante [mittels differenzieller Zentrifugation (3.6.6)] jeweils 50 ml Zellüberstand gewonnen.

Die nach Ultrazentrifugation erhaltenen Überstände wurden affinitätschromatographisch aufgearbeitet und mit Hilfe von Ultrafiltration (Amicon Centriprep Ultracel YM-10 Da, Millipore) auf 20 µl eingeeengt. Die Zelllysate und die eingeeengten Zellkultur-Überstände wurden im Immunoblot auf die Anwesenheit der MUC1-Sonden überprüft, wobei Anti-MUC1 Antikörper C595 (Ektodomänen-spezifisch) zum Einsatz kam. Bei der Untersuchung der Zelllysate wurde auf der gleichen Blot-Membran zusätzlich als endogener Standard („*Housekeeping protein*“) die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mittels Anti-GAPDH Antikörper detektiert (Abbildung 29).

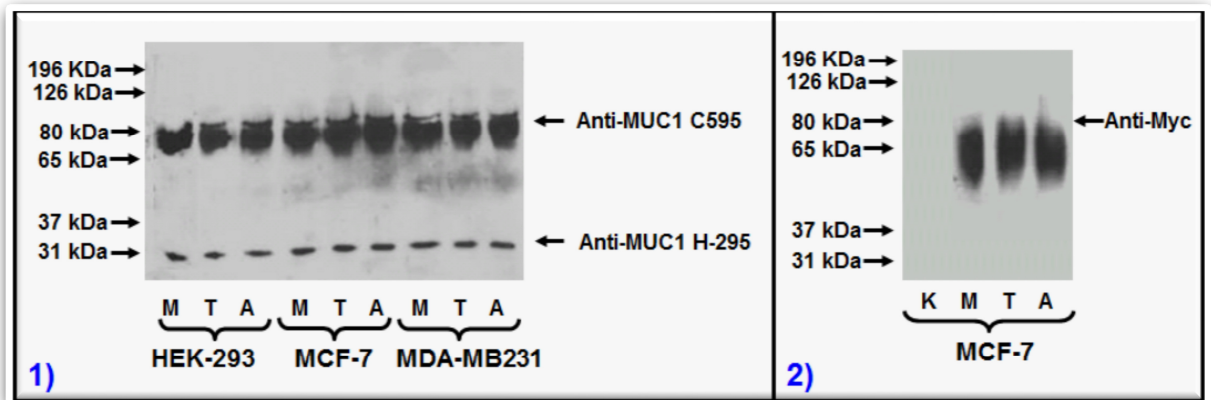
Ein *Housekeeping protein* ist ein Protein, welches konstitutiv, d.h. nicht reguliert exprimiert wird. GAPDH, die als ein ubiquitär verbreitetes Enzym eine Schlüsselrolle bei der Glykolyse (Sirover 1997) spielt, wurde deshalb als Referenz-Protein für die





### 4.3.2 Isolierung der Exosomen aus Zellkulturüberstand

Es wurde angenommen, dass ein Teil der rekombinant exprimierten Konstrukte von den Zellen über exosomal Export in das Kulturmedium abgegeben wird.



**Abbildung 30: Immunchemischer Nachweis der rekombinant exprimierten MUC1-Fusionsproteine aus Exosomen.**  
Der Nachweis erfolgte nach Aufreinigung der Exosomen mittels Ultrazentrifugation aus dem Zellkulturüberstand der MUC1-Transfektanten im Immunoblot:

- C595 erkennt die Ektodomäne des MUC1
- Anti-Myc Antikörper diskriminiert die rekombinanten Sonden vom endogenen MUC1
- H-295 erkennt die zytosolische Domäne des MUC1.

Bei allen aus Exosomen stammenden MUC1-Fusionsproteinen konnte sowohl die größere Ektodomäne (60-80 kDa) als auch die kleine zytosolische Endodomäne als eine spezifische Bande bei etwa 31 kDa detektiert werden, was auf die Ausbildung eines intakten heterodimeren Komplex bei den exosomal MUC1-Sonden hindeutet (1).

Die mit Anti-MUC1 C595 detektierten Banden sind auch mit Anti-Myc positiv, was auf das Vorliegen rekombinanter Sonden hinweist (2).

Ein weiteres Indiz stellen auch die apparenten Massen der MUC1-positiven Proteine dar, die deutlich kleiner als das Endo-MUC1 sind.

Das Molekulargewicht ist durch die Markerbanden auf der linken Seite angezeigt.

M = MUC1-M, T = MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N, A = MUC1-M-CQC/AQA, K = aus untransfizierten MCF-7 stammende Exosomen

Die Exosomen wurden aus Zellüberstand transfizierter Zellen durch eine Dreischritt-Zentrifugation isoliert. Zunächst wurden die Zelltrümmer und andere Verunreinigungen aus dem Überstand entfernt, um anschließend Zell-abgeleitete Exosomen mittels Ultrazentrifugation zu isolieren. Die aufgereinigten Exosomen wurden im Immunoblot auf die Anwesenheit der MUC1-Sonden überprüft, wobei Anti-MUC1 Antikörper C595 bzw. Anti-Myc Antikörper und H-295 zum Einsatz



kamen, um den intakten heterodimeren Komplex in exosomalen Membranen nachzuweisen.

Die größere Ektodomäne der exosomalen MUC1-Fusionsproteine konnte aufgrund der heterogenen O-Glykosylierung innerhalb der sechs Tandemrepeats als ein „Schmier“ bei etwa 60 bis 80 kDa im Immunblot detektiert werden (Abbildung 30). Eine Beobachtung, die bereits schon von Kuranda und Robbins (1991) gemacht wurde.

Durch intensive und stark variierende Glykosylierung konnte das exakte Molekulargewicht nicht bestimmt werden. Zudem wurde das Laufverhalten der Glykoproteine im SDS-Gel durch die proteingebundenen Glykane beeinflusst und zwar in dem Sinne, dass negativ geladene Sialyloligosaccharide durch teilweise Unterdrückung der SDS-Anlagerung an das Protein eine apparente Vergrößerung der molekularen Massen stark glykosylierter Proteine verursachen. Zur Identifizierung des C-Terminus der exosomalen MUC1-Spezies wurde außerdem ein Immunblot mit einem polyklonalen Anti-MUC1-Antikörper H-295 durchgeführt, dessen Epitop innerhalb der zytoplasmatischen Domäne lokalisiert ist.

Im Gegensatz zu den aus Zellüberstand isolierten Fusionsproteinen (Abbildung 33), wurde bei den aus Exosomen stammenden MUC1-Konstrukten die zytoplasmatische Domäne nachgewiesen (Abbildung 30).

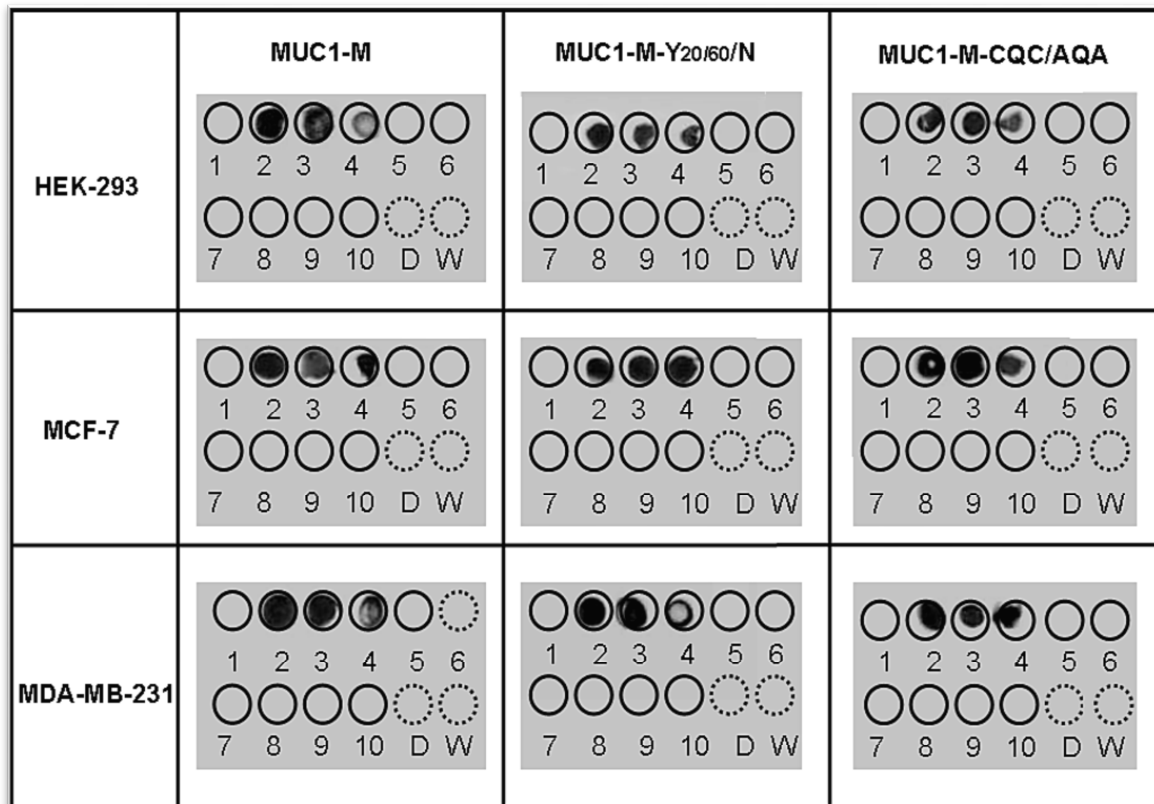
Demzufolge konnte der intakte heterodimere Komplex der rekombinant exprimierten MUC1-Konstrukte nur in exosomalen Membranen nachgewiesen werden. Die Menge an Exosomen war für die weitere Charakterisierung der exosomalen Fusionsproteine nicht ausreichend.

#### ***4.3.3 Isolierung der Fusionsproteine aus Zellkulturüberstand***

Die Aufreinigungsprozedur der MUC1-Fusionsproteine aus Zellkulturüberstand ist schematisch in Abbildung 24 zusammengefasst.

Zellkulturüberstand wurde zuerst durch Zentrifugation von Exosomen befreit, nachfolgend dialysiert und über Nickelchelate-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Nach mehreren Waschschritten wurden die Fusionsproteine mit Imidazol-Gradienten

eluiert und die MUC1-haltigen Fraktionen im Dot-Blot-Verfahren mittels Anti-Myc Antikörper identifiziert (Abbildung 31)



**Abbildung 31: Dot-Blot der eluierten, MUC1-haltigen Fraktionen nach Nickelchelataffinitätschromatographie mittels Anti-Myc Antikörper.**  
 Die Elution erfolgte in zehn Fraktionen à 5 ml mit Imidazol-hatigem Elutionspuffer. Von jeder eluierten Fraktion (1-10) sowie vom Durchfluss (D) und den Waschfraktionen (W) wurden jeweils 10 µl auf eine begrenzte Fläche einer Nitrozellulosemembran getropft und im Dot-Blot-Verfahren getestet.

Die MUC1-positiven Eluatfraktionen wurden vereinigt, mit Hilfe von Ultrafiltration eingengt und anschließend über eine C8-Säule mittels Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt.

#### 4.3.4 Aufreinigung der Fusionsproteine durch Umkehrphasen-HPLC

Nach der Affinitätschromatographie wurden die rekombinanten Proteine mittels Umkehrphasen-HPLC auf einer C8-Säule aufgereinigt und entsalzt und jeder bei 214 nm registrierte Peak als separate Fraktion gesammelt. Die Detektion MUC1-haltiger Eluatfraktionen erfolgte wieder im Dot-Blot-Verfahren. (Abbildung 31).

Die MUC1-Fusionsproteine eluierten in einem Retentionszeitintervall von etwa 16-20 min (Abbildung 32). Oberhalb von 20 min wurde kontaminierendes Serumprotein aus dem FKS des Kulturmediums eluiert. Die MUC1-Sonden enthaltenden Fraktionen wurden im Immunblot entweder über die Myc-Sequenz oder über die Tandemrepeat Sequenz (C595) identifiziert, wobei die größere Ektodomäne der membranären MUC1-Fusionsproteine aufgrund der starken und unterschiedlichen Glykosylierungsgrade innerhalb der Tandemrepeats als „Schmier-Banden“ bei etwa 55 bis 80 kDa detektiert werden konnte (Abbildung 33).

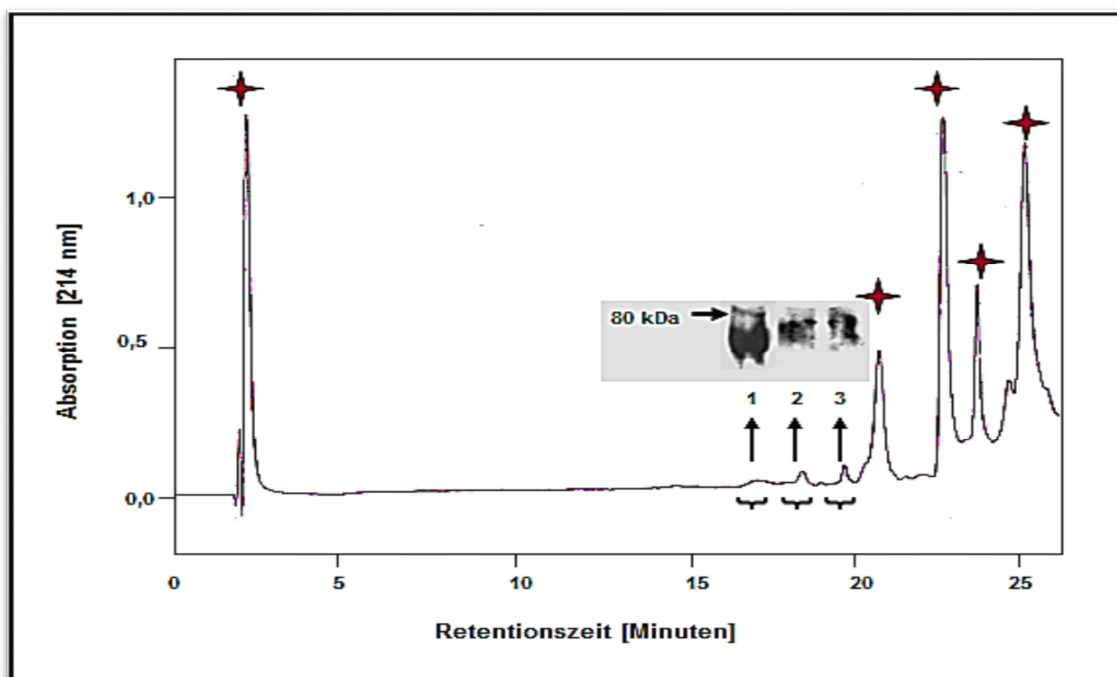
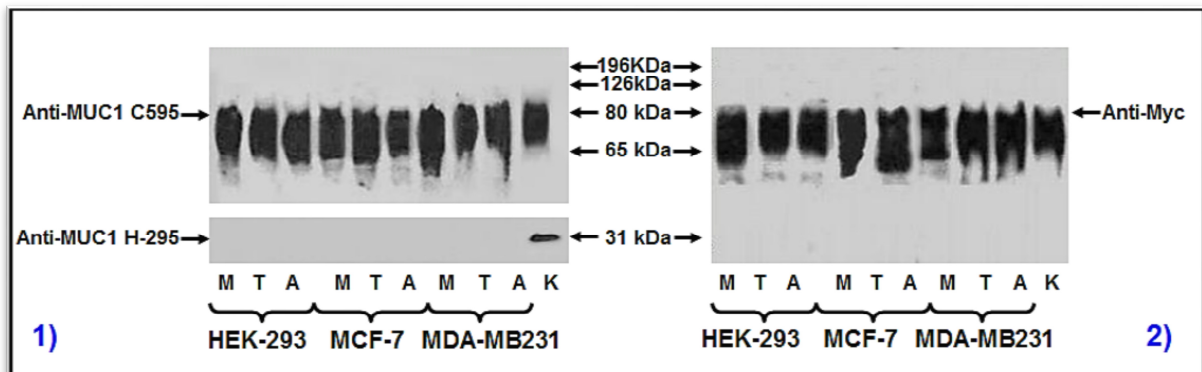


Abbildung 32: Aufreinigung von MUC1-Sonden mittels Umkehrphasen-HPLC. Die Flussrate betrug 0.5 ml/min und die Detektion erfolgte bei 214 nm. Jeder Peak wurde als separate Fraktion manuell gesammelt. Die im HPLC-Profil mit 1, 2 und 3 markierten Peaks bei 17-20 min Retentionszeit wurden als MUC1-positiv im Immunoblot mittels Anti-Myc Antikörper verifiziert, vereinigt und anschließend in der Vakuumentrifuge getrocknet. Beispielhaft wurde hier das HPLC-Profil von MUC1-M aus HEK-293 dargestellt.

★ nicht identifizierte Verunreinigung.

Zur Charakterisierung des C-Terminus der freigesetzten membranären MUC1-Spezies wurde ein Immunoblot mit einem polyklonalen Anti-MUC1-Antikörper H-295 durchgeführt, dessen Epitop innerhalb der zytoplasmatischen Domäne lokalisiert ist. Im Gegensatz zu den aus Exosomen stammenden MUC1-Konstrukten (Abbildung 30), konnte, wie erwartet, bei keinem der aus Zellüberstand isolierten Fusionsproteine die zytoplasmatische Domäne nachgewiesen werden (Abbildung 33).

Demzufolge wurde die Ektodomäne der MUC1-Sonde durch Proteolyse in den Extrazellulärraum freigesetzt.



**Abbildung 33: Immunchemische Charakterisierung der rekombinant exprimierten MUC1-Fusionsproteine aus exosomenfreiem Zellkulturüberstand.**

Der Nachweis erfolgte nach Aufreinigung des Zellkulturüberstandes der transfizierten Zellen (HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231) mittels Nickelchelate-Affinitätschromatographie und Umkehrphasen-HPLC im Immunoblot mit:

- a) Monoklonalem Anti-MUC1 Antikörper C595 (MUC1-Ektodomäne)
- b) Monoklonalem Anti-Myc Antikörper
- c) Polyklonalem Anti-MUC1-Antikörper H-295 (MUC1-Endodomäne)

Die extrazelluläre Ektodomäne erschien aufgrund der stark variablen Glykosylierungsgrade innerhalb der Tandemrepeats als typische Schmier-Banden im Immunoblot.

Bei keinem der aus exosomenfreiem Zellkulturüberstand stammenden MUC1-Fusionsproteine konnte die kleine zytoplasmatische Endodomäne detektiert werden, was auf eine Proteolyse der C-terminalen Domäne von MUC1-Fusionsproteinen hindeutet. Als Positiv-Kontrolle fungierte das exosomale MUC1-M aus HEK-293 Zellen.

Da Anti-MUC1 (C595) sowohl die VNTR-Domäne des endogenen MUC1 als auch die der MUC1-Sonden erkennt, wurden die aufgereinigten Konstrukte parallel zur Detektion mit C595 und H-295 (1) auch mit Anti-Myc Antikörper (2) getestet, der nur das Myc-Modul der Fusionsproteine und somit nicht das endogene MUC1 erkennt.

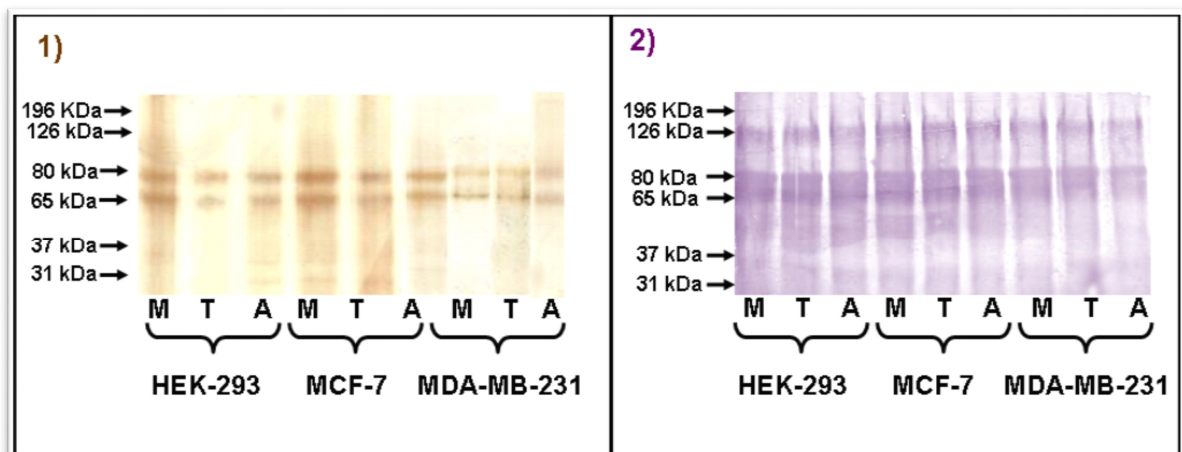
Das Molekulargewicht ist durch Markerbanden angezeigt.

M = MUC1-M, T = MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N, A = MUC1-M-CQC/AQA, K = Exosomales MUC1-M aus HEK-293

#### 4.3.4.1 Bestimmung der apparenten Massen und der Reinheit der MUC1-Sonden durch Gelelektrophorese

Um kontaminierende Begleitproteine zu detektieren und die Reinheit der Konstrukte zu demonstrieren, wurde jeweils ein Teil der mittels Umkehrphasen-HPLC aufgereinigten MUC1-haltigen Proben im SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und zur Detektion von Proteinen (Silberfärbung) und zum Nachweis von Glykoproteinen (DIG-Glykan-Detektion) im Immunblot eingesetzt.

Beide Analysen zeigten zwei distinkte Banden bei 65 kDa und 80 kDa (Abbildung 34), die isografisch mit den Fusionsproteinen, identifiziert durch Immunblot-Analyse (Abbildung 33), auftraten.



**Abbildung 34:** Silberfärbung und Nachweis von Kohlenhydratstrukturen auf MUC1-Fusionsproteinen.

Die Silberfärbung (1) sowie die Färbung mittels DIG Glykan Detektion Kit (2) zum Nachweis von Glykanstrukturen erfolgte nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der HPLC-gereinigten MUC1-Sonden (HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231) bzw. nach Immobilisierung der aufgetrennten Proteine auf einer Nitrozellulosemembran. Zwei glykosylierte, diffuse Banden im Bereich von 65 bis 80 kDa wurden detektiert, die sich isografisch zu C595-gefärbten Fusionsproteinen verhielten. Die nach Färbung der Glykanstrukturen detektierte Bande oberhalb von 126 kDa deutet auf eine Verunreinigung mit dem Glykoprotein *H factor 1* hin, das die nachfolgenden Glykananalysen beeinträchtigen könnte. Die Kontamination mit *H factor 1* war bei Silberfärbung nicht immer zu beobachten.

Das Molekulargewicht ist durch die Markerbanden auf der linken Seite angezeigt.

M = MUC1-M, T = MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N, A = MUC1-M-CQC/AQA,

Um die Kontamination zu beseitigen, wurden die nach Umkehrphasen-HPLC angereicherten MUC1-Sonden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteinbanden mit Hilfe von Coomassiefärbung sichtbar gemacht (Abbildung 35). Mittels tryptischen in-Gel-Verdau wurden die Protein-spezifischen Peptide und Glykopeptide aus dem Gel extrahiert und die O-Glykane durch reduktive  $\beta$ -Eliminierung freigesetzt.

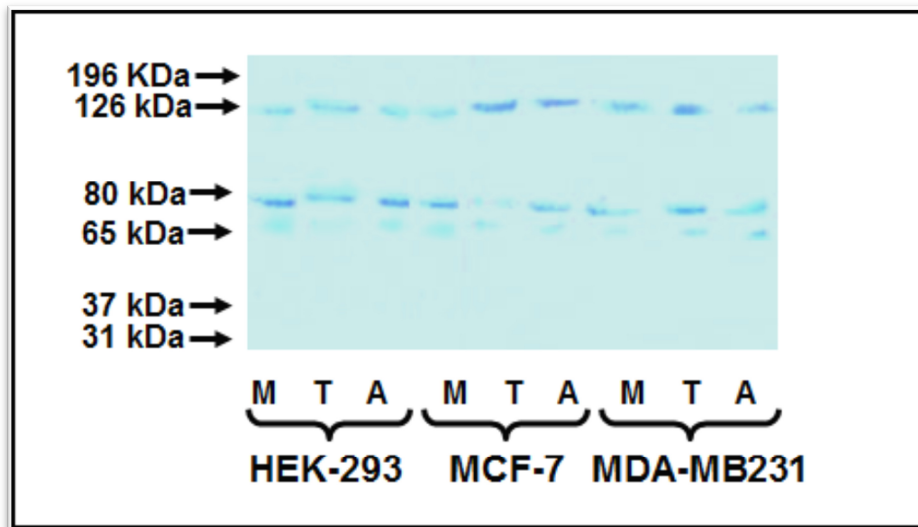


Abbildung 35: Coomassie-gefärbte MUC1-Sonden nach Gel-elektrophoretischer Auftrennung. Zwei Banden im Bereich von 65 bis 80 kDa wurden aus dem Gel herausgeschnitten. Die detektierte Bande oberhalb von 126 kDa, die als Glykoprotein *H factor 1* identifiziert wurde, konnte auch bei Färbung mit Coomassie visualisiert werden. Das Molekulargewicht ist durch die Markerbanden auf der linken Seite angezeigt. M = MUC1-M, T = MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N, A = MUC1-M-CQC/AQA,

#### 4.3.4.2 Charakterisierung des O-Glykanprofils der membranären MUC1-Fusionsproteine

Die Strukturanalyse der ApoMucin-gebundenen Kohlenhydratkomponenten erforderte die Freisetzung der Oligosaccharide vom Glykoprotein. Die O-Glykan-Profilierung erfolgte nach reduktiver  $\beta$ -Eliminierung.

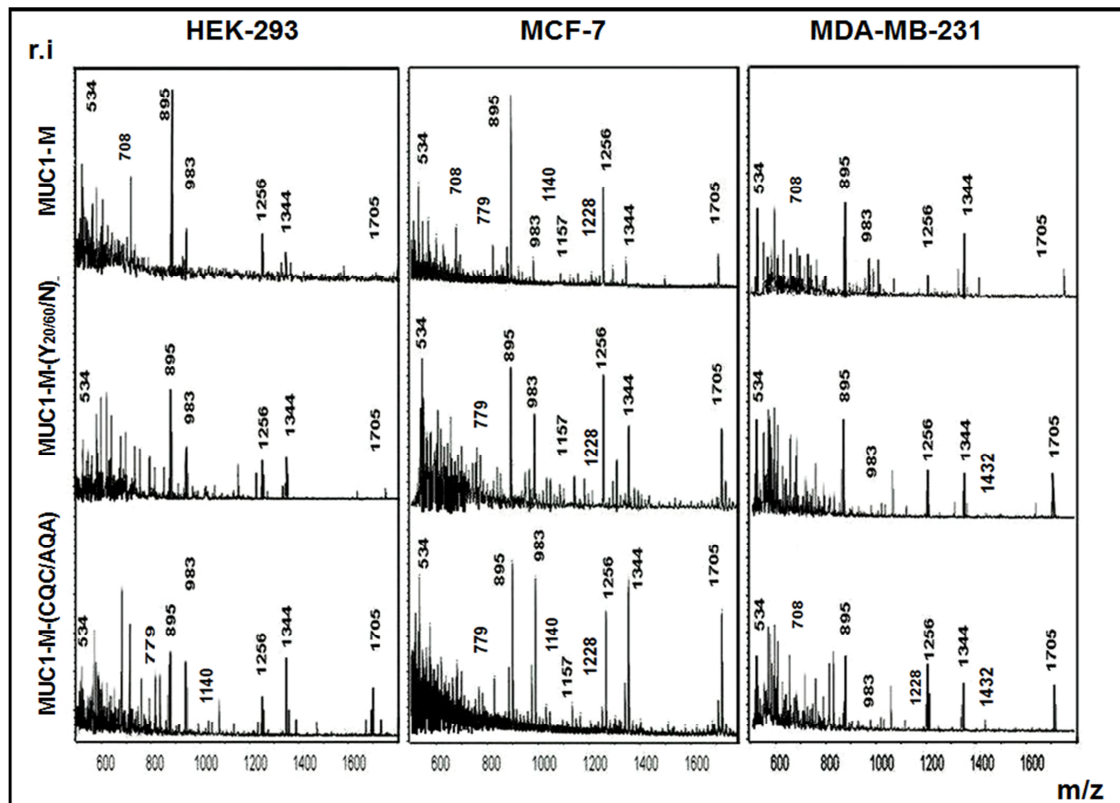
Bei der Freisetzung der Oligosaccharide vom Proteingerüst durch reduzierende  $\beta$ -Eliminierung wird der jeweilige Core-Zucker (das GalNAc) zum Aldit reduziert und trägt dadurch eine zusätzliche Alkoholgruppe. Anschließend wurden die gespaltenen

O-gebundenen Oligosaccharid-Strukturen nach Deprotonierung der Hydroxygruppen mit fein suspendiertem NaOH in DMSO mit Methyljodid permethyliert und der Strukturaufklärung zugeführt. Die Proben wurden dazu mit einer Matrix aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure auf einem polierten Gold-Target kokristallisiert und mittels MALDI-TOF-MS auf ihre Oligosaccharidstrukturen untersucht.



### 4.3.4.3 MALDI-TOF-MS-Analyse der Oligosaccharidaldite von MUC1-Sonden

Die Identifizierung der Glykanstrukturen der MUC1-Fusionproteine erfolgte über ihre relativen Massen (M+Na) in der MALDI-TOF-MS (Abbildung 36).



**Abbildung 36:** O-Glykanprofilierung der in HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231 exprimierten MUC1-Fusionsproteine mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie.

Die Signale, die O-Glykanen entsprechen, wurden annotiert. Die ihnen entsprechenden Strukturen sind in den Tabellen 6a, 6b, und 6c aufgeführt. Die Molekülionen erlauben Aussagen über die Monosaccharidzusammensetzung eines Oligosaccharids. Die nicht annotierten Peaks sind teilweise auf die Kokristallisierung der Analyte mit der DHB-Matrix zurückzuführen.

Die Abszisse stellt die Masse pro Ladung (m/z) dar. Auf der Ordinate ist die Signalintensität in willkürlich gewählten Einheiten (r.i. = relative intensity) angegeben.

Die Identifizierung der O-Glykane erfolgte in zwei Schritten: Das MALDI-Übersichtsspektrum lieferte über die Molekülionen Informationen über die Monosaccharidzusammensetzung des betreffenden Oligosaccharids, während eine nachfolgende ESI-MS/MS-Analyse Sequenzinformationen lieferte und damit Aussagen über die glykosidische Struktur möglich wurden, z.B. die Diskriminierung von linearen (Core 1) und verzweigten Tetrasacchariden (Core 2).















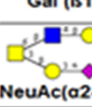










O-Glykanprofile der in embryonalen Nierenzellen HEK-293 exprimierten MUC1-Fusionsproteine					
Kohlenhydrat-Strukturen	MALDI-TOF Peak m/z	relative Mengen [%]			
		MUC1-M	MUC1-M-Y <sub>20/50</sub> /N	MUC1-M-CQC/AQA	
 Gal(β1-3)GalNAc	534	★	17,2	9,6	5,8
 Fuc(α1-2)Gal(β1-3)GalNAc	708	★	1,2	–	–
 NeuAc(α2-6)GalNAc	691	★	–	–	–
 GlcNAc(β1-6) GalNAc Gal(β1-3)	779	★	–	–	1,7
 NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc	895	★	54,4	60,4	20,5
 Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc Gal(β1-3)	983	★	5,1	9	16,9
 GlcNAc(β1-6) GalNAc NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)	1140	★	–	–	1,5
 Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc Fuc(α1-2)Gal(β1-3)	1157	★	–	–	–
 Gal(β1-3) GalNAc GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	1228	★	–	–	–
 NeuAc(α2-3)Gal(β1-3) GalNAc NeuAc(α2-6)	1256	★	15,1	9,8	12,9
 NeuAc(α2-3)Gal(β1-3) GalNAc GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	1344	★	7	11,2	24,1
 Gal(β1-3) GalNAc Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	1432	★	–	–	–
 NeuAc(α2-3)Gal(β1-3) GalNAc NeuAc(α2-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	1705	★	–	–	16,6
<b>core 1 [%]</b>	–		<b>87,9</b>	<b>79,8</b>	<b>40,9</b>
<b>core 2 [%]</b>	–		<b>12,1</b>	<b>20,2</b>	<b>59,1</b>
<b>Anteil saurer Glykane [%]</b>	–		<b>76,5</b>	<b>90,4</b>	<b>75,6</b>
<b>Anteil neutraler Glykane [%]</b>	–		<b>23,5</b>	<b>9,6</b>	<b>24,4</b>

Tabelle 6a: O-Glykanprofil und der Anteil an sauren bzw. neutralen O-Glykanen der MUC1-Fusionsproteine aus HEK-293 Zellen.

Die O-gebundenen Glykane wurden durch reduktive β-Eliminierung vom Protein freigesetzt, permethyliert und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Die Identifizierung der Oligosaccharide erfolgte durch MALDI-MS und ESI-MS/MS (Engelmann et al., 2005) und zur Quantifizierung der O-Glykanstrukturen wurden die Peakflächen integriert.

	Fukose,		Galaktose,		Glukose,		N-Acetylgalactosamin,		N-Acetylglucosamin
	N-Acetylneuraminsäure,		Core 1,		Core 2,		neutrales O-Glykan,		saures O-Glykan

O-Glykanprofile der in Brustkrebszelllinie MCF-7 exprimierten MUC1-Fusionsproteine					
Kohlenhydrat-Strukturen	MALDI-TOF Peak m/z	relative Mengen [%]			
		MUC1-M	MUC1-M-Y <sub>20/60</sub> /N	MUC1-M-CQC/AQA	
Gal(β1-3)GalNAc	534	8	16,2	4,4	
Fuc(α1-2)Gal(β1-3)GalNAc	708	1,1	–	–	
NeuAc(α2-6)GalNAc	691	–	–	–	
GlcNAc(β1-6)GalNAc Gal(β1-3)	779	0,6	1,1	1,2	
NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc	895	33,7	25,2	13,5	
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)GalNAc Gal(β1-3)	983	3,7	10,8	13,5	
GlcNAc(β1-6)GalNAc NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)	1140	1,1	–	1,1	
Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)GalNAc Fuc(α1-2)Gal(β1-3)	1157	1,9	1,7	1,3	
Gal(β1-3)GalNAc GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	1228	1,0	3,7	0,5	
NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc NeuAc(α2-6)	1256	26,8	17,9	15,1	
NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	1344	8,9	10,8	23,4	
Gal(β1-3)GalNAc Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	1432	–	–	–	
NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc NeuAc(α2-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	1705	13,2	12,6	26	
<b>core 1 [%]</b>	–	<b>70,2</b>	<b>60,4</b>	<b>34,2</b>	
<b>core 2 [%]</b>	–	<b>29,8</b>	<b>39,6</b>	<b>65,8</b>	
<b>Anteil saurer Glykane [%]</b>	–	<b>83,7</b>	<b>66,5</b>	<b>79,1</b>	
<b>Anteil neutraler Glykane [%]</b>	–	<b>16,3</b>	<b>33,5</b>	<b>20,9</b>	

Tabelle 6b: O-Glykanprofil und der Anteil an sauren bzw. neutralen O-Glykanen der MUC1-Fusionsproteine aus MCF-7 Zellen.

Die O-gebundenen Glykane wurden durch reduktive β-Eliminierung vom Protein freigesetzt, permethyliert und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Die Identifizierung der Oligosaccharide erfolgte durch MALDI-MS und ESI-MS/MS (Engelmann et al., 2005) und zur Quantifizierung der O-Glykanstrukturen wurden die Peakflächen integriert.

Fukose,	Galaktose,	Glukose,	N-Acetylgalactosamin,	N-Acetylglucosamin
N-Acetylneuraminsäure,	Core 1,	Core 2,	neutrales O-Glykan,	saures O-Glykan
























O-Glykanprofile der in Brustkrebszellen MDA-MB-231 exprimierten MUC1-Fusionsproteine					
Kohlenhydrat-Strukturen	MALDI-TOF Peak m/z	relative Mengen [%]			
		MUC1-M	MUC1-M-Y <sub>20/60</sub> N	MUC1-M-CQC/AQA	
 Gal(β1-3)GalNAc	534	★	20,9	23,4	12,2
 Fuc(α1-2)Gal(β1-3)GalNAc	708	★	6,7	–	3,9
 NeuAc(α2-6)GalNAc	691	★	–	–	–
 GlcNAc(β1-6) GalNAc Gal(β1-3)	779	★	–	–	–
 NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)GalNAc	895	★	35	26,2	21
 Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc Gal(β1-3)	983	★	6,1	–	4
 GlcNAc(β1-6) GalNAc NeuAc(α2-3)Gal(β1-3)	1140	★	–	–	–
 Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6) GalNAc Fuc(α1-2)Gal(β1-3)	1157	★	–	–	–
 Gal(β1-3) GalNAc GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	1228	★	–	–	1,8
 NeuAc(α2-3)Gal(β1-3) GalNAc NeuAc(α2-6)	1256	★	6,2	16,2	21,1
 NeuAc(α2-3)Gal(β1-3) GalNAc GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	1344	★	25,1	13,1	16,3
 Gal(β1-3) GalNAc Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	1432	★	–	7,4	8,0
 NeuAc(α2-3)Gal(β1-3) GalNAc NeuAc(α2-3)GlcNAc(β1-3) Gal(β1-4)GlcNAc(β1-6)	1705	★	–	13,7	11,7
core 1 [%]	–		68,8	65,8	58,2
core 2 [%]	–		31,2	34,2	41,8
Anteil saurer Glykane [%]	–		66,3	69,2	70,1
Anteil neutraler Glykane [%]	–		33,7	30,8	29,9

Tabelle 6c: O-Glykanprofil und der Anteil an sauren bzw. neutralen O-Glykanen der MUC1-Fusionsproteine aus MDA-MB-231 Zellen.

Die O-gebundenen Glykane wurden durch reduktive β-Eliminierung vom Protein freigesetzt, permethyliert und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Die Identifizierung der Oligosaccharide erfolgte durch MALDI-MS und ESI-MS/MS (Engelmann et al., 2005) und zur Quantifizierung der O-Glykanstrukturen wurden die Peakflächen integriert.

	Fukose,		Galaktose,		Glukose,		N-Acetylgalactosamin,		N-Acetylglucosamin
	N-Acetylneuraminsäure,		Core 1,		Core 2,		neutrales O-Glykan,		saures O-Glykan

In Übereinstimmung mit früheren Befunden (Engelmann et al., 2005), wurde das O-Glykanprofil der abgeschilferten (*Membrane-Shedding*) MUC1-M-Sonde von einer hohen *core1*-Expression dominiert. Auch das Glykosylierungsmuster der MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N-Sonde wies, trotz der stark eingeschränkten clathrin-vermittelten Endocytose, überwiegend *core1*-Strukturen auf.

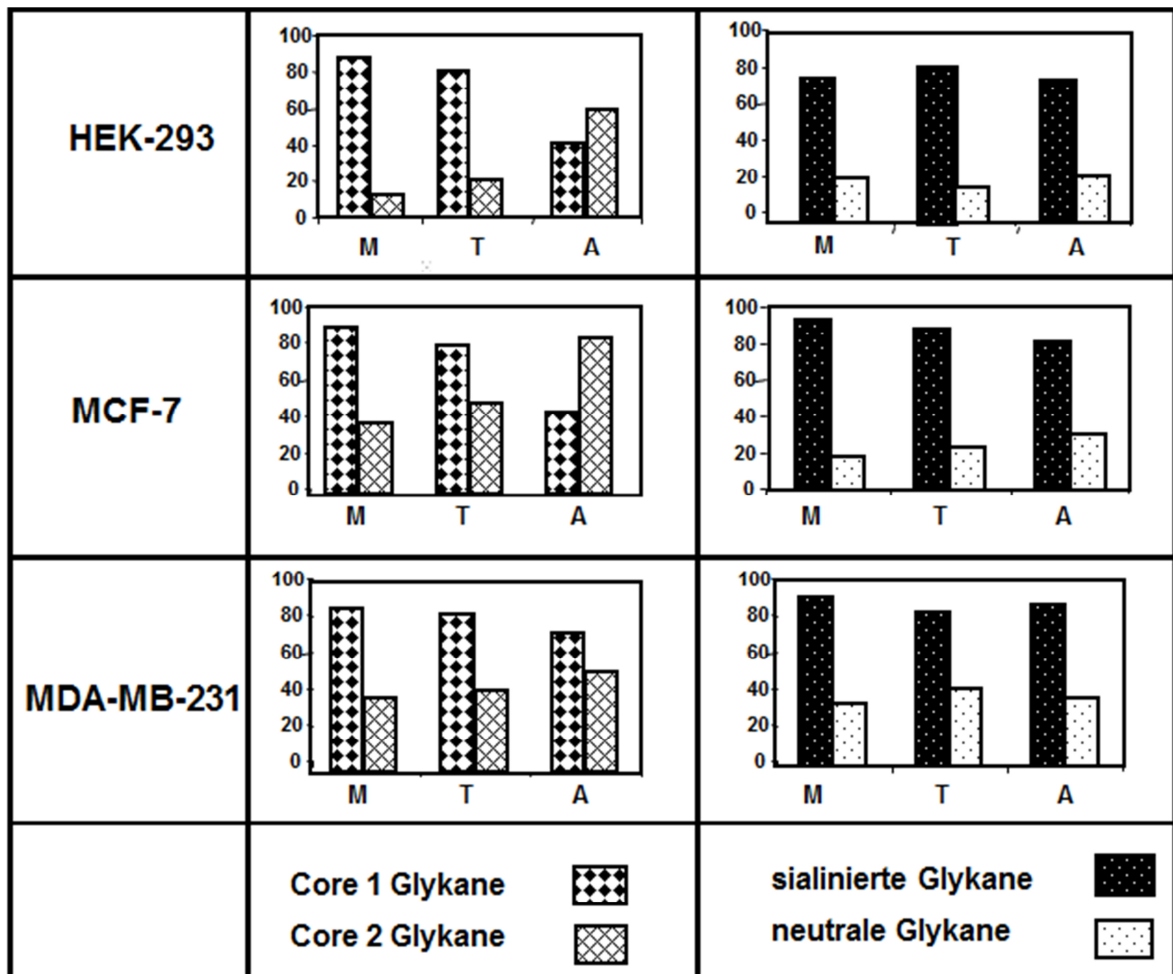


Abbildung 37: Schematische Darstellung der prozentualen Anteile der auf MUC1-Sonden vorkommenden *core*-Strukturen in HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231. Alle Zelllinien stimmten in der geringen Expression neutraler *core*-Strukturen sowie in der Anteilsverschiebung von *core* 1- nach *core* 2-Strukturen innerhalb der Gruppe membranständiger Sonden von MUC1-M und MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N nach MUC1- CQC/AQA überein. M = MUC1-M, T = MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N, A = MUC1-M-CQC/AQA

Eine drastische Verschiebung bei der Expression von *core1* in Richtung auf *core2*-basierende Zuckerstrukturen wurde allerdings bei der Sonde MUC1-M-CQC/AQA mit geblockter Rezyklisierung beobachtet. So lag beispielhaft der prozentuale Anteil an *core1*-Strukturen im Falle von MUC1-M und MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N in HEK-293-Zellen

bei 87,9 % bzw. 81 %, während auf MUC1-M-CQC/AQA (HEK-293) nur etwas weniger als die Hälfte (40,9 %) als *core1*-Strukturen exprimiert wurden.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Glykane der MUC1-M-Sonden überwiegend sialinierte Species darstellten.

Das Ausmaß der Sialinierung der abgeschilferten Fusionsproteine blieb unabhängig vom Zelltyp nahezu unverändert. MUC1-M-Sonden aus HEK-293 Zellen enthielten mit 9,6 % bis 24,5 % kaum neutrale Kohlenhydrat-Komponenten, während die sialinierten Zuckerstrukturen durchweg dominierten.

Die gewonnenen Strukturinformationen und relative Quantitäten der einzelnen Glykanspezies sind in Tabelle 6a bis 6c zusammengefasst.

Die O-Glykanprofile der in HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-213 exprimierten Sonden wiesen nur kleinere zellabhängige Unterschiede auf. Gleiches galt auch für den Anteil an sauren Glykanen.

Beispielhaft wies MUC1-M in HEK-293 ein *core1/ core2*-Verhältnis von 87,9 % zu 12,1% bei einem Anteil an sauren Kohlenhydrat-Komponenten von 76,5 % auf, während sich das Verhältnis der *core*-Strukturen des MUC1-M-Fusionsproteins in MCF-7 (70,2% zu 29,8 %) und MDA-MB-231 (68,8 % zu 31,2 %) und der Anteil an sauren Oligosacchariden (MCF-7 bei etwa 83,7 % und MDA-MB-231 bei 72,8 %) kaum veränderten. Die prozentualen Anteile der auf MUC1-Sonden vorkommenden *core*-Strukturen in HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231 sind in der Abbildung 37 schematisch dargestellt.

Aufgrund der geringen Ausbeuten an Exosomen aus Zellüberstand konnten keine O-Glykanprofile der MUC1-Sonden erstellt werden.



## 5. Ergebnisse- Teil II

### (Studien zur Re-Internalisierung von MUC1-Sonden über verschiedene Endozytosewege mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie)

#### 5.1. Überprüfung der Typ1-transmembranären Expression der MUC1-M-Konstrukte

Die Transfektanten wurden durch konfokale *Laser-Scanning-Mikroskopie* hinsichtlich der transmembranären (Typ1) Expression der Fusionsproteine überprüft. Dieses Kriterium musste erfüllt sein, um die rekombinanten Minimucine als authentische, dem endogenen Mucin funktionell vergleichbare Sonden im Kontext des zellulären *Trafficking* ansehen zu können.

Als unabhängige Methode zum Nachweis der Oberflächenexpression der MUC1-Konstrukte wurden die MUC1-negativen und mit MUC1-M, MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N und MUC1-M-CQC/AQA transfizierten HEK-293 Zellen mit Formaldehyd fixiert und anschließend mit einem Antikörper gegen die MUC1-Ektodomäne gefärbt.

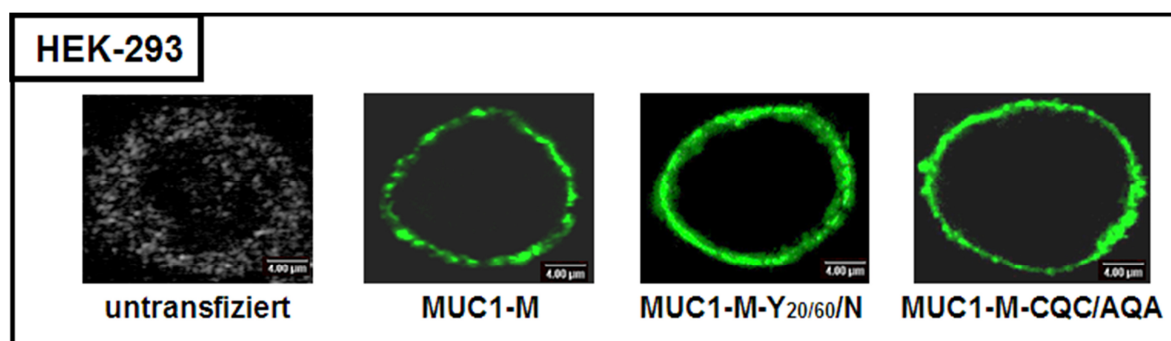


Abbildung 38: Die mit MUC1-M, MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N und MUC1-M-CQC/AQA transfizierten HEK-293 Zellen exprimierten die Konstrukte auf der Zelloberfläche.

Mittels Immunfluoreszenz-Färbung wurde die membranäre Lokalisation der MUC1-Konstrukte bestätigt. Eine fluoreszenzmikroskopische Färbung mit Anti-MUC1 (C595) war im Falle von nichttransfizierten HEK-293 Zellen ohne endogene MUC1-Expression nicht erfolgreich (Aufnahme: Hellfeldbild).

40-fache Vergrößerung. Maßstabsbalken = 4 µm

Nach erfolgter Immunreaktion mit dem Anti-MUC1 C595 Antikörper wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Antikörper Anti-Maus IgM Alexa Fluor 488 markiert und fluoreszenzmikroskopisch dargestellt (Abbildung 38).

Da die Plasmamembran nicht permeabilisiert worden war, wurden MUC1-Sonden, die in intrazellulären Transportprozessen involviert waren, in diesem Assay nicht sichtbar.

## 5.2 Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisierung der MUC1-M-Sonden in transfizierten Zellen

Die Verteilung der MUC1-M-Konstrukte wurde in vitalen HEK-239, MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen mittels konfokaler Laser-Mikroskopie der Triton-X100 behandelten Zellen durch Markierung mit monoklonalem Maus-Anti-MUC1 (C595) gegen N-terminale Ektodomänen-Epitope untersucht.

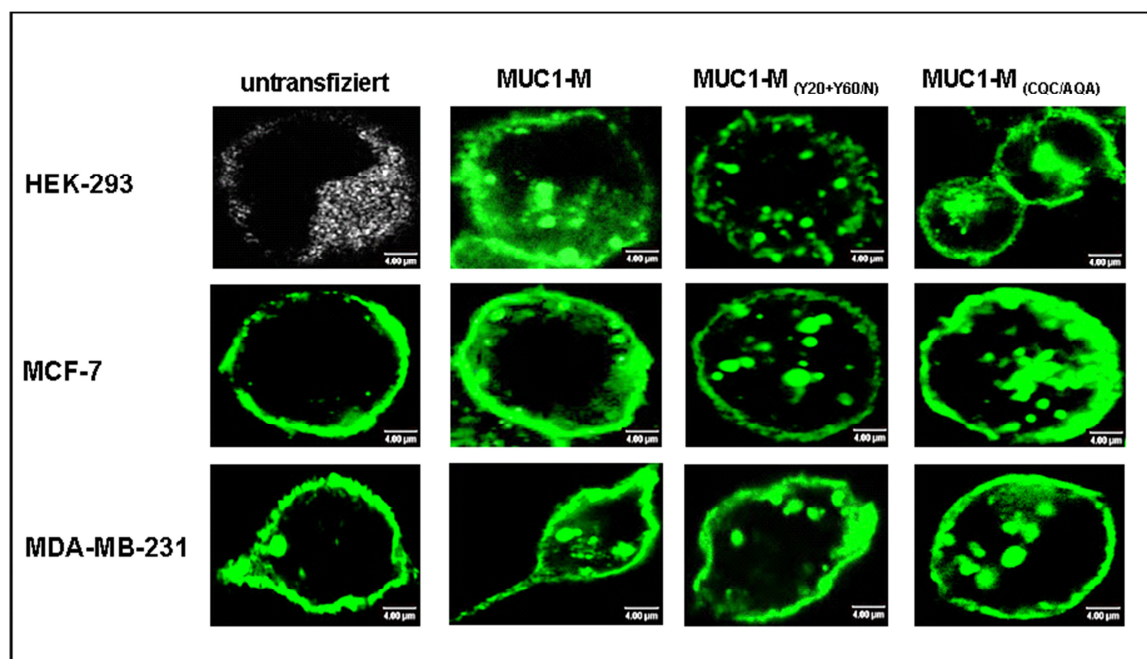


Abbildung 39: Die untransfizierten und die mit MUC1-M Konstrukten transfizierten HEK293, MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen wurden nach der Markierung mit Anti-MUC1 C595 mit Paraformaldehyd fixiert und immunzytochemisch gefärbt.

Unabhängig von der Zelllinie konnte im Falle von MUC1-M-CQC/AQA-Transfektanten eine deutlich stärkere zytosolische Anreicherung von MUC1-Proteinen im Zellinneren im Vergleich zu den mit MUC1-M oder MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N Zellen beobachtet werden.

Die Markierung der untransfizierten Zellen mit Anti-MUC1 C595 wies eine deutlich schwächere Färbung (MCF-7, MDA-MB-231) bzw. kein Signal bei MUC1-negativen HEK-293 Zellen auf (Aufnahme mittels Hellfeldbildes).

40-fache Vergrößerung der Zellen, Maßstabsbalken = 4 µm

Abgesehen von ihrer erwarteten membranständigen Lokalisation, wiesen die MUC1-Fusionsproteine eine typische punkt- oder strichförmige Lokalisierung im Zellinneren auf (Abbildung 39). Die mit MUC1-Konstrukten transfizierten Zellarten wiesen gegenüber nicht-transfizierten Zellen eine verstärkte MUC1-Expression auf, die durch diffuse oder punktuelle (vesikuläre) Verteilung des Proteins im zytoplasmatischen Raum auffiel.

### **5.3 Untersuchungen des Endozytoseverhaltens und der Fähigkeit zur Plasmamembran-Rezyklisierung der MUC1-M-Konstrukte**

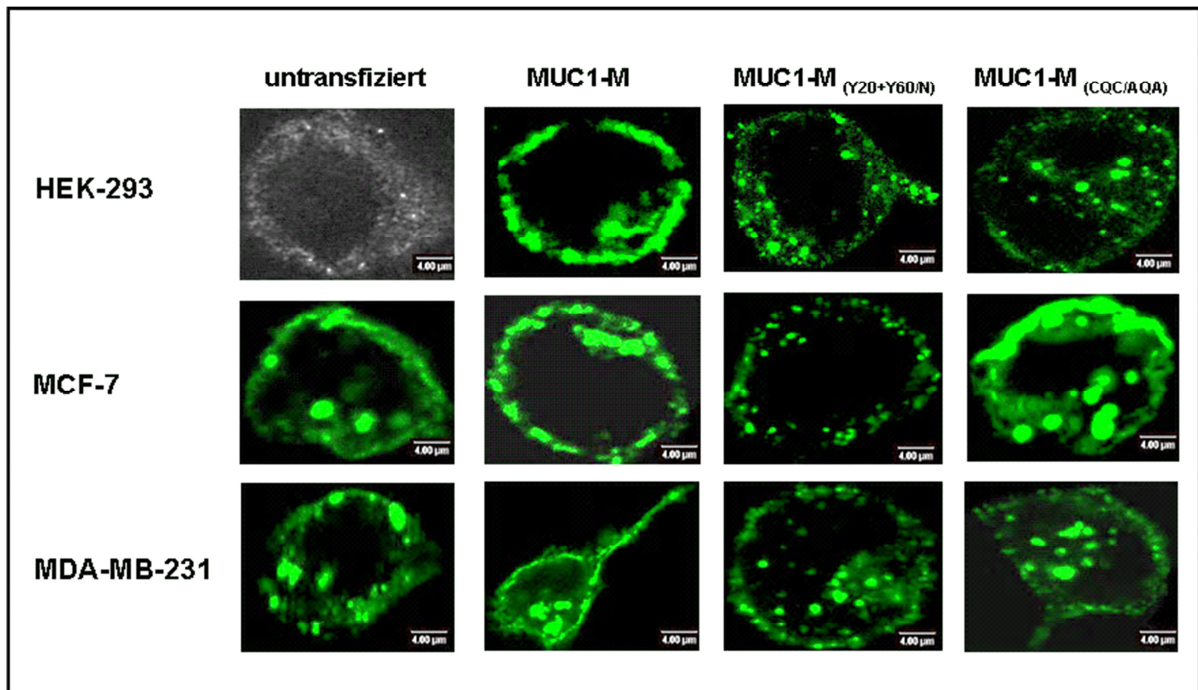
#### ***5.3.1 Reinternalisierung und Resialinierung des transmembranären MUC1 zwecks vollständiger Reifung der Glykoformen***

Durch Endozytose internalisiertes MUC1 kann bis zur Erreichung einer „reifen“ Glykosylierung (Addition von Sialinsäure) mehrfach rezyklisiert werden (Litvinov et al., 1993). Darüber hinaus ist ein Rücktransport von der Plasmamembran zu Kompartimenten des Golgi-Apparates oder dem Endoplasmatischen Retikulum möglich.

Die glykosylierten MUC1-Sonden wurden mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen MUC1-Antikörpers durch konfokale Laser-Mikroskopie nachgewiesen.

Dieser MUC1-Antikörper Ma695 bindet nur an „reife“ und sialinierte Glykoformen des MUC1.





**Abbildung 40:** Die nicht-transfizierten und mit MUC1-M Konstrukten transfizierten HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen wurden nach Markierung mit Anti-MUC1 Ma695 mit Paraformaldehyd fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Die Intensität der aufgenommenen Färbung im Fall von nicht transfizierten Zellen wies im Vergleich zur C595-Immunfluoreszenz-Färbung der transfizierten Zellen (Abbildung 27) keine größeren Unterschiede auf. Eine leichte Akkumulation von MUC1-Proteinen in MUC1-M-CQC/AQA-Transfektanten wurde auch hier beobachtet. Wie erwartet, konnte kein Signal bei Endo-MUC1-negativen HEK-293 Zellen (Aufnahme mittels Hellfeldbildes) festgestellt werden. 40-fache Vergrößerung. Maßstabsbalken = 4 µm

Zellen wurden zuerst mit Anti-MUC1 Ma695 Antikörper inkubiert, anschließend fixiert und mit fluoreszenzmarkiertem Anti-Maus IgM Alexa Fluor 488 gefärbt. Die Antikörperfärbung wurde wie in Kapitel 2.5.1 beschrieben durchgeführt (Abbildung 40).

Das Fluoreszenzmuster der Ma695-gefärbten Zellen ähnelte dem bei C595-Färbung, wobei Ma695 in stärkerem Maße größere vesikuläre Ansammlungen im zytosolischen Raum färbte.

## 5.4 Rezyklisierung und Endozytose der MUC1-Sonden über Transportvesikel

Litvinov und Hilkens (1993) zeigten für endogenes MUC1, dass die vollständige Sialylierung durch wiederholte Rezyklisierung erfolgt. Die Reinternalisierung geschieht dabei zumindest teilweise über Clathrin-vermittelte Endozytose (Altschuler et al., 2000).

Über welche Transportwege die Rezyklisierung von MUC1-Sonden zur Plasmamembran erfolgt, kann mit Hilfe der konfokalen Laser-Mikroskopie in Kollokalisationsstudien gezeigt werden.

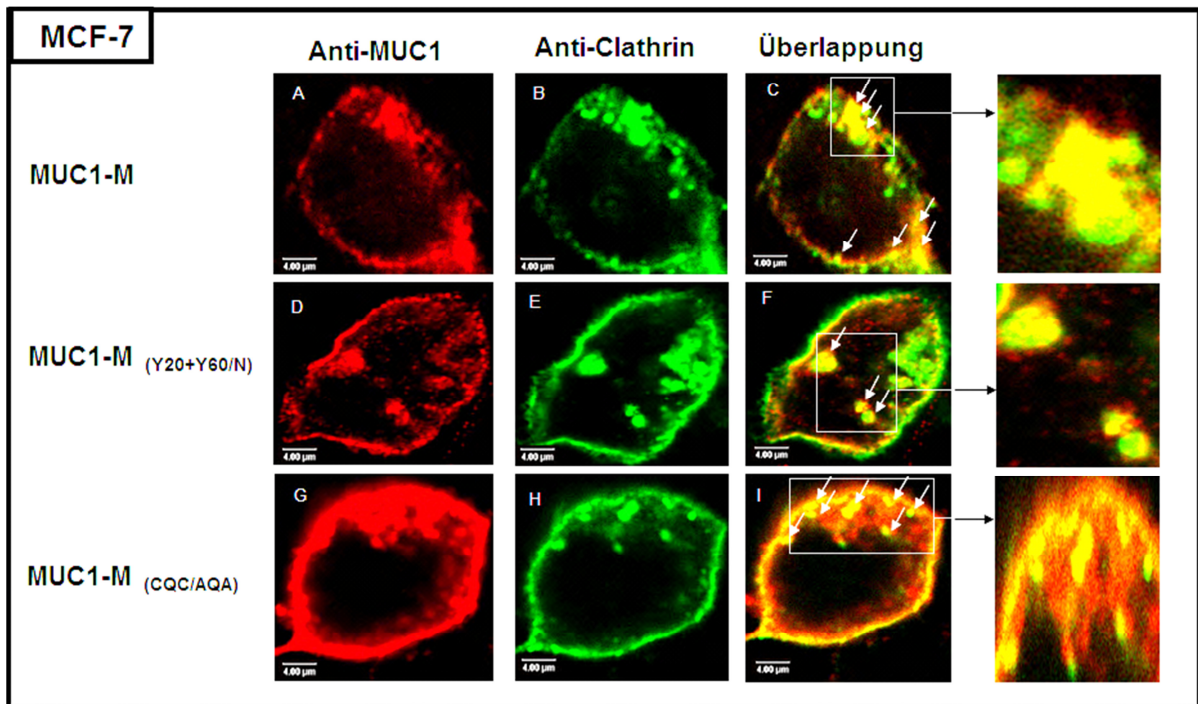
Für diesen Zweck wurde mit polyklonalem Kaninchen-Anti-MUC1 bzw. mit monoklonalem Maus-Anti-MUC1 (C595) und mit Antikörpern gegen Markerproteine für verschiedene Transportvesikel (Anti-Clathrin, Anti-Caveolin-1, Anti-Galektin-3 und Anti-Flotillin-2) gefärbt.

### 5.4.1 Clathrin-vermittelte Endozytose der MUC1-Sonden

Der Proteintransport zwischen Zellorganellen erfolgt durch Transportvesikel, die sich von einer Donormembran abschnüren und mit einer Akzeptormembran fusionieren. Die am längsten bekannten und am besten charakterisierten Vesikel sind die Clathrin beschichteten Vesikel.

Die Vesikel wandern je nach der spezifischen Substanz im Sinne eines "*vesicle sorting*" durch das Zytoplasma zum Golgi-Apparat, rauen ER und Lysosomen oder durch die Zelle hindurch zur gegenüberliegenden Zellmembran im Sinne eines transzellulären Transportes.

Nach Vorarbeiten wiesen die plasmamembranständigen MUC1-Sonden MUC1-M (Engelmann et al., 2005) und MUC1-M-CQC/AQA (Kinlough et al., 2006) die Fähigkeit zu Clathrin-vermittelter Endozytose auf.



**Abbildung 41: Kolokalisationsstudien von MUC1-Sonden und Clathrin-Vesikeln in MCF-7 Zellen.**

Die Clathrin-Vesikel wurden mit Hilfe vom Anti-Clathrin Antikörper X22 (grün) und die MUC1-Sonden mittels polyklonaler Anti-MUC1 (rot) nachgewiesen. Die Zellen wurden anschließend Fluoreszenz-gefärbt. Sequenzen von optischen Schnitten in 250 nm bis 350 nm Intervallen wurden aufgenommen.

A, D, G: Fluoreszenz-Färbung von MUC1. B, E, H: Clathrin-Färbung C, F, I: Überlagerung von MUC1- und Clathrin-Färbung. Gelbe Regionen markieren die Kolokalisation von Clathrin (grün) mit dem MUC1 (rot). MUC1 kolokalisiert mit Clathrin partiell sowohl im Zellinneren als auch an der Plasmamembran. Kolokalisationen sind teilweise mit weißen Pfeilen markiert.

40-fache Vergrößerung. Maßstabsbalken = 4 µm

Ziel der Kolokalisationsstudie war es, die Clathrin-vermittelte Endozytose der MUC1-Sonden in transfizierten Zellen der Linie MCF-7 zu überprüfen.

Wie in Abbildung 41 zu sehen ist, stellen Bilder 1-3 (Bilder A, D, G bzw. Bilder B,E,H) jeder Reihe die in den einzelnen Kanälen aufgenommene Färbung dar. Das Mischbild entsteht durch Übereinanderlegen der Einzelbilder. Die Zusammenführung der Alexa Fluor 555- und Alexa Fluor 488-Fluoreszenzen sind jeweils rechts dargestellt und kolokalisierende Foci erscheinen gelb.

Die Verteilung der Proteinpaares MUC1 (A, D, G) und Clathrin beschichtete Vesikeln (B, E, H) in mit MUC1-M-Konstrukten transfizierten MCF-7 ist hauptsächlich in einer Anhäufung intrazellulärer vesikulärer Strukturen und annähernd über die gesamte

Plasmamembran zu beobachten. Die vesikulären Signale sind dabei ungleichmäßig verteilt (Abbildung 41).

Dabei kolokalisieren die punktierten, mikrodomänen-ähnlichen und strichförmigen Signale der MUC1-Sonden (rot) mit vesikulären Clathrin-Strukturen (grün) diffus intrazellulär, aber auch submembranös und Plasmamembran-ständig (Abbildung 41).

Die Kolokalisationsstudien erlauben Aussagen über endozytotische Prozesse der MUC1-M-Sonden und bestätigten die Clathrin-vermittelte MUC1-Endozytose. Das Ergebnis der konfokalen Studien korrelierte mit den bereits vorhandenen Daten aus Vorarbeiten (Engelmann et al., 2005).

Es bestehen allerdings berechtigte Zweifel, dass das MUC1 nur über Clathrin-Vesikel endozytiert werden kann, denn die bereits referierten Ergebnisse der O-Glykanprofilierung (Abbildung 37) von mutierten und Wild-Typ-Sonden legen nahe, dass alternative Transportwege auch eine Rolle spielen.

## **5.4.2 Lipid Raft-assoziierte Endozytose**

### **5.4.2.1 Caveolae-vermittelte Endozytose**

Neben der Clathrin-vermittelten Endozytose gehören verschiedene Lipid Raft-assoziierten Endozytosewege zu den wichtigsten Aufnahme-Mechanismen der Zelle. Häufig sind Proteine von bestimmten Signaltransduktionswegen, wie die Proteine der Caveolin-Familie, in diesen *Lipid Rafts* lokalisiert und fungieren als *Scaffolding Proteins*.

Die Caveolin-abhängig-vermittelte Endozytose stellt nach heutiger Meinung eine Sonderform der Raft-assoziierten Endozytose dar, in welcher Caveolin-1 das Gerüst der Caveolae bildet und maßgeblich an der Bildung des faserartigen Mantels der Caveolae beteiligt ist und daher als biochemischer Marker der Caveolae-abhängig-vermittelten Endozytose in den unterschiedlichen Zelltypen angesehen wird.

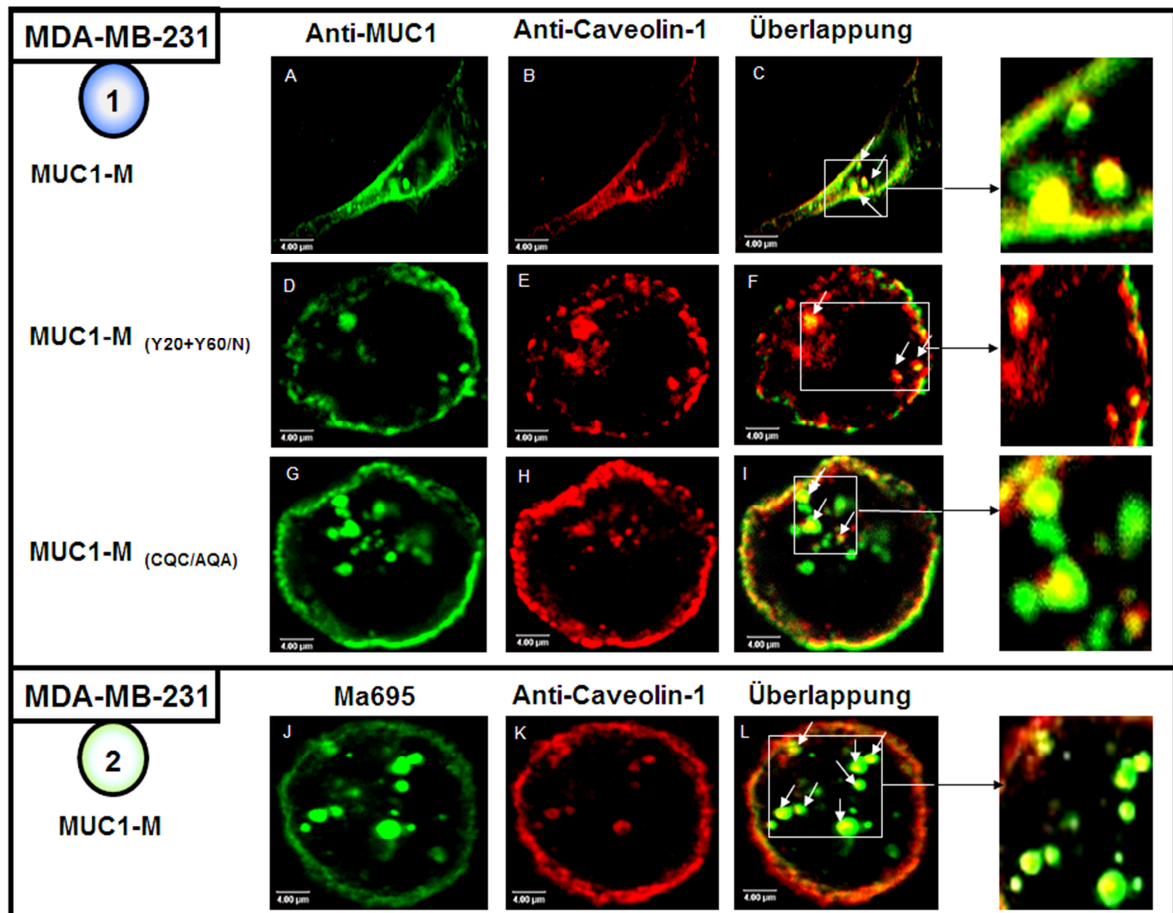


Abbildung 42: Kolokalisationsstudien von MUC1-Sonden und Caveolin-1 in MDA-MB-231 Zellen.

Bild 1: Kolokalisationsstudien von MUC1-Sonden und Caveolin-1 in transfizierten MDA-MB-231 Zellen. Die caveolären Vesikel wurden mit Hilfe vom Anti-Caveolin-1 (rot) und die MUC1-Sonden mittels Anti-MUC1 C595 (grün) nachgewiesen. Sequenzen von optischen Schnitten in 250 nm bis 350 nm Intervallen wurden mit einem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop aufgenommen.

A, D, G: Fluoreszenz-Färbung von MUC1. B, E, H: Caveolin-1-Färbung. C, F, I: Überlagerung von MUC1- und Caveolin-1-Färbung. Gelbe Regionen markieren die Kolokalisation von MUC1 (grün) mit Caveolin-1 (rot). MUC1 kolokalisiert mit Caveolin-1 partiell sowohl im Zellinneren als auch an der Plasmamembran. Überlappende Signale sind teilweise mit weißen Pfeilen markiert.

Bild 2: Kolokalisationsstudien vom markierten vollständig glykosylierten MUC1-M und Caveolin-1 in MUC1-M transfizierten MDA-MB-231 Zellen. Die caveolären Vesikel wurden mit Hilfe vom Anti-Caveolin-1 (rot) und MUC1-M mittels Anti-MUC1 Ma695 (grün) gefärbt. Sequenzen von optischen Schnitten in 250 nm bis 350 nm Intervallen wurden mit einem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop aufgenommen.

J: MUC1-Fuoreszenz. K: Caveolin-1-Färbung. L: Überlagerung von MUC1- und Caveolin-1-Färbung. Gelbe Regionen markieren die Kolokalisation vom rezyklierten MUC1 (grün) mit Caveolin-1 (rot). MUC1 kolokalisiert mit Caveolin-1 partiell sowohl im Zellinneren als auch an der Plasmamembran. Überlappende Signale sind teilweise mit weißen Pfeilen markiert.

40-fache Vergrößerung. Maßstabsbalken = 4 µm



Caveolae besitzen einen Durchmesser von etwa 50-80 nm und erscheinen als flaschenhalsförmige, vesikuläre oder tubuläre Strukturen. Neben der offenen Struktur der Caveolae scheinen diese aber auch als geschlossene Vesikel in endozytotischen oder exozytotischen Strukturen vorzuliegen.

Neben dem Clathrin-vermittelten Transportweg sollte weitere Evidenz für alternative, Caveolin-abhängige Endozytosewege der MUC1-M-Sonden durch Kolokalisationsstudien in der konfokalen Laser-Mikroskopie erbracht werden, wobei Anti-Caveolin-1 zur Visualisierung von caveolären Vesikeln zum Einsatz kam. Für die folgenden Kolokalisationsexperimente wurde neben dem bisher verwendeten C595-Antikörper, der unabhängig vom Glykosylierungsgrad an MUC1 bindet, auch der Antikörper Ma695 eingesetzt, der nur das reife und vollständig reglykosylierte MUC1 erkennt.

Der Einsatz von Ma695 diente der Beantwortung der Frage, ob das plasmamembranäre MUC1 nach erfolgter Re-Endozytose ebenfalls mit caveolären Transportkomponenten kolokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass an der Plasmamembran exponiertes, „reif“ glykosyliertes MUC1 auch über Caveolae-vermittelte Endozytose ins Zellinnere rücktransportiert werden kann.

Wie in Abbildung 42 zu sehen ist, stellen Bilder 1-4 (Bilder A, D, G, J bzw. Bilder B, E, H, K) jeder Reihe die in den einzelnen Kanälen aufgenommene Färbung dar. Die Mischbilder (C, F, I, L) entstehen durch Übereinanderlegen der Einzelbilder. Die Überlagerungen der Alexa Fluor 555- und Alexa Fluor 488-Fluoreszenzen sind jeweils rechts dargestellt und kolokalisierende Signale erscheinen gelb. Sowohl die MUC1-Sonden als auch die caveolären Vesikel sind punktuell und strichförmig im Zytoplasma bzw. unter der Zellmembran angeordnet (Abbildung 42).

Abgesehen von ihrer erwarteten membranständigen Lokalisation, zeigten die mit Anti-MUC1 (C595 bzw. Ma965) immunmarkierten MUC1-M-Sonden (grün) zytoplasmatische punktierte teilweise ringförmige Signale, die mit Caveolin-1 (rot) zwar hauptsächlich an der Plasmamembran aber auch zu geringeren Teilen im Zellinneren kolokalisierten.

Das Erscheinungsbild der untersuchten Proteinpaare, die Anzahl der Foci und die Signalintensität änderten sich im Vergleich zur Immunfluoreszenz-Analyse der MUC1-Fusionsproteine mit Clathrin-Vesikeln nicht wesentlich.

Die konfokalen Mikroskopstudien erbrachten somit Hinweise auf die Existenz alternativer Aufnahmewege für membranständiges MUC1 in Form von Caveolin-abhängigen Prozessen. Diese Erkenntnisse wurden durch Kolokalisationsanalysen in MDA-MB-231-(MUC1-M) mittels Doppelimmunfärbung mit Anti-Caveolin-1 und Ma965 bestätigt (Abbildung 42, Bild 2).

Interessant ist der Befund insofern, als das Caveolin-1 mit reifen Glykoformen des MUC1-M (Ma965-gefärbt) eine vergleichbar starke Kolokalisation aufwies (s. Abbildung 41, Bild 2), wie im Falle des C595-gefärbten MUC1-M (Abbildung 41, Bild 1).

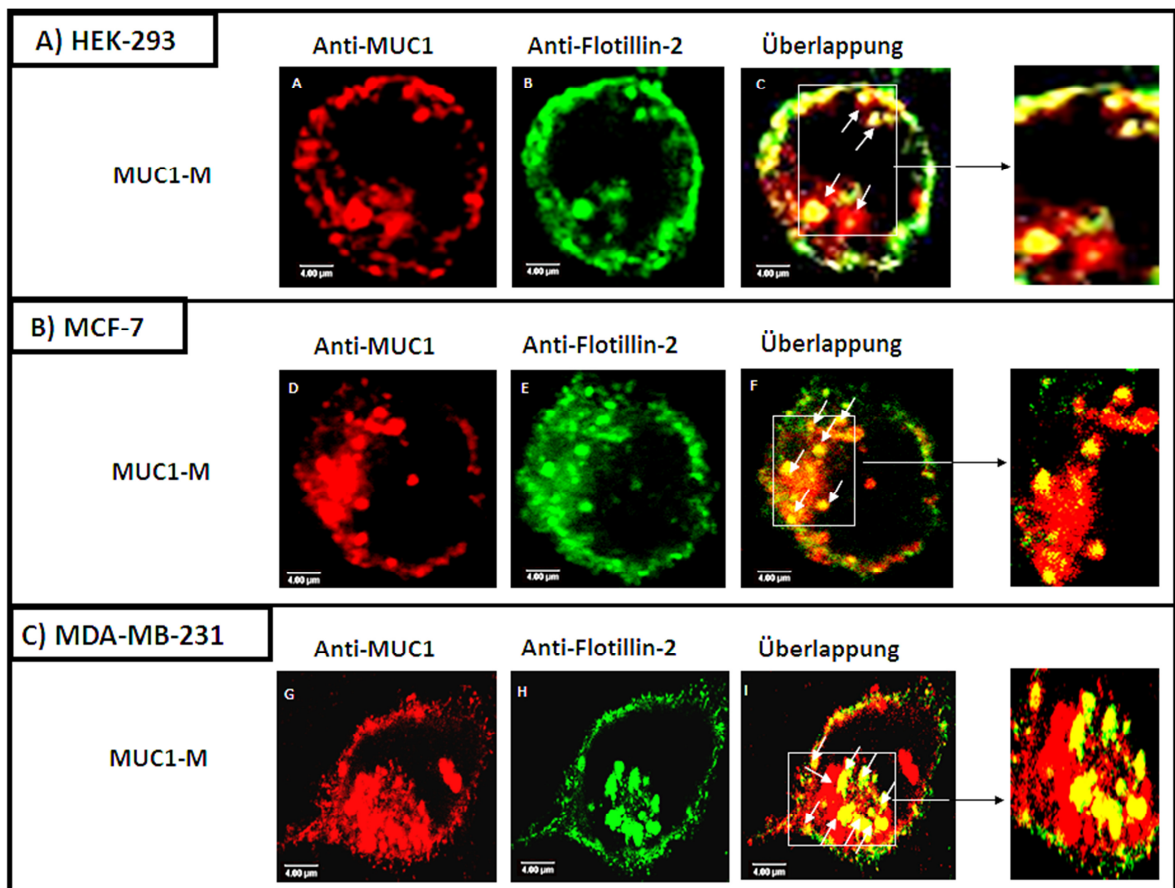
#### **5.4.2.2 Lipid-Raft-assoziierte, Caveolin-unabhängig-vermittelte Endozytose**

Reggies, auch bekannt als Flotilline werden häufig als Marker-Proteine für den Nachweis von Lipid-Rafts genutzt. Obgleich die genaue Funktion der Reggies noch nicht geklärt ist, sind die beiden Flotillin-Isoformen (Flotillin-1 und -2) aber viel mehr als nur Raft-Marker- oder Gerüstproteine, sondern erfüllen beispielsweise wichtige Aufgaben in der *Raft*-vermittelten Signaltransduktion. Dabei ist Flotillin-2 (Reggie-1) in allen bisher untersuchten Zelllinien zu finden (Volonte *et al.* 1999) und eignet sich daher besonders gut als Raft-assoziiertes Markerprotein.

Neben ihrem Vorkommen in der Plasmamembran konnten Flotilline auch intrazellulär in Endosomen und im Golgi gefunden werden, was auf eine Rolle bei der Raft-vermittelten Endozytose schließen lässt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte gezeigt werden, dass MUC1 auch über Caveolin-unabhängige, aber Flotillin-abhängige Wege endozytiert werden kann.

Für die mikroskopische Darstellung des *Lipid Raft*-assoziierten, Caveolin-unabhängigen Transportweges von MUC1 wurde Flotillin-2 als Markerprotein verwendet.



**Abbildung 43: Kolokalisationsstudien von MUC1-Sonden und Flotillin-2 in mit MUC1-M transfizierten HEK-293 (A), MCF-7 (B) und MDA-MB-231 (C) Zellen.**  
 Die Flotillin-2 beschichteten Vesikel wurden mit Hilfe vom Anti-Flotillin-2 (grün) und die MUC1-M-Sonde mittels polyklonalen Anti-MUC1 (rot) nachgewiesen. Die Zellen wurden anschließend immunzytochemisch gefärbt. Sequenzen von optischen Schnitten in 250 nm bis 350 nm Intervallen wurden mit konfokalem *Laser-Scanning*-Mikroskop aufgenommen.  
 A, D, G: MUC1-Fuoreszenz. B, E, H: Flotillin-2-Färbung. C, F, I: Überlagerung von MUC1- und Flotillin-2-Färbung. Gelbe Regionen markieren die Kolokalisation von Flotillin-2 (grün) mit MUC1 (rot). MUC1 kolokalisiert mit Flotillin-2 partiell sowohl im Zellinneren als auch an der Plasmamembran. Überlappende Signale sind teilweise mit weißen Pfeilen markiert. Maßstabsbalken = 4 µm

Die markierten MCF-7<sub>(MUC1-M)</sub> und MDA-MB-231<sub>(MUC1-M)</sub> Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz auf Lokalisation von MUC1 und Flotillin-2 hin untersucht und anschließend einer Kolokalisationsanalyse unterzogen.

Bilder 1-3 in Abbildung 43 (Bilder A, D, G bzw. Bilder B, E, H) stellen die in den einzelnen Kanälen aufgenommene Färbung dar. Das Mischbild entsteht durch Übereinanderlegen der Einzelbilder. Die Überlagerungen der Alexa Fluor 555- und Alexa Fluor 488-Fluoreszenzen sind jeweils rechts dargestellt und kolokalisierende Bereiche erscheinen gelb.



Die konfokalen Studien mit Flotillin-2 zeigten hauptsächlich, dass Flotillin-2 vornehmlich in intrazellulären vesikulären Strukturen zu finden ist, eine Anfärbung der Plasmamembran ist jedoch auch in geringerem Ausmaß sichtbar. Die Vesikel sind dabei nicht gleichmäßig verteilt, sondern in bestimmten Bereichen der Zellen angereichert. MUC1 wies ebenfalls eine intrazelluläre, vesikuläre aber auch eine Plasmamembran-ständige Lokalisation auf. In Abbildung 43 ist die Lokalisation von MUC1-M (rot) und Flotillin-2 (grün) in HEK-293<sub>(MUC1-M)</sub>, MCF-7<sub>(MUC1-M)</sub> und MDA-MB-231<sub>(MUC1-M)</sub> Zelllinien dargestellt.

Des Weiteren konnte man in den überlagerten Bildern eine signifikante Kolo-kalisation der beiden Proteine erkennen, die mit der von Caveolin-1 und MUC1 (Abbildung 39) vergleichbar ist. Die Kolo-kalisation konnte partiell sowohl bei den intrazellulären Vesikeln als auch an der Plasmamembran beobachtet werden. Diese Ergebnisse deuten auf weitere Aufnahmewege des MUC1 bei Endozytose und Rezyklisierung.

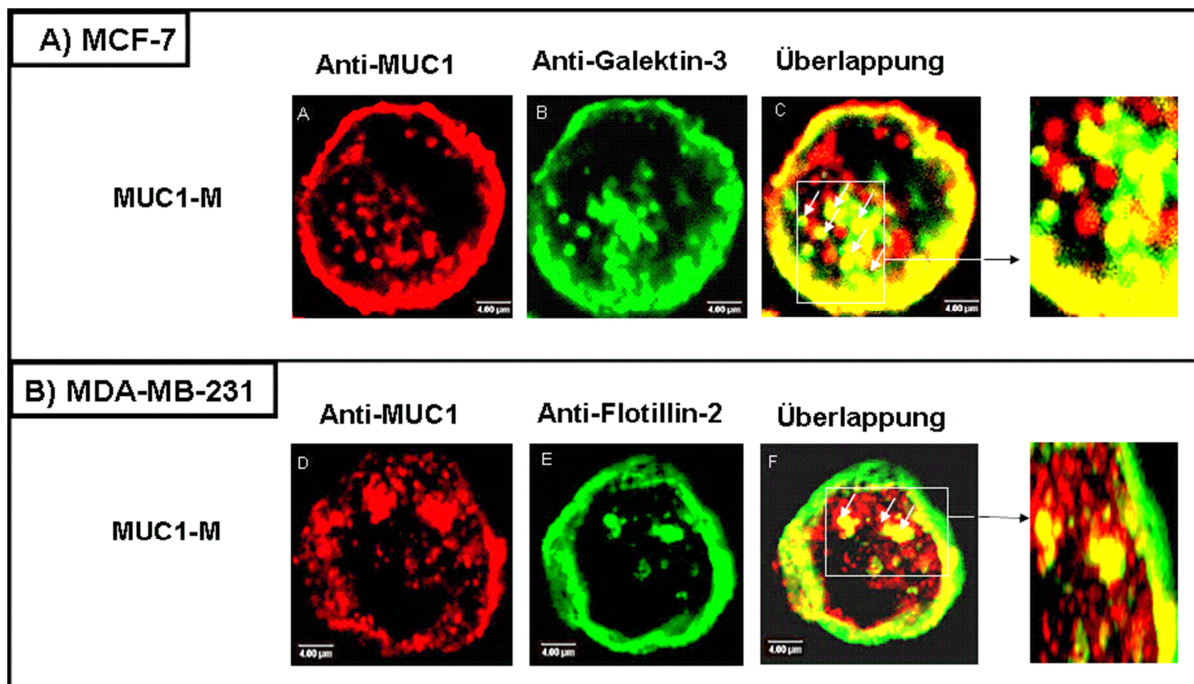
### 5.4.3 Lipid Raft-unabhängige Endozytose

Neben den bereits beschriebenen Endozytosemechanismen existiert eine unspezifische Art der Endozytose, die in der Literatur sehr schlecht charakterisiert ist (Nichols und Lippincott-Schwartz 2001). Diese aktiven Aufnahmeprozesse werden unter dem Begriff Raft-unabhängig vermittelte Endozytose zusammengefasst, welche in keine der beschriebenen Kategorien passen. Bei diesem Aufnahmemechanismus spielen Lipid Raft-unabhängige Proteine wie Galektin-3 eine entscheidende Rolle.

Galektin-3 gehört zu den apikalen Proteinen, die nicht mit *Rafts* assoziieren. Mittels Bindung an Zuckerreste der Proteine induziert Galektin-3 eine *Clusterung* und Separierung der apikalen Lipid *Raft*-unabhängigen Glykoproteine, die wiederum zu einer Membrankrümmung und schließlich zur Bildung eines *Lipid Raft*-unabhängigen Transportvesikels führt (Delacour et al., 2006; Delacour et al., 2007).

Durch Einsatz vom Anti-Galektin-3 Antikörper als Marker der *Lipid Raft*-unabhängigen Endozytose über *Raft*-unabhängige Transportvesikel sollte Evidenz für das Vorliegen dieses Transportweges bei der MUC1-Endozytose in

Kolokalisationsstudien erbracht werden. Bei der Kolokalisationsanalyse in Abbildung 44 ließ sich eine kräftige Anfärbung der Zellmembran mit Anti-Galektin-3 und teilweise mit Anti-MUC1 erreichen. Ebenfalls ließen sich deutliche Fluoreszenzsignale von MUC1-M und Galektin-3 innerhalb der Zelle feststellen.



**Abbildung 44:** Kolokalisationsstudien von MUC1-M und Galektin-3 in transfizierten MCF-7 (A) und MDA-MB-231 (B) Zellen.

Die Galektin-3 positiven Vesikel wurden mit Hilfe von Anti-Galektin-3 (grün) und die MUC1-M-Sonde mittels polyklonalen Anti-MUC1 (rot) nachgewiesen. Sequenzen von optischen Schnitten in 250 nm bis 350 nm Intervallen wurden mit einem konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskop* aufgenommen.

A, D: MUC1-Fluoreszenz. B, E: Galektin-3-Färbung. C, F: Überlagerung von MUC1- und Galektin-3-Färbung. Gelbe Regionen markieren die Kolokalisation von Galektin-3 (grün) mit MUC1 (rot). MUC1 kolokalisiert mit Galektin-3 partiell sowohl im Zellinneren als auch an der Plasmamembran. Überlappende Signale sind teilweise mit weißen Pfeilen markiert. Maßstabsbalken = 4 µm

Die vesikuläre MUC1-Fluoreszenz zeigte intrazellulär eine partielle Kolokalisation mit markierten ringförmigen Galektin-3-positiven Strukturen. Im Vergleich dazu war eine signifikant höher ausgeprägte Kolokalisation der beiden Proteine an der Plasmamembran zu beobachten.

Die beobachtete Kolokalisation des Galektin-3 mit MUC1-M in vesikulären zytoplasmatischen Strukturen hat die Beteiligung des Lektins an endozytotischen Vorgängen des MUC1 bestätigt.

## 5.5 Validierung alternativer Endozytosewege des MUC1 durch Verwendung spezifischer Endozytoseinhibitoren

Die oben referierten Ergebnisse aus konfokalen Kollokalisationsstudien haben aufgezeigt, dass neben der klassischen Clathrin-vermittelten Endozytose des MUC1 weitere alternative Routen existieren, die unabhängig von Clathrin über Caveolae bzw. *Lipid Raft*-vermittelte Mechanismen oder über *Raft*-unabhängige Mechanismen führen.

Um die Ergebnisse aus Kollokalisationsstudien weiter zu erhärten, wurden gezielt einzelne Endozytosewege mittels spezifischer Inhibitoren blockiert. Huth (Huth 2004, Huth et al., 2005) kombinierte alle in der Literatur bekannten Endozytoseinhibitoren und testete sie auf Selektivität und Spezifität im Prozess der Aufnahme. Einige dieser Hemmstoffe wurden im Rahmen dieser Arbeit (s. Tabelle 4) verwendet, die auf unterschiedliche Weise in den Aufnahmemechanismus involviert sind. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verwendeten Hemmstoffe mit Angaben über die Selektivität der Hemmung auf unterschiedliche Endozytosemechanismen.

### 5.5.1. Inhibition der Clathrin-vermittelten Endozytose

Die Clathrin-vermittelte Endozytose in den verwendeten Zellmodellen wurde zunächst durch hyperosmolare Sucrosekonzentrationen blockiert.

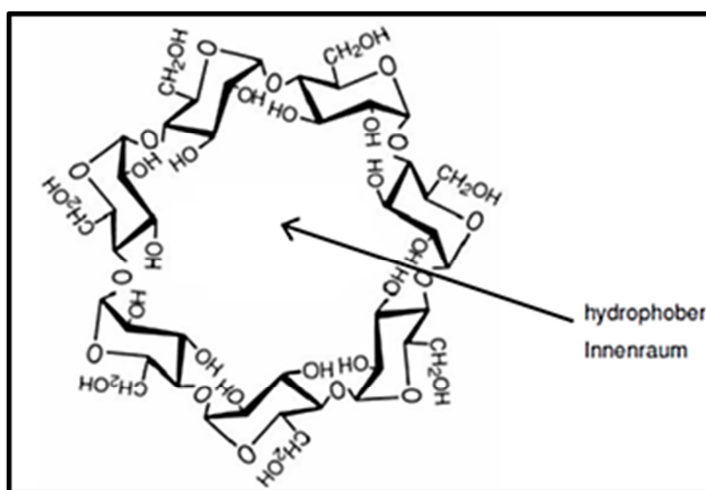


Abbildung 45: Strukturformel von Methyl-β-Cyclodextrin. Durchschnittlich 1,8 der drei Hydroxylgruppen pro Glukoseeinheit sind methyliert.

Andererseits wurde der Hemmer Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (Abbildung 45) verwendet, das den Membranen, und insbesondere den Lipid-Rafts, Cholesterin entzieht und auf diese Weise die meisten Cholesterin-abhängigen endozytotischen Mechanismen inhibiert (Rodal et al., 1999; Thomsen et al., 2002). Die Cholesterin-Depletion wird durch stabile Einschlusskomplexe hervorgerufen, die das wasserlösliche Stärke-Abbauprodukt  $\beta$ -Cyclodextrin mit Cholesterin bildet. Dabei ordnet sich das zyklische Oligosaccharid  $\beta$ -Cyclodextrin bestehend aus sieben  $\alpha$ -(1,4) verknüpften D-Glukoseeinheiten so an, dass die Hydroxylgruppen jeweils nach außen stehen und im Inneren ein hydrophober Raum entsteht, in welches sich Cholesterin einlagern kann. In dieser Studie wurde das methylierte Derivat Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin (M $\beta$ CD) verwendet.

### 5.5.2 PP2 als Src-Kinase-Inhibitor der Caveolae-abhängig vermittelten Endozytose

Zur Untersuchung der Caveolae-vermittelten Endozytose wurden die Caveolin-1 positiven MDA-MB-231 Zellen zusätzlich mit PP2 prä-inkubiert, der nicht mit dem Cholesterin der *Clathrin-coated pits* interagiert und so die Clathrin-vermittelte Endozytose nicht beeinflusst.

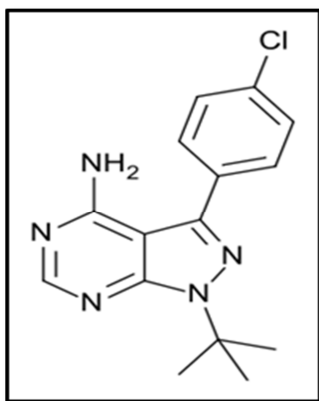


Abbildung 46: Die chemische Strukturformel von PP2 {4-Amino-5-(4-Chlorophenyl)-7-(t-Butyl)pyrazolo [3,4-d] Pyrimidin}. PP2 wird weitläufig zur Inaktivierung der Src-Kinasen eingesetzt.

Der Inhibitor PP2 {4-Amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidin} blockiert die Aktivität aller Src Kinasen, indem er mit ATP um die Bindung an die Kinase konkurriert, und so das Übertragen einer Phosphogruppe auf ein Substrat verhindert. Caveolin-1, das Strukturprotein der caveolären Vesikel, ist ein bekanntes Substrat der Src-Kinasen und wird durch sie an verschiedenen Tyrosinresten

phosphoryliert. Diese Modifikation führt zur Oligomerisierung des Caveolin-1 und zur Bildung von Caveolae (Review Krajewska und Maslowska 2004), deren Abschnürung durch den Einsatz von PP2 unterbunden wird.

### 5.5.3 Untersuchung der MUC1-Internalisierung mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie unter Einfluss spezifischer Endozytoseinhibitoren

Nach Prä-Inkubation mit dem jeweiligen Inhibitor wurden die mit MUC1-M, MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N und MUC1-M-CQC/AQA transfizierten Zellen anschließend mit Anti-MUC1 C595 Antikörper gefärbt, mit Paraformaldehyd fixiert und nach Permeabilisierung zur Markierung mit dem Fluoreszenz-Konjugaten Anti-Maus IgM Alexa Fluor 488 gefärbt.

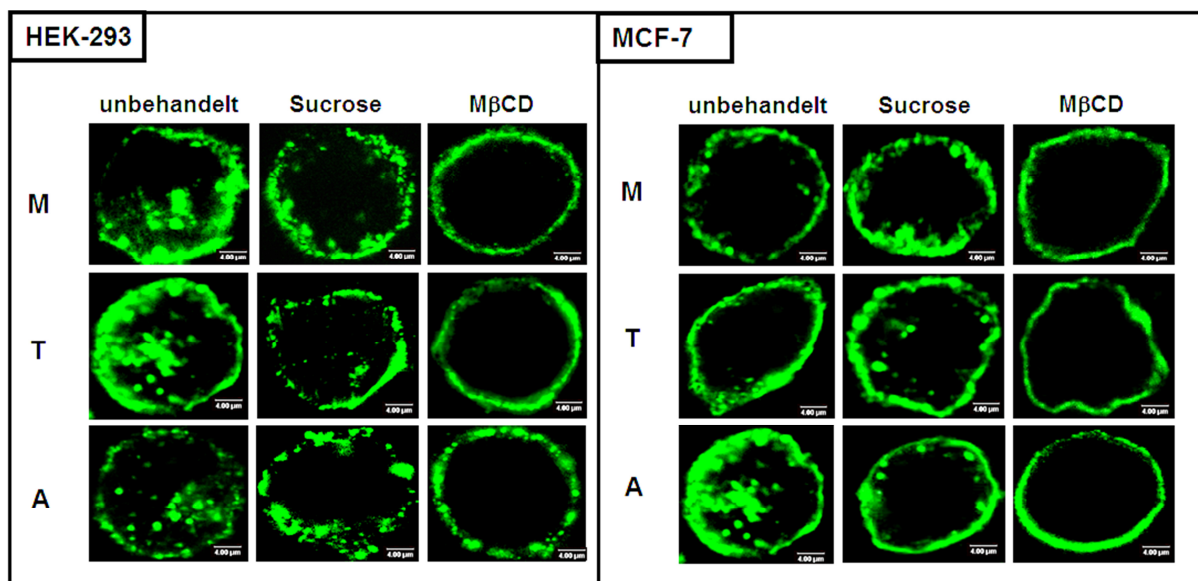


Abbildung 47: Prä-Inkubation der mit MUC1-M (M), MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N (T) und MUC1-M-CQC/AQA (A) transfizierten Zellen mit den Inhibitoren Sucrose und Methyl-β-Cyclodextrin und anschließende Markierung mit Anti-MUC1 C595.

Die MUC1-Sonden wiesen in den unbehandelten Zellproben die typische punktförmige, vesikuläre und plasmamembranständige Lokalisation auf.

Das Erscheinungsbild der untersuchten MUC1-Fusionsproteine in den mit Sucrose vorbehandelten Zellen deutete auf eine Abnahme der MUC1-Endozytose hin.

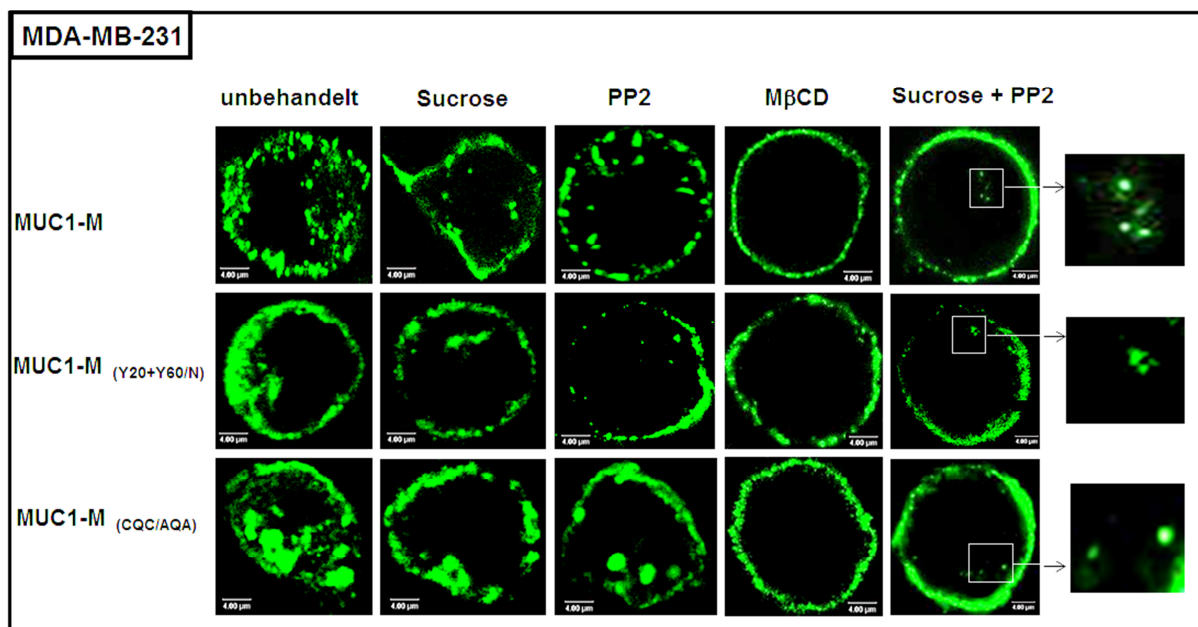
Der Einsatz von MβCD und die damit verbundene Inhibierung der Cholesterin-abhängigen Endozytose führte zu einem kompletten Rückgang der MUC1-Internalisierung. Deutliche Fluoreszenzsignale waren nur plasmamembranständig zu beobachten.

M = MUC1-M, T = MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N, A = MUC1-M-CQC/AQA

40-fache Vergrößerung der Zellen während der Fotografie. Maßstabsbalken = 4 µm

Wie in Abbildungen 47 und 48 deutlich zu erkennen ist, zeigten die unbehandelten, als Kontrolle eingesetzten und transfizierten HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen sowohl die bereits erwartete membranständige und vesikuläre Verteilung des Farbstoffes als auch eine diffuse Fluoreszenz im Zellinneren.

Die Ergebnisse der unbehandelten Zellen entsprachen so dem „normalen Verteilungsmuster“ endozytierter MUC1-M-Sonden. Vergleichsweise konnte aber in allen Inhibitor-vorbehandelten Zellen eine Verminderung bzw. ein kompletter Rückgang der MUC1-Aufnahme in das Zellinnere beobachtet werden.



**Abbildung 48: Prä-Inkubation der MDA-MB-231 Zellen mit den Inhibitoren Sucrose, PP2 und Methyl-β-Cyclodextrin und anschließende Markierung mit Anti-MUC1 C595.**

Die MUC1-Sonden wiesen in den unbehandelten Zellproben die typische punktförmige, vesikuläre und plasmamembranständige Lokalisation auf.

Die mit Sucrose und PP2 vorbehandelten MDA-MB-231 Zellen zeigten eine Abnahme der intrazellulären MUC1-positiven vesikulären Einschlüsse.

Der gleichzeitige Einsatz von Sucrose und PP2 führte zur einer beinahe kompletten Abnahme der MUC1-Internalisierung, wobei allerdings noch vereinzelte punktförmige Einschlüsse im zytosolischen Raum beobachtet wurden.

Die Verwendung von MβCD verursachte einen kompletten Rückgang der MUC1-Internalisierung. Deutliche Fluoreszenzsignale waren nur plasmamembranständig zu beobachten.

40-fache Vergrößerung der Zellen während der Fotografie. Maßstabsbalken = 4 μm

Die Vorinkubation mit Sucrose, dem Inhibitor der Clathrin vermittelten Endozytose, verursachte bei allen Zellarten zwar eine Abnahme der MUC1-Internalisierung im zytosolischen Raum, wobei internalisierte MUC1-M-Sonden dennoch im



intrazellulären Raum detektiert werden konnten. Die submembranäre bzw. membranständige Verteilung der MUC1-M-Sonden blieb in allen Zelllinien, verglichen mit der unbehandelten fluoreszenzmarkierten Kontrolle, unverändert (Abbildung 47 und Abbildung 48).

In Abbildung 48 sind die Aufnahmen von MDA-MB-231 Zellen transfiziert mit MUC1-M, MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N und MUC1-M-CQC/AQA nach Inkubation mit den Inhibitoren Sucrose, PP2 und Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin dargestellt.

Um die Caveolin-abhängige Endozytose der MUC1-Sonden zu untersuchen, wurden die Caveolin-1 exprimierenden MDA-MB-231 Zellen vor der Antikörper-Behandlung mit Sucrose bzw. PP2 inkubiert (Abbildung 48). Auch in diesem Fall zeigte sich eine deutliche Verminderung der vesikulären intrazellulären Färbung.

Insgesamt zeigte sich bei Einsatz einzelner Inhibitoren, die jeweils einen der alternativen Endozytosewege ausschalten, dass es zu einer teilweisen Reduktion der MUC1-Internalisierung kommt.

Bei Inkubation der Zellen mit M $\beta$ CD kommt es zur Cholesterinverarmung der Zellmembran. Hierbei wurden cholesterinreiche Membranmikrodomänen zerstört, welche insbesondere an Caveolae- bzw. Clathrin-vermittelter Endozytose aber auch an weiteren *Lipid Raft*-abhängigen Transportwegen beteiligt sind.

Nur im Falle des M $\beta$ CD, das alle Raft-abhängigen Prozesse blockiert (und damit auch den Clathrin-abhängigen Transport), konnte daher ein vollständiger Rückgang der MUC1-Endozytose und eine komplette Abnahme der vesikulären Strukturen im Zellinneren beobachtet werden (Abbildung 47 und 48).

Interessanterweise führte der kombinierte Einsatz von Sucrose und PP2 zu einem beinahe kompletten Rückgang der MUC1-Endozytose und ließ so auf zusätzliche alternative Aufnahmemechanismen der MUC1-Internalisierung in MDA-MB-231 schließen (Abbildung 48).

Zusammenfassend wurde die Aufnahme der MUC1-Fusionsproteine durch Behandlung mit Sucrose oder PP2 nur geringfügig aber durch die gleichzeitige Inkubation mit Sucrose und PP2 oder mit M $\beta$ CD deutlich vermindert.

### 5.5.4 Untersuchung zur Rezyklisierung der MUC1-M über das Endoplasmatische Retikulum

Als nächstes stellte sich die Frage, wo innerhalb des sekretorischen Transportweges, im Endoplasmatischen Retikulum, im cis/trans-Golgi oder im Trans-Golgi-Netzwerk, der Wiedereintritt rezyklisierender MUC1-M-Sonden stattfindet.

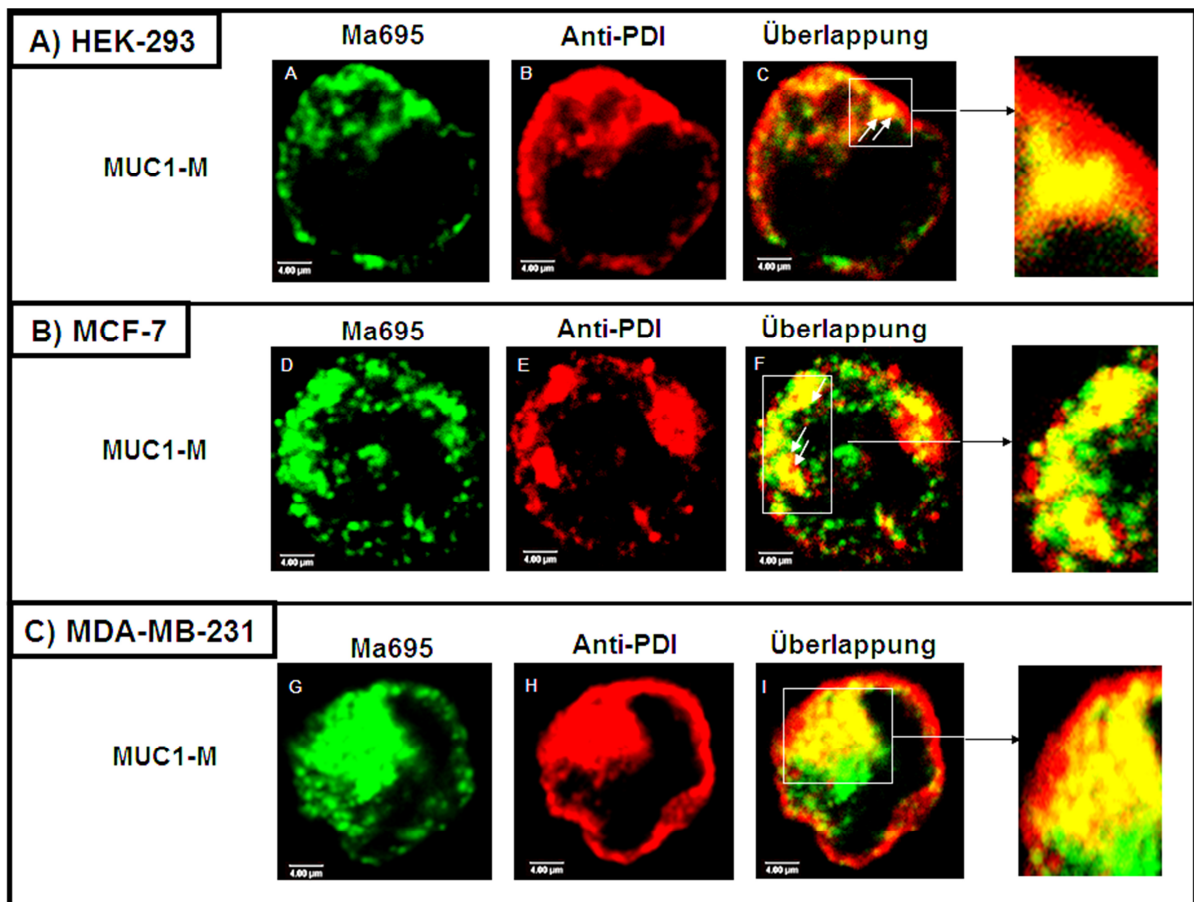


Abbildung 49: Kolokalisationsstudien von fluoreszenzmarkiertem MUC1 und PDI in mit MUC1-M transfizierten HEK-293 (A), MCF-7 (B) und MDA-MB-231 (C) Zellen.

Protein-Disulfid-Isomerase wurde mit Hilfe vom Anti-PDI (rot) und die MUC1-M-Sonde mittels Anti-MUC1 C595 (grün) nachgewiesen. Die Zellen wurden anschließend immunzytochemisch gefärbt. Sequenzen von optischen Schnitten in 250 nm bis 350 nm Intervallen wurden mit konfokalem *Laser-Scanning-Mikroskop* aufgenommen.

A, D, G: MUC1-Fuoreszenz. B, E, H: PDI-Färbung. C, F, I: Überlagerung von MUC1- und PDI-Färbung. Gelbe Regionen markieren die Kolokalisation von PDI (rot) mit MUC1 (grün). MUC1 kolokalisiert mit PDI partiell sowohl perinucleär als auch an membranahen Bereichen. Überlappende Signale sind teilweise mit weißen Pfeilen markiert.

40-fache Vergrößerung der Zellen während der Fotografie. Maßstabsbalken = 4 µm



Da Proteine im ER in der Regel nicht O-glykosyliert sein sollten, wäre der Nachweis von komplex glykosylierten Glykoformen des MUC1 im ER mit Hilfe des Antikörpers Ma965 ein Hinweis auf die Einbeziehung dieser zellulären Substrukturen in diesem Prozess.

Die Zelllinien HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231 wurden nach Behandlung mit Anti-MUC1 Antikörper Ma695 und anschließender Fixierung sowie Permeabilisierung mit dem zweiten Primärantikörper Anti-Protein-Disulfid-Isomerase (PDI-Antikörper) inkubiert.

Die Protein-Disulfid-Isomerase ist ein häufig vorkommendes, lösliches 56 kDa Protein im Lumen des ER, deren funktionell aktive Form ein Homodimer ist.

Das Enzym katalysiert Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen, d.h. die Oxidation, Reduktion und die Umlagerung von Disulfid-Brücken bei einer ganzen Reihe von Proteinen.

Sie besitzt aber auch neben ihrer Hauptaktivität, Katalyse der Disulfid-Brückenbildung, zusätzlich auch Chaperon-Aktivität (Tsai et al., 2001).

Nach der Behandlung mit dem PDI-Antikörper, wurden die Zellen mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper, Anti-Maus IgM Alexa Fluor 488 und Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 555, immunzytochemisch gefärbt.

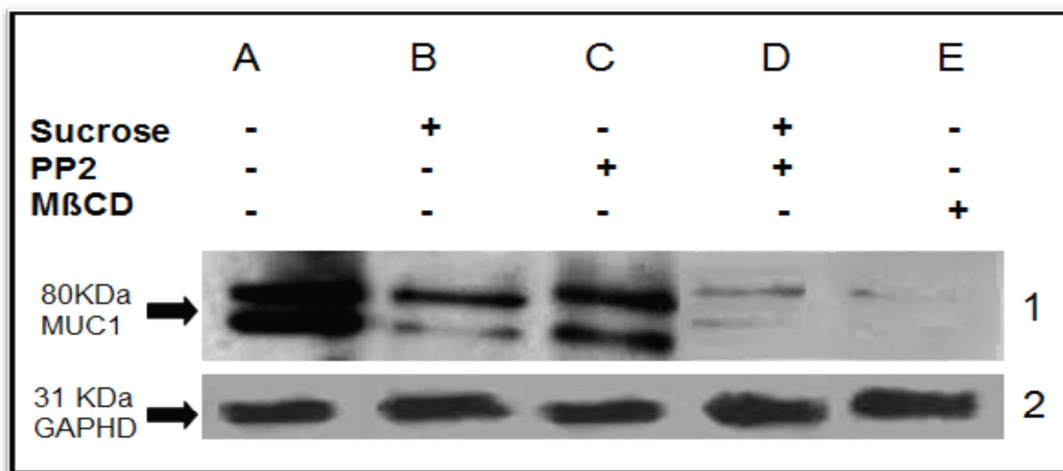
Die Lokalisation der MUC1-M- und PDI-Fluoreszenz wurde am konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop untersucht.

Die Co-Färbungen von reifem MUC1-M und dem deutlich ausgedehnt verteilten subzellulären Markerprotein PDI für ER zeigten zwar perinucleäre Überlappungen, waren aber auch an einigen membrannahen Bereichen angereichert (Abbildung 49).

Die Ergebnisse legen nahe, dass nach Plasmamembran-Exposition die Rezyklisierung der reifen Glykoformen des membranständigen MUC1 auch über das Endoplasmatische Retikulum erfolgt.

### 5.5.5 Recycling-Assay mittels reversibler Oberflächen-Biotinylierung

Die Grundlage des direkten *Recycling-Assays* bildet eine Markierung plasmamembranständiger Proteine, die wieder entfernt werden kann, nachdem das beobachtete Protein internalisiert wurde und damit der reduktiven Spaltung der Markierung unzugänglich wurde.



**Abbildung 50: Recycling-Assay im Modell MUC1-M exprimierender MCF-7 Zellen.** Die Zellen wurden bei 4 °C mit NHS-SS-Biotin inkubiert. Danach erfolgte eine Reinkultivierung unter Einsatz von Endozytose-Inhibitoren bei 37 °C mit anschließender Glutathion Behandlung. Die Zellen wurden lysiert und die biotinylierten Proteine mittels Streptavidinagarose präzipitiert. Die Präzipitate wurden mittels Anti-MUC1 Antikörper im Westernblot detektiert. Bei jeder Zellprobe wurde zusätzlich GAPDH als nicht reguliertes „House-keeping protein“ für den quantitativen Vergleich verwendet (2A-2E). Die Probe 1A entspricht der nicht-blockierten Referenz. Bei den Proben 1B bzw. 1C kamen jeweils die Inhibitoren Sucrose bzw. PP2 zum Einsatz, die die Clathrin-vermittelte bzw. Caveolae-vermittelte Endozytose blockieren. Man konnte eine deutliche Abnahme der internalisierten MUC1-M-Sonde detektieren. Ein deutlicherer Signalverlust wurde bei gleichzeitigem Einsatz von den Inhibitoren Sucrose und PP2 (1D) beobachtet, entsprechendes gilt für die Blockierung *Raft*-abhängiger Endozytose mit Methyl-β-Cyclodextrin (1E). Das Molekulargewicht ist durch die Markerbanden auf der linken Seite angezeigt. Die Proben 1A bis 1E wurden mit Anti-MUC1 Antikörper detektiert. Der mit 2) bezeichnete Blot-Streifen (2A-2E) wurde mit Anti-GAPDH Antikörper gefärbt.

Die Markierung plasmamembranständiger Proteine erfolgt durch das wasserlösliche, nichtmembranpermeable Biotinderivat Sulfo-NHS-SS-Biotin (N-hydroxylsulfosuccinimidester von Biotin, siehe 3.7.2). Die reaktive NHS-Gruppe (2,5 Dioxo-pyrolidin-1-yl-ester) des Biotinderivates bindet an die NH<sub>2</sub>-Gruppen der

Aminosäuresreste (z.B. Lysinreste) von Proteinen. Dadurch wird der Biotinrest kovalent über eine Disulfidbrücke (-SS-) mit dem Protein verknüpft.

Die Biotinmarkierung kann durch reduzierende Reagenzien, wie Glutathion, welche die Disulfidgruppe spalten, aber nicht in das Zellinnere aufgenommen werden, wieder entfernt werden.

Für die Biotinylierungsexperimente wurden die MCF-7<sub>(MUC1-M)</sub> Zellen auf eine 6-well-Platte gleichmäßig ausgesät und mit vorgekühlter Biotinlösung bei 4 °C inkubiert. Da bei einer Temperatur von 4 °C Endozytose und Rezyklisierung blockiert sind, können nur die extrazellulären Proteine der Plasmamembran markiert werden.

Nach dem Auswaschen des freien Biotins wurden die Zellproben im 37 °C warmen serumfreien Zellkulturmedium inkubiert, um die Endozytose der Zellen zu reaktivieren. Den Zellproben wurden zur spezifischen Inhibition der MUC1-M-Internalisierung einzelner Transportwege Inhibitoren zugesetzt, um Clathrin-vermittelte (Sucrose), Caveolin-abhängige (PP2) und Cholesterin-abhängige Endozytose (Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin) zu unterbinden. Eine nicht mit Inhibitoren behandelte Zellprobe wurde als Kontrolle eingesetzt. Während der Reaktivierungsphase konnten Exo- und Endozytose ablaufen, wobei biotinylierte Plasmamembranproteine in die Endosomen gelangten. Die Biotinreste der auf der Plasmamembran verbliebenen Proteine wurden während der folgenden Behandlung mit Glutathion entfernt.

Anschließend wurden die Zellproben lysiert und abzentrifugiert um die Zelltrümmer zu entfernen. Der klare Überstand, der die biotinylierten Plasmamembranproteine enthielt, die während der Reaktivierung internalisiert wurden und deshalb bei der anschließenden Glutathion-Behandlung vor der Abspaltung ihrer Markierung geschützt waren, wurde mit Streptavidin-Sepharose inkubiert. Nach der Aufnahme der Streptavidinpräzipitate in SDS-Probenpuffer wurden die Proben mit Hilfe vom SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose elektrotransferiert und mittels Anti-MUC1 C595 detektiert (Abbildung 50).

Im Vergleich zur unbehandelten Zellprobe (Abbildung 50, 1A), verursachten die Inhibitoren Sucrose (hyperosmolar) und PP2 eine Abnahme der Internalisierung der MUC1-M-Sonde (Abbildung 50, 1B und 1C). Der Inhibitor Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin zeigte bei den MUC1-M exprimierenden MCF-7 Zellen eine starke Reduktion der

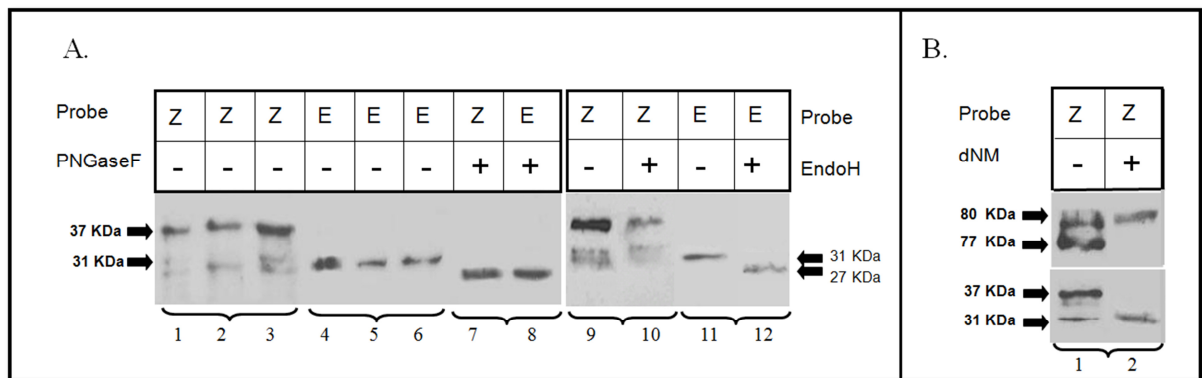
Endozytose (Abbildung 50, 1E). Eine beinahe im gleichen Maße starke Abnahme der MUC1-M-Internalisierung wurde bei der Doppelinhibition mit Sucrose und PP2 beobachtet, die auf Inhibition von Clathrin- und Caveolae-vermittelte Endozytose zurückzuführen ist.

### 5.5.6 Analyse der N-Glykosylierung von Asn36 innerhalb der kleinen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne des MUC1

Obwohl Innerhalb des heterodimeren MUC1-Komplexes die N-Glykane gegenüber den O-Glykanen nur einen kleinen Anteil der Glykosylierung ausmachen, sind sie dennoch im Zusammenhang mit dem MUC1-Trafficking von besonderem Interesse. Die C-terminale Domäne des MUC1, die sich an die TR-Region (*tandem repeats*) anschließt, beinhaltet fünf putative N-Glykosylierungsstellen, die entweder mit mannosereichen Glykanen (High-Mannose-Typ) besetzt sind (sezerniertes MUC1) oder bi- und triantennäre Komplex-Typ-Glykane (membranständiges MUC1) tragen (Parry et al., 2001).

So scheint im Falle der N-Glykosylierung dieses Transmembranproteins die Rezyklisierung durch Golgi-Kompartimente eine weitere Prozessierung zu ermöglichen, so dass die nach einfacher Golgi-Passage verbleibenden mannosereichen Glykane sukzessive in Komplex-Typ-Glykane überführt werden. Vier der fünf N-Glykosylierungsstellen befinden sich innerhalb der großen Untereinheit, der Ektodomäne des heterodimeren Mucin-Komplexes, während eine N-Glykosylierungsstelle innerhalb der kleinen MUC1-Untereinheit und in der Nähe der Transmembrandomäne von MUC1 gefunden wurde.

Diese N-Glykosylierungsstelle, Asparagin 36, ist aufgrund der Fähigkeit zur Induktion der Galektin-3-Expression und Galektin-Bindung vermutlich an den Sortierungsvorgängen von MUC1 beteiligt. Für *Asparagin 36* wurde eine spezifische Bindung des Galektin-3 in ZR-751 Zellen (Ramasamy et al., 2007) gezeigt.



**Abbildung 51:** Charakterisierung der N-Glykoformen der großen und kleinen Untereinheiten des MUC1-M (HEK-293) vor und nach PNGase F- bzw. Endo H-Behandlung bzw. nach Blockierung der N-Glykan-Prozessierung mit DNJ. Der Immunblot wurde mit H-295 und C595 entwickelt.

Abbildung 51 A zeigt die unbehandelten und mit PNGase F bzw. Endo H behandelten zellulären (Z) und exosomalen Proben (E) von HEK-293 Zellen.

- 1-3 und 9: Die unbehandelten Zelllysate-Proben zeigten jeweils eine Bande bei 37 kDa und eine Doppelbande bei 31 kDa
- 4-6 und 11: Bei den unbehandelten exosomalen Proben wurde nur eine Bande bei 31 kDa identifiziert
- 7: Nach PNGase F-Behandlung wurde bei der zellulären Probe nur noch eine Proteinbande bei 27 kDa detektiert.
- 8: Nach PNGase F-Behandlung wurde ebenfalls eine Verringerung der apparenten Molmasse von 31 kDa auf 27 kDa bei der exosomalen Probe beobachtet.
- 10: Nach Inkubation der zellulären Probe mit Endo H wurde keine Veränderung der apparenten Molmasse festgestellt, was auf eine Endo H-Resistenz hindeutet und damit auf das Vorliegen von Komplex-Typ-Glykanen.
- 12: Des Weiteren erkannte man, dass die Endo H-Behandlung eine Reduzierung der Proteingröße von 31 kDa auf 27 kDa bei der exosomalen Proben zur Folge hatte.

Abbildung 51 B zeigt ausgehend von gleicher Zellzahl die unbehandelten und mit DNJ behandelten zellulären Proben (HEK-293), deren Proteine mit Hilfe der Antikörper H-295 und C595 detektiert wurden.

- 1: Die Detektion der unbehandelten HEK-293 Zellprobe mittels C595 Antikörper ergab zwei Proteinbanden bei 77 und 80 kDa, während bei Färbung mit H-295 zwei kleinere Banden von 37 und 31 kDa resultierten, die der zytoplasmatischen Domäne des zellulären MUC1-M entsprachen.
- 2: Die Verwendung von DNJ führte zum Verschwinden der Glykoformen bei 77 bzw. 37 kDa der extrazellulären bzw. der zytoplasmatischen Domäne.

Das Molekulargewicht ist durch die Markerbanden auf beiden Seiten angezeigt.

Ein möglicher Zusammenhang der Asn36-N-Glykosylierung mit zellulärem Trafficking des MUC1 wurde unter Einsatz der Inhibitoren der N-Glyko-Prozessierung untersucht.

MUC1-M-transfizierte HEK-293 Zellen und die aus ihrem Zellkultur-Überstand abgeleiteten Exosomen wurden mit Hilfe von PNGase F bzw. Endoglykosidase H de-N-glykosyliert. Endo H spaltet die Glykane zwischen den beiden inneren GlcNAc-Resten mannosereicher N-Glykane. Dagegen spaltet PNGase F zwischen dem inneren *N*-Acetylglucosamin und dem Asparagin-Rest aller Typen von asparagingebundenen N-Glykanen (Komplex-Typ, Mannosereicher-Typ und Hybrid-Typ), vorausgesetzt, dass sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe in peptidischer Bindung vorliegen.

Zum Nachweis eines Zusammenhangs zwischen MUC1-Membranexposition bzw. exosomalem Export und der Asn36-N-Glykosylierung wurden die MUC1-M transfizierten HEK-293-Zellen mit Deoxynojirimycin (DNJ) vorbehandelt und anschließend biotinyliert. Deoxynojirimycin hemmt kompetitiv die Glukosidase I und II im ER und unterbricht so die Prozessierung von N-gebundenen Oligosaccharidseitenketten vom mannosereichen Typ zum Komplex-Typ.

Der Nachweis der kleinen MUC1-Untereinheit und damit der verschiedenen Asn36-Glykoformen erfolgte mit Endodomänen-spezifischem Antikörper Anti-MUC1 H-295. Im Falle von Deoxynojirimycin inhibierten Zellen wurden die Proben noch zusätzlich mit Hilfe von Anti-MUC1 Antikörper C595 visualisiert.

Wie es der Abbildung 51A zu entnehmen ist, ergaben die aus HEK-293 gewonnen zellulären Proben bei Detektion der kleinen MUC1-Untereinheit mittels H-295 (Abbildung 51A, Nr. 1-3) ein Muster aus drei unterschiedlich N-verknüpften Glykoformen, die der Proteingröße bei 37 kDa und einer Doppelbande bei ca. 31 kDa entsprachen, während im Falle der exosomalen Proben (Abbildung 51A, Nr. 4-6) nur eine einzelne Bande bei 31 kDa visualisiert werden konnte.

Interessanterweise war die kleine Untereinheit der exosomalen MUC1-M Glykoform mit keiner der heterogenen zellulären, plasmamembranären Spezies des Komplex-Typs isographisch.

Wie bereits erwartet, wurde nach PNGase F-Behandlung sowohl bei der zellulären als auch bei der exosomalen Probe (HEK-293) nur eine einzige Glykoform von 27 kDa beobachtet, die auf eine vollständige de-N-Glykosylierung des Proteins hindeutete (Abbildung 51A, Nr. 7 und 8)

Während bei der Endo H-resistenten Zellysat-Probe keine Veränderung der Proteingröße (Abbildung 51A, Nr. 10) festgestellt werden konnte, wurde bei der ebenfalls mit Endo H vorbehandelten exosomal Probe eine Abnahme der Proteingröße von 31 kDa auf 27 kDa detektiert (Abbildung 51A, Nr. 12).

Dieser Befund lässt vermuten, dass die Asn36-N-Glykosylierungsstelle auf dem exosomal MUC1-M dem mannosereichen Typ angehört. Dagegen sprechen die experimentellen Befunde auf Seiten der zellulären (plasmamembranären) Glykoformen für eine weitgehende Komplex-Typ-N-Glykosylierung.

Damit ergibt sich die Möglichkeit, dass exosomaler Export einen Weg darstellt, um unvollständig oder nicht-prozessierte Glykoformen des MUC1 von der Membran zu entfernen. Um die Prozessierungsabhängigkeit der MUC1-Expression (Plasmamembran vs. Exosomen) zu bestätigen, wurden vergleichende Westernblot-Analysen unter Einsatz des Prozessierungsinhibitors Desoxynojirimycin durchgeführt.

Bei der spezifischen Färbung der Ektodomäne von zellulärer MUC1-M Probe mittels C595 Antikörper in Kontrollzellen konnte zwei Proteinbanden bei 77 kDa und 80 kDa beobachtet werden (Abbildung 51B, Nr. 1), während in DNJ vorbehandelten Zellen die Bande bei 77 kDa (Abbildung 51B, Nr. 2) fehlte.

Die einzige bei 80 kDa detektierbare Proteinbande der mit DNJ gehemmten Zellen fiel außerdem durch eine deutlich schwächere Intensität im Vergleich zu den Kontrollzellen auf, was auf eine schwächere Oberflächenexpression des MUC1-M hindeutete.

Die Unterbindung der N-Glykan-Prozessierung in DNJ inhibierten HEK-293 Zellen ergab für die zelluläre Glykoform eine apparente Größe von 31 kDa (Abbildung 51B, Nr. 2), während bei Kultivierung der Zellen in Abwesenheit von DNJ eine Doppelbande bei 37 kDa und 31 kDa (Abbildung 51B, Nr. 1) beobachtet werden konnte.

Bestünde ein Zusammenhang zwischen N-Glykanprozessierung und plasmamembranärer bzw. exosomaler MUC1-Expression, hätte die Blockierung mit DNJ eine Abnahme der zellulären Expression bewirken müssen. Diese war aber nur geringfügig gegeben.



Außerdem war der Befund unerwartet, dass die zelluläre Glykoform vom Mannosereichen Typ war, denn unvollständig prozessierte Glykoformen des MUC1 hätten nach unserer Hypothese über Exosomen abtransportiert werden müssen.

## 6. DISKUSSION

Die O-Glykosylierung eines Mucins oder O-Glykoproteins wird durch genetische und epigenetische Parameter kontrolliert bzw. reguliert. Auf genetischer Ebene ist es das Zusammenspiel des zellspezifischen Repertoires von Glykosyltransferasen mit den Primärstrukturen der Targetsubstrate. In Abhängigkeit von der Verteilung der Glykosyltransferasen (GT) in den Subkompartimenten des cis/trans-Golgi kommt es bei Co-Lokalisation der Enzyme zu kompetitiven Effekten. Dies gilt nicht nur für GT, die die gleiche Substratposition eines Zuckerakzeptors angreifen, sondern auch im Sinne einer indirekten Konkurrenz, da sich die Addition von Monosaccharidbausteinen in bestimmten Positionen negativ (oder positiv) auf die Glykosylierung anderer Positionen des gleichen Substrates auswirken kann.

Für membranständige MUC1-Glykoproteine kommen weitere Parameter ins Spiel, deren konkrete Einflüsse auf die Synthese der O-Glykane im Einzelnen noch nicht bekannt sind. Dazu gehört u.a. die bereits beschriebene Rezyklisierung durch das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN), die mit einer Resialinierung bzw. Reglykosylierung (*follow-up glycosylation*) im Sinne einer Reifung der Protein-Glykoformen einhergeht. Ebenfalls liegen Erkenntnisse vor, wonach die Sortierung von MUC1 für apikale Plasmamembran-Lokalisation von der O-Glykosylierung abhängig zu sein scheint. Die Rezyklisierung des Transmembranmucins und weitere Resialinierung wurden zwar schon sehr früh beschrieben, wobei die Rolle der O-Glykane in diesem Prozess noch nicht geklärt ist. Sicher ist, dass eine unvollständige O-Glykosylierung mit verkürzten Glykanen eine verstärkte Internalisierung und Speicherung des Mucins in endozytotischen Vesikeln zur Folge hat und sowohl die O- als auch die N-Glykoproteine auf sezernierten und membranständigen Isoformen des Mucins qualitativ verschieden sind.

Diese Erkenntnisse stellten den Ausgangspunkt für Untersuchungen zur Aufklärung der zellulären Mechanismen dar, über die distinkte Glykoformen membranständiger MUC1-Sonden generiert wurden.

Im Einzelnen sollte geklärt werden, ob das unterschiedlich ausgeprägte Endozytoseverhalten der membranständigen MUC1-M-Sonden zu Glykosylierungsänderungen führen.

## 6.1 Identifizierung und Integritätsbestimmung der MUC1- M Fusionsproteine

Um den Einfluss der Rezyklisierung auf die mucin-typische O-Glykosylierung des endogenen MUC1 zu untersuchen, wurden für die *in vivo* Glykosylierungsstudien neben dem parentalen MUC1-M, das wie endogenes MUC1 rezyklisieren sollte, zusätzlich noch mutierte, von MUC1-M abgeleitete Sonden (MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N und MUC1-M-CQC/AQA) generiert, die anhand eines eukaryontischen Expressionssystems rekombinant in drei verschiedenen, sich in ihrer Glykosylierung unterscheidenden Zelllinien (HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231) exprimiert wurden.

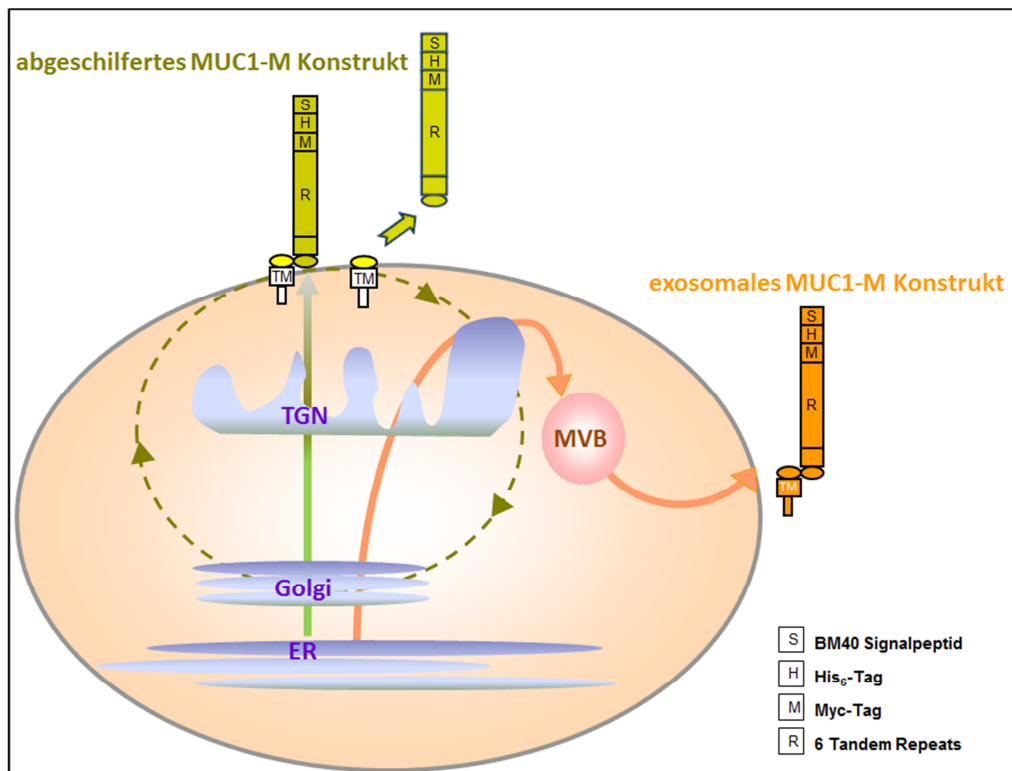


Abbildung 52: Nach dem Erreichen der Plasmamembran wird das MUC1-M entweder rezykliert oder die extrazelluläre Domäne des MUC1-M Konstrukts wird mittels proteolytischem „Shedding“ in den extrazellulären Raum abgegeben (abgeschilfertes MUC1-M Konstrukt).

Eine weitere Möglichkeit besteht in der exosomaligen Abgabe des MUC1-M Konstrukts, die über die Bildung von MVB erfolgt. Dabei kann das intakte heterodimere MUC1-M Fusionsprotein über endosomale Vesikel von multivesikulären Körperchen eingeschlossen und nach Fusion der MVB mit der Plasmamembran über Exosomen abgegeben werden (exosomales MUC1-M Konstrukt).

Aus diesem Grund wurde in Westernblot-Analyse nur beim exosomaligen MUC1-M die zytoplasmatische Domäne nachgewiesen.

Die erfolgreiche Transfektion der rekombinanten membrangebundenen Fusionsproteine wurde anschließend mittels Anti-Myc-Antikörper auf die Expression der mit Myc-Sequenz ausgestatteten MUC1-Fusionsproteine überprüft.

Desweiteren konnten Immunoblot-Analysen bestätigen, dass die MUC1-M Fusionsproteine, die ihre extrazelluläre Domäne durch das proteolytische „*Shedding*“ in den Überstand abschilfern, über keine zytoplasmatische Endodomäne verfügen (Abbildung 33). Im Gegensatz zu den isolierten Fusionsproteinen wurde bei den aus Exosomen stammenden MUC1-Konstrukten die zytoplasmatische Domäne nachgewiesen (Abbildung 30), die demzufolge zusammen mit der extrazellulären Region den intakten heterodimeren Komplex der rekombinant exprimierten MUC1-Konstrukte in exosomalen Membranen darstellt (Abbildung 52).

### **6.1.1 Quantitative Bestimmung der abgeschilferten bzw. zellulären MUC1-M-Fusionsproteine**

Bei vergleichenden Westernblot-Analysen wurde, ausgehend von gleichbleibenden Zellzahlen bei der Referenz-Sonde MUC1-M, eine höhere Menge abgeschilferten Proteins im Überstand nachgewiesen als im Falle der mutierten Sonde MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N mit stark reduzierter Clathrin-vermittelter Endozytose.

MUC1-M-CQC/AQA, die mutationsbedingt nach der Re-Endozytose nicht zur Plasmamembran zurückkehren kann und infolgedessen in Endosomen akkumuliert, wies die niedrigste Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand auf.

Man kann aufgrund dieser semi-quantitativen Bestimmung der abgeschilferten Fusionsproteine feststellen, dass die Rezyklierung der MUC1-Sonden in funktionellem Zusammenhang mit den Mengen abgeschilferten Proteins im Überstand steht, da eine funktionelle Rezyklisierung Voraussetzung für die „Reifung“ der Proteinglykosylierung im Sinne einer Sialinierung von Glykanketten ist und überwiegend mature Glykoformen des Proteins von der Zelle abgeschilfert werden.

## 6.2 Charakterisierung der O-Glykanstrukturen auf membranständigen MUC1-Fusionsproteinen

Nach Isolierung der Exosomen aus dem Zellkultur-Überstand durch differenzielle Zentrifugation wurden die membranären, in den Überstand abgeschilferten His6-Myc-MUC1-Konstrukte mit Hilfe von Nickelchelate-Affinitätschromatographie isoliert und über Umkehrphasen-HPLC aufgereinigt. Anschließend wurden die im Immunblot mit Anti-MUC1 Antikörper C595 positiv getesteten Fraktionen nach Freisetzung O-gebundener Glykane und deren Permethylierung mit Hilfe der MALDI-TOF-Massenspektrometrie hinsichtlich ihrer Glykanprofile analysiert. Die Aufreinigungsprozedur der MUC1-Fusionsproteine aus Zellkulturüberstand ist schematisch in Abbildung 24 zusammengefasst.

Anhand der molekularen Massen (Na-Ionenaddukte) konnten die jeweils vorhandenen Oligosaccharide hinsichtlich ihrer Monomierzusammensetzung charakterisiert werden. Eine Identifizierung der Glykanstrukturen durch Fragmentierungsanalysen in der MS/MS konnte auf dem vorhandenen MALDI-TOF-Massenspektrometer nicht durchgeführt werden. Allerdings erlaubten spontan (Laser-induziert) auftretende Post-Source-Decay-Fragmente weitergehende Strukturaussagen bezüglich einzelner Hauptkomponenten.

Das O-Glykanprofil der abgeschilferten MUC1-M-Sonde wurde von einer hohen *core1*-Expression dominiert, während das Glykosylierungsmuster des MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N-Fusionsproteins überraschenderweise trotz stark eingeschränkter Clathrin-vermittelter Endozytose keine auffällige Veränderung im Vergleich zur Referenzsonde aufwies. Die Ergebnisse legen nahe, dass neben der Clathrin-vermittelten Endozytose weitere Internalisierungsmöglichkeiten für die Rezyklisierung des MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N gegeben sein sollten, die die aus verminderter Clathrin-Endozytose resultierende mangelnde Reinternalisierung mindestens teilweise kompensieren. Diese alternativen Endozytosewege sind in Form von Lipid-Raft-abhängigen caveolären oder Caveolin-unabhängigen aber auch Flotillin-abhängigen Transportprozessen gegeben. Die dritte Sonde MUC1-M-CQC/AQA wies dagegen ein drastisch verändertes O-Glykopprofil auf, das durch Dominanz von

*core 2*-Strukturen geprägt war. Damit glich das Glykopprofil dieser Sonde eher den sezernierten Glykoformen des MUC1.

An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass für die Bildung *core2*-basierender Strukturen ein N-Acetylglucosaminyrest durch die *core2*- $\beta$ 1-6 N-Acetylglucosaminyltransferase an die *core1* Struktur übertragen werden muß. Dieses Enzym konkurriert mit *core1*- $\alpha$ 2-3 Sialyltransferasen, welche an Galaktose der *core1*-Struktur über eine  $\alpha$ 2-3 Verbindung Neuraminsäure addieren, um das gleiche Substrat (Gal $\beta$ 1-3GalNAc).

Die Umwandlung in *core2*-Strukturen fördert die Verlängerung der Kohlenhydratkette durch Polylactosamin-Einheiten (Hanisch et al., 1989; Lloyd et al., 1996), während terminale Neuraminsäure die Kettenverlängerung stoppt. Dalziel und Kollegen (2001) konnten nachweisen, dass die *core2*-spezifische  $\beta$ 1-6 N-Acetylglucosaminyltransferase (C2- $\beta$ 6GlcNAc-T) überwiegend im *cis*-Golgi lokalisiert ist, mit geringer Expression in der medialen Zisterne und noch detektierbarer Expression im *trans*-Golgi, während die *core1*-spezifische  $\alpha$ 2-3 Sialyltransferase (ST3Gal-I) im medialen/*trans*-Golgi dominierte aber in der *cis*-Zisterne nur noch eine geringfügige Expression aufwies. Diese asymmetrische Verteilung der Glykosyltransferasen korrespondiert mit der sequentiellen Addition individueller Zuckerreste während der Reifung in den Golgi-Zisternen, die im Falle der MUC1-Fusionsproteine MUC1-M und MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N demonstriert werden konnte.

Bei der mutierten Sonde MUC1-M-CQC/AQA ist das S-Palmitoylierungsmotiv (CQC am Übergang von der Transmembrandomäne zur zytosolischen Domäne) gegen AQA ausgetauscht. Dieser Austausch beeinflusst zwar nicht die Re-Endozytose des Transmembranproteins, wohl aber seine Rezyklisierung durch das TGN bzw. Golgi-Kompartimente zur Plasmamembran, so dass diese Sonde in Endosomen akkumuliert

Obwohl in Brustkarzinomzellen die Aktivität der *core2*- $\beta$ 1- 6 N-Acetylglucosaminyltransferase stark reduziert bis fehlend ist, so dass die *core2*-Struktur nicht oder nur geringfügig gebildet werden kann (Brockhausen et al., 1995), wurde bei Expression der Sonde MUC1-M-CQC/AQA in MCF-7 bzw. MDA-MB 231-Zellen eine drastische Verschiebung von *core1* in Richtung auf *core2*-basierende Zuckerstrukturen (Durchschnitt von 55,33% bei allen drei Zellarten) beobachtet.

An dieser Stelle muss auf die Vorarbeiten (Engelmann et al. 2005, Hanisch et al., 1989) hingewiesen werden, die bereits erste Einblicke in grundlegende Einflüsse des zellulären *Trafficking* von MUC1 auf dessen Glykosylierung geliefert haben.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass das O-Glykanprofil der sezernierten Form des MUC1, welche zuerst in Muttermilch gefunden wurde, von *core2*-basierenden, linearen oder verzweigten Polylactosaminylketten dominiert wurde, die mit bis zu drei Fucoseresten substituiert sind (Hanisch et al., 1989).

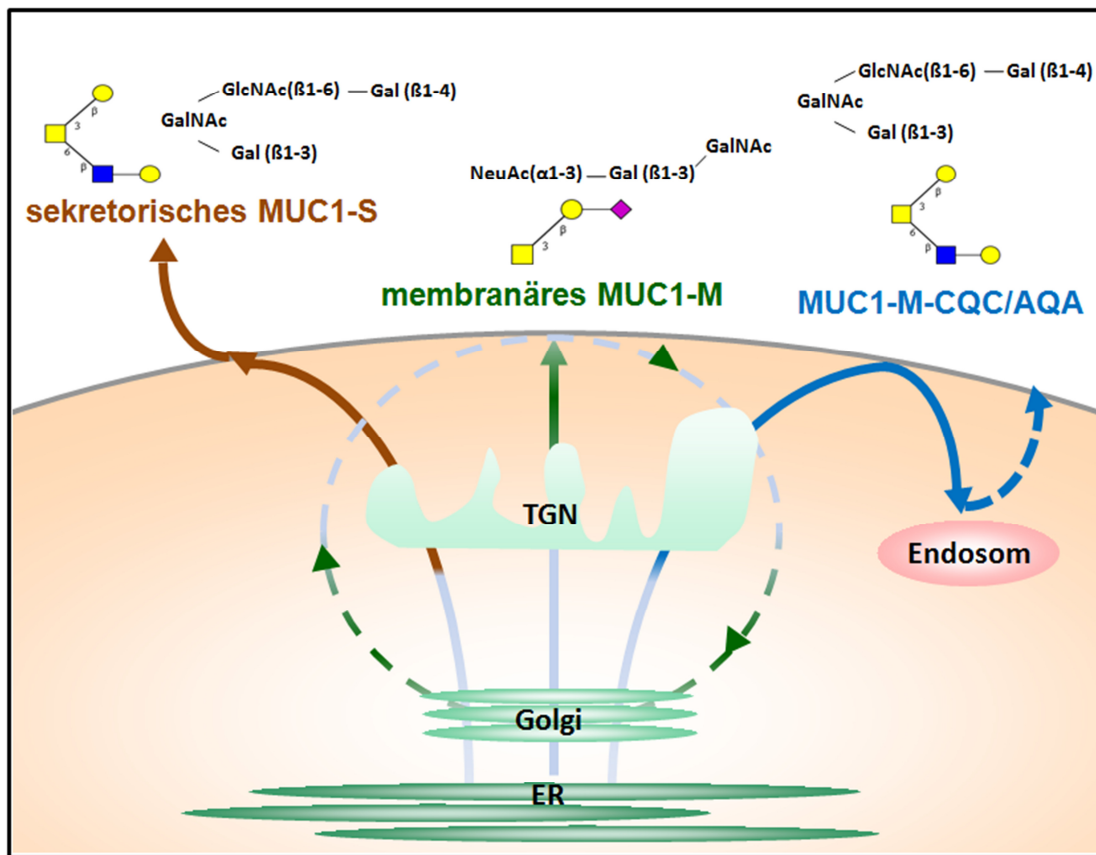


Abbildung 53: Differentielle O-Glykoproduktion des Wildtyps MUC1-M und der mutierten MUC1-M-Sonden

Das O-Glykanprofil der abgeschilferten membranären MUC1-M-Sonde (grün) wurde von einer hohen *core1*-Expression dominiert, während beim Glykosylierungsmuster der mutierten MUC1-M-CQC/AQA Sonde eine drastische Verschiebung von *core1*-Glykanen in Richtung auf *core2*-basierende Zuckerstrukturen beobachtet werden konnte (blau). Die sezernierte Isoform des Mucins MUC1-S, die überwiegend *core2* basierende O-Glykosylierung aufweist, passiert die Golgi-Kompartimente aufgrund der fehlenden transmembranären und zytosolischen Domäne nur einmal, bevor sie in den extrazellulären Raum entlassen wird (rot). Eine reduzierte oder fehlende Rezyklisierung hat anscheinend eine unvollständige, überwiegend *core2*-basierende O-Glykosylierung zur Folge.



Dieses Glykopprofil deckte sich weitgehend mit demjenigen, das auf einer sekretorischen MUC1-Sonde (MUC1-S) bei Expression in verschiedenen Epithel- bzw. Karzinomzellen gefunden wurde (Müller und Hanisch, 2002).

Die sezernierte Isoform des MUC1-Mucins (MUC1-S), der die transmembranäre und die zytosolische Domäne fehlen, passiert die Golgi-Kompartimente nur einmal, bevor sie in den extrazellulären Raum entlassen wird. Die fehlende Rezyklisierung von MUC1-S gibt Anlaß zur Annahme, dass MUC1-S ein weniger „reifes“ O-Glykosylierungsmuster aufweist als die membranären Glykoformen, die sich hauptsächlich durch *core1*-basierende Glykane auszeichnen (Müller und Hanisch, 2002; Engelmann et al., 2005).

Bekräftigt wurde diese Hypothese durch die Analyse der sezernierten Glykoform (MUC1-S), die in MCF-7 Brustkrebszellen exprimiert worden war, bei der überwiegend *core2* basierende O-Glykane (54.3%) detektiert wurden.

Obwohl sich die beiden Fusionsproteine MUC1-M-CQC/AQA und MUC1-S hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation unterscheiden und demzufolge in der Zelle verschiedene O-Glykosylierungswege beschreiten, wurde das resultierende zell-spezifische Glykosylierungsmuster der einzelnen MUC1-Konstrukte von überwiegend *core2*-basierenden O-Glykanen dominiert. Diese Vergleichsstudie gab Anlaß zur Formulierung zweier Hypothesen über den Glykosylierungsverlauf Membran-assoziiierter Proteine.

Als erste wesentliche Erkenntnis dieser Studie ergab sich, dass eine reduzierte Rezyklisierung eine unvollständige überwiegend *core2*-basierende O-Glykosylierung zur Folge hat, die sich im Falle der sezernierten Sonde (MUC1-S) und der in den Endosomen akkumulierten MUC1-M-Sonde MUC1-M-CQC/AQA eindeutig durch ein qualitativ ähnliches Glykanprofil manifestiert hat (Abbildung 53).

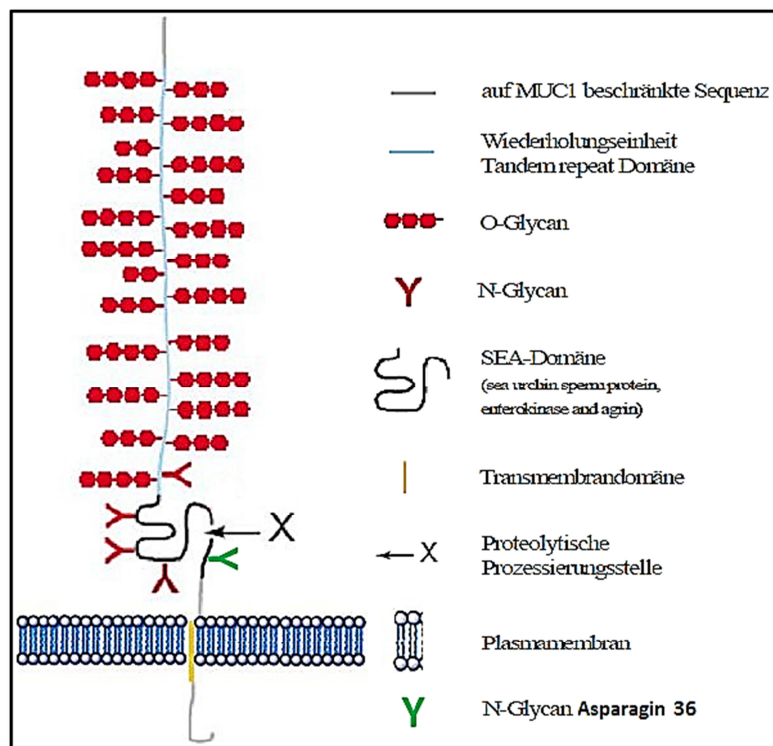
Zweitens konnte bereits im umgekehrten Fall gezeigt werden, dass abgeschilfertes (*Membrane-Shedding*) MUC1-M und MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N nahezu ausschließlich sialylierte *core1*-Strukturen ausstellten und anders glykosyliert werden als ihr sekretorisches Gegenstück MUC1-S, das den cis/trans-Golgi nur einmal passiert. Das Ausmaß dieser Sialinierung erwies sich als unabhängig vom Zelltyp.

Die Ausbeuten an exosomalen MUC1-Sonden waren nicht ausreichend, um O-Glykananalysen durchzuführen.

Die oben zitierten Befunde dokumentieren insgesamt, dass *Trafficking* und O-Glykosylierung sich wechselseitig beeinflussen und ein regulatorisches System im Zusammenhang mit der Sortierung und Zielsteuerung von MUC1 darstellen könnten.

### 6.3 Untersuchung der N-Glykosylierung innerhalb der kleinen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne von MUC1-M

Die kleinere Untereinheit des MUC1 besteht aus einer C-terminalen, zytoplasmatischen Domäne (69 Aminosäuren), dem hydrophoben intramembranären Anteil (31 Aminosäuren) und einer kurzen extrazellulären Sequenz. C-terminal schließt sich an die Region der Wiederholungseinheiten eine SEA-Domäne an. Sie beinhaltet fünf Bindungsstellen für N-Glykane und eine autokatalytische Spaltungsstelle (Abbildung 54).



**Abbildung 54:** fünf Bindungsstellen des Heterodimers MUC1 für N-Glykane. Das schematische Modell stellt MUC1 mit seiner Domänenstruktur dar. Den größten Teil macht die VNTR-Domäne (*variable number of tandem repeats domain*) aus. Die kleinere Untereinheit besteht aus einer C-terminalen, zytoplasmatischen Domäne, dem intramembranären Anteil und der kurzen extrazellulären Sequenz (Wittrock et al. 2006).

Die fünf Bindungsstellen für N-Glykane sind durch ein „Y“ gekennzeichnet.

Vier der fünf N-Glykolisierungsstellen befinden sich innerhalb der großen Untereinheit der Ektodomäne des heterodimeren Mucin-Komplexes, während eine N-Glykosylierungsstelle innerhalb der kleinen Endodomäne und in der Nähe der Transmembrandomäne von MUC1 gefunden wurde. Diese N-Glykosylierungsstelle, *Asparagin 36*, ist aufgrund der Fähigkeit zur Induktion der Galektin-3- Bindung vermutlich an den Sortierungsvorgängen von MUC1 beteiligt (s. Abbildung 54). Für *Asparagin 36* wurde eine spezifische Bindung des Galektin-3 auch in ZR-75 Zellen gezeigt (Ramasamy et al., 2007).

N-Glykane machen gegenüber den O-Glykanen zwar nur einen kleinen Anteil der Glykolysierung aus, sind aber dennoch bei der MUC1-Prozessierung und – Rezyklisierung von entscheidender Bedeutung, wie die Ergebnisse einer weiteren Studie (Parry et al., 2006) andeuten.

In dieser Untersuchung konnte für natives, aus humaner Milch isoliertes MUC1 gezeigt werden, dass sezernierte Glykoformen ein vom membranständigen MUC1 distinktes N-Glykanmuster aufweisen. Dabei wurden N-Glykane auf MUC1 der löslichen Milchphase mit solchen auf MUC1 der Milchfettmembranen verglichen. Sezerniertes MUC1 wies vornehmlich mannosereiche Glykane und kleinere Anteile sialylierter biantennarer Komplex-Typ-Glykane auf, während plasmamembranständiges Mucin ausschließlich bi- und triantennare Komplex-Typ-Glykane trug. Auch im Falle der N-Glykosylierung dieses Transmembranproteins scheint demnach die Rezyklisierung durch Golgi-Kompartimente eine weitere Prozessierung zu ermöglichen, so dass die nach einfacher Golgi-Passage verbleibenden mannosereichen Glykane sukzessive in Komplex-Typ-Glykane überführt werden können.

### 6.3.1 Untersuchung der N-Glykosylierung in MUC1-M transfizierten HEK-293 Zellen unter Einsatz von Endozytosemodulatoren

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen N-Glykosylierungsstatus und Rezyklisierung von MUC1 nachzuweisen, wurden Inhibitoren der N-Glykanprozessierung zum Einsatz gebracht.

Die Experimente wurden mit MUC1-M transfizierten, lysierten und Endo-MUC1 negativen HEK-293 Zellen und den aus ihrem Zellkultur-Überstand isolierten Exosomen durchgeführt, die im Gegensatz zu abgeschilferten MUC1-M Sonden über eine zytoplasmatische Domäne verfügen, deren Asn36 N-glykosyliert ist (Abbildung 51).

Mit Hilfe von PNGase F bzw. Endoglykosidase H wurden zelluläre bzw. exosomale MUC1-M-Sonden de-N-glykosyliert, wobei Endo H die Glykane zwischen den beiden inneren GlcNAc-Resten (Chitobiose-Core) von ausschließlich mannosereichen N-Glykanen schneidet. Dagegen spaltet PNGase F zwischen dem inneren N-Acetylglucosamin und dem Asparagin-Rest fast aller Typen von asparagingebundenen N-Glykanen (*Komplex-Typ*, *Mannosereicher-Typ* und *Hybrid-Typ*), vorausgesetzt, dass sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe in peptidischer Bindung vorliegen.

Die Proteine, die sensitiv für einen Endo H- oder einen PNGase F-Verdau sind, weisen anschließend auf einem SDS-Gel eine erhöhte elektrophoretische Mobilität auf. Ein Westernblot der elektrophoretisch getrennten Verdauprodukte unter Verwendung des Endodomänen-spezifischen Antikörpers H-295 zeigte, dass die unbehandelte kleinere Untereinheit des zellulären MUC1-M-Fusionproteins aus einem Bandenmuster von insgesamt drei Isoformen besteht, einer Bande bei 37 kDa und einer Doppelbande bei 31 kDa, während die zytoplasmatische Domäne der exosomalen MUC1-M Sonde eine einzige Bande von 31 kDa aufwies, die mit keiner der heterogenen zellulären Spezies des Komplex-Typs isographisch war.

Die Behandlung vom zellulären und exosomalen MUC1-M-Glykoformen mit PNGase F sollte zunächst den Beweis erbringen, dass die exosomalen und zellulären MUC1-M Sonden N-glykosyliert vorliegen. Wie bereits erwartet, konnte nach dem Verdau mit PNGase F nur noch eine Isoform bei 27 kDa beobachtet werden, die dem nicht-

glykosylierten Produkt entsprechen sollte und auf eine vollständige de-N-Glykosylierung der exosomalen und zellulären MUC1-Sonden hinweist.

Die Behandlung mit EndoH zeigte für plasmamembranäre Glykoformen keine Änderungen im Laufverhalten, die daher vom Komplex-Typ sein sollten, jedoch ließ sich im Falle der exosomalen Glykoformen eine vollständige de-N-Glykosylierung und ein Massenshift von 31 kDa auf 27 kDa erzielen, was auf das ausschließliche Vorliegen von Glykanen des Mannosereichen-Typs hinweist.

Als weitere unabhängige Methode zum Nachweis des Zusammenhangs zwischen exosomaler Sortierung des MUC1 und seiner N-Glykosylierung wurden die MUC1-M transfizierten HEK-293 Zellen mit Deoxynojirimycin (DNJ) vorbehandelt und anschließend auf ihrer Oberfläche biotinyliert. Dabei inhibiert Deoxynojirimycin kompetitiv die Glukosidasen I und II im ER und interferiert mit der Prozessierung von N-Glykanen vom Mannosereichen-Typ zum Komplex-Typ, so daß nach Behandlung mit DNJ nur Endo H-sensitive, d.h. mannosereiche Oligosaccharide am Protein zurückbleiben. Anschließend konnte die zytoplasmatische Domäne des plasmamembranären MUC1-M im Westernblot detektiert werden, deren apparente Molekülmasse mit 31 kDa bestimmt wurde und damit dem erwarteten Mannosereichen-Typ entsprach.

Die unter Einsatz der Endozytose-Inhibitoren erzielten Ergebnisse belegen, dass die Glykoform des MUC1, die plasmamembranär exprimiert wird, sich durch Blockierung der N-Glykanprozessierung in die exosomale Glykoform vom Mannosereichen Typ überführen lässt.

### **6.3.2 Die Rolle der N-Glykosylierung bei Qualitätskontrolle und Sortierung von apikalen Membranproteinen**

Es liegen bereits experimentelle Erkenntnisse für eine Beteiligung von N-Glykanen an der Sortierung und dem *Trafficking* zur apikalen Plasmamembran für das Prion Protein (PrP) vor, das u.a. für die folgenschwere Traberkrankheit (Scrapie) der Schafe und Rinder verantwortlich ist (Kiachopoulos et al.2005). Das Prion-Protein ist ein glykosyliertes Zelloberflächenprotein, dessen N-terminale Asparagine Asn180 und Asn196 während des cotranslationalen Imports in das ER N-glykosyliert werden.

Anschließend wandert PrP vom ER über die Golgikompartimente, wo die komplexe Glykosylierung der beiden Glykosylierungsorte erfolgt. PrP wird anschließend an die Zellmembran transportiert. Da die Missfaltung und Konformationsänderung von PrP eine zentrale Rolle bei der Infektion spielt, wurde in einer vergleichenden Analyse mit monoglykosylierten Mutanten geklärt, ob eine fehlende Glykosylierungsstelle u. a. einen Einfluss auf den Proteintransport des PrP an die Zelloberfläche besitzt.

Die umfangreichen Analysen der Mutanten ergaben, dass verschiedene PrP-Mutanten, die lediglich in einer Mannosereichen-Glykoform vorliegen, nicht im ER zurückgehalten, sondern sezerniert werden, während komplex glykosylierte Mutanten an der Plasmamembran lokalisiert bleiben.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit fokussieren sich auch u.a. auf die Untersuchung des apikalen Transportweges. Im Allgemeinen sind co- und posttranslationale Mechanismen häufig an der Regulation von zellulären Verteilungsvorgängen von Membranproteinen beteiligt.

Als häufig auftretende Proteinmodifikation spielen die N- und O-Glykosylierung nicht nur eine wichtige Rolle bei der Qualitätskontrolle von Glykoproteinen im ER aber auch beim zellulären *Targeting* und Sortierung von vielen apikalen Membranproteinen.

Der korrekte Transport des apikal sortierten Membranproteins DPP IV beispielsweise ist sowohl von der N- als auch der O-Glykosylierung abhängig (Naim et al. 1999; Slimane et al. 2000; Huet et al. 2003).

Der erste Beweis, dass posttranslationale Modifikationen in Form von N-Glykanen einen direkten Einfluss auf den apikalen Transport haben, konnte die Arbeitsgruppe von Kai Simons zeigen. Sie verwendeten das nicht glykosylierte Ratten Wachstumshormons (rGH) und fügten eine N-Glykosylierungsstelle ein. Die N-glykosylierte Mutante wurde nur über die apikale Membran sezerniert (Scheiffele et al., 1995) und nicht, wie der Wildtyp (WT), apikal und basolateral.

Weitere wichtige Hinweise, inwiefern die N-Glykosylierung einen entscheidenden Faktor darstellt, der die Lokalisation der membranären Proteine reguliert und einen Einfluss auf den apikalen Transport von Proteinen haben könnte, kamen aus Arbeiten mit Tunicamycin behandelten MDCK-Zellen, deren N-Glykosylierung blockiert war. In diesen Zellen kommt es zu einer Fehlsortierung des physiologisch

apikal sezernierten Glykoproteins-80 (gp80) an beide Plasmamembrandomänen (Delacour und Jacob, 2006). Allerdings konnte auch demonstriert werden, dass verschiedene Proteine N-Glykane zur apikalen Exozytose (z.B. der Glycin-Transporter-2) benötigen und andere (z.B. p75NTR) wiederum nicht (Delacour und Jacob, 2006).

Weitere Untersuchungen konnten ebenfalls zeigen, dass das Mucin-ähnliche Protein Endolyn (CD164) in Abhängigkeit von einer fehlerfreien N-Glykosylierung sowohl zur apikalen Membran als auch zu den Lysosomen transportiert wird (Ihrke et al. 2001) und dabei vermutlich der Zelladhäsion und der Zelldifferenzierung dient (Zannettino et al. 1998; Lee et al. 2001).

Die unterschiedlichen N-Glykosylierungsstufen der exosomalen und zellulären MUC1-M Proben weisen ebenfalls auf Sortierungsfunktionen der beiden Glykoformen hin, die im Falle des exosomalen MUC1-M mit einer N-Glykosylierung vom Mannosereichen-Typ zum Eintritt in den sekretorischen Transportweg und anschließend zu einer effizienten Sekretion in den Zellkulturüberstand führt, während die Präsenz komplexer N-gebundener Zuckerreste des zellulären MUC1-M hauptsächlich die Lokalisierung des MUC1-M an der Zelloberfläche verursacht.

Aus der vergleichenden Analyse des PrP und den mit MUC1-M erzielten Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass der N-Glykosylierungsstatus ein Signal für die Zielsteuerung apikaler plasmamembranständiger Proteine darstellt und den Transportmechanismus bestimmter Proteine durch die veränderte N-Glykosylierung beeinflussen kann.

## **6.4 Untersuchungen zur MUC1-Endozytose und der Fähigkeit zur Plasmamembran-Rezyklisierung mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie**

Durch Endozytose internalisiertes MUC1 kann bis zur vollständigen (reifen) Glykosylierung mehrfach rezyklisiert werden. Darüber hinaus ist ein Rücktransport



von der Plasmamembran zu bestimmten Kompartimenten, wie dem Golgi-Apparat oder dem Endoplasmatischen Retikulum, möglich.

Zur Aufklärung der Internalisierungswege der fluoreszenzmarkierten MUC1-Sonden wurden Kollokalisationsstudien durchgeführt, durch die über die beteiligten „*Scaffolding*-Proteine“ (Caveolin-1, Flotillin-2 oder Galektin-3) die vesikulären Transportrouten der Sonden zwischen den zellulären Kompartimenten charakterisiert werden konnten.

Um die zelluläre Topologie der MUC1-M-Konstrukte mittels konfokaler Laser-Mikroskopie zu untersuchen, wurden die Zellen mit monoklonalem Maus-Anti-MUC1 C595, polyklonalem Kaninchen-Anti-MUC1 und MUC1-Antikörper Ma695 gefärbt.

Abgesehen von einer erwarteten membranständigen MUC1-Färbung und deren Vorkommen an den Zell-Zell-Grenzkontaktflächen, wiesen die MUC1-Fusionsproteine eine typische punktförmige oder eher diffuse Färbung im Zellinneren auf.

Wie erwartet, wurde im Falle der mutierten Sonde MUC1-M-CQC/AQA aufgrund der Akkumulation in Endosomen eine deutlich stärkere intrazelluläre Anreicherung von MUC1 im Vergleich zu den mit MUC1-M oder MUC1-M-Y<sub>20/60</sub>/N transfizierten Zellen beobachtet.

Der MUC1-Antikörper Ma695, der nur an reife und stark sialylierte Glykoformen des MUC1 bindet, brachte zusätzlich den Beweis, dass nicht nur unprozessierte und wenig sialylierte, sondern auch reife Isoformen des MUC1 an die Plasmamembran transportiert bzw. rezykliert werden.

Das Verteilungsmuster der mit Ma695 gefärbten Zellen ähnelte der MUC1-Lokalisierung in C595-gefärbten Zellen, wobei die detektierten MUC1-Fusionsproteine zum Teil als größere vesikuläre Ansammlungen im zytosolischen Raum zu erkennen waren.

Diese vesikulären Strukturen wiederum verweisen auf die Reinternalisierung der MUC1-M Fusionsproteine, die möglicherweise mit alternativen Endozytosewegen in Beziehung steht.

#### ***6.4.1 Endozytose und Rezyklisierung der MUC1-Sonden über alternative Transportwege in Kolokalisationsstudien unter Berücksichtigung der bereits publizierten experimentellen Daten***

Die Entscheidung zwischen Rezyklisierung oder Abbau eines Membranproteins nach Rezyklisierung in die Zelle scheint in Verbindung mit der jeweiligen Glykanstruktur zu stehen (Altschuler et al. 2000). Die Aufklärung der intrazellulären Transportroute und Rezyklisierung des MUC1 erfolgte in Kolokalisationsstudien über Antikörperfärbungen des MUC1 und verschiedener vesikulärer Endozytose-Marker wie Clathrin, Caveolin-1, Flotillin-2 und Galektin-3.

Die Expression von Flotillin-2 konnte in allen drei Zelllinien und Caveolin-1 nur in MDA-MB-231 nachgewiesen werden (Abbildung 27). Es konnte bereits früher gezeigt werden, dass die Reinternalisierung des membranären MUC1 über Clathrin-vermittelte Endozytose stattfindet und dabei Dynamin-abhängig ist (Hughey et. al 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das Vorliegen Clathrin-vermittelter MUC1-Endozytose ebenfalls bestätigt werden. Allerdings war die Kolokalisation von MUC1 und Clathrin nur partiell zu beobachten und das Auftreten MUC1-positiver aber Clathrin-negativer vesikulärer Färbungen deutete alternative Transportwege an.

Für den Nachweis wurden entsprechende Kolokalisationsexperimente durchgeführt und dabei neben dem C595-Antikörper, der unabhängig vom Glykosylierungsgrad an MUC1 bindet, auch der Antikörper Ma695 eingesetzt, der nur das reife und vollständig sialylierte MUC1 erkennt. Zusätzlich wurden die biochemischen Marker Anti-Caveolin-1 für die Caveolae-abhängig-vermittelte Endozytose und Anti-Flotillin-2 und Galektin-3 für die Darstellung des Caveolae-unabhängigen Transportweges verwendet.

Auch bei diesen Experimenten deutete die Kolokalisierung in der Doppelimmunfluoreszenzmikroskopie darauf hin, dass die Markerproteine, namentlich Caveolin-1, Flotillin-2 und Galektin-3 über ausgedehnte Areale verteilt in überwiegend punktförmigen wahrscheinlich vesikulären Einschlüssen mit MUC1-M Fusionsproteinen kolokalisierten.

Die erzielten Ergebnisse aus Kollokalisationsstudien von MUC1 mit Galektin-3 findet ebenfalls Bestätigung in einer weiteren Studie (Merlin et al. 2011), in der wiederum die Koexpression von Galektin-3 und MUC1 nachgewiesen und ein Zusammenhang zwischen Galektin-3 und der Endozytose von MUC1 demonstriert werden konnte.

Da nicht alle Zellen, die im Rahmen der dieser Studie untersucht wurden, Caveolin-positiv waren, kann über die Rolle der Caveolae-vermittelten Endozytose im Kontext der Endozytose und Rezyklisierung wenig gesagt werden.

Caveolin-1 kann mit mehreren Molekülen über eine Oligomerisationsdomäne im N-terminalen Bereich der Caveoline interagieren, was in der Zellmembran zur Ausbildung von homo- bzw. hetero-oligomeren Komplexen führt (Sargiacomo et al., 1995; Volonté et al., 2008). Ein Teil dieses Bereichs wird als *Scaffolding*-Domäne bezeichnet (Li et al., 1996), über die einerseits EGFR (Couet et al., 1997a, b) direkt mit Caveolinen interagieren.

Andererseits kann EGFR wiederum als wichtiger Bindungspartner mit MUC1 Komplexe bilden und so dem Abbau des Rezeptors durch Ubiquitinierung (Schroeder, Thompson et al. 2001) und Erhöhung des TGF- $\alpha$  induzierten Signals über den MAP/ERK- Signalweg (Pochampalli, el Bejjani et al. 2007) entgegenwirken. Die direkte Interaktion zwischen MUC1 und EGFR führt wiederum zur verstärkten Clathrin- und Dynamin-vermittelten Endozytose von MUC1 (Liu X et al. 2008), wobei eine Caveolae-abhängig-vermittelte Endozytose aufgrund der direkten Wechselwirkung zwischen EGFR und der *Scaffolding*-Domäne des Caveolins ebenfalls in Betracht gezogen werden könnte.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten konfokalen Ergebnisse finden z. T. Bestätigung in der Literatur. Wie es bereits zuvor für MUC1-M transfizierte MCF-7 Zellen gezeigt werden konnte (Staubach et al., 2009), wurde für alle drei verwendeten Zelllinien eine Kollokalisierung des MUC1 mit Flotillin-positiven Vesikeln demonstriert.

Flotillin-abhängige Transportwege sind ebenfalls Raft-assoziiert, jedoch von der Anwesenheit des Caveolin-1 als *Scaffolding*-Protein unabhängig. Sie sind zudem unabhängig von Dynamin.

Die Interaktionspartner von MUC1, die erst die funktionelle Relevanz der Glykanstruktur des MUC1 durch die vielen in der evolutionär hoch konservierten

zytoplasmatischen Domäne lokalisierter Bindungsmotive verdeutlichen, sind beim intrazellulären Transport von MUC1 sicherlich von zentraler Bedeutung.

Allerdings stellen die Multi-Proteinkomplexe, wie die zur RAS-GTPasen-Superfamilie gehörenden Rab-GTPasen, die den vesikulären und endosomalen Transport regulieren, einen zumindest genauso wichtigen Faktor bei der Rezyklisierung von MUC1 dar.

In einer Studie (Liu X et. al 2008) wurden lebende Zellen in Echtzeit verwendet, um intrazelluläre Vorgänge des MUC1 und die Wechselwirkung zwischen EGFR und MUC1 näher zu studieren. Dabei konnte mittels FRET-Analyse beobachtet werden, dass die Interaktion von EGFR mit MUC1 zur verstärkten Endozytose von MUC1 führte. Interessanterweise führte eine Überexpression von Rab5 zu einer verminderten Membranlokalisation von MUC1 und zu einer Akkumulation vom vesikulären MUC1 im Zellinneren, während sich eine negativ dominante Rab5-Mutation in einer Anhäufung von MUC1 auf der Zelloberfläche visualisieren ließ.

Als Erklärung für die Erhöhung der MUC1-Menge auf der Zelloberfläche kommen neben verminderter Endozytose auch vermehrtem Transport des MUC1 zurück auf die Oberfläche in Betracht.

#### **6.4.2 Verwendung spezifischer Endozytoseinhibitoren zur Klärung der Re-Internalisierungswege von MUC1-Sonden**

Die oben zitierten Ergebnisse gaben Hinweise, dass neben der klassischen Clathrin-vermittelten Endozytose weitere alternative Routen für die MUC1-Internalisierung existieren können.

Die Rekonstitution vesikulären Transportes *in vivo* bietet den Vorteil einer Untersuchung bestimmter, streng definierter Transportschritte unter leicht reproduzierbaren äußeren Parametern.

Neben der Untersuchung eines bestimmten Transportweges unter Ausschaltung anderer Transportwege lassen Experimente in der Zellkultur zudem den Einsatz von spezifischen inhibierenden Substanzen zu, die diese Vorgänge spezifisch manipulieren können.

Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass höhere Konzentrationen von Endozytoseinhibitoren aufgrund toxischer Effekte den Anteil toter Zellen während des Beobachtungszeitraumes sprunghaft ansteigen lassen. Dadurch kann eine verminderte MUC1-M Endozytose vorgetäuscht werden, die nicht auf eine Aufnahmehemmung, sondern auf zelltoxische Effekte zurückzuführen ist.

Aus diesem Grund wurden für jeden Inhibitor Konzentrationen bzw. Inkubationszeiten ausgewählt, die nach den Angaben der Literatur eine nur geringe und vernachlässigbare Zelltoxizität ergeben sollten (s. Tabelle 4).

Unabhängig davon wurde durch mikroskopische Betrachtung die Zellmorphologie kontrolliert, ob die Zellen noch vital waren.

#### **6.4.2.1 Einfluss hemmender Effekte der spezifischen Endozytoseinhibitoren auf MUC1-Internalisierung**

Um die Existenz alternativer Transportwege im Kontext der MUC1-Endozytose zu demonstrieren, wurden spezifische Endozytoseinhibitoren eingesetzt, die entweder die Clathrin-vermittelte Endozytose (hyperosmolare Sucrose-Konzentration), die Bildung von Caveolaen (PP2) oder die Raft-assoziierten Transportwege blockierten (Cholesterinentzug durch Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin).

Bis auf M $\beta$ CD war keiner der genannten Inhibitoren in der Lage, einen kompletten Rückgang der MUC1-Internalisierung über vesikulären Transport zu bewirken. Der kombinierte Einsatz von hyperosmolarer Sucrose und PP2 konnte die MUC1-Endozytose zwar nochmals absenken, doch verblieb noch eine Rest-Endozytose. Erst die Verwendung von M $\beta$ CD, das alle Transportwege durch Cholesterin-Depletion blockiert, bewirkte eine vollständige Inhibition der MUC1-Internalisierung in punktförmigen, vesikulären Einschlüssen.

Diese Inhibierungsexperimente lassen einen direkten Zusammenhang zwischen MUC1-M Endozytose und den Caveolae- bzw. *Lipid Raft*-abhängigen, intrazellulären Transportmechanismen vermuten, die neben der bereits bekannten Clathrin-vermittelten Endozytose eine entscheidende Rolle der Rezyklisierung zur

Plasmamembran aber auch beim Reifungsprozess der MUC1-Glykoformen spielen könnten.

Diese eher qualitativen Daten zur MUC1-Endozytose sollten durch ein unabhängiges Verfahren (Westerblotanalyse nach Zelloberflächenmarkierung des MUC1 mit spaltbarem Biotin) ergänzt werden, das zudem semi-quantitative Daten liefert.

### 6.4.3 MUC1-Endozytose in semi-quantitativer Westernblotanalyse

Das Verfahren beruht auf einer reversiblen Biotinylierung von Oberflächenproteinen einer Zelle. Endozytiertes Protein und nicht-endozytiertes Protein, das auf der Zelloberfläche verbleibt, können dadurch unterschieden werden, dass ein Reduktionsmittel zum Einsatz kommt, das die Zellmembran nicht passieren kann und damit nur die Markierung vom nicht-endozytierten Protein entfernen kann.

In diesem direkten Rezyklisierungstest sollte gezeigt werden, dass plasmamembranständiges MUC1-M nach Exposition auf der Zelloberfläche wieder durch Endozytose reinternalisiert wird. Das Verfahren lieferte semi-quantitative Daten, insofern als die mit Anti-MUC1 gefärbten Proteinbanden in ihrer Intensität mit der von nicht-variierten „House-Keeping“-Proteinen verglichen werden konnten.

Wie erwartet, verursachten die Inhibitoren hyperosmolare Sucrose und PP2 im Vergleich zur unbehandelten Zellprobe eine Abnahme der Internalisierung der MUC1-M-Sonde im Westernblot.

Interessanterweise wurde aber dabei beobachtet, dass das für Glykoproteine charakteristische über weite Mr-Bereiche verteilte Färbemuster (*smear*) durch zwei scharfe Banden im Immunoblot ersetzt wurde, die allerdings isografisch mit dem MUC1-M Fusionsprotein auftraten.

Der Inhibitor Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin, der alle cholestrinabhängigen Endozytosewege blockiert, führte in den MUC1-M exprimierenden MCF-7 Zellen zu einer starken Reduktion der Re-Internalisierung, so dass kein Westernblot-Signal detektierbar war. Die Entfernung von Cholesterin durch Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin ist im Vergleich zu den Wirkungen von Sucrose und PP2 effektiver, jedoch wird dadurch die Spezifität der Wirkung von Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin beeinträchtigt (Simons & Toomre, 2000), da nicht

nur der Caveolin-abhängige Weg, sondern auch die bereits beschriebenen Clathrin- und *Lipid Raft*-abhängige Endozytose von MUC1 (Liu X et. al 2008) inhibiert werden. Eine ähnlich starke Abnahme der MUC1-M-Internalisierung ergab sich bei Doppelinhibition der MCF-7 Zellprobe mit hyperosmolarer Sucrose und PP2, die wahrscheinlich auf beidseitige Inhibition von Clathrin- und Caveolae-vermittelter Endozytose zurückzuführen war, wobei es aufgrund des beobachteten Restsignals im Westernblot zu keinem kompletten Rückgang der Endozytose kam.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben der Clathrin- bzw. Caveolin-abhängigen Internalisierung zusätzliche Endozytosewege wie Lipid-Raft-unabhängige oder Galektin-3-abhängige Internalisierung existieren, die nicht durch gleichzeitigen Einsatz von Sucrose und PP2 inhibiert werden und so den Internalisierungsprozess durch Bindung an die zu sortierenden Glykoproteine (Schneider et. al 2010) aufrecht erhalten können.

## **6.5 Wiedereintritt rezyklisierender MUC1-M-Sonde innerhalb des sekretorischen Transportweges**

Für membranständige Glykoproteine sind unterschiedliche Parameter von enormer Wichtigkeit, deren konkrete Einflüsse auf die Synthese der O-Glykane im Einzelnen noch nicht bekannt sind. Dazu gehören mögliche Interaktionen mit ebenfalls membranintegrierten Chaperonen im Golgi und die für einige plasmamembranäre Glykoproteine beschriebene Rezyklisierung durch das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Auch für das MUC1 wurden schon sehr früh Rezyklisierung und damit zusammenhängende weitere Resialinierung beschrieben (Litvinov et al. 1993) und doch ist noch immer unklar, ob diese Rezyklisierung nur über das TGN oder auch über frühere Kompartimente des sekretorischen Transportweges (cis/trans-Golgi) erfolgt, wie es bereits für die Dipeptidyl-Peptidase IV (Naim et a. 1999) beschrieben wurde.

Um nun der Frage nachzugehen, ob O-glykosylierte MUC1-Glykoformen nach Plasmamembran-Exposition endozytiert werden und im ER nachweisbar sind, wurde



eine fluoreszenzmikroskopische Kollokalisationsstudie mit MUC1-M transfizierten HEK-293, MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen nach Behandlung mit dem Anti-MUC1 Antikörper Ma695, der nur reife und sialinierte Glykoformen des MUC1 erkennt, und Anti-Protein-Disulfid-Isomerase (PDI-Antikörper) durchgeführt.

Die Ergebnisse legen nahe, dass nach Plasmamembran-Exposition sialinierter Glykoformen des MUC1 diese endozytiert und über das ER rezyklisieren. Damit würde der gesamte sekretorische Transportweg erneut durchlaufen und die Möglichkeit weitergehender Glykanprozessierung geboten. Während für N-Glykane die Orte und Enzymsysteme bekannt sind, die das *Trimming* der mannosereichen Glykane und nachfolgende Synthese komplexer N-Glykane katalysieren, ist über eine Prozessierung von O-Glykanen, wie sie die Ergebnisse der vorliegenden Studie nahelegen, nicht bekannt. Unerwartet ist dabei auch, dass zunächst komplexere Strukturen vom *Core*-Typ 2 aufgebaut werden, um in der Folge nach *Trimming* der Lactosamin-Einheit und Sialinierung als einfachere Core 1-Glykane auf der Zelloberfläche ausgestellt zu werden (Litvinov et al., 1993). Weitere experimentelle Arbeiten, u.a. durch Einsatz von N-Acetylglucosaminidase-Inhibitoren, könnten Aufschluss darüber geben, ob es tatsächlich zu einer Prozessierung von O-Glykanen im Zuge der Rezyklisierung des MUC1 kommt. Alternative Erklärungen für das Auftreten differentieller O-Glykosylierung von membranständigen und sezernierten Glykoformen des MUC1 könnten allerdings auch in unabhängigen sekretorischen Transportwegen und entsprechend unterschiedlichen Enzymausstattungen der betreffenden Golgi-Kompartimente gefunden werden.

## 6.6 Transportwege des MUC1

Im Rahmen dieser Arbeit machten die Ergebnisse aus kofokalen Kollokalisationsstudien deutlich, dass für die Internalisierung von MUC1-M Konstrukten neben der klassischen Clathrin-vermittelten Endozytose weitere alternative Routen u.a. mittels caveolärer Strukturen in Frage kamen.

Dabei stellt sich allerdings die Frage, ob das endogene, im Vergleich zu den rekombinanten Sonden deutlich größere MUC1, das durch den hohen Anteil an

helixbrechendem Prolin, der Vielzahl komplexer Kohlenhydratseitenketten und der durch Deprotonierung geladen vorliegenden Sialinsäuren eine entsprechend gestreckte, vergleichsweise „steife“ Konformation mit einer Länge von ca. 200-500 nm einnimmt, in den vergleichsweise kleinen Nanovesikeln transportiert werden kann.

Clathrin-Vesikel weisen einen Durchmesser von ca. 100 nm auf, während Caveolae als sehr kleine Ausbuchtungen der Plasmamembran sogar nur eine Größe von 50-80 nm besitzen.

Versuche mit B16-F10 Zellen konnten aber zeigen, dass Partikel, die größer als 300 nm sind, über diesen caveolären Transportmechanismus internalisiert werden können (Rejman et al., 2005).

Es gibt auch publizierte Daten für Lipokomplexe, die zwischen 180 und 480 nm groß sind und von verschiedenen Zelltypen ausschließlich über Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen wurden (Bragonzi et al. 1999, Rejman et al. 2005).

## 6.7 Ausblick auf Rezyklisierungsstudien durch Radio-Pulsmarkierung und Immunpräzipitation

Will man den Weg eines Proteins durch die Zelle, seine Rezyklisierung in der Zelle oder die damit einhergehende Prozessierung zeitlich aufgelöst analysieren, kann dies durch Radiopuls-Doppelmarkierung mittels  $^{32}\text{S}$ -Met/ $^3\text{H}$ -GlcNAc geschehen.

Diese Doppelmarkierungsexperimente mit Hilfe von  $^{32}\text{S}$ -Met/Cys und  $^3\text{H}$ -GlcNAc können zur Bestimmung der Halbwertszeiten des MUC1-Proteins und GlcNAc-haltiger Core 2-Glykane beitragen.

Dabei erfahren die mit MUC1-M Sonden transfizierten Zellen kurzfristig die radioaktive Markierung mit  $^{32}\text{S}$ -Met/Cys und  $^3\text{H}$ -GlcNAc (*pulse*), um anschließend längerfristig mit den „kalten“ Aminosäuren inkubiert zu werden (*chase*).

Im Allgemeinen durchläuft in solchen „*Pulse-Chase*“-Experimenten ein in der „*Pulse-Zeit*“ synthetisiertes MUC1 während der nachfolgenden „*Chase-Zeit*“ die verschiedenen Kompartimente vom rauen ER bis zu Sekretvesikeln.

Um nun die Rezyklisierung und Prozessierung von MUC1 zu untersuchen, können anschließend die oberflächlich zugänglichen Proteine mit einem spaltbaren, wasserlöslichen Biotinylierungsreagenz markiert und zu unterschiedlichen Halbwertzeiten Proben entnommen werden, die entweder durch Zellfraktionierung und Radioaktivitätsmessung oder mittels Autoradiographie näher untersucht werden können.

Die Halbwertzeiten des GlcNAc-Labels gegenüber dem Protein-Label zeigen an, ob es während der Rezyklisierung zu einer Prozessierung der *Core 2*-Strukturen zu *Core 1*-Strkturen ohne GlcNAc kommt.

## Literaturverzeichnis

Abdullah KM, Udoh EA, Shewen PE, Mellors A. (1992):

**A neutral glycoprotease of *Pasteurella haemolytica* A1 specifically cleaves O-sialoglycoproteins.**

*Infect Immun.*, 60(1):56-62.

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

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

*Cancer Res.* 58: 4079-4081.

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

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

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

Alberts D. (1998):

**Lehrbuch der molekularen Zellbiologie**

*Wiley-VCH-Verlag*

Alfalah M, Jacob R, Preuss U, Zimmer KP, Naim H, Naim HY. (1999):

**O-linked glycans mediate apical sorting of human intestinal sucrase-isomaltase through association with lipid rafts.**

*Curr Biol.*, 9(11):593-6.

Alfalah M, Jacob R, Naim HY. (2002):

**Intestinal dipeptidyl peptidase IV is efficiently sorted to the apical membrane through the concerted action of N- and O-glycans as well as association with lipid microdomains.**

*J Biol Chem.*, 277(12):10683-90.

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

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

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

Anderson HA, Chen Y, Norkin LC. (1998):

**MHC class I molecules are enriched in caveolae but do not enter with simian virus 40.**

*J Gen Virol.*, 79 ( Pt 6):1469-77.

Anumula KR, Taylor PB. (1992):

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

*Anal Biochem.*, 203(1):101-8.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*Histopathology* 40: 440-449.

Barondes SH, Cerra RF, Cooper DN, Haywood-Reid PL, Roberson MM. (1984):

**Localization of soluble endogenous lectins and their ligands at specific extracellular sites.**

*Biol Cell.*, 51(2):165-72.

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

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

*Cancer Res.* 59: 1552-1561.

Barylko, B., Binns, D.; Lin, K.-M., Atkinson, M. A. L.; Jameson, D. M.; Yin, H. L.; Albanesi, J. P. (1998):

**Synergistic activation of dynamin GTPase by Grb2 and phosphoinositides.**

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

Benn R., H. Günther (1983):

**Angew. Chem.**, 95, 381-411.

Bickel PE, Scherer PE, Schnitzer JE, Oh P, Lisanti MP, Lodish HF (1997):

**Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins.**

*J Biol Chem.*, 272(21):13793-802.

Bennett EP, Hassan H, Clausen H. (1996):

**cDNA cloning and expression of a novel human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine. Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase, GalNAc-t3.**

*J Biol Chem.*, 271(29):17006-12.

Bennett EP, Hassan H, Mandel U, Mirgorodskaya E, Roepstorff P, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Hollingsworth MA, Merx G, van Kessel AG, Eiberg H, Steffensen R, Clausen H. (1998):

**Cloning of a human UDP-N-acetyl-alpha-D-Galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase that complements other GalNAc-transferases in complete O-glycosylation of the MUC1 tandem repeat.**

*J Biol Chem.*, 273(46):30472-81.

Bennett EP, Weghuis DO, Merkx G, van Kessel AG, Eiberg H, Clausen H. (1998):  
**Genomic organization and chromosomal localization of three members of the UDP-N-acetylgalactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family.**  
*Glycobiology.*, 8(6):547-55.

Bhavanandan V. P., E. Buddecke, P. Carubelli, A. Gottschalk, Biochem. Biophys.  
**The complete enzymic degradation of glycopeptides containing O-seryl and O-threonyl linked carbohydrate.**  
*Res. Commun.* 1964, 16, 353-357.

Bhavanandan, B.H.; Zhu, Q.; Yamakami, K.; Dilulio, N.A.; Nair, S.; Capon, C.; Lemoine, J.; Fournet, B (1998):  
**Purification and characterisation of the MUC1 mucin-type glycoprotein, epitectin, from human urine: structures of the major oligosaccharide alditols.**  
*Glycoconj. J.* 15: 37-49.

Bhavanandan VP, Ringler NJ, Gowda DC (1998):  
**Identification of the glycosidically bound sialic acid in mucin glycoproteins that reacts as "free sialic acid" in the Warren assay.**  
*Glycobiology.* 8(11):1077-86.

Bobek, L.A.; Tsai, H.; Biesbrock, A.R.; Levine, M.J. (1993):  
**Molecular cloning, sequence, and specificity of expression of the gene encoding the low molecular weight human salivary mucin.**  
*J. Biol. Chem.* 268: 20563-20569.

Bramwell, M.E.; Bhananandan, V.P.; Wiseman, G.; Harris, H. (1983):  
**Structure and function of the CA antigen.**  
*Br. J. Cancer* 48: 177-83.

Bragonzi A, Boletta A, Biffi A, Muggia A, Sersale G, Cheng SH, Bordignon C, Assael BM, Conese M. (1999):  
**Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs.**  
*Gene Ther.*, 6(12):1995-2004.

Breg, J.; van Halbeek, H.; Vliegenthart, J.F.G.; Klein, A.; Lamblin, G.; Roussel, P. (1988):  
**Primary structures of neutral oligosaccharides derived from respiratory mucus glycoproteins of a patient suffering from bronchiectasis, determined by combination of 500- MHz 1-H-NMR spectroscopy and quantitative sugar analysis.**  
*Eur. J. Biochem.* 171: 643-654

Brockhausen, I.; Yang, J.; Burchell, J. M.; Whitehouse, C.; Taylor-Papadimitriou, J. (1995):  
**Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells.**  
*Eur. J. Biochem.* 233: 607-617.

Brockhausen, I. (1999):  
**Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells.**  
*Biochem. Biophys. Acta* 1473: 67-95.

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

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

*Cancer Res.* 47: 5476-5482.

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

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

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

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

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

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

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

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

*Glycobiology* 9: 1307-1311.

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

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

*Front. Biosci* 5: D95-D107.

Carver LA, Schnitzer JE. (2003):

**Caveolae: mining little caves for new cancer targets.**

*Nat Rev Cancer.*, 3(8):571-81.

Cho YJ, Chema D, Moskow JJ, Cho M, Schroeder WT, Overbeek P, Buchberg AM, Duvic M. (1995):

**Epidermal surface antigen (MS17S1): is highly conserved between mouse and human.**

*Genomics.*, 27(2):251-8.

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

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

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

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

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

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

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

**Neutral oligosaccharides of bovine submaxillary mucin.**

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



- Chai W, Feizi T, Yuen CT, Lawson AM. (1997):  
**Nonreductive release of O-linked oligosaccharides from mucin glycoproteins for structure/function assignments as neoglycolipids: application in the detection of novel ligands for E-selectin.**  
*Glycobiology.*, 7(6):861-72.
- Chardin, P.; Chamonis, J. H., Gale, N. W., Van Aelst, L. Scholessinger, J.; Wiggler, M. H.; Bar-Sagi, D. (1993):  
**Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2**  
*Science* 260: 1338-1343
- Chen D, Xia J, Tanaka Y, Chen H, Koido S, Wernet O, Mukherjee P, Gendler SJ, Kufe D, Gong J. (2003):  
**Immunotherapy of spontaneous mammary carcinoma with fusions of dendritic cells and mucin 1-positive carcinoma cells.**  
*Immunology.*, 109(2):300-7.
- Clausen H, Bennett EP. (1996):  
**A family of UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases control the initiation of mucin-type O-linked glycosylation.**  
*Glycobiology.*, 6(6):635-46.
- Cohen G, Deutsch J, Fineberg J, Levine A. (1997):  
**Covalent attachment of DNA oligonucleotides to glass.**  
*Nucleic Acids Res.*, 25(4):911-2.
- Cole SR, Ashman LK, Ey PL. (1987):  
**Biotinylation: an alternative to radioiodination for the identification of cell surface antigens in immunoprecipitates.**  
*Mol Immunol.*, 24(7):699-705.
- Conner SD, Schmid SL. (2003):  
**Regulated portals of entry into the cell.**  
*Nature.*, 422(6927):37-44.
- Couet J, Sargiacomo M, Lisanti MP. (1997):  
**Interaction of a receptor tyrosine kinase, EGF-R, with caveolins. Caveolin binding negatively regulates tyrosine and serine/threonine kinase activities.**  
*J Biol Chem.*, 272(48):30429-38.
- Couet J, Shengwen L, Okamoto T, Scherer PE, Lisanti MP. (1997):  
**Molecular and cellular biology of caveolae paradoxes and plasticities.**  
*Trends Cardiovasc Med.*, 7(4):103-10.
- Couet J, Li S, Okamoto T, Ikezu T, Lisanti MP. (1997):  
**Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins.**  
*J Biol Chem.*, 272(10):6525-33.
- Crawley S.C.; Gum, J.R.; Hicks, J.W. (1999):  
**Genomic organization and structure of the 3' region of human MUC3: Alternative splicing predicts membrane-bound and soluble forms of the mucin.**  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263: 728-36.

Croce, M.V.; Isla-Larrain, M.T.; Price, M.R.; Segal-Eiras, A. (2001):  
**Detection of circulating mammary mucin (MUC1): and MUC1 immune complexes (Muc-CIC): in healthy women.**  
*Int. J. Biol. Markers* 16: 112-120.

Dalziel M, Whitehouse C, McFarlane I, Brockhausen I, Gschmeissner S, Schwientek T, Clausen H, Burchell JM, Taylor-Papadimitriou J. (2001):  
**The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine O-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1.**  
*J Biol Chem.*, 276(14):11007-15.

Davis B. G. (1999):  
**Recent developments in glycoconjugates.**  
*J. Chem. Soc. Perkin*, 1, 3215-3237.

De Kretser, D.A.; Thorne, H.J.; Jacobs, D.J.; Jose, D.G. (1985):  
**The sebaceous gland antigen defined by the OM-1 monoclonal antibody is expressed at high density on the surface of ovarian carcinoma cells.**  
*Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 9: 1019-35.

Delacour D, Cramm-Behrens CI, Drobecq H, Le Bivic A, Naim HY, Jacob R. (2006):  
**Requirement for galectin-3 in apical protein sorting.**  
*Curr Biol.*, 16(4):408-14.

Delacour D, Jacob R. (2006):  
**Apical protein transport.**  
*Cell Mol Life Sci.*, 63(21):2491-505.

Delacour D, Cramm-Behrens CI, Drobecq H, Le Bivic A, Naim HY, Jacob R. (2006):  
**Requirement for galectin-3 in apical protein sorting.**  
*Curr Biol.*, 16(4):408-14.

Delacour D, Greb C, Koch A, Salomonsson E, Leffler H, Le Bivic A, Jacob R. (2007):  
**Apical sorting by galectin-3-dependent glycoprotein clustering.**  
*Traffic.*, 8(4):379-88.

Dent GA, Civalier CJ, Brecher ME, Bentley SA. (1999)  
**MUC1 expression in hematopoietic tissues.**  
*Am J Clin Pathol.*, 111(6):741-7.

DeSouza, M.M.; Surveyor, G.A.; Price, R.E.; Julian, J.; Kardon, R.; Zhou, X.; Gendler, S.; Hilkens, J.; Carson, D.D. (1999):  
**MUC1/episialin: a critical barrier in the female reproductive tract.**  
*J. Reprod. Immunol.* 45: 127-158.

Dufosse, J.; Porchet, N.; Audie, J.P.; Guyonnet, D.V.; Laine, A.; Van-Seuningen, I. ; Marrakchi, S., Degand, P. ; Aubert, J.P. (1993):  
**Degenerate 87-base-pair tandem repeats create hydrophobic altering domains in human mucin peptides mapped to 11p15.**  
*Biochem. J.* 293: 329-337.

Dunn R, Hicke L. (2001):

**Multiple roles for Rsp5p-dependent ubiquitination at the internalization step of endocytosis.**

*J Biol Chem.*, 276(28):25974-81.

Duraisamy S, Kufe T, Ramasamy S, Kufe D. (2007):

**Evolution of the human MUC1 oncoprotein.**

*Int J Oncol.*, 31(3):671-7.

Dwek R. A. (1996):

**Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars.**

*Chem. Rev.*, 96, 683-720.

Eckhardt, A.E.; Timpte, C.S.; Abernethy, J.L.; Toumadje, A.; Johnson, W.C., Jr.; Hill, R. (1987):

**Structural properties of porcine submaxillary gland apomucin.**

*J. Biol. Chem.* . 262:11339-344.

Edgar AJ, Polak JM (2001):

**Flotillin-1: gene structure: cDNA cloning from human lung and the identification of alternative polyadenylation signals.**

*Int J Biochem Cell Biol.*, 33(1):53-64.

Edge AS, Faltynek CR, Hof L, Reichert LE Jr, Weber P. (1981):

**Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid.**

*Anal Biochem.*, 118(1):131-7.

Efstathiou JA, Noda M, Rowan A, Dixon C, Chinery R, Jawhari A, Hattori T, Wright NA, Bodmer WF, Pignatelli M. (1998):

**Intestinal trefoil factor controls the expression of the adenomatous polyposis coli-catenin and the E-cadherin-catenin complexes in human colon carcinoma cells.**

*Proc Natl Acad Sci U S A.*, 95(6):3122-7.

Egan, S. E., Giddings, B. W.; Brooks, M. W.; Buday, L.; Sizeland, A. M.; Weinberg, R. A. (1993):

**Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation.**

*Nature* 363: 45-51.

Eggernberger ., G. Bodenhausen, **Angew. Chem.** 1990, 102, 392-402.

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

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

*Histopathology* 3: 510-16.

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

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

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

Engelmann K, Kinlough CL, Müller S, Razawi H, Baldus SE, Hughey RP, Hanisch FG. (2005):

**Transmembrane and secreted MUC1 probes show trafficking-dependent changes in O-glycan core profiles.**

*Glycobiology.*, 15 (11):, 1111-1124.

Feizi T.

**Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens**

*Nature* 1985, 314, 53-57.

Février B, Raposo G. (2004):

**Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages.**

*Curr Opin Cell Biol.*, 16(4):415-21.

Forstner G. (1995):

**Signal transduction, packaging and secretion of mucins.**

*Annu Rev Physiol.*, 57:585-605.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gesner B. M., V. Ginsburg,

**Effect of Glycosidases on the fate of transfused Lymphocytes**

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1964, 52, 359-366.

Gottschalk A., (1957):

**Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*.**

*Biochim. Biophys.*, 23: 645-646.

Gottschalk A., (1960):

**Correlation between composition, structure, shape and function of a salivary mucoprotein.**

*Nature*, 186: 949-951.

Grady EF, Slice LW, Brant WO, Walsh JH, Payan DG, Bunnett NW. (1995):

**Direct observation of endocytosis of gastrin releasing peptide and its receptor.**

*J Biol Chem.*, 270(9):4603-11.

Greis KD, Hayes BK, Comer FI, Kirk M, Barnes S, Lowary TL, Hart GW. (1996):  
**Selective detection and site-analysis of O-GlcNAc-modified glycopeptides by beta-elimination and tandem electrospray mass spectrometry.**  
*Anal Biochem.* , 234(1):38-49.

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

Gum, J.R.; Byrd, J.C; Hicks, J.W.; Toribara, N.W.; Lamport, D.T.A.; Kim, Y.S. (1989):  
**Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism.**  
*J. Biol. Chem.* . 264:6480-87.

Gum, J.R.; Hicks, J.W.; Swallow, D.M.; Lagace, R.L.; Byrd, J.C.; Lamport, D.T.; Siddiki, B.; Kim Y.S. (1990):  
**Molecular cloning of cDNAs derived from a novel human intestinal mucin gene.**  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* . 171:407-15.

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

Gum, J.R.; Crawley, S.C.; Hicks, J.W.; Szymkowski, D.E.; Kim, Y.S. (2002):  
**MUC17, a novel membrane-tethered mucin.**  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* . 291:466-75.

Hakomori S. (1981):  
**Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation, and oncogenesis.**  
*Annu Rev Biochem.*, 50:733-64.

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-acetylglucosamine backbone with Gal beta (1 4): GlcNAc beta (1-6): repeating units.**  
*J. Biol. Chem.* 264: 872-883.

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

Hanisch, F.-G.; Peter-Katalinic, J. (1992):  
**Structural studies on fetal mucins from amino fluid: core typing of short-chain O-linked glycans.**  
*Eur. J. Biochem.* 205: 527-535.

Hanisch, F.-G.; Stadie, T. R.; Deutzmann, F.; Peter-Katalinic, J. (1996):  
**MUC1 glycoforms in breast cancer cells: cell line T-47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation.**  
*Eur. J. Biochem.* 236, 318-327

Hanisch F.-G.; Müller, S.; Hassan, H.; Clausen, H.; Zachara, N.; Gooley, A.A.; Paulsen, H.; Alving, K.; Peter-Katalinic, J (1999):  
**Dynamic epigenetic regulation of initial O-glycosylation by UDP-GalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyl-transferases.**  
*J. Biol. Chem.* 274: 9946-9954.

Hanisch, F.-G.; Reis, C.A.; Clausen, H.; Paulsen, H. (2001):  
**Evidence for glycosylation-dependent activities of polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases GalNAc-T2 and -T4 on mucin glycopeptides.**  
*Glycobiology* 11 (9): 731-740.

Hanisch, F.-G. (2001):  
**Mucin-Type-O-Glycosylation.**  
*Biol. Chem.* 382: 143-149.

Müller S, Hanisch FG. (2002):  
**Recombinant MUC1 probe authentically reflects cell-specific O-glycosylation profiles of endogenous breast cancer mucin. High density and prevalent core 2-based glycosylation.**  
*J Biol Chem.*, 277(29):26103-12.

Hanisch, F.G.; Schwientek, T.; Von Bergwelt-Baildon, M.S.; Schultze, J.L.; Finn, O. (2003):  
**O-linked glycans control glycoprotein processing by antigen-presenting cells: a biochemical approach to the molecular aspects of MUC1 processing by dendritic cells.**  
*Eur. J. Immunol.* 33: 3242-3254.

Hanski, C.; Hanisch, F.-G.; Riecken, E.O. (1992):  
**Alteration of mucin-bound carbohydrate moieties in malignant transformation of colonic mucosa.**  
*Cancer J.* 5: 332-342.

Hanzal-Bayer MF, Hancock JF. (2007):  
**Lipid rafts and membrane traffic.**  
*FEBS Lett.*, 581(11):2098-104.

Harris, H. (1984):  
**The carapace of the cancer cell.**  
*J.R. Coll. Physicians London* 18: 161-65.

- Hashimoto Y., W. Pigman,  
**Light-scattering studies of bovine submaxillary mucin.**  
*Annu. N. Y. Acad. Sci.* 1962, 93, 541.
- Hettkamp H, Bause E, Legler G. (1998):  
**Inhibition by nojirimycin and 1-deoxynojirimycin of microsomal glucosidases from calf liver acting on the glycoprotein oligosaccharides Glc1-3Man9GlcNAc2.**  
*Biosci Rep.*, 2(11):899-906.
- Higuchi T, Xin P, Buckley MS, Erickson DR, Bhavanandan VP. (2000):  
**Characterization of the rabbit homolog of human MUC1 glycoprotein isolated from bladder by affinity chromatography on immobilized jacalin.**  
*Glycobiology.*, 10(7):659-67.
- Hilkens, J.; Buijs, F.; Hilgers, J.; Hageman, P.; Calafat, J.; Sonnenberg, A.; van der Valk, M. (1984):  
**Monoclonal antibodies against human milk-fat globule membranes detecting differentiation antigen of the mammary gland and its tumors.**  
*Int. J. Cancer* 34: 197-206.
- Hilkens, J.; Kroezen, V.; Bonfrer, J. M.; De Jong-Bakker, M. Bruning, P. F. (1986):  
**MAM-6 antigen, a new serum marker for breast cancer monitoring.**  
*Cancer Res.* 46: 2582-2587.
- Hilkens, J.; Buijs, F. (1988):  
**Biosynthesis of MAM-6, an epithelial sialomucin. Evidence for involvement of a rare proteolytic cleavage step in the endoplasmic reticulum.**  
*J. Biol. Chem.* 263: 4215-4222.
- Hilkens, J.; Figdor, C.G. (1993):  
**Episialin (MUC1): inhibits cytotoxic lymphocyte-target cell interaction.**  
*J. Immunol.* 151: 767-776.
- Hounsell, E.F.; Lawson, A.M.; Feeney, J.; Gooi, H.C.; Pickering, N.J.; Stoll, M.S.; Lui, S.C.; Feizi, T. (1985):  
**Structural analysis of the O-glycosidically linked core-region oligosaccharides of human meconium glycoproteins, which express oncofetal antigens.**  
*Eur.J.Biochem.* 148: 367-377.
- Hounsell, E.F.; Lawson, A.M.; Stoll, M.S.; Kane, D.P.; Cashmore, G.C.; Carruthers, R.A.; Feeney, J.; Feizi, T. (1989):  
**Characterisation by mass spectrometry and 500-MHz proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of penta-and hexasaccharide chains of human fetal gastrointestinal mucins (meconium glycoproteins):**  
*Eur. J. Biochem.* 186: 597-610.
- Huang L, Ren J, Chen D, Li Y, Kharbanda S, Kufe D. (2003):  
**MUC1 cytoplasmic domain coactivates Wnt target gene transcription and confers transformation.**  
*Cancer Biol Ther.*, 2(6):702-6.



- Huang L, Chen D, Liu D, Yin L, Kharbanda S, Kufe D. (2005):  
**MUC1 oncoprotein blocks glycogen synthase kinase 3 $\beta$ -mediated phosphorylation and degradation of beta-catenin.**  
*Cancer Res.*, 65(22):10413-22.
- Hull, S. R.; Bright, A.; Carraway, K. L.; Abe, M.; Hayes, D. F.; Kufe, D. (1989):  
**Oligosaccharide differences in the DF3 sialomucin antigen from normal human milk and the BT-20 human breast carcinoma cell line.**  
*Cancer Commun.* 1: 261-267.
- Hurlstone AF, Reid G, Reeves JR, Fraser J, Strathdee G, Rahilly M, Parkinson EK, Black DM. (1999):  
**Analysis of the CAVEOLIN-1 gene at human chromosome 7q31.1 in primary tumours and tumour-derived cell lines.**  
*Oncogene.*, 18(10):1881-90.
- Huth, U., Wieschollek, A., Garini, Y., Schubert, R. und Peschka-Süss, R. (2004):  
**Fourier transformed spectral bio-imaging for studying the intracellular fate of liposomes.**  
*Cytometry 57A*, 10-21.
- Huth, U. (2005):  
**Zelluläre Aufnahme und intrazelluläres Schicksal von partikulären Drug Delivery Systemen.**  
Dissertation Universität Freiburg.
- Ihrke G, Bruns JR, Luzio JP, Weisz OA. (2001):  
**Competing sorting signals guide endolyn along a novel route to lysosomes in MDCK cells.**  
*EMBO J.*, 20(22):6256-64.
- Jacob R, Alfalah M, Grünberg J, Obendorf M, Naim HY. (2000):  
**Structural determinants required for apical sorting of an intestinal brush-border membrane protein.**  
*J Biol Chem.*, 275(9):6566-72.
- Jentoft, N. (1990):  
**Why are proteins O-glycosylated?**  
*Trends Biochem. Sci.* 15:291-94.
- Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. (1987):  
**Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes).**  
*J Biol Chem.*, 262(19):9412-20.
- Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Efstathiou J, Valizadeh A, Noda M, Playford RJ, Kmiot W, Pignatelli M. (1998):  
**Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease.**  
*J Pathol.*, 185(4):413-8.

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

**A genetic polymorphism of a human urinary mucin.**

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

Katzmann DJ, Babst M, Emr SD (2001):

**Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I.**

*Cell.*, 106(2):145-55.

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

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

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

Kiachopoulos S, Bracher A, Winklhofer KF, Tatzelt J. (2005):

**Pathogenic mutations located in the hydrophobic core of the prion protein interfere with folding and attachment of the glycosylphosphatidylinositol anchor.**

*J Biol Chem.*, 280(10):9320-9.

Kinlough CL, Poland PA, Bruns JB, Harkleroad KL, Hughey RP. (2004)

**MUC1 membrane trafficking is modulated by multiple interactions.**

*J Biol Chem.*, 279(51):53071-7. Epub 2004 Oct 7.

Kinlough CL, McMahan RJ, Poland PA, Bruns JB, Harkleroad KL, Stremple RJ, Kashlan OB, Weixel KM, Weisz OA, Hughey RP. (2006):

**Recycling of MUC1 is dependent on its palmitoylation.**

*J Biol Chem.*, 281(17):12112-22.

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.

Kornfeld, R.; Kornfeld, S. (1980):

**Structure of glycoproteins and their oligosaccharide unit.**

*The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans.* Edited by WJ Lennarz. New York, Plenum Press pp 1-24.

Krajewska WM, Masłowska I. (2004):

**Caveolins: structure and function in signal transduction.**

*Cell Mol Biol Lett.*, 9(2):195-220.

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

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

*Hybridoma* 3: 223-32.

Kuranda MJ, Robbins PW. (1991):

**Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*.**

*Biol Chem.*, 266(29):19758-67.

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

**Structures of the major oligosaccharides from human rectal adenocarcinoma glycoprotein.**

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

Lafont F, Verkade P, Galli T, Wimmer C, Louvard D, Simons K. (1999):

**Raft association of SNAP receptors acting in apical trafficking in Madin-Darby canine kidney cells.**

*Proc Natl Acad Sci U S A.*, 96(7):3734-8.

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/<sup>1</sup>H-NMR approach, of the heterogeneity displayed by the neutral carbohydrate chains of human bronchial mucins.**

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

Lämmli, U. (1970):

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

*Nature* 227: 680.

Lamport DT, Miller DH. (1971):

**Hydroxyproline arabinosides in the plant kingdom.**

*Plant Physiol.*, 48(4):454-6.

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

**Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA.**

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

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

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

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

Lasky LA. (1992):

**Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation.**

*Science.*, 258(5084):964-9.

Lavie Y, Fiucci G, Liscovitch M. (1998):

**Up-regulation of caveolae and caveolar constituents in multidrug-resistant cancer cells.**

*J Biol Chem.*, 273(49):32380-3.

Lee YN, Kang JS, Krauss RS. (2001):

**Identification of a role for the sialomucin CD164 in myogenic differentiation by signal sequence trapping in yeast.**

*Mol Cell Biol.*, 21(22):7696-706.

Leteurtre E, Gouyer V, Delacour D, Hémon B, Pons A, Richet C, Zanetta JP, Huet G. (2003):

**Induction of a storage phenotype and abnormal intracellular localization of apical glycoproteins are two independent responses to GalNAc $\alpha$ -O-bn.**

*J Histochem Cytochem.*, 51(3):349-61.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Li S, Couet J, Lisanti MP. (1996):

**Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases.**

*J Biol Chem.*, 271(46):29182-90.

Li S, Song KS, Lisanti MP. (1996):

**Expression and characterization of recombinant caveolin. Purification by polyhistidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes.**

*J Biol Chem.*, 271(1):568-73.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lindhorst, T. K. (2000a):

**Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**  
*Wiley-VCH.*

Lindhorst, T. K. (2000b):

**Struktur und Funktion von Kohlenhydraten .**  
*Chemie in Unserer Zeit* 34(1) :38-52 .

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

**The epithelial sialomucin, episialin, is sialylated during recycling**  
*J. Biol. Chem.* 268: 21364-21371.

Liu J, Deyoung SM, Zhang M, Dold LH, Saltiel AR. (2005):

**The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes.**

*J Biol Chem.*, 280(16):16125-34.

Liu X, Yuan Z, Chung M. (2008):

**MUC1 intra-cellular trafficking is clathrin, dynamin, and rab5 dependent.**  
*Biochem Biophys Res Commun.*, 376(4):688-93.

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

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

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

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

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

*Cancer Res.* 43: 5489-5492.

McGarvey GJ, Takayama S, Wong CH. (1997):

**Microbial aldolases and transketolases: new biocatalytic approaches to simple and complex sugars.**

*Annu Rev Microbiol.*, 51:285-310.

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

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

*Tumour Biol.* 15: 33-44

Meerzaman D, Shapiro PS, Kim KC. (2001):

**Involvement of the MAP kinase ERK2 in MUC1 mucin signaling.**

*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 281(1):L86-91.

Mellman I. (1996):

**Membranes and sorting.**

*Curr Opin Cell Biol.*, 8(4):497-8.

Mellman I. (1996):

**Endocytosis and molecular sorting.**

*Annu Rev Cell Dev Biol.*, 12:575-625.

Merlin J, Stechly L, de Beaucé S, Monté D, Leteurtre E, van Seuning I, Huet G, Pigny P. (2011):

**Galectin-3 regulates MUC1 and EGFR cellular distribution and EGFR downstream pathways in pancreatic cancer cells.**

*Oncogene.*, 30(22):2514-25. doi: 10.1038/onc.2010.631. Epub 2011 Jan 24.

Merry AH, Neville DC, Royle L, Matthews B, Harvey DJ, Dwek RA, Rudd PM. (2002):

**Recovery of intact 2-aminobenzamide-labeled O-glycans released from glycoproteins by hydrazinolysis.**

*Anal Biochem.*, 304(1):91-9.

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

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

*Cancer Res.* 42: 601-8.

Montreuil J. (1980):

**Primary structure of glycoprotein glycans: basis for the molecular biology of glycoproteins.**

*Adv Carbohydr Chem Biochem.*, 37:157-223.

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

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

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

Mousavi SA, Malerød L, Berg T, Kjekken R. (2004):

**Clathrin-dependent endocytosis.**

*Biochem J.*, 377(Pt 1):1-16.

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

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

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

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

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

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

Müller, S.; Hanisch, F.-G. (2002):

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

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

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

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

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

Naim HY, Joberty G, Alfalah M, Jacob R. (1999):  
**Temporal association of the N- and O-linked glycosylation events and their implication in the polarized sorting of intestinal brush border sucrase-isomaltase, aminopeptidase N, and dipeptidyl peptidase IV.**  
*J Biol Chem.*, 274(25):17961-7.

Nguyen, P.L., Niehans, G.A.; Cherwitz, D.L.; Kim, Y.S.; Ho, S.B. (1996):  
**Membrane-bound (MUC1): and secretory (MUC2, MUC3 and MUC4): mucin gene expression in human lung cancer.**  
*Tumour Biol.* 17: 176-192.

Nicolaou KC, Mitchell HJ. (2001):  
**Adventures in Carbohydrate Chemistry: New Synthetic Technologies, Chemical Synthesis, Molecular Design, and Chemical Biology A list of abbreviations can be found at the end of this article. Telemachos Charalambous was an inspiring teacher at the Pancyprian Gymnasium, Nicosia, Cyprus.**  
*Angew Chem Int Ed Engl.* 2001 May 4;40(9):1576-1624.

Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J. (2001):  
**Endocytosis without clathrin coats.**  
*Trends Cell Biol.*, 11(10):406-12.

Nollet, S.; Moniaux, N.; Maury, J.; Petitprez, D.; Degand, P.; Laine, A.; Porchet, N.; Aubert, J.-P. (1998):  
**Human mucin gene MUC4: organization of its 5'-region and polymorphism of its central tandem repeat array.**  
*Biochem J.* 332:739-48.

Obermair, A.; Schmid, B.C.; Packer, J. (2002):  
**Expression of MUC1 splice variants in benign and malignant ovarian tumours.**  
*Int. J. Cancer* 100: 166-171.

Orlandi PA, Fishman PH. (1998):  
**Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains.**  
*J Cell Biol.*, 141(4):905-15.

Pallesen, L.T.; Berglund, L.; Rasmussen, L.K.; Petersen, T.E.; Rasmussen, J.T. (2002):  
**Isolation and characterisation of MUC15, a novel cell membrane-associated mucin.**  
*Eur. J. Biochem.* 269: 2755-63.

Pandey, P.; Kharbanda, S.; Kufe, D. (1995):  
**Association of the DF3/MUC1 breast cancer antigen with Grb2 and the Sos/Ras exchange protein**  
*Cancer Res.* 55: 4000-4003.

Parry, S.; Silverman, H.S.; McDermott, K.; Willis, A.; Hollingsworth, M.A.; Harris, A. (2001):  
**Identification of MUC1 proteolytic cleavage sites in vivo.**  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283:715-20.



Patel T, Bruce J, Merry A, Bigge C, Wormald M, Jaques A, Parekh R. (1993):  
**Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both N- and O-linked oligosaccharides from glycoproteins.**  
*Biochemistry.*, 32(2):679-93.

Patton, S.; Gendler, S.J.; Spicer, A.P. (1995):  
**The epithelial mucin, MUC1, of milk, mammary gland and other tissues.**  
*Biochim. Biophys. Acta* 1241: 407-23.

Patton, S. (2001):  
**MUC1 and MUC-X, epithelial mucins of breast and milk.**  
*Adv. Exp. Med. Biol.* 501: 35-45.

Perez-Vilar, J.; Hill, R.L. (1999):  
**The structure and assembly of secreted mucins.**  
*J. Biol. Chem.* 274: 31751-4

Paulson, J. C. (1985):  
**Interactions of animal viruses with cell surface receptors. Conn, M. (ed.).**  
*Academic Press*, 2, 131-219.

Perepelov AV, Torzewska A, Shashkov AS, Ziolkowski A, Senchenkova SN, Rozalski A, Knirel YA. (2002):  
**Structure of the O-specific polysaccharide of *Proteus vulgaris* O15 containing a novel regioisomer of N-acetylmuramic acid, 2-acetamido-4-O-[(R)-1-carboxyethyl]-2-deoxy-D-glucose.**  
*Carbohydr Res.*, 337(24):2463-8.

Perez-Vilar, J.; Hill, R.L. (1999):  
**The structure and assembly of secreted mucins.**  
*J. Biol. Chem.* 274:31751-31754.

Peterson, J.A.; Scallan, C.D.; Ceriani, R.L.; Hamosh, M. (2001):  
**Structural and functional aspects of the three major glycoproteins of the human milk fat globule membrane.**  
*Adv. Exp. Med. Biol.* 501: 179-187.

Pfaff DW, Commons KG, van Bockstaele EJ. (1999):  
**Frequent colocalization of mu opioid and NMDA-type glutamate receptors at postsynaptic sites in periaqueductal gray neurons.**  
*J Comp Neurol.*, 408(4):549-59.

Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. (2004):  
**Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine.**  
*Proc Natl Acad Sci U S A.*, 101(36):13368-73. Epub 2004 Aug 23.

Pochampalli MR, Bitler BG, Schroeder JA. (2007):  
**Transforming growth factor alpha dependent cancer progression is modulated by Muc1.**  
*Cancer Res.*, 67(14):6591-8.

- Pochampalli MR, el Bejjani RM, Schroeder JA. (2007):  
**MUC1 is a novel regulator of ErbB1 receptor trafficking.**  
*Oncogene.*, 26(12):1693-701. Epub 2006 Sep 18.
- Podolski, D.K. (1985a):  
**Oligosaccharides structures of human colonic mucin.**  
*J. Biol. Chem.* 260: 8262-8271.
- Podolski, D.K. (1985b):  
**Oligosaccharides structures of isolated human colonic mucin species.**  
*J. Biol. Chem.* 260: 15510-15515.
- Porchet, N.; Van Cong, N.; Dufosse, J., Audie, J.P.; Gujonnet-Duperat, V.; Gross, M.S.; Denis, C.; Degand, P.; Bernheim, A.; Aubert, J.P. (1991):  
**Molecular cloning and chromosomal localisation of a novel human tracheo-bronchial mucin cDNA containing tandemly repeated sequences of 48 base pairs.**  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175:414-422.
- Pratt, W.S.; Crawley, S.; Hicks, J.; Ho, J.; Nash, M.; Kim, Y.S.; Gum, J.R.; Swallow, D.M. (2000):  
**Multiple transcripts of MUC3: evidence for two genes, MUC3A und MUC3B.**  
*Biophys. Res. Commun.* 275: 916-23.
- Quin, R.J.; McGuckin, M.A. (2000):  
**Phosphorylation of the cytoplasmic domain of the MUC1 mucin correlates with changes in cell-cell adhesion.**  
*Int. J. Cancer* 87: 499-506.
- Ragupathi G., T. K. Park, S. Zhang, I. J. Kim, L. Graber, S. Adluri, K. O. Lloyd, S. J. Danishefsky, P. Livingston (1997):  
**Angew. Chem.** 109, 66-69; **Angew. Chem.Int. Ed.**, 36, 125-128.
- Ramasamy S, Duraisamy S, Barbashov S, Kawano T, Kharbanda S, Kufe D. (2007):  
**The MUC1 and galectin-3 oncoproteins function in a microRNA-dependent regulatory loop.**  
*Mol Cell.*, 27(6):992-1004.
- Regimbald LH, Pilarski LM, Longenecker BM, Reddish MA, Zimmermann G, Hugh JC. (1996):  
**The breast mucin MUC1 as a novel adhesion ligand for endothelial intercellular adhesion molecule 1 in breast cancer.**  
*Cancer Res.*, 56(18):4244-9.
- Rejman J, Bragonzi A, Conese M. (2005):  
**Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes.**  
*Mol Ther.*, 12(3):468-74.
- Reid LM, Bhaskar KR. (1998):  
**Macromolecular and lipid constituents of bronchial epithelial mucus.**  
*Symp Soc Exp Biol.*, 43:201-19.

- Ren, J.; Li, Y.; Kufe, D. (2002):  
**Protein kinase C delta regulates function of the DF3/MUC1 carcinoma antigen in beta-catenin signaling.**  
*J. Biol. Chem.* 277:17616-22.
- Ren J, Bharti A, Raina D, Chen W, Ahmad R, Kufe D. (2006):  
**MUC1 oncoprotein is targeted to mitochondria by heregulin-induced activation of c-Src and the molecular chaperone HSP90.**  
*Oncogene.*, 25(1):20-31.
- Reuter, G.; Pfeil, R.; Stoll, S.; Schaurer, R.; Kamerling, J.-P.; Versluis, C.; Vliegenhart, J.F. (1983):  
**Identification, of a new sialic acid derived from glycoprotein of bovine submandibular gland.**  
*Eur. J. Biochem.* 134: 139-143.
- Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B, Sandvig K. (1999):  
**Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles.**  
*Mol Biol Cell.*, 10(4):961-74.
- Rose, M.C. (1992):  
**Mucins: structure, function, and role in pulmonary diseases .**  
*Am. J. Physiol.* 263:L413-29.
- Roth TF, Porter KR. (1964):  
**Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito aedes aegypti. L.**  
*J Cell Biol.*, 20:313-32.
- Roussel, P.; Lambin, G. (1996):  
**Glykoproteins and Disease.**  
*New Comprehensive Biochem.* 30: 351.
- Saslowsky DE, Lawrence J, Ren X, Brown DA, Henderson RM, Edwardson JM. (2002):  
**Placental alkaline phosphatase is efficiently targeted to rafts in supported lipid bilayers.**  
*J Biol Chem.*, 277(30):26966-70.
- Scheler C, Lamer S, Pan Z, Li XP, Salnikow J, Jungblut P. (1998):  
**Peptide mass fingerprint sequence coverage from differently stained proteins on two-dimensional electrophoresis patterns by matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS).**  
*Electrophoresis.*, 19(6):918-27.
- Schmidt R. R., P. Zimmermann (1986):  
**Synthese von Glycosphingolipiden und Psychosinen.**  
*Angew. Chem.*, 98, 722-723; *Angew. Chem., Int.Ed.Engl.*, 25, 725-726.
- Schneider D, Greb C, Koch A, Straube T, Elli A, Delacour D, Jacob R. (2010):  
**Trafficking of galectin-3 through endosomal organelles of polarized and non-polarized cells.**  
*Eur J Cell Biol.*, 89(11):788-98.

Schroten, H; Hanisch, F.-G.; Plogmann, R.; Hacker, J; Uhlenbruck, G.; Nobis-Bosch, R.; Wahn, V. (1992):

**Inhibition of adhesion of S-fimbriated Escherichia coli to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction.**

*Infect. Immun.* 60: 2893-2899.

Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM, Gendler SJ. (2001):

**Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland.**

*J Biol Chem.*, 276(16):13057-64.

Schuck S, Simons K. (2004):

**Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane.**

*J Cell Sci.*, 117(Pt 25):5955-64.

Schulz BL, Packer NH, Karlsson NG. (2002):

**Small-scale analysis of O-linked oligosaccharides from glycoproteins and mucins separated by gel electrophoresis.**

*Anal Chem.*, 74(23):6088-97.

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

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

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

Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kübler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP. (1995):

**Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization.**

*Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(20):9407-11.

Shajahan AN, Tiruppathi C, Smrcka AV, Malik AB, Minshall RD. (2004a):

**Gbetagamma activation of Src induces caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells.**

*J Biol Chem.*, 279(46):48055-62.

Shajahan AN, Timblin BK, Sandoval R, Tiruppathi C, Malik AB, Minshall RD. (2004b):

**Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells.**

*J Biol Chem.*, 279(19):20392-400.

Shankar V, Gilmore MS, Elkins RC, Sachdev GP. (1994):

**A novel human airway mucin cDNA encodes a protein with unique tandem-repeat organization.**

*Biochem J.*, 300 ( Pt 2):295-8.

Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Neubauer G, Mortensen P, Mann M. (1996):

**A strategy for identifying gel-separated proteins in sequence databases by MS alone.**

*Biochem Soc Trans.*, 24(3):893-6.

Shimizu, M.; Yamauchi, K. (1982):  
**Isolation and characterisation of mucin-like glycoprotein in human milk fat globule membrane.**

*J. Biochem. (Tokyo)*: 91: 515-524.

Siddiqui J, Abe M, Hayes D, Shani E, Yunis E, Kufe D. (1988):  
**Isolation and sequencing of a cDNA coding for the human DF3 breast carcinoma-associated antigen.**

*Proc Natl Acad Sci U S A.*, 85(7):2320-3.

Simons K, Ikonen E. (1997):  
**Functional rafts in cell membranes.**

*Nature.*, 387(6633):569-72.

Simons K, Toomre D. (2000):  
**Lipid rafts and signal transduction.**

*Nat Rev Mol Cell Biol.*, 1(1):31-9.

Sirover MA. (1997):  
**Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology.**

*J Cell Biochem.*, 66(2):133-40.

Slimane TA, Lenoir C, Sapin C, Maurice M, Trugnan G. (2000):  
**Apical secretion and sialylation of soluble dipeptidyl peptidase IV are two related events.**

*Exp Cell Res.*, 258(1):184-94.

Sloper-Mould KE, Jemc JC, Pickart CM, Hicke L.(2001):  
**Distinct functional surface regions on ubiquitin.**

*J Biol Chem.*, 276(32):30483-9.

Sharon N, Lis H. (1993):  
**Carbohydrates in cell recognition.**

*Sci Am.*, 268(1):82-9.

Sharon, N.; Lis, H., (1993):  
**Kohlenhydrate und Zellerkennung.**

*Spektrum d. Wiss.*, 3, 66-74.

Staudacher E, Altmann F, Wilson IB, März L. (1999):  
**Fucose in N-glycans: from plant to man.**

*Biochim Biophys Acta.*, 1473(1):216-36.

Strous GJ, Dekker J. (1992):  
**Mucin-type glycoproteins.**

*Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 27(1-2):57-92.

Subtil A, Hémar A, Dautry-Varsat A. (1994):  
**Rapid endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited.**

*J Cell Sci.*, 107 (Pt 12):3461-8.

Sutherland DR, Marsh JC, Davidson J, Baker MA, Keating A, Mellors A. (1992):  
**Differential sensitivity of CD34 epitopes to cleavage by Pasteurella haemolytica glycoprotease: implications for purification of CD34-positive progenitor cells.**  
*Exp Hematol.*, 20(5):590-9.

Swallow, D.M.; Gendler, S.; Griffiths, B.; Kearney, A.; Povey, S.; Sheer, D.; Palmer, R.W.; Taylor-Papadimitriou, J. (1987a):  
**The hypervariable gene locus PUM, which codes for the tumour associated epithelial mucins, is located on chromosom 1, within the region 1q21-q24.**  
*Ann. Hum. Genet.* . 51:289-294.

Swallow, D.M.; Gendler, S.; Griffiths, B.; Corney, G.; Taylor-Papadimitriou, J.; Bramwell, M.E. (1987b):  
**The human tumor-associated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus PUM.**  
*Nature* 328:82-84.

Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. (2002):  
**Exosomes: composition, biogenesis and function.**  
*Nat Rev Immunol.*, 2(8):569-79.

Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O, Amigorena S. (2002):  
**Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes.**  
*Nat Immunol.*, 3(12):1156-62.

Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. (2006):  
**Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids.**  
*Curr Protoc Cell Biol.*, Chapter 3:Unit 3.22.

Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhut M, van Deurs B. (2002):  
**Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking.**  
*Mol Biol Cell.*, 13(1):238-50.

Toribara NW, Roberton AM, Ho SB, Kuo WL, Gum E, Hicks JW, Gum JR Jr, Byrd JC, Siddiki B, Kim YS. (1993):  
**Human gastric mucin. Identification of a unique species by expression cloning.**  
*J Biol Chem.*, 268(8):5879-85.

Truant S, Bruyneel E, Gouyer V, De Wever O, Pruvot FR, Mareel M, Huet G. (2003):  
**Requirement of both mucins and proteoglycans in cell-cell dissociation and invasiveness of colon carcinoma HT-29 cells.**  
*Int J Cancer.*, 104(6):683-94.

Tsai B, Rodighiero C, Lencer WI, Rapoport TA. (2001):  
**Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin.**  
*Cell.*, 104(6):937-48.

Van Halbeek, H.; Vliegthart, J.F.G.; Fiat, A.M.; Jolles, P. (1985):  
**Isolation and structural characterization of the smaller-size oligosaccharides from desialylated human kappa-casein. Establishment of a novel type of core for a mucin-type carbohydrate chain.**  
*FEBS Lett.* 187:81-88.

van Halbeek H, Strang AM, Lhermitte M, Rahmoune H, Lamblin G, Roussel P. (1994):  
**Structures of monosialyl oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a non-secretor (O, Lea+b-): patient suffering from chronic bronchitis. Characterization of a novel type of mucin carbohydrate core structure.**  
*Glycobiology.*, 4(2):203-19.

Varki, A. (1994):  
**Radiolabeling of Glycoconjugates**  
*Methods Enzymol.* 230: 18.

Vazirabadi G, Geiger TR, Coffin WF 3rd, Martin JM. (2003):  
**Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1): and lytic LMP-1 localization in plasma membrane-derived extracellular vesicles and intracellular virions.**  
*J Gen Virol.*, 84(Pt 8).

Verma, M.; Davidson, E.A. (1994):  
**Mucin genes: structure, expression and regulation**  
*Glycoconj. J.* 11:172-79.

Vinall, L.E.; Hill, A.S.; Pigny, P.; Pratt, W.S.; Toribara, N.; Gum, J.R.; Kim, Y.S.; Porchet, N.; Aubert, J.-P.; Swallow, D.M. (1998):  
**Variable number of tandem repeat polymorphism of the mucin genes located in the complex on 11p15.5.**  
*Hum. Genet.* 102:357-66.

Voet D., J. G. Voet, (1992):  
**Biochemie**  
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 251-307.

Volonte D, Galbiati F, Li S, Nishiyama K, Okamoto T, Lisanti MP. (1999):  
**Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo. Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe.**  
*J Biol Chem.* 274(18):12702-9.

Volonte D, Galbiati F, Lisanti MP. (1999):  
**Visualization of caveolin-1, a caveolar marker protein, in living cells using green fluorescent protein (GFP): chimeras. The subcellular distribution of caveolin-1 is modulated by cell-cell contact.**  
*FEBS Lett.*, 445(2-3):431-9.

Volonte D, McTiernan CF, Drab M, Kasper M, Galbiati F. (2008):  
**Caveolin-1 and caveolin-3 form heterooligomeric complexes in atrial cardiac myocytes that are required for doxorubicin-induced apoptosis.**  
*Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 294(1):H392-401. Epub 2007 Nov 2.



Volz B, Orberger G, Porwoll S, Hauri HP, Tauber R. (1995):  
**Selective reentry of recycling cell surface glycoproteins to the biosynthetic pathway in human hepatocarcinoma HepG2 cells.**  
*J Cell Biol.*, 130(3):537-51.

Walz, G.; Aruffo, A.; Kolanus, W.; Bevilacqua, M.; Seed, B. (1990):  
**Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells.**  
*Science* 250:1132-35.

Wandall HH, Hassan H, Mirgorodskaya E, Kristensen AK, Roepstorff P, Bennett EP, Nielsen PA, Hollingsworth MA, Burchell J, Taylor-Papadimitriou J, Clausen H. (1997):  
**Substrate specificities of three members of the human UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, GalNAc-T1, -T2, and -T3.**  
*J Biol Chem.*, 272(38):23503-14.

Wang LH, Rothberg KG, Anderson RG. (1993):  
**Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation.**  
*J Cell Biol.*, 123(5):1107-17.

Weinstein J, de Souza-e-Silva U, Paulson JC. (1992):  
**Sialylation of glycoprotein oligosaccharides N-linked to asparagine. Enzymatic characterization of a Gal beta 1 to 3(4):GlcNAc alpha 2 to 3 sialyltransferase and a Gal beta 1 to 4GlcNAc alpha 2 to 6 sialyltransferase from rat liver.**  
*J Biol Chem.*, 257(22):13845-53.

Williams, S.J.; McGuckin, M.A.; Gotley, D.C.; Eyre, H.J.; Sutherland, G.R.; Anatalis, T.M. (1999):  
**Two novel mucin genes down-regulated in colorectal cancer identified by differential display.**  
*Cancer Res.* 59: 4083-4089.

Williams, S.J.; Munster, D.J.; Quinn; R.J. (1999):  
**The MUC3 gene encodes a transmembrane mucin and is alternatively spliced.**  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 83-9.

Williams, S.J.; Wreschner, D.H.; Tran, M.; Eyre, H.J.; Sutherland, G.R.; McGuckin, M.A. (2001):  
**MUC13, a novel human cell surface mucin expressed by epithelial and hemopoietic cells.**  
*J. Biol. Chem.* 276: 18327-18336.

Wittmann V., Eds. B. Fraser-Reis, K. Tatsuta, J. Thiem, (2008):  
**Chemistry and Chemical Biology**  
*Glycoscience*, 2. Aufl.; 2253-2303.

Wittmann V., Eds. B. Fraser-Reis, K. Tatsuta, J. Thiem, (2008):  
**Occurrence and Significance**  
*Glycoscience*, 2. Aufl.; 1735-1770.

Wreschner, D.H.; Hareuveni, M.; Tsarfaty, I.; Smorodinsky, N.; Horev, J.; Zaretsky, J.; Kotkes, P.; Weiss, M.; Lathe, R.; Dion, A. (1990):

**Human epithelial tumor antigen cDNA sequences. Differential splicing may generate multiple protein forms.**

*Eur. J. Biochem.* 189: 463-473.

Yamada S, Noma M, Hondo K, Konno T, Ishihara T. (2007):

**Preparation and addition-elimination reactions of benzyl alpha,beta,beta-trifluoroacrylate. A new stereoselective approach to (Z)-beta-substituted alpha,beta-difluoroacrylates.**

*J Org Chem.*, 73(2):522-8.

Yamamoto, M.; Bharti, A.; Li, Y.; Kufe, D. (1997):

**Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion.**

*J. Biol. Chem.* 272: 12492-12494.

Yamashita K, Kamerling JP, Kobata A. (1982):

**Structural study of the carbohydrate moiety of hen ovomucoid. Occurrence of a series of pentaantennary complex-type asparagine-linked sugar chains.**

*J Biol Chem.*, 257(21):12809-14.

Yamashita K, Ohkura T, Tachibana Y, Takasaki S, Kobata A. (1984):

**Comparative study of the oligosaccharides released from baby hamster kidney cells and their polyoma transformant by hydrazinolysis.**

*J Biol Chem.*, 259(17):10834-40.

Yamashita, Y.; Chung, Y.S.; Sawada, T.; Kondo, Y.; Hirayama, K.; Inui, A.; Nakata, B.; Okuno, M.; Horie, R.; Saito, T. (1994):

**A new cancer-associated antigen defined by a monoclonal antibody against a synthetic carbohydrate chain.**

*Int. J. Cancer* 58. 349-355.

Yin, B.W.; Lloyd, K.O. (2001):

**Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16.**

*J. Biol. Chem.* 276: 27371-27375.

Yolken, R.H.; Peterson, J.A.; Vonderfecht, S.L.; Fouts, E.T.; Midthun, K.; Newburg, D.S. (1992):

**Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis.**

*J. Clin. Invest.* 90: 1984-1991.

Yuen, C.T.; Lawson, A.M.; Chai, W.; Larkin, M.; Stoll, M.S.; Stuart, A.C.; Sullivan, F.X.; Ahern, T.J.; Feizi, T. (1992):

**Novel sulfated ligands for the cell adhesion molecule E-selectin revealed by the neoglycolipid technology among O-linked oligosaccharides on an ovarian cystadenoma**

glycoprotein. *Biochemistry* 31:9126-31.

Zannettino AC, Bühring HJ, Niutta S, Watt SM, Benton MA, Simmons PJ. (1998):  
**The sialomucin CD164 (MGC-24v) is an adhesive glycoprotein expressed by human hematopoietic progenitors and bone marrow stromal cells that serves as a potent negative regulator of hematopoiesis.**

*Blood.*, 92(8):2613-28.

Zrihan-Licht, S.; Baruch, A.; Elroy-Stein, O.; Keydar, I.; Wreschner, D. H. (1994):  
**Tyrosine phosphorylation of the MUC1 breast cancer membrane proteins cytokine receptor-like molecules.**

*FEBS Lett.* 356: 130-136

## Abstract

The apical transmembrane glycoprotein MUC1 is Endozytosed to follow Golgi-mediated recycling or MVB-mediated exosomal export. The observed differential O-glycosylation of secreted and membrane MUC1 isoforms may be dependent on functional recycling to the plasma membrane. To address this question we used recombinant epitope-tagged MUC1 (MUC1-M) and mutant forms with abrogated Clathrin-mediated endozytosis (MUC1-M-Y20+60/N) or blocked recycling (palmitoylation-defective MUC1-M-CQC/AQA). We show that the CQC/AQA mutant accumulates in endosomal compartments and is shed at strongly reduced levels from the plasma membrane. Intriguingly, O-glycosylation of the shed MUC1 ectodomain subunit changes from preponderant sialylated core 1 (MUC1-M) to core 2 glycans on the non-recycling CQC/AQA mutant. The O-glycoprofile of the non-recycling CQC/AQA mutant resembles the core 2 glycoprofile on a secretory MUC1 probe that transits the Golgi complex only once. Exosomal targeting on the other hand, is associated with a high-mannose-type glycoform of the small transmembrane MUC1-M subunit compared to a pattern of complex-type N-glycans on plasma membranous glycoforms. Accordingly, a blocked processing of high-mannose type N-glycans by inhibiting Glukosidases I and II with deoxynojirimycin resulted in significantly decreased cell surface levels of MUC1-M. While modulated O-glycosylation may result from functional membrane recycling, differential N-glycosylation on the small subunit appears to control the trafficking routes of MUC1 by sorting of immature glycoforms either for recycling and continued processing or for exosomal export.

## Erklärung zur Dissertation

Ich erkläre hiermit, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken in der Arbeit sind als solche kenntlich gemacht. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten. Keine weiteren Personen waren bei der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die vorgelegte Arbeit wurde von mir weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zwecke einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt und ist - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden. Es haben keine früheren weder erfolgreiche noch erfolglose Promotionsversuche stattgefunden.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. F.-G. Hanisch betreut worden.

Leverkusen, den 19.04.2013

.....  
Hanieh Razawi

# Lebenslauf

## Angaben zur Person

---

Name	Hanieh Razawi
Adresse	Wiesdorfer Platz 21, 51373 Leverkusen
Telefon	0176-11271434
Fax	0214-20609281
e-mail	Hanieh.Razawi@alere.com
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	10.06.1982
Führerschein	Klasse B

## Arbeitserfahrung

---

Datum (von – bis)	01.08.2011- Jetzt
Name und Adresse des Arbeitgebers	Alere GmbH Köln, Am Wassermann 28, 50829 Köln
Tätigkeitsbereich oder Branche	Diagnostik
Beruf oder Funktion	Produktspezialistin
Wichtigste Tätigkeiten und Zuständigkeiten	Molekularbiologie/Mikrobiologie/Infektiologie

## Promotionsarbeit

Datum (von – bis)	15.05.2006 - 31.11.2010
Name und Adresse des Arbeitgebers	Prof. Dr. Franz-Georg Hanisch, Institut für Biochemie II (Medizinische Fakultät) der Universität zu Köln, Joseph-Stelzmann-Straße 52, 50931 Köln
Tätigkeitsbereich oder Branche	Medizinische Biochemie
Beruf oder Funktion	Promotionsstudentin
Wichtigste Tätigkeiten und Zuständigkeiten	Untersuchung der Rolle der Rezyklisierung in der O-Glykosylierung des transmembranären Glykoproteins MUC1

## Weiterbildung und Qualifizierung

---

### LVQ Weiterbildung GmbH (Mülheim an der Ruhr), Modulare Qualifizierung mit den Abschlüssen:

Datum (von-bis)	01.01.2011-01.07.2011
-----------------	-----------------------

- Projektmanagement (TÜV)
- Qualitätsbeauftragter (TÜV)
- Qualitätsmanagement (TÜV)
- Auditor (TÜV)
- Arbeitssicherheit SCC (LVQ)
- Umweltmanagement (LVQ)
- Englisch (LCCI)

## Studium

---

### Diplom-Biologie

Datum (von – bis)	15.10.1997 – 15.05.2006
Name und Art der Bildungseinrichtung	Universität zu Köln
Hauptfächer/berufliche Fähigkeiten	Genetik, Entwicklungsbiologie und Biochemie
Bezeichnung der erworbenen Qualifikation	Diplom-Biologie, Diplomnote: sehr gut

## **Schulbildung**

---

### **Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium**

Datum (von – bis)	1993 – 1997
Name und Art der Bildungs- oder Ausbildungseinrichtung	Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium <i>Holbein</i> in Augsburg
Hauptfächer/berufliche Fähigkeiten	Biologie, Chemie, Französisch
Bezeichnung der erworbenen Qualifikation	Allgemeine Hochschulreife, Abiturnote: 1,7