

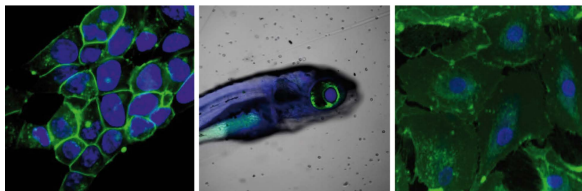


Judith Seltenreich (Autor)

In vivo Markierung von Glykostrukturen mit Hilfe neuartiger, bioorthogonaler Azid-Alkin 1,3-dipolarer Cycloadditionen

In vivo Markierung von
Glykostrukturen mit Hilfe neuartiger,
bioorthogonaler Azid-Alkin
1,3-dipolarer Cycloadditionen

Judith Seltenreich



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6744>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



2 Einleitung

Kohlenhydrate spielen im lebenden Organismus eine sehr wichtige Rolle. Die Grundbausteine aller Kohlenhydrate sind Monosaccharide, sogenannte Einfachzucker, wie Glukose, Galaktose oder Mannose. Sie sind wichtige Energielieferanten. Außerdem sind sie an Prozessen, wie Zell-Zell Erkennung, Zellschutz und Bildung von neuem Gewebe, beteiligt. Kohlenhydrate sind außerdem ein wesentlicher Grundbaustein der DNS (Desoxyribonukleinsäure). Besonders die individuelle Oberflächenbeschaffenheit von Zellen ist essentiell für die Erkennung vieler lebenswichtiger Faktoren. Zu diesen Faktoren gehören ganze Zellen, Proteine, Wachstumsfaktoren, und Botenstoffe sowie Pathogene und Wirkstoffe. Die Erkennung solcher Faktoren ist hoch spezifisch und individuell für jeden Zelltyp und basiert häufig auf Interaktionen mit entsprechenden Rezeptoren auf der extrazellulären Seite der Zellmembran. Neben den klassischen Protein-Rezeptoren spielen Protein- und Lipid-gebundene Glykostrukturen eine wichtige Rolle bei der Zellerkennung. Die großen Oligosaccharidbestandteile der Glykokonjugate bilden dabei eine Zuckerschicht auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran, die als Glykokalyx bezeichnet wird. (Pavelka and Roth 2010) Die Glykokalyx ist für jeden Zelltyp spezifisch und ändert sich häufig signifikant während der Zelldifferenzierung in der Embryogenese und Morphogenese oder bei pathogenen Prozessen wie z.B. der Tumorbildung. So besitzen beispielsweise kanzerogene Zellen eine andere Zuckerdekoration als gesunde Zellen. (Rambourg and Leblond 1967) Die Kohlenhydratschicht von Zellmembranen ist zum einen für die Zell-Zell-Wechselwirkung und zum anderen für die Interaktionen zwischen Zellen und der Umgebung verantwortlich. Außerdem beeinflusst eine Veränderung der Kohlenhydratstruktur sowohl die Zelldifferenzierung, als auch die neoplastische Transformation (Umwandlung einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle durch Aktivierung eines Onkogens). Organe und Gewebe unterscheiden sich demnach im Aufbau der Kohlenhydratverbindung der Zelloberfläche. Jede eukaryotische Zelle besitzt Kohlenhydrate an der Zelloberfläche. (Dabelsteen et al. 1991) Zudem sind diese Bausteine individuell je nach Entwicklungsstadium einer Zelle oder auch in bestimmten Zellverbänden, beispielsweise Geweben, exprimiert. (Espinosa-Marzal et al. 2013) Es existiert demnach eine Vielzahl unterschiedlicher Glykostrukturen und Glykane in Abhängigkeit der physiologischen Umgebung. Die Gesamtheit aller Kohlenhydratstrukturen in der Zelle oder im Organismus nennt man Glykom. Sowohl Glykoproteine, Proteoglykane und Glykolipide bestehen in einfacher, als auch in konjugierter Form aus Oligosacchariden (Glykanen). Da das Glykom nicht genetisch kodiert, sondern durch posttranslationale Modifizierungen von Proteinen und Lipiden generiert wird, ist es trotz vieler Einzelstudien bisher nicht gelungen, seine Rolle bei Zellerkennungsprozessen umfassend zu klären. (Argüeso 2013)



2.1 Die Glykokalyx

Die Glykokalyx leitet sich vom Griechischen, *glykos* = Zucker und *kalyx* = Mantel, ab. Sie ist ein Multikomponentensystem bestehend aus Glykoproteinen (Espinosa-Marzal et al. 2013), Glykolipiden, Proteoglykanen, Glykosaminoglykane (Dudas and Semeniken 2012; Gasimli et al. 2012), Bindungsproteinen, Enzymen, Rezeptorstellen und Antigenen. Unter anderem bildet sie auch die viskose Schleimhülle eukaryotischer Zellen und ist zwischen 200 nm und mehrere Mikrometer dick (Abbildung 2.1.1).

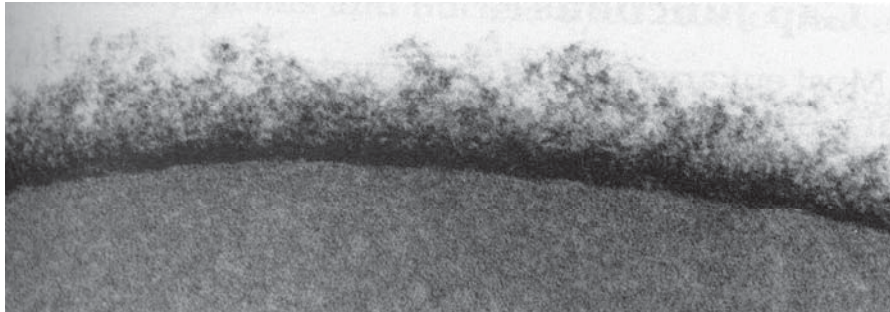


Abbildung 2.1.1| Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen einer Glykokalyx. Als Glykokalyx wird das Zuckergerüst auf der extrazellulären Seite der Zelloberfläche bezeichnet.(Voet and Voet 2004)

In vielen Fällen ermöglicht die Glykokalyx sogar erst, dass sich einzelne Zellen zu Zellverbänden zusammenschließen, indem sich gleichartig differenzierte Zellen an ihrem Oberflächenzuckermuster erkennen. Wie bereits oben erwähnt werden zahlreiche Funktionen, wie Zell-Zell-Erkennungsprozesse, Rezeptoreigenschaften, Zellhaftungsprozesse und Schutzfunktionen gegenüber Pathogenen der Glykokalyx zugeschrieben. Membranverankerte Glykoproteine und Glykolipide der Glykokalyx bilden eine essentielle Barrierefunktion.(Mauris et al. 2013) Beispielsweise schützen sie die Zelle vor Pathogenen, indem sie das Anhaften dieser vermeiden und somit deren Nährboden eliminieren. Außerdem verleiht die Glykokalyx den Zellen Antigen- und Blutgerinnungseigenschaften, die für das Immunsystem von außerordentlich großer Bedeutung sind.(Hudak et al. 2014) Schließlich kann gesagt werden, dass die Glykoproteine der Glykokalyx Träger der zellulären Immunisierung sind, da körpereigene Glykoproteine bereits eine starke Abwehr gegenüber körperfremden Glykoproteinen zeigen. Die wichtigsten Funktionen der Glykokalyx sind in der Tabelle 2.1.1 dargestellt.(Saladin 2011)

Tabelle 2.1.1| Die wichtigsten Funktionen der Glykokalyx.(Saladin 2011)

| Funktion der Glykokalyx | |
|--------------------------------|---|
| Schutzfunktion | Bedecken die äußere Zelloberfläche und dienen als Barriere- und Filterfunktion |
| Immunisierung | Fremde Organismen werden von ihr erkannt und an das Immunsystem selektiv weitergeleitet |



| | |
|--------------------------------|---|
| Schutz vor Tumorzellen | Veränderungen der Glykokalyx durch Tumorzellen werden sofort vom Immunsystem erkannt und zerstört |
| Gute Transplantationsfähigkeit | Hauptverantwortlich für die Verträglichkeit von Bluttransfusionen oder Organtransplantationen und für die Gewebsbildung |
| Gewebsbildung | Sorgt für den Zusammenschluss einzelner Zellen zu Zellverbänden |
| Befruchtung von Eizellen | Ermöglicht Spermien an ein Ei zu binden |
| Embryonalentwicklung | Embryonale Zellen werden an den Bestimmungsort im Organismus geführt |

Die wichtigsten Zucker der Glykokalyx sind Glukose, Galaktose, Fukose, *N*-Acetylglukosamin, *N*-Acetylgalaktosamin und *N*-Acetylneuraminsäure. Dabei sind die Zucker kovalent an Proteine und Lipide gebunden, die weit in den extrazellulären Raum hinausragen, aber auch fest in der Zellmembran verankert sind (Abbildung 2.1.2).

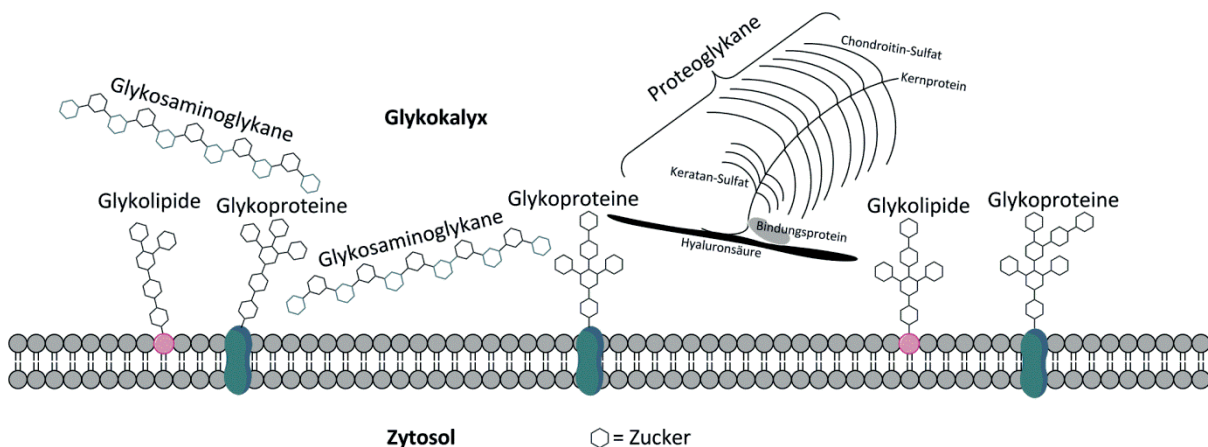


Abbildung 2.1.2| Aufbau der Glykokalyx. Zur Glykokalyx gehören Glykoproteine, Glykolipide, Proteoglykane, sowie Glykosaminoglykane. Die Oligosaccharide (Glykane) der Glykoproteinen, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Glykolipiden bilden den äußeren Zellmantel.

Im Allgemeinen ummanteln die Kohlenhydratstrukturen die Zelle auf der extrazellulären Seite der Zelloberfläche (Abbildung 2.1.1).(Voet and Voet 2004) Durch die Neubildung von Glykoproteinen, Proteoglykanen, Glykolipiden, Glykosaminoglykanen (GAG), und assoziierten Plasmaproteinen wird die Glykokalyx ständig regeneriert.(Trouillon and Ewing 2013) Dabei werden die Proteinstrukturen der Glykoproteine im rauen endoplasmatischen Retikulum (RER) gebildet und in den



Golgi Apparat transportiert. Dort werden die Zuckermoleküle an Proteine und Lipide gekuppelt. Diese Hauptbestandteile der Glykokalyx gelangen dann vom Golgi Apparat über den sekretorischen vesikulären Transport an die Plasmamembran.

2.2 Die endotheliale Glykokalyx

Die endotheliale Glykokalyx ist die kohlenhydratreiche Schutzschicht des vaskulären Endothels, des Magen-Darm-Traktes, der Atmungsorgane und der Urogenitalorgane (Harn- und Geschlechtsorgane). Sie besteht aus einer Vielzahl von Glykostrukturen überwiegend Heparan-Sulfaten, Chondroitin-Sulfaten, Glypican-1 und Syndecan-1 bzw. Glycosaminoglykanen (GAGs). (Cruz-Chu et al. 2014; Frati-Munari 2013; Zeng and Tarbell 2014) Die Glykokalyx wird durch weitere lösliche Plasmakomponenten der Extrazellulärmatrix erweitert, die direkt oder über lösliche Proteoglykane und GAG miteinander verlinkt werden können. Dadurch wird ein Netzwerk aus membrangebundenen Proteoglykanen und GAGs gebildet, über das auch lösliche Moleküle eingebaut werden können. Schließlich entsteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der löslichen Molekülschicht und der Schicht mit dem zirkulierenden Blut (Abbildung 2.2.1). Dieses Gleichgewicht ist letztendlich für den Aufbau und die Dicke der endothelialen Glykokalyx verantwortlich. Die Glykokalyx des Endothels ist aufgrund ihrer ständigen Regeneration sehr dynamisch. Zudem steht der membrangebundene Anteil ständig in Kontakt mit löslichen Glykokalyx-Bestandteilen, die ebenfalls andocken und wieder ausgetauscht werden, sodass es keine Grenze zwischen lokal synthetisierten und assoziierten Elementen gibt. (Reitsma et al. 2007) Aus diesem Grund ist es schwierig, die Glykokalyx geometrisch zu definieren. Sie ist demnach mit einem Korallenriff vergleichbar, denn an ihr sind zahlreiche Strukturen gebunden, die sich gegen die (Blut-)Strömung stemmen und dabei Moleküle filtrieren können. (Chappell et al. 2008) Sie kleiden das gesamte Blut-Gefäß aus. *In vivo* Experimente haben bisher gezeigt, dass die endotheliale Glykokalyx in muskulären Kapillaren eine Dicke von ungefähr 0,5 μm (Vink and Duling 1996) in Arterien 2 bis 3 μm (van Haaren et al. 2003) und in den großen Arterien, wie der Aorta, sogar 4,5 μm (Megens R.T.A 2007) besitzen kann. Neben der Filter- und Barrierefunktion (Lipowsky 2012) werden der endothelialen Glykokalyx weitere physiologische Funktionen zugeschrieben. Sie gehört zusammen mit den Plasmaproteinen zur Oberflächenschicht der Blutgefäße (engl. *endothelial surface layer*, ESL) (Fu and Tarbell 2013; Pries et al. 2000b) Je dünner diese Schicht ist, desto mehr steigt die Permeabilität der Gefäßwand, d.h. umso poröser wird sie. Es wird auch davon ausgegangen, dass die Glykokalyx physiologisch und pathophysiologisch für zahlreiche Krankheiten wie Hyperglykämie (Überzucker) (Nieuwdorp et al. 2006), septischer Schock (Nelson et al. 2008), Arteriosklerose (Nieuwdorp et al. 2005) und Ischämie/Reperfusion (Rehm et al. 2007; van Golen et al. 2013) eine zentrale Rolle spielt. (Chappell et al. 2008) Jedoch ist diese Zuckerschicht, die bereits 1966 elektronenmikroskopisch von Luft nachgewiesen wurde, schwierig zu markieren. (Luft 1966) Ein Grund dafür ist, dass für die Elektronenmikroskopie das zu untersuchende Gewebe fixiert werden muss.

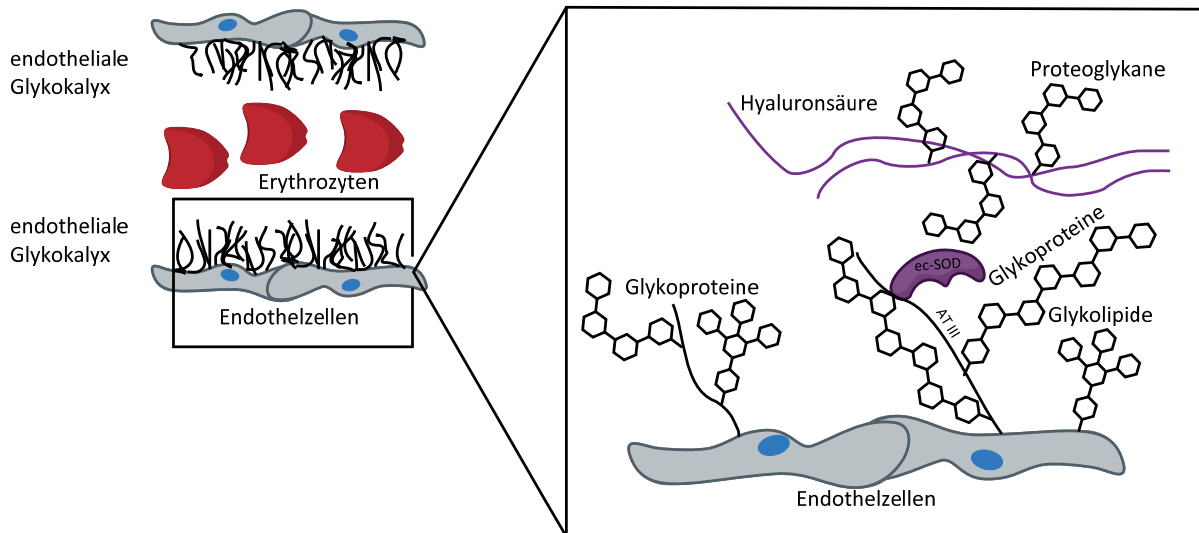


Abbildung 2.2.1| Schematischer Aufbau der endothelialen Glykokalyx. Auf der linken Seite ist die endotheliale Glykokalyx auf der luminalen Seite des vaskulären Endothels gezeigt. Auf der rechten Seite sind die Komponenten der endothelialen Glykokalyx dargestellt. Sowohl Proteoglykane mit ihren langen unverzweigten Glykosaminoglykan-Seitenketten (GAG-Seitenketten), als auch Glykoproteine mit ihren kurzen verzweigten kohlenhydrathaltigen Seitenketten sind fest mit den Endothelzellen verankert. An diese Kohlenhydrate sind weitere gelöste Komponenten, wie lösliche Proteoglykane, Hyaluronsäuren und zahlreiche andere Proteine (z.B. Enzyme wie die extrazelluläre Superoxid Dismutasen (ec-SOD) oder Blutgerinnungshemmstoffe wie Antithrombin III (AT III)), angelagert. Zusammen bilden sie die endotheliale Glykokalyx, die als Barriere zwischen Blutgefäßen und Endothelzellen fungiert. (Reitsma et al. 2007)

Allerdings ist die Glykokalyx sehr empfindlich und kann durch diesen Prozess vollständig zerstört werden. Ebenso kann eine zu hohe und lange Laserintensität die Schichtdicke der Glykokalyx stark herabsetzen. Daher bedarf es noch vieler Untersuchungen bezüglich der Visualisierung der endothelialen Glykokalyx. Zudem besteht noch deutlicher Aufklärungsbedarf hinsichtlich des Aufbaus und aller Funktionen. Dennoch ist bereits bekannt, dass die Glykokalyx ein wichtiger Faktor in der vaskulären Physiologie und Pathologie ist. (Fрати-Munari 2013; Pries et al. 2000a; Yang and Schmidt 2014)

2.3 Zusammensetzung der Glykokalyx

2.3.1 Glykoproteine

Die überwiegenden Bestandteile der Glykokalyx sind Glykoproteine. Im Allgemeinen kann gesagt werden, dass Glykoproteine für die zelluläre Immunität eine große Rolle spielen. Ein Beispiel ist hier das α -1-saure Glykoprotein (engl. *α -1-acid glycoprotein*, AGP), das in der Leber als Immunantwort einer Entzündung oder Infektion gebildet wird. Es ist ein Protein aus 183 Aminosäuren mit fünf N-gebundenen Glykanen, die 45% der Gesamtmasse von 43 kDa ausmachen. (Fournier et al. 2000) Auch bei der Bildung und Entwicklung des zentralen Nervensystems (engl. *central nervous system*, ZNS) bilden Glykoproteine ein wichtiges Fundament. Die meisten Glykoproteine können sowohl als membrangebundene Glykoproteine, wie beispielsweise Kanalproteine oder Rezeptoren, als auch in gelöster Form, wie beispielsweise als Transport-



proteine oder Serumproteine, vorliegen. Im Organismus werden Glykoproteinen zahlreiche Funktionen zugeschrieben. Sie dienen zum einen als Wechselwirkungspartner in Zell-Zellerkennungsprozessen und zum anderen sind sie für die Kommunikation der Zelle mit deren Umgebung verantwortlich. Zusätzlich zu den integralen Glykoproteinen können weitere Glykoproteine an die Zellmembran adsorbieren, die wiederum untereinander vernetzt sein können. Glykoproteine sind aus einem Protein und einer oder mehrerer kovalent aneinander gebundenen Kohlenhydratverbindung (Monosaccharide, Disaccharide oder Polysaccharide) aufgebaut. Die meisten Glykoproteine lassen sich in drei Gruppen unterteilen: i) die *N*-gebundenen Glykane, die durch eine β -*N*-glykosidische Bindung an eine Polypeptidkette anknüpfen, ii) die *O*-gebundenen Glykane, die über eine α -*O*-glykosidische Bindung an eine Polypeptidkette gebunden sind und iii) Glykosylphosphatidylinositol (GPI) Membran-Anker, die über eine Amid-Gruppe zwischen dem Mannose-6-Phosphoethanolamin und dem terminalen C-Atom der Carboxylgruppe an eine Polypeptidkette gebunden ist. Dabei werden die Kohlenhydrat-Gruppen kovalent an Asparagin (Asn)-, Serin (Ser)-, Threonin (Thr)- oder Hydroxylysinreste gebunden. Die Länge der gebundenen Kohlenhydrate kann dabei stark variieren. (Lange et al. ; Marti et al. 1988)

2.3.1.1 *N*-Glykane

Bei einer *N*-Glykosylierung (Zhang et al. 2004) ist ein Glykan direkt an den Asn-Rest der Proteinsequenz -Asn-X-Ser/Thr- gebunden, wobei X eine Aminosäure ist. (Abbildung 2.3.1).

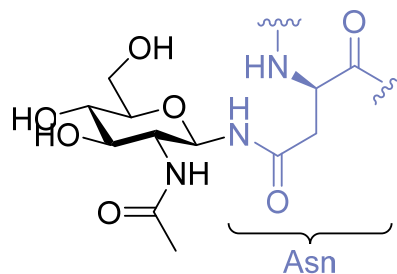


Abbildung 2.3.1| *N*-gebundenes Glykan (*N*-Acetylglucosamin, *N*-gebundenes GlcNAc). Bei einem *N*-gebundenen GlcNAc assoziiert ein Glucosamin an einem Asparagin(Asn)-Rest der Proteinsequenz -Asn-X-Ser/Thr-. Dabei ist X eine beliebige Aminosäure (mit Ausnahme von Prolin).

Bei einem klassischen Glykoprotein besteht die Grundstruktur (*core*) aus zwei *N*-Acetylglucosamin- und drei Mannose-Einheiten (Abbildung 2.3.2). An die terminale Mannose-Sequenz können weitere Oligosaccharidketten, auch Antennen genannt, gebunden sein. *N*-gebundene Glykoproteine werden in vier Schritten synthetisiert: 1. Synthese des lipidgebundenen Kohlenstoffvorläufers Dolicholphosphat, 2. Transfer der Dolicholphosphatkette an eine *N*-gebundene Polypeptidseite des Asn-Restes, 3. Entfernen einiger Zuckervorläufer und 4. die Addition der dabei entstandenen Zucker-Ketten an den „Core“. Die Glykosylierung der Proteine findet im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und im Golgi Apparat statt. (Berg et al. 2007) Synthetisiert werden die *N*-Glykane im RER. Verantwortlich für den Aufbau der



Glykoproteine ist Dolicholphosphat, ein in der ER-Membran lokalisiertes Lipidmolekül bestehend aus mindestens 20 Isopren-(C₅-)Einheiten (Abbildung 2.3.3).

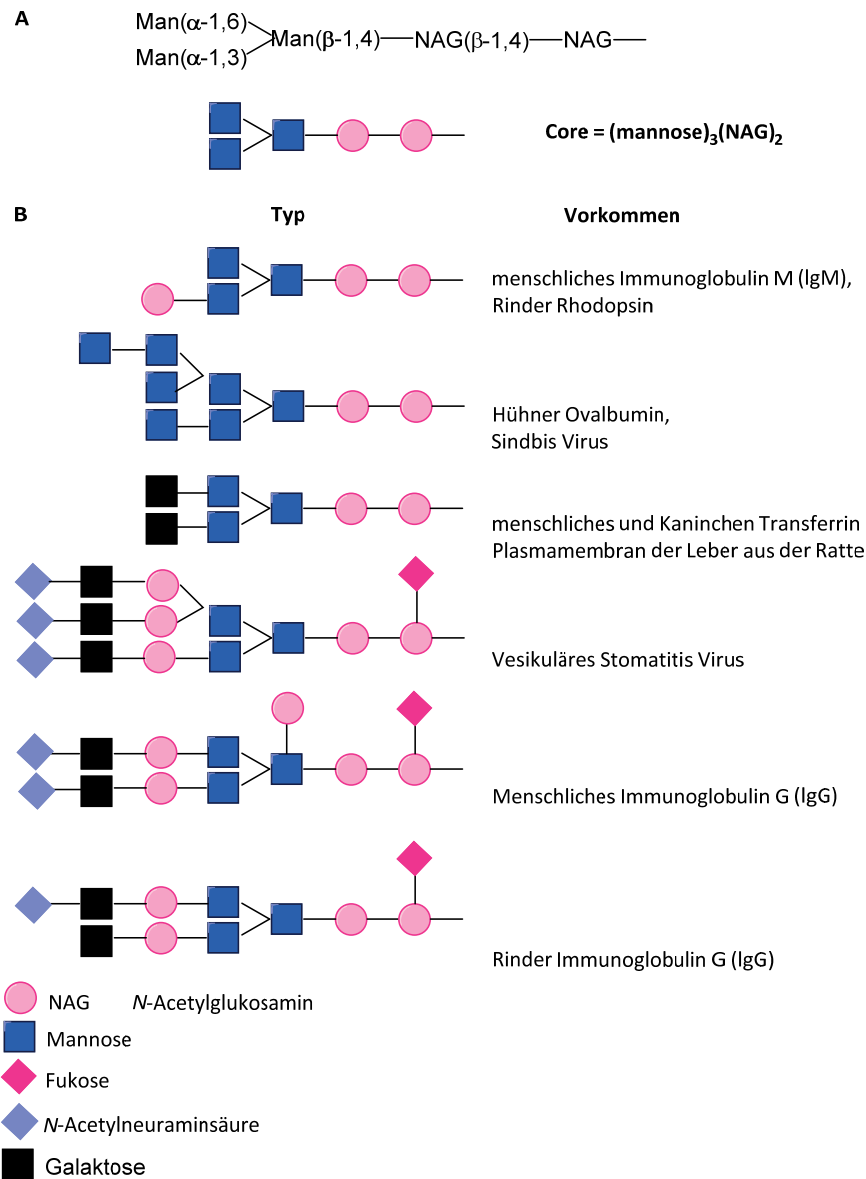


Abbildung 2.3.2| N-gebundene Oligosaccharide. **A**, Kernstruktur (Core) des N-gebundenen Glykans, (mannose)₃(NAG)₂. Jedes N-gebundene Glykoprotein besitzt ein Pentasaccharid-Core. Dieser Core dient als Grundstruktur für zahlreiche N-gebundenen Glykoproteine. **B**, Einige Beispiele zu N-gebundenen Oligosacchariden.(Berg et al. 2007; Dorland et al. 1981; Voet and Voet 2004)

Dolicholphosphat fixiert wachsende Saccharidketten an der RER-Membran. Vor dem Transport zum Golgi Apparat wird Dolicholphosphat hydrolysiert. Dabei entsteht Dolicholmonophosphat, an das zwei N-Acetylglukosamineinheiten (UDP-aktiviert) und fünf Mannoseeinheiten (GDP-aktiviert) angehängt werden. Außerdem gibt es für jede Zuckereinheit an die Kette eine Monosaccharid-spezifische Glykosyltransferase. Anschließend kommt es zur Translokation des dabei entstandenen Dolichol-PP-Oligosaccharids von der zytosolischen Seite in das Lumen des ERs.(Berg et al. 2007)

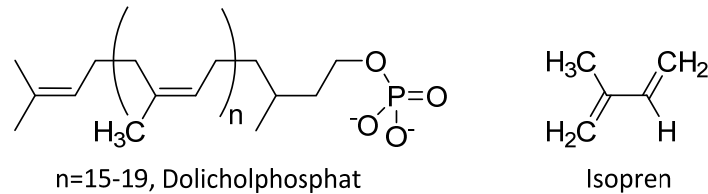


Abbildung 2.3.3| Dolicholphosphat. Die terminale Phosphatgruppe ist die Bindungsstelle des aktivierten Oligosaccharids, die anschließend auf einen Asn-Rest der Polypeptidkette übertragen wird.

Dadurch werden auch neue an Dolicholmonophosphat gebundene Zucker ins Lumen des ERs transportiert, sodass die Zuckeraddition im Lumen des ERs fortgesetzt werden kann. Nach der korrekten Faltung des Glykoproteins wird eine Mannoseeinheit über eine α -1,2-Mannosidase entfernt und das Glykoprotein wird in einem vesikulären Transport zum Golgi Apparat transportiert. Die Glykoproteine werden im Golgi Apparat mit *N*-Acetylglukosaminphosphatresten versehen. Die fertig synthetisierten Glykoproteine werden dann an die Zelloberfläche exozytiert, wo sie schließlich am Aufbau der Glykokalyx beteiligt sind. (Voet and Voet 2004)

2.3.1.2 O- Glykane

Bei einem O-gebundenen Glykan wird ein Glukosamin an die Hydroxyl(OH-)-Gruppe von Ser- oder Thr-Resten gekuppelt (Abbildung 2.3.4). Die O-Glykosylierung findet ausschließlich im Golgi Apparat statt. Dabei gilt der Golgi Apparat als Sortierungszentrum von Glykoproteinen zur Plasmamembran und den Lysosomen. Ein Fehler während der Glykosylierung kann zu Stoffwechselkrankheiten führen. Eine genaue Funktion und Anheftung der Kohlenhydrate an die Proteine ist besonders wichtig für deren Stabilität, Verarbeitung und Zielsteuerung (*targeting*). Demnach ist die richtige Modifikation von Proteinen durch Kohlenhydrate sehr wichtig. So ist beispielsweise die Muskeldystrophie, bekannter unter dem Namen CDG-Syndrom (*congenital disorders of glycosylation*, angeborene Erkrankung der Glykosylierung) auf unzureichende Glykosylierung von Membranproteinen zurückzuführen. (Jaeken and Matthijs 2007; Lehle et al. 2006; Morava et al. 2008)

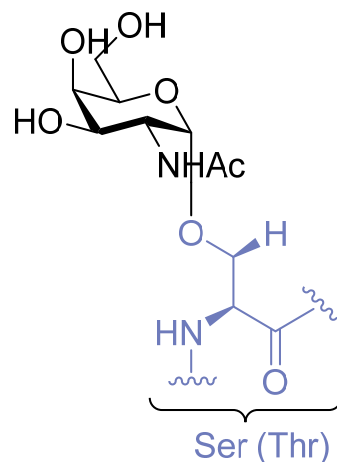


Abbildung 2.3.4| O-gebundenes Glykan (O-Acetylgalaktosamin, O-gebundenes GalNAc). Bei O-gebundenen GalNAc wird ein Glukosamin an die Hydroxyl(OH-)-Gruppe von Ser bzw. Thr angelagert.



2.3.1.3 Mucin1

Bereits 1890 konnte Emil von Behring (Nobelpreis für Physiologie und Medizin 1901) zeigen, dass kranke Zellen vom Organismus selbst produzierende, endogene Moleküle, wie Glykolipide, Glykoproteine und Proteine, tragen, die wiederum nur schwach immunogen sind, sodass der Organismus gegenüber dieser Art der Zuckerstrukturen eine natürliche Toleranz aufweist. (Kunz et al. 2012) 83 Jahre später hat Springer et al. festgestellt, dass sich die Membran von Glykoproteinen von normalen Epithelzellen und epithelialen Tumorzellen unterscheiden. (Springer 1984) Verantwortlich dafür sind die Kohlenhydratseitenketten. Im Fokus steht vor allem das in die äußere Zellmembran verankerte Glykoprotein Mucin1. Mucin1 gehört zu den Glykoproteinen, dass in der äußeren Zellmembran verankert ist. Aufgrund seiner hohen Glykosylierung kann das Mucin1 weit in den extrazellulären Raum hinausragen und deckt an den Stellen das Proteinrückgrat vollständig ab (Abbildung 2.3.5). (Linden et al. 2008) Im Vergleich dazu sind die Kohlenhydratseitenketten epithelialer Tumorzellen häufig sehr viel kürzer und liegen in sialylierter Form vor. Diese Kohlenhydratseitenketten werden somit als tumorassoziierte Kohlenhydratantigene bezeichnet. Die kurzen Saccharidseitenketten sind α -glykosidisch an Ser oder Thr geknüpft und gelten als assoziierte Kohlenhydratantigene. Mucin1 wird auf fast allen Epithelzellen exprimiert, dazu zählen beispielsweise Epithelzellen der Brust, der Prostata, des Dickdarms und des Pankreas. Auf den epithelialen Tumorzellen ist Mucin1 jedoch stark überexprimiert und wird daher als Tumormarker eingesetzt. (Hanisch and MÄ¼ller 2000; Singh and Bandyopadhyay 2007a) Der extrazelluläre Teil des Mucin1 besteht aus Wiederholungssequenzen, sogenannten „*Tandem Repeats*“, bestehend aus fünf potenziellen O-Glykosylierungsstellen, drei Threonin- und zwei Serin-Resten. (Singh and Bandyopadhyay 2007b)

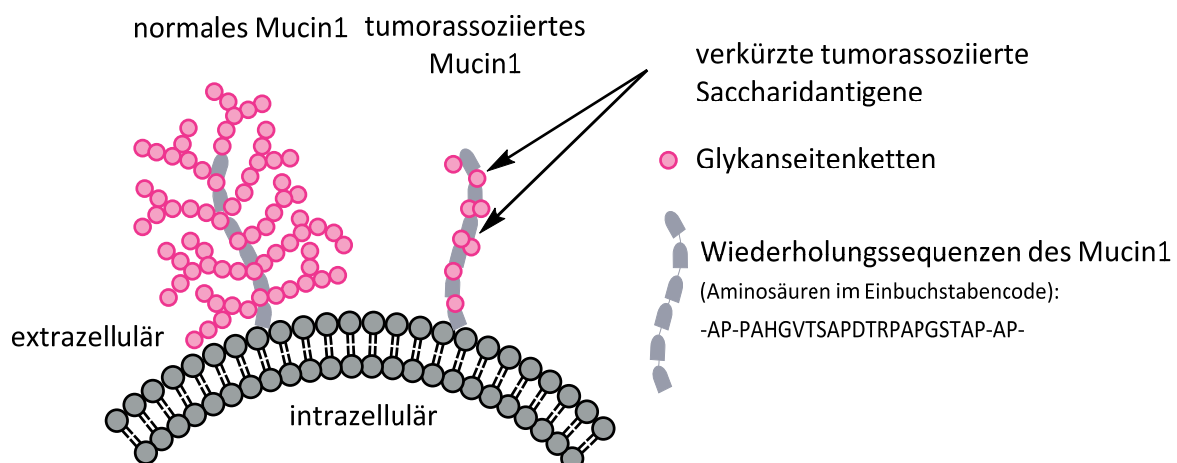


Abbildung 2.3.5] Normales und tumorassoziiertes Mucin1 auf Epithelzellen. Zu sehen ist das Mucin1 Membranglykoproteingerüst. Auf normalen Epithelzellen ragen die Glykanseitenketten weit in den extrazellulären Raum hinaus, währenddessen die Kohlenhydratseitenketten auf Tumorzellen verkürzt vorliegen. (Kunz et al. 2012)

Aufgrund der Größe (300-400 kDa) und der negativen Ladungen an der Zelloberfläche verhindert es die Adhäsion anderer Zellen und Mikroorganismen an Epithelzellen. Da es sogar die Mikrovilli (Ausstülpung der Zelloberfläche) überragt, verhindert



Mucin1, dass Bakterien an die äußeren Epithelzellwände gelangen. Studien haben jedoch gezeigt, dass Mucin1 von Tumorzellen zur Immunisierung weniger spezifisch eingesetzt werden kann, da auf jedem Proteinstrang von tumorassoziiertem Mucin1 sowohl kurze, als auch lange Kohlenhydratseitenketten abwechselnd verankert sind. Demnach lassen sich reine tumortypische Glykoproteinstrukturen nicht isolieren. (Kunz et al. 2012; Prof. Dr. Horst Kunz 2012) In den vergangenen Jahren gewann das Mucin1 immer mehr an Bedeutung, da es vor allem für eine Immundifferenzierung zwischen Normal- und Tumorzellen einsetzbar ist.

2.3.2 Proteoglykane

Neben den klassischen Glykoproteinen bilden die Proteoglykane eine wichtige Klasse der Glykostrukturen, die bei der Zellerkennung eine Rolle spielen. Dabei aggregieren Proteine und Glykosaminoglykane (GAG) sowohl kovalent als auch nicht kovalent miteinander. (Hacker et al. 2005) Sie sind ein wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix als auch der Zelloberfläche und bilden zusammen mit den Glykoproteinen und Glykolipiden die Glykokalyx. (Reitsma S. 2007) Dabei bilden sie große Komplexe zu anderen Proteoglykanen, zu Hyaluronsäure und zu Faserproteinen, wie beispielsweise Kollagen. Sie spielen auch eine Rolle bei der Bewegung von Molekülen durch die extrazelluläre Matrix. Dadurch können sie die Aktivität und Stabilität von Proteinen in der Matrix beeinflussen. Somit werden Proteoglykanen zahlreiche Funktionen zugeschrieben: i) zum einen sind sie an der Gewebsbildung, ii) an der Filterfunktion (Sortierung der Moleküle nach Größe und Polarität) und iii) an der Regulierung der Proteinaktivierung beteiligt. Folglich bilden sie große Komplexe. Sie bestehen aus einem zentralen, Zellmembran-durchspannenden oder Lipid-gebundenen Proteinrückgrat und einer oder mehreren linearen Zuckerketten, den sogenannten Glykosaminoglykanen. Diese Glykosaminoglykane setzen sich aus bis zu 1000 repetitiven Disaccharideinheiten (bis zu 50.000 bei Hyaluronsäuren) zusammen, die im Allgemeinen aus einer Uronsäure und einem sulfatierten Aminosucker (Glykosamin) bestehen. Anhand der Zusammensetzung ihres Disaccharids unterscheidet man zwischen Heparin und Heparan-Sulfat- (HS), Chondroitin-Sulfat- (CS), Dermatan-Sulfat- (DS), sowie Keratan-Sulfat- (KS) Proteoglykanen. (Grobe et al. 2002) Im Fall der Heparan-Sulfat-Proteoglykane bestehen diese Zuckerreste aus negativ geladenen *N*-acetylierten/*N*-sulfatierten Glukosamin- und D-Glucuronsäure- oder ihren C5-epimeren L-Iduronsäure-Resten. Aufgrund der Carboxylat- und Sulfatgruppen sind sowohl die Glykosaminoglykane als auch die durch sie modifizierten Proteoglykane stark negativ geladen und stark hydratisiert und können elektrostatische Wechselwirkungen mit positiv geladenen Interaktionspartnern eingehen. (Reitsma et al. 2007) Dazu gehören Rezeptoren anderer Zellen (Integrine, Rezeptor-Tyrosinkinasen, etc.), Proteine und Wachstumsfaktoren (z.B. *fibroblast growth factor* (FGF)), Signalmoleküle (Wnt, Hedgehog etc.), Chemokine, Enzyme (z.B. Lipasen) und andere Moleküle, die den Metabolismus der Zellen, den Transport von Wirkstoffen und auch den Informationstransfer innerhalb der Zelle beeinflussen. Proteoglykane sind maßgeblich an der Regulation der Zellmigration und Adhäsion sowie Signalmolekül-(Morphogen)-Gradienten beteiligt, die