

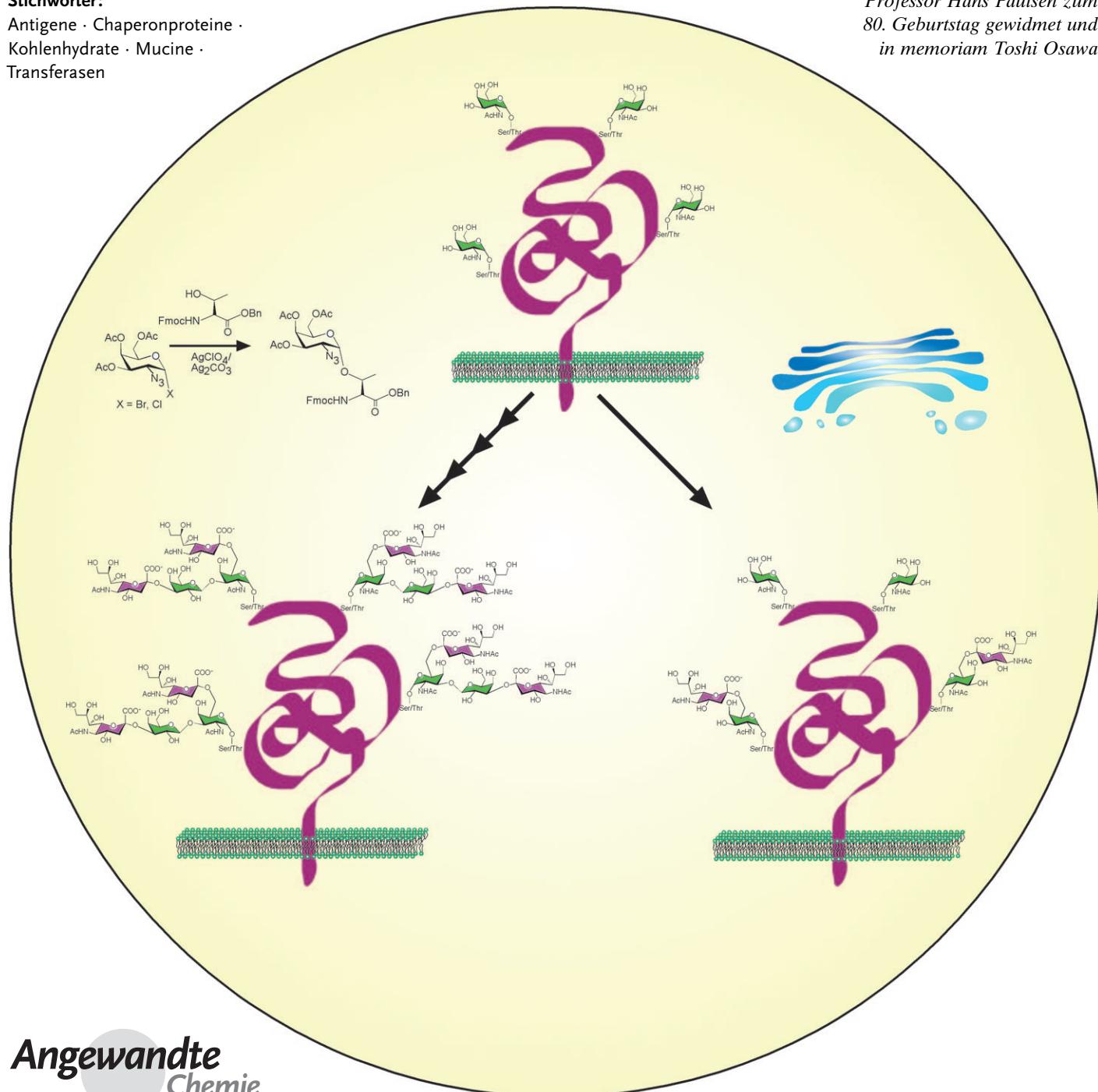
Das Tn-Antigen – strukturell einfach und biologisch komplex

Tongzhong Ju, Vivianne I. Otto und Richard D. Cummings*

Stichwörter:

Antigene · Chaperonproteine · Kohlenhydrate · Mucine · Transferasen

Professor Hans Paulsen zum 80. Geburtstag gewidmet und in memoriam Toshi Osawa



Die Glycoproteine tierischer Zellen enthalten vielfältige Glycanstrukturen, die co- und/oder posttranslational an die Proteine angeheftet werden. Mehr als zwanzig verschiedene Bindungsarten von Glycanen an Proteine sind bekannt, doch sind N-Glycane (gebunden an Asn) und O-Glycane (gebunden an Ser/Thr) die häufigsten. Ein abnormes O-Glycan, das bei Krebs und anderen menschlichen Erkrankungen auftritt, ist das Tn-Antigen. Es hat eine einfache Struktur, bestehend aus einem N-Acetyl-D-galactosamin, das α -glycosidisch an einen Serin- oder Threoninrest gebunden ist. Das Tn-Antigen war eines der ersten Glycokonjugate, die chemisch synthetisiert wurden. Es wird normalerweise von einer spezifischen Galactosyltransferase, der T-Synthase, im Golgi-Apparat modifiziert. Die Expression aktiver T-Synthase hängt vom molekularen Chaperon Cosmc ab, dessen Gen auf dem X-Chromosom liegt. Genmutationen, die die Funktion von T-Synthase, Cosmc oder anderen an der O-Glycosylierung beteiligten Faktoren beeinträchtigen, können zur Expression des Tn-Antigens führen. Da dieses bei einer Reihe von Krankheiten auftritt, besteht großes Interesse, es für die Entwicklung von Impfstoffen und anderen therapeutischen Ansätzen zu nutzen.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	1809
2. Molekulare Mechanismen der Expression des Tn-Antigens	1813
3. Das molekulare Chaperon Cosmc ist notwendig für die Bildung aktiver T-Synthase	1816
4. Die Funktionen von normalen, auf dem Tn-Antigen aufbauenden O-Glycanen vom Mucintyp	1817
5. Expression des Tn-Antigens im Zusammenhang mit menschlichen Krankheiten	1819
6. Tn-Antigen als Target zur Behandlung von Krankheiten	1823
7. Zusammenfassung und Ausblick	1824

1. Einleitung

1.1. Definition und Geschichte des Tn-Antigens

Die Entdeckung des Tn-Antigens war ein Meilenstein in der Geschichte der Glycowissenschaften und lieferte zudem eine der ersten Beschreibungen einer außergewöhnlichen Zuckerstruktur, die im Zusammenhang mit menschlicher Krankheit auftritt. Das Tn-Syndrom oder Tn-Polyagglutinierbarkeits-Syndrom wurde erstmals 1957 von Moreau et al. beschrieben.^[1] Die Autoren beobachteten ein ungewöhnliches Antigen auf den Erythrozyten eines Patienten, der an einer seltenen, erworbenen, hämolytischen Anämie litt. Diese Anämie war mit einer Polyagglutinierbarkeit der Erythrozyten bei Kälte verbunden, die unabhängig von der AB0(H)-Blutgruppe war.^[1] Schon 1925 hatten Huebner^[2] und 1927–1928 Thomsen^[3–5] beschrieben, dass gelagerte Erythrozyten normaler Blutspender agglutinieren können. Dieses Phänomen kam jedoch durch bakterielle Glycosidasen (Neuramidasen) zustande, die das T-Antigen (Gal β 1-3GalNAc1-O-Ser/Thr; Gal = Galactose, GalNAc = N-Acetylgalactosamin; Schema 1), auch Thomsen-Friedenreich- oder TF-Antigen genannt, freilegten. Auch dies war eine wegweisende Beobachtung, denn sie führte zur Entdeckung der Neuraminidase und des Bakteriums *Vibrio cholerae* als Quelle für dieses Enzym. Einmal freigelegt, konnte das T-Antigen durch vorbestehende Antikörper gebunden werden, wie Friedenreich 1930 feststellte.^[6] Dagegen agglutinierten die frisch gesammelten Blutproben des Tn-Syndrom-Patienten in der Kälte sofort. Man denkt heute, dass dies auf kalten Agglutininen vom Immunglobulin-M(IgM)-Typ beruht. Das Tn-Antigen wurde später als verkürzte Form einer der wichtigsten Gly-

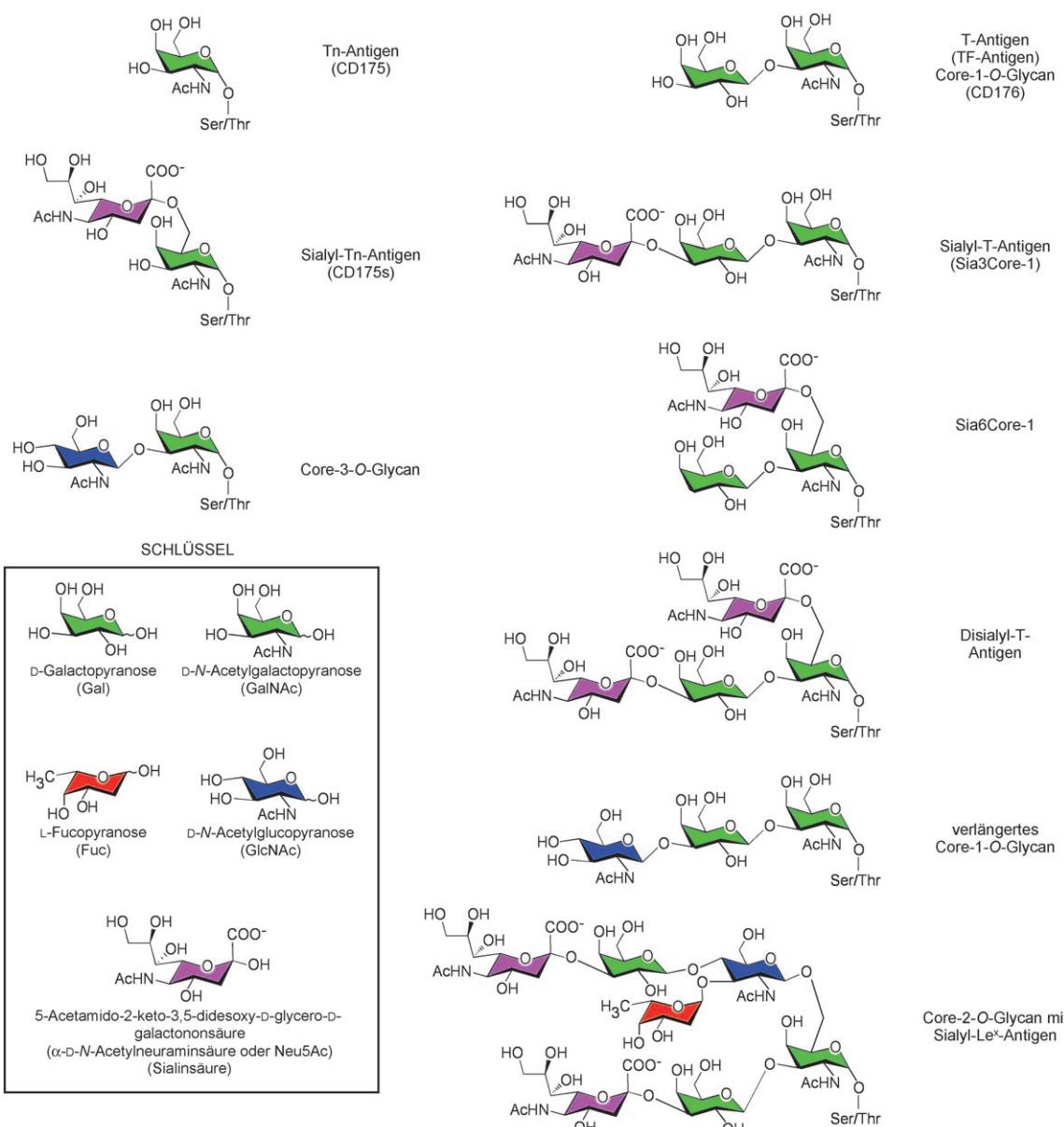
cosylierungsarten tierischer Glycoproteine erkannt und hat die einfache Struktur GalNAc1-O-Ser/Thr (Schema 1). Die historische Benennung des Tn-Antigens geht auf die Beobachtung von Moreau et al. zurück, dass es ähnlich zum T-Antigen und doch verschieden davon ist. Dies führte zur Bezeichnung „T antigen nouvelle“ oder Tn-Antigen.^[1,7] Im Sprachgebrauch der „Cluster of Differentiation“-Antigene ist das Tn-Antigen CD175, seine sialylierte Version (Sialyl-Tn) CD175s. Das Disaccharid-T-Antigen wird als CD176^[8–11] bezeichnet.

Dahr et al. berichteten 1974, dass das Tn-Antigen, das in Glycoproteinen menschlicher Erythrozyten vorkommt, ein kryptisches GalNAc-haltiges Antigen sei.^[12] Die Struktur des Tn-Antigens wurde schließlich 1975 wiederum durch Dahr et al. aufgeklärt, die mithilfe von Gas-flüssig-Chromatographie zeigen konnten, dass tryptische Glycopeptide aus Erythrozyten von Patienten mit Tn-Syndrom Ser/Thr-gebundenes GalNAc enthielten.^[13] Sie zeigten auch, dass die Behandlung von Glycoproteinen mit niedrig konzentrierter

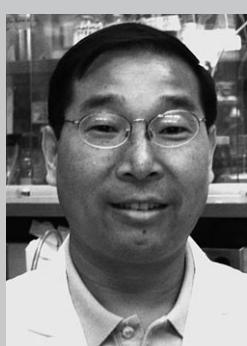
[*] T. Ju, Dr. R. D. Cummings
Department of Biochemistry
Emory University School of Medicine
O. Wayne Rollins Research Center
1510 Clifton Road, Suite 4001
Atlanta, GA 30322 (USA)
Fax: (+1) 404-727-2738
rdcummi@emory.edu

V. I. Otto
Institut für Pharmazeutische Wissenschaften
ETH Zürich, 8093 Zürich (Schweiz)

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201002313> zu finden.



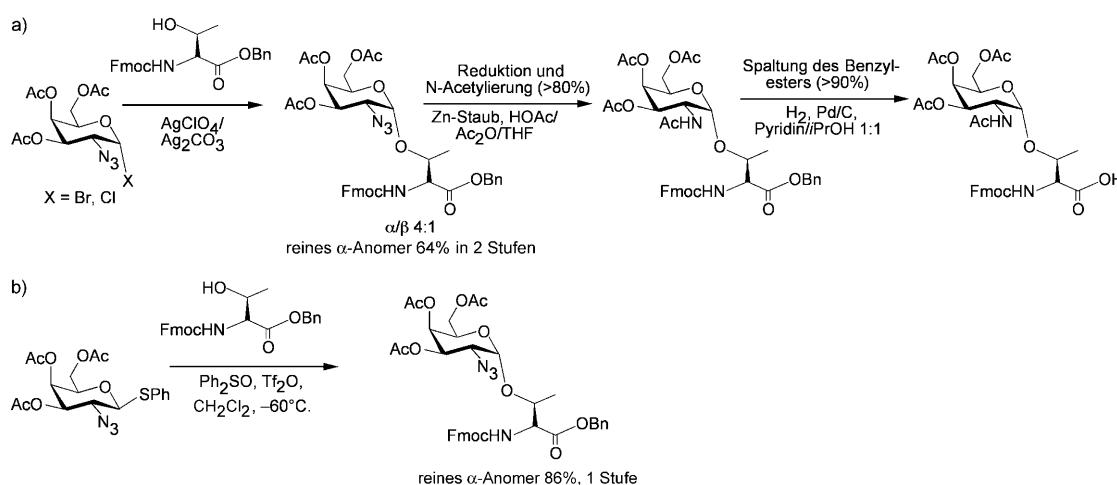
Schema 1. Die Strukturen des Tn-Antigens und davon abgeleiteter O-Glycane. Das Tn-Antigen ist die Vorstufe für viele Arten von O-Glycanen, die als Core-1-, Core-2- und Core-3-Strukturen bezeichnet werden. Diese können weiter modifiziert werden, wie in Schema 3 gezeigt.



Tongzhong Ju erhielt den Titel eines Dr. med. am Qingdao Medical College (1986) und einen PhD in Biochemie (1994) von der Medizinischen Fakultät der Fudan University Shanghai (China). Sein Postdoktorat in Biochemie/Glycobiologie absolvierte er bei Richard D. Cummings und William M. Canfield (1997–1999) und arbeitete anschließend als Research Associate (1999–2001) und Research Assistant Professor (2002–2006) am Oklahoma University Health Sciences Center (OUHSC). Seit 2006 ist er Assistant Professor am Department für Biochemie der Emory University School of Medicine in Atlanta, Georgia.



Vivianne I. Otto erhielt ihr Diplom in Pharmazeutischen Wissenschaften (1987) und ihren Doktorstitel in Naturwissenschaften (1997) an der ETH Zürich (Schweiz). Nach einem Postdoktorat über Neuroinflammation am Universitätsspital Zürich bei M. C. Morganti-Kossmann (1997–2001) schloss sie sich Richard D. Cummings' Gruppe am Oklahoma University Health Sciences Center (OUHSC) an (2001–2003). Sie habilitierte sich 2006 und ist seither als Privatdozentin am Departement Chemie und Angewandte Biowissenschaften der ETH Zürich tätig.



Schema 2. Chemische Synthese des Tn-Antigens durch α -Glycosylierung von Ser- oder Thr-Bausteinen. Bezüglich der hier dargestellten Synthesestrategien siehe Text und Literaturzitate. In (a) wird ein Azidozucker-Halogen-Donor verwendet,^[22, 32–40, 334, 335] in (b) ein Azidozucker-Thiophenyl-Donor.^[24] Bn = Benzyl, Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, Tf_2O = Trifluormethylsulfonsäureanhydrid.

NaOH in Gegenwart von Natriumborhydrid (NaBH_4) eine β -Eliminierung auslöste,^[14, 15] die *N*-Acetylgalactosaminitol aus diversen Glycoproteinen der Erythrozytenmembran freisetzte. Die chemische Struktur des T-Antigens als Disaccharid Gal β 1-3GalNAc1-*O*-Ser/Thr wurde schon früher, nämlich 1960, von Klenk und Uhlenbrück aufgeklärt.^[16] Interessant ist, dass das Disaccharid Gal β 1-3GalNAc zuerst in Studien zu den Gangliosiden im menschlichen Gehirn beschrieben wurde.^[17–19] Beispielsweise enthalten GM1, Asialo-GM1 und das nicht sialylierte GA1 allesamt terminale Gal β 1-3GalNAc β 1-R. Man beachte aber, dass das GalNAc hier in β - und nicht in α -Bindung vorliegt und sich diese Struktur somit von jener des T-Antigens unterscheidet.

1.2. Chemische Synthese des Tn-Antigens und verwandter Strukturen

Die chemische Synthese von an L-Serin und L-Threonin gebundenem Tn- und T-Antigen wurde erstmals 1977 von Osawa und Kaifu veröffentlicht,^[20] später auch von anderen

wie Lemieux et al.^[21] sowie Paulsen und Hölk.^[22] Jede dieser Gruppen wählte einen anderen Syntheseweg. Eine elegante Strategie für die Synthese des Tn-Antigens entwickelten Paulsen und Hölk, die als Erste eine nicht partizipierende Azidogruppe an der C2-Position des GalNAc-Donors einführten (3,4,6-Tri-*O*-acetyl-2-azido-2-desoxy- β -D-galactopyranosylchlorid). Diesen setzten sie in Gegenwart der Promotoren Silbercarbonat und Silberperchlorat in einer Koenigs-Knorr-Reaktion mit Benzylloxycarbonylderivaten von Serin oder Threonin um, was stereoselektiv zur Bildung des α -Anomers führte (Schema 2a).^[22] Die C2-Azidogruppe wurde anschließend durch reduktive Acetylierung in die natürlich vorkommende Acetamidgruppe überführt, und der schützende Benzylester wurde gespalten, um schließlich GalNAc1-*O*-Ser und GalNAc1-*O*-Thr zu erhalten. Ähnliche Synthesewege, bei denen die Fmoc-Derivate von Serin und Threonin zur Anwendung kommen, wurden später von Kunz und Birnbach beschrieben.^[23] Die Verwendung des C2-Azido-Halogen-Donors fördert eine hochselektive α -Glycosylierung. Zur Herstellung des Disaccharid-T-Antigens wurde die Azidogruppe des Zwischenproduktes (Schema 2a) reduziert und der Zucker selektiv O-desacyliert und benzylidiert, um ein Derivat zu erhalten, das mit Tetra-*O*-acetyl- α -D-galactosylpyranosylbromid zum Disaccharid reagierte. Die nachfolgende Entfernung der Schutzgruppen lieferte das *N*-acetylierte Gal-GalNAc-Ser/Thr. Eine andere elegante Synthese des Tn-Antigens (Schema 2b) nutzt den acetylierten 2-Azido-2-desoxyzucker-Thiophenyl-Donor und das $\text{Ph}_2\text{SO}/\text{Tf}_2\text{O}$ -Promotorsystem, das eine effiziente, stereoselektive Glycosylierung von Fmoc-Thr(OH)-OBn (oder Fmoc-Ser(OH)-OBn) fördert, sodass spezifisch das α -Glycosid entsteht.^[24] Moderne Synthesen von Tn-Antigen-haltigen Glycopeptiden basieren auf diversen Strategien.^[24–40] Eine interessante Vorgehensweise wurde für Peptide mit einem oder mehreren Tn-Antigenen entwickelt, bei der Glycosyltrichloracetimidate verwendet wurden, um die Hydroxygruppe(n) von Ser/Thr eines an ein Festphasenharz gebundenen Peptides stereoselektiv zu modifizieren.^[41] Viele



Richard D. Cummings erhielt den BA in Biologie und Chemie an der University of Montevallo (1974) und promovierte 1980 in Biochemie an der Johns Hopkins University in Baltimore. Sein Postdoktorat absolvierte er bei Stuart Kornfeld an der Washington University School of Medicine in St. Louis (1980–1983). Seine erste Professur war an der University of Georgia und dem Complex Carbohydrate Research Center (1983–1992). Später wechselte er zum OUHSC und gründete das Oklahoma Center for Medical Glycobiology. Seit 2006 ist er William Patterson Timmie Professor und Direktor des Departments für Biochemie an der Emory University School of Medicine sowie Gründer und Codirektor des dortigen Glycomics Center. 2008 wurde er mit dem Karl Meyer-Preis der Society for Glycobiology ausgezeichnet.

Angew. Chem. 2011, 123, 1808–1830

Techniken zur Glycopeptidsynthese verwenden jetzt N^{α} -Fmoc-Thr-(AcO₃- α -D-GalNAc) oder das entsprechende Ser-Derivat, die käuflich erworben werden können. Zudem können Glycopeptide mit dem Tn-Antigen auch chemoenzymatisch hergestellt werden. Dazu werden synthetische Peptidakzeptoren und Glycosyltransferasen, die GalNAc auf Ser/Thr-Reste übertragen, verwendet.^[42] Solche Strategien waren wichtig zur Entwicklung möglicher Impfstoffe gegen das Tn-Antigen, wie in Abschnitt 6.1. dargelegt.

1.3. Nachweis des Tn-Antigens

Das Tn-Antigen kommt in normalen Zellen und Geweben erwachsener Tiere kaum vor und scheint kein onkofetales Antigen zu sein. Im Verlauf der Jahre wurden diverse Methoden angewendet, um das Tn-Antigen nachzuweisen. Jede hat ihre Vor- und Nachteile. Die Methoden können in drei Kategorien eingeteilt werden: in chemische, Lectin-basierte und Antikörper-basierte. Die direkte chemische Methode beruht typischerweise auf der β -Eliminierung,^[14,15] bei der durch alkalische Hydrolyse in Gegenwart von NaBH₄ *N*-Acetylgalactosaminol abgespalten und gleichzeitig die bindende Aminosäure verändert wird (Ser zu 2-Aminocroton-säure oder Dehydroalanin und Thr zu 2-Aminocroton-säure). Die Bestimmung von *N*-Acetylgalactosaminol durch Gaschromatographie nach Acetylierung, kombiniert mit dem Nachweis der veränderten Ser- oder Thr-Aminosäuren, gilt als chemischer Nachweis des Vorhandenseins von Tn-Antigen auf Glycopeptiden und Glycoproteinen. Diese Methode ist angebracht, wenn genügend große Mengen Analysematerial zur Verfügung stehen – bei den kleinen Mengen, die in Zellen und Geweben vorliegen, ist sie jedoch kaum durchführbar. Eine Variante der direkten chemischen Methode besteht darin, Galactose-Oxidase ohne vorherige Neuramidasebehandlung zu verwenden, um die nicht reduzierenden terminalen GalNAc-Reste des Tn-Antigens an der C6-Hydroxygruppe zu oxidieren und anschließend mit radioaktiv markiertem NaB^{[3]H}₄ zu reduzieren.^[43] Der Nachweis von radioaktiv markiertem GalNAc zeigt schließlich das Tn-Antigen an. Natürlich würde auch radioaktiv markierte Gal gemessen, sollte das nicht sialylierte T-Antigen vorhanden sein.

Historisch dominieren die auf Lectinen und Antikörpern basierenden Methoden zum Nachweis von Tn-Antigen. Eine enorme Zahl verschiedener GalNAc bindender Lectine von Pflanzen und Tieren wurde verwendet, um die Expression des Tn-Antigens zu erforschen. Diese schließen die Pflanzenlectine *Dolichos-biflorus*-Agglutinin (DBA),^[44] *Marrubium-candidissimum*-Agglutinin,^[45] *Maclura-pomifera*-Lectin (MPL),^[46] *Salvia-horminum*-Agglutinin (SHA),^[47] *Salvia-sclarea*-Agglutinin (SSA),^[48] *Salvia-bogotensis*-Lectin,^[49] *Artocarpus-integrifolia*-Lectin (Jacalin),^[50] *Bauhinia-purpurea*-Agglutinin (BPA),^[51,52] das B4-Isolectin von *Vicia-villosa*-Agglutinin (VVA-B4),^[53] *Soja-hispida*-Lectin,^[54] *Moluccella-laevis*-Lectin (MLL)^[55] und das aus Schnecken isolierte *Helix-pomatia*-Agglutinin (HPA) ein.^[48,56,57] Auch das Fehlen einer Bindung durch andere Lectine wurde genutzt, um die mögliche Expression der Tn/STn-Antigene (STn-Antigen = Sialyl-Tn-Antigen; Neu5Aca2-6GalNAca1-O-Ser/Thr) zu

untersuchen. So zeigten beispielsweise Springer et al. dass das Sialinsäuren bindende *Vicia-graminea*-Lectin und das T-Antigen bindende *Arachis-hypogaea*-Lectin (peanut agglutinin, PNA) durch die Erythrozyten von Patienten mit Tn-Syndrom kaum gebunden wurden.^[58] Zudem binden Tn-Antigen exprimierende Zelllinien wie Jurkatleukämiezellen und humane Kolonkarzinom-LSC-Zellen^[59,60] gut an HPA, jedoch kaum an PNA, auch nicht nach Desialylierung,^[61] was zur Expression des Tn-Antigens durch diese Zellen passt. Zwei der am häufigsten zum Nachweis von Tn-Antigen verwendeten Pflanzenlectine sind VVA-B4 und HPA. VVA-B4 wurde z. B. verwendet, um die Tn-Antigen-Expression durch Krebszellen aus Tumoren des Pankreas, der Brust, der Lunge und der Prostata zu untersuchen.^[62,63] HPA fand seit den frühen 1980er Jahren häufige Verwendung. Vainchenker et al. entdeckten die Klonalität der Tn-Antigen-Expression, indem sie mit fluoreszenzmarkiertem HPA Tn-Antigen in Kolonien der erythroiden und granulozytischen Zellen eines Patienten mit Tn-Syndrom nachwiesen.^[64] HPA-Bindung wurde zudem kombiniert mit Galactose-Oxidase/NaB^{[3]H}₄-Reduktion eingesetzt, um Tn-Antigen auf dem Glycoprotein GPIb in den Blutplättchen eines Patienten mit Tn-Syndrom nachzuweisen.^[43] Allerdings ist die Verwendung von HPA zum Nachweis von Tn-Antigen problematisch, denn es bindet auch an das Cad-Antigen NeuAca2-3(GalNAc β 1-4)Gal β 1-R, das Blutgruppe-A-Antigen Fuc α 1-2(GalNAc α 1-3)Gal β 1-R und an Forssman-Glycolipid.^[65,66] Generell ist zu sagen, dass die meisten pflanzlichen und tierischen Lectine, die GalNAc binden, mit nicht reduzierenden, terminalen GalNAc-Resten in α - oder β -Stellung kreuzreagieren, wie für VVA-B4 beschrieben, das auch an Cad-(Sda)-Antigen bindet.^[67] Aus diesem Grund müssen Lectinstudien zur Bestimmung der Tn-Antigen-Expression mit großer Vorsicht durchgeführt werden, und die Resultate sollten mit chemischen, immunologischen und/oder genetisch/molekularen Daten untermauert werden.

Eine der frühesten immunologischen Nachweismethoden für Tn-Antigen beruhte auf Anti-Tn-Antiseren,^[68,69] die natürlicherweise infolge seiner Erkennung als Antigen entstanden. Von Springer et al. wurde natürlicher, humarer Anti-Tn-Antikörper als Reagens verwendet,^[70] denn diese Forschungsgruppe hatte beobachtet, dass in den Seren der meisten Personen geringe Mengen Anti-Tn-Antikörper vorhanden sind.^[6,7,71] Die Bildung solcher Antikörper kann durch Kontakt mit *Enterobacteriaceae*, die das Tn-Antigen exprimieren, ausgelöst werden.^[72] Springer und Tegtmeier zeigten, dass Seren von Küken des Weißen Leghorns, die in keimfreier Umgebung gehalten wurden, keine Anti-Tn-Antikörper enthielten, während Küken, die in normalen Brutstätten aufwuchsen, solche Antikörper aufwiesen. Verfütterten sie keimfreien Küken Bakterien, die das Tn-Antigen exprimierten, führte dies zur Bildung von Anti-Tn-Antikörpern.^[72] Auch bei Kleinkindern oder Erwachsenen, die Tn-Antigen tragende Bakterien einatmeten oder einnahmen, konnten anschließend zirkulierende Anti-Tn-Antikörper nachgewiesen werden.^[73]

Springer et al.^[74,75] beschrieben die Immunogenität des Tn-Antigens im Rahmen ihrer Arbeit zu den humanen MN-Blutgruppen-Antigenen und entdeckten, dass sowohl das T-

als auch das Tn-Antigen von menschlichen Tumorzellen als Karzinom-assoziierte Antigene exprimiert werden. 1985 berichteten die Forscher dann, sie hätten als Erste murine, monoklonale Antikörper (mAK) gegen Tn-Antigen entwickelt.^[70] Kurz darauf stellten Hakomori und Mitarbeiter die ersten murinen mAK gegen Sialyl-Tn-Antigen her.^[76] Unter Verwendung dieser mAK wurde gezeigt, dass Tn- und Sialyl-Tn-Antigen auf den Erythrozyten von Patienten mit Tn-Syndrom vorhanden sind, jedoch nicht auf jenen von gesunden Blutspendern.^[77] Hakomori und Kollegen entwickelten diverse mAK gegen das Tn-Antigen (NCC-LU-35 und NCC-LU-81), indem sie Mäuse mit den Lungenkarzinomzellen Lu65 impften und die Hybridome nachfolgend histologisch auf ihre Fähigkeit, mAK gegen Tumorgewebeproben herzustellen, untersuchten.^[78] Ein Problem bei der Verwendung verschiedener mAK gegen das Tn-Antigen war die Spezifität der Antikörper: Einige Anti-Tn-Antikörper kreuzreagieren eindeutig mit anderen GalNAc-haltigen Glycanen, wie dem Blutgruppe-A-Antigen.^[78] Beispiele von Publikationen, die über die Verwendung von Anti-Tn-mAK berichten, finden sich in Lit. [61, 78–85]. Einige dieser mAK scheinen spezifisch zu sein und kreuzreagieren nicht mit dem Blutgruppe-A-Antigen.^[81]

Einer der nützlichsten Mäuse-Anti-Tn-mAK ist ein IgM (CA3638, Klon 12A8-C7-F5). Er wurde ursprünglich von Springer und Mitarbeitern entwickelt und findet heute breite Anwendung für Immunhistochemie und Durchfluszytometrie.^[79] Nachdem das Labor von Dr. Springer nach dessen Tod geräumt worden war, sandte seine Assistentin Herta Tegtmeyer alle Vorräte an gereinigten mAK, einschließlich des oben erwähnten IgM, an das Labor von Dr. Cummings. Leider waren alle Hybridome des Springer-Labors schon früher verloren gegangen. Proben der mAK gegen das Tn-Antigen können aber auf Anfrage vom Cummings-Labor erhalten werden. Sie wurden auch von anderen verwendet, beispielsweise für Studien zur Tn-Antigen-Expression durch *Drosophila*.^[86,87] Der nützlichste Mäuse-Anti-STn-mAK ist ein Immunglobulin G1 (IgG1; Klon HB-STn1), das von verschiedenen Herstellern, wie DakoCytomation, erworben werden kann. Andere mAK gegen das Tn-Antigen (CD175) und Sialyl-Tn-Antigen (CD175s) sind zudem von verschiedenen Quellen kommerziell erhältlich.

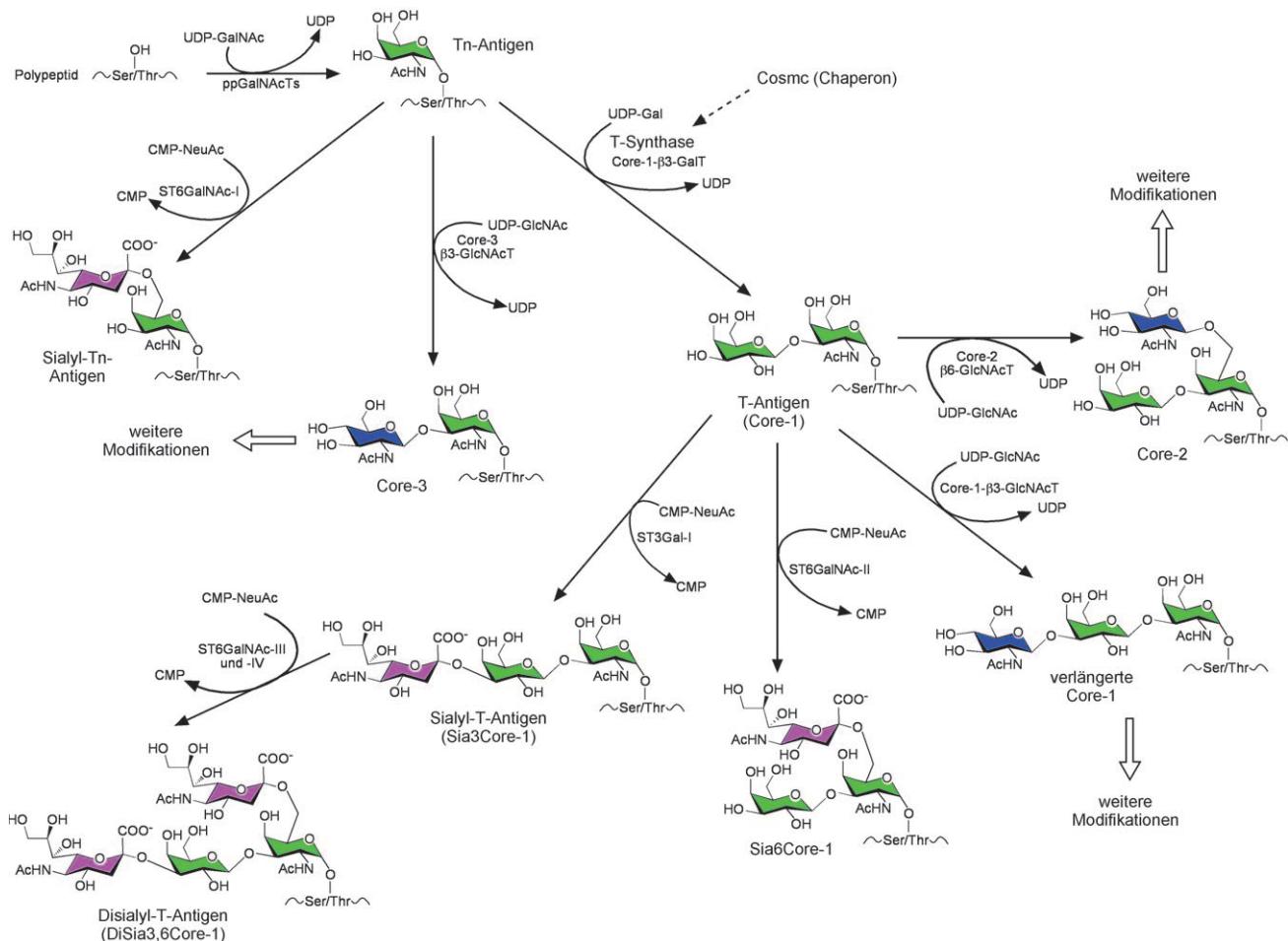
2. Molekulare Mechanismen der Expression des Tn-Antigens

2.1. Biosynthese des Tn-Antigens und der O-Glycane vom Mucintyp

Das Tn-Antigen auf Glycoproteinen wird von der Enzymfamilie der Polypeptid-*N*-Acetylgalactosaminyltransferasen (ppGalNAcTs) synthetisiert. Diese übertragen ein GalNAc vom Donor Uridin-5'-diphosphat(UDP)-GalNAc auf einen Ser- oder Thr-Rest des Proteins (Schema 3).^[88] Dies ist der erste Schritt in der Biosynthese der O-Glycane vom Mucintyp. Man schätzt, dass das menschliche Genom vierundzwanzig verschiedene ppGalNAcT-Gene enthält, jenes der Maus achtzehn.^[89–91] Die humanen Gene befinden sich auf

den Chromosomen 1–4, 7–9, 12 und 18. Die ppGalNAcTs sind transmembranäre Proteine aus 600–800 Aminosäuren (AS) und sind somit größer als die meisten anderen Glycosyltransferasen. Die Transferaseaktivität ist in der N-terminalen Domäne lokalisiert, und die C-terminale Domäne enthält eine Lectindomäne vom R-Typ.^[92] Zwar scheint es, dass alle ppGalNAcTs (EC 2.4.1.41) die gleiche allgemeine Reaktion katalysieren, allerdings ist die Expression der ppGalNAcT-Isoformen oder -Isozyme in erwachsenen Säugetieren gewebespezifisch, und die ppGalNAcTs haben unterschiedliche, wenn auch überlappende Substratspezifitäten.^[93] Die Aktivität aller ppGalNAcTs (außer T10) scheint verstärkt zu sein, wenn sich ein Pro-Rest in der (+3)-Position relativ zum Ser/Thr-Rest befindet. Pro-Reste in den (−3)-, (−1)- und (+1)-Positionen erhöhen die Aktivität in unterschiedlichem Maß je nach ppGalNAcT-Isoform.^[94–96] Die C-terminale Lectindomäne vom R-Typ hat eine gewisse Homologie zur Lectindomäne von Ricin und bindet an Kohlenhydrate. Es wurde vorgeschlagen, dass die katalytische und die Lectindomäne der ppGalNAcTs zusammenwirken, um die Wahl der Glycosylierungsstellen vorzunehmen. Dies ist in Einklang mit der Idee, dass das Anheften von GalNAc-Resten an das Protein in hierarchischer Weise erfolgt.^[90] Mucin-1 (MUC-1; MUC = Mucinglycoprotein) beispielsweise ist ein Protein, das aus 1000 AS besteht und dessen Molekülmasse durch das Anfügen von Hunderten von O-Glycanen auf über 2 Millionen Da erhöht wird. Die enorme Effizienz seiner O-Glycosylierung ist nicht nur durch die hohe Aktivität und weite Verbreitung von ppGalNAcTs im Golgi-Apparat von Epithelzellen bedingt, sondern auch durch deren Lectindomänen. Indem sie über ihre Lectindomänen an zuvor gebildete Glycane binden, können diese Enzyme am Protein entlang gleiten und hocheffizient GalNAc-Reste an ein Ser/Thr nach dem andern heften.^[97]

Die ppGalNAcTs sind, wie an Hela-Zellen gezeigt, im Golgi-Apparat lokalisiert.^[98] Man nimmt deshalb an, dass sie auf gefaltete Proteine wirken, die das endoplasmatische Retikulum (ER) korrekt verlassen haben. Das im Golgi-Apparat gebildete Tn-Antigen kann als Akzeptor für mindestens drei andere Golgi-Glycosyltransferasen wirken: 1) die Core-1- β 1,3-Galactosyltransferase (Core-1- β 3GalT oder T-Synthase), die die Core-1-Struktur oder das T-Antigen synthetisiert, 2) die Core-3- β 1,3-*N*-Acetylglucosaminyltransferase (Core-3- β 3GlcNAcT; GlcNAc = *N*-Acetylglucosamin), die die Core-3-Struktur synthetisiert, und 3) die Sialyltransferase ST6GalNAc-I, die das Sialyl-Tn-Antigen herstellt (Schema 3). Die häufigste Modifikation des Tn-Antigens ist die T-Synthase-katalysierte Bildung des Core-1-Disaccharids.^[99,100] T-Synthase ist ein Schlüsselenzym in der Biosynthese von O-Glycanen vom Mucintyp, das in allen Zellen des Menschen und der Maus vorkommt. Das Core-1-Glycan wird normalerweise entweder durch ST3Gal-I sialyliert, sodass das Sialyl-T-Antigen entsteht,^[101] das im Anschluss durch ST6GalNAc-III oder IV weiter zum Disialyl-T-Antigen (DiSia3,6Core-1) sialyliert werden kann.^[102] Alternativ kann das Core-1-O-Glycan-Disaccharid durch ST6GalNAc II zum 2,6-sialylierten Core-1-O-Glycan (Sia6Core-1)^[103] umgesetzt, zu größeren Core-1-O-Glycanen verlängert oder durch die Core-2- β 6-GlcNAcT zu Core-2-O-Glycanen verzweigt



Schema 3. Biosynthese des Tn-Antigens und verschiedener O-Glycan-Core-Strukturen, die sich von der Tn-Vorstufe ableiten.

werden.^[104] Die Core-3-Struktur GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr kommt vor allem im Gastrointestinaltrakt vor und wird normalerweise zu komplexen Core-3-O-Glycanen verlängert.^[105] ST6GalNAc-I wird in großen Mengen in der Unterkiefer-Speicheldrüse des Rindes gebildet, kommt in anderen Geweben hingegen kaum vor.^[106] STn findet man dementsprechend nicht in normalen Geweben, mit Ausnahme der Unterkiefer-Speicheldrüsen von Rindern und Schafen. Wird STn gebildet, ist es eine terminale Struktur, die nicht mehr von anderen Glycosyltransferasen verändert wird.

2.2. Die T-Synthase verwendet das Tn-Antigen für die Herstellung des T-Antigen

Das wichtigste Enzym, das in normalen Geweben das Tn-Antigen modifiziert, ist die UDP-Gal:GalNAc α 1-O-Ser/Thr-Glycopeptid- β 3-Galactosyltransferase (Core-1- β 3GalT, T-Synthase, C1GALT1, EC2.4.1.122). In Gegenwart zweier Kationen überträgt die T-Synthase Gal von UDP-Gal auf GalNAc α 1-O-Ser/Thr unter Bildung einer β -glycosidischen Bindung, sodass die Core-1-Struktur – Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr oder das T-Antigen – entsteht. Die T-Synthase ist eine invertierende Glycosyltransferase, denn sie

bildet aus dem α -gebundenen Gal-Rest im Donor UDP-Gal eine β -Bindung.^[107] Das Enzym wurde ursprünglich in BHK-Zellhomogenaten^[108] und in rohen Zubereitungen von Dickdarmschleimhaut aus Schweinen und Ratten untersucht^[109] und später aus Rattenleber partiell gereinigt.^[110] T-Synthase wurde erst 2002 zur Homogenität gereinigt^[100] und als ein 84/86 kDa schweres, Disulfid-gebundenes Homodimer charakterisiert. Allerdings wurde auch das 42/43-kDa-Monomer beobachtet, das ebenfalls enzymatisch aktiv war. Nicht bekannt ist, weshalb es zwei Formen des Homodimers mit unterschiedlichen Molekulmassen gibt. Basierend auf der N-terminalen Sequenz der Ratten-T-Synthase wurde die cDNA für die humane T-Synthase kloniert.^[99] Sie kodiert für ein Typ-II-transmembranäres Protein aus 363 AS. Northern Blot machte deutlich, dass es zwei verschiedene Transkripte der humanen T-Synthase gibt, die 2.0 und 7.0 kb (kb = 1000 Basen) groß sind. Das 2.0-kb-Transkript entspricht wahrscheinlich der reifen, aktiven Form, denn in Rattentestes kann nur dieses Transkript nachgewiesen werden. Ob das größere Transkript nur eine unvollständig gespleißte Form ist oder eine eigene Funktion hat, weiß man nicht. Die Orthologen aus diversen Spezies, einschließlich Schimpanse, Rind, Hund, Ratte, Maus, Vogel, Frosch, Zebrafisch und die Wirbellosen *Drosophila* und *C. elegans*, wurden geklont oder

identifiziert.^[111] Der Vergleich ihrer Proteinsequenzen ergab einen hohen Grad an Homologie, besonders unter den Proteinen der Säugetiere. T-Synthase ist insofern einzigartig, als sie nur minimale Homologien zu konservierten Motiven anderer β 3-Galactosyltransferasen aufweist. Bemerkenswerterweise gibt es nur ein einziges Gen für T-Synthase im Menschen und anderen Säugetieren. Das humane Gen (*C1GALT1*) befindet sich auf Chromosom 7p14-p13 und besteht aus drei Exons, von denen das zweite Exon das längste ist. Interessanterweise ist die T-Synthase der Säugetiere nicht N-glycosyliert. Dies unterscheidet sie von den meisten anderen Glycosyltransferasen, die N-Glycosylierungsstellen in ihren primären Aminosäuresequenzen aufweisen, und es unterscheidet sie auch von den T-Synthasen von *C. elegans*^[111] und *Drosophila*,^[99,112] die N-Glycosylierungsstellen enthalten.

Zwar gibt es im Menschen nur ein einziges funktionierendes Gen für T-Synthase, doch brachte eine Blast-Homologiesuche vier dem *C1GALT1* hoch homologe DNA-Sequenzen auf den Chromosomen 5, 12, 8 und 15 ans Licht, die wir humane *C1GALT1*-Pseudogene-1, -2, -3 bzw. -4 nannten (*pC1GALT1*, -2, -3 und -4; Sequenzvergleiche siehe Abbildung in den Hintergrundinformationen). Anders als beim funktionierenden Gen bestehen alle *pC1GALT*s aus einem einzelnen „Exon“ mit vielen sinnverändernden Mutationen (missense mutations) und DNA-Fragmentdeletionen. Die Sequenz von *pC1GALT1* auf Chromosom 5 ist am stärksten konserviert und zu 93 % identisch mit der cDNA von *C1GALT1*. *pC1GALT2* auf Chromosom 12 ist zu 91 % und *pC1GALT3* auf Chromosom 8 zu 80 % identisch mit der cDNA von *C1GALT1*. Die ersten 130 Basen von *pC1GALT3* passen nicht zum Exon I (220 bp) von *C1GALT1* und machen somit den Großteil der gesamten Sequenzunterschiede zwischen *pC1GALT3* und *C1GALT1* aus. *pC1GALT4* auf Chromosom 15 hat die am wenigsten konservierte Sequenz mit 71 % Homologie zum funktionierenden Gen. Es fehlen die ersten ca. 100 Basenpaare (bp) am 5'-Ende von Exon I und 200 bp im 3'-Teil des Exons II. Die Mutationen und Deletionen in den Pseudogenen führen zu zahlreichen Stopcodons und Verschiebungen des offenen Leserahmens (open reading frame, ORF), die zu Nicht-ORF-DNA-Sequenzen führen. Weder die reversen noch die komplementären Sequenzen der Pseudogene enthalten irgendeinen ORF, was darauf schließen lässt, dass sie nicht andere Gene oder Teile anderer Gene sind, und zusätzlich dafür spricht, dass es Pseudogene sind. Die Suche nach humanen transkribierten Nucleotidsequenzen (expressed sequence tags, ESTs) in der Datenbank liefert drei Treffer, die perfekt auf *pC1GALT1* passen, und zwei weitere, die auf *pC1GALT2* passen. Dies zeigt, dass *pC1GALT1* auf Chromosom 5 und *pC1GALT2* auf Chromosom 12 wahrscheinlich in bestimmten Geweben transkriptionell aktiv sind. Basierend auf der Ähnlichkeit der vier Pseudogene von humaner *C1GALT1* ist es wahrscheinlich, dass *pC1GALT3* und 4 auf Chromosom 8 bzw. 15 evolutionär die ältesten sind, während *pC1GALT1* auf Chromosom 5 das jüngste ist. Die Tatsache, dass diese Pseudogene nur aus einem einzigen Exon bestehen, lässt darauf schließen, dass sie durch reverse Transkription der mRNA von humanem *C1GALT1* entstanden sind und anschließend ins

menschliche Genom integriert wurden. Die Existenz von vier nichtfunktionalen Genen könnte jedoch nicht nur die Evolution von humanem *C1GALT1* aufzeigen, sie könnte auch wichtig für die Regulation der Expression von humanem *C1GALT1* sein, besonders weil einige dieser Pseudogene transkriptionell aktiv zu sein scheinen.

2.3. Andere Glycosyltransferasen, für die das Tn-Antigen ein Akzeptor ist

Zusätzlich zur T-Synthase verwenden auch zwei andere bekannte Glycosyltransferasen das Tn-Antigen als Akzeptor, und zwar ST6GalNAc-I und Core-3- β 3-GlcNAcT (Schema 3). CMP-NeuAc:GalNAc- α 1-*O*-Ser/Thr-Glycopeptid- α 2,6-Sialyltransferase-I (ST6GalNAc-I, EC2.4.99.3)^[113] überträgt eine Sialinsäure (*N*-Acetyl-5-neuraminsäure, Neu5Ac) von CMP-Neu5Ac (CMP = Cytidinmonophosphat) auf die 6-Position von GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr, sodass das STn-Antigen Neu5Ac α 2-6GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr entsteht. Das Gen der humanen ST6GalNAc-I befindet sich auf 17q25.1. ST6GalNAc-I gehört zur Familie der humanen ST6GalNAc,^[114] deren sechs Mitglieder sich durch ihre Spezifität für verschiedene Akzeptoren unterscheiden. ST6GalNAc-I kann auf Tn-Antigen, T-Antigen und α 2,3Sialyl-T-Antigen (Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr) wirken.^[113] ST6GalNAc-II wirkt vor allem auf das Core-1-*O*-Glycan, sodass α 2,6-sialyliertes T-Antigen (Sia6Core-1) entsteht (Schemata 1 und 3).^[115] Wenngleich eine Arbeit gezeigt hat, dass sowohl ST6GalNAc-I als auch -II Sialyl-Tn-Synthasen sein könnten,^[116] haben andere Gruppen demonstriert, dass ST6GalNAc-I die vorwiegende Sialyl-Tn-Synthase in menschlichen Tumoren ist.^[115,117] Interessanterweise zeigten einige Studien auf, dass in immortalisierten B-Zellen von Patienten mit IgA-Nephropathie das Transkript von ST6GalNAc-II, nicht aber das von ST6GalNAc-I hochreguliert war.^[118,119] Es ist offensichtlich, dass noch viel Arbeit nötig ist, um die Rolle(n) dieser Enzyme bei der Herstellung von STn zu klären.

UDP-GlcNAc:GalNAc α 1-*O*-Ser/Thr-Glycopeptid- β 3-*N*-Acetylglucosaminyltransferase (Core-3- β 3-GlcNAcT, C3-GnT, β 3GnT6, EC2.4.1.146) überträgt GlcNAc von UDP-GlcNAc auf GalNAc α 1-Ser/Thr (Tn-Antigen), sodass die Core-3-Struktur (GlcNAc β 1-3GalNAc α 1-Ser/Thr) entsteht.^[105] Humanes C3GnT ist auf dem Chromosom 11q13.4 lokalisiert. C3GnT-Expression findet sich nur in Mucus sezernierenden Geweben. Die Menge an C3GnT-Transkript, wie sie in verschiedenen menschlichen Geweben durch quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (real time PCR) gemessen wurde, war im Magen am höchsten, gefolgt von Dick- und Dünndarm. O-Glycane, einschließlich Core-3 und Core-1, sind die primären Bestandteile der intestinalen Mucus-Schicht, die das gastrointestinale Epithel bedeckt. Die Mucus-Schicht ist eine dichte, kohlenhydratreiche Matrix, die größtenteils aus Mucinen besteht. Mucine enthalten eine Vielzahl von Serin- und Threoninresten, die O-Glycane tragen. Letztere machen 80–90 % der Mucinmasse aus. Die Mucus-Schicht und die Epithelzellen bilden eine Barriere, die epithelialen und mucosalen Immunzellen vor potenziell

schädlichen luminalen Mikroorganismen und Essensbestandteilen schützt.

3. Das molekulare Chaperon Cosmc ist notwendig für die Bildung aktiver T-Synthase

3.1. Entdeckung von Cosmc

Core-1- β 3-Galactosyltransferase-spezifisches, molekulares Chaperon (Cosmc) ist in vivo notwendig für die Bildung aktiver T-Synthase.^[60] Für menschliches Cosmc kodiert ein einzelnes Exon auf Xq24.^[60] Im Unterschied zur T-Synthase, die in Wirbeltieren wie auch in Wirbellosen vorkommt, finden sich Cosmc-Orthologe nur in Wirbeltieren. Cosmc wurde ursprünglich gemeinsam mit T-Synthase aus Rattenleber partiell gereinigt und wies bei der SDS-PAGE eine Molekülmasse von 36–38 kDa auf, die jener der T-Synthase sehr ähnlich war. Die 1.5-kb-cDNA wurde basierend auf der Proteinsequenz kloniert, und es konnte vorausgesagt werden, dass der ORF für ein 318 AS großes, Typ-II-transmembränes Protein kodieren würde. Es konnte nun gezeigt werden, dass Cosmc im ER lokalisiert ist, wo es bei der Faltung von T-Synthase als Chaperon wirkt,^[83] wie in Abschnitt 3.3 ausgeführt.

Wie in Abschnitt 1.3 erwähnt, exprimiert die humane T-Leukämiezelllinie Jurkat das Tn-Antigen. Dies liegt daran, dass die T-Synthase in dieser Zelllinie inaktiv ist,^[120] sodass keine größeren O-Glycane vom Mucintyp hergestellt werden. Das Gen und auch das Transkript von T-Synthase sind in den Jurkatzellen normal. Dagegen ist die Cosmc-cDNA mutiert und enthält eine T-Insertion in Position 473, die eine Verschiebung des ORF und ein verfrühtes Stopcodon bewirkt.^[60,61] Führt man funktionierendes Cosmc vom Wildtyp in Jurkatzellen ein, wird nicht nur die T-Synthase-Aktivität wieder hergestellt, sondern es normalisieren sich auch die Strukturen der O-Glycane auf den Glycoproteinen an der Zelloberfläche.^[60,61]

Wir haben kürzlich Mäuse entwickelt, denen das Gen für Cosmc teilweise oder vollständig fehlt.^[121] Ähnlich wie beim Menschen besteht auch das Gen der Maus aus einem einzelnen Exon auf dem X-Chromosom (Xc3). Tiere, denen das Gen vollständig oder größtenteils fehlt, starben schon als Embryonen an den Tagen E10.5–E12.5 der Embryonalentwicklung. Praktisch jede identifizierbare Zelle dieser Tiere exprimierte das Tn-Antigen in beachtlichen Mengen. Mäuse mit einem partiellen Verlust von Cosmc zeigten, abhängig vom Ausmaß des Verlustes und vom Geschlecht, verschiedene Phänotypen. Männliche Mäuse überlebten viel seltener als weibliche, was mit der Lokalisation des Gens für Cosmc auf dem X-Chromosom erklärbar ist. Die Tn- und STn-Antigene wurden in vielen Geweben, wie dem Magen und Darm, der Niere, Leber, Milz, Lunge und Bauchspeicheldrüse, gefunden, was weiter bestätigt, dass Cosmc für die Funktion der T-Synthase notwendig ist.^[121]

Cosmc-Orthologe mit hoher Homologie zu humanem Cosmc wurden in vielen Wirbeltieren, wie Schimpansen, Rindern, Mäusen, Ratten, Hunden, Vögeln, Fröschen und Zebrafischen, gefunden. Im Unterschied zu Cosmc-Proteinen

anderer Säugetiere, die aus 318 AS bestehen, enthält das Cosmc der Nager nur 316 AS. Die Aminosäuresequenz ist zu mehr als 95 % identisch mit der humanen, jedoch fehlen die beiden Aminosäuren in Position 33 und 34. Diese zwei Aminosäuren befinden sich genau am Anfang der luminalen, C-terminalen Domäne, die für die Funktion von Cosmc verantwortlich ist. Sie scheinen aber die Lokalisierung im ER nicht zu beeinflussen. Tatsächlich fördert Mäuse-Cosmc die Aktivität von menschlicher und muriner T-Synthase-Aktivität ebenso gut wie menschliches Cosmc.

Anders als Wirbeltiere haben Wirbellose wie *C. elegans* oder *Drosophila* keine Cosmc-Orthologe, doch wird T-Synthase von Wirbellosen ebenso exprimiert wie von Wirbeltieren. Die T-Synthase der Wirbellosen weist mehrere N-Glycosylierungsstellen auf, jene der Wirbeltiere hingegen nicht. Es könnte deshalb sein, dass Cosmc in Wirbeltieren dazu da ist, die nicht-N-glycosyierte T-Synthase zu falten, da diese durch das Calnexin/Calreticulin-System im ER nicht erkannt und somit auch nicht gefaltet werden kann. Dagegen könnten die T-Synthasen der Wirbellosen mit ihren vielfältigen N-Glycosylierungsstellen auch ohne die Hilfe von Cosmc korrekt gefaltet und zu aktiven Proteinen werden.^[111]

Die Sequenz von humanem Cosmc ist zu ca. 20 % identisch mit jener der T-Synthase,^[60] was dazu beitrug, dass es ursprünglich fälschlicherweise für eine andere T-Synthase gehalten wurde^[122] – ein Irrtum der in der späteren Literatur korrigiert wurde.^[123] Die Homologien betreffen vor allem die luminalen Domäne und deren sechs Cysteinreste. Dies lässt darauf schließen, dass sich Cosmc entweder aus T-Synthase entwickelt hat oder dass die beiden Proteine einen gemeinsamen Ursprung haben. Diese These wird indirekt auch durch die vier Pseudogene der humanen T-Synthase auf den Chromosomen 5, 8, 12 und 15 gestützt, die alle, wie Cosmc, Ein-Exon-Gene sind. Es scheint deshalb, dass sich Cosmc über die Pseudogene aus der T-Synthase entwickelt hat.

3.2. Andere Faktoren, die zur Expression des Tn-Antigens führen können

Zwei wichtige Mechanismen, die zur Expression des Tn-Antigens führen, beruhen auf genetischen Veränderungen, die zu einer verminderten Expression von funktionellem/r Cosmc und/oder T-Synthase führen. Es gibt jedoch auch andere mögliche Faktoren, die die oben beschriebenen O-Glycosylierungswege beeinflussen und zur Expression des Tn-Antigens führen könnten. So kann eine verminderte Expression der C3GnT, welche die Core-3-Struktur im Gastrointestinaltrakt synthetisiert, zur Expression von Tn/STn führen. Ein Verlust der C3GnT findet sich im Zusammenhang mit Dickdarmkrebs.^[124–126] In Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), denen der Transporter für UDP-Gal fehlt, der so genannten Lec8-Zelllinie,^[127,128] fehlen die Galactosereste auf N- und O-Glycanen,^[129] sodass das Tn-Antigen auftritt. Von Krieger et al. wurde eine CHO-Zelllinie, genannt ldlD-Zellen, isoliert, der die UDP-Glc/GlcNAc-4-Epimerase fehlt. Diese Zellen können deshalb kein UDP-Gal oder UDP-GalNAc herstellen, wenn man ihnen nicht Gal/GalNAc oder Gal/GalNAc-haltige Glyco-

proteine von außen zuführt.^[130] Wird keine Galactose zur Verfügung gestellt, synthetisieren die IdIID-Zellen Glycoproteine, denen Galactose fehlt, also *N*-Glycane mit verkürzten Antennen und Tn-Antigen-*O*-Glycane. Somit sind sowohl der Nucleotidzucker UDP-Gal als auch der UDP-Gal-Transporter essenziell für die Synthese von normalen *O*-Glycanen. Störungen in den Biosynthese- und Transportwegen können zur abnormalen Expression des Tn-Antigens führen.

Zudem kann STn-Antigen, das in Kolon- und Brusttumoren häufig anzutreffen ist,^[131] entstehen, wenn ST6GalNAc-I überexprimiert ist. Dieses Enzym wird dann mit der endogenen T-Synthase um den Akzeptor Tn-Antigen konkurrieren^[117–119, 132, 133], sodass das Sialyl-Tn-Antigen entsteht. Die letzte Möglichkeit ist, dass normale *O*-Glycane zum Tn-Antigen abgebaut werden. So kann beispielsweise das T-Antigen durch Behandlung mit β -D-Galactosidase aus Rindertestes in Tn-Antigen umgewandelt werden.^[75] Es ist somit wichtig, die Wege der Expression in Zellen, die das Tn- und/oder STn-Antigen bilden, auf biochemischer und genetischer Ebene genau zu klären.

3.3. Wirkmechanismus von Cosmc

Cosmc bindet wahrscheinlich im ER an die neu synthetisierte T-Synthase (Abbildung 1) und verhindert deren Aggregation und nachfolgenden Abbau durch den ER-assoziierten Degradationsweg (ERAD).^[60, 83, 134, 135] In Zellen, denen Cosmc fehlt, wird T-Synthase immer noch hergestellt, ist aber an ihrem N-Terminus verkürzt, falsch gefaltet und kann an Bip (Bindendes Protein – das wichtigste Chaperon im ER, auch 78-kDa-Glucose-reguliertes Protein, Grp78, genannt) und möglicherweise auch an andere Chaperone gebunden sein. Die falsch gefaltete T-Synthase wird anschließend ins Zytosol retrotransloziert, wo sie polyubiquitiniert und danach durch das Proteasom abgebaut wird. Ohne Cosmc taucht die T-Synthase in großen, Disulfid-verknüpften oligomeren Komplexen auf, die inaktiv und im Lumen des ER gefangen sind. Der Prozess, in dem die inaktive T-Synthase ausgesondert, vom ER ins Zytosol retrotransloziert, ubiquitiniert und gezielt zerstört wird, ist erst ansatzweise verstanden. Behandlung von Cosmc-negativen Zellen mit Proteasom-inhibitor führt zu einer Anhäufung von Aggregaten inaktiver T-Synthase. Interessanterweise kann diese zusammen mit Grp78 (einem ER-Chaperon, das hydrophobe Regionen bindet, die in fehlgefalteten Proteinen zugänglich werden) immunpräzipitiert werden. Doch führt die Bindung der T-Synthase an ER-Chaperone wie Grp78 nicht zur korrekten Faltung. Die Gegenwart von funktionstüchtigem Cosmc bleibt essenziell.

Neuere Studien haben gezeigt, dass rekombinante T-Synthase, die durch Hitze oder Behandlung mit Guanidinium-Hydrochlorid denaturiert wurde, ihre Aktivität in vitro wiedererlangen kann, wenn sie mit Cosmc inkubiert wird. Weder andere Proteinfaktoren noch die Bindung oder Hydrolyse von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) spielen eine Rolle für diese Renaturierung der T-Synthase.^[134] Dieser Befund ist interessant, da Cosmc ATP bindet,^[83] und deutet darauf hin, dass ATP in vivo eine Rolle für die Interaktionen

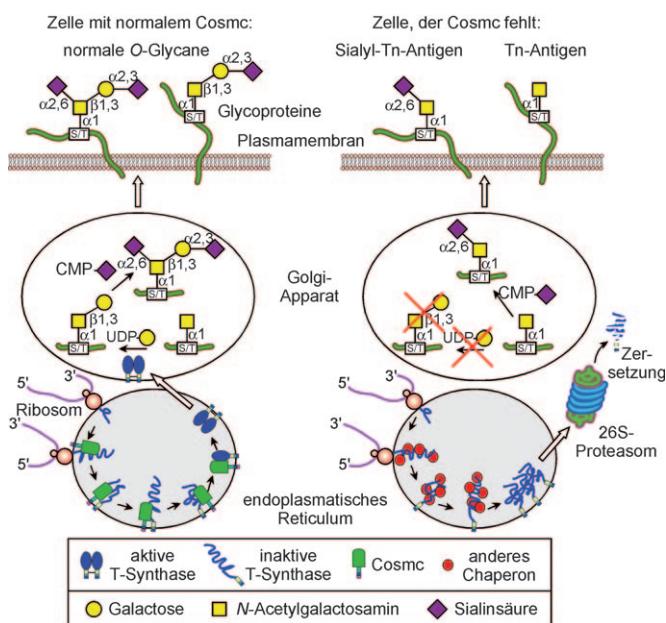


Abbildung 1. Die molekularen Grundlagen der Herstellung normaler *O*-Glycane und des Tn- und Sialyl-Tn-Antigens durch Zellen, denen wegen eines Funktionsverlustes von Cosmc eine funktionierende T-Synthase fehlt.^[61] Links: Cosmc wird im ER exprimiert, wo es an neu gebildete T-Synthase bindet und hilft, diese zu einem aktiven Enzym zu falten. Die dimere T-Synthase kann dann in den Golgi-Apparat wandern, wo sie ihre Funktion, Galactosereste vom Donor UDP-Gal auf das Vorstufenglycan aller *O*-Glycane, das Tn-Antigen, zu übertragen, ausübt. Normale *O*-Glycane können sialyliert werden, sodass sialylierte Core-1-*O*-Glycane entstehen, oder verlängert werden, um größere Core-1- oder Core-2-*O*-Glycane zu bilden (siehe Schema 3). Rechts: In Abwesenheit von funktionierendem Cosmc wird die neu synthetisierte T-Synthase im ER falsch gefaltet, ins Zytosol retrotransloziert, ubiquitiniert und im 26S-Proteasom abgebaut. Der Mangel an funktionierender T-Synthase im Golgi-Apparat führt zur Expression der Tn- und Sialyl-Tn-Antigene auf Zelloberflächen und sezernierten Glycoproteinen.^[61, 83, 134]

oder Funktionen von Cosmc spielt. Es ist offensichtlich, dass unser Wissen über die biologische Rolle von Cosmc und die Notwendigkeit eines spezifischen Chaperons für die T-Synthase noch sehr lückenhaft ist.

4. Die Funktionen von normalen, auf dem Tn-Antigen aufbauenden *O*-Glycanen vom Mucintyp

4.1. Die Rolle der *O*-Glycane für die Migration von Leukozyten

Es ist nicht erstaunlich, dass die Expression des Tn-Antigens ein Indikator für Krankheit ist, ist es doch die Vorstufe vieler wichtiger, komplexer *O*-Glycane. Diese bestehen normalerweise aus ausgedehnten, auf Core-1- oder Core-2-*O*-Glycanen aufgebauten Strukturen und kommen in zahlreichen Zelloberflächen-Glycoproteinen vor. Zu Glycoproteinen, die Core-1- oder Core-2-*O*-Glycane enthalten, zählen der „low density lipoprotein“ (LDL)-Rezeptor,^[136–138] Transferrinrezeptor,^[129, 139–141] Glycophorin A,^[142–144] Podoplanin,^[145–147] PSGL-1,^[30, 148–150] CD34,^[151] Endoglycan,^[152] Zona-pellucida-Glycoprotein ZP3,^[153, 154] CD43,^[155–157] CD45,^[158–161]

die TRAIL-Rezeptor-Familie,^[162] der Neurotrophinrezeptor,^[163,164] die MUC-Familie der Mucine (Membran-gebundene und sezernierte),^[165–169] Blutplättchen-Glycoprotein GPIba^[170] und Blutplättchen-Integrin GPIIb/IIIa (αIIbβ3).^[171] Core-1- und/oder Core-2-*O*-Glycane kommen auch in vielen sezernierten und Serumglycoproteinen vor, einschließlich humanes Immunglobulin A1 (IgA1)^[172–177] und D (IgD),^[178–180] Erythropoetin,^[181–184] von Willebrand-Faktor (vWF),^[185] Blutgerinnungsfaktor X,^[186] Serum ApoC-III,^[187–189] humanes Choriongonadotropin (HCG),^[190–193] Interleukin-6 (IL-6),^[194,195] Tamm-Horsfall-Glycoprotein/Uromodulin,^[196–199] Gc-Makrophagen aktivierender Faktor (GcMAF, eine natürlich entstehende Form des menschlichen Vitamin-D3 bindenden Proteins),^[200] humanes Urin-Thrombomodulin^[201] und die durch Gallensalze stimulierte Lipase aus menschlicher Milch.^[202–205] Zudem trifft man *O*-Glycane in praktisch allen Mucinsekreten von Epithelzellen und auf allen tierischen Zelloberflächen, inklusive jener der Erythrozyten, an. Es ist deshalb vernünftig zu folgern, dass Core-1-*O*-Glycane von allen Säugetierzellen hergestellt werden können und somit auf vielen membranären und sezernierten Glycoproteinen anzutreffen sind. Veränderungen der Expression der *O*-Glycane vieler der oben genannten Glycoproteine sind mit molekularen Veränderungen des Glycoproteins verbunden, die oft in Verbindung mit Veränderungen in der zellulären Signalgebung, dem Metabolismus oder der Rezeptorfunktion stehen. Deshalb kann das Auftreten von Tn-Antigen auf Glycoproteinen zu veränderten Funktionen führen oder solche widerspiegeln.

Eine der am besten verstandenen Core-2-*O*-Glycanfunktionen ist die Erkennung von Selectinen und insbesondere die Bindung von P-Selectin-Glycoprotein-Ligand-1 (PSGL-1) an P-, L- und E-Selectin.^[206,207,209,210] Humanes PSGL-1 ist ein Mucin mit 16 Mucin-Domänen und enthält das Sialyl-Lewis-x (SLe^x)-Antigen auf Core-2-*O*-Glycanen.^[150,211] Diese Art von Glycan ist auf PSGL-1 nicht häufig. Nur das eine am äußersten N-Terminus bildet, zusammen mit drei benachbarten sulfatierten Tyrosinresten, die Bindungsstelle für P- und L-Selectin,^[30,212] während E-Selectin keine Sulfatreste braucht, um zu binden. Somit werden wohl funktionelle Bindungsstellen auf dem PSGL-1 von Leukozyten verloren gehen, wenn Biosynthesewege zu *O*-Glycanen wegen des Fehlens von T-Synthase und/oder Cosmc ausfallen. Verlängerte Core-1-*O*-Glycane werden zudem durch spezialisierte Endothelzellen innerhalb der hochendothelialen Venolen (HEV) exprimiert, und diese enthalten sulfatierte GlcNAc-Reste innerhalb des Sialyl-Lewis-x-Motivs (6-Sulfo-SLe^x).^[213,214] Ein Verlust der Fucosylierung^[215] oder der 6-*O*-Sulfatreste^[216,217] bewirkt, dass die Erkennung durch das L-Selectin von zirkulierenden Lymphozyten nicht mehr funktioniert und dass somit deren Homing und Rezirkulation beeinträchtigt werden. Die durch die T-Synthase regulierten Biosynthesewege zu Core-1 sowie verlängerten Core-1- und Core-2-*O*-Glycanen sind entscheidend für die Wanderungen der Leukozyten und allgemein für Entzündungsreaktionen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die Expression des Tn-Antigens auf Blutzellen biologische Konsequenzen für Entzündung, Blutstillung und die Bildung von Blutgerinnseln haben wird.

4.2. *O*-Glycane in der Biologie der Blutgefäße, der Angiogenese und der Lymphangiogenese

Dass *O*-Glycane eine Rolle bei der Gefäßbildung, einschließlich Angiogenese und Lymphangiogenese, spielen könnten, wurde erst klar, als man entdeckte, dass beide Prozesse nicht mehr funktionierten, wenn in Mäusen das T-Synthase-Gen ausgeschaltet worden war und die Tiere somit das Tn-Antigen exprimierten.^[124,218,219] Interessanterweise bewirkt der Verlust der T-Synthase in Endothel- und hämatopoetischen Zellen eine Fehlverbindung zwischen Blut- und Lymphgefäßen, was auf eine Rolle der *O*-Glycane bei der Entwicklung der lymphatischen Gefäße schließen lässt.^[145] Während der Mechanismus des Beitrags der *O*-Glycane noch unklar ist, konnte gezeigt werden, dass ein Ausschalten des Glycoproteins Podoplanin, das Dutzende von *O*-Glycanen, jedoch keine *N*-Glycane enthält, zum gleichen Phänotyp führt wie das Ausschalten der T-Synthase. Interessanterweise führt der teilweise Verlust von T-Synthase in Mäusen zu Thrombozytopenie und einer Nierenkrankheit, die durch eine verzerrte glomerulär-tubuläre Architektur und andere renale Läsionen gekennzeichnet ist und zu einer fortschreitenden Proteinurie und schließlich zum Tod führt.^[220] Die genauen pathologischen Auswirkungen der Tn-Expression auf Angiogenese und Lymphangiogenese sind nicht bekannt; sie könnten jedoch auf einem durch die verkürzten *O*-Glycane bedingten Verlust von Glycoproteinfunktionen und auf der Erkennung des Tn-Antigens durch Immunzellen und anderen pathologischen Zell-Zell-Interaktionen beruhen, wie in den Abschnitten 5.2 und 6.2 beschrieben.

4.3. *O*-Glycane in den Mucinen von Schleimhautgewebe

Ein Merkmal von Schleimhaut-Epithelzellen ist die Produktion von Mucinen und anderen O-glycosylierten Glycoproteinen, deren Expression bei diversen Krebsarten verändert sein kann.^[131,221–231] Mindestens 21 Gene für Mucine sind identifiziert worden (MUC1, 2, 3A, 3B, 4, 5AC, 5B, 6–9, 11–13 und 15–21 – man beachte, dass MUC15 und MUC18 keine Tandemwiederholungen aufweisen). Diese sind bezüglich ihrer Sequenzen nicht verwandt, doch ist ihnen gemeinsam, dass sie sich wiederholende Motive enthalten, die reich an Ser/Thr/Pro-Resten sind und große Mengen *O*-Glycane tragen.^[228,232] Mucine können von 377 bis hin zu >11 000 Aminosäureresten in einem einzigen Polypeptid enthalten,^[228] und das größte Allel des submaxillären Mucins des Schweins kodiert für ein Protein mit 13 288 AS.^[233] Diverse Mucine, die in Körperflüssigkeiten vorkommen, z. B. das Epitop von CA125,^[234] wurden auf ihre Eignung als Tumormarker getestet. Die Klonierung des Gens, das für CA125 kodiert, zeigte, dass es das MUC16-Gen ist.^[235] Diverse Mucine wurden bezüglich ihrer Expression von Tn- und/oder STn-Antigen im Zusammenhang mit Krebs untersucht (Abbildung 2). MUC1 wird in großen Mengen in Brust-, Ovarial- und anderen Karzinomen exprimiert^[236–238] und wurde auch mit der Expression des Tn- und STn-Antigens in Brust-, Kolorektal- und hepatozellulärem Karzinom sowie in anderen Neoplasien in Verbindung gebracht.^[239–248] Ähnliche Stu-

dien zeigten auch die Expression von Tn/STn auf MUC2, MUC4, MUC6 und anderen Mucinen in diversen Karzinomen.^[249-255] Wie in Abschnitt 6.1 diskutiert, arbeitet eine Reihe von Forschungsgruppen daran, diese Information zu verwenden, um auf der Basis von Mucinen Glycopeptid-impfstoffe gegen Tumoren, die solche Epitope exprimieren, zu entwickeln. Man beachte auch, dass Mucine wie MUC-1 und MUC-2, die in Kolontumoren vorkommen, auch andere Tumor-assoziierte Kohlenhydratantigene,^[221] wie Sialyl-Le^x^[256] und Sialyl-Le^a^[257] aufweisen.

Newman und Uhlenbrück beobachteten 1977, dass die Fettkügelchen-Membranproteine aus Kuhmilch Anti-Tn-Antiserum und HPA banden^[48] und die T- und Tn-Antigene enthielten. Dagegen banden menschliche Fettkügelchen-Membranproteine nur HPA. Auch das bovine submaxillare Mucin (BSM) enthält beachtliche Mengen an Tn- und Sialyl-Tn-Antigen.^[258] Somit sind die bovinen Fettkügelchen-Mem-

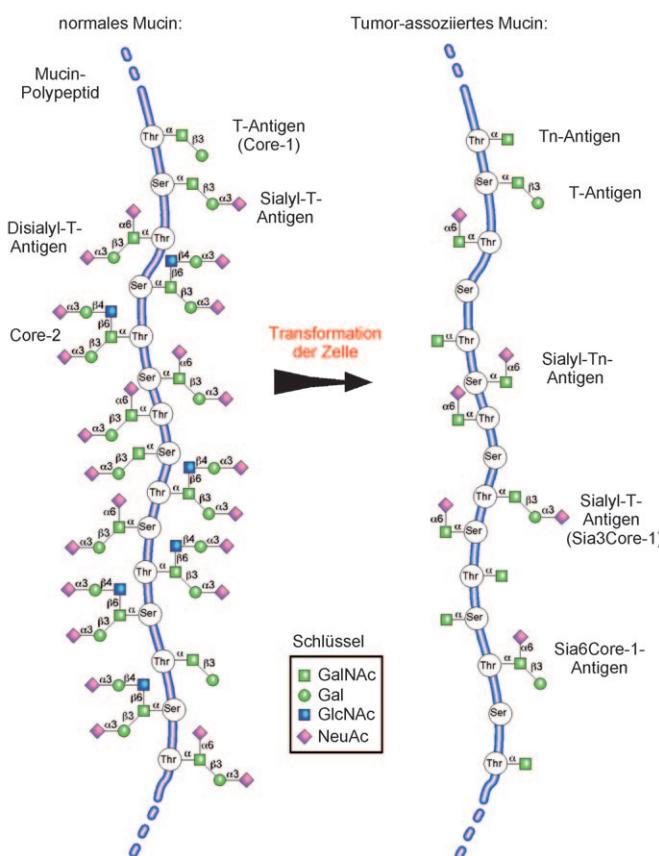


Abbildung 2. Mucine und die Expression von Tn- und Sialyl-Tn-Antigenen. Typische Mucine enthalten eine große Zahl von Ser-, Thr- und Pro-Resten in ihrem Polypeptidteil und sind reich an GalNAc α 1-O-Ser/Thr-Modifikationen. In normalen Mucinen dienen die GalNAc α 1-O-Ser/Thr als Vorläufer für verschiedene Core-Glycane, wie in Schema 3 gezeigt. Bei der Transformation von Zellen kann die Modifikation der GalNAc α 1-O-Ser/Thr beeinträchtigt sein und zu Tumor-assoziierten Mucinen führen, die die Tumor-assoziierten Kohlenhydratantigene (TACAs) Tn, Sialyl-Tn, und T enthalten. Ein Mechanismus für die Expression der Tn- und Sialyl-Tn-Antigene auf Mucinen ist der Funktionsverlust des Chaperons Cosmc (vergleiche Abbildung 1), doch könnten auch andere Faktoren zur erhöhten Expression dieser TACAs führen, wie im Text diskutiert.

branglycoproteine und BSM in Säugetieren seltene Beispiele von Glycoproteinen, die das Tn-Antigen natürlicherweise enthalten, ohne dass eine Krebs- oder andere Krankheit wie das Tn-Syndrom vorläge.

Der übliche Weg der *O*-Glycosylierung von Mucinen ist die Herstellung von Core-1-*O*-Glycanen, gefolgt von deren Verlängerung oder Umwandlung in Core-2-*O*-Glycane. Tatsächlich findet man das Transkript der T-Synthase in den meisten Zellen und Geweben.^[60,121] Eine beachtenswerte Ausnahme ist die Biosynthese von Core-3-*O*-Glycanen auf den Mucinen des Gastrointestinaltraktes, wo das *C3GnT*-Transkript spezifisch exprimiert wird.^[105] Somit wird jede Beeinträchtigung der T-Synthase oder der Core-3- β 3GlcNAcT zur vermehrten Bildung des Tn/STn-Antigens auf Mucinen in den verschiedensten Zellen führen.

Während wir viel über die Funktionen von *O*-Glycanen wissen, besonders von Core-1- und Core-2-*O*-Glycanen auf membranständigen Glycoproteinen, ist nur wenig über die spezifischen physiologischen Funktionen der Glycane auf MUC-Genprodukten, wie MUC1, MUC2 oder MUC4, bekannt. Einige Forscher haben vorgeschlagen, dass die *O*-Glycane auf diesen großen Mucinen bei Krebs eine antiadhäsive Funktion haben^[259,260] und somit eine indirekte Rolle bei der Unterstützung der Tumormetastasierung wahrnehmen, indem sie das Ablösen von Zellen von der extrazellulären Matrix (ECM) fördern. Überexpression von MUC1 kann mit der Integrin-vermittelten Adhäsion an die ECM interferieren.^[261] Alternativ kann die Glycosylierung von Mucinen wie Epiglycanin (MUC21)^[262] andere Tumorantigene an der Oberfläche von Tumorzellen maskieren, sodass deren Erkennung durch das Immunsystem behindert und somit die Tumorphproliferation gefördert wird.^[263] Der Verlust von *C3GnT* in Knockout-Mäusen führt zu einer verminderten Expression von MUC2 und einer erhöhten Anfälligkeit für Kolitis und Dickdarmkrebs,^[124] was darauf schließen lässt, dass die Glycosylierung der Mucine eine Barriere- und Schutzfunktion hat. Wir wissen allerdings wenig über die biologischen Rollen einzelner Glycanstrukturen (z. B. Core-1 und Core-3) per se auf diesen großen Mucinen. Die Glycosylierung von Atemwegsmucinen wie MUC5AC und MUC5B ist bei Krankheit verändert. Dies könnte, wie bei Patienten mit zystischer Fibrose, zu vermehrter Adhäsion und Biofilmbildung durch Pathogene führen, die Lungenentzündungen hervorrufen (z. B. *Pseudomonas aeruginosa*).^[264] Es sei jedoch noch einmal betont, dass in diesem Fall zwar *O*-Glycane durch Pathogene erkannt werden, dies jedoch keinen Hinweis auf normale, physiologische Funktionen spezifischer *O*-Glycanarten in Mucinen liefert.

5. Expression des Tn-Antigens im Zusammenhang mit menschlichen Krankheiten

5.1. *Tn-Syndrom*

Das Tn-Syndrom ist eine seltene hämatologische Störung, bei der Subpopulationen von Blutzellen aller Blutzelllinien das Tn-Antigen tragen. Wie in Abschnitt 1.1 beschrieben, wurde das Tn-Antigen erstmals bei einem Patienten, der am

Tn-Syndrom litt, entdeckt.^[1] Klinisch erscheinen solche Patienten im Allgemeinen gesund und müssen nicht therapiert werden.^[265] Laboruntersuchungen können eine mäßige hämolytische Anämie und eine verminderte Zahl von Thrombozyten und Leukozyten ans Licht bringen.

Dahr et al.^[13] berichteten 1975, dass die Erythrozyten-Glycoproteine eines Patienten mit Tn-Syndrom verminderte Mengen Sialinsäure und Galactose enthielten, was mit der Freilegung von GalNAc-Resten in α -Bindung zu Hydroxygruppen von Ser/Thr einherging. Die Autoren schlugen vor, dass dies auf einer mangelhaft funktionierenden Galactosyltransferase beruhen könnte. Da Blutzellen aller Linien betroffen waren, jedoch auch viele normale Zellen vorhanden waren, schien es wahrscheinlich, dass die Störung auf einer somatischen Mutation auf Stufe der pluripotenten Stammzellen beruhte. Interessanterweise hat Bird 1974 vorgeschlagen, dass das Tn-Antigen in Patienten mit Tn-Syndrom spontan aufgrund einer somatischen Mutation entstehen könnte.^[266] Sein Vorschlag war die Antwort auf eine Frage von Springer betreffend Birds Vortrag am Jahrestreffen der New York Academy of Sciences über die Spezifität von Pflanzenagglutininen für Antigene in den Erythrozytenmembranen.

Nachdem die Struktur des Tn-Antigens als eine verkürzte Form des T-Antigens erkannt worden war, schlugen Cartron et al. vor, dass seine Expression auf einem Defekt der β -Galactosyltransferase in den Tn-Antigen-positiven Zellen von Patienten mit Tn-Syndrom beruhe.^[267,268] Schon lange vorher hatte man bemerkt, dass bei Patienten, deren Blutplättchen zu >80% das Tn-Antigen exprimierten, ein Defekt der Glycosylierung des Glycoproteins GPIb vorlag, der mit der Thrombozytopenie, an der diese Patienten litten, korrelierte.^[43] Tatsächlich wurde später gezeigt, dass ein substanzeller Teil der T-Zellklone eines Patienten mit Tn-Syndrom überhaupt keine T-Synthase-Aktivität aufwies.^[269] Es stellte sich heraus, dass die zugrunde liegenden genetischen Veränderungen somatische Mutationen von *Cosmc* waren, wie in Tabelle 1 zusammengefasst. Diese Mutationen verursachen entweder eine Verschiebung des ORF und/oder ein Stopcodon oder bewirken, dass das *Cosmc*-Gen nicht transkribiert wird, sodass die Chaperonfunktion gänzlich fehlt oder schwer beeinträchtigt ist. Die Tatsache, dass die immortalisierten Leukozyten des Patienten Tn4 (Tabelle 1) kein Transkript von *Cosmc* aufwiesen, war möglicherweise durch eine Veränderung in der Promotorregion verursacht. Thurnher

et al.^[270] stellten die Hypothese auf, dass diese Veränderung eine Hypermethylierung sein könnte und dass dies die Suppression der T-Synthase bei Tn-Syndrom-Patienten erklärt. Es wäre interessant, das gesamte für *Cosmc* kodierende Gen der immortalisierten Leukozyten des Patienten Tn4 zu untersuchen, um zu sehen, ob der Verlust an Transkript auf einer Mutation oder der Hypermethylierung des Promotors beruht.

Die hämolytische Anämie und die verminderten Thrombozyten- und Leukozytenzahlen, die bei Patienten mit Tn-Syndrom beobachtet werden, scheinen durch mehrere Faktoren bedingt zu sein, die nicht vollständig verstanden werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass Autoantikörper gegen das Tn-Antigen gebildet werden. Diese könnten vom Typ der kalten IgM-Agglutinine sein, wie dies für Autoantikörper gegen das aus Kohlenhydraten bestehende I-Antigen auf adulten Erythrozyten gezeigt wurde.^[271]

5.2. Krebs

Terminales, α -gebundenes GalNAc auf humanen Tumorzellen wurde erstmals 1969 beschrieben, ausgehend von der Beobachtung, dass diese Zellen das Tn-Antigen bindende HPA banden.^[56] Springer et al. konnten das Tn-Antigen in ungefähr 90% der Brustkarzinome nachweisen.^[75] Kumulative Studien zeigten, dass 70–90% der Fälle von Krebs des Dickdarms, der Lunge, der Blase, der Zervix, des Ovars, des Magens und der Prostata das Tn-Antigen exprimieren.^[272–274] Im Unterschied dazu wurde in normalen, erwachsenen Geweben keine oder nur wenig Expression beobachtet. In vielen Krebsarten, einschließlich Zervixkrebs,^[275,276] Adenokarzinom der Lunge,^[277] kolorektales Karzinom,^[278] Brustkarzinom^[279] und Magenkarzinom,^[280] korreliert die Expression des Tn-Antigens mit dem metastatischen Potenzial und einer schlechten Prognose.

Auch wird in den verschiedensten humanen Tumoren die Expression von Sialyl-Tn-Antigen beobachtet. Ein wahrscheinlicher Mechanismus, der diesem Befund zugrunde liegt, ist eine erhöhte Expression oder Aktivität der ST6GalNAc-I.^[115,281] Das Enzym ST6GalNAc-II, das *in vitro* auch Sialyl-Tn-Antigen bilden kann, ist *in vivo* wahrscheinlich wichtiger für die Herstellung von Sia6Core-1^[115] (Schema 1). Verkürzte O-Glycane auf den Mucinen von Krebszellen können zudem durch Veränderungen des Expressionsverhältnisses von Core-2- β 6-GlcNAcT und ST3Gal-I zustande kommen.^[282]

Die Mechanismen, die die Tn-Antigen-Expression mit der Krebsprogression verknüpfen, werden erst ansatzweise verstanden. Man hat herausgefunden, dass Tn-Antigen auf von Kolonkarzinomzellen gebildetem MUC1 vom „macrophage galactose-type lectin“ (MGL) gebunden wird (siehe auch Abschnitt 6.2). Da MGL von unreifen menschlichen dendritischen Zellen und insbesondere von tollerogenen dendritischen Zellen ex-

Tabelle 1: Zusammenfassung der somatischen *Cosmc*-Mutationen, die in Patienten mit Tn-Syndrom identifiziert wurden.

Patienten (Geschlecht)	Tn/STn-Expression	Mutationen im <i>Cosmc</i> -Gen	Änderungen im <i>Cosmc</i> -Protein	Aktivität	Lit.
C.C. (männlich)	Tn und STn	C202T	R68*	2–5%	[82]
C.L. (männlich)	Tn und STn	G454A	E152K	0	[82, 208]
(Tn1)					
Tn2 (weiblich)	Tn und STn	T577C	S193P	n.u. ^[a]	[208]
Tn3 (männlich)	Tn und STn	G3C	M11	n.u. ^[a]	[208]
Tn4 (männlich)	Tn und STn	kein Transkript (im Gen C428T)	kein Protein	0	[208]

[a] Nicht untersucht. * bezeichnet ein Stopcodon.

primiert wird, könnte die Bindung von Tn-Antigen immun-suppressive Wirkungen haben und es dem Tumor ermöglichen, sich der Überwachung durch das Immunsystem („immunosurveillance“) zu entziehen.^[283] Es ist zudem möglich, dass ähnlich wie beim „low density lipoprotein“ (LDL)-Rezeptor,^[137,138] Transferrin-Rezeptor,^[284] P-Selectin-Glycoproteinliganden (PSGL-1)^[285] oder Dystroglycan^[286] unvollständige O-Glycosylierung von Rezeptoren auf Krebszellen deren Expression und/oder biologische Aktivität beeinträchtigt. In der Folge könnten die Proliferationskontrolle und die adhäsiven Eigenschaften von Krebszellen verändert sein.

Ein molekularer Mechanismus, der der Expression des Tn-Antigens durch humane Tumorzellen zugrunde liegt, ist der Verlust von funktionierendem *Cosmc*.^[61] Das Auftreten des Tn-Antigens in zwei Proben von humanem Zervixkarzinom, in Kolonkrebs und in Zelllinien, die von Melanomen abstammen, liess sich entweder auf somatische Mutationen von *Cosmc* oder das Fehlen des *Cosmc*-Transkriptes zurückführen (Tabelle 2). In Übereinstimmung mit den Befunden zu den humanen Tumoren exprimieren Mäuse-Fibrosarkome das Tn-Antigen wegen der Deletion von 26 AS zwischen Position 170 und 195 innerhalb der luminalen Domäne von *Cosmc*. Die Mäuse-Neuroblastom-Zelllinie Neuro-2a^[287] (auch bekannt als C1300)^[287,288] ist Tn-Antigen-positiv, da ihr *Cosmc* eine G301T-Mutation enthält, die zu einem vorzeitigen Stopcodon führt. Mit der Entdeckung von somatischen *Cosmc*-Mutationen in Krebszellen fand man das erste Beispiel eines einzelnen genetischen Locus, der die Expression eines tumorspezifischen Kohlenhydratantagens in diversen Arten von humanen neoplastischen Erkrankungen reguliert.

Bemerkenswerterweise hatten Dahr et al. 1974 geschrieben,^[12] sie seien versucht zu spekulieren, dass derselbe pathogenetische Mechanismus in Tumoren und im Tn-Syndrom zur Freilegung des Tn-Antigens führt. Vierunddreißig Jahre später wurde nun nachgewiesen, dass diese Spekulation

richtig war und dass ein gemeinsamer pathogener Mechanismus Mutationen in *Cosmc* sind, die dessen Funktion beeinträchtigen (Tabellen 1 und 2). Selbstverständlich gibt es, wie oben beschrieben, auch alternative Wege für die Bildung von Tn-Antigen, und somit muss jede Tumorart sorgfältig analysiert werden, um zu bestimmen, welcher Bildungsweg betroffen ist.

5.3. IgA-Nephropathie

IgA-Nephropathie (IgAN) ist die häufigste primäre Glomerulonephritis^[289] und führt bei 20–40% der Patienten innerhalb von 20–25 Jahren zu terminalem Nierenversagen.^[290] IgAN findet sich am häufigsten bei Chinesen und Japanern, relativ selten hingegen bei Personen afrikanischer Herkunft. Dies lässt darauf schließen, dass genetische Faktoren für die Pathogenese eine Rolle spielen.^[291] Bis heute wurde jedoch noch kein verursachendes Gen identifiziert,^[292–294] und es scheint, dass zusätzliche physiologische und Umweltfaktoren dazu beitragen müssen, dass die Krankheit sich klinisch manifestiert. Die einzige Methode zur eindeutigen Diagnose von IgAN beruht auf Nierenbiopsien.^[295] Charakteristisch sind Ablagerungen von polymerem IgA, vor allem der IgA1-Subklasse, im Mesangium. Diese Ablagerungen lösen glomeruläre Entzündungsreaktionen aus, die zur progressiven Schädigung der Nieren führen.

Das IgA1, das man aus den Nieren von IgAN-Patienten isolieren kann, enthält typischerweise Galactose-freie O-Glycane in seiner Scharnierregion (Abbildung 3). Die Scharnierregion von IgA1 enthält viele Proline, Serine und Threonine. Von den neun Ser/Thr-Resten, die für die O-Glycosylierung verfügbar wären, tragen ungefähr fünf O-gebundene Glycanketten.^[173] In normalem IgA1 bestehen die Scharnier-O-Glycane aus dem Core-1-Disaccharid (Galβ1-3GalNAc1-Ser/Thr oder T-Antigen), das eine oder zwei

Tabelle 2: Zusammenfassung der *Cosmc*-Mutationen, die in humanen Tumorzelllinien sowie Mäuse-Fibrosarkomen und -Neuroblastomzellen identifiziert wurden.

humane Krebsproben und Tumorzelllinien	Tn-/STn-Expression	Mutationen im <i>Cosmc</i> -Gen	Änderungen im <i>Cosmc</i> -Protein	Aktivität	Lit.
humaner Zervixkrebs	Tn und STn	Deletion des funktionellen Allels (LOH)	kein Protein hergestellt	0	[61]
humane Jurkat (E6.1, I2.1, I9.2)	Tn	T-Deletion in Position 473	Verschiebung ORF; N-terminales 168AS-Peptid	2–5 %	[60], nicht publizierte Resultate für I2.1 und I9.2
humane LSC	Tn und STn	T-Insertion in Position 53	Verschiebung ORF; N-terminales 28AS-Peptid	0	[61]
humane LS174T-Clone I	Tn und STn	A-Deletion in Position 482	Verschiebung ORF; N-terminales 170AS-Peptid	5 %	[61]
humane LS174T-Clone II	Tn und STn	G553T	G185*	5 %	[61]
humane LOX	Tn und STn	Deletion des Promotors (kein Transkript)	kein Protein hergestellt	0	[61]
Maus-Fibrosarkom	Tn und STn	Deletion C509-A587	Deletion von T170L195	n.u. ^[a]	[287]
Maus-Neuroblastom (Neuro2a, C1300)	Tn und STn	G301T	E101*	n.u. ^[a]	[287]

[a] Nicht untersucht. * bezeichnet ein Stopcodon.

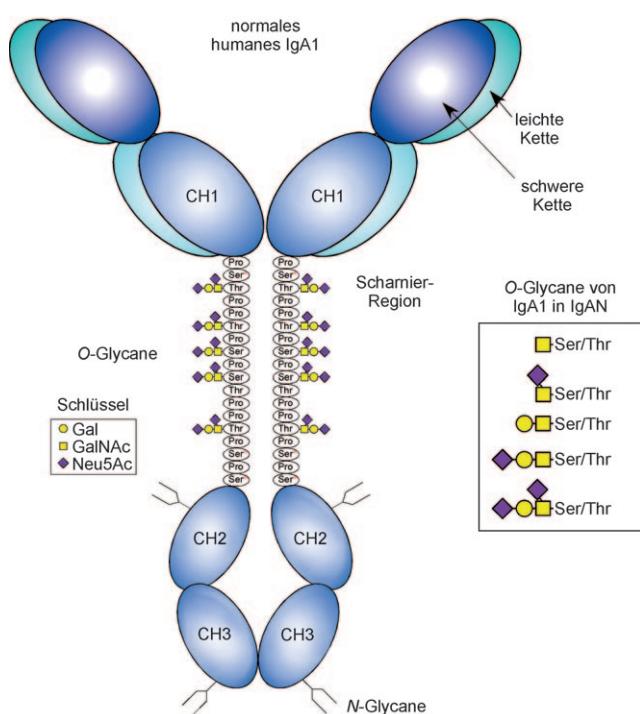


Abbildung 3. IgA1 und die O-Glycosylierung der Scharnierregion. Während normales IgA1 an ca. fünf Stellen der Scharnierregion O-Glycane vom Core-1-Typ trägt, enthält IgA1 von Patienten, die an IgA-Nephropathie leiden, O-Glycane mit reduziertem Galactosegehalt, und viele Glycane sind verkürzt und tragen Tn- und STn-Antigene.

Sialinsäuren trägt.^[295] Bei IgA-Nephropathie finden sich unter den O-Glycanen des IgA1 Tn- und STn-Antigene, wahrscheinlich wegen einer auf die B-Zellen beschränkten Reduktion der T-Synthase-Aktivität.^[296]

Ob *Cosmc* eine Rolle für die Pathogenese von IgAN spielt, ist ungewiss. Studien legten nahe, dass die Menge an *Cosmc*- und *T-Synthase*-Transkript in den B-Zellen von Patienten mit IgAN reduziert sei.^[119,297–299] Andere Untersuchungen brachten IgAN mit Polymorphismen der für *Cosmc* und *T-Synthase* kodierenden Gene in Zusammenhang.^[300] Nochmals ein anderer Bericht kam zum Schluss, dass bei Patienten mit IgAN keine aktivitätsmindernden *Cosmc*-Mutationen vorliegen.^[301] Ein zentrales Problem bei der Klärung der Rolle von *Cosmc* bei IgAN ist, dass wahrscheinlich nur ein kleiner Teil der Plasmazellen an der Sekretion des IgA1 beteiligt ist, das zur Entstehung der Krankheit führt. Die Identifizierung und Isolierung dieser Population von Plasmazellen ist äußerst schwierig und doch entscheidend für die Klärung der Frage nach der Rolle von *Cosmc* und/oder *T-Synthase* bei der Pathogenese der IgAN.

Die abnormale Glycosylierung der IgA1-Scharnierregion scheint zur Pathogenese der IgAN beizutragen. In Abwesenheit von Galactose können die terminalen GalNAc der Scharnierregion durch natürlich vorkommende IgA1- oder IgG-Antikörper erkannt werden, was zur Bildung zirkulierender Immunkomplexe führt.^[295] Deshalb könnte die Neigung eines Individuums, autoimmune Anti-Glycan-Antikörper zu bilden, ein Kofaktor für den Ausbruch der Krankheit sein.^[291] Alternativ könnten die falsch glycosylierten Schar-

nierregionen dazu führen, dass IgA1-Moleküle leichter aggregieren und somit makromolekulare Komplexe bilden, ohne dass daran ein immunologischer Mechanismus beteiligt wäre.

Die makromolekularen IgA1-Komplexe können dem hepatischen Katabolismus möglicherweise entgehen, weil sie zu groß sind, um durch die endothelialen Fenestrae zu den Hepatozyten zu gelangen.^[302] Stattdessen werden sie zur renalen Zirkulation umgeleitet, wo die endothelialen Fenestrae, die über dem glomerulären Mesangium liegen, breiter sind. Die mesangialen Zellen binden hochmolekulares IgA1 mit hoher Affinität durch einen bisher unbekannten Mechanismus.^[303] Die Aktivierung von Zellen des Mesangiums durch die IgA1-Immunkomplexe wird als der auslösende Faktor der Pathogenese der IgAN angesehen.

5.4. Andere Störungen und Krankheiten, bei denen das Tn-Antigen exprimiert wird

Das Tn-Antigen wird von verschiedenen Parasiten exprimiert. Es wurde zuerst in den Schistosomula von *Schistosoma mansoni* entdeckt. Diese produzieren O-Glycane, die aus einfachen Monosacchariden – besonders O-GlcNAc, aber auch O-GalNAc – bestehen.^[304] Der Bandwurm (Zestode) *Echinococcus granulosus* exprimiert das Tn-Antigen im Larven- und Erwachsenenstadium. Die höchsten Mengen Tn-Antigen finden sich in den Sekreten des erwachsenen Wurms.^[305] *Echinococcus granulosus* verursacht Krankheiten des Viehs und des Menschen. Humane zystische Echinokkose ist eine chronische Krankheit und kann zum Tod führen. Das Tn-Antigen kann in Serumproben betroffener Patienten nachgewiesen werden. Die Rolle des Tn-Antigens im Parasitismus von *Echinococcus granulosus* ist nicht bekannt. Jedoch stellen die Antigene in den Sekreten des Wurms die wichtigste immunologische Herausforderung für den Wirt dar und sind deshalb wahrscheinlich entscheidend dafür, ob ein erfolgreicher Parasitismus etabliert werden kann oder nicht.

Cryptosporidium parvum ist eine durch Wasser übertragbare Kokzidie, die bei Mensch und Tier Durchfallerkrankungen auslöst. In immunkompetenten Wirten verläuft die Infektion asymptomatisch und/oder selbstbeschränkend. In Patienten mit geschwächtem Immunsystem hingegen kann eine Infektion schwer, chronisch oder gar tödlich verlaufen. Die Infektion mit *Cryptosporidium* erfolgt, wenn Oozysten mit Essen oder kontaminiertem Wasser eingenommen werden. Die Oozysten setzen Sporozoiten frei, die sich spezifisch an die Epithelzellen des Dünndarms anheften und diese infizieren können. Die Infektion ist abhängig von Mucin-ähnlichen Glycoproteinen, dem gp15/40 und gp900, die von den Sporozoiten exprimiert oder sezerniert werden. Es wurde gezeigt, dass diese Glycoproteine große Mengen O-gebundener α-GalNAc-Epitope tragen.^[306] Es schien zudem, dass diese für die Infektion entscheidend sind, denn die Infektivität der Sporozoiten konnte durch GalNAc-spezifische Lectine blockiert werden. *Cryptosporidium* exprimiert auch ein multivalentes, Gal/GalNAc-bindendes Lectin, genannt P30.^[307] P30 assoziiert durch Protein-Kohlenhydrat-Wechsel-

wirkungen mit gp40 und gp900. Da p30, gp900 und gp40 für das Anheften von Sporoziten an intestinale Epithelzellen wichtig zu sein scheinen, bilden diese Proteine wahrscheinlich einen adhäsiven Komplex. Da zudem p30 ein multivalentes Gal/GalNAc-spezifisches Lectin ist, könnte es multiple Wechselwirkungen mit Kohlenhydraten des Parasiten und des Wirtes eingehen und so beim Invasionsprozess eine Brücke zwischen Parasiten- und Wirtszellen bilden.

Besonders interessant ist die Beobachtung, dass Anti-Tn-Antikörper die Infektion von Lymphozyten durch HIV-1 blockieren können^[308,309] und dass gp120 und gp160 beide das Tn-Antigen tragen. Tatsächlich enthalten diverse virale Hüllen-Glycoproteine nicht nur *N*-Glycane, sondern auch *O*-Glycane. Einige Beispiele von Viren und viralen Glycoproteinen, die *O*-Glycane enthalten, sind Herpes-simplex-Virus Typ 1,^[310–312] das HA-Protein des Vaccinia-Virus,^[313] GP1 des respiratorischen Synzytialvirus,^[314] Mäuse-Hepatitisvirus,^[315] gp70 des Maus-Leukämievirus,^[316] E1 des Coronavirus^[315,317] und gp160/120 von HIV.^[308,309,318] Bezuglich des HIV wurde vorgeschlagen, dass die Infektion der T-Zellen dazu führt, dass das Tn-Antigen exprimiert wird,^[309] doch ist unklar, nach welchem Mechanismus dies geschehen könnte und ob es sich um ein generelles Phänomen handelt. Die Sache wird auch dadurch kompliziert, dass Tn-Antigen in den Glycoproteinen der häufig verwendeten T-Zelllinie Jurkat vorkommt,^[60,120] da diese nicht in der Lage ist, funktionierende T-Synthase herzustellen.^[60] Die Expression des Tn-Antigens durch Jurkat-Zellen wurde als Target verwendet, um den Gentransfer durch Tn-vermittelte Endozytose von Antikörper-gebundener DNA zu verbessern.^[85] Interessant ist auch die neuere Beobachtung, dass die Infektion von Frettchen mit dem Influenzavirus H1N1 zu einer erhöhten Expression des Sialyl-Tn-Antigens führt.^[319]

6. Tn-Antigen als Target zur Behandlung von Krankheiten

6.1. Entwicklung von Tn-Antigen-basierten Impfstoffen

Die Entdeckung von Tn-Antigen auf den Zelloberflächen von Neoplasien hat intensive Arbeiten zur Entwicklung von Tumorimpfstoffen auf Tn-Antigen-Basis angeregt. Frühe Experimente sind die von Springer et al., die als Antigene Erythrozyten-Glycoproteine verwendeten, die sie aus überalterten Blutkonserven isoliert und mit Enzymen behandelt hatten, um das Tn-Antigen freizulegen.^[320] Die Forschungsgruppe führte mit diesem Reagens Haut-Hypersensitivitätstests durch und behauptete, so diverse Krebserkrankungen – Jahre bevor sie in Biopsien oder Röntgenbildern erkennbar wurden – diagnostizieren zu können.^[320,321] Zudem verwendeten Springer et al. ihre Zubereitung zur Langzeitimpfung gegen Karzinome und berichteten von großen Erfolgen bei der Behandlung von Brustkrebs. Von 16 behandelten Patientinnen überlebten alle mehr als fünf Jahre und 10 von ihnen mehr als zehn Jahre. Indem die Forscher diese Zahlen mit den NCI-1990-Standard-PDQ-Daten verglichen, kamen sie zum Schluss, dass die Wahrscheinlichkeit, dass ihre Resultate für das Fünfjahres-Überleben auf Zufall beruhten, äußerst gering

seien ($p < 10^{-8}$).^[320] Zwar war diese Arbeit aus heutiger Sicht eine Pionierleistung, jedoch ist es wegen der rätselhaften Qualität der Erythrozyten-Glycoprotein-Zubereitung, der nichtvalidierten Diagnosemethoden und des Fehlens sinnvoller Kontrollen unmöglich, die Validität der Daten zu beurteilen.

Es wird noch immer versucht, Impfstoffe auf der Basis von Tn-Antigen herzustellen, und die Resultate sind ermutigend. Anders als bei Springer et al. zielen jüngere Versuche auf wohldefinierte und reine Tn-Antigen-Zubereitungen ab. Diese können nicht in ausreichenden Mengen aus natürlichen Quellen isoliert werden und werden deshalb mit enzymatischen und/oder chemischen Methoden hergestellt.^[322,323]

Damit Antikörper gegen ein Kohlenhydratantigen gebildet werden, müssen T-Helper-Lymphozyten aktiviert werden und mit B-Lymphozyten kooperieren. Allerdings aktivieren Kohlenhydrate alleine die T-Helper-Lymphozyten im Allgemeinen nicht und sind nur beschränkt immunogen.^[25] Deshalb kuppelt man sie zur Herstellung von Impfstoffen normalerweise an ein Trägerprotein, das die Erkennung durch das Immunsystem verbessert und Epitope liefert, die T-Helper-Lymphozyten aktivieren können.^[324] Wird ein solches Glycoprotein durch Antigen präsentierende Zellen prozessiert und präsentiert, wird eine starke T-Zell-vermittelte Immunantwort aufgebaut, die zur Freisetzung von Zytokinen führt, die wiederum die Bildung spezifischer Antikörper fördern. Die Antikörper sind dann nicht nur gegen das Protein gerichtet, sondern auch gegen die weniger immunogenen Kohlenhydratantigene und können vom IgG- oder auch einem anderen Isotypen sein. Die Unterschiede in den Immunogenitäten verschiedener Präsentationsarten des Tn-Antigens auf dem Protein Keyhole-Limpet-Hämocyanin (KLH) deuteten darauf hin, dass die entscheidende immunogene Struktur, in der Tn-Antigen erkannt wird, eine Gruppe von drei bis vier nacheinander aufgereihten Monosacchariden ist.^[325]

Andere Glycopeptid-Impfstoffe, die Gruppen von Tn-Antigenen tragen, wurden hergestellt, indem GalNAc auf chemischem oder enzymatischem Weg an Ser/Thr-Reste von MUC1-Peptidfragmenten gebunden wurde.^[323,326] Da das MUC1-Glycoprotein in den meisten epithelialen Krebsarten vermehrt gebildet und abnorm glycosyliert wird (siehe auch Abschnitte 4.3 und 5.2), wird dieser Ansatz als besonders vielversprechend angesehen. Es konnte gezeigt werden, dass MUC1-Glycopeptide (bestehend aus drei Tandemwiederholungen, die neun Tn-Antigene tragen) durch Bindung der Tn-Antigene durch den MGL-Rezeptor spezifisch in dendritische Zellen aufgenommen wurden.^[323] Die Glycopeptide traten dann in die HLA-1 und HLA-2-Kompartimente über, die mit der Induktion von Tn1-Immunität zusammenhängen.

Die Immunantwort kann weiter verstärkt werden, indem zusätzlich zur Präsentation von mehreren, nahe beieinanderstehenden Tn-Antigenen auf einem Trägerpeptid als dritte Komponente ein immunologisches Adjutans, z.B. das Saponin QS21, verabreicht wird.^[327–329] Diverse Drei-Komponenten-Impfstoffe gegen Krebs sind in klinischen Studien getestet worden. Sie erschienen sicher, riefen keine Zeichen von Autoimmunität hervor und evozierten in allen Patienten eine Immunantwort gegen das Tn-Antigen.^[84] Bei 33 % von 15

Prostatakrebspatienten, die den Drei-Komponenten-Impfstoff Tn-KLH mit QS21 erhalten hatten, war dies mit einem verminderten Ansteigen des Tumormarkers Prostata-spezifisches Antigen (PSA) verbunden.^[325] Ob solch verminderte PSA-Anstiege auch mit einer verlangsamten Progression des Prostatakrebses und einer Verlängerung des Lebens der Patienten einhergehen, muss noch geklärt werden.

Die klinische Wirksamkeit eines Tn-Antigen-Impfstoffes hängt entscheidend von der Gegenwart des Tn-Antigens an der Oberfläche der Krebszellen ab, denn nur so können die gebildeten Antikörper binden und die Abtötung der Krebszellen auslösen. Die Resultate zur Expression des Tn-Antigens auf Tumoren der Prostata sind jedoch widersprüchlich. Li et al. kombinierten die Resultate von immunhistochemischen Studien mit vier verschiedenen Antikörpern, deren Kohlenhydratspezifitäten durch Kohlenhydrat-Mikroarray-Analysen bestimmt worden waren. Sie fanden, dass von 77 Prostataatumoren nur 4–26 % das Tn-Antigen exprimieren.^[84] Eine Vorauswahl der Patienten mit Tn-positiven Tumoren könnte demnach die Erfolgsrate von Tn-Antigen-Impfstoffen deutlich erhöhen.

6.2. Entfernung von Zellen, die das Tn-Antigen exprimieren

Das Tn-Antigen kommt beim gesunden Menschen nicht vor, sodass es nicht erstaunlich ist, dass es vom Immunsystem als fremd erkannt wird. Vom MGL-Rezeptor, der auf myeloiden Antigen präsentierenden Zellen exprimiert wird, weiß man, dass er spezifisch terminale α - und β -gebundene GalNAc-Reste erkennt.^[330] MGL-positive Antigen präsentierende Zellen findet man im Dünndarm und den Lymphknoten.^[331] MGL ist ein endozytotischer Rezeptor und wird zusammen mit dem gebundenen Liganden endozytiert. Der Ligand wird dann entlang des endosomal-lysosomalen Weges transportiert und auf Haupthistokompatibilitäts-Komplex-Molekülen der Klasse II (major histocompatibility complex class II, MHC II) präsentiert. MGL kann die durch Toll-ähnliche Rezeptoren ausgelösten Signalkaskaden regulieren und somit das Resultat einer Immunantwort beeinflussen. In Abhängigkeit davon, ob die dendritischen Zellen weiter aktiviert werden, kann die Bindung von Tn-Antigen entweder zu einer Immunantwort und dem Abtöten von Tn-Antigen-positiven Zellen oder aber zu Immuntoleranz und der Hemmung von Immunantworten führen.^[332,333] Zu klären, wie das Gleichgewicht zwischen Immunantwort gegen und Immuntoleranz für das Tn-Antigen reguliert wird, ist nicht nur entscheidend für das Verständnis der Pathogenese von Tn-Syndrom, IgAN und der Entwicklung Tn-Antigen-positiver Tumoren, es wäre auch hilfreich, um wirksame, auf dem Tn-Antigen basierende Tumorimpfstoffe zu entwerfen.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Das Tn-Antigen, obwohl so klein und einfach in seiner Struktur, hat seit seiner Entdeckung vor mehr als 50 Jahren gewaltiges Interesse geweckt. Die Biologie oder Pathophysiologie des Tn-Antigens ist offensichtlich komplex. Die ab-

normale Expression des Tn-Antigens bei Krankheit und die Expression des Tn-Antigens durch humane Pathogene lassen darauf schließen, dass es ein zentrales Target der Regulation und der Immunität ist. Die Entdeckung, dass die Tn-Antigen-Expression bei menschlichen und tierischen Krankheiten auf einer Funktionsbeeinträchtigung des molekularen Chaperons Cosmc, das die Faltung der T-Synthase reguliert, beruhen kann, hat eine neue Forschungsrichtung hervorgebracht. Diese zielt darauf ab, die genetische und möglicherweise epigenetische Regulation der Protein-O-Glycosylierung aufzuklären. Viel ist noch zu tun, um die Faktoren, die zur pathologischen Expression des Tn-Antigens beitragen und die komplexen biosynthetischen Kontrollen, die seine Expression in normalen Zellen verhindern, zu verstehen. Neue Strategien zur Entwicklung von Impfstoffen, die an Peptide gekoppeltes Tn/STn-Antigen enthalten, sind vielversprechend und könnten zu wirksamen Therapien gegen Tumoren, die diese Antigene exprimieren, führen. Auch molekulare Strategien zur Wiederherstellung einer normalen O-Glycosylierung könnten sich als fruchtbare erweisen, jetzt wo die spezifischen molekularen Targets identifiziert sind. Allerdings wissen wir über die normalen Funktionen der O-Glycane, die sich vom Tn-Antigen ableiten, erst sehr wenig. Ein solches Wissen könnte jedoch auch dazu beitragen, die pathologischen Folgen der Tn-Expression zu definieren. Es ist zu hoffen, dass die Kombination von Methoden der Synthesechemie, Immunologie, Zellbiologie, Biochemie sowie humanen und tierischen Genetik zu Durchbrüchen im Verständnis der Strukturen und Funktionen von O-Glycanen und der Rollen des Tn/STn-Antigens bei Krankheiten führen wird.

Wir danken Dr. Jamie Heimburg-Molinaro und Sandra Cummings für ihre hilfreiche Kritik und Anregungen bei der Verfassung des Manuskripts. Diese Arbeit wurde durch den NIH RO1-Forschungskredit (RO1GM068559) an R.D.C. und durch den NIH RO1-Forschungskredit (RO1K80876) an T.J. unterstützt.

Eingegangen am 19. April 2010
Online veröffentlicht am 21. Januar 2011

-
- [1] R. Moreau, J. Dausset, J. Bernard, J. Moullec, *Bull. Mem. Soc. Med. Hop. Paris* **1957**, 73, 569–587.
 - [2] G. Huebner, *Z. Immunitaetsforsch. Exp. Ther.* **1926**, 45, 223–248.
 - [3] O. Thomsen, *Z. Immunitaetsforsch. Exp. Ther.* **1927**, 52, 85–107.
 - [4] O. Thomsen, *C. R. Seances Soc. Biol. Ses Fil.* **1927**, 96, 556–558.
 - [5] O. Thomsen, *Z. Immunitaetsforsch. Exp. Ther.* **1928**, 57, 301–319.
 - [6] V. Friedenreich, *The Thomsen Hemagglutination Phenomenon*, Vol. 1, Levin and Munskgaard, Copenhagen, 1930.
 - [7] J. Dausset, J. Moullec, J. Bernard, *Blood* **1959**, 14, 1079–1093.
 - [8] K. Muroi, T. Suda, M. Nakamura, S. Okada, H. Nojiri, Y. Amemiya, Y. Miura, S. Hakomori, *Blood* **1994**, 83, 84–91.
 - [9] C. Kawano-Yamamoto, K. Muroi, Y. Nagatsuka, M. Higuchi, S. Kikuchi, T. Nagai, S. I. Hakomori, K. Ozawa, *Leuk. Res.* **2006**, 30, 829–839.
 - [10] J. R. Jass, L. M. Allison, S. Edgar, *Pathology* **1994**, 26, 418–422.

- [11] Y. Cao, A. Merling, U. Karsten, S. Goletz, M. Punzel, R. Kraft, G. Butschak, R. Schwartz-Albiez, *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 89–99.
- [12] W. Dahr, G. Uhlenbrück, G. W. Bird, *Vox Sang.* **1974**, *27*, 29–42.
- [13] W. Dahr, G. Uhlenbrück, H. H. Gunson, M. Van Der Hart, *Vox Sang.* **1975**, *29*, 36–50.
- [14] R. N. Iyer, D. M. Carlson, *Arch. Biochem. Biophys.* **1971**, *142*, 101–105.
- [15] D. M. Carlson, *J. Biol. Chem.* **1968**, *243*, 616–626.
- [16] E. Klenk, G. Uhlenbrück, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **1960**, *319*, 151–160.
- [17] G. Uhlenbrück, *Immunol. Commun.* **1981**, *10*, 251–264.
- [18] E. Klenk, U. W. Hendricks, W. Gielen, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **1962**, *330*, 140–144.
- [19] Z. Kim, G. Uhlenbrück, *Z. Immunitätsforsch. Allerg. Klin. Immunol.* **1966**, *130*, 88–99.
- [20] R. Kaifu, T. Osawa, *Carbohydr. Res.* **1977**, *58*, 235–239.
- [21] R. M. Ratcliffe, D. A. Baker, R. U. Lemieux, *Carbohydr. Res.* **1981**, *93*, 35–41.
- [22] H. Paulsen, J.-P. Hölck, *Carbohydr. Res.* **1982**, *109*, 89–107.
- [23] H. Kunz, S. Birnbach, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 354–355; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 360–362.
- [24] D. Cato, T. Buskas, G. J. Boons, *J. Carbohydr. Chem.* **2005**, *24*, 503–516.
- [25] T. Buskas, S. Ingale, G. J. Boons, *Glycobiology* **2006**, *16*, 113R–136R.
- [26] H. Kunz, S. Birnbach, P. Wernig, *Carbohydr. Res.* **1990**, *202*, 207–223.
- [27] M. J. Grogan, M. R. Pratt, L. A. Marcaurelle, C. R. Bertozzi, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 593–634.
- [28] K. T. Huang, B. C. Wu, C. C. Lin, S. C. Luo, C. Chen, C. H. Wong, C. C. Lin, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 2151–2155.
- [29] K. M. Koeller, M. E. Smith, C. H. Wong, *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1017–1025.
- [30] A. Leppanen, P. Mehta, Y. B. Ouyang, T. Ju, J. Helin, K. L. Moore, I. van Die, W. M. Canfield, R. P. McEver, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 24838–24848.
- [31] M. R. Pratt, C. R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, *34*, 58–68.
- [32] B. Liebe, H. Kunz, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 629–631; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 618–621.
- [33] S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, X.-T. Chen, P. W. Glunz, D. Sames, G. Ragupathi, P. O. Livingston, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12474–12485.
- [34] M. Elofsson, L. A. Salvador, J. Kihlberg, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 369–390.
- [35] K. A. Winans, D. S. King, V. R. Rao, C. R. Bertozzi, *Biochemistry* **1999**, *38*, 11700–11710.
- [36] S. A. Svarovsky, J. J. Barchi, Jr., *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 1925–1935.
- [37] M. Elofsson, J. Kihlberg, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 7499–7502.
- [38] H. Paulsen, W. Rauwald, U. Weichert, *Liebigs Ann. Chem.* **1988**, *75*–86.
- [39] Y. Nakahara, H. Iijima, S. Shohei, T. Ogawa, *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 6897–6900.
- [40] X. T. Chen, D. Sames, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 7760–7769.
- [41] A. Schleyer, M. Meldal, R. Manat, H. Paulsen, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 2064–2067; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 1976–1978.
- [42] H. H. Wandall, O. Blixt, M. A. Tarp, J. W. Pedersen, E. P. Bennett, U. Mandel, G. Ragupathi, P. O. Livingston, M. A. Hollingsworth, J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, H. Clausen, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1306–1313.
- [43] A. T. Nurden, D. Dupuis, D. Pidard, N. Kieffer, T. J. Kunicki, J. P. Cartron, *J. Clin. Invest.* **1982**, *70*, 1281–1291.
- [44] M. E. Etzler, S. Gupta, C. Borrebaeck, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 2367–2370.
- [45] G. W. Bird, J. Wingham, *Rev. Fr. Transfus. Immuno-Hematol.* **1981**, *24*, 347–348.
- [46] A. M. Wu, *J. Biomed. Sci.* **2005**, *12*, 135–152.
- [47] B. P. Moore, S. Marsh, *Transfusion* **1975**, *15*, 132–134.
- [48] R. A. Newman, G. G. Uhlenbrück, *Eur. J. Biochem.* **1977**, *76*, 149–155.
- [49] N. Vega, G. Pérez, *Phytochemistry* **2006**, *67*, 347–355.
- [50] K. Tachibana, S. Nakamura, H. Wang, H. Iwasaki, K. Tachibana, K. Maebara, L. Cheng, J. Hirabayashi, H. Narimatsu, *Glycobiology* **2006**, *16*, 46–53.
- [51] A. M. Wu, J. H. Wu, J. H. Liu, T. Singh, *Life Sci.* **2004**, *74*, 1763–1779.
- [52] G. Uhlenbrück, W. Dahr, *Vox Sang.* **1971**, *21*, 338–351.
- [53] S. E. Tollesen, R. Kornfeld, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 5172–5176.
- [54] W. Dahr, G. Uhlenbrück, *Blut* **1971**, *22*, 128–132.
- [55] S. Teneberg, I. Leonardsson, J. Angström, S. Ehrlich-Rogozinski, N. Sharon, *Glycoconjugate J.* **1994**, *11*, 418–423.
- [56] O. Prokop, G. Uhlenbrück, *Med. Welt* **1969**, *46*, 2515–2519.
- [57] S. Hammarstrom, L. A. Murphy, I. J. Goldstein, M. E. Etzler, *Biochemistry* **1977**, *16*, 2750–2755.
- [58] G. W. Bird, *Vox Sang.* **1964**, *9*, 748–749.
- [59] I. Brockhausen, J. Yang, N. Dickinson, S. Ogata, S. H. Itzkowitz, *Glycoconjugate J.* **1998**, *15*, 595–603.
- [60] T. Ju, R. D. Cummings, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 16613–16618.
- [61] T. Ju, G. S. Lanneau, T. Gautam, Y. Wang, B. Xia, S. R. Stowell, M. T. Willard, W. Wang, J. Y. Xia, R. E. Zuna, Z. Laszik, D. M. Benbrook, M. H. Hanigan, R. D. Cummings, *Cancer Res.* **2008**, *68*, 1636–1646.
- [62] G. Konska, M. Guerry, F. Caldefie-Chezet, M. De Latour, J. Guillot, *Oncol. Rep.* **2006**, *15*, 305–310.
- [63] K. A. Kulkarni, S. Sinha, S. Katiyar, A. Surolia, M. Vijayan, K. Suguna, *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 6775–6780.
- [64] W. Vainchenker, U. Testa, J. F. Deschamps, A. Henri, M. Titeux, J. Breton-Gorius, H. Rochant, D. Lee, J. P. Cartron, *J. Clin. Invest.* **1982**, *69*, 1081–1091.
- [65] V. Piller, F. Piller, J. P. Cartron, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *191*, 461–466.
- [66] J. Lescar, J.-F. Sanchez, A. Audfray, J.-L. Coll, C. Breton, E. P. Mitchell, A. Imbert, *Glycobiology* **2007**, *17*, 1077–1083.
- [67] A. Conzelmann, L. Lefrancois, *J. Exp. Med.* **1988**, *167*, 119–131.
- [68] H. H. Gunson, F. Stratton, G. W. Mullard, *Br. J. Haematol.* **1970**, *18*, 309–316.
- [69] P. D. Issitt, C. H. Issitt, J. Moulds, H. J. Berman, *Transfusion* **1972**, *12*, 217–221.
- [70] G. F. Springer, C. R. Taylor, D. R. Howard, H. Tegtmeyer, P. R. Desai, S. M. Murthy, B. Felder, E. F. Scanlon, *Cancer* **1985**, *55*, 561–569.
- [71] G. F. Springer, P. R. Desai, M. S. Murthy, E. F. Scanlon, *J. Surg. Oncol.* **1979**, *11*, 95–106.
- [72] G. F. Springer, H. Tegtmeyer, *Br. J. Haematol.* **1981**, *47*, 453–460.
- [73] G. F. Springer, R. E. Horton, *J. Clin. Invest.* **1969**, *48*, 1280–1291.
- [74] G. F. Springer, P. R. Desai, I. Banatwala, *J. Natl. Cancer Inst.* **1975**, *54*, 335–339.
- [75] G. F. Springer, P. R. Desai, I. Banatwala, *Naturwissenschaften* **1974**, *61*, 457–458.
- [76] T. Kjeldsen, H. Clausen, S. Hirohashi, T. Ogawa, H. Iijima, S. Hakomori, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 2214–2220.
- [77] T. Kjeldsen, S. Hakomori, G. F. Springer, P. Desai, T. Harris, H. Clausen, *Vox Sang.* **1989**, *57*, 81–87.

- [78] S. Hirohashi, H. Clausen, T. Yamada, Y. Shimosato, S. Hakomori, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 7039–7043.
- [79] D. Avichezer, G. F. Springer, B. Schechter, R. Arnon, *Int. J. Cancer* **1997**, *72*, 119–127.
- [80] Y. Numata, H. Nakada, S. Fukui, H. Kitagawa, K. Ozaki, M. Inoue, T. Kawasaki, I. Funakoshi, I. Yamashina, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *170*, 981–985.
- [81] H. K. Takahashi, R. Metoki, S. Hakomori, *Cancer Res.* **1988**, *48*, 4361–4367.
- [82] T. Ju, R. D. Cummings, *Nature* **2005**, *437*, 1252.
- [83] T. Ju, R. P. Aryal, C. J. Stowell, R. D. Cummings, *J. Cell Biol.* **2008**, *182*, 531–542.
- [84] Q. Li, M. R. Anver, D. O. Butcher, J. C. Gildersleeve, *Mol. Cancer Ther.* **2009**, *8*, 971–979.
- [85] M. Thurnher, E. Wagner, H. Clausen, K. Mechtler, S. Rusconi, A. Dinter, M. L. Birnstiel, E. G. Berger, M. Cotten, *Glycobiology* **1994**, *4*, 429–435.
- [86] E. Tian, K. G. Ten Hagen, *Glycobiology* **2007**, *17*, 820–827.
- [87] E. Tian, K. G. Ten Hagen, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 606–614.
- [88] H. C. Hang, C. R. Bertozzi, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 5021–5034.
- [89] H. E. Miwa, T. A. Gerken, O. Jamison, L. A. Tabak, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 1208–1219.
- [90] K. G. Ten Hagen, T. A. Fritz, L. A. Tabak, *Glycobiology* **2003**, *13*, 1R–16R.
- [91] M. A. Tarp, H. Clausen, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2008**, *1780*, 546–563.
- [92] T. A. Fritz, J. Raman, L. A. Tabak, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 8613–8619.
- [93] M. R. Pratt, H. C. Hang, K. G. Ten Hagen, J. Rarick, T. A. Gerken, L. A. Tabak, C. R. Bertozzi, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1009–1016.
- [94] T. A. Gerken, J. Raman, T. A. Fritz, O. Jamison, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 32403–32416.
- [95] T. A. Gerken, K. G. Ten Hagen, O. Jamison, *Glycobiology* **2008**, *18*, 861–870.
- [96] C. Perrine, T. Ju, R. D. Cummings, T. A. Gerken, *Glycobiology* **2009**, *19*, 321–328.
- [97] J. Raman, T. A. Fritz, T. A. Gerken, O. Jamison, D. Live, M. Liu, L. A. Tabak, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 22942–22951.
- [98] S. Rottger, J. White, H. H. Wandall, J. C. Olivo, A. Stark, E. P. Bennett, C. Whitehouse, E. G. Berger, H. Clausen, T. Nilsson, *J. Cell Sci.* **1998**, *111*, 45–60.
- [99] T. Ju, K. Brewer, A. D'Souza, R. D. Cummings, W. M. Canfield, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 178–186.
- [100] T. Ju, R. D. Cummings, W. M. Canfield, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 169–177.
- [101] W. Gillespie, S. Kelm, J. C. Paulson, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 21004–21010.
- [102] Y. C. Lee, M. Kaufmann, S. Kitazume-Kawaguchi, M. Kono, S. Takashima, N. Kurosawa, H. Liu, H. Pircher, S. Tsuji, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 11958–11967.
- [103] N. Kurosawa, N. Kojima, M. Inoue, T. Hamamoto, S. Tsuji, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 19048–19053.
- [104] M. F. Bierhuizen, M. Fukuda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 9326–9330.
- [105] T. Iwai, N. Inaba, A. Naundorf, Y. Zhang, M. Gotoh, H. Iwasaki, T. Kudo, A. Togayachi, Y. Ishizuka, H. Nakanishi, H. Narimatsu, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12802–12809.
- [106] N. Kurosawa, S. Takashima, M. Kono, Y. Ikehara, M. Inoue, Y. Tachida, H. Narimatsu, S. Tsuji, *J. Biochem.* **2000**, *127*, 845–854.
- [107] L. L. Lairson, B. Henrissat, G. J. Davies, S. G. Withers, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 521–555.
- [108] D. Stojanovic, P. Vischer, R. C. Hughes, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 551–562.
- [109] I. Brockhausen, G. Möller, G. Merz, K. Adermann, H. Paulsen, *Biochemistry* **1990**, *29*, 10206–10212.
- [110] I. Brockhausen, G. Möller, A. Pollex-Krüger, V. Rutz, H. Paulsen, K. L. Matta, *Biochem. Cell Biol.* **1992**, *70*, 99–108.
- [111] T. Ju, Q. Zheng, R. D. Cummings, *Glycobiology* **2006**, *16*, 947–958.
- [112] R. Müller, A. J. Hülsmeier, F. Altmann, K. Ten Hagen, M. Tiemeyer, T. Hennet, *FEBS J.* **2005**, *272*, 4295–4305.
- [113] Y. Ikehara, N. Kojima, N. Kurosawa, T. Kudo, M. Kono, S. Nishihara, S. Issiki, K. Morozumi, S. Itzkowitz, T. Tsuda, S. I. Nishimura, S. Tsuji, H. Narimatsu, *Glycobiology* **1999**, *9*, 1213–1224.
- [114] A. Harduin-Lepers, V. Vallejo-Ruiz, M. A. Krzewinski-Recchi, B. Samyn-Petit, S. Julien, P. Delannoy, *Biochimie* **2001**, *83*, 727–737.
- [115] N. T. Marcos, S. Pinho, C. Grandela, A. Cruz, B. Samyn-Petit, A. Harduin-Lepers, R. Almeida, F. Silva, V. Morais, J. Costa, J. Kihlberg, H. Clausen, C. A. Reis, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 7050–7057.
- [116] M. Kono, T. Tsuda, S. Ogata, S. Takashima, H. Liu, T. Hamamoto, S. H. Itzkowitz, S. Nishimura, S. Tsuji, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *272*, 94–97.
- [117] R. Sewell, M. Backstrom, M. Dalziel, S. Gschmeissner, H. Karlsson, T. Noll, J. Gatgens, H. Clausen, G. C. Hansson, J. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 3586–3594.
- [118] M. Raska, Z. Moldoveanu, H. Suzuki, R. Brown, R. Kulhavy, J. Andras, S. Hall, H. L. Vu, F. Carlsson, G. Lindahl, M. Tomana, B. A. Julian, R. J. Wyatt, J. Mestecky, J. Novak, *J. Mol. Biol.* **2007**, *369*, 69–78.
- [119] H. Suzuki, Z. Moldoveanu, S. Hall, R. Brown, H. L. Vu, L. Novak, B. A. Julian, M. Tomana, R. J. Wyatt, J. C. Edberg, G. S. Alarcon, R. P. Kimberly, Y. Tomino, J. Mestecky, J. Novak, *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 629–639.
- [120] V. Piller, F. Piller, M. Fukuda, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 9264–9271.
- [121] Y. Wang, T. Ju, X. Ding, B. Xia, W. Wang, L. Xia, M. He, R. D. Cummings, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 9228–9233.
- [122] T. Kudo, T. Iwai, T. Kubota, H. Iwasaki, Y. Takayama, T. Hiruma, N. Inaba, Y. Zhang, M. Gotoh, A. Togayachi, H. Narimatsu, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 47724–47731.
- [123] T. Kudo, T. Iwai, T. Kubota, H. Iwasaki, Y. Takayama, T. Hiruma, N. Inaba, Y. Zhang, M. Gotoh, A. Togayachi, H. Narimatsu, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 24999–25000.
- [124] G. An, B. Wei, B. Xia, J. M. McDaniel, T. Ju, R. D. Cummings, J. Braun, L. Xia, *J. Exp. Med.* **2007**, *204*, 1417–1429.
- [125] J. M. Yang, J. C. Byrd, B. B. Siddiki, Y. S. Chung, M. Okuno, M. Sowa, Y. S. Kim, K. L. Matta, I. Brockhausen, *Glycobiology* **1994**, *4*, 873–884.
- [126] F. Vavasseur, K. Dole, J. Yang, K. L. Matta, N. Myerscough, A. Corfield, C. Paraskeva, I. Brockhausen, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *222*, 415–424.
- [127] P. Stanley, S. Sundaram, S. Sallustio, *Glycobiology* **1991**, *1*, 307–314.
- [128] S. L. Deutscher, C. B. Hirschberg, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 96–100.
- [129] S. I. Do, R. D. Cummings, *J. Biochem. Biophys. Methods* **1994**, *24*, 153–165.
- [130] D. M. Kingsley, K. F. Kozarsky, L. Hobbie, M. Krieger, *Cell* **1986**, *44*, 749–759.
- [131] J. M. Burchell, A. Mungul, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **2001**, *6*, 355–364.
- [132] S. Julien, M. A. Krzewinski-Recchi, A. Harduin-Lepers, V. Gouyer, G. Huet, X. Le Bourhis, P. Delannoy, *Glycoconjugate J.* **2001**, *18*, 883–893.

- [133] S. Julien, C. Lagadec, M. A. Krzewinski-Recchi, G. Courtand, X. Le Bourhis, P. Delannoy, *Breast Cancer Res. Treat.* **2005**, *90*, 77–84.
- [134] R. P. Aryal, T. Ju, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 2456–2462.
- [135] Y. Narimatsu, Y. Ikehara, H. Iwasaki, C. Nonomura, T. Sato, H. Nakanishi, H. Narimatsu, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *366*, 199–205.
- [136] R. D. Cummings, S. Kornfeld, W. J. Schneider, K. K. Hobgood, H. Tolleshaug, M. S. Brown, J. L. Goldstein, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 15261–15273.
- [137] K. Kozarsky, D. Kingsley, M. Krieger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 4335–4339.
- [138] M. Kuwano, T. Seguchi, M. Ono, *J. Cell Sci.* **1991**, *98*, 131–134.
- [139] S. I. Do, R. D. Cummings, *Glycobiology* **1992**, *2*, 345–353.
- [140] G. R. Hayes, C. A. Enns, J. J. Lucas, *Glycobiology* **1992**, *2*, 355–359.
- [141] E. A. Rutledge, B. J. Root, J. J. Lucas, C. A. Enns, *Blood* **1994**, *83*, 580–586.
- [142] C. G. Gahmberg, M. Autero, J. Hermonen, *J. Cell. Biochem.* **1988**, *37*, 91–105.
- [143] M. Jokinen, L. C. Andersson, C. G. Gahmberg, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 11314–11321.
- [144] C. G. Gahmberg, M. Ekblom, L. C. Andersson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 6752–6756.
- [145] J. Fu, H. Gerhardt, J. M. McDaniel, B. Xia, X. Liu, L. Ivanciu, A. Ny, K. Hermans, R. Silasi-Mansat, S. McGee, E. Nye, T. Ju, M. I. Ramirez, P. Carmeliet, R. D. Cummings, F. Lupu, L. Xia, *J. Clin. Invest.* **2008**, *118*, 3725–3737.
- [146] M. Kaneko, Y. Kato, A. Kunita, N. Fujita, T. Tsuruo, M. Osawa, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 38838–38843.
- [147] M. K. Kaneko, Y. Kato, A. Kameyama, H. Ito, A. Kuno, J. Hirabayashi, T. Kubota, K. Amano, Y. Chiba, Y. Hasegawa, I. Sasagawa, K. Mishima, H. Narimatsu, *FEBS Lett.* **2007**, *581*, 331–336.
- [148] A. Leppanen, S. P. White, J. Helin, R. P. McEver, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 39569–39578.
- [149] F. Li, P. P. Wilkins, S. Crawley, J. Weinstein, R. D. Cummings, R. P. McEver, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 3255–3264.
- [150] P. P. Wilkins, R. P. McEver, R. D. Cummings, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18732–18742.
- [151] T. Satomaa, O. Renkonen, J. Helin, J. Kirveskari, A. Makitie, R. Renkonen, *Blood* **2002**, *99*, 2609–2611.
- [152] C. B. Fieger, C. M. Sassetti, S. D. Rosen, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 27390–27398.
- [153] J. Chen, E. S. Litscher, P. M. Wassarman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 6193–6197.
- [154] H. M. Florman, P. M. Wassarman, *Cell* **1985**, *41*, 313–324.
- [155] M. Fukuda, *Glycobiology* **1991**, *1*, 347–356.
- [156] M. Fukuda, S. R. Carlsson, *Med. Biol.* **1986**, *64*, 335–343.
- [157] T. K. van den Berg, D. Nath, H. J. Zilzener, D. Vestweber, M. Fukuda, I. van Die, P. R. Crocker, *J. Immunol.* **2001**, *166*, 3637–3640.
- [158] L. A. Earl, S. Bi, L. G. Baum, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 2232–2244.
- [159] P. Fernsten, M. Shaw, S. Hocker, R. Fulghum, J. Winfield, *Immunol. Invest.* **1998**, *27*, 323–338.
- [160] J. C. Lefebvre, V. Giordanengo, A. Doglio, L. Cagnon, J. P. Breitmayer, J. F. Peyron, J. Lesimple, *Virology* **1994**, *199*, 265–274.
- [161] R. Pulido, F. Sanchez-Madrid, *Eur. J. Immunol.* **1990**, *20*, 2667–2671.
- [162] K. W. Wagner, E. A. Punnoose, T. Januario, D. A. Lawrence, R. M. Pitti, K. Lancaster, D. Lee, M. von Goetz, S. F. Yee, K. Totpal, L. Huw, V. Katta, G. Cavet, S. G. Hymowitz, L. Amler, A. Ashkenazi, *Nat. Med.* **2007**, *13*, 1070–1077.
- [163] B. S. Chapman, M. R. Eckart, S. E. Kaufman, G. R. Lapointe, *J. Neurochem.* **1996**, *66*, 1707–1716.
- [164] C. Yeaman, A. H. Le Gall, A. N. Baldwin, L. Monlauzeur, A. Le Bivic, E. Rodriguez-Boulanger, *J. Cell Biol.* **1997**, *139*, 929–940.
- [165] S. E. Baldus, K. Engelmann, F. G. Hanisch, *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2004**, *41*, 189–231.
- [166] I. Brockhausen, *EMBO Rep.* **2006**, *7*, 599–604.
- [167] A. Guzman-Aranguez, P. Argueso, *Immunol. Lacrimal Gland Tear Film Ocul. Surf.* **2010**, *8*, 8–17.
- [168] F. G. Hanisch, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 143–149.
- [169] E. Tian, K. G. Ten Hagen, *Glycoconjugate J.* **2009**, *26*, 325–334.
- [170] N. Kieffer, N. Debili, A. Wicki, M. Titeux, A. Henri, Z. Mishal, J. Breton-Gorius, W. Vainchenker, K. J. Clemetson, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 15854–15862.
- [171] J. J. Calvete, E. Muñiz-Díaz, *FEBS Lett.* **1993**, *328*, 30–34.
- [172] A. Allen, J. Feehally, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, *435*, 175–183.
- [173] J. Baenziger, S. Kornfeld, *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 7270–7281.
- [174] Y. Hiki, H. Odani, M. Takahashi, Y. Yasuda, A. Nishimoto, H. Iwase, T. Shinzato, Y. Kobayashi, K. Maeda, *Kidney Int.* **2001**, *59*, 1077–1085.
- [175] L. X. Xu, Y. Yan, J. J. Zhang, Y. Zhang, M. H. Zhao, *Clin. Exp. Immunol.* **2005**, *142*, 569–575.
- [176] L. X. Xu, M. H. Zhao, *Kidney Int.* **2005**, *68*, 167–172.
- [177] J. Barratt, A. C. Smith, J. Feehally, *Nephrology* **2007**, *12*, 275–284.
- [178] S. J. Mellis, J. U. Baenziger, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 11557–11563.
- [179] P. M. Rudd, F. Fortune, T. Patel, R. B. Parekh, R. A. Dwek, T. Lehner, *Immunology* **1994**, *83*, 99–106.
- [180] C. D. Swenson, T. Patel, R. B. Parekh, S. M. Tamma, R. F. Coico, G. J. Thorbecke, A. R. Amin, *Eur. J. Immunol.* **1998**, *28*, 2366–2372.
- [181] H. Sasaki, B. Bothner, A. Dell, M. Fukuda, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 12059–12076.
- [182] E. Tsuda, M. Goto, A. Murakami, K. Akai, M. Ueda, G. Kawanishi, N. Takahashi, R. Sasaki, H. Chiba, H. Ishihara, M. Mori, S. Tejima, S. Endo, Y. Arata, *Biochemistry* **1988**, *27*, 5646–5654.
- [183] E. Tsuda, G. Kawanishi, M. Ueda, S. Masuda, R. Sasaki, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *188*, 405–411.
- [184] L. C. Wasley, G. Timony, P. Murtha, J. Stoudemire, A. J. Dorner, J. Caro, M. Krieger, R. J. Kaufman, *Blood* **1991**, *77*, 2624–2632.
- [185] J. A. Carew, S. M. Quinn, J. H. Stoddart, D. C. Lynch, *J. Clin. Invest.* **1992**, *90*, 2258–2267.
- [186] K. Inoue, T. Morita, *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 153–163.
- [187] H. Maeda, R. K. Hashimoto, T. Ogura, S. Hiraga, H. Uzawa, *J. Lipid Res.* **1987**, *28*, 1405–1409.
- [188] L. J. Spaapen, J. A. Bakker, S. B. van der Meer, H. J. Sijstermans, R. A. Steet, R. A. Wevers, J. Jaeken, *J. Inherited Metab. Dis.* **2005**, *28*, 707–714.
- [189] S. Wopereis, U. M. Abd Hamid, A. Critchley, L. Royle, R. A. Dwek, E. Morava, J. G. Leroy, B. Wilcken, A. J. Lagerwerf, K. M. Huijben, D. J. Lefever, P. M. Rudd, R. A. Wevers, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **2006**, *1762*, 598–607.
- [190] L. A. Cole, F. Perini, S. Birken, R. W. Ruddon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, *122*, 1260–1267.
- [191] J. A. Hanover, J. Elting, G. R. Mintz, W. J. Lennarz, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 10172–10177.
- [192] M. J. Kessler, T. Mise, R. D. Ghai, O. P. Bahl, *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 7909–7914.
- [193] T. F. Parsons, G. A. Bloomfield, J. G. Pierce, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 240–244.
- [194] L. T. May, U. Santhanam, P. B. Sehgal, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 9950–9955.

- [195] R. B. Parekh, R. A. Dwek, T. W. Rademacher, G. Opdenakker, J. Van Damme, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *203*, 135–141.
- [196] A. M. Afonso, R. D. Marshall, *Biochem. Soc. Trans.* **1979**, *7*, 170–173.
- [197] R. L. Easton, M. S. Patankar, G. F. Clark, H. R. Morris, A. Dell, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 21928–21938.
- [198] J. J. van Rooijen, A. F. Voskamp, J. P. Kamerling, J. F. Vliegenthart, *Glycobiology* **1999**, *9*, 21–30.
- [199] J. Williams, R. D. Marshall, H. van Halbeek, J. F. Vliegenthart, *Carbohydr. Res.* **1984**, *134*, 141–155.
- [200] D. S. Rehder, R. W. Nelson, C. R. Borges, *Protein Sci.* **2009**, *18*, 2036–2042.
- [201] H. Wakabayashi, S. Natsuka, M. Honda, M. Naotsuka, Y. Ito, J. Kajihara, S. Hase, *J. Biochem.* **2001**, *130*, 543–552.
- [202] T. Baba, D. Downs, K. W. Jackson, J. Tang, C. S. Wang, *Biochemistry* **1991**, *30*, 500–510.
- [203] E. Landberg, Y. Huang, M. Stromqvist, Y. Mechref, L. Hansson, A. Lundblad, M. V. Novotny, P. Pahlsson, *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *377*, 246–254.
- [204] E. Landberg, P. Pahlsson, H. Krotkiewski, M. Stromqvist, L. Hansson, A. Lundblad, *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *344*, 94–102.
- [205] C. S. Wang, A. Dashti, K. W. Jackson, J. C. Yeh, R. D. Cummings, J. Tang, *Biochemistry* **1995**, *34*, 10639–10644.
- [206] R. P. McEver, Ernst Schering Res. Found Workshop **2004**, 137–147.
- [207] R. P. McEver, R. D. Cummings, *J. Clin. Invest.* **1997**, *100*, 485–491.
- [208] V. Karamatic Crew, B. K. Singleton, C. Green, S. F. Parsons, G. Daniels, D. J. Anstee, *Br. J. Haematol.* **2008**, *142*, 657–667.
- [209] A. Zarbock, H. Müller, Y. Kuwano, K. Ley, *J. Leukocyte Biol.* **2009**, *86*, 1119–1124.
- [210] S. D. Rosen, *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22*, 129–156.
- [211] D. Sako, X.-J. Chang, K. M. Barone, G. Vachino, H. M. White, G. Shaw, G. M. Veldman, K. M. Bean, T. J. Ahern, B. Furie, D. A. Cumming, G. R. Larsen, *Cell* **1993**, *75*, 1179–1186.
- [212] W. S. Somers, J. Tang, G. D. Shaw, R. T. Camphausen, *Cell* **2000**, *103*, 467–479.
- [213] J. Mitoma, B. Petryniak, N. Hiraoka, J. C. Yeh, J. B. Lowe, M. Fukuda, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 9953–9961.
- [214] J. C. Yeh, N. Hiraoka, B. Petryniak, J. Nakayama, L. G. Ellies, D. Rabuka, O. Hindsgaul, J. D. Marth, J. B. Lowe, M. Fukuda, *Cell* **2001**, *105*, 957–969.
- [215] P. Maly, A. Thall, B. Petryniak, C. E. Rogers, P. L. Smith, R. M. Marks, R. J. Kelly, K. M. Gersten, G. Cheng, T. L. Saunders, S. A. Camper, R. T. Camphausen, F. X. Sullivan, Y. Isogai, O. Hindsgaul, U. H. von Andrian, J. B. Lowe, *Cell* **1996**, *86*, 643–653.
- [216] H. Kawashima, B. Petryniak, N. Hiraoka, J. Mitoma, V. Hucaby, J. Nakayama, K. Uchimura, K. Kadomatsu, T. Muramatsu, J. B. Lowe, M. Fukuda, *Nat. Immunol.* **2005**, *6*, 1096–1104.
- [217] K. Uchimura, K. Kadomatsu, F. M. El-Fasakhany, M. S. Singer, M. Izawa, R. Kannagi, N. Takeda, S. D. Rosen, T. Muramatsu, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35001–35008.
- [218] L. Xia, T. Ju, A. Westmuckett, G. An, L. Ivanciu, J. M. McDaniel, F. Lupu, R. D. Cummings, R. P. McEver, *J. Cell Biol.* **2004**, *164*, 451–459.
- [219] L. Xia, R. P. McEver, *Methods Enzymol.* **2006**, *416*, 314–331.
- [220] W. S. Alexander, E. M. Viney, J. G. Zhang, D. Metcalf, M. Kauppi, C. D. Hyland, M. R. Carpinelli, W. Stevenson, B. A. Croker, A. A. Hilton, S. Ellis, C. Selan, H. H. Nandurkar, C. C. Goodnow, B. T. Kile, N. A. Nicola, A. W. Roberts, D. J. Hilton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 16442–16447.
- [221] S. D. Szajda, A. Jankowska, K. Zwierz, *Dis. Markers* **2008**, *25*, 233–242.
- [222] J. L. Desseyen, D. Tetaert, V. Gouyer, *Gene* **2008**, *410*, 215–222.
- [223] S. J. Gendler, A. P. Spicer, E. N. Lalani, T. Duhig, N. Peat, J. Burchell, L. Pemberton, M. Boshell, J. Taylor-Papadimitriou, *Am. Rev. Respir. Dis.* **1991**, *144*, S42–47.
- [224] J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, D. W. Miles, M. Dalziel, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1999**, *1455*, 301–313.
- [225] P. J. Cozzi, J. Wang, W. Delprado, A. C. Perkins, B. J. Allen, P. J. Russell, Y. Li, *Clin. Exp. Metastasis* **2005**, *22*, 565–573.
- [226] Y. Li, P. J. Cozzi, *Curr. Cancer Drug Targets* **2007**, *7*, 259–271.
- [227] P. K. Singh, M. A. Hollingsworth, *Trends Cell Biol.* **2006**, *16*, 467–476.
- [228] M. C. Rose, J. A. Voynow, *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 245–278.
- [229] J. C. Byrd, R. S. Bresalier, *Cancer Metastasis Rev.* **2004**, *23*, 77–99.
- [230] J. Ringel, M. Lohr, *Mol. Cancer* **2003**, *2*, 9.
- [231] T. Higuchi, T. Orita, S. Nakanishi, K. Katsuya, H. Watanabe, Y. Yamasaki, I. Waga, T. Nanayama, Y. Yamamoto, W. Munger, H. W. Sun, R. J. Falk, J. C. Jennette, D. A. Alcorta, H. Li, T. Yamamoto, Y. Saito, M. Nakamura, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 1968–1979.
- [232] S. J. Gendler, A. P. Spicer, *Annu. Rev. Physiol.* **1995**, *57*, 607–634.
- [233] A. E. Eckhardt, C. S. Timpte, A. W. DeLuca, R. L. Hill, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 33204–33210.
- [234] B. H. Perez, I. K. Gipson, *Exp. Eye Res.* **2008**, *87*, 400–401.
- [235] B. W. Yin, A. Dnistriant, K. O. Lloyd, *Int. J. Cancer* **2002**, *98*, 737–740.
- [236] J. Burchell, S. Gendler, J. Taylor-Papadimitriou, A. Girling, A. Lewis, R. Millis, D. Lamport, *Cancer Res.* **1987**, *47*, 5476–5482.
- [237] K. O. Lloyd, J. Burchell, V. Kudryashov, B. W. Yin, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 33325–33334.
- [238] J. Taylor-Papadimitriou, J. A. Peterson, J. Arklie, J. Burchell, R. L. Ceriani, W. F. Bodmer, *Int. J. Cancer* **1981**, *28*, 17–21.
- [239] J. J. Ho, N. Bi, B. Siddiki, Y. S. Chung, M. Yuan, Y. S. Kim, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 884–890.
- [240] J. R. Jass, L. J. Allison, S. G. Edgar, *J. Pathol.* **1995**, *176*, 143–149.
- [241] Y. Cao, P. M. Schlag, U. Karsten, *Virchows Arch.* **1997**, *431*, 159–166.
- [242] F. G. Hanisch, *Tumor Biol.* **1998**, *19*, 111–117.
- [243] M. Sasaki, T. Yamato, Y. Nakanuma, *Pathol. Int.* **1999**, *49*, 325–331.
- [244] Y. Cao, U. Karsten, G. Otto, P. Bannasch, *Virchows Arch.* **1999**, *434*, 503–509.
- [245] S. Amaya, M. Sasaki, Y. Watanabe, W. M. Tsui, K. Tsuneyama, K. Harada, Y. Nakanuma, *Histol. Histopathol.* **2001**, *38*, 550–560.
- [246] U. Flucke, T. K. Zirbes, W. Schroder, S. P. Monig, V. Koch, K. Schmitz, J. Thiele, H. P. Dienes, A. H. Holscher, S. E. Baldus, *Anticancer Res.* **2001**, *21*, 2189–2193.
- [247] G. E. Kim, H. I. Bae, H. U. Park, S. F. Kuan, S. C. Crawley, J. J. Ho, Y. S. Kim, *Gastroenterology* **2002**, *123*, 1052–1060.
- [248] T. Freire, A. Medeiros, C. A. Reis, F. X. Real, E. Osinaga, *Oncol. Rep.* **2003**, *10*, 1577–1585.
- [249] T. Conze, A. S. Carvalho, U. Landegren, R. Almeida, C. A. Reis, L. David, O. Soderberg, *Glycobiology* **2010**, *20*, 199–206.
- [250] Y. Tashiro, S. Yonezawa, Y. S. Kim, E. Sato, *Hum. Pathol.* **1994**, *25*, 364–372.
- [251] C. Robbe-Masselot, A. Herrmann, I. Carlstedt, J. C. Michalski, C. Capon, *Glycoconjugate J.* **2008**, *25*, 213–224.
- [252] C. Robbe-Masselot, A. Herrmann, E. Maes, I. Carlstedt, J. C. Michalski, C. Capon, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 702–711.
- [253] C. De Bolos, M. Garrido, F. X. Real, *Gastroenterology* **1995**, *109*, 723–734.
- [254] M. B. Pereira, A. J. Dias, C. A. Reis, F. C. Schmitt, *J. Clin. Pathol.* **2001**, *54*, 210–213.
- [255] T. Freire, S. Bay, S. von Mensdorff-Pouilly, E. Osinaga, *Cancer Res.* **2005**, *65*, 7880–7887.

- [256] C. Hanski, K. Drechsler, F.-G. Hanisch, J. Sheehan, M. Manske, D. Ogorek, E. Klussmann, M.-L. Hanski, M. Blank, P.-X. Xing, I. F. C. McKenzie, P. L. Devine, E.-O. Riecken, *Cancer Res.* **1993**, *53*, 4082–4088.
- [257] K. O. Lloyd, *Glycoconjugate J.* **2000**, *17*, 531–541.
- [258] T. Tsuji, T. Osawa, *Carbohydr. Res.* **1986**, *151*, 391–402.
- [259] K. L. Carraway, G. Theodoropoulos, G. A. Kozloski, C. A. Carothers Carraway, *Future Oncol.* **2009**, *5*, 1631–1640.
- [260] K. L. Carraway, S. A. Price-Schiavi, M. Komatsu, S. Jepson, A. Perez, C. A. Carraway, *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* **2001**, *6*, 323–337.
- [261] J. Wesseling, S. W. van der Valk, H. L. Vos, A. Sonnenberg, J. Hilkens, *J. Cell Biol.* **1995**, *129*, 255–265.
- [262] Y. Itoh, M. Kamata-Sakurai, K. Denda-Nagai, S. Nagai, M. Tsuji, K. Ishii-Schrade, K. Okada, A. Goto, M. Fukayama, T. Irimura, *Glycobiology* **2008**, *18*, 74–83.
- [263] J. F. Codington, A. G. Cooper, D. K. Miller, H. S. Slayter, M. C. Brown, C. Silber, R. W. Jeanloz, *J. Natl. Cancer Inst.* **1979**, *63*, 153–161.
- [264] G. Lamblin, S. Degroote, J. M. Perini, P. Delmotte, A. Scharfman, M. Davril, J. M. Lo-Guidice, N. Houdret, V. Dumur, A. Klein, P. Rousse, *Glycoconjugate J.* **2001**, *18*, 661–684.
- [265] E. G. Berger, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1999**, *1455*, 255–268.
- [266] G. W. Bird, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1974**, *234*, 129–144.
- [267] J. P. Cartron, G. Andreu, J. Cartron, G. W. Bird, C. Salmon, A. Gerbal, *Eur. J. Biochem.* **1978**, *92*, 111–119.
- [268] J. P. Cartron, J. Cartron, G. Andreu, C. Salmon, G. W. Bird, *Lancet* **1978**, *311*, 856–857.
- [269] M. Thurnher, H. Clausen, W. Fierz, A. Lanzavecchia, E. G. Berger, *Eur. J. Immunol.* **1992**, *22*, 1835–1842.
- [270] M. Thurnher, S. Rusconi, E. G. Berger, *J. Clin. Invest.* **1993**, *91*, 2103–2110.
- [271] E. Vigorito, A. Robles, H. Balter, A. Nappa, F. Goni, *Appl. Radiat. Isot.* **1995**, *46*, 975–979.
- [272] G. F. Springer, *J. Mol. Med.* **1997**, *75*, 594–602.
- [273] G. F. Springer, *Science* **1984**, *224*, 1198–1206.
- [274] P. R. Desai, *Transfus. Med. Rev.* **2000**, *14*, 312–325.
- [275] F. Numa, N. Tsunaga, T. Michioka, S. Nawata, H. Ogata, H. Kato, *J. Obstet. Gynaecol.* **1995**, *21*, 385–389.
- [276] M. Inoue, H. Ogawa, K. Nakanishi, O. Tanizawa, K. Karino, J. Endo, *Obstet. Gynecol.* **1990**, *75*, 1032–1036.
- [277] E. Laack, H. Nikbakht, A. Peters, C. Kugler, Y. Jasiewicz, L. Edler, D. K. Hossfeld, U. Schumacher, *Am. J. Pathol.* **2002**, *160*, 1001–1008.
- [278] A. Konno, Y. Hoshino, S. Terashima, R. Motoki, T. Kawaguchi, *Clin. Exp. Metastasis* **2002**, *19*, 61–70.
- [279] F. Fernández Madrid, N. Tang, H. Alansari, R. L. Karvonen, J. E. Tomkiel, *Autoimmun. Rev.* **2005**, *4*, 230–235.
- [280] Y. Kakeji, S. Tsujitani, M. Mori, Y. Maehara, K. Sugimachi, *Cancer* **1991**, *68*, 2438–2442.
- [281] S. Julien, E. Adriaenssens, K. Ottenberg, A. Furlan, G. Courtand, A. S. Vercoutter-Edouart, F. G. Hanisch, P. Delannoy, X. Le Bourhis, *Glycobiology* **2006**, *16*, 54–64.
- [282] M. Dalziel, C. Whitehouse, I. McFarlane, I. Brockhausen, S. Gschmeissner, T. Schwientek, H. Clausen, J. M. Burchell, J. Taylor-Papadimitriou, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 11007–11015.
- [283] E. Saeland, S. J. van Vliet, M. Bäckström, V. C. M. van den Berg, T. B. H. Geijtenbeek, G. A. Meijer, Y. van Kooyk, *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, *56*, 1225–1236.
- [284] S. L. Byrne, R. Leverence, J. S. Klein, A. M. Giannetti, V. C. Smith, R. T. MacGillivray, I. A. Kaltashov, A. B. Mason, *Biochemistry* **2006**, *45*, 6663–6673.
- [285] W. Liu, V. Ramachandran, J. Kang, T. K. Kishimoto, R. D. Cummings, R. P. McEver, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 7078–7087.
- [286] T. Endo, *Acta Myol.* **2007**, *26*, 165–170.
- [287] A. Schietinger, M. Philip, B. A. Yoshida, P. Azadi, H. Liu, S. C. Meredith, H. Schreiber, *Science* **2006**, *314*, 304–308.
- [288] M. Lundström, S. Jeansson, S. Olofsson, *Virology* **1987**, *161*, 395–402.
- [289] M. Levy, J. Berger, *Am. J. Kidney Dis.* **1988**, *12*, 340–347.
- [290] G. D'Amico, *Am. J. Kidney Dis.* **2000**, *36*, 227–237.
- [291] K. Kiryluk, A. G. Gharavi, C. Izzi, F. Scolari, *Nephrol. Dial. Transplant.* **2009**, *25*, 336–338.
- [292] A. D. Paterson, X.-Q. Liu, K. Wang, R. Magistroni, X. Song, J. Kappel, J. Klassen, D. Cattran, P. St. George-Hyslop, Y. Pei, J. Am. Soc. Nephrol. **2007**, *18*, 2408–2415.
- [293] A. G. Gharavi, Y. Yan, F. Scolari, F. P. Schena, G. M. Frasca, G. M. Ghiggeri, K. Cooper, A. Amoroso, B. F. Viola, G. Battini, G. Caridi, C. Canova, A. Farhi, V. Subramanian, C. Nelson-Williams, S. Woodford, B. A. Julian, R. J. Wyatt, R. P. Lifton, *Nat. Genet.* **2000**, *26*, 354–357.
- [294] L. Bisceglia, G. Cerullo, P. Forabosco, D. D. Torres, F. Scolari, M. Di Perna, M. Foramitti, A. Amoroso, S. Bertok, J. Floege, P. R. Mertens, K. Zerres, E. Alexopoulos, D. Kirmizis, M. Er-melinda, L. Zelante, F. P. Schena, *Am. J. Hum. Genet.* **2006**, *79*, 1130–1134.
- [295] B. A. Julian, J. Novak, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2004**, *13*, 171–179.
- [296] A. C. Allen, P. S. Topham, S. J. Harper, J. Feehally, *Nephrol. Dial. Transplant.* **1997**, *12*, 701–706.
- [297] W. Qin, Q. Zhou, L. C. Yang, Z. Li, B. H. Su, H. Luo, J. M. Fan, *J. Intern. Med.* **2005**, *258*, 467–477.
- [298] T. Inoue, H. Sugiyama, Y. Hiki, K. Takue, H. Morinaga, M. Kitagawa, Y. Maeshima, K. Fukushima, K. Nishizaki, H. Akagi, Y. Nariyama, H. Narimatsu, H. Makino, *Clin. Immunol.* **2010**, *136*, 447–455.
- [299] K. Yamada, N. Kobayashi, T. Ikeda, Y. Suzuki, T. Tsuge, S. Horikoshi, S. N. Emancipator, Y. Tomino, *Nephrol. Dial. Transplant.* **2010**, *25*, 3890–3897.
- [300] G. S. Li, H. Zhang, J. C. Lv, Y. Shen, H. Y. Wang, *Kidney Int.* **2007**, *71*, 448–453.
- [301] F. Malycha, T. Eggermann, M. Hristov, F. P. Schena, P. R. Mertens, K. Zerres, J. Floege, F. Eitner, *Nephrol. Dial. Transplant.* **2009**, *24*, 321–324.
- [302] J. Novak, B. A. Julian, M. Tomana, J. Mesteck, *J. Clin. Immunol.* **2001**, *21*, 310–327.
- [303] J. C. Leung, A. W. Tsang, L. Y. Chan, S. C. Tang, M. F. Lam, K. N. Lai, *J. Lab. Clin. Med.* **2002**, *140*, 398–406.
- [304] K. Nyame, R. D. Cummings, R. T. Damian, *J. Parasitol.* **1988**, *74*, 562–572.
- [305] D. Alvarez Errico, A. Medeiros, M. Míguez, C. Casaravilla, R. Malgor, C. Carmona, A. Nieto, E. Osinaga, *Exp. Parasitol.* **2001**, *98*, 100–109.
- [306] R. M. O'Connor, K. Kim, F. Khan, H. D. Ward, *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 6027–6034.
- [307] N. Bhat, A. Joe, M. PereiraPerrin, H. D. Ward, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 34877–34887.
- [308] J. E. Hansen, H. Clausen, C. Nielsen, L. S. Teglbaerg, L. L. Hansen, C. M. Nielsen, E. Dabelsteen, L. Mathiesen, S. I. Hakomori, J. O. Nielsen, *J. Virol.* **1990**, *64*, 2833–2840.
- [309] J. E. Hansen, C. Nielsen, M. Arendrup, S. Olofsson, L. Mathiesen, J. O. Nielsen, H. Clausen, *J. Virol.* **1991**, *65*, 6461–6467.
- [310] D. C. Johnson, P. G. Spear, *Cell* **1983**, *32*, 987–997.
- [311] S. Olofsson, J. Blomberg, E. Lycke, *Arch. Virol.* **1981**, *70*, 321–329.
- [312] E. A. Wenske, R. J. Courtney, *J. Virol.* **1983**, *46*, 297–301.
- [313] H. Shida, S. Dales, *Virology* **1981**, *111*, 56–72.
- [314] C. Gruber, S. Levine, *J. Gen. Virol.* **1985**, *66*, 417–432.
- [315] H. Niemann, H. D. Klenk, *J. Mol. Biol.* **1981**, *153*, 993–1010.
- [316] A. Pinter, W. J. Honnen, *J. Virol.* **1988**, *62*, 1016–1021.
- [317] K. V. Holmes, E. W. Doller, L. S. Sturman, *Virology* **1981**, *115*, 334–344.

- [318] H. B. Bernstein, S. P. Tucker, E. Hunter, J. S. Schutzbach, R. W. Compans, *J. Virol.* **1994**, *68*, 463–468.
- [319] S. Kirkeby, C. J. M. Martel, B. Aasted, *Virus Res.* **2009**, *144*, 225–232.
- [320] G. F. Springer, P. R. Desai, H. Tegtmeyer, B. D. Spencer, E. F. Scanlon, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1993**, *690*, 355–357.
- [321] G. F. Springer, P. R. Desai, W. Wise, S. C. Carlstedt, H. Tegtmeyer, H. Stein, E. F. Scanlon in *Immunodiagnosis of Cancer*, 2. Aufl. (Hrsg.: R. B. Herberman, D. W. Mercer), Marcel Dekker, New York, **1990**, S. 587–612.
- [322] D. P. Galonić, D. Y. Gin, *Nature* **2007**, *446*, 1000–1007.
- [323] C. Napoletano, A. Rughetti, M. P. Agervig Tarp, J. Coleman, E. P. Bennett, G. Picco, P. Sale, K. Denda-Nagai, T. Irimura, U. Mandel, H. Clausen, L. Frati, J. Taylor-Papadimitriou, J. Burchell, M. Nuti, *Cancer Res.* **2007**, *67*, 8358–8367.
- [324] F. Hellings, A. Shang, M. Calves, S. Zhang, S. Ren, R. K. Yu, H. F. Oettgen, P. O. Livingston, *Cancer Res.* **1994**, *54*, 197–203.
- [325] S. F. Slovin, G. Ragupathi, C. Musselli, K. Olkiewicz, D. Verbel, S. D. Kuduk, J. B. Schwarz, D. Sames, S. Danishefsky, P. O. Livingston, H. I. Scher, *J. Clin. Oncol.* **2003**, *21*, 4292–4298.
- [326] A. Kaiser, N. Gaidzik, U. Westerlind, D. Kowalezyk, A. Hobel, E. Schmitt, H. Kunz, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7688–7692; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7551–7555.
- [327] C. R. Kensil, C. Barrett, N. Kushner, G. Beltz, J. Storey, U. Patel, J. Recchia, A. Aubert, D. Marciani, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1991**, *199*, 1423–1427.
- [328] F. Hellings, S. Zhang, A. Shang, S. Adluri, M. Calves, R. Koganty, B. M. Longenecker, T. J. Yao, H. F. Oettgen, P. O. Livingston, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2783–2788.
- [329] G. Ragupathi, *Cancer Immunol. Immunother.* **1996**, *43*, 152–157.
- [330] S. J. van Vliet, E. Saeland, Y. van Kooyk, *Trends Immunol.* **2008**, *29*, 83–90.
- [331] S. J. van Vliet, S. I. Gringhuis, T. B. Geijtenbeek, Y. van Kooyk, *Nat. Immunol.* **2006**, *7*, 1200–1208.
- [332] R. M. Steinman, D. Hawiger, M. C. Nussenzweig, *Annu. Rev. Immunol.* **2003**, *21*, 685–711.
- [333] T. B. H. Geijtenbeek, S. J. van Vliet, A. Engering, B. A. 't Hart, Y. van Kooyk, *Annu. Rev. Immunol.* **2004**, *22*, 33–54.
- [334] H. Kunz, P. Wernig, M. Schilling, J. Marz, C. Unverzagt, S. Birnbach, U. Lang, H. Waldmann, *Environ. Health Perspect.* **1990**, *88*, 247–249.
- [335] H. Paulsen, T. Bielfeldt, S. Peters, M. Meldal, K. Bock, *Liebigs Ann. Chem.* **1994**, 369–379.