

Aus dem Institut für Chemie
der Universität zu Lübeck
Direktor:
Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters

**UDP-GlcNAc als metabolischer Marker –
Neue Einblicke in den Metabolismus von Säugerzellen mittels
NMR-Spektroskopie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

Vorgelegt von
Anika Gallinger
aus Bad Hersfeld

Lübeck, 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Peters

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Achim Peters

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 24.10.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung.....	4
Abstract.....	6
1. Einleitung.....	8
1.1 Stoffwechselwege und Metabolomics.....	8
1.2 Zellatmung.....	9
1.2.1 Glycolyse	9
1.2.2 Citratzyklus.....	11
1.2.3 Atmungskette	12
1.3 Synthese von UDP-GlcNAc über den Hexosamin-Biosyntheseweg.....	13
1.4 UDP-GlcNAc als Baustein für Glycosylierungen.....	14
1.5 Die O-GlcNAcylierung	16
1.6 O-GlcNAcylierungen und Alzheimer	18
1.7 Zielsetzung.....	18
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Zellkultur	20
2.1.1 HT-22 Zelllinie: Kulturbedingungen, Subkultivierung, Kryokonservierung und Revitalisierung...	20
2.1.2 HEK 293 Zelllinie: Kulturbedingungen, Subkultivierung, Kryokonservierung und Revitalisierung	20
2.1.3 Mycoplasmenkontrolle	21
2.2 UDP-GlcNAc als metabolischer Marker	21
2.2.1 Inkubationsversuche	22
2.2.1.1 Beschichtung von Petrischalen mit Poly-L-Ornithin für HT-22 Zellen	22
2.2.1.2 Aussaat von HT-22 und HEK 293 Zellen, Inkubation und Gewinnung von Mediumproben	22
2.2.1.3 Metaboliten-Extraktion mittels Perchlorsäure.....	22
2.2.1.4 Proteinbestimmung.....	23
2.2.1.5 Methanol/Chloroform-Extraktion von Metaboliten	23
2.2.1.6 Statistische Analyse.....	24
2.2.2 Bestimmung der maximal verträglichen Inhibitorkonzentration	24
2.2.3 NMR-Messungen.....	24
2.2.3.1 Mediumproben	24
2.2.3.2 Zellextrakte.....	25
2.3 Untersuchung des O-GlcNAcylierungsmusters von Tau-Protein	26
2.3.1 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot von Tau-K32-wt	26
2.3.2 Western Blot anti O-GlcNAc mit WGA Lektin.....	26
2.3.3 Western Blot anti O-GlcNAc mit monoklonalen Antikörpern	27

2.3.4	Western Blot zum Nachweis von <i>O</i> -GlcNAc-Transferase.....	28
2.3.5	<i>O</i> -GlcNAcylierungsversuche mit Tau-K32-wt	28
2.3.5.1	Herstellung von funktionalen Zellextrakten	28
2.3.5.2	<i>O</i> -GlcNAcylierung und Detektion mit Western Blot und NMR	29
2.3.6	De-GlcNAcylierung von Tau-K32-wt mit β -1-2,3,4,6-N-Acetylglucosaminidase	30
2.3.7	β -Eliminierung von Tau-K32-wt.....	31
2.4	Synthese der <i>CKII</i> -Peptidderivate	32
2.4.1	Festphasenpeptidsynthese	32
2.4.2	Abspaltung der Peptide vom Harz	32
2.4.3	Etherextraktion.....	33
2.4.4	Reinigung der Peptide mit <i>RP</i> -HPLC	33
2.4.5	Charakterisierung der Peptide mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie	34
2.4.6	Charakterisierung der Peptide mittels NMR-Spektroskopie	34
2.4.7	Dot-Blot des Biotin-Peptid	35
2.5	Nachweis einer <i>O</i> -GlcNAcylierung der <i>CKII</i> -Peptidderivate.....	35
2.5.1	SDS-PAGE von Biotin-Peptid	36
2.5.2	<i>O</i> -GlcNAcylierungsversuche mit ^{15}N -Peptid und Biotin-Peptid	36
2.5.3	Western Blot zum Nachweis des Biotin-Peptids mit Streptavidin-HRP	36
2.5.4	Nachweis des Biotin-Peptids mittels Western Blot und monoklonalen anti- <i>O</i> -GlcNAc Antikörpern	37
2.5.5	NMR-Messungen des ^{15}N -Peptids	37
2.6	Geräte und Chemikalien	38
2.6.1	Puffer und Lösungen.....	38
2.6.2	Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	40
2.6.3	Geräte.....	40
2.6.4	Chemikalien	41
2.6.5	Materialien	43
2.6.6	Proteine und Antikörper.....	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Etablierung von UDP-GlcNAc als NMR-detektierbarer metabolischer Marker	45
3.1.1	Bestimmung der maximalen nicht-toxischen Konzentrationen von Natriumazid und Rotenon	46
3.1.1.1	HT-22 Zellen	46
3.1.1.2	HEK 293 Zellen	49
3.1.2	Auswirkungen von Natriumazid auf den Metabolismus der HT-22 Zellen bei vierstündiger Inkubation	50
3.1.3	Identifizierung von UDP-GlcNAc in Zellextrakt.....	51
3.1.4	Auswirkungen von Natriumazid auf den Metabolismus der HT-22 Zellen bei 24-stündiger Inkubation	56
3.1.5	Auswirkungen von Rotenon auf den Metabolismus der HT-22 Zellen bei 24-stündiger Inkubation	60
3.1.6	Verwendung der Methanol/Chloroform-Extraktion.....	63

3.1.6.1	Quantifizierung aktivierter Zucker bei Inkubation mit Natriumazid	67
3.1.6.2	Quantifizierung aktivierter Zucker bei Inkubation mit Rotenon	69
3.1.7	Inkubationsversuche mit HEK 293 Zellen zur Beobachtung der Auswirkung von Natriumazid auf deren Metabolismus	69
3.2	<i>Untersuchung des O-GlcNAcylierungsmusters von Tau-K32-wt</i>	75
3.2.1	Etablierung des protein-biochemischen Nachweises der O-GlcNAcylierung von Tau-K32-wt	75
3.2.1.1	SDS-PAGE und Western Blot von Tau-K32-wt	75
3.2.1.2	Nachweis der O-GlcNAc-Transferase in Zellextrakt	76
3.2.1.3	Nachweis von O-GlcNAcylierungen von Tau-K32-wt	78
3.2.1.3.1	Nachweis mit Lektin WGA	78
3.2.1.3.2	Nachweis mit monoklonalen anti-O-GlcNAc Antikörpern	80
3.2.2	O-GlcNAcylierungsversuche	81
3.2.2.1	Protein-biochemischer Nachweis einer O-GlcNAcylierung des Tau-K32-wt	81
3.2.2.2	NMR-spektroskopischer Nachweis einer O-GlcNAcylierung des ¹⁵ N-Tau-K32-wt	82
3.2.3	De-GlcNAcylierung von Tau-K32-wt	84
3.2.3.1	Enzymatische De-GlcNAcylierung mit Hilfe der β -1-2,3,4,6-N-Acetylglucosaminidase	84
3.2.3.2	De-GlcNAcylierung durch β -Eliminierung	86
3.3	<i>O-GlcNAcylierungsversuche der CKII-Peptidderivate</i>	88
3.3.1	Charakterisierung der Peptide	88
3.3.2	Darstellung des Biotin-Peptids im Western Blot	91
3.3.2.1	SDS-PAGE von Biotin-Peptid	91
3.3.2.2	Western Blot von Biotin-Peptid	92
3.3.3	NMR-spektroskopische Darstellung des ¹⁵ N-Peptids	93
3.3.4	O-GlcNAcylierungsversuche mit Biotin-Peptid und ¹⁵ N-Peptid	94
3.3.4.1	PBS als Lysepuffer	94
3.3.4.2	Natriumphosphatpuffer mit DTT und MgCl ₂ als Lysepuffer	98
3.3.4.3	Natriumphosphatpuffer mit DTT und EDTA als Lysepuffer	101
4.	Diskussion	111
4.1	<i>UDP-GlcNAc als NMR-detektierbarer metabolischer Marker</i>	111
4.1.1	Etablierung von UDP-GlcNAc als NMR-detektierbarer metabolischer Marker	111
4.1.2	Validierung der Ergebnisse mittels Methanol/Chloroform-Extraktion	117
4.1.3	Quantifizierung aktivierter Zucker	117
4.1.4	Anwendung von UDP-GlcNAc als NMR-detektierbarer metabolischer Marker	117
4.1.5	Schlussfolgerung und Ausblick	118
4.2	<i>Untersuchung des O-GlcNAcylierungsmusters von Tau-K32-wt</i>	119
4.2.1	Protein-biochemischer Nachweis von Tau und O-GlcNAcylierungen	120
4.2.2	NMR-spektroskopischer Nachweis einer O-GlcNAcylierung	121
4.3	<i>O-GlcNAcylierungsversuche der CKII-Peptidderivate</i>	122
4.3.1	O-GlcNAcylierungsversuche mit Biotin- und ¹⁵ N-Peptid	123
4.3.2	Schlussfolgerung und Ausblick	126

Literaturverzeichnis	127
Anhang.....	136
Danksagung	147

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
BSA	Bovines Serumalbumin
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
DCM	Dichlormethan
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropylethylamin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavinadenindinukleotid
f.c.	<i>final concentration</i> (Endkonzentration)
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GDP	Guanosindiphosphat
GFAT	L-Glutamin-D-Fructose-6-phosphat-Transaminase
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
kDa	Kilodalton
mAb	<i>monoclonal antibody</i> (monoklonaler Antikörper)
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization - Time of Flight</i>
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
MS	Massenspektrometrie
MW	<i>molecular weight</i> (Molekulargewicht)
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid

NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernspinresonanzspektroskopie)
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i>
OVA	Ovalbumin
OGA	O-GlcNAcase
OGT	O-GlcNAc-Transferase
O-GlcNAc	<i>O-linked</i> GlcNAc
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
ppm	<i>parts per million</i>
PUGNAc	O-(2-Acetamido-2-desoxy- D-glucopyranosyliden)amino <i>N</i> -Phenylcarbamat
RP	<i>reversed phase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> (Festphasenpeptidsynthese)
TBS	<i>tris buffered saline</i> (TRIS-gepufferte Salzlösung)
TBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
TIPS	Triisopropylsilan
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
Tricin	<i>N</i> -[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSP	3-(Trimethylsilyl)-2,2,3,3-deuteropropionsäure
UDP-Gal	Uridindiphosphat- α -D-Galactose
UDP-GalNAc	Uridindiphosphat- <i>N</i> -Acetylgalactosamin
UDP-Glc	Uridindiphosphat- α -D-Glucose
UDP-GlcNAc	Uridindiphosphat- <i>N</i> -Acetylglucosamin
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i> (Weizenkeimagglutinin)

Aminosäuren

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

Zusammenfassung

Der Hexosamin-Biosyntheseweg (HBP) ist ein Nährstoffsensor der eukaryotischen Zelle, da für die Synthese seines Hauptprodukts, UDP-GlcNAc, Stoffwechselprodukte der Glycolyse, der Aminosäuresynthese, der Nucleotidsynthese, des Pentose-Phosphatwegs und des Fettsäuremetabolismus "miteinander vereint" werden. Ob UDP-GlcNAc ein NMR-detektierbarer metabolischer Marker ist und ob Veränderungen in den verschiedenen Stoffwechselwegen innerhalb dieses Moleküls beobachtet werden können, wurde im ersten Teil dieser Arbeit geklärt. Für die Experimente wurde eine neuronale Zelllinie (HT-22) verwendet. Nachdem gezeigt worden war, dass die HT-22 Zellen UDP-GlcNAc produzieren, war es möglich, nach einer 24-stündigen Inkubation der Zellen mit ^{13}C -Glucose, die *N*-Acetylgruppe und das C1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc zu markieren. Durch die Gabe von Natriumazid, einem Inhibitor des Komplex IV der Atmungskette, wurde der Metabolismus der HT-22 Zellen gestört. Die Veränderungen, die dadurch hervorgerufen wurden, konnten innerhalb des Moleküls UDP-GlcNAc abgelesen werden. Die ^{13}C -Markierung der *N*-Acetylgruppe wurde in ihrer Intensität geringer, während die Markierung des C1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc nicht betroffen war. Die Inhibierung der Atmungskette hatte zur Folge, dass weder ATP noch NAD^+ durch den Komplex I mehr produziert werden konnte. Dadurch kam die Reaktion des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes zum Erliegen, der sonst aus Pyruvat, welches während der Glycolyse gebildet wird, Acetyl-CoA produziert. Kommt diese Reaktion zum Erliegen, kann keine ^{13}C -markierte Acetylgruppe mehr auf UDP-GlcNAc übertragen werden. Da der Fluss der Metabolite aus der Glycolyse in den HBP nicht von der Inhibierung der Atmungskette betroffen war, wurde die ^{13}C -Markierung des C1 nicht vermindert. Dies konnte durch die Verwendung von Rotenon als Inhibitor des Komplex I der Atmungskette bestätigt werden. Die NAD^+ -Synthese kam durch diesen Inhibitor zum Erliegen, wodurch kein ^{13}C -markiertes Acetyl-CoA mehr gebildet werden konnte und die ^{13}C -Markierung der *N*-Acetylgruppe des UDP-GlcNAc abnahm. Über die Quantifizierung aktivierter Zucker in Protonenspektren konnte außerdem belegt werden, dass die Inkubation der Zellen mit den beiden Inhibitoren keinen Einfluss auf die generelle Synthese von UDP-GlcNAc hat. Somit spiegeln die Effekte, die in der Änderung des Markierungsmusters von UDP-GlcNAc detektierbar sind, tatsächlich den Fluss der Glucose durch Glycolyse und HBP wider.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden O-GlcNAcylierungen NMR-spektroskopisch untersucht. Die O-GlcNAcylierung ist eine posttranslationale Modifikation von Proteinen, bei der die GlcNAc-Einheit von UDP-GlcNAc kovalent an die Hydroxylgruppe eines Serin- oder Threoninrests gebunden wird. Die Fehlregulation dieser Proteinmodifikation spielt bei verschiedenen Erkrankungen wie Diabetes Typ II oder Krebs eine wichtige Rolle. Speziell in Neuronen ist eine fehlende O-GlcNAcylierung des Tau-Proteins mit der Entwicklung von Alzheimer assoziiert. Allerdings ist der Nachweis der O-GlcNAcylierten Aminosäuren innerhalb eines Proteins mit den derzeitigen Methoden schwierig. Es sollte daher untersucht werden, ob NMR-spektroskopisch eine schnelle Zuordnung O-GlcNAcylierter Stellen im intakten Protein möglich ist. Zunächst wurde für den Nachweis einer O-GlcNAcylierung Tau-Protein verwendet, welches *in vitro* in zellulärem Extrakt O-GlcNAcyliert werden sollte. NMR-spektroskopisch wurde die O-GlcNAcylierung über ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren nachgewiesen, in denen sich die chemische Verschiebung von Serin- oder Threoninresten bei einer O-GlcNAcylierung ändern sollte. Aus Ermangelung einer protein-biochemischen Standardmethode, mit der die beobachteten Veränderungen im NMR-Spektrum als O-GlcNAcylierung hätten belegt werden können, wurden Derivate des CKII-Peptids für weitere Untersuchungen verwendet. Für diese sollten sowohl ein protein-biochemischer als auch NMR-spektroskopischer Nachweis einer O-GlcNAcylierung etabliert werden. Nachdem die Inkubationsbedingungen in den zellulären Extrakten optimiert worden waren, konnten sowohl protein-biochemisch als auch NMR-spektroskopisch erste Hinweise auf eine O-GlcNAcylierung gefunden werden. In Western Blots konnte das Peptid mit monoklonalen anti-O-GlcNAc Antikörpern detektiert werden und in den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren wurde eine Tieffeldverschiebung eines Peptidsignals während der Inkubation in zellulärem Extrakt detektiert. Allerdings muss der protein-biochemische Nachweis noch weiter optimiert werden, um die Verschiebung des Signals in den NMR-Spektren zweifelsfrei einer O-GlcNAcylierung zuordnen zu können.

Abstract

The hexosamine biosynthesis pathway (HBP) is supposed to be a nutrient sensor of eukaryotic cells. Its major product, UDP-GlcNAc, is derived from several metabolites of different metabolic pathways such as glycolysis, amino acid synthesis, nucleotide synthesis, pentose phosphate pathway, and fatty acid metabolism. In the first part of this thesis it was investigated whether UDP-GlcNAc is a suitable NMR detectable metabolic marker and whether different usage of metabolic pathways can be detected via observation of UDP-GlcNAc resonance signals. A neuronal cell line (HT-22) was used for these experiments. After showing that NMR allows straightforward detection of UDP-GlcNAc produced by HT-22 cells, ^{13}C -labeling of the *N*-acetyl group and of C1 of the GlcNAc part of UDP-GlcNAc was achieved by incubating cells for a period of 24 h with $1\text{-}^{13}\text{C}$ glucose. The metabolism of the cells was disturbed by incubating cells with sodium azide, a specific inhibitor of complex IV of the respiratory chain. Metabolic differences that occurred during incubation with this inhibitor were detected using only UDP-GlcNAc as a reporter molecule. Incorporation of ^{13}C -label in the *N*-acetyl group of UDP-GlcNAc decreased while labeling of C1 of GlcNAc of UDP-GlcNAc was not affected. Inhibition of the respiratory chain halted production of ATP as well as production of NAD^+ through complex I of the respiratory chain. Thus the pyruvate dehydrogenase complex stopped using pyruvate from glycolysis to produce acetyl-CoA. When this reaction stops no ^{13}C label from $1\text{-}^{13}\text{C}$ -glucose can be incorporated into *N*-acetyl group of UDP-GlcNAc because this requires ^{13}C labeled acetyl-CoA. Flux through glycolysis and HBP was not affected by inhibition of the respiratory chain. Therefore, ^{13}C -labeling of C1 of the GlcNAc part of UDP-GlcNAc remained unaffected. This could be further substantiated by using Rotenone as a specific inhibitor of complex I of the respiratory chain. NAD^+ synthesis stopped and ^{13}C labeled acetyl-CoA was no longer produced. This led to reduced ^{13}C -labeling of the *N*-acetyl group of UDP-GlcNAc. Furthermore, quantification of activated sugars in proton spectra showed that incubation of cells with azide or rotenone did not affect the production of UDP-GlcNAc at all. Hence, differential incorporation of ^{13}C -label into UDP-GlcNAc directly reflects the different flux of glucose through glycolysis and HBP under different physiological conditions.

In the second part of this thesis O-GlcNAcylations have been investigated by NMR. O-GlcNAcylation is a posttranslational modification of proteins where a single GlcNAc

residue is covalently linked to a serine or a threonine residue via an *O*-glycosidic linkage. Dysregulation of this modification plays an important role in development of diabetes type II or cancer. Especially in neurons decreased levels of *O*-GlcNAcylation of Tau protein are associated with the development of Alzheimer's disease. However, determination of *O*-GlcNAcylation sites of proteins is difficult with current methods. Here, it was investigated to which extent NMR spectroscopy can be used to determine *O*-GlcNAcylation sites. For analysis of *O*-GlcNAcylation sites tau protein was used as an example. *In vitro* *O*-GlcNAcylation was achieved using cellular extracts that contain the corresponding glycosyltransferase. ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-spectra were recorded to detect *O*-GlcNAcylation of serine or threonine residues via chemical shift perturbations. In the absence of protein-biochemical assays for *O*-GlcNAcylation, CKII model peptides were initially employed to correlate changes of NMR spectra with *O*-GlcNAcylation. For these peptides a protein-biochemical assay as well as a NMR spectroscopic method for detecting *O*-GlcNAcylation had to be established. Incubation conditions for *O*-GlcNAcylation had to be optimized first. Western blots with corresponding anti-*O*-GlcNAc monoclonal antibodies furnished peptide bands indicating *O*-GlcNAcylation, and down field shifts in ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-spectra were tentatively assigned to result from *O*-GlcNAcylation. In the future these findings will have to be further substantiated to unambiguously assign *O*-GlcNAcylation using NMR.

1. Einleitung

1.1 Stoffwechselwege und *Metabolomics*

Der Metabolismus einer eukaryotischen Zelle ist ein kompliziertes Netzwerk aus verschiedensten Stoffwechselwegen. Davon sind einige mehr, andere weniger miteinander verknüpft. Der wohl bekannteste Stoffwechselweg der Zelle ist die Zellatmung. Diese umfasst die Glycolyse, den Citratzyklus und die anschließende Atmungskette. Glycolyse und Citratzyklus liefern viele Substrate für andere Stoffwechselwege. So gelangt z.B. Glucose-6-phosphat der Glycolyse in den Pentosephosphatweg und Fructose-6-phosphat ist Ausgangsprodukt für den Hexosamin-Biosyntheseweg (HBP). Der Citratzyklus liefert Produkte, die z.B. für die Biosynthese von Aminosäuren, Fettsäuren und Cholesterin benötigt werden.

Typischerweise werden systemische Veränderungen dieses komplexen Metabolismus mit Hilfe der Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR), Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) und Flüssig-Chromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) untersucht. Dabei werden die Moleküle, die kleiner als 1 kDa sind und als Metabolite bezeichnet werden, detektiert, identifiziert und quantifiziert (Wishart, 2008). Die erhaltenen Spektren sind sehr komplex, da typischerweise mehrere hundert Metabolite detektiert werden können. Anwendung findet diese Methode, die *Metabolomics* genannt wird, z.B. in der Diagnose von Krankheiten (Kaddurah-Daouk and Krishnan, 2009; Moolenaar et al., 2003) oder in der Wirkstoffforschung (Kaddurah-Daouk et al., 2008). Um die Veränderungen im Metabolismus, verursacht durch eine Krankheit oder durch Wirkstoffe, detektieren zu können, gibt es zwei verschiedene Methoden (Wishart, 2008). Im chemometrischen Ansatz werden die Auswirkungen auf die Zusammensetzung aller Metabolite betrachtet, ohne die einzelnen Metabolite zu identifizieren. Mit Hilfe von Algorithmen werden Cluster und Muster identifiziert, durch die sich die beiden Zustände unterscheiden. Danach werden erst die Metabolite identifiziert, die für die Veränderungen verantwortlich sind. Der quantitative Ansatz (*targeted metabolic profiling*) hingegen setzt voraus, dass die Metabolite *a priori* bekannt sind. Dabei werden zunächst Metabolite identifiziert, um anschließend die Auswirkung einer Behandlung oder einer Erkrankung auf ihre Konzentration zu bestimmen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der NMR-Spektroskopie der quantitative *Metabolomics*-Ansatz verfolgt, um UDP-GlcNAc als metabolischen Marker zu etablieren. Die Sonderstellung, die UDP-GlcNAc im Hexosamin-Biosyntheseweg einnimmt, inwieweit dieser mit der Zellatmung verknüpft ist und wofür Zellen UDP-GlcNAc verwenden, wird in den Kapiteln 1.2 bis 1.4 dargestellt. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem NMR-spektroskopischen Nachweis einer O-GlcNAcylierung. Was eine O-GlcNAcylierung ist und welche Krankheiten mit einer fehlerhaften O-GlcNAcylierung verbunden sind, wird in den Kapiteln 1.5 und 1.6 beschrieben.

1.2 Zellatmung

Die für die Aufrechterhaltung der Zellfunktionen wichtigsten Stoffwechselwege sind die Glycolyse und der Citratzyklus mit der anschließenden Atmungskette. Sie beschreiben die drei Phasen der zellulären Atmung, bei welcher Glucose zu CO_2 und H_2O oxidiert und Adenosintriphosphat (ATP) gebildet wird.

1.2.1 Glycolyse

Die Glycolyse bildet den ersten Abschnitt der Verstoffwechselung von Glucose. Sie findet im Zytoplasma statt. Die aufgenommenen Glucosemoleküle werden in einer irreversiblen Reaktion mit Hilfe der Hexokinase unter Verwendung von ATP zu Glucose-6-phosphat verstoffwechselt. Nach der Isomerisierung zu Fructose-6-phosphat entsteht, ebenfalls unter Verbrauch von ATP, Fructose-1,6-bisphosphat. Diese Schritte, die in Abbildung 1 auf der linken Seite dargestellt sind, bezeichnen die Schritte der Glycolyse, in denen ATP verbraucht wird. Nachdem aus dem C6-Körper zwei C3-Körper gebildet wurden (Abbildung 1, rechte Seite), werden sowohl bei der Bildung von 3-Phosphoglycerat als auch von Pyruvat jeweils zwei ATP-Moleküle gewonnen. Somit liefert die Glycolyse pro Glucosemolekül zwei Moleküle ATP. Zusätzlich werden bei der Bildung von 1,3-Bisphosphoglycerat zwei Reduktionsäquivalente gewonnen, die in die Atmungskette einfließen können. Das während der Glycolyse entstandene Pyruvat wird anschließend in die mitochondriale Matrix transportiert. Dort bildet die vom Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex katalysierte Reaktion den Übergang zwischen Glycolyse und Citratzyklus. Während dieser Reaktion, dargestellt in Abbildung 2, wird Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO_2 oxidiert. Man bezeichnet diesen irreversiblen Oxidationsprozess als oxidative Decarboxylierung.

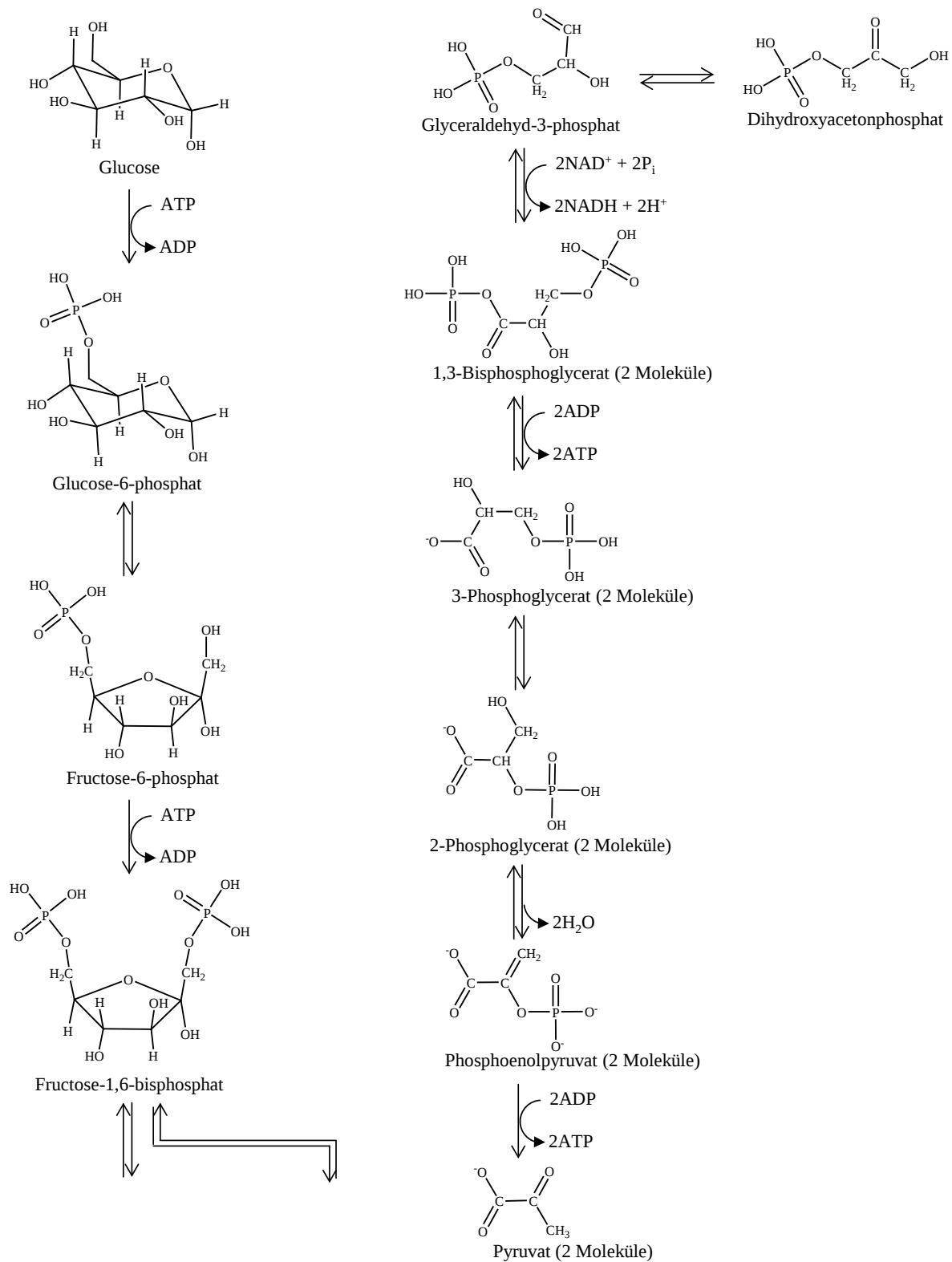


Abbildung 1: Darstellung der Glycolyse. Gezeigt sind alle Metabolite der Glycolyse sowie die Stellen, an denen ATP verbraucht und gewonnen wird. Außerdem werden die Reaktionsschritte aufgeführt, während derer Reduktionsäquivalente gewonnen werden (modifiziert nach Lodish, 2003).

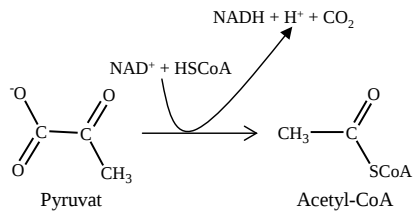


Abbildung 2: Vom Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex katalysierte Reaktion.

1.2.2 Citratzyklus

Der Citratzyklus der eukaryotischen Zelle umfasst acht Schritte und findet in der mitochondrialen Matrix statt. In Abbildung 3 sind alle Reaktionsschritte des Citratzyklus aufgeführt. Zunächst gibt Acetyl-CoA seine Acetylgruppe an Oxalacetat ab, wodurch Citrat, der Namensgeber dieses Stoffwechselzykluses, entsteht.

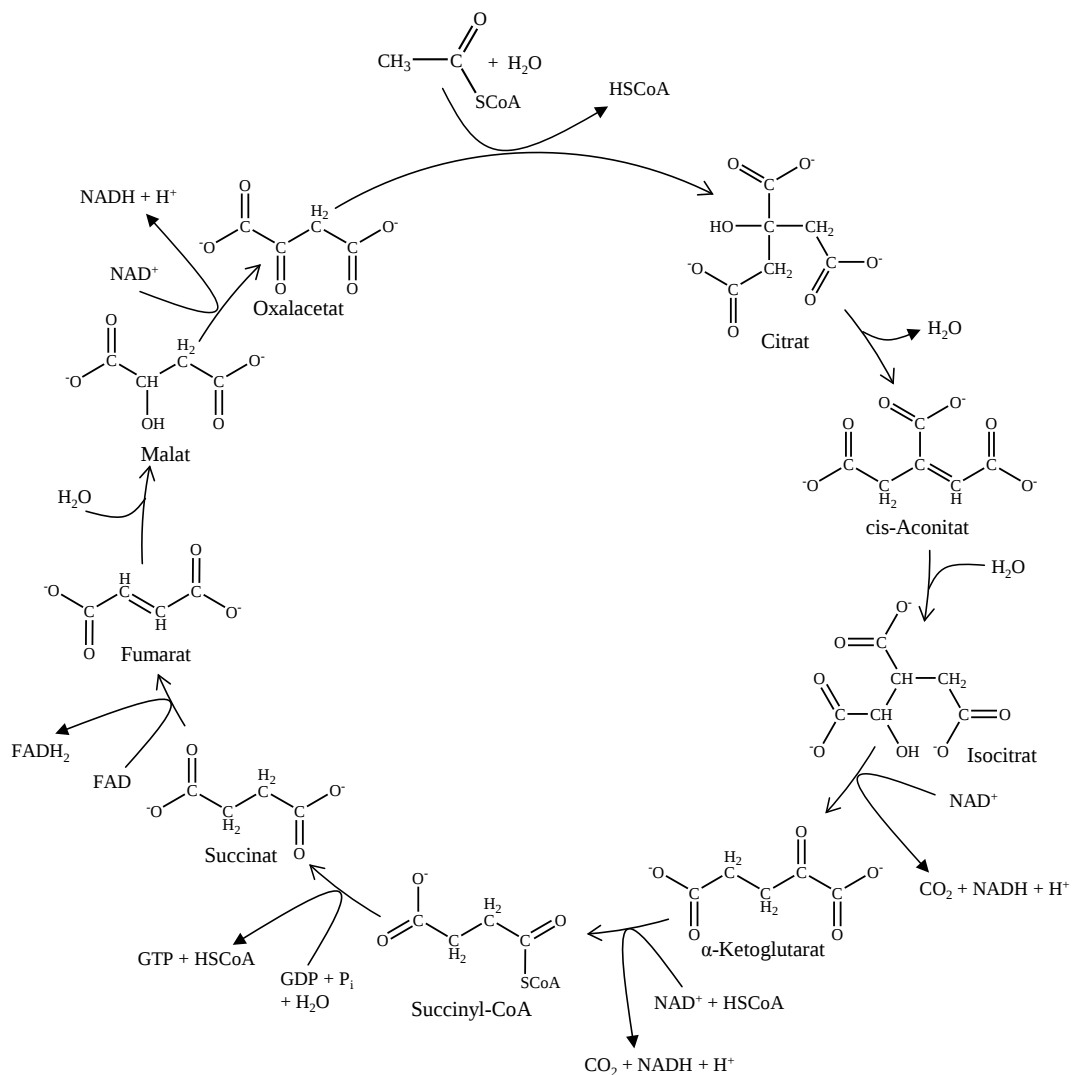


Abbildung 3: Darstellung des Citratzyklus. Gezeigt sind alle Metabolite des Citratzyklus sowie die Reaktionsschritte, während derer Reduktionsäquivalente und GTP gewonnen werden (modifiziert nach Lodish, 2003).

Citrat wird anschließend unter Bildung von *cis*-Aconitat in Isocitrat umgewandelt. Im weiteren Verlauf des Citratzyklus wird Isocitrat durch eine oxidative Decarboxylierung in α -Ketoglutarat und CO_2 umgewandelt. α -Ketoglutarat wird ebenfalls oxidativ decarboxyliert, wodurch CO_2 abgespalten wird. Über Succinyl-CoA entsteht Succinat, das über eine Dehydrierung in Fumarat umgewandelt wird. Anschließend wird Fumarat hydratisiert, wodurch Malat entsteht, welches über eine Dehydrierung wieder in das Ausgangsprodukt Oxalacetat überführt wird. Diese Reaktionsschritte dienen dazu, Energie in Form von GTP, hauptsächlich aber um Reduktionsäquivalente in Form von NADH und FADH_2 zu gewinnen.

1.2.3 Atmungskette

Die Atmungskette beschreibt die dritte Phase der Zellatmung. Sie besteht aus vier Komplexen und der ATP-Synthase, die in der inneren Mitochondrienmembran verankert sind. Dort findet die Reduktion von O_2 zu H_2O mit Elektronen statt, die von NADH und FADH_2 abgegeben werden. Außerdem werden Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum gepumpt, die für die Synthese von ATP durch die ATP-Synthase benötigt werden.

Komplex I der Atmungskette ist die NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase (NADH-Dehydrogenase). Dieser Komplex katalysiert zwei gekoppelte Reaktionen. Zum Einen werden ein Hydrid-Ion vom NADH und ein Proton aus der Matrix auf Ubichinon (UQ) übertragen, wodurch Ubichinol entsteht und den Anfang des Elektronentransports bildet. Parallel dazu werden vier Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum gepumpt. Rotenon, Myxothiazol, Amytal und Piericidin A inhibieren Komplex I, indem sie den Elektronentransfer zum Ubichinon verhindern.

Komplex II ist die Succinat-Dehydrogenase. Sie katalysiert die Oxidation von Succinat zu Fumarat und überträgt dadurch zwei Protonen auf Ubichinon. Es entsteht ebenfalls Ubichinol. Die Succinat-Dehydrogenase ist der einzige Komplex der Atmungskette, der keine Protonenpumpe ist. Da dieser Komplex auch FADH_2 an Stelle von NADH nutzen kann, fällt bei Inhibition des Komplex I die ATP-Produktion nicht komplett aus.

Komplex III wird auch als Cytochrom- bc_1 -Komplex oder Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase bezeichnet. Dieser Komplex katalysiert den Transfer von Elektronen von

Ubichinol zum Cytochrom *c*. An diese Reaktion gekoppelt findet ein Transfer von vier Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum statt.

Komplex IV wird auch Cytochrom-Oxidase genannt. Sie bildet den letzten Schritt der Atmungskette, in dem Elektronen vom Cytochrom *c* auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, der zu H₂O reduziert wird. Azide, Cyanide und Kohlenstoffmonoxid blockieren die Sauerstoffbindungsstelle. Dadurch können die Elektronen nicht mehr auf den Sauerstoff übertragen werden, alle vorhergehenden Komplexe bleiben in ihrer reduzierten Form und der Elektronentransfer stoppt. Dies hat zur Folge, dass der Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran nicht mehr aufrechterhalten werden kann und die ATP-Produktion zum Erliegen kommt

Der durch die Protonenpumpen der Atmungskette aufgebaute Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran wird anschließend durch die ATP-Synthase verwendet, um aus ADP und P_i wieder ATP zu synthetisieren.

Die Gesamtbilanz der zellulären Atmung setzt sich aus den Beiträgen der Oxidation der Glucose über die Glycolyse, die Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion, den Citratzyklus und die oxidative Phosphorylierung zusammen. Während der Glycolyse werden pro Glucosemolekül zwei NADH und vier ATP-Moleküle gebildet, aber auch zwei Moleküle ATP verbraucht. Die Pyruvat-Dehydrogenase-Reaktion liefert zwei NADH. Während des Citratzyklus entstehen sechs NADH, zwei GTP, die in ATP umgewandelt werden können, sowie zwei FADH₂. Insgesamt entstehen so pro Glucosemolekül zwischen 30 und 32 Moleküle ATP, da pro NADH 2,5 Moleküle ATP und pro FADH₂ 1,5 ATP-Moleküle gebildet werden können.

1.3 Synthese von UDP-GlcNAc über den Hexosamin-Biosyntheseweg

Uridindiphosphat-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) wurde 1953 entdeckt (Cabib et al., 1953) und wird als Nukleotidzucker oder aktivierter Zucker bezeichnet. Er wird über den Hexosamin-Biosyntheseweg (HBP) gebildet. Dieser beginnt damit, dass Fructose-6-phosphat, welches aus der Glycolyse stammt, in Glucosamin-6-phosphat umgewandelt wird. Die Aminogruppe stammt dabei von Glutamin. Die L-Glutamin-D-Fructose-6-phosphat-Transaminase (GFAT; EC 2.6.1.16) katalysiert diese Reaktion, die den Geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des HBP darstellt (Milewski, 2002). Anschließend wird durch Acetyl-CoA eine Acetylgruppe auf Glucosamin-6-phosphat übertragen, wodurch *N*-Acetylglucosamin-6-phosphat entsteht. Das für diese Reaktion essentielle Acetyl-CoA

stammt dabei aus der vom Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex katalysierten Reaktion (Abbildung 2), die die Glycolyse mit dem Citratzyklus verbindet. Nach einer Isomerisierung des *N*-Acetylglucosamin-6-phosphat in *N*-Acetylglucosamin-1-phosphat entsteht daraus unter Verwendung von UTP, welches während der Nucleotidsynthese und des Pentose-Phosphatweges gebildet wird, UDP-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc). Etwa 2 – 3 % der intrazellulären Glucose werden so in UDP-GlcNAc umgewandelt (Marshall et al., 1991). Durch eine Epimerisierung kann aus UDP-GlcNAc direkt UDP-GalNAc gebildet werden. Außerdem kann UDP-GlcNAc über verschiedene weitere Stoffwechselreaktionen in CMP-*N*-Acetylneuraminsäure umgewandelt werden.

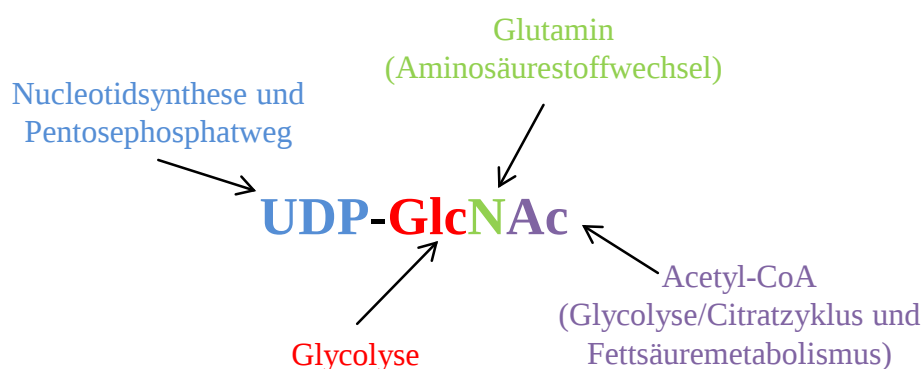


Abbildung 4: Darstellung der verschiedenen Stoffwechselwege, die zur Synthese von UDP-GlcNAc beitragen (nach Wells et al., 2003).

Abbildung 4 fasst die verschiedenen Stoffwechselwege, die zur Synthese von UDP-GlcNAc beitragen, zusammen. Daraus wird die zentrale Stellung dieses aktivierten Zuckers deutlich, die er im Metabolismus einer Zelle einnimmt. Schon in früheren Studien wurde der metabolische Status einer Zelle anhand der Konzentration von UDP-GlcNAc bestimmt (Spiro, 1984; Zhivkov et al., 1975). Durch andere Studien konnte UDP-GlcNAc die Rolle des Nährstoffsensors (*nutrient sensor*) der Zelle zugeschrieben werden (Rossetti, 2000; Wang et al., 1998; Wells et al., 2003).

1.4 UDP-GlcNAc als Baustein für Glycosylierungen

UDP-GlcNAc ist zentraler Baustein für die Bildung von Glycanen (Abbildung 5). Als Glycane bezeichnet man die Zuckerstrukturen, die kovalent mit dem Rückgrat eines Proteins verbunden sind. Dabei unterscheidet man Glycoproteine, Glycosphingolipide und Proteoglycane. Die Glycoproteine werden weiter in *N*- und *O*-Glycane unterteilt. Die Namensgebung bezieht sich dabei jeweils auf die Aminosäure, an die die Zuckerstruktur

geknüpft wird. *N*-Glycane tragen eine an Asn gekoppelte Zuckerstruktur, die in ihrer Kernstruktur aus drei Mannosen und zwei GlcNAc-Molekülen besteht. Deren Donor ist das UDP-GlcNAc. Bei den *O*-Glycanen, die ihren Namen von den Aminosäuren Ser und Thr erhalten, kommt GalNAc in der Kernstruktur vor. Donor für dieses GalNAc ist UDP-GalNAc, welches über den HBP aus UDP-GlcNAc gebildet wird. Auch die Glycosphingolipide enthalten GalNAc wie auch *N*-Acetylneuraminsäure, dessen Donor die CMP-*N*-Acetylneuraminsäure ist, die ebenfalls aus UDP-GlcNAc gebildet wird.

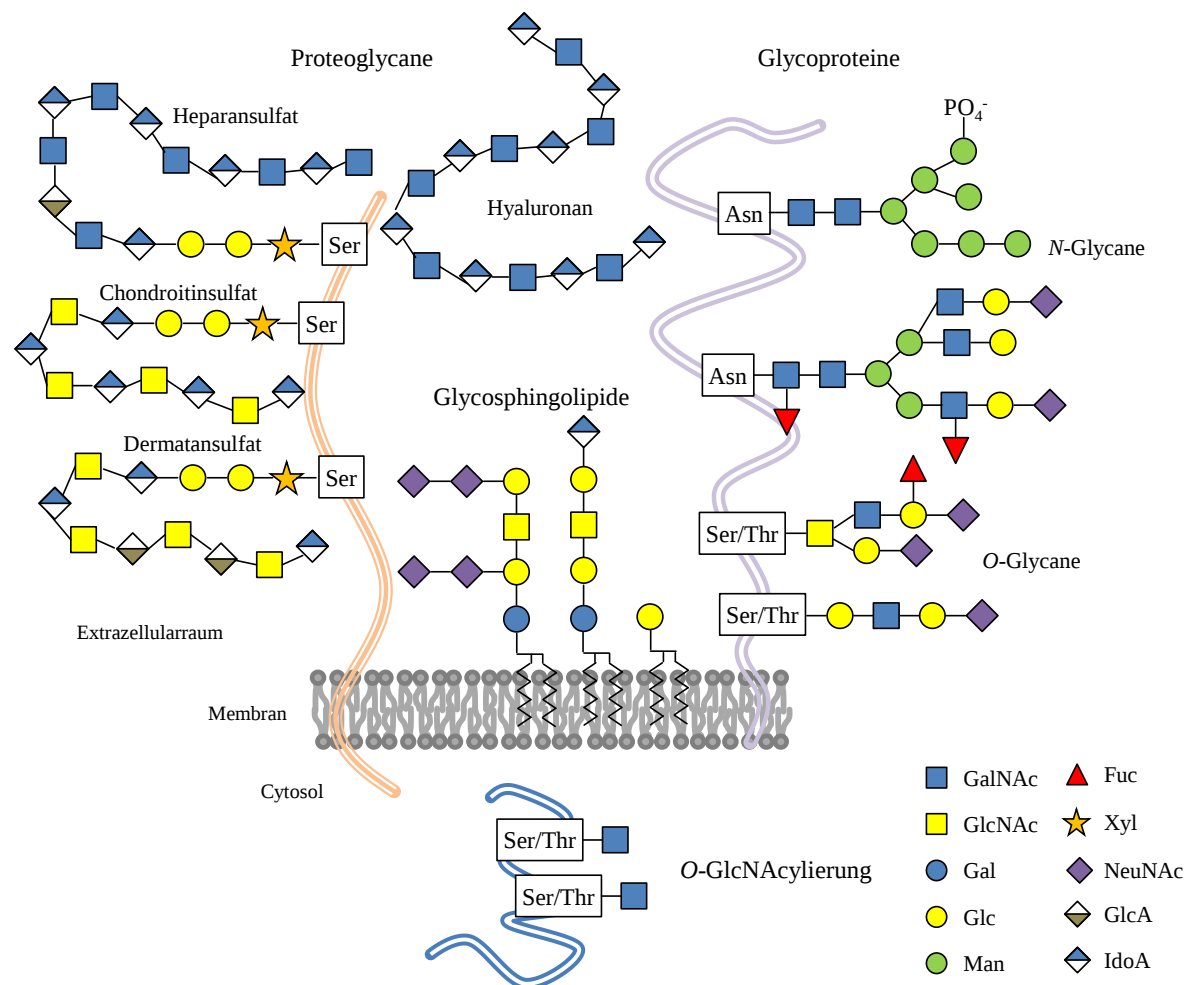


Abbildung 5: Darstellung der häufigsten eukaryotischen Glycane. GalNAc: *N*-Acetylglucosamin, GlcNAc: *N*-Acetylglucosamin, Gal: Galactose, Glc: Glucose, Man: Mannose, Fuc: Fucose, Xyl: Xylose; NeuNAc: *N*-Acetylneuraminsäure, GlcA: Glucuronsäure, IdoA: Iduronsäure. Nach (Varki and Sharon, 2009)

Die Proteoglycane Heparansulfat und Hyaluronan bestehen aus GlcNAc und Glucuronsäure. Chondroitinsulfat und Dermatansulfat werden unter anderem aus UDP-GalNAc aufgebaut. Die einzige Glycosylierung, die im Cytoplasma vorkommt, ist die *O*-GlcNAcylierung. Bei dieser Art der Glycosylierung wird ein einzelnes GlcNAc-Molekül kovalent mit einem Ser- oder Thr-Rest verknüpft und nicht weiter modifiziert (Love and Hanover, 2005).

1.5 Die O-GlcNAcylierung

Die O-GlcNAcylierung ist eine dynamische posttranslationale Proteinmodifikation, die von Stress und vom Ernährungsstatus der Zelle abhängig ist (Wells et al., 2003). Dabei wird ein einzelner GlcNAc-Rest β -glycosidisch an die Hydroxylgruppe eines Ser- oder Thr-Rests im Proteinrückgrat gebunden. Diese Modifikation ähnelt in ihrem schnellen Auf- und Abbau einer Phosphorylierung (Whelan and Hart, 2003). Im Gegensatz zu den in Kapitel 1.4 beschriebenen Glycosylierungen, die auf membranständigen oder sekretierten Proteinen zu finden sind, kommt die O-GlcNAcylierung sowohl auf Proteinen des Nucleus und des Cytoplasma (Hart et al., 2007) als auch in Mitochondrien (Hu et al., 2009) vor.

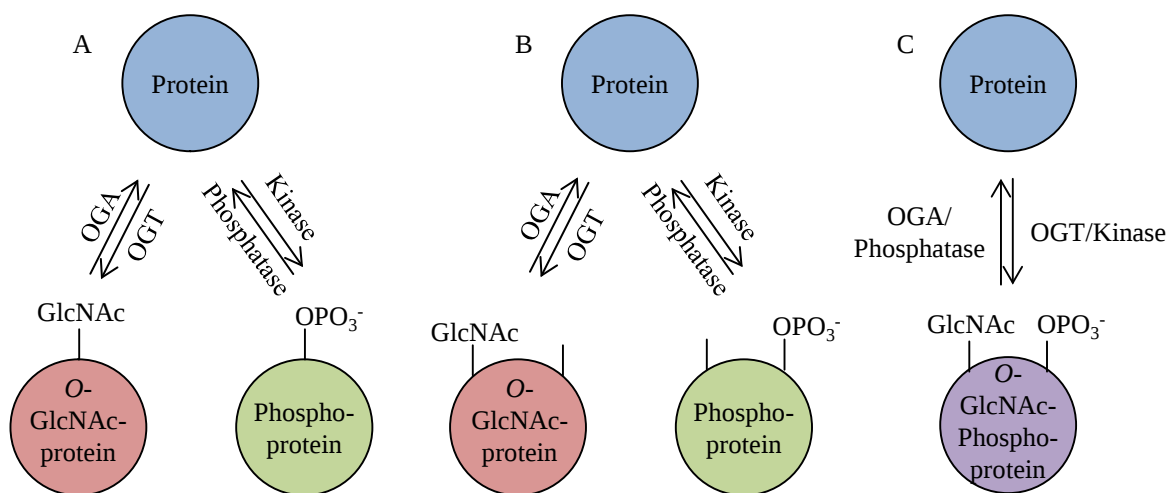


Abbildung 6: Schematische Darstellung der O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung von Proteinen. A: O-GlcNAcylierungsstelle und Phosphorylierungsstelle sind die gleichen, weshalb das Protein nur O-GlcNAcyliert oder phosphoryliert vorliegen kann. B: O-GlcNAcylierungsstelle und Phosphorylierungsstelle liegen nahe beieinander und das Protein kann auf Grund von sterischer Hinderung nur als O-GlcNAc- oder Phosphoprotein vorliegen. C: O-GlcNAcylierungsstelle und Phosphorylierungsstelle können unabhängig voneinander modifiziert werden, sodass das Protein gleichzeitig O-GlcNAcyliert und phosphoryliert sein kann.

Der erste Nachweis einer O-GlcNAcylierung gelang 1984 Torres und Hart in Lymphozyten (Torres and Hart, 1984). Seitdem sind viele weitere Proteine identifiziert worden, die O-GlcNAcyliert werden. Dazu zählen Transkriptionsfaktoren (Chou et al., 1995; Housley et al., 2008) sowie Proteine der Translation, Signaltransduktion, RNA-bindende Proteine Transportproteine, Phosphatasen, Kinasen, Metabolismusenzyime, Chaperone, Proteine des Cytoskeletts und andere regulatorische Proteine (Copeland et al., 2008; Hart and Akimoto, 2009; Teo et al., 2010). Außerdem ist bekannt, dass alle bisher identifizierten O-GlcNAcylierten Proteine auch phosphoryliert werden (Hart et al., 2007). Die Stellen der O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung können dabei ein und dieselben sein, sodass das Protein immer nur als O-GlcNAcyliertes oder phosphoryliertes Protein vorliegen kann

(Abbildung 6A). Wie in Abbildung 6B dargestellt ist es aber auch möglich, dass die O-GlcNAcylierungs- und die Phosphorylierungsstelle nicht die selben sind, aber durch sterische Hinderung immer nur eine Stelle modifiziert werden kann. Existieren zwei unterschiedliche O-GlcNAcylierungs- und Phosphorylierungsstellen, die im Protein weit genug voneinander entfernt liegen, tritt der in Abbildung 6C dargestellte Fall ein. Dann kann das Protein zur selben Zeit O-GlcNAcyliert und phosphoryliert sein (Butkinaree et al., 2009; Hart et al., 2007).

Aber im Gegensatz zur Phosphorylierung, für die etliche Kinasen und Phosphatasen existieren (Manning et al., 2002), gibt es für die Synthese von O-GlcNAcylierungen lediglich zwei Enzyme. Die O-GlcNAc-Transferase (OGT oder *O-linked N-acetylglucosamine transferase*, E.C. 2.4.1.94), ist ein Heterotrimer aus zwei 110 kDa großen Untereinheiten und einer 78 kDa großen Untereinheit (Haltiwanger et al., 1992). Sie katalysiert die kovalente Verknüpfung der GlcNAc-Einheit von UDP-GlcNAc mit der Hydroxylgruppe eines Ser- oder Thr-Rests (Haltiwanger et al., 1990). Eine Erkennungssequenz für die OGT konnte bisher noch nicht gefunden werden, aber 50% aller identifizierten O-GlcNAcylierungen fanden an einer P V S-Sequenz statt (Hart et al., 2011). Die O-GlcNAcase (OGA oder *O-linked-N-acetylglucosaminidase*, E.C. 3.2.1.52) wurde zunächst als Hexosaminidase C beschrieben (Braidman et al., 1974). Sie ist ein $\alpha\beta$ -Heterotrimer und katalysiert die Hydrolyse der GlcNAc-Einheit von Ser- oder Thr-Resten (Dong and Hart, 1994). Bisher konnten einige Inhibitoren der OGA entwickelt werden, z.B. PUGNAc (Whitworth et al., 2007).

Der Nachweis einer O-GlcNAcylierung wird mit Antikörpern gegen O-GlcNAcylierungen und Western Blots durchgeführt (Teo et al., 2010). Mit dieser Methode kann aber nur nachgewiesen werden, dass das untersuchte Protein O-GlcNAcyliert ist, nicht aber wo es einen O-GlcNAc-Rest trägt. Vocadlo et al. entwickelten eine chemische Strategie um O-GlcNAcylierte Proteine *in vitro* nachzuweisen. Den Zellen wurden bio-orthogonale Azidozucker zur Verstoffwechselung zur Verfügung gestellt, die dann durch die OGT an die Proteine geknüpft wurden. Diese Azidozucker konnten dann kovalent mit verschiedenen biochemischen Sonden verknüpft werden, um so eine O-GlcNAcylierung nachzuweisen (Vocadlo et al., 2003). Auch bei dieser Methode ist es nicht möglich die O-GlcNAcylierungsstelle zu identifizieren. Eine dritte Methode stellt die Massenspektrometrie dar, für die die O-GlcNAcylierten Proteine ebenfalls kovalent an Sonden gebunden werden, bevor Massenspektren aufgenommen werden. Hierbei können die

einzelnen O-GlcNAcylierungsstellen identifiziert werden (Khidekel et al., 2007; Wang et al., 2009).

1.6 O-GlcNAcylierungen und Alzheimer

Die O-GlcNAcylierung steht im Zusammenhang mit vielen Erkrankungen, wie Diabetes Typ II, kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs und Alzheimer (Buse, 2006; Copeland et al., 2008; Hanover et al., 2009; Lefebvre et al., 2010; Liu et al., 2009a; Liu et al., 2008; Liu et al., 2009b; Wells et al., 2003).

Die Alzheimer-Erkrankung ist eine neurodegenerative Erkrankung, die Demenz verursacht und schließlich zum Tod der betroffenen Individuen führt. Ursächlich für diese Erkrankung sind hochvernetzte Proteinaggregate in Neuronen, sogenannte neurofibrilläre Bündel (*neurofibrillary tangles*, NFTs), die zytotoxisch wirken. Eine Vorstufe dieser Aggregate sind paarige helicale Filamente (*paired helical filaments*, PHFs), die aus abnormal assoziierten Tau-Proteinen bestehen (Ballatore et al., 2007). Tau ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein und sorgt für deren Stabilität. Wird das Tau-Protein hyperphosphoryliert, kann es die Mikrotubuli nicht mehr binden und stabilisieren und aggregiert zu PHFs (Grundke-Iqbal et al., 1986a; Grundke-Iqbal et al., 1986b). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Alzheimer-Erkrankung ein gestörter Glucosemetabolismus vorausgeht (Hoyer, 1993, 2004; Small et al., 2000; Smith et al., 1992). Zusätzlich konnten weitere Studien belegen, dass Tau auch O-GlcNAcyliert wird und dadurch die Phosphorylierung reguliert wird (Liu et al., 2004). Weiterführend konnte in Mausexperimenten nachgewiesen werden, dass die Hyperphosphorylierung durch einen gestörten Glucosefluss hervorgerufen wird und reversibel ist (Li et al., 2006). Somit konnte der Zusammenhang zwischen Glucosemetabolismus, O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung gefunden werden. Ist der Glucosefluss im Neuron gestört, wird Tau weniger O-GlcNAcyliert und kann dadurch hyperphosphoryliert werden, was zur Bildung von PHFs führt (Liu et al., 2009a; Liu et al., 2009b).

1.7 Zielsetzung

UDP-GlcNAc ist ein essentieller Metabolit im Stoffwechsel einer Zelle. Die Synthese dieses aktivierten Zuckers findet im Hexosamin-Biosyntheseweg statt. Allerdings tragen noch weitere Stoffwechselwege zur Synthese von UDP-GlcNAc bei. Die Glucose aus der Glycolyse bildet die Grundeinheit, die Aminogruppe stammt von Glutamin und die

Acetylgruppe von Acetyl-CoA, welches in einer Reaktion, die die Glycolyse mit dem Citratzyklus verbindet, gebildet wird. Das UTP, welches die UDP-Einheit des UDP-GlcNAc bildet, wird während des Nucleotid-Metabolismus und dem Pentose-Phosphatweg gebildet. Daher kann der Hexosamin-Biosyntheseweg als Nährstoffsensor der Zelle angesehen werden. Ob aber in einem einzigen Molekül, nämlich UDP-GlcNAc, Änderungen im Fluss durch die verschiedenen Stoffwechselwege abgelesen werden können, sollte im ersten Teil dieser Arbeit geklärt werden. Dafür wurde zunächst der Metabolismus von HT-22 Zellen mit Hilfe der NMR-Spektroskopie charakterisiert und dargestellt. Darüber hinaus sollte der Metabolit UDP-GlcNAc in Zellextrakten detektiert und durch die Verwendung von ^{13}C -markierter Glucose als einziger Nährstoff der Zellen ^{13}C -markiert werden. Anschließend sollte der Metabolismus der Zellen durch die Gabe von Natriumazid gestört werden, um die Auswirkungen auf die zuvor identifizierten Metabolite semi-quantitativ zu beurteilen. Schließlich sollte geklärt werden, ob die Änderungen im Metabolismus Einfluss auf das Markierungsmuster des UDP-GlcNAc haben. Dann wäre UDP-GlcNAc als metabolischer Marker geeignet und man könnte den metabolischen Status der Zellen anhand dieses einen Moleküls charakterisieren.

UDP-GlcNAc hat aber nicht nur in seiner Biosynthese eine gesonderte Stellung. Es ist auch Donorsubstrat für fast alle vorkommenden Glycane. Speziell für die O-GlcNAcylierung, bei der ein einzelner GlcNAc-Rest an die Hydroxylgruppe eines Serin oder Threonin geknüpft wird, ist UDP-GlcNAc das einzige Substrat. Allerdings sind die Nachweismöglichkeiten dieser posttranslationalen Modifikation beschränkt. Bisher wurden Antikörper zum Nachweis verwendet, mit denen aber nicht die Position der O-GlcNAcylierung im Protein bestimmt werden kann. Außerdem ist der Nachweis chemisch möglich und über massenspektrometrische Methoden kann die Position der O-GlcNAcylierung gefunden werden. Allerdings bleibt bei den letzteren Methoden das Protein nicht intakt. Wenn es möglich wäre eine O-GlcNAcylierung NMR-spektroskopisch nachzuweisen, dann könnten alle vorhandenen O-GlcNAcylierungsstellen gleichzeitig im intakten Protein bestimmt werden. Daher sollte im zweiten Teil dieser Arbeit die O-GlcNAcylierung zunächst von Tau, dann von einem Peptidderivat NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Dafür sollte das Protein bzw. Peptid in zellulärem Extrakt von HT-22 oder HEK 293 Zellen O-GlcNAcyliert werden, und diese O-GlcNAcylierung sollte anschließend sowohl protein-biochemisch als auch NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 HT-22 Zelllinie: Kulturbedingungen, Subkultivierung, Kryokonservierung und Revitalisierung

Die HT-22 Zellen (Maher and Davis, 1996), eine neuronale murine Zelllinie, wurden von PD Dr. rer. nat. Olaf Jöhren, Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universität Lübeck, zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in 15 mL DMEM *high glucose* (4,5 g/L Glucose, 4 mM L-Glutamin) Medium, welches mit 10 % FCS und 1 mM Natriumpyruvat versetzt wurde, in 250 mL Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² kultiviert. Subkulturen wurden jeweils in einem 3 bzw. 4 Tage Rhythmus angelegt. Dabei wurden die Zellen vom Flaschenboden abgeklopft, resuspendiert und in einer 1:15 Verdünnung wieder ausgesät.

Für eine Kryokonservierung wurden konfluent gewachsene Zellen verwendet. Die durch Klopfen vom Flaschenboden gelösten Zellen wurden für 4 min bei 200·g pelletiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 3 mL Einfriermedium (40 % Wachstumsmedium, 50 % FCS, 10 % DMSO, steril filtriert) aufgenommen, je 1 mL der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt und für 24 h bei -80 °C eingefroren. Danach wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Die Revitalisierung der HT-22 Zellen erfolgte, indem die leicht angetaute Zellsuspension in 14 mL kaltes Wachstumsmedium überführt und die Zellen bei 200·g für 4 min pelletiert wurden. Anschließend wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet in 15 mL Wachstumsmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt.

2.1.2 HEK 293 Zelllinie: Kulturbedingungen, Subkultivierung, Kryokonservierung und Revitalisierung

Die HEK293 Zellen wurden vom Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität Lübeck zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in 15 mL DMEM *high glucose* (4,5 g/L Glucose, 4 mM L-Glutamin) Medium, welches mit 10 % FCS und 1 mM Natriumpyruvat versetzt

wurde, in 250 mL Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² kultiviert. Subkulturen wurden jeweils alle 3-4 Tage angelegt. Dafür wurde der konfluente Zellrasen zweimal mit je 7,5 mL PBS gewaschen, 1 mL Trypsin/EDTA zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in 13 mL Wachstumsmedium resuspendiert und bei 200·g für 4 min pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 5 mL Wachstumsmedium resuspendiert. Zur Subkultivierung wurden 0,8 mL dieser Zellsuspension mit 14,2 mL Wachstumsmedium in eine Kulturflasche gegeben.

Für eine Kryokonservierung wurden konfluent gewachsene Zellen verwendet und wie für eine Subkultur trypsiniert. Das Zellpellet wurde in 3 mL Einfriermedium (40 % Wachstumsmedium, 50 % FCS, 10 % DMSO, steril filtriert) aufgenommen, je 1 mL dieser Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt und für 24 h bei -80 °C eingefroren. Danach wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Die Revitalisierung der HEK 293 Zellen erfolgte, indem die leicht angetaute Zellsuspension in 14 mL kaltes Wachstumsmedium überführt und die Zellen bei 200·g für 4 min pelletiert wurden. Anschließend wurde der Überstand dekantiert, das Zellpellet in 15 mL Wachstumsmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt.

2.1.3 Mycoplasmenkontrolle

Beide Zelllinien wurden regelmäßig auf den Befall mit Mycoplasmen getestet. Für den Test wurde das Venor[®] GeM Mycoplasma Detection Kit mit MB Taq-Polymerase mit 5 U/μL von Minerva Biolabs verwendet. Dabei konnte zu keinem Zeitpunkt eine Kontamination festgestellt werden.

2.2 UDP-GlcNAc als metabolischer Marker

Für die Experimente, mit denen UDP-GlcNAc als metabolischer Marker etabliert wurde, wurden sowohl HT-22 als auch HEK 293 Zellen verwendet. Die jeweilige Vorgehensweise wird als Inkubationsversuch bezeichnet.

2.2.1 Inkubationsversuche

2.2.1.1 Beschichtung von Petrischalen mit Poly-L-Ornithin für HT-22 Zellen

Um die Adhärenz der HT-22 Zellen an ihre Wachstumsfläche zu erhöhen, wurden die für die Inkubationsversuche verwendeten Petrischalen (10 cm Durchmesser) vor Versuchsbeginn mit Poly-L-Ornithin beschichtet. Dafür wurden jeweils 4,5 mL einer 0,015 g/L Poly-L-Ornithin-Lösung in eine Petrischale gegeben und die Schale über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Poly-L-Ornithin-Lösung abgenommen und die Schale mit 7,5 mL PBS gespült.

2.2.1.2 Aussaat von HT-22 und HEK 293 Zellen, Inkubation und Gewinnung von Mediumproben

Die Inkubationsversuche wurden nach Bouzier-Sore mit kleinen Änderungen durchgeführt (Bouzier-Sore et al., 2003; Bouzier-Sore et al., 2006). Pro Petrischale (10 cm Durchmesser) wurden 48 h vor Inkubationsbeginn $1 \cdot 10^6$ HT-22 Zellen bzw. $2 \cdot 10^6$ HEK 293 Zellen ausgesät. Um die Inkubation zu starten, wurde das Wachstumsmedium abgenommen, der Zellrasen zweimal mit je 7,5 mL PBS gespült und 10 mL Inkubationsmedium zugegeben. Dieses bestand aus DMEM *without glucose* mit 4 mM L-Glutamin, dem entweder 11 mM unmarkierte Glucose oder $1\text{-}^{13}\text{C}$ -D-Glucose sowie Natriumazid oder Rotenon in ihrer maximal verträglichen InhibitorKonzentration zugesetzt wurde. Anschließen wurden die Zellen über einen Zeitraum von 4 h, 8 h, 16 h oder 24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Während des Inkubationszeitraums wurden Mediumproben von je 100 µL zu verschiedenen Zeitpunkten genommen, um die Glucose- und Laktatkonzentration im Medium zu beobachten.

2.2.1.3 Metaboliten-Extraktion mittels Perchlorsäure

Zum Beenden der Inkubation der HT-22 Zellen wurde das Inkubationsmedium abgenommen, die Zellen zweimal zügig mit je 7,5 mL PBS gewaschen und ihre Metabolite durch Zugabe von 3 mL 0,9 M Perchlorsäure extrahiert. Nach Zugabe der Perchlorsäure wurden die Zellen mit dem Zellschaber gelöst und die Suspension bei 2000·g, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Proteinpellet wurde bis zur Bestimmung der Proteinkonzentration bei -20 °C gelagert.

Der Überstand wurde abgenommen, mit 2,7 M KOH neutralisiert und die entstandenen Perchlorat Salze wurden bei 2000·g für 5 min abzentrifugiert. Der erhaltene Zellextrakt wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.1.4 Proteinbestimmung

Um den Proteingehalt der erhaltenen Proteinpellets zu bestimmen, wurden diese in 0,2 M TRIS-base-2 % SDS resuspendiert und ein BCA-Assay mit BSA als Standard durchgeführt (Smith et al., 1985).

2.2.1.5 Methanol/Chloroform-Extraktion von Metaboliten

Die Methanol/Chloroform-Extraktion wurde mit leichten Änderungen nach Teng (Teng et al., 2009) durchgeführt. Da bei dieser Art der Extraktion nicht auf den Proteingehalt normiert werden kann, musste vor der Extraktion die Zellzahl bestimmt werden. Dafür wurden die HT-22 Zellen mit dem Zellschaber vom Boden gelöst und im Inkubationsmedium resuspendiert. Die HEK 293 Zellen werden wie unter Kapitel 2.1.2 angegeben trypsinisiert und das erhaltene Pellet in 10 mL Wachstumsmedium aufgenommen. Von der jeweiligen Zellsuspension wurde eine Vitalfärbung mit Trypan Blau durchgeführt und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Anzahl der lebenden Zellen in Doppelbestimmung gezählt.

Alle weiteren Arbeiten fanden auf Eis mit gekühlten Lösungen statt. Die Zellen wurden für 4 min bei 200·g und 4° C abzentrifugiert und das Medium dekantiert. Das Zellpellet wurde in 10 mL PBS resuspendiert und die Zellen bei gleichen Zentrifugationsbedingungen pelletiert. Dann wurde die Zellsuspension in 10 ml Reagenzgläser überführt und erneut mit PBS gewaschen. Das PBS wurde dekantiert und zum Pellet wurden 4 mL MeOH (HPLC grade) und 0,85 mL MP-H₂O gegeben und anschließend für 1 min gemischt. Nach der Zugabe von 2 mL CHCl₃ wurden die Proben für 1 min gemischt, für 10 min auf Eis stehen gelassen und für 10 min bei 300 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 2 mL MP-H₂O und 2 mL CHCl₃ zugegeben, für 1 min gemischt und durch eine Zentrifugation bei 1000·g für 15 min bei 4 °C wurde eine Phasenseparation vorgenommen. Die obere polare Phase bestehend aus MeOH, H₂O und den extrahierten, wasserlöslichen Metaboliten wurde abgenommen und das MeOH am Rotationsverdampfer unter Wasserstrahlvakuum abgezogen. Der erhaltene Zellextrakt wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.1.6 Statistische Analyse

Die Darstellung der Daten erfolgte mit Mittelwert und Standardabweichung. Die statistische Analyse wurde mit GraphPad Prism 4 durchgeführt. Für den Vergleich von Datensätzen wurde der zweiseitige Mann-Whitney-U-Test verwendet. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant gewertet und sind mit * gekennzeichnet.

2.2.2 Bestimmung der maximal verträglichen InhibitorKonzentration

Um die für die jeweilige Zelllinie maximale InhibitorKonzentration zu bestimmen, wurden die Zellen, wie unter Kapitel 2.2.1 beschrieben, ausgesät. Nach 48 h Wachstum wurde das verbrauchte Wachstumsmedium abgenommen, der Zellrasen zweimal mit je 7,5 mL PBS gespült und 10 mL Inkubationsmedium, bestehend aus DMEM *without glucose* mit 4 mM L-Glutamin und 11 mM unmarkierter Glucose sowie verschiedene Konzentrationen Natriumazid oder Rotenon, zugegeben und über einen bestimmten Zeitraum inkubiert. Während der Inkubation wurde die Morphologie der Zellen lichtmikroskopisch beobachtet. Zum Beenden der Inkubation wurden die Zellen mit dem Zellschaben gelöst und im Inkubationsmedium resuspendiert. Mit Hilfe einer Vitalfärbung mit Trypan Blau wurden die lebenden und toten Zellen in Doppelbestimmung gezählt. Als maximal verträgliche InhibitorKonzentration wurde die Konzentration gewählt, bei der sich die Zahl der toten Zellen nicht von der Anzahl toter Zellen der Kontrolle unterschied.

2.2.3 NMR-Messungen

Alle NMR-Messungen von Zellextrakten aus Perchlorsäure-Extraktionen und deren zugehörigen Mediumproben wurden mit einem Bruker Avance DRX 500 NMR-Spektrometer mit 5 mm TCI-Kryoprobenkopf mit z-Gradient durchgeführt. Alle Zellextrakte aus MeOH/CHCl₃-Extraktion wurden an einem Bruker AVIII 500 NMR-Spektrometer mit 5mm TCI-Kryoprobenkopf mit z-Gradient durchgeführt. Alle Spektren wurden bei 298 K und mit Deuterium lock aufgenommen.

2.2.3.1 Mediumproben

Zur Bestimmung der Glucose- und Laktatkonzentration im Inkubationsmedium wurden 50 µL der abgenommenen Mediumproben lyophilisiert, in 550 µL D₂O mit 1 mM TSP resuspendiert und in ein 5 mm-NMR-Röhrchen überführt.

Für jedes Protonen-NMR-Spektrum wurden 32 Durchgänge mit jeweils 32768 Datenpunkten, einer Akquisitionszeit von 2,72 Sekunden und 4 *dummy scans* aufgenommen. Um vollständig relaxierte Spektren zu gewährleisten, wurden eine Relaxationszeit von 20 Sekunden und ein p1 von 4 μ s gewählt. Die spektrale Weite wurde auf 12 ppm festgelegt. Für die Bestimmung der Glucose- und Laktatkonzentrationen wurden die anomeren Protonen der Glucose bei 5,4 ppm bzw. 4,5 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und die Methylprotonen des Laktats bei 1,33 ppm bzw. 1,4 ppm integriert.

2.2.3.2 Zellextrakte

Für die Probenvorbereitung zur Aufnahme verschiedener NMR Spektren wurde der erhaltene Zellextrakt lyophilisiert. Anschließend wurde das Lyophilisat der Perchlorsäure-Extrakte in 200 μ l D_2O mit 1 mM TSP aufgenommen. Die präzipitierten Perchlorat Salze wurden bei 16100 g für 5 min abzentrifugiert und der Überstand in ein 3 mm-NMR-Röhrchen überführt. Das Lyophilisat der $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ -Extrakte wurde in 100 mM deuteriertem Natriumphosphatpuffer (pH 7 in H_2O) mit 1 mM TSP aufgenommen.

Für jedes Protonen-NMR-Spektrum wurden 4096 Durchgänge mit jeweils 32768 Datenpunkten, einer Akquisitionszeit von 2,72 Sekunden und 4 *dummy scans* aufgenommen. Bei Zellextrakten aus Perchlorsäure-Extraktionen wurde der p1 manuell bestimmt, bei Zellextrakten aus $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ -Extraktionen konnte der p1 automatisch bestimmt werden. Die spektrale Weite wurde auf 12 ppm festgelegt.

Für jedes $1\text{D-}^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrum wurden 5120 Durchgänge mit jeweils 16384 Datenpunkten, 16 *dummy scans*, einer Relaxationszeit von 0,1 s und einer Akquisitionszeit von 0,14 s aufgenommen. Die spektrale Weite wurde auf 12 ppm festgelegt. Der O2P wurde für die Detektion der *N*-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc auf 25 ppm und zur Detektion des C1 Protons auf 97,62 ppm festgelegt.

Für jedes $2\text{D-}^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrum wurden 128 Durchgänge pro Inkrement mit einer Datenmatrix von 2048 x 256 Datenpunkten, einer Relaxationszeit von 1,5 s, einer Akquisitionszeit von 0,14 s und 16 *dummy scans* aufgenommen. Die spektrale Weite in der Protonen Dimension wurde auf 12 ppm und 200 ppm in der ^{13}C -Dimension festgelegt.

2.3 Untersuchung des O-GlcNAcylierungsmusters von Tau-Protein

Die Zusammensetzung aller verwendeten Puffer und Lösungen sind unter Kapitel 2.6.1 angegeben. Das Konstrukt Tau-K32-*wt* ist ein Teil des Tau Proteins, umfasst die Aminosäuren von Ser 198 bis Ser 400 (Trinczek et al., 1995), ist 21,5 kDa groß und wurde von Prof. Dr. Eckhard Mandelkow der Max-Planck-Arbeitsgruppe für strukturelle Molekularbiologie, Hamburg, zur Verfügung gestellt.

2.3.1 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot von Tau-K32-*wt*

Die SDS-Gelelektrophorese wurde nach Laemmli (Laemmli, 1970) mit 10%igen bzw. 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gelen durchgeführt. Wenn kein anschließender Western Blot durchgeführt wurde, wurde das Gel dreimal für 10 min in MP-H₂O gewaschen, über Nacht mit Roti-Blue Coomassie gefärbt und anschließend mit MP-H₂O entfärbt.

Für den Western Blot wurde mit 1-fach Blot-Puffer für 60 min bei 180 mA und max. 15 V auf 0,2 µm Nitrocellulose-Membranen geblottet. Anschließend wurde die Membran in TBS-T gewaschen, mit Ponceau-S gefärbt, der Hintergrund mit MP-H₂O entfärbt, die Banden dokumentiert und der Blot durch zweimaliges 10 min waschen in TBS-T entfärbt. Die noch freien Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation mit primärem anti-Tau Antikörper K9JA (polyklonal-Hase-anti-Mensch) wurde mit einer Verdünnung von 1:20000 in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dreimaligem 15-minütigem Waschen mit TBS-T wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit sekundärem Ziege-anti-Hase-HRP-gekoppeltem Antikörper in einer Verdünnung von 1:5000 in TBS-T inkubiert. Die colorimetrische Detektion mittels des Opti-4CN-Detection-Kit von Biorad fand nach Herstellerangaben statt.

2.3.2 Western Blot anti O-GlcNAc mit WGA Lektin

Der Nachweis der O-GlcNAcylierung wurde mit HRP-konjugiertem Lektin WGA durchgeführt. Tau-K32-*wt*, funktionaler Zellextrakt sowie die Kontrollproteine BSA (Negativkontrolle) und OVA (Positivkontrolle) wurden über 12%ige SDS-Polyacrylamid-Gele aufgetrennt und mit 1-fach Blot-Puffer für 60 min bei 180 mA und max. 15 V auf 0,2 µm Nitrocellulose-Membranen geblottet (Towbin et al., 1979). Anschließend wurde die Membran in PBS-T gewaschen, mit Ponceau-S gefärbt, der Hintergrund mit MP-H₂O

entfärbt, die Banden dokumentiert und der Blot durch zweimal 10 min waschen in PBS-T entfärbt. Die noch freien Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 2 % Tween 20 in PBS für 2 min bei Raumtemperatur blockiert. Die Bindung des Lektins WGA an die vorhandenen GlcNAc-Reste wurde in einer zuvor bestimmten Verdünnung von 1:20000 in PBS-T mit 1 mM CaCl_2 , 1 mM MnCl_2 und 1 mM MgCl_2 für 16 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach dem anschließenden Waschen in PBS-T und PBS wurde die colorimetrische Detektion mittels des Opti-4CN-Detection-Kit von Biorad nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.3 Western Blot anti O-GlcNAc mit monoklonalen Antikörpern

Um eine O-GlcNAcylierung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern nachzuweisen, wurden die in der Gruppe von Dr. Geert-Jan Boons, Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia, (Teo et al., 2010) entwickelten, in Tabelle 1 aufgeführten, monoklonalen Antikörper verwendet. Nach dem Blotting von funktionalem Zellextrakt und BSA (Negativkontrolle) wurde die Membran in TBS-T gewaschen, mit Ponceau S gefärbt, die Banden dokumentiert und durch zweimaliges Waschen in TBS-T wieder entfärbt. Die anschließende Blockierung der freien Bindungsstellen wurde mit 3 % BSA in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Durch vorangegangene Experimente konnte die benötigte mAb Verdünnung mit 1:750 in TBS-T festgelegt werden. Die Inkubation erfolgte entweder 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Mit dem sekundären Ziege-anti-Maus-HRP-gekoppelten Antikörper wurde für 1 h bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:2500 in TBS-T inkubiert.

Tabelle 1: Verwendete monoklonale Antikörper der Arbeitsgruppe von Dr. Geert-Jan Boons, Complex Carbohydrate Research Center, University of Georgia

<i>Antikörper Bezeichnung (Abkürzung)</i>	<i>vollständige Antikörper Bezeichnung</i>	<i>Anti- körper Typ</i>	<i>Konzen- tration [mg/mL]</i>	<i>Spezifität</i>
mAb #3	18B10.C7(3)	IgG1	0,86	P V S (β -O-GlcNAc) S A
mAb #10	9D1.E4(10)	IgG1	0,59	G S T P V S (β -O-GlcNAc) S A N M
mAb #14	1F5.D6(14)	IgG2a	0,97	V S (β -O-GlcNAc) S

Die Detektion erfolgte entweder colorimetrisch mittels des Opti-4CN-Detection-Kit von Biorad nach Herstellerangaben oder mit Hilfe von Chemolumineszenz. Dabei wurde entweder das Immobilon-Western-Chemiluminescent-HRP-Substrate von Millipore oder SuperSignal-West-Femto-Chemiluminescent-Substrate von Thermo Scientific verwendet und die Detektion am Lumineszenz-Reader am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Lübeck durchgeführt.

2.3.4 Western Blot zum Nachweis von O-GlcNAc-Transferase

Für den Nachweis von OGT in den Zellextrakten von HT-22 und HEK 293 Zellen wurde der Antikörper DM-17 von Sigma verwendet. Die Zellextrakte wurden über 10%ige oder 12%ige SDS-Polyacrylamid-Gele aufgetrennt und die Proteine mit 1-fach Blot-Puffer für 60 min bei 180 mA und max. 15 V auf 0,2 µm Nitrocellulose-Membranen geblottet. Anschließend wurde die Membran in TBS-T gewaschen, die Banden mit Ponceau-S gefärbt, dokumentiert und durch zweimaliges waschen mit TBS-T wieder entfärbt. Die Blockierung der freien Bindungsstellen wurde mit 5 % Milchpulver in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Verdünnung des DM-17 Antikörpers wurde in Vorversuchen ermittelt und betrug 1:1200 in TBS-T. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Mit dem sekundären Ziege-anti-Hase-HRP-gekoppelten Antikörper wurde für 1 h bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:5000 in TBS-T inkubiert. Die colorimetrische Detektion mittels des Opti-4CN-Detection-Kit von Biorad wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.5 O-GlcNAcylierungsversuche mit Tau-K32-wt

2.3.5.1 Herstellung von funktionalen Zellextrakten

Der hier beschriebene generelle Ablauf für die Herstellung von funktionalen Zellextrakten wurde für alle Zellextrakte verwendet, in denen die Proteine stabil erhalten bleiben sollten. Im Ergebnisteil wird jeweils angegeben, ob das generelle Verfahren geändert wurde.

Zunächst wurden die Zellen vom Flaschenboden der Zellkultur-Flasche gelöst, HT-22 Zellen durch Klopfen, HEK 293 Zellen durch Trypsinieren. Anschließend wurde eine Zellzahlbestimmung durch Vitalfärbung mit Trypan Blau und Auszählung in einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und das erhaltene Zellpellet wurde in 1 mL PBS, welches verschiedene Konzentrationen von Protease Inhibitor und PUGNAC enthielt resuspendiert. Die Zellen wurden auf Eis mittels

Ultraschall aufgeschlossen. Die Zellbestandteile und die Zellmembranen wurden durch Zentrifugation bei 16100·g für 30 min bei 4 °C voneinander separiert. Der Überstand, jetzt als funktionaler Zellextrakt bezeichnet, wurde abgenommen und für den jeweiligen Versuch verwendet. Die funktionalen Zellextrakte wurden für jeden Versuch frisch hergestellt.

2.3.5.2 O-GlcNAcylierung und Detektion mit Western Blot und NMR

Für die Detektion der O-GlcNAcylierung mit Western Blot wurde aus sechs konfluent gewachsenen T75 Kulturflaschen der funktionale Zellextrakt von HT-22 Zellen gewonnen, die für 18 h mit 20 µM PUGNAc im Wachstumsmedium inkubiert wurden. Die Gewinnung des Extrakts wurde in PBS mit 1x Protease-Inhibitor und 20 µM PUGNAc durchgeführt.

Anschließend wurden zwei, in Tabelle 2 aufgeführte, Inkubationsansätze mit Tau-K32-wt durchgeführt, um dieses enzymatisch zu O-GlcNAcylieren.

Die Reaktionen wurden jeweils nach 10 min und 1 h gestoppt, indem 20 µL des Reaktionsgemisches abgenommen, mit 20 µL 2x reduzierendem Probenpuffer vermischt und bei 95 °C für 5 min aufgekocht wurden. Anschließend wurden zwei 12%ige SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet um die Proteine aufzutrennen. Ein Gel wurde für den Nachweis von Tau-K32-wt, das andere für den Nachweis der O-GlcNAcylierung mit WGA Lektin verwendet. Die Durchführung der Western Blots ist unter Kapitel 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben.

Tabelle 2: O-GlcNAcylierungsansätze von Tau-K32-wt in HT-22 Extrakt

<i>Ansatz 1</i>	<i>Ansatz 2</i>
200 µL HT-22 Extrakt	200 µL HT-22 Extrakt
7,6 µL Tau-K32-wt [5,5 mg/mL] f.c. 0,2 mg/mL	3,8 µL Tau-K32-wt [5,5 mg/mL] f.c. 0,1 mg/mL
0,2 µL UDP-GlcNAc [1 M] f.c. 1 mM	0,2 µL UDP-GlcNAc [1 M] f.c. 1 mM

Für die Detektion der O-GlcNAcylierung im NMR-Spektrum wurde aus zwei konfluent gewachsenen T75 Kulturflaschen funktionaler Zellextrakt von HT-22 Zellen gewonnen. Die Gewinnung des Extrakts wurde in PBS mit 1x Protease-Inhibitor und 20 µM PUGNAc durchgeführt. Anschließend wurde vollständig ¹⁵N-markiertes Tau-K32-wt, wie in Tabelle 3

beschrieben, mit den Reaktionspartnern vermischt, in ein 3 mm-NMR-Röhrchen überführt und NMR-Messungen durchgeführt.

Um die O-GlcNAcylierung zeitlich verfolgen zu können, wurden im Wechsel jeweils ein ^1H -NMR-Spektrum mit WATERGATE Wasserunterdrückung und ein $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektrum bei 293 K und Deuterium lock aufgenommen. Der p1 wurde manuell bestimmt. Dabei wurden für das ^1H -NMR-Spektrum 8 Durchgänge mit jeweils 32768 Datenpunkten und 4 *dummy scans* bei einer Akquisitionszeit von 2,18 Sekunden aufgenommen. Für das $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC NMR-Spektrum wurden 16 Durchgänge pro Inkrement mit einer Datenmatrix von 2048 x 256 Datenpunkten, einer Relaxationszeit von 1,5 s, einer Akquisitionszeit von 0,137 s und 16 *dummy scans* aufgenommen. Die spektrale Weite in der Protonen-Dimension wurde auf 15 ppm und 40 ppm in der ^{15}N -Dimension festgelegt.

Tabelle 3: O-GlcNAcylierungsansatz und Kontrollversuch von ^{15}N -markiertem Tau-K32-wt in HT-22 Extrakt

O-GlcNAcylierungsansatz	Kontrolle
100 μL HT-22 Extrakt	100 μL HT-22 Extrakt
100 μL ^{15}N Tau-K32-wt [10,4 mg/mL] f.c. 0,2 mg/mL	100 μL PBS
2,25 μL UDP-GlcNAc [20 mM] f.c. 20 μM	2,25 μL UDP-GlcNAc [20 mM] f.c. 20 μM
20,25 μL D ₂ O	20,25 μL D ₂ O
2,22 μL TSP in D ₂ O [100 mM] f.c. 0,99 mM	2,22 μL TSP in D ₂ O [100 mM] f.c. 0,99 mM

2.3.6 De-GlcNAcylierung von Tau-K32-wt mit β -1-2,3,4,6-N-Acetylglucosaminidase

Um im Vorhinein auszuschließen, dass das in *E. coli* exprimierte Protein Tau-K32-wt glycosyliert ist, wurde eine enzymatische De-GlcNAcylierung mit einer β -1-2,3,4,6-N-Acetylglucosaminidase durchgeführt. Dafür wurden 9,5 μg Tau-K32-wt in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 5 mit 240 mU β -1-2,3,4,6-N-Acetylglucosaminidase vermischt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Von dieser Lösung wurden zu den Zeitpunkten 10 min, 30 min, 1 h, 4 h, 8 h und 24 h Proben abgenommen, die im Verhältnis 1:2 mit 2x reduzierendem

Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht wurden. Als Kontrollen wurden Proben von Tau-K32-wt in PBS und Tau-K32-wt in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 5 im Verhältnis 1:2 mit 2x reduzierendem Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend wurden alle Proben auf zwei 15%ige SDS-Polyacrylamid-Gele aufgetragen, getrennt und geblottet. Der Nachweis von Tau-K32-wt und der O-GlcNAcylierung erfolgte wie unter Kapitel 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben.

In einem parallelen Ansatz wurde Tau-K32-wt nach der Methode von Zachara (Zachara, 2009) de-GlcNAcyliert. Dabei wurden leichte Änderungen bei der Zusammensetzung des Reaktionspuffers vorgenommen. 11 µg Tau-K32-wt in PBS wurden in Verhältnis 1:2 mit 2 % SDS vermischt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Dieser Reaktionsansatz wurde 1:2 mit 80 mM Natrium-Citrat-Puffer, pH 4 mit 8 % Triton X-100, 1 µg/mL Trypsin-Inhibitor, 0,01 U/mL Aprotinin und 1x Protease Inhibitor Cocktail vermischt und ihm wurden 0,1 U β -1-2,3,4,6-N-Acetylglucosaminidase zugesetzt. Dieser Ansatz wurde über 24 h bei 37 °C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 4 h, 7 h und 24 h wurden Proben abgenommen, die im Verhältnis 1:2 mit 2x reduzierendem Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht wurden. Anschließend wurden alle Proben auf drei 12%ige SDS-Polyacrylamid-Gele aufgetragen, getrennt und geblottet. Der Nachweis von Tau-K32-wt und der O-GlcNAcylierung erfolgte wie unter Kapitel 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben.

2.3.7 β -Eliminierung von Tau-K32-wt

Um eventuell vorhandene Zuckerketten an Tau-K32-wt abzuspalten wurde eine β -Eliminierung nach Fukuda (Fukuda, 2001) durchgeführt. Dafür wurden 110 µg Tau-K32-wt in DMSO, KOH und Ethanol gelöst, sodass sich eine finale KOH Konzentration von 0,17 M und ein Verhältnis DMSO:H₂O:Ethanol von 50:40:10 ergaben. Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 45 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend mit 0,4 M HCl neutralisiert. Die Probe wurde anschließend in der Vakuumzentrifuge bei 35 °C konzentriert und bei -20 °C gelagert. Der Nachweis einer β -Eliminierung wurde mit Western Blots erbracht. Dafür wurde der Ansatz der β -Eliminierung in 2 unterschiedlichen Konzentrationen im Verhältnis 1:2 mit 2x reduzierendem Probenpuffer gemischt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Anschließend wurden alle Proben (Ansatz β -Eliminierung, OVA (Negativkontrolle), funktionaler Zellextrakt (Positivkontrolle) und unbehandeltes Tau-K32-wt) auf zwei 12%ige SDS-Polyacrylamid-Gele aufgetragen, getrennt und geblottet.

Der Nachweis von Tau-K32-wt und seiner möglichen O-GlcNAcylierung erfolgte wie unter Kapitel 2.3.1 und 2.3.3 angegeben.

2.4 Synthese der CKII-Peptidderivate

Die Festphasenpeptidsynthesen nach Merrifield (Merrifield, 1963), sowie die Reinigung und die Charakterisierung der Peptide mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurden am Institut für Organische Chemie, Fachbereich Chemie der Universität Hamburg durchgeführt. Die beiden synthetisierten Peptide sind Derivate der α -Untereinheit des Casein Kinase II Peptids, welches als Kontrollpeptid bei *in vitro* O-GlcNAcylierungen verwendet wird (Kreppel and Hart, 1999). In Tabelle 4 sind die beiden Peptide, welche synthetisiert wurden, aufgeführt.

Tabelle 4: Bezeichnung und Sequenz der synthetisierten Peptide

Bezeichnung	Sequenz
Biotin-Peptid	Biotin-PEG- P G G S T P V S S A N M M
¹⁵ N-Peptid	P G G S T P V S(¹⁵ N) S A N M M

2.4.1 Festphasenpeptidsynthese

Die automatisierte Festphasenpeptidsynthese wurde mit Hilfe des Syntheseroboters Liberty durchgeführt. Das benötigte Rink-Amid-AM-Harz mit einer Belegung von 0,92 mmol/g wurde über Nacht in DMF quellen lassen. Die verwendeten Aminosäurederivate sowie das Biotinderivat wurden in 0,2 M Lösungen in DMF, der Aktivator TBTU in einer 0,5 M Lösung in DMF und die Aktivatorbase DIPEA in einer 2 M Lösung in DMF verwendet. Das für die Acetylierung der freien Aminogruppen verwendete Essigsäureanhydrid wurde in einer 10%igen Lösung in DMF eingesetzt. Die Abspaltung der Fmoc-Gruppen fand mit einer 20%igen Piperidinlösung in DMF statt. Die Aminosäurederivate und das Biotinderivat wurden bei 75 °C und 25 Watt für 300 s gekuppelt. Alle Kupplungen wurden doppelt durchgeführt. Anschließend wurden die Peptide manuell vom Harz abgespalten.

2.4.2 Abspaltung der Peptide vom Harz

Das Harz wurde in eine Glasfritte überführt und das DMF wurde entfernt. Anschließend wurde eine frisch angesetzte Abspatlösung aus TFA/TIPS/H₂O im Verhältnis 95:5:2 zum

Harz gegeben und 90 min geschüttelt. Die Lösung wurde in einen Kolben überführt, der Abspaltvorgang wiederholt und die Lösung in denselben Kolben überführt. Das in der Lösung vorhandene TFA wurde am Ölpumpenvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in H₂O aufgenommen, im Ultraschallbad homogenisiert, bei -80 °C eingefroren und anschließend lyophilisiert. Das Lyophilisat bildet das Rohprodukt, welches zur Vorreinigung einer Etherextraktion (Kapitel 2.4.3) unterzogen wurde.

2.4.3 Etherextraktion

Das Rohprodukt wurde in Diethylether homogenisiert und die Suspension für 4 min bei 4000·g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das erhaltene Pellet in H₂O gelöst und anschließend lyophilisiert. Das erhaltene Lyophilisat wurde für die Reinigung per *RP*-HPLC (Kapitel 2.4.4) verwendet.

2.4.4 Reinigung der Peptide mit *RP*-HPLC

Die Reinigung beider Peptide erfolgte mittels *RP*-HPLC mit einer präparativen C18 Säule und einer Flussgeschwindigkeit von 22 mL/min. Das Rohprodukt wurde mit einer Endkonzentration von 36-39 mg/mL in Laufmittel A (95 % H₂O / 5 % MeCN / 0,1 % TFA) gelöst und durch einen Spin Tube zentrifugiert. Für die Gradientenläufe wurden die Laufmittel A und B (95 % MeCN / 5 % H₂O / 0,1 % TFA) verwendet. Die erste Reinigung erfolgte bei beiden Peptiden nach Methode 1.

Methode 1:	30 min	100 % A / 0 % B nach 50 % A / 50 % B
	34 min	50 % A / 50 % B nach 0 % A / 100 % B
	36 min	0 % A / 100 % B
	40 min	0 % A / 100 % B nach 100 % A / 0 % B

Zur weiteren Reinigung wurde das Biotin-Peptid nach Methode 2 und das ¹⁵N-Peptid nach Methode 3 gereinigt.

Methode 2:	40 min	100 % A / 0 % B nach 70 % A / 30 % B
	44 min	70 % A / 30 % B nach 0 % A / 100 % B
	46 min	0 % A / 100 % B
	50 min	0 % A / 100 % B nach 100 % A / 0 % B

Methode 3:	40 min	100 % A / 0 % B nach 75 % A / 25 % B
	44 min	75 % A / 25 % B nach 0 % A / 100 % B
	46 min	0 % A / 100 % B
	50 min	0 % A / 100 % B nach 100 % A / 0 % B

Nach der HPLC-Reinigung wurden die einzelnen Fraktionen gesammelt und mit MALDI-TOF-MS identifiziert.

2.4.5 Charakterisierung der Peptide mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Für die Charakterisierung der Peptidmasse wurde MALDI-TOF-Massenspektrometrie angewendet. Dabei wurde für das Biotin-Peptid eine CCA-Matrix (α -Cyano-4-hydroxymizimsäure) und für das ^{15}N -Peptid eine FA-Matrix (Ferulasäure) verwendet. Zunächst wurden 0,5 μL der jeweiligen Matrix auf den Probenhalter gegeben. Nach der Trocknung der Matrix wurden 0,5 μL der jeweiligen zu analysierenden Fraktion aus der HPLC-Reinigung aufgetropft. Die Messungen erfolgten im positiven Ionenmodus bei einer Attenuation zwischen 35 und 50 dB mit 45 Laserpulsen.

2.4.6 Charakterisierung der Peptide mittels NMR-Spektroskopie

Die NMR-spektroskopische Charakterisierung wurde an einem Bruker AVIII 500 NMR-Spektrometer mit 5 mm TCI-Kryoprobenkopf mit z-Gradient durchgeführt. Die Peptidpulver wurden in 100 mM Natriumacetatpuffer, pH 4,2 mit 0,1 mM TSP und einem H_2O zu D_2O Verhältnis von 9:1 aufgenommen, sodass die Peptidkonzentrationen bei 405 μM (Biotin-Peptid) und 688 μM (^{15}N -Peptid) lagen. Für die Zuordnung der Signale wurden ^1H -NOESY, ^1H -COSY und ^1H -TOCSY NMR-Spektren und für das ^{15}N -Peptid wurde zusätzlich noch ein ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektrum aufgenommen. Alle Spektren wurden bei 298 K aufgenommen. Alle weiteren Parameter der aufgenommenen Spektren sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Parameter aller für die Charakterisierung der Peptide aufgenommenen NMR-Spektren

Spektrum	Puls- programm	scans	dummy scans	Akquisitions- zeit	Datenpunkte	spektrale Weite
^1H	zgesgp	16	4	4.68s	65536	14 ppm
NOESY	noesyegpph	64	16	0.29s	4096 x 256	14 ppm
COSY	cosydfesgpph	64	16	0.29s	4096 x 256	14 ppm
TOCSY	mlevesgpph	64	16	0.29s	4096 x 256	14 ppm
$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ - HSQC bei ^{15}N -Peptid	hsqcetf3gpsi	16	16	0.136s	2048 x 256	^1H : 15 ppm ^{15}N : 40 ppm

2.4.7 Dot-Blot des Biotin-Peptid

Für den Dot-Blot des Biotin-Peptids wurden ein Filterpapier und eine Nitrocellulose-Membran in 1x Blot Puffer getränkt. Anschließend wurden je 5 μL unterschiedlicher Verdünnungen des Biotin-Peptids in PBS langsam auf die Membran aufgetropft. Um zu kontrollieren, ob der Dot-Blot funktioniert hat, wurden 2 μL Streptavidin-HRP verwendet. Die Membran wurde 36 h bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde die Membran, ohne vorher gewaschen zu werden, mit 3 % BSA in 0,1 % TBS-T für 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Das überschüssige BSA wurde zweimal 10 min mit 0,1 % TBS-T und einmal 10 min im PBS abgewaschen. Die Inkubation der Membran mit Streptavidin-HRP mit einer 1:3000 Verdünnung in PBS mit 1 % BSA erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min mit PBS gewaschen und colorimetrisch mit dem Opti-4CN-Detection-Kit von Biorad nach Herstellerangaben entwickelt.

2.5 Nachweis einer O-GlcNAcylierung der CKII-Peptidderivate

Mit Hilfe der charakterisierten CKII-Peptidderivate sollte eine *in vitro* O-GlcNAcylierung mit funktionalem Zellextrakt durchgeführt werden. Dafür wurden Zellextrakte beider Zelllinien verwendet, die, wie Kapitel 2.3.5.1 beschrieben, hergestellt wurden. Falls

Änderungen in der Vorgehensweise vorgenommen wurden, so sind diese im Ergebnisteil beschrieben.

2.5.1 SDS-PAGE von Biotin-Peptid

Für die SDS-Gelelektrophorese von Biotin-Peptid wurden 16,5 % Ready-Gel-Tris-Tricine-Gele von BioRad verwendet. Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 6 aufgelistet. Als Proteinmarker wurden 7 µL des Precision Plus Dual Xtra Standard Prestained von BioRad verwendet. Die Proben wurden bei konstanter Spannung von 100 V für 70 min aufgetrennt. Vor der einstündigen Färbung der Peptidbanden wurden diese 30 min in Fixierlösung fixiert. Die Entfärbung wurde so lange durchgeführt, bis Banden erkennbar waren. Wurden die Gele für Western Blots verwendet, wurde keine Färbung vorgenommen.

2.5.2 O-GlcNAcylierungsversuche mit ¹⁵N-Peptid und Biotin-Peptid

Hier wird der allgemeine Versuchsablauf beschrieben. Sollten Veränderungen im Ablauf vorgenommen worden sein, so sind diese an gegebener Stelle erwähnt.

Für die O-GlcNAcylierungsexperimente wurde funktionaler Zellextrakt von HT-22 oder HEK 293 Zellen in verschiedenen Puffern hergestellt. Anschließend wurde jeweils für NMR-Messungen das ¹⁵N-Peptid und für einen Western Blot das Biotin-Peptid verwendet. Die Inkubation wurde begonnen, indem das jeweilige Peptid in einer bestimmten Konzentration sowie UDP-GlcNAc im Überschuss dem jeweiligen Zellextrakt zugegeben wurde. Bei NMR-Messungen wurde die Probe sofort in den Magneten überführt und bei 310 K gemessen. Das Biotin-Peptid wurde bei 37 °C inkubiert und zu bestimmten Zeitpunkten wurden Proben genommen, die 1:2 mit 2x reduzierendem Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min erhitzt wurden. Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt.

2.5.3 Western Blot zum Nachweis des Biotin-Peptids mit Streptavidin-HRP

Hier wird nur die Methode beschrieben, die erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Es wurde die Methode nach Rose (Rose et al., 2009), bei der eine Nitrocellulose-Membran vor dem Blotting in 0,05 % Gelatine in MP-H₂O für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 55 °C für 1 h getrocknet wurde, verwendet. Nach dem Blotting bei konstanten 10 V, max. 180 mA für 15 min wurden die Peptide für 2,5 h bei 37 °C in 37 %

Formaldehyd fixiert, indem die Membran auf ein mit 1 mL 37 % Formaldehyd getränktes Tuch gelegt und luftdicht verschlossen wurde. Anschließend wurde die Membran in MP-H₂O rehydratisiert und mit PBS gewaschen. Die freien Bindungsstellen wurden mit 3 % BSA in PBS für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Zum Nachweis des Biotins wurde mit an HRP-gekoppeltem Streptavidin bei einer Verdünnung von 1:3000 in PBS mit 1 % BSA für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte entweder colorimetrisch mittels des Opti-4CN-Detection-Kit von Biorad nach Herstellerangaben oder mit Hilfe von Chemolumineszenz. Dafür wurde entweder das Immobilon-Western-Chemiluminescent-HRP-Substrate von Millipore oder SuperSignal-West-Femto-Chemiluminescent-Substrate von Thermo Scientific verwendet und die Detektion am Lumineszenz-Reader am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck durchgeführt.

2.5.4 Nachweis des Biotin-Peptids mittels Western Blot und monoklonalen anti-O-GlcNAc Antikörpern

Der Nachweis einer O-GlcNAcylierung des Biotin-Peptids erfolgte wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben. Für die O-GlcNAcylierungsversuche 1 bis 9 wurde die Membran mit dem monoklonalen anti-O-GlcNAc Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Für den O-GlcNAcylierungsversuch 10 wurde diese Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.5.5 NMR-Messungen des ¹⁵N-Peptids

Für den Nachweis einer O-GlcNAcylierung mittels NMR Spektroskopie wurden über eine Gesamtmesszeit zwischen 20-24 h ¹H-NMR- und ¹H,¹⁵N-HSQC-NMR-Spektren im Wechsel aufgenommen. Dabei wurde für das ¹H-NMR-Spektrum zur Wasserunterdrückung eine WATERGATE Sequenz verwendet. Es wurden 16 Durchgänge mit jeweils 32768 Datenpunkten und 4 *dummy scans* bei einer Akquisitionszeit von 2,18 Sekunden aufgenommen. Die spektrale Weite betrug 15 ppm. Für das ¹H,¹⁵N-HSQC NMR-Spektrum wurden 8 oder 16 Durchgänge pro Inkrement mit einer Datenmatrix von 2048 x 256 Datenpunkten, einer Relaxationszeit von 1,5 s, einer Akquisitionszeit von 0,137 s und 16 *dummy scans* aufgenommen. Die spektrale Weite in der Protonendimension wurde auf 15 ppm und 40 ppm in der ¹⁵N-Dimension festgelegt.

2.6 Geräte und Chemikalien

2.6.1 Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Verwendete Puffer und Lösungen in alphabetischer Reihenfolge

<i>Puffer / Lösung</i>	<i>Herstellung</i>	<i>Konzentration</i>
1x Blot-Puffer	100 mL 10x Blot-Puffer	25 mM Tris
	200 mL Methanol	192 mM Glycin
	ad 1000mL MP-H ₂ O	20% Methanol
1x TBS-T	100 mL 10x TBS	20 mM Tris
	1 mL Tween 20	136 mM NaCl
	ad 1000 mL MP-H ₂ O	0,1 % Tween 20
10 % SDS	10 g SDS	
	ad 100 mL MP-H ₂ O	
10x Blot-Puffer	30,3 g Tris base	
	144 g Glycin	
	ad 1000 mL	
10x TBS	24,2 g Tris (OH-Form)	
	80 g NaCl	
	in ca. 800 mL MP-H ₂ O lösen, pH mit 37 % HCl auf 7,8 einstellen, warten bis Puffer abgekühlt ist, dann pH auf 7,5 einstellen	
100mM Na-Phosphatpuffer, pH 7	ad 1000 mL MP-H ₂ O	
	2.949 g NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	
	5.518 g Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O	
2x reduzierender Probenpuffer	1,2 mL Glycerin (100 %)	12 % Glycerin
	1,2 mL Sammelgel-Puffer	
	3 mL 10 % SDS	3 % SDS
	0,5 mL 2-Mercaptoethanol	
	10 mg Bromphenol Blau	
	3 g Harnstoff	
2x reduzierender Probenpuffer für Tris-Tricin Gele	ad 10 mL MP-H ₂ O	
	1,2 mL Tris-HCl 500mM, pH 6,8	200 mM Tris-HCl
	0,6 mL 10 % SDS	2 % SDS
	1,2 mL 100 % Glycerin	40 % Glycerin
	mischen, 980 µL abnehmen	2 % 2-Mercaptoethanol
	20 µL 2-Mercaptoethanol	
2 % Tween 20	2 mL Tween 20	
	ad 100 mL PBS	

20 % APS	2 g APS ad 10 mL MP-H ₂ O	
3 % BSA	1,5 g BSA ad 50 mL TBS-T	
5x Laufpuffer	30,27 g Tris (OH-Form) 144,14 g Glycin 5 g SDS ad 1000 mL MP-H ₂ O, pH nicht einstellen	
5x Laufpuffer für Tris-Tricin Gele	18,75 g Tris 27,75 g Tricin 1,55 g SDS ad 310 mL MP-H ₂ O pH ~8,3 (nicht einstellen)	500 mM Tris 500 mM Tricin 1 % SDS
5 % Milchpulver	2,5 g Milchpulver ad 50 mL TBS-T	
500mM Tris-HCl, pH 6,8	6,06 g Tris base ad 90 mL MP-H ₂ O pH auf 6,8 mit 37 % HCl einstellen ad 100 mL MP-H ₂ O	
80mM Natrium-Citrat-Phosphat Puffer, pH 4	19,3 mL 0,2 mol/L Na ₂ HPO ₄ 30,7 mL 0,1 mol/L Zitronensäure ad 100 mL MP-H ₂ O	
Entfärbelösung für Tris-Tricin Gele	10 % Essigsäure 90 % MP-H ₂ O	
Färbelösung für Tris-Tricin Gele	0,025 % (w/v) Coomassie Blue G-250 10 % Essigsäure 90 % MP-H ₂ O	
Fixierlösung für Tris-Tricin Gele	40 % Methanol 10 % Essigsäure 50 % MP-H ₂ O	
PBS	8 g NaCl 0,2 g KCl 0,2 g KH ₂ PO ₄ 1,26 g Na ₂ HPO ₄ 2 H ₂ O ad 1000 mL MP-H ₂ O pH 7,2 -7,4 mit 0,1 M HCl einstellen	137 mM 2,683 mM 1,47 mM 9,26 mM
PBS-T	500 µL Tween 20 ad 1000 mL PBS	0,05 % Tween 20

Sammelgel-Puffer	18,1 g Tris (OH-Form) ad 100 mL MP-H ₂ O pH 6,8 mit 6 M HCl einstellen (nie KOH oder NaOH verwenden)	1,5 M
Trenngel-Puffer	18,1 g Tris (OH-Form) ad 100 mL MP-H ₂ O pH 8,8 mit 6 M HCl einstellen (nie KOH oder NaOH verwenden)	1,5 M

2.6.2 Zusammensetzung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Tabelle 7: Vorschrift zur Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

	<i>Trenngel</i>			<i>Sammelgel</i>
	10 %	12 %	15 %	6 %
Bisacrylamid 30:1	3333 µL	4000 µL	5000 µL	1000 µL
Trenngel-Puffer	2500 µL	2500 µL	2500 µL	-
Sammelgel-Puffer	-	-	-	1250 µL
MP-H ₂ O	3867 µL	3200 µL	2200 µL	2580 µL
10 % SDS	100 µL	100 µL	100 µL	50 µL
87 % Glycerin	200 µL	200 µL	200 µL	100 µL
20 % APS	50 µL	50 µL	50 µL	25 µL
Bromphenol Blau	-	-	-	2 Tropfen
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL	10 µl

2.6.3 Geräte

Tabelle 8: Verwendete Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Gerätetyp</i>	<i>Hersteller</i>
Autoklav	ELV 3850	tuttnauer Systec
	Laboklav	HSP
Brutschrank	IR Autoflo CO ₂ water-jacketed incubator	Nuaire
Bench	Labguarde NU-440-400E Class II Biological Safety Cabinets	Nuaire
Fotoapparat	Powershot A95	Canon
Gefriertrocknungsanlage	Beta A	Christ
	Alpha 1-2 LD plus	Christ
HPLC	1200 series	Agilent technologies
MALDI-TOF-MS	Biflex III	Bruker Daltonics
Microwellen Synthesizer	Liberty	CEM

Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss
Mikrowaage	MC 210 S	Sartorius
NMR 500 MHz	Bruker Avance DRX 500 mit TCI-Kryoprobenkopf Bruker Avance III 500 mit TCI-Kryoprobenkopf	Bruker
Reinstwasseranlage		
SDS-PAGE Vorrichtung	Mini Protean 3	BioRad
Western Blot	Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad
Zentrifugen	Centrifuge 5810	Eppendorf
	Centrifuge 5415D	Eppendorf
	Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Electron Corporation

2.6.4 Chemikalien

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller</i>
[1-13C]-D-Glucose	Cambridge Isotope Laboratories, Inc.
2-Mercaptoethanol	Sigma
32%-ige HCl	Roth
37% Formaldehyd	Sigma
Acetonitril (HPLC for gradient analysis)	Acros
Albumin Standard (BSA)	Pierce
Ammoniumpersulfat	Sigma
Aprotinin	Fluka
BCA-Assay Kit	Pierce
Broad range, prestained Marker	Biorad
Bromphenol Blau Natriumsalz	Sigma
BSA (Alpha bovine section V)	Serva
Calciumchlorid Dihydrat	Merck
Chloroform p.a.	Fluka
Coomassie Blue G-250; Coomassie Brilliant Blue R	Sigma
D-(+)-Glucose, wasserfrei	Merck
Deuteriumoxid	Euriso-Top
Diethylether	Merck
Dimethylformamid	Iris Biotech
Dimethylsulfoxid	Serva
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck
DIPEA	Iris Biotech
Dithiothreitol	Gerbu
DMEM high glucose, with L-Glutamine	PAA

DMEM without glucose, without L-Glutamine	PAA
Essigsäure, 100% p.a.	Roth
Essigsäureanhydrid	Merck
Ethanol	Roth
Ethanol abs.	Merck
Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat	Merck
FCS (Fetal Bovine Serum)	Biochrom AG
fmoc-Ala	ABCR
fmoc-Gly	ABCR
fmoc-L-Asn(Trt)-OH	Iris Biotech
fmoc-Met	ABCR
fmoc-Pro	ABCR
fmoc-Rink-Amid-AM-Harz	Iris Biotech
fmoc-Ser(tBu)-OH	Merck
Fmoc-Thr(tBu)-OH	Nova Biochem
fmoc-Val	Sigma
Gelatine (Difco-TM-Gelatin)	Beckton Dickinson
Glycerin	Roth
Glycin	Sigma
Harnstoff	Gerbu
Immobilon-Western-Chemiluminescent-HRP-Substrate	Millipore
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma
Kaliumhydroxid, Plätzchen, wasserfrei	Merck
L-Glutamin	Merck
L-Ser-N-fmoc,o-tert-butylether (15N, 98%)	Cambridge Isotope Laboratories, Inc.
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck
Mangan-(II)-chlorid Tetrahydrat	Merck
MB Taq-Polymerase	Minerva Biolabs
Methanol	Promochem
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin (Tricin)	Roth
Natriumacetat, wasserfrei	Merck
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumpyruvat-Lösung 100 mM	PAA
N-Biotinyl-NH-(PEG)2-COOH.DIPEA	Merck
Opti-4CN Detection Kit	Biorad

Ovalbumin (Egg Whites)	Sigma
Perchlorsäure	Fluka
Piperidin	Iris Biotech
Poly-L-Ornithin Hydrobromid	Sigma-Aldrich
Ponceau-S	Serva
Precision Plus Dual Xtra Standard Prestained	Biorad
Protease-Inhibitor (Complete (TM), EDTA free)	Roche
PUGNAc (O-(2-Acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate)	Toronto Research Chemicals Inc.
Rotenon	Calbiochem
Roti-Blue Coomassie	Roth
Rotiphorese Gel 40; Acrylamid	Roth
SuperSignal-West-Femto-Chemiluminescent-Substrate	Thermo Scientific
TBTU	Iris Biotech
Trifluoressigsäure	Merck
Triisopropylsilan	Acros
Tris base	ICN
Triton X 100	Fluka
Trypan Blau	Gibco
Trypsin-EDTA (1:250) (1x)	PAA
Trypsin-Inhibitor	Sigma
TSP	Aldrich
Tween 20	Sigma
UDP-GlcNAc	Sigma
Venor®GeM Mycoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs
β-1-2,3,4,6-N-Acetylglucosaminidase	Calbiochem

2.6.5 Materialien

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien

<i>Material</i>	<i>Produkt</i>	<i>Hersteller</i>
Kanülen		B.Braun
Kryoröhrchen		
Kulturflaschen	T-75 für adherente Zellen, 250 mL	Sarstedt
NMR-Röhrchen	ST500-7 Standard Series 5 mm-NMR Tube 3mm <i>match</i>	Norell
Petrischalen	10 cm, für adhäre Zellen	Sarstedt
<i>rp</i> -Säule (präparativ)	VP 250/21 Nucleodur C18 Isis	Macherey und Nagel
serologische Pipetten	wattiert, pyrogenfrei, 5 mL, 10 mL, 25 mL	Saarstedt
Spin Tubes	SpinX tubes (0.22 µm Celluloseacetat)	CoStar
Spritzen		B.Braun

Spritzenfilter	Rotilabo®-Spritzenfilter, steril, 0,22 µm	Roth
Tris-Tricin Gele	16,5 %, 10-20 %	BioRad
Western Blot Membran	Nitrocellulose, 0,2 µm	Schleicher & Schüll

2.6.6 Proteine und Antikörper

Tabelle 11: Verwendete Proteine und Antikörper

<i>Produkt</i>	<i>Hersteller / Lieferant</i>	<i>Konzentration und Puffer</i>
Tau-K32- <i>wt</i>	Arbeitsgruppe E. Mandelkow, exprimiert in <i>E. coli</i>	5,5 mg/mL in PBS, pH 7,4, 1 mM DTT
Tau-K32- <i>wt</i> 15N	Arbeitsgruppe E. Mandelkow, exprimiert in <i>E. coli</i>	10,4 mg/mL in PBS, pH 7,4, 1 mM DTT
K9JA (polyclonal rabbit anti human Tau)	Dako	6,2 mg/mL in 0,1 mol/L NaCl, 15 mmol/L NaN ₃
DM-17 (polyclonal rabbit anti human/rat/mouse OGT)	Sigma	1,2 mg/mL in 0.01 mol/L PBS, pH 7.4, 15 mmol/L NaN ₃
18B10.C7(3)	Arbeitsgruppe Dr. G.-J. Boons	0,86 mg/mL in PBS, pH 7,4
9D1.E4(10)	Arbeitsgruppe Dr. G.-J. Boons	0,59 mg/mL in PBS, pH 7,4
1F5.D6(14)	Arbeitsgruppe Dr. G.-J. Boons	0,97 mg/mL in PBS, pH 7,4
Streptavidin-HRP Conjugate, high sensitivity	Thermo Scientific	1,1 mg/mL
WGA Lektin	Sigma	1 mg/mL in PBS, pH 7,4

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung von UDP-GlcNAc als NMR-detektierbarer metabolischer Marker

In vorangegangenen Arbeiten (Gallinger, 2008) konnte gezeigt werden, dass HT-22 Zellen $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose aufnehmen und metabolisieren. Diese Verstoffwechselung der ^{13}C -markierten Glucose wurde zum einen durch Beobachtung der Glucosekonzentration im Medium durchgeführt. Zum anderen wurden $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren von Zellextrakten aufgenommen, die deutlich zeigten, dass sich Metabolite der HT-22 Zellen nach einer vierstündigen Inkubation mit $[1-^{13}\text{C}_1]$ -D-Glucose darstellen lassen. Außerdem konnten diese Metabolite anhand einer Referenzbibliothek (Gallinger, 2008) und den Daten der Human Metabolome Database (Wishart et al., 2007) identifiziert werden. Diese Arbeit zu Grunde legend, wurde der Metabolismus der HT-22 Zellen gestört und die Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Metabolite beobachtet. Dafür wurden die Inhibitoren Natriumazid und Rotenon gewählt. Bei beiden Substanzen handelt es sich um Inhibitoren der Atmungskette, wobei unterschiedliche Komplexe inhibiert werden. Natriumazid hemmt kompetitiv die O_2 -Bindungsstelle des Komplex IV der Atmungskette und Rotenon inhibiert die NADH-Dehydrogenase (Komplex I der Atmungskette) (Berg et al., 2002). Darüber hinaus wurde in weiterführenden Experimenten beobachtet, ob die Veränderungen, die im Metabolismus der Zellen beobachtet werden konnten, anhand eines einzigen Moleküls beschrieben werden können. Aufgrund seiner außergewöhnlich hohen Konzentration und seiner wichtigen Rolle als Substrat verschiedenster Reaktionen, wurde Uridindiphosphat-*N*-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) als geeigneter Kandidat gewählt. UDP-GlcNAc kommt in einigen Zellen in einer ähnlich hohen Konzentration wie ATP vor (Wice et al., 1985). Zudem liefert UDP-GlcNAc die GlcNAc-Einheit für *O*- und *N*-Glycosylierungen, ist Vorläufer für die Synthese von Neuraminsäure und ist Substrat für *O*-GlcNAcylierungen. Daher handelt es sich bei UDP-GlcNAc um einen sehr gut geeigneten Kandidaten zur Etablierung eines metabolischen Markers. Darüber hinaus wurden diese Experimente, die mit der neuronalen HT-22 Zelllinie durchgeführt wurden, auf die HEK 293 Zelllinie übertragen.

3.1.1 Bestimmung der maximalen nicht-toxischen Konzentrationen von Natriumazid und Rotenon

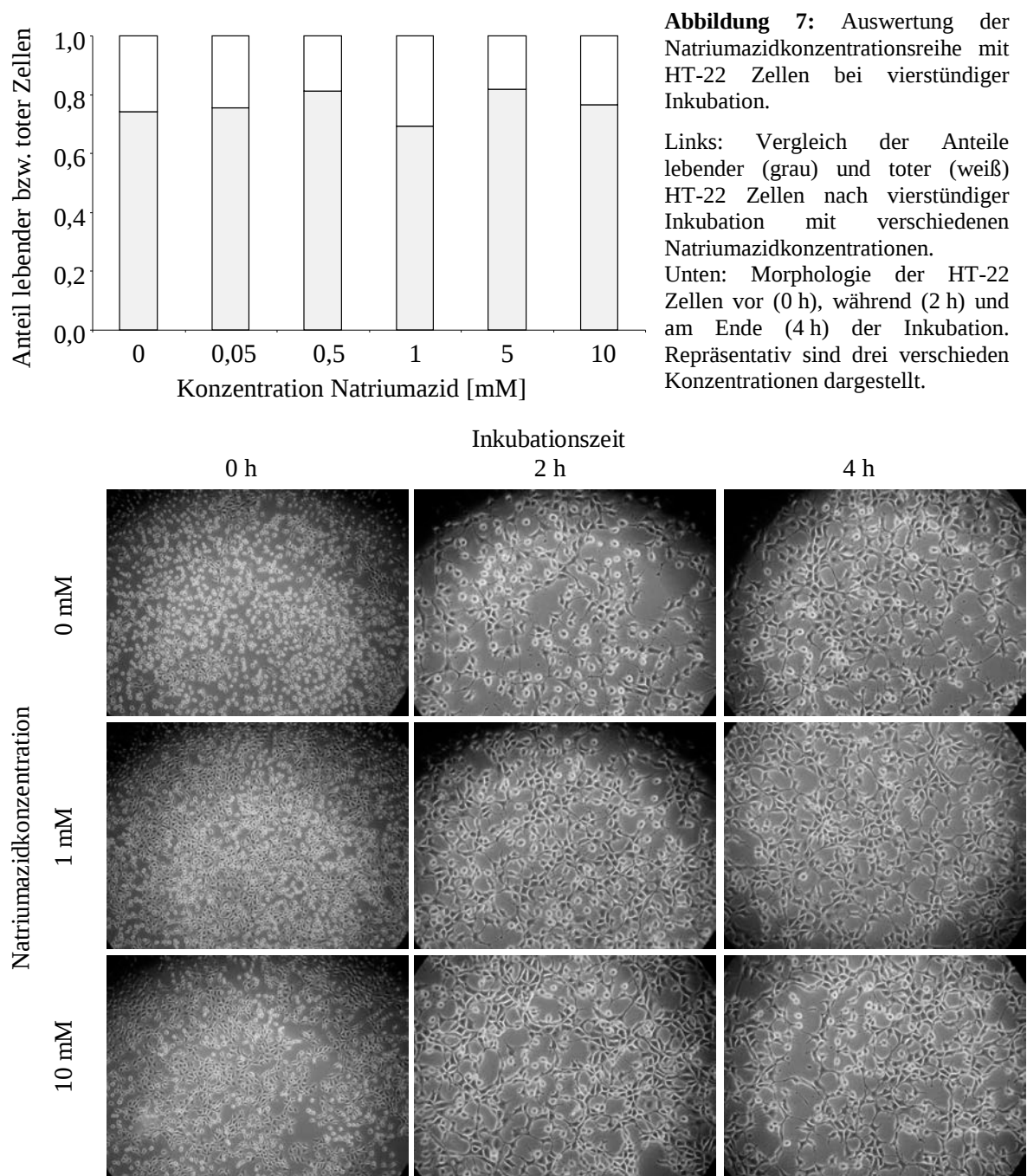
Um den Metabolismus der HT-22 und HEK 293 Zellen zu beeinflussen, wurden die Inhibitoren Natriumazid und Rotenon gewählt. Bei beiden handelt es sich um Inhibitoren der Atmungskette, wobei Natriumazid Komplex IV und Rotenon Komplex I inhibiert. Für die Experimente sollte der jeweilige maximale Effekt des Inhibitors betrachtet werden, ohne aber die Zellen in ihrer Zellzahl und Morphologie zu beeinträchtigen. Daher wurden die Zellen, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Inhibitors ausgesetzt, deren Morphologie während der Inkubation beobachtet und anschließend durch eine Vitalfärbung mit Trypan Blau die lebenden und toten Zellen ausgezählt. Zunächst wurde die maximale Natriumazidkonzentration für eine Inkubation der HT-22 Zellen von 4 h bestimmt, da die Inkubationsversuche in Anlehnung an vorherige Experimente (Gallinger, 2008) durchgeführt wurden. Spätere Inkubationsversuche wurden sowohl mit den HT-22 Zellen als auch mit den HEK 293 Zellen über einen Zeitraum von 24 h mit beiden Inhibitoren durchgeführt.

3.1.1.1 HT-22 Zellen

Zunächst wurde eine maximal verträgliche Natriumazidkonzentration bestimmt. Dafür wurde die Morphologie der HT-22 Zellen, während sie mit verschiedenen Natriumazidkonzentrationen inkubiert wurden, beobachtet und anschließend die Anzahl der lebenden und toten Zellen durch eine Vitalfärbung mit Trypan Blau bestimmt. In Abbildung 7 ist die Anzahl dieser Zellen nach vierstündiger Inkubation mit verschiedenen Natriumazidkonzentrationen dargestellt. Dabei schwankte der Anteil der lebenden Zellen zwischen 69 % und 82 %. Der Anteil an lebenden Zellen bei der höchsten Natriumazidkonzentration betrug 77 %. Die Morphologie der Zellen änderte sich unter Einfluss der verschiedenen Natriumazidkonzentrationen nicht. In Abbildung 7 ist repräsentativ die Morphologie der Zellen zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h und 4 h bei der Kontrolle (0 mM Natriumazid) sowie bei einer Inkubation mit 1 mM und 10 mM Natriumazid dargestellt. Die Zellen, die mit Natriumazid inkubiert wurden, zeigten keine morphologische Auffälligkeiten während der Inkubation. Außerdem unterschied sich ihre Morphologie verglichen mit der Kontrolle zu keinem Zeitpunkt. Da der Anteil an lebenden Zellen mit einer Erhöhung der Inhibitorkonzentration nicht abnahm und die Morphologie der

Zellen sich nicht von der der Kontrollzellen unterschied, wurde eine maximale Natriumazidkonzentration von 10 mM für die weiteren Experimente gewählt.

Für die 24-stündigen Inkubationen wurde ohne vorherige Konzentrationsreihe ebenfalls eine Natriumazidkonzentration von 10 mM verwendet. Während allen späteren Inkubationsversuchen wurde die Morphologie der Zellen beobachtet und abschließend entweder der Gesamtproteingehalt oder die Zellzahl bestimmt. Dabei kam es zu keinen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle.



Rotenon wurde nur in Inkubationen von 24 h eingesetzt. In Abbildung 8 sind die Anzahl der lebenden HT-22 Zellen sowie deren Morphologie dargestellt. Die Anzahl der toten Zellen konnte nicht bestimmt werden, da eine Inkubation mit Rotenon zu diffusen, Trypan-Blau-positiven Zellaggregaten führte (Abbildung 8, Rotenonkonzentrationen 0,25 μM und 2,5 μM zu den Zeitpunkten 1 h bis 24 h). Die Auswertung zeigt, dass die Zellzahl mit steigender Rotenonkonzentration abnahm.

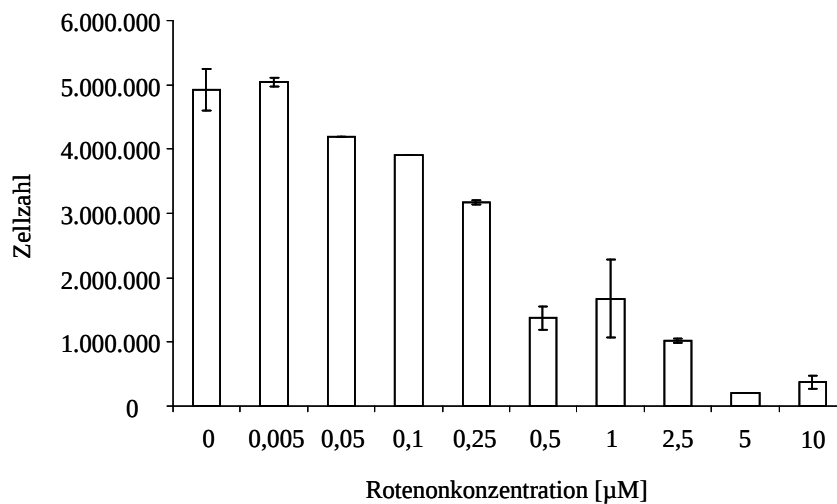
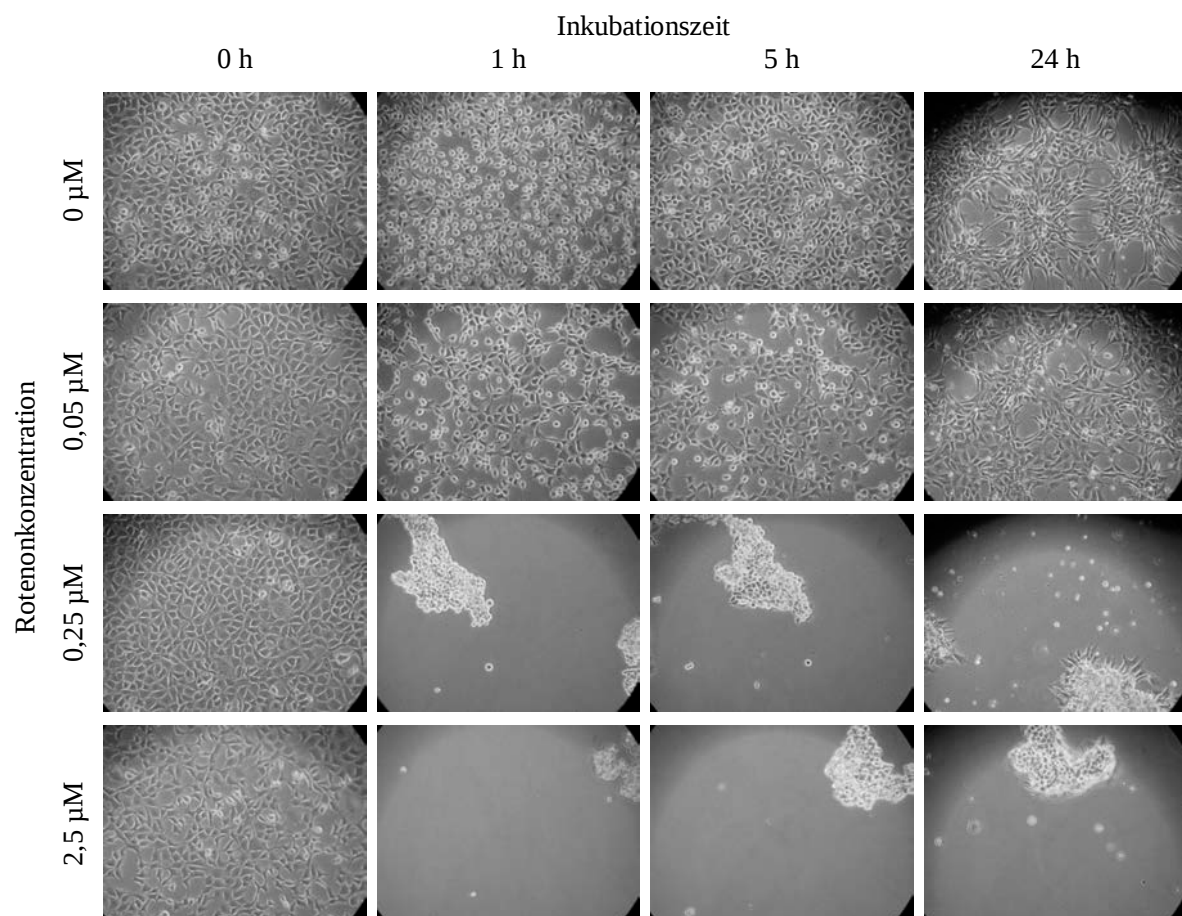


Abbildung 8: Links: Zellzahl lebender HT-22 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit verschiedenen Rotenonkonzentrationen (Doppelbestimmung)

Unten: Morphologie der HT-22 Zellen während der Inkubation mit verschiedenen Rotenonkonzentrationen. Repräsentativ sind 4 von 10 getesteten Konzentrationen dargestellt.



Außerdem konnte durch die Beobachtung der Morphologie der Zellen gezeigt werden, dass schon bei einer Rotenonkonzentration von $0,25\ \mu\text{M}$ nach einer Inkubation von 1 h Zellaggregate entstanden. Erst bei der getesteten Rotenonkonzentration von $0,05\ \mu\text{M}$ wiesen die Zellen in ihrer Morphologie keine Unterschiede zur Kontrolle auf. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine maximale Rotenonkonzentration von $0,05\ \mu\text{M}$ gewählt.

3.1.1.2 HEK 293 Zellen

Bei der Bestimmung der für die HEK 293 Zellen maximal verträglichen Natriumazidkonzentration schwankte der Anteil der toten Zellen bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen sehr (Abbildung 9). Da der Anteil toter Zellen bei einer Natriumazidkonzentration größer 1 mM wieder abnahm, wurde in Anlehnung an die maximal verträgliche Natriumazidkonzentration der HT-22 Zellen eine maximale Konzentration von Natriumazid von 10 mM für eine 24-stündige Inkubation der HEK 293 Zellen gewählt.

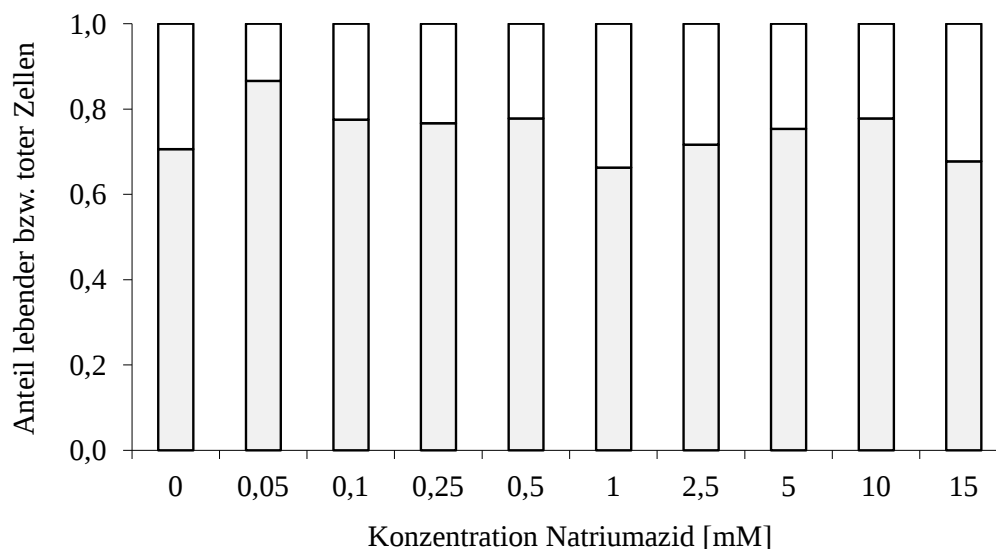


Abbildung 9: Natriumazidkonzentrationsreihe mit HEK 293 Zellen über 24 h. Vergleich der Anteile lebender (grau) und toter (weiß) HEK 293 Zellen nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Natriumazidkonzentrationen.

Für die maximale Rotenonkonzentration wurde ohne Konzentrationsreihe eine Konzentration von 50 nM gewählt. Durch die Beobachtung der Morphologie der HEK 293 Zellen während der Inkubationsversuche und der anschließenden Zellzahlbestimmungen konnte festgestellt werden, dass diese Konzentration keine Auswirkungen auf die Zellzahl und Morphologie der Zellen hat, verglichen mit den Kontrollen.

3.1.2 Auswirkungen von Natriumazid auf den Metabolismus der HT-22 Zellen bei vierstündiger Inkubation

Für die folgenden Inkubationsversuche, die in Anlehnung an vorangegangene Arbeiten durchgeführt wurden (Gallinger, 2008), wurden HT-22 Zellen für vier Stunden mit und ohne Natriumazid in Medium mit ^{13}C -markierter Glucose inkubiert und die Metabolite anschließend mit Hilfe der Perchlorsäureextraktion (vergleiche Kapitel 2.2.1.3) extrahiert. Von diesen Zellextrakten wurden ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren aufgenommen. Vergleicht man Spektren von Zellextrakten ohne Beeinflussung des Metabolismus mit Zellextrakten, die mit Natriumazid inkubiert wurden, so lässt sich im Überblick feststellen, dass sich die Zusammensetzung der detektierbaren Metabolite verändert. In den vergrößerten Ausschnitten der Spektren (Abbildung 10) wird deutlich, dass Aspartat und Acetat nach der Inkubation mit Natriumazid nicht mehr detektierbar waren und sich die Signalintensität der Metabolite Alanin und Glutamat verringerten. Das Signal von Laktat bei 1,33 ppm hingegen nahm an Intensität zu.

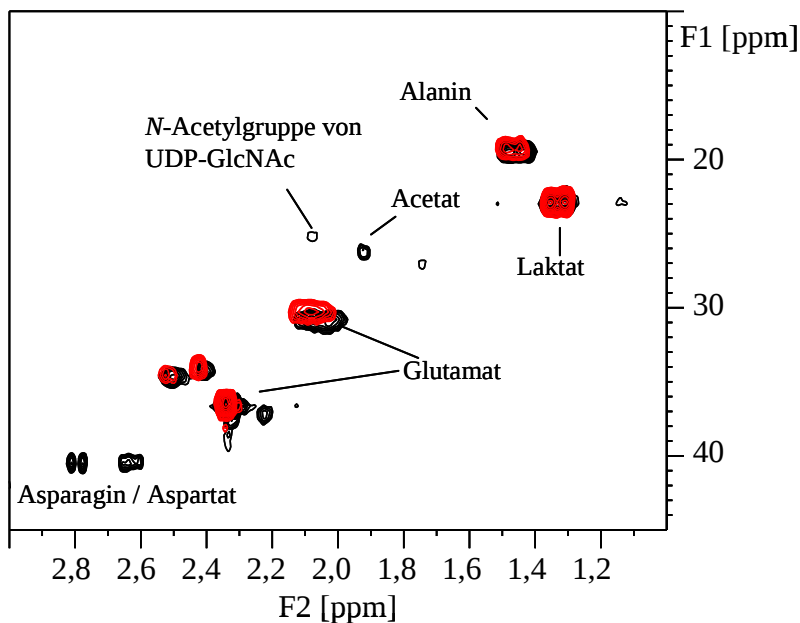


Abbildung 10: Ausschnitt aus ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren von HT-22 Zellextrakten nach 4 h Inkubation. Schwarz: Inkubation ohne Beeinflussung des Metabolismus; Rot: Inkubation mit 10 mM Natriumazid.

Über Metabolite des Citratzyklus oder aktivierte Zucker ließen sich allerdings keine Aussagen treffen, da diese weder in Spektren von Zellextrakten ohne Beeinflussung des Metabolismus noch in Spektren von Zellextrakten nach Beeinflussung des Metabolismus detektierbar waren.

Die Inkubation mit Natriumazid beeinflusste auch die Glucose- und Laktatkonzentration im Inkubationsmedium. Durch die in Kapitel 2.2.3.1 beschriebene Vorgehensweise konnten die Glucose- und Laktatkonzentrationen NMR-spektroskopisch bestimmt werden. Durch eine anschließende Normierung dieser Werte auf den Proteingehalt (vergleiche Kapitel 2.2.1.4) wurden Raten für die Glucoseaufnahme und die Laktatabgabe der HT-22 Zellen bestimmt. Die Laktatabgaberate der HT-22 Zellen lag ohne Beeinflussung des Metabolismus bei $1,36 \pm 0,03 \mu\text{mol Laktat/h/mg Protein}$. Wurden die Zellen mit Natriumazid inkubiert, stieg die Laktatabgaberate auf $2,00 \pm 0,05 \mu\text{mol Laktat/h/mg Protein}$ an. Die Messungen für die Glucoseaufnahme der Zellen schwankten untereinander sehr stark, sodass keine Aussagen getroffen werden konnten.

3.1.3 Identifizierung von UDP-GlcNAc in Zellextrakt

Wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, war es möglich, Unterschiede in den $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren von HT-22 Zellextrakten, die mit und ohne den Inhibitor Natriumazid inkubiert wurden, zu detektieren. Diese Änderungen in der Metabolitenzusammensetzung ließen auf einen veränderten Metabolismus der HT-22 Zellen schließen. Da die Synthese des Moleküls UDP-GlcNAc von verschiedenen Stoffwechselwegen in der Zelle abhängt, sollte untersucht werden, ob Veränderungen dieser Stoffwechselwege Auswirkungen auf die Synthese von ^{13}C -markiertem UDP-GlcNAc haben. UDP-GlcNAc ist ein wichtiges Vorläufersubstrat sowohl für *N*- und *O*-Glycosylierungen, die *O*-GlcNAcylierung als auch die Sialylierung. Neben ATP ist UDP-GlcNAc einer der am häufigsten vorkommende Metabolite in Zellen (Wice et al., 1985). Daher ist UDP-GlcNAc potentiell gut dafür geeignet als metabolischer Marker verwendet zu werden.

Zunächst musste dafür aber gezeigt werden, dass HT-22 Zellen UDP-GlcNAc in ausreichender Menge bilden, um es NMR-spektroskopisch in Zellextrakten nachzuweisen.

In Protonenspektren eines Zellextrakts der HT-22 Zellen, der ohne ^{13}C -Markierung gewonnen wurde (Abbildung 11, schwarze Spektren), konnte das charakteristische Doppeldublett des H1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc bei 5,52 ppm ^1H -chemischer Verschiebung nachgewiesen werden. Die Identifizierung des Signals der Protonen der *N*-Acetylgruppe der GlcNAc-Einheit bei 2,08 ppm war auf Grund der Überlagerung mit anderen Signalen nicht möglich. Um eindeutig nachzuweisen, dass UDP-GlcNAc im Zellextrakt vorhanden war, wurde derselbe Zellextrakt mit einer konzentrierten UDP-GlcNAc-Lösung versetzt, um zu bestimmen, welche Signale sich dadurch verstärken

(Abbildung 11, grüne Spektren). Wie in Abbildung 11 dargestellt, konnte dadurch eindeutig geklärt werden, dass UDP-GlcNAc im Zellextrakt vorhanden ist, da das Signal des H1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc bei 5,52 ppm verstärkt wurde. Außerdem war es dadurch möglich das Signal der Protonen der *N*-Acetylgruppe des UDP-GlcNAc bei 2,08 ppm zu identifizieren.

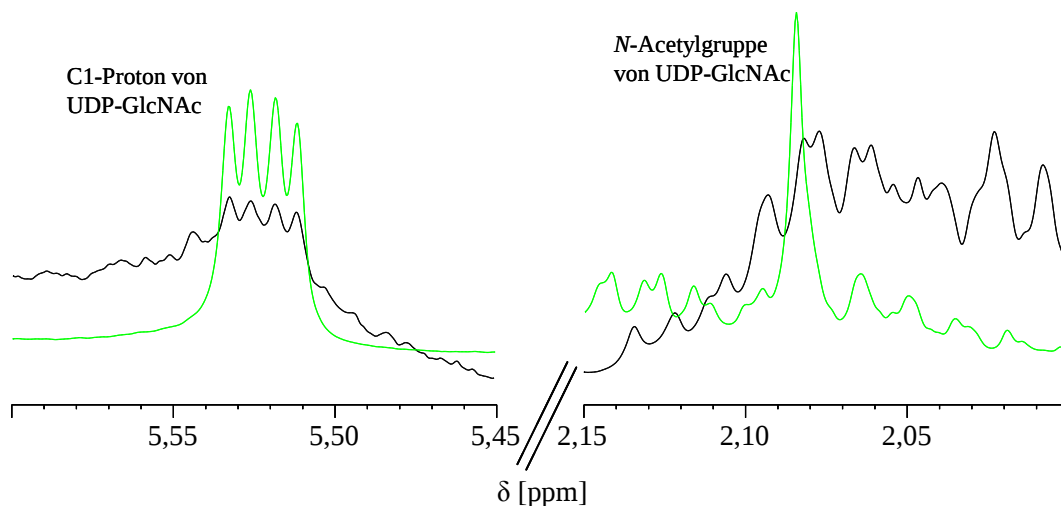


Abbildung 11: Ausschnitte aus Protonenspektren von HT-22 Zellextrakten, links: charakteristisches Doppeldublett des H1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAcs bei 5,52 ppm, rechts: *N*-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc bei 2,08 ppm. schwarz: ohne Beeinflussung des Metabolismus; grün: selber Zellextrakt nach Zugabe der konzentrierten UDP-GlcNAc-Lösung

Allerdings konnte in den ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren von Zellextrakten, die ohne Beeinflussung des Stoffwechsels der HT-22 Zellen aber mit ^{13}C -Markierung gewonnen wurden, lediglich Hinweise auf das Vorkommen von ^{13}C -markiertem UDP-GlcNAc gefunden werden. So war die *N*-Acetylgruppe bei 2,08 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 25 ppm ^{13}C -chemischer Verschiebung in sehr geringer Intensität zu finden (vergleiche Abbildung 10, schwarzes Spektrum, Kapitel 3.1.2). Für eine eindeutige Identifizierung wurden ^{13}C -gefilterte Protonenspektren von HT-22 Zellextrakt (Abbildung 12, schwarzes Spektrum) sowie von den Referenzsubstanzen $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{-D-Glucose}$ und UDP-GlcNAc aufgenommen. In diesen Protonenspektren geben nur Protonen, die an ein ^{13}C -Atom gebunden sind, ein detektierbares Signal. Da diese Spektren nicht entkoppelt aufgenommen wurden, spaltet sich das jeweilige Protonensignal mit einer $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung von 175 Hz auf. Wie in Abbildung 12 dargestellt, ließ sich so im Zellextrakt durch den Vergleich mit den Spektren der Referenzsubstanzen das anomere α -Proton der $[1\text{-}^{13}\text{C}]\text{-D-Glucose}$ bei 5,24 ppm, welches aufgrund der $^1J_{\text{CH}}$ -Kopplung in die Signale bei 5,41 ppm bzw. 5,06 ppm aufspaltet, identifizieren. Allerdings war das charakteristische Doppeldublett des H1 der

GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc bei 5,52 ppm, welches in die Signal bei 5,7 ppm und 5,34 ppm aufspaltet, nicht zu finden. Aufgrund dieser Tatsache wurde angenommen, dass eine Inkubationszeit von 4 h für die HT-22 Zellen nicht ausreicht, um über den Hexosamin-Biosynthese-Weg ^{13}C -markiertes UDP-GlcNAc zu synthetisieren.

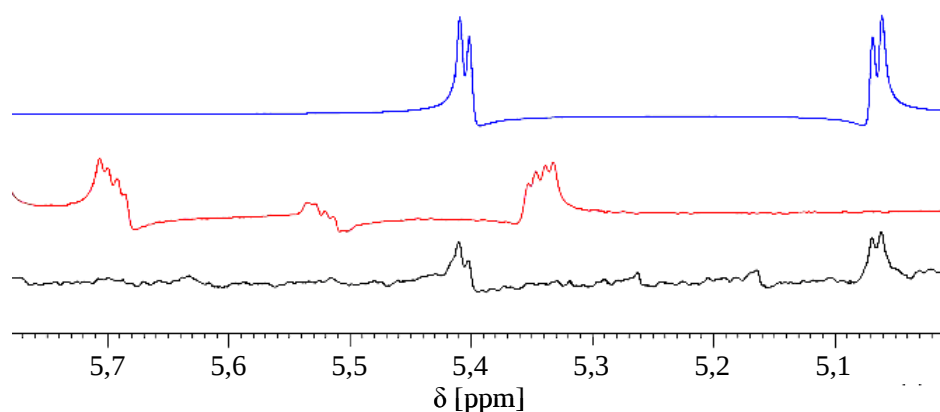


Abbildung 12: Vergleich des ^{13}C -gefilterten Protonenspektrums von HT-22 Zellextrakt (schwarz) mit Referenzspektren von $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose (blau) und UDP-GlcNAc (rot) im Bereich von 5,0 ppm bis 5,8 ppm (ohne ^1H -Entkopplung).

Daher wurden HT-22 Zellextrakte hergestellt, die 8 h, 16 h und 24 h mit $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose inkubiert wurden. $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren dieser Zellextrakte sind in Abbildung 13 und Abbildung 14 dargestellt. In Abbildung 13 sind von HT-22 Zellextrakten, die 4 h (grün) und 8 h (schwarz) mit $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose inkubiert wurden, sowohl das gesamte $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrum als auch einzelne vergrößerte Ausschnitte dargestellt. Der Überblick über das gesamte $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektrum zeigt, dass bei einer Verdopplung der Inkubationszeit von 4 h auf 8 h die Signalintensitäten aller Signale deutlich anstiegen. Durch den Vergleich der Region der anomeren Protonen zwischen 5,1 ppm und 6,25 ppm ^1H -chemischer Verschiebung (Abbildung 13, unten links) beider Inkubationszeiten wurde deutlich, dass die ^{13}C -Markierung aller dort gezeigten Metabolite zunahm. Insbesondere die relevante ^{13}C -Markierung des C1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc bei 5,52 ppm ^1H -chemischer Verschiebung wurde deutlich. Der vergrößerte Bereich von 1,0 ppm bis 3,5 ppm ^1H -chemischer Verschiebung (Abbildung 13, unten rechts) zeigt die Signale von Laktat, den Aminosäuren Alanin, Glutamat, Asparagin und Aspartat sowie die *N*-Acetylgruppe des UDP-GlcNAc. Alle diese Signale nahmen bei einer Inkubationszeit von 8 h im Vergleich zu einer Inkubationszeit von 4 h an Intensität zu. Bei einer ^1H -chemischen Verschiebung zwischen 2,3 ppm und 2,7 ppm und einer ^{13}C -chemischen Verschiebung zwischen 44 ppm und 49 ppm konnten durch den Vergleich mit Referenzspektren Signale

identifiziert werden, die den Citratzyklusmetaboliten Citrat und Malat zugeordnet werden konnten.

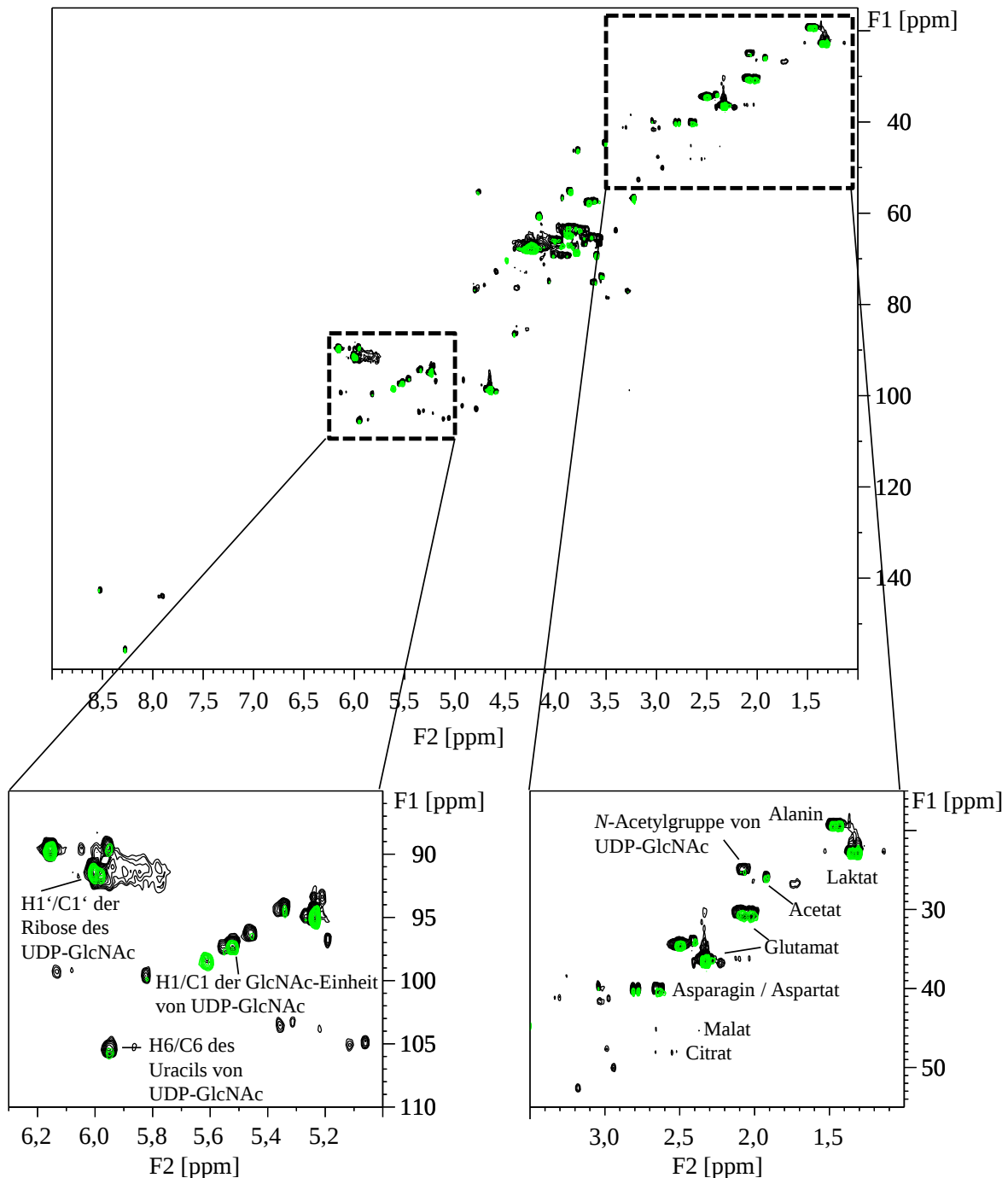


Abbildung 13: ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren von HT-22 Zellextrakten, die 4 h (grün) und 8 h (schwarz) mit $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose inkubiert wurden. Oben: vollständige Spektren; Unten: Ausschnitte aus den ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren. Links: Bereich der anomeren Protonen von aktivierten Zuckern; Rechts: Bereich der aliphatischen Protonen.

Durch eine weitere Inkubationszeitverlängerung auf 24 h war es möglich, die Citratzyklusmetabolite Citrat und Malat im ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum darzustellen (Abbildung 14, rechts).

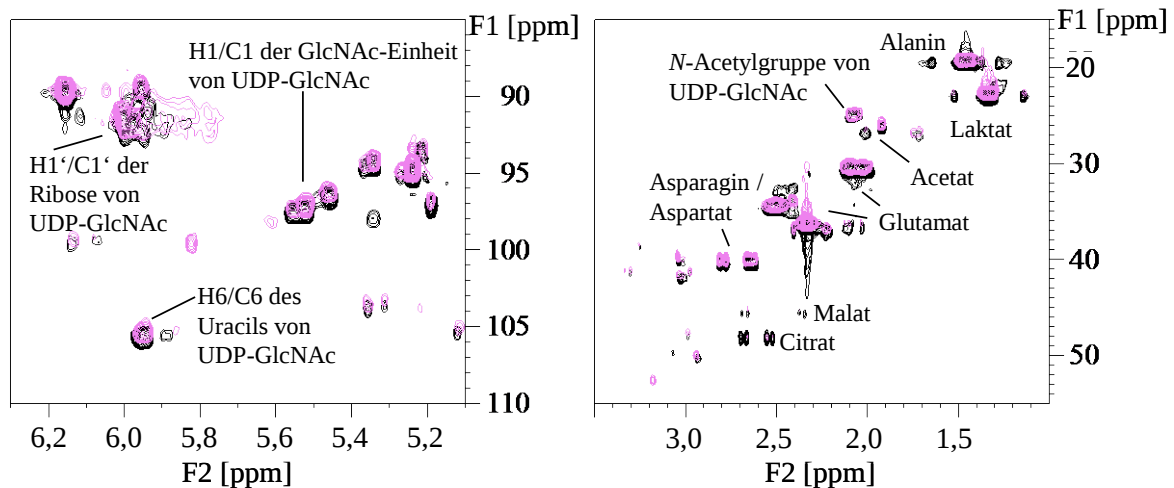


Abbildung 14: Ausschnitte aus ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren von HT-22 Zellextrakten. Rosa: 8 h Inkubation der HT-22 Zellen mit $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose; Schwarz: 24 h Inkubation der HT-22 Zellen mit $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose. Links: Bereich der anomeren Protonen von aktivierten Zuckern; Rechts: Bereich der aliphatischen Protonen.

Die Signalintensitäten von Alanin, Laktat, Glutamat, Asparagin, Aspartat, der N-Acetylgruppe des UDP-GlcNAc sowie des H1/C1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc wurden durch eine Verlängerung der Inkubationszeit nicht weiter verstärkt (Abbildung 14, rechts und links). Weiterhin wurden von HT-22 Zellextrakten, die 4 h, 8 h, 16 h und 24 h mit $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose inkubiert wurden, ^{13}C -gefilterte Protonenspektren aufgenommen. Bei diesen Spektren konnte die Zunahme der Signalintensitäten durch eine Inkubationszeitverlängerung im Vergleich zu ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren besser beobachtet werden. Abbildung 15 zeigt Ausschnitte aus den ^{13}C -gefilterten Protonenspektren von HT-22 Zellextrakten, die unterschiedlich lange mit $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose inkubiert wurden. Links ist das charakteristische Doppeldublett des H1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc dargestellt. Nach 4 h Inkubation ließ sich keine ^{13}C -Markierung des C1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc nachweisen, ebenso wenig wie bei der N-Acetylgruppe des UDP-GlcNAc, die rechts in Abbildung 15 dargestellt ist. Erst nach 8 h Inkubation mit $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose konnten Protonen nachgewiesen werden, die an ein ^{13}C -Atom gebunden waren. Allerdings wurde dieses ^{13}C -gefilterte Protonenspektrum mit 15 k Durchgängen aufgenommen. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 h führte dazu, dass das H1 der GlcNAc-Einheit und die Protonen der N-Acetylgruppe des UDP-GlcNAc in ausreichender Menge an ^{13}C -Atome gebunden waren.

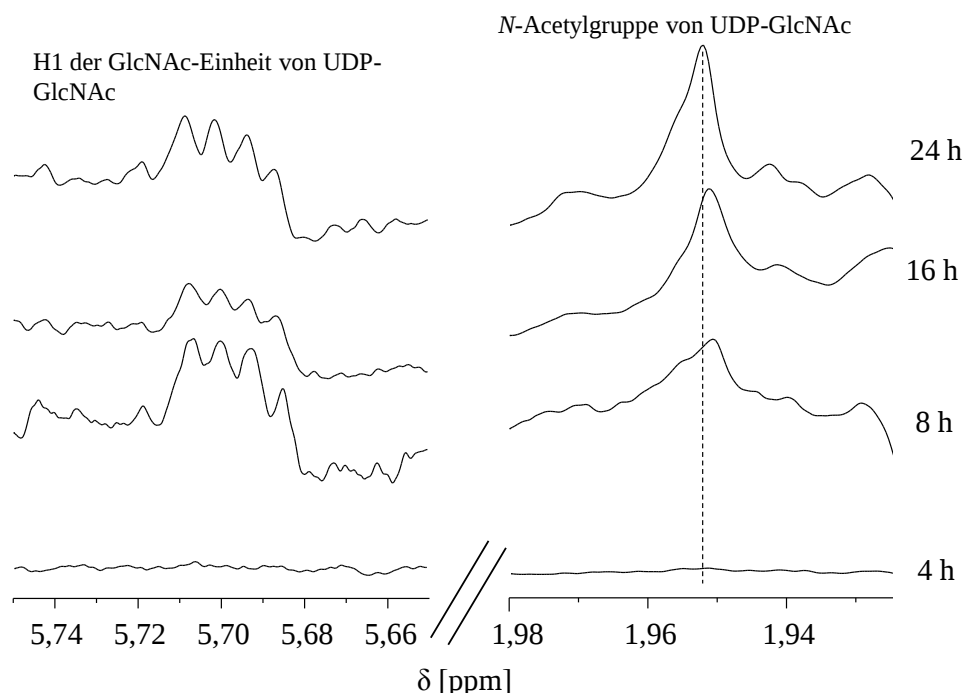


Abbildung 15: Ausschnitte aus ^{13}C -gefilterten Protonenspektren (ohne ^1H -Entkopplung) von HT-22 Zellextrakten, die über unterschiedliche Zeiträume mit $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose inkubiert wurden. Links: H1 der GlcNAc-Einheit von UDP-GlcNAc (wegen Überlagerungen im Hochfeldbereich ist nur der Tieffeldanteil des Signals dargestellt); Rechts: *N*-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc (wegen Überlagerungen im Tieffeldbereich ist nur der Hochfeldanteil des Signals dargestellt). Die Spektren der Zellextrakte mit einer Inkubationszeit von 4 h, 16 h und 24 h wurden mit 5 k Durchgängen und das Spektrum des Zellextrakts mit einer Inkubationszeit von 8 h wurde mit 15 k Durchgängen aufgenommen.

Dadurch konnten die ^{13}C -gefilterten Protonenspektren mit 5 k Durchgängen bei gleichem Signal-zu-Rausch-Verhältnis aufgenommen werden, was die benötigte Messzeit um zwei Drittel verringerte.

3.1.4 Auswirkungen von Natriumazid auf den Metabolismus der HT-22 Zellen bei 24-stündiger Inkubation

Nachdem gezeigt werden konnte, dass nach einer Inkubationszeit von 24 h eine ^{13}C -Markierung sowohl des C1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc als auch der *N*-Acetylgruppe des UDP-GlcNAc nachzuweisen ist, wurden die Versuche zur Beeinflussung des Metabolismus der HT-22 Zellen mit dieser verlängerten Inkubationszeit durchgeführt. Die Metabolite wurden mit Hilfe einer Perchlorsäureextraktion gewonnen. Während der Inkubation wurden Mediumproben genommen, in denen die Glucose- und Laktatkonzentrationen NMR-spektroskopisch bestimmt wurden. Um die Vergleichbarkeit der Werte zu gewährleisten, wurden die Glucose- und Laktatkonzentrationen auf den Proteingehalt der Zellen normiert. Da die Glucoseaufnahme und die Laktatabgabe der HT-22 Zellen über 24 h linear ist (Abbildung 16), konnten Raten für die jeweilige Aufnahme bzw.

Abgabe bestimmt werden. Unter normalen Wachstumsbedingungen zeigten die Zellen eine Glucoseaufnahme von $1,2 \pm 0,14 \mu\text{mol Glucose/h/mg Protein}$, die sich in einer Abnahme der Glucosekonzentration im Medium von 9,8 mM auf 4,4 mM widerspiegelte (Abbildung 16). Die Laktatabgaberate betrug $2,14 \pm 0,23 \mu\text{mol Laktat/h/mg Protein}$ und spiegelte sich in einer Zunahme der Laktatkonzentration von 0 mM auf 8,7 mM im Inkubationsmedium wider (Abbildung 16).

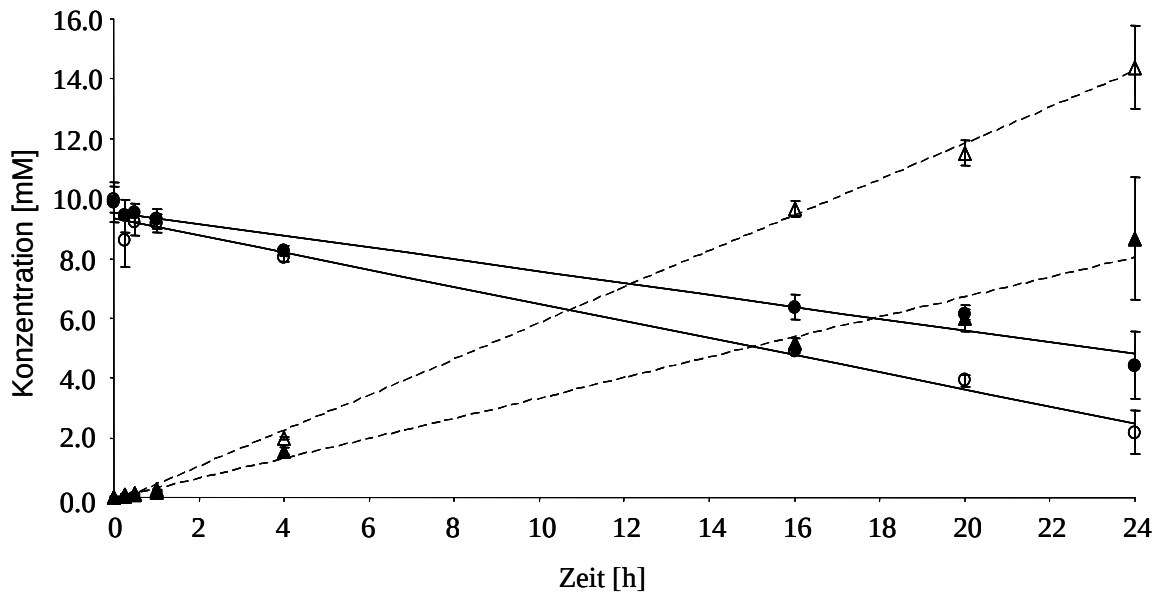


Abbildung 16: Glucose- und Laktatkonzentrationen im Medium der HT-22 Zellen während einer 24-stündigen Inkubation. Alle Datenpunkte wurde in einer 6-fach Bestimmung ermittelt. Zu den Zeitpunkten 4 h, 16 h und 20 h wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. ● Glucosekonzentration unter normalen Bedingungen; ○ Glucosekonzentration während einer Inkubation mit 10 mM Natriumazid; ▲ Laktatkonzentration unter normalen Bedingungen; △ Laktatkonzentration während einer Inkubation mit 10 mM Natriumazid (modifiziert aus (Gallinger et al., 2011)).

Wurden die Zellen mit Azid inkubiert, stieg die Glucoseaufnahme auf $2,0 \pm 0,19 \mu\text{mol Glucose/h/mg Protein}$, was einen Glucoseabnahme im Medium von 9,9 mM auf 2,1 mM zur Folge hatte. Die Laktatabgaberate stieg unter Azideinfluss auf $3,83 \pm 0,43 \mu\text{mol Laktat/h/mg Protein}$ an. Die Laktatkonzentration im Medium stieg von 0 mM auf 14,6 mM an (Abbildung 16).

In den $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR Spektren wurde der veränderte Stoffwechsel der HT-22 Zellen unter Azideinfluss ebenfalls deutlich. Abbildung 17 oben zeigt die aliphatische Region von 1,0 ppm bis 3,0 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 15 ppm bis 50 ppm ^{13}C -chemischer Verschiebung der $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren von Zellextrakten, die mit und ohne Azid inkubiert wurden. Diese verdeutlichen, dass die Intensität des Laktatsignals bei 1,33 ppm ^1H -chemischer Verschiebung unter Azid-Einfluss zunahm. In den vergrößerten Bereichen

dieser ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren sind die Signale von Asparagin und Aspartat sowie Metabolite des Citratzyklus, Citrat und Malat (Abbildung 17, links), sowie der *N*-Acetylgruppe des UDP-GlcNAc dargestellt. Dabei wurde das Spektrum des Zellextrakt, der mit Azid inkubiert wurde (Abbildung 17, rot), um 2 ppm in F1 verschoben, um die einzelnen Signale besser mit denen des Zellextrakt, der unter normalen Inkubationsbedingungen gewonnen wurde, vergleichen zu können. In Abbildung 17, links ist deutlich zu erkennen, dass sowohl Asparagin und Aspartat, als auch die Signale der Metabolite des Citratzyklus, Citrat und Malat, unter Azid-Einfluss nicht mehr vorhanden waren. Außerdem ist in der rechten Abbildung zu sehen, dass die Signalintensität der *N*-Acetylgruppe des UDP-GlcNAc stark abnahm.

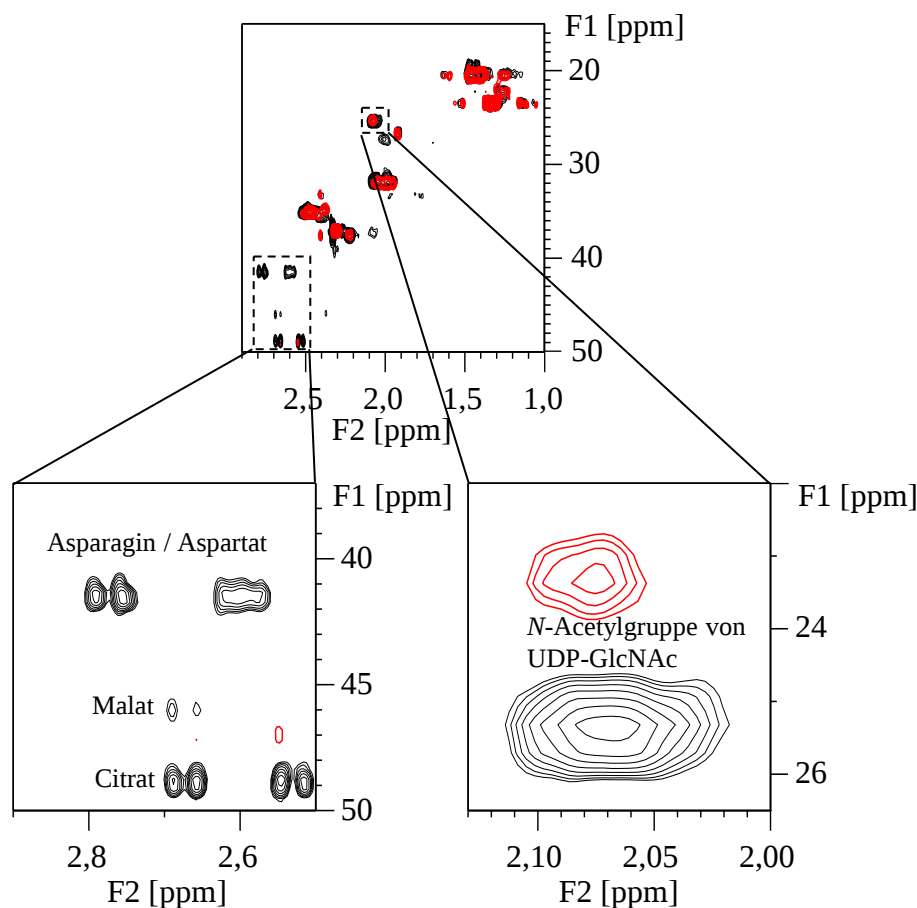


Abbildung 17: Ausschnitte aus ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren von HT-22 Zellextrakten. Schwarz: Normale Inkubationsbedingungen; Rot: Zellen wurden 24 h mit 10 mM Natriumazid inkubiert; Oben: Überblick über die aliphatische Region, Spektren wurden übereinandergelegt; Unten: Vergrößerte Teile der Spektren; Spektren wurden in um 2 ppm in der ^{13}C -Dimension verschoben (modifiziert aus Gallinger et al., 2011).

In Abbildung 18, links ist der Bereich der anomeren Protonen von 5,0 ppm bis 6,2 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 87 ppm bis 120 ppm ^{13}C -chemischer Verschiebung dargestellt. Man kann erkennen, dass die Signalintensität des H1'/C1' der Ribose des

UDP-GlcNAc durch die Inkubation mit Azid nicht beeinflusst wurde. Hingegen nahm die Signalintensität des H6/C6 des Uracils des UDP-GlcNAc ab. Im vergrößerten Ausschnitt dieser Spektren (Abbildung 18, rechts) sind die anomeren Protonen der aktivierten Zucker UDP-Glc (5,61 ppm ^1H -chemische Verschiebung), UDP-GalNAc (5,55 ppm ^1H -chemische Verschiebung), UDP-GlcNAc (5,52 ppm ^1H -chemische Verschiebung) sowie das H1/C1 von Glucose-1-phosphat (5,46 ppm ^1H -chemische Verschiebung) dargestellt. Um die Unterschiede in den Signalintensitäten deutlich zu machen, wurde das rote Spektrum um 2 ppm in F1 nach oben verschoben.

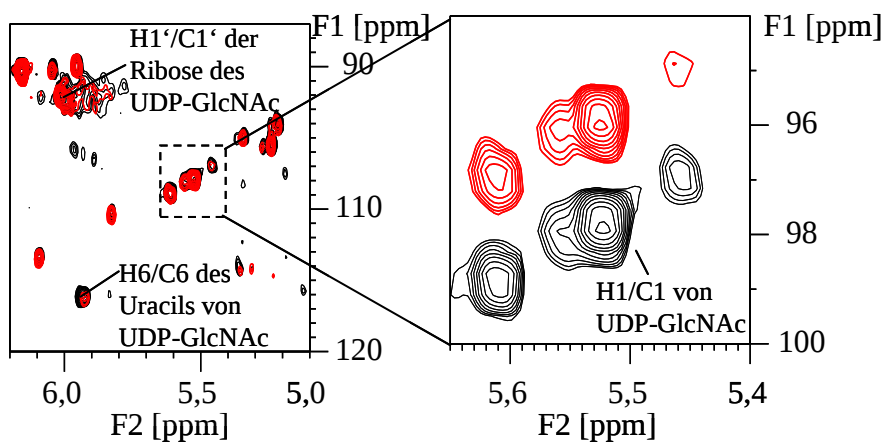


Abbildung 18: Ausschnitte von ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren von HT-22 Zellextrakten. Schwarz: Normale Inkubationsbedingungen; Rot: Zellen wurden 24 h mit 10 mM Natriumazid inkubiert; Links: Überblick über die anomere Region, Spektren wurden übereinandergelegt; Rechts: Vergrößerte Region, Spektren in F1 um 2 ppm gegeneinander verschoben. Fokus auf das anomere H1/C1 von UDP-GlcNAc; C1 von UDP-Glc: d=5,61 ppm, C1 von UDP-GalNAc: d=5,55 ppm, C1 von Glucose-1-phosphat: d=5,46 ppm (modifiziert aus Gallinger et al., 2011).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Signalintensität des H1/C1 von Glucose-1-phosphat geringer wurde. Ebenso nahm die Signalintensität des H1/C1 von UDP-Glc und UDP-GalNAc ab. Die Signalintensität des H1/C1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc zeigte unter Azideinfluss keine Veränderung.

Um die Signalintensität des H1 der GlcNAc-Einheit und der *N*-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc besser beurteilen zu können, wurden 1D- ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren aufgenommen. Diese zeigen, ebenso so wie die ^{13}C -gefilterten Protonenspektren, nur Signale von Protonen, die direkt an ein ^{13}C -Atom gebunden sind. Allerdings ließ sich bei den 1D- ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren die Messzeit bei gleichem Signal-zu-Rauschverhältnis um die Hälfte von 10 h auf 5 h verkürzen.

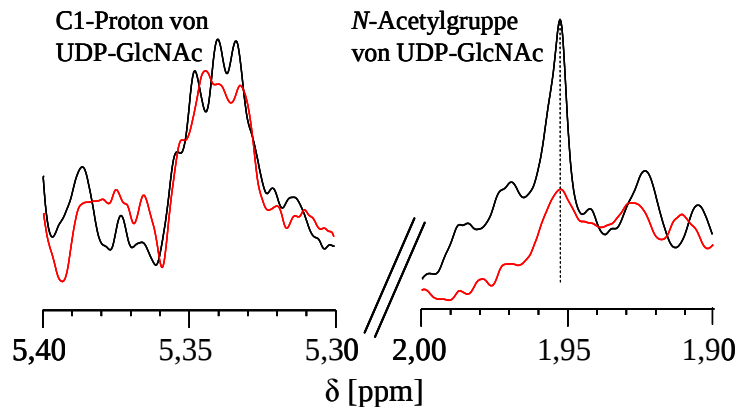


Abbildung 19: Ausschnitte aus 1D- ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren (ohne ^1H -Entkopplung) von HT-22 Zellextrakten, die die *N*-Acetylgruppe (links) und das H1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc von UDP-GlcNAc (rechts) zeigen. Aufgrund von großen Signalüberlappungen im jeweiligen Hochfeldbereich ist nur der Tieffeldanteil des jeweiligen Signals gezeigt. Schwarz: Normale Inkubationsbedingungen; Rot: Zellen wurden 24 h mit 10 mM Natriumazid inkubiert (modifiziert aus Gallinger et al., 2011).

In Abbildung 19 sind sowohl das Signal des H1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc (links) als auch der *N*-Acetylgruppe (rechts) dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Signalintensität des H1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc durch die Inkubation mit Azid (rotes Spektrum) nicht beeinflusst wurde, während die ^{13}C -Markierung der *N*-Acetylgruppe stark abnahm.

3.1.5 Auswirkungen von Rotenon auf den Metabolismus der HT-22 Zellen bei 24-stündiger Inkubation

Für weiterführende Experimente wurden die HT-22 Zellen mit Rotenon inkubiert. Diese Inkubationsversuche sollten bestätigen, dass eine Inhibierung der Atmungskette dazu führte, dass sich die Signalintensität der *N*-Acetylgruppe des UDP-GlcNAc in ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren verringerten während sich die Signalintensität des H1/C1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc nicht veränderte. Dafür wurden die HT-22 Zellen, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, über 24 h mit Inkubationsmedium, dem 11 mM [$1\text{-}^{13}\text{C}$]-D-Glucose und 50 nM Rotenon zugesetzt worden waren, inkubiert. Während des Inkubationszeitraums wurden Mediumproben genommen, in denen anschließend NMR-spektroskopisch die Glucose- und Laktatkonzentrationen bestimmt wurden. In Abbildung 20 sind die Glucose- und Laktatkonzentrationen im Medium über den Inkubationszeitraum von 24 h dargestellt. Außerdem wurden die Glucose- und Laktatkonzentrationen im Medium von HT-22 Zellen, die nicht mit Rotenon inkubiert wurden, bestimmt. Wurden die Zellen ohne den Inhibitor inkubiert, sank die Glucosekonzentration im Medium von 10,7 mM auf 4,6 mM. Daraus ließ sich, zusammen

mit dem Proteingehalt der Zellen, eine Glucoseaufnahme von $1,31 \pm 0,16 \mu\text{mol Glucose/h/mg Protein}$ berechnen. Durch die Inkubation mit Rotenon wurde von den Zellen mehr Glucose aufgenommen, was durch die Glucosekonzentration im Medium deutlich wird, die von 10,4 mM auf 0,8 mM sank. Daraus ergab sich eine gesteigerte Glucoseaufnahme von $2,04 \pm 0,18 \mu\text{mol Glucose/h/mg Protein}$. Neben der Glucosekonzentration wurde auch die Laktatkonzentration im Inkubationsmedium beobachtet. Unter normalen Inkubationsbedingungen stieg die Laktatkonzentration von 0 mM auf 8,6 mM an. Dies entsprach einer Laktatabgaberate von $1,85 \pm 0,21 \mu\text{mol Laktat/h/mg Protein}$. Durch die Inkubation mit Rotenon erhöhte sich die Laktatabgabe der HT-22 Zellen auf $3,58 \pm 0,24 \mu\text{mol Laktat/h/mg Protein}$ und die Laktatkonzentration im Inkubationsmedium stieg von 0 mM auf 16,9 mM an.

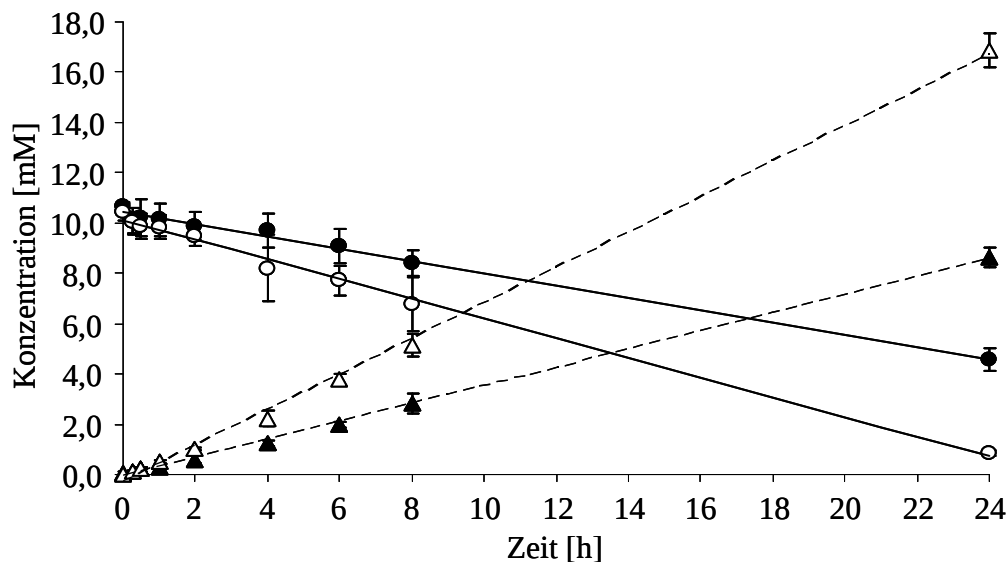


Abbildung 20: Glucose- und Laktatkonzentrationen im Medium der HT-22 Zellen während einer 24-stündigen Inkubation. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus einer Vierfachbestimmung. ● Glucosekonzentration unter normalen Bedingungen; ○ Glucosekonzentration während einer Inkubation mit 50 nM Rotenon; ▲ Laktatkonzentration unter normalen Bedingungen; △ Laktatkonzentration während einer Inkubation mit 50 nM Rotenon.

Die Auswirkungen von Rotenon auf die verschiedenen Metabolite der HT-22 Zellen sind in Abbildung 21 dargestellt. Dabei handelt es sich um Ausschnitte aus $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren von Extrakten der HT-22 Zellen, die ohne Rotenon (schwarzes Spektrum) oder zusammen mit 50 nM Rotenon (blaues Spektrum) inkubiert wurden. Dargestellt ist der Bereich zwischen 0,9 ppm und 3,0 ppm ^1H -chemischer Verschiebung. In diesem Bereich ist deutlich zu erkennen, dass die Metabolite des Citratzyklus, Citrat und Malat, sowie

Asparagin und Aspartat unter Einfluss von Rotenon von den Zellen nicht mehr gebildet wurden.

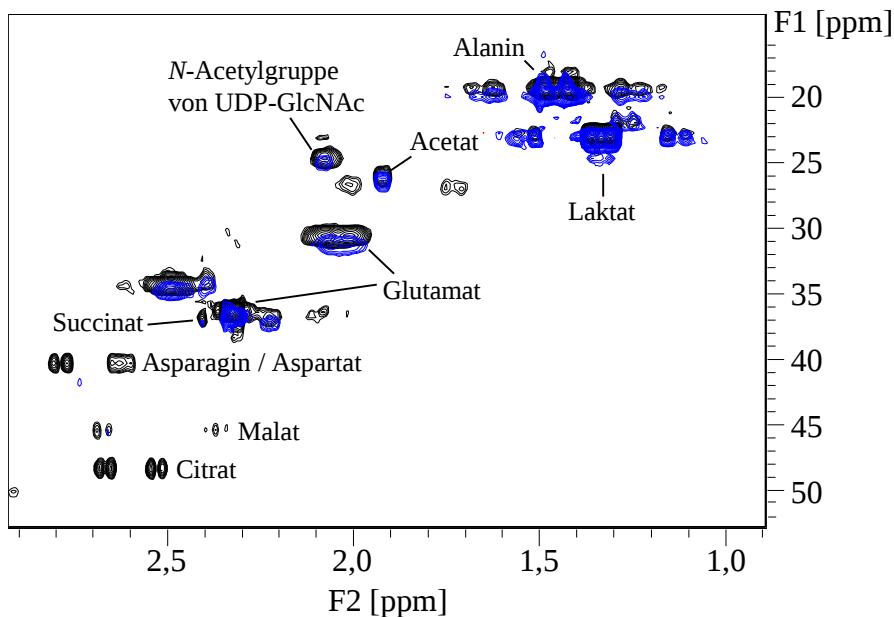


Abbildung 21: Ausschnitt aus $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren von HT-22 Zellextrakten. Schwarz: Normale Inkubationsbedingungen; Blau: Zellen wurden 24 h mit 50 nM Rotenon inkubiert; Spektren wurden übereinandergelegt.

Im Gegensatz dazu stieg die Intensität des Laktatsignals. Die Signalintensitäten des Glutamats, des Succinats und der *N*-Acetylgruppe des UDP-GlcNAc nahmen ab. Die Auswirkungen, die die Inkubation der HT-22 Zellen mit Rotenon auf UDP-GlcNAc hatte, sind in Abbildung 22 dargestellt. Im oberen Teil dieser Abbildung sind stark vergrößerte Ausschnitte aus $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren dargestellt. Links sind die anomeren Protonen der aktivierten Zucker UDP-Glc (5,61 ppm ^1H -chemische Verschiebung), UDP-GalNAc (5,55 ppm ^1H -chemische Verschiebung), UDP-GlcNAc (5,52 ppm ^1H -chemische Verschiebung) sowie das H1/C1 von Glucose-1-phosphat (5,46 ppm ^1H -chemische Verschiebung) dargestellt. Auf der rechten Seite ist das Signal der *N*-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc abgebildet. Um die beiden Spektren besser miteinander vergleichen zu können, wurde das NMR-Spektrum des Zellextrakt, der mit Rotenon behandelt worden war (blau), um 2 ppm in F1 nach oben verschoben. Dadurch wird deutlich, dass die Signalintensität der *N*-Acetylgruppe abnahm und die des H1/C1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc sich nicht veränderte. Darüber hinaus ist zu erkennen, dass die Signalintensität des H1/C1 des Glucose-1-phosphat abnahm, die des H1/C1 von UDP-GalNAc gleich blieb und die des H1/C1 von UDP-Glc zunahm.

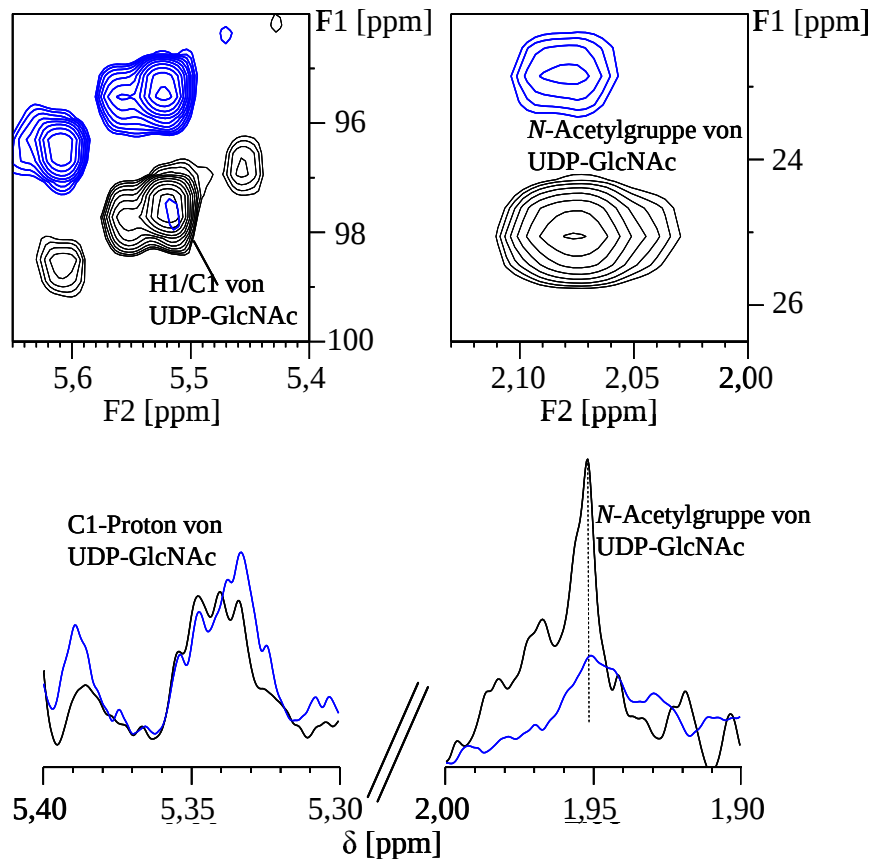


Abbildung 22: Ausschnitte von ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren (oben, Spektren in F1 um 2 ppm gegeneinander verschoben) und 1D- ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren (unten; ohne ^1H -Entkopplung; nur Tieffeldanteil der Signale dargestellt) von Zellextrakten die die *N*-Acetylgruppe (links) und das H1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc von UDP-GlcNAc (rechts) zeigen. Schwarz: Normale Inkubationsbedingungen; Blau: Zellen wurden mit 50 nM Rotenon inkubiert (modifiziert aus Gallinger et al., 2011).

Im unteren Teil von Abbildung 22 sind die 1D- ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren dieser Zellextrakte abgebildet. Der linke Teil zeigt das H1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc, der rechte die *N*-Acetylgruppe. Auch hier wird deutlich, dass das Signal des H1 durch eine Inkubation der HT-22 Zellen mit Rotenon nicht beeinflusst wurde, während die Intensität des Signals der *N*-Acetylgruppe stark reduziert wurde.

3.1.6 Verwendung der Methanol/Chloroform-Extraktion

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben ergeben, dass die Perchlorsäureextraktion dazu führt, dass aktivierte Zucker, wie UDP-Glc, UDP-Gal und zu einem geringen Teil auch UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc, zerfallen (Döpfens et al., unpublished). Um festzustellen, ob eine Perchlorsäureextraktion noch weitere Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Metabolite in Zellextrakten hat, wurden HT-22 Zellextrakte mit Hilfe der MeOH/ CHCl_3 -Extraktion hergestellt. Die Zellen wurden dafür 24 h mit $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose inkubiert und die Extraktion der Metabolite erfolgte wie in Kapitel 2.2.1.5 beschrieben.

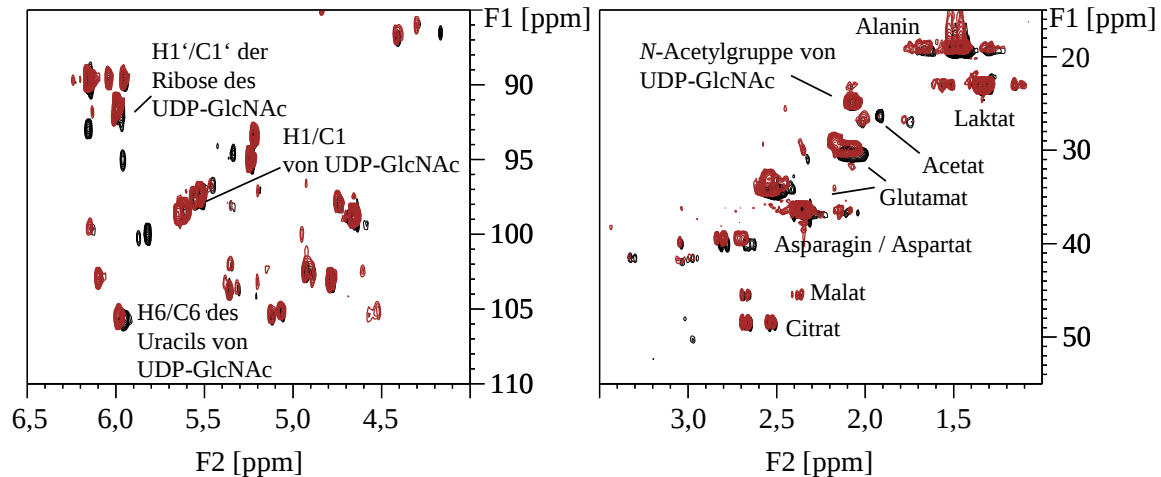


Abbildung 23: Ausschnitte aus ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren von HT-22 Zellextrakten. Für das schwarze Spektrum wurden die HT-22 Zellen 24 h mit $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose inkubiert und der Zellextrakt wurde anschließend durch eine Perchlorsäureextraktion hergestellt. Für das braune Spektrum wurden die HT-22 Zellen 24 h mit $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose inkubiert und der Zellextrakt anschließend durch eine $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ -Extraktion hergestellt.

Abbildung 23 zeigt Ausschnitte aus ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren von HT-22 Zellextrakten, die nach gleichen Inkubationsbedingungen entweder durch Perchlorsäureextraktion (schwarzes Spektrum) oder durch $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ -Extraktion (braunes Spektrum) hergestellt wurden. Vergleicht man diese NMR-Spektren miteinander, so stellt man fest, dass im Bereich von 4,0 ppm bis 6,5 ppm ^1H -chemischer Verschiebung im Spektrum des Zellextrakts, der durch $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ -Extraktion hergestellt wurde, insgesamt weniger Signale detektierbar waren. Allerdings konnte zusätzlich zu den H1/C1 der aktivierten Zucker UDP-Glc, UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc das H1/C1 von UDP-Gal bei 5,65 ppm ^1H -chemischer Verschiebung nachgewiesen werden. Im Bereich von 1,0 ppm bis 3,5 ppm ^1H -chemischer Verschiebung war das Signal von Acetat nicht mehr detektierbar und es war eine Tieffeldverschiebung der Signale von Asparagin und Aspartat zu beobachten. Alle übrigen Signale zeigten keine Veränderungen. Die $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ -Extraktion bot gegenüber der Perchlorsäureextraktion einige Vorteile. So musste während der Herstellung der Extrakte kein pH-Wert eingestellt werden. Dadurch kam es zu weniger Probenverlust. Außerdem war die Salzlast wesentlich geringer, was zu sehr geringen Halbwertsbreiten von unter 1 Hz in Protonenspektren führte. Außerdem konnte bei diesen Extrakten der 90° -Puls automatisch berechnet werden, wodurch eine bessere Reproduzierbarkeit der NMR-Spektren erreicht werden konnte. Daher wurde für alle weiteren Experimente die $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ -Extraktionsmethode verwendet.

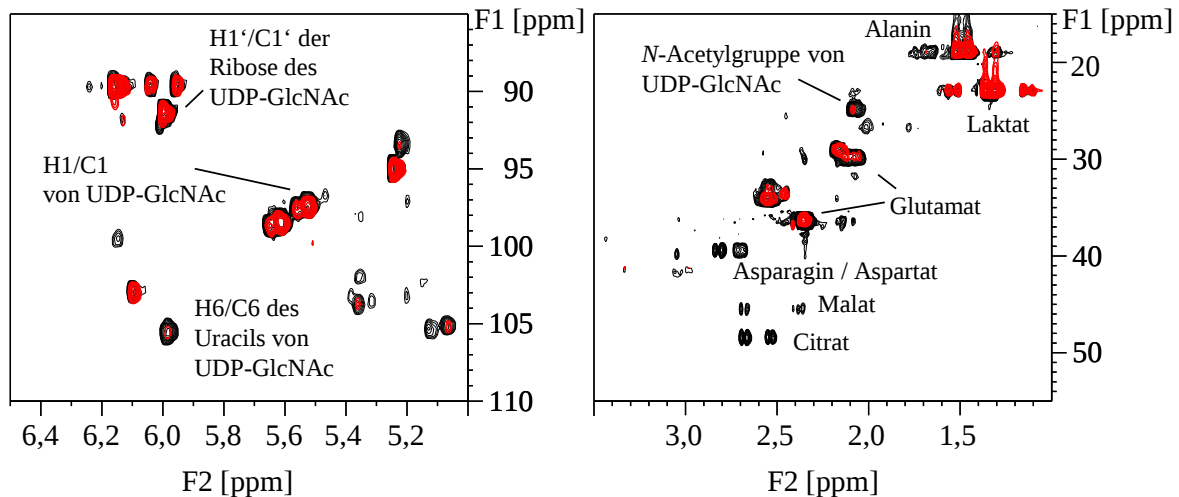


Abbildung 24: Ausschnitte aus $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren von HT-22 Zellextrakten, die mit Hilfe der MeOH/ CHCl_3 -Extraktion gewonnen wurden. Schwarz: HT-22 Zellen nach 24 h Wachstum bei normalen Inkubationsbedingungen; Rot: HT-22 Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit 10 mM Natriumazid.

Die Experimente zur Etablierung von UDP-GlcNAc als metabolischer Marker wurden unter Kapitel 3.1.4 und 3.1.5 beschrieben. Um die Reproduzierbarkeit dieser Experimente zu zeigen, wurden die 24-stündigen Inkubationen der HT-22 Zellen mit $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose und Azid oder Rotenon unter Anwendung der MeOH/ CHCl_3 -Extraktion wiederholt. Abbildung 24 zeigt Ausschnitte aus $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren von HT-22 Zellextrakten, die entweder nach Inkubation der Zellen mit Azid (rotes Spektrum) oder nach Inkubation ohne Inhibitor (schwarzes Spektrum) hergestellt wurden. Rechts ist der Bereich von 1,0 ppm bis 3,5 ppm ^1H -chemischer Verschiebung dargestellt. Er zeigt, dass nach einer Inkubation mit Azid die Signale von Asparagin, Aspartat, Malat und Citrat nicht mehr detektierbar waren. Außerdem wurden die Signalintensitäten von Glutamat und der *N*-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc geringer. Links ist unter anderem das H1/C1 der GlcNAc-Einheit von UDP-GlcNAc abgebildet. Die Intensität dieses Signals veränderte sich unter Azideinfluss nicht. In Abbildung 25 sind Ausschnitte aus $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren von Zellextrakten von HT-22 Zellen dargestellt, die 24 h entweder ohne Inhibitor (schwarzes Spektrum) oder mit Rotenon (blaues Spektrum) inkubiert wurden. Es sind die gleichen Bereiche wie in Abbildung 24 abgebildet.

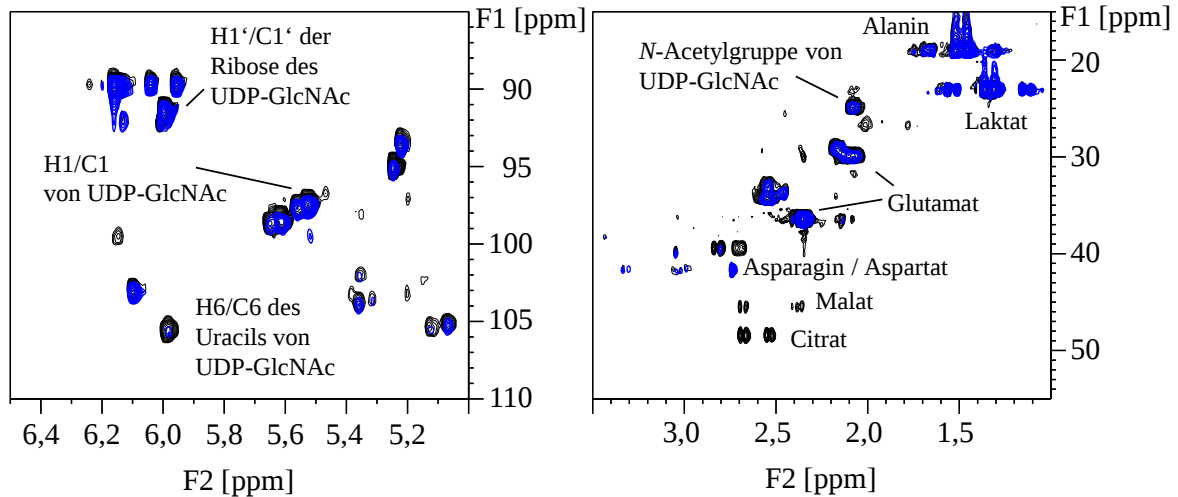


Abbildung 25: Ausschnitte aus ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren von Zellextrakten, die mit Hilfe der $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ -Extraktion gewonnen wurden. Schwarz: HT-22 Zellen nach 24 h Wachstum bei normalen Inkubationsbedingungen; Blau: HT-22 Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit 50 nM Rotenon

Wie auch bei der Inkubation mit Azid waren bei der Inkubation mit Rotenon die Signale von Asparagin, Aspartat, Malat und Citrat nicht mehr detektierbar. Außerdem wurden auch hier die Signalintensitäten von Glutamat und der *N*-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc geringer. Die Intensität des Signals des H1/C1 der GlcNAc-Einheit von UDP-GlcNAc veränderte sich unter Rotenoneinfluss nicht.

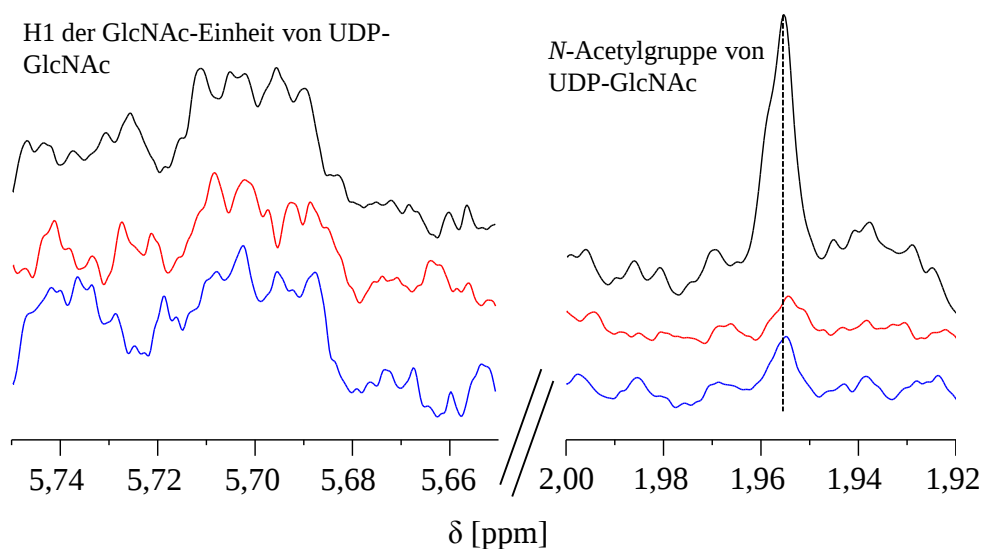


Abbildung 26: Ausschnitte aus $1\text{D-}^1\text{H}$, ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren (ohne ^1H -Entkopplung) von HT-22 Zellextrakten, die mit Hilfe der MeOH-CHCl_3 -Extraktion gewonnen wurden. Links: Bereich des H1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc (nur Hochfeldanteil des Signals dargestellt); Rechts: Bereich der *N*-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc (nur Tieffeldanteil des Signals dargestellt). Schwarz: HT-22 Zellen nach 24 h Wachstum bei normalen Inkubationsbedingungen; Rot: HT-22 Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit 10 mM Natriumazid; Blau: HT-22 Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit 50 nM Rotenon.

Für die bessere Vergleichbarkeit der Signalintensitäten des H1 und der *N*-Acetylgruppe der GlcNAc-Einheit von UDP-GlcNAc bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen, wurden 1D- ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren von HT-22 Zellextrakten aufgenommen. In Abbildung 26 sind Ausschnitte aus 1D- ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren von HT-22 Zellextrakten, die mit Hilfe der MeOH/ CHCl_3 -Extraktion gewonnen wurden, dargestellt. Für das schwarze Spektrum wurden die Zellen ohne Inhibitor, für das rote mit Azid und für das blaue mit Rotenon für 24 h inkubiert. Auf der linken Seite ist das H1 der GlcNAc-Einheit von UDP-GlcNAc dargestellt, dessen Signalintensität sich trotz Inhibitoren nicht veränderte. Rechts ist das Signal der *N*-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass dessen Signalintensität unter Einfluss der Inhibitoren stark abnahm.

3.1.6.1 Quantifizierung aktivierter Zucker bei Inkubation mit Natriumazid

Während der oben beschriebenen Inkubationsversuche wurden immer Kontrollen mitgeführt, bei denen die $[1-^{13}\text{C}]\text{-D-Glucose}$ durch unmarkierte Glucose ersetzt worden war. Durch die Bestimmung der Glucoseaufnahmerate und den Vergleich von ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren von Zellextrakten mit und ohne ^{13}C -Markierung konnte gezeigt werden, dass die $[1-^{13}\text{C}]\text{-D-Glucose}$ von den HT-22 Zellen verstoffwechselt wird. In den Protonenspektren von MeOH/ CHCl_3 -Extrakten von HT-22 Zellen, die mit nicht-markierter Glucose inkubiert wurden, konnte festgestellt werden, dass der Bereich der anomeren Protonen von aktivierten Zuckern von keinem anderen Signalen überlagert wurde. Daher konnten die Signale von UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc zugeordnet werden (Abbildung 27). Durch eben diese besondere Lage der Signale ist im Protonenspektrum eine Quantifizierung dieser Zucker möglich (Döpkins et al., unpublished).

Um die Konzentrationen der aktivierten Zucker in MeOH/ CHCl_3 -Extrakten zu bestimmen, wurden die in Kapitel 3.1.6 beschriebenen Inkubationen in Anwesenheit von Azid und unmarkierter Glucose wiederholt. Für die Quantifizierung der aktivierten Zucker UDP-Glc, UDP-Gal, UDP-GlcNAc und UDP-GalNAc wurden Protonenspektren aufgenommen. Diese Spektren wurden mit 4 k Durchgängen und mit einer Relaxationszeit von 1,5 s gemessen. Eine Verlängerung der Relaxationszeit, um vollständig relaxierte NMR-Spektren zu erhalten, hätte die Gesamtmesszeit zu stark verlängert. Die relativen Konzentrationen der aktivierten Zucker wurden durch Integration der Signale der anomeren Protonen im Verhältnis zum TSP-Signal bestimmt. Anschließend wurden die Werte auf die jeweilige Gesamtzellzahl normiert.

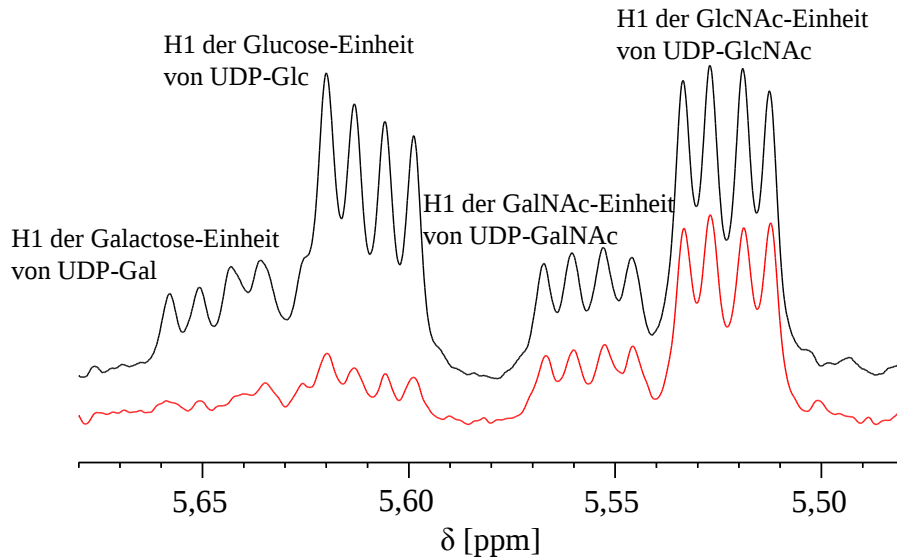


Abbildung 27: Ausschnitte aus Protonenspektren von HT-22 Zellextrakten, die mit unmarkierter Glucose inkubiert wurden. Schwarz: HT-22 Zellen nach 24 h Wachstum bei normalen Inkubationsbedingungen; Rot: HT-22 Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit 10 mM Natriumazid (Signalstärken nicht auf Zellzahl normiert).

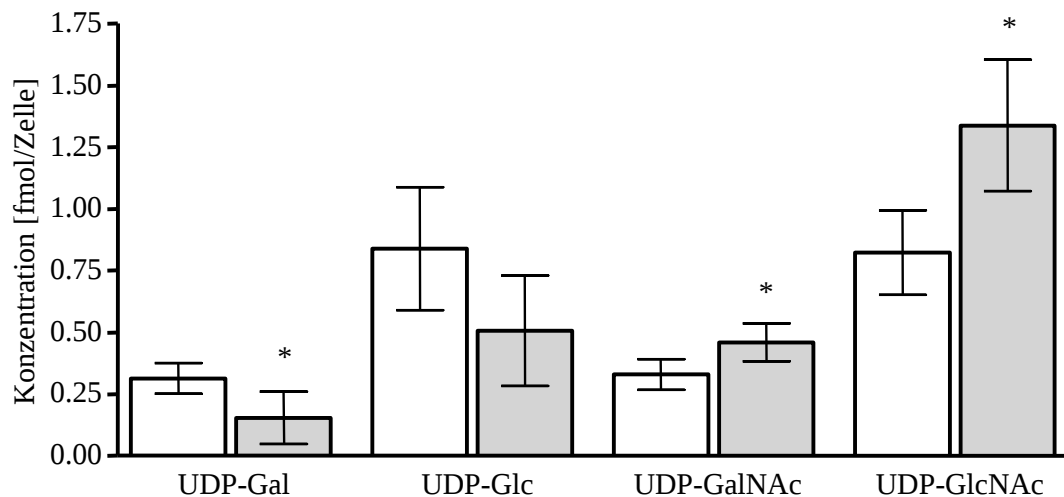


Abbildung 28: Durch Integration der H1-Signale bestimmte Konzentrationen von aktivierten Zuckern in HT-22 Zellen normiert auf die Zellzahl unter normalen Bedingungen (weiß) und unter Natriumazid-Einfluss (grau) mit Standardabweichungen; * = $p < 0,05$.

Da es sich nicht um vollständig relaxierte Spektren handelte, sind die in Abbildung 28 angegebenen Konzentrationen nur Richtwerte.

Die Inkubation mit Natriumazid wurde mit einer Stichprobengröße von $n = 6$ und für die Normalbedingungen mit $n = 5$ durchgeführt. Die statistische Analyse (Kapitel 2.2.1.6) ergab, dass die Konzentrationsänderungen unter Azideinfluss von UDP-Gal, UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc signifikant waren. Die Konzentration von UDP-Gal sank um 51,1 % und die Konzentrationen von UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc stiegen um 39,5 % bzw. 62,6 %.

Die Änderungen in der UDP-Glc-Konzentration waren nicht signifikant. Allerdings zeigte sich die Tendenz, dass UDP-Glc, wie auch UDP-Gal, in seiner Konzentration unter Azideinfluss abnahm. In den Protonenspektren (Abbildung 27) sind diese Änderungen in der Konzentration der aktivierten Zucker nicht direkt ablesbar, da hier die Signalintensitäten nicht auf die Zellzahl normiert werden konnten.

3.1.6.2 Quantifizierung aktivierter Zucker bei Inkubation mit Rotenon

Für die Inkubation mit Rotenon konnten keine Konzentrationen der aktivierten Zucker UDP-Gal, UDP-Glc, UDP-GalNAc und UDP-GlcNAc bestimmt werden, da nur in einem von drei Protonenspektren Signale der aktivierten Zucker gefunden werden konnten.

3.1.7 Inkubationsversuche mit HEK 293 Zellen zur Beobachtung der Auswirkung von Natriumazid auf deren Metabolismus

Zunächst wurde gezeigt, dass eine Inkubation der HEK 293 Zellen mit $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose dazu führte, dass Metabolite des Stoffwechsels eine ^{13}C -Markierung trugen. In Abbildung 29 sind Ausschnitte aus $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren von Zellextrakten der HEK 293 Zellen gezeigt.

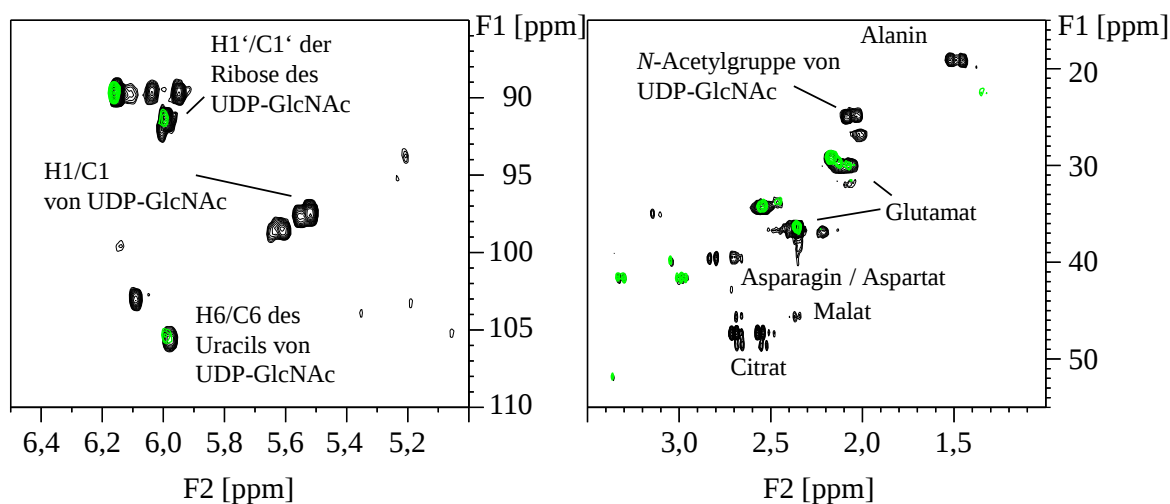


Abbildung 29: Ausschnitte aus $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren von HEK 293 Zellextrakten, die mit Hilfe der MeOH-CHCl_3 -Extraktion gewonnen wurden. Links: Bereich des H1/C1 des UDP-GlcNAc; Rechts: Bereich der N-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc. Schwarz: HEK 293 Zellen nach 24 h Wachstum bei normalen Inkubationsbedingungen mit $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose; Grün: HEK 293 Zellen nach 24 h Wachstum bei normalen Inkubationsbedingungen mit unmarkierter Glucose.

Für das grüne Spektrum wurden die HEK 293 Zellen für 24 h mit unmarkierter Glucose inkubiert, für das schwarze Spektrum wurden die Zellen über den gleichen Zeitraum mit

[1-¹³C]-D-Glucose inkubiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei einer Inkubation mit [1-¹³C]-D-Glucose mehr Signale in den ¹H,¹³C-HSQC-NMR-Spektren detektiert wurden. Durch den Vergleich dieser NMR-Spektren mit ¹H,¹³C-HSQC-NMR-Spektren von Referenzsubstanzen und mit Daten der Human Metabolome Database (Wishart et al., 2007) war es möglich die Signale der verschiedenen Metabolite zu identifizieren.

In den ¹H,¹³C-HSQC-NMR-Spektren der Extrakte von HEK 293 Zellen nach 24 h Wachstum bei normalen Inkubationsbedingungen mit unmarkierter Glucose konnte im Bereich von 1,0 ppm bis 3,5 ppm ¹H-chemischer Verschiebung nur Glutamat nachgewiesen und identifiziert werden. Im Bereich von 5,0 ppm bis 6,5 ppm ¹H-chemischer Verschiebung waren die Signale der H1'/C1' der Ribose und des H6/C6 des Uracil von UDP-GlcNAc, die mit den selben Signalen der übrigen aktivierten Zucker UDP-Gal, UDP-Glc und UDP-GalNAc überlagern, nachgewiesen worden.

Durch die Inkubation der HEK 293 Zellen mit [1-¹³C]-D-Glucose wurden durch die Inkorporation des ¹³C in verschiedene Metabolite insgesamt mehr Signale in den ¹H,¹³C-HSQC-NMR-Spektren detektiert als bei einer Inkubation der Zellen mit unmarkierter Glucose. Diese detektierten Signale unterschieden sich von denen, die bei Extrakten der HT-22 Zellen gefunden wurden. So war es bei den ¹H,¹³C-HSQC-NMR-Spektren von HEK 293 Extrakten nicht möglich Signale von Laktat oder Acetat zu detektieren. Allerdings wurde ein Metabolit bei 2,6 ppm und 2,55 ppm ¹H-chemischer Verschiebung und 47 ppm ¹³C-chemischer Verschiebung gefunden, der in den ¹H,¹³C-HSQC-NMR-Spektren von HT-22 Extrakten nicht vorkommt und mit Hilfe der Human Metabolome Database nicht identifiziert werden konnte.

Zu den Signalen, die in den ¹H,¹³C-HSQC-NMR-Spektren sowohl von HEK 293 Extrakten als auch von HT-22 Extrakten vorkamen, zählten Alanin, Glutamat, Asparagin, Aspartat, Citrat, Malat, die *N*-Acetylgruppe und das H1 der GlcNAc-Einheit von UDP-GlcNAc. Außerdem konnten die anomeren Protonen der aktivierten Zucker UDP-Gal, UDP-Glc und UDP-GalNAc zugeordnet werden.

Um die Reproduzierbarkeit der Versuche zur Etablierung von UDP-GlcNAc als metabolischer Marker zu zeigen, wurden die in Kapitel 3.1.6 beschriebenen Experimente mit der HEK 293 Zelllinie unter Verwendung der MeOH/CHCl₃-Extraktionsmethode wiederholt. Dafür wurden die HEK 293 Zellen für 24 h mit [1-¹³C]-D-Glucose entweder ohne oder mit 10 mM Natriumazid inkubiert und anschließend Zellextrakte hergestellt. Über

den Inkubationszeitraum wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Mediumproben genommen, in denen NMR-spektroskopisch die Glucose- und Laktatkonzentration bestimmt wurde. Da bei der MeOH/CHCl₃-Extraktion kein Proteinpellet wie bei der Perchlorsäureextraktion entsteht, wurde die Glucoseaufnahme- oder Laktatabgaberate auf die Zellzahl normiert.

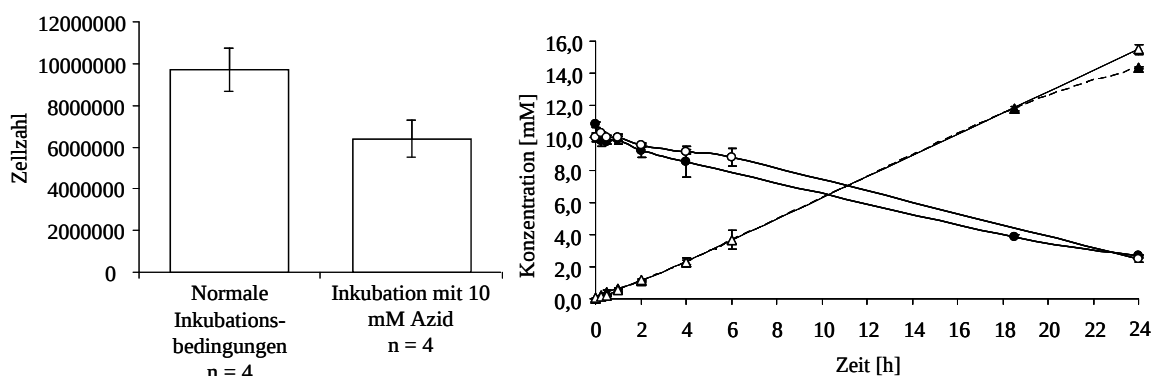


Abbildung 30: Zellzahlen sowie Glucose- und Laktatkonzentrationen im Inkubationsmedium der HEK 293 Zellen. Links: Vergleich der Zellzahlen bei normalen Inkubationsbedingungen und bei Inkubation mit 10 mM Azid; Rechts: Glucose- und Laktatkonzentrationen im Medium während einer 24-stündigen Inkubation. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus einer Vierfachbestimmung. ● Glucosekonzentration unter normalen Bedingungen; ○ Glucosekonzentration während einer Inkubation mit 10 mM Azid; ▲ Laktatkonzentration unter normalen Bedingungen; △ Laktatkonzentration während einer Inkubation mit 10 mM Azid.

Wie in Abbildung 30 links dargestellt, unterschieden sich die Zellzahlen zwischen Kontrolle und Inkubation mit Azid um das etwa 1,5-fache. Glucose- und Laktatkonzentrationen im Medium (Abbildung 30, rechts) zeigten zwischen den beiden Zuständen nur geringe Unterschiede. Ohne Einfluss von Azid sank die Glucosekonzentration im Medium innerhalb von 24 h von 10,8 mM auf 2,7 mM und die Laktatkonzentration stieg von 0 mM auf 14,4 mM. Wurden die HEK 293 Zellen mit 10 mM Azid inkubiert, sank die Glucosekonzentration von 10 mM auf 2,5 mM und die Laktatkonzentration stieg von 0 mM auf 15,5 mM. Auf die Zellzahl normiert ergab sich eine Glucoseaufnahme von $0,35 \pm 0,04$ fmol Glucose/h/Zelle, die unter Einfluss von Natriumazid auf $0,5 \pm 0,04$ fmol Glucose/h/Zelle stieg. Die Laktatabgaberate stieg von $0,62 \pm 0,07$ fmol Laktat/h/Zelle auf $1,02 \pm 0,13$ fmol Glucose/h/Zelle.

Die Veränderungen in den ¹H,¹³C-HSQC-NMR-Spektren, die durch die Inkubation mit Natriumazid entstanden, sind in Abbildung 31 dargestellt. Die detektierten Unterschiede in den Signalen entsprachen denen, die bei den HT-22 Zellen festgestellt werden konnten. Die Signale von Asparagin, Aspartat, Citrat und Malat ließen sich nicht mehr nachweisen und die Signalintensitäten von Alanin und Glutamat wurden kleiner.

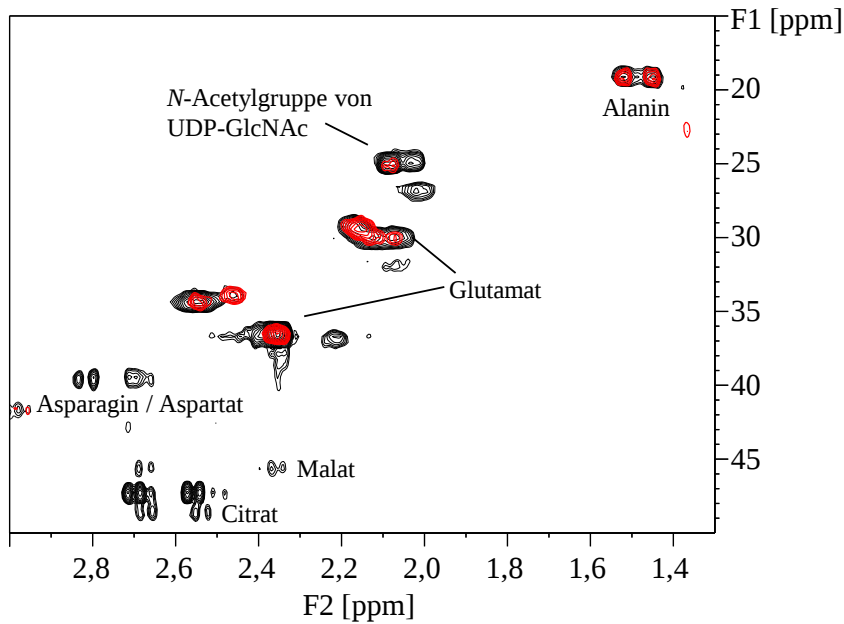


Abbildung 31: Ausschnitte aus $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren von HEK 293 Zellextrakten. Schwarz: HEK 293 Zellen nach 24 h Wachstum bei normalen Inkubationsbedingungen mit $[1-^{13}\text{C}]\text{-D-Glucose}$; Rot: HEK 293 Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit 10 mM Natriumazid und $[1-^{13}\text{C}]\text{-D-Glucose}$; Spektren wurden übereinandergelegt

Die Auswirkungen der Inkubation mit Natriumazid auf die Signale von UDP-GlcNAc sind in Abbildung 32 dargestellt.

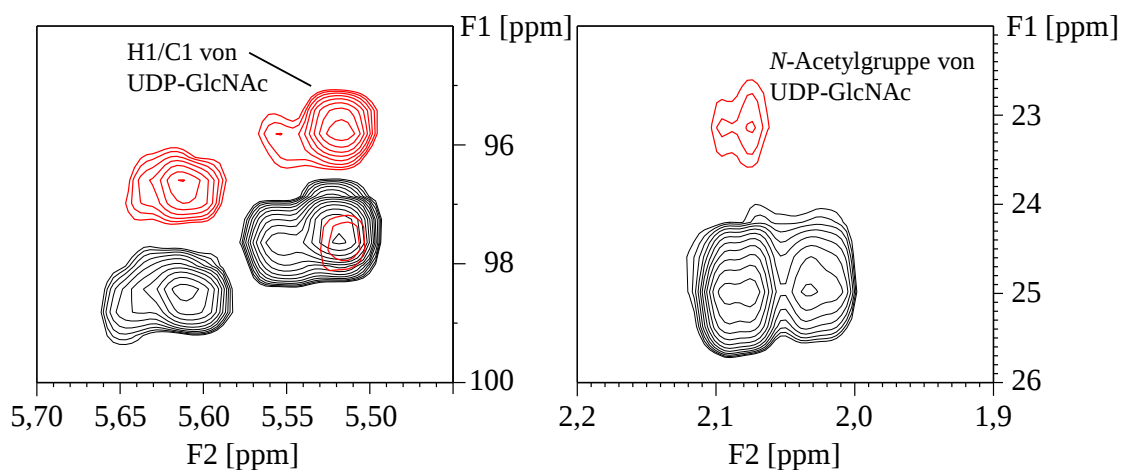


Abbildung 32: Vergrößerte Ausschnitte aus $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren von HEK 293 Zellextrakten aus Abbildung 31. Schwarz: Normale Inkubationsbedingungen; Rot: HEK 293 Zellen wurden mit 10 mM Natriumazid inkubiert; Spektren wurden in F1 um 2 ppm verschoben.

Der linke Ausschnitt der $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren im Bereich von 5,45 ppm bis 5,70 ppm ^1H -chemischer Verschiebung zeigt die anomeren Protonen der aktivierten Zucker UDP-Gal (5,65 ppm ^1H -chemische Verschiebung), UDP-Glc (5,61 ppm ^1H -chemische Verschiebung), UDP-GalNAc (5,55 ppm ^1H -chemische Verschiebung) und UDP-GlcNAc

(5,52 ppm ^1H -chemische Verschiebung). Das schwarze ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum zeigt den Extrakt von HEK 293 Zellen unter normalen Inkubationsbedingungen und das rote Spektrum zeigt den Extrakt von HEK 293 Zellen, die mit 10 mM Natriumazid inkubiert wurden. Durch die Inkubation mit Natriumazid verminderte sich die Signalintensität des H1/C1 von UDP-Gal und UDP-GalNAc, während die Signalintensität von UDP-Glc und UDP-GlcNAc nicht beeinflusst wurden. Abbildung 32, rechts zeigt das Signal der *N*-Acetylgruppe des UDP-GlcNAc bei 2,08 ppm ^1H -chemischer Verschiebung. Die Intensität dieses Signals nahm durch die Inkubation mit Natriumazid ab.

Da bei 2D- ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR Spektren eine Quantifizierung nur sehr schwer möglich ist, wurden 1D- ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren von den Extrakten der HEK 293 Zellen, die ohne und mit Natriumazid inkubiert worden waren, aufgenommen. Es konnte gezeigt werden, dass die Signalintensität der *N*-Acetylgruppe unter Azideinfluss auf ein Minimum reduziert wurde (Abbildung 33, rechts), während die Intensität des H1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc nicht beeinflusst wurde (Abbildung 33, links). Allerdings konnte nur bei einem von drei Extrakten der HEK 293 Zellen, die mit Azid inkubiert worden waren, überhaupt das Signal des H1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc gefunden werden.

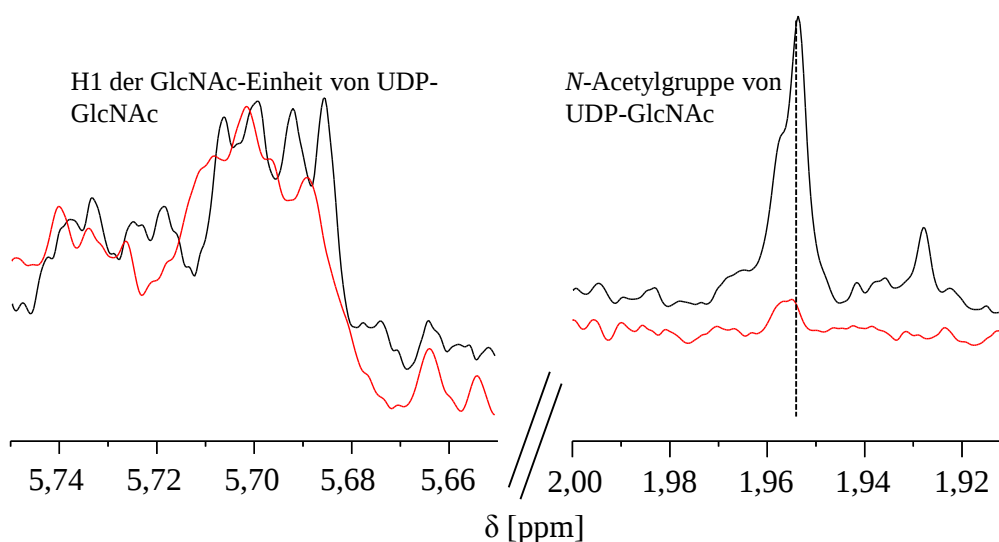


Abbildung 33: Ausschnitte aus 1D- ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren (ohne ^1H -Entkopplung) von HEK 293 Zellextrakten, die mit Hilfe der MeOH- CHCl_3 -Extraktion gewonnen wurden. Links: Bereich des H1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc (nur Hochfeldanteil des Signals dargestellt); Rechts: Bereich der *N*-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc (nur Tieffeldanteil des Signals dargestellt). Schwarz: 24 h Inkubation unter normalen Inkubationsbedingungen; Rot: HEK 293 Zellen wurden 24 h mit 10 mM Natriumazid inkubiert

Um zu klären, ob die verminderte Signalintensität der *N*-Acetylgruppe und die Tatsache, dass nur bei einem von drei Extrakten das H1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc gefunden wurden, auf die verminderte Zellzahl bei Inkubation mit Natriumazid

zurückzuführen war, wurden Zellextrakte der HEK 293 Zellen hergestellt, bei denen die Zellen mit 10 mM Natriumazid, aber ohne ^{13}C -Markierung inkubiert wurden. Von diesen mit Hilfe der $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ -Extraktion hergestellten Zellextrakten wurden Protonenspektren aufgenommen und die aktivierten Zucker quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt.

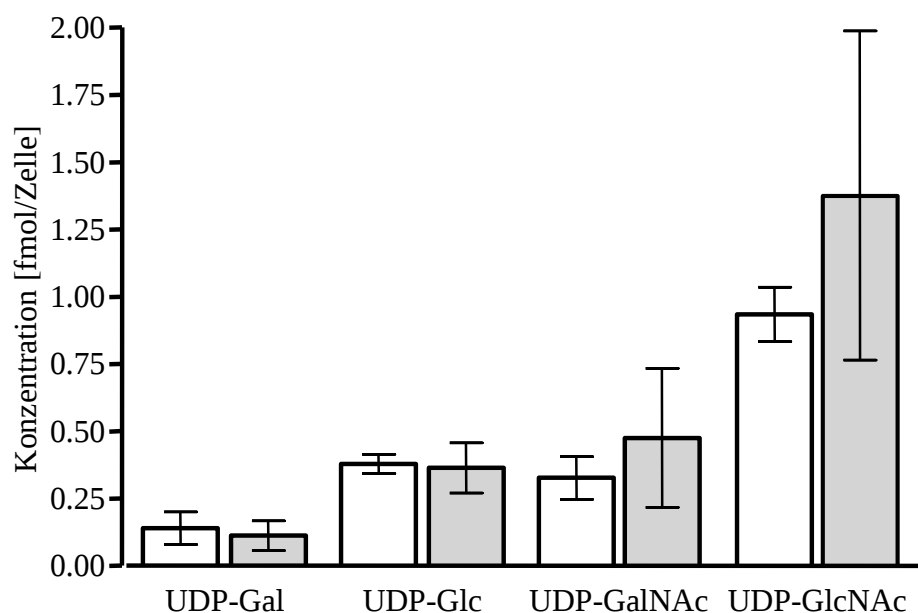


Abbildung 34: Konzentrationen von aktivierten Zuckern unter normalen Bedingungen (weiß) und unter Natriumazid-Einfluss (grau) von HEK 293 Zellen.

Es konnte festgestellt werden, dass, bei einer Stichprobenzahl von $n = 6$ und normalen Inkubationsbedingungen, die Konzentration von UDP-Glc etwa 2,7 mal größer war als die von UDP-Gal und die UDP-GlcNAc Konzentration etwa 2,9 mal größer war als die UDP-GalNAc Konzentration. Die Inkubation der HEK 293 Zellen mit Natriumazid wurde ebenfalls mit einer Stichprobengröße von $n = 6$ durchgeführt. Nach einer statistischen Analyse (vergleiche Kapitel 2.2.1.6) konnten keine signifikanten Änderungen der Konzentrationen der aktivierten Zucker unter Azideinfluss festgestellt werden. So kann lediglich festgehalten werden, dass diese weiterhin unter Azideinfluss gebildet werden. Daraus kann man schließen, dass die Abnahme der Signalintensität der *N*-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc in den $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren und den $1\text{D-}^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren auf eine Änderung im ^{13}C -Markierungsmuster zurückzuführen waren.

3.2 Untersuchung des O-GlcNAcylierungsmusters von Tau-K32-wt

Bisher konnten O-GlcNAcylierungen von Proteinen, im Gegensatz zu N-Acetylierungen und Phosphorylierungen (Landrieu et al., 2006; Liokatis et al., 2010) noch nicht NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. In dieser Arbeit sollte die O-GlcNAcylierung des Tau-K32-wt Proteins NMR-spektroskopisch untersucht werden. Bei diesem Protein handelt es sich um ein Fragment des Tau Proteins, welches die Aminosäuren von Ser 198 bis Ser 400 umfasst (Trinczek et al., 1995), und 21,5 kDa groß ist. Es sollte mit Hilfe von funktionalem Zellextrakt (Kapitel 2.3.5.1) von HT-22 und HEK 293 Zellen O-GlcNAcyliert werden. Bei dieser Art der Extrakte bleiben bei der Lyse der Zellen die Proteine und somit die O-GlcNAc-Transferase intakt, wodurch sie dafür genutzt werden kann dem Extrakt zugesetzte Proteine zu O-GlcNAcylieren. Bevor aber die NMR-spektroskopischen Experimente durchgeführt werden konnten, mussten protein-biochemische Methoden etabliert werden, mit deren Hilfe das Tau-K32-wt-Protein in funktionalem Zellextrakt nachgewiesen und eine O-GlcNAcylierung dargestellt werden sollte. Mit Hilfe dieser protein-biochemischen Methoden sollten die Ergebnisse, die NMR-spektroskopisch erzielt wurden, verifiziert werden.

3.2.1 Etablierung des protein-biochemischen Nachweises der O-GlcNAcylierung von Tau-K32-wt

Für die Etablierung des protein-biochemischen Nachweises der O-GlcNAcylierungen von Tau-K32-wt wurden Western Blots verwendet. Dabei wurde Tau-K32-wt mit Hilfe des polyklonalen K9JA-anti-Tau-Antikörpers und die mögliche O-GlcNAcylierung mit dem Lektin WGA oder mit monoklonalen anti-O-GlcNAc-Antikörpern nachgewiesen.

3.2.1.1 SDS-PAGE und Western Blot von Tau-K32-wt

Für den Nachweis von Tau-K32-wt im Western Blot wurde zunächst eine SDS-Gelelektrophorese des Proteins sowie von funktionalem Zellextrakt der HT-22 Zellen als Kontrolle auf einem 12%igem SDS-Gel durchgeführt und anschließend wurden die Proteine, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, auf eine Membran transferiert. In Abbildung 35 ist der mit polyklonalem K9JA-anti-Tau-Antikörper inkubierte und entwickelte Western Blot abgebildet. Es wird deutlich, dass der Nachweis des Tau-K32-wt sehr sensitiv war, da alle aufgetragenen Konzentrationen von 100 ng bis 1000 ng des 21,5 kDa großen Tau-K32-wt

Proteins detektiert werden konnten. Außerdem ließ sich feststellen, dass im funktionalen Zellextrakt der HT-22 Zellen keine Proteine enthalten waren, die vom polyklonalen K9JA-anti-Tau-Antikörper erkannt wurden (Spuren 8 und 9). Zusätzlich wurde auch nachgewiesen (Spur 10), dass eine Detektion des zum Zellextrakt zugesetzten Tau-K32-wt möglich war.

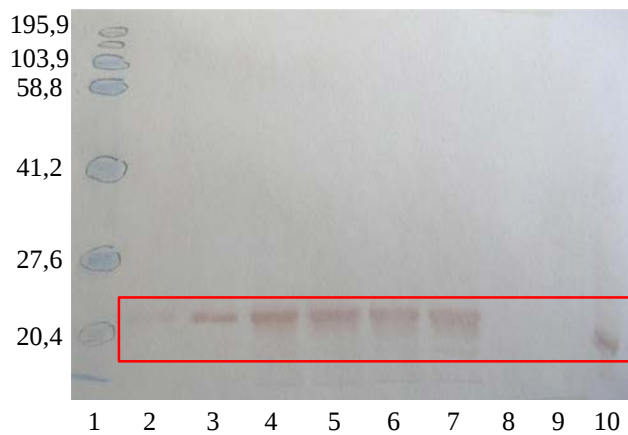


Abbildung 35: Nachweis von Tau-K32-wt im Western Blot. 1: Prestained SDS-PAGE Standards, broad range #161-0318 BioRad, Angabe der Größe der Markerproteine in kDa; 2: 100 ng Tau-K32-wt; 3: 200 ng Tau-K32-wt; 4: 400 ng Tau-K32-wt; 5: 600 ng Tau-K32-wt; 6: 800 ng Tau-K32-wt; 7: 1000 ng Tau-K32-wt; 8: HT-22 Zellextrakt, 1:10 verdünnt; 9: HT-22 Zellextrakt, 1:2 verdünnt; 10: HT-22 Zellextrakt 1:2 verdünnt + 200 ng Tau-K32-wt

3.2.1.2 Nachweis der O-GlcNAc-Transferase in Zellextrakt

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es möglich war Tau-K32-wt in funktionalem Zellextrakt zu detektieren, musste nachgewiesen werden, dass sich die funktionalen Zellextrakte von HT-22 und HEK 293 Zellen dafür eignen, Tau-K32-wt zu O-GlcNAcylieren. Dazu wurde über einen Western Blot mit polyklonalem anti-O-GlcNAc-Transferase Antikörper DM-17 bestimmt, ob OGT im Zellextrakt vorhanden war. Zunächst wurde mit funktionalem HT-22 Zellextrakt die benötigte Antikörperversdünnung des polyklonalen anti-O-GlcNAc-Transferase Antikörpers DM-17 bestimmt. Dieser bindet an die 110 kDa große Untereinheit der humanen und murinen OGT. Hierfür wurde der Zellextrakt über zwei 10%ige SDS-Polyacrylamid-Gele getrennt, auf eine Membran transferiert und diese anschließend mit verschiedenen Konzentrationen des DM-17 Antikörpers inkubiert und entwickelt. Wie in Abbildung 36 dargestellt, wurde der Antikörper in den Verdünnungen 1:600, 1:1200, 1:2400 und 1:4800 eingesetzt. Mit allen vier Verdünnungen konnte die Bindung des Antikörpers an die 110 kDa große Untereinheit der OGT nachgewiesen werden (Abbildung 36, roter Kasten). Außerdem wurde der

funktionale HT-22 Zellextrakt in absteigender Konzentration (Spur 2 bis 5) aufgetragen. Damit konnte gezeigt werden, dass der DM-17 Antikörper auch noch an stark verdünnten Zellextrakt und somit an geringe Mengen OGT band (vergleiche Abbildung 36, jeweils Spur 5). Die zu verwendende Verdünnung des Antikörpers wurde auf 1:4800 festgelegt, da beobachtet werden konnte, dass bei dieser Verdünnung des Antikörpers die unspezifischen Bindungen an Proteinbanden abnahmen, während die Bindung an die 110 kDa große Untereinheit der OGT bestehen blieb.

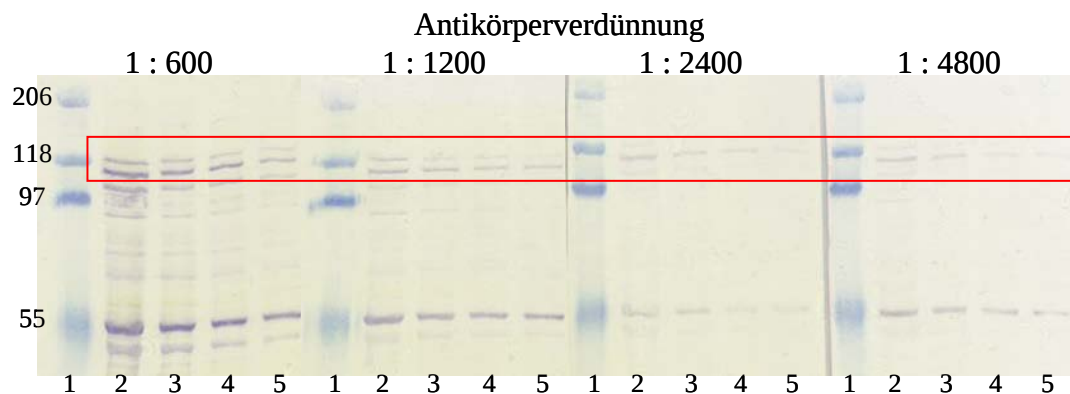


Abbildung 36: Western Blot von funktionalem HT-22 Zellextrakt (aus drei Kulturflaschen), über 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, bei verschiedenen anti-*O*-GlcNAc-Transferase Verdünnungen. Der rote Kasten zeigt die Bande der 110 kDa großen Untereinheit der OGT. Belegung: 1: Marker broad range prestained, Biorad (Angabe der Größen der Markerproteine in kDa); 2: funktionaler HT-22 Extrakt, unverdünnt; 3: funktionaler HT-22 Extrakt, 1:2 verdünnt; 4: funktionaler HT-22 Extrakt, 1:3 verdünnt; 5: funktionaler HT-22 Extrakt, 1:4 verdünnt.

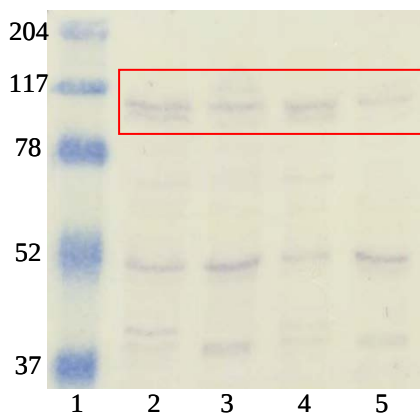


Abbildung 37: Nachweis der *O*-GlcNAc-Transferase. Über ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennte funktionale Zellextrakte (aus jeweils drei Kulturflaschen) von HT-22 und HEK 293 Zellen. Belegung: 1: Marker broad range prestained, Biorad (Angabe der Größen der Markerproteine in kDa); 2: funktionaler HEK 293 Extrakt; 3: funktionaler HT-22 Extrakt; 4: funktionaler HEK 293 Extrakt, 1:2 verdünnt; 5: funktionaler HT-22 Extrakt, 1:2 verdünnt.

Da auch bei hoher Verdünnung des Antikörpers (1:4800) Banden bei ca. 55 kDa detektiert wurden, war davon auszugehen, dass es sich hierbei um Fragmente der OGT handelte, die bei der Ultraschalllyse der HT-22 Zellen entstanden.

Nachdem die zu verwendende Antikörperverschüttung bestimmt worden war, wurden die funktionalen Zellextrakte der HEK 293 Zellen auf das Vorkommen der OGT getestet. Zusätzlich wurde der funktionale Zellextrakt der HT-22 Zellen als Kontrolle aufgetragen. Die Durchführung des Western Blots ist in Kapitel 2.3.4 beschrieben. Die Analyse der Extrakte ergab, dass die O-GlcNAc-Transferase sowohl in funktionalem HT-22 als auch HEK 293 Zellextrakt vorhanden war (Abbildung 37, roter Kasten) und sich somit die Extrakte dieser Zelllinien eignen, um Tau-K32-*wt* *in vitro* zu O-GlcNAcylieren.

3.2.1.3 Nachweis von O-GlcNAcylierungen von Tau-K32-*wt*

Eine mögliche O-GlcNAcylierung des Tau-K32-*wt*-Proteins sollte ebenfalls protein-biochemisch mit Hilfe des Western Blots nachgewiesen werden.

3.2.1.3.1 Nachweis mit Lektin WGA

Um die O-GlcNAcylierung des Tau-K32-*wt* nachzuweisen, wurde das Lektin WGA (*wheat germ agglutinin*) verwendet, welches an β -(1-4)-N-Acetylglucosamin in Glycoproteinen bindet. Das Protein Ovalbumin (OVA) wurde als Kontrollprotein verwendet, da es eine Glycosylierung trägt, an die WGA bindet. Als Negativkontrolle wurden BSA und Tau-K32-*wt*, welches in *E. coli* exprimiert wurde und somit nicht glycosyliert vorliegen sollte, verwendet.

Zunächst wurde über eine Konzentrationsreihe die zu verwendende Verdünnung des WGA ermittelt. Dafür wurden die Proteine OVA, BSA und Tau-K32-*wt*, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, über ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und anschließend auf Membranen transferiert. Diese Membranen wurden mit den WGA-Verdünnungen 1:1000, 1:3000, 1:6000 und 1:15000 (Abbildung 38 A bis D) inkubiert und anschließend entwickelt. Bei allen vier Verdünnungsstufen konnte OVA (Abbildung 38, Spur 2) als Positivkontrolle detektiert werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich BSA als Negativkontrolle eignet, da keine Bindung von WGA detektiert wurde (Abbildung 38, Spur 3). In Abbildung 38, Spur 4, ist Tau-K32-*wt* dargestellt. Bei allen vier Verdünnungsstufen des WGA zeigte es eine Bindung an Tau-K32-*wt*.

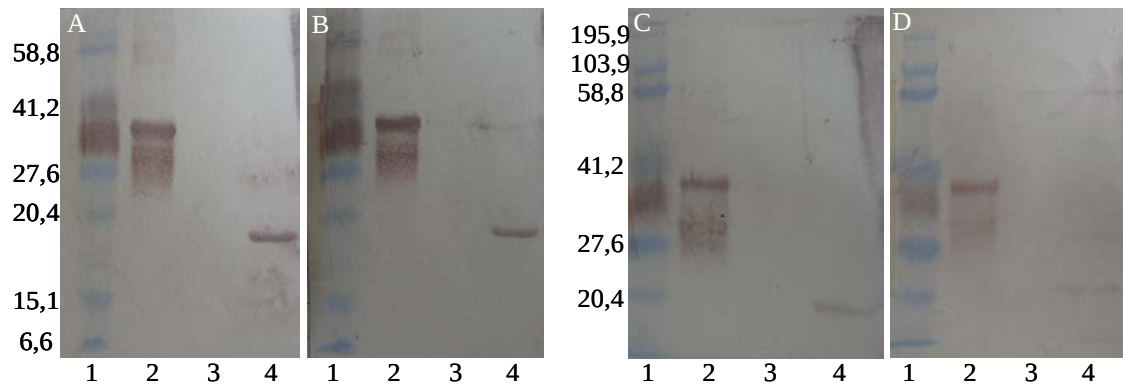


Abbildung 38: Western Blot zur Bestimmung der zu verwendenden WGA Konzentration. Über ein 12%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennte Proteine. A: 1:1000 Verdünnung; B: 1:3000 Verdünnung; C: 1:6000 Verdünnung; D: 1:15000 Verdünnung. Belegung: 1: Marker broad range prestained, Biorad (Angabe der Größen der Markerproteine in kDa); 2: 1,225 µg OVA; 3: 0,815 µg BSA; 4: 1 µg Tau-K32-wt.

Um auszuschließen, dass es sich bei der Bindung von WGA an Tau-K32-wt um eine unspezifische Bindung handelte, wurde der Western Blot mit einer WGA-Verdünnung von 1:20000 und verschiedenen Tau-K32-wt Konzentrationen wiederholt (Abbildung 39).

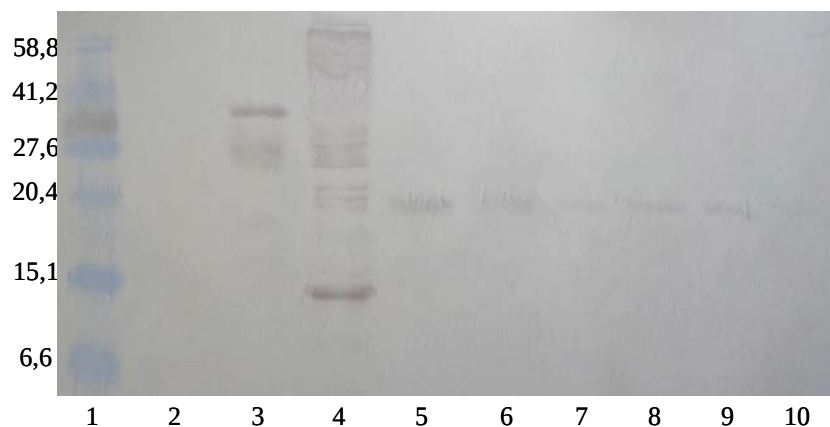


Abbildung 39: Detektion von Tau-K32-wt mittels WGA, Auftrennung der Proteine über ein 15%iges SDS-Polyacrylamid-Gel. Belegung: 1: Marker prestained broad range; 2: 0,815µg BSA; 3: 1,225µg OVA; 4: funktionaler HT-22 Zellextrakt; 5: 2µg Tau-K32-wt; 6: 1µg Tau-K32-wt; 7: 0,8µg Tau-K32-wt; 8: 0,6µg Tau-K32-wt; 9: 0,4µg Tau-K32-wt; 10: 0,2µg Tau-K32-wt.

Als Negativkontrolle wurde BSA verwendet (Abbildung 39, Spur 2). Als Positivkontrollen wurden OVA (Spur 3) und funktionaler HT-22 Zellextrakt (Spur 4) eingesetzt. Die Spuren 5 – 10 zeigen Tau-K32-wt in den Mengen 2 µg bis 0,2 µg. Bei diesem Experiment wurde Tau-K32-wt in jeder Konzentrationen von WGA gebunden. Aus diesem Grund wurde eine andere Methode zur Detektion der O-GlcNAcylierung des Tau-K32-wt Proteins gesucht.

3.2.1.3.2 Nachweis mit monoklonalen anti-O-GlcNAc Antikörpern

Da, wie unter Kapitel 3.2.1.3.1 beschrieben, das unbehandelte Tau-K32-wt-Protein von dem Lektin WGA gebunden wurde, wurden uns von der Arbeitsgruppe Gert-Jan Boons drei verschiedene monoklonale Antikörper gegen O-GlcNAcylierungen (Teo et al., 2010) zur Verfügung gestellt (Tabelle 1, Seite 27). Diese Antikörper wurden spezifisch gegen O-GlcNAcylierungen entwickelt und sollten daher nicht an unbehandeltes Tau-K32-wt binden. Diese Antikörper wurden als mAb #3, mAb #10 und mAb #14 bezeichnet. Außerdem sollten diese Antikörper weder an BSA, welches nicht glycosyliert ist, noch an OVA binden, da dieses Protein zwar glycosyliert ist, aber keine O-GlcNAcylierung trägt.

Die Experimente, mit welchen untersucht werden sollte, ob die monoklonalen anti-O-GlcNAc Antikörper an Tau-K32-wt binden, wurden mit OVA als Negativkontrolle, funktionalem HT-22 Zellextrakt als Positivkontrolle und zwei verschiedenen Antikörper-Verdünnungen durchgeführt. Abbildung 40 zeigt die verschiedenen Western Blots. Es ist deutlich zu erkennen, dass von allen drei Antikörpern (A-C) bei verschiedenen Verdünnungsstufen (1:250 und 1:750) Proteine des Zellextrakts (Spur 2) gebunden wurden. Die Negativkontrolle OVA (Spur 3) wurde unabhängig von der Antikörper-Verdünnung von keinem der drei Antikörper gebunden.

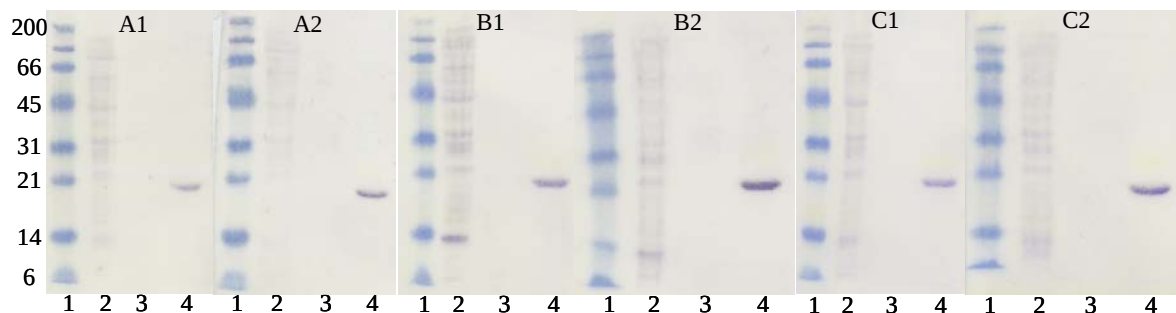


Abbildung 40: Detektion von Tau-K32-wt mittels monoklonaler anti-O-GlcNAc-Antikörper bei verschiedenen Antikörperverdünnungen (A1: mAb #3, 1:250 Verdünnung; A2: mAb #3, 1:750 Verdünnung; B1: mAb #10, 1:250 Verdünnung; B2: mAb #10, 1:750 Verdünnung; C1: mAb #14, 1:250 Verdünnung; C2: mAb #14, 1:750 Verdünnung), Auftrennung der Proteine über 12 %ige SDS-Polyacrylamid-Gele. Belegung: 1: Marker prestained, broad range; 2: funktionaler Zellextrakt aus HT-22 Zellen; 3: 1 µg OVA; 4: 1 µg Tau-K32-wt.

Das auf Spur 4 aufgetragene Tau-K32-wt, welches vorher in keiner Form behandelt wurde, wurde von allen drei monoklonalen anti-O-GlcNAc Antikörpern sowohl bei schwacher (1:250) als auch bei starker Verdünnung (1:750) gebunden.

3.2.2 O-GlcNAcylierungsversuche

Trotz der Schwierigkeiten eine O-GlcNAcylierung protein-biochemischen nachzuweisen, wurden O-GlcNAcylierungsversuche durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob eine O-GlcNAcylierung NMR-spektroskopisch nachweisbar ist.

3.2.2.1 Protein-biochemischer Nachweis einer O-GlcNAcylierung des Tau-K32-wt

Um eine O-GlcNAcylierung des Tau-K32-wt-Proteins mit der im funktionalen Zellextrakt der HT-22 Zellen enthaltenen OGT *in vitro* zu erreichen, wurden O-GlcNAcylierungsversuche, wie in Kapitel 2.3.5.2 beschrieben, durchgeführt. Die O-GlcNAcylierung sollte mit Hilfe des Lektins WGA detektiert werden. Da bekannt war, dass das Lektin bereits an nicht behandeltes Tau-K32-wt bindet, sollte bei einer vorliegenden O-GlcNAcylierung ein Anstieg in der Bandenfärbung beobachtet werden.

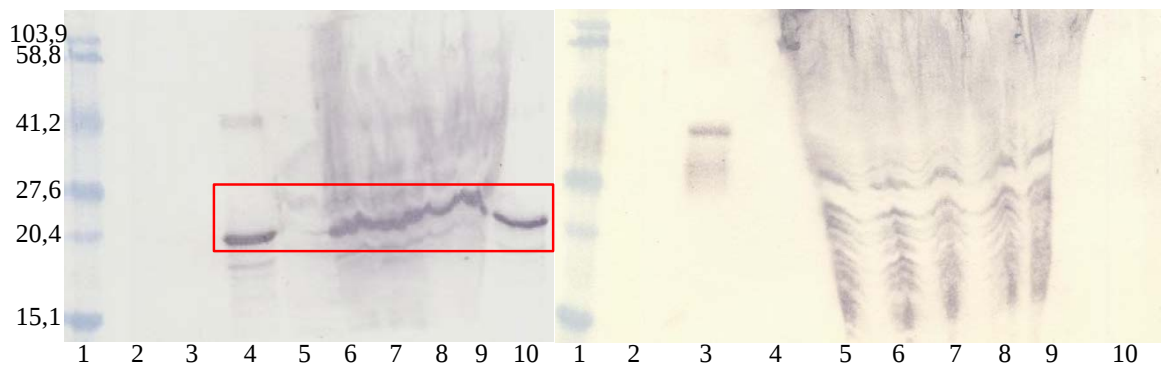


Abbildung 41: O-GlcNAcylierungsversuch des Tau-K32-wt Proteins mit funktionalem Zellextrakt der HT-22 Zellen. Die Proteine wurden über zwei 12 %ige SDS-Polyacrylamid-Gele aufgetrennt. Links: Detektion von Tau-K32-wt mit polyklonalem K9JA-anti-Tau-Antikörper; Rechts: Detektion von O-GlcNAcylierungen mit WGA. Belegung 1: Marker, prestained, broad range (Angabe der Größe der Markerproteine in kDa); 2: 0,815µg BSA; 3: 1,225µg OVA; 4: 1 µg Tau-K32-wt; 5: funktionaler HT-22 Zellextrakt, unverdünnt; 6: funktionaler HT-22 Zellextrakt mit 41,8 µg Tau-K32-wt im Inkubationsansatz, 10 Min Inkubation; 7: funktionaler HT-22 Zellextrakt mit 41,8 µg Tau-K32-wt im Inkubationsansatz, 1 h Inkubation; 8: funktionaler HT-22 Zellextrakt mit 20,9 µg Tau-K32-wt im Inkubationsansatz, 10 Min Inkubation; 9: funktionaler HT-22 Zellextrakt mit 20,9 µg Tau-K32-wt im Inkubationsansatz, 1 h Inkubation; 10: 0,5 µg Tau-K32-wt (Die Inkubationsansätze wurde so verdünnt, dass jeweils 1µg beziehungsweise 0,5 µg Tau-K32-wt auf das jeweilige Gel aufgetragen wurde).

Wie in Abbildung 41, links dargestellt, ließ sich Tau-K32-wt im Zellextrakt der HT-22 Zellen (roter Kasten) mit dem K9JA-anti-Tau-Antikörper detektieren. In Abbildung 41, rechts ist der Western Blot dargestellt, der mit WGA inkubiert wurde, um eine O-GlcNAcylierung von Tau-K32-wt nachzuweisen. Dies war der einzige Western Blot von Tau-K32-wt, bei welchem es nicht von WGA gebunden wurde (keine Bande in Spur 4, Abbildung 41, rechts). Dieses Ergebnis ließ sich nicht reproduzieren. Darüber hinaus war es

nicht möglich unter den verschiedenen Banden, die durch die Bindung an WGA an verschiedene Proteine des Zellextrakts dargestellt wurden, zu erkennen, bei welcher Bande es sich um Tau-K32-wt handelte. Daher war diese Methode zur Detektion einer O-GlcNAcylierung von Tau-K32-wt nicht anwendbar.

3.2.2.2 NMR-spektroskopischer Nachweis einer O-GlcNAcylierung des ^{15}N -Tau-K32-wt

Für den NMR-spektroskopischen Nachweis einer O-GlcNAcylierung des Tau-K32-wt-Proteins wurde vollständig ^{15}N -markiertes Tau-K32-wt verwendet. Von diesem Protein wurden ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren aufgenommen. Wenn eine O-GlcNAcylierung stattfindet, sollten sich die chemischen Verschiebungen der NH-Signale der O-GlcNAcylierten Aminosäure ändern. Das vollständige Spektrum von ^{15}N -Tau-K32-wt ist in Abbildung 42 dargestellt. Aufgrund seiner sehr flexiblen *random coil* Struktur ist die Zuordnung der Signale des Tau-Proteins sehr schwierig (Smet et al., 2004) und wurde hier nicht durchgeführt.

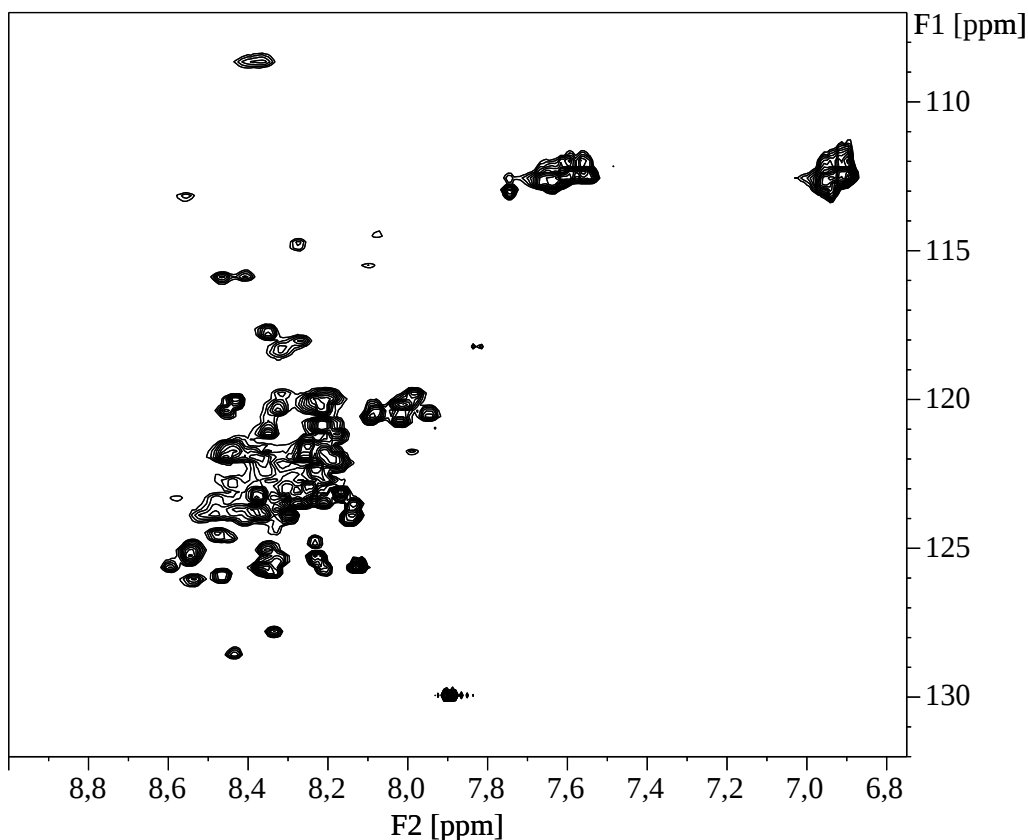


Abbildung 42: ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektrum von vollständig ^{15}N -markiertem Tau-K32-wt

Für den O-GlcNAcylierungsversuch wurde das Protein, wie in Kapitel 2.3.5.2 beschrieben, mit funktionalem HT-22 Zellextrakt vermischt. Die Inkubation fand direkt im NMR-Spektrometer statt. Dafür wurden zehn ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren mit einer Dauer von jeweils etwa 2 h aufgenommen. In Abbildung 43 sind drei dieser ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren abgebildet. Das schwarze Spektrum zeigt die Signale des vollständig ^{15}N -markierten Tau-K32-wt zu Beginn der Inkubation. In rot und blau sind die Zustände nach 10 h bzw. 20 h Inkubation mit funktionalem HT-22 Zellextrakt dargestellt.

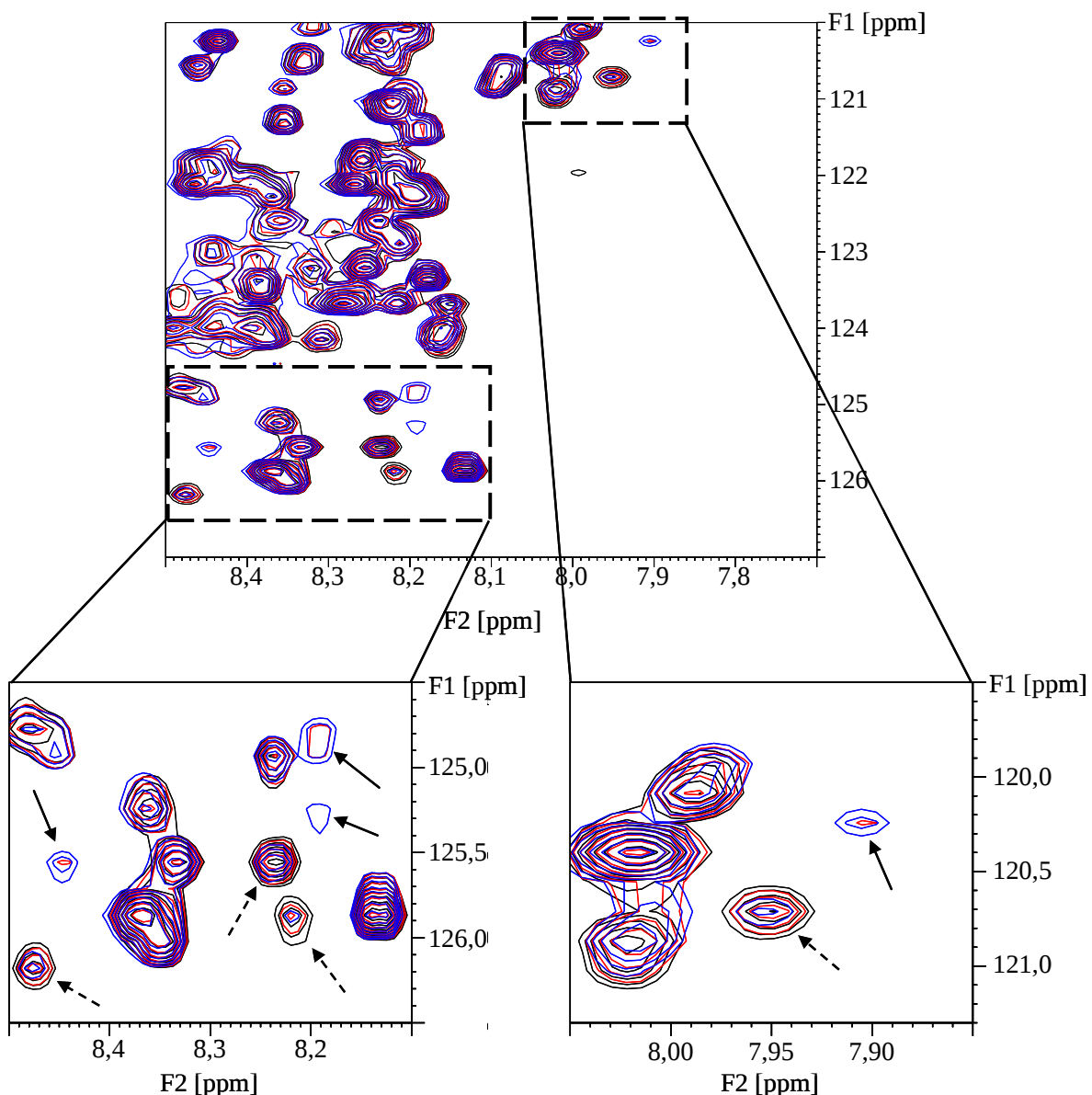


Abbildung 43: Ausschnitte aus ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren von vollständig ^{15}N -markiertem Tau-K32-wt, das durch funktionalen HT-22 Zellextrakt O-GlcNAcyliert werden sollte. Spektren, die zu verschiedenen Zeiten aufgenommen wurden, wurden übereinander gelegt. Schwarz: Vor Beginn der Inkubation; Rot: Nach 10 h Inkubation mit funktionalem HT-22 Zellextrakt; Blau: Nach 20 h Inkubation mit funktionalem HT-22 Zellextrakt. Oben: Überblick über die Veränderungen im Spektrum; Unten: Ausschnitte aus den Spektren, die die Veränderungen zeigen. Die durchgezogenen Pfeile weisen auf Signale, die neu entstehen und die gestrichelten Pfeile zeigen Signale, die über den Inkubationszeitraum hinweg abnehmen.

Durch den Vergleich dieser NMR-Spektren konnte beobachtet werden, dass nach etwa zehn Stunden Inkubation neue Signale in der Probe detektiert werden konnten, die dann bis zum Ende der Inkubation (nach 20 h) größer wurden. Andere Signale verloren über den Inkubationszeitraum an Intensität (vergleiche Abbildung 43, unten). Außerdem konnte beobachtet werden, dass die neu entstandenen Signale alle in einem Abstand von etwa 0,4 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und etwa 0,7 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung zu den Signalen, also einem $\Delta\delta = 0,8$ ppm, entstanden, die in ihrer Intensität abnahmen.

Da aber mit den protein-biochemischen Methoden keine O-GlcNAcylierung nachgewiesen werden konnte, gab es keinen Hinweis dafür, dass es sich bei den beobachteten neuen Signalen um O-GlcNAcylierte Aminosäuren handelte. Daher sollte untersucht werden, ob unbehandeltes Tau-K32-wt eine Glycosylierung trug.

3.2.3 De-GlcNAcylierung von Tau-K32-wt

Um eine O-GlcNAcylierung von Tau-K32-wt auszuschließen, wurden verschiedene Methoden verwendet, um eine mögliche O-GlcNAcylierung abzuspalten.

3.2.3.1 Enzymatische De-GlcNAcylierung mit Hilfe der β -1-2,3,4,6-N-Acetylglucosaminidase

Mit Hilfe der folgenden Experimente sollte eine mögliche O-GlcNAcylierung enzymatisch von Tau-K32-wt abgespalten werden. Beide verwendeten Methoden sind in Kapitel 2.3.6 beschrieben. Der Nachweis einer erfolgreichen De-GlcNAcylierung sollte mit Hilfe des Western Blots erbracht werden, bei dem die Banden des Tau-K32-wt, die durch die Bindung an WGA oder anti-O-GlcNAc Antikörper entstehen, an Intensität verlieren sollten.

Für die enzymatische De-GlcNAcylierung von Tau-K32-wt wurde die β -1-2,3,4,6-N-Acetylglucosaminidase verwendet. Dafür wurde Tau-K32-wt in Natriumphosphatpuffer, pH 5 mit β -1-2,3,4,6-N-Acetylglucosaminidase vermischt und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen. Diese Proben wurden auf zwei verschiedene Membranen geblottet. Eine Membran wurde mit WGA inkubiert, um zu beobachten, ob die Farbintensität der Tau-K32-wt Banden abnahm. Um zu kontrollieren, ob Tau-K32-wt während der De-GlcNAcylierung stabil blieb, wurde die zweite Membran mit anti-Tau-Antikörper inkubiert. Abbildung 44 zeigt beide Membranen. Links ist der Nachweis von Tau-K32-wt durch den polyklonalen K9JA-anti-Tau Antikörper dargestellt.

Die Bande bei 21 kDa zeigte keine Veränderung in ihrer Farbintensität und es traten keine Fragmente auf, die vom Antikörper erkannt wurden.

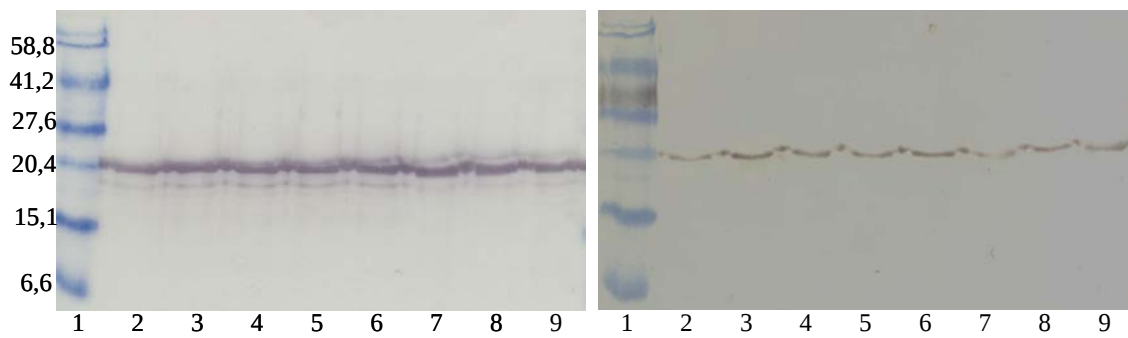


Abbildung 44: De-GlcNAcylierung von Tau-K32-wt mit β -1-2,3,4,6-*N*-Acetylglucosaminidase und Nachweis über Western Blot. Links: Nachweis von Tau-K32-wt durch polyklonalen K9JA-anti-Tau-Antikörper. Rechts: Nachweis einer O-GlcNAcylierung durch WGA. Belegung: 1: Marker, prestained, broad range (Angabe der Markerproteingrößen in kDa); 2: Tau-K32-wt in PBS pH 7,4; 3: Tau-K32-wt in Phosphatpuffer pH 5; 4: Tau-K32-wt nach 10 min Inkubation; 5: Tau-K32-wt nach 30 min Inkubation; 6: Tau-K32-wt nach 1 h Inkubation; 7: Tau-K32-wt nach 4 h Inkubation; 8: Tau-K32-wt nach 8 h Inkubation; 9: Tau-K32-wt nach 16 h Inkubation. (Es wurden immer 0,5 μ g Tau-K32-wt auf die 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gele aufgetragen)

Tau-K32-wt zerfiel während der De-GlcNAcylierung nicht. Abbildung 44, rechts zeigt die Membran, die mit WGA inkubiert wurde. Die Farbintensitäten der Tau-K32-wt Banden wiesen Schwankungen auf. Allerdings traten diese Änderungen nicht im Verlauf der Inkubationszeit auf, sodass davon ausgegangen werden musste, dass keine De-GlcNAcylierung stattgefunden hatte.

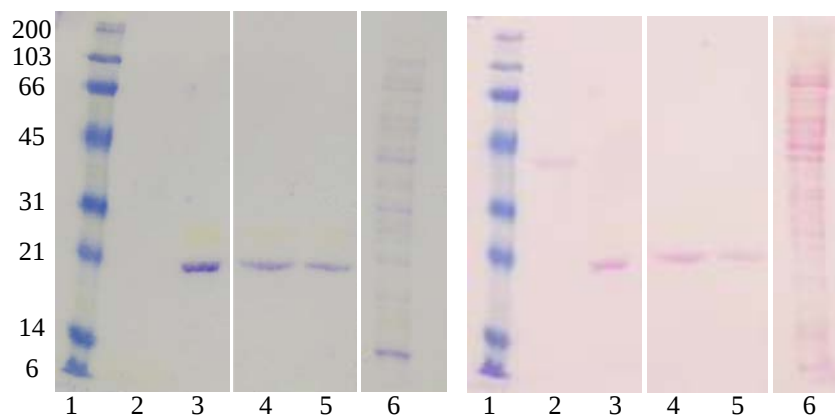


Abbildung 45: De-GlcNAcylierung von Tau-K32-wt mit β -1-2,3,4,6-*N*-Acetylglucosaminidase nach Zachara (Zachara, 2009) und Nachweis über Western Blot. Links: Nachweis einer O-GlcNAcylierung durch den monoklonalen anti-O-GlcNAc-Antikörper mAb #10. Rechts: Ponceau-S-Färbung des Western Blots. Belegung: 1: Marker, prestained, broad range (Angabe der Markerproteingrößen in kDa); 2: 1 μ g OVA; 3: 1 μ g Tau-K32-wt; 4: 1 μ g Tau-K32-wt nach 7 h Inkubation; 5: 1 μ g Tau-K32-wt nach 24 h Inkubation; 6: funktionaler HT-22 Zellextrakt.

In einem weiteren De-GlcNAcylierungsversuch von Tau-K32-wt wurde die Methode nach Zachara (Zachara, 2009) verwendet (vergleiche Kapitel 2.3.6). Für die Detektion der möglichen O-GlcNAcylierung wurden die monoklonalen anti-O-GlcNAc Antikörper verwendet. Während der Inkubation wurden Proben nach 4 h, 7 h und 24 h gewonnen, allerdings wurde die 4 h Probe zu lange aufgeköcht, sodass sie nicht verwendet werden konnte. Als Negativkontrolle für den Western Blot wurde OVA und als Positivkontrolle funktionaler HT-22 Zellextrakt verwendet. Für den Nachweis einer O-GlcNAcylierung wurden alle drei monoklonalen Antikörper verwendet, es wird in Abbildung 45 aber repräsentativ mAb #10 dargestellt. Dabei war zu erkennen, dass der Antikörper am stärksten an das unbehandelte Tau-K32-wt gebunden hatte (Spur 3). Nach 7 h bzw. 24 h Inkubation nahm die Bandenintensität ab (vergleiche Abbildung 45, Spur 4 und 5). Vor der Entwicklung des Western Blots wurde dieser mit Ponceau-S gefärbt. Dadurch werden unspezifisch alle Proteinbanden gefärbt. Auch diese Färbung des Blots zeigte, dass die Intensitäten der Banden des behandelten Tau-K32-wt geringer waren. Die Proteine des HT-22 Zellextrakts wurden durch den monoklonalen anti-O-GlcNAc-Antikörper gebunden, OVA hingegen nicht.

3.2.3.2 De-GlcNAcylierung durch β -Eliminierung

Bei der β -Eliminierung handelt es sich um eine Methode, mit der O-Glycane von Glycoproteinen abgespalten werden. Falls Tau-K32-wt eine Zuckerkette trug, sollte sie durch diese Methode abgespalten werden. Die Durchführung der β -Eliminierung wurde in Kapitel 2.3.7 beschrieben. Der Nachweis von Tau-K32-wt erfolgte im Western Blot mit dem polyklonalen K9JA-anti-Tau-Antikörper und der Nachweis einer O-GlcNAcylierung durch den monoklonalen anti-O-GlcNAc-Antikörper mAb #14. Als Positiv- und Negativkontrollen wurden funktionaler HT-22 Zellextrakt bzw. OVA verwendet. In Abbildung 46 sind beide Blots dargestellt. Links ist der Nachweis des Tau-K32-wt durch den anti-Tau Antikörper dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Protein durch die β -Eliminierung fragmentiert wurde (Spuren 5 und 7). In Abbildung 46 rechts ist der Western Blot zur Detektion einer O-GlcNAcylierung dargestellt. Es konnte beobachtet werden, dass der mAb #14 zunächst an das unbehandelte Tau-K32-wt bindet und nach der Inkubation nicht mehr. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass dieser Wegfall der Bindung durch die Fragmentierung des Proteins begründet war.

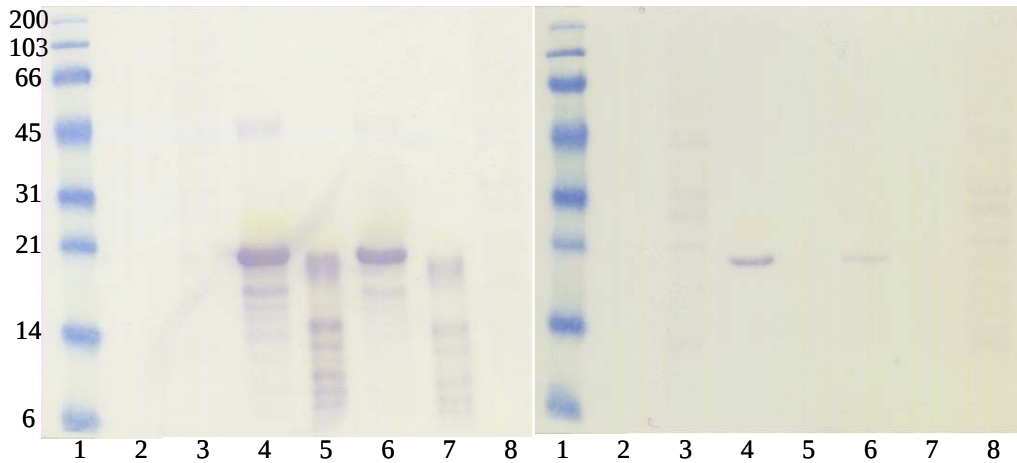


Abbildung 46: β -Eliminierung von Tau-K32-wt und Nachweis im Western Blot. Links: Nachweis von Tau-K32-wt durch ployklonalen K9JA-anti-Tau-Antikörper. Rechts: Nachweis einer O-GlcNAcylierung durch den monoklonalen anti O-GlcNAc-Antikörper mAb #14. Belegung: 1: Marker, prestained, broad range (Angabe der Markerproteingrößen in kDa); 2: 1 μ g OVA 3: funktionaler HT-22 Zellextrakt; 4: 1 μ g Tau-K32-wt, unbehandelt; 5: 1 μ g Tau-K32-wt nach β -Eliminierung; 6: 0,5 μ g Tau-K32-wt, unbehandelt; 7: 0,5 μ g Tau-K32-wt nach β -Eliminierung; 8: funktionaler HT-22 Zellextrakt.

Daher wurde von der nach der β -Eliminierung erhaltenen Probe (in DMSO) ein Protonen-NMR-Spektrum aufgenommen, um mögliche Zuckersignale zu detektieren. Abbildung 47 zeigt Ausschnitte aus diesem Protonenspektrum.

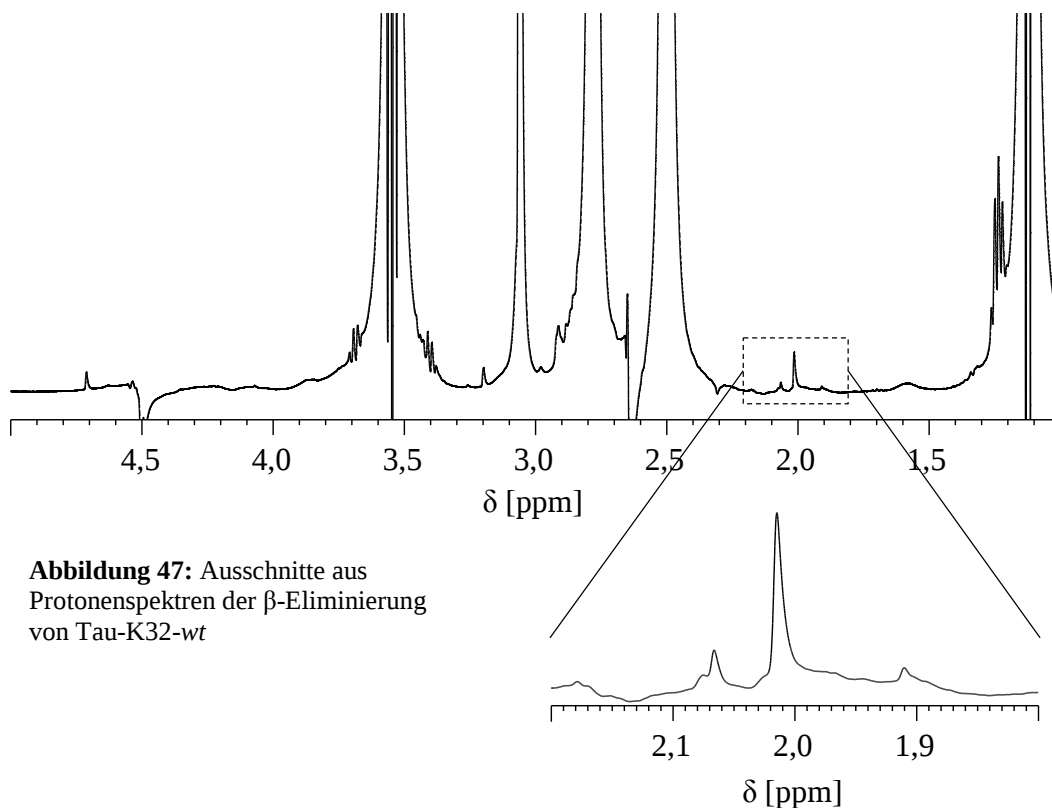


Abbildung 47: Ausschnitte aus Protonenspektren der β -Eliminierung von Tau-K32-wt

Im Bereich von 4,0 ppm bis 5,0 ppm wurden keine Hinweise auf anomere Protonen gefunden. Wenn durch die β -Eliminierung eine Glycosylierung oder O-GlcNAcylierung abgespalten worden war, dann müssten in der Probe GlcNAc oder GalNAc vorhanden sein. Deshalb wurde der aliphatische Bereich des Protonenspektrums vergrößert, um Hinweise auf die Signale der N-Acetylgruppen dieser Zucker zu suchen. Die beiden im Spektrum beobachteten Signale haben eine ^1H -chemische Verschiebung von 2,015 ppm bzw. 2,066 ppm. Die Signale der N-Acetylgruppen von GalNAc und GlcNAc haben eine ^1H -chemische Verschiebung von 2,058 ppm und 2,056 ppm. Da diese chemischen Verschiebungen nicht mit den Signalen in der Probe übereinstimmten und keine Signale von anomeren Protonen beobachtet werden konnten, konnte davon ausgegangen werden, dass keine Zucker in der Probe vorhanden waren.

3.3 O-GlcNAcylierungsversuche der CKII-Peptidderivate

Da es nicht möglich war, das Tau-K32-wt Protein als Testsystem zur NMR-spektroskopischen Identifizierung einer O-GlcNAcylierung zu etablieren, wurde ein neues Testsystem entwickelt. Dafür wurde das CKII-Peptid, ein 13 Aminosäuren langes Fragment der α -Untereinheit der Casein-Kinase II, als Substrat für eine O-GlcNAcylierung verwendet. Von diesem Peptid ist sowohl die Sequenz als auch die Tatsache bekannt, dass das Ser 8 *in vitro* O-GlcNAcyliert wird (Kreppel and Hart, 1999). Für den NMR-spektroskopischen und den protein-biochemischen Nachweis einer erfolgreichen O-GlcNAcylierung wurden zwei verschiedene Peptide mit der Sequenz P G G S T P V S S A N M M synthetisiert. Die Sequenzen beider Peptide, die im Institut für Organische Chemie, Fachbereich Chemie der Universität Hamburg synthetisiert wurden, sind in Tabelle 4 auf Seite 32 aufgeführt. Für die NMR-spektroskopischen Experimente wurde das als ^{15}N -Peptid bezeichnete Peptid verwendet, welches an Position 8 ein ^{15}N -markiertes Serin enthält. Um das Peptid protein-biochemisch nachweisen zu können, wurde das als Biotin-Peptid bezeichnete Peptid verwendet. N-terminal wurde dieses Peptid über PEG an ein Biotin gekoppelt.

3.3.1 Charakterisierung der Peptide

Die synthetisierten Peptide wurden massenspektrometrisch am Institut für Organische Chemie, Fachbereich Chemie der Universität Hamburg charakterisiert. Anschließend wurden von den gereinigten Peptiden NMR-Spektren aufgenommen, mit deren Hilfe überprüft wurde, ob die Sequenz der Peptide richtig synthetisiert wurde. Die vollständige

Charakterisierung beider Peptide ist in Kapitel 2.4.5 beschrieben. Für die NMR-spektroskopische Charakterisierung der Peptide wurden die in Kapitel 2.4.6 beschriebenen und in Tabelle 5, Seite 35 aufgeführten NMR-Spektren aufgenommen. Die Signale des ^1H , ^1H -COSY-NMR-Spektrums wurden zur Identifizierung der $\text{H}\alpha$ und die ^1H , ^1H -TOCSY-Spektren zur Identifizierung der jeweiligen Aminosäure herangezogen. Die Sequenz der Peptide wurde mit den ^1H , ^1H -TOCSY-NMR-Spektren und den zugehörigen ^1H , ^1H -NOESY-Spektren bestimmt. In Abbildung 48 ist das ^1H , ^1H -TOCSY-NMR-Spektrum sowie die Zuordnung aller Signale des ^{15}N -Peptids dargestellt.

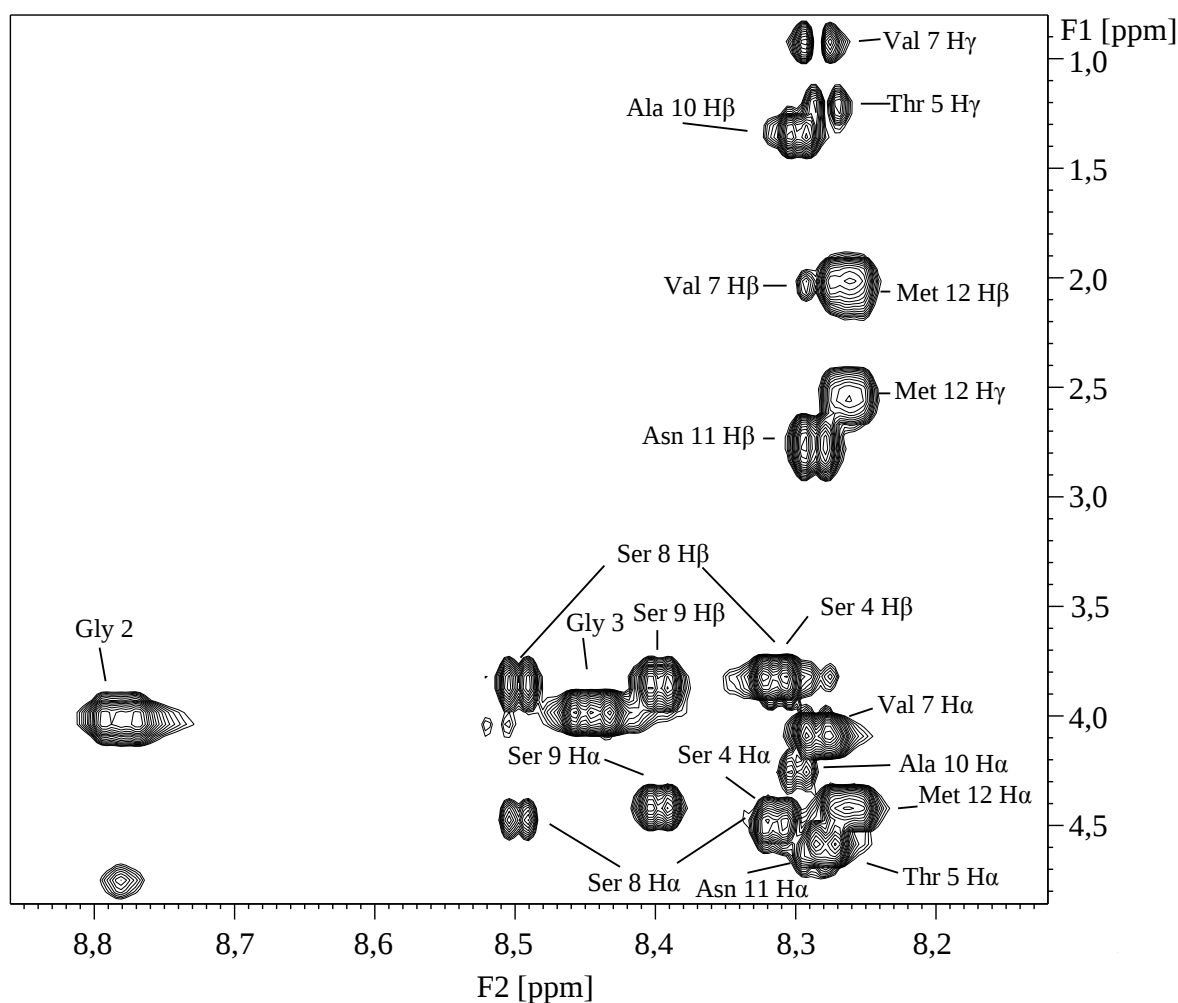


Abbildung 48: ^1H , ^1H -TOCSY Spektrum mit Zuordnung des ^{15}N -Peptids

Durch die ^{15}N -Markierung des Ser 8 spalten die Signale des $\text{H}\alpha$ und des $\text{H}\beta$ mit der charakteristischen $^1\text{J}_{\text{NH}}$ -Kopplung von 90 Hz auf. Daher konnte diese Aminosäure sofort identifiziert werden. Die weitere Zuordnung des ^{15}N -Peptids wurde dadurch erschwert, dass sich die Signale der $\text{H}\alpha$ des Ser 4 und Ser 8 sowie des Thr 5 und Asn 11 überlagerten. Weiterhin traf dies auf die Signale der $\text{H}\beta$ der Asn 11 und Val 7 zu.

Abbildung 49 zeigt das ^1H , ^1H -TOCSY-NMR-Spektrum sowie die Zuordnung aller Signale des Biotin-Peptids. Bei der Identifizierung des Biotin-Peptids erschwerte die Überlagerung der Signale H_α des Ser 8 und Ser 9 sowie der H_β des Asn 11 und Val 7 die Zuordnung.

Bei beiden Peptiden konnte die letzte Aminosäure, das Met 13, nicht identifiziert werden.

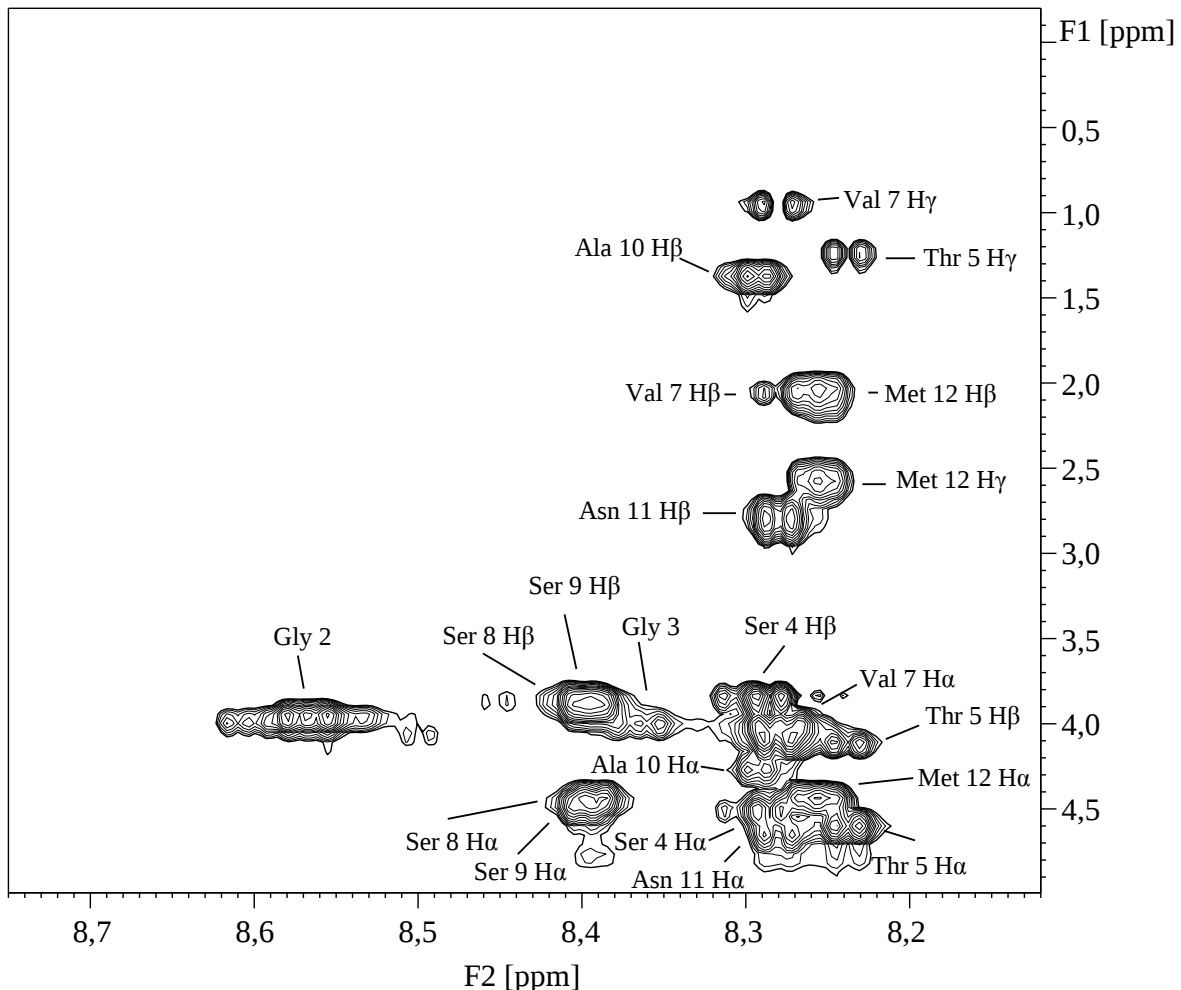


Abbildung 49: ^1H , ^1H -TOCSY Spektrum mit Zuordnung des Biotin-Peptids

Um sicher zu stellen, dass das 1,8 kDa große Biotin-Peptid tatsächlich biotinyliert vorlag, wurde ein Dot-Blot, wie in Kapitel 2.4.7 beschrieben, durchgeführt. Abbildung 50 zeigt diesen Blot. Als Kontrolle wurde HRP-konjugiertes Streptavidin verwendet. Es wurden zwischen 5 μg und 0,1 μg Biotin-Peptid aufgetropft, um die Sensitivität des Nachweises zu testen. Bei allen sieben Proben war eine Farbreaktion zu erkennen. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass in den Proben Biotin vorhanden war und das Biotin-Peptid biotinyliert vorlag.

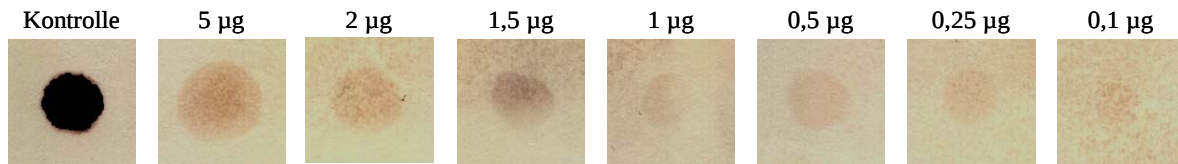


Abbildung 50: Dot-Blot Biotin-Peptid. Links: 2 µL Streptavidin-HRP als Positivkontrolle. Jeweils 5 µL Biotin-Peptid in unterschiedlichen Verdünnungen in PBS aufgetropft. Die aufgetropfte Menge Biotin-Peptid ist über dem jeweiligen Dot angegeben.

3.3.2 Darstellung des Biotin-Peptids im Western Blot

Es wurde ein Verfahren etabliert, mit dem das Biotin-Peptid im Western Blot dargestellt werden konnte. Dafür sollte nach dem Transfer des Peptids auf eine Membran die Biotinylierung mit HRP-gekoppeltem Streptavidin durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden (siehe Kapitel 2.5.1 und 2.5.3).

3.3.2.1 SDS-PAGE von Biotin-Peptid

In mehreren Ansätzen wurde versucht, das 1,8 kDa große Biotin-Peptid in einem 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufzutrennen und mit Coomassie Brilliant Blue anzufärben. In keinem der Gele konnte eine Bande bei ca. 1,8 kDa gefunden werden.

Deshalb wurden für die weiteren Experimente fertig gegossene Tris-Tricin-Gele von Biorad verwendet, welche laut Herstellerangaben gut dafür geeignet sind, Peptide darzustellen. Mit Hilfe dieser Gele konnte die Lauffront, in der sich das Biotin-Peptid auf Grund seiner Masse von 1,8 kDa befinden muss, angefärbt werden. Dieses Gel ist in Abbildung 51 dargestellt.

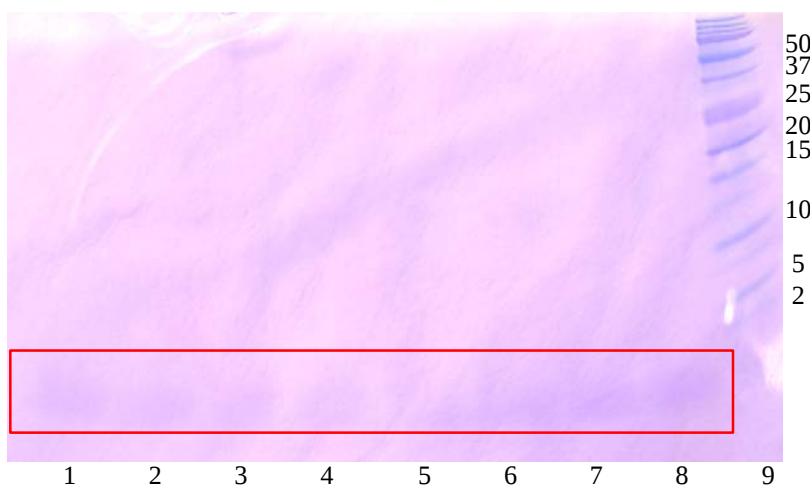


Abbildung 51: Tris-Tricin-Gel (16,5 %) von Biotin-Peptid. Belegung: 1: 2 µg Biotin-Peptid; 2: 0,1 µg Biotin-Peptid; 3: 0,25 µg Biotin-Peptid; 4: 0,5 µg Biotin-Peptid; 5: 1 µg Biotin-Peptid; 6: 1,5 µg Biotin-Peptid; 7: 2 µg Biotin-Peptid; 8: 5 µg Biotin-Peptid; 9: Marker, Precision Plus Dual Xtra Standard Prestained (Angabe der Größe der Markerproteine in kDa)

Die Banden sind durch einen roten Kasten markiert. Außerdem zeigte das Gel noch eine starke Hintergrundfärbung. Nachdem es aber weiter entfärbt wurde, waren keine Biotin-Peptid-Banden mehr erkennbar.

3.3.2.2 Western Blot von Biotin-Peptid

Nachdem, wie in Abschnitt 3.3.2.1 beschrieben, das Biotin-Peptid in einem Tris-Tricin-Gel detektiert werden konnte, sollte ein Western Blot durchgeführt werden. Zunächst wurde der Wet-Blot im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität zu Lübeck durchgeführt. Der Transfer der Proteine bei einer Spannung von 75 V für 30 min war erfolgreich, da Banden des Markers sichtbar waren. Allerdings war es nicht möglich Biotin-Peptid Banden zu detektieren. Die Inkubation des Blots bezüglich Blockierung und Streptavidin-HRP Konzentration entsprach dem des Dot-Blots. Da dieser erfolgreich Biotin nachweisen konnte, wurde davon ausgegangen, dass die Dauer des Transfers zu lang war. Daher wurde der Wet-Blot mit einer Transferzeit von 20 min und 10 min wiederholt. Auch hier waren keine Biotin-Peptid Banden detektierbar.

Daraufhin wurde das von Rose (Rose et al., 2009) in Kapitel 2.5.3 beschriebene Protokoll verwendet. Mit Hilfe dieses Protokolls war es erstmals möglich das Biotin-Peptid im Western Blot sichtbar zu machen. Allerdings stimmte die in Abbildung 52 dargestellte Bande nicht mit der theoretischen und im Massenspektrum gefundenen Masse des Biotin-Peptids überein. Vergleicht man die Laufweite der angefärbten Bande mit denen des Markers, so liegt die Masse dieser Bande zwischen 5 und 10 kDa. Das Biotin-Peptid besitzt aber eine Masse von 1,8 kDa.

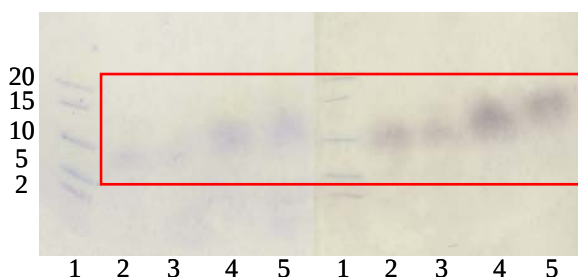


Abbildung 52: Western Blot des Biotin-Peptids. Links: ohne Blockierung der Membran mit BSA; Rechts: Mit Blockierung der Membran mit BSA für 1 h. Belegung: 1: Marker, Precision Plus Dual Xtra Standard Prestained (Angabe der Größe der Markerproteine in kDa); 2: 5 µg Biotin-Peptid in reduzierendem Probenpuffer; 3: 5 µg Biotin-Peptid in nicht-reduzierendem Probenpuffer; 4: 20 µg Biotin-Peptid in reduzierendem Probenpuffer; 5: 20 µg Biotin-Peptid in nicht-reduzierendem Probenpuffer.

Außerdem war zu erkennen, dass die Bandenfärbung umso intensiver wurde je mehr Biotin-Peptid aufgetragen wurde. Bei gleicher aufgetragener Menge Biotin-Peptid unterschieden sich die Farbintensitäten der Banden nicht. Daher haben reduzierende und nicht-reduzierende Bedingungen die gleichen Auswirkungen auf das Laufverhalten der Banden. Wurde die Membran vorher mit BSA blockiert, waren die Banden des Peptids stärker in der Farbintensität (Abbildung 52, rechts). Deshalb wurde für die nächsten Experimente der Blot immer mit BSA blockiert.

3.3.3 NMR-spektroskopische Darstellung des ^{15}N -Peptids

Um eine mögliche *O*-GlcNAcylierung des ^{15}N -Peptids darzustellen, wurden ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren aufgenommen. Durch eine *O*-GlcNAcylierung des Ser 8 sollte sich die chemische Verschiebung dieses Signals verändern. Durch die Änderung der chemischen Verschiebung könnte dann festgestellt werden, welche Aminosäure eines Proteins oder Peptids *O*-GlcNAcyliert wurde. Das ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektrum des ^{15}N -Peptids in Natriumazetatpuffer mit pH 4 ist in Abbildung 53 dargestellt. Das Spektrum wurde bei 298 K aufgenommen.

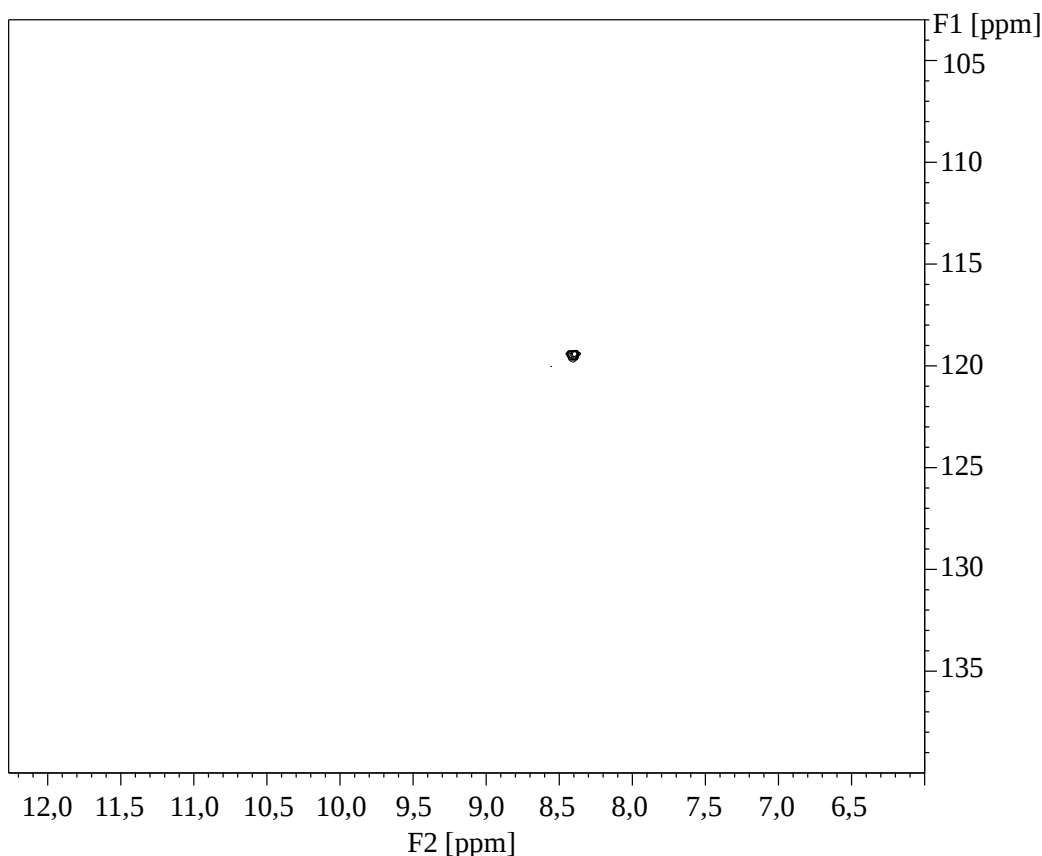


Abbildung 53: ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektrum des ^{15}N -Peptids.

Die ^1H -chemische Verschiebung wurde anhand eines internen Standards (TSP) referenziert. Für die Referenzierung der ^{15}N -chemischen Verschiebung wurde die Methode nach Wishart (Wishart et al., 1995) verwendet. Es ist deutlich zu erkennen, dass nur ein Signal bei 8,4 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 119,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung vorhanden war. Allerdings konnte bei höherem pH, wie er in den Puffern für die O-GlcNAcylierungsversuche verwendet wurde, kein NH-Signal des ^{15}N -Peptids in den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren detektiert werden. Auch ein Zusatz von 1 mg/mL BSA führte nicht dazu, dass das Signal des ^{15}N -markierten Ser 8 nachgewiesen werden konnte. Daher konnte die chemische Verschiebung dieses Signals bei höheren pH Werten nicht angegeben werden.

3.3.4 O-GlcNAcylierungsversuche mit Biotin-Peptid und ^{15}N -Peptid

Die O-GlcNAcylierungsversuche mit dem ^{15}N -Peptid wurden direkt im NMR-Spektrometer durchgeführt. Dafür wurde das ^{15}N -Peptid mit dem jeweiligen funktionalen Zellextrakt versetzt und ins NMR-Spektrometer überführt. Für die Beobachtung der O-GlcNAcylierung wurden bei der jeweiligen Inkubationstemperatur unterschiedlich viele ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren mit einer Dauer von 2 h oder 1 h aufgenommen. Für die Auswertung wurden alle aufgenommenen ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren übereinandergelegt. Um die einzelnen Signale besser miteinander vergleichen zu können, wurden diese immer um 2 ppm in F1 gegeneinander verschoben. Die y-Achse der ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren gibt so die Inkubationszeit wieder.

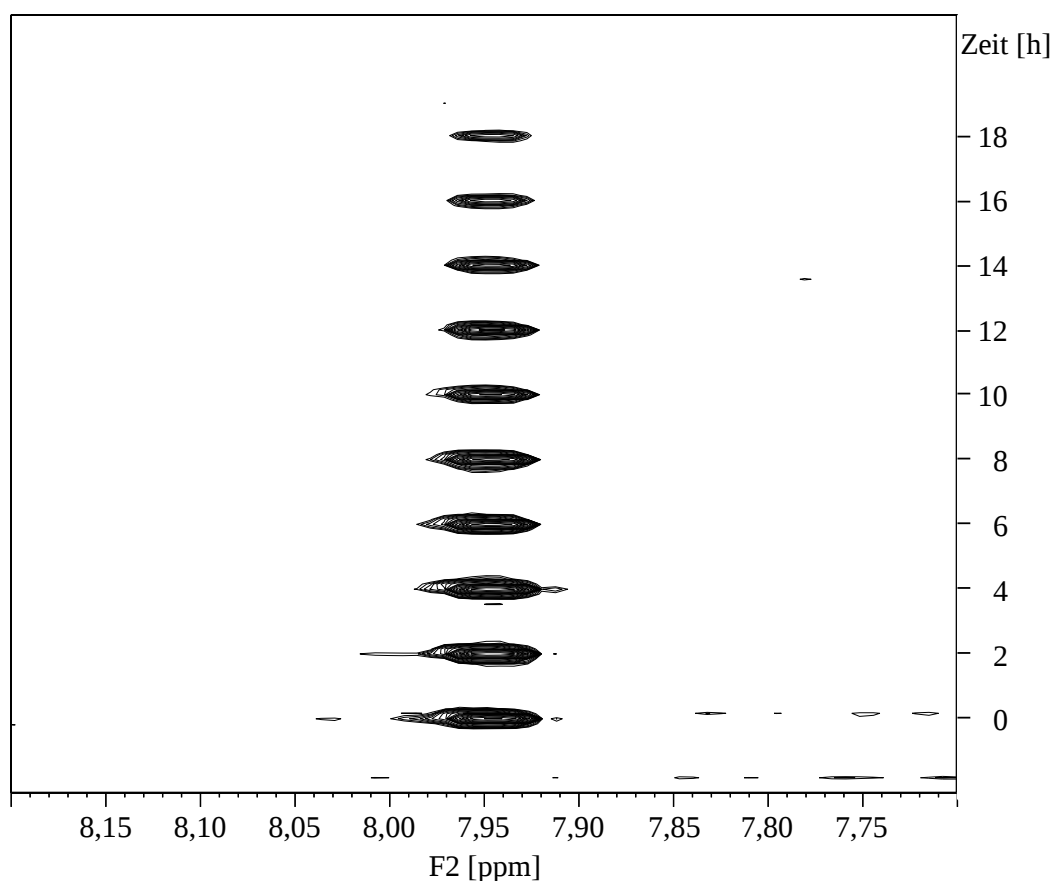
Für die O-GlcNAcylierungsversuche mit Biotin-Peptid wurde der jeweilige Zellextrakt mit dem Peptid vermischt und über einen bestimmten Zeitraum bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten während der Inkubation sowie zu Beginn und am Ende wurden Proben genommen, die mit reduzierendem Probenpuffer vermischt und bei 95 °C aufgekocht wurden, um jegliche Enzymaktivität zu inhibieren. Diese Proben wurden anschließend über Tris-Tricin-Gele aufgetrennt und für den Western Blot verwendet.

3.3.4.1 PBS als Lysepuffer

In Anlehnung an die O-GlcNAcylierungsversuche mit Tau-K32-wt in Kapitel 3.2, wurden die ersten O-GlcNAcylierungsversuche der CKII-Peptidderivate in PBS durchgeführt. In Tabelle 12 sind die verschiedenen durchgeführten Experimente aufgelistet. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Experimenten lagen dabei in der verwendeten Zelllinie, der Zellzahl, der PUGNAC- und Protease-Inhibitor-Konzentration sowie im verwendeten Peptid.

Tabelle 12: O-GlcNAcylierungsversuche in PBS. Zusammensetzung des Puffers, Zelllinie und Zellzahl

Bezeichnung	Zelllinie	Zellzahl	PUGNAc	Protease-Inhibitor	UDP-GlcNAc	Temperatur	Peptid
O-GlcNAcylierungsversuch 1	HEK 293	$4,8 \cdot 10^7$	20 μ M	1,25x	180 μ M	298 K	0,364 mM ^{15}N -Peptid
O-GlcNAcylierungsversuch 2	HT-22	$5,1 \cdot 10^7$	20 μ M	1x	180 μ M	298 K	0,364 mM ^{15}N -Peptid
O-GlcNAcylierungsversuch 3	HEK 293	$13,4 \cdot 10^7$	45 μ M	3,125x	5 mM	298 K	0,56 mM Biotin-Peptid

**Abbildung 54:** Ausschnitte aus ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren von O-GlcNAcylierungsversuch 1. Es wurden 10 ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren mit jeweils 16 Durchgängen aufgenommen. Für die Auswertung wurden Spektren übereinandergelegt und um 2 ppm in F1 gegeneinander verschoben. Die y-Achse der ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren gibt die Inkubationszeit wieder.

Für den O-GlcNAcylierungsversuch 1 wurde funktionaler Zellextrakt der HEK 293 Zelllinie verwendet. Dieser wurde mit $364 \mu\text{M}$ ^{15}N -Peptid und $180 \mu\text{M}$ UDP-GlcNAc bei 298 K inkubiert. Für die Inkubation wurde der Extrakt sofort, nachdem er mit dem ^{15}N -Peptid vermischt worden war, ins NMR-Spektrometer überführt und für 20 h gemessen. In Abbildung 54 sind alle aufgenommenen ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren dargestellt. Zu jeder Inkubationszeit war nur ein Signal bei 7,945 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 124,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung in den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren detektierbar. Da es sich um das einzige vorhandene Signal in den Spektren handelte und in den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren der Kontrolle, in der Zellextrakt alleine gemessen wurde, keine Signale nachweisbar waren, konnte man davon ausgehen, dass es sich bei diesem Signal um das ^{15}N -markierte Ser 8 des ^{15}N -Peptids handelte. Dieses Signal verlor über die Dauer der Messungen an Intensität. Es entstand kein neues Signal in den Spektren.

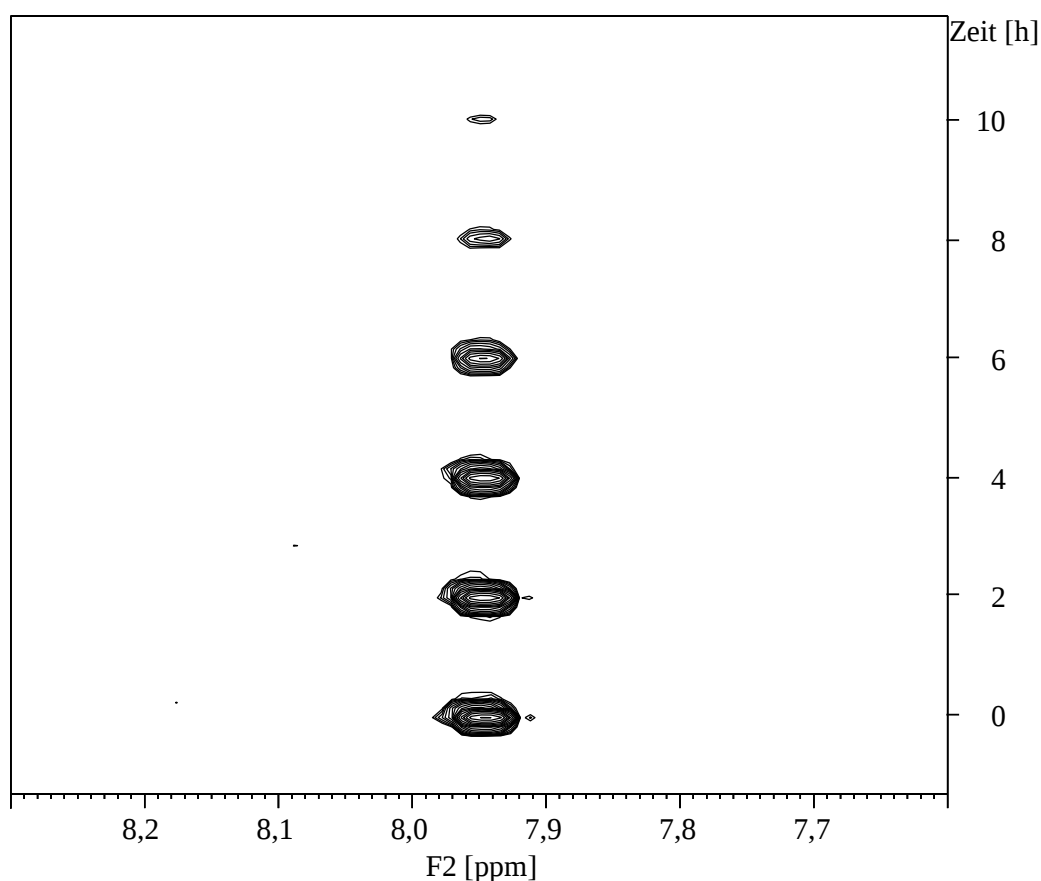


Abbildung 55: Ausschnitte aus ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren von O-GlcNAcylierungsversuch 2. Es wurden 10 ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren mit jeweils 16 Durchgängen aufgenommen. Für die Auswertung wurden die ersten sechs NMR-Spektren übereinandergelegt und um 2 ppm in F1 gegeneinander verschoben. Die y-Achse gibt die Inkubationszeit wieder.

Im Unterschied zu O-GlcNAcylierungsversuch 1 wurde für den O-GlcNAcylierungsversuch 2 die HT-22 Zelllinie verwendet. Die übereinandergelegten ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren sind in Abbildung 55 dargestellt. In allen Spektren war ein Signal bei 7,945 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 124,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung nachweisbar. Auch hier wurde das Signal des ^{15}N -markierten Ser 8 mit der Zeit kleiner. Weiterhin entstand über den Inkubationszeitraum kein neues Signal.

Außerdem konnte beobachtet werden, dass bei diesem O-GlcNAcylierungsversuch das Signal des ^{15}N -Peptids schon nach 10 h Inkubation nicht mehr detektiert werden konnte. Bei O-GlcNAcylierungsversuch 1 hatte sich die Signalintensität nach 18 h nur etwa halbiert.

Um zu klären, ob es mit der protein-biochemischen Methode möglich ist, eine O-GlcNAcylierung des Biotin-Peptids nachzuweisen, wurde im O-GlcNAcylierungsversuch 3 Biotin-Peptid mit funktionalem Zellextrakt der HEK 293 Zelllinie inkubiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass UDP-GlcNAc im Überschuss vorlag. Es wurde Protease-Inhibitor in 1,5-facher empfohlener Konzentration eingesetzt. Dieser Ansatz wurde für 20 h bei 25°C inkubiert und Proben wurden zu den Zeitpunkten 0 h, 6,5 h und 20 h gewonnen. Die Proben wurden über ein Tris-Tricin-Gel aufgetrennt und wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben auf eine Membran transferiert.

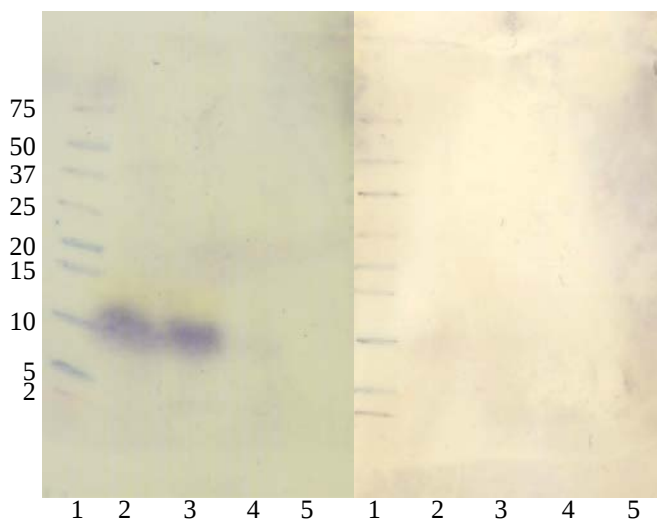


Abbildung 56: Western Blot von O-GlcNAcylierungsversuch 3 mit Biotin-Peptid. Links: Nachweis des Biotin-Peptids mit Streptavidin-HRP; Rechts: Nachweis einer O-GlcNAcylierung mit mAb #14. Belegung: 1: Marker, Precision Plus Dual Xtra Standard Prestained (Angabe der Größe der Markerproteine in kDa); 2: 5 µg Biotin-Peptid in PBS; 3: 5 µg Biotin-Peptid nach 0 h Inkubation; 4: 5 µg Biotin-Peptid nach 6,5 h Inkubation; 5: 5 µg Biotin-Peptid nach 20 h Inkubation.

Die eine Hälfte des Blots wurde zum Nachweis des Biotin-Peptids mit Streptavidin-HRP inkubiert, die zweite Hälfte mit monoklonalem anti-O-GlcNAc-Antikörper. Abbildung 56

zeigt die beiden Western Blots. Links ist der Nachweis des Biotin-Peptids mit Streptavidin dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Biotin-Peptid in der Kontrolle (Spur 2) und zu Beginn der Inkubation (Spur 3) nachweisbar war. Allerdings lag die Bande des Peptids bei etwa 10 kDa, obwohl die Masse des Peptids 1,8 kDa beträgt. Weiterhin war der Nachweis nach 6 h Inkubation nicht mehr möglich. Rechts ist der Nachweis einer O-GlcNAcylierung mit mAb #14 dargestellt. Da die Banden des Markers zu erkennen waren, musste der Transfer der Proteine auf die Membran funktioniert haben. Ein Nachweis einer O-GlcNAcylierung war aber nicht möglich.

3.3.4.2 Natriumphosphatpuffer mit DTT und MgCl_2 als Lysepuffer

In den vorangegangenen O-GlcNAcylierungsversuchen 1 bis 3 konnte weder NMR-spektroskopisch noch protein-biochemisch eine O-GlcNAcylierung nachgewiesen werden. Außerdem war das jeweilige Peptid im funktionalen Zellextrakt nicht stabil. Daher wurde der Lysepuffer der funktionalen Zellextrakte nach den Protokollen von Clarke (Clarke et al., 2008) und Iyer (Iyer and Hart, 2003) hergestellt. An Stelle von Tris-Puffer wurde Natriumphosphatpuffer verwendet, da dieser kein NMR-Signal erzeugt. Der neue Lysepuffer setzte sich aus 50mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5 mit 600 μM PUGNAc, 2,5x Protease-Inhibitor, 1 mM DTT und 12,5 mM MgCl_2 zusammen.

Tabelle 13: O-GlcNAcylierungsversuche in Lysepuffer mit 1mM DTT und 12,5 mM MgCl_2

Bezeichnung	Zelllinie	Zellzahl	PUGNAc	Protease-Inhibitor	Temperatur	pH
O-GlcNAcylierungsversuch 4	HEK 293	$21,3 \cdot 10^7$	600 μM	2,5x	310 K	7,5
O-GlcNAcylierungsversuch 5	HT-22	$7 \cdot 10^7$	600 μM	2,5x	310 K	6,8

In Tabelle 13 sind die mit diesem Lysepuffer durchgeführten O-GlcNAcylierungsversuche 4 und 5 zusammengefasst. Bei beiden Versuchen wurde sowohl das ^{15}N -Peptid als auch das Biotin-Peptid verwendet. Außerdem wurde die Inkubationstemperatur auf 37 °C erhöht. Unterschiede sind in den verwendeten Zelllinien und den pH-Werten zu finden.

Im O-GlcNAcylierungsversuch 4 wurden HEK 293 Zellen in Puffer mit pH 7,5 verwendet. Die NMR-Probe wurde mit 0,729 mM ^{15}N -Peptid und 2,25 mM UDP-GlcNAc in funktionalem HEK 293 Zellextrakt angesetzt und bei 310 K gemessen. In den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren konnten keine Signale detektiert werden.

In einem parallelen Ansatz wurden 0,56 mM Biotin-Peptid mit 2,5 mM UDP-GlcNAc in HEK 293 Zellextrakt bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationszeit wurde auf 2 h reduziert und zu den Zeitpunkten 0 h, 0,5 h, 1 h und 2h wurden Proben gewonnen, die dann im Western Blot auf Biotin und O-GlcNAcylierungen untersucht wurden. In Abbildung 57 sind die beiden Western Blots dargestellt. Links ist der Nachweis des Biotin-Peptids mit Streptavidin dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Biotin-Peptid nach 0 h und 0,5 h nachweisbar war und danach nicht mehr. Der Nachweis einer O-GlcNAcylierung mit mAb #14 ist rechts dargestellt. Dieser Blot zeigte keine Banden.

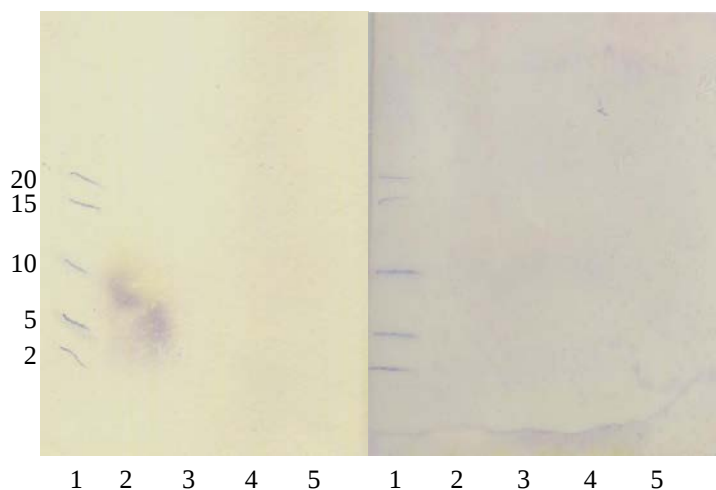


Abbildung 57: Western Blot von O-GlcNAcylierungsversuch 4 mit Biotin-Peptid. Links: Nachweis des Biotin-Peptids mit Streptavidin-HRP; Rechts: Nachweis einer O-GlcNAcylierung mit mAb #14. Belegung: 1: Marker, Precision Plus Dual Xtra Standard Prestained (Angabe der Größe der Markerproteine in kDa); 2: 5 µg Biotin-Peptid nach 0 h Inkubation; 3: 5 µg Biotin-Peptid nach 0,5 h Inkubation; 4: 5 µg Biotin-Peptid nach 1 h Inkubation; 5: 5 µg Biotin-Peptid nach 2 h Inkubation.

Für den O-GlcNAcylierungsversuch 5, der mit einem funktionalen Zellextrakt aus HT-22 Zellen durchgeführt wurde, wurde der pH-Wert des Lyse-Puffers von 7,5 auf 6,8 reduziert. Die NMR-Probe wurde mit 0,729 mM ^{15}N -Peptid und 2,25 mM UDP-GlcNAc angesetzt. In Abbildung 58 sind von den zehn aufgenommenen ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren die gezeigt, in denen Signale detektierbar waren. Zum ersten Mal konnten zwei Signale in den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren des O-GlcNAcylierungsversuchs beobachtet werden. Das deutlich intensivere Signal hatte eine ^1H -chemische Verschiebung von 7,86 ppm und eine ^{15}N -chemische Verschiebung von 124,5 ppm. Das weniger intensive Signal lag bei 8,27 ppm

^1H -chemischer Verschiebung und 122,3 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung. Da das intensivere Signal die gleiche ^{15}N -chemische Verschiebung wie die Signale aus den vorangegangenen Experimenten besaß, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesem Signal um das ^{15}N -Peptid handelte. Das zweite und weniger intensive Signal musste aus funktionalem HT-22 Zellextrakt stammen. Es konnte in den $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren der Kontrolle, die nur aus Zellextrakt ohne das ^{15}N -Peptid bestand, ebenfalls nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass das Signal des ^{15}N -Peptids über den Inkubationszeitraum an Intensität verliert und schon nach 3 h nicht mehr nachweisbar ist.

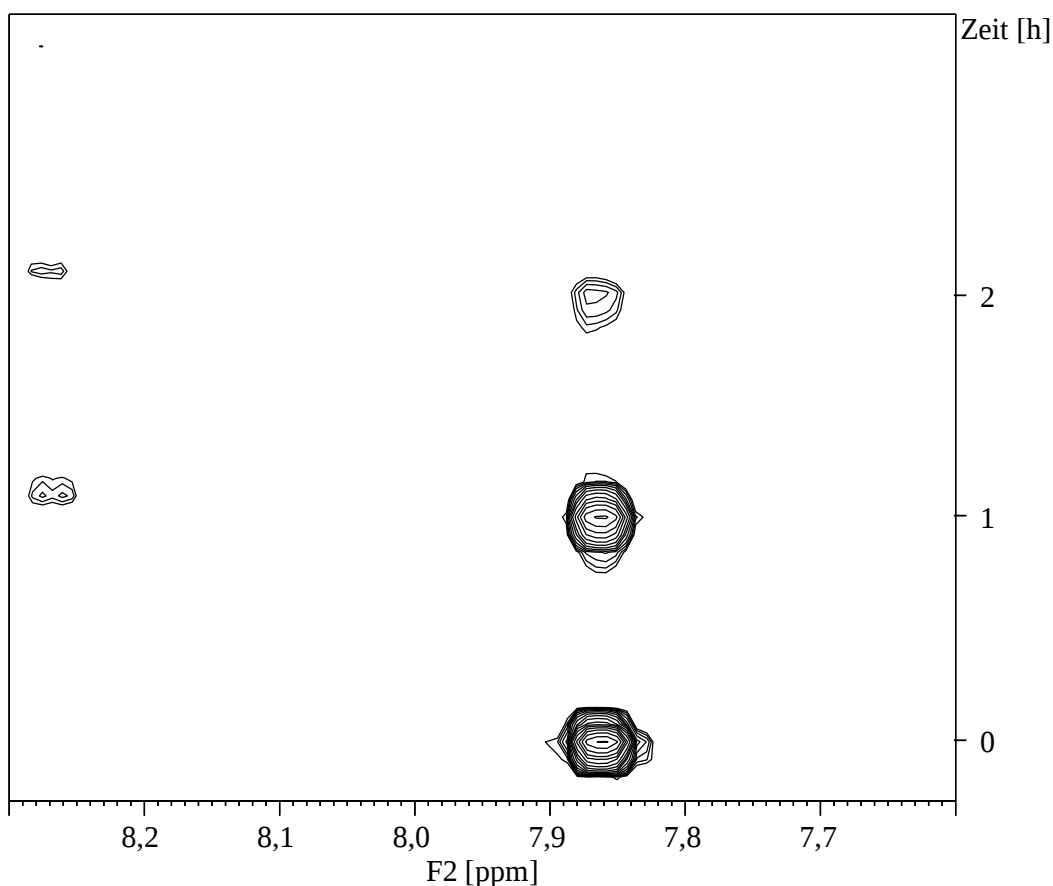


Abbildung 58: Ausschnitte aus $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren von O-GlcNAcylierungsversuch 5. Es wurden 8 $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren mit jeweils 8 Durchgängen aufgenommen. Für die Auswertung wurden die ersten drei NMR-Spektren übereinandergelegt und jeweils um 2 ppm in F1 gegeneinander verschoben. Die y-Achse gibt die Inkubationszeit wieder.

Für die Inkubation des Biotin-Peptids wurden die gleichen Inkubationsbedingungen wie zuvor schon für den O-GlcNAcylierungsversuch 4 gewählt. Abbildung 59 zeigt den Western Blot zum Nachweis des Biotin-Peptids mit Streptavidin. Die Bande des Biotin-Peptids ist

nur zum Zeitpunkt 0 h nachweisbar. Der Western Blot zum Nachweis einer O-GlcNAcylierung zeigte keine Banden.

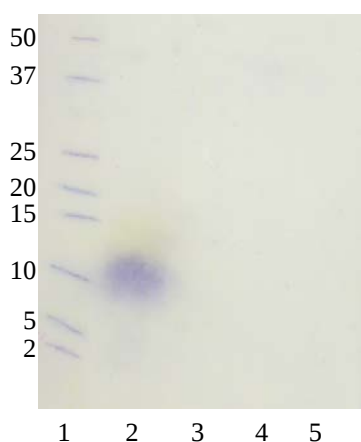


Abbildung 59: Western Blot von O-GlcNAcylierungsversuch 5 mit Biotin-Peptid. Nachweis des Biotin-Peptids mit Streptavidin-HRP; Belegung: 1: Marker, Precision Plus Dual Xtra Standard Prestained (Angabe der Größe der Markerproteine in kDa); 2: 5 µg Biotin-Peptid nach 0 h Inkubation; 3: 5 µg Biotin-Peptid nach 0,5 h Inkubation; 4: 5 µg Biotin-Peptid nach 1 h Inkubation; 5: 5 µg Biotin-Peptid nach 2 h Inkubation; Blot zum Nachweis einer O-GlcNAcylierung nicht gezeigt, da keine Banden detektiert werden konnten.

3.3.4.3 Natriumphosphatpuffer mit DTT und EDTA als Lysepuffer

Da bei den vorangegangenen O-GlcNAcylierungsversuchen weder NMR-spektroskopisch noch protein-biochemisch eine O-GlcNAcylierung nachgewiesen werden konnte, wurde neuer Lysepuffer verwendet. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Puffern wurde diesem EDTA zugesetzt, um auf diese Weise die Metalloproteasen zu inhibieren. Dieser Lysepuffer setzte sich aus 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,8 mit 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 100 µM PUGNAc und 2x Protease-Inhibitor zusammen. In Tabelle 14 sind die O-GlcNAcylierungsversuche 6 bis 10 aufgeführt. Diese unterschieden sich in der verwendeten Zelllinie, der eingesetzten Zellzahl sowie im pH-Wert des verwendeten Puffers. Alle weiteren Unterschiede sind jeweils bei der Beschreibung der einzelnen O-GlcNAcylierungsversuche angegeben.

Der O-GlcNAcylierungsversuch 6 wurde wie in Tabelle 14 angegeben ohne weitere Änderungen durchgeführt. Die NMR-Probe wurde mit 1,13 mM ^{15}N -Peptid und 2,25 mM UDP-GlcNAc angesetzt und bei 310 K gemessen. Es wurden zunächst fünf ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren aufgenommen und nach 96 h nochmals fünf Spektren.

Tabelle 14: O-GlcNAcylierungsversuche in Lysepuffer mit 1 mM DTT und 1 mM EDTA

Bezeichnung	Zelllinie	Zellzahl	PUGNAc	Protease-Inhibitor	Temperatur	pH
O-GlcNAcylierungsversuch 6	HEK 293	$17,1 \cdot 10^7$	100 μ M	2x	310 K	6,8
O-GlcNAcylierungsversuch 7	HEK 293	$12,9 \cdot 10^7$	100 μ M	2x	310 K	6,8
O-GlcNAcylierungsversuch 8	HT-22	$6,5 \cdot 10^7$	100 μ M	2x	310 K	6,6
O-GlcNAcylierungsversuch 9	HEK 293	$17,4 \cdot 10^7$	100 μ M	2x	310 K	6,6
O-GlcNAcylierungsversuch 10	HEK 293	$16,1 \cdot 10^7$	100 μ M	2x	310 K	6,8

Abbildung 60 zeigt alle aufgenommenen ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren des O-GlcNAcylierungsversuchs 6. Zur Verdeutlichung sind die Spektren in F1 um 2 ppm gegeneinander verschoben. Wie schon bei O-GlcNAcylierungsversuch 5 (Abbildung 58) ist bei 8,28 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 122,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung ein weiteres Signal zu erkennen. Dabei musste es sich um eine Substanz aus dem Zellextrakt handeln, da dieses Signal auch in den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren der Kontrollen beobachtet wurde. Neu ist bei diesen Spektren allerdings, dass neben dem Signal des Ser 8 des ^{15}N -Peptids bei 7,87 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 124,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung über den Inkubationszeitraum ein neues Signal bei 7,95 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 124,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung im Spektrum beobachtet werden konnte. Dieses Signal entstand erst nach etwa 3 h Inkubation und war in den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren der Kontrollen nicht nachweisbar. Über den Inkubationszeitraum nahm die Signalintensität dieses Signals zu. Parallel nahm die Intensität des Signals des Ser 8 über den Inkubationszeitraum ab.

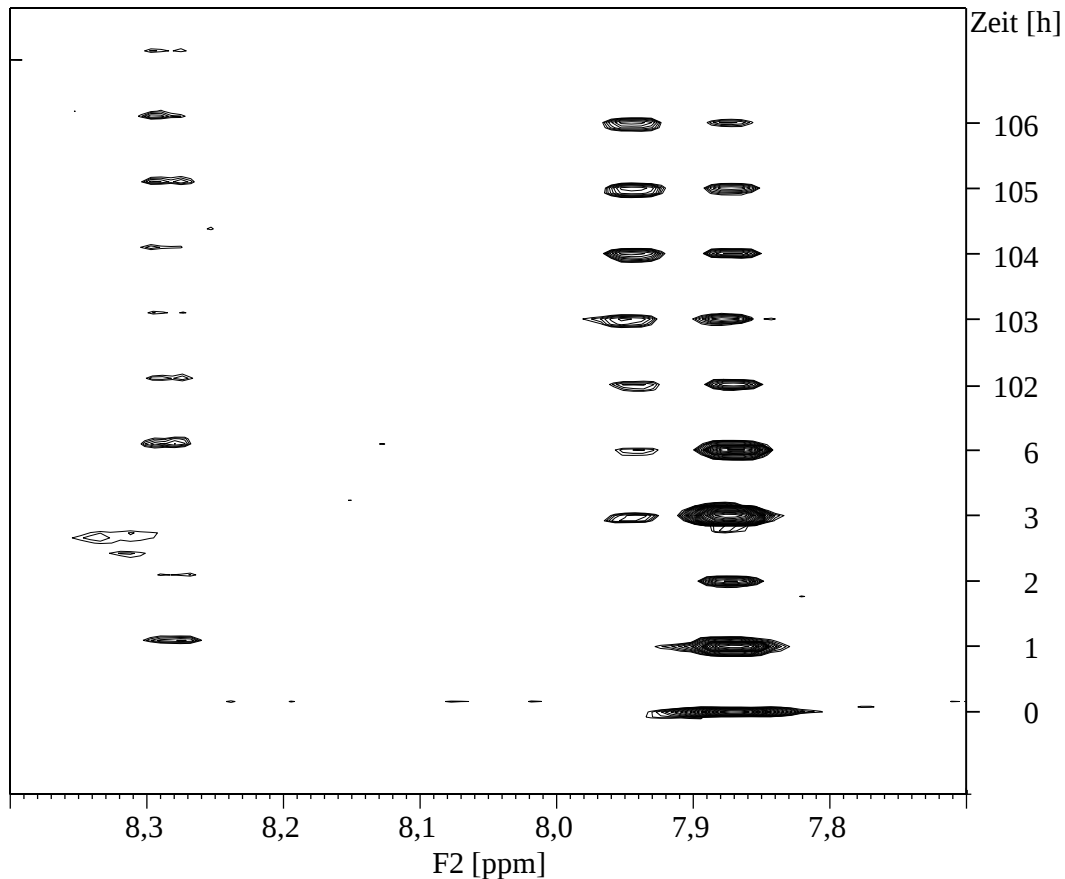


Abbildung 60: Ausschnitte aus ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren von O-GlcNAcylierungsversuch 6. Es wurden zweimal fünf ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren mit jeweils 8 Durchgängen aufgenommen. Für die Auswertung wurden alle NMR-Spektren übereinandergelegt und jeweils um 2 ppm in F1 gegeneinander verschoben. Die y-Achse gibt die Inkubationszeit wieder.

Sollte es sich bei diesem neuen Signal um eine O-GlcNAcylierung handeln, dann müsste der Western Blot dieses O-GlcNAcylierungsversuchs Aufschluss darüber geben. Für den Western Blot wurden 0,9 mM Biotin-Peptid mit 2 mM UDP-GlcNAc in funktionalem Zellextrakt der HEK 293 Zellen für 2 h bei 37°C inkubiert und Proben zu den Zeitpunkten 0 h, 0,5 h, 1 h und 2 h gewonnen. Der Blot wurde wie bisher durchgeführt, allerdings wurde die Detektion mit Chemolumineszenz im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität zu Lübeck durchgeführt. Abbildung 61 zeigt die entwickelten Western Blots. In A ist der Western Blot zum Nachweis des Biotin-Peptids gezeigt. Es konnte eine Biotin-Bande bei etwa 10 kDa festgestellt werden, die zum Zeitpunkt 0 h detektierbar war. Zu allen weiteren Zeitpunkten konnte keine Bande detektiert werden. Der rote Kasten zeigt eine sehr schwache Bande bei etwa 2 kDa, die dem Molekulargewicht des Biotin-Peptids entsprach. Für den Nachweis einer O-GlcNAcylierung wurden alle drei monoklonalen anti-O-GlcNAc-Antikörper verwendet. Die zugehörigen Western Blots sind

in Abbildung 61 B-D gezeigt. In allen drei Western Blots konnten keine Banden, weder bei 10 kDa noch bei einer zu erwartenden Größe von etwa 1,8 kDa nachgewiesen werden.

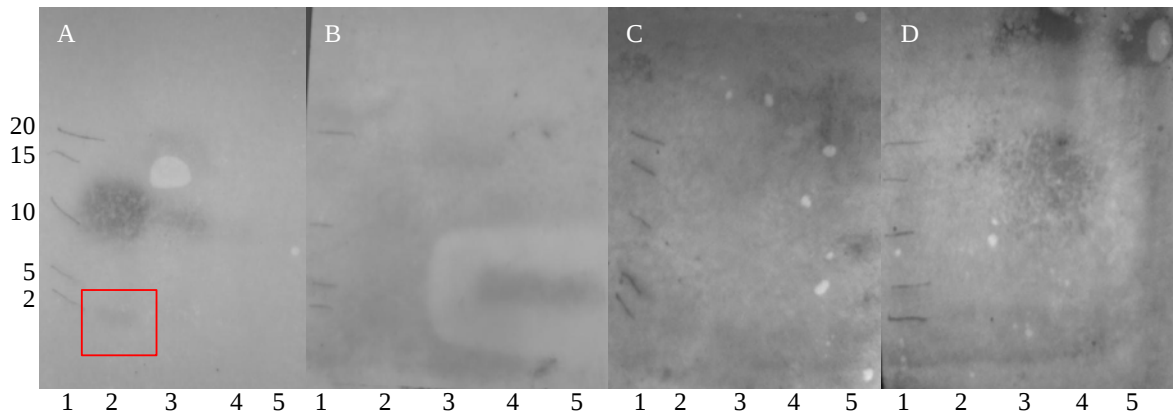


Abbildung 61: Western Blot von *O*-GlcNAcylierungsversuch 6 mit Biotin-Peptid, Detektion mit ECL. A: Nachweis des Biotin-Peptids mit Streptavidin-HRP; B: Nachweis einer *O*-GlcNAcylierung mit mAb #3; C: Nachweis einer *O*-GlcNAcylierung mit mAb #10; D: Nachweis einer *O*-GlcNAcylierung mit mAb #14. Belegung: 1: Marker, Precision Plus Dual Xtra Standard Prestained (Angabe der Größe der Markerproteine in kDa); 2: 8 µg Biotin-Peptid nach 0 h Inkubation; 3: 8 µg Biotin-Peptid nach 0,5 h Inkubation; 4: 8 µg Biotin-Peptid nach 1 h Inkubation; 5: 8 µg Biotin-Peptid nach 2 h Inkubation.

Beim *O*-GlcNAcylierungsversuch 7 wurden die Pufferzusammensetzung und die Zelllinie im Vergleich zu *O*-GlcNAcylierungsversuch 6 nicht geändert. Auch die Zellzahl war mit $12,9 \cdot 10^7$ Zellen ähnlich. Allerdings wurden die HEK 293 Zellen, 17 h bevor der funktionelle Zellextrakt hergestellt wurde, mit 50 µM PUGNAc inkubiert. Dafür wurde das verbrauchte Wachstumsmedium abgenommen und frisches Wachstumsmedium, welches mit 50 µM PUGNAc versetzt worden war, auf den Zellrasen gegeben. Anschließend wurden die Zellen 17 h bei 37 °C wachsen gelassen. Für den NMR-spektroskopischen Nachweis einer *O*-GlcNAcylierung wurden 0,98 mM ^{15}N -Peptid mit 2,25 mM UDP-GlcNAc im funktionalen HEK 293 Zellextrakt verwendet. Mit diesem Inkubationsansatz wurden bei 310 K zehn $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren über einen Zeitraum von 10 Stunden aufgenommen. Wieder konnte in den $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren (Abbildung 62) ein Signal bei 7,93 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 124,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung detektiert werden, dessen Signalintensität über den Aufnahmezeitraum größer wurde. Das Signal bei 7,86 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 124,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung, welches als das des ^{15}N -Serin des ^{15}N -Peptids identifiziert wurde, nahm in seiner Intensität über den Inkubationszeitraum ab. Das Signal bei 8,28 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 122,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung stammte aus dem funktionalen Zellextrakt.

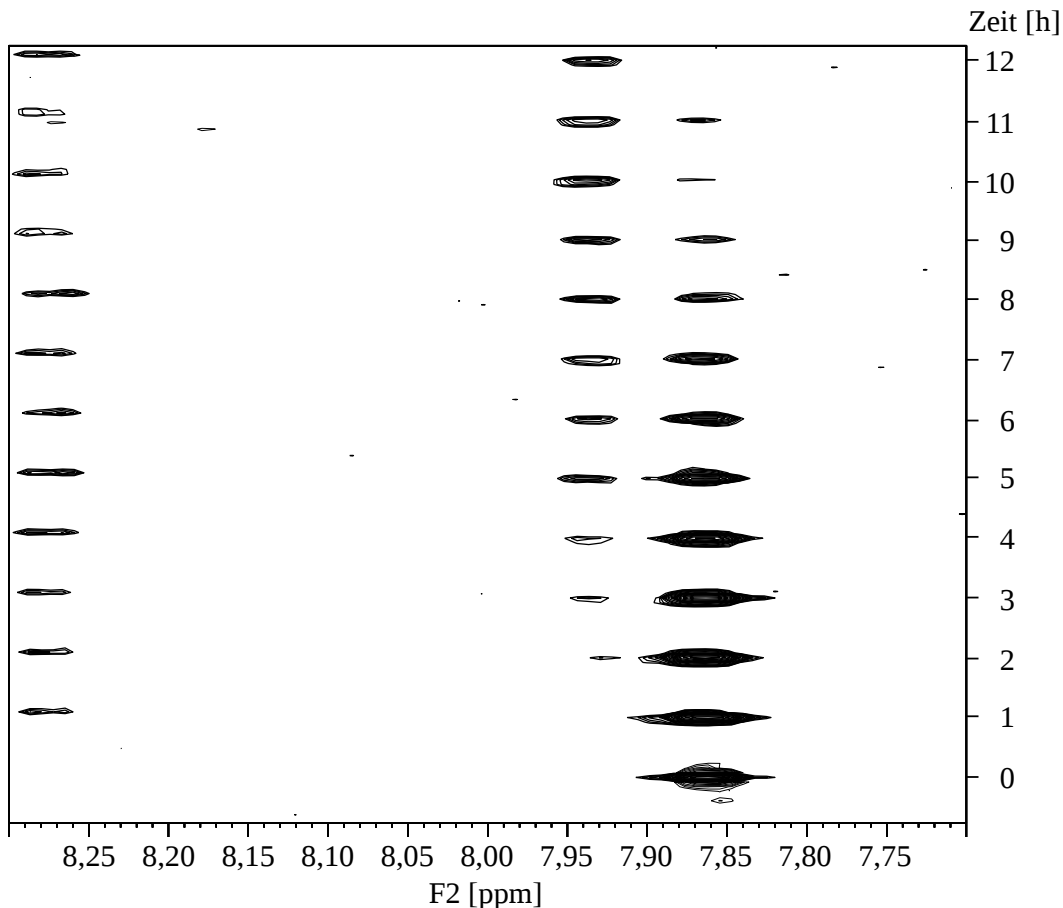


Abbildung 62: Ausschnitte aus ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren von *O*-GlcNAcylierungsversuch 7. Es wurden 13 ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren mit jeweils 8 Durchgängen aufgenommen. Für die Auswertung wurden alle NMR-Spektren übereinandergelegt und jeweils um 2 ppm in F1 gegeneinander verschoben. Die y-Achse gibt die Inkubationszeit wieder.

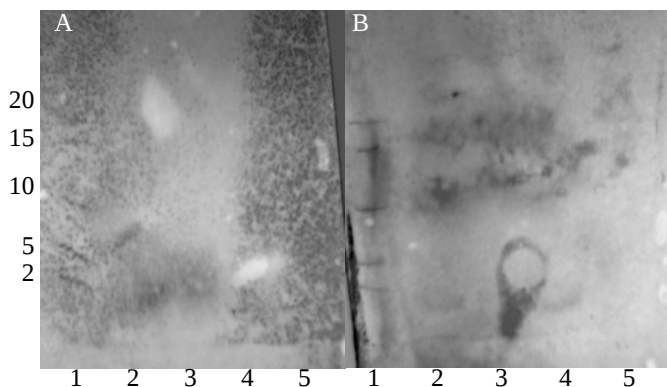


Abbildung 63: Western Blot von *O*-GlcNAcylierungsversuch 7 mit Biotin-Peptid, Detektion mit ECL. A: Nachweis des Biotin-Peptids mit Streptavidin-HRP; B: Nachweis einer *O*-GlcNAcylierung mit mAb #10. Belegung: 1: Marker, Precision Plus Dual Xtra Standard Prestained (Angabe der Größe der Markerproteine in kDa); 2: 8 µg Biotin-Peptid nach 0 h Inkubation; 3: 8 µg Biotin-Peptid nach 0,5 h Inkubation; 4: 8 µg Biotin-Peptid nach 1 h Inkubation; 5: 8 µg Biotin-Peptid nach 2 h Inkubation.

Für den protein-biochemischen Nachweis einer *O*-GlcNAcylierung wurden 0,9 mM Biotin-Peptid mit 2 mM UDP-GlcNAc in funktionalem HEK 293 Zellextrakt für 2 h bei 37 °C

inkubiert. Proben wurden zu den Zeitpunkten 0 h, 0,5 h, 1 h und 2 h gewonnen. Im Gegensatz zu allen vorangegangenen Western Blots wurde die Bindung des Streptavidin-HRP über Nacht bei 4 °C durchgeführt. In Abbildung 63 ist der durch Chemolumineszenz detektierte Western Blot zum Nachweis des Biotin-Peptids (A) sowie einer O-GlcNAcylierung mit mAb #10 (B) dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Nachweis des Biotin-Peptids keine Banden zeigte. Eine O-GlcNAcylierung ließ sich nicht detektieren.

Für den O-GlcNAcylierungsversuch 8 wurde funktionaler Zellextrakt der HT-22 Zellen verwendet und der pH-Wert des Lysepuffers wurde auf 6,6 eingestellt. Für die NMR-spektroskopische Untersuchung wurden 0,8 mM ^{15}N -Peptid mit 2,25 mM UDP-GlcNAc in funktionalem HT-22 Zellextrakt bei 310 K für 17 h gemessen.

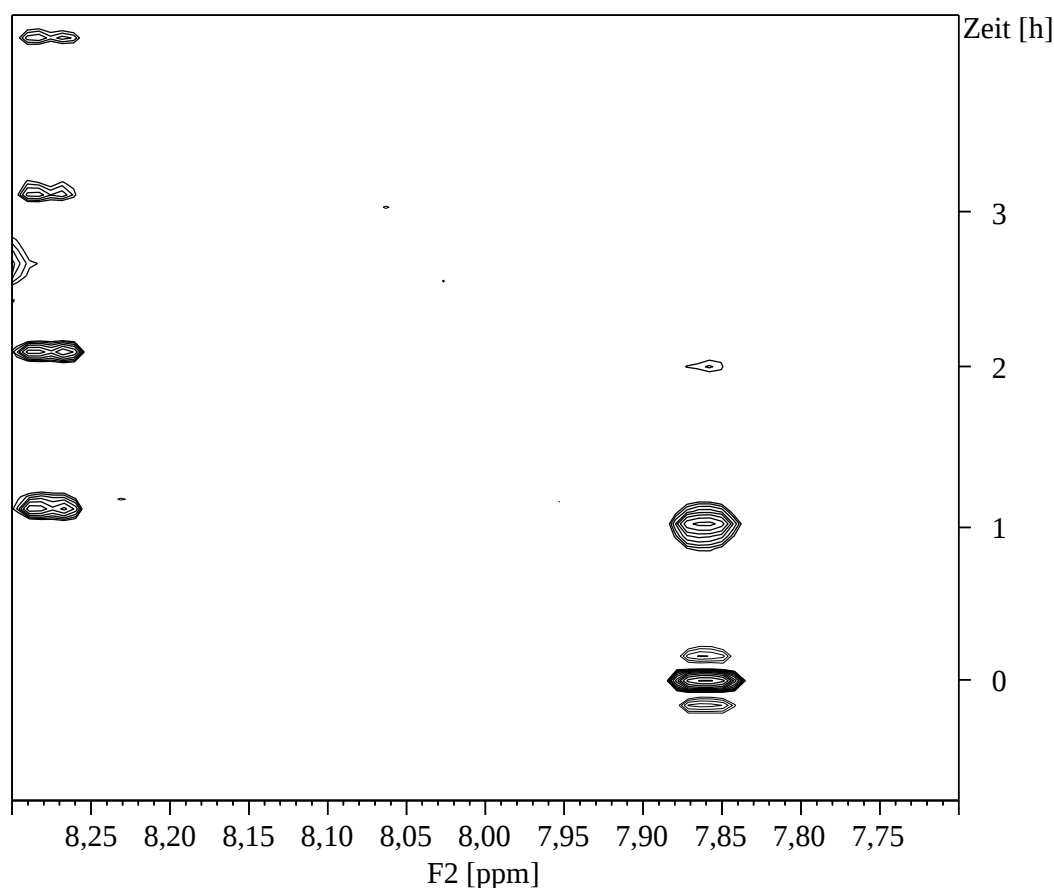


Abbildung 64: Ausschnitte aus $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren von O-GlcNAcylierungsversuch 8. Es wurden 17 $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren mit jeweils 8 Durchgängen aufgenommen, von denen nur in den ersten 4 NMR-Spektren Signale detektierbar waren. Für die Auswertung wurden diese übereinandergelegt und jeweils um 2 ppm in F1 gegeneinander verschoben. Die y-Achse gibt die Inkubationszeit wieder.

Wie in Abbildung 64 dargestellt, zeigten nur die ersten vier aufgenommenen $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren das Signal des ^{15}N -markierten Serins des ^{15}N -Peptids bei 7,86 ppm

^1H -chemischer Verschiebung und 124,5 ^{15}N -chemischer Verschiebung. Nach 3 h war dieses Signal nicht mehr detektierbar. Ein weiteres Signal bei 8,28 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 122,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung stammte aus dem Zellextrakt. Es entstand kein neues Signal. Daher wurde auf den Nachweis einer O-GlcNAcylierung mit Hilfe des Biotin-Peptids im Western Blot verzichtet.

Für den O-GlcNAcylierungsversuch 9 wurde die verwendete Zellzahl der HEK 293 Zellen auf $17,4 \times 10^7$ Zellen erhöht, womit die Menge an OGT erhöht werden sollte. Außerdem wurde ein pH-Wert von 6,6 für die Zelllyse verwendet. Für die NMR-spektroskopische Untersuchung wurden 0,76 mM ^{15}N -Peptid mit 2,25 mM UDP-GlcNAc in funktionalem HEK 293 Zellextrakt bei 310 K für 24 h gemessen.

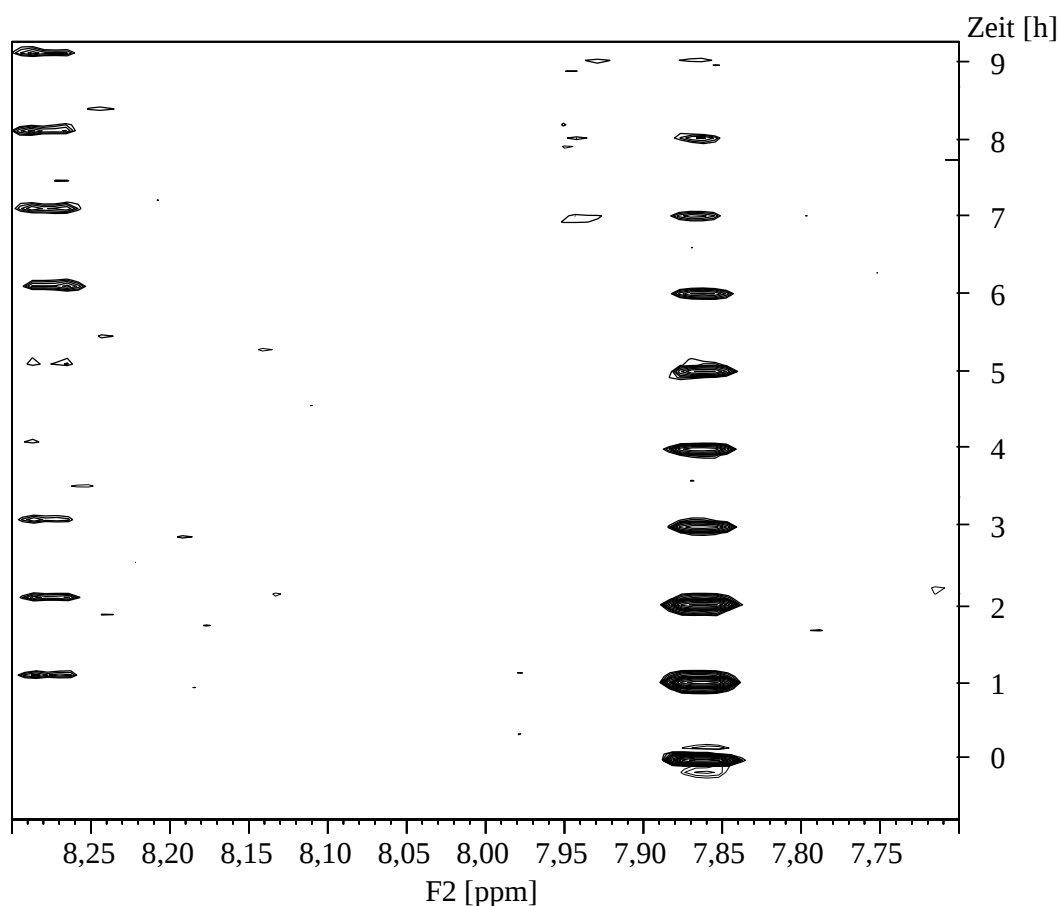


Abbildung 65: Ausschnitte aus $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren von O-GlcNAcylierungsversuch 9. Es wurden 24 $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren mit jeweils 8 Durchgängen aufgenommen, von denen nur in den ersten 10 NMR-Spektren Signale detektierbar waren. Für die Auswertung wurden diese übereinandergelegt und jeweils um 2 ppm in F1 gegeneinander verschoben. Die y-Achse gibt die Inkubationszeit wieder.

Abbildung 65 zeigt die ersten zehn aufgenommenen $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren des O-GlcNAcylierungsversuchs 9. Das Signal bei 8,28 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 122,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung, welches aus dem Zellextrakt stammt, war über den

gesamten Inkubationszeitraum nachweisbar. Das Signal des ^{15}N -Serin des ^{15}N -Peptids bei 7,86 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 124,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung verlor während der Inkubation an Intensität und war nach 9 h nicht mehr detektierbar. Nach 7 h Inkubation entstand ein neues Signal bei 7,93 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 124,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung, welches ebenfalls nach 9 h nicht mehr detektierbar war.

Für den Nachweis einer *O*-GlcNAcylierung im Western Blot wurden 0,928 mM Biotin-Peptid mit 2 mM UDP-GlcNAc in funktionalem Zellextrakt von HEK 293 Zellen für 10 h bei 37 °C inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 5 h und 10 h wurden Proben genommen, die für einen Western Blot mit anschließender Detektion durch Chemolumineszenz verwendet wurden. Allerdings konnte dieser Western Blot aufgrund eines Knicks in der Membran nicht ausgewertet werden.

Für den *O*-GlcNAcylierungsversuch 10 wurden wieder HEK 293 Zellen verwendet. Da aus der Literatur bekannt ist, dass sowohl in HepG2 Zellen ein Glucoseentzug zu einer erhöhten Produktion von OGT mRNA (Taylor et al., 2009) als auch in HEK 293 Zellen zu einer vermehrten *O*-GlcNAcylierung von Proteinen führt (Kang et al., 2009), wurden die HEK 293 Zellen für dieses Experiment 6 h vor der Zelllyse einem Glucoseentzug unterzogen. Dafür wurde das Wachstumsmedium abgenommen, der Zellrasen mit PBS gespült und anschließend wurde glucosefreies Medium zu den Zellen gegeben. Darin wurden die Zellen 6 h bei 37 °C wachsen gelassen bevor sie lysiert wurden. Für die NMR-Probe wurden 1,05 mM ^{15}N -Peptid zusammen mit 2,25 mM UDP-GlcNAc in funktionalem HEK 293 Zellextrakt verwendet. Diese Probe wurde zunächst für 16 h bei 310 K und dann zu weiteren Zeitpunkten gemessen. In Abbildung 66 sind alle aufgenommene ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren dargestellt, wobei das Signal bei 8,28 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 122,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung, welches aus dem Zellextrakt stammt, nicht gezeigt wird. Über den Inkubationszeitraum nahm die Intensität des Signals des ^{15}N -Peptids bei 7,86 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 124,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung ab und war nach 10 h nicht mehr nachweisbar. Gleichzeitig entstand nach 3 h ein Signal bei 7,93 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 124,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung, welches an Intensität zunahm und über den gesamten Messzeitraum nachweisbar war. Dieses neue Signal konnte in den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren der Kontrollen nicht nachgewiesen werden. Die Zunahme der Signalintensität des neuen Signals entsprach dabei etwa der Abnahme des Signals des ^{15}N -Peptids.

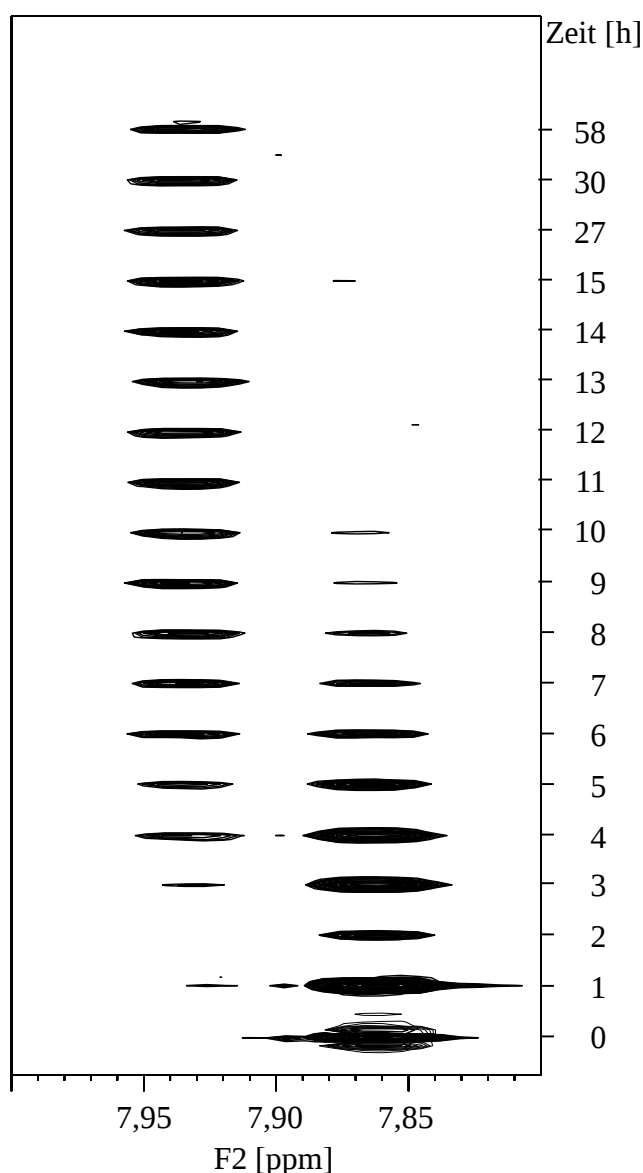


Abbildung 66: Ausschnitte aus ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren von O-GlcNAcylierungsversuch 10. Es wurden 19 ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren mit jeweils 8 Durchgängen aufgenommen. Für die Auswertung wurden diese übereinandergelegt und jeweils um 2 ppm in F1 gegeneinander verschoben. Die y-Achse gibt die Inkubationszeit wieder. Signale bei 7,86 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 124,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung sowie bei 7,93 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 124,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung.

Für den protein-biochemischen Nachweis einer O-GlcNAcylierung des Biotin-Peptids im Ansatz des O-GlcNAcylierungsversuchs 10 wurden 0,928 mM Biotin-Peptid mit 2 mM UDP-GlcNAc in funktionalem Zellextrakt der HEK 293 Zellen, denen 6 h vor der Lyse die Glucose entzogen wurde, bei 37 °C für 10 h inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 h, 2 h, 5 h und 10 h wurden Proben genommen.

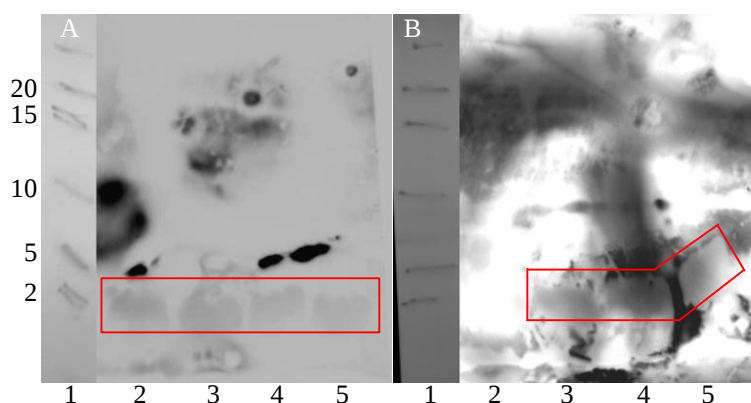


Abbildung 67: Western Blot von O-GlcNAcylierungsversuch 10 mit Biotin-Peptid, Detektion mit ECL. A: Nachweis des Biotin-Peptids mit Streptavidin-HRP; B: Nachweis einer O-GlcNAcylierung mit mAb #14. Banden sind helle Schatten im roten Kasten. Belegung: 1: Marker, Precision Plus Dual Xtra Standard Prestained (Angabe der Größe der Markerproteine in kDa); 2: 8 μ g Biotin-Peptid nach 0 h Inkubation; 3: 8 μ g Biotin-Peptid nach 2 h Inkubation; 4: 8 μ g Biotin-Peptid nach 5 h Inkubation; 5: 8 μ g Biotin-Peptid nach 10 h Inkubation.

Anschließend wurden jeweils zwei Western Blots zur Detektion des Biotin-Peptids und zur O-GlcNAcylierung mit mAb #14 durchgeführt. Dabei wurde die Inkubationszeit der Membran mit Streptavidin-HRP auf 2,5 h bei Raumtemperatur ausgedehnt und die Inkubation mit mAb #14 fand für 1 h bei Raumtemperatur statt. Abbildung 67 zeigt repräsentativ einen der erhaltenen Western Blots des O-GlcNAcylierungsversuchs 10. Diese waren die ersten Blots, die Hinweise darauf gaben, dass eine O-GlcNAcylierung stattgefunden hatte. In Abbildung 67 A ist der Nachweis des Biotin-Peptids abgebildet. Zum ersten Mal war es möglich Banden bei weniger als 2 kDa zu detektieren (roter Kasten), was dafür sprach, dass das Biotin-Peptid mit einem Molekulargewicht von 1,8 kDa gebunden wurde. Abbildung 67, B zeigt den Nachweis einer O-GlcNAcylierung durch den monoklonalen anti-O-GlcNAc Antikörper mAb #14. Zum Zeitpunkt 0 h konnte keine Bande nachgewiesen werden. Zu den Zeitpunkten 2 h, 5 h und 10 h war jeweils deutlich eine helle Bande bei weniger als 2 kDa zu erkennen (roter Kasten), die mit der Laufweite des Biotin-Peptids in A übereinstimmte. Ihre Intensität nahm mit der Inkubationszeit zu.

Sowohl die Entstehung eines neuen Signals in den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren nach 3 h Inkubation und der Nachweis einer O-GlcNAcylierten Bande im Western Blot nach 2 h sprechen deutlich dafür, dass es möglich war, ein Peptid zu O-GlcNAcylieren und dies NMR-spektroskopisch und protein-biochemisch nachzuweisen.

4. Diskussion

4.1 UDP-GlcNAc als NMR-detektierbarer metabolischer Marker

4.1.1 Etablierung von UDP-GlcNAc als NMR-detektierbarer metabolischer Marker

Für die Inkubationsversuche zur Etablierung von UDP-GlcNAc als metabolischer Marker wurden HT-22 Zellen mit ^{13}C -markierter Glucose über bestimmte Zeiträume inkubiert. Zusätzlich wurde deren Metabolismus durch die Gabe von Inhibitoren der Atmungskette, Natriumazid und Rotenon, gestört.

Für die selektive Markierung der Metabolite wurde $[1-^{13}\text{C}]\text{-D-Glucose}$ verwendet. Dadurch konnten ^{13}C -editierte Spektren aufgenommen werden. Verglichen mit Protonenspektren von Zellextrakten, in denen sich sehr viele Signale überlagern und dadurch nicht zugeordnet werden können, sind diese Spektren weniger komplex. Um eine Zuordnung der selektiv markierten Metabolite in den Zellextrakten zu erreichen, wurden NMR-Spektren von Referenzsubstanzen aufgenommen, mit denen die NMR-Spektren der Zellextrakte verglichen werden konnten (Gallinger, 2008). Durch die selektive Markierung der Metabolite und die Verwendung eines Kryoprobenkopfes wurde pro Zellextrakt jeweils nur eine voll bewachsene Petrischale verwendet. Bezogen auf die Größe der Wachstumsfläche und die Anzahl der verwendeten Petrischalen konnte so die benötigte Zellmasse um das bis zu 38-fache reduziert werden (Bouzier-Sore et al., 2003; Bouzier-Sore et al., 2006; Zwingmann et al., 2000; Zwingmann et al., 2001). Im Hinblick auf die Verwendung von primären Zellen für diese Experimente ist die Reduzierung der verwendeten Zellmasse von enormer Bedeutung, da die Anzahl der primären Zellen begrenzt ist.

In Anlehnung an vorangegangene Arbeiten (Gallinger, 2008) wurden die HT-22 Zellen zunächst für 4 h mit $[1-^{13}\text{C}]\text{-D-Glucose}$ und Natriumazid inkubiert, um deren Metabolismus zu stören. Es konnte festgestellt werden, dass sich das Muster der detektierbaren Metabolite änderte. Die Signale von Aspartat und Acetat konnten nach der Inkubation mit Natriumazid nicht mehr detektiert werden und die Signalintensitäten der Metabolite Alanin und Glutamat verringerten sich. Das Signal von Laktat nahm an Intensität zu. Über Metabolite des Citratzyklus oder aktivierte Zucker ließen sich keine Aussagen treffen, da diese nicht ^{13}C -markiert vorlagen und daher in keinem der aufgenommenen $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-

Spektren detektierbar waren. Mit Hilfe dieser Experimente war es also möglich, Metabolite der HT-22 Zellen im ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektrum sichtbar zu machen und die Änderungen in der Metabolitenzusammensetzung zu verfolgen, die eine Inhibierung der Atmungskette durch Natriumazid zur Folge hatte. Da aber weder Metabolite des Citratzyklus noch die für die Bildung von Glycosylierungen wichtigen aktivierten Zucker, wie zum Beispiel UDP-GlcNAc, ^{13}C -markiert vorlagen, waren nur sehr wenige Aussagen über die Beeinflussung des Metabolismus möglich. UDP-GlcNAc wird über den Hexosamin-Biosyntheseweg gebildet (Abbildung 68), die einzelnen Bausteine dafür entstehen aber über verschiedene andere Stoffwechselwege. Die GlcNAc-Einheit entsteht direkt aus der aufgenommenen Glucose, wobei die N-Acetylgruppe durch das im Citratzyklus synthetisierte Acetyl-CoA gebildet wird. Das UDP wird während des Pentose-Phosphatwegs synthetisiert.

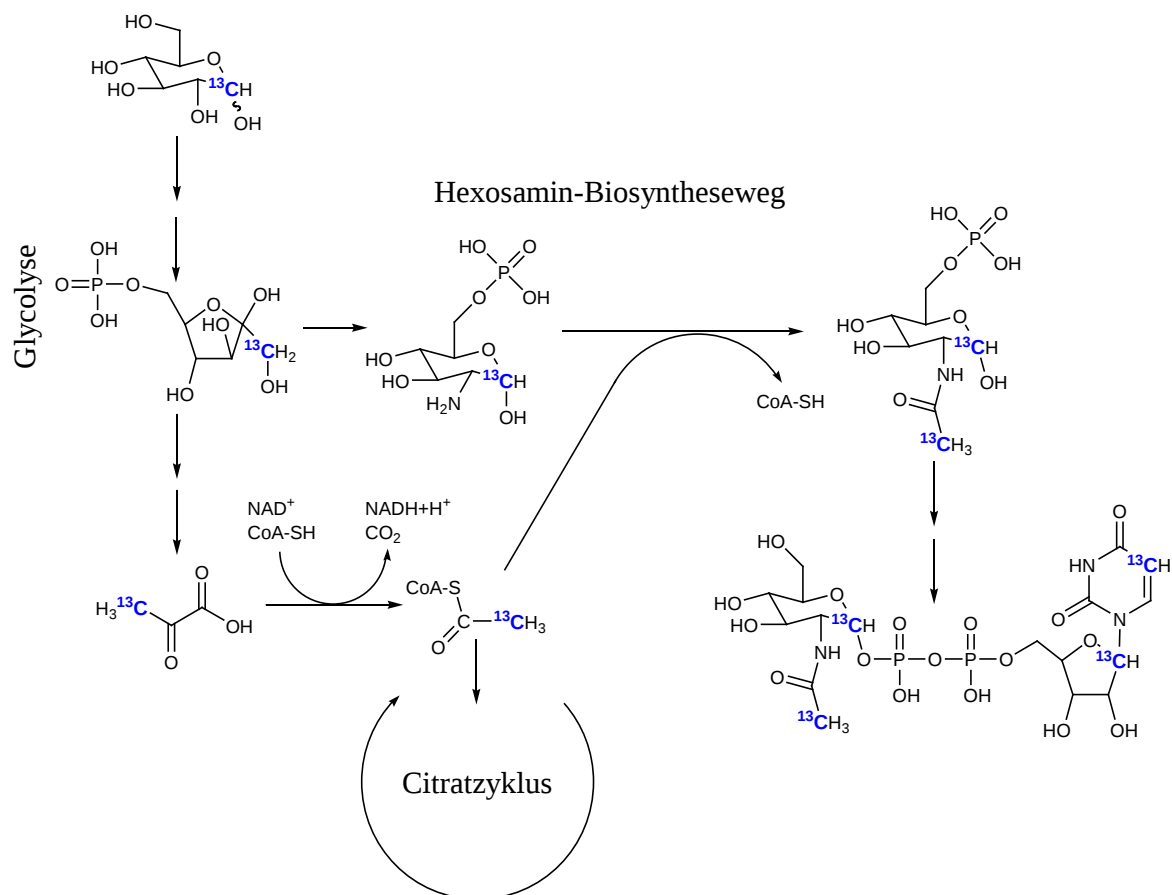


Abbildung 68: Verteilung der ^{13}C -Markierung der [1- ^{13}C]-D-Glucose über die verschiedenen Biosynthesewege. Außerdem ist das Markierungsmuster des UDP-GlcNAc dargestellt (modifiziert aus Gallinger et al., 2011)

Außerdem ist UDP-GlcNAc ein wichtiges Vorläufersubstrat sowohl für N- und O-Glycosylierungen, die O-GlcNAcylierung als auch die Sialylierung. Neben ATP ist

UDP-GlcNAc einer der am häufigsten vorkommenden Metabolite in Zellen (Wice et al., 1985). Daher ist UDP-GlcNAc potentiell gut dafür geeignet als metabolischer Marker verwendet zu werden. Wenn es gelingen könnte, ^{13}C -Markierungen an verschiedenen Stellen in das UDP-GlcNAc Molekül einzubringen, dann wären Aussagen über verschiedene Stoffwechselwege möglich.

In Protonenspektren von HT-22 Zellextrakten konnte das Signal des H1 der GlcNAc-Einheit des UDP-GlcNAc identifiziert werden. Allerdings reichte eine 4-stündige Inkubation der Zellen mit $[1-^{13}\text{C}]\text{-D-Glucose}$ nicht aus, um ^{13}C -markiertes UDP-GlcNAc zu bilden. Durch die Verlängerung der Inkubationszeit von 4 h auf 24 h konnten insgesamt mehr Metabolite ^{13}C -markiert werden. In den $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren wurden sowohl intensivere Signale von bereits identifizierten Metaboliten, wie Glutamat, Laktat und Alanin, als auch mehr Signale, insbesondere die der Metabolite Citrat und Malat, detektiert. Außerdem war es möglich die *N*-Acetylgruppe, das C1 der GlcNAc-Einheit, das C1' der Ribose und das C6 des Uridin von UDP-GlcNAc in den $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren zu detektieren.

Um zu bestätigen, dass UDP-GlcNAc sich als metabolischer Marker eignet, wurden die HT-22 Zellen für 24 h mit Natriumazid inkubiert. In den $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren konnten Veränderungen der Metabolitenzusammensetzung detektiert werden. Die Intensität des Laktatsignals nahm zu. Die Signale von Asparagin und Aspartat und die der Metabolite des Citratzyklus, Citrat und Malat, waren unter Azid-Einfluss nicht mehr vorhanden. Die Signalintensität der *N*-Acetylgruppe des UDP-GlcNAc nahm unter Azideinfluss stark ab, während sich das Signal des H1/C1 der GlcNAc-Einheit nicht veränderte. Über den Einfluss auf die Signalintensitäten des H1'/C1' der Ribose und des H6/C6 des Uridin von UDP-GlcNAc konnten keine Aussagen getroffen werden, da diese mit den selben Signalen der übrigen aktivierten Zucker UDP-Gal, UDP-Glc und UDP-GalNAc überlagern.

In den 1D- $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren konnten die Auswirkungen auf die Signale der *N*-Acetylgruppe und des H1 des UDP-GlcNAc besser beobachtet werden, da bei diesen Spektren die Signalintensitäten direkt miteinander verglichen werden können.

Durch die Inkubation mit Natriumazid wurden die HT-22 Zellen in einen glycolytischen Zustand gebracht, das heißt, die Zellen verbrauchten mehr Glucose als zuvor. Natriumazid hemmt kompetitiv die O_2 -Bindungsstelle des Komplex IV der Atmungskette. Durch diese Hemmung kommt es zu einem Stau des Elektronentransports über die einzelnen Komplexe der Atmungskette und in Folge dessen liegen diese in ihrer reduzierten Form vor. Dadurch

bricht der Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran zusammen und die Produktion von 30 ATP-Molekülen pro Glucosemolekül kommt zum Erliegen. Die HT-22 Zellen versuchen diesen Zustand auszugleichen, indem sie die Glycolyserate erhöhen. Dies äußert sich in der gesteigerten Glucoseaufnahme, welche von $1,2 \pm 0,14 \mu\text{mol Glucose/h/mg Protein}$ auf $2,0 \pm 0,19 \mu\text{mol Glucose/h/mg Protein}$ unter Azideinfluss stieg. Durch diese gesteigerte Glycolyserate soll der ATP-Vorrat wieder aufgefüllt werden, da pro Glucosemolekül während der Glycolyse zwei Moleküle ATP gebildet werden.

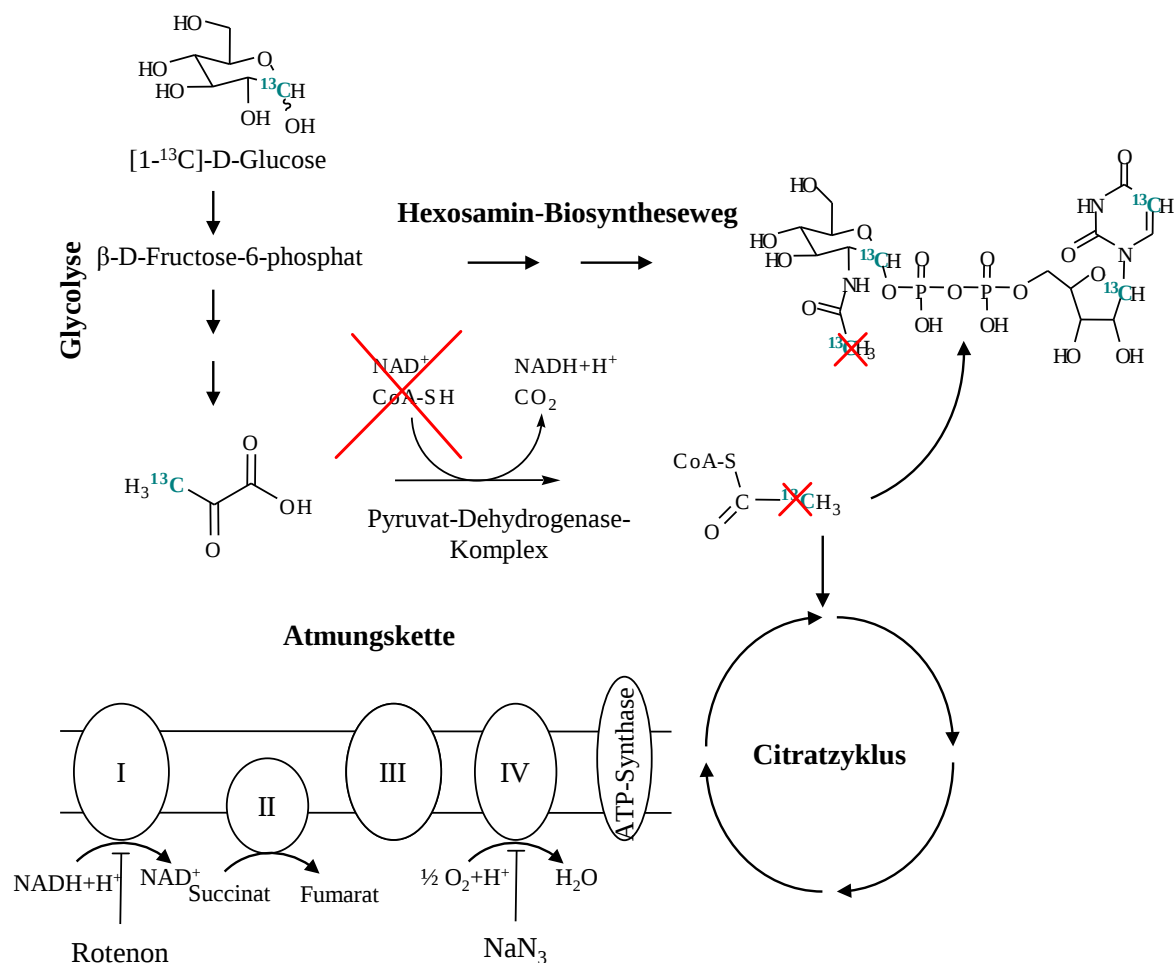


Abbildung 69: Schematische Darstellung der Auswirkungen der Inhibition der Atmungskette durch Natriumazid (NaN₃) und Rotenon. Natriumazid hemmt Komplex IV und somit die gesamte Atmungskette und Rotenon nur Komplex I, weshalb kein NAD⁺ mehr produziert werden kann. Dies hat zur Folge, dass die Reaktion des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes zum Erliegen kommt. Dadurch kann kein ¹³C-markiertes Acetyl-CoA mehr produziert werden, was dazu führt, dass die N-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc ebenfalls nicht mehr ¹³C-markiert vorliegen kann.

Durch die gesteigerte Glycolyserate wird mehr Pyruvat, das Endprodukt der Glycolyse, gebildet. Unter normalen Umständen würde der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex dieses Pyruvat zusammen mit Co-Enzym A unter Abspaltung von CO₂ zu Acetyl-CoA umsetzen.

Da aber die Laktatabgaberate unter Azideinfluss von $2,14 \pm 0,23 \mu\text{mol Laktat/h/mg Protein}$ auf $3,83 \pm 0,43 \mu\text{mol Laktat/h/mg Protein}$ stieg, kann davon ausgegangen werden, dass kein Acetyl-CoA auf diese Weise gebildet wird und die Laktatdehydrogenase das Pyruvat zu Laktat reduziert. Parallel wird $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ oxidiert. Diese Reaktion ist von großer Bedeutung, da durch den von Natriumazid verursachten Elektronenstau in der Atmungskette die NADH-Dehydrogenase (Komplex I), die Hauptquelle für NAD^+ , gehemmt wird und NADH nicht mehr zu NAD^+ oxidiert werden kann. NAD^+ ist ein wichtiges Co-Enzym, da es an der Weitergabe von Hydriden beteiligt ist. Eine *de novo* Synthese von NAD^+ ist unter den gegebenen Umständen vermutlich nicht mehr möglich, da im letzten Syntheseschritt ATP verbraucht wird. Daher akkumuliert NADH in der Zelle, was über einen negativen *feedback-loop* den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex inhibiert. Dieser Enzymkomplex bildet mit seiner katalysierten Reaktion die Verbindung zwischen Glycolyse und Citratzyklus, da während dieser Reaktion Pyruvat und Co-Enzym A unter Abspaltung von CO_2 zu Acetyl-CoA umgesetzt werden. Diese Reaktion wird unter dem Einfluss von Natriumazid gehemmt. Dies hat zur Folge, dass der Citratzyklus zum Erliegen kommt, was in den $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC-NMR-Spektren am Fehlen der Signale der Citratzyklusmetabolite Citrat und Malat erkannt werden kann.

Die Auswirkungen der Inkubation der Zellen mit Natriumazid auf die verschiedenen Stoffwechselwege lassen sich im Molekül UDP-GlcNAc ablesen, da für dessen Synthese verschiedene Synthesewege miteinander vereint werden. In Abbildung 68 ist die Verteilung der ^{13}C -Markierung der $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose über die verschiedenen Biosynthesewege in der Zelle dargestellt. Die $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose wird entlang ihres Konzentrationsgradienten von der Zelle aufgenommen, in Neuronen vorwiegend über den Glucosetransporter 3 (GLUT 3) (Bell et al., 1990). Durch die Umwandlung in $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose-6-phosphat und weiter in $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Fructose-6-phosphat wird sie über die Glycolyse verstoffwechselt. Das Produkt der Glycolyse sind zwei Pyruvatmoleküle, wobei eines der beiden an Position 3 ^{13}C -markiert ist. In Abbildung 68 wurde nur das $[3-^{13}\text{C}]$ -Pyruvat gezeigt. Den Übergang in den Citratzyklus bildet die Synthese von Acetyl-CoA aus $[3-^{13}\text{C}]$ -Pyruvat. Dadurch liegt die Acetylgruppe des Acetyl-CoA ^{13}C -markiert vor. Auf diese Weise wird die ^{13}C -Markierung über den Citratzyklus in der Zelle weiter verbreitet, was sich den ^{13}C -markierten Metaboliten Citrat und Malat widerspiegelt.

Die Synthese von UDP-GlcNAc findet über den Hexosamin-Biosyntheseweg statt, welcher 2 – 3 % der intrazellulären Glucose verstoffwechselt (Marshall et al., 1991). Aus

[1-¹³C]-D-Fructose-6-phosphat wird durch das Enzym GFAT [1-¹³C]-D-Glucosamin-6-phosphat gebildet. Dieser Syntheseschritt stellt den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt dar (Milewski, 2002). Mittels des ¹³C-markierten Acetyl-CoA entsteht weiter *N*-Acetyl-D-Glucosamin-6-phosphat, welches an C1 und der *N*-Acetylgruppe ¹³C-markiert ist. Über weitere Schritte entsteht UDP-GlcNAc mit ¹³C-Markierungen des C1 der GlcNAc-Einheit, der *N*-Acetylgruppe, des C1' der Ribose und des C6 des Uridin. Die Ribose und das Uridin werden über den Pentose- Phosphatweg synthetisiert und erhalten über die dort verwendete [1-¹³C]-D-Glucose ihre jeweilige Markierung (Lutz et al., 1996).

Bei einer Inkubation der HT-22 Zellen mit [1-¹³C]-D-Glucose und Natriumazid kann kein ¹³C-markiertes Acetyl-CoA gebildet werden, da indirekt der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex inhibiert wird (Abbildung 69). Deshalb kann die *N*-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc nicht mehr ¹³C-markiert werden. Der Hexosamin-Biosyntheseweg ist davon nicht betroffen, weshalb die ¹³C-Markierung des C1 der GlcNAc-Einheit, die direkt aus der verstoffwechselten [1-¹³C]-D-Glucose stammt, erhalten bleibt. Da unter Azideinfluss weiterhin UDP-GlcNAc gebildet wird, muss es eine weitere Acetyl-CoA Quelle in der Zelle geben. Denkbar wären der Aminosäurestoffwechsel und die Fettsäureoxidation. In weiterführenden Experimenten sollte dies analysiert werden.

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse konnte die Arbeitshypothese aufgestellt werden, dass eine Akkumulation von NADH zu einer vermehrten Laktatproduktion und einer Abnahme der Signalintensität der *N*-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc führt. Um diese zu untermauern wurden die HT-22 Zellen mit Rotenon inkubiert. Rotenon ist ein spezifischer Inhibitor der NADH-Dehydrogenase (Abbildung 69). Daher kann die ATP-Produktion über Komplex II, welcher Succinat als Substrat verwendet, in der Zelle erhalten bleiben. Wie auch schon bei der Inkubation der HT-22 Zellen mit Natriumazid konnte eine erhöhte Glucoseaufnahmerate festgestellt werden. Sie stieg von $1,31 \pm 0,16 \mu\text{mol Glucose/h/mg Protein}$ auf $2,04 \pm 0,18 \mu\text{mol Glucose/h/mg Protein}$. Die Laktatabgaberate erhöhte sich von $1,85 \pm 0,21 \mu\text{mol Laktat/h/mg Protein}$ auf $3,58 \pm 0,24 \mu\text{mol Laktat/h/mg Protein}$.

Den Einfluss, den eine Inkubation der Zellen mit Rotenon auf die verschiedenen Metabolite hatte, wurde in ¹H, ¹³C-HSQC-NMR-Spektren beobachtet. Wie erwartet waren die Signale der Metabolite des Citratzyklus, Citrat und Malat, sowie Asparagin und Aspartat nicht mehr detektierbar. Die Signalintensität des Succinat nahm stark ab. Dies spricht dafür, dass die ATP-Produktion unter Verwendung von Succinat aufrechterhalten wurde. Im Gegensatz dazu stieg die Intensität des Laktatsignals an. Die Auswirkungen auf das Markierungsmuster

des UDP-GlcNAc waren erwartungsgemäß die gleichen, wie schon bei der Inkubation mit Natriumazid. Sowohl in ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren als auch in 1D- ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren konnte gezeigt werden, dass das Signal der *N*-Acetylgruppe auf ein Minimum reduziert wird, während sich das Signal des H1/C1 der GlcNAc-Einheit in seiner Intensität nicht verändert.

4.1.2 Validierung der Ergebnisse mittels Methanol/Chloroform-Extraktion

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass während einer Perchlorsäureextraktion die aktivierten Zucker UDP-Glc und UDP-Gal zerfallen (Döpfens et al., unpublished). Um auszuschließen, dass die Ergebnisse der Inkubationsversuche auf diese Tatsache zurückzuführen sind, wurden sie mit einer Methanol/Chloroform-Extraktion wiederholt. In MeOH/ CHCl_3 -Extrakten, die sowohl nach einer Inkubation der HT-22 Zellen mit Natriumazid als auch nach einer Inkubation mit Rotenon gewonnen wurden, konnte in ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren und 1D- ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren gezeigt werden, dass die Veränderungen im Markierungsmuster von UDP-GlcNAc die gleichen sind, wie nach einer Perchlorsäureextraktion. Das Signal der *N*-Acetylgruppe wurde schwächer während das H1/C1 der GlcNAc-Einheit nicht betroffen war. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Ergebnisse reproduzierbar und von der Extraktionsmethode unabhängig waren.

4.1.3 Quantifizierung aktivierter Zucker

Durch die Methanol/Chloroform-Extraktion war es ebenfalls möglich, in Protonenspektren aktivierte Zucker zu quantifizieren. Dafür wurden die Zellen ohne ^{13}C -Markierung inkubiert, um diese in Protonenspektren quantifizieren zu können. Der Metabolismus wurde aber trotzdem durch Natriumazid gestört. Bei den HT-22 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Synthese der aktivierten Zucker unter Azideinfluss erhalten bleibt. Daher konnte folgende Schlussfolgerung gezogen werden: Die Änderung im Markierungsmuster des UDP-GlcNAc ist darauf zurückzuführen, dass kein ^{13}C -markiertes Acetyl-CoA mehr gebildet wird und liegt nicht daran, dass insgesamt keine aktivierten Zucker mehr synthetisiert werden.

4.1.4 Anwendung von UDP-GlcNAc als NMR-detektierbarer metabolischer Marker

Die Inkubationsexperimente konnten mit einer weiteren Zelllinie, den HEK 293 Zellen, reproduziert und verifiziert werden. Bei den HEK 293 Zellen handelt es sich um humane

Nierenzellen, deren Metabolismus sich von dem der HT-22 Zellen unterscheidet. So konnte in den ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren kein Laktat, dafür aber ein Metabolit bei 2,6 ppm und 2,55 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 47 ppm ^{13}C -chemischer Verschiebung gefunden werden, der nicht identifiziert werden konnte. Trotz dieser Unterschiede konnte bei diesen Zellen ebenfalls beobachtet werden, dass bei einer Inkubation mit Natriumazid die ^{13}C -Markierung nicht an den Citratzyklus weitergegeben wird und, dass die Signalintensität der *N*-Acetylgruppe von UDP-GlcNAc abnimmt. Der Hexosamin-Biosyntheseweg war weiterhin aktiv, da die ^{13}C -Markierung des C1 der GlcNAc-Einheit von UDP-GlcNAc erhalten blieb. Auch durch die Quantifizierung der aktivierten Zucker konnte bestätigt werden, dass trotz der Blockierung der Atmungskette aktivierte Zucker synthetisiert werden. Dabei behelfen sich diese Zellen ebenfalls einer gesteigerten Glycolyserate um ATP zu synthetisieren und einer Reduktion von Pyruvat zu Laktat um das NAD^+ -Defizit auszugleichen.

4.1.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass UDP-GlcNAc ein geeigneter NMR-detektierbarer metabolischer Marker ist, mit dem man den Fluss durch die beiden Biosynthesewege Citratzyklus und Hexosamin-Biosyntheseweg beobachten kann. Die ^{13}C -Markierung der *N*-Acetylgruppe des UDP-GlcNAc spiegelt den Fluss ^{13}C -markierter Glucose durch Glycolyse und Citratzyklus wider. Die ^{13}C -Markierung des C1 der GlcNAc-Einheit von UDP-GlcNAc liefert Aufschlüsse darüber, ob der Hexosamin-Biosyntheseweg gestört ist.

In vorangegangenen Studien wurde mit Hilfe der ^{13}C -Markierung von Metaboliten zwar der Fluss durch Glycolyse und den Citratzyklus sowie die Synthese verschiedener Aminosäuren beschrieben (Bouzier-Sore et al., 2003; Bouzier-Sore et al., 2006; Jans and Leibfritz, 1989; Shokati et al., 2005; Zwingmann et al., 2000; Zwingmann and Leibfritz, 2003), aber in keiner dieser Studien wurde der Hexosamin-Biosyntheseweg betrachtet. Darüberhinaus wurden Studien durchgeführt, in denen der Metabolismus von Zellen unter dem Einfluss von Stressoren (Fan et al., 2010) beobachtet, der Metabolismus von Krebszellen dem von gesunden Zellen (Fan et al., 2009) gegenübergestellt oder der Einfluss von Ischämie auf die Zellen *in vivo* (Sumegi et al., 1995) dargestellt wurde. In früheren Studien hingegen wurde die ^{13}C -Markierung von UDP-GlcNAc durch $[1-^{13}\text{C}]$ -D-Glucose beschrieben (Lutz et al., 1996) und eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigt, wie durch die Analyse von

¹³C-Isotopomeren die Markierung von UDP-GlcNAc berechnet werden kann (Moseley et al., 2011). Diese wiederum lassen den Citratzyklus und die Glycolyse außer Acht.

Keine Studie zieht eine Verbindung zwischen Citratzyklus und Hexosamin-Biosyntheseweg, wie es durch die selektive Markierung von UDP-GlcNAc, die in dieser Arbeit beschrieben und in Teilen veröffentlicht wurde (Gallinger et al., 2011), möglich ist.

UDP-GlcNAc, dieser einzigartige metabolische Marker, kann in späteren Experimenten mit primären Zellen dafür genutzt werden, krankes von gesundem Gewebe zu unterscheiden. Vor allem bei Erkrankungen wie Typ II Diabetes oder Alzheimer, bei denen der Glucosestoffwechsel gestört ist (Buse, 2006; Copeland et al., 2008; Liu et al., 2009a; Liu et al., 2008; Liu et al., 2009b; Wells et al., 2003), kann die Markierung von UDP-GlcNAc darüber Aufschluss geben, an welcher Stelle des Metabolismus eine Veränderung auftritt.

4.2 Untersuchung des O-GlcNAcylierungsmusters von Tau-K32-wt

Das Tau-K32-wt Protein ist ein 21,5 kDa großes Fragment des humanen Tau (Trinczek et al., 1995) und umfasst die Aminosäuren Ser 198 bis Ser 400. Es ist bekannt, dass Tau mit einer Stöchiometrie von mindestens vier mol O-GlcNAc pro mol Protein O-GlcNAcyliert wird (Arnold et al., 1996). Kürzlich konnte mit Hilfe von Electron-Transfer-Dissociation-Massenspektrometrie (ETD-MS) nachgewiesen werden, dass die Aminosäure Ser 400 O-GlcNAcyliert wird (Wang et al., 2010). Zusätzlich konnte eine weitere O-GlcNAcylierungsstelle gefunden werden, wobei noch nicht klar ist, ob der GlcNAc-Rest an Ser 409, Ser 412 oder Ser 413 gebunden ist (Yuzwa et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit sollte die O-GlcNAcylierung des Tau-K32-wt-Proteins NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Das für die O-GlcNAcylierung nötige Enzym, die OGT, sollte für die Experimente nicht *in vitro* synthetisiert werden, sondern die in den HT-22 Zellen und HEK 293 Zellen vorhandene OGT verwendet werden. Nach der Herstellung der funktionalen Zellextrakte wurde das Enzym nicht gereinigt, sondern im Zellextrakt belassen. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass alle für die Reaktion benötigten Co-Faktoren vorhanden sind. Da bei dieser Methode auch noch weitere Enzyme im Zellextrakt aktiv sind, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Tau-K32-wt acetyliert oder phosphoryliert wird. Um bestätigen zu können, dass eine O-GlcNAcylierung stattgefunden hatte, musste eine protein-biochemische Methode entwickelt werden. Diese

sollte die NMR-spektroskopisch erhaltenen Daten verifizieren und eine O-GlcNAcylierung des Tau-K32-wt nachweisen.

4.2.1 Protein-biochemischer Nachweis von Tau und O-GlcNAcylierungen

Durch verschiedene Western Blots konnte gezeigt werden, dass die funktionalen Zellextrakte der HT-22 und HEK 293 Zellen eine OGT enthalten und deshalb für diese Experimente geeignet sind. Außerdem ließ sich das dem Zellextrakt zugesetzte Tau-K32-wt Protein nachweisen. Allerdings konnte kein Testsystem entwickelt werden, dass zweifelsfrei eine O-GlcNAcylierung des Tau-K32-wt Proteins nachwies. Sowohl das Lektin WGA, als auch drei verschiedene monoklonale anti-O-GlcNAc Antikörper zeigten eine nachweisbare Bindung an das unbehandelte Protein. Die Spezifität des Lektins und der anti-O-GlcNAc Antikörper konnte jeweils durch Positiv- und Negativkontrollen belegt werden. Daher musste es sich bei der Bindung an Tau-K32-wt um eine unspezifische Bindung handeln, da das Tau-K32-wt Protein in *E. coli* exprimiert wurde. Allerdings konnten bereits Glycosylierungen in Prokaryoten nachgewiesen werden (Benz and Schmidt, 2002; Schaffer et al., 2001). Um eine protein-biochemische Methode zum Nachweis einer O-GlcNAcylierung etablieren zu können, musste ausgeschlossen werden, dass das Tau-K32-wt Protein O-GlcNAcyliert oder glycosyliert vorliegt. Daher wurde es sowohl enzymatisch mit Hilfe der β -1-2,3,4,6-*N*-Acetylglucosaminidase als auch chemisch durch eine β -Eliminierung De-GlcNAcyliert. Bei beiden Methoden konnte keine Glycosylierung nachgewiesen werden. Zum Einen wurde die Bindung des WGA oder der anti-O-GlcNAc Antikörper nicht schwächer und zum Anderen konnten im Protonenspektrum nach der β -Eliminierung keine Hinweise auf anomere Protonen von Glucose oder Galactose oder *N*-Acetylgruppen von GlcNAc oder GalNAc gefunden werden. Aus diesem Grund muss die Bindung des Lektins und der Antikörper auf eine Sekundärstruktur des Proteins zurückzuführen sein, die eine O-GlcNAcylierung mimikriert.

Trotz der Schwierigkeiten eine protein-biochemische Methode zum Nachweis einer O-GlcNAcylierung zu etablieren, wurden O-GlcNAcylierungsexperimente durchgeführt. Da WGA schon an das unbehandelte Tau-K32-wt bindet, sollte ein Anstieg in der Intensität der Bandenfärbung eine O-GlcNAcylierung nachweisen. Da im Zellextrakt aber zu viele Banden vorhanden sind, die durch WGA gebunden werden, konnte nicht unterschieden werden, bei welcher Bande es sich um das durch WGA gebundene Tau-K32-wt handelt. Aus diesem

Grund wurden keine weiteren O-GlcNAcylierungsversuche mit einem protein-biochemischen Nachweis durchgeführt.

4.2.2 NMR-spektroskopischer Nachweis einer O-GlcNAcylierung

Mit Hilfe des vollständig ^{15}N -markierten Tau-K32-*wt* wurde ein O-GlcNAcylierungsversuch in HT-22 Zellextrakt durchgeführt. Die Signale des Proteins wurden nicht zugeordnet, da dies aufgrund des partiell ungefalteten Zustands und der Prolin-reichen Abschnitte des Proteins sehr schwierig ist (Lippens et al., 2004). Die chemische Verschiebung der Tau-Signale, die von Lippens zugeordnet werden konnten, konnten in den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren von ^{15}N -Tau-K32-*wt* nicht wiedergefunden werden. Daher war auch eine partielle Zuordnung durch Vergleich mit bekannten chemischen Verschiebungen nicht möglich. Durch die Inkubation des Tau-K32-*wt* mit HT-22 Zellextrakt wurden die Intensitäten von vier verschiedenen Signalen geringer und im Abstand von jeweils $\Delta\delta = 0,8$ ppm entstanden vier neue Signale, die über den Inkubationszeitraum an Intensität zunahmen. In vorangegangenen Arbeiten konnten bereits Phosphorylierungen NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden (Landrieu et al., 2006; Selenko et al., 2008). Charakteristisch für diese Modifikation war die Tieffeldverschiebung des NH-Signals der phosphorylierten Aminosäure. Für die Serine 208, 214, 324, 356, 409 und 416 lagen diese zwischen 8,8 ppm und 9,2 ppm ^1H -chemischer Verschiebung. In den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren von ^{15}N -Tau-K32-*wt* waren in diesem Bereich keine Signale detektierbar. Daher ist anzunehmen, dass es sich bei der Änderung der chemischen Verschiebung der Signale des Tau-K32-*wt* nicht um eine Phosphorylierung handelt. In der Arbeit von Liokatis (Liokatis et al., 2010) konnten *in situ* sowohl Phosphorylierungen als auch Acetylierungen von Proteinen NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden. Die Acetylierungen führten zu einer Hochfeldverschiebung des $^1\text{H}/^{15}\text{N}\alpha$ Signals der Lysine von $\Delta\delta < 0,3$ ppm. Außerdem konnten die $^1\text{H}/^{15}\text{N}\epsilon$ Signale der Seitenketten der Lysine in den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren nachgewiesen werden. Zwar konnten diese in den NMR-Spektren des inkubierten Tau-K32-*wt* nicht nachgewiesen werden, aber die Änderung in der chemischen Verschiebung war ähnlich. Da aber der protein-biochemische Nachweis einer O-GlcNAcylierung nicht möglich war und eine Acetylierung weder ausgeschlossen noch bestätigt werden konnte, wurde ein neues Testsystem zur NMR-spektroskopischen Detektion einer O-GlcNAcylierung entwickelt.

4.3 O-GlcNAcylierungsversuche der CKII-Peptidderivate

Das CKII-Peptid ist ein 13 Aminosäuren langes Fragment der α -Untereinheit der Casein-Kinase II. Aus vorhergehenden Studien ist bekannt, dass dieses Peptid an Position 8 O-GlcNAcyliert wird (Kreppel and Hart, 1999) und dass das CKII-Peptid im Vergleich mit anderen Peptiden im Aktivitätstest der OGT am besten O-GlcNAcyliert wird (Kreppel and Hart, 1999). In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass das Ser347 der Casein-Kinase II, welches dem Ser 8 des CKII-Peptids entspricht, O-GlcNAcyliert und das Enzym so reguliert wird (Tarrant et al., 2012). Die Sequenz des CKII-Peptids, P G G S T P V S S A N M M, weist außerdem die Consensus-Sequenz P V S auf, die bei etwa der Hälfte aller gefundenen O-GlcNAcylierungsstellen auftritt (Hart, 2008).

Wie auch schon bei den Experimenten, mit deren Hilfe die O-GlcNAcylierungsstellen der Tau-K32-wt-Proteins gefunden werden sollten, sollte auch mit dem CKII-Peptid sowohl NMR-spektroskopisch als auch protein-biochemisch eine O-GlcNAcylierung nachgewiesen werden. Dieses Testsystem sollte den NMR-Spektroskopischen Nachweis einer O-GlcNAcylierung vereinfachen, da das CKII-Peptid kurz genug war, um alle NMR-Signale zuordnen zu können und außerdem die O-GlcNAcylierungsstelle bekannt war.

Für den NMR-spektroskopischen und protein-biochemischen Nachweis einer O-GlcNAcylierung des CKII-Peptids wurden zwei verschiedene Derivate dieses Peptids synthetisiert. Für den protein-biochemischen Nachweis wurde ein CKII-Peptidderivat synthetisiert, welches N-terminal über einen PEG-Spacer mit Biotin verknüpft wurde. Für den NMR-spektroskopischen Nachweis einer O-GlcNAcylierung wurde ein ^{15}N -markiertes CKII-Peptid synthetisiert, bei welchem ausschließlich das Ser 8 ^{15}N -markiert war.

Die synthetisierten Peptidderivate wurden massenspektrometrisch und NMR-spektroskopisch charakterisiert. Obwohl die theoretischen Massen und die gefundenen Massen der Peptide übereinstimmten, konnte in den NMR-Spektren jeweils der C-terminale Methionin-Rest nicht gefunden werden. Dies kann aber durch die Flexibilität des jeweiligen Peptids erklärt werden. Für das Biotin-Peptid wurde zusätzlich ein Dot-Blot durchgeführt, durch den gezeigt werden konnte, dass das Peptid biotinyliert vorliegt.

Für den protein-biochemischen Nachweis einer O-GlcNAcylierung des Biotin-Peptids wurde ein Western Blot verfahren entwickelt. Die Schwierigkeit lag darin, das relativ kleine Peptid mit einer Größe von 1,8 kDa zu blotten. Durch die Methode nach Rose (Rose et al., 2009) konnte verhindert werden, dass das Peptid durch die Membran diffundiert. Mit Hilfe von

HRP-gekoppeltem Streptavidin konnte die Peptid-Bande auf der Membran dargestellt werden. Allerdings zeigte diese Bande sowohl unter reduzierenden als auch nicht-reduzierenden Bedingungen eine Laufweite, die einem etwa 10 kDa großen Protein entsprach. Da in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass PEG mit einem Protein, unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Carboxylgruppen des Proteins und den Ethergruppen des PEG, Komplexe bilden kann (Kokufuta and Nishimura, 1991), ist auf Grund der Laufweite der Peptid-Bande davon auszugehen, dass sich ca. fünf Peptide zu einem Komplex zusammengelagert haben. Eine weitere Analyse wurde nicht durchgeführt.

Die Darstellung des ^{15}N -Peptids im ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektrum erwies sich als äußerst schwierig. Bei einem pH-Wert von 4 konnte die ^1H -chemische Verschiebung des ^{15}N -Serins des ^{15}N -Peptids mit 8,4 ppm bestimmt werden. Bei höheren pH-Werten des Puffers zwischen 6,6 und 7 konnte in den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren kein Signal detektiert werden. Auch nach der Zugabe von 1 mg/mL BSA zum Puffer, um das ^{15}N -Peptid zu stabilisieren, konnte im ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektrum kein Signal detektiert werden. Nur bei den O-GlcNAcylierungsversuchen, bei denen das ^{15}N -Peptid mit den funktionalen Extrakten der HT-22 und HEK 293 Zellen vermischt wurde, konnten zum Beginn der Inkubation ein oder zwei Signale in den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren detektiert werden. Nach dem Vergleich dieser Spektren mit denen der Kontrolle, für welche von reinem Zellextrakt ein ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektrum aufgenommen worden war, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem Signal bei 7,86 ppm ^1H -chemischer Verschiebung und 124,5 ppm ^{15}N -chemischer Verschiebung um ein Signal des Zellextrakts handelt. Daher wurde dieses Signal dem ^{15}N -Peptid zugeordnet.

4.3.1 O-GlcNAcylierungsversuche mit Biotin- und ^{15}N -Peptid

Die O-GlcNAcylierungsversuche wurden jeweils parallel mit dem ^{15}N -Peptid und dem Biotin-Peptid durchgeführt. In Anlehnung an die Inkubationsexperimente mit Tau-K32-wt wurden diese O-GlcNAcylierungsversuche zunächst in PBS durchgeführt. Protein-biochemisch konnte das Biotin-Peptid im Zellextrakt bei einer Laufweite von etwa 10 kDa, aber keine O-GlcNAcylierung nachgewiesen werden. Durch die hohe Proteaseaktivität im Zellextrakt war das Biotin-Peptid nach 6,5 h Inkubation nicht mehr detektierbar. Auch in den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren des ^{15}N -Peptids, welches sowohl mit HT-22 als auch mit HEK 293 Zellextrakt inkubiert worden war, konnte eine Verringerung der Signalintensität über den Inkubationszeitraum beobachtet werden. Da beide Peptide keine ausreichende

Stabilität zeigten, wurde die Zusammensetzung des Lysepuffers geändert, um die Peptide besser zu stabilisieren und die Proteasen im Zellextrakt zu inhibieren. Dafür wurden die Protokolle von Clarke (Clarke et al., 2008) und Iyer (Iyer and Hart, 2003) verwendet. Diese verwendeten Tris-Puffer mit 1 mM DTT und 12,5 mM MgCl_2 in ihren OGT-Aktivitätstests. Tris-Puffer war für die NMR-Messungen allerdings ungeeignet, da die in H_2O gemessen wurde, wodurch es ein Protonensignal (Baryshnikova et al., 2008) geliefert hätte, welches alle übrigen Signale überlagert hätte. Außerdem wurde die Konzentration des Protease-Inhibitors erhöht, um den schnelleren Abbau der Peptide zu verhindern. Wieder konnte bei Inkubationen sowohl mit HT-22 als auch HEK 293 Zellextrakt der schnelle Abbau der Peptide und keine O-GlcNAcylierung beobachtet werden.

Da der verwendete Protease-Inhibitor keine Metalloproteasen inhibierte, wurde die Zusammensetzung des Lysepuffers geändert. Statt des MgCl_2 wurde EDTA zugesetzt, um die zweiwertigen Kationen zu komplexieren, die Metalloproteasen für ihre Aktivität benötigen. Durch diese Pufferzusammensetzung war es das erste Mal möglich ein neu entstehendes Signal in den $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren zu detektieren, allerdings nur mit HEK 293 Zellextrakt. Die Proteaseaktivität in den HT-22 Zellextrakten war zu groß, so dass das Peptid zu schnell abgebaut wurde. Protein-biochemisch war es möglich das Biotin-Peptid mit seinem tatsächlichen Molekulargewicht zu detektieren und außerdem erste Hinweise auf eine O-GlcNAcylierung zu finden. Die Hinweise in den $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren auf eine O-GlcNAcylierung waren deutlich zu erkennen. Nach etwa 2 h Inkubation entstand ein neues Signal, dessen $\Delta\delta$ nicht denen entsprach, die bei den Inkubationsversuchen mit Tau-K32-wt gefunden wurden. Neben dem ^{15}N -Signal des ^{15}N -Peptids entstand bei gleicher ^{15}N -chemischer Verschiebung ein neues Signal mit einer Tieffeldverschiebung in F2 um 0,07 ppm. Dessen $\Delta\delta$ war nicht identisch mit den in der Literatur aufgeführten Werten für Phosphorylierungen und Acetylierungen (Landrieu et al., 2006; Liokatis et al., 2010), sodass zusammen mit den Ergebnissen des Western Blots von Biotin-Peptid davon ausgegangen werden konnte, dass es sich um eine O-GlcNAcylierung handelte.

Allerdings zeigte eine kürzlich erschienene Studie den NMR-spektroskopischen Nachweis einer O-GlcNAcylierung von Tau-Peptiden (Smet-Nocca et al., 2011), bei der das neue Signal eine eindeutig andere Verschiebung aufwies, als die des ^{15}N -Peptids in der vorliegenden Arbeit (vergleiche Tabelle 15). Im $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektrum dieser Studie von Smet-Nocca et al. wurde eine Hochfeldverschiebung des Signals des

O-GlcNAcylierten Serins mit $\Delta\delta = 0,9$ detektiert. Dabei wurde die O-GlcNAcylierung über Massenspektren verifiziert. Außerdem waren benachbarte Serine des Tau-Peptids ebenfalls von einer Änderung ihrer chemischen Verschiebung betroffen und das NH-Signal des O-GlcNAc-Restes konnte detektiert werden, da ^{15}N -markiertes UDP-GlcNAc für die O-GlcNAcylierungen verwendet wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen unmarkiertes UDP-GlcNAc verwendet, weshalb kein NH-Signal des O-GlcNAc in den ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren detektiert werden konnte. Zusätzlich wurden in der Studie von Smet-Nocca et al. ^1H - ^1H -TOCSY und ^1H , ^{13}C -HMQC-NMR-Spektren aufgenommen, durch welche die O-GlcNAcylierung des Tau-Peptids eindeutig nachgewiesen werden konnte. Allerdings ist das Tau-Peptid um sieben Aminosäuren länger als das hier verwendete ^{15}N -Peptid und die Sequenzen unterscheiden sich stark voneinander. Die beobachtete Änderung der chemischen Verschiebung des ^{15}N -Peptids ($\Delta\delta = 0,07$) entspricht der des benachbarten Serins 404 des Tau-Peptids in der Studie von Smet-Nocca et al. mit $\Delta\delta < 0,2$ (vergleiche Tabelle 15). Daher wäre es möglich, dass ein anderes Serin des ^{15}N -Peptids O-GlcNAcyliert wird und die beobachtete Änderung der chemischen Verschiebung lediglich die Auswirkung dieser O-GlcNAcylierung zeigt und nicht selbst eine O-GlcNAcylierung darstellt. Da aber von Tarrant et al. gezeigt werden konnte, dass das Ser347 der Casein-Kinase II, welches dem Ser 8 des ^{15}N -Peptids entspricht, *in vitro* O-GlcNAcyliert wird (Tarrant et al., 2012), kann es im Fall des ^{15}N -Peptids nicht sein, dass ein anderes Serin O-GlcNAcyliert wird.

Tabelle 15: Vergleich der in der Literatur gefundenen Änderungen der chemischen Verschiebung der NH-Signale von Serinen bei O-GlcNAcylierung und benachbarter Serine mit der in dieser Arbeit detektierten Änderung der chemischen Verschiebung des NH-Signals des ^{15}N -Peptids in O-GlcNAcylierungsversuchen in ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektren.

	Aminosäure	$\Delta\delta$
Smet-Nocca et al.	Ser 400 O-GlcNAc	0,9
	Ser 404	< 0,2
^{15}N -Peptid	Ser 8	0,07

Außerdem wurde in der Studie von Smet-Nocca et al. die O-GlcNAcylierung nicht in Zellextrakten sondern mit in *E. coli* exprimierter OGT durchgeführt. Daher stellt die von Smet-Nocca et al. NMR-spektroskopisch nachgewiesene O-GlcNAcylierung keinen

Widerspruch zu der in dieser Arbeit detektierten O-GlcNAcylierung dar. Aufgrund der unterschiedlichen O-GlcNAcylierungsmethoden sowie der stark unterschiedlichen Peptidsequenzen sind durchaus beide Änderungen der chemischen Verschiebung der ^{15}N -markierten Peptide möglich.

4.3.2 Schlussfolgerung und Ausblick

Sowohl der protein-biochemische als auch der NMR-spektroskopische Nachweis einer O-GlcNAcylierung von CKII-Peptidderivaten erwies sich als äußerst schwierig. Nachdem die Bedingungen für eine O-GlcNAcylierung mit zellulären Extrakten optimiert worden waren, konnten erste Hinweise sowohl protein-biochemisch als auch NMR-spektroskopisch detektiert werden. Um zu zeigen, dass es sich tatsächlich bei der Änderung der chemischen Verschiebung des ^{15}N -Peptids in den $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Spektren um eine O-GlcNAcylierung handelt, muss der protein-biochemische Nachweis einer O-GlcNAcylierung weiter verbessert werden. Außerdem sollten von den O-GlcNAcylierungsversuchen ^1H - ^1H -TOCSY- und $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HMQC-NMR-Spektren aufgenommen werden, um eine O-GlcNAcylierung zu bestätigen. Durch die Verwendung eines vollständig ^{15}N -markierten CKII-Peptids für die Untersuchungen könnten die Auswirkungen einer möglichen O-GlcNAcylierung auf die übrigen Aminosäuren beobachtet werden.

Durch den NMR-spektroskopischen Nachweis von O-GlcNAcylierungen ist es später möglich, das O-GlcNAcylierungsmuster verschiedener Protein zu beobachten. Wenn die Zuordnung der Proteinsignale bekannt ist, lassen sich schnell die Aminosäuren identifizieren, die neu O-GlcNAcyliert oder de-GlcNAcyliert werden. So könnte beispielsweise das Tau Protein gesunder mit dem von an Alzheimer erkrankten Personen verglichen werden, um herauszufinden, welche Aminosäuren bei gesundem Tau O-GlcNAcyliert vorliegen und wie sich dieses O-GlcNAcylierungsmuster im Krankheitsverlauf ändert.

Literaturverzeichnis

- Arnold, C.S., Johnson, G.V., Cole, R.N., Dong, D.L., Lee, M., and Hart, G.W. (1996). The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 271, 28741-28744.
- Ballatore, C., Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat Rev Neurosci* 8, 663-672.
- Baryshnikova, O.K., Williams, T.C., and Sykes, B.D. (2008). Internal pH indicators for biomolecular NMR. *Journal of Biomolecular NMR* 41, 5-7.
- Bell, G.I., Kayano, T., Buse, J.B., Burant, C.F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H., and Seino, S. (1990). Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes care* 13, 198-208.
- Benz, I., and Schmidt, M.A. (2002). Never say never again: protein glycosylation in pathogenic bacteria. *Molecular microbiology* 45, 267-276.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). *Biochemistry*, 5th edn (New York: W. H. Freeman and Company).
- Bouzier-Sore, A.K., Voisin, P., Canioni, P., Magistretti, P.J., and Pellerin, L. (2003). Lactate is a preferential oxidative energy substrate over glucose for neurons in culture. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 1298-1306.
- Bouzier-Sore, A.K., Voisin, P., Bouchaud, V., Bezancon, E., Franconi, J.M., and Pellerin, L. (2006). Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *European Journal of Neuroscience* 24, 1687-1694.
- Braidman, I., Carroll, M., Dance, N., Robinson, D., Poenaru, L., Weber, A., Dreyfus, J.C., Overdijk, B., and Hooghwinkel, G.J. (1974). Characterisation of human N-acetyl-beta-hexosaminidase C. *FEBS Lett* 41, 181-184.
- Buse, M.G. (2006). Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290, E1-E8.
- Butkinaree, C., Park, K., and Hart, G.W. (2009). O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochim Biophys Acta*.
- Cabib, E., Leloir, L.F., and Cardini, C.E. (1953). Uridine Diphosphate Acetylglucosamine. *Journal of Biological Chemistry* 203, 1055-1070.

- Chou, T.Y., Hart, G.W., and Dang, C.V. (1995). c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem* 270, 18961-18965.
- Clarke, A.J., Hurtado-Guerrero, R., Pathak, S., Schuttelkopf, A.W., Borodkin, V., Shepherd, S.M., Ibrahim, A.F., and van Aalten, D.M. (2008). Structural insights into mechanism and specificity of O-GlcNAc transferase. *EMBO J* 27, 2780-2788.
- Copeland, R.J., Bullen, J.W., and Hart, G.W. (2008). Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E17-28.
- Dong, D.L., and Hart, G.W. (1994). Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J Biol Chem* 269, 19321-19330.
- Döpfkens, M., Gallinger, A., Biet, T., and Peters, T. (unpublished). Perchloric acid extraction is not suitable for quantitative detection of activated sugar nucleotides as evaluated by ¹H-NMR studies.
- Fan, T.W., Lane, A.N., Higashi, R.M., Farag, M.A., Gao, H., Bousamra, M., and Miller, D.M. (2009). Altered regulation of metabolic pathways in human lung cancer discerned by (¹³C) stable isotope-resolved metabolomics (SIRM). *Mol Cancer* 8, 41.
- Fan, T.W.M., Yuan, P.X., Lane, A.N., Higashi, R.M., Wang, Y., Hamidi, A.B., Zhou, R.L., Guitart, X., Chen, G., Manji, H.K., *et al.* (2010). Stable isotope-resolved metabolomic analysis of lithium effects on glial-neuronal metabolism and interactions. *Metabolomics* 6, 165-179.
- Fukuda, M. (2001). β -Elimination for Release of O-GalNAc-Linked Oligosaccharides from Glycoproteins and Glycopeptides (John Wiley & Sons, Inc.).
- Gallinger, A. (2008). Untersuchung des Metabolismus von Neuronen unter Berücksichtigung der „Selfish Brain“ Theorie. In Institut für Chemie (Lübeck: Universität zu Lübeck), pp. 55.
- Gallinger, A., Biet, T., Pellerin, L., and Peters, T. (2011). Insights into neuronal cell metabolism using NMR spectroscopy: uridyl diphosphate N-acetyl-glucosamine as a unique metabolic marker. *Angew Chem Int Ed Engl* 50, 11672-11674.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., and Wisniewski, H.M. (1986a). Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261, 6084-6089.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986b). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 4913-4917.

- Haltiwanger, R.S., Holt, G.D., and Hart, G.W. (1990). Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 265, 2563-2568.
- Haltiwanger, R.S., Blomberg, M.A., and Hart, G.W. (1992). Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J Biol Chem* 267, 9005-9013.
- Hanover, J.A., Krause, M.W., and Love, D.C. (2009). The hexosamine signaling pathway: O-GlcNAc cycling in feast or famine. *Biochim Biophys Acta*.
- Hart, G.W., Housley, M.P., and Slawson, C. (2007). Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 446, 1017-1022.
- Hart, G.W. (2008). The O-GlcNAc Modification. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, ed., pp. 263 - 279.
- Hart, G.W., and Akimoto, Y. (2009). The O-GlcNAc Modification. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Hart, G.W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G., and Lagerlof, O. (2011). Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem* 80, 825-858.
- Housley, M.P., Rodgers, J.T., Udeshi, N.D., Kelly, T.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Puigserver, P., and Hart, G.W. (2008). O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose. *J Biol Chem* 283, 16283-16292.
- Hoyer, S. (1993). Intermediary metabolism disturbance in AD/SDAT and its relation to molecular events. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 17, 199-228.
- Hoyer, S. (2004). Causes and consequences of disturbances of cerebral glucose metabolism in sporadic Alzheimer disease: therapeutic implications. *Advances in experimental medicine and biology* 541, 135-152.
- Hu, Y., Suarez, J., Fricovsky, E., Wang, H., Scott, B.T., Trauger, S.A., Han, W., Oyeleye, M.O., and Dillmann, W.H. (2009). Increased enzymatic O-GlcNAcylation of mitochondrial proteins impairs mitochondrial function in cardiac myocytes exposed to high glucose. *J Biol Chem* 284, 547-555.
- Iyer, S.P., and Hart, G.W. (2003). Roles of the tetratricopeptide repeat domain in O-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity. *J Biol Chem* 278, 24608-24616.

- Jans, A.W., and Leibfritz, D. (1989). A ^{13}C NMR study on fluxes into the Krebs cycle of rabbit renal proximal tubular cells. *NMR Biomed* 1, 171-176.
- Kaddurah-Daouk, R., Kristal, B.S., and Weinshilboum, R.M. (2008). Metabolomics: a global biochemical approach to drug response and disease. *Annual review of pharmacology and toxicology* 48, 653-683.
- Kaddurah-Daouk, R., and Krishnan, K.R. (2009). Metabolomics: a global biochemical approach to the study of central nervous system diseases. *Neuropsychopharmacology* : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 34, 173-186.
- Kang, J.G., Park, S.Y., Ji, S., Jang, I., Park, S., Kim, H.S., Kim, S.M., Yook, J.I., Park, Y.I., Roth, J., *et al.* (2009). O-GlcNAc protein modification in cancer cells increases in response to glucose deprivation through glycogen degradation. *J Biol Chem* 284, 34777-34784.
- Khidekel, N., Ficarro, S.B., Clark, P.M., Bryan, M.C., Swaney, D.L., Rexach, J.E., Sun, Y.E., Coon, J.J., Peters, E.C., and Hsieh-Wilson, L.C. (2007). Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nat Chem Biol* 3, 339-348.
- Kokufuta, E., and Nishimura, H. (1991). Complexation of pepsin poly(ethylene glycol). *Polymer Bulletin* 26, 277-282.
- Kreppel, L.K., and Hart, G.W. (1999). Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 274, 32015-32022.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Landrieu, I., Lacosse, L., Leroy, A., Wieruszeski, J.M., Trivelli, X., Sillen, A., Sibille, N., Schwalbe, H., Saxena, K., Langer, T., *et al.* (2006). NMR analysis of a Tau phosphorylation pattern. *J Am Chem Soc* 128, 3575-3583.
- Lefebvre, T., Dehennaut, V., Guinez, C., Olivier, S., Drougat, L., Mir, A.M., Mortuaire, M., Vercoutter-Edouart, A.S., and Michalski, J.C. (2010). Dysregulation of the nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorders, type-2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1800, 67-79.
- Li, X., Lu, F., Wang, J.Z., and Gong, C.X. (2006). Concurrent alterations of O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in mouse brains during fasting. *Eur J Neurosci* 23, 2078-2086.
- Liokatis, S., Dose, A., Schwarzer, D., and Selenko, P. (2010). Simultaneous Detection of Protein Phosphorylation and Acetylation by High-Resolution NMR Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 132, 14704-14705.

- Lippens, G., Wieruszeski, J.M., Leroy, A., Smet, C., Sillen, A., Buee, L., and Landrieu, I. (2004). Proline-directed random-coil chemical shift values as a tool for the NMR assignment of the tau phosphorylation sites. *Chembiochem* 5, 73-78.
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Hart, G.W., and Gong, C.X. (2004). O-GlcNAcylation regulates phosphorylation of tau: a mechanism involved in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10804-10809.
- Liu, F., Shi, J., Tanimukai, H., Gu, J., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.X. (2009a). Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer's disease. *Brain* 132, 1820-1832.
- Liu, Y., Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., and Gong, C.X. (2008). Decreased glucose transporters correlate to abnormal hyperphosphorylation of tau in Alzheimer disease. *FEBS Lett* 582, 359-364.
- Liu, Y., Liu, F., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., and Gong, C.X. (2009b). Brain glucose transporters, O-GlcNAcylation and phosphorylation of tau in diabetes and Alzheimer's disease. *J Neurochem* 111, 242-249.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P. (2003). *Molecular Cell Biology* (Palgrave Macmillan).
- Love, D.C., and Hanover, J.A. (2005). The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE* 2005, re13.
- Lutz, N.W., Yahi, N., Fantini, J., and Cozzone, P.J. (1996). A new method for the determination of specific ¹³C enrichment in phosphorylated [1-¹³C]glucose metabolites. ¹³C-coupled, ¹H-decoupled ³¹P-NMR spectroscopy of tissue perchloric acid extracts. *Eur J Biochem* 238, 470-475.
- Maher, P., and Davis, J.B. (1996). The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci* 16, 6394-6401.
- Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-1934.
- Marshall, S., Bacote, V., and Traxinger, R.R. (1991). Discovery of a Metabolic Pathway Mediating Glucose-Induced Desensitization of the Glucose-Transport System - Role of Hexosamine Biosynthesis in the Induction of Insulin Resistance. *Journal of Biological Chemistry* 266, 4706-4712.
- Merrifield, R.B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* 85, 2149-2154.
- Milewski, S. (2002). Glucosamine-6-phosphate synthase--the multi-facets enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1597, 173-192.

- Moolenaar, S.H., Engelke, U.F., and Wevers, R.A. (2003). Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy of body fluids in the field of inborn errors of metabolism. *Annals of clinical biochemistry* 40, 16-24.
- Moseley, H.N., Lane, A.N., Belshoff, A.C., Higashi, R.M., and Fan, T.W. (2011). A novel deconvolution method for modeling UDP-N-acetyl-D-glucosamine biosynthetic pathways based on (13)C mass isotopologue profiles under non-steady-state conditions. *BMC biology* 9, 37.
- Rose, J.B., Crews, L., Rockenstein, E., Adame, A., Mante, M., Hersh, L.B., Gage, F.H., Spencer, B., Potkar, R., Marr, R.A., *et al.* (2009). Neuropeptide Y fragments derived from neprilysin processing are neuroprotective in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29, 1115-1125.
- Rossetti, L. (2000). Perspective: Hexosamines and nutrient sensing. *Endocrinology* 141, 1922-1925.
- Schaffer, C., Graninger, M., and Messner, P. (2001). Prokaryotic glycosylation. *Proteomics* 1, 248-261.
- Selenko, P., Frueh, D.P., Elsaesser, S.J., Haas, W., Gygi, S.P., and Wagner, G. (2008). In situ observation of protein phosphorylation by high-resolution NMR spectroscopy. *Nat Struct Mol Biol* 15, 321-329.
- Shokati, T., Zwingmann, C., and Leibfritz, D. (2005). Contribution of extracellular glutamine as an anaplerotic substrate to neuronal metabolism: A re-evaluation by multinuclear NMR spectroscopy in primary cultured neurons. *Neurochemical Research* 30, 1269-1281.
- Small, G.W., Ercoli, L.M., Silverman, D.H., Huang, S.C., Komo, S., Bookheimer, S.Y., Lavretsky, H., Miller, K., Siddarth, P., Rasgon, N.L., *et al.* (2000). Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6037-6042.
- Smet-Nocca, C., Broncel, M., Wieruszeski, J.M., Tokarski, C., Hanouille, X., Leroy, A., Landrieu, I., Rolando, C., Lippens, G., and Hackenberger, C.P. (2011). Identification of O-GlcNAc sites within peptides of the Tau protein and their impact on phosphorylation. *Mol Biosyst* 7, 1420-1429.
- Smet, C., Leroy, A., Sillen, A., Wieruszeski, J.M., Landrieu, I., and Lippens, G. (2004). Accepting its random coil nature allows a partial NMR assignment of the neuronal Tau protein. *ChemBiochem* 5, 1639-1646.
- Smith, G.S., de Leon, M.J., George, A.E., Kluger, A., Volkow, N.D., McRae, T., Golomb, J., Ferris, S.H., Reisberg, B., Ciaravino, J., *et al.* (1992). Topography of cross-sectional and longitudinal glucose metabolic deficits in Alzheimer's disease. Pathophysiologic implications. *Archives of neurology* 49, 1142-1150.

- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Spiro, M.J. (1984). Effect of diabetes on the sugar nucleotides in several tissues of the rat. *Diabetologia* 26, 70-75.
- Sumegi, B., Podanyi, B., Forgo, P., and Kover, K.E. (1995). Metabolism of [3-¹³C]pyruvate and [3-¹³C]propionate in normal and ischaemic rat heart in vivo: ¹H- and ¹³C-NMR studies. *Biochem J* 312 (Pt 1), 75-81.
- Tarrant, M.K., Rho, H.S., Xie, Z., Jiang, Y.L., Gross, C., Culhane, J.C., Yan, G., Qian, J., Ichikawa, Y., Matsuoka, T., *et al.* (2012). Regulation of CK2 by phosphorylation and O-GlcNAcylation revealed by semisynthesis. *Nat Chem Biol* 8, 262-269.
- Taylor, R.P., Geisler, T.S., Chambers, J.H., and McClain, D.A. (2009). Up-regulation of O-GlcNAc transferase with glucose deprivation in HepG2 cells is mediated by decreased hexosamine pathway flux. *J Biol Chem* 284, 3425-3432.
- Teng, Q., Huang, W.L., Collette, T.W., Ekman, D.R., and Tan, C. (2009). A direct cell quenching method for cell-culture based metabolomics. *Metabolomics* 5, 199-208.
- Teo, C.F., Ingale, S., Wolfert, M.A., Elsayed, G.A., Not, L.G., Chatham, J.C., Wells, L., and Boons, G.J. (2010). Glycopeptide-specific monoclonal antibodies suggest new roles for O-GlcNAc. *Nature Chemical Biology* 6, 338-343.
- Torres, C.R., and Hart, G.W. (1984). Topography and Polypeptide Distribution of Terminal N-Acetylglucosamine Residues on the Surfaces of Intact Lymphocytes - Evidence for O-Linked Glcna. *Journal of Biological Chemistry* 259, 3308-3317.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Trinczek, B., Biernat, J., Baumann, K., Mandelkow, E.M., and Mandelkow, E. (1995). Domains of tau protein, differential phosphorylation, and dynamic instability of microtubules. *Mol Biol Cell* 6, 1887-1902.
- Varki, A., and Sharon, N. (2009). Historical Background and Overview. In *Essentials of Glycobiology*, A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, and M.E. Etzler, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Vocadlo, D.J., Hang, H.C., Kim, E.J., Hanover, J.A., and Bertozzi, C.R. (2003). A chemical approach for identifying O-GlcNAc-modified proteins in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 9116-9121.

- Wang, J., Liu, R., Hawkins, M., Barzilai, N., and Rossetti, L. (1998). A nutrient-sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393, 684-688.
- Wang, Z., Park, K., Comer, F., Hsieh-Wilson, L.C., Saudek, C.D., and Hart, G.W. (2009). Site-specific GlcNAcylation of human erythrocyte proteins: potential biomarker(s) for diabetes. *Diabetes* 58, 309-317.
- Wang, Z., Udeshi, N.D., O'Malley, M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Hart, G.W. (2010). Enrichment and site-mapping of O-Linked N-Acetylglucosamine by a combination of chemical/enzymatic tagging, photochemical cleavage, and electron transfer dissociation (ETD) mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*.
- Wells, L., Vosseller, K., and Hart, G.W. (2003). A role for N-acetylglucosamine as a nutrient sensor and mediator of insulin resistance. *Cell Mol Life Sci* 60, 222-228.
- Whelan, S.A., and Hart, G.W. (2003). Proteomic approaches to analyze the dynamic relationships between nucleocytoplasmic protein glycosylation and phosphorylation. *Circ Res* 93, 1047-1058.
- Whitworth, G.E., Macauley, M.S., Stubbs, K.A., Dennis, R.J., Taylor, E.J., Davies, G.J., Greig, I.R., and Vocadlo, D.J. (2007). Analysis of PUGNAc and NAG-thiazoline as transition state analogues for human O-GlcNAcase: mechanistic and structural insights into inhibitor selectivity and transition state poise. *J Am Chem Soc* 129, 635-644.
- Wice, B.M., Trugnan, G., Pinto, M., Rousset, M., Chevalier, G., Dussaulx, E., Lacroix, B., and Zweibaum, A. (1985). The intracellular accumulation of UDP-N-acetylhexosamines is concomitant with the inability of human colon cancer cells to differentiate. *J Biol Chem* 260, 139-146.
- Wishart, D.S., Bigam, C.G., Yao, J., Abildgaard, F., Dyson, H.J., Oldfield, E., Markley, J.L., and Sykes, B.D. (1995). ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR. *J Biomol NMR* 6, 135-140.
- Wishart, D.S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A.C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., Arndt, D., Sawhney, S., *et al.* (2007). HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic acids research* 35, D521-526.
- Wishart, D.S. (2008). Quantitative metabolomics using NMR. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27, 228-237.
- Yuzwa, S.A., Yadav, A.K., Skorobogatko, Y., Clark, T., Vosseller, K., and Vocadlo, D.J. (2011). Mapping O-GlcNAc modification sites on tau and generation of a site-specific O-GlcNAc tau antibody. *Amino acids* 40, 857-868.
- Zachara, N.E. (2009). Detecting the "O-GlcNAc-ome"; detection, purification, and analysis of O-GlcNAc modified proteins. *Methods Mol Biol* 534, 251-279.

- Zhivkov, V., Tosheva, R., and Zhivkova, Y. (1975). Concentration of uridine diphosphate sugars in various tissues of vertebrates. *Comp Biochem Physiol B* 51, 421-424.
- Zwingmann, C., Richter-Landsberg, C., Brand, A., and Leibfritz, D. (2000). NMR spectroscopic study on the metabolic fate of [3-C-13]alanine in astrocytes, neurons, and cocultures: Implications for glia-neuron interactions in neurotransmitter metabolism. *Glia* 32, 286-303.
- Zwingmann, C., Richter-Landsberg, C., and Leibfritz, D. (2001). C-13 isotopomer analysis of glucose and alanine metabolism reveals cytosolic pyruvate compartmentation as part of energy metabolism in astrocytes. *Glia* 34, 200-212.
- Zwingmann, C., and Leibfritz, D. (2003). Regulation of glial metabolism studied by ¹³C-NMR. *NMR in biomedicine* 16, 370-399.

Anhang

NMR-Daten

Tabelle 16: Teilzuordnung der gefundenen Metabolite in den ^1H , ^{13}C -HSQC-NMR-Spektren. Es wurde auf einen internen Standard (TSP) referenziert

<i>Metabolit</i>	<i>^1H-chemische Verschiebung</i>	<i>^{13}C-chemische Verschiebung</i>
3-Phosphoglycerat C2/H2	4,06	75,10
3-Phosphoglycerat C3/H3	4,03	69,53
3-Phosphoglycerat C3/H3'	3,88	69,53
Acetat	1,92	26,12
Acetyl-CoA	4,81	76,90
Acetyl-CoA	8,54	142,84
Acetyl-CoA	6,16	89,71
Acetyl-CoA	4,26	67,80
Alanin C α /H α	3,80	53,37
Alanin C β /H β	1,49	19,10
Asparagin/Aspartat C α /H α	3,90	54,97
Asparagin/Aspartat C β /H β	2,82	39,34
Asparagin/Aspartat C β /H β	2,70	39,34
ATP	4,81	76,90
ATP	8,54	142,84
ATP	6,16	89,71
ATP	4,26	67,80
ATP	4,61	73,05
ATP	4,42	86,64
Citrat	2,68	48,40
Citrat	2,54	48,40
CMP-NeuNAc	6,01	92,12
CMP-NeuNAc	6,15	99,49

Dihydroxyacetonphosphat	4,50	70,16
Fructose-1,6-bisphosphate CH3	3,79	68,63
Fructose-1,6-bisphosphate oder Fructose-6-phosphat CH6	3,93	67,14
Fructose-1,6-bisphosphate oder Fructose-6-phosphat CH6	3,88	67,08
Fructose-6-phosphat CH 1 alpha	3,65	65,52
GlcNAc	5,22	93,55
GlcNAc	4,75	97,86
GlcNAc	3,85	63,30
GlcNAc-6-phosphat CH 5	3,93	56,84
Glucose CH 2 beta	3,54	74,02
Glucose CH 2 beta	3,29	77,20
Glucose CH 6 alpha, beta	3,85	63,30
Glucose CH1 alpha	5,25	94,97
Glucose CH1 beta	4,66	98,80
Glucose-1-phosphat	3,85	63,30
Glucose-1-phosphat CH1	5,47	96,72
Glucose-6-phosphat CH6	4,02	66,40
Glutamat C α /H α	3,77	57,47
Glutamat C β /H β	2,10	29,90
Glutamat C γ /H γ	2,36	36,34
Glycin C α /H α	3,57	44,22
Laktat C2/H2	4,12	71,38
Laktat C3/H3	1,33	22,97
Malat	4,31	73,14
Malat	2,68	45,47
Malat	2,37	45,47
ManNAc CH 4 alpha	3,60	69,29
NAD	4,26	67,80

NAD	4,36	67,80
NAD	6,04	89,71
NAD	6,10	102,94
Phosphoenolpyruvat	5,36	103,81
Phosphoenolpyruvat	5,20	103,23
Succinat	2,41	36,28
Succinyl-CoA	4,81	76,90
Succinyl-CoA	8,54	142,84
Succinyl-CoA	6,16	89,71
Succinyl-CoA	4,26	67,80
UDP-Gal C1/H1	5,65	98,66
UDP-Gal C6/H6 des Uridin	5,98	105,59
UDP-Gal C1'/H1' der Ribose	6,00	91,34
UDP-GalNAc C1/H1	5,56	97,54
UDP-GalNAc C1'/H1' der Ribose	6,00	91,34
UDP-GalNAc C6/H6 des Uridin	5,98	105,59
UDP-Glc C1/H1	5,61	98,49
UDP-Glc C6/H6 des Uridin	5,98	105,59
UDP-Glc C1'/H1' der Ribose	6,00	91,34
UDP-GlcNAc C1/H1	5,53	97,46
UDP-GlcNAc C6/H6 des Uridin	5,98	105,59
UDP-GlcNAc C1'/H1' der Ribose	6,00	91,34
UDP-GlcNAc C4'/H4' der Ribose	4,30	86,01
UDP-GlcNAc C5'/H5' der Ribose	4,26	67,80
UDP-GlcNAc <i>N</i> -Acetylgruppe	2,08	24,83

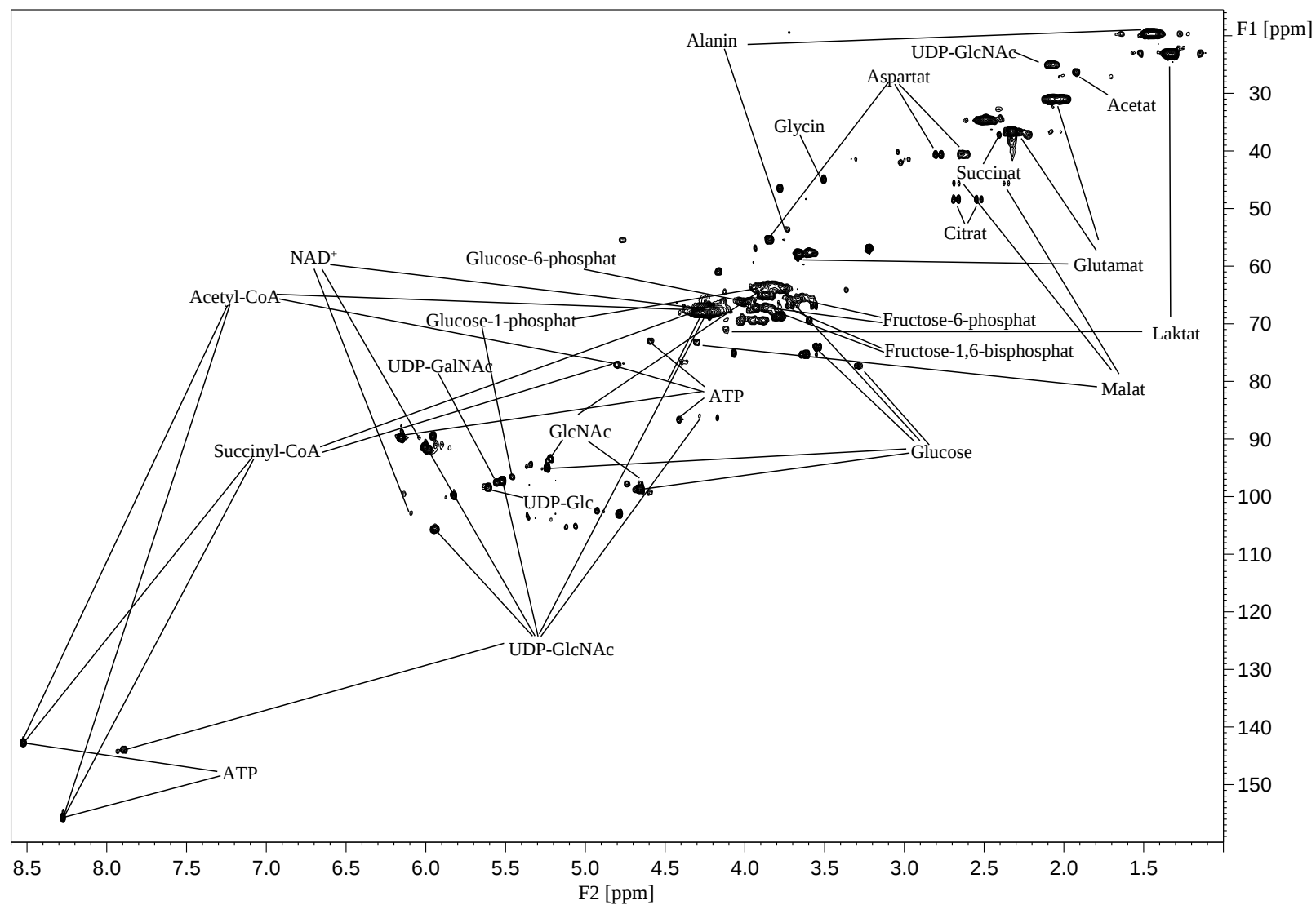


Abbildung 70: 2D-HSQC-NMR-Spektrum von HT-22 Zellextrakt nach 24-stündiger Inkubation mit ^{13}C -Glucose (Perchlorsäureextraktion) mit vollständiger Zuordnung der Metabolite.

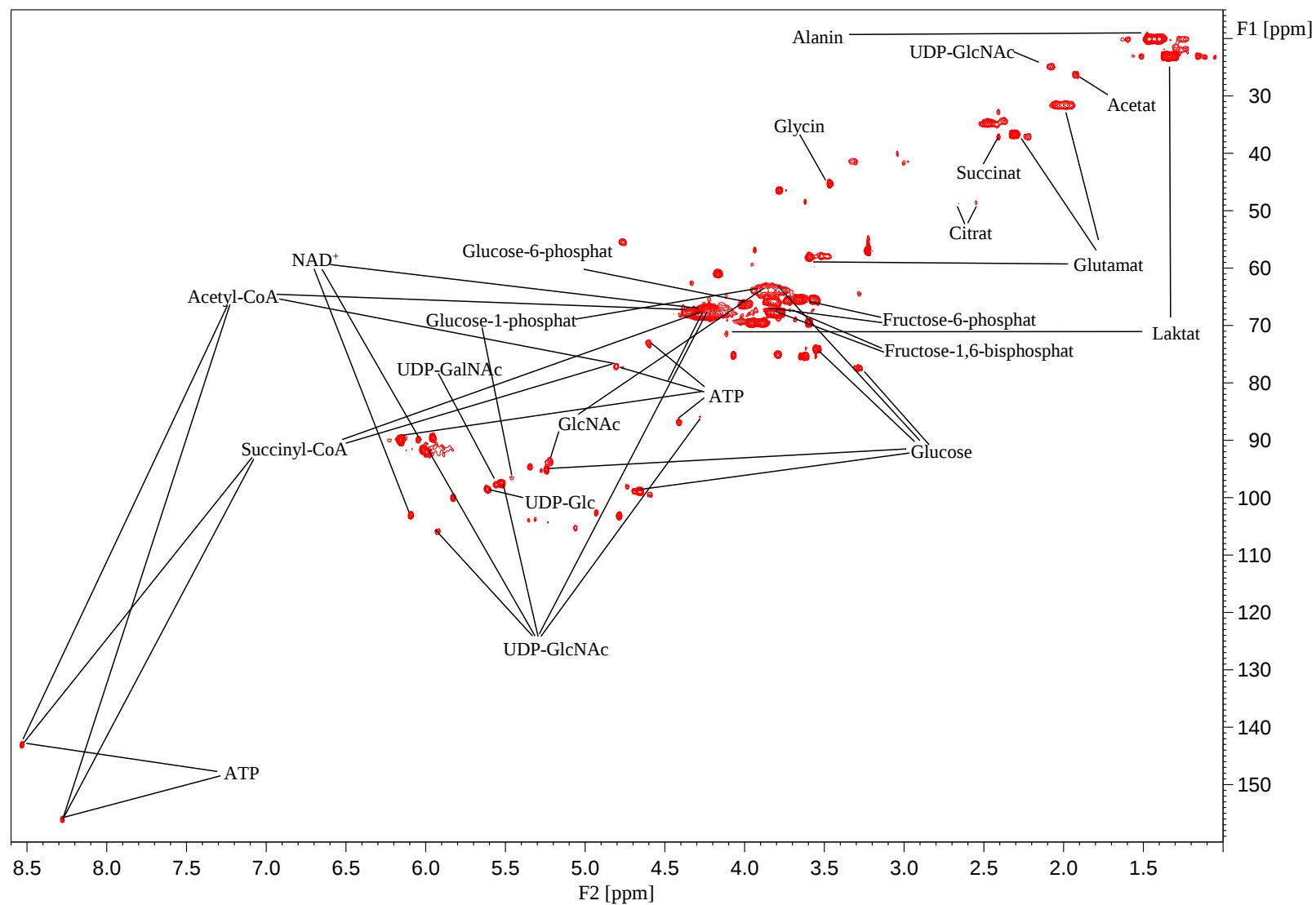


Abbildung 71: 2D-HSQC-NMR-Spektrum von HT-22 Zellextrakt nach 24-stündiger Inkubation mit ^{13}C -Glucose und Natriumazid (Perchlorsäureextraktion) und vollständige Zuordnung der Metabolite.

Charakterisierung der synthetisierten Peptide

Alle Peptide wurden nach der in Kapitel 2.4.4 beschriebenen Methode gereinigt.

Tabelle 17: Charakterisierung des Biotin-Peptids

Biotin-Peptid	Biotin-PEG-P G G S T P V S S A N M M
Molmasse [g/mol]	1778,08
Monoisotopische Masse [g/mol]	1777,21
Summenformel	C ₇₄ H ₁₂₄ N ₁₈ O ₂₇ S ₃
Ansatzgröße [μmol]	50
Ausbeute	14 mg (7,87 μmol, 15,7%)
MALDI-TOF (m/z)	1799,9 [M+Na ⁺], 1815,2 [M+K ⁺]

Tabelle 18: ¹H-chemische Verschiebungen in [ppm] des Biotin-Peptids. Das Spektrum wurde in Natriumacetatpuffer pH 4 aufgenommen. Es wurde auf einen internen Standard (TSP) referenziert.

	<i>NH</i>	<i>Hα</i>	<i>Hβ</i>	<i>Hγ</i>
Gly	8,57	3,96	-	-
Gly	8,36	4,00	-	-
Ser	8,28	4,51	3,84	-
Thr	8,24	4,60	4,11	1,24
Val	8,28	4,07	2,06	0,95
Ser	8,4	4,47	3,89	-
Ser	8,4	4,47	3,89	-
Ala	8,29	4,27	1,37	-
Asn	8,28	4,65	2,8	-
Met	8,26	4,44	2,04	2,57
Met	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Tabelle 19: Theoretische und gefundene Massen, der jeweiligen Ionen des ^{15}N -Peptids

^{15}N -Peptid	P G G S T P V S(^{15}N) S A N M M
Molmasse [g/mol]	1236,39
Monoisotopische Masse [g/mol]	1235,53
Summenformel	$\text{C}_{49}\text{H}_{82}\text{N}_{14}\text{O}_{19}\text{S}_2$
Ansatzgröße [μmol]	50
Ausbeute	16,4 mg (13,3 μmol , 26,5%)
MALDI-TOF (m/z)	1236,5 [$\text{M}+\text{H}^+$], 1258,5 [$\text{M}+\text{Na}^+$], 1274,5 [$\text{M}+\text{K}^+$]

Tabelle 20: ^1H -chemische Verschiebungen in [ppm] des ^{15}N -Peptids. Das Spektrum wurde in Natriumacetatpuffer pH 4 aufgenommen. Es wurde auf einen internen Standard (TSP) referenziert. n. d. = nicht identifiziert

	<i>NH</i>	<i>Hα</i>	<i>Hβ</i>	<i>Hγ</i>
Gly	8,78	4,02	-	-
Gly	8,45	3,98	-	-
Ser	8,31	4,48	3,83	
Thr	8,28	4,58	n.d.	1,23
Val	8,29	4,09	2,03	0,93
Ser	8,5 / 8,32	4,46	3,86	-
Ser	8,4	4,42	3,87	-
Ala	8,3	4,25	1,34	-
Asn	8,29	4,62	2,76	-
Met	8,26	4,43	2,02	2,54
Met	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Pulsprogramme

¹³C gefiltertes, unentkoppeltes Protonenspektrum (cpmg1d_diff1.tb)

```
;cpmg1d
;avance-version (04/11/23)
;1D experiment with
; T2 filter using Carr-Purcell-Meiboom-Gill sequence

#include <Avance.incl>

"p2=p1*2"
"d11=30m"

1 ze
2 30m
  d1
  d12 pl2:f2
  p1 ph1
3 d20
  (p3 ph3):f2 (p2 ph1)
  (p3 ph4):f2
  d20
  go=2 ph31
  30m mc #0 to 2 F0(zd)
exit

ph1=0 0 2 2 1 1 3 3
ph3=0 0 2 2 1 1 3 3
ph4=0 2 2 0 1 3 3 1
ph31=0 2 2 0 1 3 3 1

;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d20: fixed echo time to allow elimination of J-mod. effects
; d20 should be << 1/J ,but > (50 * P2) [1-2 msec]
;l4: loop for T2 filter [4 - 20]
;NS: 1 * n, total number of scans: NS * TD0
;DS: 16

;$Id: cpmg1d,v 1.1.4.2 2004/11/23 16:19:17 ber Exp $
```

1D-¹H, ¹³C-HSQC-NMR-Spektrum (hsqcgpnd1d)

```
;hsqcgpnd1d
;avance-version (02/05/31)
;HSQC
;1D H-1/X correlation via double inept transfer
;using gradient pulses for selection
;use as setup for pulseprogram 'invigtp'
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=1D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"d4=1s/(cnst2*4)"
"d13=4u"
```

```
"DELTA1=p16+d16"
"DELTA2=d4-p16-d16-d13-4u"
```

```
1 ze
2 30m
d1
(p1 ph1)
d4
(center (p2 ph2) (p4 ph6):f2 )
d4
(p1 ph3) (p3 ph7):f2
DELTA1 UNBLKGRAD
(p4 ph8):f2
d13
p16:gp1
d16
(p3 ph9):f2
d13
p16:gp2
d16
(p3 ph10):f2
d13
(p2 ph4)
```

```

d13
(ralign (p1 ph3) (p3 ph11):f2 )
d4
(center (p2 ph5) (p4 ph12):f2 )
d13
p16:gp3
d16
DELTA2
4u BLKGRAD
go=2 ph31
30m mc #0 to 2 F0(zd)
exit

```

```

ph1=0
ph2=0
ph3=1
ph4=0 0 2 2
ph5=0
ph6=0
ph7=1 1 1 1 3 3 3 3
ph8=0
ph9=3
ph10=0
ph11=0 2
ph12=0
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

```

```

;pl1 : f1 channel - power level for pulse (default)
;pl2 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d13: short delay [4 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;cnst2: = J(XH)
;NS: 1 * n, total number of scans: NS * TD0
;DS: 16

```

```

;use gradient ratio:   gp 1 : gp 2 : gp 3
;                      80 : 30 : 20.1   for C-13
;                      80 : 30 : 8.1    for N-15

```

```

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 30%

```

;gpz3: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15

;use gradient files:

;gpnam1: SINE.100

;gpnam2: SINE.100

;gpnam3: SINE.100

;\$Id: hsqcgpnd1d,v 1.2 2005/11/10 12:17:00 ber Exp \$

Danksagung

Mein Dank gilt

Prof. Dr. Thomas Peters für die interessante Themenstellung, die ideenreichen Diskussionen und das entgegengebrachte Vertrauen.

Prof. Dr. Achim Peters für das Erstellen des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Enno Hartmann für die Übernahme des Vorsitzes des Prüfungsausschusses.

Dr. Thorsten Biet für die hervorragende Betreuung, die Einweisung in das NMR-Spektrometer und die Hilfe bei den NMR-Experimenten.

Dr. Hanne Peters für ihre Unterstützung und die Beantwortung von Fragen jeglicher Art rund um das Zellkulturlabor.

Prof. Dr. Luc Pellerin für die anregenden Diskussionen.

PD Dr. Olaf Jöhren für die Bereitstellung der HT-22 Zellen.

Prof. Dr. Jan Rupp für die Bereitstellung der HEK 293 Zellen.

Prof. Dr. Geert-Jan Boons für die Bereitstellung der monoklonalen anti-O-GlcNAc Antikörper.

Beatrice Jürs für die Hilfe bei der Peptidsynthese sowie dem gesamten Arbeitskreis B. Meyer Organische Chemie, Universität Hamburg für die nette Arbeitsatmosphäre.

Mailin Döpkens für die tolle Zusammenarbeit, die unterstützenden Diskussionen und erkenntnisreichen Konferenzenreisen.

allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Chemie für die nette Arbeitsatmosphäre: Christiane Blunk, Brigitte Fiege, Lena L. Grimm, Wilfried Hellebrandt, Elisabeth Hölting, Thies Köhli, Sarah Leineweber, Kirsten Petersohn, Dr. Rosa Pulz, Sarah Schöning, Prof. Dr. Karsten Seeger, Nora Sindhuwinata, Anna Tomhardt, Sophie Weißbach, PD Dr. Thomas Weimar

meiner Familie und meinem Freund für ihre Liebe, ihr Vertrauen und ihre Unterstützung.