

Untersuchungen zur O-GlcNAc Modifikation neuraler Proteine

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. Nat)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Sabine Werner

aus

Bonn

Bonn 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. B. Schmitz
2. Referent: Prof. Dr. K.H. Scheidtmann
Tag der Prüfung: 11.11.2004

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni.bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

meinem Vater

Danksagung

Frau Prof. Dr. B. Schmitz herzlichen Dank für die Bereitstellung des Themas, des Arbeitsplatzes sowie ihrer steten Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. K.H. Scheidtmann danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Ich bedanke mich bei meinen Mitarbeitern für das gute Arbeitsklima, die stete Hilfsbereitschaft und Aufmunterung bei jeglichen Laborproblemen.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Benedikta Langenfeld-Oster, Dr. Birgit Müller-Chorus, Dr. Christina Ohl und Dr. Reinhild Quade für die zahlreichen Anregungen und fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen. Marie-Therese Fergen und Claudia Müller danke ich für ihre Hilfe in der Zellkultur, Bernd Gehrig für seine Unterstützung bei biochemischen Problemen.

Für ihre Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung organisatorischer Probleme bedanke ich mich besonders bei Ursula Munzel.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie:

Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und zusammen mit meinem Bruder Wolfgang mich zu jeder Zeit unterstützt und aufgemuntert haben, vielen Dank!

Meinem Freund Boris Brähler, der mir jederzeit ratgebend zur Seite stand und mich immer unterstützt hat, vielen Dank!

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Struktur des O-glykosidisch gebundenen N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc).
- Abb. 2 Yin-Yang Hypothese (Schmitz und Griffith, 1998).
- Abb. 3 Proteolytische APP-Spaltung (nach Dominguez et al., 2000).
- Abb. 4 Proteine, die mit dem C-Terminus von APP interagieren (King und Turner, 2004).
- Abb. 5 Bestimmung der Reaktivität des monoklonalen MUD50 Antikörpers mit GlcNAc-BSA im ELISA.
- Abb. 6 Quantitativer O-GlcNAc Nachweis: ELISA mit AD- und Kontrollproben.
- Abb. 7 Kontrolle der O-GlcNAc Spezifität des RL2 Antikörpers im Western-Blot.
- Abb. 8 Vergleich zwischen RL2 und MUD50 Antikörper im Western-Blot.
- Abb. 9 Vergleich der mit O-GlcNAc modifizierten Dsf/Dicf-Proteine einer Frontallappenprobe eines Kontrollpatienten (K79) mit denen eines Alzheimerpatienten (AD21).
- Abb. 10 Galactosyltransferase-Assay mit radioaktiver UDP-(³H)-Galactose.
- Abb. 11 Western-Blot-Analyse der O-GlcNAc Modifikation von humanem APP aus Hirnhomogenaten.
- Abb. 12 Western-Blot-Analyse von APP nach Immunpräzipitation aus Zellsolubilisaten mit PUGNAc und/oder Swainsonine behandelte humanes APP exprimierende N2a-Zellen.
- Abb. 13 Autoradiographische Analyse von APP Immunpräzipitaten aus Oocytenhomogenaten.
- Abb. 14 Nachweis des C-Terminus in SPA4CT-SH-SY5Y Zellen.
- Abb. 15 Analyse der O-GlcNAc Modifikation des C-Terminus im Western-Blot.
- Abb. 16 Isolierung von Banden mit dem Molekulargewicht des C-Terminus aus einem Silbergel.
- Abb. 17 ESI-MS-Spektrum der Proben A, B und C.
- Abb. 18 Western-Blot-Analyse von O-GlcNAc modifizierten Proteinen aus Kleinhirnneuronen nach Behandlung mit DON oder PUGNAc.
- Abb. 19 Detektion der O-GlcNAc Expression in embryonalen Kleinhirnneuronen.
- Abb. 20 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von pränatalen Kleinhirnneuronen mit einem für Purkinje-Zellen spezifischen Antikörper.

- Abb. 21 O-GlcNAc Expression in embryonalen Kleinhirnneuronen nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer.
- Abb. 22 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von embryonalen Kleinhirnneuronen in Abwesenheit und in Gegenwart von PUGNAc.
- Abb. 23 Detektion von O-GlcNAc in PC12-Zellen nach NGF und NGF+PUGNAc Behandlung.
- Abb. 24 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse der Expression von O-GlcNAc und der O-GlcNAc Transferase nach NGF Behandlung.
- Abb. 25 Detektion von O-GlcNAc im Zellkern und Cytoplasma.
- Abb. 26 Messung der Neuritenlängen von mit NGF und mit NGF+PUGNAc behandelten PC12-Zellen.
- Abb. 27 Darstellung der NGF-vermittelten Signaltransduktion (aus Segal und Greenberg, 1996).
- Abb. 28 Quantitativer O-GlcNAc Nachweis: ELISA mit Alzheimer- und Kontrollproben, mit Darstellung der Sekundärantikörper-Kontrollen.
- Abb. 29 Graphische Darstellung der Neuritenlängen in Form von Boxplots.
- Tab. 1 An den C-Terminus von APP bindende Proteine und ihre möglichen Funktionen.
- Tab. 2 Angaben zu den verwendeten Hirnproben.

Abkürzungsverzeichnis

A β	β -Amyloid-Peptid
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-Ethyl-Benzthiazolinsulfonsäure)
AD	Alzheimer Demenz
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
AK	Antikörper
APLP	Amyloid Precursor-like Protein
ApoE	Apolipoprotein E
APP	Amyloid Precursor Protein
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dem.	demineralisiertes Wasser
AS	Aminosäure
BACE	APP-spaltendes Enzym
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary desoxyribonucleic acid)
Ci	Curie
CTD	C-terminale Domäne (carboxy-terminal domain)
Cy3	Indocarbocyanin
Dicf	Detergens-unlösliche cytoskeletale Fraktion (detergent insoluble cytoskeletal fraction)
DMEM	"Dulbecco's modified Eagle Medium"
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
Dsf	Detergens-lösliche Fraktion (detergent soluble fraction)
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	fötale Kälberserum
g	Gramm oder Gravitationskonstante (9,81 m/sec)
Gluc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GSK-3 β	Glykogen-Synthase-Kinase 3 β
HBSS	Hank's gepufferte Salzlösung
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin der Klasse G
kDa	Kilodalton
Ko	Kontrolle
m	Milli
min	Minute
MEM	Minimum Essential Medium
MW	Molekulargewicht
μ	Mikro
n	Nano
NFT	Neurofibrillenbündel (Neurofibrillary tangles)
NGF	Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor)
OD	optische Dichte
O-GlcNAc	O-glykosidisch gebundenes N-Acetylglucosamin

OGH	O-GlcNAc Hydrolase (O-GlcNAcase)
OGT	O-GlcNAc Transferase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PHF	paarige helikale Filamente (paired helical filaments)
PKC	Phosphokinase C
PLL	Poly-L-Lysin
PMA	Phorbolester (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Merrettich-Peroxidase
PS	Präsenilin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosewell Memorial Park Institute 1640
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris Buffered Saline)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
UDP	Uridindiphosphat
V	Volt

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1	O-GlcNAc Modifikation	1
1.1.1	O-GlcNAc und die Signaltransduktion	2
1.1.2	Yin-Yang Hypothese oder das Prinzip der reziproken O-GlcNAcylierung/Phosphorylierung	4
1.1.3	Weitere potentielle regulatorische Funktionen von O-GlcNAc	5
1.1.4	Bedeutung der O-GlcNAc Modifikation bei pathologischen Prozessen	7
1.2	Die Alzheimer Krankheit	9
1.2.1	Amyloid Precursor Protein (APP)	12
1.2.2.	Proteolytische Spaltung von APP	13
1.2.2.1	α -Sekretase	14
1.2.2.2	β -Sekretase	15
1.2.2.3	γ -Sekretase	17
1.2.3	Bedeutung des C-Terminus von APP	20
1.2.4	Einfluß von Cholesterin auf die A β -Erzeugung	27
1.3	Zusammenhang zwischen der O-GlcNAc Modifikation und der Pathogenese der Alzheimer Krankheit	28
1.4	Aufgabenstellung	31
2.	Material und Methoden	33
2.1	Materialien	33
2.1.1	Primäre Antikörper	33
2.1.2	Sekundäre Antikörper	34
2.1.3	Allgemeine Geräte	35
2.1.4.1	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	35
2.1.4.2	Allgemeine Reagenzien	36
2.1.5	Lösungen und Puffer	36
2.1.6	Radioaktiv markierte Verbindungen	38
2.1.7	Tiere aus institutseigener Haltung	38
2.1.8	Zellen	38
2.2	Biochemische Methoden	39
2.2.1	MUD50-Kompetitionstest mittels Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay	

(ELISA)	39
2.2.2 Präparation der Detergens-löslichen Fraktion (Dsf) und der Detergens-unlöslichen cytoskeletalen Fraktion (Dicf) (nach Refolo et al., 1991)	40
2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	41
2.2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) mit Dsf/Dicf	42
2.2.5 Galactosyltransferase Assay	43
2.2.6 Galactosyltransferase Assay mit UDP-(³ H)-Galactose	44
2.2.7 Immunpräzipitation	45
2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli, 1970)	46
2.2.9 Tris-Tricine Gelelektrophorese	47
2.2.10 Coomassie-Blau Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	48
2.2.11 Silberfärbung	48
2.2.12 Präparation eines Gelstückes für MALDI-MS Messung	49
2.2.13 Autoradiographie von SDS Polyacrylamidgelen	49
2.2.14 Western-Blot nach dem Semi-dry Verfahren	50
2.2.15 Ponceau-S-Färbung	50
2.2.16 Immundetektion von Proteinen im Western-Blot	51
2.3 Molekularbiologische Methoden	51
2.3.1 Anzucht einer Bakterienkultur	52
2.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien	52
2.3.3 Transformation von Bakterien	52
2.3.4 Anlegen einer E.coli Übernachtskultur	53
2.3.5 Präparation der Plasmid DNA aus Bakterien	53
2.3.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	54
2.3.7 DNA Spaltung mit Restriktionsenzymen	54
2.3.8 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	54
2.4 Proteinexpression in <i>Xenopus</i> Oocyten	55
2.4.1 Gewinnung und Vereinzelung der Oocyten	55
2.4.2 Injektion der Oocyten	56
2.4.3 Markierung von Oocyten mit ³⁵ S-Methionin	56
2.4.4 Präparation von Oocyten-Solubilisaten	57
2.4.5 Immunpräzipitation aus Oocyten-Solubilisaten	57
2.5 Zellkultur	58
2.5.1 Präparation und Kultivierung muriner Kleinhirnneuronen	58

2.5.2	Kultivierung und Subkultivierung von N2a-Zellen	59
2.5.3	Kultivierung und Subkultivierung von SH-SY5Y-Zellen	60
2.5.4	Kultivierung und Subkultivierung von PC12-Zellen	60
2.5.5	Einfrieren von Zellen	61
2.5.6	Behandlung der Zellen mit pharmakologischen Substanzen	61
2.5.7	Indirekte Immunfluoreszenz	62
2.5.8	Präparation von Zell-Lysaten	63
3.	Ergebnisse	64
3.1.	Quantitativer und qualitativer Vergleich der O-GlcNAc Modifikation in Gewebeproben verschiedener Hirnareale von Alzheimer Patienten und Kontrollpersonen	64
3.1.1	Test der O-GlcNAc Spezifität des MUD50 Antikörpers	65
3.1.2	Quantitativer O-GlcNAc Nachweis: ELISA mit Alzheimer- und Kontroll-Proben	66
3.1.3	Western-Blot der O-GlcNAc modifizierten Proteine von AD- und Kontrollproben	69
3.1.4	O-GlcNAc Nachweis mittels Galactosyltransferase-Assay mit UDP-(³ H)-Galactose	73
3.2	O-GlcNAc Modifikation des humanen Amyloid Precursor Proteins (APP)	76
3.2.1	Untersuchung des humanen APP in Hirngewebeproben im Hinblick auf O-GlcNAc	77
3.2.2	Untersuchung der O-GlcNAc Modifikation von humanem APP in stabil transfizierten N2a-Zellen	78
3.2.3	Untersuchung der O-GlcNAc Modifikation des C-Terminus von APP	80
3.2.3.1	APP Expression in <i>Xenopus</i> Oocyten	80
3.2.3.2	Nachweis des C-Terminus in SPA4CT-SH-SY5Y-Zellen	82
3.2.3.3	Analyse der O-GlcNAc Modifikation des SPA4CT Produkts im Western-Blot	84
3.2.3.4	Isolierung des C-Terminus von APP aus SPA4CT-SH-SY5Y Zellsolubilisaten	85
3.3	Dynamik der O-GlcNAc Modifikationen in verschiedenen Nervenzellpopulationen	89
3.3.1	Postnatale Kleinhirnneuronen	89

3.3.2	Pränatale Kleinhirnneuronen	91
3.3.2.1	O-GlcNAc Expression in embryonalen Kleinhirnneuronen	91
3.3.2.2	O-GlcNAc Expression in embryonalen Kleinhirnneuronen nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer	95
3.3.2.3	PUGNAc Behandlung	97
3.3.3	Differenzierung von PC12-Zellen mit NGF	98
4.	Diskussion	104
4.1	Immunologische O-GlcNAc Detektion	104
4.2	Quantitativer und qualitativer Vergleich der O-GlcNAc Modifikation in Gewebeproben verschiedener Hirnareale von Alzheimerpatienten und Kontrollpersonen	106
4.3	O-GlcNAc Modifikation des humanen Amyloid Precursor Proteins (APP)	109
4.4	Untersuchung der O-GlcNAc Modifikation des C-Terminus von APP	113
4.4.1	APP Expression in <i>Xenopus</i> Oocyten	113
4.4.2	Analyse der O-GlcNAc Modifikation des C-Terminus von APP	113
4.4.3	Analyse der O-GlcNAc Modifikation des SPA4CT Produkts im Western-Blot	114
4.4.4	Isolation des C-Terminus aus SPA4CT-Zellen mit anschließender ESI-MS-Analyse	115
4.5	Dynamik der O-GlcNAc Modifikation in Kleinhirnneuronen	116
4.6	Bedeutung der O-GlcNAc Expression bei neuronalen Differenzierungsprozessen	119
5.	Zusammenfassung	125
6.	Literaturverzeichnis	128
7.	Anhang	153

1. Einleitung

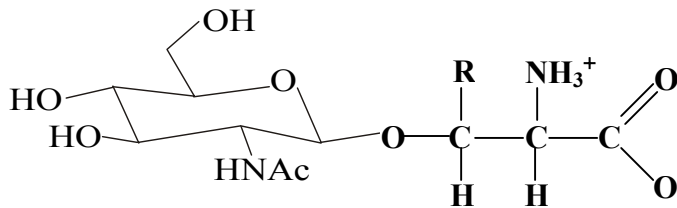
Die molekularbiologische Erforschung von Krankheiten wie zum Beispiel der Alzheimer Krankheit wird in diesem neu beginnenden Jahrtausend wesentlich durch das Zusammenspiel zweier Forschungsrichtungen geprägt werden: Während die Genomik die vollständige Analyse der DNA Sequenzen des Menschen und zahlreicher weiterer Organismen zum Ziel hat, beschäftigt sich die Proteomik mit den möglichen Strukturen und Funktionen der Proteine. Hierbei wird berücksichtigt, dass die physiologischen Prozesse einer Zelle im wesentlichen durch Proteine und andere Makromoleküle bestimmt werden, deren funktionale Komplexität nicht ausschließlich im Genom verankert ist. So können Proteine u.a. nach der Translation in vielfältiger Weise modifiziert werden. Neben der Ausbildung von Disulfidbrücken und spezifischen proteolytischen Spaltungen spielt die kovalente Bindung von Fettsäuren, Phosphatgruppen und Kohlenhydraten eine wichtige Rolle.

Kohlenhydratstrukturen von Glykoproteinen sind an den verschiedensten intra- und extrazellulären Prozessen beteiligt. Im folgenden soll eine besondere intrazelluläre Kohlenhydratmodifikation detailliert vorgestellt und der Zusammenhang zwischen dieser Modifikation und der Pathogenese, vor allen Dingen der Alzheimer Krankheit, erläutert werden.

1.1 O-GlcNAc Modifikation

Neben der N- und O-Glykosylierung von lysosomalen, sekretorischen und Membran-Proteinen, die ausschließlich im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat stattfinden, konzentrieren sich einige Glykobiologen seit ca. 20 Jahren auf die Erforschung einer neuen Form der Kohlenhydratmodifikation, die vornehmlich bei cytosolischen Proteinen, Membran-, und Kernproteinen auftritt. 1984 zeigten Torres und Hart erstmals bei der Untersuchung von Maus Lymphozyten-Zelloberflächenglykoproteinen, dass Serin- und Threoninreste von cytosolischen und Kern-Proteinen mit einem N-Acetylglucosamin β -O-glykosidisch verknüpft sein können (Torres und Hart, 1984; Abb.1). Diese als O-GlcNAc bezeichnete Modifikation ist ubiquitär verbreitet und bei allen bisher daraufhin untersuchten eukaryotischen Spezies einschließlich des Menschen und einiger Viren sowie in allen Gewebetypen nachgewiesen worden. Bisher konnte eine Reihe von hauptsächlich cytosolischen und nukleären O-GlcNAc Proteinen identifiziert werden. Dazu gehören Kern-

Proteine wie zum Beispiel Kernporen-Proteine, Chromatin-assoziierte Proteine, RNA-Polymerase II und ihre Transkriptionsfaktoren. Aber auch Cytoskelett-Proteine, Protoonkogene, Tumorsuppressoren, Hormonrezeptoren sowie Phosphatasen und Kinasen gehören zu dieser Gruppe (Hanover, 2001).



R=H für Serin

R=CH₃ für Threonin

Abb.1 Struktur des O-glykosidisch gebundenen N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc).

1.1.1 O-GlcNAc und die Signaltransduktion

Die O-GlcNAc Modifikation gerade der letztgenannten Phosphatasen und Kinasen weist auf eine vielfach diskutierte potentielle Funktion dieser Proteinmodifikation hin. So wird angenommen, dass O-GlcNAc analog zur Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion übernimmt. Tatsächlich erfüllt O-GlcNAc eine Vielzahl an Voraussetzungen, um aktiv an der Signaltransduktion in der Zelle teilnehmen zu können: Es handelt sich um eine sehr dynamische Modifikation, deren Umsatzrate wesentlich höher ist als die der Trägerproteine wie es zum Beispiel für Cytokeratine und α -B-Krystallin gezeigt wurde (Chou et al., 1992; Roquemore et al., 1996). Das bedeutet, dass O-GlcNAc schnell auf bestimmte zelluläre Signale reagieren kann. Dass die Übertragung von N-Acetylglucosamin auf Serin- oder Threoninreste bzw. dessen Abspaltung durch bestimmte Stimuli induzierbar ist, konnten u.a. Kearsse und Hart (1991) nach Aktivierung von T-Lymphozyten zeigen. Nach Zugabe des T-Zell Mitogens Concanavalin A konnte eine Abnahme der Glykosylierung im Cytosol und eine Zunahme der nukleären Glykosylierung beobachtet werden, die unabhängig von der Proteintranslation war. Dabei handelt es sich um transiente Veränderungen, die innerhalb von einigen Stunden wieder aufgehoben sind. Weiterhin könnte O-GlcNAc auch

eine Bedeutung bei der Signaltransduktion in Pflanzenzellen haben, da eine Mutation des pflanzlichen Proteins Spindly, das eine große Homologie zur O-GlcNAc Transferase aufweist, in *Arabidopsis* die Aktivierung des Signalwegs des Pflanzenhormons Gibberelin bewirkt (Thornton et al., 1999).

Die O-GlcNAc Transferase (OGT) katalysiert die Übertragung von O-GlcNAc auf Proteine und ist genauso wie das O-GlcNAc abspaltende Enzym O-GlcNAc Hydrolase (O-GlcNAcase) bereits kloniert und charakterisiert worden. Bisher wurden humane, Ratten- und *Caenorhabditis elegans* OGT-cDNAs und entsprechende Gene identifiziert (Nolte und Muller, 2002; Kreppel et al., 1997; Lubas et al., 1997). Die OGT ist hoch konserviert. Das humane Gen weist zum Beispiel eine Homologie von 80% zu dem von *Caenorhabditis elegans* auf. Das Gen für die humane und murine OGT ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. Untersuchungen an murinen Embryonen haben ergeben, dass das OGT-Gen eine essentielle Bedeutung für die Lebensfähigkeit von embryonalen Stammzellen und die embryonale Entwicklung hat (Shafi et al., 2000). Die Transkripte der OGT lassen sich in vielen Gewebetypen nachweisen, wobei sie besonders stark im Pankreas und dort vor allen Dingen in den β -Zellen der Langerhans-Inseln exprimiert sind (Hanover et al., 1999). Aber auch Skelettmuskel, Gehirn, Fettgewebe und Herzmuskel weisen relativ hohe Mengen an OGT-mRNA auf. Das Enzym selbst ist im Cytosol und Kern lokalisiert. Wie viele andere regulatorische Proteine weist die OGT Tandem-Anordnungen von Tetratricopeptiden auf, die für die Ausbildung multimerer Proteinkomplexe von Bedeutung sind. Diese Tetratricopeptide spielen vermutlich eine Rolle für die Ausbildung und Stabilität des homotrimeren OGT-Komplexes, der notwendig für die Substraterkennung ist (Kreppel und Hart, 1999; Lubas und Hanover, 2000). Interessanterweise ist das Enzym sowohl O-GlcNAc modifiziert als auch Tyrosin-phosphoryliert, was auf mögliche Regulationsmechanismen hinweist (Kreppel und Hart, 1999; Kreppel et al., 1997).

Das Fehlen einer Konsensussequenz für die Glykosylierung mit O-GlcNAc könnte für die Existenz verschiedener OGTs sprechen. Bisher konnten aber keine entsprechenden weiteren eukaryotischen Gene identifiziert werden.

Das O-GlcNAc abspaltende Enzym, die O-GlcNAcase, wurde erst kürzlich kloniert. Die humane O-GlcNAcase ist auf Chromosom 10 lokalisiert, wird in allen Gewebetypen exprimiert und ist ebenso wie die OGT hochkonserviert (Gao et al., 2001). Das Enzym ist hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert. Es werden zwei verschiedene Splicevarianten des Transkripts exprimiert: Ein Protein mit 130 kDa und ein kleineres mit 75 kDa, das hauptsächlich im Kern lokalisiert ist, aber dort anscheinend keine Aktivität besitzt (Comtesse

et al., 2001; Wells et al., 2002). Die Aktivität der O-GlcNAcase scheint regulierbar zu sein. So konnten Wells et al. 2002 die Phosphorylierung des Enzyms nachweisen. Außerdem wurde das Enzym als Teil eines größeren Proteinkomplexes isoliert, dessen potentielle regulatorische Funktion für die O-GlcNAcase noch untersucht werden muss.

1.1.2 Yin-Yang Hypothese oder das Prinzip der reziproken O-GlcNAcylierung/Phosphorylierung

Der Nachweis von Proteinen, die an solchen Stellen mit O-GlcNAc modifiziert sind, die auch von Kinasen phosphoryliert werden können, veranlasste Gerald Hart zur Formulierung der sogenannten Yin-Yang Hypothese. Diese besagt, dass die Modifikation mit O-GlcNAc, die O-GlcNAcylierung, eine reziproke Funktion zur Phosphorylierung haben kann (Abb. 2). Dafür sprechen folgende Ergebnisse: Bei einigen Proteinen wie z.B. dem Östrogen Rezeptor- β , dem SV 40 großen T-Antigen und dem c-Myc Protoonkogenprodukt konnte nachgewiesen werden, dass dieselben Serin- und Threoninreste entweder phosphoryliert oder alternativ mit O-GlcNAc modifiziert sein können (Cheng und Hart, 2001; Medina et al., 1998; Chou et al., 1995 a u. b). Damit können auch reziproke Funktionen verbunden sein: So gibt es Hinweise darauf, dass die reziproke Besetzung des Aminosäurerestes Serin16 des murinen Östrogen Rezeptor- β entweder mit O-GlcNAc oder mit O-Phosphat dessen Abbau und Transkriptionsaktivität beeinflussen kann (Cheng und Hart, 2001). Ebenso scheinen die O-GlcNAc Transferase und die Kinase des C-Terminus der RNA-Polymerase II, die die gleiche Affinität zur C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II aufweisen, möglicherweise deren Aktivität während unterschiedlicher Phasen des Transkriptionszyklus zu regulieren (Comer und Hart, 2001). *In vitro* kann die Glykosylierung der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II durch Phosphorylierung mit der CTD-Kinase verhindert werden (Comer und Hart, 2001).

Jedoch muß nicht bei allen Proteinen zwingend eine reziproke Beziehung vorliegen. Beispielsweise sind Neurofilamente und das mit Clathrin assoziierte Protein AP-3 sowohl O-GlcNAc modifiziert als auch phosphoryliert (Dong et al, 1993 a u. b; Murphy et al, 1994). Das heißt, dass gleichzeitig beide Modifikationen nebeneinander vorhanden sein können.

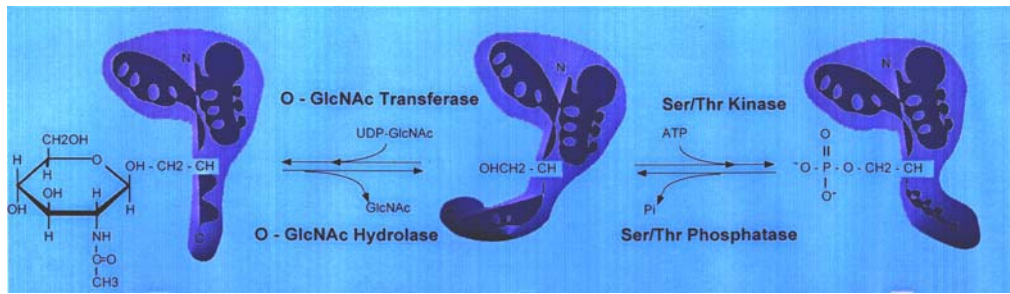


Abb. 2 Yin-Yang Hypothese (Schmitz und Griffith, 1998). Bei einigen Proteinen wie z.B dem Östrogen Rezeptor- β können dieselben Serin- oder Threoninreste reziprok entweder O-GlcNAcyliert oder phosphoryliert sein, was mit unterschiedlichen Funktionszuständen einhergehen kann (Cheng und Hart 2001).

Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass Phosphorylierung und O-GlcNAcylierung nicht immer unabhängig voneinander stattfinden, sondern sich wechselseitig beeinflussen können. So ist der O-GlcNAc Spiegel durch spezifische Aktivatoren oder Inhibitoren von Kinasen oder Phosphatasen reziprok zur Phosphorylierung beeinflussbar: Zum Beispiel konnte an Kleinhirnneuronen in Kultur gezeigt werden, dass in Gegenwart von Inhibitoren der Proteinkinase A und Proteinkinase C die O-GlcNAc Modifikation von Proteinen zunimmt, während Aktivatoren dieser Kinasen umgekehrt zu einer Abnahme des O-GlcNAc Einbaus in Proteine führt (Griffith und Schmitz, 1999). Einen weiteren Hinweis für diese Form des wechselseitigen Regulationsmechanismus ergibt sich aus der Beobachtung, dass die OGT zusammen mit einer unbekanntem Serin–Threonin Phosphatase aufgereinigt werden konnte (Wells et al., 1999).

1.1.3 Weitere potentielle regulatorische Funktionen von O-GlcNAc

Die O-GlcNAc Modifikation scheint auch auf andere proteinregulierende Mechanismen Einfluss zu nehmen. Vermutlich spielt sie eine Rolle bei der Regulation der Proteindegradation. Hierfür spricht, dass die O-GlcNAc Modifikation in „PEST“ Sequenzen auftritt, die sich durch einen hohen Gehalt an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S), und Threonin (T) auszeichnen und deren Phosphorylierung ein Signal für den proteosomalen Abbau darstellt. Es wird angenommen, dass eine Glykosylierung die Phosphorylierung dieser Sequenzen und damit den Proteinabbau verhindern kann. So konnte beim Östrogen Rezeptor ER- β nicht nur gezeigt werden, dass potentielle Degradationssequenzen, also Sequenzen mit hohem „PEST“-Gehalt entweder mit O-GlcNAc modifiziert oder phosphoryliert vorliegen können, sondern auch, dass nach Mutation der Glykosylierungsstelle der Abbau des Rezeptors

stark verzögert wird. Eine Mutation der Glykosylierungssequenz, die eine permanente Phosphorylierung vortäuscht, führt hingegen zur schnelleren Abbaurate des Proteins im Vergleich zum Wildtyp (Cheng und Hart, 2001). Bei dem Protein Plakoglobin konnte ebenfalls eine O-GlcNAc Modifikation in der Nähe der Degradationssequenz detektiert werden (Hatsell et al., 2003). Nach neuesten Erkenntnissen funktioniert die O-GlcNAc Modifikation auch als endogener Inhibitor des Proteasoms. So stellten Zhang et al. fest, dass die Rpt2 ATPase des Proteasoms 19S sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mit O-GlcNAc modifiziert ist und die Funktion des Proteasoms mit zunehmender O-Glykosylierung abnimmt (Zhang et al., 2003). Auf diese Weise kann zum Beispiel die Proteolyse des Transkriptionsfaktors SP1 unterdrückt werden.

Auch bei der Genexpression scheint die O-GlcNAc Modifikation wichtige regulatorische Funktionen zu übernehmen. Nicht nur, dass O-GlcNAc auf allen bisher daraufhin untersuchten Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase II nachgewiesen wurde, die Glykosylierung scheint auch einen direkten Einfluss auf die Transkription zu haben. Ob es sich dabei um eher aktivierende oder hemmende Effekte handelt, gilt es noch zu klären. So wurde für den Transkriptionsfaktor Sp1 in einem *in vitro* Transkriptionssystem gezeigt, dass glykosyliertes, in Hela Zellen exprimiertes Sp1 im Vergleich zu unglykosyliertem, in *E. coli* exprimiertem Sp1 eine drei- bis fünfmal höhere Transkriptionsaktivität induzieren kann (Jackson und Tjian, 1988). Ebenfalls konnte erst vor kurzem gezeigt werden, dass die O-GlcNAcylierung von Sp1, die durch Insulin stimuliert werden kann, die Translokation von Sp1 in den Nukleus bewirkt und die Transkription des Calmodulin Gens induzieren kann (Majumdar et al., 2003). Eine verstärkte DNA Bindungsaktivität, die durch eine erhöhte O-GlcNAcylierung hervorgerufen wird, konnte für den Transkriptionsfaktor PDX-1 demonstriert werden, der eine wichtige Rolle bei der Funktion und der Entwicklung des Pankreas spielt (Gao et al., 2003). Bei dem Transkriptionsfaktor Stat 5 konnte eine O-GlcNAcylierung allerdings nur auf der nukleären Form nach Cytokinaktivierung festgestellt werden. Nur diese glykosylierte Form kann an den Transkriptions-Coaktivator CBP binden und somit die Transaktivierung des Promotors eines Zielgens induzieren (Gewinner et al., 2004).

Im Gegensatz dazu wurde auch eine Transkription hemmende Wirkung der O-GlcNAc Modifikation festgestellt: Roos et al. wiesen nach, dass die O-GlcNAc Modifikation von Sp1 die Interaktion mit dem TATA-bindenden Protein assoziierten Faktor (TAF110) bzw. die Selbstassoziation stört und dies einen negativen Einfluss auf die Transkriptionsrate haben kann (Roos et al., 1997; Yang et al., 2001). Eine Form der Transkriptionsrepression durch die

O-GlcNAc Transferase beschreiben Yang et al.: Sie stellten fest, dass die O-GlcNAc Transferase durch Bindung an den Corepressor mSin3A mit der Histondeacetylase interagieren und die Transkription unterdrücken kann (Yang et al., 2002). Vermutlich wird der OGT durch die Bindung an mSin3A die O-GlcNAcylierung der im Promotorbereich lokalisierten Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase II ermöglicht, die auf diese Weise im Präinitiationskomplex inaktiv gehalten werden.

Andere Untersuchungen weisen daraufhin, dass O-GlcNAc die Assoziation von Proteinen auch begünstigen und stabilisieren kann. So bilden z.B. viele der O-GlcNAc modifizierten Proteine multimere Komplexe, wie z.B. die Proteine der Kernporenkomplexe, die in erhöhtem Maße mit O-GlcNAc modifiziert sind (Holt et al., 1987). Andere mit O-GlcNAc modifizierte Proteine sind am Aufbau und der Organisation des Cytoskeletts beteiligt. Bei einigen dieser Proteine, beispielsweise bei den Neurofilamenten, sind die Bereiche der Untereinheiten glykosyliert, die zur Anlagerung der Filamente aneinander und somit zur Ausbildung der Quartärstruktur beitragen (Dong et al., 1996).

1.1.4 Bedeutung der O-GlcNAc Modifikation bei pathologischen Prozessen

Vermutlich hat die O-GlcNAc Modifikation auch eine Bedeutung bei verschiedenen Krankheiten. Neben wichtigen Hinweisen darauf, dass O-GlcNAc eine Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen spielt (1.3.), ist auch ein Zusammenhang zwischen einer veränderten O-GlcNAcylierung von Proteinen und Typ II Diabetes gezeigt worden. Wichtige Merkmale des Typ II Diabetes sind ein erhöhter Glucosespiegel und Insulinresistenz. Es konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter extrazellulärer Glucose- und Glucosaminspiegel im Skelettmuskel und in den β -Zellen des Pankreas zu einer erhöhten O-GlcNAc Modifikation intrazellulärer Proteine führt (Yki-Jarvinen et al., 1998; Liu et al., 2000). Außerdem kam es bei den Muskelzellen unter hyperglykämischen Bedingungen zu einer Abschwächung der Signale der Insulinkaskade. Mit der reduzierten Signalstärke der Insulin-Rezeptor-Substrate (IRS-1, IRS-2) war deren erhöhte O-GlcNAc Modifikation und abnehmende Phosphorylierung verbunden (Patti et al., 1999). Daher nehmen verschiedene Arbeitsgruppen an, dass die durch Hyperglykämie induzierte O-GlcNAc Modifikation die normale Insulinsignaltransduktion stören kann, was mitverantwortlich für die bei Typ II Diabetes auftretende Insulinresistenz sein könnte (Wells et al., 2003). Neue Ergebnisse belegen diese Hypothese in noch eindeutigerer Weise: McClain et al. (2002) konnten mit Hilfe von

transgenen Mäusen zeigen, dass die Überexpression der OGT den Phänotyp eines Typ II Diabetes erzeugt und in Muskel und Fettgewebe Insulinresistenz und Hyperleptinämie hervorruft. Eine weitere Folgeerkrankung von Diabetes können Kardiomyopathien sein. Interessanterweise konnte in diesem Zusammenhang bei mit hohen Glucosekonzentrationen behandelten Kardiomyocyten oder Kardiomyocyten, die mit O-GlcNAc Transferase exprimierenden Adenoviren transfiziert worden waren, eine verschlechterte Ca^{2+} Oszillation festgestellt werden, mit der eine verminderte sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase Aktivität und verstärkte O-GlcNAcylierung nukleärer Proteine einhergeht (Clark et al., 2003). Ebenfalls können bei Diabetes mellitus Veränderungen des Augenhintergrundes (Retinopathie diabetica) auftreten. Bei Goto-Kakizaki Ratten, die spontan Diabetes entwickeln, wurde im Vergleich zu normalen Ratten in der Retina eine erhöhte O-GlcNAc Expression in den Epithelzellen beobachtet. Die ebenfalls diagnostizierte verringerte Anzahl von Hemidesmosomen in epithelialen Basalzellen und vereinzelte Ablösung der Basalmembran von den Epithelzellen konnte bei der Retina von gesunden Ratten durch Behandlung mit dem O-GlcNAc Hydrolase Inhibitor PUGNAc induziert werden (Akimoto et al., 2003a).

Ob O-GlcNAc eine Rolle bei der Krebsentstehung spielt, ist noch ungeklärt. Bei einigen als Protoonkogene bekannten Proteinen wie c-Myc oder dem SV40 T-Antigen sowie dem Tumorsuppressor p53 konnte eine O-GlcNAc Modifikation nachgewiesen werden (Chou et al., 1995 a; Medina et al., 1998; Shaw et al., 1996). Die Glykosylierungsstelle von c-Myc, die gleichermaßen auch phosphoryliert vorliegen kann, liegt in der Transaktivierungsdomäne von c-Myc und ist beim Burkitt Lymphom als Mutations-„Hotspot“ bekannt. Außerdem konnte erst kürzlich eine verstärkte O-GlcNAcase Aktivität in primären Brusttumoren im Vergleich zu normalem Brustgewebe und dementsprechend eine signifikante Abnahme der O-GlcNAcylierung in diesem Tumorgewebe festgestellt werden (Slawson et al., 2001). Weitere Zusammenhänge zwischen dieser Glykosylierungsform und deren Bedeutung bei der Tumorbildung sind jedoch noch unbekannt (Chou und Hart, 2001).

1.2 Die Alzheimer Krankheit

In Deutschland wurde die Alzheimer Krankheit 1906 erstmalig von Alois Alzheimer beschrieben (Alzheimer, 1907). Er untersuchte eine 51-jährige Patientin, die vor allem unter Gedächtnis- sowie Sprachstörungen litt und ein orientierungsloses und unberechenbares Verhalten aufwies. Nach ihrem Tod wurde in ihrem Gehirn eine enorme Ansammlung von Proteinablagerungen entdeckt. Diese wurden bereits 1854 von Rudolf Virchow als amyloid-also stärkeähnlich bezeichnet, nachdem er diese faserigen Strukturen, die er in Gehirnpräparaten unter dem Lichtmikroskop sah, mit Jod anfärben konnte, ohne dabei zu ahnen, mit welcher Krankheit sie einhergehen.

In den USA litten im Jahr 2000 4,5 Millionen Menschen unter dieser Demenzform mit den Hauptsymptomen Gedächtnis- und Wortfindungsstörungen sowie Orientierungslosigkeit. 7% der Betroffenen waren zwischen 65-74 Jahre alt, 53% zwischen 75-84 und 40% über 80 Jahre alt (Hebert et al., 2003). AD Patienten werden schwerst pflegebedürftig und versterben letztendlich an erworbenen Infektionen. Die zur Zeit möglichen, begrenzten therapeutischen Maßnahmen können das Fortschreiten der Krankheit etwas verzögern aber nicht aufhalten.

Eine sichere Diagnose ist erst *post mortem* möglich. Neben einem ausgeprägten Synapsen- und Neuronenverlust einhergehend mit einer starken Atrophie des Gehirns sind die bereits von Alzheimer nachgewiesenen Proteinablagerungen - die intrazellulären neurofibrillären Bündel (Neurofibrilläry Tangles, NFT) und die extrazellulären neuritischen oder senilen Plaques - die neuropathologischen Hauptkennzeichen der Alzheimer Demenz (AD). Die intrazellulären neurofibrillären Bündel bestehen aus dicht gepackten gepaarten helikalen Filamenten (Paired Helical Filaments, PHF). Als Hauptbestandteil der PHF wurde das mit den Mikrotubuli-assoziierte hyperphosphorylierte Protein Tau identifiziert (Brion et al., 1986; Grundke-Iqbal et al., 1986), das an der Zusammenlagerung und Stabilität der Mikrotubuli beteiligt ist. Die Dichte der NFT korreliert mehr mit dem Verlauf der Alzheimer Krankheit als die Dichte der senilen Plaques (Arriagada et al., 1992).

Die senilen Plaques sind extrazelluläre Ablagerungen, die besonders in Teilen des Neocortex speziell des Temporal- und Parietallappens aber auch in Hippocampus und Amygdala auftreten (Takahashi et al., 2002). Während in der Umgebung der sog. diffusen Plaques noch keine Neuronendegeneration erkennbar ist, sind die neuritischen oder senilen Plaques von dystrophischen Neuriten umgeben. Außerdem fallen in der Peripherie der Plaques reaktive Astrocyten und Mikroglia auf.

Ein Hauptbestandteil der Plaques ist das β -Amyloid ($A\beta$), das auch in Ablagerungen der Blutgefäße als vaskuläres Amyloid bei Alzheimer Patienten nachgewiesen werden kann (Glennner und Wong, 1984; Masters et al., 1985). Das fibrilläre $A\beta$ in den Plaques weist eine β -Faltblattstruktur auf. Es handelt sich um ein 4 kDa großes Peptid, das 39-43 Aminosäuren (AS) umfasst und ein proteolytisches Spaltprodukt des Amyloid Precursor Proteins (APP) ist. Hierbei wird vor allen Dingen zwischen zwei $A\beta$ Formen mit unterschiedlichen C-Termini unterschieden. Während die diffusen Ablagerungen fast ausschließlich aus $A\beta_{42}$ mit 42 Aminosäuren (AS) bestehen, ist $A\beta_{40}$ mit 40 AS Hauptbestandteil der senilen Plaques und des vaskulären Amyloids (Iwatsubo et al., 1994). Im Vergleich zu $A\beta_{40}$ neigt $A\beta_{42}$ sehr viel schneller zur Aggregatbildung und wird deshalb als hoch amyloidogen bezeichnet. Man geht davon aus, dass die Ablagerung des amyloidogenen $A\beta_{42}$ in den diffusen Plaques die Akkumulation von $A\beta_{40}$ begünstigt (Jarrett und Lansbury, 1993). Neben dem fibrillären β -Amyloid ($A\beta$) als Hauptbestandteil der Plaques konnten u. a. Glykoproteine wie zum Beispiel α 1-Antichymotrypsin, Apolipoprotein E, Faktoren des Komplementsystems sowie Serum Amyloid A und Thransthyretin in den Plaques nachgewiesen werden (Ma et al., 1994; Wisniewski et al., 1993). Interessanterweise scheinen einige dieser mit den Plaques assoziierten Proteine als „pathologische Chaperone“ zu fungieren, die die Fibrillenbildung von $A\beta$ zu fördern scheinen. Auch Glykosaminoglykane, die normalerweise Bestandteile der extrazellulären Hirnmatrix sind, lagern sich in den Plaques ab, binden an $A\beta$ und scheinen eine Rolle bei der Plaquebildung auszuüben (Snow et al., 1995; Gupta-Bansal et al., 1995). Es gibt einige Hinweise auf eine neurotoxische Wirkung von $A\beta$. So führte die *in vitro* Inkubation verschiedener Zelltypen mit höheren Konzentrationen an synthetischem $A\beta$ in einigen Studien zu neurodegenerativen Prozessen (Howlett et al., 1995; Pike et al., 1991; Yankner et al., 1989).

Dem veränderten Metabolismus des APP wird eine Schlüsselrolle während der Pathogenese der Alzheimer Krankheit zugeschrieben. Besonders deutlich wird die Bedeutung des APP bei der erblich bedingten familiären Form der AD, bei der der Krankheitsbeginn zum Teil erheblich früher als im Alter von 65 Jahren eintreten kann. Von dieser frühen Form der AD sind 5-10% der Erkrankten betroffen. In ca. 50% dieser erblich bedingten Fälle liegen Mutationen der Gene für Präsenilin 1 und 2 vor, denen eine Funktion bei der APP Spaltung zugeschrieben wird (s.u.), und in 5% - 20% Mutationen des APP Gens (Schellenberg et al., 2000; Fassbender et al., 2001b). Es konnte gezeigt werden, dass diese familiär bedingten Mutationen sowohl *in vitro* in Zellsystemen als auch *in vivo* in transgenen Mäusen zu einer

erhöhten Produktion der amyloidogen A β 42 Form führen. Außerdem zeigen Down Syndrom Patienten durchweg die neuropathologischen Veränderungen der Alzheimer Krankheit. Bei diesen Patienten liegen drei Kopien des APP Gens vor, das auf dem Chromosom 21 lokalisiert ist. Die ursächlichen Ereignisse für einen pathologischen Metabolismus des APP bei der sporadischen Form der AD sind jedoch noch weitgehend unbekannt. Nach neueren Erkenntnissen scheinen auch der enzymatische Abbau des Amyloidpeptides über das Insulin-degrading enzyme oder die Enkephalinase eine wichtige Rolle zu spielen (Iwata et al., 2000; Vekrellis et al., 2000).

A β ist auch als Marker zur Früherkennung für Hochrisikopatienten der sporadischen Form der AD in der Diskussion. So steigt nach Jensen et al. (1999) im frühen Stadium der AD der A β 42 Gehalt der Cerebrospinalflüssigkeit an und nimmt mit dem weiteren Fortschreiten der Krankheit wieder ab. Therapeutische Maßnahmen zeigen derzeit nur mäßigen Erfolg. Von größerer klinischer Relevanz ist hierbei der Einsatz von Acetylcholinesterase-Inhibitoren, der den massiven Verlust der Cholinacetyl-Transferase Aktivität, der bereits 1977 von White et al. im Hirngewebe von AD Patienten beschrieben wurde, entgegen wirken soll (White et al., 1977). Weiterhin hat erst vor kurzem der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantine die EU-Zulassung für die Behandlung bei mittelschwerer bis schwerer AD erhalten. Memantine blockiert selektiv den Ionenkanal des NMDA (N-Methyl D-Aspartat)-Rezeptors und schützt auf diese Weise Neuronen vor der neurotoxischen Wirkung hoher Glutamatkonzentrationen, die bei neurodegenerativen Prozessen auftreten (Parsons et al., 1999). Desweiteren sind Immunisierungen gegen A β in der klinischen Testphase. Dieser Ansatz beruht auf Immunisierungsstudien an Mäusen, in denen APP überexprimierende Mäuse passiv gegen A β immunisiert wurden. Während bei jungen Mäusen die Entwicklung der A β Plaques, neuritische Dystrophie und Astrogliosis verhindert wurden, konnten bereits entwickelte Neuropathien bei älteren Mäusen durch diese Behandlung sogar reduziert werden (Schenk et al., 1999). Solche Immunisierungen scheinen außerdem das Lernvermögen und die Gedächtnisfähigkeit in verschiedenen Mausmodellen zu fördern (Younkin, 2001).

1.2.1 Amyloid Precursor Protein (APP)

Nachdem 1984 A β erstmalig aus cerebrovaskulären Amyloidablagerungen und kurz darauf aus senilen Plaques von Alzheimer Patienten isoliert wurde, konnte mit Hilfe von Oligonucleotid-Proben der A β Sequenz die cDNA des Vorläufermoleküls APP kloniert werden (Glenner und Wong, 1984; Masters et al., 1985; Tanzi et al., 1987). Hierbei handelt es sich um eine hoch konservierte Sequenz. Es wurden homologe Sequenzen in *Drosophila*, *C. elegans* und *Xenopus* nachgewiesen. Säugetiere exprimieren noch zwei weitere APP ähnliche Proteine APLP1 und APLP2 (Amyloid Precursor Like Protein), die bis auf die A β Sequenz eine starke Homologie zu APP aufweisen (Slunt et al., 1994; Wasco et al., 1992, 1993). APP ist ein ubiquitär exprimiertes, auf Chromosom 21 lokalisiertes, integrales Typ-I-Transmembranprotein mit einer relativ langen extrazellulären Domäne, einem 23 AS langen transmembranen Bereich und einer kurzen intrazellulären Domäne. Durch alternatives Spleißen der mRNA können acht verschiedene Isoformen entstehen. Zu den drei Hauptisoformen zählen APP 695, APP 751 und APP 770, die entsprechend nach der Anzahl ihrer AS benannt werden. APP 751 und APP 770 werden in peripherem Gewebe und Astrocyten exprimiert und enthalten einen 56 AS langen Abschnitt in der Mitte der extrazellulären Domäne, der eine Homologie zur „Kunitz-Familie“ der Serin Protease Inhibitoren (KPI-Domäne) aufweist (Ponte et al., 1988). Tatsächlich können die in Thrombozyten exprimierten APP Isoformen mit KPI-Domäne den XIa Serin Protease Faktor während der Blutgerinnungskaskade inhibieren (Oltersdorf et al., 1989; Smith et al., 1990). APP 695 ohne KPI-Domäne wird hauptsächlich in Neuronen exprimiert. Die höchsten APP Expressionsraten weisen Gehirn und Niere auf (Neve et al., 1988; Koo et al., 1990). Die Funktion des Proteins ist immer noch weitgehend unverstanden. Neben der KPI enthaltenden Form, für die wie bereits erwähnt eine Rolle bei der Blutgerinnung und der Wundheilung vermutet wird, werden noch folgende weitere zelluläre Funktionen diskutiert, an denen APP beteiligt zu sein scheint: U.a. Zelladhäsion, Neuritenwachstum, Wachstumsförderung von neuronalen und nicht neuronalen Zellen, neuronale Erregbarkeit und Neuroprotektion. Einen Überblick über diese Eigenschaften gibt ein Review von B. De Strooper und W. Annaert (De Strooper und Annaert, 2000). Auch APP *knock-out* Mäuse können wenig Aufschluss über die physiologische Aufgabe von APP geben, da sie keinen klinisch auffälligen Phänotyp zeigen. Eine zusätzliche Inaktivierung von APLP1 oder APLP2 führt zu einem reduzierten Körpergewicht oder zu einem frühen postnatalen Tod der Mäuse, aber die Ursache bzw. der

Zusammenhang zwischen diesen Phänotypen und der APP Funktion ist noch ungeklärt (Heber et al., 2000; Von Koch et al., 1997).

1.2.2. Proteolytische Spaltung von APP

APP kann unterschiedlich posttranslational modifiziert werden (Weidemann et al., 1989). Neben N- und O-Glykosylierung, Sulfatierung und Phosphorylierung ist die proteolytische Spaltung von APP von entscheidender Bedeutung. Auf dem sekretorischen Transportweg und an der Zelloberfläche kann APP mehrfach gespalten werden. Dabei werden zwei verschiedene Spaltungswege einander gegenübergestellt (Abb. 3): Bei der nicht amyloidogenen Spaltung wird APP mit Hilfe der α -Sekretase innerhalb der A β Region zwischen den AS 16-17 gespalten, so dass kein amyloidogenes A β entstehen kann. Bei dieser α -Sekretase Spaltung wird die 90-100 kDa große, lösliche Ektodomäne ($APP_{s\alpha}$) freigesetzt, und es entsteht ein zellassoziertes C-terminales Fragment (CTF) mit 83 AS (C83) (Esch et al., 1990). Alternativ kann APP beim amyloidogenen Spaltungsweg vor allem in Neuronen und im Gehirn N-terminal von der A β Region durch die β -Sekretase gespalten werden. Neben der Freisetzung eines ca. 100 kDa großen N-terminalen Fragments ($APP_{s\beta}$) entsteht auf diese Weise ein membranassoziertes C-terminales APP Fragment mit intakter A β Sequenz und insgesamt 99 AS (C99). Sowohl C83 als auch C99 können weiter durch die γ -Sekretase prozessiert werden, die das CTF ungewöhnlicherweise innerhalb der Transmembranregion schneidet. Dadurch entsteht nach γ -Sekretase Spaltung von C83 bzw. C99 ein 3 kDa Fragment (P3) bzw. das A β Peptid. Ursprünglich wurde angenommen, dass der α -Sekretaseweg dem physiologischen Spaltungsprozeß von APP entspricht, während das Prozessieren durch die β -Sekretase - der amyloidogene Spaltungsweg - nur unter pathologischen Bedingungen auftritt (Sisodia et al., 1990). Dass dies nicht der Fall ist, konnte mittlerweile schon vielfältig demonstriert werden. So wurde nachgewiesen, dass A β von nahezu allen APP exprimierenden Zelltypen produziert werden kann, und zwar als Bestandteil des normalen zellulären Stoffwechsels. Außerdem wurde A β im Plasma und der Cerebrospinalflüssigkeit von gesunden Personen identifiziert (Haass et al., 1992; Seubert et al., 1992).

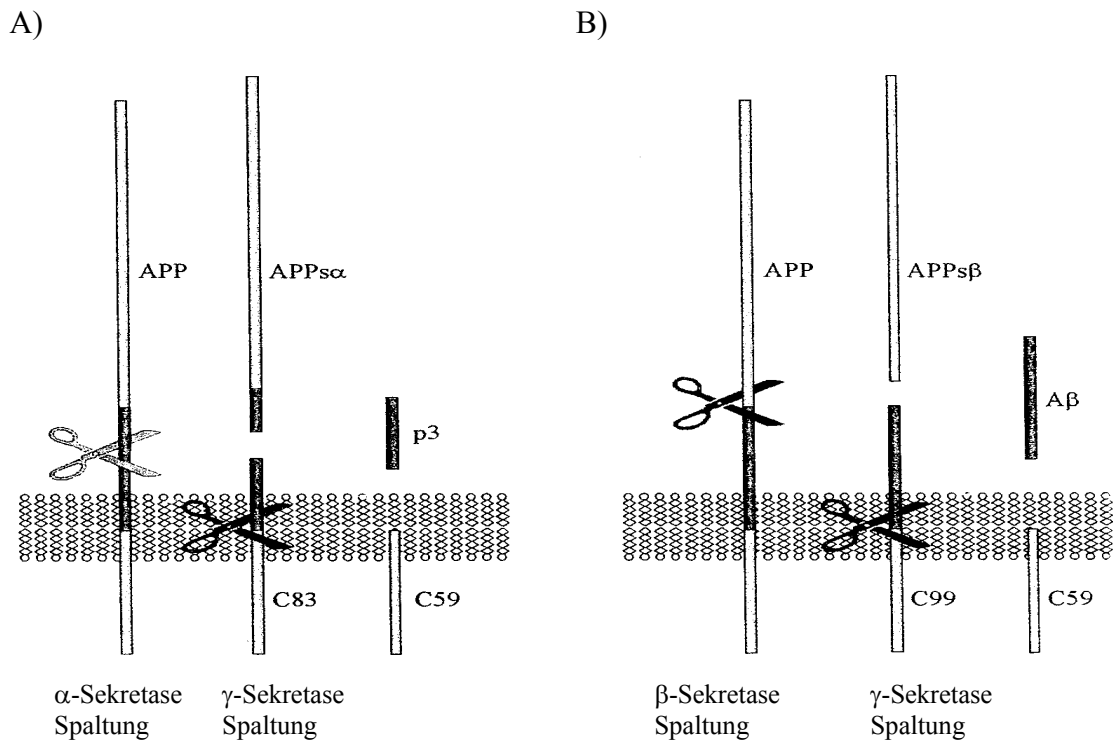


Abb. 3 Proteolytische APP-Spaltung (nach Dominguez et al., 2001). APP kann sowohl über den nicht amyloidogenen Weg (A) als auch über den amyloidogenen Weg (B) prozessiert werden.

1.2.2.1 α-Sekretase

Die α-Sekretase Aktivität ist im späten sekretorischen Weg, an der Zelloberfläche und in den späten Endosomen, die endocytosiertes intaktes APP enthalten, lokalisiert (De Strooper et al., 1993; Parvathy et al., 1999; Refolo et al., 1995). Ähnlich wie beim Prozessieren anderer integraler Membranproteine kann die α-Sekretase Aktivität und damit die Sekretion von APP_{sα} durch Behandlung mit Phorbolöster, der die Proteinkinase C aktiviert, noch zusätzlich zu ihrer Grundaktivität stimuliert werden (Buxbaum et al., 1990). Neben der konstitutiven Sekretion von APP_{sα} gibt es daher auch eine regulierbare Sekretion. Es sind verschiedene Enzyme mit α-Sekretase-Aktivität nachgewiesen worden. Dabei handelt es sich u.a. um zwei Mitglieder der ADAM (a desintegrin and metalloprotease) Familie. ADAM 17 (auch TACE genannt: tumor necrosis factor-α converting enzyme, lokalisiert auf Chromosom 2) scheint mehr an der regulierbaren Sekretion von APP_{sα} beteiligt zu sein, da bei Fibroblasten von TACE *knock-out* Mäusen die Aktivierung der Proteinkinase C durch Phorbolöster keine Stimulation der α-Sekretase bewirkte (Buxbaum et al., 1998), die basale Sekretion aber unverändert blieb. Diese Beobachtung ist auch ein Beleg für die potentielle Existenz von

mehreren α -Sekretasen. Vor allen Dingen wird ADAM 10 (auf Chromosom 15 lokalisiert) als weiterer potentieller Kandidat für die α -Sekretase favorisiert (Lammich et al., 1999). Dafür spricht nicht nur die Fähigkeit von ADAM 10, synthetische Peptide mit der α -Schnittstelle spezifisch *in vitro* spalten zu können, sondern auch die zelluläre Lokalisation von ADAM 10 im Golgi-Apparat und auf der Zelloberfläche, die mit der beobachtbaren α -Sekretase Aktivität übereinstimmt. Außerdem ist die α -Sekretase Aktivität in Fibroblasten von ADAM 10 *knock-out* Mäusen nach einer Beobachtung von Bart de Strooper u.a. nicht mehr nachweisbar (Dominguez et al., 2001).

1.2.2.2 β -Sekretase

Bei dem alternativen Spaltungsweg entstehen das amyloidogene A β und APP_{s β} nach APP Spaltung durch die β - und γ -Sekretase. In nicht neuronalen Zellen ist die β -Sekretase Aktivität sehr gering, so dass das Prozessieren von APP hauptsächlich über den nicht amyloidogenen Weg erfolgt. Die β -Sekretase Aktivität ist in dem späten sekretorischen Weg, in den Endosomen nach Reinternalisation von APP und in dem Endoplasmatischen Retikulum/Intermediärkompartiment lokalisiert (Xu et al., 1997; Koo und Squazzo, 1994; Chyung et al., 1997). Der N-Terminus von A β beginnt zwar meistens mit Asp1, es konnte aber auch eine bestimmte Heterogenität des N-Terminus festgestellt werden. So wurden A β Peptide, die mit Glu11 beginnen, im konditionierten Medium von primären neuronalen Zellkulturen und in amyloiden Plaques nachgewiesen (Gouras et al., 1998; Naslund et al., 1994). Diese N-terminale Deletion wirkt besonders „klebrig“ und scheint die A β Aggregation von A β zu Fibrillen zu verstärken (Pike et al., 1991). Generell erfolgt die β -Sekretase Spaltung sehr sequenzspezifisch und erfordert eine minimale Erkennungssequenz zwischen Val669-Ala673 (Citron et al., 1995). Während die meisten Mutationen innerhalb dieses Bereichs die A β Produktion stark verringern bzw. verhindern, scheint die sog. Schwedische Mutante, bei der die mutierten AS unmittelbar neben der β -Schnittstelle liegen (KM \downarrow DA zu NL \downarrow DA) und die bei einer familiär bedingten Form der AD auftritt, ein besseres Substrat für die β -Sekretase zu sein und verursacht dementsprechend eine verstärkte A β Bildung (Citron et al., 1994). Interessanterweise scheinen speziesspezifische Unterschiede in der Aminosäuresequenz der A β Region die Aktivität der β -Sekretase zu beeinflussen. Die murine Sequenz scheint im Vergleich zu der humanen ein schlechteres Substrat für die β -Sekretase zu

sein (De Strooper et al., 1995). Dies könnte auch einer der Gründe dafür sein, warum nur transgene Mäuse, die das humane APP exprimieren, fähig sind, amyloide Plaques zu bilden. Ebenfalls wurde gezeigt, dass sowohl humane als auch murine BACE 1 - eine der beiden erst kürzlich identifizierten Proteasen mit β -Sekretase Aktivität (s.u.) - humanes und murines APP an der Stelle Asp1 spalten können, aber die Stelle Glu11 jeweils nur speziesspezifisch schneiden (Cai et al., 2001).

Diese zwei erst vor kurzem klonierten und identifizierten Proteasen, die APP an der β -Schnittstelle spalten und dementsprechend beta-site APP cleaving enzyme BACE 1 (auf Chromosom 11 lokalisiert) und BACE 2 (Chromosom 21) genannt werden, gehören zur Familie der Aspartyl-Proteasen (Hussain et al., 1999; Vassar et al., 1999; Sinha et al., 1999; Yan et al., 1999; Lin et al., 2000). BACE 1 wird vor allen Dingen stark im Gehirn und dort hauptsächlich in Neuronen exprimiert. Das Expressionsmuster und die subzelluläre Lokalisation von BACE 1 stimmen mit dem der β -Sekretase Aktivität überein (Vassar et al., 1999, Marcinkiewicz und Seidah, 2000). Die Überexpression von BACE 1 steigert die β -spezifische APP Spaltung. Antisense Experimente konnten zeigen, dass eine Reduktion von BACE 1 zu einer verminderten A β Sekretion führt. BACE 1 *knock-out* Mäuse zeigen keinen auffälligen Phänotyp. Das Gehirn und kultivierte Neuronen dieser Mäuse weisen jedoch keine β -Sekretase Aktivität mehr auf, dafür nimmt die Menge an den α -Sekretase Spaltungsprodukten C83 und P3 zu (Roberds et al., 2001).

Es konnte noch ein weiteres Protein mit starker Homologie zu BACE 1 identifiziert werden. Dieses als BACE 2 bezeichnete Protein ist in Bezug auf die Aminosäuresequenz zu 55% identisch mit BACE 1, es wird nur in geringem Maße im Gehirn exprimiert und ist auf Chromosom 21 lokalisiert (Acquati et al., 2000; Solans et al., 2000; Bennett et al., 2000). Während keine Mutation des BACE 1 Gens bekannt ist, die mit der Alzheimer Krankheit assoziiert ist, liegt das BACE 2 Gen ebenso wie das APP Gen bei der Trisomie 21 in dreifacher Kopie vor und könnte dementsprechend eine potentielle Rolle bei der frühen AD Form, die bei Down Syndrom Patienten auftritt, übernehmen. Tatsächlich konnten Zelltransfektionsstudien zeigen, dass BACE 2 fähig ist, APP an der β -Spaltstelle vor Asp1 zu schneiden. Effektiver spaltet BACE 2 an zwei anderen Positionen innerhalb der A β -Sequenz in der Nähe der α -Sekretase Spaltstelle, und zwar an Position Phe19 und Phe20. Interessanterweise liegt eine weitere Mutation, die mit der flämischen familiären AD Form assoziiert ist, in der Nähe dieser beiden Aminosäuren und verursacht eine verstärkte BACE 2 Spaltung vor Asp1, die mit einer dementsprechend erhöhten A β Produktion verknüpft ist (Farzan et al., 2000). BACE 1 hingegen zeigt bei dieser Mutation keine verstärkte Aktivität,

so dass die A β Plaques in Individuen mit der flämischen Mutation möglicherweise auf die BACE 2-Aktivität zurückzuführen sind. Da das BACE 2-Expressionslevel im Gehirn bis auf Medulla und Rückenmark nicht sehr hoch ist, gilt es jedoch als wahrscheinlich, dass BACE 1 die hauptsächliche β -Sekretase Aktivität darstellt (Farzan et al., 2000; Bennett et al., 2000).

1.2.2.3 γ -Sekretase

Die C-terminalen Fragmente C83 und C99, die nach α - bzw. β -Sekretase Spaltung entstehen, dienen als Substrat für die γ -Sekretase. Diese Sekretase schneidet innerhalb der Transmembranregion vor allen Dingen an zwei Positionen: Val40 oder Ala42. Wie bereits erwähnt hat die γ -Sekretase Aktivität eine ganz besondere Bedeutung bei der Pathogenese der AD, da der C-Terminus von A β eine wichtige Rolle bei der Amyloidogenese spielt. So aggregieren Peptide, die mit den Aminosäuren 42 oder 43 enden, sehr viel schneller zu amyloiden Fibrillen, als diejenigen, die mit AS 39 oder 40 enden. Außerdem kann die Aggregation von A β 40 durch bereits aggregiertes A β 42 verstärkt werden (Jarrett et al., 1993). Unter physiologischen Bedingungen besteht das sekretierte A β zu ca. 90% aus A β 40, während A β 42 ein Hauptbestandteil der amyloiden Plaques darstellt. Auch die frühesten Ablagerungen, die nicht nur in Gehirnen von Patienten mit AD oder Down Syndrom sondern auch in Gehirnen von unauffälligen älteren Personen nachgewiesen werden können, bestehen ausschließlich aus A β 42 (Wang et al., 1996; Mori et al., 1992; Roher et al., 1993 a; 1993 b; Fukumoto et al., 1996).

Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass A β 40 und A β 42 in verschiedenen zellulären Kompartimenten entstehen. Während A β 40 mehr im späten sekretorischen und endocytotischen Weg erzeugt und dann ins Medium sekretiert wird, wird A β 42 hauptsächlich im frühen sekretorischen Weg (Endoplasmatisches Retikulum und Intermediärkompartiment) gebildet (Hartmann et al., 1997; Greenfield et al., 1999; Soriano et al., 1999). Es gibt Hinweise darauf, dass ein Teil von A β 42 nicht nur nicht sekretiert wird, sondern die Oligomerisierung von A β bereits intrazellulär beginnen kann (Walsh et al., 2000). Da die γ -Sekretase APP hauptsächlich an zwei verschiedenen Positionen schneiden kann und das in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten geschieht, stellt sich die Frage, ob es zwei verschiedene γ -Sekretasen gibt. Die unterschiedliche Sensitivität der beiden γ -Sekretase Aktivitäten zur Spaltung von A β 40 und A β 42 gegenüber denselben Proteaseinhibitoren

könnte ein Beleg für die Existenz zweier unterschiedlicher Enzyme sein (Citron et al., 1996; Skovronsky et al., 2000). Ebenso könnten die verschiedenen Zellkompartimente aber auch unterschiedlich zugänglich für denselben Inhibitor sein. Deletions- und Substitutionsanalysen, die die A β Sequenz und die benachbarte Region betreffen, weisen daraufhin, dass die Spaltungsaktivität der γ -Sekretase keine spezifische Erkennungssequenz erfordert (Durkin et al., 1999).

Die molekulare Identität der γ -Sekretase Aktivität ist immer noch nicht eindeutig geklärt. Es ist zumindest sicher, dass die beiden bekannten Präseniline (PS1/PS2) auf jeden Fall für die γ -Sekretase Spaltung von APP erforderlich sind. So ist die A β und P3 Sekretion in PS1 *knock-out* Mäusen um 80% reduziert, und in PS1/PS2 negativen embryonalen Stammzellen kommt es zu einer kompletten Unterdrückung der A β Sekretion. Es sind mehrere Möglichkeiten für die Funktion der Präseniline in der Diskussion. Sie könnten als „sorting chaperons“ APP zum Kompartiment transportieren, in dem es durch die γ -Sekretase gespalten wird oder als Kofaktor für die γ -Sekretase Aktivität dienen (De Strooper et al., 1998; Herremann et al., 2000; Zhang et al., 2000). Es liegen aber auch einige Hinweise vor, dass die Präseniline mit der γ -Sekretase identisch sind. Z.B. wird davon ausgegangen, dass es sich bei der γ -Sekretase um eine Aspartyl-Protease handelt, da sie sich mit Aspartyl-Protease Inhibitoren hemmen lässt (Wolfe et al., 1999b). Wird einer der beiden hoch konservierten Aspartatreste in den Transmembrandomänen 6 und 7 von Präsenilin1 mutiert, hat dies einen dominant negativen Effekt auf das APP Prozessieren: A β wird nicht mehr freigesetzt und durch α - und β -Sekretase gespaltene Fragmente häufen sich an (Wolfe et al., 1999a). Das könnte daraufhin deuten, dass es sich bei den Präsenilinen ebenfalls um Aspartyl-Proteasen handelt. Ebenso gut könnten diese dominant negativen Effekte jedoch auch auf strukturelle Veränderungen zurückzuführen sein, die z.B. die Bindung an ein unbekanntes Protein stören könnten. Weiterhin konnte aus Hela-Zellmembranen eine γ -Sekretase Aktivität solubilisiert werden, die ein rekombinantes C-terminales APP Fragment als Substrat bei Val40 und Ala42 im gleichen Verhältnis wie in intakten Zellen schneiden kann (Li et al., 2000). Dieser aktive γ -Sekretase Komplex enthält nicht nur PS1, sondern es kann auch mit einem anti-PS1 Antikörper die γ -Sekretase Aktivität aus der solubilisierten Präparation isoliert werden. Als weitere funktionale Komponente dieses Komplexes konnte Nicastrin identifiziert werden (Yu et al., 2000). Nicastrin ist ein Transmembranglykoprotein, das mit PS1, PS2 und C-terminalen Fragmenten von APP interagieren kann und anscheinend auch eine wichtige Funktion bei der A β Erzeugung hat. Eine Deletion des hoch konservierten DYIGS Motivs von Nicastrin führte

z.B. zu einer reduzierten A β Bildung, während „Missense“-Mutationen des gleichen Motivs zu einem signifikanten Anstieg von A β führten. Vor kurzem wurden Aph-1 und Pen-2 als zwei weitere Komponenten des aktiven γ -Sekretase Komplexes identifiziert (Goutte et al., 2002; Francis et al., 2002; Kimberly et al., 2003; De Strooper, 2003). Kimberly et al. demonstrierten hierbei, dass die Koexpression von allen vier Proteinen zu einer verstärkten γ -Sekretase Aktivität führte (Kimberly et al., 2003).

Einen direkten Nachweis, dass es sich bei den Präsenilinen um die γ -Sekretase Aktivität handelt, gibt es jedoch immer noch nicht. In diesem Zusammenhang gilt es auch zu klären, warum die subzelluläre Lokalisation der Präseniline nur teilweise mit den Kompartimenten, in denen die γ -Sekretase Aktivität nachgewiesen werden konnte, übereinzustimmen scheint- ein Problem, dass von Annaert und De Strooper als „spatial paradox“ bezeichnet wird (Annaert und De Strooper, 1999). Einen neuen Hinweis auf eine von den Präsenilinen unabhängige γ -Sekretase gibt eine aktuelle Untersuchung von Wilson et al. (2003). In dieser Studie konnte im ER und Intermediärkompartiment gebildetes intrazelluläres A β 42 in murinen PS1/PS2 negativen Zellen nachgewiesen werden. Hingegen konnten die meisten anderen A β Spezies in diesen Zellen nicht detektiert werden. Diese Beobachtung spricht dafür, dass murines PS1/PS2 nicht an der Bildung von im ER und Intermediärkompartiment erzeugtem A β 42 beteiligt ist. Der größte Anteil des sekretierten und intrazellulären A β scheint jedoch durch eine Präsenilin abhängige γ -Sekretase Aktivität erzeugt zu werden (Wilson et al., 2003). In einer neuen Studie von Grimm et al. wurde die Sequenzspezifität der γ -Sekretase im Hinblick auf intrazellulär gebildetes und sekretiertes A β untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Punktmutationen von APP, die in unmittelbarer Nähe zur γ -Sekretase Schnittstelle liegen, zwar bekannterweise die Produktion von deutlich mehr sekretiertem A β 42 im Vergleich zu sekretiertem A β 40 hervorrufen, das Verhältnis des intrazellulären A β 42/A β 40 dabei aber fast unverändert bleibt (Grimm et al., 2003).

Die γ -Sekretase gilt als interessantes aber auch komplexes Zielmolekül für einen medikamentösen Therapieansatz. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die proteolytische Aktivität der γ -Sekretase neben APP für die Spaltung einer Reihe von integralen Membranproteinen wie zum Beispiel Notch und wie vor kurzem gezeigt werden konnte, des Neutrophin Rezeptors P75 verantwortlich ist (Annaert und De Strooper, 2002; Jung et al., 2003). Außerdem ist zu klären, inwieweit Unterschiede in der Zusammensetzung des Komplexes Einfluss auf die Spaltung unterschiedlicher Substrate haben.

1.2.3 Bedeutung des C-Terminus von APP

APP wird u.a. eine wichtige Funktion bei der Signaltransduktion zugeschrieben. So wurde schon 1987 von Kang et al. erkannt, dass die APP Struktur als Typ-1-Transmembranprotein der eines Zelloberflächenrezeptors ähnelt (Kang et al., 1987). Da Zelloberflächenexpression von APP lange Zeit schwer nachweisbar war, konzentrierten sich APP Funktionsanalysen zunächst auf die Untersuchung der sezernierten Ektodomäne von APP (Allinquant et al., 1994). Mittlerweile konnte APP auf der neuronalen Zelloberfläche detektiert werden (Jung et al., 1996; Storey et al., 1996). Die Kollokalisierung von APP mit Komponenten von Adhäsionsplaques an der Zelloberfläche, die Beteiligung am Recycling von synaptischen Vesikeln und eine Neuritenwachstums-fördernde Aktivität, die sich von der des sekretierten APP unterscheidet, lassen darauf schließen, dass zumindest ein Teil des APP als Zelloberflächenrezeptor fungiert, der Signale von der Extrazellulärmatrix in das Zellinnere überträgt (Yamazaki et al., 1997; Marquez-Sterling et al., 1997; Qiu et al., 1995). Diese Vermutung wird wesentlich dadurch unterstützt, dass der Spaltungsmechanismus von APP dem anderer signaltransduzierender Proteine ähnelt. Zudem konnten verschiedene C-Terminus bindende Proteine, die an verschiedenen Signaltransduktionsmechanismen beteiligt sind, nachgewiesen werden (s.u.).

Ein ungewöhnlicher Spaltungsprozeß innerhalb der Membran wird nicht nur beim APP Prozessieren durch die γ -Sekretase beobachtet, sondern auch bei anderen Transmembranproteinen (Brown et al., 2000; De Strooper und Annaert, 2000). Häufig ist hierbei dieser auch als RIP (regulated intramembrane proteolysis) bezeichnete Prozess erforderlich, um ein cytosolisches Fragment freizusetzen, welches in den Kern wandert und dort die Gentranskription aktiviert (Brown et al., 2000). Das Schicksal des durch γ -Spaltung freigesetzten C-terminalen Fragments C59 von APP ist hingegen immer noch weitgehend ungewiss. Die bisher bekannten größten Analogien im Spaltungsverhalten bestehen zwischen Notch und APP. Bei Notch handelt es sich ebenso wie bei APP um ein integrales Typ-1-Transmembranprotein. Nach Abspaltung eines großen extrazellulären Teils des Proteins folgt eine zweite Spaltung innerhalb der Transmembrandomäne, an der ebenso wie bei APP Präseniline beteiligt sind. Dies führt zur Abtrennung des C-Terminus, der daraufhin im Komplex mit DNA-bindenden Proteinen in den Kern transportiert wird und dort Gene kontrolliert, die u.a. an der neuronalen Differenzierung beteiligt sind (Artavanis-Tsakonas et al., 1999). Ein ähnlicher Kerntransport wird für den C-Terminus von APP angenommen. So

gibt es seit kurzem Hinweise für eine nukleäre Translokation des C-Terminus. Nach Überexpression eines C-terminalen Fragments von APP in Hamster Nierenzellen konnte ein Teil dieser Fragmente im Detergens-unlöslichen Pellet der Kernfraktion nachgewiesen werden (Cupers et al., 2001). Ebenso wurde eine Translokation des überexprimierten C-Terminus in die Kerne von Neuronen und humanen Neurogliomazellen festgestellt (Kimberly et al., 2001; Kinoshita et al., 2002).

Hauptsächlich mit Hilfe von Two-Hybrid Analysen konnten C-Terminus bindende Proteine mit signaltransduzierenden Eigenschaften identifiziert werden. Matsuda et al. (2001) demonstrierten die Assoziation zwischen dem C-Terminus und einem Protein, das an der Regulation des JNK (c-Jun N-terminale Kinase)-MAPK (mitogen-activated protein kinase) Signalwegs beteiligt ist. Hierbei handelt es sich um eine Isoform (JIP-1b) des murinen mit der JNK interagierenden Proteins (JIP-1), das ein cytoplasmatischer Inhibitor der JNK ist und antiapoptische Eigenschaften besitzt, und des humanen homologen Proteins IB-1 (islet-brain-1), das an den Promotor des Gens für den Glucose Transporter GLUT2 binden kann (Dickens et al., 1997; Harding et al., 2001; Waeber et al., 2000). Sowohl JIP-1b als auch das humane IB-1 binden mit einer Phosphotyrosin interagierenden Domäne (PID) an den C-Terminus von APP, wobei für die Bindung die Aminosäuren Tyr(682), Asn(684) und Tyr(687) in der G(681)YENPTY(687) Sequenz des C-Terminus von APP(695) essentiell sind.

Als weitere C-Terminus bindende Proteine konnten sog. Adapterproteine identifiziert werden. Diese vermitteln Signale von Plasmamembranrezeptoren an intrazelluläre Moleküle, indem sie Komplexe mit ihnen bilden. So binden die beiden Proteine Fe65 und X11 an das bereits erwähnte Tyrosin enthaltene Motiv GYENPTY des C-Terminus. Die NPTY Sequenz vermittelt ebenso die Internalisierung von APP (Lai et al., 1995). Fe65 enthält zwei Phosphotyrosin interagierende Domänen PID1 und PID2 (Phosphotyrosine-Interaction Domain) und eine WW Domäne. Während PID2 an den C-Terminus bindet, kann PID1 an andere Proteine wie z.B. an das NPTY Motiv des Lipoproteinrezeptors LRP binden oder mit den Transkriptionsfaktoren CP2, LSF, LBP1 interagieren (Fiore et al., 1995). Einen wichtigen Hinweis auf eine mögliche transkriptionsaktivierende Funktion des C-Terminus erbrachten die Untersuchungen von Cao und Sudhof (2001). Sie konnten zeigen, dass der C-Terminus von APP einen multimeren Komplex mit Fe65 und der Histon Acetyltransferase Tip60 bilden kann. Während nach der Fusion von Tip60 mit DNA bindenden Domänen das transfizierte Fusionsprodukt allein nur eine schwache transkriptionsaktivierende Fähigkeit aufweist, ist die

Transkription von Reportergenen nach Cotransfektion mit Fe65 und APP um ein Vielfaches verstärkt.

An die WW Domäne von Fe65 kann Mena binden (Ernekova et al., 1997). Als Mena (mammalian enabled protein) wird das zu dem Ena Protein von *Drosophila* homologe Protein der Säugetiere bezeichnet. Es liegt in konzentrierter Form in fokalen Adhäsionsplaques vor und kann in Gebieten des „actin remodelings“ wie Lammellipodien und in den Spitzen von Wachstumskegeln nachgewiesen werden (Lanier et al., 1999). Bei der Interaktion zwischen Fe65 und dem C-Terminus scheint auch die Phosphorylierung von Thr668 von APP695 eine Rolle zu spielen. So beobachteten Ando et al. (2001), dass eine Mutation von Thr668 bzw. die Phosphorylierung von Thr668 zu einer Konformationsänderung des C-Terminus führt und die Assoziation zwischen Fe65 und dem C-Terminus schwächt, während die Bindung des C-Terminus zu anderen Proteinen wie X11 oder DAB (s.u.) dadurch nicht beeinträchtigt wird.

Über X11 könnte APP mit synaptischen Funktionen verbunden sein. Das X11 (auch MINT-1, Munc18 interacting protein1) Protein bindet ebenfalls mit einem PID Modul an das GYENPTY Motiv des C-Terminus (Borg et al., 1996). Der N-Terminus von X11 enthält Bindungsstellen für Munc18, das an der Exocytose von synaptischen Vesikeln beteiligt zu sein scheint und für CASK, ein Protein, das im Komplex mit X11 und dem Protein VELI an der präsynaptischen Membran lokalisiert ist (Butz et al., 1998). Dieser Komplex kann dann wiederum über CASK mit Neurexin verknüpft sein (Borg et al., 1999).

Dass X11 und Fe65, die an das gleiche Motiv des C-Terminus von APP binden, um die Bindung an APP kompetieren können, wurde von Lau et al. gezeigt (Lau et al., 2000). Sie konnten auch eine überlappende subzelluläre Verteilung für APP, X11 und Fe65 in Neuronen nachweisen. Die Koexpression entweder von X11 oder von Fe65 zusammen mit APP hat entgegengesetzte Effekte auf das APP Prozessieren. Während eine Koexpression von APP mit Fe65 zu einem Anstieg des Zelloberflächen assoziierten APP und verstärkter Spaltung zu APP_s und A β führt, vermindert X11 das Prozessieren (Sabo et al., 1999; Borg et al., 1998). Dabei verstärkt die Koexpression von X11 mit Munc18 die Unterdrückung der A β Sekretion durch X11, wobei nach Deletionsmutationsanalysen dieser Effekt unabhängig von einer direkten Interaktion von Munc18 mit X11 zu sein scheint (Ho et al., 2002).

Ein weiteres Protein, mDAB1 (homologes Säugetierprotein zu dem *Drosophila* Protein Disabled) bindet ebenfalls mit einer PID Domäne an die GYENPTY Sequenz (Homayouni et al., 1999). Durch Phosphorylierung der PID Domäne können Kinasen wie z.B. Abl, Fyn und Src aktiviert werden und somit kann APP mit „downstream“ Signaltransduktionmechanismen verbunden werden.

Während für die Interaktion der oben genannten PID enthaltenen Proteine JIP, Fe65, X11 und DAB nicht unbedingt eine Tyrosin-Phosphorylierung der GYENPTY Sequenz erforderlich ist, verstärkt die Phosphorylierung von Tyr682 die Assoziation zwischen dem C-Terminus und den Mitgliedern einer weiteren Adapterproteinfamilie. Hierbei handelt es sich um Shc Proteine, die ursprünglich als Protoonkogene mit SH2 Domänen identifiziert worden sind. Diese spielen eine Rolle bei der durch Wachstumsfaktoren vermittelten Signaltransduktion und sind an der Aktivierung der MAPK (Mitogen aktiviert Protein Kinase) beteiligt (Ravichandran, 2001). So konnten Tarr et al. (2002) nach Phosphorylierung von Tyr682 nicht nur eine Assoziation zwischen APP und ShcC im Maushirn nachweisen, sondern ebenso in N2a-Zellen zeigen, dass die Tyrosinphosphorylierung durch Pervanadatbehandlung zu einer Assoziation zwischen Shc und APP führt. Vor kurzem konnten auch in humanem Gehirn Komplexe zwischen tyrosinphosphorylierten C-terminalen Fragmenten und ShcA sowie einem weiteren Adapterprotein Grb2 nachgewiesen werden (Russo et al., 2002). Interessanterweise treten diese Komplexe verstärkt in Gehirnen von verstorbenen Alzheimer Patienten auf, in denen auch eine erhöhte Menge an ShcA Protein festgestellt werden konnte, die besonders in aktivierten Astrocyten in der Umgebung von amyloiden Plaques auftritt. Vermutlich steht diese Komplexbildung im Zusammenhang mit einer Aktivierung des MAPK Signalwegs, da in AD Gehirnen ebenso eine erhöhte Menge an phosphoryliertem (=aktiviertem) Erk Protein nachweisbar ist und in kultivierten Astrocyten erst nach Aktivierung von Erk durch Thrombin eine Komplexbildung erfolgen kann. Diese Interaktion zwischen C-terminalen Fragmenten und ShcA scheint nur auf Gliazellen begrenzt und dementsprechend vielleicht auch typisch für die in AD auftretende Gliosis zu sein, da nach Thrombin Behandlung von primären korticalen Neuronen keine Komplexbildung nachweisbar ist.

Welche Tyrosinkinase für die Phosphorylierung von Tyr682 von APP verantwortlich ist, ist noch nicht eindeutig geklärt. Sicher ist, dass die Tyrosinkinase Abl *in vitro* Tyr682 phosphorylieren kann, und es gibt einige Hinweise darauf, dass die aktive Form von Abl einen Komplex mit APP bilden kann, wenn Tyr682 phosphoryliert vorliegt (Russo et al., 2001; Zambrano et al., 2001).

Erst kürzlich wurden die C-Terminus bindenden Eigenschaften eines weiteren Typs von Adapterproteinen nachgewiesen. Man konnte zeigen, dass die intrazelluläre Domäne des APP an Numb und Numb-like (Nbl) Proteine binden kann, die den Notch Signalweg inhibieren (Roncarati et al., 2002). Für diese Assoziation sind wiederum die PID Domänen der Numb und Nbl Proteine sowie die NPTY Region von APP essentiell. Es wurde ebenfalls festgestellt,

dass auch die Überexpression von APP bzw. des C-Terminus die Transaktivierung eines Reportergens durch Notch inhibieren kann (Roncarati et al., 2002). Ob die Bindung von Numb- und Nbl-Proteinen an den C-Terminus ursächlich für dessen inhibitorische Wirkung auf Notch ist, lässt sich vermuten. Es gilt dies aber noch in weiteren Untersuchungen mit Numb- und Nbl-negativen Zellsystemen abzuklären.

Eine Verbindung zwischen APP und den Mikrotubuli existiert durch PAT1 (protein interacting with the APP tail 1; Zheng et al., 1998). PAT1 weist homologe Sequenzabschnitte zu Kinesin auf und kann Mikrotubuli in einer ATP abhängigen Weise binden. Diese Eigenschaften weisen auf eine mögliche Funktion von PAT1 bei dem APP Transport hin. Da eine Mutation von Tyr653 zu Alanin die Bindung von PAT1 an den C-Terminus unterdrückt, scheint der Rest Tyr653 des C-Terminus für die PAT1 Bindung unbedingt erforderlich zu sein (Zheng et al., 1998). Tyr653 spielt auch eine wichtige Rolle beim „basolateralen sorting“ von APP in MDCK-Zellen (Haass et al., 1995). Nach Überexpression der C-terminalen Fragmente C59 und C57 konnten Gao und Pimplikar (2001) feststellen, dass diese Fragmente im Kern nicht nur mit PAT1 interagieren, sondern diese Interaktion auch zur Herunterregulierung der PAT1 Expression führt.

Nach dem Durchsuchen einer c-DNA Expressionsbank mit der C-terminalen Region konnte noch als weiteres APP bindendes Protein APP-BP1 (APP-Binding Protein1) identifiziert werden. Diesem wird eine Funktion bei der Regulation des Zell-Zyklus zugeschrieben (Chow et al., 1996). Nach Expression von APP-BP1 in mutierten Hamsterzellen mit einem Zell-Zyklus Defekt können die vorher in der S-Phase arretierten Zellen wieder einen vollständigen Zell-Zyklus durchlaufen (Chen et al., 2000). Eine erhöhte Menge an APP-BP1 konnte in besonders lipidreichen Membrankompartimenten im Hippocampus von Alzheimer Patienten nachgewiesen werden (Chen et al., 2003).

Vor kurzem sind noch 3 weitere potentielle Bindungspartner des C-Terminus von APP identifiziert worden, über deren Funktion im Hinblick auf das Prozessieren von APP allerdings wenig bekannt ist: Hierbei handelt es sich um das UV-DDB (UV-damaged DNA binding protein), Caveolin-3 und das ARH (autosomal recessive hypercholesterolemia) Protein (Watanabe et al., 1999; Nishiyama et al., 1999; Noviello et al., 2003).

Name	Funktion	Referenz
JIP-1b/IB-1	Regulation des JNK-MAPK Signalwegs	Matsuda et al., 2001
Fe65	Adapterprotein; vermutlich transkriptions-aktivierende Fkt. im Komplex mit C-Terminus und Transkriptionsfaktoren bzw. Tip60; Bindung an Mena und LRP, Einfluss auf APP Spaltung nach Coexpressionsstudien	Fiore et al., 1995; Cao und Sudhof, 2001; Sabo et al., 1999
X11	Adapterprotein; Bindungsstellen für Proteine mit synaptischen Fkt. (Munc18 u, CASK); Einfluss auf APP Spaltung nach Coexpressionsstudien	Borg et al., 1996; Butz et al., 1998; Borg et al., 1998
mDAB1	Adapterprotein, Aktivierung von Kinasen	Homayouni et al., 1999
ShcA/ShcC	Adapterprotein; Aktivierung der MAPK	Ravichandran, 2001
Abl	Phosphorylierung von Tyr682?	Zambrano et al., 2001
Numb/Nbl	Adapterprotein, Inhibition des Notch Signalwegs	Roncarati et al., 2002
PAT1	beteiligt am APP „Trafficking“ ?	Zheng et al., 1998
APP-BP1	Zell-Zyklus Regulation	Chow et al., 1996; Chen et al., 2000; Chen et al., 2003
G ₀	Induktion von Apoptose	Nishimoto et al., 1993; Okamoto et al., 1995
UV-DDB	?	Watanabe et al., 1999
Caveolin-3	?	Nishiyama et al., 1999
ARH Protein	?	Noviello et al., 2003;

Tab. 1 An den C-Terminus von APP bindende Proteine und ihre möglichen Funktionen. Das „?“ weist auf noch nicht vollständig geklärte bzw. unbekannte Funktionen hin.

Die Assoziation des G₀ Proteins mit der C-terminalen Sequenz His657-Lys676 (Nishimoto et al., 1993) deutet auf eine wichtige potentielle Funktion von APP als G₀ Protein gekoppelter Rezeptor hin. So konnten Okamoto et al. (1995) nachweisen, dass mit einem gegen die extrazelluläre Domäne von APP gerichteten Antikörper G₀ aktiviert werden kann. Zudem scheint es einen Zusammenhang zwischen der G₀ Aktivierung und der Induktion von Apoptose zu geben. Es konnte gezeigt werden, dass APP, das eine mit AD assoziierte Mutation trägt, konstitutiv G₀ aktiviert und Apoptose über die Gβγ Untereinheit induzieren kann (Giambarella et al., 1997; Okamoto et al., 1995). So führt die Expression von V642I

APP (mit AD assoziierte sog. London Mutation) in einer neuronalen Zelllinie zur DNA Fragmentierung (Yamatsuji et al., 1996). Nach Inhibition des G_0 Proteins durch das Pertussis-Toxin kann die durch V642I-APP hervorgerufene DNA Fragmentierung verhindert werden. Die Deletion der Sequenz His657-Lys676 von V642I APP verursachte ebenfalls keine DNA Fragmentierung. Die Inhibition der A β Produktion durch Mutation der γ -Sekretase Spaltungsstelle von V642I APP hat keinen Effekt auf die DNA Fragmentierung. Zhao et al. (1997) demonstrierten, dass dieselbe Mutation und zwei weitere mit AD assoziierte Mutationen Apoptose in differenzierten PC12-Zellen induzieren.

Für eine potentielle Funktion von APP bei der Regulation von apoptotischen Vorgängen gibt es einige weitere Hinweise. Barnes et al. (1998) beobachteten einen APP Anstieg in apoptotischen Motorneuronen und wiesen nach, dass die Caspase-3, die in apoptotischen Motorneuronen aktiviert wird, APP spaltet. Außerdem ist bekannt, dass auch eine Überexpression des Wildtyp APP zum apoptotischen Tod von Neuronen führen kann (Bursztajn et al., 1998; Nishimura et al., 1998). Vor kurzem konnten Kinoshita et al. (2002) zeigen, dass die ektopische Expression des C-terminalen Fragments von APP in humanen Neurogliomazellen H4 Apoptose auslöst und dabei die Assoziation mit der Histonacetyltransferase Tip60 nicht aber die mit Fe65 notwendig ist.

Diese Apoptose induzierenden Eigenschaften und die bekannte neurotoxische Wirkung des C-Terminus veranlassten Neve et al. (2000) zu der Hypothese, dass bei der Pathogenese der Alzheimer Krankheit weniger die verstärkte Bildung von A β als vielmehr eine Dysregulation der Funktion von APP bzw. des C-Terminus eine Rolle spielt (Fukuchi et al., 1992; Fukuchi et al., 1993; Kim et al., 2000).

Die an den C-Terminus von APP bindenden Proteine und ihre möglichen Funktionen sind in Tabelle 1 bzw. in Abb. 4 zusammengefasst.

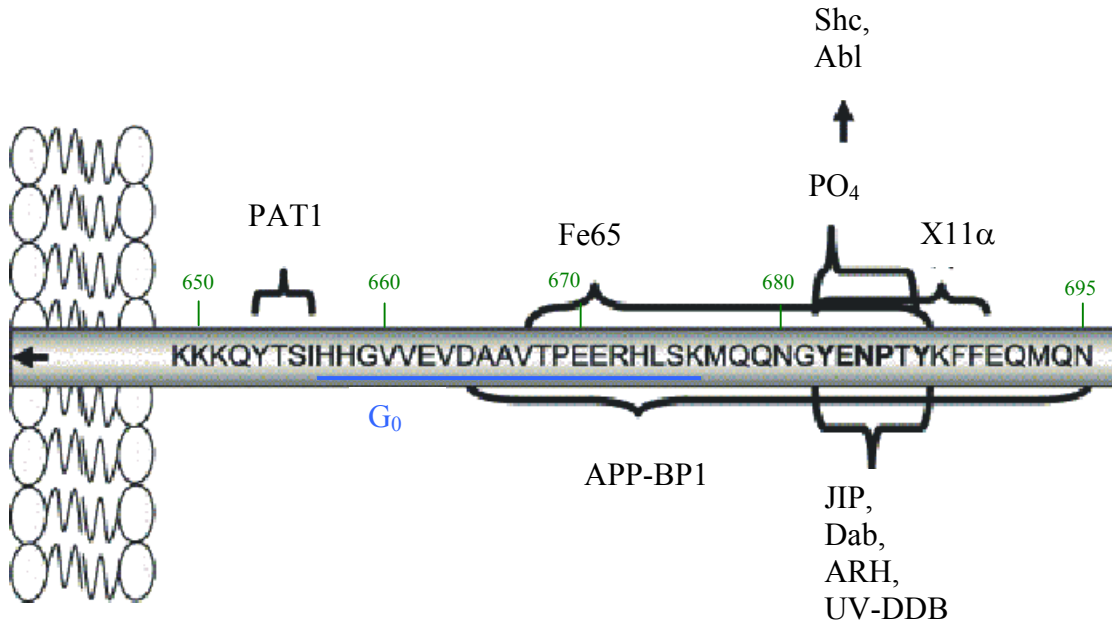


Abb. 4 Proteine, die mit dem C-Terminus von APP interagieren (King und Turner, 2004). An das YENPTY-Motiv binden die PTB Domänen von X11, Fe65, JIP, Dab1 und ARH. Fe65 benötigt zusätzlich Thr668 für seine Bindung. UV-DDB braucht ebenfalls das YENPTY-Motiv für die Interaktion. Nach Phosphorylierung des Tyr Restes der YENP-Domäne können Shc und Abl an den C-Terminus binden. PAT1 interagiert mit der YTSI-Domäne, APP-BP1 interagiert mit den letzten 31 Resten des C-Terminus. Das G₀ Protein assoziiert mit der C-terminalen Sequenz His657-Lys676 (blau markiert). Die APP Region, die für die Caveolin-3 Interaktion verantwortlich ist, ist noch nicht bekannt. Die Numerierung der AS (grün) richtet sich nach der Aminosäuresequenz der humanen APP695 Isoform.

1.2.4 Einfluss von Cholesterin auf die A β -Erzeugung

Vermutlich ist die nicht-familiäre Form der Alzheimer Krankheit multifaktoriell bedingt. Es gibt in letzter Zeit immer mehr Hinweise darauf, dass Cholesterin einen Einfluss auf die A β -Produktion und damit auf die Alzheimer Krankheit hat. Das ϵ 4 Allel des Apolipoproteins E, das mit einem höheren Plasma Cholesterinspiegel assoziiert ist, gilt als Risikofaktor für AD. In zwei unabhängigen Studien konnte eine Reduktion des Risikos an AD zu erkranken bei Patienten festgestellt werden, die Inhibitoren der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl (HMG)-CoA Reduktase wie zum Beispiel Lovastatin zur Senkung des Cholesterinspiegels eingenommen

hatten (Jick et al., 2000; Wolozin et al., 2000). Eine cholesterinreiche Ernährung von Mäusen, die APP überexprimieren, führte zu einem A β Anstieg bzw. es konnte cerebrales A β und A β in der Cerebrospinalflüssigkeit bei Meerschweinchen nach Fütterung mit Simvastatin gesenkt werden (Refolo et al., 2000; Fassbender et al., 2001 a). Weitere Hinweise auf eine Beziehung zwischen Cholesterin und A β Produktion brachten Zellkulturstudien, in denen mit Lovastatin und Simvastatin behandelte Hippocampus Neuronen signifikant weniger intrazelluläres und extrazelluläres A β aufwiesen (Fassbender et al., 2001a u. b). U.a. aufgrund dieser Ergebnisse existiert die Hypothese, dass sogenannte „lipid rafts“ also Membranabschnitte, die besonders reich an Sphingolipiden und Cholesterin sind, für das APP Prozessieren von Bedeutung sind (Wolozin, 2001). Tatsächlich konnte ein kleiner Anteil von APP, BACE und Präsenilinen in solchen Detergens-unlöslichen Membrandomänen identifiziert werden, während die potentielle α -Sekretase ADAM10 überwiegend in Detergens-löslichen Kompartimenten nachzuweisen ist (Bouillot et al., 1996; Parkin et al., 1999; Riddel et al., 2001; Kojro et al., 2001). Bei dem aus diesen Ergebnissen resultierenden Modell wird angenommen, dass das amyloidogene und das nicht-amyloidogene Prozessieren von APP in unterschiedlichen Membrankompartimenten stattfindet, wobei eine hohe Membran-Cholesterinkonzentration die A β -Produktion fördert, während eine niedrige Cholesterinkonzentration den nicht-amyloidogenen α -Sekretase Weg unterstützt. Neuere Untersuchungen bestätigen diese Annahmen. So konnten Cordy et al. zeigen, dass die gezielte Expression einer mit einem GPI-Anker versehenen BACE-Form in „lipid raft“ Domänen in einer Neuroblastom-Zelllinie zu einer erhöhten sAPP β -Sekretion und A β -Produktion führt im Vergleich zu Zellen des gleichen Zelltyps, die Wildtyp BACE exprimieren (Cordy et al., 2003).

1.3 Zusammenhang zwischen der O-GlcNAc Modifikation und der Pathogenese der Alzheimer Krankheit

Im Gehirn scheint die O-GlcNAc Modifikation eine besondere Bedeutung zu haben, da die OGT als eines der beiden zentralen Enzyme des O-GlcNAc Metabolismus am stärksten im Gehirn und im Pankreas exprimiert wird (Kreppel et al., 1997; Lubas et al., 1997). Dementsprechend könnten neurodegenerative Erkrankungen auch mit Veränderungen des O-GlcNAc Metabolismus einhergehen. Auf einen potentiellen Zusammenhang zwischen der O-GlcNAc Modifikation und der Alzheimer Krankheit weist die Lokalisation des Gens der O-GlcNAcase auf einer bestimmten Region des Chromosoms 10 hin, die mit der AD assoziiert

zu sein scheint (Gao et al., 2001; Bertram et al., 2000). Es gibt auch noch weitere konkrete Hinweise darauf, dass die O-GlcNAc Modifikation bei der Pathogenese der Alzheimer Krankheit eine Rolle spielen könnte. So kamen Griffith und Schmitz (1995) nach Untersuchungen der Gehirne von Alzheimer Patienten zu dem Ergebnis, dass die O-GlcNAc Modifikation von Cytoskelett-assoziierten Proteinen im Vergleich zu denen von gesunden Personen deutlich erhöht ist. Von dieser Erhöhung sind nur Proteine bestimmter Hirnareale wie Hippocampus, Temporal- und Frontallappen betroffen, die auch besonders die pathologischen Veränderungen der AD aufweisen. Diese O-GlcNAc modifizierten Proteine sind jedoch noch nicht identifiziert worden. Bekannt ist, dass einige Proteine, die im Zusammenhang mit der Entstehung der Krankheit diskutiert werden, mit O-GlcNAc modifiziert sind. Griffith et al. zeigten 1995 erstmalig, dass das murine APP diese besondere Kohlenhydratstruktur trägt. Auch das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau ist mit O-GlcNAc modifiziert (Arnold et al., 1996). Es ist ebenfalls bekannt, dass Neurofilamente, die Bestandteile der für die AD charakteristischen intrazellulären neurofibrillären Bündel sind und im erhöhten Maße in Neuronen in Gehirnen von AD Patienten und von Patienten mit Lewy Bodies Demenz vorliegen (Shepherd et al., 2002; Hu et al., 2002), mit O-GlcNAc modifiziert sind (Dong et al., 1993 a u. b, 1996). An den pathologischen Veränderungen des Cytoskeletts könnte auch das gleichfalls als O-GlcNAc Protein bekannte Ankyrin G beteiligt sein (Zhang und Bennett, 1996). Ob die genannten Proteine im Falle der Alzheimer Demenz mehr oder weniger mit O-GlcNAc modifiziert sind, gilt es noch zu klären. Eine geringere Expression der O-GlcNAc modifizierten, an der Clathrin-abhängigen Vesikelbildung beteiligten Proteine AP-3 (clathrin assembly protein) und AP-180 in Gehirnen von Alzheimer Patienten wurde von Yao und Coleman beobachtet (1998a und b). Allerdings wurde nicht untersucht, ob mit der verringerten Proteinexpression eine reduzierte O-GlcNAc Modifizierung verbunden ist.

Neben amyloiden Plaques und neurofibrillären Strängen ist der massive Synapsenuntergang ein wesentliches pathologisches Merkmal der Alzheimer Krankheit. Vor diesem Hintergrund erscheint der erst kürzlich erbrachte Nachweis interessant, dass auch besonders synaptische Proteine mit O-GlcNAc modifiziert sein können. So wurden in einer Synaptosomenpräparation aus Rattengehirnen neben den Enzymen OGT und O-GlcNAcase die O-GlcNAcylierten Proteine CRMP-2 (Collapsin Response Mediator Protein-2), UCH-L1 (Ubiquitin Carboxyl Hydrolase-L1) und β -Synuclein identifiziert (Cole und Hart, 2001). Bereits früher wurde das murine präsynaptische Protein Synapsin als O-GlcNAc modifiziert charakterisiert (Luthi et al., 1991; Cole und Hart, 1999). Einige dieser Proteine liegen bei der

AD in veränderter Form vor. So tritt das CRMP-2 Protein verstärkt in löslichen Fraktionen von Gehirngewebe von AD Patienten im Vergleich zu denen von Kontrollpatienten auf und scheint stark phosphoryliert zu sein, wobei eine dabei eventuell veränderte O-GlcNAc Modifikation noch zu untersuchen ist (Yoshida et al., 1998; Gu et al., 2000). Die Expression des β -Synucleins scheint bei AD und bei einer bestimmten Form der Lewy Bodies Demenz verringert zu sein (Rockenstein et al., 2001).

Die O-GlcNAc Modifikation der humanen Östrogen-Rezeptoren α und β könnte ebenfalls bei der AD eine Rolle spielen (Cheng and Hart 2001, 2000; Cheng et al., 2000; Jiang and Hart, 1997). Es gibt Studien, die zeigen, dass nach der Menopause bei Frauen eine Östrogensatztherapie das Risiko an der AD zu erkranken signifikant reduzieren bzw. den Beginn dieser Erkrankung verzögern kann (Tang, 1996). Die molekulare Wirkung dieses Steroidhormons ist dabei noch unklar, aber es existieren vermehrt Hinweise auf eine neuroprotektive Wirkung des Östrogens gegenüber A β , die durch Östrogen-Rezeptoren vermittelt wird (Kim et al., 2001; Chae et al., 2001). Es ist vorstellbar, dass dabei die posttranslationalen Modifikationen der Rezeptoren Einfluss auf die Wirkung des Östrogens nehmen können.

Ein erhöhtes Risiko an der Alzheimer Demenz zu erkranken, scheinen Patienten mit Diabetes mellitus aufzuweisen (Ott et al., 1999). Es gibt Hinweise darauf, dass bei dieser Stoffwechselkrankheit eine Veränderung des Hexosaminstoffwechsels und damit der O-GlcNAc Modifikation eine Rolle spielt. Neben den bereits oben erwähnten Zusammenhängen zwischen O-GlcNAc und Diabetes (1.1.5) konnte in einer weiteren Untersuchung an 3T3-L1 Adipocyten Insulinresistenz und damit verbunden Veränderungen der Insulinsignalkaskade durch PUGNAc - einen Inhibitor der O-GlcNAcase - induziert werden. Veränderungen der Insulinsignaltransduktion und Anzeichen für Insulinresistenz wie Herunterregulation des Insulinrezeptors und verminderte Insulinrezeptor-vermittelte Tyrosinkinase Aktivität konnten auch bei Alzheimer Patienten festgestellt werden. Die Störung der Insulinsignaltransduktion und der in Abhängigkeit von der Schwere der Demenz eingeschränkte cerebrale Glucoseverbrauch führten S. Hoyer zur Aufstellung der Hypothese, dass es sich bei der sporadischen AD um eine hirsnspezifische Form des Diabetes mellitus TypII handeln könnte (Frohlich et al., 1998; Hoyer, 1996; Hoyer 2000; Hoyer, 2002). In diesem Zusammenhang ist der Einfluss von Insulin auf das Prozessieren von APP interessant. So zeigten Gasparini et al. (2001), dass eine Insulinbehandlung von mit APP stabil transfizierten murinen Neuroblastomazellen zu einer signifikanten Abnahme des intrazellulären A β führt, während die Sekretion des extrazellulären A β erhöht ist. In transgenen Mäusen Tg2576, die die AD-

Neuropathologie aufweisen, verstärkt eine durch Diät induzierte Insulin-Resistenz die A β Produktion und damit einhergehend die Entstehung amyloider Plaques (Ho et al., 2004). Es konnte auch demonstriert werden, dass Insulin und IGF-1 über eine weitere Komponente von einem der Insulin-Signalwege – die Glykogensynthase-Kinase 3 β – die Tau Phosphorylierung beeinflussen können, die ebenfalls bei AD einer Veränderung unterworfen ist. Nicht nur die GSK-3 β konnte bisher *in vitro* mit O-GlcNAc modifiziert werden, es wurden auch andere Mitglieder der Insulinkaskade wie z.B. IRS 1 und Catenin, bei dessen Abbau Präsenilin 1 eine Rolle spielt und bei AD-assoziierten Mutationen von Präsenilin 1 verstärkt wird, als O-GlcNAc Proteine identifiziert.

1.4 Aufgabenstellung

Analog zur Phosphorylierung ist die Glykosylierung von Serin- und Threoninresten cytosolischer Proteine und Kernproteine sowie der cytosolischen Domänen von Plasmamembranproteinen mit O-glykosidisch gebundenem N-AcetylGlucosamin ubiquitär in eukaryotischen Zellen verbreitet. In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das murine Amyloid Precursor Protein (APP) mit O-GlcNAc modifiziert ist und die cytoskeletale Proteinfraction bei der AD in Hirnarealen, die von den pathologischen Veränderungen besonders betroffen sind, eine signifikant erhöhte O-GlcNAc Modifikation aufweisen (Griffith und Schmitz, 1995).

Diese O-GlcNAc modifizierten Proteine sollten in dieser Arbeit im Hinblick auf qualitative Unterschiede analysiert werden. Hierzu wurde die O-GlcNAc Expression entsprechender Proteinfractionen aus humanem Hirn sowohl mittels der Übertragung radioaktiver Galactose als auch mittels Western-Blot untersucht.

Ein weiterer Hauptaspekt dieser Arbeit stellte die Untersuchung der O-GlcNAc Modifikation des humanen APP dar. Es galt festzustellen, ob das humane APP mit O-GlcNAc modifiziert ist, ob gegebenenfalls diese Modifikation durch bestimmte pharmakologische Substanzen, die die Glykosylierung beeinflussen, manipulierbar ist und welche Serine oder Threonine des C-Terminus von APP O-GlcNAc tragen. Hierzu wurden APP und APP Mutanten, bei denen einzelne Serine oder Threonine durch nicht phosphorylierbare Aminosäuren ersetzt worden waren, in verschiedenen Expressionssystemen wie *Xenopus Oocyten* und murinen N2a-Neuroblastomazellen exprimiert und in Western-Blot-Analysen auf ihre O-GlcNAc Modifikation hin untersucht. Die cytosolische Domäne von APP sollte aus

Neuroblastomazellen, die den C-Terminus von APP überexprimieren, isoliert und im Hinblick auf die O-GlcNAc Modifikation analysiert werden.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit bestand darin, die Dynamik der O-GlcNAc Modifikation in verschiedenen Nervenzellpopulationen zu untersuchen und das Verhalten dieser Glykosylierungsform bei neuronalen Differenzierungsvorgängen zu analysieren. Die Zellen wurden hierzu im undifferenzierten oder differenzierten Zustand mit einem Inhibitor der O-GlcNAc Hydrolase behandelt und anschließend immunocytochemisch oder mit Western-Blot-Analysen im Hinblick auf O-GlcNAc untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Primäre Antikörper

- AL25: Polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen den C-Terminus der p110-Untereinheit der O-GlcNAc Transferase. Der Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. G.W. Hart, Baltimore (USA) zur Verfügung gestellt.
- CTD110.6: Monoklonaler Antikörper (IgM) gegen O-GlcNAc. Der Antikörper (Ascites) wurde gegen ein synthetisches Peptid mit Ser-O-GlcNAc hergestellt und freundlicherweise von Prof. G.W. Hart zur Verfügung gestellt (Comer et al., 2001). Proteinkonzentration: 3 µg/µL.
- RL2: Monoklonaler Maus-Antikörper (IgG₁) gegen O-GlcNAc. Der Antikörper wurde gegen Kernporenproteine aus Rattenleber hergestellt (Snow et al, 1987; Affinity Bioreagents, Golden, USA). Aliquots mit Glycerin im Verhältnis 1:1 (v/v), Antikörperkonzentration: 1 µg/µL.
- MUD50: Monoklonaler Maus-Antikörper gegen O-GlcNAc. Der Antikörper (Ascites) erkennt O-GlcNAc Epitope des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* und eukaryotischer Proteine und wurde freundlicherweise von Prof. K.L. Williams, Macquarie University, Sydney, (Australien) zur Verfügung gestellt. Proteinkonzentration: 55 µg/µL.
- 8E5: Humanspezifischer monoklonaler Maus-Antikörper gegen das Epitop 444-592 von APP 695. Der Antikörper wurde freundlicherweise von der Firma Athena Neuroscience (San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt. Aliquots mit Glycerin im Verhältnis 1:1 (v/v), Antikörperkonzentration: 2,65 µg/µL.
- W02: Humanspezifischer monoklonaler Maus-Antikörper (IgG_{2a}) gegen das Aβ-Epitop von APP (N-terminales Aβ (AS 5-8) (Hartmann et al, 1996). Der

Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. T. Hartmann, Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Antikörperkonzentration 0,5 µg/µL.

13G8: Monoklonaler Maus-Antikörper (IgG_{2b}) gegen das Epitop 676-695 von APP 695. Der Antikörper wurde freundlicherweise von der Firma Athena Neuroscience (San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt. Antikörperkonzentration: 2,02 µg/µL.

anti-CD9: Monoklonaler Maus-Antikörper (Ascites) gegen CD9. Der Antikörper wurde freundlicherweise von Dr. A. Shaw, Cross Cancer Institute Edmonton, Alberta zur Verfügung gestellt. Proteinkonzentration: 55 µg/µL.

2.1.2 Sekundäre Antikörper

Die aufgeführten sekundären Antikörper wurden von der Firma Dianova (Hamburg) bezogen.

anti-Maus-POD: Polyklonaler Ziege-Antikörper gegen IgG und IgM Maus-Antikörper gerichtet, gekoppelt an Merettich-Peroxidase.

anti-Maus-Cy3: Polyklonaler Ziege-Antikörper gegen Maus-Antikörper der Subklasse IgG gerichtet, gekoppelt an Cy3.

anti-Maus-DTAF: Polyklonaler Ziege-Antikörper gegen Maus-Antikörper der Subklasse IgG gerichtet, gekoppelt an Dichlorotriazinylamino-Fluorescein.

anti-Kaninchen-Cy3: Polyklonaler Ziege-Antikörper gegen Kaninchen-Antikörper der Subklasse IgG gerichtet, gekoppelt an Cy3.

2.1.3 Allgemeine Geräte

Elektrophoresesystem zur Proteinauftrennung:

Mini-Protean II (Bio-Rad, München)

Protean II (Bio-Rad, München)

Gene Quant RNA DNA Calculator (Pharmacia, Freiburg)

Microinjektor (Drummond, Nanoject, Bachhofer, Reutlingen)

Micromanipulator (Brinkmann, Mannheim)

31/2 Mikrokapillare (Drummond, USA)

Mikroskope:

TCS SP2 Laser Scanning Spectral Confocal Microscope (Leica, Bensheim)

Inverses Mikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Aachen), Neuritenlängenanalyse mit KS100 Zeiss Programm

Titertek Plus MS2 ELISA Reader (ICN, USA)

Trans-Blot SD (Semi-Dry Transfer cell) (Bio-Rad, München)

UV-Transilluminator (2011 Macrovue, LKB, Schweden)

Zentrifugen:

Biofuge 15R, Rotor 3751 (Heraeus, Osterode)

2K15 Zentrifuge, Rotor 12145 (Sigma, Deisenhofen)

Laborzentrifuge 2K15, Rotor 12145 (Sigma, Deisenhofen)

202 MK Zentrifuge, Rotortyp 12145 (Sigma, Deisenhofen)

2.1.4.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Deckgläser, rund, 15 mm Durchmesser (Menzel, Braunschweig)

Falcon 3912 Mikrotiterplatten (Becton-Dickinson, USA)

Filterpapiere (3MM, Whatmann, Maldstone GB)

Kryogefäße, 1 mL (Grainer)

Maxi Sorb Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden)
Mikroreaktionsgefäße (Sigma, Deisenhofen)
Nitrocellulose-Membran (Satorius, Göttingen)
Petrischalen, 35 mm und 100 mm Durchmesser (Corning, New York, USA)
Pipettenspitzen, diverse (Sarstedt, Nümbrecht)
Polyethylengefäße (Packard, USA)
Röntgenfilme X-OMAT AR (Eastman-Kodak, München)
Zellkulturflaschen (Falcon, Becton-Dickinson, Plymouth, GB)

2.1.4.2 Allgemeine Reagenzien

BSA (Roche, Mannheim) Chargenangabe 735086/001
DC Protein Assay (Protein Assay nach der Methode von Lowry (Bio-Rad, München)
Super Signal[®] Substrate Kit (Pierce, Rochester, USA)

2.1.5 Lösungen und Puffer

Häufig verwendete Puffer und Stammlösungen:

Alle verwendeten Chemikalien wurden soweit nicht anders vermerkt in p.a. Qualität von Merck (Darmstadt) bezogen; die Lösungen wurden mit demineralisiertem Wasser angesetzt, sofern nicht anders beschrieben.

ABTS-Entwicklerlösung

0,5 mL ABTS-Lsg:	2%	2,2`-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolin-sulfonat(6)) in aqua dem. (w/w) (Roche, Mannheim)
9,5 mL Acetat Puffer:	100 mM	Natriumacetat
	50 mM	Natriumdihydrogenphosphat, mit Eisessig auf pH4 einstellen
	3 µL	H ₂ O ₂ (30%ig)
Aprotinin/Leupeptin-	10 mg/mL	Aprotinin (Roche, Mannheim)

Material und Methoden

Stammlösung (10.000fach):	10 mg/mL	Leupeptin (Sigma, Deisenhofen)
PBS	137 mM	NaCl
	3 mM	KCl
	16 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
		pH 7,2-7,4
Pepstatin-Stammlösung:	1 mg/mL	Pepstatin (Roche, Mannheim)
	in Methanol	
PMSF Stammlösung	1 mM	PMSF (Sigma, Deisenhofen)
	in	
	Isopropylalkohol	
Probenpuffer (2fach):	130 mM	Tris-HCl
	4%(w/v)	SDS
	20%	Glycerin
	0,02% (w/v)	Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)
	1 mM	β-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen)
		pH 6,8
Probenpuffer (5fach):	250 mM	Tris-HCl
	7,5% (w/v)	SDS
	30% (w/v)	Glycerin
	0,25% (w/v)	Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)
	1% (v/v)	β-Mercaptoethanol (Sigma, Deisenhofen)
		pH 6,8
TBS	25 mM	Tris-HCl
	135 mM	NaCl
	25 mM	KCl
		pH 7,5

2.1.6 Radioaktiv markierte Verbindungen

¹⁴C-SDS-PAGE-Molekulargewichtsstandard (Amersham, Braunschweig)

³⁵S-L-Methionin (ICN, Eschwege)

Uridindiphospho-D-(6-³H) Galactose (Amersham, Braunschweig)

2.1.7 Tiere aus institutseigener Haltung

Xenopus Oocyten wurden aus dem südafrikanischen Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) entnommen.

Für die Präparation von Kleinhirnneuronen wurden NMRI Mäuse verwendet

2.1.8 Zellen

N2a: Murine Neuroblastomazellen (wurden freundlicherweise von Dr. T. Bayer, Institut für Neuropathologie, Universität Bonn zur Verfügung gestellt).

A3 Zellklon: Murine N2a Neuroblastomzellen, die stabil mit der cDNA des Wildtyps des humanen APP695 transfiziert worden sind. Als Expressionsvektor wurde der retrovirale Vektor pLXSN verwendet (Weggen, 1996); die Parentalzellen ebenso wie die transfizierten Zellen wurden freundlicherweise von S. Weggen und Dr. T. Bayer, Institut für Neuropathologie, Universität Bonn zur Verfügung gestellt.

Kleinhirnneuronen E17: Freundlicherweise wurden Maus Kleinhirnneuronen des embryonalen Tages 17 von Prof. K. Schilling (Institut für Anatomie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt.

- Kleinhirnneuronen P6: Zur Präparation von Kleinhirnneuronen wurden postnatale 6 Tage alte NMRI Mäuse verwendet.
- PC12: Phäochromocytomzellen der Ratte (wurden freundlicherweise von Dr. R. Probstmeier, Klinik für Nuklearmedizin, Universität Bonn zur Verfügung gestellt).
- SH-SY5Y: Humane Neuroblastomzelllinie (wurden freundlicherweise von Dr. T. Hartmann, Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt).
- SH-SY5Y-SPA4CT: Humane SH-SY5Y Zellen, die stabil den C-Terminus (C100) von APP695 als Transmembranprotein exprimieren. Für die Transfektion wurde ein pCEP4 Vektor verwendet (Dyrks et al, 1993). Die transfizierten Zellen wurden freundlicherweise von Dr. T. Hartmann, Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt.

2.2 Biochemische Methoden

2.2.1 MUD50-Kompetitionstest mittels Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA)

Primäre Antikörper: monoklonaler Mausantikörper (Ascites) MUD50, 1:500 in 1% BSA/PBS
anti-CD9 Ascites 1:500 in 1% BSA/PBS

Beide Antikörper werden im Competitionstest entweder mit 100 mM GlcNAc oder 100 mM Galactose versetzt.

Sekundärer Antikörper: Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus Antikörper (Dianova, Hamburg), 1:2000 in 1% BSA/PBS

GlcNAc-BSA (Sigma) in 100 mM NaHCO₃ verdünnt (1,25 µg/mL)

Blockierungslösung: 1% BSA/PBS

Die Mikrotiterplatte wird mit je 50 µL GlcNAc-BSA (1,25 µg/mL) pro Vertiefung beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Vertiefungen dreimal mit PBS gewaschen, dann erfolgt die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen durch 400 µL Blockierungslösung für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit PBS

erfolgt die Zugabe des gegen das O-GlcNAc Epitop gerichteten Erstantikörpers MUD50. Dieser wird mit 50 µL/Vertiefung eingesetzt. Zum Vergleich wird die Erstantikörperlösung entweder mit 100 mM GlcNAc als Kompetitor des MUD50, oder zur Kontrolle mit 100 mM Galactose versetzt. Als Negativkontrolle wird ein anderer O-GlcNAc unspezifischer Primärantikörper eingesetzt. Hierzu wird ein Tetraspannin-erkennender anti-CD9 Antikörper verwendet, der entsprechend mit 100 mM GlcNAc oder 100 mM Galactose versetzt wird. Die Ansätze werden bei RT 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS werden pro Vertiefung 50 µL des gegen den ersten Antikörper gerichteten Zweitantikörpers hinzugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung des Zweitantikörpers wird er in einigen Vertiefungen auch direkt mit dem Antigen ohne vorausgegangene Inkubation mit dem Erstantikörper inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit PBS erfolgt die Entwicklung mit 50 µL Entwicklerlösung pro Vertiefung. An den Zweitantikörper ist das Enzym Peroxidase gekoppelt, welches die zugegebene Lösung als Substrat unter Entwicklung einer Grünfärbung umsetzt. Nach 20-30 min wird diese Reaktion durch Zugabe von 50 µL 0,6% SDS-Lösung gestoppt. Daraufhin wird die optische Dichte spektralphotometrisch bei $\lambda = 405$ nm gemessen.

2.2.2 Präparation der Detergens-löslichen Fraktion (Dsf) und der Detergens-unlöslichen cytoskeletalen Fraktion (Dicf) (nach Refolo et al, 1991)

Solubilisierungspuffer A: 10 mM HEPES
50 mM KCl
2 mM EGTA
1 mM MgCl₂
2 M Glycerin
0,5% Triton X-100 (v/v)
100 mM GlcNAc
Proteaseinhibitoren
pH 7,4

Solubilisierungspuffer B: 50 mM Tris, pH 7,4
10 mM EDTA
10 mM EGTA
100 mM NaCl
1% (w/v) SDS
100 mM GlcNAc
pH 7,4

100 mM GlcNAc sowie die Proteaseinhibitoren PMSF (1 mM), Aprotinin (1 µg/mL), Leupeptin (1 µg/mL) und Pepstatin (1 µg/mL) werden frisch zu den Puffern hinzugegeben.

Zuerst wird die abgewogene Gewebeprobe mit einer Mikropistille (Eppendorf) in einem mit Trockeneis gekühlten Eppendorfgefäß zerkleinert und unter Zugabe des Dsf-Solubilisierungspuffers A (10 $\mu\text{L}/\text{mg}$ Gewebeprobe) homogenisiert. Anschließend wird das Homogenat bei 1000 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt und das Präzipitat verworfen. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 15000 g für 30 min bei 4 °C. Die Detergens-lösliche Fraktion (Dsf) wird als Überstand abgenommen und entweder zuerst mit 2 x Probenpuffer versetzt, bei 100 °C 5 min erhitzt und dann für SDS-PAGE verwendet, für eine Immunpräzipitation mit Antikörper versetzt oder bei -20 °C eingefroren. Das Präzipitat wird unter Zugabe von Puffer B (5 $\mu\text{L}/\text{mg}$ Gewebeprobe) zuerst mit einer Pipette suspendiert und darauf 10mal durch eine 23 gauge Nadel zur weiteren Homogenisierung gepresst. Dieses Homogenat wird im Heizblock bei 100 °C 10 min erhitzt und dann bei RT abgekühlt. Anschließend wird das Homogenat bei 15000 g 15 min bei 10 °C zentrifugiert. Der Überstand enthält die Detergens-unlöslichen cytoskeletalen Proteine (Dicf) und wird entsprechend wie die Detergens-lösliche Fraktion (s.o.) behandelt.

2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zunächst wird eine Verdünnungsreihe mit dem Standardprotein BSA mit einem Konzentrationsbereich von 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ bis 0,004 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in dem entsprechenden Puffer, in dem die zu quantifizierende Probe enthalten ist, hergestellt. In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte werden nun jeweils 5 μL der Standardverdünnungen und der Proben gegeben. Anschließend erfolgt die Zugabe von 25 μL der Bio-Rad Reagenzien A und S (im Verhältnis 50:1, frisch angesetzt), dann von 200 μL des Reagenz B. Sowohl von der Standardverdünnungsreihe als auch von den einzelnen Proben werden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die optische Dichte der sich entwickelnden Blaufärbung kann nach 20 min spektralphotometrisch bei $\lambda = 690 \text{ nm}$ gemessen werden. Aus den Extinktionswerten der BSA Standardverdünnungsreihe wird eine Eichkurve erstellt, mit der sich die Proteinkonzentration der Proben anhand der Werte der optischen Dichte in $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ablesen lässt.

2.2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) mit Dsf/Dicf

Primärantikörper: MUD50, 1:500 in 0,5% Pferdeserum/PBS

Sekundärantikörper: Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Maus Antikörper (Dianova, Hamburg), 1:2000 in 0,5% Pferdeserum/PBS

GlcNAc-BSA (Sigma) in 100 mM NaHCO₃ verdünnt (1,25 µg/mL)

0,5 % Glutaraldehyd in aqua dem.

Antigenverdünnungs-Lösung: 200 mM NaHCO₃

100% Ameisensäure (Sigma, Deisenhofen)

Blockierungslösung: 0,5% Pferdeserum (Sigma, Deisenhofen)/PBS

Zum quantitativen Nachweis der O-GlcNAc modifizierten Proteine der Dsf- und Dicf-Fraktionen wird ein modifizierter Enzyme-linked Immunosorbent Assay verwendet. Bei diesem modifizierten ELISA wird die Mikrotiterplatte zunächst mit 50 µL 0,5% Glutaraldehyd/ Vertiefung bei RT 30 min inkubiert. Glutaraldehyd bindet hydrophob an die Plastikoberfläche der Mikrotiterplatte und kovalent an NH₂-Gruppen von Proteinen und soll somit eine verstärkte Beschichtung mit Proteinen ermöglichen. Nach einmaligem Waschen mit PBS werden pro Vertiefung 25 µg Protein der Dsf- bzw. Dicf-Fraktion (0,25 mg/mL 100 mM NAHCO₃) pipettiert und 1 h bei RT inkubiert. Als Positivkontrolle für den Primärantikörper werden 50 µL GlcNAc-BSA (1,25 µg/mL) pro Vertiefung eingesetzt. Danach wird dreimal mit PBS gewaschen. Die Reaktivität der freien Glutaraldehydreste wird daraufhin durch 10 min Inkubation mit 100 µL TBS/Vertiefung gestoppt. Anschließend werden die restlichen unspezifischen Antikörperbindungsstellen mit 400 µL 0,5% Pferdeserum in PBS /Vertiefung 35 min bei RT abgesättigt. Zur Denaturierung der Proteine werden 4 µL 100%iger Ameisensäure pro Vertiefung eingesetzt. Dadurch sollen weitere O-GlcNAc Epitope freigelegt und somit für den Antikörper besser zugänglich gemacht werden. Nach 2 h Inkubation wird dreimal mit PBS gewaschen und dann mit 50 µL /Vertiefung Primärantikörper MUD50 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS werden pro Vertiefung 50 µL des gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörpers hinzugegeben und 3 h bei RT inkubiert. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung des Sekundärantikörpers wird dieser in einigen Vertiefungen auch direkt zum Antigen ohne Vorinkubation mit dem Erstantikörper hinzugegeben. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgt die Zugabe von 50 µL Entwicklungslösung/Vertiefung. An den Zweitantikörper ist das Enzym Peroxidase

konjugiert. Dieses setzt die zugegebene Lösung unter Entwicklung einer Grünfärbung um. Nach ca. 30 min wird diese Reaktion unter Zugabe von 50 μL 0,6% SDS-Lösung gestoppt. Es folgt die spektralphotometrische Messung der optischen Dichte bei $\lambda=405\text{nm}$. Es werden für alle Proben und Kontrollen Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.2.5 Galactosyltransferase Assay

Lösung 1: 250 mM Sucrose (Sigma, Deisenhofen)
25 mM KCl
5 mM MgCl_2
1 mM NaN_3 (Sigma, Deisenhofen)

Puffer 2: 100 mM HEPES (Serva, Heidelberg)
50 mM MnCl_2
100 mM Galactose (Sigma, Deisenhofen)
2,5% Nonidet P40 (v/v) (Roche, Mannheim)

25 mM 5'AMP (Sigma, Deisenhofen)

humane autogalactosylierte Galactosyltransferase 0,01 mU/ μL (Roche, Mannheim) gelöst in 25 mM HEPES (Serva, Heidelberg)/2,5 mM Puffer 2 und Glycerin (97%) im Verhältnis 1:1

100 mM Uridindiphospho-Galactose (Sigma, Deisenhofen) im gleichen Puffer gelöst wie Galactosyltransferase (s.o.)

Aceton

Zu 50 μg Protein (in 20-30 μL Solubilisierungspuffer A bzw. B s. 2.2.2, je nach Proteinkonzentration) werden 300 μL Lösung 1 und 25 μL Puffer 2 gegeben. Nach Zugabe von 2 μL 25 mM 5'AMP und 4 μL UDP-Galactose sowie von 10 μL Galactosyltransferase wird die Probe bei 37 °C 1 h inkubiert. Um Galactose, GlcNAc und Gal β 1-4GlcNAc abzutrennen, werden die Proteine mit eiskaltem Aceton im Verhältnis 2:1 über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag werden die Proben bei 4 °C für 15 min bei 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Proteinpräzipitat zweimal mit 150 μL eiskaltem Aceton gewaschen und nach jedem Waschschrift bei 4 °C für 5 min bei 13000 g zentrifugiert. Anschließend wird das Proteinpräzipitat in 20 μL Probenpuffer aufgenommen.

2.2.6 Galactosyltransferase Assay mit UDP-(³H)-Galactose

s. 2.2.5

Uridindiphospho-D-(6-³H) Galactose (1,0 mCi/mL) (Amersham, GB)

Ovalbumin (Sigma, Deisenhofen)

PNGase F Reaktions-Puffer: 75 mM Tris-HCl
 10 mM EDTA
 1% SDS (w/v)
 1% Mercaptoethanol
 0,7% NP40 (v/v)
 die Proteaseinhibitoren PMSF (1 mM), Aprotinin (1 µg/mL), Leupeptin (1 µg/mL) und Pepstatin (1 µg/mL) werden frisch zu dem Puffer hinzugegeben.

PNGase F (Peptid-N-Glykosidase F) (Roche, Mannheim): 1U/5 µL

Lumasafe PLUS-Lösung (LUMAC-LSC B.V., Niederlande)

weitere Reagenzien s. auch 2.2.5

Zu 50 µg Protein (in 20-30 µL Solubilisierungspuffer A bzw. B s. 2.2.2, je nach Proteinkonzentration) werden 300 µL Lösung 1 und 25 µL Puffer 2 gegeben. Nach weiterer Zugabe von 2 µL 25 mM 5'AMP und 4 µL UDP-Galactose sowie von 10 µL Galactosyltransferase und von 4 µL (4 µCi) UDP (³H)-Galactose wird die Probe bei 37 °C 1 h inkubiert. Als Kontrollprotein wird Ovalbumin, das ausschließlich mit N-glykosidisch gebundenen Glykanen modifiziert ist, die GlcNAc am nicht reduzierenden Ende tragen, eingesetzt. 10 µg Ovalbumin/ 20 µL Solubilisierungspuffer A bzw. B werden mit 60 µL Lösung 1, 5 µL Puffer 2, 2 µL 25 mM 5'AMP, 2 µL UDP-Galactose sowie 10 µL Galactosyltransferase und 4 µL (4 µCi) UDP (³H)-Galactose versetzt und ebenfalls für 1 h bei 37 °C inkubiert.

Anschließend werden die Proteine mit Aceton gefällt (2.2.5). Das Pellet wird in 40 µL 1% SDS, 1% Mercaptoethanol aufgenommen und 10 min bei 80-100 °C inkubiert. Zu dem Ansatz werden 360 µL PNGase F Reaktionspuffer und 5 µL (1U) PNGase F hinzugefügt. Nach 16-24 h bei 37 °C erfolgt die Zugabe von weiteren 5 µL (1U) PNGase F. Nach einer weiteren 16-24 h Inkubation bei 37 °C wird die Reaktion 5 min durch Erhitzen auf 90 °C gestoppt und die Proteine nach Abkühlen der Lösung mit 1 mL eiskaltem Aceton gefällt (2.2.5).

Nach Aufnahme in 50 µL reduzierendem Probenpuffer werden 5 µL davon mit 5 mL Lumasafe-PLUS-Flüssigkeit versetzt und nach einigen Stunden Inkubationszeit im Szintillationszähler gemessen. Die restlichen Proteine werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Überprüfung der aufgetragenen Proteinmenge kann das Gel mit Coomassie Blau gefärbt

werden. Anschließend wird das Gel entweder der Autoradiographie ausgesetzt (s. 2.2.11) oder es wird entlang der Laufstrecke der Proben in Gelstücke mit 1 cm Länge zerteilt. Jedes Gelstück wird in einem Szintillationsröhrchen mit 1 mL H₂O₂ versetzt und bei 50 °C ü. N. inkubiert. Nach Abkühlung werden je 5 mL Lumasafe-Plus hinzugefügt. Nach einigen Stunden Inkubationszeit wird die Radioaktivität der Proben im Szintillationszähler gemessen.

2.2.7 Immunpräzipitation

Primärantikörper: 8E5 (5 µg/mL Solubilisat)
13G8 (5 µg/mL Solubilisat)
W02 (5 µg/mL Solubilisat)
CTD 110.6 (15 µg/mL Solubilisat)

Protein G Sepharose (Pharmacia, Freiburg)

Protein A Sepharose (vorbeschichtet mit 200 µg Kaninchen anti-Maus IgG/ 75 mg Protein A Sepharose) (Pharmacia, Freiburg)

Anti-IgM Agarose (Sigma, Deisenhofen)

Sucrosekissen: 1 M Sucrose in Homogenisierungspuffer

Waschpuffer 1: 50 mM Tris-HCl
0,4 M NaCl
1 mM EDTA/EGTA
0,5% NP 40
pH 7,4

Waschpuffer 2: 50 mM Tris-HCl
1 mM EDTA/EGTA
0,1% SDS
pH 7,4

0,05% Tween/PBS

5M NaSCN

1 mL frisch präpariertes Zellsolubilisat (2.5.8) wird mit ca. 5 µg des jeweils verwendeten Antikörpers über Nacht unter Rotieren bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wird der Ansatz mit 40 µL Protein G Sepharose versetzt. Nach 1 h Rotation bei 4 °C werden 600 µL Sucroslösung mit dem Ansatz überschichtet und 5 min bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase wird vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Sucrosephase wird mit 600 µL Waschpuffer 1 überschichtet und 5 min bei 800 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Entfernen der oberen Schicht wird ein zweiter Waschschriff mit 600 µL Waschpuffer 2 durchgeführt (s.o.). Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wird die oberste Phase und zusätzlich das Sucrosekissen vorsichtig entfernt. Das Pellet wird in 1 mL Waschpuffer 2 suspendiert und 5

Minuten geschüttelt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 5 min bei 800 g und 4 °C wird das Pellet erneut mit 1 mL Waschpuffer 2 gewaschen und 5 min geschüttelt. Die Suspension wird über ein neues Sucrosekissen (600 µL) in einem neuen Eppendorfgefäß geschichtet. Der Ansatz wird 10 min bei 4000 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird in 50 µL reduzierendem 2-fach Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 100 °C gekocht. Die eluierten Proteine werden durch SDS-PAGE aufgetrennt.

Zur Anreicherung und Isolation des C-Terminus von APP, der weiter mit ESI-MS untersucht werden sollte, werden 10x 1 ml Zellsolubilisat mit ca. 5 µg 8E5 Antikörper über Nacht unter Rotieren bei 4 °C inkubiert. Nach Inkubation mit Protein G Sepharose am nächsten Tag werden die Überstände entweder mit 5µg/ml W02 oder mit 5 µg 13G8 versetzt und wiederum rotierend über Nacht bei 4 °C inkubiert und am nächsten Tag entweder mit 40 µl Protein G Sepharose (bei W02 Ansatz) oder 40 µl Protein A Sepharose (s.o) pro Ansatz versetzt. Nach 1 h Inkubation rotierend bei 4 °C werden die Ansätze zentrifugiert (s.o) und die Immunpräzipitate 3x mit 0,05% Tween/PBS gewaschen. Nach Poolen der Pellets werden die Proteine 3x mit je 900 µl 5M NaSCN eluiert. Die Eluate werden über Nacht bei 4 °C gegen 0,05 %Tween/PBS dialysiert. Am nächsten Tag werden die Eluate 3 h bei RT mit 18 µg CTD110.6 + 30 µl anti-IgM Agarose /ml inkubiert. Nach 3x Waschen der Immunpräzipitate mit 0,05% Tween/PBS wird das Pellet in 40 µL reduzierendem 2-fach Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei 100 °C gekocht. Die eluierten Proteine werden durch SDS-PAGE aufgetrennt.

2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (nach Laemmli, 1970)

Acrylamid-Stammlösung: 30% (w/v) Acrylamid
0,8% (w/v) Bisacrylamid

APS-Lösung: 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS) (Pharmacia, Freiburg)

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin) (Pharmacia, Freiburg)

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris-HCl
192 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS
pH 8,3

Zusammensetzung des Polyacrylamidgels:

	8 x 7 x 0,15 cm Gel (mL)	17 x 17 x 0,15 cm Gel (mL)	
8% Trenngel	2,3	18,6	Aqua dem
	1,3	10,7	Acrylamid-StammLösung
	1,3	10,0	1,5M Tris pH 8,8
	0,05	0,4	10% SDS
	0,05	0,4	10% APS
	0,003	0,024	TEMED
4% Sammelgel	1,4	11	Aqua dem.
	0,33	2,6	Acrylamid-Stammlösung
	0,25	2	1,5 M Tris, pH 6,8
	0,02	0,16	10% SDS
	0,02	0,16	10% APS
	0,002	0,016	TEMED

Ein 8% Trenngel wird mit einem 4% Sammelgel überschichtet. Es wird der Molekulargewichtsstandard der Fa. Gibco verwendet. Die Gelelektrophorese von Gelen mit den Maßen 8 x 7 x 0,15 cm werden bei 100 V, Gele einer Größe von 17 x 17 x 0,15 cm bei 12 Volt über Nacht durchgeführt.

Anschließend werden die aufgetrennten Proteine entweder mit Coomassie-Blau (2.2.10), mit Silber (2.2.11) gefärbt oder im Blotverfahren auf Nitrocellulose übertragen. Gele mit radioaktiv markierten Proben werden der Autoradiographie ausgesetzt.

2.2.9 Tris-Tricine Gelelektrophorese

10-20% Tris-Tricine Mini-Gele (Bio-Rad, München))

Tris-Tricine Laufpuffer (10 x): 60,55 g Tris
 89,6 g Tricin
 5,0 g SDS
 auf 500 mL mit aqua dem. auffüllen

Tris-Tricine Probenpuffer (10 mL): 1,0 mL aqua dem
 2,0 mL 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8
 4,0 mL Glycerin
 2,0 mL 10% SDS
 0,2 mL β -Mercaptoethanol
 0,8 mL 0,5% Coomassie G-250

Zum Auftrennen niedermolekularer Proteine eignet sich das Tris-Tricine Gelsystem (Schäger und Jagow, 1987). Hierzu werden bereits vorgegossene 10-20% Tricine Mini-Gele (ca 8 cm x 7cm x 0,15 cm) der Firma Biorad (München) verwendet. Die zu untersuchenden mit Tris-

Tricine Probenpuffer im Verhältnis 2:1 versetzten Proben werden 5 min bei 100 °C denaturiert. Nachdem die Proben aufgetragen worden sind, erfolgt die Auftrennung bei einer angelegten Spannung von 100 V. Als Molekulargewichtsstandard wird der Polypeptid SDS-PAGE Standard der Firma Bio-Rad (München) eingesetzt.

2.2.10 Coomassie-Blau Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Fixier-Lösung: 25% Isopropanol
10% Essigsäure

Coomassie-Lösung: 0,25% Coomassie brilliant blue R-250 (Serva, Heidelberg) (w/v)
50% Trichloressigsäure

Entfärber-Lösung: 25% Methanol
7% Essigsäure

bei Tris-Tricine Gelen:

Fixier-Lösung: 40% Methanol
10% Essigsäure

Coomassie-Lösung: Bio-Safe Coomassie G250 Stain (Bio-Rad)

Nach 30 min Inkubation in der Fixier-Lösung wird das Gel über Nacht in Coomassie-Lösung (1-3 h bei Tris-Tricine Gelen) gefärbt. Daraufhin wird der nicht gebundene Farbstoff mit der Entfärber-Lösung (bei Tris-Tricine Gelen: 2 h mit H₂O) solange herausgewaschen, bis die gefärbten Proteinbanden sichtbar werden.

2.2.11 Silberfärbung

Fixier-Lösung: 30% Ethanol
10% Essigsäure

Sensitivierungs-Lösung: 0,2 g/L Natriumthiosulfat

Silber-Lösung: 2 g/L Silbernitrat

Entwickler-Lösung: 0,7 mL/L Formaldehyd
30 g/L K₂CO₃
10 g/L Natriumthiosulfat

Stop-Lösung: 50 g/L Tris
2,5% Essigsäure

Nach 3 x 30 min Inkubation in der Fixierungs-Lösung wird das Gel 10 min in 20% Ethanol und für weitere 10 min in H₂O gelegt. Anschließend erfolgt die Sensitivierung des Gels in Natriumthiosulfat für 1 min. Nach 2 x 20 s in H₂O wird das Gel 30 min in Silber-Lösung gefärbt und nach einem weiteren Waschschrift in H₂O (10 s) in Entwickler-Lösung inkubiert bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen sind. Daraufhin wird die Entwicklung durch Inkubation des Gels für 1 min in Stop-Lösung unterbrochen. Das Gel kann zur weiteren Verwendung in H₂O aufbewahrt werden.

2.2.12 Präparation eines Gelstückes für MALDI-MS Messung

Bei den nachfolgenden Schritten wird durch entsprechende Vorsichtsmaßnahmen besonders darauf geachtet, eine Kontamination mit Keratinen zu vermeiden: Hierzu werden bereits bei Durchführung der Gelelektrophorese wenn möglich nur gebrauchsfertige Lösungen und steriles HPLC-H₂O verwendet. Außerdem werden alle eingesetzten Glaswaren vor der Benutzung in 0,5% SDS/H₂O eingesetzt. Während der gesamten Durchführung werden aus einer neuen Packung entnommene Handschuhe getragen, die ebenfalls in 0,5% SDS/H₂O eingetaucht werden. Nach der Coomassie-Färbung wird das Gelstück mit dem entsprechenden Molekulargewichtsbereich vorsichtig mit einem neuen Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in 1 x 1 mm Würfel zerteilt. Die Würfelstücke werden in ein zuvor mit Methanol gereinigtes neues Mikroreaktionsgefäß (farblos und ohne O-Ring, Eppendorf, Hamburg) überführt und zweimal jeweils 10 min in 50% Methanol inkubiert. Nach Entfernung der Methanollösung können die Gelstücke bei -20 °C aufbewahrt bzw. zur MALDI-MS Messung verschickt werden.

2.2.13 Autoradiographie von SDS Polyacrylamidgelen

Amplify (Amersham, Braunschweig)

Zur Detektion von gelelektrophoretisch aufgetrennten radioaktiv markierten Proteinen wird das Gel 1 h in Fixier-Lösung (2.2.10) und anschließend 1 h in Amplify-Lösung inkubiert. Anschließend wird das Gel im Vakuum getrocknet und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Exposition erfolgt bis zu 8 Wochen.

2.2.14 Western-Blot nach dem Semi-dry Verfahren

AnodenpufferI: 300 mM Tris
20% (v/v) Methanol
pH 10,4

AnodenpufferII: 25 mM Tris
20% (v/v) Methanol
pH 10,4

Kathodenpuffer: 25 mM Tris
40 mM Amino-n-capronsäure (Sigma,Deisenhofen)
20% (v/v) Methanol
pH 9,4

Die im SDS Gel aufgetrennten Proteine werden mit der Semi-dry Methode auf eine Nitrocellulose Membran übertragen. Hierzu wird eine horizontale Blotkammer mit einem diskontinuierlichen Puffersystem verwendet. Nachdem die Filterpapiere und die Nitrocellulose auf Gelgröße zurechtgeschnitten worden sind, werden 3 Filterpapiere mit Anodenpuffer I getränkt und auf die Anodenplatte gelegt, gefolgt von 2 in Puffer II getränkten Filterpapieren. Diese werden mit der in Puffer II getränkten Nitrocellulose und dem Gel luftblasenfrei bedeckt. Mit 5 in Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren wird das Gel überschichtet. Nach dem Abdecken mit der Kathodenplatte werden die Proteine mit einer konstanten Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ in 60 min vom Gel auf die Membran übertragen.

2.2.15 Ponceau-S-Färbung

Ponceau S-Lösung: 0,2% (w/v) Ponceau-S (Serva,Heidelberg)
3% (w/v) Trichloressigsäure

Zur Überprüfung des Proteintransfers vom SDS-Gel auf die Nitrocellulose wird die Membran nach dem Blot 1 min mit Ponceau-S-Lösung gefärbt. Anschließend wird die gefärbte Membran solange mit Wasser gewaschen bis nur noch die rot gefärbten Proteinbanden sichtbar sind. Die Banden des Molekulargewichtsstandards werden markiert und vor der darauffolgenden Immundetektion wird der Blot durch Waschen mit TBS vollständig entfärbt.

2.2.16 Immundetektion von Proteinen im Western-Blot

Antikörper-Verdünnungen:	8E5 1:8000 13G8 1:1000 RL2 1:1000; 1:3000; 1:6000 W02 1:2000 anti-Maus-POD 1:10000; 1:5000
Blockierungs-Lösung:	5% (w/v) Milchpulver 0,05% (v/v) Tween in TBS
Inkubationslösung für Antikörper:	0,25% (w/v) BSA 0,05% (v/v) Tween in TBS
Waschpuffer:	0,05% (v/v) Tween in TBS

Die auf Nitrocellulose transferierten Proteine werden nach Ponceau-S Färbung/Entfärbung transferierten Proteine durch eine Hitzebehandlung stärker auf der Membran fixiert. Hierzu wird die Membran 5 min in kochend heißem TBS inkubiert. Anschließend werden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran durch eine 1 h Inkubation mit Blockierungspuffer bei RT abgesättigt. Daraufhin wird die Blockierungslösung gegen eine Lösung mit dem primären Antikörper ausgetauscht. Nach der Inkubation über Nacht bei 4 °C wird die Membran 4x für jeweils 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Danach wird sie für 1 h bei Raumtemperatur in einer Lösung mit POD-gekoppeltem sekundären Antikörper inkubiert. Nach gründlichem Waschen (viermal je 10 min) mit Waschpuffer wird mit Hilfe des Substrats des „Super Signal Substrate“ Kits die Bindung des Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpers an den ersten Antikörper in einer Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen. Das Kit wird dazu nach Angaben des Herstellers (Pierce, Rochester, USA) gemischt und auf den Blot gegeben. Nach Einschweißen des Blots mit der Substrat-Lösung in Plastikfolie wird die Lumineszenz durch Auflegen von Röntgenfilmen detektiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

Häufig verwendete Lösungen:

LB-Medium (Luria-Bertani): 1% (w/v) Trypton (Gibco, Karlsruhe)
0,5% (w/v) NaCl

0,5% (w/v) Hefeextrakt (Difco, Detroit, USA)

pH 7,0

TE-Puffer: 10 mM Tris (Serva, Heidelberg)
1 mM EDTA (Roche, Mannheim)
pH 7,4

2.3.1 Anzucht einer Bakterienkultur

7 mL LB-Medium werden für die Vorkultur eines Bakterienstammes in einem sterilen Polystyrol Röhrechen aus einer Flüssigkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt.

2.3.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Schüttelinkubator, Certomat (Braun, Biotech, International, Melsungen)
100 mM CaCl₂

50 mL Bakterienkultur in LB-Medium werden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert bis sie eine OD₆₀₀ zwischen 0,3-0,4 erreicht haben. Nach 30 min auf Eis wird die Suspension 10 min bei 500 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das Bakteriensediment in 30 mL steriler 100 mM CaCl₂ Lösung resuspendiert und wiederum 30 min auf Eis gestellt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (s.o.) wird das Sediment in 2 mL CaCl₂ Lösung aufgenommen und zu je 100 µL aliquotiert. Die Aliquots werden bis zur Verwendung für die Transformation bei -80 °C gelagert.

2.3.3 Transformation von Bakterien

Ampicillin (Sigma, Deisenhofen)

1 µg DNA wird zusammen mit 100 µL kompetenter Bakteriensuspension (2.3.2) 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt. Das Gemisch wird daraufhin 1-2 min auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 400 µL LB-Medium 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension kann dann nach der 3-Strich-Methode mit einem sterilen

Drigalskyspatel auf Agar-Selektionsplatten ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank über Nacht invers inkubiert werden.

Für das Anlegen der Agar-Selektionsplatten wird LB-Medium zusammen mit 2% Agar autoklaviert, kurz vor dem Erstarren mit 50 µL/mL Ampicillin versetzt und anschließend in sterile Petrischalen mit einem Durchmesser von 8 cm gegossen. Die erstarrten Platten werden bei 4 °C invers bis zum Gebrauch gelagert.

2.3.4 Anlegen einer E.coli Übernachtskultur

Ampicillin (Sigma, Deisenhofen)

Mit der Impföse wird ein auf der Agar-Selektionsplatte gewachsener Bakterienklon in 7 mL LB-Medium mit 50 µg/mL Ampicillin überführt und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Nach ca. 16 h hat die Bakterienkultur die stationäre Wachstumsphase mit einer Zelldichte von ca. 1×10^9 Zellen/mL Medium erreicht. Die auf diese Weise amplifizierte DNA kann anschließend isoliert oder zum Anlegen einer weiteren Übernachtskultur genutzt werden.

2.3.5 Präparation der Plasmid DNA aus Bakterien

Mini Prep Kit (Quiagen, Hilden)

Die Plasmidisolierung erfolgt aus 7 mL Kulturvolumen mit Hilfe des Mini Prep Kits (Quiagen, Hilden) nach den Anweisungen des Herstellers.

Nach Pelletierung einer Übernachtskultur erfolgt die Aufreinigung der Plasmid DNA, die auf der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly basiert, in 4 Schritten (Birnboim und Doly, 1979). Nach Lyse der Bakterien wird die DNA an eine Silikagel-Matrix adsorbiert und nach einem Waschschrift in TE-Puffer eluiert.

2.3.6 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA Konzentration wird mit Hilfe der Extinktion der in TE-Puffer verdünnten DNA photometrisch bei 260 nm ermittelt. Die Konzentration wird nach folgender Formel berechnet:

$$c = E_{260} \times k$$

c = Konzentration ($\mu\text{g/mL}$), E_{260} = Extinktion bei 260 nm

k = Konstante (k = 50 für dsDNA)

Die Reinheit der DNA Lösung wird aus dem Quotienten der Werte für die Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Bei einem Quotienten von 1,8 liegt die DNA in ausreichender Reinheit vor.

2.3.7 DNA Spaltung mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonucleasen : Eco R I, Hind III, Kpn I (MBI, St. Leon-Rot)

1 μg DNA wird mit 2-4 Units der jeweiligen Restriktionsendonuclease, in Restriktionspuffer (20 μL Gesamtvolumen) 2 h bei 37 °C inkubiert.

Die Zusammensetzung des Restriktionspuffers ist jeweils auf das verwendete Restriktionsenzym abgestimmt und wird zusammen mit den Enzymen von der entsprechenden Firma geliefert.

2.3.8 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Ethidiumbromid (Sigma, Deisenhofen)

DNA-Ladder (MBI, St Leon-Rot)

6x Probenpuffer (MBI, St-Leon-Rot)

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat
 1 mM EDTA (Boehringer, Mannheim)
 pH 8,0

Die Auftrennung der DNA Fragmente erfolgt auf 0,8% Gelen einer Länge von 10 cm bei 90 V in TAE-Puffer. Als Standard wird der DNA-Ladder von MBI (St. Leon-Rot) aufgetragen. Die Proben werden mit 1/5 Volumen 6 fachem Probenpuffer versetzt. Dem Agarosegel wird vor dem Erstarren 0,1 $\mu\text{g/mL}$ Ethidiumbromid zugesetzt. Das Bandenmuster kann auf dem

UV-Transilluminator mit einer Videokamera (RA1, Kaiser, Göttingen) sichtbar gemacht werden.

2.4 Proteinexpression in *Xenopus* Oocyten

Häufig verwendete Lösungen:

Original Ringer (ORI) ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ frei): 90 mM NaCl
1 mM KCl
5 mM HEPES (Serva, Heidelberg)
70 mg/mL Gentamicin (Gibco, Karlsruhe)
pH 7,4

ORI: Ori ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ frei)
1 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$
1 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$
pH 7,4

2.4.1 Gewinnung und Vereinzelung der Oocyten

0,2% MS-222 (Tricain) (Sigma, Deisenhofen)

Collagenase 2 mg/mL (Sigma, Deisenhofen)

Zur Narkotisierung wird der Frosch für 20 min in eine Lösung aus 0,2% MS-222 eingetaucht. Nachdem die Oberhaut und die Bauchdecke etwa 1cm weit mit Skalpell und Schere geöffnet worden ist, ist das Ovar sichtbar und kann vorsichtig herausgezogen werden. Jedes Ovar eines weiblichen adulten *Xenopus laevis* besteht aus 24 Schleifen, deren Größe wie bei anderen Amphibien saisonal bedingt schwankt. Die Oogenese des Krallenfroschs ist ein kontinuierlicher Prozeß, dabei besitzen die Ovarien stets gleichzeitig 20000-30000 Oocyten aller Entwicklungsstadien, die nach Dumont in die Stadien I-VI eingeteilt werden (Dumont, 1972). Ovarstücke in der Größe von ungefähr 4-6 Schleifen werden abgetrennt und sofort in ORI überführt. Anschließend werden Oberhaut und Bauchdecke des Frosches jeweils getrennt vernäht. Der Frosch wird nach dem Aufwachen für 24 h in einem separaten Becken gehalten.

4-5 Monate nach der Operation kann derselbe Frosch erneut operiert werden. Zur Entfernung von Blutresten und beschädigter Oocyten werden die Ovarstücke nach der Operation gründlich in ORI gewaschen.

Ca 3 h nach der Entnahme werden die Ovarstücke weiter zerstückelt und über Nacht in 2 mg/mL Kollagenase in ORI ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ frei) bei 19 °C inkubiert. Auf diese Weise lösen sich die Oocytenverbände auf, so dass die Oocyten vereinzelt vorliegen. Außerdem wird die Thekaschicht durch die Kollagenase zerstört. Dies erleichtert die spätere Penetration mit einer Mikrokapillare. Nach der Kollagenasebehandlung werden die Oocyten 3x mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freiem ORI und 3x mit ORI gewaschen. Dabei werden kleinere, leichtere und daher oben schwimmende Oocyten der Stadien I, II und III entfernt. Die Oocyten werden bis zum Gebrauch in ORI bei 19 °C gelagert.

2.4.2 Injektion der Oocyten

Mineralöl

Für die Injektion werden Oocyten des Stadiums VI verwendet. Eine Mikrokapillare mit einem Spitzendurchmesser von ungefähr 30 μm wird mit Mineralöl gefüllt und auf den Mikroinjektor gesteckt. Daraufhin kann die cDNA in die Kapillare aufgezogen werden. Die Oocyten werden auf einer mediumgefüllten Rinne aufgereiht und für die Injektion ausgerichtet. Mit Hilfe eines Mikromanipulators, auf dem der Mikroinjektor befestigt ist, wird die Kapillare bewegt. Pro Oocyte werden 2,3 ng cDNA in den animalen dunkelbraunen Pol der Oocyte injiziert.

2.4.3 Markierung von Oocyten mit ^{35}S -Methionin

Für die Markierung von Proteinen mit ^{35}S -Methionin werden 20 Oocyten in ein Eppendorfgefäß überführt und das Medium vorsichtig entfernt. Danach erfolgt die Zugabe von 20 μCi ^{35}S -Methionin in 40 μL ORI. Nach einem 16 h Pulse bei 19 °C werden die Oocyten dreimal in ORI ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ frei) und einmal in ORI gewaschen und anschließend für 24 h bei 19 °C in ORI, supplementiert mit 5 mM L-Methionin, inkubiert. Schließlich werden die Oocyten in ORI weitere 2 Tage bei 19 °C inkubiert, wobei das Medium täglich gewechselt werden muß.

2.4.4 Präparation von Oocyten-Solubilisaten

Solubilisierungspuffer:	100 mM NaCl 20 mM Tris 4 mM EDTA(Boehringer, Mannheim) 4 mM EGTA 1 mM PMSF 0,5% Triton X100 (Sigma,Deisenhofen) 100 mM GlcNAc pH 7,4
-------------------------	---

Die Oocyten werden in ein Eppendorfgefäß überführt. Das überschüssige Medium wird vorsichtig entfernt. Pro Oocyte werden 20 µL Solubilisierungspuffer hinzugegeben. Dann werden die Oocyten durch zwanzigmaliges Auf- und Abziehen des Oocyten-Puffergemisches mit einer 200 µL-Pipette und darauffolgendem zweimaligem Vortexen homogenisiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis sedimentieren die Dotterproteine und Farbpigmente. Bei der nachfolgenden Zentrifugation für 15 min bei 13000 g und 4 °C bilden sich 3 Phasen: Eine Dotterprotein/Pigmentphase am Boden des Gefäßes, eine klare Zwischenphase mit solubilisierten Membranproteinen und eine Fettphase. Die klare Zwischenphase wird vorsichtig in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Das so aufgereinigte Solubilisat kann dann für die Immunpräzipitation eingesetzt werden.

2.4.5 Immunpräzipitation aus Oocyten-Solubilisaten

Protein G Sepharose (Pharmacia, Freiburg)

Primärantikörper:	8E5 (5 µg/2µL) RL2 (5 µg/5µL)
-------------------	----------------------------------

LiCl-Puffer:	100 mM LiCl 150 mM Tris pH 7,5
--------------	--------------------------------------

Tris/HCl-Puffer:	1 mM Tris/HCl pH 7,9
------------------	-------------------------

Zu 100 µL des Oocytenhomogenats werden 400 µL Solubilisierungspuffer, 30 µL Protein G Sepharose und 5 µg Antikörper hinzugefügt. Nach 4 h Inkubation bei 4 °C wird 10 min bei 4 °C und 13000 g zentrifugiert. Das Pellet wird dreimal mit 500 µL LiCl Puffer gewaschen und einmal mit 500 µL Tris/HCl. Die an Protein G Sepharose gebundenen Proteinkomplexe werden 10 min durch Erhitzen bei 100 °C in 50 µL reduzierendem Probenpuffer aufgeschlossen und anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.8).

2.5 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37 °C in einer wassergesättigten Atmosphäre von 5% CO₂ (Zell-Inkubator, Modell 160, ICN, Eschwege) kultiviert.

2.5.1 Präparation und Kultivierung muriner Kleinhirnneuronen

Für die Präparation der Kleinhirnneuronen werden postnatale NMRI Mäuse, die 6-7 Tage alt sind, verwendet.

Ca ²⁺ und Mg ²⁺ freies HBSS ⁻ :	5,4 mM KCl 0,4 mM KH ₂ PO ₄ 136,9 mM NaCl 4,2 mM NaHCO ₃ 0,3 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 5,5 mM D-Glucose (Serva, Heidelberg) 0,03 mM Phenolrot pH 7,2
Trypsin/ DNase-Lösung:	40 mL Trypsin (2,5%) (Boehringer, Mannheim) 100 mg DNase I (Boehringer, Mannheim) 10 mL HBSS ⁻ (s.o.) 1 mL MgCl ₂ (80 mM) auf 100 mL mit aqua dem. Auffüllen pH 7,8
DNase-Lösung:	0,1 g DNase I 0,5 g D-Glucose 200 mL BME-Medium (s.u.)
BME Medium (Basalmedium nach Eagle):	9 g BME ohne L-Glutamin und NaHCO ₃ (Gibco, Karlsruhe) 2,5 g D-Glucose 2,2 g NaHCO ₃ auf 1l mit aqua dem. Auffüllen pH 7,2
X1 Kulturmedium:	500 mL BME-Medium (s.o.) 12,5 mL HEPES (1 M Stammlösung) (Serva, Heidelberg) 1,25 g D-Glucose 5 mL Penicillin/Streptomycin (Sigma, Deisenhofen) 0,5 g BSA 250 µL Insulin (20 mg/mL Stammlösung) (Roche, Mannheim) 1,65 mL Transferrin (30 mg/mL Stammlösung) (Roche, Mannheim) 500 µL Aprotinin (2 mg/mL Stammlösung) (Roche, Mannheim) 500 µL Tyroxin II (4 µM Stammlösung) 50 µL Na-Selenit (300 nM Stammlösung)

pH 7,2

L-Glutamin (ICN, Eschwege)

0,02% Poly-L-Lysin-Lösung (PLL) (Sigma, Deisenhofen) Chargenangabe 031K5106

Die Kleinhirnneuronen werden nach der Anleitung von Schnitzer und Schachner präpariert (Schnitzer und Schachner, 1981). Kleinhirne 6-7 Tage alter Mäuse werden nach Entfernung der Hirnhaut mechanisch zerkleinert. Nach zweimaligem Waschen mit HBSS⁻ werden die Gewebestücke in Trypsin/DNAse Lösung (250 µL Enzym-Lösung / Kleinhirn) 15 min bei RT inkubiert. Nach Entfernen der Enzym-Lösung werden die Gewebefragmente zweimal mit HBSS⁻ gewaschen und in DNAse-Lösung aufgenommen (250 µL/Kleinhirn). Eine weitere Zerkleinerung der Gewebefragmente wird durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer feuergeglätteten Pasteurpipette erreicht. Die Zellsuspension wird 1:4 mit HBSS⁻ verdünnt und 5 min auf Eis inkubiert. Der Überstand wird abgenommen und 7 min bei 160 g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen werden in X1 Medium (supplementiert mit 2 mM Glutamin) aufgenommen und in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/mL auf zuvor mit 0,02% PLL beschichteten 35 mm Petrischalen ausgesät.

2.5.2 Kultivierung und Subkultivierung von N2a-Zellen

HBSS⁻, Ca²⁺ und Mg²⁺ frei (2.5.1)

Trypsin/HBSS⁻: 0,125% Trypsin (w/v) (Roche, Mannheim) in HBSS⁻

Zellkulturmedium: RPMI 1640 (mit Glutamin)(Sigma, Deisenhofen)
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (Sigma, Deisenhofen)
0,2% (w/v) Geneticin 418 (ICN, Eschwege) bei stabil transfizierten Zellen
10% FCS (Sigma, Deisenhofen)

Poly-L-Lysin 0,1 mg/mL PBS (Sigma, Deisenhofen) Chargenangabe 031K5106

Die Kultivierung von N2a und A3 Zellen erfolgt in RPMI Kulturmedium mit 10% fötalem FCS und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5% CO₂-Atmosphäre. Zur Selektion der stabil transfizierten Zellen wird entsprechend dem Selektionsmarker Geneticin 418 (0,2%) dem Kulturmedium zugefügt. Die Zellen werden in T75 bzw. T175 Zellkulturflaschen kultiviert, die zur besseren Adhäsion der Zellen mit Poly-L-Lysin beschichtet werden.

Wenn die Zellen zu ca. 90% konfluent sind, werden sie dreimal mit HBSS⁻ gewaschen und dann zur Dissoziation ca. 3 min mit Trypsin/HBSS⁻ inkubiert. Durch Zugabe von 1/10 Vol. FCS wird der Prozeß gestoppt. Die Zellsuspension wird in 10 mL HBSS⁻ aufgenommen und

bei Raumtemperatur 7 min bei 150 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 10 mL Kulturmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:10 auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.5.3 Kultivierung und Subkultivierung von SH-SY5Y-Zellen

Kulturmedium: 50% MEM (Minimum essential medium eagle) ohne L-Glutamin (Gibco, Karlsruhe)
50% Nutrient Mixture F-12; HAM (Gibco, Karlsruhe)
1% MEM nicht essentielle Aminosäure-Lösung (100x) (Gibco, Karlsruhe)
1% L-Glutamin (100x) (Serva, Heidelberg)
1% Penicillin/Streptomycin (Sigma, Deisenhofen)
15% FCS (Sigma, Deisenhofen)
250 µg/mL Hygromycin B (Gibco-BRL Freiburg), bei stabil transfizierten Zellen

Die Kultivierung und Subkultivierung der SH-SY5Y-Zellen erfolgt genauso wie die der N2a-Zellen (2.5.2) mit dem entsprechenden Kulturmedium.

2.5.4 Kultivierung und Subkultivierung von PC12-Zellen

Kulturmedium: RPMI (mit Glutamin) (Sigma, Deisenhofen)
10% (v/v) HS (Sigma, Deisenhofen)
5% (v/v) FCS (Sigma, Deisenhofen)
1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (Sigma, Deisenhofen)

Collagen Typ I 0,1 mg/mL PBS (Serva, Heidelberg)

Poly-L-Lysin 0,1 mg/mL (Sigma, Deisenhofen) Chargenangabe 031K5106

Zunächst werden ca. 6×10^6 Zellen/mL eines in flüssigem Stickstoff aufbewahrten Aliquots bei RT aufgetaut, vorsichtig in 5 mL Kulturmedium aufgenommen und bei 150 g, 7 min zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellsediments in 10 mL Medium werden die Zellen in eine zunächst mit Poly-L-Lysin und daraufhin mit Collagen Typ I beschichtete T75 Zellkulturflasche überführt und anschließend bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Die Subkultivierung erfolgt, sobald die Zellen konfluent sind. Die Zellen werden 3x mit HBSS⁻ gewaschen und dann durch Inkubation mit einer Trypsin/EDTA-Lösung von der Gefäßoberfläche abgelöst. Dann wird das Trypsin durch Zugabe von 1/10 Volumen FCS inaktiviert. Die Zellsuspension wird in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bei 160

g 7 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 4 mL Kulturmedium resuspendiert und in einem Verhältnis von 1:4 auf neue beschichtete T75 Zellkulturflaschen verteilt.

Zur Kultivierung von PC12 Zellen auf Deckgläschen, werden die Deckgläschen zunächst mit Poly-L-Lysin und anschließend mit Collagen Typ I beschichtet.

2.5.5 Einfrieren von Zellen

Einfriermedium: 90% (v/v) Zellkulturmedium
10% (v/v) DMSO (Sigma, Deisenhofen)

Konfluente Zellen werden aus einer T75-Zellkulturflasche abgelöst und pelletiert (s. 2.5.2). Das Zellsediment wird in 2 mL Einfriermedium resuspendiert und auf zwei 1mL Kryogefäße verteilt. Die Zellen werden zunächst für einige Stunden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren, dann ca. 1 Woche bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt, um dann zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff überführt zu werden.

2.5.6 Behandlung der Zellen mit pharmakologischen Substanzen

DON (6-diazo-5-oxonorleucine): DON inhibiert die Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Amidotransferase. Die Zellen werden, wenn nicht anders angegeben, 48 h mit $40\text{ }\mu\text{M}$ DON behandelt.

PUGNAc (O-(2-acetoamido-2-deoxy-D-glucopyranosyliden) amino-N-phenylcarbamat) (CarboGen, Aarau, Schweiz): PUGNAc ist ein potenter Inhibitor der O-GlcNAc Hydrolase. Die Zellen werden, wenn nicht anders angegeben, 48 h mit $40\text{ }\mu\text{M}$ PUGNAc behandelt.

Swainsonine (Sigma, Deisenhofen): Swainsonine ist ein Inhibitor der Mannosidase II. Stabil transfizierte und nicht transfizierte N2a Zellen werden ca. 3 Tage nach Aussaat bei Erreichen einer Zelldichte von 50% Konfluenz 48 h mit $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ Swainsonine behandelt.

NGF (nerve growth factor) (Pepro Tech, Rocky Hill, USA): Der Nervenwachstumsfaktor NGF wird zur neuronalen Differenzierung von PC12 Zellen eingesetzt. Hierzu werden 15000 PC12 Zellen pro Deckgläschen auf mit Poly-L-Lysin und Collagen Typ I beschichteten

Deckgläschen ausgesät (2.5.4). 24 h nach der Aussaat werden die Zellen 6 Tage mit 50 ng/mL NGF behandelt. Dabei wird zweimal das Medium gegen frisches Medium mit zugesetztem NGF ausgetauscht.

2.5.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Antikörperverdünnung: RL2 1:750 in Blockierungspuffer
Anti-Maus-Cy3 1:100 in Blockierungspuffer bzw. Anti-Maus-DTAF Cy3 1:100 in Blockierungspuffer

AL25 1:500 in Blockierungspuffer
Anti-Kaninchen-Cy3 1:100 in Blockierungslösung

4% (v/v) Paraformaldehyd

100% Ethanol

Blockierungspuffer: 1% (w/v) BSA/PBS

Bis Benzimide H 33258 DNA Stain 1:500 in Blockierungspuffer (Sigma, Deisenhofen)

Glyceringelatine

Die auf den Deckgläschen ausgesäten Zellen werden mit 4% Paraformaldehyd 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen mit eiskaltem Ethanol 5 min permeabilisiert. Zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen werden die Zellen in Blockierungspuffer für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem im Blockierungspuffer verdünnten Primärantikörper bei 4 °C über Nacht (bei Doppelfärbungen werden die Zellen in einem Antikörpercocktail, der sich aus zwei verschiedenen im Blockierungspuffer verdünnten Primärantikörpern zusammensetzt, inkubiert). Am nächsten Tag wird wiederum dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen werden mit dem Cy-3 gekoppelten Sekundärantikörper 1h unter Lichtausschluß bei RT inkubiert (bei Doppelfärbungen werden die Zellen in einem Antikörpercocktail, der sich aus zwei verschiedenen im Blockierungspuffer verdünnten mit Cy-3 und mit DTAF-gekoppelten Sekundärantikörpern zusammensetzt, inkubiert). Nach dreimaligem Waschen mit PBS können die Zellkerne mit dem DNA bindenden fluoreszierenden Farbstoff H 33258 gefärbt werden. Darauf folgt ein weiterer Waschschrift. Abschließend werden die Deckgläschen kurz in aqua dem. getaucht, an der Luft getrocknet, in Glyceringelatine eingebettet und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Die Anregung von Cy3 erfolgt bei 546-580 nm, von DTAF bei 496-528 nm.

2.5.8 Präparation von Zell-Lysaten

Solubilisierungspuffer: 50 mM Tris-HCl
150 mM NaCl
1 mM EDTA
1 mM EGTA
1 mM EDTA
1% Triton

100 mM GlcNAc sowie die Proteaseinhibitoren PMSF (1 mM), Aprotinin (1 µg/mL), Leupeptin (1 µg/mL) und Pepstatin (1 µg/mL) werden frisch zu dem Solubilisierungspuffer hinzugegeben.

Die Zellen werden nach Absaugen des Mediums einmal mit DPBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen durch Zugabe des eiskalten Solubilisierungspuffers 30 min auf Eis solubilisiert (eingesetzte Menge des Solubilisierungspuffers: 500 µL/32 mm Petrischale oder T75 Flasche; 1 mL/T175) Flasche). Anschließend wird das Solubilisat bei 14000 g 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (2.2.3) wird der Überstand entweder bei –80 °C eingefroren oder mit Probenpuffer versetzt bzw. für eine Immunpräzipitation eingesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Quantitativer und qualitativer Vergleich der O-GlcNAc Modifikation in Gewebeproben verschiedener Hirnareale von Alzheimerpatienten und Kontrollpersonen

Griffith und Schmitz wiesen 1995 eine erhöhte O-GlcNAc Modifikation in bestimmten Cortex- und Hippocampus-Gewebeproben von Alzheimerpatienten im Vergleich zu Kontrollproben nach (Griffith und Schmitz, 1995). Von dieser Erhöhung ist nur die Fraktion der Detergens-unlöslichen cytoskeletalen- und Cytoskelett-assoziierten Proteine (Dicf) und nicht die der Detergens-löslichen cytosolischen Proteine (Dsf) betroffen.

Der Nachweis erfolgte zum einen enzymatisch durch die Übertragung radioaktiv markierter UDP-Galactose auf O-GlcNAc Reste und zum anderen mit den HGAC85 und HGAC39 Antikörpern. Diese monoklonalen Mausantikörper wurden ursprünglich gegen ein bakterielles Streptokokken Antigen produziert. Später konnte gezeigt werden, daß sie auch mit dem O-GlcNAc Epitop kreuzreagieren (Turner et al, 1990). Mittlerweile sind auch weitere gegen eukaryotische Antigene gerichtete Antikörper entwickelt worden, die spezifisch O-GlcNAc erkennen und für den O-GlcNAc Nachweis zur Verfügung stehen. Zwei dieser neuen anti O-GlcNAc Antikörper, der monoklonale Mausantikörper MUD50 (Ascites) und der monoklonale Mausantikörper RL2, wurden in der vorliegenden Arbeit zur Analyse von humanen Hirngewebeproben eingesetzt.

Es galt nun zu klären, ob nach den Ergebnissen von Griffith und Schmitz, alle Dicf-Proteine im erhöhten Maße mit O-GlcNAc modifiziert sind oder ob von dieser Erhöhung nur bestimmte Proteine betroffen sind bzw. auch andere Proteine in AD-Proben als in Kontrollproben mit O-GlcNAc modifiziert sind.

Zunächst wurde die O-GlcNAc Spezifität des MUD50 Antikörpers in einem Kompetitionstest überprüft. Dann sollte mit Hilfe des MUD50 Antikörpers im Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay (ELISA) der O-GlcNAc Gehalt von Hirngewebeproben quantitativ bestimmt werden, Im Western-Blot sollten anschließend die Proben im Hinblick auf qualitative und quantitative Unterschiede untersucht werden.

3.1.1 Test der O-GlcNAc Spezifität des MUD50 Antikörpers

Der monoklonale Mausantikörper MUD50 (wurde freundlicherweise von Prof. Williams, Macquarie University, Sidney, zur Verfügung gestellt) wurde gegen Proteine der Schleimhülle und der Zelloberfläche des Einzellers *Dictyostelium discoideum* (Grant et al., 1985) erzeugt. Es konnte gezeigt werden, dass MUD50 spezifisch ein Kohlenhydratepitop des Zelloberflächenproteins PsA (Prespore-specific antigen) von *Dictyostelium discoideum* erkennt (Alexander et al., 1988). Dieses Kohlenhydratepitop von PsA wurde massenspektrometrisch untersucht und als O-GlcNAc identifiziert (Zachara et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde der MUD50 Antikörper für die O-GlcNAc Analyse von humanen Hirnpräparaten verwendet. Vorab wurde die O-GlcNAc Spezifität des MUD50 erstmals gegen GlcNAc-BSA als synthetisches Antigen, das als Positivkontrolle für O-GlcNAc verwendet wird, getestet. Hierzu wurde ein ELISA (2.2.1) mit dem MUD50 Antikörper durchgeführt (in einer Verdünnung 1:500). Als Negativkontrolle wurde ein nicht gegen O-GlcNAc gerichteter monoklonaler Maus anti-CD9 Antikörper eingesetzt, der ein spezifisches Tetraspanin erkennt. Außerdem wurde die unspezifische Bindung des Zweitantikörpers in Abwesenheit des Erstantikörpers (2. Antikörperkontrolle) getestet. In einem Kompetitionstest wurden die Antikörper mit 100 mM GlcNAc bzw. Glucose vorinkubiert und dann im ELISA eingesetzt.

Abb. 5 zeigt, dass der MUD50 Antikörper spezifisch mit GlcNAc-BSA reagiert. Diese Reaktivität kann um 81% durch 100 mM GlcNAc reduziert werden. Hingegen führt eine Inkubation des Antikörpers mit 100 mM Glucose zu einer geringfügigeren Inhibition von 29,7%. Der anti-CD9 Antikörper zeigt nur 29% der MUD50 Reaktivität und damit eine geringe, vermutlich unspezifische Bindung, wie die Nicht-Hemmbarkeit durch GlcNAc bestätigt. Somit konnten die O-GlcNAc spezifischen Bindungseigenschaften des MUD50 im Kompetitionstest mit GlcNAc eindeutig bestätigt werden.

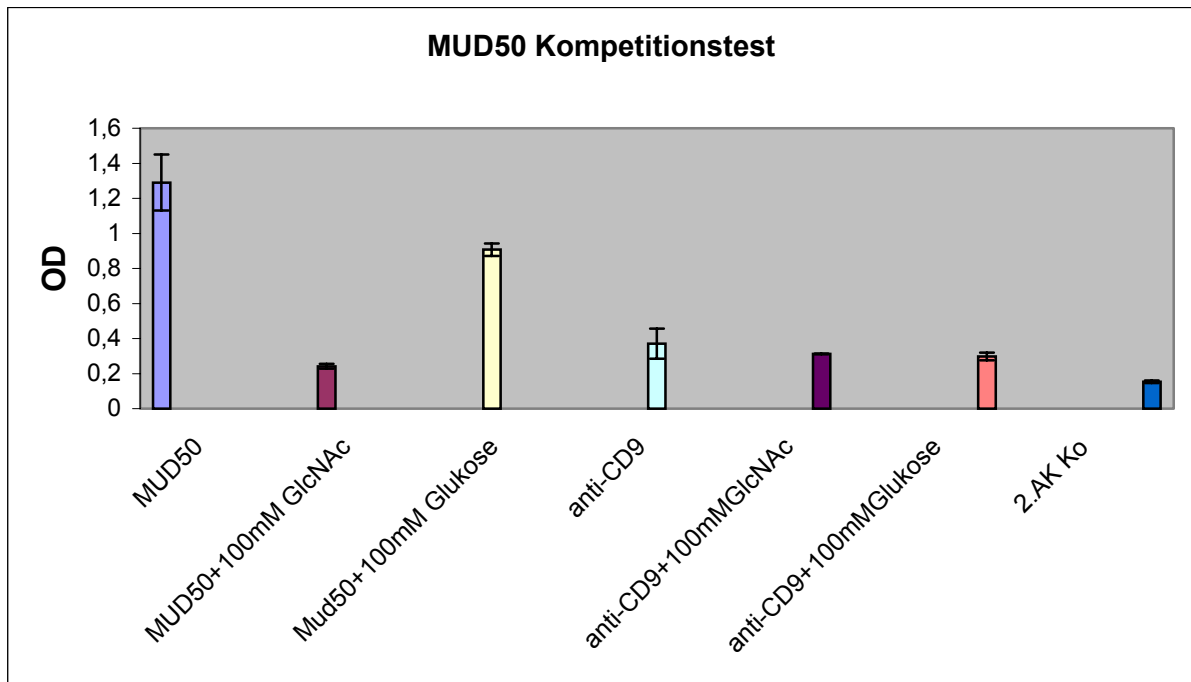


Abb. 5 Bestimmung der Reaktivität des monoklonalen MUD50 Antikörpers mit GlcNAc-BSA im ELISA.

Die Bindung des MUD50 Antikörpers und eines O-GlcNAc unspezifischen anti-CD9 Antikörpers an GlcNAc-BSA (62,5 ng/ Vertiefung) ist in An- und in Abwesenheit von 100 mM GlcNAc und 100 mM Glucose dargestellt. Außerdem wurde die unspezifische Bindung des Zweitantikörpers in Abwesenheit des Erstantikörpers (2. AK Ko) kontrolliert. Die optische Dichte (OD) der Farbreaktion der an den Zweitantikörper gebundenen Peroxidase wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen mit Standardabweichung.

3.1.2 Quantitativer O-GlcNAc Nachweis: ELISA mit Alzheimer- und Kontrollproben

Im folgenden wurden die O-GlcNAc Mengen der Dief- und Dsf-Proben verschiedener Cortexareale von Alzheimerpatienten bzw. Kontrollpersonen mittels ELISA miteinander verglichen. Zur Verfügung standen Frontal-, Temporal- und Parietallappenproben von 3 Alzheimerpatienten und 3 Kontrollpersonen. Über die Proben aus dem Institut für Neuropathologie der Universität München lagen Informationen über Alter und Geschlecht der Personen vor, sowie über die post-mortem Zeit bis zur Autopsie. Die genauen Daten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

3. Ergebnisse

RZ-Nr.	neuropathol. Diagnose	Alter (Jahre)	Geschlecht	P.-m.Z. (h)	Fr. (Probenanzahl)	Temp. (Probenanzahl)	Par. (Probenanzahl)
55	AD	80	m.	12	1	1	1
21	AD	81	m.	65	1	1	1
51	AD	90	m.	55	1	-	-
57	Ko	88	w.	48	1	-	-
58	Ko	77	w.	20	1	1	1
79	Ko	75	w.	24	1	1	1

Tabelle 2 Angaben zu den verwendeten Hirnproben.

Abkürzungen: RZ-Nr. (Referenzzentrums-Nummer), neuropathol. Diagnose (neuropathologische Diagnose), AD (Alzheimer Demenz), Ko (Kontrolle), w. (weiblich), m. (männlich), P.-m.Z. (Post-mortem Zeit), h (Stunden), Fr. (Frontallappen), Temp. (Temporallappen), Par. (Parietallappen)

Die Präparation der Dicf- und Dsf-Proben erfolgte nach der Methode der differentiellen Detergensextraktion (Refolo et al., 1991) modifiziert nach L.S. Griffith (2.2.2). Der Proteingehalt der Fraktionen wurde nach Lowry unter Verwendung des Detergens kompatiblen Ansatzes der Firma Biorad (2.2.3) bestimmt. Bei dem darauf folgenden ELISA wurde die Titerplatte mit Glutaraldehyd beschichtet, um einen höheren Beschichtungsgrad der Proteine zu erreichen (2.2.4). Es wurden 25 µg Dsf- bzw. Dicf-Proteine pro Vertiefung eingesetzt. Der ELISA wurde wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben mit dem monoklonalen MUD50 Antikörper als Erstantikörper durchgeführt. Die gemessenen Werte der optischen Dichte (OD) bei 405 nm wurden in Relation zu den parallel gemessenen OD Werten von GlcNAc-BSA, das als Positivkontrolle mitgeführt wurde, gesetzt (GlcNAc-BSA=100%).

Der sekundäre Antikörper zeigt zum Teil eine auffällig starke Reaktivität mit dem Substrat (OD bis zu 50% der Werte in Gegenwart des Erstantikörpers, s. Abb. 28 im Anhang). Wie bereits schon von Griffith und Schmitz 1995 gezeigt werden konnte, weisen auch diesmal die Dicf-Proteine der zur Verfügung stehenden Proben bis auf eine Ausnahme (Probe fr. AD55 Dicf, in Abb. 6 mit * gekennzeichnet: der Zweitantikörper zeigt mit dieser Probe eine sehr starke Reaktivität, s. auch Abb. 28) den gemessenen Werten zu Folge eine stärkere O-GlcNAc Modifikation auf als die Dsf-Proteine (Abb. 6). Wegen der starken Schwankungen zwischen den verschiedenen Proben und da der Probenumfang für die Erstellung einer aussagekräftigen Statistik zu klein ist, kann keine allgemeine Aussage über Unterschiede zwischen den AD- und Kontrollproben getroffen werden. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurden die

Dicf-Proteine von AD- und Kontrollproben ausgewählt, deren Werte die größten Unterschiede zueinander aufwiesen, wie z.B die Frontallappenproben von AD21 und K79.

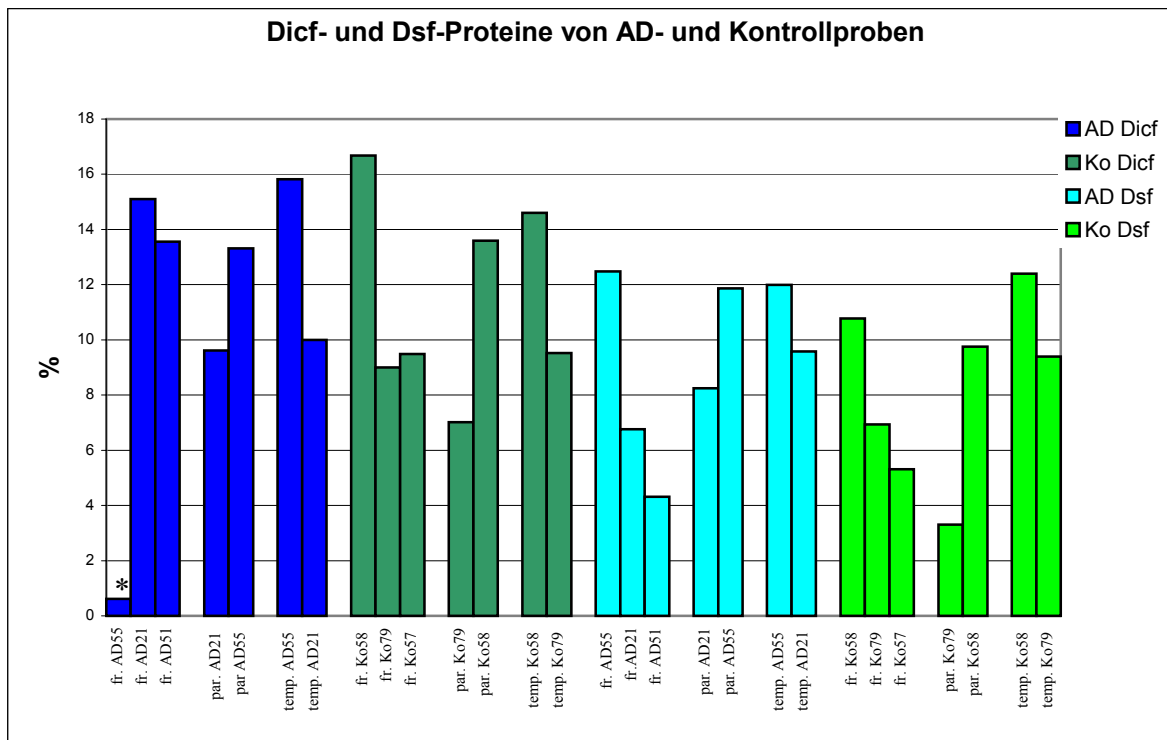


Abb. 6 Quantitativer O-GlcNAc Nachweis: ELISA mit AD- und Kontrollproben. Es wurden 25 µg Dsf- bzw. Dicf-Proteine pro Vertiefung eingesetzt. Der ELISA wurde mit dem monoklonalen MUD50 Antikörper als Erstantikörper durchgeführt (2.2.4). Die optische Dichte (OD) der Farbreaktion der an den Zweitantikörper gebundenen Peroxidase mit ABTS wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die gemessenen OD Werte wurden in Relation zu dem gemessenen OD Wert von GlcNAc-BSA (62,5 ng/Vertiefung), das als Positivkontrolle mitgeführt wurde, gesetzt (GlcNAc-BSA=100%). Die dargestellten Werte entsprechen dem Durchschnitt aus drei Messwerten aus einem von 3 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die OD Werte für die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an das Antigen wurden abgezogen. Die Standardabweichungen sowie die gemessenen Werte der Reaktivität des Sekundärantikörpers mit dem Antigen sind im Anhang in Abb. 28 graphisch dargestellt. Abkürzungen: fr (Frontallappen), par. (Parietallappen), temp. (Temporallappen), AD (Alzheimer Demenz), Ko (Kontrolle). *: Der Zweitantikörper zeigt mit dieser Probe eine sehr starke Reaktivität (s. auch Abb. 27, Anhang)

3.1.3 Western-Blot der O-GlcNAc modifizierten Proteine von AD- und Kontrollproben

Für die Analyse wurden Probenpaare von AD- und Kontrollhirnen ausgewählt, die nach dem in 1.2 beschriebenen ELISA die größten quantitativen Unterschiede in Bezug auf die O-GlcNAc Expression zueinander aufwiesen. Es sollte nun überprüft werden, ob diese Unterschiede auch bei denselben Proben im Western-Blot detektierbar sind.

Die Detektion der O-GlcNAc Proteine auf der Nitrocellulosemembran erfolgte wie in Abschnitt 2.2.16 beschrieben. Als Erstantikörper wurde jedoch der anti O-GlcNAc Antikörper RL2 verwendet, da der MUD50 nicht mehr zur Verfügung stand. Der monoklonale Mausantikörper RL2 war ursprünglich gegen O-GlcNAc modifizierte Kernporenproteine aus Rattenleber erzeugt worden (Snow et al., 1987). Dass der RL2 spezifisch das O-GlcNAc Epitop der Kernporenproteine erkennt, war von Holt et al. nachgewiesen worden (Holt et al., 1987). Da angenommen wurde, dass der Antikörper auch einen Teil der Sequenz der Kernporenproteine erkennt, sollte zunächst in einem Vorversuch die Spezifität des Antikörpers generell für O-GlcNAc getestet werden. Hierzu wurden mit Hilfe des Galactosyltransferase-Assays die O-GlcNAc Reste durch Übertragung von Galactose für die Antikörpererkennung blockiert, um so die Spezifität des Antikörpers zu bestätigen. Für diesen Versuch wurden Dsf-Proteine einer Gewebeprobe des Frontallappens eines Kontrollpatienten und GlcNAc-BSA eingesetzt. Es wurden 50 µg galactosylierte und 50 µg nicht galactosylierte Dsf-Proteine sowie 10 µg galactosyliertes und 10 µg nicht galactosyliertes GlcNAc-BSA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Während ein Teil des Gels zur Überprüfung der Proteinmenge mit Coomassie Blau gefärbt wurde, wurde mit dem anderen Teil ein Western-Blot durchgeführt. Die Bindung des Zweitantikörpers an die galactosylierten bzw. nicht galactosylierten Proben wurde zusätzlich überprüft.

Als weitere Kontrolle wurden jeweils 50 µg Dsf-Proteine im Western-Blot mit dem RL2 bzw. im Vergleich dazu mit dem MUD50 inkubiert.

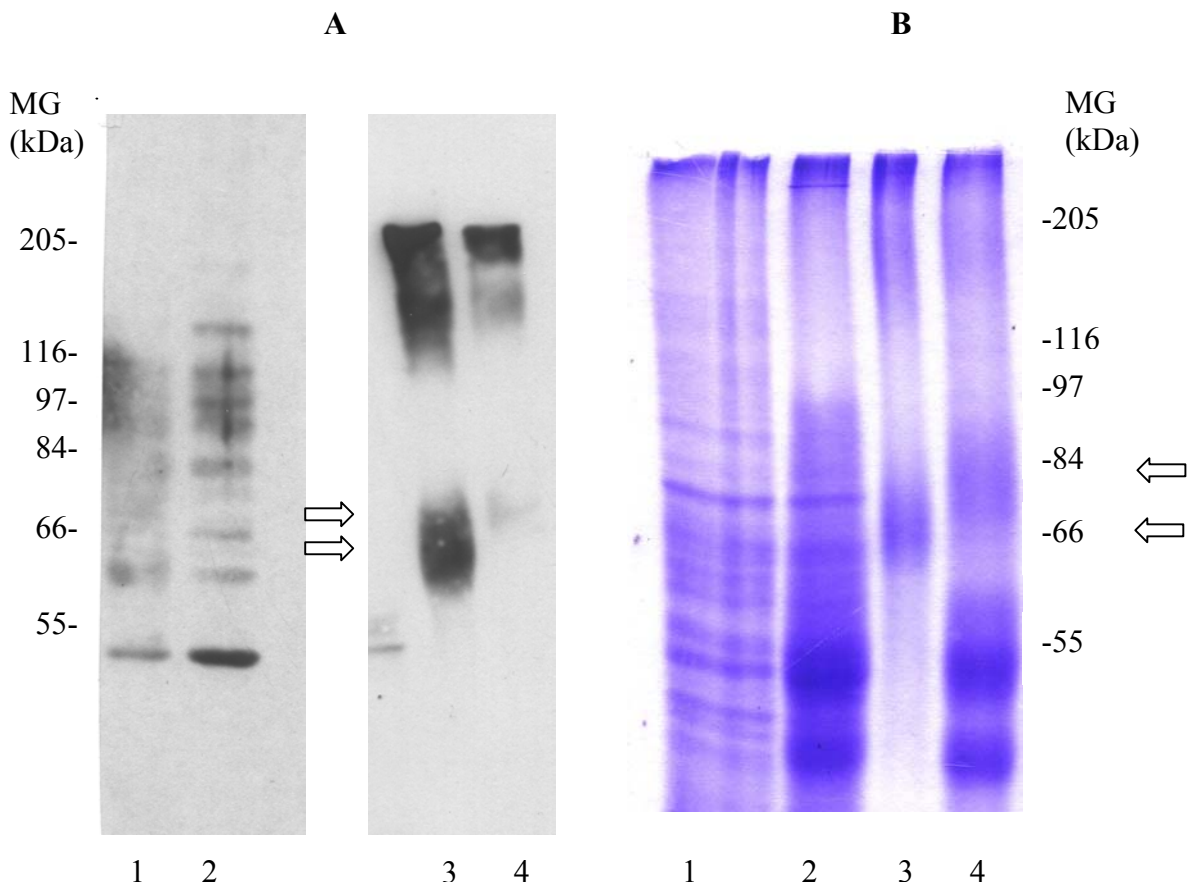


Abb. 7 Kontrolle der O-GlcNAc Spezifität des RL2 Antikörpers im Western-Blot. Es wurde zunächst ein Galactosyltransferase-Assay mit einer Detergenz-löslichen Fraktion einer Frontallappenprobe eines Kontrollpatienten (Ko57) und dem synthetischen O-GlcNAc Analogon GlcNAc-BSA durchgeführt. Die apparenten Molekulargewichte (MW) sind am linken bzw. am rechten Rand dargestellt. Die Pfeile in A und B weisen auf die GlcNAc-BSA Bande vor und nach der Galactosylierung (3,4) hin. Es wurde ein Gel mit den Maßen 17 cm x 17 cm x 0,15 cm eingesetzt.

A Western-Blot-Analyse mit 50 µg galactosylierten (Spur 1) und 50 µg nicht galactosylierten (Spur 2) Dsf-Proteinen bzw. mit 10 µg galactosyliertem GlcNAc-BSA (Spur 4) und 10 µg nicht galactosyliertem GlcNAc-BSA (Spur 3). O-GlcNAc modifizierte Proteine wurden mit dem monoklonalen Mausantikörper RL2 und POD gekoppeltem Zweitantikörper im Western-Blot mittels Chemilumineszenz detektiert.

B Coomasie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit 50 µg nicht galactosylierten (Spur 1) und 50 µg galactosylierten (Spur 2) Dsf-Proteinen und mit 10 µg nicht galactosyliertem GlcNAc-BSA (Spur 3) und 10 µg galactosyliertem GlcNAc-BSA (Spur 4).

Die O-GlcNAc Spezifität des RL2 Antikörpers im Western-Blot konnte gezeigt werden (Abb. 7): Nach Galactosylierung der Dsf-Proteine ist im Vergleich zu den nicht galactosylierten Dsf-Proteinen eine zwar nicht vollständige aber signifikante Reduktion der Immunintensität mit dem RL2 sichtbar (Abb. 7A, Spur1). Ebenso ist nach Galactosylierung die GlcNAc-BSA Bande mit dem RL2 Antikörper kaum noch nachweisbar (Abb. 7, Spur 4). Dass

Galactosylierung stattgefunden hat, läßt sich aus dem höheren Molekulargewicht von GlcNAc-BSA herleiten (Abb. 7B, Spur 3 und 4). Während das Molekulargewicht von GlcNAc-BSA im nicht galactosylierten Zustand ca. 66 kDa beträgt, konnte nach Galactosylierung ein deutlich höheres Molekulargewicht von ca. 84 kDa festgestellt werden. Bei den Banden unterhalb von 84 kDa handelt es sich um die eingesetzte Galactosyltransferase mit einem Molekulargewicht von 55 kDa und vermutlich um entsprechende Abbauprodukte. In insgesamt 3 Versuchen wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

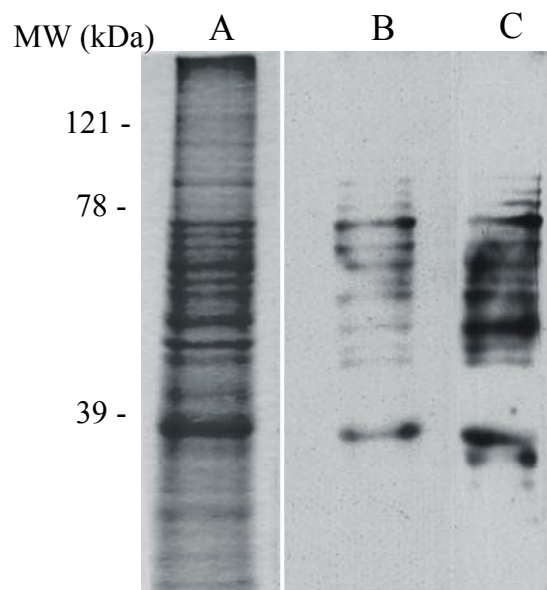


Abb. 8 Vergleich zwischen RL2 und MUD50 Antikörper im Western-Blot. A Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit 50 µg Dsf-Proteinen. B,C Western Blot Analyse mit jeweils 50 µg Dsf-Proteinen. O-GlcNAc Proteine wurden mit dem monoklonalen Mausantikörper RL2 (B) und dem Mausascites MUD50 (C) im Western-Blot detektiert. Die apparenten Molekulargewichte (MW) sind am linken Rand dargestellt. Es wurde ein Gel mit den Maßen 8 cm x 7 cm x 0,15 cm verwendet.

Das von den beiden Antikörpern RL2 und MUD50 detektierte Bandenmuster der Dsf O-GlcNAc Proteine ist annähernd gleich (Abb. 8B und C). Auffällig ist die prominente Bande bei ca. 39 kDa, die von beiden Antikörpern detektiert wurde. Der MUD50 erkennt zusätzlich unterhalb von 39 kDa zwei weitere Proteinbanden. Eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an Dsf-Proteine oder GlcNAc-BSA konnte nicht festgestellt werden (nicht gezeigt). Somit konnte die O-GlcNAc Spezifität des RL2 Antikörpers, der in den nachfolgenden Versuchen eingesetzt wurde, nochmals bestätigt werden.

Anschließend wurden je 50 µg Dicf- und Dsf-Proteine von Alzheimer und Kontrollgewebeproben gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.8). Die Proben wurden je dreifach aufgetragen. Ein Teil des Gels wurde mit Coomassie-Blau gefärbt (2.2.10), mit dem anderen Teil wurde ein Western-Blot durchgeführt (2.2.14). Als Negativkontrolle wurde die Bindung des Zweitantikörpers an die Proteine getestet.

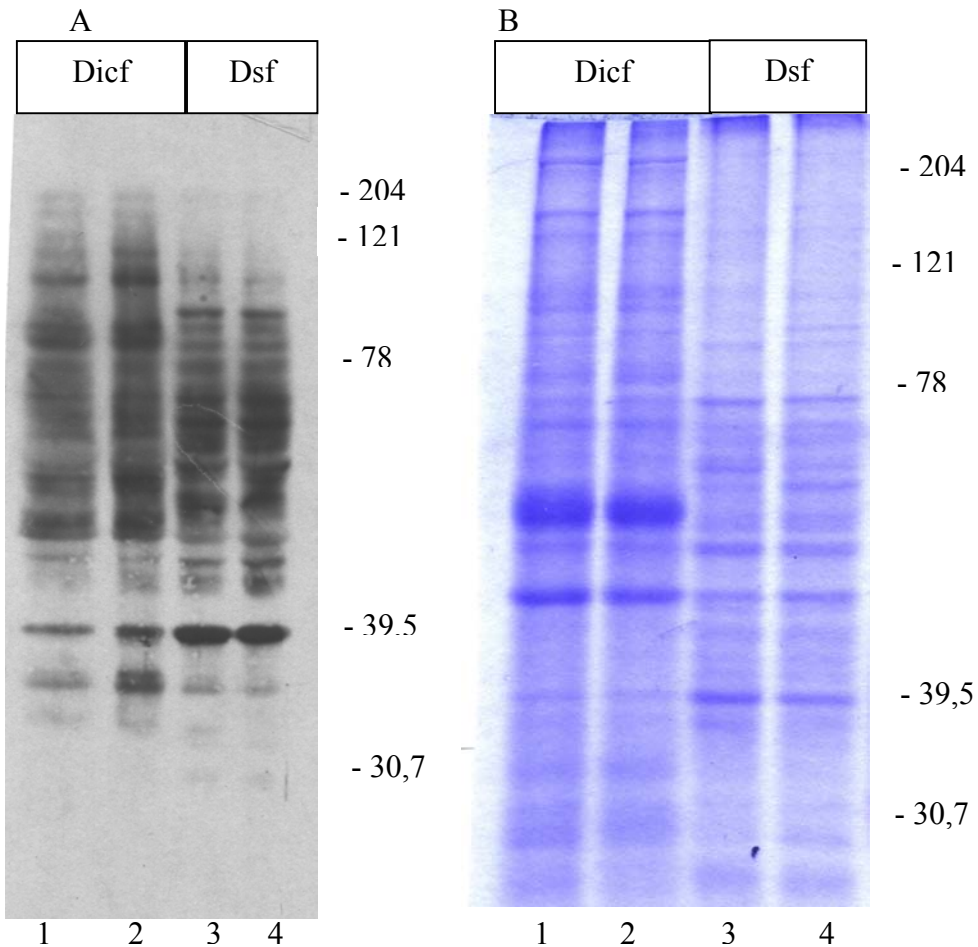


Abb. 9 Vergleich der mit O-GlcNAc modifizierten Dsf/Dicf-Proteine einer Frontallappenprobe eines Kontrollpatienten (K79) mit denen eines Alzheimerpatienten (AD21). **A** Western-Blot-Analyse mit je 50 µg Dicf- (Spur 1) und Dsf- (Spur 3) Proteine einer Frontallappenprobe eines Alzheimerpatienten bzw. je 50 µg Dicf- (Spur 2) und Dsf- (Spur 4) Proteine einer Frontallappenprobe eines Kontrollpatienten. O-GlcNAc Proteine wurden mit dem RL2 Antikörper und POD gekoppelten Zweitantikörper mittels Chemilumineszens detektiert. Rechts ist das MW in kDa angegeben.

B Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit je 50 µg Dicf-(Spur 1) und Dsf-(Spur 3) Proteine einer Frontallappenprobe eines Alzheimerpatienten bzw. je 50 µg Dicf-(Spur 2) und Dsf-(Spur 4) Proteine einer Frontallappenprobe eines Kontrollpatienten. Rechts ist das MW in kDa angegeben.

Es wurde ein Gel mit den Maßen 17 cm x 17 cm x 0,15 cm eingesetzt.

Beim Vergleich der Dsf/Dicf-Proteinen von AD- und Kontrollproben sind nach SDS-PAGE und Western-Blot folgende Ergebnisse erkennbar: Anhand des unterschiedlichen Proteinbandenmusters können Dsf- und Dicf-Proben eindeutig voneinander unterschieden werden (Abb. 9A und B). Es können keine Unterschiede in der Signalstärke des O-GlcNAc-Antikörper zwischen den Dsf-Proteinen der AD- und Kontrollprobe festgestellt werden. Dies bestätigt das ELISA-Ergebnis dieses Probenpaares, das ebenfalls keinen signifikanten Unterschied aufwies. Die Dicf-Proteine der AD- und Kontrollprobe zeigen hingegen im Gegensatz zur quantitativen ELISA-Analyse keine Unterschiede der O-GlcNAc Antikörperfärbung hinsichtlich des Proteinbandenmusters oder der Bandenintensität. Auffällig ist eine stark gefärbte Bande im Bereich von 39 kDa, die sowohl bei den Dicf- als auch bei den Dsf-Proteinen auftrat. Die Signalstärke der Banden der Dicf-Kontrollprobe erscheinen stärker als die der analogen Proteinbande der AD-Probe. Eventuell handelt es sich dabei um einen Stauchungseffekt, da die Spur mit der Kontrollprobe schmaler verläuft als die mit der AD-Probe beladene Spur.

Es wurden weitere Western-Blots mit Parietallappen- und Frontallappenproben durchgeführt. Diese zeigen jedoch alle keine Unterschiede zwischen AD- und Kontrollprobe hinsichtlich der O-GlcNAc Expression (nicht gezeigt).

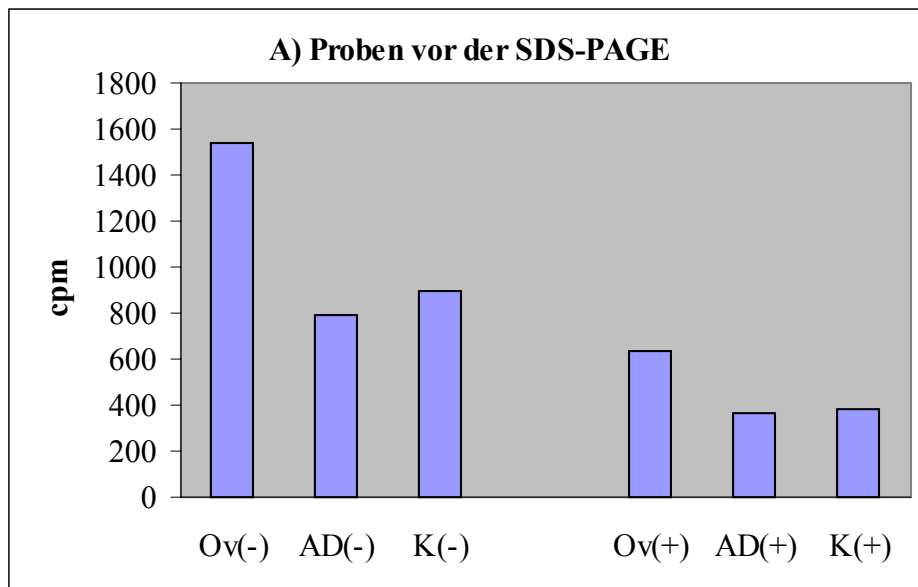
3.1.4 O-GlcNAc Nachweis mittels Galactosyltransferase-Assay mit UDP-(³H)-Galactose

Nachdem mit Hilfe der Western-Blot-Analysen keine Unterschiede hinsichtlich der O-GlcNAc Expression zwischen Proben von AD- und Kontrollpatienten festgestellt werden konnten, wurde die sensitivere Galactosyltransferase/UDP (³H)-Galactose Methode angewandt, bei der O-GlcNAc Reste spezifisch radioaktiv markiert werden, so dass eine O-GlcNAc Detektion im subpicomolaren Bereich möglich sein sollte (2.2.6). Nach Übertragung der UDP-(³H)-Galactose mit Hilfe der Galactosyltransferase auf O- und N-GlcNAc Reste der Proteine werden die N-glykosidisch gebundenen Zucker mit PNGase F abgespalten. Nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese können die radioaktiv markierten Proteine mittels Autoradiographie detektiert werden. Alternativ kann die Radioaktivität nach Zerteilen des Gels in kleine Stücke im Szintillationszählers gemessen werden.

Als Proben wurden wiederum frisch präparierte Dicf-Proteine derselben Frontallappenproben verwendet, die bereits im Western-Blot (3.1.3) eingesetzt wurden. UDP-(³H)-Galactose (4

μCi) wurde mit Hilfe der Galactosyltransferase auf O- und N-GlcNAc Reste der zu markierenden Dief-Proteine der eingesetzten Proben übertragen. Die N-glykosidisch gebundenen Zucker wurden mit Hilfe des Enzyms PNGase F abgespalten. Als Kontrollprotein wurde Ovalbumin, das mit N-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden modifiziert ist, die überwiegend am nicht-reduzierenden Ende GlcNAc besitzen, radioaktiv galactosyliert und ebenfalls mit PNGase F behandelt. Es wurden je zweimal 50 μg galactosylierte und 50 μg galactosylierte, aber nicht mit PNGase F behandelte Dief-Proteine und 10 μg galactosyliertes und 10 μg galactosyliertes aber nicht mit PNGase F behandeltes Ovalbumin gelelektrophoretisch aufgetrennt. Vor der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde jeweils 1/5 des Probenvolumens in einem Szintillationszähler gemessen. Während der eine Teil des Gels mit Coomasie-Blau gefärbt wurde, wurde der andere Teil einer bis zu vierwöchigen Autoradiographie unterzogen. Dieser Versuch wurde dreimal wiederholt.

Da auch nach vier Wochen außer dem radioaktiven Standard kein weiteres Bandenmuster auf dem Röntgenfilm erkennbar war (nicht gezeigt), wurden weitere 3 unabhängige Versuche durchgeführt, bei denen wiederum ein Teil des Gels mit Coomassie-Blau gefärbt wurde, jedoch der andere Teil mit denselben Proben entlang der Laufstrecke der Proben in Gelstücke von 1 cm Länge zerteilt wurde. Die Radioaktivität der Gelstücke wurde im Szintillationszähler gemessen.



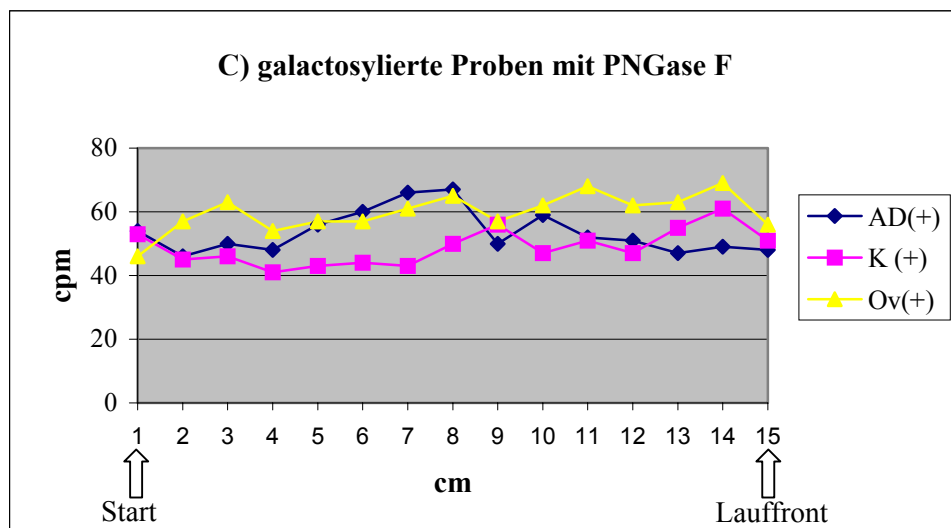
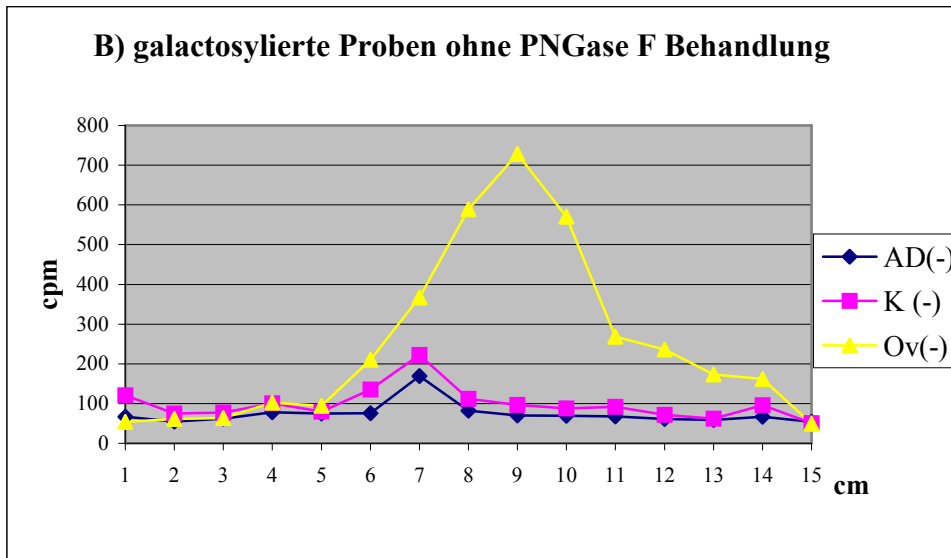


Abb. 10: Galactosyltransferase-Assay mit radioaktiver UDP-(^3H)-Galactose. Die O- und N-GlcNAc Reste von Dief-Proteinen von AD-Frontallappengewebebeobproben (AD21) und Kontroll-Frontallappengewebebeobproben (K79) sowie Ovalbumin wurden mittels Galactosyltransferase mit radioaktiver UDP (^3H)-Galactose markiert. Anschließend wurden die N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide mit Hilfe der PNGase F abgespalten. Nach SDS-PAGE wurde entlang der Laufstrecke der Proben das Gel in 1 cm große Gelstücke zerteilt, die anschließend im Szintillationszähler gemessen wurden. **A)** Messung der Proben vor der SDS-PAGE; **B)** galactosylierte Proben ohne Behandlung mit PNGase F **C)** galactosylierte Proben mit PNGase F Behandlung: B und C zeigen die cpm Werte der Gelstückchen nach SDS-PAGE. Abkürzungen: Ov=Ovalbumin; AD=Alzheimer Demenz, K=Kontrolle; “-“=ohne PNGase F Behandlung; “-” =ohne radioaktiver UDP (^3H)-Galactose, “+“=mit PNGase F Behandlung. Es wurde ein Gel mit den Maßen 17 cm x 17 cm x 0,15 cm eingesetzt. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von 3 Versuchen.

Dass die Abspaltung der N-Glykane mit PNGase F erfolgreich verlaufen ist, zeigt Abb. 10. Zumindest bei der Kontrollprobe Ovalbumin, das viele N-GlcNAc Reste aufweist, konnte vor Auftragung auf das Gel (10A) eine ca 60%ige Reduktion der Radioaktivität nach PNGase F Behandlung festgestellt werden. Nach SDS-PAGE konnte bei dem herausgeschnittenen De-N-glykosylierten Gelstück, das analog zu der mit Coomassie-Blau gefärbten 60 kDa Ovalbumin Bande 9 cm von dem Start der Laufstrecke entfernt lokalisiert war, diese deutliche Reduktion der Radioaktivität bestätigt werden (Abb. 10B u. C). Dieser Wert liegt nur geringfügig oberhalb der Hintergrundstrahlung (Gelstück ohne Probe= 30 cpm).

Die Unterschiede zwischen den Werten der Alzheimer- und Kontrollproben nach Abspaltung der N-Glykane erscheinen nicht signifikant (Abb. 10A u. C). Vor Abspaltung der N-Glykane weisen die Gelstückchen sowohl der AD- als auch der Kontrollprobe 7 cm von dem Start der Laufstrecke entfernt einen erhöhten cpm Wert auf, der aber nach PNGase F Behandlung verschwindet. Dieser Versuchsansatz wurde wiederum dreimal durchgeführt. Jeder Versuch für sich zeigte dieselben nicht signifikanten Unterschiede zwischen AD- und Kontrollproben. Aufgrund der unterschiedlichen Lauflängen der verschiedenen Gele können die Ergebnisse der Radioaktivität der jeweiligen 1 cm langen Gelstücke der drei Versuche nicht zusammengefasst werden. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse eines repräsentativen Versuches dargestellt.

So konnten mit den Proben, die zur Verfügung standen, weder mit der Western-Blot-Analyse noch mit der Galactosyltransferase Methode Proteinbanden von AD-Dicf-Proteine identifiziert werden, die im Vergleich zu Kontroll-Dicf-Proteinen Unterschiede hinsichtlich der O-GlcNAc Modifikation aufweisen.

3.2 O-GlcNAc Modifikation des humanen Amyloid Precursor Proteins (APP)

Griffith et al. konnten 1995 erstmalig die O-GlcNAc Modifikation eines Membranproteins in murinen Kleinhirnneuronen nachweisen. Dabei handelte es sich um das Amyloid Precursor Protein (APP), dessen proteolytische Degradation vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit spielt (1.2.1). In den nachfolgend beschriebenen Experimenten sollte die O-GlcNAc Modifikation des humanen APP695 untersucht werden.

3.2.1 Untersuchung des humanen APP in Hirngewebeproben im Hinblick auf O-GlcNAc

APP wurde aus Homogenaten (2.5.8) humaner Frontallappenproben von Alzheimer Patienten und Kontrollpersonen (Tabelle 2) mit dem monoklonalen anti-APP Maus-Antikörper 8E5 immunpräzipitiert. Der humanspezifische 8E5 Antikörper erkennt die N-terminale Peptidsequenz 444-592 des APP695 (Abb. 16A). Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western-Blot wurde APP mit dem 8E5 Antikörper nachgewiesen. Die O-GlcNAc Immundetektion erfolgte mit dem monoklonalen RL2 Antikörper.

Abb. 11 zeigt eine exemplarische Western-Blot-Analyse. Neben einer vermutlich unspezifischen Bande unterhalb von 200 kDa konnten APP spezifische Banden mit einem Molekulargewicht zw. 100-140 kDa nachgewiesen werden. Dies stimmt auch mit den Beobachtungen von Selkoe et al. überein, dessen Arbeitsgruppe bereits 1988 in humanem Hirngewebe mit einem gegen den C-Terminus von APP gerichteten Antikörper Banden zwischen 110-135 kDa detektieren konnte. Der RL2 Antikörper reagiert mit zwei präzipitierten Proteinen mit ca. 110 kDa und 120 kDa (Abb. 10 mit Pfeilen markiert) und mit einer weiteren Bande außerhalb des APP Molekulargewichtsbereichs unterhalb von 200 kDa.

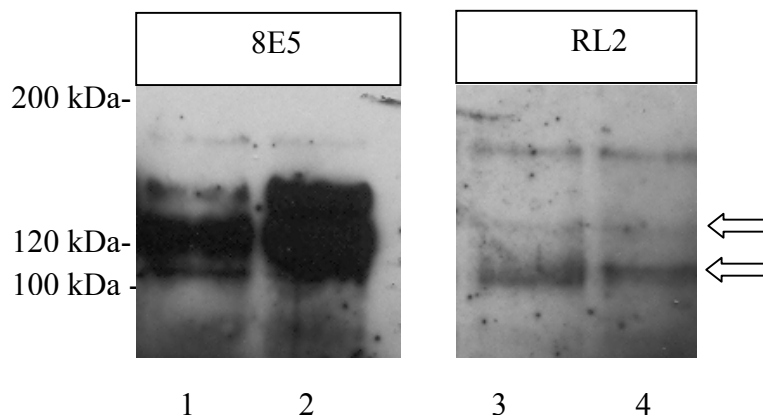


Abb. 11 Western-Blot-Analyse der O-GlcNAc Modifikation von humanem APP aus Hirnhomogenaten. Frontallappenproben von einem Alzheimerpatienten (Spur 1 und 3: AD51) und einer Kontrollperson (Spur 2 und 4: Ko58) wurden mit einem detergenshaltigen Puffer homogenisiert. APP wurde aus dem Gewebesolubilisat immunpräzipitiert, und nach SDS-PAGE im Western-Blot mit den monoklonalen Antikörpern 8E5 und RL2 sowie POD-gekoppelten Zweitantikörper mittels Chemilumineszenz immundetektiert. Es wurde ein Gel mit den Maßen 17 cm x 17 cm x 0,15 cm eingesetzt. Die Pfeile deuten auf die immundetektierten O-GlcNAc Banden. Die apparenten MW sind am linken Rand dargestellt.

3.2.2 Untersuchung der O-GlcNAc Modifikation von humanem APP in stabil transfizierten N2a-Zellen

Die in Abb. 10 dargestellten APP Banden mit unterschiedlichen Molekulargewichten beruhen vermutlich auf unterschiedlicher Glykosylierung von APP. APP ist ein Sialoglykoprotein und besitzt neben O-GlcNAc und O-glykosidischen Oligosaccharidketten ebenfalls zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen (Griffith et al., 1995; Tomita et al., 1998; Pahlsson et al., 1992). Während die intrazelluläre, ER-residente APP Form mannosereiche Oligosaccharide aufweist, ist der dominierende Typ der APP Form, die zur Plasmamembran transportiert und nach Sekretasespaltung sekretiert wird, mit komplexen Oligosacchariden versehen. Es gibt Hinweise darauf, dass Beeinflussungen der Glykosylierungen Auswirkungen auf die APP Prozessierung haben. So führt die Inhibition der Reifung der N-Glykosylierung mit dem Mannosidase Inhibitor Swainsonine zu einer Abnahme der Translokation von APP aus dem perinukleären Raum zur Zelloberfläche (Mc Farlane et al., 1999). Da bekannt war, dass die unreife ER-residente Form ein niedrigeres apparentes Molekulargewicht besitzt als die komplex glykosylierte Form (ca. 110 kDa) und diese Bande im Western-Blot (Abb. 11) die stärkste O-GlcNAc Modifizierung aufzuweisen scheint, sollte untersucht werden, ob sich die O-GlcNAc Modifikation von APP durch Swainsonine *in vitro* beeinflussen lässt. Dazu wurden Zellen des A3 Zellklon eingesetzt. Hierbei handelt es sich um N2a-Zellen, die bereits stabil mit der cDNA des humanen APP695 transfiziert worden waren (Weggen, 1996) und freundlicherweise von Dr. T. Bayer (Institut für Neuropathologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt wurden. *In vitro* kann der O-GlcNAc Stoffwechsel der Zellen direkt durch Zugabe entsprechender Substanzen beeinflusst werden. Um die Abspaltung von O-GlcNAc zu hemmen und somit den Nachweis zu erleichtern, wurden die Zellen ein Tag nach der Aussaat mit 40 μ M PUGNAc behandelt und darauf für weitere 48 h kultiviert. PUGNAc (O-(2-acetoamido-2-deoxy-D-glucopyranosyliden) amino-N-phenylcarbamat)) inhibiert die O-GlcNAcase, das O-GlcNAc abspaltende Enzym (Haltiwanger et al., 1998). Zur Anreicherung der unreifen APP Form im Golgi-Apparat wurden die Zellen in einem weiteren Ansatz für 48 h mit 2 μ g/ml Swainsonine behandelt. In einem dritten Ansatz wurden die Zellen 48 h mit 2 μ g/ml Swainsonine und 40 μ M PUGNAc inkubiert. Im Kontrollversuch blieben die Zellen unbehandelt. APP wurde mit dem 8E5 Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate der Zellhomogenate jeweils zweier T75 Zellkulturflaschen wurden zusammen aufgearbeitet, über SDS-PAGE aufgetrennt und APP im Western-Blot mit dem monoklonalen Maus anti-APP Antikörper W02 (Abb. 16A), der die N-terminale Peptidsequenz des APP Spaltprodukts

Aß erkennt und somit auch das transmembrane APP, und dem RL2 Antikörper immundetektiert.

Abb. 12 zeigt einen repräsentativen Western-Blot. Die Molekulargewichte der mit dem W02 Antikörper detektierten Proteine entsprechen denen bereits schon von z.B. von Thinakaran et al. beschriebenen “reifen” (ca. 115 kDa) bzw. “unreifen” (ca. 105 kDa) APP695 Formen, die als Doppelbande zwischen 100-120 kDa auftreten (Thinakaran et al., 1996). Das höhere Molekulargewicht der “reifen” APP Form resultiert daraus, dass es komplexe N- und O-Glykane enthält, während die “unreife” Form ausschließlich die ER-spezifischen oligomannosidischen N-Glykane trägt. Da der für die Immunpräzipitation eingesetzte 8E5 Antikörper nicht mit endogenem Maus-APP reagiert, muß es sich bei den beiden immundetektierten Proteinbanden um Formen des humanen APP695 handeln.

Beim Vergleich der nicht behandelten Zellen mit den Zellen, die mit Swainsonine bzw. mit Swainsonine+PUGNAc behandelt wurden, ist ein Unterschied hinsichtlich der exprimierten APP Menge zu beobachten, wobei die untere Bande, die die unreife Form repräsentiert, erwartungsgemäß nach Swainsonine Behandlung an Stärke zunimmt. Mit dem RL2 Antikörper konnte nicht nur die O-GlcNAc Modifikation zweier Banden in Höhe der APP Doppelbande, sondern noch eine weitere dritte Bande mit einem höheren Molekulargewicht (ca. 120 kDa) als das der “reifen” Form nachgewiesen werden. Ob es sich dabei um eine weitere Glykosylierungsform von APP handelt, die nicht von dem W02 Antikörper erkannt wird, ging hieraus nicht hervor. Die Intensität der mit dem RL2 detektierten Banden ist je nach Behandlung der Zellen unterschiedlich.

Der Versuch wurde insgesamt 6 mal durchgeführt. Jedesmal konnte die höchste Bandenintensität bei den mit PUGNAc und Swainsonine behandelten Zellen festgestellt werden.

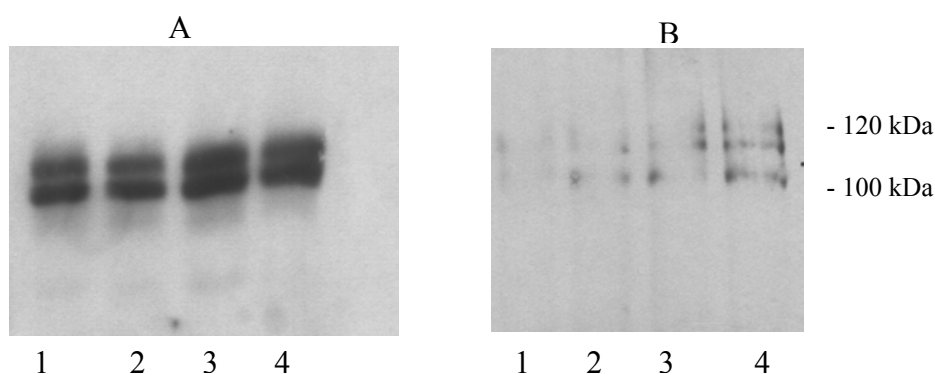


Abb. 12 Western-Blot-Analyse von APP nach Immunpräzipitation aus Zellsolubilisaten mit PUGNAc und/oder Swainsonine behandelter humanes APP exprimierender N2a-Zellen. Die Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für weitere 48 h entweder in Anwesenheit von 40 μ M PUGNAc (Spur 2) oder 2 μ g/ml Swainsonine (Spur 3) oder PUGNAc+Swainsonine (Spur 4) bzw. unbehandelt (Spur 1) kultiviert. APP wurde aus dem Zellsolubilisat immunpräzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit dem W02 (A) oder RL2 (B) Antikörper sowie POD-gekoppelten Zweitantikörper mittels Chemilumineszenz detektiert. Die apparenten MW sind am rechten Rand angegeben. Es wurde ein Gel mit den Maßen 17 cm x 17 cm x 0,15 cm eingesetzt.

3.2.3 Untersuchung der O-GlcNAc Modifikation des C-Terminus von APP

3.2.3.1 APP Expression in *Xenopus* Oocyten

Der C-Terminus von APP weist 5 Ser- bzw. Thr-Reste auf, die mit O-GlcNAc modifiziert sein könnten (Abb. 16A). Es wurden mögliche O-Glykosylierungen von zwei Aminosäureresten, Ser655 und Ser675, analysiert: Ser655, das sich innerhalb einer Sequenz eines Internalisierungssignals (YTSI) befindet, kann *in vitro* durch Proteinkinase C und Calmodulin-abhängige Proteinkinase II und *in vivo* durch APP-Kinase I phosphoryliert werden und könnte gemäß der Yin-Yang Hypothese von G. Hart potentiell mit O-GlcNAc modifiziert sein (Lai et al., 1995; Oishi et al., 1997; Isohara et al., 1999; Cheng und Hart, 2001). Die Phosphorylierung bzw. mögliche Glykosylierung von Ser655 könnte nicht nur die Internalisierung von APP, sondern ähnlich wie Tyr653 auch die Bindung von PAT1 an das YTSI Motiv beeinflussen (Zheng et al., 1998). Ser675 ist ebenfalls Bestandteil eines längeren Sequenzabschnittes des C-Terminus von APP, an den Fe65 und APP-BP1 sowie das G0 Protein binden können (1.2.3).

Hierzu sollten humane APP695 Formen, bei denen diese Serine gegen Alanine ausgetauscht waren, sowie der APP Wildtyp in *Xenopus* Oocyten exprimiert und dann auf O-GlcNAc Modifizierung untersucht werden. Verwendet wurden die cDNA der humanen APP695 Wildtypform (freundlicherweise von Prof. Selkoe (Harvard University, Boston) zur Verfügung gestellt) und zwei weitere cDNAs mit den entsprechenden Mutationen (freundlicherweise von Prof. T. Suzuki (School of Pharmaceutical Science, University of Tokio) zur Verfügung gestellt). Jede der drei cDNA Formen lag bereits kloniert im Expressionsvektor PCMV vor. Nach Amplifikation der jeweiligen cDNA in *E. coli* und cDNA Aufreinigung wurde zur Überprüfung ein Kontrollverdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen durchgeführt (nicht gezeigt).

Je 2,3 ng cDNA wurden pro Oocyte injiziert. Nach metabolischer Markierung der Oocyten mit 20 μCi ^{35}S -Methionin wurden die Oocyten homogenisiert. APP wurde als Immunpräzipitat mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes APP (8E5) aus diesem Extrakt isoliert (2.4.2-2.4.5). Zum Nachweis der O-GlcNAc Modifikation wurde parallel dazu eine Immunpräzipitation mit einem monoklonalen O-GlcNAc Antikörper (RL2) durchgeführt. Es wurde erwartet, eine Bande im Molekulargewichtsbereich von APP mittels Autoradiographie detektieren zu können. Zum Vergleich wurden jeweils nicht injizierte Kontroll-Oocyten verwendet. Für die Immunpräzipitationen wurden gleiche Proteinmengen eingesetzt. Die Immunpräzipitate wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch (2.2.13) analysiert.

Sowohl die APP Wildtypform als auch die beiden APP Mutanten konnten in *Xenopus* Oocyten exprimiert werden (Abb. 13, 1, 3, 5). Obwohl bekannt ist, dass *Xenopus* Oocyten Proteine auch O-GlcNAc tragen (Miller et al., 1999), konnten nach Immunpräzipitation mit dem RL2 Antikörper keine Proteine nachgewiesen werden. Die Versuche konnten nicht wiederholt werden, da Probleme bei der Haltung der Frösche auftraten und keine Oocyten mehr gewonnen werden konnten.

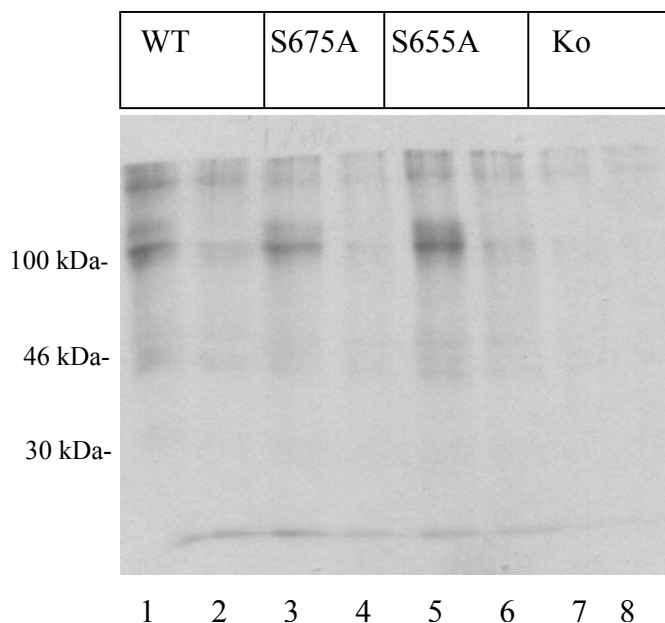


Abb. 13 Autoradiographische Analyse von APP Immunpräzipitaten aus Oocytenhomogenaten. Nach Injektion von Wildtyp APP cDNA (WT) und APP cDNA, bei denen die Aminosäuren Ser675 (S675A) bzw. 655 (S655A) gegen Alanin ausgetauscht worden waren, wurden nach Inkubation der Oocyten mit ^{35}S Methionin Immunpräzipitationen mit dem 8E5 (1,3,5,7) und dem RL2 Antikörper (2,4,6,8) durchgeführt. Zum Vergleich wurden entsprechend die Homogenate nicht injizierter Oocyten verwendet (Ko 7, 8). Die Immunpräzipitate wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. Es wurde ein Gel mit den Maßen 8 cm x 7 cm x 0,15 cm verwendet. Die apparenten MW sind am linken Rand dargestellt.

3.2.3.2 Nachweis des C-Terminus in SPA4CT-SH-SY5Y-Zellen

Bei der proteolytischen APP Spaltung durch die β - bzw. α -Sekretase entstehen neben dem N-terminalen APP_{sc} und $\text{APP}_{\text{s}\beta}$ auch C-terminale Fragmente, die durch die γ -Sekretase weiter zu $\text{A}\beta$ bzw. einem 3 kDa Fragment P3 und C59 prozessiert werden können (Abb. 3). Für die Untersuchung der O-GlcNAc Modifikation des C-Terminus standen Zellen der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y zur Verfügung, die stabil den C-Terminus von APP695 als Transmembranpeptid exprimieren und freundlicherweise von Dr. T. Hartmann (Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt worden waren. Diese Zellen waren stabil mit dem Vektorkonstrukt SPA4CT transfiziert worden (Dyrks et al., 1993) und werden im folgenden als SPA4CT Zellen bezeichnet. Der SPA4CT Vektor besteht aus einem pCEP4 Expressionsvektor, in den die Sequenz des C-Terminus des humanen APP695 mit der $\text{A}\beta$ Sequenz, einem Signalpeptid und einem Spacerpeptid mit den Aminosäuren Leucin/Glutamat kloniert worden war.

Zunächst wurde die Expression des C-Terminus in den SPA4CT Zellen überprüft und zwar mittels indirekter Immunfluoreszenz und im Western-Blot mit dem humanspezifischen monoklonalen Maus-Antikörper W02.

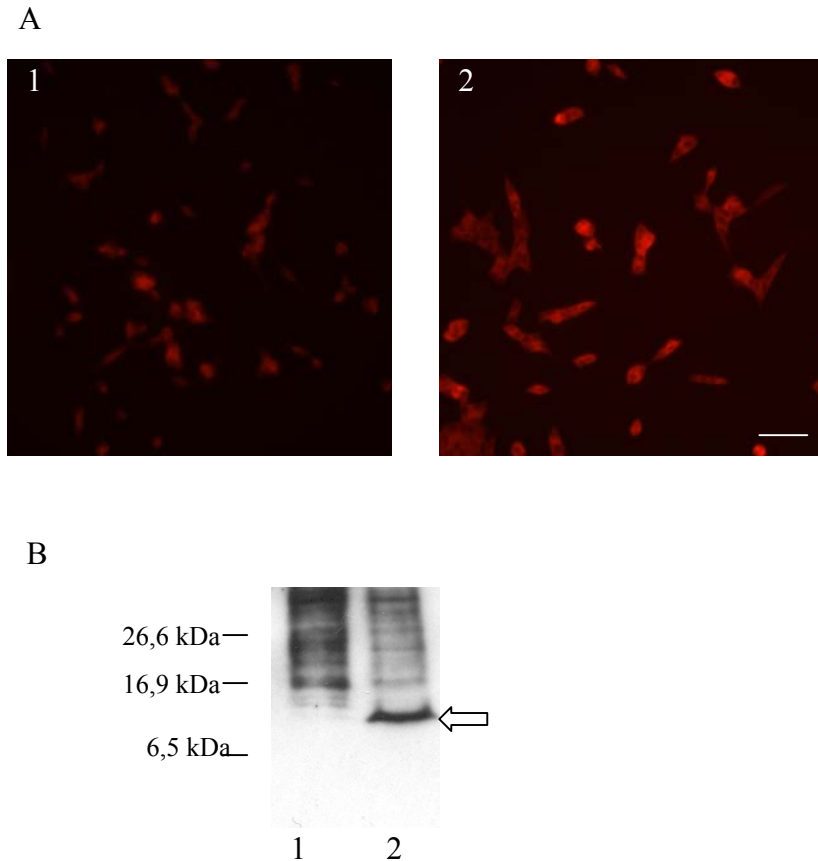


Abb. 14 Nachweis des C-Terminus in SPA4CT-SH-SY5Y Zellen. SH-SY5Y Zellen (1) und SPA4CT SH-SY5Y Zellen (2) wurden 24 h kultiviert. Der C-Terminus wurde intrazellulär mittels indirekter Immunfluoreszenz mit dem monoklonalen Antikörper W02 detektiert (A) oder nach Proteinauftrennung der Zellsolubilisate mit SDS-PAGE unter Verwendung eines 10-20% Tris-Tricine Mini-Gels (ca. 8 cm x 7cm x 0,15 cm) im Western-Blot mit dem W02 Antikörper (B) sowie POD-gekoppelten Zweitantikörper mittels Chemilumineszenz detektiert. Für die Western-Blot-Analyse wurden pro Spur jeweils gleiche Proteinmengen (15 µg) aufgetragen. Die apparenten MW sind am linken Rand dargestellt. Der Pfeil markiert die Bande des in SPA4CT Zellen überexprimierten C-Terminus. Der Balken (in A2) entspricht 10 µm.

Für die Auftrennung der Zellhomogenate mit Hilfe der SDS-PAGE wurden 10-20% Tris-Tricine Gele eingesetzt, die zur Auftrennung kleinerer Proteine geeignet sind (2.2.9). Im Western-Blot konnte bei den SPA4CT Zellen eine im Vergleich zu den SH-SY5Y Parentalzellen auffällig intensiv markierte Bande zwischen 12-14 kDa, die dem zu erwartenden Molekulargewicht des SPA4CT Proteins von 12 kDa (Dyrks et al., 1993) entsprach, detektiert werden (Abb. 14B, Pfeilmarkierung). Im Vergleich dazu zeigen die SH-SY5Y Parentalzellen in diesem Molekulargewichtsbereich eine nur sehr schwache Bande. Die

indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit dem W02 Antikörper bestätigte dieses Ergebnis. Die SPA4CT Zellen zeigen eine deutlich stärkere intrazelluläre Färbung als die Parentalzellen (Abb. 14A), die wie zu erwarten aufgrund endogener APP Expression ebenfalls mit dem humanspezifischen W02 Antikörper reagiert.

3.2.3.3 Analyse der O-GlcNAc Modifikation des SPA4CT Produkts im Western-Blot

Zur Analyse der O-GlcNAc Modifikation des C-Terminus wurde der C-Terminus aus SPA4CT Zellhomogenaten, die zuvor mit bzw. ohne PUGNAc kultiviert worden waren, mit Hilfe des monoklonalen Mausantikörpers 13G8, der im C-Terminus von APP die Peptidsequenz 676-695 erkennt (Abb. 16A), immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western-Blot mit dem W02 bzw. RL2 Antikörper detektiert.

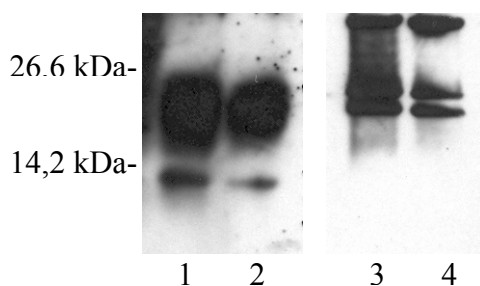


Abb. 15 Analyse der O-GlcNAc Modifikation des C-Terminus im Western-Blot. SPA4CT-Zellen wurden 24 h nach der Aussaat für weitere 48 h in Anwesenheit (Spur 1 und 3) bzw. in Abwesenheit (Spur 2 und 4) von 40 μ M PUGNAc kultiviert. Der C-Terminus wurde aus SPA4CT Zellhomogenaten mit dem gegen den C-Terminus gerichteten monoklonalen 13G8 Antikörper immunpräzipitiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Immunpräzipitate in einem 10-20% Tris-Tricine Mini-Gel wurden sie im Western-Blot mit dem W02 (Spur 1 und 2) bzw. RL2 Antikörper sowie POD-gekoppelten Zweitantikörper mittels Chemilumineszenz (Spur 3 und 4) analysiert. Die apparenten MW sind am linken Rand dargestellt.

Während der C-Terminus unterhalb der 14,2 kDa Bande des Molekulargewichtstandards mit dem W02 Antikörper detektiert wurde (Abb. 15, Spur 1 und 2), konnten keine entsprechenden Banden mit dem RL2 Antikörper nachgewiesen werden. Unterhalb der 26,6 kDa Bande des Molekulargewichtstandards sind Banden des Antikörpers zu erkennen, mit dem die Immunpräzipitation durchgeführt worden ist (Abb. 15, Spur 1-4).

3.2.3.4 Isolierung des C-Terminus von APP aus SPA4CT SH-SY5Y Zellsolubilisaten

Nachfolgend sollte der in SPA4CT Zellen überexprimierte C-Terminus isoliert und in Kooperation mit Dr. B. Cole (John Hopkins School of Medicine, Baltimore) massenspektrometrisch mit der Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) auf O-GlcNAc untersucht werden. Hierzu wurden Zell-Solubilisate von mit PUGNAc behandelten SPA4CT Zellen (2.5.8) zunächst mit dem gegen den N-Terminus von APP gerichteten 8E5 Antikörper vorimmunpräzipitiert, um APP Holoprotein auszufällen. Für die Immunpräzipitation wurden Zellsolubilisate verwendet, die aus 10 T175 Zellkulturflaschen mit je ca. $2,5 \cdot 10^8$ Zellen gewonnen wurden. Mit der einen Hälfte des Überstands wurden weitere Immunpräzipitationen mit dem W02 Antikörper durchgeführt und mit der anderen Hälfte mit dem monoklonalen Mausantikörper 13G8, der gegen das Epitop 676-695 von humanem APP695 gerichtet ist und im Gegensatz zum W02 Antikörper auch C-terminale Fragmente nach Abspaltung des A β Peptids erkennt (Abb. 16A). Um die Subpopulation der mit O-GlcNAc modifizierten C-Terminus Peptide isolieren zu können, wurden nach Elution der Immunpräzipitate mit 5M NaSCN und darauffolgender Dialyse gegen PBS mit Detergens aus den Eluaten O-GlcNAc Proteine immunpräzipitiert (2.2.7). Hierzu wurde diesmal ein neuer ebenfalls gegen das O-GlcNAc Epitop gerichteter monoklonaler Mausantikörper CTD verwendet, der gegen ein synthetisches Peptid mit einem Ser-O-GlcNAc Rest hergestellt worden war (Comer et al., 2001). Die Immunpräzipitate wurden gelelektrophoretisch in einem 10-20 prozentigen Tris-Tricine Gel aufgetrennt, das anschließend einer Silberfärbung unterzogen wurde (2.2.11). Aus dem mit Silber gefärbten Gel wurden zweimal jeweils drei Banden, die ein Molekulargewicht von ca. 12-14 kDa aufwiesen, und ein weiteres ungefärbtes Gelstück zur Kontrolle ausgeschnitten. Nach entsprechender Präparation der Gelstücke für die MALDI-Messung (2.2.12) wurden die Proben A (3 Banden der Spuren 1-3, Abb. 16), B (3 Banden der Spuren 5-7, Abb. 16) und C (Kontrollgelstück) zu Dr. B. Cole geschickt, der nach Trypsinverdau die Fragmente mit Hilfe von ESI-MS massenspektrometrisch untersuchte.

Die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie beruht auf dem Prinzip der Dispersion einer Flüssigkeit in sehr viele kleine geladene Tröpfchen mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes. Hierbei bewirkt der Elektrospray Prozess eine definierte Ionisation und komplette Desolvatisierung von in Lösung versprühten Analytmolekülen. Zur Messung der Molekülmasse wurde das Elektrospray-Verfahren erstmals von M. Dole und seinen Mitarbeitern durchgeführt (Dole et al., 1968). Der Vorteil von ESI-MS gegenüber anderen O-

3. Ergebnisse

GlcNAc Nachweismethoden liegt darin, dass diese Methode sehr sensitiv ist und der genaue Aminosäurerest des Proteins bestimmt werden kann, der mit O-GlcNAc modifiziert ist.

A



B

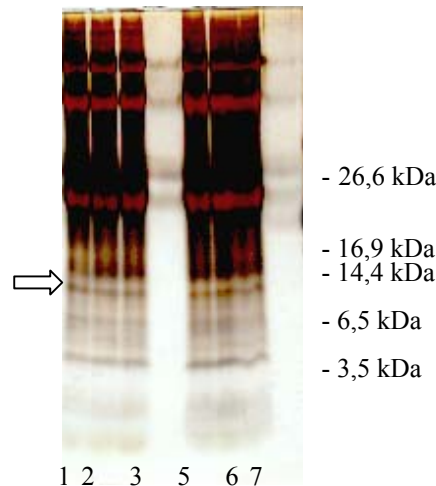
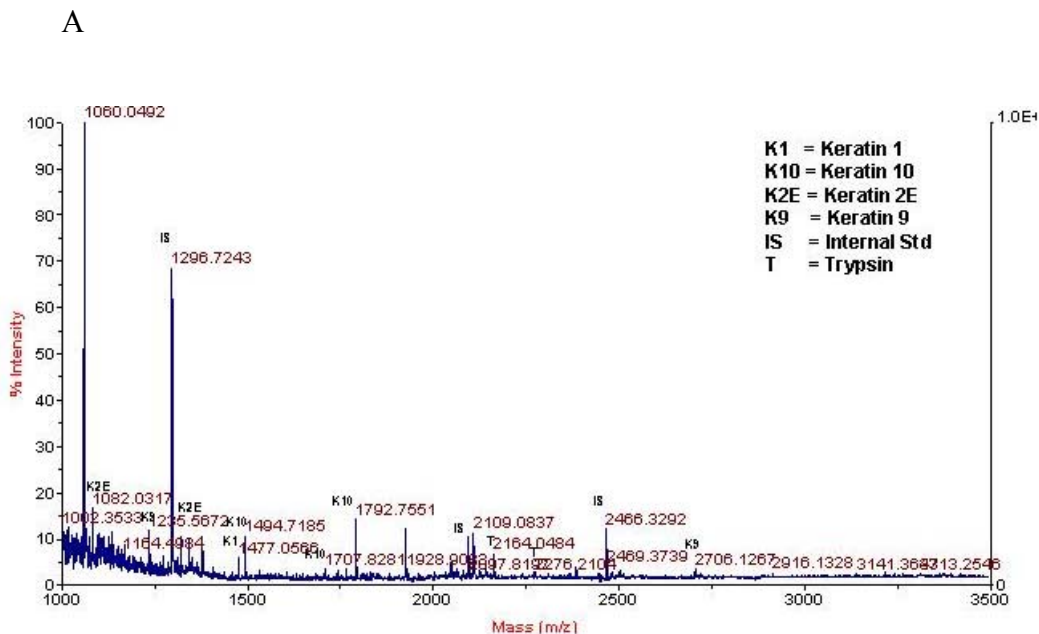


Abb. 16 Isolierung von Banden mit dem Molekulargewicht des C-Terminus aus einem Silbergel. A) Darstellung der durch die Antikörper 8E5 (AS 444-592), W02 (AS 661- 664) und 13G8 (AS 676-695) erkannten Peptidsequenzen von humanem APP695. Die AS-Sequenz des C-Terminus einschließlich der Aminosäuresequenz A β ₁₋₄₂ (fett gedruckt) ist grau schattiert dargestellt. Die potentiell mit O-GlcNAc modifizierten Serin- u. Threoninreste sind rot markiert. B) Silbergel: Nach Immunpräzipitation aus SPA4CT-SH-SY5Y-Zellsolubilisaten mit dem 8E5 Antikörper wurden mit dem Überstand weitere Immunpräzipitationen entweder mit dem W02 (Spur 1-3) oder mit dem 13G8 Antikörper (Spur 5-7) durchgeführt. Anschließend wurden nach Eluierung mit NaSCN und Dialyse aus den Eluaten O-GlcNAc modifizierte Proteine mit dem monoklonalen CTD Antikörper immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden in einem 10-20% Tris-Tricine Mini-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt, das anschließend mit Silber gefärbt wurde. Die mit einem Pfeil markierten 2x3 (Probe A und B) sichtbaren Banden unterhalb der 14 kDa Bande des Molekulargewichtsstandards sowie ein neutrales Kontrollgelstück (Probe C) wurden ausgeschnitten und nach entsprechender Vorbereitung in Kooperation mit Dr. B. Cole (John Hopkins School of Medicine, Baltimore) mit ESI-MS massenspektrometrisch untersucht (Abb. 17). Die apparenten MW sind am rechten Rand dargestellt.

3. Ergebnisse

Nach den Ergebnissen der ESI-MS Messung (Abb. 17) weisen die Proben A und B starke Kontaminationen mit Keratinen auf. Es konnten keine C-Terminus Peptidsequenzen identifiziert werden. Ein weiterer Versuch wurde unter möglichst keratinfreien Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurden u.a. die verwendeten Glaswaren sowie Handschuhe vor der Benutzung in eine 0,5% SDS-Lösung eingetaucht. Es wurde nur eine Immunpräzipitation mit dem W02 Antikörper durchgeführt, um einen Proteinverlust zu vermeiden. Die gebundenen Proteine wurden statt mit NaSCN mit 0,5% SDS eluiert. Nach einem Filtrationsschritt, bei dem Moleküle unter 30 kDa konzentriert wurden, wurden die Filtrate gefriergetrocknet und anschließend nach Aufnahme in Probenpuffer gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend mit einer kolloidalen Coomassie-Blau Lösung gefärbt. Wiederum wurden Banden im Molekulargewichtsbereich zwischen 12-14 kDa ausgeschnitten und für die Massenspektrometrie vorbereitet. Die Ergebnisse der ESI-MS Analyse waren jedoch wiederum negativ: Es konnten keine C-Terminus Fragmente detektiert werden. Die Proben waren immer noch mit Keratin verunreinigt (nicht gezeigt).



3. Ergebnisse

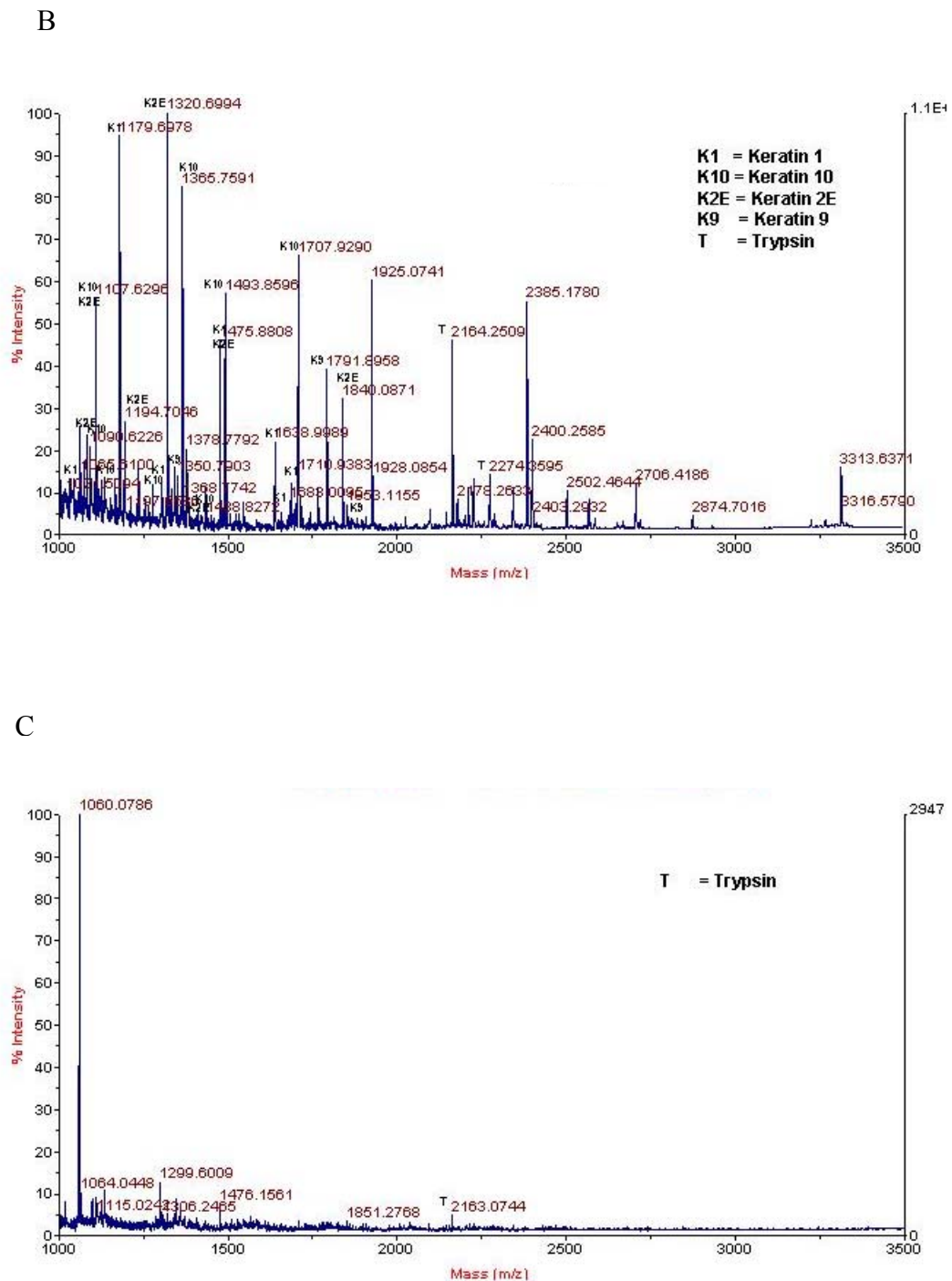


Abb. 17 ESI-MS-Spektrum der Proben A, B und C. Proben A (3 Banden der Spuren 1-3, Abb. 16), B (3 Banden der Spuren 5-7, Abb. 16) und C (Kontrollgelstück) wurden in Kooperation mit Dr. B.Cole (John Hopkins School of Medicine, Baltimore) mit ESI-MS massenspektrometrisch untersucht. Nach Trypsinverdau wurden die identifizierten Peptide bereits bekannten Proteinsequenzen zugeordnet. Dabei handelt es sich beinahe ausschließlich um Keratin- und Trypsinsequenzen.

3.3 Dynamik der O-GlcNAc Modifikation in verschiedenen Nervenzellpopulationen

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit bestand darin, die O-GlcNAc Modifikation und ihre Dynamik in verschiedenen Nervenzellpopulationen u.a. bei neuronalen Differenzierungsvorgängen zu analysieren.

O-GlcNAc konnte in bisher allen daraufhin untersuchten eukaryotischen Zellen nachgewiesen werden (Snow et al., 1998). Hinsichtlich einer potentiellen Bedeutung von O-GlcNAc bei der Alzheimer Demenz stand bei der vorliegenden Arbeit besonders die Untersuchung von neuronalen Zellen im Vordergrund. Die Enzyme, die für die Übertragung oder Entfernung von GlcNAc verantwortlich sind (OGT und OGH), werden besonders stark im Gehirn exprimiert. Im folgenden wird dargestellt, dass sowohl in embryonalen als auch in postnatalen Kleinhirnneuronen eine O-GlcNAc Expression nachweisbar ist und die O-GlcNAc Expression durch Beeinflussung von OGT und OGH manipuliert werden kann.

3.3.1 Postnatale Kleinhirnneuronen

In kultivierten Kleinhirnneuronen konnten Griffith und Schmitz 1999 nachweisen, dass die O-GlcNAcylierung reziprok zur Phosphorylierung verläuft: Nach Aktivierung der Proteinkinase A mit Dibutyrylcyclo-AMP (dbcAMP) und der Proteinkinase C mit Phorbol ester (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat, PMA) sank das O-GlcNAc Niveau der subzellulären Cytoskelettfraktion von Kleinhirnneuronen in der Zellkultur. Nach Zugabe der Kinase-Inhibitoren Bis-Indoylmaleimid (BIM) und KT5720 konnte entsprechend ein O-GlcNAc Anstieg festgestellt werden (Griffith und Schmitz, 1999). Ob die O-GlcNAcylierung auch durch direkte Beeinflussung der daran beteiligten Enzyme manipuliert werden kann, wurde in den nachfolgend beschriebenen Versuchen untersucht.

Kleinhirnneuronen von sieben Tagen alten NMRI Mäusen wurden 24 Stunden nach in Kulturnahme mit 40 μ M PUGNAc oder 40 μ M 6-Diazo-5-Oxonorleucine (DON) behandelt und für weitere 24 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen entweder für Immunfluoreszenzfärbungen mit dem RL2 Antikörper verwendet oder es wurden mit den Zell-Solubilisaten Western-Blot-Analysen mit dem RL2 Antikörper durchgeführt.

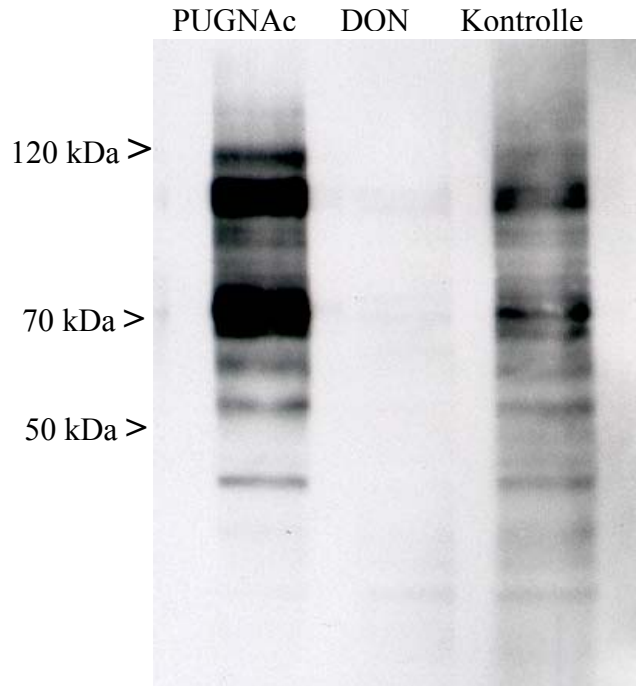


Abb. 18 Western-Blot-Analyse von O-GlcNAc modifizierten Proteinen aus Kleinhirnneuronen nach Behandlung mit DON oder PUGNAc. Postnatale Kleinhirnneuronen wurden in Abwesenheit (Kontrolle) oder in Anwesenheit von 40 μ M DON oder 40 μ M PUGNAc für 24 Stunden kultiviert. Von den Zellsolubilisaten wurden jeweils gleiche Proteinmengen (10 μ g) aufgetragen. O-GlcNAc wurde im Western-Blot mit dem monoklonalen Antikörper RL2 sowie POD-gekoppelten Zweitantikörper mittels Chemilumineszenz detektiert. Es wurde ein Gel mit den Maßen 8 cm x 7 cm x 0,15 cm verwendet. Die apparenten MW sind am linken Rand dargestellt.

Während PUGNAc die O-GlcNAc Hydrolase inhibiert (Haltiwanger et al., 1998), ist DON ein irreversibler Inhibitor der GFAT (Glutamin-Fructose-6-Phosphat Amidotransferase) und hemmt die Glucosaminbildung (Sayeski et al., 1996).

Wie bereits früher schon bei anderen Zelltypen gezeigt wurde (Sayeski et al., 1996; Han et al., 2000, 1997; Liu et al., 2000), konnte nach DON Behandlung auch in Kleinhirnneuronen eine deutlich verminderte O-GlcNAc Expression demonstriert werden. Diese Reduktion resultiert aus der durch Inhibition der GFAT verringerten Menge an UDP-GlcNAc, dem Substrat der OGT. Im Gegensatz dazu führt die kompetitive Inhibition der O-GlcNAc Hydrolase mit PUGNAc zu einem Anstieg der O-GlcNAc Expression. Diese Veränderungen der O-GlcNAc Menge konnten mittels indirekter Immunfluoreszenz (nicht gezeigt, Rex-Mathes et al., 2001) und Western-Blot-Analyse gezeigt werden (Abb. 18). Die meisten O-GlcNAc positiven Banden des Western-Blots reagierten auf die Behandlung der Zellen entweder mit DON oder PUGNAc entsprechend mit einer deutlichen Reduktion (kaum noch sichtbare Banden) oder

mit einem starken Anstieg der Intensität der Immunreaktivität. Eine verlängerte Behandlung der Zellen mit DON (> 24 h) schien die Lebensfähigkeit der Zellen zu reduzieren (nicht gezeigt). Wurden die Neuronen länger als 24 h mit PUGNAc behandelt, konnte keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit oder morphologische Veränderungen festgestellt werden.

Neben der bereits früher in murinen Kleinhirnneuronen demonstrierten durch Beeinflussung von Kinasen oder Phosphatasen reziprok zur Phosphorylierung verlaufenden O-GlcNAcylierung konnte damit die Dynamik der O-GlcNAc Expression in Gegenwart von DON oder PUGNAc erstmals in Kleinhirnneuronen gezeigt werden.

3.3.2 Pränatale Kleinhirnneuronen

3.3.2.1 O-GlcNAc Expression in embryonalen Kleinhirnneuronen

Es wurden embryonale Kleinhirnneuronen des Tages 17 verwendet, die freundlicherweise von Prof. K. Schilling zur Verfügung gestellt wurden. Die Neuronen wurden für 3 Tage auf Deckgläschen kultiviert und die O-GlcNAc Expression durch indirekte Immunfluoreszenz analysiert. Zur Überprüfung der Vitalität der Zellen wurden die Kerne der Zellen mit dem fluoreszierenden, DNA bindenden Kernfarbstoff H 33258 gefärbt.

Die permeabilisierten Zellen weisen eine auffällig variierende Intensität der RL2 Immunreaktivität auf (Abb. 19A). Während bereits tote Zellen, die an der starken DNA Färbung des kondensierten Kerns zu erkennen sind (Abb. 19B), keine O-GlcNAc Expression aufweisen (Beispiel: Pfeil Nr.2), zeigen lebende Zellen mit gleicher Kernfärbung oft eine deutlich unterschiedliche O-GlcNAc Färbung (Beispiel: Pfeile Nr.1). Da der Zellkern fast den gesamten Zellkörper ausfüllt, ist eine eindeutige Abgrenzung von nukleärer und cytoplasmatischer Immunreaktivität nicht möglich. Vereinzelt sind auch Neuritenansätze gefärbt (Beispiel: Pfeile Nr.3). Hingegen bleiben die Neuriten von der Färbung weitgehend ausgespart.

Um auszuschliessen, dass es sich bei der unterschiedlich starken Immunfärbung um einen Effekt handelt, der auf unvollständiger Permeabilisierung beruht, wurden zwei verschiedene Permeabilisierungsmethoden (Permeabilisierung mit eiskaltem Ethanol oder mit 0,05 % Triton X-100) verwendet, die aber zu identischen Ergebnissen führten (nicht gezeigt). In

nichtpermeabilisierten Zellen konnte keine Immunreaktivität auf der Plasmamembran nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Als weitere Kontrolle wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit einem Calbindin erkennenden Antikörper durchgeführt. Calbindin ist ein Antigen, das nur in einer Subpopulation der Kleinhirnneuronen, in den Purkinje-Zellen, exprimiert wird. In Abb. 20 ist eine typische Calbindinfärbung der Zellkörper von Purkinje-Zellen und ihrer Neuriten sichtbar. Es fällt auf, dass im Vergleich zur O-GlcNAc Immunfärbung die Intensität der Calbindin Immunreaktivität der gefärbten Zellen gleich ist. Stark unterschiedliche Färbungen wie sie für die O-GlcNAc Färbung typisch sind, wurden nie beobachtet. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass nicht eine unzureichende Permeabilisierung ursächlich für die variierende Intensität der O-GlcNAc Immunfärbung sein kann. Im Vergleich zur Gesamtzellzahl ist der Anteil der immunfluoreszenzgefärbten Purkinje-Zellen, die besonders in Zellaggregaten auftreten, sehr gering (Abb. 20 A u. B).

Interessanterweise konnte diese auffällig variierende Intensität der RL2 Immunreaktivität nur bei den embryonalen nicht aber bei den postnatalen Kleinhirnneuronen beobachtet werden (nicht gezeigt, Rex-Mathes et al., 2001).

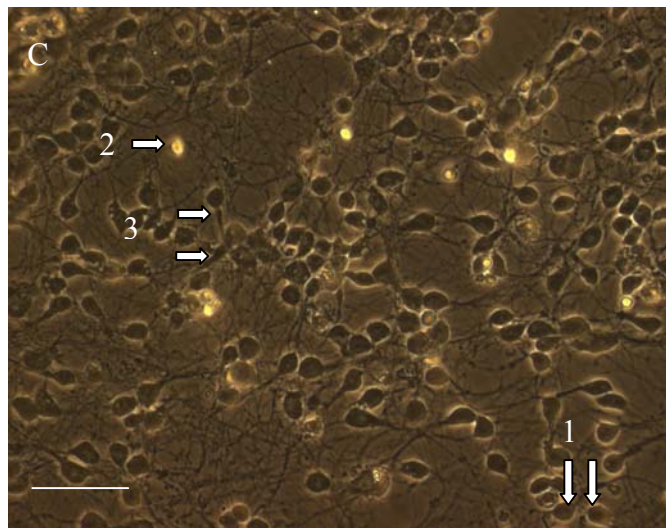
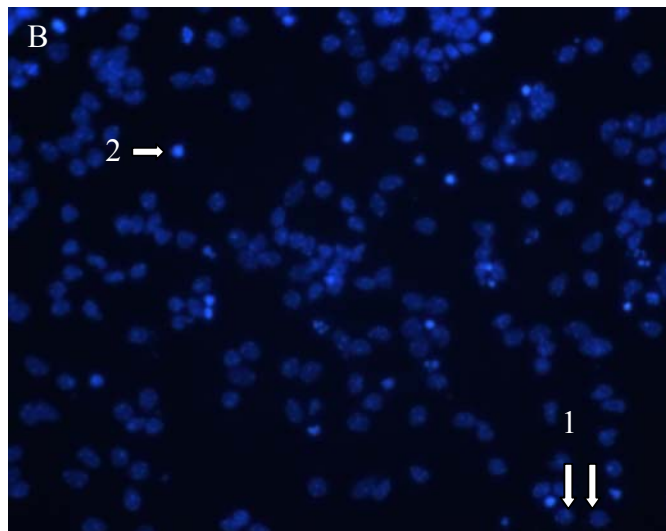
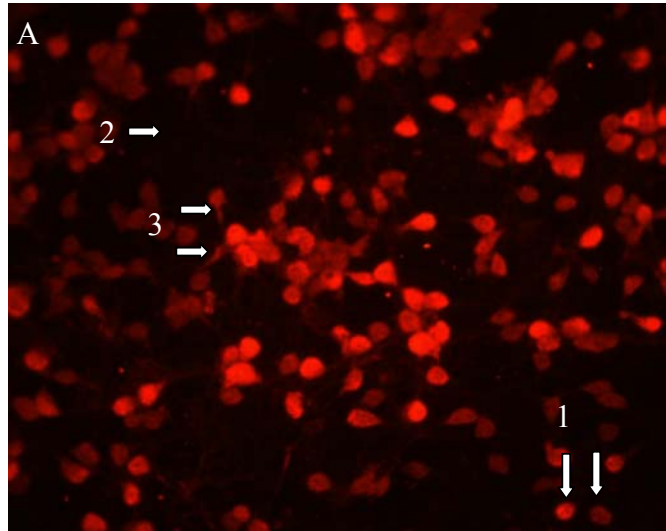


Abb. 19 Detektion der O-GlcNAc Expression in embryonalen Kleinhirnneuronen. Embryonale Kleinhirnneuronen (17. Embryonaltag) wurden für 3 Tage kultiviert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurde eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem RL2 Antikörper und Cy-3 gekoppelten Sekundärantikörper (A) und eine Kernfärbung mit H 33258 (B) durchgeführt. C ist die Phasenkontrastdarstellung von A u. B. Die Pfeile weisen auf Neuronen, die bei gleicher Kernfärbung eine unterschiedliche O-GlcNAc Färbung aufweisen (1) oder tot sind und keine RL2 Färbung mehr zeigen (2) bzw. bei denen die Neuritenansätze gefärbt sind (3). Die O-GlcNAc Färbung betrifft hauptsächlich den Zellkern, der fast das gesamte Zellsoma ausfüllt. Der Balken in C entspricht 50 µm.

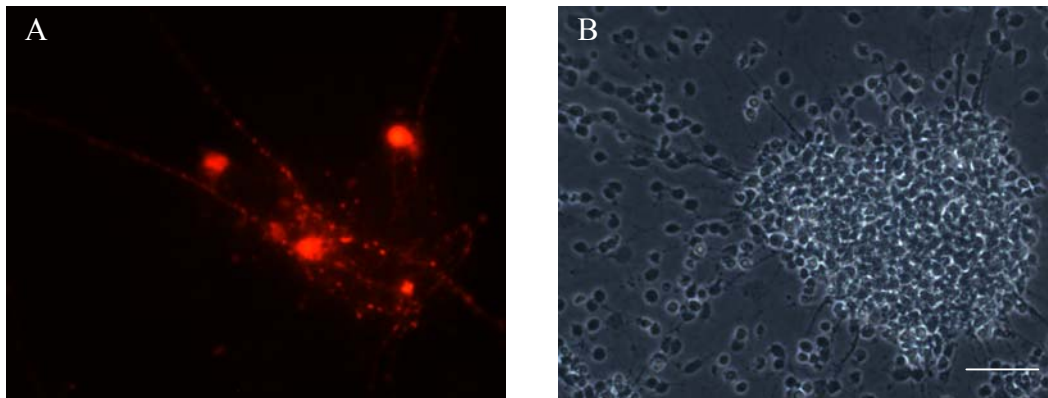


Abb. 20 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von pränatalen Kleinhirnneuronen mit einem für Purkinje-Zellen spezifischen Antikörper. Embryonale Kleinhirnneuronen des Tages 17 wurden 7 Tage kultiviert. Nach Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung mit einem monoklonalen Calbindin spezifischen Mausantikörper sowie einem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper unterzogen. An Hand der zu A gehörenden Phasenkontrastaufnahme B ist zu erkennen, dass im Vergleich zur Gesamtzellzahl der Anteil der immunfluoreszenzgefärbten Purkinje-Zellen (A) gering ist und diese besonders in Zellaggregaten auftreten. Der Balken in B entspricht 50 µm.

3.3.2.2 O-GlcNAc Expression in embryonalen Kleinhirnneuronen nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer

Es wurde untersucht, ob sich die O-GlcNAc Expression während des neuronalen Differenzierungsprozesses in Kultur verändert. Nachdem pränatale Kleinhirnneuronen vom Tag 17 für 3, 5, 7 und 10 Tage in Kultur gehalten wurden, wurde eine indirekte Immunfluoreszenzuntersuchung mit dem RL2 Antikörper und eine Kernfärbung mit H 33258 durchgeführt.

Mit zunehmender Kultivierungsdauer war ein eindeutiger Anstieg toter Zellen zu beobachten, die an den kondensierten mit H 33258 gefärbten Zellkernen zu erkennen sind (Abb. 21B). Während nach 3 und 5 Tagen sowohl Neuronen mit schwacher als auch mit starker Immunreaktivität auftreten, nimmt die Anzahl der Zellen mit geringer Immunreaktivität nach 7 und 10 Tagen deutlich ab (Abb. 21A). Die dann noch übriggebliebenen vitalen Zellen weisen eine einheitlich starke O-GlcNAc Expression auf (Abb. 21: 7 und 8).

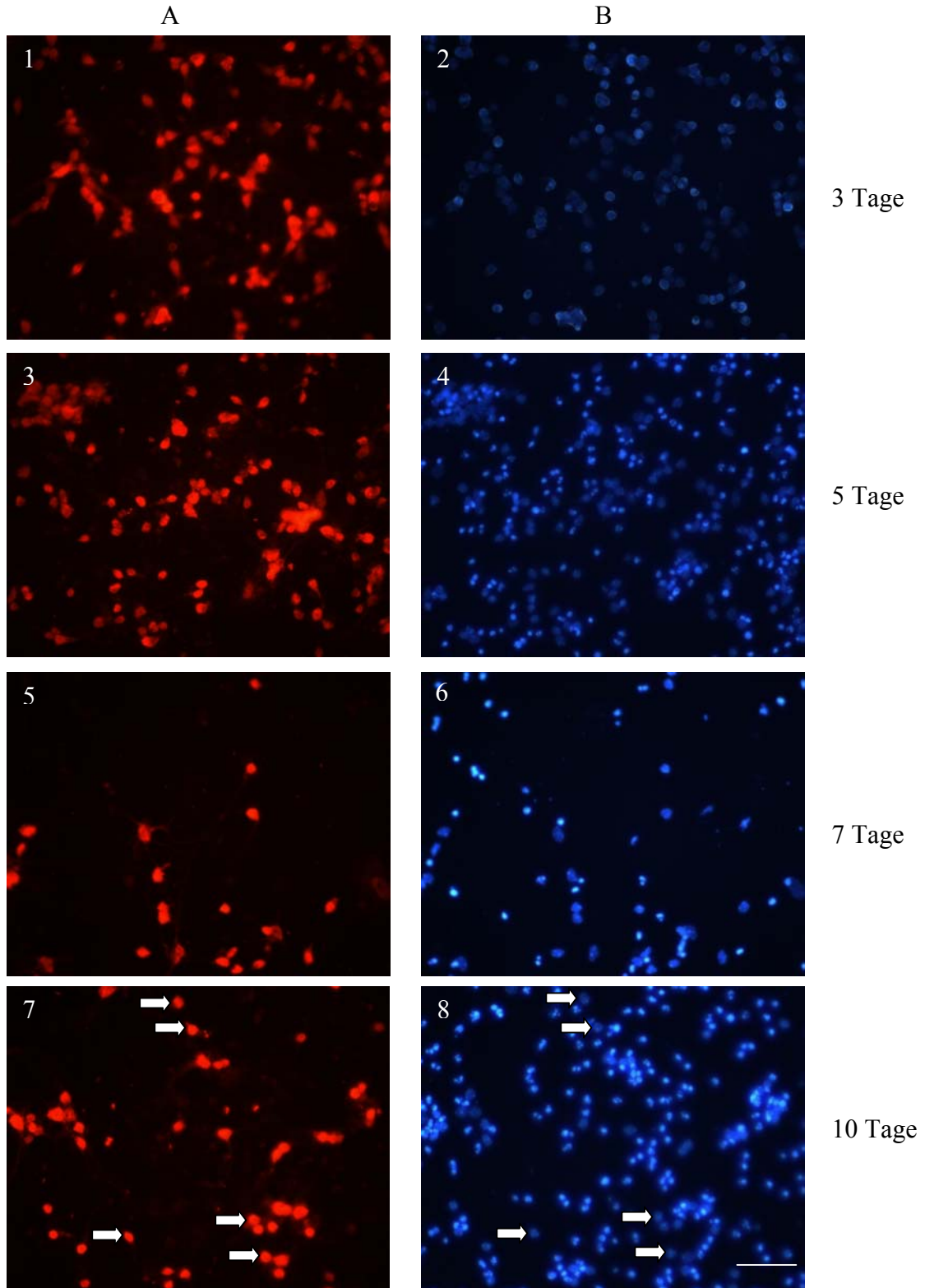


Abb. 21 O-GlcNAc Expression in embryonalen Kleinhirnneuronen nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer. Embryonale Kleinhirnneuronen des Tages 17 wurden für 3 (1, 2), 5 (3, 4), 7 (5, 6) und 10 (7, 8) Tage kultiviert, fixiert und permeabilisiert. Die intrazelluläre O-GlcNAc Expression wurde mit dem RL2 Antikörper und dem Cy3-konjugierten Zweitantikörper mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung analysiert (A). Die Zellkerne wurden mit H 33258 (B) angefärbt. Auffällig ist, dass nach 7- und 10tägiger Kultivierung die Anzahl der toten Zellen zunimmt und die restlichen lebenden Zellen eine homogene starke O-GlcNAc Immunfärbung aufweisen. Mit Pfeilen wurden beispielhaft einige nach 10 Tagen überlebende Zellen markiert, die eine einheitlich starke Immunreaktivität aufweisen. Der Balken in 8 entspricht 50 μm .

3.3.2.2 PUGNAc Behandlung

Embryonale Kleinhirnneuronen wurden für 7 Tage in Kultur gehalten, und für weitere 24 h in Gegenwart von 40 μ M PUGNAc inkubiert.

Während die Intensität der O-GlcNAc Färbung der Zellkörper gleich stark bleibt, kann in Anwesenheit von PUGNAc vereinzelt eine schwache Neuritenfärbung beobachtet werden (Abb. 22).

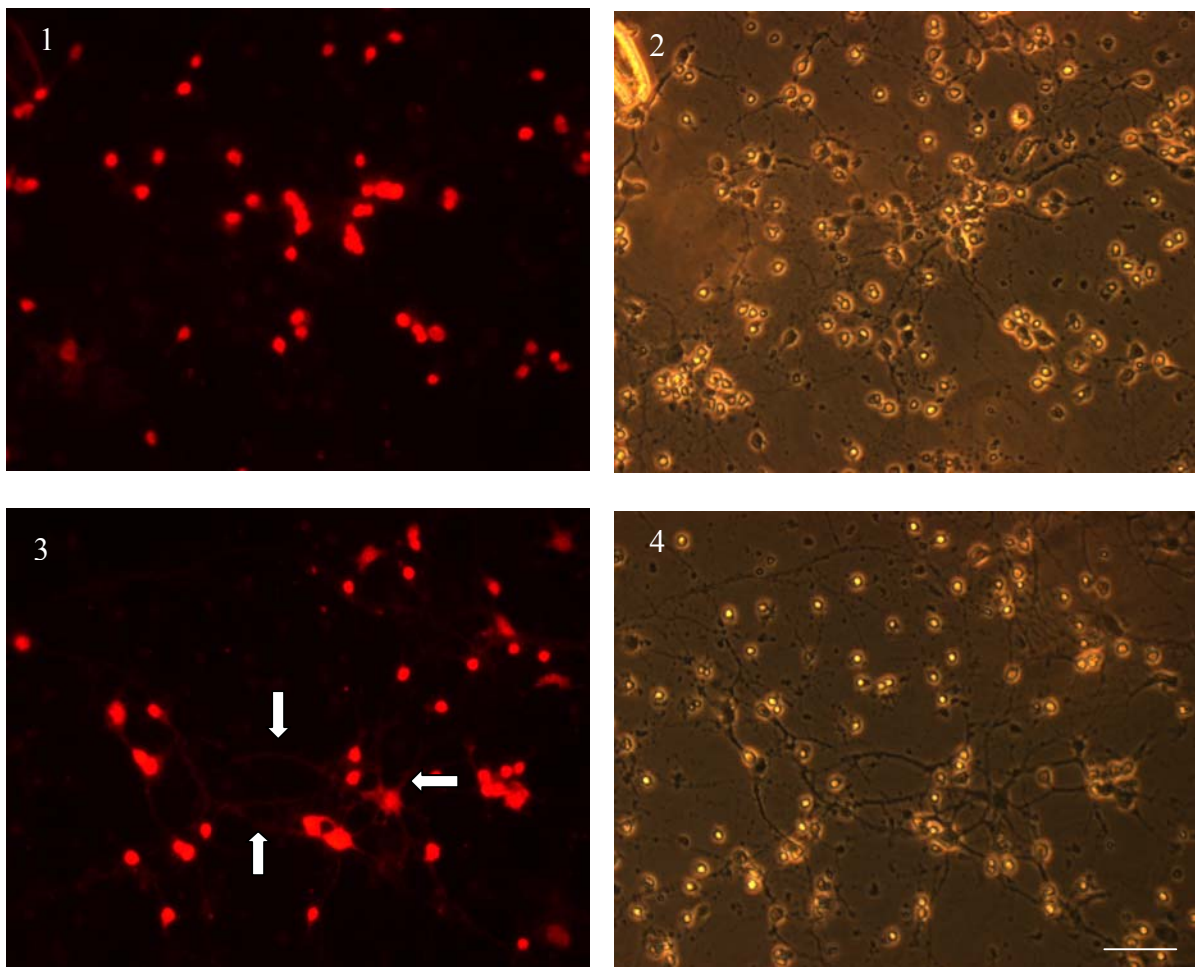


Abb. 22 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von embryonalen Kleinhirnneuronen in Abwesenheit und in Gegenwart von PUGNAc. Pränatale Kleinhirnneuronen wurden 7 Tage in Kultur gehalten. Die Zellen wurden für weitere 24 h mit PUGNAc behandelt (3,4) oder ohne PUGNAc kultiviert (1,2). Die intrazelluläre O-GlcNAc Expression wurde mit dem RL2 Antikörper und dem Cy3-konjugierten Zweitantikörper mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Ein Anstieg des O-GlcNAc Gehalts konnte nicht festgestellt werden, jedoch weisen die Neuriten z. T. eine schwache Immunfärbung auf, von denen einige beispielhaft mit Pfeilen markiert sind. 2 und 4 sind die zu 1 und 3 gehörenden Phasenkontrastdarstellungen. Der Balken in 4 entspricht 50 μ m.

3.3.3 Differenzierung von PC12-Zellen mit NGF

Da eine Reexpression von Zell-Zyklus Proteinen in Gehirnen von Alzheimer Patienten nachgewiesen wurde, stellten u.a. Herrup und Arendt (2002) die Hypothese auf, dass die verstärkte Expression von Zell-Zyklus Proteinen zu einem Wiedereintritt des postmitotischen Neurons aus der G0 Phase in den Zell-Zyklus führt. Diese Dedifferenzierung könnte dann einen apoptotischen Zelltod induzieren und damit ursächlich für den neuronalen Zelltod bei der AD verantwortlich sein.

Über eine Funktion von O-GlcNAc bei solchen Dedifferenzierungsprozessen bzw. auch bei dem umgekehrten Prozess der Zelldifferenzierung ist bisher nichts bekannt. Aber es gibt verschiedene Studien, aus denen eine potentielle Funktion von O-GlcNAc bei der Proliferation und dem Zell-Zyklus hervorgehen (Boehmelt et al., 2000; Fang und Miller, 2001). So konnte nach Aktivierung von Lymphozyten mit dem T-Zellen Mitogen Con-A eine schnelle Veränderung der O-GlcNAc Modifikation von nukleären und cytoplasmatischen Proteinen detektiert werden (Kearse und Hart, 1991).

Zur Untersuchung einer potentiellen Funktion von O-GlcNAc bei neuronalen Differenzierungsprozessen wurden PC12-Zellen, eine Phäochromocytomzelllinie der Ratte (Greene und Tischler, 1976), verwendet. Diese Zelllinie wird häufig als gut etabliertes System zur molekularen Analyse von neuronalen, insbesondere von NGF abhängigen Differenzierungsprozessen verwendet. In Gegenwart neurotropher Faktoren wie z.B. NGF stellen PC12-Zellen die Proliferation ein, und es kommt zur neuronalen Zelldifferenzierung, die u. a. mit Veränderungen der Phosphorylierung von Proteinen einhergeht.

Zur Beantwortung der Frage, ob unter solchen Bedingungen auch eine Veränderung der O-GlcNAc Expression erfolgt, wurden PC12-Zellen 6 Tage auf Deckgläschen in Gegenwart von NGF (50 ng/ml) kultiviert und die O-GlcNAc Expression durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung analysiert.

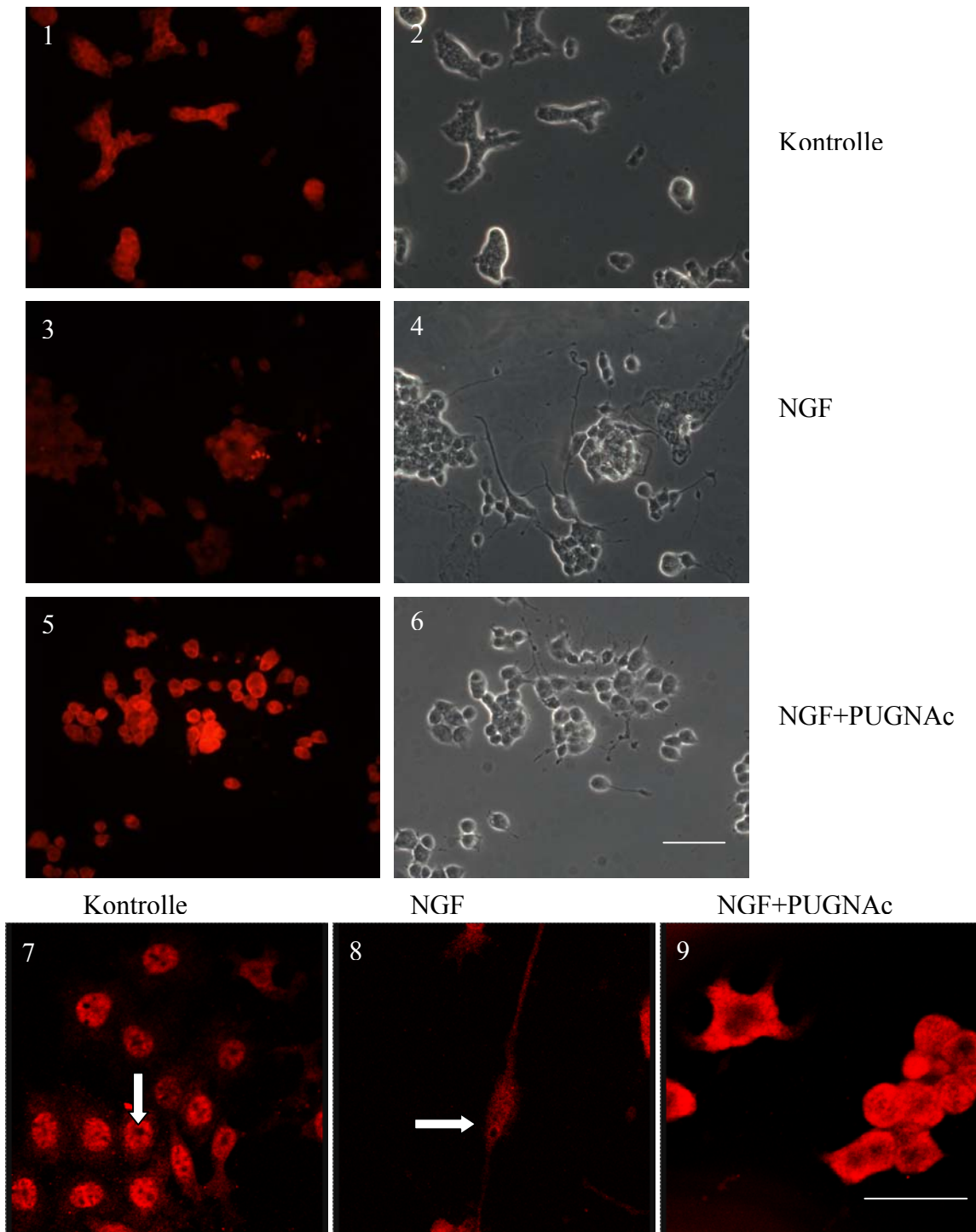


Abb. 23 Detektion von O-GlcNAc in PC12-Zellen nach NGF und NGF+PUGNAc Behandlung. PC12-Zellen wurden 6 Tage in Gegenwart von NGF (50 ng/ml) (3, 4, 8), NGF (50 ng/ml)+PUGNAc (40 μ M) (5, 6, 9), oder in Abwesenheit von NGF und PUGNAc (Kontrolle 1, 2, 3) kultiviert. Die O-GlcNAc Expression wurde licht- (1-6) und konfokalmikroskopisch mit dem RL2 Antikörper und dem Cy3-konjugierten Zweitantikörper mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung untersucht (7-9). 2, 4 und 6 sind die zu 1, 2 und 3 gehörenden Phasenkontrastdarstellungen. In Gegenwart von NGF ist eine deutlich reduzierte O-GlcNAc Immunfärbung im Vergleich zu den unbehandelten Zellen erkennbar. Eine gleichzeitige Behandlung mit NGF und PUGNAc führt nicht zu einer Reduktion der Färbung. Die Pfeile deuten auf nichtgefärbte Nucleoli. Die Balken in 6 und 9 entsprechen 50 μ m.

Während nicht permeabilisierte Zellen keine Immunreaktivität zeigen (nicht gezeigt), konnte bei den permeabilisierten Zellen eine eindeutige intrazelluläre Färbung detektiert werden, die in Gegenwart von NGF eindeutig schwächer gegenüber der Färbung der unbehandelten Zellen ausfällt (Abb. 23: 3/8 und 1/7; Abb. 24: 2/6 und 1/5). Nach 6 Tagen NGF Behandlung haben die meisten Zellen lange Neuriten entwickelt, die aber keine Immunfärbung aufweisen (Abb. 23; Abb. 25). Bei den nicht differenzierten Zellen ist keine Unterscheidung zwischen cytoplasmatischer und Kernfärbung möglich, da der Kern fast das gesamte Zellvolumen ausfüllt (Kernfärbung mit H 33258, nicht gezeigt). Bei den differenzierten Zellen kann der Zellkern mit Hilfe der Kernfärbung eindeutig vom Cytoplasma abgegrenzt werden (Abb. 25). Die nukleäre O-GlcNAc Expression ist stärker als die cytoplasmatische. Sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von NGF bleibt der Nukleolus von der Immunfärbung ausgespart. Dies wird sowohl in Abb. 23 (7 und 8, Pfeile) deutlich als auch in Abb. 25, in der der Nukleolus, der bereits im Phasenkontrast klar zu erkennen ist (Pfeile), keine Färbung erkennen lässt. Von der NGF Behandlung bleibt im Gegensatz zur O-GlcNAc Expression die Expression der O-GlcNAc Transferase, die mit Hilfe des polyklonalen Kaninchenantikörpers AL25 detektiert werden konnte, unbeeinflusst (Abb. 24). Die O-GlcNAc Transferase tritt ebenso wie die O-GlcNAc Modifikation in Cytosol und Nukleus auf. Dementsprechend kann eine Kollokalisierung der O-GlcNAc Transferase mit O-GlcNAc detektiert werden (Abb. 24, 5 u. 6).

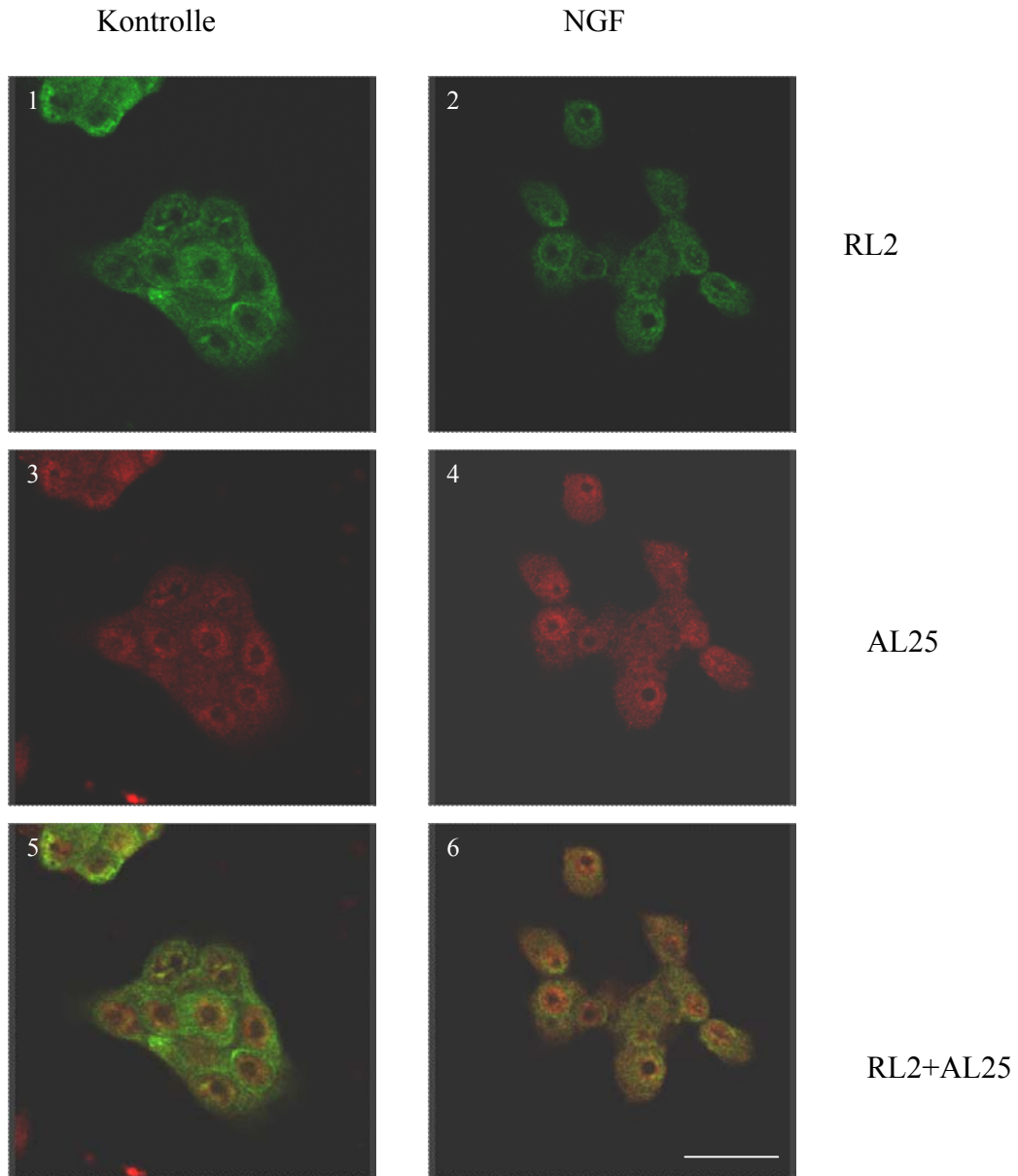


Abb. 24 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse der Expression von O-GlcNAc und der O-GlcNAc Transferase nach NGF Behandlung. PC12-Zellen wurden für 6 Tage in Gegenwart von NGF (2,4,6) kultiviert und die Expression von O-GlcNAc (1,2) sowie der O-GlcNAc Transferase (3,4) wurden mittels Laserkonfokalmikroskopie mit den Antikörpern RL2 und AL25 sowie den DTAF-gekoppelten bzw. Cy-3 gekoppelten Sekundärantikörpern mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. (5, 6) stellen Doppelfärbungen mit den Antikörpern RL2 und AL25 dar. Nach NGF Behandlung (2) nimmt die O-GlcNAc Immunreaktivität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (1) deutlich ab, wohingegen die O-GlcNAc Transferase Expression gleich bleibt (4). Eine Kolokalisation der O-GlcNAc Transferase mit O-GlcNAc ist in 5 und 6 erkennbar. Der Balken in 6 beträgt 50 μm .

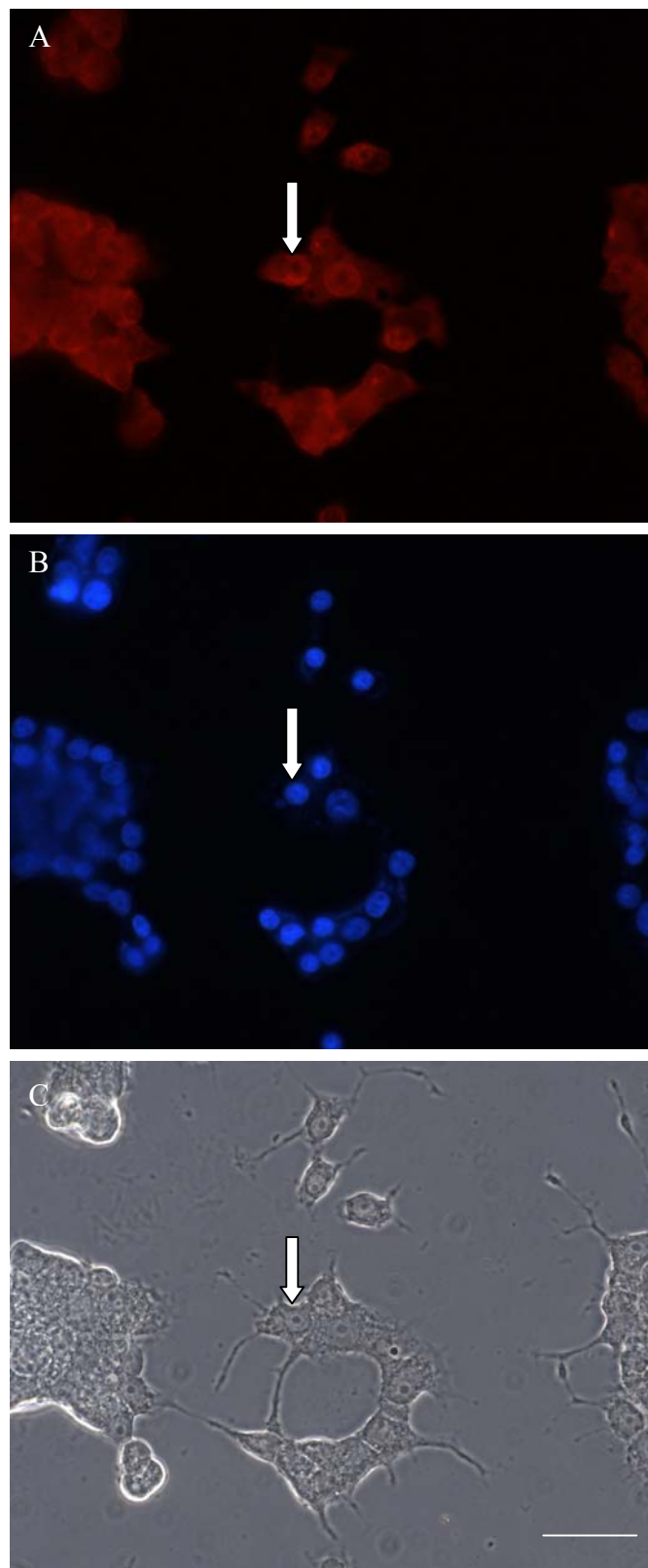


Abb. 25 Detektion von O-GlcNAc in Zellkern und Cytoplasma. PC12-Zellen wurden 6 Tage in Gegenwart von NGF kultiviert. Zusätzlich zu der O-GlcNAc Immunfluoreszenzfärbung mit dem RL2 Antikörper und dem Cy3-gekoppelten Zweitantikörper (A) wurde eine Kernfärbung mit H 33258 durchgeführt (B). Mit dem Pfeil wurde eine Zelle markiert, deren Nukleolus auf der Phasenkontrastaufnahme (C) deutlich als schwarzer Punkt zu erkennen ist. Während der Nukleolus keine Immunreaktivität aufweist, wird beim Vergleich zwischen A und B deutlich, dass außer dem Kern auch das Cytoplasma eine schwache O-GlcNAc Expression aufweist. Der Balken in C entspricht 20 μm .

Die Reduktion der Immunfärbung in Gegenwart von NGF konnte durch eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit NGF und PUGNAc, das kompetitiv die O-GlcNAc Hydrolase inhibiert und dementsprechend einen Anstieg des O-GlcNAc Gehalts in der Zelle bewirkt, verhindert werden (Abb. 24: 5 und 9). Auffällig ist, dass die Neuriten bei mit NGF und PUGNAc behandelten Zellen kürzer erscheinen als die der ausschliesslich mit NGF behandelten Zellen. Diese Beobachtung wurde noch einmal quantitativ in einer Neuritenlängenanalyse mit einem KS100 Zeiss Programm überprüft. Hierzu wurden die Neuritenlängen in Gegenwart von NGF und von NGF+PUGNAc in zwei voneinander unabhängigen Versuchen gemessen. Mit den Messdaten wurde ein U-Test für unabhängige Stichproben nach Wilcoxon, Mann und Whitney durchgeführt.

Aus der Analyse geht hervor, dass die Neuritenlängen der mit NGF+PUGNAc behandelten PC12-Zellen im Vergleich zu den ausschließlich mit NGF behandelten Zellen signifikant kürzer sind ($p < 0,001$). In Abb. 26 wird exemplarisch das Ergebnis eines Versuchs in Form eines Kurvendiagramms vereinfacht dargestellt. Die mit SPSS erstellten Boxplots sind in Abb. 29 im Anhang dargestellt.

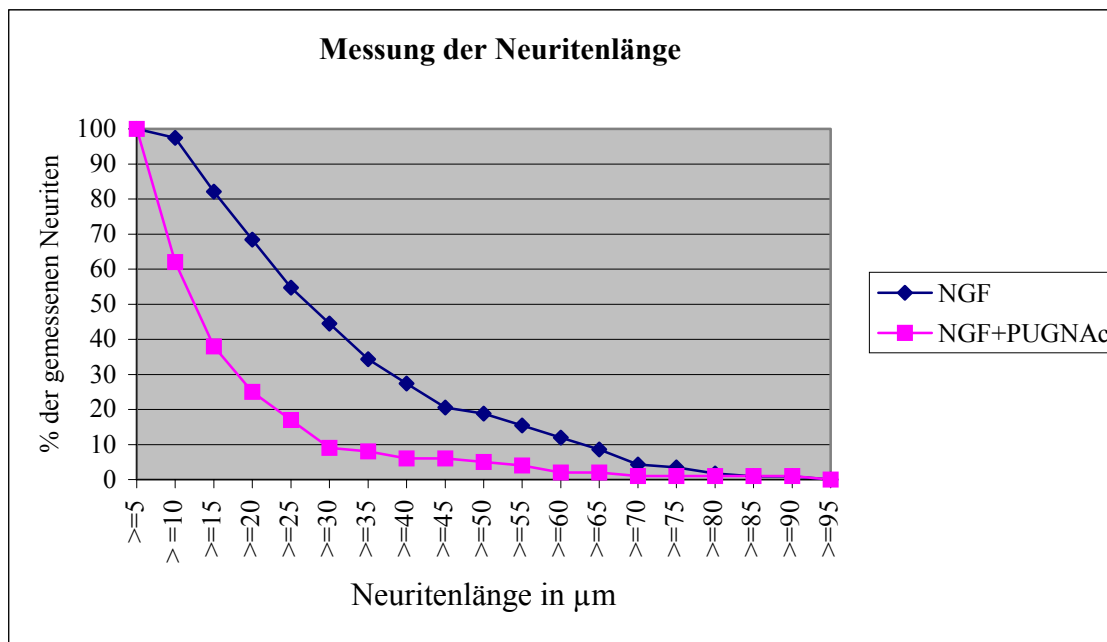


Abb. 26 Messung der Neuritenlängen von mit NGF und mit NGF+PUGNAc behandelten PC12-Zellen. PC12-Zellen wurden 6 Tage in Gegenwart mit NGF (50 ng/ml) bzw. NGF (50 ng/ml)+PUGNAc (40 μM) kultiviert. Anschließend wurde eine quantitative Neuritenlängenanalyse mit dem KS100 Zeiss Programm durchgeführt. In dem dargestellten Versuch wurden 100 Neuriten von mit NGF+PUGNAc und 118 Neuriten von mit NGF behandelten PC12-Zellen ausgemessen. Die Messdaten wurden mit Excel ausgewertet und es wurde ein U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney mit SPSS durchgeführt (Abb. 28 im Anhang). Es ist deutlich erkennbar, dass ein signifikant größerer Anteil der ausschließlich mit NGF behandelten Zellen längere Neuriten aufweist, als die zusätzlich mit PUGNAc behandelten. Die Messpunkte geben die Neuriten (in %) wieder, die eine Länge von mindestens der jeweils auf der x-Achse dargestellten Neuritenlängen haben. Z.B. besitzen 25% der Neuriten der mit NGF und PUGNAc behandelten Zellen eine Neuritenlänge $\geq 20 \mu\text{m}$, während 68% der Neuriten der mit NGF behandelten Zellen dieselbe Mindestlänge aufweisen. Es wurden nur Neuriten von Zellen vermessen, die keinen Kontakt mit anderen Zellen und eine Mindestlänge von $5 \mu\text{m}$ hatten.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, O-GlcNAc Proteine der Hirngewebeprobe von AD-Patienten, die eine verstärkte O-GlcNAc Glykosylierung im Vergleich zu den entsprechenden Proteinen aus dem Gehirn von Kontrollpatienten aufweisen, zu identifizieren. Außerdem sollte die O-GlcNAc Modifikation von APP näher untersucht werden. In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die O-GlcNAc Modifikation und ihre Dynamik in prä- und postnatalen Kleinhirnneuronen untersucht und das Verhalten der O-GlcNAc Expression bei neuronalen Differenzierungsprozessen analysiert. Die Gliederung der Diskussion orientiert sich weitgehend an der des Ergebnisteils.

4.1 Immunologische O-GlcNAc Detektion

Ein Grund dafür, warum die Identifizierung von O-GlcNAc-glykosylierten Proteinen verhältnismäßig langsam voranschreitet, hängt mit der sehr zeitaufwendigen klassischen Detektionsmethode von O-GlcNAc zusammen, bei der eine große Proteinmenge eingesetzt werden muss und die nicht in jedem Labor verfügbar ist. In der vorliegenden Arbeit wurden vor allen Dingen immunologische Nachweismethoden zur Identifikation von mit O-GlcNAc modifizierten Proteinen eingesetzt (Rex-Mathes et al., 2002). Diese Methoden haben zwar nur eine begrenzte Aussagekraft im Vergleich zu den analytischen Methoden wie zum Beispiel LC-ES Massenspektrometrie mit oder ohne enzymatischer Galactosylierung und chemischer β -Eliminierung, die z.B. von Greis und Hart (1998) beschrieben wurden und die genaue Bestimmung der mit O-GlcNAc modifizierten Peptidsequenzen erlauben, haben aber viele Vorteile in Bezug auf Zeit, Kosten und technischen Aufwand.

Für die Analyse der O-GlcNAc modifizierten Proteine humaner Hirnproben wurden zwei monoklonale Mausantikörper verwendet, die zunächst nochmals auf ihre Spezifität hin überprüft wurden. In diesem Zusammenhang konnte die O-GlcNAc Spezifität des MUD50 Antikörpers erstmals gegen GlcNAc-BSA getestet werden, das als synthetisches Antigen O-GlcNAc modifizierten Proteinen entspricht, obwohl die kovalente Bindung zwischen GlcNAc und BSA über einen Aminophenylrest nicht identisch ist mit der O-glykosidischen Bindung des O-GlcNAc, aber trotzdem sich sehr gut für Antikörper-Reaktionen eignet.

Die Ergebnisse (3.1.1) zeigen eine deutliche Reaktivität des MUD50 mit dem synthetischen O-GlcNAc Analogon GlcNAc-BSA, die nach Vorinkubation des Antikörpers mit 100 mM

GlcNAc um 81% inhibiert werden konnte (Abb. 5). Der MUD50 ist ein monoklonaler IgG Antikörper, der ursprünglich gegen Hüllenproteine des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* erzeugt wurde (Grant et al., 1985). Es konnte gezeigt werden, dass der Antikörper ein O-glykosidisches Epitop erkennt. Diese Kohlenhydratstruktur wurde u.a. mit ESI-MS als O-glykosidisch verknüpftes GlcNAc identifiziert (Gooley et al., 1991; Jung et al., 1997). Dass der Antikörper neben O-GlcNAc Epitopen von Protozoenproteinen auch O-GlcNAc modifizierte Säugetierproteine erkennt, zeigten bereits Griffith und Schmitz (1999), die im ELISA Maushirnhomogenate mit dem MUD50 untersucht hatten.

Da der MUD50 für den Nachweis der O-GlcNAc Proteine der Hirnfraktionen im Western-Blot nicht mehr zur Verfügung stand, wurde der RL2 als weiterer O-GlcNAc spezifischer Antikörper eingesetzt. Der monoklonale RL2 Antikörper wurde direkt gegen Säugetier O-GlcNAc modifizierte Kernporenglykoproteine erzeugt (Snow et al., 1987; Holt et al., 1987). Im Gegensatz zum MUD50 erkennt der RL2 zusätzlich zu dem O-GlcNAc-Epitop ein Peptid-Epitop (Snow et al., 1987).

Zur Bestätigung der O-GlcNAc Spezifität des RL2 wurde dessen Reaktivität mit der des MUD50 im Western-Blot verglichen. Abb. 8 zeigt, dass die von den beiden Antikörpern detektierten Bandenmuster der O-GlcNAc Proteine der Detergens-löslichen Fraktion (Dsf) einer humanen Hirnprobe annähernd identisch sind. Als weiterer Test zur Überprüfung der O-GlcNAc Spezifität wurde nach Übertragung von Galactose demonstriert, dass dadurch die Immundetektion von GlcNAc-BSA mit dem RL2 Antikörper fast vollständig inhibiert werden kann (Abb. 7). Eine solche Inhibition wiesen bereits Holt et al. (1987) für O-GlcNAc modifizierte Kernporenproteine nach. In dieser Studie wurden Kernporenproteine unterschiedlich stark mit radioaktiver Galactose markiert bevor sie einer Immunadsorption mit dem RL2 Antikörper ausgesetzt wurden. Bei einer mittleren Absättigung der N- und O-Glykane mit Galactose (inkorporierte 236 pmol ^3H -Galactose / $1,5 \times 10^8$ Kernäquivalente) wurde die Immunadsorption des RL2 zu ca. 70% inhibiert. In der vorliegenden Arbeit wurden neben GlcNAc-BSA auch Detergens-lösliche Proteine (Dsf) von humanen Hirnhomogenaten galactosyliert. Die Detektion der Proteine im Western-Blot mit dem RL2 wurde hierbei zwar sichtbar aber nicht vollständig inhibiert (Abb. 7). Ursächlich dafür könnte eine unvollständige Absättigung der Glykane mit Galactose sein. Da die Galactose-Inkorporation aufgrund der eingesetzten nicht radioaktiv markierten Galactose nicht messbar war, konnte dies nicht überprüft werden. Dass aber ein Galactosylierungsprozess stattgefunden hat, ist deutlich an der Veränderung des Molekulargewichts von GlcNAc-BSA zu erkennen (Abb. 7B), die auch

von Holt et al. (1987) beobachtet wurde. Damit konnte gezeigt werden, dass O-GlcNAc zumindest teilweise unabhängig von der Peptidsequenz spezifisch von dem Antikörper MUD50 erkannt wird.

4.2 Quantitativer und qualitativer Vergleich der O-GlcNAc Modifikation in Gewebeproben verschiedener Hirnareale von Alzheimerpatienten und Kontrollpersonen

Die vorliegende Arbeit basiert auf den Erkenntnissen der Untersuchungen von Griffith und Schmitz 1995, in denen eine Erhöhung der O-GlcNAc Modifizierung von Detergens-unlöslichen cytoskeletalen Proteinen (Dicf) in bestimmten Hirnarealen von Alzheimer Patienten, die von den klassischen neuropathologischen Veränderungen wie den senilen Plaques und der Neurofibrillendegeneration betroffen waren, im Vergleich zu denen von Kontrollpersonen gezeigt wurde. Diese Beobachtung ist auch im Zusammenhang mit der Diskussion interessant, dass vermutlich Veränderungen des neuronalen Cytoskeletts eine ursächliche Rolle bei der Entstehung der Alzheimer Krankheit spielen (Iqbal et al., 1986). In der Fraktion der Membran- und cytoplasmatischen Proteine (Dsf) wurde diese Erhöhung nicht gefunden. Ob diese Erhöhung nur die O-GlcNAcylierung betrifft, oder ob davon die Expression der entsprechenden Proteine, die noch nicht identifiziert worden sind, betroffen ist, ist unbekannt. Diese Erhöhung der O-GlcNAc Expression gilt nach bisherigen Kenntnissen allein für die Alzheimer Krankheit und nicht für andere neurodegenerative Erkrankungen wie z.B. der Parkinson Krankheit (Züllighofen, 1997).

Vor dem Versuch die entsprechenden glykosylierten Proteine der Dicf zu identifizieren, wurden die verwendeten Hirnproben auf ihren O-GlcNAc Gehalt immunologisch unter Einsatz des MUD50 Antikörpers überprüft. Aufgrund des geringen Probenumfangs konnte keine aussagekräftige Statistik über generelle Unterschiede zwischen den AD-Proben und den Kontrollproben getroffen werden. Die Ergebnisse bestätigen aber generell die Beobachtung von Griffith und Schmitz (1995), dass die Detergens-unlösliche Cytoskelettfraction von Hirnproben deutlich mehr O-GlcNAc modifizierte Proteine enthält als die Dsf (Abb. 6). 1999 konnten sie ebenfalls zeigen, dass cytoskeletale und mit dem Cytoskelett assoziierte Proteine in murinen Kleinhirnneuronen eine 2-3fach höhere O-GlcNAc Expression pro μg Protein als cytosolische und membrangebundene Proteine (Griffith und Schmitz, 1995, 1999) aufweisen.

Solche Beobachtungen deuten darauf hin, dass O-GlcNAc eine bestimmte Rolle bei der Funktion bzw. bestimmten Eigenschaften des Cytoskeletts spielen könnte. So sind viele cytoskeletale Proteine sowohl phosphoryliert als auch mit O-GlcNAc modifiziert, wie z.B. die MAPs (Microtubule Associated Proteins), Tau, Vinculin und Talin (Arnold et al., 1996; Ding und Vandr , 1996; Hart et al., 1996; Hagmann et al., 1992). Lefebvre et al. konnten erst vor kurzem demonstrieren, dass eine durch Okadasäure induzierte Hyperphosphorylierung von Tau mit einer verringerten O-GlcNAcylierung des Proteins korreliert und einen verringerten Transport von Tau in den Kern zur Folge hat (Lefebvre et al., 2003). O-GlcNAc scheint ebenfalls Einfluss auf die Assoziation der Neurofilamente zu haben und spielt eine Rolle bei der Fibrillenbildung von Intermediärfilamenten (Hart, 1997; Hart et al., 1996; Comer und Hart, 2000). Außerdem wiesen Refolo et al. in einer Studie, in der sie bereits 1991 getrennt voneinander die Dsf- bzw. Dicf-Fraktionen von Hirngewebe- und Zellsolubilisaten untersuchten, 50-90% des APP Proteins in der Dicf nach (Refolo und Wittenberg, 1991).

Für die darauffolgenden Untersuchungen wurden die Alzheimer- und Kontrollproben ausgewählt, deren Dicf-Proteine die gr o ten Unterschiede im Hinblick auf den O-GlcNAc Gehalt zeigten. Diese Unterschiede konnten im Western-Blot mit Hilfe des RL2 Antikörpers nicht bestätigt werden. Die Dicf-Proteine der ausgewählten Frontallappen- (Abb. 9) und Parietallappenproben weisen keine Unterschiede hinsichtlich des Proteinbandenmusters oder der Bandenintensität zwischen AD- und Kontrollproben auf. Hingegen konnten erwartungsgemäß keine Unterschiede in der Signalstärke von cytosolischen- und Membranproteinen zwischen AD- und Kontrollproben festgestellt und somit die ELISA Ergebnisse bestätigt werden. Allerdings konnte nicht die im ELISA festgestellte erhöhte O-GlcNAc Expression der Dicf-Proteine gegenüber Dsf-Proteinen im Western-Blot in Form einer stärkeren Bandenintensität reproduziert werden.

Ursächlich für diese unterschiedlichen Ergebnisse von ELISA und Western-Blot könnte die Verwendung unterschiedlicher Antikörper sein. Zwar wurden sowohl der MUD50, der zu diesem Zeitpunkt nicht mehr zur Verfügung stand, als auch der RL2 Antikörper erfolgreich auf ihre O-GlcNAc Spezifität hin überprüft und beide Antikörper detektieren ein annähernd gleiches Bandenmuster von mit O-GlcNAc modifizierten Dsf-Proteinen im Western-Blot, aber es ist ebenfalls bekannt, dass der RL2 Antikörper neben O-GlcNAc auch noch zusätzlich bestimmte Peptidsequenzen erkennt (Snow et al., 1987; Holt et al., 1987). Daher ist es vorstellbar, dass mit dem RL2 Antikörper nicht alle O-GlcNAc modifizierten Proteine, die von dem MUD50 Antikörper erkannt werden, nachgewiesen werden können. Es ist weiterhin denkbar, dass Unterschiede in der O-GlcNAc Modifikation einzelner Proteine im Western-

Blot durch andere Banden mit gleichem oder ähnlichem Molekulargewicht aber ausgeprägterer O-GlcNAc Modifikation überdeckt werden können. Für eine effizientere Auftrennung der Proteine würde sich daher in Zukunft der Einsatz der zweidimensionalen Gelelektrophorese anbieten, mit der eine Proteinauftrennung nach Ladung und nach Molekulargewicht möglich ist, wodurch eine ausgezeichnete Auflösung erreicht werden kann. Diese Möglichkeit stand aber zum gegebenen Zeitpunkt nicht zur Verfügung. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass post-mortem die Einflüsse möglicher Proteolyseereignisse auf die O-GlcNAcylierung schwer einschätzbar sind.

Da radioaktive Markierungsmethoden im Vergleich zu immunchemischen Methoden eine höhere Sensitivität aufweisen, wurde als Konsequenz aus den vorangegangenen Ergebnissen die Markierungsmethode mit ^3H -Galactose zum Nachweis der O-GlcNAc Expression eingesetzt, mit der eine O-GlcNAc Detektion im subpicomolaren Bereich möglich ist (Roquemore et al., 1994). Nachteil des Einsatzes von ^3H -Galactose zum O-GlcNAc Nachweis ist allerdings, dass auch GlcNAc Reste am nicht reduzierenden Ende von N-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden markiert werden. Diese müssen in einem weiteren Schritt enzymatisch mit PNGase F wieder abgespalten werden. Die Effizienz dieses Abspaltungsvorgangs kann mit Ovalbumin, welches nur N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide trägt, die größtenteils auf GlcNAc enden, kontrolliert werden.

Mit der Methode der ^3H -Galactose-Übertragung konnte ebenfalls keine Erhöhung der O-GlcNAc Expression in der Dief der Alzheimerproben im Vergleich zu den Kontrollproben nachgewiesen werden. Selbst nach achtwöchiger Exposition wurden autoradiographisch keine Banden detektiert. Dass eine radioaktive Inkorporation aber trotzdem erfolgt ist, zeigen die gemessenen cpm Werte der Proben vor der SDS-PAGE, die deutlich über den Werten einer mitgeführten nicht radioaktiven Probe liegen (Abb. 10A). Die Radioaktivität der nach der SDS-PAGE isolierten Gelstücke ist deutlich niedriger als die der Proben vor der SDS-PAGE. Die erfolgreiche Abspaltung der N-Glykane kann an Hand der Werte für die Ovalbuminprobe vor und nach der PNGase F Behandlung verfolgt werden. Nach De-N-Glykosylierung konnte vor der gelelektrophoretischen Auftrennung eine 50%ige Reduktion bzw. nach der SDS-PAGE eine mehr als 90%ige Reduktion des cpm Wertes für Ovalbumin gemessen werden (Abb. 10B, C) Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem Ergebnis von Roquemore et al., die beim Nachweis der O-GlcNAcylierung von αB -Crystallin auch nach PNGase F Behandlung eine 98%ige Entfernung der N-Glykane bei Ovalbumin feststellen konnten (Roquemore et al., 1996).

So war es weder immunchemisch noch mit Hilfe radioaktiver Markierung möglich, mit O-GlcNAc modifizierte Proteine in Alzheimer Hirngewebeproben zu identifizieren, die entweder verstärkt mit O-GlcNAc modifiziert sind oder verstärkt exprimiert werden. Auch die von Yao und Coleman beschriebene Abnahme eines mit O-GlcNAc modifizierten Proteins mit einem Molekulargewicht von 180 kDa in Frontalgyrusproben von Alzheimer Gehirnen konnte auf diese Weise nicht bestätigt werden (Yao und Coleman, 1998a u. b). Bei diesem AP180 Protein (clathrin assembly protein) handelt es sich um ein Adapterprotein von Clathrin beschichteten Vesikeln mit einem Molekulargewicht von 180 kDa. Die Reduktion des AP180 Proteins korreliert mit einer Zunahme der neurofibrillären Stränge und geht einher mit der Abnahme synaptischer Proteine. Folgender Grund könnte ursächlich für die nicht mögliche Detektion von Proteinen mit unterschiedlicher O-GlcNAcylierung in der vorliegenden Arbeit sein: Während in der vorliegenden Arbeit ein Proteingemisch aus der entsprechenden Detergens-unlöslichen cytoskeletalen Fraktion mit ^3H -Galactose markiert wurde, immunpräzipitierten Yao und Coleman zuerst AP180 aus dem Hirnhomogenat und reicherten damit eine entsprechend große Proteinmenge an. Darauf folgte erst die Übertragungsreaktion mit ^3H -Galactose auf das Immunpräzipitat. Es bleibt zu diskutieren, ob die Menge eines jeden mit O-GlcNAc modifizierten Proteins aus dem Proteingemisch nicht zu gering ist, um Unterschiede hinsichtlich dieser posttranslationalen Modifikation zu messen. So benötigt man für eine effiziente Markierung eine Proteinmenge im Mikrogramm Bereich (Roquemore et al., 1994). Bei zukünftigen Untersuchungen sollte zunächst die Anreicherung mit Hilfe von Immunpräzipitationen bereits bekannter O-GlcNAc glykosylierter Proteine erfolgen, um diese dann nach entsprechender Markierung auf quantitative Unterschiede zu analysieren.

4.3 O-GlcNAc Modifikation des humanen Amyloid Precursor Proteins (APP)

Das Amyloid Precursor Protein ist das Vorläufermolekül von β -Amyloid, das Bestandteil der senilen Plaques ist, die ein typisches histopathologisches Merkmal der Alzheimer Demenz darstellen. Zu den posttranslationalen Modifikationen von APP gehören N- und O-Glykosylierung, Phosphorylierung und Sulfatierung (Weidemann et al., 1989; Oltersdorf et al., 1990; Buxbaum et al., 1990). Es existieren zahlreiche Untersuchungen, die sich mit der Funktion und dem Einfluss der Glykane auf den intrazellulären Transport und die Prozessierung von APP beschäftigen (Pahlsson et al., 1992; Saito et al., 1995, Yazaki et al.,

1996; Mc Farlane et al., 1999). APP besitzt zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen an Asn467 und Asn496 (APP695). Mit Hilfe von mit APP695 cDNA transfizierten CHO(Chinese hamster ovary)-Zellen konnte gezeigt werden, dass nur Asn467 glykosyliert wird (Pahlsson et al., 1992). Die Mutation der N-Glykosylierungsstellen von APP oder die Behandlung der Zellen mit Tunicamycin oder den Golgi-Inhibitoren Monensin oder Brefeldin A sowie die Expression des Proteins in Glykosylierungs-defekten mutierten CHO-Zellen verhindern die APP Reifung und vermindern die APP Sekretion (Yazaki et al., 1996; Tienari et al., 1996; Caporaso et al., 1992; Pahlsson und Spitalnik, 1996). Sato et al. konnten 1999 erstmals die detaillierte Struktur der Oligosaccharide von sekretiertem rekombinanten humanem APP685 in CHO Zellen ermitteln und zeigten, dass APP695 sialylierte bi- und triantennäre N-Glykane mit fucosylierten und nicht fucosylierten Trimannosyl-Grundstrukturen sowie sialylierte O-Glykane aufweist. Die Glykosylierung scheint einen Einfluss auf den APP Transport zu haben. So führt die Hemmung der Mannosidase I oder II zu einer Anhäufung von zellulärem APP im perinuklearen Raum und damit verbunden zu einer Abnahme der Translokation von APP zur Zellmembran und mit einer damit verbundenen Abnahme der Sekretion von APP (Mc Farlane et al., 1999).

Für die von Griffith et al. nachgewiesene O-GlcNAc Modifikation des murinen APP ist bis heute nicht gezeigt worden, welche Serin- bzw. Threonin-Reste mit diesem Monosaccharid modifiziert sind (Griffith et al., 1995). Es wird angenommen, dass O-GlcNAc eine reziproke Funktion zur Phosphorylierung haben kann (Cheng und Hart 2001). Während bekannt ist, dass Phosphorylierung z.B. durch die Proteinkinase C Einfluss auf die Prozessierung von APP hat, konnten solche Eigenschaften für O-GlcNAc in mehreren Untersuchungen bisher nicht gezeigt werden (Hung und Selkoe, 1994; Mäß, 2002; Gollner 2001). In der vorliegenden Arbeit sollte die O-GlcNAc Modifikation des humanen APP näher untersucht werden.

Zunächst wurde APP aus humanen Frontallappenproben von AD- und Kontrollpatienten immunpräzipitiert und im Western-Blot mit Hilfe des Antikörpers 8E5 detektiert. Neben einer vermutlich unspezifischen Bande unterhalb von 200 kDa konnten drei APP spezifische Banden mit einem Molekulargewicht zwischen 100-140 kDa nachgewiesen werden, wobei eine Bande bei 120 kDa vermutlich eine Doppelbande darstellt (Abb. 11). Die auftretenden Unterschiede in der Signalstärke zwischen Alzheimer- und Kontrollprobe sind nicht repräsentativ, da der Probenumfang in diesem Versuch zu klein war. Das Auftreten mehrerer APP Banden bei Verwendung von Hirnhomogenaten entspricht den Beobachtungen bereits früherer Untersuchungen von Selkoe et al., die ebenfalls in Hirnhomogenaten aus dem Frontalcortex ein Bandenmuster mit diskreten Banden mit 108, 118, 127 und 136 kDa mit

einem gegen den C-Terminus von APP gerichteten Antikörper detektieren konnten (Selkoe et al., 1988). Diese von Selkoe et al. als unterschiedliche Glykosylierungsformen beschriebenen Banden konnten ebenso von Iijima et al. im Rattenhirn gezeigt werden (Iijima et al., 2000). Sie wiesen drei APP695 Banden nach, von denen die beiden Banden mit dem höheren Molekulargewicht als reife Formen mit unterschiedlicher O-Glykosylierung beschrieben wurden, während die unterste Bande die unreife Form darstellt und nur die ER spezifischen oligomannosidischen N-Glykane trägt.

Eine APP Bande bei ca 110 kDa konnte neben einer 120 kDa Bande und einer unbekanntem Bande unterhalb von 200 kDa im Western-Blot mit dem anti-O-GlcNAc Antikörper RL2 detektiert werden (Abb. 11). Die unterste Bande, bei der es sich vermutlich um eine unreife Form handelt, weist das stärkste Signal auf. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die reifen Formen nach den Untersuchungen von Iijima et al. im phosphorylierten Zustand vorliegen, während bei der unreifen Form keine Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte (Iijima et al., 2000). Die Phosphorylierung betrifft den Threonin-Rest 668 (APP695), der auch potentiell mit O-GlcNAc modifiziert sein könnte. Es ist denkbar, dass im Sinne von G. Harts Yin-Yang Hypothese Thr668 bei der unreifen Form im nicht phosphorylierten Zustand mit O-GlcNAc modifiziert ist und damit verantwortlich für das stärkere Signal der unreifen Bande mit dem RL2 Antikörper sein könnte.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde untersucht, ob sich die O-GlcNAc Modifikation von APP *in vitro* beeinflussen lässt. Hierzu wurde der Zellklon A3 einer murinen Neuroblastomazelllinie verwendet, die mit der cDNA des humanen APP695 transfiziert worden war (Weggen, 1996). Um die Abspaltung von O-GlcNAc zu hemmen, wurden die Zellen mit dem O-GlcNAcase Inhibitor PUGNAc behandelt. Zur Anreicherung der unreifen Form von APP im Golgi-Apparat wurden die Zellen mit dem Mannosidase Inhibitor Swainsonine inkubiert. Mit Hilfe des anti-APP Antikörpers 8E5 wurde APP aus den Zellhomogenaten immunpräzipitiert. Im Hinblick auf die APP Expression war bei den verschiedenen Behandlungsformen nur ein geringer Unterschied zu beobachten: APP695 konnte im Gegensatz zu dem komplexeren Bandenmuster *in vivo* nun in den A3 Zellen als Doppelbande nachgewiesen werden, wobei die untere Bande, die die unreife Form repräsentiert, nach Swainsonine Behandlung an Stärke zunimmt (Abb. 12). Dies entspricht den Erwartungen, da nach Inhibition der Mannosidase II die unreifen Glykosylierungsformen angereichert werden. Mc Farlane et al. konnten ebenfalls nach Beeinflussung der APP Glykosylierung durch Swainsonine einen solchen Anstieg der Bandenstärke feststellen (Mc Farlane et al., 1999).

Mit Hilfe des RL2 Antikörpers wurden im Western-Blot drei Proteine immundetektiert, wobei das Molekulargewicht der unteren zwei Banden dem der APP Doppelbande entspricht. Ob es sich bei dem detektierten dritten Protein ebenfalls um eine weitere Glykosylierungsform des humanen APP695 oder um ein Coimmunpräzipitat handelt, ist unklar. Es wird zumindest nicht von dem W02-Antikörper, der gegen den N-Terminus von A β gerichtet ist, erkannt. Die Signalstärke der detektierten Banden variiert je nach Behandlung (Abb. 12): Am stärksten ist die Bandenintensität nach einer kombinierten PUGNAc und Swainsonine Behandlung, während das schwächste Signal bei den unbehandelten Zellen auftritt. Die Signalstärke bei den ausschließlich mit PUGNAc oder mit Swainsonine behandelten Zellen ist ungefähr gleich und deutlich stärker als bei den unbehandelten Zellen. Die verstärkte O-GlcNAc Modifikation von APP nach Swainsonine bzw. der synergistische Effekt nach Swainsonine und PUGNAc Behandlung könnte darauf schließen lassen, dass auf den C-Terminus des in die Golgimembran integrierten APP Proteins während des N-Glykosylierungsprozesses bereits im ER O-GlcNAc durch die im Cytoplasma lokalisierte O-GlcNAc Transferase übertragen wird. Eine schwache Immunreaktivität von O-GlcNAc und O-GlcNAc Transferase im Bereich des ER in Purkinje-Zellen wurde bereits elektronenmikroskopisch von Akimoto et al. nachgewiesen (Akimoto et al., 2003b).

Dementsprechend könnte O-GlcNAc einen Einfluss auf das u.a vermutlich auch im ER/Golgi stattfindende APP Prozessieren haben, für das es mehrere Hinweise gibt. So konnten Sekretaseaktivitäten in diesen Kompartimenten nachgewiesen werden. In einer Studie von Grimm et al. wurde das späte Golgi-Kompartiment als der Ort lokalisiert, in dem die Erzeugung des intrazellulären A β stattfindet (Grimm et al., 2003). Außerdem können posttranslationale Modifikationen die Bindungseigenschaften des C-Terminus und diese wiederum die APP Proteolyse beeinflussen. So führt die Phosphorylierung von Thr668, die ausschließlich bei den reifen APP Formen zu beobachten ist, zu einer reduzierten Interaktion von Fe65 mit APP. Es gibt Hinweise, dass Fe65 wiederum die Reifung nach Bindung an die cytoplasmatische Domäne von APP verzögern kann, was u.a. die Sekretion von APP_s verändern kann (Ando et al., 2001). Über die Bedeutung der O-GlcNAc Modifikation für die Interaktion von APP mit Bindungspartnern ist bisher jedoch nichts bekannt.

4.4 Untersuchung der O-GlcNAc Modifikation des C-Terminus von APP

Nach der Bestätigung der Ergebnisse von Griffith et al. für humanes APP sollten nun die Serine und Threonine des C-Terminus von APP analysiert werden, die O-GlcNAc modifiziert sind. Der C-Terminus weist fünf Serin- bzw. Threonin-Reste auf, die mit O-GlcNAc modifiziert sein könnten (Abb. 16A).

4.4.1 APP Expression in *Xenopus* Oocyten

Für den ersten Versuchsansatz standen zwei humane APP Formen zur Verfügung, deren Aminosäurereste Ser655 oder Ser675 jeweils gegen Alanin ausgetauscht worden waren. Diese Mutanten sowie der Wildtyp wurden in *Xenopus* Oocyten exprimiert und im Hinblick auf O-GlcNAc untersucht. Dazu wurden die Oocyten nach metabolischer Markierung homogenisiert und APP wurde als Immunpräzipitat aus diesem Extrakt isoliert. Sowohl die Expression der APP Wildtypform als auch die der beiden APP Mutanten konnten autoradiographisch nachgewiesen werden (Abb. 13). Zum Nachweis der O-GlcNAc Modifikation wurde dazu eine Immunpräzipitation mit dem anti-O-GlcNAc Antikörper RL2 durchgeführt. Dabei wurde erwartet, neben anderen O-GlcNAc Banden eine Bande im Molekulargewichtsbereich von APP autoradiographisch detektieren zu können. Tatsächlich konnten mit dem RL2 Antikörper keine Proteine nachgewiesen werden, obwohl bekannt ist, dass *Xenopus* Oocyten auch O-GlcNAc Proteine exprimieren (Miller et al., 1999). Da sich die Haltung der Frösche als schwierig erwies und die Qualität der Oocyten nicht nur durch starke saisonale Schwankungen beeinflusst sondern auch bedingt durch Krankheiten schlechter wurde, konnten die Versuche nicht wiederholt werden.

4.4.2 Analyse der O-GlcNAc Modifikation des C-Terminus von APP

In einem zweiten Versuchsansatz sollte der C-Terminus aus Zellen der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, die stabil das Konstrukt SPA4CT, d.h. den C-Terminus als Transmembranpeptid mit der A β Region und einem Signalpeptid exprimieren und daher als SPA4CT Zellen bezeichnet werden, isoliert und in Kooperation mit B. Cole mit ESI-MS auf O-GlcNAc untersucht werden.

Die SPA4CT Expression konnte im Western-Blot mit dem für den C-Terminus des humanen APP spezifischen monoklonalen W02 Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 14). Während bei den parentalen nicht transfizierten Zellen nur eine sehr schwache Bande erkennbar ist (nicht auf Abb. 14 zu erkennen), wurde bei den SPA4CT Zellen eine intensiv markierte Bande zwischen 12-14 kDa detektiert, die dem zu erwartenden Molekulargewicht des SPA4CT Proteins von 12 kDa entspricht (Dyrks et al., 1993). Das ca. 9 kDa große Fragment, das nach Abspaltung von A β durch die γ -Sekretase entsteht, konnte nicht nachgewiesen werden, da der W02 Antikörper spezifisch die A β Region erkennt. Interessanterweise scheint das SPA4CT Peptid kein guter Ligand für die α -Sekretase zu sein, da bisher ein P3 Peptid, das nach Spaltung von A4CT durch die α -Sekretase entsteht, unter solchen Bedingungen noch nicht detektiert werden konnte (Haass et al., 1992; Dyrks et al., 1993). Immunocytochemisch ist eine schwache Färbung der parentalen, d.h. nicht mit dem SPA4CT Konstrukt transfizierten Zellen zu erkennen. Die Färbung ist zu erwarten, da die SH-SY5Y Zellen endogen humanes APP exprimieren. Die SPA4CT Zellen weisen im Vergleich zu den Parentalzellen eine deutlich stärkere cytoplasmatische und nukleäre Färbung auf (Abb. 14). Eine nukleäre Lokalisation von C-terminalen Fragmenten konnte bereits schon früher z.B. von Gao und Pimplikar (2001) gezeigt werden.

4.4.3 Analyse der O-GlcNAc Modifikation des SPA4CT Produkts im Western-Blot

Nach Immunpräzipitation des C-Terminus aus SPA4CT Zellen mit dem gegen das C-terminale Ende gerichteten Antikörper 13G8 (Abb. 16A) wurde die O-GlcNAc Modifikation im Western-Blot mit dem RL2 Antikörper überprüft (Abb. 15). Während der C-Terminus eindeutig mit dem W02 Antikörper detektiert werden konnte, wurden keine Signale mit dem RL2 Antikörper nachgewiesen. Um die Abspaltung von O-GlcNAc zu hemmen, wurde ein Teil der Zellen, deren Homogenate später für die Immunpräzipitation verwendet wurden, mit PUGNAc behandelt. Aber auch der C-Terminus der mit PUGNAc behandelten Zellen wies keine nachweisbare O-Glykosylierung auf. Die Expressionsstärke zeigte keine Veränderung nach PUGNAc Behandlung.

Es ist vorstellbar, dass der C-Terminus für die O-GlcNAc Transferase ähnlich wie für die α -Sekretase kein geeignetes Substrat darstellt (Haass et al., 1992), bzw. die O-GlcNAcase in diesen Zellen besonders aktiv ist und sich nicht durch PUGNAc inhibieren lässt. Dementsprechend könnte der C-Terminus gar nicht oder nur eine Subpopulation O-glykosyliert sein.

4.4.4 Isolation des C-Terminus aus SPA4CT Zellen mit anschließender ESI-MS Analyse

Für die Analyse der potentiellen Subpopulation wurde eine sensitivere massenspektroskopische Methode gewählt. Hierzu wurden C-Terminus Fragmente aus mit PUGNAc behandelten SPA4CT-Zellen mittels Immunpräzipitation angereichert, die entsprechenden C-Terminus Immunpräzipitate wurden aus Tris-Tricine Gelen nach Silberfärbung isoliert (Abb. 16) und in Kooperation mit B. Cole (Baltimore, USA) mit Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) untersucht. Hierbei wird nach entsprechender Vorbereitung des Gelstücks das Protein eluiert, das Protein mit ^3H -Galactose markiert und mit einer spezifischen Protease - im vorliegenden Fall Trypsin – hydrolysiert. Daraufhin werden die markierten Peptide entweder mehrfach mit HPLC oder mit dem Lektin WGA, an das O-GlcNAc bindet, aufgereinigt und dann mittels ESI-MS analysiert.

Bereits die Analyse der mit Trypsin gespaltenen Fragmente mit ESI-MS ergab, dass die auftretenden Massen nicht mit den zu erwartenden Massengrößen der C-Terminus Fragmente übereinstimmten (Abb. 17). Durch einen Abgleich mit entsprechenden Datenbanken konnten die Fragmente zum größten Teil Keratinen zugeordnet werden. Selbst unter sorgfältiger Einhaltung möglichst keratinfreier Bedingungen wurde immer noch eine große Keratinmenge detektiert.

4.5 Dynamik der O-GlcNAc Modifikation in Kleinhirnneuronen

Griffith und Schmitz zeigten 1999, dass die Expression der O-GlcNAc Modifikation von Proteinen in Kleinhirnneuronen sich reziprok nach Aktivierung bzw. Inaktivierung von Kinasen und Phosphatasen verändert. Diese Beobachtung unterstützt die sogenannte Yin-Yang Hypothese, die von einem reziproken Verhältnis zwischen O-GlcNAc Glykosylierung und Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten bei Proteinen ausgeht. Weiterhin bestätigt dieses Ergebnis die Annahme, dass es sich bei der O-GlcNAc Glykosylierung um eine ebenso dynamische posttranslationale Modifikation wie bei der Phosphorylierung handelt. In der vorliegenden Arbeit konnte nun demonstriert werden, dass die O-GlcNAc Modifikation von postnatalen murinen Kleinhirnneuronen ebenso auf die Hemmung eines Schlüsselenzyms des Glucosaminstoffwechselwegs, der Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Amidotransferase (GFAT), reagiert und direkt durch Inhibition der O-GlcNAc Hydrolase manipuliert werden kann. Wie bereits für andere Zellen gezeigt werden konnte, ist auch bei den Kleinhirnneuronen eine reduzierte O-GlcNAc Expression nach Behandlung der Zellen mit dem GFAT Inhibitor DON (6-Diazo-5-Oxonorleucine) zu beobachten (Sayeski und Kudlow, 1996). Die kompetitive Hemmung der O-GlcNAc Hydrolase mit PUGNAc führt zu einem Anstieg der O-GlcNAc Expression, der im Western-Blot (Abb. 18) und durch indirekte Immunfluoreszenz (nicht gezeigt, Rex-Mathes et al., 2001) detektiert werden konnte. Bereits früher wurde mit Hilfe unterschiedlicher Glucose und Glucosaminkonzentrationen im Kulturmedium demonstriert, dass die Stärke der O-GlcNAc Expression von der Verfügbarkeit des Substrats der OGT abhängt.

Eine länger als 24 h andauernde Behandlung mit DON scheint negativen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen zu haben (nicht gezeigt). Vermutlich wird durch die Hemmung der Glucosaminsynthese auch die posttranslationale N- und O-Glykosylierung der Proteine im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat beeinflusst. Eine mehr als 48 h andauernde Behandlung der Zellen mit PUGNAc scheint nicht die Zellvitalität oder andere morphologische Parameter zu beeinflussen. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein, die ebenfalls zeigen konnten, dass ein O-GlcNAc Anstieg keine Zellschäden bewirkt (Haltiwanger et al., 1998). Dass O-GlcNAc sogar für die Lebensfähigkeit essentiell sein kann, zeigen auch Untersuchungen mit embryonalen Stammzellen, deren OGT Gen inaktiviert war und die nicht lebensfähig waren (Shafi et al., 2000). Auch immunohistochemische Studien mit Maushirnschnitten von verschiedenen Entwicklungsstadien zeigen bereits im frühen Embryonalstadium (Embryonaltag 10) bis hin

zum adulten Entwicklungsstadium eine O-GlcNAc Expression, was weiterhin auf eine lebenswichtige Funktion von O-GlcNAc in der Zelle deutet (Rex-Mathes et al., 2001).

Während die O-GlcNAc Expression in kultivierten postnatalen Kleinhirnneuronen homogen ist (nicht gezeigt, Rex-Mathes et al., 2001), weisen Kleinhirnneuronen des Embryonaltags 17 eine auffällig variierende Intensität der RL2 Immunreaktivität auf, die nicht auf einer unvollständigen Permeabilisierung der Zellen beruht (Abb. 19). Überprüft wurde dies u.a mit einem nicht O-GlcNAc spezifischen, sondern gegen Calbindin gerichteten Antikörper, der als Marker für Purkinje-Zellen eingesetzt wird. Die Purkinje-Zellen weisen eine homogene Calbindin Immunfärbung auf, so dass eine unvollständige Permeabilisierung ausgeschlossen werden kann (Abb. 20). Die variierende Intensität der RL2 Immunreaktivität korreliert nicht mit einer Veränderung der Zellvitalität, die mit Hilfe einer Kernfärbung mit dem fluoreszierenden Farbstoff H 33258 überprüft wurde. Es sind verschiedene Ursachen für die unterschiedliche Immunfärbung bei gleicher Kernfärbung möglich. Es könnte sein, dass sich die O-GlcNAc Expression im Verlaufe der embryonalen Entwicklung verändert. Zwar stellten Mathes et al. keine signifikanten Unterschiede in der Intensität der Immunreaktion während unterschiedlicher Entwicklungsstadien oder in verschiedenen Hirnregionen fest, sie erwähnen aber, dass die Purkinje-Zellen ab dem postnatalen Tag 7 eine stärkere distinkte Färbung zeigen, die ab dem postnatalen Tag 14 am stärksten erscheint und bis zur Adoleszenz so erhalten bleibt. Kultivierte pränatale Kleinhirnneuronen stellen ein Gemisch aus zum Teil unreifen Neuronen dar, die sich erst nach weiteren mitotischen Zellzyklen bei entsprechender Kultivierung zu postmitotischen Neuronen wie Körnerzellen und Purkinje-Zellen differenzieren können. Dabei kann es sein, dass unterschiedliche Zelltypen unterschiedliche O-GlcNAc Expressionen aufweisen. So wurde vor kurzem festgestellt, dass im adulten Kleinhirn der Ratte die Purkinje-Zellen die stärkste O-GlcNAc Expression aufweisen, während die Neuronen der Molekularschicht und die Golgi-Zellen der Körnerschicht eine nicht ganz so starke und die Körnerzellen nur eine schwache Expression aufweisen (Akimoto et al., 2003b). Ob dies ebenso für die kultivierten pränatalen Kleinhirnneuronen zutrifft, kann durch Doppelfärbungen mit einem anti-O-GlcNAc Antikörper und den entsprechenden zelltypspezifischen Antikörpern überprüft werden. Im vorliegenden Fall standen nur Mausantikörper zur Verfügung, so dass keine Doppelfärbungen möglich waren. Vorstellbar ist weiterhin, dass die O-GlcNAc Expression je nach Zell-Zyklusstadium und Differenzierungsgrad variiert. Einen Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen O-GlcNAc Expression und neuronalen Differenzierungsprozess gibt das Ergebnis der Untersuchung der O-GlcNAc Expression mit zunehmender Kultivierungsdauer: Während die

Neuronen nach 3 und 5 Tagen eine variierende RL2-Immunreaktivität aufweisen, konnte nach 7- und 10- tägiger Kultivierung eine homogene O-GlcNAc-Immunfärbung detektiert werden (Abb. 21). Diese Beobachtung muss durch weitere Untersuchungen mit entsprechenden Mitosemarkern ergänzt werden. Der Einfluss von NGF bei der neuronalen Differenzierung auf die O-GlcNAc Expression wird in Kapitel 4.6 diskutiert.

Während lichtmikroskopisch eine Abgrenzung zwischen nukleärer und cytoplasmatischer Immunreaktivität kaum möglich ist, da der Zellkern fast den gesamten Zellkörper ausfüllt, konnten Akimoto et al. durch immunhistochemische Analysen von Kleinhirndünnschnitten postnataler Ratten mit dem Elektronenmikroskop die O-GlcNAc Transferase und mit O-GlcNAc modifizierte Proteine stärker im Euchromatin des Kerns als im Cytoplasma der Neuronen lokalisieren (Akimoto et al., 2003b). Die zweitstärkste Immunreaktivität mit dem Elektronenmikroskop zeigen in der Studie von Akimoto et al. die präsynaptischen Endigungen der Neuronen, aber auch Perikaryon, Dendriten, Axone und postsynaptische Endigungen weisen OGT und O-GlcNAc Expression auf. Lichtmikroskopisch wurde eine intensive Immunreaktivität in dieser früheren Studie nur in Purkinje-Zellen beobachtet, die auch eine starke Färbung der Dendriten zeigen, während die Neuriten anderer Zelltypen kaum gefärbt sind. Bei der vorliegenden Untersuchung der pränatalen Kleinhirnneuronen *in vitro* zeigen vereinzelt Neuritenansätze eine O-GlcNAc Immunreaktivität, die Neuriten bleiben jedoch ebenfalls größtenteils von der Immunfärbung ausgespart (Abb. 19A). Erst nach Behandlung der Zellen mit PUGNAc konnte vereinzelt eine Färbung der Neuriten festgestellt werden (Abb. 22).

Die Anwesenheit und Lokalisation der OGT und mit O-GlcNAc modifizierter Proteine in Neuronen sind Indizien dafür, dass die O-GlcNAc Modifikation ähnlich wie die Phosphorylierung eine wichtige Rolle in Neuronen spielt. Es wird diskutiert, ob die O-GlcNAc Modifikation bei der neuronalen Signaltransduktion eine wichtige Funktion übernimmt. Mehrere Ergebnisse sprechen dafür, dass die O-GlcNAc Modifikation eine Bedeutung bei der Exocytose bzw. Sekretion von Neurotransmittern am synaptischen Spalt hat. So konnte besonders in den Präsynapsen die OGT um die synaptischen Vesikel herum lokalisiert werden. Durch O-GlcNAcylierung von cytoskeletalen Proteinen wie zum Beispiel Mikrotubuli-assoziierte Proteine, Tau, AP-3 und Synapsine, die ebenfalls an der Exocytose beteiligt und mit O-GlcNAc modifiziert sind, könnte die OGT die Exocytose von synaptischen Vesikeln kontrollieren. Außerdem konnten in den Nervenendigungen drei weitere neuronale O-GlcNAc Proteine identifiziert werden: CRMP-2, β -Synuclein und UCH-L1 (Cole und Hart, 2001).

4.6 Bedeutung der O-GlcNAc Expression bei neuronalen Differenzierungsprozessen

Es gibt Hinweise darauf, dass O-GlcNAc auch bei der Proliferation und Zellteilung eine Rolle spielt (Kearse und Hart, 1991; Boehmelt et al., 2000; Fang und Miller, 2001). So kommt es nach Aktivierung von Lymphozyten mit dem T-Zell-Mitogen Concanavalin A zu einer raschen Veränderung der O-GlcNAcylierung von nukleären und cytoplasmatischen Proteinen, was auf eine Beteiligung von O-GlcNAc bei der Zell-Zyklus-Aktivierung hinweist (Kearse und Hart, 1991). Fang und Miller injizierten das Enzym Galactosyltransferase in *Xenopus* Oocyten, die in der Prophase der Meiose arretiert waren. Die Übertragung von Galactose auf O-GlcNAc durch die Galactosyltransferase hemmt die Deglykosylierung und lektinähnliche Interaktionen, die unmodifizierte O-GlcNAc Reste voraussetzen. Sie stellten fest, dass die Maskierung der O-GlcNAc Reste durch Galactose in den arretierten Zellen keinen Einfluss auf die Zellvitalität hat, während nach Induktion der Meiose durch Progesteron eine toxische Wirkung festzustellen ist. *In vitro* inhibiert die Galactosyltransferase in zellfreien Oocyten-Extrakten den Übergang von der M- zur S-Phase. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die Regulation des O-GlcNAc Metabolismus bedeutend für das Durchlaufen des Zellzyklus ist. Die Ergebnisse von Boehmelt et al. unterstützen diese Theorie. Sie verwendeten embryonale Mausfibroblasten mit einem inaktivierten Gen für das Enzym Glucosamin-6-Phosphat Acetyltransferase (EMeg32), das für die Synthese von UDP-GlcNAc erforderlich ist. Diese Zellen weisen einen niedrigeren O-GlcNAc Spiegel und ein vermindertes Zellwachstum auf, das entweder durch Reexpression von EMeg32 oder durch Erhöhung des intrazellulären UDP-GlcNAc Gehalts aufgehoben werden kann (Boehmelt et al., 2000).

Eine potentielle Funktion von O-GlcNAc bei der Regulation des Zell-Zyklus könnte auch eine Bedeutung bei Krankheiten mit einem abnormalen O-GlcNAc Stoffwechsel wie zum Beispiel der Alzheimer Demenz (Griffith und Schmitz, 1995) haben. Hierbei könnte die nachgewiesene verstärkte O-GlcNAc Expression in bestimmten, von der AD besonders betroffenen Hirnarealen im Zusammenhang mit den erst kürzlich festgestellten Reaktivierungs- bzw. Dedifferenzierungsprozessen in degenerierenden Neuronen aus Gehirnen von AD Patienten stehen. Bisher ist allerdings nichts über eine mögliche Funktion von O-GlcNAc bei Dedifferenzierungs- bzw. Differenzierungsprozessen der Zelle bekannt.

Um eine solche mögliche Funktion untersuchen zu können, wurden PC12-Zellen durch Behandlung mit dem Nervenwachstumsfaktor NGF zur Differenzierung angeregt. Die Klonzelllinie PC12 stammt von einer Ratten-Phaeocyromocytoma-Zelllinie ab. Bei

Behandlung mit NGF stellen die Zellen ihre Proliferation ein und differenzieren in einen sympathischen Neuronen vergleichbaren Phänotyp (Greene und Tischler, 1976): Neuriten bilden sich aus und die Zellen werden elektrisch erregbar. Damit einher geht eine Veränderung des molekularen Expressionsmusters (Hondermarck et al., 1994; Vician et al., 1997; Brown et al., 1999). NGF war das zuerst entdeckte und ist das am besten untersuchte Mitglied einer Familie von Polypeptiden, die auch als Neutrophine bekannt sind (Levi-Montalcini und Angeletti, 1968; Levi-Montalcini, 1987).

Zusammenfassend zeigen die in Kapitel 3.3.3 vorgestellten Ergebnisse, dass die O-GlcNAc Expression in Gegenwart von NGF nach 6 Tagen signifikant abnimmt (Abb. 23, 24). Die Expression der O-GlcNAc Transferase bleibt hingegen konstant (Abb. 24). Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit PUGNAc, einem Inhibitor der O-GlcNAc Hydrolase, beeinflusst die Neuritenlänge und die O-GlcNAc Modifikation der Proteine: Im Vergleich zu ausschließlich mit NGF behandelten Zellen, werden in Gegenwart von PUGNAc und NGF signifikant kürzere Neuriten ausgebildet während die O-GlcNAc Expression nicht abnimmt (Abb. 23).

Wie bereits in Kapitel 1.1.2 ausführlich beschrieben, wird nach der von G. Hart aufgestellten Yin-Yang Hypothese angenommen, dass die O-GlcNAc Modifikation eine reziproke Funktion zur Phosphorylierung übernehmen kann (Cheng und Hart, 2001). Ausschlaggebend für die verminderte O-GlcNAc Expression könnten daher folgende molekulare Mechanismen der NGF-abhängigen Differenzierung sein, die mit Phosphorylierungsvorgängen einhergehen. Durch die Bindung von NGF an seinen hochaffinen Rezeptor TrkA kommt es zu dessen Dimerisierung und Autophosphorylierung, wodurch es zur Aktivierung von verschiedenen intrazellulären Signalkaskaden kommt (Abb. 27, Segal und Greenberg, 1996; Jing et al., 1992). An den aktivierten Rezeptor können intrazellulär verschiedene Moleküle binden, die zum Teil selber über Kinaseaktivitäten verfügen. Als Folge der TrkA-Rezeptoraktivierung werden u.a. Phospholipase-C γ (PLC γ), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase), sowie das nichtkatalytische Adaptermolekül Shc (src homology containing protein, Segal und Greenberg, 1996) aktiviert, die unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden auslösen, die wiederum zu unterschiedlichen zellulären Reaktionen führen. So ist die PI-3 Kinase für das Überleben von PC12-Zellen notwendig (Yao und Cooper, 1995; Klesse et al., 1999). Der über Shc aktivierte Ras/MAPK-(Mitogen-activated protein kinase) Signalweg führt zur neuronalen Differenzierung von PC12-Zellen, wobei das durch TrkA phosphorylierte Adaptermolekül Shc mit einem Komplex aus Grb2 und Sos interagiert.

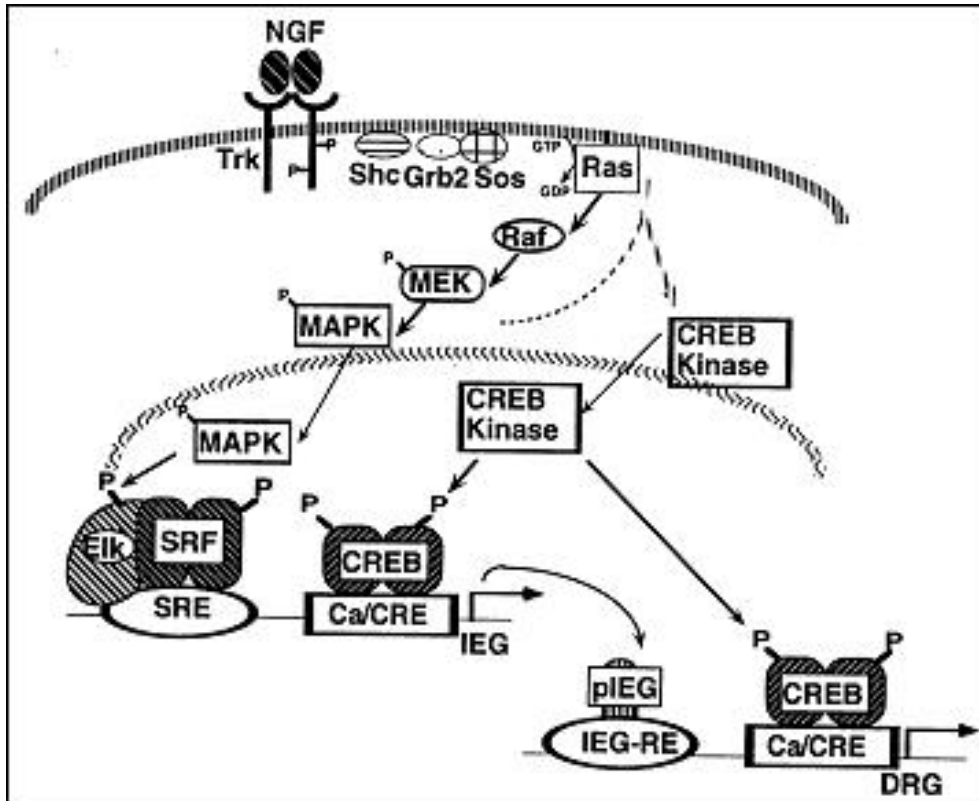


Abb. 27 Darstellung der NGF-vermittelten Signaltransduktion (aus Segal und Greenberg, 1996). Nach Bindung von NGF an seinen hochaffinen Rezeptor TrkA kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors und der Autophosphorylierung von Tyrosinresten im cytoplasmatischen Teil. An diese Phosphotyrosinreste bindet das Adaptermolekül Shc. Durch die Bindung des Grb-Sos-Komplexes an dieses Adaptermolekül kommt es zu einem GDP-GTP Austausch des G-Proteins Ras. GTP-gebundenes Ras führt zur Aktivierung der Kinase b-Raf, welche ihrerseits zur Aktivierung von MEK1 durch Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten führt. Als Substrate dieser Kinase werden Erk 1/2 an Tyrosin- und Threoninresten phosphoryliert. Nach Wanderung von aktiviertem Erk 1/2 in den Zellkern aktiviert es dort den Transkriptionsfaktor Elk. Elk bindet im Komplex mit SRF (Serum response factor) an SRE (Serum response element). Dies führt zur Induktion von verschiedenen "immediate early genes" (IEG), wie c-fos oder c-jun. Der Transkriptionsfaktor CREB (cAMP response element binding protein), der ebenfalls an der Induktion von IEGs beteiligt ist, kann auch durch aktiviertes Ras phosphoryliert werden.

Sos ist ein Guaninnukleotid-Austauschfaktor, der das G-Protein Ras durch GDP/GTP Austausch aktiviert. Daraufhin wird durch GTP-gebundenes Ras eine Kaskade aktiviert, die aus drei Elementen besteht: Das erste Element, b-Raf ist eine MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK) und phosphoryliert die MAPK-Kinase MEK1 (Mitogen-activated ERK kinase1) an Serin- und Threoninresten. Diese phosphoryliert wiederum die MAPK ERK 1/2 (Extracellular signal-regulated kinase 1/2) an Tyrosin- und Threoninresten. Nach ihrer Aktivierung können ERK1/2 in den Zellkern wandern und dort verschiedene

Transkriptionsfaktoren aktivieren, die unter anderem an der Expression von unmittelbar frühen Genen, den IEGs (Immediate early gene) beteiligt sind. Neben der Aktivierung des MAPK-Weges kann es durch Ras zur Aktivierung weiterer Signalkaskaden kommen, in deren Verlauf andere Transkriptionsfaktoren wie z.B. CREB aktiviert werden, die wiederum die Transkription von IEGs einleiten. CREB kann ebenfalls durch den MAPK-Weg aktiviert werden (Abb. 27). Die Aktivierung von Ras kann neben dem oben beschriebenen Weg auch über PLC γ erfolgen, welche durch die Bindung an TrkA aktiviert werden kann. Durch die enzymatische Spaltung von PLC γ wird Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat in zwei Signalmoleküle aufgespalten: Inositoltriphosphat und Diacylglycerol. Ersteres führt zur Ca²⁺-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Cytosol, letzteres aktiviert die Proteinkinase C (PKC). Der weitere Mechanismus, der zur Aktivierung von Ras führt, ist jedoch noch ungeklärt (Segal und Greenberg, 1996).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die pharmakologische Beeinflussung unterschiedlicher Proteinkinasen und Phosphatasen ebenfalls eine Veränderung des O-GlcNAc Status bewirken kann. So führt die Behandlung von Kleinhirnneuronen mit PMA (Phorbol-12-13-Acetat) zu einer Aktivierung der PKC und einer Abnahme der O-GlcNAc Expression (Griffith und Schmitz, 1999). Nach Inkubation der Zellen mit dem Serin-Threonin-Phosphatase Inhibitor Okadasäure kommt es ebenfalls zu einer Abnahme des O-GlcNAc Status, der nicht nur in murinen Kleinhirnneuronen sondern auch in humanen Neuroblastoma-Zellen beobachtet werden konnte (Griffith und Schmitz, 1999; Lefebvre et al., 1999). Außerdem verstärkt der O-GlcNAcase Inhibitor PUGNAc die O-GlcNAc Expression und vermindert den Einbau von Phosphat in den Transkriptionsfaktor SP1, der ebenfalls bei der neuronalen Differenzierung mit NGF eine Rolle spielt (Haltiwanger et al., 1998). Es ist bekannt, dass die neuronale Differenzierung von PC12-Zellen durch NGF u. a. einen Anstieg der Genexpression des neuronalen Acetylcholinrezeptor bewirkt. Dieser Anstieg wird durch das von ERK aktivierte c-Jun verursacht, das durch Kooperation mit SP1 an eine SP1 Bindungsstelle im Promotor der β 4-Untereinheit des neuronalen Acetylcholinrezeptors bindet (Melnikova und Gardner, 2001). Die Aktivierung des SP1 Faktors durch NGF bewirkt ebenfalls die Transkription des Cyclin-abhängigen-Kinase (CDK)-Inhibitor-Proteins p21 WAF1/CIP1 und des G1-Phase Cyclins D1 (Yan und Ziff, 1997). Es gibt Hinweise darauf, dass die Induktion des CDK Inhibitors durch Kooperation von SP1 mit dem Transkriptionscoaktivator p300 erfolgt (Billon et al., 1999). Bei diesen Interaktionen von SP1 mit anderen Transkriptionsfaktoren könnte O-GlcNAc eine Rolle spielen. So stellten Roos et al. fest, dass die O-GlcNAc Modifikation von SP1 die Interaktion mit einem anderen

Transkriptionsfaktor TAF110 bzw. die Selbstassoziation stören und dies die Transkriptionsrate negativ beeinflussen kann (Roos et al., 1997). Es ist daher vorstellbar, dass SP1 nach Induktion der neuronalen Differenzierung durch NGF weniger oder gar nicht glykosyliert ist und in dieser Form leichter an c-Jun oder p300 binden kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte einerseits eine Abnahme der O-GlcNAc Expression während der Behandlung der PC12-Zellen mit NGF beobachtet werden. Nach NGF und gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit dem O-GlcNAcase Inhibitor PUGNAc erfolgte jedoch keine Reduktion des O-GlcNAc Levels (Abb. 23). Außerdem waren die ausgebildeten Neuriten signifikant kürzer ($p < 0,01$) als die der ausschließlich mit NGF behandelten Zellen (Abb. 23, Abb. 26). Da bisher keine andere Wirkung von PUGNAc als die der O-GlcNAcase Inhibition bekannt ist, lässt dieses Ergebnis vermuten, dass eine im Vergleich zur NGF Behandlung erhöhte O-GlcNAc Expression einen hemmenden Einfluss auf die Neuritenbildung und damit der neuronalen Differenzierung haben könnte. Es ist bekannt, dass zum Beispiel die Phosphorylierung des Amyloid Precursor Proteins während der neuronalen Differenzierung von PC12-Zellen wichtig für die Neuritenextension ist (Ando et al., 1999). Dabei wird der Rest Thr668 (APP695) phosphoryliert, der ebenfalls potentiell mit O-GlcNAc modifiziert sein kann.

Ob O-GlcNAc tatsächlich einen inhibierenden Effekt auf die neuronale Differenzierung hat, könnte ein weiterer Versuchsansatz klären, bei dem die Zellen zuerst mit NGF und in verschiedenen Zeitintervallen zusätzlich mit PUGNAc behandelt werden. So ist z.B. bekannt, dass nach 15-minütiger Stimulation mit NGF ein deutlicher Anstieg im Phosphorylierungsstatus von ERK 1/2 zu erkennen ist (Gotoh et al., 1990; Gomez und Cohen, 1991). Dementsprechend könnte bei gleichzeitiger NGF+PUGNAc Zugabe überprüft werden, ob die Phosphorylierung von ERK inhibiert wird.

Im Verlauf der Differenzierung kommt es außerdem zu einer Veränderung des Proteinexpressionsmusters und es sind verschiedene Moleküle nachgewiesen worden, deren Expression mit der Differenzierung von PC12-Zellen gekoppelt ist. Z.B. kann nach Neurotrophingabe die Expression von Galectin-3 in PC12-Zellen induziert werden, die nach 4-6 h ansteigt (Kuklinski, 2000). Die Expression von MAP1B (microtubule-associated protein 1B) wird auch durch NGF stimuliert und erreicht nach 4 Tagen das höchste Expressionsniveau (Goold und Gordon-Weeks, 2001). Ob die Expression solcher Marker Proteine durch ein erhöhtes O-GlcNAc Niveau inhibiert bzw. beeinflusst wird, könnte auf diese Weise auch geklärt werden.

Ebenfalls sollte untersucht werden, ob eine verstärkte O-GlcNAc Expression zu Dedifferenzierungsprozessen bei bereits ausdifferenzierten Neuronen führen kann. Das wäre besonders im Hinblick auf den bereits erwähnten Zusammenhang zwischen Dedifferenzierungsprozessen und der neurodegenerativen Alzheimer Krankheit interessant.

5. Zusammenfassung

Die intrazelluläre Modifikation der Serin- und Threoninreste von cytosolischen und Kernproteinen mit einem N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) ist ubiquitär verbreitet und bei allen bisher daraufhin untersuchten eukaryotischen Spezies sowie in allen Gewebetypen nachgewiesen worden. O-GlcNAc scheint u.a. die Assoziation von Proteinen zu beeinflussen und ein zur Phosphorylierung alternatives Signaltransduktionssystem darzustellen. Vermutlich hat die O-GlcNAc Modifikation nicht nur eine Bedeutung bei Krankheiten wie Diabetes und Krebs sondern auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer Krankheit. So konnte in früheren Untersuchungen ein Anstieg der O-GlcNAc Modifikation in bestimmten subzellulären Fraktionen von Hirnregionen von Alzheimer Patienten nachgewiesen werden. Außerdem wurde die O-GlcNAc Modifikation der murinen Form des Amyloid Precursor Proteins, das an der Pathogenese der Alzheimer Krankheit beteiligt ist, nachgewiesen.

Im ersten Teil des vorliegenden Projekts sollte die O-GlcNAc Modifikation neuraler Proteine aus Hirnhomogenaten von Alzheimer Patienten und Kontrollpersonen näher untersucht und Proteine mit unterschiedlicher O-GlcNAc Modifikation identifiziert werden. Zum Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation wurden neben der radioaktiven Galactosylierungsmethode vor allen Dingen immunologische Methoden eingesetzt. Zunächst wurde die O-GlcNAc Spezifität der verwendeten Antikörper in verschiedenen Tests überprüft und miteinander verglichen. Mit den anti-O-GlcNAc Antikörpern RL2 und MUD50 konnte im Western-Blot ein annähernd gleiches Proteinbandenmuster einer humanen Proteinfraction detektiert werden. Aus humanen Hirnproben von Alzheimer- und Kontrollpatienten wurden sowohl Fraktionen von Detergens-unlöslichen cytoskeletalen und Cytoskelett-assoziierten Proteinen (Dicf) als auch von Detergens-löslichen cytoplasmatischen Proteinen und Membranproteinen (Dsf) präpariert und auf ihren O-GlcNAc Gehalt hin untersucht. Während die Dsf-Proteine der AD- und Kontrollproben entsprechend früherer Untersuchungen keine Unterschiede hinsichtlich der O-GlcNAc Modifikation zeigten, konnte der im ELISA gemessene Unterschied zwischen AD- und Kontrollproben der Dicf-Proteine weder im Western-Blot noch mittels Galactosylierungsmethode bestätigt werden, so dass keine entsprechenden Proteine mit unterschiedlicher Glykosylierung identifiziert werden konnten. Bei zukünftigen Untersuchungen sollten bereits bekannte mit O-GlcNAc modifizierte Proteine angereichert und im Hinblick auf mögliche quantitative Unterschiede untersucht werden.

Bei der Pathogenese der Alzheimer Demenz spielen die Spaltungsprozesse des Amyloid Precursor Proteins eine wesentliche Rolle. Diese Prozessierung von APP wird u.a. durch verschiedene Signalkaskaden bzw. Phosphorylierungsvorgänge reguliert. Ob die O-GlcNAcylierung ebenfalls darauf einen Einfluss hat, ist unbekannt. Während die O-GlcNAc Modifikation des murinen APP bereits nachgewiesen wurde, konnte die des humanen APP im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit erstmalig gezeigt werden. Die O-GlcNAc Modifikation war sowohl *in vivo* als auch *in vitro* mit einem anti-O-GlcNAc Antikörper detektierbar. *In vivo* weist die unreife APP Form eine stärkere O-GlcNAc Modifizierung im Vergleich zur reifen Form auf. Bei stabil mit dem humanen APP695 transfizierten unbehandelten murinen Neuroblastoma-Zellen (d. h. *in vitro*) konnte nur eine schwache O-GlcNAc Modifizierung von APP Immunpräzipitaten nachgewiesen werden. Die Signalstärke steigt nach Behandlung der Zellen mit PUGNAc, einem Inhibitor der O-GlcNAc Hydrolase, erwartungsgemäß an, da PUGNAc die Abspaltung von O-GlcNAc hemmt. Interessanterweise konnte ein gleicher Anstieg ebenfalls nach Behandlung der Zellen mit Swainsonine, das als Inhibitor der Mannosidase II die Anreicherung der unreifen Form im ER begünstigt, beobachtet werden. Der stärkste Anstieg und somit ein synergistischer Effekt resultiert aus der kombinierten Behandlung mit PUGNAc und Swainsonine. Ob die Hemmung der Mannosidase II und damit die Hemmung der Prozessierung von N-Glykanen im Golgi-Apparat die O-GlcNAcylierung von APP direkt oder indirekt durch andere davon betroffene Proteine beeinflusst, gilt es in Zukunft zu klären. Ebenfalls sollte in weiteren Versuchen geklärt werden, ob O-GlcNAc an dem möglicherweise schon im ER und frühen Golgi stattfindenden Prozessieren von APP, für das es bereits einige Hinweise in der Literatur gibt, beteiligt ist.

Da die O-GlcNAc Modifikation bisher ausschließlich intrazellulär nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass Aminosäurereste des intrazellulären C-Terminus des Transmembranproteins APP mit O-GlcNAc glykosyliert sind. Es konnte allerdings immunologisch keine O-GlcNAc Modifikation des C-Terminus detektiert werden, der aus stabil mit dem C-Terminus transfizierten humanen Neuroblastoma-Zellen isoliert wurde. Möglicherweise stellt der C-Terminus alleine kein geeignetes Substrat für die O-GlcNAc Transferase dar. Eine massenspektrometrische Untersuchung des isolierten C-Terminus mit ESI-MS brachte keine Ergebnisse.

Ebenfalls auf früheren Untersuchungen basierend wurde im dritten Teil der Arbeit die Dynamik der O-GlcNAc Modifikation in murinen Kleinhirnneuronen untersucht und das Verhalten der O-GlcNAc Expression bei neuronalen Differenzierungsprozessen analysiert. In pränatalen Kleinhirnneuronen wurde immunocytochemisch eine variierende Intensität der O-

GlcNAc Expression festgestellt, die postnatale Kleinhirnneuronen nicht zeigen. Diese inhomogene Immunfärbung verschwindet nach längerer Kultivierungsdauer. Ob neuronale Differenzierungsprozesse bzw. unterschiedliche Zell-Zyklus-Phasen ursächlich für die unterschiedlich starke O-GlcNAcylierung der Zellen untereinander sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Die Dynamik der O-GlcNAc Modifikation lässt sich *in vitro* ähnlich wie in anderen Zelltypen auch in murinen Kleinhirnneuronen manipulieren. In postnatalen Kleinhirnneuronen kann die O-GlcNAc Expression mit DON, einem Inhibitor der GFAT, einem Schlüsselenzym der GlcNAcSynthese, verringert und mit PUGNAc verstärkt werden. Pränatale Kleinhirnneuronen zeigen immuncytochemisch nach PUGNAc Behandlung zusätzlich zu den Somata vereinzelt eine Immunfärbung der Neuriten, während diese unter Kontrollbedingungen nicht zu beobachten sind.

Es konnte gezeigt werden, dass sich bei neuronalen Differenzierungsvorgängen die O-GlcNAc Expression verändert. So wurde eine verringerte O-GlcNAc Expression nach Induktion der neuronalen Differenzierung bei PC12-Zellen durch NGF festgestellt, obwohl die Expression der O-GlcNAc Transferase hingegen konstant bleibt. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit PUGNAc führt zur Ausbildung von signifikant kürzeren Neuriten im Vergleich zu den ausschließlich mit NGF behandelten Zellen, außerdem nimmt die O-GlcNAc Expression nicht ab im Vergleich zur Kultivierung ohne NGF bzw. sie nimmt zu im Vergleich zur Behandlung mit NGF allein. Ob eine ebenfalls verstärkte O-GlcNAc Expression, wie sie in bestimmten Hirnarealen bei AD-Patienten post mortem detektiert werden konnte, möglicherweise im Zusammenhang mit Dedifferenzierungsprozessen stehen, die von anderen Arbeitsgruppen in Hirngewebe von AD-Patienten nachgewiesen wurden, sollte in Zukunft in weiteren Versuchen geklärt werden.

6. Literaturverzeichnis

- Acquati, F., Accarino, M., Nucci, C., Fumagalli, P., Jovine, L., Ottolenghi, S., Taramelli, R. (2000).
The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region.
FEBS Lett. 468, 59-64.
- Akimoto, Y., Kawakami, H., Yamamoto, K., Munetomo, E., Hida, T., Hirano, H. (2003a).
Elevated expression of O-GlcNAc modified proteins and O-GlcNAc transferase in corneas of diabetic Goto-Kakizaki rats.
Invest. Ophthalmol Vis. Sci. 44, 3802-3809.
- Akimoto, Y., Comer, F.I., Cole, R.N., Kudo, A., Kawakami, H., Hirano, H., Hart, G.W. (2003b).
Localization of the O-GlcNAc transferase and O-GlcNAc-modified proteins in rat cerebellar cortex.
Brain Res. 966, 194-205.
- Alexander, S., Smith, E., Davis, L., Gooley, A. Por, S.B., Browne, L., Williams, K.L. (1988).
Characterization of an antigenically related family of cell-type specific proteins implicated in slug migration in Dictyostelium discoideum.
Differentiation 38, 82-90.
- Allinquant, B., Moya, K.L., Bouillot, C., Prochiantz, A. (1994).
Amyloid precursor protein in cortical neurons: coexistence of two pools differentially distributed in axons and dendrites and association with cytoskeleton.
J. Neurosci. 14, 6842-6854.
- Alzheimer, A. (1907).
Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde.
Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin 64, 146-148.
- Ando, K., Iijima, K.I., Elliott, J.I., Kirino, Y., Suzuki, T. (2001).
Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of beta-amyloid.
J. Biol. Chem. 276, 40353-40361.
- Ando K., Oishi M., Takeda S., Iijima K., Isohara T., Nairn A.C., Kirino Y., Greengard P., Suzuki T. (1999).
Role of phosphorylation of Alzheimer's amyloid precursor protein during neuronal differentiation.
J. Neurosci. 19, 4421-4427.
- Annaert, W., De Strooper, B. (2002).
A cell biological perspective on Alzheimer's disease.
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 18, 25-51.
- Annaert, W., De Strooper, B. (1999).
Presenilins: molecular switches between proteolysis and signal transduction.
Trends Neurosci. 22, 439-443.
- Arnold, C.S., Johnson, G.V., Cole, D.I., Lee, M., Hart, G.W. (1996).
The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine.
J. Biol. Chem. 271, 28741-28744.
- Arriagada, P.V., Growdon, J.H., Hedley-Whyte, E.T., Hyman, B.T. (1992).
Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease.
Neurology 42 (3 Pt1), 631-639.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., Lake, R.J. (1999).
Notch signaling: cell fate control and signal integration in development.
Science 284, 770-776.
- Barnes, N.Y., Li, L., Yoshikawa, K., Schwartz, L.M., Oppenheim, R.W., Milligan, C.E. (1998).
Increased production of amyloid precursor protein provides a substrate for caspase-3 in dying motoneurons.

- J. Neurosci. 18, 5869-5880.
Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Loeloff, R., Louis, J.C., Curran, E., Citron, M., Vassar, R. (2000).
Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues.
J. Biol. Chem. 275, 20647-20651.
- Bertram, L., Blacker, D., Mullin, K., Keeney, D., Jones, J., Basu, S., Yhu, S., McInnis, M.G., Go, R.C., Vekrellis, K., Selkoe, D.J., Saunders, A.J., Tanzi, R.E. (2000).
Evidence for genetic linkage of Alzheimer's disease to chromosome 10q.
Science 290, 2302-2303.
- Bickel, H. (2001).
Dementia in advanced age: estimating incidence and health care costs.
Z. Gerontol. Geriatr. 34, 108-115.
- Billon N., Carlisi D., Datto M.B., van Grunsven L.A., Watt A., Wang X.F., Rudkin B.B. (1999).
Cooperation of Sp1 and p300 in the induction of the CDK inhibitor p21WAF1/CIP1 during NGF-mediated neuronal differentiation.
Oncogene 18, 2872-2882.
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979).
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523.
- Boehmelt G., Wakeham A., Elia A., Sasaki T., Plyte S., Potter J., Yang Y., Tsang E., Ruland J., Iscove N.N., Dennis J.W., Mak T.W. (2000).
Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells.
EMBO J. 19, 5092-5104.
- Borg, J.P., Lopez-Figueroa, M.O., de Taddeo-Borg, M., Kroon, D.E., Turner, R.S., Watson, S.J., Margolis, B. (1999)
Molecular analysis of the X11-mLin-2/CASK complex in brain.
J. Neurosci. 19, 1307-1316.
- Borg, J.P., Yang, Y., De Taddeo-Borg, M., Margolis, B., Turner, R.S. (1998).
The X11alpha protein slows cellular amyloid precursor protein processing and reduces Abeta40 and Abeta42 secretion.
J. Biol. Chem. 273, 14761-14766.
- Borg, J.P., Ooi, J., Levy, E., Margolis, B. (1996).
The phosphotyrosine interaction domains of X11 and FE65 bind to distinct sites on the YENPTY motif of amyloid precursor protein.
Mol. Cell Biol. 16, 6229-6241.
- Bouillot, C., Prochiantz, A., Rougon, G., Allinquant, B. (1996).
Axonal amyloid precursor protein expressed by neurons in vitro is present in a membrane fraction with caveolae-like properties.
J. Biol. Chem. 271, 7640-7644.
- Brion, J.B., Flament-Durand, J., Dustin, P. (1986).
Alzheimer's disease and tau proteins.
Lancet 2, 1098.
- Brown, M.S., Ye, J., Rawson, R.B., Goldstein, J.L. (2000).
Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans.
Cell 100, 391-398.
- Brown, A.J., Hutchings, C., Burke, J.F., Mayne, L.V. (1999).
Application of a rapid method (targeted display) for the identification of differentially expressed mRNAs following NGF-induced neuronal differentiation in PC12 cells.
Mol. Cell Neurosci. 13, 119-130.

- Butz, S., Okamoto, M., Sudhof, T.C. (1998).
A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain.
Cell 94, 773-782.
- Bursztajn, S., DeSouza, R., McPhie, D.L., Berman, S.A., Shioi, J., Robakis, N.K., Neve, R.L. (1998).
Overexpression in neurons of human presenilin-1 or a presenilin-1 familial Alzheimer disease mutant does not enhance apoptosis.
J. Neurosci. 18, 9790-9799.
- Butz, S., Okamoto, M., Sudhof, T.C. (1998).
A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain.
Cell 94, 773-782.
- Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P., Black, R.A. (1998).
Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor.
J. Biol. Chem. 273, 27765-27767.
- Buxbaum, J.D., Gandy, S.E., Cicchetti, P., Ehrlich, M.E., Czernik, A.J., Fracasso, R.P., Ramabhadran, T.V., Unterbeck, A.J., Greengard, P. (1990).
Processing of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6003-6006.
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D.R., Price, D.L., Wong, P.C. (2001).
BACE1 is the major beta-secretase for generation of Aβ peptides by neurons.
Nat. Neurosci. 4, 233-234.
- Cao, X., Sudhof, T.C. (2001).
A transcriptionally [correction of transcriptionally] active complex of APP with Fe65 and histone acetyltransferase Tip60.
Science 293, 115-120.
- Caporaso G.L., Gandy S.E., Buxbaum J.D., Greengard P. (1992).
Chloroquine inhibits intracellular degradation but not secretion of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 2252-2256.
- Chae, H.S., Bach, J.H., Lee, M.W. Kim, H.S., Kim, Y.S., Choo, K.Y., Choi, S.H., Park, C.H., Lee, S.H., Suh, Y.H., Kim, S.S., Lee, W.B. (2001).
Estrogen attenuates cell death induced by carboxy-terminal fragment of amyloid precursor protein in PC12 through a receptor-dependent pathway.
J. Neurosci. Res. 65, 403-407.
- Chen, Y., Liu, W., McPhie, D.L., Hassinger, L., Neve, R.L. (2003).
APP-BP1 mediates APP-induced apoptosis and DNA synthesis and is increased in Alzheimer's disease brain.
J. Cell Biol. 163, 27-33.
- Chen, Y., McPhie, D.L., Hirschberg, J., Neve, R.L. (2000).
The amyloid precursor protein-binding protein APP-BP1 drives the cell cycle through the S-M checkpoint and causes apoptosis in neurons.
J. Biol. Chem. 275, 8929-8935.
- Cheng, X., Hart, G.W. (2001).
Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: posttranslational regulation of turnover and transactivation activity.
J. Biol. Chem. 276, 10570-10575.
- Cheng, X., Hart, G.W. (2000).
Glycosylation of the murine estrogen receptor-alpha.
J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 75, 147-158.

- Cheng, X., Cole, R.N., Zaia, J., Hart, G.W. (2000)
Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta.
Biochemistry 39, 11609-11620.
- Chou, C.F., Smith, A.J., Omary, M.B. (1992).
Characterization and dynamics of O-linked glycosylation of human cytokeratin 8 and 18.
J. Biol. Chem. 267, 3901-3906.
- Chou, T.Y., Hart, G.W. (2001).
O-linked N-acetylglucosamine and cancer: messages from the glycosylation of c-Myc.
Adv. Exp. Med. Biol. 491, 413-418.
- Chou, T.Y., Dang, C.V., Hart, G.W. (1995 a).
Glycosylation of the c-Myc transactivation domain.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4417-4421.
- Chou, T.Y., Hart, G.W., Dang, C.V. (1995 b).
c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas.
J. Biol. Chem. 270, 18961-18965.
- Chow, N., Korenberg, J.R., Chen, X.N., Neve, R.L. (1996).
APP-BP1, a novel protein that binds to the carboxyl-terminal region of the amyloid precursor protein.
J. Biol. Chem. 271, 11339-11346.
- Chyung, A.S., Greenberg, B.D., Cook, D.G., Doms, R.W., Lee, V.M. (1997).
Novel beta-secretase cleavage of beta-amyloid precursor protein in the endoplasmic reticulum/intermediate compartment of NT2N cells.
J. Cell Biol. 138, 671-680.
- Citron, M., Diehl, T.S., Gordon, G., Biere, A.L., Seubert, P., Selkoe, D.J. (1996).
Evidence that the 42- and 40-amino acid forms of amyloid beta protein are generated from the beta-amyloid precursor protein by different protease activities.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 13170-13175.
- Citron, M., Vigo-Pelfrey, C., Teplow, D.B., Miller, C., Schenk, D., Johnston, J., Winblad, B., Venizelos, N., Lannfelt, L., Selkoe, D.J. (1994).
Excessive production of amyloid beta-protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish family Alzheimer disease mutation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11993-11997.
- Citron M., Teplow, D.B., Selkoe, D.J. (1995).
Generation of amyloid beta protein from its precursor is sequence specific.
Neuron 14, 661-670.
- Clark, R.J., McDonough, P.M., Swanson, E., Trost, S.U., Suzuki, M., Fukuda, M., Dillmann, W.H. (2003).
Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation.
J. Biol. Chem. 278, 44230-44237.
- Cole, R.N., Hart, G.W. (2001).
Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals.
J. Neurochem. 79, 1080-1089.
- Cole, R.N., Hart, G.W. (1999).
Glycosylation sites flank phosphorylation sites on synapsin I: O-linked N-acetylglucosamine residues are localized within domains mediating synapsin I interactions.
J. Neurochem. 73, 418-428.
- Comer, F.I., Hart, G.W. (2001).
Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II.
Biochemistry 40, 7845-7852.

6. Literaturverzeichnis

- Comer, F.I., Vosseller, K., Wells, L., Accavitti, M.A., Hart, G.W. (2001).
Characterization of a mouse monoclonal antibody specific for O-linked N-acetylglucosamine.
Anal. Biochem. 293, 169-177.
- Comer, F.I., Hart, G.W. (2000).
O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate.
J. Biol. Chem. 275, 29179-29182.
- Comtesse, N., Maldener, E., Meese, E. (2001).
Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 283, 634-640.
- Cordy, J.M., Hussain, I., Dingwall, C., Hooper, N.M., Turner, A.J. (2003).
Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 11735-11740.
- Cupers, P., Orleans, I., Craessaerts, K., Annaert, W., De Strooper, B. (2001).
The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurons in culture.
J. Neurochem. 78, 1168-1178.
- Darkin J.T., Murthy, S., Husten, E.J., Trusko, S.P., Savage, M.J., Rotella, D.P., Greenberg, B.D., Siman, R. (1999).
Rank-order of potencies for inhibition of the secretion of abeta40 and abeta42 suggests that both are generated by a single gamma-secretase.
J. Biol. Chem. 274, 20499-20504.
- De Strooper, B. (2003).
Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex.
Neuron 38, 9-12.
- De Strooper, B., Annaert, W. (2000).
Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein.
J. Cell Sci. 113, 1857-1870.
- De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., Van Leuven, F. (1998).
Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein.
Nature 391, 387-390.
- De Strooper, B., Simons, M., Multhaup, G., Van Leuven, F., Beyreuther, K., Dotti, C.G. (1995).
Production of intracellular amyloid-containing fragments in hippocampal neurons expressing human amyloid precursor protein and protection against amyloidogenesis by subtle amino acid substitutions in the rodent sequence.
EMBO J. 14, 4932-4938.
- De Strooper, B., Umans, L., Van Leuven, F., Van Den Berghe, H. (1993).
Study of the synthesis and secretion of normal and artificial mutants of murine amyloid precursor protein (APP): cleavage of APP occurs in a late compartment of the default secretion pathway.
J. Cell Biol. 121, 295-304.
- Dickens, M., Rogers, J.S., Cavanagh, J., Raitano, A., Xia, Z., Halpern J.R., Greenberg, M.E., Sawyers, C.L., Davis, R.J. (1997).
A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway.
Science 277, 693-696.
- Ding, M., Vandre, D.D. (1996).
High molecular weight microtubule-associated proteins contain O-linked-N-acetylglucosamine.
J. Biol. Chem. 271, 12555-12561.

- Dole, M., Mack, L.L., Hines, R.L. (1968).
Molecular beams of macroions.
J. Chem. Phys. 49, 2240-2249.
- Dominguez, D.I., De Strooper, B., Annaert, W. (2001).
Secretases as therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease.
Amyloid 8, 124-142.
- Dong, D.L.-Y., Xu, Z.-S., Hart, G.W., Cleveland, D.W. (1996).
Cytoplasmic O-GlcNAc modification of the head domain and the KSP repeat motif of the neurofilament protein Neurofilament-H.
J. Biol. Chem. 271, 20845-20852.
- Dong, D.L.-Y., Xu, Z.-S., Chevrier, M.R., Cotter, R.J., Cleveland, D.W., Hart, G.W. (1993a).
Glycosylation of mammalian neurofilaments.
J. Biol. Chem. 268, 16679-16687.
- Dong, D.L., Xu, Z.S., Chevrier, M.R., Cotter, R.J., Cleveland, D.W., Hart, G.W. (1993b).
Glycosylation of mammalian neurofilaments. Localization of multiple O-linked N-acetylglucosamine moieties on neurofilament polypeptides L and M.
J. Biol. Chem. 268, 16679-16687.
- Dumont, J.N. (1972).
Oogenesis in *Xenopus laevis*.
J. Morph. 136, 153-180.
- Durkin, J.T., Murthy, S., Husten, E.J., Trusko, S.P., Savage, M.J., Rotella, D.P., Greenberg, B.D., Siman, R. (1999).
Rank-order of potencies for inhibition of the secretion of abeta40 and abeta42 suggests that both are generated by a single gamma-secretase.
J. Biol. Chem. 274, 20499-20504.
- Dyrks, T., Dyrks, E., Monning, U., Urmoneit, B., Turner, J., Beyreuther, K. (1993)
Generation of beta A4 from the amyloid protein precursor and fragments thereof.
FEBS Lett. 335, 89-93.
- Ermekova, K.S., Zambrano, N., Linn, H., Minopoli, G., Gertler, F., Russo, T., Sudol, M. (1997).
The WW domain of neural protein FE65 interacts with proline-rich motifs in Mena, the mammalian homolog of *Drosophila* enabled.
J. Biol. Chem. 272, 32869-32877.
- Esch, F.S., Keim, P.S., Beattie, E.C., Blacher, R.W., Culwell, A.R., Oltersdorf, T., McClure, D., Ward, P.J. (1990).
Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor.
Science 248, 1122-1124.
- Fang, B., Miller, M.W. (2001).
Use of galactosyltransferase to assess the biological function of O-linked N-acetyl-d-glucosamine: a potential role for O-GlcNAc during cell division.
Exp. Cell Res. 263, 243-253.
- Fassbender, K., Simons, M., Bergmann, C., Stroick, M., Lutjohann, D., Keller, P., Runz, H., Kuhl, S., Bertsch, T., von Bergmann, K., Hennerici, M., Beyreuther, K., Hartmann, T. (2001a).
Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 5856-5861.
- Fassbender, K., Masters, C., Beyreuther, K. (2001b).
Alzheimer's disease: molecular concepts and therapeutic targets.
Naturwissenschaften 88, 261-267.

6. Literaturverzeichnis

- Farzan, M., Schnitzler, C.E., Vasilewa, N., Leung, D., Choe, H. (2000).
BACE2, a beta-secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 9712-9717.
- Fiore, F., Zambrano, N., Minopoli, G., Donini, V., Duilio, A., Russo, T. (1995).
The regions of the Fe65 protein homologous to the phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding domain of Shc bind the intracellular domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein.
J. Biol. Chem. 270, 30853-30856.
- Francis, R., McGrath, G. Zhang, J., Ruddy, D.A., Sym, M., Apfeld, J., Nicoll, M., Maxwell, M. Hai, B., Ellis, M.C., Parks, A.L., Xu, W., Li, J., Gurney, M., Myers, R.L., Himes, C.S., Hiebsch, R., Ruble, C., Nye, J.S., Curtis, D. (2002).
aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation.
Dev. Cell. 3, 85-97
- Frolich, L., Blum-Degen, D., Bernstein, H.G., Engelsberger, S., Humrich, J., Laufer, S., Muschner, D., Thalheimer, A., Turk, A., Hoyer, S., Zochling, R., Boissl, K.W., Jellinger, K., Riederer, P. (1998).
Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease.
J. Neural. Transm. 105, 423-438.
- Fukuchi, K., Sopher, B., Furlong, C.E., Smith, A.C., Dang, N., Martin, G.M. (1993).
Selective neurotoxicity of COOH-terminal fragments of the beta-amyloid precursor protein.
Neurosci. Lett. 154, 145-148.
- Fukuchi, K., Kamino, K., Deeb, S.S., Furlong, C.E., Sundstrom, J.A., Smith, A.C., Martin, G.M. (1992).
Expression of a carboxy-terminal region of the beta-amyloid precursor protein in a heterogeneous culture of neuroblastoma cells: evidence for altered processing and selective neurotoxicity.
Brain Res. Mol. Brain Res. 16, 37-46.
- Fukumoto, H., Asami-Odaka, A., Suzuki, N., Shimada, H., Ihara, Y., Iwatsubo T. (1996).
Amyloid beta protein deposition in normal aging has the same characteristics as that in Alzheimer's disease. Predominance of A beta 42(43) and association of A beta 40 with cored plaques.
Am J. Pathol. 148, 259-265.
- Gao, Y., Miyazaki, J., Hart, G.W. (2003).
The transcription factor PDX is post-translationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells.
Arch. Biochem. Biophys. 415, 155-163.
- Gao, Y., Pimplikar, S.W. (2001).
The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 14979-14984.
- Gao, Y., Wells, L., Comer, F.I., Parker, G.J., Hart, G.W. (2001).
Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: Cloning and characterization of a neutral, cytosolic β -N-acetylglucosaminidase from human brain.
J. Biol. Chem. 276, 9838-9845.
- Gasparini, L., Gouras, G.K., Wang, R., Gross, R.S., Beal, M.F., Greengard, P., Xu, H. (2001).
Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling.
J. Neurosci. 21, 2561-2570.
- Gewinner, C., Hart, G.W., Zachara, N., Cole, R., Beisenherz-Huss, C., Groner, B. (2004).
The coactivator of transcription CREB binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5.
J. Biol. Chem. 279, 3563-3572.

6. Literaturverzeichnis

- Giambarella, U., Yamatsuji, T., Okamoto, T., Matsui, T., Ikezu, T., Murayama, Y., Levine, M.A., Katz, A., Gautam, N., Nishimoto, I. (1997).
G protein betagamma complex-mediated apoptosis by familial Alzheimer's disease mutant of APP.
EMBO J. 16, 4897-48907.
- Glennner, G.G., Wong, C.W. (1984).
Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 120, 885-890.
- Gollner, U.F. (2001).
Untersuchungen zur Bedeutung der N-Acetylglucosaminylierung für die proteolytische Spaltung der schwedischen Mutante des β -Amyloid Precursor Protein.
Dissertationsschrift, Universität Bonn.
- Gomez, N., Cohen, P. (1991).
Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases.
Nature 353, 170-173.
- Goold, R.G.; Gordon-Weeks, P.R. (2001).
Microtubule-associated protein 1B phosphorylation by glycogen synthase kinase 3 β is induced during PC12 cell differentiation.
J. Cell Sci. 114, 4273-4284.
- Gooley, A.A., Classon, B.J., Marschalek, R., Williams, K.L. (1991).
Glycosylation sites identified by detection of glycosylated amino acids released from Edman degradation: the identification of Xaa-Pro-Xaa-Xaa as a motif for Thr-O-glycosylation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 1194-1201.
- Gotoh, Y., Nishida, E., Ymyshita, T., Hoshi, M., Kawakami, M., Sakai, H. (1990).
Microtubule-associated-protein (MAP) kinase activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. Identity with the mitogen-activated MAP kinase of fibroblastic cells.
Eur. J. Biochem. 193, 661-669.
- Gouras, G.K., Xu, H., Jovanovic, J.N., Buxbaum, J.D., Wang, R., Greengard, P., Relkin, N.R., Gandy, S. (1998).
Generation and regulation of beta-amyloid peptide variants by neurons.
J. Neurochem. 71, 1920-1925.
- Goutte, C., Tsunozaki, M., Hale, V.A., Priess, J.R. (2002).
APH-1 is a multipass membrane protein essential for the Notch signaling pathway in *Caenorhabditis elegans* embryos.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 775-779.
- Grant, W.N., Welker, D.L., Williams, K.L. (1985).
A polymorphic, prespore-specific cell surface glycoprotein is present in the extracellular matrix of *Dictyostelium discoideum*.
Mol. Cell Biol. 5, 2559-2566.
- Greene, L.A., Tischler, A.S. (1976)
Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2424-2428.
- Greenfield, J.P., Tsai, J., Gouras, G.K., Hai, B., Thinakaran, G., Checler, F., Sisodia, S.S., Greengard, P., Xu, H. (1999).
Endoplasmic reticulum and trans-Golgi network generate distinct populations of Alzheimer beta amyloid peptides.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 742-747.

6. Literaturverzeichnis

- Greis, K.D., Hart, G.W. (1998).
Analytical methods for the study of O-GlcNAc glycoproteins and glycopeptides.
Methods Mol. Biol. 76, 19-33.
- Griffith, L.S., Schmitz, B. (1999).
O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation.
Eur. J. Biochem. 262, 824-831.
- Griffith, L.S., Schmitz, B. (1995).
O-linked N-acetylglucosamine is upregulated in Alzheimer brains.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 213, 424-431.
- Griffith, L.S., Mathes, M., Schmitz, B. (1995).
Beta-amyloid precursor protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine.
J. Neurosci. Res. 41, 270-278.
- Grimm, H.S., Beher, D., Lichtenthaler, S.F., Shearman, M.S., Beyreuther, K., Hartmann, T. (2003).
gamma-Secretase cleavage site specificity differs for intracellular and secretory amyloid beta.
J. Biol. Chem. 278, 13077-13085.
- Grundke-Iqbal, I, Iqbal, K., Quinlan, M., Tung, Y.C., Zaidi, M.S., Wisniewski, H.M. (1986).
Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments.
J. Biol. Chem. 261, 6084-6089.
- Gu, Y., Hamajima, N., Ihara, Y. (2000).
Neurofibrillary tangle-associated collapsin response mediator protein-2 (CRMP-2) is highly phosphorylated on Thr-509, Ser-518, and Ser-522.
Biochemistry 39, 4267-4275.
- Gupta-Bansal, R., Frederickson, R.C., Brunden, K.R. (1995).
Proteoglycan-mediated inhibition of A beta proteolysis. A potential cause of senile plaque accumulation.
J. Biol. Chem. 270, 18666-18671.
- Haass C, Lemere CA, Capell A, Citron M, Seubert P, Schenk D, Lannfelt L, Selkoe DJ. (1995).
The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway.
Nat. Med. 1, 1291-1296.
- Haass, C., Schlossmacher, M.G., Hung, A.Y., Vigo-Pelfrey, C., Mellon, A., Ostaszewski, B.L., Lieberburg, I., Koo, E.H., Schenk, D., Teplow, D.B. (1992).
Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism.
Nature 359, 322-325.
- Hagmann, J., Grob, M., Burger, M.M. (1992).
The cytoskeletal protein talin is O-glycosylated.
J. Biol. Chem. 267, 14424-14428.
- Haltiwanger, R.S., Grove, K., Philipsberg, G.A. (1998).
Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate.
J. Biol. Chem. 273, 3611-3617.
- Han, I., Oh, E.S., Kudlow, J.E. (2000).
Responsiveness of the state of O-linked N-acetylglucosamine modification of nuclear pore protein p62 to the extracellular glucose concentration.
Biochem. J. 350, 109-114.
- Han, I., Kudlow, J.E. (1997).
Reduced O glycosylation of Sp1 is associated with increased proteasome susceptibility.
Mol. Cell Biol. 17, 2550-2558.

- Hanover, J.A. (2001).
Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine.
FASEB J. 15, 1865-1876.
- Hanover, J.A., Lai, Z., Lee, G., Lubas, W.A., Sato, S.M. (1999).
Elevated O-linked N-acetylglucosamine metabolism in pancreatic beta-cells.
Arch. Biochem. Biophys. 362, 38-45.
- Harding, T.C., Xue, L., Bienemann, A., Haywood, D., Dickens, M., Tolkovsky, A.M., Uney, J.B. (2001).
Inhibition of JNK by overexpression of the JNL binding domain of JIP-1 prevents apoptosis in sympathetic neurons.
J. Biol. Chem. 276, 4531-4534.
- Hart, G.W. (1997).
Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins.
Ann. Rev. Biochem. 66, 315-335.
- Hart, G.W., Kreppel, L.K., Comer, F.I., Arnold, C.S., Snow, D.M., Ye, Z., Cheng, X., DellaManna, D., Caine, D.S., Earles, B.J., Akimoto, Y., Cole, R.N., Hayes, B.K. (1996).
O-GlcNAcylation of key nuclear and cytoskeletal proteins: reciprocity with O-phosphorylation and putative roles in protein multimerization.
Glycobiology 6, 711-716.
- Hartmann, T., Bieger, S.C., Bruhl, B., Tienari, P.J., Ida, N., Allsop, D., Roberts, G.W., Masters, C.L., Dotti, C.G., Unsicker, K., Beyreuther, K. (1997).
Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides.
Nat. Med. 3, 1016-1020.
- Hartmann, T., Bergsdorf, C., Sandbrink, R., Tienari, P.J., Multhaup, G., Ida, N., Bieger, S., Dyrks, T., Weidemann, A., Masters, C.L., Beyreuther, K. (1996).
Alzheimer's disease betaA4 protein release and amyloid precursor protein sorting are regulated by alternative splicing.
J. Biol. Chem. 271, 13208-13214.
- Hatsell, S., Medina, L., Merola, J., Haltiwanger, R., Cowin, P. (2003).
Plakoglobin is O-glycosylated close to the N-terminal destruction box.
J. Biol. Chem. 278, 37745-37752.
- Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rulicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., Lipp, H.P., Wolfner, D.P., Muller, U. (2000).
Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members.
J. Neurosci. 20, 7951-7963.
- Hebert, L.E., Scherr, P.A., Bienias, J.L., Bennett, D.A., Evans, D.A. (2003).
Alzheimer disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census.
Arch. Neurol. 60, 1119-1122.
- Herreman, A., Serneels, L., Annaert, W., Collen, D., Schoonjans, L., De Strooper, B. (2000).
Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells.
Nat. Cell Biol. 2, 461-462.
- Herrup, K., Arendt, T. (2002).
Re-expression of cell cycle proteins induces neuronal cell death during Alzheimer's disease.
J Alzheimers Dis. 4, 243-7.
- Ho, L., Qin, W., Pompl, P.N., Xiang, Z., Wang, J., Zhao, Z., Peng, Y., Cambareri, G., Rocher, A., Mobbs, C.V., Hof, P.R., Pasinetti, G.M. (2004).
Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.
FASEB J. 18, 902-4.

6. Literaturverzeichnis

- Ho, C.S., Marinescu, V., Steinhilb, M.L., Gaut, J.R., Turner, R.S., Stuenkel, E.L. (2002). Synergistic effects of Munc18a and X11 proteins on amyloid precursor protein metabolism. *J. Biol. Chem.* 277, 27021-27028.
- Holt, G.D., Snow, C.M., Senior, A., Haltiwanger, R.S., Gerace, L., Hart, G.W. (1987). Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. *J. Cell Biol.* 104, 1157-1165.
- Homayouni, R., Rice, D.S., Sheldon, M., Curran, T. (1999). Disabled-1 binds to the cytoplasmic domain of amyloid precursor-like protein 1. *J. Neurosci.* 19, 7507-7515.
- Hondermarck, H., McLaughlin, C.S., Patterson, S.D., Bradshaw, R.A. (1994). Early changes in protein synthesis induced by basic fibroblast growth factor, nerve growth factor, and epidermal growth factor in PC12 pheochromocytoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9377-9381.
- Howlett, D.R., Jennings, K.H., Lee, D.C., Clark, M.S., Brown, F., Wetzel, R., Wood, S.J., Camilleri, P., Roberts, G.W. (1995). *Neurodegeneration* 4, 23-32.
- Hoyer, S. (2002). The brain insulin signal transduction system and sporadic (type II) Alzheimer disease: an update. *J. Neural. Transm.* 109, 341-360.
- Hoyer, S. (2000). Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update. *Exp. Gerontol.* 35, 1363-1372.
- Hoyer, S. (1996). Oxidative metabolism deficiencies in brain of patients with Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 165, 18-24.
- Hu, Y.Y., He, S.S., Wang, X.C., Duan, Q.H., Khatoon, S., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Wang, J.Z. (2002). Elevated levels of phosphorylated neurofilament proteins in cerebrospinal fluid of Alzheimer disease patients. *Neurosci. Lett.* 320, 156-160.
- Hung A.Y., Selkoe D.J. (1994). Selective ectodomain phosphorylation and regulated cleavage of beta-amyloid precursor protein. *EMBO J.* 13, 534-542.
- Hussain, I., Powell, D., Howlett, D.R., Tew, D.G., Meek, T.D., Chapman, C., Gloger, I.S., Murphy, K.E., Southan, C.D., Ryan, D.M., Smith, T.S., Simmons, D.L., Walsh, F.S., Dingwall, C., Christie, G. (1999). Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol. Cell Neurosci.* 14, 419-427.
- Iijima K., Ando K., Takeda S., Satoh Y., Seki T., Itohara S., Greengard P., Kirino Y., Nairn A.C., Suzuki T. (2000). Neuron-specific phosphorylation of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein by cyclin-dependent kinase 5. *J. Neurochem.* 75, 1085-1091.
- Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Wisniewski H.M. (1986). Neuronal cytoskeleton in aging and dementia. *Prog. Brain Res.* 70, 279-288.
- Isohara, T., Horiuchi, A., Watanabe, T., Ando, K., Czernik, A.J., Uno, I., Greengard, P., Nairn, A.C., Suzuki, T. (1999). Phosphorylation of the cytoplasmic domain of Alzheimer's beta-amyloid precursor protein at Ser655 by a novel protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 300-305.

6. Literaturverzeichnis

- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., Kawashima-Morishima, M., Lee, H.J., Hama, E., Sekine-Aizawa, Y., Saido, T.C. (2000).
Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: suppression leads to biochemical and pathological deposition.
Nat. Med.6, 143-150.
- Iwatsubo, T., Odaka, A., Suzuki, N., Mizusawa, H., Nukina, N., Ihara, Y. (1994).
Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43).
Neuron 13, 45-53.
- Jackson, S.P., Tjian, R. (1988).
O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation.
Cell 55, 125-133.
- Jarrett J.T., Berger, E.P., Lansbury, P.T. Jr. (1993).
The C-terminus of the beta protein is critical in amyloidogenesis.
Ann NY Acad. Sci. 695, 144-148.
- Jarrett, J.T., Lansbury, P.T. Jr. (1993).
Seeding „one dimensional crystallization“ of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?
Cell 73, 1055-1058.
- Jensen, M., Schroder, J., Blomberg, M., Engvall, B., Pantel, J., Ida, N., Basun, H., Wahlund, L.O., Werle, E., Jauss, M., Beyreuther, K., Lannfelt, L., Hartmann, T. (1999).
Cerebrospinal fluid A beta42 is increased in early in sporadic Alzheimer's disease and declines with the disease progression.
Ann. Neurol. 45, 504-511.
- Jiang, M.S., Hart, G.W. (1997).
A subpopulation of estrogen receptors are modified by O-linked N-acetylglucosamine.
J. Biol. Chem. 272, 2421-2428.
- Jick, H., Zornberg, G.L., Jick, S.S., Seshadri, S., Drachman, D.A. (2000).
Statins and the risk of dementia.
Lancet 356, 1627-1631.
- Jing, S., Tapley, P., Barbacid, M. (1992).
Nerve growth factor mediates signal transduction through trk homodimer receptors.
Neuron 9, 1067-1079.
- Jung, K.M., Tan, S., Landman, N., Petrova, K. Murray, S. Lewis, R., Kim, P.K., Kim, D.S., Ryu, S.H., Chao, M.V., Kim, T.W. (2003).
Regulated intramembrane proteolysis of the p75 neurotrophin receptor modulates its association with the TrkA receptor.
J. Biol. Chem. 278, 42161-42169.
- Jung, E., Gooley, A.A., Packer, N.H., Slade, M.B., Williams, K.L., Dittrich, W. (1997).
An in vivo approach for the identification of acceptor sites for O-glycosyltransferases: motifs for the addition of O-GlcNAc in Dictyostelium discoideum.
Biochemistry 36, 4034-4040.
- Jung, S.S., Nalbantoglu, J., Cashman, N.R. (1996).
Alzheimer's beta-amyloid precursor protein is expressed on the surface of immediately ex vivo brain cells: a flow cytometric study.
J. Neurosci. Res. 46, 336-348.
- Kang, J., Lemaire, H.G., Unterbeck, A., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Grzeschik, K.H., Multhaup, G., Beyreuther, K., Muller-Hill, B. (1987).
The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor.
Nature 325, 733-736

- Kearse, K.P., Hart, G.W. (1991).
Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 1701-1705.
- Kelly, W.G., Dahmus, M.E., Hart, G.W. (1993).
RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc.
J. Biol. Chem. 268, 10416-10424.
- Kim, H., Bang, O.Y., Jung, M.W., Ha, S.D., Hong, H.S., Huh, K., Kim, S.U., Mook-Jung, I. (2001).
Neuroprotective effects of estrogen against beta-amyloid toxicity are mediated by estrogen receptors in cultured neuronal cells.
Neurosci. Lett. 302, 58-62.
- Kim, H.S., Park, C.H., Cha, S.H., Lee, J.H., Lee, S., Kim, Y., Rah, J.C., Jeong, S.J., Suh, Y.H. (2000).
Carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP destabilizes calcium homeostasis and renders neuronal cells vulnerable to excitotoxicity.
FASEB J. 14, 1508-1517.
- Kimberly, W.T., LaVoie, M.J., Ostaszewski, B.L., Ye, W., Wolfe, M.S., Selkoe, D.J. (2003).
Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 6382-6387.
- Kimberly, W.T., Zheng, J.B., Guenette, S.Y., Selkoe, D.J. (2001).
The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner.
J. Biol. Chem. 276, 40288-40292.
- King, G.D., Turner, R.S. (2004).
Adaptor protein interactions: modulators of amyloid precursor protein metabolism and Alzheimer's disease risk?
Exp. Neurology 185, 208-219.
- Kinoshita, A., Whelan C.M., Berezovska, O., Hyman, B.T. (2002).
The gamma secretase-generated carboxyl terminal domain of the amyloid precursor protein induces apoptosis via Tip60 in H4 cells.
J. Biol. Chem. 277, 28530-28536.
- Klesse, L.J., Meyers, K.A., Marshall, C.J., Parada, L.F. (1999).
Nerve growth factor induces survival and differentiation through two distinct signaling cascades in PC12 cells
Oncogene 18, 2055-2068.
- Kojro, E., Gimpl, G., Lammich, S., Marz, W., Fahrenholz, F. (2001).
Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha -secretase ADAM 10.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 5815-5820.
- Koo, E.H., Squazzo, S.L. (1994).
Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway.
J. Biol. Chem. 269, 17386-17389.
- Koo, E.H., Sisodia, S.S., Cork, L.C., Unterbeck, A., Bayney, R.M., Price, D.L. (1990).
Differential expression of amyloid precursor protein mRNAs in cases of Alzheimer's disease and in aged nonhuman primats.
Neuron 4, 97-104.
- Kreppel, L.K., Hart, G.W. (1999).
Regulation of a cytosolic and nuclear O-GlcNAc transferase. Role of the tetratricopeptide repeats.
J. Biol. Chem. 274, 32015-32022.
- Kreppel, L.K., Blomberg, M.A., Hart, G.W. (1997).
Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats.
J. Biol. Chem. 272, 9308-9315.

- Kuklinski, S (2000).
Charakterisierung des tierischen Lektins Galectin-3 in neuronalen Zellen unter normalen und pathologischen Bedingungen.
Dissertationsschrift, Universität Bonn, 46-53.
- Laemmli, U.K. (1970).
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4.
Nature 227, 680-685.
- Lai, A., Sisodia, S.S., Trowbridge, I.S. (1995).
Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain.
J. Biol. Chem. 270, 3565-3573.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C., Fahrenholz, F. (1999).
Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 3922-3927.
- Lanier, L.M., Gates, M.A., Witke, W., Menzies, A.S., Wehman, A.M., Macklis, J.D., Kwiatkowski, D., Soriano, P., Gertler, F.B. (1999)
Mena is required for neurulation and commissure formation
Neuron, 22, 313-325.
- Lau, K.F., McLaughlin, D.M., Standen, C.L., Irving, N.G., Miller, C.C. (2000).
Fe65 and X11beta co-localize with and compete for binding to the amyloid precursor protein.
Neuroreport 11, 3607-3610.
- Lefebvre, T., Ferreira, S., Dupont-Wallois, L. Bussiere, T., Dupire, M.J., Delacourte, A., Michalski, J.C., Caillet-Boudin, M.L. (2003).
Evidence of a balance between phosphorylation and O-GlcNAc glycosylation of Tau proteins--a role in nuclear localization.
Biochim. Biophys. Acta. 1619, 167-76.
- Lefebvre, T., Ferreira, S., Dupont-Wallois, L., Bussiere, T., Dupire, M.J., Delacourte, A., Michalski, J.C., Caillet-Boudin, M.L. (2000).
Evidence of a balance between phosphorylation and O-glycosylation of Tau proteins- a role in nuclear localization.
Biochem. Biophys. Acta 161, 167-176.
- Lefebvre T., Alonso C., Mahboub S., Dupire M.J., Zanetta J.P., Caillet-Boudin M.L., Michalski J.C. (1999).
Effect of okadaic acid on O-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line.
Biochim Biophys. Acta 1472, 71-81.
- Levi-Montalcini R. (1987).
The nerve growth factor 35 years later.
Science 237, 1154-1162.
- Levi-Montalcini, R., Angeletti, P.U. (1968).
Nerve growth factor.
Physiol. Rev. 48, 534-569.
- Li, Y.M., Lai, M.T., Xu, M., Huang, Q., DiMuzio-Mower, J., Sardana, M.K., Shi, X.P., Yin, K.C., Shafer, J.A., Gardell, S.J. (2000).
Presenilin 1 is linked with gamma-secretase activity in the detergent solubilized state.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 6138-6143.
- Lin, X., Koelsch, G., Wu, S., Downs, D., Dashti, A., Tang, J. (2000).
Human aspartic protease memapsin 2 cleaves the beta-secretase site of beta-amyloid precursor protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 1456-1460.

- Liu, K., Paterson, A.J., Chin, E., Kudlow, J.E. (2000).
Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic beta cells: linkage of O-linked GlcNAc to beta cell death.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2820-2825.
- Lubas, W.A., Hanover, J.A. (2000).
Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity.
J. Biol. Chem. 275, 10983-10988.
- Lubas, W.A., Frank, D.W., Krause, M., Hanover, J.A. (1997).
O-linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats.
J. Biol. Chem. 272, 9316-9324.
- Luthi, T., Haltiwanger, R.S., Greengard, P., Bahler, M. (1991).
Synapsins contain O-linked N-acetylglucosamine.
J. Neurochem. 56, 1493-1498.
- Ma, J., Yee, A., Brewer, H.B. Jr., Das, S., Potter, H. (1994).
Amyloid-associated proteins alpha 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer beta-protein into filaments.
Nature 372, 92-94.
- Mäß, C. (2002).
Untersuchungen zur Rolle der O-glykosidisch gebundenen N-Acetylglucosamin Modifikation von Proteinen auf das proteolytische Prozessieren des humanen Amyloid Precursor Proteins.
Dissertationsschrift, Universität Bonn.
- Marcinkiewicz, M., Seidah, N.G. (2000).
Coordinated expression of beta-amyloid precursor protein and the putative beta-secretase BACE and alpha-secretase ADAM10 in mouse and human brain.
J. Neurochem. 75, 2133-2143.
- Majumdar, G., Harmon, A., Candelaria, R., Martinez-Hernandez, A., Raghow, R., Solomon, S.S. (2003).
O-glycosylation of Sp1 and transcriptional regulation of the calmodulin gene by insulin and glucagon.
Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285, E584-591.
- Marquez-Sterling, N.R., Lo, A.C., Sisodia, S.S., Koo, E.H. (1997).
Trafficking of cell-surface beta-amyloid precursor protein: evidence that a sorting intermediate participates in synaptic vesicle recycling.
J. Neurosci. 17, 140-151.
- Masters, C.L., Simms, G., Weinman, N.A., Multhaup, G., McDonald, B.L., Beyreuther, K. (1985).
Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4245-4249.
- Matsuda, S., Yasukawa, T., Homma, Y., Ito, Y., Niikura, T., Hiraki, T., Hirai, S., Ohno, S., Kita, Y., Kawasumi, M., Kouyama, K., Yamamoto, T., Kyriakis, J.M., Nishimoto, I. (2001).
c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein-1b/islet-brain-1 scaffolds Alzheimer's amyloid precursor protein with JNK.
J. Neurosci. 21, 65597-65607.
- McClain, D.A., Lubas, W.A., Cooksey, R.C., Hazel, M., Parker, G.J., Love, D.C., Hanover, J.A. (2002).
Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 10695-10699.
- McFarlane, I., Georgopoulou, N., Coughlan, C.M., Gillian, A.M., Breen, K.C. (1999).
The role of the protein glycosylation state in the control of cellular transport of the amyloid beta precursor protein.
Neuroscience 90, 15-25.

- Medina, L., Grove, K., Haltiwanger, R.S. (1998).
SV40 large T antigen is modified with O-linked N-acetylglucosamine but not with other forms of glycosylation.
Glycobiology 8, 383-391.
- Melnikova I.N., Gardner P.D. (2001).
The signal transduction pathway underlying ion channel gene regulation by SP1-C-Jun interactions.
J. Biol. Chem. 276, 19040-19045.
- Miller M.W., Caracciolo M.R., Berlin W.K., Hanover J.A. (1999).
Phosphorylation and glycosylation of nucleoporins.
Arch. Biochem. Biophys. 367, 51-60.
- Mori, H., Takio, K., Ogawara, M., Selkoe, D.J. (1992).
Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease.
J. Biol. Chem. 267, 17082-17086.
- Murphy, J.E., Hanover, J.A., Froehlich, M., DuBois, G., Keen, J.H. (1994).
Clathrin assembly protein AP-3 is phosphorylated and glycosylated on the 50-kDa structural domain.
J. Biol. Chem. 269, 21346-21352.
- Naslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses, A.D., Tjernberg, L.O., Silberring, J., Gandy, S.E., Winblad, B., Greengard, P., Nordstedt, C., Terenius, L. (1994).
Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 8378-8382.
- Neve, R.L., McPhie, D.L., Chen Y. (2000).
Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein(1).
Brain Res. 886, 54-66.
- Neve, R.L., Finch, E.A., Dawes, L.R. (1988).
Expression of the Alzheimer amyloid precursor gene transcripts in the human brain.
Neuron 1, 669-677.
- Nishimoto, I., Okamoto, T., Matsuura, Y., Takahashi, S., Okamoto, T., Murayama, Y., Ogata, E. (1993).
Alzheimer amyloid protein precursor complexes with brain GTP-binding protein G(o)
Nature 362, 75-79.
- Nishimura, I., Uetsuki, T., Ohsawa, Y., Saito, I., Okamura, H., Uchiyama, Y., Yoshikawa, K. (1998).
Degeneration in vivo of rat hippocampal neurons by wild-type Alzheimer amyloid precursor protein overexpressed by adenovirus-mediated gene transfer.
J. Neurosci. 18, 2387-2398.
- Nishiyama, K., Trapp, B.D., Ikezu, T., Ransohoff, R.M., Tomita, T., Iwatsubo, T., Kanazawa, I., Hsiao, K.K., Lisanti, M.P., Okamoto, T. (1999).
Caveolin-3 upregulation activates beta-secretase-mediated cleavage of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease.
J. Neurosci 19, 6538-6548.
- Nolte, D., Muller, U. (2002).
Human O-GlcNAc transferase (OGT): genomic structure, analysis of splice variants, fine mapping in Xq13.1.
Mamm. Genome 13, 62-64.
- Noviello, C., Vito, P., Lopez, P., Abdallah, M., D'Adamio, L. (2003).
Autosomal recessive hypercholesterolemia protein interacts with and regulates the cell surface level of Alzheimer's amyloid beta precursor protein.
J. Biol. Chem. 278, 31843-31847.
- Oishi, M., Nairn, A.C., Czernik, A.J., Lim, G.S., Isohara, T., Gandy, S.E., Greengard, P., Suzuki, T. (1997).
The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid precursor protein is phosphorylated at Thr654, Ser655, and Thr668 in adult rat brain and cultured cells.
Mol. Med. 3, 111-123.

- Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Ogata, E., Nishimoto, I. (1995).
Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor
J. Biol. Chem. 270, 4205-4208.
- Oltersdorf T., Ward P.J., Henriksson T., Beattie E.C., Neve R., Lieberburg I., Fritz L.C. (1990).
The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway.
J. Biol. Chem. 256, 4492-4497.
- Oltersdorf, T., Fritz, L.C., Schenk, D.B., Lieberburg, I., Johnson-Wood, K.L., Beattie, E.C., Ward, P.J., Blacher, R.W., Dovey, H.F., Sinha, S. (1989).
The secreted form of the Alzheimer's amyloid precursor protein with the Kunitz domain is protease nexin-II.
Nature 341, 144-147.
- Ott, A., Stolk, R.P., van Harskamp, F., Pols, H.A., Hofman, A., Breteler, M.M. (1999).
Diabetes mellitus and the risk of dementia: The Rotterdam Study.
Neurology 53, 1937-1942.
- Pahlsson P., Spitalnik S.L. (1996).
The role of glycosylation in synthesis and secretion of beta-amyloid precursor protein by Chinese hamster ovary cells.
Arch. Biochem. Biophys. 331, 177-186.
- Pahlsson, P., Shakin-Eshleman, S.H., Spitalnik, S.L. (1992).
N-linked glycosylation of beta-amyloid precursor protein.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 189, 1667-1673.
- Parkin, E.T., Hussain, I., Karran, E.H., Turner, A.J., Hooper, N.M. (1999).
Characterization of detergent-insoluble complexes containing the familial Alzheimer's disease-associated presenilins.
J. Neurochem. 72, 1534-1543.
- Parsons, C.G., Danysz, W., Quack, G. (1999).
Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist- a review of preclinical data.
Neuropharmacology 38, 735-767.
- Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E.H., Turner, A.J., Hooper, N.M. (1999).
Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells.
Biochemistry 38, 9728-9734.
- Patti, M.E., Virkamaki, A., Landaker, E.J., Kahn, C.R., Yki-Jarvinen, H. (1999).
Activation of the hexosamine pathway by glucosamine in vivo induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle.
Diabetes 48, 1562-1571.
- Pike, C.J., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G., Cotman, C.W. (1991).
In vitro aging of beta-amyloid protein causes peptide aggregation and neurotoxicity.
Brain Res. 563, 311-314.
- Ponte, P., Gonzalez-DeWhitt, P., Schilling, J., Miller, J., Hsu, D., Greenberg, B., Davis, K., Wallace, W., Lieberburg, I., Fuller, F. (1988).
A new A4amyloid mRNA contains a domain homologous to serine proteinase inhibitors.
Nature 331, 525-527.
- Qiu, W.Q., Ferreira, A., Miller, C., Koo, E.H., Selkoe, D.J. (1995).
Cell-surface beta-amyloid precursor protein stimulates neurite outgrowth of hippocampal neurons in an isoform-dependent manner.
J. Neurosci. 15, 2157-2167.

6. Literaturverzeichnis

- Ravichandran, K.S. (2001).
Signaling via Shc family adapter proteins.
Oncogene 20, 6322-6330.
- Refolo, L.M., Maleste, B., LaFrancois, J., Bryant-Thomas, T., Wang, R., Tint, G.S., Sambamurti, K., Duff, K., Pappolla, M.A. (2000).
Hypercholesterolemia accelerates the Alzheimer's amyloid pathology in a transgenic mouse model.
Neurobiol. Dis. 7, 321-331.
- Refolo, L.M., Sambamurti, K., Efthimiopoulos, S., Pappolla, M.A., Robakis, N.K. (1995).
Evidence that secretase cleavage of cell surface Alzheimer amyloid precursor protein occurs after normal endocytic internalization.
J. Neurosci. Res. 40, 694-706.
- Refolo, L.M., Wittenberg, I.S. (1991).
The Alzheimer amyloid precursor is associated with the detergent-insoluble cytoskeleton.
J. Neurosci. 11, 3888-3897.
- Rex-Mathes, M., Koch, J., Werner, S., Griffith, L.S., Schmitz, B. (2002).
Immunological detection of O-GlcNAc.
Methods Mol. Biol., 194, 73-87.
- Rex-Mathes, M., Koch, J., Werner, S., Griffith, L.S., Viebahn, C., Thelen, K., Schmitz, B. (2001).
O-GlcNAc expression in developing and ageing mouse brain.
Biochimie, 83, 583-590.
- Riddel, D.R., Christie, G., Hussain, I., Dingwall, C. (2001).
Compartmentalization of beta-secretase (Asp2) into low-buoyant density, noncaveolar lipid rafts
Curr. Biol. 11, 1288-1293.
- Roberds, S.L., Anderson, J., Basi, G., Bienkowski, M.J., Branstetter, D.G., Chen, K.S., Freedman, S.B., Frigon, N.L., Games, D., Hu, K., Johnson-Wood, K., Kappenman, K.E., Kawabe, T.T., Kola, I., Kuehn, R., Lee, M., Liu, W., Motter, R., Nichols, N.F., Power, M., Robertson, D.W., Schenk, D., Schoor, M., Shopp, G.M., Shuck, M.E., Sinha, S., Svensson, K.A., Tatsuno, G., Tintrupp, H., Wijsman, J., Wright, S., McConlogue, L. (2001).
BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics.
Hum. Mol. Genet. 10, 1317-1324.
- Rockenstein, E., Hansen, L.A., Mallory, M., Trojanowski, J.Q., Galasko, D., Masliah, E. (2001).
Altered expression of the synuclein family mRNA in Lewy body and Alzheimer's disease.
Brain Res. 914, 48-56.
- Roher, A.E., Palmer, K.C., Yurewicz, E.C., Ball, M.J., Greenberg, B.D. (1993 a).
Morphological and biochemical analyses of amyloid plaque core proteins purified from Alzheimer disease brain tissue.
J. Neurochem. 61, 1916-1926.
- Roher, A.E., Lowenson, J.D., Clarke, S., Woods, A.S., Cotter, R.J., Gowing, E., Ball, M.J. (1993 b).
Beta-amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 10836-10840.
- Roncarati, R., Sestan, N., Scheinfeld, M.H., Berechid, B.E., Lopez, P.A., Meucci, O., McGlade, J.C., Rakic, P., D'Adamio, L. (2002).
The gamma-secretase-generated intracellular domain of beta-amyloid precursor protein binds Numb and inhibits Notch signaling.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 7102-7107.
- Roos, M.D., Su, K., Baker, J.R., Kudlow, J.E. (1997).
O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interaction.
Mol. Cell Biol. 17, 6472-6480.

- Roquemore, E.P., Chevrier, M.R., Cotter, R.J., Hart, G.W. (1996).
Dynamic O-GlcNAcylation of the small heat shock protein α B-crystallin
Biochemistry 35, 3578-3586.
- Roquemore E.P., Chou T.Y., Hart G.W. (1994).
Detection of O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) on cytoplasmic and nuclear proteins.
Methods Enzymol. 230, 443-460.
- Russo, C., Dolcini, V., Salis, S., Venezia, V., Zambrano, N., Russo, T., Schettini, G. (2002).
Signal transduction through tyrosine-phosphorylated C-terminal fragments of amyloid precursor protein via an enhanced interaction with Shc/Grb2 adaptor proteins in reactive astrocytes of Alzheimer's disease brain.
J. Biol. Chem. 277, 35282-35288.
- Russo, C., Salis, S., Dolcini, V., Venezia, V., Song, X.H., Teller, J.K., Schettini, G. (2001).
Amino-terminal modification and tyrosine phosphorylation of [corrected] carboxy-terminal fragments of the amyloid precursor protein in Alzheimer's disease and Down's syndrome brain.
Neurobiol. Dis 8, 173-180.
- Sabo, S.L., Lanier, L.M., Ikin A.F., Khorkova, O., Sahasrabudhe, S., Greengard, P., Buxbaum, J.D. (1999).
Regulation of beta-amyloid secretion by FE65, an amyloid precursor binding protein.
J. Biol. Chem. 274, 7952-7957.
- Saito, F., Tani, A., Miyatake, T., Yanagisawa, K. (1995).
N-linked oligosaccharide of beta-amyloid precursor protein (beta APP) of C6 glioma cells: putative regulatory role in beta APP processing.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 210, 703-710.
- Sato Y., Liu C., Wojczyk B.S., Kobata A., Spitalnik S.L., Endo T. (1999).
Study of the sugar chains of recombinant human amyloid precursor protein produced by Chinese hamster ovary cells.
Biochim Biophys Acta 1472, 344-358.
- Sayeski P.P., Kudlow J.E. (1996).
Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription.
J. Biol. Chem. 271, 15237-15243.
- Schäger, H., Jagow, G. (1987).
Tricine-sodium-dodecylsulfate polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 kDa.
Anal Biochem. 166, 368-379
- Schellenberg, G.D., D'Souza, I., Poorkaj, P. (2000).
The genetics of Alzheimer's disease.
Curr. Psychiatry Rep. 2, 158-164
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., Seubert, P. (1999).
Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse.
Nature 400, 173-177.
- Schmitz, B., Griffith, L. (1998).
N-Acetylglucosaminylierung: Die Alternative zur Ser/Thr-Phosphorylierung.
Biospektrum 6, 25-28.
- Schnitzer, J., Schachner, M. (1981).
Characterization of isolated mouse cerebellar cell populations in vitro.
J Neuroimmunol. 1, 457-70.

6. Literaturverzeichnis

- Segal, R.A., Greenberg, M.E. (1996).
Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors.
Annu. Rev. Neurosci. 19, 463-489.
- Selkoe D.J., Podlisny M.B., Joachim C.L., Vickers E.A., Lee G., Fritz L.C., Oltersdorf T. (1988).
Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 7341-7345.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., Swindlehurst, C., McCormack, R., Wolfert, R., Selkoe, D., Lieberburg, I., Schenk, D. (1992).
Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids.
Nature 359, 325-327.
- Shafi, R., Iyer, S.P., Ellies, L.G., O'Donnell, N., Marek, K.W., Chui, D., Hart, G.W., Marth, J.D. (2000).
The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 5735-5739.
- Shaw, P., Freeman, J., Bovey, R., Iggo, R. (1996).
Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus.
Oncogene 12, 921-930.
- Shepherd, C.E., McCann, H., Thiel, E., Halliday, G.M. (2002).
Neurofilament-immunoreactive neurons in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies.
Neurobiol. Dis. 9, 249-257.
- Sinha, S., Anderson, J.P., Barbour, R., Basi, G.S., Caccavello, R., Davis, D., Doan, M., Dovey, H.F., Frigon, N., Hong, J., Jacobson, Croak, K., Jewett, N., Keim, P., Knops, J., Lieberburg, J., Power, M., Tan, H., Tatsuno, G., Tung, J., Schenk, D., Seubert, P., Suomensaaari, S.M., Wang, S., Walker, D., John, V. (1999).
Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain.
Nature 402, 537-540.
- Sisodia, S.S., Koo, E.H., Beyreuther, K., Unterbeck, A., Price, D.L. (1990).
Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing.
Science 248, 492-495.
- Skovronsky, D.M., Pijak, D.S., Doms, R.W., Lee, V.M. (2000).
A distinct ER/IC gamma-secretase competes with the proteasome for cleavage of APP.
Biochemistry 39, 810-817.
- Slawson, C., Pidala, J., Potter, R. (2001).
Increased N-acetyl-beta-glucosaminidase activity in primary breast carcinomas corresponds to a decrease in N-acetylglucosamine containing proteins.
Biochim. Biophys. Acta 1537, 147-157.
- Slunt, H.H., Thinakaran, G., Von Koch, C., Lo, A.C., Tanzi, R.E., Sisodia, S.S. (1994).
Expression of a ubiquitous, cross-reactive homologue of the mouse beta-amyloid precursor protein (APP).
J. Biol. Chem. 269, 2637-2644.
- Smith, R.P., Higuchi, D.A., Broze, G.J. Jr. (1990).
Platelet coagulation factor X_{II}-inhibitor, a form of Alzheimer amyloid precursor protein.
Science 248, 1126-1128.
- Snow, D.M., Hart, G.W. (1998).
Nuclear and cytoplasmic glycosylation.
Int. Rev. Cytol. 181, 43-74.

- Snow, A.D., Kinsella, M.G., Parks, E., Sekiguchi, R.T., Miller, J.D., Kimata, K., Wight, T.N. (1995). Differential binding of vascular cell-derived proteoglycans (perlecan, biglycan, decorin and versican) to the beta-amyloid protein of Alzheimer's disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 320, 84-95.
- Snow, C.M., Senior, A., Gerace, L. (1987). Monoclonal antibodies identify a group of nuclear pore complex glycoproteins. *J. Cell Biol.* 104, 1143-1156.
- Solans, A., Estivill, X., de La Luna, S. (2000). A new aspartyl protease on 21q23.3, BACE2, is highly similar to Alzheimer's amyloid precursor protein beta-secretase. *Cytogenet. Cell Genet.* 89, 177-184.
- Soriano, S., Chyung, A.S., Chen, X., Stokin, G.B., Lee, V.M., Koo, E.H. (1999). Expression of beta-amyloid precursor protein-CD3gamma chimeras to demonstrate the selective generation of amyloid beta(1-40) and amyloid beta(1-42) peptides within secretory and endocytic compartments. *J. Biol. Chem.* 274, 32295-32300.
- Storey, E., Spurck, T., Pickett-Heaps, J., Beyreuther, K., Masters, C.L. (1996). The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is found on the surface of static but not activity motile portions of neurites. *Brain Res.* 735, 59-66.
- Takahashi, R.H., Nam, E.E., Edgar, M., Gouras, G.K. (2002). Alzheimer beta-amyloid peptides: normal and abnormal localization. *Histol. Histopathol.* 17, 239-246.
- Tang, M.X., Jacobs, D., Stern, Y., Marder, K., Schofield, P., Gurland, B., Andrews, H., Mayeux, R. (1996). Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 348, 429-32.
- Tanzi, R.E., Gusella, J.F., Watkins, P.C., Bruns, G.A., St George-Hyslop, P., Van Keuren, M.L., Patterson, D., Pagan, S., Kurnit, D.M., Neve, R.L. (1987). Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235, 880-884.
- Tarr, P.E., Roncarati, R., Pelicci, G., Pelicci, P.G., D'Adamio, L. (2002). Tyrosine phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic tail promotes interaction with Shc. *J. Biol. Chem.* 277, 16798-16804.
- Thinakaran, G., Teplow, D.B., Siman, R., Greenberg, B., Sisodia, S.S. (1996). Metabolism of the „Swedish“ amyloid precursor protein variant in Neuro2A (N2a) cells. Evidence that cleavage at the „beta-secretase“ site occurs in the Golgi apparatus. *J. Biol. Chem.* 271, 9390-9397.
- Thornton, T.M., Swain, S.M., Olszewski, N.E. (1999). Gibberellin signal transduction presents ellipsis the SPY who O-GlcNAc'd me. *Trends Plant Sci.* 4, 424-428.
- Tienari P.J., De Strooper B., Ikonen E., Simons M., Weidemann A., Czech C., Hartmann T., Ida N., Multhaup G., Masters C.L., Van Leuven F., Beyreuther K., Dotti C.G. (1996). The beta-amyloid domain is essential for axonal sorting of amyloid precursor protein. *EMBO J.* 15, 5218-5229.
- Tomita, S., Kirino, Y., Suzuki, T. (1998). Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein (APP) by secretases occurs after O-glycosylation of APP in the protein secretory pathway. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism. *J. Biol. Chem.* 273, 6277-6284.

- Torres, C.-R., Hart, G.W. (1984).
Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes.
J. Biol. Chem. 259, 3308-3317.
- Turner, J.R., Tartakoff, A.M., Greenspan, N.S. (1990).
Cytologic assessment of nuclear and cytoplasmic O-linked N-acetylglucosamine distribution by using anti-streptococcal monoclonal antibodies.
Proc Natl. Acad. Sci. 87, 5608-5612.
- Vassar, R., Bennett, B.D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E.A., Denis, P., Teplow, D.B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., Jarosinski, M.A., Biere, A.L., Curran, E., Burgess, T., Louis, J.C., Collins, F., Treanor, J., Rogers, G., Citron, M. (1999).
Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE.
Science 286, 735-741.
- Vekrellis K, Ye Z, Qiu WQ, Walsh D, Hartley D, Chesneau V, Rosner MR, Selkoe DJ. (2000).
Neurons regulate extracellular levels of amyloid beta-protein via proteolysis by insulin-degrading enzyme.
J. Neurosci. 20, 1657-1665.
- Vician, L., Basconillo, R., Herschman, H.R. (1997).
Identification of genes preferentially induced by nerve growth factor versus epidermal growth factor in PC12 pheochromocytoma cells by means of representational difference analysis.
J. Neurosci. Res. 50, 32-43.
- Von Koch, C.S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L.H., Price, D.L., Sisodia, S.S. (1997).
Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice.
Neurobiol. Aging 18, 661-669.
- Waeber, G., Delplanque, J., Bonny, C., Mooser, V., Steinmann, M., Widmann, C., Maillard, A., Miklossy, J., Dina, C., Hani, E.H., Vionnet, N., Nicod, P., Boutin, P., Froguel, P. (2000).
The gene MAPK8IP1, encoding islet-brain-1, is a candidate for type 2 diabetes.
Nat. Genet. 24, 291-295.
- Walsh, D.M., Tseng, B.P., Rydel, R.E., Podlisny, M.B., Selkoe, D.J. (2000).
The oligomerization of amyloid beta-protein begins intracellularly in cells derived from human brain.
Biochemistry 39, 10831-10839.
- Wang, R., Sweeney, D., Gandy, S.E., Sisodia, S.S. (1996).
The profile of soluble amyloid beta protein in cultured cell media. Detection and quantification of amyloid beta protein and variants by immunoprecipitation-mass spectrometry.
J. Biol. Chem. 27, 31894-31902.
- Wasco, W., Gurubhagavatula, S., Paradis, M.D., Romano, D.M., Sisodia, S.S., Hyman, B.T., Neve, R.L., Tanzi, R.E. (1993).
Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor.
Nat. Genet. 5, 95-100.
- Wasco, W., Bupp, K., Magendantz, M., Gusella, J.F., Tanzi, R.E., Solomon, F. (1992).
Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10758-10762.
- Watanabe, T., Sukegawa, J., Sukegawa, I., Tomita, S., Iijima, K., Oguchi, S., Suzuki, T., Nairn, A.C., Greengard, P. (1999).
A 127-kDa protein (UV-DDB) binds to the cytoplasmic domain of the Alzheimer's amyloid precursor protein.
J. Neurochem. 72, 549-556.

- Weggen, S. (1996).
Herstellung und Charakterisierung von retroviralen Vektoren zur Expression des humanen Amyloid Vorläufer Proteins (APP) in neuronalen Transplantaten.
Diplomarbeit der Universität Bonn, 40-47.
- Weidemann, A., König, G., Bunke, D., Fischer, P., Salbaum, J.M., Masters, C.L., Beyreuther, K. (1989).
Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein.
Cell 57, 115-126.
- Wells, L., Vosseller, K., 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.
- Wells, L., Gao, Y., Mahoney, J.A., Vosseller, K., Chen, C., Rosen, A., Hart, G.W. (2002).
Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic beta-N-acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase.
J. Biol. Chem. 277, 1755-1761.
- Wells, L., Kreppel, L.K., Hart, G.W. (1999)
A Yin-Yang Complex: O-GlcNAc Transferase is in a complex with a protein serine/threonine phosphatase.
Mol. Bio. Cell Suppl. 1112.
- White, P., Hiley, C.R., Goodhardt, M.J., Carrasco, L.H., Keet, J.P., Williams, I.E., Bowen, D.M. (1977).
Neocortical cholinergic neurons in elderly people.
Lancet 1, 668-671.
- Wilson, C.A., Doms, R.W., Lee, V.M. (2003).
Distinct presenilin-dependent and presenilin-independent gamma-secretases are responsible for total cellular Abeta production.
J. Neurosci. Res. 74, 361-369.
- Wisniewski, T., Golabek, A., Matsubara, E., Ghiso, J., Frangione, B. (1993).
Apolipoprotein E: binding to soluble Alzheimer's beta-amyloid.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 192, 359-365.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Ostaszewski, B.L., Diehl, T.S., Kimberly, W.T., Selkoe, D.J. (1999a).
Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity.
Nature 398, 513-517.
- Wolfe, M.S., Xia, W., Moore, C.L., Leatherwood, D.D., Ostaszewski, B., Rahmati, T., Donker, IO, Selkoe, D.J. (1999b).
Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease.
Biochemistry 38, 4720-4727.
- Wolozin, B. (2001).
A fluid connection: cholesterol and Abeta.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 5371-5373.
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G., Siegel, G. (2000)
Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors.
Arch. Neurol. 57, 1439-1443.
- Xu, H., Sweeney, D., Wang, R., Thinakaran, G., Lo, A.C., Sisodia, S.S: Greengard, P., Gandy, S. (1997).
Generation of Alzheimer beta-amyloid protein in the trans-Golgi network in the apparent absence of vesicle formation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 3748-3752.

6. Literaturverzeichnis

- Yamatsuji, T., Okamoto, T., Takeda, S., Murayama, Y., Tanaka, N., Nishimoto, I. (1996).
Expression of V642 APP mutant causes cellular apoptosis as Alzheimer trait-linked phenotype.
EMBO J. 15, 498-509.
- Yamazaki, T., Koo, E.H., Selkoe, D.J. (1997).
Cell surface amyloid beta-protein precursor colocalizes with beta 1 integrins at substrate contact sites in neural cells.
J. Neurosci. 17, 1004-1010.
- Yan G.Z., Ziff E.B. (1997).
Nerve growth factor induces transcription of the p21 WAF1/CIP1 and cyclin D1 genes in PC12 cells by activating the Sp1 transcription factor.
J. Neurosci. 17, 6122-6132.
- Yan, R., Bienkowski, M.J., Shuck, M.E., Miao, H., Tory, M.C., Pauley, A.M., Brashier, J.R., Stratman, N.C., Mathews, W.R., Buhl, A.E., Carter, D.B., Tomasselli, A.G., Parodi, L.A., Heinrichson, R.L., Gurney, M.E. (1999).
Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity.
Nature 402, 533-537.
- Yang, X., Zhang, F., Kudlow, J.E. (2002).
Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression.
Cell 110,69-80.
- Yang, X., Su, K., Roos, M.D., Chang, Q., Paterson, A.J., Kudlow, J.E. (2001).
O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability.
Proc. Natl. Acad. Sci. 98, 6611-6616.
- Yankner, B.A., Dawes, L.R., Fisher, S., Villa-Komaroff, L., Oster-Granite, M.L., Neve, R.L. (1989).
Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease.
Science 245, 417-420.
- Yao, P.J., Coleman, P.D. (1998a).
Reduction of O-linked N-acetylglucosamine-modified assembly protein-3 in Alzheimer's disease.
J. Neurosci. 18, 2399-2411.
- Yao, P.J., Coleman, P.D. (1998b).
Reduced O-glycosylated clathrin assembly protein AP180: implication for synaptic vesicle recycling dysfunction in Alzheimer's disease.
Neurosci. Lett. 252, 33-36.
- Yao, R., Cooper, G.M. (1995).
Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor.
Science 267, 2003-2006.
- Yazaki M., Tagawa K., Maruyama K., Sorimachi H., Tsuchiya T., Ishiura S., Suzuki K. (1996).
Mutation of potential N-linked glycosylation sites in the Alzheimer's disease amyloid precursor protein (APP).
Neurosci. Lett. 221, 57-60.
- Yki-Jarvinen, H., Virkamaki, A., Daniels, M.C., McClain, D., Gottschalk, W.K. (1998).
Insulin and glucosamine infusions increase O-linked N-acetyl-glucosamine in skeletal muscle proteins in vivo.
Metabolism 47, 449-455.
- Yoshida, H., Watanabe A., Ihara, Y. (1998).
Collapsin response mediator protein-2 is associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease.
J. Biol. Chem. 273, 9761-9768.
- Younkin, S.G. (2001).
Amyloid beta vaccination: reduced plaques and improved cognition.
Nat. Med. 7, 18-19.

6. Literaturverzeichnis

Yu, G., Nishimura, M., Arawaka, S., Levitan, D., Zhang, L., Tandon, A., Song, Y.Q., Rogaeva, E., Chen, F., Kawarai, T., Supala, A., Levesque, L., Yu, H., Yang, D.S., Holmes, E., Milman, P., Liang, Y., Zhang, D.M., Xu, D.H., Sato, C., Rogaev, E., Smith, M., Janus, C., Zhang, Y., Aebbersold, R., Farrer, L.S., Sorbi, S., Bruni, A., Fraser, P., St George-Hyslop, P. (2000).

Nicastrin modulates presenilin-mediated notch/glp-1 signal transduction and betaAPP processing.
Nature 407, 48-54.

Zachara, N.E., Packer, N.H., Temple, M.D., Slade, M.B., Jardine, D.R., Karuso, P., Moss, C.J., Mabbutt, B.C., Curmi, P.M., Williams, K.L., Gooley, A.A. (1996).

Recombinant prespore-specific antigen from *Dictyostelium discoideum* is a beta-sheet glycoprotein with a spacer peptide modified by O-linked N-acetylglucosamine.
Eur. J. Biochem. 238, 511-518.

Zambrano, N., Bruni, P., Minopoli, G., Mosca, R., Molino, D., Russo, C., Schettini, G., Sudol, M., Russo, T. (2001).

The beta-amyloid precursor protein APP is tyrosine-phosphorylated in cells expressing a constitutively active form of the Abl protooncogene.
J. Biol. Chem. 276, 19787-19792.

Zhang, F., Su, K., Yang, X., Bowe, D.B., Paterson, A.J., Kudlow, J.E. (2003).

O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome.
Cell 115, 715-725.

Zhang, Z., Nadeau, P., Song, W., Donoviel, D., Yuan, M., Bernstein, A., Yankner, B.A. (2000).

Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1.
Nat. Cell Biol. 2, 463-465.

Zhang, X., Bennett, V. (1996).

Identification of O-linked N-acetylglucosamine modification of ankyrin_G, isoforms targeted to Nodes of Ranvier.
J. Biol. Chem. 271, 31391-31398.

Zhao, B., Chrest, F.J., Horton, W.E. Jr., Sisodia, S.S., Kusiak, J.W. (1997).

Expression of mutant amyloid precursor proteins induces apoptosis in PC12 cells.
J. Neurosci. Res. 47, 253-263.

Zheng, P., Eastman, J., Vande Pol, S., Pimplikar, S.W. (1998).

PAT1, a microtubule-interacting protein, recognizes the basolateral sorting signal of amyloid precursor protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14745-14750.

Züllighofen, N. (1997).

Untersuchungen zur O-GlcNAc Modifikation von Proteinen bei der Parkinsonschen Krankheit.
Dissertationsschrift, Universität Bonn.

7. Anhang

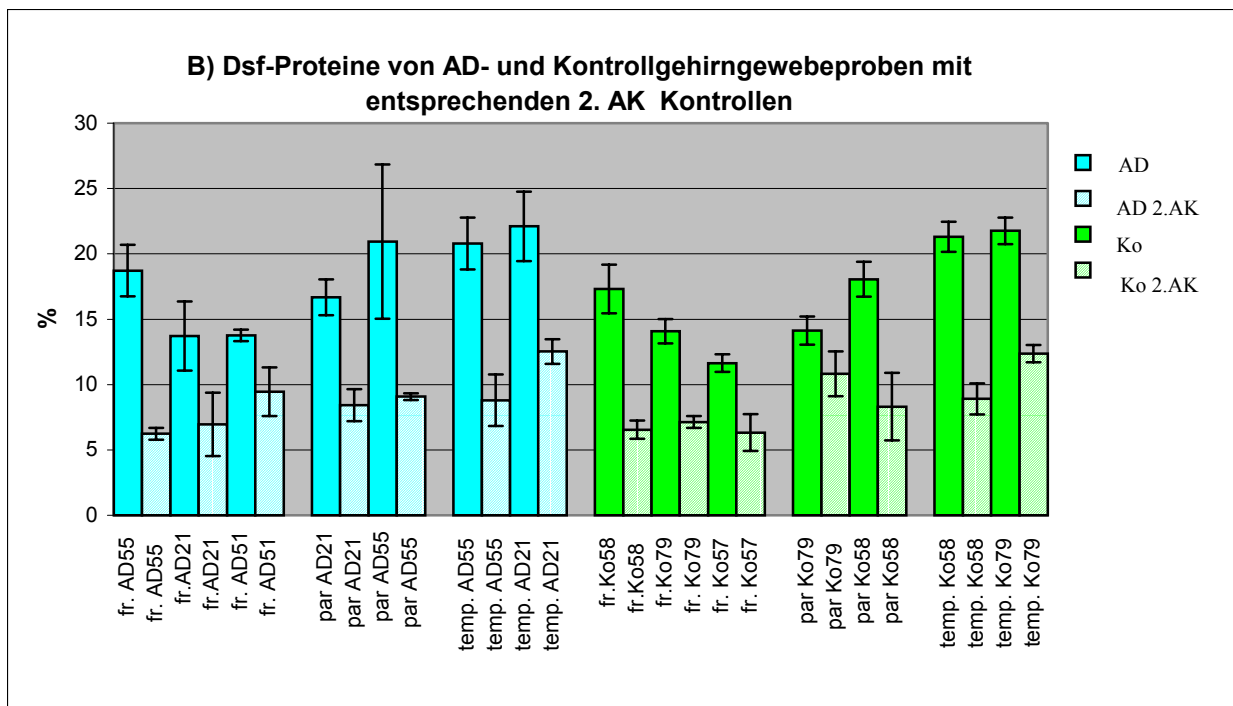
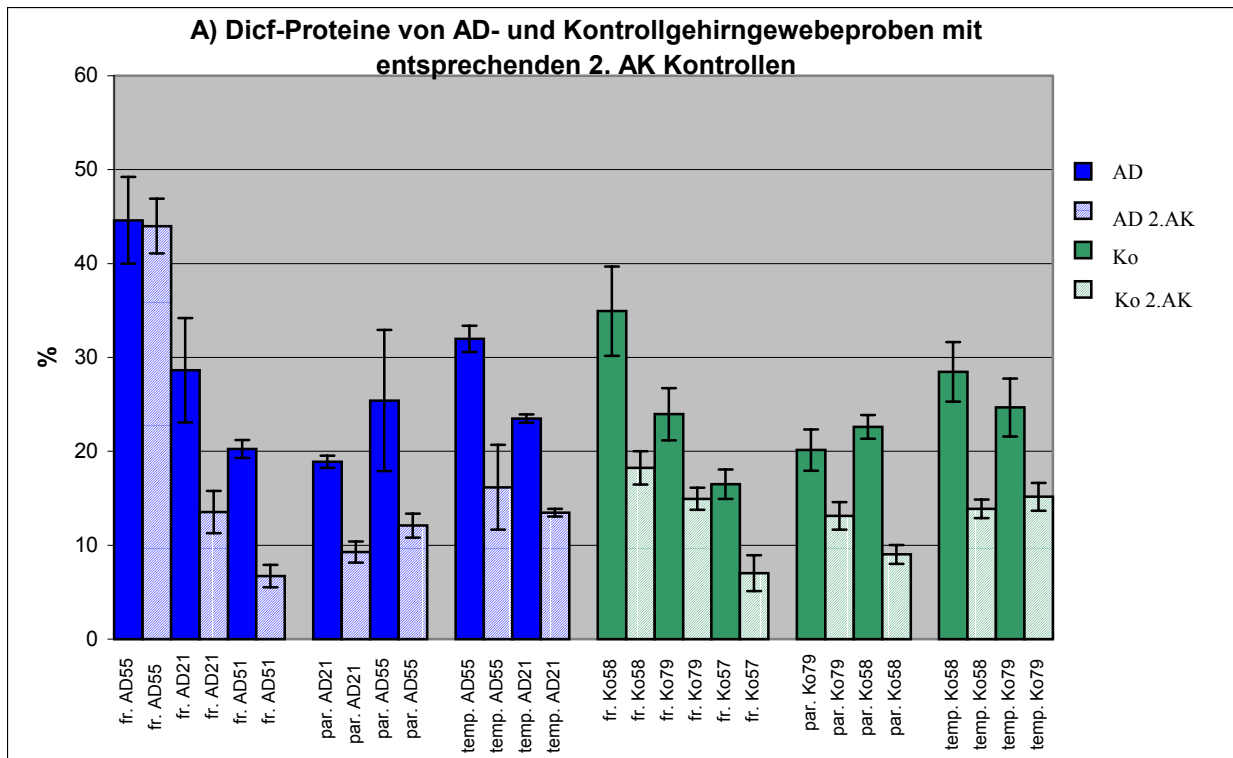


Abb. 28 Quantitativer O-GlcNAc Nachweis: ELISA mit Alzheimer- und Kontrollproben, mit Darstellung der Sekundärantikörper-Kontrollen. Es wurden 25 µg Dcf- (A) bzw. Dsf-Proteine (B) pro Vertiefung eingesetzt. Der ELISA wurde mit dem monoklonalen MUD50 Antikörper als Erstantikörper durchgeführt (2.2.4). Die optische Dichte (OD) der Farbreaktion der an den Zweitantikörper gebundenen Peroxidase mit ABTS wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die gemessenen OD Werte wurden in Relation zu dem gemessenen OD Wert von GlcNAc-BSA (62,5 ng), das als Positivkontrolle mitgeführt wurde, gesetzt (GlcNAc-BSA=100%). Die dargestellten Werte entsprechen dem Durchschnitt aus drei Messwerten ±

7. Anhang

Standardabweichung. Die OD Werte für die unspezifische Bindung des Sekundärantiköpers an das Antigen wurden separat dargestellt (AD 2.AK / Ko 2.AK). Abkürzungen: fr (Frontallappen), par (Parietallappen), temp. (Temporallappen), AD (Alzheimer Demenz), Ko (Kontrolle).

7. Anhang

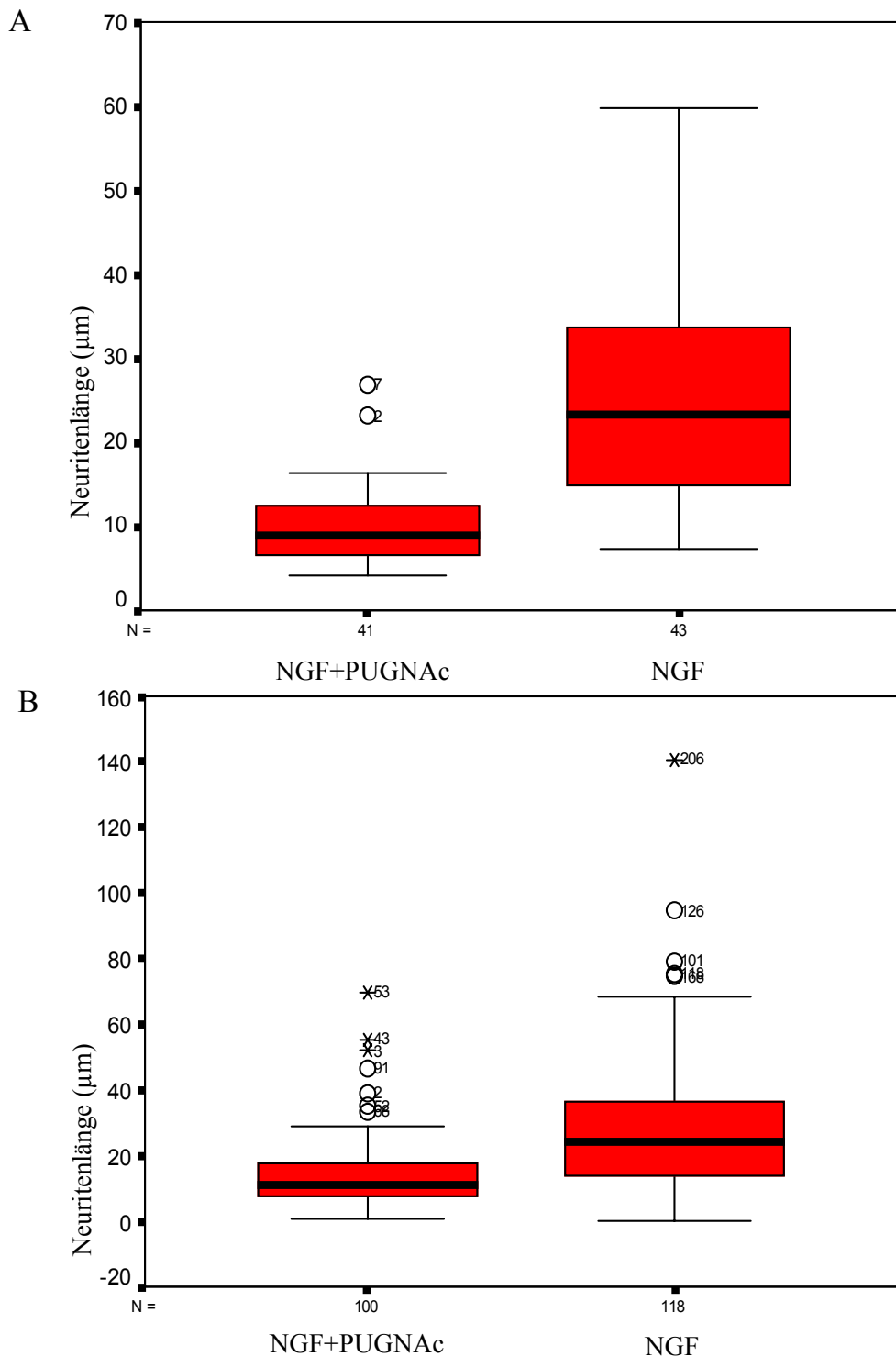


Abb. 29 Graphische Darstellung der Neuritenlängen in Form von Boxplots. Um beurteilen zu können, ob die Unterschiede hinsichtlich der Neuritenlänge zwischen mit NGF+PUGNAC und mit NGF behandelten PC12-Zellen signifikant sind, wurden die Neuritenlängen gemessen. Für die statistische Auswertung wurde der U- Test für unabhängige Stichproben nach Wilcoxon, Mann und Whitney durchgeführt. Die Neuritenlängen werden in Form eines Boxplots graphisch dargestellt. Insgesamt wurden in A) 41 Neuriten von mit NGF+PUGNac und 43 Neuriten von mit NGF behandelten PC12-Zellen und in B) 100 Neuriten von mit NGF+PUGNac und 118 Neuriten von mit NGF behandelten PC12-Zellen ausgemessen. Aus der Abbildung geht hervor, dass die mit NGF+PUGNac behandelten Zellen signifikant kürzere Neuriten haben im Vergleich zu den ausschliesslich mit NGF behandelten Zellen. Als Ausreisser (O) sind die Werte gekennzeichnet, deren Abstand vom 25%-Perzentil nach unten (rote Fläche unter dem als schwarzen Balken eingezeichneten Median) bzw. vom 75%-Perzentil nach oben zwischen dem 1,5fachen und dem 3fachen der Boxhöhe liegen. Die Boxhöhe gibt den Abstand zwischen dem 25%- und dem 75%-Perzentil wieder. Der Abstand extremer Werte (*) von dem 25%- oder dem 75%-Perzentil beträgt mehr als das Dreifache der Boxhöhe.