

Institut für Physiologie, Biochemie und Hygiene der Tiere

Der Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf das Prozessieren des Amyloid Precursor
Proteins (APP) sowie auf die Regulation der Cdk5

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Grades

Doktor der Ernährungs- und Haushaltswissenschaft
(Dr. oec. troph.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt am

11.12.2003

von

Julia Kellersmann

aus

Düsseldorf

Referent:

Frau Prof. B. Schmitz

Korreferent:

Frau Prof. H. Sauerwein

Tag der mündlichen Prüfung:

____ 17.02.2004 _____

Gedruckt bei:

Mein Dank gilt Frau Prof. Schmitz für die Vergabe des Dokorthemas und für Ihre Betreuung und Ihr offenes Ohr während meiner Doktorarbeit. Frau Prof. Sauerwein danke ich für die Kokorrektur meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und insbesondere bei Martina Schultheis, Angela Käberich, Bernd Gehrig, Marie-Therese Fergen und Claudia Müller für eine sehr gute Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Ursula Munzel gilt mein Dank für Ihre Hilfsbereitschaft und Ihre Organisation, ohne die wir so manches Problem nicht gemeistert hätten.

Außerdem danke ich meiner Familie und meinem Freund Felix für Ihre uneingeschränkte Unterstützung.

Meinen Eltern

Der Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf das Prozessieren des Amyloid Precursor Proteins (APP) sowie auf die Regulation der Cdk5

O-glykosidisch gebundenes N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) an Serin- und Threoninresten von Proteinen ist eine posttranslationale Modifikation von cytosolischen Proteinen, Kernproteinen und cytoplasmatischen Domänen von Transmembranproteinen. Es war gezeigt worden, dass die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen in einem reziproken Verhältnis zur Phosphorylierung stehen kann und damit eine ähnliche regulatorische Funktion wie die Phosphorylierung ausüben könnte.

Diese Hypothese konnte in dieser Arbeit dadurch bestätigt werden, dass durch die Behandlung von N2a-Zellen bzw. HEK293-Zellen, die mit dem humanem Wildtyp von APP₆₉₅ (APPwt) bzw. mit der schwedischen Mutante von APP (APPsw) transfiziert worden waren, mit PMA (aktiviert PKC) und PUGNAc (inhibiert OGH) Veränderungen der APP-Prozessierung hervorgerufen wurden. Die PMA-Behandlung von N2a-Zellen steigerte die Sekretion von APPs-Fragmenten (nur bei APPwt-transfizierten N2a-Zellen) und führte gleichzeitig zu einer Abnahme von A β -Peptiden (sowohl bei APPwt- als auch bei APPsw-transfizierten N2a-Zellen), wobei letztere auch bei APPwt-transfizierten HEK293-Zellen zu beobachten war. PUGNAc hingegen führte nur bei APPsw-transfizierten N2a-Zellen zu einer Zunahme der A β -Sekretion, wobei die APPs-Sekretion nicht signifikant verändert war. Bei den HEK293-Zellen zeigte sich im Gegensatz dazu nur eine Zunahme der A β -Sekretion bei den mit den APPwt-transfizierten Zellen. Somit scheint eine erhöhte O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen einen Einfluss auf den Prozessierungsprozess von APP dahingehend auszuüben, dass vermehrt der amyloidogene Weg eingeschlagen wird.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Cdk5 O-GlcNAc modifiziert ist. Da die Cdk5 durch Phosphorylierung des Ser159 negativ reguliert wird, könnte es sein, dass die O-GlcNAc-Modifikation ebenfalls einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms hat. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit PUGNAc und dem PKA-Aktivator dbcAMP die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen stärker zunahm als durch die alleinige Behandlung mit PUGNAc. Dadurch lässt sich vermuten, dass die O-GlcNAc-Modifikation der Cdk5 zu einer Dysfunktion des Enzyms führen könnte, das Enzym in dem Fall verstärkt inhibiert und dadurch die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen gefördert wird.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die O-GlcNAc-Modifikation sowohl bei der Prozessierung des APP als auch bei der Regulation der Cdk5 eine Rolle spielt.

The influence of O-GlcNAc on APP processing and Cdk5 activity

N-acetylglucosamine linked O-glycosidically (O-GlcNAc) to serin and threonine residues of proteins is a posttranslational modification of proteins of the cytosol, the nucleus and of the cytosolic domains of transmembrane proteins. It was shown, that the O-GlcNAc-modification of proteins responds reciprocally to phosphorylation and therefore might have a similar regulatory function as the phosphorylation itself. Extending these earlier studies, we were able to show, that PMA treatment (activates PKC) and PUGNAc treatment (inhibits OGH) of N2a- and HEK293-cells, which were transfected with wildtype APP₆₉₅ (APPwt) or the Swedish mutation of APP₆₉₅ (APPsw), lead to altered APP processing. PMA treatment of N2a-cells increased APPs-secretion in APPwt-transfected cells, while a decrease of A β was observed in both transfectants and in APPwt-transfected HEK293-cells.

PUGNAc-treatment increased the A β -secretion in APPsw-transfected N2a-cells without changing APPs-secretion. The increase in A β -secretion was also shown for APPwt-transfected HEK293-cells. The modification of proteins with O-GlcNAc leads therefore to an increased synthesis of amyloidogenic fragments.

We were also able to show, what Cdk5 is O-GlcNAc-modified. Because of the fact, that phosphorylation of Ser 159 negatively regulates Cdk5, the O-GlcNAc-modification might also have a regulatory function. Treatment of N2a-cells with PUGNAc and with the PKA-activator dbcAMP paradoxically lead to an increase in the O-GlcNAc-level of several proteins which was higher than in the presence of PUGNAc alone. The O-GlcNAc-modification might lead to a dysfunction of Cdk5, which then results in increased O-GlcNAc-levels.

These observations provide evidence, that the O-GlcNAc-modification modulates APP processing as well as the regulation of Cdk5.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	Seite 1
1.1 Die Alzheimer Krankheit.....	Seite 1
1.2 Histopathologische Merkmale der Alzheimer Demenz.....	Seite 2
1.3 Das Tau Protein.....	Seite 3
1.4. Das Amyloid Precursor Protein (APP).....	Seite 3
1.4.1 Die proteolytische Spaltung des APP.....	Seite 4
1.4.2 Die α -Sekretase.....	Seite 7
1.4.3 Die β -Sekretase (BACE = <i>β-site APP-cleaving enzym</i>).....	Seite 9
1.4.4 Die γ -Sekretase.....	Seite 10
1.4.5 Das A β -Peptid	Seite 11
1.5. Die Cdk5.....	Seite 13
1.5.1 Regulation der Aktivität der Cdk5.....	Seite 13
1.5.2 Cdk5 und die Alzheimer Demenz.....	Seite 15
1.6. Die O-GlcNAc-Modifikation.....	Seite 16
1.6.1 Mögliche Funktionen der O-GlcNAc-Modifikation.....	Seite 18
1.6.2 Die O-GlcNAc-Hydrolase (OGH).....	Seite 19
1.6.3 Die O-GlcNAc-Transferase (OGT).....	Seite 20
1.6.4 Zusammenhang zwischen der O-GlcNAc-Modifikation und der Alzheimer Demenz.....	Seite 21
1.7 Ziel der Arbeit.....	Seite 22
2. Material und Methoden.....	Seite 24
2.1. Material.....	Seite 24
2.1.1 Chemikalien, Enzyme.....	Seite 24
2.1.2 Primer.....	Seite 25
2.1.3. Plasmide.....	Seite 25
2.1.3.1 Klonierungsvektoren.....	Seite 25
2.1.3.2 Rekombinante Plasmide für die Tranfektion.....	Seite 26
2.1.4 Enzyme.....	Seite 26
2.1.5 Bakterienstamm.....	Seite 26

2.1.6	Verwendete Zelllinien.....	Seite 27
2.1.7	Antikörper.....	Seite 27
2.1.8	Geräte.....	Seite 28
2.1.9	Einwegmaterial und Arbeitsutensilien.....	Seite 29
2.1.10	Statistikprogramm.....	Seite 29
2.2.	Methoden.....	Seite 30
2.2.1.	Molekularbiologische Methoden.....	Seite 30
2.2.1.1.	<i>Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation.....</i>	Seite 30
2.2.1.1.1	Kompetente Bakterien.....	Seite 30
2.2.1.1.2	Transformation von Bakterien.....	Seite 31
2.2.1.2	<i>Anlegen eine E. coli Übernacht-Flüssigkultur.....</i>	Seite 32
2.2.1.3.	<i>DNA-Präparation.....</i>	Seite 33
2.2.1.3.1	Mini-Präparation.....	Seite 33
2.2.1.3.2	Midi-Präparation.....	Seite 33
2.2.1.4	<i>Agarosegel-Elektrophorese.....</i>	Seite 34
2.2.1.5	<i>Elution von DNA auch einem Agarosegel.....</i>	Seite 35
2.2.1.6	<i>Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung.....</i>	Seite 35
2.2.1.7	<i>Restriktionsanalyse.....</i>	Seite 36
2.2.1.8	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....</i>	Seite 36
2.2.1.9	<i>Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....</i>	Seite 37
2.2.1.10	<i>Ligation.....</i>	Seite 38
2.2.2.	Expression der rekombinanten O-GlcNAc-Transferase in Bakterien.....	Seite 39
2.2.2.1.	<i>Gewinnung der O-GlcNAc-Transferase unter denaturierenden Bedingungen.....</i>	Seite 39
2.2.2.1.1	Proteininduktion mit IPTG.....	Seite 39
2.2.2.1.2	Gewinnung des Bakterienlysats unter denaturierenden Bedingungen.....	Seite 39
2.2.2.1.3	Aufreinigung des Proteins über eine Ni-NTA-Säule unter denaturierenden Bedingungen.....	Seite 40
2.2.2.1.4	Acetonfällung.....	Seite 41
2.2.2.1.5	Dialyse.....	Seite 41

2.2.2.2. <i>Expression der rekombinanten O-GlcNAc-Transferase in Gegenwart von Ectoin unter nativen Bedingungen</i>	Seite 42
2.2.2.2.1 Proteininduktion durch IPTG und Zugabe von Ectoin.....	Seite 42
2.2.2.2.2 Gewinnung des Bakterienlysats in Gegenwart von Gadoliniumchlorid.....	Seite 43
2.2.2.3. <i>Gewinnung der O-GlcNAc-Transferase unter nativen Bedingungen</i>	Seite 44
2.2.2.3.1 Proteininduktion mit IPTG.....	Seite 44
2.2.2.3.2 Herstellung des Bakterienlysats mit Lysozym unter nativen Bedingungen.....	Seite 44
2.2.2.3.3 Proteinaufreinigung über eine Ni-NTA-Säule unter nativen Bedingungen.....	Seite 44
2.2.3 Zellkultur.....	Seite 45
2.2.3.1 <i>Kultivieren der Zellen</i>	Seite 46
2.2.3.1.1 Kultivieren der N2a-Zellen.....	Seite 46
2.2.3.1.2 Kultivieren der HEK293-Zellen.....	Seite 46
2.2.3.2. <i>Subkultivieren der Zellen</i>	Seite 47
2.2.3.2.1 Subkultivieren der N2a-Zellen.....	Seite 47
2.2.3.2.2. Subkultivierung der HEK293-Zellen.....	Seite 48
2.2.3.3 <i>In situ-Sandwich ELISA</i>	Seite 49
2.2.3.4 <i>Einfrieren der Zellen</i>	Seite 51
2.2.3.5 <i>Behandlung des E2 und A1a Klons mit Phorbol ester (PMA) und PUGNAc</i>	Seite 51
2.2.3.6 <i>Langzeitbehandlung der N2a-Zellen mit PUGNAc</i>	Seite 52
2.2.3.7 <i>Trypanblaufärbung</i>	Seite 53
2.2.3.8 <i>Behandlung der N2a Zellen mit dbcAMP und PUGNAc bzw. Roscovitin und PUGNAc</i>	Seite 53
2.2.3.9 <i>Behandlung der HEK293-Zellen mit PUGNAc</i>	Seite 55
2.2.3.10 <i>Transfektion der HEK293-Zellen mit APP^{wt} und APP^{sw}</i>	Seite 55
2.2.3.11 <i>Herstellung von Zellhomogenaten und Behandlung des Mediums</i>	Seite 56
2.2.3.12 <i>Herstellung der Proteinfractionen: Detergenz-unlösliche Fraktion (dicf) und Detergenz-lösliche Fraktion (dsf)</i>	Seite 58
2.2.3.13 <i>Kaninchen-Retikulozyten-Membranaufbereitung</i>	Seite 59
2.2.4 Analytische Methoden.....	Seite 60
2.2.4.1 <i>Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry</i>	Seite 60
2.2.4.2 <i>SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970)</i>	Seite 61
2.2.4.3 <i>Coomassie Färbung</i>	Seite 62

2.2.4.4 Western Blot.....	Seite 62
2.2.4.5 Entwickeln von Röntgenfilmen.....	Seite 64
2.2.4.6 Strippen eines Blots.....	Seite 65
2.2.4.7 Immunpräzipitation.....	Seite 65
2.2.4.8 Immunfluoreszenz.....	Seite 67
2.2.4.9 O-GlcNAc-Transferase-Assay.....	Seite 68
3. Ergebnisse.....	Seite 70
3.1 Langzeitbehandlung der N2a-Neuroblastomzellen mit PUGNAc.....	Seite 70
3.2 Einfluss der Behandlung von N2a-Zellen mit PUGNAc und dbcAMP auf die intrazelluläre Lokalisation von O-GlcNAc.....	Seite 71
3.3 Auswirkungen der PUGNAc- und PMA-Behandlung von APPwt- und APPsw-exprimierenden N2a-Zellen auf die Sekretion von APPs und A β	Seite 74
3.3.1 O-GlcNAc-Modifikation der Proteine der Detergenz-löslichen Fraktion (dsf) und der Detergenz-unlöslichen Fraktion (dicf) nach Behandlung des A1a-Klons und E2-Klons mit PMA und PUGNAc..	Seite 79
3.3.2 <i>In situ</i> -Sandwich-ELISA mit N2a-Zellen transfiziert mit dem Wildtyp des APP Gens und der schwedischen Mutante des APP Gens.....	Seite 80
3.3.3. <i>In situ</i> -Sandwich-ELISA mit APPwt- und APPsw-exprimierenden HEK293-Zellen.....	Seite 82
3.3.3.1 Transfektion der HEK293-Zellen mit APP ₆₉₅ Wildtyp und schwedischer Mutante.....	Seite 82
3.3.3.2 Behandlung der HEK293-Zellen mit PUGNAc.....	Seite 83
3.3.3.3 <i>In situ</i> -Sandwich-ELISA mit APPw-t und APPsw-exprimierenden HEK293-Zellen.....	Seite 84
3.4. Untersuchungen zur Bedeutung der O-GlcNAc-Modifikation der Cyclin-abhängigen Kinase Cdk5.....	Seite 86
3.4.1 Einfluss der Behandlung von N2a-Zellen mit dbcAMP und PUGNAc auf die O-GlcNAc-Modifizierung der Cdk5.....	Seite 86
3.4.2 Einfluss der Behandlung von N2a-Zellen mit PUGNAc und dbcAMP sowie Roscovitin auf die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen.....	Seite 87
3.4.3 Einfluss der Behandlung mit PUGNAc (48 h) und dbcAMP (24 h) auf die O-GlcNAc-Modifikation der Cdk5.....	Seite 89
3.5. Expression der O-GlcNAc-Transferase.....	Seite 91

3.5.1 Restriktionsanalyse des pBlueskript II SK (+)-Vektors mit integrierter OGT (p110)-cDNA und des pQE30-Vektors.....	Seite 91
3.5.2 Vermehrung der OGT-cDNA mittels PCR und der gleichzeitigen Einfügung einer Bam HI Schnittstelle.....	Seite 92
3.5.3 Restriktionsanalyse nach Einbau der OGT in den pQE30-Vektor.....	Seite 93
3.5.4 Aufreinigung der rekombinanten OGT unter denaturierenden Bedingungen.....	Seite 95
3.6. Aufreinigung der rekombinanten O-GlcNAc-Transferase unter nativen Bedingungen.....	Seite 96
3.6.1 Wachstum der Zellen in LB-Medium und Aufreinigung unter nativen Bedingungen.....	Seite 96
3.6.2 Wachstum der Bakterien unter Salzstress und in Gegenwart von Ectoin.....	Seite 98
3.7. OGT-Assay.....	Seite 99
3.7.1 OGT-Assay mit Retikulozytenmembranen.....	Seite 99
3.7.2 OGT-Assay mit rekombinanter OGT.....	Seite 100
4. Diskussion.....	Seite 101
4.1 Langzeitbehandlung der N2a-Zellen mit PUGNAc.....	Seite 101
4.2 Untersuchung zur O-GlcNAc-Expression im Zellkern nach Behandlung mit PUGNAc und dbcAMP.....	Seite 103
4.3. Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf die APP-Prozessierung.....	Seite 104
4.3.1 Auswirkungen der PUGNAc- und PMA-Behandlung auf die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen.....	Seite 104
4.3.2 Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf das Prozessieren von APP in N2a-Zellen.....	Seite 106
4.4 Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf das Prozessieren des APPs in HEK293-Zellen.....	Seite 110
4.5. O-GlcNAc-Modifikation und Regulation der Cdk5.....	Seite 112
4.5.1 Die Cdk5 ist O-GlcNAc-modifiziert.....	Seite 113
4.5.2 Mögliche regulatorische Funktion der O-GlcNAcylierung für die Cdk5-Aktivität.....	Seite 113

4.6. Etablierung eines Enzymassays zur Übertragung von GlcNAc auf Proteine.....	Seite 118
4.6.1 Kaninchen-Retikulozyten-Membranen als Enzymquelle.....	Seite 118
4.6.2 OGT-Assay mit unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigter rekombinant hergestellter OGT.....	Seite 119
4.6.3 OGT-Assay mit unter nativen Bedingungen aufgereinigter OGT.....	Seite 120
5. Zusammenfassung.....	Seite 122
6. Literaturverzeichnis.....	Seite 125

Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1:</i>	<i>Pathologische Merkmale der AD</i>	<i>Seite 2</i>
<i>Abb. 2:</i>	<i>Amyloidogene und nicht-amyloidogene Spaltung des APP</i>	<i>Seite 4</i>
<i>Abb. 3:</i>	<i>Aβ-Sequenz mit eingezeichneten Spaltstellen der Sekretasen, sowie den mutierten Aminosäuren der schwedischen Mutante.....</i>	<i>Seite 6</i>
<i>Abb. 4:</i>	<i>Die Spaltung von p35 zu p25 ist neurotoxisch.....</i>	<i>Seite 16</i>
<i>Abb. 5:</i>	<i>O-GlcNAc-Modifikation vs. Phosphorylierung.....</i>	<i>Seite 18</i>
<i>Abb. 6:</i>	<i>Einfluss von PUGNAc über 14 Tage auf O-GlcNAc Expression von N2a-Zellen.....</i>	<i>Seite 71</i>
<i>Abb. 7:</i>	<i>Einfluss von PUGNAc in Ab- und Anwesenheit von dbcAMP auf die O-GlcNAc-Expression von Proteinen des Kernes in N2a-Zellen.....</i>	<i>Seite 73</i>
<i>Abb. 8A:</i>	<i>Einfluss von PMA auf die O-GlcNAc-Expression von APPwt-exprimierenden N2a-Zellen.....</i>	<i>Seite 75</i>
<i>Abb. 8B:</i>	<i>Einfluss von PUGNAc auf die O-GlcNAc-Expression von APPwt-exprimierenden N2a-Zellen.....</i>	<i>Seite 75</i>
<i>Abb. 9A:</i>	<i>Einfluss von PMA auf die Sekretion des APPs von APPwt-exprimierenden N2a-Zellen.....</i>	<i>Seite 76</i>
<i>Abb. 9B:</i>	<i>Einfluss von PUGNAc auf die Sekretion des APPs von APPwt-exprimierenden N2a-Zellen.....</i>	<i>Seite 77</i>
<i>Abb. 10A:</i>	<i>Einfluss von PMA auf die Sekretion des APPs von APPsw-exprimierenden N2a-Zellen.....</i>	<i>Seite 78</i>
<i>Abb. 10B:</i>	<i>Einfluss von PUGNAc auf die Sekretion des APPs von APPsw-exprimierenden N2a-Zellen.....</i>	<i>Seite 78</i>
<i>Abb. 11A:</i>	<i>Einfluss von PUGNAc und PMA auf die O-GlcNAc-Expression von Proteinen der dicf von APPwt-exprimierenden N2a-Zellen.....</i>	<i>Seite 79</i>
<i>Abb. 11B:</i>	<i>Einfluss von PUGNAc und PMA auf die O-GlcNAc-Expression von Proteinen der dsf von APPwt-exprimierenden N2a-Zellen.....</i>	<i>Seite 79</i>

Abb. 12:	<i>Darstellung der Aβ Sequenz und der von den Antikörpern erkannten Regionen. Die dickgedruckten Aminosäuren umfassen das p3.....</i>	Seite 80
Abb. 13:	<i>Einfluss von PMA und PUGNAc auf die Aβ-Sekretion von APPwt- und APPsw-exprimierenden N2a-Zellen.....</i>	Seite 81
Abb. 14:	<i>Nachweis der APP-Expression in APPwt- bzw. APPsw-transfizierten HEK293-Zellen.....</i>	Seite 82
Abb. 15:	<i>Einfluss von PUGNAc auf die O-GlcNAc-Expression in HEK293-Zellen.....</i>	Seite 83
Abb. 16:	<i>Einfluss von PMA und PUGNAc auf die Aβ-Sekretion von APPwt- und APPsw-exprimierenden HEK293-Zellen.....</i>	Seite 85
Abb. 17A:	<i>Cdk5 ist O-GlcNAc-modifiziert.....</i>	Seite 86
Abb. 17B:	<i>Die Behandlung mit PUGNAc und dbcAMP hat keinen Einfluss auf die O-GlcNAc-Modifikation der Cdk5.....</i>	Seite 86
Abb. 18A:	<i>Einfluss von PUGNAc in Kombination mit Roscovitin auf die O-GlcNAc-Expression von N2a-Zellen.....</i>	Seite 87
Abb. 18B:	<i>Einfluss von PUGNAc in Kombination mit dbcAMP auf die O-GlcNAc-Expression von N2a-Zellen.....</i>	Seite 87
Abb. 19:	<i>Einfluss von dbcAMP in Kombination mit PUGNAc auf die O-GlcNAc-Expression von N2a-Zellen.....</i>	Seite 88
Abb. 20:	<i>Einfluss von gleichzeitiger Behandlung mit dbcAMP und PUGNAc auf die O-GlcNAc-Expression von N2a-Zellen.....</i>	Seite 89
Abb. 21:	<i>Die O-GlcNAc-Modifikation wird durch die Behandlung mit PUGNAc in Kombination mit dbcAMP nicht beeinflusst.....</i>	Seite 90
Abb. 22:	<i>PCR-Produkt der cDNA der OGT.....</i>	Seite 92
Abb. 23:	<i>Schematische Darstellung des pQE30-OGT-cDNA Konstrukts nach der Klonierung mit Bam HI und Hind III.....</i>	Seite 94
Abb. 24A:	<i>Aufreinigung der OGT über eine Ni-NTA-Säule unter denaturierenden Bedingungen.....</i>	Seite 96
Abb. 24B:	<i>Analyse der eluierten Fraktionen.....</i>	Seite 96
Abb. 25:	<i>Versuch zur Aufreinigung der OGT über die Ni-NTA-Säule unter nativen Bedingungen.....</i>	Seite 97

- Abb. 26:** *Versuch zur Expression der OGT unter Salzstress und der Lyse der mit der cDNA von OGT transfizierten Bakterien mit Gadoliniumchlorid..... Seite 98*
- Abb. 27:** *Möglichkeiten der Cdk5-Regulation durch Phosphorylierung und O-GlcNAc-Modifizierung..... Seite 116*
- Abb. 28:** *Die Strukturformel von Ectoin..... Seite 120*

Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1:</i>	<i>Chemikalien.....</i>	<i>Seite 24</i>
<i>Tab. 2:</i>	<i>Klonierungsvektoren.....</i>	<i>Seite 25</i>
<i>Tab. 3:</i>	<i>Plasmide.....</i>	<i>Seite 26</i>
<i>Tab. 4:</i>	<i>Enzyme.....</i>	<i>Seite 26</i>
<i>Tab. 5:</i>	<i>Zelllinien.....</i>	<i>Seite 27</i>
<i>Tab. 6:</i>	<i>Primäre und sekundäre Antikörper.....</i>	<i>Seite 27</i>
<i>Tab. 7:</i>	<i>Geräte.....</i>	<i>Seite 28</i>
<i>Tab. 8:</i>	<i>Einwegartikel/Arbeitsutensilien.....</i>	<i>Seite 29</i>
<i>Tab. 9:</i>	<i>Übersicht über die verschiedenen Vorgehensweisen der Behandlungen von N2a-Zellen nach 24 und 48 h.....</i>	<i>Seite 54</i>
<i>Tab. 10:</i>	<i>Menge an Homogenisierungspuffer je nach Zellzahl der im Versuch vorliegenden Zellen.....</i>	<i>Seite 57</i>
<i>Tab. 11:</i>	<i>Einfluss von PUGNAc in Ab- und Anwesenheit von dbcAMP auf die O-GlcNAc-Expression von Proteinen des Kernes in N2a-Zellen.....</i>	<i>Seite 72</i>
<i>Tab. 12:</i>	<i>cDNA Fragmente nach Restriktionsanalyse des pBlueskript II SK (+)-Vektor mit integrierter OGT (Ansatz 1) und des pQE30-Vektor (Ansatz 2).....</i>	<i>Seite 91</i>
<i>Tab. 13:</i>	<i>cDNA Fragmente nach Restriktionsanalyse von OGT-pQE30-cDNA mit Eco RI.....</i>	<i>Seite 93</i>
<i>Tab. 14:</i>	<i>OGT-Assay mit Retikulozytenmembranen.....</i>	<i>Seite 99</i>
<i>Tab. 15:</i>	<i>OGT-Assay durchgeführt mit unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigter rekombinant hergestellter OGT.....</i>	<i>Seite 100</i>

Abkürzungen

AD	Alzheimer Demenz
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
APP	Amyloid Precursor Protein
APPs	Sekretiertes APP
aqua dem.	demineralisiertes Wasser
BSA	Bovines Serum Albumin
Cdk5	Cyclin-abhängige Kinase 5
CKII	Casein Kinase II
dbcAMP	Dibutyryl-cyclo- Adenosinmonophosphat
dicf	Detergenz unlösliche cytoskelettale Fraktion
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsf	Detergenz lösliche Fraktion
ER	Endoplasmatisches Retikulum
etc.	et cetera
FCS	Foetales Kälberserum
G418	Geneticin
Glu	Glutamin
GSK3	Glykogen-Synthase Kinase 3
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
kDa	Kilodalton
Leu	Leucin
Lys	Lysin
MAP	Mikrotubulin-assoziiertes Protein
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
NFT	Intraneuronale neurofibrilläre Bündel
NO-Synthase	Stickstoffmonoxid-Synthase
OD	Optische Dichte
OGH	O-GlcNac-Hydrolase

XII

O-GlcNAc	O-Glycosidisch gebundenes N-Acetylglucosamin
OGT	O-GlcNAc-Transferase
PBS	Phosphat Buffer Saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PenStrep	Penicillin Streptavidin
PHF	Paarige helikale Filamente
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PLL	Poly-L-Lysin
PMA	Phorbolester
PS1	Presenilin1
PUGNAc	(O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosyliden)-amino-N-Phenylcarbammat)
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
rpm	Umdrehungen pro Minute
TACE	Tumor necrosis factor converting enzyme
Thr	Threonin
TPR	Tetratrikopeptid
Tyr	Tyrosin
UDP-GlcNAc	Uridin-diphospho-N- Acetylglucosamin

1. Einleitung

1.1 Die Alzheimer Krankheit

Die Alzheimer Demenz (AD) wurde zum ersten Mal von Alois Alzheimer im Jahre 1907 beschrieben. Mehr als 50 % der an Demenz erkrankten älteren Menschen leiden an AD, wobei von den über 65 Jahre alten Personen 6-8 % betroffen sind. Auf Grund der demographischen Entwicklung wird die Prävalenz in Zukunft weiter ansteigen (*Nourashémi et al., 2000*). Der Grund hierfür liegt darin, dass mit zunehmendem Alter auch die Wahrscheinlichkeit an AD zu erkranken stetig steigt. Gleichzeitig erhöht sich jedoch auch der Anteil an älteren Menschen in der Gesamtbevölkerung. Eine wirksame Therapie ist noch nicht verfügbar (*Liddel, 2001; Kösel et al., 1996*).

Man unterscheidet zwei Formen der AD. Zum einen die familiäre Form, die 5-10 % der Fälle ausmacht und die autosomal vererbt wird, und zum anderen die sporadische Form, die 90-95 % der Fälle betrifft und deren Ursachen noch nicht hinreichend geklärt sind (*Maccioni et al., 2001*). Die familiäre Form unterteilt man weiterhin in die frühe und die späte Form. Es konnten bereits vier Gene identifiziert werden, die für die familiäre AD verantwortlich gemacht werden. Die Preseniline 1 und 2 auf Chromosom 14 und 1, sowie das Amyloid Precursor Protein (APP) auf Chromosom 21 sind Auslöser der frühen familiären AD. Die späte Form wird durch das $\epsilon 4$ -Allel des Apo E-Gens auf Chromosom 19 begünstigt (*St. George-Hyslop, 2000*).

Ein weiterer Faktor, der bei der Entstehung der AD eine Rolle zu spielen scheint, ist die Anwesenheit von oxidativem Stress, der durch ein gestörtes Oxidations-Reduktionsgleichgewicht, welches durch die Anhäufung freier Radikale entsteht, ausgelöst wird. Für die bei der AD verstärkte Bildung freier Radikale werden veränderte Spiegel von Metallionen und Homocystein verantwortlich gemacht, sowie die vermehrte Bildung von A β -Peptiden (*Tabet et al., 2001*).

1.2 Histopathologische Merkmale der Alzheimer Demenz

Neben der Feststellung von Symptomen wie Gedächtnisverlust, zunehmende Konzentrationsschwäche, Orientierungs- und Sprachschwierigkeiten kann die Diagnose *prae mortem* nur durch Ausschlussprinzip anderer Demenzen sowie mit Gedächtnistests und *post mortem* nur durch eine neuropathologische Untersuchung des Gehirns gesichert werden (Kösel et al., 1996; van Leuven, 2000).

Im Kortex der Gehirne von Alzheimerpatienten wurden zwei pathologische Veränderungen gefunden. Zum einen die intraneuronalen neurofibrillären Bündel (*Neurofibrillary Tangles* = NFT), die aus paarigen helikalen Filamenten (PHF) bestehen, deren Hauptbestandteil hyperphosphoryliertes Tau Protein ist, und zum anderen die extrazellulären senilen Plaques, die aus aggregiertem A β bestehen, dessen Vorläufer das APP darstellt (siehe Abb. 1) (Maccioni et al., 2001a; Alvarez et al., 1999).

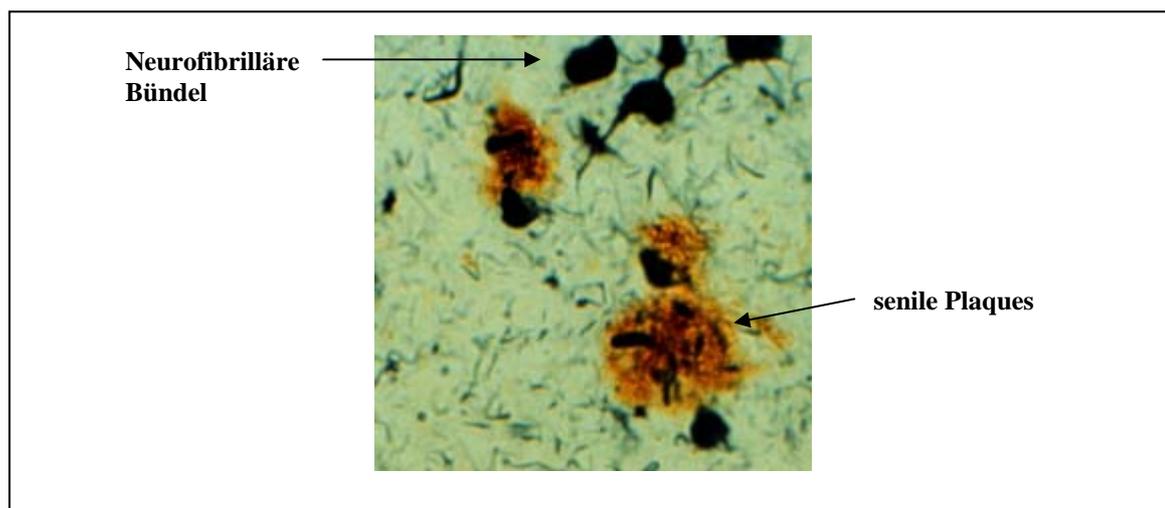


Abb. 1: Pathologische Merkmale der AD
Neurofibrilläre Bündel (schwarz) und senile Plaques (rötlich-braun) sind die beiden pathologischen Veränderungen, die in Gehirnen von Alzheimerpatienten zu finden sind (modifiziert nach www.neuropath.dote.hu/alzheim.htm)

1.3 Das Tau Protein

Tau gehört zu der Familie der Mikrotubulin-assoziierten Proteine (MAPs). Im gesunden Gehirn reguliert Tau die Stabilität des Cytoskeletts und damit auch die Morphologie und Funktion des Axons und spielt daher auch eine Rolle für das Neuritenwachstum. Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Tau. Es gibt sechs verschiedenen Isoformen des Tau Proteins, die alle sehr Serin- und Threonin-reich sind, und damit an mehr als 20 verschiedenen Resten phosphoryliert werden können. Kommt es nun zu einer Hyperphosphorylierung von Tau und damit zu einem Ungleichgewicht des Phosphorylierungsstatus, sind schwere Schäden der Neuronen und damit Neuronenuntergang die Folge (*Maccioni et al., 2001a; Shastry, 2001*).

Eine Hyperphosphorylierung von Tau führt zu Konformations- und Strukturveränderungen des Proteins, wodurch es nicht mehr an Tubulin binden kann und die Mikrotubuliassoziation gestört wird. Die Folge ist eine Aggregation des Proteins zu PHF, die sich wiederum in NFTs zusammenlagern. Tau verliert dabei vollständig seine Funktion. Es wird diskutiert, dass die Anzahl der NFTs mit dem Grad der AD korrelieren könnte (*Liu et al., 2002*).

Kinasen, die an der Phosphorylierung von Tau beteiligt sind, sind meist Prolin-gerichtete Serin/Threonin Kinasen, was bedeutet, dass diese Kinasen meist Serin-Prolin und Threonin-Prolin Motive phosphorylieren. Hierzu gehören die Glykogen-Synthase-Kinase 3 (GSK3), die Protein Kinase A (PKA), die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAP-Kinase), sowie die Cyklin-abhängige Kinase 5 (Cdk5) (siehe Kapitel 1.5) (*Maccioni et al., 2001a; Alvarez et al., 1999*). Keines dieser genannten Enzyme ist jedoch dazu in der Lage, alleine die Entstehung von PHF zu bewirken (*Hashigushi et al., 2002*).

1.4. Das Amyloid Precursor Protein (APP)

Das APP gehört zu der Familie der Transmembranglykoproteine vom Typ I, und kommt ubiquitär in Zellen vor. Es besitzt einen großen extrazellulären N-terminalen Bereich, sowie einen transmembranen Bereich und eine kurze cytoplasmatische Domäne (*Maccioni et al., 2001a*). Die letzten 28 Aminosäuren der extrazellulären Domäne sowie die ersten 11 bis 15 Aminosäuren der Transmembrandomäne umfassen das A β , das

unterschiedliche Länge aufweisen kann und ein Spaltprodukt des APP darstellt (siehe 1.4.5) (*Cappai und White, 1999*).

Man unterscheidet drei verschiedene Isoformen des APP. In nicht-neuronalen Zellen überwiegen die Isoformen, die 751 bzw. 770 Aminosäuren lang sind. Das APP₆₉₅, welches 695 Aminosäuren umfasst, befindet sich hauptsächlich in neuronalen Zellen und unterscheidet sich von den anderen durch das Fehlen der Kunitz-Protease-Inhibitor-Domäne (*Selkoe, 1999*). Im weiteren Verlauf der Arbeit soll nur noch auf das neuronale APP₆₉₅ eingegangen werden.

Die Funktion des APP ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass es eine Wachstumsfaktor-Funktion hat. Außerdem könnte es an Zelladhäsion, Axo- und Synaptogenese und Dendritenwachstum beteiligt sein. Auch wird eine neurotrophe sowie neuroprotektive Funktion diskutiert (*de Strooper et al., 2000; Maccioni et al., 2001a*).

Nach Reifung durch N- und O-glykosidische Modifizierungen im Golgi wird APP zur Zellmembran transportiert. Hier kann es dann durch die α -Sekretase gespalten werden (siehe 1.4.1). Alternativ kann APP auch reinternalisiert werden, was durch die Anwesenheit des Endozytose-Signals NPTY in der cytoplasmatischen Domäne von APP ermöglicht wird. In Endosomen bzw. Lysosomen kann die Spaltung durch die β -Sekretase stattfinden (siehe 1.4.1) (*Selkoe, 1999; Jacobsen, 1994*).

1.4.1 Die proteolytische Spaltung des APP

Das APP kann von drei Proteasen gespalten werden. Diese werden α -, β - und γ -Sekretase genannt.

Man unterteilt die Proteolyse des APP in eine amyloidogene und nicht-amyloidogene Spaltung (siehe Abb.2).

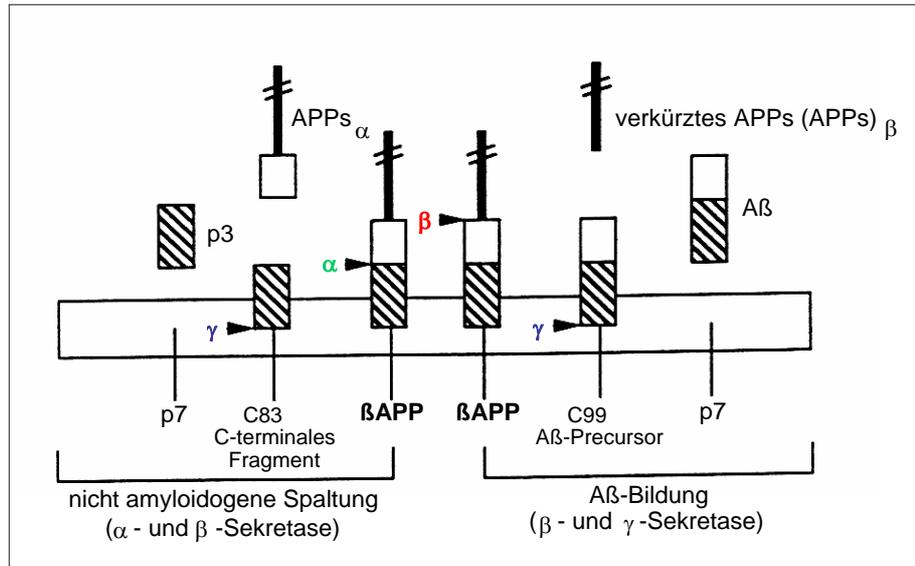


Abb.2: *Amyloidogene und nicht-amyloidogene Spaltung des APP*
 Darstellung der nicht-amyloidogenen Spaltung des APP durch die α -Sekretase und γ -Sekretase und der amyloidogenen Spaltung und Bildung des A β durch die β - und γ -Sekretase.

Die nicht-amyloidogene Spaltung erfolgt hauptsächlich in nicht-neuronalen Zellen in der Zellmembran durch die α -Sekretase (Koo et al., 1994; Chyung et al., 1997). Sie schneidet APP zwischen Lysin (Lys) 612 und Leucin (Leu) 613, die sich in der A β -Region befinden (siehe Abb.3). Somit wird eine Entstehung von A β verhindert. Die α -Sekretase setzt den extrazellulären N-Terminus von APP frei, der APPs α (s = sekretiert) genannt wird und wachstumsregulierende sowie neuroprotektive Funktion hat (de Strooper, 2000; St. George-Hyslop, 2000; Mattson, 1997). Zurück bleibt ein membranständiges, 83 Aminosäuren langes Peptid (C83), welches von der γ -Sekretase (zwischen Aminosäure 639 und 640 bzw. zwischen 641 und 642) gespalten werden kann, so dass das Peptid p3 (A β 17-40/42) freigesetzt wird (siehe Abb. 3) (Hartmann, 1999; St. George-Hyslop, 2000). Für die Spaltung des C83 durch die γ -Sekretase wird u.a. Presenilin 1 benötigt, welches die Aktivität der γ -Sekretase beeinflusst. Von einigen Forschern wird angenommen, dass Presenilin 1 mit der γ -Sekretase identisch ist, jedoch konnte bisher keine katalytische Aktivität von Presenilin 1 nachgewiesen werden (siehe auch Kapitel 1.4.4) (Vassar et al., 1999).

Der amyloidogene Weg findet verstärkt in neuronalen Zellen statt und beginnt mit dem Abbau von APP durch die β -Sekretase. Diese spaltet zwischen Aminosäuren 595 und 596 sowohl nach APP Reinternalisierung in den endosomalen/lysosomalen Kompartimenten,

als auch in post-Golgi Kompartimenten und möglicherweise auch im endoplasmatischen Retikulum (ER) (siehe Abb. 3) (Vassar *et al.*, 1999; Parvathy *et al.*, 1999; Chyung, 1997). APPs β wird sekretiert, und ein 99 Aminosäuren langes Peptid (C99) bleibt in der Membran zurück. Dieses C99 Peptid enthält die komplette A β -Sequenz. Nach Spaltung durch die γ -Sekretase zwischen Aminosäuren 639 und 640 bzw. zwischen 641 und 642 des APP wird A β 40 und A β 42 freigesetzt. Im Gegensatz zu A β 40 neigt A β 42 auf Grund seiner Aminosäure-Sequenz eher zur Ausbildung von β -Faltblatt-Strukturen und ist daher neurotoxischer als A β 40 (St George-Hyslop, 2000; Hartmann, 2000; Mattson, 1997).

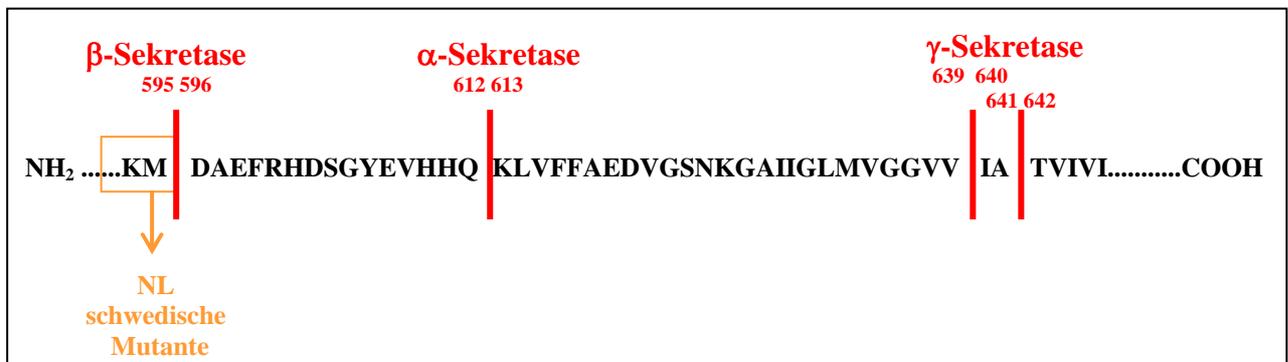


Abb. 3: A β -Sequenz mit eingezeichneten Spaltstellen der Sekretasen, sowie den mutierten Aminosäuren der schwedischen Mutante

Bei beiden Wegen findet die Spaltung durch die γ -Sekretase erst nach Spaltung des APP durch die α - bzw. β -Sekretase statt (Lippa, 1999).

Der C-Terminus des APP nimmt an einer Reihe von zellulären Vorgängen wie dem intrazellulären Transport des APP und Signaltransduktionen teil. Hierbei scheint z.T. die Phosphorylierung des C-terminalen Endes von APP eine Rolle zu spielen. Der intrazelluläre Transport des APP wird begünstigt durch Signalsequenzen in der cytoplasmatischen Domäne von APP, die z.B. die Endozytose oder das Recycling des APP zur Plasmamembran ermöglichen. Die Signaltransduktionsmechanismen werden durch Bindung des C-Terminus an intrazelluläre Faktoren und Rezeptoren ausgelöst. Neben den genannten Funktionen wird auch das Prozessieren des APP durch die Bindung des Fe65 an das Thr 668 im C-terminalen Ende von APP reguliert. Durch eine Überexpression des Fe65 in HEK293-Zellen erhöhte sich die Sekretion von A β -Peptiden.

Durch die Phosphorylierung des Thr 668 bzw. durch Mutation dieser Aminosäure, konnte die vermehrte Sekretion verhindert werden (*Ramelot et al., 2000; Ando et al., 2001*).

Mutationen im APP-Gen, die zu Veränderungen im APP-Stoffwechsel führen, sind vornehmlich in der A β -kodierenden Region zu finden und sind meist in der Nähe der Spaltstellen der Sekretasen lokalisiert (*Lippa, 1999*). Die schwedische Doppelpunktmutation der Aminosäuren 595 und 596 (K595N/M596L) des APP führt zu einer fünf- bis achtfach verstärkten Bildung von A β 40 und A β 42, da durch diese Mutation die Aktivität der β -Sekretase heraufgesetzt wird (siehe Abb. 3) (*St. George-Hyslop, 2000; Hartmann, 1999, Chapman et al., 2001*). Neben der schwedischen Mutation finden sich noch andere Mutationen, wie die Flämische, Holländische oder Londoner Mutation etc., die jedoch in dieser Arbeit keine Rolle spielen und daher nicht detailliert diskutiert werden.

Ob die Aktivitäten der Sekretasen mit dem Ausmaß der AD korrelieren, wird kontrovers diskutiert. Einige Studien belegen dies jedoch. So konnte in einer Studie bei 80 % der untersuchten Alzheimergehirn-Proben entweder eine erhöhte β -Sekretaseaktivität oder eine verringerte α -Sekretaseaktivität festgestellt werden, was impliziert, dass bei den meisten Alzheimerfällen ein kausaler Zusammenhang zwischen den Sekretaseaktivitäten und den neuropathologischen Veränderungen bestehen könnte (*Tyler et al., 2002*). Auch *Fukumoto et al.* konnten *post mortem* im Neocortex von Alzheimer-Patienten erhöhte β -Sekretase-Aktivität messen, insbesondere in den Regionen, die von amyloiden Ablagerungen betroffen waren (*Fukumoto et al., 2002*). *Sennvik et al.* konnten erniedrigte APPs α -Konzentrationen in der cerebrospinalen Flüssigkeit von AD-Patienten feststellen, während die APPs β -Konzentration sich zu der der Kontrollpersonen nicht unterschieden. Dies würde eine verringerte α -Sekretase-Aktivität, jedoch keine gesteigerte β -Sekretase-Aktivität implizieren (*Sennvik et al., 2000*).

1.4.2 Die α -Sekretase

Die α -Sekretase ist ein integrales Membranprotein. Sie ist eine Zink-bindende Metalloproteinase und gehört zur ADAM-Familie (ADAM = *a disintegrin and metalloproteinase*). Im Gegensatz zur β -Sekretase ist die α -Sekretase an der Zellmembran

aktiv. So konnte festgestellt werden, dass durch das Eliminieren der Internalisierungssequenz NPTY in der cytoplasmatischen Domäne von APP die Sekretion des APP α zunimmt (*Parvathy et al., 1999; Jacobsen et al., 1994*).

Es konnte gezeigt werden, dass ADAM10 die Funktion der α -Sekretase erfüllt. Eine Überexpression der ADAM10 in HEK293-Zellen zeigte sowohl eine verstärkte konstitutive als auch eine verstärkte regulierbare Aktivität der α -Sekretase (*Lammich et al., 1999*). Jedoch konnten Fibroblasten, in denen das Gen für ADAM10 deletiert wurde, die fehlende Sekretaseaktivität kompensieren. Es wird deshalb angenommen, dass es mehrere Proteasen geben muss, die für die Generation des APP α verantwortlich gemacht werden können. ADAM9 und ADAM17 sind zwei mögliche Kandidaten für die Kompensation der fehlenden ADAM10-Aktivität (*Hartmann et al., 2002*). ADAM17 ist auch bekannt als TACE (TACE = *tumor necrosis factor-converting enzyme*) und ADAM9 als MDC9 oder Meltrin γ (*Marcinkiewicz und Seidah, 2000*). *Asai et al.* fanden heraus, dass alle Enzyme der ADAM-Familie in Astrozytom-Zellen das APP an der α -Sekretasestelle spalten können, und sie somit α -Sekretasen darstellen (*Asai et al., 2003*). Jedoch sind nicht alle Mitglieder der ADAM-Familie im Gehirn gleich stark vertreten. So ist die ADAM17 ähnlich wie die BACE2 (siehe Kapitel 1.4.3) nur zu einem geringen Anteil im Gehirn zu finden, so dass sie hier in Bezug auf die α -Sekretaseaktivität eher eine untergeordnete Rolle hat. Der größte Teil der α -Sekretaseaktivität ist in neuronalen Zellen auf ADAM10 zurückzuführen (*Marcinkiewicz und Seidah, 2000*).

Eine verstärkte Aktivität der α -Sekretase konnte nach Behandlungen mit Phorbol ester (PMA) festgestellt werden. Die Ergebnisse der Studien weichen jedoch je nach Zelltyp voneinander ab. Injektionen von PMA in Mausgehirne zeigten einen deutlichen Rückgang der A β -Menge, jedoch keinen Unterschied bezüglich der APP α -Menge (*Savage et al., 1998*). *In vitro* Versuche an primären menschlichen Neuronen hingegen zeigten nach PMA-Behandlung einen Anstieg der APP α -Menge, ohne dass jedoch eine Veränderung in der A β -Menge beobachtet werden konnte (*LeBlanc et al., 1998*). *Qiu et al.* konnten durch PMA-Behandlungen von embryonalen kortikalen Neuronen der Maus einen Anstieg der APP α -Sekretion bei gleichzeitiger Verminderung der A β -Sekretion verzeichnen (*Qiu et al., 2001*). Da PMA die Protein Kinase C (PKC) aktiviert, hat diese möglicherweise Einfluss auf das Prozessieren von APP durch die Aktivierung der α -Sekretase.

Reguliert wird die α -Sekretase vermutlich auch durch Calcium. So führte eine erhöhte Calciumkonzentration zu einer verstärkten Aktivität des Enzyms (*Chen, 1997*). Eine Behandlung der Zellen mit Phorbolestern, die die Calciumkonzentration der Zelle beeinflusst, führte zu einer verstärkten α -Sekretaseaktivität, die jedoch unabhängig von der PKC-Aktivierung zu sein schien. Auch hier nahm durch die erhöhte Sekretaseaktivität die APP α -Sekretion zu und die A β -Sekretion ab (*Asai et al., 2003; Kim et al., 2002; Buxbaum et al., 1994*).

Weitere Kinasen, die die APP α -Sekretion stimulieren und die A β -Sekretion herabsetzen können, sind die Tyrosinkinasen. Gleichzeitige Aktivierung der PKC durch PMA und der Tyrosinkinasen mit PDGF (PDGF = *platelet derived growth factor*) führte zu einer verstärkten Sekretion von APP α gegenüber Kontrollzellen. Eine Inhibition von entweder PKC oder Tyrosinkinasen bei gleichzeitiger Aktivierung der jeweils anderen Kinase(n) reduzierte zwar die APP α -Sekretion, jedoch nicht auf das Niveau der Kontrollzellen. Daher wird angenommen, dass die Tyrosinkinasen die Sekretion des APP α unabhängig von der PKC beeinflussen können (*Kim et al., 2002*).

1.4.3 Die β -Sekretase (BACE = *β -site APP-cleaving enzyme*)

BACE1 ist ein 501 Aminosäuren umfassendes, N-glykosyliertes Membranprotein vom Typ I. Es ist auch unter dem Namen Asp2 oder Memapsin2 bekannt und hat die Spezifität einer Aspartatprotease (*Yan et al., 1999; Citron, 2002*). Die Tatsache, dass BACE ein saures Milieu für seine optimale Aktivität benötigt, lässt darauf schließen, dass es hauptsächlich in späten Golgi Kompartimenten und/oder Endosomen/Lysosomen aktiv ist (*Walter et al., 2001*). Außerdem konnte eine Aktivität von BACE1 im ER festgestellt werden, die jedoch nur 14 % der gesamten β -Sekretaseaktivität ausmacht (*Steinhilb et al., 2002*). APP stellt zwar ein Substrat von BACE dar, ist es jedoch wahrscheinlich nicht das einzige. Weitere Substrate müssen jedoch noch identifiziert werden (*Walter et al., 2001*).

Außerdem konnte eine weitere β -Sekretase (BACE2) identifiziert werden, die Asp1 oder auch Memapsin1 genannt wird und 64 % Sequenzhomologie zu BACE1 aufweist (*Howlett et al., 2000; Cai et al., 2001; Walter et al., 2001; Citron, 2002*). Diese ist jedoch im adulten Gehirn kaum vertreten, sondern kommt eher in peripheren Geweben vor. BACE2 kann APP effizienter an Stellen schneiden, die in der A β Region liegen

(Aminosäure 19/20 von A β). Außerdem kann es ebenfalls innerhalb von C99 schneiden, so dass es der A β -Entstehung eher entgegenwirkt (*Farzan et al., 2000*). Die Formen A β 20-40/42 und A β 21-40/42 konnten jedoch in embryonalen Neuronen des Cortex, wahrscheinlich auf Grund der geringen Enzymaktivität, nicht nachgewiesen werden (*Howlett et al., 2000; Cai et al., 2001; Walter et al., 2001*).

BACE1 wird stark in Neuronen und im Pankreas exprimiert (*Sinha et al., 1999*). Im Gehirn ist es vor allen Dingen in Neuronen des Hippokampus, des Neocortex und des Cerebellum zu finden. Es konnte gezeigt werden, dass die BACE1-Aktivität im Gehirngewebe am stärksten ist und dass BACE1 mit APP in den gleichen Kompartimenten der Zelle, nämlich im Golgi und in endosomalen Kompartimenten, kolokalisiert ist (*Vassar et al., 1999; Howlett et al., 2000*). *Fukumoto et al.* fanden heraus, dass die BACE-Aktivität und Konzentration in den von Amyloid-Ablagerungen betroffenen Gehirnregionen von Alzheimerpatienten größer waren als die von gesunden Kontrollpersonen. Dies war auch trotz anhaltendem Neuronenuntergang und Synapsenverlust zu beobachten (*Fukumoto et al., 2002*).

1.4.4 Die γ -Sekretase

Die γ -Sekretase ist für die intramembranäre Proteolyse von integralen Membranproteinen vom Typ I verantwortlich. Auch die Spaltung des APP durch die γ -Sekretase erfolgt innerhalb der Membran (*Maltese et al., 2001*). Zu den von der γ -Sekretase gespaltenen Proteinen gehören neben dem APP auch Notch, die Rezeptortyrosinkinase ErbB4 und E-cadherin (*Farmery et al., 2003*). Die Sekretase liegt in einem Membranproteinkomplex vor und benötigt für ihre Funktion das Transmembranprotein Presenilin 1 (PS1), Nicastrin, APH-1 und Pen-2 (*Edbauer et al., 2003*). PS1 ist dabei entweder ein notwendiger Co-Faktor oder die γ -Sekretase selber (*Howlett et al., 2000*).

Das transmembrane Glykoprotein Nicastrin spielt eine zentrale Rolle im Proteinkomplex, da es durch die Interaktion mit PS1 eine strukturelle Veränderung erfährt, die für die Sekretaseaktivität nötig ist. Außerdem benötigt es PS1, um vom ER an die Zellmembran zu gelangen. APH-1 ist ein Protein, was mehrere Transmembrandomänen besitzt, und ähnlich wie das PS1 am Transport des Nicastrins zur Zelloberfläche beteiligt ist. Es trägt weiterhin zur Stabilisierung des PS1 im Komplex bei. Pen-2 ist ein kleines,

Haarnadelschleifen-ähnliches Membranprotein und wird für die Reifung des Nicastrins und Expression von PS1 benötigt (*Farmery et al., 2003; De Strooper, 2003*).

Außerdem wird vermutet, dass die γ -Sekretase nicht nur eine einzige katalytische Aktivität besitzt, sondern, dass es mehrere enzymatisch aktive Komponenten in dem Komplex gibt, die es aber noch zu entdecken gilt (*Sisodia und St. George-Hyslop, 2002*). Fehlt eine Komponente des Membranproteinkomplexes, so verliert die γ -Sekretase ihre Funktion (*Fluhrer et al., 2003*).

Bezüglich des APP-Prozessierens wird angenommen, dass die γ -Sekretase an der Bildung mehrerer A β -Varianten beteiligt ist. Zunächst wurde angenommen, dass der Hauptsyntheseort des A β 42 eher im ER, und der des A β 40 in späten Golgi-Kompartimenten sowie in Endosomen lokalisiert ist. *Maltese et al.* konnten jedoch feststellen, dass das APP-Fragment C99, wenn es im ER „zurückgehalten“ wird, nicht zu A β abgebaut wird (*Maltese et al., 2001*).

1.4.5 Das A β -Peptid

Das A β -Peptid ist ein lösliches Peptid mit einer Länge von 40-42 Aminosäuren, das eine α -Helixstruktur aufweist. Unter neuropathologischen Bedingungen kann es β -Faltblattstruktur annehmen in der es leicht aggregiert und unlösliche Fibrillen bildet, die letztendlich zur Entstehung der senilen Plaques führen (*Pike et al., 1995; Cappai und White, 1999*). A β entsteht intrazellulär, d.h. bevor es sekretiert wird (*Turner et al., 1996*). Das A β -Peptid und A β -ähnliche Peptide weisen eine hohe Heterogenität im N- und C-Terminus, d.h. bezüglich ihrer Länge auf (*Hartmann, 1999*). Der Hauptanteil der A β -Spezies im Zellkulturmedium und in der cerebrospinalen Flüssigkeit ist das A β 1-40 (~ 50-70 %), von dem angenommen wird, dass es hauptsächlich im Golgi-Apparat entsteht. A β 1-42 hat einen Anteil von 5-20 % und wird im ER sowie in intermediären Kompartimenten gebildet. Weiterhin gibt es verkürzte Formen, wie A β 11-40/42, A β 1-28, A β 3-34; A β 14-40, A β 15-40 und A β 17-40 (*Murphy et al., 1999; Wang et al., 1996; Morichima-Kawashima et al., 1998*). *Wang et al.* konnten feststellen, dass N2a Maus-Neuroblastomazellen, die humanes APP₆₉₅ oder die schwedische Mutante des humanen APP₆₉₅ exprimieren, eine Vielzahl von unterschiedlichen A β Formen bilden können.

Diese lassen sich im Zellkulturmedium mittels Massenspektrometrie nachweisen (*Wang et al., 1996*).

Die Länge des A β beeinflusst seine physikalischen Eigenschaften. A β mit 42 bzw. 43 Aminosäuren hat eine höhere Neigung zur Aggregation und ist auf Grund dessen verstärkt in den senilen Plaques zu finden. Neben dem A β 42 konnten jedoch auch einige N-terminal verkürzte A β -Formen identifiziert werden, die wesentlich toxischer sind und schneller zur Aggregation neigen als A β 42. Von den meisten dieser verkürzten Spezies wird angenommen, dass sie durch Proteolyse des A β 40/42 entstehen. Eine weitere Möglichkeit der Entstehung der N-terminal verkürzten A β -Formen ist die Spaltung des APP durch die β -Sekretase (BACE1), die alternativ zwischen Tyrosin (Tyr) 10 und Glutamin (Glu) 11 spaltet. In kultivierten Neuronen wird diese Stelle (β' -Spaltstelle) bei erhöhter β -Sekretase-Expression der normalen β -Sekretase-Schnittstelle vorgezogen (*Liu et al., 2002b; Huse et al., 2002; Pike et al., 1995*). Außerdem kann das durch die Spaltung der β -Sekretase entstandene C99-Peptid ein weiteres Mal von der β -Sekretase an Glu 11 gespalten werden. Es bleibt dann das Peptid C89 in der Membran zurück, welches dann ebenfalls wie C99 und C83 von der γ -Sekretase gespalten werden kann (*Liu et al., 2002b; Lee et al., 2003*). Verkürzte Formen des A β , die kürzer sind als p3, also durch Einwirken von BACE2 entstehen (siehe 1.4.3), sind weniger amyloidogen und weniger neurotoxisch (*Farzan et al., 2000*).

Die Funktion des A β ist noch unklar. A β wird auch im normalen Zellmetabolismus gebildet und kann die Immunantwort stimulieren, das Neuritenwachstum inhibieren, Proteinphosphorylierung aktivieren und neurotoxische Wirkung ausüben. Hohe Konzentrationen von aggregiertem A β führen zu Zelltod, wohingegen geringe Konzentrationen neurotrophe Wirkung besitzen. Es konnte zudem beobachtet werden, dass A β zu Neuritendegeneration führt (*Cappai und White, 1999*).

Der neurotoxische Mechanismus des A β ist unklar, es konnte allerdings festgestellt werden, dass erhöhte intrazelluläre Konzentrationen an Wasserstoffperoxidmolekülen (H₂O₂) mit einer erhöhten A β -Toxizität korrelieren. Außerdem wurde in Gegenwart von A β eine erhöhte Lipidoxidation beobachtet. Auf Grund dieser und anderer Beobachtungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass freie Radikale die Vermittler der A β -Toxizität darstellen könnten. Die verstärkte Bildung von H₂O₂-Radikalen könnte dadurch erzeugt werden, dass A β mit einem Rezeptor (*receptor for advanced glycation end products* = RAGE) auf Neuronen interagieren kann. Hierdurch wird eine Signalkaskade ausgelöst, in

deren Verlauf H_2O_2 entstehen kann (*Cappai und White, 1999; Behl, 1997*). Es wird von zahlreichen Forschern angenommen, dass die Aggregation des A β die primäre Ursache der AD ist, da sie entzündliche Vorgänge auslöst, die dann zu Neuronenschäden, zu Hyperphosphorylierung von Tau und damit auch zur NFT-Bildung beitragen könnte (siehe auch 1.5.2). Diese Hypothese wird amyloide Kaskaden-Hypothese genannt (*Evin et al., 2002*).

1.5 Die Cdk5

Die Cyclin-abhängige Kinase 5 (*cyclin-dependent kinase 5 = Cdk5*) gehört zu der Familie der Serin/Threonin Kinasen und weist eine hohe Sequenzhomologie zu den anderen Cdks auf. Sie ist eine Prolin-gerichtete Kinase, aber nicht wie die anderen Cdks an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Die Cdk5 ist ubiquitär, jedoch nicht in sich teilenden Zellen zu finden. In Neuronen ist sie besonders stark exprimiert. Sie spielt im Gehirn bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems und bei der Regulation der Neuronenmigration eine große Rolle. Außerdem ist sie wahrscheinlich am Axonenwachstum und der Synapsenfunktion beteiligt, und sie trägt zur Phosphorylierung von Proteinen in postmitotischen Neuronen bei (*Tanaka et al., 2001; Smith et al., 2001; Weishaupt et al., 2003*).

Während eine gestörte Regulation der Aktivitäten der anderen Cdks zum Krebsgeschehen beiträgt, bewirken Aktivitätsveränderungen der Cdk5 die Degeneration von Neuronen (*Smith et al., 2001*).

1.5.1 Regulation der Aktivität der Cdk5

Die Cdk5 wird nicht wie alle anderen Cdks durch die Bindung von Cyclinen aktiviert (*Weishaupt et al., 2003*). Die Aktivität der Cdk5 wird hingegen zum einen durch die Bindung der Cyclin-verwandten Proteine p39, p35 und p25, und zum anderen durch Phosphorylierung reguliert (*Tanaka et al., 2001*).

p39, p35 und p25 aktivieren die Cdk5 durch Bindung an eine Seite des katalytischen Spaltes des Enzyms (*Maccioni et al., 2001b*). p35 und p39 besitzen eine Sequenzhomologie von 57 % und sind essentiell für die Aktivierung der Cdk5. So konnte

gezeigt werden, dass *knock out*-Mäuse, bei denen p35 und p39 deletiert wurden, ähnlich wie Cdk5 *knock out*-Mäuse Fehlentwicklungen im Gehirn aufweisen (Weishaupt et al., 2003). p35 ist durch Myristinsäure in der Zellmembran verankert und bildet dort mit der Cdk5 einen Komplex. p35 hat eine geringe Halbwertszeit (20-30 Minuten) und wird durch Ubiquitin-gesteuerte Proteolyse abgebaut (Dhavan und Tsai, 2001). Der Cdk5/p35-Komplex phosphoryliert Proteine, wie Synapsin, β -Catenin oder Nudel und spielt eine wichtige Rolle beim Neuritenwachstum und der Differenzierung von Neuronen (Strocchi et al., 2003).

In Anwesenheit von Calcium werden p35 bzw. p39 von Calpain in zwei Polypeptide, p10 und p25 bzw. p29 und p10, gespalten. p25 stellt einen weitaus besseren Aktivator der Cdk5 dar, da es im Vergleich zu p35 eine höhere Halbwertszeit hat (> 60 Minuten), und stärker an die Cdk5 bindet. p25 ist im Cytosol und im Kern zu finden, da es im Gegensatz zu p35 nicht an Myristinsäure gebunden und somit nicht in der Zellmembran verankert ist. Diese veränderte Lokalisation ermöglicht somit der Cdk5 auch Proteine zu phosphorylieren, die sich nicht in Membrannähe befinden, wie z. B. das Tau Protein oder die Neurofilamente (siehe Abb. 4) (Dhavan und Tsai, 2001; Weishaupt et al., 2003).

Die Cdk5 kann auch APP an Threonin (Thr) 668 phosphorylieren. Diese Phosphorylierung führt zu einer Konformationsänderung des C-Terminus von APP, und trägt wahrscheinlich zum Neuritenwachstum bei, sowie zur Verteilung von APP in der Zelle (Liu et al., 2003). So konnte von Ando et al. festgestellt werden, dass eine Phosphorylierung des Thr 668 von APP₆₉₅ zu einer neuronalen Differenzierung führte und sich das APP im Wachstumskegel der Neuriten befand (Ando et al., 1999).

Die Aktivität der Cdk5 kann weiterhin durch Phosphorylierung des Serin (Ser) 159 beeinflusst werden (Grand et al., 2001). Diese Stelle ist eine potentielle Phosphorylierungsstelle der PKA (aus *Phosphorylierungs-Programm NetPhos 2.0 entnommen*). Eine Phosphorylierung dieses Serins scheint die Aktivität der Cdk5 negativ zu beeinflussen. So konnten Tarricone et al. feststellen, dass durch eine Mutation des Ser 159 in eine Glutaminsäure, wodurch eine Phosphorylierung nachgeahmt wird, die Bindung des p35 bzw. p39 inhibiert wird. Diese Bindung scheint für eine maximale Aktivität der Cdk5 von Bedeutung zu sein. Phosphorylierung des Ser 159 kann die Bindung von p35 bzw. p39 verhindern, wodurch die Aktivität der Cdk5 negativ reguliert wird (Tarricone et al., 2001).

Die Cdk5 kann, neben der Cdk2, durch den Cyklin-abhängigen Kinase-Inhibitor Roscovitin inhibiert werden (Meijer et al., 1997).

1.5.2 Cdk5 und die Alzheimer Demenz

Cdk5 und p25 wurden verstärkt in Neuronen gefunden, die NFTs enthielten. Die gesteigerte Menge an p25 in menschlichen Gehirnen korrelierte sehr stark mit dem Grad der AD. Jedoch ist nicht sicher, ob die Akkumulation des p25 nicht auch durch eine verstärkte Degradation des p35 *post mortem* entstanden sein könnte, da p35 ein sehr instabiles Protein ist. Cdk5-, p35- und Tau-Überexpression in transgenen Mäusen zeigten jedoch keine Tau-Hyperphosphorylierung, so dass die Anwesenheit von p25 notwendig zu sein scheint, um zu dieser pathologischen Veränderung beizutragen. Tau scheint somit auch kein physiologisches Substrat der Cdk5 zu sein (*Dhavan und Tsai, 2001; Pei et al., 1998; Weishaupt et al., 2003*).

Es konnte nachgewiesen werden, dass der Cdk5/p25-Komplex an der Hyperphosphorylierung von Tau und an der Apoptose von Zellen beteiligt ist (*Dhavan und Tsai, 2001; Weishaupt et al., 2003*). Die Cdk5 scheint jedoch eher im frühen Stadium der Tauphosphorylierung eine Rolle zu spielen, da mit steigender Hyperphosphorylierung von Tau eine verminderte Immunreaktivität der Cdk5 in Neuronen korreliert (*Pei et al., 1998*).

Eine Überexpression von p25 in Neuronen resultiert in einer erhöhten Phosphorylierung von Tau an Ser 202 und Ser 404. Die Cdk5 kann Tau, neben diesen beiden genannten Aminosäuren, auch an Ser 235 und Thr 205 phosphorylieren (*Dhavan und Tsai, 2001; Takashima et al., 2001*). Jedoch laufen diese Phosphorylierungen nicht simultan oder gleich schnell ab. So konnte festgestellt werden, dass zunächst Ser 202 phosphoryliert sein muss, bevor eine Phosphorylierung des Thr 205 erfolgen kann. Außerdem erfolgt die Phosphorylierung des Thr 205 im Gegensatz zur Phosphorylierung von Ser 235 und Ser 404 langsamer. So hat p25 nicht nur einen Einfluss auf die Aktivität der Cdk5, sondern auch auf die Abfolge der Tauphosphorylierung (*Hashiguchi et al., 2002*). Weitere Reste, die von der Cdk5 phosphoryliert werden können, sind Thr 181, Ser 199, Thr 212, Ser 214, Thr 217, Thr 231, Ser 396 und Thr 404 (*Liu et al., 2002a*).

Town et al. (2002) postulierten, dass die beiden neuropathologischen Veränderungen der AD in einem Zusammenhang stehen. Sie konnten zeigen, dass die Tauphosphorylierung durch das A β -Peptid unterstützt wird. A β ist neben oxidativem Stress und anderen Stressfaktoren in der Lage den intrazellulären Calciumspiegel zu erhöhen. Dieser wiederum aktiviert die durch Calcium-aktivierbare Protease Calpain, welche das p35 in

das p25 und das p10 spaltet. Der Einsatz von Calpain-Inhibitoren konnte die Spaltung von p35 in p25 und p10 verhindern. Durch den Abbau von p35 zu p25, ist die Cdk5-Aktivität erhöht, und sie ist außerdem dazu in der Lage, Proteine, die sich nicht in unmittelbarer Nähe der Zellmembran befinden zu phosphorylieren, da p25 im Gegensatz zu p35 nicht in der Zellmembran verankert ist. Zu den Proteinen, die nun phosphoryliert werden können, zählt unter anderem auch das Tau Protein (siehe Abb. 4) (Town *et al.*, 2002; Weishaupt *et al.*, 2003; Strocchi *et al.*, 2003).

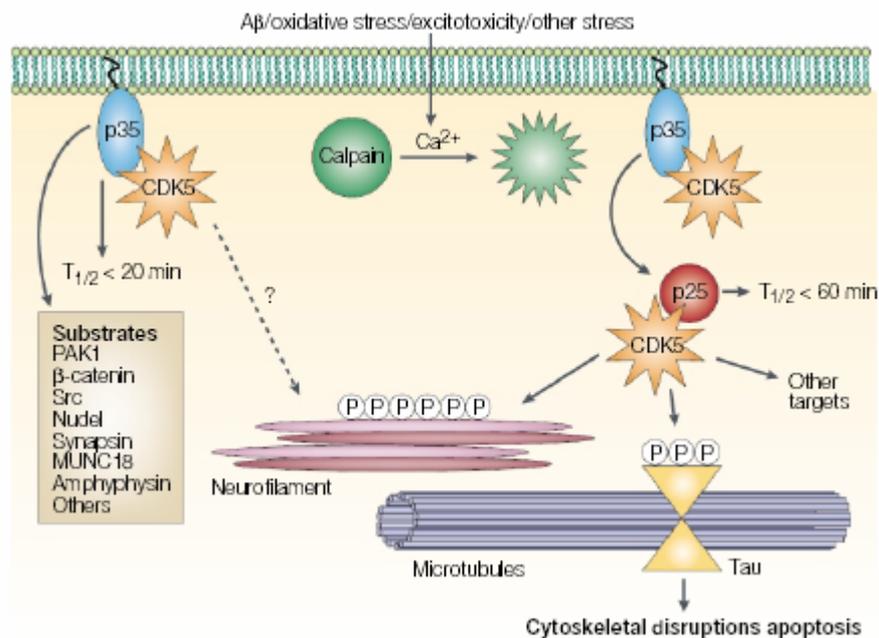


Abb. 4: Die Spaltung von p35 zu p25 ist neurotoxisch.

p35 hält die Cdk5 an der Zellmembran, wo diese viele Proteine phosphoryliert. Bei Anwesenheit von oxidativem Stress oder dem A β Peptid wird die Calcium-abhängige Protease Calpain aktiviert, die p35 in p25 und p10 spaltet. Da p25 nicht durch Myristinsäure in der Membran verankert ist, kann der Cdk5-p25-Komplex ins Cytoplasma diffundieren und dort Substrate wie das Tau-Protein oder die Neurofilamente phosphorylieren. Eine verstärkte Phosphorylierung dieser Proteine könnte zu cytoskelettalen Veränderungen und damit zum Zelltod führen (modifiziert nach Dhavan und Tsai, 2001).

1.6 Die O-GlcNAc-Modifikation

O-glykosidisch gebundenes N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) konnte erstmals von Torres und Hart 1984 an Serin- und Threoninresten von Proteinen des Cytoplasmas und des

Kerns in Eukaryonten nachgewiesen werden (*Torres und Hart, 1984*). O-GlcNAc ist eine von vielen posttranslationalen Modifikationen von Proteinen, von der angenommen wird, dass sie Einfluss auf Funktion und Aktivität von Proteinen hat (*Zachara und Hart, 2002*). Bisher konnten viele O-GlcNAc-modifizierte Proteine identifiziert werden, die alle Phosphoproteine darstellen: u.a. Cytoskelettproteine, Kernporenproteine, RNA Polymerase II, Protoonkogene, Transkriptionsfaktoren, Tumorsuppressoren, Hormonrezeptoren, Phosphatasen und Kinasen (*Vosseller et al., 2001; Lubas und Hanover, 2000*).

Eine Konsensussequenz für die Übertragung von O-GlcNAc ist noch nicht gefunden worden, jedoch sind die mit O-GlcNAc modifizierten Peptidsequenzen oft denen ähnlich, die von Kinasen phosphoryliert werden (*Wells et al., 2001b*). Es konnte festgestellt werden, dass eine „Yin-Yang“ Beziehung zwischen der O-GlcNAc-Modifikation und Phosphorylierung von Proteinen herrscht. Bestimmte Phosphataseinhibitoren bzw. Kinaseaktivatoren verringerten die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen, während Kinaseinhibitoren die Spiegel der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen neuronaler Zellen in Kultur erhöhten (*Griffith und Schmitz, 1999*).

Ähnlich wie Kinasen für die Phosphorylierung der Proteine zuständig sind, so ist die O-GlcNAc-Transferase (OGT) zuständig für die Modifikation der Proteine mit O-GlcNAc. Die Abspaltung des O-GlcNAc von Proteinen wird von der O-GlcNAc-Hydrolase (OGH) durchgeführt, die somit ähnliche Funktion hat wie die Phosphatasen (siehe Abb. 5) (*Wells et al. 2001a*). OGT und OGH wurden im Cytosol und im Kern von Zellen detektiert und konnten bereits kloniert werden (*Kreppel et al., 1997; Gao et al., 2001*).

Neben der Tatsache, dass Phosphorylierung und O-GlcNAc-Glykosylierung an gleichen Serin- oder Threoninresten stattfinden und somit Kinasen und OGT miteinander um dieselben Aminosäuren konkurrieren können, ist es auch möglich, dass ein Protein an unterschiedlichen Aminosäuren sowohl phosphoryliert als auch O-GlcNAc-modifiziert sein kann (*Ku und Omary, 1994*). Weiterhin wird vermutet, dass durch die O-GlcNAcylierung eine Konformationsänderung und damit die Aktivierung des Proteins stattfinden kann. Außerdem können dadurch phosphorylierbare Serin- und Threoninreste für Kinasen unzugänglich werden, da eine Phosphorylierung an diesen Aminosäureresten dann nicht mehr möglich wäre (*Hanover et al., 1999; Schmitz und Griffith, 1998*).

Es gibt Studien, die die O-GlcNAc-Modifikation mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung bringen. Hierzu zählen nicht nur Krebs und Diabetes, sondern auch neurodegenerative Erkrankungen wie die AD (*Hanover, 2001*). So konnte gezeigt werden,

dass nicht nur Tau, sondern auch APP O-GlcNAc-modifiziert sind (Arnold *et al.*, 1996; Griffith *et al.*, 1995). Außerdem wurde gezeigt, dass in AD-Hirnen in den Hirnarealen, die verstärkt von morphologischen Veränderungen betroffen sind, O-GlcNAc auf cytoskelettalen Proteinen im Vergleich zu Proteinen aus Kontrollhirnen verstärkt vorkommt (Griffith und Schmitz, 1995).

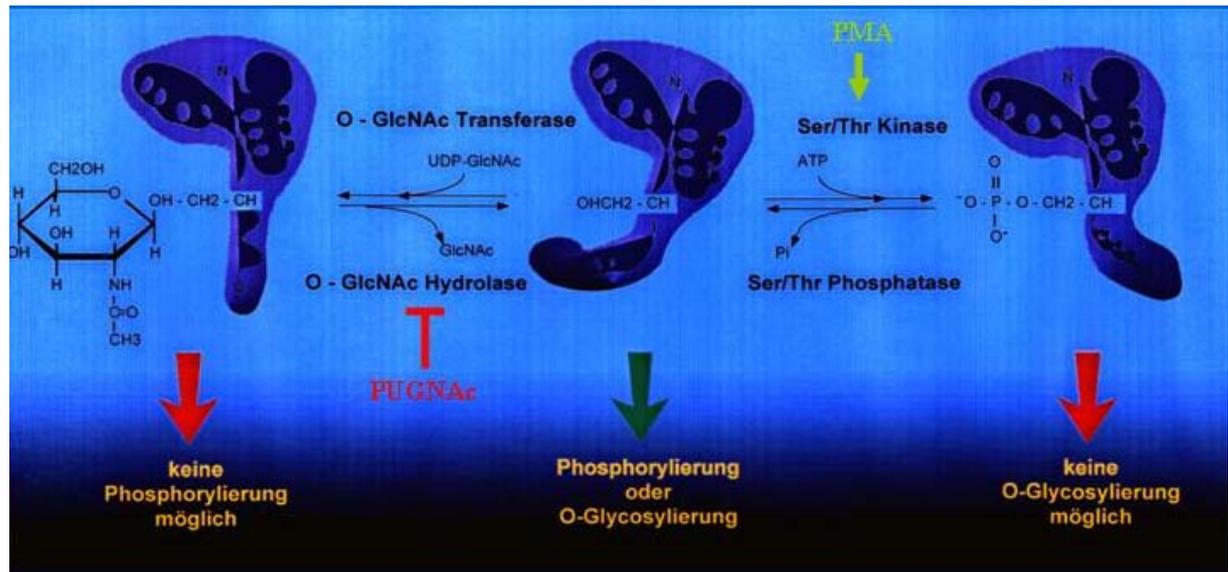


Abb. 5: *O-GlcNAc-Modifikation vs. Phosphorylierung*

Die O-GlcNAc-Modifikation an Serin- und Threoninresten als Alternative zur Phosphorylierung kann regulatorische Funktion für Proteine haben. Durch Modifikation der Proteine kann es zu einer Konformationsänderung kommen, die veränderte Eigenschaften/Funktionen des Proteins zur Folge hätten. PUGNAc hemmt die Hydrolase und verursacht somit einen Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation, wohingegen PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) die Protein Kinase C aktiviert, was zu einer verringerten O-GlcNAc-Glykosylierung führen könnte.

1.6.1 Mögliche Funktionen der O-GlcNAc-Modifikation

Verschiedene Studien lassen eine Vielzahl von möglichen Funktionen der O-GlcNAc-Modifikation erkennen. O-GlcNAc könnte demnach die Assoziation von Proteinen in Komplexen regulieren, insbesondere von Proteinen des Cytoskeletts. Des Weiteren könnte O-GlcNAc auf den Transport in den bzw. aus dem Kern Einfluss nehmen oder die Halbwertszeit und die Proteolyse von Proteinen beeinflussen, da es u.a. in PEST-Sequenzen zu finden ist. Vor allem aber könnte O-GlcNAc die Aktivität von Proteinen regulieren,

indem es mit der Phosphorylierung der Proteine konkurriert bzw. mit dieser Modifikation in einer reziproken Beziehung steht (*Zachara und Hart, 2002*). In dem Zusammenhang ist von besonderem Interesse, dass die Phosphorylierung der Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase) an Ser 1177 durch die Proteinkinase Akt/Protein Kinase B (PKB) zu einer Aktivität der NO-Synthase führte. Eine Modifikation des gleichen Serinrestes mit O-GlcNAc bewirkte hingegen eine Inaktivierung der Synthase (*Du et al. 2001*). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Kinasen GSK3 und Casein Kinase 2 (CK 2) Substrate der OGT darstellen, was bedeutet, dass auch Kinasen durch O-GlcNAc-Modifikation reguliert werden können (*Hanover, 2001*).

Die „Yin-Yang“ Hypothese konnte dadurch bewiesen werden, dass eine Behandlung von Kleinhirnneuronen z.B. mit Okadasäure (ein unspezifischer Phosphatase-Inhibitor), Phorbol ester (Protein Kinase C Aktivator) oder Dibutyryl-cyclo-Adenosinmonophosphat (dbcAMP = Protein Kinase A Aktivator) zu einer verringerten O-GlcNAc-Modifizierung von Proteinen führte. Inhibitoren von PKA und PKC (KT5720 bzw. Bis-indoylmaleimid), erhöhten den Spiegel an O-GlcNAc (*Griffith und Schmitz, 1999*). Aus diesem reziproken Verhalten lässt sich schließen, dass die O-GlcNAc-Modifikation ein alternatives Signaltransduktionssystem zur Phosphorylierung darstellt und damit eine ähnliche regulatorische Funktion besitzen könnte. Diese Annahme wird außerdem dadurch bestätigt, dass es sich bei der Übertragung/Abspaltung von O-GlcNAc um einen dynamischen Prozess handelt, der wesentlich schneller erfolgt als der Turnover des Trägerproteins (*Hart, 1997*).

1.6.2 Die O-GlcNAc-Hydrolase (OGH)

Die OGH (Hexosaminidase C) konnte von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen kloniert werden. *Gao et al.* klonierten sie als eine N-Acetylglucosaminidase und die Gruppe von *Heckel* als eine Hyaluronidase, wobei der N-Terminus des Enzyms der bakteriellen Hyaluronidase ähnlich ist, und der C-Terminus Homologien zu Acetyltransferasen aufweist (*Gao et al., 2001; Heckel et al., 1998*). Somit scheint das Enzym zwei enzymatische Aktivitäten miteinander zu verbinden (*Schultz und Pils, 2002*). Im Folgenden soll jedoch nur auf die Funktion des Enzyms als N-Acetylglucosaminidase eingegangen werden.

Bei der OGH handelt es sich um ein hoch konserviertes, hitzelabiles Enzym mit neutralem pH-Optimum und einer Größe von ca. 130 kDa bzw. 75 kDa, wobei die kleinere eine Splicevariante darstellt und inaktiv ist (*Comtesse et al., 2001*). Die OGH ist zum größten

Teil im Cytosol zu finden (betrifft 130 kDa-Form), aber auch in geringem Umfang im Kern (betrifft 75 kDa-Form) (*Gao et al., 2001; Wells et al., 2003; Iyer und Hart, 2003*). Die OGH hydrolysiert nur O-GlcNAc, im Gegensatz zur sauren Hexosaminidase der Lysosomen jedoch nicht N-Acetylgalactosamin (GalNAc). Sie ist in jedem menschlichen Gewebe exprimiert. Die höchste Expression wurde jedoch im Gehirn, im Pankreas und in der Placenta nachgewiesen (*Gao et al., 2001*).

PUGNAc (O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosyliden)-amino-N-Phenylcarbamate) stellt den spezifischsten Inhibitor der OGH dar (siehe Abb. 5). Ein weiterer, aber weniger effektiver Inhibitor ist das Streptozotocin, das im Gegensatz zu PUGNAc auch andere Enzymreaktionen beeinflusst (*Hanover, 2001*).

1.6.3 Die O-GlcNAc-Transferase (OGT)

Dieses Enzym konnte 1990 aufgereinigt und charakterisiert werden und wurde 1997 von *Kreppel et al.* und *Lubas et al.* kloniert (*Kreppel et al., 1997; Lubas und Hanover, 2000*). Die Transferase in der Leber besteht aus zwei katalytisch aktiven 110 kDa α -Untereinheiten (p110) und einer regulatorischen 78 kDa β -Untereinheit (p78) und ist im Cytosol und im Kern der Zelle zu finden. Im Gehirn ist nur die aktive 110 kDa Untereinheit exprimiert (*Kreppel und Hart 1999; Akimoto et al., 2003*). Das aktive Zentrum des Enzyms befindet sich am C-Terminus. Durch Deletion der Aminosäuren 944-1037 konnte die Aktivität der OGT vollständig eliminiert werden (*Iyer und Hart, 2003*).

Die höchste Expression der OGT findet man in Zellen des Gehirns und des Pankreas (*Cole und Hart, 2001*).

Die OGT benötigt Uridin-Diphospho-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) als Substrat und kann sowohl synthetische als auch native Proteine β -glykosidisch mit O-GlcNAc an Serin- und Threoninresten modifizieren. Sie scheint keine bestimmte Konsensussequenz für die Modifikation zu benötigen, jedoch besitzen die zu modifizierenden Peptide neben einem Serin-/Threoninrest oft auch ein Prolin. Die OGT hat einen sehr niedrigen K_m -Wert ($K_m = 545$ nM UDP-GlcNAc), d.h. sie ist schon bei sub-mikromolaren Konzentrationen an UDP-GlcNAc aktiv (*Haltiwanger et al., 1992; Kreppel und Hart, 1999, Wells et al., 2003*).

Die OGT kann keiner eindeutigen Enzymfamilie zugeordnet werden und stellt somit ein Unikat dar. Jedoch ist sie von *C. elegans* bis zum Mensch hoch konserviert und scheint daher eine essentielle Funktion für die eukaryotische Zellphysiologie zu haben. So konnte

nachgewiesen werden, dass embryonale Mausstammzellen, in denen das Gen für die OGT inaktiviert vorliegt, nicht überlebensfähig sind (*Comer und Hart, 2000*). Weiterhin wird angenommen, dass die OGT für verschiedene Funktionen von Bedeutung ist. Dies wird daraus geschlossen, dass viele Phosphoproteine von Neuronen mit O-GlcNAc modifiziert sind. Zu ihnen gehören u.a. die Neurofilamente, Tau, Synapsin, Ubiquitin-Carboxyl-Hydrolase-L1, APP und Ankyrin G. Es kann daher vermutet werden, dass O-GlcNAc an der Ausbildung von Axonen beteiligt ist. Auch ist es möglich, dass die O-GlcNAc-Modifizierung die Exozytose von synaptischen Vesikeln reguliert (*Akimoto et al., 2003*).

Die OGT ist an Tyrosinresten phosphoryliert, weist zudem auch eine Modifizierung mit O-GlcNAc auf und kann durch steigende UDP-GlcNAc-Konzentrationen aktiviert (s.o.), bzw. durch UDP inhibiert werden (*Wells et al., 2001b; O'Donnell, 2002; Haltiwanger et al., 1990*). Die Tyrosin-Phosphorylierung und damit die eventuelle Regulation durch Tyrosinkinase verknüpfen die O-GlcNAcylierung mit weiteren Signaltransduktionskaskaden und machen sie somit zu einem wichtigen regulatorischen Element des Zellstoffwechsels.

Ähnlich wie andere regulierte Proteine besitzt auch die OGT mehrere Tetratricopeptidmotive (TPR-Motiv) am N-Terminus, was vermuten lässt, dass die Transferase mit anderen Proteinen in Interaktion treten kann, um einen regulierbaren Komplex zu bilden. TPR-Motive haben unterschiedliche Funktionen. Sie spielen eine Rolle bei einer Reihe von Zellprozessen, in denen sie Protein-Protein-Interaktionen vermitteln, z.B. greifen sie in den Zellzyklus ein und sind an der Regulation der Transkription sowie des Proteintransports beteiligt (*Kreppel et al., 1997*). Einige dieser identifizierten Bindungspartner der OGT sind vermutlich dazu in der Lage die OGT zu unterschiedlichen intrazellulären Orten zu transportieren (*Wells et al., 2003*). Außerdem sind diese TPR-Motive für die Trimerisierung der katalytischen Untereinheit verantwortlich und scheinen auch eine Rolle bei der Substratspezifität zu haben. Auf die Enzymaktivität selbst haben sie allerdings keinen Einfluss (*Comer und Hart, 2000*).

1.6.4 Zusammenhang zwischen der O-GlcNAc-Modifikation und der Alzheimer Demenz

Die genaue Funktion der O-GlcNAc-Modifikation bei der AD ist noch unklar. Einige Ergebnisse zeigen, dass in AD-Gehirnen die Glucoseverstoffwechslung durch die

Glykolyse herabgesetzt ist (Hoyer, 1992). Dies führt zu einer gesteigerten UDP-GlcNAc-Konzentration, da die nicht verstoffwechselte Glucose, vermehrt in den Hexosaminweg eingehen kann. UDP-GlcNAc kann dann zur Modifizierung von Proteinen mit O-GlcNAc herangezogen werden (Sayeski und Kudlow, 1996; Hanover, 2001). Eine Studie belegt, dass Proteine in Gehirnen von Alzheimerpatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen eine erhöhte O-GlcNAc-Modifikation aufweisen. Diese erhöhte O-GlcNAc-Modifizierung gilt für Proteine der Detergenz unlöslichen cytoskelettalen Fraktion (*detergent insoluble cytoskeletal fraction = dicf*). Sie ist nicht auf eine gesteigerte Proteinsynthese zurückzuführen. Es ist außerdem interessant, dass sowohl Tau als auch APP O-GlcNAc-modifiziert sind (Arnold et al., 1996; Griffith et al., 1995).

Inwieweit die O-GlcNAc-Modifikation von Tau bei der veränderten Interaktion von Tau mit den Mikrotubuli bzw. bei der Entstehung der NFTs eine Rolle spielt, ist unbekannt.

Eine verstärkte O-GlcNAc-Expression in AD Hirnen könnte mit veränderten Aktivitäten der Sekretasen einhergehen. So ist bekannt, dass durch die Behandlung von Neuronen mit Phorbolestern, welche die PKC aktivieren, die α -Sekretase entweder direkt oder indirekt stimuliert wird. Es ist deshalb denkbar, dass eine verstärkte O-GlcNAc-Modifikation inhibierend auf die α -Sekretase wirkt. Umgekehrt kann nicht ausgeschlossen werden, dass die β -Sekretase durch eine erhöhte O-GlcNAc-Modifikation aktiviert wird.

Interessanterweise sind sowohl die OGT als auch die OGH an Chromosomenloci zu finden, die mit neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Zachara und Hart, 2002). Die OGT ist auf dem X-Chromosom (Xq13.1) zu finden und ist dadurch mit der Parkinsonkrankheit assoziiert (Iyer und Hart, 2003; Wells et al., 2003). Die OGH ist auf Chromosom 10 (10q24.1-q24.3) zu finden, einem Locus der mit AD assoziiert ist (Heckel et al., 1998; Hanover, 2001; Wells und Hart, 2003).

1.7 Ziel der Arbeit

Die Arbeit umfasst zwei Ziele. Zum einen sollte untersucht werden, inwiefern die O-GlcNAc-Modifikation einen Einfluss auf das Prozessieren von APP durch die Sekretasen hat. Da nachgewiesen worden war, dass eine Stimulation der PKC durch die Behandlung der Zellen mit PMA eine verstärkte Sekretion des APP α und eine gleichzeitig verringerte Sekretion des A β bewirken kann, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Inhibition der OGH durch PUGNAc die Sekretion von APPs und A β beeinflusst. Es wurde

postuliert, dass der Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen möglicherweise einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Aktivität der Sekretasen haben könnte. Wäre dies der Fall, so müsste ein Unterschied bezüglich der Sekretion von APPs α bzw. APPs β sowie des A β festzustellen sein.

Das zweite Ziel war, die O-GlcNAc-Modifizierung der Cdk5 und des APP zu charakterisieren, d.h. die Serin- und Threoninreste zu identifizieren, die mit O-GlcNAc modifiziert werden können, sowie den Einfluss eines erhöhten Niveaus an O-GlcNAc auf die Aktivität der Cdk5 zu untersuchen.

Für den Nachweis der O-GlcNAc-Modifizierung der Cdk5 wurde ein *in vitro* Versuch etabliert, in dem mit Hilfe der rekombinant hergestellten OGT die möglicherweise glykosylierbaren Serine und Threonine auf Peptidfragmenten der Cdk5 nachgewiesen werden sollten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme

Chemikalie	Bezugsquelle	Chemikalie	Bezugsquelle
Aβ 1–40 synthetisch	Sigma, Taufkirchen	N-Acetylglucosamin	Sigma, Taufkirchen
Acrylamid	Roth, Karlsruhe	Natriumcacodylat (C ₂ H ₆ AsO ₂ Na)	Sigma, Taufkirchen
Adenosinmonophosphat	Sigma, Taufkirchen	Natriumfluorid (NaF)	Sigma, Taufkirchen
Agarose	Roche, Grenzach-Wyhlen	Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Riedel de Haën, Seelze
Ameisensäure	Sigma, Taufkirchen	3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropan Sulfonsäure (MOPSO)	Amersham Bioscience, Freiburg
2-acetamido-1-amino-1,2-dieoxy-β-D-glucopyranose (N-Acetylglucosamin)	Sigma, Taufkirchen	Ni-NTA-Säule	Quiagen, Hilden
2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiosulfonat) (ABTS)	Fluka, Buchs	Nonidet [®] P-40 (NP40)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen	Penicilin/Streptavidin (Pen/Strep)	PAA Laboratories,
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen	Pepstatin	Sigma, Taufkirchen
Bestatin	Sigma, Taufkirchen	Pepton	Gibco BRL, GB
Bis-Acrylamid	Roth, Karlsruhe	Permafluor	Immunotech, F
β-Glycerophosphat	Sigma, Taufkirchrn	Pferdeserum	Gibco BRL, GB
Bovines Serum Albumin (BSA)	Boehringer, Mannheim	Phenolrot	Sigma, Taufkirchen
DMEM-Medium	Sigma, Taufkirchen	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Dibutryl-cyclo-AMP (dbcAMP)	Sigma, Taufkirchen	Phorbol 12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Calbiochem, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen	PIPES (Piperazin-1,4-bis-(2-ethan-sulfonsäure))	Fluka, Buchs
DNA-Ladder-Mix „Gene Ruler™“	MBI Fermentas, Litauen	Poly-L-Lysin (PLL)	Sigma, Taufkirchen
DNase (Rind)	Boehringer, Mannheim	Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
dNTPs	Roche, Grenach-Wyhlen	Protein G-Sepharose	Amersham Biosciences, Freiburg
Ectoin	Diese Substanz wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Galinski zur Verfügung gestellt	PUGNAc (= (O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosyliden)-amino-N-phenylcarbamat)	CarboGen, CH
Ethidiumbromid-Stammlsg.	Sigma, Taufkirchen	Quiaquick Gel extraction test kit	Quiagen, Hilden
Fötales Kälberserum Gold (FCS-Gold)	PAA Laboratories,	Roscovitin	Calbiochem, Darmstadt
Gadoliniumchlorid	Sigma, Taufkirchen	Roti [®] -Block (10x Konzentrat)	Roth, Karlsruhe
Geneticin (G418)	PAA Laboratories,	RPMI 1640	Sigma, Taufkirchen
Glutamin	PAA Laboratories,	RPMI 1640 Ready Mix	PAA Laboratories,
Glutaraldehyd-Stammlsg.	Sigma, Taufkirchen	Rubidiumchlorid (RbCl ₂)	Sigma, Taufkirchen
Hefe-Extrakt	Gibco BRL, GB	Sucrose	Sigma, Taufkirchen
Imidazol	Sigma, Taufkirchen	TEMED (N', N', N', N'-Tetramethylethylendiamin-Lösung)	Sigma, Taufkirchen
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Sigma, Taufkirchen	Tris (tris/hydroxymethyl)-aminomehtan (CH ₂ NC(CH ₂ OH) ₃)	ICN, Neuss
Loading Dye Solution	MBI Fermentas Litauen	Triton X-100	Boehringer, Mannheim
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen	Trypsin-EDTA	Gibco BRL, GB
Lipofektamin Plus	Gibco, BRL, GB	Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Lysozym	Sigma, Taufkirchen	Trypton	Gibco, BRL, GB
Magermilchpulver	Fluka, Buchs	Tween 20	Sigma, Taufkirchen
UDP-GlcNAc	Sigma, Taufkirchen	UDP-GlcNAc C ¹⁴ markiert	NEN Life Science Products, USA

Tab. 1: Chemikalien

Alle nicht genannten Pufferreagenzien und Salze waren von Merck (Darmstadt) und wurden als p.A. Reagenzien eingesetzt.

2.1.2 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma MWG Biotech synthetisiert und in TE-Puffer gelöst (Endkonzentration 100 pmol/ μ l). Sie wurden bei -20 °C gelagert.

2.1.3 Plasmide

2.1.3.1 Klonierungsvektoren

Vektor	Referenz
pQE30 (His-tag)	wurde uns freundlicherweise von dem Institut für Genetik Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Erhältlich bei Quiagen, Hilden

Tab. 2: *Klonierungsvektoren*

2.1.3.2 Rekombinante Plasmide für die Transfektion

Name	Klonierungsstrategie
pE695wt	Der Wildtyp des APP wurde an Stelle von GFP in den pEGFP N1 Vektor (Klontech, Heidelberg) kloniert.
pE695sw	Die schwedische Mutante des APP wurde an Stelle von GFP in den pEGFP N1 Vektor (Klontech, Heidelberg) kloniert.

Tab. 3: *Plasmide*

2.1.4 Enzyme

Name	Bezugsquelle
Bam H1	Roche, Grenzach-Wyhlen
Eco R1	Roche, Grenzach-Wyhlen
Hind III	Roche, Grenzach-Wyhlen
Ligase	Roche, Grenzach-Wyhlen
DNA-Polymerase PWO	Roche, Grenzach-Wyhlen

Tab. 4: *Enzyme*

2.1.5 Bakterienstamm

E. coli XL1-blue Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, Thi-1, Δ(mcr)A183m, Δ(mcr-cb-hsdSMR-mrr) 173, supE44, relA1, lac[F'pro AB lacI⁹ ZΔM15 Tn10(Tet^r 12,5 μg/ml)]

2.1.6 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
N2a	Maus-Neuroblastomazelllinie
N2a APPwt	N2a-Zelllinie, die konstitutiv das APPwt-Gen exprimiert, resistent gegen G418
N2a APPsw	N2a-Zelllinie, die konstitutiv das APPsw-Gen exprimiert, resistent gegen G418
HEK293	Menschliche embryonale Nierenzellen
HEK293 APPwt	HEK-Zelllinie, die konstitutiv das APPwt-Gen exprimiert, resistent gegen G418
HEK293 APPsw	HEK-Zelllinie, die konstitutiv das APPsw-Gen exprimiert, resistent gegen G418

Tab. 5: Zelllinien

2.1.7 Antikörper

a) Primäre Antikörper:	b) Sekundäre Antikörper:
<p>RL2: monoklonaler Maus-Antikörper; Antigen: Kernporenproteine; erkennt O-GlcNAc mit Protein-Backbone; Konzentration: 1 mg/ ml Bezugsquelle: Affinity Bioreagents, U.S.A. (<i>Snow et al., 1987</i>)</p> <p>4G8: monoklonaler Maus-Antikörper; Antigen : AS 17-24 des humanen Aβs; Konzentration: 1mg/ ml Bezugsquelle: Affinity Bioreagents, U.S.A.</p>	<p>α-Maus-POD: polyklonaler Ziegen-Antikörper; Peroxidase-gekoppelt; erkennt Maus-IgG und IgM Konzentration: 0,4 mg/ ml Bezugsquelle: Dianova, Hamburg</p> <p>α-Kaninchen-POD: polyklonaler Kaninchen-antikörper Peroxidase-gekoppelt, erkennt Kaninchen IgG und IgM Stammkonzentration: Bezugsquelle: Dianova, Hamburg</p>

a) Primäre Antikörper:	b) Sekundäre Antikörper:
<p>4G8: monoklonaler Maus-Antikörper; Antigen : AS 17-24 des humanen Aβs; Konzentration: 1mg/ ml Bezugsquelle: Affinity Bioreagents, U.S.A.</p>	<p>α-Maus-cy3: polyklonaler Ziegenantikörper; Cyanin 3-gekoppelt; erkennt Maus-IgG; Stammkonzentration: 0,75 mg/ml Bezugsquelle: Dianova, Hamburg</p>
<p>8E5: monoklonaler Maus-Antikörper; Antigen: AS 444-592 des humanen APPs; Konzentration: 5,3 mg/ ml Bezugsquelle: Elan Pharmaceuticals, U.S.A.</p>	<p>α-Maus Antikörper-Biotin: polyklonaler Mausantikörper Biotin-gekoppelt Bezugsquelle: Dianova Hamburg</p>
<p>W02: monoklonaler Maus-Antikörper; Antigen: AS 4-9 des humanen Aβ; Konzentration : 1 mg/ml Bezugsquelle: Abeta GmbH</p>	<p>Streptavidin-POD: bindet Biotin Bezugsquelle: Dianova, Hamburg</p>
<p>Aβ 17-42: polyklonaler Kaninchen-Antikörper Antigen: AS 17-42 des Aβs Bezugsquelle: Chemicon, Hofheim</p>	
<p>C-8: polyklonaler Kaninchen-Antikörper Antigen: cdk5 Bezugsquelle: Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg</p>	

Tab. 6: *Primäre und sekundäre Antikörper*

2.1.8 Geräte

Gerät	Hersteller
Biofuge 13	Heraeus Sepatech
Bio-Photometer	Eppendorf
Brutschrank für Bakterienkulturen	Mettler Elektronik
Brutschrank für Zellkulturen	wtc binder
Cryostat 2800 Frigocut E	Reichert-Jung
ELISA-Reader Titertek PLUS MS2	ICN
Gelelektrophorese für DNS-Auftrennung	Pharmacia
Gelelektrophorese für Proteinauftrennung	Bio Rad
Mikroskop Axiovert 200	Zeiss
Mikroskop DMIL	Leica
PH-Messgerät	Knick Fastnacht
Schüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments
Schüttler SM 25	Bühler

Sterilbank	Antair ZBK
Szintilationszähler	Kontron
Thermocycler	Eppendorf
Trans-Blot® Semi Dry Transfer Cell	BioRad
Wasserbad RM6	Mgw Lauda
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf
Zentrifuge Labofuge 200	Heraeus Sepatech
Zentrifuge Super T 21	Sorvall

Tab. 7: **Geräte**

2.1.9 Einwegmaterial und Arbeitsutensilien

Einwegartikel/ Arbeitsutensilien	Bezugsquelle
C18-Säule	Alltech, Unterhaching
Deckgläschen	Menzel, Braunschweig
Einwegartikel für die Zellkultur	Sarstedt, Nümbrecht; Falcon, USA; Greiner Solingen
Filterpapiere (3MM) für Western-Blot-Analysen	Whatmann, GB
Flexible Assay Plate (für Proteinbestimmungen)	Falcon® (Becton Dickinson GmbH), Heidelberg
Gelkammern und Elektrophorese-Apparatur für SDS-PAGE	BioRad, München
Glaswolle	VWR, Darmstadt
Injektionsnadeln	Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Nunc™ (Life Technologies GmbH), Karlsruhe
Mikrotiterplatten (für ELISA) Immunoplatte MaxiSorp	Nunc™ (Life Technologies GmbH), Karlsruhe
Nitrocellulosemembran	Satorius, Göttingen
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Pipetten	Eppendorf, Köln; Labsystems, Egelsbach
Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht; Eppendorf, Köln
Röntgenfilme (X-OMAT-AR-Filme)	Kodak, München
Vivaspin 4 ml Concentrator 10,000 MACO PES	Vivascience Limited, UK
48-, 24-, 12-, 6-Well-Platten für Zellkultur	Becton Dickinson, USA

Tab. 8: **Einwegartikel/Arbeitsutensilien**

2.1.10 Statistikprogramm

Superior Performance Software System SPSS Version 11.0 für Windows

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde eine einfaktorische ANOVA angewendet. Diese untersucht, ob mehrere unabhängige Gruppen aus Populationen mit demselben Mittelwert stammen. Dieses Verfahren enthält auch Trendanalysen, priori-Kontraste und posteriori-Mittelwertvergleiche. Es wurde sowohl für die Auswertung des *In situ*-Sandwich-ELISAs als auch für die Auswertung der Western Blots eine einfaktorische ANOVA mit einem posteriori-Mittelwertvergleich (kleinste signifikante Differenz = LSD) durchgeführt.

2.2 Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

Für die molekularbiologischen Arbeiten wird ausschließlich der *E. coli*-Stamm XL1 blue eingesetzt. Dieser ist gemäß der Gentechnik-Verordnung in die Gefahrenklasse S1 eingeordnet. Alle Bakterienamplifikationen erfolgen bei 37 °C und - sofern nicht anders vermerkt - über Nacht. Flüssigkulturen werden mit einer Frequenz von 200 rpm (rpm = *rounds per minute*) geschüttelt.

2.2.1.1. Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Die Aufnahme freier Fremd-DNA durch Bakterien wird als Transformation bezeichnet, der genaue Mechanismus dieses Vorganges ist noch ungeklärt. Durch eine besondere Behandlung nach Hanahan (1983) kann die Transformationseffizienz von *E. coli*-Bakterien um ein Vielfaches gesteigert werden. Auf diese Weise ist es möglich, Plasmid-DNA beliebig zu vermehren. Die behandelten Bakterien werden als transformationskompetent bezeichnet.

2.2.1.1.1 Kompetente Bakterien

Material:

YT-Medium:

- 8 g Trypton
- 5 g Hefeextrakt
- 5 g NaCl

in 1 L aqua dem.

YT⁺⁺-Medium:

- YT-Medium plus
- 20 mM MgSO₄
- 10 mM KCl

TFB1:

30 mM Kaliumacetat
50 mM MnCl₂
100 mM RbCl
10 mM CaCl₂
15 % Glycerin
pH 5,8

TFB2:

10 mM NaMOPs
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
15 % Glycerin
pH 7,0

Durchführung:

Zunächst wird eine *XLI blue*-Übernacht-Kultur in 2,5 ml YT⁺⁺ Medium bei 37 °C auf dem Bakterenschüttler inkubiert. Anschließend wird eine 1:100 Verdünnung in frischem YT⁺⁺-Medium hergestellt. Es erfolgt eine Inkubation, bis eine OD₆₀₀ (optische Dichte) von 0,8 erreicht ist. Der gesamte Ansatz wird dann in 100 mL vorgewärmtes YT⁺⁺ gegeben und inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht ist. Die Bakterienkultur wird dann sofort auf 4 °C abgekühlt. Die Bakterien werden anschließend bei g = 1200 und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 10 mL TFB1 bei 4 °C resuspendiert. Es folgt eine Inkubation auf Eis von 10 Minuten und eine weitere Zentrifugation bei g = 1200 und 4 °C für 10 Minuten. Der Überstand wird wiederum verworfen und das Bakterienpellet in 2 mL TFB2 resuspendiert. Die Bakterien werden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.1.1.2 Transformation von Bakterien

Material:

Bakterienstamm XL1-Blue

DNA: pQE30-OGT, pE695wt, pE695sw

LB-Medium:

1 % (w/v) NaCl
1 % (w/v) Pepton
0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
in aqua dem.
pH 7,0 autoklavieren

LB-Ampicillin-Agarplatten:

1,5 % (w/v) Agar-Agar
in LB-Medium und autoklavieren

Durchführung:

Bakterien werden auf Eis aufgetaut und zu 50 µL der Bakteriensuspension werden 25-50 µL der Plasmid-DNA (pQE30-OGT, pE695wt, pE695sw), bzw. ein ganzer Ligationsansatz gegeben. Es folgt eine Inkubation auf Eis für 10 Minuten, an die sich ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 Minute anschließt. Daraufhin erfolgt eine weitere Lagerung auf Eis für 2 Minuten. Anschließend werden 450 µL LB-Medium zu der Bakteriensuspension gegeben und die Bakterien bei 37 °C auf einem Schüttler für 30-50 Minuten inkubiert. Die Bakterien werden dann auf Agarplatten mit Ampicillinselektion ausgestrichen. Nachdem die Platten getrocknet sind, erfolgt eine Inkubation über Nacht bei 37 °C.

2.2.1.2. Anlegen einer E. coli Übernacht-Flüssigkultur

Material:

LB-Medium mit Ampicillin:

1 % (w/v) NaCl
1 % (w/v) Pepton
0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
50 µg/mL Ampicillin
in aqua dem.
pH 7,0 autoklavieren

Durchführung:

Ein auf einer Selektions-LB-Agarplatte isoliert liegender Bakterienklon wird mit Hilfe einer sterilen Impföse in 7 mL ampicillinhaltiges LB-Medium überführt und bei 37 °C und 200 rpm im Inkubationsschüttler über Nacht kultiviert. Zur Gewinnung größerer Bakterienmengen wird 100 µL einer solchen Übernacht-Kultur in 100 mL ampicillinhaltiges LB-Medium überführt und ebenfalls über Nacht kultiviert.

2.2.1.3 DNA-Präparation

2.2.1.3.1 Mini-Präparation

Material:

LB-Medium mit Ampicillin (siehe 2.2.1.2)
Mini Prep Kit (Machery-Nagel, Düren)

Durchführung:

Für die Minipräparation werden am Vortag Einzelkolonien von der Agarplatte genommen, auf die die transformierten Bakterien ausgestrichen worden waren. Die Einzelkolonie wird in jeweils 6 mL LB-Ampicillin-Medium (LB-Amp.-Medium) angeimpft (Ampicillin-Konzentration: 50 µg/ mL) und die Bakterien dann über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Jeweils 3 mL der Übernacht-Kultur werden durch Zentrifugation (g = 10.000; 30 Sekunden.; Raumtemperatur) sedimentiert.

Die weitere Durchführung der Mini-Präparation erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.3.2 Midi-Präparation

Material:

LB- Medium mit Ampicillin (siehe 2.2.1.2)
Midi Prep Kit (Machery-Nagel, Düren)

Durchführung:

Für die Midi-Präparation werden am Vortag 50 µL einer Flüssigkultur in 50 mL LB-Amp.-Medium angeimpft (Ampicillin-Konzentration: 50 µg/ mL).

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus der Übernacht-Kultur erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.2.1.4 Agarosegel-Elektrophorese

Material:

TBE-Puffer (10 x):

1 M Tris

0,83 M Borsäure

10 mM EDTA

0,8 % Agarose (w/v)

in 1 x TBE-Puffer

10 mg/mL Ethidiumbromid

6 x DNA-Probenpuffer:

0,25 % (w/v) Bromphenolblau

0,25 % (w/v) Xylencyanol

30 % (w/v) Glycerin

„Gene Ruler™ DNA-Ladder Mix”

Durchführung:

Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Gelelektrophorese wurden 0,8 %ige Gele verwendet.

Der Agarose-TBE-Puffer-Ansatz wird solange in der Mikrowelle gekocht, bis sich die Agarose in dem Puffer gelöst hat. Nach anschließender Abkühlung der Lösung auf ca. 60 °C wird Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,4 µg/mL hinzugefügt. Das Gel wird gegossen und nach völligem Erstarren mit TBE-Puffer bedeckt.

10 µL Probe werden mit 2 µL 6fach-konzentriertem Probenpuffer versetzt. Anschließend werden die DNA-Proben sowie ein ebenfalls mit Probenpuffer versetzter Molekulargewichtsmarker auf das Gel aufgetragen.

Je nach Größe des Gels erfolgt die Auftrennung der DNA-Fragmente bei 80 bzw. bei 100 V für ca. 1 h. Zur Auswertung und Dokumentation werden die Gele auf einen UV-Transilluminator gelegt und photographiert. Da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert, können die Nukleinsäurefragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.2.1.5 Elution von DNA aus einem Agarosegel

Material:

Restringierte DNA vom pQE30-Vektor mit und ohne OGT-Insert
(Restriktion siehe 2.2.1.7)
0,8 %iges Agarosegel (siehe 2.2.1.4)
QIAquick PCR Purification Kit Protokoll

Durchführung:

Die Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgt durch den QIAextraction-Kit entsprechend der Anleitung des Herstellers. Dabei wird die das DNA-Fragment enthaltende Agarose aus dem Gesamtgel ausgeschnitten, durch Zugabe von NaI/NaClO₄-Lösung aufgelöst und die DNA an eine Silika-Matrix gebunden. Nach mehreren Waschschritten wird die DNA in TE-Puffer oder H₂O eluiert.

2.2.1.6 Natrium-Acetat-Ethanol-Fällung

Material:

20 µg OGT-DNA
3 M NaAc (pH 5,2)
Ethanol absolut
70 % Ethanol

Durchführung:

20 µg der aus dem Gel eluierten cDNA der OGT werden mit 1/10 des Volumens mit 3 M NaAc-Lösung und dem 2,5fachen des Volumens mit absolutem Ethanol vermischt. Es folgt eine 10minütige Inkubation bei -20 °C, der sich eine 30minütige Zentrifugation bei 4 °C und $g = 20.000$ anschließt. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 70 %igem Ethanol (2,5faches des Volumens der ursprünglichen cDNA-Lösung) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 10 Minuten bei 4 °C und $g = 20.000$ wird der Überstand vorsichtig abgenommen und das DNA-Pellet bei 37 °C getrocknet.

Die cDNA wurde dann zur Sequenzierung an MWG geschickt.

2.2.1.7 *Restriktionsanalyse*

Material:

cDNA: cDNA der OGT im pQE-Vektor
pQE30-Vektor
Restriktionsenzyme: Bam *HI*, Hind *III*
aqua dem.
10fach Reaktionspuffer (Puffer B) (Roche, Grenzach-Wyhlen)

Durchführung:

Pro Restriktionsansatz werden pipettiert:

3 μ L cDNA
1,5 μ L 10 x Puffer
0,5 μ L Restriktionsenzym
9,5 μ L aqua dem.

Der Restriktionsansatz wird 2 h bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.8 *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Material:

Zu amplifizierende cDNA der OGT

Primer (100 pmol/ μ L):

OGThin: 5`-CGG GAT CCC GGA TGG CGT CTT CCG TGG GCA-3`

OGTrück: 5`-CCC AAG CTT GGG GAG GCT CAG GTA TAG GGG C-3`

4-fach dNTP-Mix: 10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dTTP, 10 mM dGTP

DNA-Polymerase: PWO

10fach Reaktionspuffer für PWO

aqua dem.

Durchführung:

Pro Ansatz werden pipettiert:

- 5 µL 10fach Reaktionspuffer
- 1 µL dNTP-Mix
- 1 µL OGThin-Primer
- 1 µL OGTrück-Primer
- 1,5 µL DNA
- 2,5 µL PWO
- 38 µL aqua dem.

Die cDNA der OGT wurden unter folgenden Bedingungen amplifiziert:

Vorlauf: Denaturierung	5 Min auf 95 °C	
Zyklus: Denaturierung	4 min bei 95 °C	} 30 x
Primer-Annealing	45 sec bei 65 °C	
DNA-Synthese	4 min bei 72 °C	
Auslauf:	10 min bei 72 °C	
Lagerung:	4 °C	

Die Annealing-Temperatur T_D errechnet sich nach $T_D = (A+T) \times 2 + (G+C) \times 4$.

A, T, G und C stehen hierbei für die Anzahl der jeweiligen Nukleotide Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin.

2.2.1.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Material:

cDNA

Durchführung:

Die cDNA wird 1:100 in aqua dem. verdünnt. Die Extinktion wird bei 260 nm und 280 nm gemessen. Eine OD von 1 entspricht bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg/mL DNA.

Da Proteine eine Absorption bei 280 nm aufweisen und es zu einer Überlagerung der Spektren kommt, muss mit dem Quotienten aus 260 nm und 280 nm der Reinheitsgrad der DNA bestimmt werden. Die Berechnung der Nukleinsäure-Konzentration wird nach folgender Formel durchgeführt:

$$C_{\text{DNA}} = E_{260} \times 50$$

$$C_{\text{DNA}} = E_{280} \times 40$$

Der Reinheitsgrad der Nukleinsäuren weist bei einem Quotienten E_{260}/E_{280} zwischen 1,8 und 2,0 ein Maximum auf.

2.2.1.10 *Ligation*

Material:

cDNA der OGT nach Vermehrung über PCR
 pQE30-Vektor (1:10 verdünnt)
 Ligationspuffer (10fach) (Roche, Grenzach-Wyhlen)
 Ligase

Durchführung:

Es werden drei verschieden Ansätze für die Ligation angesetzt, bei denen sich das Verhältnis Vektor : PCR-Produkt unterscheidet:

Vektor : PCR-Produkt	25 ng : 50 ng	25 ng : 75 ng	25 ng : 100 ng
Puffer	1 µL	1,5 µL	2 µL
Ligase	1 µL	1,5 µL	2 µL
aqua dem.	1,4 µL	2,7 µL	3,9 µL
Gesamtvolumen	10 µL	20 µL	30 µL

Die Inkubation erfolgt bei 16 °C im Wasserbad über Nacht.

2.2.2. Expression der rekombinanten O-GlcNAc-Transferase in Bakterien

2.2.2.1. *Gewinnung der O-GlcNAc-Transferase unter denaturierenden Bedingungen*

2.2.2.1.1 Proteininduktion mit IPTG

Material:

XL1-Blue transformiert mit pQE30-OGT
LB-Amp-Medium (siehe 2.2.1.2)
IPTG (1 M Stammlösung)
4 x Probenpuffer (siehe 2.2.4.2)

Durchführung:

Nach der Transformation der XL1-Blue Bakterien mit der pQE30-OGT-DNA (siehe 2.2.1.1.2) wird eine Übernacht-Kultur der Bakterien angelegt (10 mL). Danach findet eine Vermehrung der Übernacht-Kultur in 100 mL LB-Amp-Medium statt. Nachdem die Bakterien eine Dichte von $OD_{600} = 0,6$ nach ca. 3 h erreicht haben, findet durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM die Induktion der Proteinsynthese statt. Nach 5 h werden die Bakterien bei $g = 4000$ für 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet bei -20 °C über Nacht eingefroren.

Zur Analyse der Proteinexpression wird jeweils eine nicht-induzierte und induzierte Probe gewonnen, indem 100 μL der Bakterienkultur für 2 Minuten bei $g = 10.000$ pelletiert und das Pellet in 4 x Probenpuffer aufgenommen wird.

2.2.2.1.2 Gewinnung des Bakterienlysats unter denaturierenden Bedingungen

Material:

Lysepuffer: 100 mM NaH_2PO_4
10 mM Tris-HCl
6 M Guanidinhydrochlorid
pH 8,0

Durchführung:

Das Bakterienpellet wird gewogen und pro g in 5 mL Lysepuffer resuspendiert und auf einem Vortexer gemischt. Die Inkubation erfolgt für 1 h. Zur Zerstörung von Proteinaggregaten („inclusion bodies“) und Verbesserung der Lyse werden die Proben mit Ultraschall (10 x 10 Sekunden bei 100-200 W) behandelt. Danach werden die Lysate für 20 Minuten bei $g = 10.000$ zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen.

2.2.2.1.3 Aufreinigung des Proteins über eine Ni-NTA-Säule unter denaturierenden Bedingungen

Material:

5 mL Einwegspritzen

Glaswolle

Ni-NTA Superflow (Quiagen, Hilden)

Puffer B: 100 mM NaH_2PO_4
10 mM Tris-HCl
8 M Harnstoff
pH 8,0

Puffer C: 100 mM NaH_2PO_4
10 mM Tris-HCl
8 M Harnstoff
pH 6,3

Puffer D: 100 mM NaH_2PO_4
10 mM Tris-HCl
8 M Harnstoff
pH 5,9

Puffer E: 100 mM NaH_2PO_4
10 mM Tris-HCl
8 M Harnstoff
pH 4,5

4 x Probenpuffer (siehe 2.2.4.2)

Durchführung:

Zunächst wird eine Ni-NTA-Säule angefertigt, die ein Säulenvolumen von 1 mL besitzt. Die Säule wird mit 3 Säulenvolumina Puffer B äquilibriert. Das Bakterienlysate (ca. 1 mL) wird auf die Säule gegeben und der Durchlauf aufgefangen, von dem eine Kontrollprobe (100 μL) abgenommen, eine Acetonfällung durchgeführt (siehe 2.2.2.1.4) und diese mit 4 x Probenpuffer aufgeköcht wird.

Hiernach wird die Säule mit 5 mL Puffer B gewaschen. Der Durchlauf wird ebenfalls aufgefangen und eine Probe (100 µL) mit 4 x Probenpuffer abgenommen. Es schließt sich ein Waschschrift mit 5 mL Puffer C an. Auch hier wird eine Probe (100 µL) zur Kontrolle entnommen und mit 4 x Probenpuffer versetzt. Die Elution findet mit 4 mL Puffer D und anschließend mit 4 mL Puffer E statt. Die Elutionsschritte werden zunächst in Zentrikentrifugationsröhrchen (Ausschlussvolumen 10.000 MW) durch Zentrifugation bei $g = 4900$ für 30 Minuten aufkonzentriert. Danach werden die aufkonzentrierten Proben (ca. 300 µL) mittels Dialyse (siehe 2.2.2.1.5) entsalzt. Die Proben werden dann auf ein 8 %iges SDS-Gel aufgetragen, aufgetrennt (siehe 2.2.4.2) und mit Coomassie angefärbt (siehe 2.2.4.3).

2.2.2.1.4 Acetonfällung

Material:

zu fällende Probe (Lyse- und Waschschrift von OGT-Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen)

Aceton (-20 °C)

4 x Probenpuffer (siehe 2.2.4.2)

Durchführung:

Die zu fällende Probe wird in einem Verhältnis von 1:1 mit Aceton versetzt, und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Das Gemisch wird für 10 Minuten bei $g = 3000$ und 0 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 4x Probenpuffer aufgenommen, kurz aufgeköcht und auf ein 8 %iges SDS-Gel aufgetragen. Das Gel wird nach Auftrennung der Proteine mit Coomassie angefärbt (siehe 2.2.4.3).

2.2.2.1.5 Dialyse

Material:

Dialysemembran

OGT-Entsalzungspuffer (ohne BSA):

20 mM Tris-HCl pH 7,8

20 % Glycerin

0,02 % NaN₃

(1 Woche bei 4 °C haltbar)

Durchführung:

Von den transformierten Bakterien (siehe 2.2.1.1.2) wird eine Übernacht-Kultur der Bakterien bei 37 °C in LB-Amp-Medium angeimpft. Zu 100 µL dieser Übernacht-Kultur werden 100 mL MM63-Medium gegeben.

Die Bakterien sollen eine Dichte von $OD_{600} = 0,6$ erreicht haben bevor eine Zugabe von 1 mM IPTG erfolgt. Nach 5 h wird die Bakteriensuspension 20 Minuten bei $g = 4000$ zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wie unten (siehe 2.2.2.2.2) beschrieben aufgearbeitet.

2.2.2.2.2 Gewinnung des Bakterienlysats in Gegenwart von Gadoliniumchlorid**Material:**

1 mM Gadoliniumchlorid
in aqua dem.
(entgast unter Vakuum für 10 Minuten)
4 x reduzierender Probenpuffer (siehe 2.2.4.2)

Durchführung:

Das Bakterienpellet wird in 2-5 mL 1 mM Gadoliniumchloridlösung pro g Nassgewicht aufgenommen.

Unter dem Mikroskop sollte sich ein Platzen der Bakterien nach 1-3 Minuten beobachten lassen. Ein sich anschließender Zentrifugationsschritt bei 4 °C und $g = 10.000$ für 20 Minuten trennt die Bakterientrümmen von löslichen Proteinen.

Von dem klaren Lysat wird eine Probe entnommen (20 µL) und mit 4 x reduzierendem Probenpuffer versetzt.

Das klare Lysat sollte dann über eine Ni-NTA-Säule unter nativen Bedingungen aufgereinigt werden.

2.2.2.3 Gewinnung der O-GlcNAc-Transferase unter nativen Bedingungen

2.2.2.3.1 Proteininduktion mit IPTG

Material: (siehe 2.2.2.1.1)

Durchführung: (siehe 2.2.2.1.1)

2.2.2.3.2 Herstellung des Bakterienlysats mit Lysozym unter nativen Bedingungen

Material:

Lysepuffer: 50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
pH 8,0

(entgast unter Vakuum für 10 Minuten)

1 mg/mL Lysozym (Sigma, Taufkirchen) zu Lysepuffer hinzugeben

4 x reduzierender Probenpuffer (siehe 2.2.4.2)

Durchführung:

Das Bakterienpellet wird in Lysepuffer aufgenommen (pro g 2 mL Lysepuffer), der das Lysozym enthält. Es folgt eine Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Zur Verbesserung der Lyse wird das Bakterienlysate mit Ultraschall behandelt (10 x 10 Sekunden 100-200 W). Ein sich anschließender Zentrifugationsschritt bei 4 °C und $g = 10.000$ für 20 Minuten trennt die Bakterientrümmern von löslichen Proteinen. Von dem klaren Lysat wird eine Probe zur Kontrolle entnommen (100 µL) und mit 4 x reduzierendem Probenpuffer versetzt.

2.2.2.3.3 Proteinaufreinigung über eine Ni-NTA-Säule unter nativen Bedingungen

Material:

Ni-NTA-Säule
Quarzwolle
5 ml Einwegspritze

Lysepuffer (siehe 2.2.2.3.2)
(entgast unter Vakuum für 10 Minuten)

Waschpuffer: 50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
20 mM Imidazol
pH 8,0
(entgast unter Vakuum für 10 Minuten)

Elutionspuffer: 50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
250 mM Imidazol
pH 8,0
(entgast unter Vakuum für 10 Minuten)

4 x reduzierender Probenpuffer (siehe 2.2.4.2)

Durchführung:

Zunächst wird eine Ni-NTA-Säule angefertigt, die ein Säulenvolumen von 1 mL besitzt. Die Säule wird mit 5 mL Lysepuffer äquilibriert. Dann wird das Lysat (ca. 2 mL) auf die Säule gegeben und mit 5 mL Lysepuffer gewaschen. Hiernach schließt sich ein weiterer Waschschrift mit 5 mL Waschpuffer an. Die Elution des Proteins erfolgt mit 5 mL Elutionspuffer. Von den Waschschriften und dem Elutionsschrift werden jeweils 100 µL als Probe abgenommen und mit 4 x reduzierendem Probenpuffer versetzt.

Das Eluat wird in Zentrifugentröhrchen (Ausschlussvolumen 10.000 MW) bei $g = 4900$ für 30 Minuten bis zu einem Volumen von 500 µL aufkonzentriert.

2.2.3. Zellkultur

Die Versuche wurden an N2a Maus-Neuroblastomzellen und HEK293-Zellen (menschlichen embryonalen Nierenzellen) durchgeführt, die sowohl nicht transfiziert vorlagen, als auch mit dem humanen APP₆₉₅ (E2-Klon) bzw. mit der schwedischen Mutante von humanem APP₆₉₅ (A1a-Klon) stabil transfiziert waren (betrifft N2a-Zellen) bzw. wurden (betrifft HEK293-Zellen). Die N2a-Zellen wurden uns freundlicherweise von PD Dr. T. Bayer, die HEK293-Zellen von Prof. Fahrenholz, Universität Mainz, zur Verfügung gestellt.

2.2.3.1. *Kultivieren der Zellen*

2.2.3.1.1 Kultivieren der N2a-Zellen

Material:

0,01 % Poly-L-Lysin (PLL)
in aqua dem.

Kulturmedien:

für nicht transfizierte N2a-Zellen:
RPMI 1640 Ready Mix

für transfizierte N2a-Zellen:

10 % (v/v) Fötale Kälberserum (FCS)
0,1 mM Penicillin Streptavidin (Pen Strep)
1 mg/mL Geneticin (G 418)
in RPMI 1640

Durchführung:

Zur besseren Haftung der N2a-Zellen werden die T75 Zellkulturflaschen mit PLL-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur beschichtet.

In flüssigem Stickstoff aufbewahrte Aliquots mit ca. 6×10^6 Zellen /mL werden aufgetaut, in Kulturmedium aufgenommen und bei $g = 180$ 7 Minuten zentrifugiert. Die Zellen werden resuspendiert und in eine T75 Zellkulturflasche überführt. Die Zellen werden zur Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten.

2.2.3.1.2 Kultivieren der HEK293-Zellen

Material:

für nicht transfizierte HEK293-Zellen:

10 % (v/v) FCS
0,1 mM Pen Strep
0,2 mM Glutamin
in DMEM (1000 mg Glucose/L; ohne Glutamin)

für transfizierte HEK293-Zellen:

10 % (v/v) FCS

0,1 mM Penstrep

0,2 mM Glutamin

0,5 mg/mL G 418

in DMEM (1000 mg Glucose/L; ohne Glutamin)

Durchführung:

In flüssigem Stickstoff aufbewahrte Aliquots mit ca. 6×10^6 Zellen /mL werden aufgetaut, in Kulturmedium aufgenommen und bei $g = 180$ 7 Minuten zentrifugiert. Die Zellen werden resuspendiert und in eine T75 Zellkulturflasche überführt. Die Zellen werden zur Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten.

2.2.3.2. Subkultivieren der Zellen

2.2.3.2.1 Subkultivieren der N2a-Zellen

Material:

0,01 % PLL
in aqua dem.

1 % (v/v) FCS
in HBSS⁻

Trypsin-EDTA

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS⁻) pH 7,2-7,4:

5,4 mM KCl

0,44 mM KH₂PO₄

136,9 mM NaCl

4,62 mM Na₂HPO₄

5,5 mM D-Glucose

0,03 mM Phenolrot
in aqua dem.

Kulturmedium siehe 2.2.3.1.1

Durchführung:

Für die Subkultivierung der N2a-Zellen werden die T75 Zellkulturflaschen und Petrischalen (60 mm Durchmesser) bzw. 25 cm² Zellkulturflaschen mit PLL beschichtet. Für die

Immunfluoreszenz erfolgte eine Beschichtung von Deckgläschen in Petrischalen (30 mm Durchmesser) mit PLL.

Die erste Subkultivierung erfolgt etwa 5 Tage nachdem die Zellen in Kultur gebracht wurden bzw. nachdem die Zellen konfluent waren. Zunächst werden die N2a-Zellen mit HBSS⁻ gewaschen (3x). Da es sich um adhärenente Zellen handelt, müssen sie vor der Subkultivierung mit Trypsin von der Gefäßoberfläche abgelöst werden („trypsinisieren“). Nach 1 Minute Inkubationszeit der N2a-Zellen mit Trypsin-EDTA wird durch Zugabe von 1 % FCS-HBSS⁻ das Trypsin inaktiviert. Die Zellen werden von dem Boden der T75 Zellkulturflasche abgelöst und in ein 15 mL Röhrchen überführt. Die Zellen werden 7 Minuten bei 180 g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgesaugt, die Zellen mit Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

Für die Behandlung mit Phorbolster (PMA) bzw. O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosyliden)-amino-N-phenylcarbammat (PUGNAc) werden transfizierte N2a-Zellen nach dem Zentrifugieren in einer Zellzahl von $0,20 \times 10^6$ Zellen pro Petrischale ausgesät.

Für die Langzeitbehandlung mit PUGNAc werden die N2a-Zellen in 25 cm^2 Zellkulturflaschen in einer Zelldichte von $0,06 \times 10^6$ pro Flasche kultiviert.

Für die Behandlung der N2a-Zellen mit Dibutyryl-cAMP (dbcAMP) und PUGNAc bzw. Roscovitin und PUGNAc werden die Zellen in einer Dichte von $0,15 \times 10^6$ pro Petrischale ausgesät.

2.2.3.2.2. Subkultivierung der HEK293-Zellen

Material:

Kulturmedium (siehe 2.2.3.1.2)

0,01 % PLL
in aqua dem.

Durchführung:

Die erste Subkultivierung erfolgt etwa 5 Tage nachdem die Zellen in Kultur gebracht wurden bzw. nachdem die Zellen konfluent waren. Zunächst werden die HEK293-Zellen mit Medium einmal gewaschen. Die Zellen werden mit Medium von dem Boden der T75 Zellkulturflasche abgelöst und in ein 15 mL Röhrchen überführt. Es schließt sich ein Zentrifugationsschritt von 7 Minuten bei $g = 180$ an.

Anschließend wird der Überstand abgesaugt, die Zellen mit Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt bzw. auf 60 mm Petrischalen, die für 30 Minuten mit PLL inkubiert wurden, in einer Dichte von $0,2 \times 10^6$ Zellen/Petrischale ausgesät.

Für die Transfektion der HEK293-Zellen werden diese in 60 mm Petrischalen in unterschiedlichen Dichten ausgesät.

2.2.3.3 *In situ-Sandwich ELISA*

Material:

NUNC Immunotiterplatten

0,1 M NaHCO₃

Phosphat Buffer Saline (PBS) (pH 7,35):

1,22 M NaCl

0,02 M KCl

0,06 M Na₂PO₄ x H₂O

0,01 M KH₂PO₄

0,05 % Tween 20

in PBS

1 % BSA (Bovines Serum Albumin)

in PBS

1 mM EDTA (pH 8,0)

serumfreies Kulturmedium:

für N2a-Zellen:

0,1 M Pen Strep

1 mg/mL G418

in RPMI 1640

für HEK-Zellen:

0,1 M Pen Strep

0,5 mg/ml G418

200 µM Glutamin

in DMEM (1000 mg/mL Glucose)

Antikörper für die Beschichtung der Mikrotiterplatte:

α-Aβ 17-42 polyklonaler Kaninchenantikörper (1:1000 in 0,1 M NaHCO₃)

1. Antikörper:

4G8 monoklonaler Mausantikörper gegen Aβ 17-24 (1:1000 in 1% BSA in PBS)

W02 monoklonaler Mausantikörper gegen Aβ 4-11 (1:1000 in 1 % BSA in PBS)

2. Antikörper:

biotinylierter Pferd-Anti-Maus-Antikörper (1:5000 in 1 % BSA in PBS)

Streptavidin-POD (1:5000 in 1 % BSA in PBS)

Entwicklungspuffer:

0,1 M Natriumacetat

0,05 M NaH₂PO₄

in aqua dem.

pH 4,2 (mit Essigsäure pH-Wert einstellen)

Substratlösung:

2 g ABTS
in 100 mL aqua dem.

Färbelösung:

9,5 mL Entwicklungspuffer
0,5 mL Substratlösung
3,0 µL H₂O₂

Stopplösung:

0,6 % SDS
in aqua dem.

Durchführung:

Alle Lösungen zur Kultivierung der Zellen sind steril.

Zunächst erfolgt die Beschichtung der Vertiefungen der Mikrotiterplatte mit dem polyklonalen α -A β 17-42 Antikörper über Nacht bei 4 °C. Nach Waschen mit 0,05 % Tween 20-PBS werden die Vertiefungen mit 1 % BSA-PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Nach einem Waschschrift mit 0,05 % Tween 20 PBS (3 x), werden die Vertiefungen 2 x 30 Minuten mit serumfreien Kulturmedium inkubiert, um den Waschpuffer zu entfernen. Danach erfolgt die Kultivierung und Behandlung des A1a-Klons (APPsw-transfizierte N2a-Zellen) und E2-Klons (APPwt-transfizierte N2a-Zellen) bzw. des Klon 42 (APPsw-transfizierte HEK293-Zellen) und Klon 19 (APPwt-transfizierte HEK293-Zellen) in den Vertiefungen.

Für die Kultivierung der Zellen in den Vertiefungen der ELISA-Platte werden der E2-Klon und der A1a-Klon, sowie Klon 42 und Klon 19 in einer Dichte von 24.000 Zellen pro Vertiefung ausgesät. Da die Dissoziation der Zellen mit Trypsin z.T. Zelloberflächenproteine zerstört, werden für diese Versuche die Zellen durch Inkubation mit 1 mM EDTA (pH 8,0) für 2-4 Minuten aus den Zellkulturflaschen herausgelöst.

Bei der Kultivierung der Zellen in den Vertiefungen, wird dem Zellmedium PUGNAc in einer Endkonzentration von 40 µM und PMA in einer Endkonzentration von 2 µM hinzugefügt. Als Kontrollen werden die entsprechenden µL DMSO und aqua dem. zugefügt. Die Behandlung erfolgt für 1 h bei 37 °C im CO₂-Inkubator. Anschließend werden die Zellen mit 0,05 % Tween 20-PBS gründlich aus den Vertiefungen gewaschen. Die Vollständigkeit der Zellentfernung wird unter dem Mikroskop kontrolliert.

Die Inkubation mit 4G8- und W02-Antikörper erfolgt über Nacht bei 4 °C. Nach anschließendem Waschen mit 0,05 % Tween 20-PBS (3 x) wird mit biotinyliertem Anti-Maus-Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgt nach einem

nochmaligen Waschschrift mit 0,05 % Tween 20-PBS (3 x) die Inkubation mit Streptavidin-POD für eine weitere Stunde. Nachfolgend wird zunächst mit 0,05 % Tween-PBS gewaschen (3 x) und anschließend einmal mit PBS, bevor die Inkubation mit der Färbelösung für ca. 10 Minuten durchgeführt wird. Die Farbreaktion wird mit 0,6 %iger SDS-Lösung gestoppt. Die Messung der optischen Dichte (OD) findet bei 405 nm statt.

2.2.3.4 Einfrieren der Zellen

Material:

Einfriermedium:

Für N2a-Zellen:	20 % (v/v)	FCS
	0,1 mM	Pen Strep
	10 % (v/v)	Dimethylsulfoxid (DMSO)
	in RPMI 1640	

Für HEK293-Zellen:	90 % (v/v)	FCS
	10 % (v/v)	DMSO

Durchführung:

Die Zellen werden vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst (N2a-Zellen siehe 2.2.3.2.1; HEK293-Zellen siehe 2.2.3.2.2) und das Zellpellet (ca. 6×10^6 Zellen) in 1 mL Einfriermedium resuspendiert. Die Suspension wird in Kryoröhrchen überführt und stufenweise bei -20 °C (max. 4 h), -80 °C (über Nacht) und flüssigem Stickstoff eingefroren. Die langfristige Aufbewahrung der Zellen erfolgt in flüssigem Stickstoff.

2.2.3.5 Behandlung des E2 und A1a Klons mit Phorbolster (PMA) und PUGNAc

Material:

RPMI 1640

Kulturmedium für transfizierte N2a-Zellen (siehe 2.2.3.1.1)

PMA

Stammlösung: 1 mM

PUGNAc

Stammlösung: 4 mM

Durchführung:

Nach drei Tagen bei 37 °C werden die Zellen mit RPMI 1640 gewaschen. Nach Inkubation in neuem Kulturmedium wird PMA in einer Endkonzentration von 2 µM und PUGNAc in einer Endkonzentration von 40 µM zugegeben. Da PMA in DMSO und PUGNAc in aqua dem. gelöst vorliegen, werden für die Kontrollen äquivalente Mengen des jeweiligen Lösungsmittels zugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 1 h, 2 h, 3 h und 4 h mit den Substanzen werden Zellhomogenate hergestellt und das Medium aufgehoben, um es auf APPs zu untersuchen.

Außerdem wird von den Zellhomogenaten eine Proteinfractionierung durchgeführt, bei der die Detergenz-lösliche Fraktion (*detergent soluble fraction* = dsf) von der Detergenz-unlöslichen Fraktion (*detergent insoluble fraction* = dicf) getrennt wird. Diese Proteinfractionen werden auf ihre O-GlcNAc-modifizierten Proteine mittels eines Western Blots untersucht (siehe 2.2.4.4).

2.2.3.6 Langzeitbehandlung der N2a-Zellen mit PUGNAc

Material:

Kulturmedium für nicht transfizierte N2a-Zellen (siehe 2.2.3.1.1)

Dibutyryl-cAMP (dbcAMP)

Stammlösung: 250 mM

PUGNAc

Stammlösung: 4 mM

Durchführung:

Nach Kultivierung der Zellen für 24 h findet entweder eine Behandlung mit 40 µM PUGNAc statt, oder die Zellen werden zunächst mit 1 mM dbcAMP für 24 h zur Ausdifferenzierung gebracht, bevor 40 µM PUGNAc hinzugefügt werden. Als Kontrollen werden Zellen entweder nur mit aqua dem. oder PUGNAc behandelt, bzw. mit dbcAMP in Kombination mit aqua dem.. Nicht ausdifferenzierte Zellen werden 1 Woche in Kultur gehalten, ausdifferenzierte Zellen 9-10 Tage. Nach der Behandlungsperiode werden die Zellen homogenisiert und die Proteine im SDS-Gel aufgetrennt (siehe 2.2.4.2).

2.2.3.7 Trypanblaufärbung

Material:

Trypanblaulösung:

400 mg Trypanblau
in PBS (100 ml)

Ready Mix RPMI 1640

Trypsin EDTA

Durchführung:

Nachdem eine Langzeitbehandlung der N2a-Zellen mit PUGNAc durchgeführt wurde (siehe 2.2.3.6), wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 mL Trypsin EDTA für 2 Minuten vom Boden der Flasche abgelöst und mit 9 mL Ready Mix RPMI 1640 abgespült. Die Zellsuspension wird 7 Minuten bei $g = 180$ zentrifugiert. Die Trypanblaulösung wird 1:10 mit Ready Mix RPMI 1640 gemischt und die Zellen werden darin resuspendiert. Es folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5-10 Minuten, an die sich das Auszählen der Zellen in der Zählkammer anschließt.

Dies wird sowohl mit den PUGNAc-behandelten Zellen als auch mit den Kontrollzellen durchgeführt.

2.2.3.8 Behandlung der N2a Zellen mit dbcAMP und PUGNAc bzw. Roscovitin und PUGNAc

Material:

Ready Mix RPMI 1640

PUGNAc

Stammlösung: 4 mM in aqua dem.

dbcAMP

Stammlösung: 250 mM in DMSO

Roscovitin

Stammlösung: 30 mM in DMSO

Durchführung:

Nach 24 h in Kultur werden die Zellen für 24 h entweder mit 1 mM dbcAMP oder 40 μ M PUGNAc behandelt. Anschließend werden die mit PUGNAc-behandelten Zellen für weitere

24 h zusätzlich ohne Mediumwechsel mit 1 mM dbcAMP behandelt oder mit 60 μ M Roscovitin, bzw. die mit 1 mM dbcAMP-behandelten Zellen für weitere 24 h zusätzlich mit 40 μ M PUGNAc. Zur Kontrolle werden die Zellen entweder nur mit aqua dem. und DMSO, aqua dem. und dbcAMP bzw. Roscovitin und als weitere Kontrolle mit PUGNAc und DMSO behandelt. Nach der Gesamtbehandlungsdauer von 48 h werden die Zellen homogenisiert (siehe Tab. 9).

Außerdem werden die N2a-Zellen nach 24stündiger Kultivierung gleichzeitig mit dbcAMP und PUGNAc behandelt. Als Kontrollen werden aqua dem. und DMSO, aqua dem. und dbcAMP bzw. PUGNAc und DMSO eingesetzt. Die Homogenisierung der Zellen (siehe 2.2.3.11) erfolgt nach einer Behandlungsdauer von 24 h und 48 h. Die Proben werden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.4.2).

Behandlungsbeschreibung	Zugabe 2. Tag	Zugabe 3. Tag
Behandlung der Zellen: (1) dbcAMP (2) PUGNAc	DMSO	Aqua dem.
	dbcAMP	Aqua dem.
	DMSO	PUGNAc
	dbcAMP	PUGNAc
Behandlung der Zellen: (1) PUGNAc (2) dbcAMP	Aqua dem.	DMSO
	PUGNAc	DMSO
	Aqua dem.	dbcAMP
	PUGNAc	dbcAMP
Behandlung der Zellen: (1) PUGNAc (2) Roscovitin	Aqua dem.	DMSO
	PUGNAc	DMSO
	Aqua dem.	Roscovitin
	PUGNAc	Roscovitin

Tab. 9: Übersicht über die verschiedenen Vorgehensweisen der Behandlungen von N2a-Zellen nach 24 und 48 h.

Für die Immunpräzipitation (siehe 2.2.4.7) werden die Zellen entweder nur mit PUGNAc (48 h) oder dbcAMP (48 h) behandelt, bzw. mit zunächst PUGNAc (48 h) und zusätzlich dbcAMP (24 h), wie schon oben beschrieben.

2.2.3.9 *Behandlung der HEK293-Zellen mit PUGNAc*

Material:

PUGNAc (Stammlösung 4 mM)

Kulturmedium für nicht transfizierte HEK293-Zellen (siehe 2.2.3.1.2)

Durchführung:

Nachdem die HEK293-Zellen für 48 h bei 36 °C in Kultur gehalten worden waren, wird das Medium abgesaugt und die Zellen werden einmal mit Kulturmedium gewaschen. Danach werden 2 mL Kulturmedium auf die Zellen gegeben und diese werden für 1 h mit 40 µM oder 400 µM PUGNAc behandelt. Da PUGNAc in aqua dem. gelöst vorliegt, werden für die Kontrollen äquivalente Mengen des Lösungsmittels eingesetzt. Die Zellen werden nach Inkubation mit PUGNAc homogenisiert. Die Proben werden anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.2.4.2).

2.2.3.10 *Transfektion der HEK293-Zellen mit APP wt und APP sw*

Material:

Lipofektamin Plus

Kulturmedium für nicht transfizierte HEK293-Zellen (siehe 2.2.3.1.2)

Kulturmedium für transfizierte HEK293-Zellen (siehe 2.2.3.1.2)

pEGFP N1 (in diesem Vektor lag die cDNA von APPwt und APPsw vor)

DNA: humanes APP₆₉₅ (Wildtyp: APPwt)

humane schwedische Mutante vom APP₆₉₅ (APPsw)

DMEM (1000 mg/mL Glucose, ohne Glutamin)

Durchführung:

Die Zellen werden so in Petrischalen (60 mm Durchmesser) ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 50-90 % aufweisen. 3 µg der cDNA von APPwt und APPsw in 250 µl DMEM werden mit 4 µL Plus-Reagenz versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 6 µL des Lipofektamins in 250 µL DMEM werden dann zu dem DNA-DMEM-Plus-Gemisch gegeben und das Gemisch nochmals 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Zellen werden zweimal mit DMEM gewaschen. Das Transfektionsgemisch wird mit 2 mL DMEM verdünnt und auf die Zellen gegeben. Es folgt eine Inkubation bei 37 °C für 3 h. Danach wird das Medium abgesaugt und die Zellen werden 24 h in Kulturmedium für nicht transfizierte HEK293-Zellen gehalten. Hiernach erfolgt ein Mediumwechsel. Nach weiteren 24 h werden die Zellen in unterschiedlichen Dichten auf Petrischalen (60 mm Durchmesser) ausgesät (1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:200) und in Kulturmedium für transfizierte HEK293-Zellen gehalten. Die Selektion führt zum Absterben solcher Zellen, die das transfizierte Plasmid nicht in Genom integriert haben.

Nach ca. 14 Tagen, in denen alle 2 Tage das Medium der Schalen gewechselt wurde, konnten Klone gepickt werden. Diese werden in Multivertiefungsplatten hochgezogen. Zunächst werden sie in 48-Well-Platten kultiviert. Ist eine Konfluenz von ca. 80-100 % erreicht, werden sie schrittweise auf eine 24-, 12- bzw. 6-Well-Platte gesetzt. Von einer 6-Vertiefungsplatte erfolgt eine Kultivierung in einer T25-Zellkulturflasche und 35 mm² Petrischale. Zellen in T25-Zellkulturflaschen werden nach erreichter Konfluenz von 80-100 % eingefroren. Zellen auf der Petrischale werden homogenisiert (siehe 2.2.3.11) und die Expression von APP im Western Blot mit dem 8E5-Antikörper überprüft.

Für die *in-situ* Sandwich-ELISA-Versuche werden Klone mit gleicher Expressionsstärke von APPwt bzw. APPsw eingesetzt.

2.2.3.11 Herstellung von Zellhomogenaten und Behandlung des Mediums

Material:

DPBS:

Lösung A (10 fach): 1,37 M NaCl
0,03 M KCl
0,08 M Na₂HPO₄ x H₂O
0,01 M KH₂PO₄

Lösung B (1000 fach): 0,9 M MgCl₂ x 6 H₂O
0,9 M CaCl₂ x 2 H₂O
in aqua dem.

Homogenisierungspuffer:

- 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 8,0
- 140 mM NaCl
- 3 mM MgCl₂
- 1 % Nonidet P 40 (NP 40)
- 100 mM N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) (wird nur dann zugesetzt, wenn die O-GlcNAc-Modifikation untersucht werden soll)

- 1 mM PMSF
- 1 µg/mL Leupeptin
- 1 µg/mL Aprotinin
- 10 µg/mL Pepstatin
in aqua dem.

Proteaseinhibitoren für Zellkulturüberstände:

- 1 mM PMSF
- 1 µg/mL Leupeptin
- 1 µg/mL Aprotinin
- 10 µg/mL Pepstatin

Durchführung:

Das Zellkulturmedium (1,5 mL) der mit PUGNAc oder PMA behandelten N2a-Zellen (0,2 x 10⁶ Zellen pro Petrischale) wird in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, in das die Proteaseinhibitoren vorgelegt wurden. Falls das Zellkulturmedium nicht untersucht wird, wird es verworfen.

Die Zellen werden mit DPBS gewaschen. Die Zugabe von Homogenisierungspuffer richtet sich nach der am Ende des Versuchs vorliegenden Zellzahl. Nach Zugabe von 500 µL (betrifft PUGNAc und PMA behandelte Zellen sowie Langzeit-PUGNAc-Experiment), 250 µL (betrifft PUGNAc und dbcAMP-behandelte Zellen, sowie Roscovitin-behandelte Zellen) bzw. 100 µL (betrifft transfizierte HEK293-Zellen) des Homogenisierungspuffers, werden die Zellen von der Petrischale bzw. 25 cm² Zellkulturflasche abgelöst und in ein 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt (siehe Tab. 10).

	Behandlung mit PUGNAc und PMA	Langzeit-PUGNAc-Experiment	Behandlung mit PUGNAc, dbcAMP und Roscovitin	Transfizierte HEK293-Zellen
Menge des Homogenisierungspuffers	500 µL	500 µL	250 µL	100 µL

Tab. 10: Menge an Homogenisierungspuffer je nach Zellzahl der im Versuch vorliegenden Zellen

Nach 30minütiger Inkubation auf Eis werden die Homogenate bei 20.000 g und 4 °C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird aufgehoben und die Proteinmenge nach Lowry bestimmt.

Sowohl das Kulturmedium als auch die Zellhomogenate werden gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.2.4.2).

2.2.3.12 Herstellung der Proteinfractionen: Detergenz-unlösliche Fraktion (dicf) und Detergenz-lösliche Fraktion (dsf)

Material:

DPBS (siehe 2.2.3.11)

Puffer A: 2 M Glycerol
 0,5 % Triton X100
 10 mM Pipes
 50 mM KCl
 2,5 mM EDTA
 100 mM N-Acetylglucosamin
 1 mM PMSF
 1 µg/mL Leupeptin
 1 µg/mL Aprotinin
 10 µg/mL Pepstatin
 10 µg/mL Bestatin
 in aqua dem. pH 7,3

Puffer B: 1 % SDS
 50 mM Tris
 10 mM EDTA
 100 mM N-Acetylglucosamin
 1 mM PMSF
 1 µg/mL Leupeptin
 1 µg/mL Aprotinin
 10 µg/mL Pepstatin
 10 µg/mL Bestatin
 in aqua dem. pH 7,3

Durchführung:

Nachdem die N2a-Zellen ($0,15 \times 10^6$ Zellen pro Petrischale) für 2 Tage in Kultur gehalten worden waren, schloss sich eine einstündiger Behandlung mit PMA bzw. PUGNac an. Die Zellen werden nach Abnehmen des Mediums mit DPBS gewaschen. Danach werden sie in 75 µL Puffer A aufgenommen und mit einer 20 g-Nadel durch mehrfaches Aufziehen (10 x)

homogenisiert. Im Anschluss daran werden die Proben unter Rotation bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert und bei 4 °C und $g = 600$ für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen und der Überstand erneut bei $g = 13.000$ für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand ist die dsf-Fraktion.

Das Pellet wird mit 75 μL Puffer B versetzt und mit einer 21 g-Nadel durch mehrfaches Aufziehen (10 x) homogenisiert. Die Proben werden danach 10 Minuten gekocht und bei $g = 13.000$ zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen. Der Überstand ist die dicf-Fraktion.

Von beiden Fraktionen wird die Proteinkonzentration nach Lowry bestimmt und die Proben werden gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.2.4.2).

2.2.3.13 Kaninchen-Retikulozyten-Membranaufbereitung

Neben der Möglichkeit der Klonierung der OGT, konnte festgestellt werden, dass in der löslichen Fraktion von Retikulozytenmembranen eine OGT-Aktivität zu finden ist, und diese damit eine gute Enzymquelle für *in vitro* Versuche darstellen (Haltiwanger *et al.*, 1990).

Material:

Kaninchenretikulozyten-Membranen (Promega, USA)

STK-Puffer:

- 0,25 M Sucrose
- 10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
- 25 mM KCl
- 1 mM PMSF
- in aqua dem.

Durchführung:

Die Retikulozyten-Membranen werden 1:1 mit 4 °C kaltem STK-Puffer versetzt und in 7 Zügen mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisierer homogenisiert. Die Membranen werden dann auf das 8fache ihres Ausgangsvolumens mit STK-Puffer verdünnt und bei $g = 30.000$ für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Membranen werden drei bis fünfmal mit STK-Puffer bei $g = 30.000$ und 10 Minuten bei 4 °C gewaschen. Das Pellet wird mit OGT-Puffer so verdünnt, dass für den OGT-Assay 300 μg Membran in maximal 25 μl Puffer enthalten sind. Für den OGT-Assay werden als Enzymquelle 300 μg Membran benötigt.

2.2.4. Analytische Methoden

2.2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Material:

„Reagenz A“, „Reagenz S“ und „Reagenz B“ des Proteinbestimmungskits DC (Detergent Compatible) Protein Assay nach der Methode von Lowry (1951) (BioRad, München)
Homogenisierungspuffer (siehe 2.2.3.11)
Elutionspuffer für O-GlcNAc-Transferase unter denaturierenden Bedingungen (Puffer E) (siehe 2.2.2.1.3)
Rinderserumalbumin (BSA)
Puffer für dsf und dicf-Fraktionierung (siehe 2.2.3.12)

Durchführung:

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zellhomogenate (siehe 2.2.2.11), der dsf-/dicf-Fractionen (siehe 2.2.3.12) bzw. der OGT-Elution (siehe 2.2.2.1.3) wird eine Standard-Verdünnungsreihe von BSA mit einer Ausgangskonzentration von 10 mg Protein/mL Puffer hergestellt. Die Ausgangslösung wird dann bis zu einer Konzentration von 0,017 mg Protein/mL mit Homogenisierungspuffer bzw. Elutionspuffer verdünnt.

Es werden sowohl von der Standard-Verdünnungsreihe als auch von den Proben Dreifachbestimmungen durchgeführt. „Reagenz A“ und „Reagenz S“ werden in einem Verhältnis von 1:50 gemischt (= „Reagenz A“). Zunächst werden 5 µL der Verdünnungsreihe als auch von den Proben pro Vertiefung vorgelegt. Von „Reagenz A“ werden dann 25 µL pro Vertiefung hinzugegeben und anschließend von „Reagenz B“ 200 µL zugefügt. Nach 15 Minuten wird die OD bei 690 nm gemessen.

Aus den gemessenen Werten der Verdünnungsreihe wird eine Eichkurve erstellt, aus der sich die Proteinkonzentrationen der Proben ermitteln lässt.

2.2.4.2 SDS-PAGE (nach Laemmli, 1970)

Material:

Acrylamid-Lösung:

30 % (w/v)	Acrylamid
0,8 % (w/v)	Bis-Acrylamid in aqua dem.

Trenngelpuffer:

1,5 M	Tris-HCl pH 8,8
10 % (w/v)	Natriumdodecylsulfat (SDS) in aqua dem.

Sammelgelpuffer:

1 M	Tris-HCl pH 6,8
10 % (w/v)	SDS in aqua dem.

Gellösungen:

	8 %iges Trenngel	10 %iges Trenngel	Sammelgel
aqua dem.	7,0 mL	5,9 mL	4,1 mL
Acrylamid-Lösung	4,0 mL	5,0 mL	1,0 mL
1,5 M Tris (pH 8,8)	3,8 mL	3,8 mL	--
1,0 M Tris (pH 6,8)	--	--	750 µL
10 % (w/v) SDS	150 µL	150 µL	60 µL
10 % (w/v) APS	150 µL	150 µL	60 µL
TEMED	9 µL	6 µL	6 µL

reduzierender SDS-Probenpuffer (4 x konzentriert) für Polyacrylamid-Gele:

250 mM	Tris pH 6,8
40 % (v/v)	Glycerol
12 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,25 % (w/v)	Bromphenolblau in aqua dem.

Laufpuffer:

0,25 M	Tris
1,92 M	Glycin
1 % (w/v)	SDS in aqua dem.

Molekulargewichtsmarker PeqGold (Gibco BRL)

Durchführung:

Es werden 1,5 mm dicke 8 %ige bzw. 10 %ige Polyacrylamid-Gele verwendet.

Bevor die Zellhomogenate und die Überstände aufgetragen werden, werden diese vorher mit 4 x konzentriertem, reduzierendem Probenpuffer versetzt und 10 Minuten bei 100 °C erhitzt.

Von den Zellhomogenaten werden 10 µg Protein pro Tasche aufgetragen. Von den Überständen werden 50 µL aufgetragen. Zur Auftrennung der Proteine wird für 30 Minuten eine Spannung von 50 Volt angelegt und bis zur Beendigung der Elektrophorese eine Spannung von 100 Volt.

2.2.4.3 Coomassie Färbung

Material:

Färbelösung: 2,5 g Coomassie Brilliant blue R 250
In 1 L Entfärbelösung
Entfärbelösung: 45 % (v/v) Methanol
5 % (v/v) Essigsäure
in aqua dem.

Durchführung :

Das SDS-Gel mit den aufgetrennten Proteinen wird zunächst zweimal mit 10 mL aqua dem. gewaschen. Hieran schließt sich eine Färbung des Gels mit der Färbelösung für eine Stunde an. Die Entfärbung erfolgt durch mehrmaliges Waschen des Gels mit der Entfärbelösung.

2.2.4.4 Western Blot

Material:

Nitrocellulose-Membran

Filterpapier

Blotpuffer 1:

300 mM Tris
20 % (v/v) Methanol
in aqua dem.
auf pH 10,4 einstellen

Blotpuffer 2:

25 mM Tris
20 % (v/v) Methanol
in aqua dem.
auf pH 10,4 einstellen

Blotpuffer 3:

25 mM Tris
 40 mM Amino-n-capronsäure
 20 % (v/v) Methanol
 in aqua dem.
 auf pH 9,4 einstellen

Ponceau S-Färbelösung:

0,2 % (w/v) Ponceau S
 in 3 % (w/v) Eisessig

PBS (pH 7,35) (siehe 2.2.2.3)

0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS (PBS-Tween)
 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS (0,1 % Tween-PBS)
 5 % (w/v) Milchpulver in 0,1 % Tween-PBS
 0,25 % (w/v) BSA in PBS-Tween
 0,5 % (v/v) Triton X-100 in PBS

Roti-Block**1. Antikörper:**

RL2 (1:5000 in 0,25 % BSA in PBS-Tween)
 8E5 (1:4000 in 0,25 % BSA in PBS-Tween)
 W02 (1:2000 in 0,25 % BSA in PBS-Tween)
 Cdk5 Antikörper C-8 (1:1000 in Roti-Block)

2. Antikörper:

POD-konjugierter Anti-Maus-Antikörper (1:5000 in 0,25 % BSA in PBS-Tween)
 POD-konjugierter Anti-Kaninchen-Antikörper (1:5000 in Rotiblock)

Supersignal[®] West Pico Stable Peroxide Solution (Pierce, USA)

Supersignal[®] West Pico Luminol/Enhancer Solution (Pierce, USA)

Supersignal[®] West Dura Stable Peroxide Buffer (Pierce, USA)

Supersignal[®] West Dura Luminol/Enhancer Solution (Pierce, USA)

Durchführung:

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden mit Hilfe eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Hierzu wird ein Blotstapel angefertigt, der folgendermaßen aufgebaut ist. Auf die Anode werden zunächst 3 Filterpapiere, die in Blotpuffer 1 getränkt wurden, gelegt. Hierauf werden zwei in Blotpuffer 2 getränkte Filterpapiere und die ebenfalls in Blotpuffer 2 getränkte Nitrocellulosemembran gegeben. Auf die Nitrocellulose wird das Gel gelegt, welches mit 5 in Blotpuffer 3 getränkten Filterpapieren bedeckt wird. Den Abschluss bildet die Kathode. Für 70 Minuten wird nun eine Stromstärke von 150 mA angelegt, wodurch die Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran übertragen werden. Nach abgeschlossenem Transfer wird die Nitrocellulose-Membran für 1 Minute in Ponceau S-Färbung inkubiert und mit Wasser gewaschen. Der sichtbare Molekulargewichtsmarker wird markiert und die Membran anschließend in 20 °C warmem

PBS entfärbt. Anschließend können einzelne Komponenten durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Um die RL2- und 8E5- und C-8-Antikörperreaktivität zu verstärken, wird die Membran für 5 Minuten in kochendem PBS inkubiert. Für die Inkubation mit dem W02-Antikörper sollte die Membran nur kurz in leicht erwärmten PBS inkubiert werden. Vor der Inkubation mit Antikörpern wird die Membran für eine Stunde mit 5 % Milchpulver in 0,1 % Tween-PBS bzw. Roti-Block (betrifft nur C-8) bei Raumtemperatur blockiert.

Danach werden die Membranen über Nacht bei 4 °C mit den primären Antikörpern inkubiert. Vor der Inkubation mit dem sekundären Antikörper werden die mit RL2 und 8E5-Antikörpern behandelten Membranen mit 0,5 % Triton X-100-PBS 5 x für je 10 Minuten gewaschen. Die mit W02-Antikörper behandelte Membran wird mit PBS-Tween 5 x für je 10 Minuten gewaschen. Die C-8-Antikörper behandelte Membran wird mit Roti-Block 5 x für je 10 Minuten gewaschen.

Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur.

Bevor der Blot entwickelt werden kann, muß er erneut 5 x je 10 Minuten gewaschen werden (siehe Waschschritt nach 1. Antikörperinkubation).

Mit Hilfe der Chemilumineszenz werden die spezifischen Antigene sichtbar gemacht.

2.2.4.5 *Entwickeln von Röntgenfilmen*

Material:

X-OMAT AR Röntgenfilme

Entwicklerlösung für Röntgenfilme (Sigma, Taufkirchen)

Fixierlösung für Röntgenfilme (Sigma, Taufkirchen)

Durchführung:

Die Entwicklung des Röntgenfilms wird im Dunkeln durchgeführt.

Die Entwicklungsdauer richtet sich nach der Stärke des Chemilumineszenzsignals.

Der Film wird danach für 30 Sekunden in der Entwicklerlösung belassen, kurz mit Wasser abgewaschen und in der Fixierlösung fixiert.

2.2.4.6 *Strippen eines Blots*

Material:

Elutionspuffer: 62,5 mM Tris-HCl pH 6,7
 2 % SDS
 100 mM Mercaptoethanol
 aqua dem.
 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS (PBS-Tween)

Durchführung:

Um das Verhältnis der Stärke der O-GlcNAc-Modifikation zur Proteinmenge von Cdk5 der Proben, die mit PUGNAc und dbcAMP parallel behandelt wurden, nach Immunpräzipitation zu ermitteln, wird zunächst der Blot mit dem RL2-Antikörper inkubiert, gestrippt und danach mit dem C-8-Antikörper inkubiert.

Die Blotmembran wird mit Elutionspuffer bedeckt und für 30-90 Minuten bei 70 °C unter Schütteln inkubiert. Hiernach folgen zwei Waschschrte mit aqua dem. für 10 Minuten und ein kurzer Waschschrte für maximal 1 Minute mit PBS-Tween. Die Blotmembran wird mit Roti-Block erneut blockiert und mit dem C-8-Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.2.4.7 *Immunpräzipitation*

Material:

DPBS (siehe 2.2.3.11)
 Ripa-Lyse Puffer (ccpro, Neustadt)
 Frisch zusetzen:
 1637,61 mg/L NaF → Endkonzentration 40 mM
 34,84 mg/L PMSF
 100 mM N-Acetyl-Glucosamin

Ripa Waschpuffer: 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,2)
 → hierzu zu 500 mL 10 mM Na₂HPO₄ ca. 250 mL 10 mM
 NaH₂PO₄ geben und damit pH-Wert von 7,2 einstellen
 1 M NaCl
 10 mM EDTA
 40 mM NaF
 0,2 % Triton X-100

1. Antikörper:

Cdk5 Antikörper C-8 (1:1000 in Roti-Block)

RL2 gegen O-GlcNAc (1:5000 in 0,25 % BSA in PBS-Tween)

2. Antikörper:

Peroxidase (POD)-konjugierter Anti-Maus-Antikörper (1:5000 in 0,25 % BSA in PBS- Tween)

Peroxidase (POD)-konjugierter Anti-Kaninchen-Antikörper (1:5000 in Rotiblock)

reduzierender SDS-Probenpuffer (2 x konzentriert) für Polyacrylamid-Gele:

125 mM	Tris pH 6,8
20 % (v/v)	Glycerol
6 % (w/v)	SDS
10 % (v/v)	β -Mercaptoethanol
0,125 % (w/v)	Bromphenolblau

Durchführung:

Die N2a-Zellen werden nach erfolgter Behandlung mit PUGNAc und/oder dbcAMP bzw. nach drei Tagen Kultivierung (siehe 2.2.3.8) mit 4 °C kaltem DPBS gewaschen. Danach werden die Zellen in 500 μ L Ripa-Lysis-Puffer aufgenommen und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend werden sie 5-6 x auf einem Vortexer gemischt und 30 Minuten bei 4 °C und $g = 20.000$ zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und es werden 2 μ L des Cdk5-Antikörpers C-8 hinzugefügt. Es folgt eine Inkubation am Überkopf-Schüttler über Nacht bei 4 °C. Hieran schließt sich eine weitere Inkubation bei 4 °C am Überkopf-Schüttler nach Zugabe von 50 μ L Protein G Sepharose für 1,5 h an. Danach werden die Proben bei $g = 5000$ für 2 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, und der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird 3 x mit Ripa-Waschpuffer bei 4 °C und $g = 6500$ für 2 Minuten gewaschen. Es folgt ein weiterer Waschschrift mit aqua dem. bei 4 °C und $g = 7000$ für 2 Minuten. Das Pellet wird mit einer Kanüle trocken gesaugt und mit 2fach Probenpuffer versetzt. Nach dem Mischen der Proben auf dem Vortexer werden diese 5 Minuten gekocht, wiederum gemischt und bei $g = 20.000$ bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Proben werden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.2.4.2).

2.2.4.8 Immunfluoreszenz

Material:

Objektträger

Stammlösung:

1 % Pferdeserum

0,1 % BSA

in PBS (siehe 2.2.3.3)

Fixierlösung:

2 % Paraformaldehyd

0,1 % Glutaraldehyd

in PBS (siehe 2.2.3.3)

Inkubationspuffer:

0,1 % Triton X100

in Stammlösung

Waschpuffer:

a) 0,1 % Triton X-100

in PBS (siehe 2.2.3.3)

b) 0,2 % Tween 20

in Stammlösung

DPBS (siehe 2.2.3.11)

1. Antikörper:

RL2 gegen O-GlcNAc (1:100 in Inkubationspuffer)

2. Antikörper:

α -mouse-Cy3 (1:500 in Inkubationspuffer)

Eindeckelmedium: Permafluor

Durchführung:

Nach Kultivierung und Behandlung der Zellen (siehe 2.2.3.8) wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit DPBS gewaschen. Anschließend erfolgt die Fixierung mit Fixierlösung für 20 Minuten bei 4 °C. Nach Waschen mit 0,1 % Triton-PBS, werden die Deckgläschen 30 Minuten mit Blockierlösung behandelt. Vor der Inkubation mit dem 1. Antikörper werden die Deckgläschen 3 x kurz mit 0,2 % Tween-Waschpuffer gewaschen. Die RL2-Antikörper-Inkubation erfolgt für 30 Minuten, an die sich ein dreimaliger kurzer Waschschrift mit 0,2 % Tween-Waschpuffer anschließt. Der Cy3-Antikörper wird für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgt nochmals ein dreimaliger kurzer Waschschrift für maximal 1 Minute mit 0,2 % Tween-Waschpuffer und ein 1minütiges Waschen der Deckgläschen mit aqua dem. Zum Schluss werden die Deckgläschen „eingedeckelt“ und bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.4.9. O-GlcNAc-Transferase-Assay

Material:

C18-Säule

UDP-[¹⁴C]-GlcNAc (spezifische Aktivität: >200 mCi/mmol) in 25 mM AMP-Lösung

10 x OGT-Puffer:

500 mM	Na-Cacodylat pH 6,0
10 mM	1-amino-GlcNAc
10 mg/mL	BSA
	(frisch ansetzen)

10 mM CKII Peptid
in PBS

aufbereitete Kaninchen-Retikulozytenmembranen

entsalzte rekombinant hergestellte O-GlcNAc-Transferase (OGT) (siehe 2.2.2)

50 mM Ameisensäure

Methanol

Szintillationsflüssigkeit

Durchführung:

Das UDP-[¹⁴C]-GlcNAc (aliquotiert à 20 µL bei -80 °C eingefroren) wird unter Stickstoff eingedampft und in 25 mM 5'-AMP-Lösung gelöst, so dass sich eine Radioaktivität von 0,02-0,1 µCi ergibt. Das Eindampfen erfolgt immer frisch.

Versuchsansatz:

10 µL 10x OGT-Puffer

10 µL 10 mM CKII Peptid

5 µL UDP-[¹⁴C]-GlcNAc

≤ 25 µL entsalzte OGT bzw. aufbereitete Kaninchenretikulozytenmembranen (300 µg)
auffüllen auf 50 µL mit aqua dem.

Es folgt eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 450 µL 50 mM Ameisensäure gestoppt.

Die C18-Säule wird mit Methanol angefeuchtet und mit 5 mL aqua dem. gewaschen bevor sie mit der Reaktionslösung beladen wird. Es folgen zwei Waschschrte mit 7 mL und 1 mL aqua dem., von denen für die Messung im Szintillationszähler jeweils 1 mL mit 2 mL Methanol verdünnt wird. Die Elution des Peptids findet mit 3 mL Methanol statt, die direkt in ein Szintillationsgefäß erfolgt. Das Eluat sowie die verdünnten Waschschriffaktionen

werden mit 10 mL Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität wird im Szintillationszähler gemessen.

3. Ergebnisse

3.1 Langzeitbehandlung von N2a-Neuroblasomzellen mit PUGNAc

N2a-Zellen wurden vierzehn Tage mit PUGNAc, entweder in An- oder Abwesenheit von dbcAMP in Kultur gehalten. Anschließend wurde eine Trypanblau-Färbung durchgeführt bzw. wurden Zellhomogenate angefertigt. Bei letzteren wurden mit Hilfe des RL2-Antikörpers die mit O-GlcNAc-modifizierten Proteine im Western Blot ermittelt.

Die langzeitige PUGNAc-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Zellen. Die Trypanblau-Färbung ergab zwischen PUGNAc-behandelten Zellen und Kontrollzellen keinen Unterschied bezüglich der Zahl der toten Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die langfristige Behandlung der N2a-Zellen mit PUGNAc bewirkte jedoch einen starken Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation gegenüber den nicht behandelten Zellen (siehe Abb. 6). Zellen, die mit dbcAMP und PUGNAc behandelt worden waren, wiesen ebenfalls eine verstärkte O-GlcNAc-Modifikation gegenüber den Zellen auf, die nur mit dbcAMP behandelt worden waren.

Außerdem war unter dem Lichtmikroskop zu beobachten, dass im Vergleich zu den Zellen, die nur mit dbcAMP behandelt worden waren, die Zellen, die zusätzlich mit PUGNAc behandelt worden waren, eine verlangsamte Proliferation aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung wurde jedoch nicht statistisch ausgewertet.

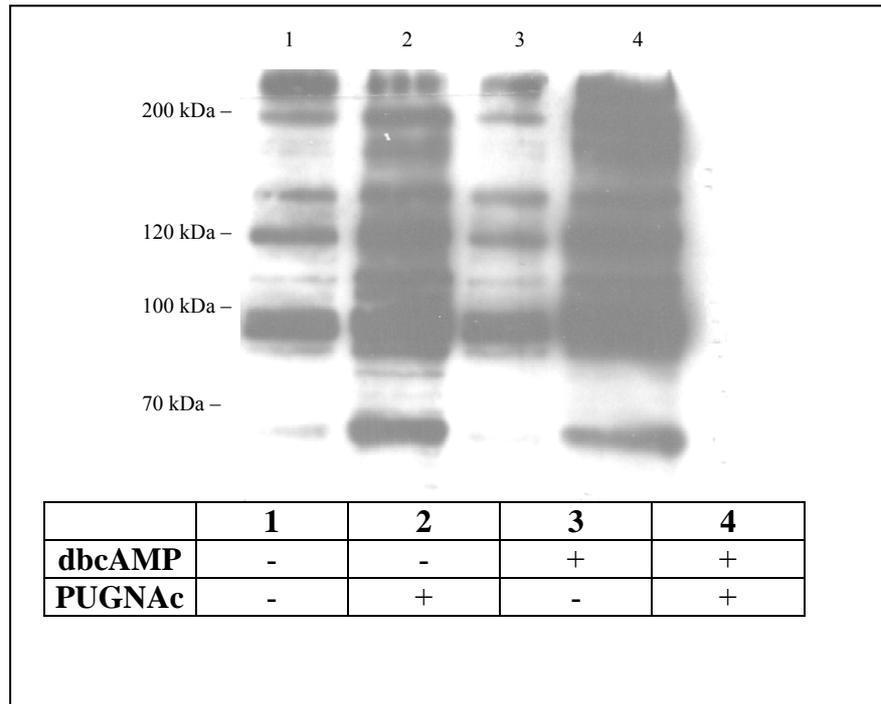


Abb. 6: *Einfluss von PUGNAc über 14 Tage auf O-GlcNAc Expression von N2a-Zellen*

Nach Inkubation der Zellen ohne (1, 3) bzw. mit 40 μ M PUGNAc (2, 4) in Verbindung mit (3, 4) bzw. ohne 1 mM dbcAMP (1, 2) für 14 Tage wurden die Zellhomogenate in einen 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem RL2-Antikörper analysiert. Links ist der Molekulargewichtsstandard in 10^3 Dalton (kDa) angegeben.

3.2 Einfluss der Behandlung von N2a-Zellen mit PUGNAc und dbcAMP auf die intrazelluläre Lokalisation von O-GlcNAc

N2a-Zellen, die 48 h mit 40 μ M PUGNAc und nach 24 h noch zusätzlich für 24 h mit 1 mM dbcAMP behandelt worden waren, wurden mit indirekter Immunfluoreszenz auf die O-GlcNAc-Verteilung in der Zelle untersucht. Hierfür wurde der gegen O-GlcNAc gerichteten RL2-Antikörper und ein Cy3-gekoppelter Zweitantikörper eingesetzt.

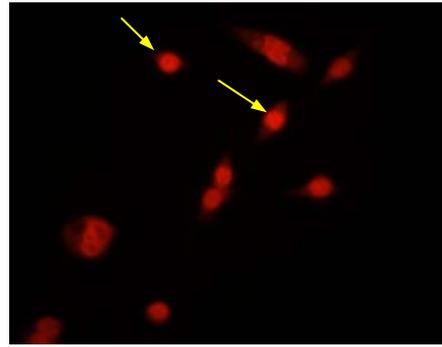
Durch die Behandlung der Zellen nur mit dbcAMP für 24 h bzw. PUGNAc für 48 h in Kombination mit dbcAMP für 24 h war eine verringerte Anfärbung der Zellkerne zu beobachten, d.h. dass eine verringerte O-GlcNAc-Modifikation der Kernproteine vorlag (siehe Abb. 7).

Es wurden jeweils 100 Kerne analysiert, und die Anzahl der stark gefärbten und nur schwach gefärbten Kerne wurde ermittelt (siehe Tab. 11). Es zeigte sich, dass durch die Behandlung mit dbcAMP in Ab- und Anwesenheit von PUGNAc 2/3 der ausgezählten Kerne geringer gefärbt waren als nach PUGNAc-Behandlung bzw. als in den Kontrollversuchen, in denen nur die benutzten Lösungsmittel DMSO bzw. aqua dem. verwendet wurden.

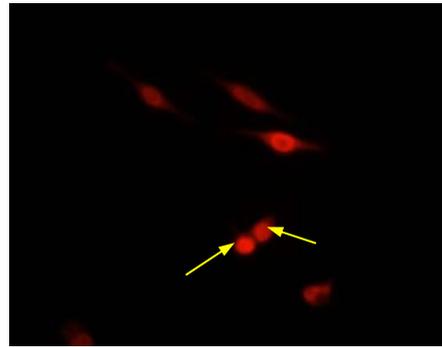
	Schwach gefärbte Kerne	Stark gefärbte Kerne
Aqua dem./ DMSO	26%	63%
PUGNAc/DMSO	29%	58%
Aqua dem./dbcAMP	60%	33%
PUGNAc/dbcAMP	55%	23%

Tab. 11: *Einfluss von PUGNAc in Ab- und Anwesenheit von dbcAMP auf die O-GlcNAc-Expression von Proteinen des Kernes in N2a-Zellen.*

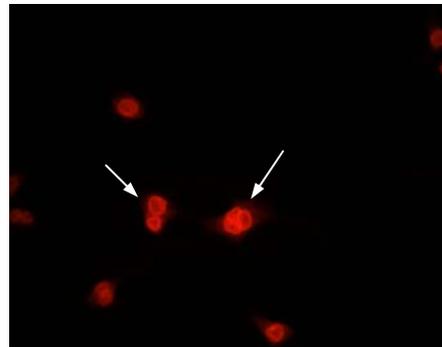
Nach Inkubation der Zellen mit bzw. ohne 40 µM PUGNAc für 48 h, bei der nach 24 h zusätzlich 1 mM dbcAMP bzw. eine äquivalente Menge an DMSO für 24 h zugefügt wurde, wurde die O-GlcNAc-Expression von Kernproteinen durch eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem RL2-Antikörper durchgeführt. Es wurden jeweils 100 Kerne analysiert und die Anzahl der stark und schwach gefärbten Kerne ermittelt.

Phasenkontrast**Fluoreszenz**

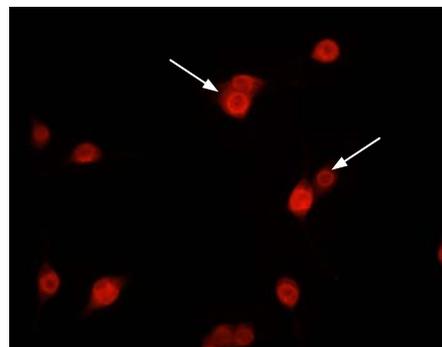
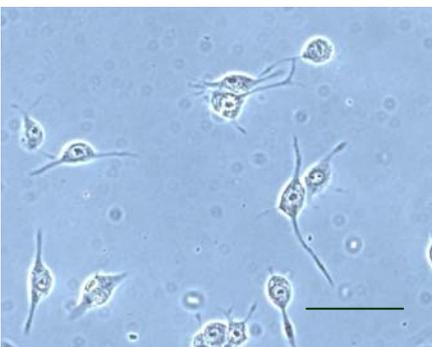
Aqua dem./DMSO



PUGNAc/ DMSO



Aqua/dbcAMP



PUGNAc/dbcAMP

Abb. 7: *Einfluss von PUGNAc in Ab- und Anwesenheit von dbcAMP auf die O-GlcNAc-Expression von Proteinen des Kernes in N2a-Zellen.*
Nach Inkubation der Zellen mit bzw. ohne 40 μM PUGNAc für 48 h, bei der nach 24 h zusätzlich 1 mM dbcAMP bzw. eine äquivalente Menge an DMSO für 24 h zugefügt wurde, wurde die O-GlcNAc-Expression von Kernproteinen durch eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem RL2-Antikörper durchgeführt. Es wurden jeweils 100 Kerne analysiert und die Anzahl der stark (gelbe Pfeile) und schwach gefärbten Kerne (weiße Pfeile) ermittelt.
Der im Foto angegebene Balken entspricht einer Länge von 20 μm .

3.3. Auswirkungen der PUGNAc- und PMA-Behandlung von APPwt- und APPsw-exprimierenden N2a-Zellen auf die Sekretion von APPs und A β

N2a Zellen, die mit der cDNA des Wildtyps von APP₆₉₅ (APPwt = E2-Klon) und der cDNA der schwedischen Mutante von APP₆₉₅ (APPsw = A1a-Klon) stabil transfiziert waren, wurden nach 3-tägiger Kultivierung für 1 h mit 2 μM PMA oder 40 μM PUGNAc behandelt. Proteine von Homogenaten der APPwt- und APPsw-exprimierenden N2a-Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit dem RL2-Antikörper, der gegen O-GlcNAc gerichtet ist, analysiert. Es konnte eine leichte, jedoch nicht signifikante Verstärkung der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen bei den mit PUGNAc behandelten Zellen beobachtet werden. PMA bewirkte keine Veränderung der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen der Zellhomogenate.

Mit dem 8E5-Antikörper, der APP erkennt, konnte kein Unterschied in der APP-Expression in Homogenaten der APPwt- und APPsw-exprimierenden N2a-Zellen durch die Behandlung mit PMA und PUGNAc festgestellt werden (siehe Abb. 8A und 8B). Das bedeutet, dass die erhöhte O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen, ausgelöst durch die PUGNAc-Behandlung, keine Veränderungen in der APP-Expression hervorruft.

In der Abb. 8 sind beispielhaft für beide Klone nur die Ergebnisse für den E2-Klon gezeigt.

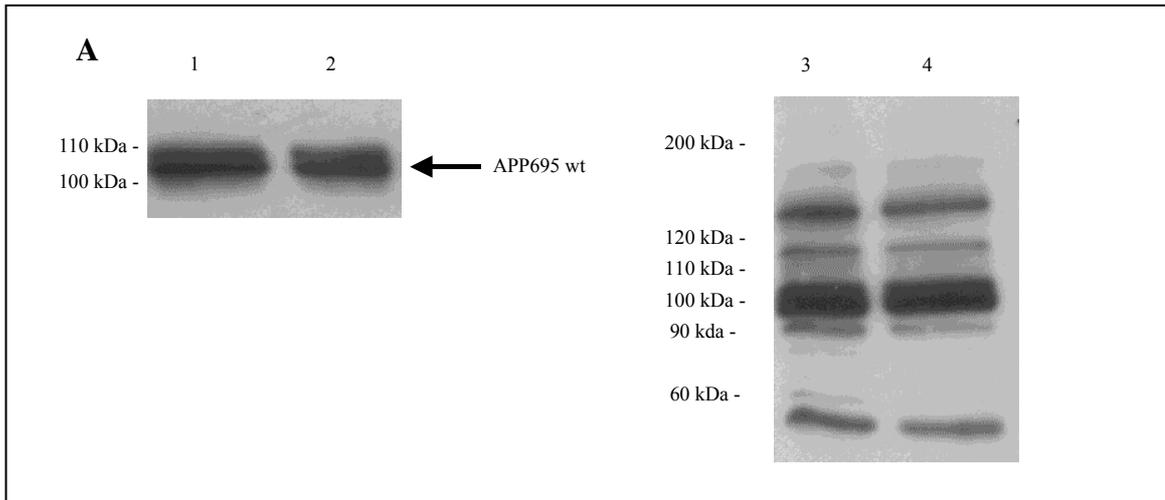


Abb. 8A: *Einfluss von PMA auf die O-GlcNAc-Expression von APPwt-exprimierenden N2a-Zellen.*

Nach Inkubation der Zellen ohne (1, 3) bzw. mit 2 μ M PMA (2, 4) für eine Stunde wurden die Zellhomogenate in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem 8E5-Antikörper (1, 2) bzw. RL2-Antikörper (3, 4) analysiert. Links ist jeweils der Molekulargewichtsstandard in 10^3 Dalton (kDa) angegeben.

APP₆₉₅wt = Wildtyp des APP₆₉₅

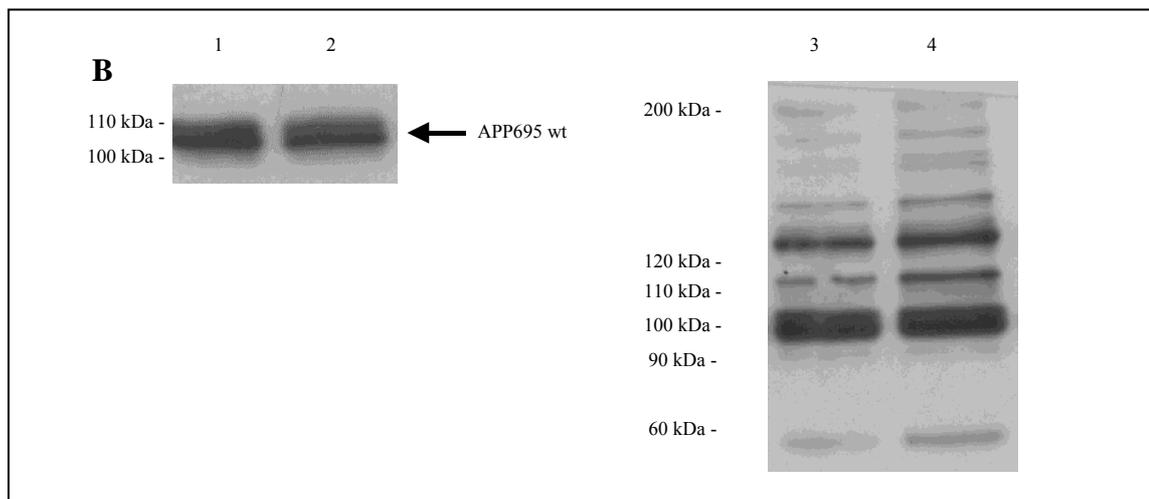


Abb. 8B: *Einfluss von PUGNAc auf die O-GlcNAc-Expression von APPwt-exprimierenden N2a-Zellen*

Nach Inkubation der Zellen ohne (1, 3) bzw. mit 40 μ M PUGNAc (2, 4) für eine Stunde wurden die Zellhomogenate in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem 8E5-Antikörper (1, 2) bzw. RL2-Antikörper (3, 4) analysiert. Links ist jeweils der Molekulargewichtsstandard in 10^3 Dalton (kDa) angegeben.

APP₆₉₅wt = Wildtyp des APP₆₉₅

Die Auftrennung der Proteine des Zellkulturmediums mittels SDS-PAGE ergab im Western Blot mit dem 8E5-Antikörper für die APPwt-exprimierenden N2a-Zellen, dass durch die Behandlung mit PMA eine signifikant höhere ($p = 0,012$) APPs-Menge im Medium nachzuweisen war als bei den Kontrollzellen (siehe Abb. 9A). Auch durch die Behandlung mit PUGNAc konnte für die APPwt-exprimierenden N2a-Zellen eine Erhöhung der APPs-Menge beobachtet werden, jedoch war diese nicht signifikant (siehe Abb. 9B). Der Nachweis der APPs α -Menge erfolgte nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE im Western Blot mit dem W02-Antikörper (siehe Abb. 9A und 9B). Die APPs α -Menge nahm bei den APPwt-exprimierenden N2a-Zellen durch die Behandlung mit PMA und PUGNAc ebenfalls zu, jedoch war der Anstieg gegenüber den Kontrollzellen nicht signifikant.

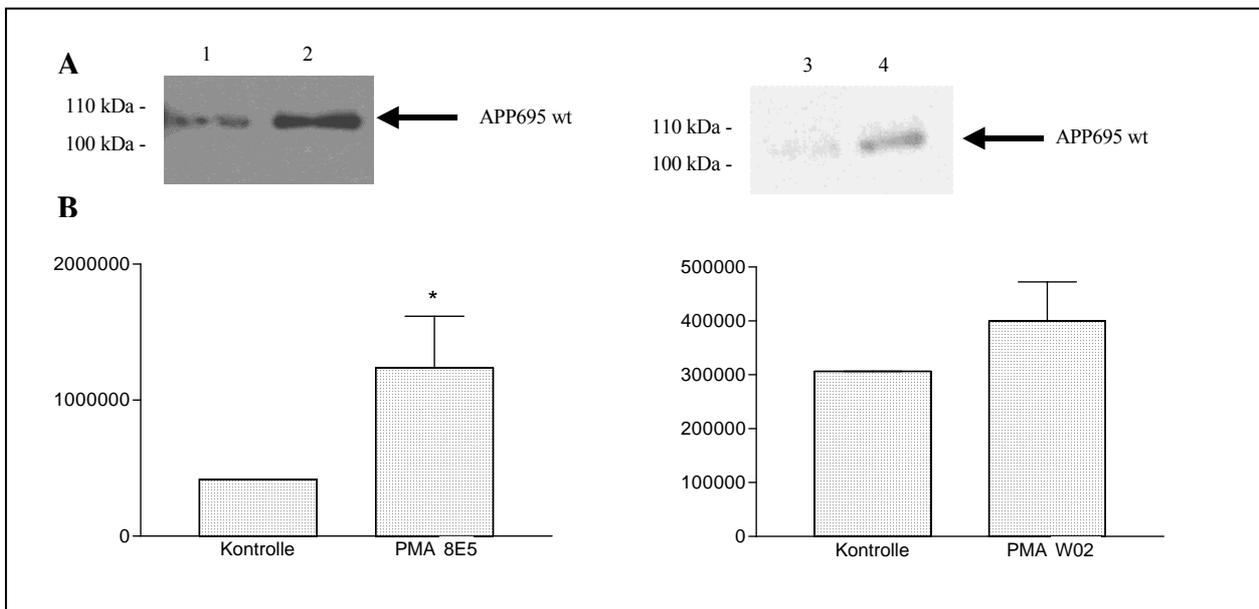


Abb. 9A: *Einfluss von PMA auf die Sekretion des APPs von APPwt-exprimierenden N2a-Zellen*

A: Nach Inkubation der Zellen ohne (1, 3) bzw. mit 2 μ M PMA (2, 4) für eine Stunde wurde das Zellmedium in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem 8E5-Antikörper (1, 2) bzw. W02-Antikörper (3, 4) analysiert. Links ist jeweils der Molekulargewichtsstandard in 10^3 Dalton (kDa) angegeben.

B: Die Balkendiagramme stellen die quantitative Auswertung der in A gezeigten Western Blots dar. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Behandlungen aufgetragen und auf der y-Achse die Werte der durchschnittlichen optischen Dichte aus 5 unabhängigen Experimenten. Die Balken geben den SEM (= standard error of the mean) an.

Für die statistische Auswertung von fünf unabhängigen Experimenten wurde eine einfaktorielle ANOVA mit einem Post-Hoc-Test durchgeführt.

*: $p = 0,012$

APP₆₉₅ wt = Wildtyp des APP₆₉₅

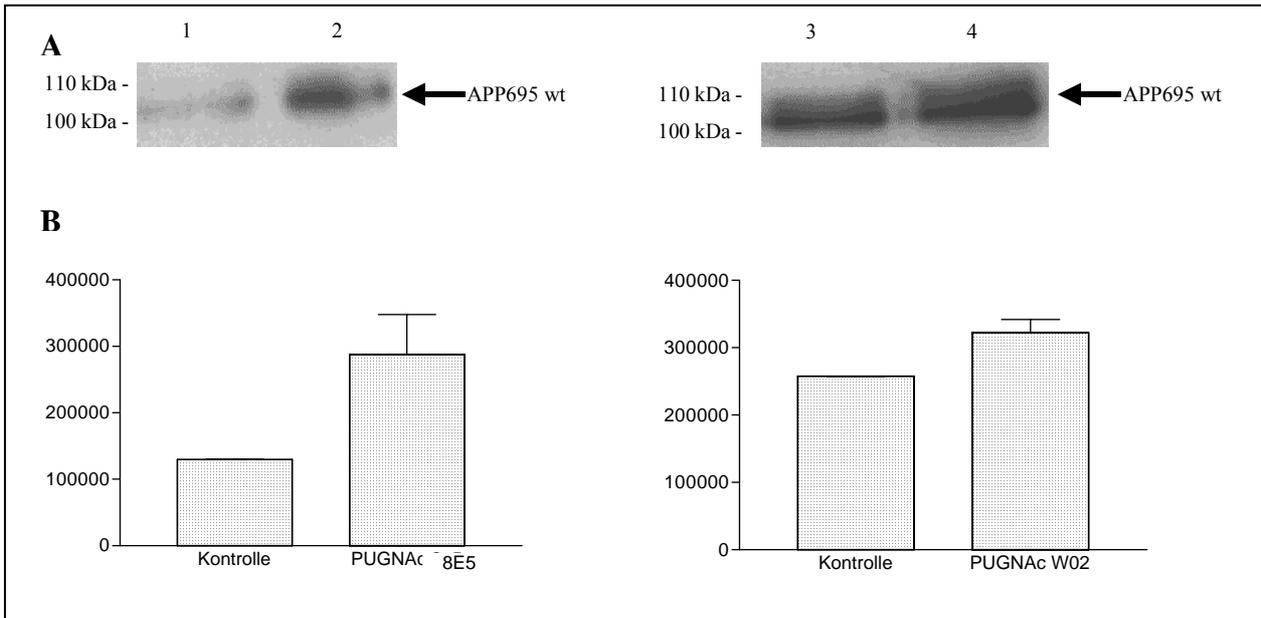


Abb. 9B: *Einfluss von PUGNAc auf die Sekretion des APPs von APPwt-exprimierenden N2a-Zellen*

A: Nach Inkubation der Zellen ohne (1, 3) bzw. mit 40 μ M PUGNAc (2, 4) für eine Stunde wurde das Zellmedium in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem 8E5-Antikörper (1, 2) bzw. W02-Antikörper (3, 4) analysiert. Links ist jeweils der Molekulargewichtsstandard in 10^3 Dalton (kDa) angegeben.

B: Die Balkendiagramme stellen die quantitative Auswertung der in A gezeigten Western Blots dar. Auf der x-Achse sind die unterschiedlichen Behandlungen aufgetragen und auf der y-Achse die Werte der durchschnittlichen optischen Dichte aus 5 unabhängigen Experimenten. Die Balken geben den SEM (= standard error of the mean) an.

Für die statistische Auswertung von fünf unabhängigen Experimenten wurde eine einfaktorielle ANOVA mit einem Post-Hoc-Test durchgeführt.

APP₆₉₅ wt = Wildtyp des APP₆₉₅

Für die APPsw-exprimierenden N2a-Zellen ergaben sich ähnliche Ergebnisse, wie sie schon von Ulrich Gollner (Dissertation, 2001) gezeigt werden konnten. Dieser hatte APPsw-exprimierende N2a-Zellen 15 h mit 40 μ M PUGNAc und 80 nM PMA behandelt. Sowohl die Sekretion der gesamte APPs-Menge als auch die Sekretion der APPs α -Menge ins Medium stieg nach Behandlung der Zellen mit PUGNAc oder PMA für 15 h an. Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Behandlung der APPsw-exprimierenden N2a-Zellen mit PUGNAc und PMA für 1 h ergab sich ebenfalls ein leichter, wenn auch nicht signifikanter Anstieg des APPs sowie des APPs α im Medium. Der Nachweis erfolgte, wie bei den APPwt-exprimierenden N2a-Zellen, im Western Blot mit dem 8E5-Antikörper (gesamte APPs-Menge) und dem W02-Antikörper (APPs α -Menge), nachdem die Proteine des Homogenates mittels SDS-PAGE aufgetrennt worden waren (siehe Abb. 10A und Abb. 10B).



Abb. 10A: *Einfluss von PMA auf die Sekretion des APPs von APPsw-exprimierenden N2a-Zellen*

Nach Inkubation der Zellen ohne (1, 3) bzw. mit 2 μ M PMA (2, 4) für eine Stunde wurde das Zellmedium in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem 8E5-Antikörper (1, 2) bzw. W02-Antikörper (3, 4) analysiert.

Links ist jeweils der Molekulargewichtsstandard in 10^3 Dalton (kDa) angegeben.

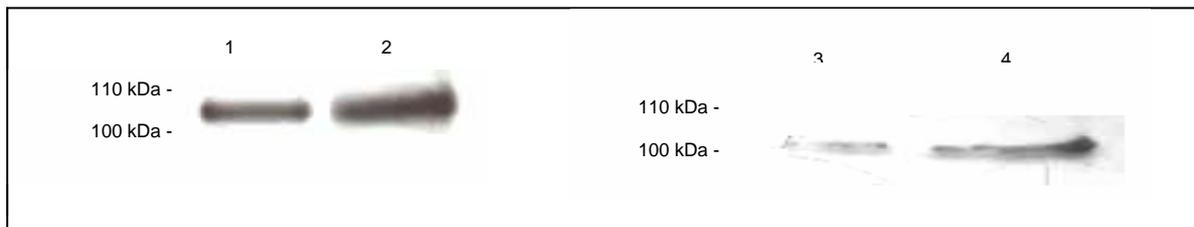


Abb. 10B: *Einfluss von PUGNAc auf die Sekretion des APPs von APPsw-exprimierenden N2a-Zellen*

Nach Inkubation der Zellen ohne (1, 3) bzw. mit 40 μ M PUGNAc (2, 4) für eine Stunde wurde das Zellmedium in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem 8E5-Antikörper (1, 2) bzw. W02-Antikörper (3, 4) analysiert.

Links ist jeweils der Molekulargewichtsstandard in 10^3 Dalton (kDa) angegeben.

3.3.1 O-GlcNAc-Modifikation der Proteine der Detergenz-löslichen Fraktion (dsf) und der Detergenz-unlöslichen Fraktion (dicf) nach Behandlung des A1a-Klons und E2-Klons mit PMA und PUGNAc

APPwt- und APPsw-exprimierende N2a-Zellen wurden nach 3-tägiger Kultivierung für 1 h mit entweder 2 μ M PMA oder 40 μ M PUGNAc behandelt. Nach der Fraktionierung der Proteine des Zellhomogenates in Detergenz-unlösliche (dicf) und Detergenz-lösliche (dsf) Proteine wurde im Western Blot die O-GlcNAc-Modifikation der Proteine mit Hilfe des RL2-Antikörpers überprüft.

Durch die PMA-Behandlung konnten in beiden Fraktionen der APPwt- und APPsw-exprimierenden N2a-Zellen keine Unterschiede der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen, im Vergleich zur Kontrolle, d.h. unbehandelten Zellen, festgestellt werden.

Durch die Behandlung mit PUGNAc hingegen zeigte sich bei beiden Zelllinien in der dsf eine leichte Erhöhung der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen, die jedoch in der dicf nicht zu beobachten war.

In den Abbildungen 11A und 11B sind beispielhaft für beide Zelllinien die Ergebnisse anhand der mit APPwt-exprimierenden N2a-Zellen dargestellt.

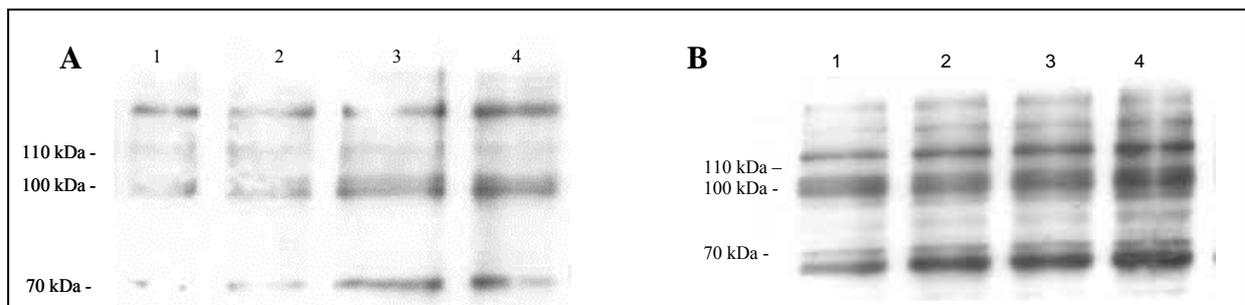


Abb. 11A: *Einfluss von PUGNAc und PMA auf die O-GlcNAc-Expression von Proteinen der dicf von APPwt-exprimierenden N2a-Zellen*
 Nach Inkubation der Zellen ohne (3) bzw. mit 40 μ M PUGNAc (4) und ohne (1) bzw. mit 2 μ M PMA (2) für eine Stunde wurden die Fraktionen in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem RL2-Antikörper (1-4) analysiert. Links ist jeweils der Molekulargewichtsstandard in 10^3 Dalton (kDa) angegeben.

Abb. 11B: *Einfluss von PUGNAc und PMA auf die O-GlcNAc-Expression von Proteinen der dsf von APPwt-exprimierenden N2a-Zellen*
 Nach Inkubation der Zellen ohne (3) bzw. mit 40 μ M PUGNAc (4) und ohne (1) bzw. mit 2 μ M PMA (2) für eine Stunde wurden die Fraktionen in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem RL2-Antikörper (1-4) analysiert. Links ist jeweils der Molekulargewichtsstandard in 10^3 Dalton (kDa) angegeben.

3.3.2 *In situ*-Sandwich-ELISA mit N2a-Zellen transfiziert mit dem Wildtyp des APP Gens oder der schwedischen Mutante des APP Gens

Im *In situ*-Sandwich-ELISA werden die N2a-Zellen in den Vertiefungen kultiviert, nachdem diese mit einem polyklonalen A β -Kaninchen-Antikörper, der die Aminosäuren 17-42 von A β erkennt, beschichtet wurden. Das von den Zellen sezernierte A β wird dann von dem beschichteten Antikörper erkannt. Die APPwt-exprimierenden bzw. APPsw-exprimierende N2a-Zellen wurden für 1 h im *In situ*-Sandwich-ELISA mit 2 μ M PMA oder 40 μ M PUGNAc behandelt. Das von den Zellen sezernierte, an den beschichteten Antikörper gebundene A β 40/42 (N-terminal verkürzt und nicht verkürzt) und p3 (siehe Abb. 12) wurden anschließend mit den Antikörpern 4G8 bzw. W02 nachgewiesen, wobei der 4G8-Antikörper alle A β -Formen und p3 erkennt, während der W02-Antikörper nur N-terminal nicht-verkürzte A β -Formen detektiert (siehe Abb. 12). Der Nachweis der Bindung wurde durch Inkubation mit einem biotinylierten Zweitantikörper, der wiederum von Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin erkannt wird, verstärkt.



Abb. 12: *Darstellung der A β Sequenz und der von den Antikörpern erkannten Regionen. Die dickgedruckten Aminosäuren umfassen das p3.*

Es konnte nachgewiesen werden, dass APPwt-exprimierende N2a-Zellen durch die Behandlung mit PMA signifikant weniger ($p = 0,015$) A β und p3 (Nachweis mit 4G8-Antikörper) im Vergleich zur Kontrolle sekretieren, während PUGNAc keinen Einfluss auf die Sekretion aller A β -Formen inklusive p3 zeigte (siehe Abb. 13A). Für nicht verkürztes A β (Nachweis mit W02-Antikörper) war sowohl nach PMA- als auch nach PUGNAc-Behandlung kein Unterschied zu beobachten (siehe Abb. 13B).

Bei den APPsw-exprimierenden N2a-Zellen hatte die Behandlung mit PMA keine Auswirkung auf die Sekretion von A β und p3, während PUGNAc eine signifikante Zunahme von A β und p3 im Vergleich zur Kontrolle erzielte (siehe Abb. 13C). Für nicht verkürztes A β

hingegen zeigte sich eine signifikant verringerte Sekretion nach PMA-Behandlung (Nachweis mit W02-Antikörper), während PUGNAc keinen Einfluss hatte (siehe Abb. 13D).

Für die statistische Auswertung von fünf unabhängigen Ergebnissen wurde eine einfaktorielle ANOVA mit einem Post-Hoc-Test durchgeführt.

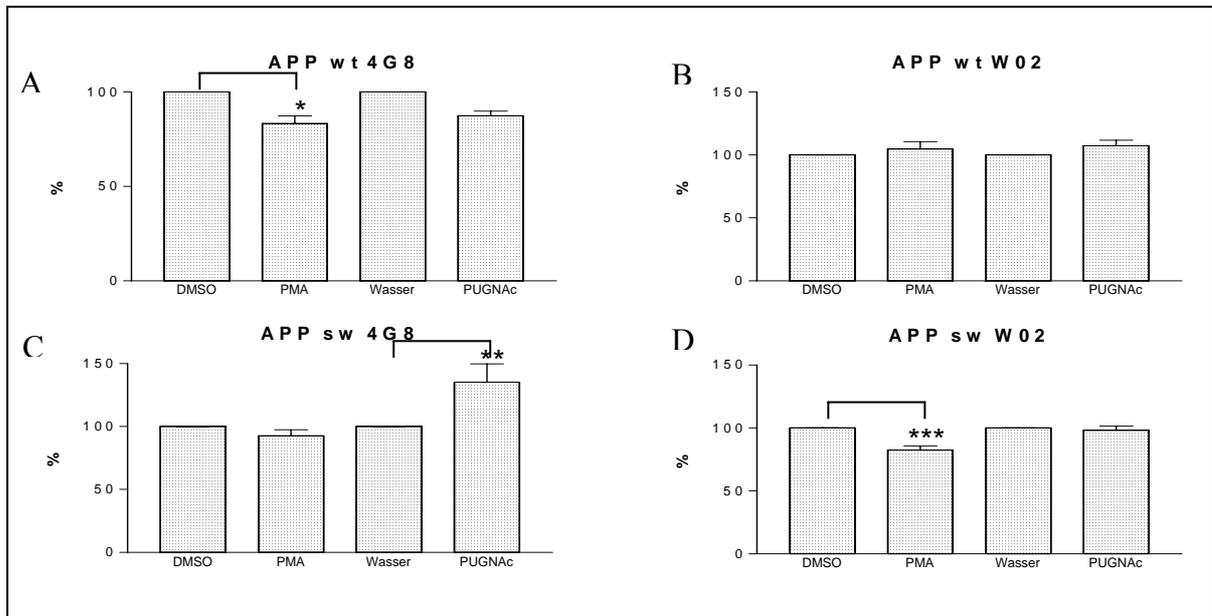


Abb. 13: Einfluss von PMA und PUGNAc auf die A β -Sekretion von APPwt- und APPsw-exprimierenden N2a-Zellen

Nach Inkubation der Zellen mit 2 μ M PMA (Kontrolle: äquivalente Menge an DMSO) bzw. 40 μ M PUGNAc (Kontrolle: äquivalente Menge an Wasser) für 1 h, wurden das sekretierte A β mit Hilfe des 4G8-Antikörpers (A,C) und des W02-Antikörpers (B,D) detektiert. Die Antikörper wurden wiederum von einem biotinylierten Maus-Antikörper erkannt, an den Streptavidin-POD gebunden war. Die gemessene optische Dichte der Färbung im ELISA ist in % angegeben, wobei die Kontrollen immer auf 100 % gesetzt sind.

Für die statistische Auswertung von fünf unabhängigen Ergebnissen wurde eine einfaktorielle ANOVA mit einem Post-Hoc-Test durchgeführt.

(* : $p = 0,015$; ** : $p = 0,0332$; *** : $p = 0,01$)

3.3.3. *In situ*-Sandwich-ELISA mit APPwt- und APPsw-exprimierenden HEK293-Zellen

3.3.3.1 Transfektion der HEK293-Zellen mit APP₆₉₅ Wildtyp und schwedischer Mutante

Zunächst wurden HEK293-Zellen mit der cDNA APPwt bzw. APPsw transfiziert. Aus allen gewonnenen Klonen wurden Zellhomogenate hergestellt und die Expressionsstärke von APP mit Hilfe des 8E5-Antikörpers im Western Blot überprüft. Es wurden zwei Klone ausgewählt, die das gleiche Expressionsniveau von APP aufwiesen (siehe Abb. 14). Hierbei handelte es sich um Klon 19 (APPwt) und Klon 42 (APPsw).

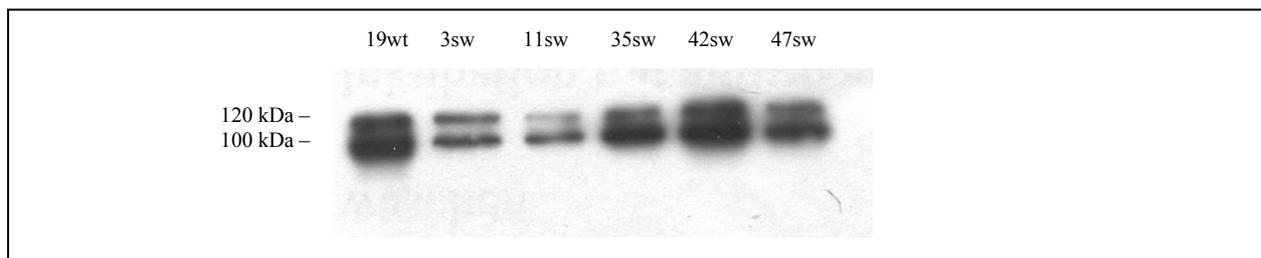


Abb. 14: *Nachweis der APP-Expression in APPwt- bzw. APPsw-transfizierten HEK293-Zellen*

Nach Transfektion der HEK293-Zellen mit der cDNA von APPwt und APPsw wurden Zellhomogenate in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem 8E5-Antikörper die APP-Expression analysiert. Links ist der Molekulargewichtsstandard in 10³ Dalton (kDa) angegeben.

wt: APPwt-exprimierende HEK293-Zellen; sw: APPsw-exprimierende HEK293-Zellen; die Zahlen geben jeweils unterschiedliche Klone an

3.3.3.2 Behandlung der HEK293-Zellen mit PUGNAc

Zunächst wurden HEK293-Zellen mit unterschiedlichen PUGNAc-Konzentrationen behandelt, um zu ermitteln bei welcher PUGNAc-Konzentration ein Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen des Zellhomogenates nach 1 h Behandlung zu beobachten ist.

Nach Auftrennung der Proteine des Zellhomogenates mittels SDS-PAGE konnte durch Western Blot Analyse mit dem RL2-Antikörper festgestellt werden, dass die HEK293-Zellen, ähnlich wie N2a-Zellen, nach einstündiger Behandlung mit 40 μM PUGNAc einen leichten Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine des Zellhomogenates aufwiesen (siehe Abb. 15). Daher wurden die HEK293-Zellen ebenfalls mit 40 μM PUGNAc im *In situ*-Sandwich-ELISA behandelt (siehe 3.3.3.3).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich durch höhere PUGNAc-Konzentrationen die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen in HEK293-Zellhomogenaten noch steigern lässt (siehe Abb. 15).

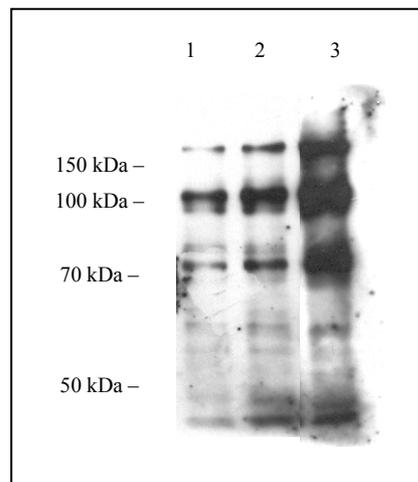


Abb. 15: *Einfluss von PUGNAc auf die O-GlcNAc-Expression in HEK293-Zellen*
Nach Inkubation der Zellen ohne (1) bzw. mit 40 μM PUGNAc (2) und 400 μM PUGNAc (3) für 1 h wurden Zellhomogenate in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem RL2-Antikörper analysiert. Links ist der Molekulargewichtsstandard in 10^3 Dalton (kDa) angegeben.

3.3.3.3 In situ-Sandwich-ELISA mit APPwt- und APPsw-exprimierenden HEK293-Zellen

HEK293-Zellen transfiziert mit APPwt bzw. mit APPsw wurden im *In situ*-Sandwich-ELISA mit 2 μ M PMA bzw. 40 μ M PUGNAc behandelt (siehe 3.3.2).

Bei den mit APPwt-transfizierten HEK293-Zellen konnte ein signifikanter Unterschied der A β -Sekretion sowohl bei der PMA als auch nach PUGNAc-Behandlung festgestellt werden. Durch die PMA-Behandlung lie β sich sowohl mit dem W02- als auch mit dem 4G8-Antikörper eine signifikant geringere Menge an sekretiertem A β feststellen (siehe Abb. 16A und 16B). Dies lässt darauf schließen, dass die PMA-Behandlung sich eher auf die Bildung/Sekretion der nicht-verkürzten A β -Formen auswirkt. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die bei den N2a-Zellen gewonnen wurden, bei denen sich die PMA-Behandlung eher auf die Bildung/Sekretion der verkürzten Formen des A β auswirkte (siehe 3.3.2). Durch die PUGNAc-Behandlung wurden die N-terminal-verkürzten Formen inklusive p3 verstärkt sekretiert, während mit dem W02-Antikörper keine Veränderung nach PUGNAc-Behandlung detektiert werden konnte. Auch diese Beobachtung unterscheidet sich von der, die bei der Behandlung der APPwt-exprimierenden N2a-Zellen mit PUGNAc gemacht worden waren. Hier hatte sich nämlich die A β -Sekretion nicht verändert (siehe 3.3.2).

Bei den HEK293-Zellen, die mit der schwedischen Mutante des APP₆₉₅ transfiziert waren, konnte durch die Behandlung mit PUGNAc oder PMA kein Unterschied in der A β -Sekretion verzeichnet werden (siehe Abb. 16C und 16D). Im Gegensatz dazu war bei APPsw-exprimierenden N2a-Zellen nach PMA-Behandlung eine signifikante Abnahme des nicht verkürzten A β und nach PUGNAc-Behandlung eine signifikante Zunahme der verkürzten A β -Formen zu beobachten (siehe 3.3.2).

Für die statistische Auswertung von fünf unabhängigen Ergebnisse wurde eine einfaktorielle ANOVA mit einem Post-Hoc-Test durchgeführt.

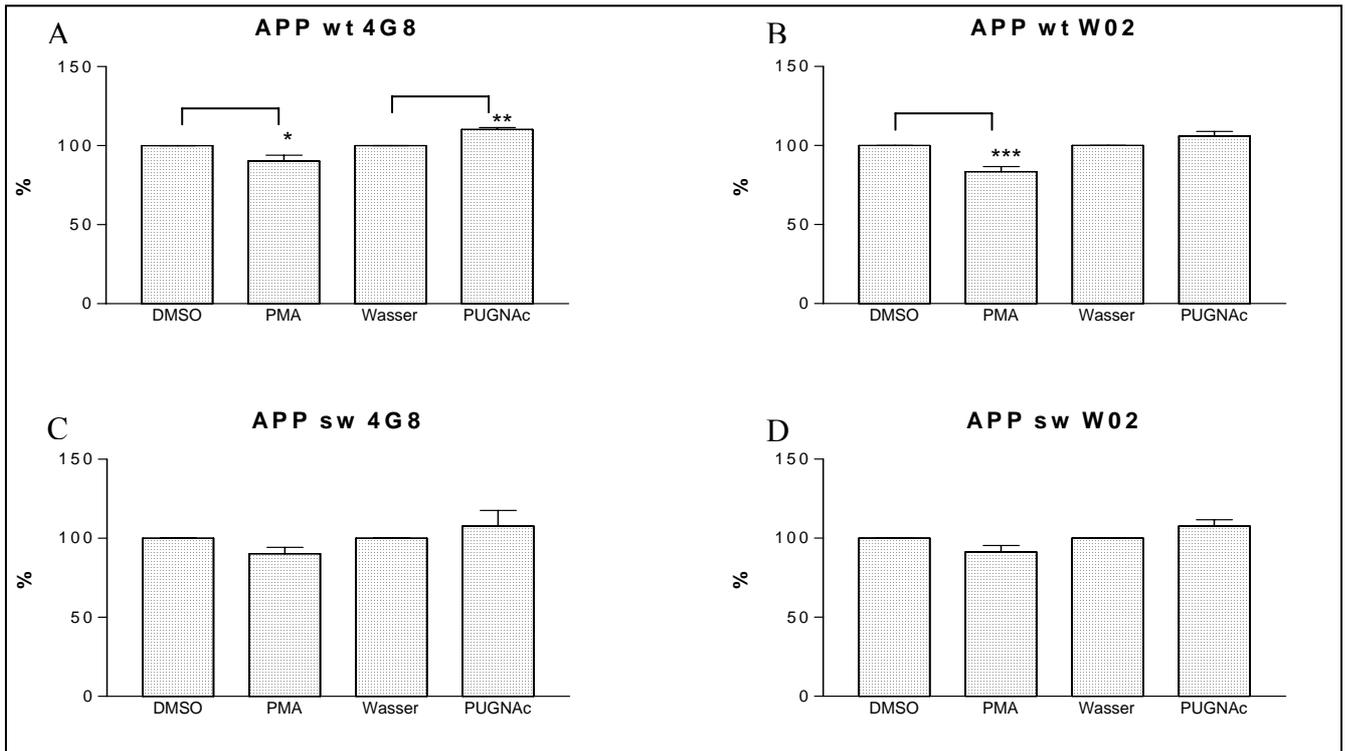


Abb. 16: Einfluss von PMA und PUGNac auf die A β -Sekretion von APPwt- und APPsw-exprimierenden HEK293-Zellen

Nach Inkubation der Zellen mit 2 μ M PMA (Kontrolle: äquivalente Menge an DMSO) bzw. 40 μ M PUGNac (Kontrolle: äquivalente Menge an Wasser) für 1 h, wurde das sekretierte A β mit Hilfe des 4G8-Antikörpers (A,C) und des W02-Antikörpers (B,D) detektiert. Diese wurden wiederum von einem biotinyliertem Maus-Antikörper erkannt, an den Streptavidin-POD gebunden war. Die gemessene optische Dichte der Färbung im ELISA wurde in % angegeben, wobei die Kontrollen immer auf 100 % gesetzt wurden. Für die statistische Auswertung von fünf unabhängigen Ergebnissen wurde eine einfaktorielle ANOVA mit einem Post-Hoc-Test durchgeführt.

(* : $p = 0,08$; ** : $p = 0,0001$; *** : $p = 0,001$)

3.4 Untersuchungen zur Bedeutung der O-GlcNAc-Modifikation der Cyclin-abhängigen Kinase Cdk5

3.4.1 Einfluss der Behandlung von N2a-Zellen mit dbcAMP und PUGNAc auf die O-GlcNAc-Modifizierung der Cdk5

Nach 3 Tagen in Kultur wurde eine Immunpräzipitation aus Homogenaten von N2a-Zellen mit dem Cdk5 Antikörper C-8 durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine mit SDS-PAGE ergab sich in dem sich anschließenden Western Blot mit dem O-GlcNAc-spezifischen RL2-Antikörper, dass die Cdk5 O-GlcNAc modifiziert ist (siehe Abb. 17A).

Eine Behandlung der N2a Zellen mit entweder dbcAMP (1 mM) oder PUGNAc (40 μ M) für 24 h ließ keinen Unterschied in der Stärke der O-GlcNAc-Modifikation der Cdk5 erkennen (siehe Abb. 17B).

Es wurden fünf unabhängige Versuche durchgeführt und analysiert.

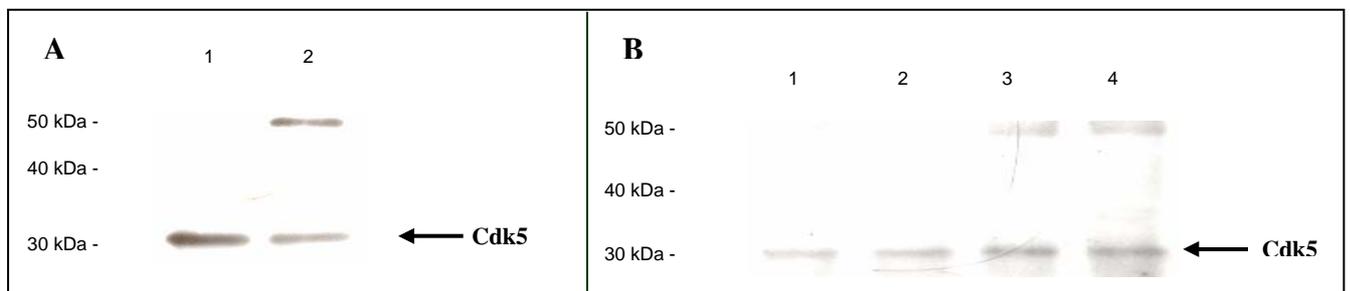


Abb. 17A: *Cdk5 ist O-GlcNAc-modifiziert*

Nach Immunpräzipitation (IP) aus N2a-Homogenaten mit dem Cdk5-Antikörper C-8 wurde ein Western Blot (WB) mit dem RL2-Antikörper durchgeführt. Die 33 kDa-Bande der Cdk5 zeigt eine deutliche Färbung mit dem RL2-Antikörper.

1 = IP mit C-8 und WB mit RL2; 2 = IP und WB mit C8

Abb. 17B: *Die Behandlung mit PUGNAc und dbcAMP hat keinen Einfluss auf die O-GlcNAc-Modifikation der Cdk5*

Nach Behandlung der N2a Zellen mit 1mM dbcAMP bzw. 40 μ M PUGNAc für 24 h wurde eine Immunpräzipitation mit dem Cdk5 Antikörper C-8 und ein anschließender Western Blot mit dem O-GlcNAc-Antikörper durchgeführt.

1-4 = IP mit C-8 und WB mit RL2

1 = Kontrolle (DMSO); 2 = Behandlung mit dbcAMP

3 = Kontrolle (H₂O); 4 = Behandlung mit PUGNAc

Links ist jeweils der Molekulargewichtsstandard in 10³ Dalton (kDa) angegeben.

3.4.2 Einfluss der Behandlung von N2a-Zellen mit PUGNAc und dbcAMP sowie Roscovitin auf die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen

N2a-Zellen wurden nach 24stündiger Kultivierung weitere 24 h mit 40 μ M PUGNAc behandelt. Danach schloss sich eine zusätzliche Behandlung für 24 h mit 40 μ M PUGNAc und 60 μ M Roscovitin bzw. PUGNAc und 1 mM dbcAMP an. Zur Kontrolle wurden die Zellen entweder für 48 h nur mit aqua dem. inkubiert oder nach 24 h aqua dem.-Behandlung für weitere 24 h nur mit Roscovitin oder dbcAMP.

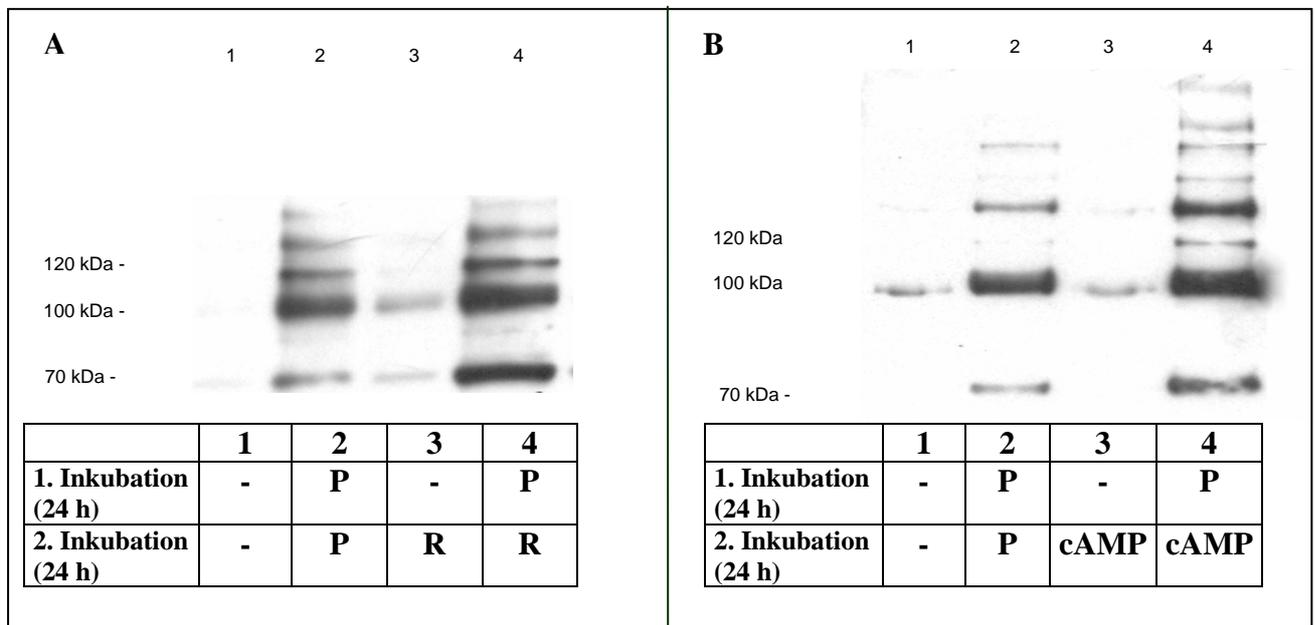


Abb. 18A: *Einfluss von PUGNAc in Kombination mit Roscovitin auf die O-GlcNAc-Expression von N2a-Zellen*

Nach Inkubation der Zellen ohne (1, 3) bzw. mit PUGNAc (2, 4) für 24 h wurden anschließend die nicht behandelten Zellen nochmals für 24 h ohne (1) bzw. mit (3) Roscovitin bzw. die mit PUGNAc behandelten Zellen nur mit PUGNAc (2) oder einer Kombination aus PUGNAc und Roscovitin (4) inkubiert. Die Zellhomogenate wurden in einem 8 %igen Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem RL2-Antikörper analysiert. Links ist jeweils der Molekulargewichtsstandard in 10^3 Dalton (kDa) angegeben und die Tabelle verdeutlicht die Behandlungszeiten.

Abb. 18B: *Einfluss von PUGNAc in Kombination mit dbcAMP auf die O-GlcNAc-Expression von N2a-Zellen*

Nach Inkubation der Zellen ohne (1, 3) bzw. mit PUGNAc (2, 4) für 24 h wurden anschließend die nicht behandelten Zellen nochmals für 24 h ohne (1) bzw. mit (3) dbcAMP bzw. die mit PUGNAc behandelten Zellen nur mit PUGNAc (2) oder einer Kombination aus PUGNAc und dbcAMP (4) inkubiert. Die Zellhomogenate wurden in einem 8 %igen Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem RL2-Antikörper analysiert. Links ist der Molekulargewichtsstandard in 10^3 Dalton (kDa) angegeben und die Tabelle verdeutlicht die Behandlungszeiten. P = PUGNAc; R = Roscovitin; camp = dbcAMP

Nach Homogenisierung der Zellen wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die O-GlcNAc-Modifikation der Proteine im Western Blot mit Hilfe des RL2-Antikörpers analysiert.

Es konnte festgestellt werden, dass sich durch die Behandlung mit PUGNAc und Roscovitin bzw. PUGNAc und dbcAMP die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen in Homogenaten von N2a-Zellen im Vergleich zur Behandlung der Zellen nur mit PUGNAc noch steigern ließ (siehe Abb. 18A und 18B).

Zur Behandlung siehe auch Schema (siehe 2.2.3.8).

Bei einer Behandlung der Zellen mit zunächst dbcAMP für 24 h und anschließender Behandlung mit dbcAMP und PUGNAc für weitere 24 h konnte keine Verstärkung der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen im Vergleich zu der alleinigen Behandlung der Zellen mit PUGNAc festgestellt werden (siehe Abb. 19).

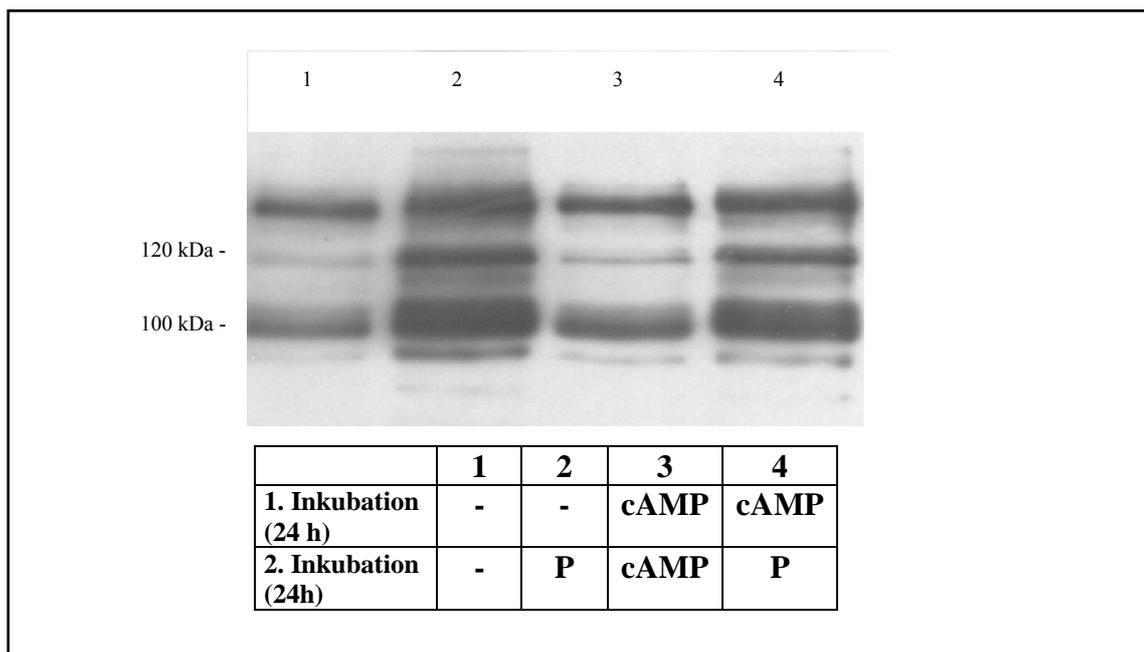


Abb. 19: *Einfluss von dbcAMP in Kombination mit PUGNAc auf die O-GlcNAc-Expression von N2a-Zellen*

Nach Inkubation der Zellen ohne (1, 2) bzw. mit 1 mM dbcAMP (3, 4) für 24 h wurden anschließend die nicht behandelten Zellen für 24 h ohne (1) bzw. mit (3) PUGNAc bzw. die mit dbcAMP behandelten Zellen nur mit dbcAMP (2) oder einer Kombination aus dbcAMP und PUGNAc (4) inkubiert. Die Zellhomogenate wurden in einem 8 %igen Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem RL2-Antikörper analysiert. Links ist der Molekulargewichtsstandard in 10^3 Dalton (kDa) angegeben und die Tabelle verdeutlicht die Behandlungszeiten.

P = PUGNAc; cAMP = dbcAMP

Gleiches galt auch für die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit PUGNAc und dbcAMP für 24 bzw. 48 h. In Abb. 20 ist beispielhaft für beide Behandlungen der Western Blot abgebildet, der die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen des Zellhomogenates nach 24stündiger Behandlung mit gleichzeitig PUGNAc und dbcAMP zeigt.

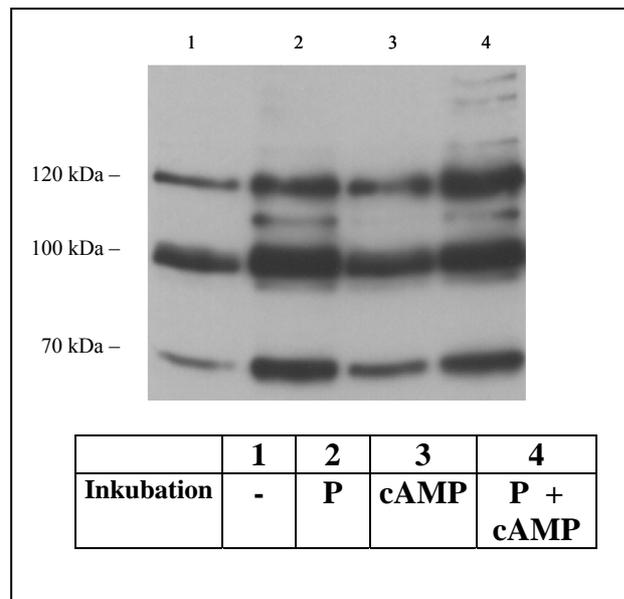


Abb. 20: *Einfluss von gleichzeitiger Behandlung mit dbcAMP und PUGNAc auf die O-GlcNAc-Expression von N2a-Zellen*

N2a-Zellen wurden ohne (1, 2) bzw. mit 1 mM dbcAMP (3, 4) für 24 h behandelt, wobei sowohl die nicht behandelten Zellen als auch die mit dbcAMP behandelten Zellen für die gleiche Zeit parallel ohne (1, 3) bzw. mit (2, 4) PUGNAc inkubiert wurden. Die Zellhomogenate wurden in einem 8 %igen Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem RL2-Antikörper analysiert.

Links ist der Molekulargewichts-standard in 10^3 Dalton (kDa) angegeben und die Tabelle verdeutlicht die Behandlungszeiten.

3.4.3 Einfluss der Behandlung mit PUGNAc (48 h) und dbcAMP (24 h) auf die O-GlcNAc-Modifikation der Cdk5

Nach Behandlung der Zellen mit PUGNAc für 24 h und anschließender Behandlung mit PUGNAc und dbcAMP wurde eine Immunpräzipitation mit dem C-8-Antikörper durchgeführt, an die sich ein SDS-PAGE und Western Blot mit dem RL2-Antikörper anschloss. Danach wurde der RL2-Antikörper vom Blot entfernt und mit dem C-8-Antikörper

inkubiert, um die immunpräzipitierte Cdk5-Menge feststellen zu können. Es zeigte sich, dass durch die verschiedenen Behandlungen kein Unterschied in der Stärke der O-GlcNAc-Modifikation der Cdk5 hervorgerufen wurde (siehe Abb. 21).

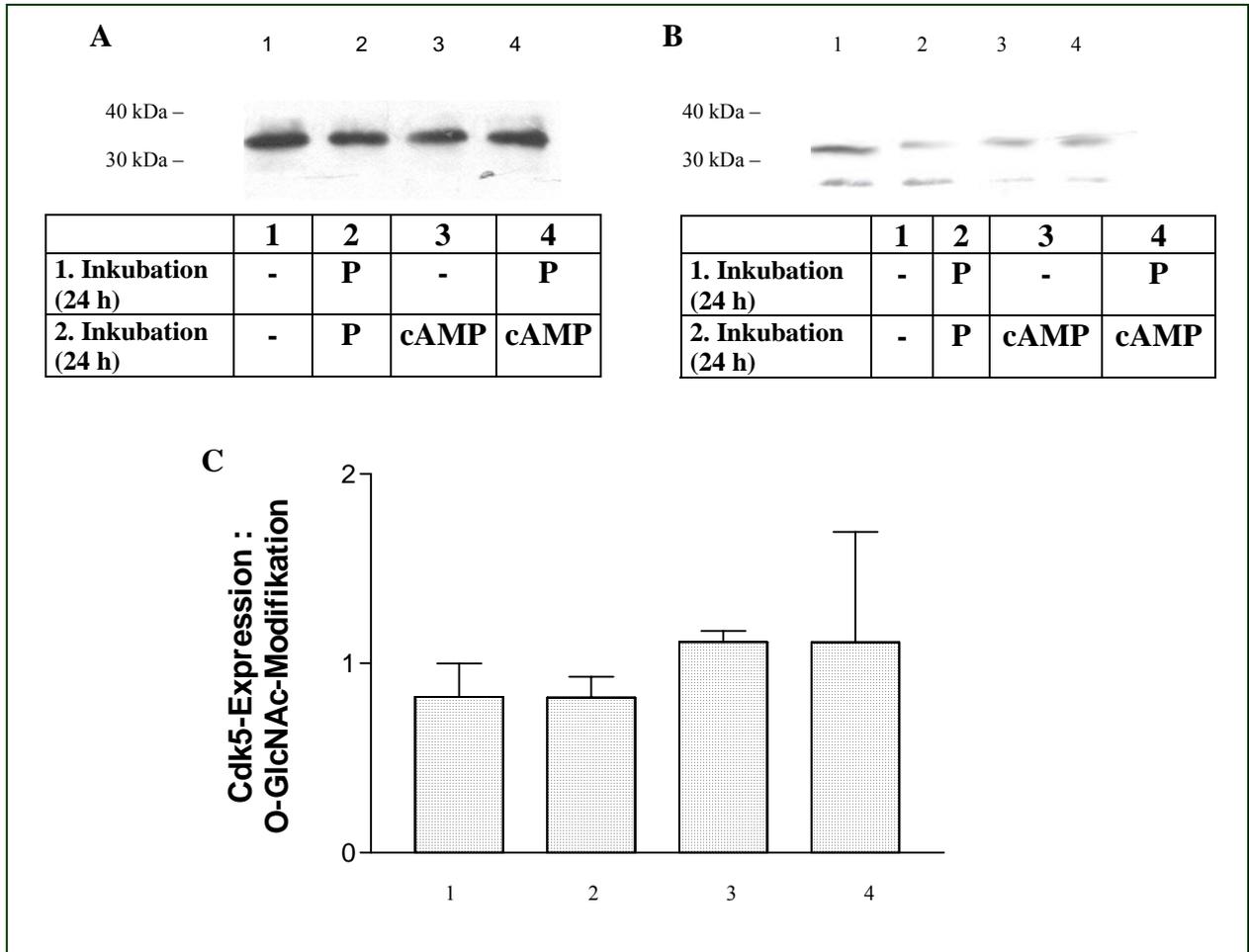


Abb. 21: Die O-GlcNAc-Modifikation wird durch die Behandlung mit PUGNAc in Kombination mit dbcAMP nicht beeinflusst

Nach Inkubation der Zellen für 24 h mit (2, 4) bzw. ohne 40 μ M PUGNAc (1, 3) wurden anschließend die nicht behandelten Zellen nochmals für 24 h ohne (1) bzw. mit (3) dbcAMP bzw. die mit PUGNAc behandelten Zellen nur mit PUGNAc (2) oder einer Kombination aus PUGNAc und dbcAMP (4) inkubiert. Eine Immunpräzipitation der Zellhomogenate wurde mit dem C-8-Antikörper durchgeführt, die Proteine im SDS-Gel aufgetrennt und ein Western Blot mit dem RL2-Antikörper (B) durchgeführt, um die immunpräzipitierte Menge der Cdk5 zu ermitteln. Nach Entfernung des RL2-Antikörpers wurde der Blot mit dem C-8-Antikörper (A) inkubiert und die ermittelte O-GlcNAc-Konzentration wurde mit der Cdk5-Expression ins Verhältnis gesetzt. Vier unabhängige Ergebnisse wurden quantitativ ausgewertet. Das Ergebnis ist in C dargestellt. Auf der x-Achse sind die Behandlungen aufgetragen und auf der y-Achse das Verhältnis Cdk5-Expression : O-GlcNAc-Modifikation.

Linkst ist der Molekulargewichtsmarker in 10^3 Dalton (kDa) angegeben und die Tabelle verdeutlicht die Behandlungszeiten.

P = PUGNAc; cAMP = dbcAMP

3.5. Expression der O-GlcNAc-Transferase

Zur Expression der OGT in *E. coli* musste die cDNA der OGT in den Expressionsvektor pQE30 eingebaut werden.

3.5.1 Restriktionsanalyse des pBlueskript II SK (+)-Vektors mit integrierter OGT (p110)-cDNA und des pQE30-Vektors

Der pBlueskript II SK (+)-Vektor mit integrierter OGT-cDNA wurde in einem Restriktionsansatz mit *Eco* RI verdaut (Ansatz 1). Da dieses Konstrukt drei *Eco* RI-Schnittstellen aufweist, ergaben sich durch den Verdau drei Fragmente mit der in Tab. 12 angegebenen Anzahl an Basenpaaren. Der Vektor pQE30 wurde mit *Bam* HI verdaut (Ansatz 2). Dadurch, dass nur eine *Bam* HI-Schnittstelle im Vektor vorlag wurde dieser linearisiert (siehe Tab. 12). Die Restriktionsansätze wurden im Agarosegel analysiert. Die durch die beiden Verdaue erhaltenen Fragmente entsprachen den erwarteten Fragmenten, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die cDNA der OGT in den pBlueskript II SK (+)-Vektor inseriert worden war.

Ansatz 1 (<i>Eco</i> RI):	2.523 Basenpaare
	2.188 Basenpaare
	3.849 Basenpaare
Ansatz 2 (<i>Bam</i> HI):	3.462 Basenpaare

Tab. 12: *cDNA Fragmente nach Restriktionsanalyse des pBlueskript II SK (+)-Vektor mit integrierter OGT (Ansatz 1) und des pQE30-Vektor (Ansatz 2)*
 Nachdem der pBlueskript II SK (+)-Vektor mit integrierter OGT-cDNA mit *Eco* RI (Ansatz 1) und der pQE30-Vektor mit *Bam* HI (Ansatz 2) verdaut worden waren, wurden die Restriktionsansätze im Agarosegel aufgetrennt. Für Ansatz 1 ergaben sich drei Fragmente mit unterschiedlicher Anzahl an Basenpaaren und für Ansatz 2 ein linearisiertes Produkt. Die erhaltenen Fragmente entsprachen jeweils den erwarteten Fragmenten.

3.5.2 Vermehrung der OGT-cDNA mittels PCR unter gleichzeitiger Einfügung einer Bam HI Schnittstelle

Die cDNA der OGT wurde mit Hilfe der DNA-Polymerase PWO amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass am 5'-Ende eine *Bam* HI Schnittstelle eingefügt wurde. Die OGT konnte erfolgreich amplifiziert werden (siehe Abb. 22).

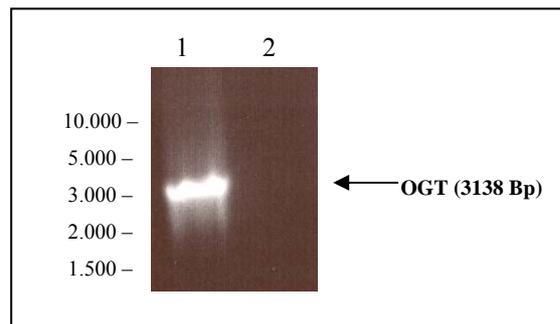


Abb. 22: **PCR-Produkt der cDNA der OGT**
Die cDNA wurde mit Hilfe der DNA-Polymerase PWO amplifiziert.
1 = cDNA der OGT nach PCR
2 = Negativkontrolle (PCR ohne cDNA durchgeführt)
Bp = Basenpaare

Die Sequenzanalyse ergab, dass keine Mutation in der cDNA der OGT vorlagen (Daten nicht gezeigt).

3.5.3 Restriktionsanalyse nach Einbau der OGT in den pQE30-Vektor

Sowohl die cDNA der OGT als auch die des pQE30-Vektors wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam* HI und *Hind* III verdaut. Die erhaltenen Fragmente wurden anschließend ligiert. Das durch eine Mini-Präparation vermehrte Konstrukt wurde mit *Eco* RI verdaut. Da zwei *Eco* RI Schnittstellen in der pQE30-OGT cDNA vorlagen, ergaben sich zwei Fragmente mit unterschiedlicher Anzahl an Basenpaaren (siehe Tab. 13).

Ansatz (<i>Eco</i> RI):	1.919 Basenpaare
	4.663 Basenpaare

Tab. 13: *cDNA Fragmente nach Restriktionsanalyse von OGT-pQE30-cDNA mit Eco RI.*
Nachdem die OGT-pQE30-cDNA mit Eco RI verdaut worden war, wurden der Restriktionsansatz im Agarosegel analysiert. Es ergaben sich zwei Fragmente mit unterschiedlicher Anzahl an Basenpaaren. Die erhaltenen Fragmente entsprachen jeweils den erwarteten Fragmenten.

Abbildung 23 gibt das Konstrukt nach Einbau der cDNA der OGT in den pQE30-Vektor wieder.

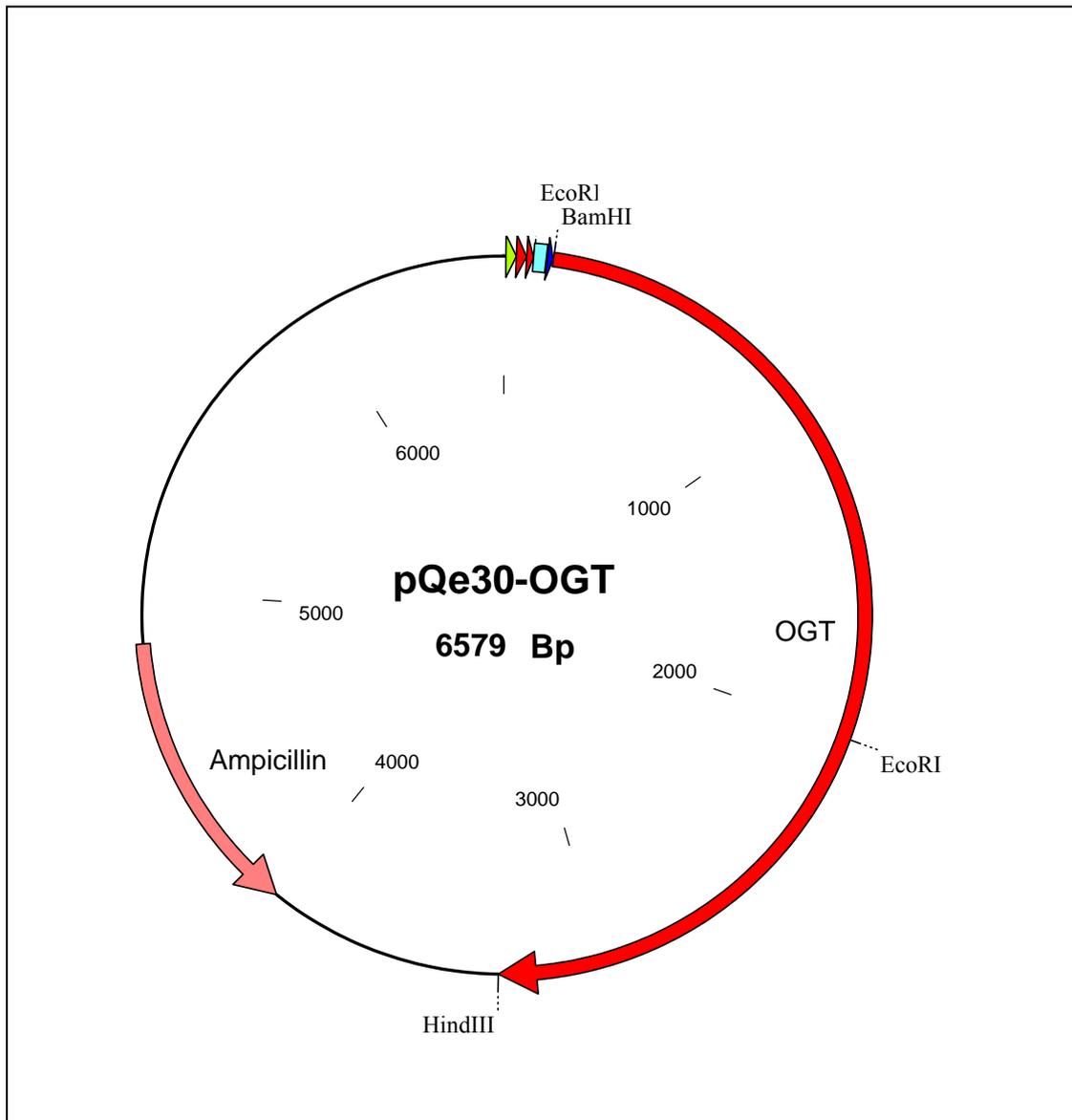


Abb. 23: *Schematische Darstellung des pQE30-OGT-cDNA Konstrukts nach der Klonierung mit Bam HI und Hind III*

Die cDNA der OGT (dunkelroter Pfeil) wurde mit Bam HI und Hind III in die multiple Klonierungsstelle des pQE30-Vektors, der eine Ampicillinresistenz besitzt (hellroter Pfeil) kloniert. Am 5'-Ende der cDNA der OGT befindet sich das His-Tag (dunkelblau). Vor dem His-Tag befindet sich die Ribosomenbindungsstelle (RBS, hellblau). Das Lactose-Operator-Element wird durch die roten Pfeile vor der RBS charakterisiert. Vor dem Lactose-Operator-Element befindet sich der T5 Promotor (hellgrün). Außerdem sind die Schnittstellen der Restriktionsenzyme Eco RI, Hind III und Bam HI eingezeichnet (gestrichelte schwarze Linien). Das gesamte Konstrukt umfasst 6579 Basenpaare (Bp).

3.5.4 Aufreinigung der rekombinanten OGT unter denaturierenden Bedingungen

Die Expression der OGT im Bakterienstamm *E. coli* XL1-Blue konnte unter dem Einfluss von 1 mM IPTG induziert werden, nachdem die Bakterien eine $OD_{600} = 0,6$ erreicht hatten. Nach Lyse der Bakterien mit Guanidinhydrochlorid und Proteinaufreinigung unter denaturierenden Bedingungen über eine Ni-NTA-Säule konnte die O-GlcNAc-Transferase in den Elutionsfraktionen D1-D3 und E1-E3 (siehe Abb. 24A) nachgewiesen werden. Im Durchlauf nach Auftragen des Lysates auf die Säule waren eine Vielzahl von Proteinen nachweisbar, die nicht an die Säule gebunden hatten (siehe Abb. 24A). Mit dem ersten Waschschrift (W1 siehe Abb. 24A) konnten nichtgebundene Proteine von der Säule gewaschen werden, so dass im zweiten Waschschrift (W2 siehe Abb. 24A) keine Proteine mehr nachweisbar waren. Eine weitere Konzentrierung der Elutionsfraktionen erfolgte mittels Zentrifugentröhrchen (siehe Abb. 24B). Für den OGT-Assay wurden jeweils 3 μg Enzym für einen Versuch eingesetzt (siehe 3.6.2).

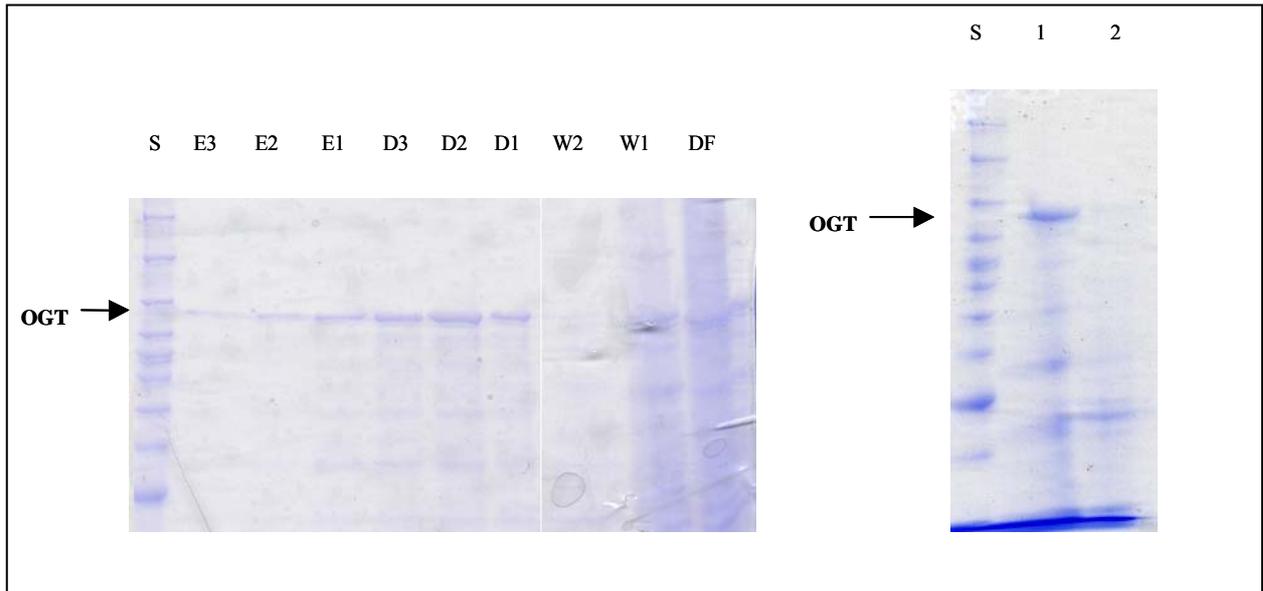


Abb. 24A: Aufreinigung der OGT über eine Ni-NTA-Säule unter denaturierenden Bedingungen

Das gewonnene Lysat wurde auf die Ni-NTA-Säule gegeben und der Durchlauf (DF) aufgefangen. Die Waschschrte W1 und W2 mit Puffer B bzw. Puffer C eliminierten die Proteine von der Säule, die nicht an das Ni-NTA gebunden hatten. Mitt Puffer D (D1-D3) und Puffer E (E1-E3) wurde die OGT von der Säule eluiert. Die verschiedenen Fraktionen wurde in einem Coomassiegel analysiert. Links ist der Molekulargewichtsstandard (S) in 10^3 Dalton (kDa) angegeben.

Abb. 24B: Analyse der eluierten Fraktionen

Die Fraktionen D1-D3 und E1-E3 wurden vereint und nach Konzentrierung der Lösung im Coomassiegel analysiert.

1 = aufkonzentrierte Probe; 2 = Überstand nach Aufkonzentrierung

3.6. Aufreinigung der rekombinanten O-GlcNAc-Transferase unter nativen Bedingungen

3.6.1 Wachstum der Zellen in LB-Medium und Aufreinigung unter nativen Bedingungen

Die OGT-Expression im *E. coli* Stamm XL1-Blue wurde durch die Zugabe von 1 mM IPTG induziert, nachdem die Bakterien eine $OD_{600} = 0,6$ erreicht hatten. Die OGT befand sich nach

Lyse der Bakterien mit Lysozym und Ultraschallbehandlung nur in geringen Mengen im Lysat.

Eine Aufreinigung des Enzyms über die Ni-NTA-Säule war nicht erfolgreich. Wie aus Abbildung 25 ersichtlich ist, befand sich die OGT nicht im Eluat, sondern im Durchlauf und in den Lösungen der Waschschritte (siehe Abb. 25). Im zweiten Waschschritt (WW siehe Abb. 25) befinden sich keine Proteine mehr.

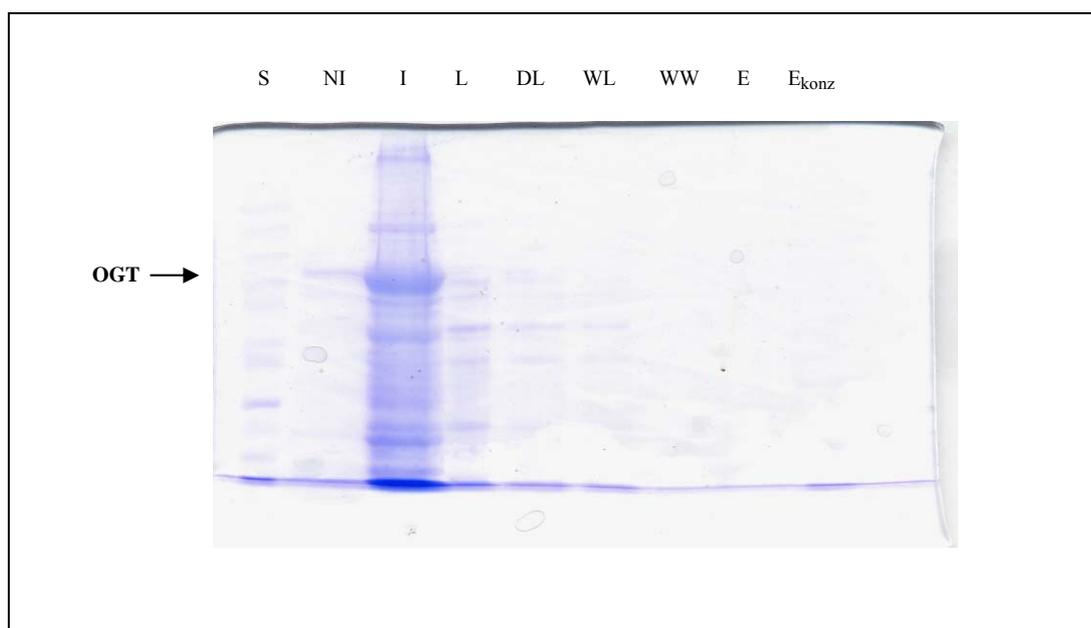


Abb. 25: *Versuch zur Aufreinigung der OGT über die Ni-NTA-Säule unter nativen Bedingungen*

Mit der cDNA der OGT transfizierte *E. coli*-Bakterien, wurden mit IPTG induziert (NI = nicht induziert; I = induziert). Die Lyse mit Lysozym und Ultraschall (L) setzte eine Reihe von Proteinen frei, die sich jedoch zum größten Teil im Durchlauf (DL) bzw. im ersten Waschschritt (WL) wiederfanden. Im zweiten Waschschritt (WW) sowie im Eluat (E) und im konzentrierten Eluat (E_{konz}) waren keine Proteine nachzuweisen. Links ist der Molekulargewichtsstandard (S) in 10^3 Dalton (kDa) angegeben.

Um die Aktivität der im Lysat befindlichen OGT zu prüfen, wurde ein OGT-Assay mit dem Lysat als Enzymquelle durchgeführt (siehe 3.7.3).

3.6.2 Wachstum der Bakterien unter Salzstress und in Gegenwart von Ectoin

Die Expression der OGT in *E. coli* XL1-Blue, die unter Salzstress (4 % NaCl) und in Gegenwart von 2 mM Ectoin nach ca. 48 h eine $OD_{600} = 0,6$ erreicht hatten, wurden mit 1 mM IPTG für 5 h induziert. Nach Lyse der Bakterien mit 1 mM Gadoliniumchlorid, das auf Grund von Inaktivierung der chemosensitiven K^+ -Kanäle die Bakterien osmotisch lysieren soll, konnten keine Proteine im Lysat festgestellt werden (siehe Abb. 26). Folglich wurde auch keine Aufreinigung der OGT über die Ni-NTA-Säule durchgeführt.

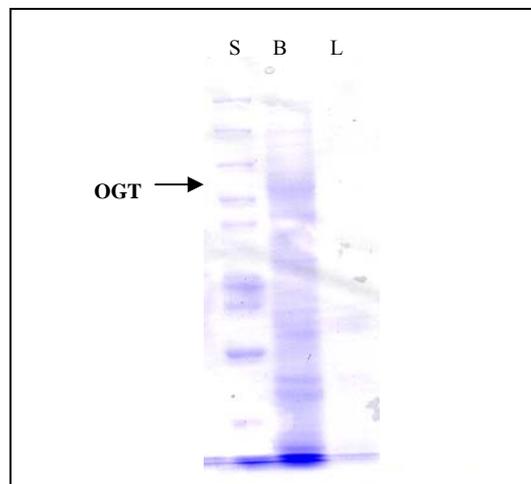


Abb. 26: *Versuch zur Expression der OGT unter Salzstress und der Lyse der mit der cDNA von OGT transfizierten Bakterien mit Gadoliniumchlorid*
Nachdem die Bakterien mit IPTG induziert worden waren (B) wurde ein Lysat (L) mit 1mM Gadoliniumchlorid angefertigt. Die Lyse war jedoch nicht erfolgreich. Links ist der Molekulargewichtsmarker (S) in 10^3 Dalton (kDa) angegeben.

3.7. OGT-Assay

3.7.1 OGT-Assay mit Retikulozytenmembranen

Der OGT-Assay wurde wie von *Haltiwanger et al.* beschrieben mit aufgereinigten Retikulozytenmembranen, die eine Quelle für die OGT darstellen, durchgeführt (*Haltiwanger et al. 1990*). Das durch Übertragung von ^{14}C -markiertem GlcNAc radioaktiv markierte O-GlcNAc modifizierte Peptid (siehe 2.2.4.9) wird über eine C18-Säule aufgereinigt. Der gesamte Versuchsansatz wurde auf die Säule aufgetragen, das ungebundene, radioaktive GlcNAc entfernt und das O-GlcNAc modifizierte Peptid anschließend von der Säule eluiert. Die Radioaktivität der einzelnen Waschschriffe, sowie die der Elutionsschritte von den mitgeführten Kontrollen (Ansatz ohne Enzym bzw. ohne zu modifizierendem Peptid) und von der Probe, wurde im Scintillationszähler gemessen. Als Substrat wurde das Peptid der CK II eingesetzt, da dies laut *Hanover* ein sehr gutes Substrat der OGT darstellt (*Hanover, 2001*).

Die meiste Radioaktivität befand sich im ersten Waschschriff der Kontrollinkubationen und des Versuchsansatzes. Auch im zweiten Waschschriff konnte Radioaktivität gemessen werden. Im Elutionsschriff war sowohl bei den Kontrollversuchen als auch bei der Probe fast keine Radioaktivität mehr messbar. Die Radioaktivität der Probe unterschied sich in keiner Weise von der der Kontrollen (siehe Tab. 14). Dies lässt darauf schließen, dass das Enzym in den Retikulozytenmembranen nicht funktionsfähig war.

	Waschschriff 1	Waschschriff 2	Elution
Kontrolle 1 (ohne Enzym)	10665 cpm	354 cpm	95 cpm
Kontrolle 2 (ohne Peptid (CK II))	10861 cpm	385 cpm	157 cpm
Versuch	10571 cpm	362 cpm	135 cpm

Tab. 14: *OGT-Assay mit Retikulozytenmembranen.*

Nach Durchführung des OGT-Assays mit Retikulozytenmembranen, wurden der Versuchsansatz und die Kontrollen jeweils über eine C18-Säule aufgereinigt. Dabei sollte sich im Elutionsschriff das radioaktiv-markierte Caseinkinase II (CK II) Peptid befinden. Die meiste Radioaktivität befand sich jedoch in den Waschschriffen und nicht in der Elution.

cpm = counts pro Minute

4. Diskussion

4.1 Langzeitbehandlung der N2a-Zellen mit PUGNAc

Shafi et al. konnten zeigen, dass embryonalen Mausstammzellen durch einen *knock out* der OGT nicht mehr überlebensfähig waren (*Shafi et al., 2000*). Somit scheint die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen eine lebenswichtige Funktion zu erfüllen. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass in Gehirnen von AD-Patienten erhöhte O-GlcNAc-Spiegel vorliegen (*Griffith et al., 1995*). In dieser Arbeit war es nun von Interesse, die Wirkung einer langfristig erhöhten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen auf die Überlebensfähigkeit von N2a-Zellen zu untersuchen.

Hierzu wurden die Zellen mit PUGNAc, einem OGH-Hemmer, über einen Zeitraum von 14 Tagen behandelt. Hierbei war auszuschließen, dass PUGNAc in der eingesetzten Konzentration von 40 μ M toxisch ist (*Haltiwanger et al., 1998*). Diese langfristige Behandlung mit PUGNAc hatte jedoch keinen Einfluss auf die Überlebensrate der Zellen. Allerdings war zu beobachten, dass die Proliferation bei den mit PUGNAc-behandelten Zellen schwächer ausfiel, als bei den nicht mit PUGNAc behandelten.

Diese letztere Beobachtung stimmt mit der von *Haltiwanger und Philipsberg* überein, die feststellten, dass durch die Behandlung von humanen Colonzellen HT29 mit Nocodazol, einem Mikrotubuli-destabilisierendem Agens, welches Zellen in der G₂/M-Interphase arretiert und somit den Zellteilungszyklus anhält, die O-GlcNAc-Modifikation von Keratin 18 anstieg. Die verstärkte O-GlcNAc-Modifikation des Keratins 18 war jedoch nicht auf eine verstärkte Aktivität der OGT bzw. verringerte Aktivität der OGH zurückzuführen. Außerdem war keine generell verstärkte O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen zu beobachten, so dass die Wirkung des Nocodazols nur für das Keratin 18 spezifisch war (*Haltiwanger und Philipsberg, 1997*). *Chou und Omary* konnten einige Jahre zuvor feststellen, dass die O-GlcNAc-Modifikation von Keratin 18 und die Phosphorylierung von Keratin 8 eine Rolle beim mitotischen Arrest spielen. Eine erhöhte O-GlcNAc-Modifikation von Keratin 18 bzw. eine erhöhte Phosphorylierung von Keratin 8 zeigte sich bei humanen Colonzellen HT29 in der G₂/M Interphase (*Chou und Omary, 1993*). Somit könnte es sein, dass eine Behandlung der Zellen mit PUGNAc zu einer verstärkten O-GlcNAc-Modifikation des Keratin 18 führt, wodurch die Zellen ebenfalls in der G₂/M-Interphase gehalten werden würden. Die verringerte Proliferation bei langfristiger Behandlung mit PUGNAc wäre dadurch erklärbar.

Um diese Annahme jedoch bestätigt zu wissen, müsste überprüft werden, ob durch die langfristige Behandlung der Zellen mit PUGNAc Keratin 18 tatsächlich verstärkt O-GlcNAc-modifiziert vorliegt.

Obwohl keine Veränderungen in der Überlebensfähigkeit bzw. in der Morphologie von N2a-Zellen zu erkennen waren, ist nicht auszuschließen, dass der Stoffwechsel der Zellen durch die langanhaltend hohe O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen verändert ist. So konnte eine O-GlcNAc-Modifikation schon an vielen Proteinen nachgewiesen werden, welche alle Phosphoproteine darstellen und Regulatoren des Stoffwechsels, wie z.B. Rezeptoren, Enzyme, Transkriptionsfaktoren etc., sind (*Wells und Hart, 2003*). Eine Erhöhung der O-GlcNAc-Modifikation hätte laut „*Yin-Yang*“-Hypothese eine Abnahme der Phosphorylierung zur Folge, die eine wichtige Funktion bei der Regulation von Proteinen und Signaltransduktionen spielt. Die „*Yin-Yang*“-Hypothese konnte bereits von *Griffith und Schmitz* mit Hilfe von Phosphataseinhibitoren bzw. -aktivatoren bestätigt werden (*Griffith und Schmitz, 1999*). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die O-GlcNAc-Modifikation, ähnlich wie die Phosphorylierung, regulatorische Funktion hat. Eine Dysregulation oder Dysfunktion der betroffenen Proteine wäre möglich und würde den Stoffwechsel der Zellen nachhaltig beeinflussen. Da die AD durch eine sich langsam entwickelnde Neuronendegeneration gekennzeichnet ist und die Zellen in den Anfangsstadien der Krankheit eine mögliche Dysregulation noch kompensieren könnten, müssten N2a-Zellen eventuell über noch längere Zeit in Kultur gehalten und mit PUGNAc behandelt werden, um Effekte beobachten zu können. Morphologische Abweichungen bzw. Veränderungen in der Zellüberlebensfähigkeit könnten dann z.B. festgestellt werden, wenn ein Zusammenhang zwischen dem bei der AD beobachteten Zelltod und der nachgewiesenen erhöhten O-GlcNAc-Modifikation besteht. So wurde bereits ein Zusammenhang zwischen erhöhten O-GlcNAc-Konzentrationen und einer einhergehenden verringerten Akt-Aktivität beschrieben. Akt ist ein Enzym welches anti-apoptotische Funktion besitzt. Durch eine erhöhte O-GlcNAc-Modifikation könnten somit die anti-apoptotischen Prozesse herunterreguliert werden, und es würde zu einer verstärkten Apoptose der Zellen kommen (*Wells et al. 2003*).

4.2 Untersuchung zur O-GlcNAc-Expression im Zellkern nach Behandlung mit PUGNAc und dbcAMP

Im Gegensatz zu *Rex-Mathes et al.*, die durch eine 24stündige PUGNAc-Behandlung von Kleinhirnneuronen einen Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation von vor allen Dingen den Kernproteinen beobachten konnten, war durch indirekte Immunfluoreszenzfärbung von N2a-Zellen nach Behandlung mit PUGNAc für 24 h keine Verstärkung der O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zu den Kontrollversuchen zu erkennen (*Rex-Mathes et al.*, 2001). Dies traf auch zu für Zellen, die erst 24 h mit PUGNAc und anschließend für 24 h mit PUGNAc und dbcAMP behandelt wurden. Da jedoch im Western Blot ein Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation zu erkennen war (siehe Abb. 18B), scheint in diesem Fall die Methode der Immunfluoreszenzfärbung nicht geeignet zu sein, um den Unterschied sichtbar zu machen.

Es zeigte sich außerdem, dass durch die Behandlung der Zellen mit dbcAMP in Verbindung mit bzw. ohne PUGNAc ein Rückgang der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen des Zellkerns zu beobachten war (siehe Abb. 7), d.h. durch dbcAMP scheint die O-GlcNAc-Modifikation von Kernproteinen abzunehmen. Im Gegensatz dazu war jedoch im Western Blot, durch die Behandlung der Zellen mit PUGNAc und dbcAMP ein Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen zu verzeichnen, der noch stärker ausfiel, als der, der durch die Behandlung mit PUGNAc allein erzielt worden war (siehe Abb. 18B). Diese konträren Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass in den hergestellten Homogenaten die Kernfraktion nicht enthalten war, und sich somit nur eine Veränderung der O-GlcNAc-Modifikation von den Proteinen zeigte, die nicht kernspezifisch sind. Es müsste eine Kernfraktionierung nach Behandlung und Homogenisierung der Zellen durchgeführt werden, um den in der Immunfluoreszenzfärbung beobachteten Rückgang der O-GlcNAc-Modifikation von Kernproteinen auch im Western Blot sichtbar zu machen.

Die verringerte Kernfärbung der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen nach dbcAMP-Behandlung könnte darauf zurückzuführen sein, dass dbcAMP ein PKA-Aktivator ist und somit die Phosphorylierung von Proteinen erhöht, wodurch die Modifikation der Kernproteine mit O-GlcNAc verringert werden könnte. Dass die Behandlung mit dbcAMP zu einer Reduktion der O-GlcNAc-Modifikation führt, konnten *Griffith und Schmitz* schon in der *dicf* von Kleinhirnneuronen nach 3stündiger Behandlung mit 2,5 mM dbcAMP nachweisen (*Griffith und Schmitz*, 1999). Eine weitere Bestätigung der beobachteten Ergebnisse wird durch die Studie von *Han und Kudlow* gegeben. Sie konnten eine verringerte O-

Glykosylierung des Transkriptionsfaktors Sp1 durch erhöhte cAMP-Spiegel feststellen. Dies führten sie auf ein Ungleichgewicht zwischen der O-GlcNAc-Hydrolase- und der O-GlcNAc-Transferase-Aktivität zurück, das durch den Anstieg der cAMP-Konzentration verursacht werden könnte (*Han und Kudlow, 1997*). Inwiefern die PKA an dieser Aktivitätsveränderung der beiden Enzyme beteiligt war, wurde in dieser Studie nicht untersucht. Da jedoch viele Kernproteine von der PKA phosphoryliert werden, die ebenso O-GlcNAc-modifiziert sein können (z.B. CREB), könnte durch eine verstärkte Aktivität der PKA eine verringerte O-GlcNAc-Modifikation von Kernproteinen die Folge sein.

Die Beobachtung, dass durch 48stündige PUGNAc- und 24stündige dbcAMP-Behandlung die Kerne ebenfalls weniger O-GlcNAc-modifizierte Proteine aufweisen, ist damit zu erklären, dass der Einfluss der dbcAMP-Behandlung auf die Kernproteine stärker ist, als der Einfluss der PUGNAc-Behandlung.

4.3. Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf die APP-Prozessierung

4.3.1 Auswirkungen der PUGNAc- und PMA-Behandlung auf die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern die O-GlcNAc-Modifikation an der Prozessierung des APP beteiligt ist. Da gezeigt wurde, dass bei Alzheimer Patienten erhöhte O-GlcNAc-Modifikationen im Gehirn in der *dicf* der durch AD betroffenen Regionen zu finden sind (*Griffith und Schmitz, 1995*), könnte angenommen werden, dass die vermehrte Modifikation von Proteinen mit O-GlcNAc die Entstehung der AD begünstigen könnte.

Zunächst musste jedoch nachgewiesen werden, dass die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen des Zellhomogenates durch eine einstündige Behandlung mit PUGNAc zunimmt, bzw. durch eine PMA-Behandlung abnimmt. Dies wurde mit Hilfe des RL2-Antikörpers im Western Blot durchgeführt. Die Behandlung wurde für eine Stunde angesetzt, da Signaltransduktionswege sehr schnell ablaufen, und die zu erwartenden Effekte, die durch die Behandlungen ausgelöst werden, demnach auch sehr schnell sichtbar sein sollten.

Ähnlich wie *Haltiwanger et al.* es an HT29-Zellen nach 2 h Behandlungszeit gezeigt hatten, konnte bereits nach 1 h ein leichter Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation an Proteinen des Zellhomogenates durch eine Behandlung mit 40 μ M PUGNAc beobachtet werden. Es ist daher anzunehmen, dass durch die verstärkte O-GlcNAc-Modifikation ein Rückgang der Phosphorylierung stattfindet, welches von *Haltiwanger et al.* für HT29-Zellen bestätigt werden konnte (*Haltiwanger et al.*, 1998). Dieser oben erwähnte Unterschied zeigte sich auch nach Analysen der *dsf* und *dicf* bezüglich der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen der jeweiligen Fraktion.

Die Konzentration des bei der Behandlung verwendeten PMA wurde auf 2 μ M festgelegt, da sich in Studien bestätigt hatte, dass bei kürzeren Behandlungszeiten eine höhere Konzentration an PMA eingesetzt werden muss, um einen ähnlichen Effekt hervorzurufen, wie nach längerfristiger Behandlung mit geringeren Konzentrationen (80 nM) an PMA. Längere Inkubation (15-24 h) mit hohen Konzentrationen an PMA können zu einer Inaktivierung der PKC führen, und damit einen umgekehrten Effekt auslösen (*Jolly-Tornetta und Wolf*, 2000). Ähnliche Ergebnisse konnten auch mit Proteasomen-Inhibitoren gezeigt werden, die bei kurzen Behandlungsdauern (bis zu 5 h) einen Anstieg der APPs α Sekretion verursachten, hingegen nach längeren Behandlungszeiten (15-20 h) einen Rückgang der Sekretion bewirkten (*Marambaud et al.*, 1996).

In dieser Arbeit konnte nach einer einstündigen PMA-Behandlung kein Rückgang der O-GlcNAc-Modifikation im Zellhomogenat verzeichnet werden. Auch die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen der *dsf* und *dicf* unterschied sich nach Behandlung der Zellen mit PMA nicht von der der unbehandelten Zellen. Dies stimmt nicht mit den Beobachtungen von *Griffith und Schmitz* überein, die nach 3stündiger Behandlung der Zellen mit 80 nM PMA eine Verminderung der O-GlcNAc-Modifikation in der *dicf* beobachtet hatten (*Griffith und Schmitz.*, 1999). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass es sich um ein anderes Zellsystem, nämlich Kleinhirnneurone handelte, die durchaus anders auf PMA reagieren könnten als N2a-Zellen. Jedoch kann ausgeschlossen werden, dass N2a-Zellen gar nicht auf PMA reagieren. So wurden diese Zellen für Studien des Dopamintransporters 30 Minuten mit 1 μ M PMA behandelt, wonach eine verstärkte Aktivität festgestellt werden konnte, die zu einer verstärkten Internalisierung des Rezeptors führte und damit die Aufnahme von Dopamin um bis zu 50 % senkte (*Granás et al.*, 2003). Die O-GlcNAc-Modifikation spielte in dieser Studie allerdings keine Rolle. Außerdem konnte *Ulrich Gollner (Dissertation, 2001)* durch die Behandlung von N2a-Zellen mit 80 nM PMA für 15 h einen Rückgang der O-GlcNAc-

Modifikation von Proteinen beobachten. Daher wäre eine weitere Erklärung für die unveränderte Stärke der O-GlcNAc-Modifikation nach 1stündiger Behandlung der N2a-Zellen mit PMA, dass nach 1 h die Unterschiede geringer sind als nach 15 h und somit nicht nachzuweisen waren.

4.3.2 Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf das Prozessieren von APP in N2a-Zellen

Von anderen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der PKC durch PMA die Entstehung von A β und damit den amyloidogenen Weg hemmen kann. Außerdem wird durch PMA-Behandlung die α -Sekretase stimuliert, so dass vermehrt APPs α sezerniert wird (*Buxbaum et al., 1993; Jacobsen et al., 1994*). Die α -Sekretase-Aktivität scheint hierbei indirekt oder direkt durch Phosphorylierung beeinflusst zu werden, jedoch konnte von *Jacobsen et al.* bewiesen werden, dass eine verstärkte Spaltung durch die α -Sekretase auf Grund einer Phosphorylierung des APP dabei auszuschließen ist (*Jacobsen et al., 1994*). *Lammich et al.* konnten feststellen, dass die ADAM10, die eine der möglichen α -Sekretasen in Neuronen darstellt, durch PMA-Behandlung aktiviert wird (*Lammich et al., 1999*).

Die genannten Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen konnten in dieser Arbeit durch Behandlungen von N2a-Zellen für 1 h mit PMA zunächst nicht bestätigt werden. Bei APPwt-exprimierenden N2a-Zellen nahm das durch den 8E5-Antikörper detektierbare gesamte APPs zu (siehe Abb. 9A). Hierzu zählen sowohl APPs α als auch APPs β . Da kein signifikanter Anstieg des APPs α mit Hilfe des W02-Antikörpers nachgewiesen werden konnte, musste zunächst davon ausgegangen werden, dass es sich bei der erhöhten APPs-Menge im Medium um eine vermehrte Sekretion des APPs β handelte. Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass der Anstieg des sekretierten APPs auf eine erhöhte APP-Expression zurückzuführen ist (siehe Abb. 8A).

Bei den N2a-Zellen, die mit der schwedischen Mutante von APP (APP^{sw}) transfiziert worden waren, ergab sich nach 1stündiger Behandlung mit PMA sowohl ein leichter Anstieg des gesamten APPs, als auch des APPs α (siehe Abb. 10A), der jedoch nicht signifikant war. Diese Ergebnisse stimmen von der Tendenz her mit den Ergebnissen überein, die *Ulrich Gollner* aus unserer Arbeitsgruppe nach Behandlungen der Zellen mit 80 nM PMA für 15 h erhalten hatte (*Dissertation 2001*). Obwohl der Anstieg des APPs α in dieser Arbeit nicht

signifikant ist, ist jedoch nicht davon auszugehen, dass PMA keinen Effekt auf die Sekretion des A β hat. So konnten *Savage et al.* durch PMA-Injektionen in Mäusegehirne zwar eine verringerte Sekretion des A β feststellen, jedoch keinen Anstieg der APPs α -Sekretion (*Savage et al.* 1998). Ähnlich wie bei den mit APPwt-transfizierten N2a-Zellen ist bei der schwedischen Mutanten die leichte Zunahme der sekretierten APPs-Menge nicht auf einen erhöhte APP-Expression zurückzuführen (siehe Abb. 8A).

Eine mögliche Erklärung dafür, dass die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden konnten ist, dass N2a-Zellen vermehrt N-terminal verkürzte A β -Formen produzieren (*Wang et al.*, 1996). Das würde bedeuten, dass sich die β -Sekretasestelle um ca. 2 bis 11 Aminosäuren zum C-Terminus verschiebt, wodurch APPs β verlängert werden würde und somit ebenfalls durch den W02-Antikörper detektiert werden könnte, da dieser die Aminosäuren 4-7 am N-Terminus des A β erkennt (siehe Abb. 12). Die Ergebnisse lassen sich nicht eindeutig interpretieren, weil beide Antikörper mehrere Formen des APPs erkennen. Da die verkürzten A β -Formen 2-42, 3-40/42, 5-40/42 und 11-40/42 auch verstärkt in den Gehirnen von Alzheimer Patienten bzw. in Zellkulturen verstärkt im Medium nachgewiesen wurden, werden sie in dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuch eine ebenfalls nicht unerhebliche Menge des gesamten A β ausmachen (*Huse et al.*, 2002; *Wiltfang et al.*, 2001; *Cescato et al.*, 2000). Demnach ist anzunehmen, dass eine ebenfalls nicht geringe Menge an verlängertem APPs β gebildet wird, welche vom W02-Antikörper detektiert werden würde, wodurch die Ergebnisse verfälscht werden könnten. Da die β -Sekretase der Maus jedoch das humane APP an der Glu11 Stelle nicht schneidet, spielt das A β 11-40/42 in diesen Versuche keine Rolle, sondern nur solche Formen die nicht mit Glu11 beginnen (siehe auch 4.5).

Auch bei den Ergebnissen, die durch die PUGNAc-Behandlung erzielt wurden, ergab sich das Problem der Differenzierung zwischen den unterschiedlichen APPs-Formen. Die Beobachtungen von *Griffith und Schmitz*, dass die O-GlcNAc-Modifikation in Kleinhirnneuronen sich reziprok zur Phosphorylierung von Proteinen verhält, lassen die Möglichkeit zu, dass sich eine Verstärkung der O-GlcNAc-Modifikation an Proteinen auf das Prozessieren des APP auswirkt (*Griffith und Schmitz*, 1999). Durch Behandlung der Zellen mit PUGNAc konnte sowohl bei den mit APPwt-transfizierten als auch bei den APPsw-transfizierten N2a-Zellen kein Anstieg im 8E5-Antikörper-Signal bzw. im W02-Antikörper-Signal für das APPs verzeichnet werden, (siehe 9B und 10B). Jedoch muss man auch hier davon ausgehen, dass der W02-Antikörper nicht spezifisch das APPs α sondern auch verlängertes APPs β erkennt und deswegen auch hier keine eindeutige Aussage über das

Prozessieren des APP getroffen werden kann. Die Ergebnisse, die durch die PUGNAc-Behandlung der mit APPsw-transfizierten N2a-Zellen erzielt worden waren, waren auch hier von der Tendenz her identisch mit denen von *Ulrich Gollner (Dissertation, 2001)*, der die Zellen für 15 h mit 40 μ M PUGNAc behandelt hatte. Auch dieser hatte eine leichte Zunahme der APPs-Fraktionen beobachten können, die durch den W02- und 8E5-Antikörper detektiert werden konnten.

Wichtig war es daher zu analysieren, ob unter PUGNAc bzw. PMA die N-terminal verkürzten A β -Formen vermehrt oder vermindert gebildet werden, da N-terminal verkürzte A β -Formen eine große Rolle bei der Entstehung der AD zu spielen scheinen. Sie neigen noch stärker zur Aggregation bzw. sind auch neurotoxischer als A β 1-40 bzw. A β 1-42 (*Liu et al., 2002b; Pike et al., 1995*). Um zu klären, ob unter PUGNAc bzw. PMA eine Veränderung der Sekretion von N-terminal verkürzten A β -Formen zu beobachten ist, wurde ein *In situ*-Sandwich-ELISA durchgeführt.

Bei den APPwt-exprimierenden N2a-Zellen war unter PMA eine Abnahme der N-terminal verkürzten A β Formen zu verzeichnen, da die Reaktivität mit dem 4G8-Antikörper abnahm, nicht aber die mit dem W02-Antikörper (siehe Abb. 13A). Dies lässt auf einen Rückgang des verlängerten APPs β jedoch auch des p3 schließen. Deshalb ist anzunehmen, dass der Anstieg der gesamten APPs-Formen auf einen Anstieg des APPs α zurückzuführen ist, der sich jedoch im Western Blot mit Hilfe des W02-Antikörpers nicht feststellen ließ. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Anstieg nicht ersichtlich wurde, weil sich nur das Verhältnis des APPs α zu verlängertem APPs β verschoben hat, die Gesamtmenge von APPs α und APPs β , die durch den W02-Antikörper detektiert wurde, jedoch gleich blieb. Wäre dies der Fall, so könnte man davon ausgehen, dass die verringerte 4G8-Reaktivität eine Abnahme der verkürzten A β -Formen anzeigt und nicht auf eine reduzierte p3-Menge zurückzuführen ist.

Die PMA-Behandlung verringerte bei den APPsw-exprimierenden N2a-Zellen die Menge des sekretierten nicht N-terminal verkürzten A β (siehe Abb. 13D). Dies lässt darauf schließen, dass auch das APPs β verringert sezerniert wird und damit der leichte Anstieg der sekretierten APPs-Formen auf einen Anstieg des APPs α zurückzuführen ist. Dies würde mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen übereinstimmen (*Buxbaum et al., 1993; Jacobsen et al., 1994*).

Zusammengenommen würde dies bedeuten, dass unter PMA sowohl für APPwt-exprimierende als auch für APPsw-exprimierende N2a-Zellen die Sekretion von APPs α

zunimmt und gleichzeitig die Sekretion von A β abnimmt. Bei den APP^{sw}-exprimierenden N2a-Zellen bezieht sich dies auf die nicht-verkürzten A β -Formen und damit auch auf das nicht verlängerte APPs β , bei den APP^{wt}-exprimierenden Zellen hingegen auf die verkürzten A β -Formen und das verlängerte APPs β . Ein Grund für diesen Unterschied könnte sein, dass durch die Mutation an der β -Sekretase-Stelle bei der schwedischen Mutante nur die nicht verkürzten A β -Formen verstärkt gebildet werden und sich dadurch Schwankungen in der Sekretion eher bemerkbar machen könnten (*Thinakaran et al., 1996*). Die verkürzten Formen wären davon nicht betroffen, da sich die Mutation direkt am N-Terminus des A β befindet. Die verminderte Sekretion des A β ist nicht auf eine veränderte APP-Expression durch die Behandlung zurückzuführen, wie im Western Blot der Zellhomogenate mit Hilfe des 8E5-Antikörpers gezeigt werden konnte (siehe Abb. 8A).

Die in anderen Arbeiten nachgewiesene verstärkte A β -Sekretion von APP^{sw}-exprimierenden Zellen im Vergleich zu APP^{wt}-exprimierenden Zellen, konnte in diesem Experiment nicht beobachtet werden. Dies kann damit begründet werden, dass die Inkubationsdauer der Zellen im *In situ*-Sandwich-ELISA nur 1 h betrug. Bei *Suzuki et al.* wurde nach Kultivierung der Zellen für 48 h das Medium im Sandwich-ELISA analysiert. Durch die längere Inkubationszeit könnten sich Unterschiede bezüglich der A β -Sekretion verstärken, die nach 1 h noch nicht nachzuweisen sind (*Suzuki et al., 1994*).

Durch die PUGNAc-Behandlung ergab sich für APP^{wt}-exprimierende N2a-Zellen keine Veränderung der Sekretion von sowohl verkürzten als auch nicht-verkürzten A β -Formen (siehe Abb. 13A und 13B). Dies unterstützt die Ergebnisse der Untersuchungen zur APPs-Sekretion. Die O-GlcNAc-Modifikation scheint also beim Prozessieren des APP^{wt} keinen Einfluss zu haben.

Bei der schwedischen Mutante zeigte sich jedoch ein Anstieg in der Sekretion von verkürzten A β -Fragmenten (siehe Abb. 13C). Demnach kann man den Anstieg des APPs auf einen Anstieg des verlängerten APPs β zurückführen, der sowohl vom W02-Antikörper als auch vom 8E5-Antikörper erkannt wurde. Es müsste jedoch ausgeschlossen werden, dass p3 nicht zunimmt, da dies gleichzeitig einen Anstieg des APPs α bedeuten würde und damit keine klare Aussage gemacht werden könnte. Um dies ausschließen zu können, wäre eine massenspektrometrische Analyse erforderlich.

Folglich könnte die O-GlcNAc-Modifikation auf zweierlei Weise wirken. Würde p3 unter PUGNAc verstärkt gebildet, könnte O-GlcNAc ähnlich wie PMA die α -Sekretase-Aktivität fördern. Die „Yin-Yang“-Hypothese würde unterstützt werden, wenn die α -Sekretase

gehemmt würde, so dass verstärkt APPs β gebildet werden würde. Jedoch wäre es auch möglich, dass die β -Sekretase direkt oder indirekt durch die O-GlcNAc-Modifikation beeinflusst wird, so dass sie verstärkt zur Spaltung der verkürzten A β -Formen beitrüge, ohne dass die α -Sekretase-Aktivität verändert wird. Eine weitere mögliche Wirkung wäre, dass ein bislang noch nicht bekanntes Enzym durch die O-GlcNAc-Modifikation Sekretase-Aktivität erlangen würde und dieses zur Spaltung der verkürzten A β -Formen beitrüge.

Allgemein lässt sich zu den Ergebnissen sagen, dass die beobachteten Unterschiede sehr gering ausfallen. Durch längere Inkubationszeiten wäre es möglich, dass die verstärkte bzw. verminderte Sekretion von APPs bzw. A β noch deutlicher werden würde. Dies ist vor allen Dingen unter dem Aspekt interessant, dass die AD eine sehr langsam verlaufende Krankheit ist und mitunter 30 Jahre bis zur Manifestation benötigt.

4.4 Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf das Prozessieren des APPs in HEK293-Zellen

Da die mauseigene β -Sekretase der N2a-Zellen nicht das humane APP am Glu 11 der A β -Region schneidet und damit eine wichtige Form des N-Terminal verkürzten A β im *In situ*-Sandwich-ELISA von N2a-Zellen fehlt, sollte ein humanes Zellsystem getestet werden. In einem solchen Zellsystem ist gewährleistet, dass die humane β -Sekretase das humane APP an Position 11 spaltet, so dass A β 11-40/42 gebildet und sekretiert wird (*Cai et al., 2001; Liu et al., 2002b*). Diese Form würde im *In situ*-Sandwich-ELISA vom 4G8-Antikörper nicht aber vom W02-Antikörper erkannt, so dass Veränderungen der A β 11-40/42-Sekretion nur durch den 4G8-Antikörper detektierbar sind. In N2a-Zellen, transfiziert mit humanem APP, werden hingegen an Stelle des 11-40/42 A β dann verstärkt Formen sekretiert die bei Aminosäure 14, 15 und 17 bzw. 2, 4 und 5 beginnen (*Wang et al., 1996*). Inwiefern diese Formen auch durch die BACE gebildet werden, ist noch nicht klar. Möglich wäre auch, dass es eine andere β -Sekretase gibt, die es noch zu entdecken gilt.

Da HEK293-Zellen schon mehrfach für Untersuchungen der APP-Prozessierung verwendet wurden und nachgewiesen werden konnte, dass auch diese das A β 11-40/42 sezernieren, wurden diese Zellen auch für den *In situ*-Sandwich-ELISA als geeignet angesehen (*Liu et al., 2002b*).

Zunächst musste jedoch überprüft werden, ob die Proteine der Zellen nach einer einstündigen Behandlung mit PUGNAc eine erhöhte O-GlcNAc-Modifikation aufweisen. Es wurden PUGNAc-Konzentrationen bis 400 μM eingesetzt. Die Proteine wiesen, wie auch schon von *Haltiwanger et al.* beschrieben, bereits bei einer PUGNAc-Konzentration von 40 μM eine Zunahme der O-GlcNAc-Expressionsstärke auf, die sich mit zunehmender PUGNAc-Konzentration noch erhöhen ließ (siehe Abb. 15). Somit waren die HEK293-Zellen für den Einsatz im *In situ*-Sandwich-ELISA geeignet (*Haltiwanger et al., 1998*). Da die endogene APP-Konzentration sehr gering ist, wurden die Zellen entweder mit APPwt bzw. APPsw transfiziert.

Bei den mit APPwt-transfizierten HEK293-Zellen konnte durch die Behandlung mit PMA eine signifikant verminderte Sekretion der N-terminal nicht verkürzten A β -Spezies festgestellt werden (siehe Abb. 16A und 16B). Dies stimmt mit Beobachtungen von *Hung et al. (1993)* überein, die für APPwt-transfizierte HEK293-Zellen ebenfalls eine verminderte Sekretion von A β durch eine Behandlung mit 1 μM PMA nach 5-6 h im *pulse-chase* Experiment feststellen konnten. Zwischen verkürzten und nicht-verkürzten Formen wurde hier jedoch nicht unterschieden. Im Vergleich zu einem Rückgang der A β -Sekretion von ca. 20 % (detektiert mit dem W02-Antikörper), die in dieser Arbeit nach 1 h PMA-Behandlung beobachtet werden konnte, wurden von *Hung et al.* eine Verringerung der Sekretion von 50 % nach 5-6 h PMA-Behandlung erzielt (*Hung et al., 1993*). Daraus lässt sich schließen, dass durch längere Behandlungsperioden die Unterschiede in der A β -Sekretion noch verstärkt werden könnten.

Die Behandlung von PUGNAc erhöhte die Sekretion von verkürzten A β -Fragmenten, zu denen allerdings auch das p3 zählen würde, wie oben diskutiert wurde (siehe Abb. 16A). Bei APPwt-transfizierten N2a-Zellen konnte keine verstärkte Sekretion der verkürzten Fragmente beobachtet werden. Da diese Zellen, im Vergleich zu HEK293-Zellen, das A β 11-40/42 nicht synthetisieren können, könnte es sein, dass die erhöhte Sekretion von A β bei den APPwt-exprimierenden HEK293-Zellen nicht das p3 betrifft, sondern N-terminal-verkürzte A β -Formen, die das A β 11-40/42 einschließen würden. Es könnte daher sein, dass eine PUGNAc-Behandlung der humanen HEK293-Zellen eine verstärkte Sekretion der N-terminal verkürzten A β -Formen hervorruft. Falls dies zutrifft, lässt sich weiterhin vermuten, dass sich die Aktivität der β -Sekretase direkt oder indirekt durch O-GlcNAc-Modifizierung verändert und damit die Bildung des A β beeinflusst wird.

Die Behandlung von APPsw-exprimierenden HEK293-Zellen mit PMA bzw. PUGNAc hatte keinen Einfluss auf die A β -Sekretion (siehe Abb. 16C und 16D). Im Gegensatz zu diesem Ergebnis wurden bei mit PUGNAc behandelten N2a-Zellen verkürzte A β -Formen und bei PMA behandelten N2a-Zellen vermehrt nicht-verkürzten A β -Formen sekretiert. Es ist möglich, dass durch die Behandlungen von HEK293-Zellen die verkürzten A β -Formen und das p3 betroffen sind. Falls die Sekretion der verkürzten A β -Formen durch die PMA-Behandlung abnimmt und gleichzeitig die Sekretion von p3 im gleichen Maße zunimmt, wäre ein Unterschied nicht sichtbar, da mit dem 4G8-Antikörper nicht zwischen p3 und verkürzten A β -Formen unterschieden werden kann. Dies wird bestätigt durch Untersuchungen von *Hung et al.*, die an HEK293-Zellen im *pulse-chase* Experiment nach 5-6 h PMA-Behandlung einen Rückgang der A β -Sekretion beobachteten bei gleichzeitig verstärkter Sekretion des p3 (*Hung et al., 1993*).

Die unveränderte A β 1-40/42-Sekretion in Gegenwart von PMA könnte auch damit begründet werden, dass PMA in diesem Fall keinen Einfluss auf die A β -Bildung, jedoch auf die APPs α -Sekretion hat. So konnten *Rossner et al.* feststellen, dass im Tiermodell (Meerschweinchen) eine Überaktivität der PKC zwar zu einer verstärkten Bildung von APPs α führte, jedoch die Sekretion von A β 1-40 und 1-42 unverändert blieb (*Rossner et al., 2000*). Ähnliches beobachteten *Dyrks et al.* an der menschlichen Neuroblastoma-Zelllinie SY5Y, bei der durch Aktivierung der PKC zwar APPs α und das p3 verstärkt sezerniert wurden, jedoch kein Rückgang der A β -Sekretion zu beobachten war (*Dyrks et al., 1994*). Da die APPs-Sekretion in HEK293-Zellen nicht überprüft wurde, kann in diesem Fall nicht zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterschieden werden. Festhalten lässt sich nur, dass die Wirkung von PMA je nach Zelltyp und Zelllinie unterschiedlich sein kann.

Um genauere Aussagen machen zu können, müsste zum einen die APPs-Sekretion überprüft werden und zum anderen, ähnlich wie bei den N2a-Zellen, eine Analyse der A β -Formen mittels Massenspektrometrie erfolgen.

4.5. O-GlcNAc-Modifikation und Regulation der Cdk5

Die Cdk5 spielt neben der GSK3, CK 2, PKA und der MAP-Kinase eine Rolle bei der Tauphosphorylierung (*Maccioni et al., 2001b; Alvarez et al., 1999*). Da eine O-GlcNAc-Modifikation der GSK3 und CK 2 schon festgestellt werden konnte (*Hanover, 2001*), welche

ein Dysregulation des Enzyms bewirken und somit zur Entstehung der AD beitragen könnte, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Cdk5 ebenfalls O-GlcNAc-modifiziert vorliegt.

4.5.1 Die Cdk5 ist O-GlcNAc-modifiziert

Die O-GlcNAc-Modifikation an Serin- und Threoninresten von Phosphoproteinen des Kerns und Cytoplasmas macht sie zu einem interessanten Gegenspieler der Phosphorylierung (*Akimoto et al. 1999*). Neben cytoskelettalen Proteinen, Kernproteinen, der RNA-Polymerase II, Hormonrezeptoren, Tumorsuppressoren sind u.a. auch Phosphatasen (z.B. Tyrosinphosphatase) und Kinasen (z.B. GSK-3 und Caseinkinase 2) O-GlcNAc-modifiziert (*Wells et al., 2003*). In dieser Arbeit konnte durch Immunpräzipitation der Cdk5 und dem sich anschließenden Westernblot mit dem RL2-Antikörper gezeigt werden, dass die Cdk5, ähnlich wie die GSK 3 oder die Caseinkinase 2 ebenfalls O-GlcNAc-modifiziert vorliegt (siehe Abb. 17A).

4.5.2 Mögliche regulatorische Funktion der O-GlcNAcylierung für die Cdk5-Aktivität

Die Funktion der O-GlcNAc-Modifikation wird auf unterschiedliche Weise diskutiert. Die „Yin-Yang“-Hypothese beschreibt die reziproke Verhalten von O-GlcNAc-Modifikation und Phosphorylierung eines Proteins. Obwohl nicht jeder Serin- oder Threoninrest eines Proteins, der phosphoryliert werden kann, auch mit O-GlcNAc modifiziert sein muss, konnten Proteine, wie c-Myc, der Östrogenrezeptor und das SV-40 T-Antigen als phosphoryliert und O-GlcNAc-modifiziert identifiziert werden (*Vosseler et al., 2001*).

Die Cdk5 weist an Ser 159 eine potentielle Phosphorylierungsstelle der PKA auf. Deren Funktion besteht darin, die Cdk5 negativ zu regulieren. Es wäre deshalb möglich, dass durch eine Modifikation dieses Serins mit O-GlcNAc die Regulation der Aktivität beeinflusst sein könnte, d.h. dass die Cdk5 möglicherweise nicht inaktiviert werden könnte (*Dhavan und Tsai, 2001; Tarricone et al., 2001*).

Da die Cdk5 an der Hyperphosphorylierung vom Tau-Protein beteiligt ist und diskutiert wird, dass eine Hyperaktivität und damit Dysregulation der Cdk5 Neuronendegeneration in

Zusammenhang steht, wäre es möglich, dass die O-GlcNAc-Modifikation an der veränderten Aktivität der Cdk5 beteiligt ist (*Smith et al., 2001*). So könnte es sein, dass durch eine O-GlcNAcylierung des Ser 159 die Cdk5 nicht in ihrer Aktivität gehemmt wird, sondern weiterhin die Fähigkeit besäße, Proteine verstärkt zu phosphorylieren. Um Tau zu phosphorylieren, müsste gleichzeitig eine Spaltung des p35 in p25 stattfinden, welches aktiver ist (siehe 1.5.1 und 1.5.2) und die Cdk5 von der Zellmembran in das Cytosol verlagert, wo sie u.a. das Tau-Protein phosphorylieren kann (*Dhavan und Tsai, 2001*). Die Spaltung von p35 in p25 findet im adulten Gehirn im Vergleich zu juvenilen Gehirnen verstärkt statt, und geht mit einer verringerten Phosphorylierung von p35 einher. Da eine Phosphorylierung des p35 seinen Abbau zu p25 inhibiert, könnte eine O-GlcNAc-Modifizierung des p35 gegenteiligen Effekt haben. So könnte eine O-GlcNAc-Modifikation des p35 seine Spaltung zu p25 nicht verhindern sondern eventuell sogar verstärken (*Saito et al., 2003*). Außerdem erfordert der Abbau von p35 in p25 die Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen, die bei oxidativen Stress, der u.a. auch durch A β hervorgerufen werden kann, vermehrt in der Zelle zu finden sind (*Town et al., 2002*).

So könnte durch die im adulten Gehirn vorliegende verstärkte Proteolyse von p35 in p25, die Anwesenheit von oxidativem Stress, sowie durch die verringerte Phosphorylierung von Proteinen, die erhöhte Menge an Cdk5-p25-Komplexen in Alzheimer-Gehirnen gewährleistet sein. Durch den zusätzlich erhöhten O-GlcNAc-Spiegel in Gehirnen von Alzheimerpatienten wäre es zudem möglich, dass eine verstärkte Aktivität der Cdk5 hervorgerufen wird, wie oben diskutiert wurde (*Maccioni et al., 2001b; Griffith und Schmitz, 1995; Christen, 2000; Saito et al., 2003*).

Berücksichtigt man jedoch die Tatsache, dass Proteine sowohl phosphoryliert als auch O-GlcNAc-modifiziert vorliegen können, so gibt es noch eine andere Möglichkeit, die die Cdk5 mit der Alzheimer Demenz in Zusammenhang bringen könnte. So könnte eine O-GlcNAc-Modifikation an einem beliebigen Serin- oder Threoninrest der Cdk5 bzw. eines Enzyms, welches die Aktivität der Cdk5 reguliert, zu einer Inaktivität der Cdk5 führen. Das hätte einen Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen zur Folge, die durch die Cdk5 phosphoryliert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von N2a-Zellen mit PUGNAc und eine anschließende Inhibition der Cdk5 durch den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor Roscovitin einen zusätzlichen Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine des Zellhomogenats gegenüber der alleinigen Behandlung mit PUGNAc bewirkte (siehe 3.4.2). Demnach könnte es sein, dass eine Modifikation der Cdk5 mit O-GlcNAc bzw. eines Enzyms, welches die Cdk5-Aktivität reguliert, eine Inaktivität der

Cdk5 bewirkt, die durch die Behandlung mit Roscovitin verstärkt werden würde. Dass es sich bei dem mit O-GlcNAc-modifizierten Serin- oder Threoninrest wahrscheinlich nicht um Ser 159 handelt, bzw. dass eine O-GlcNAc-Modifikation des Ser 159 keine Aktivierung der Cdk5 bewirkt, konnte durch folgende Beobachtung bestätigt werden. Eine Behandlung der Zellen für 24 h mit PUGNAc und anschließend 24 h mit PUGNAc und dbcAMP zeigte die gleichen Ergebnisse wie die Behandlung mit PUGNAc und Roscovitin. Durch die zusätzliche Behandlung der Zellen mit dbcAMP konnte die O-GlcNAc-Modifizierung von Proteinen des Zellhomogenates im Vergleich zur alleinigen PUGNAc-Behandlung verstärkt werden (siehe Abb. 18B). Dies könnte damit erklärt werden, dass die O-GlcNAc-Modifikation eines beliebigen Serin- oder Threoninrestes der Cdk5 bzw. eines anderen Proteins, welches die Cdk5 reguliert, eine Inhibition der Cdk5 bewirkt. Findet im Anschluss daran eine Aktivierung der PKA mittels dbcAMP-Behandlung statt, wäre es möglich, dass das Ser 159 der Cdk5, welches eine potentielle Phosphorylierungsstelle der PKA darstellt, phosphoryliert werden würde (*Phosphorylierungsprogramm NetPhos 2.0*). Da die Phosphorylierung des Ser 159 eine vollständige Aktivität der Cdk5 verhindert, könnte durch eine Aktivierung der PKA mit dbcAMP ein zusätzlicher Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen bewirkt werden, die andernfalls von der Cdk5 phosphoryliert würden. Da eine Behandlung mit zunächst dbcAMP und anschließend PUGNAc keine verstärkte O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen des Zellhomogenates gegenüber der alleinigen Behandlung mit PUGNAc zeigte, könnte es sein, dass durch die Phosphorylierung des Ser 159 der Cdk5 eine Konformationsänderung des Enzyms hervorgerufen wird. Diese Konformationsänderung könnte eine anschließende O-GlcNAc-Modifikation verhindern, so dass eine verstärkte Inhibition des Enzyms durch O-GlcNAc, und damit eine erhöhte O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen, nicht gegeben wäre.

Eine gleichzeitige Behandlung der N2a-Zellen mit PUGNAc und dbcAMP führte ebenfalls zu keiner verstärkten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen gegenüber der alleinigen Behandlung der Zellen mit PUGNAc. Dies wäre dadurch erklärbar, dass eine Substratkonkurrenz zwischen PKA und OGT besteht und nur wenig Cdk5 sowohl O-GlcNAcyliert, als auch phosphoryliert vorliegt. Die Enzyme, die zunächst phosphoryliert werden, können nicht mehr O-GlcNAc-modifiziert werden und bleiben deshalb noch aktiv. Nur die Enzyme, die erst mit O-GlcNAc modifiziert wurden, können ebenfalls phosphoryliert werden. Dieser Anteil scheint jedoch so gering zu sein, dass es keine offensichtliche Effekte bezüglich der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen gibt. Es müsste in diesem Fall demnach noch geklärt werden, inwiefern die PKA eine höhere Affinität zur Cdk5 besitzt als die OGT.

Die postulierten Regulationsmechanismen der Cdk5 sind in Abb. 27 dargestellt.

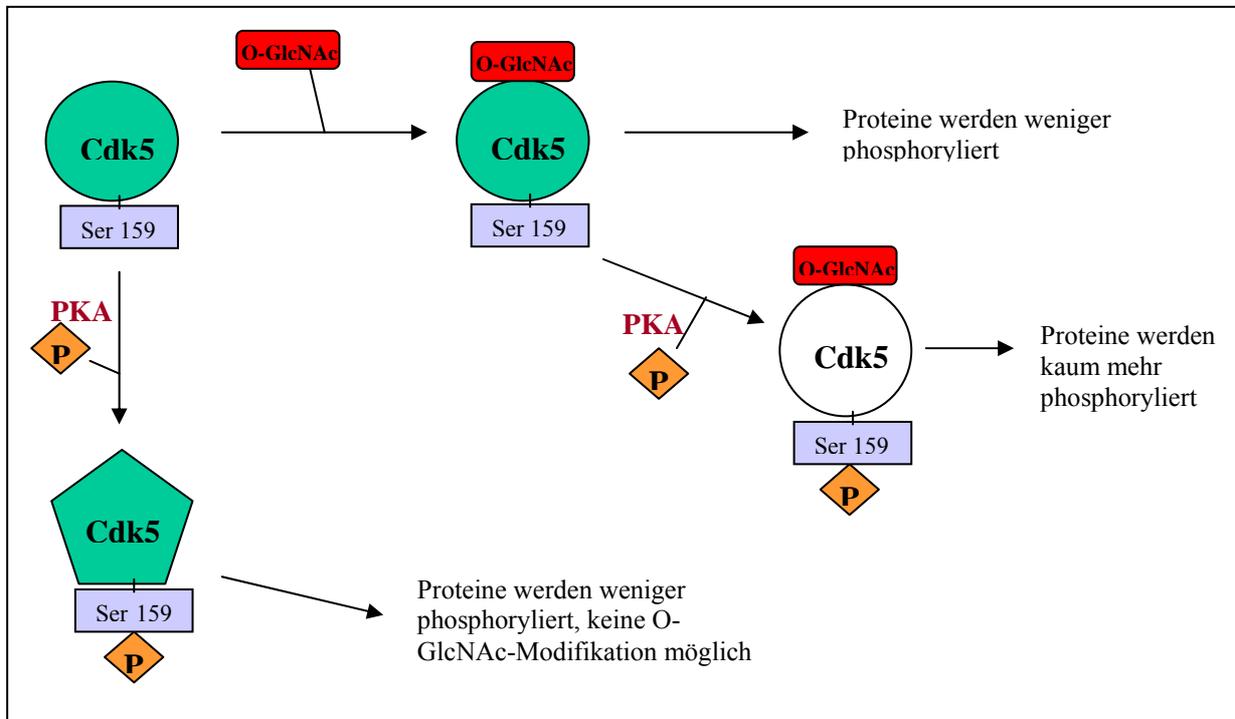


Abb. 27: *Möglichkeiten der Cdk5-Regulation durch Phosphorylierung und O-GlcNAc-Modifizierung.*

Findet zunächst eine O-GlcNAc-Modifizierung (rote Rechtecke) der Cdk5 statt, so führt das zu einer verringerten Aktivität des Enzyms, wodurch die Phosphorylierung von Proteinen niedriger, die O-GlcNAc-Modifizierung jedoch stärker ausfällt. Eine zusätzliche Phosphorylierung des Ser 159 (oranges Quadrat) durch die Protein Kinase A (PKA) würde zu einem weiteren Aktivitätsverlust der Cdk5 führen, welches den oben beschriebenen Effekt noch verstärken würde.

Findet jedoch zunächst eine Phosphorylierung des Ser 159 statt, ändert sich die Konformation der Cdk5, so dass eine O-GlcNAc-Modifizierung nicht mehr möglich ist. Die Cdk5 verliert zwar an Aktivität, jedoch nicht so stark, wie sie es durch die Kombination von O-GlcNAc-Modifizierung und Phosphorylierung erfährt.

Die beobachtete Verstärkung der O-GlcNAc-Modifizierung von Proteinen des Zellhomogenates durch die Behandlung mit zunächst PUGNAc für 24 h und anschließend mit PUGNAc und dbcAMP für weitere 24 h könnte zu einer Dysregulation von anderen Proteinen führen, welche den Zellstoffwechsel nachhaltig verändern könnten. Früher oder später könnte es dann sein, dass die Entgleisung des Stoffwechsels zur Neuronendegeneration führt.

Die beschriebene Inaktivität der Cdk5 stimmt jedoch nicht mit der Tatsache überein, dass die Cdk5 eine verstärkte Aktivität in Alzheimergehirnen aufweist, und dass sie bei der APP- und Tauphosphorylierung eine Rolle spielt (*Dahvan und Tsai, 2001; Pei et al., 1998*). Die Inaktivierung der Cdk5 durch eine O-GlcNAc-Modifikation scheint somit nicht direkt bei der Entstehung der AD beteiligt zu sein. Es könnte aber sein, dass zu Beginn der Krankheit die Cdk5 inaktiv vorliegt. So wäre es möglich, dass durch leichte Veränderungen des Phosphats-/O-GlcNAc-Gleichgewichts in den Zellen, zunächst einige Enzyme O-GlcNAc-modifiziert vorliegen. Auch die Cdk5 könnte durch eine mögliche O-GlcNAc-Modifikation neben der vorliegenden Phosphorylierung des Ser 159 verstärkt inhibiert werden. Dadurch würden sich die O-GlcNAc-Level in der Zelle erhöhen, welche dann zu einer verringerten Phosphorylierung von u.a. der Cdk5 bzw. des p35 führen könnten. Da eine verringerte Phosphorylierung des p35 zu einer verstärkten Spaltung des p35 in das p25 beiträgt und das p25 die Cdk5 wesentlich stärker aktivieren kann als p35, würde sich die Aktivität der Cdk5 verstärken (*Saito et al., 2003*). Die natürlicherweise verstärkte Proteolyse des p35 zu p25 im adulten Hirn sowie oxidativer Stress, der durch die veränderte Stoffwechsellage und die vermehrte Bildung von A β bei der AD entstehen könnte, wäre es möglich, dass zusätzlich vermehrt p25-Cdk5-Komplexe gebildet werden (*Behl, 1997; Town et al., 2002; Strocchi et al., 2003; Saito et al., 2003*). Die Cdk5 wäre dann verstärkt im Cytosol zu finden und könnte dort vermehrt Proteine, wie das Tau-Protein phosphorylieren und somit die Neuronendegeneration fördern.

Mit Hilfe der verwendeten Methoden konnte keine verstärkte O-GlcNAc-Modifikation der Cdk5 durch die alleinige Behandlung mit PUGNAc bzw. dbcAMP festgestellt werden (siehe Abb. 17B). Dies könnte jedoch dadurch zu begründen sein, dass die Methode des Western Blots mit vorangegangener Immunpräzipitation eventuell nicht sensitiv genug ist und geringe Unterschiede nicht erkennbar sind. So ist es durchaus möglich, dass die Cdk5 an mehreren Serin- und Threoninresten O-GlcNAc-modifiziert sein könnte. Würden nun durch die PUGNAc-Behandlung bzw. dbcAMP-Behandlung ein bis zwei Reste mehr oder weniger O-GlcNAc-modifiziert vorliegen, so könnte dies mit dieser Methode möglicherweise nicht erfasst werden.

Gleiches gilt für die Behandlung mit PUGNAc in Kombination mit bzw. ohne dbcAMP. Vergleicht man die Stärke der O-GlcNAc-Modifikation der Cdk5 mit der immunpräzipitierten Menge der Cdk5, so lässt sich für das Verhältnis Proteinmenge : O-GlcNAc-Modifikation kein Unterschied bei den verschiedenen Behandlungsformen erkennen. Somit scheint die Relation unverändert zu bleiben.

Um eine genaue Aussage treffen zu können, müsste eine andere Methode in Erwägung gezogen werden, die eine quantitative Auswertung zulässt. Hier würde sich eine massenspektrometrischen Analyse anbieten.

4.6. Etablierung eines Enzymassays zur Übertragung von GlcNAc auf Proteine

Im Rahmen einer anderen Doktorarbeit der Abteilung war versucht worden, den Nachweis der O-GlcNAc-Modifizierung von APP bzw. die des C-Terminus von APP C-Terminus überexprimierenden Zellen aus Zellhomogenaten durch sich anschließende massenspektrometrischer Analyse nachzuweisen. Da dieser Ansatz nicht erfolgreich war, sollte ein OGT-Assay etabliert werden, um mögliche O-GlcNAcylierte Serin- bzw. Threoninreste im C-Terminus von APP zu identifizieren.

Die O-GlcNAc-Modifikation des C-Terminus von APP ist von Interesse, da die Phosphorylierung des C-Terminus bei der Endozytose bzw. beim Recycling sowie beim Prozessieren von APP eine Rolle zu spielen scheint. Eine Phosphorylierung des Thr 668 im C-terminalen Ende von APP scheint einer A β -Bildung entgegenzuwirken (*Ando et al., 2001*). Es wäre nun von Interesse, ob dieser oder ein anderer Serin- oder Threoninrest des C-Terminus O-GlcNAc-modifiziert vorliegt und damit zu einer verstärkten A β -Bildung beitragen könnte.

Des weiteren gab es in der letzten Zeit eine Reihe von Untersuchungen, die zeigten, dass der C-Terminus u.a. auch in den Zellkern transportiert wird und möglicherweise Einfluss auf Transkriptionsvorgänge nimmt (*Scheinfeld et al., 2002*). Ähnliches wurde bereits für den von der γ -Sekretase generierten C-Terminus von Notch beschrieben (*Berezovska et al., 2000*). Auch bei diesem Vorgang könnte eine O-GlcNAc-Modifizierung möglicherweise eine Rolle spielen.

4.6.1 Kaninchen-Retikulozyten-Membranen als Enzymquelle

Zunächst wurden Kaninchen-Retikulozyten-Membranen als Enzymquelle für die OGT eingesetzt, da beschrieben ist, dass diese das Enzym enthalten. Hierfür wurden die

Membranen nach der von *Haltiwanger et al.* beschriebenen Methode aufgereinigt (*Haltiwanger et al., 1990*). Die Retikulozyten-Membranen erwiesen sich jedoch als nicht funktionsfähig, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass Enzymaktivitäten von Retikulozyten-Membranen durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen sowie durch die Aufreinigung der Membranen so stark reduziert werden, dass im OGT-Assay keine messbare Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden konnte.

4.6.2 OGT-Assay mit unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigter rekombinant hergestellter OGT

Die rekombinant in Bakterien hergestellte OGT sollte mit Hilfe eines His-Tags am N-Terminus über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt werden. Da *Lubas et al.* einen OGT-Assay mit einer OGT durchgeführt haben, die am N-Terminus mit einem His-Tag versehen war, ist davon auszugehen, dass die Aktivität der OGT durch diese Modifizierung nicht beeinflusst wird (*Lubas et al., 1997; Lubas und Hanover, 2000*).

Zunächst wurde versucht, die in Bakterien exprimierte OGT mit Hilfe eines Harnstoff-Puffers nach Herstellerangaben zu denaturieren, nachdem die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen worden waren. Dies war jedoch nicht erfolgreich, obwohl eine ähnliche Methode von *Kreppel et al.* zur Isolierung der OGT beschrieben wurde (*Kreppel et al., 1997*). Die Anwendung des Guanidinhydrochlorid-Puffers hingegen führte zur Lösung der OGT, die dann über eine Ni-NTA-Säule erfolgreich aufgereinigt werden konnte (siehe Abb. 24A).

Da die OGT in einer hohen Salzkonzentration gelöst vorlag (6 M Guanidinhydrochlorid-Lösung), wurde eine Dialyse gegen den OGT-Puffer durchgeführt (siehe Abb. 24B), um eine Inaktivität des Enzyms zu vermeiden (*Haltiwanger et al., 1992*). Im OGT-Assay zeigte sich jedoch, dass das Enzym nicht aktiv war. Es könnte sein, dass die OGT durch die hohen Salzkonzentrationen irreversibel inaktiviert wurde und somit nicht funktionsfähig war. Eine irreversible Denaturierung durch Guanidinhydrochlorid ist auszuschließen, da es geeignet ist um Renaturierungen durchzuführen. Von *Haltiwanger et al.* wurde beschrieben, dass die OGT in Salzkonzentrationen über 50 mM inaktiviert wird (*Haltiwanger et al., 1992*).

Eine weitere Möglichkeit für die Inaktivität der OGT könnte sein, dass die cDNA der OGT während der PCR nur unvollständig synthetisiert wurde. Da das aktive Zentrum der OGT sich am C-Terminus befindet, könnte es sein, dass durch das Fehlen einiger Aminosäuren am C-Terminus die Aktivität der OGT beeinträchtigt ist (*Iyer und Hart, 2003*). Der Wegfall weniger

Aminosäuren ist im Coomassiegel nicht nachweisbar, könnte jedoch das negative Ergebnis erklären.

4.6.3 OGT-Assay mit unter nativen Bedingungen aufgereinigter OGT

Da durch Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen kein aktives Enzym gewonnen werden konnte, wurde die OGT unter nativen Bedingungen, d.h. durch eine Lysozym-Behandlung der Bakterien in Kombination mit Ultraschall, ähnlich wie bei *Lubas et al.*, aufgereinigt (*Lubas und Hanover, 2000*). Außer der Induktion der Transkription in LB-Amp-Medium, wurde gleichzeitig eine Induktion in MM63-Medium in Anwesenheit von Ectoin (siehe Abb. 28) durchgeführt. Die Ectoin-Behandlung sollte den Einbau des Proteins in *inclusion bodies* vermeiden. Hierzu mussten die Zellen unter Salzstress gehalten werden, da Ectoin eine organische Substanz darstellt, die unter diesen Bedingungen aktiv von Bakterien aufgenommen wird, um sie vor hohen Salzkonzentrationen zu schützen (*Pichereau et al., 1999*). Ectoin und Hydroxyectoin sind ähnlich wie Betain Stressschutzstoffe, die das Austrocknen der Zellen unter Salzstress verhindern, jedoch den Zellmetabolismus nicht beeinträchtigen. Sie sind wichtige Schutzfaktoren von Enzymen und Zellstrukturen, da sie bei Trockenstress Hydrathüllen stabilisieren und die biologische Aktivität von Proteinen bewahren.

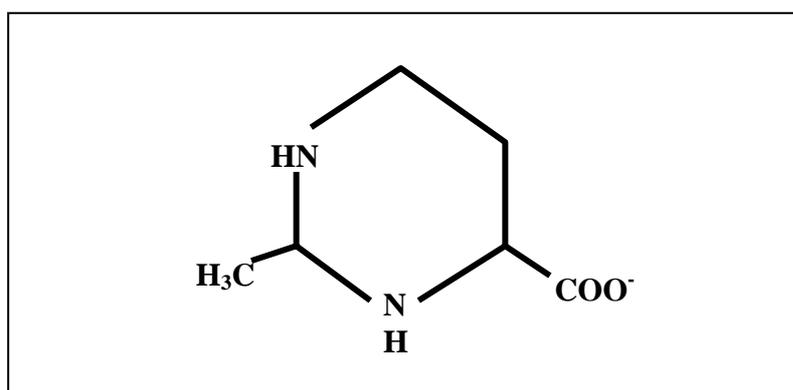


Abb. 28: Die Strukturformel von Ectoin

Zunächst wurde versucht, die Ectoin-behandelte Kultur mit Gadoliniumchlorid-Lösung zu lysieren. Gadoliniumchlorid blockiert Ionenkanäle der Zelle und bewirkt, dass die Zellen

innen kürzester Zeit (1-2 Minuten) platzen. Auf diese Weise sollte die OGT freigesetzt werden. Jedoch konnte nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Gadoliniumchlorid, nach Zentrifugation des Überstandes, keine OGT nachgewiesen werden.

Eine erfolgreiche Freisetzung des Enzyms konnte durch den Verdau mit Lysozym und anschließender Ultraschallbehandlung bei den in LB-Medium induzierten Bakterien durchgeführt werden. Eine Aufreinigung über die Ni-NTA-Säule war jedoch nicht möglich, da das Protein nicht von der Ni-NTA Matrix der Säule gebunden wurde. Dies könnte daran liegen, dass die Imidazolkonzentrationen der Elutionslösungen zu hoch, bzw. der pH-Wert des Lysepuffers und des Waschpuffers zu niedrig waren. Eine weitere Erklärung für die nicht gelungene Aufreinigung könnte sein, dass durch die native Aufreinigung eine Konformation des Proteins vorlag, in der das His-Tag sterisch an der Interaktion mit Ni-NTA gehindert wird. Eine Zugabe von β -Mercaptoethanol zum Lysepuffer könnte eventuell verhindern, dass falsch geknüpfte S-S-Brücken aufgelöst werden.

Der Einsatz des unaufgereinigten Lysats im OGT-Assay war auch nicht erfolgreich. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass es bei der Lysatherstellung ebenfalls zu einer Ausbildung von S-S-Brücken im Protein gekommen sein könnte. Da die OGT ein cytosolisches Protein ist und cytosolische Proteine in der reduzierten SH-Form vorliegen, ist es möglich, dass S-S-Brückenbildung die Konformation und damit die Aktivität des Enzyms verändern. Durch Zugabe von DTT bzw. β -Mercaptoethanol ließe sich dies verhindern.

5. Zusammenfassung

Die Alzheimer Demenz (AD) ist durch zwei histopathologische Merkmale gekennzeichnet: zum einen die senilen Plaques, die aus aggregiertem A β bestehen und zum anderen die neurofibrillären Bündel (NFT), die aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehen. Das A β entsteht beim Prozessierungsprozess des Amyloid Precursor Proteins (APP) und umfasst in der Regel 40-42 Aminosäuren, kann jedoch auch N-Terminal oder C-Terminal verkürzt vorliegen. Prozessiert wird das APP durch die α -, β - und γ -Sekretase, wobei die α - und γ -Sekretase das APP α und damit nicht amyloidogene Fragmente freisetzen, während β - und γ -Sekretase zur Bildung des A β führen und damit zur Amyloidbildung beitragen. Mutationen im APP-Gen können den Prozessierungsprozess dahingehend verändern, dass vermehrt A β gebildet wird. Dies trifft auch auf die schwedische Mutante von APP zu, bei der eine verstärkte β -Sekretaseaktivität auf Grund einer Doppelpunktmutation an der β -Sekretasestelle zu einer verstärkten A β -Bildung führt.

Eine Aktivierung der PKC (z.B. durch PMA) bewirkt in Neuronen eine verstärkte APP α - bzw. verringerte A β -Sekretion. Somit scheint eine verstärkte Phosphorylierung von Proteinen der Bildung von senilen Plaques vorzubeugen. O-glykosidisch gebundenes N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) an Serin- und Threoninresten von Proteinen ist eine posttranslationale Modifikation von cytosolischen Proteinen, Kernproteinen und cytoplasmatischen Domänen von Transmembranproteinen, die in einem reziproken Verhältnis zur Phosphorylierung stehen kann. Die Modifizierung des Proteins mit O-GlcNAc wird durch die O-GlcNAc-Transferase (OGT) und die Hydrolyse durch die O-GlcNAc-Hydrolase (OGH) katalysiert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die O-GlcNAc-Modifikation einen Einfluss auf das Prozessieren des APP hat. So wurden sowohl APPwt- als auch APPsw-exprimierende N2a- und HEK293-Zellen für 1 h mit PMA bzw. PUGNAc (OGH-Hemmer) behandelt. Bei N2a-Zellen ergab sich bei den APPwt-exprimierenden Zellen durch die PMA-Behandlung eine Abnahme der Sekretion von N-terminal verkürzten A β -Formen, die mit einer gleichzeitigen Zunahme des APP α gekoppelt zu sein scheint. Die O-GlcNAc-Modifikation hatte bei dieser Zelllinie jedoch keinen Einfluss auf die Sekretion von A β bzw. APPs-Fragmenten. Bei den APPsw-exprimierenden Zellen ergab sich durch die PMA-Behandlung eine verringerte Sekretion des nicht verkürzten A β bei gleichzeitiger nicht signifikanter

Zunahme der APP α -Sekretion. Durch PUGNAc-Behandlung erhöhte sich bei dieser Zelllinie die Sekretion der N-Terminal verkürzten A β -Formen ohne dass sich die Menge des verlängerten APP β signifikant veränderte. Bei den HEK293-Zellen waren nur bei den mit APPwt- transfizierten Zellen ein Unterschied in der A β -Sekretion zu beobachten. Durch die Behandlung der Zellen mit PMA verringerte sich die Sekretion der nicht verkürzten A β -Formen, wohingegen durch die PUGNAc Behandlung die N-terminal verkürzten Formen zunahm. Die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen, die zur Bildung des A β beitragen, scheint somit den amyloidogenen Weg positiv zu beeinflussen und dabei insbesondere die Entstehung von N-Terminal verkürzten A β -Formen zu begünstigen. N-terminal verkürzte A β -Formen neigen wie A β 42 zu einer verstärkten Aggregation sind ebenfalls verstärkt in senilen Plaques enthalten. Außerdem scheint der Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf das Prozessieren des APP je nach Zelllinie unterschiedlich auszufallen.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf die Cdk5-Aktivität untersucht. Die Cdk5 gehört zu der Familie der Cyclin-abhängigen Kinasen, wird jedoch nicht durch Cycline reguliert, sondern durch die Peptide p35 bzw. p25 und durch Phosphorylierung, die u.a. von PKA durchgeführt werden könnte. Während der Cdk5-p35-Komplex durch eine Myristinsäure in der Zellmembran verankert ist und membrangebundene Proteine, wie z.B. das APP, phosphorylieren kann, ist der Cdk5-p25-Komplex im Cytosol aktiv und trägt wahrscheinlich zur Phosphorylierung des Tau-Proteins und der NFT bei. Der Cdk5-p25-Komplex ist aktiver als der Cdk5-p35-Komplex und konnte in einigen Studien verstärkt in Alzheimergehirnen detektiert werden. Somit scheint die Cdk5 eine Rolle bei der AD zu spielen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Cdk5 O-GlcNAc-modifiziert ist. Anhand der angewendeten Methoden konnte jedoch nicht festgestellt werden, ob sich die O-GlcNAc-Modifikation der Cdk5 durch eine Behandlung mit PUGNAc, welches die OGH hemmt, verstärken lässt. Jedoch scheint die O-GlcNAc-Modifikation die Aktivität der Cdk5 zu beeinflussen, da durch die Behandlung mit PUGNAc für 48 h in Kombination mit Roscovitin (einem Cdk Inhibitor) für 24 h eine verstärkte O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen zu beobachten war, die noch stärker ausfiel als jene, die durch die alleinige Behandlung mit PUGNAc erzielt werden konnte. Gleiche Ergebnisse konnten durch die Behandlung mit PUGNAc für 48 h in Kombination mit dbcAMP (ein PKA-Aktivator) für 24 h erreicht werden, die jedoch bei umgekehrter Behandlung nicht erzielt wurde. Die Cdk5 scheint somit durch die O-GlcNAc-Modifikation eine Inaktivierung zu erfahren, der jedoch keine Phosphorylierung vorausgehen darf.

Da in AD-Gehirnen erhöhte O-GlcNAc-Konzentrationen nachgewiesen wurden, könnte es sein, dass daraus eine Dysregulation von Enzymen, hier der Cdk5, resultieren könnte, welche dann zur Entstehung neuropathologischer Veränderungen beitragen würde. Dies könnte auch die Sekretasen betreffen, die durch eine mögliche O-GlcNAc-Modifikation entweder direkt oder indirekt eine andere Aktivität aufweisen könnten, die dann zu der oben beschriebenen vermehrten A β -Bildung beitragen könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die O-GlcNAc-Modifikation neben anderen einen weiteren Faktor darstellt, der die Entstehung der AD begünstigen kann.

6. Literaturverzeichnis

Akimoto, Y.; Kreppel, L. K.; Hirano, H.; Hart, G. W.: Localization of the O-linked N-acetylglucosamine transferase in rat pancreas. *Diabetes* 48: 2407-2413 (1999).

Akimoto, Y.; Comer, F. I.; Cole, R. N.; Kudo, A.; Kawakami, H.; Hirano, H.; Hart, G. W.: Localisation of the O-GlcNAc transferase and O-GlcNAc-modified proteins in rat cerebellar cortex. *Brain Res* 966: 194-205 (2003).

Alvarez, A.; Toro, R.; Caceres, A.; Maccioni: Inhibition of tau phosphorylating protein kinase cdk5 prevents β -amyloid-induced neuronal death. *FEBS Lett* 459: 421-426 (1999).

Ando, K.; Oishi, M.; Takeda, S.; Iijima, K.-I.; Isohara, T.; Nairn, A. C.; Kirino, Y.; Greengard, P.; Suzuki, T.: role of phosphorylation of Alzheimer's amyloid precursor protein during neuronal differentiation. *J Neurosci* 19: 4421-4427 (1999).

Ando, K.; Iijima, K.-I.; Elliott, J. I.; Kirino, Y.; Suzuki, T.: Phosphorylation-dependent regulation of the interaction of amyloid precursor protein with Fe65 affects the production of β -amyloid. *J Biol Chem* 276: 40353-40361 (2001).

Arnold, C. S.; Johnson, G. V. W.; Cole, N. R.; Dong, D. L.-Y.; Lee, M.; Hart, G. W.: The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* 271: 28741-28744 (1996).

Asai, M.; Hattori, C.; Szabo, B.; Sasagawa, N.; Maruyama, K.; Tanuma, S.-I.; Ishiura, S.: Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP α -secretase. *Biochem Biophys Res Com* 301: 231-235 (2003).

Behl, C.: Amyloid β -protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell Tissue Res* 290: 471-480 (1997).

Berezovska, O.; Jack, C.; McLean, P.; Aster, J. C.; Hicks, C.; Xia, W.; Wolfe, M. S.; Kimberly, T.; Weinmaster, G.; Selkoe, D. J.; Hyman, B. T.: Aspartate mutations in presenilin and γ -secretase inhibitors both impair Notch1 proteolysis and nuclear translocation with relative preservation of Notch1 signaling. *J Neurochem* 75: 583-593 (2000).

Buxbaum, J. D.; Koo, E. H.; Greengard, P.: Protein phosphorylation inhibits production of Alzheimer amyloid β /A4 peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9195-9198 (1993).

Cai, H.; Wang, Y.; McCarthy, D.; Wen, H.; Borchelt, D. R.; Price, D. L.; Wong, P. C.: BACE1 is the major β -secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nature Neurosci* 4: 233-234 (2001).

Cappai, R.; White A. R.: Amyloid β . *Int J Biochem Cell Biol* 31: 885-889 (1999).

- Cescato, R., Dumermuth, E.; Spiess, M.; Paganetti: Increased generation of alternatively cleaved β -amyloid peptides in cells expressing mutants of the amyloid precursor protein defective in endocytosis. *J Neurochem* 74: 1131-1139 (2000).
- Chapman, P. F.; Falinska, A. M.; Knevet, S. G.; Ramsay, M. F.: Genes, models and Alzheimer's disease. *Trends in Genetic* 17: 254-261 (2001).
- Chen, M.: Alzheimer's α -secretase may be a calcium-dependent protease. *FEBS Lett* 417: 163-167 (1997).
- Chou, C.-F.; Omary, M. B.: Mitotic arrest-associated enhancement of O-linked glycosylation and phosphorylation of human keratins 8 and 18. *J Biol Chem* 268: 4465-4472 (1993).
- Christen, Y.: Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 71: 621S-629S (2000).
- Chyung, A. S. C.; Greenberg, B. D.; Cook, D. G.; Doms, R. W.; Lee, V. M.-Y.: Novel β -secretase cleavage of β -amyloid precursor protein in the endoplasmic reticulum-intermediate compartment of NT2N cells. *J Cell Biol* 138: 671-680 (1997).
- Citron, M.: β -secretase as a target for the treatment of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 70: 373-379 (2002).
- Cole, R. N.; Hart, G. W.: Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals. *J Neurochem* 79: 1080-1089 (2001).
- Comer, F. I.; Hart, G. W.: O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. *J Biol Chem* 275: 29179-29182 (2000).
- Comtesse, N.; Maldener, E.; Meese, E.: Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a β -N-Acetylglucosaminidase. *Biochem Biophys Res Comm* 283: 634-640 (2001).
- De Strooper, B.: Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active γ -secretase complex. *Neuron* 38: 9-12 (2003).
- De Strooper, B.; Annaert, W.: Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein. *J Cell Sci* 113: 1857-1870 (2000).
- Dhavan, R.; Tsai, L.-H.: A decade of cdk5. *Mol Cell Biol* 2: 749-759 (2001).
- Du, X. L.; Edelstein, C.; Dimmeler, S.; Ju, Q.; Sui, C.; Brownlee, M.: Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest* 108: 1341-1348 (2001).
- Dyrks, T.; Monning U.; Beyreuther, K.; Turner J.: Amyloid precursor protein secretion and beta A4 amyloid generation are not mutually exclusive. *FEBS Lett* 349: 210-214 (1994).
- Edbauer, D.; Winkler, E.; Regula, J. T.; Pesoid, B.; Steiner, H.; Haass, C.: Reconstitution of γ -secretase activity. *Nature Cell Biol*: 1-3 (2003).

Evin, G.; Weidemann, A.: Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease A β amyloid peptides. *Peptides* 23: 1285-1297 (2002).

Farmery, M. R.; Tjernberg, L. O.; Pursglove, S. E.; Bergman, A.; Winblad, B.; Näslund, J.: Partial purification and characterization of γ -secretase from post mortem human brain. *J Biol Chem* (2003).

Farzan, M.; Schnitzler, C. E.; Vasilieva, N.; Leung, D.; Choe, H.: BACE2, a β -secretase homolog, cleaves at the β site and within the amyloid- β region of the amyloid- β precursor protein. *PNAS* 97: 9712-9717 (2000).

Fluhrer, R.; Multhaup, G.; Schlicksupp, A.; Okochi, M.; Takeda, M.; Lammich S.; Willem, M.; Westmeyer, G.; Bode, W.; Walter, J.; Haass C.: Identification of a β -secretase activity, which truncates amyloid β -peptide after its presenilin-dependent generation. *J Biol Chem* 278: 5531-5538 (2003).

Fukumoto, H.; Cheung, B. S.; Hyman, B. T.; Irizarry M. C.: β -secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer's disease. *Arch Neurol* 59: 1381-1389 (2002).

Gao, Y.; Wells L.; Comer, F. I.; Parker, G. J.; Hart, G. W.: 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 (2001).

Gollner, U.: Untersuchung zur Bedeutung der N-Acetylglucosaminylierung für die proteolytische Spaltung der schwedischen Mutante des β -Amyloid Precursor Proteins. Dissertation 2001, an der Uni Bonn, Medizinische Fakultät.

Granas, C.; Ferrer, J.; Loland, C. J.; Javitch, J. A.; Gether, U.: N-terminal truncation of the dopamine transporter abolishes phorbol ester- and substance P receptor-stimulated phosphorylation without impairing transporter internalization. *J Biol Chem* 278: 4990-5000 (2003).

Grand, P.; Sharma, P.; Pant, H. C.: Cyclin-dependent protein kinase 5 (cdk5) and the regulation of neurofilament metabolism. *Eur J Biochem* 268: 1534-1546 (2001).

Griffith, L. S.; Mathes, M.; Schmitz, B.: β -amyloid precursor protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Neurosci Res* 41: 270-278 (1995).

Griffith, L. S.; Schmitz, B.: O-linked N-acetylglucosamine is upregulated in Alzheimer brains. *Biochem Biophys Res Comm* 219:424-431 (1995).

Griffith, L. S.; Schmitz, B.: O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation. *Eur J Biochem* 262: 824-831 (1999).

Haltiwanger, R. S.; Holt, G. D.; Hart, G. W.: Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. *J Biol Chem* 265: 2563-2568 (1990).

Haltiwanger, R. S.; Blomberg, M. A.; Hart, G. W.: Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. *J Biol Chem* 267: 9005-9013 (1992).

Haltiwanger, R. S.; Philipsberg, G. A.: Mitotic arrest with nocodazole induces selective changes in the level of O-linked N-acetylglucosamine and accumulation of incompletely processed N-glycans on proteins from HT29 cells. *J Biol Chem* 272: 8752-8758 (1997).

Haltiwanger, R. S.; Grove, K.; Philipsberg, G. A.: Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc- β -N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J Biol Chem* 273: 3611-3617 (1998).

Han, I.; Kudlow, J. E.: Reduced O Glycosylation of sp1 is associated with increased proteasome susceptibility. *Mol Cell Biol* 17: 2550-2558 (1997).

Hanahan, D.: Studies on transformation of *Escherichia Coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580 (1983).

Hanover, J. A.: Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. *FASEB J* 15: 1865-1876 (2001).

Hanover, J. A.; Lai, Z.; Lee, G.; Lubas, W. A.; Sato, S. M.: Elevated O-linked N-acetylglucosamine metabolism in pancreatic β -cells. *Arch Biochem Biophys* 362: 38-45 (1999).

Hart, G. W.: Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal protein. *Annu Rev Biochem* 66: 315-335 (1997).

Hartmann, D.; de Strooper B.; Serneels, L.; Craessaerts, K.; Herreman, A.; Annaert, W.; Umans, L.; Lübke, T.; Illert, A. L.; von Figura, K.; Saftig, P.: The disintegrin/metalloprotease ADAM10 is essential for Notch signalling but not for α -secretase activity in fibroblasts. *Hum Mol Gen* 11: 2615-2624 (2002).

Hartmann, T.: Intracellular biology of Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249: 291-298 (1999).

Hashigushi, M.; Saito, T.; Hisanaga, S.; Hshiguchi, T.: Truncation of CDK5 activator p35 induces intensive phosphorylation of Ser202/Thr205 of human tau. *J Biol Chem* 277: 44525-44530 (2002).

Heckel., D.; Comtesse, N.; Brass, N.; Blin, N.; Zang, K. D.; Meese, E.: Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum Mol Gen* 7: 1859-1872 (1998).

Howlett, D. R.; Simmons, D. L.; Dingwall, C.; Christie, G.: In search of an enzyme: the β -secretase of Alzheimer's disease is an aspartic proteinase. *TINS* 23: 565-570 (2000).

Hoyer, S.: Oxidative energy metabolism in Alzheimer brain. *Mol Chem Neuropath* 16: 207-224 (1992).

Hung, A. Y.; Haass, C.; Nitsch, R. M.; Qiu, W. Q.; Citron, M.; Wurtman, R.; Growdon, J. H.; Selkoe, D. J.: Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid β -protein. *J Biol Chem* 268: 22959-22962 (1993).

Huse, J. T.; Liu, K.; Pijak, D. S.; Carlin, D.; Lee, V. M.-Y.; Doms, R. W.: β -secretase processing in the trans-golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *J Biol Chem* 277: 16278-16284 (2002).

Iyer, S. P. N.; Hart, G. W.: Dynamic nuclear and cytoplasmic glycosylation: enzymes of O-GlcNAc-cycling. *Biochem* 42: 2493-2499 (2003).

Jacobsen, J. S.; Spruy, M. A.; Brown, A. M.; Sahasrabudhe, S. R.; Blume, A. J.; Vitek, M. P.; Muenkel, H. A.; Sonnenberg-Reines, J.: The release of Alzheimer's disease β amyloid peptide is reduced by phorbol treatment. *J Biol Chem* 269: 8376-8382 (1994).

Jolly-Tornetta, C.; Wolf, B. A.: Regulation of amyloid precursor protein (APP) secretion by protein kinase C α in human Ntera 2 Neurons (NT2N). *Biochem* 39: 7428-7435 (2000).

Kim, C.; Jang, C. H.; Bang, J. G.; Jung, M. W.; Joo, I.; Kim, S. U.; Mook-Jung, I.: Amyloid precursor protein processing is separately regulated by protein kinase C and tyrosine kinase in human astrocytes. *Neurosci Lett* 324: 185-188 (2002).

Kösel, S.; Egensperger, R.; Lücking, C. B.; Schnopp, N. M.; Mehraein, P.; Graeber, M. B.: Genotyp-Analyse bei Hirnerkrankungen. *Neuroforum* 3: 11-19 (1996).

Koo, E. H.; Squazzo, S. L.: Evidence that production and release of amyloid β -protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 269: 17386-17389 (1994).

Kreppel, L. K.; Blomberg, M. A.; Hart, G. W.: Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. *J Biol Chem* 272: 9308-9315 (1997).

Kreppel, L. K.; Hart, G. W.: Regulation of a cytosolic nuclear O-GlcNAc transferase. *J Biol Chem* 274: 32015-32022 (1999).

Ku, N. O.; Omary, M. B.: Expression, glycosylation, and phosphorylation of human keratins 8 and 18 in insect cells. *Exp Cell Res* 211: 24-35 (1994).

Laemmli, U.K.: Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970).

Lammich, S.; Koiro, E.; Postina, R.; Gilbert, S.; Pfeiffer, R.; Jasionowski, M.; Haass, C.; Fahrenholz, F.: Constitutive and regulated α -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 3922-3927 (1999).

LeBlanc, A. C.; Koutroumanis, M.; Goodyer, C. G.: Protein kinase C activation increases release of secreted amyloid precursor protein without decreasing A β production in human primary neuron cultures. *J Neurosci* 18: 2907-2913 (1998).

Lee, E. B.; Skovronsky, D. M.; Abtahian, F.; Doms, R. W.; Lee, V. M.-Y.: Secretion and intracellular generation of truncated A β in β -site amyloid- β precursor protein-cleaving enzyme expressing human neurons. *J Biol Chem* 278: 4458-4466 (2003).

van Leuven, F.: Single and multiple transgenic mice as models for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 61: 305-312 (2000).

Liddell, M. B.; Lovestone, S.; Owen, M. J.: Genetic risk of Alzheimer's disease: advising relatives. *Brit J Psychiatry* 178: 7-11 (2001).

Lippa, C. F.: Familial Alzheimer's disease : Genetic influences on the disease process. *Int J Mol Med* 4: 529-536 (1999).

Liu, F.; Zaidi, T.; Iqbal, K.; Grundke-Iqbal, I.; Merkle, R. K.; Gong, C.-X.: Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett* 512: 101-106 (2002a).

Liu, F.; Su, Y.; Li, B.; Shou, Y.; Ryder, J.; Gonzalez-DeWhitt, P.; May, P. C.; Ni, B.: Regulation of amyloid precursor protein (APP) phosphorylation and processing by p35/Cdk5 and p25/Cdk5. *FEBS Lett* 547: 193-197 (2003).

Liu, K.; Doms, R. W.; Lee, V M.-Y.: Glu11 site cleavage and N-terminally truncated A β production upon BACE overexpression. *Biochem* 41: 3128-3136 (2002b).

Lubas, W. A.; Frank, D. W.; Krause, M.; Hanover, J. A.: O-linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J Biol Chem* 272: 9316-9324 (1997).

Lubas, W. A.; Hanover, J. A.: Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. *J Biol Chem* 275: 10983-10988 (2000).

Maccioni, R. B.; Munoz, J. P.; Barbeito, L.: The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res* 32: 367-381 (2001a).

Maccioni, R. B.; Oth, C.; Concha, I. I.; Munoz, J. P.: The protein kinase cdk5. *Eur J Biochem* 268: 1518-1527 (2001b).

Maltese, W. A.; Wilson, S.; Tan, Y.; Suomensaaari, S.; Sinha, S.; Barbour, R.; McConlogue, L.: Retention of the Alzheimer's amyloid precursor fragment C99 in the endoplasmic reticulum prevents formation of amyloid β -peptide. *J Biol Chem* 276: 20267-20279 (2001).

Marambaud, P.; Wilk, S.; Checler, F.: Protein kinase A phosphorylation of the proteasome: a contribution to the α -secretase pathway in human cells. *J Neurochem* 67: 2616-2619 (1996).

Marcinkiewicz, M.; Seidah, N. G.: Coordinated expression of β -amyloid precursor protein and the putative β -secretase BACE and α -secretase ADAM10 in mouse and human brain. *J Neurochem* 2133-2143 (2000).

Mattson, M. P.: Cellular actions of β -amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 77: 1081-1132 (1997).

Meijer, L.; Borgne, A.; Mulner, O.; Chong, J. P. J.; Blow, J. J.; Inagaki, N.; Inagaki, M.; Delcros, J.-G.; Moulinoux, J.-P.: Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur J Biochem* 243: 527-536 (1997).

- Morishimo-Kawashima, M.; Ikara, Y.: The presence of amyloid β -protein in the detergent-insoluble membrane compartment of human neuroblastoma cells. *Biochem* 37: 15247-15253 (1998).
- Murphy, M. P.; Hickman, L. J.; Eckman, C. B.; Uljon, S. N.; Wang, R.; Golde, T. E.: γ -secretase, evidence for multiple proteolytic activities and influence of membrane positioning of substrate on generation of amyloid β peptides of varying length. *J Biol Chem* 274: 11914-11923 (1999).
- Nourhashemi, F.; Gillette-Guyonnet, S.; Andrieu, S.; Ghisolfi, A.; Ousset, P. J.; Grandjean, H.; Grand, A.; Pous, J.; Vellas, B.; Albaredo, J.-L.: Alzheimer disease : protective factors. *Am J Clin Nutr* 71 : 643S-649S (2000).
- O'Donnel, N.: Intracellular glycosylation and development. *Biochim Biophys Acta* 1573: 336-345 (2002).
- Parvathy, S.; Hussain, I.; Karran, E. H.; Turner, A. J.; Hooper, N. M.: Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by α -secretase occurs at the surface of neuronal cells. *Biochem* 38: 9728-9734 (1999).
- Pei, J.-J.; Grundke-Iqbal, I.; Iqbal, K.; Bogdanovic, N.; Winblad, B.; Cowburn, R. F.: Accumulation of cyclin-dependent kinase 5 (cdk5) in neurons with early stages of Alzheimer's disease neurofibrillary degeneration. *Brain Res* 797: 267-277 (1998).
- Pichereau, V.; Bourot, S.; Flahaut, S.; Blanco, C.; Auffray, Y.; Bernard T.: The osmoprotectant glycine betaine inhibits salt-induced cross-tolerance towards lethal treatment in *Enterococcus faecalis*. *Microbiol* 145: 427-435 (1999).
- Pike, C. J.; Overman, M. J.; Cotman, C. W.: Amino-terminal deletions enhance aggregation of β -amyloid peptides in vitro. *J Biol Chem* 270: 23895-23898 (1995).
- Qiu, Z.; Naten, D. L.; Liston, J. C.; Yess, J.; Rebeck, G. W.: A novel approach for studying endogenous A β processing using cultured primary neurons isolated from APP transgenic mice. *Exp Neurol* 170: 186-194 (2001).
- Ramelot, T. A.; Gentile, L. N.; Nicholson, L. K.: Transient structure of the amyloid precursor protein cytoplasmic tail indicates preordering of structure for binding to cytosolic factors. *Biochem* 39: 2714-2725 (2000).
- Rex-Mathes, M.; Werner, S.; Strutas, D.; Griffith, L. S.; Viebahn, C.; Thelen, C.; Schmitz, B.: O-GlcNAc expression in developing and ageing mouse brain. *Biochim* 83: 585-590 (2001).
- Rossner, S.; Beck, M.; Stahl, T.; Mendla, K.; Schliebs, R.; Bigl, V.: Constitutive overactivation of protein kinase C in guinea pig brain increases alpha-secretory APP processing without decreasing beta-amyloid generation. *Eur J Neurosci* 12: 3191-3200 (2000).
- Saito, T.; Onuki, R.; Fujita, Y.; Kusakawa, G.-I.; Ishiguro, K.; Bibb, J. A.; Kishimoto, T.; Hisanaga, S.-I.: Developmental regulation of the proteolysis of the p35 cyclin-dependent kinase 5 activator by phosphorylation. *J Neurosci* 23: 1189-1197 (2003).

Savage, M. J.; Trusko, S. P.; Howland, D. S.; Pinsker, L. R.; Mistretta, S.; Reaume, A. G.; Greenberg, B. D.; Siman, R.; Scott, R. W.: Turnover of amyloid β -protein in mouse brain and acute reduction of its level by phorbol ester. *J Neurosci* 18: 1743-1752 (1998).

Sayeski, P. P.; Kudlow, J. E.: Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor- α gene transcription. *J Biol Chem* 271: 15237-15243 (1996).

Scheinfeld, M. H.; Ghersi, E.; Laky, K.; Fowlkes, B. J.; D'Adamio, L.: Processing of β -amyloid precursor-like protein-1 and -2 by γ -secretase regulates transcription. *J Biol Chem* 277: 44195-44201 (2002).

Schmitz, B.; Griffith, L. S.: N-Acetylglucosaminierung: die Alternative zur Ser/Thr Phosphorylierung. *Biospektrum* 4: 25-28 (1998).

Schultz, J.; Pils, B.: Prediction of structure and functional residues for O-GlcNAcase, a divergent homologue of acetyltransferase. *FEBS Lett* 529: 179-182 (2002).

Selkoe, D. J.: Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399: A23-A31 (1999).

Sennvik, K.; Fastbom, J.; Blomberg, M.; Wahlund, L.-O.; Winblad, B.; Benedikz, E.; Levels of α - and β -Secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 278: 169-172 (2000).

Shafi, R.; Iyer, S. P. N.; Ellies, L. G.; O'Donnell, N.; Marek, K. W.; Chui, D.; Hart, G. W.; Marth, J. D.: 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* 97: 5735-5739 (2000).

Shastry, B. S.: Molecular and cell biological aspects of Alzheimer's disease. *J Hum Genet* 46: 609-618 (2001).

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, I.; Power, M.; Tan, H.; Tatsuno, G.; Tung, J.; Schenk, D.; Seubert, P.; Suomensaaari, S. M.; Wang, S.; Walker, D.; Zhao, J.; McConlogue, L.; John V.: Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature* 402: 537-540 (1999).

Sisodia, S. S.; St. George-Hyslop, P. H.: γ -secretase, notch, A β and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in? *Nature Rev* 3: 281-290 (2002).

Smith, D. S.; Greer, P. L.; Tsai, L.-H.: Cdk5 on the brain. *Cell Growth Diff* 12: 277-283 (2001).

Snow, C.M., Senior, A., Gerace, L.: Monoclonal Antibodies Identify a Group of Nuclear Pore Complex Glycoproteins. *J Cell Biol* 104: 1143-1156 (1987).

St. George-Hyslop, P. H.: Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 47: 183-199 (2000).

- Steinhilb, M. L.; Turner, R. S.; Gaut, J. R.: ELISA analysis of β -secretase cleavage of the swedish amyloid precursor protein in the secretory and endocytic pathways. *J Neurochem* 80: 1019-1028 (2002).
- Strocchi, P.; Pession, A.; Dozza, B.: Up-regulation of cdk5/p35 by oxidative stress in human neuroblastoma IMR-32 cells. *J Cell Biochem* 88: 758-765 (2003).
- Suzuki, N.; Cheung, T. T.; Cai, S.-D.; Odaka, A.; Otvos, L.; Eckman, C.; Golde, T. E.; Younkin, S. G.: An increased percentage of long amyloid β protein secreted by familial amyloid β protein precursor (β APP₇₁₇) mutants. *Science* 264: 1336-1340 (1994).
- Tabet, N.; Mantle, D.; Orrell, M.: Free radicals as mediators of toxicity in Alzheimer's disease: a review and hypothesis.
- Takashima, A.; Murayama, M.; Yasutake, K.; Takahashi, H.; Yokoyama, M.; Ishiguro, K.: Involvement of cyclin dependent kinase5 activator p25 on tau phosphorylation. *Neurosci Lett* 306: 37-40 (2001).
- Tanaka, T.; Veeranna, Ohshima, T.; Raja, P.; Amin, N. D.; Cho, A.; Sreenath, T.; Pant, H. C.; Brady, R. O.; Kulkarni, A. B.: Neuronal cyclin-dependent kinase 5 activity is critical for survival. *J Neurosci* 21: 550-558 (2001).
- Tarricone, C.; Dhavan, R.; Peng, J.; Areces, L. B.; Tsai, L.-H.; Musacchio, A.: Structure and regulation of the dck5-p25^{neck5a} complex. *Mol Cell* 8: 657-669 (2001).
- Thinakaran, G.; Teplow, D. B.; Siman, R.; Greenberg, B.; Sisodia, S. S.: Metabolism of the "swedish" amyloid precursor protein variant in N2a cells. *J Biol Chem* 271: 9390-9397 (1996).
- Torres, C.-R.; Hart, G. W.: Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surface of intact lymphocytes. *J Biol Chem* 259: 3308-3317 (1984).
- Town, T.; Zolton, J.; Shaffner, R.; Schnell, B.; Crescentin, R.; Wu, Y.; Zeng, J.; DelleDonne, A.; Obregon, D.; Tan, J.; Mullan, M.: p35/cdk5 pathway mediates soluble amyloid- β peptide-induced tau phosphorylation in vitro. *J Neurosci Res* 69: 362-372 (2002).
- Turner, R. S.; Suzuki, N.; Chyung, A. S. C.; Younkin, S. G.; Lee, V. M.-Y.: Amyloid β_{40} and β_{42} are generated intracellularly in cultured human neurons and their secretion increases with maturation. *J Biol Chem* 271: 8966-8970 (1996).
- Tyler, S. J.; Dawbarn, D.; Wilcock, G. K.; Allen, S. J.: α - and β -secretase: profound changes in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Com* 299: 373-376 (2002).
- Vassar, R.; Bennett, B. D.; Babu-Khan, S.; Kahn, S.; Mendiaz, E. A.; Denis, P.; Teplow, D. B.; Ross, S.; Amarante, P.; Leoloff, 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.: β -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286: 735-741 (1999).
- Vosseller, R.; Wells, L.; Hart, G. W.: Nucleocytoplasmic O-glycosylation: O-GlcNAc and functional proteomics. *Biochim* 83: 575-581 (2001).

Walter, J.; Fluhrer, R.; Hartung, B.; Willem, M.; Kaether, C.; Capell, A.; Lammich, S.; Multhaup, G.; Haass, C.: Phosphorylation regulates intracellular trafficking of β -secretase. *J Biol Chem* 276: 14634-14641 (2001).

Wang, R.; Sweeney, D.; Gandy, S. E.; Sisodia, S. S.: The profile of soluble amyloid β protein in cultured cell media. *J Biol Chem* 271: 31894-31902 (1996).

Weishaupt, J. H.; Neusch, C.; Bähr, M.: Cyclin-dependent kinase 5 (CDK5) and neuronal cell death. *Cell Tiss Res* (2003).

Wells, L.; Gao, Y.; Mahoney, J. A.; Vosseler, K.; Chen, C.; Rosen, A.; Hart, G. W.: Dynamic O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: further characterization of the nucleocytoplasmic O-GlcNAcase. *J Biol Chem* (2001a).

Wells, L.; Vosseler, K.; Hart G. W.: Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 291: 2376-2378 (2001b).

Wells, L.; Hart, G. W.: O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Lett* 546: 154-158 (2003).

Wells, L.; Whelan, S. A.; Hart, G. W.: O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. *Biochem Biophys Res Com* 302: 435-441 (2003).

Wiltfang, J.; Esselmann, H.; Cupers, P.; Neumann, M.; Kretzschmar, H.; Meyermann, M.; Schleuder, D.; Jahn, H.; Rütger, E.; Kornhuber, J.; Annaert, W.; De Strooper, B.; Saftig, P.: Elevation of β -amyloid peptide 2-42 in sporadic and familial Alzheimer's disease and its generation in PS1 knockout cells. *J Biol Chem* 276: 42645-42657 (2001).

Yan, R.; Bienkowski, M. J.; Shuck, M. E.; Miao, H.; Tory, M. C.; Pauley, A. M.; Brashler, J. R.; Stratman, N. C.; Mathews, W. R.; Buhl, A. E.; Carter, D. B.; Tomasselli, A. G.; Parodi, L. A.; Heinrikson, R. L.; Gurney, M. E.: Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease β -secretase activity. *Nature* 402: 533-537 (1999).

Zachara, N. E.; Hart, G. W.: The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation. *Chem Rev* 102: 431-438 (2002).

3.7.2 OGT-Assay mit rekombinanter OGT

Der OGT-Assay wurde wie beschrieben mit rekombinanter OGT durchgeführt, die unter denaturierenden Bedingungen gewonnen wurde (siehe 3.5.4). Die Radioaktivität der einzelnen Waschschriffe, sowie der Elutionsschritte des Versuchsansatzes sowie der Kontrollen (Ansatz ohne Enzym bzw. ohne zu modifizierendem Peptid) wurden im Scintillationszähler analysiert.

Die meiste Radioaktivität befand sich in den ersten Waschschriffen. Auch im zweiten Waschschriff konnte ein Rest Radioaktivität gemessen werden. Im Elutionsschriff war sowohl beim Versuchsansatz als auch bei den Kontrollen fast keine Radioaktivität mehr messbar (siehe Tab. 15). Dies lässt darauf schließen, dass die OGT durch die denaturierenden Bedingungen der Aufreinigung inaktiviert worden war.

	Waschschriff 1	Waschschriff 2	Elution
Kontrolle 1 (ohne Enzym)	3946 cpm	278 cpm	187 cpm
Kontrolle 2 (ohne Peptid (CK II))	3848 cpm	153 cpm	140 cpm
Versuch	3788 cpm	187 cpm	99 cpm

Tab. 15: *OGT-Assay durchgeführt mit unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigter rekombinant hergestellter OGT.*

Nach Durchführung des OGT-Assays mit rekombinant hergestellter OGT unter denaturierenden Bedingungen wurden der Versuchsansatz und die Kontrollen jeweils über eine C18-Säule aufgereinigt. Dabei sollte sich im Elutionsschriff das radioaktiv-markierte Caseinkinase II (CK II) Peptid befinden. Die meiste Radioaktivität befand sich jedoch in den Waschschriffen und nicht in der Elution.

cpm = counts pro Minute

Es wurde daher für weiter Versuche die unter nicht-denaturierenden Bedingungen gewonnene OGT in Form des unaufgereinigten Lysats eingesetzt (3.6.1). Auch in diesem Versuch war nur in den beiden Waschschriffen und nicht im Eluat Radioaktivität nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Daher ist anzunehmen, dass sich im Lysat keine bzw. eine nicht ausreichende Enzymaktivität befand.

Anhang

DNA-Sequenzen

1. *Rattus norvegicus* O-GlcNAc transferase, p110 subunit (OGT) mRNA

1 agcatacaact gctgtgcate tacttcaact tgetttctat aagaatcttc tategtagga
61 tcatatthtt caacaaaaat tcttgaaca aactgtacag tcagagccga ctcccaaca
121 cctcctgagc caagaacgac tagcttatat tcacgcatga tgcacacttg ttacacttag
181 tacctctcgc gctgtgtgtg ttgggtcgag gagccgtcgc cgccatttca agacagtgcg
241 agaaacattc ttgttagtag tggcggcagt agaagtcaat tatecccttg ttctatctca
301 agaagctcca gatggcgtct tccgtgggca acgtggccga cagcacaggg ttagctgagt
361 tggcacatcg ggaatatcag gcaggagact ttgaggcagc tgagagacac tgcattgagc
421 tctggagaca agagcctgac aatactggtg ttcttttatt actttcatct atacatttcc
481 agtgtcgaag getggacaga tctgctcact ttacacactt ggcaattaaa cagaatcccc
541 ttctagcaga agcctattcg aatttgggaa atgtatacaa ggaaagaggg caattacagg
601 aagcaattga gcattatcga catgctttgc ggctcaagcc tgatttcatt gatggttata
661 ttaacctggc agcagccttg gtagcagcag gtgacatgga gggagcagtg caagcatacg
721 tctctgctct tcagtacaat cctgatttgt actgtgttcg cagtgcactg gggaaacctgc
781 tcaaagccct gggctcgttg gaagaagcca aggcattgta ttgaaagca attgagacgc
841 aaccaaactt tctgttagcc tggagtaate tggctgtgt ttcaatgca caaggggaga
901 ttggctggc aattcatcac ttgaaaagg ctgtcaccct tgaccctaat ttctggatg
961 cttatatcaa tttaggaaat gttttgaaag aggcacggat tttagacaga gctgtggcag
1021 cttatcttcg tgccttaagt ttgagcccaa atcatgcggt ggtacacggc aacctggctt
1081 gtgtgtacta tgagcaagge cttatagacc tggccattga tacctacagg cgagctatag
1141 aactgcagcc tcatttccct gatgcatact gcaacctagc aaatgctctc aaagagaagg
1201 gcagtgttgc tgaagcagaa gattgttata acacagctct tctgtgtgt cctacctatg
1261 cagactcttt gaataacctt gccaacatca aacgggaaca gggcaatatt gaagaggcag
1321 ttcgcctgta tgcgaaagca ttagaggctt tcccagagtt tctgtctgca cattccaatt
1381 tagcaagtgt actgcaacag cagggcaagc tgcaggaagc actgatgcac tataaggaag
1441 ccataagaat cagtctaca ttgctgatg cttattccaa tatgggaaac actttaaagg
1501 agatgcagga tgttcaggga gctttgcagt gttatactcg tgccatccag attaatcctg
1561 ccttcgcaga tgcacacagc aatctggctt ccattcacia ggattcaggg aatattccag
1621 aagcaatagc ttctaccgc acagctctga aacttaagcc tgactttctt gatgcttatt
1681 gtaacttggc tcaattgcta cagattgtct gtgattggac agactatgat gageggatga
1741 agaaattggt tagtattgta gctgagcagc tagagaagaa taggetgcct tctgtccatc
1801 ctcacacag catgctgtac cctcttccc atggcttcag gaaggccatt gcagagagggc
1861 atgggaatct ctgcttgat aagattaatg tcttcaata accaccatat gagcatccaa
1921 aagactgaa gctcagtgat ggccgattgc gtgtaggcta tgtgagtct gactttggga
1981 atcatctac ttcacactt atgcagtcta tccaggcat gcacaacct gataagtttg
2041 aggtattctg ctatgcttg agcccggatg acggtacaaa ctccgagtg aaggtgatgg
2101 cggaagccaa tcaattcatt gatctttctc agattccgtg caatggaaaa gcagctgacc
2161 gcatccacca agatggaatt cacatccttg tcaatatgaa tgggtacacc aagggtgccc
2221 gaaatgagct ctttctctc agccagctc ctattcagge tatgtgctg ggcctacctg
2281 ggactagtg ggcactgtc atggattaca tcatcactga tcaggaaact tcccagctg
2341 aagttgcaga gcagtattct gaaaaactgg cttatatgcc ccatacgttc ttattggtg
2401 atcatgctaa tatgttcca cacctgaaga aaaaagcagt catcgatttt aatctaag
2461 ggcacattta tgacaatga atagtttga atggcatcga tctcaaagca ttctcgata
2521 gtctaccgca tgtgaagatt gtcaagatga aatgtcctga tggaggtgac aatgcagaca

2581 ccactaacac agctcttaac atgcccgta tcccatgaa tacgattgca gaagcagtaa
2641 ttgaaatgat taacagaggg cagattcaga taacaattaa tggattcagt attagcaatg
2701 gactggctac tacacagatc aataacaagg ctgcaactgg agaggaagt ccccgta
2761 ttattgtaac caccggtcc cagtacgggc taccagaaga tgccattgtg tactgtaact
2821 ttaatcagtt atataaaatt gacccttcta ccctgcagat gggggcaaat attctgaac
2881 gtgtgcctaa tagegtgctt tggctgttc gtttccagc agtaggagag ccaatattc
2941 aacaatatgc aaaaatatg ggcctcccc agaaccgtat cattttctca cctgtggctc
3001 ctaaagagga gcatgacagg agaggtcagc tggctgatgt ctgctggat actcctttg
3061 gtaatggaca taccacaggg atggatgttc tctgggcagg aacacccatg gtgactatgc
3121 caggagagac tcttgctct cgagttgag ctctcagct cactgtctca ggatgtctg
3181 agctcattgc taaaagcaga caggaatatg aagacatagc cgtgaaactg gggaccgatc
3241 tagaatacct gaagaaaatt cgtggcaaag tatggaaaca gagaatatct agccctctgt
3301 tcaacaccaa acaatacaca atggaattag agcggctgta tctgcagatg tgggagcatt
3361 atgcagctgg caacaaacc gaccacatga ttaagcctgt tgaagtcact gagtcagcct
3421 gaataaagac tgcgcacagg agaattgccc ctatacctga gcctcaacct tctgggggaa
3481 agggaactag ataacatgct ttatgcttat ctgtatagta ctgtgttgca gatgggtgat
3541 atataatgat aatagaatag cacagccaga ctgcttct gcatgatagg gagagacaag
3601 aaataagaaa ctactattcc acaaggaate tctagagttt tgcagcaaac agtdgtgca
3661 caggdctgga atgtttgctc tctttrgct tccatggat gcttaatgtg gagggagata
3721 gagattaacc agccattttg tgattccgtg gattgatcaa atcttctgat cctttattt
3781 tttcttatg ttatgggggt tgaagctttt aaaaatgttt gctttcaggt atttttttt
3841 catgtgaagt gatcttgatt ctctgagat gaggttttaa actaaaatgt tgcctcctgt
3901 tttagtgtct gaactctgac aggtgacag ggacctgct ggtgtaatct tttataggt
3961 tttataaacc acatgagcct atacagtc ttttagtgc tgacctaatg ctggcactg
4021 tcagtgcctt gtgtaaatg

2. cDNA pQE-30, 3461 bp

1 CTCGAGAAAT CATAAAAAAT TTATTTGCTT TGTGAGCGGA TAACAATTAT AATAGATTCA
61 ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGAA TTCATTAAG AGGAGAAATT AACTATGAGA
121 GGATCGCATC ACCATCACCA TCACGGATCC GCATGCGAGC TCGGTACCCC GGGTCGACCT
181 GCAGCCAAGC TTAATTAGCT GAGCTTGGAC TCCTGTTGAT AGATCCAGTA ATGACCTCAG
241 AACTCCATCT GGATTTGTTC AGAACGCTCG GTTGCCGCCG GGCCTTTTTT ATTGGTGAGA
301 ATCCAAGCTA GCTTGGCGAG ATTTTCAGGA GCTAAGGAAG CTA AAAATGGA GAAAAAATC
361 ACTGGATATA CCACCGTTGA TATATCCCAA TGGCATCGTA AAGAACATTT TGAGGCATTT
421 CAGTCAGTTG CTCAATGTAC CTATAACCAG ACCGTTTCAGC TGGATATTAC GGCCTTTTTA
481 AAGACCGTAA AGAAAAATAA GCACAAGTTT TATCCGGCCT TTATTCACAT TCTTGCCCGC
541 CTGATGAATG CTCATCCGGA ATTTTCGTATG GCAATGAAAG ACGGTGAGCT GGTGATATGG
601 GATAGTGTTT ACCCTTGTTA CACCGTTTTT CATGAGCAAA CTGAAACGTT TTCATCGCTC
661 TGGAGTGAAT ACCACGACGA TTTCCGGCAG TTTCTACACA TATATTCGCA AGATGTGGCG
721 TGTTACGGTG AAAACCTGGC CTATTTCCCT AAAGGGTTTA TGAGAATAT GTTTTTCGTC
781 TCAGCCAATC CCTGGGTGAG TTTACCAGT TTTGATTTAA ACGTGGCCAA TATGGACAAC
841 TTCTTCGCC CCGTTTTTAC CATGGGCAAA TATTATACGC AAGGCGACAA GGTGCTGATG
901 CCGCTGGCGA TTCAGGTTCA TCATGCCGTT TGTGATGGCT TCCATGTCGG CAGAATGCTT
961 AATGAATTAC AACAGTACTG CGATGAGTGG CAGGGCGGGG CGTAATTTTT TTAAGGCAGT
1021 TATTGGTGCC CTAAACGCC TGGGGTAATG ACTCTCTAGC TTGAGGCATC AAATAAACG
1081 AAAGGCTCAG TCGAAAGACT GGGCCTTCG TTTTATCTGT TGTTTGTCGG TGAACGCTCT
1141 CCTGAGTAGG ACAAATCCGC CCTCTAGAGC TGCCTCGCGC GTTTCGGTGA TGACGGTGAA
1201 AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCTT GTCTGTAAGC GGATGCCGGG
1261 AGCAGACAAG CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG
1321 ACCCAGTCAC GTAGCGATAG CGGAGTGTAT ACTGGCTTAA CTATGCGGCA TCAGAGCAGA
1381 TTGTAAGTAC AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAAAAT
1441 ACCGCATCAG GCGCTCTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG GTCGTTCCGC
1501 TGCGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA GAATCAGGGG
1561 ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG
1621 CCGCGTTGCT GCGTTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC
1681 GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG
1741 GAAGCTCCCT CGTGCCTCTT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCCT
1801 TTCTCCCTTC GGAAGCGTG GCGCTTCTC ATAGCTCACG CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG
1861 TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC CCCCCTCAG CCCGACCGCT
1921 GCGCCTTATC CGGTAACATAT CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC

1981 TGGCAGCAGC CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT
2041 TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT ATCTGCGCTC
2101 TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA
2161 CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT
2221 CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC
2281 GTTAAGGGAT TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT
2341 AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC
2401 AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTCTGTTCA TCCATAGTTG
2461 CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACTACGA TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG
2521 CTGCAATGAT ACCGCGAGAC CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC
2581 CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA
2641 TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG CGCAACGTTG
2701 TTGCCATTGC TACAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT TGGTATGGCT TCATTAGCT
2761 CCGGTTCCCA ACATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA
2821 GCTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTACAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG
2881 TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA
2941 CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG AGTTGCTCTT
3001 GCCCCGCGTC AATACGGGAT AATACGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA GTGCTCATCA
3061 TTGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACTCT CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT
3121 CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT
3181 CTGGGTGAGC AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGGAATAAGG GCGACACGGA
3241 AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTT AATATTATTG AAGCATTTAT CAGGGTTATT
3301 GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA TAAACAAATA GGGGTTCCGC
3361 GCACATTTC CCGAAAAGTG CCACCTGACG TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA
3421 CCTATAAAAA TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA C