

Institut für Tierwissenschaften

---

Untersuchungen zur O-GlcNAc-Glykosylierung  
von Proteinen aus Endothel- und Skelettmuskelzellen

**Inaugural-Dissertation**

zur  
Erlangung des Grades

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

der  
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
zu Bonn

vorgelegt am 10.06.2010

von  
Stephanie Balzen  
aus  
Kleve

Referentin:	Prof. Dr. rer.nat. Schmitz
Koreferentin:	Prof. Dr. Dr. agr. Sauerwein
Tag der mündlichen Prüfung:	13.10.2010
Erscheinungsjahr:	2010

## DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Prof. Brigitte Schmitz für die Bereitstellung des Themas, Ihre Betreuung sowie ihre stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft während meiner Arbeit.

Prof. Peter Rösen danke ich für die erfolgreiche Kooperation und die Möglichkeit dieser Doktorarbeit.

Prof. Helga Sauerwein danke ich für die Korrektur meiner Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und insbesondere bei Dr. Simone Diestel, Dr. Tobias Goschzik, Bernd Gehrig, Marie-Therese Fergen, Christine Laurini und allen Diplomanden/innen während meiner Zeit am Institut für eine sehr gute Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Diestel für zahlreiche Anregungen und ausgiebige wissenschaftliche Diskussionen. Bernd Gehrig danke ich für sein offenes Ohr und seine Unterstützung bei biochemischen Problemen. Bei Marie-Therese Fergen bedanke ich mich für ihre Hilfe in der Zellkultur.

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

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie:

Meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und zusammen mit meinem Bruder Michael mich zu jeder Zeit unterstützt und aufgemuntert haben.

Meinem Mann Christian Balzen danke ich für seine uneingeschränkte Unterstützung und Motivation, und, dass er mir jederzeit ratgebend zur Seite stand.

Vielen Dank!

Meiner Familie

## **Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit**

Kongressbeiträge

Vortrag

“Identification of O-GlcNAc-Modified Proteins of Skeletal Muscle Cells by ESI-Mass Spectrometry” 3rd Satellite Meeting der deutschen und japanischen Studiengruppe für Glykobiologie, 10. November 2009, Köln, Deutschland

Poster

S Reinders, B Gehrig, P Rösen, B Schmitz: „Is O-GlcNAc important for the Development of Endothelial Dysfunction?“ 19th Joint Glycobiology Meeting der „Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie“, der „Nederlandse Vereniging voor Glycobiologie“, der „Groupe Lillois de Glycobiologie“ und der „Belgian Working Group for Glycosciences“, 30. November bis 02. Dezember 2008, Wageningen, Niederlande

## **Untersuchungen zur O-GlcNAc-Glykosylierung von Proteinen aus Endothel- und Skelettmuskelzellen**

Die O-GlcNAcylierung ist eine Ernährungs- und Stress-sensible Proteinmodifikation, welche eine Vielzahl regulatorischer Funktionen in zellulären Prozessen, wie Transkription, Signaltransduktion und Stoffwechsel, ausübt. Hyperglykämie führt zur verstärkten GlcNAcylierung von Proteinen, was zur Entstehung von Glucosetoxizität, endothelialer Dysfunktion und Insulinresistenz beiträgt, drei hauptsächlichen Kennzeichen des Diabetes mellitus Typ 2.

Um die Fragen zu beantworten, welche Proteine Veränderungen in ihrer O-GlcNAc-Modifikation unter hyperglykämischen Bedingungen zeigen, wurden humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) und humane skelettale Muskelzellen (SkMC) in Standardglucosemedium (LG, Kontrolle) und „Hoch Glucose“ Medium (HG) in An- und Abwesenheit des O-GlcNAcase-Inhibitors PUGNAc (LGP/HGP) kultiviert.

Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurden in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Anschluss nach einem Western Blot mit dem O-GlcNAc-spezifischen, monoklonalen Antikörper CTD 110.6 nachgewiesen. Parallel wurden die O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus Coomassie gefärbten Gelen ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und mittels MALDI-ToF- bzw. ESI-MS über MASCOT Mascot Peptide Mass Fingerprint bzw. MS/MS Ions Search und der Swiss-Prot Datenbank zugeordnet.

In den HUVEC wurden 24 und in den SkMC 37 O-GlcNAc-modifizierte Proteine identifiziert. Diese Proteine sind Transkriptionsfaktoren, Strukturproteine, Proteine der Energie-/Redoxregulation, metabolische Enzyme und Proteine mit Chaperonfunktion. Bei vielen Proteinen führte die Inkubation mit HG, HGP oder LGP zum Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation, wohingegen einige andere Proteine eine Verringerung der O-GlcNAcylierung im Vergleich zur Standardkultivierungen zeigten. Die Stärke der O-GlcNAc-Modifikation einiger Proteine unterschied sich nach HG- oder PUGNAc-Kultivierung, was darauf hinweist, dass die erhöhte Metabolisierung der Glucose durch den Hexosaminbiosyntheseweg und weitere Glucose-abhängige Signalwege andere Effekte hervorruft als die Inhibierung der O-GlcNAcase.

## **Analysis of O-GlcNAc-glycosylation of proteins of endothelial and skeletal muscle cells**

O-GlcNAcylation is a nutrient/stress-sensitive protein modification with regulatory functions in a wide array of cellular processes, including transcription, signalling, and metabolism. Hyperglycaemia leads to elevated GlcNAcylation of proteins, which contributes to glucose toxicity, endothelial dysfunction and insulin resistance, three major hallmarks of type 2 diabetes.

In order to answer the question which proteins change their level of O-GlcNAc modification under hyperglycaemic conditions, HUVEC and SkMC were treated with normal (LG) and high glucose (HG) media with or without the O-GlcNAcase inhibitor PUGNAc (LGP/HGP). O-GlcNAc modified proteins were investigated by two-dimensional gel electrophoresis and subsequent Western blotting using O-GlcNAc-specific monoclonal antibody CTD 110.6. 24 O-GlcNAc-modified proteins of HUVEC and 37 O-GlcNAc-modified proteins of SkMC were identified after in-gel Trypsin digest by MALDI-ToF- or ESI-mass spectrometry, MASCOT and Swiss-Prot database search. These proteins are transcription factors, structure proteins, proteins of the energy-/redox regulation, metabolic enzymes and have chaperon function. Many proteins showed an increase of the O-GlcNAc-modification after incubation with HG, HGP or LGP, whereas on some proteins the O-GlcNAc level decreased compared to the standard cultivation. The level of O-GlcNAc-modification of some proteins was different after HG- or PUGNAc-cultivation indicating that the increased flux of glucose through the HBP and further glucose-dependent pathways may have different effects than the inhibition of O-GlcNAcase.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die O-GlcNAc-Modifikation der Proteine	1
1.1.1 O-GlcNAc-Transferase	1
1.1.2 O-GlcNAcase	3
1.2 Mögliche Funktionen der O-GlcNAcylierung	5
1.3 Prinzip der reziproken O-GlcNAcylierung/Phosphorylierung	6
1.4 Einfluss der O-GlcNAcylierung auf die Transkriptionskontrolle	8
1.4.1 Einfluss der O-GlcNAcylierung auf verschiedene Transkriptions-relevante Mechanismen	8
1.4.2 Regulation der Glucosehomöostase durch O-GlcNAcylierte Transkriptionsfaktoren	11
1.5 Der Hexosaminbiosyntheseweg	13
1.6 Hyperglykämie-/Hyperlipidämie-induzierte metabolische Veränderungen	15
1.7 Diabetes mellitus Typ 2	16
1.7.1 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme	17
1.7.2 Insulinresistenz	18
1.8 Rolle der O-GlcNAcylierung für die Pathogenese des Diabetes mellitus	19
1.9 Mögliche Beziehung zwischen O-GlcNAcylierung, Alzheimer Demenz und Diabetes mellitus	20
1.10 Kardioprotektion durch verstärkte O-GlcNAcylierung	21
1.11 Endotheliale Dysfunktion	22
1.12 Reziproke Beziehung zwischen Insulinresistenz und endothelialer Dysfunktion	24
1.13 Zielsetzung der Arbeit	26
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1 Material	28
2.1.1 Chemikalien	28
2.1.2 Geräte	31
2.1.3 Einwegmaterial und Arbeitsutensilien	32
2.1.4 Antikörper, Lektine und POD-markierte Substanzen	32
2.1.5 Kits und Standards	34
2.1.6 Zelllinien	34
2.1.7 Bakterienstamm	35
2.1.8 Plasmide und Selektionsantibiotika	35
2.1.9 Enzyme	36
2.1.10 Lösungen, Medien und Puffer	36
	I

2.2	Methoden	42
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	42
2.2.1.1	Kultivierung und Lagerung von Bakterien	42
2.2.1.2	Herstellung kompetenter Bakterien	42
2.2.1.3	Hitzeschocktransformation von Bakterien (nach Hanahan, 1983)	42
2.2.1.4	DNA-Präparation	43
2.2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	43
2.2.1.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.2.1.7	Gelelution	44
2.2.1.8	Restriktionsanalyse	44
2.2.1.9	Aufreinigung der cDNA	44
2.2.1.10	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
2.2.1.11	Ligation	44
2.2.2	Methoden der Zellkultur	45
2.2.2.1	Zellkultivierung	45
2.2.2.2	Behandlung der HEK-Zellen	46
2.2.2.3	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse	46
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden	47
2.2.3.1	Expression des rekombinanten NUP62	47
2.2.3.2	Gewinnung des rekombinanten NUP62	47
2.2.3.3	Enzym-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)	48
2.2.3.3.1	Nachweis des rekombinanten NUP62	48
2.2.3.3.2	Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation des $\gamma$ -Kristallins	48
2.2.3.4	O-GlcNAc-Transferase-Aktivitätstest (OGT-Assay)	49
2.2.3.5	Analytische Methoden	49
2.2.3.5.1	Fraktionierte Zelllyse	49
2.2.3.5.2	Immunpräzipitation (IP)	50
2.2.3.5.3	Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford, 1976)	50
2.2.3.5.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (nach Laemmli, 1970)	50
2.2.3.5.5	Coomassiefärbung	51
2.2.3.5.6	Silberfärbung	51
2.2.3.5.7	Western Blot	51
2.2.3.5.8	Reversible Ponceau S Färbung	51
2.2.3.5.9	Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen	52
2.2.3.5.10	Entwickeln eines Röntgenfilms	52
2.2.3.5.11	Färbung von Proteinen auf Membranen	52
2.2.3.6	Zweidimensionale Gelelektrophorese und massenspektrometrische Analyse der Proteine	53
2.2.3.6.1	Herstellung von Zellhomogenaten	53
2.2.3.6.2	Gießen von immobilisierten pH-Gradienten	53
2.2.3.6.3	Methanol-Chloroform-Fällung	53
2.2.3.6.4	In-Gel-Proben-Rehydratisierung	54
2.2.3.6.5	1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung	54
2.2.3.6.6	Proteinfärbung der IPG-Streifen	54
2.2.3.6.7	Äquilibration	55
2.2.3.6.8	2. Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	55
2.2.3.6.9	Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel	55

2.2.3.6.10	Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung-Flugzeit Massenspektrometrie (MALDI-ToF MS)	56
2.2.3.6.11	Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS)	56
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>57</b>
3.1	Untersuchungen zur Aktivität der rekombinanten O-GlcNAc-Transferase	57
3.1.1	Expression des OGT-Substrates NUP62	57
3.1.2	Immunologischer Nachweis des rekombinanten NUP62	58
3.1.3	Untersuchungen der Aktivität verschiedener Präparationen der OGT im ELISA	60
3.1.4	Untersuchung weiterer Substrate für den OGT-Assay	61
3.2	2D-Analyse der Proteine aus HUVEC und immunologischer Nachweis ihrer O-GlcNAc-Modifikation	62
3.2.1	2D-Analyse der O-GlcNAc-Modifikation der HUVEC nach kurz- und langzeitiger HG-Kultivierung	62
3.2.2	2D-Analyse der O-GlcNAc-Modifikation der HUVEC nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 50 µM PUGNAc	63
3.2.3	Analyse der O-GlcNAc-Modifikation von 2D-aufgetrennten Proteinen aus HUVEC in An- und Abwesenheit von 200 µM PUGNAc	67
3.2.4	Analyse der O-GlcNAc-Modifikation und OGT-Expression der HUVEC nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 200 µM PUGNAc	76
3.3	2D-Analyse der Proteine aus skelettalen Muskelzellen und immunologischer Nachweis ihrer O-GlcNAc-Modifikation	79
3.3.1	2D-Analyse der O-GlcNAc-Modifikation der nukleären Proteinfraction aus SkMC nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von PUGNAc	80
3.3.2	2D-Analyse der O-GlcNAc-Modifikation der cytosolischen Proteinfraction aus SkMC nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von PUGNAc	82
3.4	Untersuchungen der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine aus humanen embryonalen Nierenzellen nach Kultivierung mit LG, HG oder Glucosamin	87
3.4.1	Einfluss der HG- und GlcN-Kultivierung auf die intrazelluläre O-GlcNAc- und OGT-Lokalisation in HEK-Zellen	87
3.4.2	Analyse der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine aus HEK-Zellen nach Kultivierung mit LG, HG und GlcN	89
3.5	Massenspektrometrische Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Proteine aus HUVEC und SkMC	91
3.5.1	Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Proteine aus HUVEC	91
3.5.2	Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Proteine der SkMC	97
3.5.2.1	Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Proteine aus der nukleären Fraktion der SkMC	97
3.5.2.2	Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Proteine aus der cytosolischen Fraktion der SkMC	101
3.5.2.3	Funktionelle Klassifizierung der O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus der nukleären und cytosolischen Fraktion der SkMC	108
3.5.2.4	Vergleich identifizierter O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus HUVEC und SkMC	110

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>112</b>
4.1	Etablierung eines Enzymsassay zur Übertragung von O-GlcNAc auf Proteine	112
4.1.1	Analyse verschiedener OGT-Isoformen und Substratwahl für den OGT-Assay	112
4.1.2	Vorschläge zur Verbesserung des OGT-Assays	113
4.2	2D-Gelelektrophorese, Nachweis O-GlcNAc-modifizierter Proteine mittels Western Blot und Massenspektrometrie	114
4.2.1	Reproduzierbarkeit der 2D-Gelelektrophorese	114
4.2.2	Einfluss der Nachweismethode auf die O-GlcNAc-Detektion	116
4.2.3	Massenspektrometrischen Analyse O-GlcNAc-modifizierter Proteine	117
4.3	Das O-GlcNAcom	119
4.3.1	Wahl des OGA-Inhibitors	119
4.3.2	Regulation der OGT und OGA	120
4.3.3	Einfluss von Glucosamin auf die O-GlcNAc-Modifikation der Proteine	121
4.3.4	Zelluläre Reaktionen bei hoher Glucosekonzentration	121
4.3.5	Bedeutung der identifizierten O-GlcNAc-modifizierten Proteine im Metabolismus der Zelle	122
4.3.5.1	O-GlcNAc-modifizierte Proteine aus HUVEC	123
4.3.5.1.1	Strukturproteine	123
4.3.5.1.2	Proteine des Stoffwechsels	124
4.3.5.1.3	Proteine der Energie-/Redoxregulation	125
4.3.5.1.4	Chaperone	127
4.3.5.1.5	Proteine der Signaltransduktion	129
4.3.5.1.6	Proteine der Transkription	129
4.3.5.1.7	Proteine des Proteinabbaus	130
4.3.5.2	O-GlcNAc-modifizierte Proteine in SkMC	130
4.3.5.2.1	Strukturproteine	130
4.3.5.2.2	Proteine des Stoffwechsels	131
4.3.5.2.3	Proteine der Energie-/Redoxregulation	133
4.3.5.2.4	Chaperone	135
4.3.6	Die O-GlcNAc-Modifikation und ihr Einfluss auf die Apoptose	136
4.3.7	Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf die Entstehung der endothelialen Dysfunktion oder Insulinresistenz	137
4.4	Ausblick	139
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>140</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>142</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>166</b>
7.1	Plasmid pBJG1-NUP	166
7.2	cDNA-Sequenz NUP62 aus <i>Rattus norvegicus</i>	166
7.3	Mutation in der Sequenz des pBJG1-NUP	167
7.4	Aminosäuresequenz des Proteins NUP62 aus <i>Rattus norvegicus</i>	168
7.5	Potentielle O-GlcNAc-Modifikationsstellen der identifizierten Proteine aus HUVEC und SkMC	168
7.6	Ausschlussklärung	172

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur der OGT	2
Abbildung 2: Dynamische Beziehungen zwischen O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung	7
Abbildung 3: O-GlcNAc kontrolliert die Transkription durch Beeinflussung verschiedener Transkriptions-relevanter Mechanismen	9
Abbildung 4: O-GlcNAc-Modifizierung verändert die Aktivität von Transkriptionsfaktoren	11
Abbildung 5: Auswirkungen chronischer Hyperglykämie auf die O-GlcNAc-Modifikation von Transkriptionsfaktoren und die Glucosetoxizität	13
Abbildung 6: Der Hexosaminbiosyntheseweg kontrolliert die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen	14
Abbildung 7: Hyperglykämie-induzierte Überproduktion von Superoxiden aktiviert vier Nebenwege der Glykolyse, die zu den Spätschäden von Hyperglykämie und Diabetes mellitus Typ 2 beitragen	16
Abbildung 8: Überblick über die durch Insulin stimulierten Signalwege	18
Abbildung 9: Regulation der endothelialen NO-Synthase	23
Abbildung 10: Reziproke Beziehung zwischen Insulinresistenz und endothelialer Dysfunktion	25
Abbildung 11: Überprüfung verschiedener Klone der Ligation pBJG1-NUP mit Restriktionsenzymen	58
Abbildung 12: Western Blot Analyse von NUP62 in Bakterienlysaten verschiedener Expressionsansätze	59
Abbildung 13: Direct Blue Färbung der aufgearbeiteten Bakterienlysate der NUP62-Expressionsansätze	60
Abbildung 14: ELISA-Analyse der Übertragung von O-GlcNAc auf das rekombinante NUP62 durch verschiedene Präparationen der O-GlcNAc-Transferase	61
Abbildung 15: Nachweis der Bindung des biotinylierten $\gamma$ -Kristallins und des biotinylierten GlcNAc-BSA an Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten über die Detektion der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine mit sWGA und den Antikörper CTD 110.6	62
Abbildung 16: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen aus HUVEC (pH-Gradient 4-10) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 50 $\mu$ M PUGNAc	64
Abbildung 17: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten Proteine aus HUVEC (pH-Gradient 4-10) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 50 $\mu$ M PUGNAc	65
Abbildung 18: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen aus HUVEC (pH-Gradient 4-7) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 50 $\mu$ M PUGNAc	66

Abbildung 19: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten Proteine aus HUVEC (pH-Gradient 4-7) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 50 $\mu$ M PUGNAc	67
Abbildung 20: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen aus HUVEC (pH-Gradient 3-10) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen An- und Abwesenheit von 200 $\mu$ M PUGNAc	68
Abbildung 21: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten Proteine aus HUVEC (pH-Gradient 3-10) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 200 $\mu$ M PUGNAc	69
Abbildung 22: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen aus HUVEC (pH-Gradient 4-7) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 200 $\mu$ M PUGNAc	71
Abbildung 23: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten Proteine aus HUVEC (pH-Gradient 4-7) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 200 $\mu$ M PUGNAc	72
Abbildung 24: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen aus HUVEC (pH-Gradient 6-11) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 200 $\mu$ M PUGNAc	73
Abbildung 25: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten Proteine aus HUVEC (pH-Gradient 6-11) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 200 $\mu$ M PUGNAc	75
Abbildung 26: Western Blot Analyse der O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus HUVEC nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen	77
Abbildung 27: Western Blot Analyse der OGT in HUVEC nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen	78
Abbildung 28: Western Blot Analyse der O-GlcNAc-modifizierten OGT in HUVEC nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen	79
Abbildung 29: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen der nukleären Proteinfraktion aus SkMC nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen	80
Abbildung 30: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten nukleären Proteinfraktion aus SkMC nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen	81
Abbildung 31: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen der cytosolischen Proteinfraktion aus SkMC (pH-Gradient 4-7) nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen	83
Abbildung 32: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten cytosolischen Proteinfraktion (pH 4-7) aus SkMC nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen	84

Abbildung 33: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen der cytosolischen Proteinfraction aus SkMC (pH-Gradient 6-11) nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP und LGP Bedingungen	85
Abbildung 34: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten cytosolischen Proteinfraction (pH 6-11) aus SkMC nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen	86
Abbildung 35: Indirekte Immunfluoreszenzanalyse der O-GlcNAc-Modifikation und der OGT-Expression in HEK-Zellen	88
Abbildung 36: Analyse der O-GlcNAc-Modifikation von 2D-aufgetrennten Proteinen der cytosolischen Fraktion aus HEK-Zellen nach Kultivierung mit LG, HG und GlcN	89
Abbildung 37: Analyse der O-GlcNAc-Modifikation von 2D-aufgetrennten Proteinen der nukleären Fraktion aus HEK-Zellen nach Kultivierung mit LG, HG und GlcN	90
Abbildung 38 Analyse der cytosolischen und nukleären OGT-Expression in HEK-Zellen nach Kultivierung mit LG, HG und Glucosamin	91
Abbildung 39: Funktionelle Klassifizierung der O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus HUVEC	95
Abbildung 40: Funktionelle Klassifizierung der gesteigerten oder verminderten O-GlcNAc-Modifikation der Proteine aus HUVEC in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen	96
Abbildung 41: Funktionelle Klassifizierung der O-GlcNAc-modifizierten, nukleäre Proteine aus SkMC	99
Abbildung 42: Funktionelle Klassifizierung der gesteigerten oder verminderten O-GlcNAc-Modifikation der Proteine aus der nukleären Fraktion der SkMC in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen	100
Abbildung 43: Funktionelle Klassifizierung der O-GlcNAc-modifizierten, cytosolischen Proteine aus SkMC	106
Abbildung 44: Funktionelle Klassifizierung der gesteigerten oder verminderten O-GlcNAc-Modifikation der Proteine aus der cytosolischen Fraktion der SkMC in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen	107
Abbildung 45: Funktionelle Klassifizierung der O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus der zusammengefassten cytosolischen und nukleären Fraktion der SkMC	109
Abbildung 46: Funktionelle Klassifizierung der gesteigerten oder verminderten O-GlcNAc-Modifikation der Proteine aus SkMC in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen	110
Abbildung 47 Vektorkarte pBJG1-NUP	166

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Chemikalien	31
Tabelle 2: Geräte	31
Tabelle 3: Einwegmaterial und Arbeitsutensilien	32
Tabelle 4: Antikörper, Lektine und POD-markierte Reagenzien	33
Tabelle 5: Kits und Standards	34
Tabelle 6: Zelllinien	34
Tabelle 7: Kultivierung der Zellen	35
Tabelle 8: Enzyme	36
Tabelle 9: Ligationsansätze zur Konstruktion des Plasmids pBJG1-NUP	45
Tabelle 10: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine aus HUVEC	92
Tabelle 11: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine aus der nukleären Fraktion der SkMC	98
Tabelle 12: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine aus der cytosolischen Fraktion der SkMC	102
Tabelle 13 Gegenüberstellung O-GlcNAc-modifizierter Proteine, die in HUVEC und SkMC identifiziert wurden	111

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1-DE	eindimensionale Gelelektrophorese
2D	zweidimensional
2-DE	zweidimensionale Gelelektrophorese
ABTS	2,2'-Azino-Di-(3-Ethyl-Benzthiazolinsulfonsäure)
ACN	Acetonitril
ACTH	Adrenocorticotropin
AD	Alzheimer Demenz
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	„advanced glycation end product“
ALDOA	Fructotsebisphosphat-Aldolase A
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	„analysis of variance“
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dem.	demineralisiertes Wasser
AS	Aminosäure
ASS	Aminosäuresequenz
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	„B-cell lymphoma“-2 Protein
BH <sub>2</sub>	Dihydrobiopterin
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaar/e
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBB	Coomassie Brilliant Blau
Cbl	„Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene“
CBP	„CREB-binding protein“
CCT5	ε-Untereinheit des T-Komplexprotein 1
cDNA	revers von RNA transkripte DANN
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CF	cytosolische Proteinfraction
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CHAPS	3-[(3-Cholamido-Propyl-1)Dimethylammonium]-1-Propansulfonat
CHO-Zellen	Zellen aus Ovarien des chinesischen Hamsters
COS7-Zellen	Fibroblastenzelllinie der afrikanischen Grünen Meerkatze mit SV40-transfiziert
CREB	„cAMP response element-binding protein“
CRTC2	„CREB-regulated transcription co-activator 2“
CTD	carboxyterminale Domäne
C-terminal	Carboxyterminal
DAG	Diacylglycerol
Daxx	Todesdomänen-assoziertes Protein
DeStreak™	Hydroxyethylsulfid

DIGE	Differenzierungsgelelektrophorese
d.h.	das heißt
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-deoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EndoPDI	endotheliale Proteindisulfidisomerase
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erp57	Proteindisulfidisomerase A3
ESI	Elektronenspray-Ionisierung
et al.	et alii (lat.)
ETD	„Electron Transfer Dissociation“
FADH <sub>2</sub>	Flavinadenindinukleotid (reduzierte Form)
FCS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung ( $g = 9,81\text{m/s}^2$ )
G	Guanin
G6Pase	Glucose-6-Phosphatase
Gab1	GRB-assoziiertes Bindeprotein
GalT	Galactosyltransferase
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFAT	Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Amidotransferase
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GlcNAz	N-Azidoacetylglucosamin
GLUT	Glucosetransportprotein
GRP	Glucose-reguliertes Protein
GSK3	Glycogensynthasekinase 3
h	Stunde
HBP	Hexosaminbiosyntheseweg
HBSS	Hank's ausgewogene Salzlösung
HCCA	$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxizimtsäure
HEK-Zellen	humane embryonale Nierenzellen
HeLa-Zellen	humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms der Patientin Henrietta Lacks
Hep3b-Zellen	humane Leberkarzinomzelllinie
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
HepG2-Zellen	humane Leberkarzinomzelllinie
HG/HGP	„High Glucose“/„High Glucose“ + PUGNAc
His	Histidin

HMG	„High Mobility Group Protein“
Hnrnp	heterologes Ribonukleoprotein
HSC70	artverwandtes Hitzeschockprotein 70
HSP	Hitzeschockprotein
HUVEC	humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene
IEF	isoelektrische Fokussierung
IKK $\beta$	inhibitorische $\kappa$ B Kinase $\beta$
IP	Immunpräzipitation
IPG	immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
JNK	c-Jun aminoterminal Kinase
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
kVh	Kilovoltstunden
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LG/LGP	„Low Glucose“, Kontrolle/„Low Glucose“ + PUGNAc
-lsg	-lösung
M	Molekulargewichtsmarker
McOGT	cytosolische OGT aus Mäusehirnen
MDH	Malatdehydrogenase
MGEA5	Meninginoma exprimierendes Antigen 5
min	Minute
MIN6-Zellen	pankreatische $\beta$ -Zelllinie
MnOGT	nukleäre OGT aus Mäusehirnen
mOGT	mitochondriale OGT
MOPS	2-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	„messenger RNA“
mtDNA	mitochondriale DANN
MW	Molekulargewicht
MS	Massenspektrometrie
N2a-Zellen	Neuroblastomazelllinie aus der Maus
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form/reduzierte Form)
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NButGT	1,2-dideoxy-2'-propyl- $\alpha$ -D-glucopyranoso-[2,1-D]- $\Delta$ 2'-thiazolin
ncOGT	nukleocytoplasmatische O-GlcNAc-Transferase
NeuroD1	neurogener Differenzierungsfaktor 1
NF	nukleäre Proteinfraction
NIH-3T3-Zellen	Fibroblastenzelllinie aus der Maus, nach „3-day transfer, inoculum 3 x 10 <sup>5</sup> cells“-Protokoll
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase

NP-40	Nonidet P-40
N-terminal	Aminoterminal
NUP62	Nukleoporin 62 kDa
OD	optische Dichte
OGA	O-GlcNAcase
O-GlcNAc	$\beta$ -O-glykosidisch gebundenes N-Acetylglucosamin
OGT	O-GlcNAc-Transferase
OGT-Assay	O-GlcNAc-Transferase-Aktivitätstest
PAI-1	„plasminogen activator inhibitor-1“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribosepolymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDI	Proteindisulfidisomerase
PDK1	Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1
PDX-1	„Pancreatic/duodenal homeobox-1 protein“
PEG	Polyethylenglykol
PGC1 $\alpha$	„peroxisome proliferator activated receptor $\gamma$ co-activator 1 $\alpha$ “
PGK1	Phosphoglyceratkinase 1
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
pI	Isoelektrischer Punkt
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Pig3	putative Chinonoxidoreduktase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B, Akt
PKC	Proteinkinase C
PKM2	Isoenzym der Pyruvatkinase
PLL	Poly-L-Lysin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PP1	Proteinphosphatase-1
PPAR	Peroxisomen-Proliferator-aktivierender Rezeptor
Prdx	Peroxiredoxin
PUGNAc	O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosyliden)amino-N-phenylcarbammat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PYCR1	Mitochondriale Pyrrolin-5-Carboxylatreduktase 1
RACK1	Rezeptor der aktivierten Proteinkinase C1
Raldh1	Retinaldehydrogenase 1
Rho	„ras homolog“
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X-Rezeptor

s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA2a	Calcium-abhängige sarcoendoplasmatische Retikulum-ATPase 2°
SH2	scr-Homologie 2
SH3	scr-Homologie 3
siRNA	„small interfering RNA“
SkMC	humane Skelettmuskelzellen
sOGT	„short OGT“
Stat	Signalüberträger und Transkriptionsaktivierer
STZ	Streptozotocin
sWGA	succinyliertes Weizenkeimagglutinin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
TORC2	„transducer of regulated cAMP response element-binding protein 2“
TPI	Triosephosphatisomerase
TPR	Tetratricopeptidwiederholungsmotiv
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Units (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem, unter anderen
UCHL1	Isoenzym der carboxyterminalen Ubiquitinhydrolase L1
UDP	Uridindiphosphat
UDP-GlcNAc	Uridin-5'-Diphospho-N-Acetylglucosamin
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
VDAC	Spannungsabhängiges Anionenkanalprotein
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
Vmaf	„musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A“
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WGA	Weizenkeimagglutinin
z.B.	zum Beispiel

# 1 Einleitung

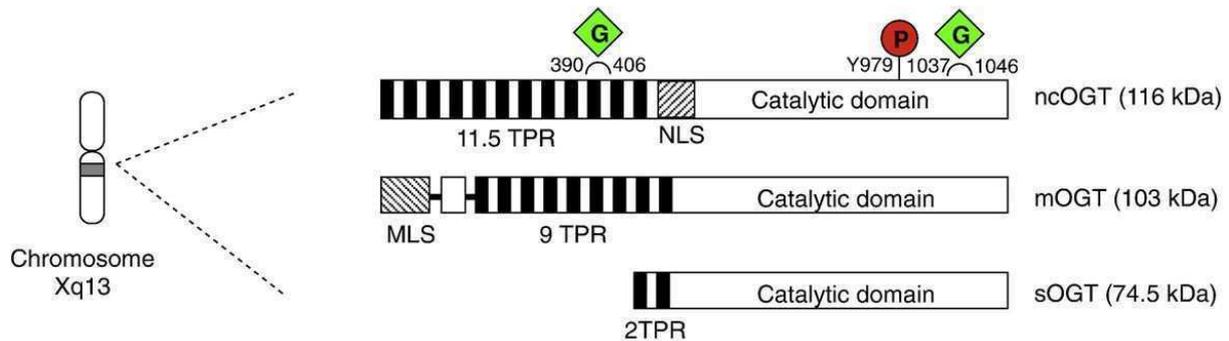
## 1.1 Die O-GlcNAc-Modifikation der Proteine

Im Jahr 1984 entdeckten Torres und Hart die Modifikation von Proteinen mit einem einzelnen  $\beta$ -O-glykosidisch verknüpften N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) an Hydroxylgruppen von Serin- oder Threoninresten (Torres und Hart, 1984). Die Modifikation zählt zu den posttranslationalen Proteinmodifikationen. Im Gegensatz zu anderen Formen der Proteinglykosylierung, welche Zellmembranproteine oder sekretorische Proteine modifizieren, ist die O-GlcNAc-Modifikation auf Proteinen im Cytoplasma und Zellkern (Hart et al., 2007) sowie in den Mitochondrien (Hu et al., 2009) zu finden. Die O-GlcNAcylierung ist eine einzigartige Glykosylierungsart, welche nicht zu höheren Oligosacchariden aufgebaut wird (Lefebvre et al., 2010). Seit ihrer Entdeckung wurden ungefähr eintausend O-GlcNAc-modifizierte Proteine identifiziert. Viele O-GlcNAcylierte Proteine sind in die Regulation der intrazellulären Signalwege und der Transkriptionskontrolle involviert, spielen aber auch eine Rolle im Cytoskelettnetzwerk, bei der Stressantwort und im Ubiquitin-Proteasom-System. O-GlcNAc kann die Funktionen der modifizierten Proteine durch Beeinflussung von Protein-Protein-Interaktionen oder der Proteinlokalisierung modulieren. Die O-GlcNAcylierung ist der Proteinphosphorylierung in Bezug auf Stöchiometrie, Lokalisation und Umsatz ähnlich. Jedoch sind bisher nur zwei Enzyme bekannt, welche die O-GlcNAc-Regulation steuern, während es Hunderte von Kinasen und Phosphatasen gibt. Die O-GlcNAc-Transferase (OGT) katalysiert das Anfügen des O-GlcNAc an Proteine und die O-GlcNAcase (OGA) ist für das Entfernen des O-GlcNAc zuständig (Butkinaree et al., 2010).

### 1.1.1 O-GlcNAc-Transferase

Das Enzym Uridin-diphospho-N-Acetylglucosamin:polypeptid- $\beta$ -N-Acetylglucosaminyltransferase (O-GlcNAc-Transferase, OGT) katalysiert die Übertragung des O-GlcNAc von Uridin-5'-Diphospho-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) auf die Hydroxylgruppen von Serin- oder Threoninresten der Zielproteine (Haltiwanger et al., 1990). Das Enzym wurde zuerst in Menschen, Ratten und *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) identifiziert (Kreppel et al., 1997; Lubas et al., 1997). Das Gen, welches für die OGT codiert, wurde während der Evolution hoch konserviert (Kreppel et al., 1997). In Säugetieren befindet sich das OGT-Gen auf dem Chromosomenloкус Xq13.1, eine Region, die mit Morbus Parkinson assoziiert wird (Shafi et al., 2000; Hanover et al., 2003). Es gibt nur ein Gen für die OGT, von dem drei alternative Spleißformen existieren: eine 116 kDa nukleocytoplasmatische Isoform ncOGT, eine 103 kDa mitochondriale Isoform mOGT sowie eine kurze 78 kDa nukleocytoplasmatische Isoform sOGT (Kreppel et al., 1997; Hanover et al., 2003; Haltiwanger et al., 1992; Love et al., 2003; Lazarus et al., 2006). Alle drei Isoformen bestehen aus zwei charakteristischen Domänen. Der C-Terminus enthält das aktive Zentrum des Enzyms (Roos und Hanover, 2000; Lubas und Hanover, 2000) und die N-terminale Domäne

enthält Tetratricopeptid-Wiederholungsmotive (TPR), welche für Protein-Protein-Interaktionen notwendig sind. Die Isoformen unterscheiden sich in der Anzahl der TPRs. Die ncOGT enthält ungefähr 11.5 TPRs, die mOGT enthält etwa 9 TPRs und zusätzlich noch einen Abschnitt mit 120 Aminosäuren (AS) am N-Terminus, welcher als mitochondriale Erkennungssequenz fungiert, und die sOGT enthält nur 2 TPRs (Kreppel et al., 1997; Love et al., 2003).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur der OGT**

Drei verschiedene Isoformen der humanen OGT werden durch alternatives Spleißen von einem einzelnen Gen auf dem Chromosom Xq13.1 codiert. Die bekannten posttranslationalen Modifikationen sind an den entsprechenden AS abgebildet (G: O-GlcNAc-Modifizierung; P: Tyrosinphosphorylierung).

TPR: Tetratricopeptid-Wiederholungsmotiv, NLS: Kernlokalisationssequenz, MLS: mitochondriale Erkennungssequenz (modifiziert nach Butkinaree et al., 2010)

Alle drei OGT-Isoformen werden in den Erythrozyten sowie in T- und B-Zellen, natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen exprimiert (Lazarus et al., 2006). Ansonsten ist die Expression der Isoformen stark gewebeabhängig. Die ncOGT kommt in allen Geweben vor. In der Niere ist sie nur schwach, hingegen im Gehirn, Pankreas und Uterus ist sie stark exprimiert (Kreppel et al., 1997). Das Vorkommen der mOGT beschränkt sich neben den oben genannten Zellen auf das fötale Gehirn und die fötale Lunge (Lazarus et al., 2006). Die sOGT ist in der Niere, in der Leber, im Muskel, im Thymus, im Blut, in der Speicheldrüse, in den Ovarien, in den Mandeln, in der Plazenta und in den pankreatischen Inselzellen nachgewiesen worden (Kreppel et al., 1997; Lazarus et al., 2006). Das gewebsspezifische Vorhandensein der OGT-Isoformen mag zu der Überlegung führen, dass die unterschiedlichen Isoformen verschiedene Funktionen ausführen und verschiedenartig auf zelluläre Signale reagieren (Kreppel et al., 1997; Lazarus et al., 2006).

Die Stärke der mRNA- und Proteinexpression der OGT ist gewebspezifisch und abhängig von spezifischen zellulären Signalen. Zum Beispiel wird in N2a-Zellen die OGT-mRNA- und -Proteinexpression als Antwort auf Glucoseentzug über die AMP-Kinase-Kaskade erhöht (Cheung und Hart, 2008). Die OGT-Aktivität wird durch die Konzentration des Substrats UDP-GlcNAc beeinflusst. Eine erhöhte UDP-GlcNAc-Konzentration kann die OGT-Affinität zu Peptidsubstraten steigern (Kreppel et al., 1997; Haltiwanger et al., 1992; Kreppel und Hart, 1999; s. Seite 14). Freies UDP ist ein effektiver Inhibitor der OGT. Die Aktivität der OGT

sinkt um mehr als 50 % bei einer UDP-Konzentration größer als 0.5  $\mu$ M UDP (Haltiwanger et al., 1990).

Die OGT-Isoformen zeigen *in vitro* keine eindeutige Präferenz für eine definierte Konsensussequenz (Lazarus et al., 2006; Gross et al., 2005). Neueste Untersuchungen haben einige hundert O-GlcNAc-modifizierte Peptidsequenzen entschlüsselt, welche zeigen, dass ungefähr die Hälfte dieser Sequenzen ein Prolin-Valin-Serin/Threonin-Serin-Threonin-Motiv enthalten (Vosseller et al., 2006; Chalkey et al., 2009; Wang et al., 2009). Zusätzlich wurde in einer Studie mit postsynaptischen Präparationen aus Mäusehirnen ein TTA-Motiv, d.h. zwei aufeinanderfolgende AS mit Hydroxylgruppen in Nachbarschaft zu einem Alanin, als O-GlcNAc-Modifikationssequenz identifiziert (Vosseller et al., 2006).

Die Aktivität und Lokalisation der OGT wird auch durch kurzzeitige Komplexbildung mit anderen regulatorischen Proteinen geregelt. Während der Mitose wandert die OGT zunächst zur mitotischen Spindel und später während der Cytokinese zu den Bündeln der Mikrotubuli, wobei sie einen Komplex mit der OGA, der Aurora B-Kinase und der Protein-Phosphatase 1 (PP1) c bildet. Inhibierung der Aurora B-Kinaseaktivität verändert die O-GlcNAc-Expression und unterbricht die Translokation der OGT zu den Bündeln der Mikrotubuli während der Cytokinese (Slawson et al., 2008).

Außerdem wird die OGT-Aktivität durch ihre eigenen posttranslationalen Modifikationen reguliert. Die OGT O-GlcNAcyliert sich selber zwischen den AS 1037 bis 1046 in der katalytischen Domäne und zwischen den AS 390 und 406 in den neunten TPR. Sie ist an Tyrosin-979 phosphoryliert (Kreppel et al., 1997; Lubas und Hanover, 2000; Tai et al., 2004). So ist z.B. eine gesteigerte OGT-Aktivität durch erhöhte Tyrosinphosphorylierung der OGT nach Insulinstimulation von 3T3-L1-Adipozyten zu beobachten (Song et al., 2009; Whelan et al., 2008). Der Mechanismus der Beeinflussung der Aktivität durch GlcNAcylierung oder Phosphorylierung ist bisher nicht bekannt.

### 1.1.2 O-GlcNAcase

Die  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase (O-GlcNAcase, OGA) ist eine Hexosaminidase mit einem neutralen pH-Optimum, welche spezifisch die Hydrolyse des  $\beta$ -glykosidisch verknüpften GlcNAc von Serin oder Threonin katalysiert (Dong und Hart, 1994; Gao et al., 2001). Die OGA wird von einem Gen codiert, das ursprünglich „Meninginoma exprimierendes Antigen 5“ (MGEA5)-Gen genannt wurde (Farook et al., 2002; Heckel et al., 1998). MGEA5 ist auf dem Chromosom 10q24.1-q24.3 kartiert, einer Region, die mit Morbus Alzheimer assoziiert ist. Zusätzlich wurde gezeigt, dass das OGA-Gen mit der Entstehung von Diabetes mellitus assoziiert ist, da ein einzelner Nukleotidpolymorphismus im MGEA5-Gen mit dem Auftreten des Diabetes mellitus Typ 2 in der mexikanischen Bevölkerung korreliert (Lehman et al., 2005). Die Sequenz der OGA ist hoch konserviert in Eukaryoten, vor allem in Säugetieren, jedoch fehlt sie in Prokaryoten und Hefen (Gao et al., 2001). Das Enzym zeigt eine mutmaßliche Acetyltransferasedomäne am C-Terminus zwischen den AS 772 bis 898, welche

mit dem katalytischen Zentrum in der N-terminalen Domäne durch eine ungeordnete Region von 150 AS verbunden ist, die keine genaue dreidimensionale Struktur aufweist (Cetinbas et al., 2006; Gao et al., 2001; Heckel et al., 1998; Comtesse et al., 2001; Dennis et al., 2006; Toleman et al., 2004).

Zwei Spleißvarianten der OGA wurden identifiziert: eine 130 kDa-Isoform bestehend aus 916 AS, welche vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert ist, sowie eine 75 kDa-Isoform aus 677 AS, welcher ein Drittel des Proteins am C-Terminus fehlt und die sich im Nukleus befindet (Gao et al., 2001; Comtesse et al., 2001; Wells et al., 2002). Kürzlich konnte auch in den Mitochondrien die OGA-Expression und -Aktivität nachgewiesen werden (Hu et al., 2009). Die cytosolische und nukleäre Isoform zeigen *in vitro* unterschiedliche enzymatische Aktivitäten (Wells et al., 2002; Kim et al., 2006a). Bisherige *in vitro*-Untersuchungen zeigten, dass der C-Terminus wichtig für die einwandfreie enzymatische Aktivität ist, wenngleich die katalytische Domäne der OGA am N-Terminus liegt (Cetinbas et al., 2006).

Trotz zahlreicher und intensiver Studien des katalytischen Mechanismus der OGA ist die Aktivitätsregulation des Enzyms noch ungeklärt. Die OGA kann durch die aktivierte Caspase 3 an Aspartat-413 *in vitro* und während der Apoptose *in vivo* geschnitten werden (Butkinaree et al., 2008; Wells et al., 2002). Die beiden Fragmente sind einzeln *in vitro* nicht aktiv (Butkinaree et al., 2008). Die Caspase 3-Schnittstelle kommt in der ungeordneten Region vor, welche für die molekulare Erkennung von Bedeutung ist und Flexibilität für die Substratbindung zwischen N- und C-terminaler Domäne bietet (Dunker et al., 2002). Massenspektrometrische Analysen der OGA zeigten, dass in HeLa-Zellen Serin-364 phosphoryliert und im Gehirn Serin-405 O-GlcNAc-modifiziert ist. Jedoch ist nicht bekannt, inwieweit diese Modifikationen die Aktivität der OGA oder die Substraterkennung beeinflussen (Beausoleil et al., 2004; Khidekel et al., 2007).

Ferner ist möglich, dass die Bildung von kurzlebigen Komplexen mit anderen Proteinen ähnlich wie für die OGT die Aktivität der OGA reguliert. Interessant ist die Komplexbildung zwischen der OGA und der OGT, die als Interaktionspartner in einem OGT-Hefe-Zwei-Hybridsystem identifiziert wurden (Cheung et al., 2008). Auch werden die beiden Enzyme bisweilen im gleichen Komplex *in vivo* gefunden, wenngleich die Zusammensetzung der anderen Komponenten des Komplexes abhängig von zellulären Prozessen ist. In CHO-Zellen kommen sie nach Estrogen- bzw. Progesteronstimulierung mit dem transkriptionalen Corepressor mSin3A und Histondeacetylase-1 assoziiert vor. Whisenhunt et al. zeigten, dass *in vitro* die OGA-Aktivität durch die Komplexbildung mit der OGT inhibiert wird (Whisenhunt et al., 2006). Die Aktivität der OGA und OGT könnte sich möglicherweise in unterschiedlichen zellulären Situationen gegenseitig beeinflussen.

Aufgrund der Kenntnisse des Mechanismus und der Struktur der OGA wurden verschiedene OGA-Inhibitoren synthetisiert, um die Rolle der OGA in der zellulären Signalweitergabe *in vivo* und *in vitro* studieren zu können. Zu diesen Inhibitoren zählen O-(2-acetamido-2-deoxy-

D-glucopyranosyliden)amino-N-phenylcarbammat (PUGNAc), GlcNAcstatin, 1,2-dideoxy-2'-propyl- $\alpha$ -D-glucopyranoso-[2,1-D]- $\Delta$ 2'-thiazolin (NButGT), Thiamet-G, GlcNAc-Thiazolin und ihre Derivate (Dong und Hart, 1994; Haltiwanger et al., 1998; Dorfmueller et al., 2006; Whitworth et al., 2007; Macauley et al., 2008; Knapp et al., 2007; Yuzwa et al., 2008). PUGNAc ist weniger selektiv gegenüber der OGA als die neueren Inhibitoren GlcNAcstatin, NButGT und GlcNAc-Thiazolin (Macauley et al., 2005; Dorfmueller et al., 2006; Whitworth et al., 2007). Streptozotocin (STZ), ein bekanntes Medikament, das in Mäusen und Ratten Diabetes mellitus induziert, ist ebenso imstande in hoher Konzentration die OGA zu inhibieren (Toleman et al., 2006). Indes wurde das Absterben der pankreatischen  $\beta$ -Zellen beobachtet, wenn durch STZ-Gabe die O-GlcNAcylierung gesteigert wurde. Es ist wahrscheinlich, dass die Effekte nicht nur auf die Inhibierung der OGA, sondern auch auf toxische Wirkungen des STZ zurückzuführen sind (Konrad und Kudlow, 2002). Andere Untersuchungen zeigen, dass das Absterben der pankreatischen  $\beta$ -Zellen ein Resultat der abnehmenden Insulinsekretion und Proteinsynthese ist, was wiederum durch STZ induziert wurde (Toleman et al., 2006; Liu et al., 2002; Gao et al., 2000; Okuyama und Yachi, 2001).

## 1.2 Mögliche Funktionen der O-GlcNAcylierung

Die O-GlcNAcylierung von Proteinen spielt eine zentrale Rolle in vielen fundamentalen zellulären Prozessen wie der Transkription (Yang et al., 2002), Translation (Ohn et al., 2008), Signaltransduktion (Hanover et al., 2005), Transport in der Zelle (Dudognon et al., 2004; Guinez et al., 2005) und Zellzykluskontrolle (Slawson et al., 2005; Slawson et al., 2008; Dehennaut et al., 2007; Dehennaut et al., 2008a). In den letzten Jahren entstand das Konzept der O-GlcNAcylierung als Nährstoffsensor (Wells et al., 2003), da das Ausmaß der O-GlcNAcylierung von Proteinen mit der UDP-GlcNAc-Konzentration korreliert, die wiederum von der Glucoseverfügbarkeit abhängt (Lefebvre et al., 2010).

O-GlcNAc kommt in sogenannten „PEST“-Sequenzen vor, was Anlass zur Vermutung gab, dass O-GlcNAc beim Protein-Turnover eine Rolle spielt (Schmitz und Griffith, 1998). Bei den PEST-Sequenzen handelt es sich um Regionen, welche reich an Prolin-, Glutaminsäure-, Serin- und Threonin-Resten sind und die zum schnellen Abbau von Proteinen führen (Hart et al., 2007). Die O-GlcNAc-Modifizierung könnte den Proteinabbau vermindern oder verhindern, da die Phosphorylierung von PEST-Sequenzen den proteasomalen Proteinabbau stimuliert (Rechsteiner und Rogers, 1996).

Der Nukleus enthält die größte Anzahl O-GlcNAc-modifizierter Proteine. Viele O-GlcNAcylierte Proteine werden vom Cytoplasma in den Nukleus und zurück transportiert (Zachara und Hart, 2002). Kernporenproteine sind sowohl glykosyliert als auch phosphoryliert. Die Phosphorylierung der Kernporenproteine wird während des Zellzyklus reguliert, während die Glykosylierung stabil innerhalb des Zellzyklus zu sein scheint (Hanover, 2001). Duverger et al. zeigten, dass die Übertragung von O-GlcNAc auf

verschiedene Proteine ohne Kernlokalisationssequenz deren Kerntransport induzieren kann (Duverger et al., 1995).

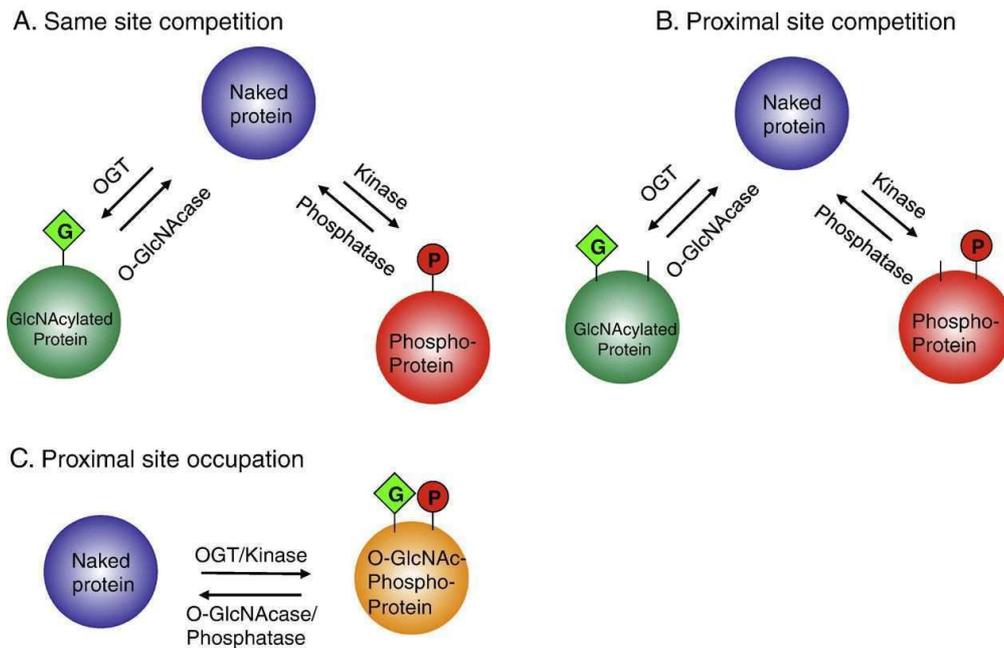
Die Zelle kann rasch ihre intrazelluläre O-GlcNAc-Konzentration als Antwort auf Stress verändern (Zachara et al., 2004; Sohn et al., 2004; Guinez et al., 2004; Guinez et al., 2006; Guinez et al., 2007; Guinez et al., 2008). Das Ausmaß der Veränderungen hängt vom jeweiligen Stress, dessen Stärke sowie vom Zelltyp ab. Thermischer Stress bewirkt beispielsweise eine Zunahme der O-GlcNAcylierung in den Zelllinien COS7 (Zachara et al., 2004), CHO, Hep3b (Sohn et al., 2004) und HepG2 (Guinez et al., 2008). Die Deletion der OGT durch Verwendung des Cre-Lox-Rekombinationssystems und die Herunterregulierung der OGT-Expression durch RNA-Interferenz hat gezeigt, dass die OGT für die Zellen notwendig ist, um Wärmestress zu überleben (Zachara et al., 2004; Guinez et al., 2008). Wie auch Hitzeschockproteine (HSP) antwortet die OGT auf Stress durch Aktivitätserhöhung (Zachara et al., 2004). Es wird vermutet, dass die OGT unter Hitzestress Chaperonfunktion ausübt (Sohn et al., 2004).

Einige Studien konnten zeigen, dass die 26S-Einheit des Proteasoms O-GlcNAc-modifiziert wird. Normalerweise reduziert O-GlcNAcylierung die proteasomale Aktivität, entweder durch direkte Modifikation der ATPase rpt2 (Sümegei et al., 2003; Zhang et al., 2003) oder möglicherweise durch Hemmung der aktivierten Kinase (Zhang et al., 2007). Aber auch die Proteinubiquitinierung wird durch O-GlcNAc moduliert und das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 konnte als O-GlcNAc-modifiziert nachgewiesen werden (Guinez et al., 2008).

Viele O-GlcNAc-modifizierte Proteine spielen wahrscheinlich eine Schlüsselrolle in der Organisation des Cytoskeletts; zu ihnen zählen Cytokeratine, Neurofilamente, Mikrotubuli-assoziierte Proteine, Adenovirusfieberproteine, Ankyrin, Talin, Vinculin, Band 4.1, Kristallin, Synapsin 1 und Tau (Comer und Hart, 2000; Zachara und Hart, 2002).

### 1.3 Prinzip der reziproken O-GlcNAcylierung/Phosphorylierung

Alle bis heute identifizierten O-GlcNAc-modifizierten Proteine können ebenso phosphoryliert vorliegen, was auf eine mögliche Wechselwirkung zwischen den beiden Modifikationen hindeutet (s. Abbildung 2, Butkinaree et al., 2010). Die meisten bisherigen Beobachtungen stehen in Einklang mit der von Gerald Hart aufgestellten „Yin-Yang“-Hypothese: also der zur Phosphorylierung alternativen, möglicherweise reziproken Rolle der O-GlcNAcylierung, bei der O-GlcNAc und Phosphat um dieselben Serine/Threonine des Proteins konkurrieren (Kelly et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, dass eine Beeinflussung der Phosphorylierung die O-GlcNAcylierung verändern kann und umgekehrt (Butkinaree et al., 2010). In Neuronen wurde gezeigt, dass durch Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) oder Proteinkinase A (PKA) die O-GlcNAcylierung von cytoskelettalen Proteinen reduziert wird, während eine Inhibierung der PKC zur vermehrten O-GlcNAc-Modifizierung cytoskelettaler Proteine führt (Griffith und Schmitz, 1999). Auch können O-GlcNAc-modifizierte, phosphorylierte und nicht-modifizierte Proteine unterschiedliche Aktivitäten aufweisen (s. Abbildung 2).



**Abbildung 2: Dynamische Beziehungen zwischen O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung**

A. GlcNAc und Phosphat konkurrieren um dieselbe Modifikationsstelle. Diese Konkurrenz kann die Aktivität oder Stabilität des Proteins verändern (gilt z.B. für Threonin-58 von c-Myc).

B. In einigen Fällen tritt die GlcNAc- und Phosphatmodifikation benachbart innerhalb von etwa zehn AS auf, was die Funktion des Proteins regulieren kann, wie z.B. bei der CTD-Wiederholung der RNA-Polymerase II (Serin-2 und -5 sind phosphoryliert, Threonin-4 ist O-GlcNAcyliert).

C. GlcNAcylierung und Phosphorylierung können am selben Protein an benachbarten AS auftreten. Die Balance zwischen den Modifikationen kann die Funktion des Proteins bzw. auch die Wahrscheinlichkeit der jeweiligen anderen Modifizierung verändern wie am Beispiel von Akt gezeigt wurde. (Threonin-308 und Serin-473 können phosphoryliert und Serin-473 O-GlcNAcyliert vorkommen) (Butkinaree et al., 2010).

O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung können um dieselbe Modifikationsstelle im Protein, wie z.B. beim Protooncogen c-Myc, konkurrieren. c-Myc kann an Threonin-58 entweder O-GlcNAc-modifiziert oder phosphoryliert werden (Chou et al., 1995; Kamemura et al., 2002; Albert et al., 1994). In sich nicht teilenden Zellen ist das Threonin-58 O-GlcNAc-modifiziert, wird jedoch bei der Zellteilung nach Serumstimulation rasch phosphoryliert (Kamemura und Hart, 2003).

Alternativ können O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung durch sterische Behinderung konkurrieren, wenn die Modifikationsstellen nicht mehr als zehn AS voneinander entfernt liegen. Die Wiederholungssequenz der carboxyterminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II kann entweder O-GlcNAcyliert oder phosphoryliert werden (Kelly et al., 1993). Die Phosphorylierungsstellen sind das Serin-2 und -5, während die O-GlcNAc-Stelle meistens das Threonin-4 betrifft. *In vitro* verhindert die Phosphorylierung der CTD die O-GlcNAcylierung und umgekehrt. Die Glykosylierung der CTD induziert eine Konformationsänderung in der CTD, was die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren beeinflussen kann (Comer und Hart, 2001; s. 1.4).

Die Akt-Kinase muss für ihre volle Aktivität an Threonin-308 und Serin-473 phosphoryliert sein (Copeland et al., 2008). Bei Hyperglykämie ist Akt nur an Serin-473 phosphoryliert. Die Inkubation von pankreatischen Zellen mit Glucosamin führt zur vermehrten O-GlcNAc-

Modifikation und verminderten Phosphorylierung von Serin-473, was mit erhöhter Apoptose einhergeht (Kang et al., 2008).

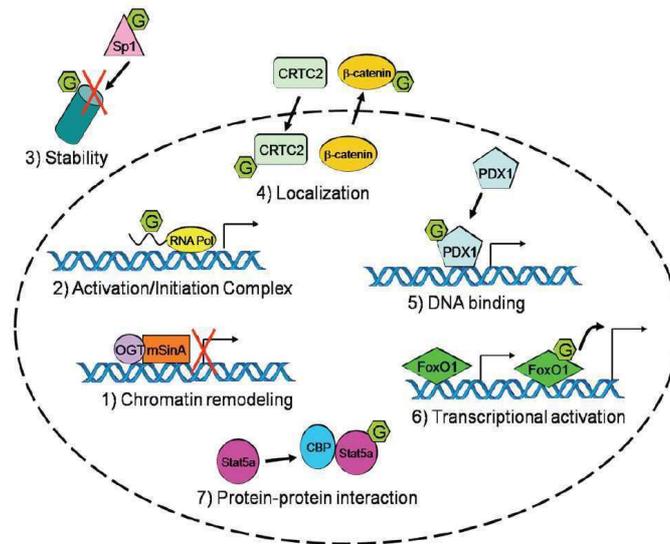
Während oft dazu tendiert wird, sich die Funktion eines Proteins binär vorzustellen (z.B. ein Enzym wird „an-“ oder „abgeschaltet“), muss in Betracht gezogen werden, dass jede mögliche Modifikation einen einzigartigen funktionellen Einfluss haben kann (Vosseller et al., 2001). Somit sind O-GlcNAc und Phosphat nicht unbedingt nur reziproke Modifikationen von Proteinen, sondern können auch funktionell verschiedene Isoformen derselben Proteine repräsentieren (Comer und Hart, 2000). Die dynamischen Wechselwirkungen lassen den Schluss zu, dass sich O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung gegenseitig beeinflussen, indem die O-GlcNAc-Modifikation die Aktivität von Kinasen oder Phosphatasen und umgekehrt die Phosphorylierung die Aktivitäten der OGT und OGA regulieren könnte (Butkinaree et al., 2010). Wang et al. erhöhten die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen aus NIH-3T3-Zellen durch Kultivierung der Zellen mit PUGNAc oder GlcNAc-Thiazolin. Diese Behandlung resultierte in der verminderten Phosphorylierung einiger Phosphopeptide und führte gleichzeitig zur verstärkten Phosphorylierung an anderen Stellen der Proteine (Wang et al., 2008). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass für das Funktionieren einer Zelle das Gleichgewicht zwischen O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung von Bedeutung ist (Butkinaree et al., 2010).

#### **1.4 Einfluss der O-GlcNAcylierung auf die Transkriptionskontrolle**

Die O-GlcNAc-Modifikation nukleärer und cytoplasmatischer Proteine spielt eine vielseitige Rolle bei der Regulation von Transkriptionsfaktoren, was die Rekrutierung Chromatinumgestaltender Faktoren einschließt, die Proteinstabilität beeinflusst, die nukleäre Lokalisation verändert und die DNA-Bindung und die Aktivierung der Transkription ändert. Die O-GlcNAcylierung kann entweder direkt den modifizierten Transkriptionsfaktor beeinflussen oder indirekt Protein-Protein-Interaktionen mit anderen modifizierten Cofaktoren ändern. Die Regulation der Transkriptionsfaktoren wird durch ihre posttranslationalen Modifikationen wie z.B. O-GlcNAcylierung abgestimmt (Hart et al., 2007). Das ist für die Zelle von Vorteil, weil Transkriptionsfaktoren unzählige Signale interpretieren müssen, wozu auch metabolische Signale zählen. Und sie müssen spezifisch reagieren, um nur die Zielgene zu regulieren.

##### **1.4.1 Einfluss der O-GlcNAcylierung auf verschiedene Transkriptionsrelevante Mechanismen**

Die Kontrolle der Transkription durch O-GlcNAc kann über mindestens sieben verschiedene Mechanismen erfolgen (s. Abbildung 3; Brimble et al., 2010). Die Rolle weiterer Modifikationen für die Regulation der Transkription wird im Rahmen dieser Arbeit nicht dargestellt.



**Abbildung 3: O-GlcNAc kontrolliert die Transkription durch Beeinflussung verschiedener Transkriptions-relevanter Mechanismen**

Die O-GlcNAc-Modifikation reguliert die Transkription durch Modulation von Proteinen, welche in die (1) Chromatinumgestaltung und (2) Transkriptionsinitiation involviert sind, ebenso wie durch Beeinflussung von (3) Stabilität, (4) Lokalisation, (5) DNA-Bindung, (6) Transaktivierung und (7) Protein-Protein-Interaktionen mittels bestimmter Transkriptionsfaktoren (Brimble et al., 2010).

1) Umgestaltung des Chromatins Chromatin sorgt nicht nur für die kompakte Verpackung der DNA, sondern reguliert auch die Transkription. Die Nukleosomen müssen so positioniert sein, dass die DNA inklusive der Promotor zugänglich für regulatorische Elemente ist. Dieser Zugang zur DNA wird durch Chromatin-umgestaltende Enzyme ermöglicht, welche die posttranslationalen Modifikationen auf den Histonen erkennen (Clapier und Cairns, 2009; Lee und Young, 2000). Die OGT ist aufgrund von Interaktionen mit mSin3a in die transkriptionale Repression involviert (Yang et al., 2002). mSin3a formt Multiproteinkomplexe mit der Histondeacetylase und kann durch Transkriptionsfaktoren rekrutiert werden, um Histone zu modifizieren und die Transkription zu unterdrücken (Dannenberget al., 2005). Es bindet an die TPR der OGT und nutzt über diesen Mechanismus die OGT für die Genstilllegung (Yang et al., 2002).

2) Initiation und Elongation der Transkription Die O-GlcNAc-modifizierte Form der RNA-Polymerase II ist in die Bildung des Initiationskomplexes involviert. Die O-GlcNAc-Modifikation der CTD verhindert die Phosphorylierung der RNA-Polymerase II, so dass sie nicht in den Preinitiationskomplex eintritt (Laybourn und Dahmus, 1990). Die Phosphorylierung der CTD ist mit der Elongation und dem RNA-Prozessieren assoziiert (Laybourn und Dahmus, 1990; Dahmus, 1996; Proudfoot, 2000). Die Yin-Yang-Beziehung zwischen der Phosphorylierung und O-GlcNAcylierung der CTD der RNA-Polymerase II könnte im O-GlcNAc-modifizierten Zustand die Elongation unterdrücken, indem die Phosphorylierung inhibiert wird (Comer und Hart, 2001).

3) Stabilität Die O-GlcNAc-Modifikation des Proteasoms kann als Regulator der Proteindegradation u.a. als Antwort auf die Nährstoffverfügbarkeit fungieren, welche

potentiell die Transkription regulieren kann, indem sie die Halbwertszeit der Transkriptionsfaktoren verändert (Zhang et al., 2003; Brimble et al., 2010). Außerdem wird die O-GlcNAc-Modifikation mit der veränderten Stabilität mancher Transkriptionsfaktoren wie dem Protooncogen c-Myc, dem Östrogenrezeptor  $\beta$  und dem Tumorsuppressor p53 in Verbindung gebracht, da sie sowohl ubiquitiniert als auch phosphoryliert werden können (Yang et al., 2006; Cheng und Hart, 2001; Sears et al., 2000). Eine reziproke Beziehung zwischen Phosphorylierung und O-GlcNAcylierung wurde für c-Myc und den Östrogenrezeptor  $\beta$  beobachtet (Cheng und Hart, 2001; Sears et al., 2000; Cheng et al., 2000; Chou et al., 1995). Die Phosphorylierung des Threonin-58 des c-Myc führt zur Polyubiquitinierung und zum proteasomalen Abbau des Proteins (Vervoorts et al., 2006). Ein Austausch des Threonin-58 gegen Alanin erhöht die Stabilität des Proteins, in dem die Glykosylierung dieser AS die Phosphorylierung blockiert (Sears et al., 2000).

4) Lokalisation Transkriptionsfaktoren müssen sich im Zellkern befinden, um die Transkription zu aktivieren. Daher zählt die Translokation der Transkriptionsfaktoren zwischen Cytosol und Nukleus zu einem weiteren Mechanismus der Transkriptionskontrolle (Brimble et al., 2010). Die O-GlcNAc-Modifikation des neurogenen Differenzierungsfaktors 1 (NeuroD1) ist für die nukleäre Lokalisation Voraussetzung. NeuroD1 ist für die Insulinproduktion in den  $\beta$ -Zellen des Pankreas erforderlich (Andrali et al., 2008). Hyperglykämie führt zur gesteigerten Phosphorylierung des NeuroD1 an Serin-274 und nachfolgend zur nukleären Translokation und verstärkten Bindung des NeuroD1 an den Insulinpromotor. Mutation des Serin-274 zu Alanin resultiert in der cytoplasmatischen Akkumulation des NeuroD1 sogar unter hyperglykämischen Bedingungen (Petersen et al., 2002). Erhöhung der O-GlcNAc-Modifikation durch PUGNAc verstärkt die nukleäre Lokalisation des NeuroD1, die Bindung an den Insulinpromotor und die Insulinexpression auch unter normoglykämischen Zuständen (Andrali et al., 2007).

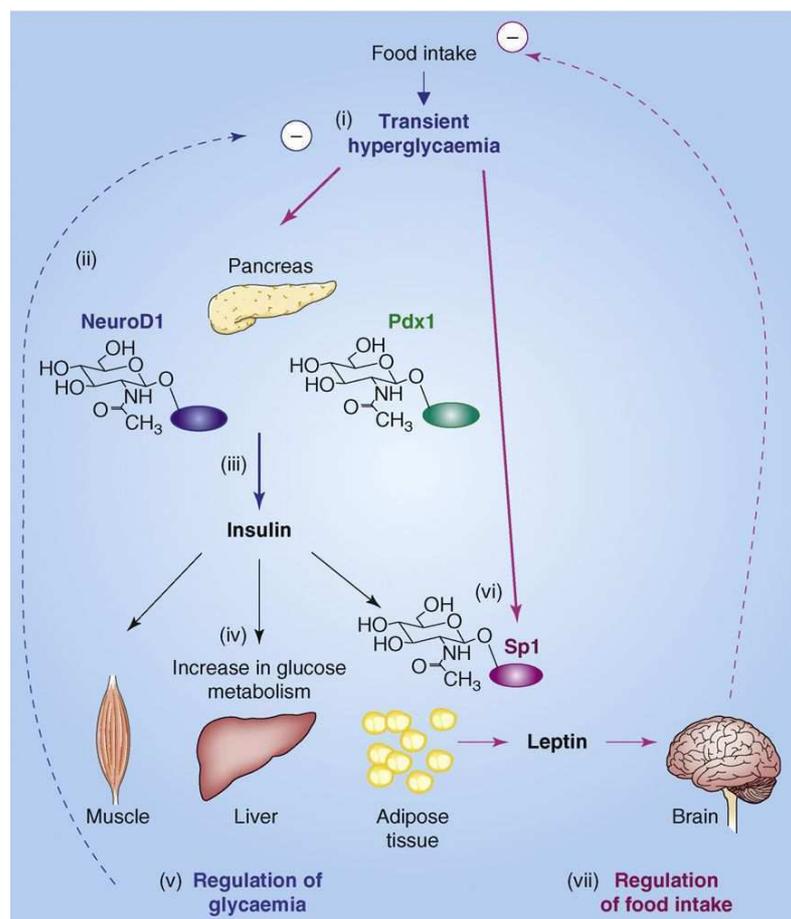
5)/6) DNA-Bindung und Aktivierung der Transkription Die Transkriptionsfaktoren NeuroD1, PDX-1 („Pancreatic/duodenal homeobox-1 protein“) und Vmaf („musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologe A“) regulieren die Insulintranskription. PDX-1 ist für die Entwicklung des Pankreas unerlässlich und aktiviert die Transkription von mehreren  $\beta$ -Zell-spezifischen Genen u.a. des Insulingens (Andrali et al., 2008). Hyperglykämie oder PUGNAc-Behandlung von MIN6-Zellen erhöhen die O-GlcNAc-Modifikation von PDX-1 und dadurch seine Bindung an den Insulinpromotor, was zur Zunahme der Insulinsekretion führt (Gao et al., 2003). O-GlcNAc spielt eine bedeutende Rolle für die Aktivität der Transkriptionsfaktoren der  $\beta$ -Zellen und hat damit eine wichtige Funktion bei der Kontrolle der Genexpression als Antwort auf Veränderungen des Blutglucosespiegels (Brimble et al., 2010).

7) Protein-Protein-Interaktionen Die Glykosylierung des Signalüberträgers und Transkriptionsaktivierers (Stat) 5a ist für seine Interaktion mit dem CBP („CREB-binding

protein“) wichtig (Gewinner et al., 2004). Stat-Proteine werden nach Stimulus durch Cytokine und Wachstumsfaktoren durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert (Levy und Darnell, 2002). Sie aktivieren die Transkription durch Dimerisierung, Translokation in den Nukleus und teilweise durch Bindung von Coaktivatorproteinen, die Histonacetyltransferaseaktivität haben (Korzus et al., 1998). Untersuchungen zeigten, dass Stat5 an Threonin-92 und potentiell an Threonin-97 O-GlcNAc-modifiziert ist. Der Austausch des Threonin-92 gegen Alanin verhindert die Interaktion von Stat5a mit CBP und die Transaktivierung, ohne die DNA-Bindung zu beeinflussen (Gewinner et al., 2004).

#### 1.4.2 Regulation der Glucosehomöostase durch O-GlcNAcylierte Transkriptionsfaktoren

Hyperglykämie führt zur erhöhten O-GlcNAcylierung des Transkriptionsfaktors Sp1 (Jackson und Tjian, 1988; Walgren et al., 2003) und wird direkt mit der DNA-Bindung und Transkriptionsaktivität in Verbindung gebracht (Kadonaga et al., 1988; Weigert et al., 2003).

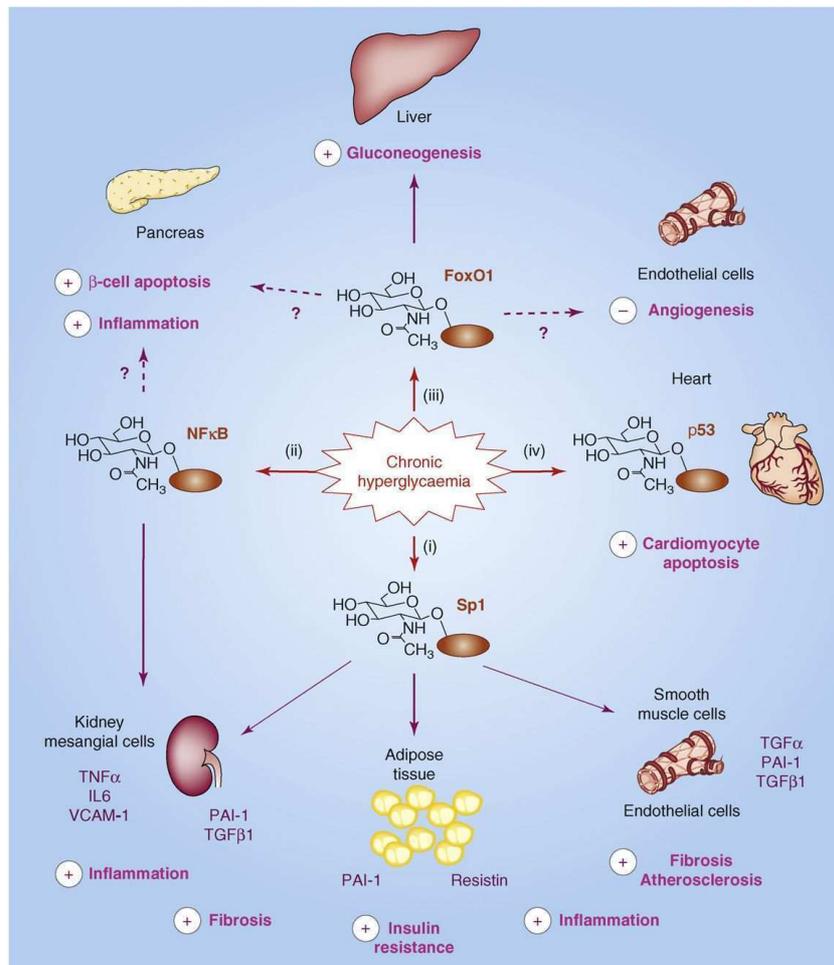


**Abbildung 4: O-GlcNAc-Modifizierung verändert die Aktivität von Transkriptionsfaktoren**

(i) Nahrungsaufnahme führt zum Anstieg der Glucosekonzentration, was zur (ii) O-GlcNAc-Modifikation des PDX-1 und NeuroD1 im Pankreas führt. Die  $\beta$ -Zellen steigern die Insulinproduktion (iii). Insulin stimuliert den Glucosemetabolismus und die Speicherung in seinen Zielgeweben (iv), was zur Wiederherstellung der Normoglykämie führt (v). Erhöhter Glucosestoffwechsel im Fettgewebe führt zur O-GlcNAc-Modifikation des Sp1s (vi) und stimuliert dabei die Leptinproduktion, welche die Nahrungsaufnahme reguliert (vii). Um der Klarheit willen sind die Beziehungen zwischen Insulin und Leptin nicht dargestellt (Issad und Kuo, 2008).

Die gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation von Sp1 erhöht die Transkription von PAI-1 („plasminogen activator inhibitor-1“), der bei der Entstehung der diabetischen kardiovaskulären Erkrankung eine Rolle spielt (Du et al., 2000; Goldberg et al., 2000; Goldberg et al., 2006). Das O-GlcNAc-modifizierte Sp1 aktiviert die Transkription des Promotors des Leptingens (Moreno-Aliaga et al., 2007). So könnte der HBP die Expression des Leptingens und somit die Nahrungsaufnahme und den Energiehaushalt regulieren (Issad und Kuo, 2008; s. Abbildung 4).

Stark erhöhte O-GlcNAcylierung der Transkriptionsfaktoren Sp1, FoxO1 und CRTC2 („CREB-regulated transcription co-activator 2“) oder TORC2 („transducer of regulated cAMP response element-binding protein 2“) wird mit der durch hohe Glucosekonzentration induzierten Expression der Gene der Gluconeogenese in Verbindung gebracht und könnte zur Glucosetoxizität beitragen (Dentin et al., 2008; Housley et al., 2006; Housley et al., 2008; Jackson und Tjian, 1988; Walgren et al., 2003). FoxO1 spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Glucoseproduktion der Leber, da es die Expression der Glucose-6-Phosphatase (G6Pase), der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase und des PGC1 $\alpha$  („peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  co-activator 1 $\alpha$ “) stimuliert (Barthel et al., 2005). Die O-GlcNAc-Modifikation des FoxO1 führt zur verstärkten mRNA-Expression der Gene dieser Proteine (Kuo et al., 2008a; Kuo et al., 2008b). Weiterhin steigert das O-GlcNAc-modifizierte FoxO1 die Expression von Genen, die bei der Detoxifikation der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine Rolle spielen, da vermehrt ROS aufgrund des erhöhten Glucosemetabolismus entstehen (Housley et al., 2008). Eine alternative Erklärung ist, dass das O-GlcNAc-modifizierte FoxO1 als Glucosensoren agiert. Es stellt sicher, dass die Leber keine Glucose in die Blutzirkulation ausschleust, solange sie nicht selber ausreichend Glucose enthält. Übereinstimmend mit dieser Hypothese führt eine sehr niedrige intrazelluläre Glucosekonzentration zur Hypoglykosylierung von FoxO1, was zur verminderten Expression der G6Pase führt und dadurch die Glucoseabgabe der Leber senkt (Issad und Kuo, 2008). Chronische Hyperglykämie könnte eine stark erhöhte Glykosylierung des FoxO1 verursachen, was die Überexpression der G6Pase und anderer FoxO1-abhängiger Gene, welche an der Gluconeogenese beteiligt sind, zur Folge haben. So könnte die Hyperglykämie die Glucoseproduktion der Leber fördern, was zu einem weiteren Anstieg der Glykämie führt und auch die O-GlcNAc-Modifikation des FoxO1 weiter steigert (Kuo et al., 2008a; Kuo et al., 2008b). Des Weiteren kann FoxO1 die Proliferation und Apoptose der  $\beta$ -Zellen des Pankreas kontrollieren (Glauser und Schlegel, 2007). In Endothelzellen inhibiert FoxO1 die Proliferation und Migration, da es die Bildung von Kapillaren reduziert (Paik, 2006; s. Abbildung 5).



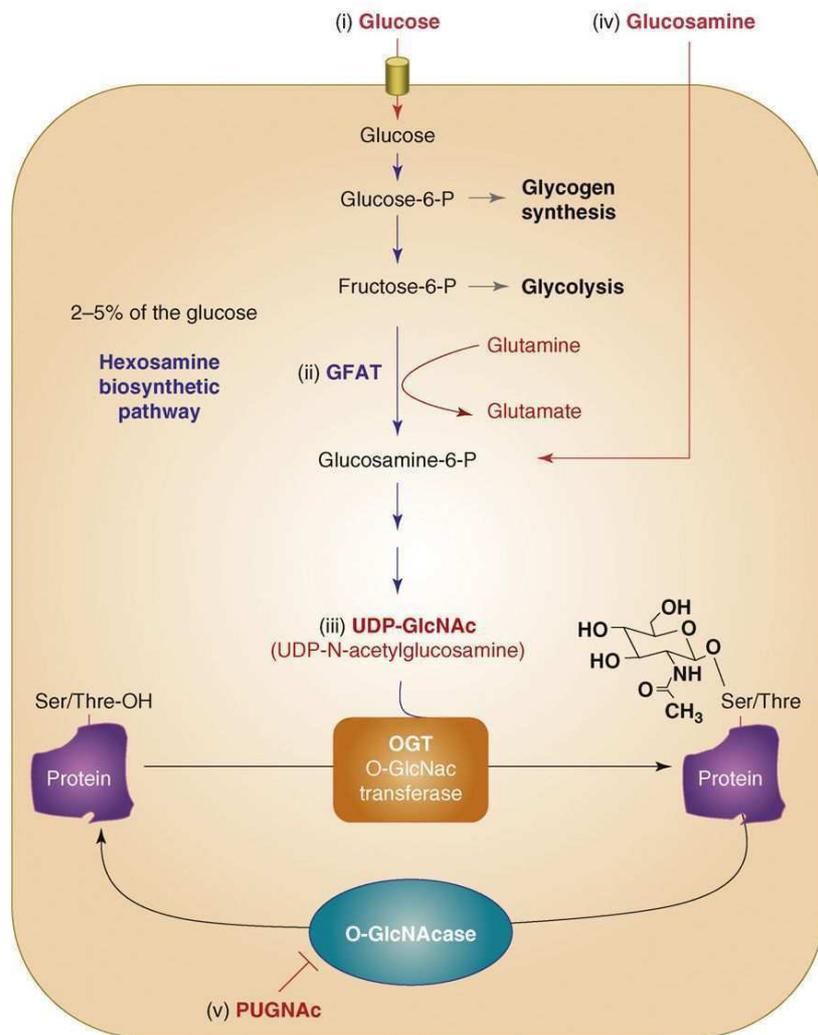
**Abbildung 5: Auswirkungen chronischer Hyperglykämie auf die O-GlcNAc-Modifikation von Transkriptionsfaktoren und die Glucosetoxizität**

Die O-GlcNAc-Modifikation von Transkriptionsfaktoren könnte eine Schlüsselrolle bei der schädlichen Wirkung chronisch erhöhter Glucosekonzentration spielen. (i) Das O-GlcNAc-modifizierte Sp1 führt zur gesteigerten Expression profibrotischer und atherosklerotischer Proteine in Endothelzellen, in Gefäßmuskeln, Mesangialzellen der Niere und dem Fettgewebe. Des Weiteren kann die Produktion des Resistin im Fettgewebe gefördert werden, was zu Insulinresistenz und Inflammation beiträgt. (ii) Die O-GlcNAc-Modifikation des NFκB bewirkt Veränderungen in den Glomeruli der Niere. (iii) O-GlcNAc-modifiziertes FoxO1 erhöht die Expression von Genen der Glukoneogenese und kann auch zur Minderung der Pankreasfunktion beitragen, da es die Apoptose der β-Zellen fördert. Zusätzlich inhibiert es die Angiogenese und fördert das Absterben der Endothelzellen. (iv) Die O-GlcNAc-Modifikation des p53 kann zur diabetischen Kardiomyopathie beitragen und dadurch den Herzzelltod fördern (Issad und Kuo, 2008).

Für viele weitere Transkriptionsfaktoren ist die O-GlcNAc-Modifikation beschrieben (Comer und Hart, 1999; Love und Hanover, 2005), jedoch sind die Funktionen dieser Modifikation nur für einige wenige bekannt.

## 1.5 Der Hexosaminbiosyntheseweg

Im Jahr 1991 entdeckten Marshall et al., dass zwei bis drei Prozent der in die Zelle aufgenommenen Glucose im Hexosaminbiosyntheseweg (HBP; s. Abbildung 6) verstoffwechselt werden. Sie nahmen an, dass dieser Stoffwechselweg eine wichtige regulatorische Rolle in der Glucoseverwertung spielt und als Glucosensensor fungiert, welcher mit einem negativen Rückkopplungsmechanismus verknüpft ist (Marshall et al., 1991a).



**Abbildung 6: Der Hexosaminbiosyntheseweg kontrolliert die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen**

Ein Bruchteil der aufgenommenen Glucose tritt in den Hexosaminbiosyntheseweg ein. Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Amidotransferase (GFAT) nutzt Glutamin, um Fructose-6-Phosphat in Glucosamin-6-Phosphat umzuwandeln, das in mehreren Schritten in UDP-GlcNAc umgewandelt wird. UDP-GlcNAc dient zum einen der Synthese von Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und Glykolipiden und zum anderen fungiert es als Substrat der OGT. Die OGA entfernt das O-GlcNAc von den modifizierten Proteinen. PUGNAc ist ein Inhibitor der OGA (Issad und Kuo, 2008; Wells et al., 2003).

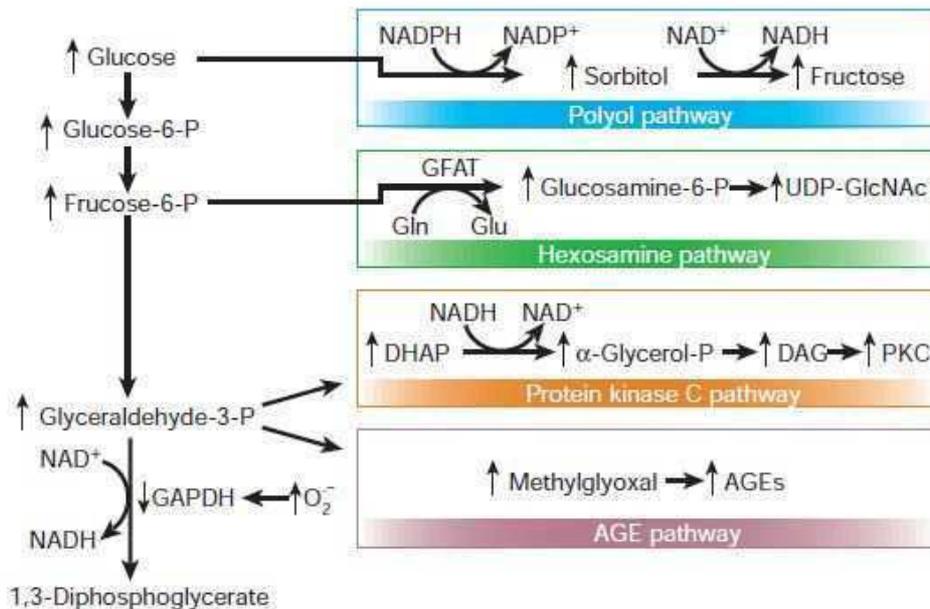
Bei Aufnahme der Glucose in die Zelle wird diese rasch zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt. Entweder wird daraus Glucose-1-Phosphat für die Glycogensynthese gebildet oder es wird zu Fructose-6-Phosphat isomerisiert. Fructose-6-Phosphat wird vorzugsweise für die Glykolyse genutzt, aber ein kleiner Prozentsatz wird durch die Glutamin-Fructose-6-Phosphat-Amidotransferase (GFAT), dem Schlüsselenzym des HBP, zu Glucosamin-6-Phosphat umgewandelt, wobei gleichzeitig aus Glutamin Glutamat entsteht. Glucosamin-6-Phosphat wird nach Isomerisierung von Glucosamin-1-Phosphat und N-Acetylierung zu UDP-GlcNAc aktiviert. UDP-GlcNAc ist nicht nur das Donornukleotid für die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen, sondern wird auch für die Glykosylierung von Lipiden und Proteinen im endoplasmatischen Retikulum (ER), für die Synthese von Glykosylphosphatidylinositolankern von Proteinen und Glykosaminoglykanen benötigt. Die Biosynthese von UDP-GlcNAc ist auf den Glucose-, Aminosäure-, Fettsäure- und Nukleotidmetabolismus

angewiesen (Wells et al., 2003). Die intrazelluläre UDP-GlcNAc-Konzentration reflektiert bzw. reguliert den Durchsatz des HBP. Eine hohe Konzentration an UDP-GlcNAc führt zu einer allosterischen Inhibierung der GFAT (Marshall, 2006).

Experimentell kann die O-GlcNAc-Modifizierung von Proteinen durch Inkubation von Zellen mit hoher Konzentration an Glucose, mit Glucosamin - das die allosterische Inhibierung der GFAT umgeht -, oder mit OGA-Inhibitoren wie z.B. PUGNAc erhöht werden (Marshall et al., 1991a; Zachara und Hart, 2004; Love und Hanover, 2005; Zachara und Hart, 2006). Es ist gezeigt worden, dass Glucosamin Insulinresistenz in vielen Zellen, Geweben und Organismen induzieren kann (McClain, 2002; Rossetti, 2000). Die logische Schlussfolgerung war, dass der HBP für die Stoffwechselregulation durch Insulin bedeutsam ist. Die durch Hyperglykämie induzierte Insulinresistenz konnte durch die Inhibierung der Aktivität oder Unterdrückung der Expression der GFAT blockiert werden (Marshall et al., 1991 a; Marshall et al., 1991 b). Weiterhin haben verschiedene Gruppen in Zellen oder an Tieren gezeigt, dass Diabetes mellitus Typ 2 mit Hyperglykämie und Hyperinsulinämie und parallel dazu mit einer erhöhten intrazellulären UDP-GlcNAc-Konzentration einhergeht (McClain, 2002; Robinson et al., 1995; Yki-Järvinen et al., 1996).

## 1.6 **Hyperglykämie-/Hyperlipidämie-induzierte metabolische Veränderungen**

Durch Hyperglykämie und Hyperlipidämie entstehen vermehrt die Elektronenüberträger NADH und FADH<sub>2</sub> in Citratzyklus, Glykolyse und  $\beta$ -Oxidation. Das Pumpen der Protonen über die innere Mitochondrienmembran erzeugt ein anormal hohes Membranpotential. Dieses inhibiert den Elektronentransport zur Cytochromoxidase, was zum Anstieg der Halbwertszeit des freien Radikalintermediates des Coenzym Q führt, das seine Elektronen vermehrt auf O<sub>2</sub> überträgt und damit die Superoxidradikalbildung beschleunigt. Brownlee hat ein Modell vorgeschlagen, nach dem als Folge der Hemmung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) durch Superoxide vier metabolische Seitenwege verstärkt ablaufen (Brownlee, 2001; s. Abbildung 7). Ein Anstieg der Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP)-Konzentration aktiviert zum einen den AGE („Advanced Glycation Endproduct“)-Signalweg, da der intrazelluläre AGE-Vorläufer Methylglyoxal aus GAP gebildet wird. Zum anderen wird der klassische PKC-Signalweg aktiviert, da Diacylglycerol (DAG) aus Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) gebildet wird. Auch die Fructose-6-Phosphat-Konzentration steigt an, was in einem erhöhten Fluss durch den HBP zu UDP-GlcNAc resultiert. Letztendlich wird Glucose auch vermehrt zu Sorbitol metabolisiert, was zunehmend NADPH verbraucht und die Glutathionkonzentration vermindert. Die Metabolite dieser vier Wege tragen zu den Spätschäden von Hyperglykämie und Diabetes mellitus bei (Brownlee, 2005).



**Abbildung 7: Hyperglykämie-induzierte Überproduktion von Superoxiden aktiviert vier Nebenwege der Glykolyse, die zu den Spätschäden von Hyperglykämie und Diabetes mellitus Typ 2 beitragen**

Ein Überschuss an Superoxiden inhibiert teilweise das Enzym Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Dabei werden die Metaboliten aus vorherigen Schritten der Glykolyse verstärkt in andere Wege der Glucosenutzung umgeleitet. Das resultiert in einem erhöhten Fluss von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu Diacylglycerol (DAG), einem Aktivator der PKC, und von Triosephosphat zu Methylglyoxal, dem hauptsächlichen intrazellulären AGE-Vorläufer. Gesteigerte Umwandlung von Fructose-6-Phosphat zu UDP-GlcNAc erhöht die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen. Verstärkte Bildung von Polyolen verbraucht NADPH und vermindert Glutathion (Brownlee, 2001).

Um auszuschließen, dass andere durch Hyperglykämie induzierte Veränderungen im Stoffwechsel für diese Effekte verantwortlich sind, wurde die Expression der GAPDH durch Antisense-DNA blockiert. Dies führte zu den gleichen metabolischen Veränderungen, wie die Inaktivierung der GAPDH durch Superoxide (Brownlee, 2005).

Der Mechanismus der Inhibierung der GAPDH unter Hyperglykämie beruht auf der Modifizierung des Enzyms durch Polymere der ADP-Ribose. Diese Modifizierung erfolgt durch die Poly-ADP-Ribosepolymerase (PARP), ein DNA-Reparaturenzym des Nukleus. Wenn die intrazelluläre Glucosekonzentration zur verstärkten Bildung von ROS in den Mitochondrien führt, induzieren die freien Radikale DNA-Strangbrüche, wodurch PARP aktiviert wird. PARP hydrolysiert  $\text{NAD}^+$  zu Nicotinsäure und ADP-Ribose und produziert Polymere der ADP-Ribose, welche auf GAPDH und andere nukleäre Proteine übertragen werden (Du et al., 2003; Brownlee, 2005). Das bedeutet, dass die Superoxide nicht direkt, sondern indirekt durch die Aktivierung von PARP und nachfolgender Poly-ADP-Ribosylierung die GAPDH hemmen.

## 1.7 Diabetes mellitus Typ 2

Diabetes mellitus ist eine Stoffwechselstörung, die durch chronische Hyperglykämie charakterisiert ist. Es liegt entweder eine gestörte Insulinsekretion oder eine verminderte Insulinwirkung oder auch beides zugrunde. Die Komplikationen der Folgeerkrankungen,

Mikro- und Makroangiopathien, betreffen vor allem das vaskuläre System, die Augen, die Niere, das Herz, das Gehirn und die peripheren Nerven (Kerner et al., 2004).

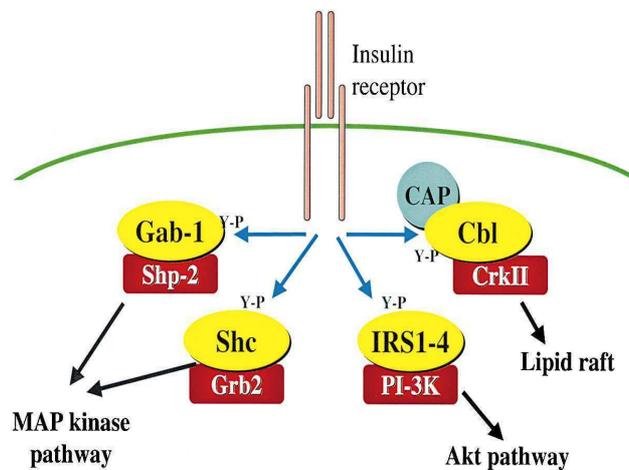
Der Plasmaglucoosespiegel eines gesunden Individuums liegt im Bereich von vier bis sieben mM. Die strenge Regulation der Glucosekonzentration wird durch das Gleichgewicht zwischen Absorption aus dem Darm, der Produktion in der Leber und der Aufnahme sowie dem Stoffwechsel durch die peripheren Organe erreicht. Insulin erhöht die Glucoseaufnahme in die Muskeln und das Fettgewebe durch die Stimulation der Translokation des Glucosetransportproteins 4 (GLUT4) zur Plasmamembran. Es inhibiert die hepatische Glucoseproduktion und dient somit als grundlegender Regulator der Blutglucosekonzentration. Insulin stimuliert auch Zellwachstum und -differenzierung und fördert die Speicherung von Substraten im Fettgewebe, in der Leber und in den Muskeln durch die Stimulation der Lipogenese, der Glycogen- und Proteinsynthese und Inhibierung der Lipolyse, Glycogenolyse und des Proteinabbaus. Insulinresistenz oder -mangel resultiert in profunder Dysregulation dieser Prozesse und erhöht den postprandialen Serumglucose- und -Lipidspiegel (Saltiel und Kahn, 2001).

Eine chronische Hyperglykämie schädigt die  $\beta$ -Zellen des Pankreas so stark, dass auf lange Sicht die Insulinsekretion beeinträchtigt wird und dadurch die Glucosetoleranz verschlechtert wird. Dieses Phänomen ist als Glucosetoxizität bekannt und initiiert den Kreislauf, in dem ein chronisch erhöhter Blutglucosespiegel zur Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 beiträgt. Mehrere Mechanismen scheinen in die schädlichen Auswirkungen der Hyperglykämie involviert zu sein, wozu wie oben beschrieben ein gesteigerter Umsatz der Polyole, die Bildung von AGEs, die Aktivierung der Proteinkinase C-Isoformen und der verstärkte Metabolismus über den HBP zählen. Es wird angenommen, dass die durch Glucose induzierte Produktion reaktiver ROS ein gemeinsamer Auslöser der verschiedenartigen Störungen sein könnte (s. 1.6; Brownlee, 2005).

### 1.7.1 Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme

Die Bindung des Insulins an den Insulinrezeptor führt zur Aktivierung der intrinsischen Tyrosinkinaseaktivität des Rezeptors (s. Abbildung 8). Der aktivierte Insulinrezeptor phosphoryliert verschiedene intrazelluläre Substrate an Tyrosinen, wozu einige der Insulinrezeptorsubstrate (IRS1/2/3/4), das Shc-Adaptorprotein, das GRB-assoziierte-Bindeprotein-1 (Gab-1) und das Protooncogen Cbl („Casitas B-lineage lymphoma protooncogene“) zählen. Die Tyrosinphosphorylierung dieser Proteine schafft Erkennungssequenzen für weitere Effektormoleküle, die Src-Homologie 2 (SH2)-Domänen tragen. Durch Tyrosinphosphorylierung der IRS-Proteine binden diese an die SH2-Domäne des p85, der regulatorischen Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und aktivieren sie. Die PI3-Kinase wird zur Plasmamembran rekrutiert, wo sie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu PIP<sub>2</sub>-3,4,5-trisphosphat (PIP<sub>3</sub>) phosphoryliert. Erhöhte PIP<sub>3</sub>-Level aktivieren die Proteinkinasekaskade, wodurch die Serin-/Threoninkinasen Akt (oder Proteinkinase B (PKB)) und die PKC-Isoformen  $\zeta$  und  $\lambda$  phosphoryliert und damit aktiviert

werden (Saltiel, 2001). Obwohl bisher nicht bekannt ist, wie die Akt-Aktivierung zur Translokation der GLUT4-Vesikel führt, konnte anhand von Akt2-K.O.-Mäusen, welche Insulinresistenz entwickeln, die Bedeutung von Akt begründet werden (Cho et al., 2001). Ferner ist zur kompletten GLUT4 Translokation parallel zur PI3-Kinase Aktivierung die Tyrosinphosphorylierung des Cbl notwendig (Ribon und Saltiel, 1997), was üblicherweise das Adapterprotein CAP erfordert. Es assoziiert mittels seiner carboxyterminalen SH3-Domäne mit der Prolinreichen Domäne des Cbl (Ribon et al., 1998). Der Cbl/CAP-Komplex transloziert mit CrkII-C3G zur Lipid Raft-Domäne der Plasmamembran, wo C3G das kleine G-Protein TC10 aktiviert. Die Aktivierung des TC10 ist essentiell für die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme (Chiang et al., 2001).



**Abbildung 8: Überblick über die durch Insulin stimulierten Signalwege**

Insulinbindung stimuliert die Tyrosinkinaseaktivität seines Rezeptors, was zur Phosphorylierung von Substraten wie Gab1, Shc, IRS 1-4 und Cbl führt. Die Proteine können mit SH2-Domänen anderer Proteine interagieren, was in verschiedene Signaltransduktionswege mündet. Gab1 reagiert mit der Tyrosinphosphatase Shp-2, was den MAP-Kinasesignalweg aktiviert. Nach Phosphorylierung des Shc bindet dieses an das Adapterprotein Grb2 und aktiviert dadurch das Protooncogen *ras*, was ebenfalls den MAP-Kinasesweg aktivieren kann. Die IRS-Isomere interagieren mit etlichen SH2-haltigen Proteinen. Unter ihnen befindet sich die regulatorische Untereinheit der PI3-Kinase, die über mehrere Schritte zur Aktivierung von Akt führt. Der Insulinrezeptor kann auch Cbl über das Adapterprotein CAP phosphorylieren. Cbl reagiert in Lipid Rafts mit der SH2-Domäne des Adapterproteins CrkII. Dieser Signalweg und die Aktivierung des Akt-Signalweges sind für den Insulin-stimulierten Glucosetransport notwendig (Saltiel, 2001).

In der OGT wurde eine PIP-bindende Domäne entdeckt, welche starke Interaktionen mit PIP<sub>3</sub> zeigt und die OGT nach Insulinstimulation zur Plasmamembran führt. Dort kann die OGT Proteine der Insulinsignalkaskade, wie Akt und IRS1, und weitere Proteine, wie Stat3, glykosylieren (Yang et al., 2008; Whelan et al., 2008). Die Interaktion zwischen OGT und PIP<sub>3</sub> verändert nicht die katalytische Aktivität der OGT (Lazarus et al., 2009). Vielmehr korreliert die Insulinstimulation mit der Tyrosinphosphorylierung der OGT durch den Insulinrezeptor, was ihre Aktivität erhöht (Whelan et al., 2008). Dies zeigt die Rolle der OGT bei der Regulation der durch Insulin stimulierten Signalwege auf.

## 1.7.2 Insulinresistenz

Insulinresistenz bezeichnet das Unvermögen der Organe, auf die normale Insulinkonzentration zu antworten und verhindert die Aufnahme der Glucose aus dem Blut in die

Muskeln und das Fettgewebe. In den Fettspeichern wird vermehrt Lipolyse und dann Fettsäurefreisetzung betrieben, da die antilipolytische Insulinwirkung nicht an diese Zellen weitergegeben wird. Bis zu einem gewissen Punkt können die  $\beta$ -Zellen des Pankreas die Insulinresistenz durch eine Erhöhung der basalen und postprandialen Insulinsekretion kompensieren. Eine Störung der Glucosehomöostase führt zur Entwicklung der Glucoseintoleranz. Die Adipozyten und Leberzellen generieren mehr Fettsäuren, die Leber produziert unkontrolliert Glucose und die  $\beta$ -Zellen erreichen den Punkt, an dem sie nicht mehr adäquat auf Glucose reagieren können (Saltiel, 2001).

Insulinresistenz kann durch Defekte in der Insulinsignaltransduktion, Veränderungen der Gen- oder Proteinexpression, welche u.a. auch Ziele der Insulinwirkung darstellen, Wechselwirkungen mit anderen hormonellen Systemen oder aus metabolischen Abnormalitäten entstehen. Änderungen von Expression, Transport, Ligandenbindung, Phosphorylierung und/oder Kinaseaktivität des Insulinrezeptors wurden in einigen Fällen schwerer Insulinresistenz wie dem Typ A-Syndrom, Leprechaunismus und Rabson-Mendenhall Syndrom identifiziert (Taylor und Arioglu, 1998). Diese Veränderungen gehen in diesem Fall auf Punktmutationen des Rezeptors zurück. Zudem führt die Eliminierung des Insulinrezeptors im Gehirn zu erhöhter Nahrungsaufnahme und Adipositas. Verknüpft mit der Insulinresistenz deutet dies auf die koordinierte Regulation der Insulinsignalgebung und Energiehomöostase durch das Gehirn hin (Brüning et al., 1998).

Studien über den frühen Verlauf der Insulinresistenz offenbarten, dass die ersten detektierbaren Veränderungen der Insulinwirkung die Glucoseaufnahme und Speicherung in Form von Glycogen im Muskel betreffen (Warram et al., 1990). Insulin moduliert die Glycogenspeicherung durch die koordinierte Aktivierung der Glycogensynthese und gleichzeitiger Hemmung des Glycogenabbaus. Die Glycogensynthese wird über die Inhibierung der PKA oder Glycogensynthasekinase 3 (GSK3) und durch Aktivierung der PP1 durch Dephosphorylierung aktiviert (Cross et al., 1995; Brady et al., 1997; Brady et al., 1998). Akt phosphoryliert und inaktiviert damit die GSK3, was die Phosphorylierungsrate der Glycogensynthese senkt. Jedoch ist die Inhibierung der GSK3 nicht ausreichend für die Aktivierung der Glycogensynthese, weil die Kinase nicht dieselben AS der Synthase phosphoryliert, die durch das Insulinsignal dephosphoryliert werden (Lawrence und Roach, 1997). Parker et al. zeigten, dass nach Inkubation von Adipozyten mit hoher Glucosekonzentration oder Glucosamin die Glycogensynthese verstärkt O-GlcNAc-modifiziert ist, was ihre Aktivität reduziert und die Aktivierung durch Glucose-6-Phosphat senkt. So stellt die O-GlcNAc-Modifikation des Enzyms einen Mechanismus der Insulinresistenz dar (Parker et al., 2003).

## 1.8 **Rolle der O-GlcNAcylierung für die Pathogenese des Diabetes mellitus**

O-GlcNAc spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Insulinsignalwirkung und als Mediator der Glucosetoxizität. Die O-GlcNAc-Modifikation beeinflusst nicht nur direkt

Insulinsignalmoleküle (z.B. IRS1), metabolische Enzyme (z.B. die Glycogensynthase) und/oder Proteine, welche für die endotheliale Funktion von Bedeutung sind (z.B. eNOS, s. 1.11), sondern fördert auch die Expression pro-inflammatorischer und pro-fibrotischer Faktoren, die schädliche Auswirkungen in verschiedenen Geweben haben (Issad und Kuo, 2008). Unter Hyperglykämie und Hyperlipidämie kommt es zur gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation besonders von Transkriptionsfaktoren, die oft in pathologischen Veränderungen der Genexpression resultiert (Kolm-Litty et al., 1998; Sayeski und Kudlow, 1996; Wells und Hart, 2003; s. 1.4).

Hyperglykämie, Hyperlipidämie und/oder Hyperinsulinämie resultieren alle in anormaler Zunahme der O-GlcNAcylierung, was das normale Gleichgewicht zwischen O-GlcNAc-Modifikation und O-Phosphorylierung der Proteine stört, welche Signalkaskaden und andere zelluläre Funktionen kontrolliert. Verstärkte O-GlcNAcylierung in Adipozyten oder Muskeln blockiert den Insulinsignalweg an mehreren Stellen (Hart et al., 2007). Werden die IRS vermehrt O-GlcNAc-modifiziert, scheint das die Interaktion mit der PI3-Kinase zu reduzieren (Vosseller et al., 2002; Federici et al., 2002). Zahlreiche Komponenten des Insulinsignalwegs oder des Glucosemetabolismus sind O-GlcNAc-modifiziert: Akt1 (Gandy et al., 2006), Akt2 (Park et al., 2005), GLUT1 (Buse et al., 2002), Caseinkinase II, GSK3 (Lubas und Hanover, 2000), IRS1/2 (Patti et al., 1999), Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PK1), die p110 $\alpha$ -Untereinheit der PI3-Kinase und die  $\beta$ -Kette des Insulinrezeptors (Yang et al., 2008). Die Überexpression der OGT in Muskeln oder im Fettgewebe transgener Mäuse verursacht Diabetes (McClain et al., 2002).

Im Muskel von Ratten erhöht Hyperinsulinämie das Ausmaß der O-GlcNAcylierung von vielen Proteinen (Yki-Järvinen et al., 1998). Hyperglykämie verändert qualitativ und quantitativ die Expression vieler O-GlcNAcylierter Proteine der Rattenaorta und in kultivierten glatten Muskelzellen der Rattenaorta (Wells et al., 2003; Buse, 2006). Transgene Mäuse, die GLUT1 im Muskel überexprimieren, sind insulinresistent und zeigen eine gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation von GLUT4-assoziierten Proteinen (Buse, 2006).

### **1.9 Mögliche Beziehung zwischen O-GlcNAcylierung, Alzheimer Demenz und Diabetes mellitus**

Seit einigen Jahren wird ein Zusammenhang zwischen Veränderungen der O-GlcNAc-Regulation und der Ätiologie des Diabetes mellitus Typ II (s. 1.8) und neurodegenerativen Erkrankungen vermutet (Comer und Hart, 2000; Hanover, 2001; Zachara und Hart, 2002).

Zahlreiche der O-GlcNAc-modifizierten, neuronalen Proteine spielen bei der Ätiologie der Alzheimer Demenz (AD) eine Rolle, wie z.B. das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau und das  $\beta$ -Amyloid Precursorprotein (Arnold et al., 1996, Griffith et al., 1995). Griffith und Schmitz konnten in humanen Hirnen zeigen, dass O-GlcNAcylierung cytoskelettaler Proteine in Alzheimerhirnen im Vergleich zu gesunden Hirnen signifikant erhöht ist (Griffith und Schmitz, 1995). Andere Studien zeigten keine Unterschiede der O-GlcNAc-modifizierten

Proteine in Alzheimer- und Kontrollgehirnen (z.B. Yao und Coleman, 1998).

Veränderungen der Glucoseutilisation wurden für viele neurodegenerative Krankheiten nachgewiesen und diese Beobachtungen deuten an, dass es zu einer Adaptation des Kohlenhydratverbrauchs in den pathologischen Prozessen kommt (Hoyer, 1998). Eine neuere Hypothese lautet, dass es zunächst zur verstärkten O-GlcNAcylierung der Proteine bei AD kommt, was Auswirkungen auf den Phosphorylierungsstatus der Proteine hat. De la Monte und Mitarbeiter schlugen vor, dass AD eine neuroendokrine Erkrankung repräsentiert und dass für diese Neurodegeneration die Bezeichnung "Typ-3 Diabetes" eingeführt werden sollte (Steen et al., 2005; de la Monte und Wands, 2005; Lester-Coll et al., 2006; Pilcher, 2006). Die Gehirne von AD-Patienten zeigten post mortem eine Reduktion des Insulins und des Insulinähnlichen Wachstumsfaktors I/II, was auch im Diabetes beobachtet wird (Steen et al., 2005). Eine Reduktion der Glucoseutilisation und die nachfolgende Energiedepletion tritt sehr früh in der Entwicklung der AD auf (Hoyer, 2000; de Leon et al., 1983; Gong et al., 2006). Die Bedeutung der jeweiligen Modifikation für die Aktivität eines Proteins lässt sich für verschiedene Proteine zeigen. Tau aus Rinderhirn ist hoch O-GlcNAc-modifiziert mit einer Stöchiometrie von vier Mol GlcNAc pro Mol Tau (Arnold et al., 1996). Ein Knockout der OGT im Gehirn resultiert in Hyperphosphorylierung von Tau, wodurch Bindung an und damit Stabilisierung der Mikrotubuli nicht mehr möglich ist (O'Donnell et al., 2004), während eine Inhibierung der OGA durch Thiamet-G in Ratten die Phosphorylierung von Tau reduziert (Yuzwa et al., 2008; O'Donnell et al., 2004). Die Inhibierung der GSK3 durch Lithium führt zur verstärkten O-GlcNAc-Modifikation und verminderten Phosphorylierung an Threonin-58 (Kamemura et al., 2002).

### 1.10 Kardioprotektion durch verstärkte O-GlcNAcylierung

Erst vor etwa sechs Jahren wurde die potentiell günstige Rolle der O-GlcNAc-Modifikation für das Überleben von Zellen in akuten pathologischen Situationen erkannt (Zachara und Hart, 2004). Erhöhung der intrazellulären Konzentration von O-GlcNAc in Gegenwart von Glutamin oder OGA-Inhibitoren führte zu erheblicher ischämischer Kardioprotektion (Liu et al., 2006; Liu et al., 2007; Champattanachai et al., 2007). Versuche mit neonatalen Kardiomyozyten zeigten, dass OGT und OGA wichtige Rollen in der Regulation der Zelle bei akuter Ischämie und oxidativem Stress spielen (Champattanachai et al., 2008; Ngoh et al., 2008; Ngoh et al., 2009). Die protektiven Effekte beruhen auf der Aktivierung von Signalwegen, die für die Überlebensfähigkeit von Zellen wichtig sind, weitere potentielle Mechanismen erfolgen über Transkriptionskontrolle und betreffen u.a. die gesteigerte Expression von HSP (Fülöp et al., 2007; Zachara et al., 2004). Die Aufrechterhaltung des mitochondrialen Membranpotentials erfolgt zum einen durch O-GlcNAc-Modifikation der spannungsabhängigen Anionenkanäle und zum anderen durch verstärkte Expression der antiapoptotischen Bcl („B-cell lymphoma“-)-2 Proteine (Jones et al., 2008; Champattanachai et al., 2008).

Hohe Glucosekonzentration, Behandlung mit Glucosamin oder die Überexpression der OGT

lösen in Kardiomyozyten einen Anstieg der O-GlcNAcylierung und eine Erniedrigung des Calciumflusses aus. Durch die gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation des Sp1 nimmt die Expression und Aktivität der Calcium-abhängigen sarcoendoplasmatischen Retikulum-ATPase (SERCA2a) ab (Clark et al., 2003). Auch O-GlcNAc-modifizierte mitochondriale Proteine sind in die Entstehung der Kardiomyopathie involviert, dazu zählen Proteine der Komplexe I, III und IV der Atmungskette. Die verstärkte O-GlcNAcylierung reduziert die Aktivität dieser Komplexe und senkt die mitochondriale Calciumkonzentration und ATP-Produktion (Hu et al., 2009), wodurch die myokardiale Kontraktilität beeinflusst wird (Lefebvre et al., 2010).

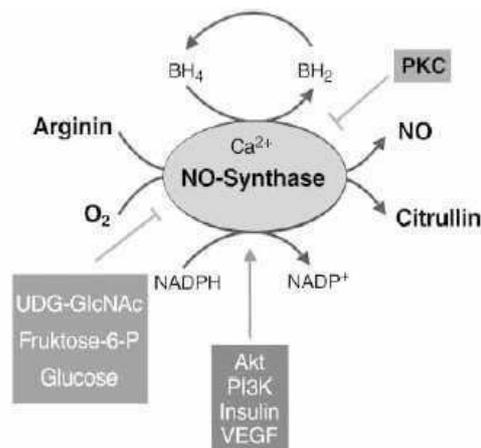
### 1.11 Endotheliale Dysfunktion

Störungen der verschiedenartigen Funktionen des Endothels werden häufig unter dem Begriff „endotheliale Dysfunktion“ zusammengefasst und spielen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung makro- und mikrovaskulärer Komplikationen bei Diabetes mellitus Typ 2. Eine wichtige Funktion des Endothels stellt die Fähigkeit dar, Signale aus der Blutbahn zu erkennen, zu integrieren und in spezifische Signale zu übersetzen. Dies wird möglich durch die Expression von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Lipidmediatoren, Wachstumsfaktoren, den Vasotonus modulierende Substanzen wie Prostazyklin, Stickstoffmonoxid (NO), Endothelin-1 und Angiotensin II und weiterer hormonähnlicher Verbindungen (Rösen, 2002).

Es gibt immer mehr Beweise dafür, dass eine hohe Glucosekonzentration für diabetische Mikroangiopathien verantwortlich ist (Vinals et al., 1999). Die endotheliale Dysfunktion entsteht vor allem in den Zellen, in denen die Glucoseaufnahme in die Zelle Insulin-unabhängig erfolgt. Die Glucoseaufnahme wird durch GLUT1 reguliert, der nur schwach auf die variierende Glucosekonzentration reagiert. Daher spiegelt sich eine schwankende Blutglucosekonzentration in der intrazellulären Glucosekonzentration wider. Zahlreiche Studien konnten jedoch eine reduzierte Glucoseaufnahme des Endothels im Diabetes zeigen (Gjedde und Crone, 1981; Matthaai et al., 1986; Kumagai et al., 1995). In Insulin-sensitiven Zellen reguliert im Gegensatz dazu - wie oben beschrieben - der Insulin-stimulierte GLUT4 den Einstrom von Glucose in die Zelle (Fischer et al., 1995; Hirsch und Rösen, 1999; Vinals et al., 1999).

Die Pathophysiologie der endothelialen Dysfunktion ist komplex. Zu den wichtigen Mechanismen, die die Auswirkung der Glucosekonzentration auf den Metabolismus herbeiführen, zählen – ausgelöst durch die vermehrte Produktion von freien Radikalen (s. 1.6) - der erhöhte Sorbitolstoffwechsel (Mandarino, 1992; Ruderman et al., 1992), die Aktivierung der PKC, Reduzierung des Phosphatidylinositolstoffwechsels, die nicht-enzymatische AGE-Proteinglykosylierung (Ruderman et al., 1992) und der gesteigerte Fluss der Glucose durch den HBP (Brownlee, 2001). Für die Endothelzellen von besonderer Bedeutung ist zusätzlich die verminderte Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS)-Aktivität (Endemann und Schiffrin, 2004).

Eine der hauptsächlichen vasodilatatorischen Substanzen, die die Endothelzellen freisetzen, ist NO, welches Wachstum und Entzündungen beeinflusst und einen anti-aggregierenden Effekt auf Thrombozyten ausübt. Das NO diffundiert in die vaskulären glatten Muskelzellen, um die Guanylatzyklase zu aktivieren. Diese aktiviert eine cGMP-abhängige Proteinkinase, welche Proteine, die den intrazellulären Calciumspiegel regulieren, phosphoryliert. Dazu zählen Calciumpumpen wie SERCA, spannungsabhängige Kanäle, Calciumspeicherkanäle und Calciumeffektoren wie die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (Trebak et al., 2010). Die cGMP-abhängige Proteinkinase reguliert die Aktivität kontraktile Proteine durch Regulation der Myosinleichtkettenkinase/-Phosphatase oder Rho („Ras homolog“)/Rho-Kinase reguliert und führt zu Relaxation der glatten Muskelzellen. NO kann auch cGMP-unabhängig direkt SERCA aktivieren und dadurch intrazelluläre Calciumspeicher auffüllen. Infolgedessen werden Kationenkanäle inhibiert und der intrazelluläre Calciumspiegel sinkt, was zur Relaxation der vaskulären glatten Muskelzellen und demzufolge zur Vasodilatation führt (Cohen und Adachi, 2006; Mackenzie et al., 2008). Bei endothelialer Dysfunktion konnte die reduzierte Bildung von NO nachgewiesen werden, die auf eine reduzierte Aktivität der endothelialen NOS (eNOS) zurückzuführen ist (Endemann und Schiffrin, 2004).



**Abbildung 9: Regulation der endothelialen NO-Synthase**

Aus Arginin und O<sub>2</sub> bildet die NO-Synthase NO und Citrullin. Als Cofaktor dient Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) und NADPH. Die Regulation der Synthese wird durch die PKC, Insulin und O-Glykosylierung beeinflusst (Rösen, 2002).

BH<sub>2</sub>: Dihydrobiopterin; PKC: Proteinkinase C; NO: Stickstoffmonoxid, PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; VEGF: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

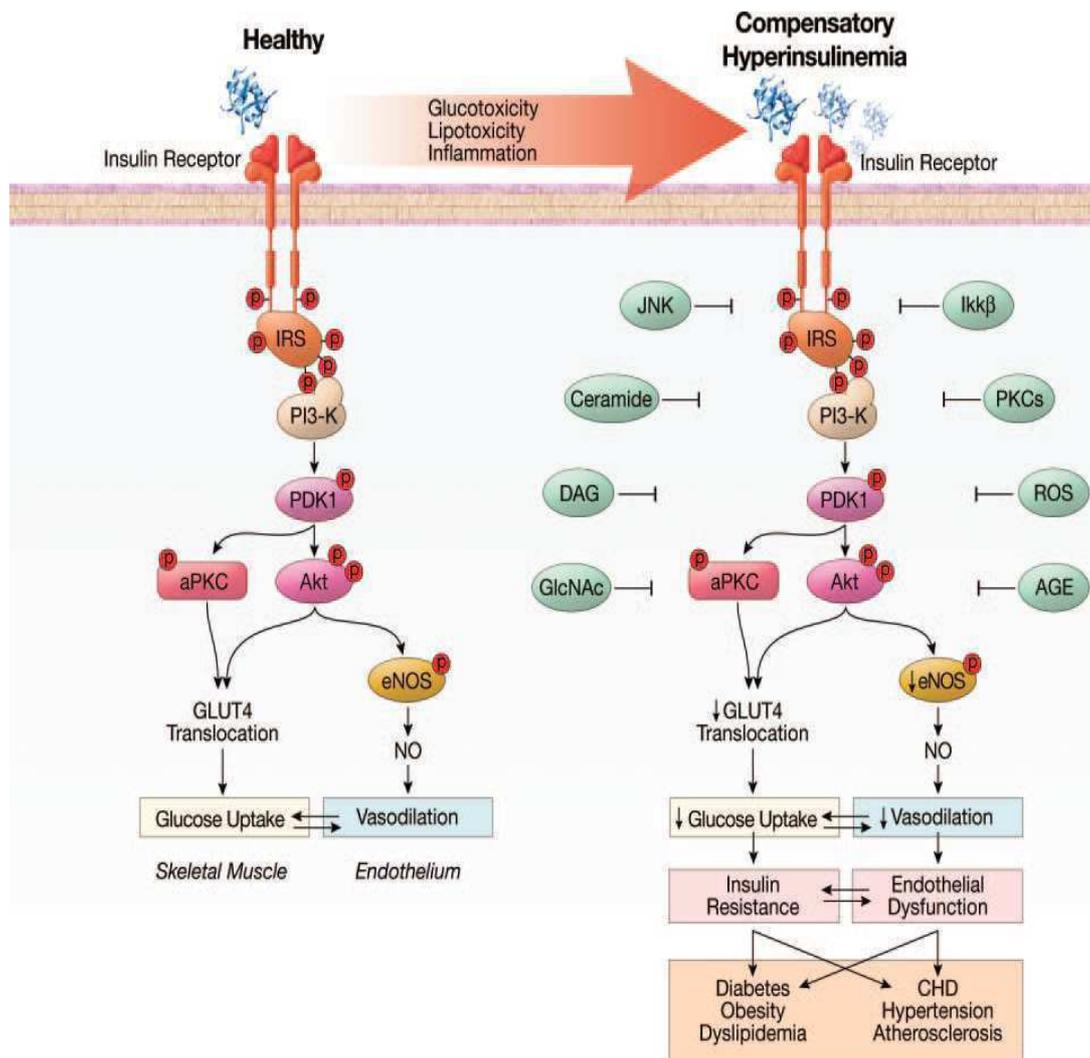
Für die Synthese von NO benötigt die eNOS als Cofaktoren molekularen Sauerstoff und NADPH sowie eine Reihe von redoxsensitiven Cofaktoren wie Häm und Tetrahydrobiopterin, um L-Arginin in NO und L-Citrullin umzuwandeln. Jede Veränderung im Redoxstatus der Zelle wird somit auch die Synthese und damit die Bioverfügbarkeit von NO beeinflussen (Rösen, 2002). Die NADPH-Oxidase kann Superoxide produzieren, die mit NO reagieren und Peroxynitrit bilden (Koppenol et al., 1992). Peroxynitrit ist cytotoxisch und beeinflusst durch Nitrierung von Proteinen deren Funktionen. Außerdem kann es OH-Radikale bilden, die praktisch alle Biomoleküle schädigen, wodurch die Endothelfunktion wesentlich beeinträchtigt werden kann. Der essentielle Cofaktor der NOS, das Tetrahydrobiopterin, wird

oxidiert. Als Folge wird die Reduktion des Sauerstoffs von der NO-Synthese entkoppelt (Förstermann, 2006). Der Begriff eNOS-Entkopplung beschreibt einen Zustand, bei dem eNOS Superoxide an Stelle von NO produziert (Landmesser et al., 2003). Des weiteren beeinflussen weitere Veränderungen die NO-Synthese und -freisetzung, wie die Verfügbarkeit des Substrates L-Arginin, Veränderungen der Genexpression bzw. mRNA-Stabilität, Defekte in Signalkaskaden, der Gehalt an NADPH, Inaktivierung der NOS durch Lipoproteine oder Sauerstoffradikale (Igarashi und Michel, 2001; Feron und Kelley, 2001). Der Mangel an NO spielt eine wichtige Rolle bei Bluthochdruck (Chin und Rubin, 2008). Bei dieser Erkrankung ist die NO-Bioverfügbarkeit reduziert und es liegt ein Ungleichgewicht zwischen Substanzen vor, die die Vasodilatation und Vasokonstriktion regulieren (Mackenzie et al., 2008).

Bradykinin, Sphingosin-1-Phosphat, der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) und Insulin führen durch Aktivierung spezifischer Proteinkinasen zur Phosphorylierung von eNOS (Rösen, 2002), was die Aktivität der eNOS erhöht (Dimmeler et al., 1999). Im Diabetes ist vermutlich vor allem die verstärkte O-Glykosylierung der NOS an Serin-1177 von Bedeutung, wodurch die Aktivierbarkeit durch Phosphorylierung an Serin-1177 signifikant gehemmt wird (Du et al., 2001; Musicki et al., 2005). Die O-GlcNAc-Modifikation von NOS und weiteren Proteinen in Endothelzellen ist von pathophysiologischer Bedeutung für die endotheliale Dysfunktion (Brownlee, 2001; D'Alessandris et al., 2004).

### **1.12 Reziproke Beziehung zwischen Insulinresistenz und endothelialer Dysfunktion**

Für die Insulin-stimulierte Glucoseaufnahme in den Skelettmuskel ist die PI3-Kinase-Signalkaskade erforderlich (s. Abbildung 10; Saltiel, 2001; Nystrom und Quon, 1999). Im Endothel stimuliert Insulin die Produktion von NO, ebenfalls über PI3-Kinase-abhängigen Insulinsignalweg. Dies führt zu verstärktem Blutfluss vom Endothel zum Skelettmuskel und damit zur gesteigerten Glucoseversorgung des Muskels (Muniyappa et al., 2007).



**Abbildung 10: Reziproke Beziehung zwischen Insulinresistenz und endothelialer Dysfunktion**

Links: PI3-Kinase-abhängige Insulinsignalwege in metabolischem und vaskulärem Gewebe verbindet synergistisch die physiologischen, metabolischen und vaskulären Vorgänge in einem gesunden Organismus. Rechts: Gleichzeitige Beeinträchtigung der PI3-Kinase-abhängigen Insulinsignalwege unter pathologischen Zuständen in Endothel- und Skelettmuskelzellen führt zur synergistischen Kopplung der Insulinresistenz und endothelialen Dysfunktion (Muniyappa et al., 2007).

AGE: „Advanced glycation end-product“; eNOS: endotheliale NOS; GLUT: Glucosetransportprotein; IKK $\beta$ , inhibitorische  $\kappa$ B Kinase  $\beta$ ; IR: Insulinrezeptor; IRS: Insulinrezeptorsubstrat; JNK: c-Jun N-terminale Kinase; NOS: NO-Synthase; PDK1: Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1; PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase; PKC: Proteinkinase C; ROS: reaktive Sauerstoffspezies

Insulinresistenz und endotheliale Dysfunktion sind pathophysiologische Zustände, welche beide durch zunehmende Anzeichen von Entzündungen (Fernandez-Real und Ricart, 2003) und zirkulierenden freien Fettsäuren gekennzeichnet sind (Roden et al., 1996; Steinberg und Baron, 2002), welche den PI3-Kinase-abhängigen Signalweg negativ beeinflussen (Muniyappa et al., 2007). Zusätzlich beeinträchtigt Hyperglykämie die Insulinsignalkaskade im skelettalen und kardialen Muskel als auch im vaskulären Endothel über verschiedene Mechanismen (Brownlee, 2005; Goldberg und Dansky, 2006; Reusch, 2003). Dazu zählen erhöhter oxidativer Stress, zunehmende Polyolbildung und eine gesteigerte Aktivität des HBP, die Bildung von AGEs und Aktivierung von DAG und PKC (Muniyappa et al., 2007). ROS senken die NO-Bioverfügbarkeit und fördern die Bildung von Superoxiden durch eNOS,

sie aktivieren verschiedene PKC-Isoformen, was in Endothelzellen in einer verminderten Expression der eNOS resultiert (Brownlee, 2005). Über den HBP erfolgt eine reversible O-GlcNAc-Modifikation regulatorischer Serin-/Threoninphosphorylierungsstellen von Proteinen der Insulinsignalkaskade (Ball et al., 2006; Muniyappa et al., 2007). Die vermehrte Bildung der AGEs inhibiert die Insulin-stimulierte Tyrosinphosphorylierung der IRS1 und IRS2, so dass die Aktivierung der PI3-Kinase und Akt vermindert wird (Miele et al., 2003). In Endothelzellen senken AGEs die NO-Bioverfügbarkeit und eNOS-Expression, da sie die eNOS-mRNA Degradation beschleunigen (Bucala et al., 1991; Rojas et al., 2000; Xu et al., 2003; Chakravarthy et al., 1998).

Die Beteiligung des Insulinsignalwegs in metabolischen und vaskulären Zielgeweben könnte einen Mechanismus darstellen, der die Glucose- und hämodynamische Homöostase reguliert (Kim et al., 2006b). Daher sollen in dieser Arbeit die O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) und humanen Skelettmuskelzellen (SkMC) identifiziert werden, die nach Steigerung der O-GlcNAcylierung Veränderungen zum „gesunden“ Zustand der Zellen zeigen. Dabei können Unterschiede und Gemeinsamkeiten im O-GlcNAc-Modifikationsmuster der Proteine für endotheliale Zellen und Skelettmuskelzellen aufgezeigt werden.

### 1.13 Zielsetzung der Arbeit

Seit mehr als 25 Jahren ist die O-GlcNAc-Modifikation bekannt. Zahlreiche Studien zeigen, dass diese posttranslationale Modifikation die Funktionen vieler Proteine reguliert, die in Signaltransduktionsmechanismen und bei anderen physiologischen und pathologischen Prozessen eine Rolle spielen. Metabolische Abweichungen, welche mit Insulinresistenz und Diabetes mellitus assoziiert werden, sind zumindest teilweise im Zusammenhang zu sehen mit dem verstärkten Fluss der Glucose durch den HBP und der daraus resultierenden erhöhten O-GlcNAc-Modifizierung von Proteinen.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von hyperglykämischen Bedingungen bzw. der Hemmung der OGA auf die O-GlcNAc-Modifizierung von Proteinen aus HUVEC und humanen SkMC zu analysieren. Hierzu wurden die Zellen in Standardglucosemedium (5 mM Glucose, Kontrolle), in „Hoch Glucose“ (HG)-Medium (30 mM Glucose) oder mit dem OGA-Inhibitor PUGNAc kultiviert. Die mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2-DE) aufgetrennten Proteine des Cytosols, des Zellkerns oder des Zelllysats wurden mit dem O-GlcNAc-spezifischen Antikörper CTD 110.6 detektiert. O-GlcNAc-positive Proteine wurden aus Coomassie gefärbten Gelen ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und mittels Massenspektrometrie und Datenbankanalyse identifiziert. Zusätzlich wurde die O-GlcNAc- und OGT-Expression in HUVEC nach eindimensionaler Gelelektrophorese (1-DE) im Western Blot untersucht.

Parallel wurden Versuche mit HEK-Zellen durchgeführt, die auch in Standardmedium, HG-Medium (20 mM Glucose) oder mit Glucosamin (10 mM) kultiviert wurden. Die O-GlcNAc-

und OGT-Expression in HEK-Zellen wurde nach 1- und 2-DE im Western Blot sowie mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse analysiert.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, einen *in vitro* Assay zu entwickeln, in dem Proteine mit aus Maushirn isolierter oder rekombinant hergestellter OGT mit O-GlcNAc glykosyliert werden können. Hierzu wurde als Modellsubstrat das Nuklearporenprotein (NUP) 62 in Bakterien exprimiert und mittels eines His-Tags in Mikrotiterplatten an einen anti-His-Antikörper gebunden. Auf diese Weise sollten *in vitro* O-GlcNAc-modifizierte Proteine zur Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Sequenzen massenspektrometrisch analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien sind, wenn nicht anders vermerkt, vom Reinheitsgrad „pro analysi“.

Chemikalie	Bezugsquelle
$\alpha$ -Cyano-4-Hydroxycimtsäure (HCCA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benzthiazolin-sulfonsäure) (ABTS)	Sigma, Taufkirchen
3-[(3-cholamido-propyl-1)dimethylammonium]-1-propansulfonat (CHAPS)	Merck, Darmstadt
Acetonitril (ACN)	Riedel-de Haen, Seelze
Acrylamid	Merck, Darmstadt
Adenosinmonophosphat (AMP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Agarose	Roche, Grenzach-Whylen
Agarose für IEF	GE Healthcare, Uppsala (S)
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumhydrogencarbonat	Applichem, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Angiotensin I	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto Agar	Difco, Detroit (USA)
Bacto Hefeextrakt	Difco, Detroit (USA)
Bacto Trypton	Difco, Detroit (USA)
Bis-Acrylamid	Serva, Heidelberg
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BugBuster® Benzonase Nuclease	Novagen, Darmstadt
BugBuster® Protein Extraction Reagent	Novagen, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB G250)	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R250 (CBB R250)	Sigma, St. Louis (USA)
Desoxyribonucleotridiphosphate (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot
D-Glucose	Serva, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Direct Blue 71	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe

Chemikalie	Bezugsquelle
Entwickler GBX	Kodak, Rochester (USA)
Essigsäure (96 %)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merk, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt
Fixierer GBX	Kodak, Rochester (USA)
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Formaldehyd (37 %)	Merck, Darmstadt
Fount India Tusche	Pelikan, Hannover
Gel Code Blue Stain	Pierce, Rockford (USA)
Glucosamin für die Zellkultur	Sigma, St. Louis (USA)
Glutamin	Sigma, Taufkirchen
Glycerin (86 %)	Roth, Karlsruhe
Glycin	KMF OptiChem, Lohmar
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	KMF OptiChem, Lohmar
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Biomol, Hamburg
Jodacetamid	Merck, Hohenbrunn
Kaliumacetat	Fluka, Buchs (CH)
Kaliumcarbonat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Loading Dye Solution	Fermentas, St. Leon-Rot
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Manganchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver für die Mikrobiologie	Fluka, Buchs (CH)
Mineralöl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Serva, Heidelberg
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) (HEPES)	Sigma, Taufkirchen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt
N-Acetylglucosamin (GlcNAc)	Sigma-Aldrich, Steinheim
N-Acetylglucosamin-BSA (GlcNAc-BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe

Chemikalie	Bezugsquelle
Natriumthiosulfat	Merck, Darmstadt
Natronlauge	T.J. Baker, Deventer (NL)
Nickelsulfat	Sigma, Taufkirchen
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
Nonidet P-40 (NP-40)	Roche, Mannheim
Paraformaldehyd	Fluka, Buchs (CH)
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe
Pepstain A	Sigma-Aldrich, Steinheim
Perma Fluor	Beckman Coulter Company, Marseille (F)
Pharmalyte	GE Healthcare, Uppsala (S)
Phenolrot	Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe
Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
Plus One Repel-Silane ES	GE Healthcare, Uppsala (S)
Polyethylenglycol 8000 (PEG 8000)	ICN Biochemicals, Cleveland (USA)
Poly-L-Lysinhydrobromid (PLL)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteaseinhibitorcocktail	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein-A-Sepharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein-G-Sepharose	Amersham Biosciences, Uppsala (S)
ProteoMass™ ACTH Fragment 18-39	Sigma-Aldrich, Steinheim
ProteoMass™ Bradykinin Fragment 1-7	Sigma-Aldrich, Steinheim
ProteoMass™ Insulin	Sigma-Aldrich, Steinheim
ProteoMass™ Insulin chain B oxidiert	Sigma-Aldrich, Steinheim
ProteoMass™ P <sub>14</sub> R	Sigma-Aldrich, Steinheim
rLysozyme™	Novagen, Darmstadt
Roti®-Block (10 x)	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 40	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Sigma, St. Louis (USA)
Salzsäure	KMF OptiChem, Lohmar
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Sinapinsäure	Sigma, Steinheim
Succinylierte Weizenkeimagglutinin-Agarose (sWGA-Agarose)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Molecular Biosciences, Boulder (USA)
Thioharnstoff	Amersham Biosciences, Buckinghamshire (GB)
Trichloressigsäure (TCA)	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure (TFA)	Merck, Darmstadt

Chemikalie	Bezugsquelle
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin-EDTA	c.c.pro, Oberdorla
Uridindiphosphat-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid (35 %)	Merck, Darmstadt

**Tabelle 1: Chemikalien**

## 2.1.2 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Agarosegelkammer Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad, Hercules (USA)
DNAEngine Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad, Hercules (USA)
Elektrophoresesystem Mini-Protean 3	Bio-Rad, Hercules (USA)
Elektrophoresesystem Multigel-Long	Biometra, Göttingen
ELISA-Reader Titertek PLUS MS2	ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim
Ettan IPGphor3	GE Healthcare, Freiburg
HPLC Ultimate 3000	Dionex, Idstein
MALDI Sample plate, SS, 100 well with circles	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Massenspektrometer HCT-ultra PTM Discovery System™	Bruker Daltonics, Bremen
Massenspektrometer Voyager-DE_ STR Biospecrometry Workstation	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Mikroskop Axiovert 200	Zeiss, Göttingen
MultiphorII Electrophoresis Unit	GE Healthcare, Freiburg
Power Pack P25	Biometra, Göttingen
Sonifier 250	Branson Ultrasonics Corporation, Danbury (USA)
Spectrophotometer SmartSpec™ Plus	Bio-Rad, Hercules (USA)
Speed Vac®, Typ SC110-240	Savant Instruments Inc., Farmingdale (USA)
Trans-Blot® Semi Dry Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules (USA)
Transilluminator Uvsolo	Biometra, Göttingen
Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super RK 102 H	Schalltec GmbH, Mörfelden-Walldorf
Ultrazentrifuge Optima LE 80K	Beckman Coulter, Krefeld
Zentrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Biofuge 13	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
Zentrifuge Super T 21	Sorvall GmbH, Bad Homburg v.d.H.
Zentrifuge Z36HK	Hermle, Wehingen

**Tabelle 2: Geräte**

### 2.1.3 Einwegmaterial und Arbeitsutensilien

Arbeitsutensilien	Bezugsquelle
12-Well-Zellkultur-Platten	Becton Dickinson, Heidelberg
Chromatographiepapier (3MM)	Whatmann, Dassel
CryoTube™-Röhrchen	Nalge Nunc International, Rochester (USA)
Deckgläser	Menzel, Braunschweig
ESI-Probenbehälter	CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe
Filter	Schleicher & Schuell, Dassel
GelBond PAG Filme	GE Healthcare, Uppsala (S)
Immobiline Dry Strips pH 3-10 NL, 4-7, 6-11	GE Healthcare, Uppsala (S)
IPG-Streifen-Kammer	GE Healthcare, Uppsala (S)
Jamshidi Nadel	Cardinal Health, Châteaubriant (F)
Kulturflaschen T75	Sarstedt, Nümbrecht
Maxisorp Nunc Immuno-Platten	Nunc, Roskilde (DK)
PS-Microtiterplatten, 96-Well flexible Assypplatten, 96-Well	PS Greiner, Nürtingen Becton Dickinson, Heidelberg
Nitrocellulosemembran Hybond ECL	GE Healthcare, Uppsala (S)
Petrischalen	Corning, New York, USA
Pipetten	Eppendorf, Köln Labsystems, Egelsbach
Pipettenspitzen, Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht; Star Lab, Ahrensburg
Plastikröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran Immobilon-P	Millipore, Schwalbach
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht Star Lab, Ahrensburg
Röntgenfilme (CL-XPosure™-Filme)	Pierce, Rockford (USA)
Zellschaber	Sarstedt, Newton (USA)
Zentrifugenröhrchen	Beckman, Palo Alto (CA)

**Tabelle 3: Einwegmaterial und Arbeitsutensilien**

### 2.1.4 Antikörper, Lektine und POD-markierte Substanzen

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
AL25 polyklonaler Kaninchenantikörper Antigen: 110 kDa-Untereinheit der OGT von S. Arnold, Department of Biological Chemistry, John Hopkins University, Baltimore (USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt	α-Kaninchen-POD Polyklonaler Ziegenantikörper Peroxidase-gekoppelt, erkennt Kaninchen IgG und IgM Konz.: 0.4 µg/mL Bezugsquelle: Dianova, Hamburg α-Kaninchen-Cy3 polyklonaler Ziegenantikörper, Cyanin 3-gekoppelt Konz.: 1.5 mg/mL Bezugsquelle: Dianova, Hamburg

Primäre Antikörper	Sekundäre Antikörper
<p>AL28 polyklonaler Kaninchenantikörper Antigen: C-Terminus der OGT von S. Arnold, Department of Biological Chemistry, John Hopkins University, Baltimore (USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt</p>	<p><math>\alpha</math>-Kaninchen-POD Polyklonaler Ziegenantikörper Peroxidase-gekoppelt, erkennt Kaninchen IgG und IgM Konz.: 0.4 <math>\mu</math>g/mL Bezugsquelle: Dianova, Hamburg <math>\alpha</math>-Kaninchen-Cy3 polyklonaler Ziegenantikörper, Cyanin 3-gekoppelt Konz.: 1.5 mg/mL Bezugsquelle: Dianova, Hamburg</p>
<p>CTD 110.6 monoklonaler Mausantikörper Antigen: <math>\beta</math>-Oglykosidisch gebundenes N-Acetyl-D- Glucosamin Konz.: 2 mg/mL, 3-5 mg/mL Bezugsquellen: Sigma, St Louis (USA); Covance, Emeryville (USA); von G. Hart, John Hopkins University, Baltimore (USA), freundlicherweise zur Verfügung gestellt</p>	<p><math>\alpha</math>-Maus-IgG+IgM-POD polyklonaler Ziegenantikörper, Peroxidase- gekoppelt, erkennt Maus IgG und IgM Konz.: 0.4 <math>\mu</math>g/mL Bezugsquelle: Dianova, Hamburg <math>\alpha</math>-Maus-Cy2 polyklonaler Ziegenantikörper, Cy2-gekoppelt, erkennt Maus IgG und IgM Konz.: 1.4 mg/mL Bezugsquelle: Dianova, Hamburg</p>
<p>RL2 monoklonaler Mausantikörper, Antigen: Kernporenproteine und O-glykosidisch gebundenes N-Acetyl-D-Glucosamin Konz.: 2 mg/mL Bezugsquelle: Affinity Bioreagents, Golden (USA)</p>	<p><math>\alpha</math>-Maus-IgG+IgM-POD polyklonaler Ziegenantikörper, Peroxidase- gekoppelt, erkennt Maus IgG und IgM Konz.: 0.4 <math>\mu</math>g/mL Bezugsquelle: Dianova, Hamburg</p>
<p>Nucleoporin p62 (D-20) polyklonaler Ziegenantikörper, Antigen: C-Terminus des Nucleoporin p62 aus Ratte Konz.: 0.2 mg/mL Bezugsquelle: Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg</p>	<p><math>\alpha</math>-Ziegen-POD polyklonaler Eselantikörper, Peroxidase- gekoppelt, erkennt Ziege IgG Konz.: 0.8 mg/mL Bezugsquelle: Dianova, Hamburg</p>
<p>Tetra-His monoklonaler Mausantikörper Antigen: Tetra-Histidin-Peptid Konz.: 0.2 mg/mL Bezugsquelle: Qiagen, Hilden</p>	<p><math>\alpha</math>-Maus-IgG+IgM-POD polyklonaler Ziegenantikörper, Peroxidase- gekoppelt, erkennt Maus IgG und IgM Konz.: 0.4 <math>\mu</math>g/mL Bezugsquelle: Dianova, Hamburg</p>
<b>Lektine</b>	<b>POD-markierte Proteine</b>
<p>biotinyliertes sWGA succinyliertes und biotinyliertes Weizenkeimagglutinin erkennt N-Acetyl-D-Glucosamin am nichtreduzierenden Ende von Glykanen Bezugsquelle: Vector Laboratories, Burlingame (USA)</p>	<p>Streptavidin-POD bindet an Biotin Peroxidase-gekoppelt Konz.: 1mg/mL Bezugsquelle: Vector Laboratories, Burlingame (USA)</p>

**Tabelle 4: Antikörper, Lektine und POD-markierte Reagenzien**

### 2.1.5 Kits und Standards

Name	Hersteller
Carbamylyte Calibration Kit for 2-D Electrophoresis	GE Healthcare, Uppsala (S)
Gelextraktionskit QIAquick	Qiagen, Hilden
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
Immobiline™ II Reagents	GE Healthcare, Uppsala (S)
NucleoSpin® Plasmid	Machery-Nagel, Düren
PageRuler® Unstained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PCR-Reinigungs-Kit	Seqlab, Göttingen
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate, SuperSignal® West Pico Substrate	Pierce, Rockford (USA)

**Tabelle 5: Kits und Standards**

### 2.1.6 Zelllinien

Name	Beschreibung	Bezugsquelle
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen	Zur Verfügung gestellt von J. Kappler, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Bonn
HUVEC	Humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene	Zur Verfügung gestellt von P. Rösen, Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf
SkMC	Humane Skelettmuskelzellen	Zur Verfügung gestellt von P. Rösen, Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf

**Tabelle 6: Zelllinien**

Die humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen, HEK) wurden während unterschiedlicher Inkubationszeiten (4 oder 24 h) gemäß Tabelle 7 kultiviert.

Die weiteren Zelllinien (s. Tabelle 6) wurden am Deutschen Diabetes Zentrum in Düsseldorf isoliert und kultiviert wie in Tabelle 7 beschrieben. Die humanen Endothelzellen (HUVEC) wurden durch Kollagenasebehandlung aus humanen Nabelschnüren isoliert und nach der Vorschrift von Jaffe et al. kultiviert (Jaffe et al., 1973). Die Kultur der humanen Skelettmuskelzellen (SkMC) erfolgte nach Angaben des Vertreibers PromoCell (<http://www.promocell.com/fileadmin/promocell/PDF/C-12530.pdf>). Für die Versuche wurden Skelettmuskelzellen aus zwei verschiedenen Spendern ausgesät: 1) weiblich, 25 Jahre alt, Kaukasierin und 2) männlich, 47 Jahre alt, Kaukasier.

Nach der 72-stündigen Kultivierung der Zellen entsprechend Tabelle 7 wurde das Medium entfernt und die Zellen in T-75-Kulturflaschen bei -80 °C eingefroren.

Name	Abkürzung	Kultivierung	+/- Serum im Medium
HEK	K HG GlcN	5 mM Glucose 25 mM Glucose 10 mM Glucosamin	+/- FCS
HUVEC	LG HG 1 HG 72	5 mM Glucose 30 mM Glucose für 1 h 30 mM Glucose für 72 h	+ FCS
HUVEC	HG HGP LG LGP	30 mM Glucose 30 mM Glucose + 50 µM PUGNAc 5 mM Glucose 5 mM Glucose + 50 µM PUGNAc	+/- FCS
HUVEC	HG HGP LG LGP	30 mM Glucose 30 mM Glucose + 200 µM PUGNAc 5 mM Glucose 5 mM Glucose + 200 µM PUGNAc	- FCS
SkMC	HG HGP LG LGP	30 mM Glucose 30 mM Glucose + 40 µM PUGNAc 5 mM Glucose 5 mM Glucose + 40 µM PUGNAc	+ FCS

**Tabelle 7: Kultivierung der Zellen**

Die Kultivierung der Zellen mit Medium, das 5 mM Glucose enthält, gilt für alle Versuche als Kontrollbedingung.

### 2.1.7 Bakterienstamm

In dieser Arbeit wurde ausschließlich der Bakterienstamm *E. coli* BL21 (DE3) verwendet (Studier und Moffatt, 1986).

### 2.1.8 Plasmide und Selektionsantibiotika

Gross et al. konstruierten das Plasmid pBJG1, welches aus einem modifizierten pET24b-Plasmid besteht, in das die multiple Klonierungsstelle des pET36b eingefügt wurde. Für das Plasmid pBJG1-ncOGT wurde die cDNA der humanen ncOGT in den Vektor pBJG1 eingebaut. Auf dem Plasmid pBJG1 befindet sich ein Gen für Kanamycinresistenz (30 µg/mL) (Gross et al., 2005). Das Plasmid pBJG1-ncOGT wurde von S. Walker von der Harvard Medical School, Boston, USA zur Verfügung gestellt.

Die cDNA des NUP62, enthalten im Vektor pExpress-1, ist bei Open Biosystems erhältlich. Das NUP62 wurde über die Restriktionsschnittstellen *Not* I und *Eco* RV in den Vektor eingefügt. Für diesen Vektor wird Ampicillin (100 µg/mL) als Selektionsantibiotika eingesetzt (Katalognummer: MRN1768-99626707, über Thermo Scientific, Huntsville, USA).

## 2.1.9 Enzyme

Name	Bezugsquelle
<i>Bam</i> HI	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Xho</i> I	Fermentas, St. Leon-Rot
Ligase T <sub>4</sub> DNA	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Polymerase Pfu	Fermentas, St. Leon-Rot
Trypsin Gold, mass spectrometry grade	Promega, Mannheim

**Tabelle 8: Enzyme**

## 2.1.10 Lösungen, Medien und Puffer

### Lösungen für die Bakterienkultur

#### **YT-Medium**

8 g/L Bacto Trypton  
 5 g/L Bacto Hefeextrakt  
 5 g/L NaCl  
 pH 7.5 einstellen, autoklavieren

#### **TFB 1-Puffer**

30 mM Kaliumacetat  
 50 mM MnCl<sub>2</sub>  
 100 mM RbCl  
 10 mM CaCl<sub>2</sub>  
 15 % (v/v) Glycerin  
 pH 5.8 einstellen

#### **LB-Medium**

1 % (w/v) NaCl  
 1 % (w/v) Bacto Trypton  
 0.5 % (w/v) Bacto Hefeextrakt  
 pH 7.0 einstellen, autoklavieren

#### **Ampicillin-Stammlösung**

50 mg/mL Ampicillin in Aqua dem., sterilfiltrieren,  
 Lagerung bei -20 °C

#### **YT<sup>++</sup>-Medium**

YT-Medium +  
 20 mM MgSO<sub>4</sub>  
 10 mM KCl

#### **TFB 2-Puffer**

10 mM MOPS  
 75 mM CaCl<sub>2</sub>  
 10 mM RbCl  
 15 % (v/v) Glycerin  
 pH 7.0 einstellen

#### **LB-Agarplatten**

1.5 % (w/v) Bacto Agar in LB-Medium, autoklavieren,  
 + 100 µg/mL Ampicillin oder  
 + 30 µg/mL Kanamycin

#### **Kanamycin-Stammlösung**

100 mg/mL Kanamycin in Aqua dem.,  
 sterilfiltrieren, Lagerung bei 4 °C

### Lösungen für die DNA-Analytik

#### **TBE-Puffer (10x)**

1 M Tris  
 0.83 M Borsäure  
 10 mM EDTA

#### **TE-Puffer**

1.2 g/L Tris  
 0.38 g/L EDTA  
 pH 8.5 einstellen, autoklavieren

### Lösungen für die Zellkultur

#### **Kulturmedium**

DMEM-L (Glucose-Konz.: 1 g/L)  
 10 % (v/v) FCS  
 100 U/mL Penicillin  
 100 µg/mL Streptomycin

#### **HBSS<sup>-</sup>**

5.4 mM KCl  
 0.44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
 136.9 mM NaCl  
 4.62 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
 5.5 mM D-Glucose  
 0.03 mM Phenolrot  
 pH 7.2–7.4 einstellen

**Poly-L-Lysin-Stammlösung**  
1 mg/mL Poly-L-Lysin, sterilfiltrieren

**25 mM Glucose**, sterilfiltrieren

**10 mM Glucosamin**, sterilfiltrieren

## Lösungen für die Immunfluoreszenzanalyse

### **Fixierungslösung**

4 % (w/v) Paraformaldehyd

### **Permeabilisierungslösung**

Blockierungslösung + 0.5 % (v/v) Triton-X100

### **Blockierungslösung**

1 % (w/v) BSA in DPBS

### **Antikörperverdünnungen** in Blockierungslösung

AL25	1:500
CTD 110.6	1:100
$\alpha$ -Kaninchen Cy3	1:500
$\alpha$ -Maus-Cy2	1:250

## Lösungen für die Proteinanalytik

Proteinextraktion aus *E. coli* BL21 (DE3)

### **Harnstoffpuffer**

7 M	Harnstoff
20 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

pH 7.5 einstellen

### **Proteaseinhibitoren**

<b>Aprotinin</b>	10 mg/mL in PBS
<b>Leupeptin</b>	10 mg/mL in Aqua dem.
<b>Pepstatin A</b>	1 mg/mL in Essigsäure:Methanol 1:10 (v/v)
<b>PMSF</b>	100 mM in Ethanol

Bestimmung der Proteinkonzentration

### **Bradfordlösung**

100 mg	CBB G250
50 mL	95 % Ethanol
100 mL	85 % Phosphorsäure

ad 1 L mit Aqua dem., filtrieren

### **BSA-Stammlösung**

1 mg/mL (w/v) BSA  
in entsprechendem Lysispuffer

Zelllyse

### **Hypotoner Puffer**

10 mM	HEPES pH 7.9
1.5 mM	MgCl <sub>2</sub>
10 mM	KCl
0.5 mM	DTT

in 100 mM GlcNAc

### **Sucrosepuffer**

1.5 M	Sucrose
10 mM	Tris/HCl pH 7.4
1 mM	MgCl <sub>2</sub>

in 100 mM GlcNAc

### **Kernlysepuffer**

20 mM	HEPES pH 7.5
600 mM	NaCl
0.5 mM	EDTA
0.05 % (v/v)	NP-40

in 100 mM GlcNAc

### **Transferaseassaypuffer**

25 mM	HEPES pH 7.0
10 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	EDTA

in 100 mM GlcNAc

## Allgemeine Puffer

### TBS (10x)

0.5 M	Tris
1.5 M	NaCl
	pH 7.5 einstellen

### DPBS

0.7 mM	PBS +
0.5 mM	CaCl <sub>2</sub>
	MgCl <sub>2</sub>

### PBS (10x)

1.5 M	NaCl
0.08 M	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0.17 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

### PBST

PBS + 0.05 % (v/v) Tween 20

## Lösungen für den Enzym-linked Immunosorbent Assay

### Beschichtungslösung

0.1 M NaHCO<sub>3</sub>

### Natrium-Acetatpuffer

100 mM	CH <sub>3</sub> COONa
50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH 4.2 mit Essigsäure einstellen

### ABTS-Lösung

0.5 mL	ABTS-Stammlösung
4.5 mL	Natrium-Acetatpuffer
5 µL	Wasserstoffperoxid

### OGT-Assay-Puffer

1 mM	DTT
12.5 mM	MgCl <sub>2</sub>
25 mM	Tris/HCl pH 7.5
1 %	BSA

### Blockierungs- und Antikörperlösung

3 % (w/v) BSA in TBS + 0.1 % Tween 20  
0.3 % (w/v) BSA in TBS + 0.1 % Tween 20

### ABTS-Stammlösung

2 % (w/v) ABTS

### Stopplösung

0.6 % (w/v) SDS

### UDP-GlcNAc-Stammlösung

2 mM UDP-GlcNAc in 25 mM AMP

## Lösungen für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

### Acrylamidlösung

30 % (w/v)	Acrylamid
0.8 % (w/v)	Bis-Acrylamid

### Sammelgelpuffer

1 M Tris/HCl pH 6.8

### Trenngel

8 %	10 %	
4 mL	5 mL	Acrylamidlösung
5.6 mL	5.6 mL	Trenngelpuffer
0.15 mL	0.15 mL	SDS-Stammlsg
5.25 mL	4.25 mL	Aqua dem.
30 µL	30 µL	20 % APS
15 µL	15 µL	TEMED

### Laufpuffer (10x)

250 mM	Tris
192 mM	Glycin
1 % (w/v)	SDS

### Trenngelpuffer

1 M Tris/HCl pH 8.8

### SDS-Stammlösung

10 % (w/v) SDS

### Sammelgel

1.5 mL	Acrylamidlösung
1.3 mL	Sammelgelpuffer
0.15 mL	SDS-Stammlsg
7.15 mL	Aqua dem.
30 µL	20 % APS
15 µL	TEMED

### SDS- Probenpuffer, reduzierend (4x)

250 mM	Tris/HCl pH 6.8
12 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
40 % (v/v)	Glycerin
0.25 % (w/v)	Bromphenolblau

## Lösungen für die 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese

### **2D-Lysispuffer**

6 M	Harnstoff
2 M	Thioharnstoff
4 % (w/v)	CHAPS
1 % (w/v)	DTT
1 % (v/v)	Proteaseinhibitorcocktail
1 % (v/v)	Pharmalyte 3-10

in 0.1 M GlcNAc

### **Rehydratisierungslösung**

8 M	Harnstoff
4 % (w/v)	CHAPS
0.4 % (w/v)	DTT
0.5 % (v/v)	Pharmalyte 3-10 / 6-11
1 % (v/v)	0.07 % Bromphenolblau

in 0.1 M GlcNAc

### **IPG-Streifen pH-Gradient 4-7**

#### **Azide Lösung**

4.3 mL
2 mL
7.5 µL
578 µL
110 µL
450 µL
-
-
ad 7.5 mL

pH 4.0 mit 4 M HCl einstellen

#### **Basische Lösung**

0.8 mL
2 mL
7.5 µL
302 µL
738 µL
151 µL
269 µL
876 µL
ad 7.5 mL

pH 7.0 mit TEMED einstellen

87 % Glycerin
Acrylamidlösung für IPG-Streifen
TEMED
Immobiline pK 3.6
Immobiline pK 4.6
Immobiline pK 6.2
Immobiline pK 7.0
Immobiline pK 9.3
Aqua bidest.

#### **Acrylamidlösung für IPG-Streifen**

30 % (w/v) Acrylamid
3 % (w/v) Bis-Acrylamid

#### **Acrylamidlösung (für SDS-Gele)**

30 % (w/v) Acrylamid
0.8 % (w/v) Bis-Acrylamid

#### **Trenngelpuffer (4 x)**

1.5 M	Tris/HCl pH 8.8
0.4 % (v/v)	10 % SDS

#### **Trenngel**

10 mL	Acrylamidlösung
7.5 mL	Trenngelpuffer 4 x
12.5 mL	Aqua dem.
0.15 mL	10 % APS
15 µL	TEMED

#### **Äquilibrierungsstammlösung**

6 M	Harnstoff
2 % (w/v)	SDS
0.1 M	EDTA
0.01 % (w/v)	Bromphenolblau
30 %	87 % Glycerin

in 50 mM Tris/HCl pH 6.8

#### **APS-Lösungen**

Für IPG-Streifen: 40 % (w/v) APS
für 2D-Gele: 10 % (w/v) APS

#### **Agaroselösung**

0.5 % (w/v) Agarose in Laufpuffer
-----------------------------------

#### **Sammelgelpuffer (4 x)**

1.5 M	Tris/HCl pH 6.8
0.4 % (v/v)	10 % SDS

#### **Sammelgel**

1 mL	Acrylamidlösung
1.5 mL	Sammelgelpuffer 4 x
6.5 mL	Aqua dem.
50 µL	10 % APS
20 µL	TEMED

#### **Äquilibrierungslösungen**

<b>I</b> = Äquilibrierungsstammlösung
+ 1 % (w/v) DTT
<b>II</b> = Äquilibrierungsstammlösung
+ 4.8 % (w/v) Jodacetamid

## Lösungen für den Western Blot und immunologischer Nachweis von Antigenen

### **Transferpuffer (12.5 x)**

39 mM	Glycin
48 mM	Tris
0.375 % (w/v)	SDS
+ 20 % (v/v)	Ethanol

### **Waschlösung**

TBST = TBS 1 x + 0.1 % (v/v) Tween 20
TBSHT = TBS 1 x + 0.3 % (v/v) Tween 20

**Blockierungslösung**

3 % (w/v) BSA in TBST

**Verdünnungen von Erstantikörpern und Lektinen**

AL25	1:15000
AL28	1:12500
CTD 110.6	1:8000–1:10000
Nucleoporin (D-20)	1:4000
Tetra-His	1:2000
sWGA	1:20000

**Lösung für Erstantikörper und POD-konjugierte Zweitantikörper, Lektine und Streptavidin-POD**

0.3 % (w/v) BSA in TBST

**Verdünnungen von POD-konjugierten Zweitantikörpern und Streptavidin**

$\alpha$ -Kaninchen-POD	1:10000
$\alpha$ -Maus-POD	1:10000
$\alpha$ -Ziegen-POD	1:10000
Streptavidin-POD	1:50000

Lösung für die Proteinfärbung

## Proteinfärbung in Gelen

**Coomassiefärbelösung**

0.1 % (w/v)	CBB R250
10 % (v/v)	96 % Essigsäure
50 % (v/v)	Ethanol

**Fixierlösung**

30 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	Essigsäure

**Sensitivierungslösung**

0.02 % (w/v) Natriumthiosulfat

**Entwicklerlösung**

3 % (w/v)	Kaliumcarbonat
0.001 % (w/v)	Natriumthiosulfat
0.07 % (v/v)	37 % Formaldehyd

## Proteinfärbungen auf Membranen

**Ponceau S-Färbelösung**

0.3 % (w/v)	Ponceau S
10 % (v/v)	96 % Essigsäure

**Indian Ink Färbelösung**

250 mL	PBST
2.5 mL	96 % Essigsäure
250 $\mu$ L	Indian Ink Tusche

**Coomassieentfärbelösung**

30 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	96 % Essigsäure

**Waschlösung**

20 % (v/v) Ethanol

**Silberlösung**

0.2 % (w/v) Silbernitrat

**Stopplösung**

3 % (v/v) 96 % Essigsäure

**Direct Blue-Färbelösung**

0.008 % (w/v)	Direct Blue 71
40 % (v/v)	Ethanol
10 % (v/v)	96 % Essigsäure

**Lösung zur Proteinelution**0.2 M Glycin  
pH 2.4-2.8 einstellenLösungen für den tryptischen Verdau von Proteinen**Trypsin-Stammlösung**50 ng/ $\mu$ L Trypsin  
in 50 mM Essigsäure**Trypsin-Lösung**Trypsin-Stammlösung 1:20 mit Aqua dem. und  
200 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  im Verhältnis 1:1 verdünnen

## Lösungen für die Massenspektrometrie

### Matrix unterstützte Laser-Desorption/ Ionisation-Flugzeit Massenspektrometrie

#### **Kalibrierlösung Pepmix**

10 pM/μL ACTH Fragment 18-39  
10 pM/μL Angiotensin I  
10 pM/μL Bradykinin Fragment 1-7  
10 pM/μL Insulin  
10 pM/μL Insulin B Kette (oxidiert)  
10 pM/μL P<sub>14</sub>R  
in 0.1 % TFA, Lagerung bei -20 °C

#### **Angiotensin I**

100 μM Angiotensin I Acetat Hydrat (human)  
in 0.1 M Essigsäure, Lagerung bei -20 °C

#### **Insulin**

100 μM ProteoMass™ Insulin  
MALDI-MS Standard  
in 1 % TFA, Lagerung bei -20 °C

#### **P<sub>14</sub>R**

100 μM ProteoMass™ P<sub>14</sub>R  
MALDI-MS Standard  
in 0.1 % TFA, Lagerung bei -20 °C

#### **Sinapinsäure-Matrix**

in 50 mg/ mL Acetonitril  
90 % (v/v) 0.1 % TFA

### Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie

#### **Puffer A**

0.1 % (v/v) Ameisensäure

#### **ACTH Fragment 18-39**

100 μM ProteoMass™ ACTH Fragment 18-39  
MALDI-MS Standard  
in 0.1 % TFA, Lagerung bei -20 °C

#### **Bradykinin Fragment 1-7**

100 μM ProteoMass™ Bradykinin Fragment 1-7  
MALDI-MS Standard  
in 50 % Acetonitril/0.05 % TFA,  
Lagerung bei -20 °C

#### **Insulin B Kette (oxidiert)**

100 μM ProteoMass™ Insulin chain B oxidized  
MALDI-MS Standard  
in 50 % Acetonitril/ 0.05 % TFA,  
Lagerung bei -20 °C

#### **HCCA-Matrix**

in 50 mg/mL Acetonitril  
90 % (v/v) 0.1 % TFA

#### **Puffer B**

90 % (v/v) Acetonitril  
0.1 % (v/v) Ameisensäure

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

*E. coli* BL21 (DE3) wird in LB-Medium auf einem Rundschtüttler bei 37 °C und 200 U/min oder auf LB-Agarplatten im Brutschrank bei 37 °C 12 bis 15 h vermehrt. Bakterienklone auf Agarplatten können bei 4 °C einige Wochen lagern und als Ausgangsmaterial zur Anzucht in Flüssigmedien dienen. Die Anzucht transgener Bakterien erfolgt stets mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum. Längerfristige Lagerung eines lebensfähigen Bakterienklons erfolgt in Glycerinstockkulturen, welche aus 850 µL Bakteriensuspension einer Über-Nacht (ÜN)-Kultur von *E. coli* in LB-Medium mit 150 µL Glycerin hergestellt werden. Die Aliquots werden bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.1.2 Herstellung kompetenter Bakterien

*E. coli* des Bakterienstammes BL21 (DE3) werden in einer ÜN-Kultur in 2.5 mL YT<sup>++</sup>-Medium auf dem Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 U/min angezogen. Die Bakterienkultur wird 1:100 in YT<sup>++</sup>-Medium verdünnt. Die Inkubation wird fortgesetzt, bis eine optische Dichte (OD) bei 600 nm von 0.8 erreicht wird. Von dieser Vorkultur werden 5 mL in 100 mL vorgewärmtes YT<sup>++</sup>-Medium überführt und bis zu einer OD bei 600 nm von 0.5 inkubiert. Die Bakterienkultur wird sofort auf 4 °C abgekühlt und 5 min auf Eis gehalten. Die Ernte erfolgt durch Zentrifugation für 10 min bei 1200 x g und 4 °C. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 10 mL TFB 1-Puffer bei 4 °C resuspendiert. Nach einer Inkubation von 10 min auf Eis erfolgt eine weitere Zentrifugation. Der Überstand wird wiederum verworfen. Das Bakterienpellet wird in 2 mL TFB 2-Puffer resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird sofort aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### 2.2.1.3 Hitzeschocktransformation von Bakterien (nach Hanahan, 1983)

Die transformationskompetenten Bakterien werden auf Eis aufgetaut und zu 50 µL der Bakteriensuspension werden 25-50 ng der Plasmid-DNA bzw. ein kompletter Ligationsansatz gegeben. Es folgt eine Inkubation auf Eis für 10 min, an die sich ein Hitzeschock bei 42 °C für 1 min anschließt. Die Zellen werden erneut für 2 min auf Eis gekühlt, 450 µL LB-Medium zu der Bakteriensuspension gegeben und die Bakterien bei 37 °C und 200 U/min auf einem Rundschtüttler für 30 min inkubiert. Die Bakterien werden zur Selektion auf Antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen. Nach Trocknung der Platten erfolgt eine Inkubation ÜN bei 37 °C.

#### 2.2.1.4 DNA-Präparation

##### Analytische Plasmid-Präparation

Für die analytische Plasmid-Präparation werden am Vortag 5 mL Flüssigkulturen mit Einzelkolonien der transformierten Bakterien angeimpft. Die Vermehrung der Bakterien erfolgt ÜN im Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 U/min. Die ÜN-Kultur wird durch Zentrifugation bei 10000 x g für 30 s bei RT sedimentiert. Die weitere Durchführung der Präparation erfolgt nach den Angaben des Herstellers (Nucleospin, Machery-Nagel, Düren).

##### Präparative Plasmid-Isolierung

Für die präparative Plasmid-Isolierung werden am Vortag je 50 µL einer 5 mL Flüssigkultur zur Animpfung von 50 mL Flüssigkulturen verwendet. Die Bakterien werden ÜN im Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 U/min angezogen. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgt nach den Angaben des Herstellers (QIAfilter Plasmid Midi Kit, Qiagen, Hilden).

#### 2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Es werden 0.8 %ige Gele aus Agarose und TBE-Puffer gegossen. Die Agarose wird durch Kochen gelöst. Nach anschließender Abkühlung der Lösung auf ca. 60 °C wird Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0.4 µg/mL hinzugefügt. Das Gel wird gegossen, ein Taschenkamm eingefügt und nach völligem Erstarren mit TBE-Puffer bedeckt. Die Proben und der Molekulargewichtsmarker werden mit Loading Dye Solution versetzt und auf das Gel aufgetragen. Je nach Größe des Gels erfolgt die Auftrennung der DNA-Fragmente bei 80 bzw. 100 V für 90 min. Zur Auswertung und Dokumentation des Trennmusters werden die Gele auf einen UV-Transilluminator gelegt und photographiert.

#### 2.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung der cDNA des NUP62 aus dem Plasmid pExpress-1 und zum Einfügen der entsprechenden Restriktionsschnittstellen in die NUP62 cDNA werden für die PCR die Primer BamNuphin und XhoNuprueck mit folgenden Sequenzen verwendet:

BamNuphin 5' - CG GGA TCC CGA TGA GTG GGT TTA ACT TTG GAG GCA CCG - 3'

XhoNuprueck 5' - CCG CTC GAG CGG GCC ATA GTC AAA GGC AAT GCG CAG - 3'

Gleichzeitig wird das Stopcodon deletiert, damit nach Ligation des neuen Konstrukts das His-Tag des Vektors pBJG1 abgelesen werden kann. Auf das His-Tag am C-Terminus des Vektors folgt ein Stopcodon.

Die PCR wurden mit folgenden Parametern durchgeführt:

Vorlauf:	Denaturierung	2 min	95 °C
Zyklus (30x):	Denaturierung	1 min	95 °C
	Annealing	45 s	65 °C
	DNA-Synthese	4.5 min	72 °C
Auslauf:		10 min	72 °C
Lagerung:		∞	4 °C

Für die PCR wird der dNTP-Mix mit 20 pmol der Primer BamNuphin und XhoNuprueck, 100 ng DNA, 1 U Pfu-Polymerase und Pfu-Puffer 10 x gemischt und mit Aqua dem. auf 50 µL aufgefüllt.

#### 2.2.1.7 Gelelution

Das cDNA-Fragment-enthaltende Gelstück wird aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Elution der cDNA erfolgt mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit entsprechend der Anleitung des Herstellers (Qiagen, Hilden).

#### 2.2.1.8 Restriktionsanalyse

Zur Restriktionsanalyse verschiedener DNA-Fragmente werden 200-300 ng cDNA, Enzyme und entsprechende Puffer nach Angaben des Herstellers (Fermentas, St. Leon-Rot) gemischt, eventuell mit Aqua dem. aufgefüllt und 2 h bei 37 °C inkubiert.

Das Plasmid pBJG1-ncOGT wird mit den Enzymen *Bam* HI und *Xho* I verdaut, um den Vektor von der cDNA der ncOGT zu trennen. Der Vektor pBJG1 wird anschließend mit der cDNA des NUP62 ligiert.

Das über PCR vermehrte NUP62-Insert mit neu angefügten Restriktionsschnittstellen wird mit *Bam* HI und *Xho* I geschnitten, um kompatible überhängende 5'- und 3'-Enden zu erzeugen, da die Pfu-Polymerase glatte Strangenden synthetisiert.

Die Restriktionskontrolle des Plasmids pBJG1-NUP mit den Enzymen *Bam* HI und *Xho* I dient zur Überprüfung des korrekten Einbaus des Inserts NUP62 in den Vektor pBJG1.

#### 2.2.1.9 Aufreinigung der cDNA

Nach einer PCR oder einer Restriktionsanalyse lässt sich die cDNA mit Hilfe des PCR-Reinigungs-Kits nach Angaben des Herstellers aufreinigen (Seqlab, Göttingen).

#### 2.2.1.10 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die cDNA wird 1:100 in Aqua dem. verdünnt. Die Extinktion wird bei 260 nm und 280 nm gemessen. Eine OD bei 260 nm von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/mL DNA. Da Proteine eine Absorption bei 280 nm aufweisen, kann mit dem Quotienten aus 260 nm und 280 nm der Reinheitsgrad der cDNA bestimmt werden. Nukleinsäuren mit einem Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  zwischen 1.8 und 1.9 besitzen den gewünschten Reinheitsgrad.

#### 2.2.1.11 Ligation

Der Vektor pBJG1 wird mit den Enzymen *Bam* HI und *Xho* I geschnitten und dem Insert NUP62 über PCR diese Restriktionsschnittstellen innerhalb des offenen Leserasters angefügt. Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 verknüpft die überhängenden Enden. Ein Überschuss an Insert-DNA gegenüber der Vektor-DNA verhindert weitgehend, dass zwei Vektoren durch die Ligase zusammengefügt werden.

Der Vektor pBJG1 und die cDNA des NUP62 werden in zwei verschiedenen Ligationsansätzen, bei denen sich das Verhältnis Vektor : Insert unterscheidet, ÜN bei 16 °C ligiert:

Vektor : Insert	1:3	1:4
Vektor pBJG1	20 ng	20 ng
Insert NUP62	40 ng	60 ng
Ligase	2 µL	2 µL
Ligase-Puffer 10 x	3 µL	3 µL
Aqua dem.	ad 30 µL	ad 30 µL

**Tabelle 9: Ligationsansätze zur Konstruktion des Plasmids pBJG1-NUP**

Mit den Ligationsansätzen werden *E. coli* BL21 (DE3) transformiert und der korrekte Einbau des Inserts in den Vektor mittels Restriktionsanalyse überprüft.

## 2.2.2 Methoden der Zellkultur

### 2.2.2.1 Zellkultivierung

#### Kultivierung von adhärennten Zellen

Die HEK293-Zellen werden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und hoher Luftfeuchtigkeit in T75-Zellkulturflaschen in DMEM-L-Medium kultiviert.

#### Subkultivierung

Das Medium wird verworfen und die Zellen mit HBSS<sup>-</sup> gewaschen. Der Zellrasen wird mit Trypsin-EDTA-Lösung (bei PLL-Beschichtung) oder HBSS<sup>-</sup> für einige Minuten inkubiert, bis sich die Zellen durch leichtes Schlagen der Zellkulturflasche lösen. Die Zellen werden mit Zellkulturmedium vom Boden der Zellkulturflasche gewaschen und die Zellsuspension in ein 15 mL-Röhrchen überführt. Nach der Zentrifugation bei 170 x g für 7 min wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wird die Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen gegeben oder auf PLL-beschichtete Deckgläschen in 12-Well-Zellkultur-Platten ausgesät.

#### Einfrieren von Kulturzellen

Von einer konfluent bewachsenen Zellkulturflasche wird das Medium verworfen und die Zellen mit HBSS<sup>-</sup> gewaschen. Der Zellrasen wird mit Trypsin-EDTA-Lösung oder HBSS<sup>-</sup> für einige Minuten inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden der Flasche lösen. Die Zellen werden in Zellkulturmedium aufgenommen und in ein 15 mL-Röhrchen überführt. Durch Zentrifugation bei 170 x g für 7 min werden die Zellen sedimentiert, der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 1 mL Zellkulturmedium resuspendiert. In ein CryoTube<sup>TM</sup>-Röhrchen werden 100 µL DMSO vorgelegt und 900 µL Zellsuspension zugegeben und die Röhrchen direkt eingefroren. Sie werden bei -80 °C oder im Stickstofftank gelagert.

## Auftauen von Kulturzellen

Die gefrorene Zellsuspension wird zügig mit Hilfe von vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgetaut und in ein 15 mL-Röhrchen mit vorgelegtem Zellkulturmedium überführt. Nach der Zentrifugation bei 170 x g für 7 min wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 mL Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wird in eine mediumhaltige Zellkulturflasche überführt und kultiviert.

## Beschichtung mit PLL

Etwa 8 mL PLL-Lösung werden in eine T75-Zellkulturflasche bzw. 1 mL PLL-Lösung auf ein Deckgläschen in einer 12-Well-Zellkultur-Platte pipettiert und mindestens 20 min bei RT inkubiert. Die Lösung wird verworfen und 9 mL Zellkulturmedium pro T75-Zellkulturflasche bzw. 900 µL Zellkulturmedium pro Vertiefung der 12-Well-Zellkultur-Platte vorgelegt.

### 2.2.2.2 Behandlung der HEK-Zellen

Die HEK-Zellen werden bei einer Konfluenz von 50-70 % behandelt. Das Medium wird verworfen und die Zellen zweimal mit HBSS<sup>-</sup> gewaschen. In die Zellkulturflaschen werden jeweils 9 mL Zellkulturmedium pipettiert und jeweils 1 mL Aqua dem. (Kontrolle), 25 mM Glucose bzw. 10 mM Glucosamin zugefügt. Die Vertiefungen der 12-Well-Zellkultur-Platte werden mit jeweils 900 µL Zellkulturmedium befüllt und je 100 µL der Kontroll-, Glucose- bzw. Glucosaminlösung zugegeben. Die Inkubation erfolgt für 24 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die Zellen in den 12-Well-Zellkultur-Platten werden mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse (s. 2.2.2.3) untersucht. Die Zellen in den Zellkulturflaschen werden entweder abzentrifugiert oder ohne Medium in den Zellkultur-flaschen bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.2.3 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse

HEK-Zellen werden auf PLL-beschichtete Deckgläschen in 12-Well-Zellkultur-Platten ausgesät und 24 h kultiviert. Nach der Behandlung der HEK-Zellen (s. 2.2.2.2) für weitere 24 h im Inkubator wird die Expression von O-GlcNAc und der OGT analysiert. Zunächst wird das Zellkulturmedium verworfen und die Zellen werden zweimal mit kaltem DPBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wird 1 mL Fixierungslösung für 20 min bei RT zugegeben und anschließend zweimal mit Blockierungslösung gewaschen. Die Permeabilisierung und Blockierung erfolgt mit 0.5 % Triton-X 100 in Blockierungslösung für 30 min. Nach zwei weiteren Waschschritten mit Blockierungslösung schließt sich die Inkubation des Erstantikörpers AL25 und/oder CTD 110.6 für 30 min bei RT an. Zur Kontrolle werden auch Zellen ohne Erstantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Blockierungslösung wird für 30 min bei RT im Dunkeln mit den Cy2- oder Cy3-gekoppelten Zweitantikörpern inkubiert. Durch zweimaliges Waschen werden die nicht gebundenen Antikörper entfernt und die Nuklei der Zellen für 5 min mit Hoechst 33258 angefärbt. Zuletzt werden die Zellen zweimal mit DPBS und einmal mit Aqua dem. gewaschen. Die

Deckgläschen werden mit der Zellseite nach unten durch einen Tropfen Perma Fluor auf Objektträgern fixiert und bis zur Auswertung im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

## 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.3.1 Expression des rekombinanten NUP62

*E. coli* BL21 (DE3) werden mit dem Plasmid pBJG1-NUP transformiert (s.1.2.1.3). Eine 5 mL Flüssigkultur wird mit einem Klon angeimpft und ÜN bei 37 °C und 200 U/min auf dem Schüttelinkubator angezogen. Mit 1 mL dieser Vorkultur werden 50 mL Hauptkultur angeimpft und die Bakterien bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 0.6 bis 0.8 bei 37 °C und 200 U/min kultiviert. Die Expression des NUP62 wird durch die Zugabe von 0.2 mM bzw. 1 mM IPTG induziert. Die Induktionsdauer beträgt für den 0.2 mM IPTG-Ansatz 4 h oder 16 h bei 20 °C und für den 1 mM IPTG-Ansatz 3 h 30 min bei 37 °C. Die Bakterien werden bei 4500 x g für 10 min bei 4 °C geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und ÜN bei -80 °C gelagert.

### 2.2.3.2 Gewinnung des rekombinanten NUP62

Die NUP62-exprimierenden Bakterien werden auf Eis aufgetaut. Die Lyse wird mit dem BugBuster® Protein Extraction Reagent durchgeführt. Das 10-fach konzentrierte Reagenz wird mit 20 mM Tris/HCl pH 7.5 auf einfache Konzentration verdünnt. Es folgt die Zugabe von 1 µL Benzonase Nuclease pro mL sowie 1 kU rLysozyme/mL laut Vorschrift. Zusätzlich werden die Proteaseinhibitoren Aprotinin und Leupeptin 1:100 sowie Pepstatin A und Phenylmethylsulfonylfluorid 1:1000 verdünnt zugesetzt. Mit 1/20 des ursprünglichen Kulturvolumens werden die Bakterien in der BugBusterlösung bei RT für 20 min lysiert. Das Lysat wird bei 16000 x g für 20 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird für weitere Analysen bei -80 °C eingefroren.

Die Pellets werden erneut lysiert, um in „Inclusion Bodies“ aufzulösen. Zunächst erfolgt die weitere Lyse nach Angaben des Herstellers (Novagen, Darmstadt). Die Pellets werden in 1/20 des ursprünglichen Kulturvolumens BugBusterlösung durch Auf- und Abpipettieren und mehrmaliges starkes Schütteln resuspendiert. Für den Lysozymverdau wird 1 kU rLysozyme pro mL zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Zur Suspension wird das gleiche Volumen 1:10 mit Aqua dem. verdünnte BugBusterlösung hinzugefügt und auf dem Vortexer 1 min geschüttelt. Nach der Zentrifugation bei 5000 x g für 15 min bei 4 °C wird der Überstand verworfen und die „Inclusion Bodies“ in 1:10 verdünnter BugBusterlösung resuspendiert, auf dem Vortexer geschüttelt und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wird noch zweimal wiederholt. Zuletzt wird das Lysat bei 16000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen. Da es sich eher um eine Suspension statt einer klaren Lösung handelt, wird diese erneut zentrifugiert. Der klare Überstand wird bei -20 °C aufbewahrt und das Pellet einer denaturierenden Lyse unterzogen.

Dazu werden die Pellets in 7 M Harnstoffpuffer (200 µL/Pellet) durch Vortexen resuspendiert und 5 min im Harnstoffpuffer inkubiert. Die Ultraschallbehandlung erfolgt für 3 Impulse á 3 s auf Eis. Nach der Zentrifugation bei 12000 x g für 30 min bei 4 °C werden die Überstände für weitere Analysen bei -20 °C eingefroren und die Pellets verworfen.

### 2.2.3.3 Enzym-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)

#### 2.2.3.3.1 Nachweis des rekombinanten NUP62

Es werden ca. 100 µg NUP62-Lysat in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> in den Mikrotiterplatten ÜN bei 4 °C inkubiert. Alternativ wird der Tetra-His-Antikörper 1:1000 in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> für 2 h bei RT als Beschichtung vorgelegt. In diesem Fall wird nach Abdekantieren der Antikörperlösung und viermaligem Waschen mit TBS und einstündiger Blockierung mit 400 µL 3 % BSA in TBST das NUP-Lysat zugegeben und ÜN bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wird viermal mit TBS für je 1 min gewaschen und mit 3 % BSA in TBST für 1 h bei RT blockiert. Nach vier Waschschritten mit TBST wird entweder mit 100 µL NUP62-Antikörper 1: 3000 oder Tetra-His-Antikörper 1:2000 in 3 % BSA in TBST 1 h bei RT inkubiert. Zur Kontrolle wird jeweils in ein oder drei Vertiefungen ohne Erstantikörper mit 3 % BSA in TBST inkubiert. Nach viermaligem Waschen werden je 100 µL des POD-konjugierten anti-Ziege- (1:5000) bzw. anti-Maus-Zweitantikörper (1:10000) in 3 % BSA in TBST zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Ungebundene Zweitantikörper werden durch viermaliges Waschen mit TBST entfernt und je 100 µL ABTS-Lösung auf die Ansätze pipettiert. Mit 0.6 % SDS wird die Reaktion abgestoppt. Die Extinktion wird bei 405 nm im ELISA-Reader gemessen.

#### 2.2.3.3.2 Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation des γ-Kristallins

Aus Linsen aufgereinigtes γ-Kristallin (zur Verfügung gestellt von Dr. Ahrend, ehemals Institut für Tierwissenschaften, Universität Bonn) wird nach Angaben des Herstellers (Molecular Biosciences, Boulder (USA)) biotinyliert. Über eine Beschichtung mit 0.1 µg Streptavidin pro Vertiefung wird das biotinylierte Protein in den Mikrotiterplatten ÜN bei 4 °C gebunden. Pro Vertiefung wird 400 µL Blockierungslösung vorgelegt und nach einstündiger Inkubation werden 3 µL Ameisensäure pro Vertiefung zugegeben und weitere 2 h inkubiert. Nach vier Waschschritten mit TBS erfolgt die Zugabe von biotinyliertem Lektin sWGA (1:5000) in 0.3 % BSA in TBST für 1 h bei RT. Die Streptavidin-POD (1:3000) in 0.3 % BSA in TBST wird nach viermaligem Waschen mit TBS für 1 h bei RT inkubiert. Alternativ wird nach der Blockierung und vier Waschschritten mit TBS mit dem Antikörper CTD 110.6 (1:20000) in 0.3 % BSA in TBST für 1h bei RT inkubiert und nach erneutem viermaligem Waschen mit TBS der POD-gekoppelte anti-Maus-Zweitantikörper (1:5000) in 0.3 % BSA in TBST für 1 h bei RT inkubiert. ABTS wird als Substrat für die Farbentwicklung eingesetzt, die mit 0.6 % SDS abgestoppt wird. Die Extinktion wird bei 405 nm im ELISA-Reader gemessen.

#### 2.2.3.4 O-GlcNAc-Transferase-Aktivitätstest (OGT-Assay)

Zunächst werden die Vertiefungen mit dem Tetra-His-Antikörper (1:1000) in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> für mindestens 2 h bei RT beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird mit 0.3 % BSA in PBS für 2 h bei RT blockiert. Auf vier Waschschrte mit PBS folgt die Zugabe von 200 µg His-Tag-markiertes NUP62 in 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pro Vertiefung, welches ÜN bei 4 °C inkubiert wird. Dann wird viermal mit PBS gewaschen, erneut mit 0.3 % BSA in PBS für 2 h bei RT blockiert und wiederum viermal mit PBS gewaschen. Für den OGT-Assay werden etwa 20 µg OGT und 100 mM UDP-GlcNAc in 100 µL OGT-Assay-Puffer für 1.5 h bei 25 °C inkubiert. Zur Kontrolle wird auch ein Ansatz ohne UDP-GlcNAc durchgeführt. Die Mikrotiterplatten werden während der Inkubation bei 100 U/min geschüttelt. Nach viermaligem Waschen mit PBST wird mit sWGA (1:3000) in 0.3 % BSA in PBS für 1 h bei RT inkubiert, ungebundenes Lektin in vier Waschschrten mit PBST entfernt, und mit Streptavidin-POD (1:5000) in 0.3 % BSA in PBS für 1 h bei RT inkubiert. Ungebundene Peroxidase lässt sich durch viermaliges Waschen mit PBST entfernen. Nach Zugabe von ABTS-Lösung erfolgt nach deutlich sichtbarer Entwicklung der Grünfärbung das Abstoppen der Reaktion mit 0.6 % SDS. Die Messung der Extinktion erfolgt im ELISA-Reader bei 405 nm.

#### 2.2.3.5 Analytische Methoden

##### 2.2.3.5.1 Fraktionierte Zelllyse

Die getrennte Lyse von Cytosol und Zellkern erfolgt nach einer modifizierten Vorschrift von Blobel und Potter (Blobel und Potter, 1966).

Die Zellen einer Zellkulturflasche werden zunächst in 1 mL hypotonem Puffer aufgenommen und in einem Glashomogenisator homogenisiert. In ein Zentrifugationsgefäß werden 2 mL Sucrosepuffer vorgelegt und mit dem Homogenat überschichtet. Der Überstand enthält nach der Zentrifugation bei 100000 x g für 1 h bei 4 °C die cytosolische Fraktion, die für weitere Analysen bei -80 °C eingefroren wird. In der Interphase liegen die Membranproteine vor, die mit hypotonischem Puffer oder 2D-Lysispuffer versetzt werden und bei -80 °C gelagert werden. Die Kernproteine werden in Kernlysepuffer aufgenommen, 20 min auf Eis lysiert und erneut bei 20000 x g für 30 min zentrifugiert. Die Kernproteine liegen im Überstand vor und werden bei -80 °C aufbewahrt. Die Fraktionen werden mit SDS-PAGE oder 2-DE analysiert.

Für die Aufreinigung der nukleären und cytosolischen OGT aus Mäusehirnen wird nach einem modifizierten Protokoll der Arbeitsgruppe von Marshall vorgegangen (Marshall et al., 2003; Okuyama und Marshall, 2003).

Die tiefgefrorenen Mäusehirne (männlich, erwachsen) werden in 3 mL Sucrosepuffer pro g Gewebe aufgenommen. Die Hirne werden manuell mit einem Glashomogenisator bei RT homogenisiert und das Homogenat durch zwei Lagen Mullbinde filtriert. Das Filtrat wird mit fünf Volumen Sucrosepuffer verdünnt und bei 600 x g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird bei 20000 x g für 10 min bei RT zentrifugiert, um die cytosolische

Fraktion zu erhalten. Das Pellet der ersten Zentrifugation wird in Sucrosepuffer resuspendiert und bei 14000 x g für 30 min bei RT abzentrifugiert. Die gereinigten Kerne werden in 1 mL Kernlysepuffer pro g Hirnausgangsgewicht resuspendiert und für 20 min auf Eis lysiert. Durch Zentrifugation bei 20000 x g für 10 min bei RT lässt sich die DNA von den Kernproteinen abtrennen.

Für die weitere Analyse werden die cytosolische und nukleäre Fraktion durch Zugabe einer 30 %igen PEG 8000-Lösung entsalzt. Durch Zentrifugation bei 20000 x g für 20 min bei RT werden die Proteine pelletiert und in Transferaseassaypuffer resuspendiert.

#### 2.2.3.5.2 Immunpräzipitation (IP)

O-GlcNAc-modifizierte Proteine werden mit sWGA-Agarose, die OGT mit Protein-A-Sepharose nach Präinkubation der Zelllysate mit 2 µL der Antikörper AL25 oder AL28 präzipitiert. Mit je 100 µL Zelllysate werden 50 µL sWGA-Agarose bzw. Protein A-Sepharose UN bei 4 °C drehend im Überkopfschüttler bei 6 U/min inkubiert. Am nächsten Morgen wird das Immunpräzipitat bei 4000 x g und 4 °C für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet viermal mit TBS gewaschen und zuletzt vollständig getrocknet. Für die Auftrennung mit SDS-PAGE wird das Pellet in 50 µL zweifach konzentrierten SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min gekocht. Der nach der Zentrifugation bei 10000 x g für 2 min erhaltene Überstand enthält die präzipitierten Proteine und die eingesetzten Antikörper. Für die Auftrennung mit 2-DE wird das Pellet in Rehydratisierungslösung, die 1 M GlcNAc enthält, gelöst. Nach der Zentrifugation bei 15000 x g für 30 min enthält der Überstand die Antikörper sowie die präzipitierten Proteine, die nun direkt für die Rehydratisierung der IPG-Streifen eingesetzt werden.

#### 2.2.3.5.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (nach Bradford, 1976)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wird eine Standard-Verdünnungsreihe mit BSA hergestellt. Die BSA-Ausgangskonzentration beträgt 1 mg/mL und wird in mehreren Schritten auf 100 µg/mL mit entsprechendem Puffer verdünnt. Zu je 100 µL jeder Verdünnungsstufe werden 5 mL Bradfordlösung zugegeben. Die Proben werden unverdünnt und 1:10 verdünnt vorgelegt, auf 100 µL mit entsprechendem Probenpuffer aufgefüllt und mit 5 mL Bradfordlösung gemischt. Nach 5 minütiger Inkubation bei RT werden 300 µL des jeweiligen Ansatzes in einer Dreifachbestimmung in eine 96-Well-Platte übertragen und die Extinktion bei 595 nm im Photometer gemessen. Als Blindwert wird der entsprechende Probenpuffer verwendet. Aus den gemessenen Werten der BSA-Verdünnungsreihe wird eine Eichkurve erstellt. Mit dieser lassen sich die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmen.

#### 2.2.3.5.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (nach Laemmli, 1970)

Für die eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden 0.75 mm dicke 8 oder 10 %ige Polyacrylamidgele gegossen. Für die 2-DE werden dickere und größere

Gele verwendet (s. 2.2.3.6.8). Zunächst wird die noch flüssige Trenngellösung in die Gießvorrichtung pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Das Trenngel ist nach etwa 1 h bei RT polymerisiert. Das Isopropanol wird abgegossen und das Trenngel mit der flüssigen Sammelgellösung überschichtet. Zur Bildung von Probenauftragstaschen wird ein Taschenkamm eingesetzt, der nach der Polymerisation des Sammelgels entfernt wird. Die Gele werden in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und diese mit Laufpuffer befüllt. Die Proben werden mit SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min gekocht und kurz anzentrifugiert. Als Molekulargewichtsstandard dient ein Proteinmarker, der zusammen mit den Proben auf das Gel aufgetragen wird. Von jeder Probe werden zwischen 10 und 20 µg Protein auf das Gel aufgetragen. Die Proteinauftrennung erfolgt bei konstanter Stromstärke von 30 mA für zwei Gele. Die Elektrophorese wird beendet, wenn die Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hat.

#### 2.2.3.5.5 Coomassiefärbung

Nach der Proteinauftrennung wird das Gel 10 min in bereits verwendetem Coomassieentfärber gewaschen und anschließend für 1h bei RT in Färbelösung gelegt. Das Gel wird ÜN entfärbt, bis der Hintergrund wieder klar ist. Zuletzt wird es in Aqua dem. gewaschen.

#### 2.2.3.5.6 Silberfärbung

Zunächst werden die Proteine ÜN in 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure fixiert. Sind die Gele bereits Coomassie gefärbt, entfällt die Fixierung. Nach drei Waschstritten für je 30 min wird genau 1 min sensitiviert. Für 20 s wird dreimal mit Aqua dem. gewaschen. Die Gele werden 20 min in der Silberlösung gefärbt. Um überschüssiges Silber zu entfernen, wird dreimal 20 s mit Aqua dem. gewaschen. Entwickelt wird solange, bis Proteinspots oder -banden sichtbar sind. Die Reaktion wird mit 3 % Essigsäure abgestoppt.

#### 2.2.3.5.7 Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wird das Trenngel sowie die Filterpapiere und Nitrocellulosemembran für den Semi-Dry Blot zunächst 30 min in Transferpuffer inkubiert. Dabei sollte die Membran während der gesamten Zeit benässt bleiben. Der Blotstapel wird wie folgt auf der Anodenplatte zusammengebaut: 3 Filterpapiere, Nitrocellulosemembran, Gel, 3 Filterpapiere. Die Kathodenplatte wird aufgesetzt und eine Stromdichte von 1 mA/cm<sup>2</sup> für 90 min angelegt. Nach abgeschlossenem Transfer wird die Nitrocellulosemembran in Aqua dem. gewaschen und das Gel verworfen.

#### 2.2.3.5.8 Reversible Ponceau S Färbung

Die Membran wird für 2 min in Ponceau S Färbelösung gelegt und dann durch mehrmaliges Waschen mit Aqua dem. und anschließender Inkubation für 5 min in TBS wieder entfärbt. Mit einem Bleistift kann der Molekulargewichtsmarker markiert werden. Vor der O-GlcNAc-Detektion wird die Membran in heißem, nicht kochendem TBS innerhalb von 3 min entfärbt.

#### 2.2.3.5.9 Nachweis von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen

Die Nitrocellulosemembran wird 5 min in TBSHT inkubiert und dann mit 0.3 % BSA in TBST für 1 h bei RT blockiert. Es folgt die Inkubation mit dem ersten Antikörper bzw. dem Lektin ÜN bei 4 °C auf dem Schüttler. Am nächsten Morgen wird sechsmal für 10 min mit TBSHT gewaschen. Es schließt sich die Zugabe des POD-gekoppelten Zweitantikörpers bzw. Streptavidins an. Nach einstündiger Inkubation wird die Membran fünfmal für je 10 min mit TBSHT und zweimal 5 min mit TBS gewaschen.

#### 2.2.3.5.10 Entwickeln eines Röntgenfilms

Für die Chemilumineszenzreaktion wird die Nitrocellulosemembran mit den Reagenzien SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate und SuperSignal® West Pico Substrate im Verhältnis 1:3 behandelt. Die enthaltenen Luminol- und Peroxidlösungen werden je 1+1 gemischt. Die Chemilumineszenzlösung wird gleichmäßig über die komplette Fläche der Membran verteilt und mindestens 3 min inkubiert. Die weiteren Arbeiten finden in der Dunkelkammer statt. Die Länge der Belichtungsdauer der Filme orientiert sich an der Stärke des Chemilumineszenzsignals. Nach der Belichtung wird der Film für 2 min in Entwicklerlösung inkubiert, kurz in Wasser gewaschen und noch für 2 min in Fixierlösung fixiert. Zuletzt wird der Film mit Wasser gewaschen und getrocknet.

#### 2.2.3.5.11 Färbung von Proteinen auf Membranen

Nach der Chemilumineszenzbehandlung wird die Membran in Aqua dem. gewaschen. Durch einstündige Behandlung mit 0.2 M Glycin pH 2.8 werden die Antikörper entfernt. Die Membran wird anschließend mit TBST gewaschen.

##### Direct Blue Färbung

Die Membran wird für 5 min in Färbelösung inkubiert. Die Hintergrundfärbung lässt sich durch mehrmaliges Waschen mit Aqua dem. reduzieren. Durch Inkubation in 40 % Ethanol und 10 % Essigsäure lässt sich die Färbung wieder rückgängig machen. Folgt keine weitere Behandlung, wird die Membran bei RT getrocknet.

##### Indian Ink Färbung (nach Hancock und Tsang, 1983)

Um eine komplette Färbung aller Proteine zu erzielen, sollte die Indian Ink Färbung 2 h bei RT dauern. Die Färbelösung wird verworfen und die Membranen mehrmals in Aqua dem. gewaschen und zuletzt bei RT getrocknet.

## 2.2.3.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese und massenspektrometrische Analyse der Proteine

### 2.2.3.6.1 Herstellung von Zellhomogenaten

Die Zellen werden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in T-75-Kulturflaschen gelagert. Nach Auftauen auf Eis wird zu jeder Flasche 1 mL 2D-Lysispuffer gegeben und über den Flaschenboden durch Schwenken verteilt. Die Zellen werden mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zelllysate werden einer Ultraschallbehandlung mit 3 Impulsen á 3 s auf Eis unterzogen. Nach Zentrifugation bei  $20000 \times g$  für 1 h bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  werden die Pellets verworfen und die Überstände aliquotiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.2.3.6.2 Gießen von immobilisierten pH-Gradienten

Zuerst wird die Oberfläche der Glasplatte, welche die Abstandshalter trägt, mit Repel Silane bestrichen. Dadurch lässt sich das Gel später von der Glasplatte besser lösen. Nachdem die Lösung getrocknet ist, wird die Glasplatte mit Aqua dem. gewaschen. Das Gel wird auf einem GelBond PAG Film polymerisiert, der mit seiner hydrophoben Unterseite auf eine Glasplatte gelegt wird. Der Gießstand wird zusammengebaut und bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgekühlt. Um den pH-Gradienten zu gießen werden jeweils 7.5 mL einer aziden Lösung und einer basischen Lösung vorbereitet. Die Standardgeldicke beträgt 0.5 mm. Den Lösungen wird direkt vor dem Gießen  $15\text{ }\mu\text{L}$  40 % APS zugesetzt und das Gel über einen Gradientenmixer gegossen. Es wird mit Isopropanol überschichtet und 10 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  polymerisiert. Die vollständige Polymerisation erfolgt bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  für mindestens 1 h. Der Gießstand wird unter Wasser abgekühlt und der GelBond PAG Film mit dem gegossenen Gel entnommen. Viermal wird mit Aqua dem. gewaschen und mit 1.5 % Glycerin für 15 min äquilibriert. Mit Hilfe eines Ventilators wird das Gel ÜN getrocknet. Am nächsten Morgen wird es mit einer Plastikfolie bedeckt und in 3 mm breite Streifen geschnitten. Das azide Ende wird markiert und die IPG-Streifen bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 2.2.3.6.3 Methanol-Chloroform-Fällung

Zur Proteinprobe wird das vierfache Volumen Methanol zugegeben und stark gemischt. Das Reaktionsgefäß wird für 2 min bei RT geöffnet inkubiert. Dann wird das einfache Volumen Chloroform zugegeben und erneut auf dem Vortexer gemischt. Während der anschließenden fünfminütigen Inkubation bleibt der Deckel des Reaktionsgefäßes ebenfalls offen. Nach Zugabe des dreifachen Probenvolumens Aqua dem. wird bei  $20000 \times g$  für 5 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die Interphase wird entnommen und mit dem sechsfachen des Probenvolumens Methanol gewaschen. Zum Lösen der Proteine wird in einem Ultraschallbad für wenige Minuten beschallt bis die Lösung klar ist. Die Proteine werden durch Zentrifugation bei  $20000 \times g$  für 5 min bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  sedimentiert und in der gewünschten Proteinkonzentration in Rehydratisierungslösung bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelöst.

#### 2.2.3.6.4 In-Gel-Proben-Rehydratisierung

Die getrockneten IPG-Streifen werden mit Rehydratisierungslösung auf ihre Originalgröße rehydriert. Durch Aufnahme der Probe in die Rehydratisierungslösung können die Proteine während der Rehydratisierung in die IPG-Streifen eintreten. Da diese Applikationsmethode keinen definierten Probenauftragungspunkt beinhaltet, wird die Bildung von Präzipitaten vermindert. Es wird ein definiertes Volumen Probenrehydratisierungslösung in die Vertiefung einer IPG-Streifen-Kammer vorgelegt, z.B. 200  $\mu$ L bei einer IPG-Streifen-Länge von 11 cm. Der IPG-Streifen wird mit der Gelseite nach unten auf die Lösung aufgebracht, so dass die Lösung sich komplett unter dem IPG-Streifen befindet. Um eine Verdunstung und Harnstoffkristallisation zu verhindern, werden alle IPG-Streifen mit Mineralöl überschichtet. Die IPG-Streifen rehydrieren ÜN bei RT.

#### 2.2.3.6.5 1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung

Isoelektrische Fokussierung (IEF) mit der MultiphorII

Dafür wurden ausschließlich selbstgegossene IPG-Streifen mit verschiedenen pH-Gradienten verwendet. Zunächst wurde auf der Kühlplatte 1 mL Kerosin zur Isolierung verteilt. Die Laufplatte wurde aufgelegt und die rehydratisierten IPG-Streifen mit der Gelseite nach oben parallel und in einer Linie auf der Laufplatte angeordnet. Die Proben wurden entweder während der Rehydratisierung in die IPG-Streifen adsorbiert oder über kleine Filterpapierstücke direkt vor der IEF auf die IPG-Streifen aufgetragen. Zwei lange angefeuchtete Filterpapierstreifen werden für den Kontakt zu den Elektroden zwischen diesen und den Enden der IPG-Streifen aufgelegt. Die Elektroden werden aufgesetzt und die gesamte Laufplatte mit Mineralöl befüllt. Die Fokussierung erfolgt für IPG-Streifen mit 11 cm Länge bei 11 kVh, 20 °C und mit den maximalen Limits von 2 mA und 5 W. Nach Vollendung der Fokussierung werden die IPG-Streifen bei -80 °C eingefroren.

IEF mit der Ettan™ IPGphor3

Zunächst wird die Laufplatte mit 108 mL Mineralöl befüllt. Die rehydratisierten IPG-Proben-Streifen werden mit der Gelseite nach oben in die Vertiefungen der Laufplatte gelegt. Angefeuchtete Filterpapiere werden für den Kontakt zur Elektrode zwischen diese und den IPG-Streifen aufgelegt. Die IEF wird über die Ettan™ IPGphor3 Control Software per Computer gesteuert. Für IPG-Streifen von 11 cm Länge und einem pH-Gradienten von 4-7 werden 16 kVh und für die pH-Gradienten 3-10 und 6-11 werden 11 kVh angelegt. Die Auftrennung erfolgt bei 20 °C und einem maximalen Limit von 50  $\mu$ A pro IPG-Streifen. Nach der Fokussierung werden die IPG-Streifen bei -80 °C eingefroren.

#### 2.2.3.6.6 Proteinfärbung der IPG-Streifen

Die Proteine werden für 10 min in 20 % Trichloressigsäure fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Aqua dem. werden die IPG-Streifen mit Gel Code Blue Stain für ca. 2 h angefärbt und kurz in Aqua dem. gewaschen.

#### 2.2.3.6.7 Äquibrierung

Die IPG-Streifen werden mit der Gelseite nach oben in eine IPG-Streifen-Kammer gelegt. Zunächst werden sie 5 min in Äquibrierungsstammllösung gewaschen, dann in je 2 mL Äquibrierungslösung I pro IPG-Streifen und anschließend in je 2 mL Äquibrierungslösung II pro IPG-Streifen jeweils für 15 min inkubiert. Die äquibrierten IPG-Streifen werden direkt auf die Sammelgele der SDS-PAGE aufgelegt und der Gellauf der zweiten Dimension gestartet.

#### 2.2.3.6.8 2. Dimension: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die zweite Dimension der 2-DE werden ausschließlich 10 %ige Gele mit einer Dicke von 1 mm verwendet. Pro Gel werden 13 mL Trenngel gegossen und das Gel vorsichtig mit Isopropanol überschichtet. Nach zweistündiger Polymerisation wird das Isopropanol abgegossen und die Trenngele mit 0.1 % SDS überschichtet und luftdicht verpackt. Die Polymerisation setzt sich ÜN bei RT fort. Pro Gel wird 1 mL Sammelgel auf das Trenngel gegossen, welches innerhalb von 30 min polymerisiert. Auch die Sammelgele werden mit Isopropanol überschichtet. Vor dem Gellauf wird das Isopropanol verworfen und auf die Gele Laufpuffer pipettiert. Die äquibrierten IPG-Streifen werden mit dem aziden Ende nach links und der Gelseite nach vorne auf die Sammelgele aufgelegt. Der Laufpuffer wird verworfen und die IPG-Streifen mit flüssiger Agarose überschichtet, um sie zu fixieren. Für das Sammelgel werden 15 mA pro Gel für 20 min angelegt und für das Trenngel 30 mA pro Gel für etwa 1 h 15 min. Die Proteingele werden gefärbt (s. 2.2.3.5.5 und 2.2.3.5.6) oder für den Western Blot (s. 2.2.3.5.7) vorbereitet.

#### 2.2.3.6.9 Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel

Für den tryptischen Verdau werden Coomassie gefärbte Gele der 2-DE verwendet. Die Gele werden nach der Färbung mehrmals in Aqua dem. gewaschen. Die als O-GlcNAc-positiv detektieren Proteinspots werden mit Hilfe einer Jamshidi Nadel aus dem Gel ausgestochen und in Aqua dem. aufgenommen. Nach mehrmaligem Waschen der Gelstücke mit Aqua dem. werden die Gelstücke lyophilisiert. Je 50 µL Trypsinlösung werden auf jedes Stück Gel gegeben und die Proteine ÜN bei 37 °C auf dem Schüttler verdaut. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Gelstücke werden in 50 µL 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 10 min bei RT inkubiert. Der Überstand wird mit dem vorigen vereint und die Gelstücke erneut 10 min in 50 µL 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> inkubiert. Der Überstand wird zu den anderen Überständen gegeben, und die Gelstücke werden zweimal mit je 75 µL 50 % ACN/0.1 % TFA für 10 min inkubiert. Auch diese Überstände werden mit den anderen vereint. Die gesammelten Überstände werden gefriergetrocknet, die Gelstücke verworfen. Das Lyophilisat wird in 0.1 % TFA aufgenommen, auf dem Vortexer gemischt und 1 h bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10000 x g für 10 min bei RT wird der Überstand für massenspektrometrische Analysen verwendet.

#### 2.2.3.6.10 Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisierung-Flugzeit Massenspektrometrie (MALDI-ToF MS)

Aus  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxymizsäure (HCCA) oder Sinapinsäure wird eine gesättigte Matrixlösung in 50 % ACN/0.1 % TFA hergestellt. Die Proben aus dem tryptischen Verdau (s. 2.2.3.6.9) werden 1:1 mit der Matrix gemischt und auf den Probenhalter aufgetragen. Die Messungen erfolgen im Massenspektrometer Voyager-DE™ STR Biospectrometry Workstation (Applied Biosystem) am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Bonn. Zur Kalibrierung wurden die monoisotopischen Peptide Bradikinin Fragment 1-7, humanes Angiotensin, P<sub>14</sub>R, humanes ACTH Fragment 18-39, bovines oxidiertes Insulin B chain und Insulin B verwendet. Die Daten werden mittels Data Explorer (Applied Biosystem, Version 4.0.0.0), Mascot Peptide Mass Fingerprint und der Swiss-Prot Datenbank bearbeitet und ausgewertet. Folgende Einstellungen werden vorgenommen:

Taxonomy:	Homo sapiens (human)
Enzym:	Trypsin
Modifizierungen:	Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)
Massenwert:	monoisotopisch
Peptidmassentoleranz:	$\pm 0.5$ Da
Peptidladung:	1+

#### 2.2.3.6.11 Elektrospray-Ionisierungs-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die Analyse der mit Trypsin verdauten Proteine erfolgt nach vorgeschalteter reversed Phase-Chromatographie über eine C<sub>18</sub>-Säule, die von einer HPLC Ultimate 3000 Anlage gesteuert wird, mit dem Massenspektrometer HTCultra PTM Discovery System am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Bonn. Die Sektion der Massen erfolgt während eines ansteigenden Acetonitrilgradienten innerhalb von 20 min. Die Moduseinstellungen sind wie folgt:

Massenbereich:	Std/erweitert
Ionenpolarität:	positiv
Ionenquelle:	NanoESI, online

Die Daten werden mit Compass DataAnalysis (Bruker, Version 4.0), Mascot MS/MS Ion Search und der Swiss-Prot Datenbank bearbeitet und ausgewertet.

Taxonomy:	Homo sapiens (human)
Enzym:	Trypsin
Modifizierungen:	Carbamidomethyl (C), Oxidation (M)
Massenwert:	monoisotopisch
Peptidmassentoleranz:	$\pm 1.2$ Da
Fragmentmassentoleranz:	$\pm 0.6$ Da

### 3 Ergebnisse

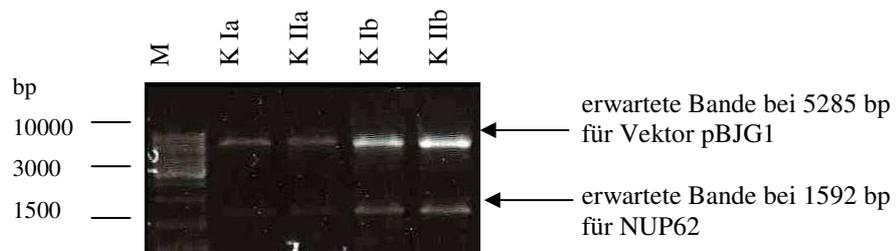
Ein Ziel dieser Arbeit war es, einen Test zu entwickeln, mit dem die O-GlcNAcylierung verschiedener Substrate mit der OGT *in vitro* durchzuführen ist. Ein zweites Ziel war es, das O-GlcNAc-Muster 2D-aufgetrennter Proteine verschiedener Zelllinien (HUVEC, SkMC und HEK) vergleichend zu untersuchen, die in Standardmedium oder in Gegenwart verschiedener Agenzien kultiviert wurden, die zu erhöhter O-GlcNAc-Modifizierung führen, wie z.B. in Gegenwart von 30 mM Glucose („High Glucose“), Glucosamin- bzw. dem OGA-Inhibitor PUGNAc. Die modifizierten Proteine sollten mittels Massenspektrometrie und Datenbankanalyse identifiziert werden.

#### 3.1 Untersuchungen zur Aktivität der rekombinanten O-GlcNAc-Transferase

##### 3.1.1 Expression des OGT-Substrates NUP62

Zur Etablierung des OGT-Assays sollte NUP62 als Modellsubstrat verwendet werden, da es als O-GlcNAc-modifiziert beschrieben ist (Starr und Hanover, 1990) und als Positivkontrolle in OGT-Assays anderer Arbeitsgruppen verwendet wurde (z.B. Lubas und Hanover 2000; Lazarus et al., 2006). Da NUP62 in *E. coli* exprimiert wurde, sollte es nicht O-GlcNAc-modifiziert vorliegen.

Zur Herstellung des Plasmids pBJG1-NUP (s. 7.1) wurde die cDNA des NUP62 aus dem Plasmid pExpress-1 über PCR amplifiziert. Dabei wurde das Stopcodon deletiert und die Restriktionsschnittstellen *Bam* HI und *Xho* I am 3'- bzw. 5'-Ende eingefügt. Die erwartete Größe des PCR-Produkts betrug 1592 bp. Die Vervielfältigung der cDNA des NUP62 über eine PCR-Reaktion war erfolgreich, auch wenn weitere schwache Banden zu erkennen waren (Abbildung nicht gezeigt). Die cDNA des NUP62 mit den neu angefügten Restriktionsschnittstellen wurde in den Vektor pBJG1 inseriert. Dafür wurde das Plasmid pBJG1-ncOGT mit den Restriktionsenzymen *Bam* HI und *Xho* I geschnitten. Durch die Restriktion ergaben sich die Fragmente 3141 bp für die ncOGT und 5285 bp für den Vektor pBJG1, dessen Bande eher auf der Höhe von 6000 bp läuft (Abbildung nicht gezeigt). Die Ligation wurde mit Vektor:Insert im Verhältnis 1:3 und 1:4 durchgeführt. Mit dem Ligationsansatz wurde *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Die entstandenen Klone wurden auf das Vorhandensein des neu konstruierten Plasmids pBJG1-NUP mittels Restriktionsanalyse überprüft.



**Abbildung 11: Überprüfung verschiedener Klone der Ligation pBJG1-NUP mit Restriktionsenzymen**

Die nach der Transformation der Ligation gewonnenen *E. coli*-Klone wurden durch Restriktion mit *Bam* HI und *Xho* I auf den Einbau des Inserts NUP62 in den Vektor pBJG1 überprüft. Bei allen Klone sind die zwei erwarteten Banden bei 5285 bp und 1592 bp zu erkennen.

M: Molekulargewichtsmarker; K Ia+b: Klone der Ligation mit Vektor:Insert = 1:3; KIIa+b: Klone der Ligation mit Vektor:Insert = 1:4.

Die Klone wiesen die erwarteten Banden bei 1592 bp und 5285 bp auf, die auf die korrekte Ligation zwischen Vektor und Insert schließen lassen. Somit ist die cDNA des NUP62 in den Vektor pBJG1 eingebaut worden.

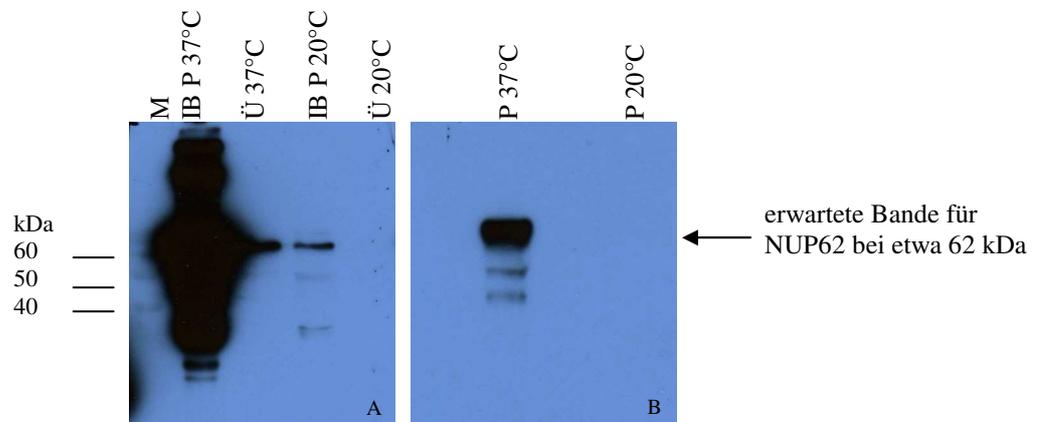
Das Plasmid pBJG1-NUP Klon IIb wurde mit den Standardprimern T7 und T7term sequenziert, um zum einen zu überprüfen, ob während der PCR Mutationen entstanden sind und zum anderen, um den korrekten Einbau des Inserts an den Schnittstellen sicher zu stellen. Die Sequenzierung ergab, dass im Vektor pBJG1 in der *Xho* I-Restriktionsschnittstelle eine Mutation vorliegt. Die Basenabfolge einer *Xho* I-Schnittstelle lautet CTCGAG. Die erste Base C wurde gegen G ausgetauscht. Statt an der mutierten Schnittstelle wurde das Plasmid pBJG1-ncOGT daher an einer der Schnittstelle ähnlichen Sequenz so geschnitten, dass 275 bp der ncOGT-Sequenz mit in das Plasmid pBJG1-NUP eingebaut wurden. Daher folgt im Plasmid pBJG1-NUP auf die Sequenz des NUP62 ein Teil der C-terminalen Sequenz der ncOGT und anschließend erst das His-Tag und das Stopcodon des pBJG1-Vektors (s. 7.3).

### 3.1.2 Immunologischer Nachweis des rekombinanten NUP62

Zunächst wurde ohne die Sequenzierungskontrolle das NUP62 in *E. coli* BL21 (DE3) aus Klon IIb für unterschiedliche Zeiten mit variierenden IPTG-Konzentrationen exprimiert. Die Bakterien wurden lysiert und die Proteine in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die erste Expression wurde mit 0.2 mM IPTG bei 20 °C für 4 h induziert. Das Trennmuster des Proteingemisches zeigte nach einer Western Blot Analyse mit dem NUP62-Antikörper und dem POD-konjugierten anti-Ziegen-Zweitantikörper zwar eine Bande bei etwa 62 kDa, jedoch waren weitere positive Banden im niedermolekularen Bereich sichtbar. Die Anfärbung der Proteine auf der Membran zeigte eine Anhäufung der niedermolekularen Proteine (Abbildungen nicht gezeigt).

In weiteren Ansätzen wurde die Expression des rekombinanten NUP62 mit 0.2 mM IPTG bei 20 °C ÜN oder mit 1 mM IPTG bei 37 °C für 3.5 h induziert. Die Bakterien beider Expressionsansätze wurden mit dem BugBusterreagenz lysiert, anschließend wurde das unlösliche Pellet erneut mit BugBusterreagenz lysiert, zentrifugiert und die erhaltene Suspension zuletzt einer Harnstoffaufarbeitung unterzogen. Das in Harnstoff suspendierte Pellet der ersten und zweiten Lyse (IB, Ü) und die Proben der Harnstoffaufarbeitung (P)

wurden in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit dem Tetra-His-Erstantikörper und dem POD-konjugierten anti-Maus-Zweitantikörper bzw. dem NUP62-Antikörper und dem POD-konjugierten anti-Ziegen-Zweitantikörper analysiert.



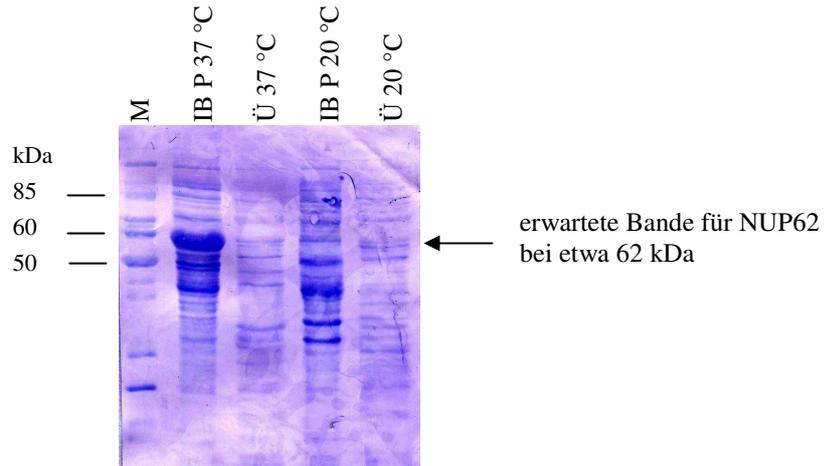
**Abbildung 12: Western Blot Analyse von NUP62 in Bakterienlysaten verschiedener Expressionsansätze**

Nach Aufschluss der Proteine wurde je 10 µg jeder Probe durch eine 10 %ige SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proben wurden nach Transfer auf Nitrocellulose mit NUP62-Antikörpern und POD-konjugierten anti-Ziegen-Zweitantikörper (A) bzw. Tetra-His-Antikörper und POD-konjugierten anti-Maus-Zweitantikörper (B) analysiert. Es konnte bei den Proben des 37 °C-Expressionsansatzes mit beiden Erstantikörper eine Bande bei etwa 62 kDa detektiert werden. Die Proben des 20 °C-Expressionsansatzes zeigten nur mit dem NUP62-Antikörper eine schwache Bande bei etwa 62 kDa. Mit dem Tetra-His-Antikörper ist für die 20 °C-Probe kein Signal zu erkennen.

M: Molekulargewichtsmarker, IB P 20 °C/37 °C: mit Harnstoff aufgereinigtes Pellet der Inclusion Body-Präparation der jeweiligen Expression, Ü 20 °C/37 °C: Überstand der Inclusion Body-Präparation der jeweiligen Expression, P 20 °C/37 °C: in Harnstoff suspendiertes Pellet der BugBusterlyse

Mit dem NUP62-Antikörper lässt sich nach der Harnstoffaufarbeitung des Pellets der Busterpräparation ein sehr starkes Signal bei etwa 62 kDa zeigen. Auch für den Überstand der 37 °C-Expression und das Pellet der 20 °C-Expression ist nach der BugBusterpräparation eine Bande für das NUP62 zu sehen. Das NUP62 wurde also exprimiert. Nur der Überstand der 20 °C-Expression nach der Aufarbeitung mittels der BugBusterreagenz zeigt kein Signal. Der Immunoblot mit dem Tetra-His-Antikörper zeigt, dass nach der ersten BugBusterlyse im Pellet des 37 °C-Expressionsansatzes das His-Tag und damit das NUP62 nachzuweisen ist. Für den 20 °C-Expressionansatz ist kein Signal zu sehen. Da mit dem Tetra-His-Antikörper nach der ersten Lyse ein Signal bei etwa 62 kDa zu sehen ist und nach weiterer Aufarbeitung des NUP62-Bakterienlysats eine Bande bei etwa 62 kDa detektierbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass das His-Tag-markierte NUP62 exprimiert wurde.

Auch die Direct Blue Färbung der Membran des Immunoblots mit dem NUP62-Antikörper zeigt eine deutliche Proteinanreicherung bei etwa 62 kDa.



**Abbildung 13: Direct Blue Färbung der aufbereiteten Bakterienlysate der NUP62-Expressionsansätze**  
 Nach der Immunoblotanalyse wurden die Antikörper durch eine saure 0.2 M Glycinlösung entfernt und die Proteinbanden mit Direct Blue angefärbt. Für das aufbereitete Pellet der Inclusion Body-Präparation ist eine deutliche Proteinanreicherung bei etwa 62 kDa zu erkennen.

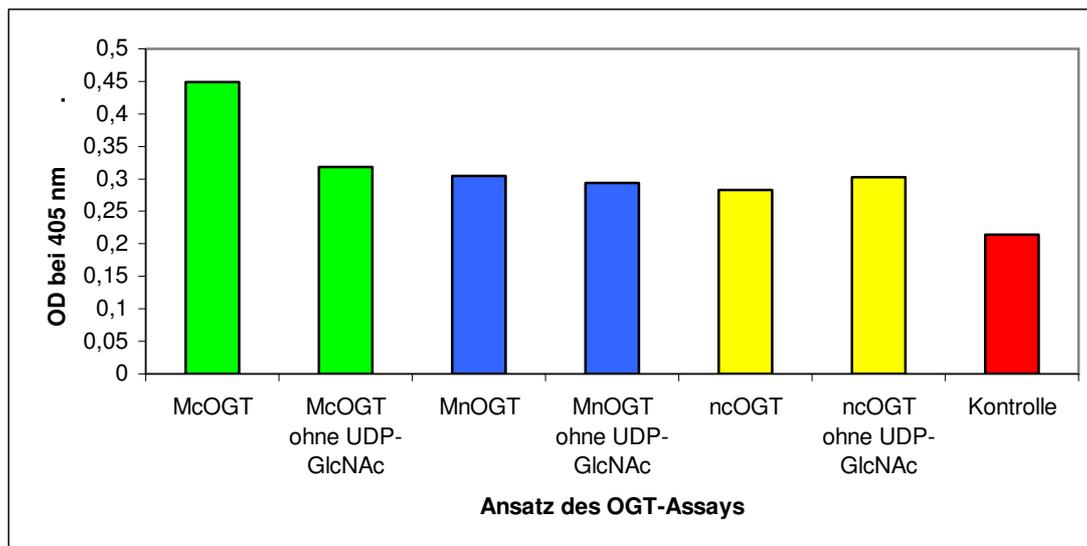
M: Molekulargewichtsmarker, IB P 20 °C/37 °C: mit Harnstoff aufgereinigtes Pellet der Inclusion Body-Präparation der jeweiligen Expression, Ü 20 °C/37 °C: Überstand der Inclusion Body-Präparation der jeweiligen Expression

Die Expression des NUP62 bei 37 °C für 3.5 h mit einer Induktion durch 1 mM IPTG führte nach einer Harnstoffpräparation zu einer Anreicherung des NUP62 in den Bakterienlysaten.

### 3.1.3 Untersuchungen der Aktivität verschiedener Präparationen der OGT im ELISA

Das rekombinante NUP62 sollte als Substrat im OGT-Assay dienen. Die Western Blot Analyse mit biotinyliertem sWGA und dem Antikörper CTD 110.6 zeigte, dass keine Glykosylierung des NUP62 in den Bakterien stattgefunden hat (Abbildung nicht gezeigt). Für den OGT-Assay wurden zunächst die Immunoplaten mit dem Tetra-His-Antikörper beschichtet, an den das NUP62 über das angefügte His-Tag bindet. Die Bindung des NUP62 sollte mit dem NUP62-Antikörper nachgewiesen werden. Jedoch konnte nie ein positives Signal detektiert werden. Auch die Detektion mit dem NUP62 Antikörper nach Beschichten der Immunoplaten mit dem Bakterienlysat des NUP62 war erfolglos. Der Nachweis des His-Tags am rekombinanten NUP62 mittels Tetra-His-Antikörper war jedoch positiv. So konnte über diese Kontrolle davon ausgegangen werden, dass das NUP62 in der Mikrotiterplatte gebunden hatte (Daten nicht gezeigt).

Es wurde die O-GlcNAc-Glykosylierung des in den Mikrotiterplatten an den Tetra-His-Antikörper gebundenen rekombinanten NUP62 zum einen mit dem Lysat der Bakterienexpression der rekombinanten ncOGT sowie mit der aus Mäusehirnen aufgereinigten cytosolischen (McOGT) und nukleären OGT (MnOGT) durchgeführt. Zur Kontrolle der Glykosylierung wurde gebundenes NUP62 mit der jeweiligen OGT, aber ohne UDP-GlcNAc inkubiert. Die Überprüfung der Glykosylierung wurde mit dem biotinylierten sWGA und POD-gekoppeltem Streptavidin durchgeführt.



**Abbildung 14: ELISA-Analyse der Übertragung von O-GlcNAc auf das rekombinante NUP62 durch verschiedene Präparationen der O-GlcNAc-Transferase**

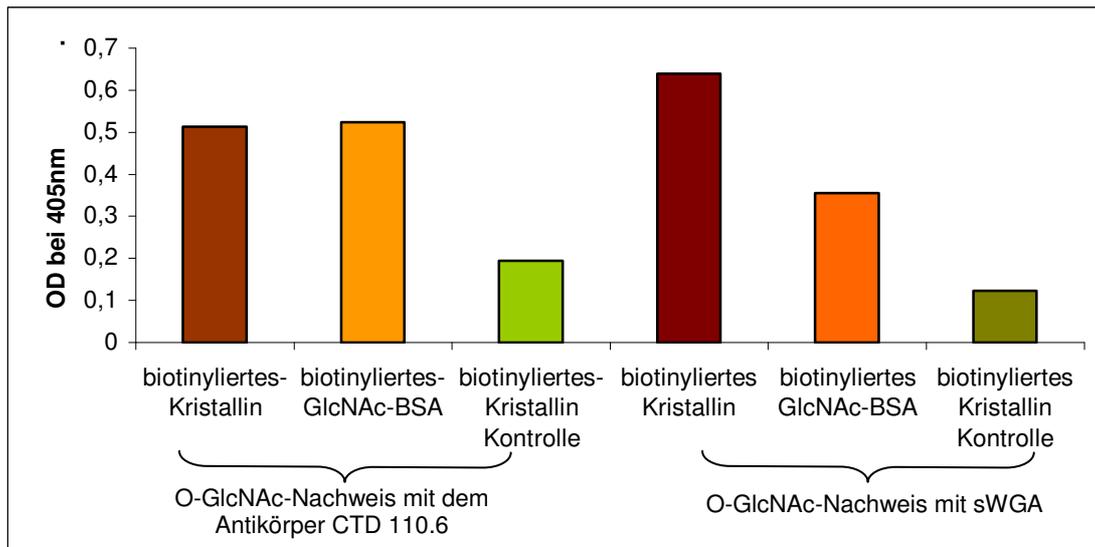
Das Diagramm zeigt die optische Dichte (OD) bei 405 nm der einzelnen OGT-Assays und der entsprechenden Kontrollversuche der Glykosylierungsansätze ohne UDP-GlcNAc sowie des NUP62 ohne Inkubation mit OGT. Der O-GlcNAc-Nachweis erfolgte mit dem biotinylierten Lektin sWGA und POD-gekoppeltem Streptavidin. Die einzelnen Werte stellen das arithmetische Mittel einer Zweifachbestimmung dar.

grüne Säulen: Versuchsansätze mit NUP62 und cytosolischer OGT aus Mäusehirnen (McOGT), blaue Säulen: Versuchsansätze mit NUP62 und nukleärer OGT aus Mäusehirnen (MnOGT), gelbe Säulen: Versuchsansätze mit NUP62 und ncOGT, rote Säule: NUP62 ohne Inkubation mit OGT (Kontrolle)

Nur die Glykosylierung mit der McOGT war erfolgreich. Abbildung 14 zeigt eine Zunahme der Extinktion bei 405 nm von ca. 0.15 OD-Einheiten für den McOGT-Glykosylierungsansatz im Vergleich zu den Kontrollen und weiteren Glykosylierungsansätzen. Der Versuch wurde jedoch nur ein Mal durchgeführt und ist daher nicht repräsentativ.

### 3.1.4 Untersuchung weiterer Substrate für den OGT-Assay

Da NUP nicht gut an das Plastikmaterial der Mikrotiterplatten zu binden schien, wurden weitere Versuche zur Optimierung der Bindung des Substrats in der Mikrotiterplatte für den OGT-Assay erprobt. Der Grundgedanke war, die O-GlcNAc-Glykosylierung von biotinylierten Substraten zu testen, die über eine Streptavidinbeschichtung gebunden waren. Hierfür wurde zunächst  $\gamma$ -Kristallin aus Rinderaugenlinsen eingesetzt, dessen Biotinylierung vorab auf einer Nitrocellulosemembran mit Streptavidin-POD nachgewiesen worden war (Abbildung nicht gezeigt). Im ELISA wurde die Bindung des biotinylierten  $\gamma$ -Kristallin an die Streptavidinbeschichtung über die O-GlcNAcylierung des Kristallins mit biotinyliertem sWGA und POD-gekoppelten Streptavidin oder dem Antikörper CTD 110.6 und dem POD-konjugierten anti-Maus-Zweitantikörper nachgewiesen. Die Glykosylierung des auch über Streptavidin gebundenen biotinylierten GlcNAc-BSA wurde zur Kontrolle ebenfalls bestimmt. In weitere Kontrollen wurden unspezifische Bindungen von POD-gekoppelten Streptavidin bzw. anti-Maus-Zweitantikörper ausgeschlossen.



**Abbildung 15: Nachweis der Bindung des biotinylierten  $\gamma$ -Kristallins und des biotinylierten GlcNAc-BSA an Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten über die Detektion der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine mit sWGA und den Antikörper CTD 110.6**

Biotinyliertes  $\gamma$ -Kristallin und biotinyliertes GlcNAc-BSA wurden über Streptavidinbeschichtung in den Mikrotiterplatten gebunden. Gezeigt ist die optische Dichte (OD) bei 405 nm des O-GlcNAc-Nachweises mit biotinyliertem sWGA und POD-gekoppeltem Streptavidin (hellbraune und hellorange Säule). Zur Kontrolle wurde das biotinylierte  $\gamma$ -Kristallin ohne sWGA, aber mit POD-gekoppeltem Streptavidin inkubiert (hellgrüne Säule). Des Weiteren wurde der Nachweis mit dem Antikörper CTD 110.6 und dem POD-konjugierten anti-Maus-Zweitantikörper durchgeführt (dunkelbraune und dunkelorange Säule). Zur Kontrolle wurde das biotinylierte  $\gamma$ -Kristallin ohne den ersten Antikörper inkubiert (dunkelgrüne Säule). Die einzelnen Werte stellen das arithmetische Mittel einer Zweifachbestimmung dar.

Der Nachweis der Bindung des biotinylierten  $\gamma$ -Kristallins und des biotinylierten GlcNAc-BSA an Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten über die O-GlcNAcylierung der Proteine ließ sich mit sWGA und dem Antikörper CTD 110.6 auf Grund der höheren OD im Vergleich zu den Kontrollen nachweisen. Da  $\gamma$ -Kristallin aus der Rinderaugenlinse schon O-GlcNAc-modifiziert ist (Ahrend et al., 2008; s. Abbildung 15), ist es zur Etablierung des OGT-Assays nicht das am besten geeignete Substrat. Versuche zur Höherglykosylierung des  $\gamma$ -Kristallins im OGT-Assay waren bisher ohne Erfolg (Daten nicht gezeigt).

Daher wurde versucht NUP62 zu biotinylieren, was erfolglos verlief (Daten nicht gezeigt).

### 3.2 2D-Analyse der Proteine aus HUVEC und immunologischer Nachweis ihrer O-GlcNAc-Modifikation

Die HUVEC wurden verschiedenen Kultivierungsansätzen mit „Low Glucose“- (5 mM Glucose, LG, Kontrolle) und „High Glucose“-Medium (30 mM Glucose, HG) in An- und Abwesenheit des OGA-Inhibitors PUGNAc unterzogen, um eine Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine zu erzielen.

#### 3.2.1 2D-Analyse der O-GlcNAc-Modifikation der HUVEC nach kurz- und langzeitiger HG-Kultivierung

Im ersten Ansatz wurden die HUVEC mit LG- sowie HG-Medium für 1 h bzw. 72 h in Serum-haltigem Medium kultiviert. Für die Versuche wurden die Überstände des Zelllysats

mittels IEF im pH-Gradienten 6-8 auf selbstgegossenen IPG-Streifen in der MultiphorII und nachfolgender 12 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden auf PVDF übertragen und die O-GlcNAc-modifizierten Proteine mit dem Antikörper CTD 110.6 und dem POD-konjugierten anti-Maus-Zweitantikörper detektiert (Abbildungen nicht gezeigt). Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine befanden sich im Molekulargewichtsbereich größer als 60 kDa und lagen zum größten Teil in sogenannten „Spotreihen“ vor, d.h. sie wiesen bei gleichem Molekulargewicht (MW) unterschiedliche isoelektrische Punkte (pI) auf. Die Spots des CTD 110.6-Blots nach 72 h HG-Inkubation zeigen die intensivsten Signale, bei einer Inkubation für 1 h sind die O-GlcNAc-Spots schwächer. Die Kontrolle mit LG zeigt sehr schwache Signale der selben Spots. Die Inkubation nur mit dem Zweitantikörper war negativ (Abbildungen nicht gezeigt).

### 3.2.2 2D-Analyse der O-GlcNAc-Modifikation der HUVEC nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 50 $\mu$ M PUGNAc

Da es zur Zunahme der Intensität der O-GlcNAc-modifizierten Proteine der HUVEC nach HG-Kultivierung kam, wurden die Zellen in einem weiteren Ansatz in LG- und HG-Medium in Ab- und Anwesenheit von 50  $\mu$ M PUGNAc (LGP/HGP) für 72 h kultiviert. In den ersten Versuchen enthielt das Medium 10 % FCS. Die Proteine wurden im pH-Gradienten 4-7 auf selbstgegossenen IPG-Streifen in der MultiphorII und anschließend in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf Nitrocellulose wurde die Auftrennung der Proteine mittels Indian Ink visualisiert. Die Färbung verdeutlichte die ungleichmäßige Auftrennung der Proteine. Proteinansammlungen schlecht aufgetrennter Proteine befanden sich im höhermolekularen Bereich größer 60 kDa und die Proteine lagen größtenteils in Spotreihen vor. Die stärkste Spotreihe um pH 5.8 und einem MW von etwa 70 kDa war auf Serumproteine des Kulturmediums zurückzuführen, die mittels MALDI-TOF MS-Analyse identifiziert wurden. Die hohe Konzentration der Serumproteine führte dazu, dass die nur in vergleichsweise geringen Mengen vorkommenden Zellproteine überdeckt wurden bzw. nicht sichtbar waren. Immunoblots mit dem O-GlcNAc-spezifischen Antikörper CTD 110.6 zeigten zudem für Serumproteine vermutlich unspezifische positive Reaktionen (Abbildungen und Daten nicht gezeigt).

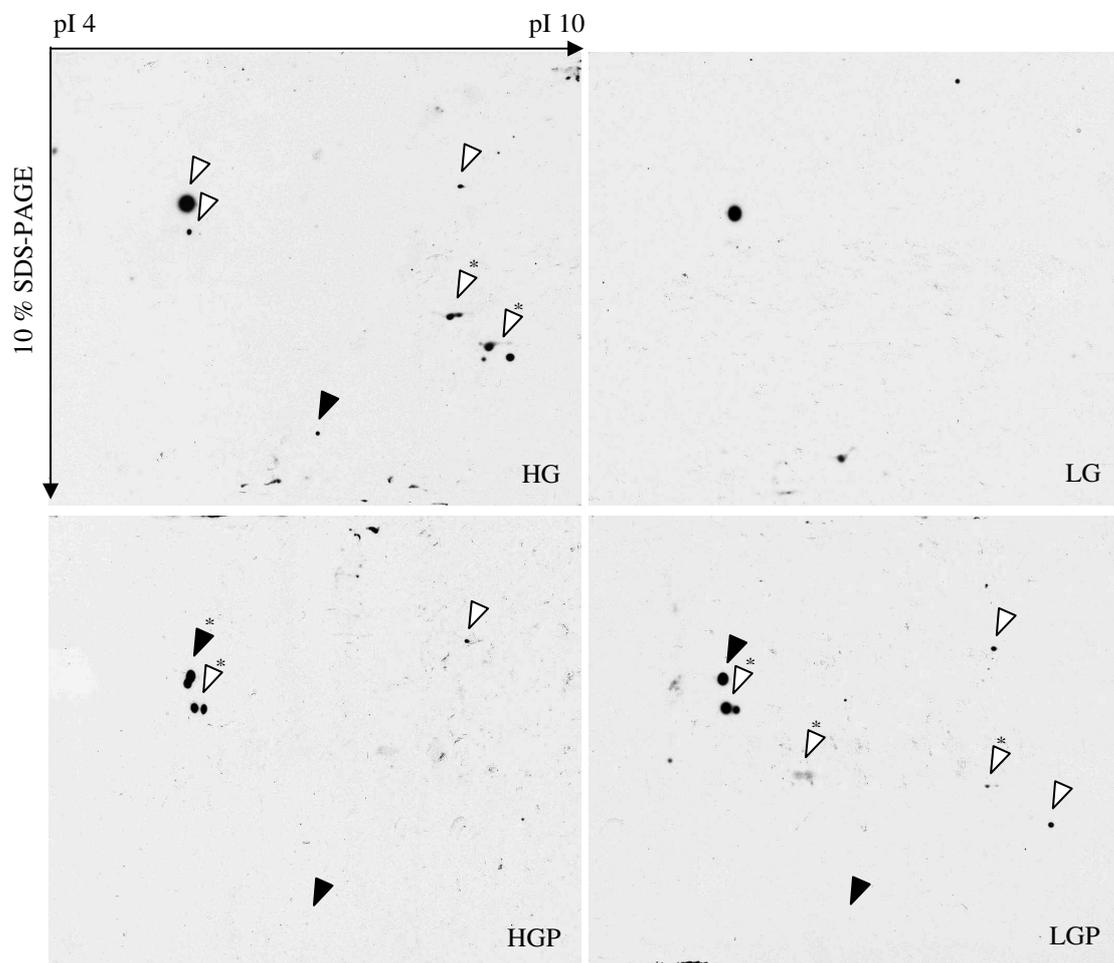
Um die 2D-Proteinauftrennung zu optimieren, wurden die HUVEC nun serumfrei kultiviert. Die Zellen wurden wie zuvor in LG- und HG-Medium kultiviert sowie zusätzlich in Anwesenheit von 50  $\mu$ M PUGNAc (LGP/HGP). Die Proteine wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 4-7 und 4-10 mit selbstgegossenen IPG-Streifen in der IPGphor3 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt und mittels Western Blot auf Nitrocellulose übertragen.

Um einen ersten Überblick über die O-GlcNAc-modifizierten Proteine zu bekommen, wurden die Proteine im pH-Gradienten 4-10 aufgetrennt und mit biotinyliertem sWGA und Streptavidin-POD detektiert, wobei einige O-GlcNAc-modifizierte Spots in allen Proben detektiert wurden. In Anzahl und Intensität unterschieden sich die Spots unter den

verschiedenen Bedingungen kaum. Der pI der positiven Proteine lag im pH-Bereich 5 bis 7 und hatte ein MW größer als 50 kDa (Abbildung nicht gezeigt).

Eine bessere Übersicht wurde jedoch mit der Auftrennung der Proteine im pH-Gradienten 4-7 gewonnen. Die O-GlcNAc-Analyse mit sWGA ergab einige positive Spots im pH-Bereich 5 bis 6 für Proteine mit einem MW größer als 50 kDa, jedoch konnten auch hier mit dem Lektin keine Unterschiede im O-GlcNAc-Muster der Proteine unter den verschiedenen Kultivierungsbedingungen nachgewiesen werden konnten.

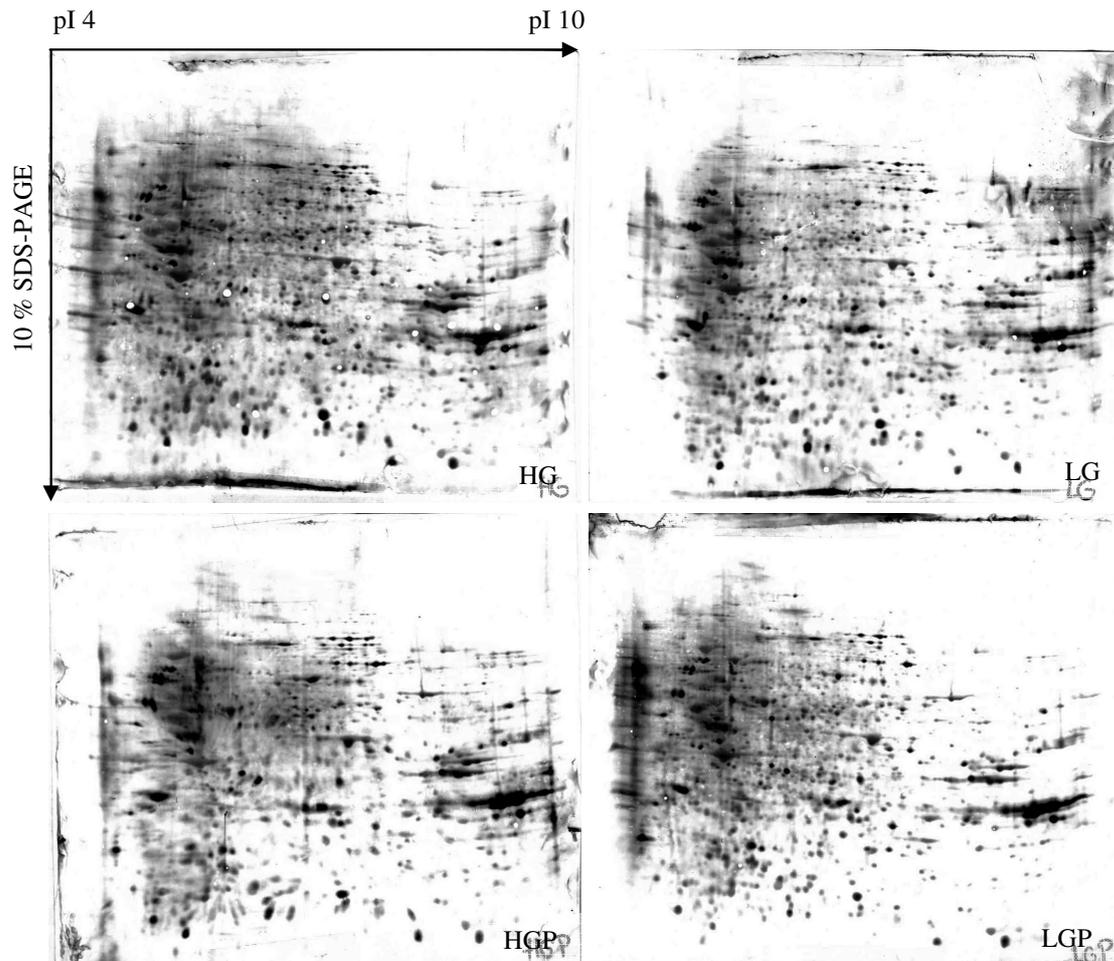
Für die exaktere O-GlcNAc-Detektion der Proteine wurde der O-GlcNAc spezifische Antikörper CTD 110.6 und der POD-konjugierte anti-Maus-Zweitantikörper eingesetzt. Im Weiteren wurden die Proben für einen möglichst umfassenden Überblick mit 2D-Gelelektrophorese im pH-Bereich 4-10 aufgetrennt (s. Abbildung 16).



**Abbildung 16: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen aus HUVEC (pH-Gradient 4-10) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 50 µM PUGNAc**

Je 100 µg Protein wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 4-10 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurden nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem Antikörper CTD 110.6 und POD-konjugiertem anti-Maus-Zweitantikörper detektiert. Die Pfeile markieren O-GlcNAc-modifizierte Proteine, deren Intensität im Vergleich zur Kontrolle (LG) entweder niedriger (schwarze Pfeile) oder höher ist (weiße Pfeile). \* bezeichnet zwei oder mehrere dicht beieinander liegende Spots desselben apparenten MW oder pI. Gezeigt sind die Western Blots eines Versuchs von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Versuchen. HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 50 µM PUGNAc

Der Western Blot der 2D-aufgetrennten Proteine mit dem Antikörper CTD 110.6 zeigt nur sehr wenige O-GlcNAc-positive Spots. Unter allen vier Kultivierungsbedingungen sind deutliche Signale bei etwa pH 5 und einem MW von etwa 50 kDa und größer zu erkennen, in der Kontrolle handelt es sich dabei um nur einen Spot. Für die HG-Probe sind auch noch Signale im basischen und niedermolekularen Bereich zu erkennen, die bei längerer Exposition des Films auch für die HGP- und LGP-Proben feststellbar sind. Dann erscheinen auch in der Kontrolle vergleichbare O-GlcNAc-Signale um pH 5 (Abbildung nicht gezeigt). Die Indian Ink Färbung zeigt die Auftrennung der Proteine (s. Abbildung 17).



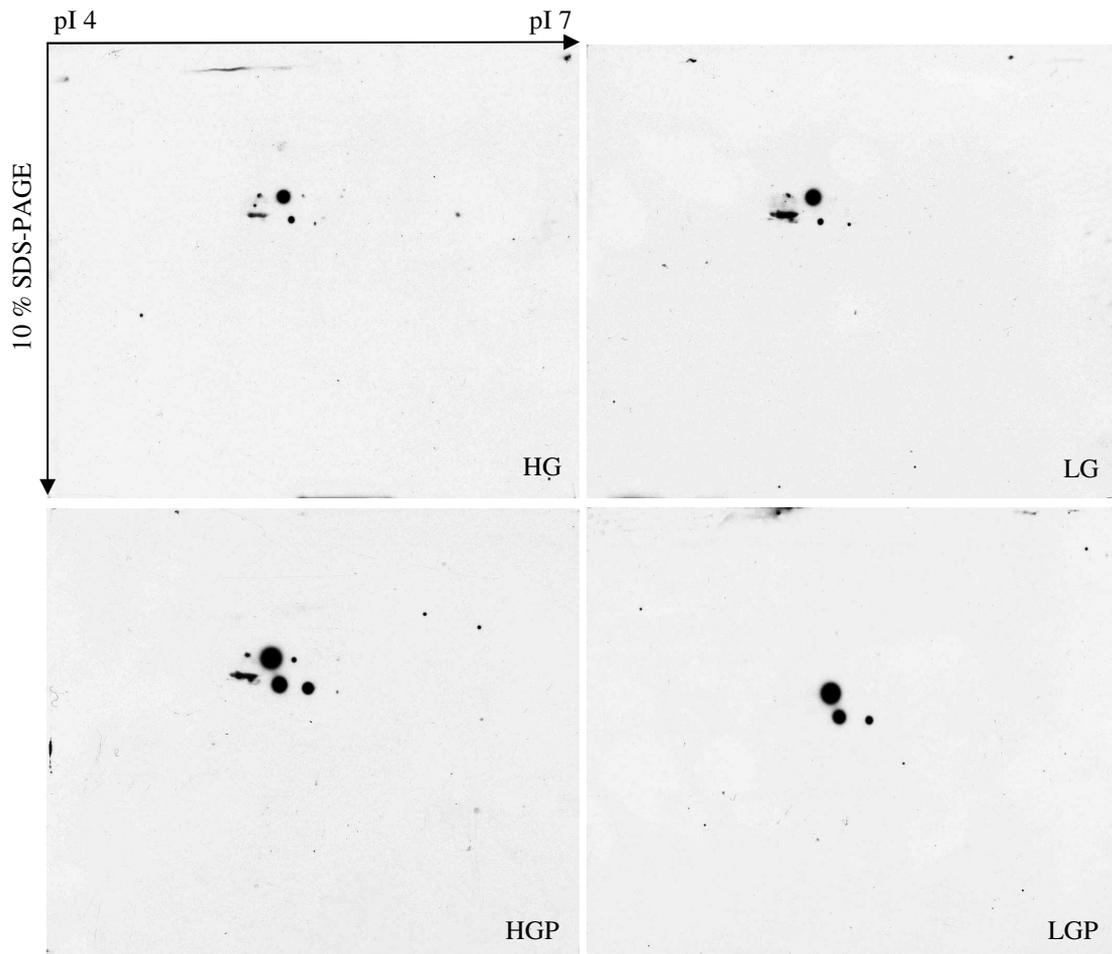
**Abbildung 17: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten Proteine aus HUVEC (pH-Gradient 4-10) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 50  $\mu$ M PUGNAc**

Je 100  $\mu$ g Protein wurden mit 2D-Gelelektrophorese im pH-Gradienten 4-10 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die Proteine wurden nach dem Transfer auf Nitrocellulose mit Indian Ink gefärbt. Gezeigt sind die Indian Ink Färbungen der in Abbildung 16 gezeigten Western Blots.

HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 50  $\mu$ M PUGNAc

Die Proteinfärbung zeigt ein akzeptabel aufgetrenntes Spotmuster. Im pH-Bereich 5 bis 6 ist eine Proteinansammlung im Molekulargewichtsbereich von 50 bis 70 kDa zu erkennen. Weitere Proteine, die z.T. nicht einzeln aufgetrennt sind, liegen im pH-Bereich 9 bis 10 bei im Molekulargewichtsbereich von ca. 30 kDa vor. Diese Proteine wurden vom Antikörper CTD 110.6 als O-GlcNAc-modifiziert erkannt. Die Zuordnung ist schwierig, da sich

Nitrocellulosemembranen beim Trocknen zusammenziehen, so dass die zugehörigen Filme nicht mehr 1:1 aufzulegen sind. Dass sich O-GlcNAc-Signal und Proteinspot von der Fläche nicht unbedingt entsprechen, verkompliziert die Zuordnung. Die weiteren O-GlcNAc-positiven Spots lassen sich nur schwer den entsprechenden Proteinspots zuordnen, da die Auftrennung im pH-Bereich 5 zu gering ist. Zur Auffächerung dieser Proteine wurde eine IEF im pH-Gradienten 4-7 durchgeführt (s. Abbildung 18 und Abbildung 19).



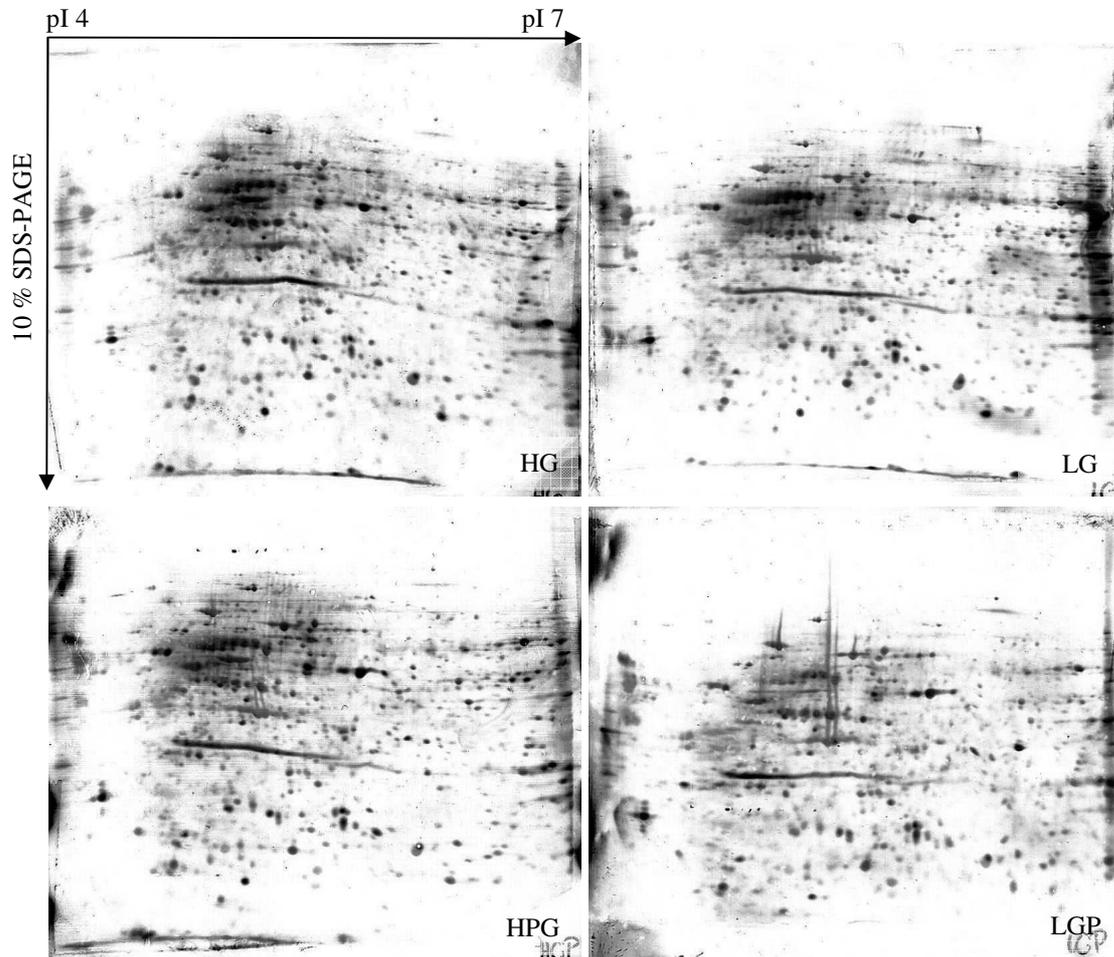
**Abbildung 18: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen aus HUVEC (pH-Gradient 4-7) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 50  $\mu$ M PUGNAc**

Je 100  $\mu$ g Protein wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 4-7 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurden nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem Antikörper CTD 110.6 und POD-konjugiertem anti-Maus-Zweitantikörper detektiert. Gezeigt sind die Western Blots eines Versuchs von insgesamt sechs unabhängig durchgeführten Versuchen. Die O-GlcNAc-positiven Proteine unterscheiden sich kaum in Anzahl und Intensität zwischen den verschiedenen Kultivierungsansätzen.

HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 50  $\mu$ M PUGNAc

Es sind nur wenige O-GlcNAc-modifizierte Proteine zu detektieren. Bei Wiederholungen dieses Versuches traten alle Signale auch für alle Kultivierungsbedingungen auf, so dass es offensichtlich zu keiner Herauf- oder Herunterregulation von O-GlcNAc unter einer der Bedingungen kam. Durch die bessere Auftrennung sind sieben O-GlcNAc-positive Proteine zu detektieren im Gegensatz zur Auftrennung im pH-Gradienten 4-10 (s. Abbildung 16). Nach PUGNAc-Inkubation (HGP/LGP) sind die Signale einiger Proteine intensiver. Die

Spots der HG-Kultivierung unterscheiden sich kaum von denen der Kontrolle (LG). Es kommen weiterhin keine O-GlcNAc-positiven Signale im niedermolekularen Bereich vor. Vergleicht man die O-GlcNAc-positiven Spots mit der Proteinfärbung, ist auf Grund der besseren Auftrennung eine Zuordnung möglich (s. Abbildung 19).



**Abbildung 19: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten Proteine aus HUVEC (pH-Gradient 4-7) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 50  $\mu$ M PUGNAc**

Je 100  $\mu$ g Protein wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 4-7 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die Proteine wurden nach dem Transfer auf Nitrocellulose mit Indian Ink gefärbt. Gezeigt sind die Indian Ink Färbungen der in Abbildung 18 gezeigten Western Blots. Die Auftrennung lässt zahlreiche und einzeln vorliegende, abgegrenzte Proteinspots erkennen.

HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 50  $\mu$ M PUGNAc

Es fällt auf, dass O-GlcNAc nur auf den stark exprimierten Proteinen detektiert wird, die mit Indian Ink als die intensivsten Proteinspots angefärbt werden.

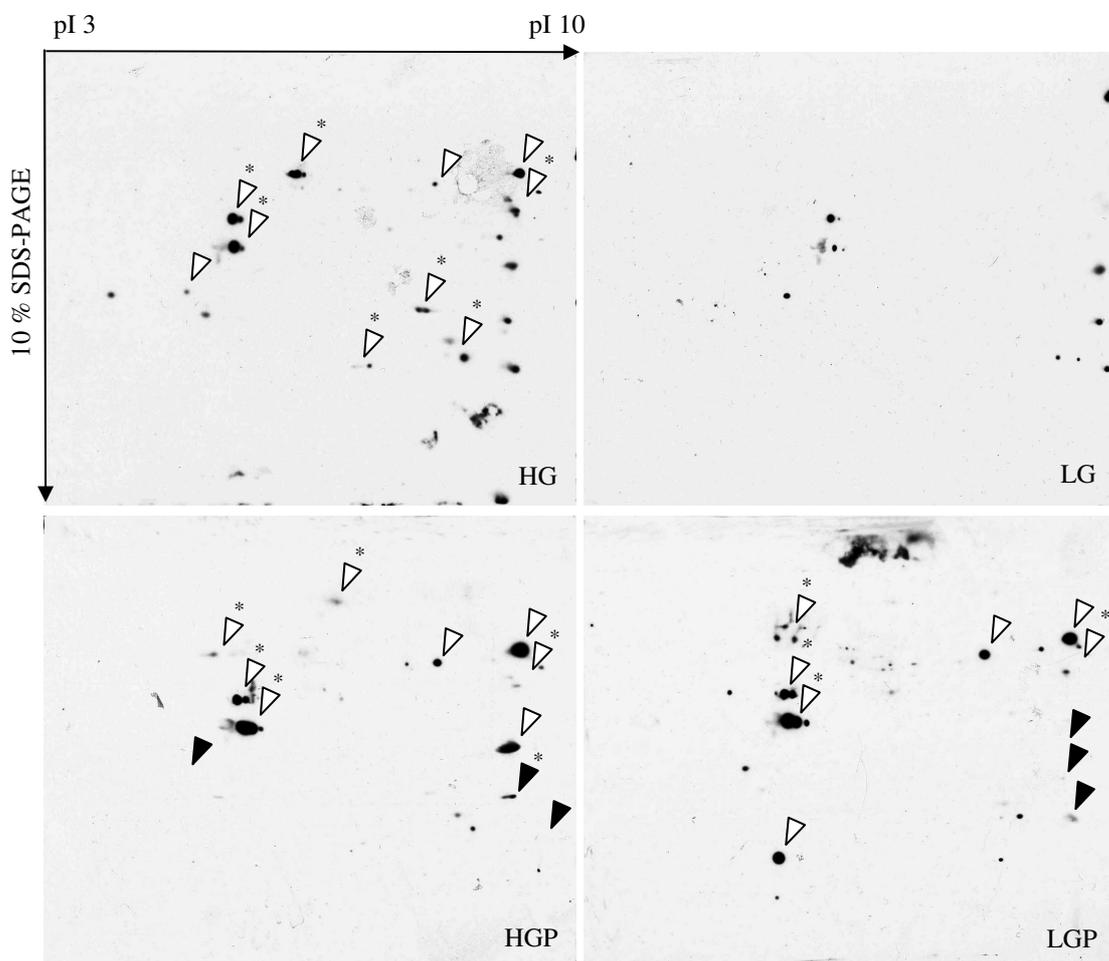
Die Versuche zeigen keine Unterschiede in der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine aus HUVEC unter HG-, HGP- oder LGP-Kultivierung im Vergleich zur Kontrolle.

### 3.2.3 Analyse der O-GlcNAc-Modifikation von 2D-aufgetrennten Proteinen aus HUVEC in An- und Abwesenheit von 200 $\mu$ M PUGNAc

In einem neuen Ansatz wurden die HUVEC 72 h in LG- oder HG-Medium kultiviert, das statt 50  $\mu$ M 200  $\mu$ M PUGNAc enthielt. Die Arbeitsgruppe von Hart verwendet für ihre Versuche

mit COS-Zellen zur Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation diese PUGNAc-Konzentration und auch die Arbeitsgruppe von Ehrlich behandelt SY5Y-Zellen mit 200  $\mu$ M des OGA-Inhibitors (Wang et al., 2007; Rengifo et al., 2007).

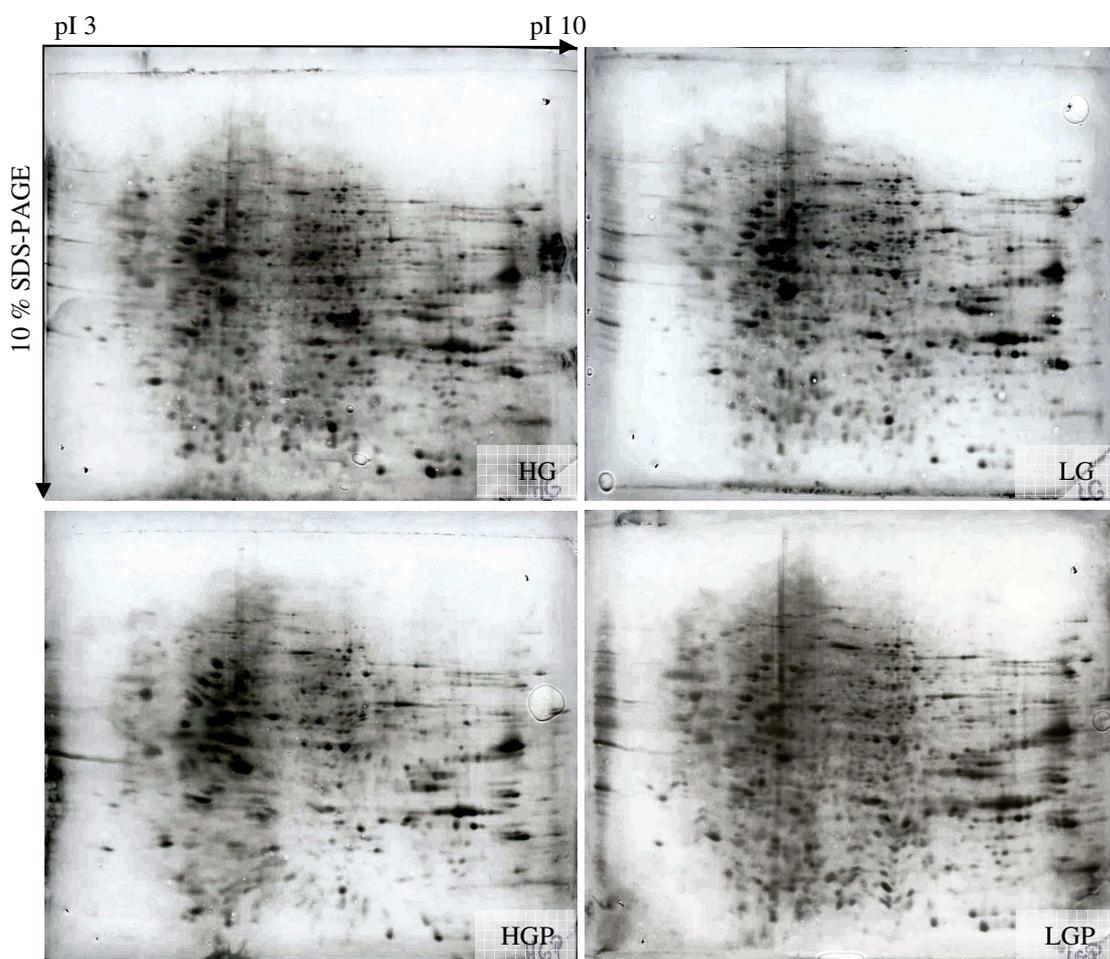
Für einen größeren Überblick wurde zunächst der pH-Gradient 3-10 (s. Abbildung 20 und Abbildung 21) in der IEF verwendet und anschließend für eine bessere Auflösung der pH-Gradient 4-7 (s. Abbildung 22 und Abbildung 23) sowie 6-11 (s. Abbildung 24 und Abbildung 25). Für eine gleichbleibende Qualität wurden die IPG-Streifen von der Firma GE Healthcare bezogen und die Fokussierungen in der IPGphor3 durchgeführt. Für alle Versuche wurden in der zweiten Dimension 10 %ige SDS-Gele gefahren. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose übertragen und nach der O-GlcNAc-Detektion mit dem Antikörper CTD 110.6 und dem POD-konjugierten anti-Maus-Zweitantikörper mit Indian Ink angefärbt.



**Abbildung 20: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen aus HUVEC (pH-Gradient 3-10) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen An- und Abwesenheit von 200  $\mu$ M PUGNAc**

Je 100  $\mu$ g Protein wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 3-10 und in 10 %igen SDS-Gele aufgetrennt. Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurden nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem Antikörper CTD 110.6 und POD-konjugiertem anti-Maus-Zweitantikörper detektiert. Die Pfeile markieren 15 O-GlcNAc-modifizierte Proteine, deren Intensität im Vergleich zur Kontrolle (LG) entweder niedriger (schwarze Pfeile) oder höher ist (weiße Pfeile). \* bezeichnet zwei oder mehrere dicht beieinander liegende Spots desselben apparenten MW oder pI. Gezeigt sind die Western Blots eines Versuchs von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Im Vergleich zur Kontrolle (LG) zeigen alle anderen Bedingungen intensivere und zahlreichere O-GlcNAc-Signale. HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 200  $\mu$ M PUGNAc

Deutlich ist zu erkennen, dass die Signale nach HG- und HGP/LGP-Kultivierung stärker und zahlreicher als in der Kontrolle (LG) sind. Die Intensität der Färbung von 15 O-GlcNAc-modifizierten Proteinen unterscheidet sich deutlich von der Intensität der selben Proteine unter LG-Bedingungen. Wie bei den Versuchen mit der PUGNAc-Konzentration von 50  $\mu$ M ist O-GlcNAc vor allem auf Proteinen mit isoelektrischen Punkten von etwa pH 5 und 9 zu detektieren. Es sind für die HG-Bedingung die meisten Spots zu zählen, während die Signale der mit PUGNAc-inkubierten HUVEC die größte Intensität aufweisen. Viele der O-GlcNAc-positiven Spots liegen im höhermolekularen Bereich von größer 50 kDa. Möglicherweise lassen sich einige der größeren Signale mehreren Proteinen zuordnen, wie die Anfärbung der Proteine mit Indian Ink zeigt.



**Abbildung 21: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten Proteine aus HUVEC (pH-Gradient 3-10) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 200  $\mu$ M PUGNAc**

Je 100  $\mu$ g Protein wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 3-10 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die Proteine wurden nach dem Transfer auf Nitrocellulose mit Indian Ink gefärbt. Gezeigt sind die Indian Ink Färbungen der in Abbildung 20 gezeigten Western Blots. Die Auftrennung lässt zahlreiche, abgegrenzte Proteinspots erkennen. Mit Ausnahme des HGP-Blots ist die Auftrennung gleichmäßig, jedoch liegt für die LGP-Probe eine geringere Proteinkonzentration vor.

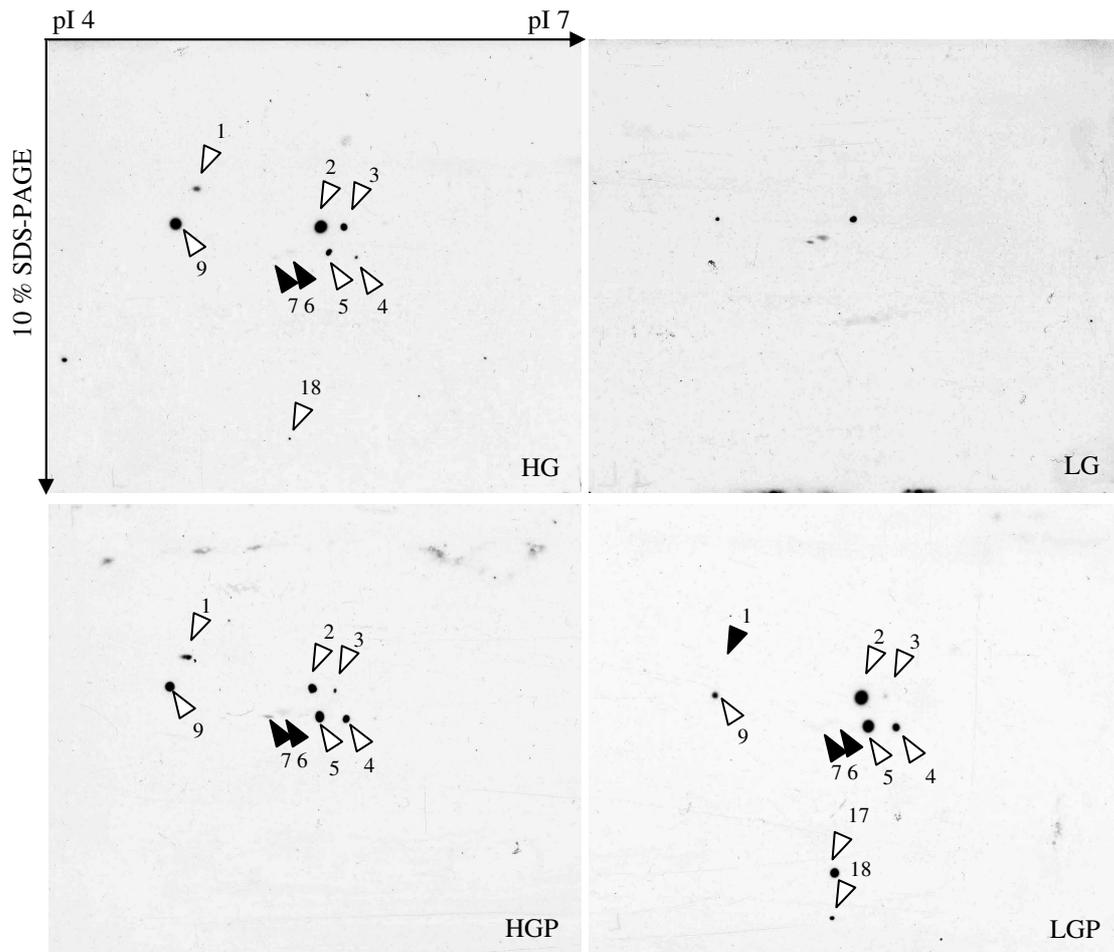
HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 200  $\mu$ M PUGNAc

Die Auftrennung der HUVEC-Proteine im pH-Gradienten 3-10 war akzeptabel. Auffällig ist, dass auf allen Blots wenige bis keine Proteine im Bereich im pH-Bereich 3 bis 4 zu erkennen

sind. Der isoelektrische Punkt der meisten Proteine liegt bei pH 5 bis 7. Im basischen Bereich kommen mehr niedermolekulare Proteine vor. Der HGP-Blot weist eine z.T. etwas unscharfe und ungleichmäßige Indian Ink Färbung auf.

Der Vergleich von Abbildung 20 und Abbildung 21 zeigt, dass sich Signale von Proteinen z.T. überlagern und ein intensives Signal bilden (mit \* gekennzeichnet). Da einige dieser überlagerten Proteinspots das selbe apparente MW vorweisen, kann es sich um ein Protein handeln, welches unterschiedlich stark posttranslational modifiziert ist.

Die Zuordnung der O-GlcNAc-positiven Spots im basischen Bereich ist eindeutig, sie entsprechen den stark gefärbten Proteinspots. Eine Unterscheidung, ob mehrere oder nur ein Protein das Signal bilden, lässt sich erst nach der Auftrennung der Proteine im pH-Gradienten 6-11 treffen. Die Zuordnung der O-GlcNAc-Proteine mit pI zwischen pH 5 bis 7 ist schwieriger, da die Auflösung dieses pH-Gradienten in diesem Bereich schlecht ist und große Proteinspots zu erkennen sind, die sich erst nach genauerer Auflösung im pH-Gradienten 4-7 als einzelne Proteine identifizieren lassen, wie Abbildung 22 und Abbildung 23 zeigen.



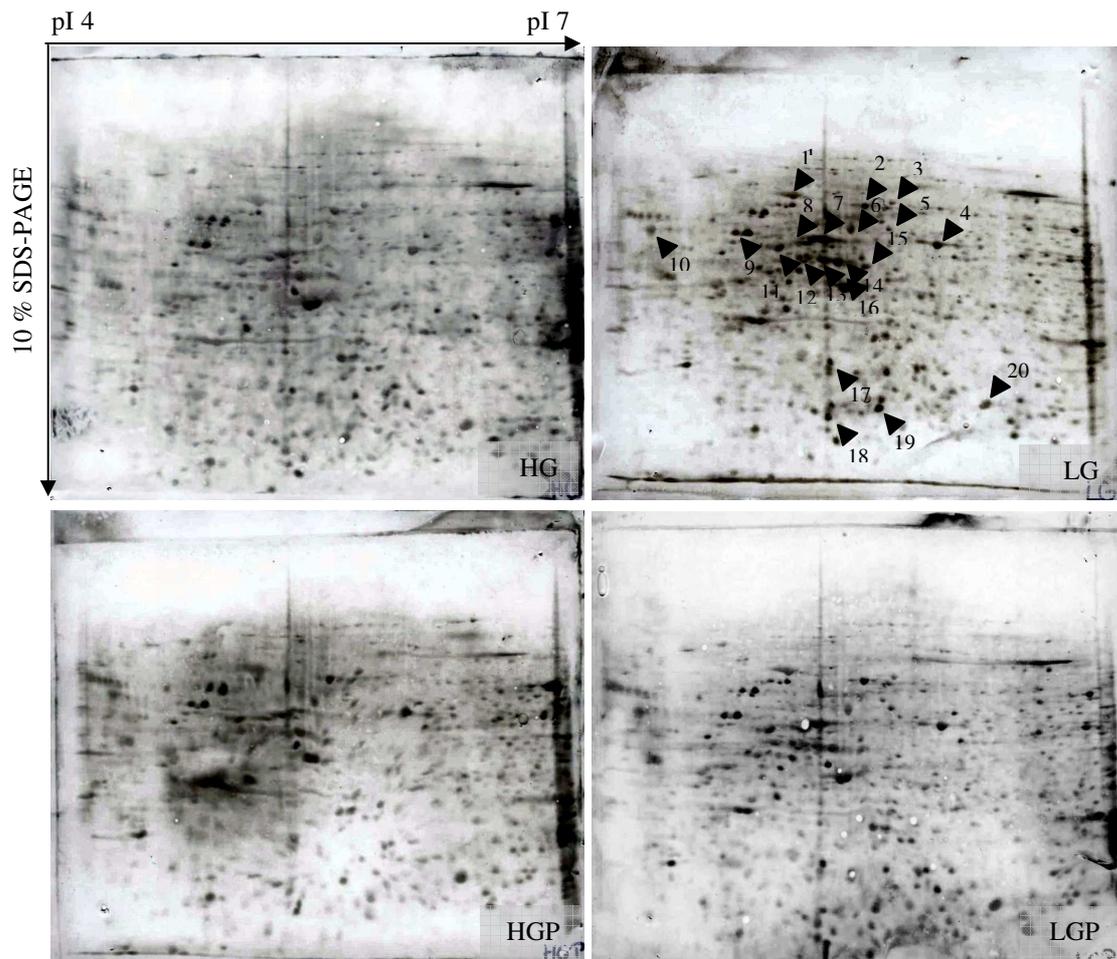
**Abbildung 22: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen aus HUVEC (pH-Gradient 4-7) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 200  $\mu$ M PUGNAc**

Je 100  $\mu$ g Protein wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 4-7 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurden nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem Antikörper CTD 110.6 und POD-konjugiertem anti-Maus-Zweitantikörper detektiert. Die Pfeile markieren zehn O-GlcNAc-modifizierte Proteine, deren Intensität im Vergleich zur Kontrolle (LG) entweder niedriger (schwarze Pfeile) oder höher ist (weiße Pfeile). \* bezeichnet zwei oder mehrere dicht beieinander liegende Spots desselben apparenten MW oder pI. Gezeigt sind die Western Blots eines Versuchs von insgesamt vier unabhängig durchgeführten Versuchen. Im Vergleich zur Kontrolle (LG) zeigen alle anderen Bedingungen intensivere und zahlreichere O-GlcNAc-Signale. HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 200  $\mu$ M PUGNAc

Es ist deutlich zu erkennen, dass nach HG- oder HGP/LGP-Kultivierung die Anzahl und Intensität der O-GlcNAc-Spots zunimmt. Für die Kontrollbedingung LG sind nur wenige, schwache Signale zu erkennen, die auch ausnahmslos auf den anderen Filmen zu finden sind. Die Intensität von zehn Spots weisen merkbare Unterschiede in der O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrolle auf. Nur die O-GlcNAc-Modifikation der Spots 6 und 7 wird nach HG- und HGP/LGP-Kultivierung herunterreguliert, Spot 1 wird nur unter LGP-Kultivierung herunterreguliert. Die weiteren Spots zeigen gegenüber der Kontrolle eine Steigerung der O-GlcNAcylierung.

Alle O-GlcNAc-Signale sind erneut größer als 50 kDa, nur unter LGP-Bedingung sind die Spots 16 und 17 im niedermolekularen Bereich um 20 kDa zu erkennen.

Insgesamt gesehen ist nur eine sehr geringe Anzahl der Proteine als O-GlcNAc-modifiziert nachzuweisen, was beim Vergleich mit der Proteinfärbung (s. Abbildung 21) offensichtlich wird. Mit Pfeilen sind die O-GlcNAc-modifizierten Proteine markiert, die aus korrespondierenden Coomassiegelen ausgeschnitten wurden und nach einem Trypsinverdau mittels MS und Datenbankanalyse identifiziert wurden. Es wurden auch Proteine untersucht, die in weiteren Versuchen mit sWGA oder dem Antikörper CTD 110.6 als O-GlcNAc-positiv identifiziert wurden.



**Abbildung 23: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten Proteine aus HUVEC (pH-Gradient 4-7) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 200  $\mu$ M PUGNAc**

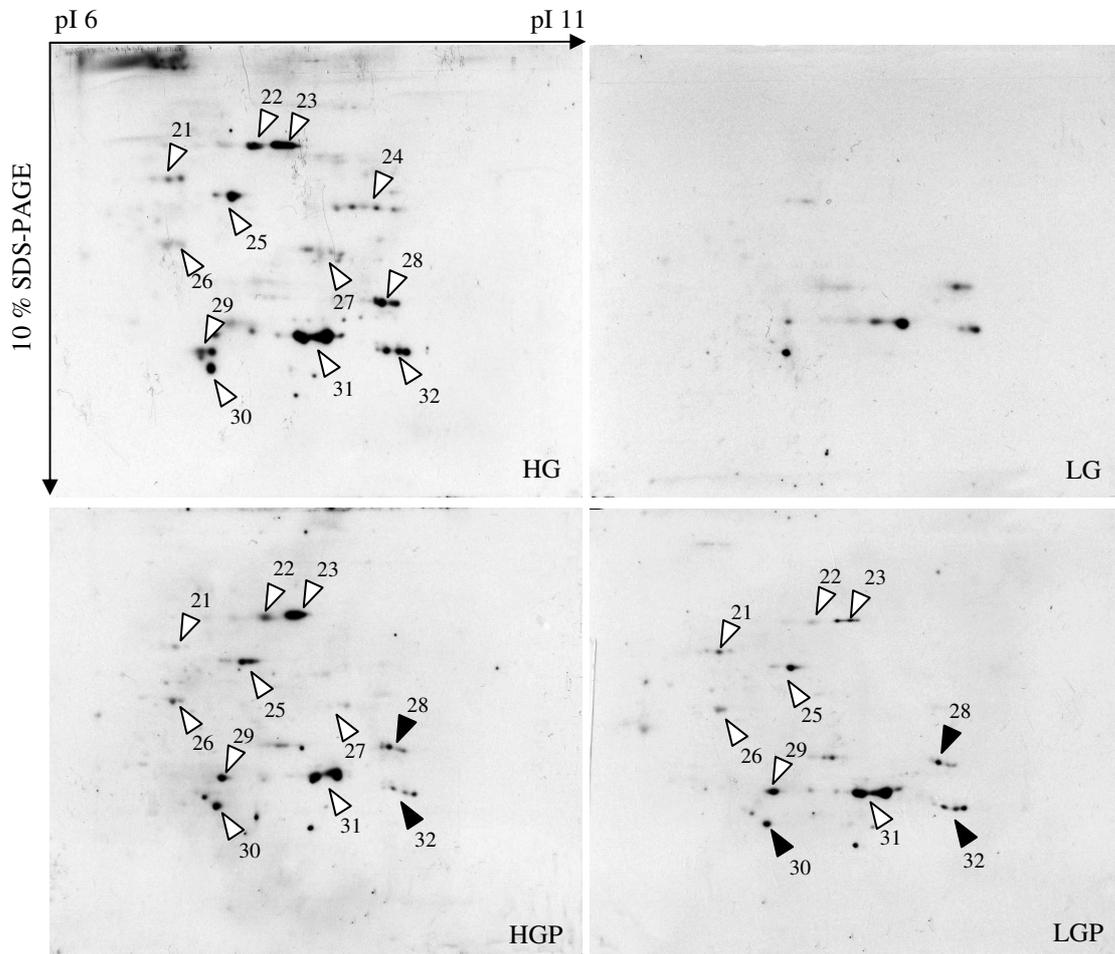
Je 100  $\mu$ g Protein wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 4-7 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die Proteine wurden nach dem Transfer auf Nitrocellulose mit Indian Ink gefärbt. Gezeigt sind die Indian Ink Färbungen der in Abbildung 22 gezeigten Western Blots. Die Pfeile markieren 20 O-GlcNAc-modifizierte Proteinspots, die aus korrespondierenden Coomassiegelen ausgeschnitten wurden und nach einem Trypsinverdau mittels MS und Datenbankanalyse identifiziert wurden. Die Auftrennung lässt zahlreiche, abgegrenzte Proteinspots erkennen. Die Auftrennung ist mit Ausnahme des HGP-Blots regelmäßig.

HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 200  $\mu$ M PUGNAc

Die 2D-Auftrennung der HUVEC im pH-Gradienten 4-7 führte zu zahlreichen überwiegend gut getrennten Spots, die sich über die gesamte Fläche der Membran verteilen. Die meisten Proteine konzentrieren sich auf den pH-Bereich 5 bis 6 und haben eher ein höheres MW. Wiederum ist die Auftrennung des HGP-Ansatzes unregelmäßig. Die Proteinmenge aller

Proben scheint sich zu entsprechen.

Wie Abbildung 20 zeigt, sind auch basische Proteine O-GlcNAc-modifiziert. Daher wurde die 2D-Auftrennung der HUVEC im pH-Gradienten 6-11 durchgeführt (s. Abbildung 24 und Abbildung 25).



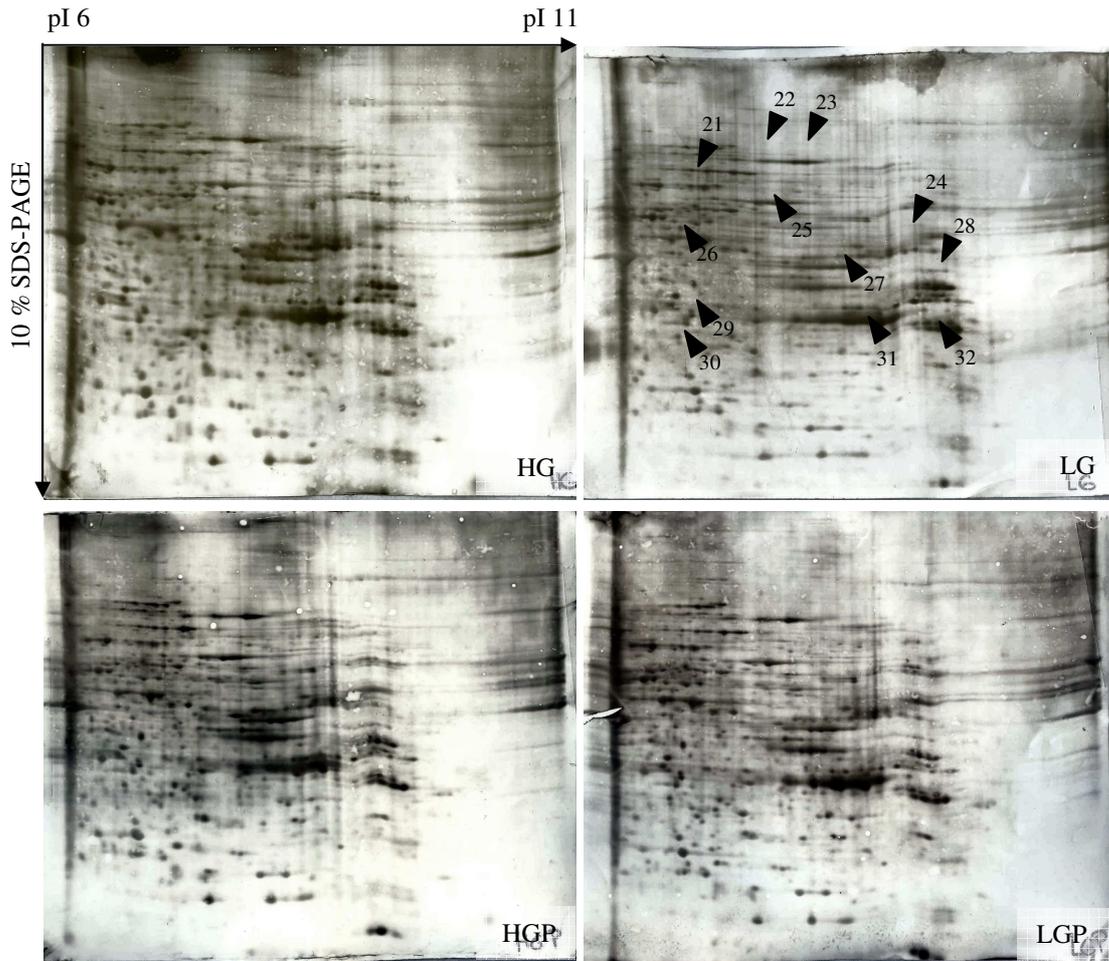
**Abbildung 24: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen aus HUVEC (pH-Gradient 6-11) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 200  $\mu$ M PUGNAc**

Je 100  $\mu$ g Protein wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 6-11 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurden nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem Antikörper CTD 110.6 und POD-konjugiertem anti-Maus-Zweitantikörper detektiert. Die Pfeile markieren zwölf O-GlcNAc-modifizierte Proteine, deren Intensität im Vergleich zur Kontrolle (LG) entweder niedriger (schwarze Pfeile) oder höher ist (weiße Pfeile). Alle Pfeile markieren zwei oder mehrere beieinander liegende Spots desselben apparenten MW oder pI. Gezeigt sind die Western Blots eines Versuchs von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Im Vergleich zur Kontrolle (LG) zeigen alle anderen Bedingungen intensivere und zahlreichere O-GlcNAc-Signale.

HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 200  $\mu$ M PUGNAc

In diesem Gradienten ist eine deutlichen Zunahme der Intensität O-GlcNAc-positiver Spots unter HG-, HGP- und LGP- im Vergleich zur Kontrollbedingung zu beobachten. Die Intensität der O-GlcNAc-Signale von zwölf Spots wurden verglichen. Spots, die merkliche Unterschiede in der O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrolle zeigten, sind mit weißen Pfeilen bei Steigerung und schwarzen Pfeilen bei Abnahme des Signals markiert. Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine erstrecken sich über den gesamten pH-Gradienten und

haben unterschiedliche molekulare Massen. Viele Signale kommen in „Spotreihen“ mit dem selben MW vor, bei denen die Signale unterschiedliche Intensitäten aufweisen. Die Kontrolle zeigt auch die Spotreihen, markiert durch Pfeile 28 und 32, die auch bei den anderen Kultivierungsbedingungen zu erkennen sind. Nur unter HG-Kultivierung sind sie intensiver, unter HGP-Kultivierung sinkt die O-GlcNAc-Modifikation der Proteine dieser Spotreihe. Für die Spotreihe, die Pfeil 31 markiert, weist in der Kontrolle das Protein mit dem höchsten pI dieser Reihe die stärkste O-GlcNAc-Modifizierung auf, die auch in gleicher Intensität unter den weiteren Kultivierungsbedingungen zu erkennen ist. Der Proteinspot links daneben in der Reihe ist in der Kontrolle schwächer modifiziert, seine Intensität nimmt jedoch in den anderen Kultivierungsansätzen zu. Alle analysierten zwölf Spots weisen eine Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation nach HG-Kultivierung verglichen mit der Kontrolle auf. Die Spots, die Pfeil 24 kennzeichnet, sind nur nach HG-Kultivierung O-GlcNAc-modifiziert. Unter HGP- und LGP-Bedingungen sind die Proteine vergleichbar O-GlcNAc-modifiziert, wobei einige Signale (Spots 23, 25 und 30) unter HG- und HGP-Kultivierung intensiver sind. Erst die Indian Ink Färbung der Proteine (s. Abbildung 25) gibt Aufschluss darüber, ob unterschiedliche Proteinkonzentrationen auf den Membranen vorliegen und dadurch die Signalstärke beeinflussen.



**Abbildung 25: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten Proteine aus HUVEC (pH-Gradient 6-11) nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 200 µM PUGNAc**

Je 100 µg Protein wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 6-11 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die Proteine wurden nach dem Transfer auf Nitrocellulose mit Indian Ink gefärbt. Gezeigt sind die Indian Ink Färbungen der in Abbildung 24 gezeigten Western Blots. Die Pfeile markieren zwölf O-GlcNAc-modifizierte Proteinspots, die aus korrespondierenden Coomassigelen ausgeschnitten wurden und nach einem Trypsinverdau mittels ESI-MS und Datenbankanalyse identifiziert wurden. Alle Pfeile markieren zwei oder mehrere beieinander liegende Spots desselben apparenten MW oder pI. Die Auftrennung ist bis etwa pH 10 regelmäßig. Zwischen pH 10 und 11 sind keine einzelnen Proteinspots zu erkennen.

HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 200 µM PUGNAc

Die Anfärbung der Proteine ist auf allen Membranen gleich intensiv, was bedeutet, dass gleiche Proteinmengen für alle Proben aufgetrennt wurden. Die Auftrennung ist im pH-Bereich 6 bis 10 als gut zu bezeichnen. Je basischer der pH wird desto häufiger treten die Proteine in nicht-aufgelösten horizontalen Streifen auf. Um pH 6 bis 7 liegen viele einzeln abgegrenzte Proteinspots vor. Zwischen pH 8 und 9 kommt es zu mehreren konzentrierten Spotreihen, die wahrscheinlich je ein Protein in unterschiedlichen Isoformen darstellen.

Im pH-Gradienten 6-11 liegen die Proteine so gut aufgetrennt vor, dass die Zuordnung der O-GlcNAc-modifizierten Proteine ohne Weiteres möglich ist. Im Großen und Ganzen entsprechen die Signalintensitäten den Flächen der Proteine unter ihnen.

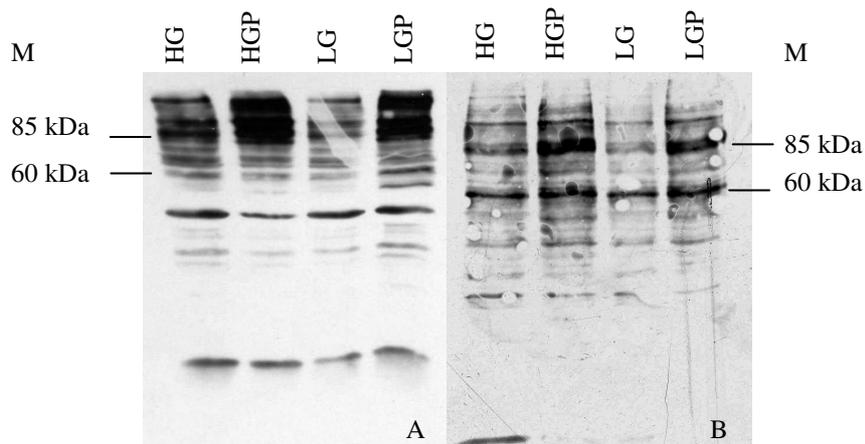
Durch Verwendung der erhöhten Konzentration von 200  $\mu$ M PUGNAc zur Kultivierung der HUVEC konnte eine vorwiegend verstärkte O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrollkultivierung mit Hilfe des Antikörpers CTD 110.6 gezeigt werden. Obwohl die Bedingungen der HG-Kultivierung im Gegensatz zu früheren Versuchen (s. 3.2.1 und 3.2.2) nicht verändert wurden, konnte nun auch hier eine Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine gezeigt werden.

Da nur wenige Proteine der HUVEC in der 2D-Auftrennung als O-GlcNAc-modifiziert identifiziert werden konnten, wurde zur Anreicherung der O-GlcNAc-modifizierten Proteine eine IP mit sWGA-Agarose vorgeschaltet. Die Zellysate wurden ÜN mit sWGA-Agarose inkubiert und die O-GlcNAc-modifizierten Proteine mit 1 M GlcNAc in Rehydratisierungslösung eluiert. Daran schloss sich die zweidimensionale Auftrennung im pH-Gradienten 4-7 und in 10 %igen SDS-Gelen an, sowie der Western Blot mit dem Antikörper CTD 110.6 und dem POD-konjugierten anti-Maus-Zweitantikörper. Die Präzipitation der glykosylierten Proteine konnte die in Abbildung 22 zu erkennende gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation nach HG-, HGP- und LGP-Kultivierung nicht reproduzieren. Es wurden die gleichen Proteine für alle Bedingungen präzipitiert, doch die Stärke der Modifizierung unterschied sich kaum. Nur die mit LG oder LGP kultivierten Zellen zeigten eine abweichende Veränderung der O-GlcNAc-Modifikation für einige Proteine (Abbildung nicht gezeigt).

### 3.2.4 Analyse der O-GlcNAc-Modifikation und OGT-Expression der HUVEC nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 200 $\mu$ M PUGNAc

Die O-GlcNAc-Modifikation der Proteine aus HUVEC wurde auch nur mittels SDS-PAGE analysiert. Parallel wurde die Expression der OGT und ihre Modifikationen untersucht. Die HUVEC wurden unter HG und LG (Kontrolle) in Ab- und Anwesenheit von 200  $\mu$ M PUGNAc (HGP/LGP) Serum-frei kultiviert. Die Proteine wurden in 8 oder 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt, auf Nitrocellulose übertragen und die O-GlcNAc-modifizierten Proteine mit O-GlcNAc-spezifischen Antikörpern untersucht. Die Detektion der OGT erfolgte mit den OGT-spezifischen Antikörpern AL25 und AL28. Die Proteine wurden mit Indian Ink oder Direct Blue visualisiert.

Um die O-GlcNAc-Modifikation der Proteine nach 1-DE zu untersuchen, wurden je 10  $\mu$ g Protein mit SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit den O-GlcNAc-spezifischen Antikörpern CTD 110.6 und RL2 und dem POD-konjugierten anti-Maus-Zweitantikörper analysiert.



**Abbildung 26: Western Blot Analyse der O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus HUVEC nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen**

Je 10 µg Protein wurden in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurden nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem Antikörper CTD 110.6 (A) oder RL2 (B) und POD-konjugiertem anti-Maus-Zweitantikörper detektiert. Gezeigt sind die Western Blots eines Versuchs von insgesamt sechs (A) bzw. von insgesamt zwei (B) unabhängig durchgeführten Versuchen. Im Vergleich zur Kontrolle (LG) zeigen alle anderen Bedingungen intensivere und zahlreichere O-GlcNAc-Signale.

M: Molekulargewichtsmarker in kDa, HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 200 µM PUGNAc

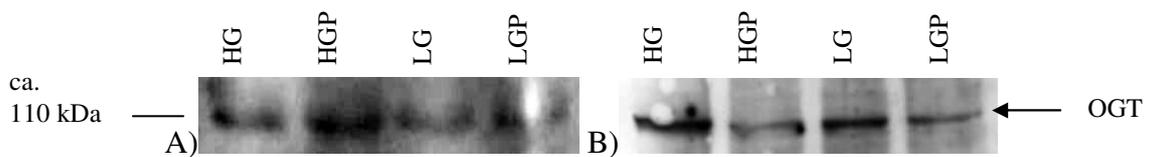
In der Abbildung ist die eindeutige Steigerung der O-GlcNAc-Modifizierung für viele Proteine nach HG- und HGP/LGP-Kultivierung im Vergleich zur Kontrolle (LG) gezeigt. Besonders im höhermolekularen Bereich kommt es zu einer verstärkten Modifizierung nach PUGNAc-Kultivierung. Die Stärke der Signale der O-GlcNAc-Modifizierung der HGP- und LGP-Proben unterscheiden sich kaum, wohingegen der Anstieg der O-GlcNAc-Modifizierung für die HG-Probe nicht ganz so stark ausfällt. Die niedermolekularen Proteine sind kaum O-GlcNAc-modifiziert. Für alle Proben sind die gleichen Proteinbanden als modifiziert zu erkennen, sie unterscheiden sich nur in der Intensität der Modifizierung.

Beide Antikörper erkennen in vielen Fällen Proteine desselben apparenten MWs als O-GlcNAc-modifiziert. Mit dem Antikörper RL2 sind jedoch auch Proteine mit einem MW kleiner 60 kDa zu detektieren. Auch spiegeln beide Antikörper die Höherglykosylierung unter den Kultivierungsbedingungen wider. Zwar handelt es sich in beiden Fällen um 10 %ige SDS-Gele, doch unterscheidet sich die Auftrennung, so dass ein genauer Vergleich nicht möglich ist. Erkennbar ist, dass der Antikörper CTD 110.6 eine stärkere Modifizierung im Molekulargewichtsbereich größer 100 kDa anzeigt als der Antikörper RL2.

Die densitometrische Auswertung der Intensitätsunterschiede der O-GlcNAc-Signale aus sechs unabhängigen Versuchen mit dem Antikörper CTD 110.6 mittels Image J und statistischer Analyse mittels one-way ANOVA Test lässt für die HGP-Kultivierung einen signifikanten Anstieg ( $p < 0.05$ ) und für die LGP-Kultivierung einen hoch signifikanten Anstieg ( $p < 0.01$ ) der O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrollkultivierung erkennen. Zum Vergleich wurden die Intensitätsunterschiede der O-GlcNAc-Signale mit dem Antikörper RL2 mittels Image J und statistischer Analyse mittels one-way ANOVA Test

densitometrisch ausgewertet. Für die HG- und HGP/LGP-Kultivierungen lässt sich ein hoch signifikanter Anstieg ( $p < 0.01$ ) der O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrollkultivierung dokumentieren. Die Werte für die O-GlcNAc-Signale unter Kontrollbedingungen wurde = 100 % gesetzt.

Im Bereich um 100 bis 120 kDa ist eine Bande mit starker O-GlcNAc-Modifizierung zu erkennen. Um zu analysieren, ob auch die OGT O-GlcNAc-modifiziert vorliegt und sich die Stärke ihrer Modifizierung je nach Kultivierungsbedingung unterscheidet, wurden die Proteine aus HUVEC in 8 %igen SDS-Gelen aufgetrennt und die OGT mit den Antikörpern AL25 und AL28 und den POD-konjugierten anti-Kaninchen-Zweitantikörper nachgewiesen (s. Abbildung 27).



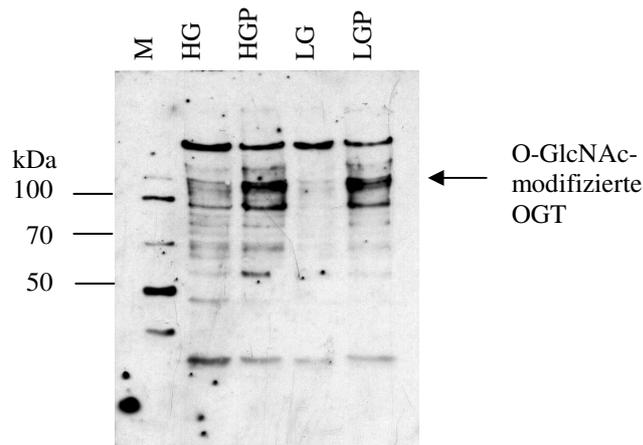
**Abbildung 27: Western Blot Analyse der OGT in HUVEC nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen**

Je 10  $\mu$ g Protein wurden in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die OGT wurde nach Transfer auf Nitrocellulose mit den Antikörpern AL25 (A) oder AL28 (B) und POD-konjugiertem anti-Kaninchen-Zweitantikörper detektiert. Gezeigt sind die Western Blots eines Versuchs von insgesamt vier unabhängig durchgeführten Versuchen. Es sind Ausschnitte der Blots dargestellt, die die OGT mit einem apparenten MW von 110 kDa zeigen, welche mit einem Pfeil markiert ist.

HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 200  $\mu$ M PUGNAc

Die OGT ist für alle HUVEC-Proben nachzuweisen. Da mit dem polyklonalen Antikörper AL25 immer eine starke Hintergrundfärbung auftritt, ist die OGT dort nicht klar zu erkennen. Der Blot mit dem Antikörper AL28 zeigt für die HGP- und LGP-Proben schwächere OGT-Banden, obwohl gleiche Proteinmengen aufgetrennt wurden (Färbung der Membran nicht gezeigt).

Parallel erfolgte der Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation der OGT. Es wurden je 10  $\mu$ g Protein in einem 8 %igen SDS-Gel aufgetrennt und nach dem Western Blot die O-GlcNAc-Modifikation mit dem Antikörper CTD 110.6 und POD-konjugiertem anti-Maus-Zweitantikörper untersucht.



**Abbildung 28: Western Blot Analyse der O-GlcNAc-modifizierten OGT in HUVEC nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen**

Je 10 µg Protein wurden in 8 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurden nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem Antikörper CTD 110.6 und POD-konjugiertem anti-Maus-Zweitantikörper detektiert. Gezeigt sind die Western Blots eines Versuchs von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Für alle Proben ist die O-GlcNAc-modifizierte OGT nachzuweisen, welche mit einem Pfeil markiert ist. Die Färbung des Molekulargewichtsmarkers (M) ist unspezifisch.

M: Molekulargewichtsmarker in kDa, HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 200 µM PUGNAc

Der CTD 110.6-Blot der HUVEC-Lysate zeigt die O-GlcNAc-modifizierte OGT. Für die Kontrolle ist eine sehr schwache Modifizierung zu erkennen. Unter PUGNAc-Kultivierung liegt die OGT stark O-GlcNAc-modifiziert vor. Auch nach HG-Kultivierung kommt es zum Anstieg der Modifizierung der OGT.

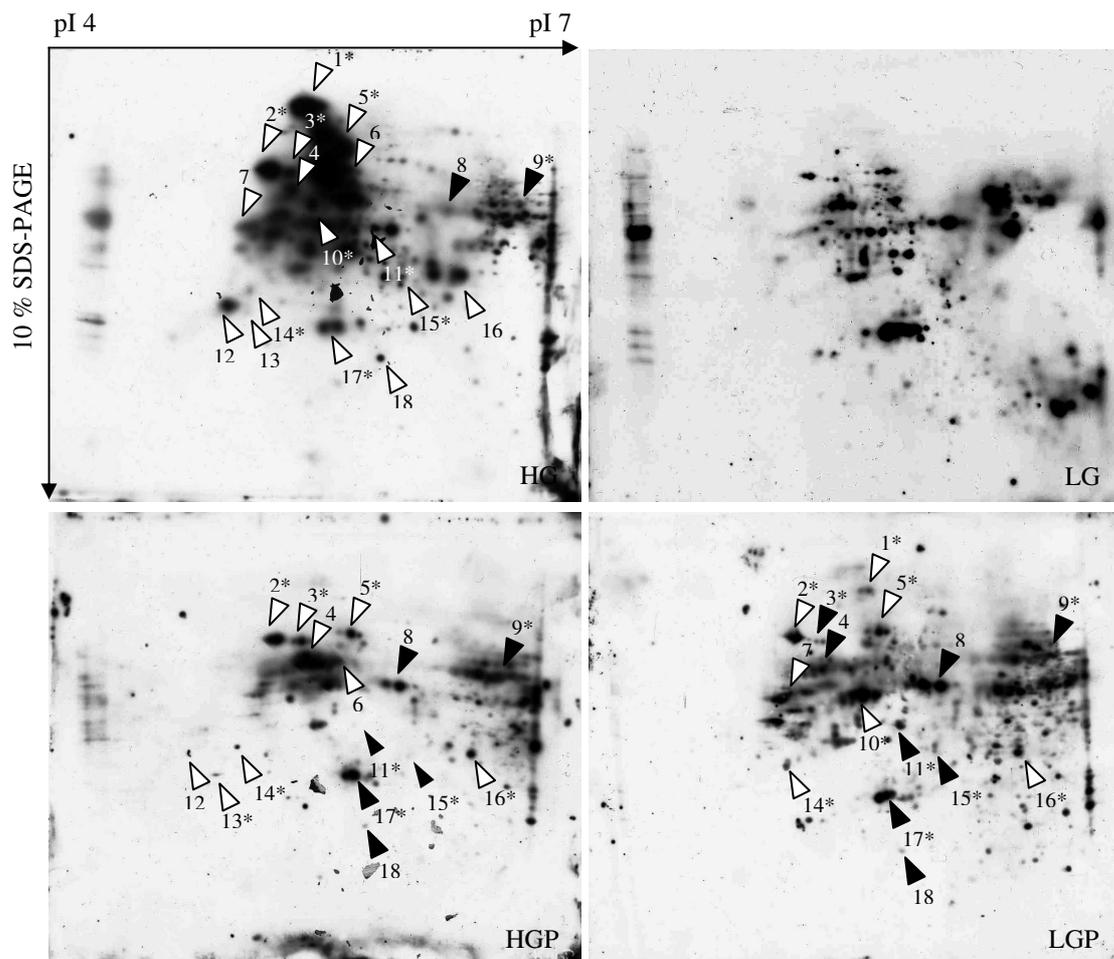
Auch nach 2D-Auftrennung der HUVEC im pH-Gradienten 4-7 wurde die OGT, dessen theoretischer pI 6.23 beträgt, mit dem Antikörper AL28 und dem POD-konjugierten anti-Kaninchen-Zweitantikörper nachgewiesen (Abbildung nicht gezeigt). Im Vergleich mit dem entsprechenden CTD 110.6-Blot konnte für die OGT-Spots jedoch keine O-GlcNAc-Modifikation gezeigt werden.

### 3.3 2D-Analyse der Proteine aus skelettalen Muskelzellen und immunologischer Nachweis ihrer O-GlcNAc-Modifikation

Die SkMC wurden in Serum-haltigem Medium unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von 40 µM PUGNAc für 72 h kultiviert. Da die O-GlcNAc-Modifizierung auf Proteinen vor allem im Cytosol und Nukleus vorkommt (Holt und Hart, 1986), wurden die Proteine aus SkMC durch eine Sucrosegradientenzentrifugation fraktioniert und mittels 2-DE aufgetrennt. Die Detektion der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine erfolgte nach dem Western Blot mit dem Antikörper CTD 110.6 und dem POD-konjugierten anti-Maus-Zweitantikörper. Die Proteine wurden schließlich mit Indian Ink angefärbt.

### 3.3.1 2D-Analyse der O-GlcNAc-Modifikation der nukleären Proteinfraction aus SkMC nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von PUGNAc

Zuerst wurden die O-GlcNAc-modifizierten, nukleären Proteine aus SkMC mit 2-DE im pH-Gradienten 4-7 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose übertragen und die O-GlcNAc-modifizierten Proteine mit dem Antikörper CTD 110.6 und dem POD-konjugierten anti-Maus-Zweitantikörper detektiert (s. Abbildung 29).



**Abbildung 29: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen der nukleären Proteinfraction aus SkMC nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen**

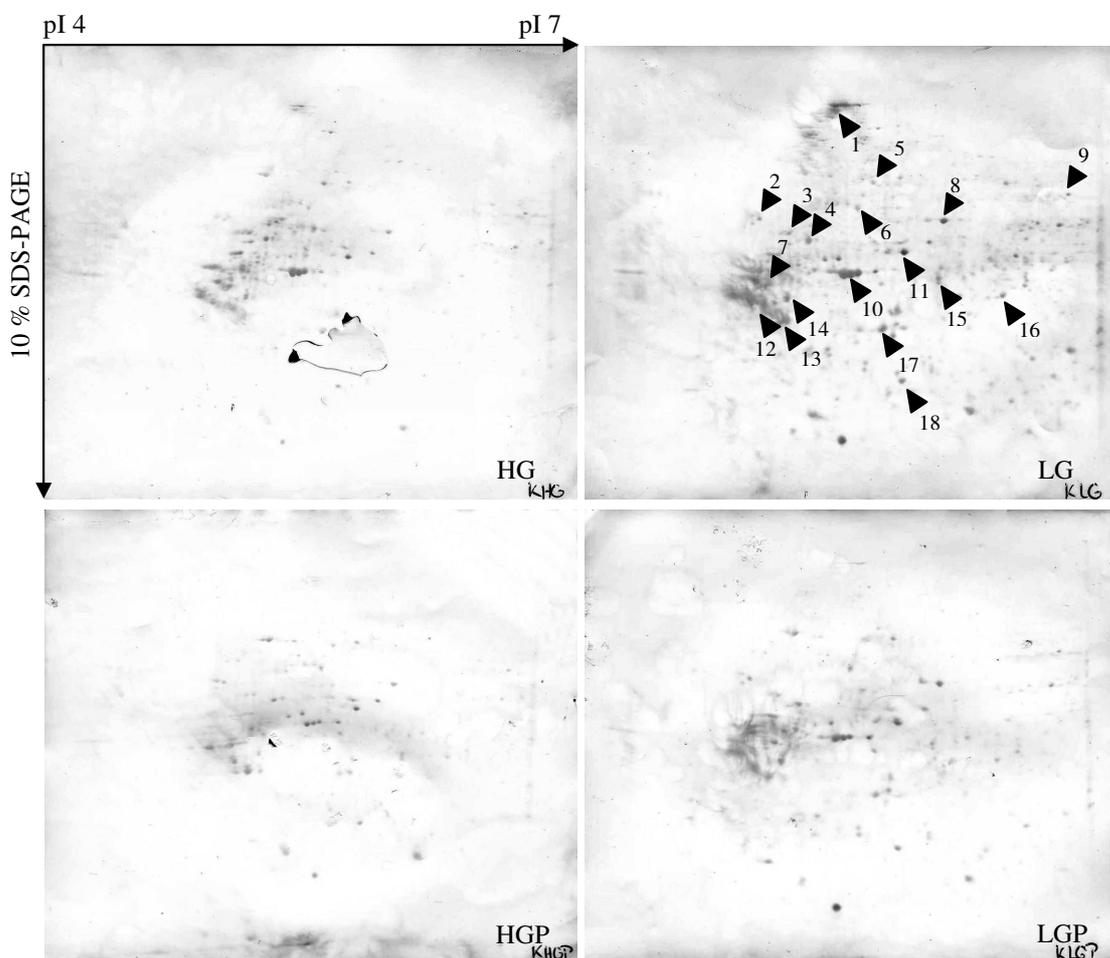
Je 100  $\mu$ L der nukleären Proteinfraction wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 4-7 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurden nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem Antikörper CTD 110.6 und POD-konjugiertem anti-Maus-Zweitantikörper detektiert. Die Pfeile markieren 18 O-GlcNAc-modifizierte Proteine, deren Intensität im Vergleich zur Kontrolle (LG) entweder niedriger (schwarze Pfeile) oder höher ist (weiße Pfeile). \* bezeichnet zwei oder mehrere dicht beieinander liegende Spots desselben apparenten MW oder pI. Gezeigt sind die Western Blots eines Versuchs von insgesamt zwei unabhängig durchgeführten Versuchen. Im Vergleich zur Kontrolle (LG) zeigt die HG-Kultivierung intensivere und zahlreichere O-GlcNAc-Signale.

HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 40  $\mu$ M PUGNAc

Für alle Kulturbedingungen sind zahlreiche O-GlcNAc-modifizierte Proteine zu erkennen, die größtenteils zwischen pH 5 bis 7 liegen. Auffällig ist, dass keine O-GlcNAc-modifizierten

Proteine zwischen pH 4 und 5 zu erkennen sind. Die Intensität der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine nach HG-Kultivierung ist so stark, dass sich die Signale überlagern. Es ist eine deutliche Steigerung der O-GlcNAcylierung nach Kultivierung mit HG für Proteine mit einem MW größer 50 kDa im pH-Bereich 5 bis 6 im Vergleich zur Kontrolle (LG) zu erkennen (Spots 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 7). Jedoch weist die Kontrolle im pH-Bereich 6 bis 7 viele stark O-GlcNAc-modifizierte Proteine auf, die unter keiner der anderen Bedingungen so intensiv modifiziert sind (Spots 8 und 9). Bei den mit PUGNac inkubierten SkMC sind nur einige Proteine (Spots 2, 5, 14 und 16) stärker O-GlcNAc-modifiziert als in der Kontrolle.

Die 2D-aufgetrennten Proteine der nukleären Fraktion de SkMC wurden anschließend mit Indian Ink Färbung angefärbt. Mit Pfeilen sind die O-GlcNAc-modifizierten Proteine markiert, die aus korrespondieren Coomassie gefärbten Gelen ausgeschnitten wurden und nach einem Trypsinverdau mittels ESI-MS und Datenbankanalyse identifiziert wurden.



**Abbildung 30: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten nukleären Proteinfraction aus SkMC nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen**

Je 100  $\mu$ L der nukleären Proteinfraction wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 4-7 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die Proteine wurden nach dem Transfer auf Nitrocellulose mit Indian Ink gefärbt. Gezeigt sind die Indian Ink Färbungen der in Abbildung 29 gezeigten Western Blots. Die Pfeile markieren 18 O-GlcNAc-modifizierte Proteinspots, die aus korrespondieren Coomassigelen ausgeschnitten wurden und nach einem Trypsinverdau mittels ESI-MS und Datenbankanalyse identifiziert wurden. Im Vergleich zur Kontrolle (LG) zeigen alle Proben weniger Protein.

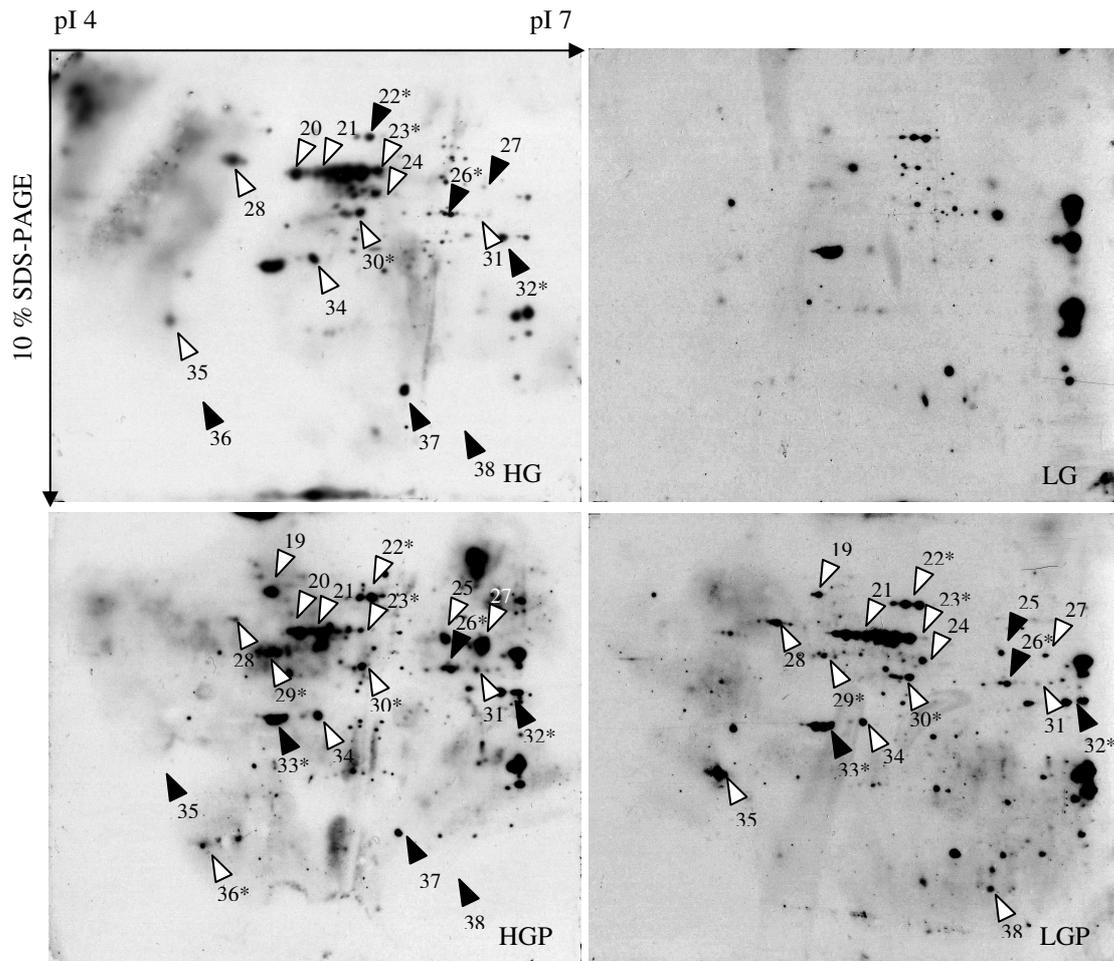
HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 40  $\mu$ M PUGNac

Nach der Indian Ink Färbung liegt eine akzeptable Auftrennung der Proteine vor, jedoch gibt es starke Unterschiede in der Proteinmenge der aufgetrennten Proben. Eine Bestimmung der Proteinkonzentration war nicht möglich, daher wurden gleiche Volumina der Probe verwendet, was die geringe Anzahl der Proteine erklärt. Die Hintergrundfärbung der Membran ist im pH-Bereich 5 bis 6 stärker als die Proteinfärbung, so dass die Proteine nicht genau abgegrenzt werden können. Auffällig ist, dass im pH-Bereich 4 bis 5 kaum bis keine Proteine vorliegen, was die in diesem Bereich nicht vorkommenden O-GlcNAc-modifizierten Proteine begründet. Obwohl nur sehr wenig Protein aufgetrennt wurde, sind die Signale für die O-GlcNAc-Modifikation z.T. sehr stark.

Für die nukleäre Proteinfraction aus SkMC konnte eine deutliche Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation vieler Proteine nach HG-Kultivierung im Vergleich zur Kontrollkultivierung gezeigt werden. Die Inkubation mit PUGNAc scheint einen nicht so starken Effekt auf die Zunahme der O-Glykosylierung zu haben.

### 3.3.2 2D-Analyse der O-GlcNAc-Modifikation der cytosolischen Proteinfraction aus SkMC nach Kultivierung unter HG- und LG-Bedingungen in An- und Abwesenheit von PUGNAc

Zunächst wurde O-GlcNAc-Modifikation der cytosolischen Proteinfraction aus SkMC mit 2-DE im pH-Gradienten 4-7 und in 10 %igen SDS-Gele untersucht. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose übertragen und die O-GlcNAc-modifizierten Proteine mit dem Antikörper CTD 110.6 und dem POD-konjugierten anti-Maus-Zweitantikörper detektiert (s. Abbildung 31).

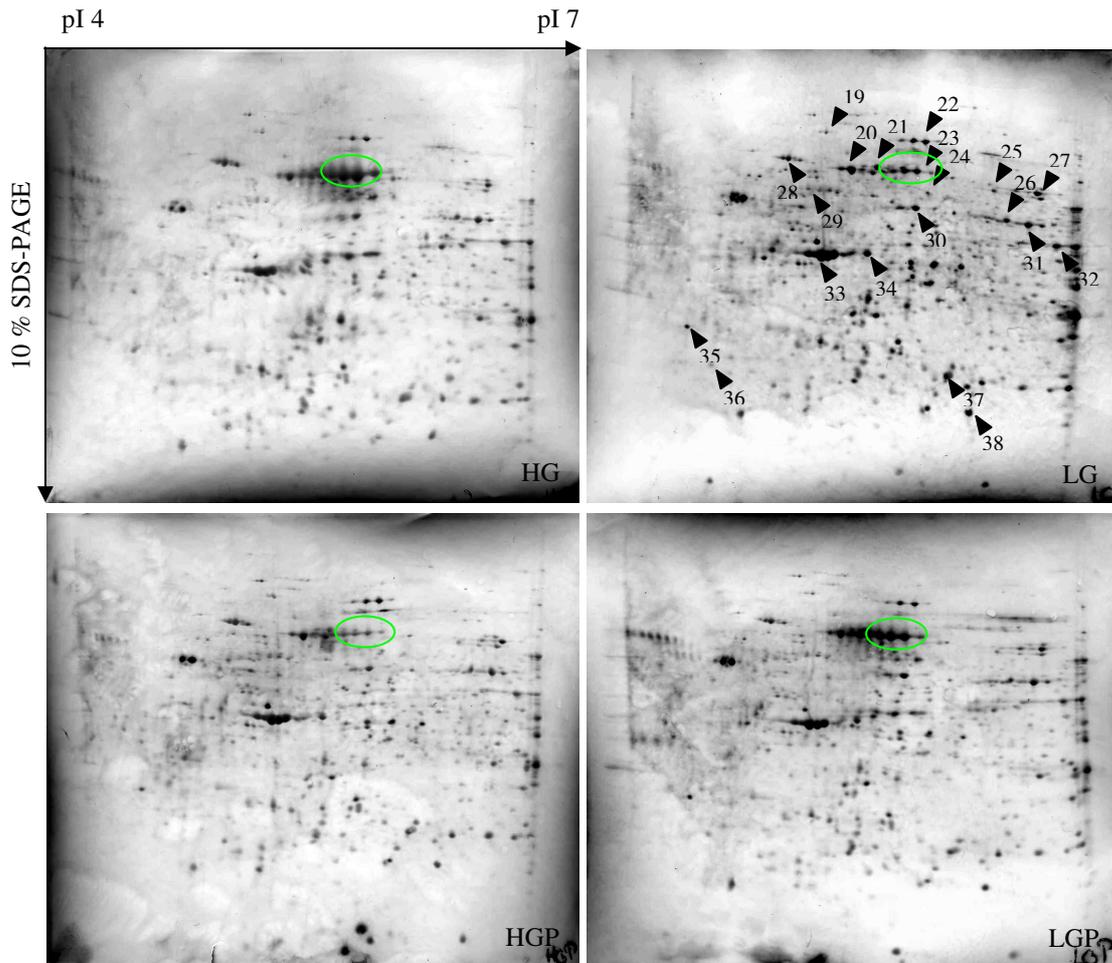


**Abbildung 31: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen der cytosolischen Proteinfraction aus SkMC (pH-Gradient 4-7) nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen**

Je 100 µg Protein der cytosolischen Fraktion wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 4-7 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurden nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem Antikörper CTD 110.6 und POD-konjugiertem anti-Maus-Zweitantikörper detektiert. Die Pfeile markieren 19 O-GlcNAc-modifizierte Proteine, deren Intensität im Vergleich zur Kontrolle (LG) entweder niedriger (schwarze Pfeile) oder höher ist (weiße Pfeile). \* bezeichnet zwei oder mehrere dicht beieinander liegende Spots desselben apparenten MW oder pI. Gezeigt sind die Western Blots eines Versuchs von insgesamt zwei unabhängig durchgeführten Versuchen. Im Vergleich zur Kontrolle (LG) zeigen alle anderen Bedingungen intensivere und zahlreichere O-GlcNAc-Signale.

HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 40 µM PUGNAc

Es ist deutlich zu erkennen, dass nach HG- oder HGP/LGP-Kultivierung die Anzahl und Intensität der O-GlcNAc-modifizierten Proteine zunimmt. So werden Spot 19 und 29 nach PUGNAc-Kultivierung (HGP/LGP) stärker modifiziert als in der Kontrolle. Einige Proteine zeigen eine verminderte O-GlcNAc-Modifikation, was für Spot 38 nach HG-Kultivierung ohne und mit PUGNAc (HG/HGP) im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen ist. Auffällig ist, dass das MW der meisten O-GlcNAc-modifizierten Proteine größer 40 kDa beträgt. Die 2D-aufgetrennten Proteine der cytosolischen Fraktion der SkMC wurden anschließend mit Indian Ink angefärbt. Mit Pfeilen sind die O-GlcNAc-modifizierten Proteine markiert, die aus korrespondierenden Coomassie gefärbten Gelen ausgeschnitten wurden und nach einem Trypsinverdau mittels ESI-MS und Datenbankanalyse identifiziert wurden.



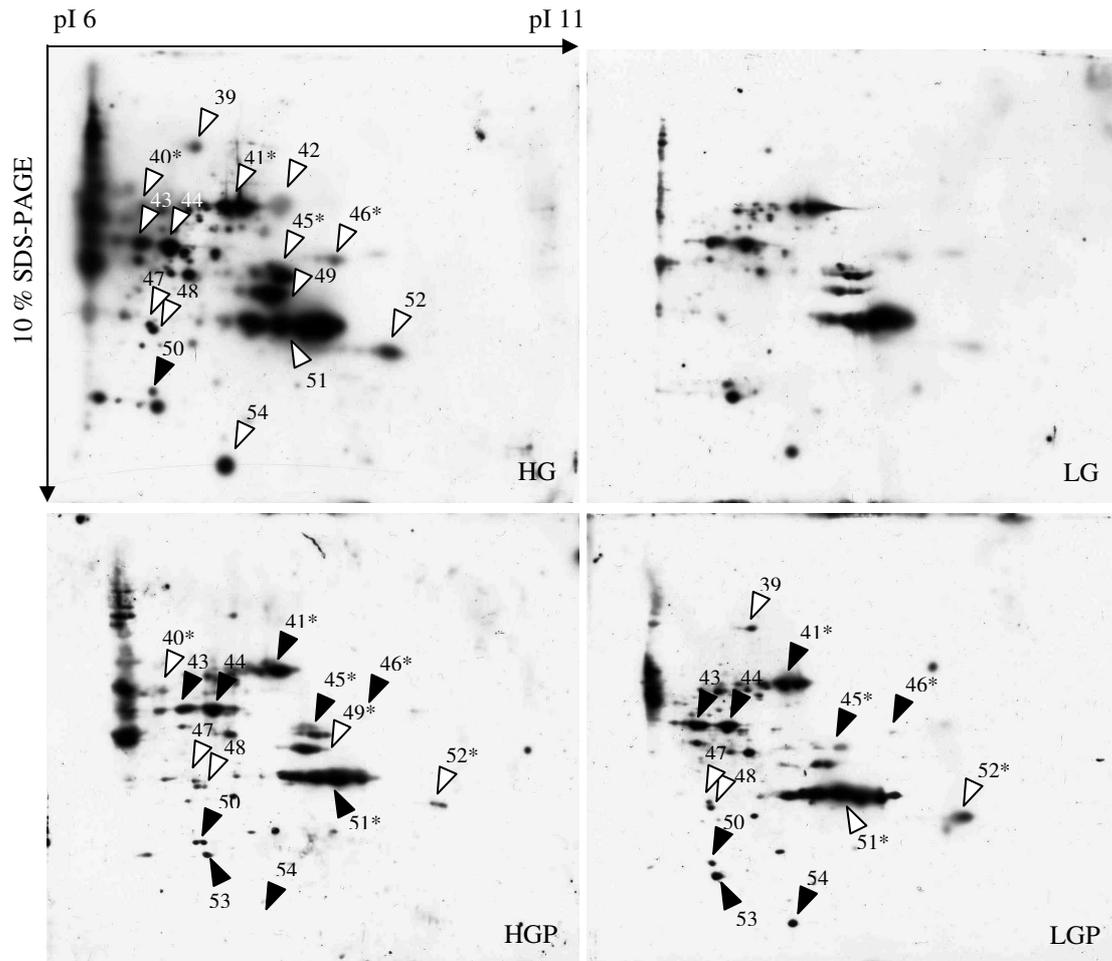
**Abbildung 32: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten cytosolischen Proteinfraction (pH 4-7) aus SkMC nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen**

Je 100 µg der cytosolischen Proteinfraction wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 4-7 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die Proteine wurden nach dem Transfer auf Nitrocellulose mit Indian Ink gefärbt. Gezeigt sind die Indian Ink Färbungen der in Abbildung 31 gezeigten Western Blots. Die Pfeile markieren 19 O-GlcNAc-modifizierte Proteinspots, die aus korrespondierenden Coomassigelen ausgeschnitten wurden und nach einem Trypsinverdau mittels ESI-MS und Datenbankanalyse identifiziert wurden. Im Vergleich zur Kontrolle (LG) zeigen alle anderen Bedingungen weniger intensiv gefärbte Proteine. Die grünen Kreise markieren Albuminvorläufer, die sich in ihrer Konzentration in den Proben unterscheiden.

HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 40 µM PUGNAc

Die Indian Ink Färbung zeigt eine gute 2D-Auftrennung, da die Proteine vereinzelt und abgegrenzt vorliegen. In grün sind Albuminvorläufer markiert, die auf Bestandteile des Serums im Kultivierungsmedium zurückzuführen sind. Auffällig ist, dass sie in jeder Probe in unterschiedlicher Konzentration vorliegen. Möglicherweise kommen dadurch Unterschiede in den aufgetrennten Proteinmengen zu Stande, da die Proteinbestimmung mit BSA als Standardprotein durchgeführt wurde. Insgesamt erscheinen die Proteine der Kontrolle (LG) intensiver gefärbt, so dass die aufgetrennte Proteinmenge möglicherweise höher ist.

Am basischen Ende der Auftrennung sind in Abbildung 31 auch einige O-GlcNAc-modifizierte Proteine zu erkennen, die genauer im pH-Gradienten 6-11 untersucht wurden (Abbildung 33).



**Abbildung 33: Western Blot Analyse von 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen der cytosolischen Proteinfraction aus SkMC (pH-Gradient 6-11) nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP und LGP Bedingungen**

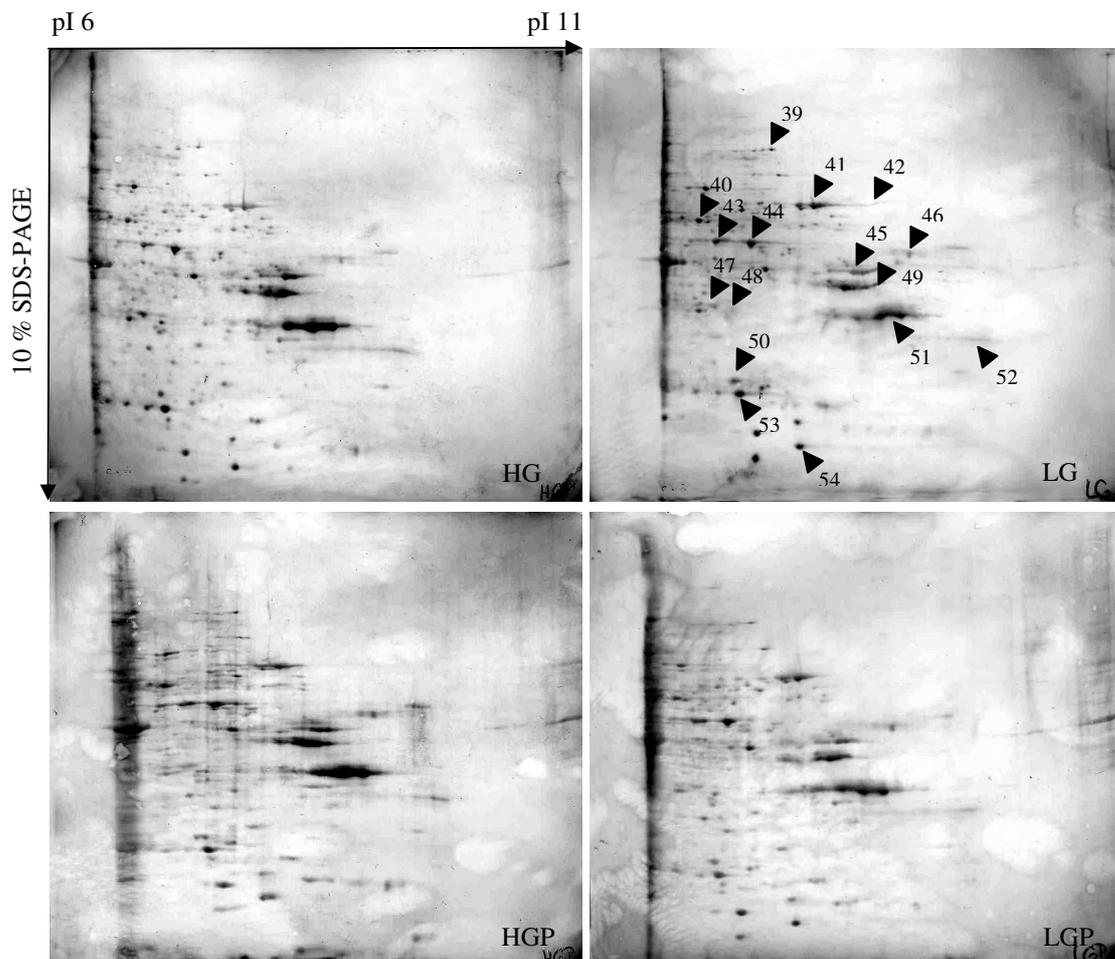
Je 100 µg Protein der cytosolischen Fraction wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 6-11 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurden nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem Antikörper CTD 110.6 und POD-konjugiertem anti-Maus-Zweitantikörper detektiert. Die Pfeile markieren 15 O-GlcNAc-modifizierte Proteine, deren Intensität im Vergleich zur Kontrolle (LG) entweder niedriger (schwarze Pfeile) oder höher ist (weiße Pfeile). \* bezeichnet zwei oder mehrere dicht beieinander liegende Spots desselben apparenten MW oder pI. Gezeigt sind die Western Blots eines Versuchs von insgesamt zwei unabhängig durchgeführten Versuchen. Nach HG-Kultivierung kommt es zu einer Zunahme der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine.

HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 40 µM PUGNAc

Sofort ersichtlich ist die Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine nach HG-Kultivierung. Im Vergleich mit der Kontrolle sind zwar die gleichen Proteine modifiziert, jedoch nimmt die Signalstärke unter HG-Einfluss erheblich zu. Die PUGNAc-Kultivierung der SkMC führt eher zu einer Abnahme der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine im Vergleich mit der Kontrolle. Auffällig ist, dass sich die Signale auf den pH-Bereich 6 bis 9 konzentrieren. Zum Teil kommen O-GlcNAc-positive Spotreihen (Spots 51) vor, die verschiedene Isoformen eines Proteins darstellen können.

Die Proteine wurden anschließend mit Indian Ink Färbung angefärbt. Mit Pfeilen sind die O-GlcNAc-modifizierten Proteine markiert, die aus korrespondierenden Coomassie gefärbten Gelen

ausgeschnitten wurden und nach einem Trypsinverdau mittels ESI-MS und Datenbankanalyse identifiziert wurden (s. Abbildung 34).



**Abbildung 34: Indian Ink Färbung der Nitrocellulose der 2D-aufgetrennten cytosolischen Proteinfraction (pH 6-11) aus SkMC nach Kultivierung unter HG-, LG-, HGP- und LGP-Bedingungen**

Je 100 µg der cytosolischen Proteinfraction wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 6-11 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die Proteine wurden nach dem Transfer auf Nitrocellulose mit Indian Ink gefärbt. Gezeigt sind die Indian Ink Färbungen der in Abbildung 33 gezeigten Western Blots. Die Pfeile markieren 15 O-GlcNAc-modifizierte Proteinspots, die aus korrespondierenden Coomassigelen ausgeschnitten wurden und nach einem Trypsinverdau mittels ESI-MS und Datenbankanalyse identifiziert wurden. Ab pH 9 sind keine Proteine angefärbt.

HG: 30 mM Glucose, LG: 5 mM Glucose, HGP/LGP: 30/5 mM Glucose + 40 µM PUGNAc

Die Indian Ink Färbung macht deutlich, dass sich die Proteine auf den pH-Bereich 6 bis 9 konzentrieren. Für alle Bedingungen sind im basischen Bereich Querstreifen zu erkennen, bei denen es sich um schlecht aufgetrennte Proteine handeln könnte. Die Proteine mit pIs kleiner pH 9 sind ordentlich aufgetrennt, da die Spots vereinzelt vorliegen und sich nicht überlappen. Nur die HGP-Probe zeigt in allen Proteinspots leichte Querstreifen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Proteine nicht vollständig gelöst vorlagen. Bei allen Ansätzen zeigen sich im mittleren Molekulargewichts- und pH-Bereich der Auftrennung einige Spotreihen, die in größeren Mengen vorliegende Proteine widerspiegeln.

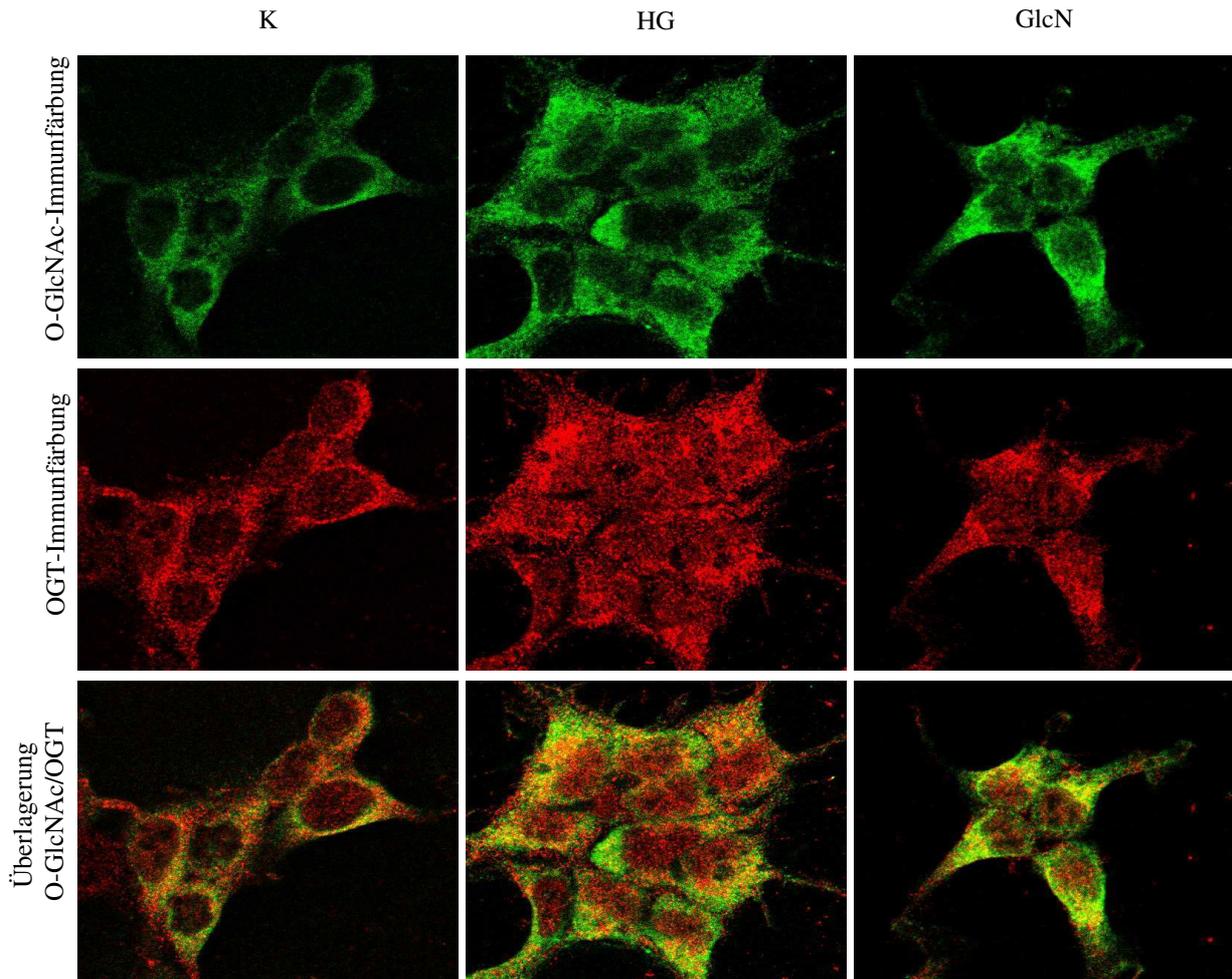
Die HG-Kultivierung führt zur Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation vieler Proteine der cytosolischen Fraktion der SkMC. Auch nach Kultivierung mit PUGNAc liegen viele Proteine verstärkt O-GlcNAc-modifiziert vor, jedoch zeigen die basischeren Proteine eher eine Abnahme der O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrolle.

### **3.4 Untersuchungen der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine aus humanen embryonalen Nierenzellen nach Kultivierung mit LG, HG oder Glucosamin**

HEK-Zellen wurden unter LG und HG-Bedingungen sowie in Gegenwart von Glucosamin kultiviert. Der Einfluss auf die O-GlcNAc-Modifikation der Proteine der HEK-Zellen wurde mit 2-DE und indirekter Immunfluoreszenz untersucht. Des Weiteren wurde die Expression der OGT analysiert.

#### **3.4.1 Einfluss der HG- und GlcN-Kultivierung auf die intrazelluläre O-GlcNAc- und OGT-Lokalisation in HEK-Zellen**

HEK-Zellen, die 24 h mit 5 (LG) oder 20 mM Glucose (HG) oder mit 10 mM Glucosamin (GlcN) kultiviert worden waren, wurden mit indirekter Immunfluoreszenz mit den Antikörpern CTD 110.6 und AL25 auf die O-GlcNAc- und OGT-Expression untersucht. Die Markierung erfolgte mit dem Cy2-gekoppelten anti-Maus-Zweitantikörper bzw. dem Cy3-gekoppelten anti-Kaninchen-Zweitantikörper. Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Diestel mit einem konfokalen Lasermikroskop am Institut für Genetik der Universität Bonn fotografiert. Die Überlagerung der Fluoreszenzsignale für die O-GlcNAc-Modifikation (grüne Fluoreszenz) und für die OGT (rote Fluoreszenz) erscheint in gelb.



**Abbildung 35: Indirekte Immunfluoreszenzanalyse der O-GlcNAc-Modifikation und der OGT-Expression in HEK-Zellen**

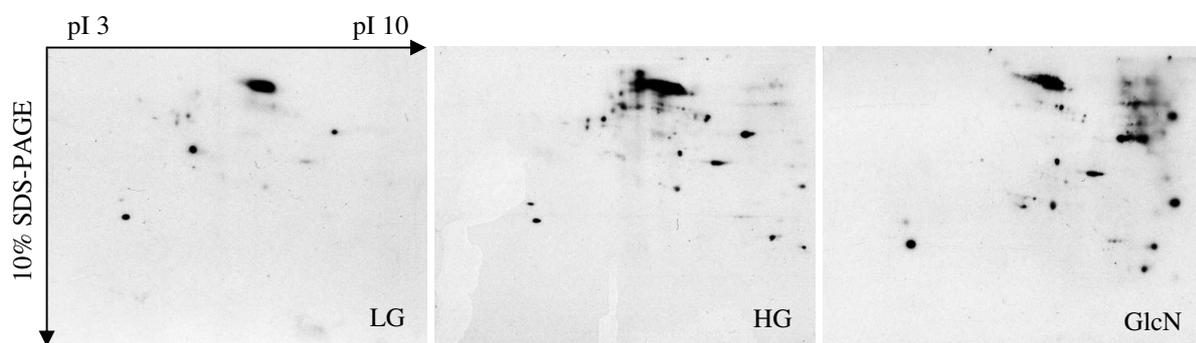
Nach Inkubation der HEK-Zellen mit 5 mM Glucose (K), 20 mM Glucose (HG) oder 10 mM Glucosamin (GlcN) für 24 h wurde die O-GlcNAc-Expression mit dem Antikörper CTD 110.6 und einem Cy2-gekoppelten anti-Maus-Zweitantikörper (grüne Fluoreszenz) und die OGT-Expression mit dem Antikörper AL25 und einem Cy3-gekoppelten anti-Kaninchen-Zweitantikörper (rote Fluoreszenz) untersucht. Die Photos wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop aufgenommen. Nach HG- bzw. Glucosamininkubation nimmt die O-GlcNAc-Modifizierung der Proteine in Zellkern und Cytoplasma sichtbar zu. Deutlich ist auch die Steigerung der OGT-Expression in den Zellkernen dieser Zellen zu erkennen. Die Überlagerung der Immunfärbungen zeigt, dass vor allem nach Glucosamininkubation im Cytoplasma vermehrt O-GlcNAc-modifizierte Proteine und die OGT erscheinen. Gezeigt ist die Immunfluoreszenz eines Versuchs von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Nach HG- bzw. GlcN-Inkubation der HEK-Zellen nimmt die O-GlcNAc-Modifizierung der Proteine in Zellkern und Cytoplasma sichtlich zu. Im Kontrollversuch ist die O-GlcNAc-Färbung im Cytoplasma und vor allem in den Zellkernen schwächer. Besonders deutlich ist die Steigerung der OGT-Expression in den Zellkernen nach HG- und GlcN-Kultivierung zu erkennen. Die alleinige Inkubation der HEK-Zellen mit dem Cy2- oder Cy-3 gekoppelten Zweitantikörper wies keine Signale auf (Abbildung nicht gezeigt).

Die Zunahme der O-GlcNAc- und OGT-Expression nach HG- bzw. GlcN-Kultivierung ließen sich mit weiteren Untersuchungen an einem Lichtmikroskop bestätigen (Abbildungen nicht gezeigt).

### 3.4.2 Analyse der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine aus HEK-Zellen nach Kultivierung mit LG, HG und GlcN

Um die Ergebnisse der Immunfluoreszenz zu bestätigen wurden die Proteine der HEK-Zellen nach LG-, HG- und GlcN-Kultivierung mittels Sucrosegradientenzentrifugation in eine cytosolische und eine nukleäre Proteinfraction aufgeteilt. Die O-GlcNAc-Modifikation der Proteinfractionen wurde mit 2-DE im pH-Gradienten 3-10 und in 10 %igen SDS-Gelen untersucht. Der immunologische Nachweis der O-GlcNAc-modifizierten Proteine erfolgte nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem Antikörper CTD 110.6 und dem POD-konjugierten anti-Maus-Zweitantikörper. Zunächst wurde die cytosolische Fraktion analysiert (s. Abbildung 36).



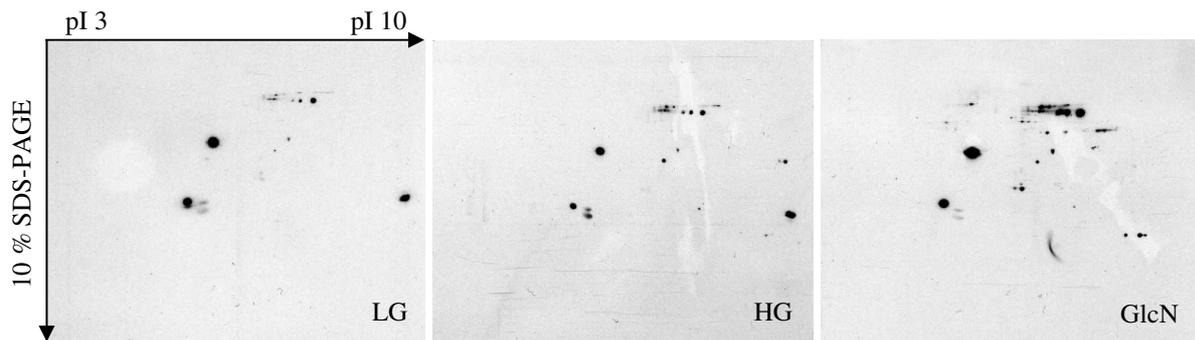
**Abbildung 36: Analyse der O-GlcNAc-Modifikation von 2D-aufgetrennten Proteinen der cytosolischen Fraktion aus HEK-Zellen nach Kultivierung mit LG, HG und GlcN**

Je 100 µg der cytosolischen Fraktion wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 3-10 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurden nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem Antikörper CTD 110.6 und POD-konjugiertem anti-Maus-Zweitantikörper detektiert. Gezeigt sind die Western Blots eines Versuchs von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Die Kontrolle (LG) zeigt eine schwächere O-GlcNAc-Modifikation der Proteine als die Kultivierung mit HG und GlcN.

LG: 5 mM Glucose, HG: 20 mM Glucose, GlcN: 10 mM Glucosamin

Die 2D-Analyse der O-GlcNAc-modifizierten cytosolischen Proteine der HEK-Zellen zeigt nach Kultivierung in LG-Medium wenige Signale, jedoch ist nach HG-Kultivierung ein Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine zu beobachten. Einige Proteine, die auch in der Kontrolle O-GlcNAc-modifiziert sind, zeigen nun eine Höherglykosylierung. Auch die GlcN-Kultivierung führt zu einem Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine. Vor allem im basischen Bereich treten mehr O-GlcNAc-modifizierte Proteine nach HG- und GlcN-Kultivierung auf. Im Gegensatz zur Kontrolle sind auch Proteine mit einem MW kleiner 70 kDa O-GlcNAc-modifiziert.

Die folgende Abbildung zeigt, dass es auch in der nukleären Fraktion der HEK-Zellen zu einem Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine kommt (s. Abbildung 37).



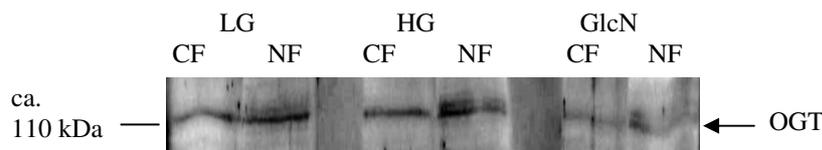
**Abbildung 37: Analyse der O-GlcNAc-Modifikation von 2D-aufgetrennten Proteinen der nukleären Fraktion aus HEK-Zellen nach Kultivierung mit LG, HG und GlcN**

Je 100 µg der nukleären Fraktion wurden mit 2-DE im pH-Gradienten 3-10 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurden nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem Antikörper CTD 110.6 und POD-konjugiertem anti-Maus-Zweitantikörper detektiert. Gezeigt sind die Western Blots eines Versuchs von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Nach Kultivierung mit GlcN kommt es zum Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation der nukleären Proteine aus HEK-Zellen. Die Signale der Kontrolle (LG) und HG-Kultivierung zeigen keine Unterschiede in der Stärke der O-GlcNAc-Modifizierung der Proteine. LG: 5 mM Glucose, HG: 20 mM Glucose, GlcN: 10 mM Glucosamin

Die nukleäre Fraktion zeigt nur nach GlcN-Kultivierung einen Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine. Die O-GlcNAc-Modifikation der Proteine, die auch in der Kontrolle oder unter HG-Bedingungen zu erkennen sind, ist unter GlcN-Bedingungen stärker und es sind weitere O-GlcNAc-modifizierte Proteine im basischen Bereich vertreten. Die Anzahl der O-GlcNAc-modifizierten Proteine in der Kontrolle und HG-Kultivierung sind etwa gleich, jedoch ist die Intensität für einige Proteine unter HG-Einfluss stärker.

Nach der 2D-O-GlcNAc-Analyse wurden die Proteine mit Indian Ink angefärbt. Es wurden gleiche Proteinmengen aufgetrennt, so dass Unterschiede in der Intensität der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine nicht auf unterschiedliche Proteinmengen zurückzuführen sind (Abbildung nicht gezeigt).

In der cytosolischen und nukleären Fraktion der 1D-aufgetrennten Proteine der HEK-Zellen sind mit dem Antikörper AL25 und dem POD-konjugierten anti-Kaninchen-Zweitantikörper keine Unterschiede in der OGT-Expression zu erkennen (s. Abbildung 38), womit das Ergebnis der indirekten Immunfluoreszenzanalyse (s. Abbildung 35) nicht bestätigt werden kann.



**Abbildung 38 Analyse der cytosolischen und nukleären OGT-Expression in HEK-Zellen nach Kultivierung mit LG, HG und Glucosamin**

Je 15 µg der cytosolischen und nukleären Fraktion wurden mit 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt. Die Expression der OGT wurde nach Transfer auf Nitrocellulose mit dem Antikörper AL25 und POD-konjugiertem anti-Kaninchen-Zweitantikörper detektiert. Gezeigt sind die Western Blots eines Versuchs von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Es sind Ausschnitte der Blots dargestellt, die die OGT mit einem apparenten MW von 110 kDa zeigen, welche mit einem Pfeil markiert ist.

LG: 5 mM Glucose, HG: 20 mM Glucose, GlcN: 10 mM Glucosamin, CF: cytosolische Proteinfraction, NF: nukleäre Proteinfraction

Aufgrund der vielen unspezifischen Reaktionen des polyklonalen Antikörpers AL25 und der fortwährenden Hintergrundbildung ist der Nachweis der OGT auch hier nicht einwandfrei. Für die cytosolische Fraktion der drei Kultivierungsansätze wird die OGT etwa gleich stark exprimiert. Die densitometrische Auswertung mittels Image J zeigt einen leichten Anstieg der Intensität nach HG-Kultivierung an, der jedoch nicht signifikant ist. In den nukleären Fraktion wird eine weitere OGT-Bande oberhalb der cytosolischen Bande detektiert. Nach HG-Kultivierung kommt es zu einer Intensitätszunahme dieser Bande. Die Bande zeigt nach GlcN-Kultivierung eine Abnahme des Signals, was aber wohl eher auf ungleichmäßig verteilte Chemilumineszenzlösung zurückzuführen ist.

### 3.5 Massenspektrometrische Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Proteine aus HUVEC und SkMC

In dieser Arbeit wurden Proteine aus HUVEC bzw. SkMC nach LG- und HG-Kultivierung in An- und Abwesenheit von PUGNAc mit 2-DE aufgetrennt und die O-GlcNAc-Modifikation mit dem Antikörper CTD 110.6 nachgewiesen.

#### 3.5.1 Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Proteine aus HUVEC

Zunächst wurden die Zelllysate nach Kultivierung in LG- oder HG-Medium in Ab- und Anwesenheit von 50 bzw. 200 µM PUGNAc (LGP/HGP) mit 2-DE im pH-Gradienten 4-7 bzw. 6-11 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Proteinspots, die zuvor mittels Western Blot Analyse als O-GlcNAc-modifiziert identifiziert worden waren (s. Abbildung 23 und Abbildung 25), wurden nach In-Gel-Trypsinverdau mit MALDI-TOF- oder ESI-MS analysiert. Mithilfe des MASCOT Peptide Mass Fingerprint und des MS/MS Ions Search sowie der Swiss-Prot Datenbank erfolgte die Zuordnung der Proteine. Insgesamt wurden 32 Spots ausgewertet und 24 Proteine identifiziert (s. Tabelle 10).

**Tabelle 10: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine aus HUVEC**

Nr.	Name	Funktion	MW (Da)/ pI	Score	Sequenz-abdeckung (%)	Lokalisation	O-GlcNAc ↑ oder ↓ (im Vergleich mit LG)			bereits als O-GlcNAcyliert beschrieben
							HG	HGP	LGP	
2	Heat shock cognate 71 kDa protein	Chaperon, katalysiert Disulfidbrücken	70898/ 5.37	54	20	Cytosol	↑	-	-	Guinez et al. 2006
2	Heat shock cognate 71 kDa protein	Chaperon, katalysiert Disulfidbrücken	70898/ 5.37	684	52	Cytosol	↑	-	-	Guinez et al. 2006
3	Stress-70 protein, mitochondrial	Zellproliferation und – altern, Chaperon	73680/ 5.87	70	33	Mitochondrien	↑	↓	↓	-
4	Protein disulfide-isomerase A3	katalysiert Disulfidbrücken	56782/ 5.98	101	29	ER	↑	↑	↑	Shimoji et al. 2010
5	T-complex protein 1 subunit epsilon	Chaperon	60089/ 5.45	288	40	Cytosol	↑	↑	↑	Shimoji et al. 2010
6	60 kDa heat shock protein	Chaperon	61187/5.70	66	36	Mitochondrien	↑	↑	↑	Kim et al. 2006c
7	Vimentin	Strukturbestandteil des Cytoskeletts	53651/5.06	811	55	Cytosol	↓	↓	↓	Wang et al. 2007
8	Vimentin	Strukturbestandteil des Cytoskeletts	53651/ 5.06	119	38	Cytosol	↓	↓	↓	Wang et al. 2007
8	Tubulin alpha-1A chain	Hauptbestandteil der Mikrotubuli	50788/ 4.94	61	47	Mikrotubuli	↓	↓	↓	Walgren et al. 2003
10	Calreticulin	Chaperon	48141/ 4.29	62	24	Cytosol, ER	↑	-	-	Sprung et al. 2005
11	Tubulin beta chain	Hauptbestandteil der Mikrotubuli	50095/ 4.78	123	57	Mikrotubuli	↓	↓	↓	Wang et al. 2007

Tabelle 10 (Fortsetzung)

Nr.	Name	Funktion	MW (Da)/ pI	Score	Sequenz- abdeckung (%)	Lokalisation	O-GlcNAc ↑ oder ↓ (im Vergleich mit LG)			bereits als O-GlcNAcyliert beschrieben
							HG	HGP	LGP	
12	ATP-Synthase subunit beta, mitochondrial	mitochondriale ATP- Synthase	56559/ 5.26	119	50	Mitochondrien, Membran	↑	↑	↑	Park et al. 2007
13	Protein disulfide-isomerase A6	katalysiert Disulfidbrücken	48121/ 4.95	457	49	ER	↓	↑	↑	-
14	Thioredoxin domain- containing protein 5	katalysiert Disulfidbrücken	47628/ 5.63	342	46	ER	↑	↑	↑	-
16	Actin, cytoplasmic 1 Actin, cytoplasmic 2	Zellmotilität	42052/ 5.29 42108/ 5.31	391	24	Cytosol, Cytoskelett	-	-	-	Hédou et al. 2007
17	Ubiquitin carboxyl- terminal hydrolase isozyeme L1	prozessiert Ubiquitinvor- läufer und ubiquitinierte Proteine	24824/ 5.33	111	16	Cytosol, Nukleus	↓	↑	↑**	Cole und Hart 2001
19	Gluthatione S-transferase P	RX + Glutathion ⇒ HX + R-S-Glutathion	23355/ 5.40	58	27	Cytosol	↓	↑	↓	-
20	Heat shock protein beta-1	Actinorganisation, Stressresistenz	22782/ 5.98	110	41	Cytosol, Nukleus, Cytoskelett	-	-	-	Roquemore et al. 1992
25	Pyruvate kinase isozyeme M1/M2	ADP + Phosphoenolpyruvat ⇒ ATP + Pyruvat	58480/ 7.96	592	29	Cytosol, Nukleus	↑	↑	↑	Wells et al. 2002
28	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	RNA-Bindung, prä- mRNA-Spleißen	39799/ 9.10	181	21	Nukleus, Spleißosom	↑	↓	↓	-
28	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3	RNA-Bindung, prä- mRNA-Spleißen	39799/ 9.10	187	22	Nukleus, Spleißosom	↑	↓	↓	-

Tabelle 10 (Fortsetzung)

Nr.	Name	Funktion	MW (Da)/ pI	Score	Sequenz- abdeckung (%)	Lokalisation	O-GlcNAc ↑ oder ↓ (im Vergleich mit LG)			bereits als O- GlcNAcyliert beschrieben
							HG	HGP	LGP	
29	Receptor for activated C kinase	verankert PKC im Cytoskelett	35511/ 7.60	377	35	Membran	↑	↑	↑	Ohn et al. 2008
30	Pyrraline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial	1-Pyrrolin-5-Carboxylat + NAD(P)H ⇒ L-Prolin + NAD(P) <sup>+</sup>	33572/ 7.18	66	22	Mitochondrien	↑	↑	↓	-
31	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycerinaldehyd-3-Phosphat + Pi + NAD <sup>+</sup> ⇌ 1,3-Bisphosphoglycerat + NADH+H <sup>+</sup>	36201/ 8.57	478	45	Cytosol, Mitochondrien	↑**	↑	↑	Wells et al. 2002
32	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	RNA-Transport zw. Nukleus und Cytosol, RNA-Spleißen	38936/ 9.26	397	27	Nukleus, Spleißosom, Cytosol	↑	↓	↓	Wang et al. 2007
32	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	RNA-Transport zw. Nukleus und Cytosol, RNA-Spleißen	38936/ 9.26	444	29	Nukleus, Spleißosom, Cytosol	↑	↓	↓	Wang et al. 2007

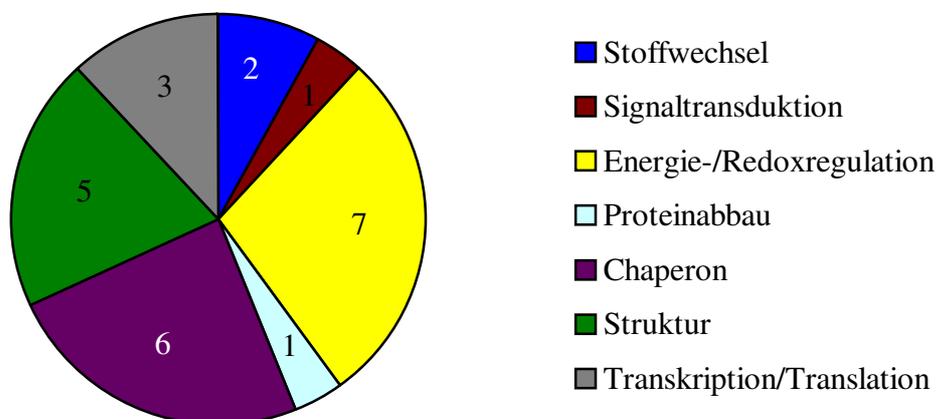
**Tabelle 10: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine aus HUVEC**

Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus HUVEC wurden aus Coomassie gefärbten Gelen ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und mittels MALDI-TOF- und ESI-MS über MASCOT Peptide Mass Fingerprint oder MS/MS Ions Search und der Swiss-Prot Datenbank zugeordnet. Die Nummerierung der Proteine entspricht Abbildung 23 und Abbildung 25. Signifikante Änderungen der O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrolle sind mit \* gekennzeichnet: \* p<0.05, \*\* p<0.01

Da zum Teil Spotreihen in den Gelen auftraten, wurden auch sehr nahe neben- oder übereinanderliegende Proteine getrennt ausgeschnitten. Sie sind teilweise unter einer Nummer in der Tabelle aufgeführt. Es handelt sich meistens um das selbe Protein, wie z.B. bei Spot 28 dem heterologen Kernribonukleoprotein A3, das in zwei Isoformen mit unterschiedlichen pIs O-GlcNAc-modifiziert vorliegt. Mithilfe der massenspektrometrischen Analyse wird nur die gemessene Masse erfasst, der angegebene pI ist theoretisch und der Swiss-Prot Datenbank entnommen. In der 2D-Auftrennung sind die beiden Isoformen deutlich zu unterscheiden (s. Abbildung 25). Für Spot 30 liegen zwei Proteine vor, die mitochondriale Pyrrolin-5-carboxylatreduktase 1 und das spannungsabhängige Anionenkanalprotein 2. Der pI und das apparente MW der Proteine liegen nah beieinander. Beim Vergleich mit Abbildung 25 ist deutlich zu erkennen, dass sich die Proteine zwei nah beieinander vorkommenden Proteinspots zuordnen lassen. Die mitochondriale Pyrrolin-5-carboxylatreduktase 1 mit dem niedrigeren pI und höherem MW liegt links oberhalb des spannungsabhängigen Anionenkanalprotein 2.

Wird die Intensität der einzelnen Spots densitometrisch mittels Image J ausgewertet und mit Hilfe eines one-way ANOVA Tests statistisch analysiert, so ist nur nach LGP-Kultivierung für das Isoenzym der carboxyterminalen Ubiquitinhydrolase L1 (Spot 17) und nach HG-Kultivierung für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Spot 31) jeweils eine hoch signifikante Zunahme ( $p < 0.01$ ) in der Intensität des O-GlcNAc-Spots im Vergleich zur Kontrolle nachzuweisen. Die Intensität des korrespondierenden Spots der Kontrolle = 100 % gesetzt.

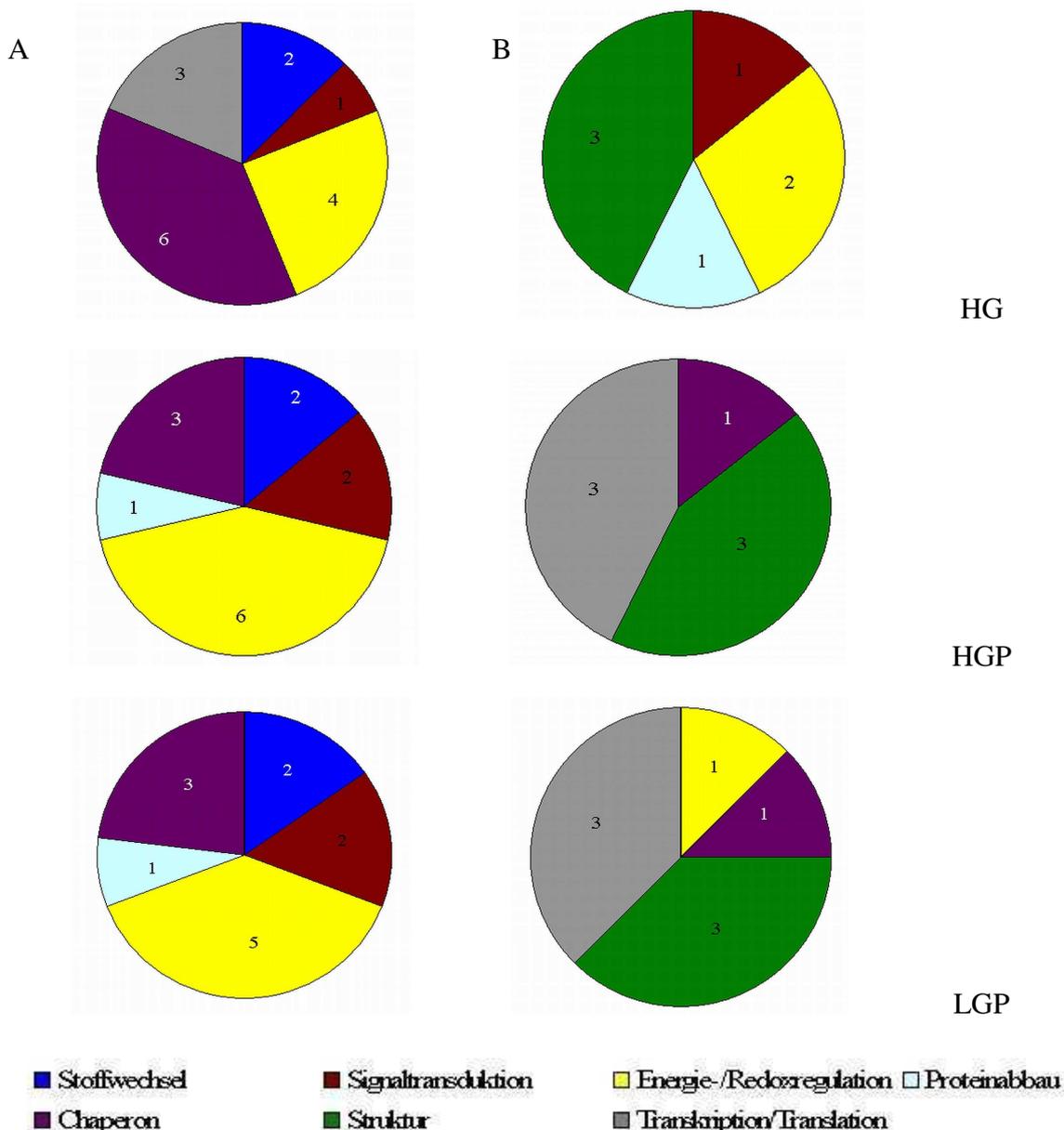
Alle 24 identifizierten Proteine aus HUVEC wurden entsprechend ihrer Funktion in Gruppen eingeteilt: Stoffwechsel, Signaltransduktion, Energie-/Redoxregulation, Proteinabbau, Chaperon, Struktur und Transkription/Translation (s. Abbildung 39). Die Informationen zu den Funktionen der Proteine wurden der Swiss-Prot Datenbank entnommen.



**Abbildung 39: Funktionelle Klassifizierung der O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus HUVEC**

Sieben der identifizierten Proteine haben eine Funktion in der Energie-/Redoxregulation, sechs sind Chaperone und fünf sind Strukturproteine. Nur drei Proteine sind in der Transkription/Translation von Bedeutung und zwei Proteine sind im Stoffwechsel involviert. Je ein Protein wird der Signaltransduktion und dem Proteinabbau zugeordnet. Einige Proteine üben mehr als eine Funktion aus und sind daher mehrfach gezählt worden.

Des weiteren wurde untersucht, ob Proteine einer bestimmten Funktion nach Inkubation in HG-, HGP- oder LGP-Medium eine gesteigerte oder verringerte O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrollkultivierung zeigen (s. Abbildung 37).



**Abbildung 40: Funktionelle Klassifizierung der gesteigerten oder verminderten O-GlcNAc-Modifikation der Proteine aus HUVEC in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen**

Die Intensität der O-GlcNAc-modifizierten Proteine nach HG-, HGP- und LGP-Kultivierung wurde mit der der Kontrolle (LG) verglichen.

A: gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation, B: verringerte O-GlcNAc-Modifikation der Proteine

Die Diagramme (s. Abbildung 40) zeigen, dass nicht einheitlich davon ausgegangen werden kann, dass Proteine einer bestimmten Funktion generell stärker oder schwächer O-GlcNAc-modifiziert werden. Auffallend ist, dass unter HG-, HGP- und LGP-Einfluss die identifizierten Proteine des Stoffwechsels sowie fast alle Chaperone stärker O-GlcNAc-modifiziert werden. Auch kommt es unter PUGNAc-Einfluss zu einer verminderten O-GlcNAc-Modifizierung der identifizierten Proteine der Transkription/Translation, die jedoch durch Kultivierung mit HG-Medium gesteigert ist. PUGNAc führt zu einer gesteigerten Modifikation der Proteine der Energie-/Redoxregulation, der Signaltransduktion sowie des Proteinabbaus. Die Strukturproteine sind nach allen Behandlungen schwächer O-GlcNAc-modifiziert als in der Kontrolle. Anzumerken bleibt, dass einige Proteine keine Unterschiede in der O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrolle zeigen.

Viele der identifizierten Proteine sind in der Literatur bereits als O-GlcNAc-modifiziert beschrieben, daher wird nachfolgend nur auf bisher nicht O-GlcNAc-modifiziert beschriebene Proteine eingegangen. Beispielhaft wird für die  $\beta$ -Untereinheit 2-wie 1 des Guaninnukleotid-Bindeproteins (Spot 29, Tabelle 10) die Aminosäuresequenz (ASS) gezeigt. Die nach MS-Analyse gefundenen Peptide wurden in der ASS rot markiert, die potentiellen O-GlcNAcylierungsstellen wurden mit Hilfe der YinOYang-Software ermittelt und fett unterstrichen gekennzeichnet. Serine/Threonine, welche entweder O-GlcNAc-modifiziert oder phosphoryliert vorliegen können, sind zusätzlich kursiv gedruckt.

1 MTEQMTLRGT LKGHNWVTQ IATTPQFPDM ILSASRDKTI IMWKLTRDET  
 51 NYGIPQRALR GHSHFVSDVV ISSDGDQFALS GSWDGTLRLW DLTTGTTTRR  
 101 FVGHTKDVLS VAFSSDNRQI VSGSRDKTIK LWNTLGVCKY TVQDESHSEW  
 151 VSCVRFSPNS SNPIIVSCGW DKLVKVNLA NCKLKTNHIG HTGYLNTVTV  
 201 SPDGSLCASG GKDGQAMLWD LNEGKHLTYL DGGDIINALC FSPNRYWLCA  
 251 ATGPSIKIWD LEGKIIVDEL KQEVISTSSK AEPPQCTSLA WSADGQTLFA  
 301 GYTDNLVRVW QVTIGTR

Es wurden 19 passende Peptide gefunden. Die Sequenzabdeckung betrug 35 %.

### 3.5.2 Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Proteine der SkMC

#### 3.5.2.1 Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Proteine aus der nukleären Fraktion der SkMC

Die nukleäre Proteinfraction der SkMC wurde nach LG- oder HG-Kultivierung in Ab- und Anwesenheit von 40  $\mu$ M PUGNAc (LGP/HGP) mit 2-DE im pH-Gradienten 4-7 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die als O-GlcNAc-modifiziert identifizierten korrespondierenden Proteinspots (s. Abbildung 29) wurden nach In-Gel-Trypsinverdau mit ESI-MS analysiert. Mithilfe des MASCOT MS/MS Ions Search und der Swiss-Prot Datenbank erfolgte die Zuordnung der Proteine. Insgesamt wurden 18 Spots ausgewertet und 10 Proteine identifiziert (s. Tabelle 11).

**Tabelle 11: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine aus der nukleären Fraktion der SkMC**

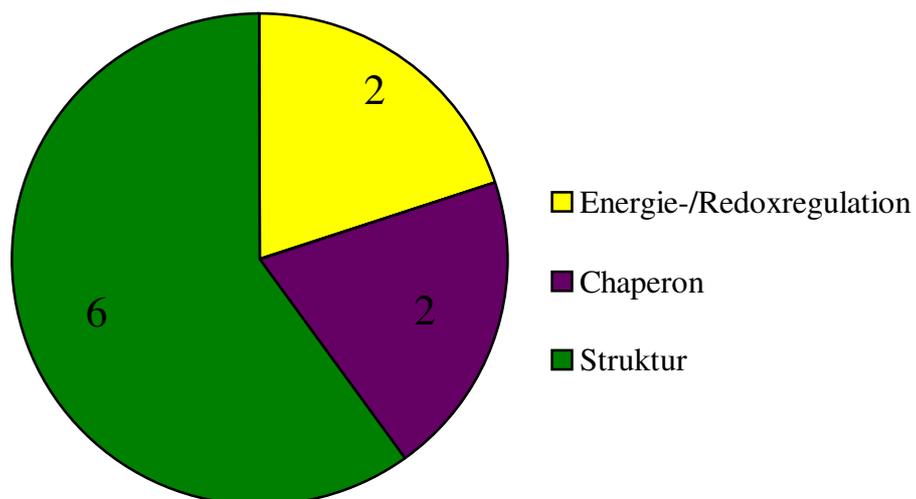
Nr.	Name	Funktion	MW (Da)/ pI	Score	Sequenz-abdeckung (%)	Lokalisation	O-GlcNAc ↑ oder ↓ (im Vergleich mit LG)			bereits als O-GlcNAcyliert beschrieben
							HG	HGP	LGP	
2	Protein disulfide-isomerase	katalysiert Disulfidbrücken, Chaperon	57480/ 4.76	130	5	ER	↑	↑	↑	Sprung et al. 2005
3	Tubulin beta-2A chain	Hauptbestandteil der Mikrotubuli	50274/ 4.78	45	3	Mikrotubuli	↑	↑	↓	Wang et al. 2007
4	ATP-Synthase subunit beta, mitochondrial	mitochondriale ATP-Synthase	56525/ 5.26	223	12	Membran, Mitochondrien	↑*	↑	↓	Park et al. 2007
6	60 kDa heat shock protein	Chaperon	61187/ 5.70	38	7	Mitochondrien	↑	↑	-	Kim et al. 2006c
7	Vimentin	Strukturbestandteil des Cytoskeletts	53676/ 5.06	230	19	Cytosol	↑	-	↑	Wang et al. 2007
8	Protein disulfide-isomerase A3	katalysiert Disulfidbrücken	57146/ 5.98	112	2	ER	↓	↓	↓	Shimoji et al. 2010
10	Actin, alpha skeletal muscle	Zellmotilität	42366/ 5.23	437	23	Cytosol, Cytoskelett	↑	-	↑	Hédou et al. 2007
10	Actin, cytoplasmic 1	Zellmotilität	42052/ 5.29	271	20	Cytosol, Cytoskelett	↑	-	↑	Hédou et al. 2007
10	Actin, aortic smooth muscle	Zellmotilität	42381/ 5.23	69	13	Cytosol, Cytoskelett	↑	-	↑	Hédou et al. 2007
12	Desmin	Typ 3-Intermediärfilament	53560/ 5.21	1030	42	Cytosol	↑	↑	-	Jones et al. 2008
13	Desmin	Typ 3-Intermediärfilament	53560/ 5.21	128	11	Cytosol	↑	↑	-	Jones et al. 2008
14	Desmin	Typ 3-Intermediärfilament	53560/ 5.21	895	37	Cytosol	↑	↑	↑	Jones et al. 2008

**Tabelle 11: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine aus der nukleären Fraktion der SkMC**

Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus HUVEC wurden aus Coomassie gefärbten Gelen ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und mittels ESI-MS über MS/MS Ions Search und der Swiss-Prot Datenbank zugeordnet. Die Nummerierung der Proteine entspricht Abbildung 30. Signifikante Änderungen der O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrolle sind mit \*gekennzeichnet: \* p<0.05, \*\* p<0.01

Da zum Teil Spotreihen in den Gelen auftraten, wurden sehr nahe neben- oder übereinanderliegende Proteine getrennt ausgeschnitten. Für Spot 10 sind sie zusammen in der Tabelle aufgeführt, es handelt sich um verschiedene Isoformen des Actins. Für die densitometrische Auswertung der Intensität der O-GlcNAc-Signale mittels Image J wurde die Intensität der O-GlcNAc-Signale der Spots bei LG-Kultivierung = 100 % gesetzt. Nach statistischer Auswertung der Intensitäten der einzelnen O-GlcNAc-positiven Spots mit Hilfe eines one-way ANOVA Tests konnte für die mitochondriale  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase (Spot 4) und Spot 18 eine signifikante Zunahme ( $p < 0.05$ ) und für Spot 15 eine hoch signifikante Zunahme ( $p < 0.01$ ) nach HG-Kultivierung im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. Für Spot 15 ist eine signifikante Abnahme ( $p < 0.05$ ) nach LGP-Kultivierung und eine hoch signifikante Abnahme ( $p < 0.01$ ) nach HGP-Kultivierung im Vergleich zur Kontrolle nachzuweisen. Die Spots 15 und 18 konnten mittels MS-Analyse nicht identifiziert werden.

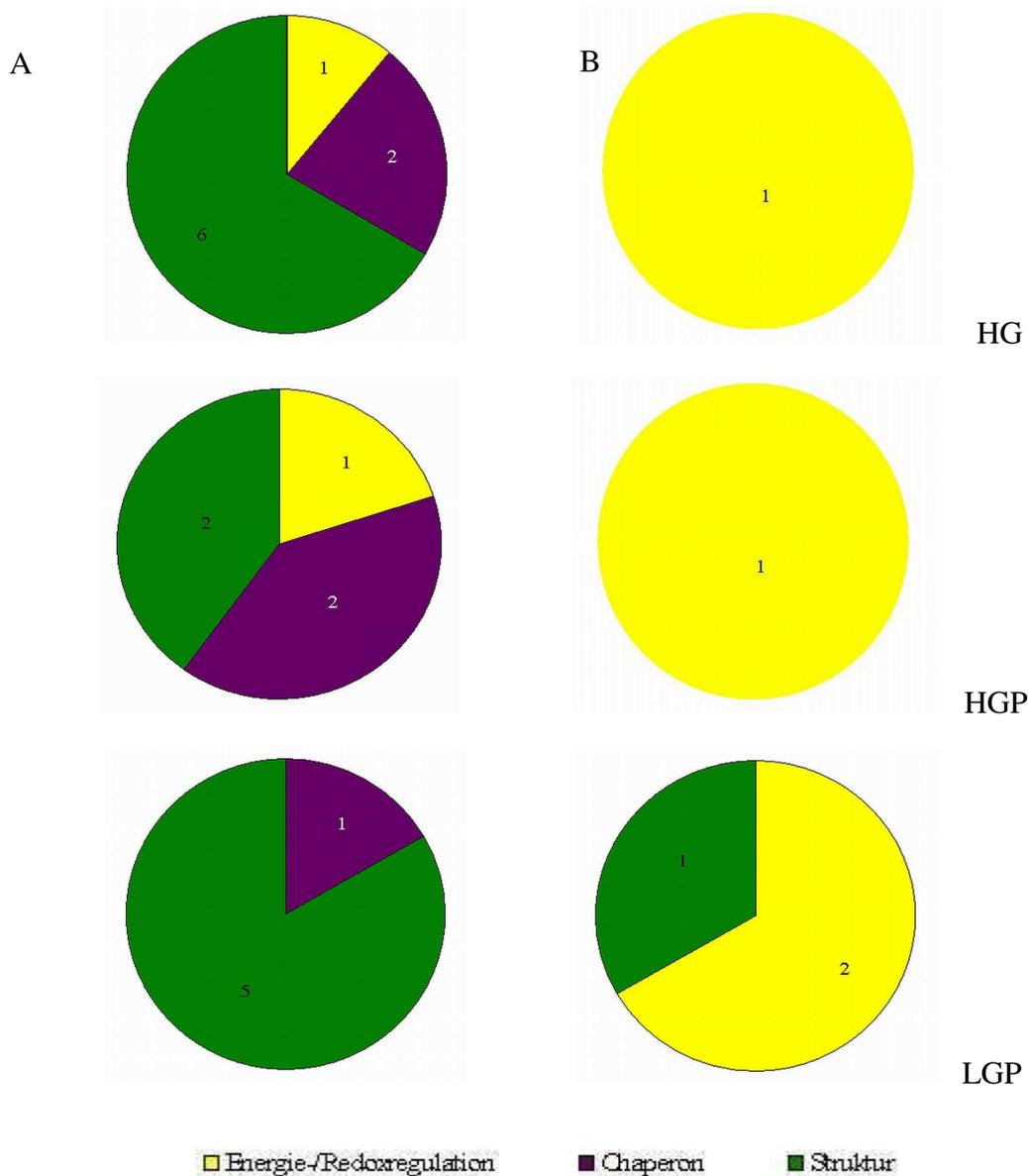
Die zehn identifizierten Proteine wurden entsprechend ihrer Funktion eingruppiert: Energie-/Redoxregulation, Chaperon und Struktur.



**Abbildung 41: Funktionelle Klassifizierung der O-GlcNAc-modifizierten, nukleäre Proteine aus SkMC**

Von den zehn identifizierten Proteinen sind je zwei Proteine in der Energie-/Redoxregulation und als Chaperon aktiv und sechs sind Strukturproteine.

Des weiteren wurde unterschieden, ob die Proteine einer bestimmten Funktion nach Inkubationen in HG-, HGP- oder LGP-Medium eine gesteigerte oder verringerte O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrollkultivierung zeigen.



**Abbildung 42: Funktionelle Klassifizierung der gesteigerten oder verminderten O-GlcNAc-Modifikation der Proteine aus der nukleären Fraktion der SkMC in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen**

Die Intensität der O-GlcNAc-modifizierten Proteine nach HG-, HGP- und LGP-Kultivierung wurde mit der der Kontrolle (LG) verglichen.

A: gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation, B: verringerte O-GlcNAc-Modifikation der Proteine

Die Diagramme zeigen für die Chaperone und fast alle Strukturproteine eine Zunahme der O-GlcNAc-Modifikation. Die Intensität der O-GlcNAc-Modifikation einiger Isoformen der Strukturproteine ist unverändert im Vergleich zur Kontrolle. Auffällig ist, dass unter HG-/HGP-Einfluss ein Protein der Redoxregulation, die Proteindisulfidisomerase A3, schwächer O-GlcNAc-modifiziert ist, alle weiteren identifizierten Proteine sind stärker O-GlcNAc-modifiziert (s. Abbildung 29).

Alle identifizierten Proteine der nukleären Proteinfraction sind in der Literatur bereits als O-GlcNAc-modifiziert beschrieben, daher wird folgend beispielhaft die ASS der  $\beta$ -Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase (Spot 4) dargestellt. Der Spot zeigte nach HG-

Kultivierung eine signifikante Zunahme der O-GlcNAc-Intensität. Die nach MS-Analyse gefundenen Peptide wurden in der ASS rot markiert. Die potentiellen O-GlcNAcylierungsstellen wurden mit Hilfe der YinOYang-Software ermittelt und sind fett unterstrichen gekennzeichnet. Serine/Threonine, welche entweder O-GlcNAc-modifiziert oder phosphoryliert vorliegen können, sind zusätzlich kursiv gedruckt.

1 MLGFVGRVAA APASGALRRL TPSASLPPAQ LLLRAAPTAV HPVRDYAAQT  
 51 SPSPKAGAAT GRIVAVIGAV VDVQFDEGLP PILNALEVQG RETRLVLEVA  
 101 QHLGESTVRT IAMDGTEGLV RGQKVLDSGA PIKIPVGPET LGRIMNVIGE  
 151 PIDERGPIKT KQFAPIHAEA PEFMEMSVEQ EILVTGIKVV DLLAPYAKGG  
 201 KIGLFGGAGV GKTVLIMELI NNVAKAHGGY SVFAGVGERT REGNDLYHEM  
 251 IESGVINLKD ATSKVALVYG QMNEPPGARA RVALTGLTVA EYFRDQEGQD  
 301 VLLFIDNIFR FTQAGSEVSA LLGRIPSAVG YQPTLATDMG TMQERITTTK  
 351 KGSITSVQAI YVPADDLTDP APATTFAHLD ATTVLSRAIA ELGIYPAVDP  
 401 LDSTSRIMDP NIVGSEHYDV ARGVQKILQD YKSLQDIIAI LGMDELSEED  
 451 KLTVSRARKI QRFLSQPFQV AEVFTGHMKG LVPLKETIKG FQQILAGEYD  
 501 HLPEQAFYMV GPIEEAVAKA DKLAEEHSS

Es wurden fünf passende Peptide gemessen. Die Sequenzabdeckung beträgt 12 %. Keine identifizierte Peptidsequenz entsprach einer der Sequenzen, die eine potentielle O-GlcNAcylierungsstelle aufweisen.

### 3.5.2.2 Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Proteine aus der cytosolischen Fraktion der SkMC

Die cytosolische Proteinfraction der SkMC wurde mit 2-DE im pH-Gradienten 4-7 bzw. 6-11 und in 10 %igen SDS-Gelen aufgetrennt und Coomassie gefärbt. Die Proteinspots, die zuvor mittels Western Blot Analyse als O-GlcNAc-modifiziert identifiziert worden waren (s. Abbildung 31 und Abbildung 33), wurden nach In-Gel-Trypsinverdau mit ESI-MS analysiert. Mithilfe des MASCOT MS/MS Ions Search und der Swiss-Prot Datenbank erfolgte die Zuordnung der Proteine. Insgesamt wurden 35 Spots ausgewertet und 27 Proteine identifiziert (s. Tabelle 12).

Da zum Teil Spotreihen in den Gelen auftraten, wurden auch sehr nahe neben- oder übereinanderliegende Proteine getrennt ausgeschnitten. Sie sind teilweise unter einer Nummer in der Tabelle aufgeführt. Es handelt sich meistens um das selbe Protein, wie z.B. bei Spot 51 der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, die in drei Isoformen mit unterschiedlichen pIs vorliegt. Für Spot 47 liegen zwei Proteine vor, die putative Chinonoxidoreduktase und die cytosolische Malatdehydrogenase. Der pI und das apparente MW der Proteine liegen sehr dicht beieinander. Beim Vergleich mit Abbildung 34 ist deutlich zu erkennen, dass sich die Proteine den zwei benachbarten Proteinspots zuordnen lassen. Die Malatdehydrogenase mit dem niedrigeren pI und MW liegt leicht links unterhalb des mit dem Pfeil markierten Proteins, der putativen Chinonoxidoreduktase.

**Tabelle 12: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine aus der cytosolischen Fraktion der SkMC**

Nr.	Name	Funktion	MW (Da)/ pI	Score	Sequenz-abdeckung (%)	Lokalisation	O-GlcNAc ↑ oder ↓ (im Vergleich mit LG)			bereits als O-GlcNAcyliert beschrieben
							HG	HGP	LGP	
20	Heat shock cognate 71 kDa protein	Chaperon	71082/ 5.37	1043	47	Cytosol	↑*	↑	↑	Guinez et al. 2006
21	Stress-70 protein, mitochondrial	Zellproliferation und –altern, Chaperon	73920/ 5.87	1431	43	Mitochondrien	↑	↑	↑	-
22	Gelsolin	Aktinfilamentbildung	86043/ 5.90	365	36	Cytosol, Cytoskelett	↓	↑	↑	-
23	Serum albumin Bos Taurus		71244/ 5.82	100	11	Medium	-	-	-	-
23	Serum albumin Bos Taurus		71244/ 5.82	301	27	Medium	-	-	-	-
23	Serum albumin Bos Taurus		71279/ 5.82	203	28	Medium	-	-	-	-
26	Retinal dehydrogenase 1	Retinal + NAD <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O ⇌ Retinsäure + NADH	55454/ 6.30	640	34	Cytosol	↓	↑*	↓	-
27	Stress-induced phosphoprotein 1	HSC70-HSP90 Multichaperon	63227/ 6.40	347	21	Cytosol	↓	↑	↑	Dehennaut et al. 2008b
28	78 kDa glucose-regulated protein	Proteinkomplexbildung	72402/ 5.07	1370	43	ER	↑**	↑*	↑*	Dapron et al.
30	Protein disulfide-isomerase A3	katalysiert Disulfidbrücken	57146/ 5.98	1143	58	ER	↑*	↑*	↑	Shimoji et al. 2010
31	Retinal dehydrogenase 1	Retinal + NAD <sup>+</sup> + H <sub>2</sub> O ⇌ Retinsäure + NADH	55454/ 6.3	970	44	Cytosol	↑	↑	↑	-
33	Actin, alpha skeletal muscle	Zellmotilität	42366/ 5.23	110	27	Cytosol, Cytoskelett	-	↓	↓	Hédou et al. 2007
33	Actin, alpha skeletal muscle	Zellmotilität	42366/ 5.23	133	21	Cytosol, Cytoskelett	-	↓	↓	Hédou et al. 2007
33	Actin, alpha cardiac muscle	Zellmotilität	42334/ 5.23	164	41	Cytosol, Cytoskelett	-	↓	↓	Hédou et al. 2007
33	Actin, cytoplasmic 1	Zellmotilität	42058/ 5.29	385	56	Cytosol, Cytoskelett	-	↓	↓	Hédou et al. 2007

Tabelle 12 (Fortsetzung)

Nr.	Name	Funktion	MW (Da)/ pI	Score	Sequenz-abdeckung (%)	Lokalisation	O-GlcNAc ↑ oder ↓ (im Vergleich mit LG)			bereits als O-GlcNAcyliert beschrieben
							HG	HGP	LGP	
34	Creatine kinase B-type	ATP + Kreatin $\Leftrightarrow$ ADP + Phosphokreatin	42902/ 5.34	594	65	Cytosol	↑	↑	↑	-
35	Tropomyosin beta chain	Aktinbindung, Muskelkontraktion	32945/ 4.66	919	52	Cytosol, Cytoskelett	↑**	↓	↑**	Hédou et al. 2009
36	Tropomyosin alpha-4 chain	Aktinbindung, Muskelkontraktion	28619/ 4.67	432	41	Cytosol, Cytoskelett	-	↑	-	Hédou et al. 2009
37	Peroxiredoxin-6	2 R'-SH + ROOH $\Rightarrow$ R'-S-S-R' + H <sub>2</sub> O + ROH	25133/ 6.00	879	82	Cytosol	↓	↓	-	-
37	Heat shock protein beta-1	Stressresistenz, Actinorganisation	22826/ 5.98	458	94	Cytosol, Nukleus, Cytoskelett	↓	↓	-	Roquemore et al. 1992
38	Protein DJ-1	Chaperon	20050/ 6.33	504	70	Cytosol, Nukleus	↓	↓	↑	-
39	Aconitate hydratase, mitochondrial	Umwandlung von Citrat über cis-Aconitrat zu Isocitrat	86113/ 7.36	406	11	Mitochondrien	↑	-	↑	-
41	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	ADP + Phosphoenolpyruvat $\Rightarrow$ ATP + Pyruvat	58740/ 7.96	742	35	Cytosol, Nukleus	↑	↓	↓	Wells et al. 2002
41	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	ADP + Phosphoenolpyruvat $\Rightarrow$ ATP + Pyruvat	58740/ 7.96	1063	57	Cytosol, Nukleus	↑	↓	↓	Wells et al. 2002
43	Alpha-enolase	2-Phospho-D-glycerat $\Leftrightarrow$ Phosphoenolpyruvat + H <sub>2</sub> O, Transkriptionsrepressor	47481/ 7.01	541	38	Cytosol, Nukleus, Membran	↑	↓	↓	Wells et al. 2002
43	Alpha-enolase	2-Phospho-D-glycerat $\Leftrightarrow$ Phosphoenolpyruvat + H <sub>2</sub> O, Transkriptionsrepressor	47481/ 7.01	726	41	Cytosol, Nukleus, Membran	↑	↓	↓	Wells et al. 2002

Tabelle 12 (Fortsetzung)

Nr.	Name	Funktion	MW (Da)/ pI	Score	Sequenz-abdeckung (%)	Lokalisation	O-GlcNAc ↑ oder ↓ (im Vergleich mit LG)			bereits als O-GlcNAcyliert beschrieben
							HG	HGP	LGP	
44	Beta-enolase	2-Phospho-D-glycerat $\leftrightarrow$ Phosphoenolpyruvat + H <sub>2</sub> O	47244/ 7.59	521	19	Cytosol	↑	↓	↓	Cieniewski-Bernard et al. 2004
44	Alpha-enolase	2-Phospho-D-glycerat $\leftrightarrow$ Phosphoenolpyruvat + H <sub>2</sub> O, Transkriptionsrepressor	47350/ 6.99	1442	62	Cytosol, Nukleus, Membran	↑	↓	↓	Wells et al. 2002
47	Putative quinone oxidoreductase	Generation von reaktiven Sauerstoffradikalen	35685/ 6.67	66	4	Cytosol	↑	↑	↑	-
47	Malate dehydrogenase cytoplasmic	(S)-Malat + NAD <sup>+</sup> $\Rightarrow$ Oxalacetat + NADH + H <sup>+</sup>	36500/ 6.89	79	8	Cytosol	↑	↑	↑	Cieniewski-Bernard et al. 2004
48	Malate dehydrogenase cytoplasmic	(S)-Malat + NAD <sup>+</sup> $\Rightarrow$ Oxalacetat + NADH + H <sup>+</sup>	36631/ 6.91	166	8	Cytosol	↑	↑	↑	Cieniewski-Bernard et al. 2004
49	Fructose-bisphosphate aldolase A	Fructose-1,6-bisphosphat $\leftrightarrow$ Dihydroxyacetonphosphat + Glycerinaldehyd-3-Phosphat	39851/ 8.30	885	57	Cytosol	↑	↑	-	Cieniewski-Bernard et al. 2004
49	Fructose-bisphosphate aldolase A	Fructose-1,6-bisphosphat $\leftrightarrow$ Dihydroxyacetonphosphat + Glycerinaldehyd-3-Phosphat	38851/ 8.30	1113	56	Cytosol	↑	↑	-	Cieniewski-Bernard et al. 2004
50	Triosephosphate isomerase	Dihydroxyacetonphosphat $\leftrightarrow$ Glycerinaldehyd-3-Phosphat	26938/ 6.45	264	29	Cytosol	↓	↓	↓	Cieniewski-Bernard et al. 2004
51	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycerinaldehyd-3-Phosphat + Pi + NAD <sup>+</sup> $\leftrightarrow$ 1,3-Bisphosphoglycerat + NADH+H <sup>+</sup>	36201/ 8.57	462	38	Cytosol, Mitochondrien	↑	↓	↑	Wells et al. 2002

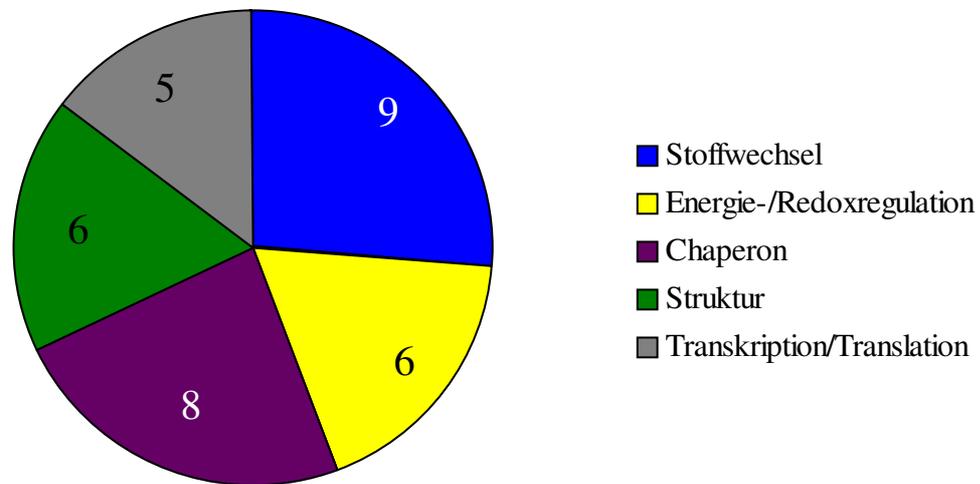
Tabelle 12 (Fortsetzung)

Nr.	Name	Funktion	MW (Da)/ pI	Score	Sequenz- abdeckung (%)	Lokalisation	O-GlcNAc ↑ oder ↓ (im Vergleich mit LG)			bereits als O-GlcNAcyliert beschrieben
							HG	HGP	LGP	
51	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycerinaldehyd-3-Phosphat + Pi + NAD <sup>+</sup> ⇌ 1,3- Bisphosphoglycerat + NADH+H <sup>+</sup>	36201/ 8.57	1240	64	Cytosol, Membran	↑	↓	↑	Wells et al. 2002
51	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycerinaldehyd-3-Phosphat + Pi + NAD <sup>+</sup> ⇌ 1,3- Bisphosphoglycerat + NADH+H <sup>+</sup>	36201/ 8.57	894	55	Cytosol, Membran	↑	↓	↑	Wells et al. 2002
53	Triosephosphate isomerase	Dihydroxyacetonphosphat ⇌ Glycerinaldehyd-3- Phosphat	26938/ 6.45	1212	70	Cytosol	-	↓	↓	Cieniewski- Bernard et al. 2004
54	Peroxiredoxin-1	2 R'-SH + ROOH ⇒ R'-S-S-R' + H <sub>2</sub> O + ROH	22324/ 8.27	607	49	Cytosol	↑	↓	↓	-

**Tabelle 12: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine aus der cytosolischen Fraktion der SkMC**

Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus HUVEC wurden aus Coomassie gefärbten Gelen ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und mittels ESI-MS über MS/MS Ions Search und der Swiss-Prot Datenbank zugeordnet. Die Nummerierung der Proteine entspricht Abbildung 32 und Abbildung 34. Signifikante Änderungen der O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrolle sind mit \*gekennzeichnet: \* p<0.05, \*\* p<0.01

Die 27 identifizierten, cytosolischen Proteine aus SkMC wurden entsprechend ihrer Funktionen in Gruppen eingeteilt.

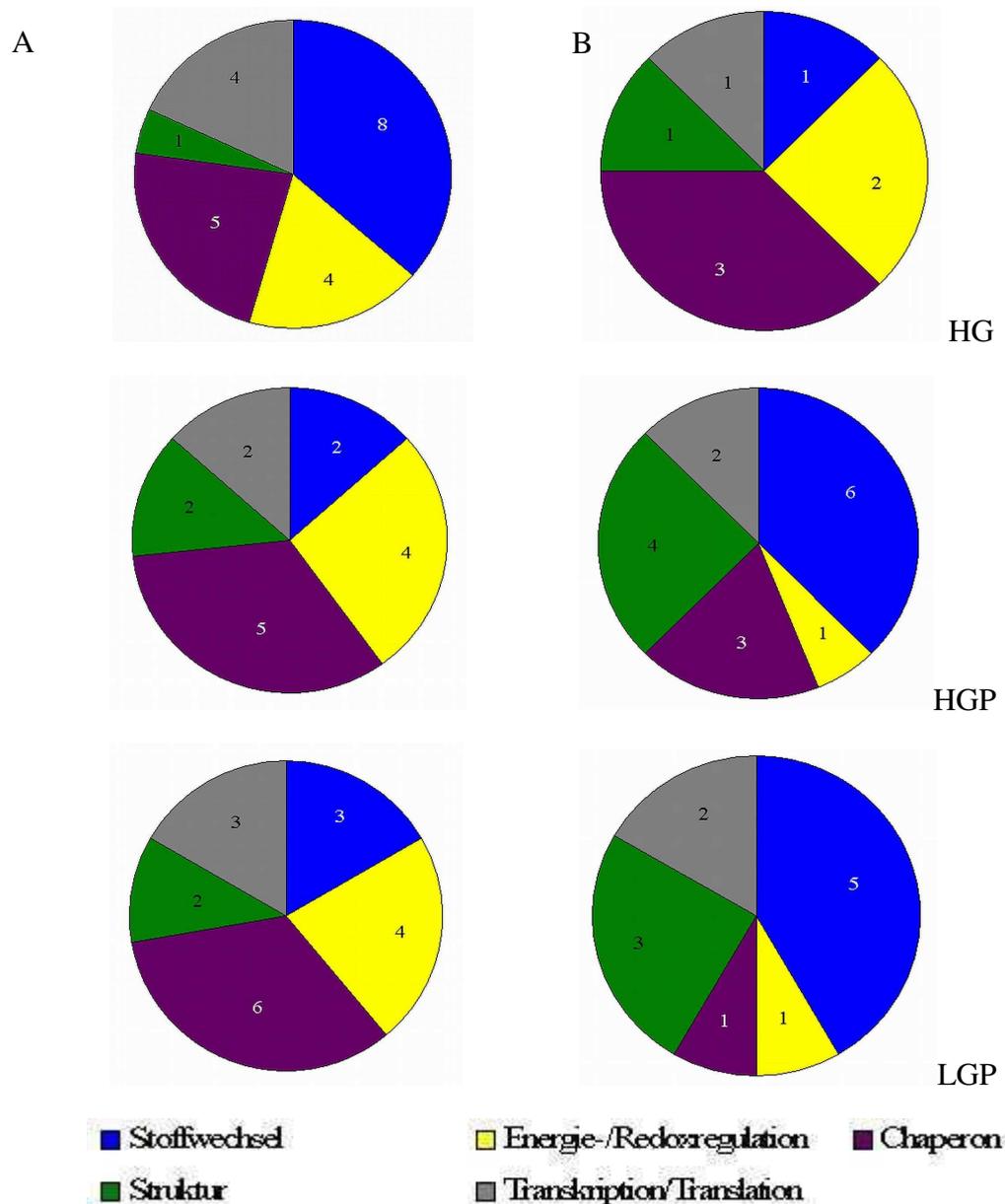


**Abbildung 43: Funktionelle Klassifizierung der O-GlcNAc-modifizierten, cytosolischen Proteine aus SkMC**

Neun der identifizierten O-GlcNAc-modifizierten Proteine sind Proteine des Stoffwechsels und acht sind Chaperone. Werden die Proteine des Stoffwechsels weiter unterteilt, so wurden zwei Proteine des Citratzyklus, sieben Proteine der Glykolyse und vier der Gluconeogenese identifiziert. Jeweils sechs identifizierte Proteine spielen eine Rolle in der Energie-/Redoxregulation und für die Struktur der Zelle. Weitere fünf Proteine üben Funktionen bei der Transkription/Translation aus. Da einige Proteine mehrere Funktionen ausüben können, werden sie mehreren Gruppen zugeordnet. Weiterhin wurde das bovine Serumalbumin identifiziert, was ein Bestandteil des Zellkulturmediums ist. Die Anhäufung dieses Proteins führt zu einer falsch positiven Reaktion mit dem Antikörper CTD 110.6.

Für die densitometrische Auswertung der Intensität der O-GlcNAc-Signale mittels Image J wurde die Intensität des Signals bei LG-Kultivierung = 100 % gesetzt. Die statistische Auswertung mit Hilfe eines one-way ANOVA Tests zeigt für das artverwandte HSP71 (Spot 20), für Spot 24 und die Proteindisulfidisomerase A3 (Spot 30) eine signifikante ( $p < 0.05$ ) und für das 78 kDa Glucose-regulierte Protein (Spot 28) und die  $\beta$ -Kette des Tropomyosins (Spot 35) eine hoch signifikante Zunahme ( $p < 0.01$ ) nach HG-Kultivierung im Vergleich zur Kontrolle. Der Spot 24 konnte mittels MS-Analyse nicht identifiziert werden. Nach HGP-Kultivierung zeigt die Retinaldehydrogenase 1 (Spot 26), das 78 kDa Glucose-regulierte Protein (Spot 28) und die Proteindisulfidisomerase A3 (Spot 30) eine signifikante Zunahme ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zur Kontrolle. Für das 78 kDa Glucose-regulierte Protein (Spot 28) ist eine signifikante Zunahme ( $p < 0.05$ ) und für die  $\beta$ -Kette des Tropomyosins (Spot 35) eine hoch signifikante Zunahme ( $p < 0.01$ ) nach LGP-Kultivierung im Vergleich zur Kontrolle nachzuweisen.

Des weiteren werden die Proteine einer bestimmten Funktion nach gesteigerter oder verringerter O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrollkultivierung eingeteilt (s. Abbildung 44).



**Abbildung 44: Funktionelle Klassifizierung der gesteigerten oder verminderten O-GlcNAc-Modifikation der Proteine aus der cytosolischen Fraktion der SkMC in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen**

Die Intensität des O-GlcNAc-modifizierten Spots nach HG-, HGP- und LGP-Kultivierung wurde mit der der Kontrolle (LG) verglichen.

A: gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation, B: verringerte O-GlcNAc-Modifikation der Proteine

Die Diagramme zeigen ein sehr heterogenes Bild der Stärke der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen mit den in Abbildung 44 genannten Funktionen. Unter HG-Einfluss zeigen fast alle identifizierten Proteine des Stoffwechsels eine stärkere O-GlcNAc-Modifikation. Jedoch sind diese Proteine nach PUGNAc-Behandlung vermindert O-GlcNAc-modifiziert. Chaperone zeigen unter HG-, HGP- und LGP-Einfluss eher eine stärkere O-GlcNAc-Modifikation. Prinzipiell sind die Strukturproteine nach Kultivierung mit PUGNAc eher schwächer O-

GlcNAc-modifiziert. Die Proteine mit Funktionen in Transkription/Translation sind eher unter HG-Inkubation stärker O-GlcNAc-modifiziert. Einige Proteine zeigten keine Unterschiede in der O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrolle.

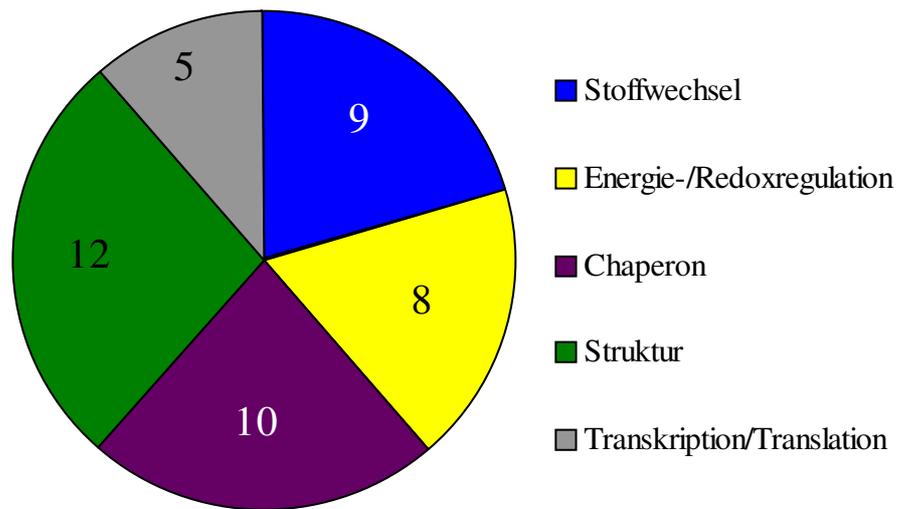
Gezeigt ist hier beispielhaft die ASS der mitochondrialen Aconitathydratase (Spot 39). Die nach MS-Analyse gefundenen Peptide wurden in der ASS rot markiert. Die potentiellen O-GlcNAcylierungsstellen wurden mit Hilfe der YinOYang-Software ermittelt und sind fett unterstrichen. Serine/Threonine, welche entweder O-GlcNAc-modifiziert oder phosphoryliert vorliegen können, sind zusätzlich kursiv gedruckt.

1 MAPYSLLVTR LQKALGVRQY HVASVLCQRA KVAMSHFEPN EYIHDLLEK  
51 NINIVRKRLN RPLTLSEKIV YGHLDDPASQ EIERGKSYLR LRPDRVAMQD  
101 ATAQMAMLQF ISSGLSKVAV P*ST*IHCDHLI EAQVGGEKDL RRAKDIHQEV  
151 YNFLATAGAK YGVGFWKPGS GIIHQILEN YAYPGVLLIG TDSHTPNGGG  
201 LGGICIGVGG ADAVDVMAGI PWELKCPKVI GVKL*T*GSLSG WSSPKDVILK  
251 VAGILTVKGG TGAIVEYHGP GVDSISCTGM ATICNMGAEI GATTSVFPYN  
301 HRMKKYSKT GREDIANLAD EFKDHLVPDP GCHYDQLIEI NLSELKPHIN  
351 GPFTPDLAHP VAEVGKVAEK EGWPLDIRVG LIGSCTNSSY EDMGRSAAVA  
401 KQALAHGLKC K*SQFTIT*PGS EQIRATIERD GYAQILRDLG GIVLANACGP  
451 CIGQWDRKDI KKGEKNTIVT SYNRNFTGRN DANPE*T*HAFV *T*SPEIVTALA  
501 IAGTLKFNPE TDYLTGTDGK KFRLEAPDAD ELPKGEFDPG QDTYQHPPKD  
551 *SS*GQHVDVSP TSQRLQLEP FDKWDGKDLE DLQILIKVKG KCTTDHISAA  
601 GPWLKFRGHL DNISNLLIG AINIENGGAN SVR*NAV**T*QEF GPVPDTARYY  
651 KKHGIRWVVI GDENYEGESS REHAALPRH LGGRAITKS FARIHETNLK  
701 KQGLLPLTFA DPADYNKIHP VDKLTIQGLK DFTPGKPLKC IIKHPNGTQE  
751 TILLNHTFNE TQIEWFRAGS ALNRMKELQQ

Es wurden zehn passende Peptide gefunden. Die Sequenzabdeckung beträgt 11 %.

### 3.5.2.3 Funktionelle Klassifizierung der O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus der nukleären und cytosolischen Fraktion der SkMC

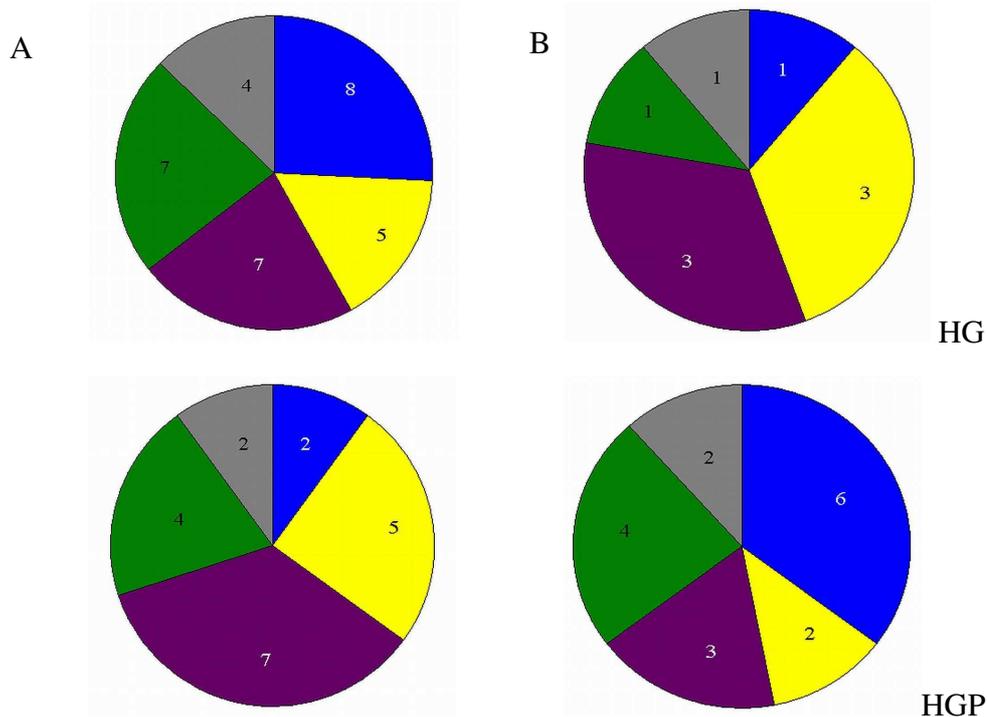
In der nukleären und cytosolischen Fraktion der SkMC konnten somit insgesamt 37 O-GlcNAc-modifizierte Proteine identifiziert werden (s. Tabelle 11 und Tabelle 12). Um einen besseren Überblick über das Gesamtbild der O-GlcNAc-modifizierten Proteine der SkMC zu gewinnen, wurden die Proteine beider Fraktionen entsprechend ihrer Funktionen zusammengefasst (s. Abbildung 45).

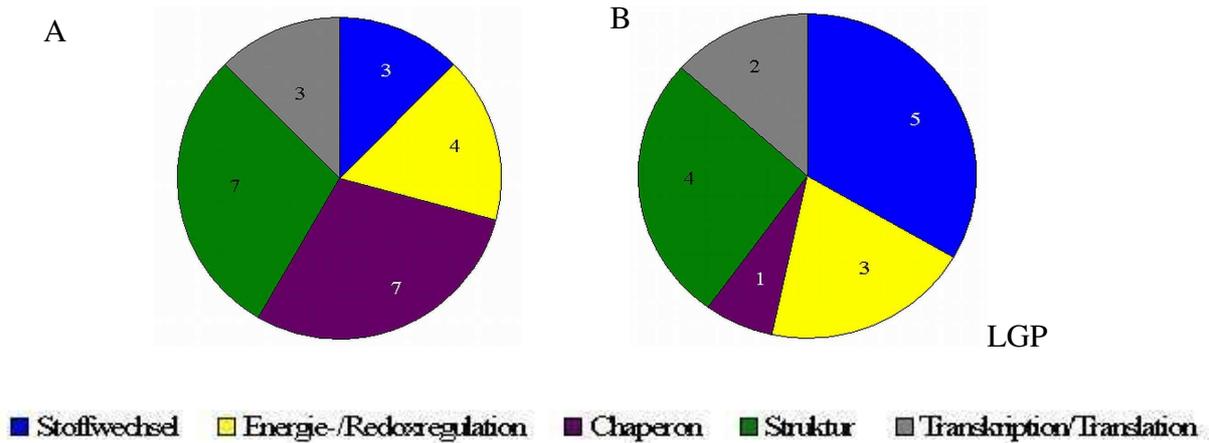


**Abbildung 45: Funktionelle Klassifizierung der O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus der zusammengefassten cytosolischen und nukleären Fraktion der SkMC**

Insgesamt konnten zwölf Strukturproteine, zehn Chaperone und neun Proteine des Stoffwechsels identifiziert werden. Acht Proteine haben eine Funktion in der Energie-/Redoxregulation und fünf sind der Transkription/Translation zugeordnet. Es wurden keine Proteine der Signaltransduktion und des Proteinabbaus identifiziert. Da einige Proteine mehrere Funktionen ausüben können, werden sie mehreren Gruppen zugeordnet.

Des Weiteren werden die Proteine einer bestimmten Funktion nach gesteigerter oder verringerter O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrollkultivierung eingeteilt (s. Abbildung 46).





**Abbildung 46: Funktionelle Klassifizierung der gesteigerten oder verminderten O-GlcNAc-Modifikation der Proteine aus SkMC in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen**

Die Intensität des O-GlcNAc-modifizierten Spots nach HG-, HGP- und LGP-Kultivierung wurde mit der der Kontrolle (LG) verglichen.

A: gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation, B: verringerte O-GlcNAc-Modifikation der Proteine

Die Diagramme zeigen ein sehr heterogenes Bild der Stärke der O-GlcNAc-Modifizierung der Proteine. Unter HG-Einfluss sind die Proteine eher stärker O-GlcNAc-modifiziert, was besonders für die identifizierten Proteine des Stoffwechsels, die Strukturproteine und Chaperone zutrifft. Auch sind die Chaperone nach Inkubation mit PUGNAc verstärkt O-GlcNAc-modifiziert. Die Proteine des Stoffwechsels sind unter PUGNAc-Einfluss schwächer O-GlcNAc-modifiziert. Einige Proteine zeigten keine Unterschiede in der O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrolle, wie z.B. die  $\alpha$ 4-Kette des Tropomyosins (Spot 36). Eine generell gesteigerte oder verminderte O-GlcNAc-Modifikation für Proteine bestimmter Funktionen ist nicht zu beobachten.

#### 3.5.2.4 Vergleich identifizierter O-GlcNAc-modifizierter Proteine aus HUVEC und SkMC

Wird zuletzt ein Vergleich der identifizierten O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus den HUVEC und SkMC gezogen, so sind die meisten der identifizierten Proteine in die Energie-/Redoxregulation (HUVEC 28 %; SkMC 18 %) involviert, haben Chaperonfunktion (HUVEC 24 %; SkMC 23 %) oder sind Strukturproteine (HUVEC 20 %; SkMC 28 %). In den HUVEC sind nur wenige Proteine des Stoffwechsels O-GlcNAcyliert (8 %), jedoch ist der Anteil dieser Proteine in den SkMC wesentlich höher (20 %). Die Proteine mit Funktionen in der Transkription/Translation (HUVEC 12 %; SkMC 11 %) sind relativ etwa gleich stark in beiden Zelllinien O-GlcNAc-modifiziert. Den geringsten Anteil machen die Proteine der Signaltransduktion (HUVEC 4 %; SkMC 0 %) und des Proteinabbaus (HUVEC 4 %; SkMC 0 %) aus.

Eine Gegenüberstellung der O-GlcNAc-modifizierten Proteine, die in beiden Zelllinien identifiziert wurden, enthält Tabelle 13.

Tabelle 13

Name	HUVEC Spot Nr.	O-GlcNAc ↑/↓ (im Vergleich zu LG)			SkMC Spot Nr.	O-GlcNAc ↑/↓ (im Vergleich zu LG)			bereits als O- GlcNAcyliert beschrieben
		HG	HGP	LGP		HG	HGP	LGP	
Heat shock cognate 71 kDa protein	2	↑	-	-	20	↑*	↑	↑	Guinez et al. 2006
Stress-70 protein, mitochondrial	3	↑	↓	↓	21	↑	↑	↑	-
Protein disulfide- isomerase A3	4	↑	↑	↑	8 (NF) 30 (CF)	↓ ↑*	↓ ↑*	↓ ↑	Shimoji et al. 2010
60 kDa heat shock protein	6	↑	↑	↑	6 (NF)	↑	↑	-	Kim et al. 2006
Vimentin	7 + 8	↓	↓	↓	7 (NF)	↑	-	↑	Wang et al. 2007
Tubulin beta chain	11	↓	↓	↓	3 (NF, 2A chain)	↑	↑	↓	Wang et al. 2007
ATP-Synthase subunit beta, mitochondrial	12	↑	↑	↑	4 (NF)	↑*	↑	↓	Park et al. 2007
Actin, cytoplasmic 1	16	-	-	-	10 (NF) 33 (CF)	↑ -	- ↓	↑ ↓	Hédou et al. 2007
Heat shock protein beta-1	20	-	-	-	37	↓	↓	-	Roquemore et al. 1992
Pyruvate kinase isozyme M1/M2	25	↑	↑	↑	41	↑	↓	↑	Wells et al. 2002
Glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase	31	↑**	↑	↑	51	↑	↓	↑	Wells et al. 2002

**Tabelle 13 Gegenüberstellung O-GlcNAc-modifizierter Proteine, die in HUVEC und SkMC identifiziert wurden**

Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine aus HUVEC und SkMC wurden aus Coomassie gefärbten Gelen ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und nach MS mittels MASCOT-Software und der Swiss-Prot Datenbank zugeordnet. Die Nummerierung der Proteine entspricht Abbildung 23, Abbildung 25, Abbildung 32 und Abbildung 34. Signifikante Änderungen der O-GlcNAc-Modifikation im Vergleich zur Kontrolle sind mit \*gekennzeichnet: \* p<0.05, \*\* p<0.01.

CF: cytosolische Fraktion; NF: nukleäre Fraktion

Diese Proteine haben vor allem Chaperonfunktion, zählen zu den Strukturproteinen und sind Enzyme des Stoffwechsels, was auf konstitutiv exprimierte Proteine schließen lässt. Die Regulation der O-GlcNAc-Modifikation nach HG- und/oder PUGNAc-Kultivierung der Zellen ist jedoch sehr unterschiedlich. So weist kein Protein die gleiche Änderung der O-GlcNAcylierung in beiden Zelllinien für alle drei Kultivierungsbedingungen auf.

Eine Übersicht über die potentiellen O-GlcNAcylierungsstellen sind für die weiteren bisher nicht beschriebenen O-GlcNAc-modifizierten Proteine im Anhang eingefügt (s. 7.5).

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung eines Enzymsassay zur Übertragung von O-GlcNAc auf Proteine

Ein Ziel dieser Arbeit war es, einen nicht radioaktiven Enzymsassay zu etablieren, der einerseits als Aktivitätstest für die OGT dienen und andererseits die Möglichkeit bieten sollte, GlcNAc auf Proteine *in vitro* zu übertragen. Das in Mikrotiterplatten gebundene Substrat sollte mit verschiedenen Isoformen der OGT O-GlcNAc-modifiziert werden, und der Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation sollte mit dem O-GlcNAc-spezifischen Antikörper CTD 110.6 oder sWGA erfolgen.

#### 4.1.1 Analyse verschiedener OGT-Isoformen und Substratwahl für den OGT-Assay

Okuyama und Marshall präparierten die cytosolische und nukleäre OGT aus frischen Rattenhirnen (Marshall et al., 2003; Okuyama und Marshall, 2003). Angelehnt an ihr Protokoll wurde die OGT aus eingefrorenen Mäusehirnen isoliert. Nachdem die OGT in der cytosolischen und nukleären Fraktion mit dem Antikörper AL25 im Western Blot nachgewiesen wurde (Abbildung nicht gezeigt), wurde sie im OGT-Assay eingesetzt. Nur mit der McOGT konnte eine leichte Zunahme der OD im Vergleich zu den Kontrollen und somit möglicherweise eine Glykosylierung des Substrats nachgewiesen werden (s. Abbildung 14). Der Versuch wurde jedoch nur einmal durchgeführt und ist daher nicht repräsentativ. Parallel wurde die in *E. coli* exprimierte humane ncOGT getestet (Tritz, 2010). Der OGT-Assay mit dieser OGT wurde nach modifizierten Protokollen von Lazarus et al. mit Bakterienlysaten durchgeführt (Lazarus et al., 2006), war aber ebenfalls nicht erfolgreich.

Durch Streptavidinbeschichtung der Mikrotiterplatten sollte erreicht werden, dass die biotinylierten Substrate in gebundener Form vorliegen und so durch Inkubation mit der OGT glykosyliert werden. Auf diese Weise können auch lösliche Proteine gebunden werden, wie z.B.  $\gamma$ -Kristallin aus Linsen der Rinderaugen (s. Abbildung 15). Da  $\gamma$ -Kristallin schon O-GlcNAc-modifiziert ist (Ahrend et al., 2008), wäre für dieses Substrat im OGT-Assay eine Höherglykosylierung zu zeigen, welche jedoch nicht nachzuweisen war.

Lubas und Hanover zeigten, dass die OGT NUP62 glykosyliert (Lubas und Hanover, 2000). Daher sollte es in dieser Arbeit als Kontrollsubstrat verwendet werden. Die Biotinylierung des NUP62 war jedoch nicht erfolgreich. Möglicherweise wurde das NUP62 während der Biotinylierung an die Gefäßwand adsorbiert, da nur eine geringe Proteinkonzentration verwendet wurde. Prinzipiell ist die Biotinylierung des NUP62 möglich, da es über 40 Lysinreste verfügt, auf die Biotin übertragen werden kann.

Eine andere Möglichkeit, ein Substrat zu markieren, ist die Expression der cDNA des Proteins in einem Vektor, der ein Tag an den C- oder N-Terminus des Proteins anfügt. Der Vektor pBJG1-NUP enthält ein His-Tag am C-Terminus (Gross et al., 2005). Jedoch zeigte die Sequenzierung des Plasmids, dass in der *Xho* I-Restriktionsschnittstelle des Vektors eine

Substitution von C nach G vorlag (s. 7.3) und aufgrund der Mutation war der Ansatz nicht erfolgreich.

#### 4.1.2 Vorschläge zur Verbesserung des OGT-Assays

Marshall et al. untersuchten die Aktivität der Rattenhirn-OGT bei 24 °C, 30 °C und 37 °C. Ihre Experimente zeigten einen rapiden und irreversiblen Rückgang der Aktivität der OGT bei 37 °C innerhalb von einer Stunde (Marshall et al., 2003). Lazarus et al. glykosylierten bei 37 °C und verwendeten eine humane OGT, die in Bakterien exprimiert wurde (Lazarus et al., 2005; Lazarus et al., 2006) und sich eventuell im Temperaturoptimum von dem der Ratten-OGT unterscheidet. Daher sollte der OGT-Assay bei verschiedenen Temperaturen für jede OGT-Isoform durchgeführt werden.

Einige Arbeitsgruppen führten den OGT-Assay mit aufgereinigter, rekombinant exprimierter OGT durch (z.B. Lubas und Hanover, 2000). Für weitere Versuche sollte die ncOGT über das His-Tag des Vektors pBJG1-ncOGT nativ mittels Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden. Die Salzkonzentration muss niedrig gehalten werden, da die OGT sehr sensitiv auf Salz reagiert (Marshall et al., 2003). Eine Anreicherung der OGT könnte über eine IP mit dem OGT-spezifischen Antikörper AL25 erfolgen. Marshall et al. präzipitieren die OGT aus Rattenhirnen mittels OGT-Antikörper und setzten die an Agarose-Beads gebundene OGT erfolgreich im OGT-Assay ein, um ein Peptid des NUP62 zu glykosylieren. Sie zeigten weiterhin, dass die OGT-Aktivität sechsfach größer im PEG-entsalzten Cytosol war als im unaufgearbeiteten Cytosol (Marshall et al., 2003).

Die beschriebenen Enzymassays verwendeten außerdem radioaktiv markiertes UDP-GlcNAc. Es kann davon ausgegangen werden, dass der Nachweis der Protein-gebundenen Radioaktivität eine höhere Sensitivität besitzt als der in dieser Arbeit angestrebte nicht radioaktive ELISA-Test. Dass der Assay nicht erfolgreich war, ist möglicherweise aber auch darauf zurückzuführen, dass die eingesetzte Konzentration von 0.1 mM UDP-GlcNAc zu hoch war und dadurch die OGT inhibiert wurde. Okuyama und Marshall zeigten, dass bei einer Konzentration von 0.1 mM die Aktivität der OGT schon sinkt und etwa 0.2 mM UDP-GlcNAc die mittlere inhibitorische Konzentration für die cytosolische bzw. nukleäre OGT darstellt (Okuyama und Marshall, 2003).

Ein weiterer Grund dafür, dass der OGT-Assay im ELISA nicht gelang, könnte sein, dass der Enzymassay weder in Gegenwart von einem OGA-Inhibitor noch von GlcNAc als kompetitiver Inhibitor der OGA durchgeführt wurde (Gao et al., 2001; Haltiwanger et al., 1998), da auch die OGA aktiv in den Lysaten vorliegt. Zachara et al. glykosylierten in Gegenwart von 1-amino-GlcNAc als Inhibitor (Zachara et al., 2002). Bakterien bilden eigene N-Acetylglucosaminidasen. So konnten Stubbs et al. zeigen, dass PUGNAc die Glucosaminidase NagZ inhibiert. Dieses Enzym spaltet in Bakterien GlcNAc vom nicht reduzierenden Ende von GlcNAc-1,6-anhydro-N-Acetylmuraminsäure ab (Stubbs et al., 2007). Möglicherweise könnte diese Glucosaminidase auch O-GlcNAc von modifizierten Proteinen in Bakterienlysaten abspalten, so dass es sinnvoll wäre, den OGT-Assay in

Gegenwart eines Inhibitors der OGA, z.B. PUGNAc, durchzuführen.

Für das GST-Fusionsystem mit den pGEX-Plasmiden ist beschrieben, dass der *E. coli*-Stamm BL21 Deletionen und Substitutionen in der Plasmid-DNA verursacht (GST Gene Fusion System, Amersham Biosciences). Tritz zeigte nach Sequenzierung des Plasmids pBJG1-ncOGT, dass dieses schon die Mutation in der *Xho*-I-Restriktionsstelle trug (Tritz, 2010). Die Klonierung des Plasmids pBJG1-ncOGT sollte mit *E. coli* K12 NovaBlue, NovaBlue T1R, JM109 und DH5 $\alpha$  durchgeführt werden. Diese Bakterienstämme sind für die Klonierung der Ziel-DNA in den Vektor geeignet, da sie *recA*<sup>-</sup> *endA*<sup>-</sup> sind, hohe Transformationseffizienz und gute Plasmidausbeute liefern (pET System Manual 11th edition, Novagen).

Die Bindungsstelle des NUP62-Antikörper befindet sich am C-Terminus des pBJG1-NUP62 (Produktbeschreibung Nucleoporin p62 (D-20), Santa Cruz Biotechnology). Das NUP62 ließ sich nach Bindung des Proteins über das His-Tag im ELISA mit diesem Antikörper nicht mehr nachweisen (Daten nicht gezeigt). Des weiteren befinden sich die bekannten O-GlcNAc-Modifikationsstellen an Threonin-373 und an Serin-486 am C-Terminus des Proteins (s. 7.4). Eine Bindung des NUP62 über den NUP62-Antikörper oder das His-Tag könnte die O-GlcNAc-Modifizierung des Proteins behindern. Daher sollte das NUP62 in einem Vektor exprimiert werden, dessen Tag sich am N-Terminus befindet, wie z.B. die pGEX-Vektoren.

## 4.2 2D-Gelelektrophorese, Nachweis O-GlcNAc-modifizierter Proteine mittels Western Blot und Massenspektrometrie

In dieser Arbeit wurden Proteine aus HUVEC, SkMC und HEK-Zellen mittels 2-DE aufgetrennt. Die O-GlcNAc-Modifikation dieser Proteine wurde nach verschiedenen Kultivierungsansätzen mit dem O-GlcNAc-spezifischen Antikörper CTD 110.6 untersucht.

### 4.2.1 Reproduzierbarkeit der 2D-Gelelektrophorese

Ziel der 2-DE ist es, ein klares und reproduzierbares Spotmuster zu erzeugen, was die aktuelle Situation der Zelle repräsentiert (Westermeier, 2005). Zu den Einschränkungen der 2-DE zählen Auflösung, Reproduzierbarkeit, Auftrennung sehr azider oder basischer Proteine, Detektion sehr gering vorkommender Proteine und von Membranproteinen (Görg et al., 2009). Da die 2-DE ein Verfahren mit vielen Arbeitsschritten ist, können an vielen Stellen der Präparation Proteine verloren gehen oder modifiziert werden (Westermeier, 2005).

In dieser Arbeit wurde mit dem pH-Gradienten 3-10 bzw. 4-10 ein grober Überblick über die Proteine der Zelle gegeben (s. Abbildung 21). Um eine bessere Auflösung zu erhalten wurde die IEF in den pH-Gradienten 4-7 und 6-11 durchgeführt (s. Abbildung 23 und Abbildung 25). Laut Görg et al. ist der beste Ansatz die Kombination von Vorfraktionierung und die Verwendung von multiplen überlappenden, schmalen immobilisierten pH-Gradienten, so dass sogenannte „Zoom-in“-Gele entstehen. Zusätzliche Nutzung von längeren Auftrennungstrecken bis zu 24 cm oder länger ermöglichen eine optimale Auflösung und verhindern, dass mehrere Proteine in einem Spot vorliegen (Görg et al., 2009). Die höhere Auflösung durch den Einsatz des ultraschmalen pH-Gradienten 4.9-5.2 über 24 cm konnte mit Proteinen aus

*Saccharomyces cerevisiae* demonstriert werden (Wildgruber et al., 2000). Da in dieser Arbeit mit geringer auflösenden pH-Gradienten gearbeitet wurde, ist nicht verwunderlich, dass für Spot 37 der SkMC zwei Proteine mittels MS identifiziert wurden (s. Abbildung 31 und Tabelle 12). Versuche mit 16 cm-langen IPG-Streifen zur Auftrennung der HUVEC-Lysate zeigten, dass die Auflösung der Spots wie zu erwarten zunimmt (Abbildungen nicht gezeigt). Die in Abbildung 18 in einer Spotreihe vorliegenden O-GlcNAc-positiven Spots trennen sich in mehrere einzelne Spots auf. Jedoch ist die Verwendung von längeren IPG-Streifen und somit auch größeren SDS-Gelen für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuchsansätze nicht praktikabel. Da parallel vier verschiedene Kultivierungsansätze verglichen wurden, musste aus Gründen der korrekten Vergleichbarkeit die Chemilumineszenzreaktion aller vier Immunoblots parallel entwickelt werden, was bei größeren Gelen nicht mehr durchführbar ist.

Vor der IEF werden die getrockneten IPG-Streifen auf ihre Originalgröße rehydratisiert (Altland und Rossmann, 1985). Proben können auf die IPG-Streifen entweder über „Cup-loading“ nach der Rehydratisierung der IPG-Streifen aufgetragen werden oder alternativ während der Rehydratisierung über sogenanntes „sample in-gel rehydration“, wobei die Rehydratisierungslösung bereits die Probe enthält (Rabilloud et al., 1994). „Sample in-gel rehydration“ ist für Proteine mit sehr hohem MW, sehr alkalische und/oder hydrophobe Proteine nicht geeignet, da diese Proteine nur schwer in das Gel aufgenommen werden. Hydrophobe Interaktionen zwischen Proteinen und der Wand der Inkubationskammer können stören, oder es kommt aufgrund von Größenausschluss der Gelmatrix nicht zur Aufnahme der Proteine. Die Aufnahme von Proteinen mit einem MW von größer 100 kDa in die IPG-Gelmatrix wird durch „aktive“ Rehydratisierung erleichtert, d.h. während des Aufquellens wird eine geringe Spannung von 30 bis 50 V angelegt (Görg et al., 1999; Görg et al., 2000). Die 2D-Analysen dieser Arbeit weisen kaum Proteine größer 100 kDa auf, obwohl in der zweiten Dimension 10 %ige SDS-Gele verwendet wurden. Die zwei größten identifizierten Proteine in dieser Arbeit sind die mitochondriale Aconitathydratase (Spot 39) und Gelsolin (Spot 22) aus den SkMC, jeweils mit einem MW von etwa 86 kDa (s. Tabelle 12 und Abbildung 32). Zur Anreicherung der Proteine mit einem MW größer 80 kDa sollte daher eine aktive Rehydratisierung durchgeführt werden.

Wenn basische pH-Gradienten verwendet werden, sollten die Proben an der Anode und damit über das „Cup-loading“ aufgetragen werden. Die Verwendung von Probenauftragsbehältern hatte zu einem Verlust von mindestens 1 cm Auftrennungsstrecke geführt (Abbildungen nicht gezeigt), daher wurde durchgängig das „Sample in-gel rehydration“-Verfahren eingesetzt. Die Auftrennung von sehr basischen Proteinen ist sehr effizient, wenn zunächst hohe Spannung angelegt wird, die nach einer kurzen Probeneingangsdauer limitiert wird (Görg et al., 1999; Drews et al., 2004). Die IEF nach dem Protokoll der Firma GE Healthcare für den pH-Gradienten 6-11 trennte die basischen Proteine der HUVEC oder SkMC in 11cm langen IPG-Streifen kaum in einzelnen Proteinspots auf (s. Abbildung 25 und Abbildung 34; 2-D Electrophoresis Handbuch, GE Healthcare). Görg schlägt für eine IEF mit einem fünf bis

sechs pH-Einheiten umfassenden Gradienten einen 8-stündigen IEF-Lauf bei 3500 V vor (<http://www.wzw.tum.de/proteomik>). Darüber hinaus sollten die Sulfhydrylgruppen der Cysteine nicht mit DTT reduziert werden, sondern mit Hydroxyethyl-disulfid (DeStreak™) zu gemischten Disulfiden oxidiert werden (Olsson et al., 2002).

Die SDS-PAGE gewährleistet keine „steady-state“ Auftrennung und bringt somit einige Variabilitäten in das 2D-Muster. Daher sollten hoch standardisierte Laufbedingungen und Elektrophoresesysteme genutzt werden. Um eine maximale Reproduzierbarkeit zu erreichen, sollten bis zu 20 Gele parallel gefahren werden (Görg et al., 2009). Aus technischen Gründen war es jedoch in dieser Arbeit nur möglich, je ein Gel jeder Probe pro Experiment zu fahren. Derzeitige Proteomikstudien zeigen, dass die Mehrheit der identifizierten Proteine nach 2-DE stark exprimierte konstitutive Proteine sind, die zu  $10^5$  bis  $10^6$  Kopien pro Zelle vorkommen. Dagegen werden Proteine, die in einer wesentlich geringeren Konzentration präsent sind, nicht detektiert. Daher sind verbesserte Methoden nötig, die zum einen gering vorkommende Proteine anreichern, z.B. über Fraktionierung, und andererseits müssen sensitivere Detektions- und Quantifizierungsmethoden entwickelt werden (Görg et al., 2004). Von den HUVEC wurden mit dem gängigen 2D-Lysispuffer nur unfraktionierte Zelllysate hergestellt. Die SkMC wurden jedoch mittels fraktionierter Lyse aufgearbeitet, um zwischen der cytosolischen und nukleären Proteinfraction unterscheiden zu können.

#### 4.2.2 Einfluss der Nachweismethode auf die O-GlcNAc-Detektion

Der immunologische Nachweis der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine wurde in Anlehnung an das Protokoll von Zachara et al. mit dem O-GlcNAc-spezifischen Antikörper CTD 110.6 (Zachara et al., 2004) und z.T. auch mit dem Lektin sWGA durchgeführt (Abbildungen nicht gezeigt). Die Blockierung erfolgte jedoch im Unterschied zu dem Protokoll mit 3 % BSA in TBSHT, da eine Blockierung mit TBSHT zu einer starken Hintergrundbildung führte (Abbildung nicht gezeigt). Comer et al. produzierten den monoklonalen Antikörper CTD 110.6. Eine Western Blot Analyse von HeLa-Zellen mit den O-GlcNAc-Antikörpern CTD 110.6 und RL2 zeigte, dass der Antikörper CTD 110.6 mehr O-GlcNAc-modifizierte Proteine detektiert als der Antikörper RL2 (Comer et al., 2001). In dieser Arbeit war in den Immunoblots jedoch die Intensität der O-GlcNAc-Signale mit beiden Antikörpern vergleichbar stark (s. Abbildung 26) und die detektierten Proteine unterschieden sich. Der Antikörper RL2 erkennt mehr Proteine im niedermolekularen Bereich als der Antikörper CTD 110.6. Da der Antikörper CTD 110.6 nicht alle O-GlcNAc-modifizierten Proteine erkennt (Zachara et al., 2004), sollte der O-GlcNAc-Nachweis parallel auch mit dem Antikörper RL2, einem anderen O-GlcNAc-spezifischen Antikörper oder mit einer sensitiveren Methode durchgeführt werden. Ferrand et al. entwickelten das synthetische Lektin Receptor 1, was mit millimolarer Affinität selektiv O-GlcNAc bindet und selektiver als WGA ist (Ferrand et al., 2009).

Da die O-GlcNAc-Modifikation nur auf einem sehr geringen Anteil der Proteine vorkommt, wurde versucht die O-GlcNAc-modifizierten Proteine mittels einer sWGA-IP anzureichern.

Jedoch wurden die Proben vor der IP nicht enzymatisch verdaut, um terminales N-GlcNAc abzuspalten (Zachara et al., 2004). So kompetitierten N- und O-GlcNAc um die Bindung des Lektins, was zur Unterdrückung O-GlcNAc-modifizierter Proteine geführt haben könnte. Da ein Aufkochen der Immunpräzipitate in SDS-Probenpuffer nicht kompatibel mit der nachfolgenden 2-DE ist bzw. in 2D-Lysispuffer aufgrund des enthaltenen Harnstoffs nicht möglich ist, wurden die Proteine nativ mit 1 M GlcNAc in 2D-Lysispuffer von den Sepharose-Beads eluiert analog zu Gewinner, die glykosylierte Proteine nach einer Lektin-Affinitätschromatographie mit 1 M GlcNAc eluierte (Gewinner, 2001).

In dieser Arbeit wurde vorausgesetzt, dass sich die Proteinexpression in den verschiedenen Kultivierungsansätzen nicht unterscheidet. Hwang et al. zeigten jedoch bei einer Proteomanalyse humaner Skelettmuskelzellen, dass sich unter Insulinresistenz die Expression einiger Proteine verändert. Mitochondriale Proteine und Proteine des Cytoskeletts nahmen ab während Chaperone und Untereinheiten des Proteasoms vermehrt exprimiert wurden (Hwang et al., 2010). In dieser Arbeit wurden keine wesentlichen Expressionsunterschiede beobachtet, aber für zukünftige Versuche sollten die Proteine von Zelllysaten mittels fluoreszierender Differenzierungs-Gelelektrophorese (DIGE) gegen die jeweilige Kontrollprobe nach Standardkultivierung getestet werden, um Unterschiede in der Proteinexpression bei der Analyse von Veränderungen der O-GlcNAc-Modifikation berücksichtigen zu können. Weiterhin können methodische Variationen der Spotposition und des Proteinvorkommens so ausgeschlossen werden (Görg et al., 2009). Eine Fluoreszenzmarkierung der O-GlcNAc-Modifikation und anschließende DIGE würden es ermöglichen, Änderungen der O-GlcNAc-modifizierten Proteine zu erfassen, da jeder Proteinspot einem internen Standard entspricht. Nach dem Scannen der Gele mittels eines Fluoreszenzscanners können die Proteine direkt mittels spezieller Software lokalisiert und analysiert werden und gleichzeitig erfolgt eine statistische Auswertung jedes Unterschieds der Spotposition und -größe im Gel.

#### 4.2.3 Massenspektrometrischen Analyse O-GlcNAc-modifizierter Proteine

In dieser Arbeit wurden parallel zu 2D-Immunoblot Analysen zur Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Proteine die Proteine in 2-DE-Gelen Coomassie gefärbt. Über den Vergleich mit den Immunoblots wurden korrespondierende O-GlcNAc-modifizierte Proteine aus den Coomassie gefärbten Gelen ausgeschnitten und nach In-Gel-Trypsinverdau mittels MS zahlreiche O-GlcNAc-modifizierte Proteine identifiziert. Der nächste Schritt wäre die Identifizierung der Positionen der O-GlcNAc-modifizierten Serine/Threonine in den Proteinen. Jedoch werden wie oben diskutiert so nur Proteine identifiziert, die in hoher Konzentration in der Zelle vorkommen. Versuche zur Identifizierung O-GlcNAc-modifizierter Proteine aus Silber-gefärbten Gelen mit anschließendem In-Gel-Trypsinverdau und MS-Analyse waren ohne Erfolg (Daten nicht gezeigt).

Alternativ könnten auch Proteine aus Indian Ink-gefärbten Membranen ausgeschnitten und nach Trypsinverdau mittels MALDI-TOF-MS analysiert werden (Dufresne-Martin et al., 2005). Bei diesen Experimenten konnten jedoch aufgrund störender Detergenzien zunächst

keine Peptide gemessen werden. Wegen eines andauernden Defekts des MALDI-TOF-Massenspektrometers wurde diese Methode nicht weiter verfolgt. Diese Methode hätte den Vorteil, dass die Zuordnung der Proteinspots zu den mit dem O-GlcNAc-Antikörper detektierten Spots auf derselben Membran erfolgen könnte und damit sicherer ist, und es könnten auch weniger stark exprimierte Proteine analysiert werden, da die Indian Ink Färbung sensitiver als die Coomassiefärbung ist.

Untersuchungen zeigten, dass bei MALDI-TOF-MS-Analysen mit einer konventionellen Matrix die Addition eines einzelnen GlcNAc an ein Peptid das MS-Signal um ungefähr das fünffache reduziert. Zusätzlich unterdrücken im Gemisch vorhandene unglykosylierte Peptide das Signal (Hart et al., 2000), so dass die Wahrscheinlichkeit der Identifizierung von O-GlcNAc-modifizierten Peptiden gering ist.

In der konventionellen Elektrospray-Ionisierungs-MS können Peptide sequenziert werden, da mit den verwendeten Kollisionsenergien bevorzugt die Peptidbindungen gespalten werden. Da O-glykosidische Bindungen wesentlich labiler als Peptidbindungen sind, wird O-GlcNAc abgespalten, so dass diese Methode ungeeignet ist, um mittels des zu erwartenden Masseninkrements eines GlcNAcs von  $m/z = 204$  modifizierte Serine oder Threonine in der Peptidsequenz zu identifizieren (Zachara et al., 2002). Dies ist hingegen möglich mittels der kürzlich entwickelten „Electron Transfer Dissociation“ (ETD) Technik, bei der die auf die Peptidionen übertragene Energie lediglich Peptidbindungen und nicht glykosidische Bindungen spaltet. Diese Methode wird zur Zeit in der Arbeitsgruppe etabliert und stand daher noch nicht zur Verfügung.

Die Click-iT™ Chemie bietet zwei verschiedene Ansätze um O-GlcNAc in Proteinen *in vitro* und *in vivo* zu markieren und dann mit Hilfe der Markierung die O-GlcNAc-modifizierten Proteine selektiv anzureichern. Die Markierung *in vitro* nutzt eine Mutante der Galactosyltransferase (GalT), welche mit Ketonen modifizierte Galactose auf GlcNAc-Reste in Proteinen überträgt. Die Ketongruppe führt eine chemisch reaktive Gruppe ein, welche mit Biotin versehen werden kann, so dass die modifizierten Proteine über Streptavidin angereichert werden können (Khidekel et al., 2003). Bei der *in vivo* Methode wird N-Azidoacetylglucosamin (GlcNAz) in die Zellen geschleust, zu UDP-GlcNAz aktiviert und durch die OGT auf die Proteine transferiert (Vocadlo et al., 2003). Die Azidogruppe des GlcNAz ermöglicht es, über die sogenannte Staudingerligation weitere funktionelle Gruppen anzufügen (Saxon und Bertozzi, 2000). Diese Methoden zur Anreicherung der O-GlcNAc-modifizierten Proteine können mit einer MS-Analyse kombiniert werden, um die Positionen von O-GlcNAc in der Proteinsequenz zu identifizieren (Brimble et al., 2010). Alternativ kann ein Fluoreszenzfarbstoff an die funktionelle Azidogruppe angefügt werden, womit Lee et al. fünf O-GlcNAc-modifizierte Proteine des Dauerstadiums von *C. elegans* nachweisen konnten (Lee et al., 2010). Wang et al. markierten O-GlcNAc-modifizierte Peptide aus Rattenhirnen mit Hilfe von GalT und sequenzierten die Proteine mittels ETD-MS. Mit dieser Methode konnten sie die GlcNAcylierungsstellen von Tau, Synuclein und Methyl-CpG-Bindeprotein 2

charakterisieren (Wang et al., 2009). Von Bedeutung ist in jedem Fall, dass die löslichen Proteinfractionen oder subzellulären Fraktionen keine im ER synthetisierten Glykoproteine enthalten, da N- und auch höhere O-Glykane terminales GlcNAc enthalten können und die GalT diese ebenfalls markieren würde. Mittels PNGase F-Behandlung lassen sich zumindest N-Glykane entfernen, so dass die Gefahr von falsch positiven Ergebnisse niedrig gehalten werden kann. Außerdem würde die Massenzunahme von mehr als einem Monosaccharid einen Hinweis auf eine eventuelle Verunreinigung mit diesen Glykanen geben (Click-iT™ O-GlcNAc Enzymatic Labeling System, Invitrogen). Wang et al. setzen der Reaktion noch alkalische Phosphatase zu, um UDP zu degradieren, damit es nicht zur Feedbackhemmung der GalT kommt (Wang et al., 2009).

### 4.3 Das O-GlcNAcom

Die HUVEC und SkMC wurden verschiedenen Kultivierungsansätzen mit LG- und HG-Medium in An- und Abwesenheit des OGA-Inhibitors PUGNAc unterzogen, um eine Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation der Proteine zu erzielen. Außerdem wurden HEK-Zellen mit LG- und HG-Medium sowie mit Glucosamin in LG-Medium inkubiert.

#### 4.3.1 Wahl des OGA-Inhibitors

Zunächst wurden die HUVEC für 72 h mit 50  $\mu$ M PUGNAc inkubiert, was zu keiner Zunahme O-GlcNAc-modifizierter Proteine führte (Abbildungen nicht gezeigt). Haltiwanger et al. zeigten einen dosisabhängigen Anstieg der durch PUGNAc induzierten O-GlcNAc-Steigerung in HT29-, NIH 3T3- und CV-1-Zellen, der jedoch ab einer Konzentration von 40  $\mu$ M nicht weiter zunahm. Jedoch konnte für HeLa-Zellen mit dieser PUGNAc-Konzentration kein Anstieg beobachtet werden (Haltiwanger et al., 1998). Eine Zunahme der O-GlcNAc-Modifikation wurde in HT29-Zellen mit 40  $\mu$ M PUGNAc bereits nach 2 h beobachtet, stieg jedoch nach 8 h nicht weiter an (Haltiwanger et al., 1998). Gao et al. inkubierten Min6-Zellen für 72 h mit 100  $\mu$ M PUGNAc, was zur maximalen Steigerung der O-GlcNAc-modifizierten Proteine nach 48 h führte (Gao et al., 2000). Wang et al. setzten zur Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation in COS-Zellen 200  $\mu$ M PUGNAc für 18 h ein und auch Rengifo et al. behandelten SY5Y-Zellen mit dieser Konzentration des OGA-Inhibitors für 24 h (Wang et al., 2007; Rengifo et al., 2007).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung der HUVEC mit 200  $\mu$ M PUGNAc für 72 h zur Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation führt (s. Abbildung 22 und Abbildung 24). Hingegen reichte in SkMC für eine Zunahme der O-GlcNAcylierung eine Inkubation mit 40  $\mu$ M PUGNAc für 72 h aus (s. Abbildung 29, Abbildung 31 und Abbildung 33). Da das Ausmaß der O-GlcNAcylierung von der Zelllinie bzw. dem Zelltyp abhängig zu sein scheint (s.o., sowie Haltiwanger et al., 1998; Dorfmueller et al., 2009), und neben der Konzentration auch die Inkubationsdauer eines OGA-Inhibitors ein wichtiger Parameter für die Stärke der O-GlcNAcylierung ist, ist es notwendig, für jede Zelllinie verschiedene

Konzentrationen und Zeiten zur maximalen Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation zu testen.

PUGNAc inhibiert neben der OGA auch verschiedene lysosomale  $\beta$ -Hexosaminidasen, was die Interpretation der Ergebnisse erschwert (Macauley et al., 2005; Copeland et al., 2008). Diese Enzyme spielen für den Metabolismus der Glykosphingolipide eine wichtige Rolle (Macauley und Vocadlo, 2009). Durch die Inhibierung der  $\beta$ -Hexosaminidasen wird der Spiegel des Gangliosid GM2 in kultivierten neuronalen Zellen erhöht (Stubbs et al., 2009). Ganglioside spielen verschiedenartige Rollen bei der Entstehung der Insulinresistenz (Zhou et al., 2004; Nojiri et al., 1991; Kawabuchi et al., 2000), so dass die Verursachung der Insulinresistenz durch PUGNAc in Adipozyten möglicherweise nicht auf die Hemmung der OGA, sondern der Hexosaminidasen zurückzuführen ist (Vosseller et al., 2003; Macauley et al., 2008).

Ein selektiverer Inhibitor der OGA ist NButGT, welcher 1500-fach selektiver gegenüber der OGA als gegenüber Hexosaminidasen ist (Macauley et al., 2005; Macauley et al., 2008). Die Inkubation von Zellen mit PUGNAc führt zur Abnahme der Wachstumsrate verschiedener Zelllinien (Slawson et al., 2005), was bei Inkubation mit NButGT nicht auftritt (Macauley et al., 2008). Des Weiteren erhöht die Verwendung von NButGT nicht die Konzentration von GM2 in neuronalen Zellen und repliziert keine weiteren physiologischen Effekte des PUGNAc (Stubbs et al., 2009; Macauley et al., 2008; Matthews et al., 2007). Thiamet-G, ein Derivat des NButGT, zeigt eine noch höhere Affinität zur OGA als NButGT und auch eine verstärkte Selektivität gegenüber Hexosaminidasen (Yuzwa et al., 2008). Thiamet-G ist stabiler und kann auch *in vivo* die O-GlcNAc-Modifikation der Proteine steigern (Yuzwa et al., 2008; Tallent et al., 2009). Zusätzlich wurde GlcNAcstatin, ein Glucoimidazol, mit einer Selektivität für die OGA entwickelt, welche 100000-fach höher ist als die gegenüber Hexosaminidasen (Dorfmueller et al., 2006; Dorfmueller et al., 2009). Während PUGNAc in einer Konzentration im mikromolaren Bereich hemmt, wird durch GlcNAcstatin eine selektive Inhibierung der OGA mit nanomolarer Konzentration erreicht (Dorfmueller et al., 2006; Dorfmueller et al., 2009).

#### 4.3.2 Regulation der OGT und OGA

Die Aktivität der OGA und OGT dürfte die Aktivität des jeweiligen anderen Enzyms aufgrund zellulärer Situationen beeinflussen. *In vitro* wird die OGA-Aktivität durch die Komplexbildung mit der OGT inhibiert (Whisenhunt et al., 2006). Jedoch könnte eine gehemmte OGA im Komplex mit der OGT diese ebenfalls hemmen, um eine Hyper-O-GlcNAcylierung der Zelle zu verhindern. Die Untersuchung der Zelllysate der HUVEC zeigten für die mit PUGNAc behandelten Zellen mit dem Antikörper AL28 eine Abnahme der OGT-Expression, die jedoch mit dem Antikörper AL25 nicht zu sehen war (s. Abbildung 27). Mit dem polyklonalen Antikörper AL25 lassen sich aufgrund der sehr starken Hintergrundbildung die Chemilumineszenzsignale immer nur schwer abgrenzen. Die O-GlcNAc-Modifikation der OGT ist unter PUGNAc-Einfluss erhöht (s. Abbildung 28). Eine

Inaktivierung durch Autoglykosylierung der OGT ist unter diesen Bedingungen nicht auszuschließen, da Untersuchungen zur Aktivität der sOGT zeigten, dass eine stark glykosylierte sOGT inaktiv ist (Abteilung Biochemie, unveröffentlicht). Viele der identifizierten Proteine zeigen unter HG-Einfluss eine verstärkte O-GlcNAc-Modifikation. Eine herunterregulierte OGT-Aktivität unter PUGNAc-Bedingungen könnte die geringere O-GlcNAc-Modifikation unter PUGNAc-Einfluss für einige Proteine erklären.

#### 4.3.3 Einfluss von Glucosamin auf die O-GlcNAc-Modifikation der Proteine

Im Vergleich zur Kontrollkultivierung im Standardglucosemedium konnte ein Anstieg der O-GlcNAc-positiven Signale nach Behandlung der HEK-Zellen mit 10 mM Glucosamin oder mit HG-Medium mit dem Antikörper CTD 110.6 durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse für die cytosolischen Proteine (s. Abbildung 35) und nach 2-DE für die cytosolische und nukleäre Proteinfraction beobachtet werden (s. Abbildung 36 und Abbildung 37). Liu et al. zeigten, dass die Behandlung mit 10 mM Glucosamin in künstlich durchbluteten Rattenherzen signifikant die O-GlcNAc-Modifikation der Proteine steigert (Liu et al., 2007). Glucosaminbehandlung stimuliert die O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen in verschiedenen Zellen stärker als die Inkubation mit HG (Marshall et al., 2004), was in dieser Arbeit für die nukleäre Proteinfraction bestätigt wurde (s. Abbildung 37). Glucosamin tritt an einer späten Stelle in den HBP ein, so dass die Feedbackhemmung der GFAT umgangen wird (s. Abbildung 6; Champattanachai et al., 2007). Hresko et al. zeigten in 3T3-L1 Adipozyten, dass eine Inkubation mit Glucosamin zur Senkung der ATP-Konzentration bedingt durch die verstärkte Bildung von UDP-GlcNAc führt (Hresko et al., 1998). So sollte bei Inkubation von Zellen mit Glucosamin die Abnahme der ATP-Konzentration berücksichtigt werden, welche weitere toxische Effekte auslösen kann (Wells et al., 2003). Ein Zellvitalitätstest unter diesen Bedingungen wäre ebenfalls sinnvoll. Taylor et al. führten die Kultivierung von Zellen mit Glucosamin in einem Glucose-freien Medium durch (Taylor et al., 2008; Taylor et al., 2009), was eventuell die Glucosaminaufnahme in den HEK-Zellen verbessert, da Glucose und Glucosamin beide über GLUT2 aufgenommen werden und somit um ihre Aufnahme konkurrieren.

#### 4.3.4 Zelluläre Reaktionen bei hoher Glucosekonzentration

Der Vergleich der 2D-aufgetrennten O-GlcNAc-modifizierten Proteine der beiden Zelllinien HUVEC und SkMC im pH-Gradienten 4-7 zeigt, dass mehr O-GlcNAc-modifizierte Proteine in den SkMC als in den HUVEC identifiziert wurden (zehn O-GlcNAc-positive Proteine in den HUVEC, mehr als 30 O-GlcNAc-positive Proteine in den SkMC; s. Abbildung 22 und Abbildung 31).

Die geringe Anzahl O-GlcNAc-modifizierter Proteine in HUVEC ist möglicherweise auf eine Reduzierung der Glucoseaufnahme durch GLUT1 des Endothels zurückzuführen, wie unter diabetischen Bedingungen gezeigt wurde (Gjedde und Crone, 1981; Matthaei et al., 1986; Kumagai et al., 1995). Hirsch und Rösen zeigten jedoch in Endothelzellen von Rattenherzen,

dass durch HG-Stimulation GLUT1 nicht herunterreguliert wird (Hirsch und Rösen, 1999). Vinals et al. beschrieben, dass die humanen Endothelzellen ECV304 als Reaktion auf erhöhte Glucosekonzentration im Medium eher die Glucoseutilisation durch inhibierte Glucose-Phosphorylierung regulieren anstatt den Glucosetransport zu blockieren (Vinals et al., 1999). Da die Hexokinase bei Assoziation mit der äußeren Mitochondrienmembran aktiv ist (Rose und Warms, 1967), könnte bei hoher Glucosekonzentration über einen Translokationsmechanismus die Kinase frei und damit inaktiv vorliegen, was eine verminderte Glucose-Phosphorylierung und geringe O-GlcNAc-Modifikation der Proteine erklären könnte (Vinals et al., 1999).

Ido et al. konnten *in vivo* zeigen, dass das metabolische Ungleichgewicht im Diabetes durch eine bevorzugte Sorbitoloxidation gegenüber der Pyruvatoxidation abläuft. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass die vaskuläre Dysfunktion im Beginn des Diabetes anfänglich durch erhöhten NADH-Spiegel verursacht wird, welche die Superoxidproduktion in der Atmungskette fördert (Ido et al., 2010). So könnte die aufgenommene Glucose in den HUVEC verstärkt zur Bildung von Polyolen genutzt werden. Eine intrazelluläre Anreicherung des Sorbitols resultiert in osmotischem Stress, was wiederum die zelluläre cytosolische Generation von Wasserstoffperoxid erhöht. Die gesteigerte Polyolbildung erschöpft den NAD(P)H-Pool und inhibiert somit die Bildung des reduzierten Glutathions, welches für die Aufrechterhaltung der Glutathionperoxidaseaktivität benötigt wird. Dadurch sinkt die zelluläre Antioxidansaktivität (Forbes et al., 2008).

#### 4.3.5 Bedeutung der identifizierten O-GlcNAc-modifizierten Proteine im Metabolismus der Zelle

Im nachfolgenden Abschnitt wird für die Zelllinien HUVEC und SkMC jeweils die Bedeutung der identifizierten, O-GlcNAcylierten Proteine für den Zellmetabolismus diskutiert. Viele der Proteine wurden in beiden Zelllinien nachgewiesen; bei einigen handelt es sich um konstitutive Proteine. Da es durch die HG-Exposition zur Entstehung von ROS und somit möglicherweise zur Einleitung der Apoptose kommt (Bellin et al., 2006; Du et al., 1999; Powis et al., 1997), wird weiter die mögliche Einbeziehung O-GlcNAc-modifizierter Proteine in diesen Prozess betrachtet. Weiterhin wichtig sind vor allem die O-GlcNAc-modifizierten Proteine, die möglicherweise bei der Entwicklung der endothelialen Dysfunktion bzw. der Insulinresistenz eine Rolle spielen. Viele der hier beschriebenen Proteine wurden unlängst als O-GlcNAc-modifiziert beschrieben (s. Tabelle 10, Tabelle 11 und Tabelle 12). Jedoch ist für die meisten Proteine noch nicht geklärt, inwieweit die O-GlcNAc-Modifikation ihre Funktionen beeinflusst.

#### 4.3.5.1 O-GlcNAc-modifizierte Proteine aus HUVEC

##### 4.3.5.1.1 Strukturproteine

Zu den identifizierten Strukturproteinen zählen das Vimentin, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des Tubulin, sowie die Actinisoformen  $\beta$  und  $\gamma$ . In vaskulären Endothelzellen kann eine hohe Glucosekonzentration die Cytoskelettstruktur beeinträchtigen (Mandal et al., 2000). Wagner et al. zeigten, dass Veränderungen des Cytoskeletts zum Zelltod führen können (Wagner et al., 2003), was von der Phosphorylierungsrate abhängen könnte. Somit könnte auch der O-GlcNAcylierungsstatus der Strukturproteine Einfluss auf die Zellstabilität haben.

Vimentin ist ein Typ3-Intermediärprotein. Nach HG-Inkubation von vaskulären Endothelzellen ist eine gesteigerte Vimentinexpression zu beobachten (Mandal et al., 2000), was augenscheinlich für die HUVEC nicht bestätigt werden konnte (s. Abbildung 23). Nach Inhibierung der GSK3 nimmt die O-GlcNAcylierung des Serin-55 des Vimentins zu (Wang et al., 2007), das benachbart zum phosphorylierbaren Serin-56 liegt (Li et al., 2006). Möglicherweise korreliert die gesteigerte O-GlcNAcylierung mit Veränderungen der Phosphorylierung und des Vimentinnetzwerkes (Wang et al., 2007). Slawson et al. demonstrierten, dass während der Cytokinese die OGT mit der OGA, der Aurora B und PP1 in einem Komplex lokalisiert ist. Dieser Komplex reguliert die posttranslationalen Modifikationen des Vimentin, jedoch bleibt die genaue Funktion des O-GlcNAcylierten Vimentins unklar (Slawson et al., 2008). Nach HG-, HGP- oder LGP-Inkubation der HUVEC kam es zur verminderten O-GlcNAc-Modifikation des Vimentin, was zur verstärkten Phosphorylierung des Vimentin und damit Stützung des Cytoskeletts führen könnte.

Tubulin ist ein Dimer aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten. Walgren et al. zeigten, dass die O-GlcNAc-Modifikation des  $\alpha$ -Tubulin bei HG-Inkubation gesteigert wird (Walgren et al., 2003). Dehennaut et al. schlossen aus der Beobachtung, dass OGT und O-GlcNAc-Modifikation an der meiotischen Spindel nachzuweisen sind, dass auch  $\beta$ -Tubulin O-GlcNAc-modifiziert vorliegt, obwohl sie es mit einem O-GlcNAc-spezifischen Antikörper nicht nachweisen konnten (Dehennaut et al., 2008b). In Adipozyten ist die Integrität des Cytoskeletts wichtig für die ordnungsgemäße Translokation der GLUT4-Vesikel nach Insulinstimulation (Fletcher et al., 2000; Guilherme et al., 2000; Olson et al., 2001).  $\alpha$ -Tubulin wurde in Membranen der GLUT4-Vesikel nachgewiesen (Guilherme et al., 2000). In einem *in vitro*-Assay mit 3T3-L1 Adipozyten konnten Olson et al. beobachten, dass GLUT4-Vesikel und IRS1 speziell an Mikrotubuli binden (Olson et al., 2001). Auch Interaktionen zwischen Tubulinisoformen und der PI3-Kinase sind beschrieben (Inukai et al., 2000; Kapeller et al., 1993; Kapeller et al., 1995). Inwieweit die O-GlcNAc-Modifikation des Tubulins eine Rolle spielt, ist noch unklar. In den HUVEC konnte nach HG-, HGP- und LGP-Inkubation eine Abnahme der O-GlcNAc-Modifikation der Tubulinisoformen beobachtet werden, was zur Stabilisierung der Zelle beitragen könnte.

Es wurden des weiteren die Isoformen  $\beta$ - und  $\gamma$ -Actin als O-GlcNAc-modifiziert identifiziert, was zuvor schon von Hédou et al. für Serin-200 des Actins nachgewiesen worden war (Hédou et al., 2007; Hédou et al., 2009). Sie wiesen der O-GlcNAc-Modifikation eine Bedeutung für die Kontraktion des Skelettmuskels zu, da die Schlüsselproteine der Kontraktion O-GlcNAc-modifiziert vorliegen und freies GlcNAc die Calciumsensitivität und die Calciumaffinität der Skelettmuskelfasern senkt (Hédou et al., 2007). Dieser Effekt könnte die Folge einer durch die O-GlcNAc-Modifikation veränderten Actin-Tropomyosin-Interaktion sein (Hédou et al., 2009). Ramirez-Correa et al. konnten auch das Serin-54 als O-GlcNAc-modifizierte AS des Actins nachweisen (Ramirez-Correa et al., 2008). Beltramo et al. zeigten, dass HG-Behandlung von Perizyten zur Schädigung des Cytoskeletts führt, was die Organisation der Actinfilamente einbezieht (Beltramo et al., 2006). In den HUVEC konnte keine Veränderung der O-GlcNAc-Modifikation für die identifizierten Actinisoformen beobachtet werden.

#### 4.3.5.1.2 Proteine des Stoffwechsels

In den HUVEC wurden das Isoenzym der Pyruvatkinase M1/M2 und die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase als O-GlcNAc-modifizierte Proteine des Stoffwechsels identifiziert. Das Isoenzym der Pyruvatkinase M1/M2 (PKM2) ist ein Schlüsselenzym der Glykolyse. PKM2 kann zwischen einer hoch aktiven tetramerschen und einer inaktiven dimerischen Form wechseln, was vom Glucosefluss abhängt (Spoden et al., 2009). Sie wurde von Wells et al. als O-GlcNAc-modifiziert beschrieben (Wells et al., 2002). Traxinger und Marshall konnten zeigen, dass das Enzym durch den HBP kontrolliert wird. Die Zunahme enzymatischer Aktivität bei Stimulation des HBP wird durch erhöhte mRNA- und Proteinexpression der PKM2 herbeigeführt (Traxinger und Marshall, 1992). Stetak et al. zeigten, dass die PKM2 nach Translokation in den Nukleus zu Caspase-unabhängiger Apoptose beiträgt (Stetak et al., 2007). Inwieweit die O-GlcNAc-Modifikation hierbei eine Rolle spielt, ist noch unklar.

Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) hat außer in Glykolyse und Gluconeogenese weitere Funktionen. Sie beeinflusst das Cytoskelett, z.B. durch Assoziation mit Tubulin und hat Kinaseaktivität (Kumagai und Sakai, 1983; Duclos-Vallee et al., 1998). GAPDH und Hexokinase II interagieren in reziproker Weise mit GLUT4, was die intrinsische Aktivität des GLUT4 nach Insulinstimulation zu regulieren scheint (Zaid et al., 2009). Die GAPDH spielt eine Rolle bei der retinalen Zellapoptose, welche durch Bluthochdruck und hohe Glucosespiegel induziert wird (Kim et al., 2006d; Kusner et al., 2004). Die S-Nitrosylierung der GAPDH steigert ihre Bindung an die E3-Ubiquitinligase Siah1 und aufgrund des Kernlokalisationsmotivs der Ligase kommt es zum Transport in den Nukleus. Dort stabilisiert die GAPDH den schnellen Umsatz der Siah1, was die Degradierung definierter Proteine ermöglicht und Apoptose bewirkt (Hara et al., 2005; Hara und Snyder, 2006). Du et al. zeigten, dass die GAPDH-Aktivität durch Hyperglykämie induzierte Überproduktion von Superoxiden inhibiert wird (Du et al., 2003). Die GAPDH-Inhibierung

erfolgt durch poly(ADP)-Ribosylierung durch PARP, welche durch DNA-Strangbrüche aktiviert wird (Garcia et al., 2001). Die PARP-Aktivierung wird als wichtiger Faktor in der Entwicklung endothelialer Dysfunktion und im Verlauf diabetischer Komplikationen gesehen (Pacher und Szabo, 2005). Es ist gezeigt worden, dass die GAPDH sich zum einen autophosphoryliert und zum anderen durch die PKC Phosphatidylserin-abhängig phosphoryliert wird (Kawamoto und Caswell, 1986; Reiss et al., 1996 a+b). Untersuchungen zum Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf die Aktivität der GAPDH stehen noch aus.

Die PKM2 und die GAPDH zeigen nach HG-, HGP- und LGP-Inkubation der HUVEC eine gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation. Da die Glykolyse unter hyperglykämischen Bedingungen herunterreguliert wird, wird die Aktivität der Enzyme im Glucosestoffwechsel durch die O-GlcNAc-Modifikation eventuell negativ beeinflusst.

#### 4.3.5.1.3 Proteine der Energie-/Redoxregulation

Zu den identifizierten Proteinen der Energie- bzw. Redoxregulation zählen die mitochondriale  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase, die Glutathion-S-Transferase P, das Thioredoxindomäne-enthaltende Protein 5, die Proteindisulfidisomerase A3 sowie A6 und die mitochondriale Pyrrolin-5-Carboxylatreduktase 1.

Højlund et al. zeigten, dass die  $\beta$ -Untereinheit der ATP-Synthase im humanen Skelettmuskel an vielen Stellen phosphoryliert ist (Højlund et al., 2003; Højlund et al., 2010). Die Phosphorylierung der ATP-Synthase partiell an Serinresten senkt ihre Aktivität. Im Diabetes kommt es zur reduzierten Anzahl der ATP-Synthasen und der Proteine der oxidativen Phosphorylierung, was zur mitochondrialen Dysfunktion beitragen könnte (Højlund et al., 2010) und in der Abnahme der ATP-Konzentration mündet (Köhnke et al., 2007). Friederich et al. konnten an isolierten Mitochondrien des Nierenkortex zeigen, dass es unter Hyperglykämie zur Entkopplung der Atmungskette durch die Zunahme der Expression und Aktivität des Entkopplungsprotein 2 kommt (Friederich et al., 2008), was auch zur Erniedrigung der ATP-Produktion führt. Es bleibt zu untersuchen, welche Serine und Threonine O-GlcNAc-modifiziert vorliegen und wie die Aktivität der ATP-Synthase dadurch beeinflusst wird. In den HUVEC kommt es nach HG- und PUGNAc-Inkubation zu einer gesteigerten O-GlcNAc-Modifikation dieses Enzyms.

Die Glutathion-S-Transferase P ist in die Redoxregulation der Zelle involviert. Die S-Glutathionylierung von Proteinen stellt eine posttranslationale Modifikation dar und greift reversibel in die Proteinregulation ein (Townsend, 2007). Erhöhte ROS-Konzentration und reaktive Stickstoffmonoxidspezies können die S-Glutathionylierung fördern und somit die Proteine vor der oxidativen oder nitrosativen Schädigung schützen. Glutathiontransferasen spielen auch eine regulatorische Rolle in zellulären Signalkaskaden durch Assoziation mit bestimmten Kinasen, welche für Apoptose, Proliferation und Stressverarbeitung von Bedeutung sind (Adler et al., 1999a; Wang et al., 2001). Die Inhibierung der c-Jun-aminoterminalen Kinase (JNK) durch die Glutathion-S-Transferase P wurde als Beispiel für

die Regulation von Kinasen durch Glutathiontransferasen beschrieben (Adler et al., 1999b). JNK wirkt pro-apoptotisch (Yin et al., 2000). Unter Stressbedingungen wird der Komplex aus JNK, c-Jun und der Glutathion-S-Transferase P nach S-Glutathionylierung aller Proteine aufgelöst, so dass JNK aktiv vorliegt (Cross und Templeton, 2004; Klatt und Lamas, 2002; Townsend, 2007). Ho et al. zeigten in HUVEC, dass Hyperglykämie ROS generiert, was wiederum die JNK aktiviert und damit die Apoptose auslöst (Ho et al., 2000; Ho et al., 2006). Möglicherweise könnte bei oxidativem Stress die Glutathion-S-Transferase P O-GlcNAc-modifiziert werden, was auch ein Signal für die Auflösung des Komplexes mit der JNK darstellen könnte. In dieser Arbeit lag die Glutathion-S-Transferase P jedoch nur nach PUGNAc-Kultivierung der HUVEC verstärkt O-GlcNAc-modifiziert vor.

Das Thioredoxidomäne-enhaltende Protein 5 gehört zur Familie der Proteindisulfid-isomerasen und verfügt über Thioredoxinaktivität. Es reduziert z.B. die Disulfidbrücken des Insulins. Sullivan et al. identifizierten es unter dem Namen endotheliale Proteindisulfid-isomerase (EndoPDI), da es in endothelialen Zellen stark exprimiert wird. EndoPDI übt protektive Funktionen in endothelialen Zellen unter Stressbedingungen aus (Sullivan et al., 2003). Da das Protein nach Inkubation mit HG-, HGP- und LGP verstärkt O-GlcNAc-modifiziert vorliegt, könnte dies die schützende Funktion des Enzyms unterstützen.

Die Proteindisulfidisomerasen A3 (Erp57) und A6 katalysieren die Reorganisation der S-S-Brücken in Proteinen (Bourdi et al., 1995). Die Proteindisulfidisomerase A6 spielt eine Rolle in der Proteinfaltung (Basrur et al., 2003), ebenso Erp57, welches mit Calreticulin, Calnexin und Erp27 interagiert (Alanen et al., 2006). Guo et al. konnte die Assoziation zwischen Erp57 und Stat3 in einem Komplex nachweisen. So könnte Erp57 durch Aktivierung und Inaktivierung von Stat3 Signale regulieren (Guo et al., 2002). Bekannt unter GRP58 zählt Erp57 zur Gruppe der Glucose-regulierten Proteine (GRP) (Lee, 1987). Erp57 kommt in einem nukleären Multiproteinkomplex mit GAPDH, HSC70 sowie HMG1 und HMG2 („High Mobility Group Protein 1 und 2) vor, welcher veränderte DNA erkennt und in die DNA-Reparatur eingreift (Krynetski et al., 2003). Andererseits kann es direkt an DNA-Reparaturgene binden (Chichiarelli et al., 2007). Die Expression des Erp57 wird durch zellulären Stress, wie z.B. durch Verringerung des Calciumspiegels des ER, die Anwesenheit falsch gefalteter Proteine, reduktiven Stress, Inhibierung der Glykosylierung, Hypoxie und niedrige pH-Werte induziert (Lee, 2001). Erp57 zeigt in dieser Arbeit eine verstärkte O-GlcNAc-Modifikation nach HG-, HGP- und LGP-Kultivierung der HUVEC. Daher könnte die Modifikation ein Erkennungsmerkmal für Stress darstellen bzw. auch funktionell bei Stress eine Rolle spielen.

Die mitochondriale Pyrrolin-5-Carboxylatreduktase 1 (PYCR1) ist in die zelluläre Reaktion bei oxidativem Stress involviert. Sie spielt auch eine Rolle in der Aminosäurebiosynthese bzw. Prolinbiosynthese. PYCR1 katalysiert den Transfer vom NAD(P)H auf Pyrrolin-5-Carboxylat, wodurch NAD(P)<sup>+</sup> und Prolin gebildet werden (Adams und Frank, 1980). Die Oxidation des NADPH erhöht die Aktivität des Pentosephosphatweges, da die Inhibierung der

Glucose-6-Phosphatdehydrogenase aufgehoben wird (Yeh und Phang, 1988). Entsteht durch Hyperglykämie vermehrt Glucose-6-Phosphat, so wird dies eventuell auch vermehrt durch den Pentosephosphatweg verstoffwechselt. Möglich wäre es, dass die O-GlcNAcylierte Form der PYCR1 nach HG-Inkubation ihre Enzymaktivität verstärkt und als Folge davon der Pentosephosphatweg aktiviert wird.

Da die identifizierten Proteine der Energie-/Redoxregulation nach HG- oder PUGNAC-Behandlung eher verstärkt O-GlcNAc-modifiziert vorliegen, könnte die Modifikation einen positiven Einfluss auf die Redoxhomöostase nehmen, um zellulärem Stress entgegenzuwirken.

#### 4.3.5.1.4 Chaperone

Zu den identifizierten Proteinen mit Chaperonfunktion gehören das artverwandte Hitzeschockprotein 71 kDa (HSC70), der Vorläufer des mitochondrialen Stress-70 Proteins (GRP75), das Hitzeschockprotein 60 kDa (HSP60), das Calreticulin, die  $\epsilon$ - Untereinheit des T-Komplexprotein 1 (CCT5) und das Hitzeschockprotein  $\beta$ 1 (HSP27).

HSC70 und GRP75 sind Hitzeschockproteine und gehören zur konstitutiv exprimierten HSP70-Familie. Sie werden durch Stress, wie Hitzeschock, Ischämie, oxidativem Stress, Glucoseentzug und Toxine verstärkt exprimiert (Kiang und Tsokos, 1998), was in dieser Arbeit nach HG- oder PUGNAC-Inkubation der HUVEC nicht beobachtet werden konnte (s. Abbildung 23). Einige Proteine der HSP70-Familie weisen eine spezifische Lektinaktivität gegenüber O-GlcNAc auf, die unter Stress gesteigert wird (Lefebvre et al., 2001; Zachara et al., 2004; Guinez et al., 2004). So könnten die Proteine als Chaperone fungieren, wobei die O-GlcNAcylierung die Proteine unter Stress stabilisiert. Ohn et al. fanden in Stressgranula Proteine, welche die Translation und den Abbau der mRNA regulieren und unter Stress O-GlcNAc-modifiziert vorliegen (Ohn et al., 2008). Zu diesen Proteinen zählen GAPDH, der Rezeptor der aktivierten Proteinkinase C1, Prohibitin 2 und viele ribosomale Proteine. Die O-GlcNAc-Modifikation des HSP70 kann die Lokalisation dieser Proteine durch Translokation zwischen Nukleus und Cytoplasma regulieren und ihre Proteinstabilität beeinflussen (Lefebvre et al., 2001; Walgren et al., 2003; Guinez et al., 2004). Shiota et al. zeigten, dass HSC70 für die endotheliale Funktion essentiell ist, da es Akt aktivieren kann (Shiota et al., 2010). Inwieweit die gesteigerte O-GlcNAcylierung des HSC70 diese Interaktion verhindert und damit zur Entstehung der endothelialen Dysfunktion beiträgt, bleibt zu untersuchen.

Das HSP60 verhindert durch Interaktion mit Bax die Apoptose (Lin et al., 2001; Gupta und Knowlton, 2002). Kim et al. zeigten, dass HSP60 unter hyperglykämischen Bedingungen verstärkt O-GlcNAcyliert ist, was die Bindung an Bax verhinderte und den Zelltod der  $\beta$ -Zellen zur Folge hatte (Kim et al., 2006c). Da auch in HUVEC HSP60 als O-GlcNAc-modifiziert dokumentiert wurde, kann dies mit ein Faktor für das Auslösen der Apoptose in diesen Zellen sein.

Calreticulin lenkt im ER sowohl die Konformation von Proteinen und Glykoproteinen, als auch die Kontrolle der cytosolischen und ER-Calciumkonzentration. Es ist ein „Multikompartimentenprotein“ und übt wichtige Funktionen bei der Wundheilung und der Immunantwort, aber auch bei Fibrose und Krebs aus (Gold et al., 2010). Sprung et al. identifizierten das durch Calcium regulierte Chaperon Calreticulin als O-GlcNAc-modifiziert (Sprung et al., 2005). Unter Einfluss von HG destabilisiert Calreticulin die mRNA des GLUT1 indem es an eine destabilisierende, glucose-sensitive Region des Proteins bindet und die GLUT1-Expression senkt. So wird die Zelle vor zu starkem Glucoseeinfluss geschützt (Totary-Jain et al., 2005). Überexpression von Calreticulin in HEK-Zellen erniedrigt den mitochondrialen Calciumspiegel und das Membranpotential, was zur verstärkten Cytochrom c-Freisetzung und größerer Anfälligkeit der Zellen für Apoptose führt (Arnaudeau et al., 2002). Da in dieser Arbeit das Calreticulin unter hyperglykämischen Bedingungen verstärkt O-GlcNAc-modifiziert ist, könnte postuliert werden, dass Calreticulin in dieser Form verstärkt die Expression von GLUT1 hemmt, um eine weitere Glucoseaufnahme zu verhindern. Unter PUGNAc-Exposition war jedoch keine Zunahme der O-GlcNAc-Modifikation zu beobachten.

Das CCT5 ist vor allem für die Faltung von Actin und Tubulin verantwortlich, beides Proteine, die auch als O-GlcNAc-modifiziert nachgewiesen wurden (Hédou et al., 2007; s. Tabelle 10). Wird die Proteinkonzentration des CCT5 reduziert, so sinkt auch die Konzentration der Tubuline, welche die Interaktion mit dem CCT5 benötigen, um ihren vollen nativen Status zu erlangen (Cowan und Lewis, 2001). Da CCT5 in den HUVEC im Vergleich zur Kontrolle verstärkt O-GlcNAc-modifiziert vorliegt, könnte vermutet werden, dass dadurch die korrekte Faltung dieser Cytoskelettproteine beeinflusst wird.

Das HSP27 zählt zur HSP20-Familie, interagiert mit Tubulin und ist in die Actinorganisation involviert (Hino et al., 2000; van Why et al., 2003). Die sogenannten „kleinen“ HSPs kontrollieren Proteine über ihre posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierung und O-GlcNAc-Modifikation (Kim et al., 1984; Rollet und Best-Belpomme, 1986; Arrigo, 1990; Roquemoire et al., 1992) und verlängerte Halbwertszeit als Antwort auf Hitzeschock und andere Stimuli (Edington und Hightower, 1990). Huot et al. zeigten in HUVEC, dass bei oxidativem Stress HSP27 durch eine MAP-Kinase phosphoryliert wird und Actinfilamente reorganisiert (Huot et al., 1997). In MCF-7-Zellen wird das HSP27 nach Aktivierung der PKC und durch Hitzeschock phosphoryliert (Faucher et al., 1993; Landry et al., 1992). HSP27 aktiviert pro-apoptotische Caspasen und Cytochrom c wird verstärkt freigesetzt (Garrido et al., 1999; Pandey et al., 2000; Bruey et al., 2000; Paul et al., 2002). Phosphoryliertes HSP27 bindet an das Todesdomänen-assoziierte Protein (Daxx) und inhibiert so die durch Fas eingeleitete Apoptose (Charette und Landry, 2000). Unter Stresseinfluss verhindert HSP27 die Inaktivierung von Akt, erhöht die Interaktion zwischen Akt und Bax und verhindert die Apoptose (Havasi et al., 2008). Dreher et al. zeigten, dass oxidativer Stress bzw. Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration und -speicher zur gesteigerten

Expression des HSP27 führt (Dreher et al., 1995), jedoch nimmt nach Hitzeschock die Expression ab (Wagner et al., 1999). In den HUVEC konnte weder eine Änderung der Expression noch der O-GlcNAc-Modifikation des HSP27 durch HG- oder PUGNAc-Einfluss gezeigt werden.

#### 4.3.5.1.5 Proteine der Signaltransduktion

Das Spannungsabhängige Anionenkanalprotein 2 (VDAC2) ist ein Porinprotein. Die durch VDAC geformte Pore in der äußeren Mitochondrienmembran ist permeabel für Moleküle mit einem geringen MW (Colombini, 1979). Die Hexokinase bindet durch Assoziation mit VDAC an die äußere Mitochondrienmembran und erlangt so gezielten Zugang zum ATP aus dem Mitochondrium, wodurch die Rate der aeroben Glykolyse gesteigert wird (Arora und Pedersen, 1988). Cheng et al. zeigten, dass VDAC2 die Aktivierung des proapoptotischen Faktors BAK inhibiert und damit Apoptose verhindert (Cheng et al., 2003). Verstärkt O-GlcNAc-modifiziertes VDAC verhindert ein Anschwellen der Mitochondrien (Jones et al., 2008). Da das VDAC2 in dieser Arbeit nach hyperglykämischer Behandlung der HUVEC stärker O-GlcNAc-modifiziert vorliegt, könnte die O-GlcNAc-Modifikation des VDAC2 eine protektive Rolle für die Zelle bzw. die Mitochondrien im Diabetes spielen.

Der Rezeptor der aktivierten Proteinkinase C1 (RACK1) erhöht nach Bindung der PKC ihre Kinaseaktivität (Ron et al., 1994). RACK1 transportiert die aktivierte PKC von der einen intrazellulären Seite zur anderen und greift in die Translationsregulation ein, da es mit der aktivierten PKC in den Ribosomen interagiert (Ron et al., 1999). Die PKC phosphoryliert den eukaryotischen Initiationsfaktor 6, wodurch die Translation stimuliert wird (Ceci et al., 2003). RACK1 ist in die Kontrolle der Translation des heterologen Ribonukleoproteins (Hnrnp) K involviert (Nilsson et al., 2004), eventuell könnten auch weitere Hnrnps durch RACK1 kontrolliert werden. Ohn et al. beschrieben, dass RACK1 unter Stressbedingungen in Stressgranula O-GlcNAc-modifiziert vorliegt. Die O-GlcNAc-Modifikation könnte ein Signal im Translationskomplex für die Aggregation der untranslatierten Ribonukleoproteine in Stressgranula darstellen (Ohn et al., 2008). So könnte durch die verstärkte O-GlcNAc-Modifikation des RACK1 nach HG-, HGP- und LGP-Inkubation die Interaktion mit der PKC gestört sein und RACK1-mRNA vermehrt abgebaut werden.

#### 4.3.5.1.6 Proteine der Transkription

Die Hnrnp A1 und A3 sind Komponenten der Ribonukleosomen. Hnrnps assoziieren mit prä-mRNA und sind beim prä-mRNA-Prozessieren, alternativen Spleißen, bei Transkriptionsregulation und mRNA-Transport beteiligt (Carpenter et al., 2006). HnrnpA1 transportiert die Pyruvatkinase zum Nukleus (Siomi und Dreyfuss, 1995). David et al. wiesen nach, dass die Bindung von HnrnpA1 und weiteren Hnrnps an die DNA der Pyruvatkinase die Expression der Kinase positiv beeinflusst (David et al., 2010). Da die O-GlcNAc-Modifikation auf verschiedene Art Einfluss auf die Transkription ausübt, könnte die gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation des HnrnpA1 nach HG-Kultivierung der HUVEC die Transkription der

Pyruvatkinase vermindern. Da jedoch unter PUGNAc-Kultivierung die O-GlcNAc-Modifikation sinkt, spielen weitere durch HG induzierte Prozesse eine Rolle.

#### 4.3.5.1.7 Proteine des Proteinabbaus

Das Isoenzym der carboxyterminalen Ubiquitinhydrolase L1 (UCHL1) wurde von Cole und Hart als O-GlcNAc-modifiziert nachgewiesen (Cole und Hart, 2001). UCHL1 gehört zur Familie der deubiquitinierenden Enzyme (Wilkinson et al., 1989). Es ist bekannt, dass die O-GlcNAc-Modifikation Proteine stabilisieren kann, indem es proteasomalen Abbau verhindert (Han und Kudlow, 1997; Cheng und Hart, 2001). Guinez et al. wiesen die O-GlcNAc-Modifikation des aktivierenden Ubiquitinenzyms E1 nach (Guinez et al., 2008). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Ubiquitinierungskaskade und der Deubiquitinierungsprozess durch O-GlcNAc reguliert werden. Da die PUGNAc-Kultivierung der HUVEC zu einer Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation der UCHL1 führt, könnte dies positiven Einfluss auf die Stabilität der Proteine nehmen.

#### 4.3.5.2 O-GlcNAc-modifizierte Proteine in SkMC

Viele der O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurden auch in den HUVEC nachgewiesen und daher im vorherigen Abschnitt besprochen (s. 4.3.5.1). Die Stärke der O-GlcNAc-Modifikation unterscheidet sich jedoch für einzelne Proteine in den beiden Zelllinien.

##### 4.3.5.2.1 Strukturproteine

Durch Proteomanalysen sind viele Proteine des Skelettmuskels als O-GlcNAc-modifiziert nachgewiesen worden, was der O-GlcNAc-Modifikation eine Bedeutung für die Kontraktion oder Dilatation von Skelettmuskelzellen zuweist (Cieniewski et al., 2004; Hédou et al., 2007). In den SkMC wurden in dieser Arbeit folgende O-GlcNAc-modifizierte Strukturproteine nachgewiesen: die  $\beta$ -,  $\alpha$ 1-,  $\alpha$ 2- und kardiale  $\alpha$ -Actinisformen, die  $\beta$ -Kette des Tubulin, Desmin, Gelsolin sowie die  $\alpha$ 4- und  $\beta$ -Kette des Tropomyosins.

Interessanterweise kann für die Actinisformen, welche in der nukleären Proteinfraction identifiziert wurden, eine gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation sowohl nach HG- als auch nach PUGNAc-Behandlung nachgewiesen werden. Es ist möglich, dass die O-GlcNAcylierung dieser Isoformen einen Transport in den Nukleus bewirken können. In Einklang damit zeigen die Isoformen der cytosolischen Fraktion nach PUGNAc-Inkubation der Zellen eine Abnahme der O-GlcNAc-Modifikation.

Desmin ist ein Typ3-Intermediärfilament und kommt im skelettalen, kardialen und glatten Muskelzellen vor. Untersuchungen mit Desmin-k.o.-Mäusen zeigten, dass Desmin eine Rolle für die mechanische Stabilität der Zellen spielt (Li et al., 1999; Milner et al., 1996). Hwang et al. wiesen in Insulin-resistenten Muskeln eine Reduktion der cytoskelettalen Proteine Desmin und  $\alpha$ -Actinin-2 nach. Sie folgerten, dass Insulinresistenz mit Veränderungen der Muskelstruktur einhergeht (Hwang et al., 2010). In der nukleären Fraktion der SkMC wurden Isoformen mit unterschiedlichem pI nachgewiesen, die nach PUGNAc-Behandlung

variierende Stärken der O-GlcNAc-Modifikationen aufwiesen. Nur nach HG-Inkubation konnte Desmin verstärkt O-GlcNAc-modifiziert nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass neben einem erhöhten Durchsatz durch den HBP weitere Veränderungen des Glucosestoffwechsels von Relevanz sind. Es konnte keine Veränderung der Expression beobachtet werden (s. Abbildung 30, Spots 12-14).

Gelsolin ist ein Calcium-abhängiges Actin-Bindeprotein (Yin und Stossel, 1979). Calcium führt zur Exposition der Actinbindestellen, was Gelsolin ermöglicht, Actin zum Nukleus zu transportieren (Khaitlina und Hinssen, 2002). Proteine der Gelsolinfamilie werden *in vitro* und *in vivo* durch verschiedene Proteinkinasen phosphoryliert (De Corte et al., 1999). Des Weiteren ist Gelsolin bei der Regulation der Apoptose beteiligt (Müllauer et al., 1993; Tanaka et al., 2006). Gelsolin kann durch die Caspase-3 abgebaut werden. Das N-terminale Fragment kann Actinfilamente Calcium-unabhängig dissoziieren und löst das Actin-basierende Cytoskelett so weit auf, dass Apoptose eingeleitet wird (Kothakota et al., 1997). Li et al. wiesen nach, dass Gelsolin für die durch Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$  induzierte ROS-Entstehung in MCF-7 Zellen erforderlich ist (Li et al., 2009). In den SkMC bewirkt nur die Inkubation mit PUGNAc eine Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation des Gelsolins.

Die  $\alpha$ 4- und  $\beta$ -Kette des Tropomyosin binden an Actinfilamente und spielen eine zentrale Rolle bei der Assoziation mit dem Troponinkomplex in der Calcium-abhängigen Regulation der Muskelkontraktion. In Nicht-Muskelzellen stabilisiert Tropomyosin Actinfilamente und damit das Cytoskelett. Die Interaktion von Actin und Myosin wird durch Tropomyosin, das Calcium-abhängig an Troponin bindet, moduliert (Gordon et al., 2000). Die Phosphorylierung des Serin-283 ist für die Interaktion mit Actin notwendig (Sano et al., 2000). Da die O-GlcNAc-Modifikation ebenfalls die Protein-Protein-Interaktion kontraktiler Proteine beeinflussen kann (Hédou et al., 2007), könnte die mögliche O-GlcNAc-Modifikation dieses Serins die Phosphorylierung verhindern und zur Destabilisierung der Zelle beitragen. Es zeigte sich nur nach LGP-Inkubation eine gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation des Tropomyosins.

#### 4.3.5.2.2 Proteine des Stoffwechsels

Die identifizierten O-GlcNAc-modifizierten Proteine des Stoffwechsels sind die mitochondriale Aconitathydratase, das Isoenzym der Pyruvatkinase M1/M2, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Enolase, die Phosphoglyceratkinase 1, die cytoplasmatische Malatdehydrogenase, die Fructose-bisphosphataldolase A, die Triosephosphatisomerase und die GAPDH.

Chen et al. beschrieben die Stabilisierung mitochondrialer DNA (mtDNA) durch die mitochondriale Aconitathydratase, was eine neue Form der Stoffwechselkontrolle darstellt. Der Energiemetabolismus wird auf diese Weise direkt an die mitochondriale Genexpression gekoppelt (Chen et al., 2005). Superoxidanionenradikale führen in isolierten Mitochondrien zur Inaktivierung des Enzyms und lösen pathophysiologische Prozesse aus (Vasquez-Vivar et al., 2000). Addabbo et al. simulierten in Mäusen die endotheliale Dysfunktion durch

Inhibierung der NO-Synthese, was zur Abnahme der Expression der Aconitathydratase führte (Addabbo et al., 2009). In den SkMC ist augenscheinlich keine Veränderung des Expressionsmusters des Proteins nach HG- als auch PUGNAc-Inkubation zu erkennen (s. Abbildung 34), jedoch ist die O-GlcNAcylierung gesteigert. Die O-GlcNAc-Modifikation könnte entweder die Funktion des Enzyms im Citratzyklus oder seine mtDNA-stabilisierende Wirkung beeinflussen, was bei oxidativem Stress von Bedeutung sein könnte.

Die  $\beta$ -Enolase, ein Enzym der Glykolyse, ist im Muskelgewebe lokalisiert (Chen und Giblett, 1976). Die  $\alpha$ -Enolase wird in nahezu allen Geweben exprimiert und weist zusätzlich zu ihrer Rolle in der Glykolyse weitere Funktionen auf. Sie ist ein neurotropher Faktor (Takei et al., 1991; Hattori et al., 1994; Hattori et al., 1995), das HSP48 (Iida und Yahara, 1984), ein Hypoxiestressprotein (Aaronson et al., 1995), ein Transkriptionsfaktor (Ray und Miller, 1991; Subramanian und Miller, 2000) und ein Plasminogen-Bindeprotein (Nakajima et al., 1994; Pancholi und Fischetti, 1998). Ein alternatives Spleißprodukt der  $\alpha$ -Enolase ist das c-Myc-Bindeprotein, welches negativen Einfluss auf die c-Myc Transkription ausübt (Ray und Miller, 1991; Feo et al., 2000). Die Genexpression der  $\alpha$ -Enolase selber wird durch c-Myc induziert (Kim und Dang, 2005), was eine "Feedbackkontrolle" aufzeigt, die die c-Myc-Expression und glykolytische Aktivität reguliert (Sedoris et al., 2007). Da c-Myc auch O-GlcNAc-modifiziert ist und dadurch stabilisiert wird, könnte die O-GlcNAc-modifizierte Form des c-Myc Einfluss auf die  $\alpha$ -Enolase-Induktion ausüben. Beide Isoformen der Enolase weisen durch HG-Kultivierung eine verstärkte O-GlcNAc-Modifikation auf, jedoch wird diese durch PUGNAc gesenkt. Da die glykolytische Aktivität unter Hyperglykämie gesenkt ist, könnte die O-GlcNAc-Modifikation einen negativen Regulationsmechanismus der Enolase darstellen.

Die Phosphoglyceratkinase 1 (PGK1) ist ein ATP-produzierendes Enzym der Glykolyse. Im Nukleus beeinflusst PGK1 die DNA-Replikation und -Reparatur (Ronai, 1993) und agiert als Primererkennungsprotein. Die verstärkte O-GlcNAc-Modifikation unter HG-Einfluss könnte die nicht-glykolytische Funktion des Enzyms unterstützen, da es bei Hyperglykämie bzw. Induktion der Apoptose vermehrt zu DNA-Schäden kommen kann.

In den meisten eukaryotischen Zellen kommt die Malatdehydrogenase (MDH) in den zwei Isoformen der mitochondrialen MDH, einem essentiellen Enzym im Citratzyklus, und der cytosolischen MDH (MDH1) vor, welche ein Enzym der Gluconeogenese ist und für den Transfer der reduzierenden Äquivalente mittels Malat-Aspartat-Shuttle über die Mitochondrienmembran zuständig ist (Goward und Nicholls, 1994). Lee et al. entdeckten, dass MDH1 mit p53 assoziiert. Glucoseentzug stabilisiert MDH1 und aktiviert p53 durch Bindung an das p53-responsive Element (Lee et al., 2009). So wird wiederum eine Verbindung zwischen Stoffwechsel und Genexpression hergestellt und ist ein weiteres Beispiel dafür, wie zelluläre Abläufe als Reaktion auf metabolischen Stress kontrolliert werden können. Da p53 in O-GlcNAc-modifizierter Form stabilisiert wird (Yang et al., 2006),

könnte die O-GlcNAc-Modifikation der MDH1 die Bindung an p53 stabilisieren und zur Apoptose beitragen. In den SkMC nach HG- und PUGNAc-Kultivierung liegt die MDH1 verstärkt O-GlcNAc-modifiziert vor.

Die Fructosebisphosphat-Aldolase A (ALDOA) konnte in Stressgranula nachgewiesen werden, lag jedoch nicht O-GlcNAc-modifiziert vor (Ohn et al., 2008). In dieser Arbeit konnte die ALDOA als O-GlcNAc-modifiziert nachgewiesen werden, jedoch führte nur die Kultivierung mit HG-Medium zur Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation.

Die Triosephosphatisomerase (TPI) katalysiert die Umwandlung von DHAP in GAP in der Glykolyse bzw. umgekehrt in der Gluconeogenese (Rieder und Rose, 1959). GAP wird durch die GAPDH weiter zu 1,3-Diphosphoglycerat oxidiert. Verringerte GAPDH-Aktivität bei Diabetes mellitus führt zur Anreicherung der Intermediate in den vorherigen Schritten der Glykolyse (Du et al., 2003; Brownlee, 2005). Cieniewski-Bernard et al. konnten die TPI als O-GlcNAc-modifiziert identifizieren, jedoch gibt es keinen Hinweis über den Einfluss der Modifikation auf das Enzym (Cieniewski-Bernard et al., 2004). In dieser Arbeit nimmt unter PUGNAc-Inkubation die O-GlcNAc-Modifikation ab und unter HG zu, so dass die O-GlcNAc-Konzentration die Regulation des Enzyms beeinflussen könnte.

#### 4.3.5.2.3 Proteine der Energie-/Redoxregulation

Als O-GlcNAc-modifizierte Proteine der Energie- bzw. Redoxregulation sind die Proteindisulfidisomerase, die Proteindisulfidisomerase A3, die Retinaldehyddehydrogenase 1, die Kreatinkinase B-Typ, das Peroxiredoxin-1 und -6 sowie die putative Chinonoxidoreduktase identifiziert worden.

Die Proteindisulfidisomerase (PDI) wurde von Sprung et al. als O-GlcNAc-modifiziert beschrieben (Sprung et al., 2005). Die PDI beeinflusst durch Katalyse von Disulfidbrücken das Falten der Proteine. Die Hyper-O-GlcNAcylierung des Proteins wird als Reaktion auf oxidativen Stress gesehen (Park et al., 2007) und könnte die Chaperonfunktion der PDI fördern. Überexpression der PDI reduziert die Glucose-stimulierte Insulinsekretion und induziert ER-Stress, was in einer Akkumulation von Proinsulin im ER resultiert (Zhang et al., 2009). Die PDI wurde in der nukleären Proteinfraction verstärkt O-GlcNAc-modifiziert nach HG-, HGP- und LGP-Inkubation der SkMC nachgewiesen, so dass die Modifikation die Translokation der PDI vom ER zum Nukleus bewirken könnte.

Die Retinaldehyddehydrogenase 1 (Raldh1) dehydriert Retinal zu Retinsäure, die den Metabolismus reguliert, indem sie spezielle nukleäre Rezeptoren, wie den Retinsäurerezeptor und den Retinoid-X-Rezeptor (RXR) aktivieren. RXR bildet mit dem Peroxisomen-Proliferator-aktivierenden Rezeptor (PPAR) einen heterodimeren Kernrezeptor (Shulman und Mangelsdorf, 2005). PPAR hat regulatorische Funktionen im Metabolismus verschiedener Organe wie Fettgewebe, Skelettmuskel und Herz (Barish et al., 2006). Raldh1-defiziente Mäuse zeigen höhere Stoffwechselraten und sind durch eine hohe Retinaldehydkonzentration gegen Diät-induzierte Insulinresistenz geschützt (Ziouzenkova et al., 2007). Inwieweit die O-

GlcNAc-Modifikation des Raldh1 den Einfluss über RXR und PPAR auf den Metabolismus und die Transkription beeinflusst, bleibt zu untersuchen. In den SkMC wurden zwei Isoformen des Enzyms mit unterschiedlichem pI (s. Abbildung 33, Spot 26 und 31) identifiziert, die ein inhomogenes Bild der O-GlcNAc-Modifizierung zeigen.

Kreatinkinasen spielen eine zentrale Rolle in der Energietransduktion in Geweben mit hoher Energiefluktuation, wie z.B. im Skelettmuskel. Schlattner et al. zeigten, dass die Kreatinkinase mit dem VDAC agiert (Schlattner et al., 2006), was einen möglichen Einflussfaktor für die Entstehung der Apoptose darstellen kann. Die Kreatinkinase wird durch die AMP-aktivierte Kinase phosphoryliert und inaktiviert (Ponticos et al., 1998). Ob eine O-GlcNAc-Modifikation die Aktivität der Kreatinkinase erhöht, ist noch unklar. Nur unter HG-Einfluss ist eine verstärkte O-GlcNAc-Modifikation der Kreatinkinase in den SkMC nachzuweisen.

Peroxiredoxin-1 (Prdx1) reduziert Peroxide über das Thioredoxinsystem. Prdx1 ist an den Signalkaskaden der Wachstumsfaktoren und von TNF- $\alpha$  beteiligt, indem es die intrazelluläre Wasserstoffperoxidkonzentration reguliert (Kang et al., 1998; Zhang et al., 1997; Ichimiya et al., 1997). Chang et al. demonstrierten, dass Prdx1 durch Cyclin-abhängige Kinasen phosphoryliert und inhibiert wird (Chang et al., 2002). Möglich wäre, dass die O-GlcNAc-Modifikation des Proteins seine Aktivität steigert, um die bei Hyperglykämie erhöhten ROS-Vorkommen zu kompensieren. Das könnte durch die unter HG-Inkubation verstärkte O-GlcNAc-Modifikation unterstützt werden.

Peroxiredoxin-6 (Prdx6) reduziert Wasserstoffperoxid, kurzkettige Fettsäuren und Phospholipidhydroperoxide (Peshenko und Shichi, 2001; Peshenko et al., 2001, Chen et al., 2000; Manevich et al., 2002). Kubo et al. zeigten in Linsen von diabetischen Ratten, dass die Expression der Prdx6-mRNA und des Proteins vermindert ist und die Zellen der Apoptose unterliegen (Kubo et al., 2004; Kubo et al., 2005). Ihre neueren Untersuchungen bestätigen dies, da die Zufuhr von Prdx5 und -6 Apoptose in Schweineperizyten inhibiert und auch die oxidative Schädigung der DNA verhindert wird (Kubo et al., 2009). In den SkMC konnte eine Abnahme der O-GlcNAc-Modifikation jedoch keine Unterschiede in der Expression im Vergleich zur Standardkultivierung beobachtet werden (s. Abbildung 32, Spot 37).

Die putative Chinonoxidoreduktase (Pig3) ist ein durch p53 induziertes Protein, das in die Generierung von ROS involviert ist (El-Deiry et al., 1992) und zur p53-abhängigen Apoptose beiträgt (Johnson et al., 1996). Der nächste Verwandte des Pig3 in Säugetieren ist die NADPH-Chinonoxidoreduktase, welche ebenfalls ROS generiert (Rao et al., 1992). Unter HG-, HGP- und LGP-Einfluss ist die O-GlcNAc-Modifikation verstärkt, was einen stabilisierenden Effekt auf das Enzym haben könnte, da es unter den Kultivierungsbedingungen zur verstärkten Bildung von ROS kommt und die Zelle versucht diesem Prozess entgegenzuwirken.

#### 4.3.5.2.4 Chaperone

Proteine mit Chaperonfunktion sind das Stress-induzierte Phosphoprotein 1, das Glucose-regulierte 78 kDa Protein, das Protein DJ-1, das HSP60, das HSC70, das GRP75 und das HSP27.

Das Stress-induzierte Phosphoprotein 1 vermittelt die Assoziation der Chaperone HSC70 und HSP90 und reguliert damit die Aktivität dieses Multichaperonkomplexes (Frydman und Höhfeld, 1997). Da die Aktivität von Chaperonen unter Stress gesteigert ist, könnte eine O-GlcNAc-Modifikation die Komplexbildung fördern und die Chaperonfunktion damit verstärken. Das Protein ist jedoch nur nach PUGNAc-Exposition der Zellen stärker O-GlcNAc-modifiziert.

Das Glucose-regulierte 78 kDa-Protein (GRP78) zählt zur HSP70-Familie (Ting und Lee, 1988). GRP78 ist ein Multifunktionsprotein mit antiapoptotischen Eigenschaften und ein Maßstab für ER-Stress (Little et al., 1994; Rutkowski et al., 2006). Durch direkte oder indirekte Interaktionen mit spezifischen Caspasen und weiteren Komponenten des proapoptotischen Signalweges reguliert GRP78 das Gleichgewicht zwischen Überleben der Zelle und Apoptose (Li und Lee, 2006; Rao et al., 2004; Reddy et al., 2003; Ranganathan et al., 2006). GRP78 ist wichtig für die Insulinbiosynthese, da eine Abnahme der GRP78-Expression zu signifikant gesenkter Insulinkonzentration und gesenkter Insulinsekretion führt. In skelettalen Muskelzellen führt die Inkubation mit Glucosamin oder HG zur gesteigerten Proteinexpression der Chaperone GRP78, Calreticulin und Calnexin, erhöhter UDP-GlcNAc-Konzentration, gesteigerter Aktivität der JNK und beeinträchtigter Insulin-stimulierter Glucoseaufnahme (Srinivasan et al., 2009). GRP78 wurde schon als O-GlcNAc-modifiziert nachgewiesen (Dapron et al., Sigma), jedoch ist der Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf die Funktionen des Proteins noch nicht untersucht. In den SkMC führte die Kultivierung mit HG und/oder PUGNAc zur Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation ohne sichtbare Änderung der Proteinexpression (s. Abbildung 32, Spot 28). Es ist möglich, dass die O-GlcNAcylierung die protektive Funktion des GRP78 unterstützt.

Protein DJ-1 ist ein multifunktionales Protein (Bonifati et al., 2003). Es ist homolog zum HSP31, einem Chaperon in *E. coli* (Quigley et al., 2003). DJ-1 schützt als Redox-abhängiges Chaperon Neuronen vor oxidativem Stress und verhindert die Proteinaggregation *in vitro* und intracytoplasmatische Einschlüsse, z.B. von  $\alpha$ -Synuclein *in vivo* (Mitsumoto und Nakagawa, 2001; Mitsumoto et al., 2001; Shendelman et al., 2004). Waanders et al. beobachteten nach HG-Behandlung von  $\beta$ -Zellen eine gesteigerte Protein DJ-1-Expression (Waanders et al., 2009). DJ-1 wird als Regulator des mitochondrialen oxidativen Stresses und apoptotischer Regulator angesehen (Yokota et al., 2003) und mag daher bei der Entstehung des Diabetes eine Rolle spielen. Die O-GlcNAc-Modifikation des DJ-1 ist nur nach LGP-Inkubation der Zellen erhöht. Die Expression des Proteins ist augenscheinlich unter allen

Inkubationsbedingungen gleich stark und zeigt keine Zunahme nach HG-Behandlung der SkMC (s. Abbildung 32, Spot 38).

#### 4.3.6 Die O-GlcNAc-Modifikation und ihr Einfluss auf die Apoptose

ROS können abhängig von Dosis und Expositionszeit zur Aktivierung des Endothels, endothelialer Dysfunktion oder dem Zelltod führen (Ager und Gordon, 1984; Whorton et al., 1985; Nawroth et al., 1993; Wolin, 1996). Du et al. zeigten, dass in HUVEC nach 48 h HG-Inkubation die ersten Zellen der Apoptose unterliegen (Du et al., 1998), so dass auch die hier untersuchten Zellen nach der 72-stündigen HG-Inkubation apoptotisch vorliegen könnten, was im Zusammenhang mit der O-GlcNAc-Modifikation bestimmter Proteine stehen könnte. Der HBP wurde schon zuvor mit der Regulation der Apoptose in Beziehung gebracht (Boehmelt et al., 2000; Hanover et al., 1999; Liu et al., 2000). Da in den Untersuchungen jedoch STZ verwendet wurde, sollte bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden, dass STZ cytotoxische Wirkungen ausübt (Kudlow, 2006). Die mOGT soll auch in die Regulation der Apoptose eingreifen (Love et al., 2003). Die Überexpression der mOGT ist im Gegensatz zur ncOGT cytotoxisch (Lubas et al., 1997; Kreppel et al., 1997). Webster et al. untersuchten am Zebrafischmodell die Rolle der O-GlcNAc-Modifikation in der Entwicklung und zeigten, dass diese die Aktivität der Proteine kontrolliert, welche die Apoptose regulieren, jedoch keinen Einfluss auf initiale Entscheidungen über das Auslösen des Zelltods hat (Webster et al., 2009). Die Kultivierung von Kardiomyozyten unter hyperglykämischen Bedingungen resultiert in einer Zunahme der O-GlcNAc-Modifikation des p53, was die Apoptose verstärkt (Fiordaliso et al., 2001). Hu et al. zeigten, dass in Kardiomyozyten durch HG-Exposition speziell mitochondriale Proteine verstärkt O-GlcNAcyliert werden, was wiederum bei der Schädigung der mitochondrialen Funktion mitwirkt (Hu et al., 2009).

Stressstimuli erhöhen die O-GlcNAc-Modifikation in Säugetierzellen, so dass die Aktivierung des HBP als Reaktion auf endogenen Stress gesehen wird. Eine Abnahme der OGT-Expression verminderte das Überleben der Zellen, während durch PUGNAc-Exposition der Zellen erhöhte O-GlcNAc-Modifikation diese gegen Stress schützt (Zachara et al., 2004). Die Inhibierung der OGT in Kardiomyozyten durch den Einsatz von siRNA, das Cre-lox-System oder pharmakologisch, reduzierte die O-GlcNAc-Modifikation, förderte den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials und verstärkte den post-hypoxischen Tod der Kardiomyozyten. Die O-GlcNAc-Modifikation des VDAC sank, was eine mögliche Verbindung zwischen O-GlcNAc-Signalen und dem Zelltod darstellt (Ngoh et al., 2008). Champattanachai et al. konnten an isolierten Kardiomyozyten zeigen, dass Glucosamin und PUGNAc einen ähnlichen protektiven Effekt gegen Hypoxie und Stress aufweisen (Champattanachai et al., 2007). Auch andere Arbeitsgruppen zeigten, dass die O-GlcNAc-Modifikation protektive Funktionen bei akutem Stress hat (Liu et al., 2006; Nagy et al., 2006; Liu et al., 2007). Des Weiteren inhibiert erhöhte O-GlcNAc-Modifikation das Proteasom (Zhang et al., 2003), was zum Überleben der Zelle beiträgt (Fülöp et al., 2007).

Eine Erklärung für die beobachteten kontroversen Effekte der erhöhten O-GlcNAc-Modifikation könnte sein, dass die Protektion durch O-GlcNAc bei akutem Stress erfolgt, jedoch die chronisch gesteigerte O-GlcNAc-Modifikation zu den adversen Effekten führt. Zum Beispiel können sich die Zielproteine einer chronisch aktivierten OGT von denen bei akutem Stress unterscheiden (Fülöp et al., 2007). Eine alternative Erklärung wäre, dass die initiale Reaktion auf akuten Stress die Aktivierung von Prozessen mit protektiver Funktion betrifft, die ein Überleben der Zelle ermöglichen. Wenn sich der Stress jedoch fortsetzt, kommt es zur Entwicklung einer pathophysiologischen Situation, die über andere Mechanismen zur Apoptose führen kann (McEwen, 1998). Oder eine bereits bestehende O-GlcNAc-Modifikation eines Proteins, welche durch Stress erhöht wird, kann zur Induktion der Apoptose führen (Fülöp et al., 2007). Für viele der identifizierten Proteine ist eine O-GlcNAc-Modifikation nach Kultivierung im Standardglucosemedium nachzuweisen, z.B. für VDAC2 (Spot 30) der HUVEC-Lysate (s. Abbildung 24). Nach Kultivierung der Zellen mit HG oder PUGNAc ist diese verstärkt, so dass die Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation des VDAC2 zur Apoptose der Zelle beitragen könnte.

#### 4.3.7 Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf die Entstehung der endothelialen Dysfunktion oder Insulinresistenz

Die Regulation der Aktivität vieler Enzyme läuft auf der Ebene der Transkription ab (Shimoji et al., 2010). Die indirekte Immunfluoreszenzanalyse der HEK-Zellen zeigt, dass nach HG- oder Glucosaminkultivierung der Zellen die OGT im Nukleus vermehrt nachzuweisen ist und auch die O-GlcNAc-modifizierten Proteine zunehmen (s. Abbildung 35). In den HUVEC konnten die O-GlcNAc-modifizierten Kernproteine HnrnpA1 und A3 identifiziert werden, welche auf Transkriptionsebene Einfluss auf den Glucosestoffwechsel nehmen (s. 4.3.5.1.6). In den SkMC wurde z.B. die O-GlcNAc-modifizierte  $\alpha$ -Enolase nachgewiesen, welche als Transkriptionsfaktor agieren kann. Auch die O-GlcNAc-modifizierte mitochondriale Aconitathydratase spielt durch ihre Fähigkeit zur Stabilisierung von mtRNA eine Rolle in der Transkription. Um die Bedeutung der O-GlcNAc Modifikation für die Funktion dieser Regulatorproteine der Transkription zu verstehen, müssten sie vergleichend in O-GlcNAc-modifizierter, nicht-modifizierter oder gegebenenfalls phosphorylierter Form untersucht werden.

Hohe Glucosekonzentration führt in Endothel- und glatten Muskelzellen zu Veränderungen des Cytoskeletts (Mandal et al., 2000). Auch die Inkubation der HUVEC mit ROS führt zur Depolymerisierung des Cytoskeletts (Valen et al., 1999). Die HG-Inkubation der HUVEC (mit oder ohne PUGNAc) führt eher zur Abnahme der O-GlcNAcylierung der Strukturproteine (s. Tabelle 10), daher scheint die Modifikation keinen direkten Einfluss auf die Instabilität des Cytoskeletts bei endothelialer Dysfunktion zu nehmen.

Ein direkter Effekt der O-GlcNAc-Modifikation auf den Glucosemetabolismus war in den SkMC eher zu beobachten, da sie mehr O-GlcNAc-modifizierte Proteine mit einer entsprechenden Funktion vorweisen. In beiden Zelllinien konnte die GAPDH und die PKM2

als O-GlcNAc-modifiziert identifiziert werden, in den SkMC wurden auch die mitochondriale Aconitathydratase, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Enolase, die PGK1, die MDH1, die ALDOA und die TPI als O-GlcNAcyliert nachgewiesen (s. Tabelle 10 und Tabelle 12). Addabbo et al. simulierten die endotheliale Dysfunktion durch Inhibierung der NO-Synthese und konnten eine Abnahme der Mitochondrienmasse sowie der mitochondrialen Aconitathydratase und Enoyl-CoA-Hydratase 1 nachweisen, was die Rate des Citratzyklus reduzierte (Addabbo et al., 2009). So könnte die verstärkte O-GlcNAc-Modifizierung nach HG-Inkubation der SkMC und HUVEC zur Inaktivierung der Enzyme des Glucosestoffwechsels führen, so dass Glucose vermehrt in alternativen Stoffwechselwegen bei Insulinresistenz und endothelialer Dysfunktion metabolisiert wird.

Signalwege, welche bei der Stressantwort von Bedeutung sind, wie z.B. die Induktion der Chaperonexpression, reagieren sensitiv auf die O-GlcNAc-Modifikation (Lazarus et al., 2009). In beiden Zelllinien konnten verschiedene Hitzeschockproteine und Chaperone als verstärkt O-GlcNAc-modifiziert nachgewiesen werden. Möglicherweise verhindert die O-GlcNAcylierung des HSC70 die Aktivierung des PI3-Kinase-/Akt-Signalweges, was zur verminderten Aktivität der eNOS beiträgt und damit die Entstehung der endothelialen Dysfunktion fördert. Andererseits stellen die endotheliale Dysfunktion bzw. die Insulinresistenz Stresssituationen für die Zellen dar. Durch die O-GlcNAc-Modifizierung werden die Chaperone stabilisiert und können so zur Wiederherstellung des „Normzustandes“ der Zellen beitragen, was die protektive Funktion der O-GlcNAcylierung bestätigen würde.

Viele Proteine in skelettalen Muskelzellen konnten schon nach Standardkultivierung als O-GlcNAc-modifiziert nachgewiesen werden. Durch HG- oder PUGNAc-Exposition der Zellen kann diese für einige Proteine noch gesteigert werden, so dass entweder das Ausmaß der O-GlcNAcylierung an einem bestimmten Serin oder Threonin erhöht ist oder parallel phosphorylierte Stellen nun O-GlcNAc-modifiziert vorliegen. Dies kann zu Veränderungen der Funktionen der Proteine und damit zur Entstehung der Insulinresistenz beitragen. Studien mit Nagetieren lassen auf eine Korrelation zwischen der Entwicklung einer Insulinresistenz und erhöhtem UDP-GlcNAc-Spiegel im Muskel schließen (Hawkins et al., 1997; Huang et al., 2002). Die Insulinsignalkaskade wird durch eine erhöhte O-GlcNAc-Modifikation der Proteine, welche an GLUT4-Translokation und Vesikelfusion mit der Zellmembran involviert sind, beeinflusst, wie für Sp1, HSP70,  $\alpha$ -Tubulin und Phospholipase C (PLC- $\beta$ 1) gezeigt wurde (Walgren et al., 2003; Kim et al., 2006e). Dies führte zur mehr als 50 %igen Senkung der intrazellulären IP<sub>3</sub>-Konzentration, welche auf die O-GlcNAc-Modifikation zurückzuführen ist, da die Expression der PLC- $\beta$ 1 unverändert war (Kim et al., 2006e). Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Beziehung zwischen Insulinresistenz und dem gesteigerten Durchsatz von Glucose durch den HBP.

In den HUVEC führt die HG- oder PUGNAc-Kultivierung weder zur Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation noch zur Zunahme der Anzahl modifizierter Proteine. Viele der identifizierten O-GlcNAc-modifizierten Proteine sind auch im normoglykämischen Zustand

modifiziert. Die O-GlcNAc-modifizierte eNOS, welche eine wichtige Rolle bei der endothelialen Dysfunktion spielt (Musicki et al., 2005), konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Sie ist vermutlich wie andere Signalmoleküle mengenmäßig zu gering vorhanden, als dass sie mit den hier angewendeten Methoden nachzuweisen wäre. So lässt sich nach dieser Untersuchung bestätigen, dass die O-GlcNAc-Modifikation zwar Einfluss auf manche wichtige Proteine des Zellstoffwechsels ausübt, jedoch ist davon auszugehen, dass sie wahrscheinlich bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion keine Hauptrolle spielt, sondern andere Signalwege (s. 1.6) von Bedeutung sind und zum Schadensbild beitragen.

#### 4.4 Ausblick

Die Kultivierungsansätze der HUVEC und SkMC sollen eine chronische Belastung der Zellen mit O-GlcNAc-modifizierten Proteinen simulieren. Für die SkMC konnte eine verstärkte O-GlcNAc-Modifikation vieler Proteine und eine Zunahme dieser nachgewiesen werden, was den Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf die Entstehung einer Insulinresistenz z.T. bekräftigt. Für die HUVEC konnte nur eine geringe Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation beobachtet werden, was dieser Modifikation keine allzu große Bedeutung in der Entstehung der endothelialen Dysfunktion beimisst. Proteine, die nur unter HG- oder HGP-Einfluss verstärkt O-GlcNAc-modifiziert sind, lassen weitere Einflussfaktoren auf den HBP vermuten. Eine alleinige Stimulation mit PUGNAc reichte für einige Proteine nicht aus, um die O-GlcNAc-Modifikation zu steigern, was jedoch auch in der Regulation der OGT und OGA begründet sein kann. Auch sollte die Expression der Proteine nach HG-, HGP- und LGP-Kultivierung im Vergleich zur Standardkultivierung densitometrisch untersucht werden, um Effekte auf die O-GlcNAc-Modifikation durch gesenkte oder gesteigerte Expression der Proteine auszuschließen.

Einige der identifizierten Proteine sind bisher nicht als O-GlcNAc-modifiziert beschrieben worden. Für diese Proteine gilt es zunächst die Modifikationsstellen im Protein zu identifizieren. Für andere ist die Funktion in ihrem O-GlcNAc-modifizierten Zustand noch nicht untersucht worden. So könnte durch Austausch möglicher O-GlcNAc-Modifikationsstellen der Proteine gegen AS, die keine Modifikation erlauben oder eine Dauerphosphorylierung darstellen, der genaue Einfluss der O-GlcNAc-Modifikation auf die Funktionen des Proteins untersucht werden. Dabei könnte nach Optimierung des OGT-Aktivitätstests ein paralleles Screening der Mutanten durchgeführt werden. Zeitgleich könnte nach Einsatz der Click-Chemie zur stabilen Markierung der O-GlcNAc-Modifikation in den Proteinen die O-GlcNAc-Modifikationsstellen mittels ETD-MS analysiert werden. Besonders Proteine, die z.B. eine Rolle im Glucosestoffwechsel und gleichzeitig in der Transkriptionskontrolle ausüben, wären interessante Zielproteine. Aufgrund dieser Untersuchungen könnte ein genaueres Bild der Bedeutung der O-GlcNAc-Modifikation einerseits bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion und andererseits bei der Insulinresistenz aufgezeigt werden.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen aus verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Das Ausmaß der O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen stellt eine sensitive Reaktion auf Nährstoffe und Stress dar. Sie übt regulatorische Funktionen in vielen zellulären Prozessen aus, wozu vor allem die Transkription, verschiedene Signalkaskaden und der Stoffwechsel zählen. Hyperglykämie führt zur verstärkten O-GlcNAc-Modifikation von Proteinen, was zur Entstehung der Glucosetoxizität im Diabetes mellitus Typ 2 beiträgt.

Es sollte der Einfluss von hyperglykämischen Bedingungen bzw. der Hemmung der OGA auf die O-GlcNAc-Modifizierung von Proteinen aus HUVEC und SkMC. Die Zellen wurden in Standardglucosemedium (LG, Kontrolle), in „Hoch Glucose“-Medium (HG) in An- oder Abwesenheit des OGA-Inhibitors PUGNAc (LGP/HGP) kultiviert. Die SkMC wurden in cytosolische und nukleäre Proteine fraktioniert, während die HUVEC mit einem 2D-Lysispuffer lysiert wurden. Die Proteine beider Zelllinien wurden mittels 2-DE aufgetrennt und die O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurden nach einem Western Blot mit dem O-GlcNAc-spezifischen Antikörper CTD 110.6 detektiert. Parallel wurden die O-GlcNAc-positiven Proteine aus Coomassie gefärbten Gelen ausgeschnitten und nach In-Gel-Trypsinverdau mittels Massenspektrometrie und MASCOT- sowie Swiss-Prot-Datenbankanalyse identifiziert. In den HUVEC konnten 24 und in den SkMC 37 O-GlcNAc-modifizierte Proteine identifiziert werden. Dabei handelte es sich um Transkriptionsfaktoren, Chaperone, Strukturproteine, Proteine der Energie-/Redoxregulation und Enzyme des Stoffwechsels. Für viele Proteine konnte eine Zunahme der O-GlcNAc-Modifikation nach Kultivierung mit HG, HGP oder LGP gezeigt werden, bei einigen Proteinen nahm diese jedoch auch im Vergleich zur Standardkultivierung ab. Der Einfluss der HG-Kultivierung auf die O-GlcNAcylierung der Proteine unterschied sich für viele Proteine von dem der Kultivierung mit PUGNAc, vermutlich weil die Steigerung des HBP und weiterer Stoffwechselwege der Glucose andere Auswirkungen als die OGA-Inhibierung nach sich zieht.

Nach 1D-Auftrennung der HUVEC-Lysate ist eine eindeutige Steigerung der O-GlcNAc-Modifizierung für viele Proteine nach HG- und HGP/LGP-Kultivierung im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. Die Stärke der Signale der O-GlcNAc-Modifizierung der HGP- und LGP-Proben unterscheiden sich kaum, wohingegen der Anstieg der O-GlcNAc-Modifizierung für die HG-Probe nicht ganz so stark ausfällt. In den HUVEC zeigt sich mit dem OGT-spezifischen Antikörper AL28 für die mit PUGNAc behandelten Zellen eine Abnahme der OGT-Expression, jedoch eine Steigerung der O-GlcNAc-Modifikation der OGT. Eine herunterregulierte OGT-Aktivität durch mögliche Autoglykosylierung des Enzyms unter PUGNAc-Einfluss könnte die geringere O-GlcNAc-Modifikation für einige Proteine nach PUGNAc-Kultivierung der HUVEC erklären.

Parallel wurden Versuche mit HEK-Zellen durchgeführt, die in Standardglucosemedium, HG-Medium oder mit Glucosamin kultiviert wurden. Die indirekte Immunfluoreszenzanalyse zeigte, dass die O-GlcNAc- und OGT-Expression in HEK-Zellen nach HG- bzw. Glucosaminkultivierung zunahm, wobei die OGT verstärkt im Zellkern detektiert werden konnte. Parallel wurden aus Zelllysaten eine cytosolische und eine nukleäre Proteinfraction gewonnen und nach ein- und zweidimensionaler Gelelektrophorese mittels Western Blot auf O-GlcNAc-modifizierte Proteine untersucht. Es konnte eine Zunahme der cytosolischen O-GlcNAc-modifizierten Proteine nach HG- und Glucosaminkultivierung im Vergleich zur Kultivierung im Standardmedium gezeigt werden, in der nukleären Fraktion steigerte nur Glucosamin die O-GlcNAc-Modifikation der Proteine.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, einen nicht radioaktiven Enzymassay zu etablieren, der einerseits als Aktivitätstest für die OGT dienen und andererseits die Möglichkeit bieten sollte, GlcNAc auf Proteine *in vitro* zu übertragen. Als Positivkontrolle für den Assay sollte NUP62 rekombinant mit einem His-Tag am C-Terminus in *E. coli* exprimiert werden. Die Sequenzierung des Plasmids pBJG1-NUP ergab jedoch, dass im Vektor pBJG1 in der *Xho* I-Restriktionsschnittstelle eine Mutation vorlag. Aufgrund der Substitution wurde daher an einer der Schnittstelle ähnelnden Sequenz die cDNA des NUP62 eingebaut, so dass noch ein Teil der DNA-Sequenz ncOGT des ursprünglichen Plasmids pBJG1-ncOGT enthalten blieb. Daher war die Konstruktion des Plasmids erfolglos.

Ob eine veränderte O-GlcNAc-Expression nach Hyperglykämie bzw. Hemmung der OGA möglicherweise im Zusammenhang mit endothelialer Dysfunktion und Insulinresistenz steht, sollte in Zukunft in weiteren Versuchen bezüglich der Funktion und Regulation von O-GlcNAc geklärt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aaronson RM, Graven KK, Tucci M, McDonald RJ, Farber HW (1995): Non-neuronal Enolase Is an Endothelial Hypoxic Stress Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, 27752-27757
- Adams E und Frank L (1980): Metabolism of proline and the hydroxyprolines. *Annu Rev Biochem*, Vol. 49, 1005-1061
- Addabbo F, Ratliff B, Park HC, Kuo MC, Ungvari Z, Ciszar A, Krasnikof B, Sodhi K, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS (2009): The Krebs Cycle and Mitochondrial Mass Are Early Victims of Endothelial Dysfunction. *The American Journal of Pathology*, Vol. 174, 34-43
- Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z (1999a): Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene*, Vol. 18, 6104-6111
- Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ, Ronai Z (1999b): Regulation of JNK signaling by GSTp. *The EMBO Journal*, Vol. 18, 1321-1334
- Ager A und Gordon JL (1984): Differential effects of hydrogen peroxide on indices of endothelial cell function. *J Exp Med*, Vol. 159, 592-603
- Ahrend M, Käberich A, Fergen MT, Schmitz B (2008): Immunochemical methods for the rapid screening of the o-glycosidically linked N-acetylglucosamine modification of proteins. *Methods Mol Biol*, Vol. 446, 267-280
- Alanen HI, Williamson RA, Howard MJ, Hatahet FS, Salo KEH, Kauppila A, Kellokumpu S, Ruddock LW (2006): ERp27, a New Non-catalytic Endoplasmic Reticulum-located Human Protein Disulfide Isomerase Family Member, Interacts with ERp57. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 281, 33727-33738
- Albert T, Urlbauer B, Kohlhuber F, Hammersen B, Eick D (1994): Ongoing mutations in the N-terminal domain of c-Myc affect transactivation in Burkitt's lymphoma cell lines. *Oncogene*, Vol. 9, 759-763
- Altland K und Rossmann U (1985): Hybrid isoelectric focusing in rehydrated immobilized pH gradients with added carrier ampholytes: Demonstration of human globins. *Electrophoresis*, Vol. 6, 314-325
- Amersham Biosciences (2002): GST Gene fusion system Handbook  
[http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/5F8EEA77C1D191D0C1257628001CDE42/\\$file/18115758.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/5F8EEA77C1D191D0C1257628001CDE42/$file/18115758.pdf); über GE Healthcare (letzte Einsicht: 04.06.2010)
- Andrali SS, Qian Q, Ozcan S (2007): Glucose mediates the translocation of NeuroD1 by O-linked glycosylation. *J Biol Chem*, Vol. 282, 15589-15596
- Andrali SS, Sampley ML, Vanderford NL, Ozcan S (2008): Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta cells. *Biochem J*, Vol. 415, 1-10
- Arnaudeau S, Frieden M, Nakamura K, Castelbou C, Michalak M, Demaurex N (2002): Calreticulin Differentially Modulates Calcium Uptake and Release in the Endoplasmic Reticulum and Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, 46696-46705
- Arnold S, Johnson G, Cole R, Dong D, Lee M, Hart GW (1996): The Microtubuli-associated Protein Tau is Extensively Modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem*, Vol. 271, 28741-28744
- Arora KK und Pedersen PL (1988): Functional Significance of Mitochondrial Bound H exokinase in Tumor Cell Metabolism. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 263, 17422-17428
- Arrigo AP (1990): Tumor Necrosis Factor Induces the Rapid Phosphorylation of the Mammalian Heat Shock Protein hsp28. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 10, 1276-1280
- Ball LE, Berkaw MN, Buse MG (2006): Identification of the major site of O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine modification in the C terminus of insulin receptor substrate-1. *Mol Cell Proteomics*, Vol. 5, 313-323
- Barish GD, Narkar VA, Evans RM (2006): PPAR $\delta$ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, Vol. 116, 590-597
- Barthel A, Schmoll D, Unterman TG (2005): FoxO proteins in insulin action and metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, Vol. 16, 183-189

- Basrur V, Yang F, Kushimoto T, Higashimoto Y, Yasumoto K, Valencia J, Muller J, Vieira WD, Watabe H, Shabanowitz J, Hearing VJ, Hunt DF, Appella E (2003): Proteomic analysis of early melanosomes: identification of novel melanosomal proteins. *J Proteome Res*, Vol. 2, 69-79
- Beausoleil SA, Jedrychowski M, Schwartz D, Elias JE, Villen J, Li J, Cohn MA, Cantley LC, Gygi SP (2004): Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *PNAS*, Vol. 101, 12130-12135
- Bellin C, de Wiza DH, Wiernsperger NF, Rösen P (2006): Generation of Reactive Oxygen Species by Endothelial and Smooth Muscle Cells: Influence of Hyperglycemia and Metformin. *Horm Metab Res*, Vol. 38, 732-739
- Beltramo E, Berrone E, Giunti S, Gruden G, Perin PC, Porta M (2006): Effects of mechanical stress and high glucose on pericyte proliferation, apoptosis and contractile phenotype. *Experimental Eye Research*, Vol. 83, 989-994
- Blobel G und Potter VR (1966): Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science*, Vol. 154, 1662-1665
- Boehmelt G, Wakeham A, Elia A, Sasaki T, Plyte S, Potter J, Yang Y, Tsang E, Ruland J, Iscove NN, Dennis JW, Mak TW (2000): Decreased UDP-GlcNAc levels abrogate proliferation control in EMeg32-deficient cells. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 312, 1342-1348
- Bonifati V, Rizzu P, Squitieri F, Krieger E, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, van Duijn CM, Oostra B, Meco G, Heutink P (2003): DJ-1( PARK7), a novel gene for autosomal recessive, early onset parkinsonism. *Neurol Sci*, Vol. 24, 159-160
- Bourdi M, Demady D, Martin JL, Jabbour SK, Martin BM, George JW, Pohl LR (1995): cDNA Cloning and Baculovirus Expression of the Human Liver Endoplasmic Reticulum P58: Characterization as a Protein Disulfide Isomerase Isoform, but Not as a Protease or a Carnitine Acyltransferase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 323, 397-403
- Bradford M (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, 248-254
- Brady MJ, Nairn A, Saltiel AR (1997): The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action. *J Biol Chem*, Vol. 272, 29698-29703
- Brady MJ, Bourbonais FJ, Saltiel AR (1998): The activation of glycogen synthase by insulin switches from kinase inhibition to phosphatase activation during adipogenesis in 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*, Vol. 273, 14063-14066
- Brimble S, Wollaston-Hayden EE, Teo CF, Morris AC, Wells L (2010): The role of the O-GlcNAc modification in regulating eukaryotic gene expression. *Current Signal Transduction Therapy*, Vol. 5, 12-24
- Brownlee M (2001): Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, Vol. 414, 813-820
- Brownlee M (2005): The Pathobiology of Diabetic Complications: A Unifying Mechanism. *Diabetes*, Vol. 54, 1615-1625
- Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, Diaz-Latoud C, Gurbuxani S, Arrigo AP, Kroemer G, Solary E, Garrido C (2000): Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol*, Vol. 2, 645-652
- Brüning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR (1998): A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell*, Vol. 2, 559-569
- Bucala R, Tracey KJ, Cerami A (1991): Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest*, Vol. 87, 432-438
- Buse MG, Robinson KA, Marshall BA, Hresko RC, Mueckler MM (2002): Enhanced O-GlcNAc protein modification is associated with insulin resistance in GLUT1-overexpressing muscles. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Vol. 283, E241-E250

- Buse MG (2006): Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Vol. 290, E1-E8
- Butkinaree C, Cheung WD, Park S, Park K, Barber M, Hart GW (2008): Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. *J Biol Chem*, Vol. 283, 23557-23566
- Butkinaree C, Park K, Hart G (2010): O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signalling and transcription in response to nutrients and stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1800, 96-106
- Carpenter B, MacKay C, Alnabulsi A, MacKay M, Telfer C, Melvin WT, Murray GI (2006): The roles of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in tumour development and progression. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1765, 85-100
- Ceci M, Gaviraghi C, Gorrini C, Sala LA, Offenhäuser N, Marchisio PC, Biffo S (2003): Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature*, Vol. 426, 579-584
- Cetinbas N, Macauley MS, Stubbs KA, Drapala R, Vocadlo DJ (2006): Identification of Asp<sup>174</sup> and Asp<sup>175</sup> as the Key Catalytic Residues of Human O-GlcNAcase by Functional Analysis of Site-Directed Mutants. *Biochemistry*, Vol. 45, 3835-3844
- Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW, McAuley E, Archer DB (1998): Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. *Diabetes*, Vol. 47, 945-952
- Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC (2007): Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein-associated O-GlcNAc. *Am J Physiol Cell Physiol*, Vol. 292, C178-C18
- Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC (2008): Glucosamine protects neonatal cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury via increased protein O-GlcNAc and increased mitochondrial Bcl-2. *Am J Physiol Cell Physiol*, Vol. 294, C1509-C1520
- Chang TS, Jeong W, Choi SY, Yu S, Kang SW, Rhee SG (2002): Regulation of Peroxiredoxin I Activity by Cdc2-mediated Phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, 25370-25376
- Charette SJ und Landry J (2000): The Interaction of HSP27 with Daxx Identifies a Potential Regulatory Role of HSP27 in Fas-Induced Apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*, Vol. 926, 126-131
- Chen SH und Giblett ER (1976): Enolase: human tissue distribution and evidence for three different loci. *Ann Hum Genet*, Vol. 39, 277-280
- Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB (2000): 1-Cys Peroxiredoxin, a Bifunctional Enzyme with Glutathione Peroxidase and Phospholipase A2 Activities. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, 28421-28427
- Chen XJ, Wang X, Kaufman BA, Butow RA (2005): Aconitase Couples Metabolic Regulation to Mitochondrial DNA Maintenance. *Science*, Vol. 307, 714-717
- Cheng X, Cole RN, Zaia J, Hart GW (2000): Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of the murine estrogen receptor beta. *Biochemistry*, Vol. 39, 11609-11620
- Cheng X und Hart GW (2001): Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J Biol Chem*, Vol. 276, 10570-10575
- Cheng EHY, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SY (2003): VDAC2 Inhibits BAK Activation and Mitochondrial Apoptosis. *Science*, Vol. 301, 513-517
- Cheung WD, Sakabe K, Housley MP, Dias WB, Hart GW (2008): O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosaminyltransferase Substrate Specificity Is Regulated by Myosin Phosphatase Targeting and Other Interacting Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, 33935-33941
- Cheung WD und Hart GW (2008): AMP-activated Protein Kinase and p38 MAPK Activate O-GlcNAcylation of Neuronal Proteins during Glucose Deprivation. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, 13009-13020
- Chichiarelli S, Ferraro A, Altieri F, Eufemi M, Coppari S, Grillo C, Arcangeli V, Turano C (2007): The Stress Protein ERp57/GRP58 Binds Specific DNA Sequences in HeLa Cells. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 210, 343-351

- Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauerk CL, Macarak IG, Pessin JE, Saltiel AR (2001): Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature*, Vol. 410, 944-948
- Chin KM und Rubin LJ (2008): Pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, Vol. 51, 1527-1538
- Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman MI, Birnbaum MJ (2001): Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB  $\beta$ ). *Science*, Vol. 292, 1728-1731
- Chou T, Hart G, Dang C (1995): c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J Biol Chem*, Vol. 270, 18961-18965
- Cieniewski-Bernard C, Bastide B, Lefebvre T, Lemoine J, Mounier Y, Michalski JC (2004): Identification of O-linked N-Acetylglucosamine Proteins in Rat Skeletal Muscle Using Two-dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 3, 577-585
- Clapier CR und Cairns BR (2009): The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu Rev Biochem*, Vol. 78, 273-304
- Clark RJ, McDonough PM, Swanson E, Trost SU, Suzuki M, Fukuda M, Dillmann WH (2003): Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation. *J Biol Chem*, Vol. 278, 44230-44237
- Cohen RA und Adachi T (2006): Nitric-Oxide-Induced Vasodilatation: Regulation by Physiologic S-Glutathiolation and Pathologic Oxidation of the Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase. *Trends Cardiovasc Med*, Vol. 16, 109-114
- Cole RN und Hart GW (2001): Cytosolic O-glycosylation is abundant in nerve terminals. *Journal of Neurochemistry*, Vol. 79, 1080-1089
- Colombini M (1979): A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature*, Vol. 279, 643-645
- Comer FI und Hart GW (1999): O-GlcNAc and the control of gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1473, 161-171
- Comer FI und Hart GW (2000): O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins. Dynamic Interplay between O-GlcNAc and O-phosphate. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, 29179-29182
- Comer FI und Hart GW (2001): Reciprocity between O-GlcNAc and O-Phosphate on the Carboxyl Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Biochemistry*, Vol. 40, 7845-7852
- Comer FI, Vosseller K, Wells L, Accavitti MA, Hart GW (2001): Characterization of a Mouse Monoclonal Antibody Specific for O-Linked N-Acetylglucosamine. *Anal Biochem*, Vol. 293, 169-177
- Comtesse N, Maldener E, Meese E (2001): Identification of a Nuclear Variant of MGEA5, a Cytoplasmic Hyaluronidase and a  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 283, 634-640
- Copeland RJ, Bullen JW, Hart GW (2008): Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Vol. 295, E17-E28
- Cowan NJ und Lewis SA (2001): Type II chaperonins, prefoldin, and the tubulin-specific chaperones. *Adv Protein Chem*, Vol. 59, 73-104
- Cross DA, Alessi D, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995): Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, Vol. 378, 785-789
- Cross JV und Templeton DJ (2004): Oxidative stress inhibits MEKK1 by site-specific glutathionylation in the ATP-binding domain. *Biochem J*, Vol. 381, 675-683
- Dahmus ME (1996): Reversible phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *J Biol Chem*, Vol. 271, 19009-19012
- D'Alessandris C, Andreozzi F, Federici M, Cardellini M, Brunetti A, Ranalli M, Del Guerra S, Lauro D, Del Prato S, Marchetti P, Lauro R, Sesti G (2004): Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *FASEB J*, Vol. 18, 959-961

- Dannenberg JH, David G, Zhong S, van der Torre J, Wong WH, Depinho RA (2005): mSin3A corepressor regulates diverse transcriptional networks governing normal and neoplastic growth and survival. *Genes Dev*, Vol. 19, 1581-1595
- Dapron J, Dias W, Tyson M, Heutel J, Roychowdhury A, Hart G, Duewel H: Specific Enrichment and Identification of Azide Modified Glycoproteins using the Staudinger Ligation. [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General\\_Information/modified\\_glycoproteins.P ar.0001.File.tmp/modified\\_glycoproteins.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/modified_glycoproteins.P ar.0001.File.tmp/modified_glycoproteins.pdf) (letzte Einsicht 04.06.2010)
- David CJ, Chen M, Assanah M, Canoll P, Manley JL (2010): HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature*, Vol. 463, 364-368
- De Corte V, Demol H, Goethals M, Van Damme J, Gettemans J, Vandekerckhove J (1999): Identification of Tyr438 as the major in vitro c-Src phosphorylation site in human gelsolin: A mass spectrometric approach. *Protein Sci*, Vol. 8, 234-241
- Dehennaut V, Lefebvre T, Sellier C, Leroy Y, Gross B, Walker S, Cacan R, Michalski JC, Vilain JP, Bodart JF (2007): O-linked N-acetylglucosaminyltransferase inhibition prevents G2/M transition in *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem*, Vol. 282, 12527-12536
- Dehennaut V, Hanouille X, Bodart JF, Vilain JP, Michalski JC, Landrieu I, Lippens G, Lefebvre T (2008a): Microinjection of recombinant O-GlcNAc transferase potentiates *Xenopus* oocytes M-phase entry. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 369, 539-546
- Dehennaut V, Slomianny MC, Page A, Vercoutter-Edouart AS, Jessus C, Michalski JC, Vilain JP, Bodart JF, Lefebvre T (2008b): Identification of Structural and Functional O-Linked N-Acetylglucosamine-bearing Proteins in *Xenopus laevis* Oocyte. *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 7, 2229-2245
- De la Monte S und Wands JR (2005): Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, Vol. 7, 45-61
- De Leon LJ, Ferris SH, George AE, Reisberg B, Christman DR, Kricheff II, Wolf AP (1983): Computed tomography and positron emission transaxial tomography evaluations of normal aging and Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab*, Vol. 3, 391-394
- Dennis RJ, Taylor EJ, Macauley MS, Stubbs KA, Turkenburg JP, Hart SJ, Black GN, Vocadlo DJ, Davies GJ (2006): Structure and mechanism of a bacterial  $\beta$ -glucosaminidase having O-GlcNAcase activity. *Nature Structural & Molecular Biology*, Vol. 13, 365-371
- Dentin R, Hedrick S, Xie J, Yates J, Montminy M (2008): Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science*, Vol. 319, 1402-1405
- Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher A (1999): Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by AKT-dependent phosphorylation. *Nature*, Vol. 10, 601-605
- Dong DLY und Hart GW (1994): Purification and Characterization of an O-GlcNAc Selective N-Acetyl- $\beta$ -glucosaminidase from Rat Spleen Cytosol. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 269, 19321-19330
- Dorfmueller HC, Borodkin VS, Schimpl M, Shepherd SM, Shpiro NA, van Aalten DMF (2006): GlcNAcstatin: a Picomolar, Selective O-GlcNAcase Inhibitor That Modulates Intracellular O-GlcNAcylation Levels. *J AM CHEM SOC*, Vol. 128, 16484-16485
- Dorfmueller HC, Borodkin VS, Schimpl M, van Aalten DMF (2009): GlcNAcstatins are nanomolar inhibitors of human O-GlcNAcase inducing cellular hyper-O-GlcNAcylation. *Biochem J*, Vol. 420, 221-227
- Dreher D, Vargas JR, Hochstrasser DF, Junod AF (1995): Effects of oxidative stress and  $Ca^{2+}$  agonists on molecular chaperones in human umbilical vein endothelial cells. *Electrophoresis*, Vol. 16, 1205-1214
- Drews O, Reil G, Parlar H, Görg A (2004): Setting up standards and a reference map for the alkaline proteome of the Gram-positive bacterium *Lactococcus lactis*. *Proteomics*, Vol. 4, 1293-1304
- Du XL, Sui GZ, Stockklauser-Färber K, Weiß J, Zink S, Schwippert B, Wu QX, Tschöpe D, Rösen P (1998): Induction of apoptosis by high proinsulin and glucose in cultured human umbilical vein endothelial cells is mediated by reactive oxygen species. *Diabetologia*, Vol. 41, 249-256

- Du X, Stocklauser-Farber K, Rösen P (1999): Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radic Biol Med*, Vol. 27, 752-763
- Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M (2000): Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *PNAS*, Vol. 97, 12222-12226
- Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M (2001): Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site. *J Clin Invest*, Vol. 108, 1341-1348
- Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengellér Z, Szabó C, Brownlee M (2003): Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest*, Vol. 112, 1049-1057
- Duclos-Vallee JC, Capel F, Mabit H, Petit MA (1998): Phosphorylation of the hepatitis B virus core protein by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein kinase activity. *Journal of General Virology*, Vol. 79, 1665-1670
- Dudognon P, Maeder-Garavaglia C, Carpentier JL, Paccaud JP (2004): Regulation of a COPII component by cytosolic O-glycosylation during mitosis, *FEBS Lett*, Vol. 561, 44-50
- Dufresne-Martin G, Lemay JF, Lavigne P, Klarskov K (2005): Peptide mass fingerprinting by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry of proteins detected by immunostaining on nitrocellulose. *Proteomics*, Vol. 5, 55-66
- Dunker AK, Brown CJ, Lawson JD, Iakoucheva LM, Obradović Z (2002): Intrinsic disorder and protein function. *Biochemistry*, Vol. 41, 6573-6582
- Duverger E, Pellerin-Mendes C, Mayer R, Roche AC, Monsigny M (1995): Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway. *Journal of Cell Science*, Vol. 108, 1325-1332
- Edington BV und Hightower LE (1990): Induction of a Chicken Small Heat Shock (Stress) Protein: Evidence of Multilevel Posttranscriptional Regulation. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 10, 4886-4898
- El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B (1992): Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*, Vol. 1, 45-49
- Endemann DH und Schiffrin EL (2004): Endothelial dysfunction. *J Am Soc Nephrol*, Vol. 15, 1983-1992
- Farook VS, Bogardus C, Prochazka M (2002): Analysis of MGEA5 on 10q24.1–q24.3 encoding the  $\beta$ -O-linked N-acetylglucosaminidase as a candidate gene for type 2 diabetes mellitus in Pima Indians. *Molecular Genetics and Metabolism*, Vol. 77, 189-193
- Faucher C, Capdevielle J, Canal I, Ferrara P, Mazarguil H, McGuire WL, Darbon JM (1993): The 28-kDa Protein whose Phosphorylation Is Induced by Protein Kinase C Activators in MCF-7 Cells Belongs to the Family of Low Molecular Mass Heat Shock Proteins and Is the Estrogen-regulated 24-kDa Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 268, 15168-15173
- Feo S, Arcuri D, Piddini E, Passantino R, Giallongo A (2000): ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Letters*, Vol. 473, 47-52
- Fernandez-Real JM und Ricart W (2003): Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev*, Vol. 24, 278-301
- Feron O und Kelly RA (2001): The caveolar paradox: suppressing, inducing, and terminating eNOS signaling. *Circ Res*, Vol. 88, 129-131
- Ferrand Y, Klein E, Barwell NP, Crump MP, Jiménez-Barbero J, Vicent C, Boons GJ, Ingale S, Davis AP (2009): A Synthetic Lectin for O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine. *Angew Chem Int Ed Engl*, Vol. 48, 1775-1779
- Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, Limana F, Safai B, Nadal-Ginard B (2001): Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes*, Vol. 50, 2363-2375

- Fischer Y, Thomas J, Linssen M, van de Vusse G, Hirsch B, Rösen P, Kammermeier H (1995): Acute stimulation of glucose transport by histamine in cardiac microvascular endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1268, 1157-1168
- Federici M, Menghini R, Mauriello A, Hribal ML, Ferrelli F, Lauro D, Sbraccia P, Spagnoli LG, Sesti G, Lauro R (2002): Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells. *Circulation*, Vol. 106, 466-472
- Fletcher LM, Welsh GI, Oatey PB, Tavaré JM (2000): Role for the microtubule cytoskeleton in GLUT4 vesicle trafficking and in the regulation of insulin-stimulated glucose uptake. *Biochem J*, Vol. 352, 267-276
- Förstermann U (2006): Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal. *Biol Chem*, Vol. 387, 1521-1533
- Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME (2008): Oxidative Stress as a Major Culprit in Kidney Disease in Diabetes. *Diabetes*, Vol. 57, 1446-1454
- Friederich M, Fasching A, Hansell P, Nordquist L, Palm F (2008): Diabetes-induced up-regulation of uncoupling protein-2 results in increased mitochondrial uncoupling in kidney proximal tubular cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1777, 935-940
- Frydman J und Höhfeld J (1997): Chaperones get in touch: the Hip-Hop connection. *Trends Biochem Sci*, Vol. 22, 87-92
- Fülöp N, Zhang Z, Marchase RB, Chatham JC (2007): Glucosamine cardioprotection in perfused rat heart associated with increased O-Linked N-acetylglucosamine protein modification and altered p38 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, Vol. 292, H2227-2236
- Gandy JC, Rountree AE, Bijur GN (2006): Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1. *FEBS Lett*, Vol. 580, 3051-3058
- Gao Y, Parker GJ, Hart GW (2000): Streptozotocin-Induced  $\beta$ -Cell Death Is Independent of Its Inhibition of O-GlcNAcase in Pancreatic Min6 Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 383, 296-302
- Gao Y, Wells L, Comer FI, Parker GJ, Hart GW (2001): Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins: Cloning and Characterization of a neutral, cytosolic  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase from human Brain. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, 9838-9845
- Gao Y, Miyazaki J, Hart GW (2003): The transcription factor PDX-1 is posttranslationally modified by O-linked N-acetylglucosamine and this modification is correlated with its DNA binding activity and insulin secretion in min6 beta-cells. *Arch Biochem Biophys*, Vol. 415, 155-163
- Garcia SF, Virág L, Jagtap P, Szabó É, Mabley JG, Liaudet L, Marton A, Hoyt DG, Murthy KG, Salzman AL, Southan GJ, Szabo C (2001) Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly (ADPribose) polymerase activation. *Nat Med*, Vol. 7, 108-113
- Garrido C, Bruey JM, Fromentin A, Hammann A, Arrigo AP, Solary E (1999): HSP27 inhibits cytochrome *c*-dependent activation of procaspase-9. *FASEB J*, Vol. 13, 2061-2070
- GE Healthcare (2004): 2-D Electrophoresis. Principles and Methods  
[http://www.gelifesciences.com/aprix/upp00919.nsf/Content/4EE093B6C6B7BB18C1257628001D252E/\\$file/80642960.pdf](http://www.gelifesciences.com/aprix/upp00919.nsf/Content/4EE093B6C6B7BB18C1257628001D252E/$file/80642960.pdf) (letzte Einsicht: 04.06.2010)
- Gewinner C (2001): Identifikation und Charakterisierung der dynamischen O-GlcNAc Modifikation von Stat5a. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe - Universität, Frankfurt am Main
- Gewinner C, Hart G, Zachara N, Cole R, Beisenherz-Huss C, Groner B (2004): The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5. *J Biol Chem*, Vol. 279, 3563-3572
- Gjedde A und Crone C (1981): Blood-brain glucose transfer: repression in chronic hyperglycemia. *Science*, Vol. 214, 456-457
- Glauser DA und Schlegel W (2007): The emerging role of FOXO transcription factors in pancreatic  $\beta$  cells. *J Endocrinol*, Vol. 193, 195-207

- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Weiss W (1999): Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis*, Vol. 20, 712-717
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W (2000): The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, Vol. 21, 1037-1053
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ (2004): Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, Vol. 4, 3665-3685
- Görg A (2007): 2-D manual  
<http://www.wzw.tum.de/proteomik/> (letzte Einsicht: 04.06.2010)
- Görg A, Drews O, Lück C, Weiland F, Weiss W (2009): 2-DE with IPGs. *Electrophoresis*, Vol. 30, S122-S132
- Goldberg HJ, Scholey J, Fantus IG (2000): Glucosamine activates the plasminogen activator inhibitor 1 gene promoter through Sp1 DNA binding sites in glomerular mesangial cells. *Diabetes*, Vol. 49, 863-871
- Goldberg IJ und Dansky HM (2006): Diabetic vascular disease: an experimental objective. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 26, 1693-1701
- Goldberg HJ, Whiteside CI, Hart GW, Fantus IG (2006): Posttranslational, reversible O-glycosylation is stimulated by high glucose and mediates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and Sp1 transcriptional activity in glomerular mesangial cells. *Endocrinology*, Vol. 147, 222-231
- Gong CX, Liu F, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2006): Impaired brain glucose metabolism leads to Alzheimer neurofibrillary degeneration through a decrease in tau O-GlcNAcylation. *J Alzheimers Dis*, Vol. 9, 1-12
- Gordon AM, Homsher E, Regnier M (2000): Regulation of Contraction in Striated Muscle. *Physiological Reviews*, Vol. 80, 853-924
- Goward CR und Nicholls DJ (1994): Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Science*, Vol. 3, 1883-1888
- Griffith L und Schmitz B (1995): O-linked N-acetylglucosamine is upregulated in Alzheimer brains. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 213, 424-431
- Griffith L, Mathes M, Schmitz B (1995): Beta-amyloid precursor protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Neurosci Res*, Vol. 41, 270-278
- Griffith L und Schmitz B (1999): O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation. *Eur J Biochem*, Vol. 262, 824-831
- Gross BJ, Kraybill BC, Walker S (2005): Discovery of O-GlcNAc Transferase Inhibitors. *J Am Chem Soc*, Vol. 127, 14588-14589
- Guilherme A, Emoto M, Buxton JM, Bose S, Sabini R, Theurkauf WE, Leszyk J, Czech MP (2000): Perinuclear Localization and Insulin Responsiveness of GLUT4 Requires Cytoskeletal Integrity in 3T3-L1 Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, 38151-38159
- Guinez C, Lemoine J, Michalski JC, Lefebvre T (2004): 70-kDa-Heat shock protein presents an adjustable lectinic activity towards O-linked N-acetylglucosamine. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 319, 21-26
- Guinez C, Morelle W, Michalski JC, Lefebvre T (2005): O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins? *Int J Biochem Cell Biol*, Vol. 37, 765-774
- Guinez C, Losfeld ME, Cacan R, Michalski JC, Lefebvre T (2006): Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization. *Glycobiology*, Vol. 16, 22-28
- Guinez C, Mir AM, Leroy Y, Cacan R, Michalski JC, Lefebvre T (2007): Hsp70-GlcNAc-binding activity is released by stress, proteasome inhibition, and protein misfolding. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 361, 414-420
- Guinez C, Mir AM, Dehennaut V, Cacan R, Harduin-Lepers A, Michalski JC, Lefebvre T (2008): Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation. *FASEB J*, Vol. 22, 2901-2911

- Guo GG, Patel K, Kumar V, Shah M, Fried VA, Etlinger JD, Sehgal PB (2002): Association of the Chaperone Glucose-Regulated Protein 58 (GRP58/ER-60/ERp57) with Stat3 in Cytosol and Plasma Membrane Complexes. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, Vol. 22, 555-563
- Gupta S und Knowlton AA (2002): Cytosolic Heat Shock Protein 60, Hypoxia, and Apoptosis. *Circulation*, Vol. 106, 2727-2733
- Haltiwanger RS, Holt GD, Hart GW (1990): Enzymatic Addition of O-GlcNAc to Nuclear and Cytoplasmic Proteins. Identification of a Uridine Diphospho-N-Acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 265, 2563-2568
- Haltiwanger R, Blomberg M, Hart G (1992): Glycosylation of Nuclear and Cytoplasmic Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 267, 9005-9013
- Haltiwanger RS, Grove K, Philipsberg GA (1998): Modulation of O-Linked N-Acetylglucosamine Levels on Nuclear and Cytoplasmic Proteins *in Vivo* Using the Peptide O-GlcNAc- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase Inhibitor O-(2-Acetamido-2-deoxy-Dglucopyranosylidene) amino-N-phenylcarbamate. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, 3611-3617
- Han I und Kudlow JE (1997): Reduced O Glycosylation of Sp1 Is Associated with Increased Proteasome Susceptibility. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 17, 2550-2558
- Hanahan D (1983): Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.*, Vol. 166, 557-580
- Hancock K und Tsang V (1983): Indian Ink Staining of Proteins on Nitrocellulose Paper. *Analytical Biochemistry*, Vol. 133, 157-162
- Hanover JA, Lai Z, Lee G, Lubas WA, Sato SM (1999): Elevated O-Linked N-Acetylglucosamine Metabolism in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 362, 38-45
- Hanover JA (2001): Glycan-dependent signalling: O-linked N-acetylglucosamine. *FASEB J*, Vol. 15, 1865-1876
- Hanover JA, Yu S, Lubas WB, Shin SH, Ragano-Caracciola M, Kochran J, Love DC (2003): Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Vol. 409, 287-297
- Hanover JA, Forsythe ME, Hennessey PT, Brodigan TM, Love LC, Ashwell G, Krause M (2005): A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *PNAS*, Vol. 102, 11266-11271
- Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, Takahashi M, Cheah JH, Tankou SK, Hester LD, Ferris CD, Hayward SD, Snyder SH, Sawa A (2005): S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nature Cell Biology*, Vol. 7, 665-674
- Hara MR und Synder SH (2005): Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade. *Cell Mol Neurobiol*, Vol. 26, 527-538
- Hart GW, Cole RN, Kreppel LK, Arnold CS, Comer FJ, Iyer S, Cheng X, Carrol J, Parker GJ (2000). Glycosylation of proteins: A major challenge in mass spectrometry and proteomics. *In Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on Mass Spectrometry in the Health and Life Sciences*, Humana Press, 365-382
- Hart GW, Housley MP, Slawson C (2007): Cycling of O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*, Vol. 446, 1017-1022
- Hattori T, Ohsawa K, Mizuno Y, Kato K, Kohsaka S (1994): Synthetic Peptide Corresponding to 30 Amino Acids of the C-Terminal of Neuron-Specific Enolase Promotes Survival of Neocortical Neurons in Culture. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 202, 25-30
- Hattori T, Takei N, Mizuno Y, Kato K, Kohsaka S (1995): Neurotrophic and neuroprotective effects of neuron-specific enolase on cultured neurons from embryonic rat brain. *Neuroscience Research*, Vol. 21, 191-198
- Havasi A, Li Z, Wang Z, Martin JL, Botla V, Ruchalski K, Schwartz JH, Borkan SC (2008): Hsp27 Inhibits Bax Activation and Apoptosis via a Phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, 12305-12313

- Hawkins M, Barzilai N, Liu R, Hu M, Chen W, Rossetti L (1997): Role of the glucosamine pathway in fat-induced insulin resistance. *J Clin Invest*, Vol. 99, 2173-2182
- Heckel D, Comtesse N, Brass N, Blin N, Zang KD, Meese E (1998): Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum Mol Genet*, Vol. 7, 1859-1872
- Hédou J, Cieniewski-Bernard C, Leroy Y, Michalski JC, Mounier Y, Bastide B (2007): O-Linked N-Acetylglucosaminylation Is Involved in the Ca<sup>2+</sup> Activation Properties of Rat Skeletal Muscle. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 282, 10360-10369
- Hédou J, Bastide B, Page A, Michalski JC, Morelle W (2009): Mapping of O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine modification sites in key contractile proteins of rat skeletal muscle. *Proteomics*, Vol. 9, 2139-2148
- Hino M, Kurogi K, Okubo MA, Murata-Hori M, Hosoya H (2000): Small Heat Shock Protein 27 (HSP27) Associates with Tubulin/Microtubules in HeLa Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 271, 164-169
- Hirsch B und Rösen P (1999): Diabetes induces long-lasting changes in the glucose transporter of rat heart endothelial cells. *Hormon Metab Res*, Vol. 31, 645-652
- Ho FM, Liu SH, Liao CS, Huang PJ, Lin-Shiau SY (2000): High Glucose-Induced Apoptosis in Human Endothelial Cells Is Mediated by Sequential Activations of c-Jun NH 2-Terminal Kinase and Caspase-3. *Circulation*, Vol.101, 2618-2624
- Ho FM, Lin WW, Chen BC, Chao CM, Yang CH, Lin LY, Lai CC, Liu SH, Liao CS (2006): High glucose-induced apoptosis in human vascular endothelial cells is mediated through NF- $\kappa$ B and c-Jun NH2-terminal kinase pathway and prevented by PI3K/Akt/eNOS pathway. *Cellular Signalling*, Vol. 18, 391-399
- Højlund K, Staehr P, Hansen BF, Green KA, Hardie DG, Richter EA, Beck-Nielsen H, Wojtaszewski JF (2003): Increased phosphorylation of skeletal muscle glycogen synthase at NH2-terminal sites during physiological hyperinsulinemia in type 2 diabetes. *Diabetes*, Vol. 52, 1393-1402
- Højlund K, Yi Z, Lefort N, Langlais P, Bowen B, Levin K, Beck-Nielsen H, Mandarino LJ (2010): Human ATP synthase beta is phosphorylated at multiple sites and shows abnormal phosphorylation at specific sites in insulin-resistant muscle. *Diabetologia*, Vol. 53, 541-551
- Holt GW und Hart GW (1986): The Subcellular Distribution of Terminal N-Acetylglucosamine Moieties: Localization of a Novel Protein-Saccharide Linkage, O-Linked GlcNAc. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 261, 8049-8057
- Housley MP, Rodgers JT, Puigserver P, Hart GW (2006): Elevated O-GlcNAc cycling on FOXO1A mediates inappropriate hepatic gluconeogenesis. *FASEB J*, Vol. 20, A955
- Housley MP, Rodgers JT, Udeshi ND, Kelly TJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Puigserver P, Hart GW (2008): O-GlcNAc regulates FoxO activation in response to glucose. *J Biol Chem*, Vol. 283, 16283-16292
- Hoyer S (1998): Risk factors for Alzheimer's disease during aging. Impacts of glucose/energy metabolism. *J Neural Transm Suppl*, Vol. 54, 187-194
- Hoyer S (2000): Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update. *Exp Gerontol*, Vol. 9-10, 1363-1372
- Hresko RC, Heimberg H, Chi MMY, Mueckleri M (1998): Glucosamine-induced Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes Is Caused by Depletion of Intracellular ATP. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, 20658-20668
- Hu Y, Suarez J, Fricovsky E, Wang H, Scott BT, Trauger SA, Han W, Hu Y, Oyeleye MO, Dillmann WH (2009): Increased Enzymatic O-GlcNAcylation of Mitochondrial Proteins Impairs Mitochondrial Function in Cardiac Myocytes Exposed to High Glucose. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 284, 547-555
- Huang C, Somwar R, Patel N, Niu W, Török D, Klip A (2002): Sustained Exposure of L6 Myotubes to High Glucose and Insulin Decreases Insulin-Stimulated GLUT4 Translocation but Upregulates GLUT4 Activity. *Diabetes*, Vol. 51, 2090-2098

- Huot J, Houle F, Marceau F, Landry J (1997): Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogenactivated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res*, Vol. 80, 383-392
- Hwang H, Bowen BP, Lefort N, Flynn CR, De Filippis EA, Roberts C, Smoke CC, Meyer C, Højlund K, Yi Z, Mandarino LJ (2010): Proteomics Analysis of Human Skeletal Muscle Reveals Novel Abnormalities in Obesity and Type 2 Diabetes. *Diabetes*, Vol. 59, 33-42
- Ichimiya S, Davis JG, O'Rourke DM, Katsumata M, Greene MI (1997): Murine thioredoxin peroxidase delays neuronal apoptosis and is expressed in areas of the brain most susceptible to hypoxic and ischemic injury. *DNA Cell Biol*, Vol. 16, 311-321
- Ido Y, Nyengaard JR, Chang K, Tilton RG, Kilo C, Mylari BL, Oates PJ, Williamson JR (2010): Early neural and vascular dysfunction in diabetic rats are largely sequelae of increased sorbitol oxidation. *Antioxid Redox Signal*, Vol 12, 39-51
- Igarashi J und Michel T (2001): More sweetness than light? A search for the causes of diabetic vasculopathy. *J Clin Invest*, Vol. 108, 1425-1427
- Iida H und Yahara H (1984): A heat shock-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows constitutive synthesis of two heat shock proteins and altered growth. *J Cell Biol*, Vol. 99, 1441-1450
- Inukai K, Funaki M, Nawano M, Katagiri H, Ogihara T, Anai M, Onishi Y, Sakoda H, Ono H, Fukushima Y, Kikuchi M, Oka Y, Asano T (2000): The N-terminal 34 residues of the 55 kDa regulatory subunits of phosphoinositide 3-kinase interact with tubulin. *Biochem J*, Vol. 346, 483-489
- Invitrogen (2007): Click-iT™ O-GlcNAc Enzymatic Labeling System  
<http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp33368.pdf> (letzte Einsicht: 04.06.2010)
- Issad T und Kuo M (2008): O-GlcNAc modification of transcription factors, glucose sensing and glucotoxicity. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, Vol.19, 380-389
- Jackson SP und Tjian R (1988): O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell*, Vol. 55, 125-133
- Jaffe F, Hoyer L, Nachman R (1973): Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultures human endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 52, 2757-2764
- Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T (1996): Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *PNAS*, Vol. 93, 11848-11852
- Jones SP, Zachara NE, Ngoh GA, Hill BG, Teshima Y, Bhatnagar A, Hart GW, Marban E (2008): Cardioprotection by N-acetylglucosamine linkage to cellular proteins. *Circulation*, Vol. 117, 1172-1182
- Kamemura K, Hayes BK, Comer FI, Hart GW (2002): Dynamic Interplay between O-Glycosylation and O-Phosphorylation of Nucleocytoplasmic Proteins: Alternative Glycosylation/Phosphorylation of Thr-58, a Known Mutational Hot Spot of c-Myc in Lymphomas, is Regulated by Mitogens. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, 19229-19235
- Kamemura K und Hart GW (2003): Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, Vol. 73, 107-136
- Kadonaga JT, Courey AJ, Ladika J, Tjian R (1988): Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation. *Science*, Vol. 242, 1566-1570
- Kang SW, Baines IC, Rhee SG (1998) Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*, Vol. 273, 6297-6302
- Kang ES, Han D, Park J, Kwak TK, Oh MA, Lee SA, Choi S, Park SY, Kim Y, Lee JW (2008): O-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic  $\beta$  cells. *Experimental Cell Research*, Vol. 314, 2238-2248
- Kapeller R, Chakrabarti R, Cantley L, Fay F, Corvera S (1993): Internalization of Activated Platelet-Derived Growth Factor Receptor-Phosphatidylinositol-3' Kinase Complexes: Potential Interactions with the Microtubule Cytoskeleton. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 13, 6052-6063
- Kapeller R, Toker A, Cantley LC, Carpenter CL (1995): Phosphoinositide 3-Kinase Binds Constitutively to  $\alpha/\beta$ -Tubulin and Binds to  $\gamma$ -Tubulin in Response to Insulin. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 270, 25985-25991

- Kawamoto RM und Caswell AH (1986): Autophosphorylation of glyceraldehydephosphate dehydrogenase and phosphorylation of protein from skeletal muscle microsomes. *Biochemistry*, Vol. 25, 657-661
- Kelly W, Dahmus M, Hart G (1993): RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem*, Vol. 268, 10416-10424
- Kerner W, Brückel J, Böhm BO (2004): Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. In: *Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG*, 1. Auflage
- Khaitlina S und Hinssen H (2002): Ca-dependent binding of actin to gelsolin. *FEBS Letters*, Vol. 521, 14-18
- Khidekel N, Arndt S, Lamarre-Vincent N, Lippert A, Poulin-Kerstien KG, Ramakrishnan B, Qasba PK, Hsieh-Wilson LC (2003): Chemoenzymatic Approach toward the Rapid and Sensitive Detection of O-GlcNAc Posttranslational Modifications *J AM CHEM SOC*, Vol. 125, 16162-16163
- Khidekel N, Ficarro SB, Clark PM, Bryan MC, Swaney DL, Rexach JE, Sun YE, Coon JJ, Peters EC, Hsieh-Wilson LC (2007): Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nature Chemical Biology*, Vol. 3, 339-348
- Kiang JG und Tsokos GC (1998): Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther*, Vol. 80, 183-201
- Kim YJ, Shuman J, Sette M, Przybyla A (1984): Nuclear Localization and Phosphorylation of Three 25-Kilodalton Rat Stress Proteins. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 4, 468-474
- Kim JW und Dang CV (2005): Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci*, Vol. 30, 142-150
- Kim CI, Lee SH, Seong GJ, Kim YH, Lee MY (2006d): Nuclear translocation and overexpression of GAPDH by the hyper-pressure in retinal ganglion cell. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 341, 1237-1243
- Kim EJ, Kang DO, Love DC, Hanover JA (2006a): Enzymatic characterization of O-GlcNAcase isoforms using a fluorogenic GlcNAc substrate. *Carbohydrate Research*, Vol. 341, 971-982
- Kim HS, Kim EM, Lee J, Yang WH, Park TY, Kim YM, Cho JW (2006c): Heat shock protein 60 modified with O-linked N-acetylglucosamine is involved in pancreatic b-cell death under hyperglycemic conditions. *FEBS Letters*, Vol. 580, 2311-2316
- Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ (2006b): Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation*, Vol. 113, 1888-1904
- Kim YH, Song M, Oh YS, Heo K, Choi JW, Park JM, Kim SH, Lim S, Kwon HM, Ryu SH, Suh PG (2006e): Inhibition of Phospholipase C- $\beta$ 1-mediated Signaling by O-GlcNAc Modification. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 207, 689-696
- Klatt P und Lamas S (2002): c-Jun regulation by S-glutathionylation. *Methods Enzymol*, Vol. 348, 157-174
- Knapp S, Abdo M, Ajayi K, Huhn RA, Emge TJ, Kim EJ, Hanover JA (2007): Tautomeric Modification of GlcNAc-Thiazoline. *Organic Letters*, Vol. 9, 2321-2324
- Köhnke R, Mei J, Park M, York DA, Erlanson-Albertsson C (2007): Fatty acids and glucose in high concentration down-regulates ATP synthase beta-subunit protein expression in INS-1 cells. *Nutr Neurosci*, Vol. 10, 273-278
- Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED (1998): High glucose-induced transforming growth factor  $\beta$ 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest*, Vol. 101, 160-169
- Konrad RJ und Kudlow JE (2002): The role of O-linked protein glycosylation in  $\beta$ -cell dysfunction. *International Journal of Molecular Medicine*, Vol. 10, 535-539
- Koppenol WH, Moreno JJ, Pryor WA, Ischiropoulos H, Beckman JS (1992): Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol*, Vol. 5, 834-842

- Korzus E, Torchia J, Rose DW, Xu L, Kurokawa R, McInerney EM, Mullen TM, Glass CK, Rosenfeld MG (1998): Transcription factor-specific requirements for coactivators and their acetyltransferase functions. *Science*, Vol. 279, 703-707
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kothe K, Kwiatkowski DJ, Williams LT (1997): Caspase-3-Generated Fragment of Gelsolin: Effector of Morphological Change in Apoptosis. *Science*, Vol. 278, 294-298
- Krajačunović and Silberring (2008): *Proteomic: Introduction to Methods and Applications*. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, USA
- Kreppel L, Blomberg M, Hart G (1997): Dynamic Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, 9308-9315
- Kreppel L und Hart G (1999): Regulation of a Cytosolic and Nuclear O-GlcNAc Transferase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, 32015-32022
- Krynetski EY, Krynetskaia NF, Bianchi ME, Evans WE (2003): A Nuclear Protein Complex Containing High Mobility Group Proteins B1 and B2, Heat Shock Cognate Protein 70, ERp60, and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is Involved in the Cytotoxic Response to DNA Modified by Incorporation of Anticancer Nucleoside Analogues. *Cancer Research*, Vol. 63, 100-106
- Kubo E, Urakami T, Fatma N, Akagi Y, Singh DP (2004): Polyol pathway-dependent osmotic and oxidative stresses in aldose reductase-mediated apoptosis in human lens epithelial cells: Role of AOP2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 314, 1050-1056
- Kubo E, Singh DP, Akagi Y (2005): Gene expression profiling of diabetic and galactosaemic cataractous rat lens by microarray analysis. *Diabetologia*, Vol. 48, 790-798
- Kubo E, Singh DP, Fatma N, Akagi Y (2009): TAT-mediated peroxiredoxin 5 and 6 protein transduction protects against high-glucose-induced cytotoxicity in retinal pericytes. *Life Sciences*, Vol. 84, 857-864
- Kudlow JE (2006): Post-translational modification by O-GlcNAc: another way to change protein function. *J Cell Biochem*, Vol. 98, 1062-1075
- Kulkarni RN, Brüning JC, Winnay JN, Postic C, Magnuson MA, Kahn CR (1999): Tissue-specific knockout of the insulin receptor in pancreatic  $\beta$  cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*, Vol. 96, 329-339
- Kumagai H und Sakai H (1983): A Porcine Brain Protein (35 K Protein) which Bundles Microtubules and Its Identification as Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase. *Biochem*, Vol. 93, 1259-1269
- Kumagai AK, Kang YS, Boado RJ, Pardridge WM (1995): Upregulation of blood-brain barrier GLUT-1 glucose transporter protein and mRNA in experimental chronic hypoglycemia. *Diabetes*, Vol. 44, 1399-1404
- Kuo M, Zilberfarb V, Gangneux N, Christeff N, Issad T (2008a): O-glycosylation of FoxO1 increases its transcriptional activity towards the glucose 6-phosphatase gene. *FEBS Letters*, Vol. 582, 829-834
- Kuo M, Zilberfarb V, Gangneux N, Christeff N, Issad T (2008b): O-GlcNAc modification of FoxO1 increases its transcriptional activity: A role in the glucotoxicity phenomenon? *Biochimie*, Vol. 90, 679-685
- Kusner LL, Sarthy VP, Mohr S (2004): Nuclear Translocation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase: A Role in High Glucose-Induced Apoptosis in Retinal Müller Cells. *IOVS*, Vol. 45, 1553-1561
- Laemmli U (1970): Cleavage of Structural Proteins During Assembly of the Head of the Bacteriophage T4. *Nature*, Vol. 227, 680-685
- Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukui T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG (2003): Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest*, Vol. 111, 1201-1209
- Landry J, Lambert H, Zhou M, Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Anderson CW (1992): Human HSP27 Is Phosphorylated at and Mitogen-activated Kinases That Motif as S6 Kinase II. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 267, 794-803
- Lawrence J und Roach PJ (1997): New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes*, Vol. 46, 541-547

- Laybourn PJ und Dahmus ME (1990): Phosphorylation of RNA polymerase IIA occurs subsequent to interaction with the promoter and before the initiation of transcription. *J Biol Chem*, Vol. 265, 13165-13173
- Lazarus BD, Roos MD, Hanover JA (2005): Mutational Analysis of the Catalytic Domain of O-Linked N-Acetylglucosaminyl Transferase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, 35537-35544
- Lazarus BD, Love DC, Hanover JA (2006): Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. *Glycobiology*, Vol. 16, 415-421
- Lazarus BD, Love DC, Hanover JA (2009): O-GlcNAc cycling: implications for neurodegenerative disorders. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol. 41, 2134-2146
- Lee AS (1987): Coordinated regulation of a set of genes by glucose and calcium ionophores in mammalian cells. *Trends Biochem Sci*, Vol. 12, 20-23
- Lee TI und Young RA (2000): Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet*, Vol. 34, 77-137
- Lee AS (2001): The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends in Biochemical Sciences*, Vol.26, 504-510
- Lee SM, Kim JH, Cho EJ, Youn HD (2009): A nucleocytoplasmic malate dehydrogenase regulates p53 transcriptional activity in response to metabolic stress. *Cell Death and Differentiation*, Vol. 16, 738-748
- Lee J, Kim KY, Lee J, Paik YK (2010): Regulation of dauer formation by O-GlcNAcylation in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 285, 2930-2939
- Lefebvre T, Cieniewski C, Lemoine J, Guerardel Y, Leroy Y, Zanetta JP, Michalski JC (2001): Identification of N-acetyl-D-glucosamine-specific lectins from rat liver cytosolic and nuclear compartments as heat-shock proteins. *Biochem J*, Vol. 360, 179-188
- Lefebvre T, Dehennaut V, Guinez C, Olivier S, Drougat L, Mir AM, Mortuaire M, Vercoutter-Edouart AS, Michalski JC (2010): Dysregulation of nutrient/stress sensor O-GlcNAcylation is involved in the etiology of cardiovascular disorder, type-2 diabetes and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1800, 67-79
- Lehman DM, Fu DJ, Freeman AB, Hunt KJ, Leach RJ, Johnson-Pais T, Hamlington J, Dyer TD, Arya R, Abboud H, Göring HHH, Duggirala R, Blangero J, Konrad RJ, Stern MP (2005): A Single Nucleotide Polymorphism in MGEA5 Encoding O-GlcNAc-selective N-Acetyl-β-D Glucosaminidase Is Associated With Type 2 Diabetes in Mexican Americans. *Diabetes*, Vol. 54, 1214-1221
- Lester-Coll N, Rivera EJ, Soscia SJ, Doiron K, Wands JR, de la Monte SM (2006): Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, Vol. 9, 13-33
- Levy DE und Darnell JE (2002): Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. 3, 651-662
- Li D, Tapscoft T, Gonzalez, Burch PE, Quinones MA, Zoghbi WA, Hill R, Bachinski LL, Mann DL, Roberts R (1999): Desmin Mutation Responsible for Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *Circulation*, Vol. 100, 461-464
- Li J und Lee AS (2006): Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med*, Vol. 6, 45-54
- Li QF, Spinelli AM, Wang R, Anfinogenova Y, Singer HA, Tang DD (2006): Critical Role of Vimentin Phosphorylation at Ser-56 by p21-activated Kinase in Vimentin Cytoskeleton Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 281, 34716-34724
- Li Q, Ye Z, Wena J, Mab L, He Y, Lian G, Wang Z, Wei L, Wua D, Jiang B (2009): Gelsolin, but not its cleavage, is required for TNF-induced ROS generation and apoptosis in MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 385, 284-289
- Lin KM, Lin B, Lian IY, Mestril R, Scheffler IE, Dillmann WH (2001): Combined and individual mitochondrial HSP60 and HSP10 expression in cardiac myocytes protects mitochondrial function and prevents apoptotic cell deaths induced by simulated ischemia-reoxygenation. *Circulation*, Vol. 103, 1787-1792

- Little E, Ramakrishnan M, Roy B, Gazit G, Lee AS (1994): The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, Vol. 4, 1-18
- Liu K, Paterson AJ, Chin E, Kudlow JE (2000): Glucose stimulates protein modification by O-linked GlcNAc in pancreatic  $\beta$  cells: Linkage of O-linked GlcNAc to  $\beta$  cell death. *PNAS*, Vol. 97, 2820-2825
- Liu K, Paterson AJ, Konrad RJ, Parlow AF, Jimi S, Roh M, Chin E, Jr, Kudlow JE (2002): Streptozotocin, an O-GlcNAcase inhibitor, blunts insulin and growth hormone secretion *Molecular and Cellular Endocrinology*, Vol. 194, 135-146
- Liu J, Pang Y, Chang T, Bounelis P, Chatham JC, Marchase RB (2006): Increased hexosamine biosynthesis and protein O-GlcNAc levels associated with myocardial protection against calcium paradox and ischemia. *J Mol Cell Cardiol*, Vol. 40, 303-312
- Liu J, Marchase RB, Chatham JC (2007): Increased O-GlcNAc levels during reperfusion lead to improved functional recovery and reduced calpain proteolysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, Vol. 293, H1391-1399
- Love DC, Kochan JP, Cathey RL, Shin SH, Hanover JA (2003): Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *J Cell Sci*, Vol. 116, 647-654
- Love DC und Hanover JA (2005): The hexosamine signaling pathway: deciphering the "O-GlcNAc code". *Sci STKE*, Vol. 312, re13
- Lubas WA, Frank DW, Krause M, Hanover JA (1997): O-Linked GlcNAc Transferase Is a Conserved Nucleocytoplasmic Protein Containing Tetratricopeptide Repeats. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 272, 9316-9324
- Lubas W und Hanover J (2000): Functional Expression of O-linked GlcNAc Transferase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, 10983-10988
- Macauley MS, Whitworth GE, Debowski AW, Chin D, Vocadlo DJ (2005): O-GlcNAcase Uses Substrate-assisted Catalysis: Kinetic Analysis and Development of Highly Selective Mechanism-inspired Inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 280, 25313-25322
- Macauley MS, Bubb AK, Martinez-Fleites C, Davies GJ, Vocadlo DJ (2008): Elevation of Global O-GlcNAc Levels in 3T3-L1 Adipocytes by Selective Inhibition of O-GlcNAcase Does Not Induce Insulin Resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, 34687-34695
- Macauley MS und Vocadlo DJ (2009): Enzymatic characterization and inhibition of the nuclear variant of human O-GlcNAcase. *Carbohydrate Research*, Vol. 344, 1079-1084
- Mackenzie IS, Rutherford D, MacDonald TM (2008): Nitric oxide and cardiovascular effects: new insights in the role of nitric oxide for the management of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, Vol. 10, Suppl 2:S3
- Mandal AK, Puchalski JT, Lemley-Gillespie S, Taylor CA, Kohno M (2000): Effect of insulin and heparin on glucose-induced vascular damage in cell culture. *Kidney International*, Vol. 57, 2492-2501
- Mandarino LJ (1992): Current hypotheses for the biochemical basis of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*, Vol. 15, 1892-1901
- Manevich Y, Sweitzer T, Pak JH, Feinstein SI, Muzykantov V, Fisher AB (2002): 1-Cys peroxiredoxin overexpression protects cells against phospholipid peroxidation-mediated membrane damage. *PNAS*, Vol. 99, 11599-11604
- Marshall S, Bacote V, Traxinger RR (1991a): Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem*, Vol. 266, 4706-4712
- Marshall S, Bacote V, Traxinger RR (1991b): Complete inhibition of glucose-induced desensitization of the glucose transport system by inhibitors of mRNA synthesis. Evidence for rapid turnover of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase. *J Biol Chem*. Vol. 266, 10155-10161
- Marshall S, Duong T, Orbus RJ, Rumberger JM, Okuyama R (2003): Measurement of UDP-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) in brain cytosol and characterization of anti-OGT antibodies. *Analytical Biochemistry*, Vol. 314, 169-179
- Marshall S, Nadeau O, Yamasaki K (2004): Dynamic Actions of Glucose and Glucosamine on Hexosamine Biosynthesis in Isolated Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, 35313-35319

- Marshall S (2006): Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: a nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer. *Sci STKE*, Vol. 346, re 7
- Matthaei S, Horuk R, Olefsky JM (1986): Blood-brain glucose transfer in Diabetes mellitus. Decreased number of glucose transporters at blood-brain barrier. *Diabetes*, Vol. 35, 1181-1184
- Matthews JA, Belof JL, Acevedo-Duncan M, Potter RL (2007): Glucosamine-induced increase in Akt phosphorylation corresponds to increased endoplasmic reticulum stress in astroglial cells. *Mol Cell Biochem*, Vol. 298, 109-123
- McClain DA (2002): Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications*, Vol. 16, 72-80
- McClain DA, Lubas WA, Cooksey RC, Hazel M, Parker GJ, Love DC (2002): Altered glycan-dependent signaling induces insulin resistance and hyperleptinemia. *PNAS*, Vol. 99, 10695-10699
- McClain DA, Taylor RP, Soesanto Y, Luo B (2010): Metabolic Regulation by the Hexosamine Biosynthesis/O-Linked N-Acetyl Glucosamine Pathway. *Current Signal Transduction Therapy*, Vol. 5, 3-11
- McEwen BS (1998): Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med*, Vol. 338, 171-179
- Miele C, Riboulet A, Maitan MA, Oriente F, Romano C, Formisano P, Giudicelli J, Beguinot F, Van Obberghen E (2003): Human glycated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced insulin receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C $\alpha$ -mediated mechanism. *J Biol Chem*, Vol. 278, 47376-47387
- Milner DJ, Weitzer G, Tran D, Bradley A, Capetanaki Y (1996): Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin. *J Cell Biol*, Vol. 134, 1255-1270
- Mitumoto A und Nakagawa Y (2001): DJ-1 is an indicator for endogenous reactive oxygen species elicited by endotoxin. *Free Radic Res*, Vol. 35, 885-893
- Mitumoto A, Nakagawa Y, Takeuchi A, Okawa K, Iwamatsu A, Takanezawa Y (2001): Oxidized forms of peroxiredoxins and DJ-1 on two-dimensional gels increased in response to sublethal levels of paraquat. *Free Radic Res*, Vol. 35, 301-310
- Moreno-Aliaga MJ, Swarbrick MM, Lorente-Cebrian S, Stanhope KN, Havel PJ, Martinez JA (2007): Sp1-mediated transcription is involved in the induction of leptin by insulin-stimulated glucose metabolism. *Journal of Molecular Endocrinology*, Vol. 38, 537-546
- Müllauer L, Fujita H, Ishizaki A, Kuzumaki N (1993): Tumor-suppressive function of mutated gelsolin in ras-transformed cells. *Oncogene*, Vol. 8, 2531-2536
- Muniyappa R, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ (2007): Cardiovascular Actions of Insulin. *Endocrine Reviews*, Vol. 28, 463-491
- Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnet AL (2005): Inactivation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction. *PNAS*, Vol. 102, 11870-11875
- Nagy T, Champattanachai V, Marchase RB, Chatham JC (2006): Glucosamine inhibits angiotensin II-induced cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> elevation in neonatal cardiomyocytes via protein-associated O-linked N-acetylglucosamine. *Am J Physiol Cell Physiol*, Vol. 290, C57-C65
- Nakajima K, Hamanoue M, Takemoto N, Hattori T, Kato K, Kohsaka S (1994): Plasminogen Binds Specifically to  $\alpha$ -Enolase on Rat Neuronal Plasma Membrane. *Journal of Neurochemistry*, Vol. 63, 2048-2057
- Nawroth PP, Waldherr R, Zhang YM, Lin J, Bierhaus A, Lu J, Zu EJ, Kasperk C, Ziegler R (1993): Mechanism of endothelial cell activation. *Transplant Proc*, Vol. 25, 2052-2053
- Ngoh GA, Watson LJ, Facundo HT, Dillmann W, Jones SP (2008): Non-canonical glycosyltransferase modulates post-hypoxic cardiac myocyte death and mitochondrial permeability transition. *J Mol Cell Cardiol*, Vol. 45, 313-325
- Ngoh GA, Facundo HT, Hamid T, Dillmann W, Zachara NE, Jones SP (2009): Inique hexosaminidase reduces metabolic survival signal and sensitizes cardiac myocytes to hypoxia/reoxygenation injury. *Circ Res*, Vol. 104, 41-49

- Nilsson J, Sengupta J, Frank J, Nissen P (2004): Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO reports*, Vol. 5, 1137-1141
- Nojiri H, Stroud M, Hakomori S (1991): A Specific Type of Ganglioside as a Modulator of Insulin-dependent Cell Growth and Insulin Receptor Tyrosine Kinase Activity. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 266, 4531-4537
- Novagen (2005): pET System Manual, 11<sup>th</sup> edition; Download unter: [http://www.emdchemicals.com/life-science-research/request-literature/c\\_cJqb.s1OkAAAAAEi47k7mKMQ](http://www.emdchemicals.com/life-science-research/request-literature/c_cJqb.s1OkAAAAAEi47k7mKMQ) (letzte Einsicht: 04.06.2010)
- Nystrom FH und Quon MJ (1999): Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell Signal*, Vol. 11, 563-574
- O'Donnell N, Zachara NE, Hart GW, Marth JD (2004): Ogt-Dependent X-Chromosome-Linked Protein Glycosylation Is a Requisite Modification in Somatic Cell Function and Embryo Viability. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 24, 1680-1690
- Ohn T, Kedersha N, Hickman T, Tisdale S, Anderson P (2008): A functional RNAi screen links O-GlcNAc modification of ribosomal proteins to stress granule and processing body assembly. *Nat Cell Biol*, Vol. 10, 1224-1231
- Okuyama R und Marshall S (2003): UDP-N-acetylglucosaminyl transferase (OGT) in brain tissue: temperature sensitivity and subcellular distribution of cytosolic and nuclear enzyme. *Journal of Neurochemistry*, Vol. 86, 1271-1280
- Okuyama R und Yachi M (2001): Cytosolic O-GlcNAc Accumulation Is Not Involved in  $\beta$ -Cell Death in HIT-T15 or Min6. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 287, 366-371
- Olson AL, Trumbly AR, Gibson GV (2001): Insulin-mediated GLUT4 Translocation Is Dependent on the Microtubule Network. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, 10706-10714
- Olsson I, Larsson K, Palmgren R, Bjellqvist B (2002): Organic disulfides as a means to generate streak-free two-dimensional maps with narrow range basic immobilized pH gradient strips as first dimension. *Proteomics*, Vol. 2, 1630-1632
- Pacher P und Szabo C (2005): Role of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Activation in the Pathogenesis of Diabetic Complications: Endothelial Dysfunction, as a Common Underlying Theme. *Antioxid Redox Signal*, Vol. 7, 1568-1580
- Paik JH (2006): FOXOs in the maintenance of vascular homeostasis. *Biochem Soc Trans*, Vol. 34, 731-734
- Pancholi V und Fischetti VA (1998):  $\alpha$ -Enolase, a Novel Strong Plasmin(ogen) Binding Protein on the Surface of Pathogenic Streptococci. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 273, 14503-14515
- Pandey P, Farber R, Nakazawa A, Kumar S, Bharti A, Nalin C, Weichselbaum R, Kufe D, Kharbanda S (2000): Hsp27 functions as a negative regulator of cytochrome c-dependent activation of procaspase-3. *Oncogene*, Vol. 19, 1975-1981
- Park SY, Ryu J, Lee W (2005): O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes. *Experimental and Molecular Medicine*, Vol. 37, 220-229
- Park J, Kwon H, Kang Y, Kim Y (2007): Proteomic Analysis of O-GlcNAc Modifications Derived from Streptozotocin and Glucosamine Induced  $\beta$ -cell Apoptosis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 40, 1058-1068
- Parker GJ, Lund KC, Taylor RP, McClain DA (2003): Insulin resistance of glycogen synthase mediated by O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem*, Vol. 278, 10022-10027
- Patti M, Virkamäki A, Landaker E, Kahn R, Yki-Järvinen H (1999): Activation of the Hexosamine Pathway by Glucosamine in Vivo Induces Insulin Resistance of Early Postreceptor Insulin Signaling Events in Skeletal Muscle. *Diabetes*, Vol. 48, 1562-1571
- Paul C, Manero F, Gonin S, Kretz-Remy C, Viroit S, Arrigo AP (2002): Hsp27 as a Negative Regulator of Cytochrome c Release. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 22, 816-834
- Peshenko IV und Shichi H (2001): Oxidation of Active Center Cysteine of Bovine 1-Cys Peroxiredoxin to the Cysteine Sulfenic Acid Form by Peroxide and Peroxynitrite. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 31, 292-303

- Peshenko IV, SINGH AK, SHICHI H (2001): Bovine Eye 1-Cys Peroxiredoxin: Expression in *E. coli* and Antioxidant Properties. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 17, 93-99
- Petersen HV, Jensen JN, Stein R, Serup P (2002): Glucose induced MAPK signalling influences NeuroD1-mediated activation and nuclear localization. *FEBS Lett*, Vol. 528, 241-245
- Pilcher H (2006): Alzheimer's disease could be "type 3 diabetes". *Lancet Neurol*, Vol. 5, 388-389
- Ponticos M, Lu QL, Morgan JE, Hardie DG, Partridge TA, Carling D (1998): Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle. *The EMBO Journal*, Vol.17, 1688-1699
- PromoCell: Skeletal Muscle Cells, Instruction Manual  
<http://www.promocell.com/fileadmin/promocell/PDF/C-12530.pdf> (letzte Einsicht: 04.06.2010)
- Proudfoot N (2000): Connecting transcription to messenger RNA processing. *TIBS*, Vol. 25, 290-293
- Quigley PM, Korotkov K, Baneyx F, Hol WG (2003): The 1.6-Å crystal structure of the class of chaperones represented by *Escherichia coli* Hsp31 reveals a putative catalytic triad. *PNAS*, Vol. 100, 3137-3142
- Rabilloud T, Valette C, Lawrence JJ (1994): Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis*, Vol. 15, 1552-1558
- Ramirez-Correa GA, Jin W, Wang Z, Zhong X, Gao WD, Dias WB, Vecoli C, Hart GW, Murphy AM (2008): O-Linked GlcNAc Modification of Cardiac Myofilament Proteins. *Circ Res*, Vol. 103, 1354-1358
- Ranganathan AC, Zhang L, Adam AP, Aguirre-Ghiso JA (2006): Functional Coupling of p38-Induced Up-regulation of BiP and Activation of RNA-Dependent Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase to Drug Resistance of Dormant Carcinoma Cells. *Cancer Res*, Vol. 66, 1702-1711
- Rao PV, Krishna CM, Zigler JS (1992): Identification and Characterization of the Enzymatic Activity of  $\zeta$ -Crystallin from Guinea Pig Lens. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 267, 96-102
- Rao RV, Poksay KS, Castro-Obregon S, Schilling B, Row RH, del Rio G, Gibson B, Ellerby HM, Bredesen DE (2004): Molecular Components of a Cell Death Pathway Activated by Endoplasmic Reticulum Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, 177-187
- Ray R und Miller DM (1991): Cloning and Characterization of a Human c-myc Promoter-Binding Protein. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 11, 2154-2161
- Rechsteiner M und Rogers SW (1996): PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, Vol. 21, 267-271
- Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS (2003): Endoplasmic Reticulum Chaperone Protein GRP78 Protects Cells from Apoptosis Induced by Topoisomerase Inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, 20915-20924
- Rengifo J, Gibson CJ, Winkler E, Collin T, Ehrlich BE (2007): Regulation of the Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type I by O-GlcNAc Glycosylation. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 27, 13813-13821
- Reiss N, Hermon J, Oplatka A, Naor Z (1996a): Interaction of purified protein kinase C with key proteins of energy metabolism and cellular motility. *Biochem Mol Biol Int*, Vol. 38, 711-719
- Reiss N, Oplatka A, Hermon J, Naor Z (1996b): Phosphatidylserine directs differential phosphorylation of actin and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by protein kinase C: possible implications for regulation of actin polymerization. *Biochem Mol Biol Int*, Vol. 40, 1191-1200
- Reusch JE (2003): Diabetes, microvascular complications, and cardiovascular complications: what is it about glucose? *J Clin Invest*, Vol. 112, 986-988
- Ribon V und Saltiel AR (1997): Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J*, Vol. 324, 839-846
- Ribon V, Printen JA, Hoffman NG, Kay BK, Saltiel AR (1998): A Novel, Multifunctional c-Cbl Binding Protein in Insulin Receptor Signaling in 3T3-L1 Adipocytes. *Molecular and Cellular Biology*, Vol. 18, 872-879

- Rieder SV und Rose IA (1959): The mechanism of the triosephosphate isomerase reaction. *J Biol Chem*, Vol. 234, 1007-1010
- Robinson KA, Weinstein ML, Lindenmayer GE, Buse MG (1995): Effects of diabetes and hyperglycemia on the hexosamine synthesis pathway in rat muscle and liver. *Diabetes*, Vol. 44, 1438-1446
- Roden M, Price TB, Perseghin G, Petersen KF, Rothman DL, Cline GW, Shulman GI (1996): Mechanism of free fatty acid-induced insulin resistance in humans. *J Clin Invest*, Vol. 97, 2859-2865
- Rojas A, Romay S, Gonzalez D, Herrera B, Delgado R, Otero K (2000): Regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by albumin-derived advanced glycosylation end products. *Circ Res*, Vol. 86, E50-E54
- Rösen P (2002): Endotheliale Dysfunktion: ein Synonym für funktionelle Atherosklerose? *Journal für Kardiologie*, Vol. 9, 556-562
- Rollet E und Best-Belpomme M (1986): HSP 26 and 27 are phosphorylated in response to heat shock and ecdysterone in *Drosophila melanogaster* cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 141, 426-433
- Ron D, Chen CH, Caldwell J, Jamieson L, Orr E, Mochly-Rosen D (1994): Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: A homolog of the  $\beta$  subunit of G proteins. *PNAS*, Vol. 91, 839-843
- Ron D, Jiang Z, Yao L, Vagts A, Diamond I, Gordon A (1999): Coordinated Movement of RACK1 with Activated hIIPKC. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 274, 27039-27046
- Ronai Z (1993): Glycolytic enzymes as DNA binding proteins. *Int J Biochem*, Vol. 25, 1073-1076
- Roos MD und Hanover JA (2000): Structure of O-linked GlcNAc transferase: mediator of glycan-dependent signaling. *Biochem Biophys Res Commun.*, Vol. 271, 275-80
- Roquemore EP, Dell A, Morris HR, Panico M, Reason AJ, Savoy LA, Wistow GJ, Zigler JS, Earles BJ, Hart GW (1992): Vertebrate Lens  $\alpha$ -Crystallins Are Modified by O-Linked N-Acetylglucosamine. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 267, 555-563
- Rosdahl JA, Mourton TL, Brady-Kalnay SM (2002): Protein Kinase C  $\delta$  (PKC $\delta$ ) Is Required for Protein Tyrosine Phosphatase  $\mu$  (PTP $\mu$ )-Dependent Neurite Outgrowth. *Molecular and Cellular Neuroscience*, Vol. 19, 292-306
- Rose IA und Warms JVB (1967): Mitochondrial Hexokinase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 242, 1635-1645
- Rossetti L (2000): Perspective: Hexosamines and nutrient sensing. *Endocrinology*, Vol. 141, 1922-1925
- Ruderman NB, Williamson JR, Brownlee M (1992): Glucose and diabetic vascular disease. *FASEB J*, Vol. 6, 2905-2914
- Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, Gunnison KM, Mori K, Sadighi Akha AA, RadenD, Kaufman RJ (2006): Adaptation to ER Stress Is Mediated by Differential Stabilities of Pro-Survival and Pro-Apoptotic mRNAs and Proteins. *PLoS Biol*, Vol. 4, 2024-2041
- Saltiel AR (2001): New Perspectives into the Molecular Pathogenesis and Treatment of Type 2 Diabetes. *Cell*, Vol. 104, 517-529
- Saltiel AR und Kahn CR (2001): Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, Vol. 414, 799-806
- Sano KI, Maeda K, Oda T, Maeda Y (2000): The Effect of Single Residue Substitutions of Serine-283 on the Strength of Head-to-Tail Interaction and Actin Binding Properties of Rabbit Skeletal Muscle  $\alpha$ -Tropomyosin. *J Biochem*, Vol. 127, 1095-1102
- Santa Cruz Biotechnology: Datenblatt nucleoporin p62 (D-20): sc-6078  
<http://datasheets.scbt.com/sc-6078.pdf> (letzte Einsicht 04.06.2010)
- Saxon E und Bertozzi CR (2000): Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger reaction. *Science*, Vol. 287, 2007-2010
- Sayeski PP und Kudlow JE (1996): Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor- $\alpha$  gene transcription. *J Biol Chem*, Vol. 271, 15237-15243

- Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T (2006): Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1762, 164-180
- Schmitz B und Griffith L (1998): N-Acetylglucosaminylierung: die Alternative zur Ser/Thr-Phosphorylierung. *Biospektrum*, Vol. 6, 25-28
- Sears R, Nuckolls F, Haura E, Taya Y, Tamai K, Nevins JR (2000): Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. *Genes Dev*, Vol. 14, 2501-2514
- Sedoris KC, Thomas SD, Miller DM (2007): c-myc promoter binding protein regulates the cellular response to an altered glucose concentration. *Biochemistry*, Vol. 46, 8659-8668
- Shafi R, Iyer SPN, Ellies LG, O'Donnell N, Marek KW, Chui D, Hart GW, Marth JD (2000): The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *PNAS*, Vol. 97, 5735-5739
- Shendelman S, Jonason A, Martinat C, Leete T, Abeliovich A (2004): DJ-1 Is a Redox-Dependent Molecular Chaperone That Inhibits  $\alpha$ -Synuclein Aggregate Formation. *PLoS Biol*, Vol. 2, 1764-1773
- Shimoji S, Park K, Hart GW (2010): Dynamic Crosstalk Between GlcNAcylation and Phosphorylation: Roles in Signaling, Transcription and Human Disease. *Current Signal Transduction Therapy*, Vol. 5, 25-40
- Shiota M, Kusakabe H, Izumi Y, Hikita Y, Nakao T, Funae Y, Miura K, Iwao H (2010): Heat Shock Cognate Protein 70 Is Essential for Akt Signaling in Endothelial Function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Vol. 30, 491-497
- Shulman AI und Mangelsdorf DJ (2005): Retinoid X Receptor Heterodimers in the Metabolic Syndrome. *N Engl J Med*, Vol. 353, 604-615
- Siomi H und Dreyfuss G (1995): A Nuclear Localization Domain in the hnRNP A1 Protein. *The Journal of Cell Biology*, Vol. 129, 551-560
- Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, Cheung WD, Lane MD, Hart GW (2005): Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J Biol Chem*, Vol. 280, 32944-32956
- Slawson C, Lakshmanan T, Knapp S, Hart GW (2008): A Mitotic GlcNAcylation/Phosphorylation Signaling Complex Alters the Posttranslational State of the Cytoskeletal Protein Vimentin. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 19, 4130-4140
- Sohn KC, Lee KY, Park JE, Do SI (2004): OGT functions as a catalytic chaperone under heat stress response: a unique defense role of OGT in hyperthermia. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 322, 1045-1051
- Song MS, Seo HS, Yang M, Kim JS, Kim SH, Kim JC, Wang HB, Sim KB, Kim H, Shin T, Moon C (2009): Activation of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II  $\alpha$  in the spinal cords of rats with clip compression injury. *Brain Research*, Vol. 1271, 114-120
- Spoden GA, Rostek U, Lechner S, Mitterberger M, Mazurek S, Zwerschke W (2009): Pyruvate kinase isoenzyme M2 is a glycolytic sensor differentially regulating cell proliferation, cell size and apoptotic cell death dependent on glucose supply. *Experimental Cell Research*, Vol. 315, 2765-2774
- Sprung R, Nandi A, Chen Y, Kim SC, Barma D, Falck JR, Zhao Y (2005): Tagging-via-Substrate Strategy for Probing O-GlcNAc Modified Proteins. *Journal of Proteome Research*, Vol. 4, 950-957
- Srinivasan V, Tatu U, Mohan V, Balasubramanyam M (2009): Molecular convergence of hexosamine biosynthetic pathway and ER stress leading to insulin resistance in L6 skeletal muscle cells. *Mol Cell Biochem*, Vol. 328, 217-224
- Starr CM and Hanover JA (1990): Glycosylation of nuclear pore protein p62. Reticulocyte lysate catalyzes O-linked N-acetylglucosamine addition *in vitro*. *J Biol Chem*, Vol. 265, 6868-6873
- Steen E, Terry BM, Rivera EJ, Cannon JL, Neely TR, Tavares R, Xu XJ, Wands JR, de la Monte SM (2005): Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease-is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis*, Vol. 7, 63-80
- Steinberg HO und Baron AD (2002): Vascular function, insulin resistance and fatty acids. *Diabetologia*, Vol. 45, 623-634

- Stetak A, Veress R, Ovadi J, Csermely P, Keri G, Ullrich A (2007): Nuclear Translocation of the Tumor Marker Pyruvate Kinase M2 Induces Programmed Cell Death. *Cancer Res*, Vol. 67, 1602-1608
- Stubbs KA, Balcewich M, Mark BL, Vocadlo DJ (2007): Small Molecule Inhibitors of a Glycoside Hydrolase Attenuate Inducible AmpC-mediated  $\beta$ -Lactam Resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 282, 21382-21391
- Stubbs KA, Macauley MS, Vocadlo DJ (2009): A Selective Inhibitor Gal-PUGNAc of Human Lysosomal  $\beta$ -Hexosaminidases Modulates Levels of the Ganglioside GM2 in Neuroblastoma Cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, Vol. 48, 1300-1303
- Studier FW und Moffatt BA (1986): Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*, Vol. 189, 113-130
- Subramanian A und Miller MD (2000): Structural Analysis of  $\alpha$ -Enolase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, 5958-5965
- Sümegi M, Hunyadi-Gulyas E, Medzihradzsky KF, Udvardy A (2003): 26S proteasome subunits are O-linked N-acetylglucosamine-modified in *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 312, 1284-1289
- Sullivan DC, Huminiecki L, Moore JW, Boyle JJ, Poulosom R, Creamer D, Barker J, Bicknell R (2003): EndoPDI, a Novel Protein-disulfide Isomerase-like Protein That Is Preferentially Expressed in Endothelial Cells Acts as a Stress Survival Factor. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 278, 47079-47088
- Tai HC, Khidekel N, Ficarro SB, Peters EC, Hsieh-Wilson LC (2004): Parallel Identification of O-GlcNAc-Modified Proteins from Cell Lysates. *J AM CHEM SOC*, Vol. 126, 10500-10501
- Takei N, Kondo J, Nagaike K, Ohsawa K, Kato K, Kohsaka S (1991): Neuronal survival factor from bovine brain is identical to neuron-specific enolase. *J Neurochem*, Vol. 57, 1178-1184
- Tanaka H, Shirkoohi R, Nakagawa K, Qiao H, Fujita H, Okada F, Hamada J, Kuzumaki S, Takimoto M, Kuzumaki N (2006): siRNA gelsolin knockdown induces epithelial-mesenchymal transition with a cadherin switch in human mammary epithelial cells. *Int J Cancer*, Vol. 118, 1680-1691
- Taylor SI und Arioglu (1998): Syndromes associated with insulin resistance and acanthosis nigricans. *J. Basic Clin Physiol Pharmacol*, Vol. 9, 419-439
- Taylor RP, Parker GJ, Hazel MW, Soesanto Y, Fuller W, Yazzie MJ, McClain DA (2008): Glucose Deprivation Stimulates O-GlcNAc Modification of Proteins through Up-regulation of O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, 6050-6057
- Taylor RP, Geisler TS, Chambers JH, McClain DA (2009): Up-regulation of O-GlcNAc Transferase with Glucose Deprivation in HepG2 Cells Is Mediated by Decreased Hexosamine Pathway Flux. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 284, 3425-3432
- Ting J und Lee AS (1988): Human gene encoding the 78,000-dalton glucose-regulated protein and its pseudogene: structure, conservation, and regulation. *DNA*, Vol. 7, 275-286
- Toleman C, Paterson AJ, Whisenhunt TR, Kudlow JE (2004): Characterization of the Histone Acetyltransferase (HAT) Domain of a Bifunctional Protein with Activable O-GlcNAcase and HAT Activities. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, 53665-53673
- Toleman C, Paterson AJ, Shin R, Kudlow JE (2006): Streptozotocin inhibits O-GlcNAcase via the production of a transition state analog. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 340, 526-534
- Torres C und Hart G (1984): Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surface of intact lymphocytes. *J Biol Chem*, Vol. 259, 3308-3317
- Totary-Jain H, Naveh-Many T, Riahi Y, Kaiser N, Eckel J, Sasson S (2005): Calreticulin Destabilizes Glucose Transporter-1 mRNA in Vascular Endothelial and Smooth Muscle Cells Under High-Glucose Conditions. *Circ Res*, Vol. 97, 1001-1008
- Townsend DM (2007): S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. *Mol Interv*, Vol. 7, 313-324
- Traxinger RR und Marshall S (1992): Insulin Regulation of Pyruvate Kinase Activity in Isolated Adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 267, 9718-9723

- Trebak M, Ginnan R, Singer HA, Jour'dheuil D (2010): Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling. *Antioxid Redox Signal*, Vol. 12, 657-674
- Tritz J (2010): Untersuchungen zur Aktivität der rekombinanten O-GlcNAc-Transferase sowie zum Einfluss von Glucosamin und NButGT auf die O-GlcNAc-Modifikation in SY5Y-Zellen. Diplomarbeit am Institut für Tierwissenschaften, Abteilung Biochemie, der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn
- Valen G, Sonden A, Vaage J, Malm E, Kjellström BT (1999): Hydrogen peroxide induces endothelial cell atypia and cytoskeleton depolymerization. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 26, 1480-1488
- Van Why SK, Mann AS, Ardito T, Thulin G, Ferris S, Macleod MA, Kashgarian M, Siegel NJ (2003): Hsp27 Associates with Actin and Limits Injury in Energy Depleted Renal Epithelia. *J Am Soc Nephrol*, Vol. 13, 98-106
- Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Kennedy MC (2000): Mitochondrial Aconitase Is a Source of Hydroxyl Radical. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 275, 14064-14069
- Vervoorts J, Luscher-Firzlaff J, Luscher B (2006): The ins and outs of MYC regulation by posttranslational mechanisms. *J Biol Chem*, Vol. 281, 34725-34729
- Vinals F, Gross A, Testar X, Palacin M, Rösen P, Zorzano A (1999): High glucose concentration inhibit glucose phosphorylation, but not glucose transport, in human endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1450, 119-129
- Vocadlo DJ, Hang HC, Kim EJ, Hanover JA, Bertozzi CR (2003): A chemical approach for identifying O-GlcNAc-modified proteins in cells. *PNAS*, Vol. 100, 9116-9121
- Vosseller K, Wells L, Hart GW (2001): Nucleocytoplasmic O-glycosylation: O-GlcNAc and functional proteomics. *Biochimie*, Vol. 83, 575-581
- Vosseller K, Wells L, Lane MD, Hart GW (2002): Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *PNAS*, Vol. 99, 5313-5318
- Vosseller K, Trinidad JC, Chalkley RJ, Specht CG, Thalhammer A, Lynn AJ, Snedecor JO, Guan S, Medzihradzky KF, Maltby DA, Schoepfer R, Burlingame AL (2006): O-Linked N-Acetylglucosamine Proteomics of Postsynaptic Density Preparations Using Lectin Weak Affinity Chromatography and Mass Spectrometry. *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 5, 923-934
- Waanders LF, Chwalek K, Monetti M, Kumar C, Lammert E, Mann M (2009): Quantitative proteomic analysis of single pancreatic islets. *PNAS*, Vol. 106, 18902-18907
- Wagner M, Hermanns I, Bittinger F, Kirkpatrick CJ (1999): Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, Vol. 277, 1026-1033
- Wagner OI, Lifshitz J, Janmey PA, Linden M, McIntosh TK, Letierrier JF (2003): Mechanisms of Mitochondria-Neurofilament Interactions. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 23, 9046-9058
- Walgren JL, Vincent TS, Schey KL, Buse MG (2003): High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including  $\alpha$ -tubulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Vol. 284, E424-E434
- Wang T, Arifoglu P, Ronai Z, Tew KD (2001): Glutathione S-transferase P1-1 (GSTP1-1) Inhibits c-Jun N-terminal Kinase (JNK1) Signaling through Interaction with the C Terminus. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 276, 20999-21003
- Wang Z, Pandey A, Hart GW (2007): Dynamic Interplay between O-Linked N-Acetylglucosaminylation and Glycogen Synthase Kinase-3-dependent Phosphorylation. *Molecular & Cellular Proteomics*, Vol. 6, 1365-1379
- Wang Z, Gucek M, Hart GW (2008): Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: Site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *PNAS*, Vol. 105, 13793-13798
- Wang Z, Udeshi ND, O'Malley M, Shabanowitz J, Hunt DF, Hart GW (2009): Enrichment and Site-Mapping of O-Linked N-Acetylglucosamine by a Combination of Chemical/Enzymatic Tagging, Photochemical Cleavage, and Electron Transfer Dissociation (ETD) Mass Spectrometry. *Mol Cell Proteomics*, Vol. 9, 153-160

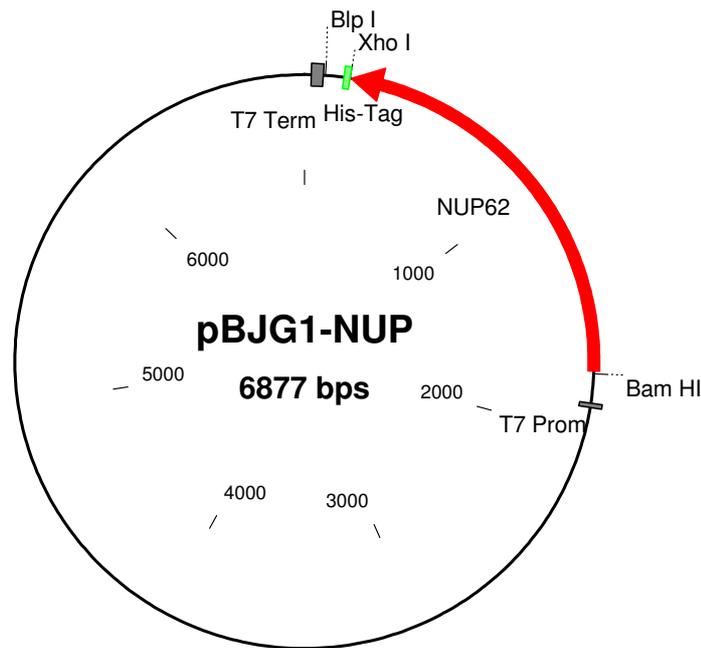
- Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR (1990): Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic patients. *Ann Intern Med*, Vol. 113, 909-915
- Webster DM, Teo CF, Sun Y, Wloga D, Gay S, Klonowski KD, Wells L, Dougan ST (2009): O-GlcNAc modifications regulate cell survival and epiboly during zebrafish development. *BMC Dev Biol*, Vol.9, 28
- Weigert C, Klopfer K, Kausch C, Brodbeck K, Stumvoll M, Haring HU, Schleicher ED (2003): Palmitate-induced activation of the hexosamine pathway in human myotubes: increased expression of glutamine:fructose-6-phosphate aminotransferase. *Diabetes*, Vol. 52, 650-656
- Wells L, Gao Y, Mahoney JA, Vosseller K, Chen C, Rosen A, Hart GW (2002): Dynamic O-Glycosylation of Nuclear and Cytosolic Proteins: Further Characterization of the Nucleocytoplasmic  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase, O-GlcNAcase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 277, 1755-1761
- Wells L und Hart GW (2003): O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Letters*, Vol. 546, 154-158
- Wells L, Whelan SA, Hart GW (2003): O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 302, 435-441
- Westermeier R (2005): *Electrophoresis in Practice*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 4. Auflage
- Whelan SA, Lane MD, Hart GW (2008): Regulation of the O-Linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine Transferase by Insulin Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 283, 21411-21417
- Wildgruber R, Harder A, Obermaier C, Boguth G, Weiss W, Fey SJ, Larsen PM, Görg A (2000): Towards higher resolution: Two-dimensional Electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, Vol. 21, 2610-2616
- Whisenhunt TR, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Van Tine BA, Kudlow JE (2006): Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signalling and development. *Glycobiology*, Vol. 16, 551-563
- Whitworth GE, Macauley MS, Stubbs KA, Dennis RJ, Taylor EJ, Davies GJ, Greig IR, Vocadlo DJ (2007): Analysis of PUGNAc and NAG-thiazoline as Transition State Analogues for Human O-GlcNAcase: Mechanistic and Structural Insights into Inhibitor Selectivity and Transition State Poise. *J AM CHEM SOC*, Vol. 129, 635-644
- Whorton AR, Montgomery ME, Kent RS (1985): Effects of hydrogen peroxide on prostaglandin production and cellular integrity in cultured porcine endothelial cells. *J Clin Invest*, Vol. 76, 295-302
- Wolin MS (1996): Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirc*, Vol. 3, 1-17
- Xu B, Chibber R, Ruggiero D, Kohner E, Ritter J, Ferro A (2003): Impairment of vascular endothelial nitric oxide synthase activity by advanced glycation end products. *FASEB J*, Vol. 17, 1289-1291
- Yang X, Zhang F, Kudlow JE (2002): Recruitment of O-GlcNAc transferase to promoters by corepressor mSin3A: coupling protein O-GlcNAcylation to transcriptional repression. *Cell*, Vol. 110, 69-80
- Yang WH, Kim JE, Nam HW, Ju JW, Kim HS, Kim YS, Cho JW (2006): Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat Cell Biol*, Vol. 8, 1074-1083
- Yang X, Ongusaha PP, Miles PD, Havstad JC, Zhang F, So WV, Kudlow JE, Michell RH, Olefsky JM, Field SJ, Evans RM (2008): Phosphoinositide signalling links O-GlcNAc transferase to insulin resistance. *Nature*, Vol. 451, 964-970
- Yao PJ und Coleman PD (1998): Reduced O-glycosylated clathrin assembly protein AP180: implication for synaptic vesicle recycling dysfunction in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, Vol. 252, 33-36
- Yeh GC und Phang JM (1988): Stimulation of Phosphoribosyl Pyrophosphate and Purine Nucleotide Production by Pyrroline 5-Carboxylate in Human Erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 263, 13083-13089
- Yin HL und Stossel TP (1979): Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature*, Vol. 281, 583-586

- Yin Z, Ivanov VN, Habelhah H, Tew K, Ronai Z (2000): Glutathione S-Transferase p Elicits Protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Cell Death via Coordinated Regulation of Stress Kinases1. *Cancer Research*, Vol. 60, 4053-4057
- Yki-Järvinen H, Daniels MC, Virkamäki A, Makimattila S, DeFronzo RA, McClain D (1996): Increased glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase activity in skeletal muscle of patients with NIDDM. *Diabetes*, Vol. 45, 302-307
- Yki-Järvinen H, Virkamäki A, Daniels M, McClain D, Gottschalk W (1998): Insulin and glucosamine infusions increase O-linked N-acetylglucosamine in skeletal muscle proteins *in vivo*. *Metabolism*, Vol. 47, 449-455
- Yokota T, Sugawara K, Ito K, Takahashi R, Ariga H, Mizusawa H (2003): Down regulation of DJ-1 enhances cell death by oxidative stress, ER stress, and proteasome inhibition. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 312, 1342-1348
- Yuzwa SA, Macauley MS, Heinonen JE, Shan X, Dennis RJ, He Y, Whitworth GE, Stubbs KA, McEachern EJ, Davies GJ, Vocadlo DJ (2008): A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau *in vivo*. *Nature Chemical Biology*, Vol. 4, 483-490
- Zachara NE und Hart GW (2002): The Emerging Significance of O-GlcNAc in Cellular Regulation. *Chem Rev*, Vol. 102, 431-438
- Zachara NE, Cole RN, Hart GW, Gao Y (2002): Detection and Analysis of Proteins Modified by O-Linked N-Acetylglucosamine. *In Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 17.6.1-17.6.25
- Zachara NE und Hart GW (2004): O-GlcNAc modification: a nutritional sensor that modulates proteasome function. *TRENDS in cell biology*, Vol. 14, 218-221
- Zachara NE, O'Donnell N, Cheung WD, Mercer JJ, Marth JD, Hart GW (2004): Dynamic O-GlcNAc Modification of nucleocytoplasmic Proteins in Response to Stress. A Survival Response of Mammalian Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, 30133-30142
- Zachara NE und Hart GW (2006): Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc! *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1761, 599-617
- Zaid H, Talior-Volodarsky I, Antonescu C, Liu Z, Klip A (2009): GAPDH binds GLUT4 reciprocally to hexokinase-II and regulates glucose transport activity. *Biochem J*, Vol. 419, 475-484
- Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo MS, Rhee SG, Obeid LM (1997): Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J Biol Chem*, Vol. 272, 30615-30618
- Zhang F, Su K, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Kudlow JE (2003): O-GlcNAc modification is an endogenous inhibitor of the proteasome. *Cell*, Vol. 115, 715-725
- Zhang F, Hu Y, Huang P, Toleman CA, Paterson AJ, Kudlow JE (2007): Proteasome function is regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase through phosphorylation of Rpt6. *J Biol Chem*, Vol. 282, 22460-22471
- Zhang L, Lai E, Teodoro T, Volchuk A (2009): GRP78, but Not Protein-disulfide Isomerase, Partially Reverses Hyperglycemia-induced Inhibition of Insulin Synthesis and Secretion in Pancreatic  $\beta$ -Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 284, 5289-5298
- Zhou D, Mattner J, Cantu Iii C, Schrantz N, Yin N, Gao Y, Sagiv Y, Hudspeth K, Wu Y, Yamashita T, Teneberg S, Wang D, Proia R, Lavery SB, Savage PB, Teyton L, Bendelac A (2004): Lysosomal Glycosphingolipid Recognition by NKT Cells. *Science*, Vol. 306, 1786-1789
- Ziouzenkova O, Orasanu G, Sharlach M, Akiyama TE, Berger JP, Viereck J, Hamilton JA, Tang G, Dolnikowski GG, Vogel S, Duester G, Plutzky J (2007): Retinaldehyde represses adipogenesis and diet-induced obesity. *Nature Medicine*, Vol.13, 695-702

## 7 Anhang

### 7.1 Plasmid pBJG1-NUP

Das Plasmid entstand aus dem pBJG1-ncOGT-Plasmid, aus dem die ncOGT mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam* HI und *Xho* I herausgeschnitten wurde. Das NUP62 war im Vektor pExpress-1 enthalten und wurde über PCR und Anfügen der Restriktionsschnittstellen für *Bam* HI und *Xho* I amplifiziert und in den Vektor pBJG1 eingebaut.



**Abbildung 47 Vektorkarte pBJG1-NUP**

T7 Term: T7 Terminator; His-Tag: 8 x His-Tag codierende Sequenz; *Bln* I, *Xho* I und *Bam* HI: Restriktionsschnittstellen innerhalb der multiplen Klonierungsstelle; T7 Prom: T7 Promotor

### 7.2 cDNA-Sequenz NUP62 aus *Rattus norvegicus*

Dargestellt ist die cDNA-Sequenz des NUP62 aus *Rattus norvegicus*, welche der NCBI-Datenbank (Zugangsnr. BC 128709) entnommen wurde. Das Start- und Stopcodon des NUP62 sind rot hervorgehoben.

```
1 ccagatcga agtaactgcc acctggaat tccacagcca tgagtgggtt taactttgga
61 ggcaccgggg ctctgctgg cggtttaca tttggaccg caaagactgc gaccaccaca
121 cccgccactg gcttttctt ctctgctt ggcaccggca ccggagggtt taattttggg
181 actccctccc agccagctgc gaccaccct tcaccagcc tcttctact tgccacacag
241 acctcaacca cacagacccc aggattcaac ttggaacaa cacctgcttc tgggggaaca
301 ggcttctccc tggggatcag caccceaaag ctacgctaa gtagecacgc cgccacacca
361 gccacagcca aactggcag ctttgggctt ggcagcagta ctcttacc aa tgccatctca
421 ggtgccagca ctccagcca ggggacagcc cccactggct ttgtcttgg ctctcttacc
481 acctctgctc ctgccaccgg caccacggga ttctcatca ccagtggcag tgcateccag
541 cctggagcct ccggttcaa cattggctct gtgggtagtt tggccagcc cacagcactg
```

601 tctgctctc ccttactcc agccactctg gcgacaacta cggcaggagc aacacagcca  
 661 gctgctgcta caccactgc tgccaccacc agtgcagggt ctactctgtt tgcttcaata  
 721 gctgctgctc ctgctcctc cagtactaca gtgctttccc tctcagctcc agcgacaact  
 781 gcagccactc ctactgctgg gactttgggc ttcagcctca aggccctgg agcagctcct  
 841 ggtgctcca ccaccagcac caccactact actaccacca ccaactactac tgcctccacc  
 901 tectctcca ccacgaccac tggctttgcc ttaagcctga aacctctggt gccagctggc  
 961 cccagcagcg tggcagctac tgctctgctt gcctccagca cagcagttgg gactacgacg  
 1021 ggtccagcaa tgacctacgc gcagctggaa agcctgatca acaagtggag tctggagctg  
 1081 gaggaccagg agcggcactt cctgcagcag gccacgcagg tcaatgcctg ggaccgcaca  
 1141 ctgattgaga atggggagaa gatcaccagc ctgcaccgag aggtggaaaa ggtgaagctg  
 1201 gatcagaagc gtctggacca ggagctggac tttatctgtt cacagcagaa ggagctggaa  
 1261 gaccttctga gccggttaga ggagtcagtg aaggagcaaa gtggcaccat ctacctcag  
 1321 catgctgatg aggagcgtga gaagacctac aagctggctg agaacatcga tgctcagctc  
 1381 aagcgcattg cccaggacct caaggacatt attgagcacc tgaacatggc tgggtggcct  
 1441 gcagacacca gtgacctact gcagcagatc tgaagatcc tcaatgcaca catggactcc  
 1501 ctctcagctg tggaccagag ctctgccctg ctgcagagga ggggtggagga ggccagcctg  
 1561 gtgtgtgaga gccggcga a ggaacaggaa cgcagcctgc gcattgcctt tgactagcca  
 1621 tacatgagtt ggggggtggg gtacctctt tgtttaggg ctgctggctt tggggtggtt  
 1681 gtattgtga gaaaaatgct ctttggtttg gttcctggt atcagaagtg gtttgcgaag  
 1741 gcatgatgct atggatgtaa taacctgtgt gctctggaga caggtgtgaa ggtcactgaa  
 1801 ctctaggcca gcatttaaag aacaaggga aactcactct ttagccactc caatacaact  
 1861 gtgacagtgg gatggcatgc tccagagatg ttggccaaga aactcactg gaatggagac  
 1921 atgctctctg tgcctcctg ctctctaac tccatctaa cccatgtcct ccagagcctg  
 1981 tgctgcacaa agcagagtca ccaagggaga ctgagcttaa caccggttg cactggctac  
 2041 cctctcacc cctctctgt gagcttctgt ggcagggact gactgctgat agttcttga  
 2101 gaacagagtg gctgcggatt tgcttctgaa tgtccagtg tcaaacctta gattcatagt  
 2161 gttgaaggct ggcagttatg tctgtctat tttattctc cacactctac ttagcctct  
 2221 atggtcctg atcaaacat tgctttcta aataaagaaa acattgtgaa atcaaaaaa  
 2281 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa  
 2341 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaa

### 7.3 Mutation in der Sequenz des pBJG1-NUP

Nach der Sequenzierung mit dem Primer T7term zur Kontrolle der DNA-Sequenz der Restriktionsstellen und des NUP62 im Plasmid pBJG1-NUP zeigte sich eine Mutation in der *Xho* I-Schnittstelle des Vektors pBJG1. So blieb ein Teil der ncOGT-DNA-Sequenz im Vektor enthalten und folgt auf die DNA-Sequenz des NUP62. Die mutierte Restriktionsschnittstelle ist blau, die mutierte Base in fett blau und unterstrichen markiert. Es liegt ein Basenaustausch von C nach G vor. Die neue *Xho* I-Restriktionsschnittstelle ist violett dargestellt. Die zusätzliche DNA-Sequenz der ncOGT ist kursiv gedruckt. Das deletierte Stopcodon ist orange gezeichnet. Das His-Tag des Vektors ist in grün dargestellt.

Es ist der laut Sequenzierung mutierte Ausschnitt der DNA-Sequenz des pBJG1-NUP-Plasmids in 3'-5' Richtung abgebildet.

att gcc ttt gac **tat** ggc ccg **ctc gag** ttg cag cat ccc agc tca ctt gct tag gtt gtc ttg agc tta ttg cta aaa aca  
gac aag aat atg aag aca tag ctg tga agc tgg gaa ctg atc tag aat acc tga aga aag ttc gtg gca aag tct gga  
agc aaa gaa tat cta gcc ctc tgt tca aca cca aac aat aca caa tgg aac tag agc ggc tct atc tac aga tgt ggg  
agc att atg cag ctg gca aca aac ctg acc aca tga tta agc ctg ttg aag tca ctg agt cag **cag tgc agc acc acc**  
**acc acc acc acc acc** act aat tga tta ata cct agg ctg cta aac aaa gcc cga aa

#### 7.4 Aminosäuresequenz des Proteins NUP62 aus *Rattus norvegicus*

Dargestellt ist die translatierte ASS des NUP62 aus der Swiss-Prot Datenbank (P37198). Die potentiellen O-GlcNAcylierungsstellen wurden mit Hilfe der YinOYang-Software ermittelt und sind grün, fett markiert und unterstrichen. Serine/Threonine, welche entweder O-GlcNAc-modifiziert oder phosphoryliert vorliegen können, sind zusätzlich kursiv gedruckt. Einige AS wurden schon als O-GlcNAc-modifiziert beschrieben.

1 MSGFNFGGTG APTGGFTFGT AKTAT**TTPA**T** GFSFSTSGTG GFNFGAPFQP A**TSTP**ST**TGLF  
61 SLATQTPA**T**Q **TT**GFTFGTAT LASGGTGFSL GIGASKLNLS NTAA**T**PAMAN PSGFGLGSSN  
121 LTNAI**SSTV**T** **SS**QGTAP**T**GF VFGPS**TT**SVA PA**TT**SGGFSF TGGSTAQPSG FNIGSAGNSA  
181 QPTAPATLPF **T**PA**T**PA**TT**A GATQPAAP**T** **T**A**TT****ST**GPS LFASIATAP**T** **SS**ATTGLSLC  
241 TPV**TT**AGAPT AG**T**QGFSLKA PGAAS**GTST**T** **T**STAA**T**A**T**A**T** **TT**SSSTTG ALNLKPLAPA  
301 GIPSNTAAAV **T**APPGGAAA GAA**SS**AMTY AQLESLINKW SLELEDQERH FLQQA**T**QVNA  
361 WDRTLIENGE KITSLHREVE KVKLDQKRLD QELDFILSQQ KELEDLLSPL EELVKEQSGT  
421 IYLQHADEER EKTYKLAENI DAQLKRMAQD LKDIEHLNT **SG**APAD**TS**DP LQQICKILNA  
481 HMDSLQWIDQ NSALLQRKVE EVTKVCEGRR KEQERSFRIT FD********

#### 7.5 Potentielle O-GlcNAc-Modifikationsstellen der identifizierten Proteine aus HUVEC und SkMC

Die nach MS-Analyse gefundenen Peptide wurden in der ASS rot markiert. Die potentiellen O-GlcNAcylierungsstellen wurden mit Hilfe der YinOYang-Software ermittelt und sind fett unterstrichen. Serine oder Threonine, welche entweder O-GlcNAc-modifiziert oder phosphoryliert vorliegen können, sind zusätzlich kursiv gedruckt.

Gezeigt ist hier die ASS des mitochondrialen Stressproteins 70 (HUVEC Spot 3; SkMC Spot 21). In den HUVEC betrug die Sequenzabdeckung 33 %.

1 MISASRAAAA RLVGAAASRG **P**TAA**R**HQDSW NGLSHEAFRL VSRRDYASEA  
51 IKGAVVGIDL GTTNSCVAVM EGKQAKVLEN AEGART**TP**SV **VA**FTADGERL  
101 VGMPAKR**Q**AV **T**NP**N**NTFYAT KRLIGR**R**YDD **PE**VQ**K**DIKNV PFKIVRASNG  
151 DAWVEAHGKL **Y**SP**S**QIGAFV LMKMKETAEN YLGHTAK**N**AV **IT**VPAYF**N**DS  
201 **Q**RQA**T**KDAGQ ISGLN**V**LRVI NEPTAAALAY **GL**DK**S**EDKVI AVYDLGGGTF  
251 DISILEIQKG VFEVK**S**TNGD **T**FLGGED**F**DQ **ALL**RHIVKEF KRETGVDLTK  
301 DN**M**ALQ**R**VRE AA**E**KAK**C**EL**S** SSVQ**T**DINLP YL**T**MDSSGPK HLN**M**KL**T**RA**Q**  
351 **F**EG**I**VD**L**IR RTIAP**C**Q**K**AM **Q**DA**E**V**S**K**S**DI **GE**V**L**VGG**M**T **R**MP**K**V**Q**Q**T**V**Q**  
401 **D**L**F**GRAP**S**KA VNP**D**E**A**V**A**IG AA**I**QGGV**L**AG DV**T**D**V**LL**L**LDV TPL**S**L**G**I**E**T**L**  
451 GGV**F**TK**L**INR NT**T**IP**T**KK**S**Q V**F**ST**A**AD**G**Q**T** Q**V**E**I**K**V**C**Q**GE REM**A**GD**N**KL**L**  
501 **Q**Q**F**TL**I**G**I**PP **A**PR**G**VP**Q**IEV TFD**I**D**A**NG**I**V H**V**SA**K**D**K**GT**G** **RE**Q**Q**I**V**I**Q**SS  
551 **G**GL**S**K**D**DI**E**N **M**V**K**NA**E**K**Y**AE **E**DR**R**K**K**ER**V**E **AV**N**M**A**E**G**I**I**H** **D**T**E**T**K**M**E**E**F**K  
601 D**Q**L**P**A**D**E**C**N**K** L**K**E**E**I**S**K**M**R**E** LL**A**R**K**D**S**E**T**G **E**N**I**R**Q**A**A**SS**L** Q**Q**AS**L**KL**F**EM  
651 A**Y**KK**M**AS**E**R**E** G**S**G**S**S**G**T**G**E**Q** **K**E**D**Q**K**E**E**K**Q**

In den SkMC betrug die Sequenzabdeckung 43 %.

1 MISASRAAAA RLVGAAASRG **P**TAA**R**HQDSW NGLSHEAFRL VSRRDYASEA  
51 IKGAVVGIDL GTTNSCVAVM EGKQAKVLEN AEGART**TP**SV **VA**FTADGERL  
101 VGMPAKR**Q**AV **T**NP**N**NTFYAT KRLIGR**R**YDD **PE**VQ**K**DIKNV PFKIVRASNG

151 DAWVEAHGKL YSPSQIGAFV LMKMKETAEN YLGHTAKNAV ITVPAYFNDS  
 201 QRQATK DAGQ ISGLNVL RVI NEPTAAALAY GLDKSEDKVI AVYDLGGGTF  
 251 DISILEIQKG VFEVKSTNGD TFLGGEDFDQ ALLRHIVKEF KRETGVDLTK  
 301 DNMALQRVRE AAEKAKCELS SSVQTDINLP YLTMDSSGPK HLNMKLTRAQ  
 351 FEGIVTDLIR RTIAPCQKAM QDAEVSKSDI GEVILVGGMT RMPKVQQTVQ  
 401 DLFGRAPSKA VNPDEAVAIG AAIQGGVLAG DVTDVLLLDV TPLSLGIETL  
 451 GGVFTKLINR NTIPTKKSQ VFSTAADGQT QVEIKVCQGE REMAGDNKLL  
 501 GQFTLIGIPP APRGVPQIEV TFDIDANGIV HVSAKDKGTG REQQVIQSS  
 551 GGLSKDDIEN MVKNAEKYAE EDRRKKER VE AVNMAEGIIH DTETKMEEFK  
 601 DQLPADECNK LKEEISKMRE LLARKDSETG ENIRQAASSL QQASLKL FEM  
 651 AYYKMASERE GSGSSGTGEQ KEDQKEEKQ

Gezeigt ist hier die ASS der Proteindisulfidisomerase A6 (HUVEC Spot 13) mit einer Sequenzabdeckung von 49 %.

1 MALLVLGLVS CTFFLAVNGL YSSSDDVIEL TPSNFNREVI QSDSLWLVEF  
 51 YAPWCGHCQR LTP EWKKAAT ALKD VVKVGA VDADKH HSLG GQYGVQGFPT  
 101 IKIFGSKNR PEDYQGGRTG EAI VDAALSA LRQLVKDRLG GRSGGYSSGK  
 151 QGRSDSSSKK DVIELTDDSF DKNVL DSE DV WMVEFYAPWC GHCKNLEPEW  
 201 AAAASEVKEQ TKGKVKLAAV DATVNQVLAS RYGIRGFPTI KIFQKGESPV  
 251 DYDGGRTTRSD IVSRALDLFS DNAPPALLE IINEDIAKRT CEEHQLCVVA  
 301 VLP HILDTGA AGRNSYLEVL LKLADKYKKK MWGWLWTEAG AQSELETALG  
 351 IGGFGYPAMA AINARKMKFA LLKGSFSEQG INEFLRELSF GRGSTAPVGG  
 401 GAFPTIVERE PWDGRDGELP VEDDIDLSDV ELDDLKDEL

Gezeigt ist hier die ASS des Thioredoxindomäne-enthaltenden Protein 5 (HUVEC Spot 14) mit einer Sequenzabdeckung von 46 %.

1 MPARPGRLLP LLARPAALTA LLLLLLGHGG GGRWGARAQE AAAAAADGPP  
 51 AADGEDGQDP HSKHLYTADM FTHGIQSAAH FVMFFAPWCG HCQRLQPTWN  
 101 DLGDKYNSME DAKVYVAKVD CTAHSDVCSA QGVRGYPTLK LFKPGQEA VK  
 151 YQGPRDFQTL ENWMLQTLNE EPVTPPEPEVE PPSAPELKQG LYELSASNFE  
 201 LHVAQGDHFI KFFAPWCGHC KALAPTWEQL ALGLEHSETV KIGKVDCTQH  
 251 YELCSGNQVR GYPTLLWFRD GKKVDQYK GK RDLESLREYV ESQ LQRTETG  
 301 ATETVTPSEA PVLAAEPEAD KGTVLALTEN NFDDTIAEGI TFIKFYAPWC  
 351 GHCKTLAPTW EELSKKEFPG LAGVKIAEVD CTAERNICSK YSVRGYPTLL  
 401 LFRGGKKVSE HSGGRDLDSL HRFVLSQAKD EL

Gezeigt ist hier die ASS der Glutathion-S-Transferase P (HUVEC Spot 19) mit einer Sequenzabdeckung von 27 %.

1 MPPYTVVYFP VRGRCAALRM LLADQGSWK EEVVTVETWQ EGSLKASCLY  
 51 GQLPKFQDGD LTLYQSNTIL RHLGRTLGLY GKDQQAALV DMVNDGVEDL  
 101 RCKYISLIYT NYEAGKDDYV KALPGQLKPF ETLLSQNQQG KTFIVGDQIS  
 151 FADYNLLDLL LIHEVLAPGC LDAFPLLSAY VGRLSARPKL KAFLASPEYV  
 201 NLPINGNGKQ

Gezeigt ist hier die ASS der mitochondrialen Pyrrolin-5-Carboxylatreduktase 1 (HUVEC Spot 30) mit einer Sequenzabdeckung von 22 %.

1 MSVGFAGQ LAFALAKGFT AAGVLAH KI MASSPDMDLA TVSALRKM GV  
 51 KLTPHNKETV QHSDVLFLAV KPHIIPFILD EIGADIEDRH IVVSCAAGVT  
 101 ISSIEKKLSA FRPAPRVIRC MTNTPVVVRE GATVYATGTH AQVEDGRLME  
 151 QLLSSVG FCT EVEEDLIDAV TGLSGSGPAY AFTALDALAD GGVKMGLPRR  
 201 LAVRLGAQAL LGA AKMLLHS EQHPGQLKDN VSSPGGATIH ALHVLES GGF  
 251 RLLINAVEA SCIRTRELQS MADQE QVSPA AIKKTILDKV KLDSPAGTAL  
 301 SPSGHTKLLP RSLAPAGKD

Gezeigt ist hier die ASS des Gelsolin (SkMC Spot 22) mit einer Sequenzabdeckung von 36 %.

1 MAPHRPAPAL LCALSLALCA LSLPVRAATA SRGASQAGAP QGRVPEARPN  
51 SMVVEHPEFL KAGKEPGLQI WRVEKFDLVP VPTNLYGDFE TGDAYVILKT  
101 VQLRNGNLQY DLHYWLGNEC SQDESGAAAI FTVQLDDYLN GRAVQHREVQ  
151 GFESATFLGY FKSGLYKKK GVASGFKHVV PNEVVVQRLF QVKGRRVVRA  
201 TEVPVSWESF NNGDCFILDL GNNIHQWCGS NSNRYERLKA TQVSKGIRDN  
251 ERSGRARVHV SEEGTEPEAM LQVLGPKPAL PAGTEDTAKE DAANRKLAKL  
301 YKVSNGAGTM SVSLVADENP FAQGALKSED CFILDHGKDG KIFVWKGKQA  
351 NTEERKAALK TASDFITKMD YPKQTQVSVL PEGGETPLFK QFFKNWRDPD  
401 QTDGLGLSYL SSHIANVERV PFDAATLHTS TAMAAQHGMDD DDGTGQKQIW  
451 RIEGSNKVPV DPATYGQFYG GDSYIILYNY RHGGRQGQII YNWQGAQSTQ  
501 DEVAASAILT AQLDEELGGT PVQSRVVQGK EPAHLMSLFG GKPMIYKGG  
551 TSREGGQTAP ASTRLFQVRA NSAGATRAVE VLPKAGALNS NDAFVLKTPS  
601 AAYLWVGTGA SEAECTGAQE LLRVLRAQPV QVAEGSEPDG FWEALGGKAA  
651 YRTSPRLKDK KMDAHPPLRF ACSNKIGRFV IEEVPGELMQ EDLATDDVML  
701 LDTWDQVFWV VGKDSQEEEK TEALTSAKRY IETDPANRDR RTPITVVKQG  
751 FEPPSFVGWF LGWDDDYWSV DPLDRAMAEL AA

Gezeigt ist hier die ASS der Retinaldehyddehydrogenase 1 (SkMC Spots 26 und 31) mit einer Sequenzabdeckung von 44 % für Spot 31.

1 MSSSGTPDLP VLLTDLKIQY TKIFINNEWH DSVSGKKFPV FNPATEEELC  
51 QVEEGDKEDV DKAVKAARQA FQIGSPWRM DASERGRLLY KLADLIERDR  
101 LLLATMESMN GGKLYSNAYL NDLAGCIKTL RYCAGWADKI QGR TIPIDGN  
151 FFTYTRHEPI GVCQIIPWN FPLVMLIWKI GPALSCGNTV VVKPAEQTPL  
201 TALHVASLIK EAGFPPGVVN IVPGYGPTAG AAISSHMDID KVAFTGSTEV  
251 GKLIKEAAGK SNLKRVTLEL GGKSPCIVLA DADLDNAVEF AHHGVFYHQG  
301 QCCIAASRIF VEESIYDEFV RRSVERAKKY ILGNPLTPGV TQGPQIDKEQ  
351 YDKILDIES GKKEGAKLEC GGGPWGNKGY FVQPTVFSNV TDEMRIAEE  
401 IFGPVQQIMK FKSLDDVIKR ANNTFYGLSA GVFTKIDIDKA ITISSALQAG  
451 TVWVNCYGVV SAQCPFGGFK MSGNGRELGE YGFHEYTEVK TVTVKISQKN  
501 S

Gezeigt ist hier die ASS der Kreatinkinase B-Typ (SkMC Spot 34) mit einer Sequenzabdeckung von 65 %.

1 MPFNSHNLAL KLRFAEDEF PDLSAHNNHM AKVLTPELYA ELRAKSTPSG  
51 FTLDDVIQTG VDNPGHPYIM TVGCVAGDEE SYEVFKDLFD PIEDRHGGY  
101 KPSDEHKTDL NPDNLQGGDD LDPNYVLSR VRTGRSIRGF CLPPHCSRGE  
151 RRAIEKLAVE ALSSLDGDLA GRYYALKSMT EAEQQQLIDD HFLFDKPVSP  
201 LLLASGMARD WPDARGIWHN DNKTFLVWVN EEDHLRVISM QKGGNMKEVF  
251 TRFCTGLTQI ETLFKSKDYE FMWNPHLGYI LTCPSNLGTG LRAVHIKLP  
301 NLGKHEKFSE VLKRLRLQKR GTGGVDAAV GGVDVSNAD RLGFESEVELV  
351 QMVVDGVKLL IEMEQRLEQG QAIDDLMPAQ K

Gezeigt ist hier die ASS des Peroxiredoxin 6 (SkMC Spot 37) mit einer Sequenzabdeckung von 82 %.

1 MPGGLLLGDV APNFEANTTV GRIRFHDFLG DSWGILFSHP RDFTPVCTTE  
51 LGRAAKLAPE FAKRNVKLIASIDSVEDHL AWSKDINAYN CEEPTEKLPF  
101 PIIDDRNREL AILLGMLDPA EKDEKGMPVT ARVVVFVFGPD KKLKLSILYP  
151 ATZGRNFDEI LRVVISLQLT AEKRVATPVD WKDGDSVMVL PTIPEEEAKK  
201 LFPKGVFTKE LPSGKKYLRY TPQP

Gezeigt ist hier die ASS des Protein DJ-1 (SkMC Spot 38) mit einer Sequenzabdeckung von 70 %.

1 MASKRALVIL AKGAEEMETV IPVDVMRRAG IKVTVAGLAG KDPVQCSRDV  
51 VICPDASLED AKKEGPDYDVV VLPGGNLGAQ NLSESA AVKE ILKEQENRKG  
101 LIAAICAGPT ALLAHEIGFG SKVTTHPLAK DKMMNGGHYT YSENRVEKDG  
151 LILTSRGPGT SFEFALAIVE ALNGKEVAAQ VKAPLVLKD

Gezeigt ist hier die ASS der putativen Chinonoxidoreduktase (SkMC Spot 47) mit einer Sequenzabdeckung von 4 %.

1 MLAVHFDKPG GPENLYVKEV AKPSPGEGEV LLKVAASALN RADLMQRQQQ  
51 YDPPPGASNI LGLEASGHVA ELGPGCQGHW KIGDTAMALL PGGGQAQYVT  
101 VPEGLLMPIP EGLTLTQAAA IPEAWLTAFAQ LLHLVGNVQA GDYVLIHAGL  
151 SGVGTAAIQL TRMAGAIPLV TAGSQKKLQM AEKLGAAAGF NYKKEDFSEA  
201 TLKFTKGAGV NLILDCIGGS YWEKNVNCLA LDGRWVLYGL MGGGDINGPL  
251 FSKLLFKRGS LITSLRSRD NKYKQMLVNA FTEQILPHFS TEGPQRLLPV  
301 LDRIYPVTEI QEAHKYMEAN KNIGKIVLEL PQ

Gezeigt ist hier die ASS des Peroxiredoxin 1 (SkMC Spot 54) mit einer Sequenzabdeckung von 49 %.

1 MSSGNAKIGH PPNFKATAV MPDGQFKDIS LSDYKGGKYVV FFFYPLDFTF  
51 VCPTEIIAFS DRAEEFKKLN CQVIGASVDS HFCHLAWVNT PKKQGGLGPM  
101 NIPLVSDPKR TIAQDYGVLK ADEGISFRGL FIIDDKGILR QITVNDLPVG  
151 RSVDETLRLV QAFQFTDKHG EVCPAGWKPG SDTIKPDVQK SKEYFSKQK

## 7.6 Ausschlussklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt, sowie alle Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, kenntlich gemacht zu haben.

Duisburg, 10. Juni 2010

---

Stephanie Balzen