

# Identifizierung von Glykosylierungsstellen des Tau-Proteins

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Verena Rumpf**

aus Essen

Düsseldorf 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. D. Riesner  
Koreferent: Prof. Dr. H.W. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 2004

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	I
<b>Abkürzungen</b>	IV
<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 Alzheimer-Demenz im Überblick	1
1.2 Faktoren für die Entstehung der Alzheimer-Demenz	2
1.3 Die Rolle des $\beta$ -Amyloid-Peptids bei der Entstehung von Alzheimer-Demenz	3
1.4 Die Rolle des Apolipoproteins bei der Entstehung von Alzheimer-Demenz	5
1.5 Die Rolle des Tau-Proteins im Gehirn	5
1.5.1 Biochemie des Tau-Proteins	5
1.5.2 Die Funktion des Tau-Proteins im Gehirn	6
1.5.3 Die Genetische Struktur des Tau-Proteins	8
1.5.4 Die verschiedenen Modifizierungen am Tau-Protein	11
1.5.4.1 Die Phosphorylierung am Tau-Protein	11
1.5.4.1.1 PHF-Tau	12
1.5.4.2 Die Glykosylierung am Tau-Protein	14
1.6 Ansätze zur Therapie in der Alzheimer-Demenz	17
1.7 Fragestellung	19
<b>2. Material und Methoden</b>	22
2.1 Chemikalien	22
2.2 Tau-Protein und Präparation	22
2.2.1 Tau-Protein	22
2.2.2 Total-Tau-Präparation	22
2.2.3 Twice-cycled-Tau-Präparation	23
2.3 Häufig verwendete Lösungen und Puffer	25
2.4 Proteinbestimmung nach Bradford	25
2.5 Proteingelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese	28
2.6.1 Isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten (Erste Dimension)	28
2.6.2 SDS-PAGE im Anschluss an die Isoelektrische Fokussierung (Zweite Dimension)	29
2.7 Färben von SDS-Gelen	31
2.7.1 Silberfärbung	31
2.7.2 Coomassiefärbung	32
2.8 Western-Blot (semi-dry)	32
2.9 Immunumsetzung	33
2.9.1 Anti-Tau-Antikörper-Umsetzung	33
2.9.2 Lektin-Umsetzung	34
2.10 Lektin-Chromatographie auf Peptid-Ebene	35
2.11 Lektin-Batch-Verfahren	35
2.12 Dot-Blot	36

2.13 Entsalzen/Umpuffern mit Centrikons.....	36
2.14 Tryptischer In-Lösung-Verdau.....	36
2.15 Dephosphorylierung.....	37
2.16 Deglykosylierung durch N-Glykosidasen.....	37
2.17 Perchlorsäure-Fällung.....	37
2.18 Chromatographische Methoden.....	38
2.18.1 Größenausschluss-Chromatographie.....	38
2.18.2 Reversed-Phase-Chromatographie.....	39
2.18.2.1 Peptidreinigung über analytische Säule.....	39
2.18.2.2 Peptidreinigung über semi-präparative Säule.....	39
2.19 Peptidsynthese.....	39
2.20 Charakterisierung von Peptiden mittels Massenspektrometrie.....	40
2.20.1 MALDI-Massenspektrometrie.....	40
2.20.2 ESI-Massenspektrometrie.....	41
2.20.3 Scan-Modi im ESI-MS.....	43
2.20.3.1 TOF-MS.....	43
2.20.3.2 Product-Ion-Scan - MS/MS-Modus.....	44
2.20.3.3 Precursor-Ion-Scan.....	44
2.20.4 Sequenzierung von Proteinen und Peptiden mittels ESI-Massenspektrometrie.....	45
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
3.1 Total-Tau-Präparation.....	47
3.1.1 Charakterisierung der Total-Tau-Präparation mittels SDS-PAGE.....	49
3.1.2 Charakterisierung der Total-Tau-Präparation mittels SEC.....	51
3.1.3 Charakterisierung von SEC-Fractionen mittels RP-HPLC.....	53
3.1.4 Charakterisierung von RP-HPLC-Fractionen mittels SDS-PAGE.....	54
3.1.5 Massenspektrometrische Charakterisierung ausgewählter RP-HPLC-Fractionen.....	56
3.2 Twice-cycled-Tau-Präparation.....	57
3.2.1 Charakterisierung der Twice-cycled-Tau-Präparation mittels SDS-PAGE.....	59
3.2.2 Chromatographische Charakterisierung der Twice-cycled-Tau- Präparation mittels RP-HPLC.....	61
3.2.2.1 Charakterisierung von RP-HPLC-Fractionen mittels SDS-PAGE.....	62
3.2.2.2 Massenspektrometrische Charakterisierung ausgewählter RP-HPLC-Fractionen.....	65
3.2.3 Charakterisierung der Twice-cycled-Tau-Präparation mittels zweidimensionaler SDS-PAGE.....	67
3.2.4 Identifikation von Glykosylierungsstellen am Tau-Protein.....	70
3.2.4.1 Anreicherung von glykosyliertem Tau mittels Lektin-Batch-Verfahren.....	71
3.2.4.2 Massenspektrometrische Analyse synthetischer Glykopeptide.....	71
3.2.4.3 Massenshift durch Zuckerabtau mit PNGasen am glykosylierten Tau-Protein.....	77
3.2.4.4 Massenspektrometrische Identifikation einer Glykosylierungs- stelle am Tau-Protein.....	78
3.2.4.4.1 Einfluss der Isotopie auf das massen- spektrometrische Signal.....	78
3.2.4.4.2 Isotopenverteilung im Tau-Massenspektrum.....	79
3.2.4.4.3 Identifikation der N-Glykosylierungsstelle N366 am nativen bovinen Tau-Protein.....	81
3.3 Charakterisierung von PHF-Tau.....	89
3.3.1 Charakterisierung von PHF-Tau mittels eindimensionaler und zweidimensionaler SDS-PAGE.....	90
3.3.2 Massenspektrometrische Charakterisierung von PHF-Tau.....	91

<b>4.Diskussion</b> .....	92
4.1 Bekannte Glykosylierungen am bovinen Tau und am PHF-Tau.....	92
4.2 Charakterisierung des Tau-Proteins.....	93
4.2.1 Identifizierung von Glykosylierungen am bovinen Tau-Protein mittels SDS-PAGE.....	93
4.2.2 Kein direkter Nachweis von Glykosylierungen durch massen- spektrometrische Analyse des bovinen Tau-Proteins.....	94
4.2.3 Ein Versuch, den Modifikationsgrad des bovinen Tau-Proteins mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese zu klären.....	95
4.2.4 Identifizierung von Phosphorylierungsstellen am PHF-Tau.....	97
4.3 Wie kann glykosyliertes bovines Tau im Massenspektrometer detektiert werden?.....	97
4.3.1 Identifizierung einer N-Glykosylierungsstelle am nativen bovinen Tau-Protein durch Massenshift.....	98
<b>5.Zusammenfassung</b> .....	101
<b>6.Literatur</b> .....	103
<b>Danksagung</b> .....	111

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A $\beta$	Amyloid $\beta$ Peptid
AD	engl.: Alzheimer's disease, Alzheimer Demenz
ADP	Adenosindiphosphat
APP	engl.: amyloid precursor protein, Amyloid Vorläuferprotein
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Rinderalbumin (Bovinseralbumin)
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetaessigsäure
ESI	Electrospray Ionisation
Fmoc	9-Fluorenylmetoxycarbonyl
FPLC	engl.: fast performance liquid chromatography
GalNAc	N-Acetyl-Galaktosamin
GDP	Guanosindiphosphat
GlcNAc	N-Acetyl-Glucosamin
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	engl.: high performance liquid chromatography Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP, pI	Isoelektrischer Punkt
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
MALDI	engl.: Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Matrix unterstützte Laser Desorption/Ionisation
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	zweidimensionale Massenspektrometrie
NaP <sub>i</sub>	Natrium-Phosphat-Puffer
NeuNAc	N-Acetyl-Neuraminsäure
NP-40	Nonidet P40
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	engl: phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PBSN	phosphate buffered saline mit 0,1% NP-40
PCA	Perchlorsäure
PHF	engl.: paired helical filaments
PIPES	Piperazinethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Q-TOF	Quadrupol/time-of-flight
RP-HPLC	engl.: reversed phase high performance liquid chromatography Umkehrphasen Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
SEC	engl.: size exchange chromatography, Größenausschluss-Chromatographie
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-methylaminomethan
ÜN	über Nacht
WGA	engl.: wheat germ agglutinin, Weizenkeim-Agglutinin

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Alzheimer-Demenz im Überblick

Demenzen gehören zu den häufigsten Erkrankungen des Gehirns. Sie sind durch einen Verlust von Gedächtnisfunktionen und Alltagskompetenzen gekennzeichnet. Die Häufigkeit von Demenzen nimmt mit höherem Lebensalter exponentiell zu. Aufgrund des wachsenden Anteils älterer Menschen an unserer Bevölkerung wird die Demenzproblematik ein zentrales Problem des heutigen Gesundheitssystems. Demenzen führen zu langwierigem Leiden der Patienten, zu erheblichen Belastungen der betreuenden Angehörigen und zu hohen Versorgungskosten.

Die häufigste Form der Demenz ist die Alzheimer-Demenz (AD). Das Demenzsyndrom ist mit einem Anteil von 6-8% bei über 65-Jährigen und bei jedem Dritten der über 85-Jährigen eine der häufigsten geronto-psychiatrischen Erkrankungen. In der Bundesrepublik Deutschland leben zwischen 800.000 und 1 Million Alzheimer-Patienten. In den Vereinigten Staaten sind vier Millionen Menschen von dem Leiden betroffen. Experten rechnen damit, dass es in 25 Jahren weltweit 22 Millionen Alzheimer-Kranke geben wird.

Der klinische Verlauf der AD ist durch die Kernsymptomatik einer Verminderung kognitiver Funktionen wie Gedächtnis, Orientierung und Sprache gekennzeichnet. Der Zeitraum vom Auftreten der ersten klinischen Symptome bis zum Versterben des Patienten beträgt im Schnitt 7 bis 9 Jahre. Der eigentliche Beginn der neurodegenerativen Krankheitsprozesse mit Bildung von Amyloid-Plaques im Gehirn und von Neurofibrillären Bündeln (NFT's) in den Nervenzellen wird jedoch 15 bis 30 Jahre vor dem Auftreten der ersten klinischen Symptome vermutet. Dies bedeutet, dass einer mehrjährigen klinischen Krankheitsphase eine wahrscheinlich jahrzehntelange präklinische Phase neurodegenerativer Veränderungen vorausgeht, so dass sich der gesamte präklinische und klinische Krankheitsprozess letztlich über einen Zeitraum von 30 bis 40 Jahren erstreckt.

Die Pathologie der AD zeichnet sich durch massive Ablagerungen von Amyloid-Plaques, Verklumpungen des A $\beta$ -Peptids und der Bildung von Neurofibrillären Bündeln durch ineinander verdrilltes Tau-Protein aus. Die Amyloid-Plaques sind schwer löslich und entstehen durch fehlerhafte proteolytische Vorgänge am Amyloid-Vorläuferprotein (APP). Die AD wird in den meisten familiären Fällen – etwa 10 bis 15% der Erkrankungen – durch

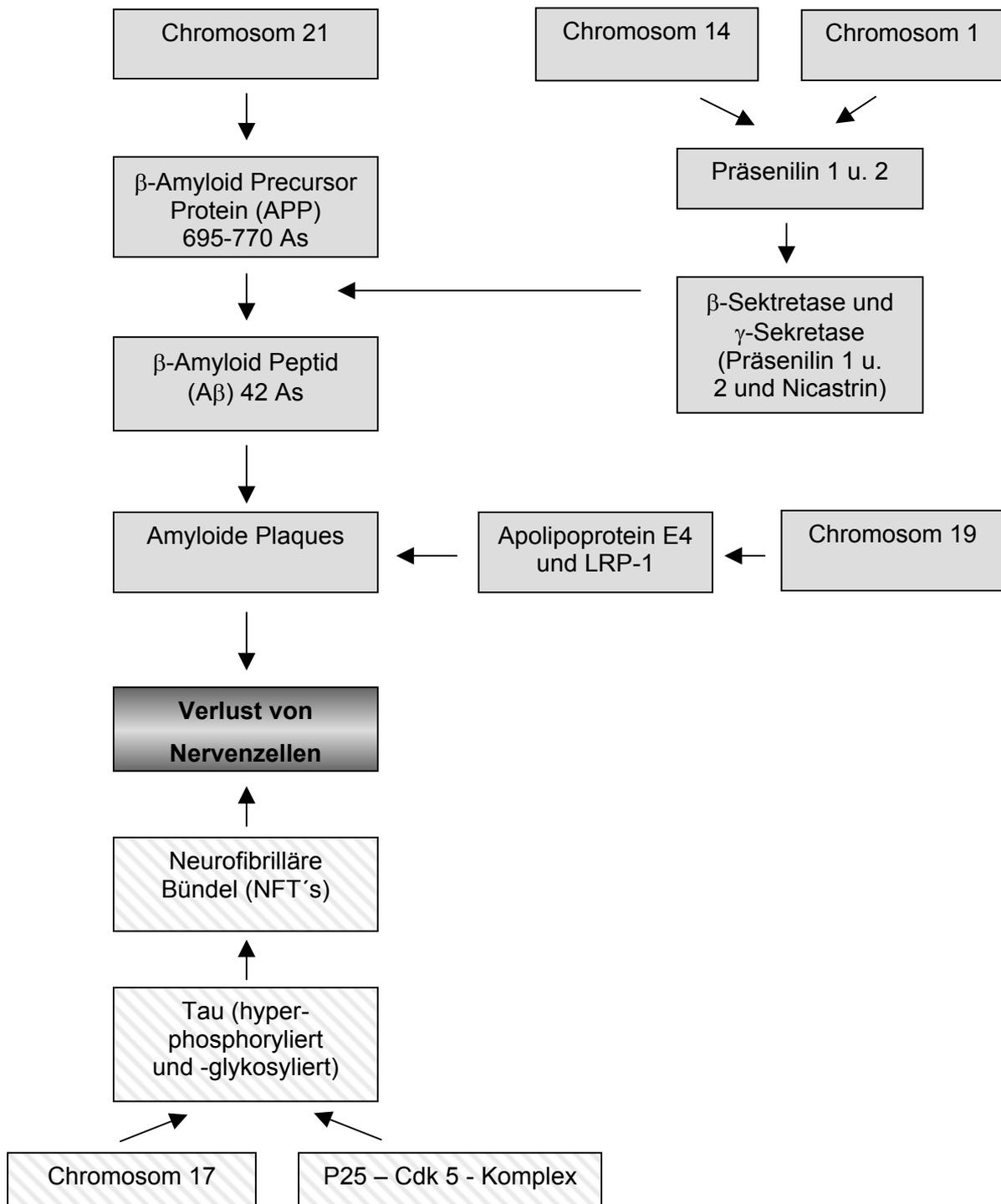
vererbare Mutationen der APP- und Präsenilin-Gene verursacht. Diese Mutationen führen zur erhöhten Bildung des gefährlichen A $\beta$  42 Peptids, das äußerst schnell aggregiert und so die pathologischen Amyloid-Plaques bildet. Die Bildung der NFT's kommt durch stark modifiziertes Tau-Protein zustande, das dadurch seine mikrotubulistabilisierende Wirkung in den Nervenzellen nicht mehr wahrnehmen kann und sich verdrillt zusammenlagert. Der Stofftransport in der Zelle kommt somit zum Erliegen, die Nervenzelle stirbt.

Eine Heilung der Alzheimer-Demenz gibt es bislang nicht. Sie lässt sich jedoch durch eine gute Medikation bei frühzeitiger Diagnose etwas verzögern. Neue Medikamente, die derzeit kurz vor der klinischen Prüfung stehen, basieren auf der Senkung der Amyloidkonzentrationen im Gehirn. Sie umfassen Enzym-Inhibitoren sowie die Immunisierung gegen Amyloid, die in transgenen Mausmodellen zu erheblicher Reduktion der Plaques führen. Wenn diese therapeutischen Ansätze zur Stabilisierung der kognitiven Funktionen führen, werden sie in der Zukunft auch präventiv bei Trägern von Risikofaktoren zur Anwendung kommen können.

## **1.2 Faktoren für die Entstehung der Alzheimer-Demenz**

Wie bereits unter 1.1 beschrieben, wird die Alzheimer-Demenz durch das Vorkommen Neurofibrillärer Bündel aus aggregiertem Tau-Protein und Eiweißablagerungen, die aus Verklumpungen des A $\beta$ -Peptids entstehen, hervorgerufen. An der Bildung der Amyloiden-Plaques sind wiederum zwei Faktoren beteiligt, die Präsenilin-Gene und das Apolipoprotein E4. Wie in Abbildung 1.1 gezeigt, sind die Präsenilin-Gene auf Chromosom 1 und 14 lokalisiert. Deren exprimierte Proteine bilden mit verschiedenen Enzymen einen Komplex, der das APP falsch schneidet. Es entsteht das A $\beta$ -Peptid. Dieses Peptid lagert sich vermehrt im Gehirn an, wenn Apolipoprotein E4 vorhanden ist. Das Apolipoprotein hat eine geringe Affinität zu A $\beta$  und schleust es nicht aus dem Gehirn heraus. Diese beiden Faktoren werden in den Kapiteln 1.3 und 1.4 genauer erklärt.

Das Tau-Protein ist im aggregierten Zustand für die Entstehung der AD verantwortlich. Dieser aggregierte Zustand wird durch Hyperphosphorylierung und Hyperglykosylierung hervorgerufen. An der starken Phosphorylierung ist der P25-Cdk5-Komplex beteiligt, auf den in Kapitel 1.5.4.1.1 detaillierter eingegangen wird. Durch das Zusammenlagern der Tau-Proteine in den NFT's können diese ihre Mikrotubuli-stabilisierende Funktion nicht mehr ausüben und der Organellentransport in der Zelle bricht zusammen (dies wird in Kapitel 1.5.2 erläutert). In Abbildung 1.1 sind die Faktoren für die Entstehung der Alzheimer-Demenz in der Übersicht dargestellt.



**Abbildung 1.1:** Faktoren für die Entstehung der Alzheimer-Demenz in der Zusammenfassung.

### 1.3 Die Rolle des $\beta$ -Amyloid-Peptids bei der Entstehung der Alzheimer-Demenz

Neben dem Tau-Protein wird das  $\beta$ -Amyloid-Peptid als Verursacher der Alzheimer-Demenz angesehen. Es ist für die Ausbildung der senilen Plaques im Gehirn von Alzheimer-Patienten

verantwortlich. Mitte der 80-iger Jahre wurde das  $\beta$ -Amyloid-Peptid - auch kurz A $\beta$  genannt - als Hauptbestandteil der Plaques identifiziert. Kurz darauf gelang es, das Gen für das größere Vorläuferprotein, das sog.  $\beta$ -Amyloid-Precursor-Protein ( $\beta$ APP), zu identifizieren, von dem das  $\beta$ -Amyloid-Peptid abstammt.

Das Gen, das für das  $\beta$ APP codiert, ist auf Chromosom 21 lokalisiert. Man konnte zeigen, dass Personen mit Mutationen in diesem Gen ein erhöhtes Risiko aufweisen, eine frühe Form der AD zu entwickeln. In diesem Zusammenhang sei noch erwähnt, dass das Chromosom 21 in doppelter Ausführung bei Patienten mit Down-Syndrom vorkommt und dass diese Patienten ungefähr mit 40 Jahren die gleichen Symptome aufweisen, wie sie bei der AD üblich sind.

Das  $\beta$ APP ist zwischen 695 und 770 Aminosäuren lang und ein Transmembranprotein. Es kann durch 2 verschiedene Enzymkomplexe geschnitten werden. Wird das  $\beta$ APP durch einen Komplex von Präsenilin 1 und 2, Nicastrin,  $\gamma$ -Sekretase und  $\alpha$ -Sekretase geschnitten, so entsteht das „harmlose“ Peptid p3. Wird das Protein hingegen durch den Komplex aus Präsenilin 1 und 2, Nicastrin,  $\gamma$ -Sekretase und  $\beta$ -Sekretase geschnitten, können 2 Endprodukte entstehen: das 40 Aminosäure lange Amyloid-Peptid oder - durch fehlerhaftes Schneiden - das 42 Aminosäure lange, neurotoxische A $\beta$ -Peptid. Bei der Spaltung durch den zuletzt genannten Komplex trennt zuerst die  $\beta$ -Sekretase ein 99 Aminosäure langes Peptid von  $\beta$ APP ab, von dem dann die  $\gamma$ -Sekretase das Amyloid abspaltet. Ein Grund für das falsche Schneiden des Enzymkomplexes könnte darin begründet liegen, dass das Gen für das  $\beta$ APP genau dort Mutationen aufweist, an denen das Molekül gespalten wird und somit die Enzyme ihr Substrat nicht mehr erkennen können und an falschen Aminosäuren angreifen. Die neurotoxische, 42 Aminosäure lange Form des Amyloid-Peptides bildet größere Aggregate außerhalb der Nervenzellen, die sog. Plaques. Diese können die Neuronen auf mehrere Weisen schädigen: durch Störung der Calcium-Regulation, indem sie die Entstehung freier Radikale fördern, oder durch Anlockung von Mikrogliazellen, die Entzündungsprozesse im Gehirn hervorrufen.

Weiterhin wurden innerhalb der Präsenilin-Gene Mutationen identifiziert. Das Präsenilin 1 Gen ist auf Chromosom 14, das Präsenilin 2 Gen auf Chromosom 1 lokalisiert. Mutationen in diesen Genen verursachen eine Alzheimer-Form, die in relativ frühem Alter beginnt und sehr aggressiv verläuft. An dieser früh einsetzenden Form erkranken in Familien mit gehäuften, erblichen Alzheimer zehn bis sechzig Prozent der Patienten.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass bei bestimmten künstlichen Mutationen in den Präsenilin-Genen bei Mäusen die Aktivität der enzymatischen Komplexe gestört ist. Bei Präsenilin-1 Knock-out Mäusen wird unter anderem kein  $\beta$ -Amyloid-Peptid gebildet. Der

zweite Spaltungsschritt von  $\beta$ APP durch die  $\gamma$ -Secretase findet dadurch nicht statt. Gerade das Gegenteil tritt bei Alzheimer-Patienten aus erblich belasteten Familien auf, wenn sie mutierte Präsenilin-Gene besitzen. Diese Mutanten bewirken die Steigerung der Schnittrate durch  $\gamma$ -Sekretase. Dadurch wird das 42 Aminosäure lange  $A\beta$  im Übermaß gebildet. Hieraus lässt sich schliessen, dass die Präsenilin-Gene mit der  $\gamma$ -Sekretase in Zusammenhang stehen.

#### **1.4 Die Rolle des Apolipoproteins bei der Entstehung der Alzheimer-Demenz**

So schwerwiegend sich die Mutationen in den Präsenilin-Genen und des  $\beta$ APP-Gens auch auswirken, sind sie jedoch nur für jeden zweiten Fall von frühzeitig ausbrechendem familiärem Alzheimer verantwortlich. Somit betrifft dies insgesamt höchstens jeden zwanzigsten Fall. Ein anderes schadhafte Gen tritt bei der häufigsten Form der AD, der sporadischen, bei der erst im Alter auftretenden Demenz deutlich gehäuft auf. Dieses Gen codiert für das Apolipoprotein E (APO E) und ist auf Chromosom 19 lokalisiert. Das Gen existiert in drei Allelen, APO E2, APO E3 und APO E4, wobei das Vorhandensein des APO E4 Allels bei 40% der Erkrankten nachgewiesen werden konnte und somit auch als mögliche Ursache der AD angesehen wird. Bemerkenswert ist weiterhin, dass Alzheimer sehr viel früher auftritt, wenn Patienten neben einer Mutation im  $\beta$ APP-Gen dieses Allel besitzen.

Das Cholesterol-transportierende Enzym LRP-1 („low-density-lipoprotein receptor-related protein“) ist normalerweise dafür verantwortlich,  $A\beta$  aus dem Hirn herauszutransportieren. LRP-1 arbeitet eng mit den Proteinen  $\alpha$ -2-Makroglobulin und APO E zusammen. Bei Patienten mit dem APO E4-Allel ist eine geringere Affinität zu  $A\beta$  zu beobachten und somit ein weniger effizienter Transport dieses Peptids aus dem Gehirn heraus. Daher kann sich das  $\beta$ -Amyloid im Hirn akkumulieren und die Plaques ausbilden.

#### **1.5 Die Rolle des Tau-Proteins im Gehirn**

##### **1.5.1 Biochemie des Tau-Proteins**

Erstmals wurde das Tau-Protein 1975 von Weingarten und Mitarbeiter als hitzestabiles Protein beschrieben, das zusammen mit Tubulin durch mehrere Polymerisationsschritte aufgereinigt werden konnte und maßgeblich an der Formierung von Mikrotubuli beteiligt ist. Daraufhin wurde dieses Protein mit „Tau“ gekennzeichnet, da es die Fähigkeit besitzt,

„Tubulinbildung zu induzieren“ (Weingarten et al., 1975). 1977 gelang es Cleveland et al., das Tau-Protein einzeln zu isolieren und es isoelektrisch über SDS-PAGE aufzutrennen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich das Protein im Gel in einzelne Banden auftrennt, die zwischen 55 und 62 kDa liegen. Weiterhin wurde festgestellt, dass Tau ein Phosphoprotein ist mit einem durchschnittlichen Isoelektrischen Punkt (pI) von 7,3. Es kommt hauptsächlich in Axonen mit geringer Intensität in Zellkörperchen und gar nicht in Dendriten vor (Binder et al., 1985).

Weiterfolgende Studien ergaben, dass das Tau-Protein eine Proteinfamilie ist, die durch alternatives Splicen eines einzigen Gens entsteht (Lee et al., 1988).

Cleveland stellte 1977 die Behauptung auf, dass Tau ein stark asymmetrisches Protein mit einer wenig definierten Sekundärstruktur sei. Dies konnte 1994 von Schweers et al. bestätigt werden, der feststellte, dass das Tau-Protein ein lineares Protein ohne  $\alpha$ -Helix oder  $\beta$ -Faltblattstruktur ist. Diese fehlende Konformation könnte durch das starke Vorkommen von Prolin und Glycin in der Primärstruktur zu erklären sein. Durch die fehlende Sekundärstruktur ist auch die Hitzestabilität des Tau-Proteins, aber auch die Löslichkeit in 2,5% Perchlorsäure (PCA) und die verzögerte Wanderung in der SDS-PAGE zu erklären.

### 1.5.2 Die Funktion des Tau-Proteins in der Zelle

Die Bedeutung des Tau-Proteins im gesunden Gehirn liegt in seiner Mikrotubuli-stabilisierenden Funktion. In Alzheimer-Hirnen ist Tau hyperphosphoryliert (Jameson et al., 1980) und stark glykosyliert (Ledesma et al., 1994). Dadurch wird seine Assoziation an die Mikrotubuli gestört. Es lagert sich zu paarigen helicalen Filamenten (PHF's) zusammen. Somit kann das Tau-Protein seine Mikrotubuli-stabilisierende Funktion nicht mehr ausüben. An den Mikrotubuli findet der Organellentransport innerhalb der Zellen statt. Ihr Aufbau wird vom MTOC („microtubule-organizing-center“) organisiert, der in der Nähe des Zellkerns, dem Minus-Ende, liegt und von dem aus der Transport in die Peripherie zu den Plus-Enden erfolgt. Im Falle von Neuronen liegen die Plus-Enden in den Axonen. Der intrazelluläre Organellentransport zu den Plus-Enden wird über Kinesin gesteuert, der Transport zu den Minus-Enden über Dynein. Wird Tau überexprimiert, inhibiert es den gerichteten Transport zu den Plus-Enden. Daraus resultiert, dass der Transport zu den Minus-Enden dominant wird, sich Mitochondrien, Peroxisomen und andere Zellorganellen im Zellinneren akkumulieren, sich das Endoplasmatische Retikulum von der Plasmamembran ablöst und die Zellprozesse langsam zum Erliegen kommen, da die Zelle mit Organellen unterversorgt ist.

Biochemisch sind die Röhren der Mikrotubuli aus 13 geraden, parallel aneinanderliegenden Protofilamenten aufgebaut, die eine ca. 6 nm dicke Wand um den inneren Hohlraum bilden. Die Protofilamente sind geradkettige Heterodimere, d.h. sie bestehen aus vielen hintereinandergeknüpften Dimeren. Dabei besteht ein Dimer aus den miteinander verbundenen globulären Proteinen alpha- und beta-Tubulin. Jedes Heterodimer bindet 2 GTP (Guanosin-5'-triphosphat)-Moleküle. Dabei bindet das alpha-Tubulin irreversibel 1 GTP, wobei das beta-Tubulin reversibel das andere GTP bindet, und dies zu GDP (Guanosin-5'-diphosphat) umwandeln kann, was für die Anlagerung von Dimeren an bestehende Mikrotubuli von Bedeutung ist. Mit den Mikrotubuli sind auch zahlreiche Proteine assoziiert. Das bekannteste ist das Dynein (eine ATPase), das zur Energieumsetzung in Bewegung benötigt wird. Ferner gibt es eine ganze Gruppe von Proteinen mit dem Sammelnamen MAPs (microtubule associated proteins), zu denen auch das Tau-Protein gehört; die meisten von ihnen nehmen regulatorische Funktionen wahr.

Mikrotubuli entstehen - wie bereits beschrieben - durch die Aneinanderreihung freier Tubulindimere zu den Protofilamenten, die sich, seitlich um wenige Nanometer versetzt, zu einem kurzen Röhrenstück aneinander lagern. Die weitere Verlängerung (self-assembly) erfolgt durch Anknüpfung zusätzlicher Dimere an den Enden der Röhre, die auch GTP-Kappen genannt werden, da dort GTP an Tubulin gebunden ist. Dabei erfolgt die Anknüpfung am Plus-Ende, wo die alpha-Tubulin Einheiten das Ende der Röhre bilden, etwa doppelt so schnell wie am Minus-Ende, wo die beta-Tubulin Einheiten als Anknüpfungsort dienen. Durch gebundenen GTP werden die Mikrotubuli stabilisiert. Zu einem Abbau (disassembly) kommt es hingegen dann, wenn durch GTP-Hydrolyse GDP-Untereinheiten entstehen, die nur labil gebunden sind. Der Auf- und Abbau der Mikrotubuli kann je nach Erfordernissen im Laufe von Tagen bis zu wenigen Minuten (z.B. bei der Mitose) erfolgen.

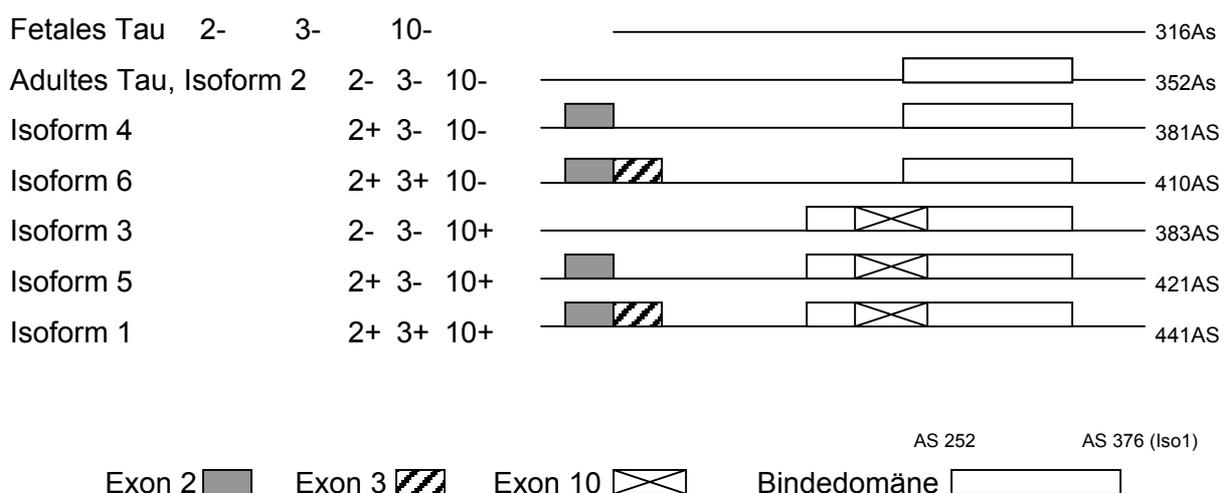
Der Organellentransport entlang der Mikrotubuli zu den Plus-Enden wird über Kinesin gesteuert, wobei ATP in mechanische Energie umgewandelt wird. Kinesin ist ein Dimer, bestehend aus zwei schweren Ketten (120-130 kDa), von denen jede am N-Terminus eine kugelförmige Motordomäne und am C-Terminus eine fächerförmige Bindedomäne besitzt. Die Motordomäne weist eine ATPase Aktivität auf, wobei die Umsetzung eines ATPs zu ADP in einer Bewegung des Kinesinmoleküls entlang des Mikrotubulus von einigen Mikrometern resultiert, um danach wieder vom Mikrotubulus abzufallen. Für die nächste Bewegung ist die Umsetzung eines neuen ATPs nötig.

Der Rücktransport von den Plus-Enden zu den Minus-Enden wird über Dynein gesteuert. An den alpha-Tubuli inserieren paarweise Dynein-Arme, die zu den benachbarten beta-Tubuli

hin gerichtet sind. Sie besitzen ATPase Aktivität. Im Ruhezustand weisen die Dynein-Arme schräg nach unten. Unter ATP-Spaltung treten sie mit dem gegenüberliegenden beta-Tubulin in Kontakt. Durch Bewegung des Dynein-Armes in die Waagerechte werden die Tubulin-Dimere gegeneinander verschoben. Durch abermalige ATP-Spaltung löst sich der Dynein-Arm wieder vom beta-Tubulin ab und streckt sich nach unten.

### 1.5.3 Die Genetische Struktur des Tau-Proteins

Das Gen, das für das Tau-Protein codiert, ist auf Chromosom 17 lokalisiert. Im menschlichen adulten Hirn entstehen durch alternatives Splicen der Tau-mRNA 6 unterschiedliche Isoformen (Goedert et al., 1989), wohingegen im bovinen Hirn nur 5 Isoformen vorkommen. Die humanen Isoformen beinhalten entweder 3 oder 4 Mikrotubuli-Binde-Domänen mit 31 oder 32 Aminosäuren in der carboxyterminalen Region des Moleküls (Himmler et al., 1989, Butner u. Kirschner, 1991; Gustke et al., 1994), abhängig von dem Vorkommen von Exon 10 in der mRNA (Goedert et al., 1989). Alle vorkommenden humanen adulten und fetalen Isoformen sind in Abbildung 1.2 zusammengefasst. Die Tau-Isoformen enthalten entweder kein aminoterminal Insert, ein 29 Aminosäure langes Insert (Exon 2) oder eine 58 Aminosäure langes Insert (Exon 2 und Exon 3). Beide Inserts – das aminoterminal sowie das carboxyterminale – werden entwicklungsgemäß reguliert, wobei jedoch dem aminoterminalen Insert bisher noch keine Funktion zugeordnet werden konnte.



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung der humanen Tau-Isoformen mit adult-spezifischen Exonen.

Es ist eindeutig geklärt, dass die Sequenz-Wiederholungen (repeats) innerhalb der Bindedomäne am carboxyterminalen Ende des Tau-Proteins für die Bindung von Tau an die Mikrotubuli verantwortlich ist, jedoch deutet vieles darauf hin, dass sowohl die flankierenden Bereiche als auch die Inter-Repeat-Regionen für die Tau-Mikrotubuli-Interaktionen von großer Bedeutung sind. Taukonstrukte haben beispielsweise nur eine geringe Affinität zu den Mikrotubuli, wenn sie nur die Sequenz-Repeats aufweisen (Gustke et al., 1994). Werden die flankierenden Bereiche dem Konstrukt zugefügt, so verstärkt sich die Affinität des Tau-Proteins, an die Mikrotubuli zu binden (Gustke et al., 1994). Weiterhin konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass bei Vorhandensein der flankierenden Bereiche Tau aggregiert, anti-parallele Dimere bildet und filamentöse Strukturen ausbildet (Wilson and Binder et al., 1995; Schweers et al., 1995). Die flankierenden Domänen sind außerdem durch das Vorhandensein von zahlreichen potentiellen Phosphorylierungsstellen gekennzeichnet. Sie beinhalten beinahe die Hälfte der 17 Ser/Thr-Pro Motive, die im Tau-Protein vorkommen. Diese Motive sind Substrate für Prolin-gerichtete Kinasen und eine große Anzahl dieser Ser/Thr-Pro Sites kommen phosphoryliert in humanem Kontroll- sowie Alzheimer-Hirnen vor (Hasegawa et al., 1992; Morishima-Kawashima et al., 1995).

Das bovine Tau weist eine große Homologie zum humanen Tau-Protein auf. Jedoch ist die längste Form im Rinderhirn 448 Aminosäuren lang (Isoform 1) im Gegensatz zu der längsten Form im humanen Hirn (long splice form), die 441 Aminosäuren aufweist. Auch gibt es beim humanen Tau im Gegensatz zu bovinem die zusätzliche Isoform 6, das im peripheren Nervensystem vorkommende „Big Tau“ und das fetale Tau. Alle Isoformen des bovinen und humanen Tau sind in der Tabelle 1 aufgelistet.

**Tabelle 1:** Vergleich der einzelnen Isoformen von humanem und bovinem Tau miteinander und Auflistung der Sequenzabschnitte der einzelnen Repeat-Units. Die Terminierung richtet sich jeweils nach den Isoformen 1.

Bovines Tau	Humanes Tau
	<b>Big Tau</b> (in peripheren Nervenzellen) 758AS
<b>Isoform 1</b> mit 448 AS	<u>long splice form</u> mit 441 AS <b>(Isoform 1)</b> AS 125 – AS 375 und AS 395 – As 460 fehlen
<b>Isoform 2</b> mit 430 AS AS 175 – AS 192 fehlt	<b>Isoform 2</b> mit 352 AS AS 45- AS 102 , AS 125 – AS 375 und AS 395 – AS 460 fehlen
<b>Isoform 3</b> mit 402 AS AS 175 – AS 192 und AS1 – AS131 verändert, 28 fehlen	<b>Isoform 3</b> mit 383 AS AS 45 - AS 102 und AS 112 – AS 375 und AS 395 – AS 460 fehlen
<b>Isoform 4</b> mit 302 AS AS 175 – AS 192 und AS 1- AS 100 aus Iso 2 fehlen	<b>Isoform 4</b> mit 381 AS AS 74 – AS 102, AS 125 – AS 375 und AS 395 – AS 460 und AS 592 – AS 622 fehlen
<b>Isoform 5</b> mit 340 AS AS 175 – AS 192 und AS 1 - AS 131 verändert, 28 fehlen AS 235 – AS 296 fehlen	<b>Isoform 5</b> mit 412 AS AS 74 – AS 102 und AS 125 – AS 375 und AS 395 – AS 460 fehlen

	<b>Isoform 6</b> mit 410 AS AS 125 – AS 375 und AS 395 – AS 460 und AS 592 – AS 622 fehlen
	<b>Fetales-Tau</b> mit 308 AS AS 2 – AS 104 und AS 125 – AS 375 und AS 395 – AS 460 und AS 592 – AS 622 fehlen.
<b>Repeat-Unit 1(nach Iso1)</b> AS 251 – AS 281	<b>Repeat-Unit 1 (nach Iso1)</b> AS 252 – AS 282
<b>Repeat-Unit 2 (nach Iso1)</b> AS 282 – AS 312	<b>Repeat-Unit 2 (nach Iso1)</b> AS 283 – AS 313
<b>Repeat-Unit 3 (nach Iso1)</b> AS 313 – AS 343	<b>Repeat-Unit 3 (nach Iso1)</b> AS 314 – AS 344
<b>Repeat-Unit 4 (nach Iso1)</b> AS 344 – AS 375 -	<b>Repeat-Unit 4 (nach Iso1)</b> AS 345 – AS 376

Am Beispiel der humanen und bovinen Isoform 1 ist in Abbildung 1.3 ein Sequenzvergleich dargestellt. Die homologen Bereiche stehen untereinander und sind grau hinterlegt. Weiterhin sind Phosphorylierungs- und Glykosylierungsstellen fett und die Mikrotubuli-Binde-Region in größerer Schrift gekennzeichnet. In der Mikrotubuli-Binde-Region des Tau-Proteins gibt es 2 potentielle Phosphorylierungsstellen (Ser 262 und Ser 356) und eine potentielle N-Glykosylierungsstelle (N-359-I-T). Ser 412 ist zugleich Phosphorylierungsstelle und gehört zum Motiv für eine potentielle N-Glykosylierungsstelle.

```

H 1 MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDEGSEEPG
B 1 MAEPRQEFVEMEDHAQGDYTLQDQEGDMDPGLKESPLQTPADDGS EEPG

H 61 SETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAG
B SETSDAKSTPTAEDATAPLVDEGAPGEQAAAQAPAEIPEGTTAEEAGIGDTSNLEDQAAG

H 121 HVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKT KIATPRGAAPPQKQQANATRIPAKTPPAPK
B HVTQARMVSKGKDGTPDDKKTGADGKPGTKIATPRGAAPPQKQQANATRIPAKTTPTPK

H 181 TPSSGEPPK SGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAK
B 181 TSPATMQVQKPPAGAKSERGESGKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAAK

H 241 SRLQ T AP V P M PDLKNVSKKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV
B SRLQAAPGMPDLKNVSKKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHV

H 301 PGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDFKDRVQSKIGSLDNI
B PGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDFKDRVQSKIGSLDNI

H 361 THVPGGGNKKIETHKLTFRENAAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMV
B THVPGGGN KKI ET H KLTFRENAAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMV

H 421 DSPQLATLADEVSASLAKQGL
B DSPQLATLADEVSASLAKQGL

```

**Abbildung 1.3:** Vergleich der Aminosäure-Sequenz der bovinen Isoform 1 (B) mit der long human splice form (H), ebenfalls Isoform 1. Zusätzlich sind die Positionen für potentielle Phosphorylierungsstellen fett und für potentielle N-Glykosylierungsstellen kursiv, unterstrichen und fett markiert. Die Region für die Mikrotubuli-Binde-Domänen ist durch größere Schrift hervorgehoben. In dieser Region gibt es 2 potentielle Phosphorylierungsstellen (Ser 262 und Ser 356) und eine potentielle N-Glykosylierungsstelle (N-359-I-T). Ser 412 ist zugleich Phosphorylierungsstelle und gehört zum Motiv für eine potentielle N-Glykosylierungsstelle.

## 1.5.4 Die verschiedenen Modifizierungen am Tau-Protein

### 1.5.4.1 Die Phosphorylierung am Tau-Protein

Neben den Isoform-Variationen spielt die Phosphorylierung eine wichtige Rolle in der Regulation der Tau-Mikrotubuli-Interaktionen. Aus Hirn isoliertes Tau-Protein ist an vielen Stellen phosphoryliert. Zusätzlich gibt es eine Vielzahl von Kinasen, die Tau *in vitro* phosphorylieren. Dazu zählen u.a., aber nicht ausschließlich, die  $\text{Ca}^{++}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) (Johnson et al., 1992), die Caseinkinase II (Greenwood et al., 1994), die cAMP-abhängige Proteinkinase (cAMP-PK) (Johnson, 1992), die MAP-Kinase (auch als ERK2 bekannt) (Drewes et al., 1992), die cyclinabhängige Kinase 5 (ckd5/p35) (Lew and Wang, 1995) und die Glykogensynthase Kinase 3 (GSK3) (Mandelkow et al., 1992). Es ist jedoch noch immer unklar, welche Proteinkinase das Tau-Protein *in vivo* phosphoryliert.

Jameson et al. präsentierten 1980 Ergebnisse, die darauf hindeuteten, dass ein erhöhter Phosphorylierungs-Grad von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) deren Fähigkeit herabsetzt, Mikrotubuli zu stabilisieren. Diese Theorie wurde von Lindwall and Cole 1984 mit der Beobachtung gestützt, dass bovines Tau durch Dephosphorylierung die Polymerisierung von Mikrotubuli viel schneller und stärker vorantreibt als im unbehandelten, phosphorylierten Zustand. Es hat sich gezeigt, dass nicht der gesamte Phosphatgehalt des Tau-Proteins, sondern vielmehr die Phosphorylierung bestimmter Sites Einfluss auf die Fähigkeit von Tau besitzt, an die Mikrotubuli zu binden und somit ihren Aufbau voranzutreiben und die Form zu stabilisieren.

Interessanterweise wird die Tubulinbindung des Tau-Proteins mit CAMP-PK durch die Phosphorylierung sehr stark geschwächt, wohingegen die Phosphorylierung durch CaMKII keine Auswirkungen hat (Johnson et al., 1992). Durch die Kinase ERK2 wird Tau *in vitro* sehr stark phosphoryliert und die Affinität des Proteins zu den Mikrotubuli stark herabgesetzt (Gustke et al., 1992).

Die Phosphorylierung des Tau-Proteins durch p110K (p110 Mikrotubuli Affinitäts-Regulierungs Kinase, auch MARK abgekürzt) an nur einigen wenigen Sites (Ser 262, Ser 356 und mit schwächerem Effekt an Ser 324 und Ser 293) innerhalb der Mikrotubuli-Binde-Domäne bringt die Fähigkeit von Tau, an Mikrotubuli zu binden, völlig zum Erliegen (Drewes et al., 1995). Diese Studien rechtfertigen die Behauptung, dass die Phosphorylierung an speziellen Tau-Sites einen großen Einfluss auf die Tau-Mikrotubuli-Interaktionen *in vitro* haben.

Das phosphorylierte Tau-Protein wird von einer großen Zahl von Phosphatasen in vitro dephosphoryliert. Bei Phosphatase 1 (PP1), Phosphatase 2 B (PP2B, auch bekannt als Calcineurin), Phosphatase 2 A und die  $\text{Ca}^{++}$ /Calmodulin-abhängige Phosphatase konnte gezeigt werden, dass sie alle Tau-Isoformen dephosphorylieren (Goedert et al., 1992; Gong et al., 1994). Die Dephosphorylierung des Tau-Proteins verstärkt wiederum die Fähigkeit von Tau, sich an Mikrotubuli zu binden und deren Aufbau zu unterstützen (Wang et al., 1995).

#### 1.5.4.1.1 PHF-Tau

Der Entdecker und Namensgeber der Alzheimer Erkrankung, Alois Alzheimer, entdeckte 1906 fibrillenähnliche Proteinbündel im Gehirn von Demenzkranken, die er Neurofibrilläre Bündel (NFT's = neurofibrillary tangles) nannte. Unabhängig davon zeigten die Wissenschaftler Kidd und Terry 1963, dass die NFT's aus paarweise umeinander gewundenen Fasern des Tau-Proteins bestehen, den sog. PHF's (paired helical filaments). In AD-Hirnen kommen die PHF's sowohl in unlöslicher Form in den NFT's vor als auch in löslicher Form. Die Struktur der löslichen PHF's ist ähnlich, aber nicht identisch mit der der unlöslichen PHF's (Lee et al., 1991), denn die löslichen können im Gegensatz zu den unlöslichen in der SDS-PAGE zu Monomeren getrennt werden.

Tau, das aus den löslichen PHF's isoliert wird (PHF-Tau), ist weitaus stärker phosphoryliert als normales Tau. Die meisten Informationen über Phosphorylierungsstellen hatte man sehr lange Zeit nur durch den Gebrauch von speziellen gegen Phospho-Epitope gerichtete Antikörper. Der Tau-1 Antikörper erkennt nur Tau, wenn es an Ser 199/202 und Thr 205 dephosphoryliert ist, und war der erste Phosphat-abhängige Antikörper, der entwickelt wurde (Binder et al., 1985). In den nachfolgenden Jahren wurden viele Antikörper speziell gegen Phospho-Epitope hergestellt, wie bspw. AT8, PHF-1, AT270 und AT 180, die die phosphorylierten Epitope an Ser 202, Ser 396, Thr 181 und Thr 231 erkennen. Auch wurden Antikörper gegen doppelt phosphorylierte Epitope hergestellt, so wie PHF-20 (Ser 214 + Thr 217), PHF-27 (Thr 231 + Ser 235) und AT 100 (Thr 212 + Ser 214) (die Nummerierung basiert auf der längsten humanen Tau-Isoform von 441 Aminosäuren). Mit Hilfe der Massenspektrometrie konnten bisher 25 Phosphorylierungsstellen identifiziert werden (Hanger et al., 1998), von denen nur 9 Ser/Thr-Pro Motive sind und alle - bis auf Ser 262 - in den amino- und carboxyterminalen Domänen liegen, die die Mikrotubuli-Binde-Region umgeben (Moishima-Kawashima et al., 1995).

In Tabelle 2 sind alle bekannten, mittels Massenspektrometrie oder Edmann-Sequenzierung identifizierten Phosphorylierungsstellen nach Hanger et al. aufgelistet. Die entsprechenden Kinase sind nebenstehend aufgeführt.

**Tabelle 2:** Tau-Phosphorylierungsstellen direkt identifiziert durch MS oder Edman-Sequenzierung (Hanger et al., 1998), CDK5, cyclin-dependent kinase 5 (Ishiguro et al., 1992; Vulliet et al., 1992); GSK-3, glycogen-synthase kinase -3 (Ishiguro et al., 1992; Yang et al., 1994; Song and Yang, 1995); MAPK, mitogen activated protein kinase (Drewes et al., 1992); p110K, p110 microtubule affinity-regulating kinase (Drewes et al., 1995); PK, phosphorylase kinase (Paudel, 1997), cAMP-PK, cyclic-AMP-dependent protein kinase (Scott et al., 1993; Drewes et al., 1995; Litersky et al., 1996); PKC, protein kinase C (Correas et al., 1992; Drewes et al., 1995).

Aminosäure in PHF-Tau	Proteinkinase
Thr 175	MAPK
Thr 181	MAPK
Ser 184/185	
Ser 198	
Ser 199	MAPK , GSK-3
Ser 202	MAPK , CDK5
Ser 208	
Ser 210	
Thr 212	MAPK , GSK-3
Ser 214	CAMP-PK , PKC
Thr 217	GSK-3
Thr 231	GSK-3 , CDK5
Ser 235	MAPK , GSK-3 , CDK5
Ser 237	
Ser 238	
Ser 262	GSK-3 , cAMP-PK , PKC , p110K
Ser356	GSK-3 , PKA , p110K
Ser 396	MAPK , GSK-3
Ser 400	GSK-3
Thr 403	
Ser 404	MAPK , GSK-3 , CDK5
Ser 409	cAMP-PK
Ser 412	
Ser 413	GSK-3
Ser 422	MAPK

Für die Phosphorylierung am Tau-Protein spielt die cyclin-dependent-kinase 5 die größte Rolle. Cdk5 ist eine prolingerichtete Kinase und bindet unter normalen Umständen p35, eine hirsnspezifische Regulatoruntereinheit. p35 ist der Vorläufer von p25. In Patienten mit AD bindet die Cdk5 zusätzlich an p25. Dadurch kommt es zu der Hyperphosphorylierung des Alzheimer PHF-Tau. Sind die potentiellen Cdk5 Sites im Tau-Protein phosphoryliert, so unterstützt sie die Phosphorylierung der nicht-Prolin-gerichteten Sites durch GSK-3 (Ishiguro et al., 1993).

Am stärksten wird die Bindung von Tau an die Mikrotubuli inhibiert, wenn das Tau-Protein an Ser 262 und Thr 231 gleichzeitig phosphoryliert vorliegt (Sengupta et al., 1998).

#### 1.5.4.2 Die Glykosylierung am Tau-Protein

Über die Glykosylierung am Tau-Protein als zusätzliche Modifikation zur Phosphorylierung und den Glykosylierungsgrad ist bisher wenig in der Literatur bekannt. Die Phosphorylierungen und O-Glykosylierungen finden an den gleichen Aminosäuren statt und es wird vermutet, dass sich die verschiedenen Modifikationen in einem dynamischen Prozess gegenseitig ersetzen (Johnson et al., 1996).

Im Jahre 1996 konnten Wang et al. zeigen, dass abnormales hyperphosphoryliertes Tau aus Alzheimer Hirnen und PHF-Tau, aber nicht normales humanes Tau-Protein, durch Lektine angefärbt wird. Sich daran anschließende Deglykosylierungs-Studien haben gezeigt, dass sich enzymatisch-deglykosyliertes PHF-Tau wieder entdrillt und löslich wird. Dies ließ den Schluss zu, dass das Tau-Protein nur in Alzheimer-Hirnen glykosyliert ist.

Die Ergebnisse von Takahashi et al. (1999) unterstützen diese Theorie, da auch an Hirnschnitten gezeigt werden konnte, dass die Tau-Proteine in den PHF's durch Lektine, die an Zucker binden, angefärbt werden.

Nicht nur PHF-Tau und hyperphosphoryliertes Tau aus Alzheimer-Hirnen sind glykosyliert, wie zunächst angenommen, sondern auch bovines Tau ist durch Lektine anfärbbar, die allgemein zum Glykosylierungsnachweis eingesetzt werden (Arnold et al., 1996). Zusätzlich wurde isoliertes bovines Tau mittels Glactosyltransferase mit [<sup>3</sup>H]-Galactose markiert und die  $\beta$ -Eliminierung untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass bovines Tau durch O-glykosidisch gebundenes GlcNAc glykosyliert ist (Arnold et al., 1996). Es wird von Arnold et al. angenommen, dass mehr als 12 besetzte O-Glykosylierungsstellen im bovinen Tau vorkommen und die Glykosylierung mit einer durchschnittlichen Stöchiometrie von mehr als 4 Mol O-GlcNAc pro Mol Tau-Protein vorliegt. Eine mögliche Erklärung für die Glykosylierung des bovinen Taus könnte sein, dass durch die O-GlcNAcetylierung der Tau-Abbau und auch die Lokalisation von Tau in der Zelle gesteuert wird (Arnold et al., 1996).

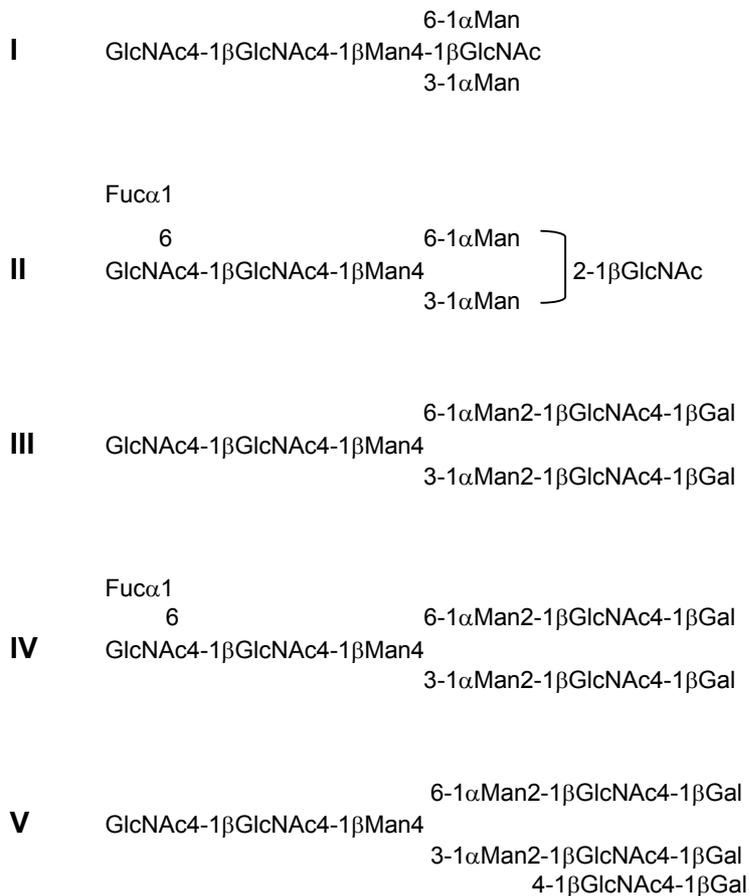
Angenommen wird, dass PHF-Tau auf nicht-enzymatischem Wege glykosyliert wird (Ledesma et al., 1994), es sich dabei um eine spontane Reaktion handelt, ähnlich der der Schiffchen Base. Hierbei werden reduzierte Zucker an die Amino- und Thiol-Gruppen der Proteine kovalent gebunden. Es wird diskutiert, dass die O-GlcNAcetylierung eine wichtige Rolle in regulatorischen Prozessen spielt und, da sie ebenfalls an Serine oder Threonine

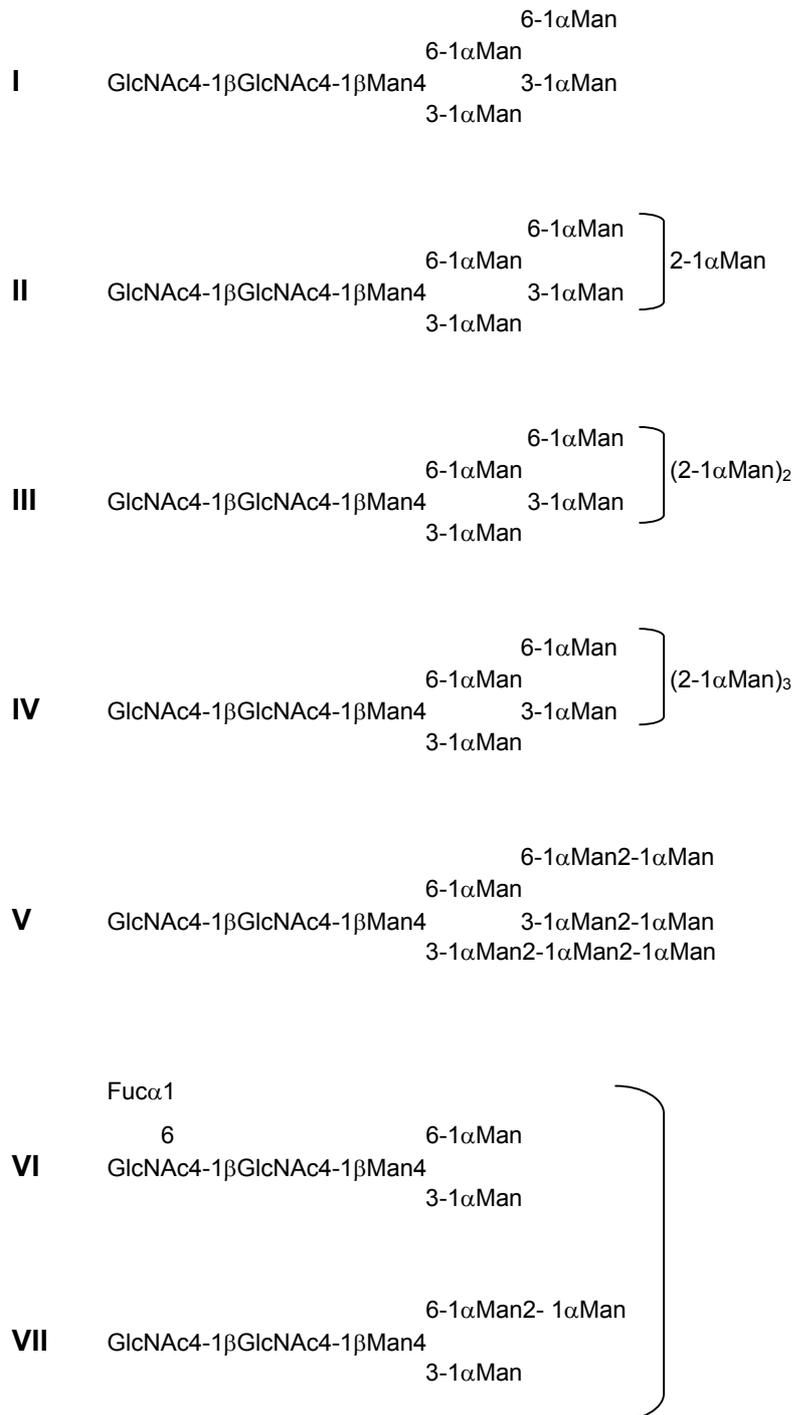
gekoppelt ist, im dynamischen Wechsel zur Phosphorylierung stattfindet (Hart, 1997). Im Gegensatz zum bovinen Tau, an dem die O-Glykosylierung eindeutig nachgewiesen werden konnte, ist in Alzheimer-Hirnen lediglich eine Herauf-Regulierung des O-GlcNAc-Levels beobachtet worden (Griffith et al., 1995).

Einen großen Erfolg in der Aufklärung der N-Glykosylierung am PHF-Tau gelang 2001 Sato et al. Diesem Forscherteam, das durch eine Kooperation von drei führenden Gruppen gebildet wurde, gelang es, die N-glykosidisch gebundenen Zuckerbäume am Peptidrückgrat von PHF-Tau und AD P-Tau (abnormally hyperphosphorylated tau) abzuspalten und deren Aufbau durch sukzessives enzymatisches Abbauen der Zucker zu identifizieren. Es wurde festgestellt, dass bovines Tau sehr wahrscheinlich nicht N-glykosyliert ist und dass in PHF-Tau und AD P-Tau N-Glykosylierungen des Komplexen Typs und des Mannosereichen Typs vorliegen.

In Abbildung 1.4 sind die verschiedenen Glykosylierungstypen in ihren unterschiedlichen Ausprägungen nach Sato et al. dargestellt.

### Komplexer Typ



Mannosereicher Typ

**Abbildung 1.4:** Angenommene Zuckerstrukturen aus Alzheimer-Hirn. Isoliert aus AD P-Tau und PHF-Tau (nach Sato et al., 2001).

Die einzelnen Aminosäure-Positionen der N-Glykosylierungen innerhalb des humanen Tau-Proteins konnten jedoch nicht geklärt werden. Jedes Tau-Protein besitzt drei potentielle N-Glykosylierungsmotive. Die Motive haben generell die Aminosäureabfolge Asn-X-Ser/Thr,

wobei X jegliche Aminosäure mit Ausnahme von Prolin oder Asparagin sein kann. Im humanen Tau sind diese Motive an den Positionen Asn<sup>167</sup>-Ala-Thr, Asn<sup>359</sup>-Ile-Thr und Asn<sup>410</sup>-Val-Ser lokalisiert. Im bovinen Tau befinden sie sich an den Positionen Asn<sup>158</sup>-Ala-Thr, Asn<sup>366</sup>-Ile-Thr und Asn<sup>417</sup>-Val-Ser.

Sato et al. diskutieren drei verschiedene Modelle, wie es zu Glykosylierungen am Tau-Protein in Alzheimer-Hirnen kommen könnte. Eine Möglichkeit sehen sie darin, dass Tau innerhalb der AD seine intrazelluläre Position verändert und dadurch untypischerweise Glykosyl-Transferasen zugänglich wird, die daraufhin Tau glykosylieren. Ein Beispiel dafür ist die Oligosaccheryltransferase (OST), die im Lumen des ER lokalisiert ist. In AD-Hirnen wurde beobachtet, dass Tau teilweise mit Ribosomen am Rauhen ER assoziiert war (Papazosomenos, 1989). Die zweite Möglichkeit wäre die der gesteigerten Aktivität der OST in den Neuronen von Alzheimer-Patienten. Als dritte Möglichkeit wurde die geänderte Aktivität einer bisher uncharakterisierten, cytosolischen PNGase angesehen, die ihre Aufgabe in der Zuckerabspaltung von Proteinen nicht mehr oder nur noch eingeschränkt ausüben kann.

In der Zusammenfassung bedeutet dies, dass an bovinem Hirn-Material O-Glykosylierungen, jedoch keine N-Glykosylierungen identifiziert wurden. Im Gegensatz dazu wurden bei PHF-Tau und AD P-Tau bisher keine O-Glykosylierungen festgestellt, sondern nur N-Glykosylierungen, von denen auch die Strukturen aufgeklärt wurden. Für den O-GlcNAc-Level wurde eine Herauf-Regulierung in AD-Hirnen beobachtet. Bisher ist es allerdings noch nicht gelungen, die genauen Aminosäure-Positionen der N- bzw. O-Glykosylierungen aus nativem humanem oder bovinem Material zu identifizieren.

## 1.6 Ansätze zur Therapie in der Alzheimer-Demenz

Der Wissensstand über die AD ist heute weitaus größer als noch vor 10 Jahren, dennoch ist die Krankheit immer noch unheilbar. Der Patient ist darauf angewiesen, dass die AD zu Lebzeiten korrekt diagnostiziert und nicht für eine andere Demenzform gehalten wird. Durch richtige Medikation ist dann eine Verzögerung des Krankheitsverlaufs möglich.

Eine erfolgreiche Medikation ist die Verabreichung von Acetylcholin-Esterase-Hemmern. Diese Therapie zielt darauf ab, den Neurotransmitter Acetylcholin, der den Reiz eines Nervenimpulses durch den Synaptischen Spalt auf das Folgeneuron überträgt, nicht sofort durch das Enzym Acetylcholin-Esterase abbauen zu lassen. Denn je länger dieser

Neurotransmitter im Synaptischen Spalt verbleibt, umso häufiger kann er das Folgeneuron stimulieren. Durch diesen Vorgang kann bis zu einem gewissen Grad das Absterben von Nervenzellen kompensiert werden. Die Firma Warner-Lambert brachte 1996 als Erste das Medikament Cognex mit dem Wirkstoff Tacrin auf den Markt. Danach folgte Pfizer mit Aricept (Wirkstoff Donepezil Hydrochlorid) und 1998 zog Novartis mit Exelon (Wirkstoff Rivastigmin) nach.

Eine andere Therapie, die ebenfalls auf dem Neurotransmitter Acetylcholin basiert, hat die Firma Shire aus England entwickelt. Das Medikament Reminyl mit seinem Wirkstoff Galantamin Hydrobromid stimuliert die Rezeptoren, Acetylcholin in großem Maße freizusetzen. Somit werden bei unveränderter Acetylcholin-Esterase-Aktivität immer genügend Neurotransmitter nachgeliefert, damit neue Reize am Folgeneuron ausgelöst werden können.

Der Nachteil dieser Art der Medikation besteht darin, dass die Medikamente umso weniger Effekt aufweisen, je mehr Nervenzellen krankheitsbedingt absterben. Somit werden sie im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit nutzlos. Auch kommt es häufig vor, dass Alzheimer-Patienten auf diese Medikamente nicht ansprechen.

Immer mehr Firmen forschen daher an neuen Therapien für die Behandlung der AD. Memantin – ein neuer Wirkstoff - blockiert die NMDA-Rezeptoren, die auf Glutamat reagieren. Verletzte Nervenzellen setzen große Mengen an Glutamat frei, die wiederum andere Nervenzellen in dieser hohen Konzentration schädigen, da deren NMDA-Rezeptoren überstimuliert werden. Werden diese Rezeptoren blockiert, so werden die Nervenzellen auf eine Art geschützt und fallen nicht so schnell der Kaskade der Schädigungen zum Opfer, die die AD mit sich bringt. Die Firma Merz bspw. setzt auf den Wirkstoff Memantin, der mittlerweile in Phase III getestet wird.

Der neue Wirkstoff Ampalax, der die Aktivität des Glutamatrezeptors „Ampa“ in den Nervenzellen verstärkt, soll im Frühstadium der AD die Effektivität der gesunden Zellen verbessern und somit den kognitiven Verfall hinauszögern. Die Firma Cortex Pharmaceuticals aus den USA hat den neuen Wirkstoff Ampalax entwickelt.

Anstatt sich mit dem Schutz von bereits existierenden Nervenzellen zu beschäftigen, konzentrierte sich die Firma Neo Therapeutics auf die Nervenzellvermehrung. Der Wirkstoff Neo Trofin, der klein genug ist, um die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und im Zellkern der

Neuronen die Expression bestimmter Wachstumsfaktoren zu stimulieren, regt somit Neuronen zur Vermehrung an.

Völlig neue Forschungsansätze geben weiterhin Grund zur Hoffnung auf die mögliche Heilbarkeit der Krankheit. Die Entwicklung von Wirkstoffen, die die Enzymaktivität von  $\beta$ -Sekretase und  $\gamma$ -Sekretase hemmen, haben sich die Firmen GlaxoSmithKline, Amgen, Novartis und DuPont Pharmaceuticals zum Ziel gesetzt.

Scios, eine andere US-amerikanische Biotechnology-Firma, entwickelt gerade einen Wirkstoff, der an die Präsenilin-Proteine bindet, diese blockiert und somit den Enzymkomplex, der das  $\beta$ -APP schneidet, inhibiert.

Die vielversprechendste und effektivste Art der Behandlung wäre die Impfung gegen AD. Die irische Firma Elan Pharmaceuticals arbeitet zur Zeit an dieser präventiven Methode. Sie entwickelte AN-1792, eine Form des 42 Aminosäure langen A $\beta$ -Peptids. Bereits 1999 konnte sie zeigen, dass sich in den Hirnen von transgenen Mäusen, die AD entwickeln, nach der Immunisierung mit AN-1792 die Anzahl der Plaques nachweislich reduzierte und die Neubildung weiterer Plaques gestoppt wurde. Die klinische Erprobungsphase I wurde mittlerweile mit Erfolg abgeschlossen und es konnte gezeigt werden, dass diese Behandlungsmethode sicher ist und eine gute Verträglichkeit bei Tieren zeigt, wie bspw. bei Schweinen, Kaninchen und Affen.

## 1.7 Fragestellung

Es wurden im Laufe der letzten Jahre einige Hypothesen zur Klärung der Alzheimer-Demenz aufgestellt. Zum einen auf Proteinebene durch das Vorkommen von hyperphosphoryliertem Tau in NFTs oder A $\beta$ -Peptiden in den Plaques. Zum anderen auf DNA-Ebene durch den APO E-Polymorphismus und die Mutationen in den Präsenilin-Genen und des APP-Gens. All diese Hypothesen basieren auf den Beobachtungen *in vivo* und wurden unterstützt durch *in vitro* Forschungsergebnissen. Aber keine Hypothese erklärt alle Aspekte der Alzheimer-Demenz und somit können nur Mutmaßungen angestellt werden, welche Hypothese wohl der Realität am nächsten kommt. Auch könnte es sein, dass all die bisher beschriebenen Studien nur Sekundäraspekte sind und keine von ihnen die wahre Ursache der AD widerspiegelt.

Jedoch die starke Modifikation des Tau-Proteins, hervorgerufen durch seine Glykosylierungen und Phosphorylierungen, wurde immer häufiger als eine der

Hauptursachen der Alzheimer-Demenz diskutiert. In diesem Zusammenhang gewinnt das Vorhandensein von N- und O-Glykosylierungen eine immer größere Bedeutung, da das Ausmaß der Glykosylierung bisher unterschätzt wurde. Deglykosylierungsstudien am Tau-Protein haben gezeigt, dass sich dadurch die NFT's wieder entdrillen (Takahashi et al., 1999 ; Sato et al., 2001).

Die Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins und die dadurch verursachte Bildung von PHFs, die sich in NFTs zusammenlagern, ist eine viel diskutierte These für die Entstehung der Alzheimer-Demenz (Jameson et al., 1980; Gustke et al., 1994; Wang et al., 1995). Bisher wurden 25 Phosphorylierungsstellen identifiziert, die unter anderem auch in den Bereichen des Tau-Proteins liegen, die für die Bindung an Tubulin verantwortlich sind. Die Glykosylierung macht neben der Phosphorylierung einen Großteil der posttranslationalen Modifizierungen am Tau aus. Allein das bovine Tau soll aufgrund stöchiometrischer Schätzungen mehr als 12 O-Glykosylierungen (Arnold et al., 1996) und könnte mindestens drei potentielle, auf Sequenzmotiven beruhende N-Glykosylierungen aufweisen. Es konnte bisher jedoch keine zugehörige O- oder N-Glykosylierungsstellen in der Sequenz des nativen Tau-Proteins identifiziert werden. Doch deutet alles darauf hin, dass die Glykosylierung eine ebenso große Rolle bei der Entstehung der AD spielt wie die Phosphorylierung (Johnson et al., 1996). Dies ist u.a. dadurch zu begründen, dass Phosphorylierungen und O-Glykosylierungen an den gleichen Aminosäuren stattfinden und sich die verschiedenen Modifikationen in einem dynamischen Prozess gegenseitig ersetzen (Johnson et al., 1996).

Daraus ergibt sich folgende Hypothese: Ist eine gestörte Glykosylierungs-Maschinerie für die Entstehung der Alzheimer-Demenz verantwortlich?

Dazu ist es nötig, die Glykosylierungsstellen in der Aminosäuresequenz von normalem und PHF-Tau (mittels Massenspektrometrie) zu identifizieren und durch deren Vergleich Hinweise auf die AD-spezifischen O- und N-Glykosylierungsstellen erhalten zu können. Würden die veränderten Sites gefunden, so könnten die dafür verantwortlichen Enzyme oder Mechanismen eindeutiger bestimmt werden. Eine gezieltere Behandlung von Alzheimer-Patienten wäre somit möglich.

Als Modellorganismus zum Menschen bietet sich in diesem speziellen Fall das Rind an, da bovines Tau eine sehr hohe Homologie zu der Aminosäuresequenz des humanen Tau-Proteins aufweist. Aus der Literatur ist bekannt, dass bovines Tau glykosyliert im Hirn vorliegt (Arnold et al., 1996). Das bovine Tau dient somit als Kontrolle im Vergleich zu den Untersuchungen am PHF-Tau aus Alzheimer-Hirn, das uns von C. Gong aus den USA zur Verfügung gestellt wurde.

Durch die Komplexität des Tau Proteins, hervorgerufen durch seine verschiedenen Isoformen mit ihren Phosphorylierungen und Glykosylierungen, erscheint es sinnvoll, Tau auf zwei unterschiedliche Arten aus bovinem Hirn aufzuarbeiten. Bei der Total-Tau-Präparation wird Wert auf den Erhalt des vollständigen komplexen Taugehaltes des Gehirns gelegt, was jedoch auch eine starke Verunreinigung der Probe mit Fremdproteinen zur Folge hat. Die Twice-cycled-Tau-Präparation hingegen zielt auf eine nahezu reine Aufarbeitung des Tau-Proteins ab, wobei es möglich wäre, dass einzelne Varianten verloren gehen.

Anhand dieser beiden Präparationen sollen N- und/oder O-Glykosylierungsstellen am Tau-Protein identifiziert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden bei den üblichen Herstellern für Laborchemikalien bezogen und entsprechen, wenn nicht anders erwähnt, dem Reinheitsgrad *pro analysis*.

### 2.2 Tau-Protein und Präparation

#### 2.2.1 Tau-Protein

Bei dem hier in der Arbeit beschriebenen Tau-Protein handelt es sich, falls nicht gesondert darauf hingewiesen wird, um selbst aufgereinigtes Protein aus Rinderhirn. Die Rinderhirne wurden mit einer Sondergenehmigung vom Düsseldorfer Schlachthof freundlicherweise zur Verfügung gestellt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Tiere bei der Entnahme nicht älter als 1 Jahr waren. Die Hirne wurden jeweils frisch präpariert und zuvor nicht auf BSE getestet.

#### 2.2.2 Total-Tau-Präparation

Für diese Art der Präparation wurde das Rinderhirn nach der Methode von Johnson et al. (1989) aufgearbeitet. Hierzu wurde das Hirn im frischen Zustand – maximal 1 Stunde nach der Entnahme – im Waring Blender 1:1 mit High-Salt-Buffer versetzt und 4x20 Sekunden mit jeweils 20-sekündiger Pause homogenisiert. Danach wurde das Homogenisat für 30 Minuten bei 28.000g abzentrifugiert, um die Proteine von Zelltrümmern zu trennen. Der Überstand wurde abgenommen und dann noch einmal für 60 Minuten bei 48.000g und 4°C zentrifugiert, um die restlichen Schwebstoffe zu entfernen. Im Anschluss daran wurde dieser Überstand im Wasserbad bei 95°C für 10 Minuten einer Hitzedenaturierung unterzogen, gefolgt von einer 30-minütigen Zentrifugation bei 35.000g und 4°C, um die ausgefallenen Proteine abzutrennen. Der Überstand wurde langsam und unter ständigem Rühren mit Ammoniumsulfat (50% Endkonzentration) versetzt und über Nacht (ÜN) bei 4°C stehen gelassen. Schließlich wurden die ausgefällten Proteine durch 20-minütige Zentrifugation bei

30.000g und 4°C gewonnen. Das so erhaltene Pellet wurde in möglichst wenig Assembly-Buffer resuspendiert und bis zum weiteren Gebrauch bei –80°C eingefroren.

### High-Salt-Buffer

Komponenten	Menge (g/l)
PIPES (Piperazinethansulfonsäure) pH 6,9	100mM
EGTA (Ethylenglycoltetraessigsäure)	1mM
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	0,5mM
MgSO <sub>4</sub> (Magnesiumsulfat)	0,5mM
DTT (Dithiothreitol)	2mM
PMSF (Phenylmethylylsulfonylfluorid)	0,1m
Benzamidin	10mM
NaCl	750mM
H <sub>2</sub> O dest. (auffüllen auf)	

### Assembly-Buffer

Komponenten	Menge (g/l)
PIPES, pH 6,9	50mM
EGTA	1mM
MgSO <sub>4</sub>	0,5mM

pH-Wert mit NaOH auf 6,9 einstellen

### 2.2.3 Twice-Cycled-Tau-Präparation

Die Strategie der Twice-cycled-Tau-Präparation ist eine Kombination aus 3 verschiedenen Aufarbeitungsprotokollen aus der Literatur (Johnson et al., 1989; Berkowitz et al., 1977; Lindwall and Cole, 1984) und basiert auf der Fähigkeit des Tau-Proteins, sich unter Zugabe von Guanosin-Tri-Phosphat (GTP) an Mikrotubuli zu binden. Dieser Bindungsprozess (Polymerisationsschritt) dient dem Zweck, Tau effektiv von Fremdproteinen zu trennen und somit eine sehr reine Präparation zu erhalten.

Das Rinderhirn wurde im frischen Zustand – maximal 1 Stunde nach der Entnahme – im Waring Blender 1:1 mit High-Salt-Buffer versetzt und 4x20 Sekunden mit jeweils 20 sekundiger Pause homogenisiert (Johnson et al., 1989). Das so erhaltene Homogenisat wurde bei 10.500g und 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert, um die groben Zelltrümmer loszuwerden. Im Anschluss daran wurde der Überstand mit 1mM GTP versetzt und wiederum bei 60.000g und 4°C zentrifugiert (Berkowitz et al., 1977). Von diesem Überstand wurden 4,5% abgenommen und als Aliquot ZP1 (= Zwischenprodukt 1) bei –80°C aufbewahrt. Diesem bereits mit GTP als Energielieferanten versetzte Überstand wurde nun Glycerol im Verhältnis 1:3 zugegeben. Durch Inkubation bei 37°C wurde dann die Probe für

20 Minuten dem ersten Polymerisationszyklus unterzogen. Im Anschluss daran wurde der entstandene Tau-Tubulin-Komplex 90 Minuten bei 60.000g und 30°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in PM-Puffer, dem 1mM GTP frisch zugegeben wurde, resuspendiert (Lindwall et al., 1984). Nach diesem Schritt wurden 22% der Probe abgenommen und als Aliquot ZP2 (= Zwischenprodukt 2) bei -80°C aufgehoben. Durch Zugabe von GTP bei 4°C soll der Tau-Tubulin-Komplex wieder zur Dissoziation gebracht werden. Im Anschluss daran wurden 75 Minuten bei 75.000g und 4°C zentrifugiert (Lindwall et al. 1984).

Der mit GTP versetzte Überstand wurde nun dem zweiten 20-minütigen Polymerisationszyklus unterzogen, in dem bei 37°C inkubiert wurde, jedoch ohne Zugabe von Glycerol (Lindwall et al., 1984). Hieran schloss sich wiederum eine 75-minütige Zentrifugation bei 75.000g und 30°C an, um den entstandenen Tau-Tubulin-Komplex erneut im Pellet zu erhalten (Lindwall et al., 1984). Dieses Pellet wurde in PM-Puffer, dem zusätzlich NaCl und DTT zugesetzt wurde, resuspendiert (Johnson et al., 1989). Von diesem Zwischenprodukt 3 (ZP3) wurden bei der zweiten Präparation 20% abgenommen und bei -80°C gelagert.

Die Probe wurde im Anschluss daran für 10 Minuten einer Hitzedenaturierung bei 95°C unterzogen, um Fremdproteine auszufällen, die sich dann nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 35.000 g und 4°C im Pellet befanden (Johnson et al., 1989). Vom Überstand wurden 12,5% abgenommen und als Zwischenprodukt 4 (ZP4) bei -80°C gelagert.

Der restliche Überstand wurde mit Ammoniumsulfat (50% Endkonzentration) versetzt (Johnson et al., 1989). Die in der Präparation von Johnson et al. angegebene Fällungszeit von 4 Stunden erwies sich als zu kurz. Fällungsschritte ÜN zeigten eine wesentlich höhere Ausbeute an Tau-Protein. Nach abgeschlossener Fällung wurde die Probe 20 Minuten bei 35.000g und 4°C zentrifugiert und das Pellet in möglichst wenig Assembly-Buffer resuspendiert (Johnson et al., 1989). Zu diesem Zeitpunkt der Präparation waren noch 41% des Ausgangsmaterials vorhanden, was als Zwischenprodukt 5 (ZP5) bei -80°C gelagert wurde.

#### **PM-Puffer**

<u>Komponenten</u>	<u>Menge (g/l)</u>
PIPES	100mM
EGTA	2mM
MgSO <sub>4</sub>	1mM

pH 6,9 mit NaOH einstellen und bei 23°C lagern.

### 2.3 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

#### 10x PBS (phosphat-gepufferte Salzlösung)

Komponenten	Menge (g/l)
NaCl	150mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40,5mM
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,5mM

den pH-Wert der Lösung mit NaOH auf 7,4 einstellen.

#### PBSN (phosphat-gepufferte Salzlösung mit Nonidet P40)

PBS (pH 7,4) + 0,1% NP-40 (Nonidet P40)

#### Acrylamid-Stammlösung (30:0,8)

Komponenten	Zusammensetzung
Acrylamid	30%
N,N-Methylenbisacrylamid	0,8%

Die Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

### Coomassie Brilliant Blue

#### Coomassie-Stammlösung, filtriert

Komponenten	Zusammensetzung
CBB R 250	0,5%
Essigsäure	50%

#### Coomassie-R-250-Färbelösung

Komponenten
1 Teil CBB- Stammlösung
2 Teile Methanol
3 Teile Wasser

#### Entfärber

Komponenten	Zusammensetzung
Essigsäure	10%
Methanol	20%

### 2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proben aus der Total-Tau-Präparation und die fünf Zwischenprodukte aus der Twice-cycled-Tau-Präparation wurden einer Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Bradford-

Methode unterzogen (M.M. Bradford, 1976). Das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G 250 verschiebt sich in einer sauren Lösung von 465 nm (rot) zu 595 nm (blau), nachdem das zu messende Protein gebunden wurde. Dies wird durch die Stabilisation der anionischen Form von Coomassie Brilliant Blue G 250 hervorgerufen, die auf hydrophoben und ionischen Interaktionen mit dem Protein zurückzuführen sind. Der Farbstoff interagiert hauptsächlich mit Arginin-Resten, aber auch in geringerem Maße mit Histidin-, Lysin-, Tyrosin-, Tryptophan- und Phenylalanin-Resten. Für jede Messreihe wurde zunächst eine Eichreihe mit BSA als Standard-Protein und Konzentrationen von 1 bis 25 µg/ml erstellt.

Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 wurde zunächst in Ethanol vollständig gelöst, bevor die konzentrierte Phosphorsäure und das Wasser hinzugefügt wurden. Nach einstündigem Rühren in einer dunklen lichtundurchlässigen Flasche wurde die Lösung für 24 Stunden bei 4°C stehen gelassen. Danach wurde sie durch einen Faltenfilter filtriert und unter Lichtabschluss bei 4°C bis zu 6 Monaten gelagert. Nach Erstellung der BSA-Standardkurve und Abgleichung durch den Leerwert (800µl BSA + 200µl Bradford) konnten die Proteinproben gemessen werden.

### Lösungen für die Proteinbestimmung nach Bradford

#### Bradford-Reagenz

<u>Komponenten</u>	<u>Zusammensetzung</u>
Coomassie Brilliant Blue G 250	0,05%
95 % Ethanol	23,75%
85,5 % H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	42,75%

#### BSA-Stocklösung

<u>Komponenten</u>	<u>Zusammensetzung</u>
BSA (Bovinseralbumin)	0,025%
1x PBS (auffüllen auf 1000 ml)	

### 2.5 Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde die Methode der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidelektrophorese nach Laemmli (1970) angewandt. Bei der Elektrophorese von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen unter den durch SDS hervorgerufenen, denaturierenden Bedingungen (Shapiro et. al., 1967; Weber et. al., 1969) ergibt sich ein lineares Verhältnis zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und der relativen Mobilität der Proteine. Diese Linearität ist aber für eine gegebene Gelkonzentration

limitiert. Die kombinierte Anwendung von SDS und Gelgradienten (Lambin, 1976; Lambin 1978) bietet den Vorteil der Genauigkeit der Molekulargewichtsabschätzung und Reproduzierbarkeit über einen breiteren Bereich (Molekulargewichte zwischen 13k und 1000k bei 3-30%igen Gelen).

Es wurden 8-18%ige, 1mm starke Gradientengele mit Hilfe von Gradientenmischern gegossen. Diese gewährleisten, dass der Gradient von oben nach unten zunimmt. Nach dem Gießen wurde mit Isobutanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erzielen. Das 4% ige Sammelgel wurde immer erst kurz vor dem Start eines Gels gegossen. Die Gele wurden in einer Hoefer SE 600 Elektrophoreseapparatur (16x16x0,1cm) in 1x Probenpuffer ÜN bei 60 Volt gefahren, bis die gewünschte Trennstrecke erreicht war. Als Marker diente der Low-Range-Molekulargewichtsstandard von Bio-Rad (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low-Range, Bio-Rad, Hercules CA).

### Lösungen für die SDS-PAGE

#### 10x Gelelektrophoresepuffer nach Laemmli

Komponenten	Zusammensetzung
Glycin	1,9M
Tris	0,25M
SDS	0,1%

#### 18% Tennngellösung

Komponenten	Zusammensetzung
Acrylamid-Stammlösung	(30:0,8)
1,5M Tris/HCl, pH 8,8	375 mM
10 % SDS	0,1%
Glycerol	12,5%

#### 8% Trenngellösung

Komponenten	Zusammensetzung
Acrylamid-Stammlösung	(30:0,8)
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	375mM
10% SDS	0,1%

#### 4% Sammelgel

Komponenten	Zusammensetzung
Acrylamid-Stammlösung	(30:0,8)
0,5M Tris/HCl pH 6,8	124mM
10% SDS	0,1%

**2x Probenpuffer nach Laemmli**

<u>Komponenten</u>	<u>Zusammensetzung</u>
0,5M Tris/HCl, pH 6,8	125mM
10 SDS	0,14M
Glycerol	20%
DTT	0,2mM
Bromphenol Blue	0,03mM

Der Probenpuffer wurde in 1ml-Portionen aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**2.6 Zweidimensionale Gelelektrophorese**

Die Zweidimensionale Gelelektrophorese hat sich für die Auftrennung komplexer Proteingemische als eine der besten Methoden etabliert (Görg et al.; 1988). Die Proteine werden in der ersten Dimension, der sog. Isoelektrischen Fokussierung, in einem elektrischen Feld nach ihrem isoelektrischen Punkt voneinander getrennt. Hierbei wird im elektrischen Feld unter Verwendung künstlicher Ampholyte ein pH-Gradient im Probenpuffer aufgebaut. In diesem pH-Gradient bewegt sich jedes Proteinmolekül zu der Stelle, die seinem isoelektrischen Punkt entspricht. Im Anschluss daran werden sie in der zweiten Dimension über eine SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Diese Methode erlaubt eine Trennung von mehr als 1000 Proteinen in einem einzelnen Gel. Die Durchführung der Isoelektrischen Fokussierung orientiert sich an der Methode von Görg et al., 1999, sowie an den Hersteller-Angaben des verwendeten IPG-Phor-Gerätes von Amersham Biosciences.

**2.6.1 Isoelektische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten (Erste Dimension)**

Für die Fokussierung wurden Immobilin Dry Strips mit einem immobilisierten pH-Bereich von 3 bis 10 (Immobilin Dry Strips pH 3-10, Amersham Biosciences) verwendet, um bei der komplexen Tau-Probe die größtmögliche Auftrennung über den gesamten pH-Bereich zu erreichen. Die Strips wurden mit der Gelseite nach unten in die bereits mit 250 $\mu\text{l}$  Probenpuffer (in dem Probe, DTT und Ampholyte schon gelöst waren) gefüllten Strip-Holder gelegt und noch einmal auf die Elektroden angedrückt, damit der elektrische Fluss gewährleistet wurde. Danach wurden die Gelstreifen mit je 800 $\mu\text{l}$  IPG Cover Fluid überschichtet, um ein Austrocknen der Strips während der Fokussierung zu verhindern. Dann wurden die Strip-Holder mit einem Plexiglasdeckel verschlossen, der im Bereich der Elektroden Ausbuchtungen aufweist und somit den Gelstreifen während der Fokussierung auf die Elektroden drückt. Die fertig zusammengesetzten Strip-Holder wurden nun auf der

Elektrodenfläche der IPG-Phor so platziert, dass das spitze Ende des Holders mit dem sauren Strip-Ende auf der Kathode und das stumpfe Ende mit dem basischen Strip-Ende auf der Anode liegt. Die Fokussierung erfolgte nach folgendem Programm:

#### **Programm für die Fokussierung**

Rehydration	7	Stunden	
S-1-Phase	8	Stunden	30 Volt
S-2-Phase	1	Stunde	500 Volt
S-3-Phase	1	Stunde	1000 Volt
S-4-Phase	9	Stunden	8000 Volt
S-5-Phase	15	Stunden	1000 Volt

In der 7-stündigen Rehydrationsphase quillt der Gelstreifen auf und die im Probenpuffer gelöste Probe diffundiert in den Gelstreifen ein. Diese Phase wird verlängert durch die sich daran anschließende S-1-Phase, in der die Probe spannungsunterstützt in das Gel einwandern kann. Ohne diesen Schritt könnten die großen Proteine über 100 kDa nicht in das Gel gelangen. In Phase S 2 und S 3 wird die Spannung langsam gesteigert, bis sie in Phase S 4 ihr Maximum erreicht. Dies ist die eigentliche Fokussierungsphase. Die Phase S 5 dient lediglich zur Lagerung der Streifen im Gerät, falls nach Phase 4 nicht direkt weitergearbeitet werden kann. Die angelegte Spannung verhindert, dass die Proteine von ihrem isoelektrischen Punkt wegdiffundieren.

#### **2.6.2 SDS-PAGE im Anschluss an die Isoelektrische Fokussierung (Zweite Dimension)**

Im Anschluss an diese erste Fokussierung wurden die Strips aus den Holdern entfernt und zur Vorbereitung auf die SDS-PAGE in zwei verschiedenen SDS-Equilibrierungspuffern inkubiert. Zunächst wurden sie für 2x7 Minuten in einem SDS-Puffer, dem 1% DTT zugesetzt wurde, gewaschen, um vorhandene Disulfidbrücken zu zerstören. Im zweiten Schritt wurde frischer SDS-Puffer mit 2% Jodacetamid versetzt und die Stripes wiederum 2x7 Minuten darin gewaschen, um die freien Cysteine zu alkylieren, damit die Zerstörung der Disulfidbrücken durch die vorgeschaltete DTT-Behandlung irreversibel wird. Nun wurden die Gelstreifen auf ein 11%-iges SDS-Gel aufgelegt und mit Agarose Sealing Solution luftblasenfrei überschichtet. Die Gele wurden in einer Hoefer SE 600 Elektrophoreseapparatur (16 x 16 x 0,1cm) in 1x Probenpuffer ÜN bei 60 Volt gefahren, bis die gewünschte Trennstrecke erreicht war. Als Marker diente der Low-Range-Molekulargewichtsstandard von Bio-Rad (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, Bio-Rad, Hercules CA).

**Lösungen für die zweidimensionale Fokussierung****Probenpuffer für die Isoelektrische Fokussierung**

Komponenten	Zusammensetzung
Urea	8M
CHAPS	1%
Bromphenolblau	1 kleine Spatelspitze
Vor Gebrauch frisch zugeben:	
Pharmalyte	0,5%
DTT	2mM

**SDS-Equilibrierungspuffer**

Komponenten	Zusammensetzung
Tris/HCl, pH 8,8	1M
Urea	36%
Glycerol (reinst)	30%
SDS	8%
Bromphenolblau	1 kleine Spatelspitze

Vor Equilibrierung Zugabe von

**Puffer 1**

Komponente	Zusammensetzung
DTT	1%

**Puffer 2**

Komponente	Zusammensetzung
Jodacetamid	2%

**Acrylamid-Monomer-Stocklösung**

Acrylamid/Bis-Solution (29:1) von Gibco BRL

**11% Trenngellösung**

Komponenten	Zusammensetzung
Acrylamid-Monomer-Stocklösung	(29:1)
Tris/HCl, pH 8,8	1M
H <sub>2</sub> O dest.	50,5g
SDS	1%

**Agarose Sealing Solution**

Komponenten	Zusammensetzung
5x Elektrophoresepuffer	20%
Agarose	1,5g
Bromphenolblau	eine kleine Spatelspitze

vor Gebrauch in der Mikrowelle verflüssigen

**5x Elektrophoresepuffer**

Komponenten	Zusammensetzung
Glycin	1,9M
Tris	0,25M
SDS	0,1%

**2.7 Färbung von SDS-Gelen**

Bei der Färbung von Proteingelen wurde darauf geachtet, dass das Färbeprotokoll kompatibel mit der anschließenden Analyse im Massenspektrometer ist.

**2.7.1 Silberfärbung**

Mit Hilfe der Silberfärbung nach Heukeshoven & Dernick (1989) kann unter optimalen Bedingungen bis zu 1 ng Protein pro Bande nachgewiesen werden, wobei jedoch die Intensität der einzelnen Spots keinen Aufschluss über die jeweilige Proteinmenge gibt. Dies ist darin begründet, dass das  $\text{Ag}^+$ -Ion-Komplexe mit den Glutamin-, Asparagin- und Cystein-Resten der Proteine bildet und sich somit an Proteine, die reich an diesen Aminosäuren sind, verstärkt anlagert. Alkalisches Formaldehyd reduziert dann in der Färbereaktion das  $\text{Ag}^+$  zu Ag.

**Färbeprotokoll**

		Konzentration der Komponenten
	<u>Zeitangaben</u>	
Fixierer I :	50% Methanol, 5% Essigsäure	für mind. 20 min.
Fixierer II:	50% Methanol	2x10 min.
Waschen	H <sub>2</sub> O dest.	10 min.
Oxidieren	0,02% Natriumthiosulfat	1 min.
Waschen	H <sub>2</sub> O dest.	3x20 sec.
Färben	0,2% Silbernitrat	20 min.
Waschen	H <sub>2</sub> O dest.	3x20 sec.
Entwickeln	3% Natriumcarbonat, 0,02% Formaldehyd, 0,0005% Natriumthiosulfat	5-10 min.
Waschen	H <sub>2</sub> O dest.	3x20 sec.
Stoppen	5% Essigsäure	5 min.
Lagerung	1% Essigsäure	bei 4°C

### 2.7.2 Coomassiefärbung

Eine weniger empfindliche Gelfärbung ist die Coomassie-Färbung (200-400ng). Hierzu wird das Gel in der Coomassie-Färbelösung für mind. 2 Stunden bei Raumtemperatur gefärbt (Chrambach et al., 1967; Weber et al., 1969). Anschließend muss ca. 2-3 Stunden entfärbt werden, bis der Hintergrund klar ist. Die Proteine werden bei dieser Art der Färbung zeitgleich fixiert und gefärbt.

Diese Färbung ist im Gegensatz zur Silberfärbung quantitativ.

### 2.8 Western-Blot (semi-dry)

Das Western-blotting erfolgte nach der semi-dry-Methode nach Khyse-Anderson (1984). Es handelt sich um einen Elektroblot, der den Vorteil bietet, dass die durch das SDS negativ geladenen Proteine durch ein angelegtes elektrisches Feld beschleunigt werden und der Transfer so in wesentlich kürzerer Zeit als mit anderen Blottechniken (z.B. einem Saugblot) erfolgen kann. Der Aufbau eines Western-Blots ist in Abbildung 2.5 dargestellt.

Die Blotkammer besteht aus zwei als Elektroden dienenden Graphitplatten, zwischen denen das Gel direkt auf der Membran aufliegt und beides von in Puffer getränkten Filterpapieren umgeben ist. Dieser Aufbau bewirkt, dass das elektrische Feld direkt senkrecht auf der Gelfläche steht und ein 1:1 Abdruck des Proteinbandenmusters auf der Membran entsteht. Die Proteine auf der Membran lassen sich mit Ponceau S reversibel anfärben. Die Nachweisgrenze für Ponceau S liegt bei ca. 50 ng pro Proteinbande.

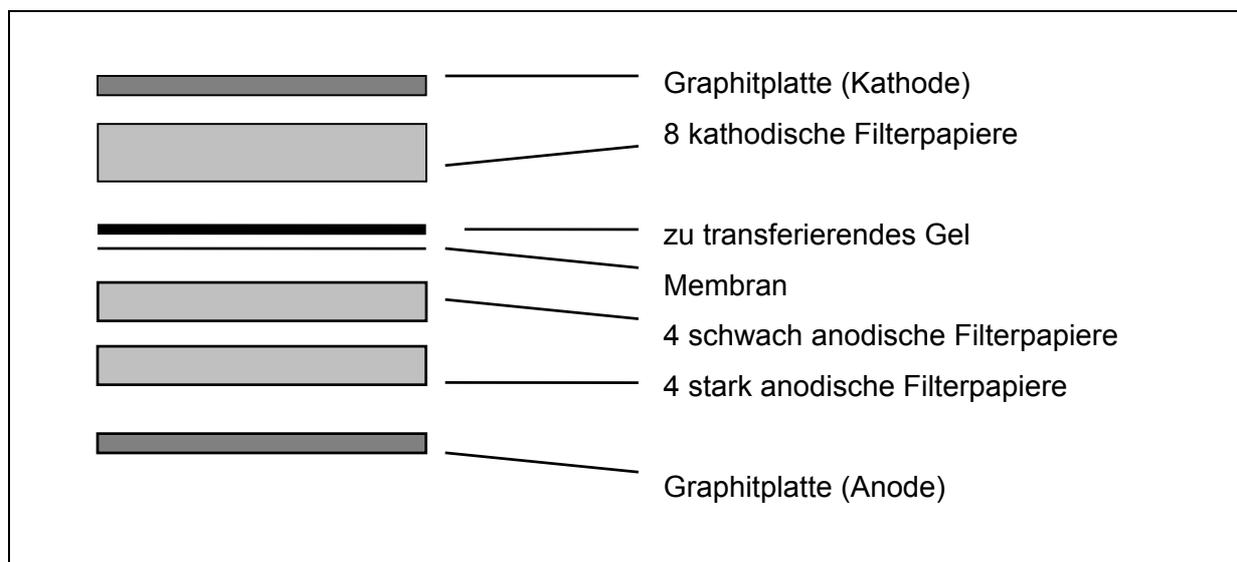


Abbildung 2.5: Aufbau einer Wester-Blot-Apparatur

## Lösungen für den Western-Blot

### Anodenpuffer, stark

Komponenten	Zusammensetzung
2M Tris/Cl	0,3M
Methanol	20%

### Anodenpuffer, schwach

Komponenten	Zusammensetzung
2M Tris/Cl	25mM
Methanol	20%

### Kathodenpuffer

Komponenten	Zusammensetzung
$\epsilon$ - Aminocaprinsäure	40mM
Methanol	20%

### Ponceau S- Färbelösung (Konzentrat)

Komponenten	Zusammensetzung
Ponceau S	0,2%
TCA	3%
Sulfosalicylsäure	3%

Ponceau S wurde lediglich mit Wasser wieder aus der Membran ausgewaschen.

## 2.9 Immunumsetzung

### 2.9.1 Anti-Tau-Antikörper-Umsetzung

Das geblottete Tau-Protein wurde zur genauen Lokalisation auf der Membran und Charakterisierung der einzelnen Isoformen einer Immunumsetzung unterzogen. Hierzu wurde die Membran zunächst mit einer Lösung aus 0,1% BSA und 10,1% NP40 über 15 Minuten blockiert, um freie Membranbindungsstellen abzudecken. Anschließend wurde 2x5 Minuten mit PBSN gewaschen. Dann wurde der geblockte Blot zuerst mit einem Anti-Tau-Antikörper in der Verdünnung von 1:1000 (Monoclonal Anti-Tau Clone Tau-2 Antikörper, Sigma) für 2 Stunden inkubiert.

Im Anschluss daran wurde 2x für 5 Minuten in PBSN gewaschen, um möglicherweise ungebundene Anti-Tau-Antikörper wegzuwaschen. Nun wurde der Blot für 1 Stunde mit dem

Zweit-Antikörper (Anti-Mouse IgG, Fc-specific, Peroxidase Conjugated, Sigma) in der Verdünnung 1:10.000 inkubiert. Dieser Antikörper reagiert unspezifisch mit dem gesamten gebundenen IgG. Nach weiterem Waschen mit PBS wurde der Blot mit Hilfe der Peroxidase-Markierung des Zweit-Antikörpers entwickelt und damit die Position des Tau-Proteins sichtbar gemacht. Für die Entwicklung wurden 10mg Diaminobenzidin (DAB) in 500µl Dimethylformamid gelöst und sogleich in 15 ml PBS verdünnt. Durch Zugabe von 50µl Wasserstoffperoxid wurde die Oxidationsreaktion der Peroxidase mit seinem DAB-Substrat ausgelöst. Nach wenigen Minuten wurde im Bereich der Proteinbanden eine bräunlich-rote Färbung sichtbar.

### 2.9.2 Lektin-Umsetzung

Lektine sind Proteine, die reversibel Mono- oder Polysaccharide oder die Zuckerreste von Glykoproteinen binden. Lektine unterscheiden sich in ihrer Zuckerspezifität, ihrem Aufbau und in den Cofaktoren, die für die Bindung des Zuckers notwendig sind. Für die Umsetzung eines Blots wurde hauptsächlich das peroxidasegekoppelte Weizenkeim-Agglutinin (WGA, Sigma), zum Teil aber auch Concanavalin A (Con A, Sigma), verwendet. WGA-Lektin hat eine Affinität zur N-Acetyl-Glucosamin und N-Acetyl-Galactosamin, wohingegen Con A terminale  $\alpha$ -D-Mannose und  $\alpha$ -D-Glucose bindet. Bei der Lektin-Umsetzung spiegelt die Stärke der gefärbten Banden die Konzentrationsstärke wider.

Für die Lektin-Umsetzung wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf dem Blot für 15 Minuten mit Blockierer abgesättigt. Dann wurde 2x für 5 Minuten mit PBSN gewaschen und im Anschluss daran der Blot mit lektin-gebundener Peroxidase in der Verdünnung 1:1000 für 2 Stunden bei Raumtemperatur in PBSN inkubiert. Bei der Verwendung von Con A muss die gesamte Reaktion bei pH 6,8 durchgeführt werden und PBSN zusätzlich  $Mn^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  in der Konzentration von jeweils 1mg/ml zugesetzt werden. Nach weiterem Waschen mit PBS konnte der Blot mit Hilfe der Peroxidase-Markierung entwickelt und damit die Position der zucker-gebundenen Proteine sichtbar gemacht werden.

Für die Entwicklung wurden 10mg Diaminobenzidin (DAB) in 500µl Dimethylformamid gelöst und sogleich in 15ml PBS verdünnt. Durch Zugabe von 50µl Wasserstoffperoxid wurde die Oxidationsreaktion der Peroxidase mit seinem DAB-Substrat ausgelöst. Nach wenigen Minuten wurde eine bräunlich-rote Färbung im Bereich der Proteinbanden sichtbar.

## Lösungen für die Immunumsetzung

### Blockierer

Komponenten	Zusammensetzung
BSA	0,2%
NP-40	10%
PBSN (PBS + 0,1% NP-40)	89,8%

### 2.10 Lektin-Chromatographie auf Peptid-Ebene

Mit Hilfe der Auftrennung der Tau-Präparationen über eine selbst gebaute Mini-Lektinsäule wurde versucht, glykosylierte Peptide aufzureinigen und aufzukonzentrieren. Die Mini-Lektinsäule wurde im Rahmen meiner Arbeit entwickelt und auf Reproduzierbarkeit getestet. In einer 10µl Pipettenspitze wurde ein Säulenbett aus 40µl WGA-Lektin-gebundenen Agarose-beads (4% Agarose, Sigma) errichtet, auf das die Probe in 10µl-Potionen aufgetropft und mit Hilfe einer 10µl-Pipette sehr langsam durchgedrückt wurde. Dann wurde mit PBS gewaschen und danach mit 0,1M löslichem GlcNAc (Sigma) eluiert. Bei der Elution werden die zuckergebundenen Peptide kompetitiv von einem Überschuss an GlcNAc von den Lektinbindungsplätzen verdrängt. Im Anschluss daran wurde das Probenvolumen an der Speed-Vac bis auf wenige µl eingengt.

### 2.11 Lektin-Batch-Verfahren

Alternativ zur Mini-Lektinsäule wurde mit Hilfe des Lektin-Batch-Verfahrens versucht, glykosylierte Peptide aus einer komplexen Mischung zu isolieren und anzureichern. Hierzu wurde das Peptidgemisch im Eppendorfgefäß mit WGA-Lektin-gebundenen Agarose-beads (Sigma, 4% Agarose) für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Danach wurde kurz abzentrifugiert und der Überstand – in dem sich nur ungebundenes, unglykosyliertes Peptid befinden sollte – abgenommen. Nun wurde 2x mit PBSN gewaschen und anschließend mit 0,1M GlcNAc eluiert und der Überstand nach dem Abzentrifugieren aufgehoben. Bei der Elution werden durch kompetitive Verdrängung mit 0,1M GlcNAc die glykosylierten Peptide von ihren Bindungsstellen freigesetzt. Der Elutionsvorgang wurde 3x wiederholt, um sicherzustellen, dass sich alle glykosylierten Peptide im Überstand befinden. Durch spezielle Dialysemembranen (Slide-A-Lyzer Mini Dialysis Units, Perbio) wurde versucht, das zur Verdrängung eingesetzte GlcNAc von der restlichen Probe zu trennen.

### 2.12 Dot-Blot

Der Dot-Blot bietet die Möglichkeit des schnellen Antigenaufzuges auf eine Membran. Hierfür wurde ausschließlich Nitrocellulose (Schleicher & Schüll) verwendet. Die Protein- oder Peptidlösung wurde von Hand aufgespottet, wobei jedoch nie mehr als 2µl Probenvolumen auf einmal auf die Membran aufgegeben wurden. Bei größeren Probenvolumen von mehr als 2µl wurde mehrfach mit dazwischengeschalteten Trockenphasen aufgespottet. Die verwendete Porengröße von 0,2µm hat den Vorteil, dass auch Peptide gut haften bleiben. Die Detektion erfolgte durch immunologischen Nachweis.

### 2.13. Entsalzen/Umpuffern mit Centrikons

Eine Methode des Entsalzens bzw. Umpufferns einer Lösung ist die Verwendung von Centrikons (Amikon, cut off 30kDa). Hierbei wurde die Probe durch Zentrifugalkraft (max. 5000g) durch eine Membran mit einer bestimmten Porengröße (30kDa) gedrückt. Alle Proteine, die nicht durch die Poren der Membran in den Abfallbehälter gedrückt wurden, konzentrierten sich oberhalb der Membran auf. Nun konnte die Probe mit einem anderem Puffer (Ammoniumhydrogencarbonat oder PBS) versetzt und durch erneutes Zentrifugieren gewaschen werden. Anschließend wurde auf den Mikrokonzentrator ein Auffanggefäß gesetzt, der Abfallbehälter abgenommen und die ganze Einheit um 180° gedreht. In dieser Position erfolgte die letzte Zentrifugation bei 1000g für 5 Minuten, wodurch die an der Membran haftenden Proteine abgelöst wurden und sich im Auffanggefäß sammelten. Diese umpufferte/entsalzte Probe wurde gefriertrocknet.

### 2.14 Tryptischer In-Lösung-Verdau

Die Proteine wurde für die massenspektrometrische Analyse tryptisch verdaut (Sequencing Grade Modified Trypsin from bovine, Promega). Trypsin spaltet Proteine an der carboxyterminalen Seite von Lysin- und Argininresten. Arginin-Prolin bzw. Lysin-Prolin Stellen sind trypsinresistent. Auch greift Trypsin Peptidbindungen zwischen einer basischen Aminosäure (Lysin, Arginin) und einer sauren Aminosäure (Glutamin, Asparagin) nur langsam an.

Der tryptische In-Lösung-Verdau wurde in einem 25 mM Ammonium-Hydrogencarbonat Puffer pH 8,0 bei 37°C für 5 Stunden durchgeführt. Es wurde jeweils 1/5 der Proteinmenge an Trypsin eingesetzt. Zum Stoppen der Reaktion wurde für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um das Enzym zu zerstören. Im Anschluss daran wurde die Probe gefriertrocknet.

### 2.15 Dephosphorylierung

Zur Dephosphorylierung wurde die Alkalische Phosphatase (AP) von Sigma verwendet. In einem Tris/MgCl<sub>2</sub>-Puffer wurde 1/10 der Proteinmenge an AP eingesetzt und für 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde für 5 Minuten auf 95°C erhitzt, um das Enzym zu zerstören. Im Anschluss daran wurde die Probe gefriertrocknet.

### 2.16 Deglykosylierung durch N-Glykosidasen

Durch die Deglykosylierung mittels N-Glykosidasen werden N-glykosidisch gebundene Zucker direkt vom Asparaginrest abgedaut, der dabei zur Asparaginsäure umgesetzt wird. Es wurden zwei verschiedene N-Glykosidasen verwendet. Die N-Glykosidase F (Roche) – auch als PNGase F bezeichnet – spaltet alle Typen asparagingebundener N-Glykanketten, vorausgesetzt, dass sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe in peptidischer Bindung vorliegen. Die N-Glykosidase A (Roche) – auch PNGase A genannt – hat die gleichen Eigenschaften und besitzt zusätzlich noch die Fähigkeit, N-glykosidisch gebundene Kohlenhydratketten zu spalten, die einen  $\alpha(1-3)$ -gebundenen Fucoserest am Asparagin-GlcNAc tragen.

Die beiden Enzyme wurden nacheinander eingesetzt, da sie bei unterschiedlichen Pufferbedingungen arbeiten. Zuerst wurde mit PNGase A abgedaut in einem 100mM Citrat-Phosphat-Puffer pH 5,0 für 3 Stunden bei 37°C. Es wurden pro 20  $\mu$ g Peptidmenge 1 U Enzym eingesetzt. Zum Stoppen der Reaktion wurde für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Im Anschluss daran wurde die Probe gefriertrocknet. Im zweiten Schritt wurde mit PNGase F abgedaut, wobei hier in einem 50mM Natrium-Phosphat-Puffer pH 8,0 für 3 Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Auch hier wurden pro 20  $\mu$ g Peptid 1 U Enzym eingesetzt. Zum Stoppen der Reaktion wurde wiederum für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Im Anschluss daran wurde die Probe erneut an der Lyophylle gefriertrocknet.

### 2.17 Perchlorsäure-Fällung

Die Perchlorsäure-Fällung bietet für das Arbeiten mit glykosyliertem Tau-Protein zwei wesentliche Vorteile. Zum einen wird Tau aufgrund seiner fehlenden Sekundärstruktur nicht ausgefällt und verbleibt im Überstand, was eine Trennung von einer großen Anzahl

Fremdproteinen ermöglicht, und zum anderen ist sie nicht so stark sauer, dass die Zuckerreste von den Proteinen abgespalten werden. Es wurde 2,5% v/w (= 0,38M) Perchlorsäure (PCA) zur Fällung eingesetzt und das PCA-Proteingemisch mit 0,1xPBS auf ein Endvolumen von 200µl aufgefüllt. Die Probe wurde 10 Minuten auf Eis stehen gelassen und danach bei 50.000g für 10 Minuten bei 4°C abzentrifugiert.

Der Tau-haltige Überstand wurde abgenommen und neutralisiert. Dazu wurden 200µl 1xPBS und 150µl 0,38M NaOH zugegeben und danach der pH mittels pH-Papier getestet, wobei sich jetzt der pH-Wert meist zwischen 5 und 7 bewegte. Die Umpufferung der Probe auf 0,1xPBS erfolgte mittels Centrikon. Anschließend wurde sie gefriertrocknet.

## 2.18. Chromatographische Methoden

Für alle chromatographischen Trennungen wurden die verwendeten Lösungsmittel vor ihrer Benutzung entgast.

### 2.18.1 Größenausschluss-Chromatographie

Mit der Größenausschluss-Chromatographie (**Size-Exclusion-Chromatography**, SEC) werden Proteine nach ihrer Größe getrennt. Das verwendete Säulenmaterial besteht aus porösen Kügelchen. Große Moleküle können nicht in die Poren dieser Kügelchen eindiffundieren und werden deshalb schneller durch die Säule hindurchtransportiert und somit weniger stark verzögert als kleine Moleküle.

Im Gegensatz zur Gelelektrophorese ist eine Denaturierung nicht erforderlich, so dass auch nicht-kovalente Wechselwirkungen erhalten bleiben. Es wurde eine FPLC (**Fast-Performance-Liquid-Chromatography**)-Anlage (Pharmacia LKB) verwendet. Als Säule wurde eine XK26/40 von Pharmacia benutzt und mit Sephadex-Material (Bio Gel 1,5 m fine, BioRad) unter Fluss selber gepackt.

Mit ihr wurde die Reinigung der Total-Tau-Präparation durchgeführt. Als Puffer wurde ausschließlich Assembly-Buffer benutzt, dem zuvor zusätzlich 750mM NaCl<sub>2</sub> und 2mM DTT zugesetzt wurden. Der gesamte Lauf dauert 180 Minuten und wurde mit einer Flussrate von 1ml/min durchgeführt. Die Fraktionierung erfolgte nach Zeit im Abstand von 3 Minuten.

## **2.18.2 Reversed-Phase-Chromatographie**

### **2.18.2.1 Peptidreinigung über eine analytische Säule**

Zur Reinigung von nativen Tau-Proteinen aus der Total-Tau- und der Twice-cycled-Tau-Präparation wurde eine Beckmann-HPLC mit einer analytischen Säule (Jupiter 5 $\mu$  C<sub>5</sub> 300A, 30x4,60 mm, Phenomenex) verwendet. Die Detektion erfolgte bei 230 nm. Es wurde ein Gradient von 5-95% Acetonitril mit einer Steigung von 0,1% pro Minute über 90 Minuten gefahren. Es wurde von Hand nach Peaks fraktioniert. Die erhaltenen Fraktionen wurden gefriertrocknet.

### **2.18.2.2 Peptidreinigung über eine semi-präparative Säule**

Zur Trennung von großen Mengen an synthetisch hergestellten Tau-Peptiden wurde eine Beckmann-HPLC (System Gold) mit einer semi-präparativen Säule (Jupiter 5 $\mu$  C<sub>18</sub> 300A, 250x10 mm, Phenomenex) verwendet. Es wurde ein Gradient von 5-65% Acetonitril in einer Zeit von 40 min. gefahren. Detektiert wurde bei 230 nm. Es wurde ebenfalls von Hand nach Peaks fraktioniert. Die erhaltenen Fraktionen wurden gefriertrocknet.

## **2.19 Peptidsynthese**

Die Peptidsynthese wurde im Peptid-Synthesizer (ABI-433A) nach der Fmoc/tert-Butyl-Schutzgruppen Strategie durchgeführt. Es wurden glykosylierte und unglykosylierte Peptide hergestellt, die in Tabelle 3 zusammengefasst sind. Die glykosylierte Aminosäure wurde von Hand gekoppelt. Danach wurde das Peptid wie gewohnt weitersynthetisiert. Die synthetischen Peptide wurden massenspektrometrisch mittels MALDI-MS überprüft.



Die durch den Laserpuls erzeugten Ionen werden in der Quelle beschleunigt und durchlaufen nach dem Verlassen der Quelle eine feldfreie Flugstrecke von etwa 1-2 Metern. Hier separieren sie sich aufgrund ihrer Geschwindigkeit nach ihrem Masse/Ladungs-(m/z)-Verhältnis. Das Verhältnis von Masse zu Ladung ist dem Quadrat der Flugzeit proportional, d.h. die schwereren Ionen mit einem großen m/z-Verhältnis erreichen den Detektor zu einem späteren Zeitpunkt als die leichteren Ionen.

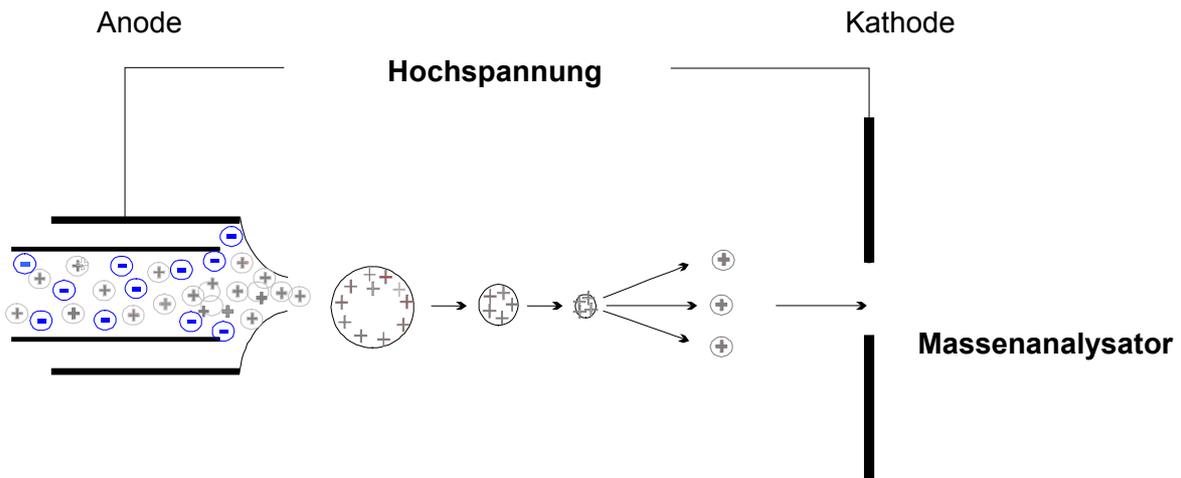
### 2.20.2 ESI-Massenspektrometrie

Bei der ESI-Methode (Fenn et al., 1989) werden die Proteine nicht durch Einbau in eine verdampfbare Matrix, sondern durch Versprühen der Proteinlösung in feinste Tröpfchen in die Gasphase überführt. Zugesezte Säuren dienen zur Ionisierung der Analyten, organische Lösungsmittel werden zur Verbesserung der Sprayeigenschaften eingesetzt.

Die von Mann und Wilm entwickelte Nanospray-ESI-Methode erlaubt die Untersuchung geringster Probenvolumina (minimal 0,5 µl) bei gleichzeitiger erhöhter Empfindlichkeit (Wilm et al, 1996; Wilm et al., 1994).

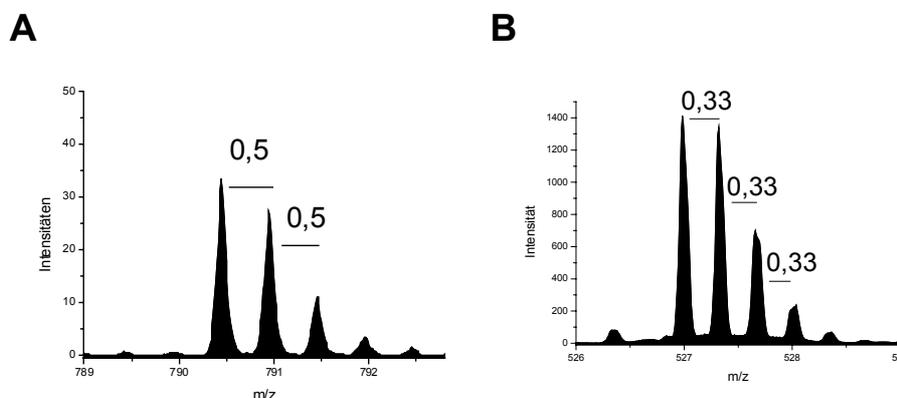
Die Probe befindet sich dabei in einer dünnen Glaskapillare (Nadel), die mit Metall bedampft ist. Zwischen Metallschicht und dem Einlass (Quelle) des Massenspektrometers wird eine Spannung angelegt.

Im so genannten Positiv-Mode werden dabei negative Ionen an der Anode entladen, während positive sich am Meniskus sammeln. Dieser wird destabilisiert und ein Nebel aus feinen Tröpfchen entsteht. Durch Verdunstung des Lösungsmittels werden diese Tröpfchen immer kleiner und die Ladungsdichte nimmt zu, bis schließlich einzelne Gasphase-Ionen entstehen. Wegen der elektrostatischen Abstoßung zerplatzen die Tröpfchen (Coulomb-Explosionen) und es entstehen – im Gegensatz zum MALDI - mehrfach geladene Peptidionen.



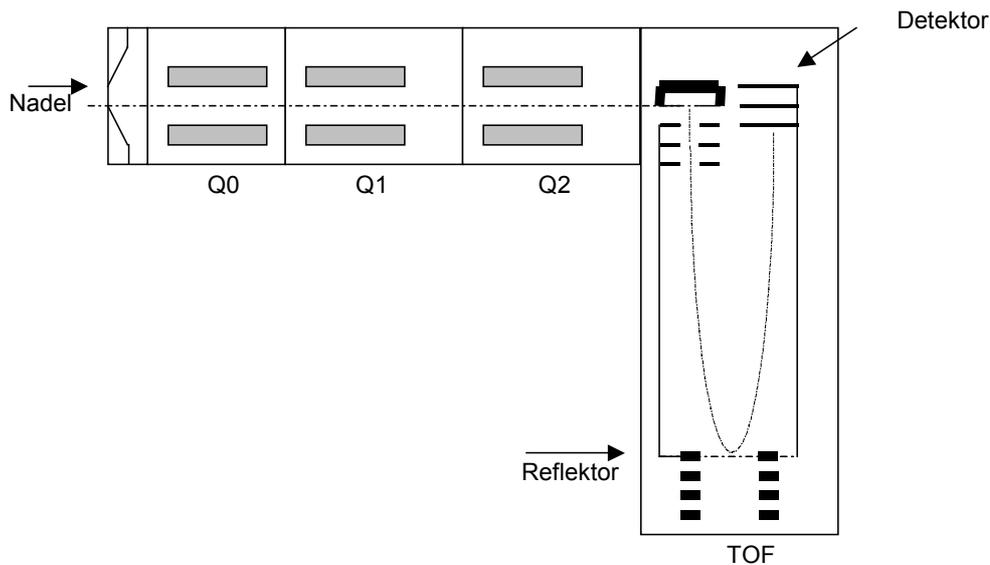
**Abbildung 2.6:** Schematische Darstellung des Elektrospray-Mechanismus.

Aus einzelnen Molekülarten können deshalb mehrere Peaks mit unterschiedlicher Ladung entstehen. Die Ladungen können aufgrund des Isotopenmusters bestimmt werden. Natürlich vorkommende schwerere Isotope der einzelnen Elemente sind in statistischer Verteilung in die Analytmoleküle eingebaut. Als monoisotopische Masse eines Elements oder Moleküls bezeichnet man die Masse des leichtesten Isotops. Als Element mit dem natürlich vorkommenden schweren Isotop ist bei Proteinen vor allem  $^{13}\text{C}$  von Bedeutung. Bei Messung der Masse eines Peptids bekommt man also ein Signal für die Monoisotopische Masse +1 (Einbau eines  $^{13}\text{C}$ -Atoms) usw. Im Spektrum ist der Massenunterschied von einer Masse sichtbar. Aus der Massendifferenz zwischen den Peaks für die einzelnen Isotope lässt sich die Ladung berechnen: So beträgt sie für ein doppelt geladenes  $(M+2H)^{2+}$ -Ion  $\frac{1}{2}=0,5$ , für ein dreifach geladenes  $(M+3H)^{3+}$  dagegen  $\frac{1}{3}=0,33$ . Bei Proteinen gilt dabei, dass bis zu einem Molekulargewicht von 1500 Da das monoisotopische Signal am stärksten ist, bei größeren Massen dagegen schwerere Isotope überwiegen (Johnsson, 2001).



**Abbildung 2.7:** Darstellung mehrfach geladener Ionen. A zeigt ein doppelt geladenes Ion, B zeigt ein dreifach geladenes Ion.

Alle ESI-MS-Messungen wurden mit einem ESI-QqTOF (Q-Star Pulsar I, Applied Biosystems) ausgestattet mit einer Nanospray-Ionenquelle durchgeführt (siehe Abbildung 2.8). Dieses Massenspektrometer besteht aus einer Ionenquelle, drei Quadrupolen - Q0, Q1, Q2 und einem TOF - und einem Detektor. Quadrupol Q1 dient hier nur als Massenanalysator im eigentlichen Sinne, während Q0 und Q2 hauptsächlich dazu dienen, den Ionenstrom durch das Gerät zu stabilisieren. Hinter Q1 befindet sich die Kollisionszelle Q2. Als dritter Massenanalysator dient ein orthogonales TOF.

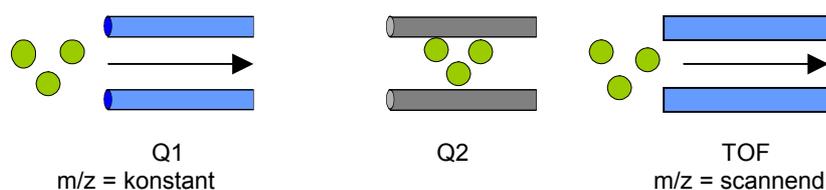


**Abbildung 2.8:** Darstellung des Q-Star Pulsar I bestehend aus einer Ionenquelle, drei Quadrupolen – Q0, Q1, Q2 - und einem orthogonalen TOF mit Detektor.

### 2.20.3 Scan-Modi im ESI-MS

#### 2.20.3.1 TOF-MS

Bei der Aufnahme eines Übersichtsspektrums eines Peptidgemisches werden Quadrupole und Kollisionszelle so geschaltet, dass sie die Ionen auf einer stabilen Flugbahn halten und die eigentliche Massenanalyse im TOF erfolgt.

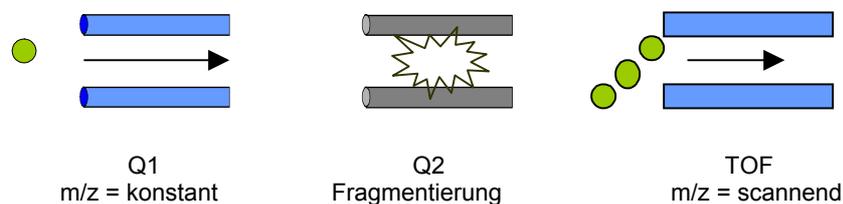


**Abbildung 2.9:** Schematische Darstellung des ESI-MS-Modus.

### 2.20.3.2 Product-Ion-Scan - MS/MS-Modus

Bei der ESI-MS-Messung dient Q1 zur Selektion einzelner Ionen einer bestimmten Masse (Product Ion) aus komplexen Substanzgemischen.

Die selektierte Masse fliegt weiter in Quadrupol Q2, der Kollisionszelle. Hier erfolgt eine stoßinduzierte Fragmentierung mit Stickstoff ( $N_2$ ) als Stoßgas. Die entstandenen Fragmente werden dann vom TOF-Analysator nach ihrem  $m/z$ -Verhältnis getrennt (MS/MS-Analyse).



**Abbildung 2.10:** Schematische Darstellung des MS/MS-Modus.

Möchte man im Product-Ion Modus nur eine bestimmte Masse ohne ihre verschiedenen natürlichen Isotope selektieren, so bedient man sich hierbei der Resolution-Einstellung am Q1.

Bei dieser Einstellung wird das Eintrittsfenster der zu selektierenden Masse in das Gerät von der Low-Resolution- über die Unit-Resolution- bis hin zur High-Resolution-Einstellung immer kleiner.

Die Low-Resolution-Einstellung wird standardmäßig im MS/MS-Modus verwendet. Hierbei werden alle Isotope einer bestimmten Masse zur MS/MS-Analyse zugelassen.

Die Unit-Resolution-Einstellung ist in der Lage, eine „mass unit“ zu selektieren. Dies bedeutet, dass für ein einfach geladenes Peptid nur ein Isotop selektiert wird, für ein doppelt geladenes Peptid zwei Isotope - also eine Masseneinheit - usw.

In der High-Resolution-Einstellung ist es möglich, jedes beliebige Isotop einzeln zu selektieren und dieses im MS/MS-Modus zu analysieren.

### 2.20.3.3 Precursor-Ion-Scan

Das ESI bietet im sog. Precursor-Ion-Scan-Modus die Möglichkeit zur Identifizierung von Modifikationen. Dazu wird die Masse der Modifikation als Selektionsgröße für das TOF

angegeben. Der Q1 steht im scannenden Modus, so dass nach und nach alle Ionen zur Fragmentierung in die Kollisionszelle überführt werden. Der zweite Quadrupol Q2 ist so geschaltet, dass nur die Masse der Modifikation zum TOF und Detektor durchgelassen wird. Das TOF ist mit dem Q1 so gekoppelt, dass dem Signal der Modifikation im TOF eine Precursor-Masse, die zu diesem Signal geführt hat, zugeordnet werden kann.

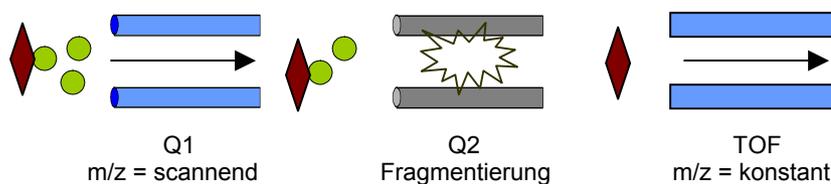
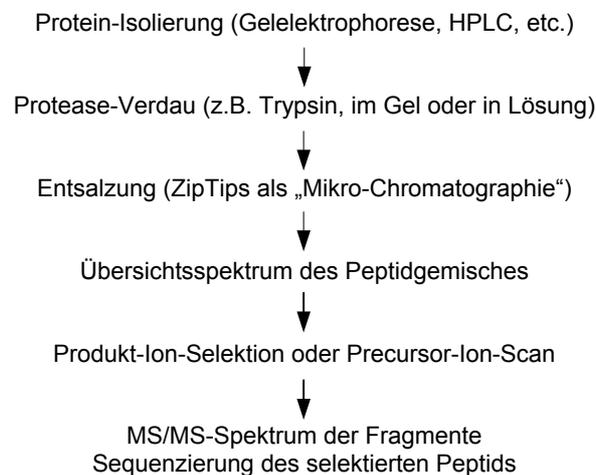


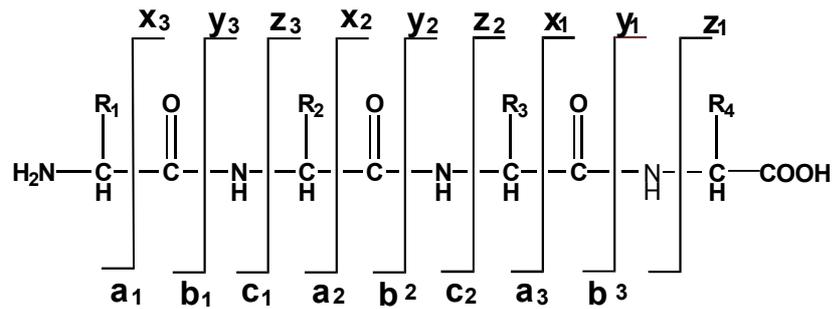
Abbildung 2.11: Schematische Darstellung des Precursor-Ion-Scans.

#### 2.20.4 Sequenzierung von Proteinen und Peptiden mittels ESI-Massenspektrometrie

Die Sequenzierung von Proteinen/Peptiden mittels ESI kann folgendermaßen ablaufen:



Bei der Fragmentierung in der Kollisionszelle können unterschiedliche Fragmentationen entstehen. Peptid-Ionen fragmentieren hauptsächlich an der Peptidbindung entlang des Rückgrades. Ist die Ladung am C-Terminus lokalisiert, spricht man von einem y-Fragment, ist sie am N-Terminus lokalisiert, von einem b-Fragment. Die Benennung orientiert sich an Roepstorff (1984) und Johnson et al. (1988).



**Abbildung 2.12:** Schematische Darstellung des Fragmentierungsverhaltens von Peptiden nach Roepsdorf und Johnson.

Der Massenabstand zwischen zwei Fragment-Ionen der gleichen Serie entspricht einer spezifischen Aminosäure. Aminosäuren mit basischen Seitenketten wie Arginin oder Lysin können je nach ihrer Position im Peptid die Art der Fragment-Serie bestimmen. Sind sie in der Nähe des N-Terminus lokalisiert, wird das Spektrum im allgemeinen von einer b-Serie dominiert. Befinden sie sich in der Nähe des C-Terminus, so dominieren die y-Fragmente. Peptide, die durch einen tryptischen Verdau entstehen, werden fast immer von einer y-Serie dominiert, da sie C-terminal ein Arginin oder Lysin besitzen.

### 3. Ergebnisse

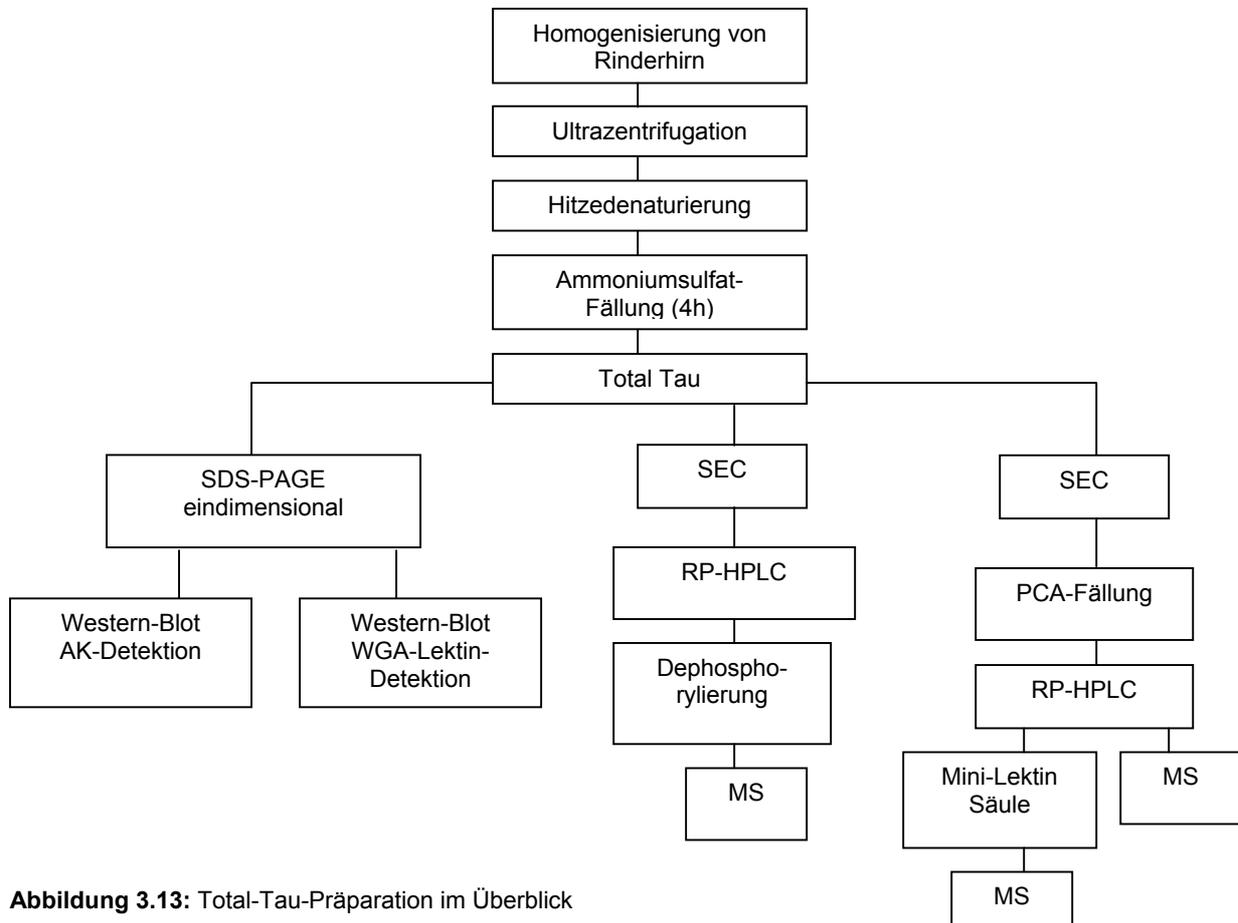
Das Tau-Protein in stark glykosylierter und hyperphosphorylierter Form ist neben dem Amyloid  $\beta$  Peptid (A $\beta$ ) ursächlich an der Entstehung der Alzheimer Demenz beteiligt. Ziel meiner Arbeit war es, die Glykosylierungsstellen am Tau-Protein mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Hierzu bot sich das bovine Tau mit seiner hohen Homologie zum menschlichen Tau-Protein als Modell an. Das bovine Tau weist 12 O-Glykosylierungsstellen (Arnold et al., 1996) und drei potentielle, auf Sequenzmotiven beruhende N-Glykosylierungsstellen auf. Die genauen Aminosäurepositionen, an denen das Tau-Protein glykosyliert wird, konnten bisher noch nicht nachgewiesen werden. Es wird jedoch angenommen, dass Phosphorylierungen und O-Glykosylierungen an den gleichen Aminosäuren stattfinden und dass sich die verschiedenen Modifikationen in einem dynamischen Prozess gegenseitig ersetzen (Johnson et al., 1996). Durch die (massenspektrometrische) Identifikation von Glykosylierungsstellen in der Aminosäuresequenz von normalem und PHF-Tau könnten durch deren Vergleich Hinweise auf die AD-spezifischen O- und N-Glykosylierungsstellen erhalten werden.

Durch die Komplexität des Tau-Proteins, hervorgerufen durch seine verschiedenen Isoformen und dem hohen Modifikationsgrad, war es sinnvoll, Tau auf zwei unterschiedliche Arten aus bovinem Hirn aufzuarbeiten. Dazu wurden die Total-Tau-Präparation und die Twice-cycled-Tau-Präparation ausgewählt.

#### 3.1 Total-Tau-Präparation

Bei der Total-Tau-Präparation wurde Wert auf den Erhalt des vollständigen komplexen Taugehaltes des Gehirns gelegt, was jedoch auch eine starke Verunreinigung der Probe mit Fremdproteinen zur Folge hat. Als einziger grober Vorreinigungsschritt nach der Homogenisierung des Rinderhirns und anschließender Ultrazentrifugation wurde eine Hitzedenaturierung durchgeführt, die die native Konformation vieler Fremdproteine zerstört und diese dadurch ausfallen lässt. Im Anschluss daran wurde ein Grossteil der verbliebenen Fremdproteine mit der nativen Ammoniumsulfatfällung vom Tau-Protein abgetrennt, das aufgrund fehlender Sekundärstruktur im Überstand verblieb. Es sollte mit dieser Präparation versucht werden, aus dem gesamten, mit Fremdprotein verunreinigten Tau-Gehalt eines Rinderhirns über verschiedene chromatographische Methoden, die teilweise auch mit anderen Aufreinigungsschritten kombiniert wurden, glykosyliertes reines Tau zu erhalten, das massenspektrometrisch charakterisiert werden kann.

Das aus der Präparation erhaltene Tau - hier als Total-Tau bezeichnet - wurde im Anschluss an die Präparation auf drei Arten weiter charakterisiert. Die Präparationsschritte und die drei Wege der weiteren Charakterisierung sind in Abbildung 3.13 dargestellt.



**Abbildung 3.13:** Total-Tau-Präparation im Überblick

Das aus dieser Präparation erhaltene Total-Tau-Protein wurde zum Ersten mit Hilfe der eindimensionalen SDS-PAGE und anschließendem Western-Blotting charakterisiert (vgl. Kapitel 3.1.1). Dabei wurden die einzelnen Tau-Isoformen im Western-Blot durch Behandlung mit Anti-Tau-2 Antikörper charakterisiert und das Vorhandensein von Glykosylierungen in der Präparation durch Behandlung mit WGA-Lektin nachgewiesen. Diese Charakterisierung vorab ist sinnvoll, um einen Überblick über die Komplexität des Tau-Proteins mit all seinen Isoformen sowie Informationen über den Glykosylierungsgrad zu erhalten.

Zum Zweiten wurde das aus der Präparation erhaltene Total-Tau über Säulen-Ausschluss-Chromatographie (SEC) (siehe Kapitel 3.1.2, Abbildung 3.15) nach der Größe getrennt und dadurch grob vorgereinigt. Die einzelnen aus der SEC erhaltenen Proben wurden über RP-

HPLC aufgetrennt und die daraus gewonnenen Fraktionen dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung dient dazu, die Komplexität der Probe zu verringern, damit die Glykosylierungen am Tau-Protein besser massenspektrometrisch analysiert werden können.

Hierbei zeigte sich jedoch, dass diese Fraktionen noch zu stark verunreinigt waren, um sie massenspektrometrisch analysieren zu können.

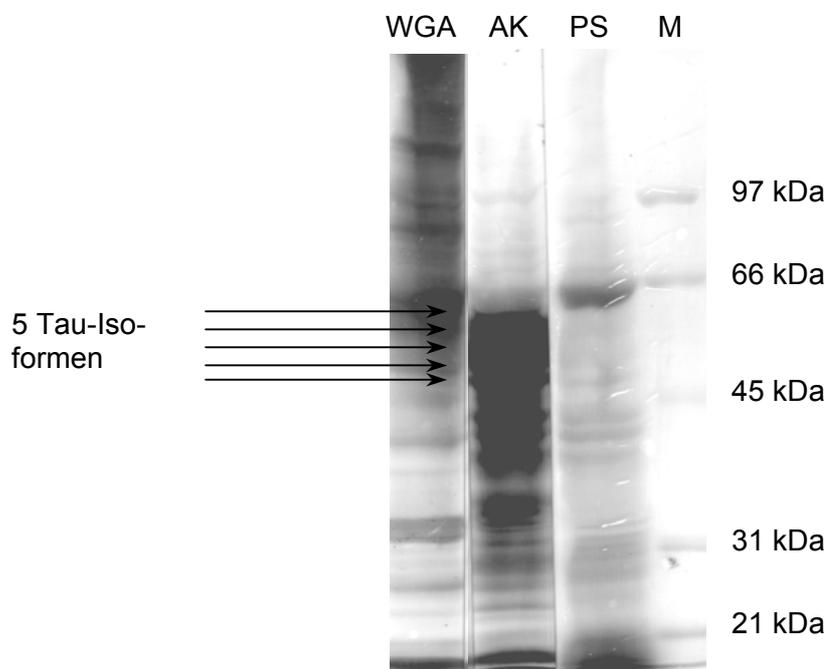
Daher wurde versucht, durch Kombination mit zusätzlichen Aufreinigungsschritten das in der Total-Tau-Präparation erhaltene Fremdprotein abzutrennen. Dazu wurde Total-Tau wiederum über SEC aufgetrennt, mittels PCA-Fällung von einem Anteil Fremdprotein gereinigt und danach über RP-HPLC in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Diese Fraktionen wurden entweder direkt massenspektrometrisch analysiert oder nach tryptischem Verdau mittels Mini-Lektinsäule aufgereinigt, um zuckerhaltige Peptide abzutrennen und diese aufzukonzentrieren. Das Eluat der Mini-Lektinsäule wurde danach ebenfalls massenspektrometrisch analysiert. Die zwischen der SEC-Trennung und RP-HPLC-Reinigung durchgeführte PCA-Fällung erwies sich als sinnvoll, da hierbei Fremdprotein ausgefällt wird und das Tau-Protein aufgrund seiner fehlenden Sekundärstruktur im Überstand verbleibt. Zudem ist die PCA-Fällung mit pH2 nicht so stark sauer, dass die Zuckerreste vom Tau-Protein abgespalten werden. Durch diese Vorreinigung war eine bessere Trennung der Probe mittels RP-HPLC und im Anschluss daran auch eine bessere massenspektrometrische Analyse möglich.

### **3.1.1 Charakterisierung der Total-Tau-Präparation mittels SDS-PAGE**

Das aus der Präparation gewonnene Total-Tau wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blotting charakterisiert. Dabei wurde Tau im Western-Blot einerseits durch Behandlung mit Anti-Tau 2 Antikörper charakterisiert und andererseits durch Färbung mit WGA-Lektin das Vorhandensein von Glykosylierungen in der Präparation getestet. Diese Charakterisierung vorab ist sinnvoll, um einen Überblick über die Komplexität und den Glykosylierungsgrad des Tau-Proteins mit seinen 5 bovinen Isoformen zu erhalten. Die aus der Charakterisierung gewonnenen Beobachtungen dienen als Grundlage für weitere Analysen am Tau-Protein. Abbildung 3.14 zeigt die Total-Tau-Präparation in der Ponceau-S-Färbung, im Western-Blot durch die Umsetzung mit Anti-Tau 2 Antikörper und nach Detektion der Glykosylierungen mittels WGA-Lektin. Ponceau-S färbt Proteine reversibel und verträgt sich mit anschließender Immunfärbung. Die in der Färbelösung enthaltene Trichloressigsäure fixiert die Proteine auf der Membran.

Hier wird deutlich, wie hoch die Probe konzentriert ist und wie komplex sie ist. In der Ponceau-S-Färbung lassen sich die Proteinbanden noch einzeln erkennen, hingegen bei der Antikörper-Detektion mit Anti-Tau 2 Antikörper ist eine Überladung des Gels im Tau-Bereich zwischen 55 und 66 kDa zu beobachten. In diesem Bereich sind die 5 Isoformen des bovinen Taus zu finden (Johnson et al., 1996). In der Total-Tau-Probe ist das durch den Anti-Tau 2 Antikörper nachgewiesene Tau-Protein – auch mit seinen kleinen Abbauprodukten, die bis in den 20 kDa Bereich reichen – in hoher Konzentration enthalten.

Die Herkunft der kleineren Tau-Abbauprodukte ist nicht geklärt, obwohl sie in allen Tau-Präparationen auftreten (vgl. auch Arnold et al., 1996). Trotz Zugabe von Enzymhemmern während der Präparation lassen sich diese Abbauprodukte im Western-Blot identifizieren. Dies deutet darauf hin, dass die 5 Isoformen des Tau-Proteins nicht erst enzymatisch während der Präparation verdaut wurden, sondern bereits im Rinderhirn. Dies könnte sowohl vor als auch nach dem Ableben des Rindes erfolgt sein. Im lebenden Organismus finden bekanntlich auch enzymatische Abbaureaktionen statt. Jedoch könnte ein verstärkter enzymatischer Abbau in der Zeit nach der Gehirnentnahme auf dem Schlachthof bis zur Präparation (maximal 1 Stunde) stattgefunden haben.

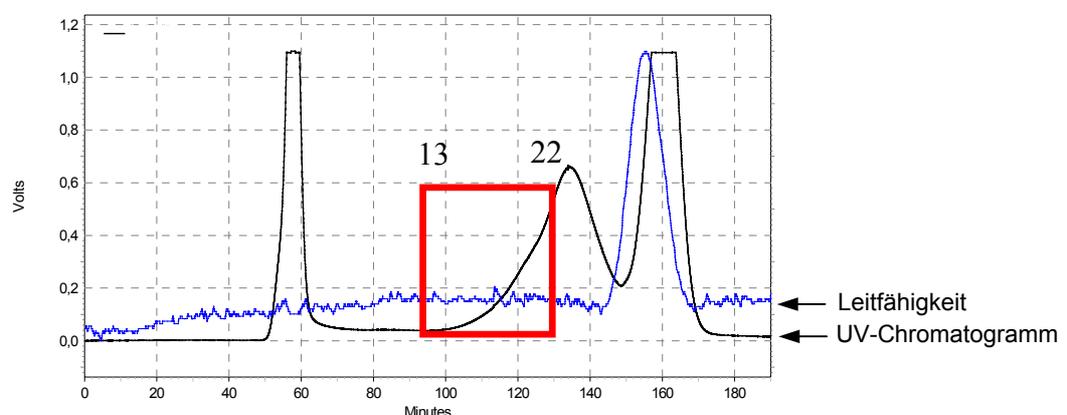


**Abbildung 3.14:** Diese Abbildung zeigt den Vergleich der Total-Tau-Präparation zwischen der Ponceau-S-Färbung (PS), der Umsetzung im Western-Blot mit Anti-Tau 2 Antikörper (AK) und der Umsetzung mit WGA-Lektin (WGA). Es wurden in der 8-18%igen SDS-PAGE pro Lane 10µg der Total-Tau-Präparation aufgetragen.

Die WGA-Färbung zeigt ebenfalls deutlich die Komplexität der Probe. Hier sind hauptsächlich in den höhermolekularen Bereichen glykosylierte Proteine angefärbt. Doch auch im Bereich der 5 bovinen Tau-Isoformen ist eine starke Färbung zu beobachten. Die kleineren Tau-Abbauprodukte werden weniger stark detektiert. Diese Beobachtung ergibt sich aus dem Vergleich mit den angefärbten Banden der Antikörperdetektion. In der WGA-Färbung wird durch die Detektion glykosylierter Proteine außerhalb des Tau-Bereichs besonders deutlich, wie stark die Total-Tau Probe mit Fremdprotein verunreinigt ist.

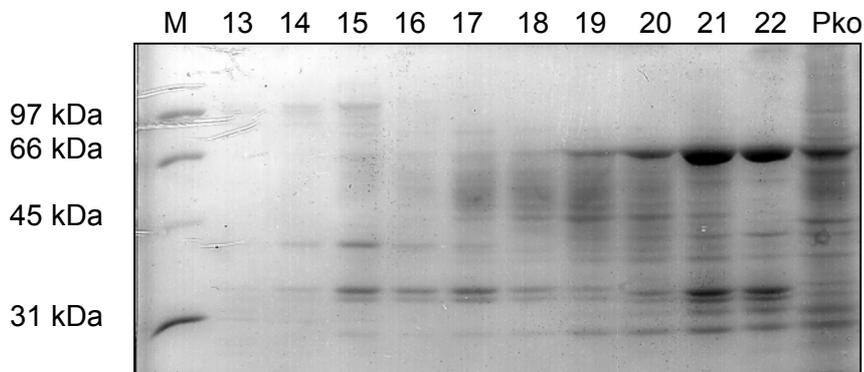
### 3.1.2 Charakterisierung der Total-Tau-Präparation mittels SEC

Zur Abtrennung größerer Fremdproteine und der kleineren Abbauprodukte wurden die Proteine, die aus der Total-Tau-Präparation gewonnen wurden, mittels SEC nach der Größe getrennt. Das SEC-Chromatogramm ist in Abbildung 3.15 dargestellt. Bei einer Flussrate von 1ml/min wurde isokratisch gefahren. Als Laufpuffer wurde ausschließlich ein spezieller „Anreicherungspuffer“, der sog. Assembly-buffer, verwendet, dem zuvor zusätzlich NaCl und DTT zugesetzt worden waren. Es wurden ab dem Einspritzpeak jeweils 3ml-Fractionen über einen Fraktionensammler gesammelt. Der eingerahmte Bereich im UV-Chromatogramm in Abbildung 3.15 - von Minute 92 bis 119 – zeigt den Elutionszeitraum des Tau-Proteins von der SEC-Säule an (Proben 13-22). Dieser Zeitraum erwies sich als typischer Elutionszeitraum des Tau-Proteins von der SEC-Säule. Dies konnte anhand mehrerer Präparationen festgestellt werden, die im Ganzen nach erfolgter SEC-Reinigung über SDS-PAGES aufgetrennt und mit Anti-Tau 2 Antikörper auf das Vorkommen von Tau-Proteinen getestet worden waren.



**Abbildung 3.15:** Auftrennung der Total-Tau-Präparation nach der Proteingröße über SEC. Es wurden 6mg Protein/1ml Assembly-Buffer auf die Säule aufgegeben. Ab dem Einspritzpeak in der 56. Minute wurde alle 3 Minuten bei einer Flussrate von 1ml/min fraktioniert. In dem eingerahmten Bereich (92. bis 119. Minute) eluiert das Tau-Protein von der Säule (Proben 13 bis 22). Gezeigt sind das UV-Chromatogramm und die Leitfähigkeit.

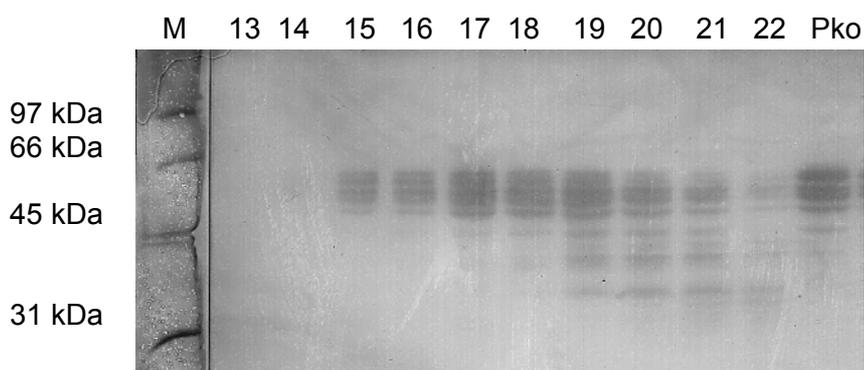
Die 3ml-Fractionen wurden über Nacht mittels eines Lyophilisators getrocknet und das Pellet in 200µl 0,1x PBS resuspendiert. Im Anschluss daran wurden die Proben 13 bis 22 über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet. Die Ponceau S-Färbung des Blots ist in Abbildung 3.16 dargestellt.



**Abbildung 3.16:** 8-18%ige SDS-PAGE der SEC-Fractionen 13-22 geblottet auf PVDF und angefärbt mit Ponceau S. Aus 200µl-Fractionen wurden jeweils 5 µl pro Lane aufgetragen. Die Positiv-Kontrolle ist mit Pko (5 µg Total-Tau-Präparation) gekennzeichnet.

Hier sieht man deutlich, wie durch die SEC-Chromatographie die Proteine nach der Größe aufgetrennt werden. In Fractionen 13 bis 15 eluieren vermehrt große Proteine zwischen 97 und 66 kDa von der Säule. Kleine Proteine sind kaum vertreten. Diese Verteilung verschiebt sich bei längerer Elutionszeit bis hin zu der Freisetzung von Proteinen unterhalb von 45 kDa in den Fractionen 21 und 22. In diesen Proben sind deutliche Banden im Bereich von 66 kDa zu erkennen. Es wurde angenommen, dass es sich hierbei um BSA handelt. Dies wurde nicht weiter spezifiziert, da es für die Fortführung des Projektes nicht von Interesse war.

Die o.g. Verteilung lässt sich auch auf die einzelnen unterschiedlich großen Tau-Isoformen und deren kleinere Abbauprodukte übertragen. Durch Umsetzung des Blots mit Anti-Tau 2 Antikörper wurde festgestellt, dass die 5 Tau-Isoformen zwar über die gesamte Elutionszeit der Proben 14 bis 22 von der Säule freigesetzt werden, jedoch mit unterschiedlichen Intensitäten. Die kleineren Tau-Abbauprodukte eluieren erst ab der 104. Minute in Probe 17 von der Säule. Der zugehörige Western-Blot ist in Abbildung 3.17 zu sehen.

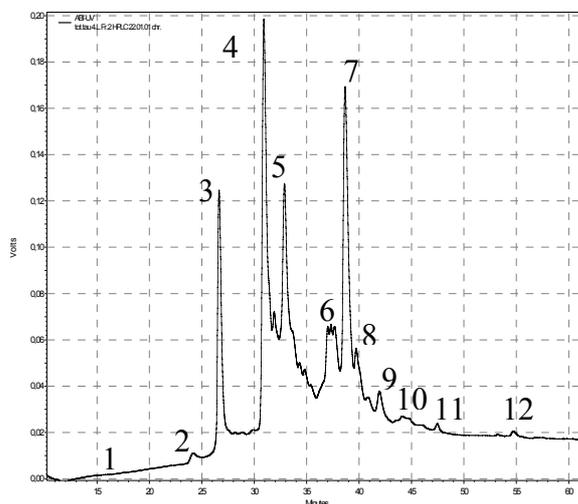


**Abbildung 3.17:** Western Blot der SEC-Fractionen 13 bis 22 mit Anti-Tau 2 Antikörper.

In den Proben 13 und 14 sind die 5 Tau-Isoformen kaum zu erkennen; in den Proben 15 und 16 sind sie nur schwach sichtbar. Aus der Ponceau-S-Färbung (Abbildung 3.16) geht hervor, dass hier hauptsächlich die großen Proteine eluieren. Proben 17 und 18 zeigen bereits erste Spuren der Tau-Abbauprodukte, die sich in Proben 19 und 20 noch verstärken. Ab Probe 20 nimmt jedoch der Anteil der von der Säule freigesetzten 5 Tau-Isoformen ab, bis sie in Probe 22 kaum noch vorkommen. Die Elution der Abbauprodukte ist in Fraktionen 19 bis 21 stark vorhanden und schwächt sich in Probe 22 ebenfalls ab.

### 3.1.3 Auftrennung von SEC-Fraktionen mittels RP-HPLC

Die Auftrennung der sehr komplexen und stark mit Fremdprotein verunreinigten Total-Tau-Präparation über SEC konnte lediglich als grobe Vorreinigung der Probe angesehen werden. Um eine bessere Aufreinigung der Probe und eine gute Auftrennung der Isoformen und Abbauprodukte zu erhalten, wurden ausgewählte SEC-Fraktionen über RP-HPLC aufgetrennt. Die Auswahl der Proben erfolgte aufgrund des ähnlichen Bandenmusters in der Ponceau-S-Färbung und in der Anti-Tau 2 Antikörper-Färbung. Ähnliche Proben wurden vereinigt und über RP-HPLC aufgetrennt. Das RP-HPLC-Chromatogramm der vereinigten SEC-Fraktionen 17 und 18 ist in Abbildung 3.18 dargestellt.



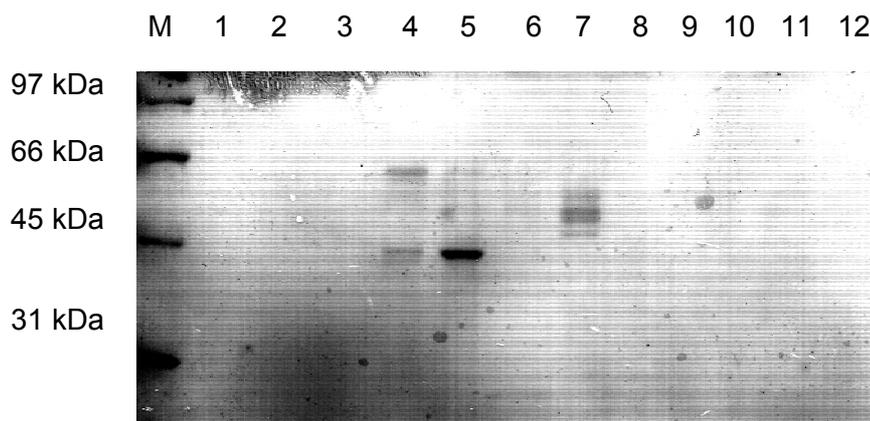
**Abbildung 3.18:** RP-HPLC Chromatogramm der vereinigten SEC-Fraktionen 17 und 18 (vgl. Abb. 3.17). Es wurde von Hand nach Peaks fraktioniert.

Dieses Chromatogramm spiegelt ebenfalls die Komplexität der bereits vorgereinigten Probe wieder. Wie in Abbildung 3.17 sichtbar ist, sind in den vereinigten Proben 17 und 18 die 5 Tau-Isoformen und einige kleine Tau-Abbauprodukte zu erkennen. Diese eluieren in 12 unterschiedlichen Peaks von der HPLC-Säule.

Die HPLC-Fractionen wurden nach der Chromatographie an einem Lyophilisator über Nacht gefriertrocknet, in 100µl 0,1xPBS aufgenommen und wiederum über eine SDS-PAGE aufgetrennt.

### 3.1.4 Charakterisierung von RP-HPLC-Fractionen mittels SDS-PAGE

Durch die Vorreinigung der Total-Tau-Präparation mittels SEC und die sich daran anschließende Chromatographie ausgesuchter Fractionen über RP-HPLC sollte eine gute Abtrennung der 5 Tau-Isoformen und deren Abbauprodukte von Fremdproteinen gegeben sein. Dies wurde durch die Trennung der einzelnen Fractionen über SDS-PAGE mit daran anschließendem Western-Blotting und Umsetzung mit Anti-Tau 2 Antikörper und WGA-Lektin überprüft. Abbildung 3.19 zeigt die Ponceau-S-Färbung der geblotteten SDS-PAGE.

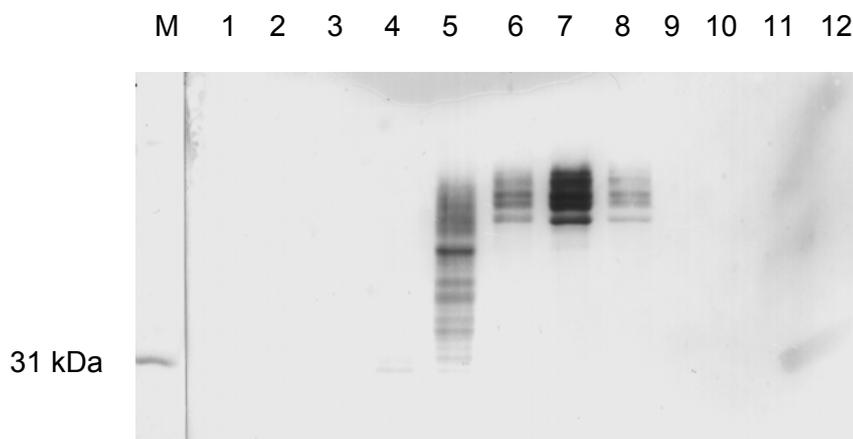


**Abbildung 3.19:** 8-18%ige SDS-PAGE der RP-HPLC Fractionen 1 - 12 über SDS-PAGE, geblottet auf PVDF und angefärbt mit Ponceau-S. 1/3 des jeweiligen Probenvolumens wurde für die einzelnen Proben pro Lane aufgegeben. Probe 7 wurde nach Dephosphorylierung massenspektrometrisch charakterisiert.

Bereits in der Ponceau-S-Färbung ist in Probe 7 das typische Tau Bandenmuster – hervorgerufen durch die 5 Isoformen – zu erkennen. Diese Probe zeigt auch keine sichtbare Verschmutzung durch Fremdprotein, was für eine massenspektrometrische Analyse der Probe Voraussetzung ist. Weitere Fremdproteinspuren sind lediglich in Fraktion 4 und 5 zu erkennen. Das zugehörige RP-HPLC-Chromatogramm in Abbildung 3.18 zeigt, dass genau die drei Fractionen die höchsten Peaks, d.h. die höchste Proteinkonzentration, aufweisen. Die geringeren Proteinkonzentrationen in den anderen Fractionen lässt ein Anfärben der darin enthaltenen Proteine durch Ponceau-S nicht zu. Hier liegt demnach die Proteinkonzentration unter der Nachweisgrenze von Ponceau-S von ca. 50ng pro Proteinbande.

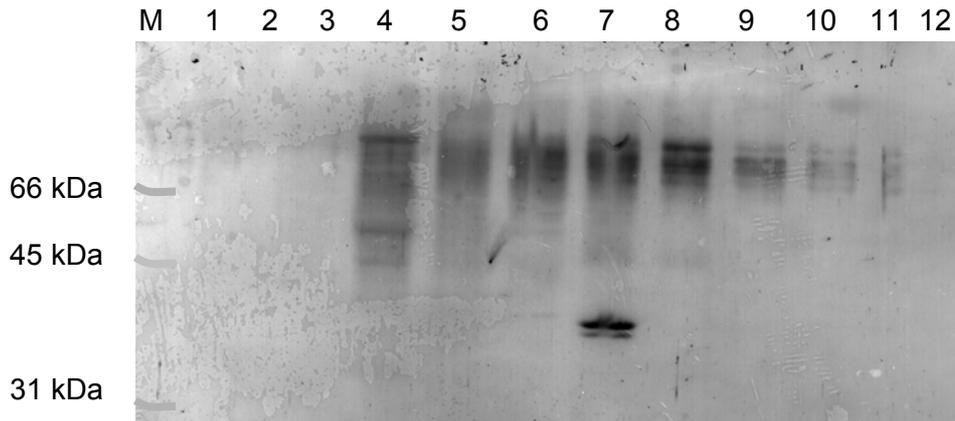
Durch den Nachweis mit Anti-Tau 2 Antikörper wird in Abbildung 3.20 sichtbar, dass die Abbauprodukte bei der HPLC-Trennung früher von der Säule eluieren als die 5 Isoformen.

Die HPLC-Fraktionen 6, 7 und 8 zeigen in der Anti-Tau 2 Antikörper-Färbung nur das reine Tau Protein mit seinen 5 Isoformen. Diese sind gut anhand ihres charakteristischen Bandenmusters zu erkennen. Die Ponceau-S-Färbung in Abbildung 3.19 weist bei diesen Fraktionen ebenfalls keine Verunreinigungen durch Fremdproteine auf.



**Abbildung 3.20:** Western-Blot der RP-HPLC Fraktionen 1 - 12 mit Anti-Tau 2 Antikörper. 1/3 des jeweiligen Probenvolumens war für die einzelnen Proben pro Lane aufgegeben worden (vgl. Abbildung 3.19).

Die Umsetzung des Western-Blots mit Anti-Tau 2 Antikörper hat gezeigt, dass gereinigtes Tau-Protein in den Fraktionen 6, 7 und 8 vorliegt und dass eine Abtrennung der Tau-Abbauprodukte von den Isoformen durch die HPLC-Trennung gegeben ist. Daher wurden im Anschluss daran diese gereinigten Proben auf mögliche Glykosylierungen getestet. Dazu wurde eine zweite SDS-PAGE mit 1/3 jeder Probe beladen, auf PVDF geblottet und mit WGA-Lektin zum Nachweis von Glykosylierungen umgesetzt (Abbildung 3.21). WGA-Lektin färbt GalNAc, GlcNAc und NeuNAc an. Der mit Poncau-S gefärbte Blot dieser zweiten SDS-PAGE ist in Abbildung 3.19 dargestellt.



**Abbildung 3.21:** Western Blot der RP-HPLC Fraktionen 1 – 12 mit WGA-Lektin (wheat germ agglutinin). 1/3 des jeweiligen Probenvolumens wurde für die einzelnen Proben pro Lane aufgegeben. Proben 6 und 8 wurden massenspektrometrisch analysiert.

Dieser Lektin-Western-Blot in Abbildung 3.21 zeigt, dass glykosylierte Proteine in den Proben 4 bis 11 enthalten sind. Auch die 5 Tau-Isoformen in Proben 6, 7 und 8 liegen in glykosyliertem Zustand vor. Dies lässt sich an dem charakteristischen Bandenmuster erkennen, das die Tau-Proteine in der SDS-PAGE aufweisen.

Auffällig ist, dass sich in Probe 7 eine ca. 31 kDa schwere Doppelbande befindet, die weder in der Ponceau-S-Färbung noch in der Anti-Tau 2 Antikörper-Färbung sichtbar war (siehe Abbildungen 3.19 und 3.20). Die einzige Erklärung dafür ist, dass es sich hierbei um stark glykosylierte Fremdproteine handeln muss, die daher nicht in der Anti-Tau 2 Antikörper-Färbung detektiert wurden. Zusätzlich müssen diese Proteine in einer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze von Ponceau-S auf der PVDF-Membran vorliegen.

Somit boten sich nur noch Proben 6 und 8 aufgrund ihrer Reinheit und ihrer vorhandenen Glykosylierung zur Charakterisierung im Massenspektrometer an.

### 3.1.5 Massenspektrometrische Charakterisierung ausgewählter RP-HPLC-Fraktionen

Die Proben 6 und 8, die reines Tau-Protein ohne Fremdproteinverschmutzungen enthalten, wurden aufgrund ihrer Reinheit und der Tatsache, dass sie glykosyliert vorliegen, für eine massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Dazu wurden sie vorab tryptisch verdaut. Im Anschluss daran wurde jeweils die Hälfte des Probenvolumens über ZipTip für die massenspektrometrische Analyse aufbereitet. Die andere Hälfte wurde über eine selbst gebaute Mini-Lektinsäule gereinigt, die die glykosylierten Peptide von den unglykosylierten abtrennen und aufkonzentrieren sollte. Danach wurde auch dieser Teil der Probe für eine massenspektrometrische Analyse mittels ZipTip vorbereitet.

In beiden Ansätzen konnte keine glykosylierte Tau-Sequenz mittels Massenspektrometrie identifiziert werden. Es ließen sich keine Signale, die auf eine glykosylierte Sequenz hindeuteten in den Massenspektren der Probe erkennen. Daher wurde darauf verzichtet, diese abzubilden. Die Komplexität des Proteins mit all seinen Phosphorylierungsstellen wurde als mögliche Ursache dafür angesehen. Daher wurde versucht, durch Dephosphorylierung der Probe 7 (vgl. Abbildungen 3.19 und 3.20) die Komplexität zu reduzieren. Doch auch in dieser Probe war es nicht möglich, eine glykosylierte Sequenz zu identifizieren.

Durch diese verschiedenen Messungen konnte eine 53%ige Sequenzabdeckung der längsten Tau-Isoform 1 erreicht werden (in Abbildung 3.22 dargestellt). Von den drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen im bovinen Tau konnte eine in unmodifiziertem Zustand identifiziert werden. Im bovinen Tau befinden sich die drei potentiellen Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn<sup>158</sup>–Ala-Thr, Asn<sup>366</sup>–Ile-Thr und Asn<sup>417</sup>–Val-Ser. Die Position Asn<sup>366</sup> konnten hier unglykosyliert identifiziert werden (vgl. Abbildung 3.22).

```

1 maeprqefdv medhaqqdyt lqdqegdmdp glkesplqtp addgseepgs etsdakstpt
61 aedataplvd egapgeqaaa qapaeipegt aeeeagigdt snledqaagh vtqarmvskg
121 kdgtgpddkk tkgadgkpgt kiatprgaap pgqkgqanat ripakttpt ktspatmqvq
181 kkpppagaks ergesgksgd rsgysspgsp gtpgsrsrtp sltpptrep kkvavvrtp
241 kpsaaksrl qaapgpmpdl knvkskigst enlkhqpggg kvqiinkkld lsnvqskcgs
301 kdnikhvpgg gsvqivykpv dlskvtscg slgnihhkpg ggqvevksek lfdkdrvqsk
361 igsldnithv pgggnkkiet hkltfrenak aktdhgaeiv ykspvvsgdt sprhlsnvss
421 tgsidmvdsp qlatladevs aslakqgl

```

**Abbildung 3.22:** Darstellung der Aminosäuresequenz der längsten bovinen Tau-Isoform 1 mit 448 Aminosäuren. Die unterlegten Sequenzbereiche wurden massenspektrometrisch identifiziert. Die drei potentiellen Glykosylierungsstellen sind fett gedruckt.

Möglicherweise ist die Total-Tau-Präparation zu komplex und zu unrein, um in einer massenspektrometrischen Analyse glykosylierte Peptide identifizieren zu können. Daher wurde das Tau-Protein aus Rinderhirn mit der Twice-cycled-Präparation aufgearbeitet, von der aus der Literatur bekannt ist, dass sie Tau in hochreiner Form liefert (Johnson et al., 1989; Lindwall and Cole, 1984).

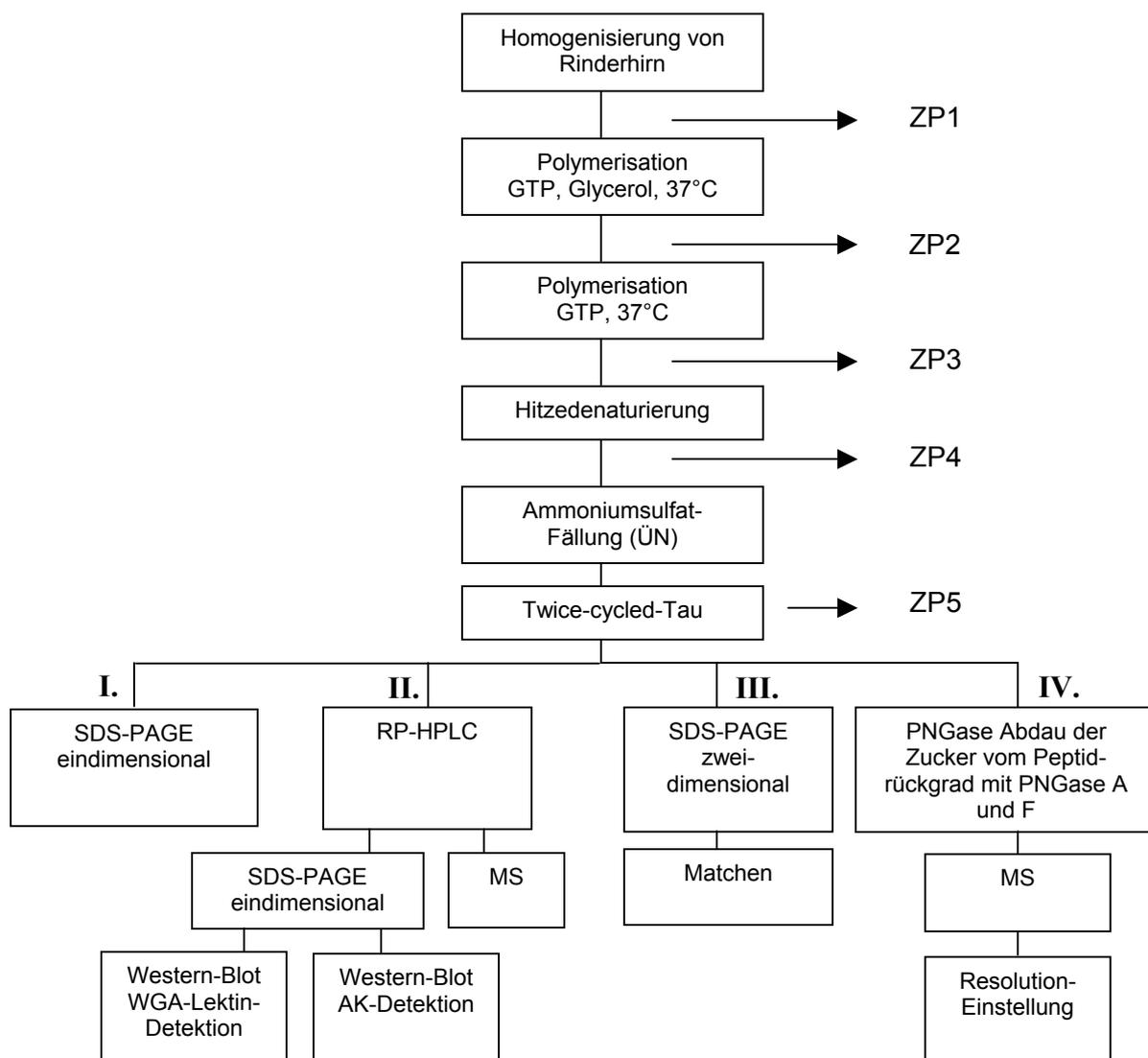
### 3.2. Twice-cycled-Tau-Präparation

Die Twice-cycled-Tau-Präparation zielt im Gegensatz zu der Total-Tau-Präparation auf eine reine Aufarbeitung des Tau-Proteins ab, wobei es jedoch möglich ist, dass einzelne Varianten verloren gehen. Diese Präparation ist eine Kombination aus drei verschiedenen

Aufarbeitungsprotokollen aus der Literatur (siehe auch Kapitel 2.2.3) und basiert auf der Fähigkeit des Tau-Proteins, sich unter Zugabe von GTP an Mikrotubuli zu binden. Dieser Bindungsprozess dient dem Zweck, Tau effektiv von Fremdproteinen zu trennen und dadurch eine sehr reine Präparation zu erhalten. Wie bereits erwähnt ist es jedoch möglich, während der Präparation einzelne Tau-Varianten zu verlieren. Die Twice-cycled-Tau-Präparation ist schematisch in Abbildung 3.23 dargestellt.

Im Gegensatz dazu steht die Total-Tau-Präparation, die bereits schon unter Kapitel 2.2.2 und Kapitel 3.1 behandelt wurde. Bei der Total-Tau-Präparation wurde Wert auf den Erhalt des vollständigen komplexen Taugehaltes des Gehirns gelegt, was jedoch auch eine starke Verunreinigung der Probe mit Fremdproteinen zur Folge hat.

Bei der Twice-cycled-Tau-Präparation wurde aufgrund der hohen Reinheit, hervorgerufen durch die Präparation, darauf verzichtet, sie über SEC vorzureinigen. Sie wurde direkt mittels RP-HPLC aufgetrennt.



**Abbildung 3.23:** Schematische Darstellung der Twice-cycled-Tau-Präparation.

Während der Twice-cycled-Tau-Präparation wurden nach bestimmten Aufarbeitungsschritten kleine Mengen an Zwischenprodukten (ZP1 bis ZP4; siehe Abbildung 3.23) abgenommen. Das durch Ammoniumsulfat gefällte Endprodukt wurde mit ZP5 gekennzeichnet.

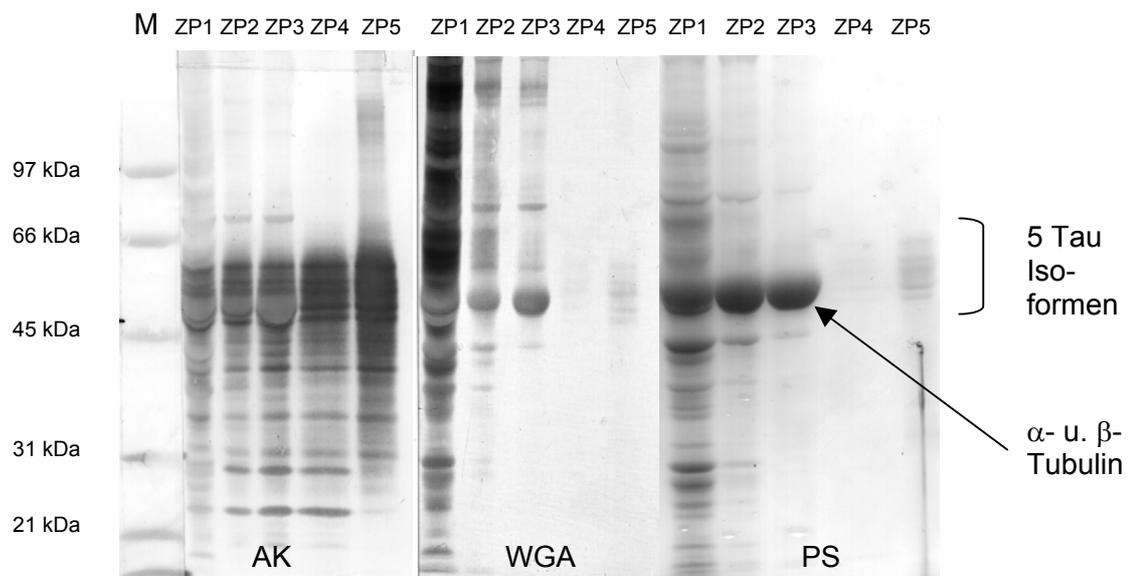
Das präparierte Twice-cycled-Tau wurde mit Hilfe von vier verschiedenen Ansätzen weiter charakterisiert. Zuerst wurde die Probe über eine eindimensionale SDS-PAGE und sich daran anschließendes Western-Blotting charakterisiert. Der Blot wurde mit Anti-Tau 2 Antikörper und mit WGA-Lektin umgesetzt, um Informationen über den Tau-Gehalt und die Glykosylierungen am Tau zu erhalten. Dies wurde zum zweiten nach vorangegangener Reinigung mittels RP-HPLC wiederholt. Diese HPLC-gereinigten und im Western-Blot charakterisierten Proben wurden dann tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert. Dies sollte Aufschluss über die Modifizierungen, im Speziellen die Glykosylierungen am Twice-cycled-Tau, geben.

Zum dritten wurde durch die zweidimensionale SDS-PAGE geklärt, ob während der Präparation die befürchteten Verluste einzelner Tau-Varianten auftreten.

Zuletzt wurde das Twice-cycled Tau tryptisch verdaut und sodann mit PNGase A und F behandelt, um die N-gebunden Zucker vom Peptidrückgrat abzuspalten. Danach wurde diese Probe mittels ZipTip für eine massenspektrometrische Analyse vorbereitet.

### **3.2.1 Charakterisierung der Twice-cycled-Tau-Präparation mittels SDS-PAGE**

Die Zwischenprodukte ZP1 bis ZP5 der Twice-cycled-Tau-Präparation wurden mittels einer 8-18%igen SDS-PAGE und Western-Blotting charakterisiert. Dabei wurde das in den Proben ZP1 bis ZP5 enthaltene Tau im Western-Blot einerseits durch Behandlung mit Anti-Tau 2 Antikörper charakterisiert, und andererseits durch Färbung mit WGA-Lektin auf das Vorhandensein von Glykosylierungen getestet. Diese Charakterisierung vorab ist sinnvoll, um einen Überblick über die Komplexität, den Glykosylierungsgrad und die Reinheit des Tau-Proteins mit seinen 5 bovinen Isoformen zu erhalten. Die aus der Charakterisierung gewonnenen Beobachtungen dienen als Grundlage für weitere Analysen am Tau-Protein. Abbildung 3.24 zeigt die Zwischenprodukte ZP1 bis ZP5 der Twice-cycled-Tau-Präparation in der Ponceau-S-Färbung, im Western-Blot durch die Umsetzung mit Anti-Tau 2 Antikörper und nach Detektion der Glykosylierungen mittels WGA-Lektin.



**Abbildung 3.24:** Vergleich der Zwischenprodukte ZP1 bis ZP5 der Twice-cycled-Tau-Präparation zwischen der Ponceau-S-Färbung (PS), der Umsetzung im Western-Blot mit Anti-Tau 2 Antikörper (AK) und der Umsetzung mit WGA-Lektin (WGA). In der Spur des ZP5 in der Ponceau-S-Färbung ist eine Verunreinigung des Blots mit einem nicht gelösten Ponceau-S-Korn unterhalb des charakteristischen Tau-Bandenmusters zu sehen.

Die Ponceau-S-Färbung in Abbildung 3.24 ganz rechts zeigt die deutliche Aufreinigung des Tau-Proteins während der Twice-cycled-Präparation. Die Verunreinigung durch Fremdprotein nimmt von ZP1 bis ZP3 immer mehr ab. In den Zwischenprodukten ZP4 und ZP5 liegt nur noch reines Tau-Protein vor, gut erkennbar an seinem charakteristischen Bandenmuster zwischen 55 und 66kDa. Bei den stark gefärbten Banden in den Zwischenprodukten ZP1 bis ZP3 mit einem Molekulargewicht von ca. 50-55kDa handelt es sich um  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, da diese Banden im Western-Blot durch die Umsetzung mit Anti-Tubulin-Antikörpern detektiert wurden (hier nicht gezeigt).

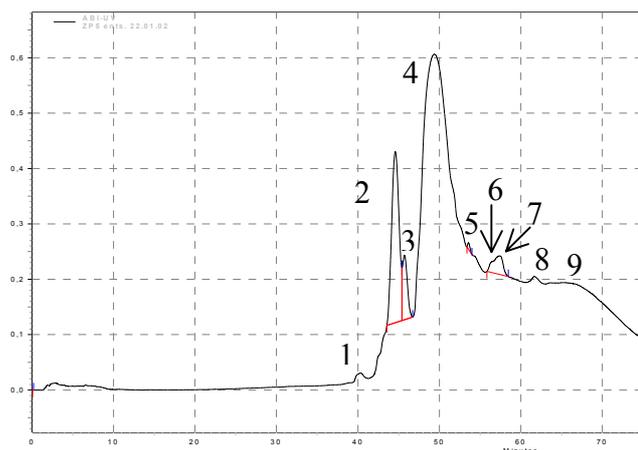
In der Anti-Tau 2 Antikörper-Färbung wird sichtbar, dass Tau in sehr hoher Konzentration in den einzelnen Zwischenprodukten vorliegt. Der Schmier oberhalb der Tau-Banden im ZP5 lässt auf eine Überladung des Gels mit Tau-Protein schließen.

Die WGA-Färbung der Zwischenprodukte ZP1 bis ZP3 zeigt eine deutliche Verunreinigung der Proben mit glykosyliertem Fremdprotein. Die Glykoproteine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin sind hier ebenfalls angefärbt. ZP4 als erstes Zwischenprodukt, das reines Tau enthält, zeigt aufgrund der geringen Proteinkonzentration auf dem Blot keine Färbung. Schon in der Ponceau-S-Färbung waren hier nur sehr schwache Banden zu erkennen. Die wesentlich stärker konzentrierte Probe ZP5 wird hingegen in der Ponceau-S-Färbung und auch in der WGA-Lektin-Färbung auf der Höhe der charakteristischen Tau-Banden deutlich angefärbt. Das

charakteristische Tau-Bandenmuster ist hier zu erkennen. Dies deutet auf glykosyliertes Tau-Protein in der Probe ZP5 hin, in der Tau in hoch reiner Form enthalten ist.

### 3.2.2 Chromatographische Charakterisierung der Twice-cycled-Tau-Präparation mittels RP-HPLC

Nach der Überprüfung des Twice-cycled-Taus hinsichtlich seines Tau-Gehaltes und der Verunreinigung mit Fremdprotein mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-blotting, wurde ZP5 aufgrund seiner hohen Konzentration an sehr reinem - auch glykosyliertem - Tau über RP-HPLC gereinigt. Damit sollte eine bessere Auftrennung der Probe in seine 5 Isoformen bzw. deren Abbauprodukte erfolgen. In Abbildung 3.25 ist die RP-HPLC-Trennung des ZP5 der Twice-cycled-Tau-Präparation dargestellt.



**Abbildung 3.25:** UV-Chromatogramm der Auftrennung des ZP5 der Twice-cycled-Tau-Präparation über RP-HPLC. Es wurden 80 µg Protein auf die Säule aufgegeben und die Peaks von Hand fraktioniert.

Hier lässt sich bei gleichem Gradienten ein geändertes Elutionsverhalten der Proteine von der Säule im Vergleich zur Total-Tau-Präparation (vgl. Abbildung 3.18) erkennen. Die einzelnen Varianten des Twice-cycled-Tau eluieren erst wesentlich später von der Säule als die Proteine der Total-Tau-Präparation.

Dies kann dadurch erklärt werden, dass bei der Total-Tau-Präparation nur ein ausgewählter Teil des Tau-Proteins (nur einzelne Fraktionen, vgl. Kapitel 3.1.3) über die HPLC getrennt wurde, während bei der Twice-cycled-Tau-Präparation der gesamte Tau-Gehalt des Rinderhirns aufgetrennt wird, jedoch ohne die kleineren Abbauprodukte. Diese kleinen Abbauprodukte, die erfahrungsgemäß sehr früh von der Säule eluieren, sind im Twice-cycled-Tau nur noch in sehr geringer Konzentration vorhanden.

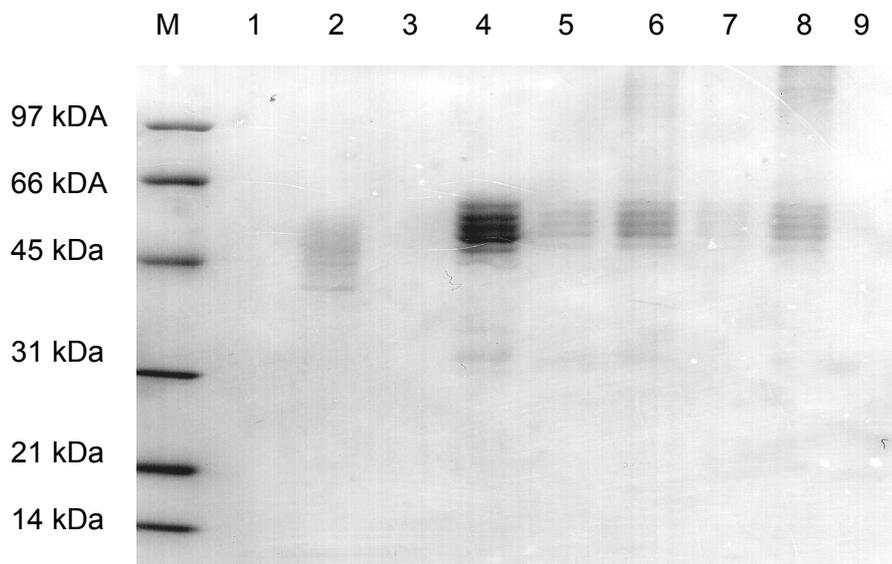
Dies könnte daran liegen, dass der größte Teil der kleinen Abbauprodukte nicht mehr fähig ist, sich an die Mikrotubuli anzulagern und somit bei der Präparation verloren gehen. Eine Erklärung dafür wäre, dass sie durch den enzymatischen Abbauprozess eine oder auch mehrere der vier Mikrotubuli-Binde-Domänen oder deren flankierende Bereiche (vgl. Kapitel 1.5.3) verloren haben. Sie können daher in den zwei Polymerisationsschritten der Twice-cycled-Präparation nicht mehr an die Mikrotubuli binden und werden dadurch mit den anderen Fremdproteinen verworfen.

Die während der RP-HPLC-Reinigung einzeln von Hand fraktionierten Peaks wurden an einem Lyophilisator über Nacht gefriertrocknet und in 100µl 0,1xPBS resuspendiert.

### 3.2.2.1 Charakterisierung von RP-HPLC-Fractionen mittels SDS-PAGE

Um Informationen über die Trennung des Tau-Proteins mittels RP-HPLC zu erhalten, wurden die einzelnen Fraktionen über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blotting auf ihren Tau-Gehalt und das Vorhandensein von Glykosylierungen getestet.

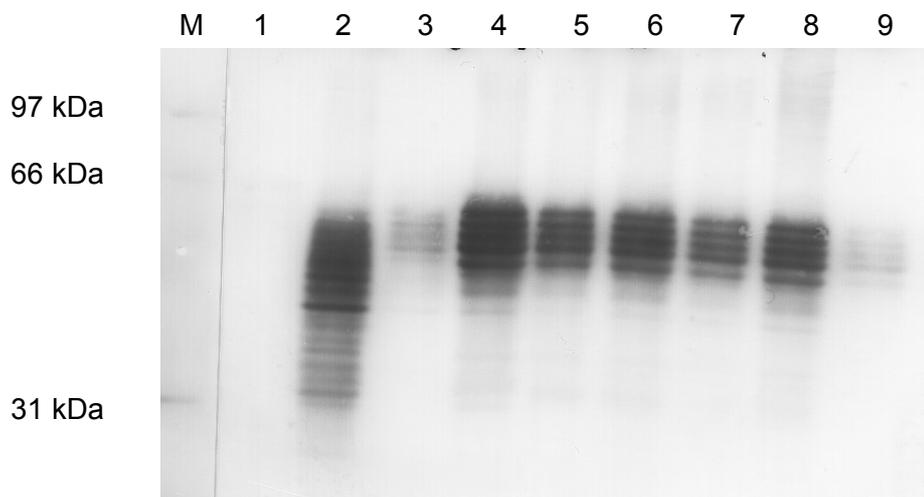
Der Ponceau-S gefärbte Blot der SDS-PAGE ist in Abbildung 3.26 dargestellt.



**Abbildung 3.26:** 8-18%ige SDS-PAGE der RP-HPLC-Fractionen auf PVDF geblottet und mit Ponceau-S angefärbt. Es wurden von jeder 100µl-Fraktion 20µl pro Lane aufgetragen.

Hier zeigt sich, dass – genau wie bei der Total-Tau-Präparation – die 5 Tau-Isoformen über die gesamte Peakbreite verteilt eluieren. Fraktionen 2, 4, 5 und 6 weisen zusätzlich geringe Spuren der kleineren Abbauprodukte auf. Diese sind hier – wie bereits unter Kapitel 3.2.2 diskutiert - im Gegensatz zur Total-Tau-Präparation nur in sehr geringen Konzentrationen vertreten.

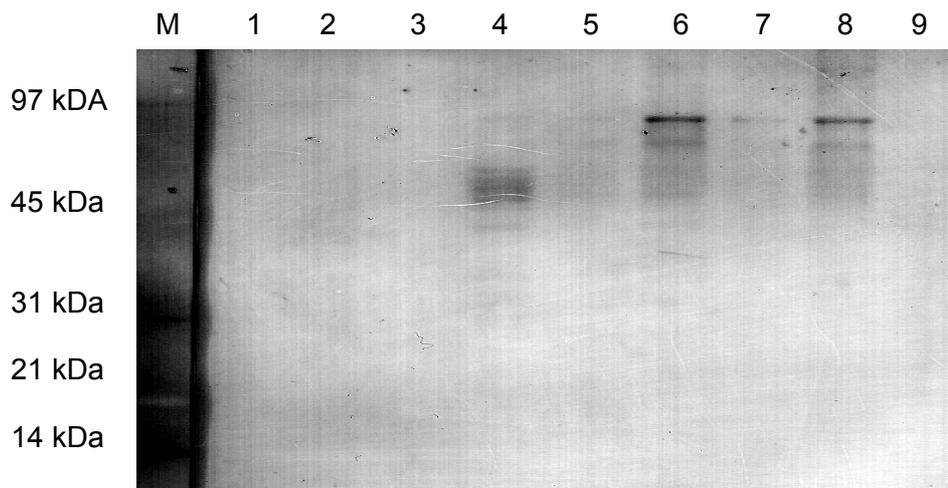
Deutlich wird dieses bei der Detektion des Tau-Gehaltes durch Umsetzung des Blots mit Anti-Tau 2 Antikörper, der in Abbildung 3.27 zu sehen ist.



**Abbildung 3.27:** Western-Blot der SDS-PAGE der RP-HPLC-Proben mit Anti-Tau 2 Antikörper umgesetzt.

Hier sieht man nun deutlich, was sich bereits in der Poncau-S-Färbung abzeichnete. Die 5 Tau-Isoformen eluieren in unterschiedlichen Konzentrationen von der Säule. Zusätzlich sind in Fraktion 2 die kleinen Abbauprodukte in geringer Konzentration enthalten. Dies lässt darauf schließen, dass sich die Isoformen in den einzelnen Fraktionen in ihrem Modifikationsgrad nur marginal unterscheiden, so dass die Unterschiede lediglich nur durch eine analytische Säule, jedoch nicht über einen Bandenshift im SDS-Gel erkannt werden können. Eine definitive Klärung des unterschiedlichen Modifikationsgrades lässt sich nur durch eine Sequenzanalyse im Massenspektrometer herbeiführen.

Um klären zu können, ob die Proteine in den einzelnen Fraktionen glykosyliert vorliegen, wurde eine zweite SDS-PAGE durchgeführt, deren Blot mit WGA-Lektin umgesetzt wurde. Es wurden hier die gleichen Mengen an Probe (1/5 des Gesamtansatzes) aufgegeben wie bei der ersten SDS-PAGE. Abbildung 3.28 zeigt den mit WGA-Lektin umgesetzten Western-Blot.



**Abbildung 3.28:** Western-Blot der SDS-PAGE der RP-HPLC-Proben mit WGA-Lektin umgesetzt. Proben 4 und 6 wurden massenspektrometrisch analysiert.

Die Abbildung 3.28 zeigt, dass nur in drei Fraktionen glykosylierte Proteine enthalten sind. Die angefärbten Banden weisen in der Fraktion 4 das typische Tau-Bandenmuster auf bzw. zeigen in Fraktionen 6 und 8 in diesem Bereich einen dunklen Schmier. Fraktionen 6 und 8 enthalten zusätzlich angefärbte Banden in einem höheren Molekularbereich zwischen 66 und 97 kDa. Grundsätzlich ist die Färbung eher schwach, was auf einen geringen Glykosylierungsgrad der Proteine in den drei Fraktionen schließen lässt. Detaillierte Angaben zu den Glykosylierungen am Tau-Protein sind in Kapitel 1.5.4.2 aufgeführt.

Das Vorhandensein von Zuckerstrukturen an den Proteinen sollte je nach Glykosylierungsgrad zu einem Massenshift führen. Auffällig ist, dass bei den gefärbten Banden in Fraktion 4 eindeutig das typische Tau-Bandenmuster ohne Massenshift zu erkennen ist.

Wahrscheinlich sind die einzelnen Isoformen nur mit ein oder zwei N-glykosidisch gebundenen Zuckerbäumen, die jeweils maximal eine Masse von 2 kDa ausmachen, oder mit vereinzelt O-Glykosylierungen versehen. Eine Massenerhöhung von 2 kDa ist bei der Auftrennung der Proteine in dieser SDS-PAGE nicht zu erkennen.

Die Fraktionen 6 und 8 zeigen in der SDS-PAGE im typischen Tau-Massenbereich einen dunklen Schmier, der keine vereinzelt Banden erkennen lässt, was jedoch auf glykosyliertes Tau hindeutet.

Zusätzlich weisen diese Fraktionen noch WGA-gefärbte Banden zwischen 66 und 97 kDa auf, die nicht durch den Anti-Tau 2 Antikörper markiert wurden (vgl. Abbildung 3.27). Dies

lässt auf sehr stark glykosyliertes Fremdprotein schließen, das in der Ponceau-S-Färbung nicht zu erkennen war, da dessen Proteinkonzentration auf der PVDF-Membran anscheinend unter der Nachweisgrenze von Ponceau S von ca. 50 ng pro Bande liegt. Trifft dies zu, lässt sich mit der Twice-cycled-Tau-Präparation keine 100% reine Präparation des Tau-Proteins erzielen.

Dass es sich bei den höhermolekularen Banden um glykosyliertes Tau-Protein handelt ist höchst unwahrscheinlich, da es – um einen Massenshift von ca. 20 - 30 kDa zu erzielen - ungefähr 10-15 N-glykosidisch gebundene Zucker tragen müsste. Das Tau-Protein besitzt jedoch nur 3 potentielle N-Glykosylierungsstellen. Würde Tau hingegen an jeder Phosphorylierungsstelle einen O-gebundenen Zuckerbaum mit einer Durchschnittsmasse von 1 kDa tragen, so ließe sich der Massenshift erklären. Diese Annahme ist jedoch aus sterischen Gründen höchst unwahrscheinlich und daher zu verwerfen.

Proben 4, 6 und 8 wurden aufgrund in der SDS-PAGE sichtbaren Glykosylierungen durch tryptischen Verdauung auf eine massenspektrometrische Analyse vorbereitet.

### **3.2.2.2 Massenspektrometrische Charakterisierung ausgewählter RP-HPLC-Fraktionen**

Durch die Charakterisierung der einzelnen RP-HPLC-Fraktionen mittels Anti-Tau-Antikörper- und Lektin-Western-Blot wurden Glykosylierungen im Bereich der Tau-Banden festgestellt. Um zu prüfen, ob es sich tatsächlich um glykosyliertes Tau-Protein handelt, wurden die Fraktionen 4, 6 und 8 aus der RP-HPLC-Reinigung massenspektrometrisch analysiert. Dazu wurden die Proteine in den Fraktionen 4, 6 und 8 tryptisch verdaut und mittels ZipTip für die Analyse vorbereitet.

Doch auch bei der massenspektrometrischen Analyse zeigte sich – wie schon bei der Total-Tau-Präparation –, dass es auch hier nicht möglich war, glykosylierte Peptide zu identifizieren. Die zahlreichen Messungen ergaben in Summe eine 55%ige Sequenzabdeckung der längsten bovinen Tau-Isoform (Isoform 1). Es konnte – wie bei der Total-Tau-Präparation (vgl. Kapitel 3.1.5) - eine der drei potentiellen Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn<sup>158</sup>-Ala-Thr, Asn<sup>366</sup>-Ile-Thr und Asn<sup>417</sup>-Val-Ser identifiziert werden. Die Position Asn<sup>366</sup> konnte hier unglykosyliert identifiziert werden (vgl. Abbildung 3.29). Dies entspricht den Ergebnissen aus der Total-Tau-Präparation. Die identifizierten Sequenzbereiche sind in Abbildung 3.29 dargestellt.

```
1 maepqrqefdv medhaqgdyt lqdqegmdmp glkesplqtp addgseepgs etsdakstpt
61 aedataplvd egapgeqaaa qapaeiepgt aeeeagigdt snledqaagh vtqarmvskg
121 kdgtgpddkk tkgadgkpgt kiatprgaap pgqkgqanat ripakttptp ktspatmqvq
181 kkpppagaks ergesgksd rsgysspssp gtpgsrsrtp sltpptrep kkvavvrtp
241 kpsaaksrl qaapgpmpdl knvkskigst enlkhqpggg kvqiinkld lsnvskcgs
301 kdnikhvpgg gsvqivykpvl dskvtskcg slgnihhkpg ggqvevksek ldfkdrvqsk
361 igslidnithv pgggnkkiet hkltfrenak aktdhgaeiv ykspvvsdgt sprhlsnvss
421 tgsidmvdsp qlatladevs aslakqgl
```

**Abbildung 3.29:** Darstellung der Aminosäuresequenz der längsten bovinen Tau-Isoform 1 mit 448 Aminosäuren. Die unterlegten Sequenzbereiche wurden massenspektrometrisch identifiziert. Die drei potentiellen Glykosylierungsstellen sind fett gedruckt.

Die geringe Konzentration der Glykosylierungen am Tau-Protein könnte als Grund für die bisher unmögliche Identifizierung der Glykosylierungsstellen angesehen werden. Die schwache Detektion im WGA-Western-Blot und der fehlende Massenshift in der SDS-PAGE (vgl. Abbildung 3.28) deuten auf einen sehr geringen Glykosylierungsgrad der einzelnen Isoformen hin.

Für eine massenspektrometrische Analyse des glykosylierten Tau-Proteins sind die Zucker anscheinend auch zu komplex, um Glykosylierungsstellen identifizieren zu können. Daher wurde versucht, mittels zuckerabdauernder Enzyme die Zuckerbäume zum Teil abzdauen und damit die Peptide, die den noch verbleibenden Zucker am Peptidrückgrat tragen, einer massenspektrometrischen Analyse zugänglich zu machen.

Es wurden die Enzyme Mannosidase, Galaktosidase und Hexosaminidase nacheinander eingesetzt, abhängig von der Struktur der angenommenen Zuckerbäume nach Sato et al. (vgl. auch Kapitel 1.5.4.2). Die einzelnen Zucker wurden dadurch von ihrem freien Ende bis auf die Core-Sequenz, die aus zwei GlcNAc und 3 Mannosen besteht, abgedaut.

Doch auch nach dieser Behandlung war eine massenspektrometrische Identifikation der Glykosylierungsstellen nicht möglich. Dies deutet darauf hin, dass nicht die hohe Komplexität der einzelnen Zucker, sondern der geringe Glykosylierungsgrad des Tau-Proteins für die bisher unmögliche Identifikation der Glykosylierungsstellen verantwortlich ist.

Die Charakterisierung des Tau-Proteins mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese könnte möglicherweise Aufschluss über den Modifikationsgrad und insbesondere den Glykosylierungsgrad des Tau-Proteins geben.

### 3.2.3 Charakterisierung der Twice-cycled-Tau-Präparation mittels zweidimensionaler SDS-PAGE

Aufschluss über den Modifikationsgrad des Tau-Proteins mit all seinen Glykosylierungen und Phosphorylierungen gibt die Charakterisierung mittels Zweidimensionaler Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 2.6). Hier wurden die Proteine zuerst nach ihrem Isoelektrischen Punkt aufgetrennt, der durch das Vorhandensein von Modifikationen beeinflusst wird. Danach erfolgte die Trennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Jeder so erhaltene Spot könnte für einen anderen Modifikationsgrad stehen.

Durch die Phosphorylierung wird der Isoelektrische Punkt (pI) des Tau-Proteins in den sauren pH-Bereich verschoben (Janke et al., 2000). Der Grad der Phosphorylierung, also die Anzahl der negativen Phosphatgruppen, ist entscheidend für den pI des Tau-Proteins. Je stärker das Protein phosphoryliert ist, umso stärker verlagert sich sein pI in den sauren Bereich.

Bei glykosylierten Proteinen ist der Isoelektrische Punkt von der Art und Gewichtung der Zuckerketten an den einzelnen Glykosylierungsstellen abhängig - und somit durch die Zahl der jeweils gebundenen, negativ geladenen NeuNAc-Resten. Die Isoelektrische Fokussierung erlaubt also auch eine wichtige Aussage im Hinblick auf den Sialysierungsstatus eines intakten Glykoproteins. Für das Tau-Protein sollte dies bedeuten, dass sich der pI durch das Tragen von O-Glykosylierungen, die ja bekanntlich kein NeuNAc beinhalten, nicht verändert.

Das Tau-Protein trägt N-glykosidisch gebundene Zucker des komplexen- und mannosereichen-Typs (Sato et al., 2001). Demnach verändert das Tau-Protein, das einen Zuckerbaum des Komplexen Typs trägt, pro Glykosylierung seinen pI um eine negative Ladung in den sauren pH-Bereich. Mannosereiche Zuckerbäume enthalten kein NeuNAc und dürften somit den jeweiligen Isoelektrischen Punkt des Tau-Proteins nicht verändern. Die 5 bovinen Tau-Isoformen haben je einen aus der Sequenz errechenbaren theoretischen pI von 9,18 (Isoform 1), 7,79 (Isoform 2), 10,69 (Isoform 3), 10,63 (Isoform 4) und 10,68 (Isoform 5) (berechnet in GPMW). Hierbei sind die Modifikationen nicht berücksichtigt.

Es sollte daher also möglich sein, durch Anfärbung der verschiedenen Modifikationen - durch einen phosphatabhängigen Anti-Tau 2 Antikörper und durch WGA-Lektin - einzelne Modifikationsvarianten des Tau-Proteins unterscheiden und charakterisieren zu können.

Ziel bei dieser Art der Charakterisierung sollte das Blotting der zweidimensionalen Gele auf PVDF sein mit daran anschließendem Western-Blotting durch Umsetzung mit Anti-Tau 2 Antikörper und WGA-Lektin. Dadurch werden sowohl die phosphattragenden als auch die zuckertragenden Proteine je nach Modifikationsgrad voneinander getrennt detektierbar.

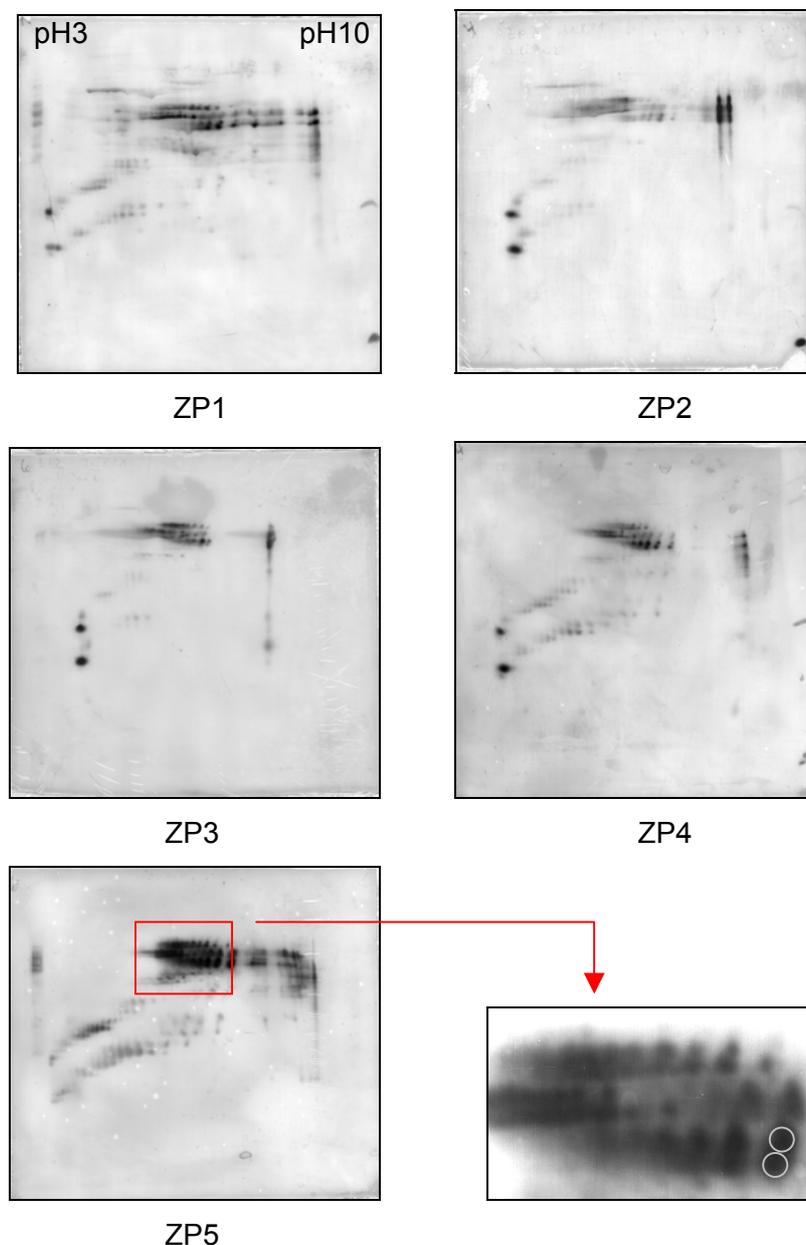
Die Blots können durch eine spezielle Auswerte-Software (Image Master) durch Matchen (Übereinanderlegen) untereinander verglichen werden. Dadurch können die unterschiedlichen Modifikationsvarianten detektiert werden.

Die Proben ZP1 bis ZP5 der Twice-cycled-Tau-Präparation wurden über eine zweidimensionale Gelelektrophorese aufgetrennt, auf PVDF geblottet und mit Anti-Tau 2 Antikörper umgesetzt. Hierbei werden nur Tau-Proteine angefärbt, eventuelle Verunreinigungen sind nur im Silbergel sichtbar. Wie in Abbildung 3.30 zu erkennen ist, weisen ZP1 bis ZP5 ungefähr das gleiche Tau-Spotmuster auf.

Die einzelnen Zwischenprodukte ZP1 bis ZP5 wurden in unterschiedlichen, jeweils abnehmenden Konzentrationen für die zweidimensionale Gelelektrophorese eingesetzt, da während der Twice-cycled-Tau-Präparation die Aufreinigung der Probe und die Konzentration des Tau-Proteins immer mehr zunahm. Lediglich ZP5 wurde in sehr hoher Konzentration eingesetzt, um auch schwach konzentrierte Spots in der Anti-Tau 2 Antikörperfärbung sichtbar zu machen.

Das vorhandene Spotmuster des Tau-Proteins erstreckt sich über den gesamten pH-Bereich zwischen pH 3 und pH 10 wie in Abbildung 3.30 zu sehen ist. Im basischen bis neutralen Bereich treten in 3 verschiedenen Banden zwischen 55 und 66 kDa je Doppelspots auf, die schräg gegeneinander nach oben verschoben sind. Hierbei könnte es sich um die Isoformen handeln, die in ihre einzelnen Modifikationsvarianten aufgetrennt sind, wobei der stetige Shift in den sauren pH-Bereich auf das unterschiedlich große Vorkommen an sauren Phosphatresten am Protein zurückzuführen sein könnte.

Aus dem neutralen in den stark sauren Bereich vereinzeln sich Spots, die ein immer geringeres Molekulargewicht bis hin zu 20 kDa aufweisen. Hierbei könnte es sich um stark phosphorylierte Tau-Abbauprodukte oder große Peptide handeln.



**Abbildung 3.30:** Auftrennung von ZP1 bis ZP5 der Twice-cycled-Tau-Präparation über zweidimensionale Gelelektrophorese. Es wurden folgende Konzentrationen eingesetzt: ZP1: 140µg; ZP2: 100 µg; ZP3: 35 µg; ZP4: 15 µg; ZP5: 50µg. Die Detektion der Tau-Proteine erfolgte mittels Anti-Tau 2 Antikörper. Aus ZP 5 ist der Bereich der potentiell phosphorylierten Isoformen herausvergrößert. Es sind hier an einem Beispiel die Doppelspots umrahmt dargestellt.

Die einzelnen Blots wurden jeweils mit den zugehörigen Silbergelen (hier nicht gezeigt), bei denen alle Proteine angefärbt sind, einer vergleichenden Analyse unterzogen. Es zeigte sich hierbei, dass Tau im ZP1 mit viel Fremdprotein verunreinigt vorlag, im ZP2 und ZP3 nur noch schwach verunreinigt war und im ZP4 und ZP5 im Reinzustand vorlag. Bei den Zwischenprodukten ZP2 und ZP3 wurde angenommen, dass sie durch  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin

verunreinigt sind, da diese Zwischenprodukte aus den Polymerisationsschritten der Twice-cycled-Tau-Präparation entnommen wurden (vgl. Kapitel 2.2.3 und Kapitel 3.2). Diese Annahme wurde durch die Umsetzung eines Blots von ZP2 und ZP3 mit Anti-Tubulin-Antikörpern gegen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin (hier nicht gezeigt) bestätigt. Auch wurden die Blots der Proben ZP1 und ZP5 untereinander verglichen, um festzustellen, ob während der Präparation Spots (also Modifikationsvarianten) verschwunden waren. Es konnte gezeigt werden, dass fast alle Spots noch vorhanden waren. Dies ist der Beweis, dass durch die Twice-cycled-Tau-Präparation das Tau-Protein vollständig und in großer Reinheit aus Rinderhirn aufgearbeitet werden kann.

Neben der Umsetzung der Western-Blots mit Anti-Tau 2 Antikörper wurden Blots der Proben ZP1 bis ZP5 auch mit WGA-Lektin umgesetzt. Es wurden jedoch auch nach diversen Wiederholungen keine Spots auf den PVDF-Membranen entdeckt. Nur beim ZP1 konnten sehr schwache, vereinzelt Spots entdeckt werden. Dies lässt darauf schließen, dass die verschiedenen Tau-Isoformen und Modifikationsvarianten wahrscheinlich nur einzelne Zuckerbäume tragen. Aufgrund ihres zusätzlichen unterschiedlichen Phosphorylierungsgrades lassen sich glykosylierte Proteine dadurch nicht in ein paar vereinzelt Spots aufkonzentrieren.

Das ZP5 ist aufgrund seiner hohen Reinheit und der vorhandenen, in der eindimensionalen SDS-PAGE nachgewiesenen Glykosylierungen am besten für weitere Analysen zur Identifikation von Glykosylierungsstellen geeignet.

### **3.2.4 Identifikation von Glykosylierungsstellen am Tau-Protein**

Die bisherigen Charakterisierungen haben gezeigt, dass das Tau-Protein sowohl in der Total-Tau-Präparation als auch in der Twice-cycled-Tau-Präparation in schwach glykosyliertem Zustand vorliegt (vgl. Abbildungen 3.21 und 3.28). Das glykosylierte Total-Tau ist mit Fremdprotein verunreinigt, wohingegen Tau im ZP5 der Twice-cycled-Präparation in hoch reinem Zustand teilweise glykosyliert vorliegt.

Möglicherweise ist es auf Grund des schwachen Glykosylierungsgrades nicht möglich, einzelne Glykosylierungsstellen am bovinen Tau-Protein massenspektrometrisch zu identifizieren. Es könnte möglich sein, dass die schwachen Signale für die glykosylierten Tau-Sequenzen im MS/MS-Spektrum unterdrückt werden.

Es erschien daher sinnvoll, glykosylierte Tau-Peptide anzureichern, um deren Signalintensität im Massenspektrometer zu erhöhen. Die Technik des Batch-Verfahrens mit an Lektin gebundener Agarose wurde hierfür als sinnvoll und vielversprechend erachtet.

#### **3.2.4.1 Anreicherung von glykosyliertem Tau mittels Lektin-Batch-Verfahren**

Mit Hilfe des Lektin-Batch-Verfahrens wurde versucht, glykosylierte bovine Tau-Peptide aus einer komplexen Mischung zu isolieren und anzureichern (vgl. Kapitel 2.11).

Hierzu wurde tryptisch verdautes ZP5 eingesetzt, bei dem zuvor im Western-Blot durch Umsetzung mit WGA-Lektin Glykosylierungen festgestellt worden waren (siehe Abbildung 3.24). Durch den tryptischen Verdau lag ein Peptidgemisch von glykosylierten und unglykosylierten Peptiden vor. Dieses wurde mit WGA-gebundenen Agarosebeads inkubiert. Hierbei sollten die glykosylierten Peptide an das WGA binden.

Die unglykosylierten Peptide verblieben im Überstand, der nach anschließender Zentrifugation abgenommen wurde. Durch Lösen des Pellets in 0,1M GlcNAc sollten die gebundenen Peptide vom WGA-Lektin kompetitiv verdrängt werden. Danach konnte der mit GlcNAc und Glykopeptid versetzte Überstand abgenommen werden.

Nun wurde versucht, das zur Verdrängung genutzte GlcNAc durch das Einsetzen einer speziellen, für Peptide geeignete Dialysemembran von der restlichen Probe abzutrennen. Nach der Dialyse war die Probe jedoch nach wie vor mit GlcNAc überfrachtet und dadurch sehr zähflüssig. Daher war es nicht möglich, die Probe mittels ZipTip für die massenspektrometrische Analyse vorzubereiten. Da die Entsalzungsproblematik nicht gelöst werden konnte, wurde diese Möglichkeit der Anreicherung von Glykopeptiden verworfen.

Um überhaupt eine Vorstellung zu erlangen, wie sich glykosylierte Peptide im Massenspektrometer verhalten und wie eine Glykosylierungsstelle zu identifizieren ist, wurden verschiedene glykosylierte Peptide selbst synthetisiert und anschließend massenspektrometrisch analysiert.

#### **3.2.4.2 Massenspektrometrische Analyse synthetischer Glykopeptide**

Durch die Analyse von Glykopeptiden ist bekannt, dass diese im Massenspektrometer sehr leicht zerfallen. Die Zuckerstrukturen fallen aufgrund hoher Stoßgasintensitäten schnell von den zugehörigen Peptiden ab. Anschließend wird die Fragmentierung des Peptidrückgrates scheinbar unterdrückt. Eine Bestimmung der Aminosäuresequenz des Peptides und damit



HPLC-Reinigung gefriertrocknet und direkt in das Methanol-Ameisensäuregemisch (60% MeOH, 1% Ameisensäure) aufgenommen, das für die Messungen am Massenspektrometer eingesetzt wird.

Die Charakterisierung der 6 synthetischen Glykopeptide erfolgte mit einem ESI Q-Star Pulsar I (vgl. Kapitel 2.20.2). Als erstes wurde ein Übersichtsspektrum des jeweiligen Peptids aufgenommen. Anhand der zuvor theoretisch berechneten, einfach geladenen Massen der synthetischen Peptide und den daraus berechenbaren, mehrfach geladenen Massen war es schon im Übersichtsspektrum möglich, das jeweilige Peptid in seinen verschiedenen Ladungszuständen zu identifizieren. Dadurch konnten die richtigen Massen über den Product-Ion-Modus selektiert und einer Analyse im MS/MS-Modus unterzogen werden.

Im MS/MS-Modus werden die Peptide durch Stoßinduzierung fragmentiert. Anhand des Fragmentspektrums kann die Sequenz des Peptids bestimmt werden.

Trägt eine Aminosäure mit einer spezifischen Masse eine Modifikation – in unserem Fall ein N-Acetylglucosamin (GlcNAc) –, so erhöht sich die spezifische Masse der Aminosäure im Peptid um die Masse  $m/z = 203,09$  des GlcNAc.

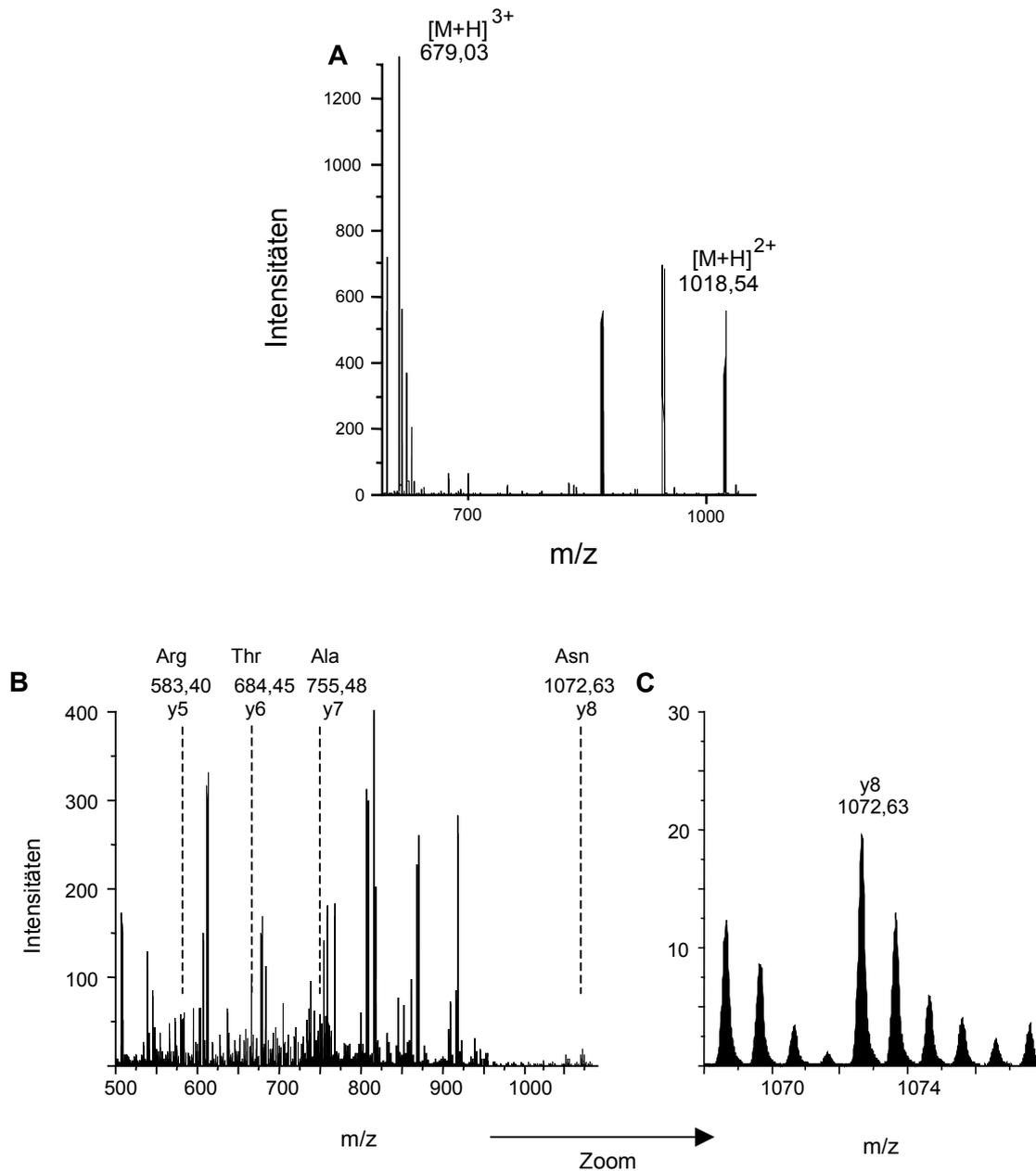
Es wurden alle 6 synthetischen Peptide massenspektrometrisch analysiert. An den drei glykosylierten Peptiden war es möglich, die jeweilige Glykosylierungsstelle zu identifizieren. An dem 27'er Glykopeptid konnten beide Glykosylierungsstellen eindeutig identifiziert werden. Am Beispiel des glykosylierten 19'er-Peptids soll an dieser Stelle die massenspektrometrische Identifizierung einer Glykosylierungsstelle erläutert werden.

Abbildung 3.31A zeigt das Übersichtsspektrum einer massenspektrometrischen Analyse des synthetischen glykosylierten 19'er-Peptids mit der Sequenz GAAPPGQKGQANATRIPAK. Dieses glykosylierte 19'er-Peptid ist an Position 12, der Aminosäure Asparagin, durch ein N-Acetylglucosamin (GlcNAc) glykosyliert. Das Peptid hat dadurch eine theoretische einfach geladene Masse  $m/z = 2036,08$ . Daraus ergibt sich in doppelt geladenem Zustand die Masse  $[M+2H]^{2+} = 1018,54$  und in dreifach geladenem Zustand die Masse  $[M+3H]^{3+} = 679,03$ .

Im Übersichtsspektrum in Abbildung 3.31A sind das dreifach und das doppelt geladene Peptid zu sehen. Da das dreifach geladene Peptid eine höhere Signalintensität aufweist als das doppelt geladene Peptid, also in höherer Konzentration vorliegt, eignet es sich besser für eine Analyse im MS/MS-Modus.

In dem MS/MS-Spektrum des dreifach geladenen glykosylierten 19'er-Peptids (Abbildung 3.31B im Auszug) konnte die Sequenz und die Glykosylierungsstelle in der Sequenz eindeutig identifiziert werden. Die Asparagin-Teilsequenz mit gebundenem N-

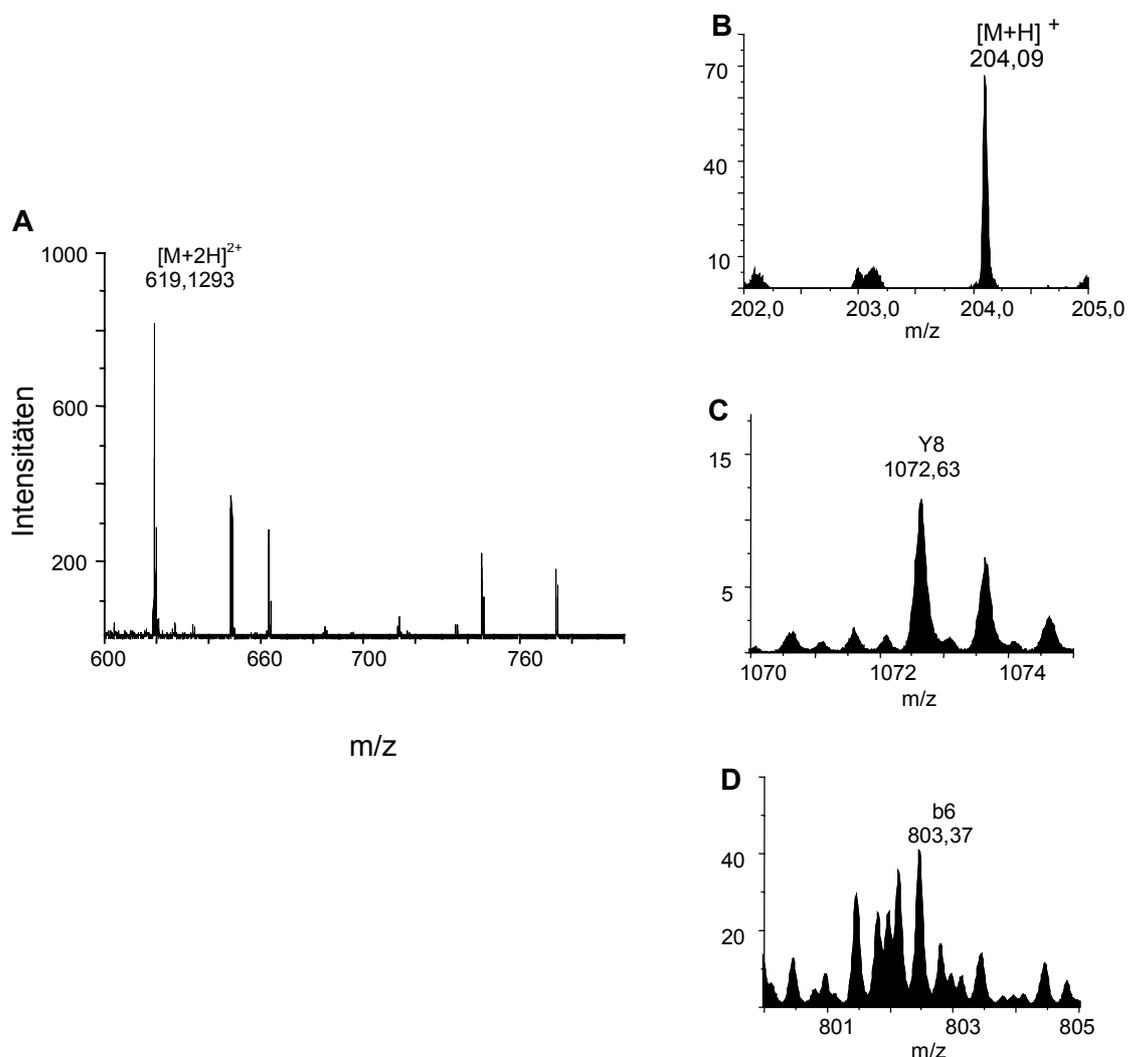
Acetylglucosamin (plus 203,09 Massen) mit einer Masse  $[M+H]^+ = 1072,63$ , ließ sich eindeutig in der Sequenz identifizieren. Dies ist in einem Ausschnitt des MS/MS-Spektrums in Abbildung 3.31C dargestellt. Die Masse der an Position 12 unmodifizierten Asparagin-Teilsequenz war nur sehr schwach in dem Spektrum wiederzufinden (nicht gezeigt).



**Abbildung 3.31:** A zeigt das Übersichtsspektrum des 19'er-Tau-Glykopeptids (GAAPPGQKKGQANATRIPAK) mit glykosyliertem Asparagin an Position 12. B zeigt das MS/MS Spektrum von  $[M+3H]^{3+} = 679,03$ . Die Aminosäureteilsequenzen mit ihren zugehörigen Massen und den entsprechenden Fragmentationen sind eingezeichnet. C zeigt einen Ausschnitt des MS/MS-Spektrums mit der Masse  $m/z = 1072,63$  für die Teilsequenz der Aminosäure Asparagin mit gebundenem N-Acetylglucosamin.

Um einschätzen zu können, ob sich mehrfach glykosylierte Peptide im Massenspektrometer anders verhalten als einfach glykosylierte Peptide, wurde das doppelt glykosylierte, 27 Aminosäuren lange Peptid massenspektrometrisch analysiert. Bei der Synthese dieses

Peptides waren die realen Tau-Sequenzen IGSLDNITHVPPGGN mit dem darin enthaltenen potentiellen N-Glykosylierungsmotiv NIT und KGQANATRIPAK mit dem potentiellen N-Glykosylierungsmotiv NAT miteinander verknüpft worden. Die theoretische einfach geladene Masse dieser doppelt glykosylierten Sequenz beträgt  $[M+H]^+ = 3091,64$ . Daraus ergibt sich in doppelt geladenem Zustand die Masse  $[M+2H]^{2+} = 1546,32$  und in dreifach geladenem Zustand die Masse  $[M+3H]^{3+} = 1031,21$ . Durch die enorme Größe von 27 Aminosäuren zerbricht ein solches Peptid während der massenspektrometrischen Analyse schnell, meist bereits schon im Quadrupol Q0. Daher sind im Übersichtsspektrum oftmals nur noch Massen von Peptidbruchstücken zu detektieren. Auch in diesem Fall war nur eine Teilsequenz sichtbar mit der Masse  $[M+2H]^{2+} = 619,13$ . Diese Teilsequenz wurde selektiert und im MS/MS-Modus sequenziert (siehe Abbildung 3.32A-D)



**Abbildung 3.32:** A zeigt das Übersichtsspektrum des doppeltglykosylierten 27-er-Peptids (vgl. Tabelle 4). In B ist der Einzelpeak des vom Asparagin gelösten N-Acetylglucosamins zu sehen. C zeigt das Asparagin aus dem Sequenzmotiv N<sup>20</sup>AT mit gebundenem GlcNAc als y-Ion. In D ist das Asparagin aus dem Sequenzmotiv N<sup>6</sup>IT mit gebundenem GlcNAc als b-Ion zu sehen.

Bei dieser massenspektrometrischen Analyse der Teilsequenz des doppelt glykosylierten 27'er Peptids konnten beide Glykosylierungsstellen identifiziert werden. Das Spektrum bzw. Ausschnitte daraus sind in Abbildung 3.32A-D dargestellt.

Eindeutiger Hinweis für das Vorhandensein einer Glykosylierungsstelle ist die Identifizierung einer abgespaltenen GlcNAc-Gruppe im MS/MS-Spektrum. Der protonierte GlcNAc-Peak mit der Masse  $[M+H]^+ = 204,09$  ist eindeutig in Abbildung 3.32B zu sehen.

Die Glykosylierungsstelle an Position 20 des doppelt glykosylierten 27'er Peptids befindet sich in dem zweiten Sequenzabschnitt des Peptids. Diese Glykosylierungsstelle war bereits aus den Messungen des glykosylierten 19'er Peptids (dort an Position 12) bekannt. Die glykosylierte Aminosäure Asparagin mit der Masse  $[M+H]^+ = 1072,63$  ist auch in diesem Sequenzabschnitt wieder eindeutig als  $\gamma$ -Ion zu identifizieren (siehe Abbildung 3.32C).

In höheren Massenbereichen werden die Auflösungen der einzelnen Peaks der  $\gamma$ -Ionen immer schlechter. Daher konnte die zweite Glykosylierungsstelle an Position 6 der Sequenz des doppeltglykosylierten 27'er Peptids nur als b-Ion, vom N-Terminus des Peptids ausgehend (vgl. Kapitel 2.20.4, Abbildung 2.12), identifiziert werden. Das Asparagin mit gebundenem GlcNAc hat als b-Ion die Masse  $[M+H]^+ = 803,37$  und konnte in dieser Sequenz eindeutig identifiziert werden (siehe Abbildung 3.32D).

Diese beiden Messungen der glykosylierten synthetischen Peptide haben gezeigt, dass sich Glykosylierungen an einer oder auch an zwei Aminosäuren in einer Sequenz gut nachweisen lassen, wenn die Aminosäuren jeweils nur mit einem einzigen Zucker modifiziert sind. Die Problematik bei nativen Proben besteht jedoch darin, dass im Zuge von N-Glykosylierungen große Zuckerbäume am Peptidrückgrat gebunden sind. Das könnte zu den bisherigen Schwierigkeiten bei der Identifizierung der Glykosylierungsstellen geführt haben. Daher musste eine andere Technik für den Nachweis der genauen Aminosäureposition von gebundenen Zuckern gefunden werden.

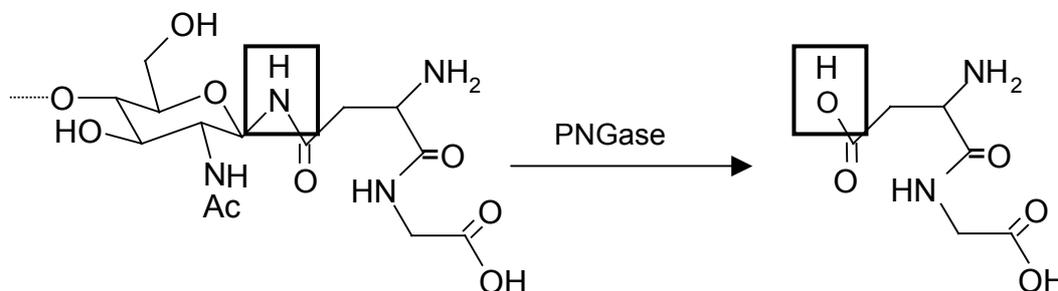
Durch die Möglichkeit der Deglykosylierung der Tau-Peptide mittels N-Glykosidasen A und F vor der massenspektrometrischen Analyse können N-glykosidisch gebundene Zucker direkt vom Asparaginrest abgedaut werden, der dabei zur Asparaginsäure umgesetzt wird. Die Asparaginsäure ist jedoch um eine Masse schwerer als das Asparagin. Dadurch kommt es in der Sequenz des vormals modifizierten Peptids zu einem Massenshift um eine zusätzliche Masse. Solch ein Massenshift lässt sich im Massenspektrometer nachweisen und somit können Rückschlüsse auf eine vormals vorhandene Glykosylierung gezogen werden (Gonzalez et al., 1992; Zhang et al., 2003).

### 3.2.4.3 Massenshift durch Zuckerabtau mit PNGasen am glykosylierten Tau-Protein

Mittels N-Glykosidasen A und F wurden N-glykosidisch gebundene Zucker im ZP5 des Twice-cycled-Tau direkt vom Asparaginrest abgedaut. Es wurden zwei verschiedene Enzyme verwendet. Die N-Glykosidase F – auch PNGase F genannt – spaltet alle Typen asparagingebundener N-Glykanketten, vorausgesetzt, dass sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppen in peptidischer Bindung vorliegen. Die N-Glykosidase A – auch als PNGase A bezeichnet – hat die gleichen Eigenschaften und besitzt zusätzlich noch die Fähigkeit, N-glykosidisch gebundene Kohlenhydratketten zu spalten, die einen  $\alpha(1-3)$ -gebundenen Fucoserest am Asparagin-GlcNAc tragen.

Das Tau-Protein besitzt drei potentielle N-Glykosylierungsstellen in seiner Sequenz und trägt dort komplexe oder mannosereiche Zuckerbäume, die teilweise einen  $\alpha(1-3)$ -gebundenen Fucoserest am Asparagin-GlcNAc tragen (Sato et al., 2001). Daher ist der Einsatz beider N-Glykosidasen sinnvoll.

Das Asparagin mit einer monoisotopischen Masse von  $[M+H]^+ = 114,04$  wird durch den enzymatischen Abtau der Zucker zu Asparaginsäure mit einer monoisotopischen Masse von  $[M+H]^+ = 115,02$  umgesetzt. Die NH-Gruppe des Asparagins, an die das GlcNAc gebunden ist (siehe Abbildung 3.33), wird beim Abspalten des Zuckers durch die PNGasen abgespalten. Sie wird ersetzt durch eine freie OH-Gruppe, die eine Masse schwerer ist. Dieser Massenshift um eine Masse lässt sich im Massenspektrometer nachweisen.



**Abbildung 3.33:** Die Bindung von GlcNAc an das Asparagin ist mittels Strukturformel dargestellt. Die umrahmte NH-Gruppe wird zusätzlich zum GlcNAc durch PNGasen abgespalten und danach durch eine OH-Gruppe ersetzt. Dadurch wird das glykosylierte Asparagin zur deglykosylierten Asparaginsäure.

### 3.2.4.4 Die Massenspektrometrische Identifikation einer Glykosylierungsstelle am Tau-Protein

Durch die Deglykosylierung der Tau-Peptide des ZP5 der Twice-cycled-Tau-Präparation mittels N-Glykosidasen A und F und den dadurch verursachten Massenshift der deglykosylierten Peptide um  $[M+H+1]^+$  wurde versucht, eine Glykosylierungsstelle am bovinen Tau-Protein massenspektrometrisch zu identifizieren.

In diesem Zusammenhang spielt die Isotopenverteilung der Peptide aus einem Gemisch von deglykosylierten und nativen, nicht glykosylierten Peptiden eine zentrale Rolle. Den Einfluss der Isotopie auf das massenspektrometrische Signal möchte ich in einem gesonderten Unterpunkt detailliert beschreiben.

#### 3.2.4.4.1 Einfluss der Isotopie auf das massenspektrometrische Signal

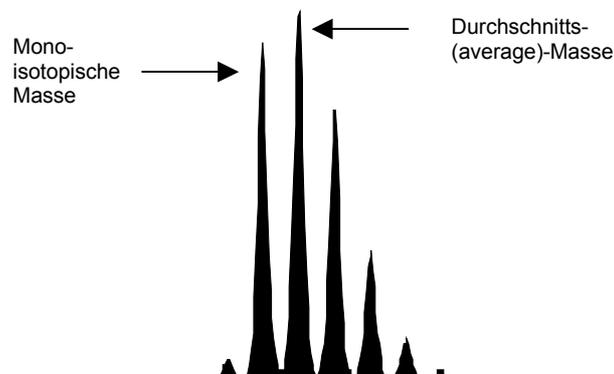
Viele in der Natur vorkommende chemische Elemente sind Gemische von Isotopen. Daher ergeben sich für fast alle natürlichen Moleküle eine Isotopenverteilung entsprechend der Anzahl an unterschiedlichen Massen. In der Massenspektrometrie können die Nebenisotope von Wasserstoff (H), Stickstoff (N) und Sauerstoff (O) wegen des nur sehr geringen Anteils in der Natur vernachlässigt werden. Das Kohlenstoff-Isotop  $^{13}\text{C}$  kommt zu einem hohen Anteil natürlich vor und ist fast allein für die Isotopenmuster von Peptiden und Proteinen verantwortlich. Das monoisotopische Peptid-Ion besteht ausschließlich aus  $^{12}\text{C}$ -Atomen. Zur Verdeutlichung der verschiedenen Möglichkeiten der Isotopie sind einige Beispiele für das Zustandekommen des ersten Isotops der bovinen Tau-Isoform 1, in Abbildung 3.34 dargestellt.

Monoisotopisch	$^{12}\text{C}_{1976} \ ^1\text{H}_{3233} \ ^{14}\text{N}_{589} \ ^{16}\text{O}_{675} \ ^{32}\text{S}_9$	46.303,43
M+1	$^{12}\text{C}_{1975} \ ^{13}\text{C} \ ^1\text{H}_{3233} \ ^{14}\text{N}_{589} \ ^{16}\text{O}_{675} \ ^{32}\text{S}_9$	46.304,43
	$^{12}\text{C}_{1976} \ ^1\text{H}_{3232} \ ^2\text{H} \ ^{14}\text{N}_{589} \ ^{16}\text{O}_{675} \ ^{32}\text{S}_9$	46.304,43
	$^{12}\text{C}_{1976} \ ^1\text{H}_{3233} \ ^{14}\text{N}_{588} \ ^{15}\text{N} \ ^{16}\text{O}_{675} \ ^{32}\text{S}_9$	46.304,43
	$^{12}\text{C}_{1976} \ ^1\text{H}_{3233} \ ^{14}\text{N}_{589} \ ^{16}\text{O}_{674} \ ^{17}\text{O} \ ^{32}\text{S}_9$	46.304,43
	$^{12}\text{C}_{1976} \ ^1\text{H}_{3233} \ ^{14}\text{N}_{589} \ ^{16}\text{O}_{675} \ ^{32}\text{S}_8 \ ^{33}\text{S}$	46.304,43

**Abbildung 3.34:** Fünf verschiedene Möglichkeiten für das Zustandekommen des ersten Isotops der bovinen Tau-Isoform 1.

Die Masse eines Moleküls einer gegebenen Elementarzusammensetzung kann mit der Durchschnittsmasse oder der monoisotopischen Masse berechnet werden. Die Durchschnittsmasse ist die Masse eines Ions, berechnet aus den durchschnittlichen Atomgewichten der einzelnen Elemente unter Berücksichtigung aller Isotope. Die monoisotopische Masse ist die Masse eines Ions, berechnet aus den exakten Massen des jeweils häufigsten Isotops eines Elements.

In Abbildung 3.35 ist am Beispiel eines dreifach geladenen Tau-Peptids die Isotopenverteilung des Peptids mit den zwei berechenbaren Massen dargestellt.



**Abbildung 3.35:** Isotopenverteilung eines dreifach geladenen Tau-Peptid-Ions.

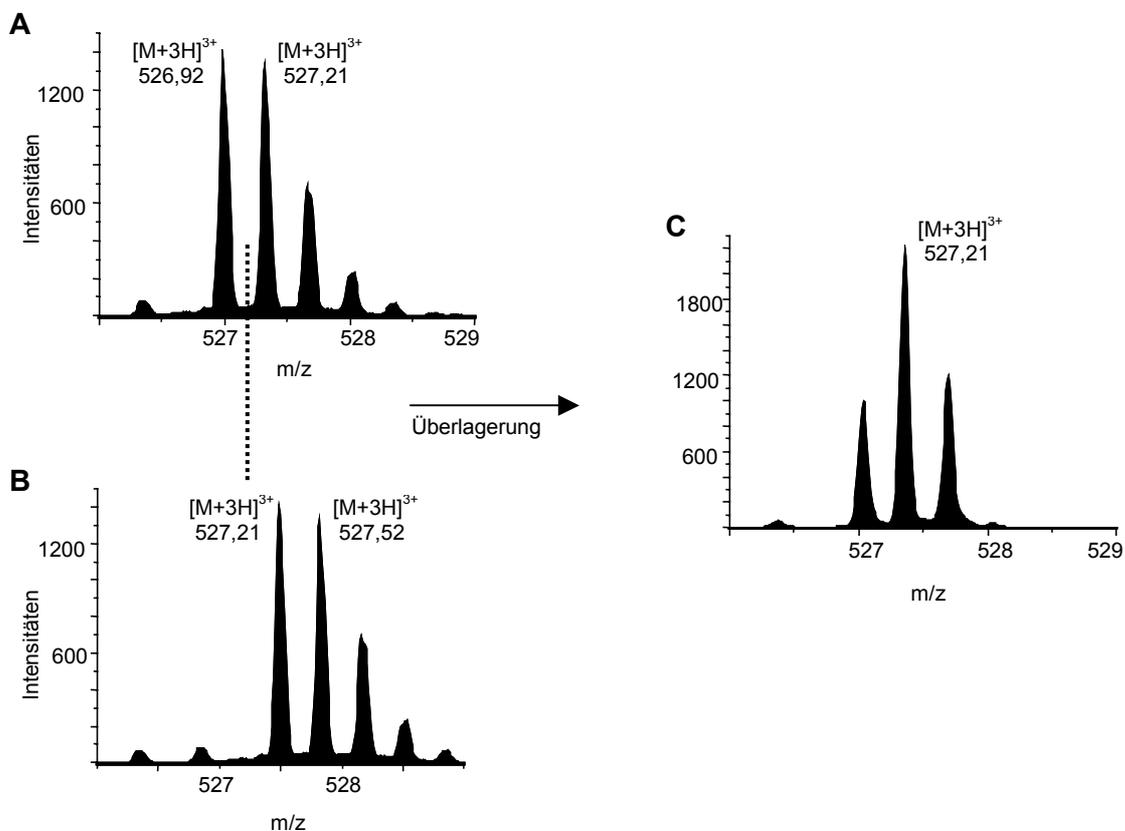
#### 3.2.4.4.2 Isotopenverteilung im Tau-Massenspektrum

Jede Peptidmasse besitzt mehrere Isotope mit unterschiedlich starken Intensitäten. Verändert nun in einem Peptidgemisch ein Teil der Peptide seine Masse um  $[M+H+1]^+$  durch Deglykosylierung mittels PNGasen und der andere Teil verändert seine Masse nicht, da er nicht glykosyliert war, so überlagern infolgedessen die Isotopenmuster der beiden Peptidgruppen miteinander und die Signalintensitäten der Isotope addieren sich durch die Überlagerung auf.

In unserem Fall sitzt dadurch das erste Isotop der asparaginsäurehaltigen und damit schwereren Sequenz auf dem zweiten Isotop der asparaginhaltigen und damit leichteren Sequenz auf usw. Um dies zu verdeutlichen sind in Abbildung 3.36 zwei Tau-Sequenzen aus dem Übersichtsspektrum des tryptisch verdauten ZP5 und deren Überlagerung dargestellt.

Hier sind die verschiedenen Isotopenverteilungen der PNGase-behandelten und -unbehandelten Tau-Sequenz  $^{361}\text{IGSLDN}^{366}\text{ITHVPGGGNK}^{376}$  im dreifach geladenen Zustand abgebildet. In Abbildung 3.36A ist die Isotopenverteilung für die unbehandelte, dreifach geladene Peptid-Sequenz mit der monoisotopischen Masse  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+} = 526,92$  zu sehen. In Abbildung 3.36B ist dieses Peptid um eine Masse schwerer (durch Massenshift), in dreifach geladenem Zustand mit der monoisotopischen Masse  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+} = 527,21$  dargestellt. Diese Isotopenverteilung ist nur eine theoretische Darstellung in Anlehnung an die Isotopenverteilung ihrer unbehandelten Sequenz. Das hier theoretisch dargestellte Isotopenmuster der schwereren Peptidsequenz konnte in den Massenspektren einzeln nicht detektiert werden, da es von der unbehandelten Sequenz überlagert wurde.

Bei Überlagerung dieser beiden Peptid-Sequenzen in dem Tau-Peptid-Gemisch der Probe ZP5 kommt es zu einer Aufsummierung ihrer Isotopen-Signale. Nur das erste Isotop der unbehandelten und dadurch leichteren Sequenz bleibt dabei unverändert. Die Überlagerung ist in Abbildung 3.36C dargestellt.

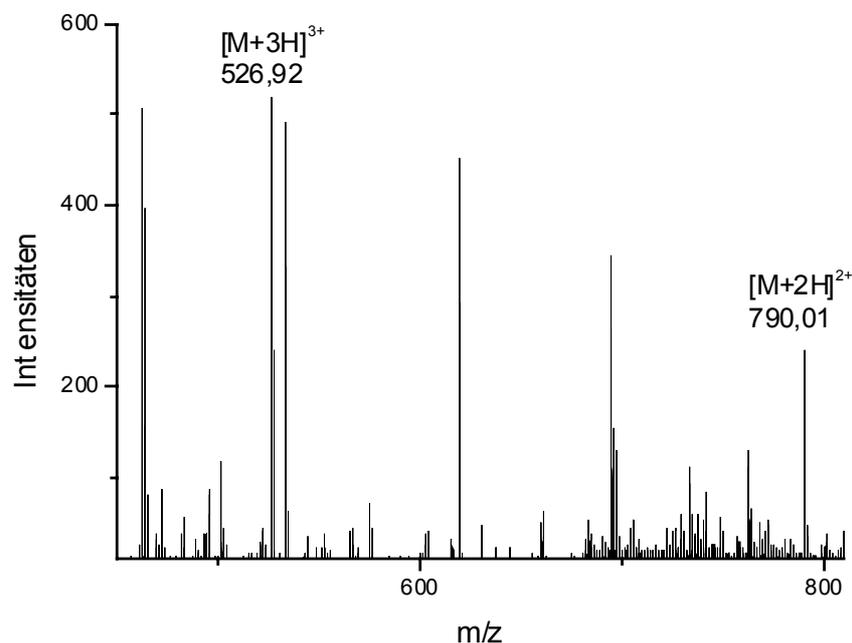


**Abbildung 3.36:** A zeigt die Isotopenverteilung der PNGase-unbehandelten Tau-Sequenz  $^{361}\text{IGSLDN}^{366}\text{ITHVPGGGNK}^{376}$  in dreifach geladenem Zustand mit der monoisotopischen Masse  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+} = 526,92$ . In B ist die theoretische Isotopenverteilung der PNGase-behandelten und somit um eine Masse schwereren Sequenz dargestellt im Vergleich zur Isotopenverteilung ihrer unbehandelten Sequenz. Sie hat die Masse  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+} = 527,21$ . C zeigt die Isotopenverteilung der beiden Peptid-Sequenzen in der realen Probe.

### 3.2.4.4.3 Identifikation der N-Glykosylierungsstelle Asn<sup>366</sup> am nativen bovinen Tau-Protein

Solch ein verändertes Isotopenmuster lässt sich natürlich nur im Vergleich zu der unbehandelten Probe feststellen, in der nur die asparaginhaltige, um eine Masse leichtere Peptidsequenz vorkommt. Die asparaginsäurehaltige Sequenz ist in der unbehandelten Probe nicht zu finden, da hier die Glykosylierungen noch vorhanden sind. Die Isotopenverteilungen einzelner Peptidsequenzen des tryptisch verdauten ZP5 wurden vor und nach Deglykosylierung mittels PNGasen miteinander verglichen. Dies konnte Aufschluss über die ursprüngliche Glykosylierungsstelle in diesen Sequenzen geben. Dies ist nachfolgend detailliert dargestellt.

Abbildung 3.37 zeigt das Übersichtsspektrum eines tryptischen Verdaus von ZP5 des Twice-cycled-Tau nach der Deglykosylierung mit PNGase A und F. Durch das Herauszoomen einzelner Peaks lässt sich deren Isotopenmuster analysieren (vgl. Abbildung 3.36C).



**Abbildung 3.37:** Übersichtsspektrum eines tryptischen Verdaus des ZP5 der Twice-cycled-Tau-Präparation nach PNGase-Behandlung. Die Massen zeigen den zweifachen und dreifachen Ladungszustand des Tau-Peptids mit der Sequenz <sup>361</sup>I<sup>362</sup>G<sup>363</sup>S<sup>364</sup>L<sup>365</sup>D<sup>366</sup>D<sup>367</sup>I<sup>368</sup>T<sup>369</sup>H<sup>370</sup>V<sup>371</sup>P<sup>372</sup>G<sup>373</sup>G<sup>374</sup>G<sup>375</sup>N<sup>376</sup>K. Hier wurde durch den Abbau des Zuckers am Peptidrückgrat die Aminosäure N (Asparagin) an Position 6 zu D (Asparaginsäure) verändert.

In der Sequenz des Tau-Proteins gibt es 3 potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn<sup>158</sup>-Ala-Thr, Asn<sup>366</sup>-Ile-Thr und Asn<sup>417</sup>-Val-Ser. Wird Tau tryptisch verdaut,

liegen diese Motive in definierten Peptidsequenzen vor. Für alle drei tryptischen theoretischen Sequenzen wurden die Massen  $[M+H+1]^+$  für den Massenshift von Asparagin zur Asparaginsäure durch PNGase-Behandlung berechnet. Das Vorhandensein dieser Massen wurde im Tau-Übersichtsspektrum (Abbildung 3.37) überprüft.

Für die durch PNGase-Behandlung veränderte Sequenz  $^{361}\text{IGSLDD}^{366}\text{ITHVPGGGNK}^{376}$  wurden die Signale des dreifach geladenen Peptids mit der Masse  $[M+3H]^{3+} = 526,92$  und des zweifach geladenen Peptids mit der Masse  $[M+2H]^{2+} = 790,01$  gefunden. Diese Peptidmassen sind in Abbildung 3.37 aufgezeigt.

In beiden Fällen war im Vergleich der Isotopenmuster in den Übersichtsspektren der behandelten und unbehandelten Probe die Signalintensität des zweiten Isotops wesentlich größer als die des ersten Isotops. Die Isotopenverteilungen für die dreifachgeladene Sequenz sind in Abbildung 3.36A-C dargestellt. Sie zeigen eine deutliche Überlagerung von zwei Sequenzen, die sich um eine Masse unterscheiden. Der zweite und dritte Isotopenpeak sind stark aufsummiert.

Dies ist der erste Hinweis darauf, dass hier ein Massenshift durch Deglykosylierung stattgefunden hat. Den Beweis dafür liefert der Vergleich zwischen den Isotopenverteilungen der Fragment-Signale in den MS/MS-Spektren der behandelten und unbehandelten Sequenz.

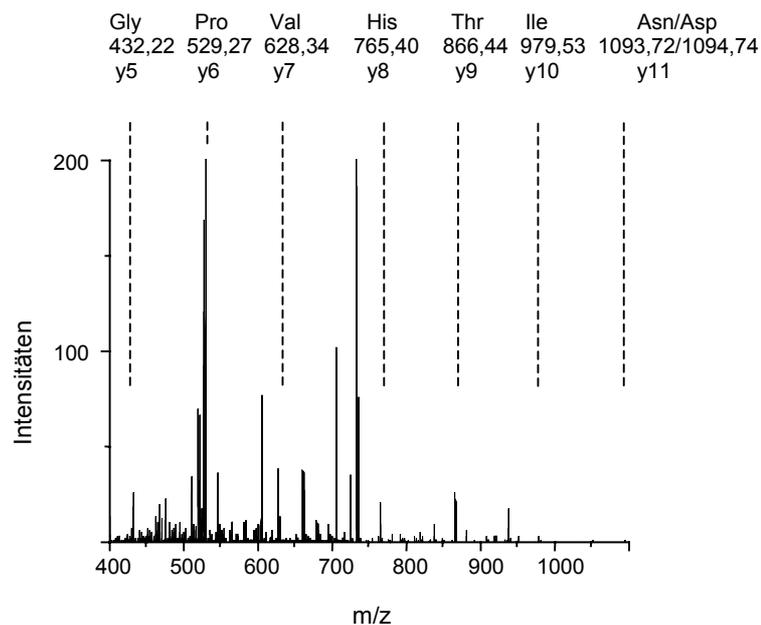
Durch unterschiedliche Resolutionseinstellungen im MS/MS-Modus (vgl. Kapitel 2.6) kann eine bestimmte Masse gezielt selektiert werden. Bei dieser Einstellung wird das Eintrittsfenster der zu selektierenden Masse in das Gerät von der Low-Resolution- über die Unit-Resolution- bis hin zur High-Resolution-Einstellung immer kleiner.

Die Low-Resolution-Einstellung wird standardmäßig im MS/MS-Modus verwendet. Hierbei werden alle Isotope einer bestimmten Masse zur MS/MS-Analyse zugelassen.

Die Unit-Resolution-Einstellung ist in der Lage, eine „mass unit“ zu selektieren. Dies bedeutet, dass für ein einfach geladenes Peptid nur ein Isotop selektiert wird, für ein doppelt geladenes Peptid zwei Isotope - also eine Masseneinheit - usw.

In der High-Resolution-Einstellung ist es möglich, jedes beliebige Isotop einzeln zu selektieren und dieses im MS/MS-Modus zu analysieren. Daher ist die High-Resolution-Einstellung von großer Wichtigkeit für den Nachweis eines Massenshifts um eine Masse. Hier kann in den MS/MS-Spektren einzelner Isotope nachgewiesen werden, um welche Sequenz – in unserem Fall die asparaginhaltige oder die asparaginsäurehaltige - es sich handelt.

Bei Vorhandensein zweier Peptide mit gleicher Sequenz, die sich nur durch eine Masse unterscheiden, ist im Isotopenmuster des Precursor-Ions sowie bei den entsprechenden Fragmentation-Signalen die beeinflusste Isotopenverteilung zu erkennen. Das MS/MS-Spektrum von zwei Peptiden mit gleicher Sequenz, die sich nur durch die Aminosäure Asparagin/Asparaginsäure unterscheiden, ist am Beispiel der Tau-Sequenz  $^{361}\text{IGSLDD}^{366}\text{ITHVPGGGNK}^{376}$  in Abbildung 3.38 dargestellt.

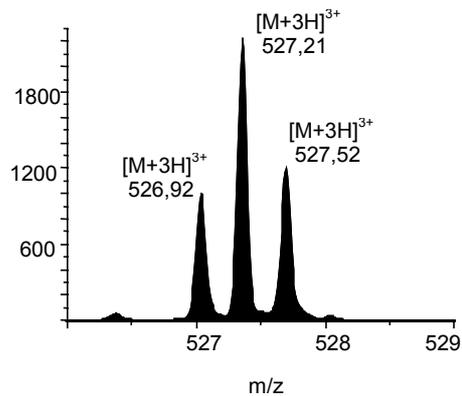


**Abbildung 3.38:** MS/MS-Spektrum des dreifach geladenen Peptids der Sequenz  $^{361}\text{IGSLDD}^{366}\text{ITHVPGGGNK}^{376}$  mit der Masse  $[\text{M}+3\text{H}]^{3+} = 526,92$ . Die Aminosäureteilsequenzen mit ihren zugehörigen Massen und den entsprechenden Fragmentationen y5 – y11 sind eingezeichnet.

Für die Sequenz  $^{361}\text{IGSLDN}^{366}\text{ITHVPGGGNK}^{376}$  hat das Signal für die Aminosäure Asparagin in der Teilsequenz für das y11-Ion die Masse  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1093,74$ . Diese Sequenz wird des weiteren mit N-Sequenz bezeichnet. Verändert sich das Asparagin durch PNGase-Behandlung zur Asparaginsäure, hat das Signal für die Asparaginsäure in der Teilsequenz die Masse  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 1094,72$ . Diese Sequenz wird im weiteren mit D-Sequenz bezeichnet.

Wie sich die Aminosäure-Signale im MS/MS-Spektrum für die N- und D-Sequenz bei Überlagerung der Tau-Sequenz  $^{361}\text{IGSLDN/DITHVPGGGNK}^{376}$  theoretisch verändern würden, möchte ich anhand der Abbildung 3.39 verdeutlichen.

Isotopenverteilung im Übersichtsspektrum



Aminosäure-Intensitäten im MS/MS-Spektrum

$[M+3H]^{3+} = 526,92$ Teilsequenz mit der Masse $[M+H]^+ = 1093,74$ ausschließlich Asparagin, da erstes Isotop ( $^{12}C$ )
$[M+3H]^{3+} = 527,21$ <b>Intensität hoch</b> , Teilsequenz mit Masse $[M+H]^+ = 1094,72$ da erstes Isotop Asparaginsäure ( $^{12}C$ ) <b>Intensität niedrig</b> , Teilsequenz mit Masse $[M+H]^+ = 1093,74$ , da zweites Isotop Asparagin ( $^{13}C$ )
$[M+3H]^{3+} = 527,52$ <b>Intensität hoch</b> , Teilsequenz mit Masse $[M+H]^+ = 1094,72$ da zweites Isotop Asparaginsäure ( $^{13}C$ ) <b>Intensität niedrig</b> , Teilsequenz mit Masse $[M+H]^+ = 1093,74$ , da drittes Isotop Asparagin

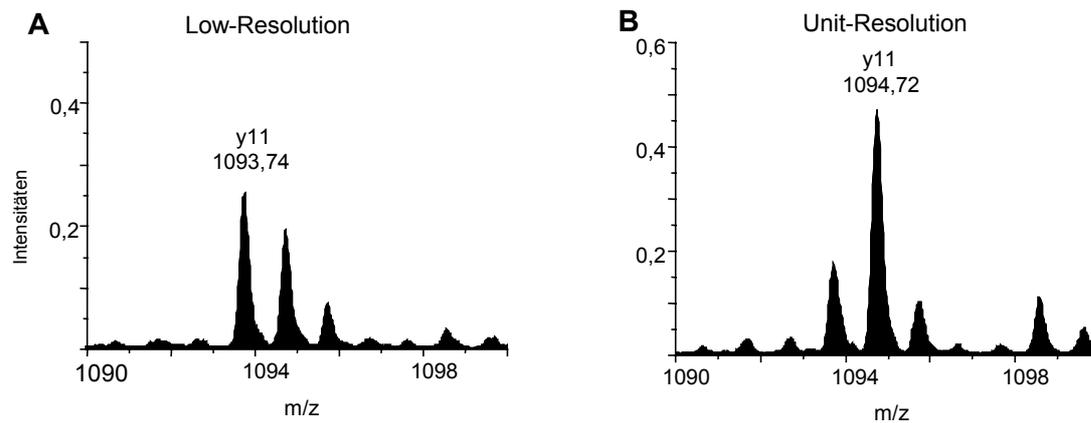
**Abbildung 3.39:** Die linke Seite zeigt die Isotopenverteilung der überlagerten dreifachgeladenen Peptidsequenz  $^{361}IGSLDN/DITHVPGGGNK^{376}$  im bovinen Tau-Protein. Auf der rechten Seite ist für diese Sequenz aufgelistet, in welchen Isotopen die N- und D-Sequenzen in hoher und niedriger Intensität vorkommt.

Für überlagerte Peptid-Sequenzen bedeutet dies, dass im ersten Isotop immer die leichtere Sequenz alleine vorliegt. In unserem Fall handelt es sich hierbei um die N-Sequenz. Im zweiten Peptid-Isotop überlagern sich N- und D-Sequenz, wobei die D-Sequenz hier in höherer Konzentration vorliegen sollte, da sie sich mit ihrem sehr intensiven ersten Isotop auf das wenig intensive zweite Isotop der N-Sequenz addiert. Diese Intensitätenverteilung lässt sich für jedes weitere Isotop gleichermaßen beobachten. Die Gesamtintensitäten nehmen jedoch ab.

Lassen sich diese Beobachtungen auf die Aminosäure-Intensitäten im MS/MS-Spektrum der nativen bovinen Tau-Sequenz übertragen, so ist dies der Beweis für das hauptsächlich Vorhandensein der schweren, asparaginsäurehaltigen Sequenz in den aufaddierten Isotopen. Daraus folgt, dass vor PNGase-Behandlung am Asparagin der Peptidsequenz ursprünglich eine Glykosylierung vorlag.

Die nachfolgenden Abbildungen 3.40 bis 3.42 zeigen jeweils den Vergleich zwischen den Fragmentensignalen der einzelnen Resolution-Einstellungen im MS/MS-Spektrum der zweifach und dreifach geladenen nativen Peptidsequenz  $^{361}IGSLDN/DITHVPGGGNK^{376}$ .

Zunächst sind in Abbildung 3.40 die Low-Resolution- und die Unit-Resolution-Einstellungen für die zweifach geladene D-Peptidsequenz nach PNGase-Behandlung mit der Masse  $[M+2H]^{2+} = 790,01$  im MS/MS-Modus dargestellt.



**Abbildung 3.40:** Resolution-Einstellungen. Hier sind in A die Low-Resolution- und in B die Unit-Resolution-Einstellungen für die zweifachgeladene D-Peptidsequenz mit der Masse  $[M+2H]^{2+} = 790,01$  nach PNGase Behandlung im MS/MS-Modus dargestellt. Die Low-Resolution-Einstellung lässt alle Isotope für den Eintritt in den MS/MS-Modus zu. Die Unit-Resolution-Einstellung selektiert eine Masseneinheit ab einer Masse von  $[M+2H]^{2+} = 790,51$  für den Eintritt in den MS/MS-Modus.

In der Abbildung 3.40 wird deutlich, dass im MS/MS-Spektrum bei Low-Resolution-Einstellung das Signal für die N-Sequenz mit der Masse  $[M+H]^+ = 1093,74$  höher ist als das für die D-Sequenz mit der Masse  $[M+H]^+ = 1094,72$ . Hierbei ist die Intensität der Masse  $[M+H]^+ = 1094,72$  für ein zweites Isotop der N-Sequenz jedoch viel zu hoch. Dies ist ein Hinweis auf eine Überlagerung von zwei Sequenzen, die also auch im MS/MS-Modus sichtbar ist.

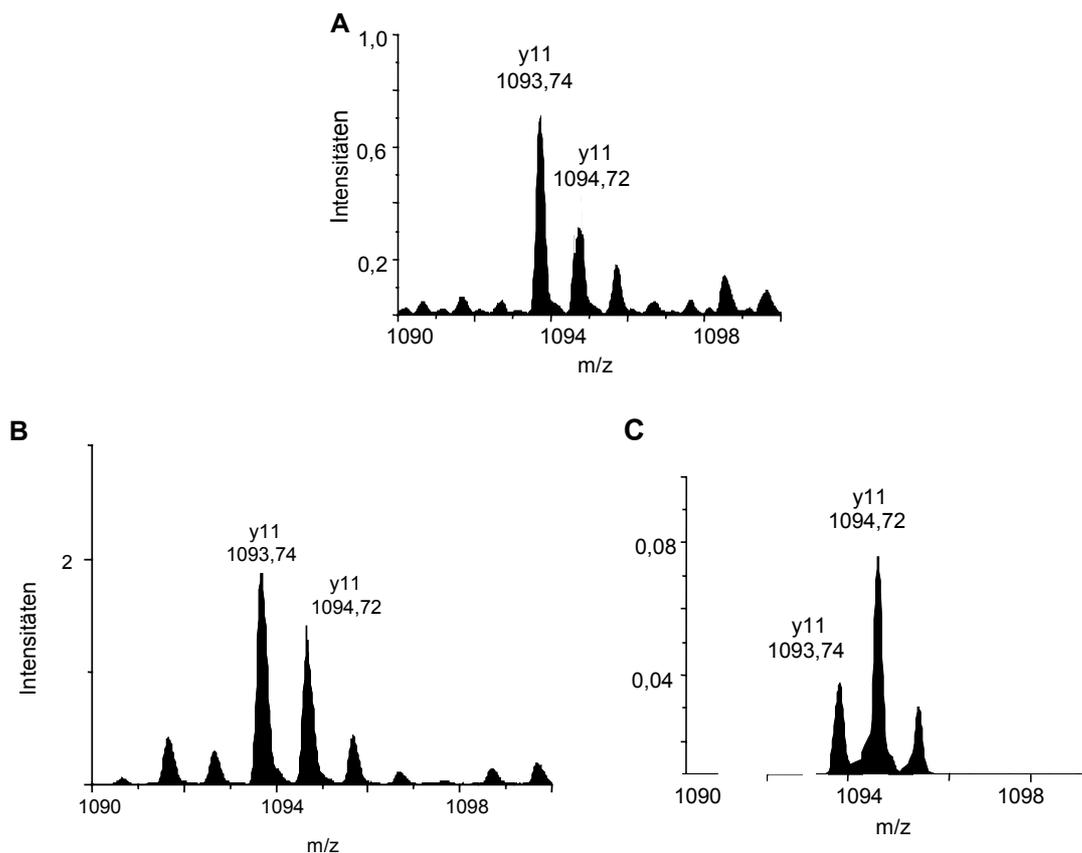
Bei der Unit-Resolution-Einstellung wird eine Masseneinheit für das zweifachgeladene Peptid mit der Masse  $[M+H]^+ = 790,01$  selektiert. Es werden hierbei die ersten beiden Isotope selektiert. Bei der Unit-Resolution-Einstellung in Abbildung 3.40 ist deutlich zu erkennen, dass das Signal der schwereren D-Sequenz mit der Masse  $[M+H]^+ = 1094,72$  das der leichteren N-Sequenz mit der Masse  $[M+H]^+ = 1093,74$  deutlich überragt.

Dies beweist, dass das zweite Isotop der Masse  $[M+2H]^{2+} = 790,01$  aus dem Übersichtsspektrum zu einem Großteil die schwerere Peptidsequenz mit der veränderten Aminosäure D enthält. Das deutet darauf hin, dass durch PNGase-Behandlung des Peptids mit der Masse  $[M+2H]^{2+} = 790,01$  ( $^{361}\text{IGSLDNITHVPGGGNK}^{376}$ ) die Aminosäure Asparagin (N) zur Asparaginsäure (D) umgewandelt wird. Dies äußert sich in einem Masseshift von  $[M+H+1]^+$ , der bei zweifach geladenen Peptiden  $[M+2H+0,5]^{2+}$  beträgt. Somit beweist das veränderte Isotopenmuster der Masse  $[M+2H]^{2+} = 790,51$  im MS/MS-Spektrum, dass die

Aminosäure Asparagin vormals glykosyliert in der Sequenz vorlag. Dieses Ergebnis ist reproduzierbar.

Diese Beobachtungen müssen für eine definitive Behauptung bei der dreifach geladenen Sequenz aus dem Übersichtsspektrum mit der Masse  $[M+3H]^{3+} = 526,92$  (Abbildung 3.37) ebenfalls zutreffen. Hier wurden die Spektren der Resolution-Einstellungen der PNGase behandelten Sequenz zusätzlich mit den MS/MS-Spektren der unbehandelten Sequenz verglichen.

Hier wurden ebenfalls - wie in Abbildung 3.41 dargestellt - die Aminosäure-Isotopen-Verteilungen in den MS/MS-Spektren der behandelten und unbehandelten Sequenz mit der Masse  $[M+3H]^{3+} = 526,92$  anhand der verschiedenen Resolution-Einstellungen überprüft.



**Abbildung 3.41:** Resolution-Einstellungen. Es sind die Low-Resolution- und Unit-Resolution-Einstellungen im MS/MS-Modus für die dreifach geladene unbehandelte Peptidsequenz und für die Peptidsequenz nach PNGase Behandlung mit der Masse  $[M+3H]^{3+} = 526,92$  dargestellt. Die Low-Resolution-Einstellung lässt alle Isotope für den Eintritt in den MS/MS-Modus zu. A zeigt die unbehandelte Sequenz in der Low-Resolution-Einstellung. B zeigt die PNGase-behandelte Sequenz in der Low-Resolution-Einstellung. Die Unit-Resolution-Einstellung selektiert eine Masseneinheit von drei Isotopen ab einer Masse von  $[M+3H]^{3+} = 527,21$  für den Eintritt in den MS/MS-Modus. C zeigt die PNGase-behandelte Sequenz der Masse  $[M+3H]^{3+} = 527,21$  in der Unit-Resolution-Einstellung.

In Abbildung 3.41A sieht man deutlich, dass in der Low-Resolution-Einstellung der unbehandelten Probe im MS/MS-Modus nur die N-Sequenz in der Masse  $[M+3H]^{3+} = 526,92$  vorliegt, da hier die restlichen Isotope nur in sehr geringen Intensitäten vorhanden sind. Das zweite Isotop der N-Sequenz ist etwa um 70% kleiner als das erste Isotop.

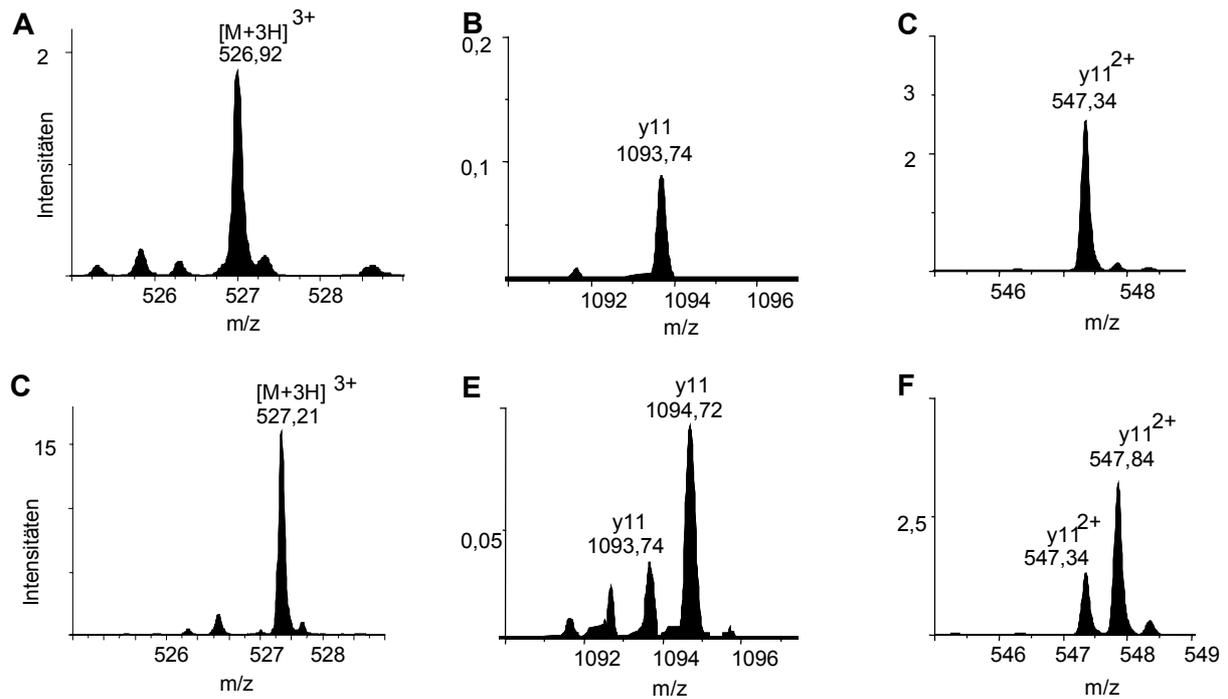
Im Gegensatz zur unbehandelten Sequenz ist in der Low-Resolution-Einstellung der behandelten Sequenz (Abbildung 3.41B) der Peak des zweiten Isotops mit der Masse  $[M+H]^+ = 1094,72$  wesentlich höher, wenn auch immer noch nicht vorherrschend. Seine Intensität macht ungefähr 60% der Gesamtintensität des ersten Isotops aus. Diese Beobachtung stimmt mit denen aus der Low-Resolution-Einstellung der zweifach geladenen Peptidsequenz überein. Es ist also bei der dreifach geladenen Sequenz ebenfalls der erste Hinweis auf eine Sequenzüberlagerung gegeben.

In der Unit-Resolution-Einstellung in Abbildung 3.41C ist deutlich zu erkennen, dass der Peak mit der Masse  $[M+H]^+ = 1094,72$  für die D-Sequenz den der N-Sequenz mit der Masse  $[M+H]^+ = 1093,74$  überragt. Diese Beobachtung stützt ebenfalls den Hinweis auf die Überlagerung von zwei Sequenzen in der Peptidmasse  $[M+3H]^{3+} = 526,92$ .

Treffen diese Beobachtungen auch auf die High-Resolution-Einstellungen der PNGase-behandelten Peptidsequenz zu, die in Abbildung 3.42 dargestellt sind, so ist dies der definitive Beweis für eine Überlagerung zweier Sequenzen. Die Schlussfolgerung aus dieser Erkenntnis ist das ursprüngliche Vorhandensein einer N-Glykosylierung am Asparagin<sup>366</sup>.

In der High-Resolution-Einstellung wird immer nur ein einziges Isotop für den Eintritt in den MS/MS-Modus zugelassen. In Abbildung 3.42A sieht man das selektierte erste Isotop der Masse  $[M+3H]^{3+} = 526,92$  vor dem Eintritt in die Kollisionszelle - also vor der Analyse im MS/MS-Modus. Das erste Isotop liegt hier völlig isoliert und von den restlichen abgetrennt vor.

Im MS/MS-Modus des ersten Isotops (Abbildung 3.42B) ist erwartungsgemäß auch nur die Masse der asparaginhaltigen Teilsequenz von  $[M+H]^+ = 1093,74$  zu erkennen. Die Masse der asparaginsäurehaltigen Teilsequenz von  $[M+H]^+ = 1094,72$  ist definitiv nicht vorhanden. Selbst die zweifach geladene Variante der N-Teilsequenz – in Abbildung 3.42C dargestellt – weist kein zweites Isotop mehr auf. Die D-Teilsequenz ist in diesem ersten Isotop erwartungsgemäß nicht enthalten.



**Abbildung 3.42:** Resolution-Einstellungen. Hier sind in A,B und C die High-Resolution-Einstellungen für das **erste** Isotop mit der Masse  $[M+3H]^{3+} = 526,92$  dargestellt. A zeigt den selektierten Peak vor dem Eintritt in die Kollisionszelle, B zeigt den Peak für die N-Teilsequenz ( $[M+H]^+ = 1093,74$ ) im MS/MS-Spektrum, C zeigt den Peaks für die N-Teilsequenz als 2-fach geladenes Ion im MS/MS-Spektrum. Abbildungen D,E und F zeigen die High-Resolution-Einstellungen für das **zweite** Isotop mit der Masse  $[M+3H]^{3+} = 527,21$ . D zeigt den selektierten Peak vor dem Eintritt in die Kollisionszelle, E zeigt den Peak für die N-Teilsequenz ( $[M+H]^+ = 1093,74$ ) und die D-Teilsequenz ( $[M+H]^+ = 1094,72$ ) im MS/MS-Spektrum, F zeigt die Peaks für die N- und die D-Teilsequenz als 2-fach geladene y-Ionen im MS/MS-Spektrum.

Die Ergebnisse der High-Resolution-Einstellung des zweiten Isotops mit der Masse  $[M+3H]^{3+} = 527,21$  geben nun Aufschluss über eine ursprüngliche Glykosylierung am Asparagin<sup>366</sup> in dieser Peptidsequenz.

In Abbildung 3.42D ist das selektierte zweite Isotop der Peptidmasse  $[M+3H]^{3+} = 526,92$  vor seiner Analyse im MS/MS-Modus zu sehen. Hier ist wieder eine eindeutige Isolation dieses Isotops mit der Masse  $[M+3H]^{3+} = 527,21$  von dem ersten und dem dritten Isotop zu erkennen.

Abbildung 3.42E zeigt das Fragmentierungsverhalten der N- und D-Teilsequenz im MS/MS-Modus. Der Massenpeak der asparaginsäurehaltigen Teilsequenz mit  $[M+H]^+ = 1094,72$  übersteigt hier den der asparaginhaltigen Teilsequenz mit  $[M+H]^+ = 1093,74$  um das Doppelte. Dies ist ebenfalls für die zweifach geladenen Varianten der N- und D-Teilsequenz zu erkennen (Abbildung 3.42F). Die asparaginsäurehaltige Sequenz ist also auch in der dreifach geladenen Peptidsequenz mit der Masse  $[M+3H]^{3+} = 526,92$  zum Grossteil vorhanden.

Diese Beobachtung ist der eindeutige Beweis für die Überlagerung der nativen asparaginhaltigen mit der veränderten asparaginsäurehaltigen Sequenzen. Daraus folgt der Schluss, dass in der Sequenz  $^{361}\text{IGSLNITHVPGGGNK}^{376}$  eine N-Glykosylierung am Asparagin<sup>366</sup> vorhanden war.

Diese Position muss in unserem nativem bovinen Material glykosyliert vorliegen, denn ansonsten wäre das Asparagin nicht durch die Abspaltung des Zuckers mittels PNGasen in Asparaginsäure umgewandelt worden. Ohne PNGase-Behandlung ist nur die asparaginhaltige Sequenz in den untersuchten Massen vorhanden (vgl. Abbildung 3.42).

Dies ist bisher der erste Nachweis einer N-Glykosylierungsstelle am Tau-Protein, der an nativem bovinem Material erbracht wurde.

### 3.3 Charakterisierung von PHF-Tau

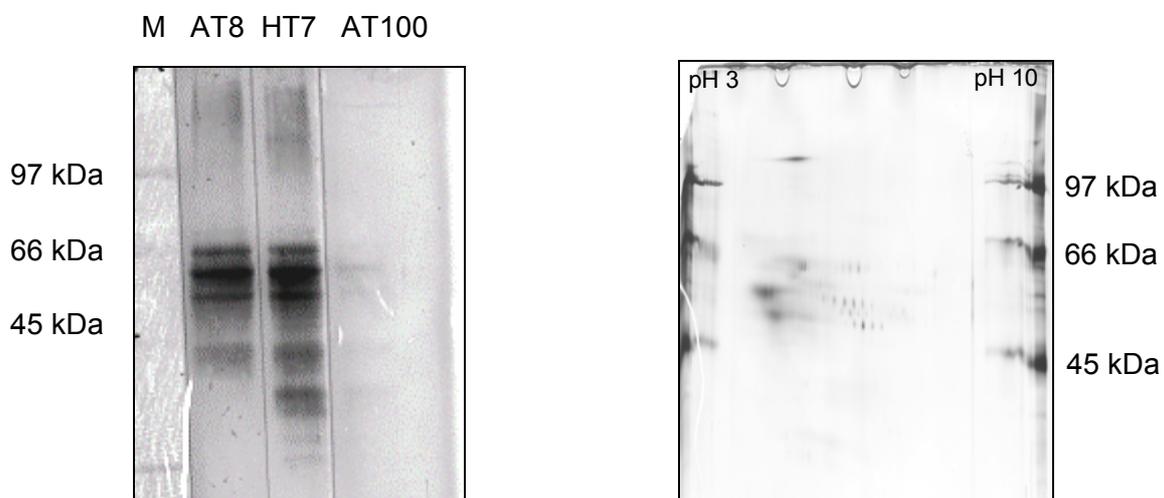
Aufgrund der hohen Sequenz-Homologie diente das bovine Tau-Protein als Modell für humanes Alzheimer-Tau. An dem bovinen Tau-Protein sollte im Rahmen dieser Arbeit das Verhalten der Tau-Peptide im Massenspektrometer analysiert werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten auf PHF-Tau aus Alzheimer-Gehirnen übertragen werden.

In Alzheimer-Hirnen liegt das Tau-Protein in stark glykosylierter und hyperphosphorylierter Form vor. Dadurch wird seine Assoziation an die Mikrotubuli gestört und es lagert sich zu paarigen helicalen Filamenten zusammen, den sog. PHF's (paired helical filaments). Zur Untersuchung von Modifikationen eignet sich PHF-Tau daher besonders gut.

Parallel zu den Versuchen, Glykosylierungsstellen am bovinen Tau-Protein zu identifizieren, wurden Charakterisierungen am PHF-Tau vorgenommen, das uns freundlicherweise von C. Gong aus den USA zur Verfügung gestellt wurde. Das PHF-Tau ist aus der Literatur als besonders stark phosphoryliertes und auch glykosyliertes Protein bekannt (z.B. Johnson et al., 1989). An ihm wurden schon viele Phosphorylierungsstudien am Massenspektrometer durchgeführt (z.B. Hanger et al., 1998).

### 3.3.1 Charakterisierung von PHF-Tau mittels eindimensionaler und zweidimensionaler SDS-PAGE

Das PHF-Tau wurde auf zwei verschiedene Arten und Weisen charakterisiert. Zum einen wurde es elektrophoretisch über ein- und zweidimensionale SDS-PAGE aufgetrennt und mit speziellen Anti-Tau-Antikörpern (AT8, HT7 und AT100, s.u.) umgesetzt. Dies ist in Abbildung 3.43 dargestellt. Zum anderen wurde es tryptisch verdaut, mit ZipTip entsalzt und umgepuffert und dadurch auf eine massenspektrometrische Analyse vorbereitet.



**Abbildung 3.43:** links: 8-18% ige SDS-PAGE mit je 2,6 µg PHF-Tau beladen, auf PVDF geblottet und mit HT7, AT8 und AT100 umgesetzt. rechts: 11%iges zweidimensionales Gel mit 4µg PHF-Tau beladen.

Die eindimensionale 8-18%ige SDS-PAGE in Abbildung 3.43 wurde geblottet und mit den 3 verschiedenen Anti-Tau-Antikörpern AT8, HT7 und AT100 umgesetzt. Das Epitop von AT8 ist phosphoryliertes Serin an Position 202 (auf Isoform 1 bezogen), HT7 markiert Tau ohne Phosphorylierung in der Region 159-163 (Isoform 1) und das Epitop von AT100 ist ein doppelt phosphoryliertes Sequenzstück mit Phospho-Serin 212 und Phospho-Threonin 214. HT7 färbt das PHF-Tau am stärksten, da der Antikörper auf einen unmodifizierten Sequenzbereich angewiesen ist, der wesentlich häufiger in den Tau-Isoformen vorkommt als eine einfache Phosphorylierung (AT8) oder eine doppelte Phosphorylierung (AT100) einer bestimmten Sequenz. Daher markiert AT 8 das PHF-Tau auch nicht so wirkungsvoll wie HT7, jedoch besser als AT 100.

Das Silbergel der zweidimensionalen Gelelektrophorese in Abbildung 3.43 zeigt nur eine schwache Färbung der Tau-Proteine. Es sind nur wenige einzelne Spots zu erkennen;

sichtbar ist ein Schmier im sauren pH-Bereich mit einem Molekulargewicht zwischen 55kDa und 66kDa . Dies lässt auf ungelöstes aggregiertes PHF-Tau schließen. Es ist bekannt, dass sich durch Hyperphosphorylierung der pI von PHF-Tau in den sauren pH-Bereich verschiebt (Sergeant et al., 1997).

### 3.3.2 Massenspektrometrische Charakterisierung von PHF-Tau

Durch die massenspektrometrische Analyse des PHF-Tau konnte ein Großteil der 25 bisher aus der Literatur bekannten Phosphorylierungsstellen (Hanger et al., 1998) bestätigt werden. Wir konnten 11 Phosphorylierungsstellen an den Positionen Thr181, Ser210, Ser214, Thr217, Thr231, Ser235, Ser237, Ser238, Ser396, Ser400, Thr403 nachweisen, die teils einzeln, teils in Kombination in einer Sequenz vorlagen. Weiterhin wurde eine Deamidierung an Position N/D<sup>255</sup> identifiziert. Die Deamidierung wurde in einer Sequenz festgestellt, die nicht zu einem potentiellen N-Glykosylierungsmotiv gehört. Es konnte in Summe eine mehr als 50%ige Sequenzabdeckung - bezogen auf die längste humane Isoform (Isoform 1) – erreicht werden.

Es konnten jedoch am PHF-Tau keine Glykosylierungen nachgewiesen werden. Möglicherweise unterdrücken im MS/MS-Spektrum die Signale für die hyperphosphorylierten Peptide auch hier die schwächeren Signale der Glykosylierungen. Dies war uns aus vorangegangenen massenspektrometrischen Analysen am bovinen Tau-Protein bekannt. Erfolgversprechend für die massenspektrometrische Identifizierung von Glykosylierungsstellen am PHF-Tau wäre möglicherweise auch eine Deglykosylierung des Proteins mittels PNGasen.

Es war nicht möglich, PHF-Tau dahingehend zu charakterisieren, da das Material nicht weiter zur Verfügung stand.

Es war uns alternativ eine Probe aus der Neuropathologie der Uniklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt worden, aus der sich jedoch weder PHF-Tau noch lösliches phosphoryliertes Tau (AD P-Tau) isolieren ließ. Dies könnte daran liegen, dass dieses Material schon mehrere Jahre bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren war und es sich dadurch verändert hat. In tiefgefrorenem Material bei diesen Temperaturen sollte jegliche Enzymaktivität zum Erliegen kommen - daher gibt es keine Erklärung für die Veränderungen in dem Material, die für das Fehlschlagen der Präparationen verantwortlich sein könnten.

## 4. Diskussion

Die Hauptproteinkomponente in den Paired Helical Filaments (PHF's) bei der Alzheimer-Demenz ist das Tau-Protein mit seinen sechs im humanen System vorkommenden Isoformen. In den PHF's kommt Tau in stark glykosylierter und hyperphosphorylierter Form vor. Es wird angenommen, dass das Tau-Protein sowohl O- als auch N-glykosyliert wird, da zum einen die O-Glykosylierung an Serin- und Threonin-Resten in dynamischem Gleichgewicht zu deren Phosphorylierung steht (Hart, 1997) und zum anderen drei potentielle N-Glykosylierungsmotive in der Tau-Sequenz vorhanden sind. Deglykosylierungsstudien am PHF-Tau haben gezeigt, dass es sich durch enzymatische Deglykosylierung wieder entdrillt und löslich wird (Wang et al., 1996).

Daraus ergibt sich die Hypothese, dass möglicherweise eine gestörte Glykosylierungsmaschinerie für die Entstehung von Alzheimer verantwortlich ist. Ziel dieser Arbeit war es, die bisher unbekanntes Glykosylierungsstellen im Tau-Protein mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Ein Vergleich der genauen Positionen der Glykosylierungen von stark glykosyliertem PHF-Tau zu normalem Tau-Protein könnte Hinweise auf die dafür verantwortlichen Enzyme oder Mechanismen geben. Die Ergebnisse könnten auch zu einem neuen Therapieansatz dienen.

### 4.1 Bekannte Glykosylierungen am bovinen Tau und am PHF-Tau

Durch die sehr hohe Sequenzhomologie zu humanem Tau bietet sich als Modellorganismus das Rind an. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass bovines Tau O-glykosyliert vorliegt (Arnold et al, 1996). Diese Erkenntnis beruht auf der Analyse von (<sup>3</sup>H)-Galaktose-markiertem Tau über SDS-PAGE und anschließendem Western-Blotting mit Umsetzung durch WGA (Weizenkeim-Agglutinin). Der Einbau der radioaktiv markierten Galaktose erfolgte in vitro durch Zugabe von Glaktosyl-Transferase. Durch Behandlung mit PNGase F, die N-gebundene Zucker am Proteinrückgrat abtrennt, ließ sich die Galaktose nicht entfernen und somit wurde dies als Beweis für das Vorliegen von O-Glykosylierungen angesehen. Im Gegensatz dazu wurden bisher am PHF-Tau nur N-Glykosylierungen entdeckt (Sato et al., 2001). Durch Behandlung mit Hydrazin wurden hier alle an PHF-Tau gebundenen Zucker abgetrennt. Diese wurden dann enzymatisch vom freien Ende abgedaut. Somit konnten Rückschlüsse auf deren Aufbau getroffen werden. Es wurden nur Zuckerstrukturen, wie sie für N-Glykosylierungen des komplexen- und des mannosereichen-Typs üblich sind, identifiziert. Die genaue Aminosäure-Position der Zucker konnte bisher weder für die O- noch für die N-Glykosylierungen geklärt werden. In meiner Arbeit ist es mir erstmals gelungen,

einen Nachweis für das Vorliegen einer N-Glykosylierungsstelle an dem Motiv Asn<sup>366</sup>-Ile-Thr an nativem bovinem Material zu erbringen.

## **4.2 Charakterisierung des Tau-Proteins**

Das bovine Material wurde uns mit einer Sondergenehmigung vom Düsseldorfer Schlachthof zur Verfügung gestellt. Es musste in frischem Zustand - maximal eine Stunde nach Entnahme - präpariert werden und wurde daher nicht auf BSE getestet. Je frischer das Material war, umso bessere Resultate wurden bei der Präparation erzielt. Es zeigte sich, dass das Tau-Protein aus eingefrorenem Rinderhirn bei  $-80^{\circ}\text{C}$  nicht zu präparieren war. Diese Präparationen schlugen mehrfach fehl. In tiefgefrorenem Material bei diesen Temperaturen sollte zwar jegliche Enzymaktivität zum Erliegen kommen, jedoch ist bekannt, dass durch das Einfrieren die Zellstruktur geschädigt wird. Dies könnte ein Grund für das Fehlschlagen der Präparationen aus tiefgefrorenem Material sein.

Dieses Phänomen wurde zusätzlich an Alzheimer-Material, das bereits mehrere Jahre tiefgefroren war, festgestellt. Es war uns eine Probe aus der Neuropathologie der Universitätsklinik Düsseldorf zur Verfügung gestellt worden, aus der sich weder PHF-Tau noch lösliches phosphoryliertes Tau (AD P-Tau) isolieren ließ. Somit wurde auf präpariertes PHF-Tau von C. Gong aus den USA zurückgegriffen, das Herrn Prof. Dr. Ralf Hoffmann im Rahmen einer Kooperation freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Dieses Material wurde zusätzlich zur bovinen Probe am Massenspektrometer analysiert. Es konnten jedoch keine Glykosylierungen identifiziert werden. Somit konnte der angestrebte Vergleich zwischen den Glykosylierungsstellen an PHF-Tau und normalem Tau (hier bovines Tau) nicht durchgeführt werden.

### **4.2.1 Identifizierung von Glykosylierungen am bovinen Tau-Protein mittels SDS-PAGE**

Durch die Komplexität des Tau-Proteins, hervorgerufen durch seine verschiedenen Isoformen und deren hohen Modifikationsgrad durch Glykosylierung und Phosphorylierung, wurde Tau auf zwei unterschiedliche Arten aus bovinem Hirn aufgearbeitet. Bei der Total-Tau-Präparation wurde Wert auf den Erhalt des vollständigen komplexen Taugehalts des Rinderhirns gelegt, was jedoch auch eine starke Verunreinigung der Probe mit Fremdprotein zur Folge hatte. Die aufwendigere Twice-cycled-Tau-Präparation zielt im Gegensatz dazu auf eine reine Aufarbeitung des Tau-Proteins ab, wobei es jedoch möglich ist, dass einzelne Varianten verloren gehen. Während der Twice-cycled-Tau-Präparation wurden nach bestimmten Aufarbeitungsschritten kleine Aliquots (Zwischenprodukte) genommen (ZP1 bis ZP4) und deren Taugehalte später mit dem des Endproduktes (ZP5) verglichen. Die

Präparationen wurden eindimensional über SDS-PAGE und anschließendes Western-Blotting analysiert. Der vollständige Tau-Gehalt der Proben wurde durch das Einsetzen des Anti-Tau-2-Antikörpers sichtbar gemacht. Durch Behandlung der Blots mit WGA-Lektin konnte das Vorhandensein von Glykosylierungen nachgewiesen werden. Die einzelnen Banden wurden hierbei nur schwach angefärbt, so dass man von einer geringen Konzentration an glykosyliertem Tau ausgehen muss.

Es zeigte sich, dass die durch WGA-Lektin angefärbten Banden in der SDS-PAGE auf gleicher Höhe mit den durch den Antikörper detektierten Tau-Banden lagen. In der Lektinfärbung waren eindeutig die fünf Isoformen des bovinen Taus zu erkennen.

Dies ist verwunderlich, da bisher bekannt war, dass glykosyliertes Tau in der SDS-PAGE einen deutlichen Massenshift aufweist. Liu et al. (2002) wiesen durch Lektinfärbung zusätzlich zu den Isoformen mit einem Molekulargewicht von 55-66 kDa gefärbte Banden zwischen 98 und 200 kDa nach. Es wurde diskutiert, dass es sich hierbei um glykosylierte Tau-Aggregate oder auch glykosyliertes Fremdprotein handeln könnte.

Diese hochmolekularen Banden traten anfangs ebenfalls in den Lektin-Blots der Zwischenprodukte ZP4 und ZP5 unserer Twice-cycled-Tau-Präparation auf (hier nicht gezeigt). Diese Banden waren jedoch nur zu beobachten, wenn die Zwischenprodukte auf die SDS-PAGE aufgetragen wurden, wie sie aus der Twice-cycled-Präparation gewonnen wurden. Wurde zuvor jedoch mittels Centricon umgepuffert, zeigten sich diese hochmolekularen Banden im Lektin-Blot nicht mehr. In den Antikörper-Färbungen waren diese Banden – auch ohne vorheriges Umpuffern - ebenfalls nicht auf den Blots vorhanden. Daher erschien es uns wahrscheinlicher, dass es sich bei diesen hochmolekularen Proteinen nicht um glykosylierte Tau-Aggregate handelt, sondern um glykosyliertes Fremdprotein.

Dies alles sind jedoch Spekulationen, da bisher ein eindeutiger Beweis durch Analyse dieser Banden im Massenspektrometer fehlt.

#### **4.2.2 Kein direkter Nachweis von Glykosylierungen durch Massenspektrometrische Analyse des bovinen Tau-Proteins**

Zur Vorbereitung auf eine massenspektrometrische Analyse müssten die detektierten Banden aus den SDS-Gelen ausgeschnitten und tryptisch verdaut werden. Bei einem tryptischen In-Gel-Verdau sind jedoch Probenverluste zu verzeichnen, da die Probe aus dem Gelstück heraus eluiert werden muss. Somit ist die Gefahr groß, dass von dem ohnehin gering konzentrierten glykosylierten Tau-Protein zu wenig für eine Analyse übrig bleibt. Somit war es sinnvoll, die einzelnen Proben zwar mittels SDS-PAGE und Western-Blotting auf das Vorhandensein von Glykosylierungen zu testen, jedoch nach erbrachtem Nachweis die restliche Probe tryptisch in Lösung zu verdauen und dann massenspektrometrisch zu

analysieren. Bei diesen Analysen konnten für die Total-Tau-Präparation eine 53%ige und für die Twice-cycled-Tau-Präparation eine über 55%ige Sequenzabdeckung erreicht werden. Es wurde jeweils eine der drei potentiellen Glykosylierungsstellen an der Position Asn<sup>366</sup> in unmodifiziertem Zustand identifiziert. Dass die beiden anderen Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn<sup>158</sup> und Asn<sup>417</sup> nicht in unmodifiziertem Zustand identifiziert werden konnten, könnte möglicherweise an der Größe, der durch den tryptischen Verdau entstandenen Peptide liegen. Die Peptide, die die Glykosylierungsstelle Asn<sup>158</sup> beinhalten sind sehr klein. Sie sind in zwei und dreifach geladenem Zustand weniger als 300 Massen schwer. In diesem Bereich finden sich in der Regel sehr viele intensive Lösungsmittel-Signale im massenspektrometrischen Übersichtsspektrum, die die Signale dieser Tau-Peptide unterdrücken könnten.

Die Peptide, die die Glykosylierungsstelle Asn<sup>417</sup> beinhalten sind sehr groß und sind selbst in dreifach geladenem Zustand noch über 1000 Massen schwer. In diesem Bereich konnten im Tau-Übersichtsspektrum keine Signale detektiert werden. Es war jedoch auch nicht möglich, glykosylierte Peptide zu identifizieren. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die Tau-Signale der unmodifizierten Peptide die möglicherweise sehr schwachen Signale der glykosylierten Peptide unterdrücken könnten. Daher erschien es sinnvoll, die glykosylierten Varianten vorab aufzukonzentrieren. Dazu wurde eine Mini-Lektinsäule selbst gefertigt, die es erlauben sollte, nach tryptischem Verdau glykosylierte Peptide anzureichern.

An Testpeptiden konnte gezeigt werden, dass diese Art der Chromatographie funktioniert, jedoch nicht reproduzierbar und verlässlich ist. Trotzdem wurde bei der Total-Tau-Präparation versucht, mit dieser Methode Glykopeptide anzureichern.

Durch Detektion mit WGA ließen sich in daran anschließenden Dot Blots (hier nicht gezeigt) Glykopeptide im Eluat nachweisen, jedoch konnten diese im Massenspektrometer nicht identifiziert werden. Daher wurde versucht, nach der Methode von Sato et al. einen Teil der Zucker vom freien Ende schrittweise enzymatisch abzubauen, um damit die Komplexität der Probe herabzusetzen. Doch auch nach dieser Behandlung ließen sich keine glykosylierten Peptide im Massenspektrometer nachweisen. Dabei ist offen, ob für die fehlgeschlagenen massenspektrometrischen Identifizierungen der Glykosylierungsstellen am nativen Tau-Protein jeweils andere Gründe oder eine einheitliche Schwierigkeit vorlagen.

#### **4.2.3 Ein Versuch, den Modifikationsgrad des bovinen Tau-Proteins mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese zu klären**

Aufschluss über den Modifikationsgrad des Tau-Proteins, der möglicherweise in seiner Komplexität mit all seinen Phosphorylierungen und Glykosylierungen der Grund für die erschwerte Analyse im Massenspektrometer ist, gibt die Charakterisierung mittels

zweidimensionaler Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 2.6). Hier trennen sich die Proteine nach ihrem Isoelektrischen Punkt auf, der durch das Vorhandensein von Modifikationen beeinflusst wird. Jeder erhaltene Spot könnte für einen anderen Modifikationsgrad stehen.

Durch Phosphorylierung wird der Isoelektrische Punkt (pI) des Tau-Proteins in den sauren pH-Bereich verschoben (Janke et al. 2000). Der Grad der Phosphorylierung, also die Anzahl der negativen Phosphatgruppen, ist entscheidend für den pI des Tau-Proteins – je stärker das Protein phosphoryliert ist, umso stärker verlagert sich sein pI in den sauren Bereich. Bei glykosylierten Proteinen ist der Isoelektrische Punkt zusätzlich von der Art und Gewichtung der Zuckerketten an den einzelnen Glykosylierungsstellen abhängig – und somit durch die Zahl der jeweils gebundenen, negativ geladenen NeuNac-Resten. Die Isoelektrische Fokussierung erlaubt also auch eine wichtige Aussage im Hinblick auf den Sialysierungsstatus eines intakten Glykoproteins.

Für das Tau-Protein sollte dies bedeuten, dass sich der pI durch das Tragen von O-Glykosylierungen, die ja bekanntlich kein NeuNac beinhalten, nicht verändert. Das Tau-Protein trägt N-glykosidisch gebundene Zucker des komplexen- und mannosereichen-Typs (Sato et al., 2001). Demnach verändert das Tau-Protein, das einen Zuckerbaum des komplexen Typs trägt, pro Glykosylierung seinen pI um eine negative Ladung in den sauren pH-Bereich. Mannosereiche Zuckerbäume enthalten kein NeuNac und dürften somit den jeweiligen Isoelektrischen Punkt des Tau-Proteins nicht verändern. Die 5 bovinen Tau-Isoformen haben je einen aus der Sequenz berechenbaren theoretischen pI von 9,18 (Isoform 1), 7,79 (Isoform 2), 10,69 (Isoform 3), 10,63 (Isoform 4) und 10,68 (Isoform 5) (berechnet in GPMW). Hierbei sind die Modifikationen nicht berücksichtigt.

Es sollte daher also möglich sein, durch Anfärbung der verschiedenen Modifikationen - durch einen phosphatabhängigen Anti-Tau 2 Antikörper und durch WGA-Lektin – einzelne Modifikationsvarianten des Tau-Proteins unterscheiden und charakterisieren zu können.

Es wurden die Proben ZP1 bis ZP5 der Twice-cycled-Tau-Präparation für die zweidimensionale Gelelektrophorese mit anschließendem Western-Blotting eingesetzt. Neben der Umsetzung der Western-Blots mit Anti-Tau-2-Antikörper, die Aufschluss über den komplexen Phosphorylierungsgrad des Tau-Proteins gaben, wurden die Blots ebenfalls mit WGA-Lektin umgesetzt. Hierbei konnten jedoch auch nach mehrfachen Wiederholungen keine Spots auf den PVDF-Membranen entdeckt werden. Lediglich ZP1 zeigte schwache vereinzelte Spots. Dies lässt darauf schließen, dass die Tau-Isoformen und deren Modifikationsvarianten nur einzelne Glykosylierungen tragen. Aufgrund ihrer zusätzlichen, unterschiedlich starken Phosphorylierung lassen sich daher die glykosylierten Proteine nicht in einzelnen Spots aufkonzentrieren.

Die Auftrennungen der Twice-cycled-Tau-Präparation mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese hätte zum Erfolg führen können, wenn zum einen eine stärkere Glykosylierung des Tau-Proteins vorliegen und/oder zum anderen sich die Glykosylierungen auf wenige Phosphorylierungsmuster aufteilen würden.

Die aus der zweidimensionalen Trennung gewonnene Erkenntnis wird unterstützt durch die Beobachtungen bei den HPLC-Trennungen, die zum Aufreinigen der Präparationen durchgeführt wurden. Auch hier eluierten die glykosylierten Proteine nicht in einer einzelnen Fraktion, sondern über einen weiten Bereich hinweg.

#### **4.2.4 Identifizierung von Phosphorylierungsstellen am PHF-Tau**

Aus diesen Beobachtungen heraus scheint eine Klärung des Modifikationsgrades, insbesondere auch des Phosphorylierungsgrades, sinnvoll für das weitere Verständnis des Verhaltens der Tau-Proteine im Massenspektrometer. Dazu wurde das humane PHF-Tau von C. Gong aus den USA eingesetzt. Das PHF-Tau ist aus der Literatur als besonders stark phosphoryliertes und zum Teil auch glykosyliertes Protein bekannt. An ihm wurden bisher viele Phosphorylierungsstudien am Massenspektrometer durchgeführt (z.B. Hanger et al., 1998). Die bisher bekannten Phosphorylierungsstellen konnten in unseren massenspektrometrischen Analysen teilweise bestätigt werden. Doch auch hier war es uns nicht möglich, ein glykosyliertes Peptid nachzuweisen.

#### **4.3 Wie kann glykosyliertes bovines Tau im Massenspektrometer detektiert werden?**

Anscheinend ist das Tau-Protein so schwach glykosyliert, dass die einzelnen Positionen kaum nachzuweisen sind.

Es erschien daher sinnvoll, nicht das vollständige glykosylierte Tau-Protein, sondern glykosylierte Tau-Peptide anzureichern. Die Technik des Batch-Verfahrens mit an Lektin gebundener Agarose wurde hierfür als sinnvoll und vielversprechend erachtet. Bei diesem Verfahren sollten glykosylierte Peptide aus tryptisch verdautem ZP5 durch Bindung an die WGA-gekoppelten Agarosebeads und anschließender Zentrifugation von den unglykosylierten Peptiden abgetrennt werden. Durch Zugabe von 0,1 M GlcNAc sollten die gebundenen Peptide von dem WGA-Lektin kompetitiv verdrängt werden. Das Problem bestand nun darin, den zur Verdrängung eingesetzten Zucker von den Glykopeptiden wieder abzutrennen. Trotz Einsatz spezieller, für Peptide geeigneter Dialysemembranen gelang dies nicht. Die Probe war nach wie vor mit freiem GlcNAc überfrachtet und sehr zähflüssig. Daher

war es nicht möglich, sie mittels ZipTip für die massenspektrometrische Analyse vorzubereiten. Da die Entsalzungsproblematik nicht gelöst werden konnte, wurde diese Möglichkeit der Anreicherung von Glykopeptiden wieder verworfen.

Um die Methode zur massenspektrometrischen Analyse von glykosylierten Peptiden zu optimieren, wurde das Verhalten von Glykopeptiden anhand synthetisch hergestellter glykosylierter Peptide untersucht. Dazu wurden drei verschiedene Glykopeptide und deren unglykosylierte Varianten selbst synthetisiert und massenspektrometrisch analysiert. Hierbei zeigte sich, dass alle drei Peptide gut zu sequenzieren und deren Glykosylierungsstellen problemlos zu identifizieren waren. Auch das lange, doppelt glykosylierte Peptid mit 27 Aminosäuren konnte vollständig analysiert und beide Glykosylierungsstellen identifiziert werden.

Dies ist der Beweis, dass es uns möglich ist, die Position einzelner gebundener Zucker am Peptidrückgrat zu identifizieren.

Die Problematik bei unseren nativen Proben besteht möglicherweise darin, dass die Tau-Proteine zu schwach glykosyliert vorliegen, um sie massenspektrometrisch analysieren zu können. Dadurch könnten ihre Signale von anderen Peptidsignalen im Massenspektrometer unterdrückt werden. Es musste also eine Möglichkeit gefunden werden, die unterdrückten Glykopeptide auf eine andere Art und Weise einer massenspektrometrischen Identifizierung zugänglich zu machen.

#### **4.3.1 Identifizierung einer N-Glykosylierungsstelle am nativen bovinen Tau-Protein durch Massenshift**

Die Deglykosylierung mittels N-Glykosidasen A und F bietet die Möglichkeit, N-glykosidisch gebundene Zucker direkt vom Asparaginrest im Peptid abzudauen. Dieser wird dabei zur Asparaginsäure umgesetzt, die eine Masse schwerer ist als das Asparagin. Daher wird auch das durch PNGase-Behandlung veränderte Peptid um eine Masse schwerer. Dieser Massenshift von  $[M+H+1]^+$  kann im Massenspektrometer nachgewiesen werden. Es können somit Rückschlüsse auf eine vormals vorhandene Glykosylierung getroffen werden (Gonzalez et al., 1992; Zhang et al., 2003). Daraufhin wurde die Probe ZP5 mit PNGase A und F behandelt, danach tryptisch verdaut und massenspektrometrisch analysiert.

Der Massenshift um  $[M+H+1]^+$  ist im Übersichtsspektrum anhand des veränderten Isotopenmusters des betreffenden Peptid-Signals zu erkennen. Jede Peptidmasse besitzt mehrere natürlich schwerere Isotope mit unterschiedlich starken Intensitäten. Der Peak für

das  $^{12}\text{C}$  -Isotop ist am größten und die Peaks für die nachfolgenden schwereren Isotope - wie bspw.  $^{13}\text{C}$  etc. - werden immer kleiner.

Verändert nun im einem Peptidgemisch ein Teil der Peptide seine Masse um  $[\text{M}+\text{H}+1]^+$  durch Deglykosylierung mittels PNGasen und der andere Teil verändert seine Masse nicht, da er nicht glykosyliert war, so überlagern infolgedessen die Isotopenmuster der beiden Peptidgruppen miteinander.

In diesem Fall sitzt das erste Isotop der asparaginsäurehaltigen und damit schwereren Sequenz auf dem zweiten Isotop der asparaginhaltigen und damit leichteren Sequenz auf. Die Signal-Intensitäten addieren sich auf und infolgedessen übersteigt der zweite Isotopen-Peak den Ersten in seiner Intensität.

Dieses Phänomen ließ sich für die Sequenz  $^{361}\text{IGSLDNITHVPGGGNK}^{376}$  beobachten, bei der das Asparagin in dem potentiellen N-Glykosylierungsmotiv  $\text{N}^{366}\text{IT}$  durch PNGase-Behandlung zur Asparaginsäure umgewandelt wurde. Diese Sequenz lag im Übersichtsspektrum zweifach und dreifach positiv geladen vor. Den definitiven Beweis lieferten die Isotopenverteilungen der Aminosäurepeaks der beiden MS/MS-Spektren der behandelten im Gegensatz zu der unbehandelten Sequenz. Hierbei wurden die Spektren in drei verschiedenen Resolutioneinstellungen miteinander verglichen.

Durch unterschiedliche Resolutioneinstellungen im MS/MS-Modus kann eine bestimmte Masse ohne ihre verschiedenen natürlichen Isotope selektiert werden. Bei dieser Einstellung wird das Eintrittsfenster der zu selektierenden Massen in das Massenspektrometer von der Low-Resolution- über die Unit-Resolution- bis hin zur High-Resolution-Einstellung immer kleiner.

Die Low-Resolution-Einstellung wird standardmäßig im MS/MS-Modus verwendet. Hierbei werden alle Isotope einer bestimmten Masse zur MS/MS-Analyse zugelassen. Die Unit-Resolution-Einstellung ist in der Lage, eine „mass-unit“ zu selektieren. Dies bedeutet, dass für ein einfach geladenes Peptid nur ein Isotop selektiert wird, für ein doppelt geladenes Peptid zwei Isotope - also eine Masseneinheit - usw. In der High-Resolution-Einstellung ist es möglich, jedes beliebige Isotop einzeln zu selektieren und dieses im MS/MS Modus zu analysieren. Daher ist die High-Resolution-Einstellung von großer Wichtigkeit für den Nachweis eines Massenshifts um eine Masse. Hier kann in den MS/MS-Spektren einzelner Isotope nachgewiesen werden, um welche Sequenz – in unserem Fall die asparaginhaltige oder die asparaginsäurehaltige - es sich handelt.

Im MS/MS-Modus der Unit-Resolution-Einstellung für die Sequenz  $^{361}\text{IGSLDNITHVPGGGNK}^{376}$  war zu beobachten, was sich durch die High-Resolution-Einstellung definitiv beweisen ließ. Im zweiten Isotop der zweifach und auch der dreifach

geladenen Peptidsequenz übersteigt das Signal der asparaginsäurehaltigen Teilsequenz mit der Masse  $[M+H]^+ = 1094,72$  das der asparaginhaltigen Teilsequenz mit der Masse  $[M+H]^+ = 1093,74$ . Dies beweist, dass in dem Peak für das zweite Isotop der zweifach und dreifach geladenen Peptidmasse aus dem Übersichtsspektrum als Hauptbestandteil die asparaginsäurehaltige, durch PNAGase-Behandlung veränderte Sequenz enthalten ist. Folglich muss in der Sequenz  $^{361}\text{IGSLDNITHVPGGGNK}^{376}$  die Position N<sup>366</sup> glykosyliert vorliegen, denn ansonsten hätte sich das Asparagin nicht durch die Abspaltung des Zuckers mittels PNGasen in Asparaginsäure umgewandelt. Ohne PNGase-Behandlung ist nur die asparaginhaltige Sequenz in den untersuchten Massen vorhanden.

Dies ist der erste Nachweis einer N-Glykosylierungsstelle, der an nativem bovinem Material bisher erbracht wurde.

Darauf aufbauend könnte im nächsten Schritt geklärt werden, ob die Glykosylierung an der Position N<sup>366</sup> krankheitskorreliert ist. Wäre dies der Fall, so müsste getestet werden, ob sich aus dieser Erkenntnis ein vereinfachter Diagnose- oder Therapieansatz in der Alzheimer-Demenz ergeben könnte.

## 5. Zusammenfassung

Die Hauptproteinkomponente in den Paired Helical Filaments (PHF's) bei der Alzheimer-Demenz ist das Tau-Protein mit seinen sechs humanen Isoformen. In den PHF's kommt Tau in stark glykosylierter und hyperphosphorylierter Form vor. Es wird angenommen, dass das Tau-Protein sowohl O- als auch N-glykosyliert wird, da zum einen die O-Glykosylierung an Serin- und Threonin-Resten in dynamischem Gleichgewicht zu deren Phosphorylierung steht (Hart, 1997) und zum anderen 3 potentielle N-Glykosylierungsmotive in der Tau-Sequenz vorhanden sind. Deglykosylierungs-Studien am PHF-Tau haben gezeigt, dass es sich durch enzymatische Deglykosylierung wieder entdrillt und löslich wird (Wang et al., 1996).

Daraus ergibt sich die Hypothese, dass möglicherweise eine gestörte Glykosylierungsmaschinerie für die Entstehung von Alzheimer verantwortlich ist. Ziel dieser Arbeit war es, die bisher unbekannt Glykosylierungsstellen im Tau-Protein mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Ein Vergleich der vermutlich veränderten Sites von stark glykosyliertem PHF-Tau zu normalem Tau-Protein könnte Hinweise auf die dafür verantwortlichen Enzyme oder Mechanismen geben. Eine gezieltere Behandlung von Alzheimer-Patienten wäre somit möglich.

Durch die sehr hohe Sequenzhomologie zu humanem Tau bietet sich als Modellorganismus das Rind an. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass bovines Tau O-glykosyliert vorliegt (Arnold et al, 1996).

Aufgrund der Komplexität des Proteins erschien es anfangs sinnvoll, Tau auf zwei verschiedene Arten aus Rinderhirn aufzuarbeiten. Es zeigte sich jedoch, dass nur eine Präparation, die sog. Twice-cycled-Tau-Präparation, Tau in so reiner Form lieferte, dass es massenspektrometrisch gut analysiert werden konnte. Die beiden Präparationen wurden über eindimensionale SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blotting und Umsetzung mit Anti-Tau 2 Antikörper und WGA-Lektin charakterisiert. Zusätzlich wurde die Twice-cycled-Tau-Präparation über zweidimensionale SDS-PAGE analysiert. Durch den Vergleich zwischen der Antikörper-Detektion und der WGA-Färbung wurde festgestellt, dass die Tau-Proteine schwach glykosyliert in den Präparationen vorlagen.

In allen massenspektrometrischen Analysen der beide Präparationen ließen sich zwar Tau-Peptide nachweisen, jedoch konnten keine glykosylierten Peptide detektiert werden. An synthetisch hergestellten Peptiden ließen sich - durch Optimierung der Parameter in der massenspektrometrischen Analyse - Glykosylierungen nachweisen und deren Positionen identifizieren.

Durch die Möglichkeit der Deglykosylierung der Tau-Peptide am Asparaginrest mittels N-Glykosidasen A und F konnte schließlich eine N-Glykosylierung am Asparagin<sup>366</sup> nachgewiesen werden. Das Asparagin wird durch die PNGase-Behandlung zur

Asparaginsäure umgesetzt, die eine Masse schwerer ist als das Asparagin. Daraus resultiert ein Massenshift von einer zusätzlichen Masse  $[M+H+1]^+$ , der sich bei der veränderten Peptidsequenz  $^{361}\text{IGSLDNITHVPGGGNK}^{376}$  massenspektrometrisch durch den Vergleich der Intensitäten der Isotopenverteilungen für diese Peptidmasse nachweisen ließ. Dies ist der erste Nachweis einer N-Glykosylierungsstelle an nativem bovinem Material.

## 6. Literatur

- Arnold, C.S., Johnson, G.V.W., Cole, R.N., Dong D.L.-Y., Lee, M., Hart, G.W.: The Microtubule-associated Protein Tau Is Extensively Modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.*, 1996, **271**, 28741-28744.
- Berkowitz, S.A., Katagiri, J., Binder H.K., Williams Jr., R.C.: Separation and Characterisation of Microtubule Proteins from Calf Brain. *Biochemistry*, 1977, **16**, 5610-5617.
- Binder, L.I., Frankfurter, A., Rebhun, L.I., The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J. Cell Biol.*, 1985, **101**, 1371-1378.
- Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.
- Butner, K.A. and Kirschner, M.W.: Tau Protein binds to microtubules through a flexible array of distributed weak sites. *J. Cell Biol.*, 1991, **115**, 717-730.
- Chrambach, A., Reisfeld, R.A., Wychoff, M., Zaccari, J.: A procedure for rapid and sensitive staining of protein fractionated by polyacrylamid gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 1967, **20**, 150-154.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y. and Kirschner, M.W.: Purification of tau, a microtubule-associated protein that induces assembly of microtubules from purified tubulin. *J. Mol. Biol.*, 1977, **116**, 207-225.
- Cleveland, D.W., Hwo, S.Y. and Kirschner, M.W.: Physical and chemical properties of purified tau factor and the role of tau in microtubule assembly. *J. Mol. Biol.*, 1977, **116**, 227-247.
- Drewes, G., Lichtenberg-Kraag, B., Baumann, K., Goris, J., Merlevede, W., Mandelkow, E.: Mitogen activated protein (MAP) kinase transforms tau protein into an Alzheimer-like state. *EMBO J.*, 1992, **11**, 2131-2138.

- Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, H.E., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E.: Mikrotubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p 110<sup>mark</sup>). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 7679-7688.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M.: Electrospray ionization for mass spectrometry of large molecules. *Science*, 1989, **246**, 64-71.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Potier, M.C., Ulrich, J., Crowther, R.A.: Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau consisting four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *EMBO J*, 1989, **8**, 393-399.
- Goedert, M., Cohen, E.S., Jakes, R., Cohen, P.: p42 Map kinase phosphorylation sites in microtubule-associated protein tau are dephosphorylated by protein phosphatase 2A1. Implications for Alzheimer's disease (corrected) (published erratum appears in *FEBS Lett* 1992 Nov 23; 313(2): 203), *FEBS Lett.*, 1992, **312**, 95-99.
- Gong, C.X., Grundke-Iqbal, I., Damuni, Z., Iqbal, K.: Dephosphorylation of microtubule-associated protein tau by protein phosphatase-1 and -2C and its implication in Alzheimer disease. *FEBS Lett.*, 1994, **341**, 94-98.
- Gonzalez, J., Takao, T., Hori, H., Beseda, V., Rodriguez, G.P., Shimonishi, Y.: A Method for Determination of N-Glycosylation Sites in Glycoproteins by Collision-Induced Dissociation Analysis in Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry: Identification of the Position of Carbohydrate-Linked Asparagine in Recombinant  $\alpha$ -Amylase by Treatment with Peptide N-Glycosidase F in <sup>18</sup>O-Labeled Water. *Anal. Biochem.*, 1992, **205**, 151-158.
- Görg, A., Postel, W., Günther, S.: The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, *Electrophoresis*, 1988, **9**, 531-546.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Weiss, W.: 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*, 1999, **20**, 712-717.

- Greenwood, J.A., Scott, C.W., Spreen, R.C., Caputo, C.B., Johnson, G.V.: Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as primary phosphate acceptor. *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 4373-4380.
- Griffith, L.S., Schmitz, B.: O-linked N-acetylglucosamin is upregulated in Alzheimers brains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, **213**, 424-431.
- Gustke, N., Steiner, B., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Meyer, H.E., Goedert, M, Mandelkow, E.: The Alzheimer-like phosphorylation of tau protein reduces microtubule binding and involves Ser-Pro and Thr-Pro motifs. *FEBS Lett.*, 1992, **307**, 199-205.
- Gustke, N., Trinczek, B., Biernat, J., Mandelkow, E.M., Mandelkow, E.: Domains of tau protein and interactions with microtubules. *Biochemistry*, 1994, **33**, 9511-9522.
- Hanger, D.P., Betts, J.C., Loviny, T.L.F., Blackstock, W.P, Anderton, B.H.: New Phosphorylations Sites Identified in Hyperphosphorylated Tau (Paired Helical Filament-Tau) from Alzheimer's Disease Brain Using Nanoelectrospray Mass Spectrometry. *J. Neurochem.*, 1998, **71**, 2465-2476.
- Hart, G.W.: Dynamic o-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, 1997, **66**, 315-335.
- Hasegawa, M., Morishima-Kawashima, M., Takio, K, Suzuki, M, Titani, K., Ihara, Y.: Protein sequence and mass spectrometric analyses of tau in Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.*, 1992, **672**, 17047-17054.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R.: Simplified method for silverstaining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silverstaining. *Elektrophoresis*, 1989, **6**, 103-112.
- Himmler, A., Drechsler, D., Kirschner, M.W., Martin, D.W., Jr.: Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol. Cell Biol.*, 1989, **9**, 1381-1388.

- Ishiguro, K., Omori, A., Takamatsu, M., Sato, K., Arioka, M., Uchida, T., Imahori, K.: Phosphorylation sites on tau by tau protein kinase I, a bovine derived kinase generating an epitope of paired helical filaments. *Neurosci. Lett.*, 1992, **148**, 202-206.
- Ishiguro, K., Shirasuchi, A. Sato, S., Amori, A., Arioka, M., Kobayashi, S., Uchida, T., Imahori, K.: Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  is identical to tau protein kinase I generating several epitopes of paired helical filament. *FEBS Lett.*, 1993, **325**, 167-172.
- Janke, C., Beck, M., Holzer, M., Bigl, V., Arendt, T.: Analysis of the molecular heterogeneity of the microtubule-associated protein tau by two-dimensional electrophoresis and RT-PCR. *Brain Res. Commun.*, 2000, **5**, 231-242.
- Jameson, L., Frey, T., Zeeberg, B., Dalldorf, F., Caplow, M.: Inhibition of microtubule assembly by phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Biochemistry*, 1980, **19**, 2472-2479.
- Johnson, G.V.: Differential phosphorylation of tau by cyclic AMP-dependent protein kinase and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II: metabolic and functional consequences. *J. Neurochem.*, 1992, **59**, 2056-2062.
- Johnson, G.V.W., Jope, R.S., Binder, L.I.: Proteolysis of Tau by Calpain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, **3**, 1505-1511.
- Johnson, G.V.W., Jenkins, S.M.: Tau Protein in Normal and Alzheimer's Disease Brain. *Alzheimers Disease Review*, 1996, **1**, 38-54.
- Johnson, R.S., Martin, S.A. & Biemann, K.: Collision-Induced fragmentation of (M+H)<sup>+</sup> Ions of Peptides. *Int. J. Mass. Spect.*, 1988, **86**, 137-154.
- Jonsson, A.P.: Mass spectrometry for protein and peptide characterisation. *Cell. Mol. Life-Sci.*, 2001, **58**, 868-884.
- Karas, M., Hillenkamp, F.: Laser desorption ionization of proteins with molecular mass exceeding 10,000 daltons. *Analytical Chemistry*, 1988, **60**, 2299-2301.

- Khyse-Anderson, J.: Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, 1984, **10**, 203-209.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t<sub>4</sub>. *Nature*, 1970, **227**, 680-685.
- Lambin, P., Rochu, D., Fine, J.M.: A new method for determination of molecular weights of proteins by electrophoresis across a sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gradient gel. *Anal. Biochem.*, 1976, **74**, 567-575.
- Lambin, P.: Reliability of molecular weight determination of proteins by polyacrylamide gradient gel electrophoresis in the presence of sodium dodecylsulfate. *Anal. Biochem.*, 1978, **85**, 114-125.
- Ledesma, M.D., Bonay, P., Colaco, C., Avila, J.: Analysis of microtubule-associated protein tau glycation in paired helical filaments. *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 21614-21619.
- Lee, G., Cowan, N., Kirschner, M.: The primary structure and heterogeneity of tau protein from mouse brain. *Science*, 1988, **233**, 285-288.
- Lee, V.M., Balin, B.J., Otvos, L., Trojanowski, J.Q.: A68: a major subunit of paired helical filaments and derivatized forms of normal tau. *Science*, 1991, **251**, 675-678.
- Lew, J. and Wang, J.H.: Neuronal cdc2-like kinase. *Trends Biol. Sci.*, 1995, **20**, 33-37.
- Lindwall, G. and Cole, R.D.: The Purification of Tau Protein and the Occurrence of Two Phosphorylation States of Tau in Brain. *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 12241-12245.
- Liu, F., Zaidi, T., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Merkle, R.K., Gong, C.X.: Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Lett.*, 2002, **512**, 101-106.
- Mandelkow, E.M., Drewes, G., Biernat, J., Gustke, N., Van Lint, J., Vendenheede, J.R., Mandelkow, E.: Glycogen synthase kinase-3 and the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau. *FEBS Lett.*, 1992, **314**, 315-321.

- Morishima-Kawashima, M., Hasegawa, M., Takio, K., Suzuki, M., Yoshida, H., Titani, K., Ihara, Y.: Proline-directed and non-proline-directed phosphorylation of PHF-tau. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 823-829.
- Papsozomenos, S.C.: Tau protein immunoreactivity in dementia of the Alzheimer type II. Electron microscopy and pathogenetic implications: Effects of fixation on the morphology of the Alzheimer's abnormal filaments. *Lab. Invest.*, 1989, **60**, 375-389.
- Roepstorff, P.: Proposal for a Common Nomenclature for Sequencing Ions in Mass Spectra of Peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*, 1984, **11**, 601-631.
- Sato, Y., Naito, Y., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Endo, T.: Analysis of N-glycans of pathological tau: possible occurrence of aberrant processing of tau in Alzheimer's disease. *FEBS Letters*, 2001, **496**, 152-160.
- Schweers, O., Schonbrunn-Hanebeck, E., Marx, A., Mandelkow, E.: Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show no evidence for  $\beta$ -structure. *J. Biol. Chem.*, 1994, **269**, 242900-242907.
- Schweers, O., Mandelkow, E.M., Biernat, J., Mandelkow, E.: Oxidation of cysteine 322 in the repeat domain of microtubule-associated protein tau controls the in vitro assembly of paired helical filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, **92**, 8463-8467.
- Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K.: Phosphorylation of Tau at Both Thr 231 and Ser 262 Is Required for Maximal Inhibition of Its Binding to Microtubules. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, **357**, 299-309.
- Sergeant, N., David, J.-P., Goedert, M., Jakes, R., Vermersch, P., Buée, L., Lefranc, D., Delacourte, A.: Two-Dimensional Characterization of Paired Helical Filament-Tau from Alzheimer's Disease: Demonstration of an Additional 74-kDa Component and Age-Related Biochemical Modifications. *J. Neurochem.*, 1997, **69**, 834-844.
- Shapiro, A.L., Vinuela, E., Maizel, J.V.: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1976, **28**, 815-820.

- Song, J.S. and Yang, S.D.: Tau protein kinase I/GSK-3 $\beta$ /kinase F<sub>A</sub> in heparin phosphorylates tau on Ser 199, Thr 231, Ser 235, Ser 262, Ser 369 and Ser400 sites phosphorylated in Alzheimer's disease brain. *J. Protein Chem.*, 1995, **14**, 95-106
- Takahashi, M., Tsujioka, Y., Yamada, T., Tsuboi, Y., Okada, H., Yamamoto, T., Liposits, Z.: Glycosylation of microtubule-associated protein tau in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol*, 1999, **97**, 635-641.
- Vulliet, R., Halloran, S.M., Braun, R.K., Smith, A.J., Lee, G.: Proline-directed phosphorylation of human tau protein. *J. Biol. Chem.*, 1992, **267**, 22570-22574.
- Wang, J.Z., Gong, C.X., Zaidi, T., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K.: Dephosphorylation of Alzheimer paired helical filaments by protein phosphatase-2A and -2B. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 4854-4860.
- Wang, J.Z., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K.: Glycosylation of microtubule-associated protein tau: An abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 1996, **2**, 871-875.
- Weber, K., Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 4406-4412.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W.: A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, **72**, 1858-1862.
- Wilm, M.S., Mann, M.: Electrospray and Taylor-Cone-Theory, Dole's beam of macromolecular at last? *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, 1994, **136**, 167-180.
- Wilm, M., Mann, M.: Analytical Properties of Nanoelectrospray Ion Source. *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 1-8
- Wilson, D.M. and Binder, L.I.: Polymerization of microtubule-associated protein tau under near-physiological conditions. *J. Biol. Chem.*, 1995, **270**, 24306-24314.
- Yang, S.D., Yu, J.S., Shiah, S.G., Huang, J.J.: Protein kinase F<sub>A</sub> / glycogen-synthase-kinase-3- $\alpha$  after heparin potentiation phosphorylates Tau on sites abnormally phosphorylated in Alzheimer's disease brain. *J. Neurochem.*, 1994, **63**, 1416-1425.

---

Zhang, H., Li, X.J., Martin, D.B., Aebersold, R.: Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazine chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, 2003, **21**, 660-666.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Detlev Riesner für die Betreuung meiner Arbeit sowie Herrn Prof. Dr. Hans Werner Müller für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas Ruzicka danke ich für seine Kooperationsbereitschaft und die Sicherstellung des Laborplatzes.

Herrn Prof. Dr. Ralf Hoffmann danke ich für die Überlassung des Themas.

Frau Dr. Sabine Metzger möchte ich herzlich für ihr Engagement, ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihre Fähigkeit zur konstruktiven Kritik danken. Ein besonderer Dank gilt ihr für die wissenschaftliche und emotionale Unterstützung während der nicht immer einfachen Promotionszeit und natürlich auch für das Korrekturlesen der Arbeit.

Meiner Kollegin Marion Gehrke und meinem Kollegen Axel Kühlberg danke ich für die zahlreichen anregenden, beruflichen und auch privaten Diskussionen.

Besonders möchte ich Frau Dr. Cornelia Höner für ihre Unterstützung und ihren Beistand in einer schwierigen Zeit danken.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Mutter Karin Rumpf, die an mich geglaubt hat und mich auch in schwierigen Zeiten ertragen konnte. Ganz besonders möchte ich ihr dafür danken, dass sie meine Pläne immer unterstützt hat.

Schließlich möchte ich mich bei allen bedanken, die nicht namentlich erwähnt sind und die doch in der einen oder anderen Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.