

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-
und Thoraxchirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Prof. h.c. Dr. h.c. Jakob R. Izbicki

Einfluss von Hypoxie auf die O-Glykosylierung humaner Zelllinien

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Alina Strohmaier
aus Backnang

Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 15.11.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Maximilian Bockhorn

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. Jörg Schrader

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Inhaltsverzeichnis | 3 |
| 1 Einleitung | 6 |
| 1.1 Glykosylierung von Proteinen | 6 |
| 1.1.1 O-Glykane | 7 |
| 1.1.1.1 Synthese und Funktion von O-GalNAc Glykanen | 7 |
| 1.1.1.2 Das Tn-Antigen und seine pathophysiologische Rolle | 10 |
| 1.1.1.3 Synthese und Funktion von O-GlcNAc Glykanen | 12 |
| 1.2 Hypoxie im menschlichen Gewebe | 16 |
| 1.2.1 Zelluläre Hypoxie und der Transkriptionsfaktor HIF-1 | 16 |
| 1.2.2 Tumorphypoxie und die Rolle von HIF-1 für die Tumorprogression..... | 18 |
| 1.3 Hypothese der Arbeit | 21 |
| 2 Materialien | 23 |
| 2.1 Geräte | 23 |
| 2.2 Verbrauchsmaterialien | 24 |
| 2.3 Chemikalien | 25 |
| 2.4 Medien und Lösungen..... | 27 |
| 2.5 Primär- und Sekundärantikörper..... | 27 |
| 2.6 Lektine und HRP-Konjugat..... | 28 |
| 2.7 Enzyme und Herstellerkits | 29 |
| 3 Methoden..... | 30 |
| 3.1 Zellbiologische Methoden | 30 |
| 3.1.1 Zelllinien | 30 |
| 3.1.2 Zellkultur | 31 |
| 3.1.3 Induktion von Hypoxie | 31 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.2 | Biochemische Methoden..... | 32 |
| 3.2.1 | Gewinnung von Proteinlysaten..... | 32 |
| 3.2.2 | Proteinkonzentrationsbestimmung (BCA-Test) | 32 |
| 3.2.3 | Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 33 |
| 3.2.3.1 | Immunblot-Analyse (Western Blot)..... | 34 |
| 3.2.3.2 | Immunreaktion (ELISA und Lektin-ELISA) | 35 |
| 3.2.3.3 | ECL-Detektion | 37 |
| 3.2.3.4 | Entfernung gebundener Antikörper vom Western Blot | 37 |
| 3.2.4 | Enzymverdau..... | 38 |
| 3.2.5 | Fraktionierung von Zellkern- und Zytoplasmaproteinen | 39 |
| 3.2.6 | Enzymaktivitätsbestimmung (T-Synthase-Assay) | 40 |
| 3.3 | Molekularbiologische Methoden..... | 41 |
| 3.3.1 | RNA-Extraktion..... | 41 |
| 3.3.1.1 | Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Nukleinsäuren..... | 41 |
| 3.3.2 | Generierung der cDNA | 42 |
| 3.3.3 | PCR-Array | 42 |
| 4 | Ergebnisse | 44 |
| 4.1 | Expression humaner Glykosylierungsgene unter Hypoxie..... | 44 |
| 4.2 | O-GalNAcylierung unter Hypoxie | 46 |
| 4.2.1 | Hypoxie vermindert die T-Synthase-Aktivität..... | 46 |
| 4.2.2 | Hypoxie induziert Tn-Antigen in HEK-Zellen, PANC-1 und HPDE | 49 |
| 4.2.3 | Die hypoxische Tn-Antigen-Expression ist HIF-1 vermittelt | 51 |
| 4.2.4 | Zelluläre Lokalisation des Tn-Antigens..... | 53 |
| 4.3 | O-GlcNAcylierung unter Hypoxie | 54 |
| 4.3.1 | Beeinflussung des GlcNAcylierungs- und Phosphorylierungsstatus | 55 |
| 4.4 | Verifizierung der Ergebnisse durch enzymatischen Glykanverdau..... | 58 |

| | |
|--|-----------|
| 5 Diskussion..... | 60 |
| 5.1 Expression humaner Glykosylierungsgene unter Hypoxie..... | 61 |
| 5.2 Hypoxie induziert Tn-Antigen in HEK-Zellen, dukta- len Pankreaszellen und Pankreaskarzinomzellen | 63 |
| 5.3 Molekulare Mechanismen aberranter O-GalNAcylierung unter Hypoxie | 65 |
| 5.4 Hypoxie-bedingte Beeinflussung der O-GlcNAcylierung und zellulärer Signalwege | 67 |
| 5.5 Hypoxie-induzierte und HIF1- α -vermittelte, differentielle O-Glykosylierung reguliert onkogene Signalwege | 71 |
| 6 Zusammenfassung | 76 |
| 7 Summary | 77 |
| A Abkürzungsverzeichnis | 78 |
| B Abbildungsverzeichnis | 80 |
| C Tabellenverzeichnis..... | 81 |
| D Literaturverzeichnis..... | 82 |
| E Danksagung | 91 |
| F Lebenslauf..... | 92 |
| G Eidesstattliche Versicherung | 93 |
| H Anhang | 94 |

1 Einleitung

1.1 Glykosylierung von Proteinen

Glykosylierung bezeichnet die post- bzw. cotranslationale Modifikation von Proteinen mittels enzymatischer Anknüpfung von Zuckerresten und hat einen modulierenden Effekt auf Proteine, unter anderem durch deren korrekte Faltung. Die Struktur eines Proteins bestimmt seine Hitzestabilität, seine Löslichkeit und die Labilität gegenüber Proteasen. Glykoproteine werden über ihre Struktur in ihrer Aktivität reguliert und nehmen hierüber Einfluss auf intrazelluläre Signalwege. Der Prozess der Glykosylierung wird durch eine Vielzahl von Enzymen (Glykosyltransferasen) ermöglicht. Die Zuckerreste werden hierbei kovalent an die Aminosäuren Serin/Threonin (O-glykosidisch) oder an Asparaginreste (N-glykosidisch) gebunden, wobei entweder sogenannte O- oder N-Glykane entstehen.

N-Glykosylierung erfolgt co- und posttranslational im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Hierbei wird zunächst eine in Eukaryonten evolutionär konservierte Vorläuferstruktur synthetisiert und diese anschließend *en bloc* an die Aminogruppe (-NH₂) eines Asparaginrestes innerhalb einer N-Glykosylierungskonsensussequenz verknüpft. Die Vorläuferstruktur wird anschließend im Golgi-Apparat noch weiter modifiziert.

Die O-Glykosylierung findet posttranslational im Golgi-Apparat statt. Spezifische Glykosyltransferasen übertragen aktivierte Nukleotid-Zucker direkt auf den Proteinvorläufer. Es findet eine kovalente enzymatische Verknüpfung an die Hydroxylgruppe (-OH) von Serin- oder Threoninresten unter Bildung einer Ethergruppe (-O-) statt.

Fertige Glykoproteine werden in die Zellmembran eingebaut, wobei N- und O-Glykane ausschließlich extrazellulär präsentiert werden und in ihrer Gesamtheit die Glykokalyx bilden. Glykoproteine dienen auf der Zelloberfläche zur Adhäsion und Kommunikation mit anderen Zellen, regulieren diverse biologische Vorgänge, wie zum Beispiel Signaltransduktion oder Abbauprozesse und dienen der

Strukturerhaltung sowie bestimmter Transportfunktionen (Taylor et al. 2011, Rassow 2012).

1.1.1 O-Glykane

Bei den O-Glykanen werden zwei große Gruppen unterschieden: Die O-Glykane vom Muzin-Typ und die Proteoglykane. Proteoglykane beinhalten sehr viel größere, anhaftende Glykane als Muzine. Ein Proteoglykan besteht aus mehreren hunderten, linearen Mono- oder Disaccharidketten, wie man sie auch auf Muzinen findet, welche zusätzlich untereinander quervernetzt sind. Daraus ergibt sich ihre stabile und gleichzeitig elastische Eigenschaft. Sie kommen in der extrazellulären Matrix von kartilaginären Strukturen oder der Haut vor. Beispiele für Proteoglykane sind die Hyaluronsäure oder Chondroitinsulfat. In dieser Arbeit liegt das Hauptaugenmerk allerdings auf den O-Glykanen vom Muzin-Typ. Muzine sind glykosylierte Proteine, welche sehr gut Wasser binden können. Daher kommen sie vor allem, als Bestandteile der extrazellulären Schleimschicht auf epithelialen Oberflächen, im Gastrointestinal- oder Respirationstrakt vor. Hier wirken sie als Barrierschicht, um die epithelialen und mukosalen Immunzellen vor potentiell schädlichen Mikroorganismen und Krankheitserreger sowie Nahrungsbestandteilen zu schützen (Taylor et al. 2011).

1.1.1.1 Synthese und Funktion von O-GalNAc Glykanen

Die Synthese der O-Glykane vom Muzin-Typ erfolgt in einem mehrstufigen, multi-enzymatischen Prozess direkt am Protein. Hierbei initiieren spezifische Enzyme der Familie der Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferasen (ppGalNAcTs) die ersten Syntheseschritte unter Entstehung einer von acht bekannten Core-Strukturen (Abb. 2), welche alle auf einem α -GalNAc-Rest an Serin oder Threonin basieren. Die Synthese beginnt mit der Übertragung eines aktivierten GalNAc-Moleküls vom Donor Uridin-5'-diphosphat (UDP)-GalNAc durch ein spezifisches Enzym der Familie der Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferasen (ppGalNAcTs) auf den Serin-/Threonin-Rest eines Polypeptids. Hierbei entsteht das Tn-Antigen (Abb. 1) (Brockhausen et al. 2017). Das Tn-Antigen wiederum

Einleitung

dient dann als Akzeptor für weitere im Golgi-Apparat lokalisierte Glykosyltransferasen. So entsteht unter Übertragung eines aktivierten Galaktosemoleküls durch die Core-1- β 1,3-Galactosyltransferase (C1GALT1, T-Synthase) und seinem Chaperon Cosmc (C1GALTC1) die Core-1-Struktur (T-Antigen). Diese durch die T-Synthase katalysierte Modifikation des Tn-Antigens ist die häufigste in menschlichen und murinen Zellen. Das T-Antigen wird anschließend entweder durch das Enzym ST3Gal-I sialyliert, sodass das Sialyl-T-Antigen entsteht, zu größeren Core-1-O-Glykanen verlängert oder durch die Core-2- β 6-GlcNAc-Transferase zu Core-2-O-Glykanen verzweigt (Gillespie et al. 1992). Die zweite Glykosyltransferase, die das Tn-Antigen als Akzeptor verwendet, ist die Core-3- β 1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase (Core-3- β 3-GlcNAcT). Sie synthetisiert die Core-3-Struktur, welche vorwiegend in Muzinen von Magen-, Dünndarm- und Kolongewebe vorkommt (Iwai et al. 2002). Die dritte Glykosyltransferase ist eine spezifische Sialyltransferase (ST6GalNAc-I), welche das Sialyl-Tn-Antigen (STn) herstellt. Das STn-Antigen findet man lediglich in Speicheldrüsen von Rindern. In humanem Gewebe kommt es unter physiologischen Bedingungen nicht vor. Es ist eine terminale Struktur, welche nicht mehr von Glykosyltransferasen verändert werden kann (Lee et al. 1999).

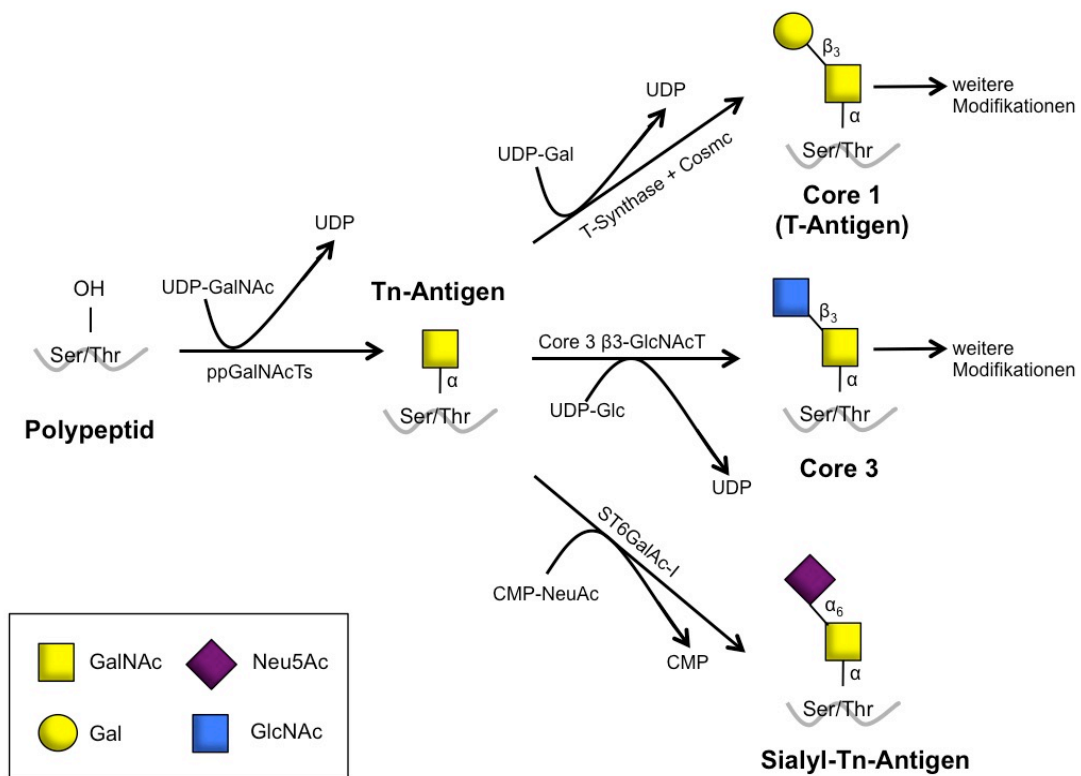


Abbildung 1: Synthese und Struktur des Tn-Antigens und davon abgeleitete O-Glykan-Core-Strukturen vom Muzin-Typ

Dargestellt ist die Synthese des Tn-Antigens durch spezifische Polypeptid-N-Acetylgalactosaminyltransferasen (ppGalNAcTs) und die Verwendung des Tn-Antigens als Substrat für die weitere Anknüpfung von Monosacchariden, unter Entstehung einer von acht Core-Strukturen. Hierbei entsteht zum einen über die Anknüpfung eines Galaktosemoleküls (Gal) durch die Core-1- β 1,3-Galactosyltransferase (C1GALT1, T-Synthase) das T-Antigen, zum anderen die Core-3-Struktur durch Anheftung eines N-Acetylglucosamins (GlcNAc) und das Sialyl-Tn-Antigen durch Sialylierung über eine spezifische Sialyltransferase (ST6GalNAc-I). Modifiziert nach (Ju et al. 2011, Stowell et al. 2015).

In humanem Gewebe werden Core 1 (Gal β 1-3GalNAc-Ser/Thr, Thomsen-Friedenreich-Antigen) und Core 2 (Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc-Ser/Thr) ubiquitär exprimiert und sind vor allem Bestandteile zahlreicher Zelloberflächen-Glykoproteine. Bei Core 3 (GlcNAc β 1-3GalNAc) und Core 4 (GlcNAc β 1-6(GlcNAc β 1-3)GalNAc) lässt sich eine weniger abundante und organspezifische Expression beobachten, welche sich auf die Bronchien, den Gastrointestinaltrakt und auf fetale Muzine beschränkt. Die Core-Strukturen 5 bis 8 treten deutlich seltener auf (Peter-Katalinic 2005, Brockhausen et al. 2017). Diese Core-Strukturen werden Zelltyp-spezifisch, durch Verknüpfung weiterer Monosaccharide modifiziert, welche die *backbone* Region bilden. Die Anknüpfung weiterer Zuckermoleküle und somit Verlängerung der Zuckerkette übernehmen Core-spezifische Glykosyltransferasen. Das Ende der Zuckerkette wird periphere Region genannt und bildet das Epitop eines Glykoproteins (Abb. 2 B). Die Funktionen von O-Glykanen vom Muzin-Typ sind vielseitig. Sie sind involviert in der Migration von Leukozyten, in Angio- und Lymphangiogenese und kommen wie bereits beschrieben als Muzine in und auf Schleimhautgeweben vor (Taylor et al. 2011).

Einleitung

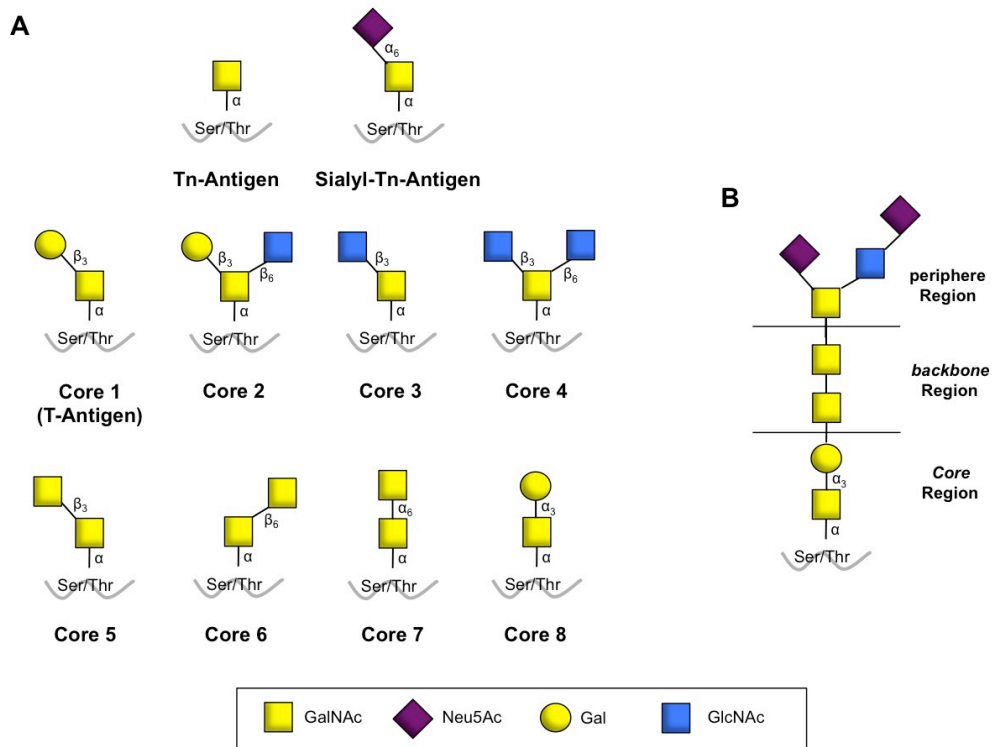


Abbildung 2: Core-Strukturen und struktureller Aufbau der O-Glykane vom Muzin-Typ

Die Grundstrukturen der Zuckerketten von O-Glykanen werden durch ein α -glykosidisch an Serin oder Threonin gebundenes GalNAc gebildet. Bei diesem Syntheseschritt entsteht das Tn-Antigen. An dieses gebundene GalNAc-Molekül werden weitere Monosaccharide verknüpft, diese bilden die sogenannten Core-Strukturen 1-8 (A). Der strukturelle Aufbau eines O-Glykans besteht aus einer von acht Core-Strukturen, einer individuellen Verlängerung (*backbone* Region) und der peripheren Region (B).

1.1.1.2 Das Tn-Antigen und seine pathophysiologische Rolle

Das Tn-Antigen stellt einen α 1-glykosidisch mit Serin oder Threonin verbundenen N-Acetylgalactosaminrest dar und bildet, wie bereits beschrieben, das Grundgerüst der O-Glykane vom Muzin-Typ. Es wird in dieser Form, ohne weitere Verlängerung der Glykanstruktur, nur auf wenigen O-glykosylierten Proteinen, darunter aber vorwiegend auf epithelialem Gewebe und vor allem im embryonalen Wachstum, exprimiert (Cao et al. 1996). Das Tn-Antigen wird im Golgi-Apparat durch die Enzymgruppe der α -N-Acetylgalactosaminyltransferasen (ppGalNAcTs) synthetisiert, welche GalNAc vom Donor UDP-GalNAc auf den Serin- oder Threoninrest eines Proteins übertragen (Abb. 1). Bislang sind im menschlichen Gewebe zwanzig dieser ppGalNAc-Transferasen bekannt, welche gewebespezifisch exprimiert werden und unterschiedliche Substratspezifitäten

aufweisen (Pratt et al. 2004, Gill et al. 2011). Das Tn-Antigen verbleibt jedoch eigentlich nicht in seiner ursprünglichen Form, sondern wird unter Anknüpfung weiterer Monosaccharide wie Glukose, Galaktose, N-Acetylglucosamin (GlcNAc), N-Acetylgalactosamin (GalNAc), N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), Glucuronsäure (GlcA), Mannose (Man), Fucose (Fuc) oder Xylose (Xyl) direkt prozessiert.

Das Vorkommen des Tn-Antigens im adulten Organismus ist Anzeichen einer unvollständigen Glykosylierung und wird mit Malignität assoziiert. Ursächlich hierfür sind meist Mutationen oder Veränderungen der Synthese von Enzymen, die sich auf die weitere Prozessierung des Tn-Antigens auswirken, allen voran die Defizienz der T-Synthase oder seines Chaperons Cosmc (Ju et al. 2008). Diese Mangelfunktion führt zu einer fehlenden Anknüpfung eines aktivierten Galaktosemoleküls, sodass kein T-Antigen entstehen kann. Im physiologischen Zustand wird das Chaperon Cosmc im ER exprimiert und dient der korrekten Faltung der neu gebildeten T-Synthase, welche daraufhin in den Golgi-Apparat transportiert werden kann. Dort übernimmt sie die Funktion der Synthese der Core-1-Struktur. Diese kann dann weiter sialyliert oder verlängert und an die Zelloberfläche transportiert werden. Es entsteht eine größere Vielfalt an Core-1- und Core-2-Glykanen. Bei fehlender Expression von Cosmc kann keine korrekte Faltung der T-Synthase stattfinden. Diese wird daraufhin im Zytosol ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut (Ju et al. 2014). Durch das Fehlen einer funktionierenden T-Synthase im Golgi-Apparat kommt es zur Anhäufung unverarbeiteten Tn-Antigens und STn-Antigens und zu deren Expression auf der Zelloberfläche. Eine komplette Cosmc-Defizienz zeigte in Mausmodellen keine Lebensfähigkeit der Tiere (Wang et al. 2010). Die Über- oder Neuexpression verkürzter O-Glykane, wie dem Tn-, STn- oder T-Antigen, tritt auf der Oberfläche von Tumorzellen vieler Krebsarten, wie z.B. Magen-, Darm- und Pankreaskarzinomen auf und ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Fu et al. 2016).

Einleitung

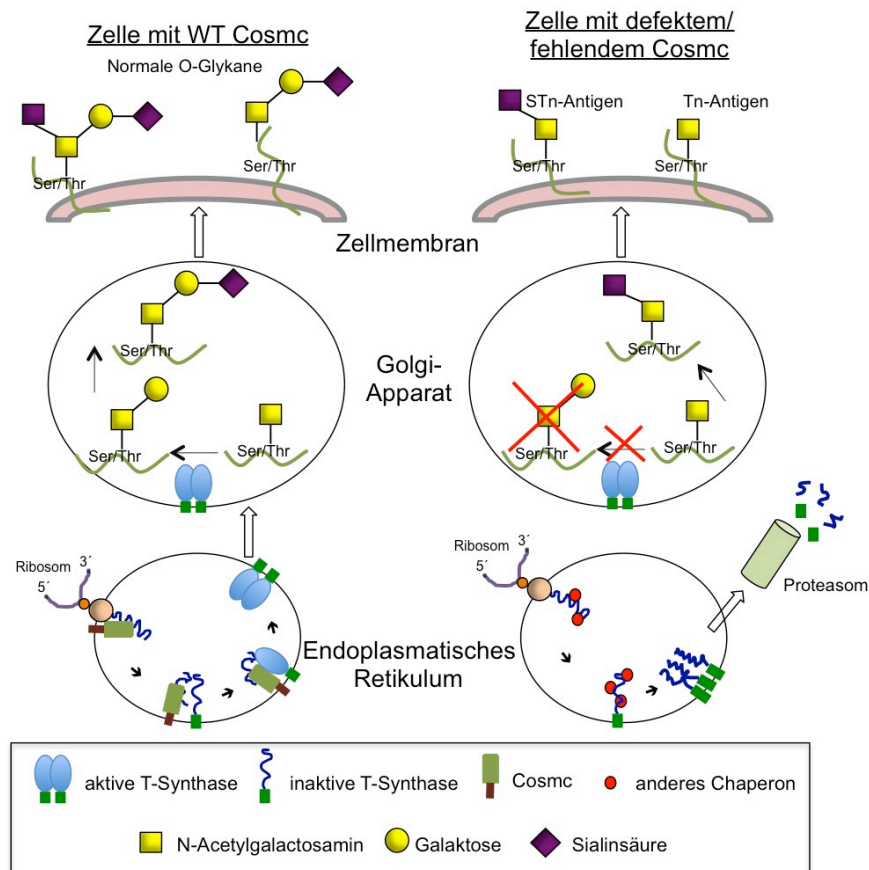


Abbildung 3: O-Glykan-Synthese in Abhängigkeit von Cosmc und der T-Synthase-Aktivität

Abbildung 3 zeigt links die molekularen Grundlagen einer normalen Zelle mit funktionierendem WT (Wildtyp) Cosmc und daher effizienter T-Synthase-Aktivität, sowie rechts im Bild eine Zelle mit Funktionsverlust von Cosmc und folgendem Fehlen einer funktionsfähigen T-Synthase. Modifiziert nach Ju et al. 2011.

1.1.1.3 Synthese und Funktion von O-GlcNAc Glykanen

Obwohl der Großteil der Glykosylierung von Proteinen in extrazytoplasmatischen Kompartimenten stattfindet, sind die O-glykosidisch verknüpften N-Acetylglucosamine (O-GlcNAc) im Zytosol und im Kern lokalisiert. Diese Art der Glykosylierung unterscheidet sich grundlegend von den anderen Glykosylierungsprozessen, da es sich hier um einen dynamischen und reversiblen Prozess handelt. Die Enzyme des O-GlcNAcylierungsprozesses sind löslich und im Zytosol anzutreffen. Zum Prozess der O-GlcNAcylierung gehört die Anknüpfung eines aktivierten GlcNAc-Moleküls an einen Serin- oder Threonin-Rest durch die N-Acetylglucosamintransferase (OGT) und dessen Entfernung durch die N-Acetylglucosaminidase (OGA, O-GlcNAcase) (Abb. 4). Dabei wird keine Verlängerung einer Glykankette vorgenommen und es kommt auch nicht zur

Einleitung

Entstehung eines statischen Glykoproteins, wie bei der Synthese von O-Glykanen vom Muzin-Typ. Die Anknüpfung und Entfernung von O-GlcNAc führt vielmehr zu einer funktionellen Veränderung des Proteins und kann beliebig oft wiederholt werden (Taylor et al. 2011).

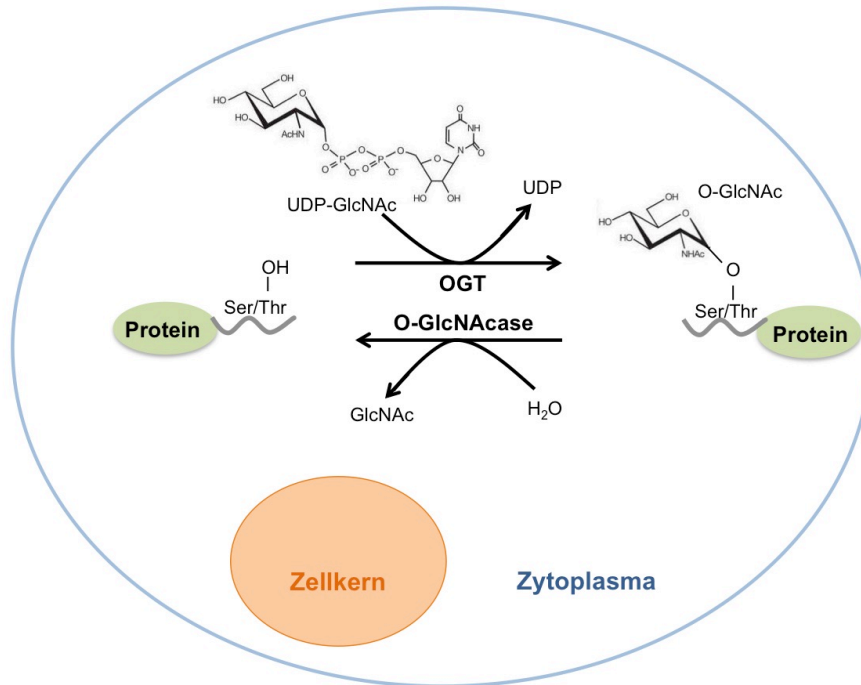


Abbildung 4: Synthese von O-GlcNAc Glykanen

Darstellung der dynamischen O-GlcNAc-Synthese im Zytoplasma einer menschlichen Zelle. Durch die N-Acetylglucosamintransferase (OGT) wird unter Anknüpfung des GlcNAc-Moleküls, an einen freien Serin- oder Threonin-Rest des Proteins, das O-GlcNAc-Protein synthetisiert. Dieser dynamische Prozess ist reversibel. Hierfür kann die N-Acetylglucosaminidase (O-GlcNAcase) das GlcNAc vom Protein wieder entfernen (Zachara et al. 2015).

Das dynamische Gleichgewicht der Anknüpfung und Entfernung von O-GlcNAc steht in direktem Zusammenhang mit dem Gleichgewicht von O-Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen. Dieser Prozess wiederum stellt einen bekannten Mechanismus zur Aktivierung und Deaktivierung von intrazellulären Signalkaskaden darstellt (Abb. 5). Die Liste der O-GlcNAc-modifizierten Proteine ist lang. Sie reicht von nukleären über zytoplasmatische Proteine und beinhaltet vor allem Transkriptionsfaktoren (Zachara et al. 2015).

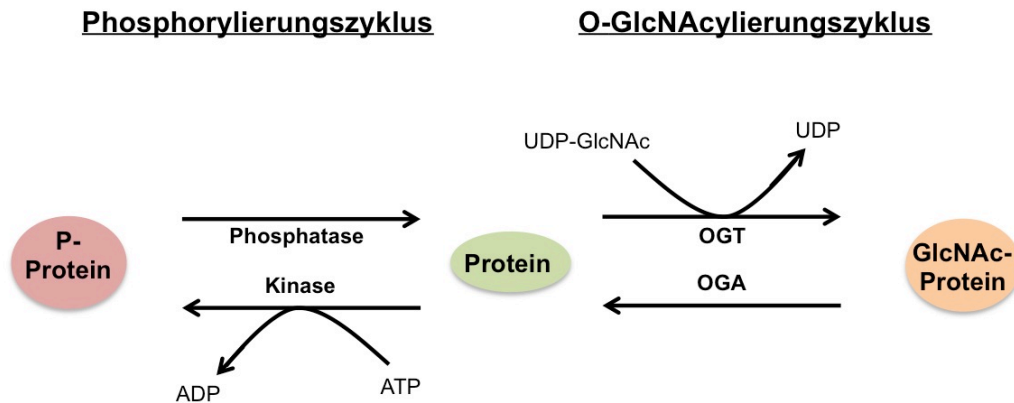


Abbildung 5: Dynamik zwischen O-GlcNAcylierung und O-Phosphorylierung

Viele nukleäre und zytoplasmatische Proteine werden durch O-GlcNAc modifiziert. Der dynamische Prozess der Anknüpfung von O-GlcNAc, durch die O-GlcNAc-Transferase (OGT) und dessen Entfernung durch die O-GlcNAcase (OGA), steht bei einer Vielzahl von Proteinen in direktem Zusammenhang mit dessen Phosphorylierung. Hierbei katalysieren Kinasen unter ATP-Verbrauch die Entstehung eines phosphorylierten Proteins (P-Protein). Die Desphosphorylierung erfolgt durch Phosphatasen (Zachara et al. 2015).

Nahezu alle O-GlcNAc-modifizierten Proteine werden ebenso phosphoryliert (Butkinaree et al. 2010). Beide Prozesse, Protein-Phosphorylierung und Protein-GlcNAcylierung, können sich über drei mögliche Wege direkt oder indirekt beeinflussen. Erstens über direkte Konkurrenz an derselben Serin-/Threonin-Bindungsstelle. Es kommt je nach Konzentration des jeweiligen Substrates entweder zur Phosphorylierung oder zur GlcNAcylierung. Hierzu gehört beispielsweise das Protoonkogen c-Myc, welches durch GlcNAc und Phosphat modifiziert wird (Kamemura et al. 2002). Die zweite Möglichkeit besteht in einer sterischen Beeinflussung unterschiedlicher Bindungsstellen, die nicht weit voneinander entfernt liegen. Bei Bindung von entweder Phosphat oder GlcNAc wird die Bindung des jeweils anderen verhindert und somit die Aktivität des Enzyms kontrolliert. Ein Enzym, welches ein Beispiel für diese Art der Regulation darstellt, ist die RNA-Polymerase II (Comer et al. 2001). Die dritte Möglichkeit einer Interaktion von Phosphat- und GlcNAc-Bindungsstellen eines Proteins stellt das antiapoptotische Enzym AKT (Proteinkinase B) dar. Es muss speziell an den Bindungsstellen Threonin 308 und Serin 473 phosphoryliert werden, um enzymatisch aktiv zu sein (Manning et al. 2007). Kommt es zu Schwankungen der intrazellulären UDP-GlcNAc-Konzentration, so konkurrieren Phosphat und GlcNAc an der Serin 473-Bindungsstelle und regulieren darüber die AKT-Aktivität (Kang et al. 2008, Butkinaree et al. 2010). C-Myc, die RNA-Polymerase II und AKT sind

Einleitung

somit wichtige Beispiele von Enzymen mit hoher transkriptioneller Aktivität, die durch O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung reguliert werden.

Hierbei wird oft dazu tendiert, diese Modifikationen als ein „An- und Abschalten“ des Proteins und seiner Funktion zu sehen. Vielmehr handelt es sich dabei um keine rein reziproke Modifikation, sondern um viele einzigartige funktionelle Einflüsse, welche verschiedene Isoformen des Proteins darstellen (Comer et al. 2000, Vosseller et al. 2006). Letztendlich ist für das Funktionieren einer Zelle das Gleichgewicht zwischen O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung von großer Bedeutung.

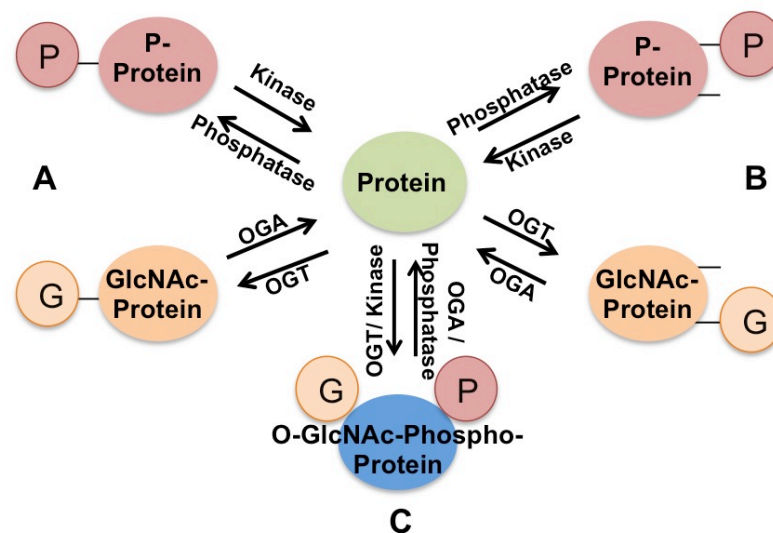


Abbildung 6: Beeinflussungsmöglichkeiten von O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung

A) O-GlcNAc und O-Phosphate können um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren. Diese Konkurrenz kann die Aktivität und Stabilität des Proteins verändern (z.B. c-Myc). B) In einigen Fällen treten O-GlcNAc- und O-Phosphat-Modifikationen in einer Entfernung von zirka 10 Aminosäuren auf und regulieren hierüber die Funktion des Proteinsubstrates. C) GlcNAcylierung und Phosphorylierung können am selben Protein auch proximal, direkt nebeneinander auftreten. Hier reguliert das Gleichgewicht zwischen GlcNAcylierung und Phosphorylierung die zelluläre Funktion des Proteins (z.B. AKT; Threonin 308 und Serin 473 für O-Phosphat, Serin 473 für O-GlcNAc) (Butkinaree et al. 2010).

1.2 Hypoxie im menschlichen Gewebe

Die ausreichende Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff ist essentiell für den physiologischen Ablauf zellulärer Mechanismen. Im Vordergrund steht hierbei die Energiegewinnung der Zelle über die Herstellung von Adenosintriphosphat (ATP). Der zelluläre Energieträger ATP wird für nahezu alle Stoffwechselwege benötigt. Eine verminderte Sauerstoffversorgung des Gesamtorganismus oder bestimmter Geweberegionen wird als Hypoxie bezeichnet. Hypoxie spielt bei der Entstehung oder im Verlauf vieler Erkrankungen eine übergeordnete Rolle. Offensichtlich ist dies bei primär ischämischen Erkrankungen wie dem Herzinfarkt, wobei der Mangel an Sauerstoff zum Zell- und Gewebeuntergang führt. Doch ebenso bedeutend ist ein Sauerstoffmangel für den Verlauf von neoplastischen und inflammatorischen Erkrankungen. In entzündetem Gewebe entstehen lokal hypoxische Gewebeareale aufgrund des aktiven Metabolismus infiltrierender Immunzellen und durch den fibrotischen Gewebeumbau, samt verlängerten Diffusionsstrecken. Das Gewebe solider Tumoren weist eine ausgeprägte Heterogenität bezüglich des Auftretens von normoxischen, gut vaskularisierten, neben hypoxischen, schlechter vaskularisierten und zum Teil nekrotischen Arealen auf, welche maßgeblich zu einer Veränderung im Wachstumsverhalten beitragen (Mimeault et al. 2013).

1.2.1 Zelluläre Hypoxie und der Transkriptionsfaktor HIF-1

Auf die Beeinträchtigung der oxidativen Phosphorylierung unter Hypoxie und dem damit einhergehenden Energiemangel, reagieren Zellen und folglich der gesamte Organismus mit spezifischen Mechanismen. Die wichtigste Anpassungsreaktion der Zellen an eine mittel- bis langfristige lokale Hypoxie ist sicherlich die Aktivierung Hypoxie-induzierter Faktoren (HIF), die als Transkriptionsfaktoren agieren. Um eine zelluläre Anpassung an den verminderten Sauerstoffgehalt zu initiieren, kommt es an Stellen der lokalen Hypoxie zur Aktivierung des Hypoxie-induzierten Faktors 1 (HIF-1), welcher den HIF-Signalweg initiiert. HIF ist ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Untereinheit, welche beide zu der Familie der „*basic helix-loop-helix PAS domain*“ Proteine gehören. Während die

α -Untereinheiten Hypoxie-bedingt reguliert werden, wird die β -Untereinheit konstitutiv exprimiert (Wang et al. 1995). Abbildung 7 zeigt die Regulation von HIF-1 unter Normoxie und Hypoxie. Unter normoxischen Bedingungen erfolgt die sauerstoffabhängige Hydroxylierung der HIF-1 α -Untereinheit durch Prolylhydroxylasen (PHD). Es kommt zur Bindung des Von-Hippel-Lindau-Proteins (VHL) und einer dadurch vermittelten Ubiquitinierung von HIF-1 α , welche zu dessen proteasomalen Abbau führt. Hypoxie inhibiert Prolylhydroxylasen. HIF-1 α wird somit stabilisiert und dimerisiert mit der HIF-1 β -Untereinheit. Es erfolgt der Transport in den Zellkern, wo HIF-1 an das Hypoxie-responsive Element (HRE) bindet. Dort wirkt HIF als Transkriptionsfaktor wichtiger Gene, die das Überleben der Zelle unter Hypoxie regulieren. Es kommt zur Proteinbiosynthese von Signalproteinen mit Beteiligung an Signalwegen zellulärer Proliferation, Migration und Invasion, Angiogenese, Erythropoese sowie der Anpassung des Energiemetabolismus (Semenza 2001, Mimeault et al. 2013).

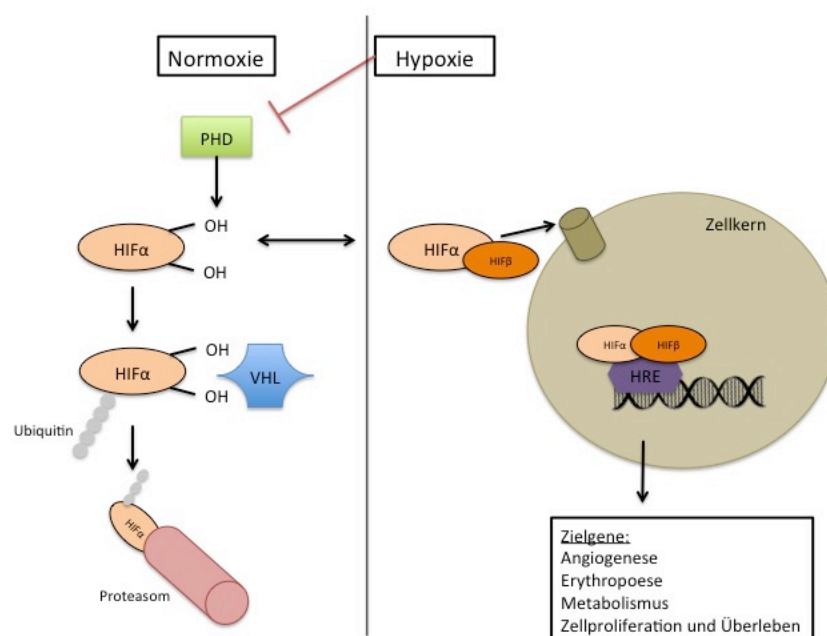


Abbildung 7: Regulation von HIF-1

Links im Bild ist der Abbau der HIF-1 α -Untereinheit über eine sauerstoffabhängige Hydroxylierung durch Prolylhydroxylasen (PHD) und dem dadurch über Ubiquitinierung vermittelten, proteasomalen Abbau, gezeigt. Rechts im Bild ist die unter Hypoxie stattfindende Dimerisierung der beiden HIF-1 α - und HIF-1 β -Untereinheiten dargestellt. Es erfolgt der Transport in den Zellkern, wo HIF-1 an das Hypoxie-responsive Element (HRE) bindet und zur Transkription zahlreicher Zielgene mit Beteiligung an Angiogenese, Erythropoese, Metabolismus und Zellüberleben führt.

1.2.2 Tumorhypoxie und die Rolle von HIF-1 für die Tumorprogression

Das Gewebe solider Tumoren weist eine starke Heterogenität auf. Dicht nebeneinander existieren normoxische und hypoxische Bereiche sowie unterschiedliche Stoffwechselwege und -prozesse. Es ist bekannt, dass in mehr als 60 % der soliden Tumore hypoxische (≤ 1 % Sauerstoff) oder anoxische ($< 0,01$ % Sauerstoff) Bedingungen herrschen. Vor allem Karzinome des Kolons, der Brust, der Prostata und des Pankreas weisen, im Vergleich zu ihrem Ursprungsgewebe, umfangreiche hypoxische Areale auf (Brown et al. 1998, Koong et al. 2000). Der Grad der Hypoxie in soliden Tumoren variiert innerhalb eines Tumors und zwischen den verschiedenen Tumorarten. Der Sauerstoffpartialdruck liegt in soliden Tumoren durchschnittlich zwischen 1-10 mmHg und entspricht einem Sauerstoffgehalt von 0,1-1 % (Rajendran et al. 2004). Ursächlich für das Auftreten von Hypoxie in soliden Tumoren sind verschiedenste Veränderungen der Mikroumgebung innerhalb des Tumorgewebes. Die Sauerstoffversorgung kann bis zu einem Durchmesser von 1-2 mm mittels Diffusion erfolgen. Für das Wachstum eines größeren, soliden Tumors ist eine ausreichende Vaskularisierung daher notwendige Voraussetzung. Das Wachstum der Gefäße in Tumoren ist allerdings sehr ungeordnet und es kommt, aufgrund fehlgebildeter Blutgefäße und Bildung von bindegewebsreichem, desmoplastischem Stroma, immer wieder zu Regionen der Hypovaskularisation mit der Folge von sauerstoffunterversorgten Gewebearealen (Mimeault et al. 2013).

Diese intratumorale Hypoxie hat eine wesentliche kausale Bedeutung für die Progression von Krebserkrankungen. Zunächst scheint Hypoxie das Tumorwachstum durch Inhibition der Zellproliferation sowie Induktion von Wachstumsarrest und Apoptose zu limitieren (Vaupel 2004). Daraus entsteht ein Selektionsdruck, welcher Hypoxie-adaptierte Tumorzellen hervorbringt, die sauerstoffunabhängig proliferieren und die Tumorprogression trotz veränderter Mikroumgebung vorantreiben (Graeber et al. 1996). So übernehmen die physiologischen Adaptationsmechanismen unter Hypoxie in Tumorzellen, über HIF-1 regulierte Zielgene, eine pathophysiologische Rolle. Über den oben beschriebenen HIF-Signalweg aktiviert die Tumorzelle verschiedene

Einleitung

Transkriptionsfaktoren, welche zum einen zwar eine Anpassung an das erniedrigte Sauerstoffniveau ermöglichen, zum anderen allerdings mit der Aktivierung onkogener Signalwege verknüpft sind.

Unter Hypoxie in Tumoren transkribierte HIF-Zielgene betreffen vor allem die Bereiche Metabolismus, Proliferation, Angiogenese sowie Invasion und stellen damit Charakteristika eines malignen Phänotyps dar (Harris 2002). Diese passen die Zelle beispielsweise an den anaeroben Energiemetabolismus an und stellen auch unter Fehlen von Sauerstoff genug Energie bereit, um die Tumorprogression voranzutreiben und maligne Eigenschaften wie Metastasierung zu fördern (Zhong et al. 1999, Vaupel 2004). Die Expression von HIF-1 in soliden Tumoren ist nachweislich mit einem schlechteren Erkrankungsverlauf und unzureichendem Therapieansprechen der Patienten assoziiert (Moulder et al. 1987, Teicher 1994, Jubb et al. 2010, Favaro et al. 2011). Um unter Sauerstoffknappheit eine ausreichende Energieversorgung zu gewährleisten, induziert HIF-1 beispielsweise die Transkription und Proteinbiosynthese von Glukosetransportern (z.B. GLUT1) und glykolytischen Enzymen (z.B. Phosphofructokinase B (PFKB)) (Denko 2008). Die oben beschriebene Neovaskularisation in Tumoren kann über die Expression des HIF-Zielgens VEGF erklärt werden. Dieses nimmt eine zentrale Stellung bei der Stimulation von Endothelzellproliferation und -migration ein und trägt somit zur Neoangiogenese in soliden Tumoren bei (Forsythe et al. 1996). Maligne Charakteristika von Tumorzellen, wie Invasion und Migration, werden beispielsweise über das HIF-Zielgen CXCR4, einen Chemokinrezeptor vermittelt (Staller et al. 2003). Einfluss auf das Proliferations- und Apoptoseverhalten von Tumorzellen nimmt HIF-1 über Interaktionen mit dem KRAS-Signalweg und RAGE, dem Rezeptor für *Advanced Glycation Endproducts*. KRAS ist ein G-Protein mit GTPase-Aktivität, welches vom KRAS-Gen kodiert wird und am Anfang des RAF/MEK/ERK- oder des PI3K/AKT-Signalweges steht. Diese Signalwege sind an Prozessen des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung beteiligt und nehmen eine bedeutende Rolle bei der Proliferation von bösartigen Tumoren ein. So ist KRAS beispielsweise in 98 % der Pankreaskarzinomen mutiert (Bryant et al. 2014, Kang et al. 2014). Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen HIF-induziertem RAGE und dem Transkriptionsfaktor NF- κ B, einem Transmembranrezeptor der Immunglobulin-Superfamilie, dessen Aktivität verantwortlich ist für Inflammation und die Entstehung von Krebs (Sparvero et al.

2009). Einen Überblick über eine Auswahl an HIF-regulierten Genen gibt Abbildung 8.

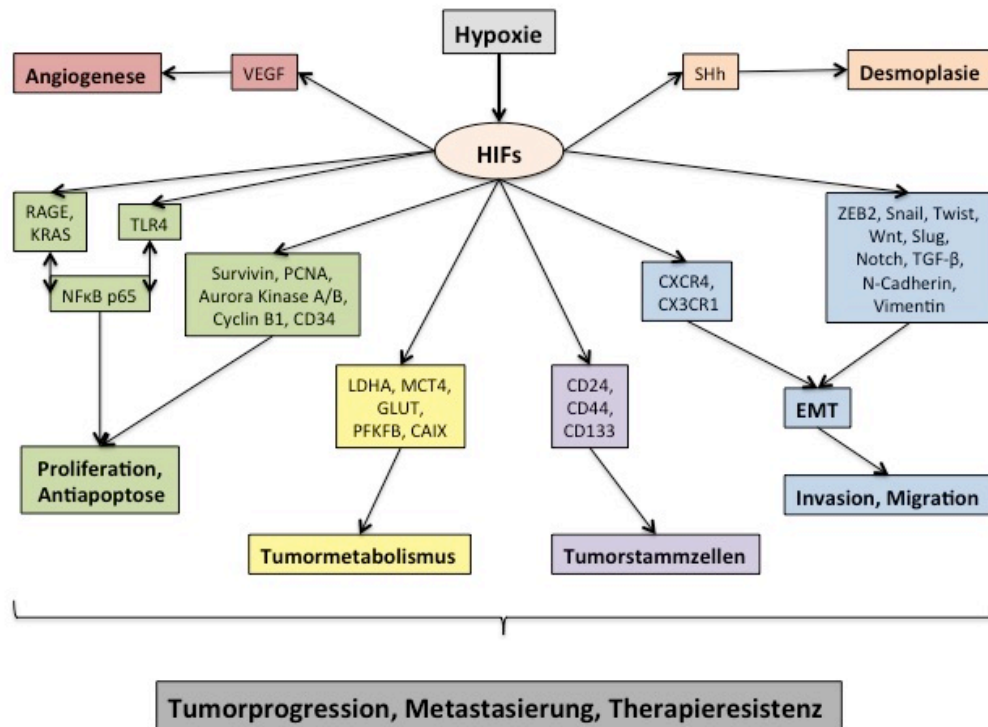


Abbildung 8: Auswirkungen von HIFs auf onkogene Signalwege

Hypoxie-induzierte Faktoren (HIFs) interagieren mit zahlreichen onkogenen Proteinen und Signalwegen mit Auswirkung auf Angiogenese, Proliferation und Antiapoptose sowie Verstärkung des Tumormetabolismus und Tumorstammzellinduktion, Desmoplasie, Invasion und Migration. Deren Veränderung führt wiederum zu Tumorprogression, Metastasierung und Therapieresistenz. Abkürzungen: VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*, RAGE: Rezeptor für „*Advanced Glycation Endproducts*“, NF-κB p65: Nukleärer Faktor κB p65-Untereinheit, TLR4: *Toll-like-Rezeptor 4*, PCNA: *Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen*, LDHA: Laktatdehydrogenase A, MCT4: Monocarboxylat-Transporter 4, GLUT: Glukosetransporter, PFKFB: Phosphofructokinase-2/Fructose-2,6-bisphosphatase, CA IX: Carboanhydrase IX, CXCR4: CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, CX3CR1: CX3C-Chemokinrezeptor 1, EMT: Epitheliale-mesenchymale Transition, ZEB2: *Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2*, TGF-β: *Transforming Growth Factor-β*, SHh: *Sonic hedgehog* (Semenza 2003).

1.3 Hypothese der Arbeit

Die Glykosylierung ist eine der bedeutendsten posttranslationalen Modifikationen von Proteinen. N-Glykosylierung (Asparagin-gebunden) und O-Glykosylierung (Serin-/Threonin-gebunden) sind die zwei Hauptformen. Die fertigen Glykoproteine übernehmen wichtige Aufgaben der Strukturbildung innerhalb von Zellen und auf deren Oberfläche sowie bei der zellulären Kommunikation, insbesondere mit Zellen des Immunsystems. Damit die O-Glykosylierung reibungslos funktioniert, ist ein Zusammenspiel aller daran beteiligten Enzyme essentiell. Eine Dysregulation bestimmter Glykosyltransferasen, molekularen Chaperone oder der zellulären Umgebung ist assoziiert mit einer Dysregulation von O-Glykanen und der Über- oder Neuexpression verkürzter O-Glykane, wie dem Tn-, STn- oder T-Antigen. Auswirkungen aberranter O-Glykosylierung zeigen sich im Tumorzellkontext. Dort wirken sie sich nachteilig auf das Therapieresultat und die Prognose von Krebspatienten aus. Allerdings sind die Ursachen, welche in Tumoren zu einer differentiellen Glykosylierung führen, bisher nur wenig erforscht.

Das Fehlen von Sauerstoff im menschlichen Gewebe ist ein Beispiel für zellulären Stress. Zu den Reaktionen, sich an zeitlich begrenzte hypoxische Bedingungen anzupassen, gehört die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1, welcher unter Hypoxie die Expression zahlreicher Proteine wichtiger intrazellulärer Signalwege aktiviert. Auch in soliden Tumoren treten aufgrund ihrer Gewebheterogenität neben normoxischen Bereichen auch hypoxische Areale auf. Die konstitutive Expression von HIF-1 in soliden Tumoren führt zur Aktivierung onkogener Signalwege und trägt so zur Tumorprogression bei. Sowohl Hypoxie an sich, als auch das Auftreten von Tn-Antigen stehen mit Malignität und Tumorprogression in Zusammenhang.

Die Hypothese dieser Arbeit besteht darin den Faktor Hypoxie als Ursache aberranter O-Glykosylierung, in Form einer erhöhten Tn-Antigen-Expression in repräsentativen humanen Zelllinien zu identifizieren um somit eine Brücke zwischen den beiden Malignitätsfaktoren Hypoxie und aberranter O-Glykosylierung in soliden Tumoren zu schlagen um neue Erklärungs- und Forschungsansätze ermöglichen zu können.

Hierzu wurde Hypoxie in HEK293-Zellen mittels Inkubation (1 % Sauerstoff) und chemisch (Kobaltchlorid) induziert. Repräsentativ erfolgte die Untersuchung des

Einleitung

Einflusses von Hypoxie auf die Tn-Antigen-Expression in duktaalen Zellen des Pankreas (HPDE) und auf die Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 mittels Western Blot-Analysen. Die DNA der HEK293-Zellen wurde nach Hypoxieinduktion extrahiert, um eine globale Analyse von 84 Genabschnitten der humanen Glykosylierung mittels quantitativer PCR durchzuführen und um Veränderungen durch Hypoxie auf genetischer Ebene zu detektieren. Ebenso sollten Proteinanalysen von HEK-Zelllysaten nach Hypoxieinduktion, mittels Western Blot und spezifischer Antikörper/Lektine, auf das Auftreten aberranter O-Glykosylierung in Form des Tn-Antigens und vermehrter O-GlcNAcylierung untersucht werden. Eine bekannte Ursache erhöhter Tn-Antigen-Expression ist die Defizienz der T-Synthase oder ihres Chaperons Cosmc. Hierzu wurde die Aktivität der T-Synthase unter Hypoxie in Enzymaktivitätsanalysen gemessen und mit HEK-Zellen verglichen, welche durch eine induzierte Cosmc-Defizienz (HEK Cosmc-Knockout-Zellen) charakterisiert sind. Der Einsatz des chemischen HIF-1 α -Induktors ML 228 unter Normoxie und des HIF-1 α -Inhibitors Echinomycin ermöglichte die Untersuchung des Einflusses von HIF-1 α . Es gibt zahlreiche Untersuchungen zum Einfluss von Hypoxie auf den zellulären Energie- und Glukosestoffwechsel und einer damit verbundenen Veränderung der intrazellulären O-GlcNAcylierung. Daher wurde auch dieser Aspekt in den eigenen Untersuchungen näher beleuchtet und der Einfluss von Hypoxie auf die daran beteiligten Enzyme OGA und OGT untersucht. Hierbei wurde auch die Möglichkeit einer veränderten Interaktion zwischen O-GlcNAcylierung und O-Phosphorylierung unter Hypoxie in Betracht gezogen. Mittels Western Blot-Analysen wurde nach Veränderungen in phosphoryliertem Serin/Threonin sowie phosphoryliertem Tyrosin gesucht. Ein verändertes Phosphorylierungs- oder O-GlcNAcylierungsmusters nimmt einen wichtigen Platz bei der Aktivierung und Inaktivierung wichtiger Signalproteine ein und kann Hinweise auf Änderungen zellulärer Signalwege unter Hypoxie geben.

2 Materialien

2.1 Geräte

Tabelle 1: Geräte

| <u>Gerät</u> | <u>Modell</u> | <u>Hersteller</u> |
|---|-----------------------------|-------------------------------|
| Brutschrank 37 °C, 5 % CO ₂ | | Heraeus Instruments, Hanau |
| Filmkassette | <i>x-ray cassette rego</i> | Augsburg |
| Gefrierschrank -20 °C | | Liebherr, Bulle, Schweiz |
| Gefrierschrank -80 °C | | Kryotec, Hamburg |
| Heizblock | <i>Thermo Shaker TS-100</i> | Peqlab, Erlangen |
| Kühlschrank +4 °C | | Linde, Unterschleißheim |
| Laufkammer | Mini Protean III | Bio-Rad, München |
| Magnetrührer | Ikamag RH | IKA Labortechnik, Staufen |
| Pipetten | 1000/200/100/20µl | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettierhilfen | pipetus® | Hirschmann, Eberstadt |
| PCR-Gerät | T3 Thermocycler | Biometra, Göttingen |
| <i>Real-time quantitativer PCR-Cycler</i> | LS 480 | Roche, Basel, Schweiz |
| Rüttler | <i>KS 15 Control</i> | Edmund Bühler, Tübingen |
| Schüttler | <i>Orbital Shaker</i> | S03 Stuart, Staffordshire, UK |
| SDS-PAGE <i>Power Supply</i> | <i>PowerPac Universal</i> | Bio-Rad, München |

Materialien

| | | |
|-------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| Sicherheitswerkbank | HERA safe | Heraeus Instruments, Hanau |
| Spektralphotometer | <i>NanoDrop™ 1000</i> | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Vortexer | Certomat MV | B. Braun Biotech International |
| Wärmebad | W6 | Labortechnik Medingen, Arnsdorf |
| Wärmeinkubator | B15 | Heraeus Instruments, Hanau |
| Wärmeschränk Zellkultur | | |
| Zentrifuge | <i>Centrifuge 5417R</i> | Eppendorf, Hamburg |
| | Rotina 35 R | Hettich Zentrifugen, Tuttlingen |

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

| <u>Produkt</u> | <u>Modell</u> | <u>Hersteller</u> |
|---|--|---|
| 6-Schalen-Platte | <i>Nunclon Delta Surface 6-well-plate</i> | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| 96-Loch-Zellkultur-Platte | <i>Microplate F-Bottom Cellstar 96-well Culture Plate</i> | Greiner, Frickenhäusen |
| Fließpapier | | Whatman™ |
| Nitrozellulosemembran | | Thermo Scientific, Waltham, USA |
| Pasteurpipetten | <i>Disposable Glass Pasteur Pipettes 230 mm</i> | VWR, Darmstadt |
| Pipettenspitzen, verschiedene Größen | | Falcon, Eppendorf, Biosphere, Sarstedt |

Materialien

| | | |
|--|----------------------------------|---------------------------|
| Reaktionsgefäße | 15 ml, 50 ml | Greiner, Frickenhausen |
| Reaktionsgefäße, <i>safe lock</i> | 0,1 ml, 0,5 ml | Eppendorf, Hamburg |
| Röntgenfilm | <i>Medical x-ray screen film</i> | CEA, Hamburg |
| Spritzen | Injekt, verschiedene Volumina | Braun, Melsungen |
| Sterilfilter | Sterile Syringe Filter 0,2 µm | VWR, Darmstadt |
| Ultrazentrifugationseinheit | Vivaspin 20, Vivaspin 60 | Sartorius AG, Göttingen |
| Zählkammer | | Neubauer |
| Zellkulturflaschen (75 cm ² , 175 cm ²) | TC Flasche T75, T175 | Sarstedt, Nümbrecht |
| Zellkulturschalen | <i>nunc lon surface</i> | nunc, Langenselbold |
| Zellschaber | <i>Cell Scraper</i> 16 cm | Sarstedt, Nümbrecht |

2.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

| <u>Produkt</u> | | <u>Hersteller</u> |
|-------------------------|---|---|
| Zellkulturmedium | RPMI 1640 Medium | GIBCO <i>life technologies</i> , Carlsbad, USA |
| Einfriermedium | <i>Recovery</i> | |
| HEPES-Puffer | | |
| FCS | 10 % | |
| Penicillin/Streptomycin | 200 IU/ml | |
| Trypsin | 0,25 % EDTA | |
| PBS (-T) | <i>Dilbecco's phosphate buffered saline (+ Tween)</i> | |

Materialien

| | | |
|--|--|---|
| Trypanblau | <i>Blue Stain 0,4 %</i> | |
| BCA-Reagenz | <i>Pierce Microplate BCA Protein Assay Kit. Reducing Agent Compatible</i> | Thermo Scientific, Rockford, USA |
| Blockierungslösung | <i>Carbo-Free Blocking Solution</i> | Vector Laboratories, Burlingame, USA |
| Blot-Entwickler-Substrat | <i>Super Signal West Dura Extended Duration Substrate</i> Pierce ECL Western Blotting Substrat | Thermo Scientific, Rockford, USA |
| Echinomycin | HIF-1 α Inhibitor | Tocris Bioscience, R&D Systems Company |
| EDTA | <i>0.5 M EDTA Solution</i> | Thermo Scientific, Rockford, USA |
| Kobaltchlorid | <i>Cobalt(II) chloride</i> | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Ladepuffer | <i>Laemmli Sample Buffer</i> | Bio-Rad, München |
| Lyse-Puffer | RIPA-Puffer | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| ML 228 | HIF-Signalweg Aktivator | Tocris Bioscience, R&D Systems Company |
| Protease- und Phosphatase-Inhibitor | Halt Protease & Phosphatase Inhibitor <i>Single-Use Cocktail</i> (100x) | Thermo Scientific, Rockford, USA |
| Proteinstandard | <i>Precision Plus Protein Standards Dual Color</i> | Bio-Rad, München |
| TRIS-Puffer | <i>Trizma base</i> | Sigma-Aldrich, St. Louis, USA |
| Tween 20 | | Serva, Heidelberg |

2.4 Medien und Lösungen

Tabelle 4: Medien und Lösungen

| <u>Lösung</u> | <u>Zusammensetzung</u> |
|-----------------------------------|---|
| Blot-Puffer | 3 g TRIS/HCl, 14,4 g Glycin ad 1 l mit dH ₂ O |
| <i>Laemmli</i> -Probenpuffer (5x) | 60 mM TRIS/HCl (pH 6,8), 10 % SDS, 10 % β -Mercaptoethanol, 50 % Glycerin, 1,5 % Bromphenolblau |
| PBS-Puffer | 0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 3,2 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,5 mM KH ₂ PO ₄ |
| PBS-T | PBS und 0,1 % Tween 20 |
| SDS-PAGE Laufpuffer | 25 mM TRIS-HCl; 190 mM Glycerol; 0,1 % SDS (pH 8,3) in H ₂ O |
| TBS-T | 50 mM TRIS-HCl; 0,15 M NaCl (pH 7,6) Western Blot Transfer-Puffer: 50 mM TRIS (pH 8,0); 380 mM Glycin; 0,1 % SDS |
| TSM-Puffer | 20 mM TRIS/HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , 0,01 mM MnCl ₂ |

2.5 Primär- und Sekundärantikörper

Tabelle 5: Primär- und Sekundärantikörper

| <u>Antigen</u> | <u>Primärantikörper</u> | <u>Sekundärantikörper</u> |
|----------------|---|---------------------------|
| O-GlcNAc | Anti-O-GlcNAc Maus (HRP-konjugiert) (CTD110.6), (1:1000) Cell Signalling Technology, Danvas, USA | |

Materialien

| | | |
|------------------------|--|---|
| HSC-70 | Anti-HSC70 (B-6); sc7268 Maus (1:1000) Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA | <i>Anti-Mouse Antibody</i> (1:3000) New England Biolabs, Ipswich, USA |
| CA IX | Anti-CAIX (M75) Maus (1:1000) BioScience, Bratislava, Slowakei | |
| T-Synthase | Anti-C1GALT1 Kaninchen (1:1000) Sigma-Aldrich, St. Louis, USA | <i>Anti-Rabbit Antibody</i> (1:3000) New England Biolabs, Ipswich, USA |
| Phospho-Tyrosin | <i>Phospho-Tyrosine (P-Tyr-1000) MultiMAb™ Rabbit mAb mix</i> (1:2000) Cell Signalling Technology, Danvas, USA | |
| Phospho-Serin/Threonin | <i>Phospho-(Ser/Thr) Phe Antibody Rabbit</i> (1:100) Cell Signalling Technology, Danvas, USA | |

2.6 Lektine und HRP-Konjugat

Tabelle 6: Lektine und HRP-Konjugat

| <u>Antigen</u> | <u>Lektin</u> | <u>Hersteller</u> |
|------------------|--|-------------------------------------|
| Tn-Antigen | <i>Biotinylated Vicia Villosa Agglutinin</i> (VVA) | Vectorlabs, Burlingame, USA |
| T-Antigen | <i>Biotinylated Peanut Agglutinin</i> (PNA) | |
| Streptavidin-HRP | | Thermo Scientific, Rockford, USA |

2.7 Enzyme und Herstellerkits

Tabelle 7: Enzyme und Herstellerkits

| Kit | | Hersteller |
|--|---------------------------|-----------------------------------|
| MinElute Gel Extraction | DNA-Agarosegel-Extraktion | Qiagen, Venlo, Niederlande |
| QIAquick PCR Purification Kit | PCR-Aufreinigung | |
| RT ² First Strand Kit | cDNA-Synthese | |
| RT ² Profiler PCR Array Human Glycosylation (PAHS-046) | Glycosylation PCR Array | |
| O-GlcNAc Deglycosylation Kit | | Prozomix, Northumberland, UK |
| PNGase F | | New England Biolabs, Ipswich, USA |
| Alpha-N-Acetylgalactosaminidase (P0734) | | |
| O-Glycosidase | | |
| NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents | | Thermo Scientific, Rockford, USA |

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zelllinien

Tabelle 8: Zelllinien

| Zelllinie | Eigenschaften |
|-------------------------|--|
| HEK293 (Wildtyp) | <i>Human embryonic kidney</i> |
| HEK SC (Cosmc-Knockout) | <i>Human embryonic kidney SimpleCell</i> |
| PANC-1 | Humane Pankreaszellen, Adenokarzinom |
| HPDE | <i>Human pancreatic duct epithelial</i> |

Die HEK293-Zelllinie ist eine humane Zelllinie aus embryonalen Nierenzellen, die mit DNA des Adenovirus 5 transformiert ist. Sie eignet sich hervorragend für die Untersuchung der Tn-Antigen-Expression, da sie unter normalen Bedingungen eine Glykosylierung wie im menschlichen Körper aufweist und kein Tn-Antigen exprimiert (Graham et al. 1977).

Die HEK SC-Zellen sind transfizierte HEK293-Zellen, die ein, durch eine Zinkfinger-Nuklease abgeschaltetes, Cosmc-Gen (C1GALTC1) aufweisen. Das Fehlen des Chaperons Cosmc führt zu einer Dysfunktion der T-Synthase der HEK-Zellen. Somit kommt es zur dauerhaften Expression von Tn-Antigen. Diese Zellen haben in den folgenden Untersuchungen als Referenz für positive Tn-Antigen-Expression gedient und wurden uns freundlicherweise von Prof. Henrik Clausen (Copenhagen Center for Glycomics) zur Verfügung gestellt (Steentoft et al. 2013).

Bei der PANC-1-Zelllinie handelt es sich um immortalisierte, epitheloide Zellen eines duktales Adenokarzinoms des Pankreas. Sie stammen ursprünglich von einem 56-jährigen, männlichen Patienten kaukasischer Herkunft (Lieber et al. 1975). Die HPDE-Zelllinie wurde aus immortalisierten, duktales Pankreaszellen generiert (Ouyang et al. 2000).

3.1.2 Zellkultur

Die Kultivierung der oben genannten Zellen erfolgte in HEPES 25-gepuffertem Kulturmedium bei 37 °C, Kohlendioxidbegasung (5 % CO₂) und atmosphärischem Sauerstoffgehalt (Normoxie, 21 % Sauerstoff). Nach Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen mithilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und in neue Kulturgefäße überführt. Diese Methode erlaubt die Bestimmung der Zellzahl sowie eine routinemäßige Betrachtung der Zellvitalität. Es erfolgte eine Überprüfung der verwendeten Zellen auf eine mögliche Mykoplasmenkontamination mittels PCR.

3.1.3 Induktion von Hypoxie

Die hypoxischen Kulturbedingungen wurden zum einen mittels eines CO₂/N₂-Zellinkubators induziert. Dieser generierte eine hypoxische Atmosphäre aus 1 % O₂, 5 % CO₂ und 94 % N₂. Für jedes Hypoxie-Experiment wurden die Zellen in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser kultiviert und 24 Stunden unter Normoxie inkubiert. Anschließend wurden sie für das entsprechende Zeitintervall hypoxischen Bedingungen (1 % Sauerstoff) ausgesetzt. Die zweite Methode zur Hypoxieinduktion erfolgte chemisch mittels Kobaltchlorid. Nach 24-stündiger, normoxischer Kultivierung der Zellen wurden diese weitere 24 Stunden mit einer Kobaltchlorid-Lösung in einer Endkonzentration von 400 µM behandelt. Kobaltchlorid (CoCl₂) ist ein Mimetikum, welches in vitro benutzt wird, um Zellantworten auf Hypoxie zu vermitteln. Dies erfolgt über eine Stabilisierung von HIF-1α durch Inhibition des Enzyms Prolylhydroxylase (Ho et al. 1996).

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Gewinnung von Proteinlysaten

Zur Gewinnung der zytosolischen und Zellmembran-assoziierten Proteine werden die Zellen mechanisch aufgebrochen und die Proteine chemisch von den restlichen Zellbestandteilen getrennt.

Verwendete Lösungen und Materialien

- DPBS
- RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich)
- Protease-Inhibitor (1:100) (Thermo Scientific)
- Phosphatase-Inhibitor (1:100) (Thermo Scientific)

Durchführung

Nach Absaugung des Kulturmediums wurden die Zellen kurz mit DPBS gewaschen. Danach wurden 400 µl (für eine 10 cm Petrischale) einer Mischung aus RIPA-Puffer und Protease-/Phosphatase-Inhibitoren auf die Zellen gegeben. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der Kulturschale gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzem Vortexen ruhte das Gemisch für zirka zehn Minuten. Anschließend erfolgte die Trennung der Zellbestandteile von den Proteinen in der Lösung mittels Zentrifugation für fünfzehn Minuten bei 20 000 g. Danach wurde der Überstand mit den darin gelösten Proteinen in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und das Pellet verworfen. Die Lagerung der Proteinlysate erfolgte bei -20 °C.

3.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung (BCA-Test)

(Smith et al. 1985)

Der BCA-Test ist eine Methode zur quantitativen Proteinbestimmung, die eine Kombination der Biuret-Reaktion mit Bicinchoninsäure (BCA) als Detektionssystem darstellt. Grundlage des Tests ist die Bildung eines Komplexes aus dem Natriumsalz der Bicinchoninsäure und Kupfer(I)-Ionen. Zunächst entsteht

bei der Biuret-Reaktion ein Komplex aus Protein und Kupfer(II)-Ionen, dadurch kommt es zur Reduktion der Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen. In der zweiten Reaktion bilden Moleküle der Bicinchoninsäure einen Komplex mit den Kupfer(I)-Ionen. Der dabei entstehende, violette Farbstoff kann dann bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen werden.

Verwendete Lösungen und Materialien

- 96-well-Microtiterplatte (Greiner)
- *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific)

Durchführung

Auf die Gewinnung der Proteinlysate folgte die Bestimmung der darin enthaltenen Proteinkonzentration. Die Lysate wurden hierzu in einem Verhältnis von 1:5 mit Wasser verdünnt, da die Messung bei geringen Proteinmengen genauer verläuft. Es wurden zusätzlich Albumin-Standardproben mit bekannter Proteinkonzentration verwendet (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/ml in dH₂O). Jeweils 10 µl des Proteinstandards und der Proben wurden in die 96-well-Microtiterplatte pipettiert. Die Bestimmung erfolgte in Zweifachansätzen. Nun wurden Reagenz A und B im Verhältnis 1:50 gemischt und je 200 µl dieses BCA-Reagenz zu den Proben und dem Proteinstandard gegeben. Das BCA-Reagenz beinhaltet die Kupfer(II)-Sulfat-Lösung und die Bicinchoninsäure. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C mit anschließender, photometrischer Messung bei 562 nm. Eine aus den Proteinstandardproben ermittelte Eichgerade wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysatproben herangezogen.

3.2.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli 1970)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes mithilfe eines elektrischen Feldes. Die Auftrennung der Proteine findet in einem quervernetzten Gel aus Acrylamid statt, in welchem die negativ geladenen Proteine vom Minus- zum Pluspol wandern. Der Konzentrationsgradient des Gels bildet seine Trenneigenschaft verschieden großer Proteine. Das Gel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngelanteil.

Die Funktion des Sammelgels besteht darin, die Proben zu konzentrieren, um diese dann im Trenngel der Größe nach aufzutrennen. Die Trennung erfolgt aufgrund der Tatsache, dass Proteine mit großem Molekulargewicht langsamer wandern als Proteine mit einem geringeren Gewicht.

Verwendete Lösungen und Materialien

- Mini-Protean III Elektrophoreselaufkammer (Bio-Rad Laboratories)
- Gradienten-Gele (4-20 %), Bio-Rad Precast (Bio-Rad Laboratories)
- Proteinstandard, *Precision Plus Protein Standards Dual Color* (Bio-Rad Laboratories)
- SDS-Laufpuffer
- *Laemmli*-Puffer (TRIS-Glycin-Puffer)

Durchführung

Vor der Beladung des Gels werden die Proben (80 µl) mit 5x *Laemmli*-Puffer (20 µl) versetzt, bei zirka 95 °C fünf Minuten aufgeköcht und kurz zentrifugiert. Hierbei werden die Proteine denaturiert und mit einer gleichmäßig negativen Ladung überzogen. Dies ermöglicht die Wanderung zum Pluspol der Elektrophoresekammer. Es erfolgte die Beladung der Geltaschen mit je 40 µg Protein und die anschließende Auftrennung für eine Stunde bei einer Spannung von 100 Volt.

3.2.3.1 Immunblot-Analyse (Western Blot)

(Towbin et al. 1979, Burnette 1981)

Der Transfer eines Proteins auf eine Trägermembran wird Western Blot genannt. Der Western Blot ist nach der Auftrennung der Proteine (SDS-PAGE, Kapitel 3.2.3) der zweite Schritt der Immunblot-Analyse. Die Proteine werden dazu elektrophoretisch von dem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Membran transferiert. Dies gelingt durch ein senkrecht zum Gel angelegtes, elektrisches Feld, wodurch die Proteine zur Anode wandern. Dadurch werden die Proteine für weitere Methoden zugänglich und können beispielsweise mit Antikörpern nachgewiesen werden.

Verwendete Lösungen und Materialien

- Blot-Puffer
- Kohlenhydratfreie Blockierungslösung (*Carbo-free Blocking Solution*, Vectrolabs)
- Nitrozellulosemembran (0,45 nm Porengröße) (Protan® Nitrozellulosemembran, Schleicher & Schuell)
- MINI TRANSBLOT-Apparatur (Bio-Rad Laboratories)
- Fließpapier (*Whatman*®-Filter, GE Healthcare)

Durchführung

Es erfolgte der Transfer der Proteine von dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran. Hierzu wurde zunächst ein Transfer-Sandwich, bestehend aus zwei Fließpapieren, dem SDS-Gel, der Nitrozellulosemembran und wiederum zwei Fließpapieren, nach Angaben des Herstellers in die Blot-Apparatur eingesetzt. Alle Bestandteile des Sandwiches wurden vor dem Gebrauch in Blot-Puffer eingeweicht, um Luftblasen zu eliminieren. Der Transfer erfolgte bei 100 Volt und bei 4 °C für eine Stunde. Nach erfolgtem Transfer wurden freie Bindungsstellen auf der Membran mittels *Carbo-free Blocking Solution* in TBS-T (1:10) geblockt. Nach abgeschlossenem Transfer wird die Nitrozellulosemembran in Aqua dest. gewaschen und das Gel verworfen. Der Blockierungsvorgang wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (150 UpM) durchgeführt.

3.2.3.2 Immunreaktion (ELISA und Lektin-ELISA)

(Ausubel 1996)

Um bestimmte Proteine oder Glykoproteine auf der Nitrozellulosemembran zu detektieren und sichtbar zu machen, nutzt man das ELISA-Verfahren. Bei einem ELISA handelt es sich um ein quantitatives Verfahren zum Nachweis von Antigenen über eine Bindung an spezifische Antikörper. Dazu werden polyklonale oder monoklonale, für das nachzuweisende Protein spezifische Primärantikörper eingesetzt. Ein mit einem Reporterenzym (HRP, *horseradish peroxidase*) gekoppelter Sekundärantikörper bindet an die Fc-Region des Primärantikörpers. Nach Zugabe eines Substrats für das Reporterenzym kann die Detektion über Chemielumineszenz erfolgen. Diese wird in diesem Fall über einen Röntgenfilm

Methoden

sichtbar gemacht (Kapitel 3.2.3.3). Zum Nachweis des Tn-Antigens wurde das pflanzliche Lektin VVA (*Vicia villosa* Agglutinin) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein Lektin, welches α - oder β -verknüpftes N-Acetylgalactosamin erkennt, das an einen Serin- oder Threonin-Rest eines Proteins gebunden ist. Das Lektin ist seinerseits mit Biotin gekoppelt. Bei einem Präinkubationsschritt des VVA-Lektins mit Streptavidin-HRP, bindet HRP das Biotin des Lektins unter Entstehung eines Lektin-HRP-Komplexes. Dieser wird anschließend auf der Membran inkubiert, bindet an das Tn-Antigen und kann dann wiederum über Chemielumineszenz detektiert werden.

Verwendete Lösungen und Materialien

- Primär- und Sekundärantikörper (Kapitel 2.5)
- Lektine (Kapitel 2.6)
- Streptavidin-HRP
- TSM-Puffer
- TBS-T
- Kohlenhydratfreie Blockierungslösung

Durchführung

Die Primärantikörper wurden in *Blocking-Solution*/TBS-T verdünnt (15 ml, 1:1000) und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler (150 UpM) inkubiert. Dann wurde die Membran einmal drei Minuten und fünfmal fünf Minuten mit TBS-T (15 ml) gewaschen. Es erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in TBS-T (1:3000). Daraufhin durchlief die Membran erneut einen Waschvorgang von einmal drei Minuten und fünfmal fünf Minuten mit TBS-T (15 ml). Der Nachweis von Glykoproteinen erfolgte mittels Lektinen. Hierzu wurde ein Ansatz aus VVL-Biotin (Endkonzentration: 5 µg/ml) mit Streptavidin-HRP (1 µl) in TSM-Puffer für eine Stunde präinkubiert und anschließend eine weitere Stunde auf die Nitrozellulosemembran gegeben. Es erfolgte ein Waschvorgang von einmal drei Minuten und fünfmal fünf Minuten mit TBS-T (15 ml).

3.2.3.3 ECL-Detektion

Das Sichtbarmachen, der in den vorherigen Schritten beschriebenen Antikörperbindungen, erfolgt über die am Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase (HRP). Diese setzt enzymatisch das ECL-Substrat (*Enhanced chemiluminescence*) unter Lichtemission um.

Verwendete Lösungen und Materialien

- Chemilumineszenzlösung (Pierce® ECL Western Blot Substrat)
- *SuperSignal®* West Dura, Extended Duration Substrate (Thermo Scientific)
- Filmkassette
- Röntgenfilm (*Medical x-ray screen film*, CEA, Hamburg)

Durchführung

Zur Entwicklung wurde 1 ml, der zuvor im Verhältnis 1:1 mit Wasser gemischten ECL-Lösung, zur Inkubation auf die Membran gegeben und diese anschließend zwischen einer Klarsichtfolie in der Filmkassette fixiert. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser entwickelt.

3.2.3.4 Entfernung gebundener Antikörper vom Western Blot

Verwendete Lösungen und Materialien

- *Stripping*-Lösung (Eisessig und 5 M NaCl in dH₂O)
- TRIS-Puffer (pH 8,0)

Durchführung

Die Nitrozellulosemembran wurde für 15 min mit *Stripping*-Lösung unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert und danach kurz mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend erfolgte ebenfalls bei Raumtemperatur auf dem Schüttler eine Neutralisierung mit 100 mM TRIS-Puffer für 10 min. Nach kurzem Waschen mit TBS-T konnte dann wieder ein Blockierungsvorgang erfolgen und die Membran erneut mit einer Antikörperlösung inkubiert werden.

3.2.4 Enzymverdau

Verwendete Lösungen und Materialien

- *O-GlcNAc Deglycosilation Kit* (PRO-K0001, Prozomix)
 - 0.5 M TRIS/HCl Puffer, pH 7,5, beinhaltet 100 mM Imidazol
 - O-GlcNAcase
- α -N-Acetylgalactosaminidase Kit (New England Biolabs)
 - *GlycoBuffer1* (5 mM CaCl_2 , 50 mM Natriumacetat, pH 5,5)
 - α -N-Acetylgalactosaminidase
- PNGase F Kit (New England Biolabs):
 - PNGase F
 - *Glycoprotein Denaturing Buffer* (0,5 % SDS, 40 mM DTT)
 - NP-40 (1 % NP-40 in MilliQ- H_2O)

Durchführung

Zur Kontrolle der Nachweisspezifität der verwendeten Lektine und Antikörper in der Immunreaktion (Kapitel 3.2.3.2), wurde ein Verdau der drei Proteine PNG, O-GalNAc und O-GlcNAc vorgenommen. Zunächst erfolgte die Herstellung von normoxischen und hypoxischen Proteinlysaten und deren Proteinkonzentrationsbestimmung (Kapitel 3.2.1 und 3.2.2). Zur Deglykosylierung wurden die entsprechenden Glykoproteinlysate mit spezifischen Endo- und Exoglykosidasen behandelt. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung zur SDS-PAGE (Kapitel 3.2.3) und die Untersuchung mittels Immunreaktion (Kapitel 3.2.3.2). Die Ansätze für die drei unterschiedlichen Proteine O-GlcNAc, O-GalNAc und PNG wurden wie folgt angesetzt.

O-GlcNAc-Verdau: Für einen Reaktionsansatz von insgesamt 50 μl wurde zunächst eine Proteinmenge von 80 μg bis zu einem Volumen von 35 μl mit H_2O aufgefüllt. Hinzu kamen 5 μl Glyko-Puffer und 10 μl O-GlcNAcase. Der Reaktionsmix wurde für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert und die Probe anschließend für die SDS-PAGE vorbereitet.

O-GalNAc-Verdau: Eine Proteinmenge von 1 μg pro Ansatz wurde mit *GlycoBuffer1* (1:10) und 1 μl der α -N-Acetylgalactosaminidase versetzt und daraufhin für eine Stunde bei 37 °C inkubiert sowie für die SDS-PAGE vorbereitet.

PNG-Verdau: Eine Menge von 10 µg Protein pro Ansatz wurde mit Glykoprotein-Denaturierungspuffer (1:10) bei 100 °C für 10 min denaturiert. Danach erfolgte die Zugabe von NP-40 (1:10) und 2 µl PNGase F pro Ansatz. Der Reaktionsmix wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und anschließend für die SDS-PAGE vorbereitet.

3.2.5 Fraktionierung von Zellkern- und Zytoplasmaproteinen

(NE-PER® *Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents*, Thermo Scientific)

Verwendete Lösungen und Materialien

- 500 µl CER I Lösung
- 27,5 µl CER II Lösung
- 250 µl NER-Lösung

Durchführung

Die Fraktionierung der Proteinlysate erfolgte nach Protokoll des verwendeten Kits. Hierzu wurde zunächst wie bereits beschrieben ein Proteinlysat hergestellt (Kapitel 3.2.1) und dessen Proteinkonzentration bestimmt (Kapitel 3.2.2.). Anschließend wurde ein Zellpellet mit zirka 2×10^6 Zellen pro Ansatz durch Zentrifugation bei 500 g für zwei bis drei Minuten gewonnen. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Puffer und Arbeitsgeräte wurden vor Verwendung gekühlt. Die angegebenen Mengen der Puffer beziehen sich auf einen Reaktionsansatz. Diese Methode wurde nach Herstellerangaben (*Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents*, Thermo Scientific) durchgeführt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Die Kern- und Zytosolfraktion wurde für Immunblot-Analysen (Kapitel 3.2.3.1) verwendet.

3.2.6 Enzymaktivitätsbestimmung (T-Synthase-Assay)

(Ju et al. 2013)

Verwendete Lösungen und Materialien

- Enzym-Puffer-Lösung (50 µl Ansatz pro 40 µg Protein je Probe)
 - 1,25 µl 40 mM GalNAc α -4-MU (Endkonzentration 1 mM)
 - 2,5 µl 10 mM UDP-Gal (Endkonzentration 500 µM)
 - 5 µl 200 mM MnCl₂ (Endkonzentration 20 mM)
 - 1 µl 40000 U/µl O-Glycosidase (Endkonzentration 800 U/µl)
 - 40,25 µl 50 mM MES NaOH pH 6,8

Durchführung

Die Bestimmung der Enzymaktivität der T-Synthase (Core-1- β 3GalT) erfolgte anhand einer fluoreszenzbasierten Messmethode. Die Enzym-Puffer-Lösung enthält hierbei das Akzeptorsubstrat der T-Synthase GalNAc α -4-MU und das Donorsubstrat UDP-Gal, um das Disaccharid Gal- β -1,3-GalNAc α -(4-MU) zu synthetisieren. Dieses Produkt wird hydrolysiert durch die α -N-Acetylgalactosaminidase (O-Glycosidase) und setzt 4-MU frei. Das freie 4-MU ist hoch fluoreszent bei einem pH-Wert von 9,6-10 und kann mit der Fluoreszenzmessung (Exzitation: 355 nm, Emission: 460 nm) detektiert werden.

Die Anzucht der HEK293-Zellen in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser, bis zu einer Konfluenz von zirka 60 %, beanspruchte 24 Stunden. In den darauffolgenden 24 Stunden erfolgte die Zellbehandlung mit Kobaltchlorid in einer Endkonzentration von 400 µM unter Normoxie bzw. die Inkubation unter Hypoxie (1 % Sauerstoff) mit und ohne Zugabe von Echinomycin in einer Endkonzentration von 5 µM. Es folgte die Herstellung von Zelllysaten (Kapitel 3.2.1) und eine Proteinkonzentrationsbestimmung (Kapitel 3.2.2). Aus je 40 µg Protein einer Probe wurde ein Ansatz mit je 50 µl Enzym-Puffer-Lösung hergestellt und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Fluoreszenzmessung wurde das Ansatz-Probengemisch in Doppelbestimmung in eine Microtiterplatte überführt und im Fluoreszenzmessgerät (Exzitation: 355 nm, Emission: 460 nm) gemessen.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA-Extraktion

(RNeasy® Mini Kit, Qiagen)

Verwendete Lösungen und Materialien

- RNeasy *spin column*
- Volumen pro Reaktionsansatz
 - 600 µl RLT-Puffer
 - 700 µl RW1-Puffer
 - 500 µl RPE-Puffer
 - 40 µl RNase-freies Wasser

Durchführung

Die Isolierung der RNA aus Zelllysaten der HEK293-Zellen erfolgte nach Herstellerprotokoll des *Qiagen RNeasy Mini Kits*. Es wurde eine Zellmenge von zirka 7×10^6 Zellen pro Reaktionsansatz verwendet.

3.3.1.1 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Nukleinsäuren

Die RNA wurde zunächst 1:25 in DEPC-H₂O verdünnt. Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden im Spektralphotometer bestimmt, wobei die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen wurden. Eine Absorption bei 260 nm (A₂₆₀) von 1,0 entspricht einem DNA-Gehalt von 50 µg ds/ml bzw. 40 µg ssRNA/ml. Da Proteine eine spezifische Absorption bei 280 nm (A₂₈₀) aufweisen, kann mit dem Quotienten aus 260 nm und 280 nm der Reinheitsgrad der RNA bestimmt werden. Bei einer DNA-Konzentrationsbestimmung mit einem Quotienten (A₂₆₀/A₂₈₀) $\geq 1,8$ liegt reine DNA vor. Ein Quotient $< 2,0$ deutet auf eine Kontamination durch Proteine hin. RNA von ausreichender Reinheit liegt bei einem Quotienten von A₂₆₀/A₂₈₀ $\geq 2,0$ vor. Die Mengenbestimmung der RNA erfolgte in einer Quarzküvette mittels Photometer. Bei der Verdünnung von 1:25 in DEPC-H₂O entspricht die abgelesene Absorption der RNA-Konzentration in µg/µl.

3.3.2 Generierung der cDNA

(*Qiagen RT² First Strand Kit*)

Verwendete Lösungen und Materialien

Volumen pro Ansatz

- 1 µg RNA
- 2 µl GE-Puffer
- 4 µl BC3-Puffer
- 1 µl Kontrolle P2
- 2 µl Reverse Transkriptase Mix
- 3 µl RNase-freies Wasser (DEPC-H₂O)

Durchführung

Die Umschreibung der isolierten RNA in cDNA erfolgte nach den Herstellerangaben des Qiagen RT² First Strand Kits. Die cDNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.3.3 PCR-Array

(*Qiagen RT² ProfilerTM PCR Arrays Human Glycosilation*)

Verwendete Lösungen und Materialien

Volumen je Probenansatz

- 1350 µl SYBR Green Mastermix
- 102 µl cDNA
- 1248 µl RNase-freies Wasser

Durchführung

Es erfolgte eine quantitative Analyse der Expression von Glykosylierungsgenen in HEK293-Zellen unter Normoxie, Hypoxie und Kobaltchloridbehandlung mithilfe des *Qiagen RT² ProfilerTM PCR Arrays*. Dieses erstellt im Rahmen einer real-time quantitativen PCR ein Genexpressionsprofil von 84 Schlüsselgenen, welche an der Kodierung von Enzymen der posttranslationalen Synthese und der Abspaltung von Zuckerbausteinen von Proteoglykanen und Glykoproteinen beteiligt sind. Dazu wurde die im vorherigen Schritt generierte cDNA, nach Herstellerprotokoll

Methoden

des *Qiagen RT² ProfilerTM PCR Array Human Glycosilation*, weiter verarbeitet. Alle Schritte erfolgten auf Eis. Die cDNA wurde hierzu in oben aufgeführter Menge im *SYBR Green Mastermix* eingesetzt und hiervon je 25 µl pro Näpfchen pipettiert.

Die Messung erfolgte im 96-*well*-Format in einem Roche 480 *LightCycler*, einem real-time PCR Amplifikations- und Detektionsinstrument. Hierbei erfolgte die Amplifikation der DNA durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und im Rahmen dieser eine fluoreszenzbasierte, quantitative Bestimmung der jeweiligen Glykosylierungsgene mittels spezifischen Primern. Die Auswertung erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben.

4 Ergebnisse

4.1 Expression humaner Glykosylierungsgene unter Hypoxie

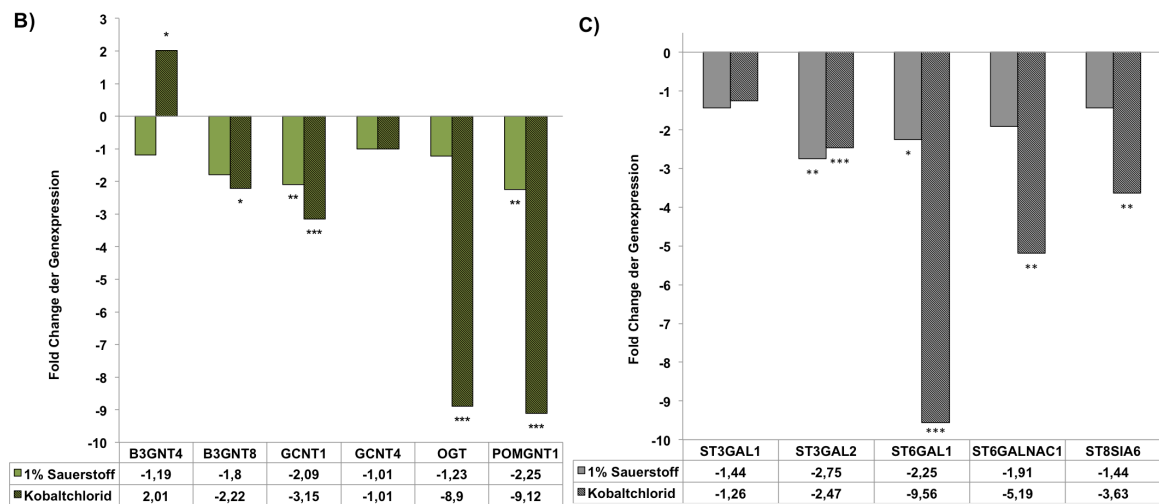
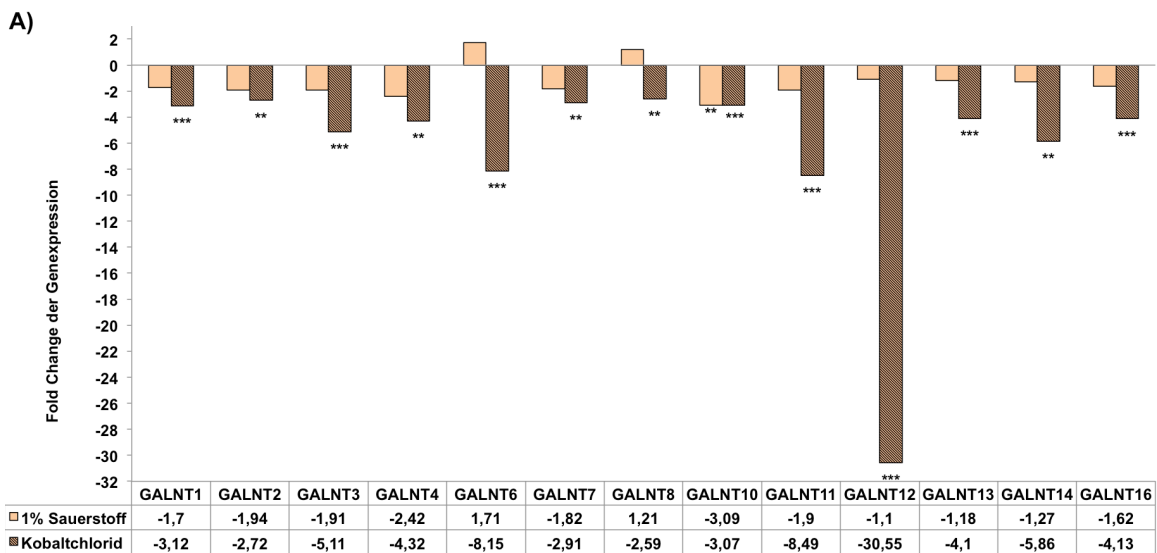
Um einen Überblick aller Gene zu erhalten, die an der O-Glykosylierung humaner Zellen beteiligt sind, wurde die Genexpression dieser unter Hypoxie im Vergleich zu normoxischen Zellen in HEK293 untersucht. Die Analyse erfolgte anhand des *Qiagen RT² ProfilerTM PCR Arrays*. In Abbildung 9 A-F sind die Expressionsmuster der Gene der O-Glykosylierung dargestellt. Die Ergebnisse der Expression von HEK293-Zellen unter Normoxie und Hypoxie (1 % O₂ und CoCl₂) wurden dazu ins Verhältnis gesetzt und als Veränderungswert (*Fold Change*, FC) angegeben. Ein Gen zeigt bei FC-Werten von < 0 in der Testprobe eine verminderte Expression gegenüber der Kontrollprobe (Normoxie). Bei FC-Werten von > 0 wird das untersuchte Gen in der Testprobe gegenüber der Kontrolle vermehrt exprimiert. FC-Werte zwischen -2 und 2 liegen in einem Bereich, in dem keine zuverlässige Aussage über die Genregulation gemacht werden kann. Diese werden als unverändert gegenüber der Kontrolle bewertet. Eine Liste aller untersuchten Gene findet sich im Anhang (Tabelle 9).

Für nahezu alle untersuchten Gene der O-Glykosylierung kann eine signifikante Reduktion der Genexpression unter Hypoxie gezeigt werden. Lediglich die GalNAc-Transferasen GALNT6 und GALNT8 (bei 1 % O₂) (Abb. 9 A) und B3GNT4 (bei CoCl₂) (Abb. 9 B) zeigen eine allerdings nicht signifikante, vermehrte Expression. Generell fallen die Veränderungen der Expression unter 1 % Sauerstoff abgeschwächer und weniger häufig signifikant aus als unter Kobaltchloridbehandlung.

Deutlich signifikante Ergebnisse in Form einer verminderten Genexpression zeigen sich unter den N-Acetylgalactosaminidasen bei GALNT6 (CoCl₂), GALNT11 und GALNT12 (Abb. 9 A), unter den N-Acetylglucosamintransferasen bei POMGNT1 und OGT (Abbildung 9 B), unter den Sialyltransferasen die ST6GAL1 (Abb. 9 C), unter den Galactosyltransferasen bei C1GALTC1 (Abb. 9 D) sowie unter den Fucosyltransferasen bei POFUT1 (Abb. 9 F). Relevante Genabschnitte der Enzyme für die Expression von Tn-Antigen sind die T-Synthase

Ergebnisse

(C1GALT1) und dessen Chaperon Cosmc (C1GALTC1). Hierfür lässt sich sowohl unter 1 % Sauerstoff, als auch unter Kobaltchloridbehandlung vor allem für Cosmc eine signifikant verminderte Genexpression beobachten. Ebenfalls auffällig ist die unter Hypoxie signifikant verminderte Expression der O-GlcNAc-Transferase (OGT), welche im Syntheseweg der O-GlcNAcylierung eine wichtige Rolle spielt.



Ergebnisse

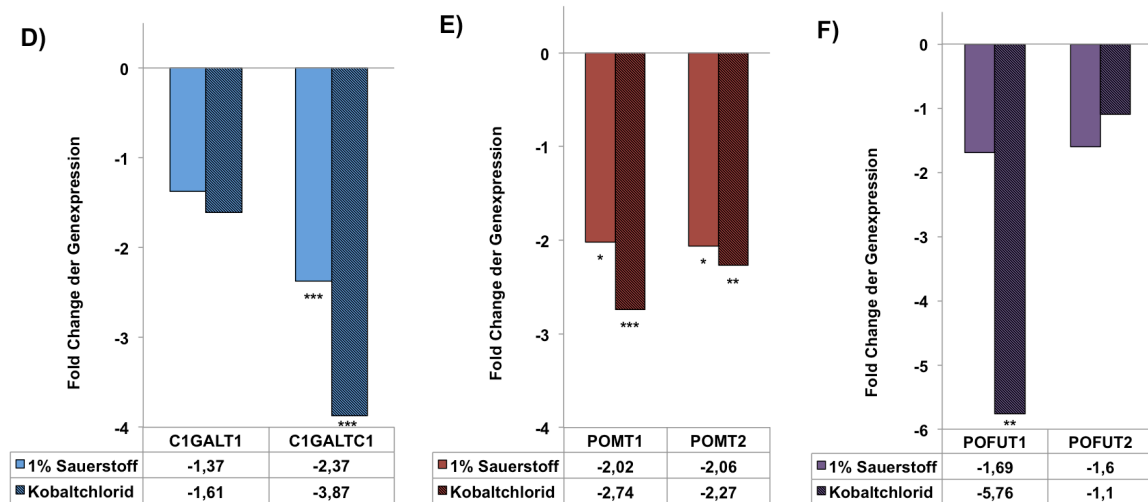


Abbildung 9: Expression von Genen der O-Glykosylierung in HEK-Zellen unter Hypoxie

PCR-Array der Genexpression von O-Glykosylierungsgenen in HEK-Zellen. Darstellung der Veränderungswerte (Fold Change) unter Hypoxie (1 % Sauerstoff und Kobaltchlorid (400 µM)) im Vergleich zu Normoxie. A) N-Acetylgalactosamintransferasen, B) N-Acetylglucosamintransferasen, C) Sialyltransferasen, D) Galactosyltransferasen, E) Mannosyltransferasen, F) Fucosyltransferasen $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)

4.2 O-GalNAcylierung unter Hypoxie

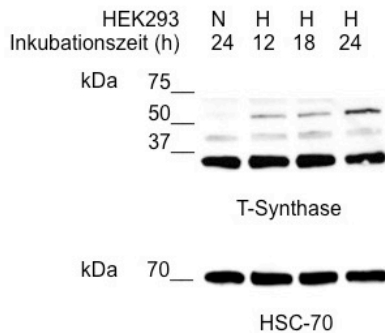
4.2.1 Hypoxie vermindert die T-Synthase-Aktivität

Da es sich bei der T-Synthase um ein zentrales Enzym der O-Glykosylierung handelt, galt es die in der Genexpressionsanalyse unter Hypoxie signifikant verminderte Expression näher zu untersuchen. Auch in Hinblick darauf, dass es sich bei der Genexpressionsanalyse um ein rein quantitative Ergebnisse handelt, sollte im Folgenden mittels Enzymaktivitätsanalysen die qualitativen Veränderungen der T-Synthase unter Hypoxie untersucht werden. Die Auswirkungen von Hypoxie auf die T-Synthase in HEK293-Zellen sind in Abbildung 10 dargestellt. Verdeutlicht wird die Expression der T-Synthase durch Western Blot-Analysen (Abb. 10 A) und die Aktivität der T-Synthase anhand eines Enzymaktivitätstests (Abb. 10 B). Unter 12-stündiger Hypoxieinkubation tritt im Western Blot zum Nachweis der T-Synthase eine zusätzliche Bande bei 50 kDa auf, welche auf eine Veränderung in Bezug auf die Proteinzusammensetzung der T-Synthase hindeutet (Abb. 10 A). Diese Bande ist in ihrer Signalstärke unter 24 h Hypoxie am stärksten ausgeprägt. Abbildung 10 B zeigt die signifikante Abnahme

Ergebnisse

der T-Synthase-Aktivität unter Hypoxieinkubation auf 41 % und eine Abnahme der Aktivität auf 20 % unter Kobaltchloridbehandlung.

A)



B)

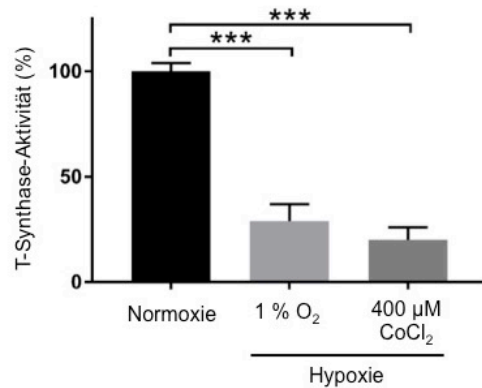


Abbildung 10: T-Synthase unter Hypoxie

A) Immunchemischer Nachweis der T-Synthase in HEK-Zellen unter Normoxie (N 24 h) und Hypoxie (H 12 h, 18 h, 24 h). Die Ladekontrolle erfolgte mittels HSC-70. B) Darstellung der T-Synthase-Aktivität in HEK293-Zellen unter Normoxie (angenommen 100 % Enzymaktivität), unter Hypoxie (Restaktivität von 41 %) und unter Kobaltchloridbehandlung (Restaktivität der T-Synthase von 20 %). Referenz für 0 % Enzymaktivität bilden HEK SC-Zellen. (n=5, Signifikanz mittels einfachem t-Test: $p < 0,001^{***}$).

Wie in Abbildung 11 A zu erkennen ist, synthetisiert die T-Synthase mithilfe des Chaperons Cosmc unter Anheftung von Galaktose an das Tn-Antigen das T-Antigen (Core-1-Struktur). Kommt es zu einer Fehlfunktion der T-Synthase oder Cosmc, akkumuliert das Tn-Antigen. Folglich wurde untersucht, inwiefern die T-Synthase und Cosmc unter Hypoxie beeinflusst werden. Daraufhin erfolgte die Untersuchung einer HEK-Zelllinie mit defizienter O-Glykosylierung einer dänischen Forschungsgruppe (Schjoldager et al. 2012). In diesen sogenannten HEK *SimpleCells* (HEK SC) wurde über eine Zinkfinger-Nuklease das Cosmc-Gen inaktiviert. Hieraus resultiert eine fehlende Verlängerung der O-Glykane aufgrund einer verringerten T-Synthase-Aktivität (Abb. 11 A).

Die Ergebnisse einer Untersuchung der Proteine im Western Blot sind in Abbildung 11 B/C dargestellt. In Abbildung 11 B zeigen die HEK-WT-Zellen unter Hypoxie im Vergleich zur Kontrollgruppe unter Normoxie eine deutliche Tn-Antigen-Expression. Ebenso findet sich auch bei HEK SC-Zellen unter Normoxie eine deutliche Expression von Tn-Antigen. Das Bandenmuster der HEK-Zellen unter Hypoxie und der HEK SC unter Normoxie weist jedoch keine Übereinstimmung auf. In Abbildung 11 C ist unter Normoxie ein Nachweis von

Ergebnisse

PNA (T-Antigen) zu erkennen. Diese Bande im Bereich von zirka 200 kDa fehlt unter Hypoxie.

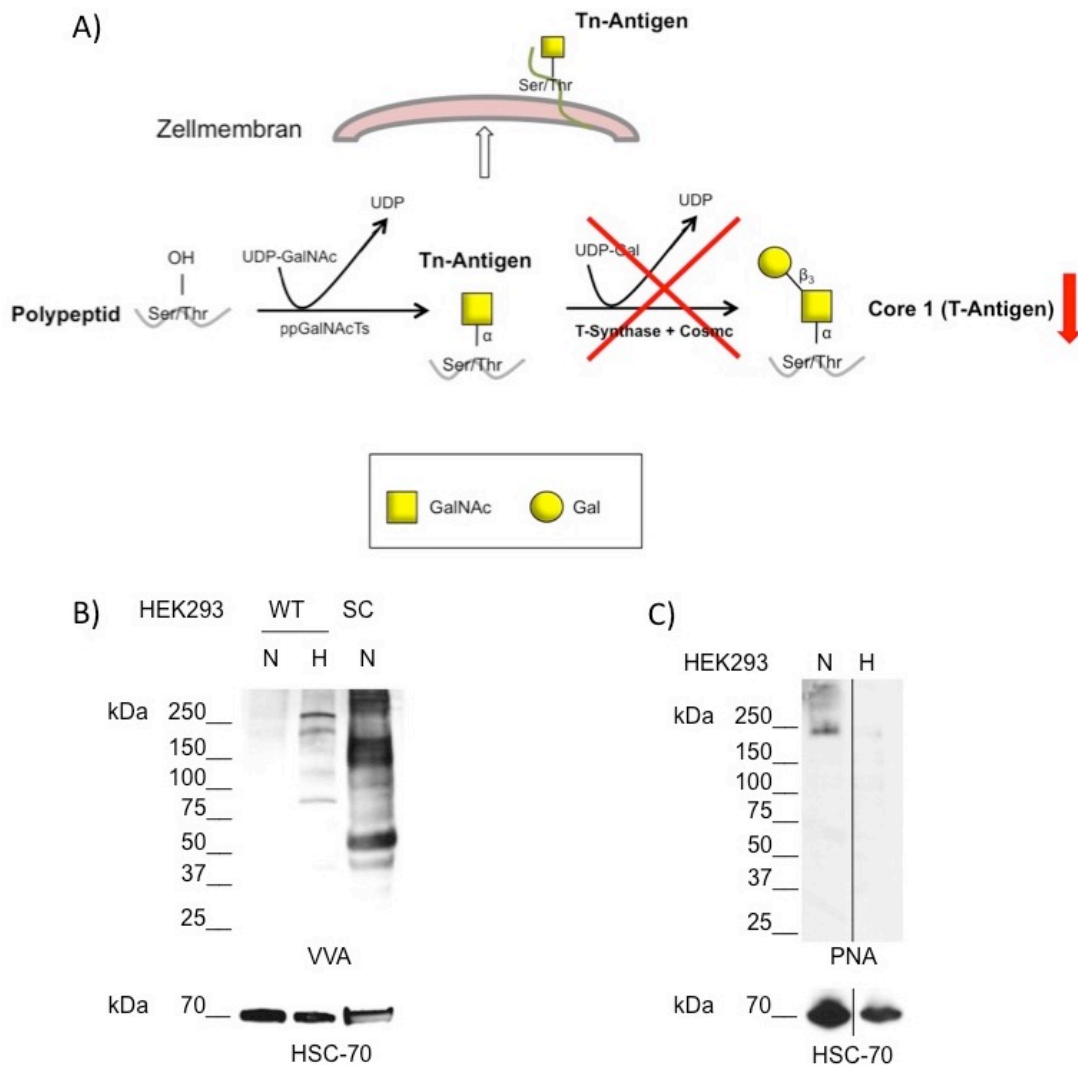


Abbildung 11: Tn-Antigen und T-Antigen unter Hypoxie und T-Synthase-Defizienz

A) Schematische Darstellung der ersten beiden Schritte der O-Glykosylierung im Golgi-Apparat. Der erste Schritt ist die Synthese des Tn-Antigens unter Anheftung von GalNAc an die OH-Gruppe von Serin oder Threonin eines Polypeptids. Darauf folgt die Anheftung von Galaktose (Gal) an die GalNAc-Gruppe des Tn-Antigens. Dieser Schritt wird von der T-Synthase und seinem Chaperon Cosmc synthetisiert. Hierbei entsteht das T-Antigen (Core-1). Bei Defizienz der T-Synthase oder von Cosmc kommt es zu einer sinkenden Konzentration von T-Antigen und es kann keine Verlängerung des Glykanbaumes stattfinden. Tn-Antigen akkumuliert daraufhin und wird an der Zelloberfläche exprimiert. B) Western Blot mit immunchemischer Darstellung des Tn-Antigens unter Normoxie (N) und Hypoxie (H) in HEK293-Zellen (WT) und HEK SC mit defizienter T-Synthase. C) Western Blot mit immunchemischem Nachweis des T-Antigens (Gal β 1-3GalNAc α Ser/Thr, Core-1-Struktur) unter Normoxie (N) und Hypoxie (H) mittels PNA-Lektin in HEK-Zellen. Die Ladekontrolle erfolgte jeweils durch HSC-70.

4.2.2 Hypoxie induziert Tn-Antigen in HEK-Zellen, PANC-1 und HPDE

Unter normalen Zellkulturbedingungen zeigen die humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) eine für den Menschen normale O-Glykosylierung. Es findet keine Expression aberranter O-Glykane statt, ebenso findet sich kein Tn-Antigen (Kapitel 3.1.1). Dieses tritt vermehrt im Kontext von Karzinomen auf (Stowell et al. 2015). Eine durch die Genanalyse offenbarte, verminderte Cosmc- und T-Synthase-Expression unter Hypoxie (Abb. 9 D), welche wie bekannt zu einer Tn-Antigen-Expression führt, veranlasste die weitere Untersuchung der O-GalNAcylierung in HEK-Zellen unter Hypoxie mit speziellem Augenmerk auf das Tn-Antigen. Zur Untersuchung der Expression des Tn-Antigens unter hypoxischen Bedingungen erfolgte die Hypoxieinduktion zunächst in Form von tatsächlichem Sauerstoffentzug in einem Inkubator mit 1 % Sauerstoff und 5 % Kohlenstoffdioxid sowie chemisch über Kobaltchlorid (CoCl_2) in einer Endkonzentration von 400 μM für 24 h. Kobaltchlorid induziert die Hypoxie-induzierten Faktoren 1-3 und bietet damit die Möglichkeit zelluläre Hypoxie chemisch zu induzieren (Piret et al. 2002). Abbildung 12 A zeigt die Expression von Tn-Antigen im Western Blot sowohl unter 1 % Sauerstoff als auch unter Kobaltchlorid. Das Vorhandensein hypoxischer Bedingungen wird, mittels Nachweis von CA IX (Carboanhydrase IX), in beiden Proben belegt. Die Proben aus Abbildung 12 B wurden jeweils für 6 h, 12 h, 18 h und 24 h Inkubationszeit in Hypoxie belassen. Daneben wurden Proben nach einer Hypoxiezeit von 24 h wiederum für weitere 6 h, 12 h und 18 h in Normoxie inkubiert. Als Kontrolle dienen Proben, die 24 h unter Normoxie belassen wurden. Abbildung 12 B zeigt den Western Blot mit Nachweis von Tn-Antigen dieser Proben in Abhängigkeit von der Hypoxiedauer und die Reversibilität dessen unter Rückführung in Normoxie. Ein Nachweis von Tn-Antigen ist ab einer Hypoxieinkubation von 18 h zu beobachten. Geringfügig stärker wird das Signal bei 24 h Hypoxie. Nach Überführen der Zellen in Normoxie, im Anschluss an die Hypoxieinkubation, zeigt sich im Western Blot eine Abschwächung des Tn-Antigen-Signals. Der Rückgang des Signals ist aber nicht vergleichbar mit der Kontrollprobe unter Normoxie.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine Induktion der Tn-Antigen-Expression in HEK293-Zellen unter Hypoxie. Die Stärke des Tn-Antigen-Signals

Ergebnisse

im Western Blot ist abhängig von der Inkubationszeit. Hier zeigt sich ein deutliches Tn-Antigen-Signal nach 24 Stunden. Zusätzlich ist eine Abschwächung des Signals bei Rückführung der hypoxischen Zellen unter Normoxie sichtbar.

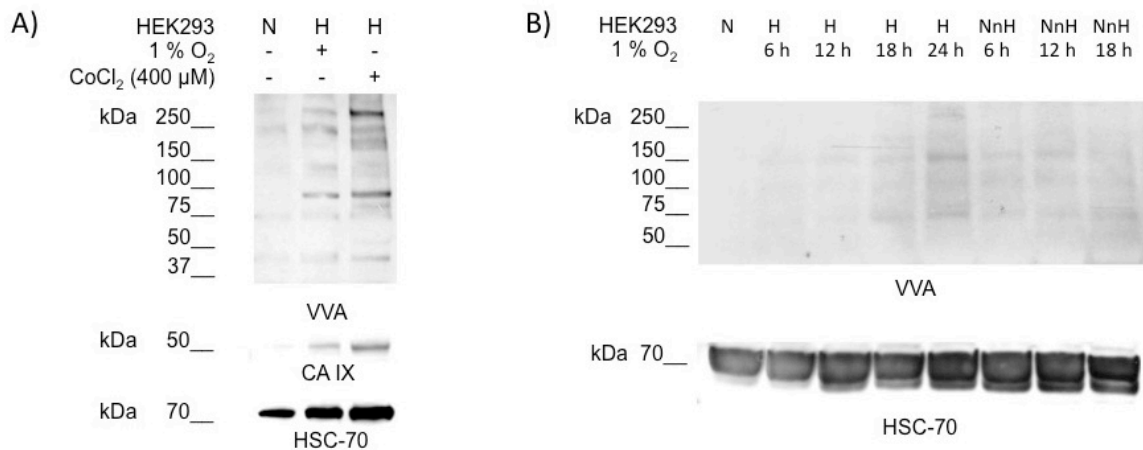


Abbildung 12: Tn-Antigen-Expression unter Hypoxie

A) Dargestellt ist der immunchemische Nachweis von Tn-Antigen in HEK293-Zellen mittels VVA-Lektin unter Normoxie (N) und Hypoxie in Form von Sauerstoffentzug (1 % O₂) und Kobaltchloridbehandlung (CoCl₂ 400 µM). Der Nachweis von Hypoxie wurde durch die Carboanhydrase IX (CA IX) gezeigt. B) Immunchemischer Nachweis von Tn-Antigen (VVA-Lektin) in HEK-Zellen unter Hypoxieinkubation (1 % O₂). HEK-Zellen wurden für je 6, 12, 18 und 24 Stunden (H 6 h, H 12 h, H 18 h, H 24 h) unter 1 % Sauerstoff inkubiert. Zellen, die bereits 24 h unter hypoxischen Bedingungen verbracht haben, wurden anschließend für 6, 12 und 18 Stunden (NnH (Normoxie nach Hypoxie)) wieder unter Normoxie inkubiert. Eine Ladekontrolle erfolgte mittels HSC-70.

Aberrante O-Glykosylierung wird vermehrt im Zusammenhang mit der Entstehung von bösartigen Tumoren, wie beispielsweise Bauchspeicheldrüsenkrebs, beschrieben (Itzkowitz et al. 1991). Dabei ist nicht vollständig geklärt, welche Faktoren auf biochemischer Ebene Einfluss auf die Veränderung in der O-Glykosylierung neoplastischer Zellen nehmen und die Aberrationen hervorrufen. Eine mögliche Erklärung könnte oxidativer Stress in Form von Hypoxie sein.

Im Folgenden wurden in Abbildung 13 die humane duktale Pankreaszelllinie HPDE und die Pankreaskarzinomzelllinie PANC-1 in Hinblick auf ihre Tn-Antigen-Expression unter Normoxie und Hypoxie untersucht. Dabei zeigen die HPDE-Zellen und die Karzinomzelllinie PANC-1 unter Normoxie kein Tn-Antigen. Unter Hypoxie jedoch weisen beide eine deutliche Tn-Antigen-Expression auf.

Ergebnisse

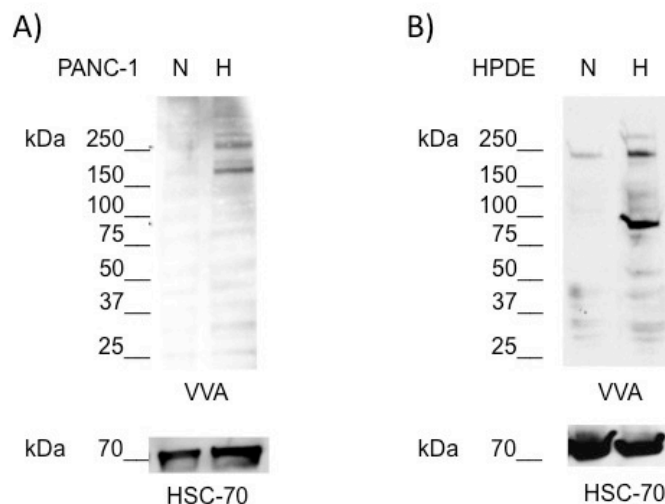


Abbildung 13: Tn-Antigen in PANC-1 und HPDE unter Hypoxie

A) Immunchemischer Nachweis von Tn-Antigen mittels VVA-Lektin in PANC-1-Zellen unter Normoxie (N) und Hypoxie (H). B) Immunchemischer Nachweis von Tn-Antigen mittels VVA-Lektin in HPDE-Zellen unter Normoxie (N) und Hypoxie (H). Die Ladekontrolle erfolgte anhand HSC-70.

4.2.3 Die hypoxische Tn-Antigen-Expression ist HIF-1 vermittelt

Zur Bestätigung, dass die oben erwähnten Beobachtungen tatsächlich auf den Entzug von Sauerstoff und die damit verbundene HIF-Induktion zurückzuführen sind, wurde der Einfluss des chemischen HIF-Signalweg-Aktivators ML 228 auf die Tn-Antigen-Expression in HEK-Zellen unter Normoxie überprüft (Theriault et al. 2012). Hierbei zeigt Abbildung 14 A die vermehrte Tn-Antigen-Expression unter Hypoxie und unter HIF-Aktivierung mittels ML 228 unter Normoxie. Ebenso wurde der Effekt der HIF-1 α -Inhibition durch Echinomycin unter Hypoxieinkubation untersucht. Echinomycin ist ein kleines Molekül, welches die Eigenschaft der DNA-Bindung besitzt und so HIF-1 α bindet und inhibiert (Kong et al. 2005). Abbildung 14 B zeigt die Tn-Antigen-Induktion unter Hypoxie. Dieses Bandenmuster wird bei gleichzeitiger Echinomycinbehandlung unter Hypoxie jedoch deutlich abgeschwächt. Wird HIF-1 α unter Hypoxie mittels Echinomycin inhibiert, ist also eine verminderte Tn-Antigen-Expression zu erkennen. Jedoch ist das Signal im Vergleich zur Kontrollprobe der HEK-Zellen unter Normoxie nicht vollständig aufgehoben.

Ergebnisse

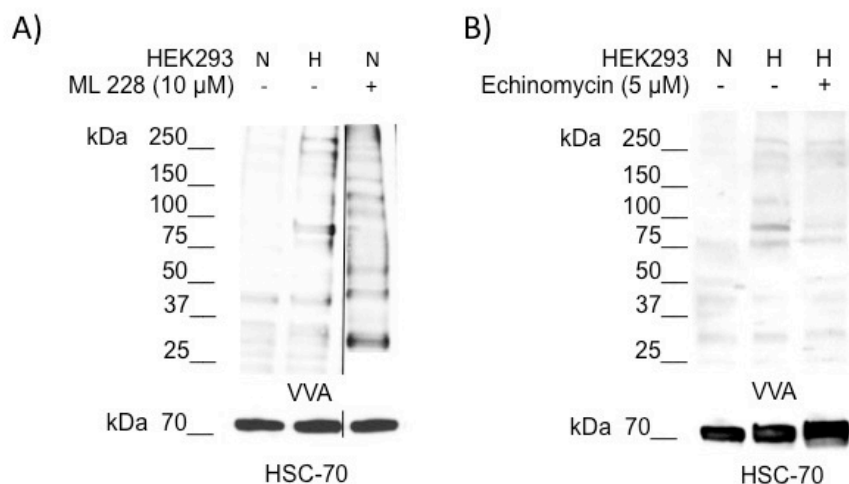


Abbildung 14: Tn-Antigen unter chemischer HIF-1-Induktion (ML 228) und HIF-1-Inhibition (Echinomycin)

A) Immunchemischer Nachweis von Tn-Antigen mittels VVA-Lektin in HEK-Zellen unter Normoxie (N) und Hypoxie (H) sowie unter Hypoxie mit gleichzeitiger Zugabe von ML 228 in einer Endkonzentration von 10 µM. B) Immunchemischer Nachweis von Tn-Antigen mittels VVA-Lektin in HEK-Zellen unter Normoxie (N) und Hypoxie (H) sowie durch HIF-1-Induktion mittels Echinomycin in einer Endkonzentration von 5 µM. Die Ladekontrolle erfolgte mittels HSC-70.

Auch die T-Synthase-Aktivität wurde auf die Abhängigkeit von Hypoxie-induzierten Faktoren mittels ML 228 und Echinomycin untersucht (Kapitel 4.2.1). Hierbei zeigt Aktivierung des HIF-Signalwegs mittels ML 228 in Abbildung 15 A eine signifikante Reduktion der T-Synthase-Aktivität auf 51 % im Vergleich zur normoxischen Probe. Zudem zeigt sich in Abbildung 15 B eine Zunahme der T-Synthase-Aktivität auf 60 % unter Hypoxie und gleichzeitiger Behandlung mit Echinomycin im Vergleich zur Kontrollprobe unter Hypoxie mit einer Aktivität von 23 %.

Ergebnisse

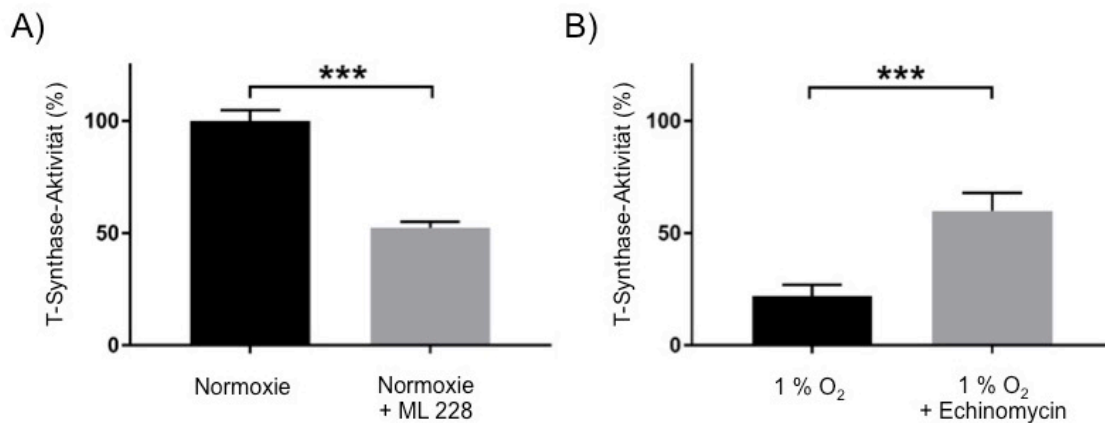


Abbildung 15: T-Synthase-Aktivität unter Aktivierung des HIF-Signalwegs (ML 228) und unter HIF-Inhibition (Echinomycin)

A) Darstellung der T-Synthase-Aktivität in HEK293-Zellen unter Normoxie (angenommen 100 % Enzymaktivität) und unter Aktivierung des HIF-Signalweges mittels ML 228 (T-Synthase-Aktivität von 51 %). B) Darstellung der T-Synthase-Aktivität in HEK293-Zellen unter Hypoxie (1 % O₂) (T-Synthase-Aktivität 23 %) und unter HIF-Inhibition mittels Echinomycin (Aktivität T-Synthase von 60 %). (n=5, Signifikanz mittels einfachem t-Test: $p < 0,001^{***}$)

4.2.4 Zelluläre Lokalisation des Tn-Antigens

Um der Frage nachzugehen, in welchem Zellkompartiment sich das unter Hypoxie vermehrt exprimierte Tn-Antigen befindet, wurde im Folgenden eine Zytosol- und Kernfraktionierung der HEK-Zellen durchgeführt und mittels immunchemischem Nachweis das Tn-Antigen detektiert. Ebenso wurde mit dem Nachweis der T-Synthase verfahren. Abbildung 16 zeigt den immunchemischen Nachweis von Tn-Antigen und T-Synthase im Zytosol (Z) und Zellkern (K) jeweils unter Normoxie und Hypoxie. Hierbei zeigt sich die vermehrte Tn-Antigen-Expression unter Hypoxie verstärkt in der zytosolischen Fraktion. Das Bandenmuster der T-Synthase unterscheidet sich generell in der zytosolischen und der nukleären Fraktion. Das zytosolische Bandenmuster zeigt keine Veränderung unter Normoxie oder Hypoxie, wohingegen die T-Synthase im Zellkern unter Normoxie eine 250 kDa große Bande aufweist, welche unter Hypoxie verschwindet. Stattdessen tritt unter Hypoxie im Zellkern eine 25 kDa große Bande der T-Synthase hinzu.

Ergebnisse

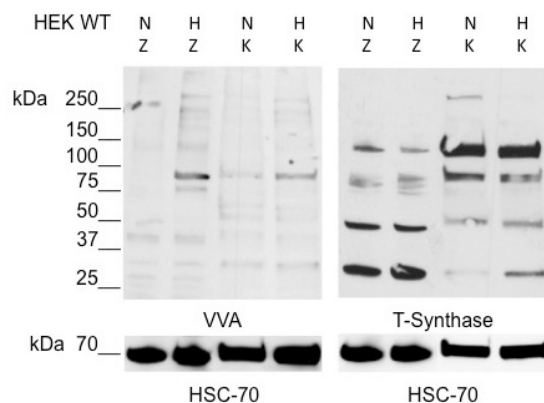


Abbildung 16: Tn-Antigen und T-Synthase in verschiedenen Zellkompartimenten

Western Blot zur Darstellung von Tn-Antigen mittels VVA-Lektin und T-Synthase in HEK-Zellen unter Normoxie (N) und Hypoxie (H, 24 h) nach Fraktionierung der Zellkompartimente in Zytosol (Z) und Zellkern (K). Ladekontrolle mittels HSC-70.

4.3 O-GlcNAcylierung unter Hypoxie

Die O-GlcNAcylierung von Proteinen ist ein dynamischer Prozess, der im Zytosol stattfindet und in Verbindung mit Signalwegen innerhalb der Zelle steht (Kapitel 1.1.1.3). Daher war bei der Untersuchung des Einflusses von Hypoxie auf die O-Glykosylierung auch diese Art der posttranslationalen Modifikation von besonderem Interesse. Bei der Analyse humaner Glykosylierungsgene zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression des OGT-Gens (Kapitel 4.1). Dieses Enzym spielt eine maßgebliche Rolle in der O-GlcNAcylierung. Es findet ein dynamischer Prozess von Anheftung und Entfernung von GlcNAc am Protein statt. Daran beteiligt sind die O-GlcNAc-Transferase (OGT), welche die enzymatische Anheftung von GlcNAc an ein Polypeptid katalysiert und die OGA (O-GlcNAcase), welche GlcNAc vom Protein entfernt (Zachara et al. 2015). Im Folgenden wurde daher der Einfluss von Hypoxie auf die an der Synthese von O-GlcNAc Glykanen beteiligten Proteine und deren Auswirkung auf die Tn-Antigen-Expression untersucht um mögliche Zusammenhänge der O-GlcNAc und O-GalNAc Glykane zu beleuchten. Abbildung 17 stellt das Tn-Antigen, O-GlcNAc und die OGT unter Normoxie und Hypoxie dar. Der Nachweis von Tn-Antigen unter Hypoxie zeigt deutliche Banden bei 250 kDa und bei zirka 75 kDa. Unter Normoxie zeigt sich keine Tn-Antigen-Expression. Die Immundetektion von O-GlcNAc zeigt unter Normoxie ein ähnliches Bandenmuster bei 250 kDa und 75 kDa wie das Tn-

Ergebnisse

Antigen unter Hypoxie. Unter Hypoxie verstärkt sich das Bandenmuster von O-GlcNAc der HEK-Zellen nochmals deutlich. Die Expression der OGT ist unter Hypoxie stark abgeschwächt.

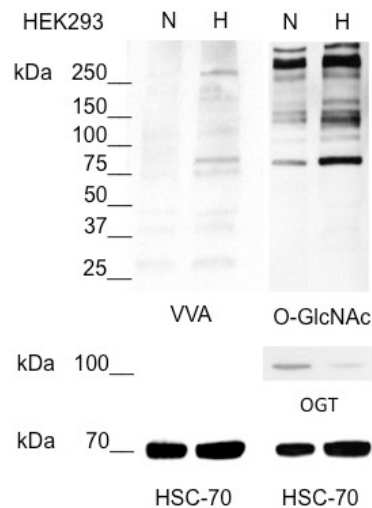


Abbildung 17: Tn-Antigen, O-GlcNAc und OGT unter Hypoxie

Im Western Blot dargestellt sind das Tn-Antigen mittels VVA-Lektin, das O-GlcNAc und die O-GlcNAc-Transferase (OGT) in HEK-Zellen unter Normoxie (N) und Hypoxie (H, 24 h). Ladekontrolle mittels HSC-70.

4.3.1 Beeinflussung des GlcNAcylierungs- und Phosphorylierungsstatus

Um die Auswirkung einer erhöhten Konzentration an O-GlcNAcylierten Proteinen auf den Tn-Antigen- sowie Phosphorylierungsstatus der Zellen zu untersuchen, wurde die O-GlcNAcase (OGA) mittels zweier chemischer Inhibitoren (Z-PugNAc oder Thiamet G) gehemmt (Abb. 18 A) (Yuzwa et al. 2008). Die Ergebnisse der Expression von Tn-Antigen und O-GlcNAc, mit und ohne OGA-Inhibition, sind in Abbildung 18 B/C dargestellt. Hier wird deutlich, dass die Aktivität der OGA keinen Einfluss auf die Expression des Tn-Antigens unter Normoxie zeigt. Das Tn-Antigen ist weder ohne Hemmung der OGA, noch unter Behandlung mit einem Inhibitor nachweisbar. Unter Hypoxie zeigt sich ebenfalls kein Einfluss auf die Expression des Tn-Antigens mit und ohne Hemmung der OGA, das Tn-Antigen ist hier unter Hypoxie stets nachweisbar. In Abbildung 18 C ist der Nachweis von O-GlcNAc unter Hypoxie und Normoxie mit und ohne Inhibition von OGA dargestellt. Hierbei wird zunächst die Expression von O-GlcNAc unter Normoxie und Hypoxie ohne Einfluss eines Inhibitors betrachtet. Es zeigt sich eine schwache, zusätzliche

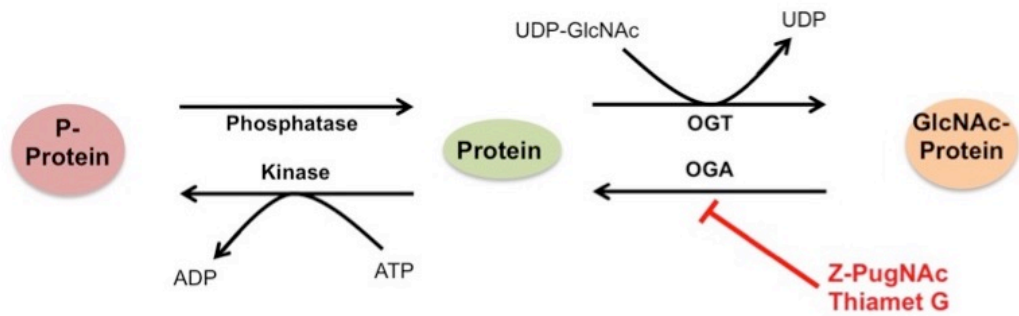
Ergebnisse

Bande bei ungefähr 80-90 kDa unter Hypoxie. Diese tritt unter Inhibition von OGA mittels Z-PugNAc auch unter Normoxie auf. Diese Bande wird bei Kombination von Hypoxie und OGA-Inhibition noch deutlicher. Unter Hypoxie tritt eine zusätzliche, zirka 50 kDa große Bande auf.

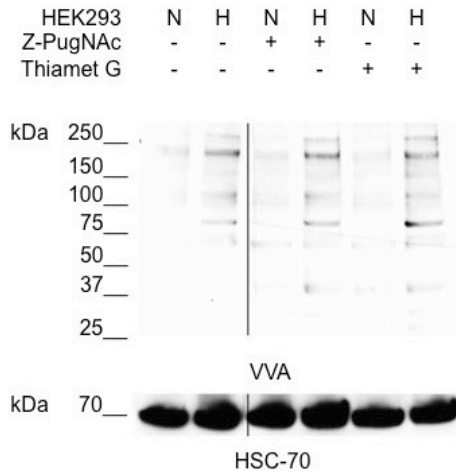
Die Kanzerogenese einer Zelle wird häufig durch Veränderungen in Signalwegen initiiert, welche Einfluss auf das Zellwachstum haben. Hierbei spielen Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen von Proteinen zur Aktivierung und Inaktivierung solcher Signalwege eine entscheidende Rolle. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Hypoxie einen Einfluss auf die Entstehung aberranter O-Glykane (z.B. Tn-Antigen) hat, welche wiederum mit diversen Tumorentitäten in Verbindung stehen (Stowell et al. 2015). Ebenso steht die dynamische Synthese von O-GlcNAc Glykanen in Verbindung mit Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen und beeinflusst somit Signalwege innerhalb einer Zelle (Kapitel 1.1.1.3). Daher wird im Folgenden der Phosphorylierungsstatus von HEK-Zellen unter Normoxie und Hypoxie im Western Blot untersucht. Hierbei zeigt sich unter Normoxie ohne Inhibitoren ein schwacher Nachweis von p-Tyrosin, wobei unter Hypoxie kein Nachweis vorhanden ist (Abb. 18 D). Unter Inhibition von O-GlcNAcase wird p-Tyrosin jedoch auch unter Hypoxie nachweisbar. Abbildung 18 E zeigt die Darstellung von phosphoryliertem Serin/Threonin. Hier wird p-Ser/Thr sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie exprimiert, unter Hypoxie tritt allerdings in allen Probenansätzen eine zusätzliche Bande bei 75 kDa auf. Unter Inhibition von O-GlcNAcase ist keine Veränderung dieses Expressionsmusters zu beobachten.

Ergebnisse

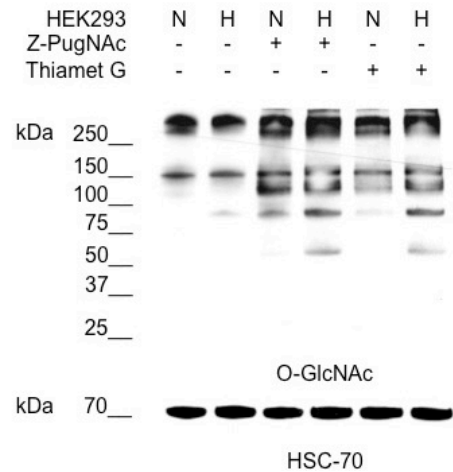
A)



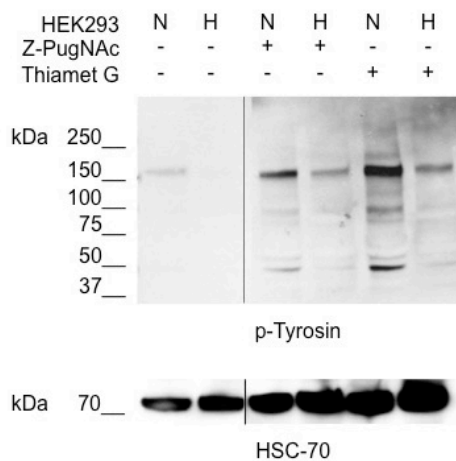
B)



C)



D)



E)

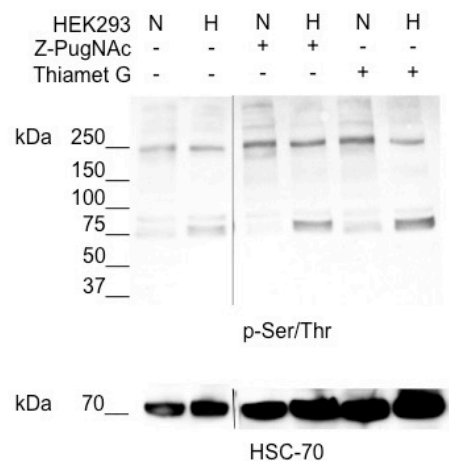


Abbildung 18: O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung unter Hypoxie

A) Schematische Darstellung der Synthese eines GlcNAc-Proteins unter Anheftung von GlcNAc mittels O-GlcNAc-Transferase (OGT) und Entfernung von GlcNAc durch O-GlcNAcase (OGA). Die Hemmung von O-GlcNAc erfolgt mithilfe der chemischen Inhibitoren Z-PugNAc oder Thiamet G.

B) Western Blot zum Nachweis von Tn-Antigen mittels VVA-Lektin unter Normoxie (N) und Hypoxie (H) ohne (-) und mit (+) Hemmung der O-GlcNAcase durch Z-PugNAc oder Thiamet G.

C) Western Blot zum Nachweis von O-GlcNAc unter Normoxie (N) und Hypoxie (H) ohne (-) und mit (+) Hemmung der O-GlcNAcase mittels Z-PugNAc oder Thiamet G.

D) Immunchemische Darstellung von p-Tyrosin in HEK293-Zellen unter Normoxie (N) und Hypoxie (H) mit und ohne Behandlung mit O-GlcNAcase-Inhibitoren (Z-PugNAc, Thiamet G).

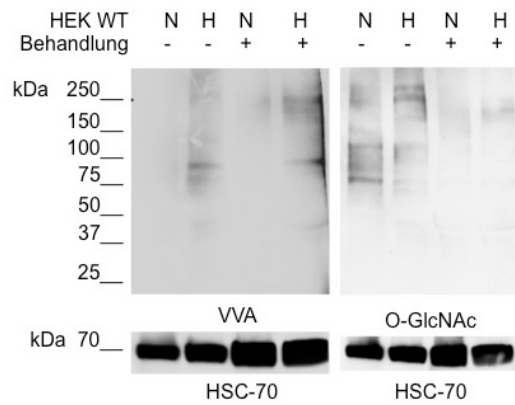
E) Immunchemische Darstellung von p-Serin/Threonin in HEK293-Zellen unter Normoxie (N) und Hypoxie (H) mit und ohne Behandlung mit O-GlcNAcase-Inhibitoren (Z-PugNAc, Thiamet G). Ladekontrolle jeweils mittels HSC-70.

4.4 Verifizierung der Ergebnisse durch enzymatischen Glykanverdau

Um die bisherigen Beobachtungen zu verifizieren und um Überlagerungen von Banden im Western Blot auszuschließen, wurden die Lysate der HEK-Zellen nach Proteinverdau erneut im Western Blot auf O-GlcNAc und O-GalNAc untersucht. Hierzu wurden Proteinlysate von HEK-Zellen unter Normoxie und Hypoxie einem enzymatischen Verdau von jeweils O-GlcNAc und O-GalNAc unterzogen. Abbildung 19 A zeigt den Nachweis von Tn-Antigen und O-GlcNAc mit und ohne Behandlung eines enzymatischen O-GlcNAc-Verdaus mittels O-GlcNAcase. Hierbei zeigt sich kein Einfluss auf den Nachweis von Tn-Antigen. Dieses ist mit und ohne Behandlung gleichermaßen unter Hypoxie vorhanden und unter Normoxie nicht nachweisbar. O-GlcNAc ist ohne Behandlung unter Normoxie und Hypoxie nachweisbar, mit Behandlung zeigt sich kein Nachweis von O-GlcNAc. Der O-GlcNAc-Verdau zeigt somit keine Veränderung im Expressionsmuster von O-GalNAc. Abbildung 19 B zeigt HEK-Zellen unter Normoxie und Hypoxie mit und ohne den Einfluss eines O-GalNAc-Verdaus mittels O-GalNAcase. Hierbei ist das Tn-Antigen ohne Behandlung unter Hypoxie die typische, zusätzlich auftretende Bande bei 75 kDa, unter O-GalNAc-Verdau, ist kein Tn-Antigen nachweisbar. O-GlcNAc wird unbehandelt sowohl unter Hypoxie, als auch unter Normoxie exprimiert. Nach dem O-GalNAc-Verdau zeigt sich das Expressionsmuster unter Normoxie leicht abgeschwächt. Der O-GalNAc-Verdau zeigt also keine Veränderungen im Expressionsmuster von O-GlcNAc. Die Spezifität der verwendeten Nachweismethoden ist hiermit bestätigt, eine Überlagerung der Banden ausgeschlossen.

Ergebnisse

A) O-GlcNAc-Verdau



B) O-GalNAc-Verdau

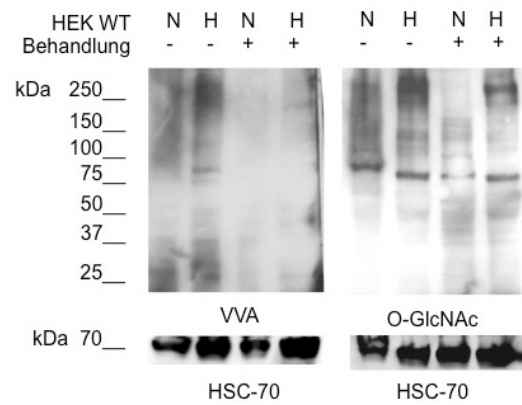


Abbildung 19: Tn-Antigen- und O-GlcNAc-Nachweis im Glykanverdau

A) Western Blot zur Darstellung von Tn-Antigen und O-GlcNAc unter Normoxie (N) und Hypoxie (H) ohne (-) und mit (+) Behandlung durch O-GlcNAcase zum Abbau von O-GlcNAc. B) Western Blot zur Darstellung von Tn-Antigen und O-GlcNAc unter Normoxie (N) und Hypoxie (H) ohne (-) und mit (+) Behandlung durch O-GalNAcase zum Abbau von Tn-Antigen (O-GalNAc). Ladekontrolle mittels HSC-70.

5 Diskussion

Das Auftreten von Hypoxie im menschlichen Gewebe führt auf zellulärer Ebene zu Stress. Menschliche Zellen beherrschen einige Mechanismen sich an zeitlich begrenzte, hypoxische Bedingungen anzupassen. Der wichtigste Mechanismus ist sicher die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1, welcher unter Hypoxie die Expression zahlreicher Proteine wichtiger intrazellulärer Signalwege aktiviert und eine Anpassungsreaktion der Zellen ermöglicht. Allerdings führt eine länger anhaltende Hypoxie, wie sie in soliden Tumoren aufgrund ihrer Gewebheterogenität vorkommt, zur Aktivierung onkogener Signalwege und treibt somit die Tumorgenese weiter voran (Semenza 2010).

In jeder menschlichen Zelle finden Glykosylierungsprozesse statt. Die fertigen Glykoproteine übernehmen wichtige Aufgaben der zellulären Strukturhaltung, auf der Zelloberfläche, bei der Kommunikation untereinander und mit Zellen des Immunsystems. Eine aberrante O-Glykosylierung zeichnet sich unter anderem durch das Auftreten des Tn-Antigens aus. Dieses verkürzte Glykoprotein bildet normalerweise den Grundbaustein der O-Glykane vom Muzin-Typ. Sein Vorkommen im adulten Organismus ist mit Malignität assoziiert und dient bei vielen Tumorentitäten als globaler Tumormarker (Stowell et al. 2015). Zur Erklärung einer vermehrten Expression des Tn-Antigens und damit einer Fehlfunktion in der O-Glykosylierung, gibt es in der Literatur übereinstimmende Untersuchungen, welche in erster Linie die Defizienz der T-Synthase oder seines Chaperons Cosmc als Ursache identifizieren (Ju et al. 2014). Auch eine vermehrte Protein-O-GlcNAcylierung, welche als dynamischer Prozess in engem Zusammenhang mit Protein-Phosphorylierung steht, wird in Tumoren und chronischen Erkrankungen beobachtet (Very et al. 2018).

An diesem Punkt stellen die Ergebnisse dieser Arbeit einen Zusammenhang her zwischen Hypoxie als Element der Tumorerheterogenität in soliden Tumoren und aberranter O-Glykosylierung, in Form des Auftretens von Tn-Antigen und Hyper-O-GlcNAcylierung. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert, mit dem aktuellen Stand der Literatur verglichen und in einem Erklärungsmodell zusammengefasst.

5.1 Expression humaner Glykosylierungsgene unter Hypoxie

Bei der globalen Betrachtung humaner Glykosylierungsgene unter Hypoxie (1 % O₂, CoCl₂) mittels quantitativer PCR in HEK293-Zellen, zeigte sich eine Verminderung der Genexpression in nahezu allen Genen der Glykosylierung. Generell wies Kobaltchlorid einen stärkeren und häufiger signifikanten Effekt als der Entzug von Sauerstoff auf die Expression der Gene auf.

Unter den Fucosyltransferasen kam es vor allem beim POFUT1-Gen zu einer hypoxischen Unterexpression (Abb. 9 F). Die Protein-O-Fucosyltransferase 1 (POFUT1) überträgt Fucose von GDP-Fuc auf einen Ser/Thr-Rest eines korrekt gefalteten Proteins mit einer *EGF-like* Domäne. O-Fucose-Glykane spielen eine wichtige Rolle in *Notch*-Signalwegen. Eine Dysregulation des *Notch*-Signalweges führt zu einer Vielzahl an menschlichen Erkrankungen, inklusive diverser Krebsarten und zu unterschiedlichsten Störungen in der Entwicklung (Haltiwanger et al. 2015, Holdener et al. 2019). Ein Zusammenhang mit dem Auftreten unter Hypoxie wurde bisher nicht beschrieben.

Deutlich signifikante Ergebnisse zeigten bei den Genen der N-Acetylgalactosaminidasen (pp-GalNAc-Transferasen) GALNT6, GALNT11 und GALNT12 (Abb. 9 A). Bisher werden etwa zwanzig humane GalNAc-Transferasen (GALNTs) mit unterschiedlichen Substratspezifitäten beschrieben, welche den ersten Schritt der Synthese von O-GalNAc-Proteinen des Muzin-Typs katalysieren und damit das Tn-Antigen synthetisieren (Bennett et al. 2012). GALNT12 kommt vor allem in Verdauungsorganen wie Magen, Kolon und Dünndarm vor und ist an der Synthese von Muzinen beteiligt (Guo et al. 2002). GALNT6 ist das Gen für die Kodierung der pp-GalNAc-Transferase-6 und konnte in einer Vielzahl von Krebsarten als hochreguliert beobachtet werden (Banford et al. 2017). GALNT11 wurde bisher nur in Zusammenhang mit chronisch lymphatischer Leukämie beschrieben. Dort zeigte sich eine gleichzeitige Überexpression von GALNT11 und Tn-Antigen (Libisch et al. 2014). *Hussain et al.* untersuchten die Expression aller zwanzig Gene der GalNAc-Transferasen und beschrieben deren Einfluss auf die Ausbildung eines neoplastischen Phänotyps der Zellen (Hussain et al. 2016). In den genannten Studien sind die Gene für die pp-GalNAc-Transferasen in Tumoren überexprimiert, ein Zusammenhang mit Hypoxie wurde bisher allerdings noch nicht untersucht. *Hofmann et al.* zeigten unter *Cosmc-Knockdown* in

PANC-1-Zellen eine Abnahme der GALNT-mRNAs (Hofmann et al. 2015). Da die eigenen Ergebnisse unter Hypoxie (1% O₂ und CoCl₂) eine signifikant verminderte Expression von C1GALTC1 (Cosmc) zeigten (Abb. 9 D), ist der oben genannte Aspekt von großem Interesse. Eine inkorrekte oder verminderte Transkription des Cosmc-Gens (C1GALTC1) führt zur fehlerhaften Faltung der T-Synthase und einer damit einhergehenden Funktionsunfähigkeit, was eine erhöhte Konzentration an Tn-Antigen zur Folge hat (Ju et al. 2011). Eine mögliche Erklärung in der Abnahme der GALNT-Expression unter Hypoxie, bei verminderter Cosmc-Aktivität, besteht eventuell in einer negativen Feedbackschleife. Das erhöhte Tn-Antigen signalisiert eine Verminderung der Expression seiner synthetisierenden Enzyme (GALNTs). Ursprünglich wird eine Reihe an Regulationsmechanismen der GALNTs diskutiert. Hierzu gehört beispielsweise die Regulation durch Relokalisation der GALNTs vom Golgi-Apparat ins ER (Gill et al. 2011). Ein direkter Zusammenhang der Expression von Galactosyltransferasen unter Hypoxie wurde in der aktuellen Literatur jedoch nicht beschrieben.

Bei den N-Acetylglucosamintransferasen zeigte vor allem das OGT-Gen ein signifikant vermindertes Expressionsmuster unter Hypoxie (CoCl₂) (Abb. 9 B). Eigene Ergebnisse im Western Blot bestätigten eine Abnahme der OGT-Expression unter Hypoxie in HEK293 (Abb. 17). Die O-GlcNAc-Transferase knüpft GlcNAc an Serin-/Threonin-Reste von zytosolischen Proteinen und führt damit zu einer Zunahme O-GlcNAcylierten Proteinen. *Zachara et al.* bestätigen eine Hyper-O-GlcNAcylierung von Proteinen unter zellulärem Stress (u.a. Hypoxie (mittels CoCl₂)), bei gleichzeitiger Zunahme der OGT-Expression, was die vermehrte O-GlcNAcylierung direkt erklärt (Zachara et al. 2004). Die eigenen Ergebnisse in Bezug auf die OGT-Expression unter Hypoxie weichen hiervon ab. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine unterschiedliche Reaktion der von *Zachara et al.* verwendeten tierischen Zelllinie und der humanen HEK293-Zellen unter Hypoxie.

Unter den Sialyltransferasen sticht das ST6GAL1-Gen als signifikant unterexprimiert hervor (Abb. 9 C). Die ST6-β-Galactosamid-α-2,6-Sialyltransferase-1 ist eine von zirka zwanzig Sialyltransferasen und katalysiert die terminale Anknüpfung von Neu5ac (NaNAc, N-Acetylneuraminsäure) eines CMP-Neu5Ac-Substrates über eine α-2,6-Verknüpfung an ein Oligoglykan oder ein Glykoprotein (Hamamoto et al.

1993, Harduin-Lepers et al. 2001). *Jones et al.* beschrieben einen Schutz der Tumorzellen vor Hypoxie durch eine ST6GAL1-vermittelte Steigerung des HIF-1 α -Signals. Sie haben damit die Sialylierung als eine molekulare Veränderung gedeutet, welche das Tumorzellüberleben fördert (Jones et al. 2018, Li et al. 2018).

5.2 Hypoxie induziert Tn-Antigen in HEK-Zellen, duktalem Pankreaszellen und Pankreaskarzinomzellen

Sowohl Hypoxie an sich als auch das Auftreten von Tn-Antigen stehen mit Malignität und Tumorgenese in Verbindung (Jubb et al. 2010, Stowell et al. 2015). Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen die hypoxieabhängige (1% O₂ und CoCl₂) Induktion von Tn-Antigen in humanen HEK293, duktalem Pankreaszellen (HPDE) und Pankreaskarzinomzellen (PANC-1) im Western Blot. Der Nachweis von hypoxischen Arealen in den unterschiedlichsten Krebsarten mittels HIF-1 steht in Verbindung mit einem schlechten Outcome bei Tumorpatienten (Semenza 2010). So konnten unter anderem beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) erhöhte Konzentrationen an HIF-1 nachgewiesen werden (Sun et al. 2007).

Die posttranslationale Glykosylierung ist ein klassisches Beispiel epigenetischer Veränderung im Rahmen einer neoplastischen Transformation. Diese Veränderungen zeigen sich sowohl in den Core-Strukturen von Glykanen durch deren vorzeitige Verkürzung (Tn-Antigen), als auch in terminalen Strukturen von Glykanen. Hierzu zählen hoch fucosylierte Lewis-Antigene und die Sialylierung terminaler Glykane (STn-Antigen). In Bezug auf aberrante O-Glykosylierung stellen das O-glykosidisch verknüpfte N-Acetylgalactosamin (Tn-Antigen) und dessen Sialyl-Form (STn-Antigen) die häufigsten Alterationen der Glykosylierung im PDAC dar (Itzkowitz et al. 1991, Kim et al. 2002). Veränderungen in der O-Glykosylierung stehen in direktem Zusammenhang mit Veränderungen in Zell-Zell-Interaktionen und zunehmender Zellmigration im Pankreaskarzinom (Radhakrishnan et al. 2014). Ebenso können verkürzte O-Glykane Interaktionen mit dem Immunsystem und damit eine Abschirmung neoplastischer Zellen vor Immunzellen bewirken, was zur immunologischen Toleranz von Tumorzellen führt (Saeland et al. 2007).

Den Zusammenhang von Hypoxie und dem Auftreten von STn-Antigen in Harnblasenkarzinomzelllinien untersuchten *Peixoto et al.* Hierbei zeigte sich eine deutliche Zunahme der STn-Antigen-Expression unter Hypoxie. Sie beschrieben ebenso eine Umkehrung dieser Beobachtung bei Reoxygenierung. Die Zellen zeigten unter Hypoxie eine Zunahme von Migration und Invasion (Peixoto et al. 2016). Der Fokus dieser Arbeit wurde allerdings speziell auf das Auftreten des Tn-Antigens gerichtet.

Die Literatur nennt verschiedene Einflussfaktoren, die Protein-Glykosylierung in Tumorzellen beeinflussen können. Diese könnten auch mögliche Erklärungen bieten, weshalb Hypoxie zu einer Beeinträchtigung der O-Glykosylierung führt. Zum einen kann sowohl das Expressionslevel als auch die Lokalisation von Glykosyltransferasen in verschiedenen zellulären Kompartimenten deren Aktivität bestimmen. Ein weiterer Einfluss ist die Expression von spezifischen Chaperonen, die der Faltung von Glykoproteinen und Glykosyltransferasen dienen. Das beste Beispiel hierfür ist das Chaperon Cosmc. Seine Fehlfunktion führt über die verminderte Aktivität der T-Synthase zur Expression des Tn-Antigens. Weiterhin beeinflusst die proteinspezifische Natur eines Glykoproteins, also sein anhängendes Protein bzw. die darin enthaltenen Aminosäuren, seine Biologie und seine Affinität zu bestimmten Glykosyltransferasen. Bei der Synthese von Glykoproteinen spielt auch die Verfügbarkeit von Proteinen und deren Substraten (Zuckermoleküle) eine beeinflussende Rolle. Ebenso wirkt sich auch der intrazelluläre pH-Wert, bzw. der pH-Wert im Golgi-Apparat oder im ER auf die Aktivität der Glykosylierungsenzyme aus (Stowell et al. 2015). Zum Zusammenhang des Auftretens von Tn-Antigen unter Hypoxie gibt es bisher keine Studien. Diese Arbeit hat allerdings gezeigt, dass Hypoxie zu aberranter O-Glykosylierung führt, welche in Form von erhöhter Tn-Antigen-Expression nachzuweisen ist und benennt Hypoxie erstmals als direkten Einflussfaktor hierfür.

5.3 Molekulare Mechanismen aberranter O-GalNAcylierung unter Hypoxie

Die Hypoxie-abhängige Induktion von Tn-Antigen in HEK-Zellen zeigte in Abbildung 12 B einen zeitabhängigen Effekt mit einer maximalen Ausprägung nach 24-stündiger Inkubation und war potentiell und partiell reversibel unter nachfolgender 18-stündiger Normoxie. Weitere Untersuchungen zum molekularen Mechanismus hinter diesem Effekt veranlassten den Einsatz des chemischen HIF-Induktors ML 228 und eines HIF-1-Inhibitors (Echinomycin), unter deren Einsatz gezeigt werden konnte, dass der Effekt der vermehrten Tn-Antigen-Expression durch eine Hypoxie-abhängige, HIF-1-vermittelte Reaktion zu erklären ist. Das Tn-Antigen ließ sich in HEK293-Zellen durch chemische HIF-Induktion exprimieren und diese Expression durch HIF-Inhibition unter Hypoxie wiederum verhindern (Abb. 14). Die in der Genexpressionsanalyse signifikant verminderte Expression von C1GALTC1 (*Cosmc*) unter Hypoxie in HEK293, veranlasste Untersuchungen zur Enzymaktivität der T-Synthase, welche stark von seinem Chaperon *Cosmc* abhängt. Die T-Synthase zeigte unter Hypoxie eine deutlich verminderte Aktivität (Abb. 10 B). Eine Western Blot-Untersuchung der T-Synthase zeigte bei 24-stündiger Hypoxieinkubation eine zusätzliche Bande, die auf eine veränderte Proteinstruktur hindeuten könnte, welche das Enzym in seiner Funktion einschränkt. Das T-Antigen, welches das Syntheseprodukt der T-Synthase aus dem Tn-Antigen darstellt, war unter Hypoxie vermindert exprimiert. Dieser Aspekt bestärkt die Theorie einer Mangelfunktion der T-Synthase durch eine verminderte Expression von *Cosmc* unter Hypoxie (Abb. 9 D). Vergleiche mit der HEK SC-Zelllinie unter Normoxie, welche eine *Cosmc*-Defizienz durch C1GALTC1-*Knockout* aufweist, haben jedoch keine Übereinstimmung im Bandenmuster für das Tn-Antigen unter Hypoxie in HEK-WT-Zellen gezeigt (Abb. 11 B). Die Literatur bestätigt hierbei, dass ein *Cosmc-Knockdown* in PANC-1-Zellen die Expression von Tn-Antigen bewirkt und folglich zu onkogenen Eigenschaften der Zellen in Form von veränderter Zellproliferation, erhöhter Migration und verminderter Apoptose führt (Hofmann et al. 2015).

Eine weitere Möglichkeit auf die Regulation der T-Synthase Einfluss zu nehmen, ist die Hypoxie-bedingte Lokalisationsänderung der T-Synthase in andere

Zellkompartimente. Dieser Prozess zur Regulierung von GALNTs wurde bereits von *Gill et al.* beschrieben (Gill et al. 2011). Die Hypoxie-induzierte Tn-Antigen-Expression in HEK293 konnte in dieser Arbeit sowohl im Zytosol als auch im Zellkern nachgewiesen werden, wobei das Expressionsmuster im Zytosol etwas stärker ausgeprägt war (Abb. 16). Untersuchungen zur Lokalisation der T-Synthase unter Normoxie und Hypoxie ergaben im Western Blot allerdings keine eindeutigen Ergebnisse. Es zeigte sich lediglich eine Veränderung des Bandenmusters zwischen Normoxie und Hypoxie in der Zellkernfraktion, welche zunächst unspezifisch erscheint (Abb. 16), aber auf eine veränderte Proteinstruktur der T-Synthase hindeuten könnte, welche ihre Aktivität reguliert.

Die eigenen Ergebnisse lassen mehrere Erklärungsmöglichkeiten zur vermehrten Tn-Antigen-Expression unter Hypoxie zu. Zum einen bestätigen sie sicherlich die Defizienz von *Cosmc* und einer damit einhergehenden Aktivitätsminderung der T-Synthase mit der Folge einer erhöhten Tn-Antigen-Expression. Andererseits könnte die vermehrt zytosolische Lokalisation des Tn-Antigens unter Hypoxie auch auf einen lokalisationsabhängigen Regulationsmechanismus der T-Synthase hindeuten.

In der Literatur werden generell weitere potentielle Erklärungsmöglichkeiten einer erhöhten Tn-Antigen-Expression diskutiert, welche in dieser Arbeit allerdings nicht untersucht wurden, prinzipiell aber auch als Folge von Hypoxie denkbar wären.

Eine Möglichkeit besteht in einer Veränderung der Substratkonzentrationen unter Hypoxie, welche für eine normale Synthese von Glykanen notwendig wären. Es kommt zu HIF-1-vermittelten Veränderungen des Zellmetabolismus, welche auch eine Veränderung des intrazellulären Zuckermolekülangebotes zur Folge haben (Semenza 2008). So beschrieben *Do et al.* beispielsweise eine vermehrte Tn-Antigen-Expression der Lec8-Zelllinie, welche Störungen in der Synthese von UDP-Gal und dem UDP-Gal-Transporter aufweist. Das Substrat UDP-Gal und sein Transporter sind essentiell für die Synthese von Glykoproteinen (Do et al. 1992). Eine weitere Möglichkeit, die zu einer erhöhten, zellulären Konzentration an Tn-Antigen führt, besteht im Abbau von normalen O-Glykanen zu verkürztem Tn-Antigen. Dies kann experimentell, beispielsweise mittels β -D-Galaktosidase, erfolgen (Springer et al. 1974). Eine Zunahme der Aktivität an Galaktosidasen, wie z.B. der β -D-Galaktosidase, unter Hypoxie wäre prinzipiell denkbar.

Ebenso könnte eine verminderte Aktivität von Enzymen, die Tn-Antigen als Akzeptor verwenden und somit weiterverarbeiten würden, zu einer Zunahme an unverarbeitetem Tn-Antigen führen (Abb. 1). Hierzu gehört zum einen die T-Synthase, die das Tn-Antigen als Akzeptor verwendet und bei einer verminderten Aktivität eine Zunahme des Tn-Antigens zur Folge hat. Zum anderen zählt hierzu die Sialyltransferase ST6GalNAc-I, welche die wichtigste und vermehrt aktive Sialyl-Tn-Synthase in menschlichen Tumoren darstellt (Sewell et al. 2006). Die eigenen Genexpressionsanalysen zeigten eine verminderte Expression von ST6GAL1 unter Hypoxie. Die verminderte Aktivität dieses Enzyms hat die Folge eines Anstiegs ihres Akzeptors Tn-Antigen. Als drittes Tn-Antigen-modifizierendes Enzym gilt die Core-3- β 3-GlcNAc-Transferase (C3GnT), welche die Core-3-Glykoprotein-Struktur im Gastrointestinaltrakt synthetisiert. Ein Verlust von C3GnT findet sich im Zusammenhang mit Dickdarmkrebs und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, wie zum Beispiel Colitis ulcerosa (An et al. 2007, Xia 2010).

5.4 Hypoxie-bedingte Beeinflussung der O-GlcNAcylierung und zellulärer Signalwege

Bei der O-GalNAcylierung und der O-GlcNAcylierung handelt es sich um zwei verschiedene Stoffwechselwege, die mithilfe unterschiedlicher Enzyme in unterschiedlichen Zellkompartimenten stattfinden. Allerdings veranlassten die Ergebnisse dieser Arbeit, welche eine Lokalisation von Tn-Antigen bei Hypoxie vermehrt im Zytosol ergaben, zu Überlegungen ob möglicherweise Interaktionen zwischen der O-GalNAcylierung und der O-GlcNAcylierung unter Hypoxie auftreten könnten. Eigene Ergebnisse im Western Blot haben den Nachweis von O-GlcNAc sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie verdeutlicht, wobei eine Zunahme von O-GlcNAc unter Hypoxie beobachtet werden konnte. Allerdings haben sowohl die Genexpressionsanalyse als auch der Western Blot unter Hypoxie eine reduzierte Expression von OGT gezeigt (Abb. 16). Bei einer verminderten Expression von OGT würde man eine verminderte Aktivität dieses Enzyms und eine somit reduzierte Expression von O-GlcNAc-Proteinen erwarten (Abb. 4).

Die Bandenmuster von Tn-Antigen unter Hypoxie und von O-GlcNAc unter Hypoxie sind sehr ähnlich. Dies könnte bedeuten, dass Proteine von ähnlicher Größe (kDa) entweder ein O-GlcNAc oder ein O-GalNAc tragen. Das durch Hypoxie entstandene Tn-Antigen befindet sich laut eigenen Untersuchungen hauptsächlich im Zytosol, dem Ort der physiologischen O-GlcNAcylierung. Daher könnte man die Hypothese aufstellen, dass es dadurch zu Interaktionen von beiden kommt. Die vermehrte O-GalNAc-Konzentration im Zytosol könnte mit O-GlcNAc konkurrieren, direkten Einfluss auf die damit zusammenhängenden Phosphorylierungen nehmen und Signalkaskaden einer Zelle beeinflussen. Umgekehrt haben Untersuchungen erhöhter Konzentrationen von O-GlcNAcylierten Proteinen, induziert durch chemische OGA-Hemmung, keine Veränderungen in der Tn-Antigen-Expression gezeigt (Abb. 18 B).

Die eigenen Ergebnisse weichen hier allerdings zum Teil vom aktuellen Stand der Literatur ab. Übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen wird auch hier von einer erhöhten O-GlcNAcylierung in Tumorzellen gesprochen, welches durch zellulären Stress, unter anderem in Form von Hypoxie, erklärt wird. Hierzu gehören vor allem Tumorzellen aus soliden Tumoren des Pankreas, des Kolons, der Leber und der Lunge (Yi et al. 2012, Zhu et al. 2012, Ma et al. 2013, Yang et al. 2015). Diese Zunahme der O-GlcNAc-Modifikationen resultiert aus einer in Neoplasien veränderten Aktivität und Expression der beiden essentiellen Enzyme der O-GlcNAc-Modifikationen: OGT und OGA. Das Resultat einer vermehrten OGT-Aktivität und damit vermehrter O-GlcNAcylierung unter zellulärem Stress initiiert ein Überlebens-Signal-Programm in Zellen und Gewebe und fördert somit das Zellüberleben unter Hypoxie. Gegenteilig führt eine Suppression von O-GlcNAc-Level zu pharmakologischer und genetischer Sensitivierung der Zellen gegenüber oxidativem und osmotischem Stress (Ma et al. 2014). Eigene Ergebnisse konnten eine Zunahme der OGT-Aktivität unter Hypoxie nicht direkt bestätigen. Die oben dargestellte, verminderte OGT-Expression in Genanalysen und im Western Blot ließ keinen direkten Rückschluss auf die tatsächliche Aktivität des Enzyms zu, sondern eher auf die Menge des vorhanden Enzyms.

Die Hypothese einer Interaktion zwischen dem unter Hypoxie vermehrt im Zytosol exprimierten Tn-Antigen (O-GalNAc) und dem stets im Zytosol vorhandenen O-GlcNAc wird bestärkt, wenn man den Aspekt der Umwandlung von UDP-GalNAc in UDP-GlcNAc durch die UDP-GlcNAc-4-Epimerase (4-Epimerase)

miteinbezieht. Dieses Enzym katalysiert den vierten Schritt des *Leloir*-Pathways, der den Abbau von Galaktose beschreibt. Hierbei entsteht im vierten Schritt das Substrat UDP-GalNAc, welches dann durch die 4-Epimerase in UDP-GalNAc umgewandelt werden kann und umgekehrt (Winans et al. 2002, Holden et al. 2003).

Die Berücksichtigung der Verknüpfung von O-GlcNAcylierung und Protein-Phosphorylierung ist insofern relevant, da ein veränderter Phosphorylierungsstatus mit der Aktivierung und Deaktivierung von onkogenen Signalwegen einhergeht. Hierbei spielen vor allem die Phosphorylierungen an Serin und Threonin eine Rolle. Dies sind die Aminosäuren, die auch direkt O-GlcNAcyliert werden. Eigene Western Blot-Untersuchungen zeigten, dass p-Ser/Thr sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie exprimiert wird. Unter Hypoxie tritt eine zusätzliche Bande bei 75 kDa auf. Unter Inhibition von O-GlcNAcase, das heißt vermehrtem O-GlcNAc, ist keine Veränderung dieses Expressionsmusters zu beobachten (Abb. 18 E). Eine erhöhte O-GlcNAc-Konzentration (durch OGA-Hemmung) hatte nach eigenen Ergebnissen also keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Serin und Threonin. Es findet somit zumindest keine direkte Konkurrenz von Phosphat und O-GlcNAc an diesen Bindungsstellen statt. *Mishra et al.* unterstrichen zusätzlich die wichtige Rolle der Tyrosin-Phosphorylierung im Zusammenhang mit der O-GlcNAcylierung. Zwei Drittel der O-GlcNAcylierten Proteine, hierunter auch Tyrosinkinasen, werden zusätzlich an Tyrosin phosphoryliert (Mishra et al. 2011). Auch *Ande et al.* bestätigten eine Interaktion zwischen O-GlcNAcylierung und Tyrosin-Phosphorylierung im Zusammenhang mit der Regulation bestimmter Signalproteine (Ande et al. 2009).

Die eigenen Ergebnisse im Western Blot zeigten ein Signal von p-Tyrosin in HEK293 unter Normoxie, welches unter Hypoxie verschwindet (Abb. 18 D). Eine pharmakologische Hemmung von OGA durch Thiamet G oder Z-PugNAc und der damit einhergehenden erhöhten O-GlcNAc-Konzentration, führt zu verstärkter Tyrosin-Phosphorylierung unter Normoxie und ist dann auch unter Hypoxie nachzuweisen. Hier stimmen die eigenen Daten, welche eine vermehrte Tyrosin-Phosphorylierung unter erhöhter O-GlcNAc-Konzentration gezeigt haben, mit den Ergebnissen der oben erwähnten Arbeitsgruppen überein.

Der Zusammenhang von Hypoxie und differentieller O-GlcNAcylierung wurde bisher vor allem in Bezug auf metabolische, zelluläre Veränderungen beschrieben. Hierzu gehört auch der unter Hypoxie in Tumoren auftretende Warburg-Effekt. Dieser beschreibt den allgemeinen metabolischen Phänotyp einer Tumorzelle, in welchem anaerobe Glykolyse zur Energiegewinnung der oxidativen Phosphorylierung vorgezogen wird. Die Konsequenz dieses Phänotyps ist die Zunahme an Glucosetransportern (GLUT) und die Zunahme des Durchflusses von Metaboliten durch die Hexosamin-Biosynthese (HBP) mit der Folge von erhöhten UDP-GlcNAc-Konzentrationen als Produkt dieses Syntheseweges. UDP-GlcNAc wiederum dient als Substrat für die OGT bei der O-GlcNAcylierung intrazellulärer Signalproteine.

Ma et al. zeigten, am Beispiel des duktales Adenokarzinoms des Pankreas (PDAC), als Folge des Warburg-Effektes eine damit einhergehende Zunahme an UDP-GlcNAc und der OGT-Aktivität sowie eine Abnahme der OGA-Aktivität. Eine Reduktion der O-GlcNAcylierung inhibierte die Zellproliferation des PDAC und triggerte Apoptose. Das Wachstum des PDAC wird unterstützt durch die Aktivität des onkogenen Transkriptionsfaktors NF- κ B. Die p65-Untereinheit von NF- κ B und deren Kinase IKK α /IKK β gehören zu den O-GlcNAc-modifizierten Proteinen. Eine Reduktion in der O-GlcNAcylierung verminderte die Aktivität der p65-Untereinheit und die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B. Umgekehrt führt eine Hyper-O-GlcNAcylierung, induziert durch pharmakologische OGA-Hemmung, zu einer Zunahme des NF- κ B-Signals (*Ma et al.* 2013). *Yang et al.* haben die Hyper-O-GlcNAcylierung in Zusammenhang mit onkogener Transformation und Entzündungsreaktionen im Kolon gebracht. Sie erklären diese Vorgänge in murinen Kolonzellen ebenfalls mit der durch eine vermehrte O-GlcNAcylierung einhergehenden Aktivierung des NF- κ B-Signals (*Yang et al.* 2015).

Eine Beeinflussung der Phosphorylierung von Proteinen unter Hypoxie durch Zunahme der O-GlcNAcylierung könnte man, unter Einbeziehung der Interaktionsmöglichkeiten von O-Phosphat und O-GlcNAc am Protein, wie von *Butkinaree et al.* beschrieben, erklären (1.1.1.3). Durch die Zunahme an O-GlcNAc im Zytosol unter Hypoxie kommt es entweder zur direkten Konkurrenz zwischen O-GlcNAc und O-Phosphat um dieselbe Bindungsstelle, zur sterischen Konformationsänderung des Zielproteins durch O-GlcNAc-Bindung an einer entfernten Bindungsstelle oder zur gleichzeitigen Phosphorylierung und

O-GlcNAcylierung proximaler Bindungsstellen mit jeweiliger funktioneller Veränderung des Zielproteins oder der Überführung in eine andere Isoform (Butkinaree et al. 2010). Das unter Hypoxie entstehende Ungleichgewicht von O-GlcNAcylierung und O-Phosphorylierung könnte zu Fehlregulationen von Signalwegen führen, welche in Zusammenhang mit proliferativer Aktivität und Zellüberleben und somit dem malignen Phänotyp einer Zelle stehen.

5.5 Hypoxie-induzierte und HIF1- α -vermittelte, differentielle O-Glykosylierung reguliert onkogene Signalwege

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass Hypoxie und die daraus resultierende HIF-Aktivierung in HEK293 und Pankreaszellen (HPDE, PANC-1) zur Expression von Tn-Antigen und vermehrter O-GlcNAcylierung führt und dass O-GlcNAc und O-GalNAc im Zytosol interagieren. Dies kann letztendlich zur Aktivierung onkogener Signalwege führen. Die oben beschriebenen Veränderungen der intrazellulären Signalwege unter vermehrter O-GlcNAcylierung, stellen dabei nur einen Bruchteil der tatsächlich stattfindenden Veränderungen dar. *Ferrer et al.* geben einen Überblick über die wichtigsten durch Hyper-O-GlcNAcylierung aktivierten Signalproteine. Diese Proteine sind eingebettet in verschiedene Signalwege, welche Auswirkungen auf den Zellmetabolismus sowie die Proliferations- und Migrationseigenschaften einer Zelle haben und damit einen malignen Phänotyp darstellen. Diese Veränderungen resultieren in einer Resistenz gegenüber Zelltod, Steigerung der Angiogenese durch VEGF, Invasion und Proliferation. Dies wird umgekehrt bestätigt durch eine Reduktion der Proliferation und Migration von Tumorzellen bei verminderter Konzentration an O-GlcNAc-Proteinen durch Suppression der OGT (Ferrer et al. 2016). Die zahlreichen Signalproteine, welche direkte oder indirekte Zielstrukturen der OGT darstellen, sind in Abbildung 20 zusammengefasst und geben einen Einblick über den weitreichenden Einfluss der O-GlcNAcylierung von Proteinen.

Diskussion

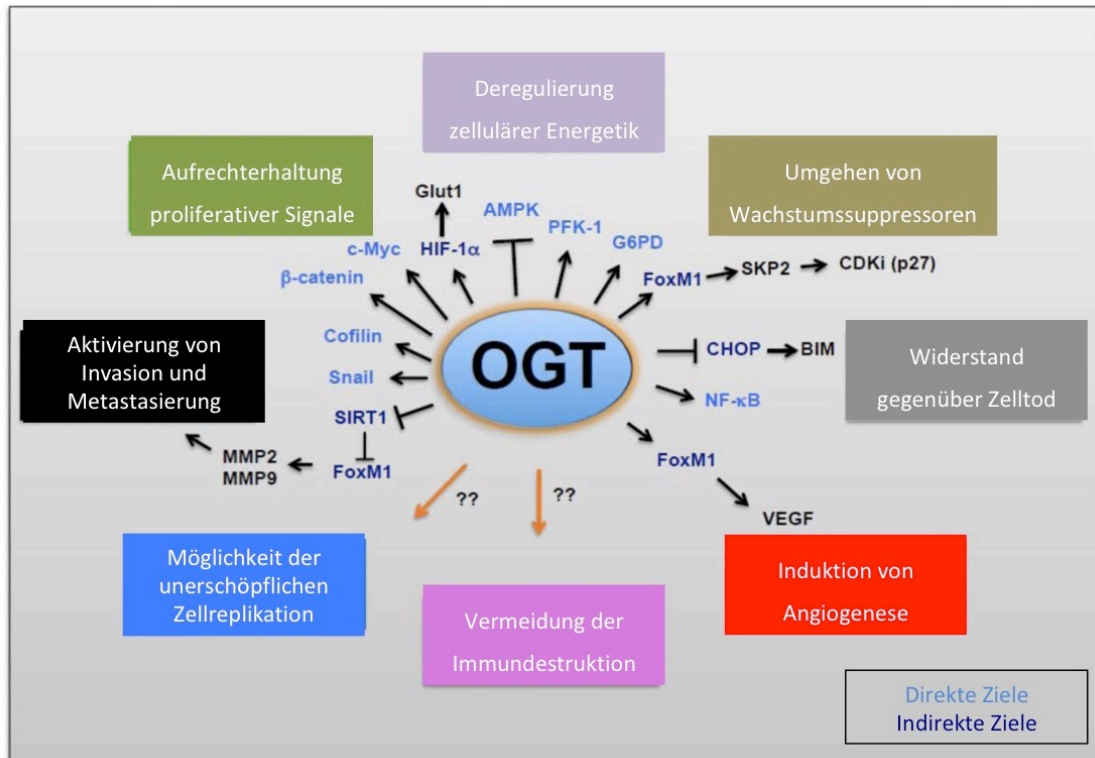


Abbildung 20: Indirekte und direkte OGT-Zielstrukturen in Karzinomen

OGT reguliert über O-GlcNAcylierung direkt oder indirekt Proteine, die eine Hauptrolle in der Regulation verschiedener Karzinom-Phänotypen spielen (Ferrer et al. 2016).

Abbildung 21 fasst die Interaktion der molekularen Mechanismen der O-Glykosylierung unter Hypoxie und deren Beeinflussung zellulärer Signalwege in einem Schaubild zusammen. Durch eine Hypoxie-bedingte und HIF-1 α -vermittelte Abnahme der Expression von Cosmc und der damit einhergehenden Inaktivität der T-Synthase, kommt es zum Anstieg der Tn-Antigen-Konzentration im Zytosol und auf der Zelloberfläche. Das vom Tn-Antigen abgespaltene UDP-GalNAc wird dann über die 4-Epimerase zu UDP-GlcNAc umgewandelt, dessen Konzentration im Zytosol steigt. Die Regulation der UDP-GlcNAc-Konzentration einer Zelle erfolgt ursprünglich über die Hexosamin-Biosynthese (HBP). Glukose tritt hierzu über den Glukosetransporter 1 (GLUT1) in die Zelle ein und wird zum größten Teil in die Glykolyse eingespeist. Ein kleinerer Teil fließt durch die HBP und wird über Zwischenschritte zu UDP-N-Acetylglucosamin (UDP-GlcNAc) synthetisiert. Dieses wird als Substrat der O-GlcNAc-Transferase (OGT) verwendet um GlcNAc an Serin- oder Threonin-Reste von nukleären oder zytoplasmatischen Zielproteinen zu heften. Diese O-GlcNAc-Modifikationen können von der O-GlcNAcase (OGA) wieder entfernt werden. Die O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung an Proteinen

stehen in direktem Zusammenhang und beeinflussen sich gegenseitig durch Konkurrenz an gleichen Bindungsstellen oder durch Konformationsänderungen des Proteins bei Besetzung zweier unterschiedlicher Bindungsstellen (Butkinaree et al. 2010). Die Signalproteine IRS-1/2, PI3K und AKT werden O-GlcNAc-modifiziert und reguliert. Eine durch die oben beschriebenen Mechanismen entstehende erhöhte O-GlcNAcylierung von IRS-1/2, PI3K oder AKT führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors mTOR. Dieser reguliert Schlüsseltranskriptionsfaktoren, welche im Tumormetabolismus involviert sind. Die Aktivierung von mTOR führt zur Synthese von Proteinen mit Beteiligung an Zellmetabolismus, Proliferation, Zellüberleben, Angiogenese und Invasion (Federici et al. 2002).

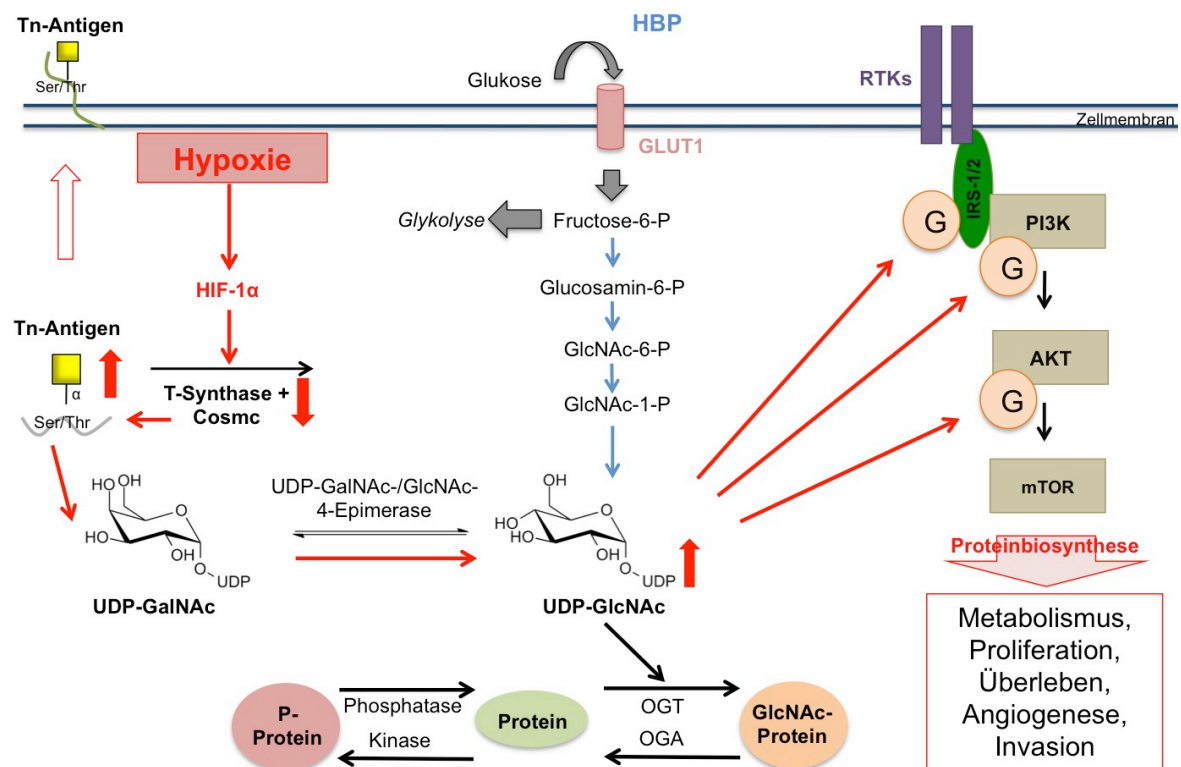


Abbildung 21: Interaktion von O-GalNAc und O-GlcNAc unter Hypoxie und die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges

Links im Bild wird die Hypoxie-bedingte und HIF-1α-vermittelte Überexpression des Tn-Antigens in HEK293 gezeigt. Der in der Mitte des Bildes dargestellte *Hexosamin-Biosynthese-Pathway* (HBP) stellt die physiologische Synthese von UDP-GlcNAc und die Regulation der O-GlcNAcylierung (G) von nukleären und zytoplasmatischen Proteinen dar. Im rechten Teil des Bildes wird der Zusammenfluss von Rezeptor-Tyrosinkinase-(RTK)-vermittelten Signalwegen, wie dem PI3K/AKT-Signalweg, auf mTOR gezeigt. Die Signalproteine IRS-1/2, PI3K und AKT werden O-GlcNAc-modifiziert und reguliert. Abkürzungen: Insulinrezeptor-Substrat-1/2 (IRS-1/2), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), Proteinkinase B (AKT) (Butkinaree et al. 2010, Ferrer et al. 2016, Very et al. 2018).

Zusammenfassend liefert diese Arbeit mit dem Vorhandensein von hypoxischen Arealen in soliden Tumoren eine mögliche Erklärung, wie es über die oben genannten Mechanismen zur Expression von verkürzten und aberranten Glykoproteinen kommt, welche eine neoplastische Transformation weiter vorantreiben oder initial auslösen könnten. Diese Veränderungen stellen spezifische Zielstrukturen für die Erkennung potentiell neoplastischer Läsionen dar. Deshalb steht die Erforschung veränderter Glykoproteine nicht nur im Fokus zur Gewinnung neuer prognostischer Marker, sondern auch um potentielle therapeutische Ziele zu erforschen. Es gibt bereits viele Glykoproteine, die sich als Tumormarker oder Tumorantigene im Serum für verschiedene Krebsarten etabliert haben und im klinischen Alltag Verwendung finden: CA 19-9 (z.B. Ösophaguskarzinom), CA 125 (MUC16) beispielsweise bei Ovarialtumoren oder AFP beim hepatozellulären Karzinom (Fu et al. 2016). Die Erkenntnis einer unter Hypoxie veränderten O-GlcNAc- und O-GalNAcylierung, durch Beeinflussung der daran beteiligten Enzyme OGT/OGA und Cosmc/T-Synthase, könnten neue Biomarker für die frühe Erkennung von humanen Tumorzellen, vor allem in soliden Tumoren mit dem Einfluss von Hypoxie, darstellen. Aufgrund der Abhängigkeit einer Tumorzelle von O-GlcNAc zur Aktivierung vieler onkogener Signalwege, die das Zellüberleben sichern, wäre auch eine Reduktion der Aggressivität von Tumorzellen und gleichzeitige Sensitivierung gegenüber Chemotherapeutika durch Beeinflussung der OGT als Zielstruktur denkbar. Dabei stellt diese Arbeit nur einen Bruchteil an Informationen bereit und es benötigt weitere gründliche Untersuchungen zur Ausreifung der oben beschriebenen Theorien. Die allgemeine Aussagekraft der Arbeit lässt sich ebenso darin beschränken, dass hier exemplarisch für eine normale humane O-Glykosylierung die HEK-Zellen und HPDE-Zellen sowie zur Repräsentation der Karzinomzelllinien PANC-1-Zellen herangezogen wurden. Limitationen dieser Arbeit mögen zum anderen darin bestehen, dass der Tn-Antigen-Nachweis ausschließlich über Lektine erfolgte. Hierbei sind prinzipiell verschiedene Lektine in der Anwendung denkbar. Die beiden am häufigsten angewandten GalNAc-bindenden Pflanzenlektine zum Nachweis von Tn-Antigen, sind an erster Stelle das *Vicia villosa* Agglutinin (VVA-B4) (Tollefsen et al. 1983) oder an zweiter Stelle das *Helix pomatia* Agglutinin (HPA) (Wu et al. 1997). Generell müssen Lektinstudien zum Nachweis von Tn-Antigen immer mit großer Vorsicht durchgeführt werden, da

generell pflanzliche Lektine mit nicht-reduzierenden, terminalen GalNAc-Resten in α - oder β -Stellung kreuzreagieren. HPA ist zum Nachweis von Tn-Antigen insofern problematisch, da es auch an das Cad-Antigen und das Blutgruppen-Antigen A bindet (Piller et al. 1990, Lescar et al. 2007). Resultate sollten daher mit chemischen, immunologischen oder genetischen/molekularen Daten untermauert werden. VVA gilt allerdings als etabliertes Lektin zum Nachweis von O-GalNAc und fand bereits vielfach Verwendung im Nachweis von Tn-Antigen-Expression in Krebszellen von Pankreas und Lunge (Konska et al. 2006). Generell wäre auch der Nachweis von Tn-Antigen durch Antikörper denkbar gewesen. In dieser Arbeit wurde die Spezifität von VVA und des O-GlcNAc-Antikörpers mittels spezifischem Enzymverdau verifiziert (Abb. 19). Der hauptsächliche Nachweis von Tn-Antigen oder bestimmten Enzymen erfolgte in dieser Arbeit mittels Western Blot oder RNA-Nachweis. Dies sind quantitative Methoden, welche nur die Menge an Proteinen und Glykoproteinen darstellen. Eine direkte Aussage über die Aktivität der beteiligten Enzyme konnte nur in Bezug auf die T-Synthase gemacht werden.

Die Zusammenführung der eigenen Ergebnisse mit der aktuellen Literatur liefert neue Ansätze zur Untersuchung der Theorie einer Interaktion zwischen O-GalNAc und O-GlcNAc in soliden Tumoren mit hypoxischen Arealen. Hierbei bleiben noch einige Fragen offen, die in weiteren Experimenten verifiziert werden sollten. Es stellt sich beispielsweise die Frage nach der tatsächlichen Aktivität der 4-Epimerase unter Hypoxie und der Expression der Signalproteine des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges. Weiterhin wäre die Übertragung der Untersuchungen auf Patientenproben mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas zu erwägen, da eigene Untersuchungen bereits erhöhte Tn-Antigen-Expression in Pankreaskarzinomzellen unter Hypoxie zeigten und die Literatur eine erhöhte HIF-1-Expression in Pankreaskarzinomen bestätigt. Hierbei könnten immunhistochemische Färbungen zum Nachweis von HIF-1 α , Tn-Antigen und O-GlcNAc die in HEK293-Zellen beschriebenen Vorgänge aufzeigen. Trotzdem kann schon jetzt von den Erkenntnissen dieser Arbeit profitiert werden, da sie Anregungen für einen neuen Zusammenhang zwischen O-GalNAc und O-GlcNAc unter Hypoxie zeigen und somit neue mögliche Ansatzpunkte für die Forschung in Bezug auf Tumormarker und potentielle Therapieziele darstellen.

6 Zusammenfassung

Das Auftreten von hypoxischen Arealen in soliden Tumoren induziert eine Neuprogrammierung des Zellmetabolismus und Veränderungen in der Glykosylierung, welche Kennzeichen von Karzinomen und Metastasierung sind und die Therapieresistenz fördern. Ziel der Arbeit war es Hypoxie als Einflussfaktor für aberrante O-Glykosylierung, in Form des Tn-Antigens und Hyper-O-GlcNAcylierung, in humanen HEK293- und Pankreaszellen (PANC-1, HPDE) zu identifizieren und die molekularen Mechanismen dahinter zu beleuchten. Die differentielle Expression von 84 Glykosylierungsgenen mittels quantitativer PCR in HEK293-Zellen unter Normoxie und Hypoxie, hat eine globale Verminderung der Expression von Genen der O-Glykosylierung gezeigt. Unter gleichen hypoxischen Bedingungen war im Western Blot eine Tn-Antigen-Expression induzierbar, welche sich nach Reoxygenierung teilweise reversibel zeigte. Besonders relevant für die Erklärung, der im Western Blot erhöhten Expression des Tn-Antigens, war eine signifikant verminderte Genexpression von Cosmc, dem Chaperon der T-Synthase (C1GALT1). Hypoxie führte hierüber zu einer reduzierten Aktivität der T-Synthase in der Enzymaktivitätsanalyse mit folgender Expression des Tn-Antigens. Die Rolle der HIF-1 α -regulierten Transkription differentieller O-Glykosylierung unter Hypoxie wurde unter Einsatz des chemischen HIF-1 α -Induktors ML 228 verdeutlicht. Es zeigte sich eine Tn-Antigen-Expression und Reduktion der T-Synthase-Aktivität. Bei HIF-1 α -Inhibition (Echinomycin) unter Hypoxie nahm die Tn-Antigen-Expression ab und die T-Synthase-Aktivität zu. Zytosol- und Kernfraktionsanalysen von Zelllysaten haben das unter Hypoxie exprimierte Tn-Antigen vermehrt im Zytosol lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass der dort stattfindende dynamische Prozess der Protein-O-GlcNAcylierung unter Hypoxie ebenso zunimmt und im Zusammenhang mit einer veränderten O-Phosphorylierung von Signalproteinen steht. Die Einbettung der eigenen Ergebnisse in die Erkenntnisse der aktuellen Literatur deutet auf eine Interaktion zwischen O-GalNAc und O-GlcNAc im Zytosol hin, mit der Folge einer Aktivierung von onkogenen Signalwegen, wie dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg, und erweitert so das Verständnis der differentiellen O-Glykosylierung unter Hypoxie und dessen Auswirkung auf die Tumorgenese.

7 Summary

Hypoxia-induced reprogramming of energy metabolism and changes in glycosylation in solid tumours are hallmarks of cancer that promote metastasis and treatment resistance. The aim of this work was to investigate the impact of hypoxia on aberrant O-glycosylation, which is described as an increase in O-GalNAc (Tn antigen) and O-GlcNAc glycosylation in human HEK293 cells and pancreatic cell lines (PANC-1, HPDE) as well as shedding light on the underlying molecular mechanisms. The comparative analysis of 84 glycosylation-relevant genes using qPCR in HEK293 cells, under standard or hypoxia, identified key enzymes of O-glycosylation as regulated. HEK293 cells in hypoxia showed the clear expression of Tn antigen and its disappearance after reoxygenation. Highly relevant for the explanation of the increased expression of Tn antigen was a significantly decreased gene expression of *Cosmc*, the chaperone of T-synthase (C1GALT1). Thus hypoxia led to a reduced activity of T-synthase in enzyme activity analyses with subsequent expression of Tn antigen. Interestingly, the pattern differs from engineered *Cosmc* deficient cells. Through the application of the chemical HIF pathway activator ML 228 and HIF pathway inhibitor Echinomycin truncated glycoform could be induced underlining the importance of the HIF-1 α regulated transcription of differential glycosylation under hypoxia. It could be shown that under hypoxia the dynamic process of O-GlcNAcylation, located in the cytosol, increased as well and was related to an altered O-phosphorylation of signal proteins. Cytosol and nuclear fraction analyses derived from hypoxia treated cells mainly displayed cytosolic proteins as O-GalNAc modified. Glycosidase assays could validate specificity of the detection method used and excludes a crossreaction between the detection of O-GalNAc and O-GlcNAc. An embedding of own results in the knowledge of current literature points to a hypoxia derived interaction between O-GalNAc and O-GlcNAc leading to the activation of oncogenic signalling pathways such as PI3K/AKT/mTOR. Thus this study extends the understanding of differential O-glycosylation under hypoxia and the dependency of a tumors malignancy also on the tumor microenvironment.

A Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------------|---|
| AFP | alpha-Fetoprotein |
| AKT | Proteinkinase B (PKB) |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCA | <i>Bicinchoninic acid</i> |
| CA | <i>Cancer antigen</i> |
| CA IX | Carboanhydrase IX |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CoCl ₂ | Kobaltchlorid |
| DEPC-H ₂ O | Diethylpyrocarbonat-Wasser |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| EDTA | Ethylendiaminetetraacetat |
| ELISA | <i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> |
| Fc | <i>Fragment crystallizable region</i> |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum) |
| Gal | Galaktose |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HIF-1 | Hypoxie-induzierter Faktor 1 |
| HPA | Helix-pomatia-Agglutinin |
| HRE | Hypoxie-responsives Element |
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| HSC-70 | <i>Heat shock cognate 71kDa protein</i> |
| IRS-1/2 | Insulin-Rezeptor-Substrat-1/2 |
| kDa | Kilodalton |
| mTOR | <i>Mechanistic Target of Rapamycin</i> |
| N ₂ | Stickstoff |
| NF-κB | <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> |
| OGA | O-GlcNAcase |
| O-GalNAc | <i>O-linked N-Acetylgalactosamin</i> |
| O-GlcNAc | <i>O-linked N-Acetylglucosamin</i> |
| OGT | O-GlcNAc-Transferase |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|--|
| PBS-T | <i>Posphate-buffered saline with Tween20</i> |
| PCR | <i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion) |
| PHD | Prolylhydroxylase |
| PI3K | Phosphoinositid-3-Kinase |
| PNA | <i>Peanut agglutinin</i> |
| RIPA | <i>Radioimmunoprecipitation assay</i> |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure) |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| Ser | Serin |
| TBS-T | <i>TRIS-buffered saline with Tween20</i> |
| Thr | Threonin |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UDP | Uridindiphosphat |
| VHL | Von-Hippel-Lindau-Protein |
| VVA | <i>Vicia villosa</i> Agglutinin |
| Z-PugNAc | O-(2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranosyliden)amino <i>N</i> -Phenylcarbammat |

B Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Synthese und Struktur des Tn-Antigens und davon abgeleitete O-Glykan-Core-Strukturen vom Muzin-Typ..... | 9 |
| Abbildung 2: Core-Strukturen und struktureller Aufbau der O-Glykane vom Muzin-Typ | 10 |
| Abbildung 3: O-Glykan-Synthese in Abhängigkeit von Cosmc und der T-Synthase-Aktivität..... | 12 |
| Abbildung 4: Synthese von O-GlcNAc Glykanen | 13 |
| Abbildung 5: Dynamik zwischen O-GlcNAcylierung und O-Phosphorylierung | 14 |
| Abbildung 6: Beeinflussungsmöglichkeiten von O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung | 15 |
| Abbildung 7: Regulation von HIF-1 | 17 |
| Abbildung 8: Auswirkungen von HIFs auf onkogene Signalwege | 20 |
| Abbildung 9: Expression von Genen der O-Glykosylierung in HEK-Zellen unter Hypoxie | 46 |
| Abbildung 10: T-Synthase unter Hypoxie..... | 47 |
| Abbildung 11: Tn-Antigen und T-Antigen unter Hypoxie und T-Synthase-Defizienz | 48 |
| Abbildung 12: Tn-Antigen-Expression unter Hypoxie..... | 50 |
| Abbildung 13: Tn-Antigen in PANC-1 und HPDE unter Hypoxie..... | 51 |
| Abbildung 14: Tn-Antigen unter chemischer HIF-1-Induktion (ML 228) und HIF-1-Inhibition (Echinomycin)..... | 52 |
| Abbildung 15: T-Synthase-Aktivität unter Aktivierung des HIF-Signalwegs (ML 228) und unter HIF-Inhibition (Echinomycin) | 53 |
| Abbildung 16: Tn-Antigen und T-Synthase in verschiedenen Zellkompartimenten | 54 |
| Abbildung 17: Tn-Antigen, O-GlcNAc und OGT unter Hypoxie..... | 55 |
| Abbildung 18: O-GlcNAcylierung und Phosphorylierung unter Hypoxie | 57 |
| Abbildung 19: Tn-Antigen- und O-GlcNAc-Nachweis im Glykanverdau..... | 59 |
| Abbildung 20: Indirekte und direkte OGT-Zielstrukturen in Karzinomen | 72 |
| Abbildung 21: Interaktion von O-GalNAc und O-GlcNAc unter Hypoxie und die Aktivierung des PI3K/AKT/mTOR-Signalweges..... | 73 |

C Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Geräte..... | 23 |
| Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien..... | 24 |
| Tabelle 3: Chemikalien..... | 25 |
| Tabelle 4: Medien und Lösungen | 27 |
| Tabelle 5: Primär- und Sekundärantikörper | 27 |
| Tabelle 6: Lektine und HRP-Konjugat | 28 |
| Tabelle 7: Enzyme und Herstellerkits..... | 29 |
| Tabelle 8: Zelllinien | 30 |
| Tabelle 9: Humanes Glykosylierungs-PCR-Array | 94 |

D Literaturverzeichnis

An, G., B. Wei, B. Xia, J. M. McDaniel, T. Ju, R. D. Cummings, J. Braun and L. Xia (2007). "Increased susceptibility to colitis and colorectal tumors in mice lacking core 3-derived O-glycans." J Exp Med **204**(6): 1417-1429.

Ande, S. R., S. Moulik and S. Mishra (2009). "Interaction between O-GlcNAc modification and tyrosine phosphorylation of prohibitin: implication for a novel binary switch." PLoS One **4**(2): e4586.

Ausubel, F. (1996). Current Protocols in Molecular Biology. Brooklyn, New York, Greene Publishing Associates, Inc.

Banford, S. and D. J. Timson (2017). "UDP-N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase- 6 (pp-GalNAc-T6): Role in Cancer and Prospects as a Drug Target." Curr Cancer Drug Targets **17**(1): 53-61.

Bennett, E. P., U. Mandel, H. Clausen, T. A. Gerken, T. A. Fritz and L. A. Tabak (2012). "Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family." Glycobiology **22**(6): 736-756.

Brockhausen, I. and P. Stanley (2017). O-GalNAc Glycans. Essentials of Glycobiology (Internet). nd, A. Varki, R. D. Cummings et al. Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press
The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California.

Brown, J. M. and A. J. Giaccia (1998). "The unique physiology of solid tumors: opportunities (and problems) for cancer therapy." Cancer Res **58**(7): 1408-1416.

Bryant, K. L., J. D. Mancias, A. C. Kimmelman and C. J. Der (2014). "KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation." Trends Biochem Sci **39**(2): 91-100.

Burnette, W. N. (1981). ""Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.

Butkinaree, C., K. Park and G. W. Hart (2010). "O-linked beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc): Extensive crosstalk with phosphorylation to regulate signaling and transcription in response to nutrients and stress." Biochim Biophys Acta **1800**(2): 96-106.

Cao, Y., P. Stosiek, G. F. Springer and U. Karsten (1996). "Thomsen-Friedenreich-related carbohydrate antigens in normal adult human tissues: a systematic and comparative study." Histochem Cell Biol **106**(2): 197-207.

Comer, F. I. and G. W. Hart (2000). "O-Glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate." J Biol Chem **275**(38): 29179-29182.

- Comer, F. I. and G. W. Hart (2001). "Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II." Biochemistry **40**(26): 7845-7852.
- Denko, N. C. (2008). "Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour." Nat Rev Cancer **8**(9): 705-713.
- Do, S. I. and R. D. Cummings (1992). "The hamster transferrin receptor contains Ser/Thr-linked oligosaccharides: use of a lectin-resistant CHO cell line to identify glycoproteins containing these linkages." J Biochem Biophys Methods **24**(3-4): 153-165.
- Favaro, E., S. Lord, A. L. Harris and F. M. Buffa (2011). "Gene expression and hypoxia in breast cancer." Genome Med **3**(8): 55.
- Federici, M., R. Menghini, A. Mauriello, M. L. Hribal, F. Ferrelli, D. Lauro, P. Sbraccia, L. G. Spagnoli, G. Sesti and R. Lauro (2002). "Insulin-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase is impaired by O-linked glycosylation modification of signaling proteins in human coronary endothelial cells." Circulation **106**(4): 466-472.
- Ferrer, C. M., V. L. Sodi and M. J. Reginato (2016). "O-GlcNAcylation in Cancer Biology: Linking Metabolism and Signaling." J Mol Biol **428**(16): 3282-3294.
- Forsythe, J. A., B. H. Jiang, N. V. Iyer, F. Agani, S. W. Leung, R. D. Koos and G. L. Semenza (1996). "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1." Mol Cell Biol **16**(9): 4604-4613.
- Fu, C., H. Zhao, Y. Wang, H. Cai, Y. Xiao, Y. Zeng and H. Chen (2016). "Tumor-associated antigens: Tn antigen, sTn antigen, and T antigen." Hla **88**(6): 275-286.
- Gill, D. J., H. Clausen and F. Bard (2011). "Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation." Trends Cell Biol **21**(3): 149-158.
- Gillespie, W., S. Kelm and J. C. Paulson (1992). "Cloning and expression of the Gal beta 1, 3GalNAc alpha 2,3-sialyltransferase." J Biol Chem **267**(29): 21004-21010.
- Graeber, T. G., C. Osmanian, T. Jacks, D. E. Housman, C. J. Koch, S. W. Lowe and A. J. Giaccia (1996). "Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours." Nature **379**(6560): 88-91.
- Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." J Gen Virol **36**(1): 59-74.
- Guo, J. M., Y. Zhang, L. Cheng, H. Iwasaki, H. Wang, T. Kubota, K. Tachibana and H. Narimatsu (2002). "Molecular cloning and characterization of a novel member of the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase family, pp-GalNAc-T12." FEBS Lett **524**(1-3): 211-218.

Haltiwanger, R. S., L. Wells, H. H. Freeze and P. Stanley (2015). Other Classes of Eukaryotic Glycans. Essentials of Glycobiology. rd, A. Varki, R. D. Cummings et al. Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press
Copyright 2015-2017 by The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California. All rights reserved.: 151-160.

Hamamoto, T., M. Kawasaki, N. Kurosawa, T. Nakaoka, Y. C. Lee and S. Tsuji (1993). "Two step single primer mediated polymerase chain reaction. Application to cloning of putative mouse, beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase cDNA." Bioorg Med Chem **1**(2): 141-145.

Harduin-Lepers, A., V. Vallejo-Ruiz, M. A. Krzewinski-Recchi, B. Samyn-Petit, S. Julien and P. Delannoy (2001). "The human sialyltransferase family." Biochimie **83**(8): 727-737.

Harris, A. L. (2002). "Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth." Nat Rev Cancer **2**(1): 38-47.

Ho, V. T. and H. F. Bunn (1996). "Effects of transition metals on the expression of the erythropoietin gene: further evidence that the oxygen sensor is a heme protein." Biochem Biophys Res Commun **223**(1): 175-180.

Hofmann, B. T., L. Schluter, P. Lange, B. Mercanoglu, F. Ewald, A. Folster, A. S. Picksak, S. Harder, A. T. El Gammal, K. Grupp, C. Gungor, A. Drenckhan, H. Schluter, C. Wagener, J. R. Izbicki, M. Jucker, M. Bockhorn and G. Wolters-Eisfeld (2015). "COSMC knockdown mediated aberrant O-glycosylation promotes oncogenic properties in pancreatic cancer." Mol Cancer **14**: 109.

Holden, H. M., I. Rayment and J. B. Thoden (2003). "Structure and function of enzymes of the Leloir pathway for galactose metabolism." J Biol Chem **278**(45): 43885-43888.

Holdener, B. C. and R. S. Haltiwanger (2019). "Protein O-fucosylation: structure and function." Curr Opin Struct Biol **56**: 78-86.

Hussain, M. R., D. C. Hoessli and M. Fang (2016). "N-acetylgalactosaminyltransferases in cancer." Oncotarget **7**(33): 54067-54081.

Iitzkowitz, S., T. Kjeldsen, A. Frier, S. Hakomori, U. S. Yang and Y. S. Kim (1991). "Expression of Tn, sialosyl Tn, and T antigens in human pancreas." Gastroenterology **100**(6): 1691-1700.

Iwai, T., N. Inaba, A. Naundorf, Y. Zhang, M. Gotoh, H. Iwasaki, T. Kudo, A. Togayachi, Y. Ishizuka, H. Nakanishi and H. Narimatsu (2002). "Molecular cloning and characterization of a novel UDP-GlcNAc:GalNAc-peptide beta1,3-N-acetylglucosaminyltransferase (beta 3Gn-T6), an enzyme synthesizing the core 3 structure of O-glycans." J Biol Chem **277**(15): 12802-12809.

Jones, R. B., K. A. Dorsett, A. B. Hjelmeland and S. L. Bellis (2018). "The ST6Gal-I sialyltransferase protects tumor cells against hypoxia by enhancing HIF-1alpha signaling." J Biol Chem **293**(15): 5659-5667.

- Ju, T., R. P. Aryal, M. R. Kudelka, Y. Wang and R. D. Cummings (2014). "The Cosmc connection to the Tn antigen in cancer." Cancer Biomark **14**(1): 63-81.
- Ju, T., R. P. Aryal, C. J. Stowell and R. D. Cummings (2008). "Regulation of protein O-glycosylation by the endoplasmic reticulum-localized molecular chaperone Cosmc." J Cell Biol **182**(3): 531-542.
- Ju, T. and R. D. Cummings (2013). "A fluorescence-based assay for Core 1 beta3galactosyltransferase (T-synthase) activity." Methods Mol Biol **1022**: 15-28.
- Ju, T., V. I. Otto and R. D. Cummings (2011). "The Tn antigen-structural simplicity and biological complexity." Angew Chem Int Ed Engl **50**(8): 1770-1791.
- Jubb, A. M., F. M. Buffa and A. L. Harris (2010). "Assessment of tumour hypoxia for prediction of response to therapy and cancer prognosis." J Cell Mol Med **14**(1-2): 18-29.
- Kamemura, K., B. K. Hayes, F. I. Comer and G. W. Hart (2002). "Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: alternative glycosylation/phosphorylation of THR-58, a known mutational hot spot of c-Myc in lymphomas, is regulated by mitogens." J Biol Chem **277**(21): 19229-19235.
- Kang, E. S., D. Han, J. Park, T. K. Kwak, M. A. Oh, S. A. Lee, S. Choi, Z. Y. Park, Y. Kim and J. W. Lee (2008). "O-GlcNAc modulation at Akt1 Ser473 correlates with apoptosis of murine pancreatic beta cells." Exp Cell Res **314**(11-12): 2238-2248.
- Kang, R., W. Hou, Q. Zhang, R. Chen, Y. J. Lee, D. L. Bartlett, M. T. Lotze, D. Tang and H. J. Zeh (2014). "RAGE is essential for oncogenic KRAS-mediated hypoxic signaling in pancreatic cancer." Cell Death Dis **5**: e1480.
- Kim, G. E., H. I. Bae, H. U. Park, S. F. Kuan, S. C. Crawley, J. J. Ho and Y. S. Kim (2002). "Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucins and sialyl Tn antigen in intraepithelial neoplasms of the pancreas." Gastroenterology **123**(4): 1052-1060.
- Kong, D., E. J. Park, A. G. Stephen, M. Calvani, J. H. Cardellina, A. Monks, R. J. Fisher, R. H. Shoemaker and G. Melillo (2005). "Echinomycin, a small-molecule inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 DNA-binding activity." Cancer Res **65**(19): 9047-9055.
- Konska, G., M. Guerry, F. Caldefie-Chezet, M. De Latour and J. Guillot (2006). "Study of the expression of Tn antigen in different types of human breast cancer cells using VVA-B4 lectin." Oncol Rep **15**(2): 305-310.
- Koong, A. C., V. K. Mehta, Q. T. Le, G. A. Fisher, D. J. Terris, J. M. Brown, A. J. Bastidas and M. Vierra (2000). "Pancreatic tumors show high levels of hypoxia." Int J Radiat Oncol Biol Phys **48**(4): 919-922.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Lee, Y. C., M. Kaufmann, S. Kitazume-Kawaguchi, M. Kono, S. Takashima, N. Kurosawa, H. Liu, H. Pircher and S. Tsuji (1999). "Molecular cloning and functional expression of two members of mouse NeuAcalpha2,3Galbeta1,3GalNAc GalNAcalpha2,6-sialyltransferase family, ST6GalNAc III and IV." J Biol Chem **274**(17): 11958-11967.

Lescar, J., J. F. Sanchez, A. Audfray, J. L. Coll, C. Breton, E. P. Mitchell and A. Imberty (2007). "Structural basis for recognition of breast and colon cancer epitopes Tn antigen and Forssman disaccharide by Helix pomatia lectin." Glycobiology **17**(10): 1077-1083.

Li, F. and J. Ding (2018). "Sialylation is involved in cell fate decision during development, reprogramming and cancer progression." Protein Cell.

Libisch, M. G., M. Casas, M. Chiribao, P. Moreno, A. Cayota, E. Osinaga, P. Oppezio and C. Robello (2014). "GALNT11 as a new molecular marker in chronic lymphocytic leukemia." Gene **533**(1): 270-279.

Lieber, M., J. Mazzetta, W. Nelson-Rees, M. Kaplan and G. Todaro (1975). "Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas." Int J Cancer **15**(5): 741-747.

Ma, Z., D. J. Vocadlo and K. Vosseller (2013). "Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF-kappaB activity in pancreatic cancer cells." J Biol Chem **288**(21): 15121-15130.

Ma, Z. and K. Vosseller (2014). "Cancer metabolism and elevated O-GlcNAc in oncogenic signaling." J Biol Chem **289**(50): 34457-34465.

Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell **129**(7): 1261-1274.

Mimeault, M. and S. K. Batra (2013). "Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells." J Cell Mol Med **17**(1): 30-54.

Mishra, S., S. R. Ande and N. W. Salter (2011). "O-GlcNAc modification: why so intimately associated with phosphorylation?" Cell Commun Signal **9**(1): 1.

Moulder, J. E. and S. Rockwell (1987). "Tumor hypoxia: its impact on cancer therapy." Cancer Metastasis Rev **5**(4): 313-341.

Ouyang, H., L. Mou, C. Luk, N. Liu, J. Karaskova, J. Squire and M. S. Tsao (2000). "Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype." Am J Pathol **157**(5): 1623-1631.

Peixoto, A., E. Fernandes, C. Gaiteiro, L. Lima, R. Azevedo, J. Soares, S. Cotton, B. Parreira, M. Neves, T. Amaro, A. Tavares, F. Teixeira, C. Palmeira, M. Rangel, A. M. Silva, C. A. Reis, L. L. Santos, M. J. Oliveira and J. A. Ferreira (2016). "Hypoxia enhances the malignant nature of bladder cancer cells and concomitantly antagonizes protein O-glycosylation extension." Oncotarget **7**(39): 63138-63157.

- Peter-Katalinic, J. (2005). "Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins." Methods Enzymol **405**: 139-171.
- Piller, V., F. Piller and J. P. Cartron (1990). "Comparison of the carbohydrate-binding specificities of seven N-acetyl-D-galactosamine-recognizing lectins." Eur J Biochem **191**(2): 461-466.
- Piret, J. P., D. Mottet, M. Raes and C. Michiels (2002). "CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2." Ann N Y Acad Sci **973**: 443-447.
- Pratt, M. R., H. C. Hang, K. G. Ten Hagen, J. Rarick, T. A. Gerken, L. A. Tabak and C. R. Bertozzi (2004). "Deconvoluting the functions of polypeptide N-alpha-acetylgalactosaminyltransferase family members by glycopeptide substrate profiling." Chem Biol **11**(7): 1009-1016.
- Radhakrishnan, P., S. Dabelsteen, F. B. Madsen, C. Francavilla, K. L. Kopp, C. Steentoft, S. Y. Vakhrushev, J. V. Olsen, L. Hansen, E. P. Bennett, A. Woetmann, G. Yin, L. Chen, H. Song, M. Bak, R. A. Hlady, S. L. Peters, R. Opavsky, C. Thode, K. Qvortrup, K. T. Schjoldager, H. Clausen, M. A. Hollingsworth and H. H. Wandall (2014). "Immature truncated O-glycophenotype of cancer directly induces oncogenic features." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(39): E4066-4075.
- Rajendran, J. G., D. A. Mankoff, F. O'Sullivan, L. M. Peterson, D. L. Schwartz, E. U. Conrad, A. M. Spence, M. Muzi, D. G. Farwell and K. A. Krohn (2004). "Hypoxia and glucose metabolism in malignant tumors: evaluation by [18F]fluoromisonidazole and [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging." Clin Cancer Res **10**(7): 2245-2252.
- Rassow, H., Netzker, Deutzmann (2012). Duale Reihe Biochemie. Thieme.
- Saeland, E., S. J. van Vliet, M. Backstrom, V. C. van den Berg, T. B. Geijtenbeek, G. A. Meijer and Y. van Kooyk (2007). "The C-type lectin MGL expressed by dendritic cells detects glycan changes on MUC1 in colon carcinoma." Cancer Immunol Immunother **56**(8): 1225-1236.
- Schjoldager, K. T., S. Y. Vakhrushev, Y. Kong, C. Steentoft, A. S. Nudelman, N. B. Pedersen, H. H. Wandall, U. Mandel, E. P. Bennett, S. B. Levery and H. Clausen (2012). "Probing isoform-specific functions of polypeptide GalNAc-transferases using zinc finger nuclease glycoengineered SimpleCells." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(25): 9893-9898.
- Semenza, G. L. (2001). "HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing." Curr Opin Cell Biol **13**(2): 167-171.
- Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." Nat Rev Cancer **3**(10): 721-732.
- Semenza, G. L. (2008). "Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate." J Clin Invest **118**(12): 3835-3837.
- Semenza, G. L. (2010). "Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics." Oncogene **29**(5): 625-634.

- Sewell, R., M. Backstrom, M. Dalziel, S. Gschmeissner, H. Karlsson, T. Noll, J. Gatgens, H. Clausen, G. C. Hansson, J. Burchell and J. Taylor-Papadimitriou (2006). "The ST6GalNAc-I sialyltransferase localizes throughout the Golgi and is responsible for the synthesis of the tumor-associated sialyl-Tn O-glycan in human breast cancer." *J Biol Chem* **281**(6): 3586-3594.
- Smith, P. K., R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson and D. C. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." *Anal Biochem* **150**(1): 76-85.
- Sparvero, L. J., D. Asafu-Adjei, R. Kang, D. Tang, N. Amin, J. Im, R. Rutledge, B. Lin, A. A. Amoscato, H. J. Zeh and M. T. Lotze (2009). "RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation." *J Transl Med* **7**: 17.
- Springer, G. F., P. R. Desai and I. Banatwala (1974). "Blood group MN specific substances and precursors in normal and malignant human breast tissues." *Naturwissenschaften* **61**(10): 457-458.
- Staller, P., J. Sulitkova, J. Lisztwan, H. Moch, E. J. Oakeley and W. Krek (2003). "Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL." *Nature* **425**(6955): 307-311.
- Steenfot, C., S. Y. Vakhrushev, H. J. Joshi, Y. Kong, M. B. Vester-Christensen, K. T. Schjoldager, K. Lavrsen, S. Dabelsteen, N. B. Pedersen, L. Marcos-Silva, R. Gupta, E. P. Bennett, U. Mandel, S. Brunak, H. H. Wandall, S. B. Levery and H. Clausen (2013). "Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology." *Embo j* **32**(10): 1478-1488.
- Stowell, S. R., T. Ju and R. D. Cummings (2015). "Protein glycosylation in cancer." *Annu Rev Pathol* **10**: 473-510.
- Sun, H. C., Z. J. Qiu, J. Liu, J. Sun, T. Jiang, K. J. Huang, M. Yao and C. Huang (2007). "Expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha and associated proteins in pancreatic ductal adenocarcinoma and their impact on prognosis." *Int J Oncol* **30**(6): 1359-1367.
- Taylor, M. E. and K. Drickamer (2011). *Introduction to Glycobiology*. New York, Oxford University Press.
- Teicher, B. A. (1994). "Hypoxia and drug resistance." *Cancer Metastasis Rev* **13**(2): 139-168.
- Theriault, J. R., A. S. Felts, B. S. Bates, J. R. Perez, M. Palmer, S. R. Gilbert, E. S. Dawson, J. L. Engers, C. W. Lindsley and K. A. Emmitte (2012). "Discovery of a new molecular probe ML228: an activator of the hypoxia inducible factor (HIF) pathway." *Bioorg Med Chem Lett* **22**(1): 76-81.
- Tollefsen, S. E. and R. Kornfeld (1983). "The B4 lectin from *Vicia villosa* seeds interacts with N-acetylgalactosamine residues alpha-linked to serine or threonine residues in cell surface glycoproteins." *J Biol Chem* **258**(8): 5172-5176.

- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Vaupel, P. (2004). "Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology." Semin Radiat Oncol **14**(3): 198-206.
- Very, N., A. S. Vercoutter-Edouart, T. Lefebvre, S. Hardiville and I. El Yazidi-Belkoura (2018). "Cross-Dysregulation of O-GlcNAcylation and PI3K/AKT/mTOR Axis in Human Chronic Diseases." Front Endocrinol (Lausanne) **9**: 602.
- Vosseller, K., J. C. Trinidad, R. J. Chalkley, C. G. Specht, A. Thalhammer, A. J. Lynn, J. O. Snedecor, S. Guan, K. F. Medzihradszky, D. A. Maltby, R. Schoepfer and A. L. Burlingame (2006). "O-linked N-acetylglucosamine proteomics of postsynaptic density preparations using lectin weak affinity chromatography and mass spectrometry." Mol Cell Proteomics **5**(5): 923-934.
- Wang, G. L., B. H. Jiang, E. A. Rue and G. L. Semenza (1995). "Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(12): 5510-5514.
- Wang, Y., T. Ju, X. Ding, B. Xia, W. Wang, L. Xia, M. He and R. D. Cummings (2010). "Cosmc is an essential chaperone for correct protein O-glycosylation." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(20): 9228-9233.
- Winans, K. A. and C. R. Bertozzi (2002). "An inhibitor of the human UDP-GlcNAc 4-epimerase identified from a uridine-based library: a strategy to inhibit O-linked glycosylation." Chem Biol **9**(1): 113-129.
- Wu, A. M., S. C. Song, S. Sugii and A. Herp (1997). "Differential binding properties of Gal/GalNAc specific lectins available for characterization of glycoreceptors." Indian J Biochem Biophys **34**(1-2): 61-71.
- Xia, L. (2010). "Core 3-derived O-glycans are essential for intestinal mucus barrier function." Methods Enzymol **479**: 123-141.
- Yang, Y. R., D. H. Kim, Y. K. Seo, D. Park, H. J. Jang, S. Y. Choi, Y. H. Lee, G. H. Lee, K. Nakajima, N. Taniguchi, J. M. Kim, E. J. Choi, H. Y. Moon, I. S. Kim, J. H. Choi, H. Lee, S. H. Ryu, L. Cocco and P. G. Suh (2015). "Elevated O-GlcNAcylation promotes colonic inflammation and tumorigenesis by modulating NF-kappaB signaling." Oncotarget **6**(14): 12529-12542.
- Yi, W., P. M. Clark, D. E. Mason, M. C. Keenan, C. Hill, W. A. Goddard, 3rd, E. C. Peters, E. M. Driggers and L. C. Hsieh-Wilson (2012). "Phosphofructokinase 1 glycosylation regulates cell growth and metabolism." Science **337**(6097): 975-980.
- Yuzwa, S. A., M. S. Macauley, J. E. Heinonen, X. Shan, R. J. Dennis, Y. He, G. E. Whitworth, K. A. Stubbs, E. J. McEachern, G. J. Davies and D. J. Vocadlo (2008). "A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo." Nat Chem Biol **4**(8): 483-490.

Zachara, N., Y. Akimoto and G. W. Hart (2015). The O-GlcNAc Modification. Essentials of Glycobiology. rd, A. Varki, R. D. Cummings et al. Cold Spring Harbor (NY), Cold Spring Harbor Laboratory Press
Copyright 2015-2017 by The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California. All rights reserved.: 239-251.

Zachara, N. E., N. O'Donnell, W. D. Cheung, J. J. Mercer, J. D. Marth and G. W. Hart (2004). "Dynamic O-GlcNAc modification of nucleocytoplasmic proteins in response to stress. A survival response of mammalian cells." J Biol Chem **279**(29): 30133-30142.

Zhong, H., A. M. De Marzo, E. Laughner, M. Lim, D. A. Hilton, D. Zagzag, P. Buechler, W. B. Isaacs, G. L. Semenza and J. W. Simons (1999). "Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases." Cancer Res **59**(22): 5830-5835.

Zhu, Q., L. Zhou, Z. Yang, M. Lai, H. Xie, L. Wu, C. Xing, F. Zhang and S. Zheng (2012). "O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation." Med Oncol **29**(2): 985-993.

E Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Izbicki für die zur Verfügung gestellten Räumlichkeiten und Geräte im Labor des Institutes.

Prof. Maximilian Bockhorn danke ich für den inhaltlichen Austausch, konstruktive Verbesserungen und schnelle Unterstützung bei Fragen und Problemen und die Betreuung als Doktorvater. Ein großes Dankeschön verdienen Dr. Gerrit Wolters-Eisfeld und Baris Mercanoglu für die Auswahl des spannenden Themas bei dem ich die Arbeit im Labor kennenlernen durfte und die hervorragende Betreuung mit stets aufbauenden, humorvollen und ermutigenden Worten während meiner experimentellen Arbeit im Labor.

Ein besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Medizinische Glykobiologie und dem Laborleiter Dr. Cenap Güngör. Danke für die Kompetenz, die Lehre, die gute Zusammenarbeit und stets gute Gespräche während der Forschungsarbeit.

Herzlich möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des Labors der Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie bedanken. Insbesondere gilt der Dank den MTAs Petra Merkert, Antje Heinecke und Petra Schroeder für die unkomplizierte und stetige Hilfsbereitschaft im Labor sowie die Einarbeitung in die Zellkultur, die SDS-PAGE und das Western Blotting.

Ein letzter besonderer Dank gilt Hans für das ausführliche Korrekturlesen und für die stetige mentale Unterstützung während der Arbeit im Labor und während des Schreibprozesses.

F Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

G Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

H Anhang

Quiagen RT² ProfilerTM PCR Array Gene Expression Human Glycosylation

Tabelle 9: Humanes Glykosylierungs-PCR-Array

| Position | RefSeq Nummer | Symbol | Beschreibung | Fold Change | |
|----------|---------------|-----------|--|--------------------|-------------------|
| | | | | 1 % O ₂ | CoCl ₂ |
| A01 | NM_016161 | A4GNT | Alpha-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase | 1,12 C | -1,01 C |
| A02 | NM_000027 | AGA | Aspartylglucosaminidase | 1,09 | -3,63 |
| A03 | NM_194318 | B3GLCT | Beta 1,3-galactosyltransferase-like | -1,86 | -3,28 |
| A04 | NM_006577 | B3GNT2 | UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 | -1,71 | 1,35 C |
| A05 | NM_014256 | B3GNT3 | UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 3 | 1,12 C | -1,01 |
| A06 | NM_030765 | B3GNT4 | UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 4 | -1,19 B | 2,01 |
| A07 | NM_198540 | B3GNT8 | UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 8 | -1,80 | -2,22 |
| A08 | NM_001497 | B4GALT1 | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1 | -1,37 | 1,20 |
| A09 | NM_003780 | B4GALT2 | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 2 | -2,02 | -10,6 |
| A10 | NM_003779 | B4GALT3 | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 3 | -1,9 | -2,31 |
| A11 | NM_004776 | B4GALT5 | UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 5 | -2,26 | -1,77 |
| A12 | NM_020156 | C1GALT1 | Core 1 synthase, glycoprotein-N-acetylgalactosamine 3-beta-galactosyltransferase, 1 | -1,37 | -1,61 |
| B01 | NM_152692 | C1GALT1C1 | C1GALT1-specific chaperone 1 | -2,37 | -3,87 |
| B02 | NM_014674 | EDEM1 | ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1 | -1,10 | -1,70 |
| B03 | NM_018217 | EDEM2 | ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 2 | -1,40 | -1,92 |
| B04 | NM_025191 | EDEM3 | ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 3 | -2,22 | -3,09 |
| B05 | NM_000147 | FUCA1 | Fucosidase, alpha-L- 1, tissue | -1,37 | -2,87 |
| B06 | NM_032020 | FUCA2 | Fucosidase, alpha-L- 2, plasma | -1,61 | -2,11 |
| B07 | NM_173540 | FUT11 | Fucosyltransferase 11 (alpha (1,3) fucosyltransferase) | 1,64 | -1,67 |
| B08 | NM_178157 | FUT8 | Fucosyltransferase 8 (alpha (1,6) fucosyltransferase) | -1,55 | -4,30 |
| B09 | NM_020474 | GALNT1 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (GalNAc-T1) | -1,70 | -3,12 |
| B10 | NM_198321 | GALNT10 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10 (GalNAc-T10) | -3,09 A | -3,07 A |
| B11 | NM_022087 | GALNT11 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 11 (GalNAc-T11) | -1,9 | -8,49 |

Anhang

| Position | RefSeq Nummer | Symbol | Beschreibung | Fold Change | |
|----------|------------------|---------|--|-------------|---------|
| B12 | NM_024642 | GALNT12 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12 (GalNAc-T12) | -1,10 | 30,55 A |
| C01 | NM_052917 | GALNT13 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 13 (GalNAc-T13) | -1,18 | -4,1 |
| C02 | NM_024572 | GALNT14 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 14 (GalNAc-T14) | -1,27 B | -5,86 |
| C03 | NM_004481 | GALNT2 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNAc-T2) | -1,94 | -2,72 |
| C04 | NM_004482 | GALNT3 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNAc-T3) | -1,91 | -5,11 |
| C05 | NM_003774 | GALNT4 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 4 (GalNAc-T4) | -2,42 A | -4,32 A |
| C06 | NM_007210 | GALNT6 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6 (GalNAc-T6) | 1,71 | -8,15 A |
| C07 | NM_017423 | GALNT7 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7 (GalNAc-T7) | -1,82 | -2,91 |
| C08 | NM_017417 | GALNT8 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 8 (GalNAc-T8) | 1,21 B | -2,59 |
| C09 | NM_021808 | GALNT9 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 9 (GalNAc-T9) | 1,12 C | -1,01 C |
| C10 | NM_020692 | GALNT16 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1 | -1,62 | -4,13 A |
| C11 | NM_145292 | GALNTL5 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 5 | 1,12 C | 1,09 |
| C12 | NM_001034845 | GALNTL6 | UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 6 | 1,12 C | -1,02 |
| D01 | NM_198334 | GANAB | Glucosidase, alpha; neutral AB | -1,67 | -1,98 B |
| D02 | NM_001490 | GCNT1 | Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2 | -2,09 | -3,15 C |
| D03 | NM_004751 | GCNT3 | Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 3, mucin type | 1,12 C | 1,88 |
| D04 | NM_016591 | GCNT4 | Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 4, core 2 | -1,01 B | -1,01 |
| D05 | NM_000404 | GLB1 | Galactosidase, beta 1 | -1,79 | -1,36 B |
| D06 | NM_024312 | GNPTAB | N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, alpha and beta subunits | -1,80 | -6,06 B |
| D07 | NM_032520 | GNPTG | N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, gamma subunit | -1,65 | -1,79 |
| D08 | NM_000520 | HEXA | Hexosaminidase A (alpha polypeptide) | -1,24 | -1,51 |
| D09 | NM_000521 | HEXB | Hexosaminidase B (beta polypeptide) | -1,29 | -2,83 |
| D10 | NM_005907 | MAN1A1 | Mannosidase, alpha, class 1A, member 1 | -1,72 | -1,33 |
| D11 | NM_006699 | MAN1A2 | Mannosidase, alpha, class 1A, member 2 | -2,18 | -3,09 |
| D12 | NM_016219 | MAN1B1 | Mannosidase, alpha, class 1B, member 1 | 2,11 | -13,45 |
| E01 | NM_020379 | MAN1C1 | Mannosidase, alpha, class 1C, member 1 | -2,74 A | -10,88 |
| E02 | NM_002372 | MAN2A1 | Mannosidase, alpha, class 2A, member 1 | -1,68 | -2,00 A |
| E03 | NM_006122 | MAN2A2 | Mannosidase, alpha, class 2A, member 2 | -1,94 | -3,03 A |
| E04 | NM_000528 | MAN2B1 | Mannosidase, alpha, class 2B, member 1 | -1,34 | -1,39 |
| E05 | NM_005908 | MANBA | Mannosidase, beta A, lysosomal | 1,14 | -2,02 |

Anhang

| Position | RefSeq Nummer | Symbol | Beschreibung | Fold Change | |
|----------|---------------|------------|--|-------------|---------|
| E06 | NM_002406 | MGAT1 | Mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase | -2,69 | -1,28 |
| E07 | NM_002408 | MGAT2 | Mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase | -1,82 | -1,32 |
| E08 | NM_002409 | MGAT3 | Mannosyl (beta-1,4-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase | -2,28 | -4,80 |
| E09 | NM_012214 | MGAT4A | Mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme A | -1,56 | -2,17 |
| E10 | NM_014275 | MGAT4B | Mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme B | -2,83 | -3,76 |
| E11 | NM_013244 | MGAT4C | Mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme C (putative) | 1,02 B | -1,11 |
| E12 | NM_002410 | MGAT5 | Mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase | -2,04 | -2,07 |
| F01 | NM_144677 | MGAT5B | Mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase, isozyme B | -1,10 B | -2,68 B |
| F02 | NM_006302 | MOGS | Mannosyl-oligosaccharide glucosidase | -2,24 | -6,16 |
| F03 | NM_016256 | NAGPA | N-acetylglucosamine-1-phosphodiester alpha-N-acetylglucosaminidase | 1,05 B | 1,44 |
| F04 | NM_000434 | NEU1 | Sialidase 1 (lysosomal sialidase) | -1,91 | 1,21 |
| F05 | NM_005383 | NEU2 | Sialidase 2 (cytosolic sialidase) | 1,12 C | -1,01 B |
| F06 | NM_006656 | NEU3 | Sialidase 3 (membrane sialidase) | -2,93 | -6,69 |
| F07 | NM_080741 | NEU4 | Sialidase 4 | 1,12 C | -1,01 C |
| F08 | NM_181673 | OGT | O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosaminyl transferase) | -1,23 | -8,90 A |
| F09 | NM_172236 | POFUT1 | Protein O-fucosyltransferase 1 | -1,69 | -5,76 |
| F10 | NM_133635 | POFUT2 | Protein O-fucosyltransferase 2 | -1,60 | -1,10 |
| F11 | NM_017739 | POMGNT1 | Protein O-linked mannosyl transferase beta1,2-N-acetylglucosaminyltransferase | -2,25 | -9,12 A |
| F12 | NM_007171 | POMT1 | Protein-O-mannosyltransferase 1 | -2,02 | -2,74 |
| G01 | NM_013382 | POMT2 | Protein-O-mannosyltransferase 2 | -2,06 | -2,27 |
| G02 | NM_002743 | PRKCSH | Protein kinase C substrate 80K-H | -2,02 | -1,22 |
| G03 | NM_173344 | ST3GAL1 | ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1 | -1,44 A | -1,26 |
| G04 | NM_006927 | ST3GAL2 | ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2 | -2,75 | -2,47 |
| G05 | NM_003032 | ST6GAL1 | ST6 beta-galactosamide alpha-2,6-sialyltransferase 1 | -2,25 | -9,56 |
| G06 | NM_018414 | ST6GALNAC1 | ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylglucosaminidase alpha-2,6-sialyltransferase 1 | -1,91 B | -5,19 |
| G07 | NM_006011 | ST8SIA2 | ST8 alpha-N-acetyl-neuraminidase alpha-2,8-sialyltransferase 2 | -1,18 A | -6,42 A |
| G08 | NM_015879 | ST8SIA3 | ST8 alpha-N-acetyl-neuraminidase alpha-2,8-sialyltransferase 3 | 1,12 C | -1,01 |
| G09 | NM_175052 | ST8SIA4 | ST8 alpha-N-acetyl-neuraminidase alpha-2,8-sialyltransferase 4 | -1,92 A | -2,58 A |
| G10 | NM_001004470 | ST8SIA6 | ST8 alpha-N-acetyl-neuraminidase alpha-2,8-sialyltransferase 6 | -1,44 | -3,63 C |
| G11 | NM_020120 | UGGT1 | UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1 | -1,8 | -2,43 A |

Anhang

| Position | RefSeq Nummer | Symbol | Beschreibung | Fold Change | |
|----------|---------------|--------|--|-------------|-------|
| G12 | NM_020121 | UGGT2 | UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 2 | -1,41 | -3,30 |
| H01 | NM_001101 | ACTB | Actin, beta | | |
| H02 | NM_004048 | B2M | Beta-2-microglobulin | | |
| H03 | NM_002046 | GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | | |
| H04 | NM_000194 | HPRT1 | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 | | |
| H05 | NM_001002 | RPLP0 | Ribosomal protein, large, P0 | | |
| H06 | SA_00105 | HGDC | Human Genomic DNA Contamination | | |
| H07 | SA_00104 | RTC | Reverse Transcription Control | | |
| H08 | SA_00104 | RTC | Reverse Transcription Control | | |
| H09 | SA_00104 | RTC | Reverse Transcription Control | | |
| H10 | SA_00103 | PPC | Positive PCR Control | | |
| H11 | SA_00103 | PPC | Positive PCR Control | | |
| H12 | SA_00103 | PPC | Positive PCR Control | | |

Aufgelistet sind die Fold Change Ergebnisse humaner Glykosylierungsgene in HEK293 unter Hypoxie (1 % Sauerstoff und Kobaltchlorid) im Vergleich zu Normoxie (Kontrolle). A/B: n.sc., C: Messfehler.

Zugehörige Stoffwechselwege und Enzymgruppen der Glykosylierungsgene

N-Acetylgalactosamintransferasen: GALNT1, GALNT10, GALNT11, GALNT12, GALNT13, GALNT14, GALNT2, GALNT3, GALNT4, GALNT6, GALNT7, GALNT8, GALNT9, GALNTL1, GALNTL5, GALNTL6.

N-Acetylglucosamintransferasen: A4GNT, B3GNT2, B3GNT3, B3GNT4, B3GNT8, GCNT1, GCNT3, GCNT4, MGAT1, MGAT2, MGAT3, MGAT4A, MGAT4B, MGAT4C, MGAT5, MGAT5B, OGT, POMGNT1.

Galactosyltransferasen: B3GALT1, B4GALT1, B4GALT2, B4GALT3, B4GALT5, C1GALT1.

Glucosyltransferasen: UGGT1, UGGT2.

Mannosidasen: EDEM1, EDEM2, EDEM3, MAN1A1, MAN1A2, MAN1B1, MAN1C1, MAN2A1, MAN2A2, MAN2B1, MANBA.

Mannosyltransferasen: POMT1, POMT2.

Galactoside & Glucosidasen & Hexosaminidasen: GANAB, GLB1, HEXA, HEXB, MOGS, PRKCSH.

Fucosidasen & Fucosyltransferasen: FUCA1, FUCA2, FUT11, FUT8, POFUT1, POFUT2.

Sialidasen: NEU1, NEU2, NEU3, NEU4.

Sialyltransferasen: ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GAL1, ST6GALNAC1, ST8SIA2, ST8SIA3, ST8SIA4, ST8SIA6.

Mannose-6-Phosphat Synthese & Katabolismus: GNPTAB, GNPTG, NAGPA.

Andere: AGA, C1GALT1C1.

N-Glykosylierung: AGA, B3GNT2, B3GNT3, B3GNT8, B4GALT1, B4GALT2, B4GALT3, EDEM1, EDEM2, EDEM3, FUCA1, FUCA2, FUT11, FUT8, GANAB, GLB1, GNPTAB, GNPTG, HEXA, HEXB, MAN1A1, MAN1A2, MAN1B1, MAN1C1, MAN2A1, MAN2A2, MAN2B1, MANBA, MGAT1, MGAT2, MGAT3, MGAT4A, MGAT4B, MGAT4C, MGAT5, MGAT5B, MOGS, NAGPA, NEU1, NEU2, NEU3, NEU4, PRKCSH, ST6GAL1, ST8SIA2, ST8SIA3, ST8SIA4, ST8SIA6, UGGT1, UGGT2.

O-Glykosylierung: A4GNT, B3GALT1, B3GNT8, B4GALT5, C1GALT1, C1GALT1C1, GALNT1, GALNT10, GALNT11, GALNT12, GALNT13, GALNT14, GALNT2, GALNT3, GALNT4, GALNT6, GALNT7, GALNT8, GALNT9, GALNTL1, GALNTL5, GALNTL6, GCNT1, GCNT3, GCNT4, OGT, POFUT1, POFUT2, POMGNT1, POMT1, POMT2, ST3GAL1, ST3GAL2, ST6GALNAC1, ST8SIA3, ST8SIA6.

Glykosphingolipide: B3GNT3, B3GNT4, B4GALT1, B4GALT2, B4GALT3, GLB1, HEXA, HEXB, ST3GAL1, ST3GAL2, ST8SIA6.