



Visualisierung proteinspezifischer Glycosylierung in lebenden Zellen

Franziska Doll[†], Annette Buntz[†], Anne-Katrin Späte, Verena F. Schart, Alexander Timper, Waldemar Schrimpf, Christof R. Hauck, Andreas Zumbusch* und Valentin Wittmann*

Professor Horst Kunz zum 75. Geburtstag gewidmet

Abstract: Die Glycosylierung von Proteinen ist eine weit verbreitete posttranskriptionale Modifikation, die an der Regulation vieler Proteinfunktionen beteiligt ist. Um die biologischen Funktionen dieser Modifikation zu verstehen, wäre die Visualisierung des Glycosylierungszustandes spezifischer Proteine in lebenden Zellen von entscheidender Bedeutung. Bisher wurde dies noch nicht erreicht. Hier zeigen wir die Detektion proteinspezifischer Glycosylierung der intrazellulären Proteine OGT, Foxo1, p53 und Akt1 in lebenden Zellen. Unser breit anwendbarer Ansatz beruht auf der Fluoreszenzmarkierung intrazellulärer, metabolisch eingebauter Kohlenhydrate durch Diels-Alder-Chemie. Die gewählten Proteine sind mit grün fluoreszierendem Protein (EGFP) markiert. Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie (FLIM) gestattet die Detektion von Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zwischen EGFP und dem am Glycan gebundenen Fluorophor mit hohem Kontrast selbst in Gegenwart des großen Überschusses an Akzeptorfluorophor.

Glycosylierung ist eine essenzielle posttranskriptionale Modifikation.^[1] Die Anknüpfung von Oligosacchariden, wie N-Glykanen (gebunden an Asparagin) oder O-Glykanen des Mucin-Typs (gebunden an Serin oder Threonin), erfolgt auf dem ER-Golgi-Weg (ER = endoplasmatisches Retikulum). Diese Glycoproteine finden sich auf der Zelloberfläche wieder oder werden in den extrazellulären Raum sekretiert. Darüber hinaus sind viele zyttoplasmatische, nukleäre und mitochondriale Proteine mit einzelnen N-Acetylglucosamin-(GlcNAc)-Resten an Serin oder Threonin modifiziert

(O-GlcNAc-Modifikation, O-GlcNAcylierung).^[2] Die O-GlcNAcylierung reguliert Proteinkinaseaktivierung, -abbau und -lokalisierung sowie Protein-Protein-Wechselwirkungen und beeinflusst die Transkription.^[3] Störungen der O-GlcNAcylierung sind mitverantwortlich für ernstzunehmende Krankheiten, wie Typ-2-Diabetes, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und die Alzheimer-Krankheit.^[4] Methoden zur Visualisierung des Glycosylierungszustandes eines spezifischen Proteins in lebenden Zellen sind Voraussetzung, um biologische Funktionen der O-GlcNAcylierung zu untersuchen. Dieses wichtige Ziel wurde bislang jedoch noch nicht erreicht.

In früheren Arbeiten wurde die Glycosylierung spezifischer Proteine über biochemische Methoden und Massenspektrometrie nach Isolierung detektiert, was jedoch den zellulären Kontext des Proteins aufhebt.^[5] Conze et al. verwendeten einen Proximitäts-Ligations-Test, um die Glycosylierung von MUC2 zu detektieren.^[6] Andere Gruppen nutzen metabolisches Glycoengineering (MGE) für die Fluoreszenzmarkierung von Kohlenhydraten im gesamten Glycom^[7] und führten einen zweiten Fluorophor an einem bestimmten Protein ein. Proteinglycosylierung wurde über Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) als Nachweis räumlicher Nähe von Donor- und Akzeptor-Fluorophor verfolgt.^[8] All diese Ansätze verwendeten die Azid-Alkin-Cycloaddition als bio-orthogonale Ligationsreaktion und beschränkten sich auf Zelloberflächenproteine. Tatsächlich ist die Anwendbarkeit der Kupfer(I)-katalysierten^[9] oder Ringspannungs-vermittelten^[10] Azid-Alkin-Cycloaddition innerhalb von lebenden Zellen begrenzt.^[11] Cu¹ ist zytotoxisch, und für die Cyclooctine, die bei der Ringspannungs-vermittelten Variante Anwendung finden, wurde gezeigt, dass sie mit Thiolen reagieren,^[12] die im reduzierenden Milieu des Zytosols in hohen Konzentrationen vorliegen.

Kürzlich wurde die Diels-Alder-Reaktion mit inversem Elektronenbedarf (DAinv-Reaktion) mit terminalen Alkenen^[13] oder Methylenecyclopropenen^[14] als chemischen Reportergruppen beim MGE als alternative bioorthogonale Ligationsreaktion angewendet. Carbamat-verknüpfte Methylcyclopropenderivate haben sich für diesen Zweck als besonders geeignet herausgestellt.^[14c-e] Die DAinv-Reaktion^[15] ist hoch selektiv, benötigt keinen giftigen Schwermetallkatalysator, und Methylenecyclopropene sind stabil in Gegenwart von Thiolen.^[14a,16] Diese Eigenschaften machen die DAinv-Reaktion zu einer besonders geeigneten Ligationsmethode für intrazelluläre Anwendungen. Unter verschiedenen Kohlenhydraten, die zur Visualisierung der O-GlcNAcylierung beschrieben wurden,^[14d,e,17] reagiert das kürzlich entwickelte, peracetylierte Methylenecyclopropen-markierte N-Acetylglu-

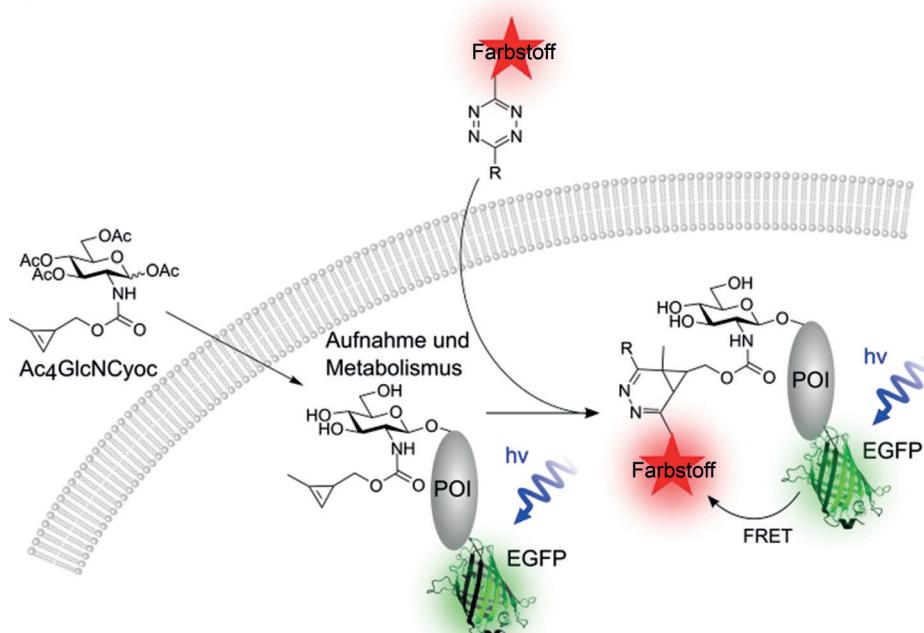
[*] F. Doll,^[†] A. Buntz,^[†] A.-K. Späte, V. F. Schart, Prof. Dr. A. Zumbusch, Prof. Dr. V. Wittmann
Fachbereich Chemie und Konstanz Research School Chemical Biology (KoRS-CB), Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)
E-Mail: andreas.zumbusch@uni-konstanz.de
mail@valentin-wittmann.de

A. Timper, Prof. Dr. C. R. Hauck
Fachbereich Biologie und Graduate School Biological Science
Universität Konstanz
Universitätsstraße 10, 78457 Konstanz (Deutschland)

W. Schrimpf
Department Chemie und Munich Center for Integrated Protein Science and Center for Nanoscience
Ludwig-Maximilians-Universität München
Butenandtstraße 11, 81377 München (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201503183> zu finden.

A



B

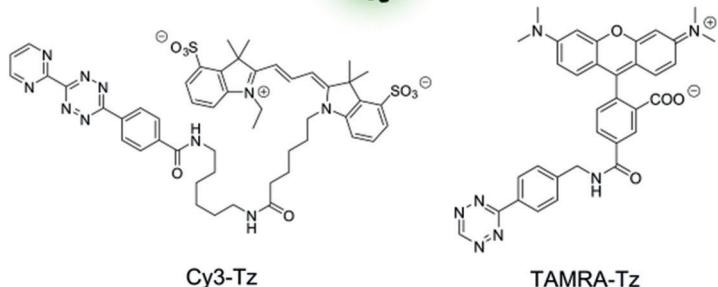


Abbildung 1. Experimentelle Strategie. A) Peracetyliertes Methylcyclopropen-modifiziertes N-Acetylglucosamin ($\text{Ac}_4\text{GlcNCyoc}$) wird von der Zelle aufgenommen, von unspezifischen Esterasen desacyliert und in das zelluläre Glycom einschließlich des EGFP-markierten Zielproteins (protein of interest, POI) eingebaut. Alle Proteine, in die GlcNCyoc eingebaut wurde, werden in einer spezifischen DAinv-Reaktion mit einem Farbstoff-Tetrazin-Konjugat verknüpft. Die Fluoreszenzlebenszeit des Donors (EGFP) kann zur Untersuchung der Glycosylierung des Zielproteins verwendet werden, indem FRET zwischen dem Donor und dem Akzeptorfärbstoff-Tetrazin-Konjugat ausgelesen wird. B) Chemische Strukturformeln von Cy3-Tetrazin (Cy3-Tz) und TAMRA-Tetrazin (TAMRA-Tz).

cosamin ($\text{Ac}_4\text{GlcNCyoc}$) schnell in einer DAinv-Reaktion mit Tetrazinen.^[14d,e]

Hier präsentieren wir die erste Methode zur Visualisierung der Glycosylierung spezifischer intrazellulärer Proteine in lebenden Zellen (Abbildung 1A). Hierzu markierten wir verschiedene Zielproteine mit dem verstärkt (enhanced) grün fluoreszierenden Protein (EGFP) und führten MGE mit $\text{Ac}_4\text{GlcNCyoc}$ durch. Über eine DAinv-Reaktion wurde ein Akzeptorfärbstoffglycomweit an die metabolisch eingebauten Zucker gebunden. Nur die Glycosylierung des Zielproteins führt zu FRET zwischen EGFP-Donor und Akzeptorfärbstoff. Wir zeigen, dass FRET durch Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie (FLIM) selbst in Gegenwart eines großen Überschusses an Akzeptorfärbstoff mit hohem Kontrast detektiert werden kann. Mit dieser Strategie können wir die Glycosylierung der intrazellulären Proteine OGT, Foxo1, p53 und Akt1 visualisieren.

Das Enzym *O*-GlcNAc-Transferase (OGT)^[18] fungierte als Modellprotein für unsere Methode. Die OGT katalysiert die β -*O*-glycosidische Verknüpfung von UDP-GlcNAc an Serin- oder Threoninresten von Proteinen, was zur *O*-GlcNAcylierung führt. Sie befindet sich im Zytoplasma und im Zellkern und kann sich selbst *O*-GlcNAcylieren.^[19] Andere Glycosylierungsarten sind für die OGT nicht bekannt.

Nach Optimierung des $\text{Ac}_4\text{GlcNCyoc}$ -Einbaus und Bestimmung der geeigneten Markierungsbedingungen (Abbildungen S1 und S2 der Hintergrundinformationen) wurde sichergestellt, dass die OGT mit $\text{Ac}_4\text{GlcNCyoc}$ modifiziert wird. Dazu wurden HEK293T-Zellen mit einem EGFP-OGT-Expressionsvektor transfiziert. Kontrollexperimente wurden mit Zellen durchgeführt, die mit einem EGFP-Expressionsvektor transfiziert worden waren. Die Zellen wurden 20 h mit 100 μM $\text{Ac}_4\text{GlcNCyoc}$ oder Ac_4GlcNAc behandelt. Ac_4GlcNAc fungierte als Kontrolle, da es nicht mit dem Farbstoff-Tetrazin(Tz)-Konjugat reagieren kann. Die Zellen wurden lysiert, und EGFP-OGT oder EGFP wurde mit einem anti-GFP-Antikörper aus den Zelllysaten extrahiert. Die Immunpräzipitate wurden mit Cy3-Tz markiert und über SDS-PAGE aufgetrennt, und die Glycosylierung der Proteine wurde durch Detektion der Cy3-Fluoreszenz auf dem Western Blot detektiert (Abbildung 2A).

Immunmarkierung gegen GFP bestätigte gleiche Ladungsmengen von EGFP-OGT und EGFP für $\text{Ac}_4\text{GlcNCyoc}$ - oder Ac_4GlcNAc -behandelte Proben. Für EGFP-OGT-transfizierte Zellen wurde nur für $\text{Ac}_4\text{GlcNCyoc}$ -behandelte Proben Cy3-Fluoreszenz bei etwa 135 kDa beobachtet. Für EGFP-transfizierte Zellen war kein Cy3-Fluoreszenzsignal bei 30 kDa vorhanden. Diese Befunde veranschaulichen, dass EGFP nicht glycosyliert ist und die Cy3-Fluoreszenz von EGFP-OGT allein von der Modifikation der OGT mit $\text{Ac}_4\text{GlcNCyoc}$ herrührt. Daher verwendeten wir in den folgenden Experimenten EGFP als Negativkontrolle. Zusammenfassend ergibt sich, dass sich der Einbau von $\text{Ac}_4\text{GlcNCyoc}$ zur Beobachtung intrazellulärer, proteinspezifischer Glycosylierung durch DAinv-Chemie eignet.

Für die Detektion über Western Blot setzten wir Cy3-Tz ein (Abbildung S2C). Zur Detektion der OGT-Glycosylier-

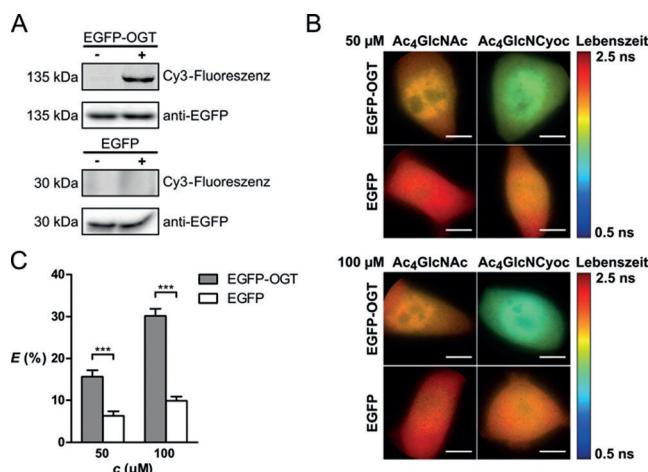


Abbildung 2. Visualisierung der Glycosylierung von OGT in lebenden Zellen. A) Der Einbau von Ac₄GlcNCyoc wurde biochemisch bestätigt. HEK293T-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für EGFP-OGT oder EGFP transfiziert, 20 h mit 50 oder 100 µM Ac₄GlcNAc (–) oder Ac₄GlcNCyoc (+) behandelt und lysiert. EGFP-OGT und EGFP wurden durch Verwendung eines anti-GFP-Antikörpers aus Ganzzelllysaten immunpräzipitiert und mit Cy3-Tz markiert. Die Cy3-Fluoreszenz wurde über Western Blots detektiert. Gleiche Mengen an isolierten EGFP-Fusionsproteinen wurden durch einen anti-GFP-Antikörper sichergestellt. B) Bilder der in Falschfarben und intensitätsgewichtet dargestellten Fluoreszenzmodulationslebenszeiten EGFP-OGT- und EGFP-transfizierter Zellen. HEK293T-Zellen wurden mit entweder 50 oder 100 µM Ac₄GlcNAc oder Ac₄GlcNCyoc behandelt und mit TAMRA-Tz markiert. Maßstab: 10 µm. C) Fluoreszenzmodulationslebenszeiten τ aus drei Experimenten mit fünf Zellen jeweils mit Zuckerkonzentrationen c von 50 oder 100 µM wurden gemittelt und die apparenten FRET-Effizienzen E als $(1 - \tau_{\text{Ac}4\text{GlcNCyoc}} / \tau_{\text{Ac}4\text{GlcNAc}}) 100\%$ berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwertes). Die statistische Signifikanz wurde mit einem Zwei-Weg-ANOVA- und einem Bonferroni-Post-Test bestimmt. Der Signifikanzgrad beträgt *** $p < 0.001$.

rung im Inneren lebender Zellen durch FRET-Mikroskopie wählten wir das zellgängige TAMRA-Tz (Abbildung 1B), das die Viabilität der Zellen nicht beeinflusst (Abbildung S3). Eine 20-stündige Behandlung der Zellen mit 50 µM Ac₄GlcNCyoc oder Ac₄GlcNAc reduzierte die Überlebensrate nur leicht (auf 81–85 %), während 100 µM zu 53 bzw. 74 % lebender Zellen führten (Abbildung S4).

Da der klassische FRET auf der Strahlungsemission des Akzeptors beruht, werden aufwändige Kontrollen benötigt, um Kreuzanregung und spektrales Durchlecken zu korrigieren. Für intrazelluläre Anwendungen ist das spektrale Auslesen des FRET durch das Hintergrundsignal, das durch einen Überschuss an Akzeptorfarbstoff entsteht, limitiert. Wir verwendeten daher Fluoreszenzlebenszeitmikroskopie (FLIM) als einen alternativen Ansatz. Die Fluoreszenzlebenszeit des Donors ist ein direktes Maß für die Energieübertragung, da sie durch einen zusätzlichen Desaktivierungsweg, wie FRET, gesenkt wird. Aus mehreren FLIM-Techniken wählten wir den Weitfeldansatz in der Frequenzdomäne, da er besonders für die Messung in lebenden Zellen geeignet ist. Aufgrund der schnellen, parallelen Aufnahme der Daten aller Pixel können viele Zellen innerhalb kürzester

Zeit abgebildet werden, was statistische Vergleiche ermöglicht.

HEK293T-Zellen wurden mit EGFP-OGT oder EGFP transfiziert, 20 h mit Ac₄GlcNAc oder Ac₄GlcNCyoc behandelt und mit TAMRA-Tz inkubiert. Bilder der Fluoreszenzlebenszeiten sind in Falschfarben dargestellt und intensitätsgewichtet. Die Farbe eines Pixels entspricht dabei seiner Lebenszeit und die Helligkeit seiner Intensität (Abbildung 2B). Bemerkenswerterweise ist die Fluoreszenzlebenszeit von EGFP-OGT nach Behandlung mit Ac₄GlcNCyoc deutlich kürzer als nach der mit Ac₄GlcNAc. Dieser Effekt ist schon bei einer Zuckerkonzentration von 50 µM klar erkennbar, ist jedoch bei einer Konzentration von 100 µM noch deutlicher ausgeprägt (Abbildungen 2B und S5).

Die Fluoreszenzlebenszeiten von EGFP-OGT unterscheiden sich auch in Abwesenheit von Ac₄GlcNCyoc leicht von denen von EGFP (Abbildungen 2B und S5). Dies kann durch zwei Effekte erklärt werden: Die Fluoreszenzlebenszeit kann von lokalen Parametern (Viskosität, Temperatur, Ionenkonzentration, pH-Wert und Sauerstoffkonzentration), die für verschiedene EGFP-Fusionsproteine unterschiedlich sein können, beeinflusst werden.^[20] Zusätzlich kann die unspezifische Markierung von Proteinen mit TAMRA-Tz zu einem Hintergrund-FRET führen, der sowohl in mit Ac₄GlcNCyoc- als auch in mit Ac₄GlcNAc-behandelten Zellen vorhanden ist. Für die Analyse der FRET-Effizienzen haben wir daher die Fluoreszenzlebenszeiten von Ac₄GlcNCyoc- und Ac₄GlcNAc-behandelten Zellen für jedes Protein verglichen (Abbildung 2C). Die FRET-Effizienzen für EGFP-OGT betragen 16 bzw. 30 % bei 50 bzw. 100 µM Zucker. Da EGFP nicht mit dem Akzeptorfluorophor markiert ist, wurde es als Negativkontrolle verwendet, um das Ausmaß des intermolekularen FRET zu benachbarten Proteinen zu bestimmen, die den modifizierten Zucker eingebaut hatten und spezifisch mit TAMRA-Tz markiert worden waren. Die FRET-Effizienzen für EGFP lagen für beide Zuckerkonzentrationen unter 10 %. Dies zeigt, dass der intermolekulare FRET deutlich schwächer ist als der proteinspezifische, intramolekulare FRET. Trotzdem kann ein FRET zwischen einem EGFP-markierten Protein und seinem glycosylierten Interaktionspartner nicht ausgeschlossen werden, wenn eine unmittelbare Nähe der beiden Fluoreszenzfarbstoffe gegeben ist.

Um unsere Befunde zu untermauern, bestimmten wir die FRET-Effizienzen zusätzlich über Akzeptorphotobleichen mit fixierten Zellen (Abbildung S6). Die in EGFP-OGT- und EGFP-transfizierten Zellen gemessenen apparenten FRET-Effizienzen stimmen gut mit unseren FLIM-Befunden überein. Zusammengenommen zeigen unsere Daten die Glycosylierung von OGT in lebenden Zellen.

Um die generelle Anwendbarkeit des Ansatzes zu demonstrieren, untersuchten wir fünf zusätzliche intrazelluläre Proteine mit einer Vielzahl zellulärer Aufgaben (Forkhead-Box-Transkriptionsfaktor Foxo1, Tumorsuppressor p53, Serin/Threonin-Kinase 1 Akt1, zytoplasmatisches Aktin-Bindeprotein Vinculin und Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase CAMK4). Für alle ist O-GlcNAcylierung die einzige dokumentierte Glycosylierung (Tabelle S1).

Die entsprechenden EGFP-Fusionsproteine wurden immunpräzipitiert, um den Einbau von Ac₄GlcNCyoc zu untersuchen. Immunpräzipitationen mit einem monoklonalen Antikörper gegen GFP zeigten, dass Foxo1-EGFP, p53-EGFP, Akt1-EGFP und CAMK4-EGFP mit Ac₄GlcNCyoc modifiziert waren, während EGFP-Vinculin nicht modifiziert wurde (Abbildung 3A und S7A). Bei der Durchführung

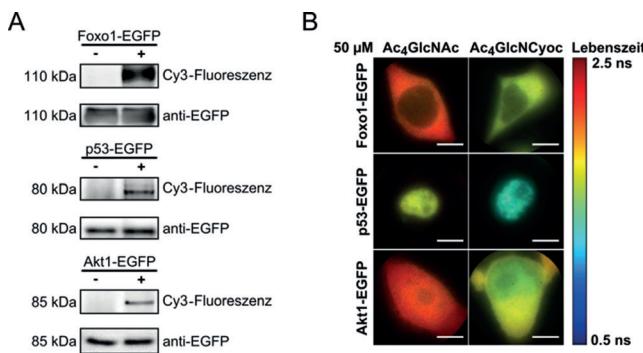


Abbildung 3. Visualisierung der Glycosylierung von Foxo1, p53 und Akt1 in lebenden Zellen. A) Der Einbau von Ac₄GlcNCyoc in Foxo1-EGFP, p53-EGFP und Akt1-EGFP wurde biochemisch bestätigt. HEK293T-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren der EGFP-Fusionsproteine transfiziert, 20 h mit 100 µM Ac₄GlcNAc (–) oder Ac₄GlcNCyoc (+) behandelt und lysiert. Die EGFP-Fusionsproteine wurden durch Verwendung eines anti-GFP-Antikörpers aus Ganzzelllysaten immunpräzipitiert und mit Cy3-Tz markiert. Die Cy3-Fluoreszenz wurde detektiert. Gleiche Mengen an präzipitierten EGFP-Fusionsproteinen wurden mithilfe eines anti-GFP-Antikörpers sichergestellt. B) Repräsentative Bilder der Fluoreszenzmodulationslebenszeiten von Foxo1-EGFP-, p53-EGFP- und Akt1-EGFP-transfizierten Zellen. HEK293T-Zellen wurden mit 50 µM Ac₄GlcNAc oder Ac₄GlcNCyoc behandelt und mit TAMRA-Tz markiert. Maßstab: 10 µm.

der FLIM-FRET-Mikroskopie mit lebenden Zellen wurden nach der Behandlung mit 50 µM Ac₄GlcNCyoc deutliche Unterschiede der Fluoreszenzlebenszeiten für Foxo1-EGFP, p53-EGFP und Akt1-EGFP detektiert (Abbildung 3B und S8A). Bei einer Konzentration von 100 µM Ac₄GlcNCyoc verkürzten sich die Fluoreszenzlebenszeiten noch deutlicher (Abbildung S8B und S9A).

Foxo1-EGFP befindet sich überwiegend im Zytoplasma, p53-EGFP ausschließlich im Zellkern und Akt1-EGFP sowohl im Zytoplasma als auch im Kern (Abbildung 3B). Während sich die Fluoreszenzlebenszeiten von Foxo1-EGFP und p53-EGFP innerhalb der Zellen nicht räumlich unterschieden, nahm die Fluoreszenzlebenszeit von Akt1-EGFP im Zellkern stärker ab als im Zytoplasma (Abbildung 3B). Es war berichtet worden, dass die nukleäre Lokalisation von Akt1 durch dessen O-GlcNAcylierung reguliert sein könnte.^[21] Durch eine quantitative Analyse unserer FLIM-FRET-Daten konnten wir diese biochemische Beobachtung bestätigen (Abbildung S9B). Die räumlich aufgelöste Darstellung der Akt1-Glycosylierung demonstriert die Leistungsfähigkeit des hier vorgestellten Mikroskopieansatzes.

Sowohl ein ausreichend hohes Glycosylierungsniveau als auch die räumliche Nähe von EGFP-Markierung und Glycosylierungsstelle sind die Voraussetzungen, um einen signi-

fikanten intramolekularen FRET zu beobachten. Beispiele, die diese Voraussetzungen nicht erfüllen, sind CAMK4-EGFP und EGFP-Vinculin. Im Fall von CAMK4-EGFP konnte die Modifikation mit Ac₄GlcNCyoc im Western Blot detektiert werden (Abbildung S7A), die Fluoreszenzlebenszeit war jedoch nicht signifikant verringert (Abbildung S7B und S8). Vermutlich kam(en) sich die Fluoreszenzmarkierung(en) an der/den Glycosylierungsstelle(n) und die EGFP-Markierung nicht nahe genug. Die Modifikation von EGFP-Vinculin mit Ac₄GlcNCyoc konnte auf dem Western Blot nicht nachgewiesen werden (Abbildung S7A). Folglich wurden auch nur kleine Veränderungen der Lebenszeiten beobachtet (Abbildung S7B und S8). Diese beiden Beispiele sprechen zusätzlich dafür, dass unspezifischer, intermolekularer FRET unsere FLIM-FRET-Messungen nicht stört.

Die FRET-Effizienzen aller untersuchten EGFP-Fusionsproteine sind in Abbildung 4 zusammengefasst. Für EGFP-OGT, Foxo1-EGFP, p53-EGFP und Akt1-EGFP wurden für beide Konzentrationen FRET-Effizienzen deutlich über dem Hintergrundsignal von EGFP erhalten.

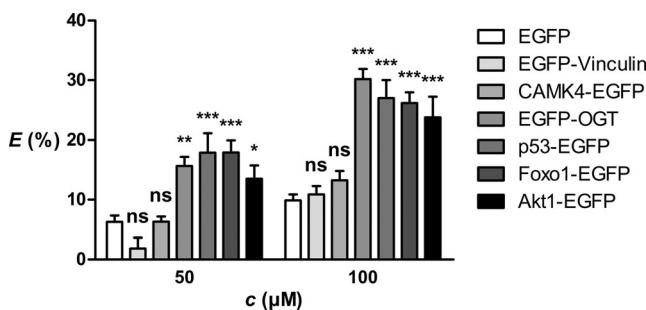


Abbildung 4. Vergleich der FRET-Effizienzen aller untersuchten Proteine. Fluoreszenzmodulationslebenszeiten von 15 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten mit Zuckerkonzentrationen c von 50 und 100 µM wurden gemittelt und die apparenten FRET-Effizienzen E berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Statistische Signifikanz wurde mit einem Zwei-Weg-ANOVA- und einem Bonferroni-Post-Test sichergestellt. Der Signifikanzgrad beträgt ns = nicht signifikant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$.

Eine Frage bei MGE-Experimenten ist die nach dem genaueren Schicksal der modifizierten Zucker. Beispielsweise wurde gezeigt, dass Monosaccharide enzymatisch epimerisiert und in von den Zielglycanen abweichende Glycane eingebaut werden können.^[17b-d] Daher haben wir uns bei der Auswahl der innerhalb dieser Studie untersuchten Proteine auf Beispiele beschränkt, deren einzige dokumentierte Glycosylierung die O-GlcNAcylierung ist (Tabelle S1). Um sicherzugehen, dass der Einbau von Ac₄GlcNCyoc von der OGT-Aktivität abhängt, wurde die EGFP-markierte OGT überexprimiert, was zu einem gesteigerten Einbau des modifizierten Zuckers führte (Abbildung S10A). Weiterhin bewirkte die Behandlung von Zelllysaten mit Ac₄5GlcNAc,^[22] einem bekannten OGT-Inhibitor, einen reduzierten Einbau von Ac₄GlcNCyoc (Abbildung S10B). Kürzlich konnten Pratt und Mitarbeiter zeigen, dass Pentinylgruppen von 1-Desoxy-N-pentinylglucosamin auf Lysinseitenketten unter Bildung

stabiler Amidbindungen übertragen werden können.^[23] Eine vergleichbare Übertragung von einer Carbamatstruktur, wie GlcNCyoc, würde in einer basenstabilen Carbamatverknüfung an Lysinseitenketten resultieren. Eine durch mild-basische Bedingungen hervorgerufene β -Eliminierung ist eine etablierte Methode, um an Serin- und Threoninreste gebundene *O*-Glycane zu entfernen.^[24] *N*-Glycane (und Carbamate) dagegen überstehen diese Behandlung unversehrt. Daher untersuchten wir, ob die durch metabolischen Einbau von Ac₄GlcNCyoc entstandenen Proteinmodifikationen sensibel auf Basenbehandlung reagieren. Lysate von Ac₄GlcNCyoc-behandelten Zellen wurden mit Biotin-Tz inkubiert, und anschließend wurde der pH-Wert auf 12 eingestellt. Dies führte zum Verschwinden des *O*-GlcNAc- und des Biotin-Signals im Western Blot (Details und Kontrollexperimente siehe Abbildung S11). Zusammengenommen implizieren diese Daten, dass Ac₄GlcNCyoc enzymatisch in *O*-GlcNAcylierte Proteine eingebaut wird.

Zusammenfassend konnten wir einen Ansatz zur Visualisierung der Glycosylierung spezifischer Proteine in lebenden Zellen entwickeln. Die Möglichkeit, den Glycosylierungsstatus eines Proteins räumlich aufzulösen, wurde am Beispiel von Akt1 demonstriert. Unsere Strategie hat das Potenzial, den Einfluss externer Stimuli auf die Lokalisation und Glycosylierung von Proteinen zu untersuchen. Die Beobachtung zeitabhängiger Abläufe kann durch Verwendung der Weitfeld-FLIM-Technik erreicht werden. Es sollte hierbei jedoch bedacht werden, dass markiertes *O*-GlcNCyoc möglicherweise nicht in der gleichen Weise wie natürliches *O*-GlcNAc prozessiert wird. Wir haben nachgewiesen, dass unsere Strategie auf eine Vielzahl von Proteinen anwendbar ist, vorausgesetzt, eine EGFP-Markierung in unmittelbarer Nähe zur Glycosylierungsstelle ist möglich. Wir halten diese Methode für ein innovatives Hilfsmittel, um ein tieferes Verständnis des Einflusses der Glycosylierung auf die Funktion intrazellulärer Proteine zu erlangen.

Danksagung

Diese Arbeit wurde durch die DFG (SFB 969 und SPP 1623), die Konstanz Research School Chemical Biology, die Gradiertenchule Biological Science und die Deutsche Telekom Stiftung gefördert. Wir danken Domenico Accili (Institute of Human Nutrition, Columbia University) für das Foxo1-EGFP-Plasmid, Arthur Fischbach (Fachbereich Biologie, Universität Konstanz) für das p53-EGFP-Plasmid und Kris DeMali (Carver College of Medicine, University of Iowa) für das EGFP-Vinculin-Plasmid. Dank gilt auch Enrico Gratton (Laboratory for Fluorescence Dynamics, University of California) für seine Hilfe mit SimFCS, Holger Bußkamp (Fachbereich Chemie, Universität Konstanz) für die Synthese von Cy3-Tz und David Vocadlo (Department of Chemistry, Simon Fraser University) für die Bereitstellung von Ac₄SGlcNAc.

Stichwörter: Bioorthogonale Chemie · FRET · Glycoproteine · Lebendzell-FLIM · Metabolisches Engineering

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 2262–2266
Angew. Chem. **2016**, *128*, 2303–2308

- [1] *Essentials of Glycobiology*, 2. Aufl. (Hrsg.: A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, M. E. Etzler), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, **2009**.
- [2] a) C.-R. Torres, G. W. Hart, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 3308–3317; b) G. D. Holt, G. W. Hart, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 8049–8057.
- [3] G. W. Hart, C. Slawson, G. Ramirez-Correa, O. Lagerlof, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 825–858.
- [4] T. Lefebvre, V. Dehennaut, C. Guinez, S. Olivier, L. Drouat, A.-M. Mir, M. Mortuaire, A.-S. Vercoutter-Edouart, J.-C. Michalski, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2010**, *1800*, 67–79.
- [5] a) J. R. Ha, L. Hao, G. Venkateswaran, Y. H. Huang, E. Garcia, S. Persad, *Exp. Cell Res.* **2014**, *321*, 153–166; b) N. Khidekel, S. B. Ficarro, E. C. Peters, L. C. Hsieh-Wilson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 13132–13137; c) W. Morelle, J.-C. Michalski, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1585–1602.
- [6] T. Conze, A. S. Carvalho, U. Landegren, R. Almeida, C. A. Reis, L. David, O. Söderberg, *Glycobiology* **2010**, *20*, 199–206.
- [7] a) O. T. Keppler, R. Horstkorte, M. Pawlita, C. Schmidt, W. Reutter, *Glycobiology* **2001**, *11*, 11R–18R; b) D. H. Dube, C. R. Bertozzi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 616–625; c) T.-L. Hsu, S. R. Hanson, K. Kishikawa, S.-K. Wang, M. Sawa, C.-H. Wong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2614–2619; d) J. Du, M. A. Meledeo, Z. Wang, H. S. Khanna, V. D. Paruchuri, K. J. Yarema, *Glycobiology* **2009**, *19*, 1382–1401; e) S. Stairs, A. A. Neves, H. Stöckmann, Y. A. Wainman, H. Ireland-Zecchini, K. M. Brindle, F. J. Leeper, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1063–1067.
- [8] a) Y. Haga, K. Ishii, K. Hibino, Y. Sako, Y. Ito, N. Taniguchi, T. Suzuki, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 907; b) B. Belardi, A. de la Zerda, D. R. Spicarich, S. L. Maund, D. M. Peehl, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 14045–14049; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 14295–14299; c) W. Lin, Y. Du, Y. Zhu, X. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 679–687.
- [9] a) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599; *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; b) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [10] a) N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046–15047; b) X. Ning, J. Guo, M. A. Wolfert, G.-J. Boons, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 2253–2255; *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 2285–2287.
- [11] W. Lin, L. Gao, X. Chen, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 2571–2575. Anmerkung bei der Korrektur: Dieses Manuskript berichtet über den Nachweis proteinspezifischer Glycosylierung innerhalb von fixierten Zellen und wurde nach Einreichung dieses Beitrags publiziert.
- [12] R. van Geel, G. J. M. Pruijn, F. L. van Delft, W. C. Boelens, *Bioconjugate Chem.* **2012**, *23*, 392–398.
- [13] a) A. Niederwieser, A.-K. Späte, L. D. Nguyen, C. Jüngst, W. Reutter, V. Wittmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4265–4268; *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 4359–4363; b) A.-K. Späte, V. F. Schart, S. Schöllkopf, A. Niederwieser, V. Wittmann, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 16502–16508.
- [14] a) D. M. Patterson, L. A. Nazarova, B. Xie, D. N. Kamber, J. A. Prescher, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 18638–18643; b) C. M. Cole, J. Yang, J. Šečkuté, N. K. Devaraj, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 205–208; c) A.-K. Späte, H. Bußkamp, A. Niederwieser, V. F. Schart, A. Marx, V. Wittmann, *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 147–154; d) D. M. Patterson, K. A. Jones, J. A. Prescher, *Mol. Biosyst.* **2014**, *10*, 1693–1697; e) A.-K. Späte, V. F. Schart, J. Häfner, A. Niederwieser, T. U. Mayer, V. Wittmann, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 2235–2242.
- [15] A.-C. Knall, C. Slugovic, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 5131–5142.

- [16] J. Yang, J. Šečkuté, C. M. Cole, N. K. Devaraj, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7476–7479; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7594–7597.
- [17] a) D. J. Vocadlo, H. C. Hang, E.-J. Kim, J. A. Hanover, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 9116–9121; b) M. Boyce, I. S. Carrico, A. S. Ganguli, S.-H. Yu, M. J. Hanguer, S. C. Hubbard, J. J. Kohler, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 3141–3146; c) B. W. Zaro, Y.-Y. Yang, H. C. Hang, M. R. Pratt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 8146–8151; d) K. N. Chuh, B. W. Zaro, F. Piller, V. Piller, M. R. Pratt, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12283–12295.
- [18] a) L. K. Kreppel, M. A. Blomberg, G. W. Hart, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 9308–9315; b) M. B. Lazarus, Y. Nam, J. Jiang, P. Sliz, S. Walker, *Nature* **2011**, *469*, 564–567.
- [19] R. J. Konrad, J. F. Tolar, J. E. Hale, M. D. Knierman, G. W. Becker, J. E. Kudlow, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *288*, 1136–1140.
- [20] a) E. B. van Munster, T. W. J. Gadella, *Microsc. Tech.* **2005**, *95*, 143–175; b) K. Suhling, P. M. French, D. Phillips, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2005**, *4*, 13–22.
- [21] J. C. Gandy, A. E. Rountree, G. N. Bijur, *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 3051–3058.
- [22] T. M. Gloster, W. F. Zandberg, J. E. Heinonen, D. L. Shen, L. Deng, D. J. Vocadlo, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 174–181.
- [23] B. W. Zaro, K. N. Chuh, M. R. Pratt, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1991–1996.
- [24] R. A. Reeves, A. Lee, R. Henry, N. E. Zachara, *Anal. Biochem.* **2014**, *457*, 8–18.

Eingegangen am 7. April 2015,
veränderte Fassung am 29. Oktober 2015
Online veröffentlicht am 12. Januar 2016