

Massenspektrometrische Identifizierung posttranslational modifizierter Proteine aus verschiedenen Entwicklungsstadien von *Caenorhabditis elegans*

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Ökotoxikologie
des Fachbereiches der Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und
Umweltmanagement (Fachbereich 09) der Justus-Liebig Universität Gießen.

vorgelegt von
Dipl. Oec. troph. Julia Grabitzki
aus Asslar

Asslar 2006

Aus dem Biochemischen Institut des Fachbereiches Medizin der
Justus-Liebig Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. Klaus T. Preissner

1. Gutachterin: Prof. Dr. Katja Becker
Biochemie der Ernährung des Menschen (FB 09)
Justus-Liebig-Universität Gießen
2. Gutachter: PD Dr. Günter Lochnit
Biochemisches Institut (FB 11)
Justus-Liebig-Universität Gießen

Tag der Dissertation: 13. November 2006

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit

Publikationen

J. Grabitzki, V. Sauerland, R. Geyer, G. Lochnit (2005). "Identification of phosphorylcholine substituted peptides by their characteristic mass spectrometric fragmentation." *Eur J Mass Spectrom* 11(3): 335-344.

G. Lochnit, S. Schmitt, J. Grabitzki, R. Geyer (2005). „Neue Trends im Proteomlabor: von „spot picking“ und „in gel digestion“ zu „membrane cutting“ und „on membrane processing“ *BIOspektrum*, 6/05, 11. Jahrgang.

G. Lochnit, J. Grabitzki, B. Henkel and R. Geyer (2006) „First identification of a phosphorylcholine-substituted protein from *Caenorhabditis elegans*. Isolation and characterization of the aspartyl protease ASP-6.“ *Biol. Chem.* 387(10-11):1487-93.

J. Grabitzki, M. Ahrend, B. Schmitz, R. Geyer and G. Lochnit “Yin and Yang in the worm: O-GlcNAcylation in *Caenorhabditis elegans*”. Manuskript eingereicht

J. Grabitzki, M. Ahrend, R. Geyer, H. Schachter and G. Lochnit “The PCome of *Caenorhabditis elegans*. Identification of phosphorylcholine substituted proteins.” Manuskript in Vorbereitung

B. Wenige, H. Bönisch, J. Grabitzki, G. Lochnit, B. Schmitz and M. Ahrend “Separation of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis using cationic rehydrated strips“. Manuskript in Vorbereitung

Kongressbeiträge

Vortrag

“Phosphocholine modified proteins of *Caenorhabditis elegans* are specific for different developmental stages” European Worm Meeting, *C. elegans* meeting `06, 30. April - 03. Mai 2006, Heraklion, Kreta, Griechenland.

Poster

J. Grabitzki, G. Lochnit, B. Henkel und R. Geyer „Isolation and identification of a phosphorylcholine-substituted protein from the free-living nematode *Caenorhabditis elegans*“ 13th Joint Meeting of the “Netherlands Society for Glycobiology”, the “Groupe Lillois de Glycobiologie” and the “Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie”, 22.-23. November 2002, Münster, Deutschland.

G. Lochnit, J. Grabitzki, C. Friedl, V. Sauerland und R. Geyer „Phosphorylcholine – a zwitterionic substituent of pathogen-derived antigens – shows characteristic fragmentation patterns in mass spectrometry” Annual Meeting of the „Deutsche Gesellschaft für Massenspektrometrie“, 9.-12. März 2003, Münster, Deutschland.

G. Lochnit, J. Grabitzki, B. Henkel, R. Geyer “Isolation and characterization of the aspartyl protease ASP-6.” European Worm Meeting, *C. elegans* meeting `04, 22-25 Mai 2004, Interlaken, Schweiz.

J. Grabitzki, G. Lochnit and R. Geyer “The PCome of *Caenorhabditis elegans*; Identification of phosphorylcholine-substituted proteins and comparison of developmental changes in the expression of this epitope.” European Worm Meeting, *C. elegans* meeting `04, 22-25 Mai 2004, Interlaken, Schweiz.

J. Grabitzki, R. Geyer and G. Lochnit “Dissecting posttranslational modifications in *Caenorhabditis elegans*” 15th Joint Meeting of the “Netherlands Society for Glycobiology”, the “Groupe Lillois de Glycobiologie” and the “Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie”, 28-30. November 2004, Wageningen, Holland.

Julia Grabitzki, Michael Ahrend, Brigitte Schmitz, Rudolf Geyer and Günter Lochnit „O-linked *N*-acetylglucosamine modified proteins of *Caenorhabditis elegans*” 16th Joint Meeting of the “Netherlands Society for Glycobiology”, the “Groupe Lillois de Glycobiologie” and the “Studiengruppe Glykobiologie der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie”, 27-29. Oktober 2005, Hannover, Deutschland.

Julia Grabitzki, Michael Ahrend, Brigitte Schmitz, Rudolf Geyer and Günter Lochnit “Identification of O-linked *N*-acetylglucosamine modified proteins in *Caenorhabditis*

elegans” European Worm Meeting, *C. elegans* meeting `06, 30. April - 03. Mai 2006, Heraklion, Kreta, Griechenland.

Julia Grabitzki, Michael Ahrend, Brigitte Schmitz, Rudolf Geyer and Günter Lochnit “Identification of O-linked *N*-acetylglucosamine modified proteins in *Caenorhabditis elegans*“ From Proteomics to Lipidomics; Bonner Forum Biomedizin; 30. Juni – 01. Juli 2006, Bonn, Deutschland.

Julia Grabitzki, Michael Ahrend, Rudolf Geyer and Günter Lochnit “Identification of phosphorylcholine substituted proteins in differential developmental stages *Caenorhabditis elegans*“ From Proteomics to Lipidomics; Bonner Forum Biomedizin; 30. Juni – 01. Juli 2006, Bonn, Deutschland.

Birger Wenige, Heinz Bönisch, Julia Grabitzki, Günter Lochnit, Brigitte Schmitz and Michael Ahrend “Separation of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis using cationic rehydrated strips“ From Proteomics to Lipidomics; Bonner Forum Biomedizin; 30. Juni – 01. Juli 2006, Bonn, Deutschland.

Julia Grabitzki, Michael Ahrend, Rudolf Geyer and Günter Lochnit “Dissecting of phosphorylcholine-modified proteins in different developmental stages of *Caenorhabditis elegans*” 3rd Summer School in Proteomic Basics “Exploring the diversity of proteins”, 13.08.-19.08.2006 in Brixen/Bressanone, Italien.

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 <i>Caenorhabditis elegans</i>	1
1.1.1 Morphologie, Entwicklung und Lebenszyklus von <i>C. elegans</i>	1
1.1.2 <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellsystem.....	3
1.2 Posttranslationale Modifikationen bei Nematoden.....	4
1.3 Proteomics.....	5
1.4 Proteinmodifikationen.....	8
1.4.1 Phosphorylcholin - eine posttranslationale Modifikation mit immunmodulatorischer Funktion	8
1.4.1.1 Biosynthese von PC.....	11
1.4.1.2 Funktionen von PC.....	12
1.4.2 Modifikation an Serin und Threonin mit <i>N</i> -Acetylglucosamin - eine posttranslationale Modifikation mit regulierenden Funktionen.....	15
1.4.2.1 Biosynthese von O-GlcNAc.....	15
1.4.2.2 „Yin-Yang“-Hypothese.....	16
1.4.2.3 Funktionen von O-GlcNAc.....	17
1.5 Problemstellung.....	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.2 Chemikalien.....	21
2.3 Methoden.....	22
2.3.1 Kultivierung von <i>C. elegans</i> auf Agarplatten.....	22
2.3.1.1 Kultivierung mit <i>Escherichia coli</i> als Nährboden	22
2.3.1.2 Kultivierung mit hühnereihaltigem Nährboden	23
2.3.2 Aufreinigung der <i>C. elegans</i>	23
2.3.3 Gewinnung von Eiern aus <i>C. elegans</i>	24
2.3.4 Synchronisierung der einzelnen Stadien von <i>C. elegans</i>	24
2.3.5 Proteinbestimmung.....	24
2.3.6 Proteinisolation.....	25
2.3.7 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	26
2.3.7.1 Erste Dimension	26
2.3.7.2 Zweite Dimension.....	29
2.3.8 Western Blot.....	30
2.3.9 Proteinfärbung.....	32
2.3.9.1 Proteinfärbung mit Imperial Stain	32

2.4.9.2 Proteinfärbung mit Massenspektrometrie (MS)-kompatibler Silberfärbung.....	33
2.4.10 Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel.....	33
2.4.11 Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight Massenspektrometrie.....	34
3. Ergebnisse.....	35
3.1 Das PCom von <i>C. elegans</i>	35
3.2 Das O-GlcNAcom von <i>C. elegans</i>	54
3.3 Gemeinsamkeiten der O-GlcNAc und PC-Modifikation an Proteinen von <i>C. elegans</i>	71
4. Diskussion.....	72
4.1 Methodenoptimierung der 2D-SDS-PAGE und massenspektrometrischer Identifizierung von <i>C. elegans</i>	72
4.2 Proteomstudien zu posttranslationalen Modifikationen.....	74
4.2.1 PCom.....	76
4.2.2 O-GlcNAcom.....	78
4.3 Ausblick.....	78
5. Zusammenfassung.....	81
6. Summary.....	83
7. Literatur.....	84
8. Anhang.....	95

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines adulten Hermaphroditen von <i>C. elegans</i>	1
Abb. 2: Lebenszyklus von <i>C. elegans</i>	2
Abb. 3: Struktur von Phosphorylcholin.....	5
Abb. 4: Vernetzung der Methoden zur Identifizierung von Proteinen aus 2D-SDS-PAGE, deren Charakterisierung und Lokalisation von posttranslationalen Modifikationen.....	7
Abb. 5: Vorkommen PC-haltiger Glykosphingolipide der Arthroserie.....	9
Abb. 6: Postulierte Struktur für PC-haltige N-Glykane von <i>A. viteae</i> , <i>C. elegans</i> , <i>T. spiralis</i> , <i>O. gibsoni</i> und <i>O. volvulus</i>	10
Abb. 7: Kennedy- und Bremer-Greenberg Stoffwechselweg: Synthese von Phosphatidylcholin.....	12
Abb. 8: Signalübertragung durch den B-Zell-Rezeptor.....	14
Abb. 9: Hexosemonophosphatweg zur Synthese von O-GlcNAc.....	16
Abb. 10: „Yin-Yang“-Beziehung.....	17
Abb. 11: Auftrennung von <i>C. elegans</i> -Proteinen aus Stadiengemischen durch zweidimensionale Gelelektrophorese.....	36
Abb. 12: Identifizierung des PC-modifizierten Proteins 2-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (<i>enol-1</i>) (Spot 72) von <i>C. elegans</i>	37
Abb. 13: Auftrennung von <i>C. elegans</i> Proteinen verschiedener Stadien des N2-Stammes durch zweidimensionale Gelelektrophorese.....	40
Abb. 14: Zelluläre Lokalisation der PC-modifizierten Proteine von <i>C. elegans</i> des N2-Stammes.....	42
Abb. 15: Funktionelle Klassifikation von PC-modifizierten Proteinen von <i>C. elegans</i> für das Gemisch aus allen Stadien des N2-Stammes und des TKO-Stammes, des Eistadiums, des Dauerlarvenstadiums, des L4 und des adulten Stadiums.....	43
Abb. 16: <i>C. elegans</i> -Proteine des N2-Stammes nach Auftrennung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese.....	54
Abb. 17: Identifizierung des O-GlcNAc-modifizierten Proteins Arginin/Creatin-Kinase (Spot 51) von <i>C. elegans</i>	56
Abb. 18: Zelluläre Lokalisation der O-GlcNAc-modifizierten Proteine von <i>C. elegans</i> aus allen Entwicklungsstadien.....	58
Abb. 19: Funktionelle Klassifikation von O-GlcNAc-modifizierten Proteinen von <i>C. elegans</i> aus allen Entwicklungsstadien.....	60
Abb. 20: Multiple isoelektrische Formen von VIT-6 und GPD-2.....	71
Abb. 21: PC-Epitope in Nematoden.....	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Identifizierte PC-modifizierte Strukturproteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i>	44
Tabelle 2: Identifizierte PC-modifizierte Signaltransduktionsproteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i>	45
Tabelle 3: Identifizierte PC-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i> , die an der Proteinsynthese/Translation beteiligt sind.....	47
Tabelle 4: Identifizierte PC-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i> , die der Funktionsgruppe Chaperone zugeordnet werden.....	48
Tabelle 5: Identifizierte PC-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i> , die am Energie-/Redoxstoffwechsel beteiligt sind.....	49
Tabelle 6: Identifizierte PC-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i> , die am Proteinstoffwechsel beteiligt sind.....	50
Tabelle 7: Identifizierte PC-modifizierte metabolische Proteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i>	51
Tabelle 8: Identifizierte PC-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i> , die keiner Funktionsgruppe zugeordnet werden konnten.....	53
Tabelle 9: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Strukturproteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i>	61
Tabelle 10: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte metabolische Proteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i>	62
Tabelle 11: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i> , die an der Proteinsynthese/Translation beteiligt sind.....	64
Tabelle 12: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Signaltransduktionsproteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i>	65
Tabelle 13: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i> , die am Proteinstoffwechsel beteiligt sind.....	66
Tabelle 14: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i> , die am Energie/Redoxstoffwechsel beteiligt sind.....	67
Tabelle 15: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i> , die zu den Chaperonen gezählt werden.....	68
Tabelle 16: Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i> , deren Funktion unbekannt ist.....	69
Tabelle 17: Zugeordnete und nicht zugeordnete Peptide der identifizierten PC-modifizierten Proteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i>	94
Tabelle 18: Zugeordnete und nicht zugeordnete Peptide der identifizierten O-GlcNAc-modifizierten Proteine der Entwicklungsstadien von <i>C. elegans</i>	98

Abkürzungen

A	adult
Abb.	Abbildung
<i>A. viteae</i>	<i>Acanthocheilonema viteae</i>
ACN	Acetonitril
AMPS	Ammoniumperoxidsulfat
<i>A. suum</i>	<i>Ascaris suum</i>
ÄSS	Äquilibrierungsstammlösung
BCR	B-Zell-Rezeptor
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CRP	C-reaktives Protein
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DL	Dauerlarve
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
ECL	Chemilumineszenz
ES	exkretorisch-sekretorisch
ESI	Elektrospray-Ionisierung
ESI-IT-MS	Elektrospray-Ionisierung-Ion Trap-Massenspektrometer
Etn	Ethanolamin
etc	etcetera
g	Gramm
ggf	gegebenenfalls
Ig	Immunglobulin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
Gal	Galaktose
GFAT	Glutamin/Fruktose-6-Phosphat Amidotransferase
Glc	Glukose
GlcNAc	2-Acetamino-2-deoxy-D-Glukose (<i>N</i> -Acetylglucosamin)
HCCA	α -Cyano-4-hydroxymizsäure
H ₂ O	Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatografie
HRP	Horse raddish peroxidase
HSP	Hitzeschockprotein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter PH-Gradient
kDa	Kilodalton

Abkürzungen

L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
μ	Mikro
mA	Milliampere
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight Massenspektrometer
Man	Mannose
mL	Milliliter
MS	Massenspektrometer
O-GlcNAc	O-gebundenes <i>N</i> -Acetylglucosamin
O-GlcNAcase	O-GlcNAc-Hydrolase
OGT	O-GlcNAc Transferase
<i>O. gibsoni</i>	<i>Onchocerca gibsoni</i>
<i>O. volvulus</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>
P	Prolin
PC	Phosphorylcholin
PDI	Proteindisulfidisomerase
PI-3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PUGNAc	<i>O</i> -(2-amido-2-deoxy- <i>D</i> -gluko-pyranosylidene)amino- <i>N</i> - phenylcarbamate
S	Serin
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat/Polyacryamid Gelelektrophorese
slg	antigenbindende Einheit
T	Threonin
TEMED	<i>N,N,N,N</i> - Tetramethylethylendiamin
TKO	Triple knock out
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
<i>T. spiralis</i>	<i>Trichinella spiralis</i>
u.a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
v/v	volume/volume
V	Volumen
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
2D	zweidimensional

1 Einleitung

1.1 *Caenorhabditis elegans*

1.1.1 Morphologie, Entwicklung und Lebenszyklus von *C. elegans*

Caenorhabditis elegans haben zylindrische bis fadenförmige Gestalt und werden von einer transparenten Kutikula umgeben, deren einzelne Schichten aus der Hypodermis, der Basalzzone, einer medialen Zone und der kortikalen Zone bestehen. Die kortikale Zone und die basale Zone sind unterbrochen durch Verstrebungen (mediale Zone), gelegen zwischen den Reihen der Annulae. Die basale Schicht besteht aus einer amorphen und zwei fibrillären Schichten, die entgegengesetzt spiralg um den ganzen Wurm verlaufen. Die Basalzzone, die mediale Zone und der innere Teil der kortikalen Schicht sind hauptsächlich kollagenös. Der äußere Teil der kortikalen Schicht enthält hauptsächlich nicht-kollagenöse Proteine, Lipide und Kohlenhydrate in der Epikutikula. Der Darm besteht aus drei Abschnitten, dem ektodermalen, mit einer Kutikula ausgekleideten Vorder- und Enddarm, zwischen denen sich der wenig differenzierte endodermale Mitteldarm erstreckt. Die Atmung erfolgt über die Haut. Es existiert ein einfaches Zentralnervensystem, welches sowohl aus mehrfachen Ganglien und Nervenfasern, die den Pharynx umschließen, besteht, sowie dem ventralen Markstrang. Als Mechano- bzw. Chemorezeptoren dienen die Sensillen, die Sinnesorgane der Nematoden.

Adulte Würmer sind im Durchschnitt 2 mm lang. Eier, die Embryonen enthalten, sind durchschnittlich 50 µm groß (Abb. 1). Nur 0,3 % der *C. elegans* sind Männchen, die Mehrzahl Hermaphroditen. Diese haben eine auf 959 begrenzte Zellzahl, von denen 302 Nervenzellen sind. Die Hermaphroditen besitzen zwei Gonadenarme, die in einen gemeinsamen Uterus münden. Strukturell ist der adulte Wurm ein Weibchen mit gespeichertem Sperma, das im späten L4-Larvenstadium produziert wird.

Der Entwicklungszyklus von *C. elegans* beträgt 3 Tage, seine Lebensspanne 14 Tage. Die Eier von *C. elegans* können für ungefähr 25 Jahre in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden, ohne dass sie ihre Lebensfähigkeit verlieren.

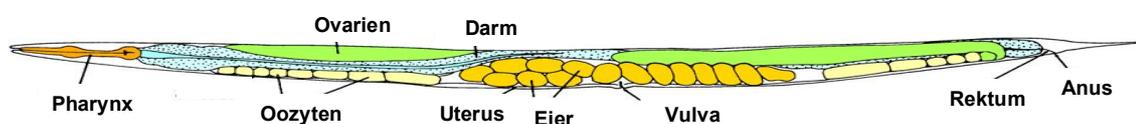


Abb. 1: Schematische Darstellung eines adulten Hermaphroditen von *C. elegans*

C. elegans durchläuft vier Larvenstadien (L1, L2, L3 und L4), die nach den jeweiligen Häutungen unterschieden werden, bis er sein adultes Stadium erreicht. Bis zum Ende der Gastrulation verbleibt der Embryo im Uterus und wird anschließend auf das Habitat abgelegt. Der Embryo schlüpft nach 14 Stunden (L1) und häutet sich zum ersten Mal nach 25 Stunden (L2). Nach 32 Stunden ist die Entwicklungsstufe der Larve 3 (L3) erreicht, nach 40 Stunden erfolgt die vierte Häutung (L4). Der adulte, geschlechtsreife Wurm erreicht nach 50 Stunden seine „Vollendung“.

Bei Nahrungsmangel ist *C. elegans* in der Lage, nach dem L2-Stadium als sogenannte Dauerlarve bis zu 3 Monaten in der Entwicklung zu stagnieren und so zu überleben. Die Lebensdauer kann in der Form bis auf das 10-fache erweitert werden. Ist wieder ausreichend Nahrung vorhanden, beendet der Nematode das Dauerlarvenstadium und entwickelt sich bis zu seinem adulten Stadium weiter (Abb. 2).

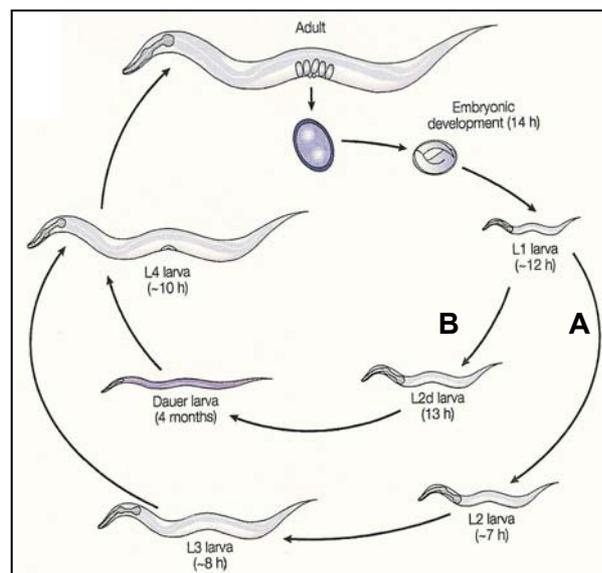


Abb. 2: Lebenszyklus von *C. elegans*

A, Entwicklungszyklus von *C. elegans* vom Eistadium über die vier Larvenstadien bis zum adulten Stadium. Bei Nahrungsmangel entwickelt sich der Nematode über L2 in eine Dauerlarve (DL) (B). Sobald wieder genügend Nahrung vorhanden ist, entwickelt sich der Wurm über L4 zu seinem adulten Stadium.

Der adulte *C. elegans* kann als Hermaphrodit mit der Produktion von Embryonen durch Selbstbefruchtung beginnen. Die Entwicklung des Geschlechtsapparates beginnt durch Teilungsvorgänge des Primordiums während des L1-Stadiums und findet ihren Abschluss bei der Entstehung von geschlechtsreifen Nematoden. Die Spermatogenese hingegen beginnt erst im L4-Stadium. Die Nachkommenschaft eines Hermaphroditen ist auf die Anzahl der vorhandenen Spermien im Gonadengang beschränkt. Jeder der zwei Gonadenarme bildet 150 Spermien, folglich können bis zu 300 Nachkommen

produziert werden. Wird ein Hermaphrodit allerdings durch einen männlichen *C. elegans* befruchtet, kann die Nachkommenschaft auf das Dreifache gesteigert werden.

1.1.2 *Caenorhabditis elegans* als Modellsystem

Sidney Brenner kultivierte als genetisches Modellsystem die N2-Linie des Bristol-Stammes von *C. elegans* (Brenner 1974), der 1965 als Wildtyp-Referenz definiert wurde. 1967 verwendeten Brenner und White den frei lebenden, nicht-pathogenen Bodennematoden *C. elegans* als Tiermodell für genetische, morphologische und Verhaltensstudien eines einfachen Nervensystems. Bereits Mitte der 1970er wurde die Entwicklung auf zellulärer Ebene beschrieben. Es wurde das 97 Millionen Basenpaare zählende Genom von *C. elegans* entschlüsselt. Mehr als 19 000 Gene wurden detektiert (*C. elegans* Consortium 1998). Diese Daten wurden inzwischen in der WormBase Datenbank für die Modellorganismen *C. elegans* und *Caenorhabditis briggsae* (Chen *et al.* 2005) zusammengefasst. Die Datenbank integriert viele Ergebnisse aus Publikationen rund um die Nematoden und wird regelmäßig mit neuesten Erkenntnissen aktualisiert. Neben *Drosophila melanogaster* ist *C. elegans* einer der wissenschaftlich interessantesten Modellorganismen dieser Zeit geworden. In dieser Arbeit wurde neben dem Bristol-Stamm N2 auch der TKO (triple knock-out)-Stamm, bei dem die GlcNAc-Transferase I ausgeschaltet ist, verwendet. Ein Vorteil der Nematoden ist, sie einfach und in großer Zahl reproduzieren und kultivieren zu können. Die stark konservierten Homologien zwischen den Nematodenarten prädestinieren den Nematoden als Stellvertreter für die Untersuchung von Biomolekülen, die für das Überleben und die Differenzierung bei parasitischen Nematoden eine Rolle spielen. Allerdings findet er nicht nur Verwendung als prototypisches Modell für parasitäre Nematoden, sondern spielt ebenfalls als Modellorganismus im biomedizinischen Bereich bei der Untersuchung von Embryonen, der Apoptose, der Alterungsgene und des Alterns, in den Neurowissenschaften sowie bei der Untersuchung von Krebserkrankungen (z.B. Leukämie) eine wichtige Rolle (Chen *et al.* 2005). Seit Anfang 2000 erobert *C. elegans* sogar den Weltraum. Die NASA nutzt u.a. diesen Modellorganismus um Verhaltens- und Entwicklungsstudien im Weltraum durchzuführen (<http://weboflife.nasa.gov/celegans/>).

1.2 Posttranslationale Modifikationen bei Nematoden

Die identifizierte Genomsequenz (*C. elegans* Consortium 1998) von *C. elegans* und die Nutzung der Wormbase (www.wormbase.org) ermöglichten die Forschung in vielen neuen Bereichen: RNAi (Hannon 2002; Kamath *et al.* 2003; Kim *et al.* 2005; Sönnichsen *et al.* 2005), Genexpressionsanalysen (Jones *et al.* 2001; Jones *et al.* 2005), Proteininteraktion und posttranslationale Modifikationen (Altmann *et al.* 2001; Schachter *et al.* 2002; Fan *et al.* 2005).

Viele posttranslationale Modifikationen sind verantwortlich für die große Anzahl an Überlebensstrategien parasitärer Nematoden in ihren Wirtsorganismen. Die Kutikula des Parasiten spielt hierbei eine große Rolle für die Manifestierung im infizierten Wirt. Die Oberfläche der Nematoden verändert sich während ihrer Individualentwicklung. Sie muss sich den äußeren Einflüssen und seiner Entwicklung anpassen können, damit der Parasit überleben kann. So kommt es zu stadienspezifischer Exprimierung und Ausprägung von Modifikationen (z.B. Glykosylierungen oder Phosphorylierungen) bis hin zu Gestaltveränderungen (Cox *et al.* 1981; Cox *et al.* 1981; Bulik *et al.* 2002; Tabuse *et al.* 2004). Durch „molekulares Mimikry“ (Damian 1964) kann die Kutikula so gestaltet werden, dass wirtsähnliche Moleküle an der Oberfläche positioniert werden. Daneben binden bei der „Maskierung“ Oberflächenstrukturen Moleküle des Wirtes, die somit vorhandene Antigene überdecken (Blaxter 1993). Bestimmte Parasiten (*Brugia malayi*, *Trichinella spiralis*, *Achantocheilonema viteae*) verfügen über Antigene oder setzen exkretorische-sekretorische Produkte (ES-62 von *A. viteae*; ASP-6 von *C. elegans*) frei (Ackerman *et al.* 2003; Harnett *et al.* 2004; Meyer *et al.* 2005; Lochnit *et al.* 2006).

Glykosylierungen sind neben Phosphorylierungen die am häufigsten vorkommenden posttranslationalen Modifikationen. Die kohlenhydratvermittelte Interaktion zwischen Zellen und deren Umwelt sind nicht nur wichtig für die Differenzierung, Signaltransduktion, Embryogenese, Entzündung und Immunität (Cipollo *et al.* 2002; Wells *et al.* 2003; Cipollo *et al.* 2005), sondern sind auch für die Kommunikation und die Interaktion zwischen Parasit und Wirt verantwortlich. Diese Glykokonjugate helfen dem Parasiten, den Wirt zu erkennen und sich an diesen zu binden. Allerdings können sie auch ein Erkennungsmerkmal für das Immunsystem des Wirtes sein, um Abwehrreaktionen zu induzieren.

Bei Glykanen unterscheidet man je nach Bindung ans Peptidrückrat zwischen N- und O-Glykanen. Erfolgt die Bindung der Glykane an die freie Aminogruppe von Asparagin, spricht man von N-Glykanen. O-Glykane sind hingegen mit der Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin verknüpft (Schachter 2000; Merry *et al.* 2002). Veränderungen bei

der N- oder auch O-Glykosylierung können zu Störungen in der Entwicklung führen (Helenius *et al.* 2001; Royle *et al.* 2002; Schachter *et al.* 2002; Kamemura *et al.* 2003; Helenius *et al.* 2004; Schmitt *et al.* 2004).

Cipollo *et al.* (2005) konnten bei ihren Untersuchungen an *C. elegans* zeigen, dass es einen stadienspezifischen Verlauf der N-Glykan-Biosynthese bei *C. elegans* gibt. Es wurden N-Glykane identifiziert, die mit Phosphorylcholin (PC) substituiert waren (Abb. 3). Mittels dieser Modifikation ist der Nematode in der Lage, das Immunsystem des Wirtes zu modulieren und ihm so zu entgehen. Parasitäre sowie nicht-parasitäre Nematoden weisen PC-Modifikationen auf (Cipollo *et al.* 2005). Immunhistochemische Studien von Gerdt *et al.* (1999) belegten bei *C. elegans* eine embryonal- und postembryonal-spezifische Expression von PC-substituierten Glykosphingolipiden. (Gerdt *et al.* 1999).

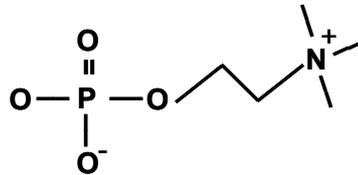


Abb. 3: Struktur von Phosphorylcholin

Viele posttranslationale Modifikationen sind bei Nematoden nicht nur essentiell für das Überleben im Wirt, sondern haben auch wichtige Funktionen in der Regulation vieler zellulärer Prozesse (Signaltransduktion, Differenzierung, Entwicklung, Zellkontrolle und Metabolismus) (Chen *et al.* 2004; Loyet *et al.* 2005). Phosphorylierungen spielen hierbei eine entscheidende Rolle. Sie sind u.a. verantwortlich für das Aktivieren von Proteinen und von zellulären Wegen. Kinasen und Phosphatasen sind verantwortlich für die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen (Hunter 1995; Loyet *et al.* 2005).

1.3 Proteomics

Der Australier Marc Wilkins prägte 1995 (Wilkins *et al.* 1997) den Begriff „Proteom“, der das gesamte Proteinäquivalent eines Genoms bezeichnet. Dieser Begriff umschreibt das vollständige Proteinmuster einer Zelle, eines Organismus oder einer komplexen Körperflüssigkeit. Ein Proteom reflektiert die Proteinexpression und ist somit ein sehr dynamisches Gebilde (Dove 1999). Unterschiedliche intra- sowie extrazelluläre Bedingungen führen zur Bildung unterschiedlicher Proteinmuster, so dass eine Proteomanalyse einen „Schnappschuss“ des zellulären Funktionszustandes darstellt.

Die differenzielle Proteomanalyse erlaubt es, einen Einblick in verschiedene zelluläre Lebensvorgänge unter bestimmten Bedingungen zu gewinnen. Im Gegensatz zum Proteom ist das Genom ein statisches Gebilde, das durch die genaue Abfolge, Art und Anzahl der Nukleotide definiert ist (Lottspeich 1999).

Das Konzept der Proteomanalytik basiert auf der Technik der Proteintrennung. O'Farrell (1975) entwickelte die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-SDS-PAGE). Die erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung) trennt Proteine nach dem isoelektrischen Punkt, die Trennung nach dem Molekulargewicht erfolgt anschließend in der zweiten Dimension (SDS-PAGE). Seit über 20 Jahren ist die 2D-SDS-PAGE das Instrument, um komplexe Proteingemische zu trennen. Sie erlaubt es, verschiedene Proteine zu visualisieren und sie somit identifizierbar zu machen. Obwohl auch mRNAs viele Informationen über das An- und Ausschalten von Genen liefern, kann man durch mRNAs keine Zusammenhänge von Proteinprozessen, Degradationen, translationalen Kontrollen und posttranslationalen Modifikationen von Proteinen erhalten (Lottspeich 1999). Molekularbiologische Methoden reichen daher nicht aus, um die multiplen, komplexen biologischen Prozesse genauer zu entschlüsseln. Aus diesem Grund ist die Proteomanalytik ein unerlässliches Instrument in der Forschung geworden.

Seit der Entwicklung der 2D-SDS-PAGE etablierten sich immer neue und sensitivere Techniken und Methoden. In den 1980er Jahren wurde die Proteinanalytik durch die Edman-Sequenzierung erweitert, die eine terminale Aminosäuresequenzierung von Proteinen erlaubt (Edman *et al.* 1967; Thiede *et al.* 1977). Die Massenspektrometrie erfuhr in den 1990ern eine rapide Entwicklung. Zwei Techniken wurden erfolgreich in der Proteinanalytik etabliert: ESI-MS (Elektrospray-Ionisation-Tandem-Massenspektrometrie) und MALDI-TOF-MS (Matrix-assisted desorption/ionisation time-of-flight Massenspektrometrie) (Patterson 1994; Lehmann 1996) erlauben eine sehr hohe Präzision in der Messung der durch Spaltung von Proteinen mittels Endopeptidasen resultierenden Peptide. Mit Hilfe dieser Peptidmassen ist ein Vergleich mit verschiedenen Sequenzdaten der Genomprojekte in der Datenbank möglich. Diese Technik des „Peptid-Fingerprinting“ ist vor allem für solche Organismen geeignet, deren Genom bekannt, cDNAs verfügbar sind oder Proteine bereits sequenziert wurden (Ziv *et al.* 2000). Mittlerweile gibt es neben den Gendatenbanken verschiedene Proteinsequenzdatenbanken (z.B. Swissprot, TrEMBL, MSDB), welche die Identifizierung der Proteine bzw. Peptide ermöglichen.

In den letzten beiden Jahren wurde der Membranverdau (Dufresne-Martin *et al.* 2005) entwickelt und optimiert und findet in der Praxis immer häufiger Anwendung. Es gibt mittlerweile Färbemethoden und Farbstoffe, die es ermöglichen, Proteine mit einer Absolutmenge kleiner als 50 ng zu detektieren [z.B. Fluoreszenzfarbstoffe (Ge *et al.*

2004; Wang *et al.* 2005)]. Computerunterstützte Vergleiche von Proteinmustern mit Hilfe entsprechender Softwareprogramme (z.B. ProteomeWeaver, PDQuest, Bio Rad) erleichtern die Zuordnung und Vergleichbarkeit von verschiedenen 2D-SDS-PAGES und deren Proteine. Die Entwicklung neuer Geräte, mit denen die Automatisierung von Arbeitsschritten ermöglicht wird, hält immer mehr Einzug in die Proteomanalytik. Die Kopplung von Kapillar-HPLC und ESI MS/MS (Lochnit *et al.* 2004; Fandino *et al.* 2005) oder MALDI-TOF-MS (Hattan *et al.* 2005; Zucht *et al.* 2005), die Etablierung von 2D-HPLC oder LC-PAGE (Hata *et al.* 2006; Ikegami *et al.* 2006) zur besseren Trennung von Proteinen und Peptiden, „Spotpicker“ (z.B. ExQuest, Bio Rad) zum Ausschneiden von Proteinspots aus Gelen, „Digester“ (z.B. Microstar, Hamilton) zum Verdau von zuvor ausgeschnittenen Proteinsspots, sowie einen „Spotter“ zum direkten Auftrag von Peptidlösungen auf MALDI-Targets sind einige wichtige Beispiele. In Abbildung 4 ist die Vernetzung der Methoden zur Identifizierung von Proteinen aus 2D-SDS-PAGE zu sehen.

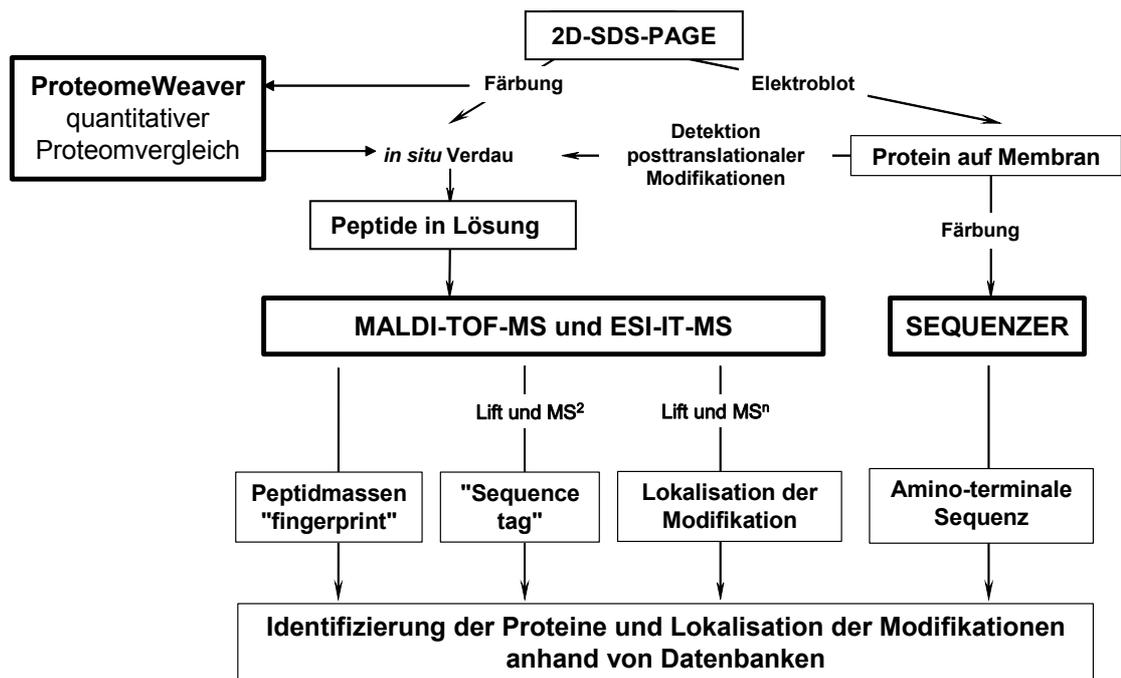


Abb. 4: Vernetzung der Methoden zur Identifizierung von Proteinen aus 2D-SDS-PAGE, deren Charakterisierung und Lokalisation von posttranslationalen Modifikationen.

1.4 Proteinmodifikationen

Ein wichtiger Bereich der Proteomanalytik ist die Analyse von Proteinmodifikationen. Viele Proteine werden während oder nach ihrer Synthese prozessiert. Das ist nicht nur strukturell für das Protein von Bedeutung, sondern hat auch Einfluss auf seine Funktion, seine subzelluläre Lokalisation und seine Interaktion mit anderen Makromolekülen (Lottspeich 1999).

Proteinmodifikationen lassen sich nach dem Zeitpunkt der Entstehung in drei verschiedene Klassen einteilen: Prätranslational, Cotranslational und Posttranslational. Kooperiert Selenocystein und/oder Pyrrolysin mit Aminosäuren der tRNA, spricht man von einer prätranslationalen Modifikation. Einige Modifikationen erfolgen während der Polypeptidsynthese an den Ribosomen, was als cotranslationale Modifikation bezeichnet wird (Thiede *et al.* 2005). Die meisten Proteine allerdings werden erst nach der Faltung modifiziert. Dies wird als posttranslationale Modifikation bezeichnet (Lottspeich 1999; Wollscheid *et al.* 2004). Posttranslationale Modifikationen sind bei heterologen Expressionssystemen verändert oder fehlen häufig völlig. In vielen Fällen ist eine posttranslationale Modifikation Voraussetzung für die Funktion des Proteins.

Posttranslational modifizierte Proteine können auf drei verschiedenen Wegen entstehen: 1. durch proteolytische Spaltung an einem Teil der Peptidsequenz (z.B. Entfernung einer Initiator-Methionin, Signalsequenz, etc.); 2. durch Anknüpfung an eine chemischen Gruppe (z.B. Acetyl-, Phosphoryl-, Glykosylgruppe, etc.) und 3. durch Formierung einer Inter- bzw. Intraeptidbindung (z.B. Disulfidbrückenbindung, Thioesterbindung, etc.) (Pandey *et al.* 2000; Clarks *et al.* 2005; Stults *et al.* 2005).

1.4.1 Phosphorylcholin - eine posttranslationale Modifikation mit immunmodulatorischer Funktion

Phosphorylcholin (PC) (Abb. 3) ist als Pathogenitätsfaktor bei Pro- und Eukaryonten weit verbreitet. 1967 wurde es in der Zellwand von *Streptococcus pneumoniae* in Verbindung mit Polysaccharid-Komponenten erstmals lokalisiert (Tomasz 1967; Harnett *et al.* 1999). Gram-negative Bakterien, Protozoen (Heise *et al.* 1999) und parasitäre Nematoden (Lochnit *et al.* 2000) tragen diese posttranslationale Komponente. Des weiteren wurde PC bei dem Cestoden *Bothriocephalus scorpii* (Fletcher *et al.* 1980) und dem Trematoden *Schistosoma mansoni* (Pery *et al.* 1974) vorgefunden. PC wird an Teichonsäure (Brundish *et al.* 1968), Lipoteichonsäure (Tomasz *et al.* 1975), Lipopolysaccharid (LPS) (Harnett *et al.* 2000), Glykolipiden

(Lochnit *et al.* 1998; Yamada-Hada *et al.* 2004) und Glykoproteinen (Cipollo *et al.* 2002; Houston *et al.* 2004) gebunden.

Durch Untersuchungen zur Lokalisation der PC-Epitope wurden unterschiedliche interne Strukturen nachgewiesen (Choy *et al.* 1991). Die meisten bisher beschriebenen PC-Epitope sind über komplexe N-Glykane gebunden, einige allerdings auch über O-Glykane.

PC-konjugierte Glykosphingolipide wurden bei allen Parasiten und frei-lebenden Nematoden gefunden (Gerdt *et al.* 1997; Dennis *et al.* 1998; Wuhrer *et al.* 2000). Bei *A. suum* sind drei verschiedene Klassen an Glykosphingolipiden nachgewiesen worden: neutrale, saure und zwitterionische Glykolipide. Die neutralen und zwitterionischen Glykolipide gehören der Arthroserie mit der Kernstruktur GlcNAc(β1-3)Man(β1-4)Glc-Ceramid an (Lochnit *et al.* 1998). Die sauren Glykolipide umfassen phosphoinositol- und sulfathaltige Glykosphingolipide. Zwitterionische Glykosphingolipide tragen ein PC oder Phosphorylethanolamin. PC ist dabei an C-6 des N-Acetylglucosamin (GlcNAc), Phosphorylethanolamin dagegen an C-6 der Man als Ester gebunden (Deehan *et al.* 2003). Bei *C. elegans* und *O. volvulus* wurden analoge Glykosphingolipidstrukturen gefunden (Dell *et al.* 1999; Gerdt *et al.* 1999) (Abb. 5).

	<i>C. elegans</i>	<i>A. suum</i>	<i>O. volvulus</i>
PC-6 ₁ GlcNAcβ3Manβ4Glcβ-Cer		+	+
GalNAcβ4GlcNAcβ3Manβ4Glcβ-Cer	+	+	+
Galα3GalNAcβ4GlcNAcβ3Manβ4Glcβ-Cer	+	+	+
Galβ3Galα3GalNAcβ4GlcNAcβ3Manβ4Glcβ-Cer	+	+	
Galα3GalNAcβ4GlcNAcβ3Manβ4Glcβ-Cer		+	

Abb. 5: Vorkommen PC-haltiger Glykosphingolipide der Arthroserie (Lochnit *et al.* 2000)

Bei *A. viteae* wurde ein 62 kDa schweres exkretorisch-sekretorisches (ES)-PC-modifiziertes Protein gefunden. Dieses liegt im Darm des Parasiten vor und wird an die Umgebung abgegeben. Nachweisbar ist ES-62 ab dem 8. Tag nach erfolgter Infektion im L4 Larvenstadium (Houston *et al.* 2004). PC ist über N-Glykane an das Protein gebunden. Massenspektrometrische Strukturanalysen haben weiterhin gezeigt, dass die PC-substituierten N-Glykane von ES-62 aus Trimannosylkernstrukturen zusammengesetzt sind, die teilweise fucosyliert vorliegen können. Als Bindungspartner

des PC wurde der terminale *N*-Acetylglucosaminrest gezeigt (Haslam *et al.* 1997). Analoge Befunde wurden auch bei *O. volvulus* und *O. gibsoni* erhoben. Charakteristisch war dabei eine Kernfucosylierung bei *A. viteae*, und *O. gibsoni*, wohingegen die N-Glykane von *O. volvulus* hauptsächlich nicht-fucosyliert waren (Harnett *et al.* 1999; Lochnit *et al.* 2000) (Abb. 6).

Obwohl *C. elegans* viele Proteine besitzt, die PC-modifiziert sind, gibt es nur ein PC-substituiertes Protein im Überstand. Dieses Protein konnte als Aspartylprotease ASP-6 identifiziert werden. ASP-6 ist 40 kDa schwer und wird im Verlauf der Entwicklung von *C. elegans* verstärkt exprimiert (Lochnit *et al.* 2006). Die höchste Expression erreicht dieses Protein im adulten Stadium (Tabuse *et al.* 2004). Im Gegensatz zu ES-62 wird ASP-6 nicht über ein N-Glykan gebunden, sondern ist entweder über ein O-Glykan gebunden oder direkt mit der Polypeptidkette verknüpft (Lochnit *et al.* 2006). Über ein O-Glykan ist das ES-Produkt von *O. gibsoni* verknüpft (MacDonald *et al.* 1996).

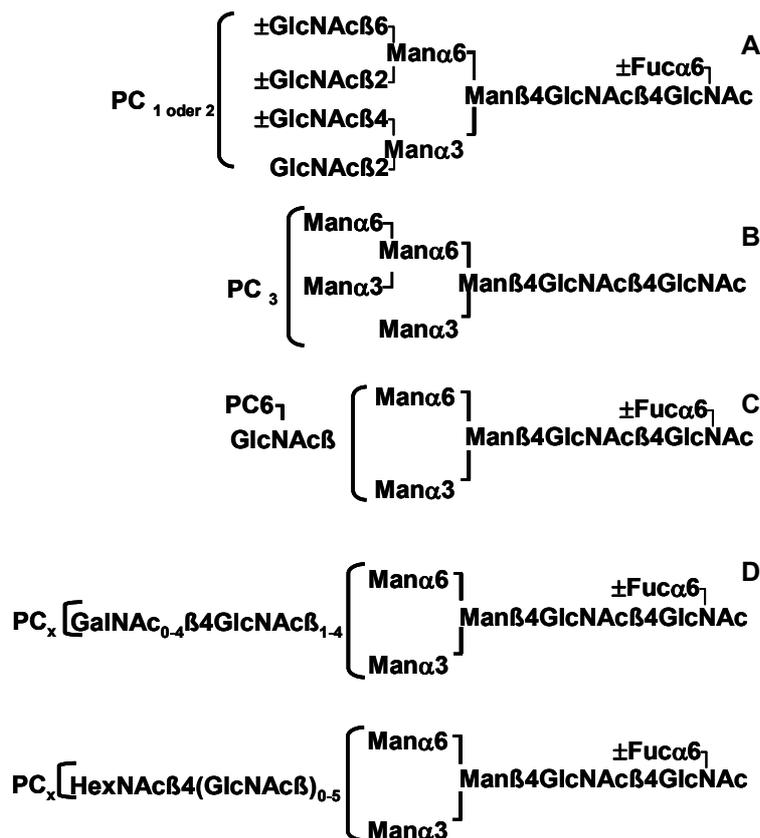


Abb. 6: Postulierte Struktur für PC-haltige N-Glykane von *A. viteae* (A), *C. elegans* (B), *T. spiralis* (C), *O. gibsoni* und *O. volvulus* (D) (Lochnit *et al.* 2000; Haslam *et al.* 2003).

Die massenspektrometrische Analyse der PC-substituierten Moleküle ist oft schwierig aufgrund des zwitterionischen Charakters von PC. Die Fragmentierung von PC-Substituenten ist sehr spezifisch und unabhängig von der Verknüpfung des PC an

die Kernstruktur (Esterbindung von Glykosphingolipiden, Diazophenylkomponenten oder Amidatverbindungen). PC-tragende Glykosphingolipide und PC-modifizierte Proteine zeigen eine charakteristische Fragmentierung im MALDI-TOF-MS und ESI-IT-MS durch den Verlust der Trimethylamingruppe. Der Verlust der Trimethylamingruppe erfolgt aufgrund der Hoffmann-Eliminierung und der Bildung eines zyklischen Phosphates (Friedl *et al.* 2000; Wuhrer *et al.* 2000; Friedl *et al.* 2003; Grabitzki *et al.* 2005).

1.4.1.1 Biosynthese von PC

Die Biosynthese von PC-substituierten Proteinen wurde anhand von ES-62 von *A. viteae* näher untersucht (Harnett *et al.* 2004). Der PC-Transfer erfolgt während der Proteinsynthese zwischen der 40. und 60. Minute. Aufgrund verschiedener Studien mit unterschiedlichen Inhibitoren wurde gezeigt, dass die Bindung des PC an das Protein ein posttranslationaler Prozess im medialen Golgi-Apparat ist. Abhängig ist dieser Vorgang von den Akzeptorstrukturen Man₅GlcNAc₃, oder Man₃GlcNAc₃. Die Bindung von PC an ES-62 kann durch Tunicamycin, einen Inhibitor der N-Glykosylierung von Proteinen, durch Brefeldin A, das den Transport des synthetisierten Proteins vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat hemmt und 1-Deoxynorjirimycin, einen Inhibitor der Mannosidase I im cis-Golgi, blockiert werden. Swainsonin, ein Inhibitor der Mannosidase II des medialen Golgi-Apparates, weist dagegen keinen blockierenden Effekt auf (Houston *et al.* 1996).

Die Biosynthese von PC-substituierten Oligosacchariden von *C. elegans* wurde von Cipollo *et al.* (2004) untersucht. PC aus Dauerlarven von *C. elegans* wird von dem Donor Phosphatidylcholin auf komplexe mannosereiche N-Glykane übertragen. Die Übertragung des PC von Phosphatidylcholin auf Akzeptorstrukturen findet im Golgilumen statt (Cipollo *et al.* 2004).

Die Synthese von Phosphatidylcholin bei Eukaryoten erfolgt vor allem auf der cytosolischen Seite des glatten ER über den Kennedy-Stoffwechselweg. Bei *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass neben dem Kennedy-Stoffwechselweg auch noch ein zweiter, der Bremer-Greenberg Stoffwechselweg, existiert (Lochnit *et al.* 2003).

Beim Kennedy-Stoffwechselweg wird der γ -Phosphatrest von ATP mittels Cholin kinase (E.C.2.7.1.32) auf Cholin übertragen. Das entstandene PC wird zusammen mit CTP unter Abspaltung von Pyrophosphat durch die CTP:Phosphorylcholin-Cytidyltransferase (E.C.2.7.7.15) zu CDP-Cholin umgesetzt. Danach wird der PC-Rest durch die CDP-Cholin:Cholinphosphotransferase (E.C.2.7.8.2) auf 1,2-Diacylglycerin

übertragen (Houston *et al.* 2002) (Abb. 6). Beim Bremer-Greenberg Stoffwechselweg entsteht Phosphatidylcholin über enzymatische Methylierung und Verwendung von S-Adenosyl-Methionin als Methylgruppendonator. Ethanolamin (Etn) wird durch Übertragung des γ -Phosphatrestes von ATP über Phospho-Etn zu CDP-Etn. Nach Abspaltung von Pyrophosphat entsteht Phosphatidyl-Etn (Lochnit *et al.* 2003; Lochnit *et al.* 2005) (Abb. 7).

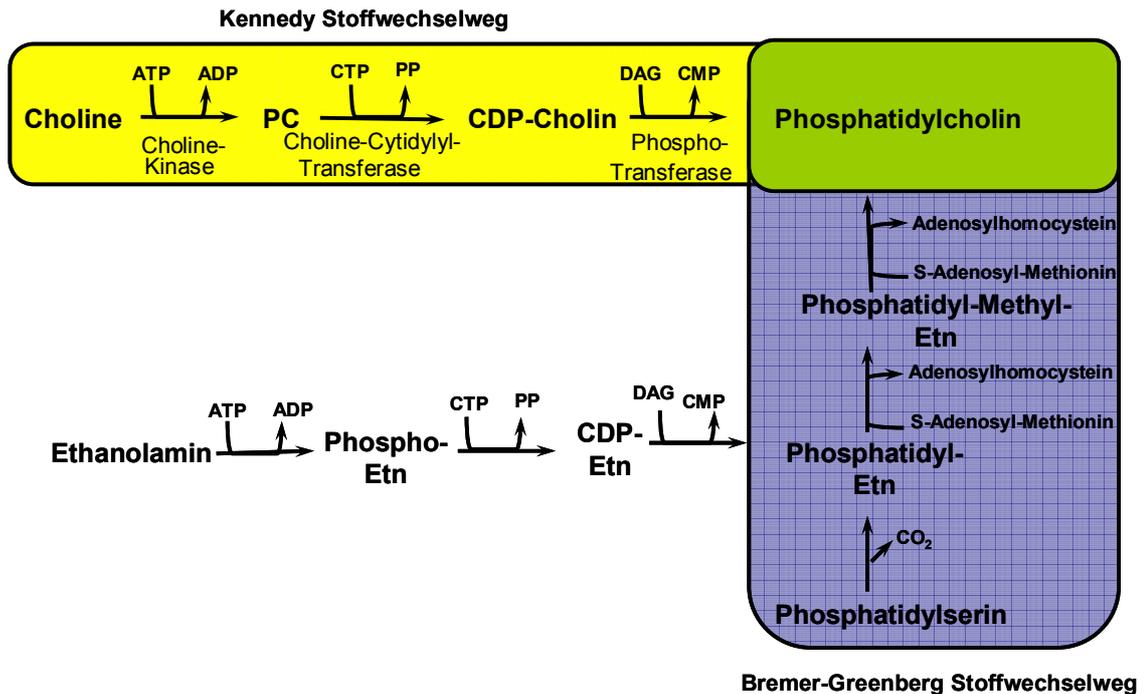


Abb. 7: Kennedy- und Bremer-Greenberg Stoffwechselweg: Synthese von Phosphatidylcholin (Lochnit *et al.* 2003)

1.4.1.2 Funktionen von PC

Parasitäre Nematoden haben während der Evolution Mechanismen entwickelt, um gezielt das Immunsystem ihrer Wirte zu modulieren, der wirtseigenen Abwehr zu entkommen und so über lange Zeiträume persistierende Infektionen etablieren zu können. Diese chronischen Infektionen können zu schwerwiegenden Schädigungen führen (z.B. der Lymphgefäße, hervorgerufen durch *Wucheria bancrofti*). Bei der Immunmodulation der Nematoden spielt die Modifikation von Proteinen und Glykosphingolipiden mit PC eine entscheidende Rolle.

PC hat zwei konträre Funktionen. Zum einen unterstützt PC die wirtseigene Infektabwehr, indem PC dem C-reaktiven Protein (CRP) als Bindungspartner dient, das durch die Interaktion mit PC das Komplementsystem aktiviert und die Oponierung von

Fremdkörpern und damit deren Phagozytose fördert. Auf der anderen Seite besitzen PC-Antigene die Fähigkeit, die Proliferation von B- und T-Lymphozyten durch Aktivierung zellulärer Phosphatasen gezielt herunter zu regulieren (Deehan *et al.* 1998; Lochnit *et al.* 2000; Houston *et al.* 2004; Couper *et al.* 2005).

Eine immunsuppressive Aktivität auf PC-Antigene wurde zum ersten Mal bei dem Nematoden *T. spiralis* beschrieben (Dea-Ayuela *et al.* 1999). Die ersten Studien über die Interaktion von PC mit Zellen des adaptiven Immunsystems und die Abhängigkeit von Antigenrezeptoren wurden an *Streptococcus pneumoniae* durchgeführt. Das Bakterium bewirkt *in vitro* eine Stimulierung der polyklonalen Differenzierung von B-Zellen in antikörper-produzierenden Zellen (Al-Qaoud *et al.* 1998).

PC-substituierte Glykosphingolipide führen zu einer Reduktion der B-Zell-Proliferation, welche durch LPS oder F(ab')₂-Fragmente induziert werden. PC-substituiertes LPS Gram-negativer Bakterien, z.B. *Haemophilus influenzae*, induziert in Makrophagen die Freisetzung von IL-12, was zu einer Stimulation von TH1-Zellen führt (Goodridge *et al.* 2001; Goodridge *et al.* 2005). Die PC-modifizierten Antigene von Filarienextrakten hingegen fördern den TH2-Phänotyp der Immunantwort durch Unterdrückung einer IL-12-Freisetzung durch Makrophagen und Stimulierung einer IL-10-Produktion durch B-Zellen, welche die TH1-Zellentwicklung hemmen (Deehan *et al.* 2001; Goodridge *et al.* 2001).

PC-modifizierte Glykosphingolipide spielen außerdem eine wichtige Rolle für das Überleben, die Entwicklung und Reproduktivität der Nematoden. Die große Bedeutung der PC-Modifikation für die Nematoden konnte durch RNAi-Experimente gezeigt werden, die die Glykosphingolipidsynthese und den Cholinmetabolismus zum Ziel hatten. Die meisten dieser RNAi-Experimente hatten einen dramatischen Rückgang der Nachwuchsproduktion zur Folge. Inhibitorstudien zur Glykosphingolipidsynthese von *C. elegans* während der Entwicklung zeigten, dass bei Zugabe von Tunicamycin die Würmer ab dem L2-Stadium in ihrer Ontogenese stagnierten. Bei Behandlungen mit *N*-Butyldeoxynorijimycin entwickelten sich adulte Nematoden, die allerdings nur Embryos im multizellulären Stadium bildeten. Mit beiden chemischen Inhibitoren ist der Nematode nicht in der Lage, Glykosphingolipide mit PC zu modifizieren (Lochnit *et al.* 2005). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass in frühen embryonalen Stadien sowie im L1-Stadium PC-Epitope nur lipidgebunden vorliegen. In der späteren embryonalen sowie postembryonalen Entwicklung von *C. elegans* werden lipidgebundene und proteingebundene PC-Epitope vorgefunden (Gerdt *et al.* 1999).

Auch PC-modifizierte Glykoproteine haben eine immunmodulatorische Wirkung, die eine Induktion TH2-spezifischer Cytokine sowie die Bildung von Antikörpern der Klasse IgG1 zeigen (Dell *et al.* 1999; Couper *et al.* 2005).

Die Regulation der B-Zell-Proliferation erfolgt über Signalkaskaden (Abb. 8), an denen unter anderem das Ras-Protein, die MAP-Kinase und/oder die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K) beteiligt sind (Harnett *et al.* 1999). Dabei sind insbesondere die über B-Zell-Rezeptoren aktivierten Signalwege wichtig für die Proliferationsantwort. Der B-Zell-Rezeptor(BCR)-Komplex besteht aus einer antigenbindenden Einheit (sig) und weiteren Molekülen (Ig- α , Ig- β), die das Signal weiterleiten. Diese Komponenten werden unter dem Begriff „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“ (ITAM) zusammengefasst. Bindung eines Antigens an den BCR-Komplex induziert die Aktivierung zellulärer Tyrosinkinasen. Die resultierende Tyrosinphosphorylierung führt zu einer Rekrutierung der Syk-Kinase und zu einer Reorientierung und Aktivierung ITAM-assoziiierter Tyrosinkinasen der src-Familie (z.B. Blk, Fyn, Lck und Lyn) sowie zur Bindung von Adaptormolekülen (z.B. Shc). Auch wenn die molekularen Mechanismen noch nicht im Detail geklärt sind, wird davon ausgegangen, dass nach Rekrutierung des Grb2/Sos-Komplexes das Signal dann durch Aktivierung des Ras-Proteins weitergeleitet wird (Abb. 8). Durch ES-62 werden die SHP-1 Tyrosinphosphatase und die MAP-Kinase-Phosphatase, Pac-1, aktiviert, was die Proliferation von B-Zellen herunterreguliert (Harnett *et al.* 2004). Aktivierung der SHP-1 Tyrosinphosphatase verhindert die Initiation des BCR-Signals, da die ITAM-Module in einem ruhenden, dephosphorylierten Zustand gehalten werden. Dadurch verhindert ES-62 die Rekrutierung des Shc Grb2 Sos-Komplexes, der für die Aktivierung von Ras benötigt wird. Weiterhin bewirkt ES-62 eine Stimulierung der nukleären MAP-Kinase-Phosphatase, Pac-1, und unterbricht so die Weiterleitung von Signalen. Dieser zweigleisige Mechanismus resultiert in einer raschen und tiefgreifenden Entkopplung des BCR von der Ras ErkMAPKinase Kaskade (Harnett *et al.* 1999).

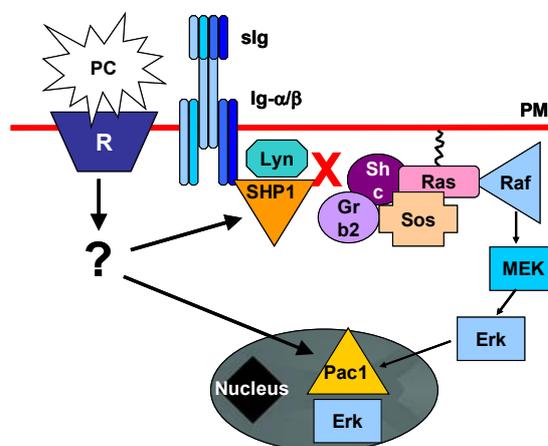


Abb. 8: Signalübertragung durch den B-Zell-Rezeptor (Harnett *et al.* 1999).

1.4.2 Modifikation an Serin und Threonin mit *N*-Acetylglucosamin: eine posttranslationale Modifikation mit regulierenden Funktionen

An Serin oder Threonin verknüpftes β -O-glykosidisch gebundenes *N*-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) wurde erstmals von Torres und Hart 1984 an Proteinen des Cytoplasmas und des Kerns in Eukaryoten nachgewiesen (Torres *et al.* 1984). O-GlcNAc ist eine posttranslationale Modifikation, die ubiquitär in allen bisher untersuchten Eukaryoten einschließlich Menschen und einiger Virenproteine [Rotavirus NS26 (Gonzales *et al.* 1991), Baculovirus gp41 (Whitford *et al.* 1992)] vorkommt (Zachara *et al.* 2004). Zahlreiche O-GlcNAc-modifizierte Proteine wurden bislang identifiziert. Diese Proteine stellen alle Phosphoproteine aus dem funktionellen Bereich der Zytoskelettproteine, Kernporenproteine (Guinez *et al.* 2005), RNA Polymerase II (Kelly *et al.* 1993), Protoonkogene, Tumorsuppressoren (Vosseller *et al.* 2005), Transkriptionsfaktoren (Hanover *et al.* 2005) sowie Phosphatasen und Kinasen (Wells *et al.* 2003) dar.

O-GlcNAc kann in einem reziproken Verhältnis zur Phosphorylierung stehen. Diese kann regulierende Funktion für Proteine haben. O-GlcNAc stabilisiert das Protein und ist somit in der Lage multiple Komplexe zu bilden (Holt *et al.* 1987). Außerdem können O-GlcNAc-substituierte Proteine am Aufbau und der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sein. Bei einigen dieser modifizierten Proteine (z.B. Neurofilamente) sind die Bereiche der Untereinheiten mit O-GlcNAc glykosyliert, die zur Anlagerung der Filamente aneinander und somit zur Ausbildung der Quartärstruktur beitragen (Griffith *et al.* 1995).

1.4.2.1 Biosynthese von O-GlcNAc

Der Hexosemonophosphatweg bildet UDP-GlcNAc-6-Phosphat, den Donor für die Addition von O-GlcNAc an Proteine. Der Hexosemonophosphatweg beginnt mit der Umwandlung von Glukose-6-phosphat zu Fruktose-6-phosphat. Limitierend ist der Schritt von Fruktose-6-Phosphat zu Glukosamin-6-Phosphat, welcher mittels Glutamin/Fruktose-6-Phosphat Amidotransferase (GFAT) katalysiert wird. Anschließend wird Glukosamin-6-Phosphat zusammen mit Uridin zu UDP-GlcNAc-6-Phosphat konvertiert. UDP-GlcNAc-6-Phosphat kann nun so zur Glykosylierung von Proteinen verwendet werden (Wells *et al.* 2003) (Abb. 9).

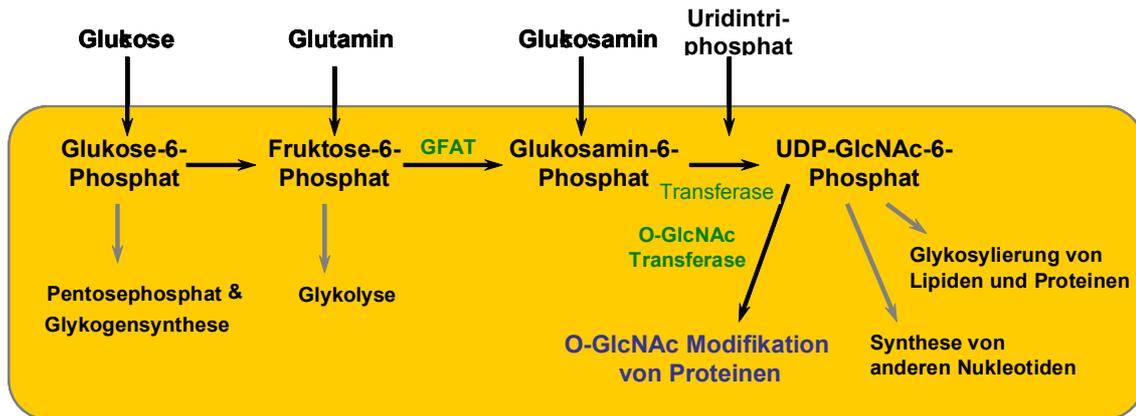


Abb. 9: Hexosemonophosphatweg zur Synthese von O-GlcNAc

1.4.2.2 „Yin-Yang“-Hypothese

Der Nachweis von Proteinen, die an bestimmten Positionen mit O-GlcNAc modifiziert sind sowie von Kinasen phosphoryliert werden können, veranlasste Gerald Hart zur Formulierung der so genannten „Yin-Yang“-Hypothese. Diese Hypothese besagt, dass die O-GlcNAcylierung eine reziproke Funktion zur Phosphorylierung haben kann (Wells *et al.* 2004) (Abb. 9). O-GlcNAc ist analog zur Phosphorylierung und kann eine wichtige Rolle für die Regulation von Proteinen spielen. Es besteht eine so genannte „Yin-Yang“-Beziehung. Durch Modifikation mit O-GlcNAc oder durch Phosphorylierung kann es zu Konformationsänderungen kommen, die Veränderungen in den Eigenschaften bzw. Funktionen des Proteins zur Folge haben. Wird O-GlcNAc mittels O-GlcNAc-Transferase (OGT) (EC 2.4.1.94) an Serin bzw. Threonin des Proteins gebunden, erfolgt eine Konformationsänderung des Proteins, so dass eine Phosphorylierung an der Bindungsstelle von O-GlcNAc nicht mehr möglich ist. Die Bindung kann durch die O-GlcNAc-Hydrolase (O-GlcNAcase) (EC 3.2.1.52) wieder gelöst werden. Die Ser/Thr-Kinase bewirkt eine Phosphorylierung des Proteins. Auch in diesem Falle erfolgt eine Konformationsänderung, so dass keine Verknüpfung mit O-GlcNAc mehr möglich ist. Diese Verbindung wird mittels Ser/Thr-Phosphatase wieder gelöst. O-(2-amido-2-deoxy-D-glukopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate (PUGNAc) hemmt spezifisch die O-GlcNAcase und verursacht somit einen Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation. Alloxan ist ein unspezifischer Inhibitor der OGT (Konrad *et al.* 2002). Eine Anreicherung von phosphorylierten Proteinen kann durch eine Förderung der Ser/Thr-Kinase mittels Phorbol ester erreicht werden (Griffith *et al.* 1999; Rex-Mathes *et al.* 2002; Zachara *et al.* 2002) (Abb. 10). Die Annahme, dass eine Erhöhung der O-GlcNAc-Modifikation laut „Yin-Yang“-Hypothese eine Abnahme der

Phosphorylierung zur Folge hat, konnte durch Griffith *et al* (1999) mittels Phosphataseinhibitoren bzw. -aktivatoren bestätigt werden (Griffith *et al.* 1999). Neben der Tatsache, dass Phosphorylierungen und O-GlcNAcylierungen an den gleichen Serin- oder Threoninresten stattfinden und somit Kinase und OGT miteinander um die gleichen Aminosäuren konkurrieren können, ist es auch möglich, dass ein Protein an unterschiedlichen Aminosäuren sowohl phosphoryliert als auch O-GlcNAc-modifiziert sein kann (Ku *et al.* 1994, Grabitzki *et al* 2006a).

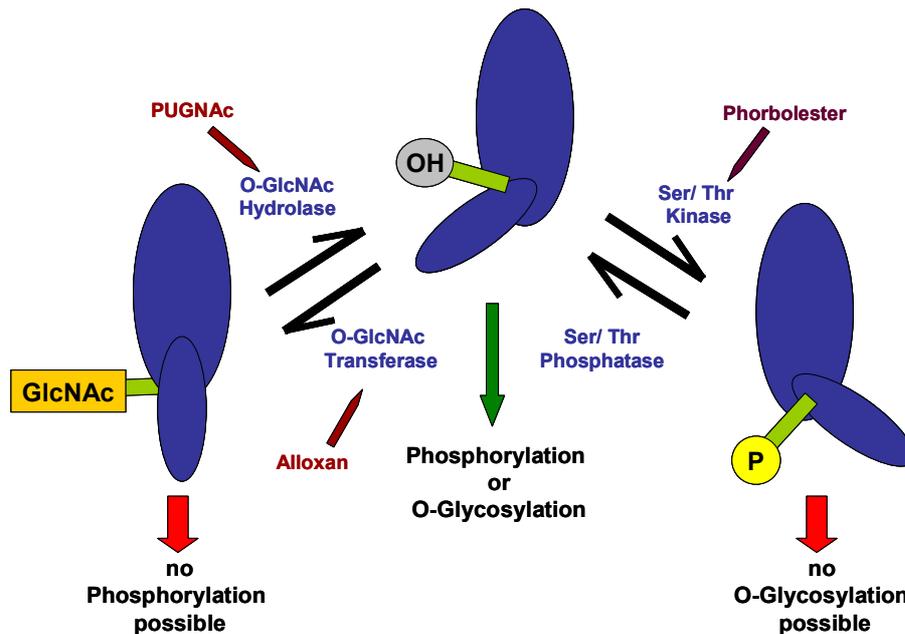


Abb. 10: „Yin-Yang“-Beziehung

Die O-GlcNAc-Modifikation an Serin- und Threoninresten als Alternative zur Phosphorylierung kann regulierende Funktion für Proteine haben. Durch die Modifikation kann es zu einer Konformationsänderung kommen, die veränderte Eigenschaften/Funktionen des Proteins zur Folge hätten. PUGNac hemmt die Hydrolase und verursacht somit einen Anstieg der O-GlcNAc-Modifikation, wohingegen Phorbol ester die Proteinkinase C aktiviert, was zu einer verringerten O-GlcNAcylierung führen könnte.

1.4.2.3 Funktionen von O-GlcNAc

Die OGT und die O-GlcNAcase wurden bereits kloniert und charakterisiert. Die humane O-GlcNAcase ist auf Chromosom 10 lokalisiert und wird in allen Gewebetypen exprimiert. Sie ist hoch konserviert und hauptsächlich im Cytoplasma vorzufinden (Gao *et al.* 2001).

OGT-cDNA Gene wurden bereits für Menschen, Ratten und *C. elegans* identifiziert (Lubas *et al.* 1997; Wells *et al.* 2004). Die OGT wie die O-GlcNAcase sind hoch

konservierte Enzyme. Das humane Gen weist eine 80 %ige Homologie zu dem von *C. elegans* auf (Zachara *et al.* 2002). Das OGT-Gen ist beim Menschen auf dem X-Chromosom lokalisiert. Untersuchungen an murinen Embryonen haben ergeben, dass das OGT-Gen eine essentielle Bedeutung für die Lebensfähigkeit von embryonalen Stammzellen und die embryonale Entwicklung hat (Shafi *et al.* 2000). Weder OGT Knock-out-Mutanten noch eine Überexpression der OGT zeigten einen Phänotyp bei *C. elegans* (Lubas *et al.* 1997). Die OGT weist eine Tandem-Anordnung von Tetratricopeptiden auf, die für die Ausbildung der Protein-Protein-Interaktion von Bedeutung sind (Shafi *et al.* 2000). Diese Tetratricopeptide spielen vermutlich eine Rolle für die Ausbildung und Stabilität des homotrimeren OGT-Komplexes, der notwendig für die Substraterkennung ist (Lubas *et al.* 1997; Wells *et al.* 2004). Dieses Enzym ist sowohl O-GlcNAcyliert als auch Tyrosin-phosphoryliert (Kreppel *et al.* 1997). Die Transkripte der OGT lassen sich in vielen Gewebetypen nachweisen, wobei sie besonders stark in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas exprimiert werden (Hanover *et al.* 2005). Außerdem ist die mRNA der OGT noch in Skelettmuskulatur, Gehirn, Fettgewebe und Herzmuskulatur nachzuweisen. Das Enzym selbst ist im Cytosol und im Kern lokalisiert (Lubas *et al.* 1995; Hanover *et al.* 2005). O-GlcNAcylierung spielt eine große Rolle im Kohlenhydratmetabolismus und bei Insulinresistenz (Vosseller *et al.* 2002; Slawson *et al.* 2003).

O-GlcNAc-modifizierte Proteine werden mit diversen Erkrankungen in Verbindung gebracht, u.a. Diabetes mellitus und neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson Disease (Guinez *et al.* 2005; Hanover *et al.* 2005; Lefebvre *et al.* 2005). Bei Diabetes mellitus konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Glukose- und Glutaminspiegel im Skelettmuskel und in den β -Zellen des Pankreas zu einer erhöhten O-GlcNAc Modifikation intrazellulärer Proteine führt (Yki-Jarvinen *et al.* 1998; Hanover *et al.* 2005). Es wird angenommen, dass die durch Hyperglykämie induzierte O-GlcNAcylierung die normale Insulinsignaltransduktion durch reduzierte Signalstärke der Insulin-Rezeptorsubstrate stören kann und somit mitverantwortlich für die bei Diabetes mellitus Typ II auftretende Insulinresistenz sein könnte (Wells *et al.* 2003).

Eine weitere potentielle Funktion von O-GlcNAc Substituenten ist die Regulation der Proteindegradation. O-GlcNAc-Modifikationen treten in so genannten „PEST“-Sequenzen auf, die sich durch einen hohen Gehalt an Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) auszeichnen und deren Phosphorylierung ein Signal für den proteosomalen Abbau darstellt. Es wird angenommen, dass eine Glykosylierung die Phosphorylierung dieser Sequenz und damit den Proteinabbau verhindern kann. Studien am Östrogen-Rezeptor ER- β konnten zeigen, dass potentielle Degradationssequenzen, also Sequenzen mit hohem „PEST“-Gehalt, entweder

O-GlcNAcyliert oder phosphoryliert vorliegen. Mutationen der Glykosylierungsstelle verzögern den Abbau des Rezeptors. Führt allerdings eine Mutation zu einer „Vortäuschung“ einer Phosphorylierung der Degradationssequenz, so wird dieses Protein schneller abgebaut (Cheng *et al.* 2001).

Des Weiteren sind O-GlcNAc-modifizierte Proteine in der Lage, multiple Komplexe mit anderen Proteinen zu bilden und sie somit zu stabilisieren, wie z.B. die Proteine der Kernporenkomplexe, die in erhöhtem Maße mit O-GlcNAc modifiziert sind (Holt *et al.* 1987). Außerdem können Proteine so mit O-GlcNAc glykosyliert sein, dass sie zur Ausbildung der Quartärstruktur beitragen können (Zachara *et al.* 2002).

1.5 Problemstellung

Infektionen mit parasitären Nematoden stellen nach wie vor weltweit eine der häufigsten Erkrankungen bei Menschen und Tieren dar. Gleichzeitig stehen nur wenige Therapeutika zur Verfügung. Infektionen mit Nematoden sind meist durch eine lang anhaltende Persistenz gekennzeichnet. Sowohl bei der Invasion als auch Persistenz spielen posttranslationale Modifikationen der Proteine eine zentrale Rolle. Der frei lebende Bodennematode *Caenorhabditis elegans* stellt für die Untersuchungen der Nematoden ein ausgezeichnetes Modellsystem dar.

In dieser Arbeit sollen zwei posttranslationale Modifikationen schwerpunktmäßig bearbeitet werden: die Substitution mit Phosphorylcholin, welches als immunmodulatorische Komponente eine zentrale Rolle im Parasitismus der Nematoden spielt, jedoch auch für die Entwicklung des Nematoden selbst essentiell ist, sowie die Modifikation von Proteinen mit *N*-Acetylglucosamin. Letztere ist in höheren Eukaryoten bei der Embryonalentwicklung essentiell, spielt jedoch auch bei weiteren zentralen zellphysiologischen Vorgängen eine wichtige Rolle. Bislang lagen zur Funktion dieser Modifikation in Nematoden noch keine Untersuchungen vor.

Ziel der Arbeit war die Etablierung einer proteinanalytischen Methodik zur Trennung und Identifizierung von PC- (PCom) und O-GlcNAc-modifizierten (O-GlcNAcom) Proteinen aus *C. elegans*. Um die Dynamik dieser Modifikationen zu erfassen, sollen alle Entwicklungsstadien des Nematoden *C. elegans* isoliert und untersucht werden. Die gewonnenen Erkenntnisse über diese Modifikationen sollen die Grundlage für die Entwicklung neuer Bekämpfungsstrategien der Nematodeninfektionen bilden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Modulares System-Stereomikroskop Leica MS 5, Leica, Wetzlar

Universal 32 R-Zentrifuge, Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen

Ultraschallbad Badelin Sonorex TK 52, Roth, Karlsruhe

Digitale Waage Mettler AJ150, Mettler PB3000, Mettler-Toledo GmbH, Giessen

Speed Vac, RC 10.22. Jouan, Thermo, Fernwald

Spektrophotometer DU 640, Beckmann, Krefeld

Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4, Christ, Osterode am Harz

Für die zweidimensionale Gelelektrophorese:

Netzgerät: Electrophoresis Power Supply EPS 3501 XL, GE Healthcare, Freiburg

Elektrophoresekammer: Multiphor II, GE Healthcare, Freiburg

Protean Xi Cell, Bio Rad, München

Protean XL Cell, Bio Rad, München

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio Rad, München

Spotcutter ExQuest, Bio Rad, München

Ultraflex TOF/TOF Massenspektrometer mit Lيفةinheit, Bruker Daltonics, Bremen

Edelstahl-Target, Bruker Daltonics, Bremen

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität bzw. als Lösungsmittel für die HPLC bezogen (Merck, Darmstadt; Roth, Karlsruhe; Fluka, Neu Ulm; Serva, Heidelberg). Wasser wurde mit dem "Milli-Q Ultra-pure water system" (Millipore, Eschborn) entsalzt und gereinigt.

2.3 Methoden

2.3.1 Kultivierung von *C. elegans* auf Agarplatten

Für die Kultivierung von *C. elegans* wurden Petrischalen von 145 mm Durchmesser verwendet, in die eine Agarlösung gegossen wurde.

Die Agarlösung setzt sich zusammen aus:

- 5 g Caseinhydrolysat (Pepton 140) (Merck)
- 5 g Hefeextrakt (Life Technologie, Eggenstein)
- 3 g NaCl
- 20 g Agar, high gel-strength (Serva)
- auf ein 1 L mit H₂O auffüllen

Anschließend wurde die Agarlösung autoklaviert (20 Minuten, 120 °C) und es wurden folgende sterile Lösungen dazugegeben:

- 1,0 mL Cholesterinlösung (5,0 g Cholesterin/ 1L Ethanol)
- 0,5 mL CaCl₂-Lösung (110,8 g CaCl₂/ 1L H₂O)
- 1,0 mL MgSO₄-Lösung (246,5 g MgSO₄/ 1L H₂O)
- 25 mL Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (108,3 g KH₂PO₄ und 36 g K₂HPO₄/ 1L H₂O)
- 2,0 mL Thiabendazol (10 mg/ mL Thiabendazol in Dimethylsulfoxid)
- 2,0 mL 0,1 %ig Methyleneblau in H₂O

Nach guter Durchmischung wurde der Agar in einer 0,5 cm dicken Schicht in die Petrischale gegossen und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen.

2.3.1.1 Kultivierung mit *Escherichia coli* als Nährboden

Für den Bakterienrasen auf den Agarplatten wurden *E. coli*-Bakterien (OP 50) verwendet.

Bakterienmedium:

- 0,5 g Caseinhydrolysat
- 0,5 g Hefeextrakt
- 0,3 g NaCl
- 100 mL H₂O

Das Bakterienmedium wurde verrührt und bei 120 °C für 20 Minuten autoklaviert. Nach dem Autoklavieren kühlte die Lösung ab und wurde mit 50 µL *E. coli*-Bakterienmedium versetzt. Die Suspension wuchs über Nacht bei 37 °C. Der abgekühlte Agar wurde schließlich mit 800 µL der Bakteriensuspension angeimpft. Der Bakterienrasen wuchs anschließend über Nacht bei 37 °C in einem Brutschrank.

Auf die bewachsenen Agarplatten wurden 500 µL *C. elegans*-Suspension (~ 2000 Würmer) aufgegeben. Die Agarplatten wurden bei 18 °C inkubiert.

2.3.1.2 Kultivierung mit hühnereihaltigem Nährboden

Für das Hühnereimedium auf der Agarplatte wurde ein Hühnerei in ein Gefäß mit 50 mL kochendem Wasser gegeben und geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde abdekantiert. Das Ei wurde daraufhin auf höchster Stufe homogenisiert. Auf eine Agarplatte wurden 5 mL des Homogenates aufgetragen. Etwa 500 µL *C. elegans* - Suspension (~ 2000 Würmer) wurden mit einer Pipette auf eine Agarplatte pipettiert und bei 18 °C inkubiert.

2.3.2 Aufreinigung der *C. elegans*

Die Agarplatten werden mit 15 mL M9-Puffer abgespült und die Flüssigkeit in Zentrifugenröhrchen (V=50 mL) überführt.

Zusammensetzung des M9-Puffers:

250 mL Phosphatpuffer (60 g KH_2PO_4 , 120 g Na_2HPO_4), pH=6,0
25 g NaCl
5 mL 1 mol/ L MgSO_4
auf 5 L mit H_2O auffüllen

C. elegans wurden im M9-Puffer auf Eis gestellt, dadurch setzten sich die Würmer als Sediment ab. Der Überstand wurde abgezogen. Da das Sediment noch Kontaminationen mit Zelltrümmern, Bakterienresten und Häutungsaggregaten enthielt, wurden die Nematoden durch eine Dichtezentrifugation (Gbewonyo *et al.* 1994) gereinigt.

Zur Reinigung der Würmer wurden sie mit M9-Puffer auf 15 mL aufgefüllt und mit 10 mL Saccharoselösung (30 %ig) unterschichtet. Anschließend wurden sie bei 1500 xg 7 Minuten zentrifugiert. Die Saccharoseschicht mit den *C. elegans* wurde in

ein weiteres Zentrifugenröhrchen (V=50 mL) überführt und dreimal mit M9-Puffer gewaschen.

2.3.3 Gewinnung von Eiern aus *C. elegans*

Die gewaschenen Würmer wurden mit 15 mL M9-Puffer und 15 mL Natriumhypochlorit (12 % Chlor, Roth) Lösung versetzt, 5 Minuten kräftig geschüttelt und bei 900 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 15 mL abgesaugt. Es wurden nochmals 15 mL Natriumhypochlorid-Lösung zugegeben, erneut 2 Minuten geschüttelt und zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so häufig wiederholt, bis im Mikroskop nur noch die Eier sichtbar waren. Diese wurden anschließend drei- bis viermal mit je 50 mL M9-Puffer gewaschen.

2.3.4 Synchronisierung der einzelnen Stadien von *C. elegans*

Zur Gewinnung eines definierten Larvenstadiums musste eine Wurmpopulation zunächst synchronisiert werden. Das Prinzip beruht auf der Eliminierung aller lebenden Larvenstadien und adulten Tiere durch eine stark alkalische Hypochloritlösung, wobei nur die Embryonen, geschützt durch eine Vitellinschicht ihrer Eihülle, diese Prozedur überleben (siehe 2.3.3). Die gewaschenen Eier von *C. elegans* blieben im M9-Puffer bei 18 °C über Nacht. Nach dem Schlüpfen blieben die Tiere bei Nahrungsmangel im M9-Puffer in einer frühen L1-Phase und begannen ihr Wachstum (über L2) erst nach Umsetzung auf *E. coli*-Platten. Nach der Fütterung wurde der Entwicklungsgrad der Würmer regelmäßig mikroskopisch überprüft. Sobald das gewünschte Larvenstadium erreicht war, wurden die Würmer geerntet und gereinigt (siehe 2.3.2). Die sauberen Larvenstadien wurden sofort lyophilisiert. Für die Synchronisierung der Nematoden in Dauerlarven wurden die Würmer erst nach 8 Wochen von den *E. coli*-Platten abgeerntet und anschließend lyophilisiert.

2.3.5 Proteinbestimmung

Die Proben wurden in Küvetten mit 200 µL H₂O gegeben. Anschließend wurde das Bio-Rad Protein Assay Reagenz (Bio Rad) ein Teil zu vier Teilen mit H₂O verdünnt und 800 µL des Reagenzes in die Küvetten pipettiert. Der Ansatz wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 1000 µL H₂O hinzugegeben und die Absorption der Lösung bei 578 nm gemessen.

Eine Verdünnungsreihe mit einem Albumin-Standard (Pierce, Bonn) in den Konzentrationen 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20 µg/ µL diene als Kalibrierungsgerade.

2.3.6 Proteinisolation

Um störende Agenzien oder Ionen zu entfernen, welche die Gelelektrophorese stören können und um die *C. elegans*-Proteine aufzukonzentrieren, wurde eine Chloroform/Methanol-Fällung vollzogen (Wessel *et al.* 1984).

15 mg lyophilisierte und synchronisierte *C. elegans* (ca. 1 mg Protein) wurden in 500 µL Lysispuffer gelöst und 1 Stunde bei 20000 xg zentrifugiert. Anschließend wurden 90 µL des Überstandes in ein Eppendorfgefäß überführt, mit 400 µL Methanol und 100 µL Chloroform gemischt. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden 300 µL H₂O hinzugefügt und erneut gemischt. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation wurde diese Probe für 5 Minuten bei 13000 xg zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und die Probe mit weiteren 300 µL Methanol versetzt. Anschließend wurde die Probe erneut für 5 Minuten bei 13000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde für 5 Minuten in ein 40 °C warmes Wasserbad gestellt, um das restliche Methanol abzdampfen. Die Probe wurde nun mit 50 µL Probepuffer versetzt und im Ultraschallbad gelöst. Anschließend wurden diese Proben auf 3 x 5 mm große Probenplättchen pipettiert. Diese standen nun für die isoelektrische Fokussierung zur Verfügung (siehe 2.3.7.1).

Lysispuffer

360 mg	6 mol/ L Urea
152 mg	2 mol/ L Thiourea
40 mg	4 % CHAPS
10 mg	DTT
10 µL	Protease Inhibitor Cocktail
30 µL	Servalyte 3-10
auf 1 mL mit H ₂ O auffüllen	

Probenpuffer

360 mg	6 mol/ L Urea
152 mg	2 mol/ L Thiourea
40 mg	4 % CHAPS
10 mg	DTT
30 µL	Servalyte 3-10
auf 1 mL mit H ₂ O auffüllen	

2.3.7 Zweidimensionale Gelelektrophorese

2.3.7.1 Erste Dimension

Die Anwendung der isoelektrischen Fokussierung (IEF) ist auf die Trennung solcher Moleküle beschränkt, die einen amphoteren Charakter besitzen.

Zunächst wurden IEF-Gelstrips gegossen. Auf eine hydrophile Glasplatte wurden 1,5 mL H₂O gegeben. Ein GelBond PAG film (GE Healthcare) wurde luftblasenfrei auf die Glasplatte aufgezogen. Nach 5 Minuten wurde mit einer Rolle das überschüssige H₂O entfernt und die Schutzfolie abgezogen. Eine silikonisierte Glasplatte mit integrierter Gummidichtung an den Seiten wurde auf die Folie gelegt und mit Klammern fixiert. Mit einer Schlauchpumpe wurde langsam luftblasenfrei 20 mL Acrylamidlösung (IEF- und IPG-Lösung) zwischen die Glaskammern laufen gelassen. Anschließend wurde das Gel mit 70 %igen Isopropanol überschichtet. Das Gel wurde zunächst 60 Minuten bei Raumtemperatur, anschließend 10 Minuten bei 60 °C polymerisiert.

Die Glasplatten wurden entfernt und das Gel mit der Folie zweimal 10 Minuten mit H₂O und einmal 15 Minuten mit 2 %igen Glycerin gewaschen. Anschließend wurde das Gel bei Raumtemperatur getrocknet und auf die entsprechende Stripgröße (IEF-Strips: 3 mm x 14,4 cm; IPG-Strips: 3 mm x 18 cm) zugeschnitten.

IEF-Lösung

IEF-Strips wurden zur Analyse von PC-modifizierten Proteinen verwendet.

Acrylamid-IEF-Stammlösung.:

29,1 g Acrylamid –IEF

0,9 g Bisacrylamid

auf 100 mL mit H₂O auffüllen (filtrieren)

für ein 124 x 258 mm großes Gel:

4 mL Acrylamid-Stammlösung

16 mL H₂O

10 µL TEMED

20 µL (40 %ig) AMPS (40 mg AMPS in 1 mL H₂O)

IPG-Lösung

IPG-Strips ($5 \leq \text{pH} \leq 9$, linear) wurden zur Analyse von O-GlcNAc-modifizierten Proteinen verwendet.

Pipettierschema für ein IPG-Strip ($5 \leq \text{pH} \leq 9$, linear):

	V/ μL	Saure Lösung pH=4,0/ (4 mol/ L)	Basische Lösung pH=10,0/ (4 mol/ L)
Glycerin (87 %)		4300	800
Immobiline pK 3,6		830	
Immobiline pK 4,6		582	249
Immobiline pK 6,2		2,18	263
Immobiline pK 7,0		138	212
Immobiline pK 8,5		795	292
Immobiline pK 9,3		122	230
Acrylamid-IEF- Stammlösung		2000	2000
H ₂ O		15000	15000
TEMED		7,5	7,5
AMPS (40 %ig)		7,5	7,5

Die sauren und basischen Lösungen wurden in einen Gradientenmischer gegeben und bei 4 °C luftblasenfrei zwischen die Glasplatten laufen gelassen.

Am nächsten Tag wurde auf die Gelseite der Gelfolie faltenfrei Frischhaltefolie gespannt. Mit einer Schneidemaschine wurde die Gelfolie auf 14,5 cm Länge und 3 mm breite Streifen für die IEF-Strips und auf 18 cm Länge und 3 mm Breite für die IPG-Strips geschnitten und bei – 20 °C gelagert.

Rehydratisierung

Je 300 μL der Gellösung für IEF-Strips und 400 μL für IPG-Strips wurden in insgesamt 12 Spuren des „Reswelling Trays“ (GE Healthcare) mit einer Pipette perlenförmig eingefüllt, so dass möglichst keine Luftblasen entstanden. Auf dieses Lösungsbett wurde jeweils ein Gelstrip mit der Acrylamidseite nach unten gelegt. Damit der Harnstoff aus der Lösung nicht auskristallisiert, wurde jede Spur mit 3 mL DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) bedeckt. Die Strips wurden über Nacht bei Raumtemperatur rehydratisiert.

Gellösung

4,8 g	8 mol/ L Urea
100 mg	CHAPS
10 mg	DTT
300 µL	Servalyte 3-10 (iso-Dalt)
200 µL	Ampholine 5-7
20 µL	Bromphenolblau 2 %ig
auf 10 mL mit H ₂ O aufgefüllt	

Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Der gequollene Gelstreifen wurde aus dem Reswelling Tray herausgenommen, auf einem fusselfreien Papier (Kimberley Clark, Roth) getrocknet und mit der Gelseite mittig nach oben auf eine Glasplatte gelegt.

Die Elektrodenklammern wurden aufgesteckt, so dass der Elektrodendraht auf der Gelschicht der Strips auflag. Die Gelstreifen wurden mit 80 mL Cover Fluid überdeckt. Auf jeden Gelstreifen wurden bei der Anode 3 x 5 mm große Probelplättchen gelegt, die jeweils 10 µL Probelösung enthielten (siehe 2.4.6). Der Deckel des Multiphor-Gerätes wurde aufgesetzt und die Kabel wurden mit dem Spannungsgerät verbunden.

Das Spannungsgerät wurde für die IEF-Strips wie folgt programmiert:

U/ V	I/ mA	P/ W	t/ Minuten
2000	1	2	60
2000	2	2	165
2500	2	3	15

Das Spannungsgerät wurde für die IPG-Strips wie folgt programmiert:

U/ V	I/ mA	P/ W	t/ Minuten
500	2	5	1
3500	2	5	90
3500	2	5	600

Nach Abschluss der isoelektrischen Fokussierung wurden die Gelstrips herausgenommen und auf fusselfreiem Papier getrocknet. Die Strips wurden bei – 80 °C gelagert.

2.4.7.2 Zweite Dimension

Die Natriumdodecylsulfat/Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde basierend auf der Methode von Laemmli durchgeführt (Laemmli 1970). Dabei kamen 10-15 %iges Gradientengel bzw. 10 %iges Trenngel zum Einsatz.

Pipettierschema für ein 10-15 %iges Gradientengel:

	V/ mL	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %
H ₂ O		15,4	12
30 % Acrylamid		14,3	20
2 mol/ L Tris, pH=8,8		7,5	7,5
80 %ig Saccharose		2,4	
10 %ig SDS		0,4	0,4
10 %ig AMPS		0,16	0,16
TEMED		0,016	0,016

Pipettierschema für ein 10 %iges Trenngel:

	V/ mL	Trenngel 10 %	Sammelgel 4 %
H ₂ O		29,9	6
30 % Acrylamid		23	1,5
2 mol/ L Tris, pH=8,8		17	
1 mol/ L Tris, pH=6,8			2,5
10 %ig SDS		0,7	0,08
10 %ig AMPS		0,35	0,04
TEMED		0,035	0,02

Um eine gleichmäßige Oberfläche zu erreichen, wurde das Trenngelgemisch mit 0,1 %ig SDS überschichtet und drei Stunden bei 60 °C ruhen gelassen. Nach der Polymerisation wurde das 0,1 %ige SDS abgegossen und die Trenngeloberfläche gründlich mit einem Filterpapier getrocknet. Das Sammelgel (nur bei IEF-Strips verwendet) wurde mit 70 %igem Isopropanol überschichtet.

Nach dem Auftauen der Gelstrips (siehe 2.4.7.1) wurden diese 10 Minuten in 2 mL Äquilierungspuffer (ÄSS) (6 mol/L Urea, 0,1 mmol/L EDTA, 0,01 % Bromphenolblau, 50 mmol/L Tris pH=6,8, 30 % Glycerin, v/v) gewaschen. Anschließend wurde 2 mL DTT-Lösung [100 mg 1,4-Dithio-DL-threitol (Fluka), 200 mg SDS in 10 mL ÄSS] auf die Gelstrips gegeben. Für weitere 15 Minuten wurden die Gelstrips anschließend in 5 mL Jodacetamid-Lösung [400 mg Jodacetamid (Fluka), 200 mg SDS in 10 mL ÄSS] äquilibriert. Die Strips wurden auf einem fusselreien Tuch abgetrocknet und auf die Geloberkante gelegt. Auf ein 2 x 2 mm großes Probenplättchen wurde ein Precision Protein Standard (Bio Rad) aufgetragen und getrocknet. Der Gelstrip und der Standardmarker wurden mit Agarose [0,5 % IEF-Agarose (GE Healthcare), 2,5 mL 1 mol/L Tris, pH=6,8, 7,5 mL H₂O] fixiert und in die Elektrophoreseapparatur (Protean XI für IEF-Strips; BioRad Protean XL für IPG-Strips) gestellt. Diese Kammer benötigt 2 L Elektrophorese-Laufpuffer. In die innere Kammer wurden 700 mL und in die äußere Kammer 1,3 L Elektrodenlaufpuffer eingefüllt.

Elektrodenlaufpuffer:

30 g	Tris
144 g	Glycin
10 mL (10 %ig)	SDS
auf 1 L mit H ₂ O auffüllen	

Das Gel lief mit einer Spannung von 600 V, 90 mA und 50 W für 3 Stunden bei 15°C. Danach wurden die Gele entnommen, mit Silbernitrat (siehe 2.4.9.2) gefärbt oder für einen Western-Blot (siehe 2.4.8) weiterverarbeitet.

2.4.8 Western Blot

Zur immunchemischen Detektion wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine von *C. elegans* von einem Gel auf eine Hybond P 0,45 µm PVDF-Membran (GE Healthcare) oder Nitrocellulose-Membran 0,45 µm (Roth) gegeben.

Die PVDF-Membranen (für O-GlcNAc-modifizierte Proteine) oder Nitrocellulose-Membranen (für PC-modifizierte Proteine) wurden auf die entsprechende Gelgröße zugeschnitten. Die PVDF-Membranen wurden für 10 Sekunden in Methanol, die Nitrocellulose-Membranen wurden für 10 Sekunden in H₂O getaucht. Auf der Anode wurden drei Filterpapiere, die in Blotpuffer I äquilibriert waren, positioniert, auf diese wurden zwei Filterpapiere gelegt, die in Blotpuffer II zuvor äquilibriert wurden. Zum Proteintransfer wurde das Gel auf die PVDF-Membran oder Nitrocellulose-Membran

gelegt. Anschließend wurden fünf weitere Filterpapiere, die zuvor in Blotpuffer III äquiliibriert waren, auf das Gel gegeben und die Kathode abschließend oben aufgelegt. Es wurde 90 Minuten bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ geblottet. Nach dem Blotvorgang wurden die Membranen 5 Minuten in $0,2 \text{ mol/L NaOH}$ geschwenkt. Anschließend wurden die Membranen in Roti-Block (Roth) über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ blockiert.

Blotpuffer I (Anodenpuffer)

20 % (v/v) MeOH
0,3 mol/ L Tris
auf 1 L mit H_2O aufgefüllt

Blotpuffer II (Anodenpuffer)

20 % (v/v) MeOH
25 mmol/ L Tris
auf 1 L mit H_2O aufgefüllt

Blotpuffer III (Kathodenpuffer)

20 % (v/v) MeOH
25 mL 1 mol/ L Tris 40 mM 6- Aminohexansäure
0,1 % (g/v) SDS
auf 1 L mit H_2O aufgefüllt

Als primärer Antikörper zur Erkennung von PC-Epitopen wurde der PC-spezifische monoklonare Antikörper TEPC-15 (Maus IgA; Sigma, 1:1000 in Roti-Block) verwendet. Als zweiter Antikörper diente ein mit Horse raddish peroxidase (HRP) konjugiertes Anti-Maus-Immunglobulin (Dako 0260, Hamburg, 1:3000 in Roti-Block).

Als primärer Antikörper zur Erkennung von O-GlcNAcylierten Proteinen wurde der O-GlcNAc-spezifische Antikörper CTD110.1 (Sigma, 1:2500 in Roti-Block) verwendet. Als zweiter Antikörper diente ein HRP konjugierter IgM/ IgG Ziege-Anti-Maus Antikörper (Dianova, Hamburg, 1:10000 in Roti-Block).

Als primärer Antikörper zur Erkennung von phosphorylierten Proteinen wurden drei phosphatspezifische Antikörper verwendet: Phospho-Ser (16B4, 1:500 in Roti-Block), Phospho-Thr (14B3, 1:750 in Roti-Block) und Phospho-Tyr (2C8, 1:4000 in Roti-Block) (Calbiochem, Darmstadt). Als zweiter Antikörper diente ein mit HRP konjugiertes Anti-Maus Immunglobulin (0260, DakoCytomation, Hamburg, 1: 3000 in Roti-Block).

Der erste Antikörper wurde über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf die Membran gegeben. Am nächsten Tag wurden die Membranen dreimal je zehn Minuten mit Roti-Block

gewaschen. Anschließend wurde der zweite Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben. Die Membran wurde fünfmal je 10 Minuten mit Roti-Block gewaschen und schließlich einmal zehn Minuten mit PBS-T gewaschen. O-GlcNAc-modifizierte Proteine und PC-modifizierte Proteine wurden mittels Chemilumineszenz (ECL) mit dem West Dura Substrate Kit (Perbio Science, Bonn) visualisiert.

PBS-T:	9,68 g	NaCl
	2,9 g	Na ₂ HPO ₄
	0,234 g	NaH ₂ PO ₄
	0,1 g	NaN ₃
	0,5 mL	Tween 20
	auf 1 L mit H ₂ O auffüllen	

Der Blot wurde über die Kante abgetropft und auf die Saranfolie (Roth) gelegt. Lösung A und Lösung B des West Dura Substrate Kit wurden 1:1 vermischt und auf der Proteinseite verteilt. Der Blot wurde mit Saranfolie bedeckt und in eine Fotokassette gelegt und im Dunkeln mit einem Film (Kodak, X-Omat AR Film, XAR-5; 24x30 cm; Sigma) bedeckt. Nach der Exposition (zwischen 30 Sekunden und 5 Minuten) wurde der Blot 60 Sekunden in Entwicklerlösung (Cronex MD-Developer, Agfa, Dübendorf) 30 Sekunden in H₂O und anschließend für 5 Minuten in Fixiererlösung (Cronex MFE-Developer, Agfa, Dübendorf) getaucht. Nach der Fixierung wurde der Blot getrocknet.

2.4.9 Proteinfärbung

2.4.9.1 Proteinfärbung mit Imperial Stain

Das Gel wurde mit 50 mL Imperial Stain (Pierce) 60 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Das Entfärben des Gels erfolgte mit H₂O, bis der Hintergrund klar und die Proteine sichtbar waren.

2.4.9.2 Proteinfärbung mit Massenspektrometrie (MS)-kompatibler Silberfärbung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Silberfärbung verwendet, die keine Glutardialdehyd-Vernetzung der Proteine verursacht und somit MS-kompatibel ist.

Nach erfolgter 2D-SDS-Gelelektrophorese wurden die 2D-Gele über Nacht in Fixierlösung [500 mL Ethanol, 400 mL H₂O, 100 mL Essigsäure, 0,5 mL Formaldehyd (37 %ig)] fixiert. Am nächsten Tag wurden sie zweimal je 25 Minuten in 50 % Ethanol gewaschen. Anschließend erfolgte die Sensitivierung mit einer frisch angesetzten Sensitivlösung [0,1 g Na₂S₂O₃ * 5 H₂O (Merck) in 500 mL H₂O] für 60 Sekunden. Nach dreimaligem Waschen für je 20 Sekunden mit H₂O wurden die 2D-SDS-PAGE für 20 Minuten in Färbelösung [0,4 g AgNO₃ in 200 mL H₂O, 150 µL Formaldehyd (37 %ig)] inkubiert. Fortführend wurde dreimal für 20 Sekunden mit H₂O gewaschen. Die 2D-SDS-PAGEs wurden mit Entwicklerlösung [15 g Na₂CO₃, 1 mg NaS₂O₃ * 5 H₂O in 250 mL H₂O, 125 µL Formaldehyd (37 %)] behandelt, bis die Spots sichtbar wurden. Zum Abstoppen der Färbung wurden die Gele für 20 Sekunden gewässert und anschließend 10 Minuten in Stopplösung (220 mL Ethanol, 220 mL H₂O, 60 mL Essigsäure) inkubiert. Die Aufbewahrung der Gele erfolgte in H₂O bei 4°C.

2.4.10 Tryptischer Verdau von Proteinen im Gel

Der *in situ*-Verdau erfolgte in Eppendorf LoBind Gefäßen (Eppendorf, Hamburg). Die Spots wurden aus dem Gel ausgeschnitten, in die Eppendorf LoBind gegeben, mit 100 µL H₂O versetzt und 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Das Gel wurde zunächst 15 Minuten mit 100 µL 50 mmol/ L NH₄HCO₃/ ACN gewaschen und der Überstand abgenommen. Das Gelstück wurde mit 30 µL ACN vollständig bedeckt. Nach genau 60 Sekunden wurde das ACN entfernt. Anschließend wurde das Gelstück mit 50 µL 50 mmol/ L NH₄HCO₃ Puffer rehydriert. Nach 5 Minuten wurde es mit 50 µL ACN versetzt und weitere 15 Minuten geschüttelt. Der Überstand wurde abgenommen. Anschließend wurde das Gel durch Zugabe von 50 µL ACN in der Speed Vac getrocknet.

Zur Trypsinbehandlung wurden 0,5 µg Trypsin (MS-gold grade, Roche) in 250 µL 25 mmol/ L NH₄HCO₃ gelöst. Das Gel wurde mit 50 µL der Trypsinlösung versetzt und zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Proben mit 10 µL 1 %ig TFA versetzt

und für 15 Minuten ins Ultraschallbad gestellt. Die resultierenden Peptide standen nun für massenspektrometrische Analysen zur Verfügung.

2.4.11 Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS)

MALDI-TOF-MS-Analysen wurden mit dem Ultraflex TOF/TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonics, Bremen), das mit einem Stickstofflaser und einer LIFT-MS/MS Einheit ausgestattet ist, durchgeführt. Die Messungen wurden im positiven Reflektormodus durchgeführt. 2,5-Dihydroxybenzoesäure (Sigma) in 50 % ACN in 1 % Phosphorsäure wurde als Matrix verwendet. Die Kalibrierung erfolgte mit einem Peptid (Kalibrierungs)-Standard (~1000 - 4000 Da) von Bruker Daltonics. Es wurden jeweils 200 - 400 Einzelspektren addiert. Als Auswertungsprogramm wurden Compass 1.1 Software bestehend aus FlexControl 2.4, FlexAnalysis 2.4 und BioTools 3.0 (Bruker) verwendet. Proteine wurden mit Hilfe der Mascot Suchmaschine (<http://www.matrixscience.com>) identifiziert. Hierbei wurde die MSDB Datenbank verwendet. Die Suche wurde auf *C. elegans* mit einer Massentoleranz von 75 ppm und Carbamidomethylierung von Cystein als globale Modifikation und einer Oxidation von Methionin als variable Modifikation beschränkt. Proteine wurden ab einem 57 Mowse Score als identifiziert betrachtet.

Die zelluläre Lokalisation wurde mit PENCE-Proteome-Analyst-Software (<http://pa.cs.ualberta.ca:8080/pa/>) ermittelt. Homologien und Funktionen der identifizierten Proteine wurden mittels Wormbase (WS153; <http://www.wormbase.org>) bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Das PCom von *C. elegans*

Studien an chemisch-definiertem Medium von *C. elegans* ergaben, dass im Überstand nur ein einziges, ca. 40 kDa schweres PC-modifiziertes Protein (Aspartylprotease ASP-6), von diesen Nematoden freigesetzt wird (Lochnit *et al.* 2006). Allerdings zeigen zahlreiche Proteine nach Homogenisierung von *C. elegans* im eindimensionalen Western Blot mit dem PC-spezifischen monoklonalen Antikörper TEPC-15 eine positive Reaktion. Das Ziel dieser Arbeit war es, alle PC-modifizierten Proteine, die im Laufe der Entwicklung von *C. elegans* synthetisiert werden, zu identifizieren. Es sollte darüber hinaus untersucht werden, inwieweit die Substitution mit PC stadienspezifisch verläuft. Hierfür wurden sowohl ein Gemisch aus allen Stadien als auch aus synchronisierte Stadien (Eistadium, L1, L2, L3, L4, adultes Stadium und Dauerlarvenstadium) eingesetzt (siehe 2.3.4). Da fast alle bisher identifizierten PC-substituierten Proteine eine Modifikation mit N-Glykanen zeigen (Lochnit *et al.* 2000; Houston *et al.* 2004), eine Ausnahme stellt die Aspartylprotease ASP-6 dar (Lochnit *et al.* 2006), wurde neben dem N2-Stamm noch der TKO-Stamm von *C. elegans* auf seine PC-Modifikationen untersucht (Abb. 11). Beim TKO-Stamm wurde die GlcNAc-Transferase I ausgeschaltet, so dass die Würmer nicht in der Lage waren, komplexe N-Glykane auszubilden.

Die lyophilisierten synchronisierten *C. elegans* wurden in Lysispuffer aufgenommen und zentrifugiert. Um Lipide und niedermolekulare Verbindungen zu entfernen, die die Gelelektrophorese stören könnten und um die *C. elegans*-Proteine aufzukonzentrieren, wurde eine Chloroform/Methanol – Fällung vollzogen (siehe 2.3.6). Die gelöste Probe wurde für die erste Dimension auf selbst hergestellte IEF-Strips gegeben (siehe 2.3.7.1). Anschließend erfolgte eine weitere Auftrennung in der zweiten Dimension mittels SDS-PAGE (siehe 2.4.7.2). Die aufgetrennten Proteine wurden mit Silbernitrat visualisiert (siehe 2.4.9.2). PC-modifizierte Proteine wurden via Western Blot unter der Verwendung des PC-spezifischen monoklonalen Antikörpers TEPC-15 detektiert (siehe 2.4.8). Die korrespondierenden Spots wurden aus dem Silbergel ausgeschnitten und tryptisch verdaut (siehe 2.4.10). Die resultierenden Peptide wurden anschließend mittels MALDI-TOF-MS Peptide Mass Fingerprint und MASCOT Datenbanksuche identifiziert (siehe 2.4.11). Die Identifizierung wurde durch MS/MS Analyse von ausgewählten Peptiden bestätigt (Abb. 12).

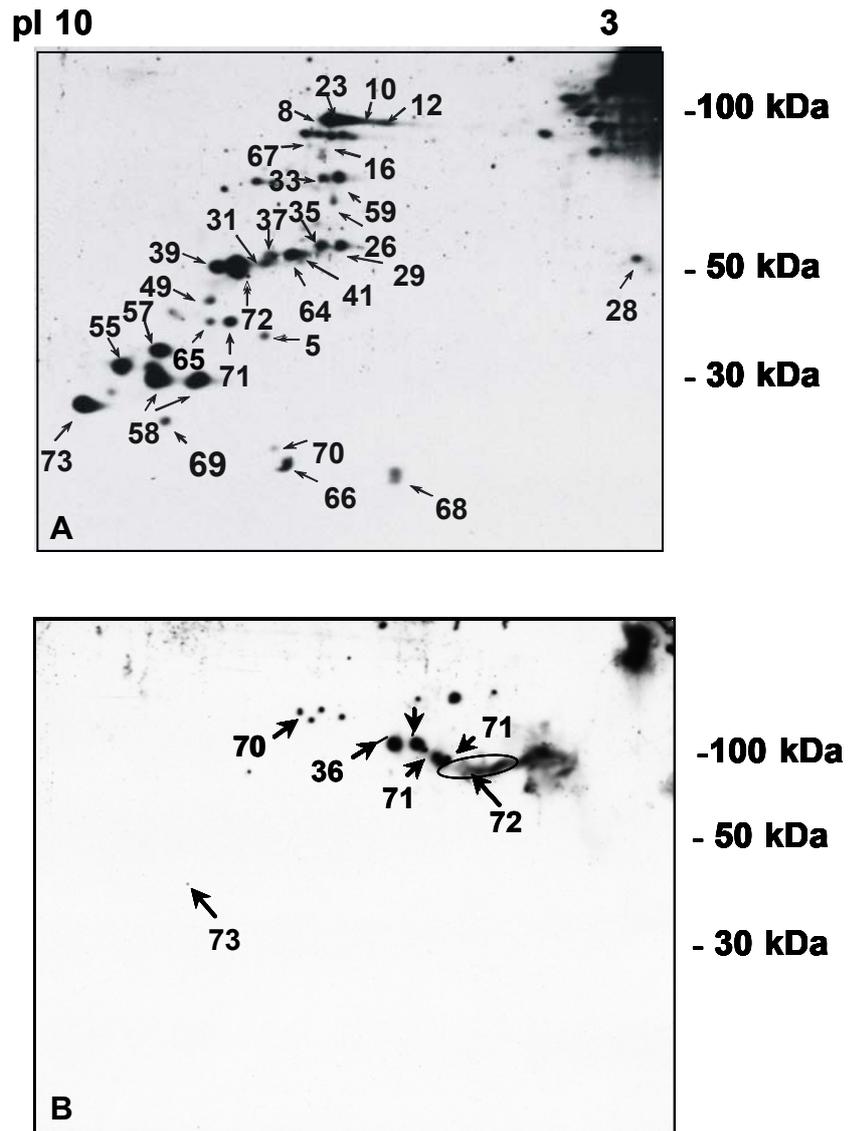


Abb. 11: Auftrennung von *C. elegans* Proteinen aus Stadiengemischen durch zweidimensionale Gelelektrophorese. PC-substituierte Proteine wurden mittels eines PC-spezifischen monoklonalen Antikörpers TEPC-15 von einem Gemisch aus allen Larvenstadien des N2-Stammes (A) und des TKO-Stammes (B) detektiert.

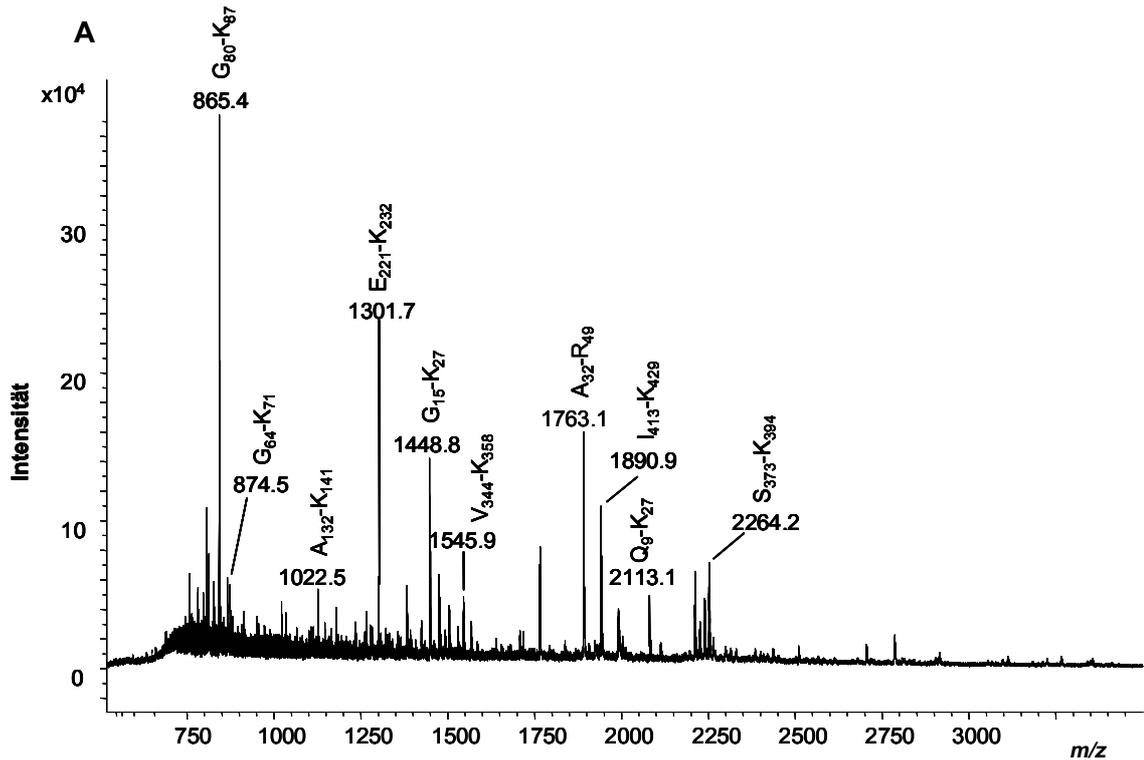
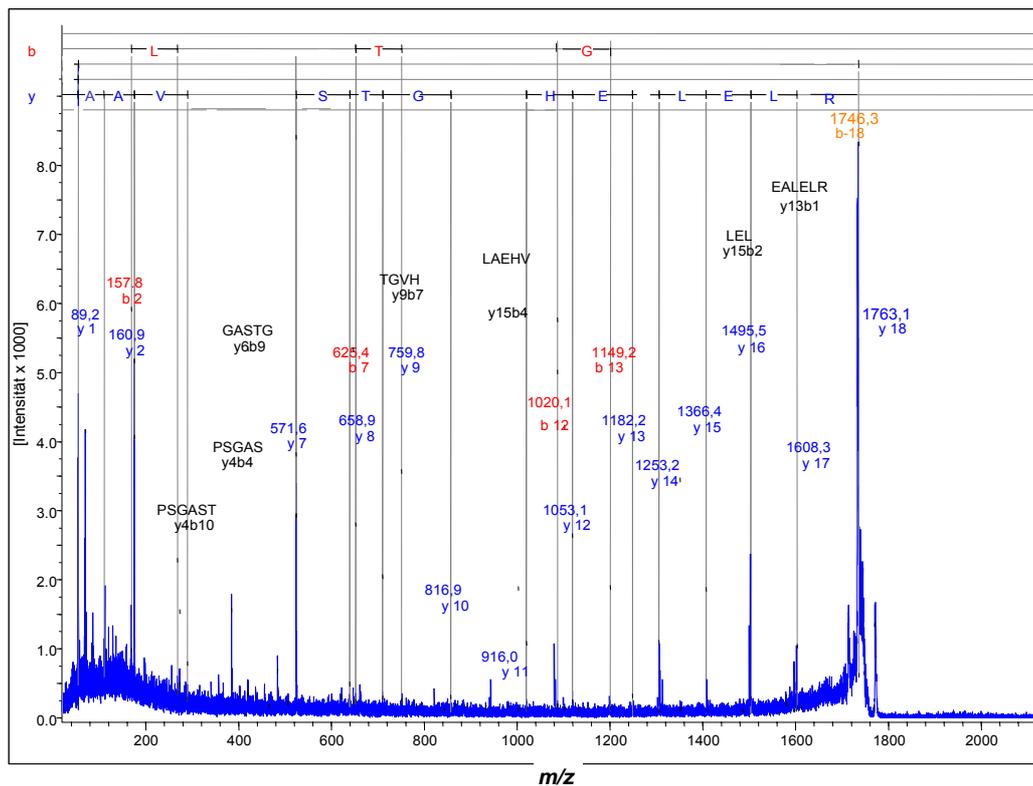
**B**

Abb. 12: Identifizierung des PC-modifizierten Proteins 2-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (*enol-1*) (Spot 72) von *C. elegans*. Das Protein wurde via MALDI-TOF-MS Peptidmassen Fingerprint identifiziert (A). Die Identifizierung wurde mittels MS/MS Analyse von selektiven Peptiden bestätigt. Gezeigt ist hier ein Beispiel eines MS/MS Experiments des Peptides RLELAEHVGTSAAGSPVAA $[M+H]^+$ 1763,1 (B). Die MS-Analyse ergab eine Sequenzabdeckung von 46 %. Die gefundenen Peptide wurden in der Sequenz rot markiert (C).

C

1 PITKIHAR**QI** **YDSRGNPTVE** **VDLFTEK**GVF **RAAVPSGAST** **GVHEALELRD**
 51 GDKAVHLGKG VLK**AVSNINE** **KIAPALIAKG** **FDVTAQKDID** DFMMALDGSE
 101 NKGNLGANAI LGVSLAVAKA GAVHKGLPLY KYIAELAGTG KVVLPVPAFN
 151 VINGGSHAGN **KLAMQEFMIL** **PVGASSFAEA** **MRMGSEVYHH** LKAEIKKRYG
 201 LDATAVGDEG GFAPNIQDNK **EGLDLLNTAI** **DKAGYTGKIS** IGMDVAASEF
 251 FKDGKYDLDF KNPASDSSKW LSQEQLTELY QSFIKEYPVV SIEDAFDQDD
 301 WDNWGFHGA TSIQLVGDDL TVTNPKRIQT AIDKKSCNCL LL**KVNQIGSV**
 351 **TESIEAAKLS** RANGWGMVS **HRSGETEDTF** **IADLVVGLAT** **GQIKTGAPCR**
 401 SERLAKYNQL LR**IEEELGAD** **AVYAGHNFRN** PQV

Fortsetzung von Abb. 12: Identifizierung des PC-modifizierten Proteins 2-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (*enol-1*) (Spot 72) von *C. elegans*.

Insgesamt wurden 73 PC-modifizierte Proteine identifiziert. Mittels der PENCE-Analyst-Proteome-Software (<http://pa.cs.ualberta.ca:8080/pa/>) konnte eine Voraussage über die zelluläre Lokalisation der identifizierten Proteine getroffen werden (Abb. 14). Diese Analyse ergab, dass die überwiegende Anzahl der PC-substituierten Proteine mitochondrial (36 %), cytosolisch (27 %) und nukleär (23 %) lokalisiert sind. Des Weiteren wurden sie im endoplasmatischen Retikulum (9 %) sowie extrazellulär (5 %) vorgefunden.

Alle identifizierten Proteine wurden entsprechend ihrer Funktion in Gruppen eingeteilt: Stoffwechsel, Signaltransduktion, Energie-/Redoxstoffwechsel, Proteinstoffwechsel, Chaperone, Struktur, Proteinsynthese/Translation und Proteine mit unbekanntem Funktionen. Zu der Funktionsgruppe des Stoffwechsels wurden allgemeine metabolische Funktionen, mit Ausnahme des Proteinstoffwechsels und des Energie-/Redoxstoffwechsels, gezählt. Die meisten der identifizierten Proteine (33 %) sind an der Stoffwechselregulation beteiligt. Daneben wurden Proteine, die in der Signaltransduktion (17 %) oder dem Proteinabbau (14 %) involviert sind, sowie Strukturproteine (11 %) identifiziert (Abb. 15). Weitaus weniger PC-modifizierte Proteine wurden dem Energie-/Redoxstoffwechsel und der Proteinsynthese/Translation zugeordnet. Außerdem wurden einige PC-substituierte Chaperone identifiziert.

Vergleiche der PC-Modifikationsmuster zwischen dem N2-Stamm und dem TKO-Stamm ergaben Änderungen der PC-Substitution der Proteine. Der TKO-Stamm wies eine deutliche Reduktion der PC-modifizierten Proteine auf. Außerdem wurden auch Proteine identifiziert, die nicht im N2-Stamm PC-modifiziert sind. Dementsprechend wurde bei diesen Proteinen eine andere Verteilung der Funktionen und Lokalisationen beobachtet (Abb. 14, Abb. 15). Im TKO-Stamm wurden PC-modifizierte Proteine in den

Mitochondrien (43 %) und im endoplasmatischen Retikulum (14 %) vorgefunden. Sie haben hauptsächlich metabolische Funktion (43 %), allerdings sind sie auch an der Signaltransduktion (29 %), der Proteinsynthese/Translation (14 %) und dem Proteinstoffwechsel (14 %) beteiligt.

Um die Verteilung der PC-Modifikationen während der Entwicklung näher zu untersuchen, wurden synchronisierte Larvenstadien des N2-Stammes verwendet und die unterschiedlichen Spotmuster analysiert. Die Analyse der PC-modifizierten Proteine zeigte einen stadienspezifischen Verlauf in der Entwicklung von *C. elegans* des N2-Stammes (Abb. 13) sowohl in der Lokalisation als auch in der Funktion der Proteine (Abb. 14, Abb. 15). Die meisten PC-substituierten Proteine sind im Eistadium vorzufinden, gefolgt vom adulten Stadium, dem Dauerlarvenstadium und L4. In L2 und L3 wiesen nur wenige Proteine eine PC-Modifikation auf. In L1 wurden keine PC-substituierten Proteine gefunden.

Im Eistadium sind die identifizierten Proteine an unterschiedlichen Funktionen beteiligt: Proteinsynthese/Translation (10 %), Energie-/Redoxstoffwechsel (10 %), Struktur (10 %), Chaperone (20 %), Proteinstoffwechsel (25 %) und Stoffwechsel (25 %). Sie liegen vorwiegend im Mitochondrium (36 %), Cytosol (27 %) und Nukleus (23 %) vor. Die PC-modifizierten Proteine des Dauerlarvenstadiums haben ebenfalls vielfältige Funktionen [Stoffwechsel (27 %), Struktur (27 %), Chaperone (19 %), Energie-/Redoxstoffwechsel (9 %), Proteinstoffwechsel (9 %) und Proteinsynthese/Translation (9 %)]. Sie sind im Mitochondrium (33 %), Nukleus (25 %) sowie im Cytosol (42 %) lokalisiert.

Die Mehrzahl der PC-modifizierten Proteine ist im Cytosol lokalisiert und am Stoffwechsel (38 %) beteiligt. Außerdem spielen in diesem Stadium solche PC-substituierten Proteine eine Rolle, die eine Funktion in der Signaltransduktion (12 %) haben. Die überwiegende Anzahl der PC-modifizierten Proteine im adulten Stadium ist in den Energie- und Redoxstoffwechsel (36 %) involviert und in den Mitochondrien (64 %) lokalisiert.

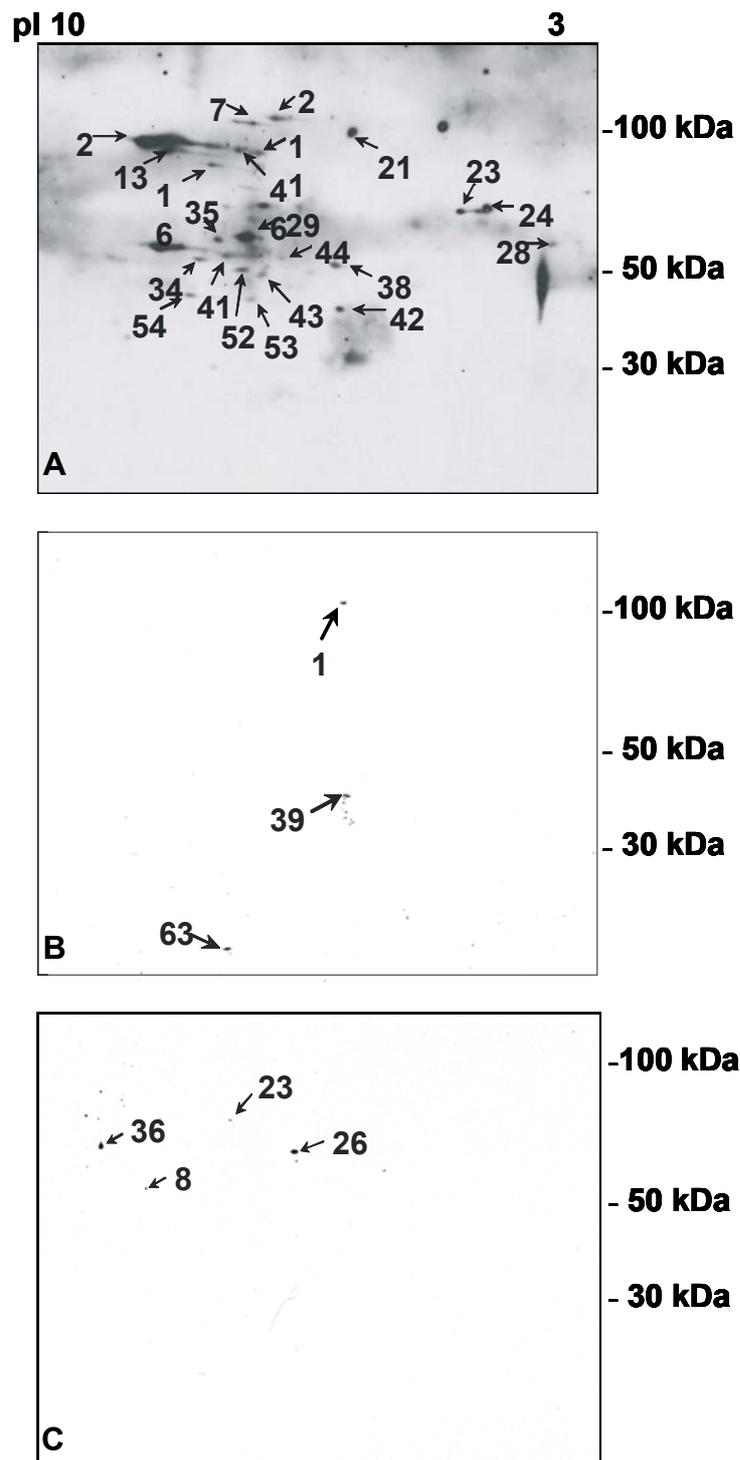
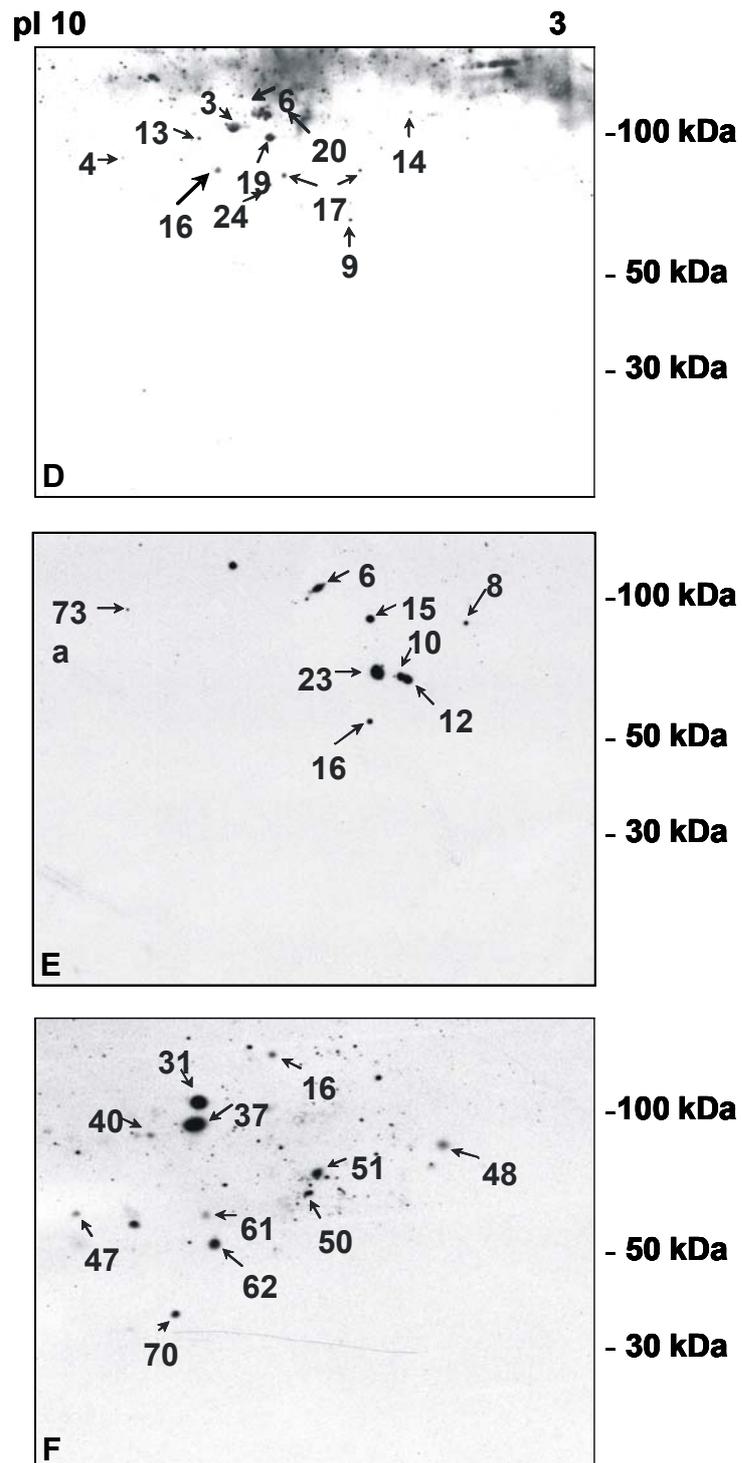


Abb. 13: Auftrennung von *C. elegans* Proteinen verschiedener Stadien des N2-Stammes durch zweidimensionale Gelelektrophorese. PC-substituierte Proteine der unterschiedlichen Stadien (A: Eistadium, B: L2, C: L3, D: Dauerlarvenstadium, E: L4, F: adultes Stadium) wurden mittels eines PC-spezifischen monoklonalen Antikörpers TEPC-15 detektiert.



Fortsetzung Abb. 13: Auftrennung von *C. elegans* Proteinen verschiedener Stadien des N2-Stammes durch zweidimensionale Gelelektrophorese.

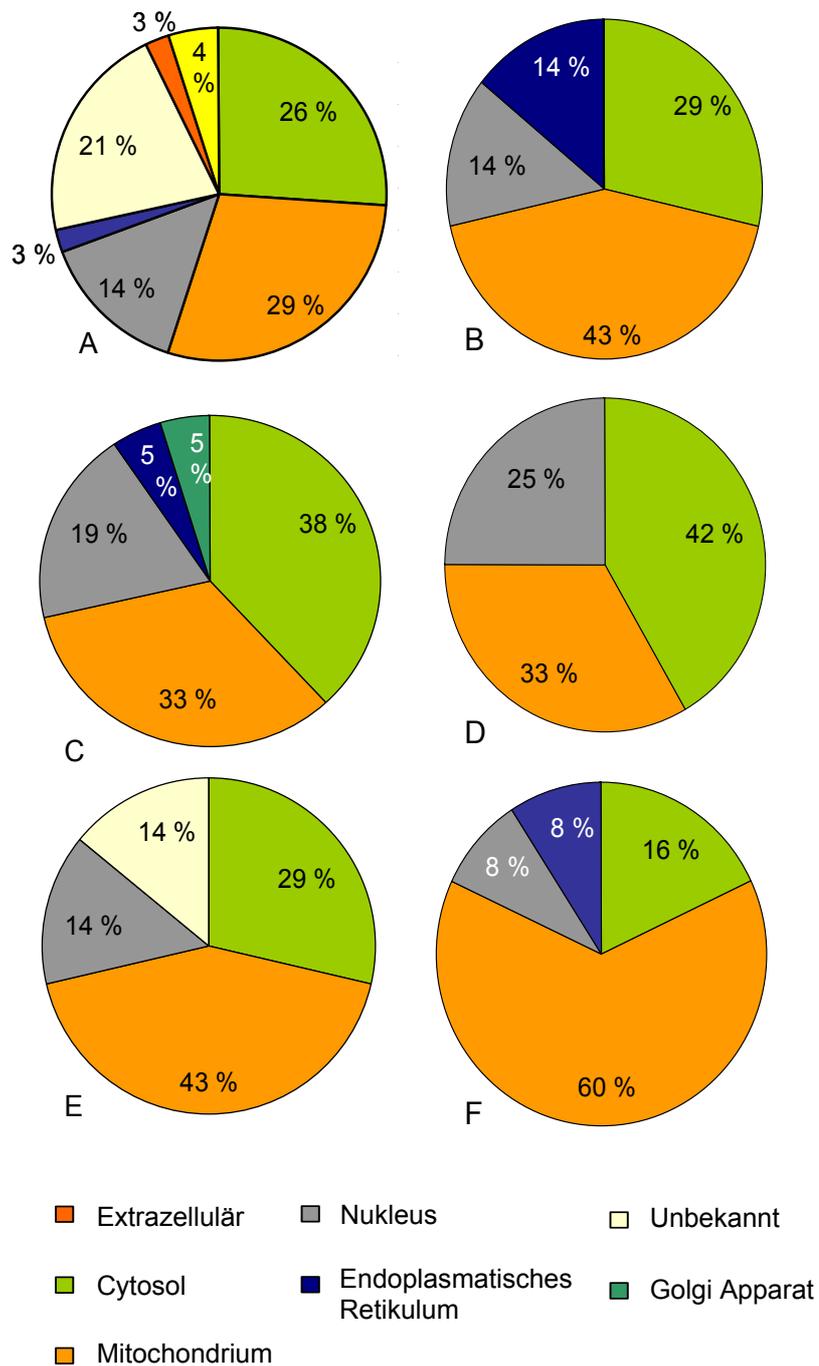


Abb. 14: Zelluläre Lokalisation der PC-modifizierten Proteine von *C. elegans* des N2-Stammes. Die Verteilung der zellulären Lokalisation der identifizierten Proteine wurde mit dem PENCE-Proteome-Analyst-Software-Programm für das Gemisch aus allen Entwicklungsstadien des N2-Stammes (A), und des TKO-Stammes (B), des Eistadiums (C), des Dauerlarvenstadiums (D), des L4 (E) und des adulten Stadiums (F) ermittelt.

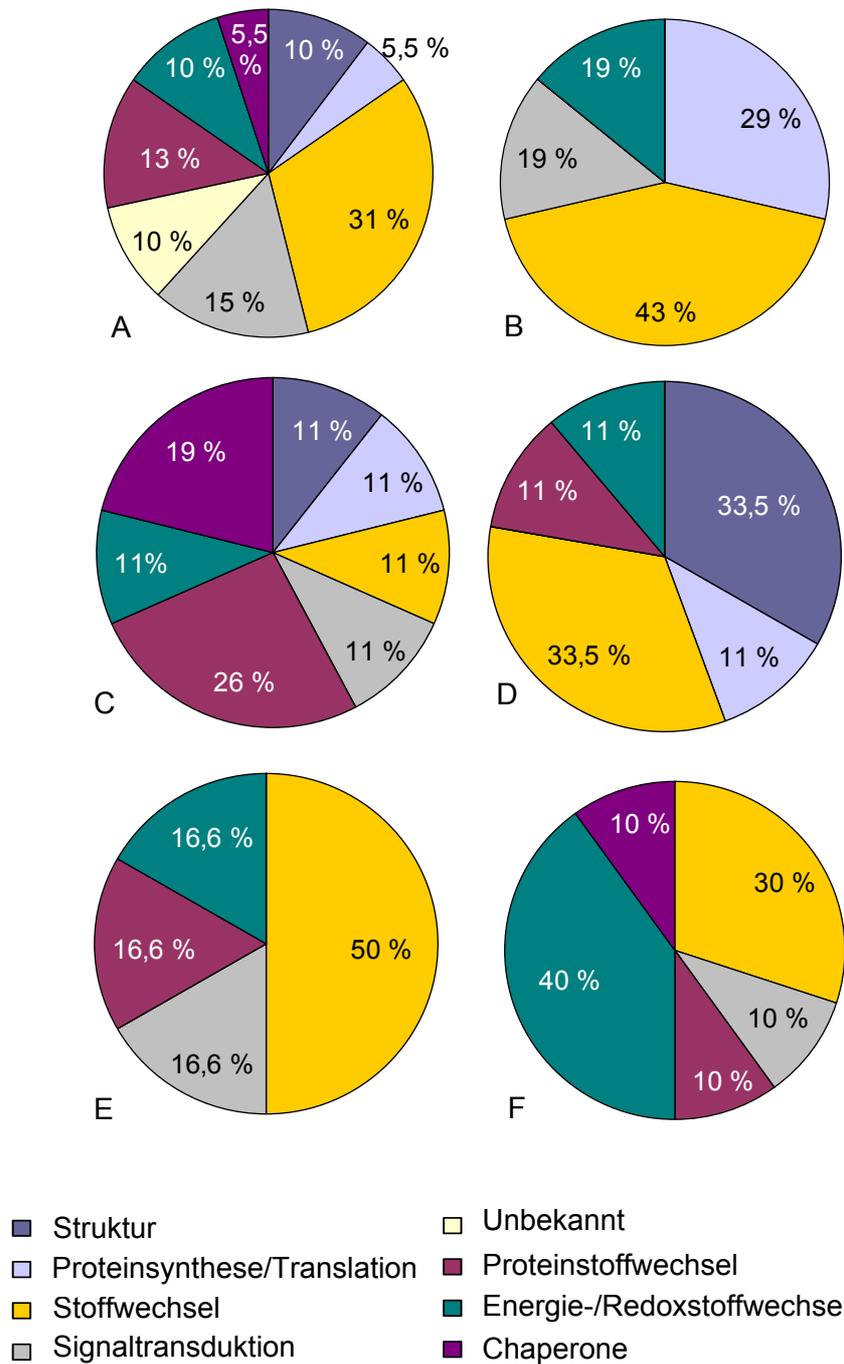


Abb. 15: Funktionelle Klassifikation von PC-modifizierten Proteinen von *C. elegans* für das Gemisch aus allen Stadien des N2-Stammes (A) und des TKO-Stammes (B), des Eistadiums (C), des Dauerlarvenstadiums (D), des L4 (E) und des adulten Stadiums (F).

Tabelle 1:Identifizierte PC-modifizierte Strukturproteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*.

Nr	Genname	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b								
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A	
2	K07H8.6 <i>vit-6</i>	Vitellogenin	193,1	6,85	E		+							
4	Y66H1B.2	Aktin-bindendes Zytoskelettprotein, Filamin	153,4	8,04	C			+						
12	F58G11.1b	Ca-bindendes Transmembranprotein	87,4	6,08	G	+								
18	M6.1 <i>ifc-2</i>	Intermediäres Filament-C-Protein-2	78,1	6,49	C		+	+						
19	T14G11.3	Mitochondriales inneres Membranprotein (Mitofilin)	76,0	6,69	M			+						
25	Y46H3A.6 <i>gly-7</i>	Polypeptid-GalNAc-Transferase	68,8	8,1	G	+								
30	F25H9.5 <i>frm-10</i>	Membran - Zytoskelett verknüpfendes Protein	57,5	6,06	C	+								
67	Y104H12BR.1	Ca-bindendes Aktin-bündelndes Protein	19,8	9,22	C	+								

^a **Lokalisation:** C: Cytoplasma, E: Extrazellulär, G: Golgi Apparat; M: Mitochondrium, N: Nukleus.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

Die Gruppe der Strukturproteine ist in PC-modifizierter Form überwiegend im Ei- und Dauerlarvenstadium in verschiedenen zellulären Lokalisationen vorzufinden: das Genprodukt von *vit-6* (Vitellogenin 6, K07H8.6), das Aktin-bindende Zytoskelettprotein (Filamin, Y66H1B2), das intermediäre Filament-C-Protein-2 (IFC-2, M6.1), das Membran-Zytoskelett verknüpfende Protein FRM-10 (F25H9.5) und ein Calcium-bindendes Aktin-bündelndes Protein (Y104H12BR.1). Das größtenteils in die mitochondriale Struktur eingebundene innere Membranprotein (Mitofilin, T14G11.3) konnte ebenfalls identifiziert werden. Das Calcium-bindende Transmembranprotein (F58G11.1b) wurde als einziges Protein mittels PENCE-Analyst-Proteome-Software im Golgi Apparat lokalisiert. Das Lipoprotein Vitellogenin 6 ist ein wichtiges carbonyliertes Eidotterprotein, das vom und im Darm während des Eierlegens synthetisiert wird. Allerdings wurde Vitellogenin 6 auch in älteren Nematoden gefunden, die keine Eier mehr legen. Da das Protein Metallionen-Bindungskapazität hat, wird spekuliert, dass es als Schutz vor oxidativer Schädigung dient (Goto *et al.* 1999; Nakamura *et al.* 1999). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Vitellogenin 6 ebenfalls O-GlcNAcyliert ist

Nr	Genname	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b							
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A
68	ZK524.2	Neurotransmitter abgebender Regulator	65,4	9,24	C	+							
73	<i>unc-13</i>												

^a **Lokalisation:** NP: kein Ergebnis, C: Cytoplasma, E: Extrazellulär, M: Mitochondrium, N: Nukleus.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

^c in N2- und TKO-Stamm vorhanden.

^e keine N-Glykosylierungsstelle vorhanden.

PC-modifizierte Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, sind vorwiegend im Nukleus und im Cytosol lokalisiert. Diese Proteine kommen nahezu in allen Stadien vor. Diese Gruppe beinhaltet die Membran-assoziierte Guanylatkinase DLG-1 (C25F6.2), Rho Guaninnukleotid-Austauschfaktor VAV-1 (C35B8.2), die Serin/Threonin Proteinkinase TPA-1 (B0545.1), das Aktivatorprotein von G-Protein Signalwegen AGS-3 (F32A6.4), das Rezeptorzielprotein LIN-7 (Y54G11A.10), das Neurotransmitter abgebende Regulatorprotein UNC-13 (ZK524.2), das Hormon-Rezeptor homologe Protein NHR-216 (T09D3.4), die PAF-Acetylhydrolase (C52B9.7), die Carbon-Nitrogen-Hydrolase NIT-1 (ZK1058.6) und das Galektin LEC-2 (F52H3.7). DLG-1 ist zum einen eine Komponente des basalen Teiles der apikalen Junctions und zum anderen Bestandteil eines molekularen Netzwerkes, das epitheliale Zellpolaritäten während der Entwicklung kontrolliert (Muller *et al.* 2003). VAV-1 führt nach seiner Phosphorylierung zu einer Aktivierung von Rho/Rac GTPasen. Daraufhin aktiviert die Phospholipase C Inositol-3-Phosphat, das eine Calciumausschüttung des endoplasmatischen Retikulums bewirkt und somit zu einem intrazellulären Anstieg der Calciumkonzentration führt. Aus diesem Grund ist der VAV-1 Stoffwechselweg wichtig für den Bewegungsablauf des Nematoden (Norman *et al.* 2005). Die Proteinkinase C TPA-1 ist involviert in die Signaltransduktion und wichtig für die Regulation des Nikotin-Acetylcholin-Rezeptors (Tabuse 2002). Dieses Protein ist nicht nur mit PC modifiziert, sondern ist außerdem noch O-GlcNAcyliert (Grabitzki *et al.* 2006a). Das Aktivatorprotein von G-Protein Signalwegen (AGS-3) spielt eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Spindelpositionen im frühen embryonalen Stadium (Gotta *et al.* 2003). Zusammen mit LIN-2 und LIN-10 bildet LIN-7 heterotrimere Komplexe und hat eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Organisation von Signalproteinen (Harris *et al.* 2002). UNC-13 interagiert mit Syntaxin. Diese Interaktion wird für synaptische Übermittlung benötigt. Eine wichtige Rolle in der Produktion der Wachstumsfaktoren spielt NIT-1, ein Homolog des Tumorsuppressors (Madison *et al.* 2005). Bei Galektin

LEC-2 konnte gezeigt werden, dass es neben der PC-Modifikation auch O-GlcNAcyliert ist (Grabitzki *et al.* 2006a).

Tabelle 3:

Identifizierte PC-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*, die an der Proteinsynthese/Translation beteiligt sind.

Nr	Genname	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b							
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A
7	F10G7.2 <i>tsn-1</i>	Transkriptionaler Coaktivator p100	100,7	7,59	N C		+						
14	Y54E10A.15 <i>cdt-1</i>	DNA Replikationsfaktor	84,6	9,94	N			+					
50	C44E4.4	RNA-bindendes Protein La	43,6	6,61	N		+						
55	F26A3.3 <i>ego-1</i>	RNA-abhängige RNA-Polymerase	38,0	5,68	NP	+							
71	T03F1.7 ^{d,e}	Ribosomale RNA Adenin-dimethylase	42,3	8,37	C	+							

^a **Lokalisation:** NP: kein Ergebnis, C: Cytoplasma, N: Nukleus.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

^d nur in TKO-Stamm vorhanden.

^e keine N-Glykosylierungsstelle vorhanden.

Der Funktionsgruppe Proteinsynthese/Translation wurden fünf PC-modifizierte Proteine, die vorwiegend im Cytosol und im Nukleus lokalisiert sind, zugeordnet: der transkriptionale Coaktivator p100 (TSN-1, F10G7.2), der Replikationsfaktor CDT-1 (Y54E10A.15), das RNA-bindende Protein La (C44E4.4), die RNA-abhängige RNA-Polymerase (EGO-1, F26A3.3), die ribosomale RNA-Adenindimethylase (T03F1.7). Hauptsächlich wurden diese Proteine von den Ei- und den Dauerlarvenstadien synthetisiert. TSN-1 wurde als Bestandteil des RISC-Komplexes identifiziert, der vermutlich einen Einfluss auf den RNA-Abbau hat (Caudy *et al.* 2003). Der DNA-Replikationsfaktor CDT-1 ist wichtig in der späten Phase der Mitose und der frühen Phase des G1 (Yanagi *et al.* 2005). Als ein essentielles Protein für die Entwicklung und Teilung der Keimzellen ist EGO-1 als PC-modifiziert identifiziert worden (Maine *et al.* 2005). Für das RNA-Processing werden u.a. die ribosomale RNA Adenindimethylase (Lafontaine *et al.* 1998) sowie das RNA-bindende Protein La, das in die Reifung der tRNA involviert ist, benötigt.

Tabelle 4:

Identifizierte PC-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*, die der Funktionsgruppe Chaperone zugeordnet werden.

Nr	Genname	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b								
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A	
21	C12C8.1 <i>hsp-70</i>	Chaperone HSP70/ HSC 70	73,1	4,95	C		+							
22	C37H5.8 <i>hsp-6</i>	Molekulare Chaperone	70,8	5,89	M		+							
27	Y22D7AL.5	HSP 60	60,4 60,2	5,39 5,31	C M	+								
36	H06O01.1 ^{c, e} <i>pdi-3</i>	Proteindisulfidomerase	54,9	5,96	ER		+							
43	F31D4.3 <i>fkf-6</i>	FKBP-typ Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase	48,0	5,65	C N		+							
45	B0403.4 ^e <i>tag-320</i>	Thioredoxin/Protein-Disulfidomerase	47,7	5,83	ER									+

^a **Lokalisation:** NP: kein Ergebnis, C: Cytoplasma, E: Extrazellulär, M: Mitochondrium, N: Nukleus, ER: endoplasmatisches Retikulum.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

^c in N2- und TKO-Stamm vorhanden.

^e keine N-Glykosylierungsstelle vorhanden.

PC-modifizierte Proteine aus der Gruppe der Chaperone wurden hauptsächlich im Eistadium gefunden: die Chaperone HSP-70/ HSC-70 (*hsp-70*, C12C8.1), die Chaperone HSP-6 (C37H5.8), HSP-60 (Y22D7AL.5), die Proteindisulfidomerase (*pdi-3*, H06O01.1), die FKBP-typ Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase (*fkf-6*, F31D4.3) und die Thioredoxin/Proteindisulfidomerase (*tag-320*, B0403.4). Diese Proteine sind im Cytosol, in den Mitochondrien und im endoplasmatischen Retikulum vorzufinden. HSP-70 dient nicht nur als Lektin für O-GlcNAc, sondern ist damit auch modifiziert (Grabitzki *et al.* 2006a, Guinez *et al.* 2006). HSP-70 hat eine Funktion im Ras Signaltransduktionsweg. Zusammen mit der Proteindisulfidomerase (PDI) haben die Angehörigen der HSP-70-Familie kompensatorische Funktionen bei Abwesenheit von Calreticulin und / oder Calnexin (Lee *et al.* 2006). Die mitochondrial lokalisierten Chaperone HSP-6 und HSP-60 werden selektiv durch das Absinken von defekten Proteinfaltungen und Prozessierungen in der Organelle aktiviert (Yoneda *et al.* 2004). PDI-3, eine Cofaktor-unabhängige Proteindisulfidomerase, zeigt eine unübliche enzymatische Aktivität. Sie entschlüsselt ein Enzym der ERp60-Klasse von

Thioredoxinproteinen und wird in vielen Geweben (z.B. Darm und Hypodermis) exprimiert (Eschenlauer *et al.* 2003). PDI-3 wird für einen Großteil der postembryonalen Körperformen benötigt, da es die extrazelluläre Matrix durch die Quervernetzungsaktivität und Disulfidisomeraseprotein-Chaperonaktivität stabilisieren kann (Galat 2000). Des Weiteren wurde FKBP-typ Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase und Thioredoxin/Proteindisulfidisomerase als TEPC-15 positiv identifiziert.

Tabelle 5:

Identifizierte PC-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*, die am Energie-/Redoxstoffwechsel beteiligt sind.

Nr	Genname	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b								
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A	
11	Y37E3.17	Dimethylglycin-Dehydrogenase	91,8	7,06	M		+							
17	Y45G12B.1 <i>nuo-5</i>	NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase	79,5	6,29	M			+		+				
23	C53D5.5	Gamma-Glutamyltransferase	70,6	5,78	NP	+					+			
29	H28O16.1	F0F1-typ ATP Synthase Untereinheit	57,9	8,98	M	+								+
35	H28O16.1d	F0F1-typ ATPase Untereinheit	55,1	8,25	M	+								+
41	C46F11.2	Mitochondriale Glutathion-Reduktase	51,4	6,66	M		+							
44	T10B10.2	Ubiquinol-Cytochrom-C-Reduktase Untereinheit QCR2	47,9	9,18	M									+
47	VW06B3R.1 b	Ubiquinol-Cytochrom-C-Reduktase Untereinheit QCR2	44,4	8,79	M									+
69	F23C8.5 ^{d, e}	Elektronentransfer Flavoprotein, Beta Untereinheit	27,6	8,51	M	+							+	

^a **Lokalisation:** NP: kein Ergebnis, M: Mitochondrium.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

^d nur in TKO-Stamm vorhanden.

^e keine N-Glykosylierungsstelle vorhanden.

Alle identifizierten PC-substituierten Proteine, die in den Energie- und Redoxstoffwechsel involviert sind, sind in den Mitochondrien lokalisiert. Sie kommen in nahezu allen Larvenstadien, insbesondere aber im adulten Stadium, vor. Zu dieser Funktionsgruppe zählen die Dimethylglycinderhydrogenase (Y37E3.17), die NADH-Ubiquinonoxidoreduktase (*nuo-5*, Y45G12B.1), die Gamma-Glutamyltransferase

(C53D5.5), die F0F1-typ ATP Synthase Untereinheit (H28O16.1, H28O16.1d), die mitochondriale Glutathionreduktase (C46F11.2), die Ubiquinol-Cytochrom-C-Reduktase Untereinheit QCR2 (T10B10.2, VW06B3R.1b) und die Elektronentransfer-Flavoprotein- β -Untereinheit (F23C8.5). Die Dimethylglycinderhydrogenase ist ein Flavoprotein, das die Katalyse der oxidativen N-Demethylierung von Dimethylglycin zu einem anionischen Semichinon reduziert (Steenkamp *et al.* 1982). Die Gamma-Glutamyltransferase spielt eine besondere Rolle im Katabolismus der Glutathione in Nematoden (Hussein *et al.* 1995).

Tabelle 6:

Identifizierte PC-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*, die am Proteinstoffwechsel beteiligt sind.

Nr	Genname	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b								
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A	
9	ZK520.4 <i>cul-2</i>	E3 Ubiquitin-Ligase/Cullin	98,3	8,33	N			+						
10	F38B7.5 <i>duo-1</i>	Ubiquitin-spezifische Protease	94,9	6,19	C	+							+	
62	F52C6.4 <i>math-32</i>	Ubiquitin-ähnliches Protein	33,4	9,43	C N	+								
33	W07G4.4	Aminopeptidase	56,5	6,57	C	+	+							
40	F56D2.1	Mitochondriale Peptidase	51,8	6,07	M		+							
42	F01F1.9	Aminopeptidase-I-Zink-Metalloprotease	51,1	6,21	C		+							
51	W08E12.7 ^e	Metallopeptidase	43,0	7,59	N		+							
56	K10H10.2	Cystathionin- β -Synthase	36,5	7,56	NP	+								+
28	ZK829.4	Glutamatdehydrogenase	59,2	6,9	M	+	+							
38	K04D7.3 <i>gta-1</i>	4-Aminobutyrat-Aminotransferase	53,2	8,67	M									+

^a **Lokalisation:** NP: kein Ergebnis, C: Cytoplasma, M: Mitochondrium, N: Nukleus.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

^c in N2- und TKO-Stamm vorhanden.

^d nur in TKO-Stamm vorhanden.

^e keine N-Glykosylierungsstelle vorhanden.

Zu der Funktionsgruppe der Proteinstoffwechsel werden Enzyme und Proteine, die am Protein- und Aminosäurestoffwechsel beteiligt sind, zusammengefasst. Zehn Proteine, die eine PC-Modifikation aufweisen, wurden identifiziert. So wurden E3 Ubiquitin-Ligase/Cullin (*cul-2*, ZK520.4), Ubiquitin-spezifische Protease (*duo-1*, F38B7.5),

Ubiquitin-ähnliches Protein (*math-32*, F52C6.4), Aminopeptidase (W07G4.4), mitochondriale Peptidase (F56D2.1), Aminopeptidase-I-Zink-Metalloprotease (F01F1.9), Metalloprotease (W08E12.7), Cystathionin- β -Synthase (K10H10.2), Glutamatdehydrogenase (ZK829.4) und 4-Aminobutyrat-Aminotransferase (*gta-1*, K04D7.3) als PC-modifiziert nachgewiesen und sind dort in verschiedenen Organellen lokalisiert. Hauptsächlich wurden sie im Eistadium vorgefunden. Deutlich weniger PC-modifizierte Proteine finden sich im adulten Stadium, in den Dauerlarven und in L4. In L2 und L3 wurden keine PC-substituierten Proteine gefunden, die zu dieser Funktionsgruppe gehören. Drei Proteine (E3 Ubiquitin-Ligase/-Cullin, Ubiquitin-spezifische Protease, Ubiquitin-ähnliches Protein) sind am, über Ubiquitinylierung induzierten, Proteinabbau beteiligt. Eine wichtige Funktion für *C. elegans* haben die Ubiquitin-spezifische Protease sowie die E3 Ubiquitin-Ligase/Cullin. CUL-2 bewirkt in der Anaphase der Meiose die Ausrichtung der anterioren und posterioren Achse von *C. elegans* (Liu *et al.* 2004).

Sowohl die PC-modifizierten Aminopeptidasen als auch die in den Mitochondrien lokalisierte Peptidase der Insulinase-Superfamilie sind in der Proteolyse involviert. Bestandteile des Aminosäurenmetabolismus sind die Cystathionin- β -Synthase, die Glutamatdehydrogenase und die 4-Aminobutyrat-Aminotransferase.

Tabelle 7:

Identifizierte PC-modifizierte metabolische Proteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*.

Nr	Genname	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b							
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A
5	C05E4.9 <i>gei-7</i>	Isocitratlyase/ Malatsynthase	108,6	7,49	C	+						+	
13	F54H12.1 <i>aco-2</i>	Aconitase/Homoaconitase	85,7	8,59	M		+	+					
39	LLC1.3 ^c	Dihydroliponamid- Dehydrogenase	52,6	7,59	M	+	+						
16	F27D9.5	Propionyl-CoA-Carboxylase Untereinheit	80,2 79,7	7,61	M N	+	+	+			+	+	+
46	Y57A10C.6	Peroxisomale 3-Ketoacyl- CoA-Thiolase P-44/SCP2	44,9	7,55	NP	+							
48	Y57A10C.6	Peroxisomale 3-Ketoacyl- CoA-Thiolase P-44/SCP2	44,4	9,24	M	+						+	
52	T02G5.8 <i>kat-1</i>	3-Ketoacyl-CoA-Thiolase	42,7	8,82	M	+							

Nr	Genname	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b								
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A	
61	B0272.3	3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase	33,5	7,66	M	+								
49	T03F1.3 ^e	3-Phosphoglyceratkinase	44,1	6,53	C		+							
54	F01F1.12	Fruktose-bisphosphat Aldolase	39,1	7,71	NP	+								
57	K10B3.7 <i>gpd-2</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	36,4	6,76	C									+
72	T21B10.2 ^{d,e} <i>enol-1</i>	2-Phosphoglycerat Dehydrogenase	46,6	5,56	N	+								
66	C33A12.7 ^e	Glyoxylase	26,4	7,69	M	+								+
70	F54D8.3 ^{d,e} <i>alh-1</i>	Aldehyddehydrogenase	59,5	7,14	M	+								
20	W06H3.3	CTP-Synthase	75,6	5,92	C	+								
24	K07E3.4b	Formyltetrahydrofolat-Synthetase	69,4	6,53	C			+						
32	K08E3.5	UDP-Glukose-Pyrophosphorylase	56,8	6,55	C		+							

^a **Lokalisation:** NP: kein Ergebnis, C: Cytoplasma, M: Mitochondrium, N: Nukleus.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

^c in N2- und TKO-Stamm vorhanden.

^d nur in TKO-Stamm vorhanden.

^e keine N-Glykosylierungsstelle vorhanden.

Die meisten PC-modifizierten Proteine sind am Stoffwechsel beteiligt. Diese Proteine sind hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert. Daneben gibt es allerdings auch PC-modifizierte Proteine im Cytosol und im Nukleus. Die meisten PC-substituierten Proteine werden im Eistadium (34 %) exprimiert. Im adulten Stadium, in L4 und im Dauerlarvenstadium wurden jeweils 20 % und in L3 6 % PC-modifizierte Proteine identifiziert. Die meisten Proteine sind an dem Fettsäurestoffwechsel und der Glykolyse beteiligt.

Zu den Proteinen des Fettsäurestoffwechsels zählen die Propionyl-CoA-Carboxylase Untereinheit (F27D9.5), die in fast allen Stadien gefunden wurde. Des Weiteren zählen die im Cytosol lokalisierte peroxisomale 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase P-44/SCP2 (Y57A10C.6) und die 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (B0272.3) zu dieser Stoffwechseluntergruppe. Die Gruppe der an der Glykolyse beteiligten PC-modifizierten Proteine enthält die Fruktose-bisphosphat-Aldolase (F01F1.12), die Fruktose-1,6-bisphosphat in Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxy-acetonphosphat umwandelt. Die 3-Phosphoglyceratkinase (T03F1.3) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gpd-2*, K10B3.7) bilden 1,3-Bisphospho-

glycerat. Außerdem zählt die 2-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (*enol-1*, T21B10.2) zu dieser Gruppe. Proteine, die im Pyruvatdehydrogenase-Komplex involviert sind, sind Aconitase/Homoaconitase (*aco-2*, F54H12.1) und Dihydroliponamid-Dehydrogenase (LLC1.3). LLC1.3 ist zudem O-GlcNAcyliert (Grabitzki *et al.* 2006a). Zwei Proteine sind beteiligt am Glyoxylatstoffwechsel: (Isocitratlyase/Malatsynthase (*gei-7*, C05E4.9) und Glyoxylase (C33A12.7)). Die Aldehyddehydrogenase (*alh-1*, F54D8.3) und die UDP-Glukose-Pyrophosphorylase (K08E3.5) spielen eine wichtige Rolle im Ethanolstoffwechsel. Außerdem wurden die CTP-Synthase (W06H3.3), welche am Pyrimidinstoffwechsel beteiligt ist, die 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase (*kat-1*, T02G5.8) und Formyltetrahydrofolatsynthetase (K07E3.4b) als TEPC-15 positiv identifiziert.

Tabelle 8:

Identifizierte PC-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*, die keiner Funktionsgruppe zugeordnet werden konnten.

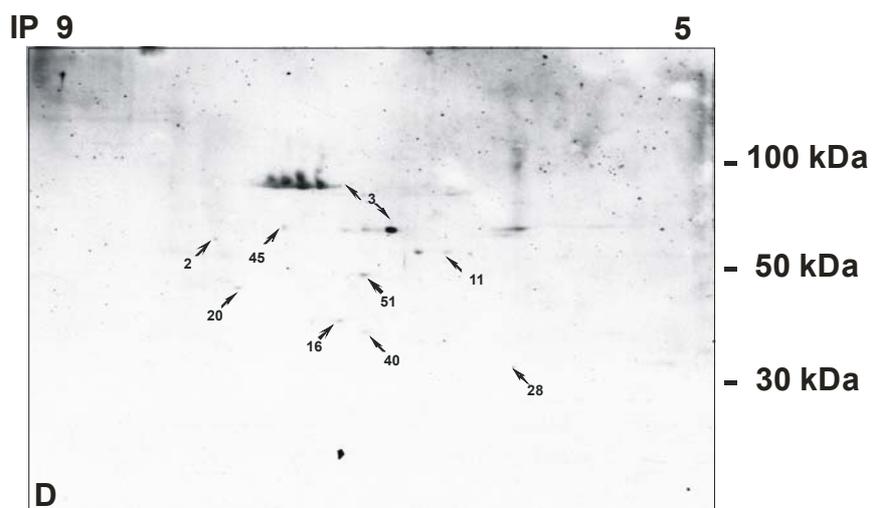
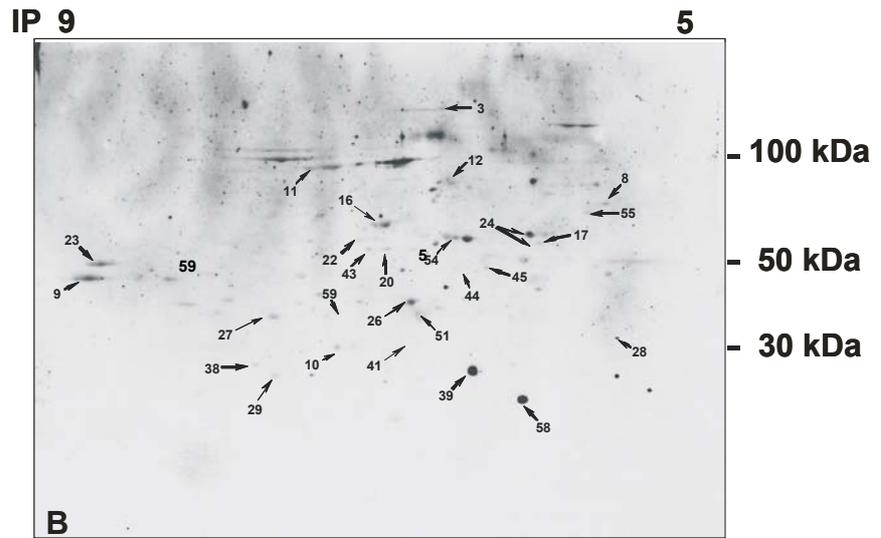
Nr	Genname	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b								
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A	
1	F44E2.2		201,1	6,68	NP					+				
34	F44B9.2 ^e		56,2	4,84	C N						+			
53	Y47H9C.11 ^e		40,5	6,1	NP	+								
59	C37C3.8 <i>tag-253</i>	Dioxygenase	34,4	7,76	NP	+				+				
64	Y73B6BL.16 ^e		30,6	8,68	NP	+								
65	T13C2.4		27,5	5,16	NP	+								

^a **Lokalisation:** NP: kein Ergebnis, C: Cytoplasma, N: Nukleus.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

^e keine N-Glykosylierungsstelle vorhanden.

Es wurden sechs PC-modifizierte Proteine gefunden, die keiner Funktionsgruppe zugeordnet werden konnten. Nur bei einem Protein (F44B9.2 aus L3) konnte eine zelluläre Lokalisation auf das Cytosol bzw. den Nukleus eingegrenzt werden. Die Dioxygenase (C37C3.8, *tag-253*) wurde in L2 gefunden. Die restlichen PC-modifizierten Proteine wurden in gemischten Entwicklungsstadien gefunden.



Fortsetzung Abb. 16: *C. elegans* Proteine des N2-Stammes nach Auftrennung mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese.

Eine positive Reaktion auf Phosphorylierungen wurde nur von Phospho-Ser gezeigt. Korrespondierende Spots wurden aus dem SDS-PAGE ausgeschnitten und tryptisch verdaut (siehe 2.4.10). Die resultierenden Peptide wurden anschließend mittels MALDI-TOF-MS Peptide Mass Fingerprint und MASCOT Datenbank Suche (siehe 2.4.11) identifiziert. Die Identifizierung wurde durch MS/MS-Analyse von selektiven Peptiden bestätigt. Die Lokalisation der identifizierten Peptide wurde mittels PENCE-Analyst-Proteome-Software ermittelt (Abb. 17).

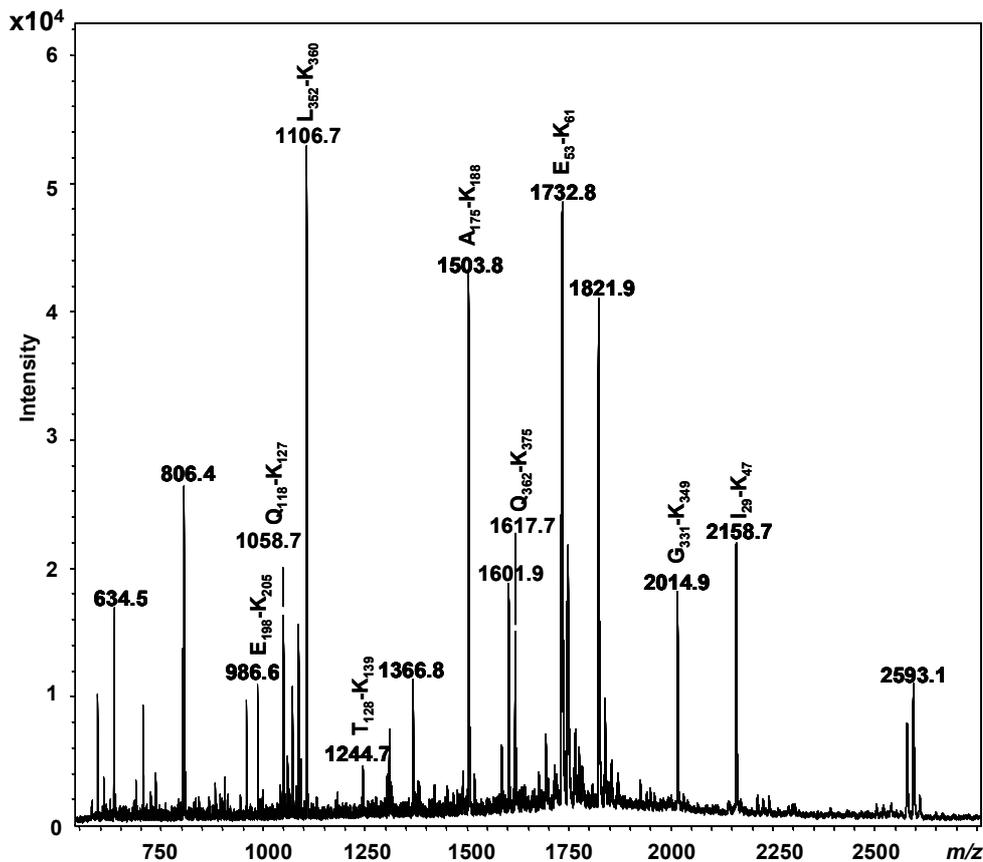
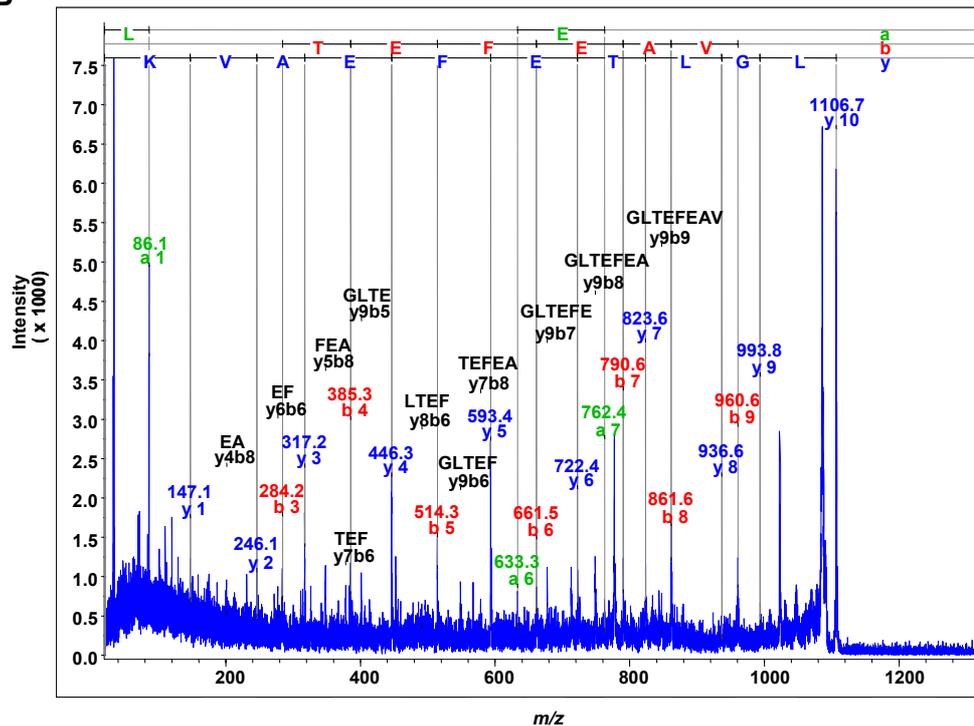


Abb. 17: Identifizierung des O-GlcNAc-modifizierten Proteins Arginin/Creatin-Kinase (Spot 51) von *C. elegans*. Das Protein wurde via MALDI-TOF-MS Peptidmassen Fingerprint identifiziert (A). Die Identifizierung wurde mittels MS/MS-Analyse von selektiven Peptiden bestätigt. Gezeigt ist hier ein Beispiel eines MS/MS-Experiments des Peptides LGLTEFEAVK $[M+H]^+$ 1106,7 (B). Die MS-Analyse ergab eine Sequenzabdeckung von 40 % (C). Die gefundenen Peptide wurden in der Sequenz rot markiert, die potentiellen O-GlcNAcylierungsstellen wurden mit Hilfe des YinOYang-Software-Programms ermittelt und mit einem Stern gekennzeichnet.

B



C

```

1 MLREAYSTSL HCVQAQEGMS VSPDVIAKIE EGYAKLQAAP ECHSLLK KYL
  *
51 TKEVVDQLKD KKTKLGANLL DVIQSGVANL DSGVGVYAPD AEAYTLFKPL
101 FDPLIQDYHN GFAPDAKQPN TDLGEGK TSA LVDLLDPEGKF INSTRIRCGR
  *
151 SLQGYFPNPC LSEANYLEME SKVK AIFDNI TDPELAGKYF PLDGMTKEIQ
201 DQLIKDHFLF KEGDRFLQAA NACRYWPKGR GIFHNNQKTF LIWCNEEDHL
251 RIISMQEGGN VGQVLERLIK GVKTIEKQAP FSRDDRLGWL TFCPSNLGTT
  *
301 VRASVHIRLP KISAKPDFKS ICDGLKLQIR GIHGEHSESE GGVYDISNKA
351 RLGLTEFEAV KQMYDGHIAHL IALEKAA

```

Fortsetzung von Abb. 17: Identifizierung des O-GlcNAc-modifizierten Proteins Arginin/Creatinkinase (Spot 51) von *C. elegans*.

Insgesamt wurden 64 O-GlcNAc-substituierte Proteine identifiziert, von denen fünf eine Phosphorylierung von Serin zeigten. Die Modifikation wurde in allen Stadien gefunden (Abb. 16). Die meisten Proteine waren im adulten Stadium modifiziert, in abnehmender Häufigkeit gefolgt von L1, dem Eistadium, L3, L4 und L2. Am wenigsten O-GlcNAc-modifizierte Proteine wurden im Dauerlarvenstadium gefunden. Lokalisiert sind sie hauptsächlich im Cytosol (31 %) und in den Mitochondrien (34 %). Die restlichen O-GlcNAcylierten Proteine befinden sich im Nukleus (7 %) und im endoplasmatischen Retikulum (21 %). 7 % der identifizierten Proteine konnten nicht mittels PENCE-Analyst-Proteome-Software ermittelt werden (Abb. 18). O-GlcNAc-modifizierte Proteine des Nukleus wurden vorwiegend in L1, L2, L3 und L4 gefunden. Dauerlarven und

Eistadien haben die O-GlcNAc-Modifikationen hauptsächlich an mitochondrial lokalisierten Proteinen.

Die Proteine wurden in die gleichen Funktionsgruppen wie beim zuvor beschriebenen PCom-Projekt eingeteilt: Strukturproteine, Stoffwechsel, Proteinstoffwechsel, Proteinsynthese/Translation, Energie-/Redoxstoffwechsel, Chaperone, Signaltransduktion und Proteine mit unbekanntem Funktionen. In Abbildung 19 sind Tortendiagramme der Entwicklungsstadien von *C. elegans* und deren Funktion abgebildet.

Die Analyse der *C. elegans*-Stadien ergab, dass die meisten Proteine der Funktionsgruppe Stoffwechsel (52 %) zuzuordnen sind. Die starke Dynamik der Proteinmodifikation mit O-GlcNAc wird durch die Analyse der einzelnen Stadien gezeigt, da die Mehrzahl der Proteine nur in einem Stadium modifiziert ist.

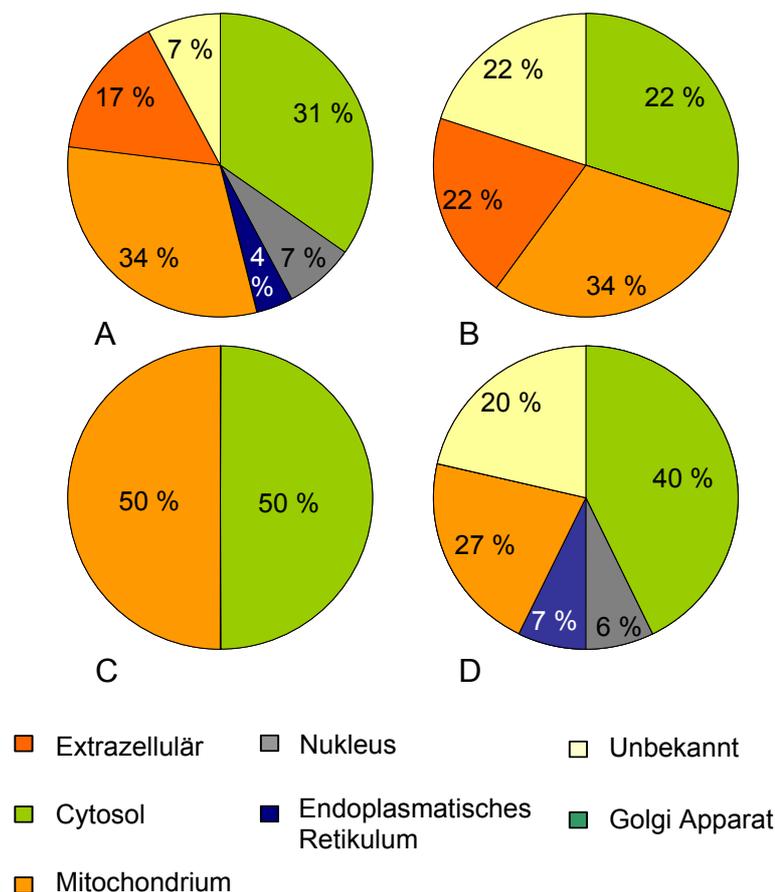
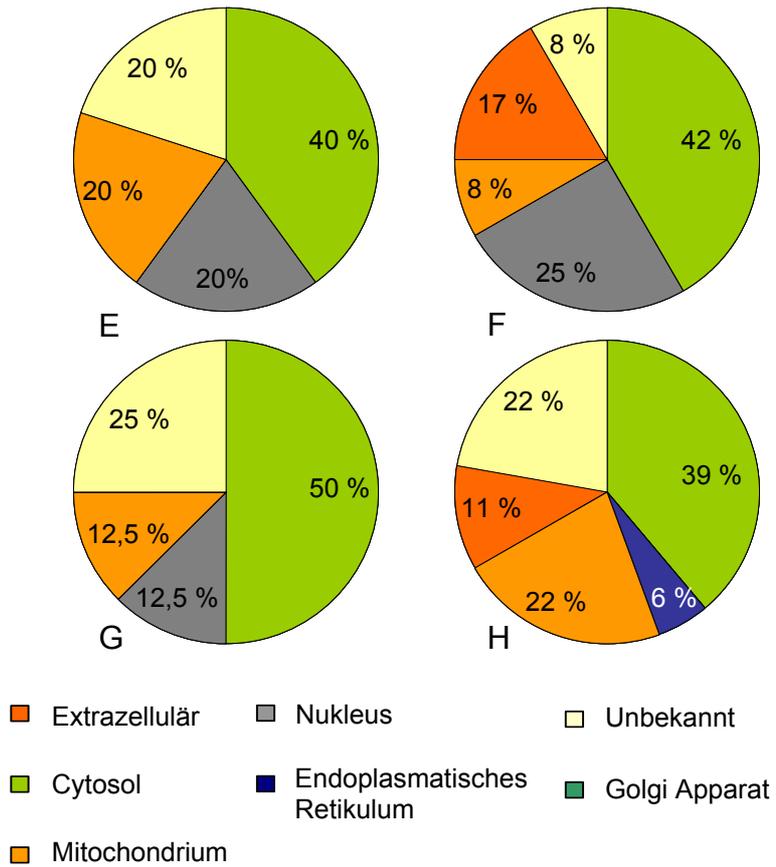


Abb. 18: Zelluläre Lokalisation der O-GlcNAc-modifizierten Proteine von *C. elegans* aus allen Entwicklungsstadien. Die Verteilung der zellulären Lokalisation der identifizierten Proteine wurde mit PENCE-Proteome-Analyst-Software-Programm für das Gemisch aus allen Entwicklungsstadien des N2-Stammes (A), des Eistadiums (B), des Dauerlarvenstadiums (C), des L1 (D), des L2 (E), des L3 (F), des L4 (G) und des adulten Stadiums (H) ermittelt.



Fortsetzung von Abb. 18: Zelluläre Lokalisation der O-GlcNAc-modifizierten Proteine von *C. elegans* aus allen Entwicklungsstadien.

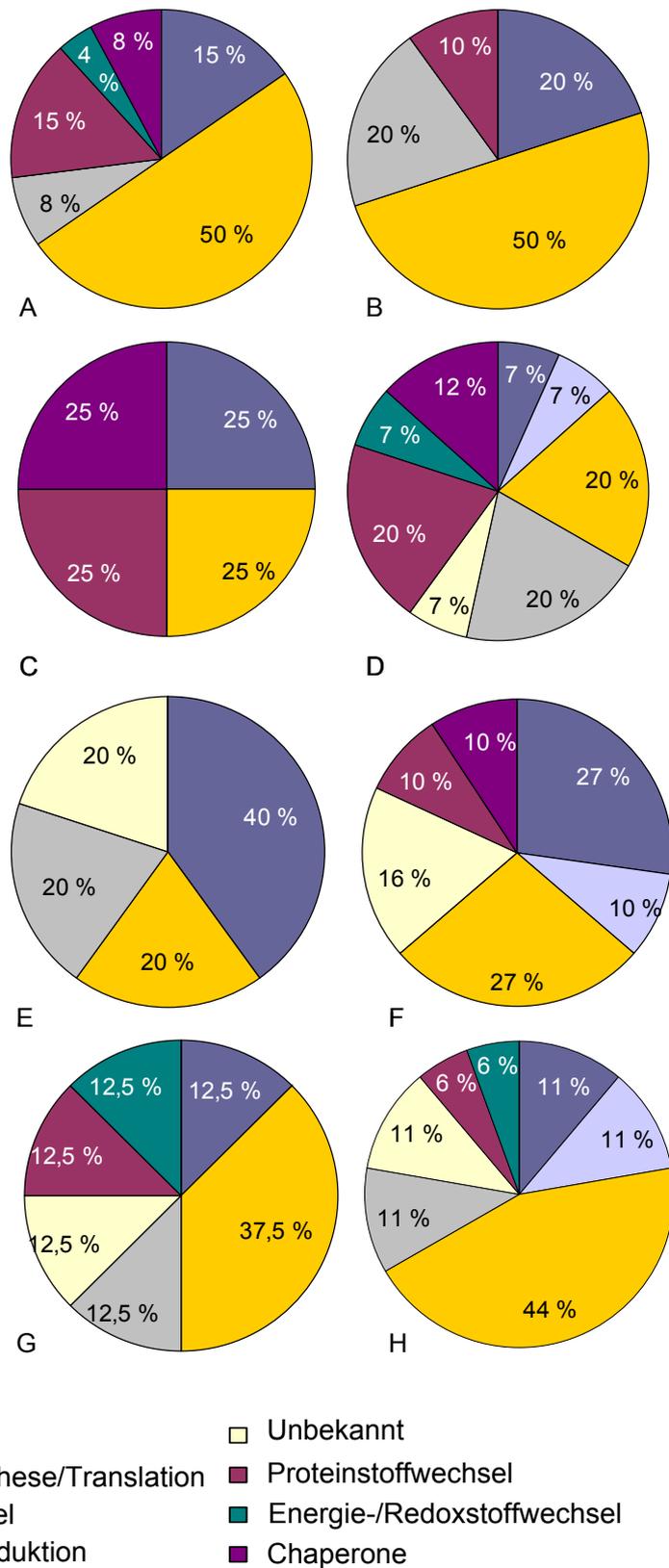


Abb. 19: Funktionelle Klassifikation von O-GlcNAc-modifizierten Proteinen von *C. elegans* aus allen Entwicklungsstadien. Die Verteilung der funktionellen Klassifikationen der identifizierten Proteine für das Gemisch aus allen Entwicklungsstadien des N2-Stammes (A), des Eistadiums (B), des Dauerlarvenstadiums (C), des L1 (D), des L2 (E), des L3 (F), des L4 (G) und des adulten Stadiums (H) ermittelt.

Tabelle 9:

Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Strukturproteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*.

Nr	Gen-name	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b							
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A
1	R31.1 <i>sma-1</i>	Beta-H-Spektrin	472,0	6,01	C							+	
2	F52B10.1 <i>nmy-1</i>	Nicht-Muskel-Myosinprotein	230	5,55	C		+			+			
3	K07H8.6 <i>vit-6</i>	Vitellogenin 6	193,1	6,85	E	+	+						
4	F07A5.7 <i>unc-15</i>	Paramyosin Ortholog	99,9	5,43	C			+					
5	M6.1 <i>ifc-2</i>	Intermediäres Filament-C-Protein 2	78,1	6,49	C				+	+	+		
6	C04F6.4 <i>unc-78</i>	Aktin-interagierendes Protein Homolog	65,6	6,57	C							+	
7	T04C9.6 <i>frm-2</i>	FERM-Domäne-Protein EHM2	67,9	9,32	C								+
8	DY3.2 <i>lmn-1</i>	Lamin 1	64,1	5,43	N	+					+		
9	F08B6.4 <i>unc-87</i>	Filament-assoziiertes Protein Unc-87	39,9	9,02	NP	+							+
10	C14C6.5	sekretiertes Oberflächenprotein	20,5	7,81	E	+							

^a **Lokalisation:** NP: kein Ergebnis, C: Cytoplasma, E: Extrazellulär, N: Nukleus.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

O-GlcNAc-modifizierte Strukturproteine wurden in allen Stadien gefunden. Es wurden zehn Proteine identifiziert: Beta-H-Spektrin (*sma-1*, R31.1), das Nicht-Muskel-Myosinprotein (*nmy-1*, F52B10.1), Vitellogenin 6 (*vit-6*, K07H8.6), Paramyosin Ortholog (*unc-15*, F07A5.7), intermediäres Filament-C-Protein 2 (*ifc-2*, M6.1), Aktin interagierendes Protein (*unc-78*, C04F6.4), FERM-Domäne-Protein EHM2 (*frm-2*, T04C9.6), Lamin 1 (*lmn-1*, DY3.2), Filament-assoziiertes Protein (*unc-87*, F08B6.4) und ein sekretiertes Oberflächenprotein (C14C6.5). Lokalisiert sind sie hauptsächlich im Cytosol, im Nukleus und extrazellulär. SMA-1 wird für die Assoziation zwischen Aktin und der apikalen Membran benötigt, die für eine normale Morphogenese verantwortlich ist (Praitis *et al.* 2005). NMY-1 formt filament-ähnliche Strukturen, die ebenfalls für die Entwicklung des Nematoden wichtig sind (Piekny *et al.* 2003). VIT-6

und IFC-2 sind mit O-GlcNAc und mit PC modifiziert. UNC-87 ist essentiell für die Ausbildung der Körperwandmuskulatur der Nematoden (Kranewitter *et al.* 2001). Die FERM-2 fungiert als Verbindung zwischen Membranproteinen und F-Aktin Zytoskelett. Sie interagiert mit dem Catenin-Cadherin-System (Van Furden *et al.* 2004). LMN-1 ist ein wichtiges Gen für Nematoden und ist involviert in die Chromatinorganisation, den Zellzyklus, die Chromosomensegregation und die richtige Ausrichtung der nukleären Porenkomplexe (Liu *et al.* 2000). Es hat außerdem einen Einfluss auf die Lebensspanne von *C. elegans* (Haithcock *et al.* 2005) und die korrekte Lokalisation von anderen Proteinen, z.B. von Emerin und UNC-84 (Gruenbaum *et al.* 2002; Lee *et al.* 2002). UNC-78 ist ein Aktin-interagierendes Protein, das am Aktin-Turnover beteiligt ist (Mohri *et al.* 2004).

Tabelle 10:

Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte metabolische Proteine von den Entwicklungsstadien von *C. elegans*.

Nr	Gen-name	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b							
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A
11	F27D9.5	Propionyl-CoA-Carboxylase	80,0	7,61	M	+	+				+		+
12	R11A5.4	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	74,0	5,79	M	+							
13	F02A9.4	3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase	67,1	8,56	M							+	
14	T10H4.4	Phytanoyl-CoA Hydroxylase assoziiertes Protein	64,5	9,26	E						+		
15	F47G6.2	Langkettige Fettsäuren Acyl-CoA-Ligase	61,9	9,15	C								+
16	ZK829.4	Glutamatdehydrogenase	59,2	6,90	M	+	+	+					
17	F57B10.3	Cofactor-unabhängige-Phosphoglyceratmutase	59,8	5,57	C	+							+
18	F13D12.4 <i>alh-8</i>	Methylmalonat-Semialdehyd Dehydrogenase	56,9	7,56	M				+				
19	F01F1.6 <i>alh-9</i>	Aldehyddehydrogenase	55,6	5,92	C							+	
20	F54D8.3 ^c <i>alh-1</i>	Aldehyddehydrogenase	55,3	7,14	M	+							+
21	R06C7.3 <i>dhp-1</i>	Dihydroorotase E.C.3.5.2.2	54,4	6,07	N				+				
22	LLC1.3 ^c	Dihydroliponamid-Dehydrogenase	52,8	7,59	M	+	+						+
23	C44B7.10	Acetyl-CoA-Hydrolase	50,9	8,70	C	+							

Nr	Gen-name	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b								
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A	
24	T21B10.2 <i>enol-1</i>	Enolase	46,6	5,56	N	+								
25	C44C1.2	Mitglied der Glykosyl-Hydrolasenfamilie 18	42,7	5,82	NP							+		
26	T05D4.1	Fruktose-bisphosphat-Aldolase	39,4	6,26	C	+								+
27	K10B3.8 ^c <i>gpd-2</i>	Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase	36,6	6,50	C	+	+						+	+
28	H14A12.2 <i>fum-1</i>	Fumarase	35,2	7,77	M	+			+					
29	B0272.3	3-Hydroxylacyl-CoA Dehydrogenase	33,5	7,66	M	+				+				+
30	F40F4.2 ^d <i>lbp-2</i>	Fettsäure-bindendes Protein	18,9	6,22	E	+								

^a **Lokalisation:** NP: kein Ergebnis, C: Cytoplasma, E: Extrazellulär, M: Mitochondrium, N: Nukleus.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

^c O-GlcNAcyliert und phosphoryliert.

^d nur phosphoryliert.

Zu der Funktionsgruppe des Stoffwechsels werden allgemeine metabolische Funktionen mit Ausnahme des Proteinstoffwechsels und des Energie-/Redoxstoffwechsels gezählt. Insgesamt konnten 20 O-GlcNAc-modifizierte Proteine dieser Funktionsgruppe zugeordnet werden. Sie liegen hauptsächlich in den Mitochondrien vor. Außerdem sind sie im Cytosol, im Nukleus und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. In jedem Stadium von *C. elegans* wurden O-GlcNAc-modifizierte Proteine gefunden, die dieser Funktionsgruppe angehören. Im Eistadium sind über die Hälfte dieser Proteine O-GlcNAcyliert. Eine Vielzahl der O-GlcNAc-modifizierten Proteine sind Glykolyseenzyme: U. a. die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, die Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat umsetzt. Die O-GlcNAc-substituierte Propionyl-CoA-Carboxylase carboxyliert Propionyl-CoA aus Methylmalonyl-CoA (Nelson *et al.* 2001). Die Glutamatdehydrogenase (ZK829.4) wurde als O-GlcNAc-modifiziert identifiziert. Die Enolase ENOL-1 (T21B10.2) bewirkt, dass 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat umgesetzt wird. Eine wichtige Funktion im Katabolismus von Leucin hat die 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase. Phytanoyl-CoA-Hydroxylase assoziiertes Protein katalysiert den ersten Reaktionsschritt der α -Oxidation von Phytansäure. Das Enzym Phosphoglyceratmutase (F57B10.3) katalysiert eine reversible Verschiebung der Phosphorylgruppe bei der Umwandlung von 3-Phosphoglycerat zu 2-Phosphoglycerat.

Eine reversible Aldolkondensation, bei der aus einem C6-Körper Fruktose-bisphosphat zwei C3-Körper werden, wird durch die O-GlcNAc-modifizierte Fruktose-1,6-bisphosphat-Aldolase (T05D4.1) katalysiert. Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gpd-2*, K10B3.8) trägt beide in dieser Arbeit beschriebenen posttranslationalen Modifikationen und ist zudem noch phosphoryliert. Die reversible Hydratisierung von Fumarat zu L-Malat wird durch die Fumarase (*fum-1*, H14A12.2) katalysiert. Acetyl-CoA wird via Acetyl-CoA Hydrolase (C44B7.10), die O-GlcNAc trägt, in CoA und Acetat gespalten. Dihydroorotase (E.C.3.5.2.2, *dhp-1*, R06C7.3) katalysiert durch Abspaltung von H₂O aus N-Carbamoylaspartat L-Dihydroorotat. Aldehyddehydrogenasen (ALH-1, ALH-8 und ALH-1) sind O-GlcNAc-modifizierte Enzyme, die am Alkoholstoffwechsel die Aldehydgruppen zu Carbonsäuren oxidieren. Beim Fettsäureabbau wird an einer C3-Hydroxylgruppe mittels 3-Hydroxylacyl-CoA Dehydrogenase zu einer Ketofunktion oxidiert.

Tabelle 11:

Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*, die in der Proteinsynthese/Translation beteiligt sind.

Nr	Gen-name	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b								
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A	
31	F25H5.4 <i>eft-2</i>	Elongationsfaktor 2	95,4	6,10	NP									+
32	ZC518.3 <i>ccr-4</i>	Glukose-repressible Alkohol-Dehydrogenase transkriptionaler Effektor CCR4	70,2	7,03	N						+			
33	W09G3.7	RCC1-Domäne Regulator der Chromosomenkondensation	41,9	6,46	C									+
34	C18A3.5	Apoptose-auslösendes RNA-bindendes Protein TIA-1/TIAR (RRM Superfamilie)	41,6	6,26	C				+					

^a **Lokalisation:** NP: kein Ergebnis, C: Cytoplasma, N: Nukleus.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

Im L1, L3 und adulten Stadium wurden Proteine, die der Funktionsgruppe der Proteinsynthese/Translation angehören, gefunden. In den restlichen Stadien wurden keine O-GlcNAc-modifizierten Proteine gefunden, die zu dieser Gruppe gezählt werden konnten. Der Elongationsfaktor 2 (*eft-2*, F25H5.4) hat eine wichtige Funktion bei der Translation. Des Weiteren wurden noch die Glukose-repressible Alkohol-Dehydrogenase, ein transkriptionaler Effektor CCR4 (*ccr-4*, ZC518.3), der Regulator

der Chromosomenkondensation (RCC1-Domäne) (W09G3.7) und das Apoptose-auslösende RNA-bindende Protein TIA-1/TIAR (RRM Superfamilie) (C18A3.5) als O-GlcNAc-modifiziert identifiziert. Sie sind im Cytosol und im Nukleus lokalisiert.

Tabelle 12:

Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Signaltransduktionsproteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*.

Nr	Gen-name	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b							
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A
35	B0545.1 <i>tpa-1</i>	Serin/Threonin-Proteinkinase	81,9	7,69	NP					+			
36	W08E3.3 <i>tag-210</i>	GTP-bindendes Protein	44,6	6,44	C				+				
37	K04D7.1 <i>rack-1</i>	Guanin Nukleotid-bindendes Protein β -Untereinheit 2-ähnlich 1	36,0	6,47	NP				+			+	
38	ZK892.1 <i>lec-3</i>	Galektin-bindendes Lektin	33,7	7,18	E	+							+
39	W09H1.6 <i>lec-1</i>	Galektin, Galaktose-bindendes Lektin	31,8	6,02	E	+							
40	F45D11.9	F-box-Domäne	31,8	9,41	NP		+						
41	F52H3.7 ^c <i>lec-2</i>	Galektin, Galaktose-bindendes Lektin	31,3	6,19	E	+							+
42	C25B8.4	C-typ Lektin	31,0	8,70	NP				+				

^a **Lokalisation:** NP: kein Ergebnis, C: Cytoplasma, E: Extrazellulär.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

^c O-GlcNAcyliert und phosphoryliert.

Die extrazellulären Signaltransduktionsproteine (Serin/Threonin-Proteinkinase (*tpa-1*, B0545.1), Galektin-bindendes Lektin (*lec-3*, ZK892.1), Galaktose-bindendes Lektin (*lec-1*, W09H1.6), Galektin-Galaktose-bindendes Lektin (*lec-2*, F52H3.7) und C-typ Lektin (C25B8.4)) finden sich überwiegend im adulten Stadium. In den L2, L3, L4 und den Dauerlarvenstadien wurden keine O-GlcNAc-modifizierten Signaltransduktionsproteine gefunden. Das GTP-bindende Protein (*tag-210*, W08E3.3) wurde im L1 von *C. elegans* gefunden und ist ein cytosolisches Protein. Die Guanin-Nukleotid-bindende Protein β -Untereinheit (*rack-1*, K04D7.1) ist in L1 und L4 mit O-GlcNAc modifiziert. Die F-Box-Domäne (F45D11.9) ist im Eistadium modifiziert vorzufinden. Mittels PENCE

konnten sie allerdings nicht zellulär lokalisiert werden. Bisher wurden 11 Galektine bei *C. elegans* beschrieben. LEC-1, LEC-2 und LEC-3 wurden als O-GlcNAc-modifiziert identifiziert. Diese Lektine haben unterschiedliche Funktionen und sind u.a. an der Zell-Zell-Interaktion während der Entwicklung und der Apoptose beteiligt (Arata *et al.* 2001; Ahmend *et al.* 2002).

Tabelle 13:

Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*, die am Proteinstoffwechsel beteiligt sind.

Nr	Gen-name	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b								
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A	
43	C32F10.8	Alanin-Aminotransferase	55,8	7,48	C	+								
44	F56D2.1	Mitochondriale Protease	51,7	6,07	M	+		+						
45	K10C2.4 ^c	Fumarylacetoacetathydrolase	46,3	5,73	NP	+	+							
46	R08E5.2	Cystathionin- β -Synthase (E.C.4.2.99.8)	32,7	7,71	C								+	
47	C36B1.4 <i>pas-4</i>	20S Proteasom, regulierende Untereinheit α -Typ PSMA7/PRE6 (E.C.3.4.25.1)	28,3	5,93	C				+					
48	F25H2.5	Nukleosiddiphosphatkinase	17,2	6,97	C				+					

^a **Lokalisation:** NP: kein Ergebnis, C: Cytoplasma; M: Mitochondrium.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

^c O-GlcNAcyliert und phosphoryliert.

Als O-GlcNAcylierte Proteine, die in den Proteinmetabolismus involviert sind, wurde die Alanin Aminotransferase, die α -Aminogruppe von Glutamat auf Pyruvat überträgt, identifiziert (Nelson *et al.* 2001). Die Cystathionin- β -Synthase ist ebenfalls O-GlcNAc-modifiziert. Dieses Enzym katalysiert Serin und es entsteht Cystathionin. Die Nukleosiddiphosphatkinase ist ein Enzym, das die Übertragung der endständigen Phosphatgruppe eines Nukleosid-5'-triphosphats auf ein Nukleosid-5'-diphosphat katalysiert (Nelson *et al.* 2001). Die Fumarylacetoacetathydrolase (K10C2.4) katalysiert die Umsetzung von Fumarylacetat zu Fumarat. Die mitochondriale Protease (F56D2.1) und die 20S Proteasom-regulierende Untereinheit α -Typ PSMA7/PRE6 (E.C.3.4.25.1, *pas-4*, C36B1.4) wurden ebenfalls der Proteinstoffwechselgruppe zugeordnet. Sie liegen hauptsächlich cytosolisch (72 %) vor. Die restlichen Proteine befinden sich im

endoplasmatischen Retikulum (14 %) und in den Mitochondrien (14 %). In jedem *C. elegans*-Stadium gibt es Proteine dieser Funktionsgruppe.

Tabelle 14:

Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*, die am Energie-/Redoxstoffwechsel beteiligt sind.

Nr	Gen-name	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b								
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A	
49	Y37E3.17	Dimethylglycin-Dehydrogenase Vorläufer	92,9	6,75	NP								+	
50	C53D5.5	Gamma-Glutamyltransferase	70,6	5,78	NP									+
51	F46H5.3 ^c	Arginin/Creatin-Kinase	42,4	6,17	C	+	+					+		+
52	R07E5.2 <i>prdx-3</i>	Alkylhydroperoxid- Reduktase, Thiolspezifische- antioxidative Enzyme	25,3	6,95	M				+					
53	F59C6.5 ^d	NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase PDSW Untereinheit	31,4	6,13	M	+								

^a **Lokalisation:** NP: kein Ergebnis, C: Cytoplasma, M: Mitochondrium.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

^c O-GlcNAcyliert und phosphoryliert.

Es konnten fünf O-GlcNAc-modifizierte Proteine der Energie-/Redoxstoffwechsel-Funktionsgruppe zugeordnet werden. Dazu zählen die mitochondrialen und cytosolischen Proteine: Dimethylglycinderhydrogenase Vorläufer (Y37E3.17), Gamma-Glutamyltransferase (C53D5.5) und Alkylhydroperoxidreduktase (*prdx-3*, R07E5.2). Die Arginin/Creatin-Kinase (F46H5.3) spaltet in der letzten Reaktion des Harnstoffzyklus Arginin unter Bildung von Harnstoff und Ornithin. Die reversible Reaktion von Phosphocreatin und ADP zu Creatin und ATP wird durch die Creatin-Kinase, welche O-GlcNAc-substituiert ist, katalysiert. Im adulten Stadium, in L4, in L3 und im Eistadium wurden Proteine identifiziert, die dieser Funktionsgruppe zuzuordnen sind. Es konnten keine O-GlcNAc-modifizierten Proteine dieser Funktionsgruppe in L2 und im Dauerlarvenstadium nachgewiesen werden.

Tabelle 15:

Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*, die zu den Chaperonen gezählt werden.

Nr	Gen-name	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b								
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A	
54	H06O01.1 <i>pdi-3</i>	Proteindisulfidisomerase	55,5	5,96	ER	+			+					
55	Y37A1B.5	Selen-bindendes Protein	52,9	5,58	C	+								
56	K08H10.2	Anhydrobiosisprotein	49,9	4,56	E									
57	C50F2.6 <i>fkf-5</i>	FKBP-Typ-Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase	30,3	5,80	ER				+					
58	C09B8.6 <i>hsp-25</i>	Hitzeschockprotein 25	25,3	5,75	C	+			+					
59	C12C8.1 <i>hsp-70</i>	Molekulare Chaperone HSP-70 Fragment	69,7	5,44	C	+		+			+			

^a **Lokalisation:** C: Cytoplasma, E: Extrazellulär, ER: endoplasmatisches Retikulum.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

Die Proteindisulfidisomerase (*pdi-3*, H06O01.1), das Selen-bindende Protein (Y37A1B.5), die FKBP-typ-Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase (*fkf-5*, C50F2.6), das Anhydrobiosisprotein (K08H10.2), das Hitzeschockprotein hsp-25 (*hsp-25*, C09B8.6) und das HSP-70 Fragment (*hsp-70*, C12C8.1) wurden den Chaperonen zugeordnet, deren hauptsächliche Funktion die Unterstützung der korrekten Proteinfaltung ist. Lokalisiert sind sie überwiegend im Cytosol und im endoplasmatischen Retikulum. Sie wurden im Dauerlarvenstadium, in L1 und in L3 gefunden. Eine Funktion bei der Proteinfaltung hat FKB-5, die Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase, die sowohl mit O-GlcNAc als auch mit PC modifiziert ist. Auch bei HSP-70 wurden beide Modifikationen entdeckt (Grabitzki et al. 2006b). HSP-25 ist ein Hitzeschockprotein mit einer α -Crystallin-Domäne. Es spielt eine wichtige Rolle in der Organisation der Myofilamente und der adhärenen Junctions in *C. elegans* (Ding et al. 2000). HSP-70 wurde nicht nur als O-GlcNAc-modifiziert identifiziert, sondern dient auch als Ligand für O-GlcNAc. HSP-70 hat eine wichtige Funktion im Ras-Signaltransduktionsweg (Lee et al. 2006). Das Genprodukt Y37A1B.5 zeigt eine starke Homologie zu dem Selen-bindenden Protein, welches in den intra-Golgi-Transport involviert ist (Porat et al. 2000).

Tabelle 16:

Identifizierte O-GlcNAc-modifizierte Proteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*, deren Funktion unbekannt ist.

Nr	Gen-name	Funktion/ Homologe	MW (kDa)	pI	Lo ^a	Stadien ^b								
						Alle	E	DL	L1	L2	L3	L4	A	
60	W03B1.2		96,2	8,73	ER									+
61	T22A3.5 <i>pash-1</i>		88,5	5,76	NP									+
62	C56A3.8		43,6	7,62	C						+			
63	Y27F2A.6		55,5	9,4	N				+	+	+			
64	Y26D4A.5		13,9	9,27	NP				+					

^a **Lokalisation:** NP: kein Ergebnis, C: Cytoplasma, N: Nukleus, ER: endoplasmatisches Retikulum.

^b A: adultes Stadium, DL: Dauerlarvenstadium, E: Eistadium.

^c O-GlcNAcyliert und phosphoryliert.

O-GlcNAc-modifizierte Proteine mit unbekannt Funktionen (W03B1.2, *pash-1* (T22A3.5), C56A3.8, Y27F2A.6, Y62H9A.12, Y26D4A.5) wurden in L1, L2, L3, L4 und im adulten Stadium gefunden. Die Zuordnung mittels PENCE-Analyst-Proteome-Software ergab, dass jeweils 14 % der O-GlcNAc-modifizierten Proteine im Nukleus, im endoplasmatischen Retikulum und im Cytosol lokalisiert sind. Die Lokalisation von 44 % der identifizierten Proteine konnte nicht mittels PENCE ermittelt werden.

3.3 Gemeinsamkeiten der O-GlcNAc- und PC-Modifikation an Proteinen in *C. elegans*

Bei zehn Proteinen (IFC-2, VIT-6, F27D9.5, ALH-1, LLC1.3, ENOL-1, GPD-2, TPA-1, LEC-2, Y37E31.7) wurde festgestellt, dass sie nicht nur mit PC, sondern auch mit O-GlcNAc modifiziert waren. GPD-2 sowie LLC1.3 tragen nicht nur O-GlcNAc und PC als Modifikation, sondern sind zusätzlich noch an Serin phosphoryliert.

Von den identifizierten O-GlcNAc-modifizierten Proteinen reagierten sechs Proteine zusätzlich mit dem Phospho-Serin Antikörper: Glutamatdehydrogenase (ZK829.4), Dihydroliponamid-Dehydrogenase (LLC1.3), Fumarylacetoacetat-Hydrolase (K10C2.4), Arginin/Creatin-Kinase (F46H5.3), Galektin LEC-2 (F52H3.7) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (K10B3.8). Phospho-Serin ist ein sequenzabhängiger Phosphoantikörper. Er reagiert nur auf Phospho-Serin-Prolin-Rest bzw. Phospho-Serin-Lysin-Rest. Bisher wurde nur bei Menschen Tyrosinphosphorylierung an GPD-2-Homolog gefunden.

In den Proteomstudien dieser Arbeit wurden multiple, horizontale und vertikale Isoformen von Proteinen entdeckt, die aufgrund von z.B. Glykosylierung in der horizontalen und z.B. durch Splicing während der Proteinbiosynthese in der vertikalen Ebene entstehen (Vergleiche Abb. 11 A und B, Spot 73).

Bei VIT-6 wurden in der PCom-Studie multiple (horizontal und vertikal) Isoformen entdeckt. Diese multiplen Isoformen von VIT-6 sind alle mit PC modifiziert. Für GPD-2 wurden zwar multiple horizontale Spots für die O-GlcNAcylierung und für die Serinphosphorylierung gefunden. Allerdings war nur eine isoelektrische Form mit PC modifiziert.

Bei der Studie des O-GlcNAcom wurden multiple Isoformen von VIT-6, GPD-2, Propionyl-CoA-Carboxylase, Glutamatdehydrogenase und PDI-3 gefunden. GPD-2 zeigte multiple Proteinspots beim Serinphosphorylierungsnachweis. Besonders starke Reaktionen wurden bei den stark aciden Isoformen beobachtet. In Abb. 20 werden am Beispiel von VIT-6 und GPD-2 die multiplen horizontalen Isoformen aus dem 2D-SDS-PAGE und dem Western Blot aus den entsprechenden Proteomstudien heraus vergrößert.

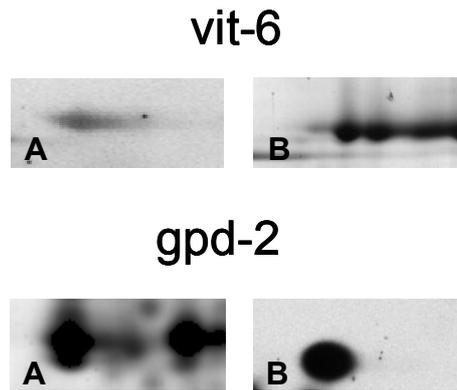


Abb. 20: Multiple isoelektrische Formen von VIT-6 und GPD-2.

(A) zeigt eine Vergrößerung aus einem 2D-SDS-PAGE und (B) aus dem entsprechenden 2D-Western Blot. Alle multiplen Isoformen von VIT-6 sind mit PC modifiziert. Bei GPD-2 wurden multiple Spots im 2D-SDS-PAGE gefunden, allerdings ist nur eine isoelektrische Form mit PC-modifiziert.

4 Diskussion

4.1 Methodenoptimierung der 2D-SDS-PAGE und der massenspektrometrischen Identifizierung von *C. elegans*

Obwohl bisher viele Proteine mittels Proteomics analysiert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Proteine nicht erfasst werden können. Eine optimale Methode ist wichtig, damit das Proteom so vollständig wie nur möglich entschlüsselt werden kann. Allerdings kann jedes Proteom methodenabhängig variieren. Die Aufreinigung und Lyse von *C. elegans* ist entscheidend, um die Proteine effektiv zu extrahieren. In der Literatur variieren die Auftrennungsmethoden (Tabuse *et al.* 2005, Cipollo *et al.* 2005). Es gibt unterschiedliche Zusammensetzungen der Lysepuffer oder Aufspaltungen der Membranen mittels flüssigen Stickstoffs. Bei dieser Methode bleibt allerdings viel Material im Mörser und an dem Pistel. Nur mit viel Ausgangsmaterial ist es möglich, ausreichende Mengen für ein zweidimensionales SDS-PAGE zu erhalten. Ob ein Proteom vollständig erfasst werden kann und welche Proteine detektiert werden können, ist ferner von der Prozessierung der Zelle und dem Entwicklungsstadium des Organismus abhängig. Die Dynamik der Proteinmodifikation sowie die Proteinkonzentration des Entwicklungsstadiums spielen hierbei eine wichtige Rolle für die Identifizierung des Proteoms. Seltene Proteine lassen sich in einem Proteom schlecht erfassen. Diese Proteine kann man zwar anreichern und sensitiv anfärben, allerdings sind Proteinspots eines 2D-SDS-PAGE mengenmäßig nach einer Gauss-Kurve verteilt. Proteine hoher Konzentration verdecken daher die Flecken von Proteinen niedriger Konzentrationen (Rehm 2002). So besteht die Möglichkeit, dass Proteine andere Proteine mit demselben bzw. einem ähnlichen isoelektrischen Punkt und einer ähnlichen Masse überdecken.

Zur Analyse des Proteoms dieser Dissertation musste daher eine optimale Methode entwickelt werden. Zunächst wurde lyophilisiertes *C. elegans* Material mit einem Standardlysepuffer homogenisiert. Die gelöste Probe wurde ohne weitere Behandlung direkt der zweidimensionalen Gelelektrophorese zugeführt. Es wurden kommerziell erhältliche IPG-Strips verwendet. Im SDS-PAGE zeigte sich starkes horizontales Streaking und keine optimale Auftrennung der Proteine. Die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix von *C. elegans* besteht überwiegend aus Kollagen (Page *et al.* 2006), aus diesem Grund musste die Aufarbeitung modifiziert werden. Um störende Zellbestandteile von *C. elegans* zu minimieren, wurde nach der Lyse eine Chloroform/Methanol-Fällung durchgeführt und das Pellet anschließend in einen Probenpuffer

aufgenommen. Außerdem wurden für die erste Dimension nicht mehr kommerziell erhältliche IPG's verwendet, sondern selbst hergestellte IEF-Strips für die Analyse des PComs verwendet. Es wurde festgestellt, dass zwar über den kompletten pH-Bereich PC-modifizierte Proteine zu finden sind, allerdings lagen besonders zwischen $5 \leq \text{pI} \leq 7$ die Proteine gehäuft vor. Aus diesem Grund wurde der entsprechende Bereich mit veränderter Ampholinzusammensetzung aufgespreizt. Der Vorteil von IEF-Strips im Gegensatz zu kommerziell erhältlichen IPG's liegt in der höheren Ampholinkonzentration und der damit besseren Löslichkeit der Probe. Es konnte dadurch mehr Probenmaterial auf die Strips gegeben werden. Da die IEF nur 4 Stunden dauerte, konnte die Ampholinwanderung auf ein Minimum reduziert werden. Zur Detektion der O-GlcNAc-modifizierten Proteine wurde eine Methode zur Herstellung eigenproduzierter IPG-Strips etabliert. Es stellte sich heraus, dass eine noch bessere Auftrennung der O-GlcNAc-modifizierten Proteine mit diesen Strips erreicht werden konnte. Dadurch dass der Gradient fest an die Gelmatrix gebunden ist, bleibt er über die gesamte Trennzeit unverändert. Die Ampholinwanderung ist damit so gut wie ausgeschlossen. Außerdem kann bei sehr flachen Gradienten - bis zu 0,01 pH-Einheiten pro cm - eine extrem hohe Auflösung erreicht werden (Westermeier 1990). Die O-GlcNAc-modifizierten Proteine lagen ausschließlich im pH-Bereich zwischen 5 und 9. Durch die Verwendung entsprechender IPG-Strips konnten diese Proteine optimal aufgetrennt werden. Ein weiterer Vorteil der selbst hergestellten IEF-Strips und/oder IPG-Strips lag u.a. in der gewünschten Striplänge und dem für die Probe bzw. dem Arbeitsziel angepassten pH-Bereich. Die Strips wurden optimal an die Proteinprobe und die Fragestellung angepasst. Die IEF- und IPG-Strips wurden über Nacht in einem Rehydratisierungspuffer ohne Probenmaterial rehydratisiert. Eine bessere Auftrennung konnte erreicht werden, wenn die Proben erst kurz vor Beginn des IEF-Laufes aufgearbeitet und auf die Strips appliziert wurden. Je länger die aufgearbeitete Probe gelagert wurde (in Rehydratisierungspuffer bei RT, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), desto schlechter war die Auftrennung in der ersten Dimension. Proteinlösungen degradieren mit zunehmendem Alter, je länger sie in einer warmen bzw. heißen Umgebung gelagert und je häufiger sie aufgetaut werden.

Es zeigte sich, dass mit einem 10 %igen Trenngel die Proteine besser in der zweiten Dimension getrennt wurden, als mit höheren oder niedrigeren Trenngelkonzentrationen. Für die Auftrennung der O-GlcNAc-modifizierten Proteine zeigte sich allerdings, dass sich ein 10-15 %iges Gradientengel besser eignete als ein Standardtrenngel, da ein breiterer Trennbereich erzielt wurde und so die teilweise sehr dicht beieinander liegenden modifizierten Proteinspots besser aufgelöst wurden und weiter auseinander lagen.

Die modifizierten Proteinspots wurden tryptisch verdaut und mittels MALDI-TOF-MS identifiziert. Für die erfolgreiche Zuordnung der erhaltenen Peptide spielte dabei die richtige Wahl der Matrixzusammensetzung bzw. des Targets eine wichtige Rolle. Es wurde festgestellt, dass mit einer DHB/ACN/Phosphorsäure als Matrix und einem Edelmetalltarget, eine bessere Ionisierung der Peptide erreicht wurde. Der Vorteil im Vergleich zu einem Prespotted-Target mit HCCA-Matrix oder HCCA als Matrix auf einem Anchorchip-Target war, dass DHB/ACN/Phosphorsäure als Matrix eine bessere Identifizierung der Proteine brachte, da der Matrixabtrag gegenüber z.B. HCCA-Matrix kleiner war. Außerdem wurden bei der Auswertung der Spektren höhere Mowse Scores erreicht, da mehr Peptide detektiert und zugeordnet werden konnten.

4.2 Proteomstudien zu posttranslationalen Modifikationen

Mittlerweile gibt es diverse Proteomstudien mit dem Modellorganismus *C. elegans*, deren Methoden zur Auftrennung und Lyse des *C. elegans*-Materials ebenso variieren wie die Forschungsschwerpunkte.

Die Bedeutung der 2D-SDS-PAGE und N-terminalen Mikrosequenzierung zu physiologischen Untersuchungen von *C. elegans* wurde durch Bini *et al.* (1997) gezeigt. Zwei Jahre später nutzten Geier *et al.* (1999) diese Techniken zur Identifizierung von Aspartylproteasen von *C. elegans*. Mit diesen Methoden konnten sie fünf der sechs Aspartylproteasen identifizieren. Die Aspartylprotease ASP-6 wurde von Lochnit *et al.* (2006) identifiziert und näher charakterisiert. Untersuchungen zur Dynamik von *C. elegans*-Proteinen zeigten, dass ca. 40 Proteine während des Eistadiums bis zu den jüngeren L1 des Nematoden hoch- bzw. runterreguliert werden. U.a. werden GPD-3, Galektine und Fruktose-1,6-bisphosphat-Aldolase in diesem Entwicklungszeitraum hochreguliert (Tabuse *et al.* 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Proteine mit PC und O-GlcNAc modifiziert sind. Diese Proteine wurden hauptsächlich in gemischten Entwicklungsstadien sowie im adulten Stadium als substituiert gefunden. Mittels Proteomstudien wurden Glutathion S-Transferasen von *C. elegans* identifiziert (van Rossum *et al.* 2001). Fan *et al.* (2004, 2005) nutzten elektrophoretische und massenspektrometrische Methoden, um membranständige und hydrophobe N-glykosylierte Proteine aus *C. elegans* zu extrahieren und zu identifizieren. Der stadienspezifische Verlauf von N-glykosylierten Proteinen wurde von Cipollo *et al.* (2005) gezeigt.

4.2.1 PCom

Die PCom-Studie ergab, dass die Expression der PC-modifizierten Proteine stadienspezifisch verläuft. Die meisten dieser Proteinmodifikationen werden im Ei- und im adulten Stadium gefunden. Deutlich weniger PC-substituierte Proteine als in den Dauerlarven wurden in L4, L3 und L2 gefunden. Einen ganz ähnlichen Verlauf zeigten Cipollo *et al.* (2005), die die Expression der N-Glykane während der Entwicklung von *C. elegans* untersuchten. Bei dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Dauerlarven und L1 die meisten N-glykosylierten Proteine aufweisen, dicht gefolgt von adulten Nematoden und L4. In L3 und L2 wurden am wenigsten N-Glykane gefunden. Die Untersuchungen zu PC-modifizierten Glykanen zeigten ebenfalls diesen stadienspezifischen Verlauf. Dauerlarven tragen PC-Modifikationen an Glykanen sowohl kern- als auch terminal-gebunden (Cipollo *et al.* 2005). Bei kerngebundenem PC ist das PC an das Kern-GlcNAc gebunden. Das terminalgebundene PC bindet an das endständige GlcNAc (Abb. 18).

Im L1 wurden keine PC-substituierten Proteine gefunden. Das Fehlen der PC-Modifikation in L1 bestätigt die Beobachtung von Gerdt *et al.* (1999), die zeigen konnten, dass PC-Epitope in L1 ausschließlich lipidgebunden vorliegen. In der späten embryonalen Phase sowie ab L2 werden, neben der lipidgebundenen PC-Epitope, proteingebundene PC-Epitope verstärkt exprimiert (Gerdt *et al.* 1999). Entweder werden diese PC-Transferasen nicht in L1 exprimiert oder diese Transferasen übertragen dort PC nur auf Glykolipide.

Es wurden PC-modifizierte Proteine entdeckt, die mit der Entwicklung von *C. elegans* einhergehen und auf diese zurückzuführen sind. Im Dauerlarven- und Eistadium haben die identifizierten Proteine vielfältige Funktionen und unterschiedliche Lokalisationen. Die PC-modifizierten Proteine von L4 liegen überwiegend cytosolisch vor und haben metabolische Funktionen. Im adulten Stadium sind die hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisierten PC-modifizierten Proteine zum größten Teil in den Energie-/Redoxstoffwechsel involviert (Abb. 14).

Die Untersuchung des TKO-Stammes, bei dem die GlcNAc-Transferase I ausgeschaltet wurde, zeigte dieselben Veränderungen in der PC-Substitution der Proteine. Es wurden drei Proteine (AGS-3, PDI-3 und LLC1.3), die sowohl im N2-Stamm, als auch im TKO-Stamm gefunden wurden, identifiziert. Vier PC-modifizierte Proteine (F23C8.5, ALH-1, T03F1.7 und ENOL-1) wurden nur im TKO-Stamm identifiziert. Die Tatsache, dass so wenige PC-modifizierte Proteine im TKO-Stamm exprimiert werden, zeigt die Bedeutung der N-Glykosylierung für PC-Modifikationen, offenbar wird PC hauptsächlich über N-Glykane gebunden. Allerdings ergaben die

Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise, dass PC-Substitutionen nicht nur über N-Glykane gebunden werden, sondern auch über andere Verbindungen Kontakte mit den Proteinen aufnehmen. ENOL-1 und ALH-1, die im TKO-Stamm exprimiert werden und keine N-Glykosylierungsstelle haben, tragen neben der PC-Modifikation auch O-GlcNAc. Eventuell ist PC über das O-GlcNAc mit dem Protein verbunden. Bei der beta-Untereinheit des Elektronentransfer-Flavoproteins (F23C8.5) und der ribosomalen RNA-Adenin-Dimethylase (T03F1.7), zwei weiteren Proteinen die keine N-Glykosylierungsstelle haben, könnte PC über ein O-Glykan mit dem Protein oder direkt am Protein verknüpft sein.

Es sind nur wenige Daten über die Akzeptorstrukturen und den PC-Donor vorhanden. Cipollo *et al.* (2004) fanden erste Hinweise in Mikrosomen von Dauerlarven, dass Phosphatidylcholin der Donor von PC sein könnte. Zu den Untersuchungen der N-Glykane wurden $\text{Man}\alpha 1,2[\text{Man}\alpha 1,6]$, als obere Verzweigung und $\text{GlcNAc}\beta 1,2[\text{GlcNAc}\beta 1,4]$, als unterer Verzweigung der Trimannosylkernstruktur als geeignete Akzeptorstrukturen verwendet (Cipollo *et al.* 2005). Es besteht eine Ähnlichkeit der Kernstrukturen von Glykosphingolipiden und N-Glykanen (Abb. 21). PC ist an das Kern-GlcNAc der Arthroserie dieser Struktur geknüpft. Diese Ähnlichkeit könnte ein Indiz sein für die vielen PC-modifizierten Glykolipide und N-glykosylierten Proteine, die vielleicht sogar von denselben oder nah verwandten Transferasen modifiziert werden.

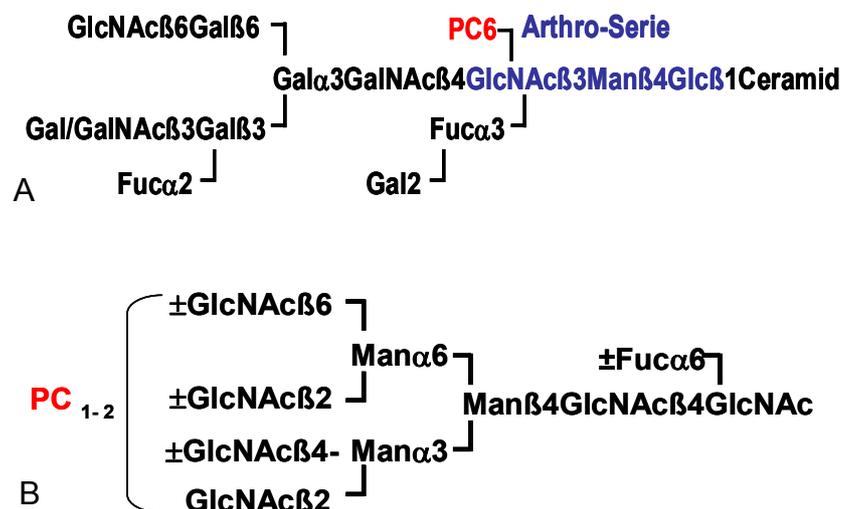


Abb. 21: PC-Epitope in Nematoden

A: Glykosphingolipid-basierende PC-Epitope aus *A. suum*; B: Protein-basierende Epitope aus *A. viteae*.

Bis heute sind die PC-Transferasen allerdings nicht bekannt. Die Daten aus dieser Arbeit sprechen dafür, dass verschiedene PC-Transferasen mit diversen zellulären Lokalisationen und Akzeptorspezifitäten an dem PCom beteiligt sein müssen. Im Cytosol gibt es keine N-glykosylierten Proteine, daher könnte O-GlcNAc als Akzeptorstruktur der PC-Transferasen dienen oder das PC direkt am Protein gebunden sein. Sobald die PC-Transferasen identifiziert und charakterisiert sind, können Fragen über die Funktion der identifizierten Proteine und deren Bedeutung für die Entwicklung der Nematoden geklärt werden.

C. elegans hat viele PC-modifizierte Proteine im Eistadium, die während der Entwicklung von L2 bis zum adulten Stadium vermehrt exprimiert werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass diese Proteinmodifikation eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Nematoden spielt. Lochnit *et al.* (2005) zeigten an Inhibitorstudien und RNAi-Experimenten die Bedeutung von PC für die Entwicklung der Nematoden. Die immunmodulatorische Funktion von PC könnte gerade bei parasitären Nematoden im Eistadium eine große Rolle spielen. In diesem Stadium sind viele Proteine PC-substituiert. Der Parasit steckt noch in seiner Entwicklung und ist sehr angreifbar. Durch die vielen PC-modifizierten Proteine und Lipide könnte sich der Organismus vor Angriffen von außen schützen, indem er das Immunsystem des Wirtes moduliert. Der Nematode könnte so eine Abwehrstrategie entwickeln, um länger im Wirt verweilen zu können.

4.2.2 O-GlcNAcom

Es wurden 64 O-GlcNAc-substituierte Proteine identifiziert, die hauptsächlich metabolische Funktionen haben. Dass die O-GlcNAcylierung ein sehr dynamischer Prozess ist, konnten die Ergebnisse dieser Proteomstudie bestätigen. Die meisten identifizierten Proteine werden nur in einem Stadium modifiziert. Allerdings gibt es auch O-GlcNAc-substituierte Proteine, die in unterschiedlichen Stadien modifiziert werden, wie z.B. die Propionyl-CoA-Carboxylase (F27D9.5) und die Arginin/Creatin-Kinase (F46H5.3), die O-GlcNAc-modifiziert im Eistadium, in L3 und im adulten Stadium vorliegen. Von den identifizierten Proteinen sind in höheren Organismen bisher nur drei beschrieben, die O-GlcNAc tragen (ENOL-1, HSP-70 und GPD-2) (Whelan *et al.* 2003). O-GlcNAcylierte Proteine in höheren Organismen sind hauptsächlich involviert in Signaltransduktion und Transkription (Kelly *et al.* 1993) sowie Zytoskelettformation (Whelan *et al.* 2003) und nukleäre Transportwege (Holt *et al.* 1987). Es wurde außerdem gezeigt, dass bei höheren Organismen diese modifizierten Proteine eine wichtige Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel und bei der Insulinresistenz spielen

(Vosseller *et al.* 2002; Park *et al.* 2005). Die Tatsache, dass in dieser O-GlcNAcom-Analyse von *C. elegans* hauptsächlich metabolische Proteine gefunden wurden, bestätigen die Befunde der OGT knockout-Studie der Nematoden von Hanover *et al.* (2005). Diese fanden heraus, dass eine konservierte Insulin-ähnliche Signalkaskade die Makronährstoffspeicher, Langlebigkeit und Dauerlarvenformierung reguliert. Der OGT knockout-Stamm moduliert die Hauptnährstoffspeicherung und unterdrückt die Dauerlarvenformierung bei *C. elegans*. Dieses Resultat zeigt die Wichtigkeit der O-GlcNAc-modifizierten Proteine.

Eine Reihe von Glykosyltransferasen wurde bisher gefunden, die für höhere Organismen eine wichtige Rolle spielt. Unsere Daten unterstützen neuere Erkenntnisse über Glykosylierungen bei *C. elegans*, die darauf hinweisen, dass einige Glykosyltransferasen, die bei höheren Lebewesen lebensnotwendig, für diesen Organismus verzichtbar sind (Chen *et al.* 1999; Chen *et al.* 2003; Zhu *et al.* 2004). Es besteht offenbar eine außerordentliche Flexibilität mit dem Leben vereinbarer Glykosylierungsmuster bei *C. elegans*. Man könnte spekulieren, dass die Glykosylierungen im Verlauf der Evolution viele unterschiedliche Rollen erworben haben, u.a. dekorative Glykosyltransferasen, die zwar zum Überleben in Stresssituationen beitragen, allerdings nicht absolut lebensnotwendig sind. Die Bedeutung dieser Funktionen hat im Verlaufe der Evolution zugenommen. Am unteren Ende der Skala stehen aber noch immer Pflanzen und Invertebraten, die auch bei größeren Veränderungen der N-Glykosylierungen lebensfähig bleiben, was ihnen eine weitaus größere Flexibilität in ihren glykogenischen Anforderungen verleiht.

4.3 Ausblick

Das PCom sowie das O-GlcNAcom sind mit den zur Verfügung stehenden Methoden nahezu vollständig identifiziert. Allerdings sind weitere Untersuchungen mit anderen Phosphoantikörpern sowie massenspektrometrische Analysen notwendig, um die Phosphorylierungen zu identifizieren und lokalisieren. Nur mit Hilfe dieser Informationen ist es möglich, das „Yin-Yang“-Phänomen zu zeigen und die Dynamik der Proteine zu demonstrieren.

Die Verknüpfungsstellen der Modifikationen an das Protein sind noch weitgehend unbekannt. Grabitzki *et al.* (2005) konnten zeigen, dass im Massenspektrometer PC-typische Fragmentmassen entstehen, was die Lokalisation von PC-Bindungen an das Protein erschwert. O-GlcNAc wird durch den Laserbeschuss sofort abgespalten. Die frühzeitige Fragmentierung der Modifikationen erfordert neue Methoden, die etabliert werden müssen, um die Bindungsstellen zu lokalisieren. Eine Möglichkeit

besteht in der Messung mit Elektrospray-Ionisations-(ESI)-MS. Mittels ESI-MS wird eine definierte Ionisation und komplette Desolvatisierung von in Lösung versprühten Analytmolekülen erreicht (Lottspeich *et al.* 2002). Bei dem ESI-IT-MS oder ESI-QTOF-MS bestimmt man die Ionenmassen mit Quadropolen. Mehrere hintereinander geschaltete Quadropole (Q) ermöglichen es, einzelne Proteinionen durch Kollision mit Edelgasen zu fragmentieren und die Fragmentmassen zu bestimmen (Rehm 2002). Durch die spezifische Fragmentierung der Proteinionen könnten die Lokalisationen der Modifikationen bestimmt werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse über die Lokalisationen und Funktionen der Modifikationen sollen schließlich die Grundlage für die Entwicklung neuer Bekämpfungsstrategien der Nematodeninfektionen bilden.

5 Zusammenfassung

Infektionen mit parasitären Nematoden stellen weltweit eine der häufigsten Erkrankungen bei Menschen und Tieren dar. Gleichzeitig stehen nur wenige Therapeutika zur Verfügung. Infektionen mit Nematoden sind meist durch eine lang anhaltende Persistenz gekennzeichnet. Sowohl bei der Invasion als auch bei der Persistenz spielen posttranslationale Modifikationen der Proteine des Parasiten eine zentrale Rolle. Der frei lebende Bodennematode *Caenorhabditis elegans* stellt für die Untersuchungen der Nematoden ein ausgezeichnetes Modellsystem dar.

In dieser Arbeit wurden zwei posttranslationale Modifikationen bearbeitet: die Substitution mit Phosphorylcholin, welches als immunmodulatorische Komponente eine zentrale Rolle im Parasitismus der Nematoden spielt, jedoch auch für die Entwicklung des Nematoden selbst essentiell ist, sowie die Modifikation von Proteinen mit O-gebundenem *N*-Acetylglucosamin. Letztere ist in höheren Eukaryoten bei der Embryonalentwicklung maßgeblich, spielt jedoch auch bei weiteren zentralen zellphysiologischen Vorgängen eine wichtige Rolle. Bislang lagen zur Funktion dieser Modifikation bei Nematoden noch keine Untersuchungen vor.

Es wurde das komplette PCom und O-GlcNAcom verschiedener Entwicklungsstadien von *C. elegans* analysiert. Die Proteine wurden via zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels zweidimensionalen Western-Blots detektiert. Die korrespondierenden Spots wurden aus dem Gel ausgeschnitten und tryptisch verdaut. Die resultierenden Peptide wurden via MALDI-TOF-MS und MS/MS-Experimenten identifiziert.

Die Modifikationsmuster der PC-substituierten Proteine erwiesen sich als stadienspezifisch. Insgesamt wurden 73 Proteine identifiziert, die PC-substituiert sind. Die meisten PC-modifizierten Proteine wurden im Eistadium und adulten Stadium gefunden, gefolgt vom Dauerlarvenstadium und L4. Die wenigsten modifizierten Proteine wurden in L2 und L3 gefunden. In L1 konnten keine PC-modifizierten Proteine detektiert werden. Die zelluläre Lokalisierung der PC-modifizierten Proteine ergab, dass sie hauptsächlich im Cytosol und in den Mitochondrien vorkommen. Proteine, die im Nukleus lokalisiert sind, wurden vorwiegend im Ei- und Dauerlarvenstadium gefunden. Im Ei- und Dauerlarvenstadium haben die PC-substituierten Proteine vielfältige Funktionen. Die meisten der identifizierten Proteine aus L4 und adulten Nematoden sind in den Stoffwechsel und den Energie-/Redoxmetabolismus involviert. Bei der O-GlcNAcom-Analyse von *C. elegans* wurden 64 O-GlcNAc-modifizierte Proteine identifiziert, von denen fünf eine Phosphorylierung von Serin zeigten. Die Modifikation wurde in allen Stadien gefunden. Die meisten Proteine waren im adulten

Stadium modifiziert, in abnehmender Häufigkeit gefolgt von L1, dem Eistadium, L3, L4 und L2. Am wenigsten O-GlcNAc-modifizierte Proteine wurden im Dauerlarvenstadium gefunden. Sie sind ebenfalls hauptsächlich im Cytosol und in den Mitochondrien lokalisiert. Die Analyse der *C. elegans*-Stadien ergab, dass die meisten Proteine metabolische Funktion haben. Die starke Dynamik der Proteinmodifikation mit O-GlcNAc wird durch die Analyse der einzelnen Stadien gezeigt, da die Mehrzahl der Proteine nur in einem Stadium modifiziert ist.

Die gewonnenen Erkenntnisse über diese Proteinmodifikationen und ihre jeweilige stadienspezifische Expression sollen die Grundlage für die Entwicklung neuer Bekämpfungsstrategien der Nematodeninfektionen bilden.

6 Summary

Nematode infections are amongst the most common human and animal diseases, but there is only a limited number of therapeutics available. Nematodes produce long-lasting infections that are characterised by little or no immunoprotection. Posttranslational modifications of proteins play an important role in invasion and persistence. The free-living nematode *Caenorhabditis elegans* has proved to be an excellent model system for (parasitic) nematode investigations.

In this thesis, posttranslational modifications of proteins in the developmental stages of *C. elegans* were analysed: the substitution with phosphorylcholine, which has an immunomodulatory function, plays an important role in nematode infections but is, also important for the development of the nematode. We also analysed the substitution of proteins by O-linked *N*-acetylglucosamine. This modification has been proved to be essential for the embryonic development of higher eukaryotes as well as playing an important role in vital physiological processes of the cell. Despite the fact that *C. elegans* is the best-studied model organism, there have been no studies on O-GlcNAcylation in this organism so far.

The complete PCome and O-GlcNAcome of *C. elegans* developmental stages were analysed using two-dimensional PAGE separation and 2D-Western-blotting. After in-gel digestion with trypsin, the resulting peptides were analysed by MALDI-TOF mass spectrometry and MS/MS-analysis.

In the PCome study we could identify 73 PC-modified proteins. The pattern of PC-modification was found to be stage-specific. PC-substituted proteins were most abundant in the egg-stage and adult nematodes followed by the Dauer larval-stage and L4. Only a small number of PC-modified proteins were found in L3 and L2. In L1 we could not detect any PC-modification. The cellular localisation of the identified proteins revealed a predominantly cytosolic and mitochondrial occurrence of the PC-modification. Nuclear proteins were predominantly found in the egg- and Dauer larval-stages. In these stages, the proteins have considerable functional diversity. Most of the identified proteins of the L4 and adult stages are involved in metabolism and energy-/ redox-metabolism.

The O-GlcNAcome study revealed 64 modified proteins. Five of them were, additionally, phosphorylated on serine residues. We found O-GlcNAc-modification in all of the *C. elegans* stages. The most modified proteins were detected in the adult stage; followed by the L1, egg, L3 and L4 stages. Small amounts of the O-GlcNAc-modification were, also, found in the Dauer larval-stage. The cellular localisation of the identified proteins revealed a predominantly cytosolic and mitochondrial occurrence of

the O-GlcNAc-modified proteins. The proteins indicated functional diversity, but they were predominantly involved in metabolism. Most of the identified proteins were modified in only one of the life-cycle stages, this revealed the strong dynamic of protein modification.

The results presented in this thesis are intended to form part of a foundation for the development of new strategies in combating nematode infections.

7 Literatur

- Ackerman, C. J., M. M. Harnett, W. Harnett, S. M. Kelly, D. I. Svergun and O. Byron (2003). "19 A solution structure of the filarial nematode immunomodulatory protein, ES-62." *Biophys J* **84**(1): 489-500.
- Ahmend, H., M. A. Bianchet, L. M. Amzel, J. Hirabayashi, K. Kasai, Y. Giga-Hama, H. Tohda and G. R. Vasta (2002). "Novel carbohydrate specificity of the 16-kDa galectin from *Caenorhabditis elegans*: binding to blood group precursor oligosaccharides (type 1, type 2, Talpha and Tbeta) and gangliosides." *Glycobiology* **12**: 451-461.
- Al-Qaoud, K. M., B. Fleischer and A. Hoerauf (1998). "The Xid defect imparts susceptibility to experimental murine filariasis--association with a lack of antibody and IL-10 production by B cells in response to phosphorylcholine." *Int Immunol* **10**(1): 17-25.
- Altmann, F., G. Fabini, H. Ahorn and I. B. Wilson (2001). "Genetic model organisms in the study of N-glycans." *Biochimie* **83**(8): 703-12.
- Arata, Y., J. Hirabayashi and K. Kasai (2001). "Sugar binding properties of the two lectin domains of the tandem repeat-type galectin LEC-1 (N32) of *Caenorhabditis elegans*. Detailed analysis by an improved frontal affinity chromatography method." *J Biol Chem* **276**(5): 3068-77.
- Bini, L., H. Heid, S. Liberatori, G. Geier, V. Pallini and R. Zwillig (1997). "Two-dimensional gel electrophoresis of *Caenorhabditis elegans* homogenates and identification of protein spots by microsequencing." *Electrophoresis* **18**(3-4): 557-62.
- Blaxter, M. L. (1993). "Cuticle surface proteins of wild type and mutant *Caenorhabditis elegans*." *J Biol Chem* **268**(9): 6600-9.
- Brenner, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* **77**(1): 71-94.
- Brundish, D. E. and J. Baddiley (1968). "Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate." *Biochem J* **110**(3): 573-82.
- Bulik, D. A. and P. W. Robbins (2002). "The *Caenorhabditis elegans* sqv genes and functions of proteoglycans in development." *Biochim Biophys Acta* **1573**(3): 247-57.
- C. elegans* Consortium, T. C. e. S. (1998). "Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology." *Science* **282**: 2012-2018.
- Caudy, A. A., R. F. Ketting, S. M. Hammond, A. M. Denli, A. M. Bathorn, B. B. Tops, J. M. Silva, M. M. Myers, G. J. Hannon and R. H. Plasterk (2003). "A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes." *Nature* **425**(6956): 411-4.
- Chen, F., D. David, A. Ferrari and J. Götz (2004). "Posttranslational modifications of tau-role in human tauopathies and modeling in transgenic animals." *Curr Drug Targets* **5**: 503-515.
- Chen, N., T. W. Harris, I. Antoshechkin, C. Bastiani, T. Bieri, D. Blasiar, K. Bradnam, P. Canaran, J. Chan, C. K. Chen, W. J. Chen, F. Cunningham, P. Davis, E. Kenny, R. Kishore, D. Lawson, R. Lee, H. M. Muller, C. Nakamura, S. Pai, P. Ozersky, A. Petcherski, A. Rogers, A. Sabo, E. M. Schwarz, K. Van Auken, Q. Wang, R. Durbin, J. Spieth, P. W. Sternberg and L. D. Stein (2005). "WormBase: a comprehensive data resource for *Caenorhabditis* biology and genomics." *Nucleic Acids Res* **33 Database Issue**: D383-9.
- Chen, S., A. M. Spence and H. Schachter (2003). "Isolation of null alleles of the *Caenorhabditis elegans* gly-12, gly-13 and gly-14 genes, all of which encode UDP-GlcNAc: alpha-3-D-mannoside beta1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I activity." *Biochimie* **85**(3-4): 391-401.
- Chen, S., S. Zhou, M. Sarkar, A. M. Spence and H. Schachter (1999). "Expression of three *Caenorhabditis elegans* N-acetylglucosaminyltransferase I genes during development." *J Biol Chem* **274**(1): 288-97.

- Cheng, X. and G. W. Hart (2001). "Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity." J Biol Chem **276**(13): 10570-5.
- Choy, W. F., M. H. Ng and P. L. Lim (1991). "*Trichinella spiralis*: light microscope monoclonal antibody localization and immunochemical characterization of phosphorylcholine and other antigens in the muscle larva." Exp. Parasitol **73**: 172-183.
- Cipollo, J. F., A. Awad, C. E. Costello, P. W. Robbins and C. B. Hirschberg (2004). "Biosynthesis in vitro of *Caenorhabditis elegans* phosphorylcholine oligosaccharides." Proc Natl Acad Sci U S A.
- Cipollo, J. F., A. M. Awad, C. E. Costello and C. B. Hirschberg (2005). "N-glycans of *Caenorhabditis elegans* are specific to developmental stages." J Biol Chem **280**(28): 26063-72.
- Cipollo, J. F., C. E. Costello and C. B. Hirschberg (2002). "The fine structure of *Caenorhabditis elegans* N-glycans." J Biol Chem **277**(51): 49143-57.
- Clarks, R. S., H. Bayir and L. W. Jenkins (2005). "Posttranslational protein modifications." Crit. Care. Med. **33**(12): 407-409.
- Couper, K. N., W. Chen, K. M. Houston, W. Harnett and L. L. Johnson (2005). "ES-62 is unable to modulate *Toxoplasma gondii*-driven Th1 responses and pathology." Parasite Immunol **27**(4): 147-50.
- Cox, G. N., M. Kusch and R. S. Edgar (1981). "Cuticle of *Caenorhabditis elegans*: its isolation and partial characterization." J Cell Biol **90**(1): 7-17.
- Cox, G. N., S. Staprans and R. S. Edgar (1981). "The cuticle of *Caenorhabditis elegans*. II. Stage-specific changes in ultrastructure and protein composition during postembryonic development." Dev Biol **86**(2): 456-70.
- Damian, R. T. (1964). "Molecular mimicry; antigen sharing by parasite and host and its consequences." Am Naturalist **98**: 129-149.
- Dea-Ayuela, M. A. and F. Bolas-Fernandez (1999). "Trichinella antigens: a review." Vet Res **30**(6): 559-71.
- Deehan, M. R., M. J. Frame, R. M. Parkhouse, S. D. Seatter, S. D. Reid, M. M. Harnett and W. Harnett (1998). "A phosphorylcholine-containing filarial nematode-secreted product disrupts B lymphocyte activation by targeting key proliferative signaling pathways." J Immunol **160**(6): 2692-9.
- Deehan, M. R., H. S. Goodridge, B. Blair, G. Lochnit, R. D. Dennis, R. Geyer, M. Harnett and W. Harnett (2003). "Immunomodulatory properties of *Ascaris suum* glycosphingolipids-phosphorylcholine and non-dependent effects." parasite immunol **25**.
- Deehan, M. R., W. Harnett and M. M. Harnett (2001). "A filarial nematode-secreted phosphorylcholine-containing glycoprotein uncouples the B cell antigen receptor from extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase by promoting the surface Ig-mediated recruitment of Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase-1 and Pac-1 mitogen-activated kinase-phosphatase." J Immunol **166**(12): 7462-8.
- Dell, A., S. M. Haslam, H. R. Morris and K. H. Khoo (1999). "Immunogenic glycoconjugates implicated in parasitic nematode diseases." Biochim Biophys Acta **1455**(2-3): 353-62.
- glyco Dennis, R. D., G. Lochnit and R. Geyer (1998). "Strategies for preliminary characterization of novel amphoteric sphingolipids." Methods Mol Biol **76**: 197-212.
- Ding, L. and E. P. Candido (2000). "HSP-25, a small heat shock protein associated with dense bodies and M-lines of body wall muscle in *Caenorhabditis elegans*." J Biol Chem **275**: 9510-9517.
- Dove, A. (1999). "Proteomics: translating genomics into products?" Nature Biotechnology **17**: 233-236.
- Dufresne-Martin, G., J. F. Lemay, P. Lavigne and K. Klarskov (2005). "Peptide mass fingerprinting by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry

- of proteins detected by immunostaining on nitrocellulose." *Proteomics* **5**(1): 55-66.
- Edman, P. and G. Begg (1967). "A Protein Sequenator." *Eur J Biochem* **1**: 80-91.
- Eschenlauer, S. C. and A. P. Page (2003). "The *Caenorhabditis elegans* ERp60 homolog protein disulfide isomerase-3 has disulfide isomerase and transglutaminase-like cross-linking activity and is involved in the maintenance of body morphology." *J Biol Chem* **278**(6): 4227-37.
- Fan, X., Y. M. She, R. D. Bagshaw, J. W. Callahan, H. Schachter and D. J. Mahuran (2005). "Identification of the hydrophobic glycoproteins of *Caenorhabditis elegans*." *Glycobiology* **15**(10): 952-64.
- Fandino, A. S., I. Rais, M. Vollmer, H. Elgass, H. Schägger and M. Karas (2005). "LC-nanospray-MS/ MS analysis of hydrophobic proteins from membrane protein complexes isolated by blue-native electrophoresis." *J. Mass Spectrom.* **40**: 1223-1231.
- Fletcher, T. C., A. White and B. A. Baldo (1980). "Isolation of a phosphorylcholine-containing component from the turbot tapeworm, *Bothriocephalus scorpii* (Muller), and its reaction with C-reactive protein." *Parasite Immunol* **2**(4): 237-48.
- Friedl, C. H., G. Lochnit, R. Geyer, M. Karas and U. Bahr (2000). "Structural elucidation of zwitterionic sugar cores from glycosphingolipids by nanoelectrospray ionization-ion-trap mass spectrometry." *Anal Biochem* **284**(2): 279-87.
- Friedl, C. H., G. Lochnit, U. Zahringer, U. Bahr and R. Geyer (2003). "Structural elucidation of zwitterionic carbohydrates derived from glycosphingolipids of the porcine parasitic nematode *Ascaris suum*." *Biochem J* **369**(Pt 1): 89-102.
- Galat, A. (2000). "Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes." *Eur J Biochem* **267**(16): 4945-59.
- Gao, Y., L. Wells, F. I. Comer, G. J. Parker and G. W. Hart (2001). "Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain." *J Biol Chem* **276**(13): 9838-45.
- Gbewonyo, K., S. P. Rohrer, L. Lister, B. Burgess, D. Cully and B. Buckland (1994). "Large scale cultivation of the free living nematode *Caenorhabditis elegans*." *Biotechnology* **12**: 50-54.
- Ge, Y., L. Rajkumar, R. C. Guzman, S. Nandi, W. F. Patton and B. J. Agnew (2004). "Multiplexed fluorescence detection of phosphorylation, glycosylation, and total protein in the proteomic analysis of breast cancer refractoriness." *Proteomics* **4**(11): 3464-7.
- Gerdt, S., R. D. Dennis, G. Borgonie, R. Schnabel and R. Geyer (1999). "Isolation, characterization and immunolocalization of phosphorylcholine-substituted glycolipids in developmental stages of *Caenorhabditis elegans*." *Eur J Biochem* **266**(3): 952-63.
- Gerdt, S., G. Lochnit, R. D. Dennis and R. Geyer (1997). "Isolation and structural analysis of three neutral glycosphingolipids from a mixed population of *Caenorhabditis elegans* (Nematoda:Rhabditida)." *Glycobiology* **7**(2): 265-75.
- Gonzales, S. A. and O. R. Burrone (1991). "Rotavirus NS26 is modified by addition of single O-linked residues of N-acetylglucosamine." *Virology* **182**: 8-16.
- Goodridge, H. S., F. A. Marshall, K. J. Else, K. M. Houston, C. Egan, L. Al-Riyami, F. Y. Liew, W. Harnett and M. M. Harnett (2005). "Immunomodulation via novel use of TLR4 by the filarial nematode phosphorylcholine-containing secreted product, ES-62." *J Immunol* **174**(1): 284-93.
- Goodridge, H. S., E. H. Wilson, W. Harnett, C. C. Campbell, M. M. Harnett and F. Y. Liew (2001). "Modulation of macrophage cytokine production by ES-62, a secreted product of the filarial nematode *Acanthocheilonema viteae*." *J Immunol* **167**(2): 940-5.

- Goto, S., A. Nakamura, Z. Radak, H. Nakamoto, R. Takahashi, K. Yasuda, Y. Sakurai and N. Ishii (1999). "Carbonylated proteins in aging and exercise: immunoblot approaches." Mech Ageing Dev **107**(3): 245-53.
- Gotta, M., Y. Dong, Y. K. Peterson, S. M. Lanier and J. Ahringer (2003). "Asymmetrically distributed *C. elegans* homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo." Curr Biol **13**(12): 1029-37.
- Grabitzki, J., V. Sauerland, R. Geyer and G. Lochnit (2005). "Identification of phosphorylcholine substituted peptides by their characteristic mass spectrometric fragmentation." Eur J Mass Spectrom **11**(3): 335-344.
- Grabitzki, J, Ahrend, MJH, Schmitz, B, Geyer, R. and G. Lochnit (2006a) "Yin and Yang in the worm: O-GlcNAcylation in *Caenorhabditis elegans*" Manuskript in Vorbereitung
- Grabitzki, J, Ahrend, MJH, Geyer, R, Schachter, H and G. Lochnit (2006b) "The PCome of *Caenorhabditis elegans*. Identification of phosphorylcholine substituted proteins." Manuskript in Vorbereitung
- Griffith, L. S., M. Mathes and B. Schmitz (1995). "Beta-amyloid precursor protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine." J Neurosci Res **41**(2): 270-8.
- Griffith, L. S. and B. Schmitz (1999). "O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation." Eur J Biochem **262**(3): 824-31.
- Gruenbaum, Y., K. K. Lee, J. Liu, M. Cohen and K. L. Wilson (2002). "The expression, lamin-dependent localization and RNAi depletion phenotype for emerin in *C. elegans*." J Cell Sci **115**(Pt 5): 923-9.
- Guinez, C., M. E. Losfeld, R. Cacan, J. C. Michalski and T. Lefebvre (2006). "Modulation of HSP70 GlcNAc-directed lectin activity by glucose availability and utilization." Glycobiology **16**(1): 22-8.
- Guinez, C., W. Morelle, J. C. Michalski and T. Lefebvre (2005). "O-GlcNAc glycosylation: a signal for the nuclear transport of cytosolic proteins?" Int J Biochem Cell Biol **37**(4): 765-74.
- Haithcock, E., Y. Dayani, E. Neufeld, A. J. Zahand, N. Feinstein, A. Mattout, Y. Gruenbaum and J. Liu (2005). "Age-related changes of nuclear architecture in *Caenorhabditis elegans*." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(46): 16690-5.
- Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." Nature **418**(6894): 244-51.
- Hanover, J. A., M. E. Forsythe, P. T. Hennessey, T. M. Brodigan, D. C. Love, G. Ashwell and M. Krause (2005). "A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11266-71.
- Harnett, W. and M. M. Harnett (1999). "Phosphorylcholine: friend or foe of the immune system?" Immunol Today **20**(3): 125-9.
- Harnett, W. and M. M. Harnett (2000). "Phosphorylcholine: an Immunomodulator present on glycoproteins secreted by filarial nematodes." Mod. Asp. Immunobiol. **1**(2): 40-42.
- Harnett, W., I. B. McInnes and M. Harnett (2004). "ES-62, a filarial nematode-derived immunomodulator with anti-inflammatory potential." Immunology letters **94**: 27-33.
- Harris, B. Z., S. Venkatasubrahmanyam and W. A. Lim (2002). "Coordinated folding and association of the LIN-2, -7 (L27) domain. An obligate heterodimerization involved in assembly of signaling and cell polarity complexes." J Biol Chem **277**(38): 34902-8.
- Haslam, S. M. and A. Dell (2003). "Hallmarks of *Caenorhabditis elegans* N-glycosylation: complexity and controversy." Biochimie **85**(1-2): 25-32.
- Haslam, S. M., K. H. Khoo, K. M. Houston, W. Harnett, H. R. Morris and A. Dell (1997). "Characterisation of the phosphorylcholine-containing N-linked oligosaccharides in the excretory-secretory 62 kDa glycoprotein of *Acanthocheilonema viteae*." Mol Biochem Parasitol **85**(1): 53-66.

- Hata, K., H. morisaka, K. Hara, J. Mima, N. Yumoto, Y. Tatsu, M. Furuno, N. Ishizuka and M. Ueda (2006). "Two-dimensional HPLC on-line analysis of phosphopeptides using titania and monolithic columns." Anal Biochem **350**(2): 292-297.
- Hattan, S. J., J. Marchese, N. Khainovski, S. Martin and P. Juhasz (2005). "Comparative study of [Three] LC-MALDI workflows for the analysis of complex proteomic samples." J Proteome Res **4**(6): 1931-41.
- Heise, A., W. Peters and H. Zahner (1999). "Phosphocholine epitopes in *Eimeria bovis*." Exp Parasitol **92**(4): 279-82.
- Helenius, A. and M. Aebi (2001). "Intracellular functions of N-linked glycans." Science **291**(5512): 2364-9.
- Helenius, A. and M. Aebi (2004). "Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum." Annu Rev Biochem **73**: 1019-49.
- Holt, G. D., C. M. Snow, A. Senior, R. S. Haltiwanger, L. Gerace and G. W. Hart (1987). "Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked *N*-acetylglucosamine." J Cell Biol **104**(5): 1157-64.
- Houston, K. M. and W. Harnett (1996). "Prevention of attachment of phosphorylcholine to a major excretory-secretory product of *Acanthocheilonema viteae* using tunicamycin." J Parasitol **82**(2): 320-4.
- Houston, K. M. and W. Harnett (2004). "Structure and synthesis of nematode phosphorylcholine-containing glycoconjugates." Parasitology **129**(Pt 6): 655-61.
- Houston, K. M., G. Lochnit, R. Geyer and W. Harnett (2002). "Investigation of the nature of potential phosphorylcholine donors for filarial nematode glycoconjugates." Mol Biochem Parasitol **123**(1): 55-66.
- Hunter, T. (1995). "Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling." Cell **80**: 225-236.
- Hussein, A. S. and R. D. Walter (1995). "Purification and characterization of gamma-glutamylcysteine synthetase from *Ascaris suum*." Mol Biochem Parasitol **72**(1-2): 57-64.
- Ikegami, T., T. Hara, H. Kimura, H. Kobayashi, K. Hosoya, K. Cabrera and N. Tanaka (2006). "Two-dimensional reversed-phase liquid chromatography using two monolithic silica C18 columns and different mobile phase modifiers in the two dimensions." J Chromatogr A **1106**(1-2): 112-7.
- Jones, A. K., S. D. Buckingham and D. B. Sattelle (2005). "Model organisms: Chemistry-to-gene screens in *Caenorhabditis elegans*." Nat Rev Drug Discov **4**(4): 321-30.
- Jones, S. J., D. L. Riddle, A. T. Pouzyrev, V. E. Velculescu, L. Hillier, S. R. Eddy, S. L. Stricklin, D. L. Baillie, R. Waterston and M. A. Marra (2001). "Changes in gene expression associated with developmental arrest and longevity in *Caenorhabditis elegans*." Genome Res **11**(8): 1346-52.
- Kamath, R. S., A. G. Fraser, Y. Dong, G. Poulin, R. Durbin, M. Gotta, A. Kanapin, N. Le Bot, S. Moreno, M. Sohrmann, D. P. Welchman, P. Zipperlen and J. Ahringer (2003). "Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi." Nature **421**(6920): 231-7.
- Kamemura, K. and G. W. Hart (2003). "Dynamic interplay between O-glycosylation and O-phosphorylation of nucleocytoplasmic proteins: a new paradigm for metabolic control of signal transduction and transcription." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **73**: 107-36.
- Karabinos, A., H. Schmidt, J. Harborth, R. Schnabel and K. Weber (2001). "Essential roles for four cytoplasmic intermediate filament proteins in *Caenorhabditis elegans* development." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(14): 7863-8.
- Kelly, W. G., M. E. Dahmus and G. W. Hart (1993). "RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc." J Biol Chem **268**(14): 10416-24.
- Kim, J. K., H. W. Gabel, R. S. Kamath, M. Tewari, A. Pasquinelli, J. F. Rual, S. Kennedy, M. Dybbs, N. Bertin, J. M. Kaplan, M. Vidal and G. Ruvkun (2005).

- "Functional genomic analysis of RNA interference in *C. elegans*." Science **308**(5725): 1164-7.
- Konrad, R. J., F. Zhang, J. E. Hale, M. D. Knierman, G. W. Becker and J. E. Kudlow (2002). "Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase." Biochem Biophys Res Commun **293**(1): 207-12.
- Kranewitter, W. J., J. Ylanne and M. Gimona (2001). "UNC-87 is an actin-bundling protein." J Biol Chem **276**(9): 6306-12.
- Kreppel, L. K., M. A. Blomberg and G. W. Hart (1997). "Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats." J Biol Chem **272**(14): 9308-15.
- Ku, N. O. and M. B. Omary (1994). "Expression, glycosylation, and phosphorylation of human keratins 8 and 18 in insect cells." Exp Cell Res **211**(1): 24-35.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Lafontaine, D. L., T. Preiss and D. Tollervey (1998). "Yeast 18S rRNA dimethylase Dim1p: a quality control mechanism in ribosome synthesis?" Mol Cell Biol **18**(4): 2360-70.
- Lee, K. K., D. Starr, M. Cohen, J. Liu, M. Han, K. L. Wilson and Y. Gruenbaum (2002). "Lamin-dependent localization of UNC-84, a protein required for nuclear migration in *Caenorhabditis elegans*." Mol Biol Cell **13**(3): 892-901.
- Lee, W., K. R. Kim, G. Singaravelu, B. J. Park, H. Kim do, J. Ahnn and Y. J. Yoo (2006). "Alternative chaperone machinery may compensate for calreticulin/calnexin deficiency in *Caenorhabditis elegans*." Proteomics **6**(4): 1329-39.
- Lefebvre, T., C. Guinez, V. Dehennaut, O. Beseme-Dekeyser, W. Morelle and J. C. Michalski (2005). "Does O-GlcNAc play a role in neurodegenerative diseases?" Expert Rev Proteomics **2**(2): 265-75.
- Lehmann, W. D. (1996). "Massenspektrometrie in der Biochemie." Spektrum Akademischer Verlag.
- Liu, J., T. Rolef Ben-Shahar, D. Riemer, M. Treinin, P. Spann, K. Weber, A. Fire and Y. Gruenbaum (2000). "Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes." Mol Biol Cell **11**(11): 3937-47.
- Liu, J., S. Vasudevan and E. T. Kipreos (2004). "CUL-2 and ZYG-11 promote meiotic anaphase II and the proper placement of the anterior-posterior axis in *C. elegans*." Development **131**(15): 3513-25.
- Lochnit, G., R. Bongaarts and R. Geyer (2005). "Searching new targets for anthelmintic strategies: Interference with glycosphingolipid biosynthesis and phosphorylcholine metabolism affects development of *Caenorhabditis elegans*." Int J Parasitol **35**(8): 911-23.
- Lochnit, G., R. D. Dennis and R. Geyer (2000). "Phosphorylcholine substituents in nematodes: structures, occurrence and biological implications." Biol Chem **381**(9-10): 839-47.
- Lochnit, G., R. D. Dennis, A. J. Ulmer and R. Geyer (1998). "Structural elucidation and monokine-inducing activity of two biologically active zwitterionic glycosphingolipids derived from the porcine parasitic nematode *Ascaris suum*." J Biol Chem **273**(1): 466-74.
- Lochnit, G. and R. Geyer (2003). "Evidence for the presence of the Kennedy and Bremer-Greenberg pathways in *Caenorhabditis elegans*." Acta Biochimica Polonica **50**(4): 1239-1243.
- Lochnit, G. and R. Geyer (2004). "An optimized protocol for nano-LC-MALDI-TOF-MS coupling for the analysis of proteolytic digests of glycoproteins." Biomed. Chromatogr.

- Lochnit, G., S. Nispel, R. D. Dennis and R. Geyer (1998). "Structural analysis and immunohistochemical localization of two acidic glycosphingolipids from the porcine, parasitic nematode, *Ascaris suum*." *Glycobiology* **8**(9): 891-9.
- G. Lochnit, J. Grabitzki, B. Henkel and R. Geyer (2006) "First identification of a phosphorylcholine-substituted protein from *Caenorhabditis elegans*. Isolation and characterization of the aspartyl protease ASP-6." *Biol. Chem.* In press
- Lottspeich, F. (1999). "Proteom Analysis: A pathway to the functional analysis of proteins." *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**: 2476-2492.
- Loyet, K. M., J. T. Stults and D. Arnott (2005). "Mass spectrometric contributions to the practice of phosphorylation site mapping through 2003: a literature review." *Mol Cell Proteomics* **4**(3): 235-45.
- Lubas, W. A., D. W. Frank, M. Krause and J. A. Hanover (1997). "O-linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats." *J Biol Chem* **272**(14): 9316-24.
- Lubas, W. A., M. Smith, C. M. Starr and J. A. Hanover (1995). "Analysis of nuclear pore protein p62 glycosylation." *Biochemistry* **34**(5): 1686-94.
- MacDonald, M., D. B. Copeman and W. Harnett (1996). "Do excretory-secretory products of *Onchocerca gibsoni* contain phosphorylcholine attached to O-type glycans?" *Int J Parasitol* **26**(10): 1075-80.
- Madison, J. M., S. Nurrish and J. M. Kaplan (2005). "UNC-13 interaction with syntaxin is required for synaptic transmission." *Curr Biol* **15**(24): 2236-42.
- Maine, E. M., J. Hauth, T. Ratliff, V. E. Vought, X. She and W. G. Kelly (2005). "EGO-1, a putative RNA-dependent RNA polymerase, is required for heterochromatin assembly on unpaired dna during *C. elegans* meiosis." *Curr Biol* **15**(21): 1972-8.
- Merry, A. H., D. C. Neville, L. Royle, B. Matthews, D. J. Harvey, R. A. Dwek and P. M. Rudd (2002). "Recovery of intact 2-aminobenzamide-labeled O-glycans released from glycoproteins by hydrazinolysis." *Anal Biochem* **304**(1): 91-9.
- Meyer, S., E. van Liempt, A. Imbert, Y. van Kooyk, H. Geyer, R. Geyer and I. van Die (2005). "DC-SIGN mediates binding of dendritic cells to authentic pseudo-LewisY glycolipids of *Schistosoma mansoni* cercariae, the first parasite-specific ligand of DC-SIGN." *J Biol Chem* **280**(45): 37349-59.
- Mohri, K., S. Vorobiev, A. A. Fedorov, S. C. Almo and S. Ono (2004). "Identification of functional residues on *Caenorhabditis elegans* actin-interacting protein 1 (UNC-78) for disassembly of actin depolymerizing factor/ cofilin-bound actin filaments." *J Biol Chem* **279**: 31697-31707.
- Muller, H. A. and O. Bossinger (2003). "Molecular networks controlling epithelial cell polarity in development." *Mech Dev* **120**(11): 1231-56.
- Nakamura, A., K. Yasuda, H. Adachi, Y. Sakurai, N. Ishii and S. Goto (1999). "Vitellogenin-6 is a major carbonylated protein in aged nematode, *Caenorhabditis elegans*." *Biochem Biophys Res Commun* **264**(2): 580-3.
- Nelson, D. L. and M. M. Cox (2001). "Lehninger Biochemie." *Springer-Verlag Heidelberg* **3. Auflage**.
- Norman, K. R., R. T. Fazio, J. E. Mellem, M. V. Espelt, K. Strange, M. C. Beckerle and A. V. Maricq (2005). "The Rho/Rac-family guanine nucleotide exchange factor VAV-1 regulates rhythmic behaviors in *C. elegans*." *Cell* **123**(1): 119-32.
- Nowikovsky, K., E. M. Froschauer, G. Zsurka, J. Samaj, S. Reipert, M. Kolisek, G. Wiesenberger and R. J. Schweyen (2004). "The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K⁺ homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome." *J Biol Chem* **279**(29): 30307-15.
- O'Farrell, P. H. (1975). "High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins." *J Biol Chem* **250**: 4007-4021.
- Page, A. P., G. McCormack and A. J. Birnie (2006). "Biosynthesis and enzymology of the *Caenorhabditis elegans* cuticle: Identification and characterization of a novel serine protease inhibitor." *Int J Parasitol* **36**(6): 681-9.

- Pandey, A. and M. Mann (2000). "Proteomics to study genes and genomes." Nature **405**(6788): 837-46.
- Park, S. Y., J. Ryu and W. Lee (2005). "O-GlcNAc modification on IRS-1 and Akt2 by PUGNAc inhibits their phosphorylation and induces insulin resistance in rat primary adipocytes." Exp Mol Med **37**: 220-229.
- Patterson, S. D. (1994). "From Electrophoretically separated proteins to Identification strategies for sequence and mass analysis." Anal Biochem **221**: 1-15.
- Pery, P., A. Petit, J. Poulan and G. Luffau (1974). "Phosphocholine-bearing components in homogenates of nematodes." Eur J Immunol **4**: 637-639.
- Piekny, A. J., J. L. Johnson, G. D. Cham and P. E. Mains (2003). "The *Caenorhabditis elegans* nonmuscle myosin genes nmy-1 and nmy-2 function as redundant components of the let-502/Rho-binding kinase and mel-11/myosin phosphatase pathway during embryonic morphogenesis." Development **130**(23): 5695-704.
- Porat, A., Y. Sagiv and Z. Elazar (2000). "A 56-kDa selenium-binding protein participates in intra-Golgi protein transport." J Biol Chem **275**: 14457-14465.
- Praitis, V., E. Ciccone and J. Austin (2005). "SMA-1 spectrin has essential roles in epithelial cell sheet morphogenesis in *C. elegans*." Dev Biol **283**(1): 157-70.
- Rehm, H. (2002). "Der Experimentator: Proteinbiochemie/ Proteomics." Spektrum Akademischer Verlag **4. Aufl.**
- Rex-Mathes, M., J. Koch, S. Werner, L. S. Griffith and B. Schmitz (2002). "Immunological detection of O-GlcNAc." Methods Mol Biol **194**: 73-87.
- Royle, L., T. S. Mattu, E. Hart, J. I. Langridge, A. H. Merry, N. Murphy, D. J. Harvey, R. A. Dwek and P. M. Rudd (2002). "An analytical and structural database provides a strategy for sequencing O-glycans from microgram quantities of glycoproteins." Anal Biochem **304**(1): 70-90.
- Schachter, H. (2000). "The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-Glycan branches." Glycoconj J **17**: 465-483.
- Schachter, H., S. Chen, W. Zhang, A. M. Spence, S. Zhu, J. W. Callahan, D. J. Mahuran, X. Fan, R. D. Bagshaw, Y. M. She, J. C. Rosa and V. N. Reinhold (2002). "Functional post-translational proteomics approach to study the role of N-glycans in the development of *Caenorhabditis elegans*." Biochem Soc Symp(69): 1-21.
- Schmitt, S., D. Glebe, T. K. Tolle, G. Lochnit, D. Linder, R. Geyer and W. H. Gerlich (2004). "Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus." J Gen Virol **85**(Pt 7): 2045-53.
- Shafi, R., S. P. Iyer, L. G. Ellies, N. O'Donnell, K. W. Marek, D. Chui, G. W. Hart and J. D. Marth (2000). "The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 5735-9.
- Slawson, C. and G. W. Hart (2003). "Dynamic interplay between O-GlcNAc and O-phosphate: the sweet side of protein regulation." Curr Opin Struct Biol **13**(5): 631-6.
- Sönnichsen, B., L. B. Koski, A. Walsh, P. Marshall, B. Neumann, M. Brehm, A. M. Alleume, J. Artelt, P. Bettencourt, E. Cassin, M. Hewitson, C. Holz, M. Khan, S. Lazik, C. Martin, B. Nitsche, M. Ruer, J. Stamford, M. Winzi, R. Heinkel, M. Röder, J. Finell, H. Häntsch, J. S. J. M., J. M., F. Piano, K. C. Gunsalus, K. Oegema, P. Göczy, A. Coulson, A. A. Hyman and C. J. Echeverri (2005). "Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*." Nature **434**: 462-469.
- Steenkamp, D. J. and M. Husain (1982). "The effect of tetrahydrofolate on the reduction of electron transfer flavoprotein by sarcosine and dimethylglycine dehydrogenases." Biochem J **203**(3): 707-15.
- Stults, J. T. and D. Arnott (2005). "Proteomics." Methods in Enzymology **402**: 245-289.
- Tabuse, Y. (2002). "Protein kinase C isoforms in *C. elegans*." J Biochem (Tokyo) **132**: 519-522.

- Tabuse, Y., T. Nabetani and A. Tsugita (2005). "Proteomic analysis of protein expression profiles during *Caenorhabditis elegans* development using two-dimensional difference gel electrophoresis." Proteomics **5**(11): 2876-91.
- Tabuse, Y., T. Nebetani and A. Tsugita (2004). "Proteomic analysis of protein expression profiles during *Caenorhabditis elegans* development using two-dimensional difference gel electrophoresis." Proteomics **5**: 2876-2891.
- Thiede, B., W. Hohenwarter, A. Krah, J. Mattow, M. Schmidt, F. Schmidt and P. R. Jungblut (2005). "Peptide mass fingerprint." Methods **35**(3): 237-247.
- Thiede, B., J. Salnikow and B. Wittmann-Liebold (1977). "C-terminal ladder sequencing by an approach combining chemical degradation with analysis by matrix-assisted laser desorption/ ionisation mass spectrometry." Eur J Biochem **244**(750-754).
- Tomasz, A. (1967). "Choline in the cell wall of a bacterium: novel type of polymer-linked choline in *Pneumococcus*." Science **157**(789): 694-7.
- Tomasz, A., M. Westphal, E. B. Briles and P. Fletcher (1975). "On the physiological functions of teichoic acids." J Supramol Struct **3**(1): 1-16.
- Torres, C. R. and G. W. Hart (1984). "Topography and polypeptide distribution of terminal *N*-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc." J Biol Chem **259**(5): 3308-17.
- Tu, Y., S. Wu, X. Shi, K. Chen and C. Wu (2003). "Migfilin and Mig-2 link focal adhesions to filamin and the actin cytoskeleton and function in cell shape modulation." Cell **113**(1): 37-47.
- Van Furden, D., K. Johnson, C. Segbert and O. Bossinger (2004). "The *C. elegans* ezrin-radixin-moesin protein ERM-1 is necessary for apical junction remodelling and tubulogenesis in the intestine." Dev Biol **272**(1): 262-76.
- van Rossum, A. J., P. M. Brophy, A. Tait, J. Barrett and J. R. Jefferies (2001). "Proteomic identification of glutathione S-transferases from the model nematode *Caenorhabditis elegans*." Proteomics **1**(11): 1463-8.
- Vosseller, K., K. C. Hansen, R. J. Chalkley, J. C. Trinidad, L. Wells, G. W. Hart and A. L. Burlingame (2005). "Quantitative analysis of both protein expression and serine / threonine post-translational modifications through stable isotope labeling with dithiothreitol." Proteomics **5**(2): 388-98.
- Vosseller, K., K. Sakabe, L. Wells and G. W. Hart (2002). "Diverse regulation of protein function by O-GlcNAc: a nuclear and cytoplasmic carbohydrate post-translational modification." Curr Opin Chem Biol **6**(6): 851-7.
- Wang, M., G. G. Xiao, N. Li, Y. Xie, J. A. Loo and A. E. Nel (2005). "Use of a fluorescent phosphoprotein dye to characterize oxidative stress-induced signaling pathway components in macrophage and epithelial cultures exposed to diesel exhaust particle chemicals." Electrophoresis **26**(11): 2092-108.
- Wells, L. and G. W. Hart (2003). "O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar." FEBS Lett **546**(1): 154-8.
- Wells, L., L. K. Kreppel, F. I. Comer, B. E. Wadzinski and G. W. Hart (2004). "O-GlcNAc transferase is in a functional complex with protein phosphatase 1 catalytic subunits." J Biol Chem **279**(37): 38466-70.
- Wells, L., S. A. Whelan and G. W. Hart (2003). "O-GlcNAc: a regulatory post-translational modification." Biochem Biophys Res Commun **302**(3): 435-441.
- Wessel, D. and U. Flügge (1984). "A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids." Anal Biochem **138**: 141-143.
- Westmeier, R. (1990). "Electrophoresis in practise." VCH Verlagsgesellschaft mbh Weinheim, Germany.
- Whelan, S. A. and G. W. Hart (2003). "Proteomic approaches to analyze the dynamic relationships between nucleocytoplasmic protein glycosylation and phosphorylation." Circ Res **93**(11): 1047-58.

- Whitford, M. and P. Faulkner (1992). "A structural polypeptide of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus contains O-linked *N*-acetylglucosamine." J Virol **66**(6): 3324-9.
- Wilkins, M. R., K. L. Williams, R. D. Appel and D. F. E. Hochstrasser (1997). "Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics." Springer-Verlag Heidelberg.
- Wollscheid, B., J. D. Watts and R. Aebersold (2004). "Proteomics/genomics and signaling in lymphocytes." Curr Opin Immunol **16**(3): 337-44.
- Wuhrer, M., S. Rickhoff, R. D. Dennis, G. Lochnit, P. T. Soboslay, S. Baumeister and R. Geyer (2000). "Phosphocholine-containing, zwitterionic glycosphingolipids of adult *Onchocerca volvulus* as highly conserved antigenic structures of parasitic nematodes." Biochem J **348 Pt 2**: 417-23.
- Yamada-Hada, J., N. Hada, K. Aoki, K. Yamamoto and T. Takeda (2004). "structural elucidation of novel phosphocholine-containing glycosylinositol-phosphoceramides in filamentous fungi: (2). Spectral analysis of the sugar-inositol portion by 2D-NMR." Chem Pharm Bull (Tokyo) **52**(4): 473-6.
- Yanagi, K., T. Mizuno, T. Tsuyama, S. Tada, Y. Iida, A. Sugimoto, T. Eki, T. Enomoto and F. Hanaoka (2005). "*Caenorhabditis elegans* gemin homologue participates in cell cycle regulation and germ line development." J Biol Chem **280**(20): 19689-94.
- Yki-Jarvinen, H., A. Virkamaki, M. C. Daniels, D. McClain and W. K. Gottschalk (1998). "Insulin and glucosamine infusions increase O-linked *N*-acetyl-glucosamine in skeletal muscle proteins *in vivo*." Metabolism **47**(4): 449-55.
- Yoneda, T., C. Benedetti, F. Urano, S. G. Clark, H. P. Harding and D. Ron (2004). "Compartment-specific perturbation of protein handling activates genes encoding mitochondrial chaperones." J Cell Sci **117**(Pt 18): 4055-66.
- Zachara, N. E. and G. W. Hart (2002). "The emerging significance of O-GlcNAc in cellular regulation." Chem Rev **102**(2): 431-8.
- Zachara, N. E. and G. W. Hart (2004). "O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress." Biochim Biophys Acta **1673**(1-2): 13-28.
- Zhu, S., A. Hanneman, V. N. Reinhold, A. M. Spence and H. Schachter (2004). "*Caenorhabditis elegans* triple null mutant lacking UDP-N-acetyl-D-glucosamine:alpha-3-D-mannoside beta1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I." Biochem J **382**(Pt 3): 995-1001.
- Ziv, M. and D. de Vienne (2000). "Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology." Plant Mol Biol **44**(5): 575-80.
- Zucht, H. D., J. Lamerz, V. Khamenia, C. Schiller, A. Appel, H. Tammen, R. Cramer and H. Selle (2005). "Data mining methodology for LC-MALDI-MS based peptide profiling." Comb Chem High Throughput Screen **8**(8): 717-723.

9 Anhang

Tabelle 17:

Zugeordnete und nicht zugeordnete Peptide der identifizierten PC-modifizierten Proteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*.

Nr	Genname	Funktion/ Homologie	NZ	Z	Mowse Score	S (%)
		Strukturproteine				
2	K07H8.6 <i>vit-6</i>	Vitellogenin	32	14	71	12
4	Y66H1B.2	Aktin-bindendes Zytoskelettprotein, Filamin	5	16	183	21
12	F58G11.1b	Ca-bindendes-Transmembranprotein	47	11	61	17
18	M6.1 <i>ifc-2</i>	Intermediäres Filament-C-Protein 2	51	17	81	14
19	T14G11.3	Mitochondriales inneres Membranprotein (Mitofilin)	60	22	151	37
25	Y46H3A.6 <i>gly-7</i>	Polypeptid-GalNAc-Transferase	54	7	58	19
30	F25H9.5 <i>frm-10</i>	Membran-Zytoskelett verknüpfendes Protein				
67	Y104H12BR.1	Ca-bindendes Aktin-bündelndes Protein	17	4	63	33
		Stoffwechsel				
5	C05E4.9 <i>gei-7</i>	Isocitratlyase/Malatsynthase	85	14	70	32
13	F54H12.1 <i>aco-2</i>	Aconitase/Homoaconitase	19	13	117	24
39	LLC1.3 ^c	Dihydroliponamid-Dehydrogenase	34	10	82	32
16	F27D9.5	Propionyl-CoA-Carboxylase Untereinheit	68	30	177	36
46	Y57A10C.6	Peroxisomale 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase P-44/SCP2	35	12	79	31
48	Y57A10C.6	Peroxisomale 3-Ketoacyl-CoA-Thiolase P-44/SCP2	35	12	79	31
52	T02G5.8 <i>kat-1</i>	3-Ketoacyl-CoA-Thiolase	56	9	61	35
61	B0272.3	3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase	16	10	114	32
49	T03F1.3 ^e	3-Phosphoglycerat-Kinase	64	11	79	21
54	F01F1.12	Fruktose-bisphosphat-	83	15	115	51

Nr	Genname	Funktion/ Homologie	NZ	Z	Mowse Score	S (%)
		Aldolase				
57	K10B3.7 <i>gpd-2</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	39	13	117	39
72	T21B10.2 ^{d,e} <i>enol-1</i>	2-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	55	14	107	46
66	C33A12.7 ^e	Glyoxylase	58	7	63	31
70	F54D8.3 ^{d,e} <i>alh-1</i>	Aldehyddehydrogenase	72	18	101	34
20	W06H3.3	CTP-Synthase	32	7	82	11
24	K07E3.4b	Formyltetrahydrofolat-Synthetase	28	12	88	23
32	K08E3.5	UDP-Glucose-Pyrophosphorylase	62	14	82	24
		Proteinsynthese/ Translation				
7	F10G7.2 <i>tsn-1</i>	Transkriptionaler Coaktivator p100	59	39	306	45
14	Y54E10A.15 <i>cdt-1</i>	DNA-Replikationsfaktor	58	9	93	16
50	C44E4.4	RNA-bindendes Protein La	64	14	95	37
55	F26A3.3 <i>ego-1</i>	RNA-abhängige RNA-Polymerase	21	16	67	8
71	T03F1.7 ^{d,e}	Ribosomale RNA-Adenin-Dimethylase				
		Signaltransduktion				
3	C25F6.2 <i>dlg-1</i>	Membran-assoziierte Guanylatkinase	79	17	62	17
6	C25F6.2 <i>dlg-1</i>	Membran-assoziierte Guanylatkinase MAGUK	79	17	62	17
8	C35B8.2 <i>vav-1</i>	Rho Guaninnukleotid-Austauschfaktor	71	16	63	21
15	B0545.1 <i>tpa-1</i>	Serin/Threonin-Proteinkinase	9	16	66	12
26	F32A6.4 ^c <i>ags-3</i>	Aktivator von G-Protein-Signalwegen	44	8	61	11
31	T09D3.4 <i>nhr-216</i>	Hormon-Rezeptor Homolog	87	12	62	26
37	C52B9.7 ^e <i>paf-2</i>	PAF-Acetylhydrolase	19	4	63	13
58	Y54G11A.10 ^e <i>lin-7</i>	Rezeptorzielprotein LIN-7	14	4	61	15
60	ZK1058.6	Carbon-Nitrogen-Hydrolase	50	8	63	31

Nr	Genname	Funktion/ Homologie	NZ	Z	Mowse Score	S (%)
	<i>nit-1</i>					
63	F52H3.7 ^e <i>lec-2</i>	Galektin	16	6	78	22
68 73	ZK524.2 <i>unc-13</i>	Neurotransmitter abgebender Regulator	52	6	63	24
		Proteinstoffwechsel				
9	ZK520.4 <i>cul-2</i>	E3 Ubiquitin-Ligase/Cullin	84	15	91	18
10	F38B7.5 <i>duo-1</i>	Ubiquitin-spezifische Protease				
62	F52C6.4 <i>math-32</i>	Ubiquitin-ähnliches Protein	46	8	63	32
33	W07G4.4	Aminopeptidase	54	20	172	45
40	F56D2.1	Mitochondriale Peptidase	21	10	91	25
42	F01F1.9	Aminopeptidase I Zink- Metalloprotease	48	8	63	22
51	W08E12.7 ^e	Metallopeptidase	56	20	135	46
56	K10H10.2	Cystathionin- β -Synthase	31	13	97	37
28	ZK829.4	Glutamatdehydrogenase	53	27	205	41
38	K04D7.3 <i>gta-1</i>	4-Aminobutyrat- Aminotransferase	16	7	65	14
		Chaperone				
21	C12C8.1 <i>hsp-70</i>	Chaperone HSP70/ HSC 70	39	17	133	28
22	C37H5.8 <i>hsp-6</i>	Molekulare Chaperone	25	10	95	18
27	Y22D7AL.5	HSP 60	18	29	283	42
36	H06O01.1 ^{c, e} <i>pdi-3</i>	Proteindisulfidomerase	53	23	177	40
43	F31D4.3 <i>fkf-6</i>	FKBP-typ Peptidyl-Prolyl cis- trans Isomerase				
45	B0403.4 ^e <i>tag-320</i>	Thioredoxin/Proteindisulfid- Isomerase	35	9	74	27
		Energie-/ Redoxstoffwechsel				
11	Y37E3.17	Dimethylglycin- Dehydrogenase	63	18	98	21
17	Y45G12B.1 <i>nuo-5</i>	NADH Ubiquinon- Oxidoreduktase	73	20	128	39
23	C53D5.5	Gamma- Glutamyltransferase	71	11	72	18

Nr	Genname	Funktion/ Homologie	NZ	Z	Mowse Score	S (%)
29	H28O16.1	F0F1-typ ATP-Synthase Untereinheit	79	75	107	41
35	H28O16.1d	F0F1-typ ATPase Untereinheit	75	19	115	41
41	C46F11.2	Mitochondriale Glutathion-Reduktase	55	11	80	27
44	T10B10.2	Ubiquinol-Cytochrom-C-Reduktase Untereinheit QCR2	86	13	71	34
47	VW06B3R.1b	Ubiquinol-Cytochrom-C-Reduktase Untereinheit QCR2	33	10	100	36
69	F23C8.5 ^{d, e}	Elektronentransfer-Flavoprotein, Beta Untereinheit	42	17	173	72
		Proteine mit unbekanntem Funktionen				
1	F44E2.2		42	15	72	9
34	F44B9.2 ^e		66	11	64	20
53	Y47H9C.11 ^e		40	8	59	26
59	C37C3.8 <i>tag-253</i>	Dioxygenase				
64	Y73B6BL.16 ^e		13	4	72	17
65	T13C2.4		9	3	61	16

S: Sequenzabdeckung, Z: zugeordnete Peptidmassen, NZ: nicht zugeordnete Peptidmassen.

Tabelle 18:

Zugeordnete und nicht zugeordnete Peptide der identifizierten O-GlcNAc-modifizierten Proteine der Entwicklungsstadien von *C. elegans*.

Nr	Genname	Funktion/ Homologie	NZ	Z	Mowse Score	S (%)
		Strukturproteine				
1	R31.1 <i>sma-1</i>	Beta-H spektrin	29	22	65	7
2	F52B10.1 <i>nmy-1</i>	Nicht-Muskel Myosin	73	22	62	11
3	K07H8.6 <i>vit-6</i>	Vitellogenin 6	55	31	167	20
4	F07A5.7	Paramyosin Ortholog	66	20	59	23

Nr	Genname	Funktion/ Homologie	NZ	Z	Mowse Score	S (%)
	<i>unc-15</i>					
5	M6.1 <i>ifc-2</i>	Intermediäres Filament-C-Protein 2	80	9	59	13
6	C04F6.4 <i>unc-78</i>	Aktin-interagierende Protein Homolog	75	24	159	34
7	T04C9.6 <i>frm-2</i>	FERM-Domänen-Protein EHM2	81	7	72	13
8	DY3.2 <i>lmn-1</i>	Nukleäres Lamin 1	22	17	194	44
9	F08B6.4 <i>unc-87</i>	Aktin-bündelndes Protein	29	21	171	34
10	C14C6.5	Sekretierendes Oberflächenprotein	91	7	63	42
		Stoffwechsel				
11	F27D9.5	Propionyl-CoA-Carboxylase Untereinheit Homolog	59	15	80	25
12	R11A5.4	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	76	19	104	37
13	F02A9.4	Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase 2	46	6	60	11
14	T10H4.4	Phytanoyl-CoA Hydroxylase assoziierendes Protein	25	6	63	13
15	F47G6.2	Langkettige Fettsäure-Acyl-CoA-Ligase	68	8	59	23
16	ZK829.4	Glutamatdehydrogenase	30	25	226	44
17	F57B10.3	Cofactor-unabhängige Phosphoglyceratmutase	81	18	104	42
18	F13D12.4 <i>alh-8</i>	Methylmalonat-Semialdehyd-Dehydrogenase	37	6	59	24
19	F01F1.6 <i>alh-9</i>	Aldehyddehydrogenase	24	12	102	20
20	F54D8.3 <i>alh-1</i>	Aldehyddehydrogenase 2	32	13	91	31
21	R06C7.3 <i>dhp-1</i>	Dihydropyrimidinase	36	5	58	10
22	LLC1.3	Dihydroliponamid-Dehydrogenase	27	18	145	43
23	C44B7.10	Acetyl-CoA Hydrolase	49	26	193	71
24	T21B10.2 <i>enol-1</i>	2-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	88	11	71	36
25	C44C1.2	Glycosylhydrolase Familie 18 Mitglied	51	6	65	15
26	T05D4.1	Fruktose-bisphosphat-Aldolase	37	20	195	62

Nr	Genname	Funktion/ Homologie	NZ	Z	Mowse Score	S (%)
27	<i>gpd-2</i>	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	23	11	123	36
28	H14A12.2 <i>fum-1</i>	Fumarase	44	26	216	46
29	B0272.3	3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase	16	10	114	32
30	F40F4.2 <i>lbp-2</i>	Fettsäure-bindendes Protein	33	4	61	24
		Proteinsynthese / Translation				
31	F25H5.4 <i>eft-2</i>	Translation Elongationsfaktor 2	71	13	59	14
32	ZC518.3 <i>ccr-4</i>	Glukose-repressible Alkohol-Dehydrogenase transkriptionaler Effektor	75	11	71	20
33	W09G3.7	Regulator der Chromosomen Kondensation	71	5	68	17
34	C18A3.5	Apoptose-fördernde RNA-bindendes protein TIA-1/TIAR (RRM Superfamilie)	16	6	67	22
		Signaltransduktion				
35	B0545.1 <i>tpa-1</i>	Serin/Threonin Proteinkinase	17	9	66	14
36	W08E3.3 <i>tag-210</i>	GTP-bindendes Protein	36	17	156	44
37	K04D7.1 <i>rack-1</i>	Rezeptor der aktivierten C Kinase	52	11	85	34
38	ZK892.1 <i>lec-3</i>	Galektin, Galaktose-bindendes Lektin	73	15	124	54
39	W09H1.6 <i>lec-1</i>	Galektin, Galaktose-bindendes Lektin	86	15	106	57
40	F45D11.9	Mechanosensitiver Ionenkanal Familienprotein	88	11	72	49
41	F52H3.7 <i>lec-2</i>	Galektin, Galaktose-bindendes Lektin	16	6	78	22
42	C25B8.4	C-typ Lektin	65	12	81	30
		Proteinstoffwechsel				
43	C32F10.8	Alanin-Aminotransferase	32	15	101	31
44	F56D2.1	Mitochondriale Protease	54	8	67	31
45	K10C2.4	Fumarylacetoacetat-Hydrolase	88	11	58	23
46	R08E5.2	Cystathionin- β -Synthase	36	8	71	36
47	C36B1.4 <i>pas-4</i>	Proteasom α -Untereinheit	25	15	156	66

Nr	Genname	Funktion/ Homologie	NZ	Z	Mowse Score	S (%)
48	F25H2.5	Nukleosiddiphosphatkinase	18	7	76	45
		Energie-/ Redoxstoffwechsel				
49	Y37E3.17	Dimethylglycinderhydrogenase Vorläufer	49	21	100	22
50	C53D5.5	Gamma-Glutamyltransferase	42	7	63	10
51	F46H5.3	Arginin/Creatin-Kinase	70	19	114	39
52	R07E5.2 <i>prdx-3</i>	Alkyl-Hydroperoxidreduktase	43	8	70	33
53	F59C6.5	NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase PDSW Untereinheit	65	13	74	35
		Chaperone				
54	H06O01.1 <i>pdi-3</i>	Proteindisulfidisomerase	34	8	70	19
55	Y37A1B.5	Selen-bindendes Protein	90	9	58	27
56	K08H10.2	Anhydrobiosisprotein	88	11	64	19
57	C50F2.6 <i>fkf-5</i>	FKBP-typ-Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase	15	6	60	18
58	C09B8.6 <i>hsp -25</i>	Hitzeschockprotein 25	18	8	70	42
59	C12C8.1 <i>hsp-70</i>	Hitzeschockprotein 70 (Fragment)	50	16	101	25
		Unbekannt				
60	W03B1.2		31	4	58	5
61	T22A3.5 <i>pash-1</i>		69	16	60	14
62	C56A3.8		91	9	58	23
63	Y27F2A.6		36	8	60	17
64	Y26D4A.5		66	6	61	41

S: Sequenzabdeckung, Z: zugeordnete Peptidmassen, NZ: nicht zugeordnete Peptidmassen

Zu guter Letzt möchte ich mich bei lieben Menschen in meinem Umfeld für ihre große Unterstützung bedanken, ohne die ich meine Dissertation nicht hätte verwirklichen können:

Meinem Doktorvater PD Dr. Günter Lochnit, der mir ein tolles Thema für meine Doktorarbeit bereitstellte, mich ausgezeichnet betreute, stets Diskussionsbereitschaft zeigte und immer parate Lösungen zu meinen unzähligen Fragen hatte.

Prof. Dr. Rudolf Geyer, der mir den Weg für meine Doktorarbeit ebnete, für seine Inspiration und große Hilfe und natürlich die Möglichkeit, in seinem Team diese Dissertation durchführen zu dürfen.

Prof. Dr. Katja Becker für die Vertretung des Fachbereiches 09.

Der Arbeitsgruppe Geyer für eine tolle Arbeitsatmosphäre im Labor, ihr Fachwissen und jede Menge Spaß.

Der Proteinanalytik für die Bereitstellung der Gerätschaften.

PD Dr. Roger Dennis für seine große Hilfe bei meinen englischen Texten und den Feinheiten der englischen Aussprache.

Dem „Gel- und Blot-Gott“ Michael Ahrend für sein großes Engagement bei der isoelektrischen Fokussierung.

Christina, Sebastian, Tobias, Kai, Sandra und Martin, die mir die Stunden im Labor mit Kaffee, Mut und Spaß verkürzten. Und mir hilfreichen Input für meine Forschung und Doktorarbeit gaben.

Meiner Familie für die tolle Unterstützung während meiner gesamten Ausbildungszeit und dass sie immer an mich geglaubt haben, meinen Weg zu gehen und meine Ziele zu erreichen.
„Würmer, statt Ameisen und ein paar Seiten mehr...!“

und Micha fürs Dasein!

Vielen Dank!