

---

Das Glykosylierungsmuster  
von *Caenorhabditis elegans* Embryonen  
und ausgewählten Mutanten

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von Martin Schmidt  
aus Wiesbaden

Giessen, 21.10.2014





Aus dem Biochemischen Institut am Fachbereich Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Giessen  
Gf. Direktor Professor Dr. Lienhard Schmitz

Betreuer: Professor Dr. Rudolf Geyer

Dekan: Professor Dr. Trinad Chakraborty

Gutachter: Professor Dr. Geyer  
Gutachter: Professor Dr. Menke

Tag der Disputation: 21.10.2014



---

*Meinen Eltern  
Cornelia und Wolfgang*



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Glykosylierungsdefekte als Krankheitsursache .....	1
1.2	<i>Caenorhabditis elegans</i> .....	3
1.2.1	<i>C. elegans</i> als Modellorganismus .....	3
1.2.2	Morphologie und Lebenszyklus von <i>C. elegans</i> .....	5
1.3	Struktur und Biosynthese von N-Glykanen .....	9
1.4	Das N-Glykom von <i>C. elegans</i> .....	13
1.5	Problemstellung .....	15
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1	Chemikalien .....	16
2.2	Biologische Materialien .....	16
2.2.1	Isolation und Reinigung der Würmer nach Kultivierung auf Agar-Platten .....	16
2.2.2	Isolation und Reinigung der Embryonen nach Kultivierung in Flüssigmedium .....	18
2.3	Proteinbestimmung .....	19
2.3.1	Proteinbestimmung mittels Bio-Rad Protein-Assay Kit .....	19
2.3.2	Proteinbestimmung mittels BCA Protein-Assay Kit .....	19
2.4	Aufarbeitung der <i>C. elegans</i> Proben .....	20
2.4.1	Proteinfällung .....	20
2.4.2	Denaturierung der Proteine und tryptischer Verdau .....	20
2.4.3	Freisetzung der N-glykosidisch gebundenen Glykane .....	21
2.4.3.1	Enzymatische Freisetzung der N-Glykane .....	22
2.4.3.2	Chemische Freisetzung durch Hydrazinolyse .....	22
2.4.4	Aufreinigung der enzymatisch freigesetzten Glykane .....	23
2.4.4.1	Aufreinigung über C18-Kartuschen .....	23
2.4.4.2	Aufreinigung über PGC-Kartuschen .....	24
2.4.4.3	Aufreinigung über Zip-Tip® (C18-Material) .....	24
2.5	Strukturaufklärung durch enzymatische und chemische Umsetzung .....	25
2.5.1	Abspaltung von Fucose und Phosphorylcholin-Resten mit Flusssäure .	25
2.5.2	Abbau von Hexose-Oligomeren mit $\alpha$ -Glucosidase .....	25
2.6	Massenspektrometrische Analyse der N-Glykane .....	25
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
3.1	Optimierung der Probenaufarbeitung .....	27
3.2	Evaluation von Methoden zur Freisetzung der Glykane .....	30
3.3	Vergleich der N-Glykane von <i>C. elegans</i> Würmern und Embryonen des Wildtyps .....	31
3.3	Vergleich der N-Glykane von <i>C. elegans</i> Würmern und Embryonen des Wildtyps .....	32
3.4	Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die N-Glykanprofile von <i>C. elegans</i> Embryonen .....	34
3.5	<i>C. elegans</i> Mutanten .....	36

---

3.5.1	<i>C. elegans</i> Mutante <i>glp-1</i> .....	36
3.5.2	<i>C. elegans</i> Mutante <i>lit-1</i> .....	38
3.5.3	<i>C. elegans</i> Mutanten <i>t1099</i> und <i>cib-1</i> .....	39
3.5.4	<i>C. elegans</i> Mutante <i>sud-1</i> .....	41
3.5.5	<i>C. elegans</i> Mutante <i>t3091</i> .....	43
3.6	Semiquantitative Auswertung der erhaltenen N-Glykanprofile .....	44
3.7	Strukturelle Verifizierung ausgewählter N-Glykane .....	46
3.7.1	MALDI-TOF-MS/MS Analysen .....	46
3.7.2	Behandlung der Glykane mit Flussäure .....	48
3.7.3	Verdau von Glucose-Oligomeren mit $\alpha$ -Glucosidase .....	50
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>56</b>
4.1	Methodische Aspekte .....	56
4.2	N-Glykanprofil von <i>C. elegans</i> Wildtyp im Vergleich zu Embryonen bei Verwendung verschiedener Kultivierungsbedingungen .....	57
4.3	Vergleich der N-Glykanprofile der Mutanten .....	61
4.4	Strukturen der Glykane .....	64
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>68</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungs- und Symbolverzeichnis</b> .....	<b>69</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>71</b>
<b>9.</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>73</b>
<b>10.</b>	<b>Publikationsverzeichnis</b> .....	<b>79</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b> .....	<b>81</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Glykosylierungsdefekte als Krankheitsursache

Kohlenhydrate spielen in unserer Umwelt und insbesondere als Krankheitsverursacher eine größere Rolle als mancher vermutet. Natürlich kennt man Zucker als eine Ursache von Karies und auch Diabetes mellitus wird oft als Zuckerkrankheit bezeichnet, obwohl die Namensgebung von seinem Entdecker Thomas Willis 1675 nur vom „honigsüßen Durchfluss“ herrührt. Zuckerstrukturen sind aber in der belebten Natur auch als Bausteine der Zellen essentiell. Neben den Proteinen, den Lipiden und den Nukleinsäuren bilden sie die vierte große Gruppe der Zellbestandteile. Dabei erfüllen sie nicht nur Funktionen als Nahrung oder Gerüststrukturen, sondern können auch als komplexe Mehrfachzucker an Lipide oder Proteine gebunden in der Zellmembran vorkommen und hier an Zell/Zell-Interaktionen beteiligt sein. Viren, Bakterien oder Parasiten präsentieren bestimmte Glykane nach außen und benötigen weiterhin spezifische Kohlenhydratstrukturen auf den Zellen ihres Wirtes um infektiös zu sein (Gagneux und Varki 1999). Die Glykanketten der Glykoproteine sind dabei vielfach spezies-, gewebe-, zelltyp-, entwicklungs- und/oder proteinspezifisch. Daher wird ihnen auch eine große Rolle bei der Entwicklung von Lebewesen und Erkrankungen zugeschrieben (Haltiwanger und Lowe 2004; Stevens und Spang 2013).

Einer der ersten Meilensteine der Glykobiologie war die Entdeckung der verschiedenen, durch Kohlenhydrat-Epitope kodierten Blutgruppen durch Landsteiner in den dreißiger Jahren des vergangenen Jahrhunderts (Landsteiner 1931). Glykane spielen daher auch im Immunsystem eine herausragende Rolle und können, IgE vermittelt, allergische Reaktionen auslösen (Fotisch und Vieths 2001; Paschinger *et al.* 2005; Hoffmann-Sommergruber *et al.* 2011).

Somit hat die Entschlüsselung der Glykane und ihrer Biosynthese in den letzten Jahrzehnten in der Medizin stark an Bedeutung gewonnen. Im Jahre 1980 wurde von Jaeken erstmals eine familiär aufgetretene geistige Retardierung mit einem Glykosylierungsdefekt in Verbindung gebracht und damit gleichzeitig der neue Krankheitstypus des *carbohydrate deficient glycoprotein syndrome* beschrieben (Jaeken *et al.* 1980). In späteren Jahren konnte gezeigt werden, dass diese Glykosylierungsdefekte angeboren sind. Sie werden seither als CDGs (*congenital*

*disorders of glycosylation*) bezeichnet. Hierbei werden Störungen im Aufbau des Oligosaccharid-Grundgerüsts als CDG-I Syndrom und Fehler im Verlauf der Prozessierung und Modifizierung der Glykanketten im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat als CDG-II Syndrom unterschieden (Denecke 2001). Derzeit sind über 20 verschiedene Defekte in der Glykosylierung mit ihren entsprechenden Genloci identifiziert, wobei die Ausprägung der Erkrankungen von schwerer psychomotorischer Retardierung über Kardiomyopathien und Anfallsleiden bis hin zu Immundefekten und weiteren hämatologischen Störungen reicht. Durch fehlerhafte oder nicht vorhandene Enzyme der Glykanprozessierung können sowohl die N-glykosidisch wie auch die O-glykosidisch gebundenen Zucker betroffen sein (Schachter 2001)(Struktureklärung siehe Kapitel 1.3). Insbesondere die Stabilität und die Funktion der Glykoproteine hängen von einer korrekten Ausbildung und Anordnung der Glykane ab, damit Prozesse wie Organentwicklung, Signaltransduktion und Zell/Zell-Interaktion unbeeinträchtigt ablaufen können.

Derzeit sind nur für zwei Typen von CDG-Syndromen Therapien bekannt. Beim CDG-Typ Ib ist die Phosphomannose-Isomerase in ihrer Funktion gestört, die aus Fructose-6-Phosphat Mannose-6-Phosphat herstellt. Dies führt zu einem Mangel an GDP-Mannose, einem wichtigen Zwischenprodukt der N-Glykanbiosynthese. Eine orale Gabe von Mannose schließt die Lücke in der Biosynthese der Glykane. Die Substituierung von Fucose kann bei Patienten mit CDG-Typ IIc den verminderten Transport von GDP-Fucose in den Golgi-Apparat durch ein höheres Substratangebot ausgleichen. Im Blut des Patienten sind diese Erkrankungen durch verschiedene Isolierungsmethoden leicht zu erkennen (Denecke 2001; Freeze und Aebi 2005).

Die Zahl der auf Glykosylierungsdefekte zurückzuführenden Erkrankungen nimmt weiter zu. Dies ist sicherlich auch darin begründet, dass die Synthese der Glykoproteine unter der Verwendung von mehr als 100 Glykosyltransferasen, Glykosidasen und Transportproteinen gesteuert wird (Körner 2012). Die für die Kodierung der jeweiligen Proteine verantwortlichen Gene machen 1-2% des menschlichen Genoms aus. Vermutlich werden durch diese Enzyme mehr als tausend verschiedene Glykanstrukturen biosynthetisiert (Ohtsubo und Marth 2006), wobei die Kohlenhydratketten in Säugetieren oft deutlich komplexer aufgebaut sind als in wirbellosen Tieren oder Einzellern. Daher bestehen durch die vielen Syntheseschritte auch viele potentielle Fehlerquellen.

In Tumorzellen wurden fehlerhafte bzw. veränderte Glykosylierungsmuster als Ursachen defekter Zellfunktionen und eingeschränkter Signaltransduktion identifiziert (Zhao *et al.* 2008). Auch Gefäßerkrankungen, Gerinnungsstörungen, Neoplasien, Tumorwachstum und die Fähigkeit von Tumoren zur Ausbildung von Metastasen sind häufig mit spezifischen Struktureigenschaften der jeweils vorhandenen N-Glykane assoziiert (Banerjee 2012).

In Versuchen mit dem Bodennematoden *Caenorhabditis elegans* konnte gezeigt werden, dass Glykosylierungsdefekte nicht nur Erkrankungen auslösen, sondern auch zu Resistenzen bezüglich bakterieller Infektionen oder gegenüber von Toxinen führen können (Cipollo *et al.* 2004b; Barrows *et al.* 2007a; Barrows *et al.* 2007b).

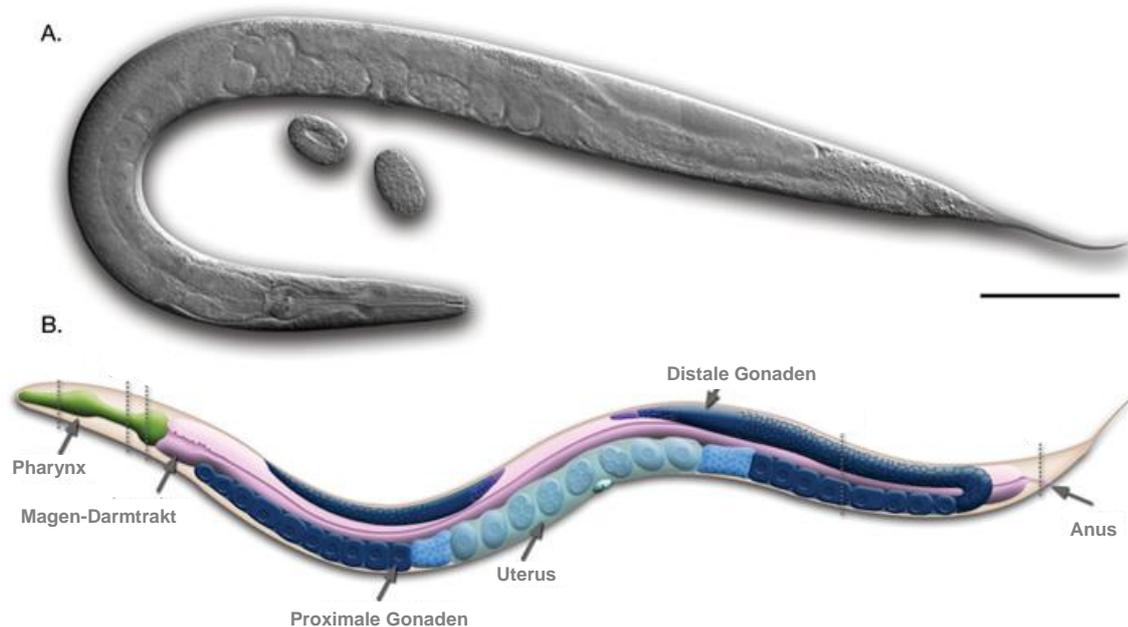
## 1.2 *Caenorhabditis elegans*

### 1.2.1 *C. elegans* als Modellorganismus

Bereits im Jahre 1965 erkannte der Genetiker Sydney Brenner das Potential des Nematoden *C. elegans* als genetischem Modellorganismus und definierte später den N2-Wildtyp als Referenz (Brenner 1974). Dieser N2-Wildtyp wird heute als eine multiple Mutante bezeichnet, da Untersuchungen zeigten, dass in der natürlichen Umgebung aufgefundene *C. elegans* Würmer in vielerlei Hinsicht andere Eigenschaften aufweisen (Kimura *et al.* 1997). Brenner begriff aber schon damals die Vorzüge dieses Nematoden als Modellorganismus: Die schnelle Reproduktionszeit von nur drei Tagen, verbunden mit einer hohen Reproduktionsrate von 300 Eiern pro Individuum. Weiterhin ist die Kultivierung von *C. elegans* unter Laborbedingungen einfach und kostengünstig. Er kann mit Bakterien ernährt werden und bietet die Möglichkeit, viele Millionen Exemplare des nur 1,3 mm großen Wurms auf engstem Raum zu kultivieren. Bei besonderen Fragestellungen, wie zum Beispiel Wachstumsprozessen der Axone, wird durch Fluoreszenzmarkierung einzelner Moleküle im lebenden Wurm ein weiterer Vorteil von *C. elegans* deutlich, die Transparenz seiner Kutikula. Darüber hinaus lässt sich der Organismus in flüssigem Stickstoff mindestens 25 Jahre lebensfähig lagern. Er steht damit über einen längeren Zeitraum hinweg in genetisch unverändertem Zustand fortlaufenden Studien zur Verfügung (Blaxter 2011).

Während Brenner damals die Neurobiologie und die Entwicklung des Fadenwurms besonders interessierte, ist *C. elegans* inzwischen generell zu einem der bedeutendsten Modelorganismen unserer Zeit geworden. Dabei hat sich das Forschungsinteresse mit den Jahren auch auf zahlreiche andere Gebiete der Zellbiologie ausgeweitet, die Mechanismen der Apoptose, der Signaltransduktion, des Zellzyklus, der Genregulation und des Stoffwechsels sowie Alterungsprozesse und Geschlechtsdifferenzierung bei diesem Wurm einschließen (Riddle *et al.* 1997). Im Jahr 1998 konnte sein komplettes Genom mit 97 Millionen Basenpaaren und 19.000 Genen entschlüsselt werden (Consortium 1998). In Anbetracht der Tatsache, dass in *C. elegans* circa 50-60% der krankheitsverursachenden Gendefekte mit denen des Menschen übereinstimmen (Ahringer 1997; Rubin *et al.* 2000; Friedel 2002), ist es nicht verwunderlich, dass sich auch Teile der medizinischen Forschung zur Ätiologie und Pathologie einzelner Erkrankungen auf den Fadenwurm stützen. Viele herausragende Entdeckungen in biologisch und medizinisch relevantem Kontext wurden zuerst bei *C. elegans* beschrieben. Hierzu gehören häufig untersuchte Erkrankungen wie, zum Beispiel, die Depression, die Alzheimer-Erkrankung, Morbus Parkinson, Muskeldystrophien, Diabetes mellitus Typ 2 und einige Tumorerkrankungen (Kaletta und Hengartner 2006). Als ein Grund für die besondere Eignung dieses Wurms im Zusammenhang mit Studien über neuronale und neurodegenerative Erkrankungen ist die vergleichsweise hohe Anzahl von Nervenzellen in *C. elegans* zu nennen, die mit 302 Zellen ungefähr ein Drittel aller Zellen des Wurmes repräsentieren.

Als weitere Bestätigung für die Bedeutung von *C. elegans* als Modellorganismus kann man die Tatsache werten, dass bereits dreimal Forschungsarbeiten an dem Fadenwurm mit dem Nobelpreis geehrt wurden, wobei zweimal der Nobelpreis für Medizin/Physiologie, einmal an Brenner, Sulston und Horvitz (2002) und einmal an Fire und Mello (2006), verliehen wurde. Die Forschergemeinschaft Chalifie, Shimomura und Tsien wurde darüber hinaus 2008 in der Kategorie Chemie ausgezeichnet. Seit dem Jahre 2000 werden sogar Verhaltens- und Entwicklungsstudien an *C. elegans* im Weltraum betrieben. So wählte die amerikanische Weltraumbehörde NASA unter anderem diesen Helminthen zur Erforschung diesbezüglicher Einflüsse der Schwerelosigkeit auf Organismen aus (Nasa 2012).



**Abbildung 1.1:** Anatomie von *C. elegans*: (A) Mikroskopische Abbildung eines adulten Hermaphroditen, linke laterale Seite, Balken entspricht 0,1 mm; (B) Schemazeichnung der anatomischen Strukturen eines Hermaphroditen, linke laterale Seite; Quelle: [www.wormatlas.org](http://www.wormatlas.org)

## 1.2.2 Morphologie und Lebenszyklus von *C. elegans*

Der zur Ordnung der Rhabditiden gehörende zylindrische Fadenwurm ist im Durchschnitt im adulten Stadium 1,3 mm lang und kommt in der Wildbahn in gemäßigten Klimazonen im Boden und pilzbesiedelten Komposthaufen vor (Abbildung 1.1). *C. elegans* liegt in der Mehrzahl der Fälle als Zwitter vor und besteht im adulten Stadium aus konstant 959 Zellen (Riddle *et al.* 1997; Consortium 1998). Er kann durch Selbstbefruchtung ungefähr 300 Nachkommen zeugen. Neben der hermaphroditen Form mit dem Geschlechtschromosomensatz XX können auch Männchen (XO) mit 1031 Zellen ausgebildet werden, welche die Hermaphroditen ebenfalls befruchten können. Der Nematode entwickelt sich in 14 Stunden von der befruchteten Oozyte zur Larve und in 36 Stunden über vier Larvenstadien hinweg zum adulten Wurm. Der Hermaphrodit bildet dabei in dem vierten Larvenstadium (L4) die

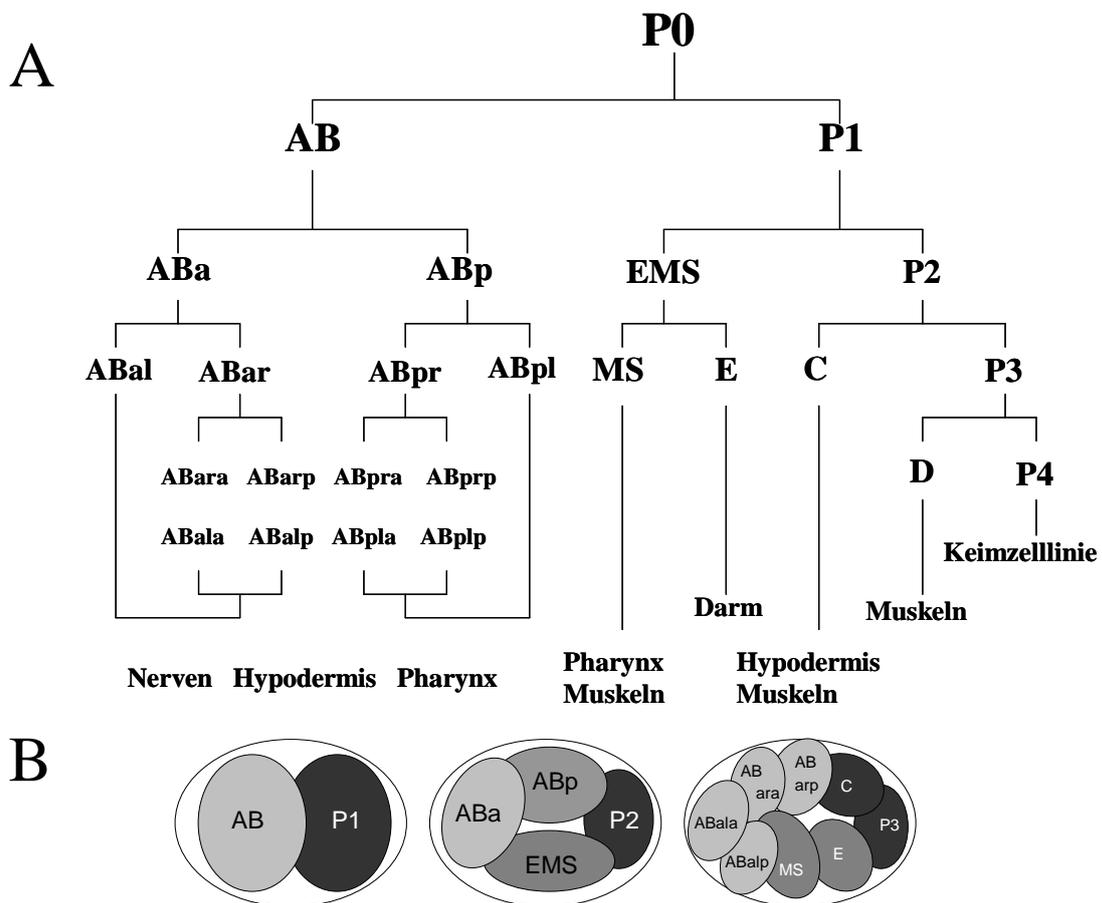
Spermien und erst im adulten Stadium Oozyten, weshalb der adulte Wurm einem Weibchen mit gespeicherten Spermien gleicht. Daher ist der Hermaphrodit in seiner Zahl an Nachkommen durch das vorhandene Sperma auf ca. 300 limitiert. Paart er sich mit anderen Männchen und speichert deren Spermien, so sind über 1000 Reproduktionen pro Wurm möglich (Friedel 2002). Diese Art der Fortpflanzung wird in Zeiten mit hohem Nahrungsangebot bevorzugt.

Nach der Befruchtung teilt sich die Oozyte (P0) durch eine typische Furchungsteilung nach einem invarianten Schema bis hin zum ersten Larvenstadium (L1) in 558 Zellen. Während der ersten Zellteilung entstehen die stammzellartige P1 Zelle und die so genannte AB Zelle, die anteriore Somazelle (Blaste). Die Keimbahnzelle P1 setzt ihre inäquale Teilung fort, so dass insgesamt fünf somatische Gründerzellen entstehen, die mit AB, MS, C, D und E bezeichnet werden. Nach ihrer vierten Teilung sind alle Nachkommen der P4 Zelle Keimbahnzellen. Aus der MS-Zelle werden Pharynx und Muskeln, die C-Zelle und D-Zelle bilden Muskeln und teilweise Hypodermis aus und die E-Zelle entwickelt sich zum Darmtrakt des Wurmes. Die anteriore Blaste, die AB-Zelle, wird in den folgenden Teilungen nur durch einen Code aus a (anterior), p (posterior), r und l (rechts und links) erweitert bezeichnet (Abbildung 1.2). Die Nomenklatur der nach Teilung entstandenen Zellen war zunächst nur beschreibend für die Anordnung im Embryo.

Die Entwicklung der 4D-Mikroskopie, wobei als vierte Dimension die Zeit fungiert, stellte daher einen Meilenstein auf dem Weg zur Entschlüsselung der Embryogenese im Verlauf der Entstehung eines komplexen Organismus dar. Mittels dieser Technik, die am Beispiel des Modellorganismus *C. elegans* etabliert wurde, wurde nicht nur der Beweis für eine definierte anterior - posteriore Achsenbildung des Organismus, sondern auch der Beleg für die Rechts - Links Orientierung der Zellen im Embryo erbracht. So wurde gezeigt, dass sich im entstehenden Organismus bereits im Vierzell-Stadium eine Achsenausrichtung bezüglich vorne und hinten ausprägt, die dann im Achtzell-Stadium um die links - rechts Achse erweitert wird (Sulston *et al.* 1983; Schnabel 1995; Hutter und Schnabel 1995a; Hutter und Schnabel 1995b; Schierenberg 1997). Daraus ergaben sich auch neue Erkenntnisse bezüglich der Zelllinien von *C. elegans*.

Es zeigte sich, dass die Embryogenese des Wurms vollständig invariant verläuft, so dass zu jedem Zeitpunkt der Organismusentwicklung jede Zelle und deren Nachkommen eindeutig einem späteren Schicksal zugeordnet werden kann. Dies kann die Ausdifferenzierung einer bestimmten Organzelle sein oder eine regelhafte Apoptose

von einzelnen Zellen in bestimmten Generationen beinhalten. So konnte ein Zelllinienstammbaum angelegt werden, der die Embryogenese von *C. elegans* ohne Abweichungen darstellt. Mehr noch konnte gezeigt werden, dass bestimmte Zellen während der Embryogenese auf immer gleichem Weg durch den initialen Zellhaufen wandern, um am Zielort bestimmte Organe auszubilden (Schnabel *et al.* 1997; Schnabel *et al.* 2006). Es stellte sich nun jedoch die Frage nach den auslösenden Signalen und nach der Fähigkeit der Zellen zur Orientierung in ihrer Umwelt. Woher erkennen die Zellen, an welchem Ort sie sich gerade im Embryo befinden, und welches Signal befiehlt ihnen ein bestimmtes Zellschicksal auszubilden? Welche Wegweiser zeigen den wandernden Zellen ihren immer gleichen Weg durch den Embryo?



**Abbildung 1.2:** (A) Stammbaum der frühen Differenzierung der Zelllinien von *C. elegans* Wildtyp mit dem Differenzierungspotential der Blastomeren, Quelle: (Schnabel 1995); (B) Ausrichtung der Blastomeren im Embryo, zur besseren Übersichtlichkeit sind die Abkömmlinge von ABp nicht dargestellt; AB, anteriore Blaste; P, Keimzelllinie; p, posterior; a, anterior; l, links; r, rechts, Quelle: (Schierenberg 1997)

Nach der Embryogenese schlüpft die so genannte L1 Larve mit 558 Zellen, welche durch Häutung in die nächste der insgesamt vier Larvenstadien bzw. Juvenilstadien übergeht (Abbildung 1.3). Die Entwicklung der Larve zum adulten Wurm dauert 36 Stunden und kann durch die Ausbildung einer Vulva abgegrenzt werden. Die Geschlechtsreife erreicht der Nematode damit nach einer Gesamtentwicklungszeit von 50 Stunden.

In Zeiten mit knappem Nahrungsangebot ist *C. elegans* in der Lage, während des L2 Stadiums in einen Dauerlarvenzustand überzugehen und so seine reguläre Lebensspanne von bis zu 18 Tagen auf mehrere Monate auszudehnen. Diese Eigenschaft machte *C. elegans* interessant für Studien zu Alterungsprozessen von Zellen und Organismen (Kimura *et al.* 1997). Der Übergang zum Dauerlarvenstadium wird durch das Dauerpheromon ausgelöst und bewirkt die Ausbildung einer dünneren Larve mit weniger Stoffwechsel und kleinerer Mundöffnung. Die Dauerlarve geht bei ausreichendem Nahrungsangebot in das L4 Stadium über. Die Außenhülle von *C. elegans* ist ein transparenter Hautmuskelschlauch, der aus der Kutikula, der Hypodermis und einer Längsmuskelschicht besteht. Darüber hinaus verfügt der

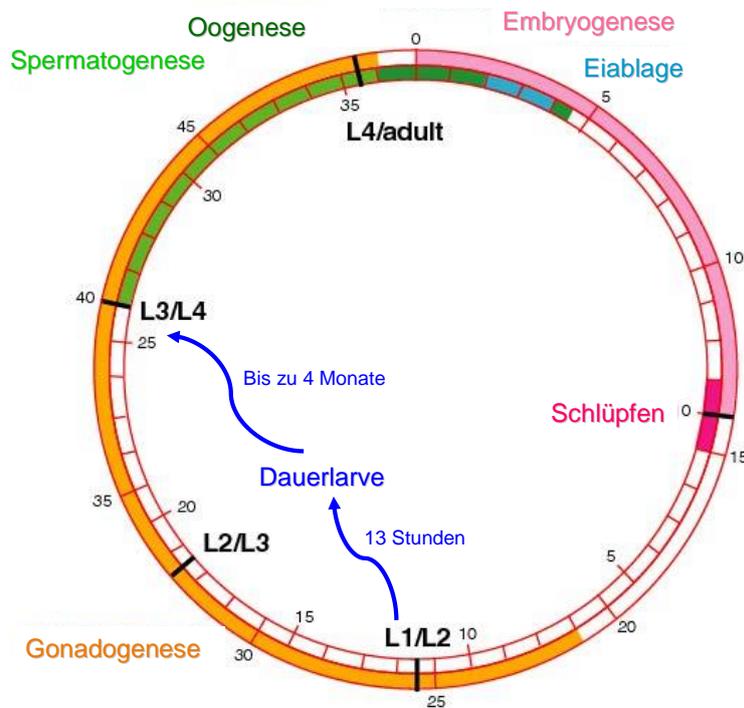


Abbildung 1.3: Lebenszyklus von *C. elegans* bei 25°C; der äußere Ring entspricht dem Lebensalter in Stunden nach der Befruchtung der Eizelle, der innere Ring dem Lebensalter nach Schlüpfen der Larve in Stunden. Modifiziert nach [www.nematodes.org](http://www.nematodes.org).

Nematode über eine Hautatmung. Zentral geht vom vorderen Teil her der Pharynx in das lange Darmrohr über und endet im hinteren Teil des Wurmes lateral in dem Anus (Abbildung 1.1). Das Nervensystem besteht aus 302 Zellen, konzentriert sich zu einem großen Teil anulär um den Pharynx herum und zieht von dort aus über einen ventralen Markstrang in den restlichen Wurm. So genannte Sensillen stellen die Sinnesorgane dar und fungieren als Mechano- und Chemorezeptoren. Relativ prominent ist das Geschlechtsorgan über  $\frac{3}{4}$  seiner Länge mit proximal und distal angelegten Ovarien und einem mittigen Uterus angelegt, welcher die befruchteten Eizellen bis zum Ende der Gastrulation beherbergt. Die Männchen verfügen über Spikulae, womit sie ihre Spermien aus der Kloake auf die Hermaphroditen übertragen können.

### 1.3 Struktur und Biosynthese von N-Glykanen

Glykane sind neben Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren die Hauptbestandteile der Zellen. Zusätzlich sind viele Proteine glykosyliert und kommen sowohl innerhalb als auch außerhalb der Zelle in Form von Enzymen, Antikörpern, Hormonen, Zytokinen und, in die Zellmembran eingebettet, auch als Rezeptoren oder Adhensionsmoleküle vor (Sharon 1997). Glykoproteine spielen damit als Oberflächenmoleküle der Zellmembran eine wichtige Rolle bei Zell/Zell-Interaktionen.

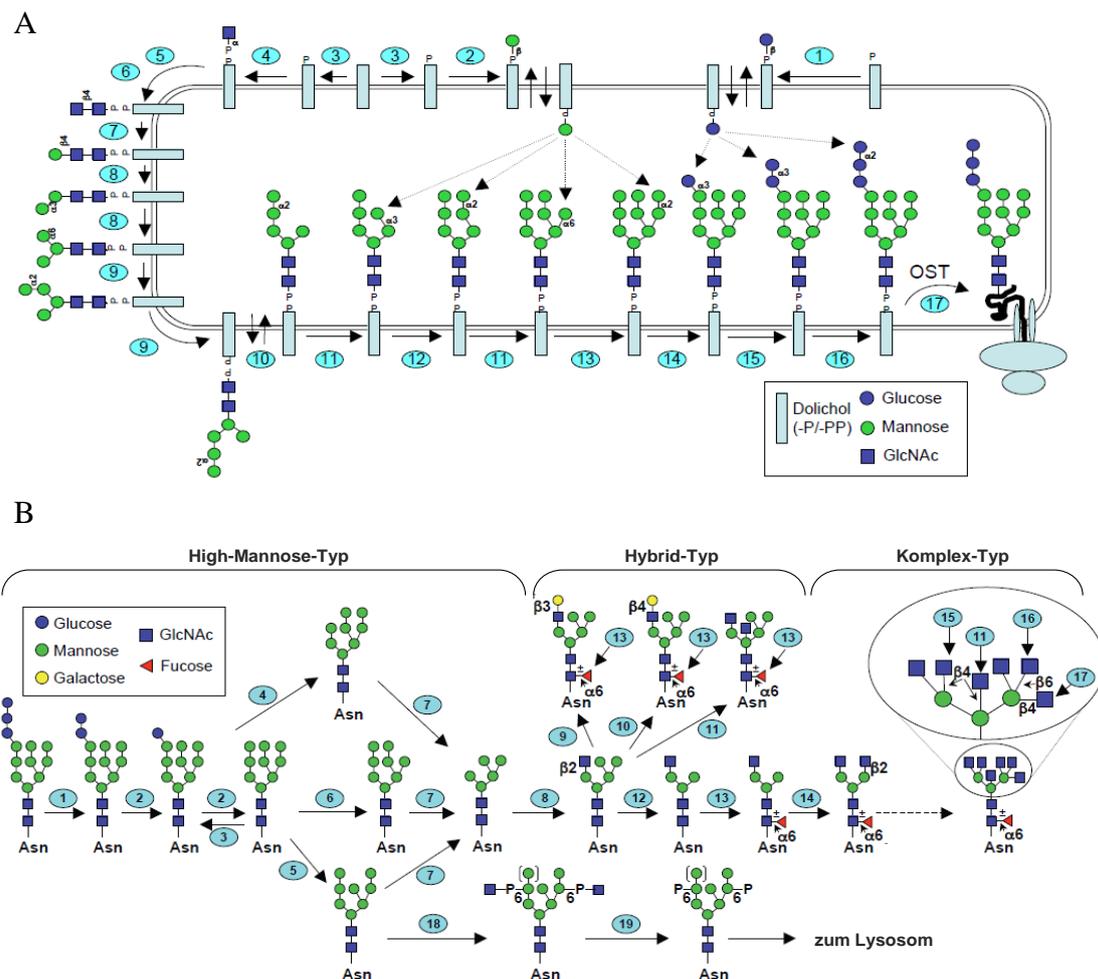
Die Glykanketten von Glykoproteinen können generell in zwei unterschiedliche Typen unterteilt werden: N-glykosidisch verknüpfte Oligosaccharide (N-Glykane) und O-glykosidisch gebundene Kohlenhydratketten (O-Glykane). O-Glykane sind in der Regel  $\alpha$ -glykosidisch über die Hydroxylgruppe eines Serin- oder Threoninrestes an das Peptid gebunden. Der verknüpfende Monosaccharid-Baustein ist hier *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc). Auf diesen Typ der Glykosylierung wird im Folgenden jedoch nicht näher eingegangen. Die in dieser Arbeit untersuchten N-Glykane sind über ein *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) mit dem Amidstickstoff der Aminosäure Asparagin (Asn) des Proteins  $\beta$ -glykosidisch verbunden.

Die Grund- oder Kernstruktur von N-Glykanen besteht aus einem Pentasaccharid aus zwei *N*-Acetylglucosaminen und drei Mannosen (Trimannosylcore, Core-Struktur), wobei die erste Mannose (Man) in einer ( $\beta$ 1-4)-Verknüpfung an das distale GlcNAc gebunden ist. Die beiden weiteren Mannosen sind in  $\alpha$ -glykosidischer Bindung mit dem



Entsprechend ihrer Zusammensetzung werden drei Glykantypen unterschieden: Oligomannosidischer (auch *high-mannose*) Typ, hybrider Typ und komplexer Typ (Lowe und Marth 2003). Oligomannosidische N-Glykane enthalten neben den drei Mannosen der Kernstruktur noch bis zu sechs weitere Man-Einheiten und während ihrer Biosynthese zusätzlich noch bis zu drei Glc-Reste. Beim komplexen Typ können sich ausgehend von den  $\alpha$ -Mannosen der Kernstruktur bis zu fünf Antennen ausbilden, bei denen zunächst jeweils GlcNAc-Reste über  $\beta$ -glykosidische Verknüpfung mit dem zweiten, vierten und/oder sechsten Kohlenstoffatom der  $\alpha$ -Mannosen verbunden sind. Darüber hinaus kann GlcNAc auch am vierten C-Atom der  $\beta$ -Mannose (*bisecting* GlcNAc) vorliegen. Mit Ausnahme von *bisecting* GlcNAc können alle weiteren Antennen durch Anheftung  $\beta$ -glykosidisch verknüpfter Gal- und/oder GalNAc-Reste sowie  $\alpha$ -glykosidisch gebundener Fuc- und Neu5Ac-Einheiten verlängert werden (Abbildung 1.4). Des Weiteren können Fuc- und Gal-Reste auch an den proximalen bzw. distalen GlcNAc-Rest der Kernstruktur und Xyl an den  $\beta$ -Man-Rest gebunden sein. Der hybride Typ besteht sowohl aus Man- als auch aus GlcNAc-Resten und repräsentiert eine biosynthetische Zwischenstufe auf dem Weg von der oligomannosidischen Form zum komplexen Glykantyp (Abbildung 1.4 A).

Die Biosynthese der N-Glykane beginnt im Zytosol mit der enzymatisch katalysierten Bindung eines GlcNAc-Restes an Dolichol über eine Pyrophosphatbindung (siehe Abbildung 1.5 A, Enzym 4). Nach Verknüpfung mit einem weiteren *N*-Acetylglucosamin-Rest durch eine Chitobiose- $\beta$ -*N*-Acetylglucosaminyltransferase erfolgt die Übertragung von fünf Man-Resten durch Mannosyltransferasen (Enzyme 7-9 in Abbildung 1.5 A). Dieses Grundgerüst wird in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums überführt, wobei die Glykankette weiterhin über den Dolicholrest membranständig bleibt. Der Aufbau des High-Mannose Vorläufermoleküls  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  wird hier durch Mannosyl- und Glucosyltransferasen weiter fortgesetzt. Es folgt nun die Übertragung des N-Glykans auf einen Asparaginrest des Proteins durch die Oligosaccharyltransferase, welche eine spezifische Sequenz des Proteins erkennt. Diese Konsensus-Sequenz (Asn-Xxx-Ser/Thr) besteht aus dem Triplet von Asparagin, einer beliebigen Aminosäure mit Ausnahme von Prolin, sowie einer der polaren Aminosäuren Serin (Ser) oder Threonin (Thr) (Gavel und von Heijne 1990). Für die O-glykosidische Bindung ist keine strikte Konsensus-Sequenz bekannt. Generell ist die Glykosylierung potentieller Bindungsstellen in einem Protein häufig zell-, protein-, gewebs- und entwicklungsspezifisch reguliert.



**Abbildung 1.5:** Biosynthese von N-Glykanen (A) bis zur Prozessierungsvorstufe  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  und (B) Prozessierung zum Hybrid und Komplex-Typ; Quelle: (Nairn und Moremen 2012); Asn, Asparagin; OST, Oligosaccharyltransferase; Zahlen, Nummerierung der unterschiedlichen Enzyme des Syntheseweges je Abbildung.

Anschließend werden die drei Glc-Reste und eine Mannose durch spezifische Glykosidasen abgespalten (siehe Abbildung 1.5 B). Es erfolgt der Transfer des Glykoproteins in den Golgi-Apparat zur weiteren Prozessierung, wobei im cis-Golgi und medialen Teil des Golgi-Apparats durch wiederum spezifische  $\alpha$ -Mannosidasen die Man-Reste außerhalb der Kernstruktur entfernt und durch die entsprechenden Monosaccharide zum Aufbau des gewünschten N-Glykans ersetzt werden. Nach Übertragung von GlcNAc-Resten durch eine der sechs verschiedenen GlcNAc-Transferasen (Abbildung 1.4 B und 1.5 B) erfolgt im trans-Golgi der weitere Aufbau der Antennen jeweils mit spezifischen Glykosyltransferasen bis hin zu

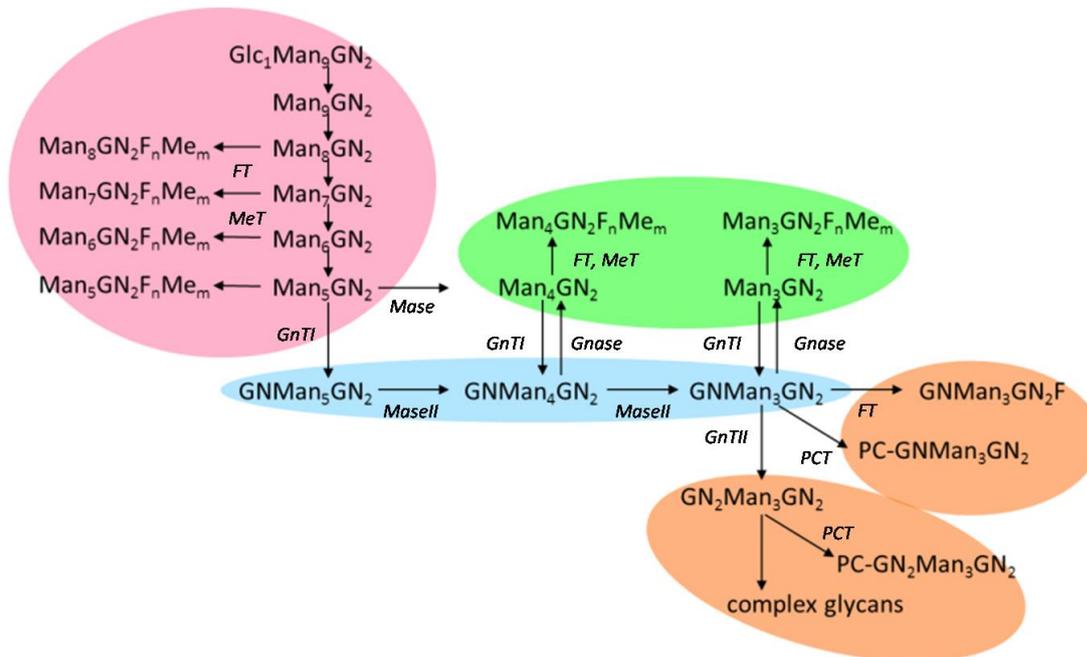
---

N-Glykanen vom komplexen Typ (Kornfeld und Kornfeld 1985; Sharon 1997; Haltiwanger und Lowe 2004; Schachter 2004).

#### 1.4 Das N-Glykom von *C. elegans*

Unter dem Begriff „N-Glykom“ versteht man die Gesamtheit an N-Glykanen in einer definierten biologischen Entität, wie zum Beispiel einer Zelle, einem Organ oder einem Organismus. Entsprechende Analysen des Gesamtprofils an N-Glykanen zeigen nicht nur die Glykosylierungskapazität der Zelle bzw. des Organismus auf, sondern erlauben auch Rückschlüsse auf die Einflussnahme pathologischer Situationen auf die N-Glykosylierung und damit auch die Rolle von N-Glykanen im Gesamtkontext. Vor diesem Hintergrund wurde insbesondere auch das N-Glykom des Modellorganismus *C. elegans* in den letzten Jahren von vielen Arbeitsgruppen untersucht (Altmann *et al.* 2001; Cipollo *et al.* 2002; Natsuka *et al.* 2002; Haslam und Dell 2003; Schachter 2004; Cipollo *et al.* 2005; Hanneman *et al.* 2006; Schachter 2007; Paschinger *et al.* 2008; Schachter 2009). Dabei zeigte sich, dass sich das N-Glykom von *C. elegans* mit mehr als 100 N-Glykanstrukturen durch eine große strukturelle Variabilität auszeichnet, wobei die Zuckerketten zum Teil denen von Vertebraten homolog sind, zum Teil aber auch charakteristische Unterschiede aufweisen (Cipollo *et al.* 2002; Natsuka *et al.* 2002; Haslam und Dell 2003; Cipollo *et al.* 2004a; Hanneman *et al.* 2006; Paschinger *et al.* 2008). Hier sind vor allem so genannte paucimannosidische ( $\text{Man}_{3-4}\text{GlcNAc}_2$ ), verkürzte komplexe ( $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ ), hoch fucosylierte, *O*-methylierte bzw. mit Phosphorylcholin (PC) substituierte Glykane zu nennen (siehe Abbildung 1.6).

Interessanterweise unterscheiden sich die N-Glykanprofile von *C. elegans* während seiner verschiedenen Entwicklungsstufen (L1-L4, Dauerlarve und erwachsener Wurm), was auf eine spezifische Rolle der Glykane bei der Wurmentwicklung hindeuten könnte (Cipollo *et al.* 2005). Die Frage, inwieweit sich auch in Embryonalstadien des Wurms charakteristische Eigenschaften des jeweils exprimierten N-Glykoms nachweisen lassen, war bis zum Zeitpunkt dieser Dissertation noch offen.



**Abbildung 1.6:** Schematischer Biosyntheseweg von N-Glykanen in *C. elegans* Wildtyp von der Prozessierungsvorstufe  $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  zu modifizierten mannosereichen Glykanen und paucimannosidischen Glykanen (rosa und grün), Glykanen vom Hybrid-Typ (blau) und Komplex-Typ (orange); Vergleiche Tabelle 3.2; (Schachter 2007; Geyer *et al.* 2012). F, Fucose; Me, *O*-Methyl; Glc, Glucose; Man, Mannose; GN, *N*-Acetylglucosamin; FT, Fucosyltransferase; GnT I und II, *N*-Acetylglucosamin-Transferase I und II; Gnase,  $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidase; Mase, GnT I unabhängige  $\alpha$ -Mannosidase; Mase II,  $\alpha$ -Mannosidase II; MeT, Methyltransferase; PCT, Phosphorylcholintransferase.

## 1.5 Problemstellung

In der vorliegenden Dissertation sollte deshalb das N-Glykom von *C. elegans* Embryonen näher charakterisiert werden.

Dabei standen folgende Fragestellungen im Vordergrund:

- Massenspektrometrische Charakterisierung der N-Glykanmuster von Embryonen.
- Abhängigkeit der N-Glykanprofile von den jeweiligen Kultivierungsbedingungen.
- Mögliche Veränderungen der N-Glykanmuster bei Embryonen von *C. elegans* Mutanten, die in unterschiedlichen Stadien der Embryonalentwicklung arretiert waren.

Auf diese Weise sollte eine Grundlage für zukünftige funktionelle Modellstudien zur potentiellen Rolle von N-Glykanen während der Embryogenese dieses Wurms geschaffen werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Chemikalien**

Die verwendeten Standard-Chemikalien wurden, soweit nicht gesondert vermerkt, in p.a.-Qualität von Fluka (Steinheim am Albuch), Riedel de Haen (Seelze), Merk (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim am Albuch) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Die Laborgase (Linde, Höllriegelskreuth und München) hatten eine Reinheit von 4.6. Das im Labor verwendete Wasser wurde durch eine Elix UV5 Anlage und anschließend mit einer Milli-Q Synthesis A10 Anlage (Millipore, Eschborn) entsalzt und gereinigt.

### **2.2 Biologische Materialien**

Die *C. elegans* Embryonen und die verwendeten Mutanten wurden von Dr. Matthias Müller (Arbeitsgruppe Prof. Dr. R. Schnabel, Technische Universität Braunschweig) angezüchtet, isoliert und anschließend für die geplanten Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Eine Embryonen-Probe der Würmer wurde auf NGM-Platten angezüchtet (s. Kapitel 2.2.1). Der Rest der *C. elegans* Würmer und Mutanten wurden in einem Flüssignährmedium kultiviert (2.2.2). Die verwendeten *mixed-stage* Würmer in verschiedenen Stadien wurden von Dr. Julia Grabitzki (Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Lochnit, Justus-Liebig-Universität Giessen), auf Agar-Platten angezüchtet und isoliert (2.2.1).

#### **2.2.1 Isolation und Reinigung der Würmer nach Kultivierung auf Agar-Platten**

Für die Kultivierung von *C. elegans* wurden Petrischalen mit einem Durchmesser von 145 mm mit einer Agarlösung ausgegossen. Diese Agarlösung bestand aus 5 g Caseinhydrolysat (Pepton 140, Merck), 5 g Hefeextrakt (Life Technologie, Eggenstein),

3 g NaCl, 20 g Agar (high gel-strength, Serva) und einem Liter Wasser. Nach 20 minütiger Autoklavierung der Agarlösung bei 120°C wurde eine Lösung aus 1,0 mL Cholesterinlösung (5,0 g Cholesterin/ L Ethanol), 0,5 mL CaCl<sub>2</sub>-Lösung (110,8 g CaCl<sub>2</sub>/L H<sub>2</sub>O), 1,0 mL MgSO<sub>4</sub>-Lösung (246,5 g MgSO<sub>4</sub>/L H<sub>2</sub>O), 25 mL Kaliumphosphat-Lösung (108,3 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 36 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/L H<sub>2</sub>O), 2,0 mL Thiabendazol (10 mg/mL Thiabendazol in Dimethylsulfoxid) und 2,0 mL 0,1%igem Methyleneblau in H<sub>2</sub>O hinzugegeben und ausreichend durchmischt. Die in die Petrischalen gegossene Agarlösung hatte eine Schichtdicke von 5 mm und verfestigte sich über Nacht bei Raumtemperatur.

Auf die Agarplatten wurden dann *Escherichia coli* (Stamm OP50) als Bakterienrasen aufgebracht. Diese befanden sich in einem Bakterienmedium, das vor Animpfung mit 50 µL *E. coli* Stammlösung ebenfalls bei 120°C über 20 min autoklaviert und anschließend abgekühlt wurde. Dieses Medium bestand aus 0,5 g Caseinhydrolysat, 0,5 g Hefeextrakt, 0,3 g NaCl und 100 mL H<sub>2</sub>O. Die Bakterien wuchsen in der Suspension über Nacht bei 37°C und konnten dann auf die Agar-Platten aufgebracht werden (800 µL Suspension). Der Bakterienrasen wuchs über Nacht im Brutschrank bei 37°C und wurde dann mit 500 µL *C. elegans* Suspension (~ 2000 Würmer) belegt. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 18°C.

Nach drei Tagen wurden die Würmer mit 15 mL M9-Puffer ab gespült, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zur Sedimentierung der Würmer auf Eis gestellt. Der M9-Puffer hatte folgende Zusammensetzung: 250 mL Phosphatpuffer, pH 6,0 (60 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 120 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), 25 g NaCl, 5 mL 1 M MgSO<sub>4</sub>, auf 5 L mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt.

Die sich durch die Kältesedimentierung abgesetzten Würmer wurden durch Saccharose-Dichte-zentrifugation von Kontaminationen bestehend aus Zelltrümmern und Bakterienresten gereinigt (Gbewonyo *et al.* 1994). Die Zentrifugation erfolgte bei 1500 × g über 7 min in 15ml M9-Puffer, welche mit 10 ml 30%er Saccharoselösung unterschichtet wurde. Die *C. elegans* setzen sich in dieser Saccharoseschicht ab, werden in dieser in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und dreimal in M9-Puffer gewaschen (Grabitzki 2006). Die Würmer standen dann zur weiteren Aufarbeitung zur Verfügung. Der Zellaufschluss erfolgte durch Einwirkung von Ultraschall mit einem Ultraschallstab im Eiswasserbad für zwei Minuten.

## **2.2.2 Isolation und Reinigung der Embryonen nach Kultivierung in Flüssigmedium**

Zunächst wurde das Futter der Würmer in Erlenmeyerkolben vorbereitet. Dazu wurden *E. coli* Bakterien (OP50) über Nacht bei 37°C in einem DYT-Medium kultiviert. Das DYT-Medium bestand aus 20 g Trypton, 10 g Hefe-Extrakt, 5 g NaCl und wurde auf 1 Liter mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Bakterien wurden 10 min bei 6.000 Umdrehungen/min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Bakteriensediment wurde dann mehrfach in M9-Puffer (2.2.1) resuspendiert, wieder abzentrifugiert und bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren.

Das Flüssigmedium wurde in einem 2 Liter Erlenmeyerkolben vorbereitet, hierzu wurden 0,5 L S Basal Medium bestehend aus 3 ml 1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22 ml 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,9 g NaCl und 475 mL H<sub>2</sub>O gegeben und autoklaviert. Anschließend wurden eine Lösung aus 0,5 mL Cholesterinlösung (5,0 g Cholesterin/ L Ethanol), 1,5 g CaCl<sub>2</sub> und 1,5 g MgSO<sub>4</sub> und L1 Larven hinzugegeben. Der Kolben wurde bei 15°C langsam geschwenkt. Zugabe von 10 g Bakterienfutter starteten dann das Wachstum der Würmer. Die Lösung sollte stets durch ausreichend Bakterien trüb gehalten werden, da die Würmer sonst leicht verhungern. Die Inkubation dauerte 70-80 Stunden bis zum Erreichen der L4 Stadien. Nach Erwärmung auf 25°C erfolgte die Ernte der mit Embryonen gefüllten Würmer nach circa 20 Stunden, wenn das Medium gelblich klar geworden ist. Das Flüssigmedium wurde dann in einen mit Eis gefüllten Zylinder überführt und etwas Eis als Abschluss aufgegeben. Nach 2-3 Stunden waren die Würmer zum Boden sedimentiert und der Überstand wurde mit einer Wasserstrahlpumpe entfernt. Die Würmer wurden mit M9-Puffer gespült und anschließend einer alkalischen Hypochlorit-Behandlung unterzogen, um die Embryonen zu erhalten (Gerdt *et al.* 1999). Diese wurden dann von Dr. M. Müller auf Trockeneis an uns verschickt (Müller 2007), eine Quantifizierung der Embryonen war nicht möglich. Der Zellaufschluss erfolgte durch Einwirkung von Ultraschall mit einem Ultraschallstab im Eiswasserbad für zwei Minuten.

## 2.3 Proteinbestimmung

### 2.3.1 Proteinbestimmung mittels Bio-Rad Protein-Assay Kit

Zur Proteinbestimmung wurde jeweils ein 1  $\mu\text{L}$  Aliquot der Embryonen-Proben mit 200  $\mu\text{L}$  Wasser in Küvetten (Sarstedt) gegeben und mit 800  $\mu\text{L}$  einer nachstehend beschriebenen Lösung in Dunkelheit zur Reaktion gebracht. Diese Lösung wird gemäß Herstellerangaben aus einem Teil Bio-Rad Protein-Assay Reagenz (Bio-Rad, München) und vier Teilen Wasser angesetzt. Sie muss mit der Probe zehn Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubieren und kann dann gegen eine identisch angesetzte Verdünnungsreihe einer Vergleichslösung, hier eine käufliche Rinderserumalbumin-Lösung (BSA; 2 mg/mL; Pierce, Bonn), im Photometer gemessen werden. Der Absorptionsverlauf der BSA-Eichreihe (0, 1, 2, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{g}$  Protein) ist bei Verwendung dieses Reagenz laut Hersteller im Bereich von 1-20  $\mu\text{g}$  Protein linear und kann daher als Vergleichslösung herangezogen werden.

Nach der Reaktionszeit wurden die Küvetten aus technischen Gründen mit jeweils einem Milliliter Wasser aufgefüllt und die Absorption bei 578 nm im Photometer (Beckmann DU 640, Krefeld) gemessen. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

### 2.3.2 Proteinbestimmung mittels BCA Protein-Assay Kit

Alternativ zu der oben genannten Methode wurden Proteinbestimmungen auch mit dem BCA Protein-Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) durchgeführt. Der empfindliche Messbereich liegt bei diesem Kit zwischen 20  $\mu\text{g}$  und 2 mg.

Als Vergleich wurde auch hier nach Anleitung mit der im Kit enthaltenen BSA-Lösung (2 mg/mL) eine Verdünnungsreihe (0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) angesetzt. Von dieser Standardreihe wurden jeweils 10  $\mu\text{L}$  in die Vertiefungen (*wells*) einer Rotilabo<sup>®</sup>-Mikrotiterplatte (Roth, Karlsruhe) gegeben, analog wurde mit den Proben verfahren. Zur Absicherung der Werte wurde auch hier jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Die zum Kit gehörenden Reagenzien A und B wurden in einem Mischungsverhältnis von 50:1 gemischt und jeweils 200 µL der entstandenen Lösung in die mit Proben bzw. Standardlösung gefüllten *wells* gegeben. Die Inkubationszeit betrug bei Raumtemperatur 30 min. Dann wurden die Absorption der Proben bei 562 nm im Microplate Reader EL X800 (BioTEK, Bad Friedrichshall) gemessen und jeweils ein Mittelwert der Dreifachbestimmungen ermittelt.

## **2.4 Aufarbeitung der *C. elegans* Proben**

### **2.4.1 Proteinfällung**

Zur Gewinnung der Proteine wurde eine Fällung mit eiskaltem Aceton durchgeführt. Dazu wurden die wässrigen Proben mit dem vierfachen Volumen an Aceton versetzt, welches zuvor bei -20°C gelagert worden war, und über Nacht bei -20°C gehalten. Anschließend wurde die Probe bei 14.000 Umdrehungen pro Minute in einer Universal 32 R Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen) abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das verbleibende Aceton im Sediment wurde unter Stickstoff-Strom abgeblasen. Dann wurde dem Sediment erneut Aceton hinzugesetzt, die Probe bis zur vollständigen Dispersion homogenisiert, erneut zentrifugiert und das Sediment wieder im Stickstoffstrom getrocknet.

### **2.4.2 Denaturierung der Proteine und tryptischer Verdau**

Eine vollständige Denaturierung der Proteine erfolgte durch Aufspaltung der Disulfidbrücken und nachfolgende Carbamidomethylierung (Parry *et al.* 2006). Dazu wurde die Probe in einer Lösung aus 4 M Guanidin, 0,6 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,5) und Dithiothreitol (2 mg/mL) gelöst und homogenisiert. Die Reduktion erfolgte bei 50°C in einem Thermomix (Eppendorf, Hamburg) bei 300 Umdrehungen pro min innerhalb von zwei Stunden. Anschließend wurde Iodacetamid in fünffachem molaren Überschuss zu Dithiothreitol zugegeben und der Ansatz eine Stunde bei

Raumtemperatur inkubiert. Zur nachfolgenden Dialyse der Probe gegen einen 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Puffer (pH 8,5) wurde die Probe in einen Slide-A-Lyser mit der Porengröße 3500 (Pierce, Rockford, IL, USA) überführt und 48 h bei 4°C belassen. Während dieser Zeit wurde der Dialysepuffer dreimal ausgetauscht.

Die proteolytische Spaltung der Proteine erfolgte durch tryptischen Verdau. Hierzu wurde die lyophilisierte Probe nach Proteinfällung in 300-600  $\mu\text{L}$  0,025 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung aufgenommen. Das in 50  $\mu\text{L}$  1mM HCl (pH 3) aktivierte (5 min) und TPCK-vorbehandelte Trypsin (aus bovinem Pancreas; Sigma, Steinheim) wurde dann in einer Konzentration von 1 mg/mL im Verhältnis 1:40 zur gelösten Probe hinzugegeben. Der Verdau wurde nach 12-15 stündiger Inkubation bei 37°C durch Kochen bei 100°C (5 min) beendet. Die Probe wurde bei  $48.000 \times g$  zentrifugiert und der Überstand zur weiteren Verarbeitung lyophilisiert.

### 2.4.3 Freisetzung der N-glykosidisch gebundenen Glykane

Die Freisetzung der N-Glykane erfolgte unter Erhalt des freien reduzierenden Endes sowohl auf enzymatischem als auch auf chemischem Wege. Für die enzymatische Freisetzung wurden die käuflich zu erwerbenden, rekombinanten N-Glykosidasen PNGase F (Roche, Mannheim und BioLabs, Frankfurt/Main) und PNGase A (Roche) verwendet, die sich in ihrer Substratspezifität vor allem im Hinblick auf die Akzeptanz einer möglichen ( $\alpha$ 1-3)-Kernfucosylierung der N-Glykane unterscheiden. Nach der Freisetzung wurden die Glykane von Peptiden und anderen Probenbestandteilen mittels kommerziell erhältlicher Festphasenextraktionsmaterialien abgetrennt.

Die alternative chemische Freisetzung der N-Glykane erfolgte durch Hydrazinolyse. Nach der anschließenden Re-N-acetylierung wurden die Glykane mittels selbst hergestellter MB3-Ionenaustauscher-Kartuschen und gebrauchsfertiger *porous graphitic carbon* (PGC-) und *reversed-phase* (C18-) Kartuschen aufgereinigt (siehe Kapitel 2.4.4).

### **2.4.3.1 Enzymatische Freisetzung der N-Glykane**

Zur Freisetzung der Glykane mit PNGase F wurden die lyophilisierten Proben in 75 - 300 µl 20 mM Natriumhydrogenphosphat Puffer (pH 7,2) gelöst und anschließend im Ultraschallbad und unter Vortex-Behandlung vollständig in Lösung gebracht. Die Zugabe von 5 - 10 µl PNGase F (5 - 10 Units) startete die N-Glykanabspaltung, welche bei 37°C über Nacht und unter Schütteln erfolgte. Fünf Stunden nach Beginn des Verdau wurden erneut 5 - 10 µl PNGase F-Lösung hinzugegeben.

Zur Freisetzung der Glykane mit PNGase A aus Mandeln wurden die lyophilisierten Proben in 40 - 300 µl 10 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,1) gelöst. Zur vollständigen Lösung der Proben wurde auch hier eine Behandlung mit Ultraschall und Vortex eingesetzt. Für den Verdau wurden 5 - 10 µl PNGase A (250 - 500 µU) und nach fünf Stunden erneut 5 - 10 µl PNGase A hinzugegeben. Auch hier erfolgte die Inkubation bei 37°C über Nacht unter Schütteln.

### **2.4.3.2 Chemische Freisetzung durch Hydrazinolyse**

Die Hydrazinolyse ist das am häufigsten eingesetzte chemische Verfahren zur Abspaltung von Glykanen unter Erhalt eines freien reduzierenden Endes. Die Vorgaben hierfür lieferten Patel und Parekh (Patel und Parekh 1994). Die Probe wurde nach Proteinfällung mit Aceton in ein konisches Gläschen mit Schraubdeckel überführt und mindestens 48 h lyophilisiert. Die wasserfreie Probe wurde mit 500 µl 98%igem wasserfreien Hydrazin (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) aufgenommen und mit einem Teflonseptum im Schraubdeckel fest verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei 100°C über Nacht. Danach wurde das Hydrazin unter Vakuum entfernt, Gefäß und Rückstand zweimal mit 200 µl Toluol gespült und die Flüssigkeit jeweils unter Vakuum verdampft. Die Re-N-Acetylierung der Aminozucker erfolgte durch Zugabe eines Gemischs von 200 µl einer gesättigten und eisgekühlten NaHCO<sub>3</sub>-Lösung und 8 µl Acetanhydrid-Lösung zu der getrockneten Probe. Der Ansatz wurde intensiv geschüttelt und auf Eis (0°C) fünf Minuten inkubiert. Die Prozedur wurde nach nochmaliger Zugabe von Acetanhydrid und einer verlängerten Inkubationszeit von 30 Minuten,

wiederum auf Eis (0°C), wiederholt. Die nachfolgende Aufreinigung und Entsalzung der Glykane erfolgte mit einem Serdolit MB3-Ionenaustauscherharz (Serva, Heidelberg) in einer selbst gepackten Kartusche, sowie mit den oben beschriebenen C18 und PGC-Kartuschen (siehe Kapitel 2.4.4).

## **2.4.4 Aufreinigung der enzymatisch freigesetzten Glykane**

### **2.4.4.1 Aufreinigung über C18-Kartuschen**

Um die freigesetzten Glykane zu isolieren und von Begleitsubstanzen abzutrennen, wurde der komplette Ansatz über eine gebrauchsfertige C18-Kartusche (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) gegeben, welche Peptide und ungespaltene Glykopeptide bindet, während freie Glykane nicht gebunden werden. Das C18-Gelmaterial bindet laut Herstellerangaben ca. 3-5% der eigenen Masse, so dass Kartuschen mit 25 mg C18-Material bzw. bei größeren Probenmengen mit 100 mg als ausreichend zu betrachten waren. Die Kartuschen mussten vor Gebrauch mit dem jeweils mindestens zehnfachen Volumen an Methanol, Wasser, 0,1%iger Trifluoressigsäure (TFA), 80%igem Acetonitril (ACN) in 0,1%iger TFA, 60% ACN in 0,1%iger TFA, 40% ACN in 0,1%iger TFA, 20% ACN in 0,1%iger TFA und Wasser äquilibriert werden. Es wurde darauf geachtet, dass das Gelmaterial nicht trocken lief. Anschließend wurden die enzymbehandelten Proben auf das Gelmaterial aufgebracht und eine Einwirkzeit von 10-15 Minuten gewährleistet. Nach Waschen der Kartusche mit dem mindestens zehnfachen Gelvolumen einer 0,1%igen TFA-Lösung befanden sich die freien Glykane in Durchlauf und Waschfraktion. Diese wurden vereinigt und lyophilisiert. Die von dem Gelmaterial gebundenen Anteile wurden mit 20%iger, 40%iger und 60%iger ACN-Lösung eluiert und nach Entfernung des ACN durch eine Vakuumzentrifuge Jouan (Thermo Scientific, Schwerte) ebenso lyophilisiert.

#### **2.4.4.2      Aufreinigung über PGC-Kartuschen**

Die durch Behandlung mit PNGase F und PNGase A freigesetzte und über eine C18-Kartusche aufgereinigte Gesamtfraction an Glykanen wurde zur weiteren Verwendung über eine PGC-Kartusche (25mg Material, Supelco, Sigma-Aldrich Group, Steinheim am Albuch) entsalzt. Zur Vorbereitung der PGC-Kartusche wurde diese mit je 5 mL Wasser, 80% ACN in 0,1%iger TFA, 20% ACN in 0,1%iger TFA und erneut mit 10 ml Wasser äquilibriert. Die lyophilisierte Glykanprobe wurde in Wasser gelöst, auf das Säulenmaterial aufgegeben und einsickern gelassen. Der Durchlauf wurde erneut aufgegeben. Die gebundenen Glykane wurden mit einem Milliliter Wasser gewaschen und anschließend mit jeweils 0,5 mL einer 25%igen und 80%igen ACN in 0,1%iger TFA Lösung eluiert. Die erhaltenen Eluate wurden anschließend mittels einer Vakuumzentrifuge und durch Gefriertrocknung zur Trocknung gebracht (Packer *et al.* 1998).

#### **2.4.4.3      Aufreinigung über Zip-Tip<sup>®</sup> (C18-Material)**

Bereits aufgereinigte Glykanproben, die während der Messungen im MALDI-TOF Massenspektrometer noch Verunreinigungen aufwiesen wurden *on-target* in 0,5 µL gereinigtem Wasser gelöst und anschließend zehn Mal in das zuvor äquilibrierte C18-Material einer speziellen Pipettenspitze (Zip-Tip<sup>®</sup>, Millipore, Eschborn) aufgenommen. Nichtpolare Verunreinigungen binden im Gelmaterial, die Glykane wurden in Lösung wieder auf das Target gespottet.

Die Äquilibrierung des C18-Materials der Zip-Tip<sup>®</sup> Pipettenspitze erfolgte mit dem zehnfachen Materialvolumen mit Wasser, 20%igem Acetonitril (ACN) in 0,1%iger TFA, 40% ACN in 0,1%iger TFA, 60% ACN in 0,1%iger TFA, 80% ACN in 0,1%iger TFA und anschließend analog in absteigender Konzentration bis hin zum Wasser.

## 2.5 Strukturaufklärung durch enzymatische und chemische Umsetzung

### 2.5.1 Abspaltung von Fucose und Phosphorylcholin-Resten mit Flusssäure

Aliquots ausgewählter Proben wurden nach Lyophilisierung mit 25-30  $\mu\text{L}$  48%iger Flusssäure (HF) versetzt und anschließend über Nacht im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Reste von HF wurden unter Stickstoffstrom abgeblasen. Anschließend wurde die Probe zweimalig in 30  $\mu\text{L}$  Methanol aufgenommen, erneut lyophilisiert und für die massenspektrometrische Messung vorbereitet (Haslam *et al.* 2000; Geyer *et al.* 2005; Lehr *et al.* 2007).

### 2.5.2 Abbau von Hexose-Oligomeren mit $\alpha$ -Glucosidase

Zur Degradierung der in einigen Proben vorkommenden Hexose-Oligomere wurden diese mit  $\alpha$ -Glucosidase aus Reis (Serva, Heidelberg) behandelt. Dazu wurden 5  $\mu\text{L}$  der kommerziell erhältlichen Enzymlösung zunächst auf eine in 25 mM Ammoniumacetat-Puffer (pH 6,0) schwimmende Dialysemembran (Millipore, Schwalbach/Ts; Porengröße 25 nm) aufgegeben und 120 min lang ungepuffert. Zwei Mikroliter dieser ungepufferten Lösung wurden dann direkt zu der in 4  $\mu\text{L}$  des gleichen Ammoniumacetat-Puffers gelösten Probe auf den Probenhalter des Massenspektrometers aufgetragen (*on-target* Verdau). Die Einwirkzeit entsprach der Trocknungszeit des Gemisches bei Raumtemperatur. Das getrocknete Probengemisch wurde dann massenspektrometrisch analysiert (Geyer *et al.* 1999)

## 2.6 Massenspektrometrische Analyse der N-Glykane

Die Detektion der N-Glykane erfolgte mittels *matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight* Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS). Diese Methode gewinnt seit Jahren zunehmend an Bedeutung bei der Analyse von

N-Glykanen, auch im Bezug auf die zuvor genannten CDG Syndrome (Wada 2006). Die hierbei verwendete „sanfte Ionisierung“ erlaubt sowohl eine Bestimmung von intakten Molekülen als auch eine Fragmentierung mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Als Massenspektrometer wurde ein Ultraflex-TOF der Firma Bruker (Bremen) mit Stickstofflaser und einer LIFT- (TOF-TOF-) Einheit verwendet.

Die Glykanproben wurden nach Aufreinigung und Lyophilisation in 10 µL reinem Wasser gelöst, zusammen mit 0,5-1 µL 6-aza-2-thiothymine (ATT; 5 mg/mL Wasser) als Matrix auf ein 600er *anchor chip target* (Bruker) aufgetragen und wahlweise bei Raumtemperatur oder im warmen Luftstrom getrocknet. Der zur Ionisation verwendete Stickstofflaser hatte eine Frequenz von 50 Hertz und eine Spannung von 25.000 Volt. Es wurde der positive Reflektormodus benutzt. Während der Messungen wurden 500-1000 Einzelspektren für die Erstellung der Summenspektren aufaddiert.

Unter Verwendung der vorhandenen TOF-TOF-Einheit des Geräts wurden weiterhin Fragmentspektren ausgewählter Molekülspezies nach laserinduzierter Ionisation und Spontanfragmentierung (*post source decay*) aufgenommen. Die Selektion des Molekülions erfolgte durch ein zeitlich begrenztes Ionenfenster. Die Ionen wurden auch hier im Reflektormodus detektiert.

### 3. Ergebnisse

Die Embryogenese von *C. elegans* und die dafür erforderliche Zellorientierung im wachsenden Organismus mit einer Achsenbildung und einer rechts/links Orientierung sind von der Wissenschaft noch nicht gänzlich verstanden. Die hierfür notwendige Kommunikation der Zellen untereinander könnte zum Teil auf dem Niveau der auf der Zellmembran präsentierten N-Glykane ablaufen. Daher wurden in den hier durchgeführten Experimenten zunächst die Glykanmuster von *C. elegans* Embryonen aller Embryonalstadien im Vergleich zu einem Gemisch aller späteren Entwicklungsstadien von der Larve 1 (L1) bis zum adulten Wurm (so genannte *mixed stages*) vom N2-Wildtyp Bristol untersucht. Dabei wurde auch der Einfluss verschiedener Kultivierungsarten auf die N-Glykanmuster von Wildtyp-Embryonen miteinander verglichen. Im zweiten Teil der Arbeit wurden dann die N-Glykanprofile von *C. elegans* Mutanten vergleichend untersucht, welche im Verlauf ihrer Embryogenese deutliche Auffälligkeiten zeigten, wie zum Beispiel eine Arretierung in einem bestimmten Zellstadium, das Fehlen bestimmter Organstrukturen oder Aberrationen in der Zellteilung.

Die Probenaufarbeitung wurde zunächst unter Verwendung von *mixed-stage* Wildtypwürmern optimiert und - soweit nicht anders angegeben - wie in Kapitel 3.1 beschrieben beibehalten. Die Optimierung der Methoden zur Freisetzung und Detektion der N-Glykane ist in Kapitel 3.2 beschrieben (Geyer und Geyer 1998; Geyer und Geyer 2006).

#### 3.1 Optimierung der Probenaufarbeitung

Die Wildtypwürmer wurden im Labor von Prof. G. Lochnit (Justus-Liebig Universität, Gießen) auf Agarplatten mit einem *E. coli* beimpften Rasen (OP50) angezchtet (siehe Kapitel 2.2.1) und nach drei Tagen abgeerntet, wohingegen die Embryonen von Wildtypwürmern und Mutanten im Labor von Prof. R. Schnabel (Technische Universität, Braunschweig) hergestellt wurden, wobei Wildtypwürmer entweder auf

Agar oder in Flüssigkultur (2.2.1 und 2.2.2) angezüchtet wurden (Gerdt *et al.* 1999; Müller 2007).

Bei allen Proben wurden die Zellverbände durch Ultraschalleinwirkung aufgelöst. Nach Bestimmung des Proteingehalts mittels microBCA™ Assay oder BioRad™ Protein Assay (2.3), Acetonfällung (2.4.1) sowie Carbamidomethylierung und tryptischem Verdau (2.4.2) erfolgte die enzymatische Freisetzung der N-Glykane sowohl mit PNGase F, als auch mit PNGase A, da die alleinige Abspaltung durch PNGase A nicht ausreichend war (2.4.3). Andererseits ist nur mit PNGase A eine Spaltung der Bindung zwischen einem ( $\alpha$ 1-3)-fucosylierten GlcNAc und dem Asn-Rest des Proteins möglich (Tretter *et al.* 1991).

Die Aufreinigung der Proben zur Beseitigung von Lipiden, Proteinen und eventuellen Zellresten sowie zur Entsalzung erfolgte über RP- (*reversed-phase*) und PGC- (*porous graphitic carbon*) Kartuschen (2.4.4). Auf C18 RP-Kartuschen werden unpolare Bestandteile gebunden, während sich die Glykane in der Waschfraktion befinden. Im Falle von PGC-Kartuschen werden die Oligosaccharide gebunden und nach Auswaschen der Salze wieder eluiert (Packer *et al.* 1998). In Anbetracht der geringen zu erwartenden Probenmengen wurden die Aufarbeitungsschritte zunächst unter Verwendung von Serumtransferrin als Standardglykoprotein und verschiedenen Kartuschentypen optimiert, wobei zusätzlich weitere kommerziell erhältliche Festphasenextraktionsmaterialien (Supelclean™ LC-SCX Supelco/Sigma Aldrich; ENVI-Carb, Supelco/Sigma Aldrich; Discovery DPA-6S, Supelco/Sigma Aldrich; Bond Elut® Plexa, Varian; StratoSpheres™ SPE Tubes, Polymer Laboratories Ltd) als auch selbst mit Serdolit MB3 (Serva, Heidelberg) gepackte Kartuschen zum Einsatz kamen (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurden verschiedene Inkubationszeiten mit dem Festphasenmaterial getestet. Anschließend wurden die gewonnenen Glykanproben mittels Massenspektrometrie charakterisiert. Durch Analyse der in den einzelnen Waschfraktionen bzw. Eluaten enthaltenen Monosaccharide konnten in exemplarischen Versuchsreihen darüber hinaus quantitative Aussagen zur Kohlenhydrat-Ausbeute getroffen werden. Dabei zeigte sich, dass teilweise nur 20-30% der in der Ausgangsprobe enthaltenen Zucker im finalen Eluat detektiert werden konnten, was auf einer unvollständigen Freisetzung der N-Glykane, auf dem Vorhandensein von O-glykosidisch gebundenen Zuckerketten und/oder der Präsenz anderer Glykokonjugate beruhen könnte (Daten nicht gezeigt). Auch bei Verwendung gleicher Proben und Materialien waren zeitweise Variationen in der Ausbeute feststellbar, wobei jedoch die

im Methodenteil genannten PGC- (Supelco/Sigma Aldrich) bzw. RP-Kartuschen (Thermo Fisher Scientific) die reproduzierbarsten Ergebnisse lieferten. Deshalb wurden alle weiteren Versuche unter Verwendung dieser Materialien durchgeführt.

Nach Aufnahme in Wasser wurden 1-2  $\mu\text{L}$  der Probe auf ein *ancor chip target* (Bruker) aufgetragen, 1  $\mu\text{L}$  ATT (6-Aza-2-thiothymine)-Lösung als Matrix hinzu pipettiert und wahlweise unter Warmstrom oder über einen entsprechend längeren Zeitraum bei Raumtemperatur getrocknet. Die langsame Auskristallisation bei Raumtemperatur ergab eine verbesserte Ausbildung der Kristallstruktur, was zu einer effizienteren Ionisierung der Glykane und damit zu höheren Signalintensitäten führte. Zur Detektion der Glykane wurde ein Ultraflex MALDI-TOF-Massenspektrometer mit Stickstofflaser benutzt (2.6). Auf eine Derivatisierung der Glykane wurde aus Materialgründen verzichtet, da dies weitere Aufarbeitungsschritte bedingt hätte, die ihrerseits wieder zu Substanzverlusten geführt hätten.

In den erhaltenen Spektren wurden dann diejenigen Signale ausgewählt und annotiert, die eine ausreichende Intensität und das zu erwartende Isotopenmuster aufwiesen. Für die einzelnen Pseudomolekülmassen wurden anschließend mittels des Softwareprogramms Glyco-Peakfinder™ (Maass *et al.* 2007; Ceroni *et al.* 2008) mögliche Monosaccharid-Zusammensetzungen berechnet und diese mit den bereits für *C. elegans* beschriebenen Glykanen verglichen. Zur exemplarischen Bestätigung der Strukturen wurden einzelne Signale mit genügend hoher Intensität im MS/MS-Modus des MALDI-TOF-MS Geräts analysiert (siehe Kapitel 2.6, 3.7.1 sowie Abbildung 3.11 A und B). Des Weiteren wurden zur Strukturabsicherung in einigen Fällen die Proben parallel mit Flusssäure behandelt (siehe 2.5.1, 3.7.2, Abbildung 3.12) bzw. vorhandene Glucose-Oligomere ( $\text{Hex}_{3-11}$ ) durch Verdau mit  $\alpha$ -Glucosidase verifiziert (2.5.2, 3.7.3 und Abbildung 3.13).

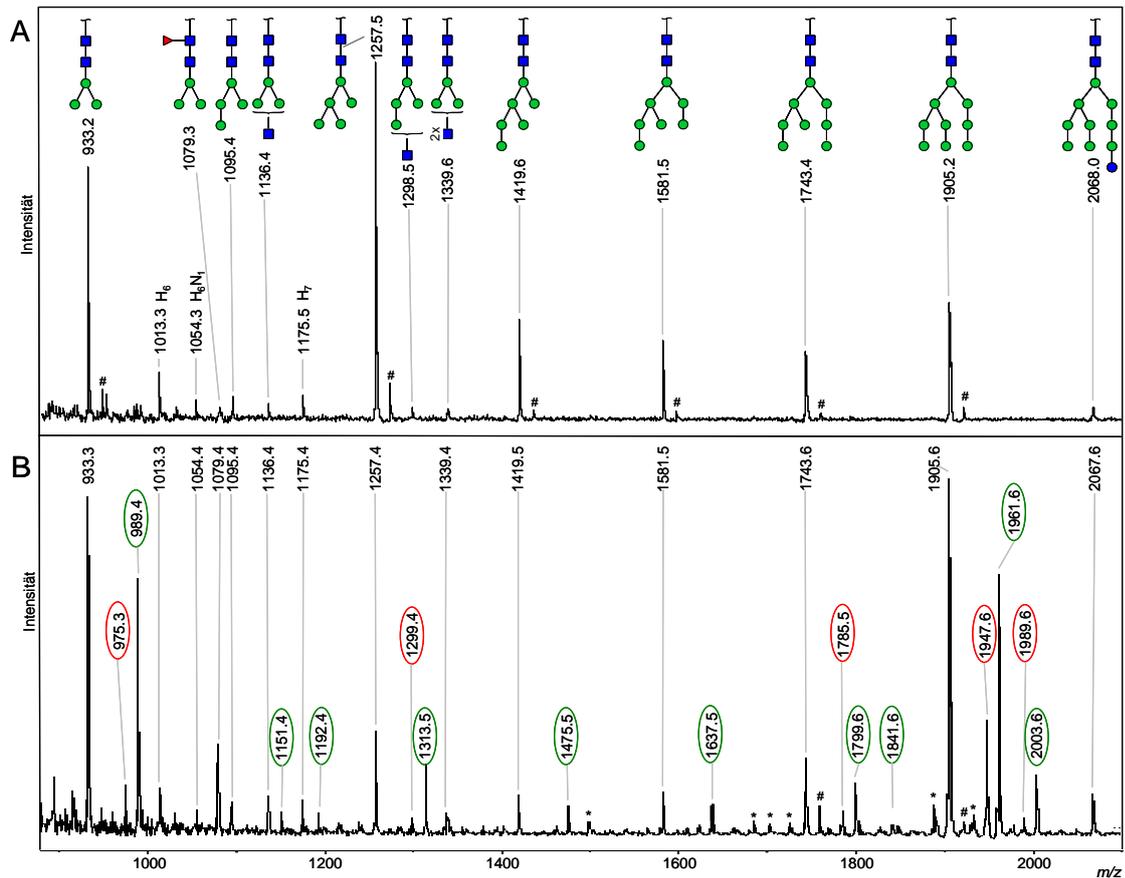
Vereinzelt zeigten sich trotz Aufreinigung über RP- und PGC-Kartuschen noch Verunreinigungen, die mittels Zip-Tip® C18 Festphasenextraktionsmaterial entfernt werden konnten. Hierzu wurden die Proben auf dem MALDI Target erneut in Wasser gelöst und anschließend mehrfach mit der mit C18-Material gefüllten Pipettenspitze aufgenommen und wieder auf das Target aufgespottet (siehe Kapitel 2.4.4.3).

### 3.2 Evaluation von Methoden zur Freisetzung der Glykane

Für die Freisetzung von N-Glykanen aus Proteinen gibt es verschiedene Möglichkeiten. Die gewählte Methode hängt in erster Linie von der Fragestellung und den zur Verfügung stehenden Substanzmengen und Detektionsmethoden ab. Insbesondere die Tatsache der geringen zur Verfügung stehenden Probenmengen machte in der vorliegenden Arbeit eine sorgfältige Optimierung der Aufbereitungsschritte mit dem Ziel einer möglichst hohen Ausbeute an Glykanen erforderlich. Neben der in Kapitel 3.1 angesprochenen enzymatischen Abspaltung der Zuckerketten mit PNGase A und PNGase F wurde deshalb auch die Möglichkeit einer chemischen Freisetzung durch Hydrazinolyse ins Auge gefasst. Letztere Methode wird von manchen Arbeitsgruppen favorisiert, weil auf diesem Weg bei *C. elegans* komplexere Glykane mit bis zu vier Fuc-Resten und zwei Methylhexosen nachweisbar waren (Hanneman *et al.* 2006). Um diese Methode zu testen, wurden in Flüssigmedium kultivierte *C. elegans* Embryonen nach Proteinfällung (siehe Kapitel 2.4.1) und Lyophilisation mit wasserfreiem Hydrazin behandelt (2.4.3.2). Nach Re-*N*-Acetylierung wurden die Glykanproben mittels RP- und PGC-Kartuschen aufgereinigt und zusammen mit ATT als Matrix massenspektrometrisch analysiert.

Die resultierenden Massenspektren wiesen in der Tat eine deutlich höhere Anzahl an Signalen auf (Abbildung 3.1). Bei genauerer Analyse fiel jedoch auf, dass bei intensiven Signalen stets Begleitsignale mit einer Massendifferenz von jeweils  $n \times 42$  Masseneinheiten auftraten (in Abbildung 3.1 B rot umrahmt). Im Fall der Glykane der Zusammensetzung Hex<sub>9</sub>HexNAc<sub>2</sub> ( $m/z$  1905,6) waren dies zum Beispiel die Signale bei  $m/z$  1947,6 und  $m/z$  1989,6. Dieser Abstand entspricht einer Acetylgruppe (-CH<sub>2</sub>-CO-). Darüber hinaus waren im gesamten Spektrum vielfach Begleitsignale nachweisbar, die sich von den Ausgangssignalen um 56 Masseneinheiten unterschieden (in Abbildung 3.1 B grün umrahmt), was auf eine weitere chemische Derivatisierung der Glykane unter zusätzlicher Aufnahme eines Hydrazinrestes schließen lässt. Die genauen Strukturen der jeweiligen Modifikationen wurden hier nicht im Detail untersucht. Dieses Ergebnis zeigt jedoch, dass bei Abspaltung der N-Glykane mit Hydrazin und nachfolgende Re-*N*-Acetylierung offensichtlich in höherem Maße Nebenprodukte gebildet wurden, was die Auswertung und Interpretation dieser Spektren erschwerte. Die nach Freisetzung mit PNGase A und PNGase F gewonnenen Glykane lieferten

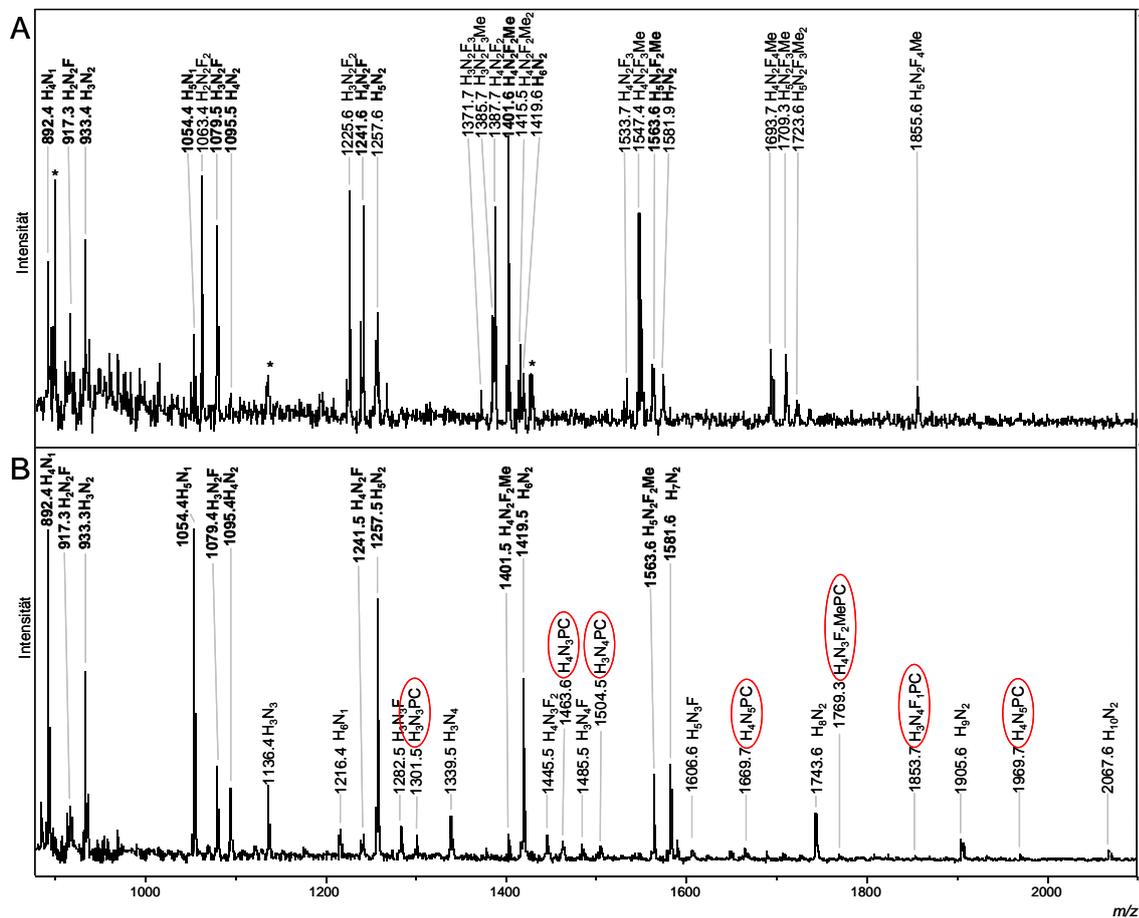
dagegen klar zuordenbare Massenspektren, da hier derartige chemische Modifikationen nicht stattfanden (Abbildung 3.1 A). Aus diesem Grund wurde im Folgenden ausschließlich die enzymatische Freisetzung genutzt.



**Abbildung 3.1:** Vergleichende MALDI-TOF Massenspektren der N-Glykane von *C. elegans* Wildtyp Embryonen, nach Freisetzung mit PNGase A und PNGase F (A) bzw. durch Hydrazinolyse (B). Detektierte Signale repräsentieren in der Regel Natriumaddukte  $[M+Na]^+$ . Beispielhaft sind einige Strukturformeln angegeben. H, Hex; N, HexNAc; grüner Kreis, Man; blaues Quadrat, GlcNAc; blauer Kreis, Glc; rotes Dreieck, Fuc; #, Kaliumaddukte  $[M+K]^+$ ; \*, nicht identifizierte Massen; grün und rot umkreiste Massen, Aufarbeitungsartefakte (siehe Kapitel 3.2).

### 3.3 Vergleich der N-Glykane von *C. elegans* Würmern und Embryonen des Wildtyps

Zunächst wurden die N-Glykane von *mixed stage* Würmern des Wildtyps von *C. elegans* und deren Embryonen mittels MALDI-TOF-MS untersucht (Abbildung 3.2), wobei die Wurmproben ein Gemisch verschiedener Larven-Stadien bis hin zum adulten Wurm enthielten, während die Embryonenproben Eier in unterschiedlichen Stadien der Embryonalentwicklung beinhalteten. Beide Proben stammten aus mit *E. coli* beimpften Kulturen auf Agar-Platten.



**Abbildung 3.2:** MALDI-TOF-MS N-Glykanprofile von *C. elegans* Wildtyp *mixed stage* Würmern (A) und Embryonen (B) nach Anzuchtung auf Agar-Platten. Es wurden jeweils Natriumaddukte  $[M+Na]^+$  registriert. In den hier exemplarisch gezeigten Spektren sind nicht alle Signale, die im Text besprochen werden, erkennbar. Eine vollständige Auflistung der insgesamt nachgewiesenen Glykane findet sich in Tabelle 3.1. H, Hex; N, HexNAc; F, Fuc; Me, Methylsubstituent; PC, Phosphorylcholin; rote Kreise, PC modifizierte Glykane; \*, nicht identifizierte Strukturen.

Das N-Glykanmuster der *mixed stage* Wurmproben wies sowohl Signale für mannosereiche Glykane ( $\text{Hex}_{5-7}\text{HexNAc}_2$ ) als auch paucimannosidische Spezies ( $\text{Hex}_{3-4}\text{HexNAc}_2$ ) auf, während frühe Glykanvorläufer ( $\text{Hex}_{8-10}\text{HexNAc}_2$ ) kaum nachgewiesen werden konnten (Abbildung 3.2 A). Im Gegensatz zu bisherigen Veröffentlichungen auf diesem Gebiet (Altmann *et al.* 2001; Natsuka *et al.* 2002; Haslam und Dell 2003; Cipollo *et al.* 2004a; Hanneman *et al.* 2006) waren die Signale mannosereicher Spezies nur in deutlich geringeren Intensitäten detektierbar. Dagegen repräsentierten Kohlenhydratketten, die zusätzlich noch Fuc-Reste und *O*-methylierte Zucker aufwiesen, eindeutig Hauptkomponenten. So wurde eine Vielzahl von Kohlenhydratkomponenten mit der summarischen Zusammensetzung  $\text{Hex}_{2-4}\text{HexNAc}_{2-5}\text{Fuc}_{0-4}\text{Me}_{0-2}$  und vereinzelt auch mit Phosphorylcholin (PC) modifizierte Glykane ( $\text{Hex}_{3-4}\text{HexNAc}_{4-5}\text{Fuc}_{0-1}\text{PC}$ ) nachgewiesen (siehe hierzu auch Tabelle 3.1), die auch von anderen Arbeitsgruppen (Cipollo *et al.* 2002; Paschinger *et al.* 2004; Hanneman *et al.* 2006) beschrieben worden waren.

Im Gegensatz zu den vorgenannten Ergebnissen zeichneten sich die N-Glykanprofile von *C. elegans* Embryonen, die Eier aller Entwicklungsstadien von der ersten Zellteilung bis hin zum Brezelstadium enthielten, durch eine klare Dominanz mannosereicher ( $\text{Hex}_{5-10}\text{HexNAc}_2$ ) und in geringerem Maße paucimannosidischer ( $\text{Hex}_{3-4}\text{HexNAc}_2$ ) Glykane aus (Abbildung 3.2 B). Auch hier konnten, allerdings in deutlich geringerer Intensität, Glykane mit ein bis zwei Fucosen sowie zum Teil *O*-methylierte Zuckerketten ( $\text{Hex}_{2-5}\text{HexNAc}_{2-4}\text{Fuc}_{0-2}\text{Me}_{0-1}$ ) nachgewiesen werden. Besonders im höheren Massenbereich wurden weiterhin PC-substituierte Kohlenhydratkomponenten ( $\text{Hex}_{3-5}\text{HexNAc}_{3-5}\text{Fuc}_{0-2}\text{Me}_{0-1}\text{PC}$ ) registriert, die zum Teil nicht in den Würmern des N2-Wildtyps detektierbar waren (Tabelle 3.1). Beispiele hierfür sind Spezies mit den Zusammensetzungen  $\text{Hex}_4\text{HexNAc}_3\text{PC}$  ( $m/z$  1463,6),  $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4\text{PC}$  ( $m/z$  1504,6) und  $\text{Hex}_4\text{HexNAc}_3\text{Fuc}_2\text{Me}_1\text{PC}$  ( $m/z$  1769,3) (in Abbildung 3.2 B rot umrahmt). Weiterhin fanden sich im Vergleich zu postembryonalen Stadien zusätzliche N-Glykane vom hybriden Typ mit den Zusammensetzungen  $\text{Hex}_{4-5}\text{HexNAc}_3$  ( $m/z$  1298,5 bzw.  $m/z$  1460,6) und  $\text{Hex}_{3-4}\text{HexNAc}_4$  ( $m/z$  1339,6 bzw.  $m/z$  1501,6), wobei die Signale zum Teil mit Nachbarsignalen überlappen, jedoch als eigenständige Isotopenpeaks erkennbar waren. Als weiteres Charakteristikum konnten in den untersuchten Embryonen auch Glykane der Zusammensetzung ( $\text{Hex}_{4-7}\text{HexNAc}_1$ ) detektiert werden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um Abbauprodukte einer

Endo- $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidase, die im Zytosol von *C. elegans* bereits nachgewiesen wurde (Kato *et al.* 2007).

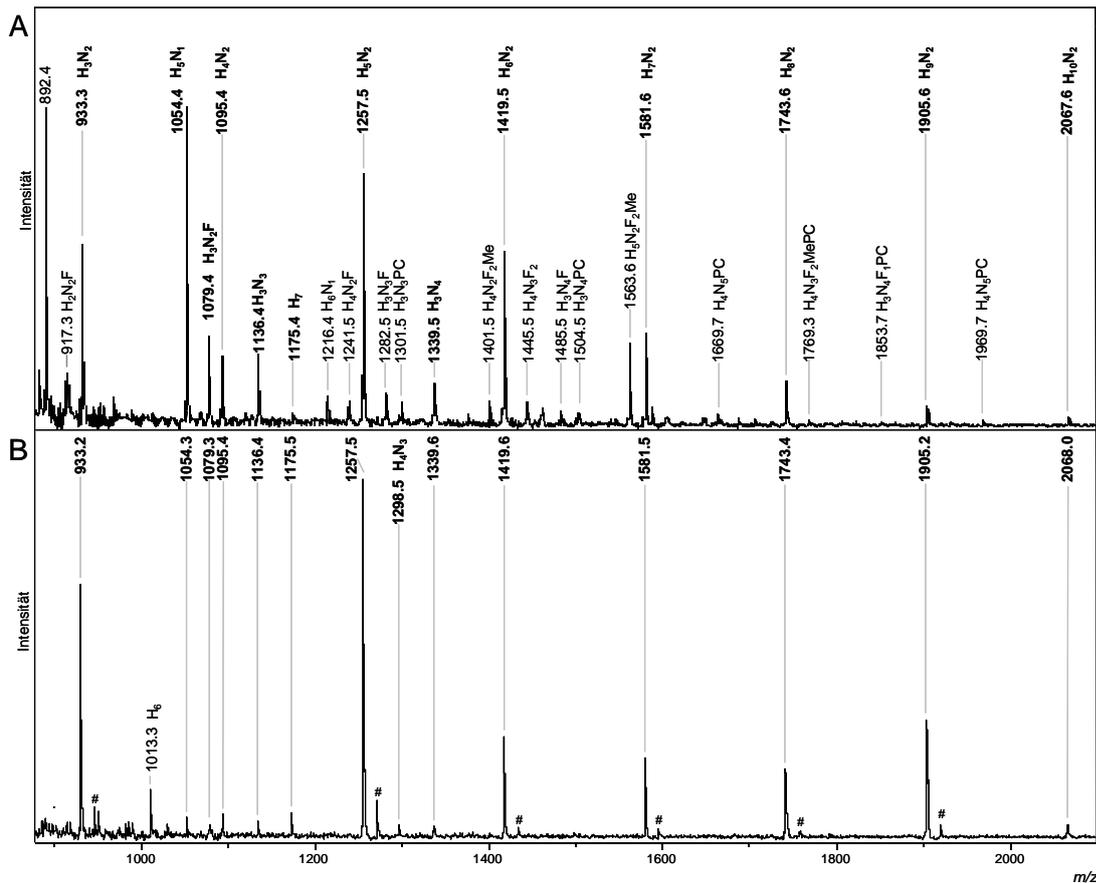
Insgesamt zeigte der Vergleich der N-Glykanprofile von *C. elegans* Embryonen und *mixed stage* Würmern deutliche Unterschiede auf. Die Glykane der Larven und Würmer waren in vielen Fällen mehrfach fucosyliert und *O*-methyliert. Auch die Zuckerketten vom komplexen Typ wiesen eine größere Heterogenität auf und waren mit höheren Intensitäten nachweisbar, während mannosereiche Vorläuferglykane nur in geringem Maße oder gar nicht detektierbar waren. Die Glykane der Embryonen zeichneten sich demgegenüber durch eine Dominanz mannosereicher Spezies aus. Dennoch waren auch hier, insbesondere im höheren Massenbereich, mehrfach fucosylierte Oligosaccharide mit Methylhexosen nachweisbar, die zum Teil auch Phosphorylcholin-Substituenten trugen. Offensichtlich findet bereits im Embryo zumindest teilweise eine Prozessierung der Vorläuferglykane statt.

### **3.4 Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die N-Glykanprofile von *C. elegans* Embryonen**

Da die Kultivierung und Gewinnung der Embryonen von *C. elegans* Mutanten aus technischen Gründen nur in Flüssigmedium möglich war, wurden zunächst die N-Glykanprofile von Wildtypembryonen, die entweder auf Agar-Platten oder in Flüssigkultur gewonnen worden waren, miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass die Kultivierungsmethode einen großen Einfluss auf die N-Glykanmuster der Embryonen hat. Wie in Abbildung 3.3 ersichtlich waren bei gleicher Aufarbeitung in *C. elegans* Eiern aus Flüssigmedium deutlich weniger N-Glykanspezies nachweisbar als in den entsprechenden Proben von Agar-Platten. Während paucimannosidische Glykane ( $\text{Hex}_{3-4}\text{HexNAc}_2$ ) und mannosereiche Spezies ( $\text{Hex}_{5-10}\text{HexNAc}_2$ ) meist in annähernd vergleichbaren Intensitäten nachgewiesen werden konnten, fiel dennoch die ausgeprägte Dominanz von  $\text{Hex}_5\text{HexNAc}_2$  Spezies ( $m/z$  1257,5) und ein deutlich höheres Signal im Fall von  $\text{Hex}_9\text{HexNAc}_2$  ( $m/z$  1905,2) bei Embryonen aus Flüssigkultur auf. N-Glykane vom komplexen Typ konnten lediglich bis zu einer einfach fucosylierten oder einfach methylierten Stufe nachgewiesen werden (siehe auch Tabelle 3.1). Gleiches gilt für

folgende Glykane von hybriden bzw. komplexen Typ: Hex<sub>3</sub>HexNAC<sub>3</sub>, Hex<sub>4</sub>HexNAC<sub>3</sub> und Hex<sub>3</sub>HexNAC<sub>4</sub>.

Im direkten Vergleich werden damit insbesondere Zuckerketten, die eine weiter fortgeschrittene Prozessierung der Glykane widerspiegeln, bei den in Flüssigkultur propagierten Embryonen nicht mehr gebildet. Aus diesen Gründen wurde für die folgenden Vergleiche der einzelnen Mutanten jeweils nur *C. elegans* Embryonen aus Flüssigkulturen herangezogen.



**Abbildung 3.3:** MALDI-TOF-MS N-Glykanprofile von *C. elegans* Wildtypembryonen nach Kultivierung auf Agar-Platte (A) oder in Flüssigmedium (B). Es wurden jeweils Natriumaddukte  $[M+Na]^+$  registriert. In den hier exemplarisch gezeigten Spektren sind nicht alle Signale, die im Text besprochen werden, erkennbar. Eine vollständige Auflistung der insgesamt nachgewiesenen Glykane findet sich in Tabelle 3.1.. H, Hex; N, HexNAC; F, Fuc; Me, Methylsubstituent; PC, Phosphorylcholin; #, Kaliumaddukte; fett gedruckte Massen ließen sich in beiden Kulturansätzen nachweisen.

### 3.5 *C. elegans* Mutanten

Wie bereits in Kapitel 1.3 angesprochen, stellen die Kohlenhydrat-Seitenketten von Glykoproteinen Schlüsselmoleküle im Kontext der Zell/Zell-Erkennung dar. Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war daher, Mutanten von *C. elegans*, bei denen bestimmte Zelllinien ausfallen und somit einzelne Organstrukturen nicht ausgebildet werden können, auf Varianzen hinsichtlich ihrer N-Glykome zu untersuchen. Wie bereits oben ausgeführt, wurden aus Gründen der Vergleichbarkeit diese Mutanten, welche in Flüssigmedium kultiviert wurden, mit *C. elegans* Wildtypembryonen in Beziehung gesetzt, die ebenfalls in Flüssigkultur propagiert worden waren.

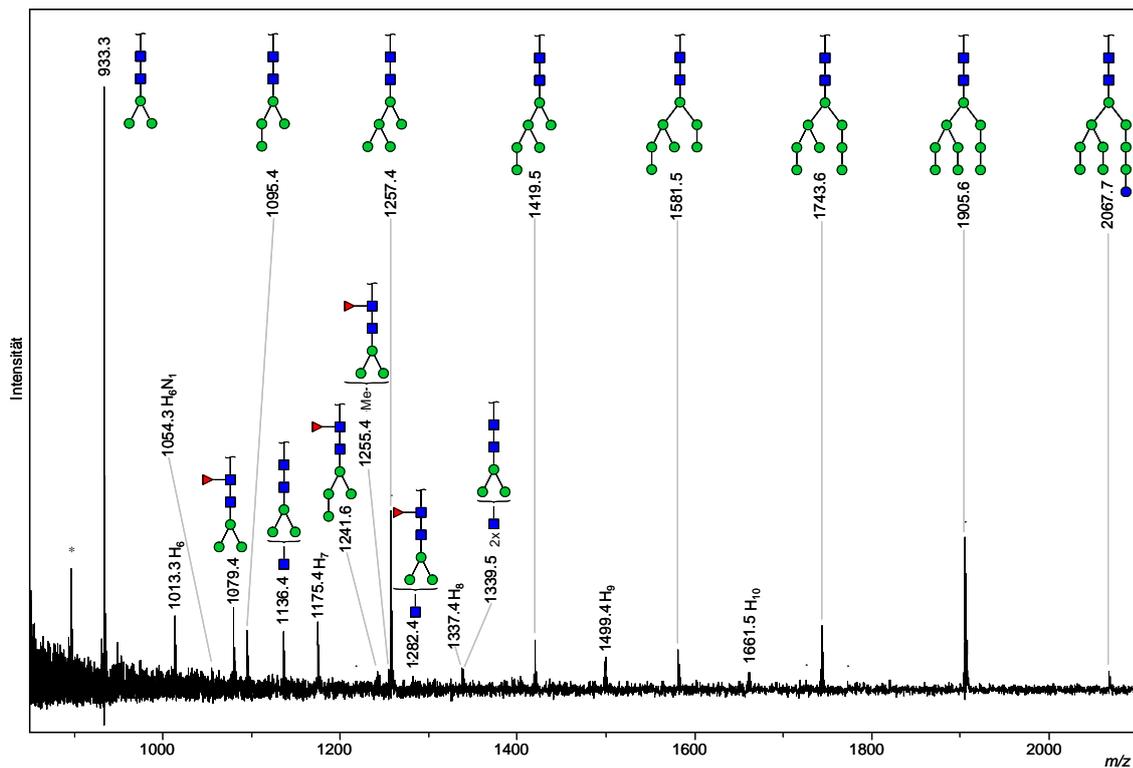
#### 3.5.1 *C. elegans* Mutante *glp-1*

Die *glp-1* (*e2144*) Mutante von *C. elegans* weist eine gestörte Zellproliferation in der Keimbahn auf, die auf einem Defekt im *glp-1* (*germ line proliferation*) Gen beruht. Der Defekt wird mit einem fehlerhaften Notch-Rezeptor, einem N-glykosylierten Membranprotein, begründet und bewirkt eine Reduktion der AB-Zelllinie im 12-Zellstadium von acht verschiedenen Zellidentitäten auf zwei (Priess *et al.* 1987; Hutter und Schnabel 1994). Aus den gebildeten vier ABala und ABarp Blastomeren entwickeln sich nahezu ausschließlich Zellen der Hypodermis und des Nervensystems. Die von der P1-Keimzelle abgeleiteten Zellen (siehe Abbildung 1.2) entwickeln sich nahezu normal, so dass im adulten Wurm lediglich 20 mesodermal gebildete Muskeln (MS-Zelllinie) der 81 Körpermuskeln fehlen (Austin und Kimble 1987; Priess *et al.* 1987; Crittenden *et al.* 1994; Hutter und Schnabel 1994; Crittenden *et al.* 1997).

Um zu überprüfen, inwieweit dieser Gen-Defekt im frühen Embryonalstadium mit einem veränderten Glykosylierungsmuster einhergeht, wurden in dieser Arbeit vier unabhängige *glp-1* Proben aufgearbeitet. Wie Abbildung 3.4 und Tabelle 3.1 zeigen, dominierten im N-Glykanprofil der *glp-1* Mutante mannosereiche ( $\text{Hex}_{5-10}\text{HexHexNAC}_2$ ) und vor allem paucimannosidische Spezies  $\text{Hex}_3\text{HexNAC}_2$ , wobei in allen Spektren die Glykane  $\text{Hex}_3\text{HexNAC}_2$  ( $m/z$  933,3) und  $\text{Hex}_9\text{HexNAC}_2$  ( $m/z$  1905,6) die höchste Signalintensität aufwiesen, gefolgt von der Kernstruktur

Hex<sub>5</sub>HexNAc<sub>2</sub> ( $m/z$  1257,4). Daneben konnten auch fucosylierte und methylierte mannosereiche Spezies sowie wenige, zumeist nur geringfügig prozessierte Glykane (Hex<sub>3-4</sub>HexNAc<sub>2-4</sub>Fuc<sub>0-1</sub>) detektiert werden. In einigen Proben waren noch weitere N-Glykane, die zum Teil auch *O*-methylierte Zucker enthielten, nachweisbar, die in Tabelle 3.1 in Klammern angegeben sind, da sie nicht in allen Proben reproduzierbar waren.

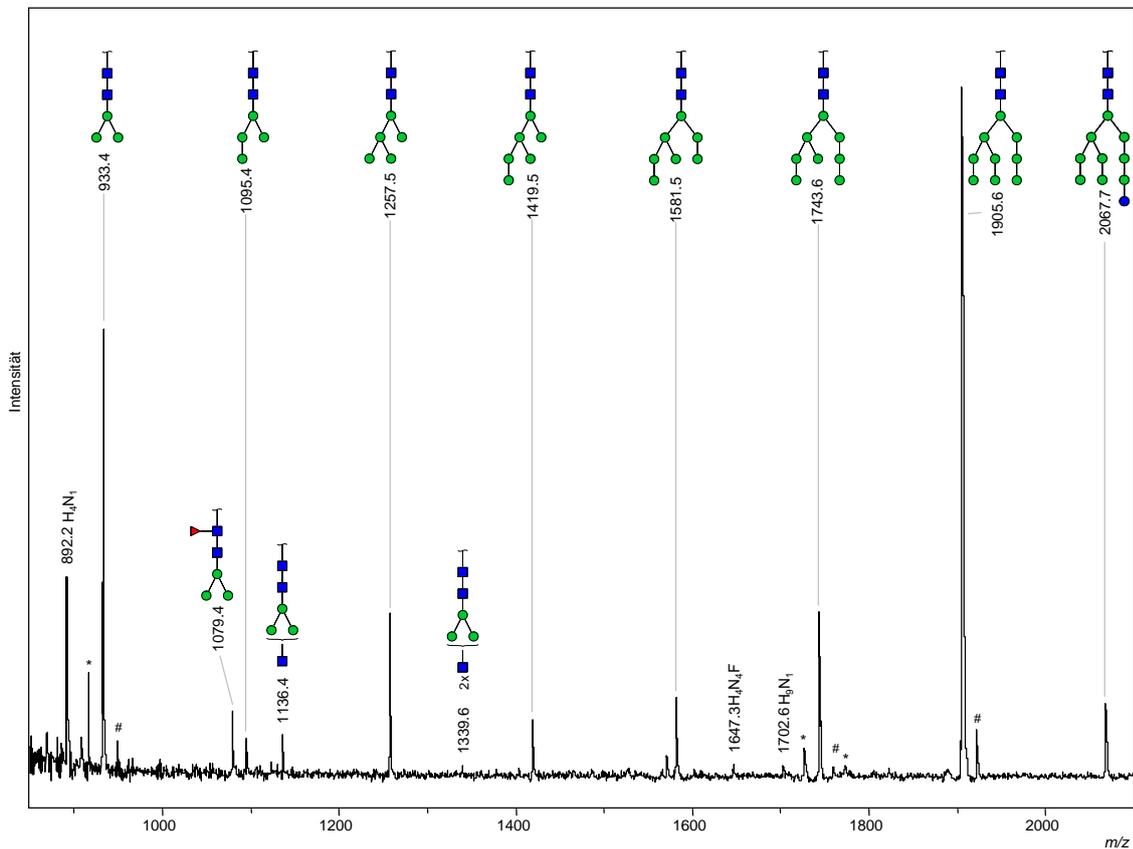
Zu Beginn zeigten sich in allen Spektren auch Glucose-Polymere bestehend aus sechs bis zehn Hexose-Einheiten, welche durch *on-target* Verdau mit  $\alpha$ -Glucosidase weitgehend eliminiert werden konnten (2.5.2). Verbleibende Glykane dieses Typs, die nicht durch diese Behandlung entfernt werden konnten, sind in den Abbildungen 3.4 bis 3.9 annotiert.



**Abbildung 3.4:** MALDI-TOF-MS N-Glykanprofile von *C. elegans* Embryonen der Mutante *glp-1*. Es wurden jeweils Natriumaddukte  $[M+Na]^+$  registriert. In den hier exemplarisch gezeigten Spektren sind nicht alle Signale, die im Text besprochen werden, erkennbar bzw. annotiert. Eine vollständige Auflistung der insgesamt nachgewiesenen Glykane findet sich in Tabelle 3.1. H, Hex; N, HexNAc; grüner Kreis, Man; blaues Quadrat, GlcNAc; blauer Kreis, Glc; rotes Dreieck, Fuc; \*, nicht identifizierte Strukturen.

### 3.5.2 *C. elegans* Mutante *lit-1*

Die *lit-1* (*t1512ts*) Mutante von *C. elegans* zeigt eine nahezu doppelte Ausbildung des anterioren Wurms mit einer Verdopplung pharyngealer Strukturen und einem Verlust des Intestinaltraktes. Dies beruht auf einer Transformation der E-Zelllinie in eine anteriore MS-Linie. Der posteriore Anteil zeigt lediglich in der normalen Ausprägung der D-Zelllinie keine Abnormitäten, welche später 20 Körpermuskeln ausbildet. Weitere Veränderungen bezüglich der jeweiligen Zellschicksale und der entsprechend fehlenden Körperzellen sind detailliert beschrieben (Kaletta *et al.* 1997) und werden deshalb hier nicht näher ausgeführt. Die zugrunde liegende Mutation ist im Embryonalstadium letal. Die Analyse der Glykane erfolgte an drei unabhängigen Ausgangsproben.



**Abbildung 3.5:** MALDI-TOF-MS N-Glykanprofile von *C. elegans* Embryonen der Mutante *lit-1*. Es wurden jeweils Natriumaddukte  $[M+Na]^+$  registriert. In den hier exemplarisch gezeigten Spektren sind nicht alle Signale, die im Text besprochen werden, erkennbar bzw. annotiert. Eine vollständige Auflistung der insgesamt nachgewiesenen Glykane findet sich in Tabelle 3.1. H, Hex; N, HexNAc; F, Fuc; grüner Kreis, Man; blaues Quadrat, GlcNAc; blauer Kreis, Glc; rotes Dreieck, Fuc; \*, nicht identifizierte Strukturen; #, Kaliumaddukte.

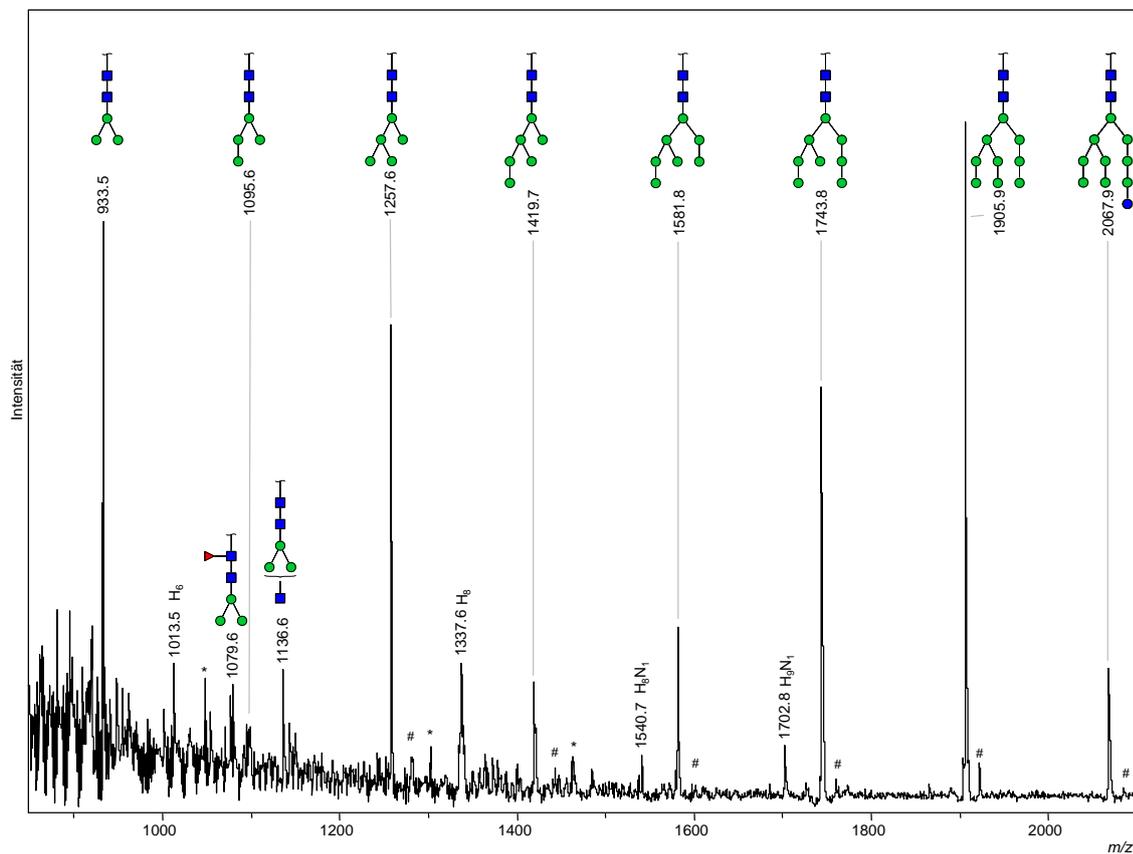
Das N-Glykanprofil der *lit-1* Mutante spiegelte vor allem mannosereiche Spezies ( $\text{Hex}_{5-10}\text{HexNAc}_2$ ) wider (Abbildung 3.5). Im Gegensatz zur *glp-1* Mutante war dabei das  $\text{Hex}_9\text{HexNAc}_2$  Signal ( $m/z$  1905,6) vergleichbar mit dem der paucimannosidischen  $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2$  Glykane und deutlich intensiver als das von  $\text{Hex}_5\text{HexNAc}_2$  Spezies. Fucosylierte mannosereiche und paucimannosidische Ketten kamen bei *lit-1* ebenso wie einzelne paucimannosidische ( $\text{Hex}_4\text{HexNAc}_2$ ) und hybride ( $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_3$ ) Glykantypen dagegen in deutlich geringerer Menge vor. Interessanterweise waren nur bei dieser Mutante im komplexen Glykanbereich neben  $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_4$  Spezies auch Phosphorylcholin (PC)-modifizierte Zuckerketten ( $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_{3-4}\text{PC}$ ) nachweisbar (Tabelle 3.1). Damit zeigte auch die *lit-1* Mutante in ihrem Glykanspektrum vornehmlich unprozessierte N-Glykane und nur wenige hybride bzw. komplexe Strukturtypen, wobei sich das N-Glykanmuster jedoch von dem der Mutante *glp-1* unterschied.

### 3.5.3 *C. elegans* Mutanten *t1099* und *cib-1*

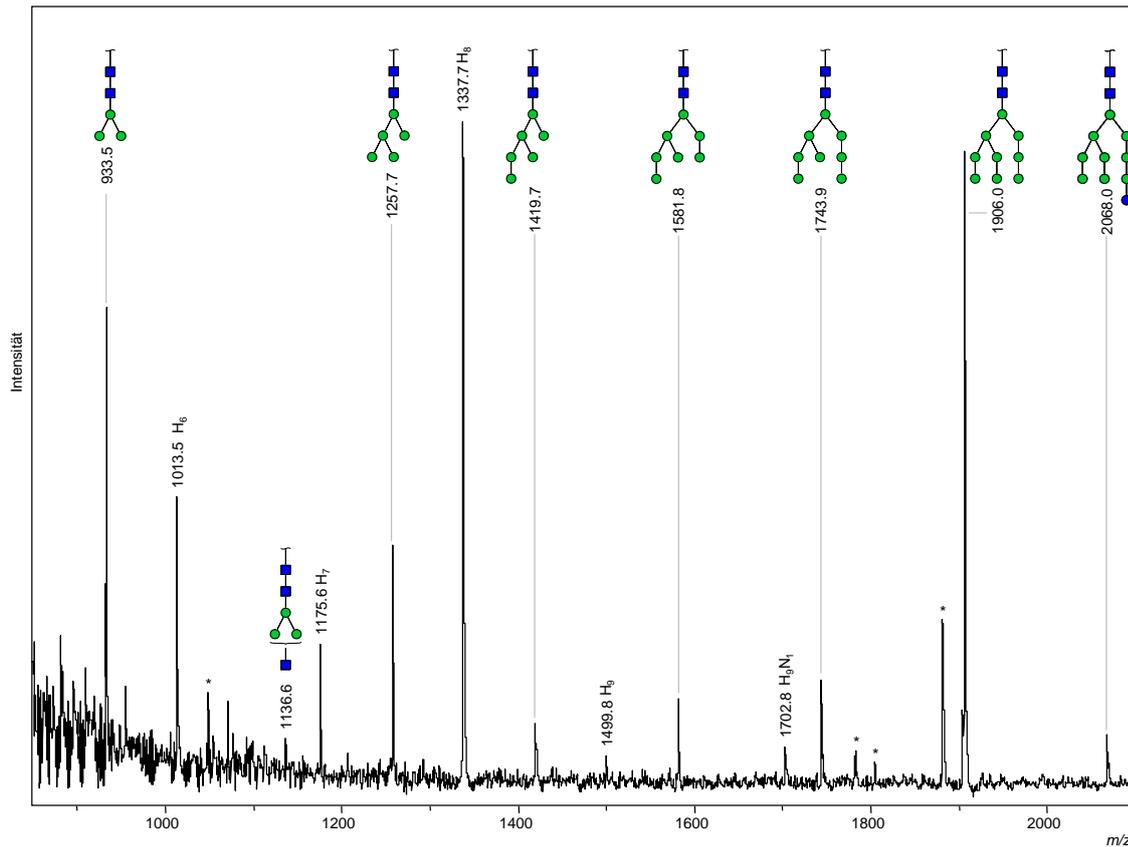
Die Mutante mit der Kurzbezeichnung *t1099* wurde bisher noch nicht veröffentlicht. Sie zeigt in ihrer Entwicklung eine bisher noch nicht näher verstandene Arretierung im 50-100 Zellstadium und nur eine gering ausgeprägte Differenzierung der Zellen (Schnabel et al, unpubliziert). Auch die Mutante *cib-1* (*e2300*) (*changed identity of blastomeres*) zeichnet sich durch eine Arretierung im 50-80 Zellstadium und eine geringe Differenzierung der Zellen in spezifische Gewebe aus (Schnabel und Schnabel 1990). Deshalb werden die beiden Mutanten hier gemeinsam besprochen. Für die nachfolgende Analyse wurden jeweils drei unabhängige Proben eingesetzt.

Wie aus Tabelle 3.1 und den Abbildungen 3.6 (*t1099*) und 3.7 (*cib-1*) ersichtlich, wurden auch bei diesen beiden Mutanten überwiegend mannosereiche Glykane mit Dominanz von  $\text{Hex}_5\text{HexNAc}_2$  und  $\text{Hex}_9\text{HexNAc}_2$  Spezies sowie paucimannosidische Ketten der Zusammensetzung  $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2$  und hybride Glykane der Zusammensetzung  $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_3$  gefunden. Während bei der *t1099* Mutante daneben auch methylierte, fucosylierte mannosereiche ( $\text{Hex}_{6-8}\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1\text{Me}_1$ ) und hybride Glykane ( $\text{Hex}_{3-4}\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_{0-1}$ ) nachgewiesen werden konnten, war dies bei *cib-1* nicht mehr möglich. Da die Signale der *O*-methylierten Zucker von unmittelbar

benachbarten Signalen höherer Intensitäten teilweise überlagert wurden, war eine Abgrenzung nicht immer mit Sicherheit zu erzielen. Insgesamt spiegelten die N-Glykanmuster dieser beiden Mutanten jedoch nur einen sehr gering ausgeprägten Prozessierungsgrad wider, wobei insbesondere die Prozessierung bei *cib-1* offensichtlich drastisch reduziert war.



**Abbildung 3.6:** MALDI-TOF-MS N-Glykanprofile von *C. elegans* Embryonen der Mutante *t1099*. Es wurden jeweils Natriumaddukte  $[M+Na]^+$  registriert. In den hier exemplarisch gezeigten Spektren sind nicht alle Signale, die im Text besprochen werden, erkennbar bzw. annotiert. Eine vollständige Auflistung der insgesamt nachgewiesenen Glykane findet sich in Tabelle 3.1. H, Hex; N, HexNAc; grüner Kreis, Man; blaues Quadrat, GlcNAc; blauer Kreis, Glc; rotes Dreieck, Fuc; \*, nicht identifizierte Strukturen; #, Kaliumaddukte.



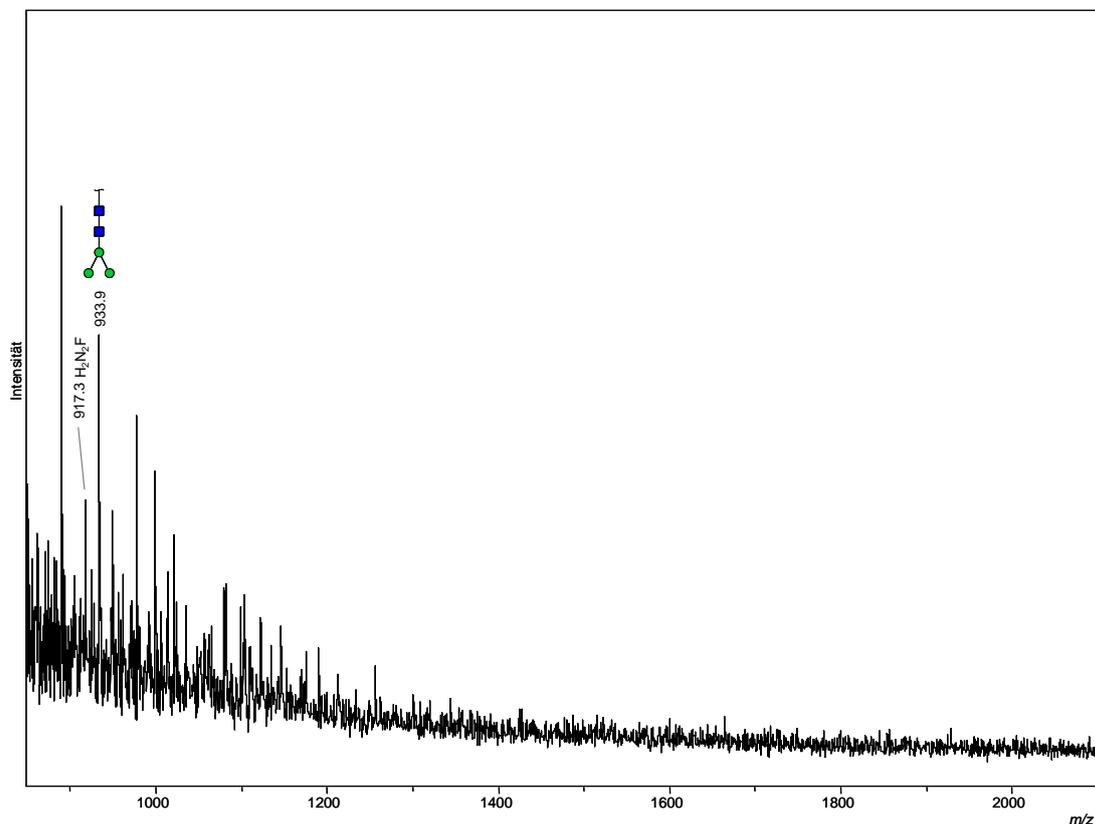
**Abbildung 3.7:** MALDI-TOF-MS N-Glykanprofile von *C. elegans* Embryonen der Mutante *cib-1*. Es wurden jeweils Natriumaddukte  $[M+Na]^+$  registriert. In den hier exemplarisch gezeigten Spektren sind nicht alle Signale, die im Text besprochen werden, erkennbar bzw. annotiert. Eine vollständige Auflistung der insgesamt nachgewiesenen Glykane findet sich in Tabelle 3.1. H, Hex; N, HexNAc; grüner Kreis, Man; blaues Quadrat, GlcNAc; blauer Kreis, Glc; \*, nicht identifizierte Strukturen.

### 3.5.4 *C. elegans* Mutante *sud-1*

Die Mutante *sud-1* (*supernumerary cell divisions*) zeigt in der Zellproliferation eine „onkogene“ übermäßige Teilung der meisten embryonalen Zellen. Eine terminale Differenzierung der Zellen bleibt dagegen in ca. 80% der Fälle aus. Auch fehlt bei dieser Mutante die für *C. elegans* spezifische Zellmigration einzelner Zellen während der Embryogenese (Müller 2007). Die Anzucht dieser Mutante ist sehr schwierig und kann nicht in größeren Ansätzen erfolgen. Die für die Untersuchung gewonnenen Eier wurden deshalb einzeln unter dem Mikroskop abgeerntet. Von dieser Mutante lag nur eine Probe vor. Aufgrund der geringen Probenmenge wurde hier auch auf eine

Proteinbestimmung verzichtet. Alle weiteren Aufarbeitungsschritte wurden wie oben angegeben durchgeführt.

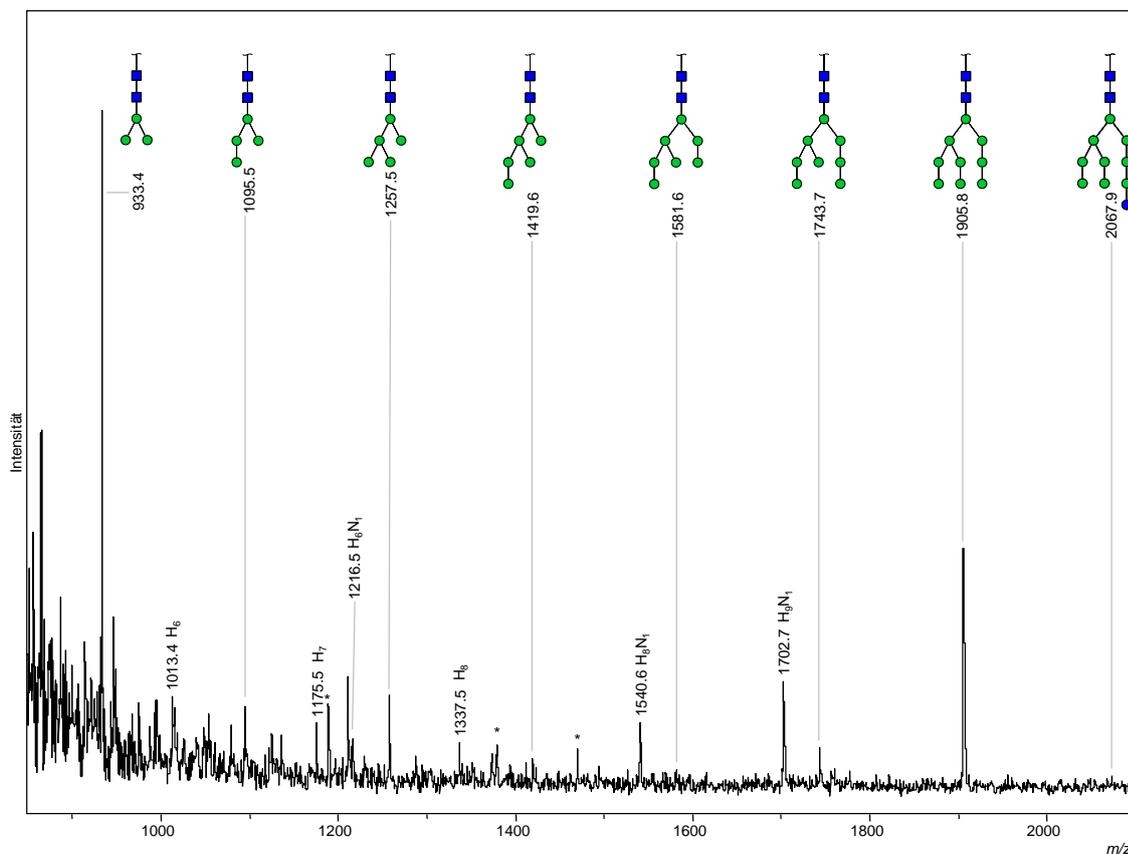
Die Massenspektren der *sud-1* N-Glykanprobe zeigten sich inhomogen, wobei nur zwei Signale reproduzierbar N-Glykanen zuordenbar waren (Abbildung 3.8). Dies trifft für die paucimannosidische Species  $\text{Hex}_3\text{HexNAC}_2$  ( $m/z$  933,9) und ein Signal bei  $m/z$  917,5 zu, das die Anwesenheit von Glykanen der Zusammensetzung  $\text{Hex}_2\text{HexNAC}_2\text{Fuc}_1$  indiziert. Das restliche Massenspektrum zeigte einige Signale gleicher Intensität, oft mit einem Massenabstand von 44 Da. Eine eingehende Charakterisierung dieser Molekülspezies mittels MALDI-TOF-MS/MS scheiterte jedoch an zu geringen Signalintensitäten.



**Abbildung 3.8:** MALDI-TOF-MS N-Glykanprofile von *C. elegans* Embryonen der Mutante *sud-1*. Es wurden jeweils Natriumaddukte  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  registriert. Eine vollständige Auflistung der insgesamt nachgewiesenen Glykane findet sich in Tabelle 3.1. H, Hex; N, HexNAC; F, Fuc; grüner Kreis, Man; blaues Quadrat, GlcNAc.

### 3.5.5 *C. elegans* Mutante *t3091*

Für die Mutante *t3091* gibt es derzeit noch keine ausreichenden Informationen bezüglich des genauen Gendefektes. Bekannt ist lediglich, dass sich die Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt der Embryonalentwicklung bei ihrer Wanderung durch die Zellansammlung verirren. Es wird ein Fehler in der Positionsbestimmung der Zellen vermutet (Hintze 2006). Auch von diesen Embryonen lag nur eine Probe zur Analyse vor.



**Abbildung 3.9:** MALDI-TOF-MS N-Glykanprofile von *C. elegans* Embryonen der Mutante *t3091*. Es wurden jeweils Natriumaddukte  $[M+Na]^+$  registriert. In den hier exemplarisch gezeigten Spektren sind nicht alle Signale, die im Text besprochen werden, erkennbar bzw. annotiert. Eine vollständige Auflistung der insgesamt nachgewiesenen Glykane findet sich in Tabelle 3.1. H, Hex; N, HexNAc; grüner Kreis, Man; blaues Quadrat, GlcNAc; blauer Kreis, Glc; \*, nicht identifizierte Strukturen.

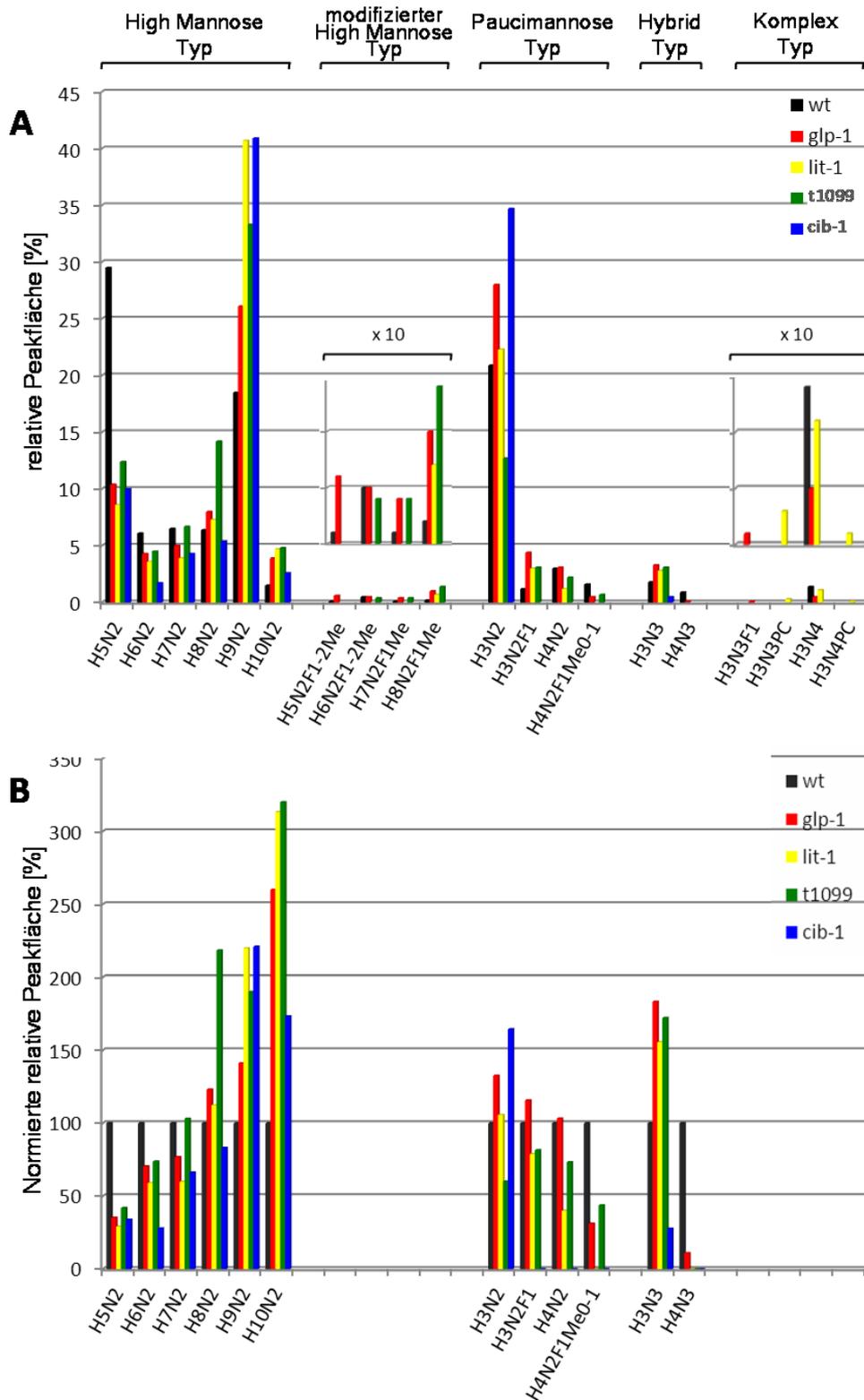
Das zunächst gewonnene Glykanspektrum wurde stark von Hexose-Oligomeren (Hex<sub>6</sub>-Hex<sub>12</sub>) mit  $m/z$ -Werten von 1013,4, 1175,5, 1337,6, 1499,6, 1661,6, 1823,6 und 1985,6 überlagert (ohne Abbildung). Erst nach *on-target* Verdau mit  $\alpha$ -Glucosidase (siehe Kapitel 2.5.2) (Geyer *et al.* 1999) waren mannosereiche (Hex<sub>5-9</sub>HexNAc<sub>2</sub>) und

paucimannosidische Glykane ( $\text{Hex}_{3-4}\text{HexNAc}_2$ ) deutlich erkennbar, wobei  $\text{Hex}_9\text{HexNAc}_2$  und  $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2$  Hauptkomponenten repräsentierten (Abbildung 3.9). Zusätzlich ließen sich reproduzierbar Signale von Glykanen der Zusammensetzung  $\text{Hex}_{5-9}\text{HexNAc}_1$  detektieren, was sich wiederum auf die bereits oben angesprochene Endo- $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidase-Aktivität im Zytosol von *C. elegans* zurückführen lässt. Fucosylierte und methylierte Glykanspecies fehlten ebenso wie Oligosaccharide vom hybriden und komplexen Typ. Die Prozessierung der N-Glykane ist offensichtlich auch bei dieser Mutante stark eingeschränkt.

### 3.6 Semiquantitative Auswertung der erhaltenen N-Glykanprofile

Um die Unterschiede zwischen den N-Glykanprofilen der Embryonen vom Wildtyp und der Mutanten besser zu verdeutlichen, wurden die jeweiligen Peakflächen quantifiziert. Dazu wurden ausgehend von fünf individuellen MALDI-TOF-MS Spektren einer jeden N-Glykan-Präparation Mittelwerte gebildet und diese entweder auf die Gesamtfläche aller Peaks des jeweiligen Spektrums (Abbildung 3.10 A) oder auf das betreffende Signal im Spektrum der Wildtypembryonen bezogen, das als 100% gesetzt wurde (Abbildung 3.10 B). Die Daten der Mutanten *sud-1* und *t3091* wurden hier nicht berücksichtigt, da in diesen Fällen jeweils nur eine Anzucht zur Verfügung stand.

Wie Abbildung 3.10 B zeigt, exprimierten alle Mutanten höhere Spiegel an  $\text{Hex}_{8-10}\text{HexNAc}_2$  und geringere Mengen an  $\text{Hex}_{5-7}\text{HexNAc}_2$  Glykanen als der Wildtyp. Die übrigen methylierten mannosereichen, paucimannosidischen, hybriden und komplexen Glykane spiegelten jedoch individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Mutanten wider. Während das N-Glykanmuster der *glp-1* Mutante dem der Wildtypembryonen im Hinblick auf fucosylierte und *O*-methylierte mannosereiche Glykane sowie paucimannosidische und komplexe Species weitgehend ähnelte, wurde das *lit-1* N-Glykanespektrum von  $\text{Hex}_9\text{HexNAc}_2$  Spezies dominiert und zeigte deutlich geringere Mengen an modifizierten mannosereichen Strukturen auf. Interessanterweise waren nur bei dieser Mutante auch geringe Mengen an PC-modifizierten Glykanen nachweisbar (Abbildung 3.10 A). Im Fall der Mutante *t1099* waren wiederum modifizierte mannosereiche Ketten, jedoch keine komplexen Glykanspecies zu finden, während die *cib-1* Mutante das am meisten eingeschränkte Glykanspektrum aufwies



**Abbildung 3.10:** Quantitative Evaluation der detektierten N-Glykane in *C. elegans* Embryonen vom Wildtyp und untersuchten Mutanten. (A) Mittlere relative Peakflächen (%) von fünf verschiedenen MALDI-TOF-MS Profilen aus verschiedenen N-Glykan Aufarbeitungen. Die Peakflächen der Signale einer Messung wurden auf 100% normiert. Die einzelnen Spezies wurden nach N-Glykan-Typen sortiert: High-Mannose Typ, modifizierter High-Mannose Typ, Paucimannose Typ, Hybrid Typ, Komplex Typ. (B) Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen N-Glykanzusammensetzungen der einzelnen Spezies wurden die Peakflächen der Wildtyp N-Glykane als Referenz gleich 100% gesetzt. H, Hex; N, HexNAc; F, Fuc; Me, Methylgruppe; PC, Phosphorylcholin. (Geyer *et al.* 2012)

und neben unmodifizierten mannosereichen Glykanen nur noch Hex<sub>3</sub>HexNac<sub>2</sub> und Spuren an Hex<sub>3</sub>HexNac<sub>3</sub> Ketten exprimierte. Mutanten, die in einem sehr frühen Stadium der Embryogenese arretiert sind, scheinen somit auch im Hinblick auf die Prozessierung ihrer N-Glykane in stärkerem Maße blockiert zu sein als diejenigen, bei denen die Embryogenese weiter voranschreitet. Dies deckt sich auch mit den in dieser Auswertung nicht aufgenommenen Daten zu den Mutanten *t3091* und *sud-1*.

### **3.7 Strukturelle Verifizierung ausgewählter N-Glykane**

Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, wurde das N-Glykom vom *C. elegans* Wildtyp sowohl von ausgewachsenen Würmern als auch einzelnen Larvenstadien bereits vielfach analysiert und die durch Massenspektrometrie ermittelten Molekülmassen der Glykane mit entsprechenden Oligosaccharidstrukturen korreliert (Paschinger *et al.* 2008). Aus diesem Grund konnte in dieser Arbeit auf eine detaillierte Strukturaufklärung der betreffenden Zuckerketten verzichtet werden. Deshalb wurden hier exemplarisch nur ausgewählte Glykane mittels MALDI-TOF-MS/MS Technik und chemischer Umsetzung näher charakterisiert.

#### **3.7.1 MALDI-TOF-MS/MS Analysen**

Um zusätzliche Strukturinformationen mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) zu gewinnen, wurden Pseudomolekülonen ausreichender Intensität selektiert und zusammen mit gleichzeitig durch Laser-Anregung gebildeten Fragmentationen in der LIFT-Zelle des MALDI-TOF-MS Geräts (2.6) nachbeschleunigt und danach detektiert. Die Analyse der registrierten Fragmentationen erlaubte dann Rückschlüsse auf die Struktur des jeweiligen Oligosaccharides. So lieferte das MS/MS-Spektrum der Glykane mit  $m/z$  1906 der Mutante *t1099* (Abbildung 3.11 A) Fragmentationen mit Abständen von 203,1 bzw. 162,1 Masseneinheiten, die jeweils dem Verlust eines *N*-Acetylglucosamin- bzw. eines Hexose-Rests zugeordnet werden konnten. Der Massenabstand von  $m/z$  221 ergab sich bei Abspaltung von *N*-Acetylglucosamin + H<sub>2</sub>O

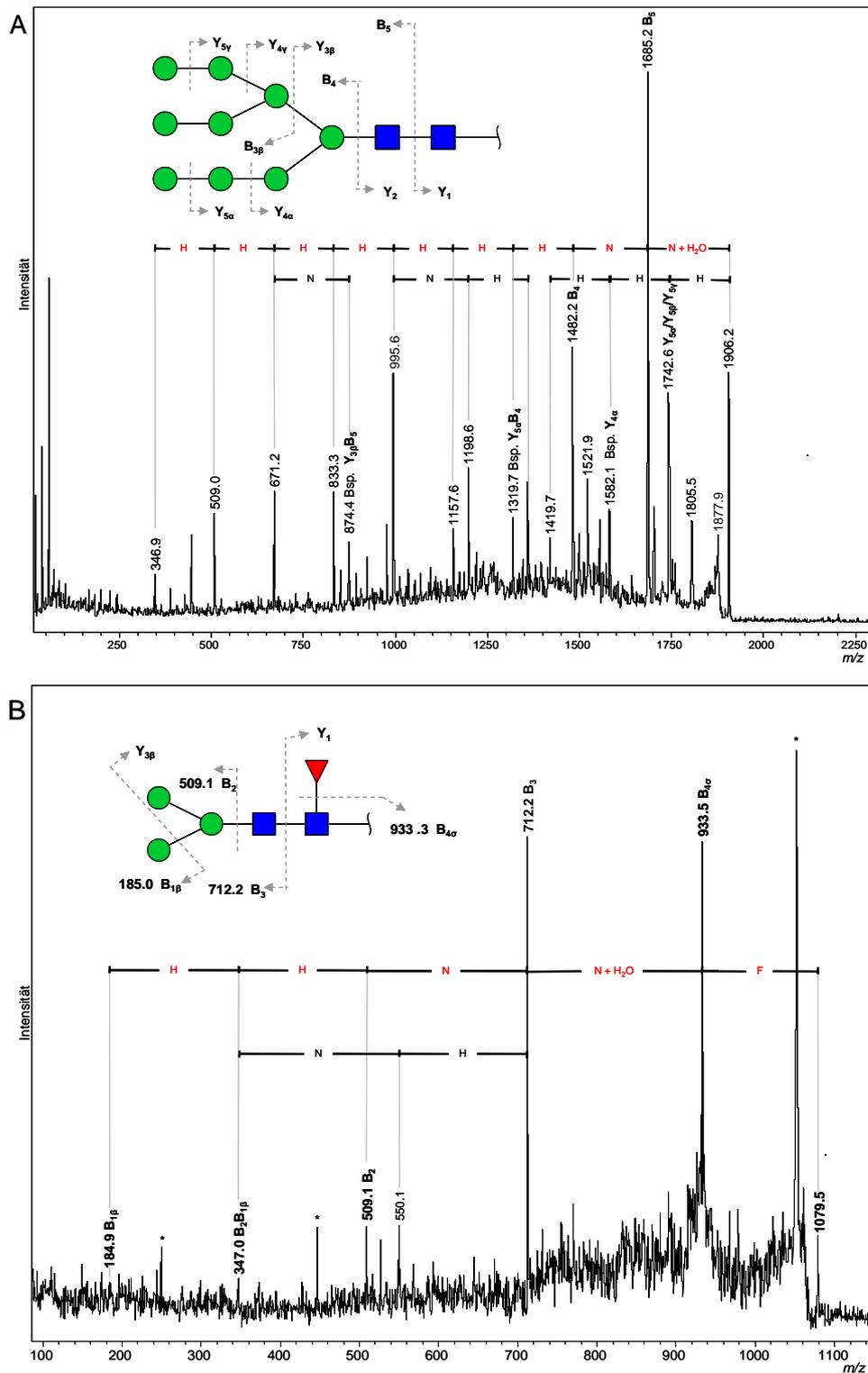


Abbildung 3.11: Beispielhafte MALDI-TOF-MS/MS Spektren des Moleküls  $m/z$  1906,2 von Embryonen der Mutante t1099 (A) und des Moleküls  $m/z$  1079,5 von Embryonen des Wildtyps (B). Die Fragmentierungionen wurden als Natriumaddukte  $[M+Na]^+$  registriert und gemäß der Nomenklatur nach Domon und Costello annotiert (Domon und Costello 1988). Beispiele für entsprechende Fragmente sind schematisch im Inset abgebildet. H, Hex; N, HexNAc; F, Fuc;  $H_2O$ , Wasser; grüner Kreis, Man; blaues Quadrat, GlcNAc; rotes Dreieck, Fuc; \*, nicht identifiziert.

( $m/z$  203,1 +  $m/z$  18). Die Nebensignale zwischen den annotierten Signalen ließen sich auf Zuckerfragmente und/oder Verunreinigungen zurückführen. Das erhaltene MS/MS-Spektrum bestätigte somit die Annahme, dass es sich bei diesem Signal um ein Glykan der Zusammensetzung Hex<sub>9</sub>HexNAC<sub>2</sub> handelte. Gleichmaßen verhielt es sich mit dem Fragmentspektrum der Glykanspecies mit Masse  $m/z$  1079 vom *C. elegans* Wildtyp, die dem N-Glykan Hex<sub>3</sub>HexNAC<sub>2</sub>Fuc<sub>1</sub> entsprach (Abbildung 3.11 B). Als Einzelbausteine konnte hier zusätzlich Fucose als Desoxyhexose anhand eines Masseninkrements von 146,1 Da identifiziert werden.

### 3.7.2 Behandlung der Glykane mit Flussäure

Eine weitere Möglichkeit, einzelne Bestandteile von Glykanen einer bestimmten Masse mittels MALDI-TOF-MS aufzuklären, ist die Behandlung mit HF (2.5.1). Hierbei kommt es zu einer chemischen Abspaltung von ( $\alpha$ 1-3)-gebundener Fucose und Phosphorylcholin (PC)-Substituenten. Mehrfach fucosylierte Strukturen sind nach HF-Behandlung ebenfalls nicht mehr nachweisbar. Lediglich ( $\alpha$ 1-6)-gebundene Fucose-Reste am inneren *N*-Acetylglucosamin sind Publikationen zufolge gegenüber HF resistent (Haslam *et al.* 2000; Poltl *et al.* 2007). Analog werden auch *O*-methylierte Fucose-Reste auf diese Weise abgespalten (Haslam und Dell 2003). Die Vorteile der HF-Behandlung sind vor allem darin zu sehen, dass die restlichen Glykane (weitgehend) intakt bleiben und bei *on-target* Durchführung nur geringe Substanzmengen benötigt werden.

Abbildung 3.12 zeigt den Vergleich zweier Massenspektren von *C. elegans* Wildtypembryonen (auf Agar angezüchtet) vor und nach HF-Behandlung. Nach der chemischen Abspaltung fehlten im Spektrum diejenigen Signale, die zuvor den fucosylierten Glykanen Hex<sub>2-8</sub>HexNAC<sub>2-4</sub>Fuc<sub>0-2</sub>Me<sub>0-2</sub> zugeordnet worden waren. Andererseits waren nach Hydrolyse die Signale der Glykane mit  $m/z$  1136,3 (Hex<sub>3</sub>HexNAC<sub>3</sub>),  $m/z$  1339,5 (Hex<sub>3</sub>HexNAC<sub>4</sub>),  $m/z$  1501,5 (Hex<sub>4</sub>HexNAC<sub>4</sub>) und  $m/z$  1542,6 (Hex<sub>3</sub>HexNAC<sub>5</sub>) deutlich intensiver. Letzteres Oligosaccharid war im Ausgangsspektrum nicht oder nur in einem Konglomerat von Signalen nachweisbar. Die Intensitätszunahme dieser Signale beruhte offenbar auf der Abspaltung von Fucose- und/oder PC-Resten, was wiederum Rückschlüsse auf die Ausgangsstrukturen erlaubte.

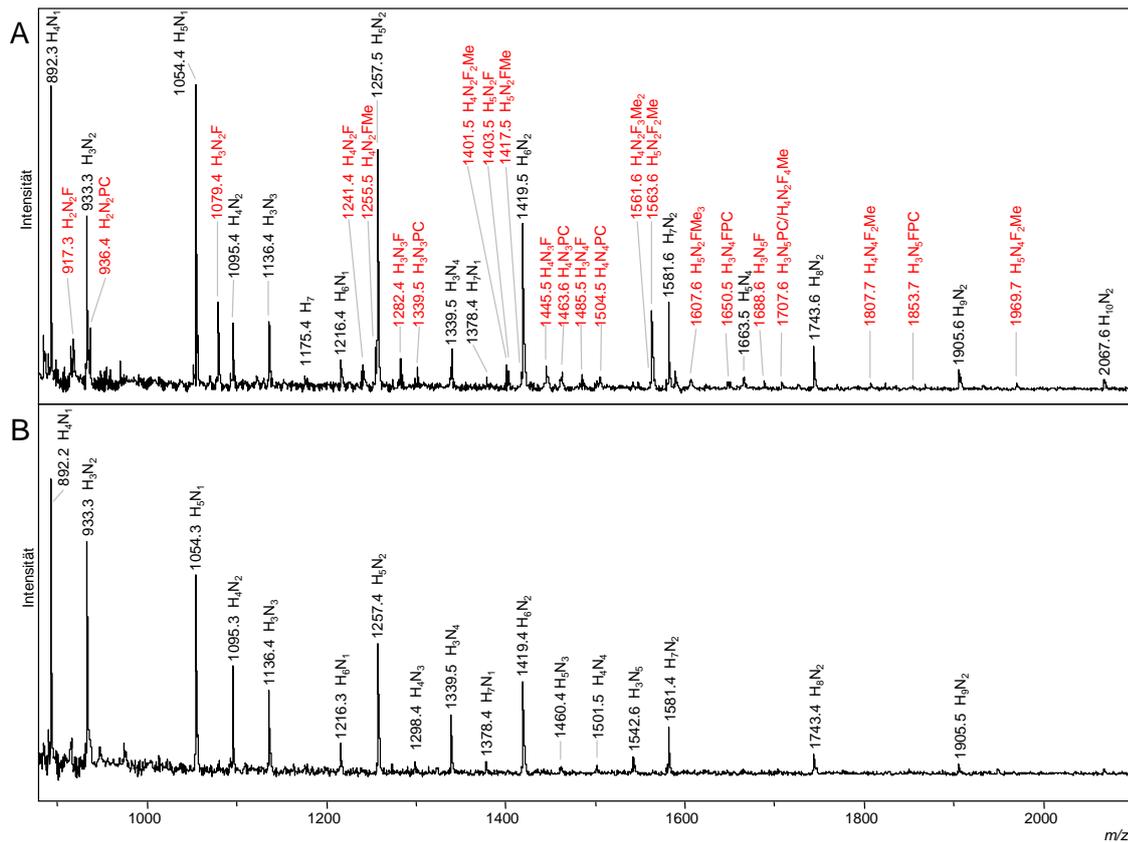


Abbildung 3.12: MALDI-TOF-MS N-Glykanprofil von *C. elegans* Embryonen des Wildtyps vor (A) und nach Behandlung mit Flußsäure (B). Rot hervorgehoben sind nach HF-Behandlung nicht mehr nachweisbare N-Glykane mit Fucosen oder Phosphorylcholinrest. Es wurden jeweils Natriumaddukte  $[M+Na]^+$  registriert. Eine vollständige Auflistung der insgesamt nachgewiesenen Glykane findet sich in Tabelle 3.1. H, Hex; N, HexNAc; F, Fuc; Me, Methylgruppe; PC, Phosphorylcholin.

Im Fall von  $Hex_3HexNAc_5$  galt dies insbesondere für die Glykane  $Hex_3HexNAc_5Fuc$  ( $m/z$  1688,6),  $Hex_3HexNAc_5PC$  ( $m/z$  1707,6) und  $Hex_3HexNAc_5FucPC$  ( $m/z$  1853,7), die nach HF-Behandlung nicht mehr detektierbar waren. Andere einfach fucosylierte N-Glykane, deren Signale im Ausgangsspektrum sehr ausgeprägt waren, waren ebenfalls nicht mehr nachweisbar wie z.B.  $Hex_3HexNAc_2Fuc$  ( $m/z$  1079,4),  $Hex_4HexNAc_2Fuc$  ( $m/z$  1241,4) und  $Hex_3HexNAc_3Fuc$  ( $m/z$  1282,4). Bezüglich methylierter Fucose-Reste war eine Aussage über deren Abspaltung zum Teil nur schwer zu treffen, da die entsprechenden Massensignale selbst bei Wildtypembryonen nur mit geringer Intensität vorkamen. Am Beispiel des Doppelpeaks bei  $m/z$  1561,6 und  $m/z$  1563,6, der die Species  $Hex_4HexNAc_2Fuc_3Me_2$  und  $Hex_5HexNAc_2Fuc_2Me$  repräsentierte, konnte jedoch eine Abspaltung dieser Methylzucker reproduzierbar bestätigt werden. Generell waren Glykane der Zusammensetzung  $Hex_{2-5}HexNAc_{2-4}Fuc_{1-2}Me_{0-2}$  nach HF-Behandlung nicht mehr nachweisbar. Lediglich für die beiden  $Hex_4HexNAc_2Fuc_1Me_{1-2}$  Spezies mit Molekülmassen von  $m/z$  1255,5 und

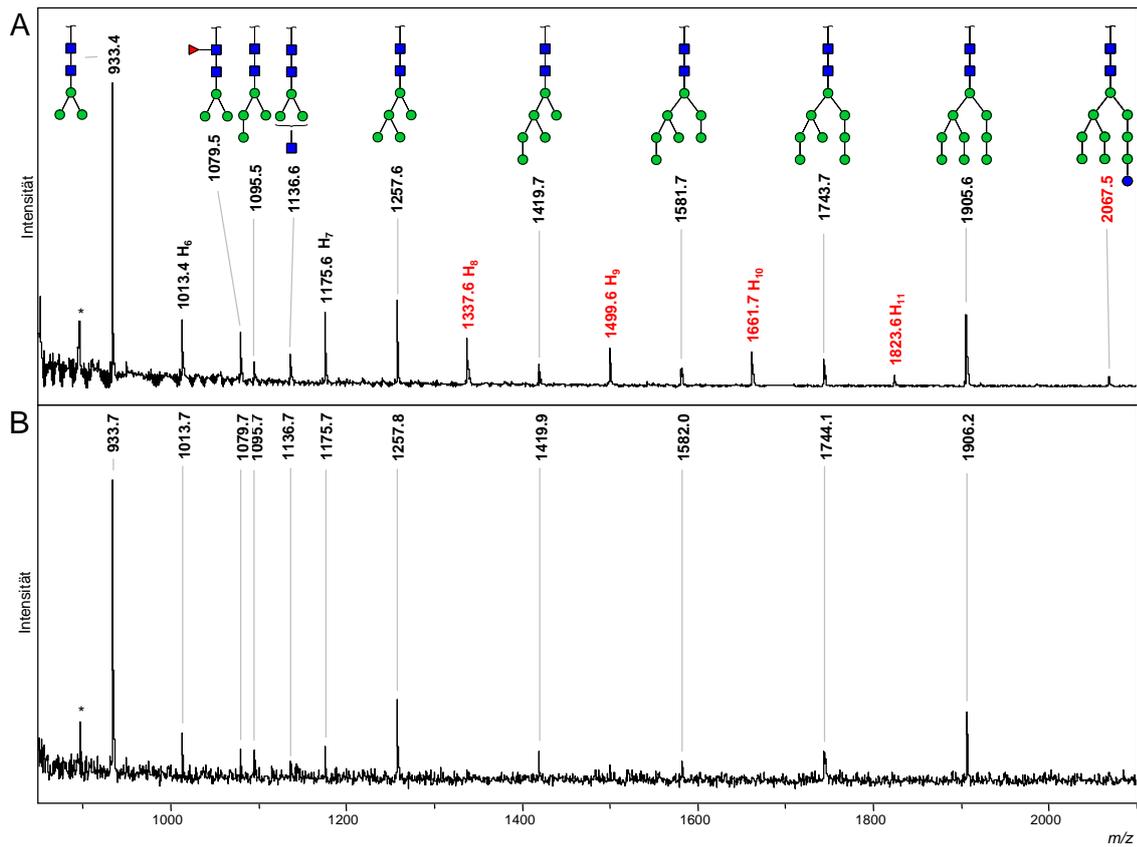
$m/z$  1417,5 ließ sich dies nicht eindeutig klären, da sie sich in unmittelbarer Nachbarschaft ( $\Delta$  2 Da) intensive Signale mannosereicher Glykane befanden (Abbildung 3.12).

Ähnlich verhielt es sich im Fall der mit Phosphorylcholin modifizierten Glykane Hex<sub>2-5</sub>HexNAC<sub>2-5</sub>Fuc<sub>0-2</sub>PC, die nach HF-Behandlung nicht mehr nachweisbar waren, was die Abspaltung von Phosphorylcholin indizierte. Besonders deutlich wurde dies bei Signalen größerer Intensitäten, wie denen von Hex<sub>2</sub>HexNAC<sub>2</sub>PC ( $m/z$  936,4) und Hex<sub>5</sub>HexNAC<sub>4</sub>Fuc<sub>2</sub>Me<sub>1</sub>PC ( $m/z$  1969,7) (Abbildung 3.12).

### 3.7.3 Verdau von Glucose-Oligomeren mit $\alpha$ -Glucosidase

In einigen Proben waren im MALDI-TOF-MS Spektrum neben N-Glykanen auch Hexose-Oligomere ( $m/z$  1013,4,  $m/z$  1175,5,  $m/z$  1337,6,  $m/z$  1499,6,  $m/z$  1661,6 und  $m/z$  1823,6) nachweisbar. Durch *on-target* Verdau mit  $\alpha$ -Glucosidase (siehe Kapitel 2.5.2) konnten letztere weitgehend eliminiert werden, was die Vermutung bestätigte, dass es sich hierbei, zumindest zum Teil, um  $\alpha$ -glykosidisch verknüpfte Glucose-Oligomere handelte (Abbildung 3.13). Die nach dem Verdau verbleibenden Peaks der genannten Massen können durch einen nicht ganz vollständigen Verdau erklärt werden. Der Verdau mit  $\alpha$ -Glucosidase führte auch zum Verschwinden des Signals von Hex<sub>10</sub>HexNAC<sub>2</sub>, da dieses Oligosaccharid einen terminalen,  $\alpha$ -glykosidisch gebundenen Glucose-Rest aufweist. Das Produkt für diesen Verdau ist Hex<sub>9</sub>HexNAC<sub>2</sub> ( $m/z$  1906,2) (Abbildung 3.13 B).

Eine weitere Verifizierung dieser Hexose-Oligomere erfolgte mittels MALDI-TOF-MS/MS (ohne Abbildung).



**Abbildung 3.13:** MALDI-TOF-MS N-Glykanprofil von *C. elegans* Embryonen des Wildtyps vor (A) und nach (B) *on-target* Verdau mit  $\alpha$ -Glucosidase. Rot hervorgehoben sind nach *on-target* Verdau mit  $\alpha$ -Glucosidase nicht mehr nachweisbare Glykane. Es wurden jeweils Natriumaddukte  $[M+Na]^+$  registriert. Eine vollständige Auflistung der insgesamt nachgewiesenen Glykane findet sich in Tabelle 3.1. H, Hex; N, HexNAc; grüner Kreis, Man; blaues Quadrat, GlcNAc; blauer Kreis, Glc; rotes Dreieck, Fuc; \*, nicht identifiziert.

**Tabelle 3.1:** Monosaccharid-Zusammensetzungen der N-Glykane von *C. elegans mixed-stage* Würmern, Embryonen und Mutanten nach enzymatischer Freisetzung. Es sind jeweils die monoisotopischen Pseudomolekülmassen  $[M+Na]^+$  aufgeführt. H, Hexose; N, *N*-Acetylhexosamin; F, Fucose; Me, *O*-Methylgruppe; PC, Phosphorylcholin. Paucimannosidische und mannosereiche Hex<sub>3-10</sub>HexNAc<sub>2</sub> Glykane sind kursiv und durch Fettdruck hervorgehoben. Die jeweiligen Glykanprofile wurden wie folgt semiquantitativ ausgewertet: (+), <1% der Gesamtfläche aller Signale; +, 1-10%; ++, >10%; +++, Hauptkomponente.

<i>m/z</i> [M+Na] <sup>+</sup>	Zusammen- setzung	Wildtyp Würmer <sup>a</sup>	Wildtyp Embryos <sup>a</sup>	Wildtyp Embryos <sup>b</sup>	Mutanten Embryonen <sup>b</sup>						
					<i>glp-1</i>	<i>lit-1</i>	<i>t-1099</i>	<i>cib</i>	<i>sud-1</i>	<i>t3091</i>	
892.4	H4N1		+								
917.3	H2N2F1	+	+ <sup>c</sup>							+	
931.3	H2N2F1Me	+									
<b>933.4</b>	<b><i>H3N2</i></b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>++</b>
936.3	H2N2PC		+ <sup>c</sup>								
1054.4	H5N1	+	+	+							
1063.4	H2N2F2	+									
1077.3	H2N2F2Me	+	(+) <sup>c</sup>								
1079.5	H3N2F1	+	+ <sup>c</sup>	+	+	+	+				
1093.4	H3N2F1Me	+	+ <sup>c</sup>								
<b>1095.5</b>	<b><i>H4N2</i></b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>				<b>+</b>
1136.5	H3N3	+	+	+	+	+	+	+			
1216.4	H6N1		+								+
1225.6	H3N2F2	+									
1239.6	H3N2F2Me	+	+ <sup>c</sup>								
1241.6	H4N2F1	+	+ <sup>c</sup>		(+)			(+)			
1255.6	H4N2F1Me	+	+ <sup>c</sup>	+							
<b>1257.6</b>	<b><i>H5N2</i></b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>+</b>	<b>++</b>	<b>++</b>			<b>+</b>
1282.6	H3N3F1	+	+ <sup>c</sup>	(+) <sup>d</sup>	(+)						
1298.5	H4N3		+	+	(+)						
1301.5	H3N3PC		+ <sup>c</sup>			(+)					
1339.6	H3N4		+	+	(+)	+					
1371.7	H3N2F3	+									
1378.5	H7N1		+								
1385.7	H3N2F3Me	+									
1387.7	H4N2F2	+									
1401.6	H4N2F2Me	+	+ <sup>c</sup>								
1403.6	H5N2F1	+	+ <sup>c</sup>		(+)						
1415.5	H4N2F2Me2	+									
1417.6	H5N2F1Me		+ <sup>c</sup>	+							
<b>1419.6</b>	<b><i>H6N2</i></b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>			<b>+</b>
1445.5	H4N3F1		+ <sup>c</sup>								
1460.6	H5N3		+								
1463.6	H4N3PC		(+) <sup>c</sup>								
1485.3	H3N4F1		+ <sup>c</sup>								
1501.6	H4N4		+ <sup>c</sup>								
1504.6	H3N4PC		+ <sup>c</sup>			(+)					

<i>m/z</i> [M+Na] <sup>+</sup>	Zusammen- setzung	Wildtyp Würmer	Wildtyp Embryos <sup>a</sup>	Wildtyp Embryos <sup>b</sup>	Mutanten Embryonen <sup>b</sup>					
					<i>glp-1</i>	<i>lit-1</i>	<i>t-1099</i>	<i>cib</i>	<i>sud-1</i>	<i>t3091</i>
1533.7	H4N2F3	+								
1540.5	H8N1					(+)	+			+
1542.6	H3N5	+	(+)							
1547.4	H4N2F3Me	+	(+) <sup>c</sup>							
1549.8	H5N2F2	+	(+) <sup>c</sup>							
1561.5	H4N2F3Me2	+	+ <sup>c</sup>							
1563.6	H5N2F2Me	+	+ <sup>c</sup>		(+)					
1579.5	H6N2F1Me		+ <sup>c</sup>	+				(+)		
<b>1581.7</b>	<b>H7N2</b>	+	+	+	+	+	+	+		+
1606.6	H5N3F1		+ <sup>c</sup>							
1607.5	H6N2F1Me3		+ <sup>c</sup>							
1625.6	H5N3PC									
1647.6	H4N4F1		+ <sup>c</sup>			(+)			+	+
1650.5	H3N4F1PC		+ <sup>c</sup>							
1663.5	H5N4		(+) <sup>e</sup>							
1688.6	H3N5F1		+ <sup>c</sup>							
1693.7	H4N2F4Me	+								
1702.6	H9N1					(+)	(+)	(+)		+
1707.7	H3N5PC / H4N2F4Me	+	+ <sup>c</sup>							
1709.3	H5N2F3Me	+								
1723.6	H5N2F3Me2	+								
1725.6	H6N2F2Me		(+) <sup>c</sup>		(+)					
1741.6	H7N2F1Me			+	(+)			(+)		+
<b>1743.7</b>	<b>H8N2</b>		+	+	+	+	++	+		+
1769.3	H4N3F2MePC		+ <sup>c</sup>							
1807.6	H4N4F2Me	+	+ <sup>c</sup>							
1853.7	H3N5F1PC	+	+ <sup>c</sup>							
1855.6	H5N2F4Me	+								
1868.6	H4N5PC		+ <sup>c</sup>							
1903.4	H8N2F1Me			+	+	(+)		(+)		
<b>1905.6</b>	<b>H9N2</b>		+	+	++	+++	+++	+++		+
1969.7	H5N4F2Me	+	+ <sup>c</sup>							
<b>2067.5</b>	<b>H10N2</b>		+	+	+	+	+	+		+

Zeichenerklärung:

<sup>a</sup>Anzucht auf Agarplatte

<sup>b</sup>Anzüchtung in Flüssigkultur

<sup>c</sup>Nach HF-Behandlung nicht mehr nachweisbar

<sup>d</sup>Nur nach Hydrazinolyse nachweisbar

<sup>e</sup>Nur nach HF-Behandlung nachweisbar

**Tabelle 3.2:** Strukturelle Klassifizierung der nachgewiesenen N-Glykane von *C. elegans mixed-stage* Würmern, Embryonen und Mutanten. Bezeichnung der Monosaccharide und semiquantitative Auswertung der Oligosaccharid-Muster wie in Tabelle 3.1.

<i>m/z</i> [M+Na] <sup>+</sup>	Zusammen- setzung	Wildtyp Würmer <sup>a</sup>	Wildtyp Embryos <sup>a</sup>	Wildtyp Embryos <sup>b</sup>	Mutanten Embryonen <sup>b</sup>					
					<i>glp-1</i>	<i>lit-1</i>	<i>t-1099</i>	<i>cib</i>	<i>sud-1</i>	<i>t3091</i>
<b>Freie Oligosaccharide</b>										
892.4	H4N1		+							
1054.4	H5N1	+	+	+						
1216.4	H6N1		+							+
1378.5	H7N1		+							
1540.5	H8N1					(+)		+		+
1702.6	H9N1					(+)		(+)	(+)	+
<b>Mannosereiche Glykane</b>										
933.4	H3N2	+	+	+	+++	++	++	++	+	++
1095.5	H4N2	+	+	+	+	+	+	+		+
1257.6	H5N2	+	+	+	++	+	++	++		+
1419.6	H6N2	+	+	+	+	+	+	+		+
1581.7	H7N2	+	+	+	+	+	+	+		+
1743.7	H8N2		+	+	+	+	++	+		+
1905.6	H9N2		+	+	++	+++	+++	+++		+
2067.5	H10N2		+	+	+	+	+	+		+
<b>Paucimannosidische Glykane</b>										
917.3	H2N2F1	+	+ <sup>c</sup>						+	
931.3	H2N2F1Me	+								
936.3	H2N2PC		+ <sup>c</sup>							
1063.4	H2N2F2	+								
1077.3	H2N2F2Me	+	(+) <sup>c</sup>							
1079.5	H3N2F1	+	+ <sup>c</sup>	+	+			+		
1093.4	H3N2F1Me	+	+ <sup>c</sup>							
1225.6	H3N2F2	+								
1239.6	H3N2F2Me	+	+ <sup>c</sup>							
1241.6	H4N2F1	+	+ <sup>c</sup>		(+)			(+)		
1255.6	H4N2F1Me	+	+ <sup>c</sup>	+						
1371.7	H3N2F3	+								
1385.7	H3N2F3Me	+								
1387.7	H4N2F2	+								
1401.6	H4N2F2Me	+	+ <sup>c</sup>							
1415.5	H4N2F2Me2	+								
1533.7	H4N2F3	+								
1547.4	H4N2F3Me	+	(+) <sup>c</sup>							
1561.5	H4N2F3Me2	+	+ <sup>c</sup>							
1693.7	H4N2F4Me	+								
1707.7	H3N5PC / H4N2F4Me	+	+ <sup>c</sup>							
<b>Modifizierte mannosereiche Glykane</b>										
1403.6	H5N2F1	+	+ <sup>c</sup>		(+)					
1417.6	H5N2F1Me		+ <sup>c</sup>	+						
1549.8	H5N2F2	+	(+) <sup>c</sup>							
1563.6	H5N2F2Me	+	+ <sup>c</sup>		(+)					
1579.5	H6N2F1Me		+ <sup>c</sup>	+				(+)		
1607.5	H6N2F1Me3		+ <sup>c</sup>							
1709.3	H5N2F3Me	+								
1723.6	H5N2F3Me2	+								
1725.6	H6N2F2Me		(+) <sup>c</sup>		(+)					
1741.6	H7N2F1Me			+	(+)			(+)		+
1855.6	H5N2F4Me	+								
1903.4	H8N2F1Me			+	+	(+)		(+)		

<i>m/z</i> [M+Na] <sup>+</sup>	Zusammen- setzung	Mixed st. Würmer	Wildtyp Embryos <sup>a</sup>	Wildtyp Embryos <sup>b</sup>	Mutanten Embryonen						
					<i>glp-1</i>	<i>lit-1</i>	<i>t-1099</i>	<i>cib</i>	<i>sud-1</i>	<i>t3091</i>	
<b>Hybride Glykane</b>											
1298.5	H4N3		+	+	(+)						
1445.5	H4N3F1		+ <sup>c</sup>								
1460.6	H5N3		+								
1463.6	H4N3PC		(+) <sup>c</sup>								
1501.6	H4N4		+ <sup>c</sup>								
1606.6	H5N3F1		+ <sup>c</sup>								
1625.6	H5N3PC										
1647.6	H4N4F1		+ <sup>c</sup>			(+)			+		+
1663.5	H5N4		(+) <sup>e</sup>								
1769.3	H4N3F2MePC		+ <sup>c</sup>								
1807.6	H4N4F2Me	+	+ <sup>c</sup>								
1868.6	H4N5PC		+ <sup>c</sup>								
1969.7	H5N4F2Me	+	+ <sup>c</sup>								
<b>Glykane vom komplexen Typ</b>											
1136.5	H3N3	+	+	+	+	+	+	+	+		
1282.6	H3N3F1	+	+ <sup>c</sup>	(+) <sup>d</sup>	(+)						
1301.5	H3N3PC		+ <sup>c</sup>				(+)				
1339.6	H3N4		+	+	(+)		+				
1485.3	H3N4F1		+ <sup>c</sup>								
1504.6	H3N4PC		+ <sup>c</sup>					(+)			
1542.6	H3N5	+	(+)								
1650.5	H3N4F1PC		+ <sup>c</sup>								
1688.6	H3N5F1		+ <sup>c</sup>								
1707.7	H3N5PC / H4N2F4Me	+	+ <sup>c</sup>								
1853.7	H3N5F1PC	+	+ <sup>c</sup>								

Zeichenerklärung:

<sup>a</sup>Anzucht auf Agarplatte

<sup>b</sup>Anzüchtung in Flüssigkultur

<sup>c</sup>Nach HF-Behandlung nicht mehr nachweisbar

<sup>d</sup>Nur nach Hydrazinolyse nachweisbar

<sup>e</sup>Nur nach HF-Behandlung nachweisbar

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über das N-Glykosylierungsprofil von *C. elegans* in embryonalen Entwicklungsstadien zu gewinnen. Die Entwicklung dieses Nematoden ist vom Einzellstadium bis zur schlüpfenden Larve in allen Zelllinien bekannt und wird darüber hinaus als invariant beschrieben. Ein besonderer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag deshalb auf der Untersuchung von speziellen Mutanten, deren Entwicklung in verschiedenen Stadien arretiert (*cib-1* und *t1099*) bzw. durch das Fehlen bestimmter Zelllinien charakterisiert ist (*glp-1* und *lit-1*), eine onkogene Zellteilung zeigt (*sud-1*) oder eine abnorme Zellwanderung aufweist (*t3091*). Damit fehlen Embryonen dieser Mutanten bestimmte Organsysteme oder Gewebearten, während in anderen die Zellteilung oder Zellwanderung direkt gestört ist. Die Frage, inwieweit durch Charakterisierung der N-Glykane eine mögliche Rolle dieser Kohlenhydrate während der Embryogenese und insbesondere im Hinblick auf Zell/Zell-Interaktionen während der Zellwanderungen durch den Embryo aufgezeigt werden kann, war Gegenstand dieser Untersuchung, da Glykosylierungsdefekte in anderen biologischen Systemen bereits mehrfach als Ursache für die Entstehung von Krankheiten beschrieben wurden (siehe Kapitel 1.1).

### 4.1 Methodische Aspekte

Die Kohlenhydratanalytik bietet ein breites Spektrum an Methoden zu Freisetzung und Detektion von N-Glykanen. Da für dieses Projekt jeweils nur wenig Probenmaterial zur Verfügung stand, mussten die einzelnen Arbeitsschritte zur Gewinnung und Reinigung der N-Glykane optimiert werden. Dabei sollten möglichst wenige Arbeitsschritte Anwendung finden, weil bei jedem Zwischenschritt wertvolles Material verloren ging. Zur Abspaltung der N-Glykane vom Peptidrückgrat wurden deshalb zunächst zwei verschiedene Methoden gegenübergestellt: Die enzymatische Freisetzung mittels PNGase A und PNGase F und die chemische Abspaltung durch Hydrazinolyse. Bei letzterem Verfahren ist danach jedoch eine Re-N-Acetylierung der Zucker notwendig, die zusammen mit der Hydrazinolyse selbst zur Bildung von Artefakten führte (siehe

Kapitel 3.2 und Abbildung 3.1). Somit stellte diese Methode keine Alternative zur enzymatischen Freisetzung der Zuckerketten dar.

Als noch problematischer stellte sich die Aufreinigung der Oligosaccharide durch Festphasenextraktion heraus. Wie in Kapitel 3.1 ausgeführt, banden die Glykane nur relativ schwach an das PGC-Festphasenmaterial, so dass sich unterschiedlich große Anteile auch in der Waschfraktion wiederfanden. Die letztlich für die Aufreinigung der Proben verwendeten RP- und PGC-Kartuschen lieferten gegenüber anderen getesteten Festphasenextraktionsmaterialien zwar den höchsten Anteil an Glykanen in der Endprobe, dennoch war auch hier ein vergleichsweise hoher Verlust an Oligosacchariden zu verzeichnen. Derzeit gibt es noch keine Aufreinigungsprotokolle, die selektiv auf Zucker abgestimmt sind. Diese wären für die hier bearbeitete Fragestellung ohne Zweifel sehr hilfreich gewesen.

Darüber hinaus wiesen die Massenspektren einiger Proben mehrere Signale auf, die sich jeweils um das Masseninkrement einer Hexose unterschieden ( $\text{Hex}_{3-11}$ ) und durch Verdau mit  $\alpha$ -Glucosidase, zumindest zum Teil, degradiert werden konnten. Nach Verdau dieser Hexose-Oligomere wurden MALDI-TOF-MS Spektren erhalten, die zum Teil eine größere Signalheterogenität aufwiesen als die Ausgangsspektren. Möglicherweise beeinflussen diese Hexose-Oligomere die Ionisation insbesondere langkettiger N-Glykane und damit deren massenspektrometrischen Nachweis (siehe Abbildung 3.13).

## **4.2 N-Glykanprofil von *C. elegans* Wildtyp im Vergleich zu Embryonen bei Verwendung verschiedener Kultivierungsbedingungen**

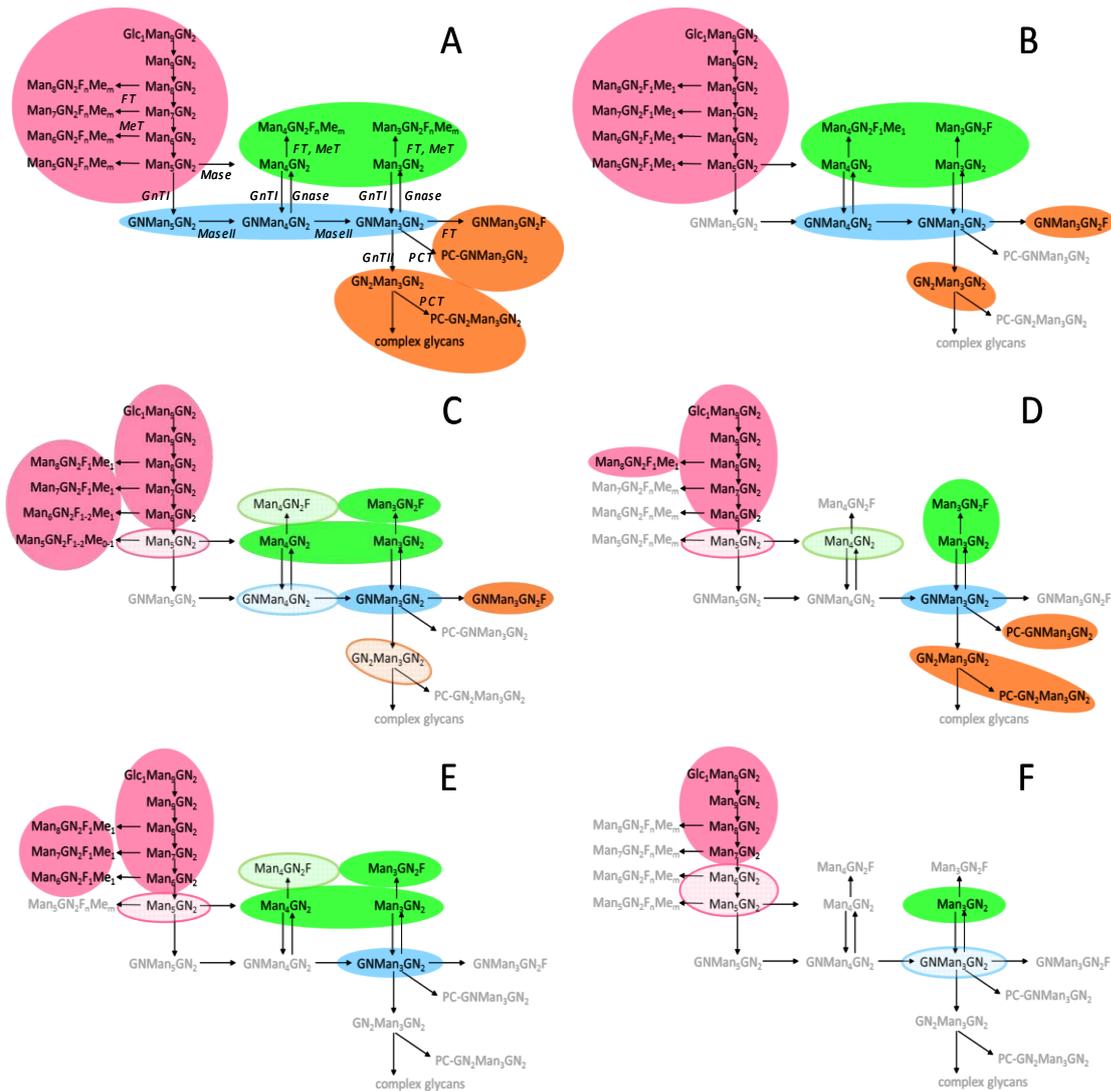
Der N2-Wildtyp von *C. elegans* ist als einfach zu propagierender Modellorganismus etabliert. Sein N-Glykom ist hinreichend und als stadienspezifisch beschrieben (Altmann *et al.* 2001; Cipollo *et al.* 2002; Natsuka *et al.* 2002; Haslam und Dell 2003; Schachter 2004; Cipollo *et al.* 2005; Hanneman *et al.* 2006; Schachter 2007; Paschinger *et al.* 2008; Schachter 2009). Generell zeigt es eine höhere Prozessierung der Glykane mit zunehmender Entwicklung von der Larve 1 (L1) bis zum adulten Wurm. Die publizierten Strukturen konnten in den hier beschriebenen Experimenten an einer

*mixed-stage* N2-Probe, die alle Stadien von L1 bis zum Wurm enthielt, weitgehend nachvollzogen werden.

Die massenspektrometrische Analyse der N-Glykanprofile von Embryonen des Wildtyps zeigte ebenfalls die für Larven und Wurm beschriebenen fucosylierten und partiell *O*-methylierten Glykane der Zusammensetzung  $\text{Hex}_{2-8}\text{HexNAC}_{2-5}\text{Fuc}_{0-3}\text{Me}_{0-3}$ . Daneben wurden auch Phosphorylcholin (PC)-modifizierte Oligosaccharide nachgewiesen ( $\text{Hex}_{2-5}\text{HexNAC}_{2-5}\text{Fuc}_{0-2}\text{Me}_{0-1}\text{PC}$ ). Hauptkomponenten repräsentierten Strukturen vom mannosereichen Typ mit einer Präferenz der für die weitere Prozessierung wichtigen Kernstruktur  $\text{Hex}_5\text{HexNAC}_2$ , während Glykane mit steigender Anzahl an Hexosen ( $\text{Hex}_{6-10}\text{HexNAC}_2$ ) mit geringerer Intensität detektiert wurden. Im Biosyntheschema (Abb 4.1 A) wird deutlich, dass in Embryonen vom Wildtyp bereits alle wesentlichen Glykosylierungsschritte durchgeführt werden. Es müssen also im Ei bereits alle erforderlichen Prozessierungsenzyme vorhanden sein. Im Vergleich zum Glykosylierungsmuster von *mixed-stage* Würmern, die keine so deutliche Präferenz unmodifizierter, mannosereicher Strukturtypen zeigten, wird deutlich, dass sich die Prozessierung der Glykane in Embryonen jedoch noch in einem Frühstadium befindet. Allerdings beschreiben bisherige Publikationen auch für den adulten Wurm vielfach eine Dominanz mannosereicher Glykane (Altmann *et al.* 2001; Haslam und Dell 2003; Cipollo *et al.* 2004a; Hanneman *et al.* 2006). Generell ist zu bedenken, dass die untersuchten Proben von *C. elegans* Embryonen alle Stadien der Embryonalentwicklung beinhalteten. Möglicherweise sind bei einem entstehenden Organismus mit hoher Zellteilungsrate und gesteigertem Stoffwechselumsatz Glykosylierungsvorstufen in größeren Mengen zu erwarten als bei den verwendeten *mixed-stage* Würmern, die nur wenige Larven mit hoher Stoffwechselrate und deshalb überwiegend höherprozessierte Glykane aufwiesen.

In zweiter Instanz fallen als Zwischenprodukte der Glykanprozessierung hybride und komplexe Strukturen ( $\text{Hex}_{3-5}\text{HexNAC}_{3-5}$ ) sowie partiell modifizierte paucimannosidische Glykane ( $\text{Hex}_{3-4}\text{HexNAC}_2$ ) auf (Abbildung 4.1 A). Insbesondere Signale für  $\text{Hex}_3\text{HexNAC}_2$ ,  $\text{Hex}_3\text{HexNAC}_3$  und  $\text{Hex}_3\text{HexNAC}_4$  zeigten hier höhere Intensitäten, was wiederum auf eine erhöhte Stoffwechselrate während der Embryonalentwicklung hindeuten könnte.

Neben den beschriebenen Oligosacchariden wurden in den Embryonen auch N-Glykane mit nur einem *N*-Acetylglucosamin-Rest ( $\text{Hex}_{4-7}\text{HexNAC}_1$ ) gefunden, während in *mixed-stage* Würmern nur  $\text{Hex}_5\text{HexNAC}_1$  nachweisbar war. Diese, durch den regulären



**Abbildung 4.1:** Schematischer Biosyntheseweg von N-Glykanen in *C. elegans* Wildtyp Embryonen aus Agar-Platten Kultur (A). Aufgrund der detektierten Strukturen angenommene Synthesewege in Wildtyp Embryonen aus einer Flüssigmedium-Kultur (B) und den Mutanten *glp-1* (C), *lit-1* (D), *t1099* (E) und *cib-1* (F). Rosa und grün unterlegt, mannoseiche Glykane und paucimannosidische Glykane; blau hinterlegt, Glykane vom Hybrid-Typ; orange hinterlegt, Komplex-Typ N-Glykane. Glykan-Spezies, deren MS-Signale im Vergleich zu Wildtyp Embryonen aus Flüssigkultur weniger als 50% betragen, sind in der entsprechenden Farbe schattiert dargestellt und solche, die nicht nachweisbar waren, sind grau markiert. Vergleiche Tabelle 3.2. (Schachter 2007; Geyer *et al.* 2012). F, Fuc; Me, O-Methyl; Glc, Glucose; Man, Mannose; GN, HexNAc; FT, Fucosyltransferase; GnT I und II, N-Acetylglucosamin-Transferase I und II; Gnase,  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase; Mase, GnT I unabhängige  $\alpha$ -Mannosidase; Mase II,  $\alpha$ -Mannosidase II; MeT, Methyltransferase; PCT, Phosphorylcholintransferase.

Prozessierungsweg nicht zu erklärenden Moleküle weisen ebenfalls auf eine hohe Stoffwechselrate hin. Sie können im Fall von Glykoproteinen durch eine Endo- $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase-Aktivität gebildet werden, die im Zytosol von *C. elegans* bereits nachgewiesen wurde (Kato *et al.* 2007). Insbesondere bei aktiver Stoffwechsellage mit einer hohen Produktion an Glykoproteinen fallen auch fehlerhaft produzierte oder falsch

gefaltete Glykoproteine an, die dann durch enzymatischen Abbau wieder eliminiert werden müssen. Diese Abfallprodukte des Stoffwechsels werden noch vor der Überführung in den Golgi-Apparat aktiv aus dem Endoplasmatischen Retikulum entfernt. Freisetzung und Abbau der freien Oligosacchariden kann dann sowohl im Endoplasmatischen Retikulum als auch im Zytosol stattfinden (Cacan und Verbert 2000; Chantret und Moore 2008). Im Fall von *C. elegans* wurde berichtet, dass 94% der freien Oligosaccharide im Zytosol aus Glykanen mit nur einem *N*-Acetylglucosamin-Rest bestehen (Kato *et al.* 2007). Versuche mit *S. cerevisiae* zeigten weiterhin die vermehrte Bildung derartiger freier Oligosaccharide bei einem forcierten Wachstum der Zellen (Chantret *et al.* 2011). Die Frage, ob auch die Glykane der Zusammensetzung  $\text{Hex}_2\text{HexNAC}_2\text{Fuc}_{0-2}\text{Me}_{0-1}\text{PC}_{0-1}$  (siehe Tabelle 3.1) auf diese Endo- $\beta$ -*N*-Acetylhexosaminidase-Aktivität zurückzuführen sind, kann derzeit nicht beantwortet werden. Aus Übersichtgründen wurden sie hier dem paucimannosidischen Strukturtyp zugerechnet (Tabelle 3.2). Insgesamt ist zu vermuten, dass die Dominanz mannosereicher und hybrider Strukturen sowie die gesteigerte Präsenz freier Oligosaccharide bei *C. elegans* Embryonen möglicherweise auf die hohe Stoffwechselrate des in der Entstehung befindlichen Organismus zurückzuführen ist. Interessanterweise konnten parallel auch deutliche Unterschiede in den *N*-Glykanprofilen von *C. elegans* Embryonen aus Flüssigkultur im Vergleich zur Anzucht auf Agar-Platten festgestellt werden. Zum einen konnten insgesamt deutlich weniger komplexe Glykane, zum anderen auch nur wenige fucosylierte und methylierte Zuckerketten nachgewiesen werden. Modifizierte mannosereiche Glykane ( $\text{Hex}_{4-8}\text{HexNAC}_2\text{Fuc}_1\text{Me}_1$ ) waren zwar in kleinen Signalen nachweisbar, aufgrund des geringen Massenunterschieds von 2 Da jedoch nicht immer sicher von den benachbarten hohen Signalen der unmodifizierten mannosereichen Spezies abzugrenzen. Lediglich zwei fucosylierte Oligosaccharide ( $\text{Hex}_3\text{HexNAC}_{2-3}\text{Fuc}_1$ ) und einige hybride bzw. komplexe Strukturen ( $\text{Hex}_{3-4}\text{HexNAC}_{3-4}$ ) indizierten eine beginnende Glykanprozessierung.

Insgesamt stellt sich die Frage, warum die Glykane bei Anzucht von *C. elegans* in Flüssigmedium weniger prozessiert werden. Untersuchungen von N. Memar und R. Schnabel liefern hier möglicherweise Hinweise auf eine Erklärung. Die Bewegungsfähigkeit von *C. elegans* auf Agar-Platten durch „krabbeln“ hängt in erster Linie von der Glykosylierung der hypodermalen Falz-Zellen (*seam cells*) ab (R. Schnabel unpubliziert). Eine ausreichende Ernährung ist demnach auf Agar-Platten

nur für „gute Krabbler“ gewährleistet. Für einen in Flüssigmedium schwimmenden Wurm mit ubiquitärem Nahrungsangebot ist die Glykosylierung der *seam cells*, zumindest im frühen Larvenstadium, weniger essentiell. Dies würde voraussetzen, dass *C. elegans* Embryonen bereits im Ei Kenntnis ihrer Umgebung und der notwendigen Voraussetzungen zum Überleben haben. Die zumindest theoretische Möglichkeit, dass nach Anzucht der Embryonen in Flüssigmedium Begleitsubstanzen mit angereichert werden, die dann die Ionisierungseffizienz einzelner Glykane bei der Massenspektrometrie beeinträchtigen könnten, ist jedoch ebenfalls in Betracht zu ziehen.

### 4.3 Vergleich der N-Glykanprofile der Mutanten

Neben der erstmaligen Erstellung von N-Glykanprofilen von *C. elegans* Embryonen bestand der zweite Teil dieser Arbeit in der Analyse der N-Glykane von ausgewählten Mutanten. Wie bereits in den Kapiteln 3.4 und 4.2 beschrieben, waren bei in Flüssigkultur gezüchteten *C. elegans* Embryonen deutlich weniger N-Glykane nachweisbar als bei den auf Agar-Platten angezüchteten Eiern. Leider konnten die uns überlassenen Mutanten aus technischen Gründen nur in Flüssigkultur gezogen werden, wodurch sich der Nachweis der jeweiligen Glykane schwieriger gestaltete.

Die grundlegende Idee, die zur Analyse der N-Glykane von Mutanten führte, war, dass die einzelnen Blastomere möglicherweise spezifische Glykanprofile aufweisen und so den Zellen durch Erkennen der Oberflächenglykane ihrer Nachbarzellen eine Orientierung während der Wanderung durch den Embryo ermöglichen könnten. Wie in Kapitel 3.5 ausgeführt, fehlen den Mutanten *glp-1* und *lit-1* ganze Zelllinien, teilweise mutieren einzelne Zellschicksale dabei zu dem ihrer Nachbarzellen. Dies könnte bedeuten, dass die Zellen ihre Nachbarzelle erkennen und sich aufgrund dieser Information weiterentwickeln. Die Mutanten *cib-1* und *t1099* arretieren im 50-100 Zellstadium, wohingegen die *sud-1* Mutante das Gegenteil, nämlich eine onkogene Zellteilung, zeigt. In der untersuchten *t3091* Mutante sind die Zellen nicht mehr zu der sonst zu beobachtenden invarianten Zellwanderung im Embryo befähigt. Insgesamt wurden damit Mutanten ausgewählt, die sich in ihren späteren Schicksalen bezüglich der Zell/Zell-Interaktion deutlich unterscheiden. Die Ausgangshypothese, dass

unterschiedliche Zelllinien unterschiedlichen Glykanprofile aufweisen, sollte sich damit verifizieren oder falsifizieren lassen. Auf die Mutante *sud-1* wird in der folgenden Diskussion der Ergebnisse gesondert eingegangen, da sie ein zu den anderen Mutanten abweichendes Glykanmuster zeigte.

Allen anderen Mutanten war gemein, dass hier mannosereiche Glykane dominierten. Dies ist insofern nicht verwunderlich, als in einem entstehenden Organismus mit hoher Zellteilungsrate der Stoffwechsel besonders aktiv ist. Da für die Tochterzellen auch viele Glykoproteine benötigt werden, ist die Vorläuferzelle möglicherweise nicht mehr in der Lage, die synthetisierten N-Glykane ausreichend zu prozessieren. Hierfür spricht, dass auch hybride und komplexe Oligosaccharide nur in untergeordnetem Maße anfielen. Dennoch zeigten die verschiedenen Mutanten sowohl untereinander als auch im Vergleich zu den N2-Wildtyp Embryonen Unterschiede auf, die insbesondere bei einzelnen mannosereichen und paucimannosidischen Strukturtypen zutage traten.

So zeigten alle Mutanten deutlich höhere Signalintensitäten bei Hex<sub>8,9</sub>HexNAc<sub>2</sub> Species im Vergleich zu Embryonen des Wildtyps, in welchen weiter prozessierte Glykane (Hex<sub>5,7</sub>HexNAc<sub>2</sub>) vorherrschten (siehe Abbildung 3.2 und 3.4 - 3.9). Somit ist zu vermuten, dass die Mutanten in ihrem Golgi-Apparat über eine niedrigere  $\alpha$ -Mannosidase 1-Aktivität (Mase) verfügen als die Embryonen des Wildtyps, während die Bildung der lipid-gebundenen Oligosaccharidvorläufer offenbar normal abläuft (Abbildung 1.5). Weiterhin sind in den Mutanten *glp-1*, *lit-1*, *cib-1* und *t1099* Aktivitäten der N-Acetylglucosaminyltransferase I (GnT I) und einer  $\beta$ -N-Acetylhexosaminidase (Gnase) vorhanden, da in allen Proben, allerdings in unterschiedlichem Ausmaß, Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>3</sub> (*m/z* 1136) und weitere hybride Glykane gebildet werden (siehe Abbildungen 3.4 - 3.7). Die Mutante *t3091* bildet diese Zuckerstrukturen nicht (siehe dazu und bezüglich des folgenden Textes Tabelle 3.1 und Abbildung 3.9). Für das Vorhandensein einer oder mehrerer Fucosyltransferase (FT)-Aktivitäten in den Mutanten *glp-1*, *lit-1* und *t1099* spricht der Nachweis fucosylierter mannosereicher Zuckerketten sowie die Struktur Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>2</sub>Fuc<sub>1</sub> (*m/z* 1079), welche weder in *t3091* noch in *cib-1* detektierbar war.

Methylierte Kohlenhydrate konnten in den Mutantenproben von *glp-1*, *lit-1* und *t1099* nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Hier sind insbesondere entsprechend modifizierte mannosereiche Species (Hex<sub>7-8</sub>HexNAc<sub>2</sub>Fuc<sub>1</sub>Me<sub>1</sub> mit *m/z* 1741,6 und *m/z* 1903,4) zu nennen. PC-substituierte Glykane (Hex<sub>3</sub>HexNAc<sub>3,4</sub>PC) wurden dagegen nur bei Mutante *lit-1* gefunden.

Die gezeigten Strukturunterschiede spiegeln offensichtlich die in den einzelnen Mutanten in unterschiedlichem Ausmaß exprimierten Enzymaktivitäten wider (Abbildung 4.1 C-F). Möglicherweise werden die jeweiligen Enzyme in diesen Mutanten (noch) nicht oder fehlerhaft produziert. Denkbar wäre auch, dass die betreffenden Kohlenhydratstrukturen und damit auch die entsprechenden Enzyme in einem früheren Entwicklungsstadium noch nicht benötigt werden, da die Mutanten *glp-1* und *lit-1* ein höheres Differenzierungsstadium erreichen als die Mutanten *t1099* und *cib-1*, welche im 50-100 Zellstadium arretieren.

Erstaunlich war, dass auch die Proben von Mutanten N-Glykane mit nur einem *N*-Acetylglucosamin-Rest, so genannte freie Oligosaccharide, aufwiesen, was im N-Glykanspektrum der Mutante *t3091* besonders deutlich zu sehen war (siehe  $\text{Hex}_{5,9}\text{HexNAc}_1$  in Abbildung 3.9). Dabei fiel weiterhin auf, dass diese freien Oligosaccharide unterschiedliche Prozessierungsgrade widerspiegeln, während *lit-1*, *t1099* und *cib-1* nur geringe Mengen an  $\text{Hex}_9\text{HexNAc}_1$ , *lit-1* zusätzlich noch  $\text{Hex}_6\text{HexNAc}_1$  Species aufwiesen. Diese Beobachtung ist in Einklang mit dem Befund, dass in der Mutante *t3091* fast ausschließlich mannosereiche Zuckerketten zu finden waren. Ausgehend von der Annahme, dass Oberflächenglykane bei Zell/Zell-Interaktionen im Embryo eine wichtige Rolle spielen, könnte die fehlende N-Glykanprozessierung für das Ausbleiben einer kontrollierten Zellwanderung in den Embryonen von *t3091* verantwortlich sein. Neue Daten geben Hinweise, dass ein selektiver Defekt der  $\alpha$ -Glucosidase I zu einer vermehrten Anzahl von freien Oligosacchariden führt und dabei viel High Mannose Typen und wenig Paucimannosidische oder Komplex-Typ Glykane detektiert werden (Katoh *et al.* 2013).

Einen Sonderfall stellte die Mutante *sud-1* dar, bei der lediglich Glykane der Zusammensetzung  $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2$  ( $m/z$  933) und  $\text{Hex}_2\text{HexNAc}_2\text{Fuc}$  ( $m/z$  917) nachweisbar waren. Da es sich hier um sehr inhomogene Spektren mit vielen nicht zuordenbaren Signalen handelte, waren Aussagen zu den jeweils exprimierten Enzymaktivitäten nicht möglich. Offensichtlich war die geringe Menge an einzeln selektierten Eiern nicht ausreichend, um ein gesichertes N-Glykanprofil zu erstellen. Sollten diese beiden Oligosaccharide aber tatsächlich die einzigen ausgebildeten Glykane sein, könnte dies als ein Erklärungsansatz für die onkogene Zellteilung der *sud-1* Mutante gewertet werden. Da bei den Embryonen aller übrigen Mutanten mannosereiche Strukturen nachgewiesen wurden, würde das Nichtvorhandensein dieser

Glykanstrukturen von den umgebenden Zellen als fehlendes Signal gewertet und so eine Zelldifferenzierung unmöglich gemacht. Eine undifferenzierte Teilung der Zellen, wie bei *sud-1*, wäre dann die Folge (Abbildung 3.8).

#### 4.4 Strukturen der Glykane

Wie bereits im Ergebnissteil ausgeführt, wurde auf eine detaillierte Strukturaufklärung der Glykane verzichtet, da dies aufgrund der limitierten Probenmengen und des ohnehin geringen Anteils an Glykanen nicht möglich war. Die bereits publizierten N-Glykanmuster von *C. elegans* nach Schlüpfen der Larve bis zum adulten Wurm wurden jedoch massenspektrometrisch verifiziert, wobei es keine Hinweise auf zusätzliche Glykane gab. Zur weiteren Strukturbestätigung wurden ausgewählte Oligosaccharide ( $\text{Hex}_9\text{HexNAc}_2$  und  $\text{Hex}_3\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1$ ) mittels MALDI-TOF-MS/MS Analyse exemplarisch charakterisiert (Abbildung 3.11).

Eine weitere Methode der Strukturanalyse, insbesondere für höher prozessierte Glykane mit Fuc-Resten und PC-Substituenten ist die Umsetzung mit HF (Abbildung 3.12). Hierbei kommt es zu einer chemischen Abspaltung vor allem von ( $\alpha$ 1-3)-gebundenen Fucosen (Haslam *et al.* 2000) und PC-Resten. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass sie auch auf kleine Probenmengen angewandt werden kann. Im Fall der *C. elegans* Embryonen des Wildtyps waren nach HF-Behandlung fucosylierte und PC-modifizierte Glykane nicht mehr nachweisbar. Dies galt auch für mehrfach fucosylierte Zuckerketten. Damit kann vermutet werden, dass offensichtlich keiner der vorhandenen Fucose-Reste in einer ( $\alpha$ 1-6)-Bindung vorlag. Die Frage, inwieweit auf diesem Weg auch ( $\alpha$ 1-2)- und/oder ( $\alpha$ 1-4)-gebundene Fucosen freigesetzt werden, wurde hier nicht untersucht. Bemerkenswert war weiterhin, dass nach HF-Behandlung auch methylierte Kohlenhydratstrukturen nun nicht mehr nachweisbar waren, was das Vorkommen methylierter Fuc-Reste indizierte (Haslam and Dell 2003). Dies war insbesondere im Fall der modifizierten mannosereichen Glykane  $\text{Hex}_{5,8}\text{HexNAc}_2\text{Fuc}_1\text{Me}_1$  zu beobachten.

Da methylierte Glykane immer nur als Signale geringer Intensität auftraten, blieb offen, ob Methylgruppen ausschließlich an Fucosen gebunden waren oder nicht. In dieser Arbeit wurden jedoch keine Glykane mit mehr Methylgruppen als Fuc-Resten

gefunden, was als Bestätigung für die Annahme gewertet werden könnte, dass Methylgruppen hauptsächlich an Fucose gebunden vorliegen. Andererseits beschreiben andere Autoren beim adulten Wurm durchaus Glykane mit einer Fucose und zwei Methylgruppen, jedoch nie Methylgruppen an nicht-fucosylierten Glykanen (Cipollo *et al.* 2005; Paschinger *et al.* 2008). Damit ist zu vermuten, dass Fuc-Reste oder zumindest fucosylierte Glykane bevorzugt methyliert werden.

Die in einigen Proben gefundenen Hexose-Oligomere wurden ebenfalls mittels MALDI-TOF-MS/MS Analysen als eine Dextranreihe Hex<sub>6-11</sub> verifiziert. Der Abbau der Oligomere durch  $\alpha$ -Glucosidase belegte bereits eine  $\alpha$ -glykosidische Verknüpfung von Glucose-Einheiten und widerlegte damit die Möglichkeit einer Verunreinigung mit Cellulose. Denkbar wäre jedoch, dass diese Kohlenhydrate als Nahrungsreserve für die Zellen im Cytoplasma vorkommen. Derartige Polyhexosen wurden auch in N-Glykan Spektren anderer Spezies, wie z.B. *Drosophila melanogaster*, gefunden und dort als Nahrungsbestandteil erklärt, der während der Züchtung aufgenommen wurde (Sarkar *et al.* 2006). Bemerkenswert war, dass der *on-target*  $\alpha$ -Glucosidase Verdau häufig auch zu einer allgemeinen Verbesserung der Spektren führte, was zum einen auf die Eliminierung der Hexose-Oligomere und zum anderen auch auf eine verbesserte Kristallisation der Probe und damit eine effizientere Ionisation der Analytmoleküle beruhen könnte.

Zusammenfassend kann auf der Grundlage dieser Arbeit das Postulat einer stadienspezifischen Glykosylierungen nun auf alle Entwicklungsstadien von *C. elegans* einschließlich der Embryonalentwicklung ausgeweitet werden, wobei die Glykanprozessierung im unreifen Embryo stärker limitiert ist als im erwachsenen Wurm. Während im 50-100 Zellstadium nur wenig prozessierte mannosereiche und kaum fucosylierte Glykane nachweisbar waren, entsprachen die N-Glykanmuster ausgereifter Embryonen qualitativ eher denen der Larvenstadien. Es kann daher vermutet werden, dass die, wenn auch nur in limitiertem Umfang prozessierten, kurzkettigen mannosereichen Ketten, ebenso wie hybride und paucimannosidische Glykane, eine wichtige Rolle im Verlauf der Entwicklung von *C. elegans* spielen.

Die Hypothese der Beteiligung von Glykanen an Zell/Zell-Interaktionen während der Zellwanderung im Embryo hat durch die Analyse der Mutanten *sud-1* und *t3091* weitere Bestätigung gefunden. Dies sollte in Zukunft eingehender untersucht werden. Möglich wäre dies mit neuen Methoden, die es erlauben, z.B. mehr Eier zur Analyse bereitzustellen und größere Ausbeuten bei der Aufreinigung der Glykane zu erzielen.

Darüber hinaus könnten auch Lectine zur Klassifizierung von Glykanen auf der Zelloberfläche herangezogen werden. Lectine binden weitgehend spezifisch definierte N-Glykantypen (Hirabayashi *et al.* 2002) und können in Form einer *frontal affinity chromatography* auch mit massenspektrometrischen Methoden kombiniert werden (Arata *et al.* 2007; Ng *et al.* 2007). Aufgrund ihrer Bindungsspezifität könnten mit Hilfe von Lectinen damit leichter Aussagen in Bezug auf strukturelle Parameter der jeweiligen N-Glykane getroffen werden (Nemoto-Sasaki *et al.* 2011), so dass in Zukunft der selektive Nachweis definierter N-Glykanklassen selbst bei geringsten Probenmengen möglich sein sollte.

## 5. Zusammenfassung

Der frei lebende, nicht human pathogene Bodennematode *C. elegans* wird seit mehr als 40 Jahren als einer der wichtigsten Modellorganismen für genetische, morphologische und Verhaltensstudien herangezogen. Daneben wurden zahlreiche strukturelle Untersuchungen auf Protein-, Lipid- und Glykanebene durchgeführt, da Glykoproteine der Plasmamembran wichtige Zielstrukturen im Kontext von Zell/Zell-Interaktionen darstellen. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das N-Glykanprofil von *C. elegans* Embryonen des Wildtyps und ausgewählten Mutanten (*glp-1*, *lit-1*, *sud-1*, *cib-1*, *t1099* und *t3091*) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die N-Glykanmuster der Embryonen stark von den Kultivierungsbedingungen (Agar-Platten vs. Flüssigmedium) abhängen. Bei den in Wildtyp-Embryonen nachgewiesenen N-Glykanen handelte es sich im Wesentlichen um oligomannosidische, hybride und zum Teil auch kurzkettige Oligosaccharide vom komplexen Typ. Die untersuchten Mutanten, die aufgrund ihrer Gen-Defekte allesamt nicht lebensfähig waren, wiesen im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen in ihren N-Glykanprofilen zum Teil distinkte Unterschiede auf, die zum Teil auf eine deutlich verminderte Prozessierung der Vorläuferglykane schließen ließen. Insgesamt zeigten die N-Glykane der Embryonen von Wildtyp und Mutanten generell einen wesentlich geringeren Prozessierungsgrad als die des adulten Wurms oder seiner Larvenstadien.

## 6. Summary

The free-living nematode *C. elegans* is not a pathogenic organism for humans but a well known eukaryotic model organism for studies in genetics, morphology and behavior research since 40 years. Many studies were made to get a better understanding in cell-cell interaction involving proteins, lipids and glycans of the cell membrane. In this thesis the N-glycan profil of *C. elegans* wild-type embryos was determined for the first time in comparison to mutant embryos (*glp-1*, *lit-1*, *sud-1*, *cib-1*, *t1099* und *t3091*) arrested in embryogenesis early before differentiation. It is shown that the pattern of N-glycans is less heterogeneous in wild-type embryos obtained in liquid culture than embryos cultured on agar plates. Nonetheless, paucimannose, hybrid and truncated complex type glycans were also found in the latter of *C. elegans* wild-type embryos. In contrast, mutant embryos expressed a restricted N-glycan profile as a result of reduced oligosaccharide processing of the respective high-mannose type glycan precursors. All mutants analysed were not viable because of severe genetic defects. In general, N-glycans of wild-type embryos and mutants reflected a lower degree of oligosaccharide processing than those of adult worms or respective larval stages.

## 7. Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

ACN	Acetonitril
Asn	Asparagin
ATT	6-Aza-2-thiothymin
CDG	<i>congenital disorders of glycosylation</i>
Da	Dalton
dHex	Deoxyhexose
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F, Fuc	L-Fucose, ▲
FT	Fucosyltransferase
Gal	D-Galaktose, ●
GalNAc	2-Acetamido-2-deoxy-D-galaktose ( <i>N</i> -Acetylgalaktosamin)
GDP	Guanosindiphosphat
Glc	D-Glucose, ●
GlcNAc, GN	2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose ( <i>N</i> -Acetylglucosamin), ■
Gnase	β- <i>N</i> -Acetylglucosaminidase
GnT	<i>N</i> -Acetylglucosaminyltransferase
H, Hex	Hexose
N, HexNAc	<i>N</i> -Acetylhexosamin
HF	Flusssäure
MALDI	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
Man	D-Mannose, ●
Mase	GnT I unabhängige α-Mannosidase
Mase II	α-3,6-Mannosidase II
Me	Methylgruppe
MeH	Methylhexose
MeT	Methyltransferase
MS	Massenspektrometrie
<i>m/z</i>	Masse pro Ladung
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure, Sialinsäure, ◆
PC	Phosphorylcholin

PCT	Phosphorylcholintransferase
PGC	<i>porous graphitic carbon</i>
PNGase A	N-Glykosidase A
PNGase F	N-Glykosidase F
RP	<i>reversed phase</i>
TFA	Trifluoressisäure
TOF	<i>time-of-flight</i>

## 8. Abbildungsverzeichnis

1.1	Anatomie von <i>C. elegans</i>	Seite 5
1.2A	Stammbaum der frühen Zelldifferenzierung im Embryo von <i>C. elegans</i>	Seite 7
1.2B	Ausrichtung der Blastomeren im Embryo von <i>C. elegans</i>	Seite 7
1.3	Lebenszyklus von <i>C. elegans</i>	Seite 8
1.4A	Verschiedene Typen der N-Glykane	Seite 10
1.4B	Glc-NAc- Transferasen I – VI	Seite 10
1.5	Biosynthese von N-Glykanen	Seite 12
1.6	Prozessierung der N-Glykane	Seite 14
3.1	N-Glykanprofil (WT): PNGase A vs. PNGase F	Seite 31
3.2	N-Glykanprofil (WT): Würmer vs. Embryonen	Seite 32
3.3	N-Glykanprofil (WT): Kultivierung auf AGAR vs. Flüssigmedium	Seite 35
3.4	N-Glykanprofil der Mutante <i>glp-1</i>	Seite 37
3.5	N-Glykanprofil der Mutante <i>lit-1</i>	Seite 38
3.6	N-Glykanprofil der Mutante <i>t1099</i>	Seite 40
3.7	N-Glykanprofil der Mutante <i>cib-1</i>	Seite 41
3.8	N-Glykanprofil der Mutante <i>sud-1</i>	Seite 42
3.9	N-Glykanprofil der Mutante <i>t3091</i>	Seite 43
3.10	Quantitative Evaluation der N-Glykane (Embryonen und Mutanten)	Seite 45
3.11	MALDI-TOF- MS/MS Spektren	Seite 47
3.12	N-Glykanprofil (Embryonen): Flusssäurebehandlung	Seite 49
3.13	N-Glykanprofil (Embryonen): <i>on-target</i> Verdau mit $\alpha$ -Glucosidase	Seite 51
4.1	Prozessierung der N-Glykane in Embryonen und den beschriebenen Mutanten	Seite 59

## Tabellenverzeichnis

Monosaccharid-Zusammensetzungen der N-Glykane von *C. elegans mixed-stages* Würmern, Embryonen und ausgewählten Mutanten nach enzymatischer Freisetzung

3.1	Sortierung nach aufsteigenden Massen	Seite 52
3.1	Sortierung nach struktureller Klassifikation	Seite 54

## 9. Literatur

- Ahringer, J. (1997). "Turn to the worm!" *Curr Opin Genet Dev* **7**(3): 410-415.
- Altmann, F., G. Fabini, et al. (2001). "Genetic model organisms in the study of N-glycans." *Biochimie* **83**(8): 703-712.
- Arata, Y., N. Ishii, et al. (2007). "Identification of the amino acid residue in the nematode galectin LEC-1 responsible for its unique sugar binding property: analysis by combination of site-directed mutagenesis and frontal affinity chromatography." *Biol Pharm Bull* **30**(11): 2012-2017.
- Austin, J. and J. Kimble (1987). "glp-1 is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*." *Cell* **51**(4): 589-599.
- Banerjee, D. K. (2012). "N-glycans in cell survival and death: Cross-talk between glycosyltransferases." *Biochim Biophys Acta*.
- Barrows, B. D., J. S. Griffiths, et al. (2007a). "Resistance is non-futile: resistance to Cry5B in the nematode *Caenorhabditis elegans*." *J Invertebr Pathol* **95**(3): 198-200.
- Barrows, B. D., S. M. Haslam, et al. (2007b). "Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in *Caenorhabditis elegans* from loss of fucose." *J Biol Chem* **282**(5): 3302-3311.
- Blaxter, M. (2011). "Nematodes: the worm and its relatives." *PLoS Biol* **9**(4): e1001050.
- Brenner, S. (1974). "The genetics of *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* **77**(1): 71-94.
- Cacan, R. and A. Verbert (2000). "Transport of free and N-linked oligomannoside species across the rough endoplasmic reticulum membranes." *Glycobiology* **10**(7): 645-648.
- Ceroni, A., K. Maass, et al. (2008). "GlycoWorkbench: a tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans." *J Proteome Res* **7**(4): 1650-1659.
- Chantret, I., V. P. Kodali, et al. (2011). "Endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) and free oligosaccharide generation in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* **286**(48): 41786-41800.
- Chantret, I. and S. E. Moore (2008). "Free oligosaccharide regulation during mammalian protein N-glycosylation." *Glycobiology* **18**(3): 210-224.
- Cipollo, J. F., A. Awad, et al. (2004a). "Biosynthesis in vitro of *Caenorhabditis elegans* phosphorylcholine oligosaccharides." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(10): 3404-3408.
- Cipollo, J. F., A. M. Awad, et al. (2004b). "srf-3, a mutant of *Caenorhabditis elegans*, resistant to bacterial infection and to biofilm binding, is deficient in glycoconjugates." *J Biol Chem* **279**(51): 52893-52903.
- Cipollo, J. F., A. M. Awad, et al. (2005). "N-Glycans of *Caenorhabditis elegans* are specific to developmental stages." *J Biol Chem* **280**(28): 26063-26072.
- Cipollo, J. F., C. E. Costello, et al. (2002). "The fine structure of *Caenorhabditis elegans* N-glycans." *J Biol Chem* **277**(51): 49143-49157.
- Consortium, T. C. e. S. (1998). "Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology." *Science* **282**(5396): 2012-2018.
- Crittenden, S. L., D. Rudel, et al. (1997). "Genes required for GLP-1 asymmetry in the early *Caenorhabditis elegans* embryo." *Dev Biol* **181**(1): 36-46.
- Crittenden, S. L., E. R. Troemel, et al. (1994). "GLP-1 is localized to the mitotic region of the *C. elegans* germ line." *Development* **120**(10): 2901-2911.

- Denecke, J. M., T (2001). "Angeborene Glykosylierungsstörungen - Eine Erkrankung mit vielen Gesichtern." Kinder- und Jugendmedizin **5**: 140-145.
- Domon, B. and C. E. Costello (1988). "A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates." Glycoconj J **5**(4): 397-409.
- Fotisch, K. and S. Vieths (2001). "N- and O-linked oligosaccharides of allergenic glycoproteins." Glycoconj J **18**(5): 373-390.
- Freeze, H. H. and M. Aebi (2005). "Altered glycan structures: the molecular basis of congenital disorders of glycosylation." Curr Opin Struct Biol **15**(5): 490-498.
- Friedel, C. H. (2002). Der Bodennemathode Caenorhabditis elegans. Warum Lebewesen altern. Berlin, Logos Verlag Berlin: 93-109.
- Gagneux, P. and A. Varki (1999). "Evolutionary considerations in relating oligosaccharide diversity to biological function." Glycobiology **9**(8): 747-755.
- Gavel, Y. and G. von Heijne (1990). "Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering." Protein Eng **3**(5): 433-442.
- Gbewonyo, K., S. P. Rohrer, et al. (1994). "Large scale cultivation of the free living nematode *Caenorhabditis elegans*." Biotechnology **12**: 50-54.
- Gerdt, S., R. D. Dennis, et al. (1999). "Isolation, characterization and immunolocalization of phosphorylcholine-substituted glycolipids in developmental stages of *Caenorhabditis elegans*." Eur J Biochem **266**(3): 952-963.
- Geyer, H. and R. Geyer (1998). "Strategies for glycoconjugate analysis." Acta Anat (Basel) **161**(1-4): 18-35.
- Geyer, H. and R. Geyer (2006). "Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation." Biochim Biophys Acta **1764**(12): 1853-1869.
- Geyer, H., M. Schmidt, et al. (2012). "Mass spectrometric comparison of N-glycan profiles from *Caenorhabditis elegans* mutant embryos." Glycoconj J **29**(2-3): 135-145.
- Geyer, H., S. Schmitt, et al. (1999). "Structural analysis of glycoconjugates by on-target enzymatic digestion and MALDI-TOF-MS." Anal Chem **71**(2): 476-482.
- Geyer, H., M. Wuhler, et al. (2005). "Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*." J Biol Chem **280**(49): 40731-40748.
- Grabitzki, J. (2006). Massenspektrometrische Identifizierung posttranslational modifizierter Proteine aus verschiedenen Entwicklungsstadien von *Caenorhabditis elegans*, Justus-Liebig Universität Giessen.
- Haltiwanger, R. S. and J. B. Lowe (2004). "Role of glycosylation in development." Annu Rev Biochem **73**: 491-537.
- Hanneman, A. J., J. C. Rosa, et al. (2006). "Isomer and glycomer complexities of core GlcNAcs in *Caenorhabditis elegans*." Glycobiology **16**(9): 874-890.
- Haslam, S. M., G. C. Coles, et al. (2000). "Structural characterization of the N-glycans of *Dictyocaulus viviparus*: discovery of the Lewis(x) structure in a nematode." Glycobiology **10**(2): 223-229.
- Haslam, S. M. and A. Dell (2003). "Hallmarks of *Caenorhabditis elegans* N-glycosylation: complexity and controversy." Biochimie **85**(1-2): 25-32.
- Hintze, A. (2006). Charakterisierung der Musterbildung durch Zellwanderungen in *Caenorhabditis elegans*. Fakultät für Lebenswissenschaften, Braunschweig, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. **Dr. rer. nat.** 169.

- Hirabayashi, J., T. Hashidate, et al. (2002). "Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography." Biochim Biophys Acta **1572**(2-3): 232-254.
- Hoffmann-Sommergruber, K., K. Paschinger, et al. (2011). "Glycomarkers in parasitic infections and allergy." Biochem Soc Trans **39**(1): 360-364.
- Hutter, H. and R. Schnabel (1994). "glp-1 and inductions establishing embryonic axes in *C. elegans*." Development **120**(7): 2051-2064.
- Hutter, H. and R. Schnabel (1995a). "Establishment of left-right asymmetry in the *Caenorhabditis elegans* embryo: a multistep process involving a series of inductive events." Development **121**(10): 3417-3424.
- Hutter, H. and R. Schnabel (1995b). "Specification of anterior-posterior differences within the AB lineage in the *C. elegans* embryo: a polarising induction." Development **121**(5): 1559-1568.
- Jaeken, J., M. Vanderschueren-Lodeweyckx, et al. (1980). "Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG-deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome[quest]: 90." Pediatr Res **14**(2): 179-179.
- Kaletta, T. and M. O. Hengartner (2006). "Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism." Nat Rev Drug Discov **5**(5): 387-398.
- Kaletta, T., H. Schnabel, et al. (1997). "Binary specification of the embryonic lineage in *Caenorhabditis elegans*." Nature **390**(6657): 294-298.
- Kato, T., K. Kitamura, et al. (2007). "Free oligosaccharides in the cytosol of *Caenorhabditis elegans* are generated through endoplasmic reticulum-golgi trafficking." J Biol Chem **282**(30): 22080-22088.
- Katoh, T., J. Takase, et al. (2013). "Deficiency of alpha-glucosidase I alters glycoprotein glycosylation and lifespan in *Caenorhabditis elegans*." Glycobiology **23**(10): 1142-1151.
- Kimura, K. D., H. A. Tissenbaum, et al. (1997). "daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*." Science **277**(5328): 942-946.
- Körner, C. (2012). Retrieved 10.10.2012, from <http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/1-Die-Glykoproteinbiosynthese.9504.0.html>.
- Kornfeld, R. and S. Kornfeld (1985). "Assembly of asparagine-linked oligosaccharides." Annu Rev Biochem **54**: 631-664.
- Landsteiner, K. (1931). "Individual Differences in Human Blood." Science **73**(1894): 403-409.
- Lehr, T., H. Geyer, et al. (2007). "Structural characterization of N-glycans from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* cross-reacting with *Schistosoma mansoni* glycoconjugates." Glycobiology **17**(1): 82-103.
- Lowe, J. B. and J. D. Marth (2003). "A genetic approach to Mammalian glycan function." Annu Rev Biochem **72**: 643-691.
- Maass, K., R. Ranzinger, et al. (2007). "'Glyco-peakfinder'--de novo composition analysis of glycoconjugates." Proteomics **7**(24): 4435-4444.
- Müller, M. (2007). Funktionelle Modulation der Zelladhäsion durch sud-1 und Galectine im *Caenorhabditis elegans* Embryo. Universität Braunschweig. Braunschweig, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig. **MD**: 152.
- Nairn, A. and K. Moremen. (2012). "N-Glycan Biosynthesis." Biomedical Glycomics at CCRC, from <http://www.crc.uga.edu/~moremen/glycomics>.

- Nasa. (2012). "Welcome to Ask a *C. elegans* Expert!", from <http://weboflife.nasa.gov/celegans/>.
- Natsuka, S., J. Adachi, et al. (2002). "Structural analysis of N-linked glycans in *Caenorhabditis elegans*." *J Biochem* **131**(6): 807-813.
- Nemoto-Sasaki, Y., S. Takai, et al. (2011). "The DC2.3 gene in *Caenorhabditis elegans* encodes a galectin that recognizes the galactose $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4fucose disaccharide unit." *Biol Pharm Bull* **34**(10): 1635-1639.
- Ng, E. S., N. W. Chan, et al. (2007). "Frontal affinity chromatography-mass spectrometry." *Nat Protoc* **2**(8): 1907-1917.
- Ohtsubo, K. and J. D. Marth (2006). "Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease." *Cell* **126**(5): 855-867.
- Packer, N. H., M. A. Lawson, et al. (1998). "A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins." *Glycoconj J* **15**(8): 737-747.
- Parry, S., D. Hadaschik, et al. (2006). "Glycomics investigation into insulin action." *Biochim Biophys Acta* **1760**(4): 652-668.
- Paschinger, K., G. Fabini, et al. (2005). "Definition of immunogenic carbohydrate epitopes." *Acta Biochim Pol* **52**(3): 629-632.
- Paschinger, K., M. Gutternigg, et al. (2008). "The N-glycosylation pattern of *Caenorhabditis elegans*." *Carbohydr Res* **343**(12): 2041-2049.
- Paschinger, K., D. Rendic, et al. (2004). "Molecular basis of anti-horseradish peroxidase staining in *Caenorhabditis elegans*." *J Biol Chem* **279**(48): 49588-49598.
- Patel, T. P. and R. B. Parekh (1994). "Release of oligosaccharides from glycoproteins by hydrazinolysis." *Methods Enzymol* **230**: 57-66.
- Poltl, G., D. Kerner, et al. (2007). "N-glycans of the porcine nematode parasite *Ascaris suum* are modified with phosphorylcholine and core fucose residues." *FEBS J* **274**(3): 714-726.
- Priess, J. R., H. Schnabel, et al. (1987). "The *glp-1* locus and cellular interactions in early *C. elegans* embryos." *Cell* **51**(4): 601-611.
- Riddle, D. L., T. Blumenthal, et al. (1997). "Introduction to *C. elegans*."
- Rubin, G. M., M. D. Yandell, et al. (2000). "Comparative genomics of the eukaryotes." *Science* **287**(5461): 2204-2215.
- Sarkar, M., P. A. Leventis, et al. (2006). "Null mutations in *Drosophila* N-acetylglucosaminyltransferase I produce defects in locomotion and a reduced life span." *J Biol Chem* **281**(18): 12776-12785.
- Schachter, H. (2001). "Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins." *Cell Mol Life Sci* **58**(8): 1085-1104.
- Schachter, H. (2004). "Protein glycosylation lessons from *Caenorhabditis elegans*." *Curr Opin Struct Biol* **14**(5): 607-616.
- Schachter, H. (2007). Glycobiology of *Caenorhabditis elegans*. *Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology, Vol.4: Cell Glycobiology and Development, Health and Disease in Glycomedicine*. Elsevier, Amsterdam, Kamerling, J. P., Boons, G.-J., Lee, Y.C., Suzuki, A, Taniguchi, N, Voragen, A.G.J.
- Schachter, H. (2009). "Paucimannose N-glycans in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*." *Carbohydr Res* **344**(12): 1391-1396.
- Schierenberg, E. (1997). "[Specification of cell destiny in early *Caenorhabditis elegans* embryo]." *Naturwissenschaften* **84**(2): 55-64.
- Schnabel, R. (1995). "Über die Links-rechts und andere Orientierungen: Embryogenese eines Wurms." *MPG-Spiegel (Max-Planck-Gesellschaft)* **5/95**: 24-31.

- 
- Schnabel, R., M. Bischoff, et al. (2006). "Global cell sorting in the *C. elegans* embryo defines a new mechanism for pattern formation." *Dev Biol* **294**(2): 418-431.
- Schnabel, R., H. Hutter, et al. (1997). "Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: variability of development and regional specification." *Dev Biol* **184**(2): 234-265.
- Schnabel, R. and H. Schnabel (1990). "Early determination in the *C. elegans* embryo: a gene, *cib-1*, required to specify a set of stem-cell-like blastomeres." *Development* **108**(1): 107-119.
- Sharon, N. a. L., H (1997). *Glycoproteins: Structure and Function*. Weinheim, Chapman & Hall.
- Stevens, J. and A. Spang (2013). "N-glycosylation is required for secretion and mitosis in *C. elegans*." *PLoS One* **8**(5): e63687.
- Sulston, J. E., E. Schierenberg, et al. (1983). "The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*." *Dev Biol* **100**(1): 64-119.
- Tretter, V., F. Altmann, et al. (1991). "Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminyl)asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha 1----3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue." *Eur J Biochem* **199**(3): 647-652.
- Wada, Y. (2006). "Mass spectrometry for congenital disorders of glycosylation, CDG." *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **838**(1): 3-8.
- Zhao, Y. Y., M. Takahashi, et al. (2008). "Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer." *Cancer Sci* **99**(7): 1304-1310.



## 10. Publikationsverzeichnis

### Veröffentlichungen:

März 2012

Geyer,H; Schmidt,M; Müller,M; Schnabel,R; Geyer,R:

Mass spectrometric comparison of N-glycan profiles from *Caenorhabditis elegans* mutant embryos, Glycoconjugate Journal 2012, Vol 29, Numbers 2-3: 135-145

2012 Nährlich,N; Schmidt,M; Köhler,K; Alzen,G; Steiß,JO:

Exogen allergische Alveolitis als Ursache von Dyspnoe und Gewichtsverlust.  
Pädiatrische Praxis; 2012; 79: 47-52

### Kongressbeiträge:

#### Poster:

April 2011 33. Jahrestagung der Gesellschaft für Pädiatrische Pulmonologie,  
Graz, Österreich

Schmidt,M; Köhler,K; Nährlich,L; Alzen,G; Heckmann,M; Bagheri,A; Steiß,JO:  
Fallvorstellung Exogene Allergische Alveolitis  
„10jähriges Mädchen mit belastungsabhängiger Dyspnoe und Gewichtsverlust“

August 2011 21st International Symposium on Glycoconjugates, Wien, Österreich

Geyer,H; Schmidt,M; Müller,M; Schnabel,R; Geyer,R:

Mass spectrometric profiling of N-glycans from *Caenorhabditis elegans*, mutant embryos

November 2013 8th World Congress of World Society for Pediatric Infectious  
Diseases (WSPID); Cape Town, South Africa

Bruns,R, Bahlmann,H, Heckmann,M, Beyersdorff,A, Schmidt,M, et al.

Meningococcal- Meningitis in two sibling- preventable by immunization?

Juni 2014 40. Jahrestagung der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, Bonn, Deutschland

Schmidt,M; Bahlmann,H; Utzig,N; Langner,S; Heckmann,M:

Erfolgreiche therapeutische Hypothermie bei Krampfanfall assoziierter neonataler ischämischer Enzephalopathie

September 2014 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie; Leipzig, Deutschland

Schmidt,M; Wegner,M; Zimmermann, K; Grunwald,U; Lode,H; Bruns,R:

Rotavirusimpfung weist Weg zum SCID (Severe Combined Immunodeficiency)

Vorträge:

Februar 2014 Jahrestagung der AG Neonatologie Mecklenburg Vorpommern e.V. und AG Perinatalogie M-V, Greifswald, Deutschland

Schmidt,M; Heckmann,M;

Hypothermiebehandlung nach prolongiertem Krampfanfall

Februar 2014 Jahrestagung der AG Neonatologie Mecklenburg Vorpommern e.V. und AG Perinatalogie M-V, Greifswald, Deutschland

Wolfram,J; Schmidt,M; Heckmann,M;

Der seltene Fall eines neonatalen Diabetes mellitus

---

## Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht 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 sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Allen danken, die zum Gelingen dieses Promotionsvorhabens beigetragen haben:

Meinem Doktorvater, Professor Dr. Rudolf Geyer möchte ich hervorgehoben danken. Er hat mich herzlich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen und mit der spannenden Themenstellung mein Interesse geweckt. Seine weitergegebene Begeisterung für die Glykobiologie, die hervorragende fachliche Unterstützung und letztlich auch seine große Geduld haben diese Dissertation möglich gemacht. Auch möchte ich mich für sein stets offenes Ohr in persönlichen Angelegenheiten bedanken.

Dr. Hildegard Geyer und Professor Dr. Günter Lochnit gilt der Dank für die Betreuung beim Erlernen der biochemischen Methoden, den kompetenten Ratschlägen, dem Beistand und den Hilfestellungen bei MALDI-MS Problemen. Hille möchte ich außerdem für die Unterstützung bei der Auswertung der Daten danken die zur Veröffentlichung führten.

Professor Dr. R. Schnabel und Dr. Matthias Müller danke ich für die freundliche Zusammenarbeit und die Bereitstellung des biologischen Probenmaterials.

Der gesamten AG Geyer gilt ein herzliches Dankeschön für die vielen Hilfestellungen, Ratschläge, Mutbekundungen und Durchhalteparolen. Aber auch für das freundschaftliche, familiäre Miteinander, die gemeinsamen Tage und Nächte im und außerhalb des Labors. Christina und Sebastian, Jule, Kai, Sandra F., Tina, Dennis, Tobias und Sandra M., Werner, Siegfried und Peter. Ihr seid mir ans Herz gewachsen.

PD Dr. Roger Dennis hat mich besonders im „britischen Sinne“ unterstützt, danke.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 535 Projekte A8 und Z1, sowie FOR471.

Meinen Eltern und meiner Familie danke ich für ihre andauernde Unterstützung, die mich durch mein ganzes Studium bis hierher begleitet hat. Es ist schön zu wissen, dass ihr immer darauf vertraut habt, dass ich das Richtige tue.