

**Biochemische Modifikation von Glykan-Strukturen
durch nicht natürliche Monosaccharide und
ihr Einfluss auf die Sialidase-Resistenz**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Daniel Gröbe

aus Weißenfels

Berlin, im Juli 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Werner Reutter

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 29.09.2008

Diese Arbeit möchte ich zwei Personen widmen,
denen ich leider für ihre Unterstützung nicht mehr danken kann.

Ulrich Gröbe

Dr. Martin Zimmermann-Kordmann

Danksagung

Herrn Prof. Werner Reutter möchte ich danken, die Funktion des Betreuers und Gutachters übernommen und mir die Möglichkeit der Einarbeitung in dieses neue und interessante Thema der Glykobiologie gegeben zu haben

Bei Herrn Prof. Rupert Mutzel bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Die Einarbeitung in die neue Thematik, das Kennenlernen der analytischen Methoden und die Beantragung des finanzielle Rahmen des Projektes wären nicht ohne Herrn Dr. Martin Zimmermann-Kordmann und Gesche Harms möglich gewesen.

Dem Analytik-Team in Berlin-Dahlem mit Rose-Maria Förster, Ute Schöber, Robin Oelschlegel, & dem Ing. für alle Probleme der Technik/Zertifizierung Detlef Grunow gebührt mein Dank für die schnelle Aufnahme in das Team, die freundliche Atmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft. Das Beenden des Projektes und vor allem die schriftliche Darlegung der Arbeiten waren nur mit der tatkräftigen Unterstützung von Diana Mutz zu meistern.

Der Arbeitsgruppe Glykodesign & Glykoanalytik in Berlin-Mitte verdanke ich einen erfolgreichen End“spurt“ meiner Promotionszeit. Hier waren Vanessa Frenz, Xi Liu, Stefan Risch, Christiane Ogorek, Matthias Kaup, Inmaculada M. Sánchez de Medina Herrera, Véronique Blanchard, Markus Berger, Astrid Lusch, Susann Eigel und Manuela Hügelland am zum Teil auch positiven Verlauf der Experimente und täglichen Arbeits-Spaß beteiligt.

Ein besonderer Dank gilt meiner Projekt-Kollegin, Mitstreiterin und *Doktorantin* Ines Repschläger, ohne deren Hilfe diese Arbeit nicht bis hierher gelungen wäre.

Der CBF-Arbeitsgruppe Dervedde, insbesondere Sebastian Riese, danke ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Zellkulturen.

Vielen Dank meinen Freunden aus Halle, Berlin, ... falls nicht schon bereits erwähnt.

Der größte Danke gilt meiner Familie - meiner Oma, meinem Bruder, meinen Schwiegereltern und besonders meinen Eltern, die mir die schöne und erfolgreiche Zeit bis hierher ermöglicht haben.

Zum Schluss zum Besten – meiner Frau Tina und meinem Sohn Tim. Zwei Gründe mit einem Lächeln im Gesicht auch sehr früh aufzustehen. Danke fürs Aufbauen in der schwierigen Zeit, die schönen Tag bisher und die noch vielen kommenden in der Zukunft!!!

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	12
1.1. Glykosylierung von Proteinen	14
1.1.1. Aufbau der Glykane	14
1.1.2. Sialinsäuren	15
1.1.3. N-Glykane	17
1.1.4. O-Glykane	20
1.2. Biologische Funktionen von Glykanen und Sialinsäuren	21
1.3. Modifikation von Glykan-Strukturen	23
1.4. Analytische Methoden zur Glykan-Charakterisierung	25
1.5. Zielsetzung der Arbeit	28
1.5.1. N-Glykan-Modifikation	28
1.5.2. Analytik von Glykanen	28
2. Material und Methoden	29
2.1. Chemikalien und Verbrauchsmittel	29
2.2. Enzyme	29
2.3. Geräte	30
2.4. Zellkultur	30
2.4.1. Organismen	31
2.4.2. Zellkulturbedingungen	31
2.4.3. Stammhaltung	31
2.4.4. Materialien	32
2.4.4.1. Medien und Zusätze	32
2.4.4.2. Gefäße	32
2.5. Polyacrylamidgelelektrophorese	32
2.5.1. SDS-PAGE nach LAEMMLI	33
2.5.2. Färbung von Polyacrylamidgelen	34
2.5.3. Trocknen von Polyacrylamidgelen	34
2.6. Proteinbestimmung	35
2.7. Rohmembranpräparation von eukaryotischen Zellen	35
2.8. Isolierung und Anreicherung von Glykanen	36
2.8.1. Isolierung von Glykanen	36
2.8.1.1. Enzymatische Methoden	36
2.8.1.1.1. Trypsin	36
2.8.1.1.2. PNGase F	37
2.8.1.2. Chemische Freisetzung von Glykanen	37

2.8.1.2.1.	β -Eliminierung	37
2.8.1.2.2.	Kontinuierliche nicht-reduzierende Freisetzung von Glykanen	38
2.8.1.3.	Separation von N- und O-Glykanen.....	39
2.8.2.	Aufreinigung von Glykanen und Peptiden.....	39
2.8.2.1.	Kationenaustauscher	40
2.8.2.2.	Mischbett-Ionenaustauscher.....	40
2.8.2.3.	Carbograph-Material	40
2.8.2.3.1.	Carbograph-Festphasenextraktion-Säulen	40
2.8.2.3.2.	TopTip.....	41
2.8.2.4.	C18- (<i>Reversed Phase</i> -) Material.....	41
2.8.2.5.	Entfernung von Salzen	42
2.8.3.	Trocknen von Proben	42
2.9.	Derivatisierungen und Enzymatische Behandlungen von Glykanen.....	42
2.9.1.	Fluoreszenzmarkierung von Oligosacchariden mit 2-Aminobenzamid	42
2.9.2.	Fluoreszenzmarkierung von Sialinsäuren mit 1,2-Diamino-4,5-Methylenedioxybenzol	43
2.9.2.1.	Herstellung des DMB-Labelreagenz.....	43
2.9.2.2.	Hydrolyse von Sialinsäuren	44
2.9.2.3.	DMB-Markierung der Sialinsäuren.....	44
2.9.3.	Permethylierung von Glykanen.....	44
2.9.4.	Verwendung von Glykosidasen.....	45
2.9.4.1.	Sialidase	45
2.9.4.1.1.	Sialidase A	46
2.9.4.1.2.	Sialidase S.....	46
2.9.4.1.3.	Sialidase C	46
2.9.4.2.	Fucosidase.....	46
2.9.4.3.	β -Galactosidase.....	46
2.10.	Auftrennung und Identifizierung von Glykanen mittels HPLC.....	47
2.10.1.	Monosaccharid-Analyse mit der Ionenchromatographie HPAEC-PAD	47
2.10.1.1.	TFA-Hydrolyse	47
2.10.1.2.	Standard-Mix	48
2.10.1.3.	Bestimmung von Monosacchariden mit der HPAEC-PAD	48
2.10.2.	2AB-markierte Oligosaccharide.....	49
2.10.2.1.	HPLC-Systeme.....	50
2.10.2.1.1.	Shimadzu.....	50
2.10.2.1.2.	Dionex - Summit.....	50
2.10.2.1.3.	Dionex - Ultimate 3000	50
2.10.2.2.	Ladungsprofile von Glykanen mit Asahi-Pak-HPLC	51
2.10.2.3.	Antennaritäten von Glykanen mit NH ₂ -Phasen-HPLC.....	51

2.10.3.	Quantifizierung DMB-markierter Sialinsäuren.....	52
2.11.	Charakterisierung von Glykanen mittels Massenspektrometrie.....	53
2.11.1.	MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	54
2.11.1.1.	Matrizes für die Glykan-Analyse.....	54
2.11.1.1.1.	Positiver Modus.....	54
2.11.1.1.2.	Negativer Modus.....	55
2.11.1.2.	MALDI-TOF Biflex [®] Bruker TM	55
2.11.1.3.	MALDI-TOF/TOF Ultraflex [®] III Bruker TM	55
2.11.2.	ESI-IonTrap-Massenspektrometrie.....	56
2.11.2.1.	Analyse von Glykanen.....	58
2.11.2.2.	Analysen ohne HPLC-Kopplung.....	58
2.11.2.3.	Analysen mit HPLC-Kopplung.....	59
2.11.3.	Hardware-unabhängige Software.....	59
2.12.	Auswertung von Daten aus der Analytik.....	60
2.12.1.	Darstellung von Glykanen.....	61
2.12.2.	Berechnung der molekularen Massen von Glykanen, Proteinen und deren Fragmentierungen.....	61
2.12.2.1.	GlycoProtMass.....	63
2.12.2.2.	GlycoWorkbench.....	63
2.12.3.	Verwendung von Online-Datenbanken.....	69
2.12.3.1.	Glykan-Strukturen.....	70
2.12.3.2.	GlycoPeakfinder.....	72
2.12.3.3.	Enzyme des Glykosylierungssystems.....	73
2.12.3.4.	Glykosylierung von Proteinen.....	74
2.12.3.5.	Protein-Datenbanken.....	74
3.	Ergebnisse.....	75
3.1.	Isolierung von Glykanen.....	77
3.1.1.	Nachweis von Glykoproteinen.....	77
3.1.2.	Isolierung von O-Glykanen.....	79
3.1.3.	Vergleich von Isolierungsmethoden.....	82
3.2.	Charakterisierung von Glykanen mittels Massenspektrometrie.....	84
3.2.1.	Glykan-Analysen für die MALDI-TOF-MS.....	84
3.2.2.	Etablierung der ESI-IonTrap-MS.....	86
3.2.2.1.	Massenspektrometrie.....	87
3.2.2.2.	Kopplung mit der HPLC.....	87
3.3.	Supplementation mit 2-Desoxy-D-galactose.....	88
3.3.1.	Zellkultur.....	88
3.3.2.	Nachweis des Einbaus der 2-Desoxy-D-galactose.....	88
3.3.3.	2-Desoxy-D-galactose in Glykanen verschiedener Zelllinien.....	90

3.3.3.1.	Nachweis der 2-Desoxy-D-galactose mittels HPLC.....	91
3.3.3.2.	Massenspektrometrische Analyse.....	97
3.3.3.3.	Einfluss der 2dGal-Supplementation auf die Sialylierung.....	101
3.3.4.	Untersuchungen zur Sialidase-Resistenz von Glykanen.....	102
3.3.4.1.	CHO-Zellen.....	102
3.3.4.2.	HEK293-Zellen.....	104
3.3.4.3.	K-562-Zellen.....	105
3.4.	Supplementation mit Analoga von Sialinsäure-Vorläufern.....	106
3.4.1.	Zellkultur.....	107
3.4.2.	Modifizierte Sialinsäuren in Zellglykanen.....	108
3.4.3.	Untersuchungen zur Sialidase-Resistenz von Glykanen.....	109
3.5.	Auswertung von Daten aus der Massenspektrometrie.....	111
3.5.1.	GlycoProtMass – Berechnung m/z und Erstellung von Datenbanken.....	111
3.5.1.1.	GlycoProtMass 1.0.....	113
3.5.1.2.	GlycoProtMass 2.0.....	116
3.5.1.3.	GlycoProtMass 3.0.....	118
3.5.1.4.	Anwendungen der FileMaker-Datei <i>Differenzen.fp7</i>	124
3.5.1.5.	Kalkulation von Fragmentierungen.....	125
3.5.1.6.	Berechnung von Massen mit GlycoProtMass.....	127
3.5.1.7.	Erstellung von Datenbanken mit GlycoProtMass.....	130
4.	Diskussion.....	131
4.1.	Supplementation mit 2-Desoxy-D-galactose.....	132
4.1.1.	Nachweis und Wirkung der 2-Desoxy-D-galactose.....	132
4.1.2.	Beeinflussung der Sialidase-Resistenz.....	135
4.2.	Supplementation mit Analoga von Sialinsäure-Vorläufern.....	138
4.2.1.	Metabolisierung und Einbau nicht-physiologischer Sialinsäuren.....	138
4.2.2.	Untersuchungen zur Sialidase-Resistenz von Glykanen.....	139
4.3.	Auswertung von Daten aus der Massenspektrometrie.....	141
4.4.	Aussichten.....	143
5.	Zusammenfassung.....	144
6.	Summary.....	145
7.	Literaturverzeichnis.....	146
8.	Publikationen.....	166
9.	Anhang.....	167