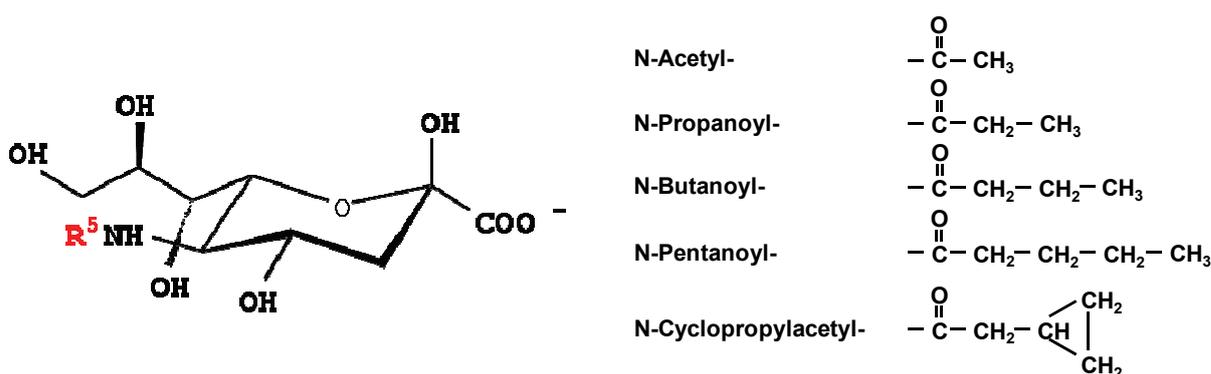


### 3. ERGEBNISSE

Das Hauptziel dieser Arbeit war die biochemische Modifikation von Glykanen. Im Hinblick auf die Anwendung im medizinischen Bereich stand die Funktion der proteingebundenen Oligosaccharide für die Halblebenszeit im Serum (Keck *et al.*, 2008) im Vordergrund. Glykoproteine, die zahlenmäßig den größten Anteil der Serumproteine darstellen, werden in der Leber vom Asialo-Glykoprotein-Rezeptor (ASGPR). Dies ist jedoch nur möglich, wenn keine terminale Sialinsäure vorhanden ist. Der Anteil dieses geladenen Monosaccharids nimmt mit längerer Zirkulation des Proteins im Serum durch Sialidase-Einwirkung ab. Da rekombinante Glykoproteine glykosyliert sind, wird deren Bioverfügbarkeit und -aktivität durch die Sialidase-Aktivität und ASGPR beeinflusst. Zur gezielten Optimierung neuer Pharmazeutika kann der Kohlenhydrat-Anteil verändert werden. Ein möglicher Ansatzpunkt ist das Hinzufügen zusätzlicher Glykosylierungsstellen. Eine weitere Alternative ist die Veränderung einzelner Strukturkomponenten, die eventuell einen Einfluss auf die enzymatische Freisetzung der Sialinsäuren ausüben. Dieser Grundgedanke war der Ausgangspunkt für die Experimente dieser Arbeit und wurde auf zwei Wegen verfolgt.

Die erste Modifikation sollte direkt an der Sialinsäure erfolgen. Hierfür wurde dem Medium ein ManNAc-Analogon zugegeben, welches in den Biosynthese von Sialinsäuren eingeschleust wird (Abbildung 5) und zur Entstehung von nicht natürlichen Sialinsäuren führt (Kayser *et al.*, 1992; Keppler *et al.*, 1998; Keppler *et al.*, 2001). Während die natürliche Neu5Ac eine Acetylierung besitzt, tragen die nicht physiologischen Neuraminsäuren der resultierenden Glykokonjugate die Analoga-abhängigen Substituenten der Abbildung 28.



**Abbildung 28: Strukturformel der Neuraminsäure** Die natürliche trägt eine Acetylierung am C-5-Atom; die Substituenten der nicht natürlichen Sialinsäuren sind mit aufgeführt

Die zweite Möglichkeit der Glykan-Modifikation bestand in dem Zusatz der 2-Desoxy-D-galactose (2dGal) zum Medium, welche zumindest partiell gegen die Galactosen (Gal) der proteingebundenen Oligosaccharide ausgetauscht werden sollte (Abbildung 29). Da diese

Monosaccharide direkt mit den terminalen Sialinsäuren verknüpft sind, ist möglicherweise ein Einfluss auf die Bindung von Sialidasen gegeben. Die Inkorporation der 2dGal (Büchsel *et al.*, 1980; Geilen *et al.*, 1992; Kannicht, 1995) könnte die Wechselwirkung zwischen Enzym und Glykan negativ beeinflussen und eine erhöhte Sialidase-Resistenz induzieren.

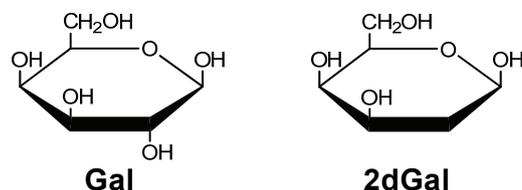


Abbildung 29: Strukturen der Galactose und 2-Desoxy-D-galactose

Der Einbau der ManNAc- und Gal-Analoga in die Glykane sollte für verschiedene Zelllinien getestet und optimiert werden. Die isolierten Oligosaccharide der Proteine waren zu charakterisieren und im Vergleich zu Kontrollen auf das Verhalten gegenüber Sialidase-Behandlungen zu untersuchen. Die erwarteten Änderungen innerhalb der Glykane sind in der Abbildung 30 an einem Beispiel dargestellt.

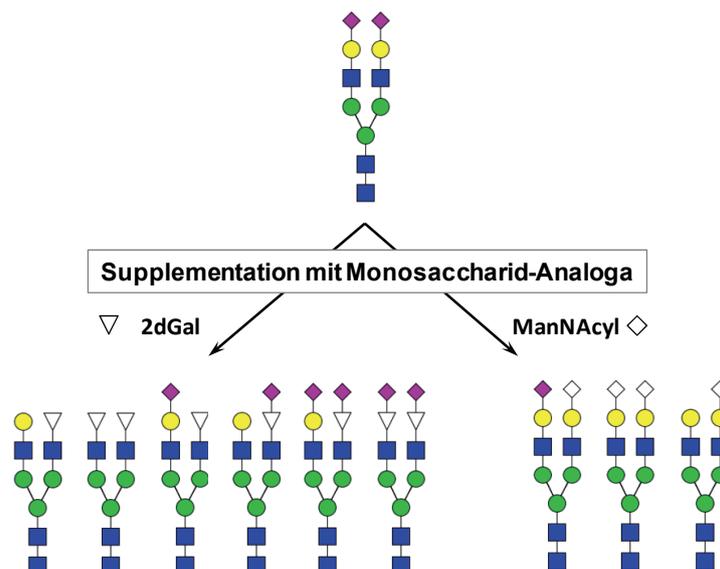


Abbildung 30: Zu erwartende Glykane nach den erfolgreichen Supplementationen mit Gal- und ManNAc-Analoga am Beispiel einer komplexen biantennären Struktur

Die in dem Ergebnisteil dieser Arbeit untersuchten Glykane sind, wenn nicht genauer definiert, N-glykosidisch gebunden und Protein-assoziiert (Experimente zu O-Glykanen werden im Abschnitt 3.1.2 näher erläutert). Die Grundlage für die Durchführung der Versuche war die Aneignung der vorhandenen Methoden, die Etablierung, sowie Optimierung neuer Analyse-Techniken und die Interpretation von resultierenden Daten. Aufgrund der noch relativ neuen Thematik sind diese Aspekte ständig in der Entwicklung und Erweiterung. In Abhängigkeit von den vorhandenen

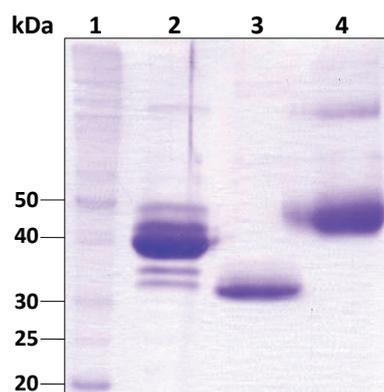
Geräten kann die Analyse von glykosylierten Proteinen vom Glykopeptid oder vom isolierten Glykan erfolgen. Letzteres war die Basis für die in dieser Arbeit dargestellten Experimente.

### 3.1. Isolierung von Glykanen

Glykane können theoretisch auf jedem Protein eines bakteriellen, pflanzlichen und tierischen Organismus vorkommen. Hierfür muss das Peptid spezifische Sequenzen für die Modifikation enthalten. Zusätzlich sind die Glykosyl-Transferasen, sowie Glykosidasen für die Biosynthese des Oligosaccharides notwendig (Janeway *et al.*, 2005). Die Gene hierfür liegen in jeder Zelle vor. Ob ein Enzym jedoch translatiert wird und welche Bedingungen zu einem bestimmten Oligosaccharid führen, hängt von vielen endogenen (z.B. Metabolite, Zelltyp, Alter) und exogenen Faktoren (z.B. Medium, Zellkontakte) ab. Die Isolierung bzw. Anreicherung der Glykane und die Probenvorbereitung für folgende Versuche werden in diesem Abschnitt beschrieben.

#### 3.1.1. Nachweis von Glykoproteinen

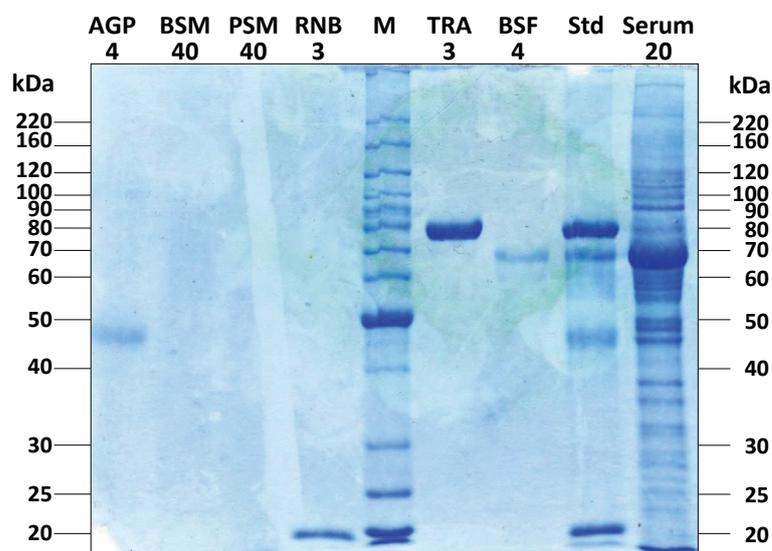
Um die Glykosylierung eines isolierten Proteins nachzuweisen, sind verschiedene Methoden anwendbar. Die einfachste Möglichkeit ist die Standardauftrennung durch SDS-PAGE. Im Vergleich zu nicht modifizierten Proteinen sind, wie Abbildung 31 zeigt, nur unscharfe (Spur 4) oder mehrere Banden (Spur 2) sichtbar. Die Variation an gebundenen Glykanen führt zu keiner absoluten Masse, sondern einer sichtbaren Variabilität für das Glykoprotein.



**Abbildung 31:** Glykoproteine nach Auftrennung im 12,5%igen SDS-Gel (1 = Marker, 2 = exprimierte Glykopeptid-IgG-Fusion 10  $\mu$ g, 3 = 2 nach Abspaltung des Glykopeptids (28 Aminosäuren=3,4 kDa) 10 $\mu$ g, 4 = Referenz-Glykoprotein AGP 10  $\mu$ g)

Durch die Abspaltung des Oligosaccharid-tragenden Peptides oder den enzymatischen Verdau mit PNGase F (bei N-Glykanen) entstand nur eine definierte Bande (Spur 3), welche die Masse der verbleibenden Aminosäuren darstellte.

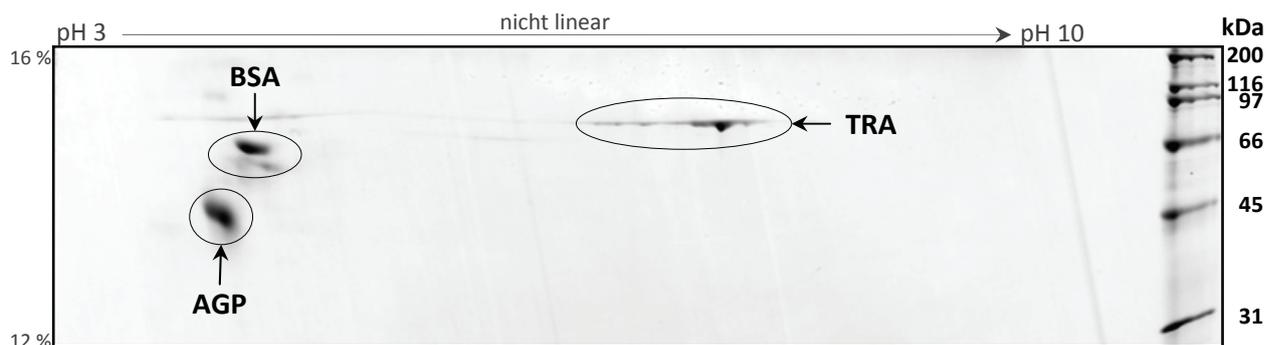
Im SDS-Gel ist jedoch auch eine Problematik von Glykoproteinen sichtbar. Die Anfärbung von Peptiden in Gelen oder deren kolorimetrische Quantifizierung wird durch die räumliche Abschirmung der Aminosäuren durch die Zuckerstrukturen erschwert. Die Beeinflussung durch die Primärstruktur des Eiweiß-Moleküls ist dabei vergleichsweise von geringerer Bedeutung. In Abbildung 32 wurden verschiedene Glykoproteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die angegebenen Proteinmengen zeigten keine korrelierende Detektion. BSM und PSM, deren Peptidanteil 15-30% der Gesamtmasse beträgt, waren kaum sichtbar. Die Banden entsprachen nicht den zu erwartenden Größen aus der Aminosäure-Zusammensetzung (S. 36). Im Falle des Auftretens von größeren Molekülen nach Expressionen sollte somit die Glykosylierung berücksichtigt werden. Da diese in und vor allem zwischen Zellen stark variieren kann, ist die Größendifferenz die durch die Oligosaccharide verursacht wird, nicht genau abschätzbar und muss durch entsprechende Methoden charakterisiert werden.



**Abbildung 32: SDS-PAGE (10%ig) zum Vergleich von Anfärbung bzw. Proteinbestimmung von verschiedenen Glykoproteinen** (unter Angabe der Konzentration in  $\mu\text{g}$  nach Herstellerangabe oder BCA-Bestimmung, M = Marker, Std = Standard aus den im Gel verwendeten Glykoproteinen, Abk. S. 36)

Die unterschiedliche Intensität der Proteinbanden verweist auf die Beeinflussung der Quantifizierung von Probenmengen, die aber eine wichtige Voraussetzung für nachfolgende analytische Methoden darstellt. Eine höhere Genauigkeit kann nur erzielt werden, wenn die Messungen erst nach Entfernung der Glykane erfolgen.

Ist die Glykosylierung von weiterem Interesse, kann die 2-D-Gel-Elektrophorese angewandt werden (Abbildung 33), bei welcher in der ersten Dimension nach dem isoelektrischen Punkt und in der zweiten nach der Molekülgröße aufgetrennt wird. Hierdurch ist die Modifikation eindeutig sichtbar und Änderungen, z.B. bei verschiedenen Zellkulturen, können nachgewiesen werden.



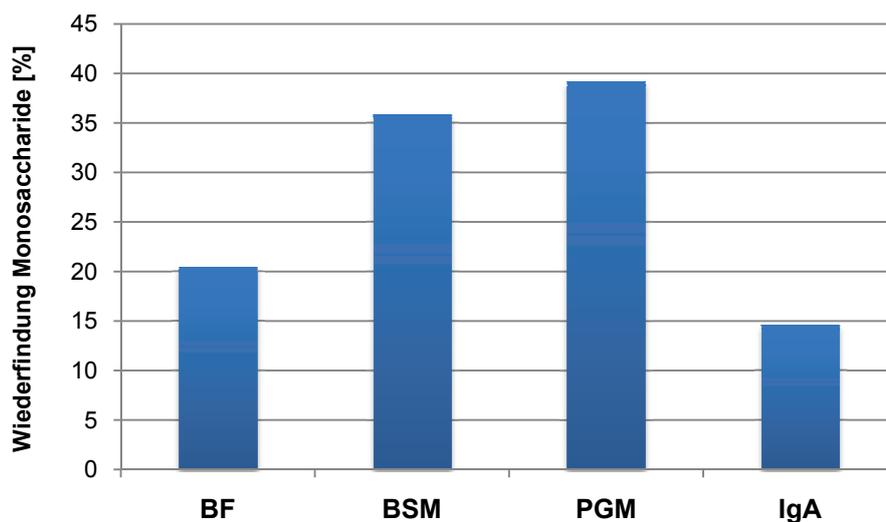
**Abbildung 33: 2D-SDS-Gel mit den Glykoproteinen AGP, BSA und TRA** (Gradientengel ca. 12-16%, pH 3-7 nicht linear) Die größere Anzahl an unscharfen Banden gibt die unterschiedlichen Glykosylierungsformen wieder.

Zur weiteren Strukturaufklärung der vorhandenen Oligosacchariden mussten diese in Abhängigkeit von der Probe und der Glykosylierungsart isoliert werden.

### 3.1.2. Isolierung von O-Glykanen

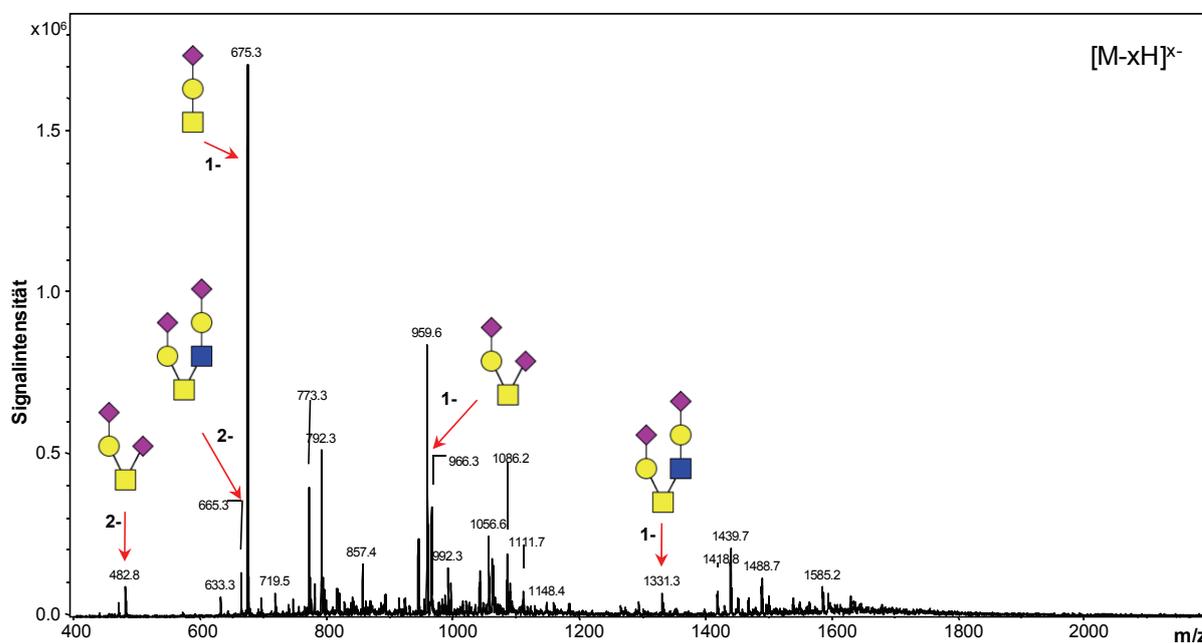
Die bereits etablierte Isolierung und Charakterisierung von N-Glykanen sollte in dieser Arbeit weiter optimiert und auch für O-Glykane ermöglicht werden. Die an Serin oder Threonin gebundenen Oligosaccharide können nur mit wenigen spezifischen Enzymen abgespalten werden, die jedoch nur definierte O-Glykane erkennen und freisetzen. (Abdullah *et al.*, 1992; Sutherland *et al.*, 1992). Aus diesem Grund sind vor allem chemische Methoden verbreitet (Edge *et al.*, 1981; Patel *et al.*, 1993; Greis *et al.*, 1996; Hanisch *et al.*, 2001; Florea *et al.*, 2002; Knirel & Perepelov, 2002; Merry *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2002; Peter-Katalinic, 2005; Yamada *et al.*, 2007).

Für die Versuche zur O-Glykan-Isolierung wurde die  $\beta$ -Eliminierung ausgewählt, die nach der Abspaltung der N-Glykane an den verbleibenden Glykopeptiden erfolgte. Von den verschiedenen Abwandlungen der Methode wurde im ersten Experiment eine kontinuierliche Freisetzung der Oligosaccharide von C18-gebundenen Glykoproteinen angewandt (S. 38) (Karlsson & Packer, 2002). Von den verwendeten Glykoproteinen BF, BSM, PGM und IgA waren Daten zum O-Glykan-Anteil bekannt und der Vergleich der Monosaccharid-Analyse ohne bzw. mit Hydrolyse diente der Einschätzung der Methodeneffizienz. Die Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse für die einzelnen Glykoproteine in Form der prozentualen Wiederfindungsraten. Der mittlere Wert von ca. 30% für das Gesamtexperiment war in Hinblick auf geplante Projekte im  $\mu\text{g}$ -Bereich nicht ausreichend. Zusätzlich ist die Nutzung einer HPLC-Anlage für 16 Stunden je Probe eine ungünstige Voraussetzung im hohen Probendurchsatz.



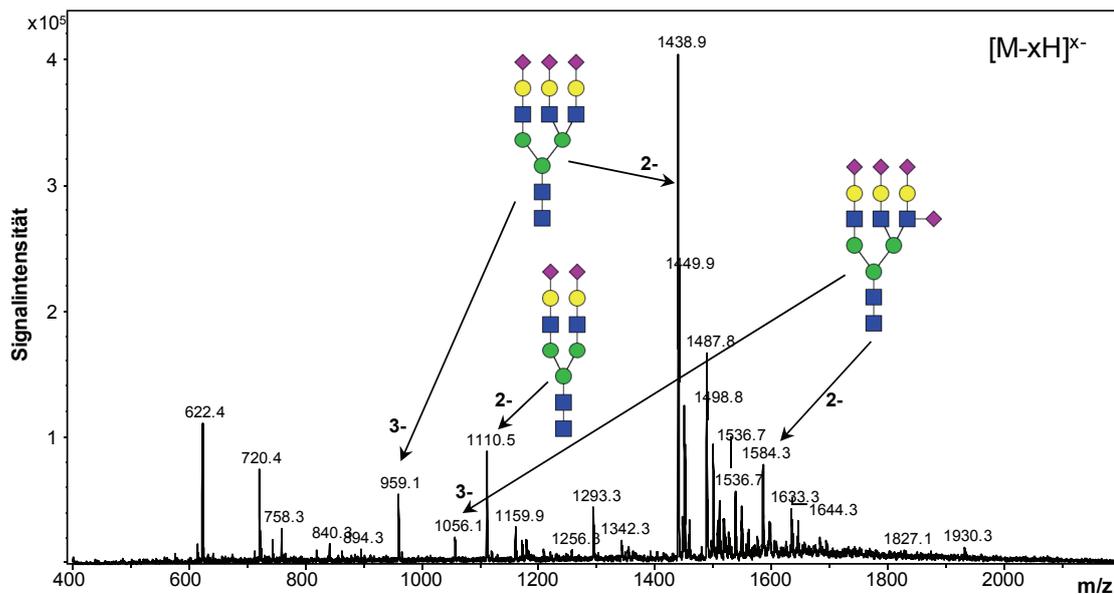
**Abbildung 34: Wiederfindungsraten von Glykanen nach der kontinuierlichen Freisetzung mittels KOH-Hydrolyse** Grundlage war der Mittelwert aus den quantitativen Monosaccharid-Bestimmungen

Aus diesen Gründen wurde als weitere Methode die  $\beta$ -Eliminierung verwendet (S. 37) (Huang *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2002; Bäckstrom *et al.*, 2003). Die Hydrolyse erfolgte direkt mit NaOH und NaBH<sub>4</sub>. Bei direkter Verwendung von Rinder-Fetuin waren N- und O-Glykane detektierbar (Abbildung 35).



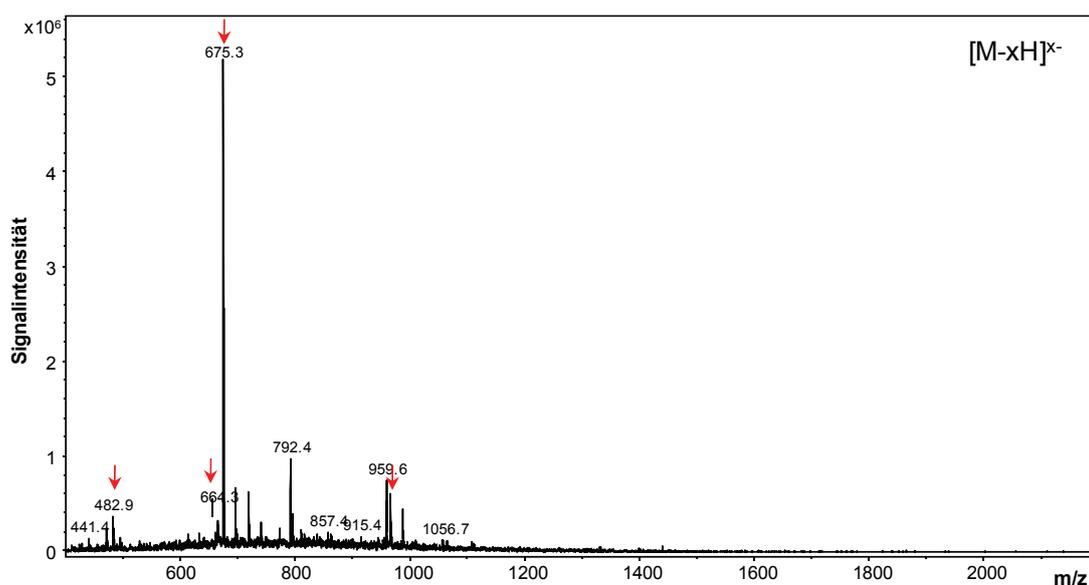
**Abbildung 35: ESI-IonTrap-MS-Spektrum nach  $\beta$ -Eliminierung von Rinder-Fetuin** Dieses Protein enthält O-Glykane (mit Struktur und Ladung angegeben) und N-Glykane

Wie in der Abbildung 13 (S. 39) ersichtlich, konnten die N-Glykane durch die Verwendung von C18-Material (Durchlauf) nach der PNGase F-Behandlung isoliert werden (Abbildung 36).



**Abbildung 36:** ESI-IonTrap-MS-Spektrum nach Trypsin/PNGase F-Behandlung von Rinder-Fetuin und anschließender C18-Chomatographie (Durchlauf) Es liegen nur N-Glykane vor (mit Struktur und Ladung angegeben)

Nach Elution der auf dem RP-Material verbliebenen O-Glykan-Peptide, waren deren Oligosaccharide mittels  $\beta$ -Eliminierung freizusetzen. Das Resultat ist in der Abbildung 37 dargestellt. Es konnten vorwiegend O-Glykane nachgewiesen werden. Die Anteile der N-glykosidisch gebundenen Oligosaccharide stammen von einem unvollständigen PNGase F-Verdau, deren Freisetzung erst mit der  $\beta$ -Eliminierung erfolgte.



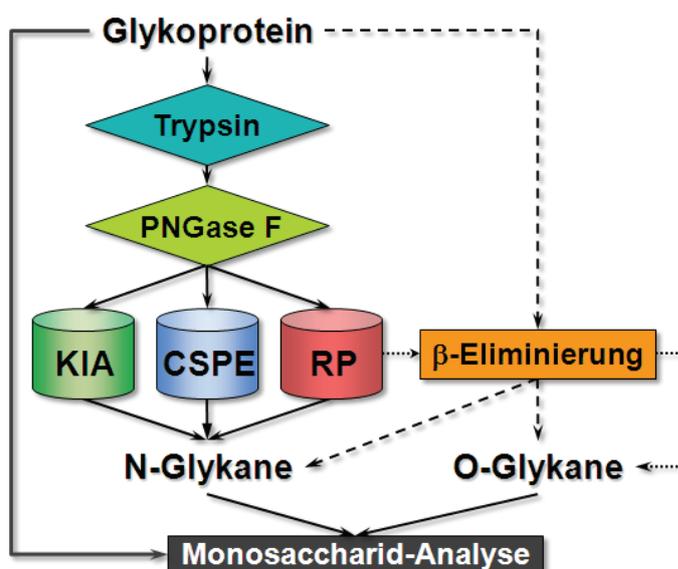
**Abbildung 37:** ESI-IonTrap-MS-Spektrum nach Trypsin/PNGase F-Behandlung von Rinder-Fetuin und anschließender C18-Chomatographie (Eluat), sowie  $\beta$ -Eliminierung Die O-Glykane (markiert) und geringe Mengen an N-Glykanen sind sichtbar

Unter Berücksichtigung des Schemas auf der Seite 82 konnten sowohl die N-Glykane, als auch die O-Glykane aus BF isoliert und in der MS zugeordnet werden. Die Auswertung der Daten sollte immer mit dem Vergleich beider Isolate erfolgen. Die Wiederfindungsrate ist im folgenden Kapitel 3.1.3 dargestellt und betrug das 1,5-fache der vorher erläuterten kontinuierlichen Hydrolyse.

Eine separate Strukturcharakterisierung von N- und O-Glykan war mit beiden Methoden möglich, wobei die zuletzt beschriebene als Standardmethode weiter verwendet wurde (S. 37). Diese wies eine einfachere Handhabung und eine höhere Effizienz auf. Diese Freisetzung von Oligosacchariden war jedoch nicht nur für O-Glykane geeignet, sondern stellte auch eine Alternative für die Probenherstellung zur Analyse von N-Glykanen mittels MS dar.

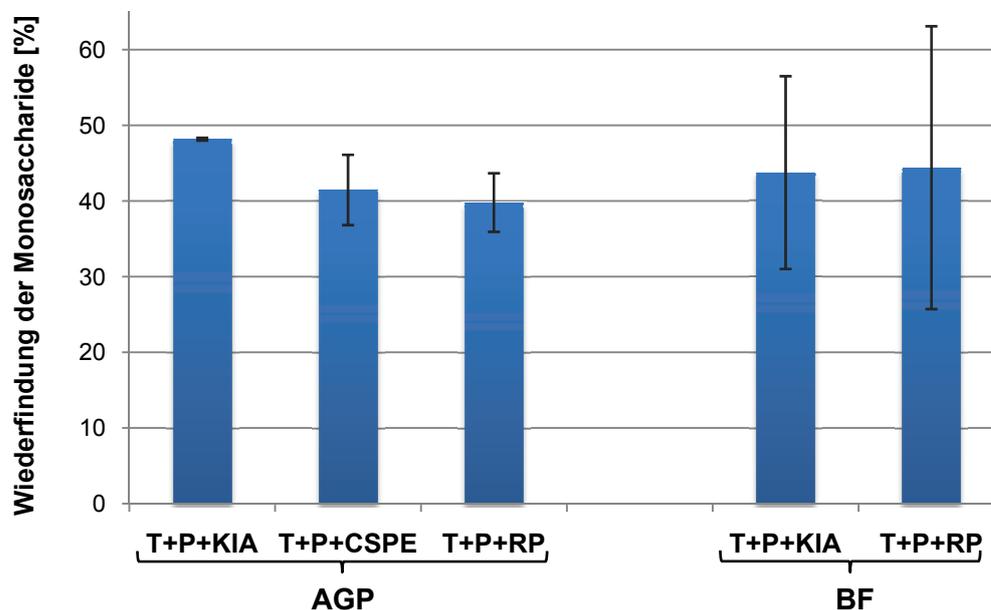
### 3.1.3. Vergleich von Isolierungsmethoden

Für die Isolierung und Entsalzung der Glykane bzw. Abtrennung von Peptiden vor der HPLC oder MS standen verschiedene Methoden zur Verfügung (Abbildung 38). Ein Vergleich der Wiederfindungsraten sollte die Wahl des entsprechenden Material erleichtern und eine Abschätzung der Verluste ermöglichen. Die einzelnen Reinigungen waren abhängig von Arbeitsziel und konnten auch miteinander kombiniert werden, wie in der Aufreinigung nach  $\beta$ -Eliminierung (S. 37). Einerseits durfte der Glykan-Anteil nicht zu gering sein, um aussagekräftige Resultate zu erhalten und andererseits musste der Verbrauch an Materialien so gering wie möglich gehalten werden.



**Abbildung 38: Schema zu Isolierung von Glykanen** Die anschließende Monosaccharid-Analyse (optional) diente der Verlustbestimmung; N-Glykane sind bei KIA und RP im Durchlauf und bei CSPE im Eluat zu finden; KIA=Kationenaustauscher; CSPE=Graphit-Material; RP=C18 Durchlauf (direkt) + Eluat (nach  $\beta$ -Eliminierung)

Ohne Differenzierung des Glykan-Typs und der Anteile an neutralen bzw. geladenen Strukturen ergab sich eine mittlere Wiederfindungsrate von 45 % für alle getesteten Methoden dieses Versuches.



**Abbildung 39: Wiederfindungsraten nach verschiedenen Isolierungen am Beispiel von AGP (nur N-Glykane) und BF (N- und O-Glykane) auf Basis der Monosaccharid-Analyse T+P=Trypsin und PNGase F-Behandlung**

Die Aufreinigung von AGP mittels KIA wies die geringsten Verluste auf. Zusätzlich erzeugten diese Glykane in der ESI-IonTrap-MS die Spektren mit dem besten Signal-Basis-Rauschen-Verhältnis und die höchsten absoluten Signalintensitäten (S. 168). Im Fall der Verwendung des RP-Materials führt die größere Anzahl an Arbeitsschritten auch zu einer Verringerung der Ausbeute. Bei BF lag der Wert mit KIA etwas niedriger, da die vorhandenen O-Glykane nur bei der Anwendung des RP-Materials mit  $\beta$ -Eliminierung freigesetzt wurden.

Die verschiedenen Methoden zur Glykan-Aufreinigung unterschieden sich in der Effizienz nicht wesentlich und sollten in ihrer Anwendung auf die Probe abgestimmt werden. Der Vergleich zwischen unterschiedlichen Glykoproteinen, in diesem Fall AGP und BF, ist nur bedingt möglich. Aufgrund des Einflusses der Art und Menge an proteingebundenen Oligosacchariden bzw. des Proteins selbst auf die Trypsin-/PNGase-F-Behandlung konnten keine identischen Ausgangsbedingungen für das Experiment sichergestellt werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Carbograph-Material (CSPE) primär für das Entsalzen oder HPLC-Auftrennung von Glykanen verwendet. Bei höheren Protein-Anteilen diente der KIA als Matrix. Die Umkehrphase eignete sich zur Separation von Glykanen und (Glyko-)Peptiden bzw. für die O-Glykan-Isolierung.

### 3.2. Charakterisierung von Glykanen mittels Massenspektrometrie

Der Nachweis und die Strukturaufklärung von Glykanen sind maßgeblich von der Massenspektrometrie abhängig. Bei diesen Arbeiten wurden direkte Messungen von Isolaten, den Fraktionen von HPLC-Läufen und Resultaten von Enzym-Behandlungen vorgenommen.

#### 3.2.1. Glykan-Analysen für die MALDI-TOF-MS

Die Standard-Matrix für das Arbeiten mit Glykanen ist Arabinosazon, welches im positiven Modus angewandt wird (Harvey, 1999). Eine Detektion ist dabei jedoch nur von neutralen Oligosacchariden möglich, so dass sialylierte Strukturen nicht sichtbar sind. Aus diesem Grund musste vor der Messung mit Sialidase behandelt werden. Zur Erweiterung des Analysenspektrums gab es zwei Möglichkeiten, die untersucht wurden.

1. Veränderung der Matrix oder
2. eine andere Ionisationstechnik (3.2.2)

Die Abbildung 40 zeigt das Spektrum desialylierter Glykane unter Verwendung von Arabinosazon.

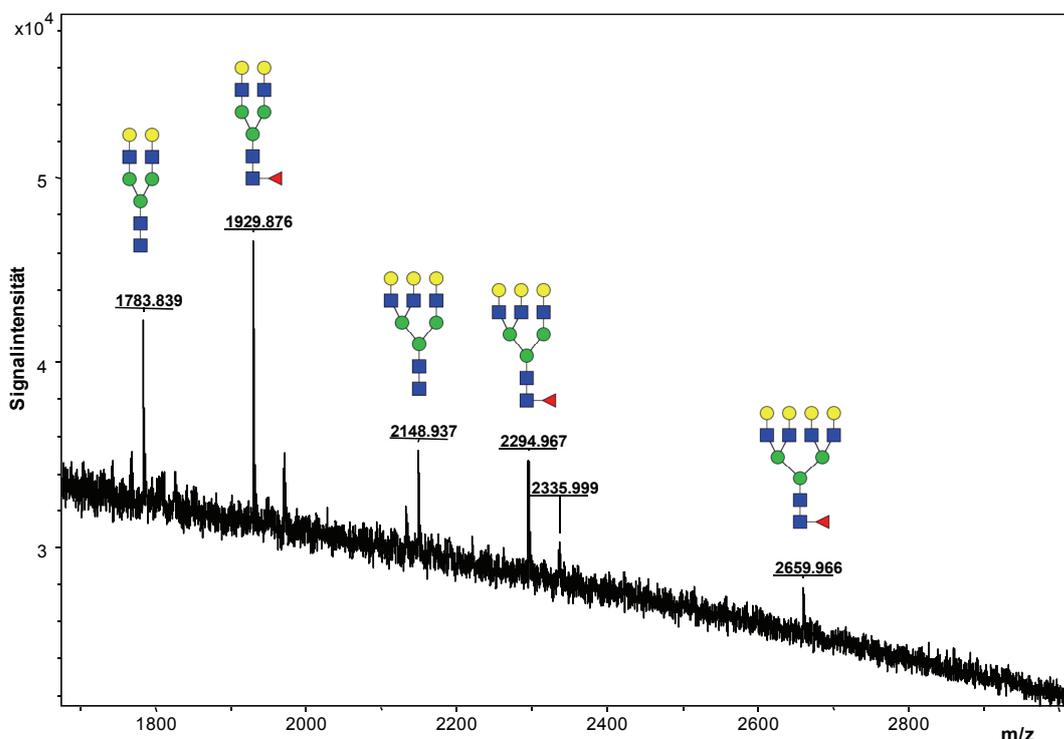
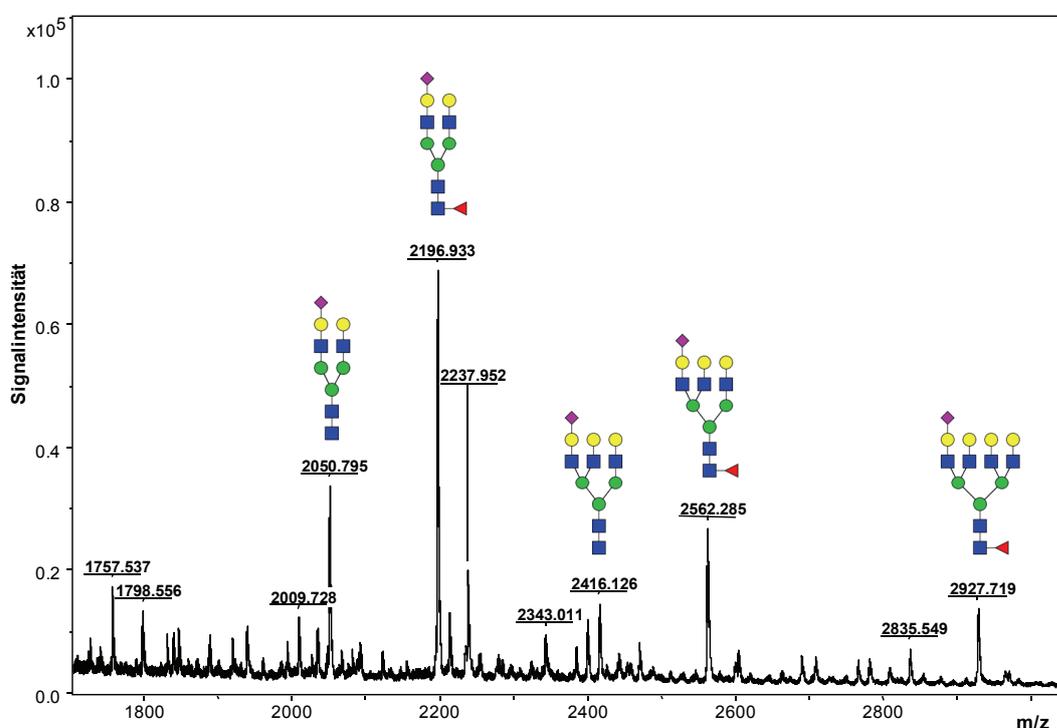


Abbildung 40: MALDI-TOF-Spektrum von desialylierten Glykanen aus HEK293-Zellen (2AB-markiert) Messung im positiven Modus mit der Matrix Arabinosazon

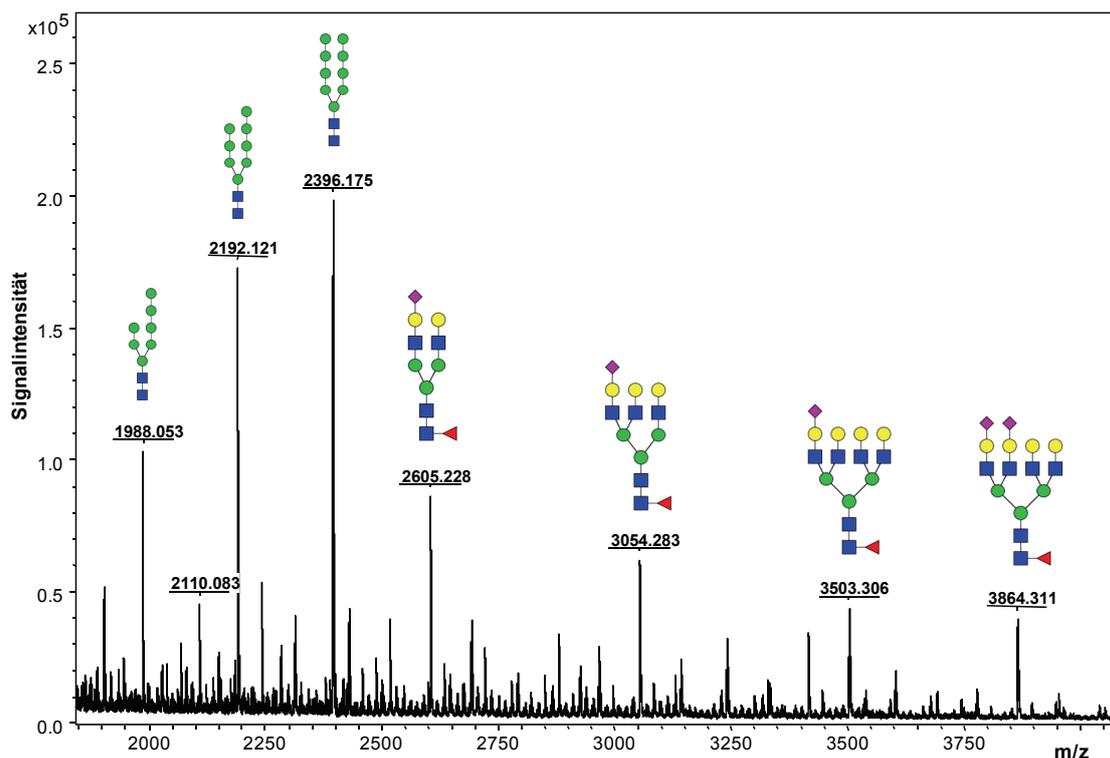
Nach Versuchen mit den Matrizes THAP und ATT (Papac *et al.*, 1996) war es möglich die nativen Oligosaccharide im negativen Modus zu detektieren (Abbildung 41) und somit einen höheren Informationsgehalt zu erzielen. Die Untersuchung der Sialylierung ist für die Zielstellung dieser Arbeit von besonderem Interesse.

Für Proben nach Auftrennung mit der HPLC zeigte die Matrix THAP eine höhere Signalintensität und ein gutes Verhältnis von Signal zu Basisrauschen. Der Einfluss von noch geringen Restmengen an Salzen nach Glykan-Aufreinigungen über KIA oder Carbograph-Material war gravierend. Es konnten teilweise keine Strukturen mehr detektiert werden. Die Matrix ATT zeigte dieses Verhalten nicht, verursachte jedoch stärkere Hintergrundsignale. Die Auswahl der optimalen Bedingungen war deshalb von der Probenpräparation und -menge abhängig oder konnte bei ausreichend Material mit beiden Matrizes durchgeführt werden. Im Vergleich zu Arabinosazon fielen für THAP und ATT die geringere Signalstärke und die höhere benötigte Laserintensität auf, so dass eine etwas höhere Probenmenge einzusetzen war.

Zur vollständigen Charakterisierung wurden die nativen und die desialylierten Glykane gemessen und die erhaltenen Daten für das vollständige Profil verwendet. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde die Permethylierung von Glykanen etabliert (S. 44), die mehrere Vorteile für die MS-Messungen erbrachte (Dell, 1990; Ciucanu, 2006).



**Abbildung 41: MALDI-TOF-Spektrum von Glykanen aus HEK293-Zellen (2AB-markiert) Messung im negativen Modus mit der Matrix THAP**



**Abbildung 42: MALDI-TOF-Spektrum von Glykanen aus HEK293-Zellen (permethyliert)** Messung im positiven Modus mit der Matrix Arabinosazon

Die Oligosaccharide besitzen nach der Derivatisierung zusätzliche Methyl-Gruppen, durch die der Ionisationsprozess weniger Struktur-abhängig ist. Die Anzahl der modifizierten Hydroxyl-Gruppen ist von der Struktur jedes Monosaccharides abhängig. Dadurch können nach der Permethylierung einige Strukturen voneinander differenziert werden, die im underivatisierten Zustand keine oder nur sehr geringe Massenunterschiede (<1 u) besitzen (Abbildung 42).

Die Abbildungen des Anhangs von Seite 168 bis 168 zeigen Spektren mit den verschiedenen Matrizes bzw. Derivatisierungen von Glykanen aus Zelllinien, die in den Supplementationsversuchen von Bedeutung waren. Für die Charakterisierung von Glykanen mit MALDI-TOF-MS war die Nutzung der Matrizes THAP bzw. ATT und die Permethylierung wichtige Methodenerweiterungen. Die Oligosaccharide konnten ohne Desialylierung und somit im nativen Zustand gemessen werden. Zusätzlich waren damit auch Zeit- und Materialersparnisse verbunden.

### 3.2.2. Etablierung der ESI-IonTrap-MS

Die Einarbeitung und Optimierung der Methodik wurde meiner Person übertragen und die gewonnenen Kenntnisse an die nachfolgenden Anwender weitergegeben. Zu diesem Zeitpunkt war das Ultraflex-MALDI-TOF-Gerät noch nicht vorhanden, so dass die Hauptanwendungen der Ionenfalle in der Fragmentierungsanalyse (Reinhold *et al.*, 1996) und der Messung von geladenen Glykanen (Chai *et al.*, 2001) lagen. Die Strukturaufklärung über die Spaltung von Mutter-Ionen

war eine in ihrer Wichtigkeit zunehmende Methode, die mit dem zu dem Zeitpunkt zur Verfügung stehenden Biflex-MALDI-TOF nicht möglich war. Nach der Einarbeitung für das Massenspektrometer sollte diese mit der HPLC-Komponente gekoppelt werden. Hierdurch können Proben direkt vor der Messung entsalzt und komplexe Proben aufgetrennt werden.

### 3.2.2.1. Massenspektrometrie

Mit den Bedingungen unter 2.11.2.1 konnten neutrale und geladene Glykane direkt detektiert werden (Spektren auf S. 168). Die Messung von desialylierten Strukturen im negativen Modus vereinfachte die Auswertung, da die verschiedenen Kationen nicht auftreten und somit nur ein Signal für die Ladung einer Struktur auftritt. Das Resultat der Optimierungen wurde im Methodenteil beschrieben und erlaubte Routine-Messungen (direkte Probeninjektion) von einzelnen Monosacchariden bzw. Aminosäuren (Daten nicht gezeigt) bis zu komplexen Peptiden und Glykanen.

Die Fragmentierung war in Abhängigkeit von der Probenkonzentration bis  $MS^4$  möglich und wurde mit der GlycoWorkbench (S. 63) ausgewertet. Für die Charakterisierung von Glykanen war der  $MS^2$ -Modus die Standard-Methode, bei der die ersten Fragmente durch die Abspaltung der Sialinsäuren entstanden (Daten nicht gezeigt).

### 3.2.2.2. Kopplung mit der HPLC

Die Verwendung einer HPLC-Kopplung sollte primär zur Auftrennung von komplexen Glykan-Proben erfolgen. Für die Fragmentierungsanalysen wäre es von Vorteil, jede Struktur einzeln vermessen zu können. Bei direkter Probeninjektion und teilweise über 30 Strukturen war dies nicht ohne einen hohen Probenverbrauch möglich. In der Zeit der Fragmentierung einer Struktur gehen die anderen verloren und sind nicht für die Datenaufnahme verwendbar. Eine Auftrennung durch eine HPLC würde dieses Problem umgehen, da die einzelnen Oligosaccharide konzentriert und zeitlich versetzt in der Ionenfalle eintreffen.

Die beschriebene Methode unter 2.11.2.3 ermöglichte jedoch keine vollständige Auftrennung. Die Glykane wurden bevorzugt nach ihrem Ladungszustand eluiert, d.h. einfach sialylierte Strukturen waren früher zu detektieren als mehrfach sialylierte (Daten nicht gezeigt). Die Auftrennung von Oligosacchariden konnte somit gezeigt werden, war jedoch noch durch andere Säulen und Gradienten zu optimieren.

Die verschiedenen angeeigneten, optimierten und etablierten analytischen Methoden stellten die Grundlage für die weiteren Versuche zur Modifikation von Glykanen in eukaryotischen Zellen dar.