

**Serumglykom-Charakterisierung und
automatisierte Strukturaufklärung der *N*-Glykane
beim Ovarialkarzinom**

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

Stefan Risch

aus Berlin

2012

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Januar 2007 bis Dezember 2010 am Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte, in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Markus Berger, angefertigt.

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. Christian Hackenberger

2. Prof. Dr. Stephan Hinderlich

Disputation am 12.07.2012

Das Glück ist das einzige,

das sich verdoppelt,

wenn man es teilt.

Albert Schweitzer (1875-1965)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	5
Symbolverzeichnis	7
Nomenklatur	8
1 Zusammenfassung	10
2 Abstract.....	11
3 Einleitung.....	12
3.1 Das Glykom	12
3.2 Glykosylierungen.....	12
3.2.1 N-Glykane.....	13
3.2.2 O-Glykane.....	16
3.2.3 Diversität und Anforderungen an die Analytik.....	17
3.3 Veränderung der Glykosylierung bei Krebserkrankungen	18
3.3.1 GlcNAc(β 1-6)Man-Verzweigungen	19
3.3.2 Polylaktosamine und Sialyl-Lewis ^x -Strukturen.....	21
3.3.3 Veränderung der Blutserumglykoproteine bei Krebs	22
3.4 Ovarialkarzinom	23
3.5 Glykoanalytik	25
3.5.1 Glykoanalytik von Glykoproteinen.....	25
3.5.2 Massenspektrometrie	26
3.5.3 HPAEC-PAD	26
3.5.4 HPLC	26
3.5.5 Kapillarelektrophorese.....	28
3.5.6 Zusammenfassung Glykoanalytikmethoden.....	29
3.6 Detektion O-Glykosylierungsstellen	30
3.7 Automatisierung	32
4 Zielsetzung.....	34
5 Ergebnisse.....	35
5.1 Experimentelles Design: Analyse der N-Glykane und Detektion von Biomarkern	35
5.2 Serumauflaufbereitung für die 2D-Gelelektrophorese.....	36
5.2.1 Borat-Chromatographie	36
5.2.2 Depletion-Kits und Anfärbung der Glykoproteine im 2D-Gel	38
5.2.3 Lektin-Chromatographie.....	39
5.3 <i>AnchorChip</i> mit Arabinosazon als Matrix.....	42
5.4 In-Gel-PNGase F-Behandlung.....	45
5.5 Automatisierung der Glykananalytik.....	48

5.5.1	Glykoproteine in Lösung.....	50
5.5.2	Blutserum	53
5.5.3	Glykoproteine aus SDS-PAGE-Gelen.....	56
5.6	Trennung von <i>N</i> -Glykan-Isomeren mittels Kapillarelektrophorese.....	58
5.6.1	Strukturen mit Fucose	59
5.6.2	Triisomere Strukturen.....	63
5.6.3	Bisecting-Strukturen.....	71
5.7	Potenzielle Glykan-Biomarker vom Ovarialkarzinom aus Blutserum.....	74
5.7.1	2D-Gele	74
5.7.2	Statistik zu den Serumglykoproteinen aus 2D-Gelen.....	77
5.7.2.1	Alpha-1-saures-Glykoprotein (A1AG).....	77
5.7.2.2	C1-Esterase-Inhibitor (IC1).....	79
5.7.2.3	Fetuin (FETUA)	79
5.7.2.4	Haptoglobin (HPT).....	82
5.7.2.5	Alpha-1-Antitrypsin (A1AT).....	85
5.7.2.6	Alpha-1-Antichymotrypsin (AACT).....	88
5.7.2.7	Transferrin (TRFE).....	91
5.7.2.8	Alpha-1B-Glykoprotein (A1BG).....	91
5.7.2.9	Hämopexin (HEMO).....	91
5.7.2.10	Vitamin-D-bindendes Protein (VTDB)	91
5.7.3	Statistik zu den <i>N</i> -Glykanen des gesamten Blutserums.....	95
5.7.4	Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse.....	97
5.8	Experimentelles Design: Analyse der <i>O</i> -Glykosylierungsstellen.....	99
5.9	Detektion von <i>O</i> -Glykosylierungsstellen.....	99
5.9.1	Biotin-GG-SH	104
5.9.2	Biotin-SH.....	107
5.9.3	Biotin-PEG-SH.....	107
6	Diskussion	112
6.1	Serumaufarbeitung für die 2D-Gelelektrophorese	112
6.2	<i>AnchorChip</i> mit Arabinosazon als Matrix	113
6.3	In-Gel-PNGase F-Behandlung und Automatisierung der Glykananalytik	114
6.4	Trennung von <i>N</i> -Glykan-Isomeren mittels Kapillarelektrophorese.....	117
6.5	Besonderheit des Transferrin	120
6.6	Potenzielle Biomarker für das Ovarialkarzinom aus Blutserum.....	120
6.6.1	2D-Gele, Proteinexpression und isoelektrischer Punkt der Serumproteine	120
6.6.2	Bedeutung einzelner <i>N</i> -Glykane und <i>N</i> -Glykangruppen.....	122
6.6.3	Zusammenfassung und Ausblick.....	125
6.7	Detektion von <i>O</i> -Glykosylierungsstellen.....	127
7	Material und Methoden	129

7.1	Materialien	129
7.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmittel	129
7.1.2	Enzyme	132
7.1.3	Lektine	132
7.1.4	Geräte, Software und Datenbanken	133
7.1.5	Zelllinien	134
7.1.6	Blutserumproben	134
7.2	Methoden	135
7.2.1	Borat-Chromatographie	135
7.2.2	Lektin-Chromatographie	135
7.2.3	Proteinbestimmung nach Bradford	136
7.2.4	SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Biosafe und Densitometrie	136
7.2.5	Western-Blot und Immunodetektion	137
7.2.6	2D-Gelelektrophorese	137
7.2.7	Fluoreszenzfärbung von Glykoproteinen	139
7.2.8	Enzymatische Freisetzung von <i>N</i> -Glykanen	139
7.2.8.1	Trypsin-PNGase F-Behandlung	139
7.2.8.2	PNGase F-Behandlung ohne Trypsin (automatisiert)	139
7.2.9	Reinigung der <i>N</i> -Glykane über Grafit	140
7.2.10	Desialylierung durch Essigsäurehydrolyse	141
7.2.11	Spaltung der <i>N</i> -Glykane durch Exoglykosidasen	141
7.2.12	Oligosaccharidtrennung mittels HPAEC-PAD	142
7.2.13	EXQuest Spot Cutter	143
7.2.14	In-Gel-Behandlung von Glykoproteinen mit PNGase F aus SDS-PAGE-Gelen	143
7.2.15	In-Gel-Behandlung von Glykoproteinen mit PNGase F aus 2D-Gelen (automatisiert)	145
7.2.16	In-Gel-Behandlung von Proteinen mit Trypsin	146
7.2.17	Permethylierung	147
7.2.18	MALDI-TOF/TOF-MS	147
7.2.18.1	<i>N</i> -Glykane mit Arabinosazon auf Ground Steel Target	147
7.2.18.2	<i>N</i> -Glykane mit Arabinosazon auf 800er AnchorChip Target	147
7.2.18.3	Peptide mit super DHB auf Ground Steel Target	148
7.2.19	Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie (ESI-MS)	148
7.2.20	Peptide mapping	148
7.2.21	Markierung der <i>N</i> -Glykane mit APTS	148
7.2.22	Reinigung der <i>N</i> -Glykane über Zellulose	148
7.2.23	Kapillarelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenz (CE-LIF)	149
7.2.24	Epimerisierung	149
7.2.25	Synthese der Biotin-Thiol-Linker	149

7.2.26 Herstellung des Fetuinstandards für die Biotin Markierung von O-Glykanstellen.....	150
7.2.27 Biotinmarkierung von O-Glykanstellen	150
7.2.28 Aufreinigung von Proteinen und Peptiden mit einem starken Kationenaustauscher.....	151
7.2.29 Proteinspaltung mit Trypsin	151
7.2.30 Proteinspaltung mit <i>peptidyl-Asp metalloendopeptidase</i> (Asp-N).....	151
7.2.31 Aufreinigung von biotinmarkierten Proteinen und Peptiden mit einer Avidinsäule.....	151
7.2.32 Aufreinigung von Peptiden mittels einer C18-Säule.....	152
7.2.33 Herstellung eines biotinylierten Fetuins über freie Amine	152
8 Literaturverzeichnis.....	153
9 Poster- und Publikationsliste.....	165
10 Curriculum vitae	166
11 Danksagung.....	167
12 Eigenständigkeitserklärung.....	168

Abkürzungsverzeichnis

2AB	2-Aminobenzamid
2D	zweidimensional
A1AG	alpha-1-saures-Glykoprotein
A1AT	alpha-1-Antitrypsin
A1BG	alpha-1B-Glykoprotein
A2GL	<i>Leucine-rich alpha-2-glycoprotein</i>
AACT	alpha-1-Antichymotrypsin
AcN	Acetonitril
APTS	Trinatrium-8-Aminopyren-1,3,6-trisulfonat (8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt)
Ara	Arabinosazon
Asp-N	<i>peptidyl-Asp metalloendopeptidase</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CA-125	Krebsantigen-125
CE	Kapillarelektrophorese
Con A	Concanavalin A
DH	Dextranhydrolysat
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DTE	1,4-Dithioerytriol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
FETUA	Fetuin, alpha-2-HS-Glykoprotein
FKS	fötales Kälberserum
Fuc	L-Fucose(n), 6-Desoxy-L-Galactose(n)
FucT	Fucosyltransferase(n)
Gal	D-Galactose(n)
GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin(e)
Glc	Glucose(n)
GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin(e)
GnT	<i>N</i> -Acetylglucosamin-Transferase(n)
HBTU	2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium- Hexafluorophosphat
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEMO	Hämopexin Beta-1B-Glykoprotein

Abkürzungsverzeichnis









HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPAEC-PAD	<i>High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection</i>
HPT	Haptoglobin
IC1	<i>plasma protease C1 inhibitor</i> C1-Esterase-Inhibitor
ICAT	<i>Isotope-coded affinity tag</i>
IgG(s)	Immunglobulin G
IGHA	Immunglobulin schwere Kette alpha (IgA)
IP	isoelektrischer Punkt(e)
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
LcH	<i>Lens culinaris</i> Agglutinin
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion
MAA	<i>Maackia amurensis</i> Agglutinin
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
Man	D-Mannose(n)
ManNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-mannosamin(e)
MS	Massenspektrometrie
Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure(n)
OGP	n-Octyl- β -D-glucopyranosid
PEG	Polyethylenglykol
PHA-L	Phytohemagglutinin-L
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNase B	Ribonuclease B
PNGase F	Peptid- <i>N</i> ⁴ -(<i>N</i> -Acetyl- β -glucosaminyl)asparagin-Amidase
RT	Raumtemperatur
SCX	<i>strong cation exchanger</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SNA-I	<i>Sambucus nigra</i> Agglutinin
super DHB	9:1 Mixtur von 2,5-Dihydroxybenzoesäure und 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure
TBP	Tributylphosphin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	<i>time of flight</i>
TRFE	Transferrin bzw. Serotransferrin
VTDB	Vitamin-D-bindendes Protein
WGA	<i>Wheat Germ</i> Agglutinin

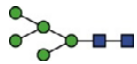
Symbolverzeichnis

φ (phi)	Volumenanteil
σ (sigma)	Volumenkonzentration
β (beta)	Massenkonzentration
c	Stoffmengenkonzentration

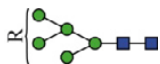
Nomenklatur

Die verwendete Nomenklatur basiert auf den Empfehlungen des „*Nomenclature Committee Consortium for Functional Glycomics*“ (<http://www.functionalglycomics.org/static/consortium/Nomenclature.shtml>). Im Folgenden werden die wichtigsten Symbole erläutert.

Symbol	Abkürzung	Monosaccharid
	Man	D-Mannose
	Gal	D-Galactose
	GlcNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-glucosamin
	ManNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-mannosamin
	GalNAc	<i>N</i> -Acetyl-D-galactosamin
	HexNAc	<i>N</i> -Acetyl-hexosamine
	Fuc	L-Fucose, 6-Desoxy-L-Galactose
	Neu5Ac	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure



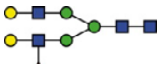
High-Mannose-5



High-Mannose-Grundstruktur; beinhaltet alle Glykane mit dieser Grundstruktur



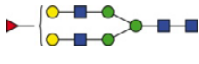
biantennäres *N*-Glykan



biantennäres *N*-Glykan mit einer antennären Fucose (Fuc); wobei nicht genau definiert ist, an welcher Antenne die Fuc gebunden ist



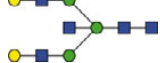
biantennäres *N*-Glykan mit *core*-Fuc



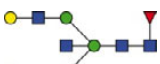
biantennäres *N*-Glykan mit einer Fuc; beinhaltet alle Arten von Fuc



biantennäre Grundstruktur; beinhaltet alle Glykane mit dieser Grundstruktur



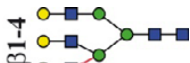
biantennäres *N*-Glykan mit einem *bisecting*-GlcNAc



biantennäres *N*-Glykan mit einem *bisecting*-GlcNAc und *core*-Fuc



biantennäre Grundstruktur mit einem *bisecting*-GlcNAc; beinhaltet alle Glykane mit dieser Grundstruktur



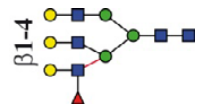
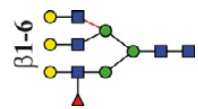
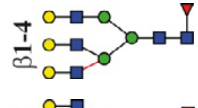
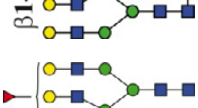
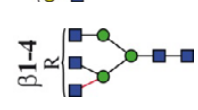
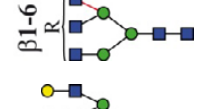
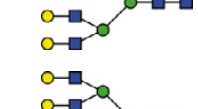
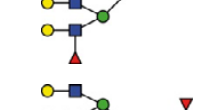
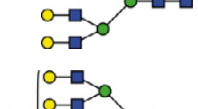
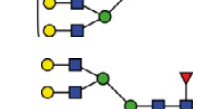
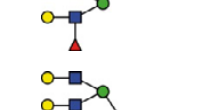
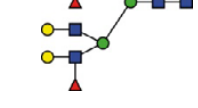
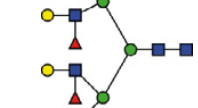
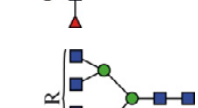

triantennäres *N*-Glykan mit der GlcNAc(β1-4)-Variante an der dritten Antenne



triantennäres *N*-Glykan mit der GlcNAc(β1-6)-Variante an der dritten Antenne



triantennäres *N*-Glykan, beinhaltet die GlcNAc(β1-4)-und GlcNAc(β1-6)-Variante

	triantennäres <i>N</i> -Glykan der GlcNAc(β 1-4)-Variante mit einer antennären Fuc; wobei nicht genau definiert ist, an welcher Antenne die Fuc gebunden ist
	triantennäres <i>N</i> -Glykan der GlcNAc(β 1-6)-Variante mit einer antennären Fuc; wobei nicht genau definiert ist, an welcher Antenne die Fuc gebunden ist
	triantennäres <i>N</i> -Glykan der GlcNAc(β 1-4)-Variante mit <i>core</i> -Fuc
	triantennäres <i>N</i> -Glykan der GlcNAc(β 1-6)-Variante mit <i>core</i> -Fuc
	triantennäres <i>N</i> -Glykan mit einer Fuc, beinhaltet die GlcNAc(β 1-4)- und GlcNAc(β 1-6) -Variante und alle Arten von Fuc
	triantennäre Grundstruktur mit der GlcNAc(β 1-4)-Variante an der dritten Antenne; beinhaltet alle Glykane mit dieser Grundstruktur
	triantennäre Grundstruktur mit der GlcNAc(β 1-6)-Variante an der dritten Antenne; beinhaltet alle Glykane mit dieser Grundstruktur
	tetraantennäres <i>N</i> -Glykan
	tetraantennäres <i>N</i> -Glykan mit einer antennären Fuc; wobei nicht genau definiert ist, an welcher Antenne die Fuc gebunden ist
	tetraantennäres <i>N</i> -Glykan mit <i>core</i> -Fuc
	tetraantennäres <i>N</i> -Glykan mit einer Fuc; beinhaltet alle Arten von Fuc
	tetraantennäres <i>N</i> -Glykan mit einer antennären und <i>core</i> -Fuc ; wobei nicht genau definiert ist, an welcher Antenne die Fuc gebunden ist
	tetraantennäres <i>N</i> -Glykan mit zwei antennären Fuc; wobei nicht genau definiert ist, an welchen Antennen die Fuc gebunden sind
	tetraantennäres <i>N</i> -Glykan mit drei antennären Fuc; wobei nicht genau definiert ist, an welchen Antennen die Fuc gebunden sind
	tetraantennäre Grundstruktur; beinhaltet alle Glykane mit dieser Grundstruktur

1 Zusammenfassung

Die *N*-Glykosylierung von Proteinen ist eine wichtige und häufig vorkommende, co-translationale Modifikation mit fundamental-biologischer Relevanz. Sie beeinflusst eine Vielzahl an Eigenschaften von Proteinen, so z. B. deren Stabilität, Sekretion, Protein-Protein Wechselwirkungen und ihre immunogene Aktivität. Veränderungen im Glykosylierungsmuster korrelieren häufig mit der Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen, einschließlich Krebs.

Gegenwärtig ist die Probenaufarbeitung für eine Hochdurchsatzanalyse von *N*-Glykanen nicht etabliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine robotergestützte Hochdurchsatzmethode im 96-*well*-Plattenformat entwickelt. Der Roboter ermöglicht die Behandlung von *N*-Glykanen mit PNGase F, die Entfernung der Sialinsäuren und die Derivatisierung des GlcNAc am reduzierenden Ende mittels APTS. Es können Proteine in Lösung, isolierte Glykoproteine aus SDS-PAGE-Gelen oder komplettes Blutserum verwendet werden. Eine Kombination von MALDI-TOF-MS und Kapillarelektrophorese (CE) wurde zur Analyse der *N*-Glykane erprobt. Erstmals gelang die kapillarelektrophoretische Auftrennung und Identifikation der zwei triantennären Isomere mit der GlcNAc(β 1-4)Man(α 1-3)Man und GlcNAc(β 1-6)Man(α 1-6)Man Antenne. Der neuartige Prozess wurde für die Suche nach potenziellen Biomarkern für das Ovarialkarzinom angewandt. Zehn Glykoproteine, isoliert aus 2D-Gelen und *N*-Glykane aus Blutserum, wurden analysiert. Die *N*-Glykane wurden mit PNGase F abgespalten und mittels MALDI-TOF-MS und CE untersucht. Das digalactosylierte biantennäre *core*-fucosylierte *N*-Glykan, die triantennäre Grundstruktur mit der GlcNAc(β 1-6)-Variante an der dritten Antenne, das tetragalactosylierte tetraantennäre *N*-Glykan mit einer antennären Fuc und das tetragalactosylierte tetraantennäre *N*-Glykan mit drei antennären Fuc wurden als potenzielle Biomarker identifiziert.

Weiterhin wurde eine Eintopfreaktion für die Detektion von *O*-Glykosylierungsstellen etabliert. Ein Biotin-Thiol-Reagenz wurde mittels Festphasensynthese am Cysteamin synthetisiert. Glycin und PEG wurden zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit eingeführt. Zur Detektion der *O*-Glykosylierungsstellen wurden die *O*-Glykane des Modellproteins Fetuin (FETUA) durch β -Eliminierung entfernt. Das entstandene Michael-System reagierte mit der Thiol-Gruppe des Biotin-Thiol-Reagenz. Über eine Avidin-Chromatographie und sich anschließende massenspektrometrische Untersuchungen konnten *O*-glykosylierte Peptide isoliert und identifiziert werden. Die Verwendung von zwei Biotin-R-SH Reagenzien mit unterschiedlicher Masse erleichterte die Identifikation *O*-glykosylierter Peptide.

2 Abstract

N-glycosylation of proteins is an important and frequently occurring co-translational modification. Glycans affect a number of proteins properties including stability, secretion, protein-protein interactions and immunogenicity, and are therefore of fundamental biological relevance. Changes in the glycosylation pattern are often associated with the development of a variety of diseases such as cancer.

So far limitations in sample preparation hamper high-throughput analysis of glycans. In this study, a robot-aided 96-well plate high-throughput method has been developed. The robot allows the release of *N*-glycans using PNGase F, the removal of sialic acids and the derivatization of reducing GlcNAc using APTS. It can handle recombinant glycoproteins in solution, glycoproteins from SDS-PAGE gels as well as serum. A combination of mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and capillary electrophoresis (CE) was used to analyze *N*-glycans. For the first time, separation and identification of the isomers of triantennary *N*-glycans, namely with GlcNAc(β 1-4)Man(α 1-3)Man and GlcNAc(β 1-6)Man(α 1-6)Man antennae were shown by CE. The novel process was used to search for potential ovarian cancer biomarkers. Ten glycoproteins were isolated from 2D-gels and analyzed as well as *N*-glycans from serum. *N*-glycans were cleaved using PNGase F and analyzed by MALDI-TOF-MS and CE. The core-fucosylated digalactosylated biantennary *N*-glycan, the triantennary *N*-glycan carrying a GlcNAc(β 1-6) on the third antenna, the tetragalactosylated tetraantennary *N*-glycan bearing one antennary fucose and the tetragalactosylated tetraantennary *N*-glycan bearing three antennary fucoses were identified as potential biomarkers.

Furthermore, a one-pot reaction for the detection of *O*-glycosylation sites has been established. A biotin-thiol reagent was produced by solid phase synthesis using cysteamine. Glycine and PEG as groups conferring water solubility were introduced. For the detection of *O*-glycosylation sites *O*-glycans from the model protein fetuin were removed by β -elimination. The resulting Michael-System reacts with the thiol group of the biotin-thiol reagent. *O*-glycosylated peptides were isolated and identified using avidin-chromatography and mass spectrometry. The use of two biotin-R-SH reagents with different masses improved the identification of *O*-glycosylated peptides.

3 Einleitung

3.1 Das Glykom

Die meisten Menschen verstehen Zucker in erster Linie als ein Grundnahrungsmittel und somit als den süßen Begleiter des Lebens. Die Wissenschaft betrachtete Zucker lange Zeit vorrangig als Energiespeicher, strukturelles Material oder als „Dekoration“ der Zelloberfläche (Schmidt 2002; Berg et al. 2003). Mit dem wachsenden Forschungsfeld der Glykobiologie konnte die Beteiligung von Zuckern an fast allen biologischen Abläufen wie der Proteinfaltung und Stabilität, der Differenzierung von Zellen und der Signaltransduktion nachgewiesen werden (Vanderschaeghe et al. 2010a).

Als Glykom wird die Gesamtheit aller Glykane eines Organismus, einer Zelle oder Körperflüssigkeit zu einem genauen Zeitpunkt unter bestimmten Bedingungen bezeichnet. Die Erforschung des Glykoms stellt für die Wissenschaft eine große Herausforderung dar, da Glykanstrukturen nicht linear aufgebaut sind. Aufgrund seiner reaktiven Hydroxylgruppen kann ein Monosaccharid mehrere Verknüpfungen bilden. Aus zwei verschiedenen Hexosen lassen sich 16 verschiedene Disaccharide konstruieren und aus drei verschiedenen Hexosen bereits 81 Trisaccharide. Monosaccharide liegen in der Natur nicht als Kette vor, sondern in Furanose- und Pyranoseringen, welche in zwei verschiedenen anomeren Konfigurationen vorkommen. Die Glykanstrukturen sind im Gegensatz zu Proteinen nicht direkt durch die DNA codiert. Das Genom codiert für Enzyme, die die Monosaccharide synthetisieren, aktivieren und mit ihrem Zielprotein verbinden (Abbildung 3-1) (Schmidt 2002; Lottspeich and Engels 2006; Varki et al. 2009). 1 % der ca. 30000 humanen Gene codiert für Enzyme, die in die Glykosylierung involviert sind (Roest Crollius et al. 2000; Schmidt 2002; Varki et al. 2009).

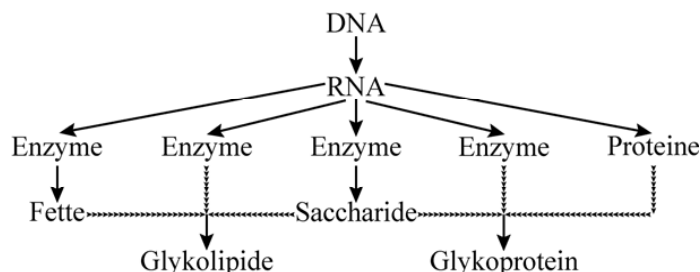


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Entstehung des Glykoms.

3.2 Glykosylierungen

Glykosylierungen sind co- und posttranslationale Modifikationen, welche sich durch ihre Verknüpfungsarten zu Fetten oder Proteinen unterteilen. Bei den Glykoproteinen sind die

Glykane *N*-glykosidisch über *N*-Acetyl-D-glucosamin (GlcNAc) am Asparagin, *O*-glykosidisch an Serin und Threonin oder über das Phosphat eines Phosphoserins gebunden. *C*-glykosidische Verknüpfungen erfolgen über Mannose (Man) am Tryptophan. Proteoglykane sind Proteine die lange lineare Glykane tragen, welche *O*-glykosidisch am Serin über Xylose gebunden sind. Die Glykane bestehen aus einer Tetrasaccharidsequenz, an die sich ein wiederholendes Disaccharid aus Glykosaminoglykanen anschließt. Glykosphingolipide sind Glykolipide, bei denen die Glykane über Glucose (Glc) oder Galactose (Gal) mit der Hydroxylgruppe des Ceramids verbunden sind. Der Glykosylphosphatidylinositol-Anker ist ein Glykolipid, das mit dem C-Terminus eines Proteins verbunden ist und somit eine Brücke zwischen Protein und Lipid bildet (Abbildung 3-2) (Haynes 1998; Varki et al. 2001; Varki et al. 2009). Eine sehr seltene Verknüpfungsart ist die *S*-glykosidische Bindung an Cystein (Stepper et al. 2011).

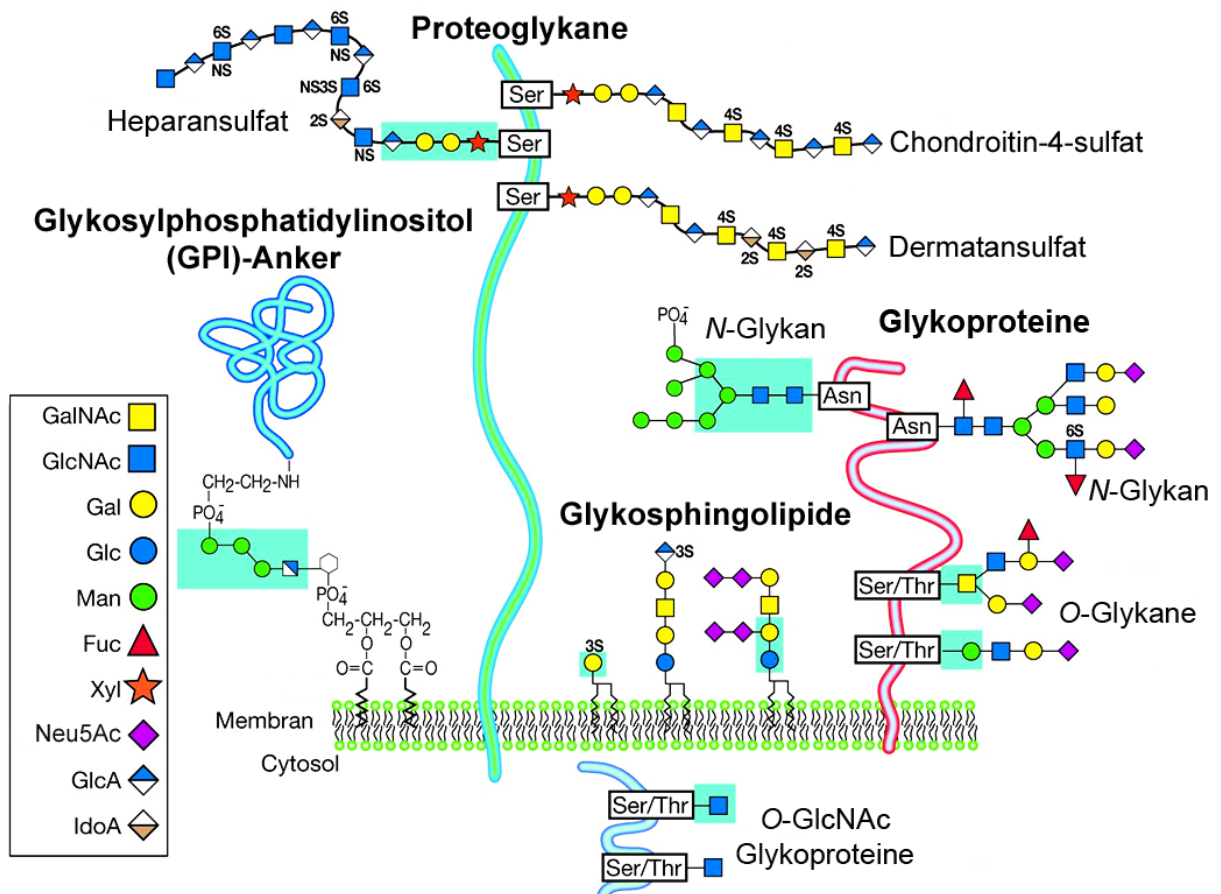


Abbildung 3-2: Glykosylierungen in tierischen Zellen (adaptiert nach Varki et al. 2009)

3.2.1 *N*-Glykane

Beim Menschen bestehen die *N*-Glykane hauptsächlich aus den Monosacchariden Man, Gal, Fucose (Fuc), GlcNAc und *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac). Allen *N*-Glykanen gemeinsam ist eine Pentasaccharid-*core*-Struktur aus zwei GlcNAc und drei Man, wobei das reduzierende Ende des GlcNAc mit dem Amidstickstoff des Asparagins verknüpft ist. Aufgrund der Ver-

bindung von Protein und Glykan über ein Stickstoffatom wird diese Klasse als *N*-Glykane bezeichnet. Es werden drei Typen von *N*-Glykanen unterschieden, der *High*-Mannose-, Komplex- und Hybrid-Typ. Beim *High*-Mannose-Typ sind beide Mannosereste der *core*-Struktur ausschließlich mit Man besetzt. Komplexe Strukturen tragen GlcNAc an den Man der *core*-Struktur, auf welche dann Gal und Sialinsäuren folgen können. Der Hybrid-Typ verbindet die beiden anderen *N*-Glykan-Varianten miteinander. Monosaccharide können sich mannigfaltig miteinander verbinden. Aufgrund des prinzipiell einheitlichen Grundaufbaus ist die Anzahl der möglichen *N*-Glykan-Strukturen jedoch reduziert (Abbildung 3-3) (Berg et al. 2003; Lottspeich and Engels 2006; Varki et al. 2009).

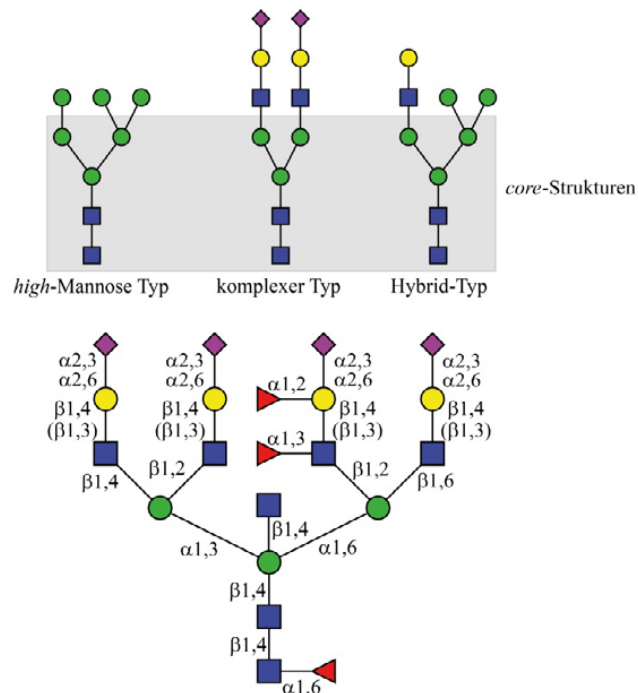


Abbildung 3-3: Die drei Grundtypen von *N*-Glykanen (oben). Schematische Darstellung einiger Verknüpfungsarten von komplexen *N*-Glykanen. In den Klammern stehen die selteneren Bindungsarten (unten).

N-Glykane benötigen die Konsensussequenz Asn Xxx Ser/Thr (Xxx = beliebige Aminosäure außer Prolin) in der Proteinkette, um sich mit dem Asparagin zu verbinden, wobei aber nicht alle potenziellen Glykosylierungsstellen genutzt werden. Der Ablauf der *N*-Glykosylierung von Proteinen wird in drei Schritte unterteilt: die Synthese des Vorläufer-Oligosaccharids, die Übertragung des Vorläufer-Oligosaccharids auf das Protein und die Bearbeitung des Vorläufer-Oligosaccharids zum endgültigen *N*-Glykan. Die Synthese des Vorläufer-Oligosaccharids beginnt mit der Verknüpfung eines GlcNAc mit dem Dolicholphosphat. Dieses Lipid ist zu Beginn der Synthese auf der cytosolischen Seite der Membran des rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER) verankert. Das erste GlcNAc wird um ein GlcNAc und fünf Man verlängert, bevor die Zuckerkette durch eine unbekannte Flippase auf die andere Seite der Membran in das Lumen des ER wechselt. Durch die Anknüpfung von vier weiteren

Man und drei Glc wird das Vorläufer-Oligosaccharid ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) vervollständigt. Die Monosaccharide, die für die Verlängerung notwendig sind, werden durch ein Dolicholphosphat in das Lumen des ER transportiert. Im zweiten Schritt wird das Vorläufer-Oligosaccharid durch den membrangebundenen Enzymkomplex Oligosaccharyltransferase an das Protein cotranslational übertragen. Das entstehende Protein wächst in das Lumen des ER und wird dort mit dem ersten GlcNAc des Vorläufer-Oligosaccharids am Asparagin *N*-glykosidisch verknüpft (Abbildung 3-4) (Taylor and Drickamer 2003; Kamerling et al. 2007; Varki et al. 2009).

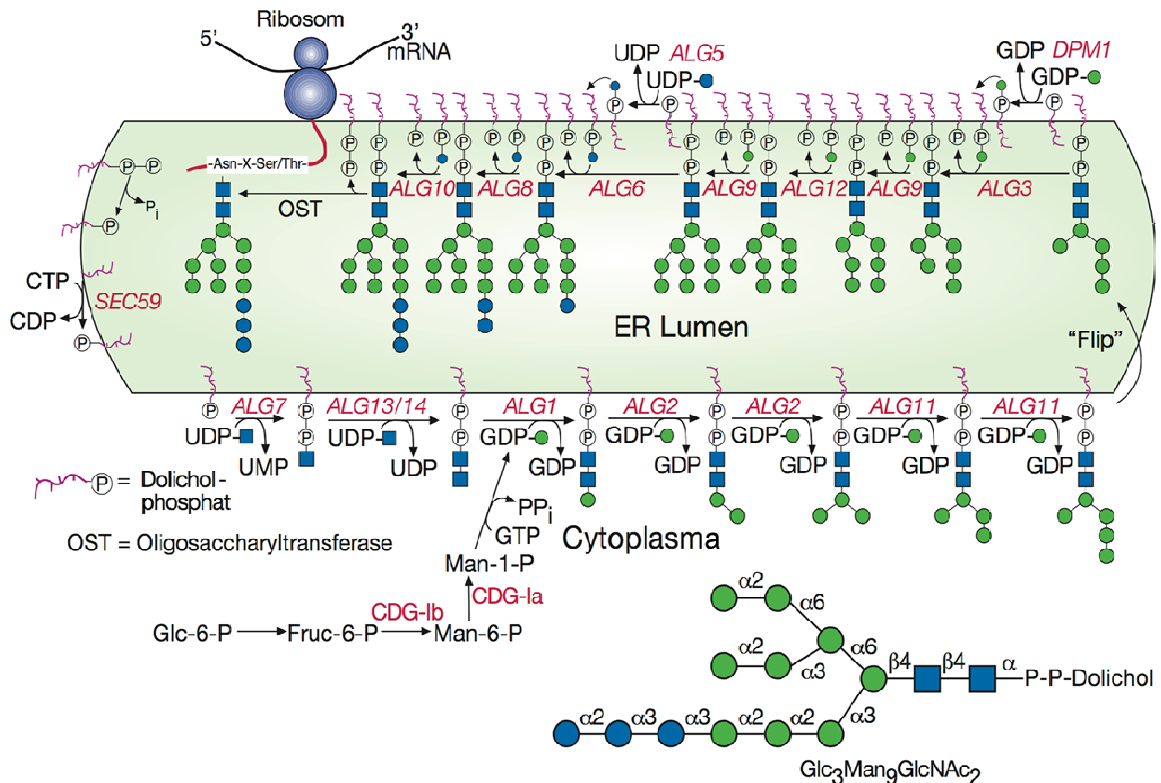


Abbildung 3-4: Synthese des Vorläufer-Oligosaccharid $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ im ER am Dolicholphosphat (adaptiert nach Varki et al. 2009).

Im dritten Schritt werden die ersten beiden Glc am nicht reduzierenden Ende des Vorläufer-Oligosaccharids abgespalten. Das entstandene Glykan $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}$ wird von den Chaperonen Calnexin und Calreticulin erkannt und unterstützt die Faltung. Wird die letzte Glc vor der richtigen Faltung des Proteins abgespalten, kann eine Glucosyltransferase das Oligosaccharid mit einer neuen Glc verknüpfen und die Faltung erneut initiieren. Bei korrekter Faltung wird eine Man abgespalten und das Protein gelangt in den Golgi-Apparat, wo die weitere Prozessierung der *N*-Glykane durch Glykosidasen und Glyktransferasen erfolgt. Die endgültige Glykosylierung hängt von der Bereitstellung der einzelnen aktivierten Monosaccharide, dem Zielprotein und der Aktivität der Transferasen in der jeweiligen Zelle ab (Abbildung 3-5) (Taylor and Drickamer 2003; Kamerling et al. 2007; Varki et al. 2009).

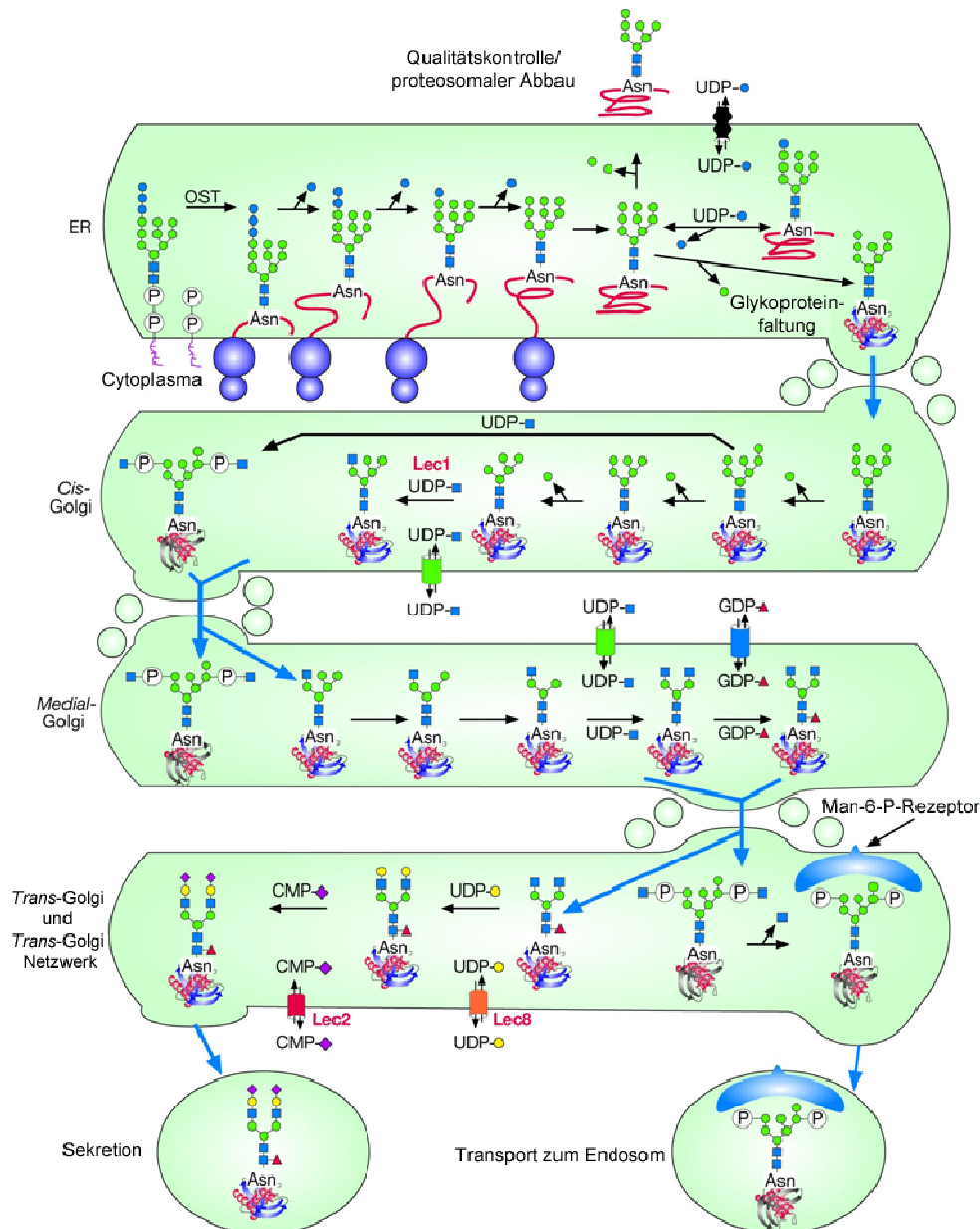


Abbildung 3-5: Prozessierung der N-Glykane im ER und Golgi-Apparat (adaptiert nach Varki et al. 2009).

3.2.2 O-Glykane

Die O-Glykosylierung erfolgt posttranslational im Golgi-Apparat durch die sukzessive Verknüpfung von Monosacchariden. Es gibt kein einheitliches Vorläufer-Oligosaccharid und keine bisher bekannte Konsensussequenz. Es gibt mehrere Transferasen, die Glykane mit dem Protein O-glykosidisch verknüpfen. O-Glykane sind weniger verzweigt als N-Glykane, haben aber eine höhere Strukturvielfalt in der Reihenfolge ihres Aufbaus. Eine häufige O-glykosidische Verbindungsart in Wirbeltierproteinen ist das α -verknüpfte N-Acetyl-D-galactosamin (GalNAc). Weiterhin sind O-glykosidisch-verknüpfte Fuc, Man, Gal, Glc, Xylose und GlcNAc bekannt. Das α -verknüpfte GalNAc vom Muzin-Typ besitzt acht core-Strukturen (Tabelle 3-1) (Taylor and Drickamer 2003; Varki et al. 2009).

Tabelle 3-1: core-Strukturen des α -verknüpften GalNAc vom Muzin-Typ

	Struktur
<i>core 1</i>	Gal(β 1-3)GalNAc α Ser/Thr
<i>core 2</i>	GlcNAc(β 1-6)[Gal(β 1-3)]GalNAc α Ser/Thr
<i>core 3</i>	GlcNAc(β 1-3)GalNAc α Ser/Thr
<i>core 4</i>	GlcNAc(β 1-6)[GlcNAc(β 1-3)]GalNAc α Ser/Thr
<i>core 5</i>	GalNAc(α 1-3)GalNAc α Ser/Thr
<i>core 6</i>	GlcNAc(β 1-6)GalNAc α Ser/Thr
<i>core 7</i>	GalNAc(α 1-6)GalNAc α Ser/Thr
<i>core 8</i>	Gal α (1-3)GalNAc α Ser/Thr

3.2.3 Diversität und Anforderungen an die Analytik

Die Glykane unterscheiden sich zwischen einzelnen Molekülen des gleichen Proteins. Der Unterschied in derselben Glykosylierungsstelle wird als Mikroheterogenität und der Unterschied des gesamten Glykanprofils eines Proteins als Makroheterogenität bezeichnet. Bei den *N*-Glykanen werden etwa 30 % der potenziellen Glykosylierungsstellen genutzt (Varki et al. 2009). Eine Glykosylierungsstelle kann somit mit und ohne Glykan vorkommen. Die Ribonuclease gibt es zum Beispiel in der nicht-glykosylierten Form als Ribonuclease A und mit *N*-Glykanen als Ribonuclease B (RNase B).

Bisher sind mehr als 500 Varianten von *N*-Glykanen aus Säugetieren bekannt (Taylor and Drickamer 2003). Die Glykane sind jedoch nicht spezifisch für ein einzelnes Protein. Durch die Anwesenheit eines bestimmten Glykans kann nicht auf die Komposition des gesamten Glykanprofils geschlossen werden. Der dynamische Konzentrationsbereich der *N*-Glykane ist außerdem hoch. Die Diversität der *N*-Glykane ist eingrenzbar, wenn Informationen über den Ursprung des Glykoproteins vorhanden sind. Im Laufe der Evolution ist der Glykosylierungsapparat höher entwickelter Organismen variantenreicher geworden (Abbildung 3-6). Einer der wenigen evolutionären Unterschiede zwischen den Schimpansen und dem Menschen ist die Fähigkeit *N*-Glycolylneuraminsäure zu produzieren, dessen Bedeutung Gegenstand diverser Studien ist (Martin et al. 2005; Varki and Gagneux 2009).

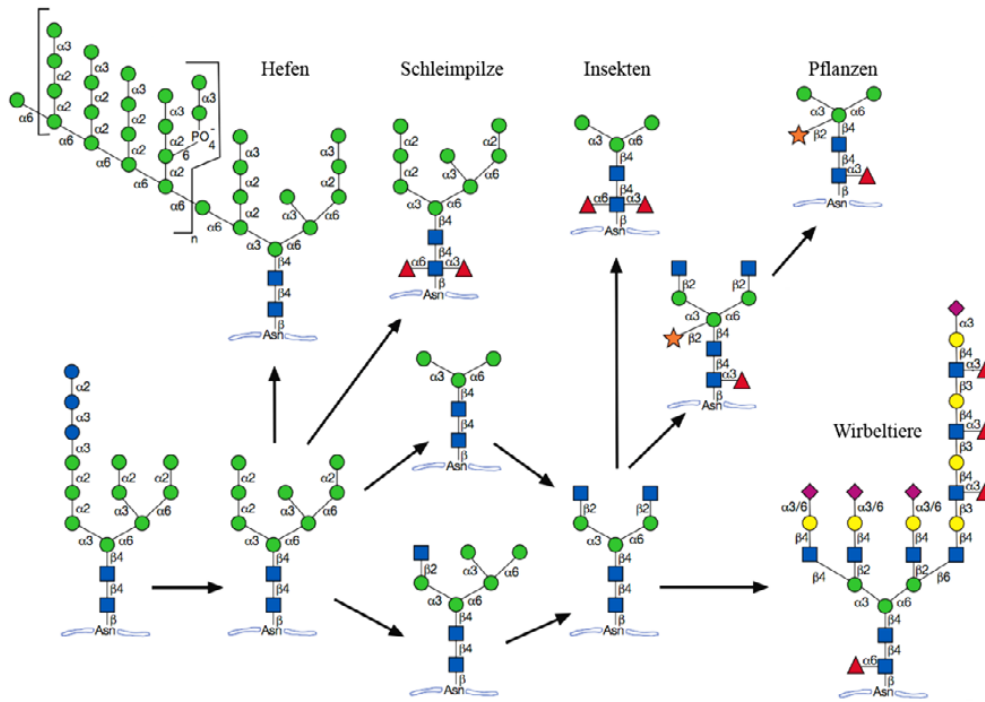


Abbildung 3-6: speziesspezifische N-Glykosylierung (adaptiert nach Varki et al. 2009).

Die Glykosylierung hängt aber nicht nur von der Spezies ab, sondern auch davon wie der genetische Code der Transferasen und anderer Enzyme umgesetzt wird, vom Vorhandensein von Substraten, der Proteinsequenz des Glykoproteins und anderer äußerer Faktoren. Die Wahl des Expressionssystems für die Herstellung rekombinanter Glykoproteine entscheidet über die Glykosylierung und somit die Funktionalität. Zelllinien werden nach den verschiedensten Anforderungen optimiert, z. B. nach Sialylierung (Mantey et al. 2001; Bork et al. 2009), *core*-Fuc (von Horsten et al. 2010) und Glykosylierungsstellen (Sinclair and Elliott 2005).

Der Einfluss der Proteinsequenz auf die Glykosylierung ist weitestgehend unbekannt. Serumproteine aus ein und demselben Organ, wie z. B. der Leber, haben ein unterschiedliches Glykanprofil, welches aber charakteristisch für des jeweilige Protein ist (Anumula 2006; Saldova et al. 2007; Sarrats et al. 2010). Dasselbe wird beobachtet, wenn verschiedene Glykoproteine in einer Zelllinie exprimiert werden (Lottspeich and Engels 2006). Glykosylierungen sind somit spezies-, gewebs-, zelltyp- und proteinspezifisch.

3.3 Veränderung der Glykosylierung bei Krebserkrankungen

Eine Veränderung der Glykane ist bei vielen natürlichen und krankheitsbedingten biologischen Prozessen, wie der Entstehung von Krebs, zu beobachten (Fuster and Esko 2005). Durch die Einführung der monoklonalen Antikörpertechnik wurde entdeckt, dass viele Krebsantigene (CA, *cancer antigen*) spezifisch gegen Glykanepitope von Glykolipiden gerichtet

sind. In vielen Fällen wurde gezeigt, dass die veränderte Glykanstruktur, die sowohl bei Tumoren als auch bei der normalen fetalen Entwicklung vorkommt, als onkofetales Antigen fungiert (Taylor and Drickamer 2003; Varki et al. 2009). Tumorassoziiert auftretende Strukturveränderungen der Glykosylierung sind gekennzeichnet durch eine relative Zunahme an tri- und tetraantennären *N*-Glykanen, eine Zunahme an Polylactosaminresten, einem erhöhten Anteil von GlcNAc(β 1-6)Man-Verzweigungen, einem erhöhten Gehalt an antennärer Fuc und Sialinsäuren sowie der vermehrten Expression von Lewis-Antigenen. Das Auftreten einer neuen Glykanvariante ist sehr selten, viel häufiger wird eine Veränderung in der Zusammensetzung der exprimierten Glykane beobachtet (Kim and Varki 1997; Dennis et al. 1999b; Dennis et al. 1999a). Die Forschung auf dem Gebiet der krebsassoziierten Glykosylierung konzentriert sich auf verschiedene Fragestellungen. Es wird versucht, die Bildung eines Karzinoms mit der veränderten Glykosylierung zu erklären und diese für diagnostische und therapeutische Zwecke zu nutzen (Fuster and Esko 2005; Arnold et al. 2008; Varki et al. 2009).

3.3.1 GlcNAc(β 1-6)Man-Verzweigungen

Für den Aufbau der Antennen von *N*-Glykanen sind die *N*-Acetylglucosamin-Transferasen (GnT) verantwortlich. Aufgrund der Spezifität der GnT unterliegt der Syntheseweg einer bestimmten Reihenfolge. Zuerst werden die biantennären *N*-Glykane hergestellt. Diese biantennären *N*-Glykane werden als Substrat von drei GnT genutzt. GnT-IV katalysiert die GlcNAc(β 1-4)Man-Verzweigung am Man(α 1-3)Man. Die GnT-V baut die GlcNAc(β 1-6)Man-Verzweigung am Man(α 1-6)Man auf. Das triantennäre *N*-Glykan mit der GlcNAc(β 1-4)-Variante an der dritten Antenne ist im Vergleich zum biantennären *N*-Glykan das bessere Substrat für die GnT-V, weshalb der Syntheseweg des tetraantennären *N*-Glykans bevorzugt in der Reihenfolge GnT-IV gefolgt von GnT-V abläuft. Die GnT-III ist für die Biosynthese des *bisecting*-GlcNAc verantwortlich. Ein *bisecting* GlcNAc inhibiert die Gesamtheit der GnT (Abbildung 3-7) (Brockhausen et al. 1988; Arnold et al. 2008; Varki et al. 2009).

Ein bekanntes Phänomen, das häufig in Verbindung mit einer Krebserkrankung steht, ist der Anstieg der GlcNAc(β 1-6)Man-Verzweigungen durch die erhöhte Expression der GnT-V. Als Beispiele sind Mammakarzinome (Dennis and Laferté 1989), kolorektale (Fernandes et al. 1991), ovariale (Takahashi et al. 2009) und Blasenkarzinome (Ishimura et al. 2006), sowie *maligne* Zellen, die von Patienten mit Sézary-Syndrom isoliert wurden (Derappe et al. 1996) und verschiedene Krebszelllinien (Wojciechowicz et al. 1995; Derappe et al. 1996) bekannt. Der Effekt auf die Glykosylierung wird beinahe ausschließlich durch die Lektinfärbung mit

Phytohemagglutinin-L (PHA-L) gemessen, was keine Aussage über die exakten Glykanstrukturen liefert. PHA-L hat eine hohe Affinität zum β 1-6-verknüpften GlcNAc (Cummings and Kornfeld 1982). Kaneda und seine Kollegen zeigten mit einer Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Messung, dass das biantennäre *N*-Glykan in der Assoziationsphase besser an PHA-L bindet als das tetraantennäre *N*-Glykan. In der Dissoziationsphase änderte sich das Verhalten dramatisch. Das tetraantennäre *N*-Glykan blieb gebunden und das biantennäre *N*-Glykan dissoziierte fast vollständig (Kaneda et al. 2002).

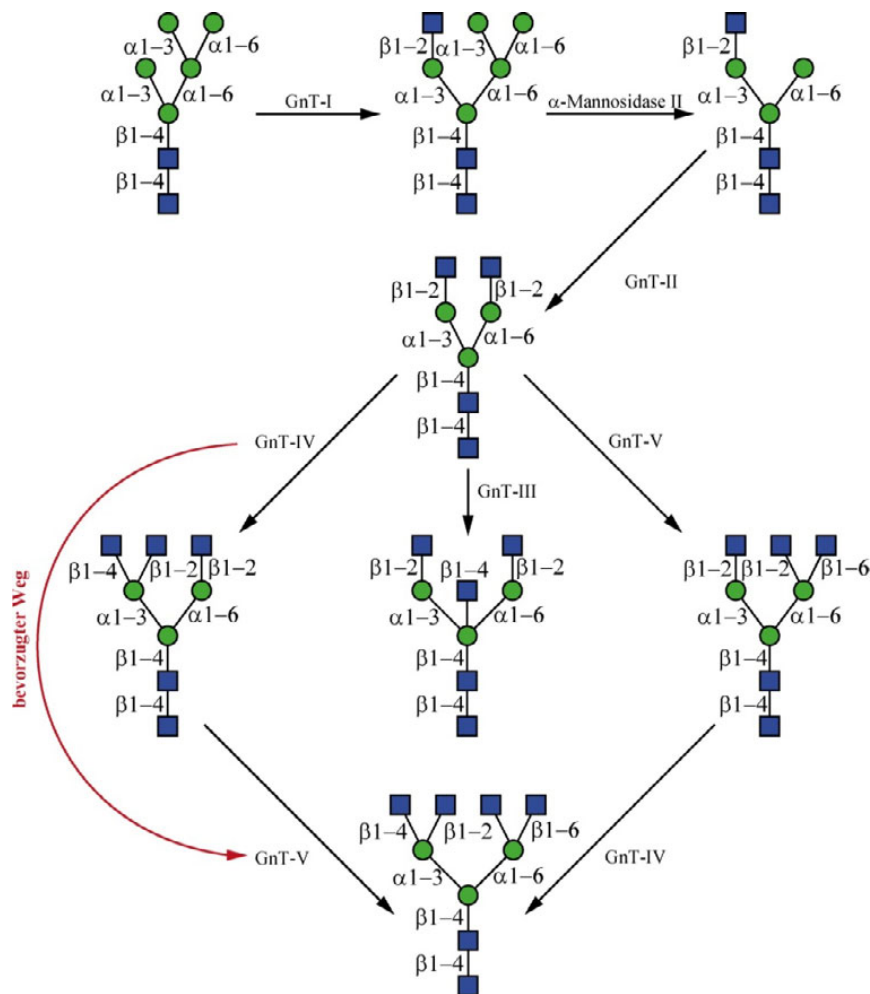


Abbildung 3-7: Verzweigung von komplexen *N*-Glykanen

Die GnT-V ist ein Transmembran-Glykoprotein, das im Golgi-Apparat lokalisiert (Shoreibah et al. 1993) und durch das Gen *magt5* codiert ist. Die Expression dieses Gens kann durch virale und chemische Karzinogenese erhöht werden. Zelllinien mit erhöhter GnT-V-Aktivität weisen meist eine erhöhte Metastasierungsneigung auf. Wenn Zelllinien mit cDNA von *magt5* transfiziert werden, zeigen sie typische Karzinomeigenschaften, wie z. B. maligne Transformation und erhöhte Kolonieformation auf Agar. Umgekehrt haben *magt5*-defiziente Mäuse eine Reduktion im Wachstum und der Metastasierung eines Mammakarzinoms (Granovsky et al. 2000). Diese Ergebnisse implizieren eine wichtige Rolle der GnT-V bei der Entwicklung eines Karzinoms (Dennis et al. 1999b; Dennis et al. 1999a; Varki et al. 2009).

3.3.2 Poly-laktosamine und Sialyl-Lewis^x-Strukturen

Bei der Krebsentwicklung geht die erhöhte GnT-V-Expression mit einer höheren Poly-*N*-Acetyllaktosaminkonzentration einher (Abbildung 3-8). Die Poly-*N*-Acetyl-laktosamine sind bevorzugt am GlcNAc(β 1-6)-verzweigten Arm zu finden und kommen auch bei *O*-Glykanen vor (Yousefi et al. 1991; Zhou 2003). Diese Poly-*N*-Acetyllaktosaminstrukturen sind vermehrt mit Fucosen (Fuc) und endständigen Sialinsäuren besetzt und bilden die Lewis^x und Sialyl-Lewis^x Strukturen, wie z. B. bei chronisch-myeloischen Leukämiezellen (Fukuda et al. 1985), kolorektalen Karzinomen (Saitoh et al. 1992) und murinen Melanomzellen B16-F1 (Ohyama et al. 1999). Poly-*N*-Acetyllaktosamine an Glykoproteinen beeinflussen auch die Lymphozyten- und Makrophagen-Aktivierung. Es wird vermutet, dass Poly-*N*-Acetyllaktosamine an *N*-Glykanen eine exzessive Immunantwort unterdrücken und das Grundniveau der Immunreaktivität regulieren (Togayachi et al. 2007).

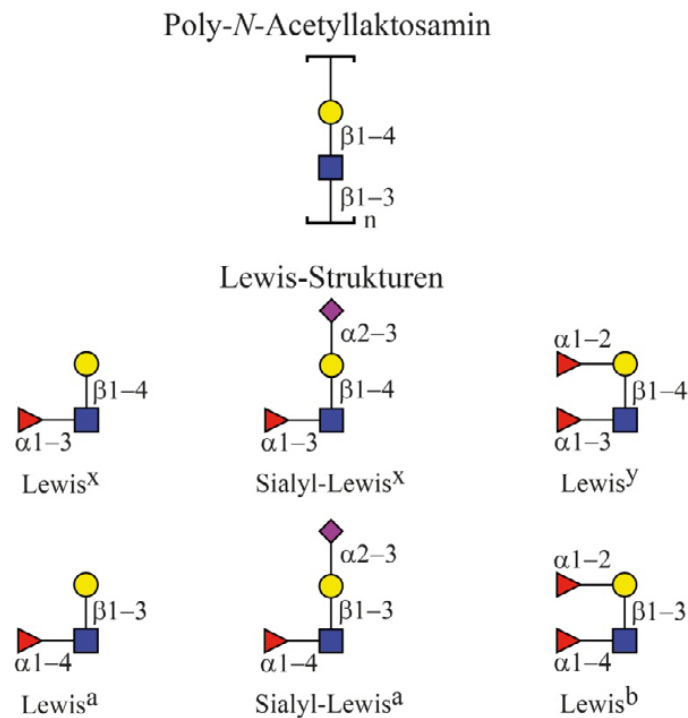


Abbildung 3-8: Poly-*N*-Acetyllaktosamin und Lewis-Strukturen

Eine Sialyl-Lewis^x-Struktur besteht aus einer α 2-3-verknüpften Neu5Ac zur Gal und einer α 1-3-verknüpften Fuc zum GlcNAc (Abbildung 3-8). Die α 2-3 Sialyltransferase-IV ist für die α 2-3-verknüpfte Neu5Ac verantwortlich. Diese α 2-3-verknüpfte Neu5Ac ist bevorzugt bei tri- und tetraantennären *N*-Glykanen zu finden (Nemansky et al. 1995). Sechs humane Gene codieren Enzyme, die für die α 1-3-verknüpfte Fuc verantwortlich sind. Sie werden als Fucosyltransferase III, IV, V, VI, VII und IX (FucT-III bis VII und FucT-IX) bezeichnet. Alle haben eine α 1-3 Aktivität, doch FucT-III und FucT-V können die Fuc auch α 1-4 verlinken (Ma et al. 2006). Sie werden zellspezifisch exprimiert und haben unterschiedliche Substrat-

affinitäten. Die FucT-VI scheint in der Leber für die α 1-3-verknüpfte Fuc verantwortlich zu sein (Brinkman-Van der Linden et al. 1996).

Die Lewis-Epitope Lewis^x, Sialyl-Lewis^x, Lewis^y, Sialyl-Lewis^a sind bei Krebserkrankungen häufig erhöht. Vor allem die dimeren Formen am Poly-*N*-Acetyllaktosamin-Rückrad korrelieren mit einer schlechten Prognose (Itzkowitz et al. 1986; Hoff et al. 1989; Dennis et al. 1999b). Bei Bauchspeicheldrüsenkrebszellen konnte gezeigt werden, dass durch das Ausschalten der FucT-III die Bildung von Sialyl-Lewis^x unterdrückt wird und der metastasenbildende Phänotyp verloren geht (Aubert et al. 2000). Die Sialyl-Lewis^x-Struktur hat eine hohe Bindungsaffinität zu Selektinen. Mit kolorektalen Karzinomzellen konnte eine *in-vitro* Bindung an Selektine (Mannori et al. 1995) und eine erhöhte Expression von Sialyl-Lewis^x und Sialyl-Lewis^a gegenüber dem Primärtumor im Metastasengewebe nachgewiesen werden (Hoff et al. 1989; Ogawa et al. 1992).

3.3.3 Veränderung der Blutserumglykoproteine bei Krebs

Eine veränderte Glykosylierung bei Tumorzellen und –geweben kann fast immer festgesellt werden. Ob diese Veränderungen im Blut oder anderen Körperflüssigkeiten nachweisbar und für die diagnostische Beweisführung geeignet sind, wird erst seit Anfang der 90er Jahre analysiert. Es gibt mehrere Möglichkeiten wie die Glykane von Tumorzellen in Körperflüssigkeiten gelangen, z. B. durch proteolytisches *shedding* an der Zelloberfläche, Apoptose oder Sekretion. Der Tumor selbst kann auch indirekt eine veränderte Glykosylierung bei der Herstellung der Glykoproteine in den gesunden Zellen auslösen.

Die meisten charakterisierten Veränderungen im *N*-Glykom von Blutserum bei Krebspatienten sind Erhöhungen der Antennarität und der Lewis^x sowie der Sialyl-Lewis^x-Strukturen (Arnold et al. 2008). Beim Mammakarzinom wurde eine erhöhte Konzentration von Sialyl-Lewis^x-Strukturen sowohl im Gesamtserum als auch bei einigen Serumproteinen festgestellt (Abd Hamid et al. 2008). Eine Erhöhung der *High*-Mannose-Strukturen wurde ebenfalls detektiert (de Leoz et al. 2010). Beim Pankreaskarzinom wurden erhöhte Werte für die Lewis^x und Sialyl-Lewis^x-Strukturen, die Antennarität und die *core*-Fuc, insbesondere bei alpha-1-saurem-Glykoprotein (A1AG) und Haptoglobin (HPT) gefunden (Okuyama et al. 2006; Miyoshi and Nakano 2008; Sarrats et al. 2010). Vermehrte Lewis^x, Sialyl-Lewis^x Strukturen und Antennarität im Gesamtserum und bei A1AG, HPT und alpha-1-Antichymotrypsin (AACT) wurden auch beim Ovarialkarzinom gefunden (Thompson et al. 1992; Saldova et al. 2007). Bei einer weiteren Erkrankung, der Leberzirrhose, wurden erhöhte Werte für das

bisecting-GlcNAc gefunden (Callewaert et al. 2004). Beim hepatozellulären Karzinom wurden für Hämopexin erhöhte Werte von Lewis^x-Strukturen (Debruyne et al. 2010), für alpha-1-Antitrypsin (A1AT) erhöhte Werte für *core*-Fuc (Comunale et al. 2010) und für Transferrin (TRFE) erhöhte Werte in der Antennarität (Yamashita et al. 1989) festgestellt. Bei diesem Karzinom hat sich die erhöhte *core*-Fuc am α -Fetoprotein als diagnostischer Marker durchgesetzt. Gemessen wird der Unterschied mit einem im Jahr 2005 zugelassenen Verfahren der *Food and Drug Administration* unter Verwendung des Lektins *Lens culinaris* Agglutinin (LcH) (Mehta and Block 2008).

Die hier aufgeführten Beispiele beruhen meist auf der Glykosylierung von Akut-Phasen-Proteinen, die nach Albumin und den Immunglobulinen G (IgGs) den größten Anteil an Serumproteinen ausmachen. Die Erhöhung der Lewis^x- und Sialyl-Lewis^x-Strukturen tritt auch bei temporären und chronischen Entzündungen auf (Arnold et al. 2008). Krebserkrankungen sind andererseits häufig mit einer Akut-Phasen-Reaktion verbunden (Abd-el-Fattah et al. 1981; Hansen et al. 1987). Viele Krebsantigene, die auf Glykanen beruhen, kommen nur in geringen Konzentrationen vor. Krebsantigene gelangen von den Tumoren selbst ins Blut und werden dort stark verdünnt, was das Auffinden neuer spezifischer Tumormarker aus dem Blut erschwert (Sell 1990; Taylor and Drickamer 2003; Arnold et al. 2008).

3.4 Ovarialkarzinom

Das Ovarialkarzinom wird nach der Internationalen Klassifikation der Krankheiten mit ICD-10 C56 nummeriert. Es ist eine meist bösartige Erkrankung der Eierstöcke (Adenokarzinom). Zusätzlich kann es sich um Tumoren bindegeweblichen Ursprungs, Mischtumoren und Tumoren aus reifen Keimzellen bzw. embryonalen Zellen handeln. Im Jahre 2006 wurden in Deutschland 9670 Neuerkrankungen diagnostiziert. 5,7 % aller Krebssterbefälle bei Frauen entfallen auf das Ovarialkarzinom. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 68 Jahren. Aufgrund des demografischen Wandels steigt die Anzahl der Neuerkrankungen bei den über 70-jährigen an (Abbildung 3-9). Ungünstige Faktoren, um an Eierstockkrebs zu erkranken, sind eine frühe erste Regelblutung, spätes Einsetzen der Wechseljahre, Kinderlosigkeit und fehlende Stillzeit. Dagegen schützt die Pille vor Eierstockkrebs. Ein erhöhtes Risiko tragen Frauen, deren Verwandte ersten Grades Brust- oder Eierstockkrebs hatten, sowie Frauen, die selbst bereits an Brust-, Gebärmutterkörper- oder Darmkrebs erkrankt sind. Veränderungen in den Genen *brca1* und *brca2* steigern, wie bei Brustkrebs, das Risiko der Erkrankung. Weitere genetische Faktoren sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate lag 2004 bei 47 %. Anfang der 80er Jahre lag sie bei nur 34 %. Die Standard-

behandlung ist zurzeit die operative Entfernung der Eierstöcke, Eileiter und Gebärmutter und eine unterstützende Chemotherapie (Robert-Koch-Institut 2006; Robert-Koch-Institut 2010).

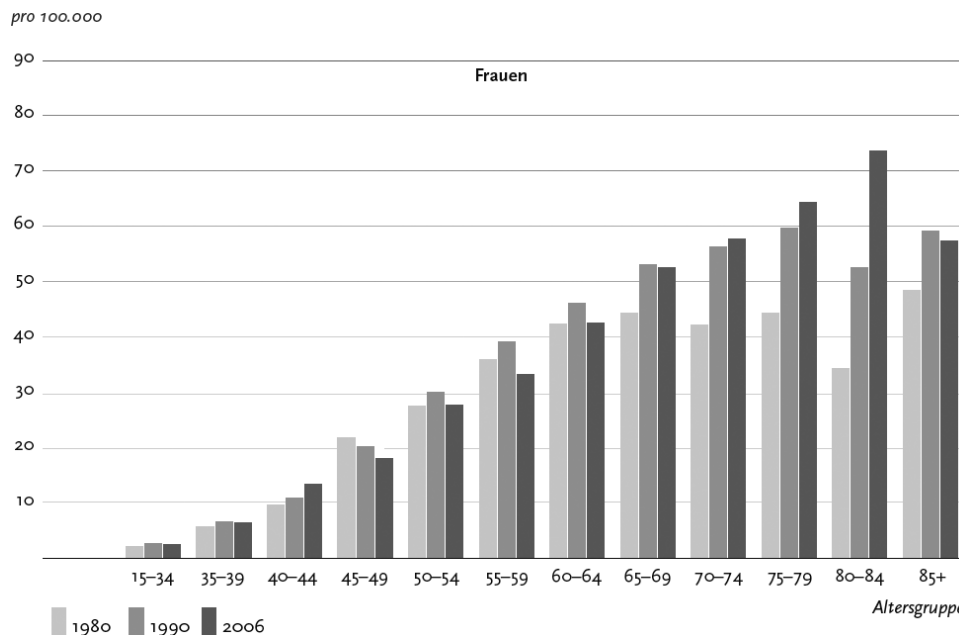


Abbildung 3-9: Altersspezifische Ovarialkarzinom-Erkrankungen in Deutschland in den Jahren 1980, 1990 und 2006 (Robert-Koch-Institut 2006)

Zurzeit wird das Ovarialkarzinom durch Ultraschall, bei dem die Größe der Eierstöcke gemessen wird, und den Serumgehalt vom Krebsantigen-125 (CA-125) diagnostiziert. Der monoklonale Antikörper gegen das Glykoprotein CA 125 wurde 1983 entwickelt (Bast et al. 1983). CA-125 eignet sich gut zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs, da sich bei 80 % der Ovarialkarzinom-Patientinnen erhöhte Werte im Serum zeigen. Von einem erhöhten Wert wird ab 35 U/mL gesprochen. Eine Erhöhung des Grenzwertes auf 65 U/mL ergibt keine entscheidende Verbesserung der diagnostischen Wertigkeit. Trotz der hohen Übereinstimmung zwischen CA-125 Wert und klinischem Krankheitsverlauf eignet sich CA-125 nicht zur Früherkennung. Die meisten Ovarialkarzinome werden erst ab dem Stadium drei erkannt. Eine Früherkennung wäre aber sehr wichtig, da die Fünf-Jahres-Überlebensrate im Frühstadium über 90 % beträgt und ab Stadium drei und vier auf 30 % sinkt. Unter den bekannten Biomarkern ist aber keiner, der allein oder in Kombination die gleiche diagnostische Sicherheit wie CA-125 hat. Deshalb ist es wichtig, neue Biomarker für die Früherkennung zu finden (Meden 1996; Saldova et al. 2007). Ein innovativer Ansatz ist, die Veränderung des Serumglykoms im Zusammenhang mit dem Ovarialkarzinom zu untersuchen. Für HPT, A1AT, alpha-1-Markroglobulin, TRFE, IgGs und Gesamtserum konnten in ersten Untersuchungen Veränderungen der Glykosylierung gezeigt werden. Es wurden dazu meist Lektine oder eine Monosaccharidanalyse eingesetzt, die keine genauen Aussagen über die Glykanveränderungen zulassen (Thompson et al. 1992; Turner et al. 1995; Gerçel-Taylor et al. 2001; Saldova et al. 2007).

3.5 Glykoanalytik

3.5.1 Glykoanalytik von Glykoproteinen

Für die Glykoanalytik gibt es aufgrund der vielen Glykosylierungsvarianten eine große Anzahl an möglichen Analysestrategien. Die folgenden Kapitel behandeln ausschließlich die verschiedenen Analysemethoden von Glykoproteinen.

Werden Proteine mit ihren Glykanen vermessen, kann die Glykosylierung einer bestimmten Position im Protein zugeordnet werden. Die Herausforderung dabei ist, die einzelnen Glykopeptide zu erkennen, da sie trotz gleicher Peptidsequenz aufgrund der Mikroheterogenität unterschiedliche Massen haben. Glykopeptide und Peptide lassen sich nur schwer chromatografisch voneinander trennen. Eine Aufkonzentrierung und Anreicherung ist häufig erforderlich, da Peptide die Ionisierung der Glykopeptide unterdrücken. Eine Möglichkeit ist, die Glykopeptide über hydrophile Interaktionschromatographie oder Lektine anzureichern. Bei diesem Ansatz wird das gesamte Protein untersucht, weshalb eine größere Probenmenge erforderlich ist. Die intakten Glykoproteine können auch mit Hilfe von Lektinen oder nach ihrem isoelektrischen Punkt (IP), der von den Sialinsäuren beeinflusst wird, analysiert werden. Für die Verwendung von Lektinen sind *Microarrays* erhältlich, jedoch liefern diese nur eingeschränkte Aussagen über die einzelnen Strukturen (Harvey 2005; Wuhrer et al. 2007; An et al. 2009).

Das Abspalten der Glykane vom Protein ist die Standardmethode zur Untersuchung des Glykanprofils. Für die Abspaltung der *N*-Glykane steht ein universelles Enzym zur Verfügung, die Peptid- N^4 -(*N*-Acetyl- β -glucosaminy)asparagin-Amidase, kurz PNGase F. Diese spaltet das gesamte *N*-Glykan zwischen GlcNAc und Asparagin ab. *N*-Glykane, die eine α 1-3-verknüpfte Fuc am asparagingebundenen GlcNAc tragen, sind resistent gegen PNGase F. Ein zweites Enzym ist die Endo- β -*N*-Acetylglucosaminidase H, die zwischen den zwei GlcNAc-Resten der *core*-Struktur von *High*-Mannose und Hybrid-Typ-Glykanen spaltet. Eine chemische Freisetzung der *N*-Glykane ist mittels Hydrazinolyse möglich. In einer ungewollten Nebenreaktion kommt es zur Deacetylierung der *N*-Acetylgruppen der Glykane, die später reacetyliert werden müssen. Für die *O*-Glykane gibt es aufgrund der vielen *core*-Strukturen kein universelles Enzym. Hier ist die β -Eliminierung die Methode der Wahl (siehe Kapitel 3.6) (Harvey 2005; Lottspeich and Engels 2006; Vanderschaeghe et al. 2010a). Nach der Abspaltung der Glykane stehen mehrere Messmethoden zur Verfügung.

3.5.2 Massenspektrometrie

In der Glykoanalytik kommen *Fast Atom Bombardment* Massenspektrometrie (MS), *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*(MALDI)-MS und Elektrospray-Ionisation(ESI)-MS zum Einsatz, die im femtomolaren Bereich messen. Durch Fragmentierung können weitere Strukturaussagen getroffen werden. Ein Nachteil ist, dass Strukturisomere nicht ohne weiteres unterscheidbar sind. Problematisch sind die stark sauren Sialinsäuren der Glykane, da diese u. a. nicht im Flugzeitmassenspektrometer mit Ionenspiegel gemessen werden können. Eine chemische Modifizierung wie die Permethylierung kann dieses Problem lösen. Durch Permethylierung mit Methyljodid können die freien Hydroxyl-Gruppen in Metylether und die negativ geladenen Carboxylgruppen in Methylester verwandelt und im positiven Ionenmodus vermessen werden. Permethylierte Glykane zeigen außerdem meist bessere Ionisierungseigenschaften. Nach der Permethylierung sind weitere Markierungen der Glykane am reduzierenden Ende ausgeschlossen. Grundsätzlich kann eine Markierung am reduzierenden Ende für eine bessere Ionisierung der Glykane eingesetzt werden (Abbildung 3-10) (siehe Kapitel 3.5.4.) (Harvey 2005; Hillenkamp and Peter-Katalinić 2007; Vanderschaeghe et al. 2010a).

3.5.3 HPAEC-PAD

Eine weitere Möglichkeit, nicht markierte Glykane zu untersuchen, ist die *High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection* (HPAEC-PAD). Im Vergleich zur Massenspektrometrie sind größere Probenmengen, von nmol bis pmol erforderlich, allerdings können Strukturisomere voneinander getrennt werden. Bei dieser Methode wird ausgenutzt, dass Monosaccharide Polyhydroxyverbindungen sind. Diese Hydroxylgruppen sind schwache Säuren mit einer Ionisierungskonstante von 10^{-12} bis 10^{-14} mol/L. Bei einem pH-Wert größer 13 lassen sich die Glykane daher aufgrund ihrer negativen Ladungen trennen. Sialinsäuren bewirken aufgrund ihrer sauren Natur eine deutliche Verlängerung der Retentionszeit (Lottspeich and Engels 2006; Vanderschaeghe et al. 2010a).

3.5.4 HPLC

Durch klassische HPLC lassen sich Glykane und Strukturisomere trennen. Für die Detektion werden die Glykane am reduzierenden Ende durch reduktive Aminierung mit UV- oder fluoreszenzaktiven Gruppen markiert (Abbildung 3-10). Bei der Reaktion bildet sich im sauren Milieu am reduzierenden Ende die offenkettige Form des Glykans. Das dabei entstehende Aldehyd reagiert mit einem primären Amin zu einem Imin (Schiffsche Base). Dieses

wird durch das starke Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid zum sekundären Amin reduziert (Abbildung 3-11) (Dalpathado et al. 2005; Anumula 2006). Neben der besseren Detektion können durch die Markierungsgruppe gleichzeitig aromatische Gruppen eingeführt werden, wodurch die Hydrophobizität der Glykane so stark erhöht wird, dass sie mit einer Umkehrphasen-HPLC getrennt werden können. Die markierten Glykane werden oft durch eine 2D-HPLC analysiert. Eine Möglichkeit zur 2D-HPLC ist, die Glykane erst nach ihrer Ladung an einer schwachen Anionenaustauschersäule zu trennen und zu fraktionieren. Danach werden die Sialinsäuren abgespalten und die desialylierten Glykane nach ihrer Hydrophobizität mittels einer hydrophilen Interaktionschromatographie oder Umkehrphasen-HPLC getrennt. Die Chromatogramme können mit einer Datenbank über die Glucoseeinheiten eines Standards verglichen werden. Für 2-Aminobenzamid-markierte Glykane ist es die „GlycoBase“ Datenbank (<http://glycobase.nibr.ie/>). Es gibt auch Beispiele, bei der eine 3D-HPLC eingesetzt wird (Takahashi 1996; Rudd et al. 1997; Campbell et al. 2008; Vanderschaeghe et al. 2010a).

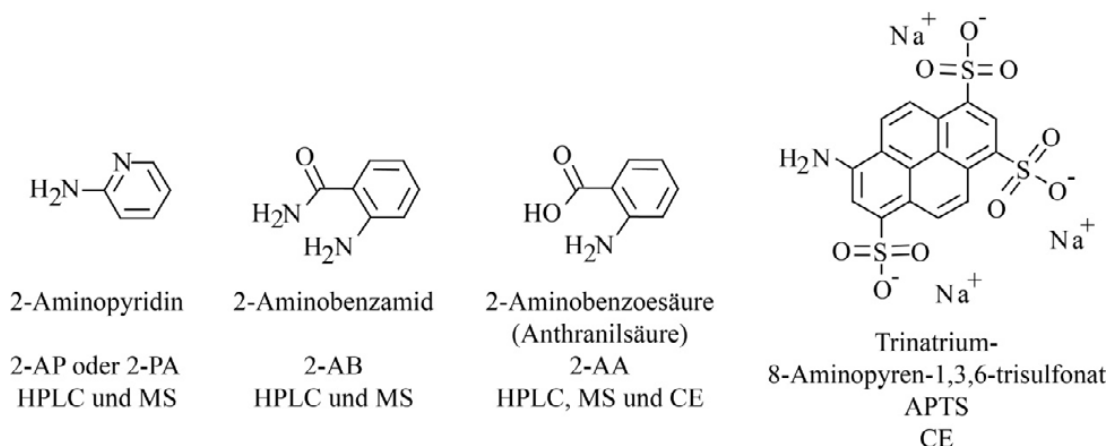
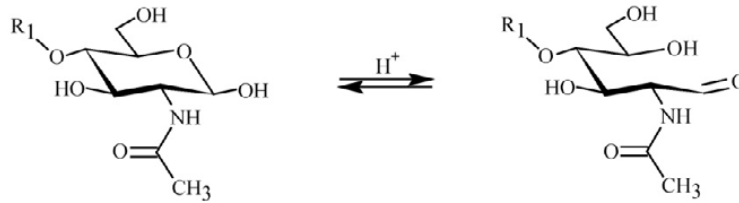
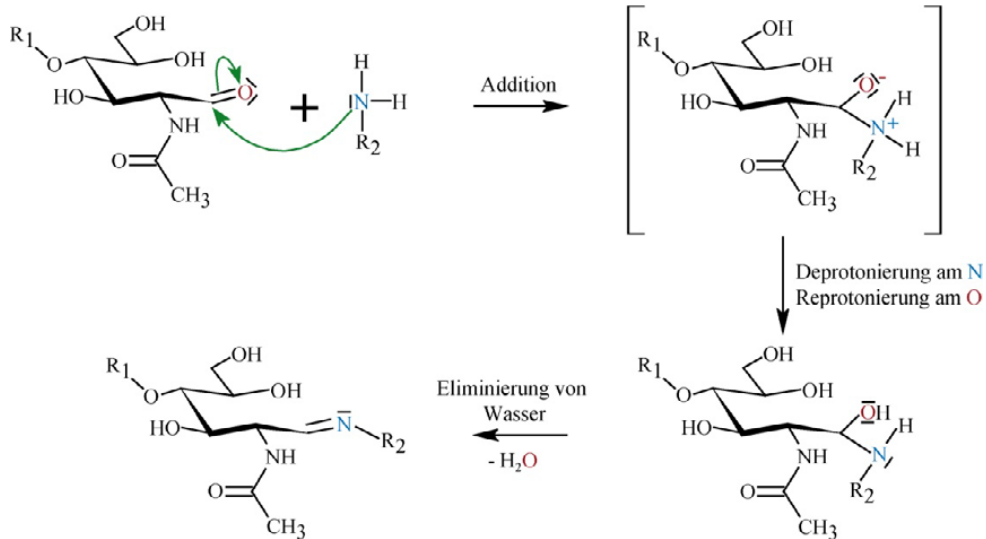


Abbildung 3-10: Strukturen von oft verwendeten Markierungsreagenzien für die reduktive Aminierung, ihre Abkürzungen und ihre Anwendungsfelder in der Glykoanalytik

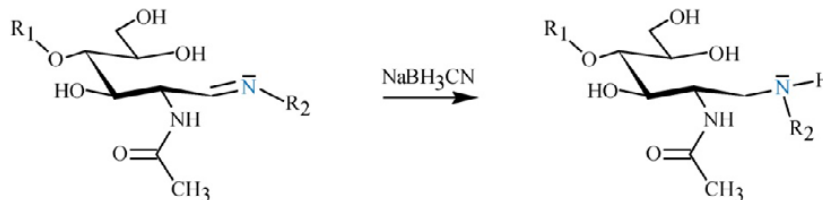
Bildung des offenkettigen GlcNAc



Bildung des Imin



Reduktion zum Amin



R₁ = Glykanrest R₂ = fluoreszenzaktive Gruppe

Abbildung 3-11: Reduktive Aminierung von *N*-Glykanen mit aminhaltigen Fluoreszenzmarkierungen

3.5.5 Kapillarelektrophorese

Bei der Kapillarelektrophorese (CE) werden die Analyten im elektrischen Feld nach ihrer Mobilität getrennt. Die Mobilität des Analyten wird durch seine Ladung und dessen Stokeschen Radius beeinflusst. Mit dieser Methode können Strukturisomere voneinander getrennt werden. Detektiert wird direkt durch die Kapillare, je nach Anwendung auf der Kathoden- oder Anodenseite. Durch den Innendurchmesser von 50-100 μm haben die Kapillaren einen hohen elektrischen Widerstand. Kleinste Volumina von 1-50 nL können in kürzester Zeit getrennt werden. Für eine gleichmäßige Trennung ist die Kühlung der Kapillare zwingend notwendig. Der elektroosmotische Fluss, der durch die Dissoziation der Silanolgruppen entsteht, hat einen Einfluss auf die Trennung. Die negative Ladung der Silanolgruppen an der Glaswand ist ortsgebunden, die positiven Ladungen an der Lösemittelaußen-

seite werden von der Kathode angezogen. Durch die dünne Kapillare wird dabei die gesamte Flüssigkeit in Richtung Kathode transportiert. Der elektroosmotische Fluss ist vom pH-Wert abhängig. Im basischen Milieu kann er so groß werden, dass selbst Anionen zur Kathode transportiert werden. Bei der Glykoanalytik stört diese Eigenschaft, weshalb die Kapillarinenseite mit einem Polymer beschichtet wird, was eine Reduzierung des elektroosmotischen Flusses zur Folge hat. Geladene Glykane können auch ohne zusätzliche Markierung mittels CE getrennt werden. Sie werden dann anhand der UV-Absorption bei 190-210 nm gemessen (Lottspeich and Engels 2006; Vanderschaeghe et al. 2010a). Standardmäßig werden Glykane mit negativ geladenen und fluoreszenzaktiven Gruppen markiert (Abbildung 3-10), da sich dann auch neutrale Glykane im elektrischen Feld trennen. Durch die Fluoreszenzmarkierung ist eine empfindlichere Messung möglich. Die zusätzlichen negativen Ladungen der Sialinsäuren führen zu einer Migrationszeitverkürzung und einer Verschlechterung der Auflösung, weshalb sie oft abgespalten werden. Für die Auswertung der Elektropherogramme sind zur Zeit keine zentralen Datenbanken vorhanden. Jedes Labor muss seine eigene Datenbank anlegen. Die Glykanstrukturen werden durch Massenspektrometrie und Enzymbehandlungen bestimmt und können später über ihre Mobilität identifiziert werden. Die Mobilität wird über einen internen Standard berechnet. Als vorteilhaft hat sich ein interner Standard bewährt, der den gesamten Messbereich abdeckt. Dieser fluoresziert bei einer anderen Wellenlänge als die Fluoreszenzmarkierung der Glykane. Ein Hochdurchsatz ist ohne weiteres möglich, da für diese Technik ein DNA-Sequenzer mit 96-Kanal-System genutzt werden kann (Callewaert et al. 2001; Schwarzer et al. 2008).

3.5.6 Zusammenfassung Glykoanalytikmethoden

In der folgenden Tabelle sind die Vor- und Nachteile der glykoanalytischen Methoden zusammengefasst.

Tabelle 3-2: Vor- und Nachteile der glykoanalytischen Methoden; modifiziert nach (Vanderschaeghe et al. 2010a)

Empfindlichkeit	Vorteile	Nachteile
Kapillarelektrophorese		
pmol- fmol	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hochdurchsatz ➤ kurze Analysenzeit ➤ hoher dynamischer Bereich ➤ Trennung von Isomeren ➤ kleines Probenvolumen 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Markierung ist nötig ➤ keine Datenbank ➤ Kopplung mit MS schwierig

Einleitung

Empfindlichkeit	Vorteile	Nachteile
MALDI-TOF-MS		
pmol- fmol	<ul style="list-style-type: none"> ➤ hohe Auflösung ➤ keine Markierung nötig ➤ Hochdurchsatz 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ hohe Anschaffungskosten ➤ empfindlich gegenüber Verunreinigungen ➤ keine Trennung von Isomeren ➤ chemische Modifikationen werden zur Verbesserung der Ionisierung und zur Stabilisierung von labilen Modifikationen benötigt
ESI-MS		
pmol- fmol	<ul style="list-style-type: none"> ➤ hohe Auflösung ➤ keine Markierung nötig ➤ sanfte Ionisierung, lässt labile Modifikationen intakt ➤ Kopplung mit CE und LC möglich 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ hohe Anschaffungskosten ➤ empfindlich gegenüber Verunreinigungen ➤ keine Trennung von Isomeren (ohne CE und LC) ➤ komplexe Daten ➤ Durchsatz kleiner als beim MALDI
HPAEC-PAD		
nmol- pmol	<ul style="list-style-type: none"> ➤ hoher dynamischer Bereich ➤ Trennung von Isomeren ➤ keine Markierung nötig 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Messsignal abhängig von der Natur der Glykane ➤ zeitaufwendig ➤ Nebenreaktionen möglich
HPLC		
pmol- fmol	<ul style="list-style-type: none"> ➤ hoher dynamischer Bereich ➤ Trennung von Isomeren ➤ Datenbank verfügbar ➤ Kopplung mit ESI möglich 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ kleiner bis mittlerer Hochdurchsatz ➤ Markierung für gute Detektion nötig ➤ zeitaufwendig

3.6 Detektion *O*-Glykosylierungsstellen

Die Vorhersage einer *O*-Glykosylierungsstelle ist schwierig, da *O*-Glykane, im Gegensatz zu *N*-Glykanen, keine Konsensussequenz haben. Zusätzlich wird die Analyse erschwert, weil kein universales Spaltenzym vorhanden ist. Die β -Eliminierung mit Basen ist eine Methode, um *O*-Glykane vom Proteinrückgrat zu trennen (Rademaker et al. 1998; Hanisch et al. 2001). Mit derselben Reaktion können auch Phosphorylierungen von Serin oder Threonin entfernt werden (Byford 1991; Rusnak et al. 2004). Das dabei entstehende Michael-System kann für die Detektion von *O*-Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen genutzt werden (Oda et al. 2001).

Bei der β -Eliminierung von *O*-Glykanen kommen mehrere sanfte Basen zum Einsatz. Allerdings kann ein Abbau von Proteinen nicht vollständig ausgeschlossen werden (Hanisch et al. 2001). Bei der Verwendung von Ammoniak, Methylamin, Ethylamin und Dimethylamin wirken diese Reagenzien gleichzeitig als Base für die β -Eliminierung und Nukleophil für die Michael-Addition. Das Produkt der Michael-Addition weist einen Massenunterschied zum nicht-glykosylierten Serin oder Threonin auf, bei Ammoniak -1 Da, bei Methylamin +13 Da, bei Ethyl- und Dimethylamin +27 Da (Abbildung 3-12). Diese Veränderung kann im Massenspektrum durch Fragmentierung einer Aminosäure zugeordnet werden. Die aliphatischen Amine zeigen eine effiziente Additionsreaktion, doch eine selektive Anreicherung der markierten Peptide aus einem komplexen Gemisch ist nicht möglich (Rademaker et al. 1998; Hanisch et al. 2001; Hanisch et al. 2005; Zheng et al. 2009).

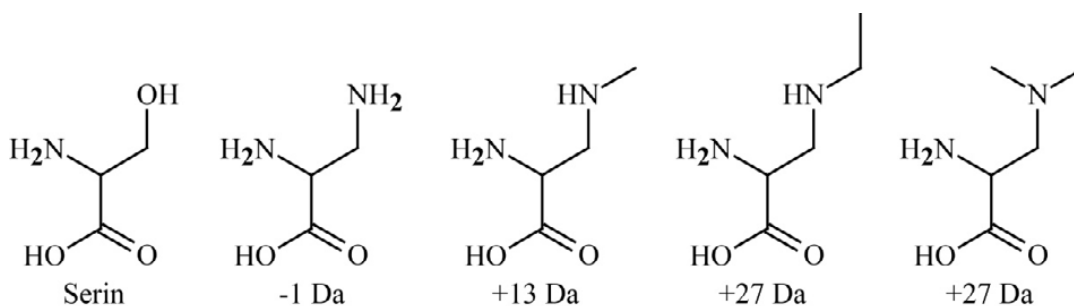


Abbildung 3-12: Serin und die Produkte der β -Eliminierung und Michael-Addition mit Ammoniak und aliphatischen Aminen vom *O*-glykosylierten Serin

Bei den Phosphoproteinen werden z. B. Barium- und Natriumhydroxid zur β -Eliminierung verwendet. Für eine anschließende Michael-Addition werden verschiedene Nukleophile, die wie bei den *O*-Glykanen einen Massenunterschied erzeugen, eingesetzt (Mega et al. 1990; Rusnak et al. 2004). In einem komplexen Gemisch oder einer unbekannt Probe sind diese nur sehr schwer zu erkennen. Deshalb entwickelten Oda et al. (2001) und seine Kollegen ein System zur Anreicherung der phosphorylierten Peptide. Durch Lithiumhydroxid werden die Phosphate von Serin oder Threonin abgespalten und das entstandene Michael-System reagiert mit 1,2-Ethandithiol. Das Protein wird durch Acetonfällung gereinigt, wieder gelöst und mögliche Disulfidverbindungen werden reduziert. Die freien Thiole reagieren im nächsten Schritt mit einem Biotin-Maleimid. Über das Biotin werden die markierten Proteine oder Peptide isoliert und die Sequenz im ESI-MS/MS bestimmt (Oda et al. 2001). Theoretisch ist diese Reaktion auch auf *O*-Glykane übertragbar. Das Verfahren ähnelt der *Isotope-coded affinity tag*-Technologie (ICAT) (Shiio and Aebersold 2006).

Die Geschwindigkeit der β -Eliminierung und die anschließende Michael-Addition verlaufen in der Summe zwischen Serin und Threonin unterschiedlich. Phosphoryliertes Serin reagiert ca. 20-mal schneller als phosphoryliertes Threonin. Das *O*-glykosylierte Serin wird zwei- bis

dreimal schneller umgesetzt als das *O*-glykosylierte Threonin. *O*-Glykane werden zudem langsamer umgesetzt als phosphorylierte Proteine. Bei der β -Eliminierung ist die Phosphorsäure eine bessere Abgangsgruppe als das Halbacetal des *O*-Glykans. Beim Threonin führt die zusätzliche Methylgruppe zu einem Michael-System, was im Vergleich zum korrespondierenden Serin-Produkt, langsamer mit dem Nukleophil reagiert. (Mega et al. 1990; Byford 1991; Zheng et al. 2009). Da zwischen dem *O*-glykosylierten Serin und Threonin der Reaktionsgeschwindigkeitsunterschied kleiner als bei den phosphorylierten Varianten ist, ist bei den Glykoproteinen die β -Eliminierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Thiole reagieren mit dem Michael-System um ein Vielfaches schneller als Amine. Amine sind schwache Nukleophile im Vergleich zu dem sich unter diesen basischen Bedingung bildenden Thiolat.

Bei Veröffentlichungen mit phosphorylierten Proteinen wird oft nur theoretisch beschrieben, dass das System für *O*-Glykane genauso funktioniert. Bei *O*-Glykanen wird ausschließlich mit synthetischen oder isolierten Peptiden gearbeitet. Ein Beweis, dass das System auch in einem komplexen Gemisch funktioniert, konnte nicht erbracht werden.

3.7 Automatisierung

Die Laborautomatisierung begann Anfang der 80er Jahre mit der Entwicklung der computer-gestützten Mess- und Regeltechnik. Ein weiterer wichtiger Schritt war die Erfindung des Roboterarms und des Pipettiersystems, das als *liquid-handling* bezeichnet wird. Die Diagnostik in Krankenhäusern und die pharmazeutisch-chemische Industrie waren an Automatisierungsverfahren zur Wirkstoffsuche und –erforschung interessiert. Im *Life-Sciences*-Bereich war die Genomsequenzierung der initiale Anstoß zur Laborautomatisierung. Es folgten Proteomik und Zellkultur (Boyd 2002; Chapman 2003; Labonté 2010). 2009 wurde ein Roboter namens „Adam“ vorgestellt, der menschenunabhängig zu wissenschaftlichen Erkenntnissen gelangte (King et al. 2009). Roboter können die Innovationsfähigkeit von Forschern jedoch nicht ersetzen. Nicht zu vergessen, dass der Zufall schon oft zu neuen Entdeckungen geführt hat.

Die Automatisierung der Glykoanalytik steht am Anfang ihrer Entwicklung. Sie orientiert sich an der Proteomik, wo bereits Komplettsysteme erhältlich sind (Suckau et al. 2003; Jahn et al. 2006; Martin et al. 2008). Bisher publizierte Ansätze basieren auf dem *96-well* Format. Eine Idee ist, die Glykoproteine an eine Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran zu binden. An dieser PVDF-Membran wird das Glykoprotein reduziert, alkyliert, die Membran geblockt und

die *N*-Glykane mit PNGase F abgespalten. Danach werden die Glykane im MALDI vermessen oder markiert und dann mit Hilfe der Massenspektrometrie, HPLC oder CE untersucht. Ein anderer Ansatz ist, die Glykoproteine in einem Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese(SDS-PAGE)-Gel mit PNGase F zu behandeln und dann zu analysieren (Papac et al. 1998; Royle et al. 2008; Ruhaak et al. 2008; Kim et al. 2009). Es wird auch vorgeschlagen, statt eines normalen ein schmelzbares SDS-PAGE-Gel zu verwenden, um die Zugänglichkeit zu den Glykoproteinen zu verbessern (Callewaert et al. 2002). Alle Veröffentlichungen zeigen Protokolle, die roboterkompatibel sind, aber der Beweis der Glykanpräparation in einem *liquid-handling*-Robotersystem wurde nicht erbracht. Teilautomatisierte Prozesse wie die Aufreinigung von *N*-Glykanen wurden kürzlich präsentiert (Kronewitter et al. 2010). Der Bedarf eines Komplettsystems ist groß, um z. B. klinisch relevante Daten von hunderten Personen in kurzer Zeit bestimmen zu können.

4 Zielsetzung

Zu Beginn dieser Arbeit war kein vollautomatisiertes Protokoll zur Analyse der *N*-Glykane von Glykoproteinen publiziert. Der Hauptaspekt dieser Arbeit war es, die Detektion und Analyse von neuen, aussagekräftigen Biomarkern des Ovarialkarzinoms zu automatisieren. Dies ist insofern äußerst wichtig, da bisher keine Früherkennungsmethode für ein Ovarialkarzinom bekannt ist und die Erkennung in einem späteren Stadium oftmals eine schlechte Prognose für die betroffene Patientin bedeutet. Um Früherkennung für eine große Anzahl von Patientinnen perspektivisch zugänglich zu machen, war es das Ziel, eine *liquid-handling* Hochdurchsatzmethode unter Einbeziehung folgender Methoden zu entwickeln:

- Aufarbeitung von Blutserumproben für die 2D-Gelelektrophorese
- Etablierung der Trennung von Blutserumproben im 2D-Gel
- Optimierung der Messung im MALDI-TOF-MS mit Roboter kompatiblen *AnchorChip Target*
- Aufklärung der *N*-Glykanstrukturen mittels CE
- kombinierte *N*-Glykananalyse mit MALDI-TOF-MS und CE
- Automatisierung der PNGase F-Behandlung für Proteine in Lösung und im SDS-PAGE-Gel in einem *liquid-handling* Roboter
- Detektion von neuartigen *N*-Glykan Biomarkern für das Ovarialkarzinom

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer universellen Ein-Topf-Reaktion zur Detektion von *O*-Glykanstellen in Proteinen und Proteingemischen. Diese ist erforderlich, da *O*-Glykane gegenüber *N*-Glykanen keine Konsensussequenz haben und Vorhersagen aus der reinen Proteinsequenz nicht möglich sind. Folgende Arbeitsschritte sollen durchgeführt werden:

- Synthese des Biotin-Thiol-*Linkers*
- Test der hergestellten Biotin-Thiol-*Linkers* mit Fetuin
- Messung mittels MALDI-TOF-MS

5 Ergebnisse

5.1 Experimentelles Design: Analyse der *N*-Glykane und Detektion von Biomarkern

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung eines vollautomatisierten Protokolls zur Analyse der *N*-Glykane von Glykoproteinen und der Identifikation von Biomarkern für das Ovarialkarzinom.

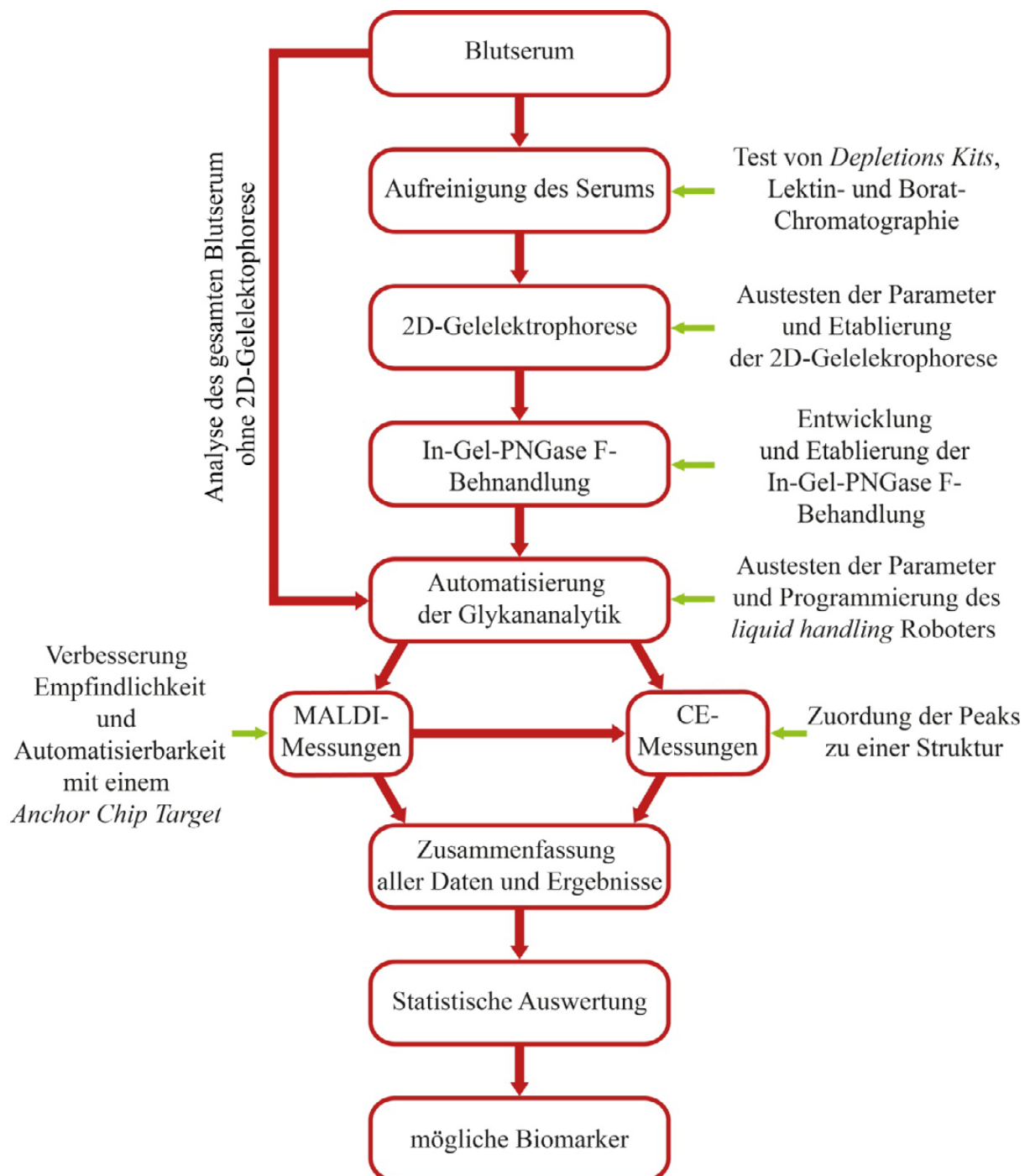


Abbildung 5-1: Experimentelles Design für das *N*-Glykom von Blutserum und Detektion von möglichen Biomarkern

5.2 Serumauflösung für die 2D-Gelelektrophorese

Blutserum besteht zu großen Teilen aus Albumin und IgGs, wobei vor allem Albumin mit einem Proteingehalt von mehr als 50 % (Anderson et al. 2004) die 2D-Gelelektrophorese beeinträchtigt. Werden diese Proteine nicht aus dem Serum entfernt, kommt es zu einer Überladung der Gele mit Albumin und IgGs. Die Proteine sind dann als Schmier und nicht voneinander getrennt im Gel zu erkennen (Abbildung 5-2), weshalb die Suche nach einem geeigneten System zur Anreicherung der Serumglykoproteine initiiert wurde.

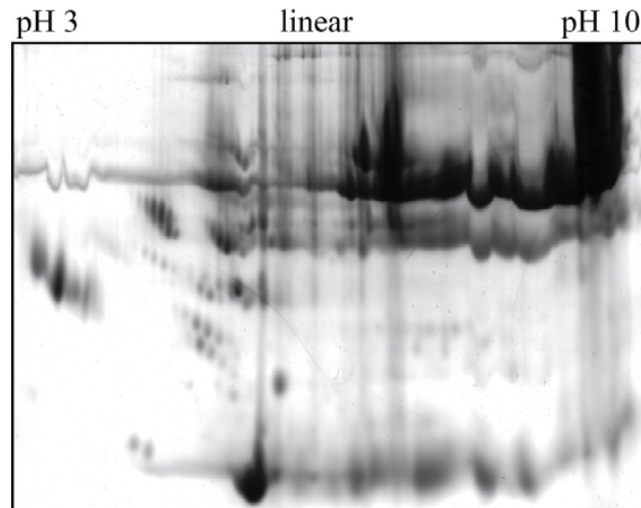


Abbildung 5-2: 2D-Gelelektrophorese von 40 µL unbehandeltem Serum

Der IPG-Streifen war 18 cm lang und hatte einen pH-Gradienten von drei bis zehn. Das SDS-PAGE-Gel war 10 %ig und wurde mit Coomassie gefärbt.

5.2.1 Borat-Chromatographie

Die Borat-Chromatographie mit 3-Aminophenylborsäure wurde genutzt, um Glykanstrukturen zu isolieren und anzureichern. 3-Aminophenylborsäure ist spezifisch für cis-Diole, die häufig in Monosacchariden vorkommen. Außerdem kann weiterhin ein Komplex mit den Hydroxylgruppen in Position vier und sechs der Hexosen entstehen (Morin et al. 1994; Fang et al. 2004). Die *N*-Acetylneuraminsäure kann mit den Hydroxylgruppen in Position sieben und acht sowie acht und neun mit der Phenylborsäure zwei mögliche Komplexe eingehen (Otsuka et al. 2003). Die Anwendung der Borat-Chromatographie zur Aufreinigung von Erythropoetin aus Säugerzellen ist in der Literatur bereits beschrieben (Zanette et al. 2003). In Abbildung 5-3 sind die möglichen Interaktionen der Phenylborsäure mit den relevanten Monosacchariden der Glykane dargestellt. Aufgrund der vielen Bindungsmöglichkeiten wurde eine hohe Affinität zu den Glykoproteinen erwartet.

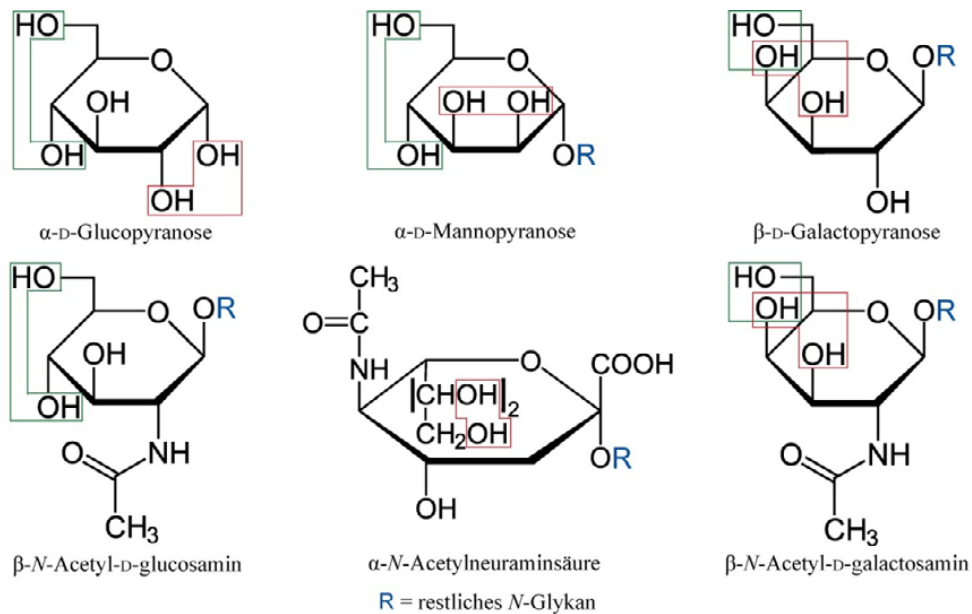


Abbildung 5-3: Interaktionsstellen der Phenylborsäure zu verschiedenen Monosacchariden

Die rot umrandeten Interaktionsstellen beruhen auf Hydroxylpaaren in cis-Diol-Stellung und vicinalen Diolen. Die grünen Interaktionsstellen beruhen auf Hydroxylpaaren in der Position vier und sechs des Monosaccharids.

Getestet wurden die Glykoproteine Lactoferrin aus Rindermilch, RNase B aus Rinderpankreas, humanes A1AG sowie *bovine serum albumin* (BSA). Lactoferrin bindet als einziges Glykoprotein vollständig. Die Bindung bei RNase B ist nur sehr schwach. BSA, das als Negativkontrolle diente, zeigt eine stärkere Bindung als RNase B. A1AG zeigt keine Affinität zur Boratsäule (Abbildung 5-4). Die Boratsäule ist aufgrund dieser Ergebnisse für die Serumaufräumung ungeeignet.

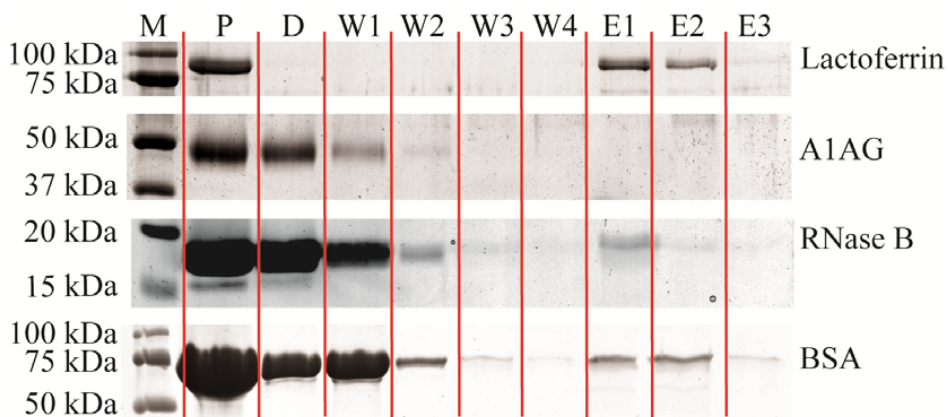


Abbildung 5-4: Borat-Chromatographie von Lactoferrin aus Rindermilch, humanem A1AG, RNase B aus Rinderpankreas und BSA

Das 10%ige SDS-PAGE-Gel wurde mit Coomassie gefärbt. M = Marker, P = Probe vor Chromatographie, D = Durchlauf, W1-4 = Waschfraktionen, E1-3 Elutionsfraktionen

A1AG besitzt komplexe N-Glykane mit fast vollständiger Sialylierung, wohingegen RNase B nur *High-Mannosen* trägt (Daten nicht gezeigt). Lactoferrin ist in seiner Glykosylierung heterogener und trägt als Hauptbestandteil *High-Mannosen*, aber auch komplexe und hybride N-Glykane (Abbildung 5-5). Diese haben im Unterschied zu A1AG kaum Sialinsäuren, dafür aber endständige Gal, GalNAc und GlcNAc. Lactoferrin aus Rindermilch hat die Besonder-

heit, dass an Stelle von Gal auch GalNAc bei den *N*-Glykanen vorkommt (Spik et al. 1988; Lopez et al. 1997).

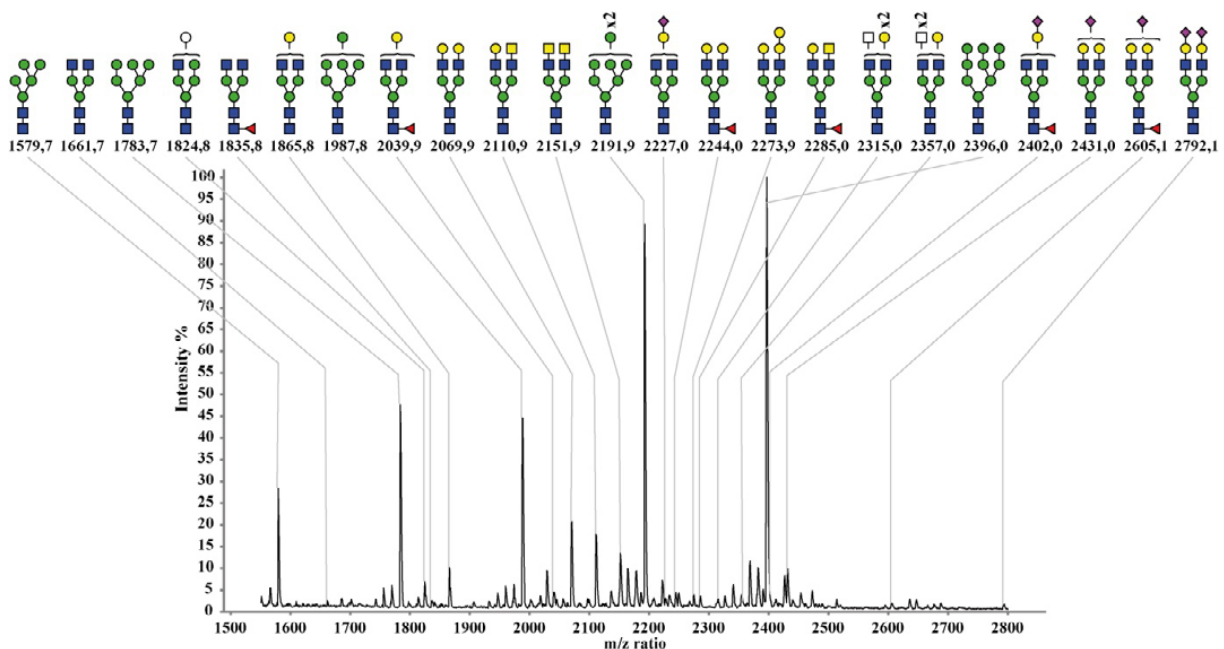


Abbildung 5-5: MALDI-TOF-MS-Spektrum $[M+Na]^+$ der permethylierten *N*-Glykane von Lactoferrin aus Rindermilch

5.2.2 Depletion-Kits und Anfärbung der Glykoproteine im 2D-Gel

Eine andere Möglichkeit zur Serumbehandlung für die 2D-Gelelektrophorese ist die Entfernung von Albumin und den IgGs. Dazu wurden zwei Systeme getestet, das *Enchant Multi-Protein Affinity Separation Kit* von Pall und das *Aurum Serum Protein Kit* von BioRad. Das Kit von Pall arbeitet unter denaturierenden Bedingungen mit Antikörpern, das System von BioRad dagegen nativ mit *Affi-Gel Blue (Cibacron Blue F3GA)* und Protein A. Das System von Pall ist für die Entfernung besser geeignet (Abbildung 5-6, Vergleich nicht gezeigt).

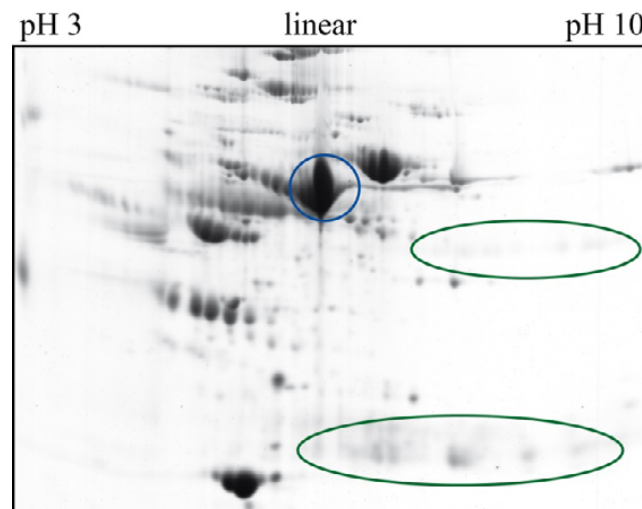


Abbildung 5-6: Gelelektrophorese von 40 μ L nach Reduzierung der Albumin- und IgG-Konzentration mit dem *Enchant Multi-Protein Affinity Separation Kit*.

Der IPG-Streifen war 18 cm lang und hatte einen pH-Gradienten von drei bis zehn. Das SDS-PAGE-Gel war 10 %ig und wurde mit Coomassie gefärbt. Die blaue Markierung zeigt den Albuminbereich und die grünen Bereiche zeigen die leichten und schweren Ketten der IgGs.

Zur Lokalisierung der Serumglykoproteine im 2D-Gel wurden diese mit Pro-Q Emerald 300 fluoreszenzmarkiert und anschließend mit Coomassie gefärbt. Albumin fluoresziert nicht. Es ist zu erkennen, dass durch die hohe Konzentration an Albumin andere Glykoproteine verdeckt bzw. verdrängt werden. Fast alle Glykoproteine befinden sich im neutralen bis sauren Bereich und sind größer als 30 kDa. Daraufhin wurden nur noch IPG-Streifen von pH 4-7 verwendet (Abbildung 5-7).

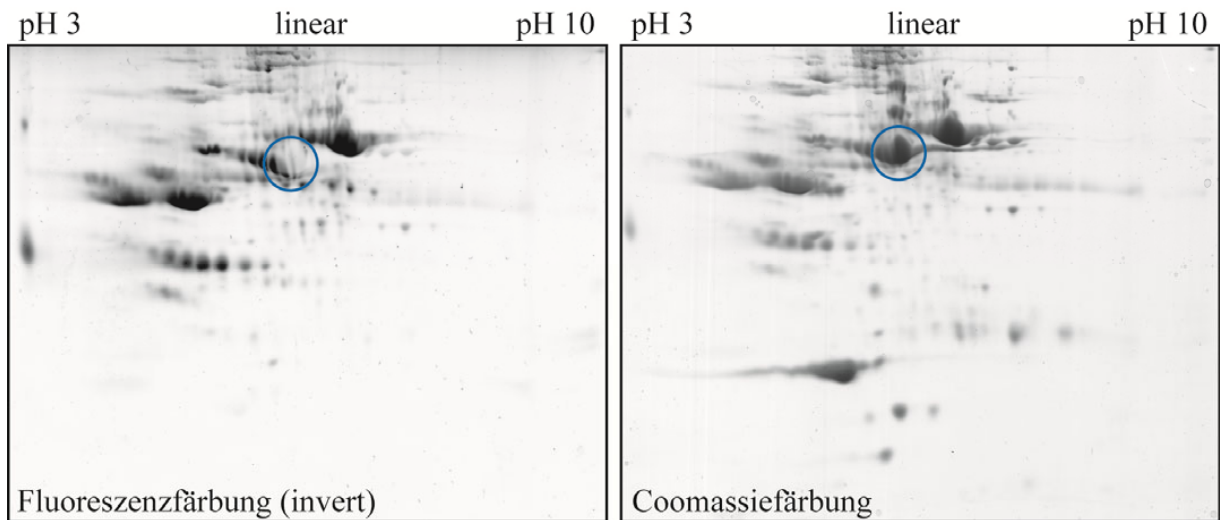


Abbildung 5-7: Vergleich von Fluoreszenzfärbung der Glykoproteine (links) und Gesamtproteinfärbung mit Coomassie (rechts)

Aus 40 μ L Serum wurde die Albumin- und IgG-Konzentration mit dem *Enchant Multi-Protein Affinity Separation Kit* reduziert. Der IPG-Streifen war 18 cm lang und hatte einen pH-Gradienten von drei bis zehn. Das SDS-PAGE-Gel war 10 %ig und wurde erst mit Pro-QEmerald 300 (Fluoreszenzfärbung) und danach mit Coomassie gefärbt. Die blaue Markierung zeigt den Albuminbereich.

5.2.3 Lektin-Chromatographie

Lektine sind Proteine, die spezifisch an Glykanstrukturen binden und zur Anreicherung von Glykoproteinen dienen. Es wurden jeweils 100 μ L Serum mit 2 mL Säulen mit *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA-I), *Maackia amurensis* Agglutinin (MAA), LcH, Concanavalin A (Con A), *Wheat Germ* Agglutinin (WGA), PHA-L und Borat aufgearbeitet. Die Menge an isoliertem Protein ist sehr unterschiedlich. Con A, WGA und Borat haben die höchsten Ausbeuten mit 1,5 bis 3 mg Protein. SNA-I, MAA und LcH liefern mit 175 bis 400 μ g deutlich geringere Mengen. Lotus und PHA-L erzielen mit 40 bis 70 μ g Protein fast keine Ausbeute (Tabelle 5-1).

Die Proteinausbeute liefert keine Aussage über die Reinheit der Glykoproteine. Zur Überprüfung wurden die Proben durch eine 2D-Gelelektrophorese analysiert. Die Lektine Con A und WGA sowie das Borat weisen eine hohe Konzentration an Albumin auf. Con A und Borat zeigen außerdem eine hohe Affinität zu den IgGs und TRFE. Die Gruppe der Lektine mit der mittleren Ausbeute zeigt die beste Auflösung. Der Albuminanteil ist stark gesunken und die

Affinität zu den IgGs ist geringer als zu den sauren Glykoproteinen. MAA bindet mehr Proteine im Bereich von pH 4,0 bis 5,5. SNA-I erzielt die besseren Ergebnisse im pH-Bereich von 5,5 bis 7. α 2-3-verknüpfte Neu5Ac, welche an MAA binden, sind bevorzugt bei tri- und tetraantennären *N*-Glykanen zu finden (Nemansky et al. 1995). An Lotus und PHA-L binden nur wenige Glykoproteine (Tabelle 5-1, Abbildung 5-8).

Tabelle 5-1: Lektinspezifität und Ausbeute an Protein nach Lektin-Chromatographie. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford.

Lektin	Spezifität des Lektins (Freeze 2001)	Ausbeute an Protein von 100 μ L Serum
SNA-I	α 2-6-verknüpfte Sialinsäuren in <i>N</i> - und <i>O</i> -Glykanen	175 μ g
MAA	α 2-3-verknüpfte Sialinsäuren zu Gal in <i>N</i> -Glykanen	184 μ g
LcH	bi- und triantennäre <i>N</i> -Glykane mit α 1-6-Fuc am Chitobiose <i>core</i> (α -Man > α -Glc)	337 μ g
Lotus	antennäre α -Fuc; keine Bindung, wenn die Fuc am Chitobiose <i>core</i> gebunden ist	38 μ g
Con A	<i>High</i> -Mannose, hybride und biantennäre <i>N</i> -Glykane (α -Man > α -Glc)	3033 μ g
Borat (kein Lektin)	cis-Diole	1803 μ g
WGA	endständiges GlcNAc und Sialinsäuren; bindet GlcNAc > Sialinsäuren	1467 μ g
PHA-L	GlcNAc von tri- und tetraantennären <i>N</i> -Glykanen	71 μ g

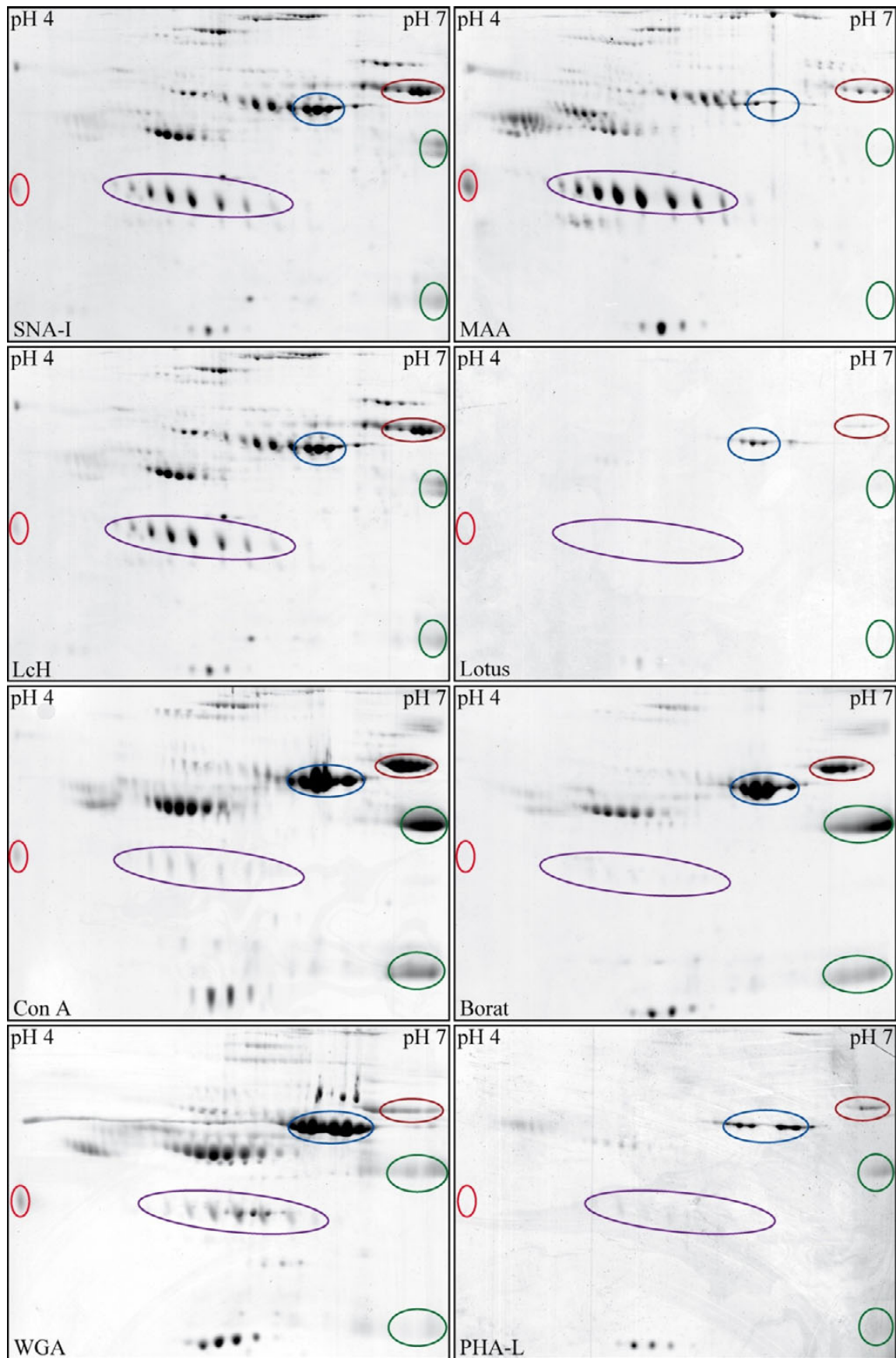


Abbildung 5-8: 2D-Gelelektrophorese von Blutserum nach Lektin-Chromatographie und Borat-Chromatographie

100 μ L Serum wurden chromatographisch aufgereinigt. Die IPG-Streifen waren 18 cm lang und hatte einen pH-Gradienten von vier bis sieben. Die SDS-PAGE-Gele waren 10 %ig und wurden mit Coomassie gefärbt. Die markierten Zonen zeigen die Bereiche von Albumin (blau), IgG der leichten und schweren Kette (grün), TRFE (rostrot), HPT (violett) und A1AG (rot). Proteinbeladung der 2D-Gele (Ausbeuten siehe Tabelle 5-1) SNA-I 175 μ g; MAA 184 μ g; LcH 337 μ g; Lotus 38 μ g; Con A 315 μ g; Borat 720 μ g; WGA 600 μ g; PHA-L 71 μ g

Für die Auftrennung der Blutserumproben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom und der Kontrollgruppe wurde ein IPG-Streifen von pH 4-7 und das *Enchant Multi-Protein Affinity Separation Kit* von Pall verwendet. Der pH-Bereich 4-7 zeigte die höchste Konzentration an Glykoproteinen. Das System von Pall zeigt die besten Resultate für die Vorbereitung des Blutserums für die 2D-Gelelektrophorese. Es verändert die Probe am wenigsten, reduziert das Albumin und IgGs zuverlässig, ist einfach in der Handhabung und mit ca. 30 € pro Serumprobe das kostengünstigste System.

5.3 *AnchorChip* mit Arabinosazon als Matrix

Zur Erhöhung der Empfindlichkeit der MALDI-TOF-MS-Messungen und für eine mögliche Automatisierung der MALDI- *Target*-Präparation wurde ein neues Protokoll gesucht. Für diese Fragestellung bietet Bruker das *AnchorChip Target* an. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind vollautomatisierte Verfahren nur mit α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure als Matrix bekannt. Für die Glykananalytik hingegen werden im positiven Ionenmodus werden 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) und Arabinosazon (Ara) verwendet.

Bei DHB als Matrix müssen aktive Kristalle bei der Messung gesucht werden. Diese bilden sich nur schwer und unregelmäßig auf dem *AnchorChip Target* aus, weshalb sich DHB für die gewünschte Anwendung als ungeeignet erwies (Daten nicht gezeigt). Ara hingegen bildet eine homogene Fläche mit gleichmäßig verteilter Aktivität. Im Laufe der Arbeit wurde ein Protokoll entwickelt, in dem die Proben in 80 % Ethanol oder Wasser gelöst wurden. Die Variante mit 80 % Ethanol ist empfindlicher. Jedes erneute Umkristallisieren hatte eine Abnahme der Messsignale zur Folge. Die Reinheit des Ara's und der Probe waren wichtig, da auch Verunreinigungen, wie z. B. Salze auf dem *AnchorChip Target* aufkonzentriert werden. Als vorteilhaft erwies sich, alle verwendeten Spitzen mit Ethanol zu waschen.

Zur Bestimmung der Empfindlichkeit wurde anfänglich Dextranhydrolysat (DH) in einer Konzentration von 150 ng/ μ L verwendet. Diese Kalibrierlösung wurde jeweils 1:10 verdünnt und auf dem *Ground Steel* und dem *AnchorChip Target* vermessen. Beim *AnchorChip Target* kann bis zu einer Konzentration von 1,5 ng/ μ L DH kein Auflösungsverlust verzeichnet werden. Bei einer Konzentration von 0,15 ng/ μ L DH ist der Standard noch immer detektierbar. Nur im kleinen Massenbereich nimmt der Rauschanteil der Matrix stark zu. Beim *Ground Steel Target* kann bis zu einer Konzentration von 15 ng/ μ L DH gearbeitet werden. Bei 1,5 ng/ μ L DH sind nur kleine Peakspitzen von einigen DH-Strukturen zu erkennen. Die Messung mit dem *AnchorChip Target* ist somit ca. 20fach empfindlicher (Abbildung 5-10).

Ergebnisse

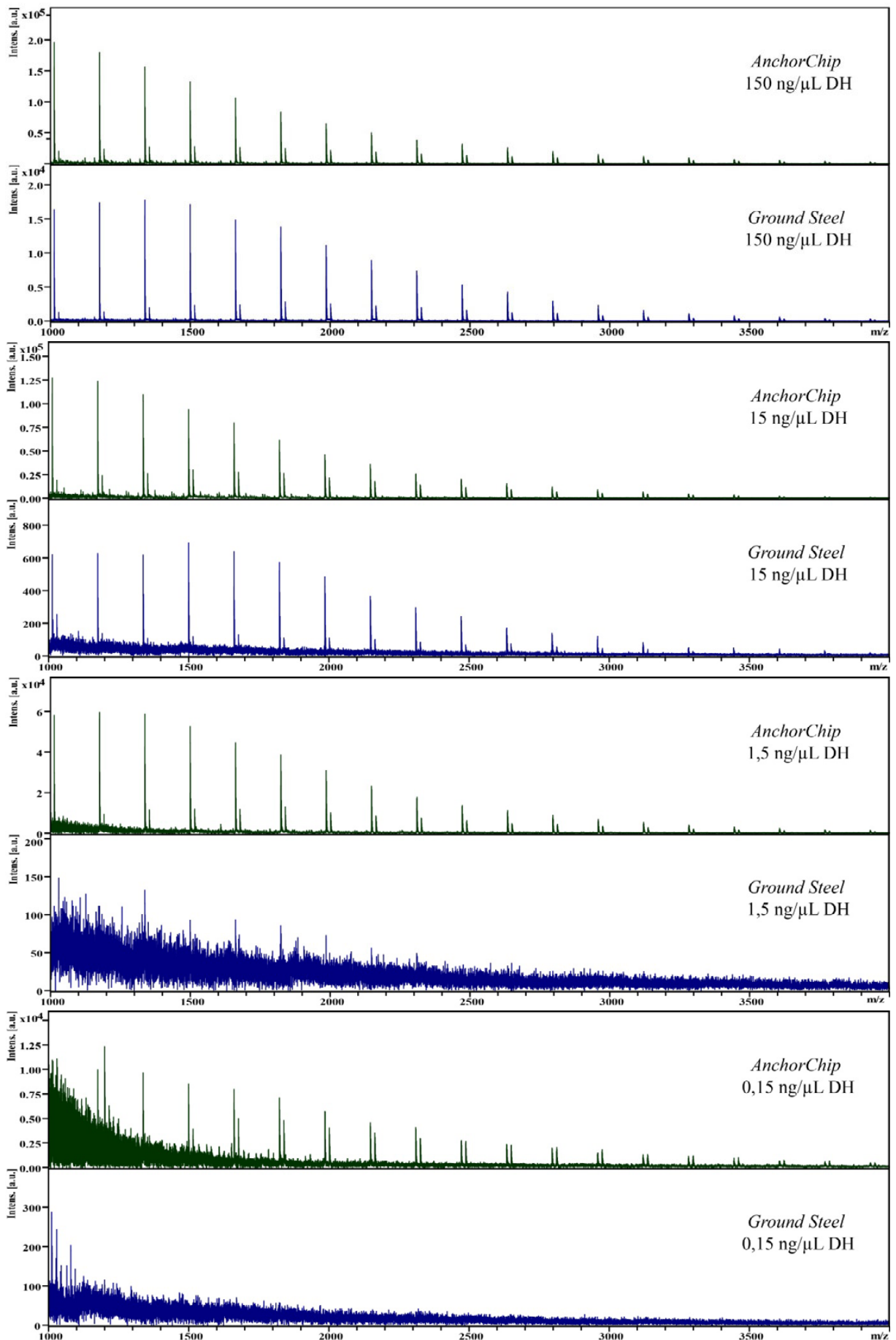


Abbildung 5-9: Vergleich von MALDI-TOF-MS-Spektren $[M+Na]^+$ von *AnchorChip*- und *Ground Steel*-*Target* bei verschiedenen DH-Konzentrationen
Für das *AnchorChip Target* war das DH in 80 % Ethanol, für das *Ground Steel Target* in Wasser gelöst.

Zur Bestimmung der exakten Nachweisgrenze wurden zwei Substanzen verwendet, Maltoheptaose, welche eingewogen wurde und desialylierte *N*-Glykane vom FETUA, deren Konzentration mittels CE bestimmt wurde. Bis zu einer Stoffmenge von 10 fmol sind beide Substanzen gut messbar. Das triantennäre *N*-Glykan kann bei 1,3 fmol noch detektiert werden. Somit liegt die Nachweisgrenze bei 1-10 fmol (Abbildung 5-10). Im Vergleich dazu liegt die Nachweisgrenze beim *Ground Steel Target* bei 500 fmol (Daten nicht gezeigt). Die Empfindlichkeit der Messung wurde somit um den Faktor 50 verbessert. Die Volumina von $\geq 1 \mu\text{L}$ und die Lösungen der neuen Präparationstechnik für das *AnchorChip Target* mit Ara sind zusätzlich mit dem Freedom EVO Roboter kompatibel.

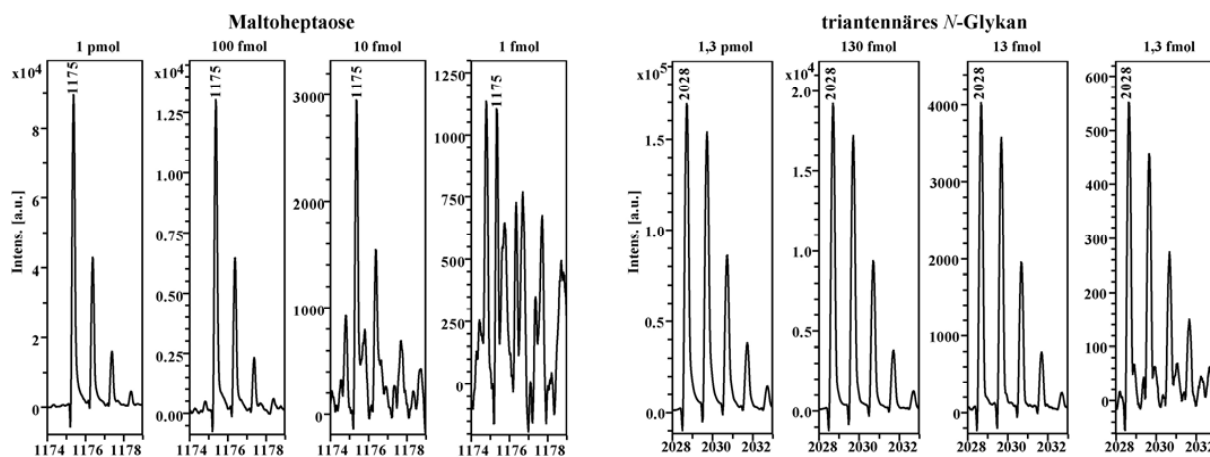
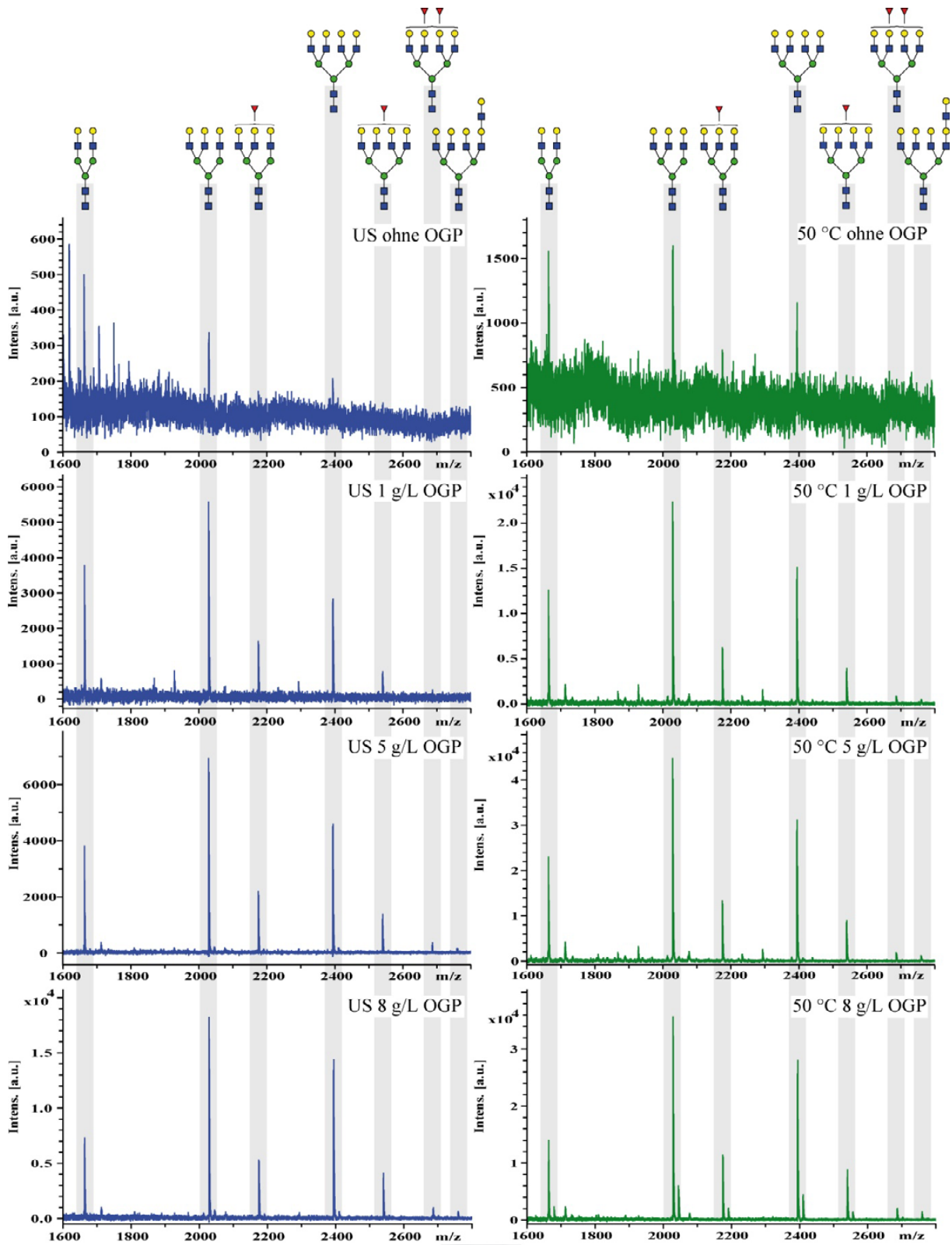


Abbildung 5-10: Nachweisgrenze vom *AnchorChip Target* mit Ara

Die MALDI-TOF-MS-Spektren $[M+Na]^+$ zeigen Maltoheptaose ($m/z = 1145,4$) und das triantennäre *N*-Glykan ($m/z = 2028,7$) vom FETUA.

5.4 In-Gel-PNGase F-Behandlung

Zur Abspaltung der *N*-Glykane von elektrophoretisch getrennten Proteinen im SDS-PAGE-Gel wurde eine neuartige In-Gel-PNGase F-Behandlungsmethode entwickelt. Die Methode von Küster et al. (1997) war nicht reproduzierbar und außerdem ungeeignet für die Automatisierung. Bei der Methode von Küster et al. (1997) werden die Proteine in einem 17,5 % SDS-PAGE-Gel mit einer geringen Bisacrylamidkonzentration von nur 0,07 % getrennt. Die *N*-Glykane werden von den Proteinen im Gel mit PNGase F in 130 μ L 20 mmol/L Natriumhydrogencarbonat abgespalten und danach mit dreimal 200 μ L Wasser im Ultraschallbad extrahiert. Bei der hier neu entwickelten Methode wurde anstelle des beschriebenen Ultraschallbads zur Extraktion ersatzweise ein Inkubator bei 50 °C getestet und zusätzlich ein Detergenz eingesetzt. Es wurden jeweils sechs Gelspots von humanem A1AG mit einem Durchmesser von 1 mm aus dem SDS-PAGE-Gel ausgestanzt (Abbildung 5-19). Die Proben wurden mit Trypsin behandelt, die *N*-Glykane mit PNGase F abgespalten und *n*-Octyl- β -D-glucopyranosid (OGP) in einer Konzentration von 0; 1; 5 und 8 g/L hinzugegeben. Die Sialinsäuren wurden mit Neuraminidase entfernt. Die Messung im MALDI-TOF-MS mit Ara und *AnchorChip Target* erfolgte mit 2000 Schuss. Mit zunehmender OGP Konzentration werden mehr *N*-Glykane freigesetzt. Die Extraktion der *N*-Glykane bei 50 °C zeigt gegenüber der Extraktion im Ultraschallbad bessere Ergebnisse (Abbildung 5-11) und ist außerdem roboterkompatibel.




 jede Probe enthält sechs Gelstücke von A1AG human mit 1 mm Durchmesser

Abbildung 5-11: Vergleich der In-Gel-PNGase F-Behandlung mit und ohne OGP, sowie Vergleich von Ultraschall-(US) und 50 °C-Extraktion.

Dargestellt sind die MALDI-TOF-MS-Spektren $[M+Na]^+$ mit Ara auf dem *AnchorChip Target* mit 2000 Schuss. Jede Probe enthielt sechs A1AG-Gelstücke von je 1 mm Durchmesser, welche mit dem *EXQuest Spot Cutter* ausgestanzt wurden (unten). Diese Proben wurden mit Trypsin, PNGase F und Neuraminidase behandelt. Der PNGase F-Puffer enthält unterschiedliche OGP Konzentrationen (Angabe in Abbildung) und außerdem wurden die Glykane mit Ultraschall oder Wärme bei 50 °C aus dem Gel extrahiert.

In weiteren Versuchen wurde festgestellt, dass *N*-Glykane auch aus nur einem Gelspot von 1 mm Durchmesser erfolgreich extrahiert und vermessen werden können (Abbildung 5-12). Ab einer OGP-Konzentration im PNGase F-Inkubationspuffer von 15 g/L ist eine MALDI-TOF-MS-Messung nicht mehr durchführbar.

Es wurde weiterhin getestet, ob die Trypsin-Behandlung vor der PNGase F-Inkubation eliminiert werden kann. Ein Modelversuch mit rekombinantem A1AT aus AGE1.HN (von Dr. A. Lusch, Charité Berlin, AG Glykodesign und Glykoanalytik, zur Verfügung gestellt) zeigt, dass der Verzicht prinzipiell möglich ist. Es wurde dabei eine OGP-Konzentration von 10 g/L verwendet (Abbildung 5-12). In späteren Arbeiten mit 2D-Gelen zeigte sich, dass die In-Gel-PNGase F-Behandlung ohne Trypsin bei A1AG zu geringeren Empfindlichkeiten führt.

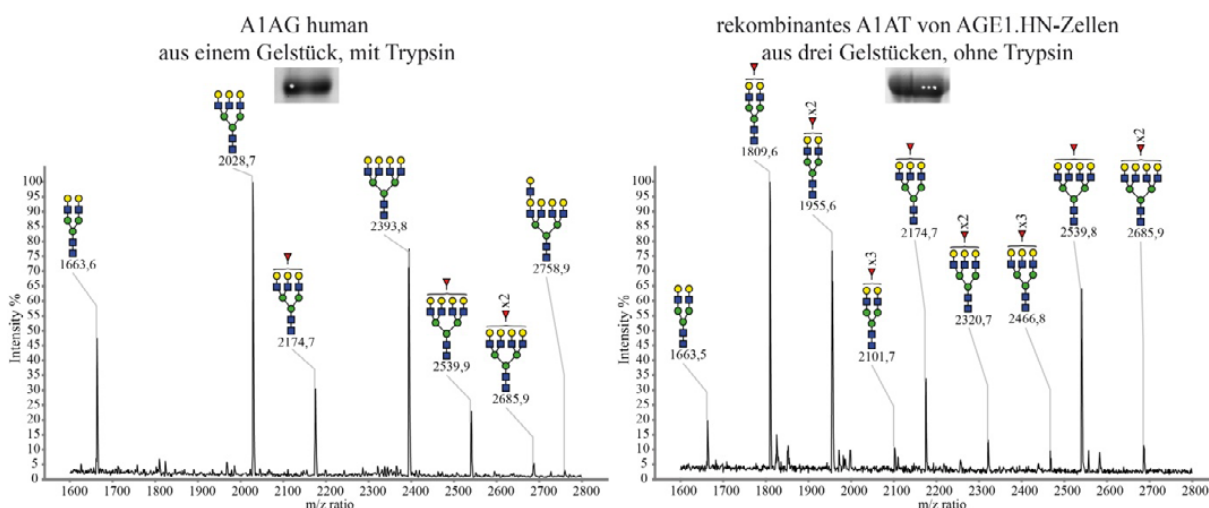


Abbildung 5-12: Vergleich der In-Gel-PNGase F-Behandlung von einem Gelstück A1AG mit Trypsin und drei Gelstücken von A1AT ohne Trypsin

Dargestellt sind die MALDI-TOF-MS-Spektren $[M+Na]^+$ mit Ara auf dem *AnchorChip Target* mit 2000 Schuss. A1AG enthielt ein und A1AT drei Gelstücke von je 1 mm Durchmesser, die mit dem EXQuest *Spot Cutter* ausgestanzt wurden (Gelbänder über den MS-Spektren dargestellt). A1AG wurde mit Trypsin, PNGase F und Neuraminidase behandelt, wobei der PNGase F-Puffer 8 g/L OGP enthielt. A1AT wurde mit PNGase F und Neuraminidase behandelt, wobei der PNGase F-Puffer 10 g/L OGP enthielt. Extrahiert wurde bei 50 °C.

Die Isolierung der *N*-Glykane aus 2D-Gelen erfolgte in einem größeren Gelvolumen im Vergleich zur Isolierung aus den dünneren SDS-PAGE-Gelen. Alle Parameter, mit Ausnahme der PNGase F- und OGP-Konzentration, wurden der Volumenvergrößerung angepasst. Die OGP-Menge wurde auf 2 g/L reduziert. Die PNGase F wurde aus Kostengründen auf 2 Units pro Probe limitiert (siehe Kapitel 7.2.15 und 5.5.3).

5.5 Automatisierung der Glykananalytik

Ein Hauptziel dieser Arbeit war, den Prozess der Glykananalytik in einem Freedom EVO 200 *liquid handling* Roboter von Tecan zu automatisieren. Der Roboter hatte zwei feste Stahlnadeln, zwei Vorrichtungen für Einwegspitzen, zwei Inkubatoren, zwei Vakuumstationen, mehrere Hotels und mehrere Flüssigkeitsbehälter, welche temperierbar waren (temperiert auf RT, 4 °C und 37 °C) (Abbildung 5-13 A). Eine Besonderheit des Systems war die speziell angefertigte Universalplatte zur Unterdruckreinigung mit Spitzen. Die Platte ist mit dem 96-well-System kompatibel und konnte mit allen gängigen 10 bis 20 µL Spitzen variabel bestückt werden. Die nicht verwendeten Löcher wurden mit einem Blindstopfen verschlossen (Abbildung 5-13 B und D).

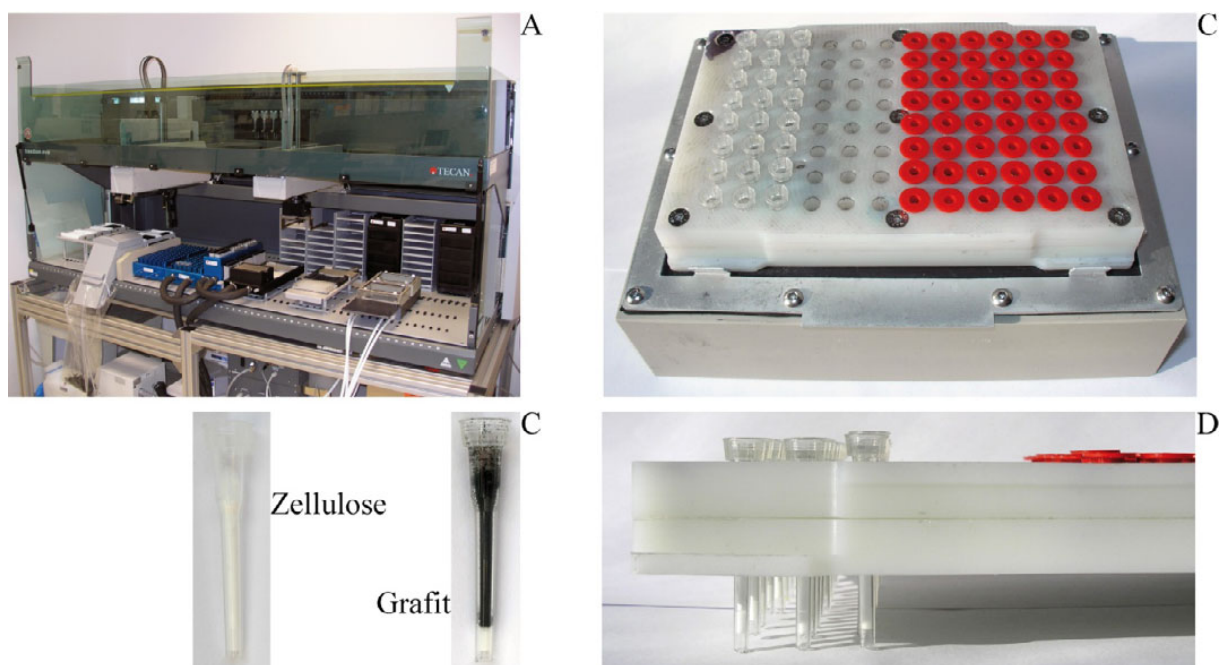


Abbildung 5-13: Freedom EVO 200 und Universalplatte für Spitzen

- A Freedom EVO 200 (Tecan)
 B 96-well Universalplatte für Spitzen auf Vakuumstationshalter; links Filterspitze #765288 FT10E (Greiner Bio-One); Mitte leer; rechts rote Blindstopfen von TopTip (Glygen)
 C Filterspitze #765288 FT10E befüllt mit Zellulose (links) und Grafit (rechts)
 D Seitenansicht von 96-well Universalplatte für Spitzen; links Filterspitze #765288 FT10E (Greiner Bio-One); Mitte leer; rechts rote Blindstopfen von TopTip (Glygen)

Das System war in der ursprünglichen Planung mit den grafitgefüllten TopTip-Spitzen der Firma Glygen vorgesehen. Mehrere Testläufe zeigten, dass durch die sehr kleine Öffnung der TopTip-Spitzen nicht genügend Unterdruck erzeugt wird. Es wurde getestet, ob Filterspitzen verschiedener Hersteller gefüllt mit Grafit als Mini-Chromatographiesäulen verwendbar sind. Die Filterspitze FT10E der Firma Greiner Bio-One lieferte die besten Resultate. Sie ist gekennzeichnet durch einen sehr tief sitzenden Filter, was eine Säulenhöhe von ca. 1,5 cm ermöglicht und einem Säulenvolumen von ca. 40 µL entspricht. Für einen besseren Unterdruck

wurde der vordere Teil der Filterspitze entfernt. Kontrollen zeigten, dass keine Kontamination vom Filter in die Probe gelangt (Daten nicht gezeigt). Das System funktioniert auch mit Zellulose als Chromatographiematerial (Abbildung 5-13 C). Die Materialkosten für die Mini-Chromatographiesäulen liegen unter 0,30 € pro Stück, wohingegen ein TopTip 2,50 € kostet.

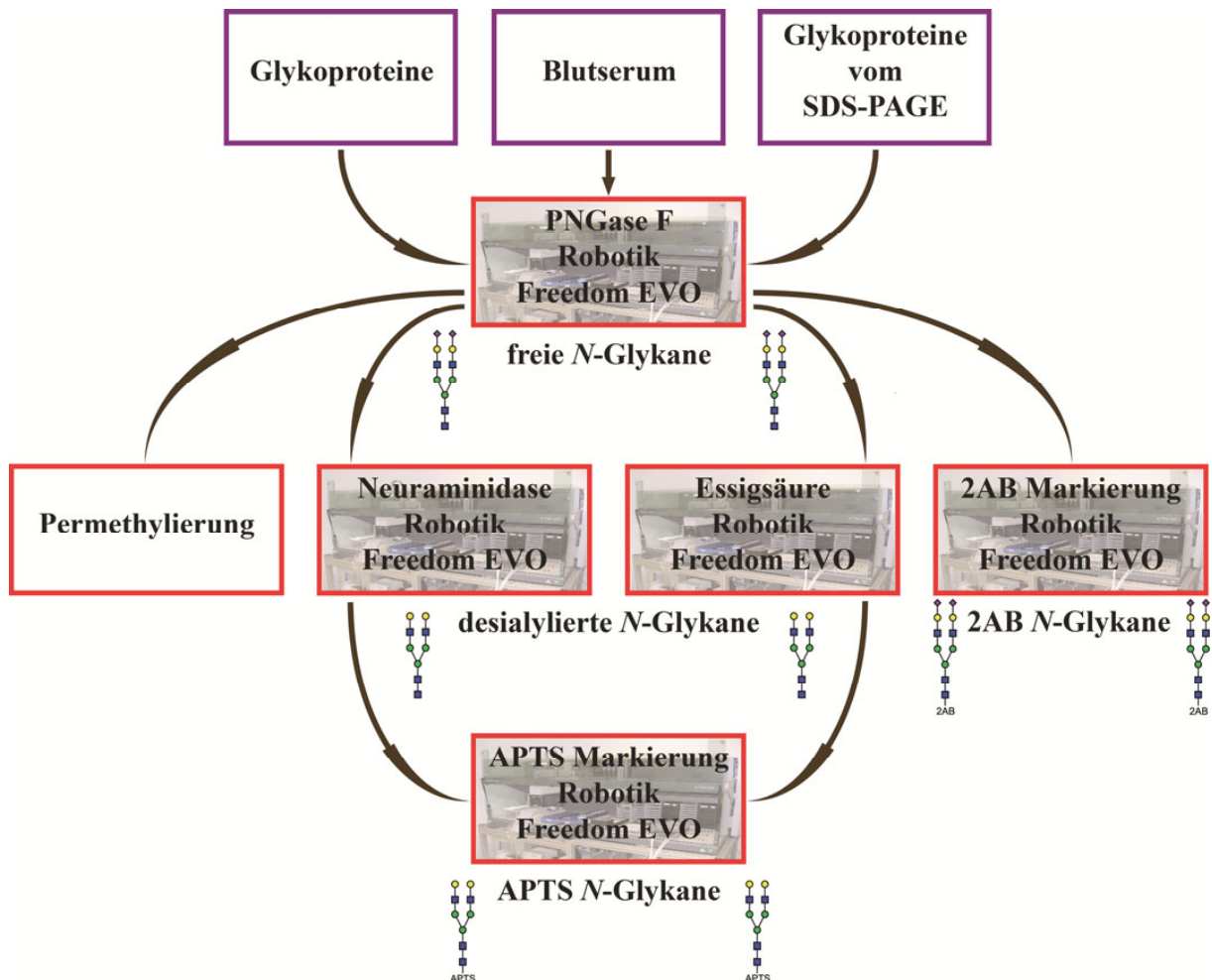


Abbildung 5-14: Konzept für die Automatisierung der Glykanalytik

Im nächsten Schritt wurde ein Konzept für die Automatisierung der Glykanalytik entwickelt. Dabei wurden die *N*-Glykane mit PNGase F vom Protein abgeschnitten und über Grafit aufgereinigt. Nach diesem zentralen Schritt der *N*-Glykanalytik liegen die Glykane mit Sialylierung und vollständigem *core* vor. In dieser Form können die *N*-Glykane permetyliert (7.2.17) werden, was aber ohne Roboterunterstützung erfolgt. Mit Roboterunterstützung kann die Abspaltung der Sialinsäuren entweder mit Neuraminidase (7.2.11) oder Essigsäure (7.2.10) und die Markierung der Glykane mit APTS (7.2.21) oder anderen Fluoreszenzmarkierungen (Abbildung 3-10) stattfinden. Die *N*-Glykane wurden nach der Abspaltung der Sialinsäuren über Grafit (7.2.9) und nach der Markierungsreaktion über Zellulose (7.2.22) im Roboter gereinigt (Abbildung 5-14). Es gab drei technische Einschränkungen: 1. Der Roboter hatte keine eigene Vakuumzentrifuge zum Trocknen der Proben. 2. Er besaß keinen Abzug und keinen *Sealer*, weshalb die Markierungsreaktion außerhalb des Roboters

stattfand 3. Der Inkubator erreicht maximal 60 °C, weshalb die Essigsäurehydrolyse in einem externen Inkubatorschrank stattfand. Der Hochdurchsatz wurde durch das konstant beibehaltene 96-well-Format garantiert. Die Roboterprogrammierung bestand aus einzelnen kleineren Programmen (*batches*). Durch Anpassung und Kombination einer geringen Anzahl an Grundprogrammen konnten die komplexen Gesamtabläufe leicht variiert werden.

5.5.1 Glykoproteine in Lösung

Für die Erprobung des Konzepts wurden vier verschiedene Glykoproteine in Wasser gelöst. Es wurden humanes A1AG, FETUA aus fötalem Kälberserum (FKS), A1AT aus humanem Blutplasma und TRFE ausgewählt. Diese Proteine wurden in vier verschiedenen Mengen von 2,5 µg; 1,0 µg; 0,5 µg und 100 ng in einer Doppelbestimmung im 96-well-Format untersucht. Bei dem Protokoll zur Gewinnung von *N*-Glykanen aus gelösten Proteinen wurden die Proben zur Unterstützung der PNGase F-Behandlung mit SDS und Tributylphosphin (TBP) unter Wärme denaturiert und reduziert. Weithin wurden nach einer Abkühlphase Nonidet P-40 und OGP zugegeben. Nach erfolgter PNGase F-Inkubation wurden die Detergenzien mit Calbiosorb entfernt und die Glykane durch eine Grafitaufreinigung gewonnen. Anschließend wurden die Proben in der 96-well-Platte in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Danach wurden die *N*-Glykane mit Neuraminidase desialyliert, durch eine Grafitaufreinigung entsalzt und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Proben wurden im MALDI-TOF-MS mit dem 800er *AnchorChip Target* vermessen.

Die *N*-Glykane wurden bei allen Proteinen erfolgreich isoliert. Sie zeigen die typischen Glykanprofile wie bei einer Präparation ohne Roboter. Beispielhaft ist dies für A1AG und FETUA in Abbildung 5-15 dargestellt. Bei A1AG ist der hohe Anteil an tri- und tetraantennären Strukturen zu sehen, was ein zufriedenstellendes Ergebnis ist. A1AG und A1AT sind als „schwierige“ Glykoproteine bekannt, da die Abspaltung der *N*-Glykane optimierte Protokolle erfordert. Für A1AG bedeutet das einen kombinierten Ansatz mit Trypsin und PNGase F. Bei A1AT wird aufgrund der inhibierenden Wirkung auf Trypsin mit einer Mischung von Detergenzien gearbeitet. FETUA und TRFE zeigen ein sehr einfaches Glykanprofil. FETUA weist hauptsächlich das triantennäre und TRFE das biantennäre *N*-Glykan auf. Der Versuch bestätigte, dass mit dem entworfenen Roboterprozess *N*-Glykane von den verschiedensten Glykoproteinen isoliert werden können (Abbildung 5-16 und Abbildung 5-17). Die Nachweisgrenze liegt bei allen vier Glykoproteinen bei 0,5 µg Protein, was ca. 5 bis 10 pmol entspricht. Die Hauptstrukturen sind noch bei 100 ng zu sehen. Für Spektren mit Glykanstrukturen, die nur in sehr geringen Mengen vorkommen, wie z. B. das

pentaantennäre *N*-Glykan bei A1AT und A1AG sind mindestens 1 µg erforderlich (Abbildung 5-16 und Abbildung 5-17).

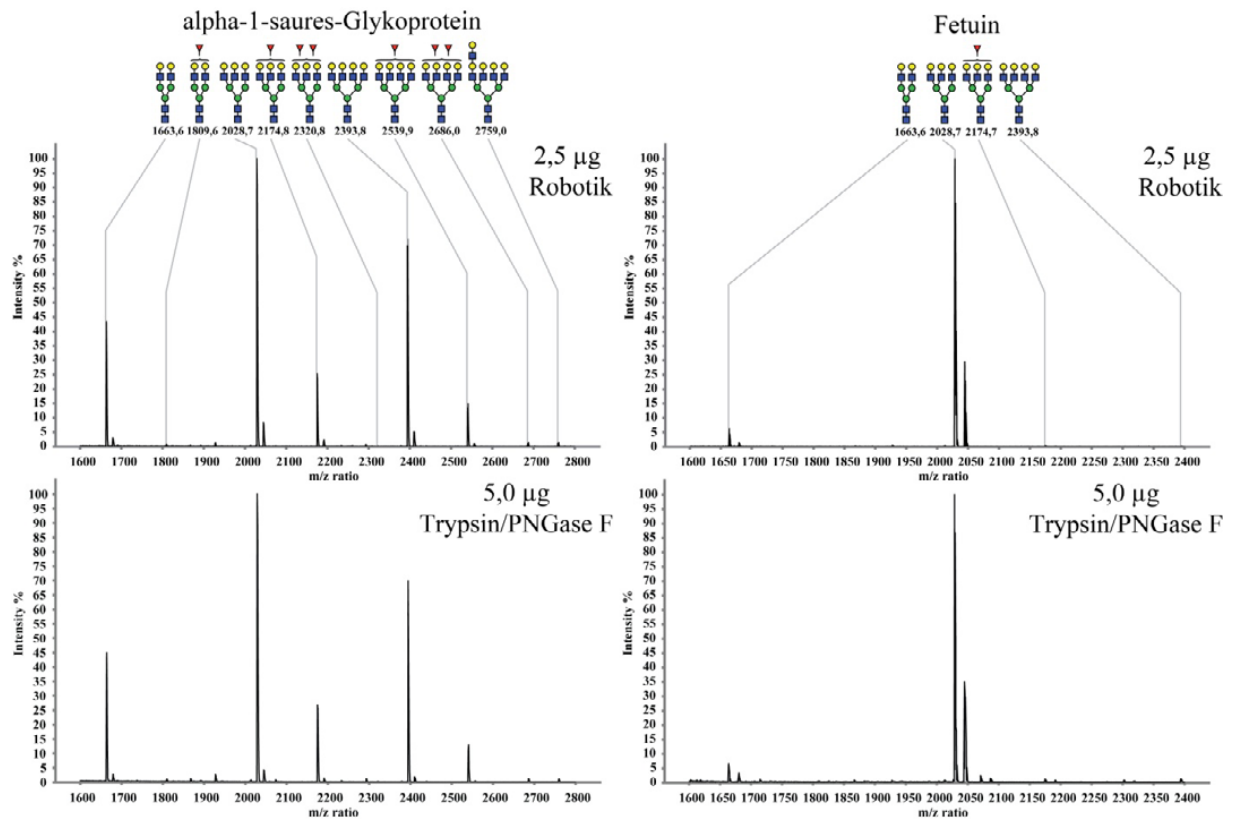


Abbildung 5-15: Vergleich von MALDI-TOF-MS-Spektren $[M+Na]^+$ der desialylierten *N*-Glykane von A1AG und FETUA aus FKS nach PNGase F- und Neuraminidase-Behandlung im Freedom EVO Roboter (oben) mit desialylierten *N*-Glykanen der gleichen Proteine nach Trypsin-, PNGase F- und Neuraminidase-Behandlung ohne Roboter (unten).

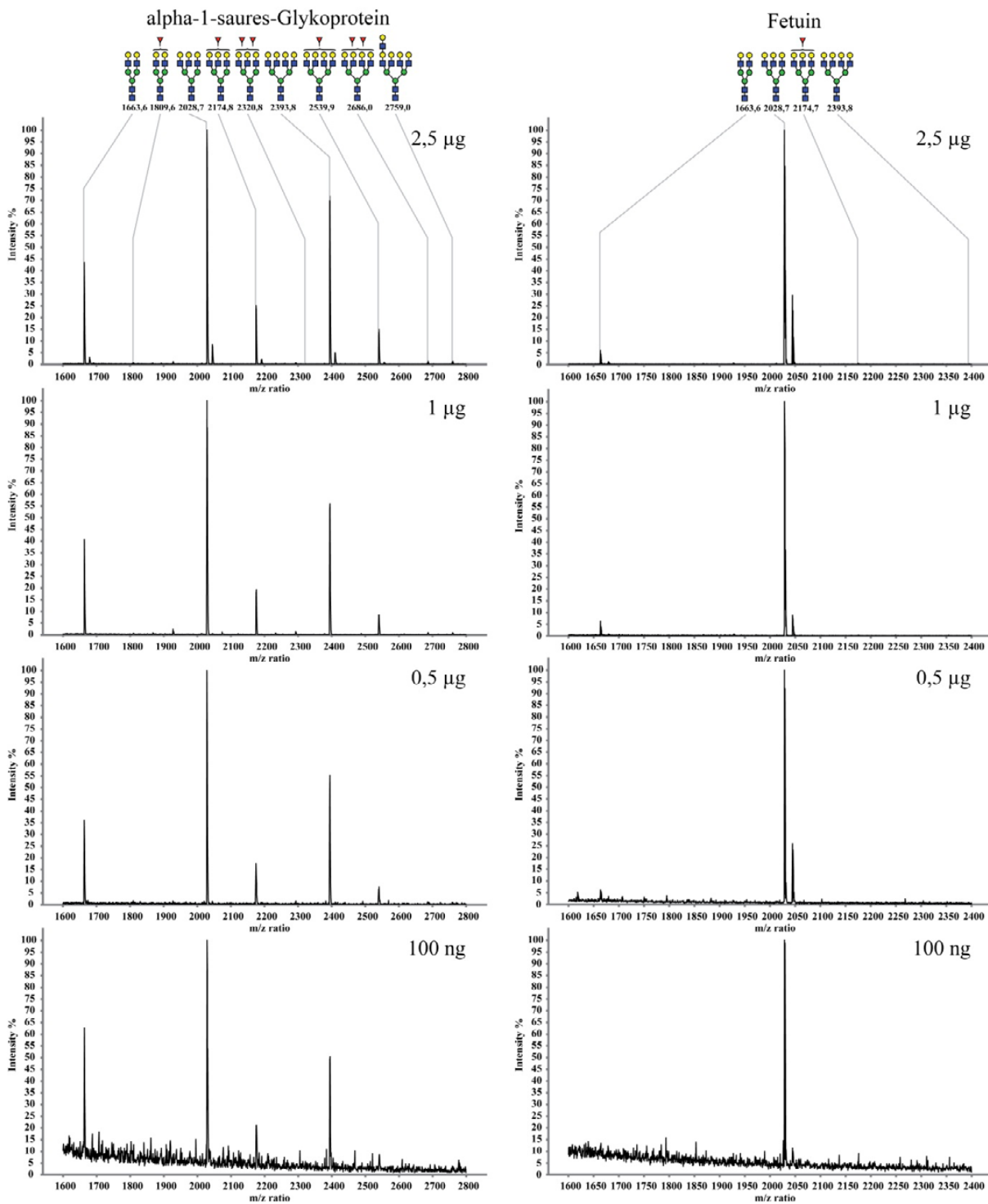


Abbildung 5-16: MALDI-TOF-MS-Spektren $[M+Na]^+$ der desialytierten *N*-Glykane von A1AG und FETUA aus FKS nach PNGase F- und Neuraminidase-Behandlung im Freedom EVO Roboter.

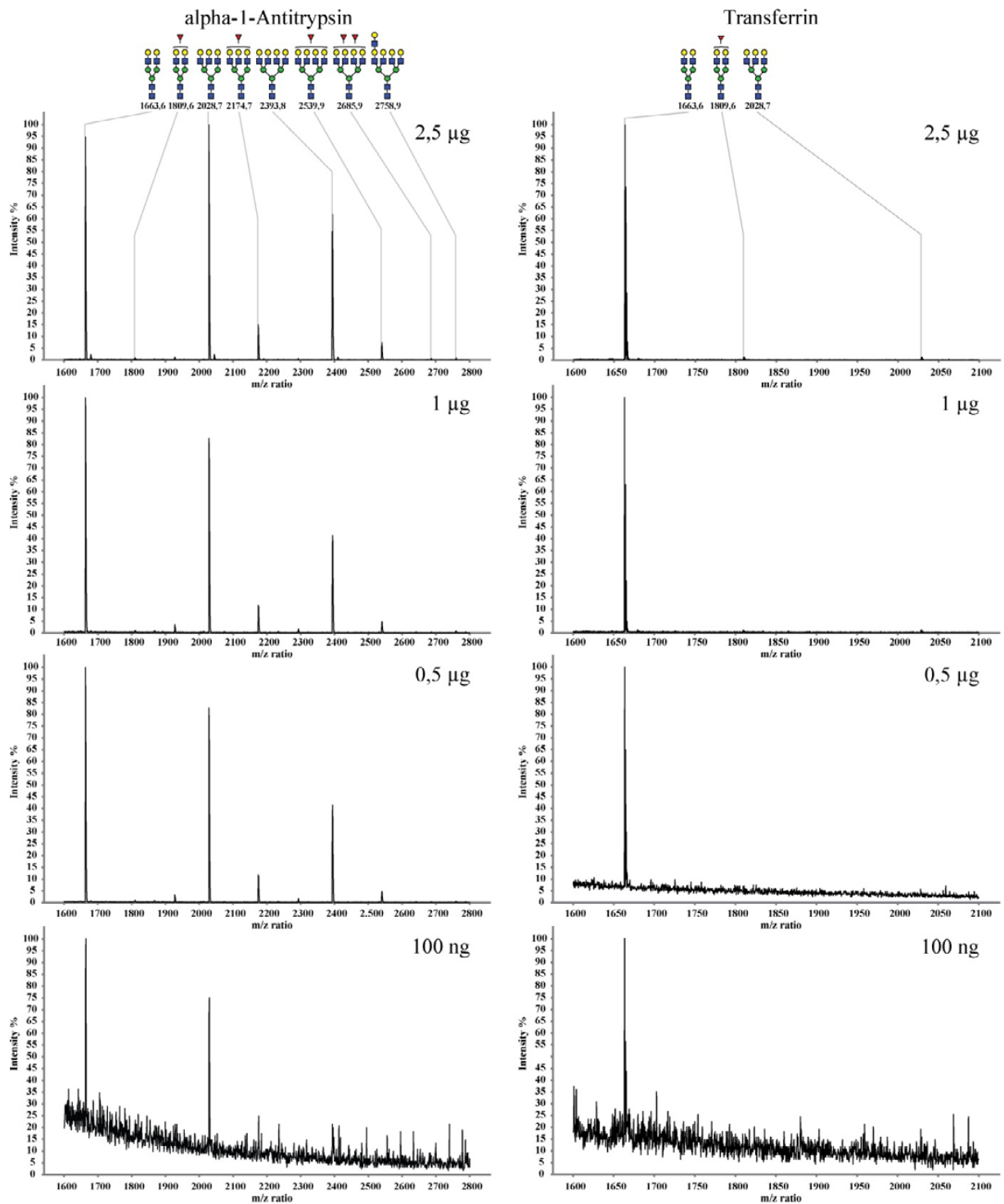


Abbildung 5-17: MALDI-TOF-MS-Spektren $[M+Na]^+$ der desialytierten *N*-Glykane von A1AT und TRFE nach PNGase F- und Neuraminidase-Behandlung im Freedom EVO Roboter.

5.5.2 Blutserum

Nach den erfolgten Voruntersuchungen mit den vier Serumproteinen wurde mit humanem Blutserum gearbeitet. Es wurden 3 μ L Blutserum pro Probe verwendet. Das Analysenmaterial stammte von Patientinnen mit und ohne Ovarialkarzinom. Beide Gruppen enthielten Probenmaterial von je fünf Frauen. Die Ergebnisse wurden durch eine Dreifachbestimmung gefestigt.

Die Blutserumproben wurden vor der PNGase F-Inkubation mit SDS, TBP, Nonidet P-40 und OGP behandelt. Die Detergenzien wurden mit Calbiosorb entfernt und die Proben über Grafit gereinigt. Nach der Trocknung wurden die *N*-Glykane mit Neuraminidase desialyliert, über Grafit aufgereinigt und getrocknet. Anschließend wurden die Proben im MALDI-TOF-MS mit dem *800er AnchorChip Target* vermessen. Der Rest der Proben wurde mit APTS markiert und getrocknet. Ohne zusätzliche Aufreinigung wurden die Proben mit Wasser verdünnt und mittels CE vermessen.

Mit beiden Messmethoden wurden hohe Signalintensitäten bei allen Proben erzielt. Sowohl im MALDI als auch bei der CE werden Unterschiede zwischen beiden Gruppen sichtbar (Abbildung 5-18). Die statistische Auswertung wird in Kapitel 5.7.3 gezeigt.

Im Experiment wurde ermittelt, dass die Menge an Blutserum ohne Verlust an Information auf 1 μ L reduzierbar ist (Daten nicht gezeigt). Mit dem *AnchorChip Target* lassen sich viele Proben in kürzester Zeit vermessen (ca. 1 min pro Messung). Bei der CE gab es die zeitliche Einschränkung, da das Gerät mit nur einer Kapillare ausgerüstet war und ein Analysenlauf 22 min dauert. Somit konnte diese CE dem Hochdurchsatzansatz nicht mehr gerecht werden .

Ergebnisse

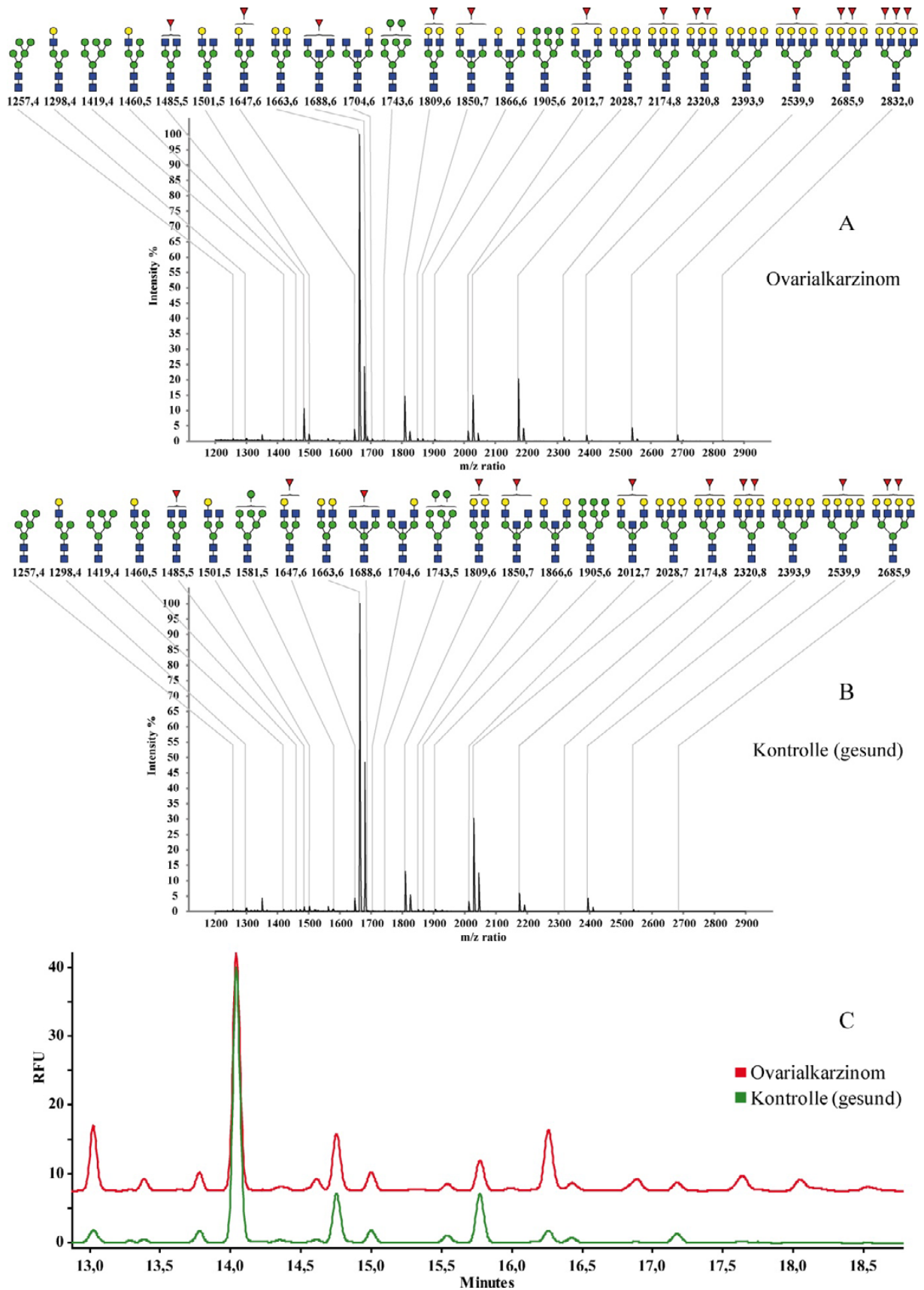


Abbildung 5-18: Bestimmung des Serum-Glykanprofils der Patientinnen mit Ovarialkarzinom

A und B MALDI-TOF-MS-Spektrum $[M+Na]^+$ von desialylierten *N*-Glykanen aus Blutserum nach PNGase F- und Neuramindase-Behandlung im Roboter Freedom EVO

C CE-Elektropherogramm von desialylierten *N*-Glykanen aus Blutserum nach PNGase F-, Neuramindase-Behandlung und APTS-Markierung (ohne Zellaufreinigung) im Freedom EVO Roboter

5.5.3 Glykoproteine aus SDS-PAGE-Gelen

Zur Isolierung von *N*-Glykanen aus SDS-PAGE-Gelen wurde humanes A1AT aus Blutplasma verwendet. In der SDS-PAGE wurden Verunreinigungen des A1AT mit anderen Proteinen detektiert. Diese wurden nach der In-Gel-Spaltung mit Trypsin und einer Mascot-Analyse identifiziert. Über eine densitometrische Analyse wurden die Anteile der Proteine berechnet. Die verwendete A1AT-Probe setzt sich aus ca. 40 % A1AT, 40 % A1AG, 20 % Albumin und AACT zusammen, wobei die letzten zwei in einer Bande laufen. Eine weitere schwache Bande am Gelende konnte nicht identifiziert werden (Abbildung 5-19).

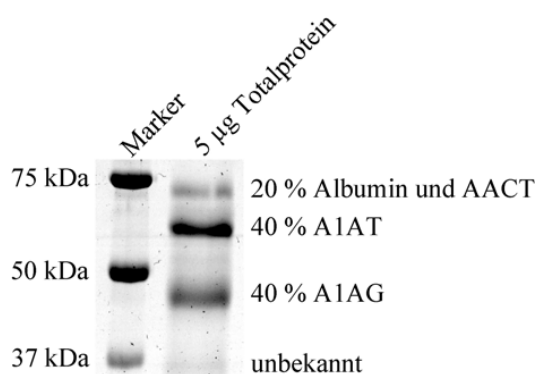


Abbildung 5-19: 5 µg Totalprotein von A1AT aus humanem Plasma (#A615010 der Firma Sigma-Aldrich)
10 %iges SDS-PAGE-Gel mit Coomassie gefärbt

Nachdem die Zusammensetzung der Probe aufgeklärt war, konnte die Menge an A1AT berechnet werden. Das Proteingemisch wurde vor der SDS-PAGE mit TBP und Iodacetamid reduziert und alkyliert. In jede Tasche wurden 5 µg Totalprotein aufgetragen, sodass die A1AT-Bande 2 µg entsprach (Abbildung 5-19). Für die In-Gel-Behandlung mit PNGase F im Roboter wurden vier verschiedene Mengen an A1AT verwendet. Es wurde die ganze Bande sowie sechs, drei und ein Gelstück von jeweils 1 mm Durchmesser ausgeschnitten. Dieses entsprach einer Menge von 2 µg; 0,83 µg; 0,42 µg und 140 ng Protein. Die Gelstücke wurden entfärbt, getrocknet und mit PNGase F und OGP versetzt. Nach der Inkubation wurden die *N*-Glykane mit Hilfe von Acetonitril (AcN), Wasser und Wärme extrahiert. Die gesammelten Extrakte wurden in der Vakuumzentrifuge getrocknet und über Grafit gereinigt. Danach wurden die Sialinsäuren mit Essigsäure abgespalten und die *N*-Glykane erneut über Grafit aufgereinigt. Die getrockneten Proben wurden im MALDI-TOF-MS mit dem *800er AnchorChip Target* vermessen. Das verbleibende Probenmaterial wurde mit APTS markiert und danach getrocknet. Nach einer Zelluloseaufreinigung im Roboter wurden die Proben in 20 µL Wasser gelöst und mittels CE vermessen. Das Glykanprofil des reinen A1AT unterscheidet sich vom Proteingemisch, wie es in Kapitel 5.5.1 eingesetzt wurde (Abbildung 5-17). Der Anteil an triantennären und tetraantennären Strukturen ist bedeutend kleiner. Diese *N*-Glykane stammen vom A1AG (Abbildung 5-16), das zu 40 % in dem Proteingemisch ent-

halten ist. Das gefundene Profil vom A1AT entspricht dem Profil aus den 2D-Gelen von der gesunden Kontrollgruppe (Abbildung 5-39).

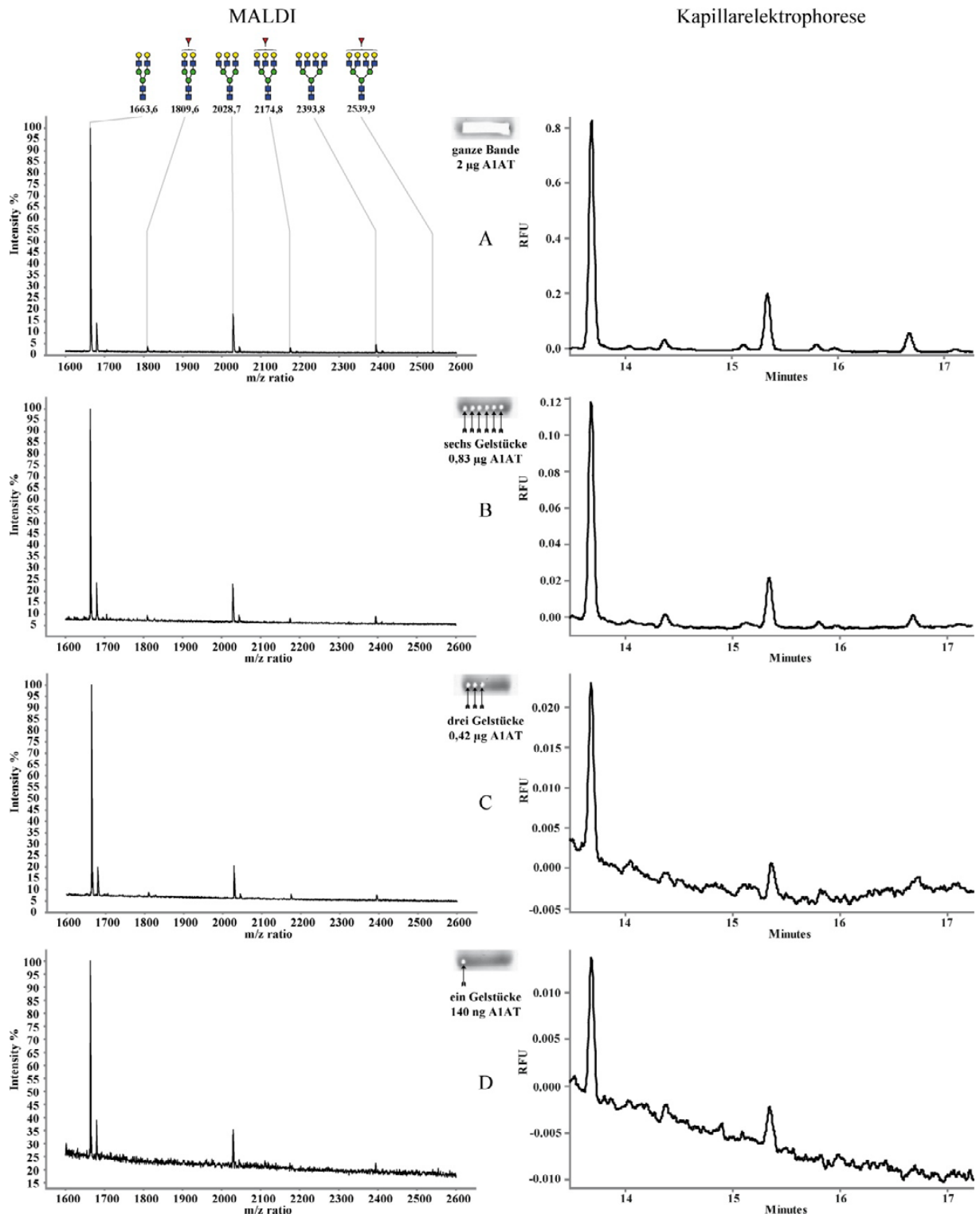


Abbildung 5-20: MALDI-TOF-MS-Spektren [M+Na]⁺ und CE-Elektropherogramme der N-Glykane von A1AT aus einem SDS-PAGE-Gel nach PNGase F-Behandlung, Desialylierung durch Essigsäurehydrolyse und Aufreinigung im Roboter Freedom EVO

- A N-Glykane der gesamten Proteinbande von 2 µg A1AT
- B N-Glykane von sechs Gelstücken von 1 mm Durchmesser, entspricht 0,83 µg A1AT
- C N-Glykane von drei Gelstücken von 1 mm Durchmesser, entspricht 0,42 µg A1AT
- D N-Glykane von einem Gelstück von 1 mm Durchmesser, entspricht 0,14 µg A1AT

Bei der MALDI-TOF-MS-Messung liegt die Nachweisgrenze für Proteine aus SDS-PAGE-Gelen bei 0,42 µg. Für die CE-Messung sind 2 µg A1AT erforderlich. Die zwei Hauptstrukturen sind auch bei 140 ng noch detektierbar (Abbildung 5-20). Die Zelluloseaufreinigung war für diese CE-Messung zwingend erforderlich um das Basislinienrauschen zu minimieren und damit die geringen Mengen an *N*-Glykanen zu detektieren (Daten nicht gezeigt).

Sialinsäuren lassen sich auch nach der In-Gel-PNGase F-Behandlung durch Neuraminidase entfernen. Durch die Anwesenheit von OGP muss eine höhere Konzentration verwendet werden. Die Abspaltung der Sialinsäure durch Essigsäurehydrolyse führt zu einem geringen Verlust an Fuc (Daten nicht gezeigt).

5.6 Trennung von *N*-Glykan-Isomeren mittels Kapillarelektrophorese

Die CE trennt Glykane nach ihrer Mobilität. Die Schwierigkeit ist, die Peaks des Elektropherogramms den entsprechenden Strukturen zu zuordnen. Derzeit gibt es dafür keine Mobilitätsdatenbank. Zur Normalisierung der Migrationszeiten wurde jeder Probe Maltose als interner Mobilitätsmarker hinzugefügt. Durch die Arbeit von Dr. M. Kaup (Charité Berlin, AG Glykodesign und Glykoanalytik) ist bekannt, in welchen Bereichen die einzelnen *N*-Glykane im Elektropherogramm der CE laufen. Durch die CE lassen sich zudem Strukturisomere trennen. Abbildung 5-21 zeigt einen Vergleich vom MALDI-Spektrum mit dem CE-Elektropherogramm von A1AT, welches aus einem 2D-Gel heraus analysiert wurde. Die Fragmentierung des biantennären *N*-Glykans mit einer Fuc mittels MALDI-TOF/TOF-MS zeigte hauptsächlich *core*-Fuc und die des triantennären und tetraantennären *N*-Glykans mit einer Fuc zeigten antennäre Fuc.

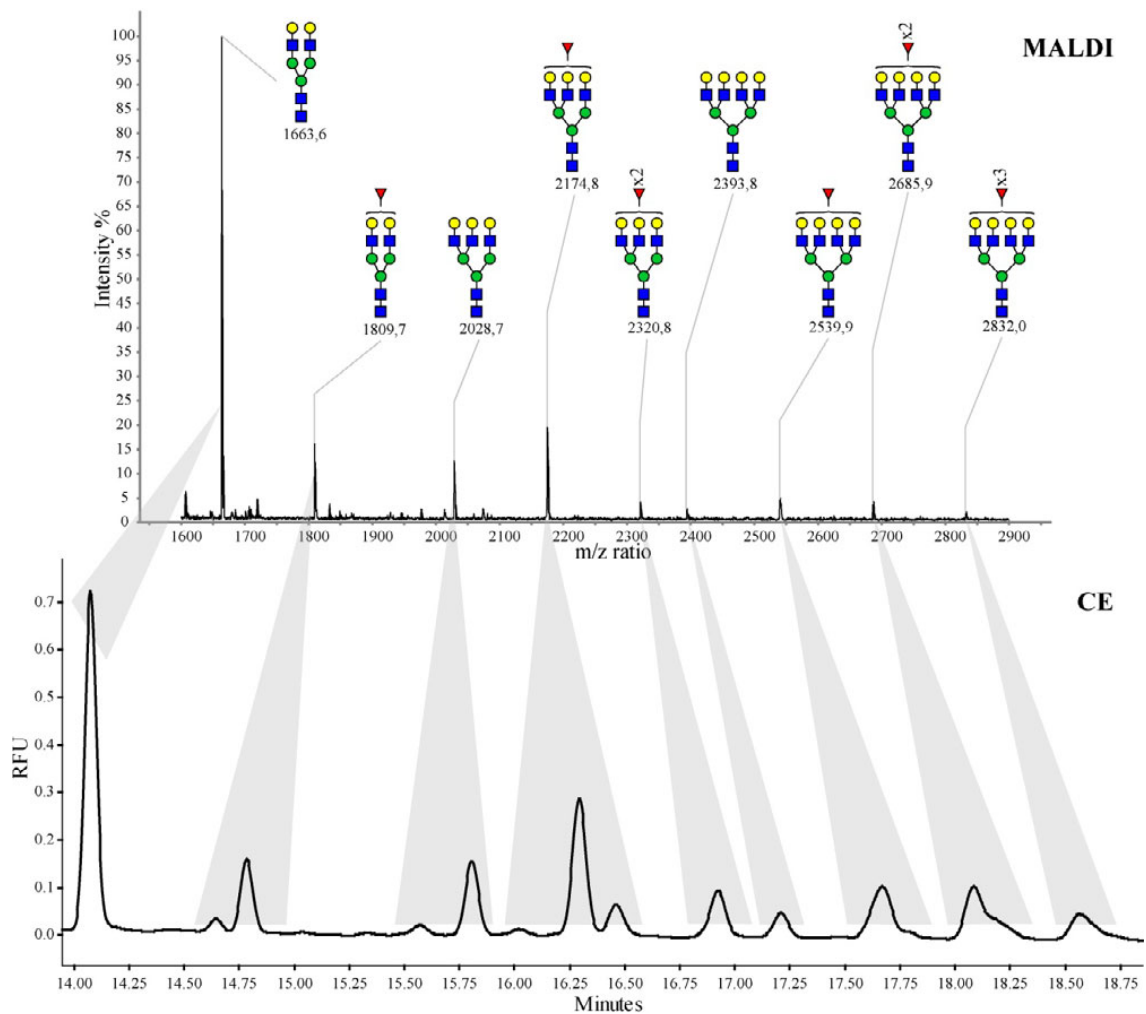


Abbildung 5-21: Vergleich von MALDI-TOF-MS-Spektrum $[M+Na]^+$ und CE-Elektropherogramm von desialylierten *N*-Glykanen von A1AT aus einem 2D-Gel der Ovarialkarzinomgruppe.

Die grauen Kegel markieren den Bereich in dem die entsprechenden *N*-Glykane im Elektropherogramm laufen.

5.6.1 Strukturen mit Fucose

Für die Zuordnung der Strukturen mit Fuc wurden verschiedene Enzymbehandlungen durchgeführt. Für die Untersuchung der biantennären *N*-Glykane mit Fuc wurde HPT von EMD Chemicals verwendet. Dafür wurden die *N*-Glykane mit $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase (*Streptomyces sp.* 142) oder mit $\alpha(1-2,3,4,6)$ Fucosidase (*Bovine Kidney*) inkubiert. Die antennäre Fuc hat einen kleineren Einfluss als die *core*-Fuc auf die Mobilität und damit ist eine kürzere Migrationszeit der entsprechenden *N*-Glykane zu beobachten. Es wurde weiterhin deutlich, dass die $\alpha(1-2,3,4,6)$ Fucosidase (*Bovine Kidney*) kaum Aktivität gegenüber der antennären Fuc zeigt (Abbildung 5-22 A). Der Hersteller beschreibt, dass dieses Enzym die höchste Aktivität gegenüber der $\alpha 1-6$ -Verknüpfung zeigt und die Spaltung anders verknüpfter Fuc konzentrationsabhängig ist (Prozyme, San Leandro, USA). Eine Verdopplung der Enzymkonzentration zeigt keine erfolgreiche Spaltung der antennären Fuc. Für die weitere Arbeit wurde das Enzym nur noch als $\alpha 1-6$ Fucosidase (*Bovine Kidney*) angesehen, da es keine

weiteren Aktivitäten zeigte. Der Lager- oder Reaktionspuffer verursachte zudem ein kleineres Signal-Rausch-Verhältnis im MALDI-Spektrum und der CE (Daten nicht gezeigt).

Im folgenden Versuch wurden die *N*-Glykane von A1AT, die aus einem 2D-Gel einer Ovarialkarzinomprobe stammten, verwendet. Die Ovarialkarzinomprobe zeigte sehr hohe Konzentrationen an tetraantennären Glykanen mit ein bis drei antennären Fuc. Im Elektropherogramm zeigen die Signale der tetraantennären Strukturen mit einer oder zwei Fuc ein *tailing*, welches durch die *core*-fucosylierte Variante verursacht wird, die ebenso wie die *core*-fucosylierten bi- und triantennären Strukturen eine längere Migrationszeit besitzt. In diesem Größenbereich können die Strukturisomere nicht mehr basisliniengetrennt werden. Des Weiteren führt der hohe Anteil an antennärer Fuc zusätzlich zu Überlappungen und Überlagerungen. Im MALDI-TOF-MS ist nur antennäre Fuc vom tetraantennären *N*-Glykan mit einer Fuc nachzuweisen. Die Behandlung mit $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase (*Streptomyces sp.* 142) zeigt ebenfalls, dass der größte Teil antennär gebundene Fuc ist (Abbildung 5-22 B).

Im folgenden Versuch wurde mit AACT aus demselben 2D-Gel der Ovarialkarzinomprobe gearbeitet. Hier zeigen die tetraantennären Strukturen mit Fuc kein *tailing*. Durch die Behandlung mit $\alpha(1-6)$ Fucosidase (*Bovine Kidney*) wird keine Veränderung sichtbar. Durch $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase (*Streptomyces sp.* 142) werden alle Fucosestrukturen eliminiert. Dieses Experiment bestätigte die Zuordnungen aus dem vorhergehenden Versuch (Abbildung 5-22 C).

Für die Untersuchung der Fucosestrukturen der triantennären *N*-Glykane wurde HPT aus dem 2D-Gel der Ovarialkarzinomprobe verwendet. Die Behandlung mit $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase (*Streptomyces sp.* 142) zeigt hauptsächlich antennärer fucosetragende Strukturen. Hierbei fiel auf, dass das triantennäre *N*-Glykan mit einer antennärer Fuc in zwei Peaks nachgewiesen werden kann. Das MALDI-Spektrum zeigte in diesem Massenbereich kein weiteres *N*-Glykan (Daten nicht gezeigt), so dass es sich vermutlich um strukturisomere *N*-Glykane handeln musste. Im Bereich des triantennären *N*-Glykans ohne Fuc vergrößern sich die zwei Peaks nach der Fucosidase-Behandlung, wobei das triantennäre *N*-Glykan ohne Fuc mit der höheren Migrationszeit (rote Kurve bei ca. 16 min) (Abbildung 5-22 D) nach der $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase-Behandlung (*Streptomyces sp.* 142) stärker zunimmt und somit zum dominanteren triantennären *N*-Glykan mit einer antennären Fuc gehört (rote Kurve bei ca. 16,5 min) (Abbildung 5-22 D). Es sind ebenfalls zwei triantennäre *N*-Glykane mit *core*-Fuc zu finden. Das Verhältnis stellt sich so dar, dass das *N*-Glykan mit der kürzeren Migrationszeit den kleineren Anteil ausmacht (grüne Kurve, bei ca. 16,4 min) (Abbildung 5-22 D).

Für den anschließenden Versuch wurde rekombinantes A1AT aus *human embryonic kidney*-293-Zellen (HEK-293-Zellen) von Dr. A. Lusch (Charité Berlin, AG Glykodesign und Glykoanalytik) zur Verfügung gestellt. Bei diesem A1AT sind die triantennären Glykanstrukturen fast vollständig *core*-fucosyliert. Das A1AT aus Blutserum hingegen enthält hauptsächlich antennäre Fuc (siehe Kapitel 5.7.2.5). Zur Kontrolle wurde beim rekombinanten A1AT eine $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase-Behandlung (*Streptomyces sp.* 142) durchgeführt. Ein Vergleich mit HPT (EMD Chemicals), das jeweils nur ein Signal für das triantennäre *N*-Glykan mit einer antennären und *core*-Fuc aufweist, zeigt eine teilweise Überlappung mit der *core*-Fuc-Variante mit der kleineren Migrationszeit (grüne Kurve, bei ca. 16,4 min) (Abbildung 5-22 E). Außerdem wurde eine Übereinstimmung mit der zweiten *core*-Fucosestruktur, welche die längere Migrationszeit zeigt, gefunden (grüne Kurve, bei ca. 16,7 min) (Abbildung 5-22 E). Die Abspaltung der *core*-Fuc erzielt hauptsächlich eine Zunahme der triantennären Struktur mit der kleineren Migrationszeit (blaue Kurve, bei ca. 15,8 min) (Abbildung 5-22 E).

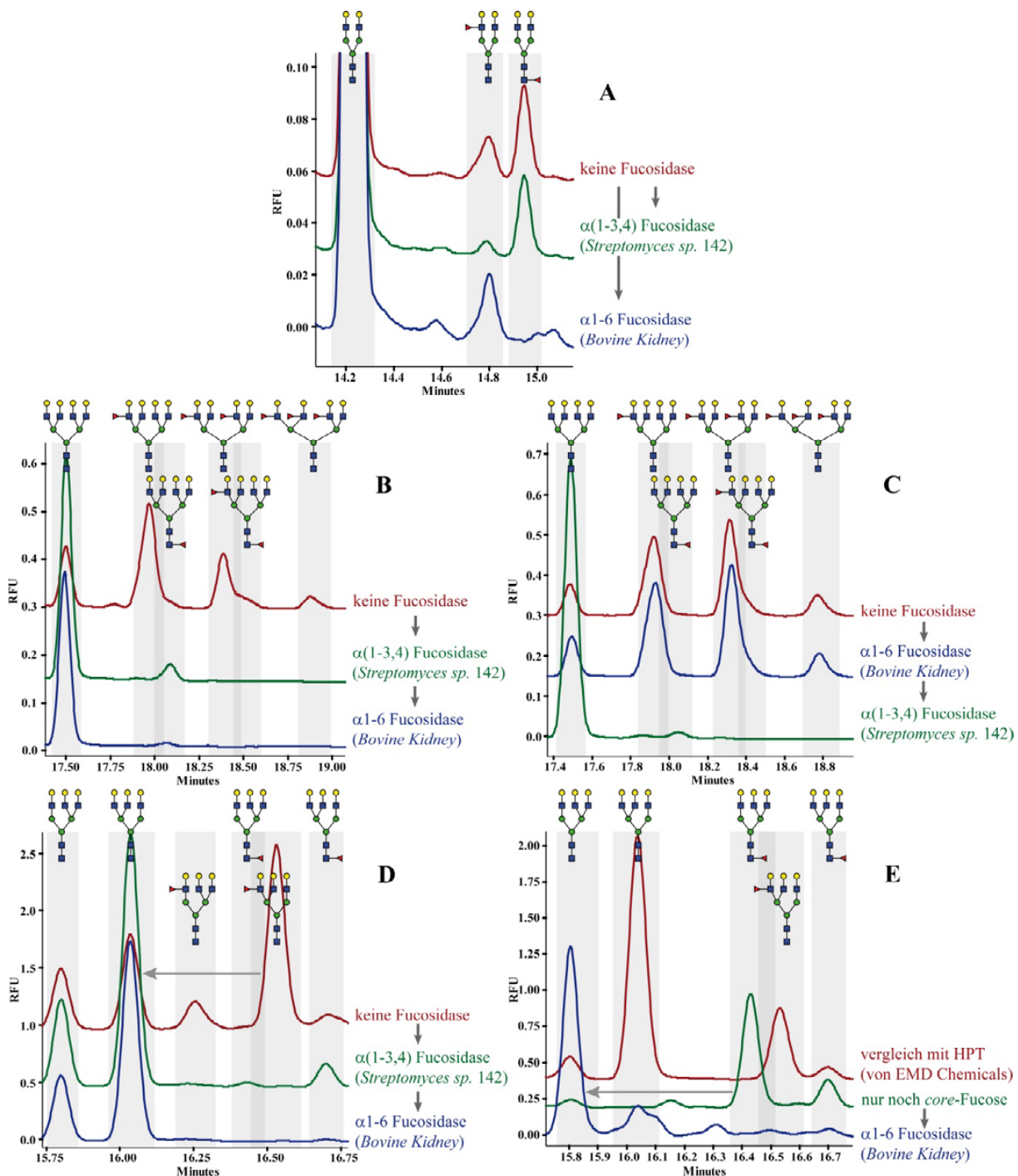


Abbildung 5-22: CE-Elektropherogramme von verschiedenen Fucosidase-Behandlungen

Die grauen Rechtecke markieren die entsprechenden Bereiche der *N*-Glykane. Die vertikalen Pfeile zeigen die Reihenfolge der Enzyme. Die horizontalen Pfeile zeigen die Veränderung der Hauptstruktur.

- | | | |
|---|--------------------------------------|--|
| A | HPT von EMD Chemicals: | 1. Sialidase (rostrot); 2. Sialidase und $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase (grün); 3. Sialidase und $\alpha 1-6$ Fucosidase (blau) |
| B | A1AT aus 2D-Gel Ovarialkarzinom: | 1. Sialidase (rostrot); 2. Sialidase und $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase (grün); 3. Sialidase; $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase und $\alpha 1-6$ Fucosidase (blau) |
| C | AACT aus 2D-Gel Ovarialkarzinom: | 1. Sialidase (rostrot); 2. Sialidase und $\alpha 1-6$ Fucosidase (blau); 3. Sialidase; $\alpha 1-6$ Fucosidase und $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase (grün) |
| D | HPT aus 2D-Gel Ovarialkarzinom: | 1. Sialidase (rostrot); 2. Sialidase und $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase (grün); 3. Sialidase; $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase und $\alpha 1-6$ Fucosidase (blau) |
| E | A1AT rekombinant aus HEK-293-Zellen: | 1. Vergleich mit HPT von EMD Chemicals, Sialidase (rostrot); 2. Sialidase und $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase (grün); 3. Sialidase; $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase und $\alpha 1-6$ Fucosidase (blau) |

5.6.2 Triisomere Strukturen

Die Ergebnisse aus Abbildung 5-22 D und E zeigen, dass zwei triantennäre Strukturisomere in den Proben enthalten sind, welche jeweils ein Signal für die Struktur mit antennärer und *core*-Fuc zeigen. Das triantennäre *N*-Glykan mit einer Fuc spaltet sich dadurch in vier Signale auf (zweimal antennäre Fuc und zweimal *core*-Fuc). Zur Kontrolle dieser Beobachtung wurde eine HPAEC-PAD durchgeführt. Mit dieser Methode können Glykane und ihre Isomere getrennt werden. Für einen HPAEC-PAD-Lauf wurden die desialylierten *N*-Glykane von 100 µg HPT (EMD Chemicals) verwendet. Die Peaks wurden fraktioniert, über Grafit gereinigt und mit dem MALDI-TOF-MS analysiert. Die *N*-Glykane wurden anschließend mit APTS für die CE-Messung markiert (Abbildung 5-23).

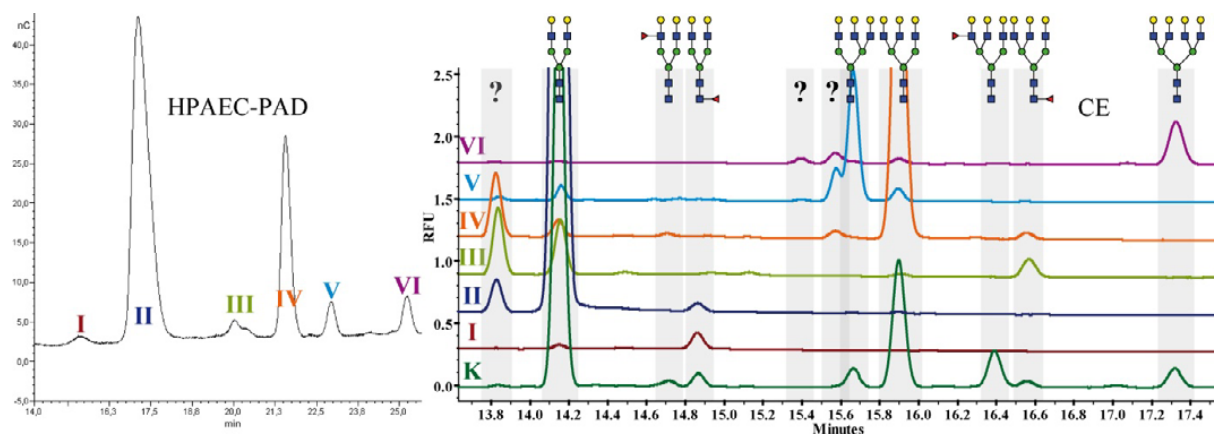


Abbildung 5-23: Trennung der desialylierten *N*-Glykane von HPT (EMD Chemicals) durch HPAEC-PAD und CE-Elektropherogramme der einzelnen Fraktionen.

Die grauen Rechtecke markieren die entsprechenden Bereiche der bekannten *N*-Glykane bzw. der neuen Peaks (?) mit wahrscheinlich unbekanntem *N*-Glykanen. I-VI sind die Fraktionen der HPAEC-PAD und K ist HPT vor der Auftrennung.

In den einzelnen Fraktionen ist mehr als ein *N*-Glykan zu finden. Im Vergleich zu den MALDI-TOF-MS Daten (Daten nicht gezeigt) werden im Elektropherogramm unbekannte Glykanstrukturen detektiert. Die fucosylierten gegenüber den nicht-fucosylierten Verbindungen eluieren bei der HPAEC-PAD früher. Erstaunlich ist, dass nur *N*-Glykane mit *core*-Fuc gefunden wurden (Abbildung 5-23 I und III). Der Hauptpeak II stellt das biantennäre *N*-Glykan, Peak VI das tetraantennäre *N*-Glykan dar. Die beiden Peaks IV und V beinhalten die triantennären *N*-Glykane, wobei V das Isomer mit dem kleineren Anteil ist. Im Vergleich zur CE zeigte sich hier, wie bei den Fuc, eine umgekehrte Elutionsreihenfolge. Mit diesem Kontrollversuch konnte zweifelsfrei geklärt werden, dass es sich um zwei Isomere des triantennären *N*-Glykans handelt (Abbildung 5-23).

Um den Strukturunterschied zwischen den triantennären Isomeren aufzuklären, wurden drei Hypothesen aufgestellt. Die erste Hypothese war, dass es sich um eine C2-Epimerisierung des

GlcNAc am reduzierenden Ende zu *N*-Acetyl-D-mannosamin (ManNAc) handelt (Abbildung 5-24). Diese läuft unter basischen Bedingungen in Richtung des ManNAc ab. Es ist beschrieben, dass diese zwei Epimere mittels CE zu trennen sind (Toida et al. 1996).

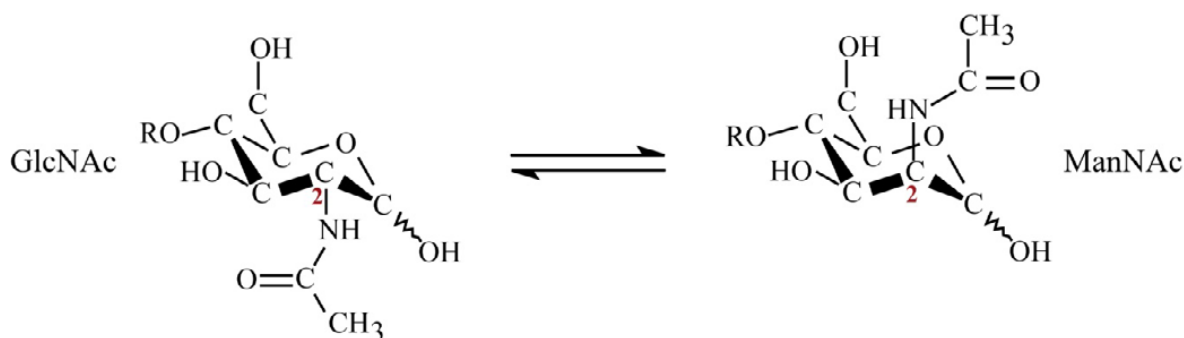


Abbildung 5-24: Reaktionsschema der C2-Epimerisierung des GlcNAc zu ManNAc am reduzierenden Ende von *N*-Glykanen.

Für die Überprüfung dieser Hypothese wurden zwei Standards hergestellt. Die *N*-Glykane von HPT (EMD Chemicals) wurden einerseits mit 25 % Ammoniak und andererseits mit 50 mmol/L NaOH behandelt. Die Standardproben wurden mit APTS markiert und gereinigt. Im Anschluss wurden diese mit der unbehandelten Probe mittels CE verglichen. Es zeigt sich, dass die Epimerisierung eine deutliche Verringerung der Migrationszeit von ca 0,3 min verursacht. Weiterhin ist zu erkennen, dass das untersuchte Isomer des triantennären *N*-Glykans nicht das C2-Epimer darstellt. Das kleinere Isomer hat eine längere Migrationszeit (rote Kurve, bei ca. 15,15 min) als das C2-Epimer des großen triantennären Isomers (grüne und blaue Kurve, bei ca. 15,05 min) (Abbildung 5-25 A). Außerdem erzeugte das kleinere triantennäre Isomer selbst einen Peak für ein C2-Epimer (blaue Kurve, bei ca. 14,9 min) (Abbildung 5-25 A). Die Verwendung von 50 mmol/L NaOH erzielte eine höhere Epimerisierung, aber auch eine Erniedrigung des Signal-Rausch-Verhältnisses (Abbildung 5-25 A). Ein Vergleich mit den Fraktionen aus der HPAEC-PAD zeigt, dass es während dieser Methode auch zur C2-Epimerisierung des GlcNAc kommt. Die unbekannt Peaks aus der HPAEC-PAD (Abbildung 5-23) waren identisch mit den C2-Epimeren (Abbildung 5-25 B). Natronlauge als Bestandteil der mobilen Phase ist der Grund für die Nebenreaktion bei der chromatografischen Trennung.

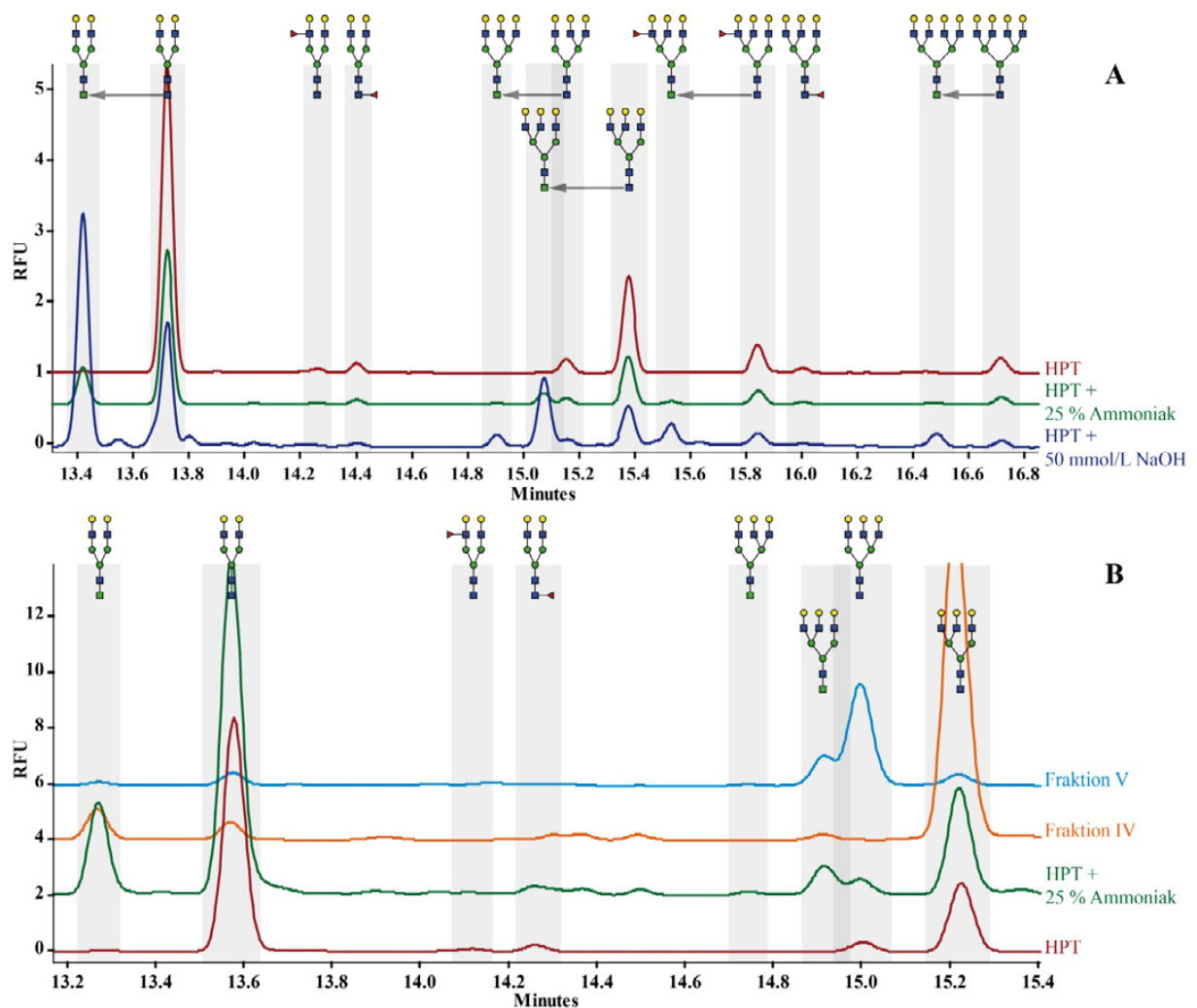


Abbildung 5-25: CE-Elektropherogramme der C2-Epimerisierung des GlcNAc am reduzierenden Ende zu ManNAc durch Ammoniak und NaOH (A), sowie der Vergleich mit den Fraktionen IV und V aus der HPAEC-PAD (B).

Die zweite Hypothese war, dass eine oder mehrere Gal β 1-3-verknüpft statt β 1-4 sind. Dieses Phänomen ist vom FETUA aus FKS bekannt (Green et al. 1988). Dieses verursacht in der CE eine Verkürzung der Migrationszeit. Durch eine Behandlung mit der β (1-3,6) Galactosidase wurde diese eine Gal vom triantennären *N*-Glykan spezifisch abgespalten. Im Vergleich zum HPT (EMD Chemicals) sind keine Veränderungen feststellbar. Weiterhin hat das triantennäre *N*-Glykan mit der einen β 1-3-verknüpften Gal vom FETUA eine längere Migrationszeit (rote Kurve, bei ca. 15,85 min) als das kleinere triantennäre Isomer vom HPT (EMD Chemicals) (blaue Kurve, bei ca. 15,75 min) (Abbildung 5-26 A). Es zeigte sich eindeutig, dass die *N*-Glykane aus humanen Proben keine β 1-3-verknüpften Gal besitzen. In einem Kontroll-experiment wurde geprüft, ob die Gal β 1-4-verknüpft sind. Die Fraktionen IV und V aus der HPAEC-PAD wurden mit β 1-4 Galactosidase (*Streptococcus pneumoniae*) inkubiert. Das HPT (EMD Chemicals) wurde zum Vergleich mit β (1-3,4) Galactosidase (*Bovine Testis*) behandelt. Es zeigte sich, dass alle Gal β 1-4-verknüpft sind. Weiterhin wurde festgestellt, dass

die beiden triantennären Isomere nach der Abspaltung der Gal nicht mehr voneinander zu trennen sind (blau und orange Kurve, bei ca. 12,75 min) (Abbildung 5-26 B).

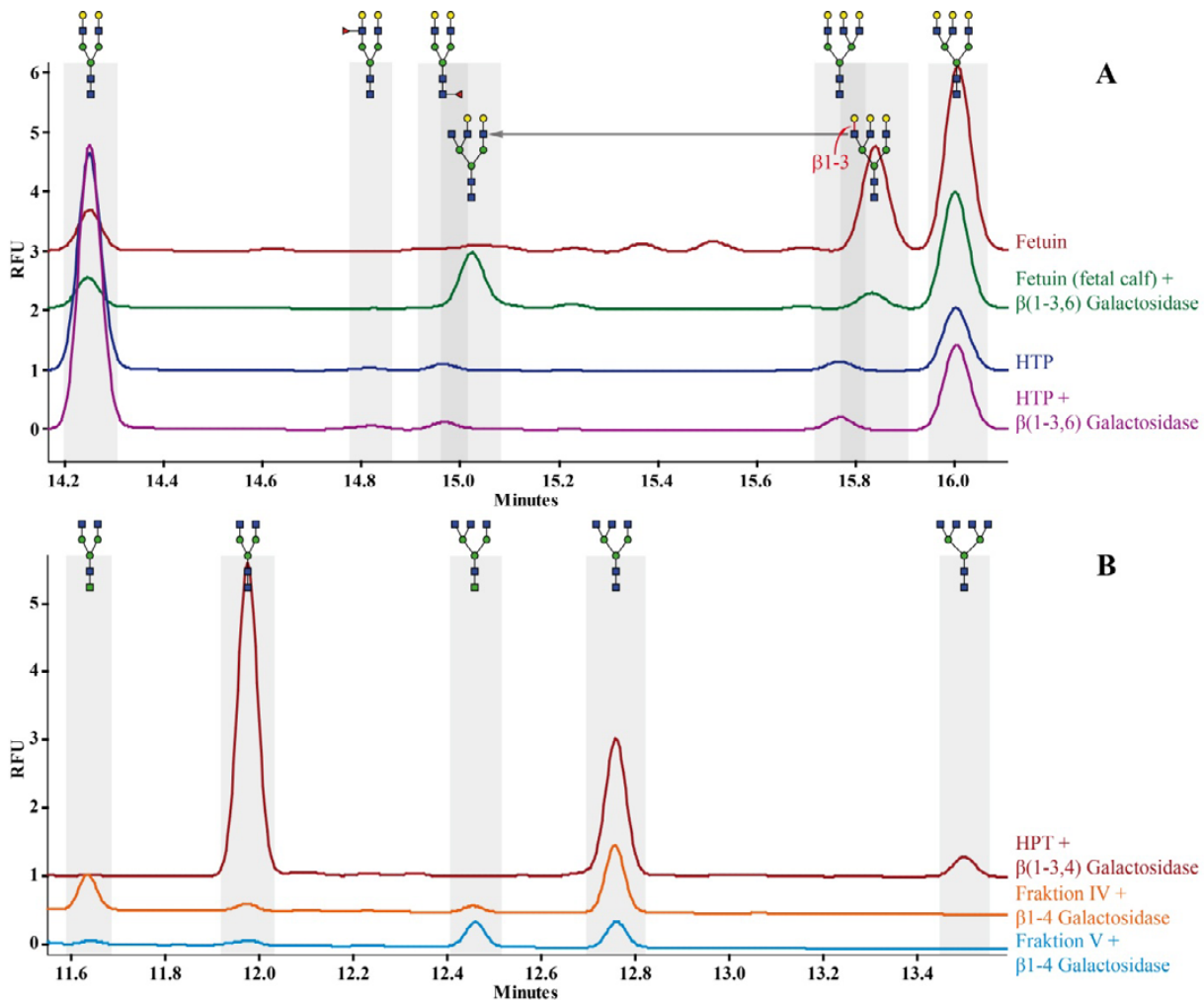


Abbildung 5-26: Test auf β 1-3 oder β 1-4 verknüpfter Gal bei N-Glykanen

- A 1. FETUA aus FKS: Behandlung mit Neuraminidase; 2. FETUA aus FKS: Behandlung mit $\beta(1-3,6)$ Galactosidase; 3. HTP: Behandlung mit Neuraminidase; 4. HTP: Behandlung mit $\beta(1-3,6)$ Galactosidase
- B 1. HTP: Behandlung mit $\beta(1-3,4)$ Galactosidase; 2. Fraktion IV aus HPAEC-PAD: Behandlung mit β 1-4 Galactosidase; 3. Fraktion V aus HPAEC-PAD: Behandlung mit β 1-4 Galactosidase

Die dritte Hypothese war, dass die dritte Antenne des einen triantennären Isomers durch ein β 1-4- und das andere Isomer durch ein β 1-6-verknüpftes GlcNAc gebildet wird. Zwei unabhängige Experimente sollten das beweisen. Das Lektin PHA-L bindet bevorzugt die GlcNAc(β 1-6)-Variante (Cummings and Kornfeld 1982; Kaneda et al. 2002). Es wurde versucht, die desialylierten N-Glykane von HPT (EMD Chemicals) über die PHA-L Säule zu isolieren. Der Vergleich mit der unbehandelten Probe zeigte eine Anreicherung des Isomers mit der geringeren Migrationszeit (grüne Kurve, bei ca. 15,02 min). Eine vollständige Trennung der Isomere konnte jedoch nicht erreicht werden. Die Anreicherung gab einen ersten Hinweis darauf, dass die triantennäre Isomerform mit der kleineren Migrationszeit die GlcNAc(β 1-6)-Variante darstellt (Abbildung 5-27).

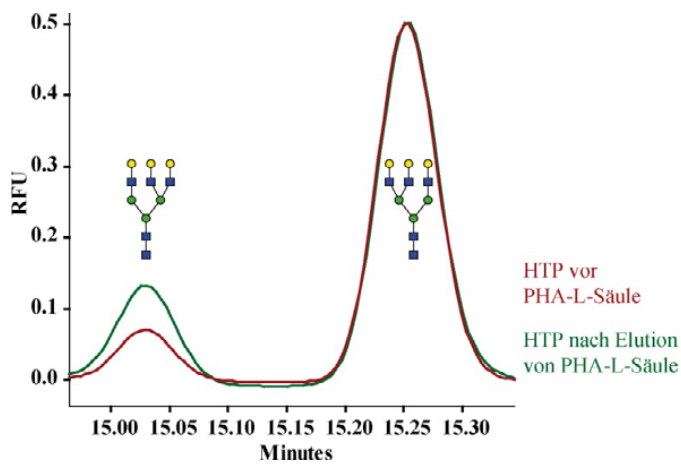


Abbildung 5-27: Vergleich der triantennären *N*-Glykane von HTP (EMD Chemicals) vor und nach der PHA-L-Chromatographie (normiert auf das Isoomer mit der höheren Migrationszeit)

In einem weiteren Versuch wurde das Enzym β -*N*-Acetylhexosaminidase von *Streptococcus pneumoniae* verwendet. Niedrig konzentriert spaltet es nur β 1-2-verknüpfte GlcNAc von den Antennen ab. Befindet sich in der Nachbarschaft ein β 1-6-verknüpftes GlcNAc, wird die β 1-2-verknüpfte Form nicht mehr abgespalten (Yamashita et al. 1981). Die daraus folgenden vier Möglichkeiten sind in Tabelle 5-2 dargestellt.

Tabelle 5-2: Mögliche Produkte der β -*N*-Acetylhexosaminidase aus *Streptococcus pneumoniae* bei einer Konzentration von 40 mU/mL

Glykan mit absoluter Masse vor der Inkubation	Behandlung mit β - <i>N</i> -Acetylhexosaminidase (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)	Absolute Masse nach der Inkubation
biantennäres <i>N</i> -Glykan $m/z = 1339,5$		$m/z = 933,3$
triantennäres <i>N</i> -Glykan mit GlcNAc(β 1-4)Man $m/z = 1542,5$		$m/z = 1136,4$
triantennäres <i>N</i> -Glykan mit GlcNAc(β 1-6)Man $m/z = 1542,5$		$m/z = 1339,5$
tetraantennäres <i>N</i> -Glykan $m/z = 1745,6$		$m/z = 1542,5$

Zur Kontrolle der Behandlung mit β -*N*-Acetylhexosaminidase aus *Streptococcus pneumoniae* wurden die *N*-Glykane von HPT (EMD Chemicals) und die *N*-Glykane des rekombinanten A1AT aus HEK-293-Zellen verwendet. Beim HPT (EMD Chemicals) ist das triantennäre Isomer mit der höheren Migrationszeit und beim rekombinanten A1AT aus HEK-293-Zellen das Isomer mit der kleineren Migrationszeit dominant (Abbildung 5-22 E).

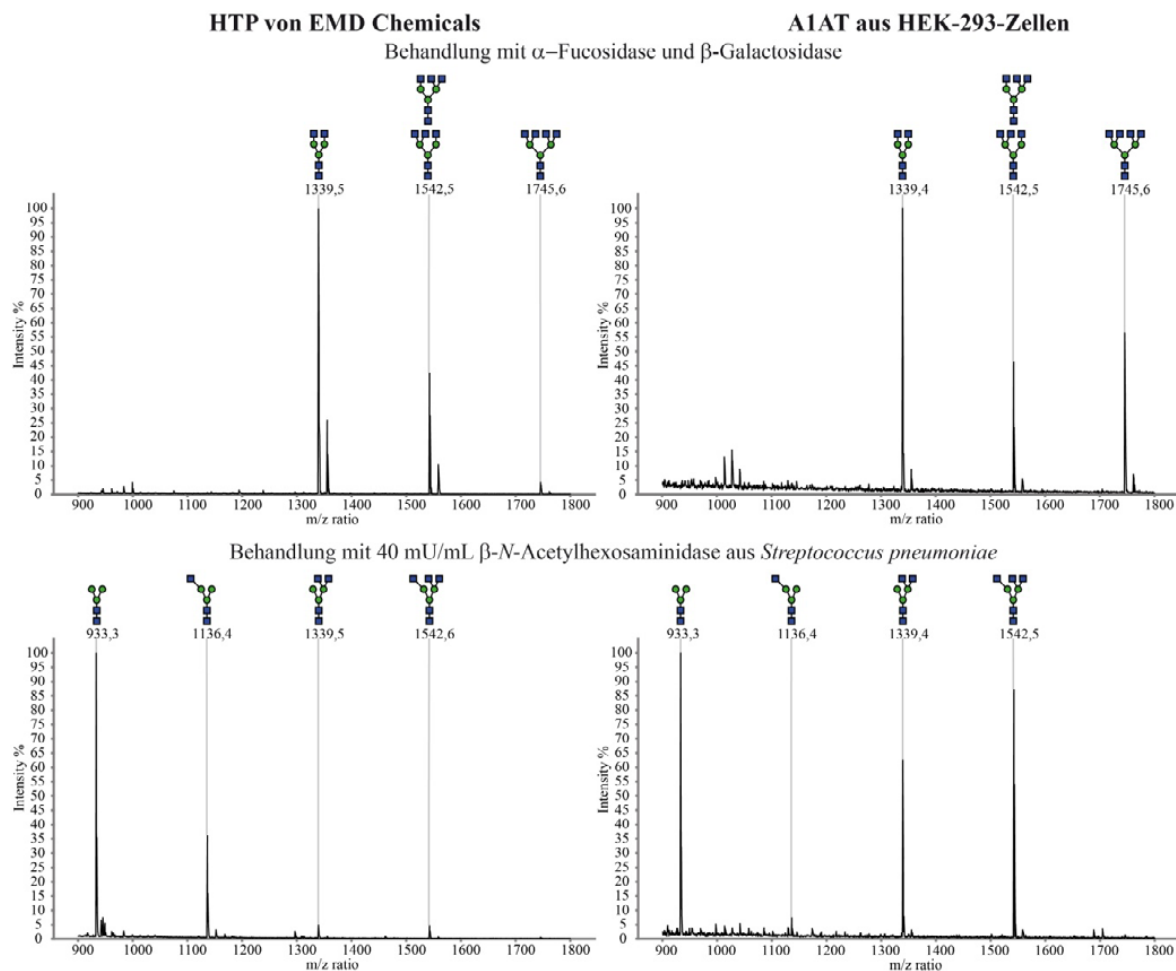


Abbildung 5-28: MALDI-TOF-MS-Spektren $[M+Na]^+$ von *N*-Glykanen vor und nach Verwendung von 40 mU/mL β -*N*-Acetylhexosaminidase aus *Streptococcus pneumoniae* (Nomenklatur Tabelle 5-2)

Die Behandlung der *N*-Glykane mit den Enzymen wurde mehrfach wiederholt, um deren Vollständigkeit zu überprüfen. Die Abbildung 5-28 zeigt das Ergebnis nach MALDI-TOF-MS-Messung. Die triantennären *N*-Glykane vom HPT (EMD Chemicals) repräsentierten das Produkt mit der Masse $m/z = 1136,4$, was der β 1-4-verknüpften GlcNAc-Variante entspricht. Die triantennären *N*-Glykane vom rekombinanten A1AT aus HEK-293-Zellen zeigen das Produkt mit der Masse $m/z = 1339,5$, was die Variante mit dem β 1-6-verknüpften GlcNAc darstellt. Daraus folgte, dass das triantennäre *N*-Glykan mit der kleineren Migrationszeit die β 1-6-verknüpfte und das mit der höheren Migrationszeit die β 1-4-verknüpfte Variante darstellt.

Nach MALDI-TOF-MS-Messung wurden die Proben mit APTS markiert. Die Fraktionen IV und V aus der HPAEC-PAD wurden mit 40 mU/mL β -N-Acetylhexosaminidase (*Streptococcus pneumoniae*) behandelt und mittels CE vergleichend analysiert. Die N-Glykane des rekombinanten A1AT aus HEK-293-Zellen zeigen im Elektropherogramm die drei Hauptstrukturen, die schon im MALDI-TOF-MS beobachtet wurden. Das triantennäre N-Glykan hat ein GlcNAc(β 1-2) verloren, was die β 1-6-verknüpfte GlcNAc-Variante darstellt. Dieses verkürzte triantennäre N-Glykan (rote Kurve, bei ca. 12,35 min) hat die gleiche Masse wie das biantennäre N-Glykan (grüne Kurve, bei ca. 12,10 min), aber im Elektropherogramm weisen sie unterschiedliche Migrationszeiten auf (Abbildung 5-29 A und B). Würde die β -N-Acetylhexosaminidase (*Streptococcus pneumoniae*) nicht spezifisch arbeiten, müssten noch β 1-2 biantennäre N-Glykane zu detektieren sein. Das Gleiche ist beim tetraantennären N-Glykan zu beobachten, welches ein GlcNAc verloren hat. Das Produkt hat die gleiche Masse wie das triantennäre N-Glykan (grüne Kurve, bei ca. 12,90 min), aber eine andere Migrationszeit (rote Kurve, bei ca. 13,20 min). Aufgrund der geringen Ausgangskonzentration des rekombinanten A1AT war das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich niedriger nach der Enzym-Inkubation (Abbildung 5-29 A und B).

Die triantennären N-Glykane vom HPT (EMD Chemicals) teilen sich erneut in zwei Peaks auf, ähnlich ihrem Erscheinungsbild nach der Neuraminidase-Behandlung. Der kleinere Anteil hat nur ein (violette Kurve, bei ca. 12,35 min) und der größere Anteil zwei GlcNAc(β 1-2) verloren (violette Kurve, bei ca. 11,55 min). Es zeigte sich, dass der Hauptanteil der triantennären N-Glykane β 1-4-verknüpfte GlcNAc trägt (Abbildung 5-29 C und D).

Der Vergleich der Fraktionen IV und V aus der HPAEC-PAD zeigte deutlich, dass die beiden triantennären Isomere ohne Gal die gleiche Migrationszeit haben, aber unterschiedlich mit der β -N-Acetylhexosaminidase (*Streptococcus pneumoniae*) reagieren. Die Fraktion VI enthielt das triantennäre N-Glykan mit dem β 1-4-verknüpften GlcNAc an der dritten Antenne und Fraktion V das triantennäre N-Glykan mit dem β 1-6-verknüpften GlcNAc. Weiterhin enthält die Fraktion V einen hohen Anteil des C2-Epimers der GlcNAc(β 1-4)-Variante (hellblaue Kurve, bei ca. 11,45 min) (Abbildung 5-29 E-H).

Damit ist der Unterschied zwischen den beiden triantennären N-Glykanen aufgeklärt. Dieser liegt in der β 1-4- oder β 1-6-Verknüpfung des GlcNAc an der dritten Antenne.

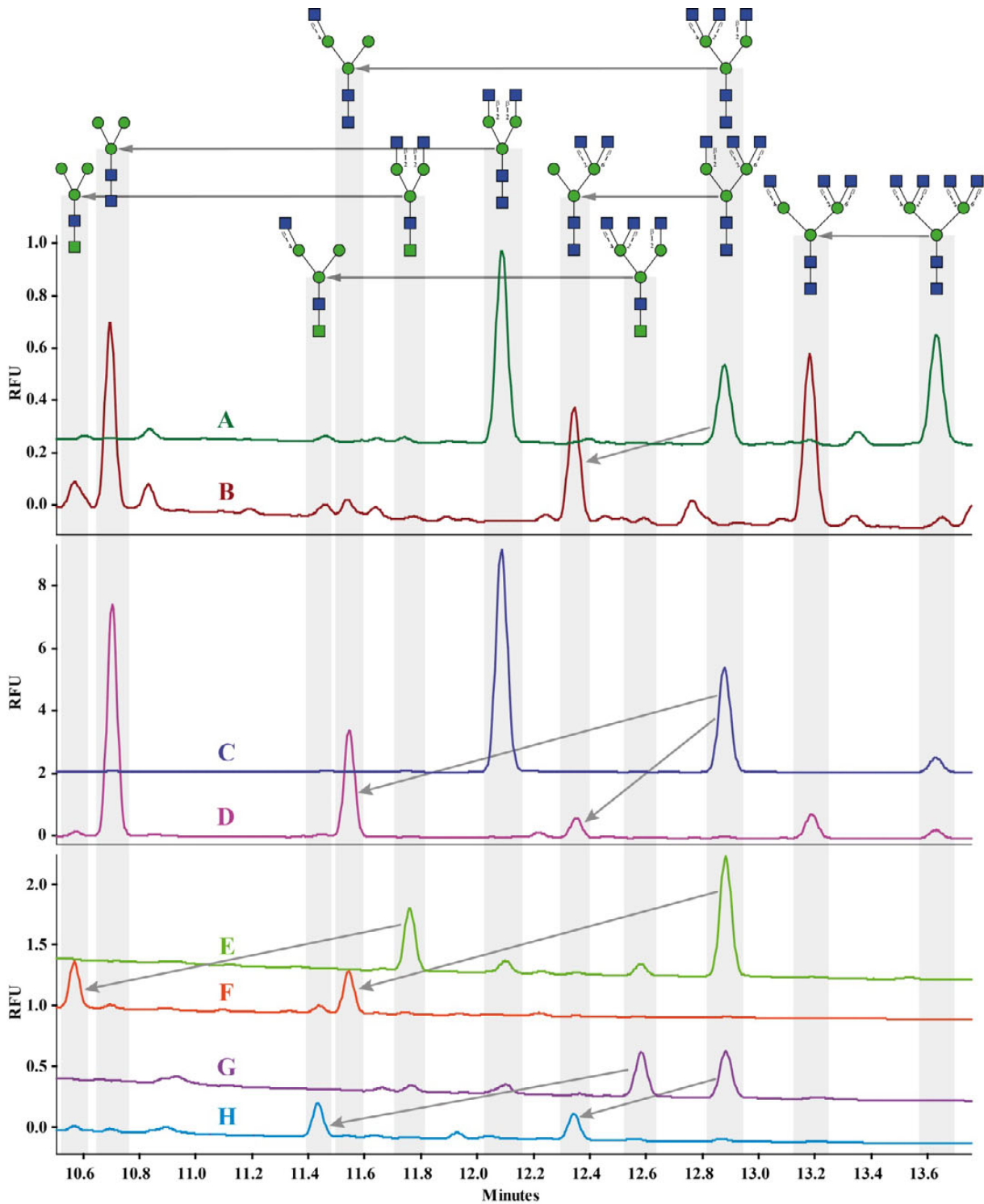


Abbildung 5-29: CE-Elektropherogramme der N-Glykane vor und nach Verwendung von 40 mU/mL β -N-Acetylhexosaminidase aus *Streptococcus pneumoniae*

A	A1AT aus HEK-293 Zellen	Behandlung mit α -Fucosidase und β -Galactosidase
B	A1AT aus HEK-293 Zellen	Behandlung mit β -N-Acetylhexosaminidase
C	HPT von EMD Chemicals	Behandlung mit α -Fucosidase und β -Galactosidase
D	HPT von EMD Chemicals	Behandlung mit β -N-Acetylhexosaminidase
E	Fraktion IV aus HPAEC-PAD	Behandlung mit α -Fucosidase und β -Galactosidase
F	Fraktion IV aus HPAEC-PAD	Behandlung mit β -N-Acetylhexosaminidase
G	Fraktion V aus HPAEC-PAD	Behandlung mit α -Fucosidase und β -Galactosidase
H	Fraktion V aus HPAEC-PAD	Behandlung mit β -N-Acetylhexosaminidase

5.6.3 *Bisecting-Strukturen*

Eine weitere nicht eindeutig zuzuordnende Struktur im Elektropherogramm hatte die Masse $m/z = 2012,8$. Diese stellt höchstwahrscheinlich ein biantennäres *N*-Glykan mit einem *bisecting*-GlcNAc und einer Fuc dar. Es könnte sich jedoch auch um eine triantennäre Struktur mit einer Fuc und einer Antenne ohne Gal handeln (Abbildung 5-30 A).

Zunächst wurde analysiert, ob es sich um *core*- oder antennär-fucosylierte Strukturen handelt (hellblaue und violette Kurve, bei ca. 14,75 min). Die Probe wurde mit $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase (*Streptomyces sp.* 142) und $\alpha 1-6$ Fucosidase (*Bovine Kidney*) behandelt. Das Ergebnis zeigt, dass das untersuchte *N*-Glykan eine *core*-Fuc trägt (Abbildung 5-30 B). Weiterhin wurde die Probe mit den *N*-Glykanen von humanem IgG verglichen. Von diesem Protein ist bekannt, dass sie *bisecting*-Strukturen und ausschließlich *core*-Fuc, aber keine triantennären *N*-Glykane, enthalten. Der Vergleich zeigt eindeutige Übereinstimmungen mit dem *core*-fucosylierten bzw. nicht-fucosylierten Variante des biantennären *N*-Glykans mit *bisecting*-GlcNAc, was die Zuordnung der untersuchten *N*-Glykane des TRFE bestätigt (Abbildung 5-30 B-C).

Das *bisecting*-GlcNAc hat erwartungsgemäß einen relativ kleinen Einfluss auf die Mobilität. Um diese zu messen, wurden die Glykane von TRFE und der IgGs nach der Fucosidase-Inkubation mit β -Galactosidase behandelt. Der Vergleich mittels CE zeigt eindeutig, dass das biantennäre *N*-Glykan bei 11,9 min, das triantennäre *N*-Glykan bei 12,7 min und das biantennäre *N*-Glykan mit *bisecting*-GlcNAc dazwischen bei 12,3 min migriert (Abbildung 5-31). Aus diesen Experimenten wird die Schlussfolgerung gezogen, dass die untersuchte Struktur des Transferrins ($m/z = 2012,8$) ein biantennäres *N*-Glykan mit einem *bisecting*-GlcNAc und einer *core*-Fuc darstellt.

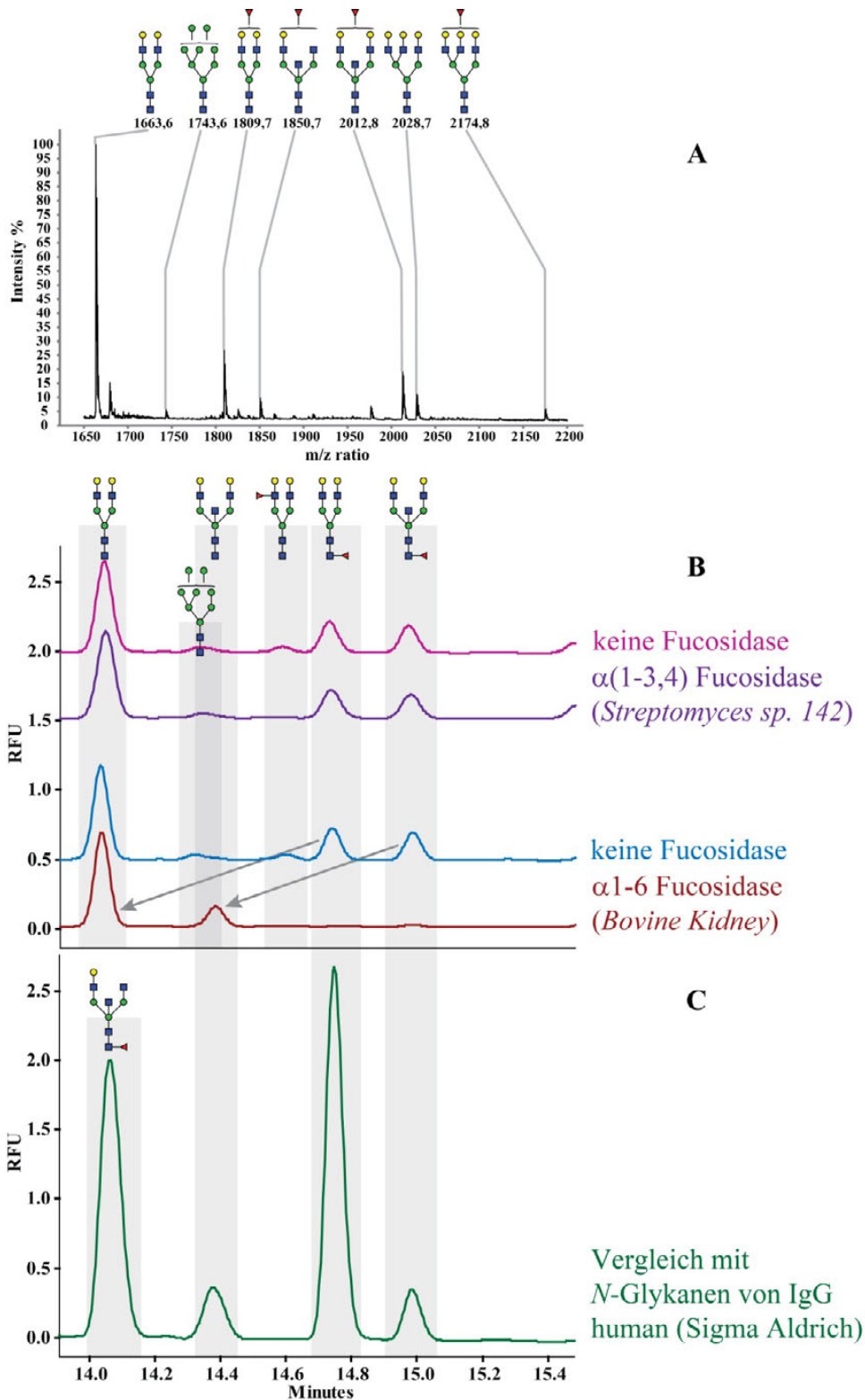


Abbildung 5-30: Nachweis des biantennären *N*-Glykans mit einem *bisectin*-GlcNAc und *core*-Fuc vom TRFE

- | | | |
|---|---------------------------------|--|
| A | TRFE aus einem 2D-Gel von Serum | MALDI-TOF-MS-Spektren $[M+Na]^+$, nach Behandlung mit Neuraminidase |
| B | TRFE aus einem 2D-Gel von Serum | CE-Elektropherogramme:
Behandlung mit 1. Neuraminidase (rosa) 2. Neuraminidase und $\alpha(1-3,4)$ Fucosidase (violett); 3. Neuraminidase (blau) 4. Neuraminidase und $\alpha 1-6$ Fucosidase (rot) |
| C | IgG human (Sigma-Aldrich) | CE-Elektropherogramme |

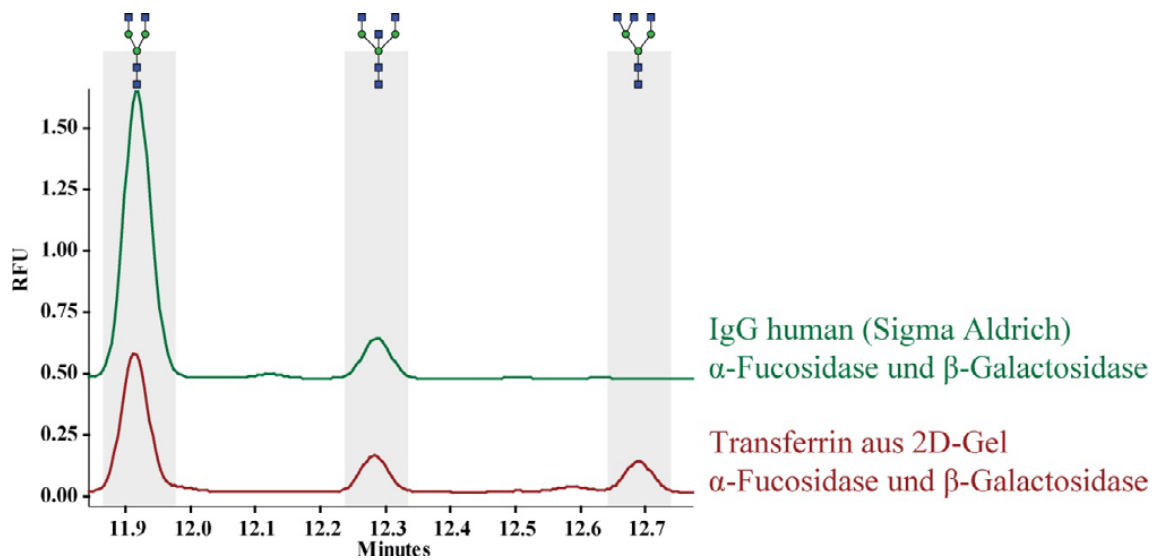


Abbildung 5-31: Nachweis des biantennären *N*-Glykans mit einem *bisecting*-GlcNAc vom TRFE
CE-Elektropherogramme von IgG human und TRFE aus einem 2D-Gel von Blutserum nach Inkubation mit Neuraminidase, α -Fucosidase und β -Galactosidase

5.7 Potenzielle Glykan-Biomarker vom Ovarialkarzinom aus Blutserum

5.7.1 2D-Gele

Für die Suche nach potenziellen Biomarkern vom Ovarialkarzinom wurden je fünf Serumproben von krebserkrankten und gesunden Patientinnen untersucht. Für ein 2D-Gel wurden 40 µL Blutserum verwendet. Aus dem Blutserum wurde die Konzentration von Albumin und IgGs durch Antikörper reduziert. Vor der ersten Dimension wurden die Proben reduziert, alkyliert und durch Acetonfällung gereinigt und konzentriert. Für die erste Dimension wurde ein 18 cm langer IPG-Streifen von pH vier bis sieben, für die zweite Dimension ein 10 %iges SDS-PAGE-Gel verwendet. Gefärbt wurden die Gele mit Coomassie. Die weitere Analyse erfolgte, wie in Kapitel 5.5.3 beschrieben. Zusätzlich wurden die Proteine nach der PNGase F-Behandlung über die In-Gel-Spaltung mit Trypsin und *peptide mapping* identifiziert. *Leucine-rich alpha-2-glycoprotein* (A2GL) und Immunglobulin schwere Kette alpha (IGHA) wurden über SWISS-2DPAGE der ExPASy Datenbank identifiziert.

Untersucht wurden die Glykoproteine mit den höchsten Konzentrationen. Die Lokalisation dieser Glykoproteine im 2D-Gel ist in Abbildung 5-32 dargestellt. Von HPT, A1AT, AACT, Hämopexin (HEMO) und Vitamin-D-bindendes Protein (VTDB) konnten die einzelnen Proteinspezies miteinander verglichen werden. Die Proteinspezies wurden von sauer nach basisch nummeriert. Bei A1AG und C1-Esterase-Inhibitor (IC1) konnten aufgrund des eingeschränkten pH-Bereiches im sauren Milieu die Primärproteine nicht aufgetrennt werden. FETUA, TRFE und A1BG zeigen im 2D-Gel Proteinspezies. Die einzelnen Proteinspezies konnten jedoch zwischen den Gelen nicht eindeutig zugeordnet werden, weshalb sie zusammen als ein Protein analysiert wurden.

Durch den Vergleich aller zehn 2D-Gele wird eine deutliche Veränderung der Zusammensetzung der Serumproteine erkennbar. Es fällt auf, dass in den Ovarialkarzinomproben das Albumin stark reduziert ist, wohingegen A1AT, HPT, AACT, A1AG und A2GL in erhöhten Konzentrationen vorhanden sind. Hingegen ist die Konzentration von FETUA, HEMO und IGHA erniedrigt. Diese Ergebnisse stellen eine Akut-Phasen-Reaktion der Patientinnen dar (Gruys et al. 2005). Auffällig war die Probe mit dem Geburtsdatum 1952. Der Phänotyp ähnelt dem einer gesunden Frau, mit Ausnahme des reduzierten Albuminanteils (Abbildung 5-32; Abbildung 5-33).

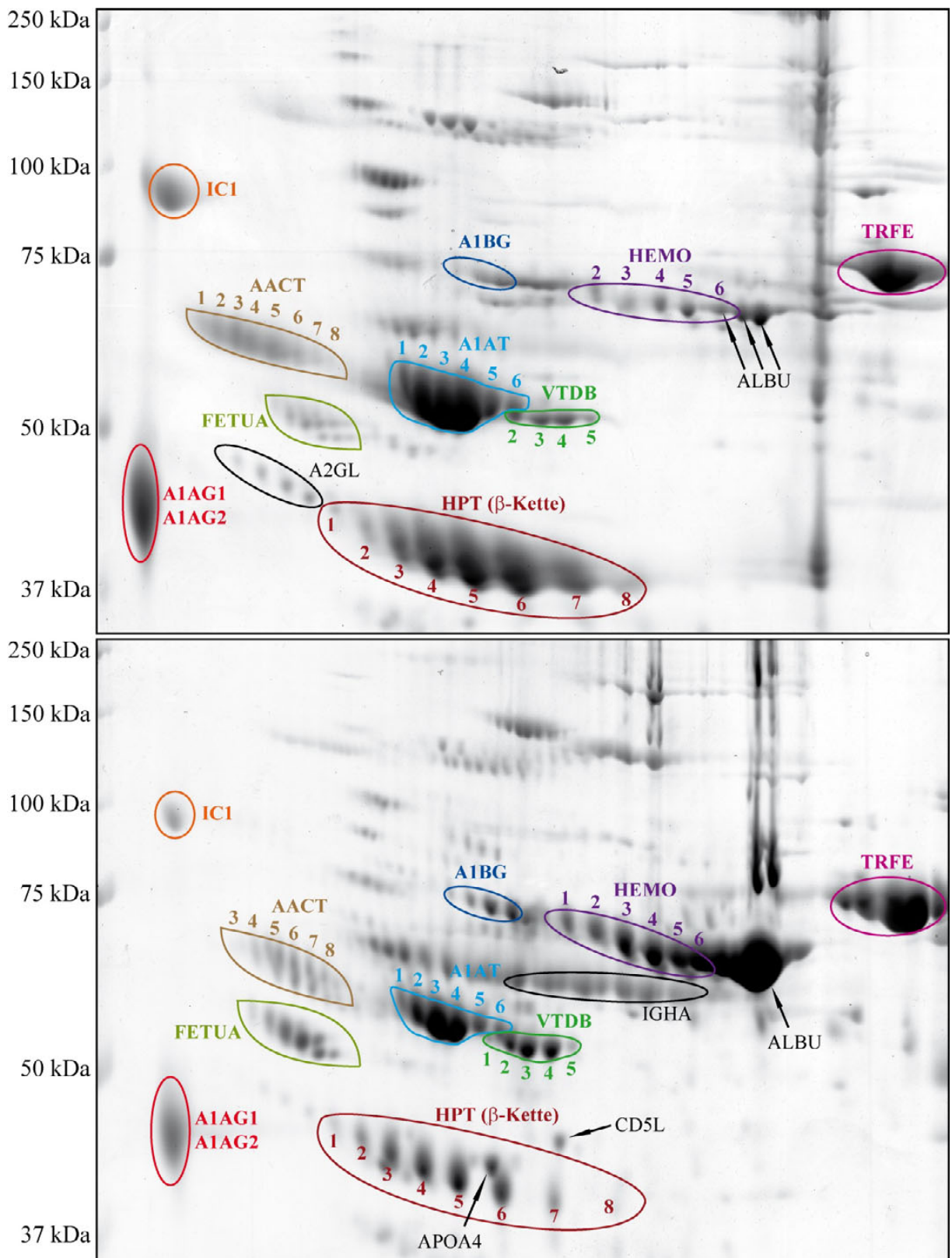


Abbildung 5-32: Beispiel für 2D-Gele von Blutserum mit Proteinbenennung von einer Patientin mit Ovarialkarzinom (oben) und einer gesunden Frau (unten).

Der IPG-Streifen waren 18 cm lang und hatten einen pH-Gradienten von vier bis sieben. Die SDS-PAGE-Gele waren 10 %ig und wurden mit Coomassie gefärbt. Alle Proteine wurden über *peptide mapping* identifiziert, außer A2GL und IGHA, die über SWISS-2DPAGE der ExpASY Datenbank identifiziert wurden.

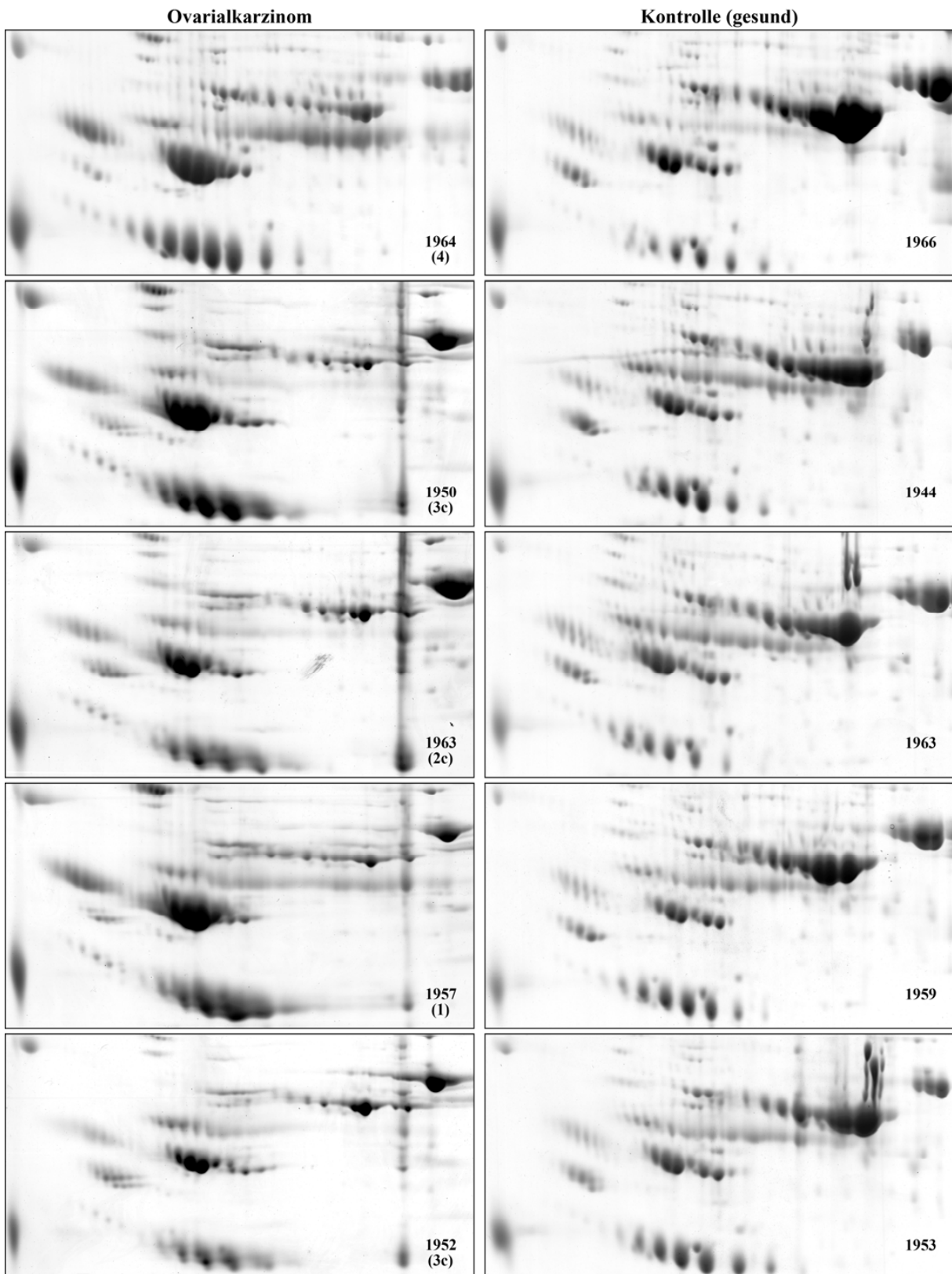


Abbildung 5-33: Vergleich aller zehn Blutserumproben im 2D-Gel (links Ovarialkarzinom, rechts Kontrollgruppe).

Die IPG-Streifen waren 18 cm lang und hatten einen pH-Gradienten von vier bis sieben. Die SDS-PAGE-Gele waren 10 %ig und wurden mit Coomassie gefärbt. Die Jahresangaben entsprechen den Geburtsjahren der Patientinnen. Weiterhin ist das Stadium der Erkrankung in Klammern angegeben.

5.7.2 Statistik zu den Serumglykoproteinen aus 2D-Gelen

Für die statistische Auswertung wurden die korrigierten Flächen der CE-Elektropherogramme verwendet. Die MALDI-TOF-MS-Spektren dienten zur Absicherung der Strukturen. Alle Flächen wurden addiert und für jedes *N*-Glykan der prozentuale Anteil berechnet. Die Ovarialkarzinomgruppe und die Kontrollgruppe bestanden jeweils aus fünf Proben. Von jedem *N*-Glykan in einer Gruppe wurde der Mittelwert des prozentualen Anteils und die Standardabweichung berechnet. Diese Daten wurden genutzt um den statistischen Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit Hilfe eines Zweistichproben-t-Tests zu bestimmen. Zur einfacheren Darstellung der Güte der statistischen Signifikanz, wurden drei verschiedene p-Wertegrenzen mit folgenden Zeichen festgelegt * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,02$; *** = $p \leq 0,01$. Des Weiteren wurden nur Strukturen, die in mindestens einer Gruppe einen Anteil von $\geq 0,2\%$ hatten, statistisch untersucht. Durch den Quotienten des Mittelwertes der Ovarialkarzinomgruppe und der Kontrollgruppe wurde der relative Expressionsunterschied ermittelt.

Zusätzlich wurden zwei weitere Vergleiche durchgeführt. Beim Ersten wurden alle Flächen einer Strukturisomere-Familie addiert (biantennäre *N*-Glykane mit einer Fuc, triantennäre *N*-Glykane beider Varianten und triantennäre *N*-Glykane beider Varianten mit einer Fuc) um festzustellen, ob die gefundenen Unterschiede auch im MALDI-TOF-MS detektierbar sind. Beim zweiten zusätzlichen Vergleich wurden die *N*-Glykane mit gleicher Grundstruktur addiert, um die Effekte von Fuc und Gal auszublenden.

5.7.2.1 *Alpha-1-saures-Glykoprotein (A1AG)*

A1AG hat den höchsten Anteil an tri- und tetraantennären *N*-Glykanen. Die Ovarialkarzinomgruppe zeigt eine höhere Streuung als die Kontrollgruppe. Dieses Phänomen ist bei allen Proteinen zu sehen. Die größten Unterschiede sind in der Erhöhung des biantennären *N*-Glykans mit *core*-Fuc (8,9-fach) und in der Erniedrigung des triantennären *N*-Glykans mit der GlcNAc(β 1-4)-Variante (0,5-fach) zu sehen. Nach Addition der zugehörigen Strukturisomere sind diese Unterschiede noch immer erkennbar. Beim Vergleich der Grundstrukturen ist deutlich sichtbar, dass bei den triantennären *N*-Glykanen die GlcNAc(β 1-4)-Variante abnimmt (0,7-fach) und die GlcNAc(β 1-6)-Variante zunimmt (3,3-fach). Diese gegensätzliche Tendenz ist bei fast allen Proteinen zu beobachten. Bei nahezu allen Proteinen nehmen die Strukturen ohne Fuc ab und Strukturen mit antennärer Fuc zu. Das tetraantennäre *N*-Glykan mit drei Fuc kann nur in der Gruppe mit Ovarialkarzinom, jedoch nicht bei allen Patientinnen detektiert werden (Abbildung 5-34).

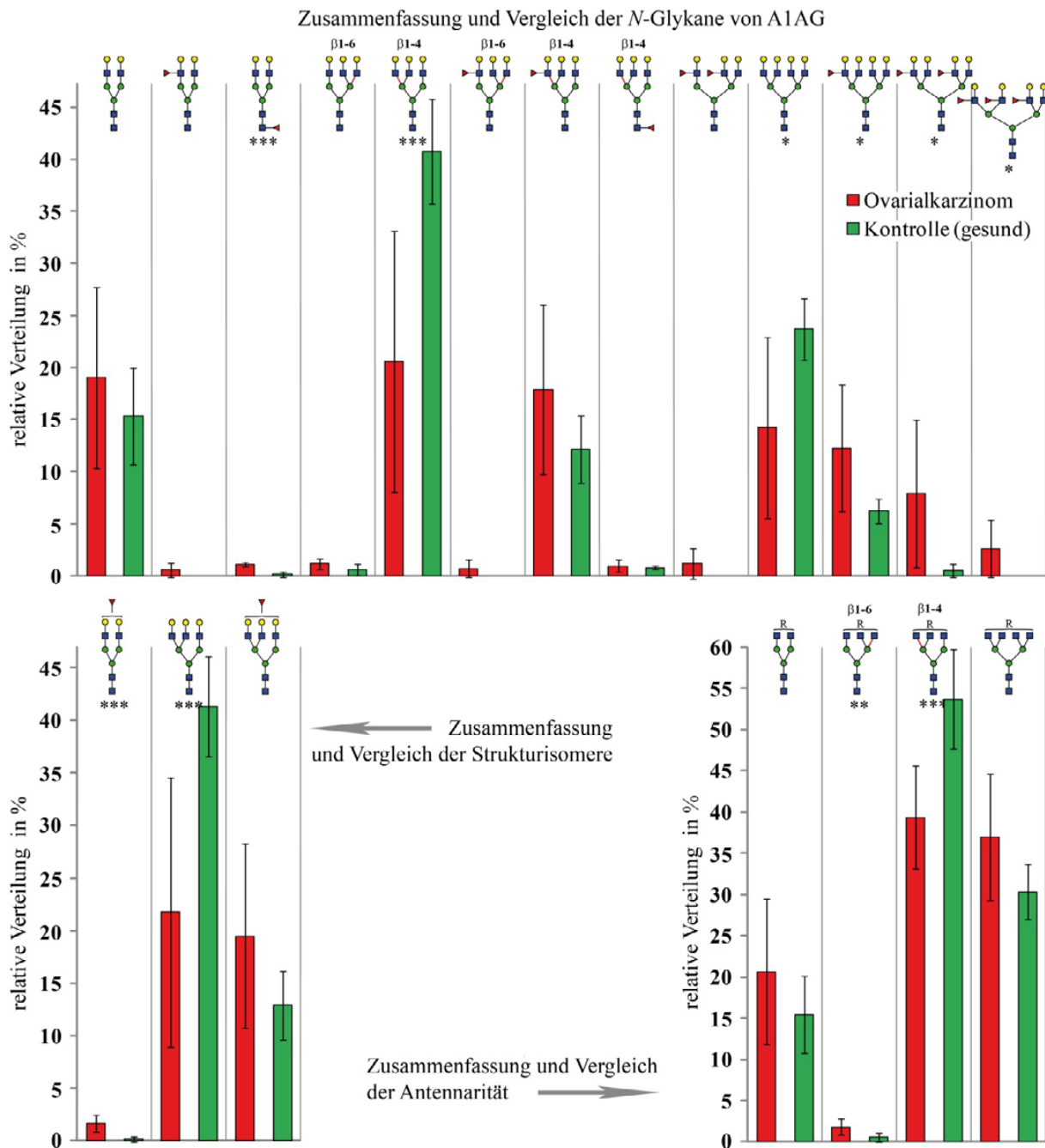


Abbildung 5-34: Statistik zu A1AG

Gezeigt werden nur Strukturen, die in mindestens einer Gruppe einen Anteil von $\geq 0,2\%$ haben. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Anteile eines *N*-Glykans oder einer *N*-Glykangruppe mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,02$; *** $p \leq 0,01$

oben: Die relative Verteilung der *N*-Glykane, berechnet anhand der gemessenen Peakflächen im Elektropherogramm der CE.

links unten: Zusammenfassung (Addition) der Flächen der Strukturisomere zu einer *N*-Glykangruppe

rechts unten: Zusammenfassung (Addition) der Flächen mit gleicher Antennarität zu einer *N*-Glykangruppe

5.7.2.2 *C1-Esterase-Inhibitor (IC1)*

IC1 hat einen sehr hohen Anteil an biantennären *N*-Glykanen, kleinere Mengen an *bisecting*- und wenig höherantennäre Strukturen. Zwischen gesunden und erkrankten Testpersonen können nur wenige Unterschiede detektiert werden. Das triantennäre *N*-Glykan der GlcNAc(β1-6)-Variante mit einer antennären Fuc kann nur in der Ovarialkarzinomgruppe gefunden werden. Das biantennäre *N*-Glykan mit einer antennären Fuc ist 3,6-fach erhöht. Es wurde weiterhin festgestellt, dass ein höherer Anteil an antennärer Fuc vorhanden ist, die triantennäre GlcNAc(β1-6)-Variante zunimmt und die GlcNAc(β1-4)-Variante abnimmt (Abbildung 5-35).

5.7.2.3 *Fetuin (FETUA)*

FETUA besitzt nur eine geringe Anzahl an *N*-Glykanstrukturen. Der Anteil der biantennären Strukturen liegt bei über 85 %. Der Hauptunterschied zwischen der Ovarialkarzinom- und der Kontrollgruppe sind die Erhöhungen der Grundstrukturen an triantennären *N*-Glykanen mit der GlcNAc(β1-6)-Variante (5,1-fach) und tetraantennären *N*-Glykanen (4,0-fach) (Abbildung 5-36).

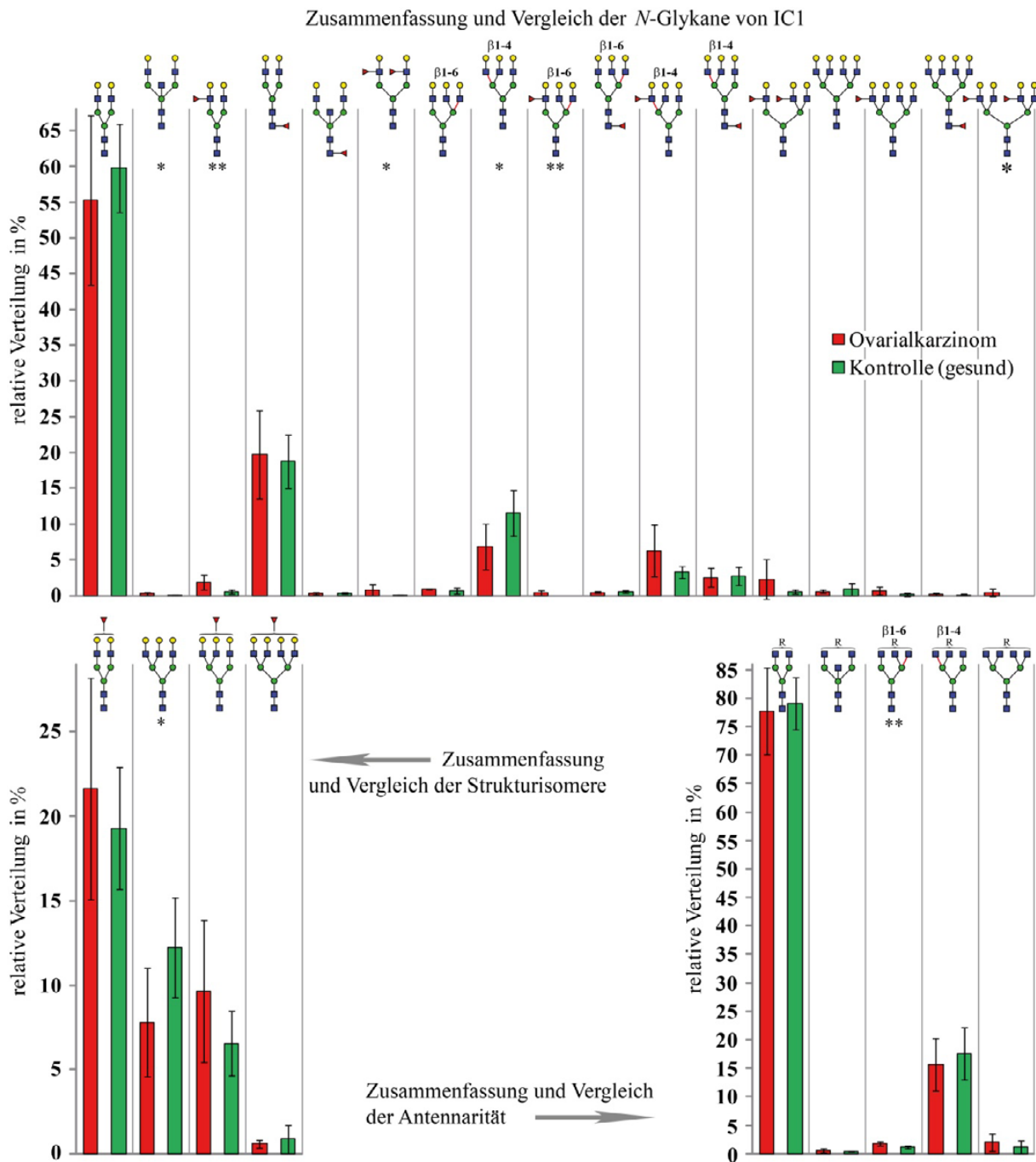


Abbildung 5-35: Statistik zu IC1

Gezeigt werden nur Strukturen, die in mindestens einer Gruppe einen Anteil von $\geq 0,2\%$ haben. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Anteile eines *N*-Glykans oder einer *N*-Glykangruppe mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,02$; *** $p \leq 0,01$

oben: Die relative Verteilung der *N*-Glykane, berechnet anhand der gemessenen Peakflächen im Elektropherogramm der CE.

links unten: Zusammenfassung (Addition) der Flächen der Strukturisomere zu einer *N*-Glykangruppe

rechts unten: Zusammenfassung (Addition) der Flächen mit gleicher Antennarität zu einer *N*-Glykangruppe

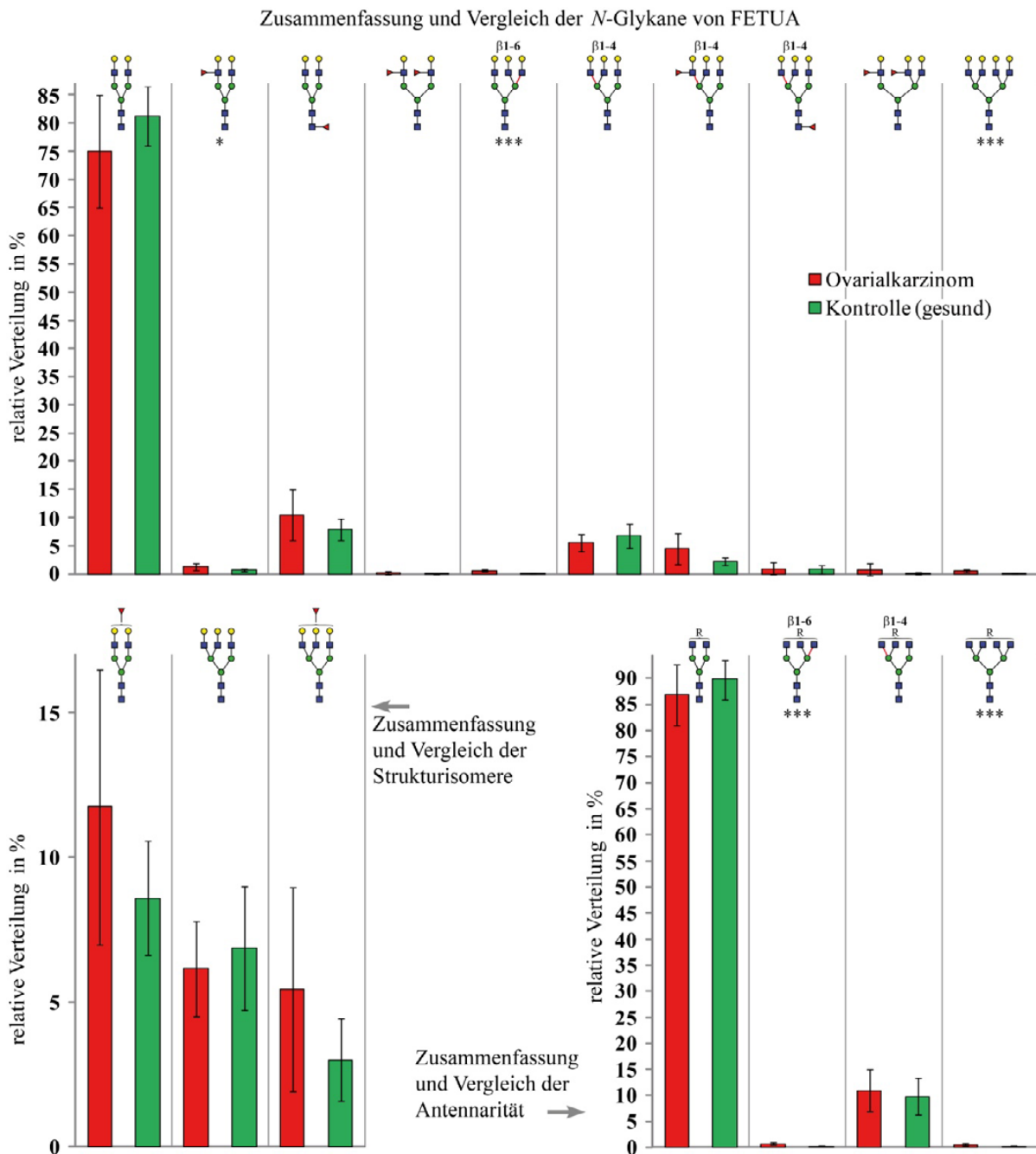


Abbildung 5-36: Statistik zu FETUA

Gezeigt werden nur Strukturen, die in mindestens einer Gruppe einen Anteil von $\geq 0,2\%$ haben. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Anteile eines *N*-Glykans oder einer *N*-Glykangruppe mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,02$; *** $p \leq 0,01$

oben: Die relative Verteilung der *N*-Glykane, berechnet anhand der gemessenen Peakflächen im Elektropherogramm der CE.

links unten: Zusammenfassung (Addition) der Flächen der Strukturisomere zu einer *N*-Glykangruppe

rechts unten: Zusammenfassung (Addition) der Flächen mit gleicher Antennarität zu einer *N*-Glykangruppe

5.7.2.4 Haptoglobin (HPT)

Vom HPT konnten die einzelnen Proteinspezies verglichen werden. Da HPT 1 und HPT 8 nicht bei allen Proben im 2D-Gel zu erkennen sind, wurden diese statistisch nicht ausgewertet. Auffällig ist der Verlauf des Glykanprofils vom saueren zum basischen IP. Mit abnehmendem IP der Proteinspezies nimmt der Anteil an kleinen biantennären *N*-Glykanen ab. Gleichzeitig steigt der Anteil tri- und tetraantennären *N*-Glykanen (Abbildung 5-37; Abbildung 5-38).

In einer Vielzahl von Punkten unterscheidet sich die Ovarialkarzinomgruppe von der Kontrollgruppe. Eine gute statistische Signifikanz ist beim triantennären *N*-Glykan mit der GlcNAc(β 1-6)-Variante mit bzw. ohne antennäre Fuc, dem biantennären *N*-Glykan mit einer antennären Fuc (5,1-25,3-fach), dem tetraantennären *N*-Glykan mit einer antennären Fuc (4,3-13,0-fach) und dem biantennären *N*-Glykan mit einem *bisecting*-GlcNAc zu erkennen. Der prozentuale Anteil dieser fünf Strukturen erhöht sich. Diese Unterschiede sind bei fast allen Proteinspezies zu finden. Beim Vergleich der Grundstrukturen ist eine Erhöhung der triantennären Strukturen mit der GlcNAc(β 1-6)-Variante (1,7-2,5-fach) zu sehen. Das triantennäre *N*-Glykan der GlcNAc(β 1-6)-Variante mit antennärer Fuc sowie das tetraantennäre *N*-Glykan mit zwei und drei antennären Fuc kommt nur in der Ovarialkarzinomgruppe vor. Eine tendenzielle Erhöhung der antennären Fucosestrukturen ist zu erkennen (Abbildung 5-37; Abbildung 5-38).

Durch die Addition der Strukturisomere ist die statistische Signifikanz verloren gegangen. Der statistische Unterschied beruht allein auf der Zunahme der antennären Fuc. Weiterhin verhalten sich die zwei triantennären Varianten entgegengesetzt, wobei die GlcNAc(β 1-4)-Variante dominanter ist (Abbildung 5-37; Abbildung 5-38).

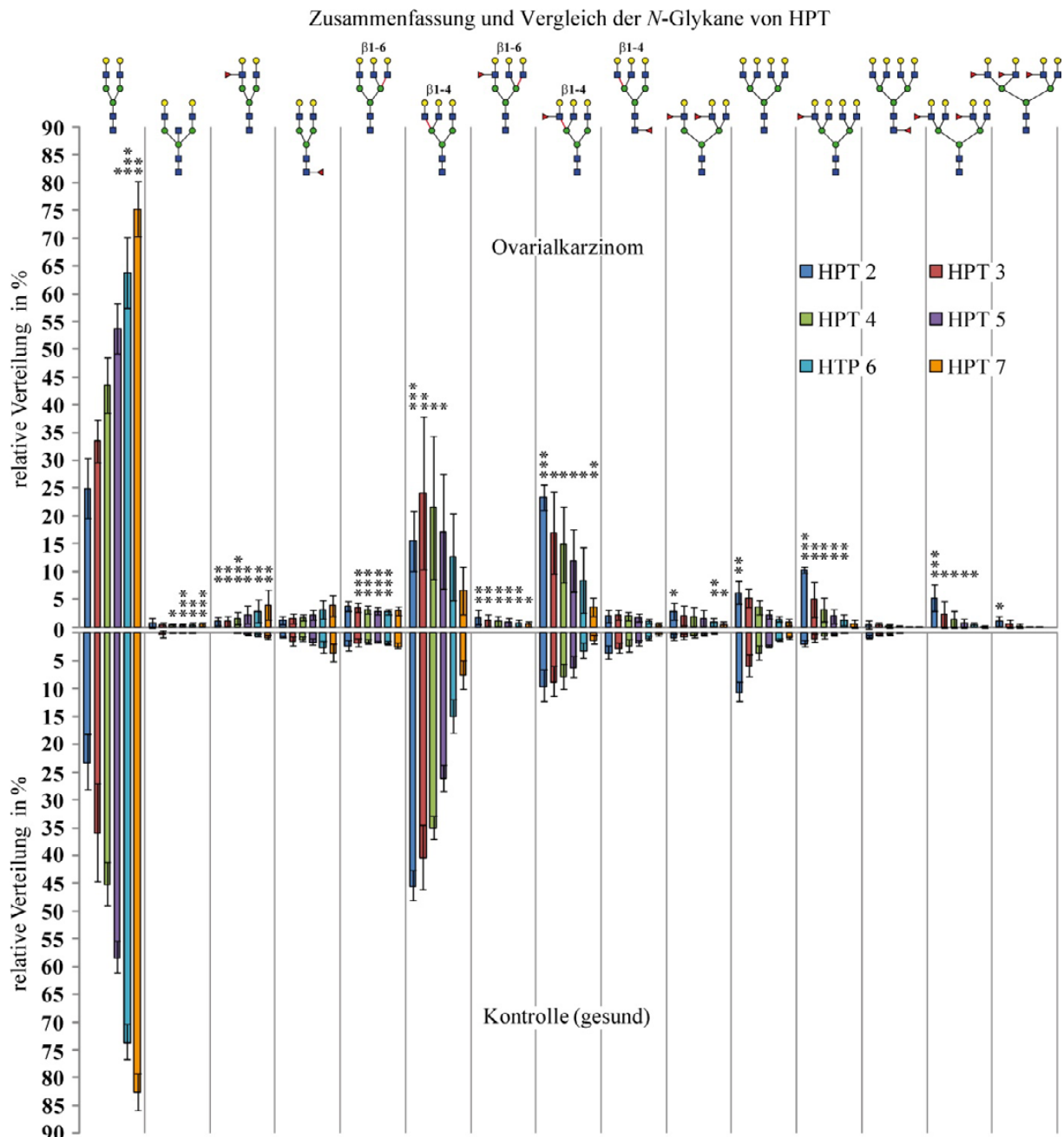


Abbildung 5-37: Statistik zu HPT (Grafik eins)

Gezeigt werden nur Strukturen, die in mindestens einer Gruppe einen Anteil von $\geq 0,2\%$ haben. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Anteile eines *N*-Glykans oder einer *N*-Glykangruppe mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,02$; *** $p \leq 0,01$

Dargestellt ist relative Verteilung der *N*-Glykane, berechnet anhand der gemessenen Peakflächen im Elektropherogramm der CE.

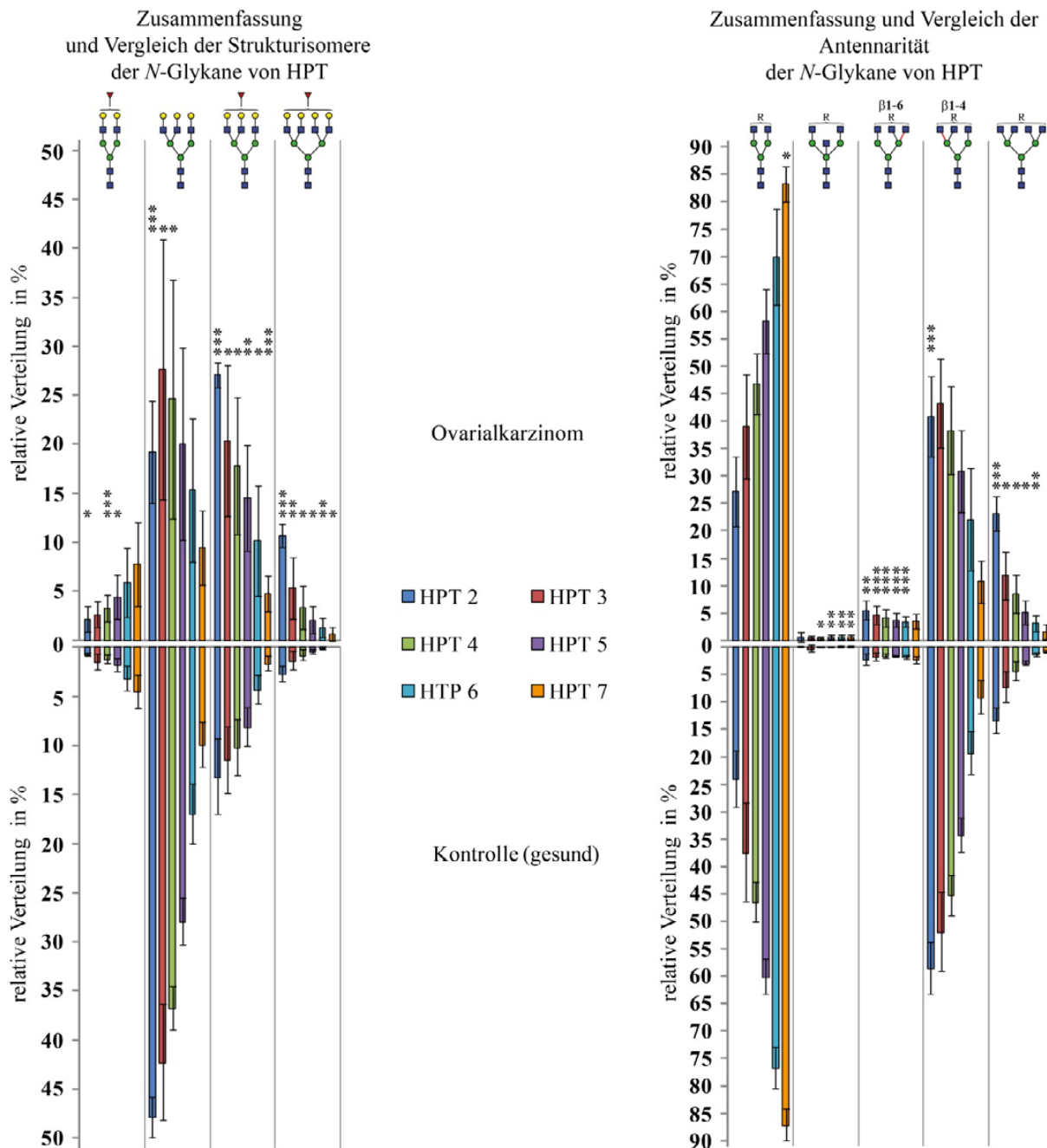


Abbildung 5-38: Statistik zu HPT (Grafik zwei)

Gezeigt werden nur Strukturen, die in mindestens einer Gruppe einen Anteil von $\geq 0,2\%$ haben. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Anteile eines N-Glykans oder einer N-Glykangruppe mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,02$; *** $p \leq 0,01$

- links: Zusammenfassung (Addition) der Flächen der Strukturisomere zu einer N-Glykangruppe
- rechts: Zusammenfassung (Addition) der Flächen mit gleicher Antennarität zu einer N-Glykangruppe

5.7.2.5 *Alpha-1-Antitrypsin (A1AT)*

Von A1AT wurden mehrere Proteinspezies untersucht. A1AT 6 wurde nicht bewertet, da es nicht bei allen Proben isoliert werden konnte. Bei A1AT 6 und A1AT 5 kam es im 2D-Gel mit VTDB 1 und VTDB 2 zu Überschneidungen (Abbildung 5-32). Die Proteinspezies zeigen einen ähnlichen Verlauf wie HPT. Je saurer die Proteinspezies ist, desto geringer ist der Anteil an biantennären *N*-Glykanen. Eine Ausnahme bildet der Übergang zwischen A1AT 4 und A1AT 5. Im Gegensatz zu A1AT 5 sind bei A1AT 4 nahezu keine triantennären *N*-Glykane detektierbar. Für A1AT 5 kann der Einfluss von VTDB 1, welches auf dem 2D-Gel in direkter Nachbarschaft liegt, nicht geklärt werden (Abbildung 5-39; Abbildung 5-40).

Die statistischen Unterschiede zwischen beiden Testgruppen sind gering und nur vereinzelt zu beobachten. Nur bei A1AT 2 und A1AT 3 ist das tetraantennäre *N*-Glykan mit einer antennären Fuc signifikant erhöht (2,9-31,1-fach). Im Vergleich zu den addierten Strukturisomeren bleibt für dieses Glykan dieselbe Signifikanz bestehen. Der Einfluss der Variante mit der *core*-Fuc ist unbedeutend. Insgesamt sind die tetraantennären *N*-Glykane erhöht. Eine Addition der triantennären *N*-Glykane mit einer Fuc zeigt eine Verbesserung der statistischen Signifikanz. Das tetraantennäre *N*-Glykan mit drei antennären Fuc ist ausschließlich in der Ovarialkarzinomgruppe und nicht bei den gesunden Probandinnen zu finden (Abbildung 5-39; Abbildung 5-40).

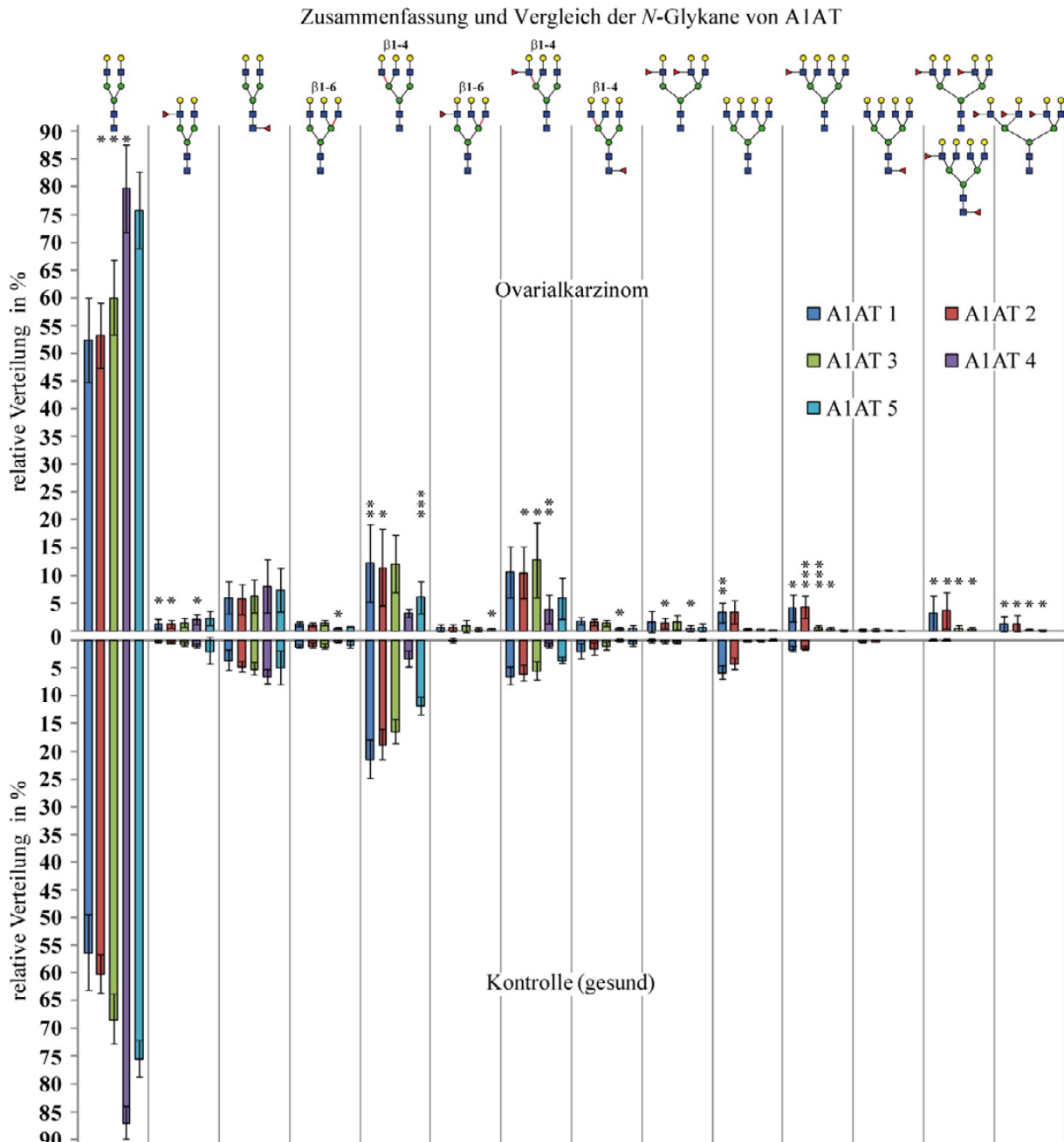


Abbildung 5-39: Statistik zu A1AT (Grafik eins)

Gezeigt werden nur Strukturen, die in mindestens einer Gruppe einen Anteil von $\geq 0,2\%$ haben. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Anteile eines N-Glykans oder einer N-Glykangruppe mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,02$; *** $p \leq 0,01$

Dargestellt ist relative Verteilung der N-Glykane, berechnet anhand der gemessenen Peakflächen im Elektropherogramm der CE.

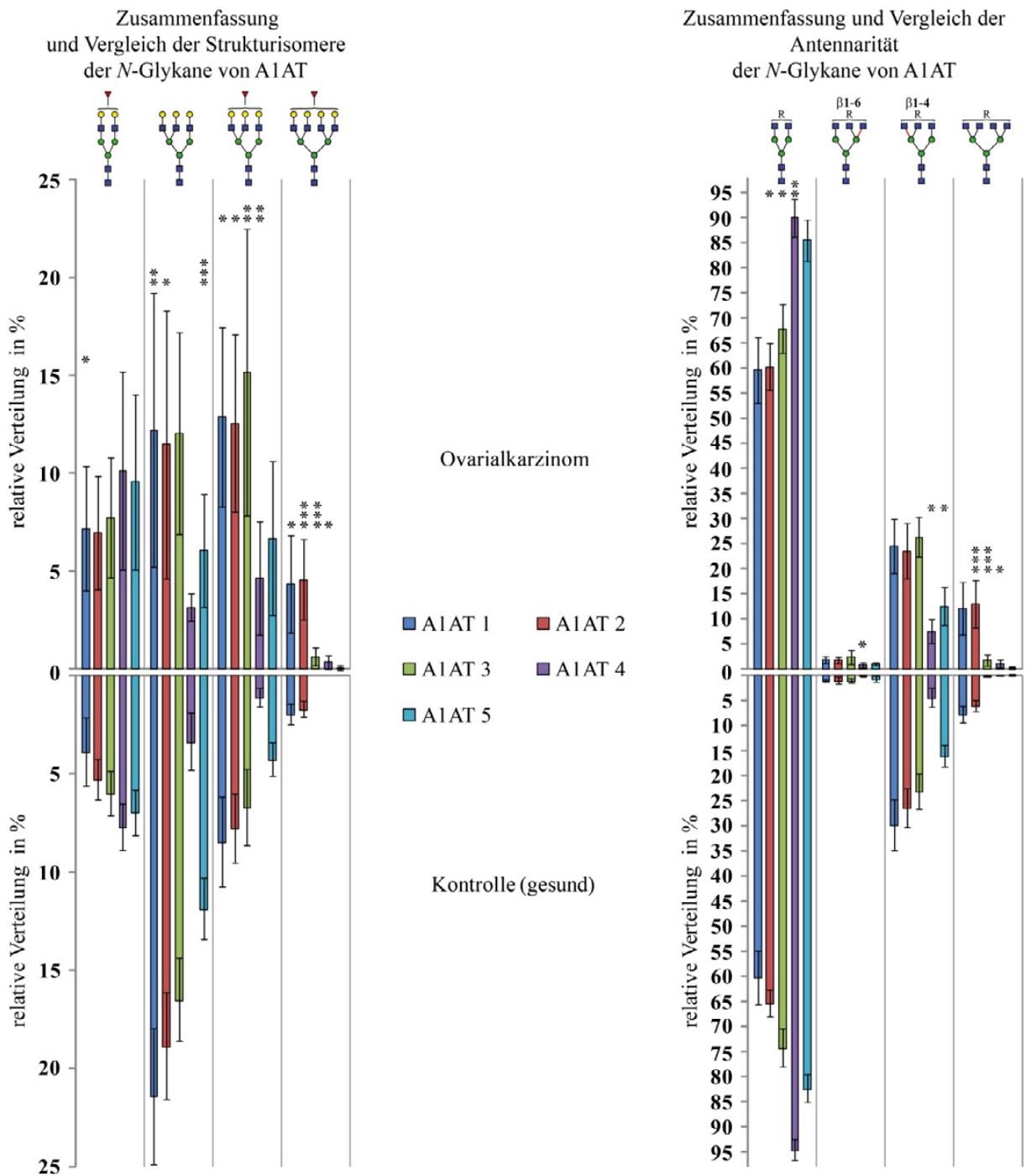


Abbildung 5-40: Statistik zu A1AT (Grafik zwei)

Gezeigt werden nur Strukturen, die in mindestens einer Gruppe einen Anteil von $\geq 0,2\%$ haben. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Anteile eines N-Glykans oder einer N-Glykangruppe mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,02$; *** $p \leq 0,01$

- links: Zusammenfassung (Addition) der Flächen der Strukturisomere zu einer N-Glykangruppe
- rechts: Zusammenfassung (Addition) der Flächen mit gleicher Antennarität zu einer N-Glykangruppe

5.7.2.6 *Alpha-1-Antichymotrypsin (AACT)*

Von AACT wurden die Proteinspezies drei bis acht ausgewertet. AACT 1 und 2 sind ausschließlich in der Ovarialkarzinomgruppe nachweisbar, da das gesamte Protein in dieser Gruppe stark erhöht ist. Die Veränderung des Glykanprofils der Proteinspezies ist bei AACT deutlich zu sehen. Mit niedrigerem IP nimmt der Anteil an biantennären *N*-Glykanen ab. Auffällig ist, dass die Grundstruktur des triantennären *N*-Glykans mit der GlcNAc(β 1-6)-Variante mit steigendem IP zunimmt (Abbildung 5-41; Abbildung 5-42).

Die gefundenen statistischen Unterschiede sind bei fast allen Proteinspezies identisch. Am signifikantesten sind sie beim biantennären *N*-Glykan mit einer antennären Fuc, beim triantennären *N*-Glykan mit der GlcNAc(β 1-4)-Variante (0,5-fach) und dem tetraantennären *N*-Glykan mit einer antennären Fuc (3,4-4,1-fach). Die Strukturen mit antennärer Fuc sind erhöht. Der Anteil an triantennären *N*-Glykanen mit der GlcNAc(β 1-4)-Variante ist erniedrigt. Nach Addition der Strukturisomere der triantennären *N*-Glykane und der tetraantennären *N*-Glykane mit einer Fuc veränderte sich die Signifikanz kaum. Der prozentuale Anteil des triantennären *N*-Glykans mit der GlcNAc(β 1-6)-Variante und des tetraantennären *N*-Glykans mit einer *core*-Fuc ist zu klein, um die Signifikanz zu beeinflussen. Bei Addition der Strukturisomere der biantennären *N*-Glykane mit einer Fuc geht die Signifikanz verloren (Abbildung 5-41; Abbildung 5-42).

Der Vergleich der Grundstrukturen zeigt, dass die triantennären *N*-Glykane mit der GlcNAc(β 1-4)-Variante (0,6-0,7-fach) abnehmen und die tetraantennären *N*-Glykane zunehmen (1,6-1,8-fach) (Abbildung 5-41; Abbildung 5-42).

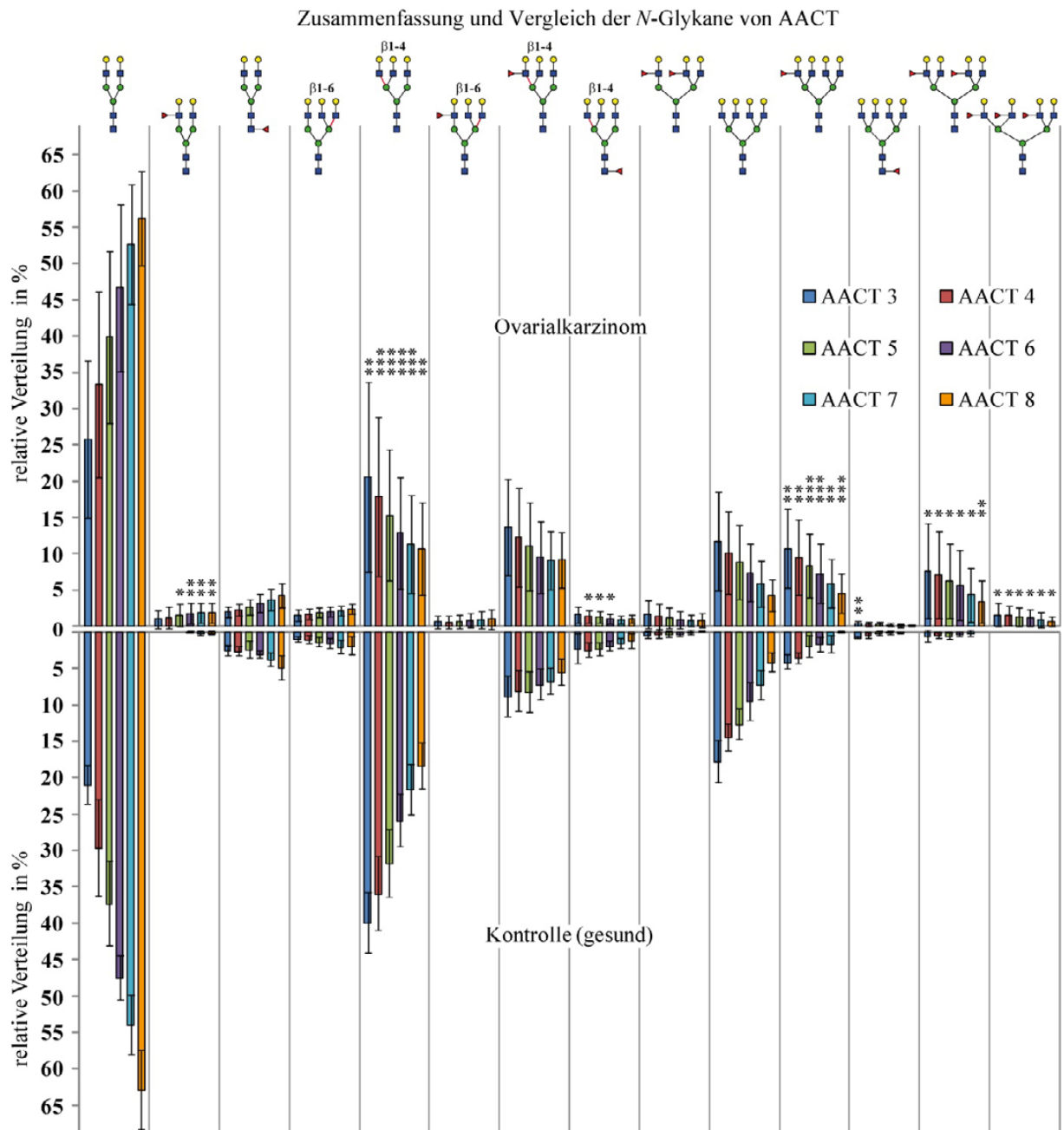


Abbildung 5-41: Statistik AACT (Grafik eins)

Gezeigt werden nur Strukturen, die in mindestens einer Gruppe einen Anteil von $\geq 0,2\%$ haben. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Anteile eines N-Glykans oder einer N-Glykangruppe mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,02$; *** $p \leq 0,01$

Dargestellt ist relative Verteilung der N-Glykane, berechnet anhand der gemessenen Peakflächen im Elektropherogramm der CE.

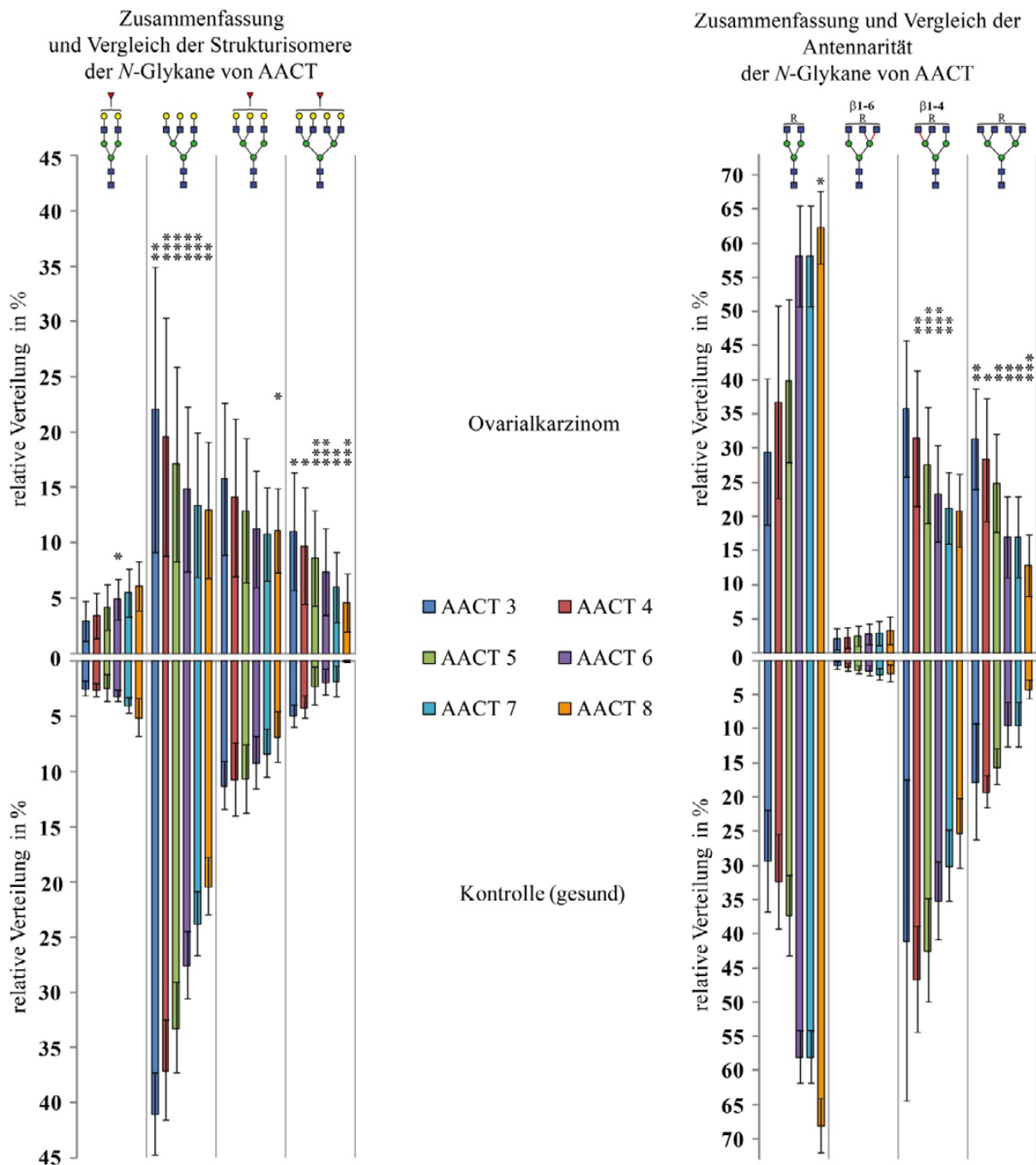


Abbildung 5-42: Statistik zu AACT (Grafik zwei)

Gezeigt werden nur Strukturen, die in mindestens einer Gruppe einen Anteil von $\geq 0,2\%$ haben. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Anteile eines *N*-Glykans oder einer *N*-Glykangruppe mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,02$; *** $p \leq 0,01$

- links: Zusammenfassung (Addition) der Flächen der Strukturisomere zu einer *N*-Glykangruppe
- rechts: Zusammenfassung (Addition) der Flächen mit gleicher Antennarität zu einer *N*-Glykangruppe

5.7.2.7 Transferrin (TRFE)

TRFE weist als einziges untersuchtes Protein *High*-Mannose-Strukturen auf. Eine weitere Besonderheit im Vergleich zu den anderen untersuchten Glykoproteinen ist der hohe Anteil des biantennären *N*-Glykans mit einem *bisecting*-GlcNAc und einer *core*-Fuc (über 5 %). Auffällig ist das Verhältnis der zwei Strukturisomere des triantennären *N*-Glykans. Bei allen anderen Proteinen ist die GlcNAc(β 1-4)-Variante das deutlich dominantere Isomer. Bei TRFE ist die GlcNAc(β 1-6)- und GlcNAc(β 1-4)-Variante zu gleichen Teilen nachweisbar. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Ovarialkarzinom- und der Kontrollgruppe war ausschließlich in der Abnahme des triantennären *N*-Glykans mit der GlcNAc(β 1-4)-Variante festzustellen (Abbildung 5-43).

5.7.2.8 Alpha-1B-Glykoprotein (A1BG)

Das Glykanprofil von A1BG zeigt bis zu 90 % biantennäre *N*-Glykane. Alle anderen *N*-Glykane sind schwach vertreten. Signifikante Unterschiede zwischen der Ovarialkarzinom- und der Kontrollgruppe sind nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

5.7.2.9 Hämopexin (HEMO)

Von Hämopexin konnten mehrere Proteinspezies untersucht werden. HEMO 6 überlappt stark mit Albumin, weshalb es beim *peptide mapping* schlecht zu identifizieren ist. Albumin hat als eins der wenigen Serumproteine keine Glykane und deshalb keinen Einfluss auf das Glykanprofil. Das Glykanprofil von HEMO besteht wie bei A1BG aus bis zu 90 % biantennären *N*-Glykanen. Die Beobachtung, dass mit Zunahme der Azidität der Proteinspezies der biantennäre Anteil abnimmt, konnte auch hier bestätigt werden. Der einzige Unterschied zwischen der Ovarialkarzinom- und der Kontrollgruppe ist die Zunahme des triantennären *N*-Glykans mit der GlcNAc(β 1-4)-Variante und einer antennären Fuc (Abbildung 5-44; Abbildung 5-45).

5.7.2.10 Vitamin-D-bindendes Protein (VTDB)

Vom VTDB wurden mehrere Proteinspezies untersucht. In der Datenbank von UniProt (Stand 31.12.2011) ist nur eine potenzielle *N*-Glykosylierungsstelle eingetragen. Es sind auch nur geringe Mengen an *N*-Glykanen gefunden worden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese von Verschleppungen des in der Nähe liegenden A1AT stammen (Daten nicht gezeigt).

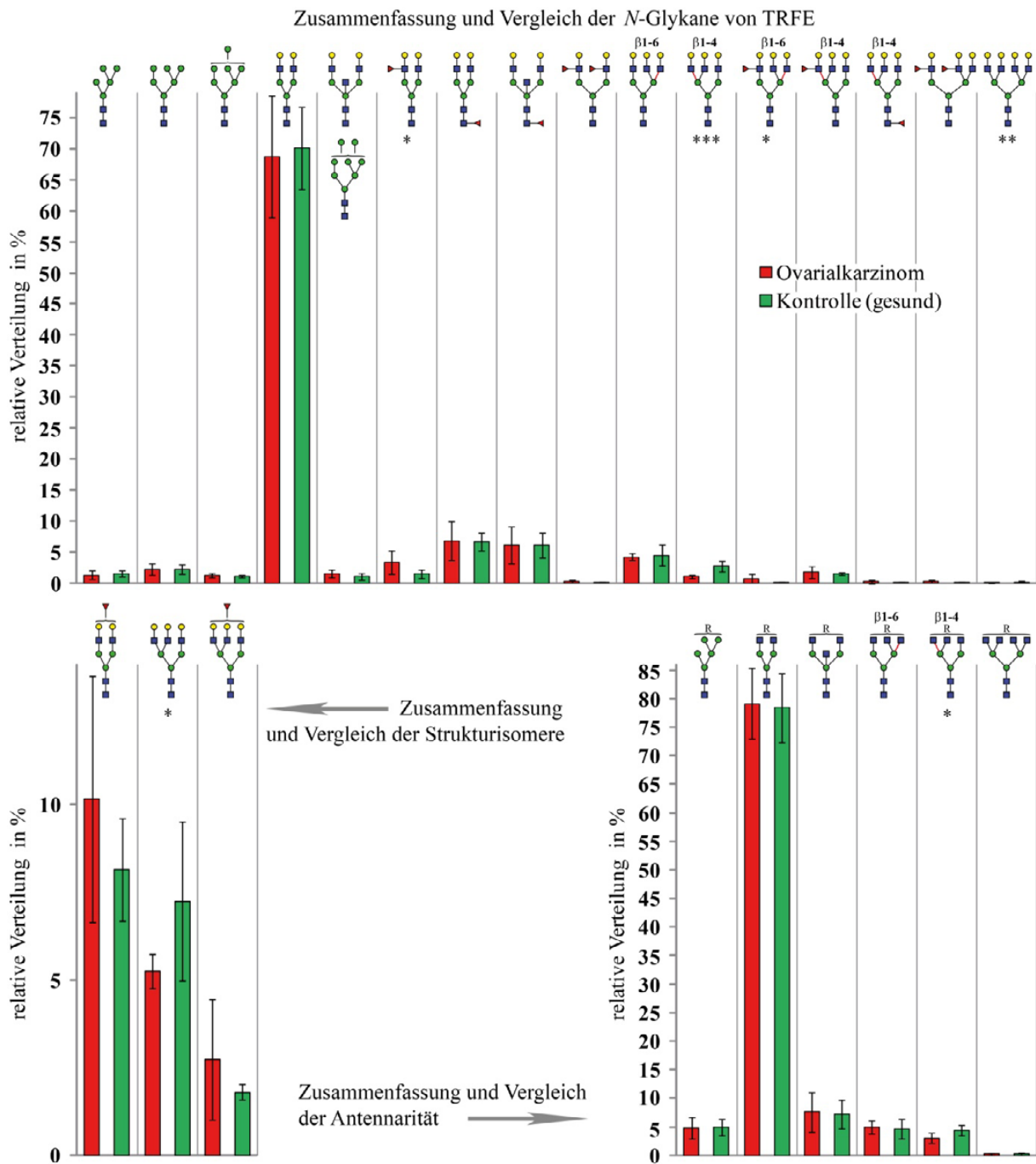


Abbildung 5-43: Statistik zu TRFE

Gezeigt werden nur Strukturen, die in mindestens einer Gruppe einen Anteil von $\geq 0,2\%$ haben. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Anteile eines N-Glykans oder einer N-Glykangruppe mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,02$; *** $p \leq 0,01$

oben: Die relative Verteilung der N-Glykane, berechnet anhand der gemessenen Peakflächen im Elektropherogramm der CE.

links unten: Zusammenfassung (Addition) der Flächen der Strukturisomere zu einer N-Glykangruppe

rechts unten: Zusammenfassung (Addition) der Flächen mit gleicher Antennarität zu einer N-Glykangruppe

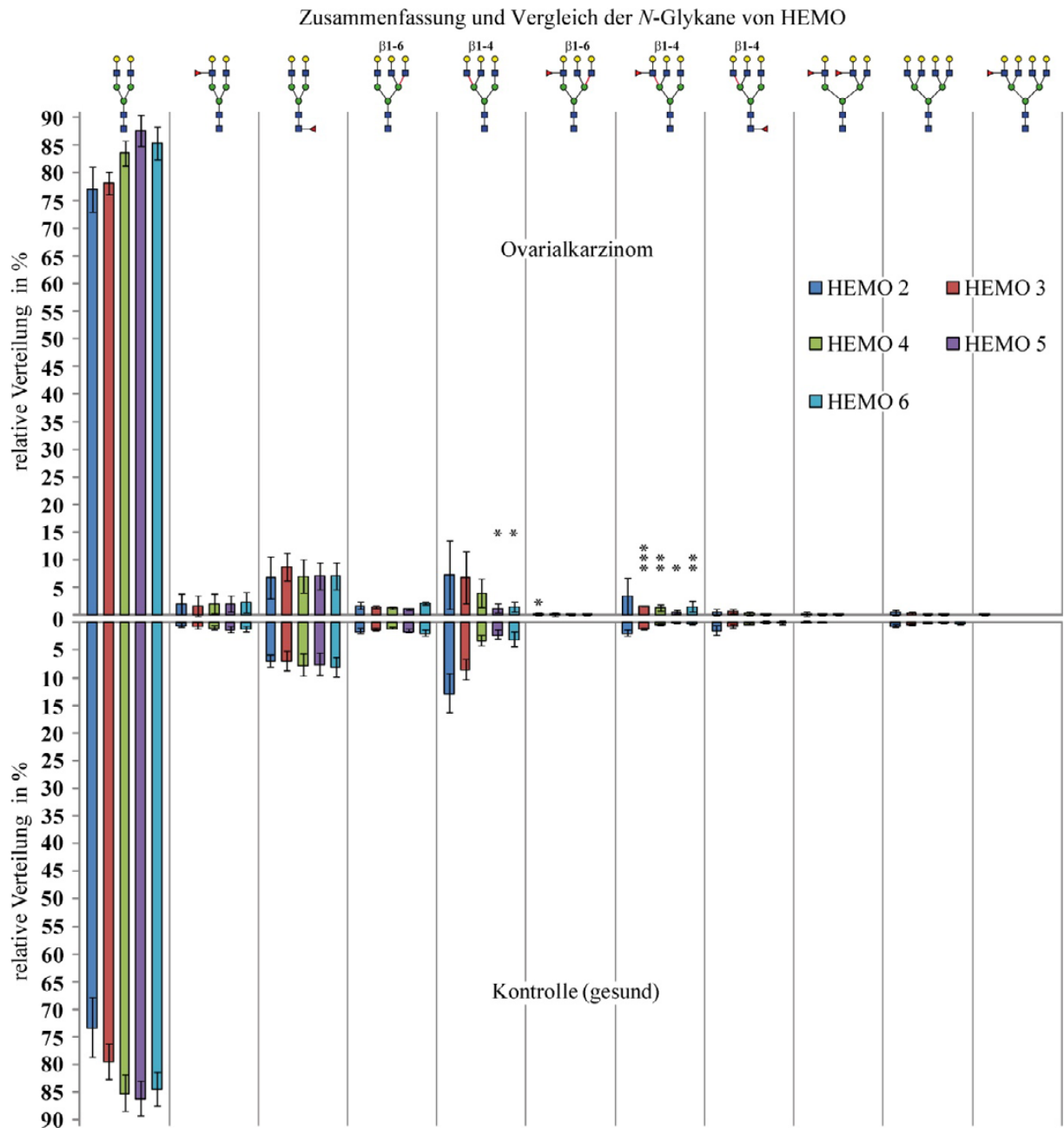


Abbildung 5-44: Statistik zu HEMO (Grafik eins)

Gezeigt werden nur Strukturen, die in mindestens einer Gruppe einen Anteil von $\geq 0,2\%$ haben. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Anteile eines N-Glykans oder einer N-Glykangruppe mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,02$; *** $p \leq 0,01$

Dargestellt ist relative Verteilung der N-Glykane, berechnet anhand der gemessenen Peakflächen im Elektropherogramm der CE.

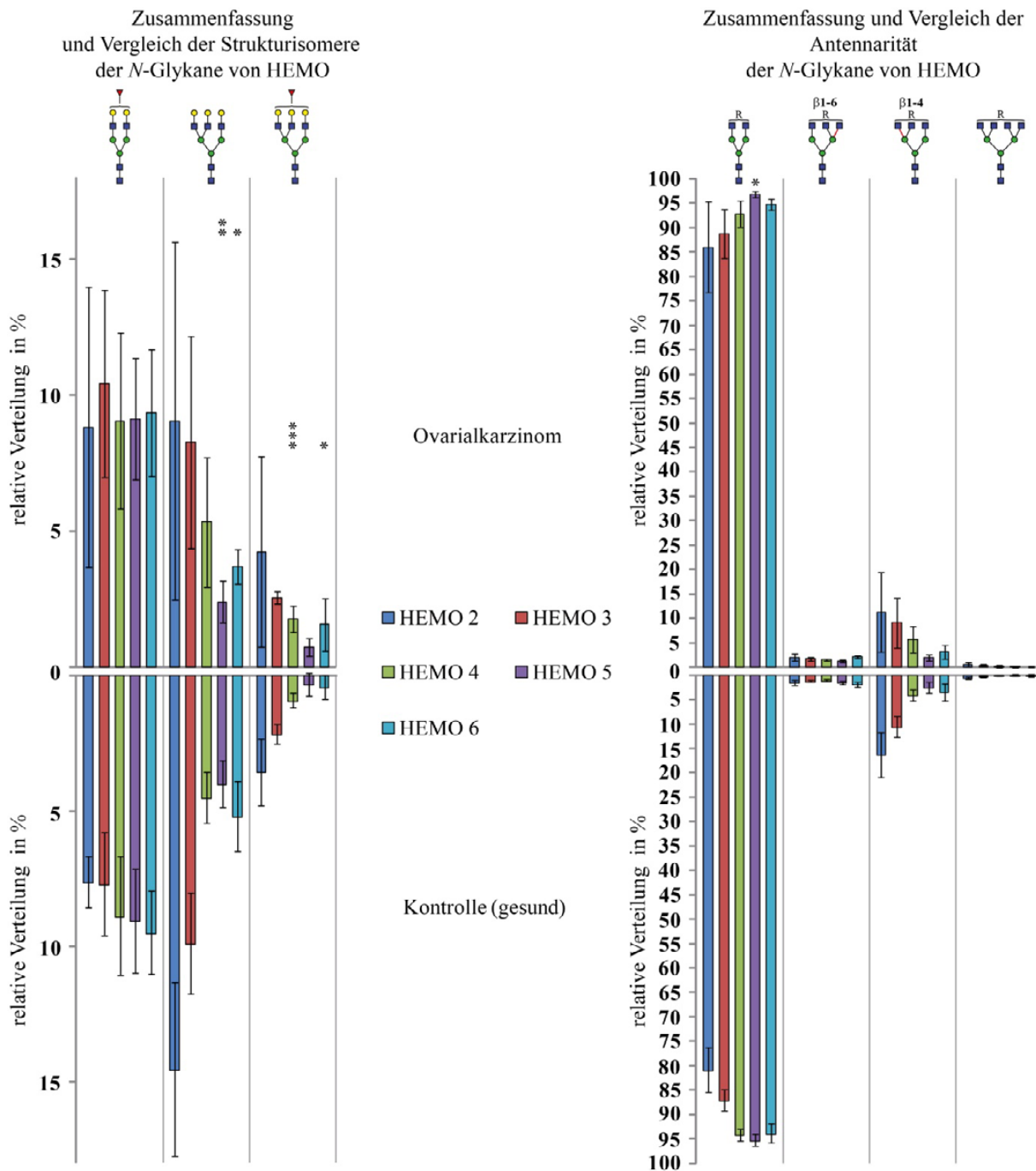


Abbildung 5-45: Statistik zu HEMO (Grafik zwei)

Gezeigt werden nur Strukturen, die in mindestens einer Gruppe einen Anteil von $\geq 0,2\%$ haben. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Anteile eines *N*-Glykans oder einer *N*-Glykangruppe mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,02$; *** $p \leq 0,01$

- links: Zusammenfassung (Addition) der Flächen der Strukturisomere zu einer *N*-Glykangruppe
- rechts: Zusammenfassung (Addition) der Flächen mit gleicher Antennarität zu einer *N*-Glykangruppe

5.7.3 Statistik zu den *N*-Glykanen des gesamten Blutserums

Das gesamte Serumglykom der *N*-Glykane wurde mit dem Roboter wie in Kapitel 5.5.2 beschrieben isoliert, und anschließend analysiert. Dazu wurde für jede einzelne Probe eine Dreifachbestimmung durchgeführt und der Mittelwert für die Statistik verwendet.

Im Serum ist im Unterschied zu den untersuchten Glykoproteinen ein hoher Anteil an *High*-Mannose-Strukturen, biantennären *N*-Glykanen mit und ohne *bisecting*-GlcNAc, sowie nur einer oder keiner Gal zu finden. Diese Glykane stammen zum größten Teil von den IgGs, die in hohen Konzentrationen im Blutserum vorkommen. Die IgGs sind für diese Arbeit nicht von Bedeutung.

Die signifikanten Unterschiede sind beim biantennären *N*-Glykan mit einer antennären oder *core*-Fuc zu erkennen, wobei die antennäre Fuc erhöht (2,3-fach) und die *core*-Fuc erniedrigt (0,7) vorliegt. Dadurch wird bei der Addition dieser Strukturisomere der statistische Unterschied verringert. Weitere Unterschiede sind die Erhöhung des triantennären *N*-Glykans mit der GlcNAc(β 1-6)-Variante (1,7-fach), des triantennären *N*-Glykans der GlcNAc(β 1-4)-Variante mit einer antennären Fuc (2,2-fach) und des tetraantennären *N*-Glykans mit einer antennären Fuc (4,2-fach) (Abbildung 5-46).

Nach der Addition der Strukturisomere, der tri- und tetraantennären *N*-Glykane mit jeweils einer Fuc, ist eine gute Signifikanz gegeben, welche durch die Zunahme der antennären Fuc verursacht wird. Beim Vergleich der Grundstrukturen wird die Erhöhung aller triantennären *N*-Glykane mit der GlcNAc(β 1-6)-Variante (1,6-fach) und der tetraantennären *N*-Glykane (2,4-fach) sichtbar (Abbildung 5-46).

Das tetraantennäre *N*-Glykan mit drei antennären Fuc ist ausschließlich in der Ovarialkarzinomgruppe zu finden, wie bei den zuvor untersuchten Serumglykoproteinen. Ein weiteres interessantes Phänomen ist die Fucoseverteilung bei den beiden triantennären Varianten im Blutserum der Kontrollgruppe. Die GlcNAc(β 1-4)-Variante hat mehr antennäre Fuc (3,20 %) als *core*-Fuc (1,15 %). Bei der GlcNAc(β 1-6)-Variante ist dieses Verhältnis umgekehrt. Es sind nur 0,02 % antennäre Fuc und 0,33 % *core*-Fuc zu finden. In der Ovarialkarzinomgruppe sind bei beiden triantennären Varianten die antennären Fuc am häufigsten detektierbar (Abbildung 5-46).

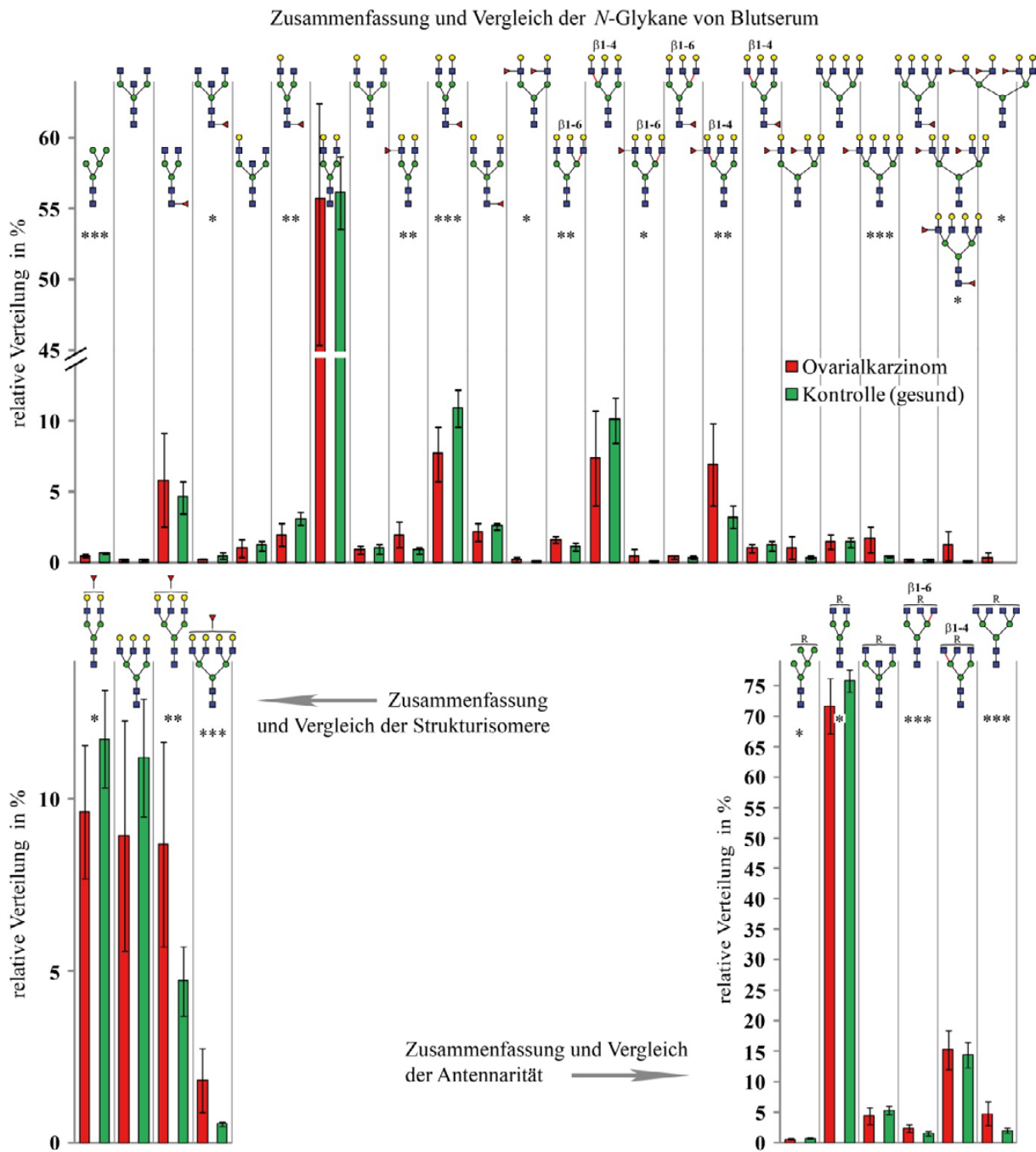


Abbildung 5-46: Statistik zu Blutserum

Gezeigt werden nur Strukturen, die in mindestens einer Gruppe einen Anteil von $\geq 0,2\%$ haben. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Anteile eines *N*-Glykans oder einer *N*-Glykangruppe mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,02$; *** $p \leq 0,01$

oben: Die relative Verteilung der *N*-Glykane, berechnet anhand der gemessenen Peakflächen im Elektropherogramm der CE.

links unten: Zusammenfassung (Addition) der Flächen der Strukturisomere zu einer *N*-Glykangruppe

rechts unten: Zusammenfassung (Addition) der Flächen mit gleicher Antennarität zu einer *N*-Glykangruppe

5.7.4 Zusammenfassung und Vergleich der Ergebnisse

In Tabelle 5-3 sind die wichtigsten Ergebnisse aus dem Blutserum und von den isolierten Glykoproteinen aus 2D-Gelen zusammengefasst. Auffällig zwischen Blutserum und Glykoproteinen aus den 2D-Gelen ist, dass im Blutserum der Ovarialkarzinomgruppe das biantennäre *N*-Glykan mit einer *core*-Fuc abnimmt und bei A1AG zunimmt. Bei allen anderen Glykoproteinen konnte bei dieser Struktur kein Unterschied gefunden werden. Es fällt auf, dass die deutliche Signifikanz des triantennären *N*-Glykans der GlcNAc(β 1-4)-Variante mit der antennären Fuc nur im Blutserum zu finden ist. Im Vergleich zum Blutserum ist bei den Glykoproteinen HTP, A1AT, TRFE und HEMO eine geringe Signifikanz zu sehen.

Die Erhöhung der Grundstrukturen vom triantennären *N*-Glykanen mit der GlcNAc(β 1-6)-Variante ist bei A1AG, IC1, FETUA und HPT sowie im Blutserum zu finden. Die Veränderung des tetraantennären *N*-Glykans mit einer antennären Fuc kann im Blutserum und bei HPT, A1AT und AACT festgestellt werden.

Bei allen Proben kann die Tendenz der Zunahme an antennärer Fuc beobachtet werden. Das tetraantennäre *N*-Glykan mit drei antennären Fuc ist ausschließlich in der Ovarialkarzinomgruppe zu finden.

5.8 Experimentelles Design: Analyse der *O*-Glykosylierungsstellen

Dieser Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Detektion von *O*-Glykosylierungsstellen, wie im folgenden Schema dargestellt.

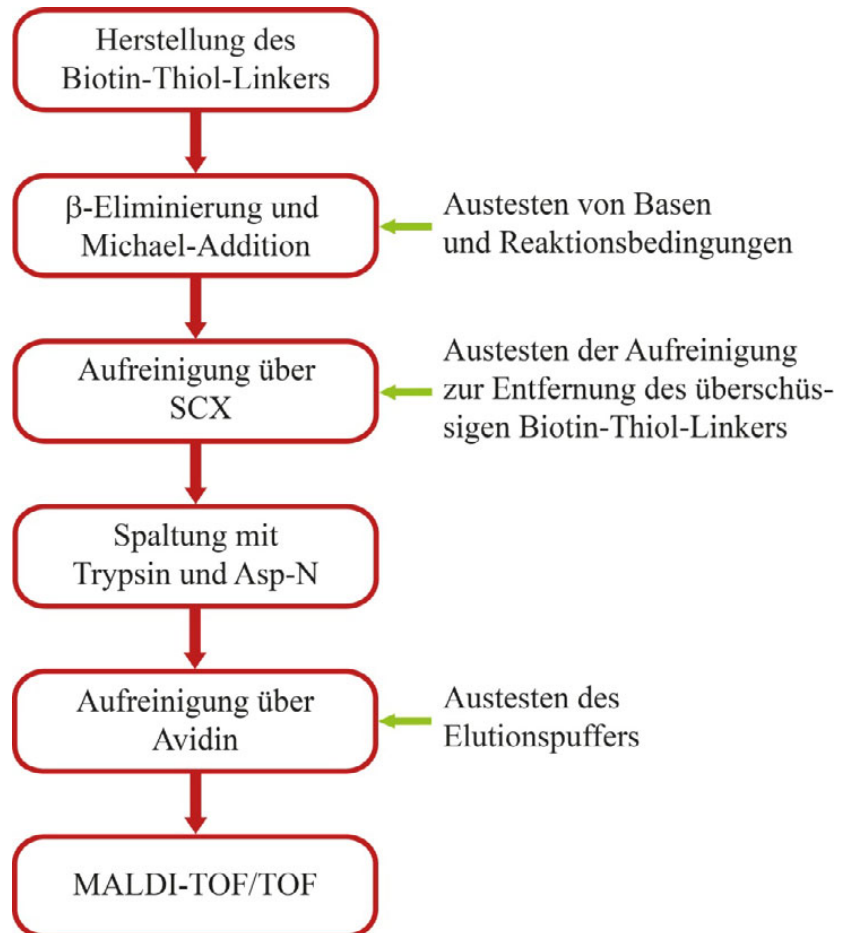


Abbildung 5-47: Experimentelles Design für die Detektion von *O*-Glykosylierungsstellen

5.9 Detektion von *O*-Glykosylierungsstellen

Für die Detektion der *O*-Glykosylierungsstellen wurde folgendes Konzept erstellt. Durch die β -Eliminierung von *O*-Glykanen mit Basen entsteht das Dehydroalanin bei Serin und die Dehydro- α -aminobuttersäure bei Threonin. Diese Produkte sind α,β -ungesättigte Carbonyl-Verbindungen, welche als Michael-System bezeichnet werden. Der Reaktionsmechanismus für diese β -Eliminierung ist postuliert als E1cb und E2 (Abbildung 5-48, oben und Mitte) (Friedman 1999; Sinnott 2007). Das Michael-System wird im zweiten Schritt der Methode durch ein Nukleophil angegriffen. Für diese Michael-Addition wurde ein Thiol als Nukleophil eingesetzt, das kovalent mit einem Biotin zur Selektion und Anreicherung der markierten *O*-Glykosylierungsstellen verbunden ist (Abbildung 5-48, unten). Über eine MS-Fragmentierung kann die Peptidsequenz und somit die *O*-Glykosylierungsstelle ermittelt werden.

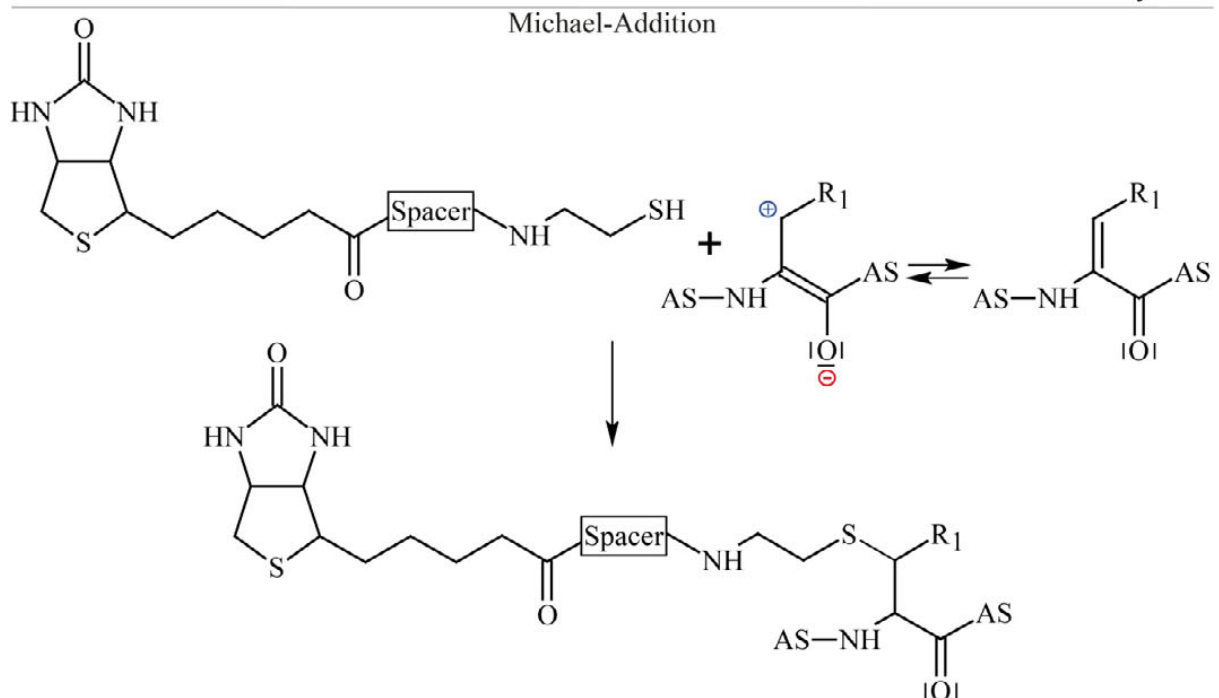
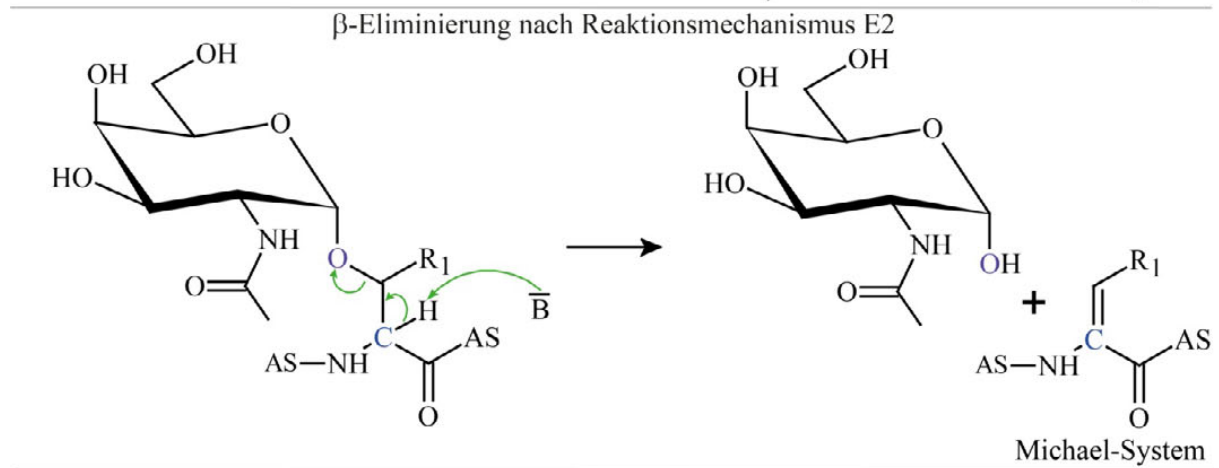
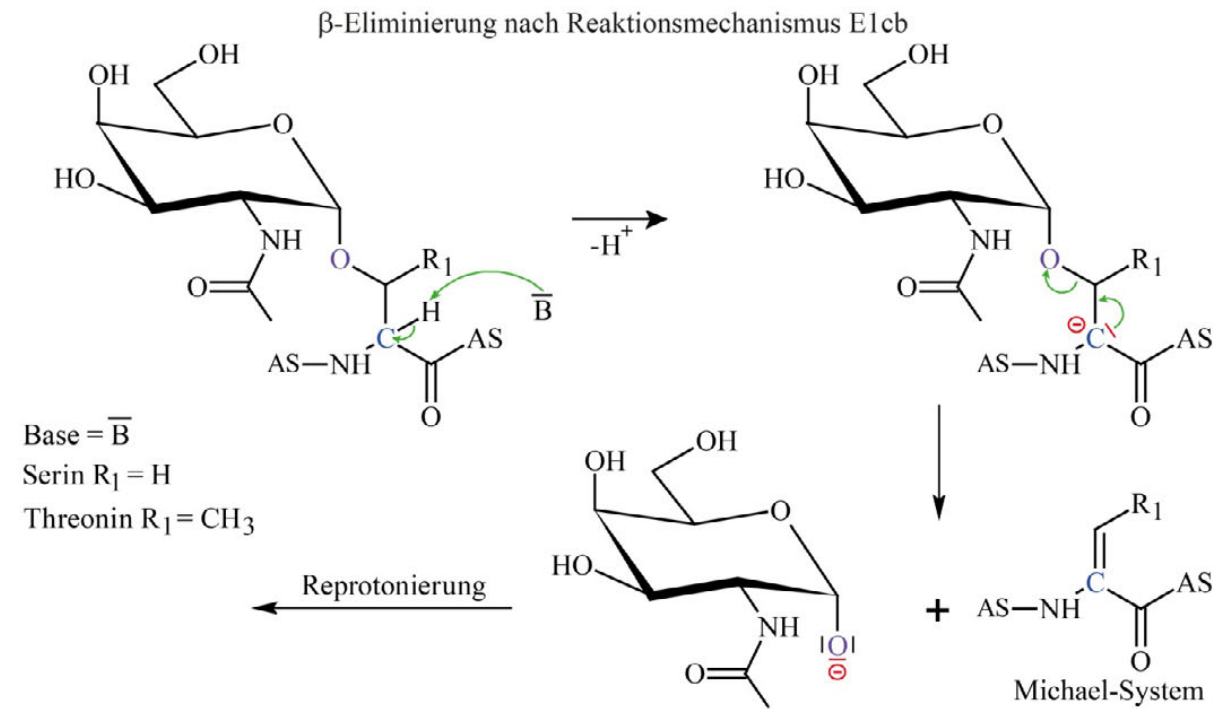


Abbildung 5-48: β -Eliminierung von *O*-Glykanen vom Protein nach dem Reaktionsmechanismus E1cb (oben) und E2 (mitte) sowie die Michael-Addition mit dem Biotin-Thiol-Linker (unten)

Zur Herstellung des Biotins mit dem Thiol und einem *Spacer*, welcher zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit diene, wurde die Festphasensynthese gewählt. An einem Cysteamin-2-chlorotryl-Harz wurde mittels Peptidsynthese unter Verwendung von 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), 2-(1H-Benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-Tetramethyluronium-Hexafluorophosphat (HBTU) und Diisopropylethylamin das Produkt N-terminal verlängert. Mit Fmoc geschützten Reagenzien wurden *Spacer* zwischen Biotin und Cysteamin eingeführt. Der fertige Biotin-Thiol-Linker wurde mit Trifluoressigsäure (TFA) vom Harz abgespalten (Abbildung 5-49, Abbildung 5-50, 7.2.25).

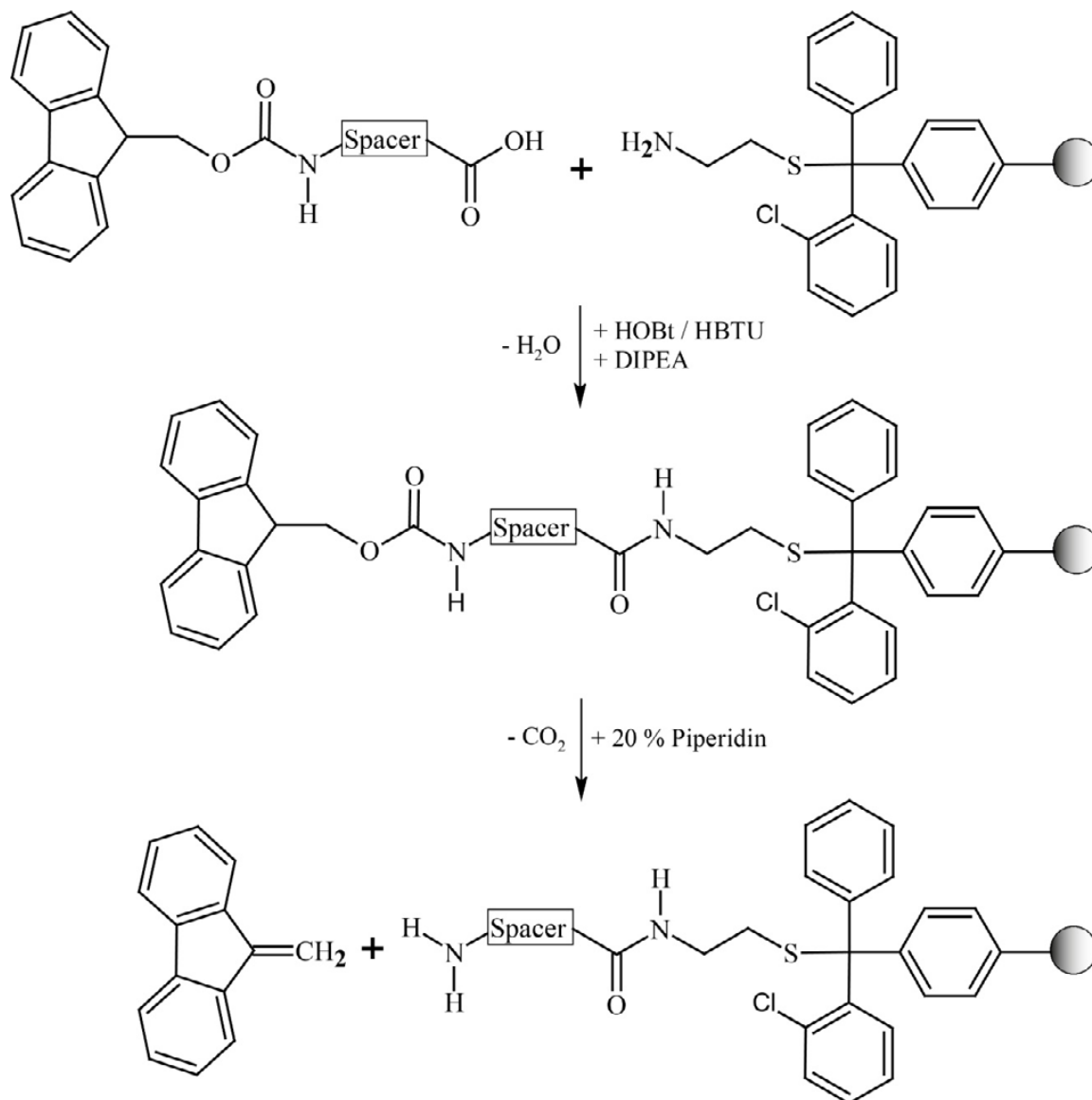


Abbildung 5-49: Festphasensynthese des Biotin-Thiol-Linkers (Teil eins)

Synthese mit einem Cysteamin-2-chlorotryl-Harz und Fmoc geschützten Reagenzien zum Einfügen eines *Spacers* in den Biotin-Thiol-Linker

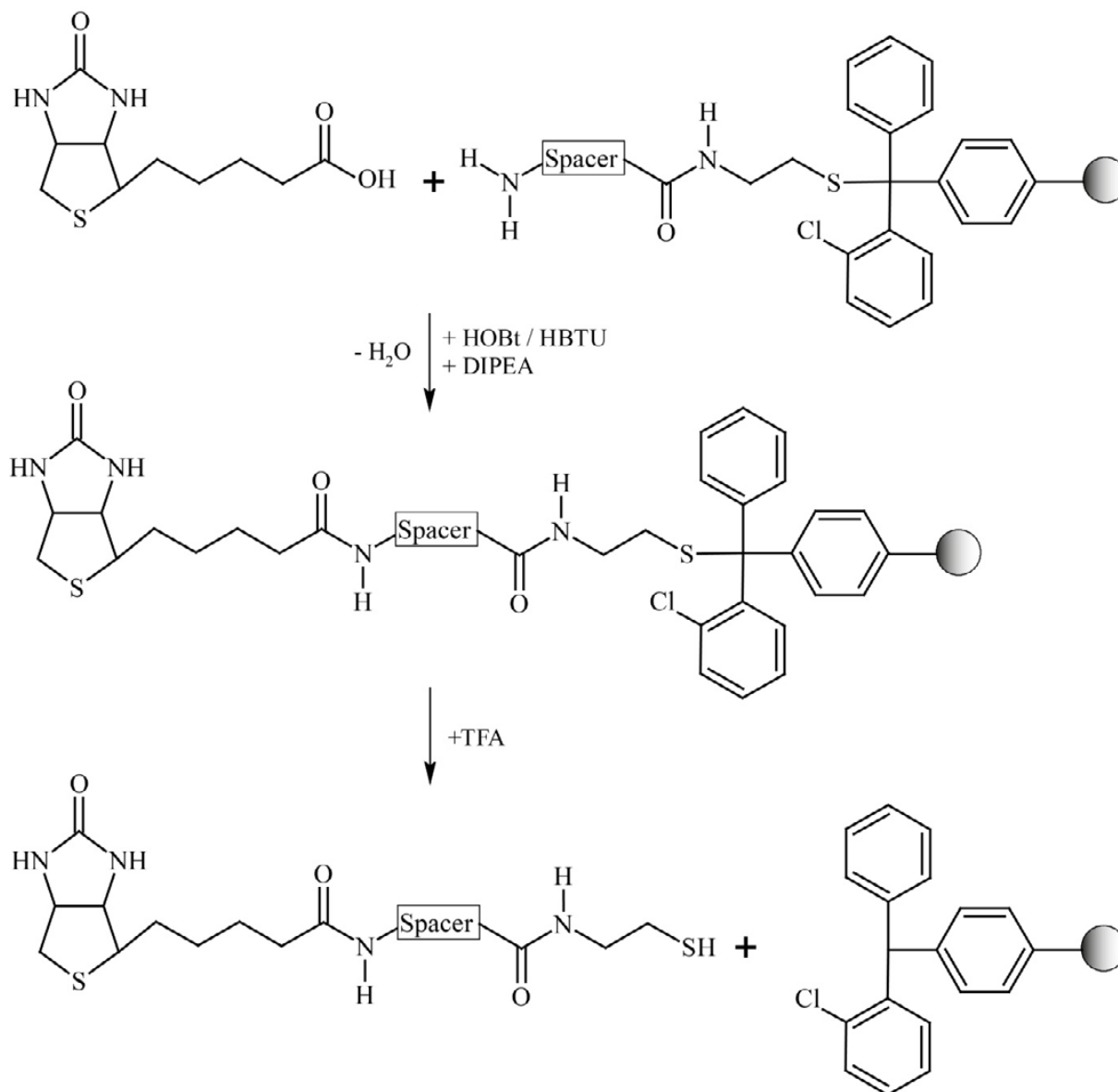


Abbildung 5-50: Festphasensynthese des Biotin-Thiol-Linkers (Teil zwei)
Einfügen des Biotins in den Biotin-Thiol-Linker und Abspaltung vom Harz

Als Modellprotein wurde FETUA aus FKS verwendet. FETUA vom Rind trägt jeweils drei *O*- bzw. *N*-Glykosylierungsstellen. In der ExpASy-Datenbank ist auch eine nur teilweise genutzte *O*-Glykosylierungsstelle aufgelistet. Die drei *O*-Glykosylierungsstellen liegen in einer Sequenz von 12 Aminosäuren und sind nach einer Trypsin-Behandlung innerhalb eines 6 kDa Peptids lokalisiert (Abbildung 5-51 oben). Diese Peptidgröße ist kritisch bei der Fragmentierung im MALDI-TOF/TOF-MS. Deshalb wurde nach der Trypsin-Spaltung die Asp-N als weitere Protease eingesetzt, welche auch eine schwache N-terminale Spaltaktivität zur Glutaminsäure haben kann (Hagmann et al. 1995) (Abbildung 5-51 unten). Es ergeben sich mehrere mögliche Peptide, die in Tabelle 5-4 aufgelistet sind.

Ergebnisse

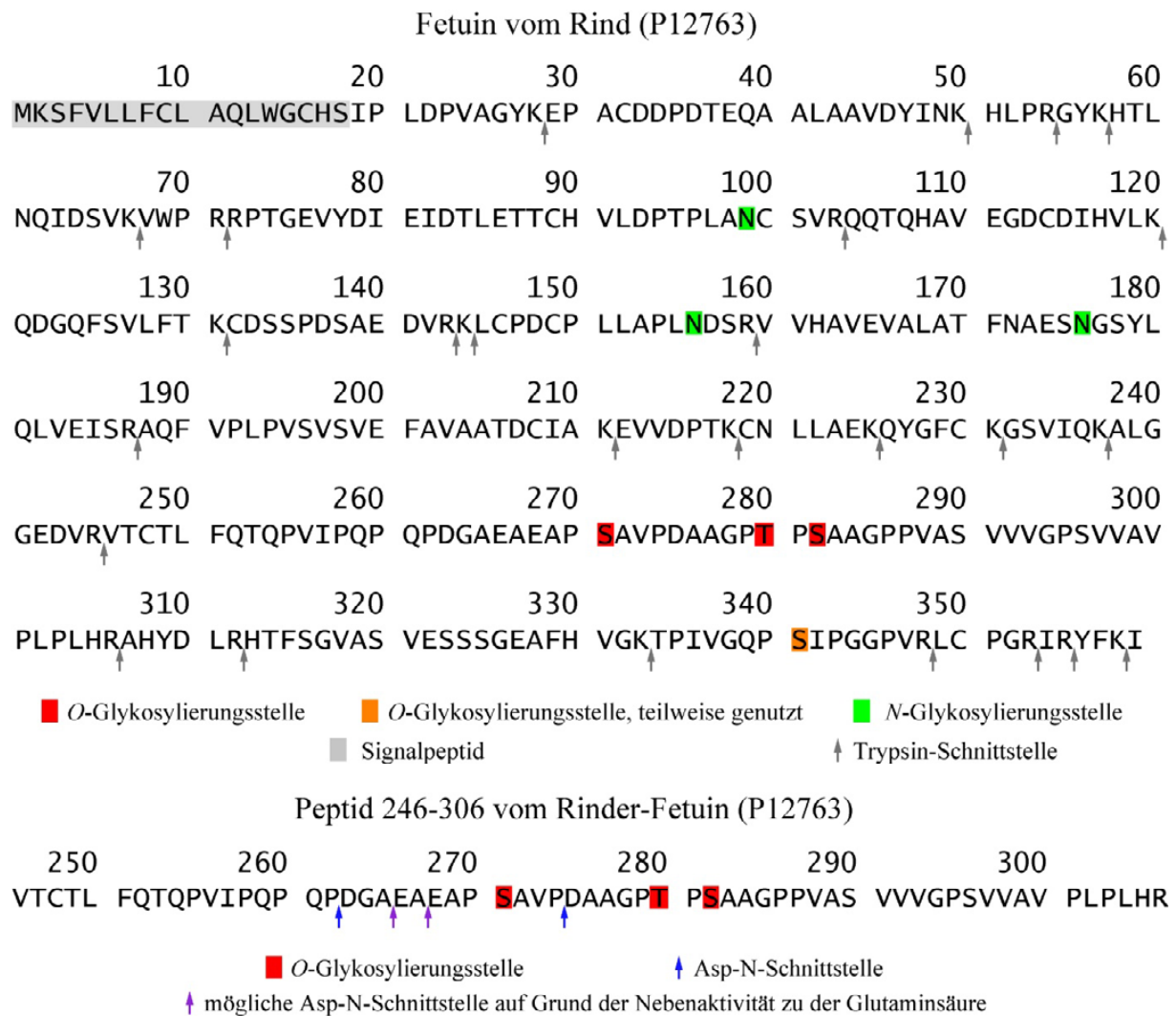


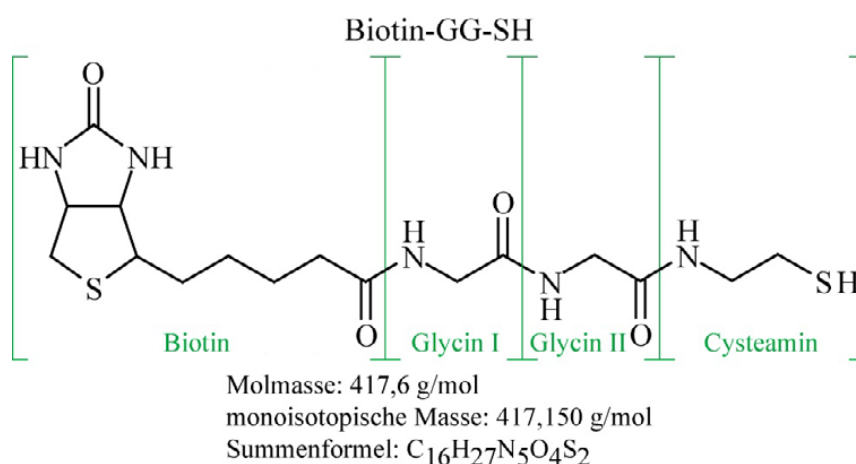
Abbildung 5-51: Glykosylierungsstellen vom FETUA (Rind), Trypsin-Schnittstellen vom gesamten Protein (oben) und Asp-N-Schnittstellen vom Peptid 246-306 (unten), Sequenz aus der UniProt-Datenbank

Tabelle 5-4: Mögliche Peptide nach Asp-N-Behandlung von Peptid 246-306. Die O-Glykosylierungsstellen sind rot markiert.

Peptidsequenz	Proteinposition	monoisotopische Masse [g/mol]
DAAGP I P S AAGPPVASVVVGPSVVAVPLPLHR	275-306	2984,6
VTCTLFQTQPVIPQPQP	246-262	1896,0
		1953,0 mit Carbamidomethyl-Cystein
DGAEAEAP S AVP	263-274	1112,5
EAEAP S AVP	266-274	869,4
EAP S AVP	268-274	669,3
DGAEA	263-267	461,2
DGA	263-265	261,1
EA	266-267	218,1

5.9.1 Biotin-GG-SH

Die erste Variante des Biotin-Thiols-Linkers hatte zwei Glycine als *Spacer* (Abbildung 5-52). Diese Glycine erhöhten die Wasserlöslichkeit des *Linkers*. Das Endprodukt der Festphasensynthese war ein bräunlicher Feststoff. Die Messung im ESI-MS (FU Berlin) zeigte, dass zwei Produkte, mit einem oder zwei Glycinen, produziert wurden ($[M+H]^+ = 418,16$ für Biotin-GG-SH und $[M+H]^+ = 361,14$ für Biotin-G-SH, MS-Spektren nicht gezeigt).

Abbildung 5-52: Biotin-GG-SH für das Michael-System nach β -Eliminierung

Für die β -Eliminierung und anschließende Michael-Addition wurden 20 μ g FETUA aus FKS reduziert, alkyliert und anschließend über eine Ultrafiltration aufgereingt (7.2.26). Das FETUA wurde reduziert und alkyliert, weil dadurch das Protein einerseits entfaltet ist und andererseits Disulfidbrücken unter den Reaktionsbedingungen der basischen β -Eliminierung

auch ein Dehydroalanin bilden können (Friedman 1999). Weiterhin wurde das FETUA mit Trypsin und Asp-N behandelt, um später die Peptide identifizieren zu können (7.2.29, 7.2.30). Für die β -Eliminierung der getrockneten Probe wurde konzentrierter Ammoniak und für die Michael-Addition das Biotin-GG-SH verwendet (7.2.27). Nach der Reaktion wurde der Ammoniak aus dem Gemisch in der Vakuumzentrifuge entfernt und der Rückstand über eine C18-Säule gereinigt (7.2.32). In der Elutionsfraktion war das überschüssige Biotin-GG-SH noch immer zu finden. Die getrocknete Elutionsfraktion wurde über *Monomeric Avidin-Agarose* aufgetrennt (7.2.31). Die zwei Elutionsarten mit Biotin oder Glycin wurden getrennt gesammelt und über C18-Säulen entsalzt (7.2.32). Beide getrocknete Elutions-Proben enthielten einen weißen Rückstand aus Biotin vom Elutionspuffer der Avidin-Aufreinigung. Es zeigt sich, dass Biotin nicht durch eine C18-Vorreinigung von den Peptiden zu trennen ist. Dieser Rückstand beeinflusst die sich anschließende MALDI-TOF-MS-Messung und führt zu einem hohen Hintergrundrauschen.

In beiden Massenspektren ist die *O*-Glykosylierungsstelle des Serins-271 zu finden, die des Thr-280 und Ser-282 jedoch nicht. Bei beiden Elutionsarten sind dieselben Peptide zu sehen. Durch die unterschiedlichen *Linker*-Massen können die Peptide leicht anhand des Glycin-Abstands identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass das Asp-N die Glutaminsäureschnittstelle 268 fast vollständig nutzt. Das größtmögliche Peptid, bei dem ausschließlich Asparaginsäureschnittstellen genutzt wurden, ist vorrangig in der Regenerationsfraktion mit Glycin nachzuweisen. Auffällig war ein dominantes Peakpaar der Masse $m/z = 855$ und 799 , was der Massendifferenz von einem Glycin entspricht. Die Massen der Peptide deuten auf den Verlust von Valin 273, Prolin 274 und einer Masse hin, die einer weiteren Wasserabspaltung entspricht. Aufgrund des Glycin-Abstands zwischen beiden Peaks ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich um dieses Peptid handelt. Von keinem Peak konnte aufgrund des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses eine erfolgreiche Fragmentierung durchgeführt werden (Tabelle 5-4; Abbildung 5-53).

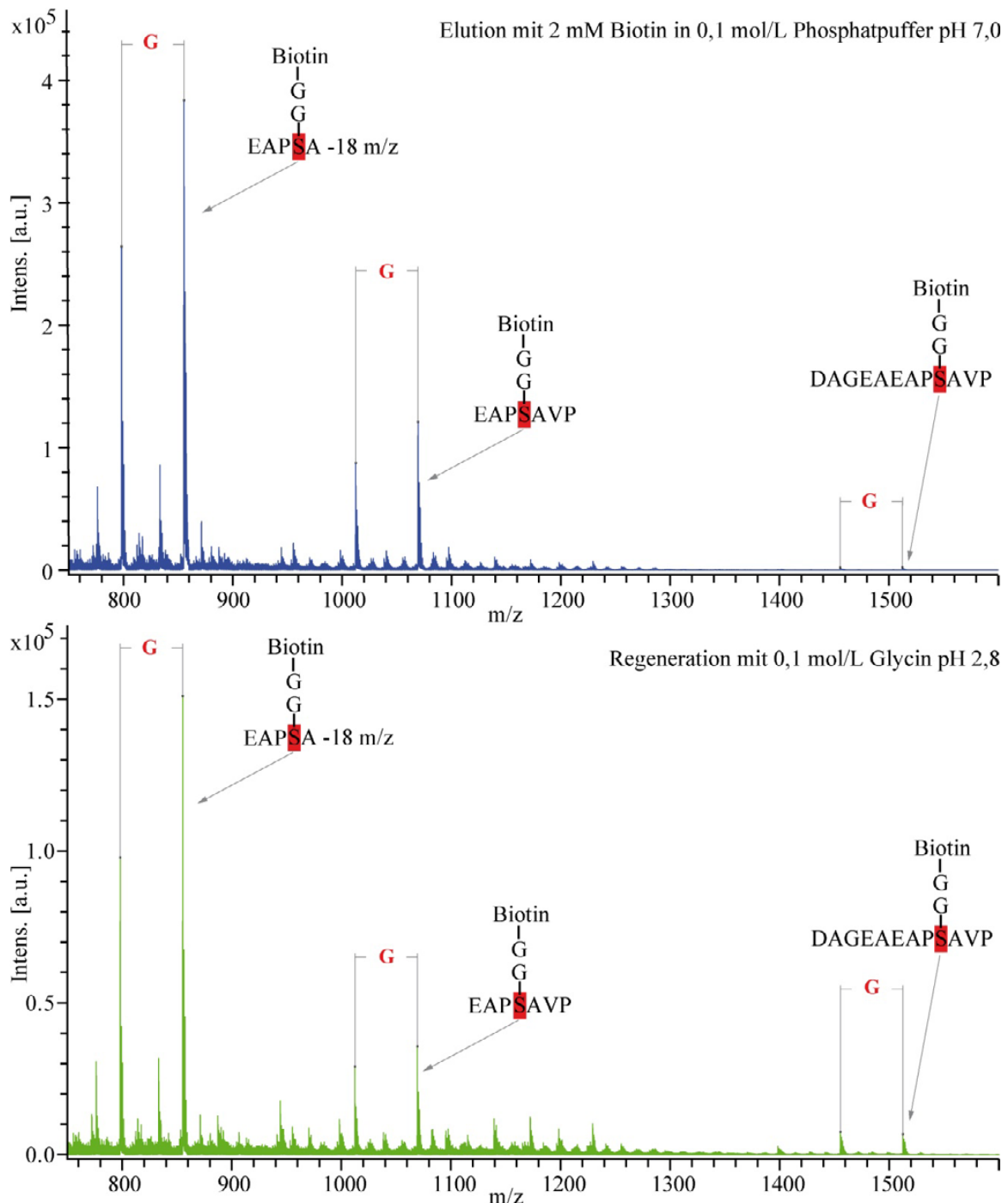


Abbildung 5-53: MALDI-TOF-MS-Spektren $[M+H]^+$ der Elution- (oben) und Regenerationsfraktion (unten) aus der *Monomeric-Avidin*-Aufreinigung der β -Eliminierung mit konzentriertem Ammoniak und Biotin-GG-SH für die Michael-Addition.

Vor der MALDI-TOF-MS-Messung wurden die Fraktionen über C18-Chromatographiematerial entsalzt. Das FETUA wurde zu Beginn des Versuches reduziert, alkyliert und mit Trypsin und Asp-N behandelt.

5.9.2 Biotin-SH

Die nächste Variante des Biotin-Thiol-Linkers hatte keinen *Spacer* (Abbildung 5-54), da Glycine eine Fragmentierungsinterpretation erschweren können. Reines Biotin ist schlecht wasserlöslich, zeigt jedoch in Anwesenheit von konzentriertem Ammoniak gute Löslichkeit. Entgegen der Erwartung war Biotin-SH in konzentriertem Ammoniak kaum löslich. Um freie Thiol-Gruppen zu gewährleisten, wurde das Biotin-SH mit TBP behandelt. Doch die Löslichkeitseigenschaften änderten sich nicht. Das Biotin-SH löste sich jedoch gut in TFA und Dimethylsulfoxid. Aufgrund der schlechten Löslichkeit konnte kein Nachweis der Biotin-SH im MS gezeigt (Daten nicht gezeigt). Die Variante ohne *Spacer* war unbrauchbar für die Detektion von *O*-Glykosylierungsstellen.

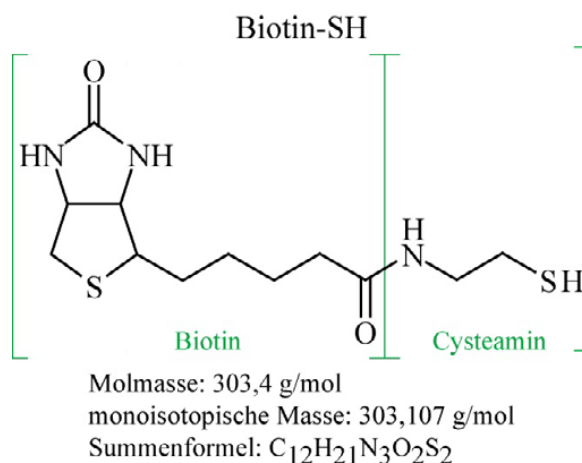


Abbildung 5-54: Biotin-SH für das Michael-System nach β -Eliminierung

5.9.3 Biotin-PEG-SH

Die nächste Variante des Biotin-Thiol-Linkers hatte einen Polyethylenglykol(PEG)-*Spacer* (Abbildung 5-55). Dieser *Spacer* erhöht die Wasserlöslichkeit und ist bei der Fragmentierung nicht mit einer Aminosäure verwechselbar. Beim fertigen Produkt handelt es sich um eine bräunlich klare, gelartige Substanz, welche wasserlöslich war. Der gelartige Zustand ist damit zu erklären das PEG-106 (zwei Monomere) flüssig ist, dadurch war das Biotin-PEG-SH kein Feststoff. Das Biotin-PEG-SH konnte nicht erfolgreich im ESI-MS (FU Berlin) ionisiert werden. Aufgrund dieser Schwierigkeiten und des besseren Nachweis der Michael-Addition, wurde die Kopplung des Biotin-PEG-SH am Protein mit Streptavidin-Peroxidase in einem Western-Blot untersucht (Kapitel 7.2.5). Nur richtig synthetisiertes Biotin-PEG-SH kann mit Streptavidin-Peroxidase nachgewiesen werden, da PEG und Cysteamin nicht erkannt werden und Biotin-SH im Reaktionspuffer unlöslich ist (Kapitel 5.9.2).

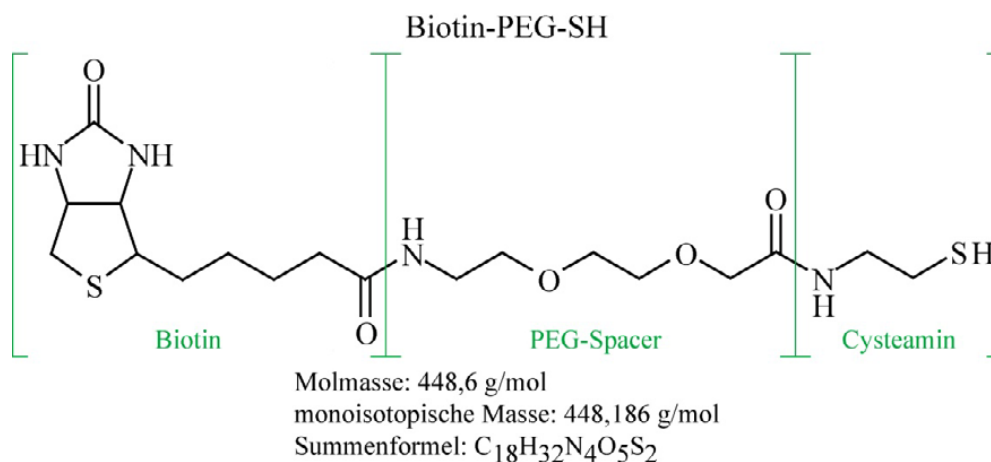


Abbildung 5-55: Biotin-PEG-SH für das Michael-System nach β -Eliminierung

Für die Testreaktion wurden jeweils 400 μ g FETUA aus FKS reduziert, alkyliert und anschließend über eine Ultrafiltration aufgereingt (7.2.26). Vor der β -Eliminierung wurde keine proteolytische Spaltung durchgeführt, um später einen Western-Blot und SCX-Aufreinigung durchführen zu können. Vor der β -Eliminierung wurden zwei Proben getrocknet. Diesmal wurde als Base einmal konzentrierter Ammoniak und das andere Mal Ba(OH)₂ verwendet (Kapitel 7.2.27). Ba(OH)₂ wurde getestet, weil dieses für die β -Eliminierung von phosphoryliertem Serin und Threonin verwendet wird (Byford 1991; Rusnak et al. 2004). Das Reaktionsgemisch wurde über SCX aufgereinigt (Kapitel 7.2.28). Die Elutionsfraktion mit FETUA wies einen kleinen, braun gefärbten Rückstand auf. Die getrocknete Waschfraktion zeigte einen klaren, gelartigen und der Durchlauf einen bräunlich klaren, gelartigen Rückstand. Mittels SCX kann das FETUA vom überschüssigen Biotin-PEG-SH getrennt werden. Um den Erfolg der β -Eliminierung zu überprüfen, wurden Durchlauf und Waschfraktion der SCX-Aufreinigung über Grafit entsalzt und permethyliert (Kapitel 7.2.17). Die anschließende MALDI-TOF-MS-Messung zeigt die erfolgreiche Abspaltung der *O*-Glykane (Daten nicht gezeigt). Zur Überprüfung der Michael-Addition des Biotin-PEG-SH wurden 1,3 % der SCX-Elutionsfraktionen über eine nicht reduzierende SDS-PAGE und einen anschließenden Western-Blot analysiert (Kapitel 7.2.5). Es wurden zwei Kontrollen verwendet, darunter unbehandeltes FETUA und FETUA, das über Sulfo-NHS-SS-Biotin an freien Aminen mit Biotin markiert ist (Kapitel 7.2.33). Mittels Coomassie-Färbung war zu erkennen, dass das gesamte FETUA in der SCX-Elutionsfraktion vorhanden ist. Durch die Behandlung mit Ammoniak verändert sich die Größe von FETUA nicht. Im Gegensatz dazu ist das Ba(OH)₂ behandelte FETUA etwas kleiner. Die Positivkontrolle für den Western-Blot ist aufgrund der zusätzlichen NHS-SS-Biotin-Verbindungen etwas größer (Abbildung 5-56 oben). In beiden SCX-Elutionsfraktionen und der Positivkontrolle ist beim Western-Blot mit Immuno-detektion ein Signal für das gebundene Biotin deutlich zu erkennen. Das mit Ammoniak be-

handelte FETUA zeigt ein stärkeres Signal als das mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ behandelte FETUA (Abbildung 5-56 unten).

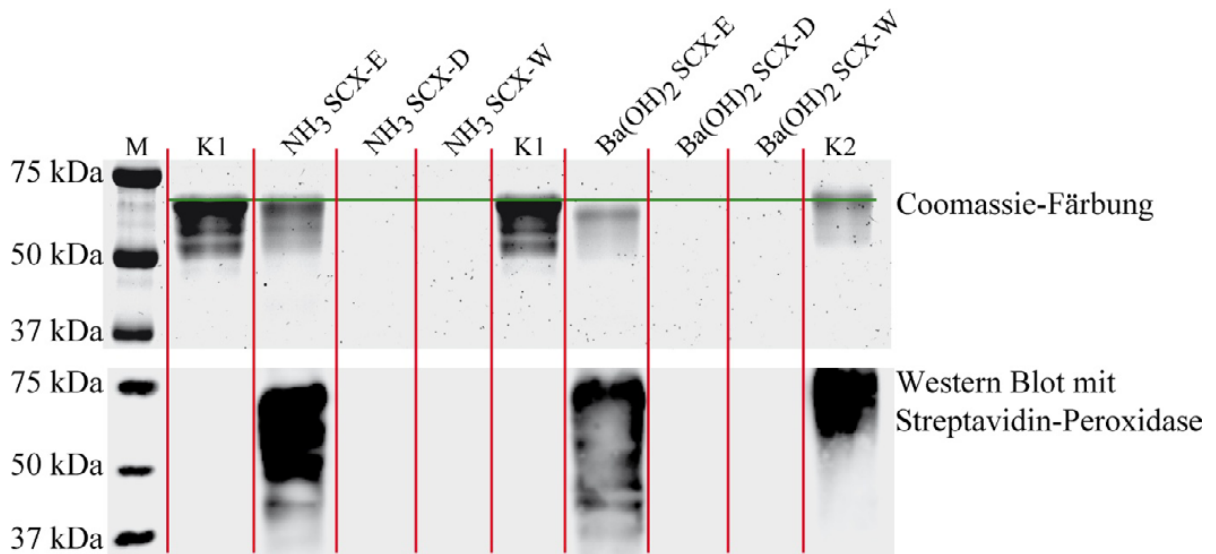


Abbildung 5-56: SDS-PAGE-Gel und Western-Blot nach Reaktion von Biotin-PEG-SH mit FETUA in Ammoniak oder Bariumhydroxid und anschließender Aufreinigung über SCX.

Das 10 %ige SDS-PAGE-Gel wurde erst mit Coomassie gefärbt (oben), nach dem Entfärben auf eine PVDF-Membran geblottet und Biotin mit Streptavidin-Peroxidase detektiert (unten). M = Marker, K1 = FETUA unbehandelt, SCX-E = Elutionsfraktion der SCX-Aufreinigung, SCX-D = Durchlauf der SCX-Aufreinigung, SCX-W = Waschfraktion der SCX-Aufreinigung, K2 = FETUA mit NHS-SS-Biotin markiert.

Die Reste der SCX-Elutionsfraktionen wurden getrocknet und über *Monomeric Avidin-Agarose* gereinigt (Kapitel 7.2.31). Eluiert wurde mit Glycin, welches auch zur Regeneration der Säule verwendet wird. Bei der mit Ammoniak behandelten Probe wurde zur Kontrolle zusätzlich mit Biotin eluiert. Die Fraktionen wurden über ein Amicon Ultra-0,5-Säulchen mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa gereinigt und mittels nicht reduzierenden SDS-PAGE und sich anschließendem Western-Blot analysiert. Es wurden 10 % der Elutionsfraktion mit Glycin und 20 % der zusätzlichen Elutionfraktion mit Biotin sowie vom Durchlauf mit Waschfraktion verwendet. Von der Elutionsfraktion mit Biotin wurde mehr verwendet, da erwartet wurde, dass nach der Regeneration mit Glycin kein Produkt mehr auf der Avidin-Säule zu finden ist. Die Coomassie-Färbung zeigt in den Elutionen mit Glycin nur schwache, diffuse Banden. Hingegen zeigt die zusätzliche Elution mit Biotin eine stark gefärbte, diffuse Bande. Die Verluste durch die Avidin-Aufreinigung sind hoch. Im Durchlauf und der Waschfraktion ist nur wenig Protein zu finden, das im Western-Blot mittels Immunodetektion nicht detektierbar ist. Der größte Anteil an FETUA bleibt auf der Säule gebunden, da auch in den Elutionsfraktionen nur wenig Protein zu finden sind. Die Elutionsfraktionen zeigen dennoch ein starkes Signal für das gekoppelte Biotin (Abbildung 5-57). Die Reste der Avidin-Elutionen wurden getrocknet und mit Trypsin behandelt (Kapitel 7.2.29). Eine MALDI-TOF-MS-Messung der Probe zeigt nicht das gesuchte Peptid von ca. 6 kDa (Daten nicht gezeigt). Zur Trennung der biotinmarkierten Peptide wurde der Ansatz mit *Monomeric Avidin-Agarose* auf-

gereinigt. Eluiert wurde mit Biotin (Kapitel 7.2.31). Die Elutionsfraktion wurde anschließend über SCX aufgereinigt (Kapitel 7.2.28) und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Das gesuchte Peptid ist nicht nachweisbar gewesen (Daten nicht gezeigt). Die restliche Probe wurde mit Asp-N behandelt. Auch diese MALDI-TOF-MS-Messung zeigt nicht die gesuchten biotinmarkierten Peptide. Selbst das erwartete Peptidstück 246-262 ohne *O*-Glykosylierungsstellen ist nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Durch die geringe Ausbeute nach der Avidin-Aufreinigung und den vielen anderen Zwischenschritten war nicht mehr genügend Probe für eine MALDI-TOF-MS-Messung vorhanden.

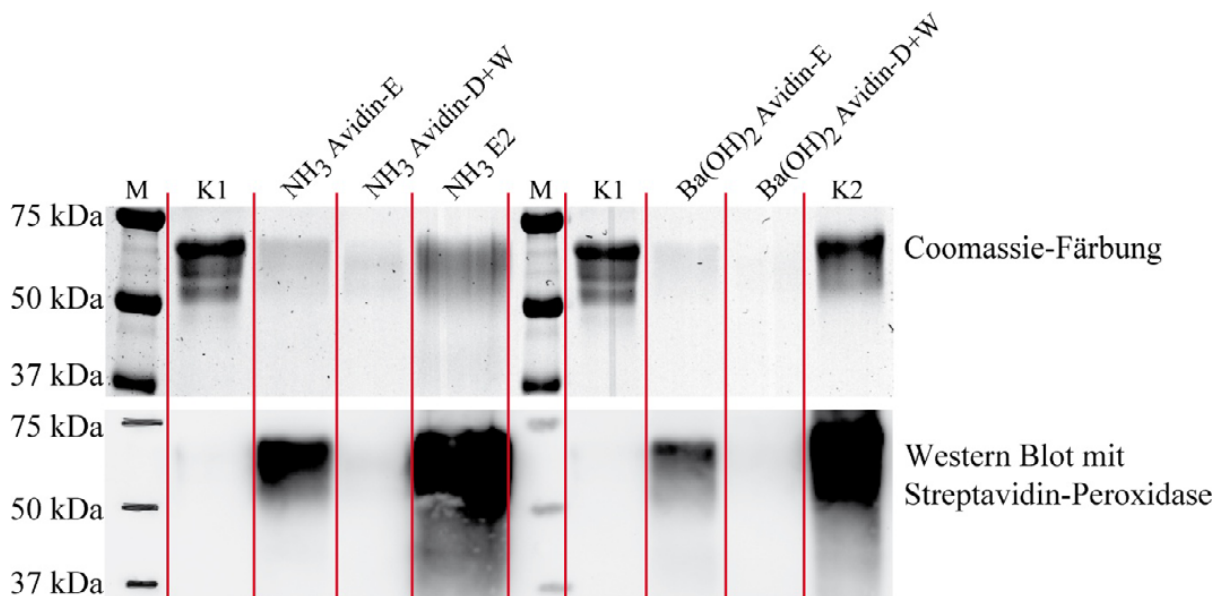


Abbildung 5-57: SDS-PAGE-Gel und Western-Blot nach der Aufreinigung über *Monomeric Avidin-Agarose*.

Das 10 %ige SDS-PAGE-Gel wurde erst mit Coomassie gefärbt (oben), nach dem Entfärben auf eine PVDF-Membran geblotet und das Biotin mit Streptavidin-Peroxidase detektiert (unten). M = Marker, K1 = FETUA unbehandelt, Avidin-E = Elutionsfraktion mit Glycin von der Avidin-Aufreinigung, D+W = Durchlauf und Waschfraktion der Avidin-Aufreinigung, Avidin-E2 = Elutionsfraktion zwei mit Biotin von der Avidin-Aufreinigung, K2 = FETUA mit NHS-SS-Biotin markiert.

Die Western-Blots mit Immunodetektion zeigen eine erfolgreiche Michael-Addition des Biotin-PEG-SH am FETUA und Aufreinigung. Als kritisch zu betrachten sind dennoch die hohen Verluste und die verwendeten Elutionspuffer bei der Avidin-Aufreinigung. Die hohen Rückstände von Biotin aus dem Elutionspuffer beeinflussen die MALDI-TOF-MS-Messung, weshalb ein Protokoll mit flüchtigem Elutionspuffer aus 50 % AcN + 0,1 % TFA getestet wurde (Oda et al. 2001). Wie zuvor wurden jeweils 400 µg FETUA aus FKS reduziert, alkyliert und gereinigt (Kapitel 7.2.26). Für die β -Eliminierung der beiden getrockneten Proben wurde konzentrierter Ammoniak und Ba(OH)₂ verwendet (Kapitel 7.2.27). Das Reaktionsgemisch wurde über SCX aufgereinigt (Kapitel 7.2.28). Die Elutionsfraktion mit FETUA weist einen kleinen bräunlichen Rückstand auf. Die getrocknete Elutionsfraktion wurde mit Trypsin und Asp-N behandelt (Kapitel 7.2.29, 7.2.30). Der Ansatz wurde über *Monomeric Avidin-Agarose* aufgetrennt und die Elution mit AcN und TFA durchgeführt

(Kapitel 7.2.31). Die Eluate der Avidin-Aufreinigung wurden aufgrund eines weißen unbekanntes Rückstands über C18-Chromatographiematerial aufgereinigt (Kapitel 7.2.32) und in MALDI-TOF-MS gemessen. Das Massenspektrum zeigt ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis. Es sind eine Vielzahl von Peaks zu sehen, von denen aber keiner dem FETUA zugeordnet werden kann. Die MS-Fragmente des Hauptpeaks ($m/z = 2832$) konnten keinem bekannten Peptid zugeordnet werden (Abbildung 5-58).

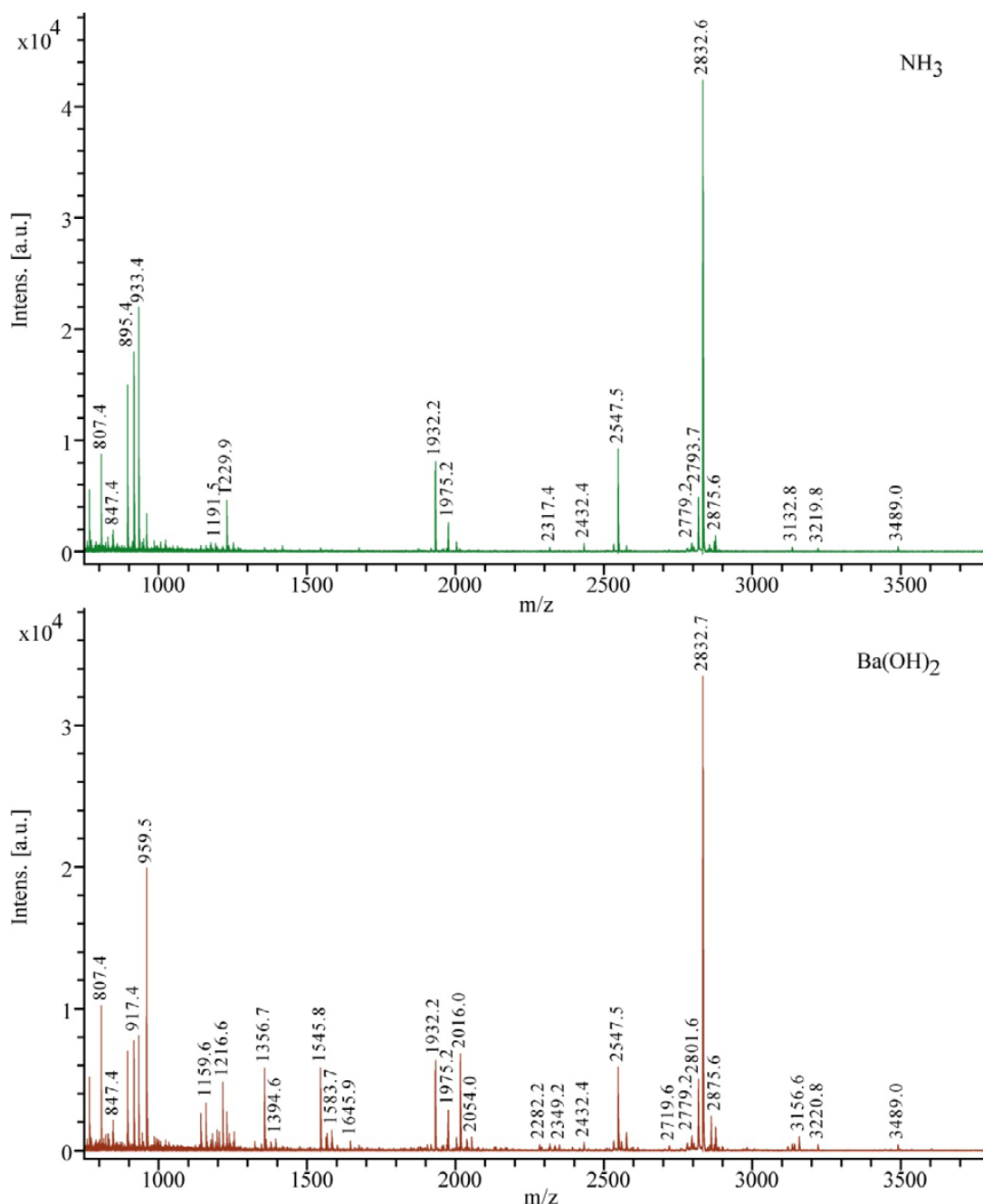


Abbildung 5-58: MALDI-TOF-MS-Spektren $[\text{M}+\text{H}]^+$ der Elutionsfraktionen mit 50 % AcN + 0,1 % TFA aus der Monomeric-Avidin-Aufreinigung der β -Eliminierung mit konzentriertem Ammoniak oder $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und der Michael-Addition mit Biotin-PEG-SH

Für die β -Eliminierung wurde konzentrierter Ammoniak oder $\text{Ba}(\text{OH})_2$ verwendet. Für die Michael-Addition wurde Biotin-PEG-SH eingesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über SCX aufgereinigt und das FETUA wurde mit Trypsin und Asp-N behandelt. (oben: Elution von β -Eliminierung mit NH_3 ; unten: Elution von β -Eliminierung mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$)

6 Diskussion

6.1 Serumaufarbeitung für die 2D-Gelelektrophorese

Zur Aufreinigung von Blutserum wurden drei verschiedene Ansätze getestet. Dabei handelt es sich um die Borat-Chromatographie, die Lektin-Chromatographie und ein *Depletion-Kit*. Es hat sich gezeigt, dass die Borat-Chromatographie nicht ausreichend Glykoproteine bindet und somit ungeeignet ist. Theoretisch steht der Phenylborsäure eine Vielzahl an Bindungen zur Verfügung, da eine Affinität zu den einzelnen Monosacchariden bereits gezeigt wurde (Abbildung 5-3) (Morin et al. 1994; Otsuka et al. 2003; Fang et al. 2004). Jedoch zeigen Glykoproteine mit endständigen Sialinsäuren keine Bindung und solche mit endständigen Mannosen nur eine geringe Affinität. Wahrscheinlich sind sterische Gründe dafür verantwortlich. Bei den Mannosen ist z. B. das *cis*-Diol in Position zwei und drei in räumlicher Nähe zur Verknüpfungsstelle eins, welche die Mannose zum restlichen *N*-Glykan verbindet. Nur Lactoferrin aus Rindermilch zeigte eine vollständige Bindung (Abbildung 5-4). Dieses Glykoprotein hat im Unterschied zu den anderen getesteten Glykoproteinen endständige Gal, GalNAc und GlcNAc (Abbildung 5-5). Für die gute Bindung sind vermutlich die Gal und GalNAc verantwortlich, denn diese haben in Position drei und vier ein *cis*-Diol. Somit liegt diese potenzielle Bindungsstelle gegenüber der Verbindung zum restlichen *N*-Glykan und ist damit sterisch am besten zugänglich.

Die Lektin-Chromatographie ist prinzipiell in Kombination von SNA-I und MAA möglich (Tabelle 5-1 und Abbildung 5-8). Diese zwei Lektine zeigten eine gute Ausbeute an Glykoproteinen mit einem geringen Anteil an Albumin. Lektine sind spezifisch für Sialinsäuren (Tabelle 5-1), welche gut zugänglich am Ende der Glykane hängen. Die Methode würde aber nur Glykoproteine mit Sialinsäuren isolieren. Zur Erweiterung der Bindungsspezifität wäre LcH auf Grund der guten Ergebnisse denkbar, aber es benötigt einen anderen Bindungspuffer als SNA-I und MAA (Tabelle 7-2), was eine Kombination der drei Lektine in einer gemeinsamen Chromatographiesäule erschwert. Ein Problem der Lektin-Chromatographie ist, dass die Spezifität von Lektinen oft nicht exakt definiert und teilweise widersprüchlich ist (Iskratsch et al. 2009). Das liegt daran, dass Lektine z. B. im *Microarray* mit synthetischen Mono-, Di- und Trisacchariden getestet werden (Manimala et al. 2006). Testreihen mit vollständigen natürlichen *N*-Glykanen sind selten. Dabei haben gerade die Sialinsäuren einen Einfluss auf die Bindungsaffinität (Iskratsch et al. 2009; Tateno et al. 2009). Aufgrund dieser Nachteile und des hohen Kosten- und Zeitaufwands, sowie der Gefahr von Kreuz-

kontaminationen, durch Mehrfachverwendung der Chromatographiematerialien, wurde die Lektin-Chromatographie als ungeeignete Methode angesehen.

Das *Enchant Multi-Protein Affinity Separation Kit* von Pall arbeitet mit Antikörpern gegen Albumin und IgG. Durch die Denaturierung der Serumprobe können effektiv Wechselwirkungen zwischen den Proteinen, vor allem mit Albumin (Adkins et al. 2002), reduziert werden. Dadurch werden weniger Proteine zusammen mit dem Albumin aus der Probe entfernt. Durch diese Vorteile wird die Serumprobe kaum verändert und somit effektiv für die 2D-Gelelektrophorese vorbereitet. Dennoch ist die Reduktion von Albumin und IgG bei dieser Art *Depletion-Kit* nicht vollständig (Echan et al. 2005; Lei et al. 2008). Da das *Kit* mit Abstand die besten Ergebnisse lieferte, wurde es als Standardmethode zur Aufreinigung von Blutserum in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Im neutralen bis sauren pH-Bereich und ab einer Größe von 40 kDa sind die meisten Glykoproteine zu finden (Abbildung 5-7). Der tendenzielle saure IP der Serumglykoproteine lässt sich auf die Sialinsäuren zurückführen. Neu5Ac ist ein stark saures Molekül. Es hat einen pKs-Wert von ca. 2,5 (Zimmermann et al. 2007). Die Größenabgrenzung von 40 kDa hängt mit dem natürlichen *cutoff* der Niere von etwa 45 kDa zusammen. Die klassischen Plasmaproteine werden von Leber und Darm sekretiert und sind oft größer als der *cutoff der Niere*, um die Serumhalblebenszeit zu verlängern (Anderson et al. 2004).

6.2 *AnchorChip* mit Arabinosazon als Matrix

Zur Entwicklung eines automatisierbaren Protokolls für das *spotting* eines MALDI-Targets wurden zwei Matrices getestet. DHB ist durch die Bildung unregelmäßig aktiver Kristalle („*sweet spots*“) ungeeignet (Strupat et al. 1991; Laugesen and Roepstorff 2003). Ara bildet im Vergleich zu DHB eine homogene Fläche mit gleichmäßiger Aktivität (Chen et al. 1997). Durch die verschiedenen hydrophilen und hydrophoben Bereiche des *AnchorChip Targets* können die Proben konzentriert werden. Mit diesem *Target* kann aufgrund seiner exakten x-y-Koordinaten sowohl automatisch gespottet, als auch vermessen werden (Bruker Daltonik 2002). Die Nachweisgrenze konnte um den Faktor 50 im Vergleich zum *Ground Steel Target* verringert werden, was 1 bis 10 fmol des Analyten entspricht (Abbildung 5-9, Abbildung 5-10). Das entwickelte Präparationsprotokoll für das 800 µm *AnchorChip Target* ist einfach und robust sowie vollständig mit dem Freedom EVO 200 oder anderen *liquid-handling* Robotern kompatibel. Nordhoff et al. (2007) demonstrierte mit einem 200 µm *AnchorChip Target* und α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure als Matrix, dass Messungen von nur 10 amol an

Peptiden möglich sind, wobei das verwendete Volumen von 20 nL nur von speziellen Robotern pipettierbar ist. Die Verwendung eines 200 µm *AnchorChip Target* könnte vielleicht eine weitere Verbesserung der Nachweisgrenze zur Folge haben.

Weiterhin zeigte sich, dass das Lösen von Glykanen in 80 % Ethanol optimal für MALDI-*target*-Präparation mit Ara ist, da der Wassergehalt der Lösung für wasserunlösliche Matrices besonders wichtig ist. Wenn der Wassergehalt zu hoch ist, fällt die Matrix aus bevor der Analyt im *Anchor* konzentriert ist. Ist der Wassergehalt zu niedrig, sind die Probe und die Matrix im *Anchor* konzentriert, aber das Massenspektrum hat eine schlechte Qualität. Diese Beobachtungen werden durch andere Wissenschaftler bestätigt (Cohen and Chait 1996; Nordhoff et al. 2003). Die Empfindlichkeit könnte weiter gesteigert werden, wenn der Anteil der $[M+K]^+$ -Ionen reduziert wird. Dazu könnten die Glykane zuvor auf einer Na-Nafion-Membran inkubiert werden (Börnsen et al. 1995).

6.3 In-Gel-PNGase F-Behandlung und Automatisierung der Glykananalytik

Es ist bekannt, dass es bei der Isolierung von Glykoproteinen aus 2D-Gelen zu hohen Verlusten kommen kann (Küster et al. 2001). Eine früher beschriebene In-Gel-PNGase F-Behandlung war nicht reproduzierbar und außerdem nicht roboterkompatibel (Küster et al. 1997). Zur Verbesserung der In-Gel-PNGase F-Behandlung wurden Trypsin und OGP getestet. Trypsin spaltet das Protein in kleinere Peptide, die für die PNGase F besser zugänglich sind. OGP wird in der Proteomik zur Verbesserung der In-Gel-Trypsin-Behandlung eingesetzt und ist in geringen Mengen massenspektrometrisch kompatibel (Katayama et al. 2001; Nordhoff et al. 2003; Jahn et al. 2006). Weiterhin wurde für die Extraktion der Glykane der Einsatz von 50 °C Wärme mit der Inkubation im Ultraschallbad verglichen (Abbildung 5-11). Der Einsatz von 1 g/L OGP verbesserte die In-Gel-PNGase F-Behandlung deutlich. Die absolute Menge von 0,1 µg OGP wurde nicht überschritten, da es ab diesem Wert zur Beeinflussung bei der MALDI-TOF-MS-Messung kommt. Der positive Effekt des Ultraschallbades beruht sehr wahrscheinlich nur auf der Wärmeentwicklung während der Behandlung, da keine Zerstörung der Gelstücke zu erkennen ist. Innerhalb der Gelmatrix sind die Molekularbewegungen diffusionskontrolliert. Auf die Diffusion haben das Konzentrationsgefälle, die zu überwindende Distanz (Fick'sches Gesetz) und die Temperatur einen großen Einfluss. Der effektivste Weg, den Stofftransport von Enzym und Glykan zu verbessern, ist ein hohes Konzentrationsgefälle, kleine Gelstücke und hohe Temperaturen (Havliš et al. 2003). Das neu entwickelte Protokoll für die In-Gel-PNGase F-Behandlung mit OGP und Wärmeextraktion

war im Vergleich zu Küster et. al. (1997) mit höherer Bisacrylamidkonzentration im SDS-PAGE-Gel und geringeren PNGase F-Mengen (ein Unit statt drei Units) erfolgreich und roboterkompatibel. Im folgenden Entwicklungsschritt wurde gezeigt, dass die Proteaseinkubation vor der PNGase F-Behandlung nicht unbedingt für eine *N*-Glykananalyse erforderlich ist (Abbildung 5-12).

Für den *scale-up* auf den Roboter und 2D-Gele musste das Protokoll angepasst werden, da die Enzymbehandlungen in 0,5 mL Reaktionsgefäßen und 10 µL Volumina entwickelt wurden. Beim Roboter war aufgrund des fehlenden *sealers* das System zur Umwelt offen, so dass es zu inkonstanten Verdunstungsverlusten, abhängig von der Probenzahl und *well*-Position, kam. Ein weiterer Grund für die Anpassung des Protokolls war, dass im Roboter eine 96-*well* Filterplatte als Reaktionsgefäß verwendet wurde, die mindestens 40 µL Flüssigkeit zur Bedeckung des Bodens benötigt. Zudem waren die ausgeschnittenen Gelstücke der 2D-Gele dicker und hatten ein viel größeres Volumen als 10 µL. Aus Kostengründen wurde die PNGase F-Menge auf zwei bis drei Units beschränkt. Auf dem Roboter wurde das In-Gel-PNGase F-Behandlungsprotokoll für 2D-Gele etabliert. Testläufe mit A1AT human zeigen, dass 15 pmol (0,85 µg) humanes A1AT für eine MALDI-TOF-MS und CE-Analyse ausreichend sind (Abbildung 5-20). Die Fähigkeit der vollautomatischen In-Gel-PNGase F-Behandlung stellt ein technisches Novum dar. Im Vergleich dazu benötigt Küster et. al. (1997) mit dem nicht automatisierten Protokoll zwischen 50 und 100 pmol an Glykoprotein. Eine Alternative ist die Verwendung von schmelzbaren SDS-PAGE-Gelen (Callewaert et al. 2002). Dazu müsste das SDS-PAGE-Gel aus ProtoPrep-II (National Diagnostics, Atlanta, USA) hergestellt werden. Dieses spezielle Gel löst sich mit einem Auflösungspuffer bei 60 °C auf und das gelöste Acrylamid wird mit AcN ausgefällt. In der restlichen Lösung befinden sich die Glykoproteine, welche dann mit PNGase F behandelt werden können. Durch diese Methode könnte die PNGase F effizienter arbeiten, da sie nicht in das Gel diffundieren muss.

Das Konzept der automatisierten Glykoanalytik ging über die In-Gel-PNGase F-Behandlung hinaus (Abbildung 5-14). Für spätere Anwendungen wie Diagnostik oder Kontrolle von *batches* rekombinanter Proteine aus Fermentationen ist der Aufwand der 2D-Gel-Technik sehr hoch. Deshalb wurde die Abspaltung der *N*-Glykane in Lösung ebenfalls automatisiert. Der zentrale Prozess der PNGase F-Behandlung wurde für alle drei Anwendungen (Serum, rekombinante Proteine und SDS-PAGE-Gele) so konzipiert, dass die *N*-Glykane frei, gereinigt und entsalzt mit Sialylierung vorliegen. Vorschläge für die enzymatische Freisetzung der *N*-Glykane für ein Hochdurchsatzverfahren im 96-*well*-Format gab es bereits vor dieser Arbeit. Diese Prozesse beruhen auf der Bindung der Proteine an eine PVDF-Membran in

einer 96-*well*-Platte und der Abspaltung der *N*-Glykane an der Membran durch PNGase F. Die Nachweisgrenze lag zwischen 0,1-0,5 µg Glykoprotein (Papac et al. 1998; Callewaert et al. 2001; Kim et al. 2009). In dieser Arbeit wurde aufgrund der beschriebenen Probleme, bei Küster et al. (2001), mit der Bindung von Proteinen an einer Membran, eine Mikrotiterplatte als Reaktionsgefäß verwendet. Durch den Einsatz von Wärme, TBP sowie den Detergenzien SDS, Nonidet P-40 und OGP konnte eine Reaktionsumgebung gefunden werden, in der eine Vielzahl an Glykoproteinen deglykosyliert werden. Der Grund dafür liegt in dem Gemisch der verschiedenen Reagenzien. TPB ist ein stärkeres Reduktionsmittel als Dithiothreitol (DTT)/1,4-Dithioerytriol (DTE) und wirkt schon in geringerer Konzentration. Alternativ könnte statt TPB auch Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) eingesetzt werden (Simpson 2003). SDS ist vielleicht das am weitesten verbreitete Detergenz in der Bioanalytik. Es denaturiert effektiv Proteine, bindet aber nicht an den hydrophilen Glykanen der Glykoproteine (Rehm 2006). Nonidet P-40 ist ein nicht-ionisches Detergenz, welches aus mehreren Homologen besteht und wird häufig zur Unterstützung der PNGase F-Behandlung eingesetzt. OGP ist ebenfalls ein nicht-ionisches Detergenz, welches aus einer Glucose und eine Alkylrest besteht. Wahrscheinlich interagieren die Hydroxylgruppen der Glucose besonders gut mit den Glykanen der Glykoproteine (Fu et al. 2009). Die Nachweisgrenze der *N*-Glykane der Glykoproteine liegt bei dieser Methode bei ca. 0,5 µg Protein (Abbildung 5-16, Abbildung 5-17). Für den diagnostischen Bereich wurde das Robotersystem mit Serum erfolgreich angewendet. Dabei wurden die Proben über MALDI-TOF-MS und CE vermessen (Abbildung 5-18). Da Serum reich an Glykoproteinen ist, sind 3 µL für die Analytik ausreichend. Vergleichbare 96-*well*-Prozesse wurden mit 5 µL Serum durchgeführt (Royle et al. 2008; Kim et al. 2009). Limitiert war der diagnostische Hochdurchsatz durch die verwendete CE-LIF, die nur eine Kapillare besitzt. Diese Einschränkung wäre durch die Anwendung eines entsprechend adaptierten modernen Mehrkanal-DNA-*Sequencers* zu lösen, wie es bereits von Callewaert et al. (2001) und Schwarzer et al. (2008) gezeigt wurde.

Teilautomatisierte Prozesse wurden für die Neuraminidase-Behandlung, die Essigsäurehydrolyse und die APTS-Markierung erfolgreich entwickelt und angewandt. Eine Vollautomatisierung war aufgrund des Fehlens der technischen Ausstattung nicht möglich. Die dadurch resultierenden Arbeitsschritte außerhalb des Roboters beschränkten sich ausschließlich auf die Zugabe einer einzigen Lösung, das Versiegeln der 96-*well*-Platte oder den Transport in ein anderes Gerät. Der Zeitaufwand dafür betrug nie mehr als 15 min und das 96-*well*-Format wurde dabei nicht verlassen. Somit konnte ein Hochdurchsatz eingehalten werden. Der aufwendigste Schritt, die Aufreinigung über Grafit oder Zellulose war vollautomatisiert.

Das war möglich durch den Einsatz der Universalplatte für Spitzen mit selbst entwickelten und optimierten Mini-Chromatographiesäulen (Abbildung 5-13).

Zusammenfassend lässt sich sagen, es wurde erstmals ein gesamtheitliches Verfahren zur Aufreinigung der *N*-Glykane aus einer minimalen Menge Blutserum und SDS-Gelen unter Verwendung eines universellen, aber einzigartigen Roboters gezeigt. Die bereits publizierten Vorschläge zur Automatisierung der Glykanalytik werden als roboterkompatibel beschrieben, aber ein Testlauf auf einem *liquid-handling* Robotersystem wurde nicht gezeigt (Papac et al. 1998; Callewaert et al. 2001; Callewaert et al. 2002; Royle et al. 2008; Kim et al. 2009). Der einzelne Arbeitsschritt, der Reinigung der *N*-Glykane über Grafit in einer 96-well-Filterplatte wurde parallel zu dieser Arbeit mit einem *liquid-handling*-Robotersystem realisiert (Kronewitter et al. 2010).

6.4 Trennung von *N*-Glykan-Isomeren mittels Kapillarelektrophorese

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit Hilfe von MALDI-TOF-MS und Exoglykosidase-Behandlungen eine umfangreiche Datenbank für die Identifizierung von *N*-Glykanen mittels CE angelegt werden, welche später für die Untersuchung der Blutserumproben genutzt wurde. Durch die CE können mehrere *N*-Glykane getrennt werden, welche im MS die gleiche Masse besitzen (Abbildung 5-21).

Eine hohe Variabilität bei den *N*-Glykanen besitzt die Fuc. Sie kann am *core* α 1-6 und an der Antenne α 1-3-, α 1-4- und α 1-2-verknüpft vorliegen (Abbildung 3-3). Mittels CE können diese Strukturisomere voneinander getrennt werden. Um die verschiedenen Fucose-verknüpfungsarten zu identifizieren, wurden diese mit spezifischen Exoglykosidasen abgespalten (Abbildung 5-22). Es zeigte sich, dass die *core*-Fuc im Vergleich zur antennären Fuc die Migrationszeit stärker erhöht. Ab einem tetraantennären *N*-Glykan konnten die *core*- und antennäre Fuc nicht mehr basislinien-getrennt werden. In Kombination mit anderen Exoglykosidasen konnte gezeigt werden, dass es sich bei der antennären Fuc aus Serumproteinen nur um die α 1-3-verknüpfte Variante am GlcNAc handelt. Die Behandlung mit α 1-2 Fucosidase war negativ und es zeigte sich, dass alle Gal β 1-4-verknüpft sind (Abbildung 5-26). Somit ist eine α 1-4-verknüpfte Fuc am GlcNAc nicht mehr möglich und es bleibt einzig die α 1-3-verknüpfte Variante übrig. Ähnliche Ergebnisse für die Analyse von Serumglykoproteinen wurden parallel zu dieser Arbeit publiziert (Ruhaak et al. 2010). Die genaue Peakzuordnung von *core*- und antennärer Fuc wurde bei der CE-Analyse von APTS-markierten *N*-Glykanen bisher nicht gezeigt. Aus der Literatur sind Elektropherogramme

bekannt, wo lediglich die Strukturen der Hauptpeaks aufgeklärt sind. Kleinere Peaks werden nicht identifiziert und ausschließlich das Peakmuster wird untereinander verglichen (Callewaert et al. 2001; Callewaert et al. 2004; Laroy et al. 2006; Vanderschaeghe et al. 2009; Vanderschaeghe et al. 2010b). In anderen Publikationen wird auf die Abspaltung der Sialinsäuren verzichtet, was zu einer schlechteren Auflösung führt. Bei den *N*-Glykanen aus Serum werden dabei nur *core*-Fuc gezeigt (Schwarzer et al. 2008; Ruhaak et al. 2010).

Ein besonderes Ergebniss war, dass das triantennäre *N*-Glykan zwei Peaks im Elektropherogramm zeigt (Abbildung 5-22 D und E). Durch Fraktionierung der *N*-Glykane mit der HPAEC-PAD und anschließender Analyse mit MALDI-TOF-MS und CE konnte eindeutig bewiesen werden, dass es sich um zwei triantennäre Glykan-Isomere handelt (Abbildung 5-23). Zwei unabhängige Experimente mit PHA-L (Abbildung 5-27) (Cummings and Kornfeld 1982; Kaneda et al. 2002) und β -*N*-Acetylhexosaminidase aus *Streptococcus pneumoniae* (Abbildung 5-29) (Yamashita et al. 1981) bestätigten den Unterschied zwischen den beiden triantennären Isomeren. Das GlcNAc an der dritten Antenne ist einerseits β 1-4- und andererseits β 1-6-verknüpft. Das triantennäre *N*-Glykan mit der höheren Migrationszeit ist die GlcNAc(β 1-4)-verknüpfte Form. Das triantennäre *N*-Glykan mit der GlcNAc(β 1-6)-Verknüpfung an der dritten Antenne benötigt weniger räumlichen Platz, was sich auch über die kürzere Migrationszeit zeigt. Eine computergestützte Analyse zeigt, dass bei der GlcNAc(β 1-4)-Variante die dritte Antenne fast senkrecht zu den restlichen zwei Antennen steht. Bei der GlcNAc(β 1-6)-Variante hingegen bildet die dritte Antenne eine Ebene mit den restlichen zwei Antennen und benötigt dadurch weniger Raum (Abbildung 6-1).

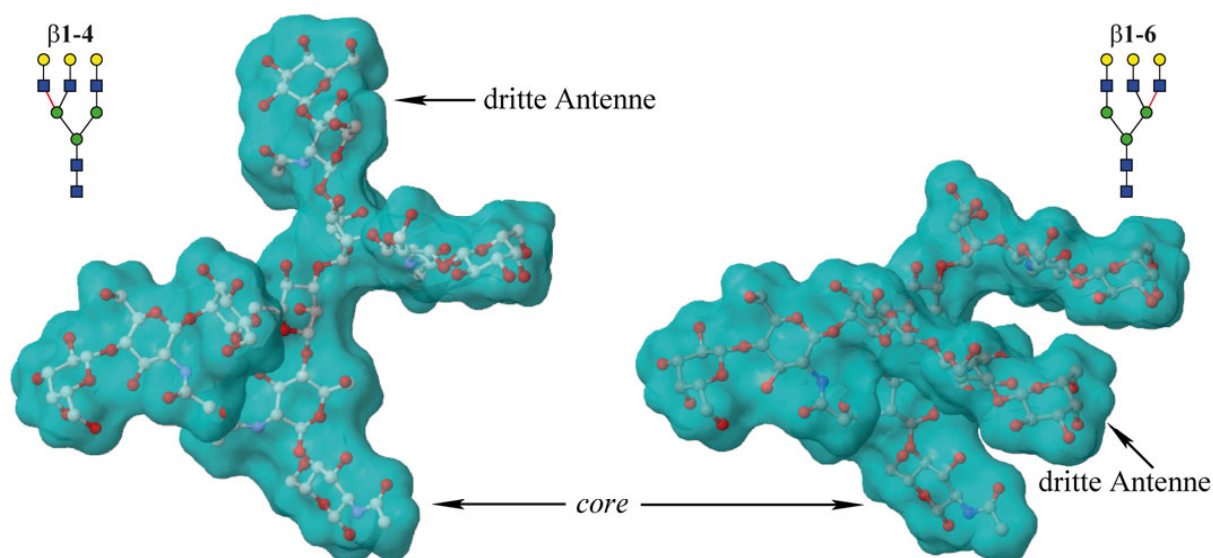


Abbildung 6-1: 3D-Struktur der triantennären Isomere in der GlcNAc(β 1-4)Man und GlcNAc(β 1-6)Man – verzweigten Variante

Darstellung des Molekürückrats ohne Wasserstoffatome (rot = Sauerstoff, blau = Stickstoff, grau = Kohlenstoff) und seiner theoretischen Moleküloberfläche (cyan). Die Grafik wurde mit der Software Jmol und den Daten von glycosciences.de erstellt.

Die genaue CE gestützte Analyse der beiden triantennären Isomere stellt ein einzigartiges Verfahren dar. Andere Arbeitsgruppen zeigen bereits Elektropherogramme von Serum mit den beiden Peaks der Isomeren, klärten aber nur die Struktur des dominanten GlcNAc(β 1-4)Man-verzweigten triantennären *N*-Glykans auf (Laroy et al. 2006; Vanderschaeghe et al. 2009; Vanderschaeghe et al. 2010b). Bei der Analyse der *N*-Glykane mit Sialinsäuren aus humanem Blutserum wird bisher kein GlcNAc(β 1-6)Man-verzweigtes triantennäres *N*-Glykan gezeigt (Saldova et al. 2007; Vanderschaeghe et al. 2009; Sarrats et al. 2010). In humanen Serumglykoproteinen kommt das triantennäre Isomer mit der β 1-6-Verknüpfung nur zu einem geringen Anteil vor, da das bevorzugte Substrat für die GnT-V das triantennäre *N*-Glykan mit der GlcNAc(β 1-4)-Verknüpfung an der dritten Antenne ist (Abbildung 3-7) (Brockhausen et al. 1988). Rekombinantes A1AT aus HEK-239 Zellen erleichterte die Aufklärung des Unterschieds zwischen den triantennären Isomeren. Bei diesem A1AT war die GlcNAc(β 1-6)-Variante die dominantere Form im Gegensatz zu A1AT aus Serum (Abbildung 5-22 Abbildung 5-39). Bei der Produktion von rekombinanten Proteinen in *chinese hamster ovary*-Zellen wurde dasselbe Phänomen beobachtet (Inoue et al. 1999; Shahrokh et al. 2010). Der erhöhte Anteil der GlcNAc(β 1-6)Man-Verzweigung ist ein Merkmal vieler Krebsarten und Krebszelllinien (Kapitel 3.3.1). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass bei der Verwendung von Krebszellen als Produktionslinie eine Erhöhung der GlcNAc(β 1-6)-Variante des triantennären *N*-Glykans möglich ist. Inwieweit dieser Unterschied im Vergleich zum natürlichen Glykosylierungsmuster einen Einfluss auf die Eigenschaften des Proteins hat, muss noch untersucht werden.

Das biantennäre *N*-Glykan mit einem *bisecting*-GlcNAc wurde ebenfalls eindeutig identifiziert (Abbildung 5-30). Das *bisecting*-GlcNAc hat aufgrund seiner kompakten Lage im Zentrum der *N*-Glykane einen geringeren Einfluss auf die Migrationszeit, als die äußeren GlcNAc an den Antennen (Abbildung 5-31). Dieses Ergebnis wird durch mehrere Publikationen bestätigt (Callewaert et al. 2004; Laroy et al. 2006).

Durch die im Verlauf der Arbeit notwendige Abspaltung der Sialinsäuren geht deren Information verloren. Aufgrund ihrer negativen Ladung wirken sie beschleunigend auf die Mobilität. Dadurch kommt es zu mehr Überlappungen der einzelnen *N*-Glykane und die Möglichkeit, die oben beschriebenen Unterschiede zu erkennen, wird geringer oder ganz aufgehoben (Ruhaak et al. 2010). Ein Ansatz für die Zukunft ist die Ladung der Neuraminsäure durch Esterifizierung zu neutralisieren und dann mit APTS zu markieren. Dadurch haben alle Glykane wieder die gleiche Ladung (Daten nicht gezeigt), was eine hohe Auflösung ermöglicht.

6.5 Besonderheit des Transferrin

TRFE zeigt ein besonderes Verhältnis zwischen den beiden triantennären Isomeren, da sie im gleichen Verhältnis vorhanden sind. Bei den anderen untersuchten Serumproteinen war die GlcNAc(β 1-4)-Variante um ein Vielfaches höher konzentriert (Abbildung 5-43). Bei HPT 4 z. B. war das Verhältnis ca. 9:1 (Abbildung 5-38). Diese Besonderheit wird bei den bisherigen Untersuchungen von TRFE aus Patientenserum nicht erfasst (Satomi et al. 2004; Sturiale et al. 2005; Sarrats et al. 2010). Fu und van Halbeek (1992) zeigten durch eine komplexe Kombination von verschiedenen Lektin-Aufreinigungen, *Fast Atom Bombardment*-MS und Wasserstoff-Kernspinresonanzspektroskopie, dass das Verhältnis zwischen der GlcNAc(β 1-4)- und GlcNAc(β 1-6)-Variante beim Asparagin-413 des TRFE 5:1 und beim Asparagin-611 1:1 ist. Die in dieser Arbeit verwendete CE-Methode stellt ein schnelles, einfaches und empfindliches Verfahren zur Bestimmung der triantennären Isomere dar. TRFE weist wie IgG (Wormald et al. 1997) keine tetraantennären und wenig triantennäre *N*-Glykane auf. Der Grund für den erhöhten Anteil an der triantennären GlcNAc(β 1-6)-Variante gegenüber der GlcNAc(β 1-4)-Variante könnten sterische Hinderungen sein, da die GlcNAc(β 1-6)-Variante weniger Raum als die GlcNAc(β 1-4)-Variante benötigt.

Weiterhin auffällig ist, dass der verwendete humane TRFE-Standard zur Etablierung der Präparation von *N*-Glykanen mit dem Roboter nicht das komplexe Glykanprofil des Transferrins aus Blutserum aufweist (Abbildung 5-17, Abbildung 5-43). Andere Arbeiten, bei denen das TRFE ebenfalls direkt aus dem Blutserum untersucht wurde, zeigen das komplexe Glykanprofil (Satomi et al. 2004; Sturiale et al. 2005; Sarrats et al. 2010). Die Herkunft der Glykoproteine hat einen hohen Einfluss auf die Glykosylierung und muss grundsätzlich beachtet werden.

6.6 Potenzielle Biomarker für das Ovarialkarzinom aus Blutserum

6.6.1 2D-Gele, Proteinexpression und isoelektrischer Punkt der Serumproteine

Die 2D-Gele von Patientinnenserum mit Ovarialkarzinom zeigten im Vergleich zu den gesunden Frauen ein verändertes Muster. Eine Akut-Phasen-Reaktion in der Ovarialkarzinomgruppe ist deutlich zu sehen. Positive Akut-Phasen-Proteine wie A1AG, A1AT, AACT, HPT und IC1 sind erhöht und negative Akut-Phasen-Proteine wie ALBU und FETUA sind in ihren Konzentrationen erniedrigt (Abbildung 5-33). Eine Akut-Phasen-Reaktion kann von vielen Faktoren, wie z. B. temporären und chronischen Entzündungen, Gewebeschäden, rheumatoider Arthritis und Karzinomen ausgelöst werden (Gruys et al. 2005; Arnold et al.

2008; Gornik and Lauc 2008; Sarrats et al. 2010). Selbst während einer Schwangerschaft kann es zu einer veränderten Glykosylierung der Akut-Phasen-Proteine kommen (Dijk et al. 1994). Die Schwierigkeit besteht daher in der Bestimmung der Ursache für die Veränderung der Akut-Phasen-Proteine und deren Glykosylierung (siehe dazu auch Kapitel 6.6.3).

Von einigen Serumproteinen konnten die Proteinspezies anhand ihres IP getrennt werden. Für IC1, A1AG und TRFE gelang das nicht. Selbst die Verwendung eines 18 cm langen IPG-Streifen von pH 3-10 konnte die Trennung nicht herbei führen (Abbildung 5-2). Zur Verbesserung der Auflösung wäre es sinnvoll mehrere IPG-Streifen zur Abdeckung des gesamten pH-Bereiches zu verwenden (Duan et al. 2004). Die unterschiedlichen IP eines Serumglykoproteins beruhen hauptsächlich auf dem Sialinsäuregehalt (Barrabés et al. 2010). In den 2D-Gelen der Ovarialkarzinomgruppe können aufgrund der höheren Expression der positiven Akut-Phasen-Proteine von diesen mehr Proteinspezies detektiert werden. Bei AACT kann zusätzlich eine Verschiebung der Proteinspezies zum kleineren IP hin beobachtet werden, was für eine Zunahme an Sialinsäuren spricht. Eine erhöhte Sialylierung der Serumglykoproteine, oft in Zusammenhang mit Sialyl-Lewis^x-Strukturen, ist bereits für mehrere Karzinome (Brooks et al. 2008; Saldova et al. 2008) aber auch bei anderen Akut-Phasen-Reaktionen beschrieben (Arnold et al. 2008; Sarrats et al. 2010) (Kapitel 3.3.3). Werden die Sialinsäuren des gesamten Serums bestimmt, könnte jedoch der Wert allein schon durch die erhöhte Expression der Akut-Phasen-Proteine steigen. Eine Veränderung des Sialinsäureanteils ist nur im direkten Vergleich der Proteine sichtbar. Beim Vergleich der gleichen Proteinspezies mit demselben IP kann davon ausgegangen werden, dass beide den gleichen Sialinsäuregehalt besitzen (Barrabés et al. 2010). Anhand des Sialylierungsgrades eines Proteins wird versucht, vorherzusagen, inwieweit sich die Sialinsäuren auf den IP auswirken. Da sie bei den einzelnen Proteinen unterschiedliche Auswirkungen zeigen, sind allgemeingültige Aussagen nicht möglich (Wilson et al. 2002; Barrabés et al. 2010). In dieser Arbeit konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die einzelnen IPs auch mit einer Veränderung der Antennarität einhergehen. Je kleiner der IP der Proteinspezies, desto größer der Anteil an tri- und tetraantennären *N*-Glykanen (z. B. Abbildung 5-41). Bei den meisten Serumglykoproteinen, außer den Immunglobulinen (Arnold et al. 2007), könnte der IP der Proteinspezies anhand der Antennarität abgeleitet werden, da die komplexen *N*-Glykane dieser Proteine zu 90 % sialyliert sind (Wilson et al. 2002). Eine Erklärung für den hohen Sialylierungsgrad ist, dass die Glykoproteine mit freien Gal und GalNAc im Blutkreislauf durch den Asialoglykoproteinrezeptor erkannt werden. Dieser Rezeptor befindet sich in der Leber und sorgt dort für die Aufnahme der nicht vollständig sialylierten Glykoproteine, damit diese ab-

gebaut werden. Durch diesen Mechanismus wird die Serumhalblebenszeit der Serumglykoproteine reguliert (Ashwell and Harford 1982; Park et al. 2003).

6.6.2 Bedeutung einzelner *N*-Glykane und *N*-Glykangruppen

Der allgemeine Anstieg der antennären Fuc ist bei einzelnen Proteinen und im Gesamtserum zu beobachten. Die antennären Fuc sind ausschließlich α 1-3 und die Gal β 1-4-verknüpft. Diese Konstellation bildet die Lewis^x-Struktur. Wird ein α 2-3-gebundenes Neu5Ac zusätzlich verknüpft, handelt es sich um eine Sialyl-Lewis^x-Struktur. Die α 2-3 Sialyltransferase-IV ist für das α 2-3-verknüpfte Neu5Ac verantwortlich und bevorzugt dabei tri- und tetraantennäre *N*-Glykane (Nemansky et al. 1995). Diese Lewis^x-Strukturen sind bei Krebserkrankungen sowohl im Serum als auch am Karzinom selbst häufig erhöht (Dennis et al. 1999b; Arnold et al. 2008; Sarrats et al. 2010) (Kapitel 3.3.2 und 3.3.3). Dasselbe Phänomen wird bereits bei Akut-Phasen-Reaktionen durch temporäre und chronische Entzündungen beobachtet (Brinkman-van der Linden et al. 1998; Arnold et al. 2008; Sarrats et al. 2010). Inwieweit die Zunahme der Lewis-Epitope mit dem Karzinom selbst oder einer anderen Akut-Phasen-Reaktion assoziiert ist, wird derzeit noch diskutiert und konnte noch nicht eindeutig bewiesen werden.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass sich die Strukturen mit antennärer Fuc unterschiedlich signifikant Verhalten (Tabelle 5-3). Die Erhöhung des triantennären *N*-Glykans in der β 1-4-Variante mit einer antennären Fuc zeigt nur im Gesamtserum einen hohen signifikanten Unterschied zwischen der Ovarialkarzinom- und der Kontrollgruppe. Wahrscheinlich beruht dieser Effekt auf der allgemein gleichmäßigen Erhöhung dieser Struktur und der erhöhten Expression der Akut-Phasen-Proteine. Das biantennäre und tetraantennäre *N*-Glykan mit einer antennären Fuc ist sowohl bei einigen Proteinen als auch im Gesamtblutserum signifikant erhöht. Das tetraantennäre *N*-Glykan mit einer antennären Fuc zeigt die signifikanteste Veränderung im Vergleich der beiden Gruppen. Das triantennäre *N*-Glykan in der β 1-6-Variante mit einer antennären Fuc konnte in der Kontrollgruppe nur zu einem kleinen Anteil im Gesamtserum gefunden werden. Bei den einzelnen Proteinen wurde diese Struktur nur in der Ovarialkarzinomgruppe detektiert. Eine Addition aller Strukturen mit antennärer Fuc konnte die Signifikanz zwischen den beiden untersuchten Gruppen nicht erhöhen. Ein Biomarker, der allein auf dem Gehalt von Lewis^x-Strukturen ohne Betrachtung der restlichen Glykanstruktur beruht, wäre nicht sinnvoll, da sich die *N*-Glykane mit antennären Fuc unterschiedlich verhalten.

Das biantennäre *N*-Glykan mit *core*-Fuc zeigt Unterschiede im Gesamtserum und bei A1AG. Im Gesamtserum ist diese Struktur in einem niedrigeren (Abbildung 5-46), bei A1AG hingegen in einem erhöhten Ausmaß vorhanden (Abbildung 5-34, Tabelle 5-3). Für die *core*-Fuc ist die FucT-VIII (oder α 1,6FucT) verantwortlich (Miyoshi et al. 2008). Das Phänomen der erhöhten *core*-Fuc bei A1AG ist bereits für das Pankreaskarzinom beschrieben und als mehr karzinom- als entzündungsspezifisch charakterisiert (Sarrats et al. 2010). Beim Lungenkarzinom konnte ebenfalls ein erhöhter Wert für die *core*-Fuc bei mehreren Serumproteinen gefunden werden (Ueda et al. 2007). Als Biomarker bei der Diagnose des hepatozellulären Karzinoms hat sich die erhöhte *core*-Fuc am α -Fetoprotein bereits durchgesetzt (Mehta and Block 2008). Diese Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass das biantennäre *N*-Glykan mit *core*-Fuc am A1AG ein potenzieller Biomarker für das Ovarialkarzinom ist (Abbildung 6-2).

Triantennäre Strukturen mit der GlcNAc(β 1-4)-Variante an der dritten Antenne sind in ihren Signifikanzen zwischen Gesamtserum und Proteinen unterschiedlich. A1AG, AACT und TRFE zeigen einen ca. 50 % geringeren Anteil des triantennären *N*-Glykans der GlcNAc(β 1-4)-Variante ohne Fuc (Abbildung 5-34; Abbildung 5-41). Die triantennäre Grundstruktur mit der GlcNAc(β 1-4)-Verzweigung ist ebenfalls erniedrigt bei diesen Proteinen. Diese Beobachtungen sind jedoch im Gesamtserum nicht wiederzufinden (Abbildung 5-46). Das triantennäre *N*-Glykan der GlcNAc(β 1-4)-Variante mit einer antennären Fuc hingegen ist signifikant im Gesamtserum erhöht, jedoch nicht in dieser Bestimmtheit bei einem einzigen Protein (Tabelle 5-3). Deshalb sind triantennäre *N*-Glykans der GlcNAc(β 1-4)-Variante ungeeignet als Biomarker.

Die triantennären Strukturen mit der GlcNAc(β 1-6)-Variante an der dritten Antenne konnten allein durch die zuvor erfolgten CE-Untersuchungen identifiziert. Diese Strukturen sind nur in geringen Mengen bei den Serumglykoproteinen vorhanden. Die triantennäre Grundstruktur mit der GlcNAc(β 1-6)-Verzweigung ist bei A1AG, IC1, FETUA und HPT sowie im Gesamtserum signifikant erhöht (Tabelle 5-3). Im Vergleich dazu nimmt die zweite triantennäre Grundstruktur in der GlcNAc(β 1-4)-Variante ab. HPT besitzt einen hohen Anteil an triantennären Grundstrukturen mit der GlcNAc(β 1-6)-Variante und ist eines der am häufigsten vorkommenden Serumglykoproteine. Somit ist HPT der Hauptlieferant für diese Strukturen. Das dazugehörige *N*-Glykan mit antennärer Fuc ist fast ausschließlich in der Ovarialkarzinomgruppe zu finden. Auch hier lässt sich also eine Korrelation bei der Ovarialkarzinomentwicklung vermuten. Der Anstieg der triantennären Grundstruktur mit der GlcNAc(β 1-6)-Variante an der dritten Antenne ist auf eine erhöhte Aktivität der GnT-V zurückzuführen. Die GnT-V bevorzugt das triantennäre *N*-Glykan mit der GlcNAc(β 1-4)-

Variante als Substrat (Brockhausen et al. 1988) (Abbildung 3-7). Aufgrund dieser Substratspezifität sind die triantennären Strukturen mit der GlcNAc(β 1-6)-Variante an der dritten Antenne selten und somit ein direkter Nachweis der GnT-V-Aktivität. Eine erhöhte GnT-V-Aktivität wurde bereits bei vielen Karzinomen festgestellt und korreliert mit dem Metastasierungspotential vieler Zellen (Dennis et al. 1999b; Taylor and Drickamer 2003; Ihara et al. 2007) (Kapitel 3.3.1). Des Weiteren ist bei rekombinanten Glykoproteinen aus Krebszelllinien, wie HEK-239 oder *chinese hamster ovary* (Inoue et al. 1999; Shahrokh et al. 2010), das triantennäre *N*-Glykan der GlcNAc(β 1-6)-Variante die dominantere Form. Im Serumglykom hingegen ist das Verhältnis stark auf Seiten der GlcNAc(β 1-4)-Variante. Diese Fakten sprechen dafür, dass die triantennäre Grundstruktur mit der GlcNAc(β 1-6)-Variante an der dritten Antenne als mögliche Biomarker für das Ovarialkarzinom in Betracht zu ziehen ist. Um Einflüsse der Fuc auf die Statistik auszuschließen, sollte diese zukünftig vor der Messung abgespalten werden. Damit könnte außerdem das Messsignal erhöht werden. Bei den Serumproteinen A1AG, IC1, FETUA und HPT wäre eine Veränderung deutlich zu erkennen und könnte die Diagnostik erheblich verbessern (Abbildung 6-2).

Die tetraantennären Strukturen haben sich sowohl im Gesamtserum als auch bei den Proteinen am deutlichsten und signifikantesten verändert (Tabelle 5-3). Die Erhöhung des tetraantennären *N*-Glykans mit einer antennären Fuc ist bei HPT, A1AT und AACT sowie im Gesamtserum gut zu erkennen. Diese Strukturerrhöhung wird durch die erhöhten Aktivitäten der GnT-V und der FucT für antennäre Fuc (Kapitel 6.6.2) verursacht. Da das tetraantennäre *N*-Glykan fast ausschließlich antennäre Fuc trägt, ist diese Veränderung auch im MALDI-Spektrum detektierbar. Das tetraantennäre *N*-Glykan mit einer antennären Fuc könnte auch einen möglichen Biomarker für das Ovarialkarzinom darstellen. Dieser ist sowohl im Gesamtserum als auch bei HPT, A1AT und AACT messbar, was für einen Einsatz dieses Glykans als Marker spricht (Abbildung 6-2).

Das tetraantennäre *N*-Glykan mit drei antennären Fuc wurde ausschließlich in der Ovarialkarzinomgruppe gefunden, jedoch nicht mit hohem signifikantem Unterschied, weil diese Struktur häufig einen Anteil von unter 0,2 % einnimmt. Am besten konnte die Veränderung bei AACT beobachtet werden. *N*-Glykane, die nur bei Karzinomen zu finden sind, sind sehr selten (Varki et al. 2009). Ein Antikörper gegen dieses tetraantennäre *N*-Glykan mit drei antennären Fuc könnte zukünftig zur Detektion entwickelt werden. Damit wäre eine schnelle und einfache Kontrolle der Karzinome möglich (Abbildung 6-2).

6.6.3 Zusammenfassung und Ausblick

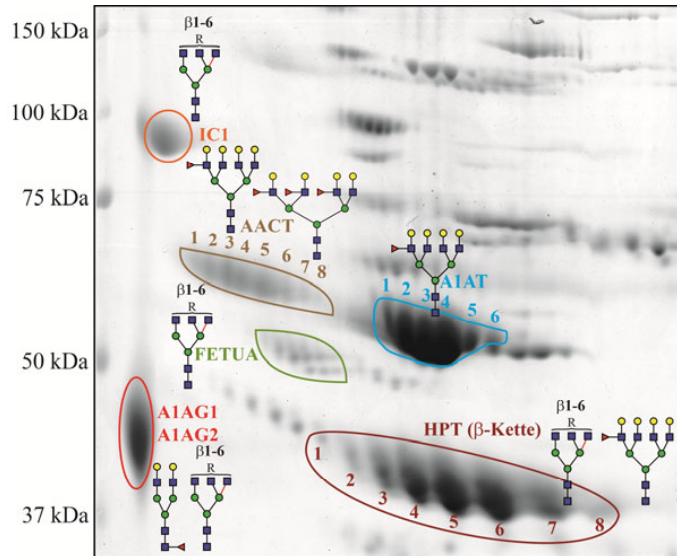
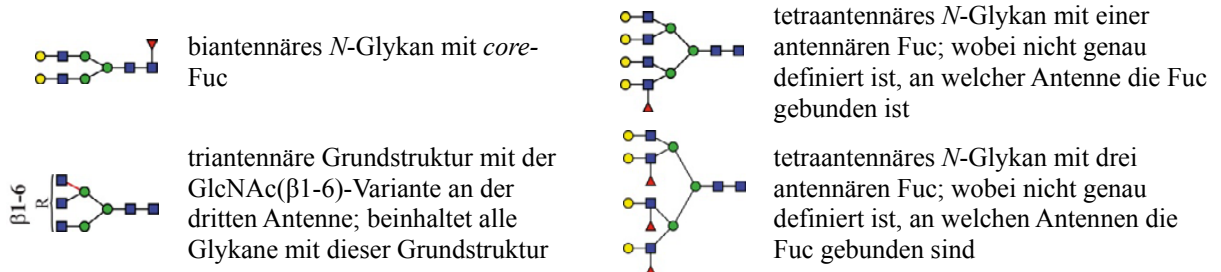


Abbildung 6-2: Lokalisation der möglichen Glyko-Biomarker und ihrer Proteine im 2D-Gel



Der IPG-Streifen waren 18 cm lang und hatten einen pH-Gradienten von vier bis sieben. Gezeigt wird der pH-Bereich von vier bis ca sechs. Das SDS-PAGE-Gel war 10 %ig und wurden mit Coomassie gefärbt.

In dieser Arbeit konnten vier mögliche Biomarker für das Ovarialkarzinom detektiert werden: das biantennäre *N*-Glykan mit *core*-Fuc, die triantennäre Grundstruktur in der GlcNAc(β1-6)-Variante an der dritten Antenne, das tetraantennäre *N*-Glykan mit einer antennären Fuc und das tetraantennäre *N*-Glykan mit drei antennären Fuc (Abbildung 6-2). Bis auf die Erhöhung des biantennären *N*-Glykans mit *core*-Fuc konnten diese Ergebnisse auch im Gesamtserum gefunden werden. Alle haben ein hohes Potenzial für den diagnostischen Einsatz und sollten daher zukünftig im Detail weiteranalysiert werden.

In der Literatur beschriebene Untersuchungen von Serumglykoproteinen von Patientinnen mit Ovarialkarzinom zeigen eine erhöhte Fucosylierung und einen erhöhten GlcNAc-Gehalt bei HPT und A1AT (Thompson et al. 1992; Turner et al. 1995). Diese Ergebnisse beruhen jedoch nur auf einer Monosaccharidanalyse. Weiterhin wird eine Erhöhung der Sialyl-Lewis^x-Strukturen bei A1AG, HPT und AACT sowie im Gesamtserum beschrieben (Saldova et al. 2007). In der Summe sprechen alle Ergebnisse für eine Zunahme der antennären Fuc beim Ovarialkarzinom, die allerdings auch bei entzündlichen Prozessen im Körper erhöht sein kann (Brinkman-van der Linden et al. 1998).

Das biantennäre *N*-Glykan mit *core*-Fuc und die triantennäre Grundstruktur mit der GlcNAc(β1-6)-Variante an der dritten Antenne sind aufgrund der erhöhten GnT-V und FucT-VIII Aktivität schon in direktem Zusammenhang mit einer Karzinomart diskutiert worden (Dennis et al. 1999b; Ihara et al. 2007; Ueda et al. 2007; Mehta and Block 2008; Abbott et al. 2010; Sarrats et al. 2010). Beim Ovarialkarzinom konnte bereits eine erhöhte GnT-V Aktivität beim muzinösen Adenokarzinom (Takahashi et al. 2009) und eine erhöhte FucT-VIII Aktivität beim serösen Adenokarzinom nachgewiesen werden (Takahashi et al. 2000). Beim endometrioiden Ovarialkarzinom konnte eine Hochregulierung der Gene *magt5* und *fut8* nachgewiesen werden (Abbott et al. 2008). Weiterhin wurde bereits eine erhöhte HPT-Expression in Ovarialkarzinomen mittels immunhistologischen Methoden gezeigt (Ahmed et al. 2004). Eine andere Möglichkeit wie das Ovarialkarzinom Einfluss auf die Leber ausübt, wurde kürzlich gezeigt. Dabei setzt das Ovarialkarzinom proinflammatorisches Zytokin Interleukin-6 frei (Stone et al. 2012), welches in der Leber nicht nur eine Akut-Phasen-Reaktion sondern auch eine Veränderung der Glykosylierung von HPT hervorruft (Narisada et al. 2008; Bones et al. 2011). Ob die veränderten Glykoproteine vom Karzinom oder aus der Leber stammen, wurde nicht untersucht.

Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Unterschiede konnten weitestgehend bei den Serumglykoproteinen und im Gesamtserum nachgewiesen werden, da in dieser Arbeit untersuchten Proteine zu den am häufigsten vorkommenden Vertretern im Serum gehören. Jedoch weist das Serumproteom ein sehr hohes Konzentrationsgefälle auf. Während Albumin in Konzentrationen von 55 mg/mL vorliegt, sind andere Analyten nur in Mengen von ca. 10 pg/mL vorhanden. Es sind mehr als 250 Primärproteine bekannt (Anderson et al. 2004). Zur Erforschung der niedrig konzentrierten Proteine, müssen die höher exprimierten Serumproteine entfernt werden. Dazu steht beispielsweise das *Multiple Affinity Removal System*, besser bekannt als MARS, oder das ProteoMiner zur Verfügung. Kürzlich wurde gezeigt, dass nach Entfernung der 12 häufigsten Serumproteine andere Serumglykoproteine detektiert werden konnten, bei denen die Erhöhung der Lewis^x-Strukturen mehr pankreaskarzinom- als entzündungsspezifisch ist (Sarrats 2010). Dies ließe in Zukunft auch bessere Erkenntnisse in Bezug auf die karzinomassoziierten Veränderungen des Glykanprofils zu.

6.7 Detektion von O-Glykosylierungsstellen

Eine Ziel dieser Arbeit war es, die Detektion von O-Glykosylierungsstellen durch eine Eintopfreaktion zu ermöglichen. Dazu reagiert das durch die β -Eliminierung entstehende Michael-System mit einem Thiol, an dem ein Biotin kovalent gebunden ist (Abbildung 5-48). Eine Thiol-Gruppe wurde verwendet, da die Anionen dieser Gruppe gute Nukleophile darstellen. Um die Komplexität der Probe für die massenspektroskopische Untersuchung zu reduzieren und die markierten Peptide spezifisch zu isolieren, wurde ein Biotin-*Linker* synthetisiert. Zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit benötigt das Reagenz einen zusätzlichen *spacer* (Abbildung 5-49, Abbildung 5-50). Das Konzept ist dem der ICAT-Technologie ähnlich (Shiio and Aebersold 2006).

Die ersten Versuche mit dem doppelten Glycin-*spacer* zeigten, dass es grundsätzlich möglich ist, die O-Glykosylierungsstellen über die Michael-Addition und Biotin-Markierung zu identifizieren. Der spätere PEG-*spacer* sollte kein Problem darstellen, da dieser bereits für die Detektion von Phosphoserin und -threonin beschrieben ist (Goshe et al. 2001; Oda et al. 2001). Der Glycin-*spacer* wurde gegen den PEG-*spacer* ausgetauscht um Fehlinterpretationen der Peptidfragmentierung im MS zu vermindern. Zwei Basen, Ammoniak (Hanisch et al. 2001) und Bariumhydroxid (Byford 1991) wurden getestet. Ammoniak wird häufig für die Abspaltung von O-Glykanen genutzt, wobei dabei die O-Glykane und nicht das Peptid untersucht werden. Bariumhydroxid wird bei der β -Eliminierung von Phosphoproteinen eingesetzt. Der Vorteil von Bariumhydroxid ist, dass unter diesen Bedingungen das Michael-System stabil ist und nicht nucleophil angegriffen wird (Rusnak et al. 2004). Um eine weitere Nebenreaktion auszuschließen, sollten alle freien Amine vor der β -Eliminierung acetyliert werden. Denn die unerwünschte Quervernetzung von Proteinen durch die Reaktion vom Dehydroalanin mit der ϵ -Aminogruppe des Lysin zum Lysinoalanin ist in der Nahrungsmittelverarbeitung bekannt (Friedman 1999).

Weiterhin stellte sich heraus, dass ein Gemisch von unterschiedlich schweren Biotin-Thiol-Reagenzien die Identifizierung erheblich erleichtert. Dazu könnte ein PEG₂- und PEG₃-*spacer* verwendet werden. Ähnliches wurde bereits für die Analyse von phosphorylierten Peptiden vorgeschlagen (Mano et al. 2009). Eine Verwendung von Isotopen wie bei ICAT wäre in diesem Fall nicht sinnvoll, da kein Vergleich unterschiedlicher Proben durchgeführt wird.

Die Herausforderung dieser Methode war die Isolation der biotinmarkierten Proteine und Peptide. Die verwendete *Monomeric Avidin-Agarose* ist nicht das geeignete Chromato-

graphiematerial. Mehrfach biotinmarkierte Proteine und Peptide eluieren kaum bis gar nicht und die Standardelutionspuffer erwiesen sich als nachteilig für die spätere MALDI-TOF-MS-Messung aus. Eine Alternative dazu wäre die Verwendung von ICAT-Avidin (Yi et al. 2005; Shiio and Aebersold 2006) oder *immobilized NeutrAvidin* (Oda et al. 2001), welche mit flüchtigen Elutionspuffern aus AcN und TFA kompatibel sind. Die Probleme, dass doppelt biotinylierte Peptide auf dem Chromatographiematerial hängen bleiben können und das Biotin die massenspektrometrische Untersuchung stört, sind damit nicht gelöst. Zur Lösung dieser Probleme ist ein abspaltbarer Biotin-*Linker* nötig. Für einen säurelabilen *Linker* können Carbamate (Fauq et al. 2005) und für einen photolabilen *Linker* o-Nitrobenzylgruppen verwendet werden (Zhou et al. 2002). Um die Bindungsstärke zwischen dem Avidin und dem biotinmarkierten O-Glykanpeptid zu verringern könnte statt dem Biotin ein Streptavidin-Binde-Tag verwendet werden. Dafür könnte der Nano-Tag oder SBP-Tag verwendet werden. Andere in Frage kommende Affinitäts-Tags, welche auf Aminosäuresequenzen basieren, sind S-Tag, Flag-Tag und Calmodulin-Binde-Peptide (Terpe 2003; Terpe 2007). Diese Aminosäure-Tags müssten allerdings vor der massenspektrometrischen Untersuchung entfernt werden.

7 Material und Methoden

7.1 Materialien

7.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Alle hier nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

- 1,4-Dithioerythrit (DTE) Sigma-Aldrich, Steinheim
- 1-Hydroxybenzotriazol-Anhydrid, #081133 Biosolve, Valkenswaard (Niederlande)
- 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure Sigma-Aldrich, Steinheim
- 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) Sigma-Aldrich, Steinheim
- 2-Methyl-2-butanol (*tert-Amylalkohol*) Fluka, Buchs (CH)
- 96-well DuoPlate (PCR-Platte) Vollrand, 200 μ L, #72.1964.202 Sarstedt, Nümbrecht
- 96-well PP Mikrotiterplatte mit V-Boden, #651201 Greiner Bio-One, Frickenhausen
- 96-well Storage Plate, Rundboden, 0.8mL, #AB-0765 Thermo Scientific, Bonn
- Aceton Sigma-Aldrich, Steinheim
- AcroPrep 96-well Filterplatten 0.2 μ m GHP Membran, 350 μ L, #5045 Pall, Dreieich
- AcroPrep 96-well Filterplatten 0.45 μ m Supor Membran, 350 μ L, #5029 Pall, Dreieich
- Acrylamid (4xkrist) Roth, Karlsruhe
- Agarose (NEEO Ultra-Qualität) Roth, Karlsruhe
- Albumin Fraktion V Sigma-Aldrich, Steinheim
- alpha-1-Antitrypsin from human plasma, #A6150 Sigma-Aldrich, Steinheim
- alpha-1-saures-Glykoprotein human isoliert von humanem Serum im Labor
- Aluminumsulfat-(14-18)-Hydrat AppliChem, Darmstadt
- Amicon Ultra-0.5, *Ultracel-10 Membrane*, 10 kDa Millipor, Schwalbach
- APTS (*8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt*) Sigma-Aldrich, Steinheim
- Arabinosazon (Ara) Dr. Matthias Kaup, Charité Berlin
- *Aurum Serum Protein Kit* Bio-Rad, München
- Bio-Lyte 3-10; 40 % (Ampholyte) Bio-Rad, München
- Biotin Roth, Karlsruhe
- Bisacrylamid (2K) AppliChem, Darmstadt
- Bromphenolblau AppliChem, Darmstadt

➤ BSA-Biotin frei	Roth, Karlsruhe
➤ Calbiosorb Adsorbent	Calbiochem, Darmstadt
➤ Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
➤ Carbograph (Grafit)	Grace, Deerfield (USA)
➤ <i>Carbohydrate Separation Buffer</i>	Beckman Coulter, Krefeld
➤ Cellulose mikrokristallin	Merck, Darmstadt
➤ <i>Coomassie Biosafe</i>	Bio-Rad, München
➤ Cysteamin-2-chlorotriyl-Harze	Merck, Darmstadt
➤ Dextranhydrolysat (DH), Kalibrierstandard	Oxford Glycosystems, Oxford (UK)
➤ Dichlormethan	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
➤ Diisopropylethylamin, #367840500	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
➤ Dimethylformamid	Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
➤ Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
➤ Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
➤ <i>Disposable Columns</i> , 2mL, Polystyrensäule mit Polyethylenfilter #29920	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
➤ <i>Enchant Multi-Protein Affinity Separation Kit</i>	Pall, Dreieich
➤ EPPS (3-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-propansulfonsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
➤ Ethylenglycol	AppliChem, Darmstadt
➤ <i>Fetuin from fetal calf serum</i> , #F2379	Sigma-Aldrich, Steinheim
➤ Filterspitze #765288 FT10E	Greiner Bio-One, Frickenhausen
➤ Fmoc-Gly-OH, #852001	Merck, Darmstadt
➤ Fmoc-O ₂ Oc-OH #FAA1435.0005	Iris Biotech, Marktredwitz
➤ <i>Glow Writer</i> , GLWR-1000	Diversified Biotech, Dedham (USA)
➤ Glycerin (Glycerol)	Fluka, Buchs (CH)
➤ Glycin zur Synthese	Roth, Karlsruhe
➤ Haptoglobin, Mixed Type, Human Plasma	EMD Chemicals, Gibbstown (USA)
➤ HBTU, #851006	Merck, Darmstadt
➤ Immobiline DryStrip	GE Healthcare, München
➤ Immobilon-P-Membran, PVDF-Membran, #42581.01	Serva, Heidelberg
➤ Iodacetamid	Sigma-Aldrich, Steinheim

- IPG-Streifen, Immobiline DryStrip, 18 cm GE Healthcare, München
- Kunststoffsäule, #210208 Grace Alltech, Geerfield (USA)
- *Extract-Clean Empty Reservoirs*, Polypropylene ICN Biochemicals, Solon (USA)
- *Lactoferrin from bovine milk* #02152333
- Lithiumacetat Sigma-Aldrich, Steinheim
- Maltoheptaose Sigma-Aldrich, Steinheim
- Methyljodid (Jodmethan) Sigma-Aldrich, Steinheim
- Methyl- α -D-mannopyranosid Fluka, Steinheim
- *Monomeric Avidin-Agarose*, #20228 Pierce, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
- *N*-Acetyl-D-glucosamin Sigma-Aldrich, Steinheim
- Natriumchlorid Roth, Karlsruhe
- Natriumcyanoborhydrid Fluka, Buchs (CH)
- Nonidet P-40 Roche, Mannheim
- OGP (n-Octyl- β -D-glucopyranosid) Roth, Karlsruhe
- *Peptide Calibration Standard* Bruker Daltonics, Bremen
- Piperidin Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
- Polyethylenoxid (mittleres Molekülmasse 300000) Sigma-Aldrich, Steinheim
- *Precision Plus Protein Standards* Bio-Rad, München
- *Pro Q Emerald 300 Glycoprotein Gel and Blot Stain Kit* Invitrogen, Karlsruhe
- *PROSEP-PB* Millipore, Schwalbach
- *ProteoPrep Reduction and Alkylation Kit* Sigma-Aldrich, Steinheim
- *reversed-phase extract-clean columns*, Standard C18, 100 mg 1,5mL, #205000 Grace Alltech, Geerfield (USA)
- *RNase B from bovine Pancreas* #R7884 Sigma-Aldrich, Steinheim
- SDS (Natriumdodecylsulfat) Serva, Heidelberg
- Serva Blue G (*Coomassie Brilliant Blue G-250*) Serva, Heidelberg
- Sorbit Roth, Karlsruhe
- Streptavidin-Peroxidase (HRP) Sigma-Aldrich, Steinheim
- *strong cation exchange spin columns, mini*, #90008 Pierce, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
- *Sulfo-NHS-SS-Biotin and Biotinylation Kit*, #21328 Pierce, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
- super DHB Sigma-Aldrich, Steinheim
- *SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate* Pierce, Thermo Fisher Scientific, Schwerte

- Tetrahydrofuran Sigma-Aldrich, Steinheim
- TopTip Carbon Glygen, Columbia (USA)
- Transferrin human, #T3309 Sigma-Aldrich, Steinheim
- Tributylphosphin Sigma-Aldrich, Steinheim
- Tris Ultra Qualität Roth, Karlsruhe

7.1.2 Enzyme

- Asp-N, #11054589001 Roche, Mannheim
- Neuraminidase (Sialidase) (*Arthrobacter ureafaciens*) Roche, Mannheim
- N-Glycosidase F (PNGase F) (aus *Flavobacterium meningosepticum* expremiert in *E. coli*) Roche, Mannheim
- *sequencing grade modified* Trypsin Promega, Madison (USA)
- *Trypsin TPCK Treated* Sigma-Aldrich, Steinheim
- Zellulase aus *Aspergillus niger* Sigma-Aldrich, Steinheim
- α (1-2,3,4,6) Fucosidase (*Bovine Kidney*) Prozyme, San Leandro (USA)
- α (1-3,4) Fucosidase (*Streptomyces sp.* 142) Prozyme, San Leandro (USA)
- α 1-2 Fucosidase (*Xanthomonas manihotis*) Prozyme, San Leandro (USA)
- β (1-3,4) Galactosidase (*Bovine Testis*) Prozyme, San Leandro (USA)
- β (1-3,6)-Galactosidase (rekombinant in *E. coli*) Merck, Darmstadt
- β 1-4 Galactosidase (*Streptococcus pneumoniae*) Prozyme, San Leandro (USA)
- β -N-Acetylhexosaminidase (*Jack Bean*) Prozyme, San Leandro (USA)
- β -N-Acetylhexosaminidase (aus *Streptococcus pneumoniae* expremiert in *E. coli*) Prozyme, San Leandro (USA)

7.1.3 Lektine

- Concanavalin A (ConA from *Canavalia ensiformis*) Sigma-Aldrich, Steinheim
- *Lens culinaris* Agglutinin (LcH) EY Laboratories, SanMateo (USA)
- *Lotus tetragonolobus* Agglutinin (Lotus) EY Laboratories, SanMateo (USA)

- *Maackia amurensis* Agglutinin (MAA) EY Laboratories, SanMateo (USA)
- Phytohemagglutinin-L (PHA-L from *Phaseolus vulgaris*) EY Laboratories, SanMateo (USA)
- *Sambucus nigra* Agglutinin (SNA-I) EY Laboratories, SanMateo (USA)
- *Triticum vulgare* Agglutinin; *Wheat Germ* Agglutinin (WGA) Sigma-Aldrich, Steinheim

7.1.4 Geräte, Software und Datenbanken

- 32Karat Version 8.0 Beckman Coulter, Krefeld
- Agilent 6210 ESI-TOF Agilent Technologies, Santa Clara (USA)
- *AnchorChip Target* (800er) Bruker Daltonics, Bremen
- BioTools 3.1 Bruker Daltonics, Bremen
- CarboPac PA200 *Carbohydrate Column* (250 × 3 mm) Dionex, Germering
- CarboPac PA200 *Carbohydrate Column* (50 × 3 mm) Dionex, Germering
- ChemSketch Advanced Chemistry Development, Toronto (CDN)
- Chromeleon 6.80 Dionex, Germering
- EVOware 2.0 Plus Tecan, Männedorf (CH)
- EVOware Standard Tecan, Männedorf (CH)
- ExPASy (<http://expasy.org/>) Swiss Institute of Bioinformatics (CH)
- EXQuest *Spot Cutter* Bio-Rad, München
- FlexAnalysis 3.0 & FlexControl 3.0 Bruker Daltonics, Bremen
- GlycoPeakFinder (www.eurocarbodb.org) EuroCarbDB
- GlycoWorkbench (www.eurocarbodb.org) EuroCarbDB
- *Ground Steel Target* Bruker Daltonics, Bremen
- GS 800 (Gelscanner) Bio-Rad, München
- ICS-3000 (*High Performance Ion Chromatography*) Dionex, Germering
- ISIS Draw 2.4 MDL Information Systems, Hayward (USA)
- Jmol 12.0 (3D-Molekülbetrachter) <http://www.jmol.org/>
- Kapillarelektrophorese P/ACE MDQ DNA System Beckman Coulter, Krefeld
- Kühlfalle Unicryo MC2 × 2l -60 °C Uniequip, Planegg
- Magellan V 6.4 Tecan, Männedorf (CH)
- MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer Ultraflex III Bruker Daltonics, Bremen

- Mascot (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html) Matrix Science, London (UK)
- Mikroplattenphotometer Infinite M200 Tecan, Männedorf (CH)
- Mini-PROTEAN Bio-Rad, München
- PDQuest 8.0.1 Bio-Rad, München
- PROTEAN II System für 2D-Gele Bio-Rad, München
- Quantity One 4.6.3 Bio-Rad, München
- Tecan Freedom EVO 200 Tecan, Männedorf (CH)
- Vakuumzentrifuge Univapo 150 ECH Uniequip, Planegg
- VersaDoc Bio-Rad, München

7.1.5 Zelllinien

- HEK-293 (humane embryonale Nierenzellen) DSMZ, Braunschweig
- AGE1.HN (humane neuronale Zelllinie) entwickelt von ProBioGen AG, Berlin (Dr. Volker Sandig)

7.1.6 Blutserumproben

Alle verwendeten Blutserumproben stammen von weiblichen Probandinnen. Weitere wichtige Daten sind in Tabelle 7-1 aufgelistet. (OvK = Ovarialkarzinom)

Tabelle 7-1: Verwendete Blutserumproben

Phänotyp	Geburtsjahr der Patientinnen	CA-125 (U/mL)	Stadium des OvK
Ovarialkarzinom	1964	3842	4
Ovarialkarzinom	1950	1580	3c
Ovarialkarzinom	1963	1184	2c
Ovarialkarzinom	1957	8540	1
Ovarialkarzinom	1952	keine Angabe	3c
Kontrolle (gesund)	1966	/	/
Kontrolle (gesund)	1963	/	/
Kontrolle (gesund)	1944	/	/
Kontrolle (gesund)	1953	/	/
Kontrolle (gesund)	1959	/	/

7.2 Methoden

7.2.1 Borat-Chromatographie

PROSEP-PB ist ein Chromatographiematerial bei dem 3-Aminophenylborsäure an Glas gebunden ist. Zur Vorbereitung wird 1 mL Säulenmaterial (2,5 cm Säulenhöhe, Leersäule 2 mL Pierce) mit 1 mL Bindungspuffer ($c_{\text{(EPPS)}} = 0,05 \text{ mol/L}$; $\text{pH} = 8,4$) und 1 mL Elutionspuffer ($c_{\text{(Sorbit)}} = 0,1 \text{ mol/L}$, $c_{\text{(Harnstoff)}} = 8 \text{ mol/L}$) gewaschen. Anschließend wird mit dreimal 1 mL Bindungspuffer equilibriert. Die Probe wird in Bindungspuffer auf die Säule gegeben. Nach einer Wartezeit von 20 min wird mit viermal 500 μL Bindungspuffer gewaschen. Die Elution erfolgt mit dreimal 500 μL Elutionspuffer.

7.2.2 Lektin-Chromatographie

Von jedem Lektin-Chromatographiematerial werden 2 mL (2,0-2,5 cm Säulenhöhe, Leersäule 2 mL Pierce) verwendet. Diese Säulen werden dreimal mit 2 mL 1,4 mol/L NaCl gewaschen und danach mit dreimal 2 mL Bindungspuffer für die Chromatographie vorbereitet (Tabelle 7-2). Die 100 μL Serumproben werden mit 900 μL Bindungspuffer verdünnt und 5 min auf Eis im Ultraschallbad behandelt. Die Probe wird auf die Säule überführt und 20 min inkubiert. Die Säule wird mit dreimal 2 mL Bindungspuffer gewaschen und die Proteine werden mit insgesamt 2,5 mL Elutionspuffer eluiert (Tabelle 7-2). Die Säule wird mit 1,4 mol/L NaCl und Bindungspuffer regeneriert.

Tabelle 7-2: Puffer für Lektin-Chromatographie. Die Herstellerpuffer sind von EY Laboratories, SanMateo (USA)

Lektin	Bindungspuffer	Elutionspuffer
Con A	20 mmol/L Tris/HCl 300 mmol/L NaCl 1 mmol/L Mn ₂ Cl 1 mmol/L CaCl ₂ pH = 7,5	100 mmol/L Methyl- α -D-mannopyranosid in Bindungspuffer
LcH	50 mmol/L Tris 150 mmol/L NaCl pH = 7,0-7,2 (Herstellerpuffer)	200 mmol/L D-Man in Bindungspuffer (Herstellerpuffer)
Lotus	100 mmol/L Phosphatpuffer 150 mmol/L NaCl pH = 7,2-7,4 (Herstellerpuffer)	200 mmol/L L-Fuc in Bindungspuffer (Herstellerpuffer)
MAA	100 mmol/L Phosphatpuffer 150 mmol/L NaCl pH = 7,2-7,4 (Herstellerpuffer)	100 mmol/L Glycin 20 mmol/L Ethylendiammin in Bindungspuffer gelöst, pH = 9,0 (Herstellerpuffer)
PHA-L	100 mmol/L Phosphatpuffer 150 mmol/L NaCl pH = 7,2-7,4 (Herstellerpuffer)	100 mmol/L Glycin pH = 3,5-4,0 (Herstellerpuffer)
SNA-I	100 mmol/L Phosphatpuffer 150 mmol/L NaCl pH = 7,2-7,4 (Herstellerpuffer)	100 mmol/L Lactose in Bindungspuffer (Herstellerpuffer)
WGA	100 mmol/L Phosphatpuffer 150 mmol/L NaCl pH = 7,2-7,4 (Herstellerpuffer)	200 mmol/L GlcNAc in Bindungspuffer (Herstellerpuffer)

7.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird die Kalibrierung mit 10-100 μ g/mL Albumin durchgeführt. 20 μ L Standard oder Probe werden jeweils mit 80 μ L Bradfordreagenz (β (Coomassie-Brillant-Blau G-250) = 0,1 g/L; σ (Phosphorsäure) = 100 mL/L; σ (Ethanol) = 50 mL/L; über 0,2 μ m filtriert) in einer 96-*well* Platte gemischt und nach 3-5 min bei 595 nm vermessen.

7.2.4 SDS-PAGE und Färbung mit Coomassie Biosafe und Densitometrie

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte durch eine Elektrophorese nach Lämmli (1970). Dazu wird ein ca 7 \times 8 cm großes SDS-PAGE-Gel aus einer 30 % Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (30 % T; 2,67 % C) gegossen. Das Sammelgel enthält 4 % und das Trenngel in der Regel 10 % Acrylamid-Bisacrylamid. Die Probe wird vor der Überführung auf das Gel 5 min bei 95 °C in SDS-Probenpuffer mit DTE erwärmt. Als Größenstandard dient der *Precision Plus Protein-Standard*. Die Proteine werden durch 1 min bei 200 V, 20 min bei 20 V und 30 bis 45 min bei 200 V im elektrischen Feld getrennt. Nach dem Lauf

wird das Gel dreimal 5 min mit Wasser gewaschen, 1 h in *Coomassie Biosafe* gefärbt und über Nacht in Wasser entfärbt.

Die Coomassie gefärbten Gele werden mit dem Gelscanner GS 800 eingescannt und mittels des Programms Quantity One analysiert. Anhand der Färbung kann eine densitometrische Bestimmung durchgeführt werden.

7.2.5 Western-Blot und Immunodetektion

Nach der SDS-PAGE und der Färbung mit Coomassie Biosafe wird das Gel 15 min mit 50 % AcN entfärbt, 30 min in 20 g/L SDS gelagert, 15 min mit SDS-Laufpuffer (Kapitel 7.2.4) sowie 5 min im Blotpuffer ($\beta_{(\text{Tris})} = 3,02 \text{ g/L}$; $\beta_{(\text{Glycin})} = 8,54 \text{ g/L}$; $\sigma_{(\text{Ethanol})} = 100 \text{ mL/L}$) inkubiert. Die Proteine werden 1 h bei 250 mA in gekühltem Puffer auf eine Immobilon-P PVDF-Membran geblottet. Die Membran wird nach dem Blotten mit TBS ($\beta_{(\text{Tris})} = 2,24 \text{ g/L}$; $\beta_{(\text{NaCl})} = 8,0 \text{ g/L}$, pH = 7,0) gewaschen, eine Stunde mit biotinfreiem BSA ($\beta_{(\text{BSA})} = 50 \text{ g/L}$ in TBS) geblockt und erneut mit TBS gewaschen. Die biotinmarkierten Proteine werden mit Streptavidin, das mit der Meerrettichperoxidase kovalent verbunden ist, detektiert. Die Streptavidin-Peroxidase wird 1:10000 in TBS verdünnt für eine Stunde auf die Membran gegeben. Gewaschen wird einmal mit TBS sowie fünfmal fünf Minuten mit 0,1 % Tween 20 in TBS. Auf der trockenen Membran wird der *Precision Plus Protein* Standard mit einem *Glow Writer* nachgezeichnet. Für die Chemilumineszenz wurde das *SuperSignal West Pico Chemiluminescent* (Pierce) und das VersaDoc (Bio-Rad) zur Dokumentation verwendet.

7.2.6 2D-Gelelektrophorese

Die Albumin- und die IgG-Menge aus 40 μL Blutserum wird mit dem *Enchant Multi-Protein Affinity Separation Kit* reduziert. Die 250 μL Durchlauf und die 250 μL Waschfraktion werden vereinigt und die Proteinlösung wird mit dem *ProteoPrep Reduction and Alkylation Kit* behandelt. Zur Entsalzung der Probe werden die Proteine mit eiskaltem Aceton ausgefällt. Die Endkonzentration beträgt 80 % Aceton. Die Fällung wird über Nacht bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Am nächsten Tag werden die Proteine bei 4500 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird 15 min unter Vakuum getrocknet.

Die 18 cm langen Streifen mit immobilisiertem pH-Gradient (IPG) pH 4-7 oder pH 3-10 (nicht linear) werden mit 500 μL Rehydrationspuffer ($c_{(\text{Harnstoff})} = 7 \text{ mol/L}$; $c_{(\text{Thioharnstoff})} = 1 \text{ mol/L}$; $\beta_{(\text{CHAPS})} = 40 \text{ g/L}$; $\beta_{(\text{DTE})} = 1 \text{ g/L}$; $\varphi_{(\text{Ampholyte})} = 0,7 \%$; $\beta_{(\text{Bromphenolblau})} = 0,025 \text{ g/L}$) für 16 h gequollen. Das Probenpellet wird mit 110 μL Re-

hydrationspuffer gelöst und kathodisch durch *cup loading* auf den IPG-Streifen aufgetragen. Die Bedingungen bei der isoelektrischen Fokussierung sind in Tabelle 7-3 dargestellt.

Tabelle 7-3: Isoelektrische Fokussierung von 18 cm IPG-Streifen

Zeit oder Voltstunden	Spannung	Gradient
4 bis 6 h	200 V	schnell
1 h	500 V	schnell
4 h	1000 V	linear
3 h	5000 V	linear
40000 Vh	10000 V	schnell
99 h (Haltespannung)	500 V	schnell

Für die zweite Dimension wird ein ca. 19 × 19 cm großes 10 %iges SDS-PAGE-Gel verwendet. Bevor der IPG-Streifen auf das SDS-PAGE-Gel überführt wird, muss dieser 15 min in Äquilibriumspuffer-I ($\beta_{(\text{DTE})} = 10 \text{ g/L}$; $c_{(\text{Harnstoff})} = 6 \text{ mol/L}$; $\beta_{(\text{Glycerol})} = 300 \text{ g/L}$; $\beta_{(\text{SDS})} = 40 \text{ g/L}$; $c_{(\text{Tris})} = 0,05 \text{ mol/L}$; pH 8,8) und weitere 15 min in Äquilibriumspuffer-II ($\beta_{(\text{Iodacetamid})} = 40 \text{ g/L}$; $c_{(\text{Harnstoff})} = 6 \text{ mol/L}$; $\beta_{(\text{Glycerol})} = 300 \text{ g/L}$; $\beta_{(\text{SDS})} = 40 \text{ g/L}$; $c_{(\text{Tris})} = 0,05 \text{ mol/L}$; pH 8,8) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert werden. Die IPG-Streifen werden mit *Overlay Agarose* ($\beta_{(\text{Agarose})} = 5 \text{ g/L}$; $\beta_{(\text{Bromphenolblau})} = 0,25 \text{ g/L}$ in 1× SDS-Laufpuffer) auf dem SDS-PAGE-Gel fixiert. Die Laufbedingungen sind in Tabelle 7-4 beschrieben.

Tabelle 7-4: SDS-PAGE von 2D-Gelen

Spannung, Stromstärke oder Leistung	Zeit
200 V	2 min
20 V	20 min
10 mA pro Gel	1 h
2 W pro Gel	16 h

Nach der SDS-PAGE wird das Gel mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt. Dazu wird das Gel 30 min fixiert ($\sigma_{(\text{Ethanol})} = 500 \text{ mL/L}$; $\sigma_{(\text{Phosphorsäure})} = 30 \text{ mL/L}$); zweimal 10 min mit Wasser gewaschen; 3,5 h gefärbt ($\beta_{(\text{Coomassie-Brillant-Blau G-250})} = 0,2 \text{ g/L}$; $\beta_{(\text{Aluminumsulfat-(14-18)-Hydrat})} = 50 \text{ g/L}$; $\sigma_{(\text{Phosphorsäure})} = 30 \text{ mL/L}$; $\sigma_{(\text{Ethanol})} = 100 \text{ mL/L}$) (Kang et al. 2002) und über Nacht mit Wasser entfärbt. Dokumentiert wird das 2D-Gel mit dem Gelsanner GS-800.

7.2.7 Fluoreszenzfärbung von Glykoproteinen

Das Gel wird nach der SDS-PAGE, in Wasser für 5 min gewaschen und entsprechend der Herstellervorschrift zum Pro-Q Emerald 300-Kit behandelt. Im Anschluss erfolgt die Dokumentation mit dem Imaging-System VersaDoc. Die Anregung erfolgt mit UV-Licht und das Signal wird mit einem Filter von 530 nm gemessen.

7.2.8 Enzymatische Freisetzung von *N*-Glykanen

Die Peptid- N^4 -(*N*-Acetyl- β -glucosaminy)asparagin-Amidase (PNGase F) spaltet *N*-Glykane vom Asparagin der Proteinkette ab. Allerdings gibt es hier zwei Ausnahmen:

1. Das Asparagin, welches das *N*-Glykan trägt, muss von beiden Seiten von mindestens einer weiteren Aminosäure flankiert sein.
2. *N*-Glykane, die eine α 1-3-verknüpfte Fuc am endständigen GlcNAc der *core*-Chitobiose tragen, sind resistent gegen PNGase F.

7.2.8.1 Trypsin-PNGase F-Behandlung

Das Glykoprotein wird in 25 mmol/L Phosphatpuffer pH 7,1 gelöst, im Verhältnis 1:20 mit Trypsin versetzt und 4 bis 16 h bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wird die Probe 5 min bei 95 °C erhitzt. Nach Abkühlung der Probe wird 1 U PNGase F zugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Für die weitere Bearbeitung wird die Probe über Grafit gereinigt.

7.2.8.2 PNGase F-Behandlung ohne Trypsin (automatisiert)

Die PNGase F-Behandlung ohne Trypsin wurde auf der Plattform eines Freedom EVO 200 von Tecan etabliert. Als Proben dienen Proteine oder Blutserum. Der Ablauf ist in Tabelle 7-5 beschrieben.

Tabelle 7-5: Automatisierte PNGase F-Behandlung ohne Trypsin

1. Proben liegen in einer 96-well Polypropylen-Mikrotiterplatte mit V-Boden vor und das Calbiosorb-Material befindet sich in einer AcroPrep 96-well Filterplatte mit 0.45 μ m Supor Membran
2. Zugabe von 25 μ L Denaturierungspuffer ($c_{\text{(Phosphatpuffer)}} = 125 \text{ mmol/L}$; $\beta_{\text{(SDS)}} = 5 \text{ g/L}$; $c_{\text{(TBP)}} = 0,5 \text{ mmol/L}$; pH = 7,1) je well
3. Inkubation 1 h bei 50 °C

4. Abkühlung
5. Zugabe von 20 μL Detergenzienlösung ($\varphi_{(\text{Nonidet P-40})} = 5 \%$; $\beta_{(\text{OGP})} = 10 \text{ g/L}$)
6. Zugabe von 50 μL Wasser
7. Zugabe von 20 μL 0,025-0,05 U/ μL PNGase F (in $c_{(\text{Phosphatpuffer})} = 25 \text{ mmol/L}$; $\text{pH} = 7,1$)
8. Inkubation 7,5 h bei 37 °C
9. Während der PNGase F Inkubation wird das Calbiosorb-Material dreimal mit 80 μL Wasser gewaschen.
10. Überführung der Probe auf Calbiosorb-Material und Nachspülen mit 85 μL Wasser
11. Inkubation der Probe auf Calbiosorb für 3 Stunden bei RT
12. Absaugen der Probe und waschen mit zweimal 80 μL Wasser
13. Ansäuern der Probe und Aufreinigung der Probe über Grafit
14. Trocknung der Probe in der Vakuumzentrifuge
15. Behandlung der Proben mit Sialidase in 50 mmol/L Natriumacetatpuffer $\text{pH} = 5,0$
16. Ansäuern der Probe und Aufreinigung der Probe über Grafit

7.2.9 Reinigung der *N*-Glykane über Grafit

Zur Herstellung der Mini-Chromatographiesäulen wird eine Filterspitze FT 10E von Greiner mit Carbograph-Material (Grafit) gefüllt. Das Carbograph-Material wird in AcN ausgeschwemmt und mit Hilfe einer abgeschnittenen Spitze in die Filterspitze pipettiert. Zum Verfestigen der Säule wird die Spitze zentrifugiert. Am Ende beträgt die Säulenhöhe ca. 1,5 cm, was einem Säulenvolumen von ca. 40 μL entspricht.

Die Probe wird im entsprechenden Waschpuffer gelöst oder mit TFA bis zu einer Endkonzentration von 0,1 % angesäuert. Die Flüssigkeiten werden entweder durch die Säule zentrifugiert oder abgesaugt. Die verschiedenen Reinigungsverfahren sind in Tabelle 7-6 zusammengefasst. Am Ende wird die Probe in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Tabelle 7-6: Reinigung der N-Glykane über Grafit

	Tischzentrifuge	Tecan-Roboter	Tischzentrifuge mit APTS markierten Proben
Konditionierung	dreimal 40 μ L $\varphi_{(\text{AcN})} = 80 \%$ $\varphi_{(\text{TFA})} = 0,1 \%$	dreimal 40 μ L $\varphi_{(\text{AcN})} = 80 \%$ $\varphi_{(\text{TFA})} = 0,1 \%$	dreimal 40 μ L $\varphi_{(\text{AcN})} = 80 \%$ $\varphi_{(\text{TFA})} = 0,1 \%$
Äquilibration	dreimal 40 μ L - $\varphi_{(\text{TFA})} = 0,1 \%$	dreimal 40 μ L $\varphi_{(\text{AcN})} = 5 \%$ $\varphi_{(\text{TFA})} = 0,1 \%$	dreimal 40 μ L $\varphi_{(\text{AcN})} = 5 \%$ $\varphi_{(\text{TFA})} = 0,1 \%$
Probenauftrag	Probenauftrag	Probenauftrag	Probenauftrag
Waschen	dreimal 40 μ L - $\varphi_{(\text{TFA})} = 0,1 \%$	dreimal 40 μ L $\varphi_{(\text{AcN})} = 5 \%$ $\varphi_{(\text{TFA})} = 0,1 \%$	dreimal 40 μ L $\varphi_{(\text{AcN})} = 5 \%$ $\varphi_{(\text{TFA})} = 0,1 \%$
Elution	dreimal 30 μ L $\varphi_{(\text{AcN})} = 25-30 \%$ $\varphi_{(\text{TFA})} = 0,1 \%$	zweimal 45 μ L oder viermal 30 μ L $\varphi_{(\text{AcN})} = 25-30 \%$ $\varphi_{(\text{TFA})} = 0,1 \%$	zweimal 30 μ L $\varphi_{(\text{AcN})} = 30 \%$ $\varphi_{(\text{TFA})} = 0,1 \%$ und zweimal 50 μ L $\varphi_{(\text{AcN})} = 50 \%$ $\varphi_{(\text{TFA})} = 0,1 \%$

7.2.10 Desialylierung durch Essigsäurehydrolyse

Die getrocknete Probe wird 3 h mit 0,5 mol/L Essigsäure oder 1 h mit 3 mol/L Essigsäure bei 80 °C inkubiert. Anschließend wird die Probe über Grafit gereinigt.

7.2.11 Spaltung der N-Glykane durch Exoglykosidasen

Die Proben werden mit den Exoglykosidasen (Tabelle 7-7) 37 °C über Nacht inkubiert und danach über Grafit gereinigt.

Tabelle 7-7: Exoglykosidasen mit Spezifität und Puffer

Enzyme	Spezifität	Puffer
Neuraminidase (Sialidase)	α 2-3, α 2-6 und α 2-8 Neu5Ac	100 mmol/L Natriumacetat pH 5,0 oder 12,5-25 mmol/L Lithiumacetat pH 5,0
α -Fucosidase (<i>Bovine Kidney</i>)	α 1-2, α 1-3, α 1-4, α 1-6 Fuc	Herstellerpuffer oder 100 mmol/L Phosphatpuffer pH 6,0
α -Fucosidase (<i>Streptomyces</i> <i>sp.</i> 142)	α 1-3, α 1-4 Fuc	100 mmol/L Phosphatpuffer pH 6,0
α -Fucosidase (<i>Xanthomonas</i> <i>manihotis</i>)	α 1-2 Fuc	Herstellerpuffer
β -Galactosidase (<i>bovine</i> <i>testis</i>)	β 1-3, β 1-4 Gal	Herstellerpuffer oder 100 mmol/L Phosphatpuffer pH 6,0 oder 12,5-25 mmol/L Lithiumacetat pH 5,0
β -Galactosidase (<i>Strepto-</i> <i>coccus pneumoniae</i>)	β 1-4 Gal	Herstellerpuffer
β -Galactosidase (rekombi- nant, <i>E. coli</i>)	β 1-3, β 1-6 Gal	100 mmol/L Phosphatpuffer pH 5,0
β -N-Acetylhexosaminidase (<i>Jack Bean</i>)	β 1-2, β 1-3, β 1- 4, β 1-6 GlcNAc;	Herstellerpuffer
β -N-Acetylhexosaminidase (rekombinant, <i>Streptococcus</i> <i>pneumoniae</i>)	β 1-2, β 1-4, β 1-6 GlcNAc	Herstellerpuffer

7.2.12 Oligosaccharidtrennung mittels HPAEC-PAD

Die HPAEC-PAD (*High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*) ist eine Anionenaustauschchromatographie, bei der unter alkalischen Bedingungen die Glykane getrennt werden. Zur Detektion wird die gepulste Amperometrie eingesetzt. Die zu trennenden Glykane werden mit PNGase F vom Protein abgespalten und über Grafit entsalzt. Für die HPAEC-PAD liegen die Glykane in Wasser vor. Verwendet wird die Ionenchromatographieanlage ICS-3000 und die Säulen CarboPac PA200 *Carbohydrate Column* 250 × 3 mm (Trennsäule) und CarboPac PA200 *Carbohydrate Column* 50 × 3 mm (Vorsäule). Der Säulenthermostat und der Detektorthermostat haben eine Temperatur von 25 °C. Der Probengeber hat eine Temperatur von 10 °C. Die Trennung erfolgt

mit einem Natriumacetatgradienten (Tabelle 7-8). Die Fraktionen werden direkt nach dem Lauf über Grafit gereinigt.

Tabelle 7-8: Oligosaccharidtrennung mittels HPAEC-PAD

Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	100 mmol/L NaOH	100 mmol/L NaOH 600 mmol/L NaAc	200 mmol/L NaOH	Kurve
0	0,4	100 %	0 %	0 %	linear (5)
10	0,4	100 %	0 %	0 %	linear (5)
90	0,4	55 %	45 %	0 %	konkav (7)
100	0,2	0 %	100 %	0 %	linear (5)
105	0,2	0 %	0 %	100 %	linear (5)
125	0,2	0 %	0 %	100 %	linear (5)
130	0,4	100 %	0 %	0 %	linear (5)
150	0,4	100 %	0 %	0 %	linear (5)

7.2.13 EXQuest Spot Cutter

Für den EXQuest *Spot Cutter* sind die Gele in Wasser gequollen. Die Gele werden auf eine Ausstanzfolie (Gel Cutting Sheets, Bio-Rad) überführt, diese Folie wiederum liegt auf dem Arbeitstisch des *Spot Cutter*. Über das Programm PDQuest wird das Gerät gesteuert und die Ziele können bestimmt werden. Der EXQuest *Spot Cutter* ist in diesem Falle mit einer Nadel ausgestattet, die Gelstücke von 1 mm produziert.

7.2.14 In-Gel-Behandlung von Glykoproteinen mit PNGase F aus SDS-PAGE-Gelen

Die zu untersuchenden Proteine werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Protokoll in Tabelle 7-9 bearbeitet.

Tabelle 7-9: In-Gel-Behandlung mit PNGase F aus SDS-PAGE-Gelen mit und ohne Trypsin

	ohne Trypsin	mit Trypsin
➤ Überführung der Gelstücke mit dem EXQuest <i>Spot Cutter</i> in 0,2 mL Reaktionsgefäße (ein Gelstück hat 1 mm Durchmesser)	•	•
➤ Entfärbung der Gelstücke mit 25 mmol/L Phosphatpuffer; $\varphi_{(\text{AcN})} = 50 \%$; pH = 8,0	•	•

➤ Inkubation 10 min bei RT	•	•
➤ Flüssigkeit abnehmen	•	•
➤ Quellen der Gelstücke mit 50 mmol/L Phosphatpuffer; pH = 8,0	•	•
➤ Inkubation 30 min bei 37 °C	•	•
➤ Flüssigkeit abnehmen	•	•
➤ Schrumpfung der Gelstücke mit AcN	•	•
➤ Inkubation 10 min bei RT	•	•
➤ Flüssigkeit abnehmen	•	•
➤ Trocknung der Gelstücke bei 50 °C für 45 min	•	•
➤ Abkühlung der Gelstücke	•	•
➤ Zugabe von 4 µL <i>Sequencing Grade</i> Trypsin ($c_{\text{Phosphatpuffer}} = 25 \text{ mmol/L}$; $\beta_{\text{OGP}} = 1 \text{ g/L}$; $\beta_{\text{Trypsin}} = 50 \text{ ng/}\mu\text{L}$; pH = 8,0)		•
➤ Inkubation 45 min bei 4 °C		•
➤ Zugabe von 6 µL Inkubationspuffer ($c_{\text{Phosphatpuffer}} = 25 \text{ mmol/L}$; $\beta_{\text{OGP}} = 1 \text{ g/L}$; pH = 8,0)		•
➤ Inkubation über Nacht bei 37 °C oder 3 h bei 50 °C		•
➤ Zugabe von 10 µL AcN		•
➤ Inkubation 20 min bei RT		•
➤ Trocknung der Proben in der Vakuumzentrifuge		•
➤ Zugabe von 5 µL 0,2 U/µL PNGase F (in $c_{\text{Phosphatpuffer}} = 25 \text{ mmol/L}$; $\beta_{\text{OGP}} = 8 \text{ g/L}$; pH = 7,1)		•
➤ Zugabe von 5 µL 0,2 U/µL PNGase F (in $c_{\text{Phosphatpuffer}} = 25 \text{ mmol/L}$; $\beta_{\text{OGP}} = 10 \text{ g/L}$; pH = 7,1)	•	
➤ Inkubation über Nacht bei 37 °C	•	•
➤ Zugabe von 15 µL Wasser	•	•
➤ Inkubation 1 h bei 50 °C	•	•
➤ Überstand abnehmen und sammeln	•	•
➤ Zugabe von 20 µL AcN	•	•
➤ Inkubation 10 min bei RT	•	•
➤ Überstand abnehmen und sammeln	•	•
➤ Zugabe von 20 µL OGP ($\beta_{\text{OGP}} = 1 \text{ g/L}$)	•	•
➤ Inkubation 1 h bei 50 °C	•	•
➤ Überstand abnehmen und sammeln	•	•
➤ Zugabe von 20 µL AcN	•	•

➤ Inkubation 10 min bei RT	•	•
➤ Überstand abnehmen und sammeln	•	•
➤ Zugabe von 20 µL Wasser	•	•
➤ Inkubation 1 h bei 50 °C	•	•
➤ Überstand abnehmen und sammeln	•	•
➤ Zugabe von 20 µL AcN	•	•
➤ Inkubation 10 min bei RT	•	•
➤ Überstand abnehmen und sammeln	•	•
➤ Vereinigte Überstände in der Vakuumzentrifuge trocknen	•	•
➤ Reinigung über Grafit	•	•

7.2.15 In-Gel-Behandlung von Glykoproteinen mit PNGase F aus 2D-Gelen (automatisiert)

Nach der Auftrennung der Serumproteine im 2D-Gel werden die Proteinspots mit dem Skalpell ausgeschnitten und wie in Tabelle 7-10 beschrieben bearbeitet. Bei Schritt 20, der automatisierten Inkubation mit PNGase F, werden alle 3 h 45 min 15 µL Wasser zugegeben. Das Wasser wird dabei auf 37 °C vorgewärmt.

Tabelle 7-10: In-Gel-Behandlung mit PNGase F aus 2D-Gelen

1. Überführung der Gelstücke in *AcroPrep* 96 Filterplatte mit 0,2 µm GHP-Membran
2. Zugabe von 50 µL Wasser
3. Zerkleinerung der Gelstücke mit einem Glasstab
4. Flüssigkeit absaugen
5. Entfärbung der Gelstücke mit 80 µL 25 mmol/L Phosphatpuffer; $\varphi_{(\text{AcN})} = 50 \%$;
pH = 8,0
6. Inkubation 10 min bei RT
7. Flüssigkeit absaugen
8. Quellen der Gelstücke mit 80 µL 50 mmol/L Phosphatpuffer; pH = 8,0
9. Inkubation 30 min bei 37 °C
10. Flüssigkeit absaugen
11. Wiederholung von Schritt 5 bis 10
12. Schrumpfung der Gelstücke mit 80 µL AcN
13. Inkubation 10 min bei RT
14. Flüssigkeit absaugen
15. Trocknung der Gelstücke bei 50 °C für 45 min

16. Abkühlung der Gelstücke
17. Zugabe von 35 μL 0,0571 U/ μL PNGase F
(in $c_{\text{(Phosphatpuffer)}} = 25 \text{ mmol/L}$; $\beta_{\text{(OGP)}} = 2 \text{ g/L}$; $\text{pH} = 7,1$)
18. Inkubation 1 h bei 37 °C
19. Zugabe von 35 μL 5 mmol/L Phosphatpuffer; $\text{pH} = 7,1$; vorgewärmt auf 37 °C
20. Inkubation 16 h bei 37 °C
21. Zugabe von 70 μL Wasser
22. Inkubation 1 h bei RT
23. Flüssigkeit absaugen und sammeln
24. Zugabe von 70 μL AcN
25. Inkubation 10 min bei RT
26. Flüssigkeit absaugen und sammeln
27. Zugabe von 40 μL AcN
28. Inkubation 10 min bei RT
29. Flüssigkeit absaugen und sammeln
30. Zugabe von 40 μL AcN
31. Flüssigkeit absaugen und sammeln
32. Zugabe von 90 μL Wasser
33. Inkubation 1 h bei 50 °C
34. Flüssigkeit absaugen und sammeln
35. Wiederholung von Schritt 23 bis 34
36. Zugabe von 40 μL AcN
37. Inkubation 10 min bei RT
38. Flüssigkeit absaugen und sammeln
39. Zweimal Wiederholung Schritt 36 bis 38
40. Vereinigte Filtrate in Vakuumzentrifuge trocknen
41. Reinigung über Grafit

7.2.16 In-Gel-Behandlung von Proteinen mit Trypsin

Nach der Inkubation mit PNGase F können die Proteine zur Identifizierung mit Trypsin behandelt werden. Dazu werden die Gelstücke mit 30 μL *sequencing grade* Trypsinlösung ($c_{\text{(NH}_4\text{HCO}_3)} = 10 \text{ mmol/L}$; $\beta_{\text{(Trypsin)}} = 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$) versetzt und 45 min bei 4 °C gequollen. Danach werden 60 μL 10 mmol/L Ammoniumhydrogencarbonat dazu gegeben und 3 h bei 50 °C oder 37 °C über Nacht inkubiert. Zur Extraktion der Peptide werden 40 μL Wasser zugeben, 1 h bei 37 °C inkubiert und der Überstand gesammelt. Die zweite Extraktion wird mit

60 μL 1 % TFA und einer Inkubation von 1 h bei 37 °C durchgeführt. Der Überstand wird gesammelt. Die dritte Extraktion erfolgt mit 60 μL AcN und einer Inkubation von 10 min bei RT. Der Überstand wird gesammelt. Die Extraktion drei wird wiederholt. Die Extrakte werden vereinigt und in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

7.2.17 Permethylierung

Die Permethylierung wurde nach dem Protokoll von Wedepohl et al. (2010) durchgeführt.

7.2.18 MALDI-TOF/TOF-MS

Das verwendete Ultraflex III von Bruker ist ein Massenspektrometer, das die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI, *Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization*) als Ionisationsquelle nutzt. Als Analysator dient ein Flugzeitmassenspektrometer mit Ionenspiegel (*reflectron* TOF-MS, *Time-of-flight mass spectrometer with reflectron*). Zur Fragmentierung von Molekülen kann ein zweites TOF hinzugeschaltet werden, das die gewünschte Masse herausfiltert. Die Fragmentierung erfolgte mit oder ohne dem Kollisionsgas Helium. Die verschiedenen Matrixpräparationen werden in den folgenden Punkten besprochen. Das verwendete Ara wurde nach dem Protokoll von Peng Chen hergestellt (Chen et al. 1997).

7.2.18.1 N-Glykane mit Arabinosazon auf Ground Steel Target

Die Probe wird in Wasser gelöst und von dieser werden 0,5 μL auf das *Ground Steel Target* übertragen. Dieser Tropfen wird mit 0,5 μL Ara ($\beta_{(\text{Ara})} = 5 \text{ mg/mL}$; $\varphi_{(\text{Ethanol})} = 80 \%$) versetzt und vermischt. Als Standard zur Kalibrierung diente DH.

7.2.18.2 N-Glykane mit Arabinosazon auf 800er AnchorChip Target

Alle verwendeten Pipettenspitzen werden vor der Benutzung in Ethanol gespült. Anschließend wird 1 μL Ara ($\beta_{(\text{Ara})} = 0,5\text{-}1 \text{ mg/mL}$; $\varphi_{(\text{Ethanol})} = 80 \%$) auf das *800er AnchorChip Target* aufgetragen und an der Luft getrocknet. Die Matrix wird mit 2 μL Wasser gewaschen. Die Probe wird in eiskaltem 80 % Ethanol gelöst. 1 μL des Ethanol-Probengemisches wird auf die Matrix gegeben und abermals an der Luft getrocknet. Eine zweite Möglichkeit ist, die Probe in Wasser zu lösen, von dieser wird 1 μL auf das *Target* mit der gewaschenen Matrix zu geben, an der Luft getrocknen und anschließend mit 1 μL 80 % Ethanol zu rekristallisieren. Als Kalibrierungsstandard dient in beiden Fällen DH.

7.2.18.3 Peptide mit super DHB auf Ground Steel Target

Die Probe wird in Wasser gelöst. Es werden dann 0,5 μL auf das *Ground Steel Target* übertragen. Dieser Tropfen wird mit 0,5 μL super DHB ($\beta_{(\text{super DHB})} = 15 \text{ mg/mL}$; $\varphi_{(\text{AcN})} = 50 \%$; $\varphi_{(\text{TFA})} = 0,1 \%$) versetzt und vermischt. Als Standard zur Kalibrierung diente der *Peptide Calibration Standard* von Bruker.

7.2.19 Elektrospray-Ionisation Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die ESI-MS (Agilent 6210 ESI-TOF) wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Christian Hackenberger (FU Berlin) durchgeführt. Der Fluss wird auf 4 $\mu\text{L}/\text{min}$ und die Elektrosprayspannung auf 4.000 V eingestellt. Der Gasfluss liegt bei 15 psi (1 bar). Alle anderen Parameter werden für eine maximale Signalstärke für den positiven Modus $[\text{M}+\text{H}]^+$ angepasst.

7.2.20 Peptide mapping

Für das *peptide mapping* werden die Peptide aus der Protein-In-Gel-Behandlung mit Trypsin gewonnen und mit super DHB als Matrix im MALDI-TOF-MS vermessen. Das Spektrum wird in das Programm BioTools überführt. BioTools verbindet sich über das Internet mit dem Programm Mascot. Dieses vergleicht die Daten mit der gewählten ExPASy-Datenbank und erstellt eine Wahrscheinlichkeitstabelle, um welche Proteine es sich handelt. Die Ergebnisse dieser Suchläufe werden in BioTools gespeichert.

7.2.21 Markierung der N-Glykane mit APTS

Die Probe wird mit 200-400 pmol Maltose als Mobilitätsmarker versetzt und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Danach wird die Probe mit 3 μL Tetrahydrofuran + 15 % Essigsäure (1+1); 0,5 μL 1 mol/L Natriumcyanoborhydrid (in Tetrahydrofuran) und 0,5 μL APTS ($\beta_{(\text{APTS})} = 100 \text{ mg/mL}$, in 15 %iger Essigsäure) versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

7.2.22 Reinigung der N-Glykane über Zellulose

Die Mini-Zellulosesäule wird genauso gefüllt wie die Grafitspitzen. Die fertig gepackte Zellulosesäule wird sechsmal mit 50 μL Wasser gewaschen und zweimal mit 50 μL AcN entwässert. Die Zellulosesäule wird vor dem Gebrauch je dreimal mit 40 μL Wasser und 40 μL 85 % AcN äquilibriert. Die getrockneten, mit APTS markierten N-Glykane werden in 40 μL 85 % AcN gelöst und auf die Säule gegeben. Die Zellulosesäule wird jeweils zweimal mit 30-

40 μL 85 % AcN und 81 % AcN gewaschen. Eluiert wird die Probe mit Wasser. Am Ende wird die Probe in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Um mögliche Verunreinigungen durch die Zellulose auszuschließen, wird diese mit 20 μL Zellulase (25 ng/ μL) in 12,5 mmol/L Lithiumacetat (pH = 5,0) über Nacht bei 37 °C inkubiert.

7.2.23 Kapillarelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenz (CE-LIF)

Mittels CE können die APTS markierten *N*-Glykane nach Mobilität aufgetrennt werden. Die Detektion erfolgt mittels laserinduzierter Fluoreszenz (LIF) bei einer Anregung von 488 nm und einer Emission von 520 nm. Die Probe wird für die Messung in Wasser gelöst. Als CE-Puffer zur Auftrennung der *N*-Glykane wurde der *Carbohydrate Separation Buffer* von Beckman Coulter verwendet. Der weitere Programmablauf ist in Tabelle 7-11 dargestellt.

Tabelle 7-11: Programmablauf zur Trennung von APTS markierten *N*-Glykanen

Programmschritt	Einstellungen	Zeit
Spülen	30,0 psi	2,0 min
Injektion	0,5 psi	4,0 sec
Pause	/	0,2 min
Trennung	30,0 kV	20,0 min

7.2.24 Epimerisierung

Zur C2-Epimerisierung des GlcNAc am reduzierenden Ende werden zwei Methoden eingesetzt. Zum einen werden die Glykane über Nacht in 50 mmol/L NaOH bei RT und zum anderen in 25 % Ammoniak bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wird die Probe in der Vakuumzentrifuge getrocknet, mit APTS markiert und über Zellulose gereinigt.

7.2.25 Synthese der Biotin-Thiol-Linker

Die Synthese der Biotin-Thiol-*Linker* wird mittels Festphasensynthese durchgeführt. Dazu werden 250 mg eines Cysteamin-2-chlorotriptyl-Harzes (Merck) in eine 8 mL Kunststoffsäule aus Polypropylen mit einem Filter (Grace, #210208) überführt. Diese Menge entspricht etwa 0,3 mmol Cysteamin-2-chlorotriptyl. Bevor das Harz eingesetzt werden kann, wird es unter Schütteln 1 h in Dichlormethan gequollen und danach mit dreimal 4 mL Dimethylformamid gewaschen. Für die Einführung eines *Spacers* wurden 0,6 mmol Fmoc-Gly-OH (Merck) oder 0,6 mmol Fmoc-O₂Oc-OH ($\{2\text{-}[2\text{-}(\text{Fmoc-amino})\text{ethoxy}]\text{ethoxy}\}$ acetic acid) mit 0,6 mmol HOBt und 0,6 mmol HBTU in 1,5 mL Dimethylformamid gelöst. Das Gemisch wurde mit 204 μL Diisopropylethylamin versetzt und 2 min geschüttelt. Dabei bildet sich eine rotbraune

klare Lösung. Dieses Reaktionsgemisch wird auf das Harz gegeben und 1 h bei RT geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wird mit dreimal 4 mL Dimethylformamid aus dem Harz gewaschen. Die Fmoc-Schutzgruppe wurde durch eine Behandlung von viermal 5 min mit 20 % Piperidin in Dimethylformamid entfernt. Das Harz wird danach nochmals mit dreimal 4 mL Dimethylformamid gewaschen. Im Falle des Biotin-GG-SH wird jetzt das zweite Glycin angeknüpft. Der letzte Abschnitt im *Linker* ist das Biotin. Für die Verknüpfungsreaktion werden 0,6 mmol Biotin, 0,6 mmol HOBt und 0,6 mmol HBTU in 1 mL Dimethylsulfoxid und 1 mL Dimethylformamid suspendiert. Nach der Zugabe von 204 µL Diisopropylethylamin und 2 min schütteln, wird das Reaktionsgemisch rotbraun und klar. Diese Lösung wird auf das Harz gegeben und 1 h bei RT geschüttelt. Nach der Inkubation wird das Harz viermal mit 4 mL Dimethylformamid gewaschen und die Verknüpfungsreaktion mit Biotin wiederholt. Zur Kontrolle der vollständigen Reaktion werden einige Harzkügelchen in ein Eppi überführt und mit jeweils einem Tropfen 10 % Diisopropylethylamin und 1 % 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure versetzt. Die zwei Reagenzien sind dafür in Dimethylformamid gelöst. Nach 3 min blieb die Rotfärbung aus und zeigte somit, dass keine freien Amine vorliegen. Das mit Dimethylformamid gespülte Harz wird mit dreimal 4 mL Dichlormethan gewaschen. Der fertige *Linker* wird 1 h mit 1,5 mL 100 % TFA abgespalten. Da aufgrund der Kürze des *Linkers* eine Ausfällung mit eiskaltem Ether keinen Erfolg zeigte, wird das TFA unter einem Stickstoffstrom entfernt. Der Rückstand wird mit 200 µL Wasser versetzt und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Gelagert wird das Produkt unter Argon bei -20 °C.

7.2.26 Herstellung des Fetuinstandards für die Biotin Markierung von O-Glykanstellen

Als Modelprotein wird FETUA aus FKS verwendet. Das FETUA wird mit dem *ProteoPrep Reduction and Alkylation Kit* behandelt und über ein Amicon Ultra-0,5 mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa gereinigt. Der Rückstand wird mit Wasser gewaschen und auf eine Konzentration von 3 mg/mL eingestellt.

7.2.27 Biotinmarkierung von O-Glykanstellen

Für den Ansatz wird FETUA im intakten oder proteolytisch gespaltenen Zustand verwendet und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zu der Probe werden entweder 50 µL konzentrierter Ammoniak oder gesättigte Ba(OH)₂-Lösung gegeben und 1 h bei 45 °C bzw. 1 h bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wird eine Spatelspitze des jeweiligen Biotin-Thiol-*Linkers* zugegeben und eine weitere Stunde unter denselben Bedingungen inkubiert.

7.2.28 Aufreinigung von Proteinen und Peptiden mit einem starken Kationenaustauscher

Proben mit flüchtigen Reagenzien wie Ammoniak werden vor der Aufreinigung in der Vakuumentrifuge getrocknet und wieder in 400 μ L 0,1 % TFA gelöst. Bei nicht flüchtigen Reagenzien wird auf 400 μ L mit Wasser verdünnt und der pH-Wert mit TFA auf kleiner vier eingestellt. Für die Aufreinigung wurden *strong cation exchange (SCX) spin columns* (Pierce) gewählt und wie im Folgenden beschrieben verwendet.

Tabelle 7-12: Aufreinigung mit *strong cation exchange spin columns (SCX)*

1. 400 μ L 0,1 % TFA; 2000 g; 5 min
2. Probe; 2000 g; 5 min (Durchfluss)
3. zweimal 400 μ L 30 % Methanol + 0,1 % TFA (Waschen); 2000 g; 5 min
4. zweimal 400 μ L 30% Methanol + 5 % NH_3 (Elution); 2000 g; 5 min
5. Fraktionen in Speedvac trocknen
6. Fraktionen in 50 μ L Wasser lösen und wieder in Speedvac trocken
7. Wiederholung von Schritt 6

7.2.29 Proteinspaltung mit Trypsin

Die Probe wird mit 50 bis 100 μ L 50 mmol/L NH_4HCO_3 gepuffert und im Verhältnis 1:50 zum Proteingehalt mit *sequencing grade* Trypsin versetzt. Inkubiert wird bei 37 °C für mindestens vier Stunden. Anschließend wird das Trypsin bei 95 °C für 5 min inhibiert.

7.2.30 Proteinspaltung mit *peptidyl-Asp metalloendopeptidase (Asp-N)*

Die Probe wird mit 50 bis 100 μ L 50 mmol/L NH_4HCO_3 gepuffert und im Verhältnis 1:20 zum Proteingehalt mit *sequencing grade* Asp-N versetzt. Inkubiert wird bei 37 °C für mindestens vier Stunden. Anschließend wird die Asp-N bei 95 °C für 5 min inhibiert.

7.2.31 Aufreinigung von biotinmarkierten Proteinen und Peptiden mit einer Avidinsäule

Für die Aufreinigung wurde *Monomeric Avidin-Agarose* von Pierce verwendet. Von der *Avidin Agarose* werden 2 mL (2,0-2,5 cm Säulenhöhe, Leersäule 2 mL Pierce) verwendet. Die Säule wird mit 5 mL PBS ($c_{\text{Phosphatpuffer}} = 0,1 \text{ mol/L}$; $c_{\text{NaCl}} = 0,15 \text{ mol/L}$; pH = 7,0), 5 mL Elutionspuffer ($c_{\text{Biotin}} = 2 \text{ mmol/L}$ in PBS), 5 mL Regenerationspuffer ($c_{\text{Glycin}} = 0,1 \text{ mol/L}$; pH 2,8) und 5 mL PBS vorbereitet. Die Probe wird in 1 mL PBS gelöst und dann auf die Säule ge-

geben. Nach 15 min Inkubation wird die Säule mit 5 mL PBS gewaschen. Danach wird die Probe mit 4 mL Elutionspuffer und/oder 4 mL Regenerationspuffer eluiert. Proteine werden nach der Avidin-Aufreinigung über ein Amicon Ultra-0,5-Säulchen mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa und Peptide über eine C18-Säule gereinigt.

Eine zweite Variante ist, die Avidinsäule mit 5 mL PBS vorzubereiten. Die Probe wird in 1 mL PBS gelöst und dann auf die Säule gegeben. Nach 15 min Inkubation wird die Säule mit 5 mL PBS, 5 mL PBS+CHAPS ($\beta_{\text{(CHAPS)}} = 10 \text{ g/L}$ in PBS) und 5 mL Wasser gewaschen. Eluiert wird die Probe mit 5 mL 50 % AcN+0,1 % TFA (Oda et al. 2001). Die Elutionsfraktion wird in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

7.2.32 Aufreinigung von Peptiden mittels einer C18-Säule

Für die C18-Aufreinigung wurde 100 mg 1,5 mL *reversed phase extract-clean* Säule mit Standard C18-Chromatographiematerial von Grace verwendet. Die Säule wird mit 400 μL AcN und dreimal 400 μL 80 % AcN + 0,1 % TFA äquilibriert und mit dreimal 400 μL 0,1 % TFA konditioniert. Die Probe wird mit TFA auf 0,1 % TFA angesäuert und auf die Säule gegeben. Eluiert wird mit 50 oder 80 % AcN + 0,1 % TFA. Anschließend wird die Probe in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

7.2.33 Herstellung eines biotinylierten Fetuins über freie Amine

Für die Positivkontrolle wird FETUA aus FKS mit Sulfo-NHS-SS-Biotin nach Herstellerangaben der Firma Pierce markiert. Nach der Reaktion wird das FETUA über ein Amicon Ultra-0,5-Säulchen mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa gereinigt.

8 Literaturverzeichnis

- Abbott, K. L., A. V. Nairn, E. M. Hall, M. B. Horton, J. F. McDonald, K. W. Moremen, D. M. Dinulescu and M. Pierce (2008). "Focused glycomic analysis of the N-linked glycan biosynthetic pathway in ovarian cancer." *Proteomics* 8(16): 3210-3220.
- Abbott, K. L., J.-M. Lim, L. Wells, B. B. Benigno, J. F. McDonald and M. Pierce (2010). "Identification of candidate biomarkers with cancer-specific glycosylation in the tissue and serum of endometrioid ovarian cancer patients by glycoproteomic analysis." *Proteomics – Clinical Applications* 4(8-9): 752-752.
- Abd-el-Fattah, M., R. Scherer, F. M. Fouad and G. Ruhenstroth-Bauer (1981). "Kinetics of the Acute-Phase Reaction in Rats after Tumor Transplantation." *Cancer Research* 41(6): 2548-2555.
- Abd Hamid, U. M., L. Royle, R. Saldova, C. M. Radcliffe, D. J. Harvey, S. J. Storr, M. Pardo, R. Antrobus, C. J. Chapman, N. Zitzmann, J. F. Robertson, R. A. Dwek and P. M. Rudd (2008). "A strategy to reveal potential glycan markers from serum glycoproteins associated with breast cancer progression." *Glycobiology* 18(12): 1105-1118.
- Adkins, J. N., S. M. Varnum, K. J. Auberry, R. J. Moore, N. H. Angell, R. D. Smith, D. L. Springer and J. G. Pounds (2002). "Toward a Human Blood Serum Proteome." *Molecular & Cellular Proteomics* 1(12): 947-955.
- Ahmed, N., G. Barker, K. T. Oliva, P. Hoffmann, C. Riley, S. Reeve, A. I. Smith, B. E. Kemp, M. A. Quinn and G. E. Rice (2004). "Proteomic-based identification of haptoglobin-I precursor as a novel circulating biomarker of ovarian cancer." *British Journal of Cancer* 91(1): 129-140.
- An, H. J., J. W. Froehlich and C. B. Lebrilla (2009). "Determination of glycosylation sites and site-specific heterogeneity in glycoproteins." *Current Opinion in Chemical Biology* 13(4): 421-426.
- Anderson, N. L., M. Polanski, R. Pieper, T. Gatlin, R. S. Tirumalai, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, J. N. Adkins, J. G. Pounds, R. Fagan and A. Lobley (2004). "The Human Plasma Proteome." *Molecular & Cellular Proteomics* 3(4): 311-326.
- Anumula, K. R. (2006). "Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates." *Analytical Biochemistry* 350(1): 1-23.
- Arnold, J. N., M. R. Wormald, R. B. Sim, P. M. Rudd and R. A. Dwek (2007). "The Impact of Glycosylation on the Biological Function and Structure of Human Immunoglobulins." *Annual Review of Immunology* 25(1): 21-50.
- Arnold, J. N., R. Saldova, U. M. A. Hamid and P. M. Rudd (2008). "Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation." *Proteomics* 8(16): 3284-3293.
- Ashwell, G. and J. Harford (1982). "Carbohydrate-Specific Receptors of the Liver." *Annual Review of Biochemistry* 51(1): 531-554.
- Aubert, M., L. Panicot-Dubois, C. Crotte, V. Sbarra, D. Lombardo, M.-O. Sadoulet and E. Mas (2000). "Peritoneal colonization by human pancreatic cancer cells is inhibited by antisense FUT3 sequence." *International Journal of Cancer* 88(4): 558-565.
- Barrabés, S., A. Sarrats, E. Fort, R. De Llorens, P. M. Rudd and R. Peracaula (2010). "Effect of sialic acid content on glycoprotein pI analyzed by two-dimensional electrophoresis." *Electrophoresis* 31(17): 2903-2912.
- Bast, R. C., T. L. Klug, E. S. John, E. Jenison, J. M. Niloff, H. Lazarus, R. S. Berkowitz, T. Leavitt, C. T. Griffiths, L. Parker, V. R. Zurawski and R. C. Knapp (1983). "A Radioimmunoassay Using a

- Monoclonal Antibody to Monitor the Course of Epithelial Ovarian Cancer." *New England Journal of Medicine* 309(15): 883-887.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko and L. Stryer (2003). "Biochemie". Spektrum-Lehrbuch. Kapitel: 11, Heidelberg, Spektrum Akad. Verl., 324-344
- Bones, J., J. C. Byrne, N. O'Donoghue, C. McManus, C. Scaife, H. Boissin, A. Nastase and P. M. Rudd (2011). "Glycomic and Glycoproteomic Analysis of Serum from Patients with Stomach Cancer Reveals Potential Markers Arising from Host Defense Response Mechanisms." *Journal of Proteome Research* 10(3): 1246-1265.
- Bork, K., R. Horstkorte and W. Weidemann (2009). "Increasing the sialylation of therapeutic glycoproteins: The potential of the sialic acid biosynthetic pathway." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98(10): 3499-3508.
- Börnsen, K. O., M. D. Mohr and H. M. Widmer (1995). "Ion exchange and purification of carbohydrates on a Nafion® membrane as a new sample pretreatment for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 9(11): 1031-1034.
- Boyd, J. (2002). "Robotic Laboratory Automation." *Science* 295(5554): 517-518.
- Brinkman-Van der Linden, E. C. M., R. Mollicone, R. Oriol, G. Larson, D. H. Van den Eijnden and W. Van Dijk (1996). "A Missense Mutation in the FUT6 Gene Results in Total Absence of α 3-Fucosylation of Human α 1-Acid Glycoprotein." *Journal of Biological Chemistry* 271(24): 14492-14495.
- Brinkman-van der Linden, E. C. M., P. F. de Haan, E. C. Havenaar and W. van Dijk (1998). "Inflammation-induced expression of sialyl Lewis^x is not restricted to α 1-acid glycoprotein but also occurs to a lesser extent on α 1-antichymotrypsin and haptoglobin." *Glycoconjugate Journal* 15(2): 177-182.
- Brockhausen, I., S. Narasimhan and H. Schachter (1988). "The biosynthesis of highly branched N-glycans: studies on the sequential pathway and functional role of N-actylglucosaminyltransferases I, II, III, IV, V and VI." *Biochimie* 70(11): 1521-1533.
- Brooks, S. A., T. M. Carter, L. Royle, D. J. Harvey, S. A. Fry, C. Kinch, R. A. Dwek and P. M. Rudd (2008). "Altered glycosylation of proteins in cancer: What is the potential for new anti-tumour strategies." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 8(1): 2-21.
- Bruker Daltonik (2002). "AnchorChip Technology-Preparation for Ultra-Sensitive Automated MALDI-TOF MS (Manual)" Revision 2.0. Bremen.
- Byford, M. F. (1991). "Rapid and selective modification of phosphoserine residues catalysed by Ba²⁺ ions for their detection during peptide microsequencing." *Biochemical Journal* 280: 261-265.
- Callewaert, N., S. Geysens, F. Molemans and R. Contreras (2001). "Ultrasensitive profiling and sequencing of N-linked oligosaccharides using standard DNA-sequencing equipment." *Glycobiology* 11(4): 275-281.
- Callewaert, N., W. Vervecken, A. Van Hecke and R. Contreras (2002). "Use of a Meltable Polyacrylamide Matrix for Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis in a Procedure for N-Glycan Analysis on Picomole Amounts of Glycoproteins." *Analytical Biochemistry* 303(1): 93-95.
- Callewaert, N., H. V. Vlierberghe, A. V. Hecke, W. Laroy, J. Delanghe and R. Contreras (2004). "Noninvasive diagnosis of liver cirrhosis using DNA sequencer-based total serum protein glycomics." *Nature Medicine* 10(4): 429-434.
- Campbell, M. P., L. Royle, C. M. Radcliffe, R. A. Dwek and P. M. Rudd (2008). "GlycoBase and autoGU: tools for HPLC-based glycan analysis." *Bioinformatics* 24(9): 1214-1216.
- Chapman, T. (2003). "Lab automation and robotics: Automation on the move." *Nature* 421(6923): 661-666.

- Chen, P., A. G. Baker and M. V. Novotny (1997). "The Use of Osazones as Matrices for the Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry of Carbohydrates." *Analytical Biochemistry* 244(1): 144-151.
- Cohen, S. L. and B. T. Chait (1996). "Influence of Matrix Solution Conditions on the MALDI-MS Analysis of Peptides and Proteins." *Analytical Chemistry* 68(1): 31-37.
- Comunale, M. A., L. Rodemich-Betesh, J. Hafner, M. Wang, P. Norton, A. M. Di Bisceglie, T. Block and A. Mehta (2010). "Linkage Specific Fucosylation of Alpha-1-Antitrypsin in Liver Cirrhosis and Cancer Patients: Implications for a Biomarker of Hepatocellular Carcinoma." *PLoS ONE* 5(8): e12419.
- Cummings, R. D. and S. Kornfeld (1982). "Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosaccharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinating and erythroagglutinating lectins." *Journal of Biological Chemistry* 257(19): 11230-11234.
- Dalpathado, D. S., H. Jiang, M. A. Kater and H. Desaire (2005). "Reductive amination of carbohydrates using $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381(6): 1130-1137.
- de Leoz, M. L. A., L. J. T. Young, H. J. An, S. R. Kronewitter, J. Kim, S. Miyamoto, A. D. Borowsky, H. K. Chew and C. B. Lebrilla (2010). "High-Mannose Glycans are Elevated during Breast Cancer Progression." *Molecular & Cellular Proteomics* 10(1).
- Debruyne, E. N., D. Vanderschaeghe, H. Van Vlierberghe, A. Vanhecke, N. Callewaert and J. R. Delanghe (2010). "Diagnostic Value of the Hemopexin N-Glycan Profile in Hepatocellular Carcinoma Patients." *Clinical chemistry* 56(5): 823-831.
- Dennis, J. W. and S. Laferté (1989). "Oncodevelopmental expression of -GlcNAc- β 1-6Man α 1-6Man β 1-branched asparagine linked oligosaccharides in murine tissues and human breast carcinomas." *Cancer Research* 49(4): 945-950.
- Dennis, J. W., M. Granovsky and C. E. Warren (1999a). "Protein glycosylation in development and disease." *BioEssays* 21(5): 412-421.
- Dennis, J. W., M. Granovsky and C. E. Warren (1999b). "Glycoprotein glycosylation and cancer progression." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1473(1): 21-34.
- Derappe, C., G. Haentjens, S. Lemaire, J. P. Feugeas, C. Lebbe, V. Pasqualetto, A. Bussel, M. Aubery and D. Neel (1996). "Circulating malignant lymphocytes from Sezary syndrome express high level of glycoproteins carrying beta(1-6)N-acetylglucosamine-branched N-linked oligosaccharides." *Leukemia* 10(1): 138-141.
- Dijk, W., G. A. Turner and A. Mackiewicz (1994). "Changes in glycosylation of acute-phase proteins in health and disease: Occurrence, regulation and function." *Glycoconjugate Journal* 1(1): 5-14.
- Duan, X., D. M. Yarmush, F. Berthiaume, A. Jayaraman and M. L. Yarmush (2004). "A mouse serum two-dimensional gel map: Application to profiling burn injury and infection." *Electrophoresis* 25(17): 3055-3065.
- Echan, L. A., H.-Y. Tang, N. Ali-Khan, K. Lee and D. W. Speicher (2005). "Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma." *Proteomics* 5(13): 3292-3303.
- Fang, H., G. Kaur and B. Wang (2004). "Progress in Boronic Acid-Based Fluorescent Glucose Sensors." *Journal of Fluorescence* 14(5): 481-489.
- Fauq, A. H., R. Kache, M. A. Khan and I. E. Vega (2005). "Synthesis of Acid-Cleavable Light Isotope-Coded Affinity Tags (ICAT-L) for Potential Use in Proteomic Expression Profiling Analysis." *Bioconjugate Chemistry* 17(1): 248-254.

- Fernandes, B., U. Sagman, M. Auger, M. Demetrio and J. W. Dennis (1991). " β 1–6 Branched Oligosaccharides as a Marker of Tumor Progression in Human Breast and Colon Neoplasia." *Cancer Research* 51(2): 718-723.
- Freeze, H. H. (2001). "Lectin Affinity Chromatography". *Current Protocols in Protein Science*. 9.1.1–9.1.9., John Wiley & Sons, Inc.
- Friedman, M. (1999). "Chemistry, Biochemistry, Nutrition, and Microbiology of Lysinoalanine, Lanthionine, and Histidinoalanine in Food and Other Proteins." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(4): 1295-1319.
- Fu, D. and H. van Halbeek (1992). "N-glycosylation site mapping of human serotransferrin by serial lectin affinity chromatography, fast atom bombardment-mass spectrometry, and ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy." *Analytical Biochemistry* 206(1): 53-63.
- Fu, Q., Z. Guo, T. Liang, X. Zhang, Q. Xu and X. Liang (2009). "Chemically bonded maltose via click chemistry as stationary phase for HILIC." *Analytical Methods* 2(3): 217-224.
- Fukuda, M., B. Bothner, P. Ramsamooj, A. Dell, P. R. Tiller, A. Varki and J. C. Klock (1985). "Structures of sialylated fucosyl polylectosaminoglycans isolated from chronic myelogenous leukemia cells." *Journal of Biological Chemistry* 260(24): 12957-12967.
- Fuster, M. M. and J. D. Esko (2005). "The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets." *Nature Reviews Cancer* 5(7): 526-542.
- Gerçel-Taylor, Ç., L. B. Bazzett and D. D. Taylor (2001). "Presence of Aberrant Tumor-Reactive Immunoglobulins in the Circulation of Patients with Ovarian Cancer." *Gynecologic Oncology* 81(1): 71-76.
- Gornik, O. and G. Lauc (2008). "Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases." *Disease Markers* 25(4-5): 267-278.
- Goshe, M. B., T. P. Conrads, E. A. Panisko, N. H. Angell, T. D. Veenstra and R. D. Smith (2001). "Phosphoprotein Isotope-Coded Affinity Tag Approach for Isolating and Quantitating Phosphopeptides in Proteome-Wide Analyses." *Analytical Chemistry* 73(11): 2578-2586.
- Granovsky, M., J. Fata, J. Pawling, W. J. Muller, R. Khokha and J. W. Dennis (2000). "Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice." *Nature Medicine* 6(3): 306-312.
- Green, E. D., G. Adelt, J. U. Baenziger, S. Wilson and H. Van Halbeek (1988). "The asparagine-linked oligosaccharides on bovine fetuin. Structural analysis of N-glycanase-released oligosaccharides by 500-megahertz ¹H NMR spectroscopy." *Journal of Biological Chemistry* 263(34): 18253-18268.
- Gruys, E., M. J. M. Toussaint, T. A. Niewold and S. J. Koopmans (2005). "Acute phase reaction and acute phase proteins." *Journal of Zhejiang University. Science. B* 6(11): 1045-56.
- Hagmann, M.-L., U. Geuss, S. Fischer, G.-B. Kresse and J. B. Alan (1995). "[⁵¹I] Peptidyl-asp metalloendopeptidase". *Methods in Enzymology*. Volume 248, Academic Press
- Hanisch, F.-G., M. Jovanovic and J. Peter-Katalinic (2001). "Glycoprotein Identification and Localization of O-Glycosylation Sites by Mass Spectrometric Analysis of Deglycosylated/Alkylaminylated Peptide Fragments." *Analytical Biochemistry* 290(1): 47-59.
- Hanisch, F.-G., S. Müller and J. M. Walker (2005). "Approaches to the O-Glycoproteome". *The Proteomics Protocols Handbook*, New York City, Humana Press, Chapter 43
- Hansen, J.-E. S., J. Iversen, A. Lihme and T. C. Bøg-Hansen (1987). "Acute phase reaction, heterogeneity, and microheterogeneity of serum proteins as nonspecific tumor markers in lung cancer." *Cancer* 60(7): 1630-1635.

- Harvey, D. J. (2005). "Proteomic analysis of glycosylation: structural determination of N- and O-linked glycans by mass spectrometry." *Expert Review of Proteomics* 2(1): 87-101.
- Havliš, J., H. Thomas, M. Å ebela and A. Shevchenko (2003). "Fast-Response Proteomics by Accelerated In-Gel Digestion of Proteins." *Analytical Chemistry* 75(6): 1300-1306.
- Haynes, P. A. (1998). "Phosphoglycosylation: A new structural class of glycosylation?" *Glycobiology* 8(1): 1-5.
- Hillenkamp, F. and J. Peter-Katalinić (2007). "MALDI MS : a practical guide to instrumentation, methods and applications". Weinheim, Wiley-VCH-Verl.
- Hoff, S. D., Y. Matsushita, D. M. Ota, K. R. Cleary, T. Yamori, S.-i. Hakomori and T. Irimura (1989). "Increased Expression of Sialyl-Dimeric Le^x Antigen in Liver Metastases of Human Colorectal Carcinoma." *Cancer Research* 49(24 Part 1): 6883-6888.
- Ihara, S., E. Miyoshi, N. Taniguchi and E.-i.-C. P. Kamerling (2007). "4.22 - GnT-V and Cancer". *Comprehensive Glycoscience*, Oxford, Elsevier, Chapter: 4.22
- Inoue, N., T. Watanabe, T. Kutsukake, H. Saitoh, H. Tsumura, H. Arai and M. Takeuchi (1999). "Asn-linked sugar chain structures of recombinant human thrombopoietin produced in Chinese hamster ovary cells." *Glycoconjugate Journal* 16(11): 707-718.
- Ishimura, H., T. Takahashi, H. Nakagawa, S.-I. Nishimura, Y. Arai, Y. Horikawa, T. Habuchi, E. Miyoshi, A. Kyan, S. Hagiwara and C. Ohyama (2006). "N-Acetylglucosaminyltransferase V and β 1-6 Branching N-Linked Oligosaccharides Are Associated with Good Prognosis of Patients with Bladder Cancer." *Clinical Cancer Research* 12(8): 2506-2511.
- Iskratsch, T., A. Braun, K. Paschinger and I. B. H. Wilson (2009). "Specificity analysis of lectins and antibodies using remodeled glycoproteins." *Analytical Biochemistry* 386(2): 133-146.
- Itzkowitz, S. H., M. Yuan, Y. Fukushi, A. Palekar, P. C. Phelps, A. M. Shamsuddin, B. F. Trump, S.-i. Hakomori and Y. S. Kim (1986). "Lewis^x- and Sialylated Lewis^x-related Antigen Expression in Human Malignant and Nonmalignant Colonic Tissues." *Cancer Research* 46(5): 2627-2632.
- Jahn, O., D. Hesse, M. Reinelt and H. Kratzin (2006). "Technical innovations for the automated identification of gel-separated proteins by MALDI-TOF mass spectrometry." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386(1): 92-103.
- Kamerling, J. P., G. J. Boons, Y. C. Lee, A. Suzuki, N. Taniguchi and A. G. J. Voragen (2007). "Comprehensive glycoscience : from chemistry and systems biology", Amsterdam, Elsevier, Chapter 1.02, 3.01, 3.02
- Kaneda, Y., R. F. Whittier, H. Yamanaka, E. Carredano, M. Gotoh, H. Sota, Y. Hasegawa and Y. Shinohara (2002). "The High Specificities of Phaseolus vulgaris Erythro- and Leukoagglutinating Lectins for Bisecting GlcNAc or β 1-6-Linked Branch Structures, Respectively, Are Attributable to Loop B." *Journal of Biological Chemistry* 277(19): 16928-16935.
- Kang, D., Y. S. Gho, M. Suh and C. Kang (2002). "Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis." *Bulletin of the Korean Society* 23(11): 1511-1512.
- Katayama, H., T. Nagasu and Y. Oda (2001). "Improvement of in-gel digestion protocol for peptide mass fingerprinting by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 15(16): 1416-1421.
- Kim, Y.-G., H.-J. Jeong, K.-S. Jang, Y.-H. Yang, Y.-S. Song, J. Chung and B.-G. Kim (2009). "Rapid and high-throughput analysis of N-glycans from ovarian cancer serum using a 96-well plate platform." *Analytical Biochemistry* 391(2): 151-153.
- Kim, Y. and A. Varki (1997). "Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer." *Glycoconjugate Journal* 14(5): 569-576.

- King, R. D., J. Rowland, S. G. Oliver, M. Young, W. Aubrey, E. Byrne, M. Liakata, M. Markham, P. Pir, L. N. Soldatova, A. Sparkes, K. E. Whelan and A. Clare (2009). "The Automation of Science." *Science* 324(5923): 85-89.
- Kronewitter, S. R., M. L. A. de Leoz, K. S. Peacock, K. R. McBride, H. J. An, S. Miyamoto, G. S. Leiserowitz and C. B. Lebrilla (2010). "Human Serum Processing and Analysis Methods for Rapid and Reproducible N-Glycan Mass Profiling." *Journal of Proteome Research* 9(10): 4952-4959.
- Küster, B., S. F. Wheeler, A. P. Hunter, R. A. Dwek and D. J. Harvey (1997). "Sequencing of N-linked oligosaccharides directly from protein gels: In-gel deglycosylation followed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography." *Analytical Biochemistry* 250(1): 82-101.
- Küster, B., T. N. Krogh, E. Mørtz and D. J. Harvey (2001). "Glycosylation analysis of gel-separated proteins." *Proteomics* 1(2): 350-361.
- Labonté, V. (2010). "Roboter an der Bench" *Laborjournal - Service-Magazin für Medizin und Biowissenschaften* 6/2010: 46-49. Merzhausen, LJ-Verl. Herfort und Sailer.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680-685.
- Laroy, W., R. Contreras and N. Callewaert (2006). "Glycome mapping on DNA sequencing equipment." *Nature Protocols* 1(1): 397-405.
- Laugesen, S. and P. Roepstorff (2003). "Combination of two matrices results in improved performance of maldi ms for peptide mass mapping and protein analysis." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 14(9): 992-1002.
- Lei, T., Q.-Y. He, Y.-L. Wang, L.-S. Si and J.-F. Chiu (2008). "Heparin chromatography to deplete high-abundance proteins for serum proteomics." *Clinica Chimica Acta* 388(1-2): 173-178.
- Lopez, M., B. Coddeville, J. Langridge, Y. Plancke, P. Sautière, H. Chaabihi, F. Chirat, A. Harduin-Lepers, M. Cerutti, A. Verbert and P. Delannoy (1997). "Microheterogeneity of the oligosaccharides carried by the recombinant bovine lactoferrin expressed in *Mamestra brassicae* cells." *Glycobiology* 7(5): 635-651.
- Lottspeich, F. and J. W. Engels (2006). "Bioanalytik", München, Spektrum Akad. Verl., Kapitel: 22
- Ma, B., J. L. Simala-Grant and D. E. Taylor (2006). "Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes." *Glycobiology* 16(12): 158R-184R.
- Manimala, J. C., T. A. Roach, Z. Li and J. C. Gildersleeve (2006). "High-Throughput Carbohydrate Microarray Analysis of 24 Lectins." *Angewandte Chemie* 118(22): 3689-3692.
- Mannori, G., P. Crottet, O. Cecconi, K. Hanasaki, A. Aruffo, R. M. Nelson, A. Varki and M. P. Bevilacqua (1995). "Differential Colon Cancer Cell Adhesion to E-, P-, and L-selectin: Role of Mucintype Glycoproteins." *Cancer Research* 55(19): 4425-4431.
- Mano, N., S. Aoki, T. Yamazaki, Y. Nagaya, M. Mori, K. Abe, M. Shimada, H. Yamaguchi, T. Goto and J. Goto (2009). "Analysis of Phosphorylated Peptides by Double Pseudoneutral Loss Extraction Coupled with Derivatization Using N-(4-Bromobenzoyl)aminoethanethiol." *Analytical Chemistry* 81(22): 9395-9401.
- Mantey, L. R., O. T. Keppler, M. Pawlita, W. Reutter and S. Hinderlich (2001). "Efficient biochemical engineering of cellular sialic acids using an unphysiological sialic acid precursor in cells lacking UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase." *FEBS Letters* 503(1): 80-84.
- Martin, M. J., J. C. Rayner, P. Gagneux, J. W. Barnwell and A. Varki (2005). "Evolution of human-chimpanzee differences in malaria susceptibility: Relationship to human genetic loss of N-glycolylneuraminic acid." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(36): 12819-12824.

- Martin, S. L., L. E. Epperson, J. C. Rose, C. C. Kurtz, C. Ané and H. V. Carey (2008). "Proteomic analysis of the winter-protected phenotype of hibernating ground squirrel intestine." *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 295(1): R316-R328.
- Meden, H. (1996). "Ovarialkarzinom : aktuelle Aspekte zur Diagnostik und Therapie in Klinik und Praxis". Berlin; New York, de Gruyter.
- Mega, T., N. Nakamura and T. Ikenaka (1990). "Modifications of Substituted Seryl and Threonyl Residues in Phosphopeptides and a Polysialoglycoprotein by β -Elimination and Nucleophile Additions." *Journal of Biochemistry* 107(1): 68-72.
- Mehta, A. and T. M. Block (2008). "Fucosylated glycoproteins as markers of liver disease." *Disease Markers* 25(4): 259-265.
- Miyoshi, E., K. Moriwaki and T. Nakagawa (2008). "Biological Function of Fucosylation in Cancer Biology." *Journal of Biochemistry* 143(6): 725-729.
- Miyoshi, E. and M. Nakano (2008). "Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: Detailed analyses of oligosaccharide structures." *Proteomics* 8(16): 3257-3262.
- Morin, G. T., M. P. Hughes, M.-F. Paugam and B. D. Smith (1994). "Transport of Glycosides through Liquid Organic Membranes Mediated by Reversible Boronate Formation is a Diffusion-Controlled Process." *Journal of the American Chemical Society* 116(20): 8895-8901.
- Narisada, M., S. Kawamoto, K. Kuwamoto, K. Moriwaki, T. Nakagawa, H. Matsumoto, M. Asahi, N. Koyama and E. Miyoshi (2008). "Identification of an inducible factor secreted by pancreatic cancer cell lines that stimulates the production of fucosylated haptoglobin in hepatoma cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377(3): 792-796.
- Nemansky, M., W. E. C. M. Schiphorst and D. H. Van den Eijnden (1995). "Branching and elongation with lactosaminoglycan chains of N-linked oligosaccharides result in a shift toward termination with α 2-3-linked rather than with α 2-3-linked sialic acid residues." *FEBS Letters* 363(3): 280-284.
- Nordhoff, E., M. Schürenberg, G. Thiele, C. Lübbert, K.-D. Kloeppel, D. Theiss, H. Lehrach and J. Gobom (2003). "Sample preparation protocols for MALDI-MS of peptides and oligonucleotides using prestructured sample supports." *International Journal of Mass Spectrometry* 226(1): 163-180.
- Nordhoff, E., H. Lehrach and J. Gobom (2007). "Exploring the limits and losses in MALDI sample preparation of attomole amounts of peptide mixtures." *International Journal of Mass Spectrometry* 268(2-3): 139-146.
- Oda, Y., T. Nagasu and B. T. Chait (2001). "Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome." *Nature Biotechnology* 19(4): 379-382.
- Ogawa, H., M. Inoue, O. Tanizawa, M. Miyamoto and M. Sakurai (1992). "Altered expression of sialyl-Tn, Lewis antigens and carcinoembryonic antigen between primary and metastatic lesions of uterine cervical cancers." *Histochemistry and Cell Biology* 97(4): 311-317.
- Ohshima, C., S. Tsuboi and M. Fukuda (1999). "Dual roles of sialyl Lewis X oligosaccharides in tumor metastasis and rejection by natural killer cells." *The EMBO Journal* 18(6): 1516-1525.
- Okuyama, N., Y. Ide, M. Nakano, T. Nakagawa, K. Yamanaka, K. Moriwaki, K. Murata, H. Ohgashi, S. Yokoyama, H. Eguchi, O. Ishikawa, T. Ito, M. Kato, A. Kasahara, S. Kawano, J. Gu, N. Taniguchi and E. Miyoshi (2006). "Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation." *International Journal of Cancer* 118(11): 2803-2808.
- Otsuka, H., E. Uchimura, H. Koshino, T. Okano and K. Kataoka (2003). "Anomalous Binding Profile of Phenylboronic Acid with N-Acetylneuraminic Acid (Neu5Ac) in Aqueous Solution with Varying pH." *Journal of the American Chemical Society* 125(12): 3493-3502.

- Papac, D. I., J. B. Briggs, E. T. Chin and A. J. S. Jones (1998). "A high-throughput microscale method to release N-linked oligosaccharides from glycoproteins for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis." *Glycobiology* 8(5): 445-454.
- Park, E. I., S. M. Manzella and J. U. Baenziger (2003). "Rapid Clearance of Sialylated Glycoproteins by the Asialoglycoprotein Receptor." *Journal of Biological Chemistry* 278(7): 4597-4602.
- Rademaker, G. J., S. A. Pergantis, L. Blok-Tip, J. I. Langridge, A. Kleen and J. E. Thomas-Oates (1998). "Mass Spectrometric Determination of the Sites of O-Glycan Attachment with Low Picomolar Sensitivity." *Analytical Biochemistry* 257(2): 149-160.
- Rehm, H. (2006). "Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics", München, Elsevier, Spektrum, Akad. Verl., Kapitel 1.3.1
- Robert-Koch-Institut (2006). "Krebs in Deutschland 2005/2006 : Häufigkeiten und Trends ; eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V - Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes" 7. Ausg. Berlin, Robert Koch-Inst.
- Robert-Koch-Institut (2010). "Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010 ; eine Veröffentlichung des Zentrums für Krebsregisterdaten am RKI". Berlin, Robert-Koch-Institut.
- Roest Crollius, H., O. Jaillon, A. Bernot, C. Dasilva, L. Bouneau, C. Fischer, C. Fizames, P. Wincker, P. Brottier, F. Quetier, W. Saurin and J. Weissenbach (2000). "Estimate of human gene number provided by genome-wide analysis using Tetraodon nigroviridis DNA sequence." *Nature Genetics* 25(2): 235-238.
- Royle, L., M. P. Campbell, C. M. Radcliffe, D. M. White, D. J. Harvey, J. L. Abrahams, Y.-G. Kim, G. W. Henry, N. A. Shadick, M. E. Weinblatt, D. M. Lee, P. M. Rudd and R. A. Dwek (2008). "HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software." *Analytical Biochemistry* 376(1): 1-12.
- Rudd, P. M., G. R. Gulle, B. Kuster, D. J. Harvey, G. Opdenakker and R. A. Dwek (1997). "Oligosaccharide sequencing technology." *Nature* 388(6638): 205-207.
- Ruhaak, L. R., C. Huhn, W.-J. Waterreus, A. R. de Boer, C. Neusuł'ss, C. H. Hokke, A. M. Deelder and M. Wuhrer (2008). "Hydrophilic Interaction Chromatography-Based High-Throughput Sample Preparation Method for N-Glycan Analysis from Total Human Plasma Glycoproteins." *Analytical Chemistry* 80(15): 6119-6126.
- Ruhaak, L. R., R. Hennig, C. Huhn, M. Borowiak, R. J. E. M. Dolhain, A. M. Deelder, E. Rapp and M. Wuhrer (2010). "Optimized Workflow for Preparation of APTS-Labeled N-Glycans Allowing High-Throughput Analysis of Human Plasma Glycomes using 48-Channel Multiplexed CGE-LIF." *Journal of Proteome Research* 9(12): 6655-6664.
- Rusnak, F., J. Zhou and G. M. Hathaway (2004). "Reaction of phosphorylated and O-glycosylated peptides by chemically targeted identification at ambient temperature." *Journal of biomolecular techniques : JBT* 15(4): 296-304.
- Saitoh, O., W. C. Wang, R. Lotan and M. Fukuda (1992). "Differential Glycosylation and Cell Surface Expression of Lysosomal Membrane Glycoproteins in Sublines of a Human Colon Cancer Exhibiting Distinct Metastatic Potentials." *Journal of Biological Chemistry* 267(8): 5700-5711.
- Saldova, R., L. Royle, C. M. Radcliffe, U. M. Abd Hamid, R. Evans, J. N. Arnold, R. E. Banks, R. Hutson, D. J. Harvey, R. Antrobus, S. M. Petrescu, R. A. Dwek and P. M. Rudd (2007). "Ovarian Cancer is Associated with Changes in Glycosylation in Both Acute-Phase Proteins and IgG." *Glycobiology* 17(12): 1344-1356.

- Saldova, R., M. R. Wormald, R. A. Dwek and P. M. Rudd (2008). "Glycosylation changes on serum glycoproteins in ovarian cancer may contribute to disease pathogenesis." *Disease Markers* 25(4-5): 219-232.
- Sarrats, A. (2010). "Glycan alterations of serum proteins as tumour markers. Prostate-specific antigen in prostate cancer and acute-phase proteins in pancreatic cancer". Universitat de Girona. Departament de Biologia. dissertation. Girona, Spain
- Sarrats, A., R. Saldova, E. Pla, E. Fort, D. J. Harvey, W. B. Struwe, R. de Llorens, P. M. Rudd and R. Peracaula (2010). "Glycosylation of liver acute-phase proteins in pancreatic cancer and chronic pancreatitis." *Proteomics – Clinical Applications* 4(4): 432-448.
- Satomi, Y., Y. Shimonishi, T. Hase and T. Takao (2004). "Site-specific carbohydrate profiling of human transferrin by nano-flow liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18(24): 2983-2988.
- Schmidt, K. (2002). "Sugar rush." *New Scientist* 176(2366): 34-38.
- Schwarzer, J., E. Rapp and U. Reichl (2008). "N-glycan analysis by CGE–LIF: Profiling influenza A virus hemagglutinin N-glycosylation during vaccine production." *Electrophoresis* 29(20): 4203-4214.
- Sell, S. (1990). "Cancer-associated carbohydrates identified by monoclonal antibodies." *Human Pathology* 21(10): 1003-1019.
- Shahrokh, Z., L. Royle, R. Saldova, J. Bones, J. L. Abrahams, N. V. Artemenko, S. Flatman, M. Davies, A. Baycroft, S. Sehgal, M. W. Heartlein, D. J. Harvey and P. M. Rudd (2010). "Erythropoietin Produced in a Human Cell Line (Dynepo) Has Significant Differences in Glycosylation Compared with Erythropoietins Produced in CHO Cell Lines." *Molecular Pharmaceutics* 8(1): 286-296.
- Shiio, Y. and R. Aebersold (2006). "Quantitative proteome analysis using isotope-coded affinity tags and mass spectrometry." *Nature Protocols* 1(1): 139-145.
- Shoreibah, M., G. S. Perng, B. Adler, J. Weinstein, R. Basu, R. Cupples, D. Wen, J. K. Browne, P. Buckhaults, N. Fregien and M. Pierce (1993). "Isolation, characterization, and expression of a cDNA encoding N-acetylglucosaminyltransferase V." *Journal of Biological Chemistry* 268(21): 15381-15385.
- Simpson, R. J. (2003). "Proteins and proteomics: a laboratory manual", Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter 7
- Sinclair, A. M. and S. Elliott (2005). "Glycoengineering: The effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94(8): 1626-1635.
- Sinnott, M. (2007). "Chapter 4 Primary Structure and Conformation of Oligosaccharides and Polysaccharides". *Carbohydrate Chemistry and Biochemistry: Structure and Mechanism*, The Royal Society of Chemistry
- Spik, G., B. Coddeville and J. Montreuil (1988). "Comparative study of the primary structures of sero-, lacto- and ovotransferrin glycans from different species." *Biochimie* 70(11): 1459-1469.
- Stepper, J., S. Shastri, T. S. Loo, J. C. Preston, P. Novak, P. Man, C. H. Moore, V. Havlíček, M. L. Patchett and G. E. Norris (2011). "Cysteine S-glycosylation, a new post-translational modification found in glycopeptide bacteriocins." *FEBS Letters* 585(4): 645-650.
- Stone, R. L., A. M. Nick, I. A. McNeish, F. Balkwill, H. D. Han, J. Bottsford-Miller, R. Rupaimoole, G. N. Armaiz-Pena, C. V. Pecot, J. Coward, M. T. Deavers, H. G. Vasquez, D. Urbauer, C. N. Landen, W. Hu, H. Gershenson, K. Matsuo, M. M. K. Shahzad, E. R. King, I. Tekedereli, B. Ozpolat, E. H. Ahn, V. K. Bond, R. Wang, A. F. Drew, F. Gushiken, K. Collins, K. DeGeest, S. K. Lutgendorf, W. Chiu, G. Lopez-Berestein, V. Afshar-Kharghan and A. K. Sood (2012). "Paraneoplastic Thrombocytosis in Ovarian Cancer." *New England Journal of Medicine* 366(7): 610-618.

- Strupat, K., M. Karas and F. Hillenkamp (1991). "2,5-Dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption-ionization mass spectrometry." *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 111: 89-102.
- Sturiale, L., R. Barone, A. Fiumara, M. Perez, M. Zaffanello, G. Sorge, L. Pavone, S. Tortorelli, J. F. O'Brien, J. Jaeken and D. Garozzo (2005). "Hypoglycosylation with increased fucosylation and branching of serum transferrin N-glycans in untreated galactosemia." *Glycobiology* 15(12): 1268-1276.
- Suckau, D., A. Resemann, M. Schuerenberg, P. Hufnagel, J. Franzen and A. Holle (2003). "A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376(7): 952-965.
- Takahashi, N. (1996). "Three-dimensional mapping of N-linked oligosaccharides using anion-exchange, hydrophobic and hydrophilic interaction modes of high-performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography A* 720(1-2): 217-225.
- Takahashi, N., E. Yamamoto, K. Ino, E. Miyoshi, T. Nagasaka, H. Kajiyama, K. Shibata, A. Nawa and F. Kikkawa (2009). "High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in mucinous tumors of the ovary." *Oncology Reports* 22(5): 1027-1032.
- Takahashi, T., Y. Ikeda, E. Miyoshi, Y. Yaginuma, M. Ishikawa and N. Taniguchi (2000). " α 1,6fucosyltransferase is highly and specifically expressed in human ovarian serous adenocarcinomas." *International Journal of Cancer* 88(6): 914-919.
- Tateno, H., S. Nakamura-Tsuruta and J. Hirabayashi (2009). "Comparative analysis of core-fucose-binding lectins from *Lens culinaris* and *Pisum sativum* using frontal affinity chromatography." *Glycobiology* 19(5): 527-536.
- Taylor, M. E. and K. Drickamer (2003). "Introduction to glycobiology", Oxford, Oxford Univ. Press, Chapter: 3, 4, 9, 12
- Terpe, K. (2003). "Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems." *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(5): 523-533.
- Terpe, K. (2007). "Protein-Affinität-Tags." *BIOspektrum* 13(04/2007): 389-391.
- Thompson, S., E. Dargan and G. A. Turner (1992). "Increased fucosylation and other carbohydrate changes in haptoglobin in ovarian cancer." *Cancer Letters* 66(1): 43-48.
- Togayachi, A., Y. Kozono, H. Ishida, S. Abe, N. Suzuki, Y. Tsunoda, K. Hagiwara, A. Kuno, T. Ohkura, N. Sato, T. Sato, J. Hirabayashi, Y. Ikehara, K. Tachibana and H. Narimatsu (2007). "Polylactosamine on glycoproteins influences basal levels of lymphocyte and macrophage activation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(40): 15829-15834.
- Toida, T., I. R. Vlahov, A. E. Smith, R. E. Hileman and R. J. Linhardt (1996). "C-2 Epimerization of N-Acetylglucosamine in an Oligosaccharide Derived From Heparan Sulfate." *Journal of Carbohydrate Chemistry* 15(3): 351 - 360.
- Turner, G., M. Goodarzi and S. Thompson (1995). "Glycosylation of alpha-1-proteinase inhibitor and haptoglobin in ovarian cancer: evidence for two different mechanisms." *Glycoconjugate Journal* 12(3): 211-218.
- Ueda, K., T. Katagiri, T. Shimada, S. Irie, T.-A. Sato, Y. Nakamura and Y. Daigo (2007). "Comparative Profiling of Serum Glycoproteome by Sequential Purification of Glycoproteins and 2-Nitrobenzenesulfenyl (NBS) Stable Isotope Labeling: A New Approach for the Novel Biomarker Discovery for Cancer." *Journal of Proteome Research* 6(9): 3475-3483.
- Vanderschaeghe, D., W. Laroy, E. Sablon, P. Halfon, A. Van Hecke, J. Delanghe and N. Callewaert (2009). "GlycoFibroTest Is a Highly Performant Liver Fibrosis Biomarker Derived from DNA Sequencer-based Serum Protein Glycomics." *Molecular & Cellular Proteomics* 8(5): 986-994.

- Vanderschaeghe, D., N. Festjens, J. Delanghe and N. Callewaert (2010a). "Glycome profiling using modern glycomics technology: technical aspects and applications." *Biological Chemistry* 391(2/3): 149-161.
- Vanderschaeghe, D., Á. Szekrényes, C. Wenz, M. Gassmann, N. Naik, M. Bynum, H. Yin, J. Delanghe, A. Guttman and N. Callewaert (2010b). "High-Throughput Profiling of the Serum N-Glycome on Capillary Electrophoresis Microfluidics Systems: Toward Clinical Implementation of GlycoHepatoTest." *Analytical Chemistry* 82(17): 7408-7415.
- Varki, A., H. H. Freeze and A. E. Manzi (2001). "Overview of Glycoconjugate Analysis". *Current Protocols in Protein Science*. Volume 12.1, John Wiley & Sons, Inc.
- Varki, A., R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart and M. E. Etzler (2009). "Essentials of glycobiology", New York, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter: 1; 8; 13;19; 44, eBook:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=glyco2>
- Varki, A. and P. Gagneux (2009). "Human-specific evolution of sialic acid targets: Explaining the malignant malaria mystery?" *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(35): 14739-14740.
- von Horsten, H. H., C. Ogorek, V. Blanchard, C. Demmler, C. Giese, K. Winkler, M. Kaup, M. Berger, I. Jordan and V. Sandig (2010). "Production of non-fucosylated antibodies by co-expression of heterologous GDP-6-deoxy-d-lyxo-4-hexulose reductase." *Glycobiology* 20(12): 1607-1618.
- Wedepohl, S., M. Kaup, S. B. Riese, M. Berger, J. Dervede, R. Tauber and V. Blanchard (2010). "N-Glycan Analysis of Recombinant L-Selectin Reveals Sulfated GalNAc and GalNA-GalNAc Motifs." *Journal of Proteome Research* 9(7): 3403-3411.
- Wilson, N. L., B. L. Schulz, N. G. Karlsson and N. H. Packer (2002). "Sequential Analysis of N- and O-Linked Glycosylation of 2D-PAGE Separated Glycoproteins." *Journal of Proteome Research* 1(6): 521-529.
- Wojciechowicz, D. C., P. Y. Park and P. B. Paty (1995). "β1-6 Branching of N-Linked Carbohydrate Is Associated with K-ras Mutation in Human Colon Carcinoma Cell Lines." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 212(3): 758-766.
- Wormald, M. R., P. M. Rudd, D. J. Harvey, S.-C. Chang, I. G. Scragg and R. A. Dwek (1997). "Variations in Oligosaccharide-Protein Interactions in Immunoglobulin G Determine the Site-Specific Glycosylation Profiles and Modulate the Dynamic Motion of the Fc Oligosaccharides." *Biochemistry* 36(6): 1370-1380.
- Wuhrer, M., M. I. Catalina, A. M. Deelder and C. H. Hokke (2007). "Glycoproteomics based on tandem mass spectrometry of glycopeptides." *Journal of Chromatography B* 849(1-2): 115-128.
- Yamashita, K., T. Ohkura, H. Yoshima and A. Kobata (1981). "Substrate specificity of diplococcal β-N-acetylhexosaminidase, a useful enzyme for the structural studies of complex type asparagine-linked sugar chains." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 100(1): 226-232.
- Yamashita, K., N. Koide, T. Endo, Y. Iwaki and A. Kobata (1989). "Altered glycosylation of serum transferrin of patients with hepatocellular carcinoma." *Journal of Biological Chemistry* 264(5): 2415-2423.
- Yi, E., H. Zhang, K. Cooke, R. Aebersold and D. R. Goodlett (2005). "Quantitative Analysis of Proteomes and Subproteomes by Isotope-Coded Affinity Tag and Solid-Phase Glycoprotein Capture", Chapter 38
- Yousefi, S., E. Higgins, Z. Daoling, A. Pollex-Krüger, O. Hindsgaul and J. W. Dennis (1991). "Increased UDP-GlcNAc:Gal beta 1-3GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc) beta-1, 6-N-acetylglucosaminyltransferase activity in metastatic murine tumor cell lines. Control of polylysosamine synthesis." *Journal of Biological Chemistry* 266(3): 1772-1782.
- Zanette, D., A. Soffientini, C. Sottani and E. Sarubbi (2003). "Evaluation of phenylboronate agarose for industrial-scale purification of erythropoietin from mammalian cell cultures." *Journal of Biotechnology* 101(3): 275-287.

- Zheng, Y., Z. Guo and Z. Cai (2009). "Combination of β -elimination and liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry for the determination of O-glycosylation sites." *Talanta* 78(2): 358-363.
- Zhou, D. (2003). "Why are Glycoproteins Modified by Poly-N-Acetylglucosamine Glycoconjugates?" *Current Protein & Peptide Science* 4(1): 1-9.
- Zhou, H., J. A. Ranish, J. D. Watts and R. Aebersold (2002). "Quantitative proteome analysis by solid-phase isotope tagging and mass spectrometry." *Nature Biotechnology* 20(5): 512-515.
- Zimmermann, V., H.-G. Hennemann, T. Daubmann and U. Kragl (2007). "Modelling the reaction course of N-acetylneuraminic acid synthesis from N-acetyl-D-glucosamine—new strategies for the optimisation of neuraminic acid synthesis." *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(3): 597-605.

9 Poster- und Publikationsliste

Konferenzbeiträge

- 05/2012 Highly efficient extraction and clean-up of zearalenone from edible oils, 34. Mycotoxin-Workshop, Braunschweig, Germany
- 05/2011 *N*-glycosylation of single glycoproteins from ovarian cancer serum samples, 21st International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, Berlin, Germany
- 03/2011 Automated *N*-glycan profiling, application to human serum glycoproteins, 5th Glycan Forum, Berlin, Germany
- 08/2010 Elucidation of glycoprotein glycosylation from human blood serum, Sialoglyco 2010, Potsdam, Germany
- 03/2009 Investigation of *N*-glycosylation of single glycoproteins from human blood serum, 20th Joint Glycobiology Meeting, Köln, Germany
- 11/2008 Elucidation of glycoprotein glycosylation from human blood serum, 19th Joint Meeting, Wageningen, Netherland
- 10/2007 „Glykodesign und Glykoanalytik“ – Neue Perspektiven für Medizin und Biotechnologie, 14th European Carbohydrate Symposium Lübeck, Germany
- 06/2007 “Glycomics”: Development and Characterization of Glycan-Based Biotechnological Products, Proceedings of the 20th ESACT Meeting, Dresden, Germany

Publikationen

- 2011 „Growth and Polyhydroxybutyrate Production by *Ralstonia eutropha* in Emulsified Plant Oil Medium“, Applied Microbiology and Biotechnology, Charles F. Budde, Sebastian L. Riedel, Florian Hübner, Stefan Risch, Milan K. Popović, ChoKyun Rha, Anthony J. Sinskey, 2011

10 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name Stefan Risch

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Dr. Markus Berger für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe Glyko-design und Glykoanalytik (Charité Berlin) und die damit einhergehende wissenschaftliche Betreuung meines Dissertationsprojekts. Seine Unterstützung, in Form von konstruktiver und inspirierender Kritik und das Interesse am Gelingen des Vorhabens haben entschieden zum erfolgreichen Abschluss beigetragen.

Nicht weniger möchte ich Frau Dr. Véronique Blanchard für ihre stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung danken. Sie war es, von der ich die Feinheiten der Glykoanalytik mit Begeisterung näher gebracht bekam.

Dr. Matthias Kaup gehört mein besonderer Dank für die kooperative Zusammenarbeit und Unterstützung bei der CE.

Prof. Rudolf Tauber danke ich für die Möglichkeit, dass ich meine wissenschaftliche Laufbahn in einem seiner Institute fortführen durfte.

Desweiteren möchte ich den Gutachtern meiner Arbeit, Prof. Christian Hackenberger (FU Berlin) und Prof. Stephan Hinderlich (Beuth Hochschule für Technik, Berlin) für die Übernahme dieser Aufgabe danken.

Ein herzliches Dankeschön geht an Detlef Grunow, Dennis Mewis und Hannes Hinneburg für die exzellente technische Unterstützung im Labor.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die angenehme Zeit im Labor danken. Danke auch für das rekombinante A1AT, liebe Astrid.

Manuela Hügelland verdient ein ganz besonderes Dankeschön für die Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit. Es war eine schöne gemeinsame Zeit im Labor.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern, Schwiegereltern und meiner kleinen Familie für die Unterstützung während der gesamten Zeit danken. Schön das es Euch gibt. Ihr habt es um vieles angenehmer gemacht, ganz besonders Du, kleiner Jannis.

Diese Arbeit wurde vom BMBF und der Sonnenfeld Stiftung unterstützt.

12 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation eigenständig und nur mit den in der Arbeit aufgeführten Hilfsmitteln angefertigt zu haben. Die Arbeit wurde in keinem früheren Promotionsverfahren eingereicht, angenommen oder abgelehnt.

Ort, Datum, Stefan Risch