

Aus dem Institut für
Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Charakterisierung der Glykosylierungsstelle von Glykoproteinen
mittels Matrix-unterstützter Laserdesorption / Ionisations- (MALDI)
und Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt an der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Xi Liu

aus Anhui

Datum der Promotion: 04.09.2015

Für meine Familien

Inhaltsverzeichnis

Tabelle- und Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Zusammenfassung	1
1.1. Zusammenfassung.....	1
1.2. Abstract.....	2
2. Einleitung.....	4
2.1. Proteinglykosylierung	4
2.1.1. N-Glykane	6
2.1.2. O-Glykane	11
2.1.3. C-Mannosylierung	12
2.2. Glykoproteine	13
2.2.1. A1AT und entsprechende Varianten	13
2.2.2. Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor.....	16
2.3. Analytische Methoden zur Analyse von Glykopeptiden und Glykanen ..	18
2.3.1. Charakterisierung des gesamten Glykanpools	18
2.3.2. Charakterisierung der Glykopeptide	20
2.4. Zielsetzung der Arbeit.....	24
3. Material und Methoden.....	26
3.1. Material	26
3.1.1. Chemikalien	26
3.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	27
3.1.3. Enzyme.....	28
3.1.4. Puffer und Lösungen	29
3.1.5. Aufreinigungsmaterialien.....	30
3.2. Methoden	31
3.2.1. Proteinaufreinigung über FPLC	31
3.2.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	31
3.2.3. Western Blot.....	33
3.2.4. Proteinbestimmung	34
3.2.5. Monosaccharid-Analyse über HPAEC-PAD	34

3.2.6.	Sialinsäurebestimmung mit HPAEC-PAD.....	35
3.2.7.	Freisetzung der Glykane/Glykopeptide.....	35
3.2.8.	In-Gel-Verdau	37
3.2.9.	Exoglykosidase Verdauen.....	37
3.2.10.	Aufreinigung von Glykanen und Peptiden	38
3.2.11.	Chemische Verfahren	40
3.2.12.	Ladungsprofile von Glykanen mit <i>Asahi-Pak</i> -HPLC.....	42
3.2.13.	MALDI -TOF-MS	42
3.2.14.	Nano-LC-Q-TOF-MS.....	44
3.2.15.	Datenbanken.....	46
4.	Ergebnisse.....	48
4.1.	Charakterisierung von A1AT aus der NZL-Zelllinie (AGE1.hn)	48
4.1.1.	Aufreinigung des A1AT mittels FPLC.....	48
4.1.2.	<i>Peptid-Mapping</i> von A1AT	50
4.1.3.	Neutrale Monosaccharidanalyse von A1AT	52
4.1.4.	Bestimmung der Sialinsäure von A1AT mittels HPAEC-PAD.....	53
4.1.5.	Massenspektrometrische Charakterisierung von Glykanen	54
4.1.6.	Analyse der Sialinsäureverknüpfung von A1AT mittels 2AB-HPLC	56
4.1.7.	Charakterisierung der N-Glykosylierungsstellen von A1AT	58
4.2.	Charakterisierung der Glykosylierungsstelle im A1AT-Wildtyp (wt) aus der HEK293-Zelllinie	65
4.3.	Charakterisierung der Glykosylierungsstelle der A1AT-Variante aus der HEK293-Zelllinie	68
4.4.	Charakterisierung des GM-CSF aus der HEK293-Zelllinie	75
4.4.1.	Charakterisierung des N-Glykanpools.....	75
4.4.2.	Charakterisierung der O-Glykane.....	80
5.	Diskussion.....	83
5.1.	A1AT.....	83
5.1.1.	Analyse des A1AT N-Glykanpools	83
5.1.2.	Glykosylierungsstellen-spezifische Analytik der N- Glykane von A1AT aus verschiedenen Zelllinien.....	86
5.1.3.	Biologische Aktivität des A1AT.....	91
5.1.4.	Isolierung der Glykopeptide	95
5.2.	GM-CSF.....	96
6.	Literaturverzeichnis	99

7. Anhang.....	115
8. Lebenslauf.....	117
9. Publikationslist.....	118
10. Danksagung	119
11. Eidesstattliche Versicherung.....	120

Tabelle- und Abbildungsverzeichnis

Tab. 1 Einige typische Monosaccharid Bausteine von Glykanen	5
Tab. 2 Verwendete Chemikalien.....	26
Tab. 3 Geräte	27
Tab. 4 Verbrauchsmaterialien.....	28
Tab. 5 verwendete Enzyme	29
Tab. 6 Zusammensetzung verschiedener Puffer und Lösungen	29
Tab. 7 Aufreinigungsmaterialien.....	30
Tab. 8 Pipettierschema zur Herstellung eines SDS-Gels	32
Tab. 9 Peptide des Kalibrierstandards	44
Tab. 10 Kalibrant für Nano-LC-QTOF-MS	46
Tab. 11 Datenbanken für die Analyse der MS-Data.....	47
Tab. 12 <i>Peptide Mapping</i> der ersten und zweiten Bande.	51
Tab. 13 Isolierte N-verknüpfte Oligosaccharidstrukturen aus A1AT.	55
Tab. 14 Aminosäuresequenz der vier Glykosylierungsstellen.....	61
Tab.15 Kohlenhydrate jeder Glykosylierungsstelle.	62
Tab. 16 Oligosaccharide aller Glykosylierungsstellen des A1AT-wt aus HEK293-Zellen.	68
Tab. 17 Oligosaccharidanteil des Glykopeptids der A1AT-Variante N201	71
Tab. 18 Glykopeptidsequenz der A1AT-Variante N201	72
Tab. 19 Glykopeptidsequenz der A1AT-Variante N123	74
Tab. 20 Oligosaccharidanteil des Glykopeptids der A1AT-Variante N123	74
Tab. 21 N-Glykanstrukturen des GM-CSF	78
Tab. 22 O-Glykanstrukturen des GM-CSF	81
Abb. 1 Strukturen der N-Glykane: Mannosereichen-, Komplex- und Hybrid-Typ.....	7
Abb. 2 Struktur des Dolicholphosphats	8
Abb. 3 Biosynthese des N-Glykan-Vorläufers	9
Abb. 4 Biosynthese II der N-Glykane des Komplex-tyt [Taylor et al. 2003].....	10
Abb. 5 Die <i>Core</i> Strukturen von O-Glykanen.....	11
Abb. 6 C-Mannosyliertes Tryptophan.....	13
Abb. 7 Kristallstruktur von A1AT.	14
Abb. 8 Schematische Übersicht der verwendeten Analytik der Glykane	20
Abb. 9 Schema der enzymatischen Deglykosylierung eines N-Glykans	20
Abb. 10 Nomenklatur für Glykanfragmente nach Domon und Costello	23
Abb. 11 SPE mit hydrophober RP-18-Phase.....	39
Abb. 12 Funktionelle Gruppe der stationäre Phase einer ZIC-HILIC-Säule	39
Abb. 13 Fluoreszenzmarkierung mittels 2- Aminobenzamid.....	40
Abb. 14 Schema des Ultraflex III MALDI-TOF-MS	43

Abb. 15 Schematische Prinzip einer Nano-LC-ESI-MS	46
Abb. 16 Fraktionen der Mono Q-Aufreinigung von A1AT.	49
Abb. 17 MALDI-TOF-Spektrum der Molekularmasse von A1AT.	49
Abb. 18 Chromatogramme der Monosaccharidanalysen mit Hilfe der HPAEC-PAD.	53
Abb. 19 Chromatogramme der Sialinsäureanalyse.	54
Abb. 20 Glykosylierungsnachweis des A1AT mittels PNGase F Verdau	55
Abb. 21 Chromatogramme der Asahipak-Fractionen	57
Abb. 22 MALDI-TOF Spektren von permethylierten N-Glykanen des A1AT.	58
Abb. 23 HPLC-Chromatogramme der Glykopeptide	59
Abb. 24 Nano-LC-MS Spektren der A1AT Glykopeptide.	61
Abb. 25 Das extrahierte Ionenchromatogramm (EIC 204) des A1AT	63
Abb. 26 Das HPLC-Spektrum des A1AT nach Trypsin Verdau.	64
Abb. 27 Das Nano-LC-QTOF-MS/MS Fragmentierungsspektrum	65
Abb. 28 Nano-LC-MS Spektren der A1AT-HEK293-Wildtyp Glykopeptide.	66
Abb. 29 Das extrahierte Ionenchromatogramm (EIC m/z 204) des A1AT-wt	67
Abb. 30 Aminosäuresequenz des A1AT.....	69
Abb. 31 Nano-LC-MS Spektren der A1AT-Variante N 201 Glykopeptids.	70
Abb. 32 Nano-LC-MS Spektren der Glykopeptide der A1AT-Variante N123.	73
Abb. 33 Nachweis des GM-CSF nach Thrombin-Verdau.	76
Abb. 34 Schematische Übersicht zur Analytik des GM-CSF	76
Abb. 35 MALDI-Spektrum der N-Glykane des GM-CSF.....	78
Abb. 36 MALDI-TOF/TOF-MS Spektrum der permethylierten Glykanstruktur	80
Abb. 37 MALDI-TOF-Spektrum der O-Glykane des GM-CSF. # nicht identifiziert.....	81
Abb. 38 MALDI-TOF/TOF-MS-Spektrum des O-Glykans des GM-CSF mit m/z 879.	82
Abb. 39 Übereinstimmung mit veröffentlichten Glykopeptiden	88
Abb. 40 Übereinstimmung mit veröffentlichten Glykopeptiden	89
Abb. 41 Übereinstimmung mit veröffentlichten Glykopeptiden	89
Abb. 42 Zusammenfassung der ESI-Daten der Glykopeptide von A1AT	90
Abb. 43 Verschiedene Konzentrationen von Elastase	94
Abb. 44 A. Humane Monozyten	95
Abb. 45 Zusammenfassung der MALDI-TOF-MS-Daten der N-Glykane	97
Abb. 46 Vergleichen des Sialyierungsgrades der N-Glykane	115
Abb. 47 Aminosäuresequenz des GM-CSF.....	115
Abb. 48 Molekular Masse des Fusionprotein GM-CSF und IgG-Fc	116

Abkürzungsverzeichnis

2AB	2-Aminobenzamide
A1AT	alpha-1 Antitrypsin
ACN	Acetonitril
AEC	<i>Anion-Exchange Chromatography</i>
AGE1.hn	<i>Human Neuronal Cell Line</i>
APS	Ammoniumpersulfat
APTS	8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt
Asn	Asparagin
BCA	Bicinchoninsäure
CDG	<i>Congenital Disorder of Glycosylation</i>
CDS	<i>Coding Sequence</i>
CHO	Chinese Hamster Ovary
CID	Kollision Induzierte Dissoziation
COS	<i>CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material</i>
Da	Dalton
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
dHex	Desoxyhexose
Dol-P	Dolicholphosphat
DTT	Dithiothreitol
ER	Endoplasmatischen Retikulum
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ETD	Elektronentransfer Dissoziation
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-AcetylGalactosamin
Glc	Glucose
GlcNAc	N-AcetylGlucosamin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierende Faktor
HEK293	<i>Human Embryonic Kidney 293</i>
Hex	Hexose
HexNAc	N-Acetyl-Hexosamin
HILIC	<i>Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography</i>
HPAEC-PAD	<i>High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
IgG	Immunglobulin G
LPS	Lipopolysaccharid

m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
Man	Mannose
mg	Milligramm
MilliQ Wasser	aufbereitet durch Wasseraufbereitungsanlage
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>
NANA	N-Acetylneuraminsäure
Nano-LC-ESI-MS	<i>Nano Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
Neu5Gc	N-Glycolylneuraminsäure
OST-Komplex	Oligosaccharyltransferase-komplex
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PNGase F	<i>Peptide-N4-(N-acetyl-β-glucosaminyl) Asparagine Amidase F</i>
Q-TOF	<i>Quadrupole Time-Of-Flight</i>
RCL	<i>Reactive Center Loop</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SPE	Solid Phase Extraction
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
wt	wildtypisch
ZIC	<i>Zwitterion Chromatography</i>

1. Zusammenfassung

1.1. Zusammenfassung

Die Glykosylierung ist eine wichtige posttranslationale Modifikation, die die biologische Aktivität von Proteinen wesentlich beeinflusst. Sie ist ortsspezifisch und abhängig von der sterischen Hinderung um die Glykosylierungsstellen und den vorhandenen Glycosyltransferasen.

Humanes Alpha-1-Antitrypsin (A1AT) ist ein bekanntes Glykoprotein mit Antiprotease-Aktivität. Das Protein A1AT besitzt 394 Aminosäuren und drei potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn-46, Asn-83 und Asn-247. Ein A1AT-Mangel wird zur Zeit mit humanem A1AT aus dem Plasma behandelt. In Hinblick auf die therapeutischen Anwendungen wurde rA1AT in der neuen humanen neuronalen Zelllinie (AGE1.hn) und der *human embryonic kidney* 293 (HEK293) Zelllinie hergestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden die N-Glykosylierung und die Glykosylierungsstelle von A1AT aus AGE1.hn-Zellen und HEK293-Zellen sowie von den entsprechenden A1AT-Varianten aus HEK293-Zellen massenspektrometrisch analysiert.

Die Glykopeptide wurden mit der zwitterionischen hydrophilen Interaktionsflüssigkeitschromatographie (ZIC-HILIC) angereichert und mittels nano-RPLC-MS/MS analysiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass A1AT aus der AGE1.hn Zelllinie Asn-247 größtenteils biantennäre fucosylierte N-Glykane besitzt, während die Glykosylierungsstelle Asn-46 triantennäre Glykane trägt. Asn-83 besitzt überwiegend fucosylierte tri- und tetraantennäre Glykane. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass die verwendeten Zelllinien (AGE1.hn und HEK293) zur Produktion der A1AT einen entscheidenden Einfluss auf die Kohlenhydratseitenketten des Glykoproteins haben.

Die neuen A1AT-Varianten N123 und N201 aus der HEK293-Zelllinie wurden mit einzelnen zusätzlichen N-Glykosylierungsstellen hergestellt. Das ortsspezifische

Profil der A1AT-Variante N123 bestand vor allem aus monofucosylierten bi-, tri- und tetraantennären komplexen N-Glykanen mit einer Tendenz zu höheren Antennen-Strukturen im Vergleich zum Wildtyp. An der Glykosylierungsstelle N201 sind ausschließlich tetraantennäre Strukturen vorhanden.

Humanes GM-CSF stimuliert hauptsächlich Granulozyten- und Makrophagenvorläuferzellen und ist an der Regulation der Hämatopoese sowie an Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt. Es wird als Medikament bei Krebspatienten verwendet, um Granulozytopenie, eine Nebenwirkung der Chemotherapie zu vermeiden. GM-CSF ist ein Fusionsprotein, das in HEK293-Zellen exprimiert wurde. Es wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine detaillierte Strukturanalyse der N- und O-Glykane dieses Proteins dargelegt. Bei den N-Glykanen konnten ca. 60 verschiedene Kohlenhydratkompositionen, vor allem Oligosaccharide vom komplexen Typ mit mehrfach Fucose und/oder Sialinsäuren, nachgewiesen werden. In Proben dominierten sialylierte O-Glykane.

1.2. Abstract

Glycosylation is an essential protein post-translational modification that influences biological activity of the protein. Glycosylation is site-specific, depends on the steric hindrance around the glycosylation sites and on the availability of glycosyltransferases.

Human alpha-1-antitrypsin (A1AT), produced by hepatocytes, consists of 394 amino acids and is N-glycosylated at Asn-46, Asn-83, and Asn-247. A1AT deficiency is currently treated with A1AT that is purified from human serum. In view of therapeutic applications, rA1AT was produced using a novel human neuronal cell line (AGE1.hn) and the human embryonic kidney 293 (HEK293) cell line. In this study, the N-glycosylation patterns, as well as the site-specificity of the recombinant glycoprotein A1AT and its variants were analyzed by means of mass spectrometry (MS).

Glycopeptides were enriched using zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography (ZIC-HILIC) and analyzed using nano-RPLC-MS/MS. Analysis of the site-specificity of A1AT (AGE1.hn) revealed that Asn-247 was mainly occupied by diantennary N-glycans whereas Asn-46 was occupied by bi- and triantennary N-glycans. Asn-83 was exclusively occupied by sialylated tri- and tetraantennary N-glycans. Results show that the production of A1AT in different cell lines (AGE1.hn or HEK293) can have a decisive influence on the carbohydrate side chains of the glycoprotein.

Novel A1AT variants having an additional N-glycosylation site at N123 and N201 were recombinantly expressed in HEK293 cells. The site-specific profile of the A1AT variants N123 was mostly composed of monofucosylated bi, tri- and tetraantennary complex-type N-glycans with a tendency toward higher antennary structures compared to the wild-type. Tetraantennary structures were exclusively present at site N201.

Human GM-CSF stimulates the majority of the granulocyte- and macrophage progenitor cells and functions as a regulator of hematopoiesis and immune- and inflammatory responses. It is used as a medication for cancer patients to avoid granulocytopenia, which is a possible side effect of chemotherapy. GM-CSF was a fusion protein expressed in HEK293 cells and the structural analysis of its N- and O-glycans is reported in this thesis. A total of 60 N-glycan structures, mostly of the complex-type with fucose and/or sialic acid, were identified. Sialylated O-glycans were found to be the most abundant.

2. Einleitung

2.1. Proteinglykosylierung

Über 50 % aller Proteine enthalten neben den Aminosäuren auch langkettige und verzweigte Kohlenhydratmoleküle, die kovalent an bestimmte Aminosäuren wie Asparagin, Serin oder Threonin gebunden sind [Gao 2009; Mayampurath et al., 2011; Van den Steen et al., 1998]. Die Proteinglykosylierung ist eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen, die in Eukaryoten sowie Prokaryoten stattfindet [Weerapana et al., 2006]. Eukaryotische Glykoproteine sind zu ca. 90 % mit N-Glykanen modifiziert, die restlichen 10 % stellen die O-Glykanen dar [Apweiler et al., 1999].

Die Glykosylierung ist spezifisch für die Spezies, das Gewebe, den Zelltyp und das Protein [Lottspeich et al., 1998]. Darüber hinaus ist sie die Ursache für charakteristische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Zellen, wie z. B. bei der Zell-Zell-Erkennung [Gey 2008]. Die unterschiedlichen Typen der Verknüpfung von Kohlenhydratanteil (z. B. in α - oder β -Stellung) und Protein sowie die Position der Glykosylierung innerhalb des Peptidrückgrats spielen bei der Charakterisierung eines Glykoproteins eine wichtige Rolle [Ramen et al., 2005].

Die Kohlenhydratketten der Glykoproteine bestehen aus verschiedenen Monosacchariden wie Glucose (Glc), Galactose (Gal), Mannose (Man), N-Acetylglucosamin (GlcNAc), N-Acetylgalactosamin (GalNAc), Fucose (Fuc) und N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), die in der Tab. 1 aufgeführt sind. Außerdem sind Sulfatierungen, Phosphorylierungen und Methylierungen als Glykanmodifikationen möglich. Die hauptsächlich vorkommenden Verbindungen zwischen einer Kohlenhydratkette und einem Protein sind die N- und die O-glykosidischen Verknüpfungen. Es konnten aber auch andere Glykosylierungsformen identifiziert werden, wie die weniger bekannte C-Glykosylierung [Hofsteenge et al. 1994]. In den nächsten Unterkapiteln sollen die Struktur und Biosynthese dieser Moleküle und

deren Funktion erläutert werden.

Tab. 1 Einige typische Monosaccharidbausteine von Glykanen

Monosaccharid	Struktur	Symbol	Abkürzung
D-Galactose			Gal
D-Mannose			Man
L-Fucose			Fuc
N-Acetyl-D-glucosamine			GlcNAc
D-Glucose			Glc
N-Acetyl-D-galactosamine			GalNAc
N-Acetylneuraminsäure			NeuAc

2.1.1. N-Glykane

2.1.1.1. Struktur

Bei N-glykosylierten Proteinen ist das Glykan β -glykosidisch mit der γ -Amidogruppe eines Asparaginrestes verknüpft. Das N-Glykan kann nur am Asparaginrest der Asn-X-Thr/Ser Konsensussequenz verknüpft werden, wobei X jede beliebige Aminosäure abgesehen von Prolin sein kann [Gavel et al., 1990]. Alle N-Glykane enthalten das Pentasaccharid $\text{Man}\alpha 1-6(\text{Man}\alpha 1-3)\text{Man}\beta 1-4\text{GlcNAc}\beta 1-4\text{GlcNAc}$ als Kernstruktur („Core“). Je nach Zusammensetzung werden N-Glykane in drei Hauptklassen unterteilt: den Mannose-reichen (*high mannose*) Typ, den Komplex-Typ und den Hybrid-Typ (siehe Abb. 1). Bei dem Mannose-reichen Typ sind nur zusätzliche Mannosereste an die *Core*- Struktur verknüpft. Demgegenüber steht der Komplex-Typ, der keine weiteren Mannosereste enthält, sondern verschiedene Kombinationen aus N-Acetylglucosamin-, Galactose-, Sialinsäure- und Fucoseeinheiten, die an die endständigen Mannosen der Pentasaccharidkernstruktur gebunden sind. Im Allgemeinen können bis zu sechs GlcNAc-Einheiten an den drei Mannosylresten der Kernstruktur gebunden sein, die als mono-, bi-, tri-, tetra- penta- oder hexaantennäre N-Glykanstrukturen bezeichnet werden [Roth et al., 2002, Jenkins et al., 1996]. Die Fucosereste können zusätzlich entweder am ersten GlcNAc der *Core*-Struktur oder an den Antennen sowie an eine der Galactoseeinheiten gebunden sein. Der Hybrid-Typ enthält strukturelle Elemente aus dem Mannose-reichen und dem Komplex-Typ und stellt daher eine Mischform dar. Diese N-Glykane können weiterhin bi-, tri- oder tetraantennäre Strukturen aufweisen. Der *bisecting*-GlcNAc-Rest vom Komplex- und Hybrid-Typ kann an die $\beta 1-4$ gebundene Mannose der Kernstruktur gebunden sein.

Die Sialinsäuren werden auch als Neuraminsäure bezeichnet und kommen in über 50

verschiedenen Typen vor [Varki et al., 2009]. Dabei kann beispielsweise an die Aminogruppe der Neuraminsäure eine N-Acetyl- bzw. N-Glycolylgruppe gebunden sein, was zur N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) bzw. N-Glycolylneuraminsäure (Neu5Gc) führt. Sialinsäuren können über eine α 2,3- oder α 2,6-Bindung an die Galactose verknüpft sein.

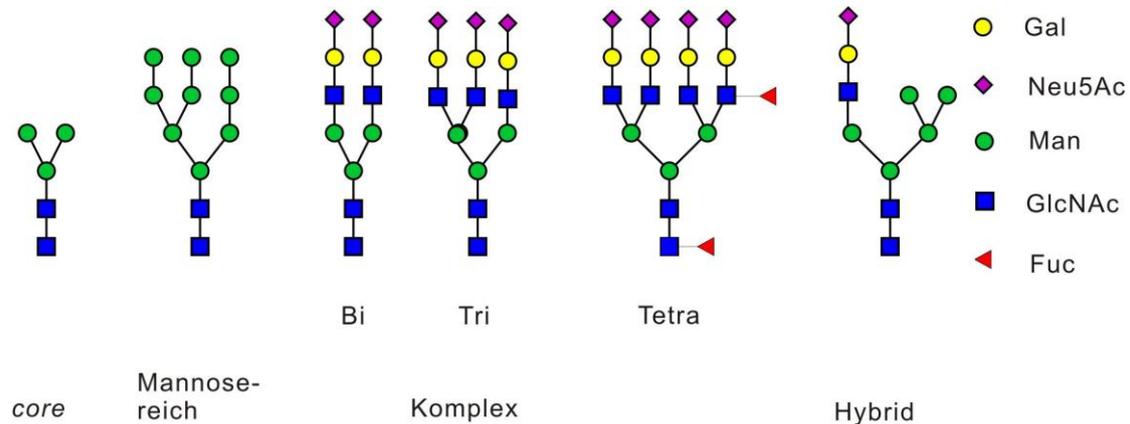
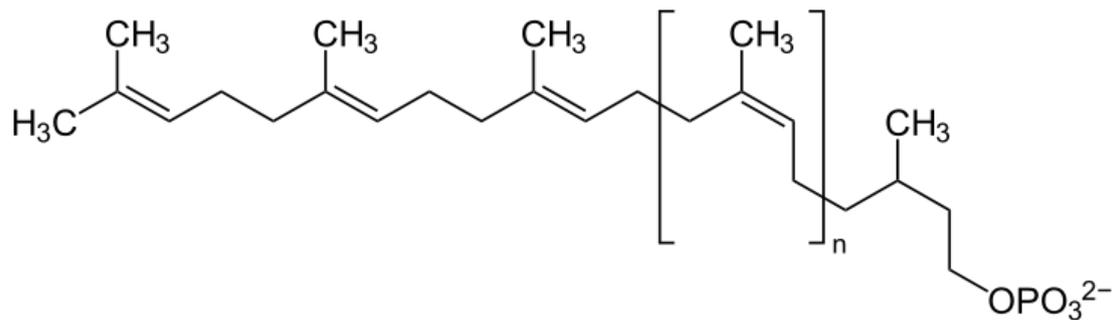


Abb. 1 Strukturen der N-Glykane: Mannose-reichen, Komplex- und Hybrid-Typ

2.1.1.2. Biosynthese

Die Biosynthese der N-Glykane beginnt an der cytoplasmatischen Membranseite des ERs, wird im Golgi-Apparat fortgeführt und durch verschiedene Glykosyltransferasen und Glykosidasen katalysiert, die zell-, gewebe- und proteinspezifisch exprimiert werden. Nukleotidaktivierte Monosaccharide werden an einem Vorläufer von Dolicholphosphat (Dol-P) gebunden. Dolicholphosphat ist ein einzelnes Lipidmolekül aus mindestens 20 Isopren-(C5-)Einheiten, das in der ER-Membran lokalisiert ist [Berg et al., 2007] (Abb. 2). Es dient als Verankerung des wachsenden Glykans in der ER-Membran.



n = 15 - 19

Abb. 2 Struktur des Dolicholphosphats

Die Bindung von zwei GlcNAc mit Dol-P wird durch die Enzyme GlcNAc-1-Phosphotransferase und Glykosyltransferase katalysiert. Nach Bindung von fünf Mannose-Einheiten auf der cytosolischen Seite des ER erfolgen nach einem „Flip-like Mechanismus“ auf die luminal Seite der ER-Membran weitere Glykosylierungsschritte. Die Proteinkomponenten werden gleichzeitig an den Ribosomen des ER synthetisiert und im Lumen des ER mit einer Glykanvorstufe verknüpft. Der entstehende Vorläufer $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ wird kotranslational auf den Asparaginrest der Konsensussequenz Asn-X-Thr/Ser übertragen. Dieser Schritt wird durch den Oligosaccharyltransferase-Komplex (OST-Komplex) katalysiert. Der OST-Komplex ist ein Transmembranprotein, das bis zu acht Untereinheiten aufweist (Abb. 3).

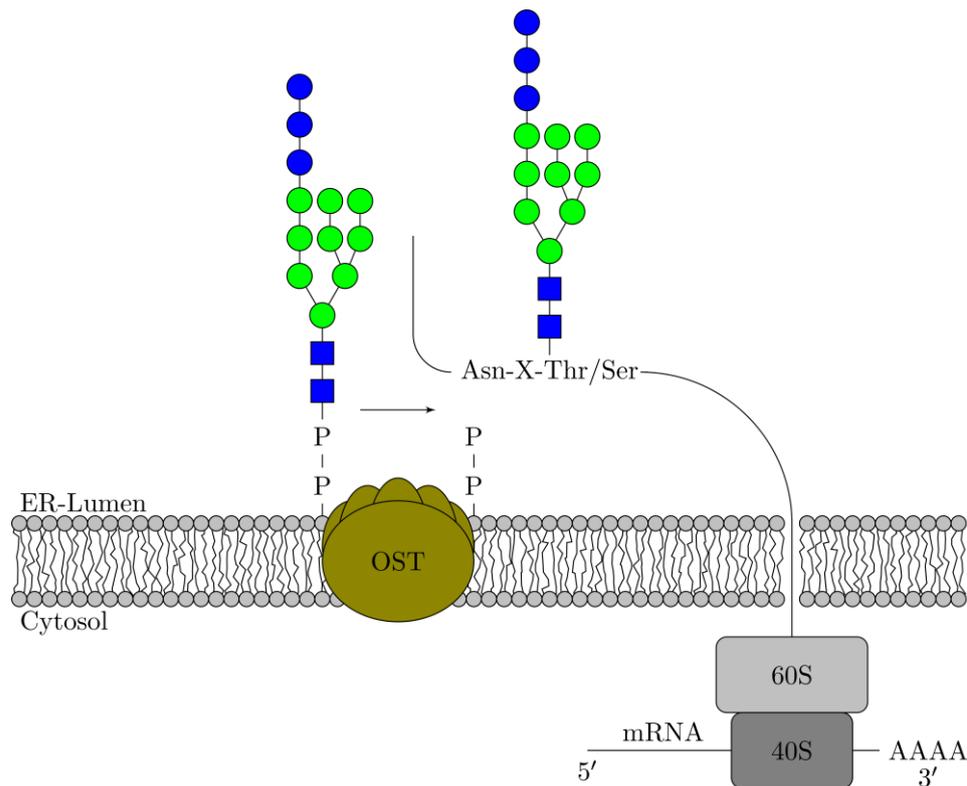


Abb. 3 Biosynthese des N-Glykan-Vorläufers

Während der nachfolgenden *Trimming*-Reaktionen katalysieren verschiedene Enzyme im ER und den Vesikeln des cis-, medial- und trans-Golgi-Apparates die schrittweise terminale Entfernung und Anheftung von Monosacchariden. Hierbei stellt das Produkt der vorhergehenden Reaktion das Substrat für die nächste Reaktion dar. Im Lumen des ER werden durch Glucosidase I endständige Glucosereste abgespalten, wobei durch Glucosidase II die zwei folgenden Glucosereste abgespalten werden können. Durch zwei Mannosidasen werden $\alpha 1,3$ und $\alpha 1,6$ -verknüpfte Mannosen von der 6'-Tetramannosyl-Struktur abgespalten und führen zur Bildung von N-Glykanen des Komplex-Typs [Gabijs 2009]. Mithilfe der N-Acetylglucosaminyltransferase I wird ein GlcNAc-Rest übertragen und im Anschluss können durch spezifische GlcNAc-Transferasen die bi-, tri- und tetraantennären oder *bisecting*-Glykane gebildet werden. Weiterhin werden mithilfe spezifischer Glykosyltransferasen wie Fucosyltransferase, N-Acetylglucosaminyl- β -galactosyltransferase und Sialyltransferase die N-Glykane durch Anfügen von Fucosen, Galactosen und Sialinsäuren modifiziert (Abb. 4).

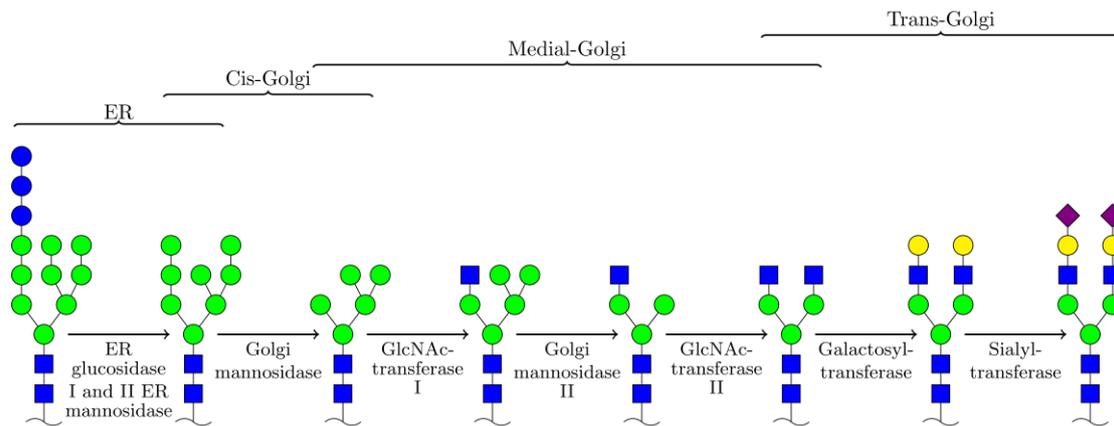


Abb. 4 Biosynthese II der N-Glykane des Komplex-Typs [Taylor et al. 2003]

2.1.1.3. Funktionen der Glykoproteine

Die Glykoproteine übernehmen verschiedene Funktionen [Varki, 1993] und spielen eine wichtige Rolle in der Ausbildung von mehrzelligen Organismen [Taylor et al., 2003]. Viele Serumproteine wie z. B. Enzyme, Blutgerinnungsfaktoren, Immunglobuline und Hormone gehören zur Gruppe der Glykoproteine. Glykoproteine sind Bestandteile biologischer Membranen, wo sie z. B. eine wichtige Rolle als „determinierende Substanzen der Blutgruppen“ spielen [Kreutzig et al., 2006]. Sie sind essentiell für zellbiologische Phänomene wie die Zelladhäsion, das Zellwachstum oder die Zelltransformation [Wyss et al., 1995]. N-Glykane vermitteln die Wechselwirkung mit Pathogenen und fungieren hier als Ligand für Glykan-bindende Proteine (Lektine). Sie spielen bei Prozessen, wie z. B. der Entwicklung und Differenzierung der Zellen sowie der Physiologie und Entstehung von Krankheiten, eine entscheidende Rolle, wie z. B. beim Prion-Protein [Stimson et al. 1999; Horiuchi et al. 1999]. Ferner vermögen sie Proteine gegen Degradation und Proteolyse zu stabilisieren [Helenius et al., 2001; Matzuk et al., 1988]. Sie sichern die korrekte Proteinfaltung und erhöhen die Löslichkeit im wässrigen Milieu. Die Halbwertszeit von Glykoproteinen im Blutplasma wird durch ihren Kohlenhydratanteil bestimmt. Nach Verlust der endständigen Sialinsäurereste werden derartige Glykoproteine über die Bindung an einen spezifischen Asialoglykoprotein-Rezeptor von der Leber aufgenommen und abgebaut [Löffler et al., 1993 und Ashwell et al. 1982]. Durch eine

Erhöhung der Sialylierung von Glykoproteinen im Serum wird parallel auch deren Halbwertszeit erhöht. Von pathophysiologischer Bedeutung sind fehlerhafte Glykosylierungen, die als Stoffwechselerkrankungen (CDG-Syndrom, *congenital disorders of glycosylation*), als angeborene Funktionsstörungen der Glykosylierung, wie z. B. die I-Zell-Krankheit, oder auch Mukopolidose II, bezeichnet werden [Berg et al., 2007].

2.1.2. O-Glykane

2.1.2.1. Struktur

Die O-gebundenen Glykane sind α -glykosidisch über den Baustein N-Acetylgalactosamin mit dem Sauerstoffatom eines Serin- oder Threoninrestes des Polypeptids verknüpft. Die meisten O-verknüpften Kohlenhydratketten weisen *Core*-Strukturen des Muzin-Typs auf (Abb. 5). GlcNAc kann außerdem mit einer Galactoseeinheit verknüpft werden, wobei Sialinsäuren an eine Galactoseeinheit oder GlcNAc gebunden werden können. Weiterhin kann die Fucoseeinheit an GlcNAc der Antenne verknüpft sein. Für O-Glykane ist im Gegensatz zu den N-Glykanen keine definierte Konsensussequenz bekannt.

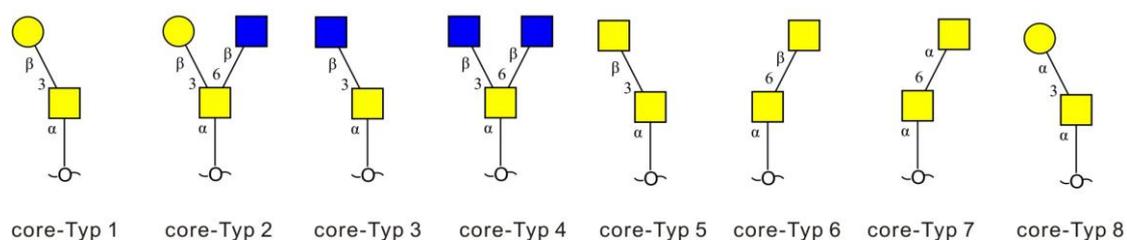


Abb. 5 Die *Core* Strukturen von O-Glykanen

2.1.2.2. Biosynthese

Die Biosynthese der O-Glykane des Muzin-Typs (O-GalNAc) findet im Golgi-Apparat statt [Van den Stehen et al., 1998]. Beim ersten Schritt wird mit Hilfe der O-GalNAc-Transferase GalNAc an den Serin- oder Threoninrest des Proteins

angefügt. Die Verlängerung der O-Glykankette erfolgt in den Zisternen des Golgi-Apparates durch weitere spezifische Transferasen, die verschiedene Monosaccharide wie N-Acetylglucosamin, Galactose, Fucose oder Sialinsäure bilden [Peter-Katalinic et al., 2005].

2.1.2.3. Funktionen der O-Glykane

Die O-Glykosylierung erfüllt unterschiedliche Funktionen wie Hitzeresistenz oder Resistenz gegenüber Proteasen. Ohne die O-Glykosylierung werden diese Eigenschaften nicht beobachtet [Gabius et al., 2009]. N- und auch O-Glykane spielen bei folgenden Prozessen eine entscheidende Rolle: bei der Vermittlung der Zellkontakte [Marshall et al., 2002], bei dem Prozess des Immunsystems zur Identifizierung endogener und exogener Faktoren [Rudd et al., 2001], bei der Proteinfaltung [Parodi et al., 2000], bei der Stabilität [Shental-Bechor et al., 2008] sowie bei der Entwicklungsbiologie [Haltiwanger & Lowe, 2004]. Die O-Glykosylierung hat außerdem einen Einfluss auf die Clearance und auf immunologische Prozesse wie die immunologische Erkennung. Des Weiteren beeinflussen Glykane die räumliche Struktur von Proteinen, wie z. B. die Ausbildung von α -Helices in der Sekundärstruktur, die hydrophoben Wechselwirkungen in der Tertiärstruktur oder die Oligomerisierung in der Quartärstruktur [Spiro et al., 2002]. Außerdem spielen O-Glykane in Tumoren bei der Adhäsion und Invasion sowie dem Überleben der Krebszellen im Blut eine wichtige Rolle [Brockhausen et al., 1995].

2.1.3. C-Mannosylierung

Bei einer C-Mannosylierung wird ein α -Mannosylrest über eine C-C-Bindung an das C-2-Kohlenstoffatom des Tryptophanrestes (Trp) gebunden [de Beer 1995], wobei das Erkennungssignal die Konsensussequenz Trp-X-X-Trp darstellt, in der nur das erste Trp glykosyliert wird (Abb. 6). Hier kann X jede beliebige Aminosäure sein. Wird das Trp durch Ala ausgetauscht, geht die Überföhrungsaktivität verloren. Diese

Konsensussequenz Trp-X-X-Trp konnte in 336 Säugetierproteinen gefunden werden [Krieg et al., 1998]. Die Biosynthese der C-Mannose beginnt im ER, wobei die Dol-P-Mannose zunächst als Vorstufe fungiert. Diese posttranslationale Modifikation konnte in verschiedenen Glykoproteinen nachgewiesen werden, wie z. B. bei der RNase2 [de Beer et al., 1995], Thrombospondin [Hofsteenge et al., 2001; De Peredo et al., 2002], F-Spondin [Furmanek und Hofsteenge 2000], Erythropoietin Rezeptor [Furmanek et al., 2003], Mindin (spondin-2) [Li et al., 2009], Muzin (MUC5AC und MUC5B) [Perez-Vilar et al., 2004], Interleukin-12 [Doucey et al., 1998] und Properdin [Hartmann und Hofsteenge 2000].

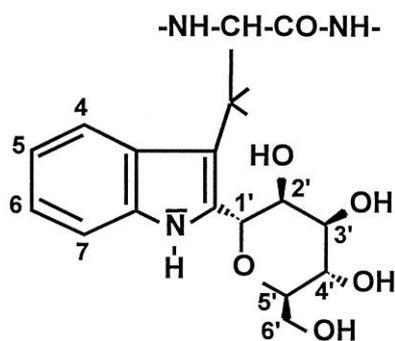


Abb. 6 C-Mannosyliertes Tryptophan

2.2. Glykoproteine

2.2.1. A1AT und entsprechende Varianten

2.2.1.1. Struktur

A1AT wird hauptsächlich in den Hepatozyten produziert. A1AT inhibiert neutrophile Elastase und andere Proteasen, die Serin in ihrem aktiven Zentrum aufweisen [Koehnlein et al., 2010]. Deshalb wird A1AT ebenfalls als α_1 -Proteinase-Inhibitor bezeichnet. Es kommt im Plasma in einer Konzentration von 1,9-3,5 mg/ml vor [Lomas et al., 2004].

Mit Hilfe von Kristallstrukturen wurde die Proteinstruktur von A1AT bestimmt (Abb. 7). A1AT besteht aus neun α -Helixes, drei β -Faltblättern und einer freiliegenden

beweglichen Proteinschleife (*reactive center loop*, RCL). Dieser RCL (Met 358 und Ser 359) spielt für die Interaktion mit der Protease eine wesentliche Rolle, denn der präsentiert eine Peptidsequenz als ein Pseudosubstrat für die Zielprotease [Lomas 2005]. Durch die Oxidation des Methionins an der Position 358 geht die inhibitorische Aktivität verloren [Johnson et al., 1979; Beatty et al., 1980; Taggart et al., 2000]. A1AT ist insgesamt ein relativ kleines und polares Protein [Baumann et al., 1991] und besitzt eine Halbwertszeit von 4-5 Tagen.

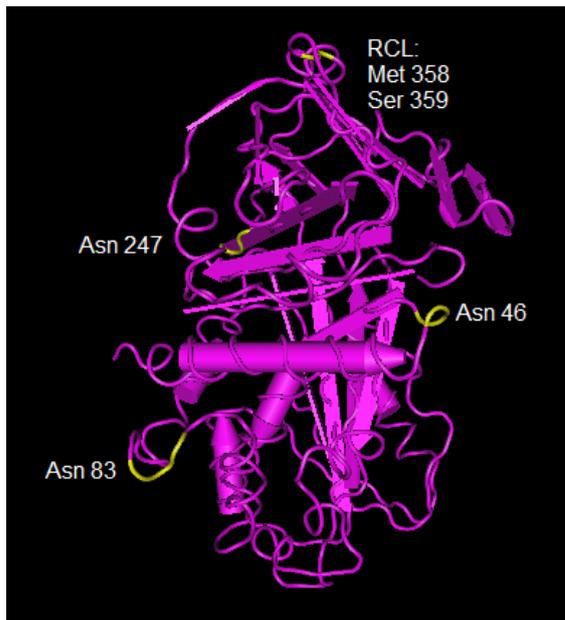


Abb. 7 Kristallstruktur von A1AT. Markiert sind die drei Glykosylierungsstellen und der *reactive center loop* (RCL). Die entsprechenden Aminosäuren sind gelb gekennzeichnet [Song et al., 1995].

Das Protein A1AT ist ein 52 kDa Glykoprotein und besitzt 394 Aminosäuren [Mega et al., 1980; Carrell et al., 1981]. Der Anteil der Oligosaccharide, welcher aus bi- und triantennären Glykanen besteht, macht etwa 14 % der Gesamtmasse aus [Hodges et al., 1979]. In der Polypeptidkette des A1AT befinden sich drei N-Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn-46, Asn-83 und Asn-247 [Carrell et al., 1981]. Im humanen Blutserum werden die Positionen Asn-46 und Asn-247 komplex mit biantennären Glykanen besetzt. Die Position Asn-83 ist zu 35 % mit triantennären und zu 65 % biantennären Glykanen glykosyliert [Carrell et al., 1981, Brantly et al., 1988]. Es wurde gezeigt, dass das N-Glykanmuster von A1AT in humanem Plasma α 2,6

bisialylierte biantennäre Glykane und α 2,3 bzw. α 2,6-trisialylierte triantennäre Glykane (in Mol-Verhältnis 2:1) besitzt [Mega et al., 1980]. A1AT trägt zu 4 % N-Glykane, die eine α 1,6 *core*-gebundene Fucose darstellen [Mills et al., 2001, Wilson et al., 2002, Kolarich et al., 2006]. Außerdem wurden bis zu 6 % Sialyl-Lewis^x (Le^x)-Strukturen mit terminal gebundenen α 2,3 Sialinsäuren detektiert. Tetraantennäre N-Glykane mit Le^x-Strukturen machen einen Anteil von 3 % aus. Humanes A1AT aus der Leber besitzt nur α 2,6-verknüpfte Sialinsäuren [Gabius et al., 2009]. A1AT, in Leukozyten synthetisiert, weist jedoch auch α 2,3 verknüpfte Neu5Ac aus [Gabius et al., 2009].

2.2.1.2. Funktion

A1AT ist in allen Körpergeweben nachweisbar, vor allem in der Lunge, denn mit der Atemluft findet in der Lunge ständig eine Vielzahl von zellulären Abwehrvorgängen statt. Proteasen werden zuerst aus neutrophilen Granulozyten in das umgebende Lungengewebe freigesetzt, davon ist die wichtigste Protease die neutrophile Elastase. A1AT schützt die Lunge vor der Zerstörung durch neutrophile Elastase. Darum ist bei Patienten mit A1AT-Mangel das Gleichgewicht zwischen Proteasen und Antiproteasen zur Proteasenseite in der Lunge verschoben [Morse 1978; Köhnlein et al., 1999; Brantly et al., 1991]. Bei einem A1AT-Mangel handelt es sich um einen genetisch bedingten Defekt des A1AT. Der A1AT-Mangel wurde erstmals im Jahr 1963 von Laurell und Eriksson mit Hilfe von Serumelektrophoresen nachgewiesen [Laurell et al., 1963]. Der A1AT-Mangel wird in der europäischen Bevölkerung auf 0,01 bis 0,02 % geschätzt [Biedermann et al., 2006]. Er verursacht eine schwere, chronisch obstruktive Atemwegserkrankung (COPD) und ein Lungenemphysem, weil kein A1AT zur Hemmung der Elastasen vorhanden ist [Van Steenberger 1993]. Dieser Mangel führt zur Leberzirrhose, was die Inzidenz eines primären Leberzellkarzinoms deutlich erhöht [Eriksson et al., 1986]. Bei einem A1AT-Mangel ergeben sich Funktionsstörungen wie Asthma, rheumatoide Arthritis, Vaskulitis und Wegener's Granulomatose, bei der es zu Ablagerungen von A1AT in Leberzellen kommt

[Goodarzi et al., 1995]. Bei unterschiedlichen Tumoren kann es im Zuge der Akute-Phase-Reaktion zu einer starken Erhöhung der A1AT-Serumkonzentration kommen. Daher wurden A1AT-Bestimmungen als Tumormarker eingesetzt. Ein Anstieg der Serumkonzentration kann ebenfalls durch einen Myokardinfarkt, eine chronisch entzündliche Darmerkrankung oder durch eine akute Leberentzündung verursacht werden [Schneider et al., 1986].

Die wichtige Struktur im aktiven Zentrum von A1AT ist die Aminosäure Methionin an Position 358. Wenn Methionin im aktiven Zentrum oxidiert wird, ist A1AT inaktiv. Entzündungszellen in der Lunge können neben Proteasen auch oxidative Substanzen freisetzen. Ebenso fördert Zigarettenrauch durch chemische Oxidation die Inaktivierungsreaktion.

Die Glykane haben eine wesentliche Bedeutung für die A1AT-Aktivität. Sie spielen bei der Stabilisierung der Konformation von A1AT, bei der Verhinderung der Aggregation und bei der Erhöhung der Halblebenszeit im Serum eine Rolle [Karnaukhova et al., 2006].

2.2.2. Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor

2.2.2.1. Struktur

Bei *in vitro* kultivierten Lymphozyten, Monozyten und Fibroblasten wurden erstmalig koloniestimulierende Faktoren (CSF) in den Kulturüberständen entdeckt [Stanley et al., 1975]. GM-CSF wurde als erster hämatopoetischer Wachstumsfaktor isoliert und gereinigt [Burgess et al., 1977]. Humanes GM-CSF ist in Abhängigkeit des Glykosylierungsgrades ein 18-40 kDa großes Glykoprotein. hGM-CSF ist auf dem Chromosom 5q21-q32 lokalisiert [Huebner et al., 1985] und besteht aus 127 Aminosäuren mit zwei potentiellen N-Glykosylierungsstellen (Asn-27 und Asn-37), vier potentiellen O-Glykosylierungsstellen (Ser-5, Ser-7, Ser-9 und Thr-10) und Disulfidbrückenbindungen, welche essentiell für die biologische Aktivität des Proteins sind. Es wurde gezeigt, dass das N-Glykan-Muster von GM-CSF in der CHO

(*chinese hamster ovary*) Zelllinie überwiegend tri- und tetraantennäre Glykane und 10 % biantennäre Glykane besitzt. Über 90 % der Galactosereste der N-Glykane sind α 2,3 sialyliert. Die N-Glykane können ebenfalls einen Fucoserest tragen, welcher in 90 % der Fälle eine α 1,6 verknüpfte Fucose darstellt [Forno et al., 2004].

2.2.2.2. Funktion

Wachstumsfaktoren stellen eine heterogene Gruppe von Glykoproteinen dar und haben vielfältige Funktionen. GM-CSF wird nach Stimulation von T-Zellen, Mastzellen, Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen gebildet und induziert im Rahmen seiner Funktionen das Wachstum von Progenitorzellen der Granulozyten und Makrophagen. Es stimuliert die Differenzierung der Myelo- und Monoblasten, aktiviert reife Monozyten und Granulozyten und verstärkt ihre phagozytische und zytotoxische Fähigkeiten. Diese Wirkungen werden durch die Regulation von bestimmten Oberflächenmolekülen auf den Effektorzellen des Immunsystems vermittelt. GM-CSF kann auf Makrophagen *in vitro* die Oberflächendichte des Fc-gamma-Rezeptors II erhöhen [Rossmann et al., 1993]. GM-CSF ist dafür bekannt *in vitro* ebenso wie *in vivo* als potenter hämatopoetischer Wachstumsfaktor zu agieren und führt dendritische Zellen zur Rekrutierung und Reifung [Zarei et al., 2009]. Es wurde von Weisbart et al. gezeigt, dass durch die direkte GM-CSF-Wirkung neben einer Inhibition der Neutrophilenmigration eine Veränderung der Rezeptorexpression und, über Veränderungen im Zytoskelett, eine Modifizierung der Zellform induziert wird [Weisbart et al., 1986]. GM-CSF wird zur Stimulation des Immunsystems (Immunabwehr) eingesetzt und findet Anwendung in der Vermeidung einer therapieinduzierten Granulozytopenie, welche eine wesentliche Todesursache bei Patienten während der Chemotherapie und Bestrahlung ist. Außerdem wird GM-CSF zur Behandlung von akuter bakterieller Sepsis eingesetzt [Pfeifer et al., 2006] und kommt bei der Neutropeniebehandlung nach Knochenmarktransplantation zur klinischen Anwendung. Therapeutische Anwendung findet es ebenfalls bei leukopenischen Patienten im Rahmen antineoplastischer Therapien, bei Hochdosischemotherapie und autologer Knochenmarktransplantation, beim

myelodysplastischen Syndrom und zur Behandlung myelotoxischer Nebenwirkungen bei der antiviralen Therapie von AIDS-Patienten [Antman et al., 1988; Brandt 1988; Groopman 1987; Pluda 1990].

2.3. Analytische Methoden zur Analyse von Glykopeptiden und Glykanen

Die Glykosylierung von Proteinen zu analysieren ist methodisch sehr anspruchsvoll, da das Glykosylierungsmuster eines Glykoproteins enorm heterogen ist. Die Glykane sind Oligosaccharidstrukturen, die aus unterschiedlichen Monosacchariden bestehen, welche wiederum vielfältig miteinander kombiniert werden können. Daher stellt die Analyse der Glykosylierung von Proteinen eine Herausforderung dar.

2.3.1. Charakterisierung des gesamten Glykanpools

Die Glykosylierung eines Polypeptides kann mehrere Glykoformen umfassen [Rademacher, et al., 1988]. Die strukturelle Komplexität der Glykane wird maßgeblich durch die Verknüpfung und Konfiguration der Monosaccharideinheiten bestimmt. Weitere strukturbestimmende Kriterien sind die Anzahl der Antennen, der Grad der Sialylierung, d. h. die Anzahl der endständigen Sialinsäuren, und die Verknüpfungsart der Sialinsäuren. Weiterhin werden die N-Glykanstrukturen durch die Anwesenheit von Fucosen und deren Bindungsstellen sowie durch mögliche Phosphorylierungen und Sulfatierungen der Glykane selbst und des Proteins bestimmt. Im Hinblick auf die physikalischen Eigenschaften der Glykane spielt der Grad der Sialylierung eine besonders wichtige Rolle, da der isoelektrische Punkt des Glykoproteins aufgrund der negativen Ladung maßgeblich verändert wird.

Eine schematische Darstellung für die Charakterisierung der Glykoproteine zeigt die Abb. 8, Glykoproteine wurden dafür isoliert und aufgereinigt. Nach Hydrolyse der Glykane wurden die Monosaccharidanalyse und die Sialinsäureanalyse durch HPAEC-PAD durchgeführt. Die Freisetzung der Glykane erfolgte entweder

enzymatisch für N-Glykane oder durch chemische Verfahren für O-Glykane. PNGase F spaltet mannose-reiche, hybride und komplexe N-Glykane vom Asparaginrest eines Glykopeptides ab (Abb. 9). Dabei wird das Asparagin in Aspartat konvertiert, was bei Analyse des intakten Peptidrests zur massenspektrometrischen Bestimmung der Glykosylierungsstelle verwendet werden kann [Kuhn, et al., 1995; Blanchard et al., 2008]. Damit PNGase F die N-glykosidische Bindung erreichen kann, wird die Proteinstruktur des Glykoproteins mit Reduktionsmitteln, wie z. B. β -Mercaptoethanol, oder mit Hilfe von Proteasen wie Trypsin zuvor entfaltet bzw. gespalten. O-Glykane werden chemisch durch β -Eliminierung gewonnen. Durch Zusatz von reduzierenden Chemikalien, wie NaBH_4 oder BH_3 , können O-Glykane freigesetzt werden. Dabei wird das O-Glykan zum Alditol reduziert.

Für die chromatographische Analyse des Sialyierungsgrades wird eine Fluoreszenzmarkierung mit 2-Aminobenzamid (2AB) verwendet [Merry *et al.*, 2002; Nuck, 2002]. Die markierten Glykane werden mit HPLC (*Asahi-Pak*) nach mono-, bi-, tri- und tetrasialylierten Glykanen aufgetrennt. Neben der chromatographischen Analyse der Glykane lässt die Fragmentierung der Glykane mittels Massenspektrometrie zuverlässige Aussagen über die Sialylierung und Fucosylierung zu. Außerdem wurde die Verknüpfung der Sialinsäuren (α 2,6-, und α 2,3-verknüpfte Sialinsäure) bestimmt. Die Spaltung von Sialinsäure-Verknüpfungen des Typs α 2,3 erfolgte mit der Sialidase S [Glasgow et al., 1977]. Zur Abspaltung von Sialinsäure-Verknüpfungen des Typs α 2,3 und α 2,6 wurde Sialidase C verwendet [Roggentin et al., 1995]. Eine weitere Derivatisierungsmethode, die Permethylierung, ist vor allem bei der massenspektrometrischen Strukturanalyse notwendig um die negative Ladung der Sialinsäure zu derivatisieren, damit neutrale und sialylierte Glykane gleichzeitig gemessen werden können [Ciucanu, et al., 1984]. Nach der Permethylierung von Glykanen steigern sich deren Ionisierungseffizienz und die Sensitivität bei der massenspektrometrischen Detektion. Die entstehenden massenspektrometrischen Spektren werden mit Hilfe der Datenbank (Glycoworkbench, Glycopeakfinder, Glycomod usw.) analysiert und den Massenpeaks Glykanstrukturen zugeordnet.

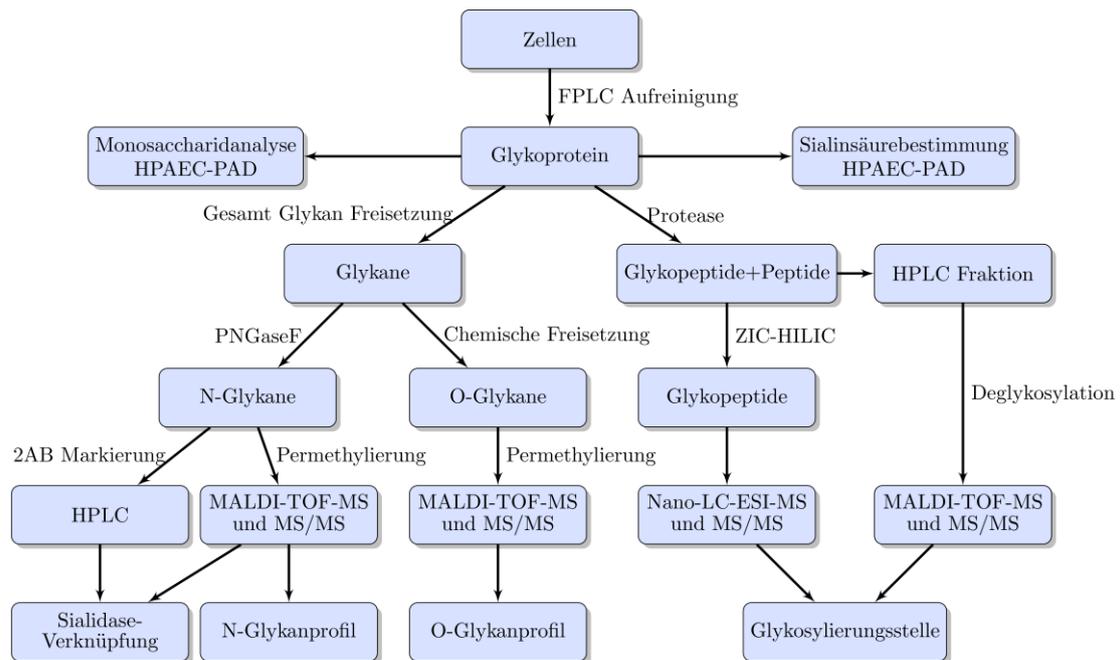


Abb. 8 Schematische Übersicht der verwendeten Analytik der Glykane und Glykopeptide von Proteinen

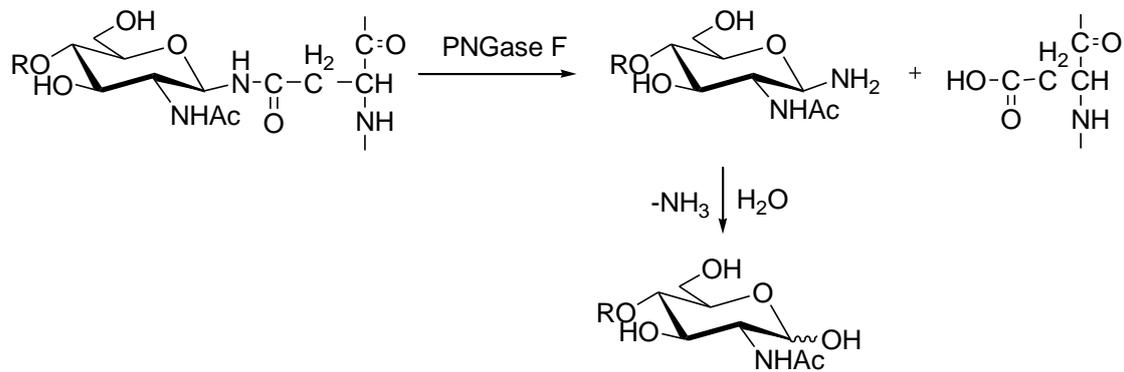


Abb. 9 Schema der enzymatischen Deglykosylierung eines N-Glykans durch PNGase F [Kamerling 2007]

2.3.2. Charakterisierung der Glykopeptide

Die Analyse des Glykosylierungsprofils von Glykoproteinen gewinnt enorm an Bedeutung für die Forschung in den Bereichen der Biologie und Medizin. Fast alle Glykoproteine tragen mehrere N- und/oder O-Glykosylierungsstellen (Makroheterogenität) und jede dieser Glykosylierungsstellen besitzt mehrere

Glykanstrukturen. Dieses Phänomen wird als Mikroheterogenität bezeichnet, was bedeutet, dass ein Glykoprotein nicht als eine einheitliche Strukturform existiert, sondern vielmehr als Gemisch aus verschiedenen Glykoformen.

Die Glykosylierungseffizienz wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, z. B. die Stelle der Erkennungssequenz in der Polypeptidkette, der Status der Proteinfaltung, die Verfügbarkeit von Dolichol-Vorstufen und die Verfügbarkeit von fertig prozessierten Oligosaccharidstrukturen. Außerdem sind die Erkennungssequenzen Asn-X-Ser und Asn-X-Thr nicht gleich effektiv. Im Vergleich ist die Erkennungssequenz Asn-X-Thr zwei- oder dreifach öfter glykosyliert als die Erkennungssequenz Asn-X-Ser [Kaplan et al., 1987, Gavel et al., 1990]. Mit Hilfe von bioinformatischen Programmen (NetNGlyc, NetOGlyc) ist es möglich zu prognostizieren, welche Glykosylierungsstellen glykosyliert sind.

2.3.2.1. Isolierung der Glykopeptide

N- und O-Glykane werden in der Arbeitsgruppe Glykodesign und Glykoanalytik der Charité standardmäßig nach PNGase F-Verdau oder β -Eliminierung mittels Massenspektrometrie charakterisiert. Diese Techniken geben jedoch keine Informationen über die Mikroheterogenität, d. h. die Besetzung der einzelnen Glykosylierungsstellen mit den verschiedenen Glykanen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Glykoproteine mit Endoproteinasen (Trypsin, Chymotrypsin) verdaut, was zu einem Gemisch von Peptiden und Glykopeptiden führt. Hierbei stellen die Glykopeptide häufig nur einen geringen Teil der gesamten Peptidmischung dar. Aufgrund der geringeren Ionisationseffizienz ist die Intensität der Glykopeptide relativ niedriger als bei nicht-glykosylierten Peptiden. Weiterhin wird das Signal des Glykopeptides in Anwesenheit von anderen Peptiden oft unterdrückt [Annesley 2003], insbesondere wenn die Glykane sialyliert sind. Daher werden die Glykopeptide aus einem komplexen Peptidgemisch mit Hilfe verschiedener Methoden nach dem Verdau angereichert.

Für die Anreicherung der Glykopeptide wurden Affinitätschromatographien mit einem Lektin wie ConA [Geng et al., 2001, Lis et al., 1998], mit Boronsäure [Liu et al., 2002] und mit einer hydrophilen Chromatographie mit Cellulose oder Sepharose [Wada et al., 2004] verwendet. Für diese Untersuchung wurde erstmals eine stark polare HILIC-Säule (*Hydrophilic Interaction Chromatography*), mit zusätzlichen "zwitterionischen" funktionellen Gruppen benutzt (ZIC[®]-HILIC, SeQuant). Moleküle mit positiven und negativen Ladungen zeigen hierbei eine höhere Selektivität und erhöhte Retention des Analyten. Da Glykopeptide hydrophiler als Peptide sind, eignet sich diese Methode besonders zur einfachen und effektiven Entfernung der nicht glykosylierten Peptide.

HPLC ist eine etablierte Methode zur Trennung von Peptiden und Glykopeptiden und kann mit ESI-MS kombiniert werden [Lo-Guidice et al., 1996]. Häufig verwendete stationäre Phasen für die LC-Analyse der Glykopeptide sind sogenannte Anionenaustauscher (IEX-), Reversed-Phase (RP-) [Huddleston et al., 1993; Peterman et al., 2006; Harmon et al., 1996], Normal-Phase (NP-) [Ruhaak et al., 2008] und Chromatographie mit porösem Graphitmaterial (*porous graphitized carbon* PGC) [Wuhrer et al., 2005; Rupbst et al., 2007; Karlsson et al., 2008; Deguchi et al., 2008]. Die Chromatographie mit porösem Graphitmaterial ist gut für die Trennung von Glykopeptiden mit geringem Anteil an Peptiden geeignet, welche mit unspezifischer Protease verdaut wurden, z. B. Pronase. Alternativ können Glykopeptide mit Hilfe der HILIC aufgetrennt werden [Zauner et al., 2011]. In der vorliegenden Arbeit wurde die RP-HPLC verwendet. Dadurch eluieren unterschiedliche Peptide mit einem Glykan-Anteil bei unterschiedlichen Retentionszeiten [Harmon et al., 1996]. Die Kombination von RP-HPLC und ZIC-HILIC kann daher für die Isolierung der Glykopeptide aus einem komplexen Peptidgemisch eingesetzt werden, um die Unterdrückung der Glykopeptidmassen im Massenspektrometer zu vermeiden.

2.3.2.2. Massenspektrometrische Analyse der Glykopeptide

Glykosylierungsstellen von Glykopeptiden können durch ESI-MS [Wuhrer et al., 2005a, b; Kawasaki et al. 2009] oder MALDI-TOF-MS [Ullmer et al., 2009]

aufgeklärt werden. Zur Identifizierung der Peptidsequenz und des Glykosylierungsmusters wurden verschiedene Fragmentierungstechniken (MS/MS-Techniken) verwendet. Eine Standardmethode in der Proteomanalyse ist die kollisionsinduzierte Dissoziation (CID). Die Analyse der Glykopeptide mit CID führt vor allem zur Glykanfragmentierung und gibt wenig Auskunft über das Peptidrückgrat. Ion Trap-Massenspektrometer können dieses Problem mit Hilfe von sich wiederholenden Zyklen von Analyt-Isolierung und Fragmentierung überwinden. Eine effektivere Sequenzierung eines Peptidrückgrats von Glykopeptiden kann durch Elektronentransfer Dissoziation (ETD) [Geyer et al., 2006] erreicht werden.

Durch die Aufnahme von Fragmentspektren eines Glykans können die Informationen zum sequentiellen Aufbau des Glykans, dessen Verzweigungen und Verknüpfungspositionen der Monosaccharide und dessen Strukturisomere bestimmt werden [Dell et al., 2007; Maass, et al., 2007]. In Abb. 10 ist die Nomenklatur der detektierbaren Fragmentionen graphisch dargestellt. Die häufigsten Glykan-Fragmente sind B- bzw. Y-Ionen. Bei hochenergetischen Fragmentierungsmethoden können außerdem auch A-Ionen und X-Ionen detektiert werden [Domon et al., 1988].

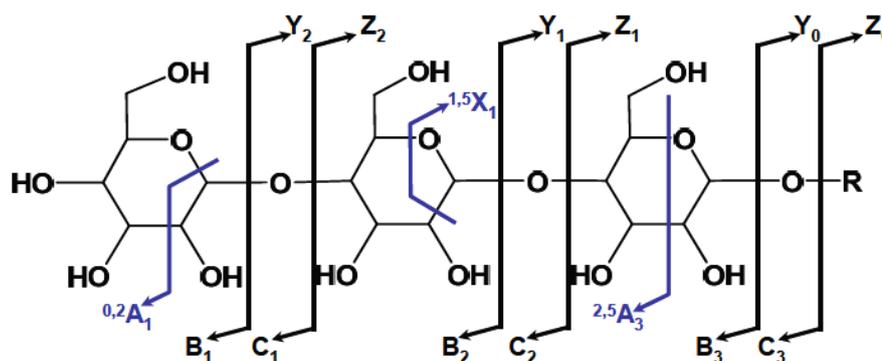


Abb. 10 Nomenklatur für Glykanfragmente nach Domon und Costello [Domon et al., 1988]

Die häufigsten Fragmentionen, die aus dem Zerfall von Glykopeptiden erzeugt werden, sind GlcNAc m/z 204, Sialinsäure m/z 292, Lactosamin (LacNAc) m/z 366 und Sialyl-Lactosamin m/z 657 [Geyer et al., 2006; Budnik et al., 2006; Carr et al.,

1993; Seymour et al., 2006]. In Tabelle 2 sind die charakteristischen Ionen des Oligosaccharides für glykosylierte Peptide dargestellt.

Tab 2 Fragmentationen der Glykopeptide

Oligosaccharid-Komposition	Oxonium Ion Mass[M+H]⁺
Hexose (Hex)	163.053
N-Acetylhexosamine (HexNAc)	204.079
Desoxyhexose (dHex)	147.058
Sialinsäure (NeuAc)	292.096
HexNAc-Hex	366.132
Hex2	325.106
HexNAc2	407.159
HexNAc-Hex2	528.185
HexNAc-Hex-NeuAc	657.228

Die Interpretation der MS/MS-Daten ist oft eine zeitaufwendige Aufgabe, insbesondere für Glykopeptide, denn es gibt keine Datenbank für die automatische Analyse von Glykopeptiden. Allerdings können einzelne Online Software Tools für die Identifizierung und Charakterisierung von Peptiden und Glykopeptiden mit MS/MS-Daten herangezogen werden. ExPASy Proteomics Server ist eine Möglichkeit für eine erste Übersicht.

2.4. Zielsetzung der Arbeit

A1AT ist ein hochglykosyliertes Protein, welches drei N-Glykosylierungsstellen besitzt (Asn-46, Asn-83, Asn-247). Es ist bekannt, dass die Oligosaccharidseitenketten unterschiedlich prozessiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Oligosaccharidstrukturen der drei Glykosylierungsstellen des A1AT getrennt voneinander analysiert werden.

Die physiologische Bedeutung des A1AT sowie dessen Mangel ist gut untersucht. Ein A1AT-Mangel führt zur Erkrankungen mit Lungenemphysem und Leberzirrhose. Derzeit werden Patienten mit aufgereinigtem A1AT aus humanem Serum (*Prolastin*) behandelt. Jedoch besteht hier stets das Risiko einer Infektion. Darüber hinaus wird

rekombinantes Protein A1AT zur Therapie von erblich bedingtem A1AT-Mangel eingesetzt. In dieser Arbeit soll das Glykan-Muster des rekombinanten humanen A1AT charakterisiert werden. Da es bekannt ist, dass verschiedene Zelllinien sich hinsichtlich des Glykosylierungsprofils von Glykoproteinen unterscheiden, sollte weiterhin A1AT in unterschiedlichen Zellen exprimiert werden, um die Strukturen der Oligosaccharidseitenketten des A1AT zu vergleichen. In der vorliegenden Arbeit wurde A1AT in einer humanen neuronalen Zelllinie (AGE1.hn) (in Kooperation mit der Firma ProBioGen) und in HEK293-Zellen (humane embryonale Nierenepithelzelllinie) exprimiert.

Durch Einfügung zusätzlicher N-Glykosylierungsmotive in A1AT können zusätzliche komplexe N-Glykane eingebaut werden. Dies beeinflusst die Serum-Halbwertszeit und Serum-Clearance-Raten des rekombinanten A1AT. Durch den Vergleich von A1AT-Wildtyp mit A1AT-Varianten, die zusätzliche N-Glykosylierungsstellen enthalten, lässt sich herausfinden, ob die zusätzlichen, nicht natürlichen Glykosylierungsstellen Einfluss auf die Gesamtglykosylierung haben. Dies ist zum einen interessant um bessere Biopharmazeutika zu entwickeln und zum anderen um Mechanismen der Glykosylierungsmaschinerie (ER+Golgi) besser verstehen zu können.

Das Analysenspektrum sollte mit GM-CSF auch auf O-Glykane erweitert werden. GM-CSF besitzt zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen (Asn-27, Asn-37) und vier potentielle O-Glykosylierungsstellen (Ser-5, Ser-7, Ser-9 und Thr-10). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen die Glykanstrukturen untersucht werden.

Die qualitative Analyse der Glykansstruktur und Glykosylierungsstellen erfolgt mittels Massenspektrometrie und ins besondere mit Hilfe der nano-LC-MS Technik.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Die aufgeführten Chemikalien wurden von den genannten Firmen bezogen.

Tab. 2 Verwendete Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Acetonitril	Promochem
Ameisensäure	Fluka
Ammoniaklösung > 25 %	Merck
Ammoniumacetat	Merck
APTS(8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt)	Sigma-Aldrich
Acrylamid-Bisacrylamid (Fertiglösung 30 %)	Merck
BCA TM Protein Assay Reagent A	Perbio / Pierce®
BCA TM Protein Assay Reagent B	Pierce®
BCA TM Protein Assay Kit	Pierce®
Butanol	Merck
Coomassie G250 Stain	BioSafe TM / BioRad
Chloroform	Merck
Dithioerythritol (DTE)	Sigma-Aldrich
Dowex 50WX8-400	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	VWR-Prolabo
Ethanol	Roth
Essigsäure LC-MS	Fluka
Harnstoff	Merck
Iodacetamid	Sigma-Aldrich
Luminol	Roth
Mangan-II-Chlorid Tetrahydrat	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Methanol	Merck
Methyliodid	VWR-Prolabo
Natriumcyanoborhydrit	Fluka

Natriumacetat	Merck
Natriumborhydrid >97 %	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Roth
Natriumhydroxid Plätzchen	Merck
Natriumhydroxid	Baker
Nonylphenoxypolyethoxyethanol-40	Calbiochem
Phenylhydrazin-hydrochlorid	Fluka
Super-DHB	Sigma
TEMED	BioRad
Trifluoressigsäure	Merck
Tris (Base)	Roth
Wasserstoffperoxid	Roth

3.1.2. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Es wurden die gängigen Laborgeräte und Materialien von verschiedenen Herstellern verwendet (Siehe Tab. 3 und Tab. 4).

Tab. 3 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
MALDI-TOF/ TOF Ultraflex III MS	Bruker Daltonics GmbH
Vortex Mixer	neoLab® 7-2020
Nano LC- QTOF-MS	Bruker Daltonics GmbH
Nano HPLC UltiMate3000	Dionex
HPLC UltiMate 3000	Dionex
HPAEC-PAD ICS-3000	Dionex
Gelscanner GS-800 Calibrated Densitometer	BioRad
Analysenwaage ME 235 S	Sartorius AG
FPLC® System Pump P-500	Pharmacia Biosystem
Digi-Block™ (Heizblock)	Laboratory Devices Inc.
Inkubationshaube Unimax 1010	Heidolph
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Vakuumentrifuge Univapo 150 ECH	Uniequip
Ultraschallbad Sonovex TK52 Transistor	Bandelin
Mikroprozessor pH-Meter	Hanna
Magnetrührer	IKA Labortechnik
MilliQ Gradient A 10	Millipore
Präzisionschneider <i>Spot Cutter EXQuest</i>	BioRad
ETD-System HCT-Ultra	Bruker Daltonics GmbH
Zentrifuge	Desaga
Photometer Infinite M200	Tecan

Tab. 4 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Maldi-Target MTP 384 ground steel TF Target Plate with transponder technology Part No. 209519, target frame # 74115	Bruker Daltonics GmbH
Millex® GV-Filter (0,22µm), Lot. N8NN7069I Nadel PicoTip™ EMITTER FS360_20_10_D_5	Millex® / Millipore New Objective
VivaSpin 6 & 20, 30.000 MVCO PES, Lot. 07VS2016	VivaScience
TopTip™ Typ P2 Lot. 668-TT1CAR.96 ZipTip™-Spitzen Lot. Nr. R7HN72093	Sunchrom Millipore
C18-Säulen Extra-Clean SPE 100 mg;1,5 ml Lot.205000	Grace GmbH
Alltech® Extract-Clean™ Carbograph SPE 150 mg, 4 ml Lot. 210142	Grace GmbH
WPS-vials Lot. 6820.0029	Dionex
Polypropylene Caps Lot. 6820.0028	Dionex
Calbiosorb™ Absorbent (50 ml) Lot.D00003034	Calbiochem®
Affinity Chromatography Media PROSEP-PB Catalogue No.:113247324 Batch No. : 0650013	Millipore
Proteo Extract® Glycopeptide Enrichment Kit Lot.: ZC860790	Calbiochem®

3.1.3. Enzyme

Es wurden die gängigen Enzyme von verschiedenen Herstellern verwendet (siehe Tab. 5).

Tab. 5 Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller	Quelle	Spezifität
Trypsin Sequencing Grade 3.4.21.4	(Promega)	<i>porcine</i>	C-Terminal Arg und Lys
Chymotrypsin Sequencing Grade 3.4.21.1	(Roche)	<i>bovine pancreas</i>	C-Terminal Tyr, Phe und Trp
Sialidase A 3.2.1.18	(Roche)	<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	$\alpha 2,6 > \alpha 2,3 > \alpha 2,8$
Sialidase S 3.2.1.18	(Prozyme)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , rekombinant aus <i>E. coli</i>	$\alpha 2,3$
Sialidase C 3.2.1.18	(Prozyme)	<i>Clostridium perfringens</i> , rekombinant aus <i>E. coli</i>	$\alpha 2,6$ und $\alpha 2,3$
PNGase F EC 3.2.218; 3.5.1.52	(Roche)	<i>Flavobacterium meningosepticum</i> ; rekombinant aus <i>E. coli</i>	Asparaginverknüpfte N-Glykane, mnd. Chitobiose

3.1.4. Puffer und Lösungen

Tab. 6 Zusammensetzung verschiedener Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
5 x SDS-Probenpuffer	0,3 M Tris/ HCl pH 6,8; 50 % Glycerin (v/v); 15 % SDS (w/v); 0,015 % Bromphenol-Blue; 50 mM DTT
10 x SDS-Laufpuffer	250 mM Tris; 1,92 M Glycin; 1 % SDS (w/v) auf 1 Liter MilliQ
10 x PBS	1,4 M NaCl; 27 mM KCl; 81 mM Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O; 15 mM KH ₂ HPO ₄ auf 1 Liter MilliQ

3.1.5. Aufreinigungsmaterialien

Tab. 7 Aufreinigungsmaterialien

Säule	Lot. Nr.	Hersteller
FPLC-Säule MonoQ 5/50 GL	Code Nr. 17-5166-01 ID-Nr. 0624200	Pharmacia
FPLC-Säule S200 10/300 GL	Code Nr. 17-5175-01 ID-Nr. 0637039	Pharmacia
Nano-LC-Trap Säule Pep-Map 100C-18 300 µm i.d. x 5 mm	P/N 164503	Dionex
Nano-LC-Säule Pep-Map 100C-18 3µm i.d. x15 cm, 100Å	P/N 160321	Dionex
Luna-Säule 3µ(150x4,6mm) NH2 100Å	OOE_4377-E0	Phenomenex ®
Asahipak-Säule NH2P-50 4E	N607092	Shodex
RP-C18 5 µm, 250 x 4,6 mm	Code Nr. 00G-4435-E0 ID-Nr. 281823-6	Phenomenex ®
Carbograph SPE	707000184	Alltech
Top Tip Typ P2-Carbon	668-TT1CAR.96	Glygen Corp./ Sun Chrom GmbH
ZipTip Tip Size P10	Lot. Nr. R7HN72093	Millipore Corporation
ZIC-HILIC SPE	P/N 2942-042	SeQuant

3.2. Methoden

3.2.1. Proteinaufreinigung über FPLC

Die Aufreinigung von A1AT erfolgte in zwei aufeinander folgenden Chromatographieschritten. 1. Anionenaustauschchromatographie zum Aufkonzentrieren des Zielproteins. 2. Grössenausschlusschromatographie zum Trennen und Entsalzen.

Nach einem Zentrifugationsschritt (1000 rpm, 15 min, 4 °C) wurde der Zellkulturüberstand von 40 ml filtriert, um größere Bestandteile aus dem Medium zu isolieren. Anschließend wurde die filtrierte Probe mit 40 ml MilliQ Wasser verdünnt und mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Anionenaustauschersäule MonoQ 5/50 GL geladen. Die verwendeten Laufmittel sind 0,5 x PBS (Puffer A) und 0,5 x PBS/1 M NaCl (Puffer B), die beide zuvor filtriert wurden. Zu Puffer A wurde die Konzentration an Puffer B graduell (0 % – 100 %) erhöht. Das Glykoprotein wurde durch Erhöhung der Salzkonzentration im Laufmittel eluiert und in Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden auf ein SDS Gel aufgetragen und anschließend analysiert. Die Fraktionen mit den höchsten A1AT-Konzentrationen wurden vereinigt und mittels Gelfiltration über eine S200 10/300 GL-Säule aufgetrennt. Dabei wurde A1AT von den restlichen Proteinen nach der Größe getrennt. Das Eluat wurde in 5-ml-Fraktionen gesammelt und nach Auswertung des Elutionsprofils mit SDS-PAGE analysiert.

3.2.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

10 x SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS

Trenngelpuffer: 1,5 mM Tris/HCl; pH 8,8

Sammelgelpuffer: 0,5 mM Tris/HCl; pH 6,8

4 x SDS-Probenpuffer: 0,3 mM Tris/HCl; pH 6,8; 50 % (v/v) Glycerin;

15 % (w/v) SDS; 0,015 % (w/v) Bromphenolblau;

reduzierend: 8 % 2-Mercapto- ethanol

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinmischungen hinsichtlich ihrer Molekülmasse und ermöglicht eine schnelle Molekulargewichtsbestimmung [Hubert Rehm 2006]. Das anionische Tensid SDS bindet quantitativ an Proteine und überdeckt deren Eigenladung, sodass alle Proteine eine negative Ladungsverteilung aufweisen und nach Molekülmasse getrennt werden. Das Gel besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Die Zusammensetzung des Gels ist Tabelle.9 zu entnehmen.

Die Proben wurden mit 4 x SDS Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Dieser Schritt bedingt die Denaturierung und das damit einhergehende Aufbrechen von Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine. Im Anschluss wurden 15 µl des SDS-Protein-Komplexes auf ein Gel geladen. Um das entsprechende Protein bezüglich seiner Molekülmasse identifizieren zu können, wurden 3 µl eines Proteinstandards mitgeführt. Die Trennung der Proteine erfolgte mit 1 x SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA.

Nach dieser Trennung der Proteine wurde einen chemischer Hintergrund zur Visualisierung der Proteinbanden erstellt. Das Gel wurde zunächst dreimal mit Wasser gewaschen und anschließend mit Färbelösung (*G250 Stain* von BioRad) für 1 h auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Färbelösung entfernt und das Gel mit Wasser entfärbt.

Tab. 8 Pipettierschema zur Herstellung eines SDS-Gels

	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)	Trenngel (15 %)	Sammelgel (4 %)
MilliQ H ₂ O	1,6 ml	1,37 ml	1,05 ml	0,98 ml
Trenngelpuffer	0,57 ml	0,57 ml	0,57 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	0,42 ml
SDS 10 %	30 µl	30 µl	30 µl	16,7 µl
A/Bis	1,1 ml	1,33 ml	1,67 ml	216,7 µl
TEMED	3,3 µl	3,3 µl	3,3 µl	1,67 µl
APS 10 %	33 µl	33 µl	33 µl	16,7 µl

TEMED: N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin

APS: Ammoniumpersulfat

3.2.3. Western Blot

Blotpuffer: 25 mM Tris; 114 mM Glycin; 0,1 % (v/v) Ethanol

Blockierungspuffer: 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS

Ponceau-Färbungslösung: 0,1 % (w/v) Ponceau-S, 5 % (v/v) Essigsäure

Detektions-LösungA : 6,8 mM p-Cumarsäure in DMSO

Detektions-LösungB: 0,1 M Tris, pH 8,5; 1,25 mM Luminol

Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis der Proteine mit Hilfe von markierten Antikörpern. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE werden diese durch hydrophobe Wechselwirkungen in einem gerichteten elektrischen Feld auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend mit Antikörpern detektiert.

Direkt nach der Elektrophorese wurde das Blot-Sandwich zusammengebaut, sodass die Nitrozellulosemembran zur Anode zeigt. Der Transfer wurde bei Raumtemperatur mit einer konstanten Stromstärke von 250 mA für 1 h im Blotpuffer durchgeführt. Zur Überprüfung des Proteintransfers können die auf die Membran übertragenen Proteine mit unspezifischer Ponceau-Färbungslösung angefärbt werden. Der Nachweis spezifischer Proteine auf der Nitrozellulose-Membran erfolgt immunologisch mit Antikörpern. Dafür wurde die Membran zunächst für eine Stunde bei RT mit Blockierungspuffer inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran 3 Mal für 5 min mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper Anti-hA1AT (HRP) erfolgte für 1 h bei RT. Nach dem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Anti-Maus-HRP, welcher mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt ist und für 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde vor dem Entwickeln mit dem Chemolumineszenz-Luminol-System mit PBS gewaschen. Die leicht getrocknete Membran wurde mit einer Entwicklungslösung (1 ml LösungB, 10 µl LösungA, 1 µl 30

% H₂O₂) für 1 min inkubiert und anschließend mittels *VersaDoc* MP 4000 das emittierte Licht detektiert.

3.2.4. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde ein BCA-Test durchgeführt. Das Protein bildet mit Bicinchoninsäure (BCA) und Cu²⁺-Ionen einen violetten Farbkomplex in alkalischer Lösung. Die Cu²⁺-Ionen werden hierbei zu Cu⁺ reduziert.

Zunächst wurden die BCA-Reagenzien Bicinchoninsäure und Kupfersulfat gemäß der Vorschrift des Herstellers Pierce in einem Verhältnis von 50:1 vorbereitet und je 10 µl mit der Probe oder der Standardreihe von BSA in einer 96-Wellplatte gemischt. Die Standardreihe setzte sich aus den Konzentrationen 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800 µg/ml der BSA-Stammlösung zusammen. Die Inkubation erfolgte für 45 min bei 37 °C. Anschließend wurden die Proben im Magelan 6 V6.4 (Tecan) gemessen.

3.2.5. Monosaccharid-Analyse über HPAEC-PAD

Zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der Monosaccharid-Zusammensetzung wurde die HPAEC-PAD verwendet. Die chromatographische Trennung der einzelnen Monosaccharide erfolgt unter stark alkalischen Elutionsbedingungen („HP“: *high pH*) an einem Anionenaustauscher (AEC: *anion-exchange chromatography*) und werden aufgrund steigender Acetat-/Anionenkonzentration nacheinander von der Säule verdrängt. Zur Registrierung dient die gepulste amperometrische Detektion (PAD: *pulsed-amperometric detection*). Hierbei wurde der entstehende Elektronenstrom für die einzelnen Monosaccharid-Komponenten kontinuierlich gemessen und in einem Chromatogramm in Form von Peaks aufgezeichnet.

Zunächst wurden die Glykoproteine einer Hydrolyse unterzogen. Die dabei entstandenen Monosaccharide wurden unter stark alkalischen Bedingungen voneinander getrennt. Im Vergleich mit definierten Monosaccharid-Standards können die Signale ausgewertet werden. Die Monosaccharide GlcNAc und GalNAc verloren

bei der Hydrolyse ihre Acetylierung und wurden deshalb als deren Amine (GlcNH₂, GalNH₂) nachgewiesen. Die Probe wurde in 2 M TFA für 4 h bei 100 °C hydrolysiert. Anschließend wurden 500 µl Wasser zugegeben und wiederum eingengt. Jeweils 100 pmol von D-Fructose und 2-Desoxy-D-Ribose und jeweils 200 pmol von D-Galactose, D-Glucose, D-Mannose, L-Fucose, N-Acetyl-D-Galactosamin, Arabinose und Xylose wurden zur Kalibrierung im externen Standardgemisch eingesetzt. Als interner Standard ist 2-Desoxy-D-Ribose notwendig, um die Proben quantitativ auszuwerten. Die entstandenen Gemische wurden an der Dionex Summit auf einer PA-1-Säule (250 x 2 mm) getrennt. Durch die isokratische Elution mit 2,25 mM NaOH erhält man eine Trennung der neutralen Monosaccharide. Die Auswertung der Daten erfolgte mit „Chromeleon® Version 6.8“ (Chromeleon Client Programm) von Dionex.

3.2.6. Sialinsäurebestimmung mit HPAEC-PAD

5 µg Glykoprotein wurden mit 200 µl 3 M Essigsäure versetzt und bei 80 °C für 90 min inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde die Probe mit 25 % NH₃ neutralisiert. Anschließend wurden 200 µl Ethanol (100 %) zugegeben. Die Salze wurden in der SpeedVac entfernt. Als interner Standard dienten 50 pmol Neu5Ac, Neu5Gc, und KDN. Die Trennung des Gemisches erfolgte mit 100 mM NaOH und Natriumacetat bei 250 µl/min. Die Eluenten waren A: 100 mM NaOH und Natriumacetat und B: 100 mM NaOH. Zur Separation wurde der Anteil von 8 % A auf 40 % A erhöht. Die Säule wurde in einem Säulenthmostat auf 25 °C temperiert.

3.2.7. Freisetzung der Glykane/Glykopeptide

3.2.7.1. Trypsin und Chymotrypsin

100 µg A1AT in 0,5 PBS wurden in der SpeedVac getrocknet und in H₂O₂ (50 mM) sowie MgCl₂ (1 mM) gelöst. Dadurch wurden die Methioninreste oxidiert. Nach Inkubation für 1 h bei RT wurden 50 µl TFE sowie 5 µl DTE (200 mM) zugeben und weiter bei 60 °C für 45 min inkubiert. Zur Spaltung der Disulfidbrücken in den Proteinen wurde A1AT mit 5 µl Iodoacetamide (200 mM) für 1 h im Dunkeln

carbamidomethyliert. Diese Reaktion wurde durch Zugabe eines Überschusses von DTE gestoppt. Die Mischung wurde noch in 400 µl H₂O, 20 µl Phosphatpuffer (pH 7.0, 100 mM) und Urea (8 M) gegeben. Die Trypsin-Lösung in 50 mM Essigsäure wurde im Verhältnis 1:100 der Proteinmenge zugesetzt und die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Nach der Deaktivierung des Enzyms bei 95 °C für 5 min wurden weitere 250 ng Trypsin in 50 mM Essigsäure als fertige Lösung zugegeben und bei 37 °C für 4 h inkubiert.

3.2.7.2. PNGase F

Das in 0.5 x PBS gelöste Glykoprotein (300 µg) wurde mit 1 % SDS (w/v) und 10 % 2-Mercaptoethanol denaturiert. Nach Inkubation für 5 min bei 95 °C wurde das Glykoprotein mit MilliQ H₂O 1:10 verdünnt und mit 1 % NP40 sowie 300 mU PNGase F zugesetzt. Nach Inkubation für 16 h bei 37 °C wurden die Glykane über C18-Säulen und Carbographsäulen aufgereinigt.

3.2.7.3. Thrombin

Thrombin ist eine Serinprotease, die selektiv die Arg-Gly Bindungen von Fibrinogen zu Fibrin und die Fibrinopeptide A und B spaltet. Die optimalen Spaltstellen für Thrombin wurden wie folgt bestimmt:

1) AB-Gly-Arg-| -Gly und 2) AB-Pro-Arg-| -XY wobei A und B hydrophobe Aminosäuren sind. X und Y sind nicht saure Aminosäuren.

Das Fusionsprotein setzt sich aus einem IgG-Fc-Fusionsteil und dem GM-CSF zusammen. Um GM-CSF nachzuweisen, wurde das in HEK293-Zellen exprimierte Fusionsprotein mit Thrombin enzymatisch gespalten.

Das GM-CSF (100 µg) wurde mit 1 Unit Thrombin bei RT für 16 h in 5 mM Natrium Citrat, pH 6.5, 20 mM NaCl, 0,1 % PEG-8000, 50 % Glycerol verdaut. Als Kontrolle wurde ein 48 kDa Fusionsprotein (Merck, Detuschland) verwendet. Durch Thrombin wurde das Fusionsprotein in zwei Proteine mit 35 kDa und 13 kDa abverdaut.

3.2.7.4. Glu-C

Endoproteinase Glu-C ist eine Serinprotease, die spezifisch C-terminal nach einem Glutamatrest schneidet. Endoproteinase Glu-C Standard wurde durch Zufügen von 50 µl sterilem HPLC-Grade Wasser rekonstituiert. Das zu verdauende Protein wurde in 25 mM Ammoniumcarbonat-Puffer, pH 7,8 gelöst und 1:50 mit Glu-C bei 25 °C 16 h inkubiert.

3.2.8. In-Gel-Verdau

Aus den Coomassie gefärbten Proteinbanden wurden Gelstücke mit einem Durchmesser von 1,0 mm mit dem *EXQuest-Spotcutter* (Biorad) ausgeschnitten. Die Steuerung des Gerätes erfolgte mit der Software *PDQuest*. Zunächst wurden die ausgestanzten Gelstücke in 20 µl ACN: 100 mM NH₄HCO₃ (v/v 1:1) entfärbt und lyophilisiert. Anschließend wurden durch Zugabe von 10 µl DTT (100 mM) in NH₄HCO₃ (100 mM) und Inkubation für 30 min bei 56 °C die Disulfidbrücken reduziert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Carbamidomethylierung mit 55 mM Iodacetamid in 100 mM NH₄HCO₃ für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Gelstücke wurden anschließend mit 100 mM NH₄HCO₃ für 15 min bei RT gewaschen. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und die Gelstücke mit 7 µl Trypsin (12.5 ng/µl) in 100 mM NH₄HCO₃ versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

3.2.9. Exoglykosidase Verdauen

An den N-Glykanen befinden sich häufig endständig gebundene N-Acetyl-Neuraminsäurereste (Neu5Ac, Neu5Gc, KDN), welche eine negative Ladung aufweisen. Sialinsäuren spielen in vielen biologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Bisher wurden 20 humane Sialyltransferasen identifiziert, welche die Sialinsäuren an Galactosereste in der Regel α 2,3 oder α 2,6 verknüpfen.

3.2.9.1. Enzymatische Desialylierung mit Sialidase S

Die Spaltung der α 2,3 verknüpften Sialinsäuren erfolgte mit der Sialidase S [Glasgow et al., 1977]. Die Inkubation der Probe erfolgte mit 7 μ l MilliQ-Wasser, 2 μ l 250 mM Natriumphosphat (pH 6,0) und 2 μ l Sialidase S (1 mU/ μ l) bei 37 °C für 16 h.

3.2.9.2. Enzymatische Desialylierung mit Sialidase C

Für die Abspaltung der α 2,3 und α 2,6 verknüpften Sialinsäuren wurde Sialidase C verwendet [Roggentin et al., 1995]. Die N-Glykane wurden in 2 μ l 250 mM Natriumacetat (pH 5,0) mit 1 μ l Sialidase C (1 mU/ μ l) und 7 μ l MilliQ-Wasser versetzt und für 16 h bei 37°C inkubiert.

3.2.10. Aufreinigung von Glykanen und Peptiden

3.2.10.1. Carbograph-Material und TopTip

Mit Carbograph- und TopTip-Säulen, welche aus porösem Graphit bestehen, wurden die Glykane entsprechend der Ausgangskonzentration gesammelt. Carbograph-Säulen wurden für größere Ausgangsmengen, TopTip-Säulen dagegen für kleinere Ausgangsmengen verwendet. Die Säule wurde mit 80 % ACN 0,1 % TFA äquilibriert. Nach dem Waschen der Säule mit 0,1 % TFA wurde die angesäuerte Probe auf die Säule geladen und im Anschluss abermals mit 0,1 % TFA gewaschen. Die gebundenen Glykane wurden mit 25 % ACN 0,1 % TFA eluiert.

3.2.10.2. C18-(Reversed Phase-)Material und ZipTip

Die C18- und ZipTip-Säulen wurden für die Aufkonzentrierung und Aufreinigung der Peptide und Proteine verwendet. Bei größeren Ausgangsmengen wurden C18-Säulen, bei kleineren Ausgangsmengen ZipTip-Säulen verwendet. Ein ZipTip ist eine 10 μ l Pipettenspitze, in der sich ein Filter aus C18-Material befindet. Das Säulenmaterial besteht aus einem Polymer, an dessen Oberfläche sich die hydrophoben Seitengruppen von Peptiden bevorzugt anlagern (Abb. 11). Wasserlösliche Salze

binden nicht an der Säule und werden ausgewaschen. Proteine und Peptide binden an der stationären Phase, einem modifizierten Silicagel und können wieder eluiert werden.

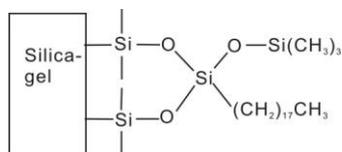


Abb. 11 SPE mit hydrophober RP-18-Phase

Die Säule wurde mit 80 % ACN 0,1 % TFA äquilibriert. Anschließend wurden die Glykane von der Säule mit 0,1 % TFA gewaschen und die gebundenen (Glyko-)Proteine und Peptide mit 50 % ACN 0,1 % TFA eluiert.

3.2.10.3. Isolierung und Anreicherung der Glykopeptide mit ZIC-HILIC-SPE

Die Glykane eines Peptid-Rückgrates erhöhen dessen Hydrophilie, sodass das HILIC-Material für die Affinitätsanreicherung von Glykoproteinen und Glykopeptiden verwendet werden kann. Das ZIC-HILIC Material (SeQuant AB), besteht aus einer Gruppe von *Sulfobetain* an einem Silicagel, und kann aufgrund der kovalent gebundenen zwitterionischen Funktion für die Anreicherung von Glykopeptiden eingesetzt werden (Abb. 12). ZIC-HILIC konnte für N-Glykopeptide aus verdauten Proteinmischungen verwendet werden [Hagglund et al., 2004].

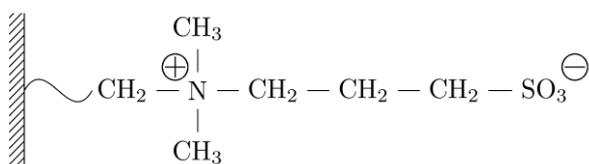


Abb. 12 Funktionelle Gruppe der stationären Phase einer ZIC-HILIC-Säule

Die Probe wurde in 80 % ACN 0,1 % FA gelöst. Die Säule wurde mit 80 % ACN 0,1 % FA äquilibriert. Im Anschluss wurde die Probe auf die Säule geladen und mit 80 % ACN 0,1 % FA gewaschen. Die gebundenen Glykopeptide wurden mit 10 % ACN 0,5 % FA eluiert.

3.2.11. Chemische Verfahren

3.2.11.1. Fluoreszenzmarkierung von Oligosacchariden mit 2-Aminobenzamid

2-Aminobenzamid (2-AB) reagiert mit Aldehydgruppen am reduzierenden Ende des Oligosaccharids. Unter der Abspaltung von Wasser wird eine Schiff'sche Base gebildet. Durch die Zugabe des Reduktionsmittels NaCNBH_3 wird die Schiff'sche Base zu einem sekundären Amin reduziert wodurch der Reaktion das Produkt entzogen wird. Dadurch wird eine größere Stabilität und eine quantitative Markierung gewährleistet [Bigge et al., 1995].

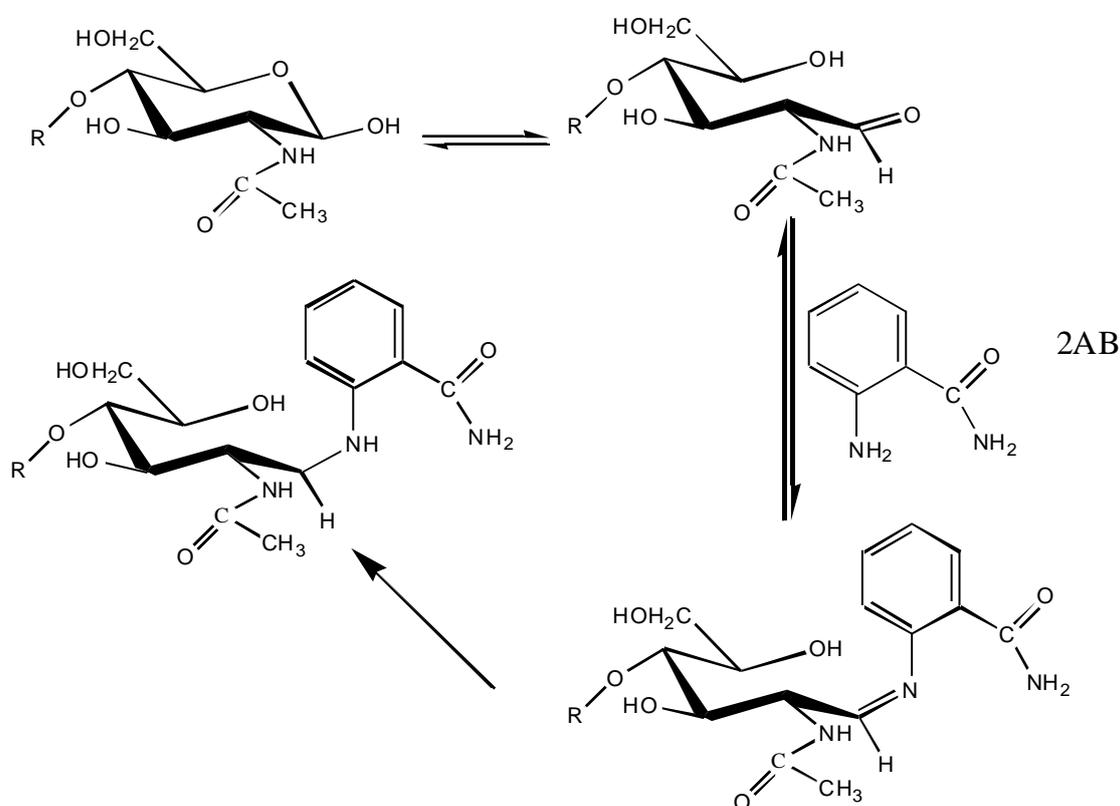


Abb. 13 Fluoreszenzmarkierung mittels 2-Aminobenzamid

Zunächst wurde ein Essigsäure/DMSO-Gemisch im Verhältnis 3:7 hergestellt, in welchem circa. 5 mg 2-AB (Endkonzentration 0,05 mg/ μl) gelöst wurden. In dieser Lösung wurde NaCNBH_3 gelöst, sodass das Endverhältnis von 2-AB zu NaCNBH_3 5:6 betrug. Je nmol Glykoprotein wurden 10 μl der Markierungslösung zugegeben und diese für zwei Stunden bei 65 °C im Dunkeln schüttelnd inkubiert. Anschließend

wurde die Probe über eine Papierchromatographie aufgereinigt. Hierzu wurden jeweils 5 µl der markierten Probe auf 3 mm Chromatographiestreifen aufgetragen und im Dunkeln über Nacht getrocknet. Die Chromatographie erfolgte mit einem Lösungsgemisch bestehend aus Butanol : Ethanol : H₂O im Verhältnis (4:1:1) für eine Stunde in einer Glaskammer. Anschließend wurde die Probe mit H₂O eluiert und eingengt.

3.2.11.2. Permethylierung von Glykanen

Zuerst wurde eine NaOH/DMSO-Suspension hergestellt (3-4 NaOH-Plätzchen, 3 ml wasserfreies DMSO, mörsern). Diese Lösung wurde im Vortex geschüttelt. Anschließend wurde die zuvor getrocknete Probe mit NaOH/DMSO-Suspension versetzt. Um die Permethylierungsreaktion zu stoppen wurden CHCl₃ und MilliQ-Wasser zugegeben, gemischt und die wässrige Phase wurde verworfen. Die Probe wurde gewaschen bis die wässrige Phase einen pH-Wert von 7 hatte. Die Glykane wurden getrocknet und in 10 µl 75 % gekühltem Acetonitril für die MS Analyse gelöst.

3.2.11.3. Chemische Freisetzung von Glykanen mittels β-Eliminierung

10 µg Glykoprotein wurde mit 50 µl Base (0,5 M NaBH₄ in 50 mM NaOH) versetzt und bei 50 °C für 16 h inkubiert. Nach Abkühlung wurde Essigsäure schrittweise zugegeben bis die Gasbildung ausblieb. Für die Aufreinigung der Probe wurde DOWEX-Material und Sepabeads verwendet.

Präparation von DOWEX[®]

Der kommerziell erhältliche saure Kationenaustauscher DOWEX[®] (50WX8-400, H⁺ Form; Sigma-Aldrich) wurde mit MilliQ-Wasser gewaschen, in 0,1 M Natronlauge geschüttelt und anschließend mit MilliQ-Wasser neutral gewaschen. Im Anschluss wurde der Kationenaustauscher mit 5 % Essigsäure versetzt und erneut neutral gewaschen.

Präparation von Sepabeads[™]

Das kommerziell erhältliche hydrophobe Kunstharz Sepabeads[™] (SP-20SS; Supelco)

wurde mit Methanol inkubiert und anschließend mit MilliQ-Wasser mehrfach gewaschen.

100 μl DOWEX[®] wurden mit 100 μl Sepabeads[™] überschichtet. Nach der β -Eliminierung wurde die Probe auf die DOWEX[®]-Sepabeads[™]-Säule überführt und mit 0,1 % TFA eluiert. Das wässrige Eluat wurde auf eine zuvor äquilibrierten Carbograph-Säule SPE geladen und mit 0,1 % TFA gewaschen. Die Glykane wurden mit 25 % ACN in 0,1 % TFA eluiert. Das Eluat wurde eingengt und bei -20 °C gelagert.

3.2.12. Ladungsprofile von Glykanen mit Asahi-Pak-HPLC

Diese HPLC-Methode diente der Auftrennung 2AB-markierter Glykane hinsichtlich der Anzahl geladener Sialinsäuren. Die Trennung wurde mittels einer Asahipak-NH₂ P-50 E4 5 μ (250 x 4,6 mm, Shodex) Säule durchgeführt. Der Eluent A besteht aus 2 % Essigsäure und 1 % Tetrahydrofuran in 100 % ACN, der Eluent B aus 5 % Essigsäure, 1 % Tetrahydrofuran und 3 % Triethylamin in MilliQ. Zur Separation wurde der Anteil von 30 % B auf 95 % B in 82 min bei einer Flußrate von 0,8 ml/min erhöht. Diese Säule wurde in einer Dionex ultimate 3000 HPLC-Anlage zusammen mit einem Dionex Fluoreszenz Detektor RF2000 ($\lambda_{\text{exc.max}} = 330 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em. max}} = 420 \text{ nm}$) durchgeführt. Generell konnten neben neutralen Glykanstrukturen (A0) weitere mit einer (A1), zwei (A2), drei (A3) oder vier (A4) Sialinsäure(n) nachgewiesen werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit „Chromleon[®] Version 6.8“ (Chromleon Client Programm) von Dionex.

3.2.13. MALDI -TOF-MS

Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS) ist die Desorption und Ionisierung mittels gepulster Laserstrahlung („LDI“) von Biomolekülen unter Einsatz einer organischen Matrix („matrix-assisted“) in Kombination mit einem Flugzeitmassenspektrometer („TOF“). Der Zweck der Massenspektrometrie ist die Erzeugung von Ionen aus neutralen

Molekülen und die Detektion des Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z) der Ionen durch geeignete Methoden im Hochvakuum.

Die Aufnahme der MALDI-Spektren der vorliegenden Arbeit erfolgte mit einem Ultraflex III TOF/TOF-Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonik GmbH. Dieses Gerät ist ein MALDI Tandem Massenspektrometer, das für Messungen im MS- und MS/MS Modus zur Identifizierung der Glykane und Peptide eingesetzt werden kann.

Ein Massenspektrometer besteht aus Ionenquelle, Massenanalysator und Detektor. In der Ionenquelle werden bei der Matrix-unterstützten-Laserdesorption/Ionisation die Ionen durch Laserbeschuss erzeugt. Die Ionentrennung findet im Flugzeitanalysator (TOF) statt. Die Ionenquelle ist mit einem TOF-Analysator verbunden, in welchem die Massen der gebildeten Ionen im Hochvakuum bestimmt werden. Nachdem die Ionen die Ionenquelle verlassen, fliegen sie mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ins feldfreie Flugrohr, wo sie aufgrund ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z) getrennt werden. Durch die Beschleunigungsspannung und die Länge des Flugrohres kann die Flugzeit bestimmt werden. Große Ionen mit hohen m/z -Werten erreichen den Detektor langsamer als kleine Ionen (siehe Abb. 14). Die Analyten konnten fragmentiert werden, bei dem Zerfall der Mutterionen werden geladene und neutrale Fragmentationen gebildet.

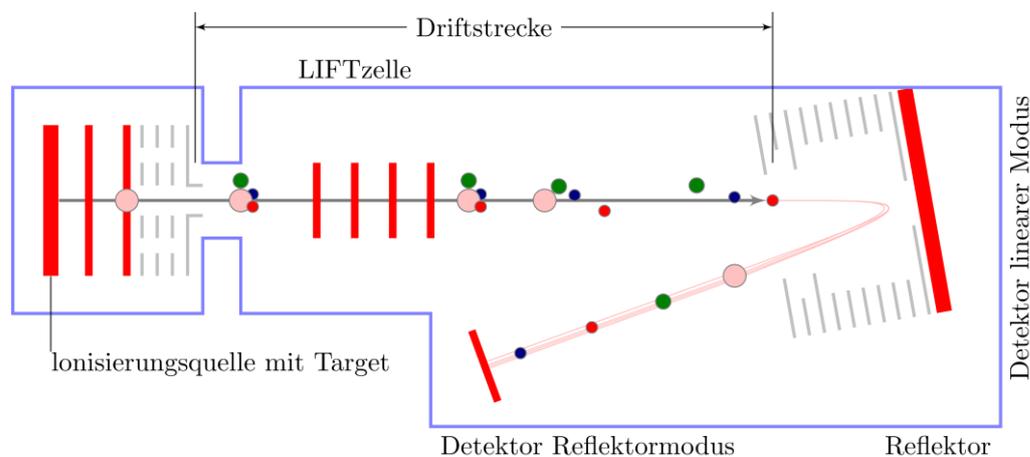


Abb. 14 Schema des Ultraflex III MALDI-TOF-MS (Nach Bruker Daltonics)

3.2.13.1. Sequenzierung von Peptiden mit MALDI-TOF-MS

Gesättigte Matrixsubstanz (α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure) wurde in 50 μ l 70 % ACN 0,1 % TFA gelöst. Für die Analyse wurden 0,5 μ l eines tryptischen Verdauansatzes auf den Probeträger aufgetragen und mit 0,5 μ l Matrixlösung gemischt. Als Kalibrierstandard wird Pepmix verwendet (Tab. 9).

Tab. 9 Peptide des Kalibrierstandards

Peptide	Monoisotopische Masse[M+H] ⁺
Bradykinin (1-7)	757,399
Angiotensin II	1046,541
Angiotensin I	1296,684
Substanz P	1347,735
Bombesin	1619,822
Renin Substrat	1758,932
ACTH-clip (1-17)	2093,086
ACTH-clip (18- 39)	2465,198
Somatostatin (28)	3147,471

3.2.13.2. Sequenzierung von Glykanen mit MALDI-TOF-MS

Die Glykane wurden zum Einen mit Sialidase verdaut und zum Anderen permethyliert. Super-DHB wurde mit 10 % ACN 0,1 % TFA gelöst und kalt gesättigt. Die entsalzten Glykane wurden auf das Stahltarget aufgetragen und mit der Matrix gemischt. Für die Kalibrierung wurde 0,5 μ l Dextranhydrolysatlösung (0,15 μ g/ μ l) verwendet.

3.2.14. Nano-LC-Q-TOF-MS

Die ESI Ionisierungstechnik wurde von Fenn und Yamashita durch Kopplung von Sektorfeld- bzw. Quadrupolanalysatoren entwickelt [Fenn et al., 1990]. In Abhängigkeit der zu analysierenden Probe kann das ESI mit weiteren Analysatortypen

ausgerüstet werden. Für die vorliegenden Analysen wurde ein MicrOTOF-Q II Massenspektrometer der Firma Bruker verwendet. Das Massenspektrometer ist mit einer nano-ESI-Quelle mit Sprühkapillaren („Pico Tip“, New Objective, Woburn, USA) ausgestattet.

Das Nano-LC-QTOF-MS-System besteht aus einem UltiMate 3000 Nano/Kapillare Probengeber, einem UltiMate 3000 Flow Manager FLM-3000, einer Micro-Pumpe (Dionex) und einem micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics). Nach Aufreinigung der Glykopeptide mit ZIC-HILIC wurden diese mittels einer Pepmap 100 C18-Vorsäule (300 µm x 5 mm, Dionex) und einer Pepmap 100 C18-Säule (75 µm x 150 mm, Dionex) analysiert. Der Eluent A besteht aus 1 % ACN, 0,1 % FA in H₂O, der Eluent B aus 0,1 % FA in 100 % ACN. Zur Separation wurde der Anteil von 6 % B auf 60 % B in 65 min, bei einer Flußrate von 220 nl/min erhöht. Die in flüchtigen Lösungsmitteln gelösten Proben wurden in einem elektrischen Feld versprüht, das zwischen der Kapillarspitze und einer gegenüberliegenden Elektrode erzeugt wurde (Abb. 15). Bei Atmosphärendruck und unter Einfluss eines elektrischen Feldes verdunstet das Lösungsmittel und wird als feiner Nebel hochgeladener Tröpfchen versprüht. Durch die starken Abstoßungseffekte kommt es zu einem explosionsartigen Zerfall der Tröpfchen, wodurch die Ladungsdichte an der Oberfläche zunimmt. Die Ionen wurden dann in den Analysator des Massenspektrometers geleitet. Der Analysator besteht aus einer Hexapol-Stoßzelle, einem Quadrupol, einer Collision Cell und einem Reflektor-TOF-Analysator. Im MS-Modus passieren die Ionen den Hexapol, Quadrupol und Collision Cell und werden mit Hilfe des TOF-Analysators anhand der Flugzeit analysiert. Als Kalibrierstandard wurde ein Kalibrant verwendet (Tab. 10). Die Aufnahme und Auswertung der Massenspektren erfolgte mit dem Programm *DataAnalysis* Version 3.4.

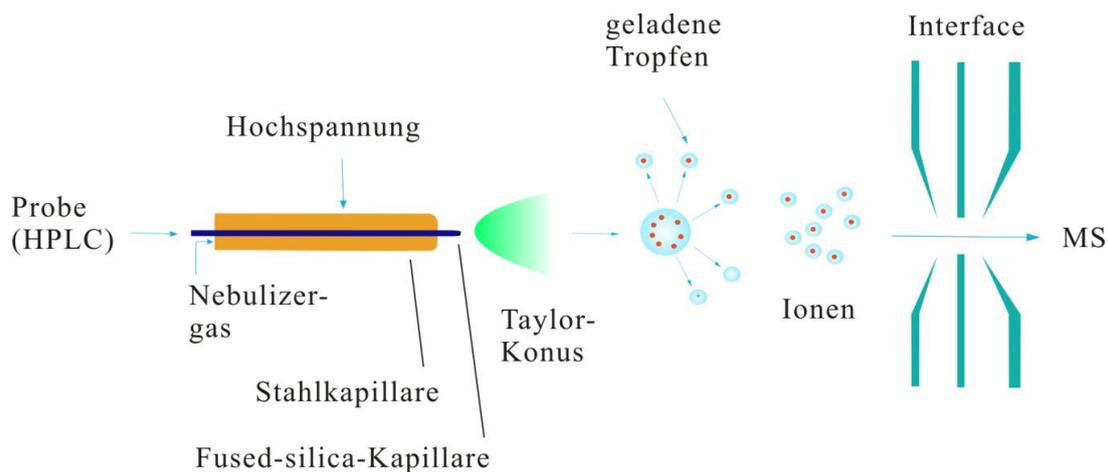


Abb. 15 Schematisches Prinzip einer Nano-LC-ESI-MS

Tab. 10 Kalibrant für Nano-LC-QTOF-MS

Kalibrant Name	Masse
C5H12O2N	118,086255
C6H19O6N3P3	322,048121
C2H19O6N3P3F12	622,028960
C18H19O6N3P3F24	922,009798
C26H19O6N3P3F40	1321,984249
C30H19O6N3P3F48	1521,971475
C42H19O6N3P3F72	2121,933152
C54H19O6N3P3F96	2721,894829

3.2.15. Datenbanken

Mit Hilfe der verfügbaren Datenbanken im Internet erfolgte die Analyse der Peptide, Glykopeptide und Glykane (siehe Tab. 11). Die innerhalb der Analytik gefundenen Glykane, Glykopeptide und Peptide werden im Ergebnissteil ausführlich erläutert.

Tab. 11 Datenbanken für die Analyse der MS-Data

Software	Internet-Adresse	Anwendung
GlycoWorkbench	http://www.glycoworkbench.org/	Glykane & Fragmentierung
Glycopeakfinder	http://www.glyco-peakfinder.org/	Glykane & Fragmentierung
GlycoPep DB	http://hexose.chem.ku.edu/sugar.php	Glykopeptide
GlycoSpectrumScan	http://137.111.107.45:8080/glycoSpectrumScan_REFINED/query_page	Glykopeptide
Glycomod	http://expasy.org/tools/glycomod/	Glykopeptide
Mascot	http://www.matrixscience.com	Peptide

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung von A1AT aus der NZL-Zelllinie (AGE1.hn)

4.1.1. Aufreinigung des A1AT mittels FPLC

Das A1AT wurde in einer neuen humanen neuronalen Zelllinie in Kooperation mit der Firma ProBioGen AG (Berlin) exprimiert. Die verwendete Probe (SLA 121 PT 6.8 von Silke Langhammer) stammt aus einem Fermenter (Standardrührkessel-Bioreaktorsystem). Das A1AT wurde mittels FPLC in zwei Schritten aufgereinigt. Zunächst wurde der Zellüberstand mit Hilfe eines Filters (0,22 µm) gereinigt, um zu verhindern, dass Zelltrümmer die Säule verstopfen. Der erste Schritt der Aufreinigung erfolgte mittels Anionenaustauscher-Chromatographie (Mono Q-Säule). Die aufzureinigende Proteinlösung wurde auf die Mono Q-Säule geladen, hierbei treten die negativ geladenen Komponenten der Proteine mit dem Säulenmaterial in Wechselwirkung. Mit Hilfe eines NaCl-Gradienten wurden die Proteine eluiert und in Fraktionen gesammelt. Aliquote aus jeder Fraktion wurden mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

Die folgende Abbildung (Abb. 16A) zeigt, dass die Fraktionen Nr. 6 und 7 hierbei den größten Anteil des gewünschten A1AT beinhalten. Diese Probenfraktionen wurden danach mittels einer Gelfiltrationssäule S200 weiter aufgereinigt. Hierbei wurde das Protein von anderen enthaltenden Proteinen der Größe nach getrennt. Der FPLC-Lauf von aufkonzentriertem A1AT wurde fraktioniert. Anhand eines 10 %igen SDS-Gels wurde die Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration ermittelt (Abb. 16 B Fraktion Nr. 12 und 13). Die molekulare Masse des A1AT wurde mittels MALDI-TOF-MS vermessen und betrug 52266 Da (Abb. 17).

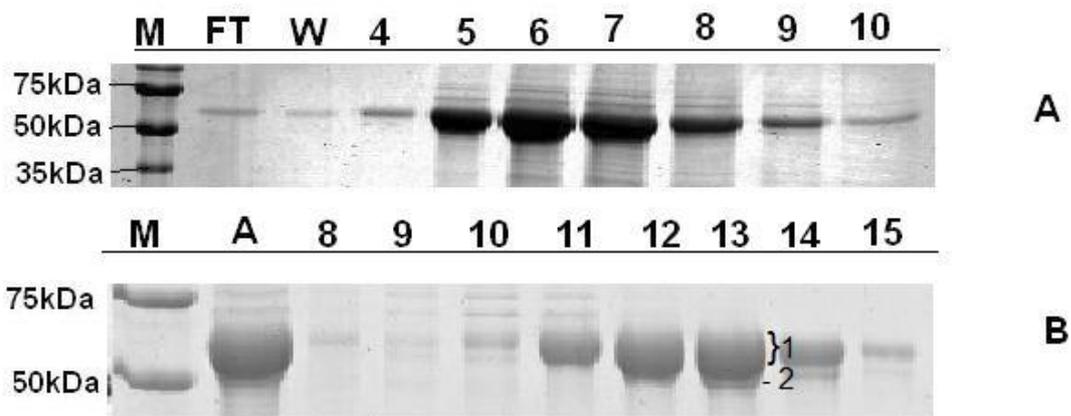


Abb. 16A: Fraktionen der Mono Q-Aufreinigung von A1AT im Coomassie gefärbten 10 %igen SDS-Gel; 16B: Fraktionen der Gelfiltrationschromatographie an S200 von A1AT im Coomassie gefärbten 10 %igen SDS-Gel. 1: erste Bande des A1AT; 2: zweite Bande des A1AT; FT: Durchlauf des Filters; W: Originallösung aus dem Zellüberstand; A: Die Fraktionen aus Nr. 6 und 7 von Abb. 16A; M: Marker.

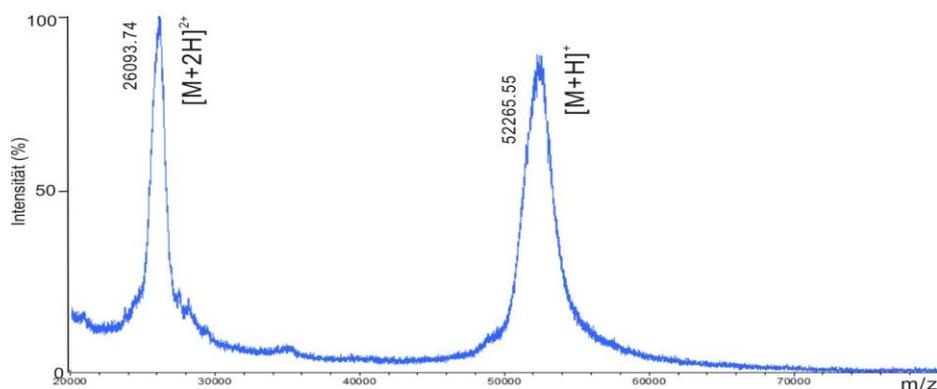


Abb. 17 MALDI-TOF-Spektrum der Molekularmasse von A1AT. Die Masse von 52266 m/z ist das einfach geladene Ion. Die Masse von 26094 m/z ist das zweifach geladene Ion.

Die Methode der BCA-Proteinbestimmung wurde herangezogen, um die Proteinkonzentration in den Fraktionen Nr. 12 und Nr. 13 (Abb. 16B Nr. 12 und 13) zu ermitteln. Die A1AT-Konzentrationen lagen bei 535,79 $\mu\text{g/ml}$ und 627,95 $\mu\text{g/ml}$.

4.1.2. Peptid-Mapping von A1AT

In der Fraktion (Abb. 16B Nr. 13) sind zwei Banden erkennbar. Zur genaueren Untersuchung wurden die obere („1“) und die untere („2“) Bande der Fraktion aus dem Gel ausgeschnitten und mittels *Peptid-Mapping* näher analysiert. Die Proteine wurden dabei zunächst mit Trypsin mit Hilfe der In-Gel-Verdau-Methode verdaut (Abschnitt 3.2.8), aufgereinigt und anschließend mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Die Datenbankanalyse der ersten und zweiten Bande wurde mit dem Programm Mascot durchgeführt. Dabei wurden *Scores* von 143 und 80 erreicht. Diese hohen Werte bestätigen, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein um A1AT handelt. Die Tab. 12 listet alle gefundenen Peptide mit entsprechender Aminosäuresequenz auf. Darüber hinaus konnten Unterschiede von m/z 1855,91; m/z 1871,87; m/z 2258,95; m/z 2274,94 und m/z 2290,93 identifiziert werden. Dies lässt darauf schliessen, dass der unteren Bande der C-Terminus mindestens ab G-368 fehlt, wodurch die Migrationsverschiebung im SDS-PAGE Gel erklärt werden kann (Abb. 16B Nr. 13, Bande 2).

Tab. 12 *Peptid-Mapping* der ersten und zweiten Bande. Gefundene Peptide sind rot markiert. Ox. (M) = Oxidation des Methionins

Obere Bande (1)						
Mascot Score	143					
Proteinsequenz	1 MPSSVSWGIL LLAGLCCLVP VSLAEDPQGD AAQK TDTSHH DQDHPTFNKI					
	51 TPNLAEFAPS LYRQLAHQSN STNIFFSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI					
	101 LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF QELLRTLNPQ DSQQLTTGN GLFLSEGLKL					
	151 VDKFLEDVKK LYHSEFTVN FGDTEEAKKQ INDYVEK GTQ GKIVDLVKEL					
	201 DRDTVFALVN YIFFKGK WER PFEVKDTEEE DFHVDQVTTV KVPMMKRLGM					
	251 FNIQHCKKLS SWVLLMKYLG NATAIFFLPD EGKL QHLENE LTHDIITKFL					
	301 ENEDRR SASL HLPKLSITGT YDLK SVLGQL GITKVFSNGA DLSGVTEEAP					
	351 LKLSKAVHKA VLTIDEKGTE AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE					
	401 QNTK SPLFMG KVVNPTQK					
gefundene Peptide	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
	35 - 49	1779.7959	1778.7886	1778.7609	16	0 K.TDTSHHDQDHPTFNKI
	161 - 178	2057.8769	2056.8696	2056.9378	-33	0 K.LYHSEFTVNFQDTEEAK.K
	180 - 187	1008.4385	1007.4313	1007.4924	-61	0 K.QINDYVEK.G
	218 - 225	1090.5531	1089.5459	1089.5607	-14	0 K.WERPFEVK.D
	226 - 241	1891.8577	1890.8504	1890.8483	1	0 K.DTEEDDFHVDQVTTVK.V
	284 - 298	1803.9812	1802.9739	1802.9526	12	0 K.LQHLENELTHDIITK.F
	299 - 305	922.3447	921.3374	921.4192	-89	0 K.FLENEDR.R
	325 - 334	1015.5755	1014.5683	1014.6073	-39	0 K.SVLGQLGITK.V
	335 - 352	1833.9372	1832.9299	1832.9156	8	0 K.VFSNGADLSGVTEEAPLK.L
	368 - 389	2258.9528	2257.9455	2258.1326	-83	0 K.GTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVK.F
	368 - 389	2274.9448	2273.9375	2274.1276	-84	0 K.GTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVK.F Ox.(M)
	368 - 389	2290.9384	2289.9311	2290.1225	-84	0 K.GTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVK.F 2Ox.(M)
	390 - 404	1855.9138	1854.9065	1854.9702	-34	0 K.FNKPFVFLMIEQNTK.S
	390 - 404	1871.8789	1870.8716	1870.9651	-50	0 K.FNKPFVFLMIEQNTK.S Ox.(M)
Untere Bande (2)						
Mascot Score	80					
Proteinsequenz	1 MPSSVSWGIL LLAGLCCLVP VSLAEDPQGD AAQK TDTSHH DQDHPTFNKI					
	51 TPNLAEFAPS LYRQLAHQSN STNIFFSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI					
	101 LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF QELLRTLNPQ DSQQLTTGN GLFLSEGLKL					
	151 VDKFLEDVKK LYHSEFTVN FGDTEEAKKQ INDYVEK GTQ GKIVDLVKEL					
	201 DRDTVFALVN YIFFKGK WER PFEVKDTEEE DFHVDQVTTV KVPMMKRLGM					
	251 FNIQHCKKLS SWVLLMKYLG NATAIFFLPD EGKL QHLENE LTHDIITKFL					
	301 ENEDRR SASL HLPKLSITGT YDLK SVLGQL GITKVFSNGA DLSGVTEEAP					
	351 LKLSKAVHKA VLTIDEKGTE AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE					
	401 QNTK SPLFMG KVVNPTQK					
gefundene Peptide	Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	ppm	Miss Sequence
	35 - 49	1779.8102	1778.8030	1778.7609	24	0 K.TDTSHHDQDHPTFNKI

218 - 225	1090.5950	1089.5877	1089.5607	25	0	K.WERPFEVK.D
226 - 241	1891.8955	1890.8883	1890.8483	21	0	K.DTEEDFHVDQVTTVK.V
299 - 305	922.4500	921.4427	921.4192	26	0	K.FLENEDR.R
335 - 352	1833.9570	1832.9497	1832.9156	19	0	K.VFSNGADLSGVTEEAPLK.L

4.1.3. Neutrale Monosaccharidanalyse von A1AT

Das A1AT wurde durch TFA-Hydrolyse in Monosaccharide aufgespalten. Die Monosaccharidanalyse der N-Glykane des A1AT erfolgte als erster Schritt in der Glykananalytik um zu überprüfen, dass keine Kontamination aus dem Zellkulturmedium in der Probe vorhanden ist. Die Monosaccharide GlcNAc und GalNAc verloren bei der TFA-Hydrolyse ihre Acetylierung und wurden deshalb als deren Amine (GlcNH₂, GalNH₂) nachgewiesen. Die Monosaccharidkonzentration wurde mit einem externen und einem internen Kalibrierungsstandard berechnet. Abb. 18A zeigt den Kalibrierungsstandard für die einzelnen Monosaccharide. Sie wurden in der jeweils eingesetzten Konzentration detektiert. Abb. 18B zeigt die Trennung von vier Monosaccharid-Species (Fuc, Gal, GlcNAc, Man), die vorwiegend im Glykoprotein A1AT vorkommen. Es zeigte sich, dass A1AT nach der FPLC Aufreinigung keine Verunreinigung mit Man und Glc mehr aufwies, die überwiegend im Kulturmedium vorhanden sind. Die Konzentration der Monosaccharide GlcNAc, Man, Gal und Fuc sind bedeutend für die nachfolgenden Analysen. Die molaren Verhältnisse der einzelnen Monosaccharidbausteine Man, GlcNAc, Gal, Fuc sind 3 : 5,3 : 3,2 : 1,9. Dabei wurde Man auf 3 als Massenverhältnis gesetzt, weil 3 Man-Reste im *Core* des N-Glykans typisch sind.

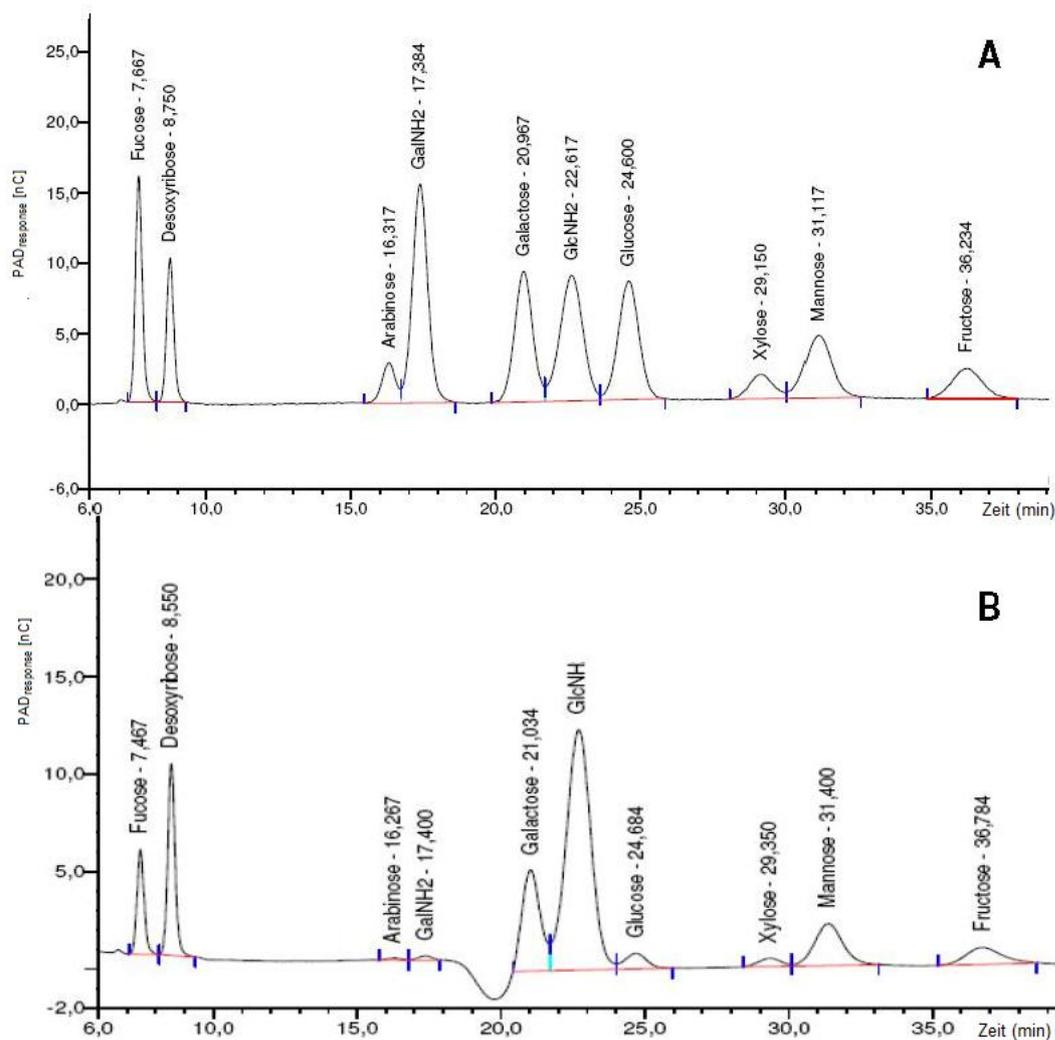


Abb. 18 Chromatogramme der Monosaccharidanalysen mit Hilfe der HPAEC-PAD. A: Standardlösung; B: A1AT; HPAEC-PAD Chromatographie wurde an einer CarboPac PA-1-Säule durchgeführt, die Glykane wurden dabei isokratisch eluiert.

4.1.4. Bestimmung der Sialinsäure von A1AT mittels HPAEC-PAD

Die Sialinsäuren wurden mit Hilfe der Essigsäure-Hydrolyse abgespalten. Die resultierenden geladenen Monosaccharide wurden mittels HPAEC-PAD detektiert und mit KDN als interner Standard quantifiziert. In Abb. 19 sind die Chromatogramme der Standardlösung und des A1AT dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass in A1AT kein Neu5Gc vorkommt. Da Neu5Gc antigenisch im menschlichen System ist sollen potentielle Biopharmaceutika systematisch auf Neu5Gc überprüft werden. Es war allerdings zu erwarten, dass eine humane neuronale Zelllinie kein Neu5Gc auf N-Glykane synthetisieren kann.

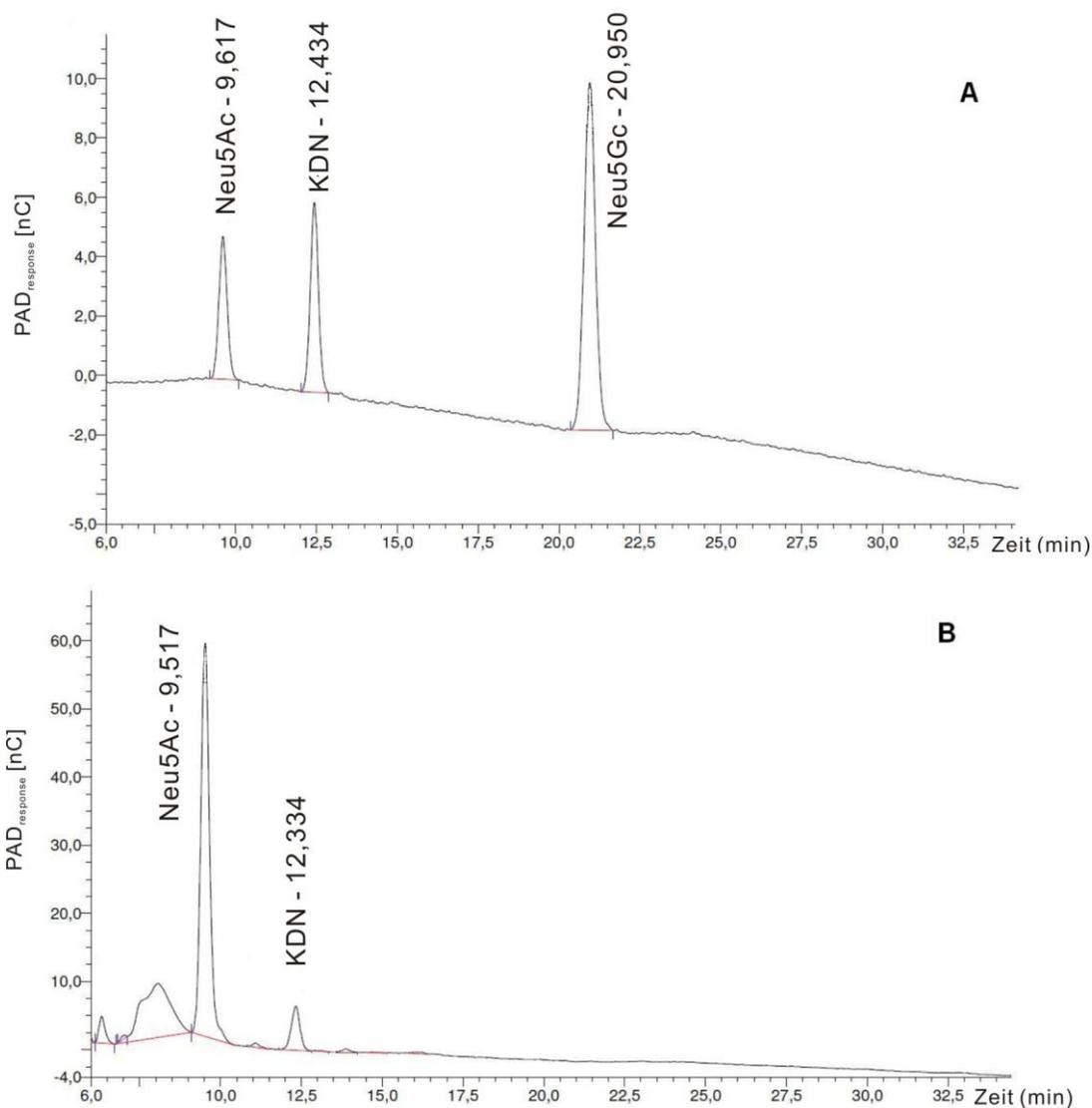


Abb. 19 Chromatogramme der Sialinsäureanalyse. A: Standardlösung (Neu5Ac, KDN, Neu5Gc); B: A1AT

4.1.5. Massenspektrometrische Charakterisierung von Glykanen

Das in der neuronalen Zelllinie exprimierte A1AT wurde mit PNGase F verdaut. Mit Hilfe der MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie erfolgte eine qualitative Strukturanalyse der N-Glykane. Die Überprüfung der N-Deglykosylierung wurde mittels SDS-PAGE durchgeführt (Abb. 20). Es konnte gezeigt werden, dass nach der Abspaltung der N-Glykane eine deutliche Bande bei etwa 45 kDa entsteht. Dies spricht dafür, dass nach der Aufreinigung der N-Glykane diese permethyliert und mittels MALDI-TOF/TOF-MS im positiven Ionenmodus bestimmt wurden (Abb. 22A).

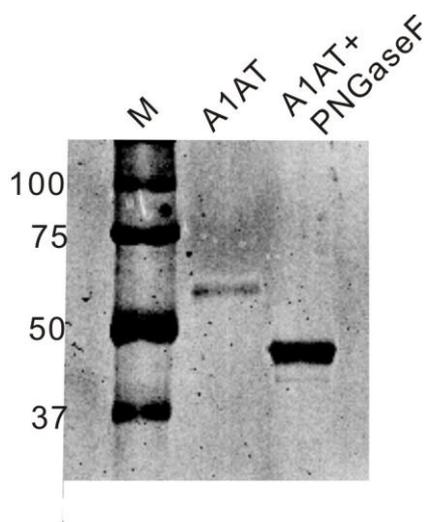


Abb. 20 Glykosylierungsnachweis des A1AT mittels PNGase F Verdau (SDS-PAGE). M=Proteinmarker

28 N-Glykane konnten hier in einem Massenbereich zwischen m/z 2000 und 5000 identifiziert werden. Die ermittelten komplexen N-Glykane wiesen Bi-, Tri- und Tetraantennarität auf. Außerdem konnten bis zu drei Fucosen und bis zu vier Sialinsäuren pro Struktur beobachtet werden (Tab. 13). Die zwei Hauptstrukturen sind ein monosialyliertes biantennäres bifucosyliertes Glykan und ein bisialyliertes biantennäres monofucosyliertes Glykan. Diese beiden Glykanstrukturen stellen jeweils 25 % (m/z 2779,5) und 18 % (m/z 2966,6) des gesamten N-Glykanpools dar. Demgegenüber treten die fucosylierten triantennären N-Glykane mit sehr geringen relativen Intensitäten zwischen 1,0 und 5,3 % auf. Alle Glykane sind fucosyliert, außer dem monosialylierten biantennären Glykan mit der Masse m/z 2431,3. Die relativen Intensitäten aller bifucosylierten Strukturen sind höher als die der tri- und tetrafucosylierten Strukturen.

Tab. 13 Isolierte N-verknüpfte Oligosaccharidstrukturen aus A1AT. Relative Intensitäten (%) sind auf Peakflächen der 2AB-markierten N-Glykane im HPLC-Chromatogramm bestimmt.

	A0	A1	A2	A3	A4
Hex5HexNAc4		0.7			
dHex1Hex5HexNAc4	1.0	5.2	18.6		
dHex2Hex5HexNAc4	2.2	25.0			
dHex3Hex5HexNAc4	7.0	0.7			
dHex1Hex6HexNAc5		1.0	3.2	5.3	
dHex2Hex6HexNAc5		1.5	5.0		
dHex3Hex6HexNAc5	1.0	2.5			
dHex1Hex7HexNAc6			2.3	7.0	7.0
dHex2Hex7HexNAc6				3.8	

4.1.6. Analyse der Sialinsäureverknüpfung von A1AT mittels 2AB-HPLC

Das Chromatogramm der Aminophasen-HPLC (*Asahipak*-Säule) (Abb. 21A) zeigt, dass es fünf charakteristische Gruppen von Peaks (A0, A1, A2, A3 und A4) gibt, wobei A0 asialylierte (11 %), A1 monosialylierte (41 %), A2 bisialylierte (28 %), A3 trisialylierte (14 %) und A4 tetrasialylierte (6 %) N-Glykane sind.

Die N-Glykane wurden mit Sialidase S behandelt, die spezifisch für α 2,3 gebundene Sialinsäure ist. Abb. 21B zeigt das Chromatogramm mit drei charakteristischen Gruppen von Peaks A0, A1 und A2. Im Vergleich zu unverdauten N-Glykanen sind die Peaks von A3 und A4 nicht vorhanden und etwa die Hälfte des Gesamtsialinsäureanteils geht verloren. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden die N-Glykanstrukturen zusätzlich permethyliert und über die Methode der MALDI-TOF/TOF-MS untersucht (Abb. 22). Es konnte gezeigt werden, dass Verknüpfungen mit Sialinsäuren teilweise durch den Verdau mit Sialidase S verschwinden. Dies konnte in bi-, tri- und tetraantennären N-Glykanen nachgewiesen werden. Diese wurden insbesondere bei vollsialylierten N-Glykanen (Abb. 22A) beobachtet, nämlich bei m/z 2966,6 (dHex1Hex5HexNAc4Neu5Ac2), m/z 3777,1 (dHex1Hex6HexNAc5Neu5Ac3) und m/z 4587,7 (dHex1Hex7HexNAc6Neu5Ac4), welches durch m/z 3142,5 (dHex1Hex7HexNAc6) nach Sialidase S-Verdau ersetzt wurde. Alle Sialinsäuren konnten durch die unspezifische *Clostridium perfringens* Neuraminidase abgespalten werden. Es wurde bestätigt, dass A1AT α 2,3- und α 2,6-Neu5Ac beinhaltet, wobei der Anteil an α 2,3-Neu5Ac etwa 30 % beträgt (siehe Abb. 46 im Anhang).

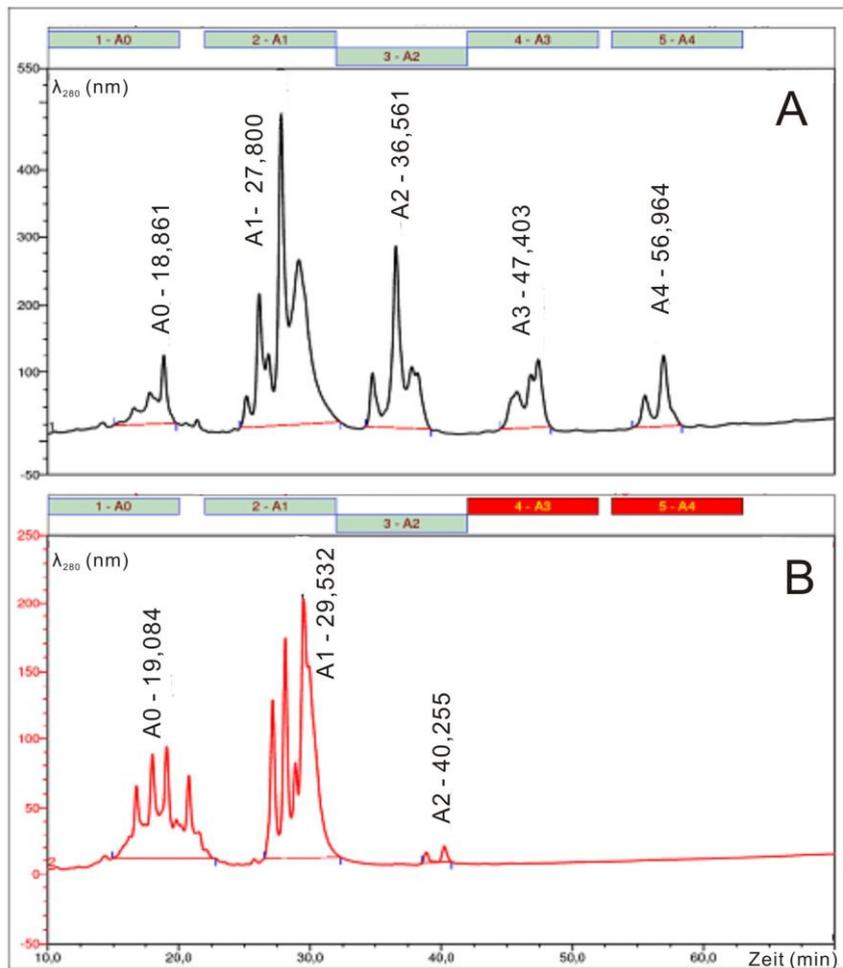


Abb. 21 Chromatogramme der Asahipak-Fractionen der 2AB-markierten N-Glykane des A1AT. Die Darstellung zeigt N-Glykane nach ihrer Anzahl an Sialinsäuren (A0-A4). A: ohne Sialidase S Behandlung B: nach Sialidase S Behandlung.

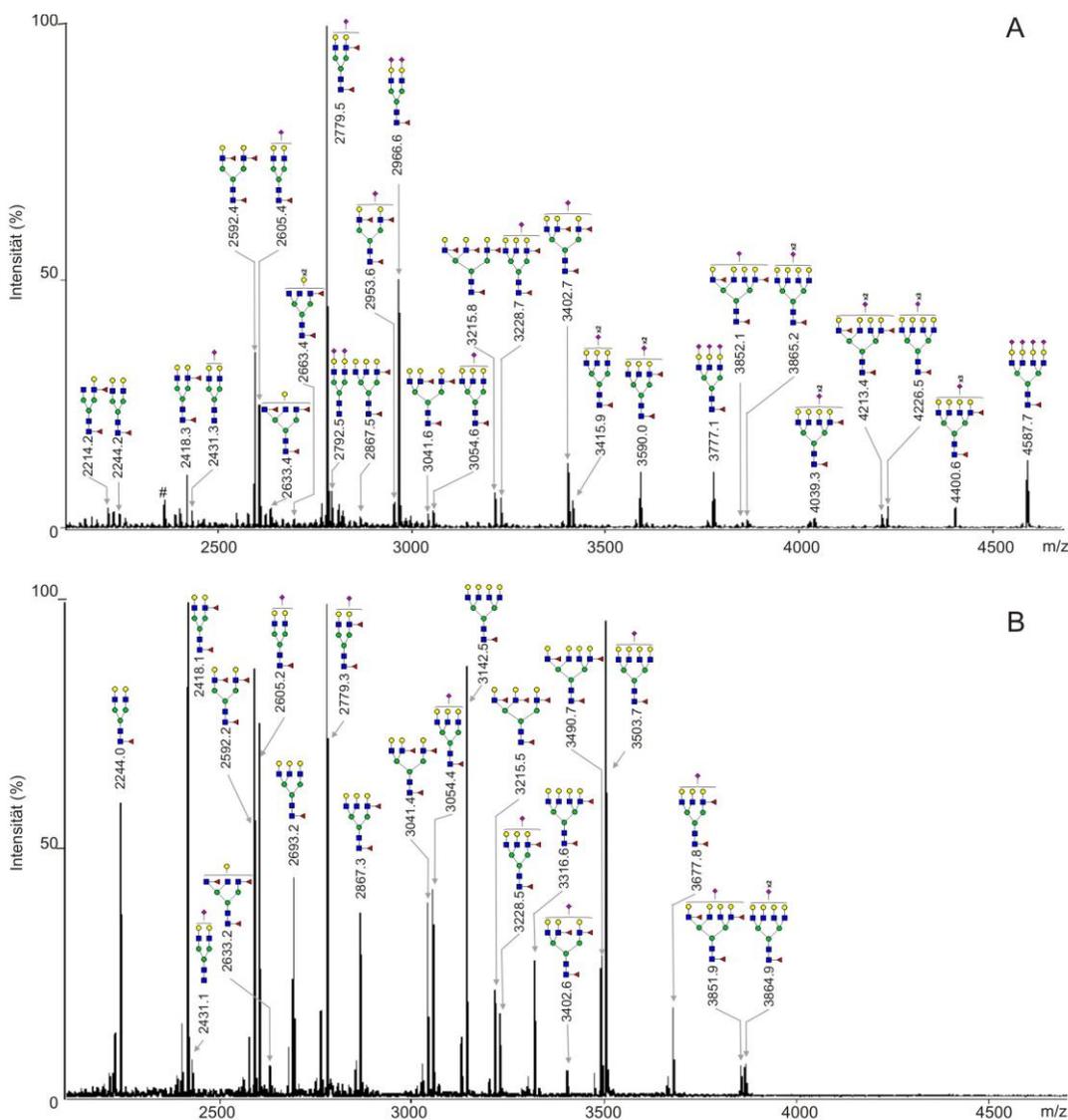


Abb. 22 MALDI-TOF Spektren von permethylierten N-Glykanen des A1AT. A: gesamter N-Glykanpool; B: N-Glykane mit Sialidase S verdaut.

4.1.7. Charakterisierung der N-Glykosylierungsstellen von A1AT

4.1.7.1. Inaktivierung des A1AT

Durch die Reaktion eines aktiven Serins einer sogenannten Serinprotease mit dem Methionin 358 des reaktiven Zentrums des A1AT erfolgte die irreversible Inhibition der Serinprotease, zu denen Trypsin und Chymotrypsin gehören [Huntington et al., 2000; Johnson et al., 1978]. Daher sollte das Methionin von A1AT oxidiert werden, damit A1AT mit Trypsin für die Analyse verdaut werden konnte. Für die Inaktivierung wurden verschiedene Reagenzien wie H_2O_2 , Iodoacetamide (IAA), Dithiothretol (DTT), Harnstoff und In-Gel-Verdau getestet. Danach wurde

das A1AT mit Trypsin verdaut und die Effizienz der Verdauung wurde mit HPLC C18-Säule überprüft. Abb. 23 gibt darüber Auskunft, dass nach H_2O_2 , Harnstoff und Carbamidomethylierung mehrere Peptide und Glykopeptide des A1AT produziert wurden. Daher wurde das Glykoprotein mit H_2O_2 und Harnstoff inaktiviert und dann carbamidomethyliert, anschließend mit Trypsin und Chymotrypsin verdaut. Glykopeptide wurden aus dem gesamten Peptidpool mit Hilfe von ZIC-HILIC-SPE isoliert.

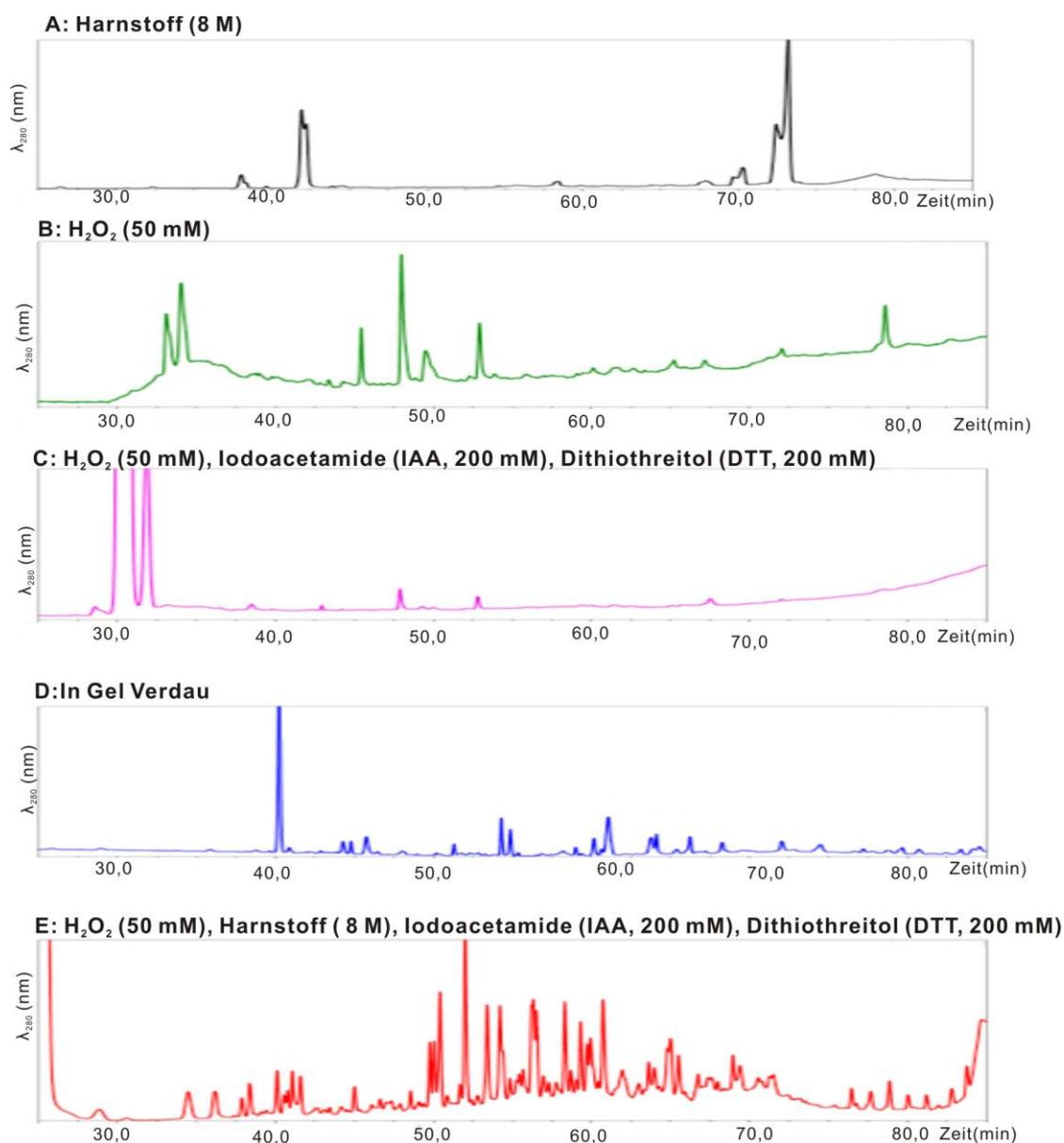


Abb. 23 HPLC-Chromatogramme der Glykopeptide und Peptide des A1AT nach Trypsinverdau zur Prüfung der Inaktivierung des A1AT vor Trypsinverdau.

4.1.7.2. Analyse der Glykopeptide von A1AT mittels Nano-LC-QTOF-MS

Die proteolytisch verdauten Glykopeptide wurden isoliert, mittels Nano-LC-QTOF-MS getrennt und im positiven Modus gemessen. Die Glykopeptide wurden durch die erhaltenen MS/MS Daten identifiziert. Die Glykane und die Peptidsequenz wurden durch die Fragmentierungsanalyse bestätigt. Abb. 24A zeigt das Base-Peak-Chromatogramm (BPC) mit den Hauptintensitäten über die gesamte Zeit der LC-MS-Analyse. Insgesamt wurden vier Glykopeptide Asn-46, Asn-46§, Asn-83 und Asn-247 detektiert (Tab. 14). Asn-46§ ist ein Glykopeptid, das nach His-43 abgespalten wurde. Die N-Glykane der Glykosylierungsstelle Asn-46 (Abb. 24B) wiesen hauptsächlich biantennäre Strukturen ($\text{dHex}_2\text{Hex}_5\text{HexNAC}_4\text{Neu5Ac}_1$ und $\text{dHex}_3\text{Hex}_5\text{HexNAC}_4$) auf. Ebenfalls wurden triantennäre sialylierte Strukturen identifiziert ($\text{dHex}_2\text{Hex}_6\text{HexNAC}_5\text{Neu5Ac}_1$, $\text{dHex}_2\text{Hex}_6\text{HexNAC}_5\text{Neu5Ac}_2$, $\text{dHex}_3\text{Hex}_6\text{HexNAC}_5\text{Neu5Ac}_1$, $\text{dHex}_1\text{Hex}_6\text{HexNAC}_5\text{Neu5Ac}_2$). Ein weiteres Glykopeptid Asn-46 § (Abb. 24B und C) trägt nur biantennäre Strukturen: $\text{dHex}_2\text{Hex}_5\text{HexNAC}_4$ (m/z 2825,18), $\text{dHex}_3\text{Hex}_5\text{HexNAC}_4$ (m/z 2971,25) und $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAC}_4\text{Neu5Ac}_2$ (m/z 3261,35). Die Glykosylierungsstelle Asn-83 (Abb. 24C) wurde ausschließlich von sialylierten tri- und tetraantennären N-Glykanen besetzt: $\text{dHex}_1\text{Hex}_6\text{HexNAC}_5\text{Neu5Ac}_2$ (m/z 3980,72), $\text{dHex}_1\text{Hex}_6\text{HexNAC}_5\text{Neu5Ac}_3$ (m/z 4271,84), $\text{dHex}_1\text{Hex}_7\text{HexNAC}_6\text{Neu5Ac}_3$ (m/z 4636,97), $\text{dHex}_2\text{Hex}_7\text{HexNAC}_6\text{Neu5Ac}_3$ (m/z 4783,02), $\text{dHex}_1\text{Hex}_7\text{HexNAC}_6\text{Neu5Ac}_2$ (m/z 4346,88) und $\text{dHex}_1\text{Hex}_7\text{HexNAC}_6\text{Neu5Ac}_4$ (m/z 4929,07). Biantennäre Glykane wurden an der Glykosylierungsstelle Asn-83 nicht nachgewiesen. Die Glykosylierungsstelle Asn-247 wies biantennäre N-Glykane (Abb. 24D) und Spuren von triantennären N-Glykanen auf. Die Hauptstrukturen bilden $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAC}_4\text{Neu5Ac}_1$ (m/z 2866,25), $\text{dHex}_2\text{Hex}_5\text{HexNAC}_4\text{Neu5Ac}_1$ (m/z 3012,31) und $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAC}_4\text{Neu5Ac}_2$ (m/z 3157,35). Die relativen Intensitäten der identifizierten N-Glykane sind in Tab. 15 zusammengefasst.

Tab. 14 Aminosäuresequenz der vier Glykosylierungsstellen

Glykosylierungsstelle	Sequenz
Asn-46	AHQSNSTNIF
Asn-46§	QSNSTNIF
Asn-83	NLTEIPEAQIH
Asn-247	LGNATAIF

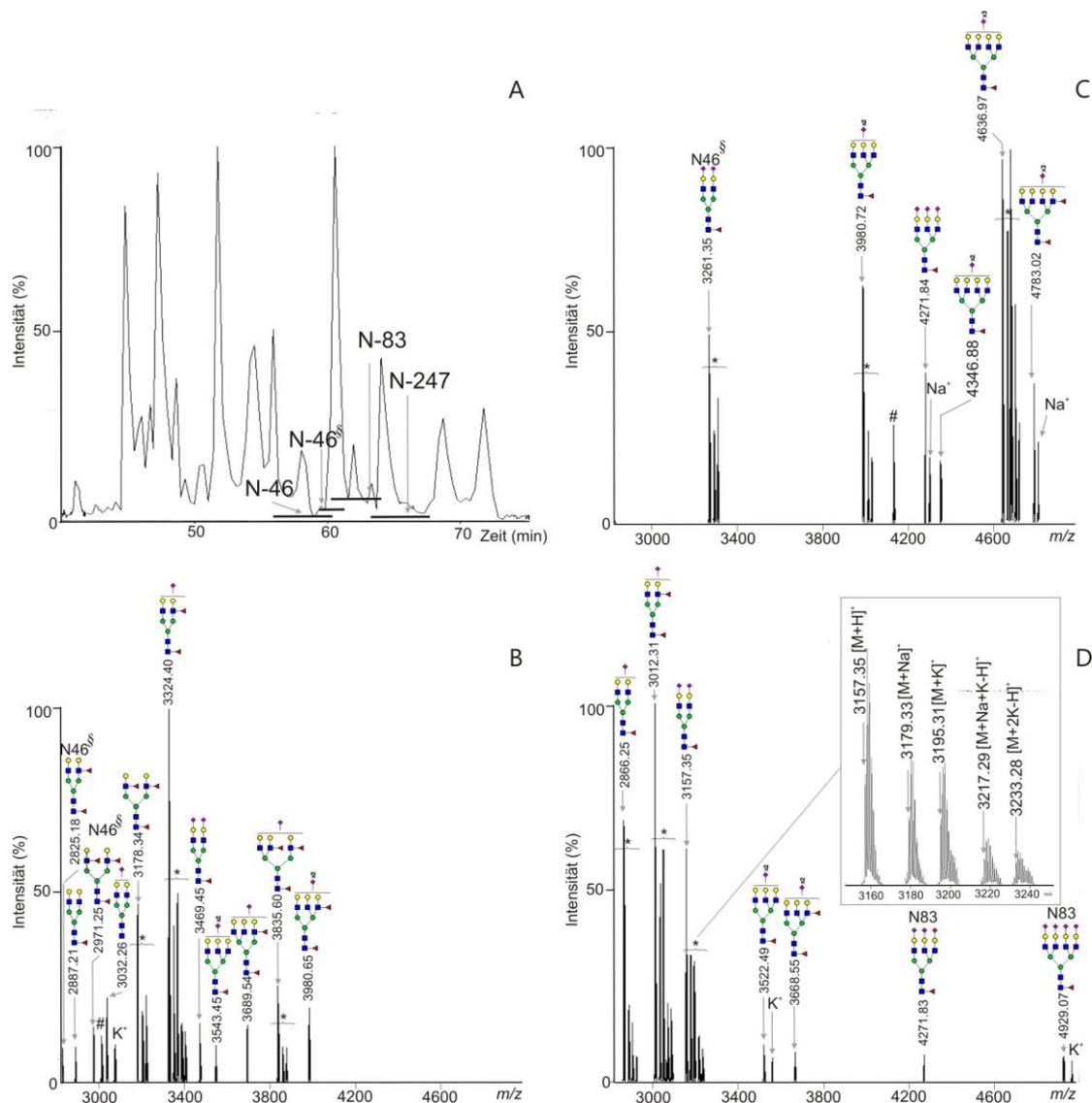


Abb. 24 Nano-LC-MS Spektren der A1AT Glykopeptide.

A: BPC; B: Asn-46; C: Asn-83; D: Asn-247; Asn-46§ zeigt eine zusätzliche Spaltstelle nach H43; *Natrium- oder Kalium-Addukte; # nicht identifiziert

Tab. 15 Kohlenhydrate jeder Glykosylierungsstelle.

Glykane	Asn-46	Asn-46§	Asn-83	Asn-247
dHex1Hex5HexNAc4	4			
dHex2Hex5HexNAc4		17		
dHex3Hex5HexNAc4	20	29		
Hex5HexNAc4Neu5Ac1	8			
dHex1Hex5HexNAc4Neu5Ac1				29
dHex2Hex5HexNAc4Neu5Ac1	36			40
dHex1Hex5HexNAc4Neu5Ac2	5	54		24
dHex2Hex6HexNAc5Neu5Ac1	6			
dHex2Hex6HexNAc5Neu5Ac2	7			3
dHex3Hex6HexNAc5Neu5Ac1	10			
dHex1Hex6HexNAc5Neu5Ac2	4		22	4
dHex1Hex6HexNAc5Neu5Ac3			19	
dHex1Hex7HexNAc6Neu5Ac3			32	
dHex2Hex7HexNAc6Neu5Ac3			14	
dHex1Hex7HexNAc6Neu5Ac2			6	
dHex1Hex7HexNAc6Neu5Ac4			7	

Das extrahierte Ionenchromatogramm (EIC) (siehe Abb. 25) liefert hilfreiche Information zur Auswahl der Glykopeptid-Vorläuferionen. Glykopeptide konnten mit Hilfe der Aminosäuresequenz der Peptide, die eine putative N-Glykosylierungsstellen enthalten, zugeordnet werden. Abb. 25A zeigt, dass die Glykosylierungsstellen Asn-46, Asn-46§, Asn-83 und Asn-247 55 min bis 68 min lang eluieren.

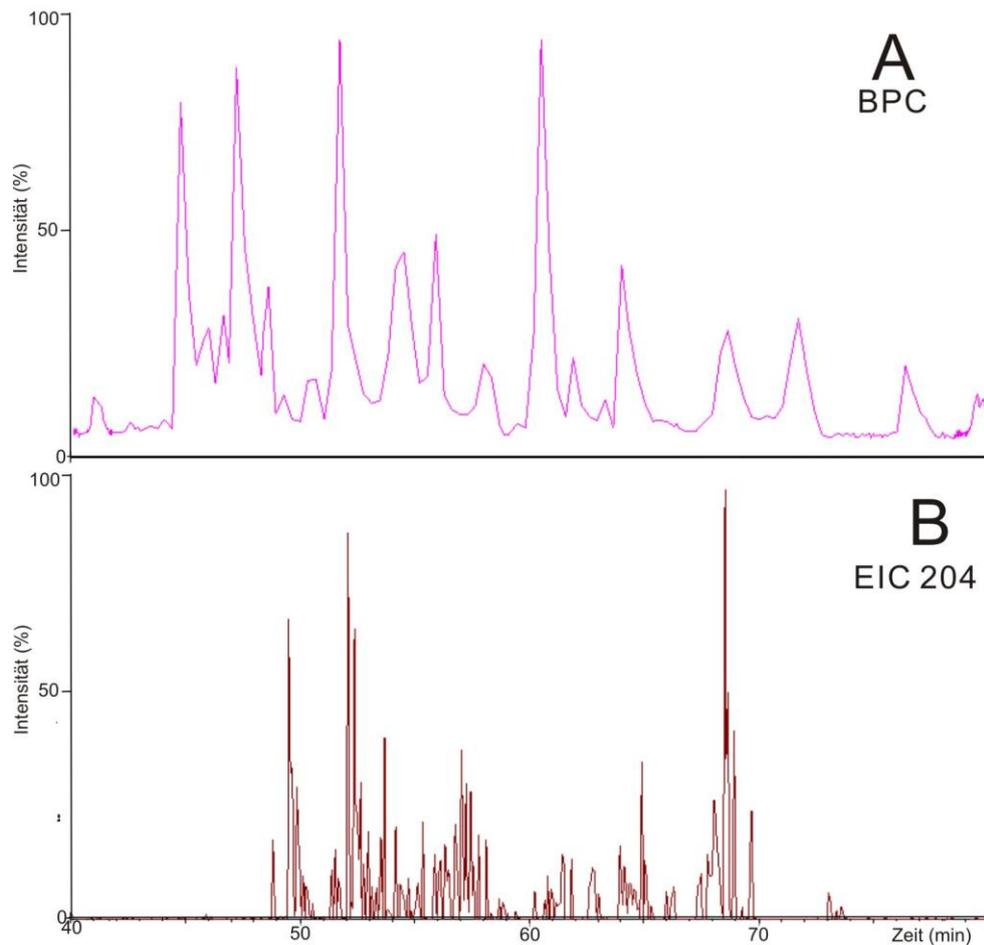


Abb. 25 Das extrahierte Ionenchromatogramm (EIC 204) des A1AT

Die Glykopeptide liegen in Doppel- und/oder Dreifach- und/oder Vierfachladung vor. Obwohl die Proben mit C18-Säulen und ZIC-HILIC-SPE entsalzt wurden, konnten zusätzlich noch $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Na+K-H]^+$ und $[M+2K-H]^+$ -Addukte beobachtet werden (Abb. 26D). Die Ergebnisse aus 2D-HPLC und MALDI-TOF-MS stimmen überein (Abb. 26).

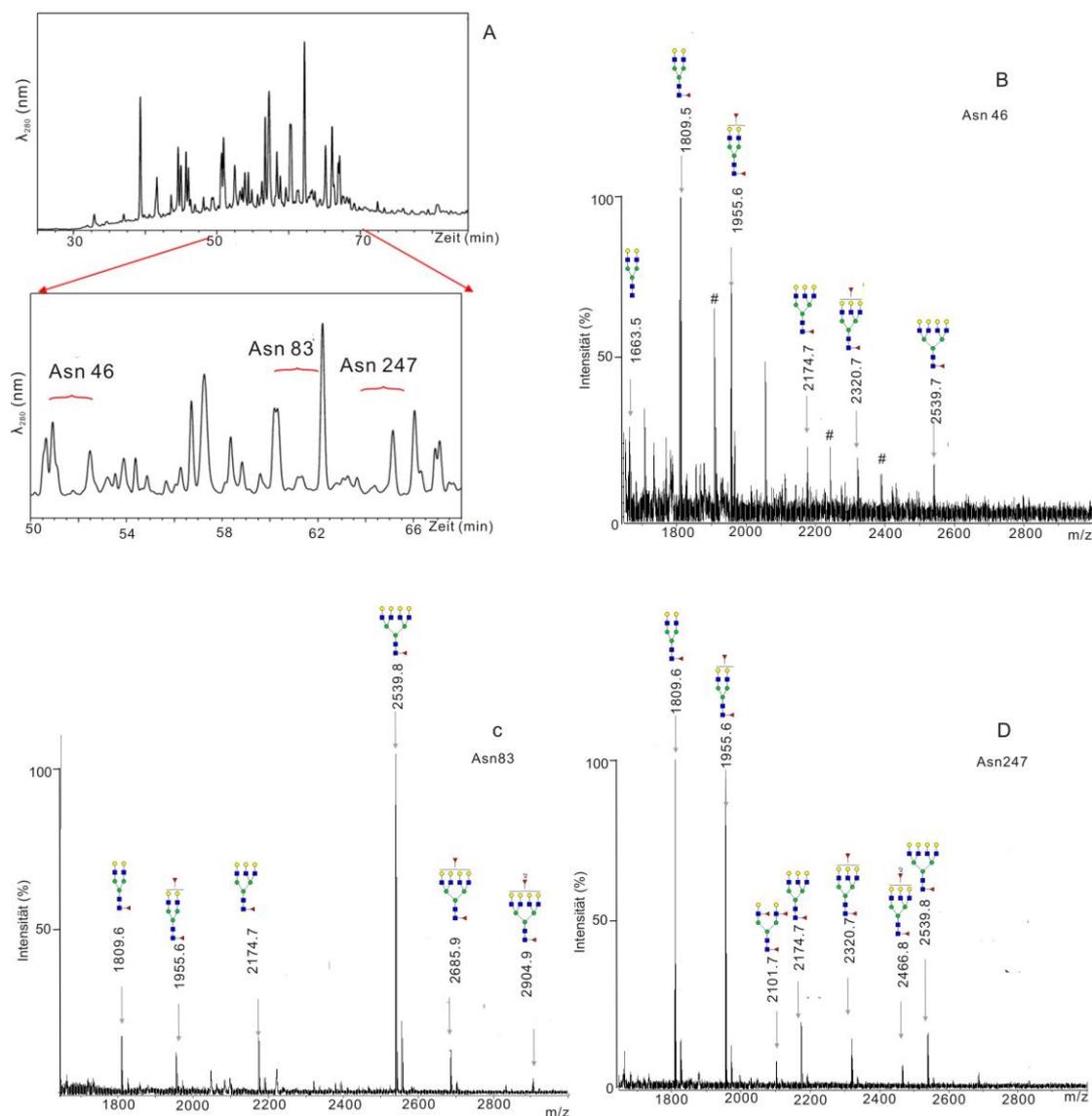


Abb. 26 A: Das HPLC-Spektrum des A1AT nach Trypsinverdau B: Das MALDI-TOF-Spektrum des Glykopeptids Asn-46 von A1AT; C: Das MALDI-TOF -Spektrum des Glykopeptids Asn-83 von A1AT; D: Das MALDI-TOF-Spektrum des Glykopeptids Asn-247 von A1AT.

Mit Hilfe der Fragmentierungsanalyse kann jedes Glykopeptid eindeutig bestätigt werden. In Abb. 27 ist beispielhaft das MS/MS Spektrum des Glykopeptids der Glykosylierungsstelle Asn-247 $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{Neu5Ac}_2$ (m/z 3157,35) dargestellt. Mehrere Ionen bestätigen die Anwesenheit von N-Glykanen des Komplex-Typs, wie m/z 204 (HexNAc), m/z 366 (HexHexNAc) und m/z 186 (HexNAc- H_2O). Die Produkt-Ionen m/z 274 (NeuAc- H_2O), m/z 292 (NeuAc) und m/z 657 (HexNAcHexNeuAc) zeigen ein sialyliertes Glykopeptid an. Peptid (m/z 806,42), Peptid + HexNAc (m/z 1009,490), Peptid + 2HexNAc (m/z 1212,55), Peptide + 2HexNAc + Hex (m/z 1374,61), Peptide + 2HexNAc + 2Hex (m/z 1536,65) und Peptide +

2HexNAc + 3Hex (m/z 1698,70) zeigen die sequentielle Fragmentierung der Pentasaccharid-Kernstruktur (*Core*) an. Peptid + Hex + dHex (m/z 1155,55) und Peptide + 2HexNAc + 3Hex + dHex (m/z 1844,75) zeigen eine *Core*-Fucose an. Das Molekulargewicht des Glykans m/z 2350,94 wurde mit dem theoretischen Molekulargewicht des Peptids (m/z 806,42) und dem berechneten Molekulargewicht des Glykopeptids (m/z 3157,35) bestimmt. Dann wurde die Zusammensetzung des Glykans dHex₁Hex₅HexNAc₄Neu5Ac₂ aus dem Molekulargewicht abgeleitet.

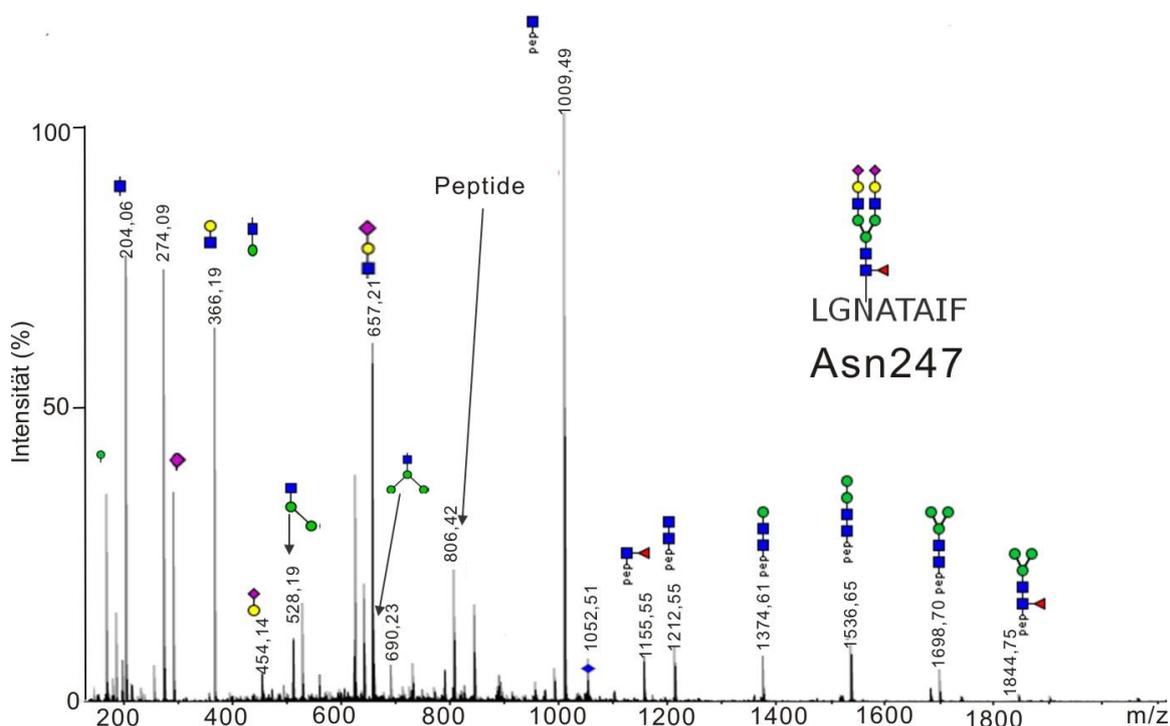


Abb. 27 Das Nano-LC-QTOF-MS/MS Fragmentierungsspektrum des Glykopeptids Asn-247 m/z 3157,35.

4.2. Charakterisierung der Glykosylierungsstelle im A1AT-Wildtyp (wt) aus der HEK293-Zelllinie

Das Glykoprotein A1AT wurde von der Kollegin Astrid Lusch aus der humanen embryonalen Nierenepithelzelllinie HEK293 isoliert. Das tryptisch und chymotryptisch verdaute Glykoprotein wurde isoliert und mittels Nano-LC-QTOF-MS vermessen. Die Glykopeptide wurden wie oben beschrieben durch die erhaltenen MS/MS Daten ermittelt. Die Glykane und die Peptidsequenz wurden wie bereits beschrieben durch die Fragmentierungsanalyse identifiziert. Eine Übersicht der Glykopeptide von A1AT wt ist in Abb. 28 gegeben.

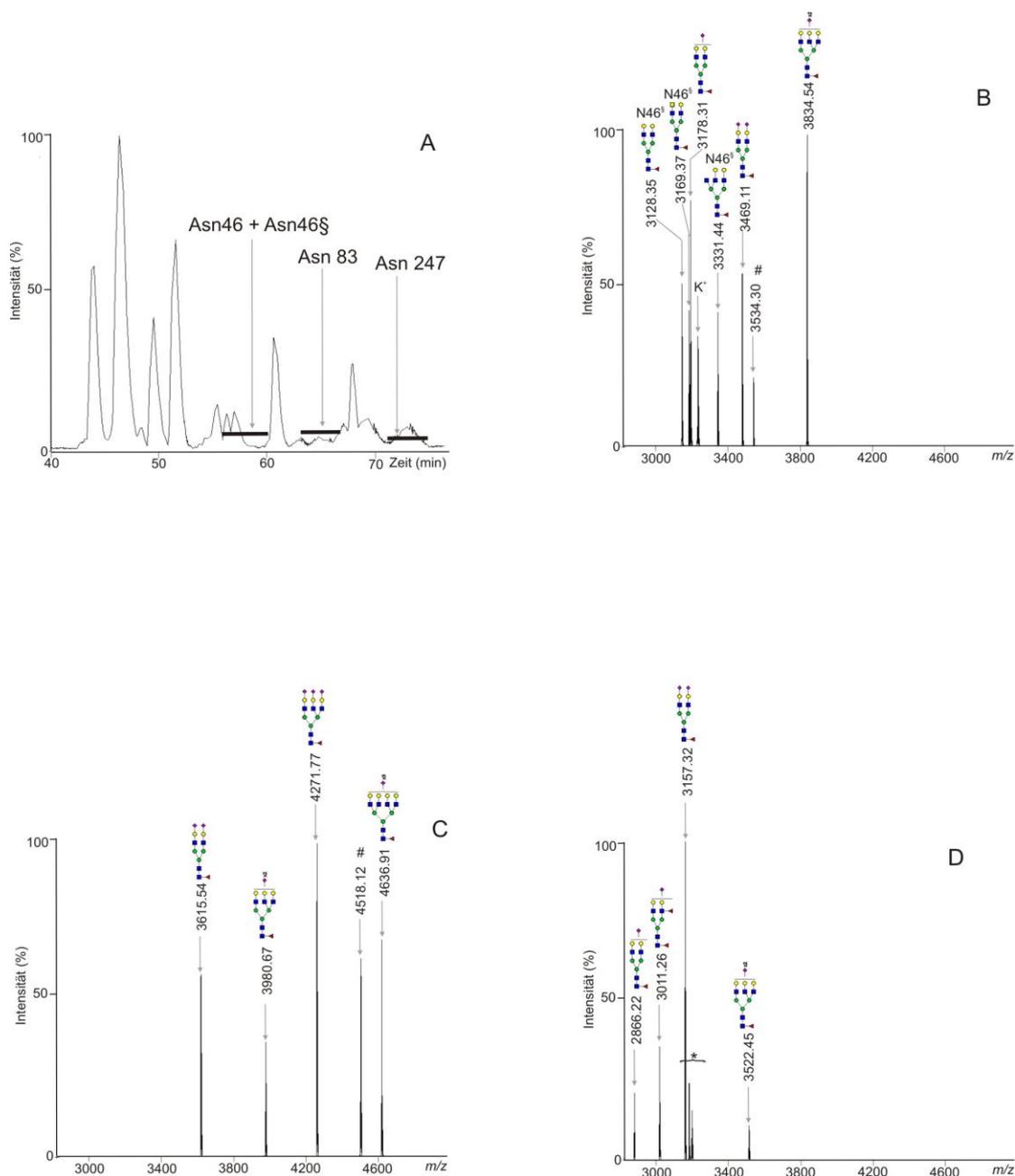


Abb. 28 Nano-LC-MS Spektren der A1AT-HEK293-Wildtyp Glykopeptide.

A: BPC; B: Asn-46; C: Asn-83; D: Asn-247; § zeigt eine zusätzliche Spaltstelle nach H43. *Natrium- oder Kalium-Addukte; # nicht identifiziert

Die Glykosylierungsstellen Asn-46, Asn-46§ (eine zusätzliche Spaltstelle nach H43), Asn-83 und Asn-247 konnten nachgewiesen werden. In erster Linie ist das Fragmentation m/z 204 (HexNAc) charakteristisch für die Glykopeptide von A1AT (Abb. 29).

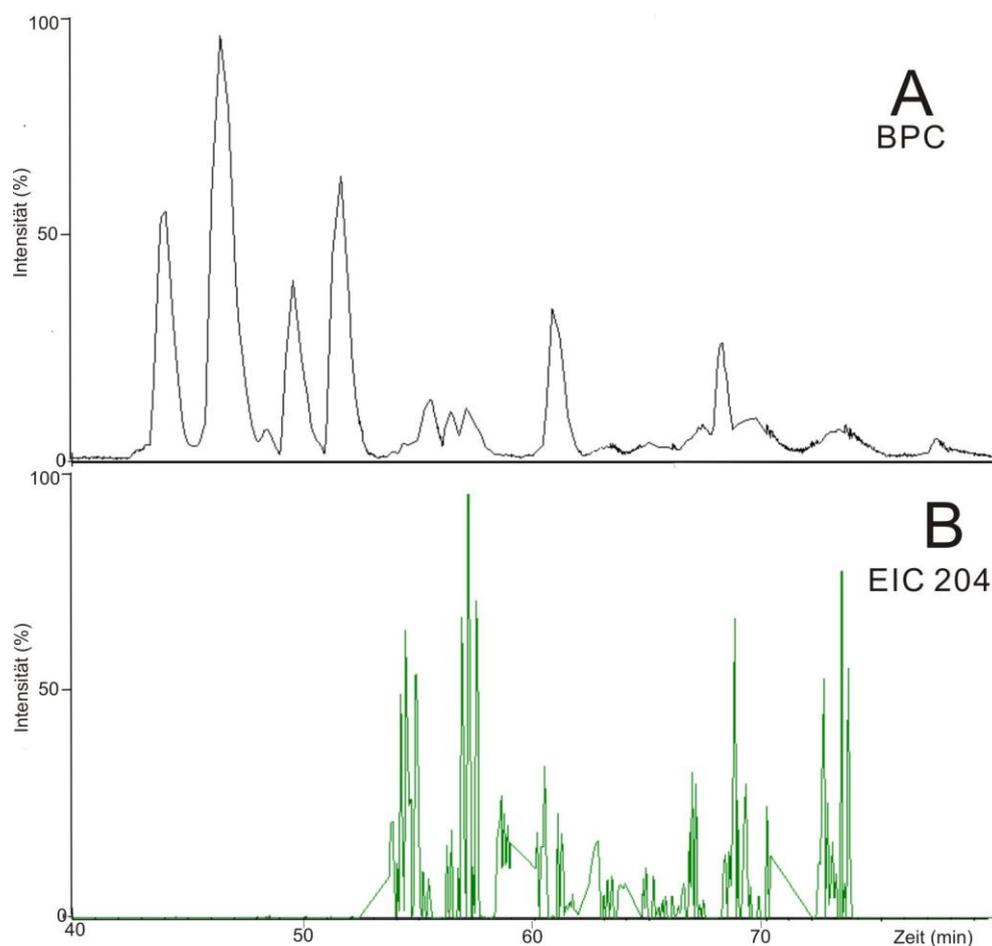


Abb. 29 Das extrahierte Ionenchromatogramm (EIC m/z 204) des A1AT-wt aus den HEK293-Zellen

Die Oligosaccharide bei den jeweiligen N-Glykosylierungsstellen wurden durch Massenspektren bestimmt. Abb. 28 A zeigt die Elutionszeit des jeweiligen Glykopeptids und Abb. 28B-D zeigen die Massenspektren der Oligosaccharide für die jeweiligen N-Glykosylierungsstellen.

Die Ergebnisse der Glykosylierungsanalysen sind in Tab. 16 zusammengefasst. Die Glykosylierungsstellen Asn-46 und Asn-46§ wurden ausschließlich von bi- und triantennären N-Glykanen besetzt (Abb. 28B). Der größte Oligosaccharidanteil des Glykopeptids Asn-46 ist $dHex_1Hex_5HexNAc_4Neu5Ac_1$ (m/z 3178,31) mit 43 %, welches mit dem Addukt $[M+K]^+$ zusammengerechnet wurde. Die tri- und tetrantennären Glykane $dHex_1Hex_6HexNAc_5Neu5Ac_3$ (m/z 4271,77) und $dHex_1Hex_7HexNAc_6Neu5Ac_3$ (m/z 4636,91) wurden bei der Glykosylierungsstelle Asn-83 beobachtet (Abb. 28C). Abb. 28D zeigt, dass die Hauptstruktur bei der Glykosylierungsstelle Asn-247 ein biantennäres einfach fucosyliertes $dHex_1Hex_5HexNAc_4Neu5Ac_2$ (m/z 3157,32) Oligosaccharid ist. Die Oligosaccharide des A1AT aus HEK293-Zellen zeigen eine ähnliche Antennarität wie die Oligosaccharide des A1AT aus der

humanen neuronalen Zelllinie (AGE1.hn). Im Vergleich zu A1AT aus der AGE1.hn Zelllinie weisen die N-Glykopeptid-Spektren des A1AT-HEK293 unvollständige Strukturen auf. Einen deutlichen Unterschied weisen dHex₁Hex₄HexNAc₅ (*m/z* 3169,37) und dHex₁Hex₅HexNAc₅ (*m/z* 3331,44) an der Glykosylierungsstelle Asn-46§ auf, die keine vollständige Galactosylierung aufzeigt.

Tab. 16 Oligosaccharide aller Glykosylierungsstellen des A1AT-wt aus HEK293-Zellen.

Glykane	Asn-46	Asn-46§	Asn-83	Asn-247
dHex1Hex4HexNAc5		31		
dHex1Hex5HexNAc4		38		
dHex1Hex5HexNAc4Neu5Ac1	43			11
dHex2Hex5HexNAc4 Neu5Ac 1				17
dHex1Hex5HexNAc4 Neu5Ac 2	21		21	67
dHex1Hex5HexNAc5		31		
dHex1Hex6HexNAc5 Neu5Ac 2	36		13	5
dHex1Hex6HexNAc5 Neu5Ac 3			37	
dHex1Hex7HexNAc6 Neu5Ac 3			29	

4.3. Charakterisierung der Glykosylierungsstelle der A1AT-Variante aus der HEK293-Zelllinie

Für pharmazeutische Zwecke ist es interessant, A1AT durch Einfügen von zusätzlichen Glykosylierungsstellen zu verändern, um die Halbwertszeit im Serum zu verlängern. Wir haben die A1AT-Variante aus der HEK293-Zelllinie erfolgreich experimentell analysiert, um sie für pharmazeutische Anwendungen nutzbar zu machen.

Zusätzliche N-Glykosylierungsstellen wurden durch Mutagenese-PCR in A1AT eingefügt. Diese zwei A1AT-Varianten N201 und N123 sind in Abb. 30 dargestellt [Lusch et al., 2013].

```

        6           16           26           36
MPSSVSWGIL LLAGLCCLVP VSLAEDPQGD AAQKTDTS HH DQDHPTFNKI TPNLAEEFAFS
        46           56           66           76           86           96
LYRQLAHQSN STNIFFSPVS IATAFAMLSL GTKADTHDEI LEGLNFNLTE IPEAQIHEGF
        106          116          126          136          146          156
QELLRTL NQP DSQQLQTTGN GLFLSEGLKL VDKFLEDVKK LYHSEAF TVN FGDTEEA KKQ
        166          176          186          196          206          216
INDYVEKGTQ GKIVDLVKEL DRDTVFALVN YIFFK GKWER PFEVKDTEEE DFHVDQVTTV
        226          236          246          256          266          276
KVPMMKRLGM FNIQHCKKLS SWVLLMKYLG NATAIFFFLPD EGKLQHLENE LTHDIITKFL
        286          296          306          316          326          336
ENEDRRSASL HLPKLSITGT YDLKSVLGQL GITKVFSNGA DLSGVTEEAP LKLSKAVHKA
        346          356          366          376          386
VLTIDEKGTE AAGAMFLEAI PMSIPPEVKF NKPFVFLMIE QNTKSPLFMG KVVNPTQK

```

Abb. 30 Aminosäuresequenz des A1AT. Die drei natürlichen Glykosylierungsstellen Asn-46, Asn-83 und Asn-247 sind rot markiert. Die A1AT-Variante N123 ist grün markiert. Durch eine ortsgerichtete Mutagenese wurden die Aminosäuren G¹²³ zu N und K¹²⁵ zu T verändert. Die andere A1AT-Variante N201 ist blau markiert. Durch eine ortsgerichtete Mutagenese wurde die Aminosäure K²⁰¹ zu T verändert.

Die A1AT-Varianten wurden nach proteolytischem Verdau mit Hilfe der ZIC-HILIC angereichert und mittels Nano-LC-ESI-MS vermessen. Eine Übersicht über die Glykopeptide der A1AT-Variante N201 ist in Abb. 31 dargestellt. Die relativen Intensitäten der gefundenen N-Glykane sind in Tab. 17 zusammengefasst.

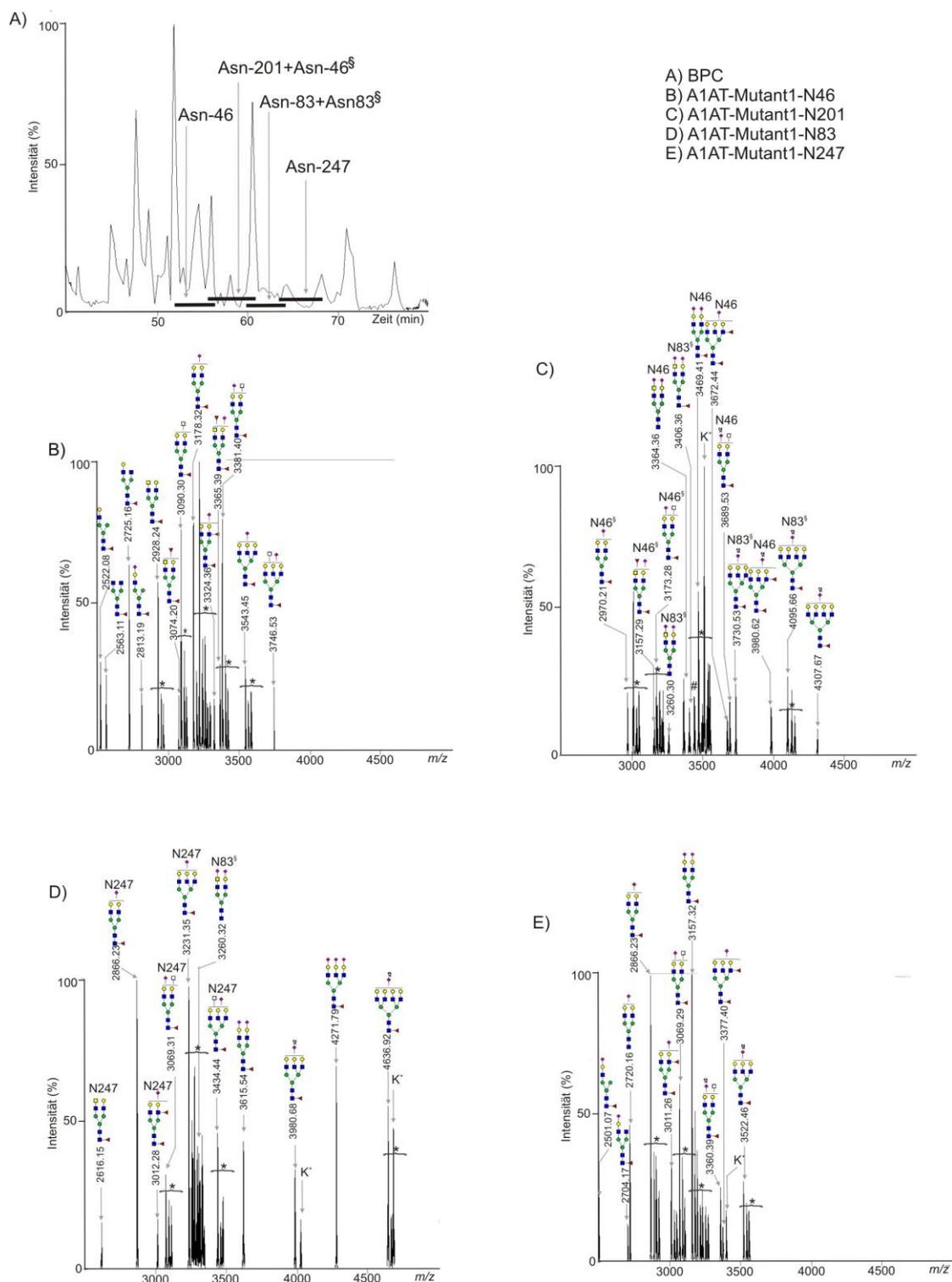


Abb. 31 Nano-LC-MS Spektren der A1AT-Variante N 201 des Glykopeptids.

A: BPC; B: Asn-46; C: Asn-201; D: Asn-83; E: Asn-247; § zeigt eine zusätzliche Spaltstelle; *Natrium- oder Kalium-Addukte; # nicht identifiziert

Tab. 17 Oligosaccharidanteil des Glykopeptids der A1AT-Variante N201

Glykane	Asn-46	Asn-46§	Asn-83	Asn-83§	Asn-201	Asn-247
dHex1Hex3HexNAc4	4					
dHex1Hex4HexNAc3	4					
dHex1Hex4HexNAc3Neu5Ac1	3					3
dHex1Hex4HexNAc4Neu5Ac1						2
dHex1Hex4HexNAc4	9					
dHex1Hex4HexNAc5Neu5Ac2				13		
dHex1Hex4HexNAc5	9					2
dHex2Hex4HexNAc5	6					
Hex4HexNAc5Neu5Ac2	3			37		
dHex2Hex4HexNAc5Neu5Ac1	4	18				
Hex5HexNAc4 Neu5Ac1						7
dHex1Hex5HexNAc4Neu5Ac1	12	48				25
dHex2Hex5HexNAc4Neu5Ac1	2					10
dHex1Hex5HexNAc4Neu5Ac2	8		22			15
dHex1Hex5HexNAc5	12					
dHex1Hex5HexNAc5Neu5Ac1	9	34				8
dHex1Hex5HexNAc5Neu5Ac2	3					8
dHex1Hex6HexNAc5Neu5Ac1	4					9
dHex1Hex6HexNAc6Neu5Ac1	3					5
dHex1Hex6HexNAc5Neu5Ac2			17	23		4
dHex2Hex6HexNAc5Neu5Ac1	3					2
dHex2Hex6HexNAc5Neu5Ac2	2					
dHex1Hex6HexNAc5Neu5Ac3			28			
dHex1Hex7HexNAc6Neu5Ac2				27	100	
dHex1Hex7HexNAc6Neu5Ac3			33			

Die Glykopeptide der Glykosylierungsstellen Asn-46, Asn-46§ (eine zusätzliche Spaltstelle), Asn-83, Asn-83§ (eine zusätzliche Spaltstelle), Asn-247 und Asn-201 (siehe Abb. 31) wurden ebenfalls analysiert. Bei den N-Glykanen der Glykosylierungsstelle Asn-46 (Abb. 31B) wurden hauptsächlich biantennäre Strukturen $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{Neu5Ac}_1$ (m/z 3178,32) und $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_5$ (m/z 3090,30) analysiert, daneben konnten auch triantennäre sialylierte Strukturen $\text{dHex}_1\text{Hex}_6\text{HexNAc}_5\text{Neu5Ac}_1$ (m/z 3543,45) und $\text{dHex}_1\text{Hex}_6\text{HexNAc}_6\text{Neu5Ac}_1$ (m/z 3746,53) beobachtet werden. Ein weiteres Glykopeptid Asn-46§ (Abb. 31B und C) trägt nur biantennäre Strukturen: $\text{dHex}_2\text{Hex}_4\text{HexNAc}_5\text{Neu5Ac}_1$ (m/z 3157,29), $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{Neu5Ac}_1$ (m/z 2970,21) und $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_5\text{Neu5Ac}_1$ (m/z 3173,28). Bei der Glykosylierungsstelle Asn-201 wurde nur eine Glykanstruktur

dHex₁Hex₇HexNAc₆Neu5Ac₂ (*m/z* 4307,67) gefunden. Die Glykosylierungsstelle Asn-83 (Abb. 31D) wird ausschließlich von sialylierten bi-, tri- und tetraantennären N-Glykanen besetzt: dHex₁Hex₅HexNAc₄Neu5Ac₂ (*m/z* 3615,54), dHex₁Hex₆HexNAc₅Neu5Ac₂ (*m/z* 3980,68), dHex₁Hex₆HexNAc₅Neu5Ac₃ (*m/z* 4271,79), und dHex₁Hex₇HexNAc₆Neu5Ac₃ (*m/z* 4636,92). Ein weiteres Glykopeptid Asn-83§ (Abb. 31C und D) trägt bi-, tri- und tetraantennäre Strukturen: Hex₄HexNAc₅Neu5Ac₂ (*m/z* 3406,36), dHex₁Hex₆HexNAc₅Neu5Ac₂ (*m/z* 3730,53), dHex₁Hex₇HexNAc₆Neu5Ac₂ (*m/z* 4095,66). Biantennäre N-Glykane wurden bei der Glykosylierungsstelle Asn-247 (Abb. 31D und E) gefunden. Die Hauptstruktur bildet dHex₁Hex₅HexNAc₄Neu5Ac₁ (*m/z* 2866,23). Im Vergleich zum A1AT-Wildtyp aus der HEK293-Zelllinie treten hier geringe Anteile von unvollständigen N-Glykanen auf (Abb. 31B, *m/z* 2522,08; *m/z* 2563,11; *m/z* 2725,16).

Tab. 18 Glykopeptidsequenz der A1AT-Variante N201

Glykosylierungsstelle	Sequenz
Asn-46	AHQSNSTNIF
Asn-46§	QSNSTNIF
Asn-83	NLTEIPEAQIH
Asn-83§	NLTEIPEAQ
Asn-201	EVNDTEEEDF
Asn-247	LGNATAIF

Glykopeptide der A1AT-Variante N123 mit den Glykosylierungsstellen Asn-46, Asn-83, Asn-83§, Asn-247 und Asn-123 konnten nachgewiesen werden (Abb. 32). Die Variante N123 weist, ebenso wie die Variante N201, geringe Teile von unvollständigen N-Glykanen auf. Die Glykosylierungsstelle Asn-123 (Abb. 32C) wurde ausschließlich von sialylierten bi-, tri- und tetraantennären N-Glykanen besetzt: dHex₁Hex₅HexNAc₄Neu5Ac₂ (*m/z* 2926,00), dHex₁Hex₆HexNAc₅Neu5Ac₂ (*m/z* 3291,12), dHex₁Hex₇HexNAc₆Neu5Ac₂ (*m/z* 3656,23).

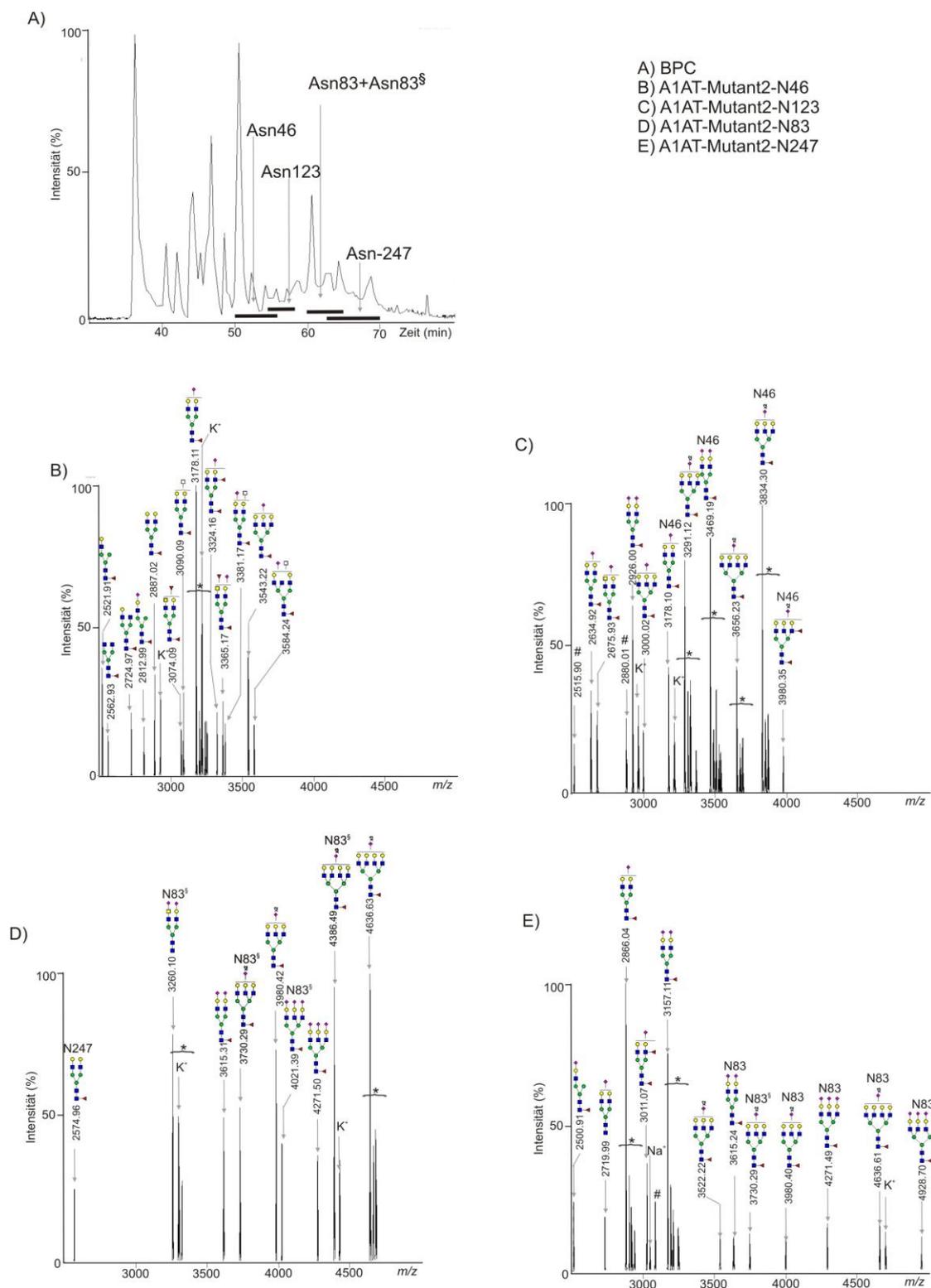


Abb. 32 Nano-LC-MS Spektren der Glykopeptide der A1AT-Variante N123.

A: BPC; B: Asn-46; C: Asn-123; D: Asn-83; E: Asn-247; § zeigt eine zusätzliche Spaltstelle; *Natrium- oder Kalium-Addukte; # nicht identifiziert

Die Glykopeptide der A1AT-Variante N123 der Glykosylierungsstellen Asn-46, Asn-83, Asn-83§ (eine zusätzliche Spaltstelle), Asn-247 und Asn-123 wurden ebenfalls analysiert (Tab. 19). Die relativen Intensitäten der identifizierten N-Glykane sind in Tab. 20 zusammengefasst.

Tab. 19 Glykopeptidsequenz der A1AT-Variante N123

Glykosylierungsstelle	Sequenz
Asn-46	AHQSNSTNIF
Asn-83	NLTEIPEAQIH
Asn-83§	NLTEIPEAQ
Asn-123	LSENL
Asn-247	LGNATAIF

Tab. 20 Oligosaccharidanteil des Glykopeptids der A1AT-Variante N123

Glykane	Asn-46	Asn-83	Asn-83§	Asn-123	Asn-247
dHex1Hex3HexNAc4	2				
dHex1Hex4HexNAc3	6				
dHex1Hex4HexNAc3Neu5Ac1	3				8
dHex1Hex4HexNAc4	3				
dHex2Hex4HexNAc5	3				
Hex4HexNAc5 Neu5Ac 2			24		
dHex1 Hex4HexNAc5Neu5Ac 1				10	
dHex2 Hex4HexNAc5Neu5Ac 1	5				
dHex1Hex5HexNAc4	6				7
Hex5HexNAc4 Neu5Ac 1					8
dHex1Hex5HexNAc4 Neu5Ac 1	23			13	33
dHex2 Hex5HexNAc4Neu5Ac 1	4				12
dHex1Hex5HexNAc4 Neu5Ac 2	12	19		24	27
dHex1Hex5HexNAc5	5				
dHex1 Hex5HexNAc5Neu5Ac 1	3				
dHex1Hex5HexNAc6 Neu5Ac 1	3				
dHex1Hex6HexNAc5 Neu5Ac 1	7			8	
dHex1Hex6HexNAc5 Neu5Ac 2	13	25	27	29	5
dHex2Hex6HexNAc5 Neu5Ac 2	2				
dHex1Hex6HexNAc5 Neu5Ac 3		17	15		
dHex1 Hex7HexNAc6Neu5Ac 2				16	
dHex1Hex7HexNAc6 Neu5Ac 3		34	34		
dHex1Hex7HexNAc6 Neu5Ac 4		5			

Wie in der A1AT-Variante N201 gezeigt, wiesen die N-Glykane der N123-Variante an der

Glykosylierungsstelle Asn-46 als Hauptstruktur ebenfalls ein biantennäres Glykan $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{Neu5Ac}_1$ (m/z 3178,11) auf. Die Hauptstruktur an der Glykosylierungsstelle Asn-83 wurde von sialylierten tri- und tetraantennären N-Glykanen besetzt: $\text{dHex}_1\text{Hex}_7\text{HexNAc}_6\text{Neu5Ac}_3$ (m/z 4636,63) (Abb. 32D). Das Peptid mit der Glykosylierungsstelle Asn-83 § (Abb. 32D und E) trägt die gleiche Hauptstruktur wie Asn-83. Biantennäre N-Glykane konnten ähnlich wie bei der Variante N201 auch bei der Glykosylierungsstelle Asn-247 (Abb. 32E) gefunden werden. Die Hauptstruktur bildet $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{Neu5Ac}_1$ (m/z 2866,04). Alle vier Glykosylierungsstellen besitzen $\text{dHex}_1\text{Hex}_5\text{HexNAc}_4\text{Neu5Ac}_2$ (m/z 2926,00) und $\text{dHex}_1\text{Hex}_6\text{HexNAc}_5\text{Neu5Ac}_2$ (m/z 3291,12).

4.4. Charakterisierung des GM-CSF aus der HEK293-Zelllinie

4.4.1. Charakterisierung des N-Glykanpools

Die Glykosylierung des therapeutischen Proteins GM-CSF ist essentiell für seine biologische Aktivität. Daher ist es notwendig, dieses rekombinante Glykoprotein hinsichtlich seiner Kohlenhydratstrukturen zu charakterisieren.

Das Fusionsprotein setzt sich aus einem IgG-Fc-Fusionsteil und dem GM-CSF zusammen (hergestellt von Sebastian Riese). Das in HEK293-Zellen exprimierte Fusionsprotein wurde mit Thrombin gespalten, um den IgG-Fc-Teil enzymatisch abzuspalten und das GM-CSF nachzuweisen. Der Erfolg der Abspaltung wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung bestätigt (Abb. 33).

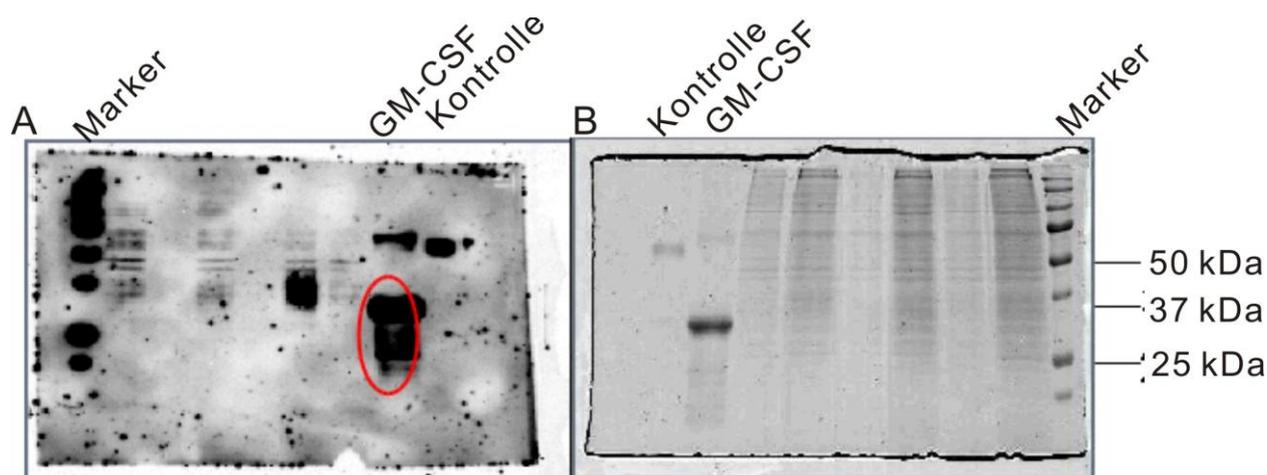


Abb. 33 Nachweis des GM-CSF nach Thrombinverdau. Gelelektrophoretische Auftrennung unter reduzierenden Bedingungen mittels 12 % SDS-PAGE A: Western Blot; B: Coomassie-Färbung

Für die massenspektrometrische Analyse der N-Glykane des GM-CSF mittels MALDI-TOF/TOF-MS sind 50 µg aufgereinigtes GM-CSF zunächst mit Endo S verdaut worden, wodurch nur die N-Glykane des IgG-Fc gespalten wurden. Endo S ist spezifisch für die N-Glykane des IgG-Fc-Teils [Collin et al., 2001, Collin et al., 2002, Allhorn et al., 2008]. Anschließend wurden die N-Glykane des GM-CSF mit PNGase F abgespalten. Dann wurden die N-Glykane des GM-CSF mittels Carbograph-Säule entsalzt und permethyliert (Abb. 34).

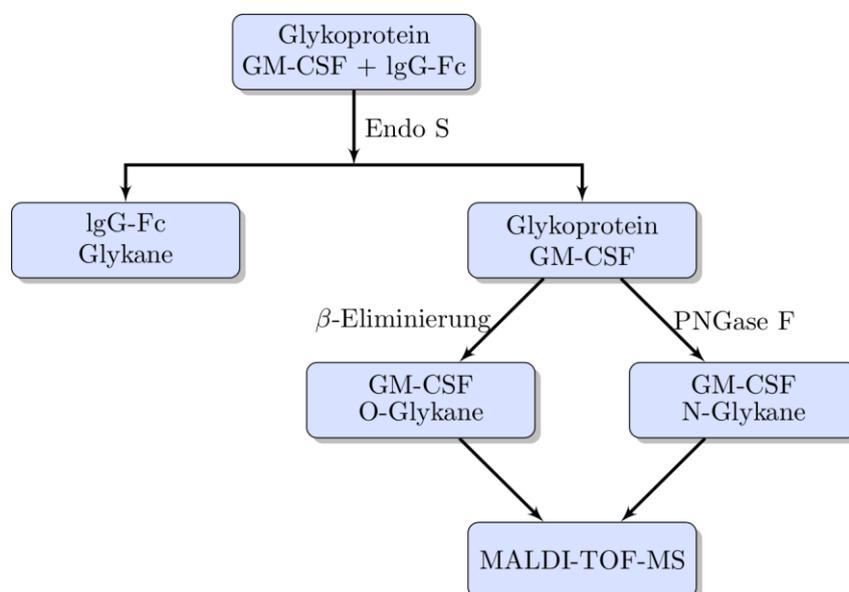


Abb. 34 Schematische Übersicht zur Analytik des GM-CSF

Das MALDI-TOF-Massenspektrum der gefundenen N-Glykane des GM-CSF in einem Massenbereich zwischen m/z 2000 und 5000 ist in Abb. 35 dargestellt. Insgesamt konnten 60

N-Glykanstrukturen in diesem Massenbereich identifiziert werden. Abb. 35 zeigt, dass am GM-CSF hauptsächlich tri- und tetraantennäre N-Glykanstrukturen mit einer gebundenen Fucose vorhanden sind. Den Hauptmassenpeak stellt dabei $\text{dHex}_1\text{Hex}_6\text{HexNAc}_5$ (m/z 2693,29), mit einer relativen Intensität von 10,9 % dar. Wie in Abb. 36 dargestellt, wurde das $\text{dHex}_1\text{Hex}_6\text{HexNAc}_5$ (m/z 2693,29) fragmentiert und das Fragmentation m/z 719,29 ist ein Beweis dafür, dass die Fucose in $\text{dHex}_1\text{Hex}_6\text{HexNAc}_5$ (m/z 2693,29) *core*-gebunden ist. Die bi- und triantennären N-Glykane besitzen nur einen sehr geringen Sialylierungsgrad. Im Vergleich dazu besitzen die tetraantennären N-Glykane ein, zwei oder drei Sialinsäuren oder treten als vollsialylierte N-Glykane auf. In geringem Anteil treten ebenfalls unvollständige N-Glykane auf. Auffällig ist hier das triantennäre N-Glykan (m/z 2734,32), welches nur zwei Galaktosen trägt. Der Anteil dieses Glykans beträgt entsprechend dem Gesamtmassenspektrum etwa 4,5 %. Alle identifizierten N-Glykane des GM-CSF sind in Tab. 21 aufgelistet.

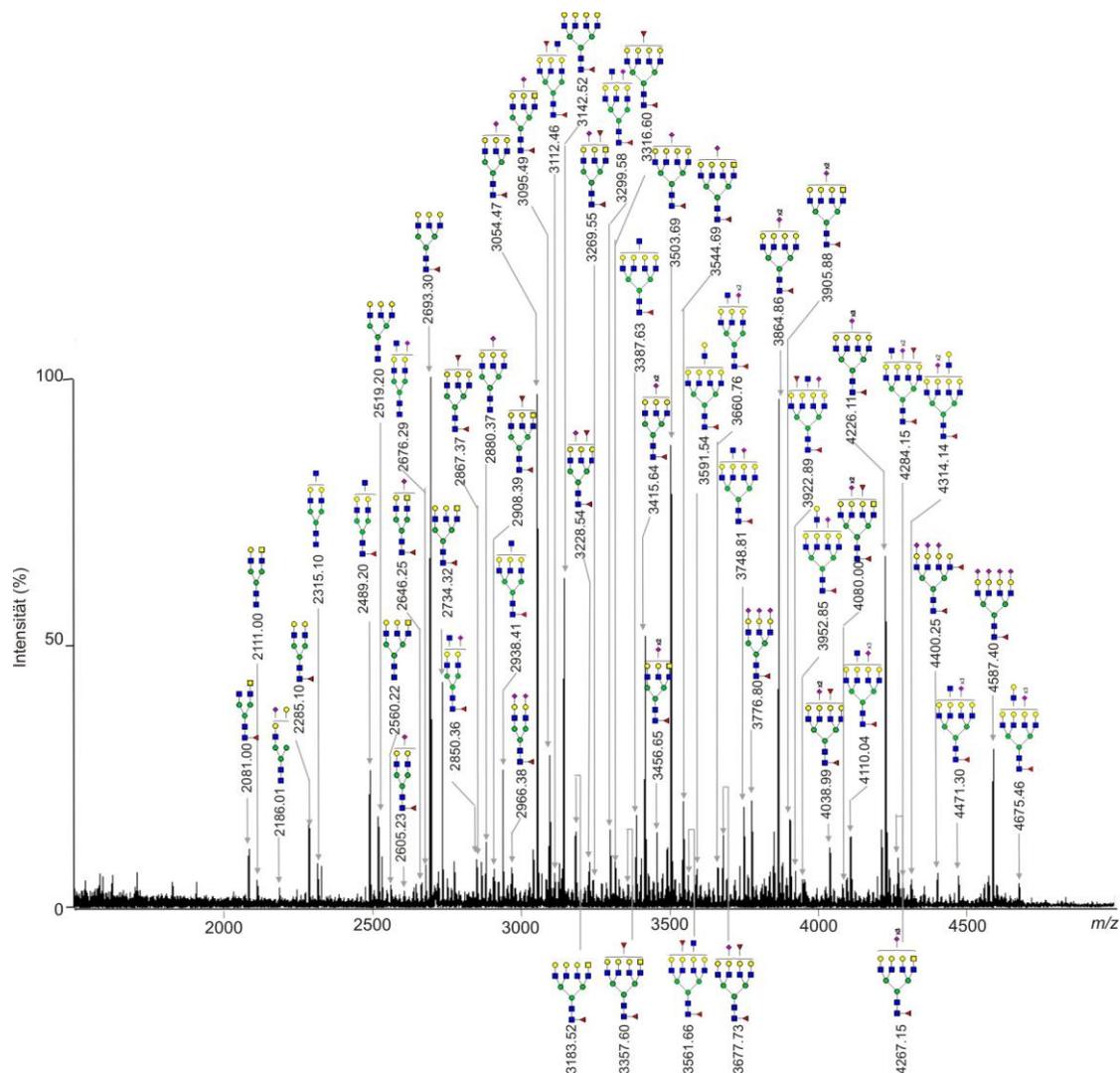


Abb. 35 MALDI-Spektrum der N-Glykane des GM-CSF

Tab. 21 N-Glykanstrukturen des GM-CSF

m/z	Glykane	Rel. Int. in%
2081,00	dHex1Hex3HexNAc5	1,4
2111,00	Hex4HexNAc5	0,6
2186,01	Hex5HexNAc3Neu5Ac1	0,4
2285,10	dHex1Hex5HexNAc4	2,0
2315,10	Hex5HexNAc5	1,0
2326,12	dHex1Hex3HexNAc6	0,8
2489,20	dHex1Hex5HexNAc5	3,1
2519,20	Hex6HexNAc5	2,0
2560,22	Hex5HexNAc6	0,5
2605,23	dHex1Hex5HexNAc4Neu5Ac1	0,3
2646,25	dHex1Hex4HexNAc5Neu5Ac1	0,4
2676,29	Hex5HexNAc5Neu5Ac1	0,3

2693,30	dHex1Hex6HexNAc5	10,9
2734,32	dHex1Hex5HexNAc6	4,5
2850,36	dHex1Hex5HexNAc5Neu5Ac1	0,9
2867,37	dHex2Hex6HexNAc5	0,8
2880,37	Hex6HexNAc5Neu5Ac1	1,2
2908,38	dHex2Hex5HexNAc6	0,7
2938,41	dHex1Hex6HexNAc6	2,5
2966,38	dHex1Hex5HexNAc4Neu5Ac2	0,4
3054,47	dHex1Hex6HexNAc5Neu5Ac1	9,1
3095,49	dHex1Hex5HexNAc6Neu5Ac1	2,8
3112,46	dHex2Hex6HexNAc6	0,5
3142,52	dHex1Hex7HexNAc6	6,4
3183,52	dHex1Hex6HexNAc7	1,2
3228,54	dHex2Hex6HexNAc5Neu5Ac1	0,6
3269,55	dHex2Hex5HexNAc6Neu5Ac1	0,4
3299,58	dHex1Hex6HexNAc6Neu5Ac1	1,4
3316,60	dHex2Hex7HexNAc6	0,8
3357,59	dHex2Hex6HexNAc7	0,4
3387,63	dHex1Hex7HexNAc7	1,5
3415,64	dHex1Hex6HexNAc5Neu5Ac2	4,6
3456,65	dHex1Hex5HexNAc6Neu5Ac2	1,3
3503,69	dHex1Hex7HexNAc6Neu5Ac1	7,5
3544,69	dHex1Hex6HexNAc7Neu5Ac1	1,4
3561,66	dHex2Hex7HexNAc7	0,3
3591,54	dHex1Hex8HexNAc7	0,2
3660,76	dHex1Hex6HexNAc6Neu5Ac2	0,3
3677,73	dHex2Hex7HexNAc6Neu5Ac1	0,7
3748,81	dHex1Hex7HexNAc7Neu5Ac1	1,6
3776,80	dHex1Hex6HexNAc5Neu5Ac3	1,6
3864,86	dHex1Hex7HexNAc6Neu5Ac2	7,9
3905,88	dHex1Hex6HexNAc7Neu5Ac2	1,3
3922,89	dHex2Hex7HexNAc7Neu5Ac1	0,5
3952,85	dHex1Hex8HexNAc7Neu5Ac1	0,3
4038,99	dHex2Hex7HexNAc6Neu5Ac2	0,8
4080,00	dHex2Hex6HexNAc7Neu5Ac2	0,2
4110,04	dHex1Hex7HexNAc7Neu5Ac2	1,0
4226,12	dHex1Hex7HexNAc6Neu5Ac3	4,8
4267,15	dHex1Hex6HexNAc7Neu5Ac3	0,6
4284,15	dHex2Hex7HexNAc7Neu5Ac2	0,2
4314,14	dHex1Hex8HexNAc7Neu5Ac2	0,3
4400,25	dHex2Hex7HexNAc6Neu5Ac3	0,4
4471,31	dHex1Hex7HexNAc7Neu5Ac3	0,3
4587,41	dHex1Hex7HexNAc6Neu5Ac4	1,9
4675,46	dHex1Hex8HexNAc7Neu5Ac3	0,2

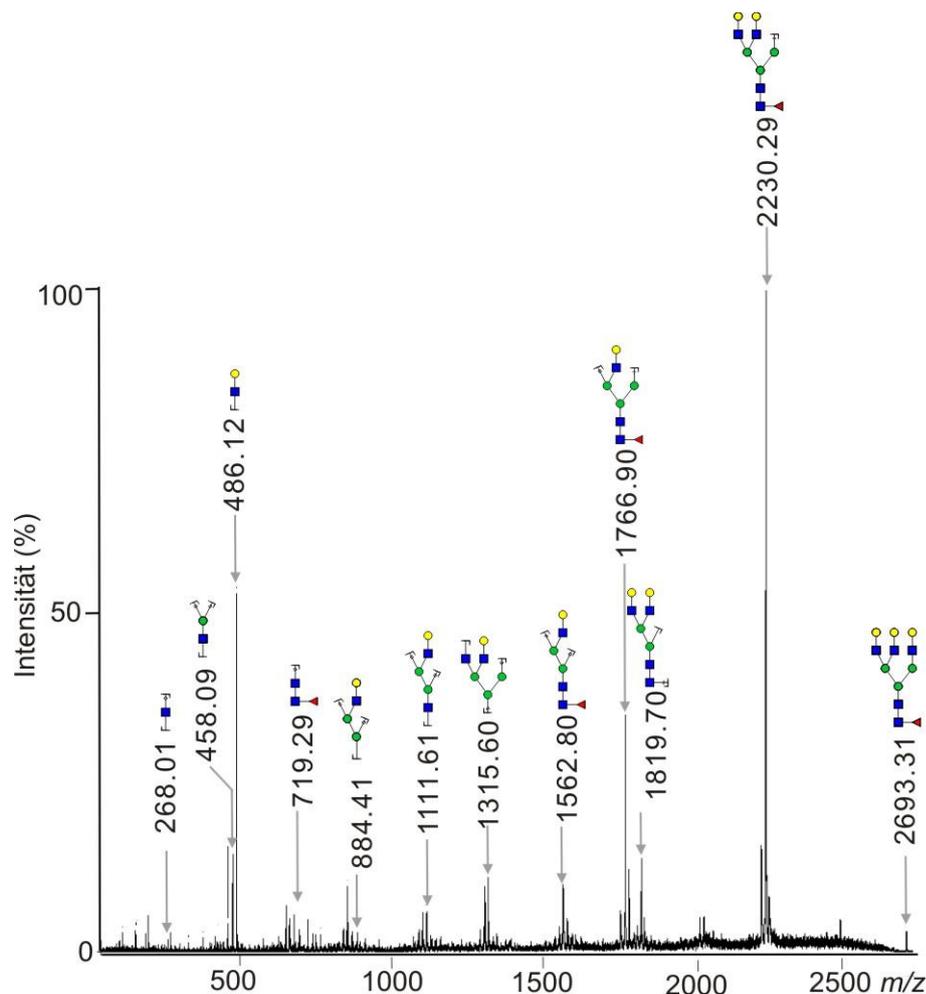


Abb. 36 MALDI-TOF/TOF-MS Spektrum der permethylierten Glykanstruktur m/z 2693,31 (dHex1Hex6HexNAc5). Der Peak m/z 719,29 zeigt die Art der Fucoseverknüpfung. Positiver Modus, $[M+Na]^+$, permethyliert. Matrix: s-DHB.

4.4.2. Charakterisierung der O-Glykane

Um das O-Glykosylierungsprofil des GM-CSF aus HEK-Zellen zu analysieren, wurden zunächst die O-Glykane des GM-CSF mittels β -Eliminierung abgespalten und permethyliert. Dabei wurden die O-Glykane mit MALDI-TOF/TOF-MS identifiziert. Das erhaltene Spektrum ist in Abb. 37 dargestellt. Die relativen Intensitäten der gefundenen O-Glykane sind in Tab. 22 zusammengefasst. Den Hauptmassenpeak stellt dabei im Falle des GM-CSF Hex₁Neu5Ac₁ (m/z 634,36), mit einer relativen Intensität von 72 % dar. Das O-Glykan vom Muzin-Typ Hex₁HexNAc₁ (m/z 518,25) bildet 18 % der gesamten Oligosaccharide in GM-CSF, wobei das Glykan dHex₁Hex₁HexNAc₁ (m/z 692,45) mit 4 % vertreten ist. Die GalGalNAc-Core-Struktur wurde einerseits einfach sialyliert mit m/z 879,62 und andererseits zweifach sialyliert mit m/z

1240,88 beobachtet. Das Ergebnis der Fragmentierung ist beispielhaft für das Glykan m/z 879,62 Hex₁HexNAc₁Neu5Ac₁ wie in Abb. 38 gezeigt. Es handelt sich dabei um B- und C-Ionen. Das Fragmentierungsspektrum zeigte zwei besondere C-Ionen, m/z 504,39 und m/z 620,47. Diese konnten jeweils einer Hex-HexNAc und einer Gal-Neu5Ac zugeordnet werden. Damit wurde bestätigt, dass es sich im Fall der m/z 879,62 um eine Neu5Ac-Gal-GalNAc-Struktur handelt.

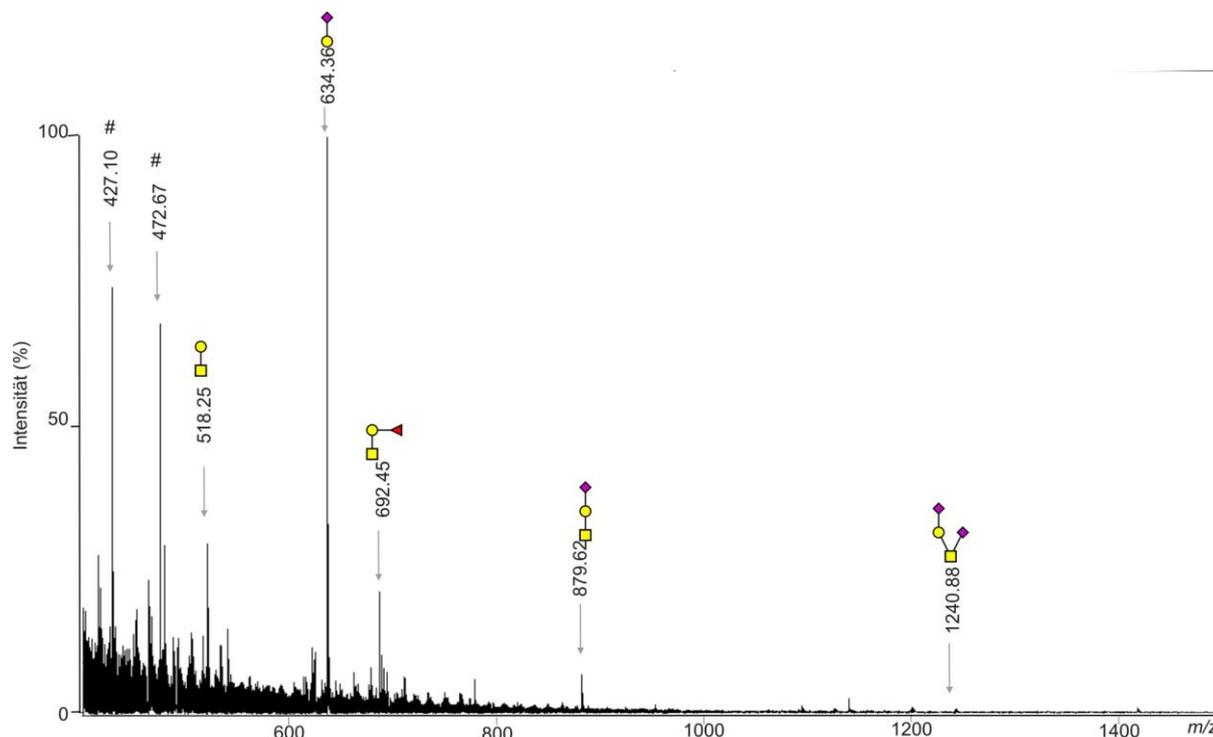


Abb. 37 MALDI-TOF-Spektrum der O-Glykane des GM-CSF. # nicht identifiziert

Tab. 22 O-Glykanstrukturen des GM-CSF

m/z	Glykane	Rel. Int. in %
518,25	Hex1HexNAc1	18,9
634,36	Hex1Neu5Ac1	72,2
692,45	dHex1Hex1HexNAc1	4
879,62	Hex1HexNAc1Neu5Ac1	4,3
1240,88	Hex1HexNAc1Neu5Ac2	0,4

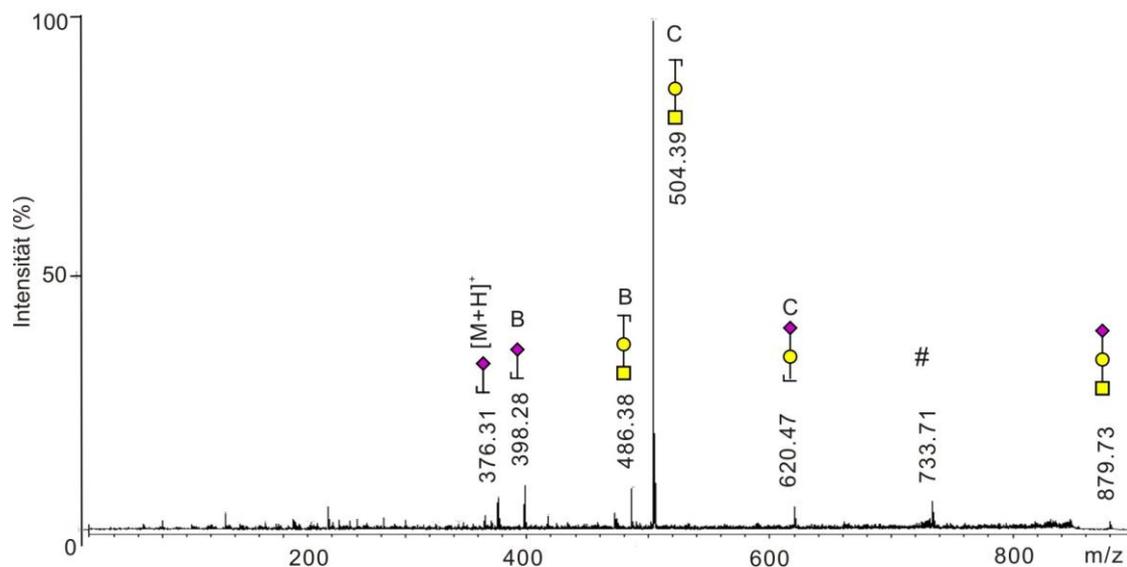


Abb. 38 MALDI-TOF/TOF-MS-Spektrum des O-Glykans des GM-CSF mit m/z 879. B und C-Ionentypen, # ist nicht identifiziert.

5. Diskussion

Eine wichtige Funktion des A1AT ist die Inhibierung der neutrophilen Elastase polymorphkerniger Leukozyten in der Lunge. Die Bedeutung der Glykosylierung des A1AT für die Proteinfaltung wurde bereits beschrieben. Die Abwesenheit der Oligosaccharide führt zur Missfaltung und Aggregation des A1AT, sowie dem Verlust der inhibitorischen Funktion [Karnaukhova et al. 2006]. Die Glykosylierung ist des Weiteren essentiell für die Stabilität des A1AT. Im Vergleich zu rekombinantem A1AT, welches mittels Hefezellen produziert wird und durch N-Glykanen des mannose-reichen Typs gekennzeichnet ist, bildet das humane N-glykosylierte A1AT ein stabileres Molekül [Kwon et al. 1997]. Die Arbeitsgruppe Glykoanalytik der Charité-Universitätsmedizin Berlin hat gezeigt, dass die Kultivierungsbedingungen einen signifikanten Einfluss auf die Glykosylierungsmuster des A1AT haben. Die Parameter pH, Temperatur und pO_2 verändern die Glykosylierungsmuster [Eigel 2008]. Die Supplementation der natürlichen Neuraminsäuren durch synthetische Neuraminsäurederivate erhöhte die Menge an messbaren sialylierten Strukturen 1,6-fach in HEK293-Zellen, wodurch sich die Halbwertszeit von Glykoproteinen verlängern ließ [Gröbe 2009].

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Glykomanalyse des Glykoproteins A1AT, welches mittels verschiedener Zelllinien (AGE1.hn- und HEK293-Zellen) exprimiert wurde, durchgeführt. Ausserdem erfolgte eine quantitative Charakterisierung der Glykosylierungsmuster und Glykosylierungsstellen.

5.1. A1AT

5.1.1. Analyse des A1AT N-Glykanpools

Die massenspektrometrische Analyse der enzymatisch freigesetzten N-Glykane erfolgte nach der Permethylierung. Die Messungen wurden mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie, ohne chromatographische Vortrennung direkt aus den einzelnen Glykanmischungen durchgeführt.

Abbildung 22A zeigt ein typisches Massenspektrum aller Glykane des rekombinanten A1AT aus AGE1.hn Zellen. 28 N-Glykane konnten hier in einem Massenbereich zwischen m/z 2000 und 5000 identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das N-Glykosylierungsprofil des A1AT aus AGE1.hn untersucht und verglichen. Das rekombinante A1AT weist im Vergleich zu dem aus humanem Plasma isolierten, therapeutisch eingesetzten A1AT (Prolastin) deutlich mehr tri- und tetraantennäre N-Glykane auf. hA1AT wurde zuvor mit verschiedenen Expressionssystemen wie *E. coli* [Johansen et al., 1987], *Saccharomyces diastaticus* [Kwon et al. 1995], *Aspergillus niger* [Chill et al., 2009], transgenen Mäusen [Zbikowska et al., 2002], Schaf [Wright et al., 1991] und Pflanzenzellen [Huang et al., 2001] exprimiert. Da in *E. coli* exprimiertes A1AT nicht glykosyliert wird, besitzt dieses eine kürzere Halbwertszeit als humanes Prolastin [Kwon et al., 1995]. Hefezellen produzieren ausschließlich High-Mannose N-Glykane, es tritt keine humane Glykosylierung auf. Das Glykosylierungsmuster von Hep G2- Zellen hat keinen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität von A1AT und spielt eine wichtige Rolle bei der Stabilität des Enzyms [Guzdek et al., 1990]. Die in Hefe gebildeten Oligomannosen stabilisieren das A1AT im humanen Blut weniger als die humanen Komplex-Typ Glykane. Die Glykosylierung verbessert die thermische Beständigkeit durch eine Erhöhung der konformativen Stabilität [Kwon et al., 1997]. Es wurde bisher kein rekombinantes A1AT für die Therapie verwendet [Karnaukhova et al. 2006].

Die N-Glykane des A1AT aus *Saccharomyces diastaticus* und *Aspergillus niger* sind vom Mannose-reichen Typ mit 5-20 Hexosen-Einheiten und terminalen Galaktofuranosen [Kwon et al., 1995; Chill et al., 2009], die somit nicht der humanen Glykosylierung entsprechen und sich deshalb nicht für den therapeutischen Einsatz eignen. Daher ist es von entscheidender Bedeutung, die Glykosylierungsmuster von rekombinanten Glykoproteinen zu analysieren und gegebenenfalls zu beeinflussen [Conradt et al, 1995; Cumming et al, 1991].

Fucosen weisen verschiedene Verknüpfungsarten auf, wie Gal- und GlcNAc-gebundene Fucose, *core*-Fucose usw. Bei A1AT aus der AGE1.hn Zelllinie wurden *core*-fucosylierte bi-, tri- und tetraantennäre N-Glykane identifiziert. Bei einem Teil der Strukturen konnte das Le^X-Epitop nachgewiesen werden, bei dem GlcNAc-gebundene Fucose auftritt. Diese beiden Typen der

Fucoseverknüpfung waren zuvor auch in N-Glykanen des Prion-Proteins bei Mäusen und bei syrischen Hamstern nachgewiesen worden [Rudd et al, 1999; Stimson et al, 1999], was darauf hindeutet, dass *Core*- und Le^{X} -Fucosylierung Eigenschaften der neuronalen N-Glykosylierung sein könnten. Darüber hinaus wurden Le^{X} -Epitope nachgewiesen, bei denen die Fucose der Zellerkennung dient. Etwa 5 % *Core*-Fucosylierung wurde in A1AT aus Serumproben von gesunden Probanden sowie Serumproben von Patienten mit *CDG-Ia* und *Ic* beobachtet [Mills et al., 2001; Mills et al., 2003; Wilson et al, 2002]. Das Le^{X} -Epitop wurde auch in den N-Glykanen des hA1AT gefunden [Kolarich et al., 2006a], aber es tritt hier in geringeren Mengen auf (ca. 6 %) als im rekombinanten A1AT aus AGE1.hn (20 %). Die Hauptstrukturen monosialylierte biantennäre bifucosylierte Glykane und bisialylierte biantennäre monofucosylierte Glykane treten zu 18 % beziehungsweise zu 25 % auf (Tab. 13). Fucosylierte Strukturen spielen bei verschiedenen humanen Krankheiten eine wichtige Rolle. Eine Veränderung der Fucosylierung von Oligosacchariden in Glykoproteinen oder Glykolipiden wird bei verschiedenen Krebsarten beobachtet. So gelten das H-Antigen und das Sialyl Le^{X} als Tumormarker bei Prostatakrebs. Die Fucose an dem triantennären Glykan mit Le^{X} -Struktur wurde in humanen Hepatomzelllinien, bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und bei CDG-Patienten entdeckt [Goodarzi et al., 1998]. Jedoch konnten Mills et al. [2001] zeigen, dass Le^{X} Typ Fucose ebenfalls in gesunden Personen vorhanden ist.

Die zusätzliche Glykosylierungsstelle der A1AT-Varianten wurde mittels gerichteter Mutagenese-PCR in die A1AT-CDS (*coding sequence*) eingefügt [Lusch et al., 2013]. A1AT-Varianten mit zusätzlicher Glykosylierungsstelle besitzen größere Anteile der höher antennären Strukturen. Auffällig ist besonders der hohe Anteil an tetraantennären Glykanen bei der Variante N123. Die Variante N123 weist auch eine Steigerung der bi- und trisialylierten Glykane auf, wobei die monosialylierten Glykane reduziert sind. Im Vergleich zu hA1AT zeigt das A1AT aus HEK293 Zellen GalNAc-Reste, welche erstmals für hA1AT nachgewiesen wurden.

Die Analyse der Sialinsäureverknüpfung von A1AT wurde mittels 2AB-HPLC durchgeführt. Es wurde bestätigt, dass A1AT α 2,3- und α 2,6-Neu5Ac beinhaltet, wobei der Anteil an α 2,3-Neu5Ac etwa 30 % beträgt. α 2,3-verknüpfte Neu5Ac der triantennären N-Glykane von

A1AT wurde ebenfalls identifiziert [Kolarich et al., 2006a; Quintero et al., 1998]. A1AT aus AGE1.hn präsentiert mehr α 2,3-sialylierte N-Glykane, aber der Sialylierungsgrad war niedriger als in humanem Plasma [Kolarich et al., 2006a und 2006b]. Darüber hinaus wurde α 2,3-Sialylierung in bi-, tri- und tetraantennären N-Glykanstrukturen des A1AT aus AGE1.hn und nur in triantennären N-Glykanen von A1AT in humanem Plasma gefunden [Mega et al., 1980, Kolarich et al., 2006a]. In chromatographischen Untersuchungen konnte für die AGE1.hn-Zelllinie N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), nicht aber N-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc) nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 4.1.4). Die Abwesenheit von Neu5Gc und das Vorhandensein von α 2,6-Sialylierung sind signifikant für die humane neuronale Zelllinie AGE1.hn im Vergleich zu *Chinese Hamster Ovary* (CHO)-Zellen. Rekombinante Glykoproteine aus CHO-Zellen weisen geringe Anteile von Neu5Gc und fast ausschließlich α 2,3-verknüpfte Neu5Ac Sialylierung auf, selten wurde α 2,6-verknüpfte Neu5Ac Sialylierung nachgewiesen [Bergwerff et al., 1993; Hokke et al., 1990].

Im Vergleich zum A1AT-wt sind die Halbwertszeiten der A1AT aus HEK 293 einheitlich erhöht, insbesondere bei den A1AT-Varianten N123 und N201, obwohl das Glykanmuster Ähnlichkeit mit dem A1AT-wt aufweist [Lusch et al., 2013].

5.1.2. Glykosylierungsstellen-spezifische Analytik der N- Glykane von A1AT aus verschiedenen Zelllinien

Das A1AT besitzt drei Glykosylierungsstellen. Im folgenden Abschnitt wird ein Vergleich der Glykopeptide von A1AT aus AGE.hn- und HEK293-Zellen vorgenommen (vgl. Abschnitt 4.1.7.2 und Abschnitt 4.2). Die N-Glykosylierungsstellen wurden anhand der isolierten Glykopeptide nach Spaltung des A1AT mit Trypsin und Chymotrypsin charakterisiert. Die Analyse der Glykopeptide von A1AT aus AGE1.hn-Zellen zeigt, dass die Struktur dHex1Hex5HexNAc4Neu5Ac2 einen Anteil von 54 % an der Glykosylierungsstelle Asn-46 (zusätzliche Spaltstelle) besitzt. Die Strukturen dHex3Hex5HexNAc4 und dHex2Hex5HexNAc4Neu5Ac1 haben zusammengenommen einen Anteil von 56 % an der Glykosylierungsstelle Asn-46. Die Hauptstruktur an der Glykosylierungsstelle Asn-247 weist ebenfalls bifucosylierte biantennäre Glykane mit einem Anteil von 40 % auf. Außerdem macht

die Oligosaccharidkernstruktur der monofucosylierten biantennären Glykane mit 29 % einen hohen Anteil aus. Bei der Glykosylierungsstelle Asn-83 wird, verglichen mit Asn-46 und Asn-247, die größte Heterogenität der Oligosaccharide beobachtet. Die Hauptstrukturen sind hier triantennäre fucosylierte sialylierte Glykane und tetraantennäre monofucosylierte sialylierte Glykane (Tab. 15). In allen Formen von CDG wird die Glykosylierungsstelle Asn-83 bevorzugt nicht glykosyliert [Mills et al. 2003].

Eine Gemeinsamkeit zwischen A1AT aus humanem Plasma und AGE1.hn-Zellen ist die höhere Antennarität an der Glykosylierungsstelle Asn-83 im Vergleich zu den beiden anderen Glykosylierungsstellen. In der Literatur werden geringfügige Mengen von triantennären Glykanen an der Glykosylierungsstelle Asn-46 des A1AT aus humanem Plasma und biantennäre Glykane an der Glykosylierungsstelle Asn-247 beschrieben [Kolarich et al., 2006a]. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die High-Mannose Glykane an den Glykosylierungsstellen Asn-83 und Asn-247 des A1AT aus *Aspergillus niger* identifiziert wurden, jedoch wurde die Glykosylierungsstelle Asn-46 hier nicht detektiert [Chill et al., 2009].

Weiterhin wurde eine massenspektrometrische Analyse der Glykopeptide durchgeführt. Ziel war es, die Strukturen an jeder Glykosylierungsstelle der rekombinaten A1AT aus AGE1.hn und A1AT-Varianten aus HEK293 aufzuklären. Im Vergleich zu A1AT aus AGE1.hn weist das von HEK293 exprimierte A1AT biantennäre Glykane an der Glykosylierungsstelle Asn-83 auf. Die weiteren zwei Glykosylierungsstellen weisen keine grundlegenden Veränderungen der Komplex-Typ N-Glykane auf, jedoch sind die Anteile der verschiedenen Strukturen verändert (Abb. 42). Als Grund können unterschiedliche Glykosyltransferasen, eine sterische Hinderung durch das jeweilige Glykan oder die Konformationsänderung in Frage kommen. Für A1AT aus HEK293-Zellen wurden weniger komplexe N-Glykane nachgewiesen (Abschnitt 4.2). Die Glykosylierungsstelle Asn-247 von A1ATwt wird mit biantennären, Asn-46 mit hauptsächlich biantennären und auch triantennären, jedoch keinen tetraantennären N-Glykanen, und Asn-83 nur mit tri- und tetraantennären fucosylierten sialylierten N-Glykanen, jedoch nicht mit biantennären N-Glykanen exprimiert. Interessanterweise konnte im Vergleich zu A1AT-wt aus AGE1.hn-Zellen ein biantennäres N-Glykan mit einer terminalen GalNAc-Struktur nachgewiesen werden (Bsp. m/z 2928,24 in Abb. 31B). Die Struktur GalNAc β (1-4) GlcNAc wird als LacdiNAc-Glykan bezeichnet und wird bei N-Glykanen in Vertebraten und in

Invertebraten beschrieben [Van Eijnden et al. 1995; Neeleman et al., 1994]. LacdiNAc-Glykane spielen eine entscheidende Rolle bei der Halbwertszeit der Hormone [Manzella et al. 1996], der Zellerkennung [Lowe and Marth 2003] und der Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen der Maus [Sasaki et al. 2011].

Abb. 39, Abb. 40 und Abb. 41 zeigen eine weitgehende Übereinstimmung der Glykopeptide von A1AT aus AGE1.hn-, HEK293-Zellen und humanem Plasma [Kolarich et al. 2006a]. Es zeigten sich jedoch auch deutliche Unterschiede beim Vergleichen der einzelnen Glykosylierungsstellen des A1AT. Die Glykopeptide variieren je nach Glykosylierungsstelle in der Anzahl der antennären Einheiten und im Fucosylierungsgrad, was im folgenden Abschnitt diskutiert wird.

Für die Glykosylierungsstelle Asn-46 wurden zehn Glykopeptide von AGE1.hn-Zellen detektiert, während nur sechs Glykopeptide von HEK293-Zellen nachgewiesen wurden. Von diesen wurden wiederum nur vier Glykopeptide in humanem Plasma nachgewiesen [Kolarich et al., 2006a] (Abb. 39). Die Glykosylierungsstelle Asn-83 zeigt dagegen ein anderes Massenspektrometrieprofil. Der Datensatz enthielt 11 Glykopeptide, die ebenfalls von Kolarich et al. [2006a] in humanem Plasma nachgewiesen wurden. Zudem wurden vier Glykopeptide zugeordnet, welche homolog sowohl zu A1AT aus AGE1.hn als auch A1AT aus HEK293-Zellen waren. Vier der identifizierten Glykopeptide an der Glykosylierungsstelle Asn-247 aus AGE1.hn-Zellen wurden auf den HEK293-Zellen nachgewiesen.

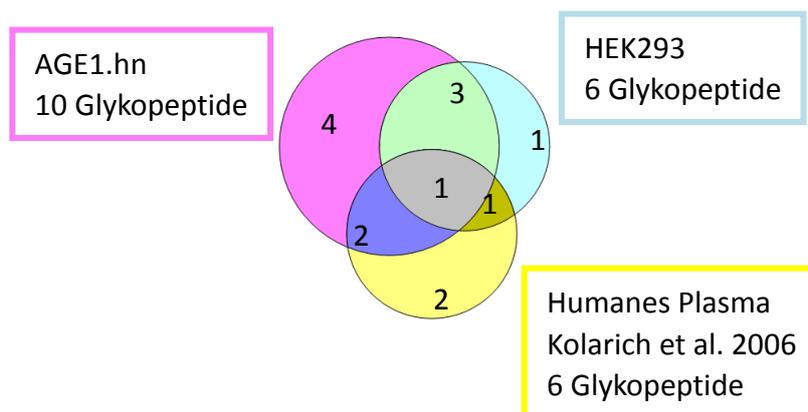


Abb. 39 Übereinstimmung mit veröffentlichten Glykopeptiden an der Glykosylierungsstelle Asn-46 von A1AT

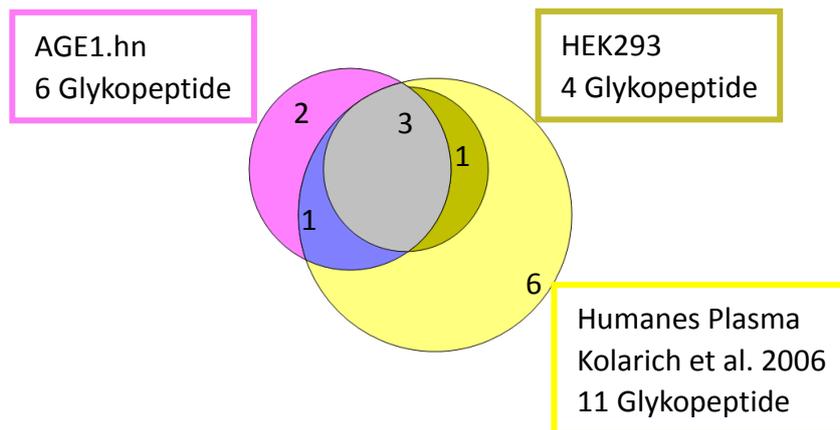


Abb. 40 Übereinstimmung mit veröffentlichten Glykopeptiden an der Glykosylierungsstelle Asn-83 von A1AT

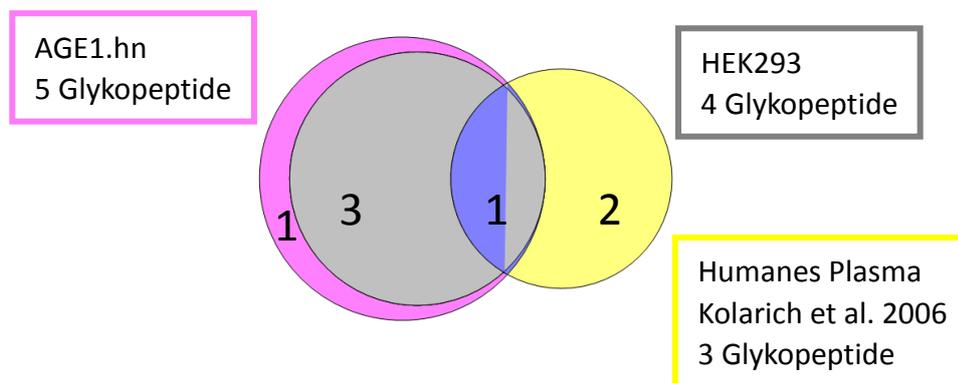


Abb. 41 Übereinstimmung mit veröffentlichten Glykopeptiden an der Glykosylierungsstelle Asn-247 von A1AT

In Abb. 42 wird die prozentuale Verteilung der Glykopeptid-Zusammensetzung der analysierten A1AT-Varianten gezeigt. Die verwendete Zelllinie hat offensichtlich einen entscheidenden Einfluss auf die Oligosaccharidzusammensetzung des A1AT. Die AGE1.hn-Zelllinie ist immortalisiert, besitzt eine Apoptose-Resistenz und wurde als Produktionszelllinie für rekombinante Proteine, Viren und Virusvektoren entwickelt [Niklas et al., 2011]. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die A1AT-Varianten aus den verschiedenen Zelllinien deutliche Unterschiede im Glykosylierungsmuster zeigen. Alle Oligosaccharide sind vom Komplex-Typ und sind fucosyliert. Der wesentliche Unterschied zwischen HEK293- und AGE1.hn-Zellen besteht in einem erhöhten Fucosylierungsgrad und vollständiger Glykosylierung des A1AT aus den AGE1.hn-Zellen. Unterschiede in der Fucosylierung können demzufolge auf den verwendeten Zellen, unterschiedlichen Medien und Kultivierungsbedingungen basieren [Byres et al., 2008, Hills et al., 2001, Werner et al., 2007]. Die Ursache dafür liegt in den unterschiedlichen verwendeten Geweben, was sich somit auch in verschiedenartigen Glykosylierungen der entsprechenden Zelllinien widerspiegelt.

Unterschiedliche Glykosylierungen der Gewebe dürften wiederum in den unterschiedlichen Funktionen der Glykosylierung im Organismus begründet sein.

Die Frage, wie es überhaupt zur sogenannten Mikroheterogenität von Glykoproteinen kommt, wird durch den sich verzweigenden, komplexen Biosyntheseweg der N-Glykane erklärt. Verschiedene Strukturen repräsentieren verschiedene Stufen dieses Prozessierungsweges, bei dem einige Glykoproteine in der Lage sind, dem vollständigen Prozessieren der N-Glykane zu entgehen, indem sie den Weg vorzeitig verlassen [Lehmann, 1998].

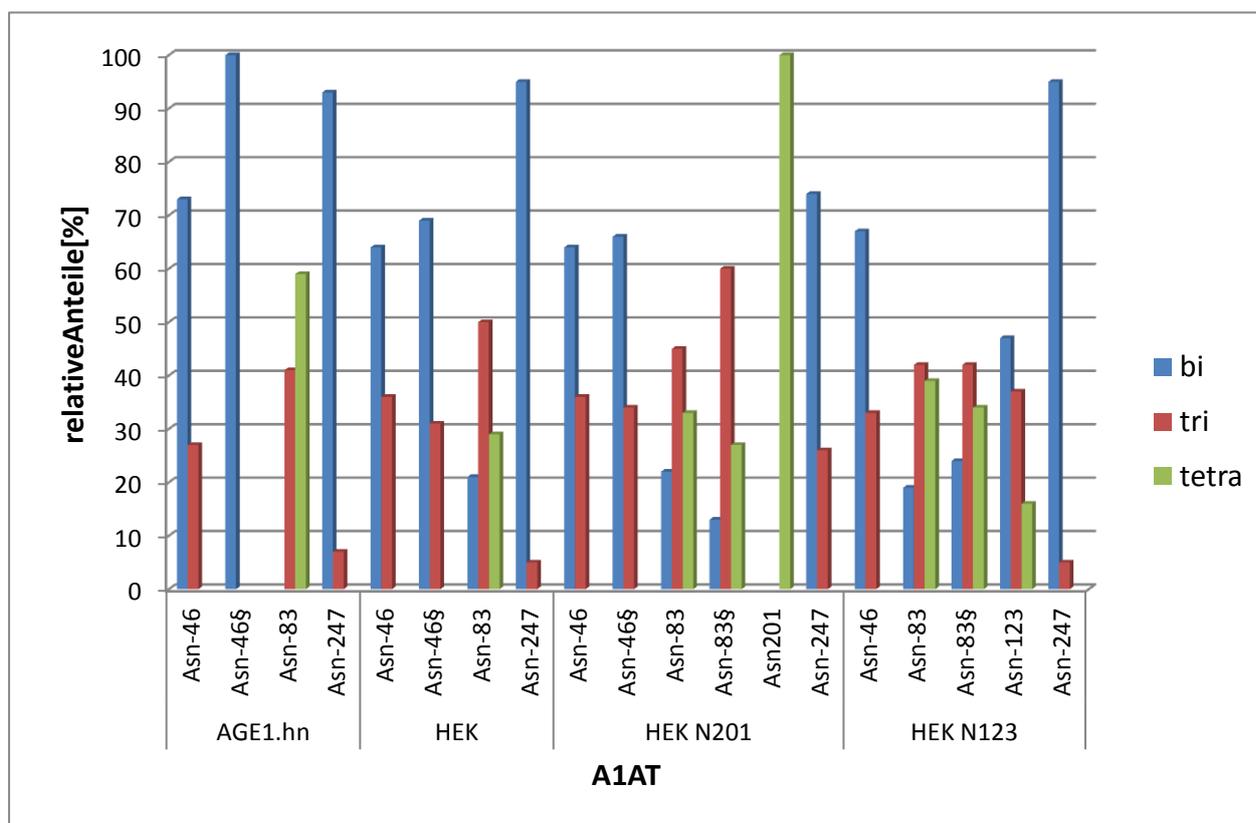


Abb. 42 Zusammenfassung der ESI-Daten der Glykopeptide von A1AT und A1AT-Varianten aus AGE1.hn- und HEK293-Zellen.

Die zusätzlich eingefügten N-Glykosylierungsstellen der A1AT-Varianten N201 und N123 aus HEK293-Zellen wurden mittels Nano-LC-QTOF-MS untersucht (Abschnitt 4.3). An der zusätzlichen Glykosylierungsstelle Asn-123 werden hauptsächlich bi- und triantennäre und, in geringen Anteilen, tetraantennäre fucosylierte N-Glykane beobachtet. Dies bestätigt das Ergebnis der Gesamtglykananalyse von Lusch [Lusch et al., 2013]. Nur ein tetraantennäres N-Glykan wurde bei der Glykosylierungsstelle Asn-201 der A1AT-Variante N201 gefunden. Das Ergebnis

stimmt auch mit dem Gesamtglykanpool aus den MALDI-TOF-MS Daten überein, welche ebenfalls eine Zunahme der tetraantennären Strukturen zeigen. Vergleicht man die Glykosylierungsstelle Asn-46 der A1AT-Varianten mit dem A1AT-wt, zeigen sich viele unvollständige biantennäre Glykane (Tab. 17 und Tab. 20).

Welche Funktionen die beschriebenen Kohlenhydratdeterminanten in Bezug auf die Interaktion und Wirkung von A1AT haben, bedarf weiterer Untersuchungen.

5.1.3. Biologische Aktivität des A1AT

Ein A1AT-Mangel manifestiert sich als Lungenemphysem, chronische Bronchitis, Lebererkrankung und seltener in Form von Hauterkrankungen [Kueppers et al., 1974; Morse, 1978b; Morse, 1978a]. Für die Therapie des A1AT-Mangels steht seit 1989 humanes A1AT zur intravenösen Substitution zur Verfügung. Die Substitutionstherapie (Synonym: Augmentationstherapie) wird weltweit mit einem A1AT-Präparat (z. B. Prolastin 60 mg/kg KG/Woche) durchgeführt [Stoller & Aboussouan 2005]. Es sollte hierbei ein A1AT Serumspiegel über 0,8 g/L angestrebt werden [Barker et al., 1994, Graf et al., 1992]. Die Substitution von A1AT vermindert eine Inflammation der Atemwege, mindert die Schwere der Exulzeration und verringert außerdem die Häufigkeit von Atemwegsinfektionen, Lungenfunktionseinschränkungen und Mortalität [Stockley et al., 2002; Lieberman, 2000; Dirksen et al., 2009]. Die Aufreinigung des A1AT aus humanem Serum ist aufwendig und die Chargen sind naturbedingt inhomogen.

Als potenzielle Therapie eines A1AT-Mangels könnte die somatische Gentherapie dienen. Das humane A1AT-Gen wurde unter adenoviraler Kontrolle in die Epithelzellen des respiratorischen Trakts von Cotten-Ratten eingeschleust [Rosenfeld et al. 1991] und konnte noch sieben Tage nach der Injektion des A1AT nachgewiesen werden. Hierbei wurde eine Halbwertszeit von 6 Tagen für das A1AT ermittelt [Carrell et al. 1982]. Die produzierten Mengen reichen jedoch für eine klinische Anwendung bisher nicht aus.

Die Lungen- oder Lebertransplantation ist kurativ bei terminaler Lungenerkrankung oder Lebererkrankung, weil A1AT kaum in extrahepatischem Gewebe synthetisiert wird [Hosenpud et

al., 1995]. Die langfristigen Resultate zeigen jedoch, dass nur noch sehr sorgfältig ausgewählte Patienten einer solchen chirurgischen Therapie unterzogen werden.

Bislang wurde kein rekombinantes A1AT für die Therapie eingesetzt [Karnaukhova et al., 2006]. Die allgemeinen gesetzlichen Anforderungen an biologische Präparate für therapeutische Zwecke, einschließlich A1AT, sind Reinheit, Sicherheit und Wirksamkeit. Therapeutische Proteine müssen zudem *in vivo* und *in vitro* stabil sein.

Für das zugelassene humane Therapeutikum sollte eine möglichst humanähnliche Glykosylierung des A1AT angestrebt werden. Dabei ist die CHO-Zelle die am häufigsten eingesetzte Säugerzelle für die Produktion von Biotherapeutika. Diese produziert zwar komplexe humanähnliche N-Glykane, es wurden aber auch geringe Anteile von N-Glykolylnneuraminsäure (Neu5Gc) nachgewiesen, welche nicht im humanen System vorkommt [Nevalainen et al., 2005]. Humanes A1AT aus der Milch von transgenen Schafen kann mit einem hohen Reinheitsgrad gewonnen werden, allerdings können Spuren von Schaf-A1AT und alpha 1-Antichymotrypsin eine systemische Antikörper-Reaktion hervorrufen [Spencer et al. 2005].

Die Abwesenheit der menschlichen Glykosylierung bei rekombinantem A1AT stellt ein großes Problem für intravenöse Therapien dar. Es ist bekannt, dass die Halbwertszeit *in vivo* von nicht-glykosyliertem A1AT aus Hefe (*S. cerevisiae*) deutlich kürzer ist als die des aus humanem Plasma gewonnen Prolastins. Pharmakokinetische Studien an Primaten haben gezeigt, dass das A1AT einen signifikant unterschiedlichen *IP* (isoelektrischen Punkt) zu Prolastin hat [Casolaro et al., 1987].

In Zukunft könnten weitere neue therapeutische Ansätze in der Substitutionstherapie zur Verfügung stehen: die inhalative Substitutionstherapie, die Behandlung mit rekombinantem A1AT und die Therapie mit synthetischen Elastasehemmern sind zu erwähnen. Weitere Alternativen sind z. B. Adenovirus-basierte somatische Gentherapie, Hemmung der intrahepatischen A1AT-Polymerisation, Elastasehemmung durch niedrigmolekulare Pharmaka oder PEGylierung von A1AT, um die Halbwertszeit zu verlängern [Fairbanks & Tavill 2008].

Die inhalative Substitutionstherapie könnte die Kosten der Substitutionstherapie (60,000 – 150,000 \$ pro Patient pro Jahr weltweit) mit Prolastin deutlich verringern [Silverman & Sandhaus 2009]. Darüber hinaus könnte die lange Infusionszeit mit rekombinantem A1AT, das

frei von anderen humanen Serum-Komponenten ist, reduziert werden. Die Entwicklung von rekombinantem A1AT sowie A1AT-Varianten mit einer verlängerten Serumhalbwertszeit und somit gesteigerter Wirksamkeit könnten die Behandlungskosten reduzieren und Nebenwirkungen verringern.

A1AT gehört zu den Akut-Phase-Proteinen, die durch Interleukin (IL 6, IL 1) oder TNF- α (Tumor Nekrose Faktor-alpha) stimuliert werden. Die Konzentration des A1AT im Plasma steigt bei einer Entzündungsreaktion oder Infektion um den Faktor 3-5 an [Kushner 1993; Schreiber et al., 1989]. Natürliches und rekombinantes A1AT weist verschiedene entzündungshemmende Eigenschaften auf [Dabbagh et al., 2001; Janciauskiene et al., 2004; Griese et al., 2007].

In verschiedenen Zell-Modellen waren anti-inflammatorische Aktivitäten des A1AT bestimmt worden, insbesondere die Hemmung der TNF- α Sekretion und Expression [Subramaniam et al., 2008]. Die anti-inflammatorischen Aktivitäten, die in dieser Arbeit diskutiert werden, wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Janciauskiene der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt. Weitere Untersuchungen zur inhibitorischen Aktivität des A1AT gegenüber Protease wurden im Zuge dieser Arbeit durchgeführt (Abb. 44).

Verschiedene Konzentrationen von Prolastin oder rA1AT wurden zu isolierten humanen Neutrophilen in der Anwesenheit oder Abwesenheit von Lipopolysaccharid hinzugefügt (LPS, 10 ng / ml). Zellen, die nur mit LPS stimuliert wurden, dienten als positive Kontrolle und PBS behandelte Neutrophile dienten als negative Kontrolle. Wie in Abb. 44A dargestellt, führte rA1AT zu einer signifikanten Reduktion der TNF- α Freisetzung in den Zellen wie mit Prolastin.

Die Hemmung der LPS-induzierten TNF- α Sekretion durch Prolastin oder rA1AT war konzentrationsabhängig. 0,5 mg/mL Prolastin und rA1AT wurden zugegeben und ihre Auswirkungen auf die LPS-stimulierte TNF- α Sekretion aus humanen Monozyten verglichen. Wie in Abb. 44B gezeigt, konnten Prolastin und rA1AT signifikant die LPS-induzierte TNF- α Sekretion hemmen. Die hemmende Wirkung von rA1AT war hierbei vergleichbar mit Prolastin.

Die inhibitorische Aktivität von A1AT gegenüber der Pankreas-Elastase wurde ebenfalls untersucht und es wurde festgestellt, dass eine einheitliche Aktivität in Gegenwart von A1AT aus AGE1.hn-Zellen und Prolastin besteht (Abb. 43).

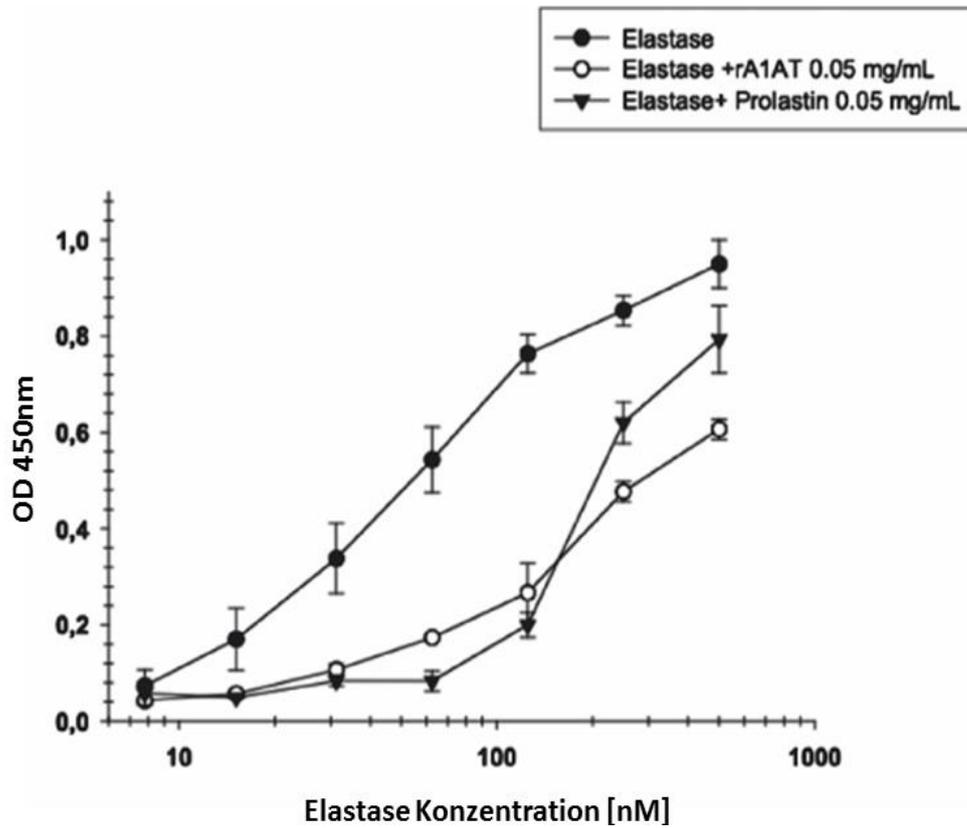
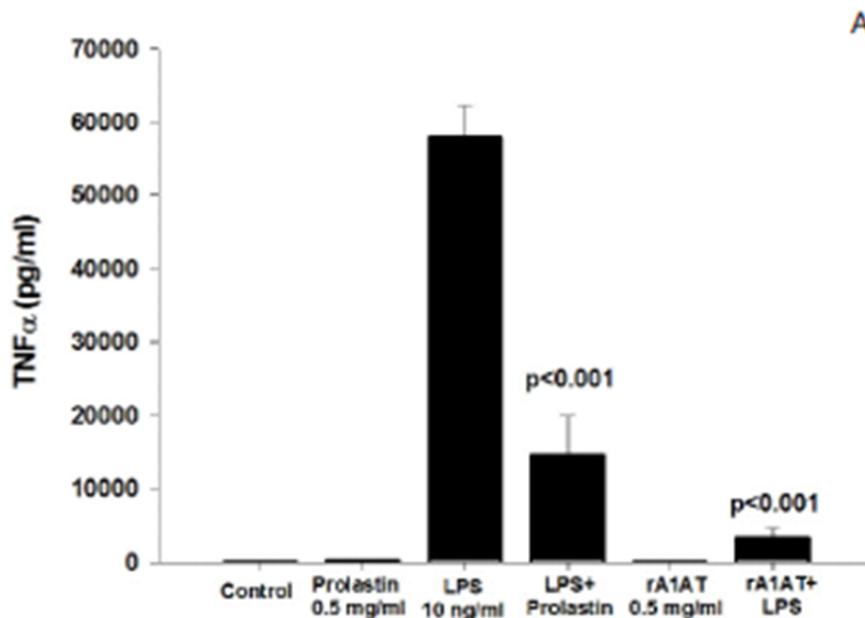


Abb. 43 Verschiedene Konzentrationen von Elastase (von 0 bis 125 mM) wurden mit einer konstanten Konzentration von A1AT für 5 min inkubiert. Die Absorption wurde bei 410 nm gemessen.



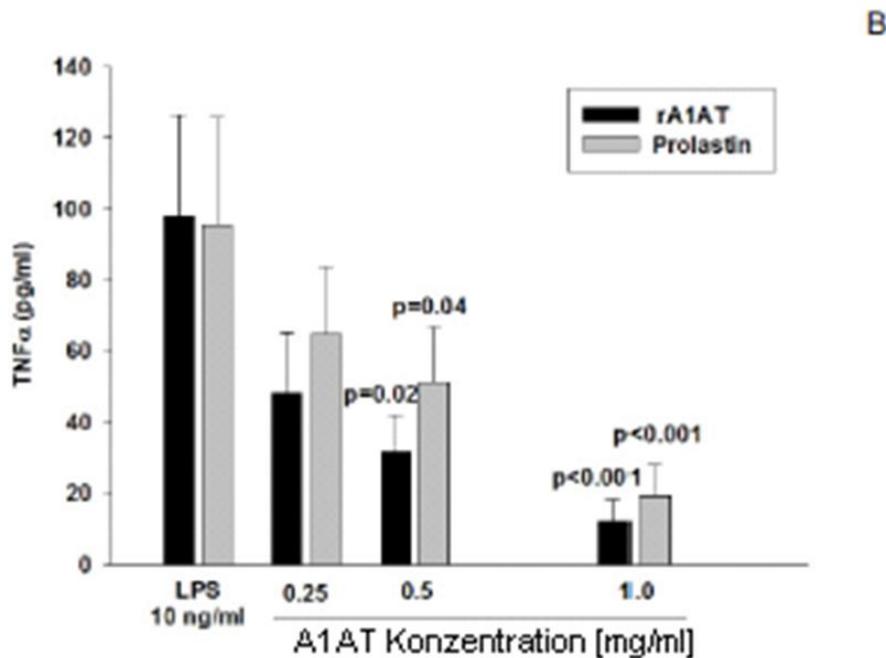


Abb. 44 A. Humane Monozyten wurden mit LPS allein oder in Kombination mit Prolastin oder rA1AT für 18 h stimuliert

B. Humane Neutrophile wurden mit LPS allein oder in Kombination mit Prolastin oder rA1AT für 8 h stimuliert

Die optimierte Glykosylierung des A1AT-Neoglykoproteins führt zur Verbesserung der Stabilität, Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit und damit zu einer wesentlich verbesserten Bioverfügbarkeit und Wirksamkeit des Biopharmazeutikums. Im Vergleich zur A1AT-wt-Aktivität zeigt das A1AT-Neoglykoprotein (Varianten mit zusätzlicher Glykosylierungsstelle) keine Veränderung der inhibitorischen Aktivität gegenüber dem Trypsin. Die zusätzliche N-Glykosylierung hat Einfluss auf die Abschirmung des Glykoproteins gegen Proteasen. Eine negative Beeinflussung durch die zusätzliche Glykosylierung konnte folglich nicht festgestellt werden [Lusch et al., 2013].

5.1.4. Isolierung der Glykopeptide

In Kapitel 4.1.7.1 wurden die Inaktivierung und Isolierung des A1AT beschrieben. Die drei tryptischen N-verknüpften Glykopeptide von A1AT bestehen aus relativ großen Aminosäureketten und sind daher in der Regel im MALDI-Prozess unterdrückt. Daher wurde das A1AT mit Trypsin und Chymotrypsin verdaut, welches theoretisch zu kleinen Peptiden führen

sollte. Hierbei machen Glykopeptide häufig nur einen geringen Teil der gesamten Peptidmischung aus. Aufgrund der geringeren Ionisationseffizienz ist die Intensität der Glykopeptide relativ niedriger als die der nicht-glykosylierten Peptide. In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sowohl Lektin-Affinitätschromatographie, Graphit-Mikrosäulen, Hydrazid Beads als auch die HILIC-Methode zur Isolierung von Glykopeptiden eingesetzt werden können [Hirabayashi 2004, Nilsson et al., 2009, Ruhaak et al., 2009, Larsen et al., 2005, Wuhrer et al., 2007, Wuhrer et al., 2005, Gilar et al. 2011]. Die Glykopeptide werden hauptsächlich durch die Hydrophilie und Größe der Glykane getrennt. Eine weitere Isolierungsmethode ist die Größenausschluss-Chromatographie [Alvarez-Manilla et al., 2006].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ZIC-HILIC-Methode für die Isolierung der Glykopeptide des A1AT aus AGE1.hn- und der HEK293Zelllinie verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass die ZIC-HILIC viele Vorteile gegenüber der Standardmethode aufweist. Die Vorteile der herkömmlichen ZIC-HILIC Methode wird von vielen Gruppen beschrieben [Takegawa et al. 2008]. Darüber hinaus wurde ein zwitterionischer Typ (ZIC)-HILIC verwendet, um tryptische Glykopeptide von Immunglobulin G aus humanem Serum zu trennen [Takegawa et al., 2006a]. Die ZIC-HILIC-Methode konnte sialylierte N-Glykopeptide mit relativ großen, isomeren tri- und tetraantennären N-Glykanstrukturen und unterschiedlichen Bindungstypen (α 2,3; α 2,6) von der Sialinsäure trennen [Takegawa et al., 2006b].

5.2. GM-CSF

Das hGM-CSF wurde bereits mit so unterschiedlichen Zellen wie *E.coli* [Burgess et al., 1987], COS [Metcalf, et al., 1986] und CHO [Moonen et al., 1987] hergestellt. Bei *E.coli* wurde keine Glykosylierung synthetisiert, bei COS und CHO wurden keine humanen Oligosaccharide exprimiert. Diese Glykane können die biologische Aktivität beeinflussen [Moonen et al., 1987]. Ding et al. bestätigten, dass die N-Glykosylierung für die Bindung an die α -Untereinheit im GM-CSF Rezeptor erforderlich ist [Ding et al., 1995].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das N- und O-Glykosylierungsprofil des GM-CSF aus HEK293-Zellen untersucht. Die aufgereinigten Glykane wurden mit Hilfe der

MALDI-TOF-MS-Methode vermessen. Es konnten insgesamt 60 N-Glykanstrukturen und 5 O-Glykanstrukturen des GM-CSF identifiziert werden, wobei $\text{dHex}_1\text{Hex}_6\text{HexNAC}_5$ (m/z 2693,29) die N-Glykanhauptstruktur mit einer relativen Intensität von 10,9 % darstellt. Die Übersicht der N-Glykane von GM-CSF in Abb. 45 zeigt beispielhaft fucosylierte tri- und tetraantennäre Glykane zu etwa 35 %, wobei der Anteil fucosylierter biantennärer N-Glykane etwa 18 % beträgt. Analysen durch Forno et al. [2004] am GM-CSF aus CHO Zellen zeigen abweichende Ergebnisse. Hier sind die triantennären Glykane mit einem oder tetraantennäre Glykane mit zwei N-Acetyllactosaminen die Hauptstrukturen. 12 % biantennäre Glykane wurden detektiert. Außerdem wurde auch ein kleiner Anteil von α 2,3 sialylierten Glykanen mit Neu5Gc gefunden.

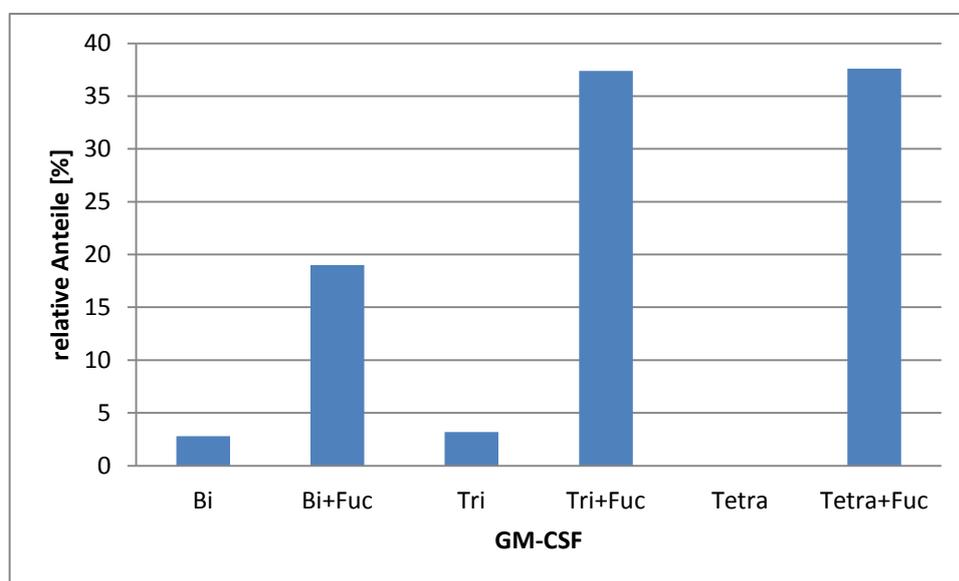


Abb. 45 Zusammenfassung der MALDI-TOF-MS-Daten der N-Glykane isoliert von GM-CSF

Die O-Glykane des Glykoproteins GM-CSF wurden mittels β -Eliminierung freigesetzt, aufgereinigt und massenspektrometrisch analysiert. Die O-Glykanstrukturen konnten in einem Massenbereich von m/z 500 bis m/z 1500 detektiert werden. Die O-Glykane sind dafür bekannt, dass sie keine einheitliche *Core*-Struktur besitzen. Acht *Core*-Strukturen werden in der Literatur für die O-Glykane des Muzin-Typs beschrieben [Varki et al.2009b]. Im Rahmen dieser Arbeit stellt m/z 634,13 den höchsten Peak in dem Gesamtspektrum der O-Glykane. Dieser Peak ist mit einer relativen Intensität von 72,2 % dargestellt. Durch die Fragmentierung wurde gezeigt, dass es sich im Fall der m/z 634,36 um eine Neu5Ac-Gal Struktur handelt. Das O-Glykan $\text{Hex}_1\text{HexNAC}_1$ (m/z 518,25) wurde auch bei GM-CSF aus CHO-Zellen gefunden, während die

anderen vier O-Glykane neue O-Glykanstrukturen des GM-CSF darstellen.

Die Oligosaccharide von GM-CSF besitzen wichtige Funktionen, z. B. Pharmakokinetik [Donahue et al, 1986a; Hovgaard et al, 1992], Toxizität [Denzlinger et al, 1993; Dorr 1993] und Immunogenität [Gribben et al., 1990; Wadhwa et al., 1996]. Es ist bekannt, dass sich Monozyten in Gegenwart von GM-CSF zu Makrophagen differenzieren [Santin et al., 1999].

Heutzutage wird GM-CSF aus *E.coli* und *Saccharomyces cerevisiae* für klinische Applikationen verwendet [Fornio et al., 2004]. Das rekombinant hergestellte rhGM-CSF, Sagramostim (Leukine®), wurde als Medikament eingesetzt und ist ein hämatologischer Wachstumsfaktor.

6. Literaturverzeichnis

Allhorn, M., A. I. Olin, et al. Human IgG/Fc gamma R interactions are modulated by streptococcal IgG glycan hydrolysis. *PLoS One* 2008. 3: e1413.

Alvarez-Manilla, G., J. Atwood, 3rd, et al. Tools for glycoproteomic analysis: size exclusion chromatography facilitates identification of tryptic glycopeptides with N-linked glycosylation sites. *J Proteome Res* 2006. 5: 701-8.

Amoresano, A., A. Andolfo, et al. Structural characterization and independent folding of a chimeric glycoprotein comprising granulocyte-macrophage colony stimulating factor and erythropoietin sequences. *Glycobiology* 1998. 8: 779-90.

Andreeff, M. and K. Welte. Hematopoietic colony-stimulating factors. *Semin Oncol* 1989. 16: 211-29.

Annesley, T. M. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem* 2003. 49: 1041-4.

Anthonisen, N. R., J. E. Connett, et al. Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of FEV1. The Lung Health Study. *Jama* 1994. 272: 1497-505.

Anthony, R. M., F. Nimmerjahn, et al. Recapitulation of IVIG anti-inflammatory activity with a recombinant IgG Fc. *Science* 2008. 320: 373-6.

Antman, K. S., J. D. Griffin, et al. Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression. *N Engl J Med* 1988. 319: 593-8.

Apweiler, R., H. Hermjakob, et al. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta* 1999. 1473: 4-8.

Ashwell, G. and J. Harford. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem* 1982. 51: 531-54.

Barker, A. F., F. Siemsen, et al. Replacement therapy for hereditary alpha1-antitrypsin deficiency. A program for long-term administration. *Chest* 1994. 105: 1406-10.

Baumann, U., R. Huber, et al. Crystal structure of cleaved human alpha 1-antichymotrypsin at 2.7 Å resolution and its comparison with other serpins. *J Mol Biol* 1991. 218: 595-606.

Beatty, K., J. Bieth, et al. Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin. *J Biol Chem* 1980. 255: 3931-4.

Berg, J. M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. *Stryer Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, 2007.

- Bergwerff, A. A., J. van Oostrum, et al. Primary structure of N-linked carbohydrate chains of a human chimeric plasminogen activator K2tu-PA expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem* 1993. 212: 639-56.
- Biedermann A., K. T. Alpha-1-Antitrypsin-Mangel. *Dtsch Arztlbl* 2006. 26: 1828-1832
- Blanchard, V., M. Frank, et al. The structural basis of the difference in sensitivity for PNGase F in the de-N-glycosylation of the native bovine pancreatic ribonucleases B and BS. *Biochemistry* 2008. 47: 3435-46.
- Brandt, S. J., W. P. Peters, et al. Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on hematopoietic reconstitution after high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1988. 318: 869-76.
- Brantly, M., T. Nukiwa, et al. Molecular basis of alpha-1-antitrypsin deficiency. *Am J Med* 1988. 84: 13-31.
- Brantly, M. L., J. T. Wittes, et al. Use of a highly purified alpha 1-antitrypsin standard to establish ranges for the common normal and deficient alpha 1-antitrypsin phenotypes. *Chest* 1991. 100: 703-8.
- Brockhausen, I., J. M. Yang, et al. Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells. *Eur J Biochem* 1995. 233: 607-17.
- Brown, W. M. rAAt (dermatological) Arriva/ProMetic. *Curr Opin Mol Ther* 2006. 8: 69-75.
- Budnik, B. A., R. S. Lee, et al. Global methods for protein glycosylation analysis by mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta* 2006. 1764: 1870-80.
- Bunkenborg, J., B. J. Pilch, et al. Screening for N-glycosylated proteins by liquid chromatography mass spectrometry. *Proteomics* 2004. 4: 454-65.
- Burgess, A. W., C. G. Begley, et al. Purification and properties of bacterially synthesized human granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Blood* 1987. 69: 43-51.
- Burgess, A. W., J. Camakaris, et al. Purification and properties of colony-stimulating factor from mouse lung-conditioned medium. *J Biol Chem* 1977. 252: 1998-2003.
- Byres, E., A. W. Paton, et al. Incorporation of a non-human glycan mediates human susceptibility to a bacterial toxin. *Nature* 2008. 456: 648-52.
- Carr, S. A., M. J. Huddleston, et al. Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry. *Protein Sci* 1993. 2: 183-96.
- Carrell, R. W., J. O. Jeppsson, et al. Structure and variation of human alpha 1-antitrypsin. *Nature* 1982. 298: 329-34.

- Casolaro, M. A., G. Fells, et al. Augmentation of lung antineutrophil elastase capacity with recombinant human alpha-1-antitrypsin. *J Appl Physiol* (1985) 1987. 63: 2015-23.
- Champlin, R. E., S. D. Nimer, et al. Treatment of refractory aplastic anemia with recombinant human granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor. *Blood* 1989. 73: 694-9.
- Chill, L., L. Trinh, et al. Production, purification, and characterization of human alpha1 proteinase inhibitor from *Aspergillus niger*. *Biotechnol Bioeng* 2009. 102: 828-44.
- Ciucanu, I., Kerek, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. *Carbohydrate Research* 1984. 131: 209-217.
- Clark, S. C. and R. Kamen. The human hematopoietic colony-stimulating factors. *Science* 1987. 236: 1229-37.
- Collin, M. and A. Olsen. EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG. *Embo J* 2001. 20: 3046-55.
- Collin, M., M. D. Svensson, et al. EndoS and SpeB from *Streptococcus pyogenes* inhibit immunoglobulin-mediated opsonophagocytosis. *Infect Immun* 2002. 70: 6646-51.
- Conradt, H. S., Gawlitzek, M., Grabenhorst, E., Hoffmann, A., Nimtz, M., Oltmanns-Bleck, F., Pohl, S. Modulation of the carbohydrate structures of recombinant human glycoprotein therapeutics. Tokyo, Blackwell science, 1995.
- Cumming, D. A. Glycosylation of recombinant protein therapeutics: control and functional implications. *Glycobiology* 1991. 1: 115-30.
- Dabbagh, K., G. J. Laurent, et al. Alpha-1-antitrypsin stimulates fibroblast proliferation and procollagen production and activates classical MAP kinase signalling pathways. *J Cell Physiol* 2001. 186: 73-81.
- Dalpiatz, O., H. J. Knopf, et al. Mid-term complications after placement of the male adjustable suburethral sling: a single center experience. *J Urol* 186: 604-9.
- de Beer T, V. J., Löffler A, Hofsteenge J. The hexopyranosyl residue that is C-glycosidically linked to the side chain of tryptophan-7 in human RNase Us is alpha-mannopyranose. *Biochemistry* 1995. 34: 11785-9.
- Deguchi, K., T. Keira, et al. Two-dimensional hydrophilic interaction chromatography coupling anion-exchange and hydrophilic interaction columns for separation of 2-pyridylamino derivatives of neutral and sialylated N-glycans. *J Chromatogr A* 2008. 1189: 169-74.
- Dell, A., Chalabi, S., Hitchen, P.G., Jang-Lee, J., Ledger, V., North, S.J., Pang, P.-C., Parry, S., Sutton-Smith, M., Tissot, B., Morris, H.R., Panico, M., Haslam, S.M. Mass Spectrometry of glycoprotein glycans: Glycomics and glycoproteomics, in *Comprehensive Glycoscience from Chemistry to Systems Biology*, Elsevier, 2007.

Denzlinger, C., W. Tetzloff, et al. Differential activation of the endogenous leukotriene biosynthesis by two different preparations of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in healthy volunteers. *Blood* 1993. 81: 2007-13.

Ding, D. X., J. C. Vera, et al. N-glycosylation of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha subunit is essential for ligand binding and signal transduction. *J Biol Chem* 1995. 270: 24580-4.

Dirksen, A., E. Piitulainen, et al. Exploring the role of CT densitometry: a randomised study of augmentation therapy in alpha1-antitrypsin deficiency. *Eur Respir J* 2009. 33: 1345-53.

Dölle, G. (1987). Alpha-1-Antitrypsin und saures alpha-1-Glykoprotein als Arthrose-Indikatoren. Med. Diss. Würzburg. Würzburg.

Domon, B. and C. E. Costello. Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry. *Biochemistry* 1988. 27: 1534-43.

Donahue, R. E., E. A. Wang, et al. Effects of N-linked carbohydrate on the in vivo properties of human GM-CSF. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986a. 51 Pt 1: 685-92.

Donahue, R. E., E. A. Wang, et al. Stimulation of haematopoiesis in primates by continuous infusion of recombinant human GM-CSF. *Nature* 1986b. 321: 872-5.

Dorr, R. T. Clinical properties of yeast-derived versus *Escherichia coli*-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Clin Ther* 1993. 15: 19-29; discussion 18.

Doucey, M. A., D. Hess, et al. Protein C-mannosylation is enzyme-catalysed and uses dolichyl-phosphate-mannose as a precursor. *Mol Biol Cell* 1998. 9: 291-300.

Drickamer, K. Clearing up glycoprotein hormones. *Cell* 1991. 67: 1029-32.

Eigel, S. (2008). Untersuchungen zum Einfluss unterschiedlicher Expressionsparameter auf die Glykosylierung am Beispiel des humanen Alpha-1 Antitrypsins. Biology, Freien Universität Berlin.

Emerson, S. G., S. Thomas, et al. Developmental regulation of erythropoiesis by hematopoietic growth factors: analysis on populations of BFU-E from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver. *Blood* 1989. 74: 49-55.

Eriksson, S., J. Carlson, et al. Risk of cirrhosis and primary liver cancer in alpha 1-antitrypsin deficiency. *N Engl J Med* 1986. 314: 736-9.

Fairbanks, K. D. and A. S. Tavill. Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review. *Am J Gastroenterol* 2008. 103: 2136-41; quiz 2142.

Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F. Electrospray ionization-Principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews* 1990. 9: 37-70.

Forno, G., M. Bollati Fogolin, et al. N- and O-linked carbohydrates and glycosylation site occupancy in recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor secreted by a Chinese hamster ovary cell line. *Eur J Biochem* 2004. 271: 907-19.

Furmanek, A., D. Hess, et al. The WSAWS motif is C-hexosylated in a soluble form of the erythropoietin receptor. *Biochemistry* 2003. 42: 8452-8.

Furmanek, A. and J. Hofsteenge. Protein C-mannosylation: facts and questions. *Acta Biochim Pol* 2000. 47: 781-9.

Gabius, H. J. *The Sugar Code: Fundamentals of Glycosciences*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2009.

Gao, H. Y. Generation of asparagine-linked glycan structure databases and their use. *J Am Soc Mass Spectrom* 2009. 20: 1739-42.

Gavel, Y. and G. von Heijne. Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. *Protein Eng* 1990. 3: 433-42.

Geng, M., X. Zhang, et al. Proteomics of glycoproteins based on affinity selection of glycopeptides from tryptic digests. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001. 752: 293-306.

Gey, M. H. *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik*, Springer, 2008.

Geyer, H. and R. Geyer. Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation. *Biochim Biophys Acta* 2006. 1764: 1853-69.

Gilar, M., Y. Q. Yu, et al. Characterization of glycoprotein digests with hydrophilic interaction chromatography and mass spectrometry. *Anal Biochem* 2011. 417: 80-8.

Glasgow, L. R., J. C. Paulson, et al. Systematic purification of five glycosidases from *Streptococcus* (*Diplococcus*) *pneumoniae*. *J Biol Chem* 1977. 252: 8615-23.

Glaspay, J. A. and D. W. Golde. Clinical applications of the myeloid growth factors. *Semin Hematol* 1989. 26: 14-7.

Gonzalez de Peredo, A., D. Klein, et al. C-mannosylation and o-fucosylation of thrombospondin type 1 repeats. *Mol Cell Proteomics* 2002. 1: 11-8.

Goodarzi, M. T., J. S. Axford, et al. Sialyl Lewis(x) expression on IgG in rheumatoid arthritis and other arthritic conditions: a preliminary study. *Glycoconj J* 1998. 15: 1149-54.

Gough, N. M., J. Gough, et al. Cloning and expression of the gene for murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Haematol Blood Transfus* 1985. 29: 380-4.

Graf, H. J., Konietzko, N. . Substitutionstherapie bei schwerem Alpha-1 Proteasen Inhibitor-Mangel und

Lungenemphysem. Dtsch Ärztebl. 1992. 33: 2701–2703

Gribben, J. G., S. Devereux, et al. Development of antibodies to unprotected glycosylation sites on recombinant human GM-CSF. *Lancet* 1990. 335: 434-7.

Griese, M., P. Latzin, et al. alpha1-Antitrypsin inhalation reduces airway inflammation in cystic fibrosis patients. *Eur Respir J* 2007. 29: 240-50.

Gröbe, D. (2008). Biochemische Modifikation von Glykan-Strukturen durch nicht natürlich Monosaccharid und ihr Einfluss auf die Sialidase-Resistenz. *Biologie, Chemie, Pharmazie Berlin, Freien Universität Berlin.*

Groopman, J. E., R. T. Mitsuyasu, et al. Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on myelopoiesis in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1987. 317: 593-8.

Guzdek, A., J. Potempa, et al. Comparative properties of human alpha-1-proteinase inhibitor glycosylation variants. *FEBS Lett* 1990. 272: 125-7.

Hagglund, P., J. Bunkenborg, et al. A new strategy for identification of N-glycosylated proteins and unambiguous assignment of their glycosylation sites using HILIC enrichment and partial deglycosylation. *J Proteome Res* 2004. 3: 556-66.

Haltiwanger, R. S. and J. B. Lowe. Role of glycosylation in development. *Annu Rev Biochem* 2004. 73: 491-537.

Harmon, B. J., X. Gu, et al. Rapid monitoring of site-specific glycosylation microheterogeneity of recombinant human interferon-gamma. *Anal Chem* 1996. 68: 1465-73.

Hart, G. W., K. Brew, et al. Primary structural requirements for the enzymatic formation of the N-glycosidic bond in glycoproteins. Studies with natural and synthetic peptides. *J Biol Chem* 1979. 254: 9747-53.

Hartmann, S. and J. Hofsteenge. Properdin, the positive regulator of complement, is highly C-mannosylated. *J Biol Chem* 2000. 275: 28569-74.

Haurum, J. S., G. Arsequell, et al. Recognition of carbohydrate by major histocompatibility complex class I-restricted, glycopeptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1994. 180: 739-44.

Haurum, J. S., L. Tan, et al. Peptide anchor residue glycosylation: effect on class I major histocompatibility complex binding and cytotoxic T lymphocyte recognition. *Eur J Immunol* 1995. 25: 3270-6.

Helenius, A. and M. Aebi. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 2001. 291: 2364-9.

Heyne, K., Tegtmeier, FK. ; Henke-Wolter, J., Ziesenitz, S., . Alpha-1-Antitrypsin als Modell-Glykoprotein: Modifikation des genetisch determinierten Phänotyps durch nutritiv-metabolische Einflüsse und in der

- Akute-Phase-Reaktion. *M Schr Kinderheilk* 1988. 136: 511.
- Heyne, K., F. K. Tegtmeyer, et al. Variation of alpha 1-antitrypsin glycoprotein microheterogeneity in hepatic postresuscitation disease. *Eur J Pediatr* 1990. 149: 789-91.
- Hiddemann, W. [Hematopoietic growth factors. Current status of therapy]. *Internist (Berl)* 1994. 35: 395-400.
- Hills, A. E., A. Patel, et al. Metabolic control of recombinant monoclonal antibody N-glycosylation in GS-NS0 cells. *Biotechnol Bioeng* 2001. 75: 239-51.
- Hirabayashi, J. Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. *Glycoconj J* 2004. 21: 35-40.
- Hofsteenge, J., M. Blommers, et al. The four terminal components of the complement system are C-mannosylated on multiple tryptophan residues. *J Biol Chem* 1999. 274: 32786-94.
- Hofsteenge, J., K. G. Huwiler, et al. C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. *J Biol Chem* 2001. 276: 6485-98.
- Hofsteenge, J., D. R. Muller, et al. New type of linkage between a carbohydrate and a protein: C-glycosylation of a specific tryptophan residue in human RNase Us. *Biochemistry* 1994. 33: 13524-30.
- Hokke, C. H., A. A. Bergwerff, et al. Sialylated carbohydrate chains of recombinant human glycoproteins expressed in Chinese hamster ovary cells contain traces of N-glycolylneuraminic acid. *FEBS Lett* 1990. 275: 9-14.
- Horiuchi, M. and B. Caughey. Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *Embo J* 1999. 18: 3193-203.
- Hovgaard, D., B. T. Mortensen, et al. Clinical pharmacokinetic studies of a human haemopoietic growth factor, GM-CSF. *Eur J Clin Invest* 1992. 22: 45-9.
- Hrycaj, P., S. Nayyar, et al. Microheterogeneity of alpha 1-antitrypsin in relation to the concentration of its complex with immunoglobulin A in the sera of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1996. 14: 119-23.
- Huddleston, M. J., M. F. Bean, et al. Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests. *Anal Chem* 1993. 65: 877-84.
- Huebner, K., M. Isobe, et al. The human gene encoding GM-CSF is at 5q21-q32, the chromosome region deleted in the 5q- anomaly. *Science* 1985. 230: 1282-5.
- Huntington, J. A., R. J. Read, et al. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation.

Nature 2000. 407: 923-6.

Hussein, A. M., M. Ross, et al. Effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor produced in Chinese hamster ovary cells (regramostim), Escherichia coli (molgramostim) and yeast (sargramostim) on priming peripheral blood progenitor cells for use with autologous bone marrow after high-dose chemotherapy. Eur J Haematol 1995. 54: 281-7.

Janciauskiene, S., I. Zelvyte, et al. Divergent effects of alpha1-antitrypsin on neutrophil activation, in vitro. Biochem Biophys Res Commun 2004. 315: 288-96.

Jenkins, N., R. B. Parekh, et al. Getting the glycosylation right: implications for the biotechnology industry. Nat Biotechnol 1996. 14: 975-81.

Johansen, H., J. Sutiphong, et al. High-level production of fully active human alpha 1-antitrypsin in Escherichia coli. Mol Biol Med 1987. 4: 291-305.

Johnson, D. and J. Travis. Structural evidence for methionine at the reactive site of human alpha-1-proteinase inhibitor. J Biol Chem 1978. 253: 7142-4.

Johnson, D. and J. Travis. The oxidative inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor. Further evidence for methionine at the reactive center. J Biol Chem 1979. 254: 4022-6.

Kamerling, J. P. Comprehensive Glycoscience from Chemistry to System Biology Elsevier 2007.

Kaneko, Y., F. Nimmerjahn, et al. Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. Science 2006. 313: 670-3.

Kaplan, H. A., J. K. Welply, et al. Oligosaccharyl transferase: the central enzyme in the pathway of glycoprotein assembly. Biochim Biophys Acta 1987. 906: 161-73.

Karlsson, G., E. Swerup, et al. Combination of two hydrophilic interaction chromatography methods that facilitates identification of 2-aminobenzamide-labeled oligosaccharides. J Chromatogr Sci 2008. 46: 68-73.

Karnaukhova, E., Y. Ophir, et al. Recombinant human alpha-1 proteinase inhibitor: towards therapeutic use. Amino Acids 2006. 30: 317-32.

Kaushansky, K., J. A. Lopez, et al. Role of carbohydrate modification in the production and secretion of human granulocyte macrophage colony-stimulating factor in genetically engineered and normal mesenchymal cells. Biochemistry 1992. 31: 1881-6.

Kaushansky, K., P. J. O'Hara, et al. Genomic cloning, characterization, and multilineage growth-promoting activity of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Proc Natl Acad Sci U S A 1986. 83: 3101-5.

- Kawasaki, N., S. Itoh, et al. LC/MSn for glycoprotein analysis: N-linked glycosylation analysis and peptide sequencing of glycopeptides. *Methods Mol Biol* 2009. 534: 239-48.
- Kelm, S. and R. Schauer. Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int Rev Cytol* 1997. 175: 137-240.
- Köhnlein, T., Welte, T. . Alpha-1 Antitrypsin Deficiency - Clinical Aspects and Management UNI-MED Verlag AG, 2007.
- Kohnlein, T., H. Klein, et al. [Alpha 1-protease inhibitor deficiency. Diagnosis, follow-up and therapy options]. *Med Klin (Munich)* 1999. 94: 371-6.
- Kohnlein, T. and K. Rifai. [Alpha1-antitrypsin deficiency]. *Internist (Berl)* 2010. 51 Suppl 1: 269-76.
- Kolarich, D., P. L. Turecek, et al. Biochemical, molecular characterization, and glycoproteomic analyses of alpha(1)-proteinase inhibitor products used for replacement therapy. *Transfusion* 2006b. 46: 1959-77.
- Kolarich, D., A. Weber, et al. Comprehensive glyco-proteomic analysis of human alpha1-antitrypsin and its charge isoforms. *Proteomics* 2006a. 6: 3369-80.
- Kreutzig, T. *Kurzlehrbuch Biochemie* Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2006.
- Krieg, J., S. Hartmann, et al. Recognition signal for C-mannosylation of Trp-7 in RNase 2 consists of sequence Trp-x-x-Trp. *Mol Biol Cell* 1998. 9: 301-9.
- Kueppers, F. and L. F. Black. Alpha1-antitrypsin and its deficiency. *Am Rev Respir Dis* 1974. 110: 176-94.
- Kuhn, P., C. Guan, et al. Active site and oligosaccharide recognition residues of peptide-N4-(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl)asparagine amidase F. *J Biol Chem* 1995. 270: 29493-7.
- Kushner, I. Regulation of the acute phase response by cytokines. *Perspect Biol Med* 1993. 36: 611-22.
- Kwon, K. S., M. Song, et al. Purification and characterization of alpha 1-antitrypsin secreted by recombinant yeast *Saccharomyces diastaticus*. *J Biotechnol* 1995. 42: 191-5.
- Kwon, K. S. and M. H. Yu. Effect of glycosylation on the stability of alpha1-antitrypsin toward urea denaturation and thermal deactivation. *Biochim Biophys Acta* 1997. 1335: 265-72.
- Larsen, M. R., P. Hojrup, et al. Characterization of gel-separated glycoproteins using two-step proteolytic digestion combined with sequential microcolumns and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2005. 4: 107-19.
- Laurell, C. B. and S. Eriksson. The electrophoretic alpha1-globulin pattern of serum in alpha1-antitrypsin deficiency. 1963. *Copd* 1963. 10 Suppl 1: 3-8.
- Li, Y., C. Cao, et al. Structure of the F-spondin domain of mindin, an integrin ligand and pattern recognition

molecule. *Embo J* 2009. 28: 286-97.

Lieberman, J. Augmentation therapy reduces frequency of lung infections in antitrypsin deficiency: a new hypothesis with supporting data. *Chest* 2000. 118: 1480-5.

Lis, H. and N. Sharon. Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition. *Chem Rev* 1998. 98: 637-674.

Liu, X.-C. S., W.H. boronic acids as selective ligands for affinity chromatography. New York, Taylor and Francis(CRC Press), 2002.

Löffler, G. Funktionelle Biochemie, Eine Einführung in die medizinische Biochemie, Springer-Lehrbuch, 1993.

Lo-Guidice, J. M. and M. Lhermitte. HPLC of oligosaccharides in glycobiology. *Biomed Chromatogr* 1996. 10: 290-6.

Lomas, D. A. Molecular mousetraps, alpha1-antitrypsin deficiency and the serpinopathies. *Clin Med* 2005. 5: 249-57.

Lomas, D. A. and H. Parfrey. Alpha1-antitrypsin deficiency. 4: Molecular pathophysiology. *Thorax* 2004. 59: 529-35.

Lottspeich, F., Zorbas, H. Bioanalytik. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag., 1998.

Lottspeich, F., Engels, J.W. Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag, 2006

Lusch, A, et al. Development and Analysis of Alpha 1-Antitrypsin Neoglycoproteins: The Impact of Additional N-Glycosylation Sites on Serum Half-Life. *Molecular pharmaceutics* 2013. 10: 2616-29.

Maass, K., R. Ranzinger, et al. "Glyco-peakfinder"--de novo composition analysis of glycoconjugates. *Proteomics* 2007. 7: 4435-44.

Mackiewicz, A., D. Schultz, et al. Effect of cytokines on glycosylation of acute phase proteins in human hepatoma cell lines. *Clin Exp Immunol* 1989. 75: 70-5.

Marshall, L. J., B. Perks, et al. IL-8 released constitutively by primary bronchial epithelial cells in culture forms an inactive complex with secretory component. *J Immunol* 2001. 167: 2816-23.

Matzuk, M. M., C. M. Kornmeier, et al. The glycoprotein alpha-subunit is critical for secretion and stability of the human thyrotropin beta-subunit. *Mol Endocrinol* 1988. 2: 95-100.

Mayampurath, A. M., Y. Wu, et al. Improving confidence in detection and characterization of protein N-glycosylation sites and microheterogeneity. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011. 25: 2007-19.

- Mega, T., E. Lujan, et al. Studies on the oligosaccharide chains of human alpha 1-protease inhibitor. II. Structure of oligosaccharides. *J Biol Chem* 1980. 255: 4057-61.
- Merry, A. H., D. C. Neville, et al. Recovery of intact 2-aminobenzamide-labeled O-glycans released from glycoproteins by hydrazinolysis. *Anal Biochem* 2002. 304: 91-9.
- Metcalf, D., C. G. Begley, et al. Biologic properties in vitro of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1986. 67: 37-45.
- Mills, K., P. B. Mills, et al. The underglycosylation of plasma alpha 1-antitrypsin in congenital disorders of glycosylation type I is not random. *Glycobiology* 2003. 13: 73-85.
- Mills, P. B., K. Mills, et al. Analysis by matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry of the post-translational modifications of alpha 1-antitrypsin isoforms separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics* 2001. 1: 778-86.
- Miyajima, A., K. Otsu, et al. Expression of murine and human granulocyte-macrophage colony-stimulating factors in *S. cerevisiae*: mutagenesis of the potential glycosylation sites. *Embo J* 1986. 5: 1193-7.
- Moonen, P., J. J. Mermod, et al. Increased biological activity of deglycosylated recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor produced by yeast or animal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987. 84: 4428-31.
- Morse, J. O. Alpha1-antitrypsin deficiency (second of two parts). *N Engl J Med* 1978a. 299: 1099-105.
- Morse, J. O. alpha1-antitrypsin deficiency (first of two parts). *N Engl J Med* 1978b. 299: 1045-8.
- Musiani, P., L. Lauriola, et al. Inhibitory activity of alpha-1-antitrypsin bound to human IgA. *Clin Chim Acta* 1978. 85: 61-6.
- Neeleman, A. P., W. P. van der Knaap, et al. Identification and characterization of a UDP-GalNAc:GlcNAc beta-R beta 1->4-N-acetylgalactosaminyltransferase from cercariae of the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. Catalysis of a key step in the synthesis of N,N'-diacetyllactosedi amino (lacdiNAc)-type glycans. *Glycobiology* 1994. 4: 641-51.
- Neustroev, K. N., A. M. Golubev, et al. Effect of modification of carbohydrate component on properties of glucoamylase. *FEBS Lett* 1993. 316: 157-60.
- Niklas, J., Y. Nonnenmacher, et al. Quercetin treatment changes fluxes in the primary metabolism and increases culture longevity and recombinant alpha(1)-antitrypsin production in human AGE1.HN cells. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011. 94: 57-67.
- Nuck, R. Enzymatical hydrolysis of N-glycans from glycoproteins and fluorescent labeling by 2-aminobenzamide (2-AB). *Methods Mol Biol* 2002. 194: 37-44.

- Otto, V. I., T. Schurpf, et al. Sialylated complex-type N-glycans enhance the signaling activity of soluble intercellular adhesion molecule-1 in mouse astrocytes. *J Biol Chem* 2004. 279: 35201-9.
- Pabst, M., J. S. Bondili, et al. Mass + retention time = structure: a strategy for the analysis of N-glycans by carbon LC-ESI-MS and its application to fibrin N-glycans. *Anal Chem* 2007. 79: 5051-7.
- Pacis, E., M. Yu, et al. Effects of cell culture conditions on antibody N-linked glycosylation-what affects high mannose 5 glycoform. *Biotechnol Bioeng* 2011.
- Parodi, A. J. Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem* 2000. 69: 69-93.
- Perez-Vilar, J., S. H. Randell, et al. C-Mannosylation of MUC5AC and MUC5B Cys subdomains. *Glycobiology* 2004. 14: 325-37.
- Peter-Katalinic, J. Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins. *Methods Enzymol* 2005. 405: 139-71.
- Peterman, S. M. and J. J. Mulholland. A novel approach for identification and characterization of glycoproteins using a hybrid linear ion trap/FT-ICR mass spectrometer. *J Am Soc Mass Spectrom* 2006. 17: 168-79.
- Pfeifer, B., Preiß, J., Unger, C., . *Onkologie integrativ: Konventionelle und komplementäre Therapie*, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2006.
- Pluda, J. M., R. Yarchoan, et al. Subcutaneous recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor used as a single agent and in an alternating regimen with azidothymidine in leukopenic patients with severe human immunodeficiency virus infection. *Blood* 1990. 76: 463-72.
- Quintero, O., R. Montesino, et al. Two-dimensional mapping of 8-amine-1,3,6-naphthalene trisulfonic acid derivatives of N-linked neutral and sialyloligosaccharides. *Anal Biochem* 1998. 256: 23-32.
- Rademacher, T. W., R. B. Parekh, et al. The role of IgG glycoforms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 1988. 10: 231-49.
- Raman, R., S. Raguram, et al. Glycomics: an integrated systems approach to structure-function relationships of glycans. *Nat Methods* 2005. 2: 817-24.
- Rehm, H., Letzel, T. *Der Experimentator Proteinbiochemie / Proteomics*. München, Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
- Remaley, A. T., M. Ugorski, et al. Expression of human glycoporphin A in wild type and glycosylation-deficient Chinese hamster ovary cells. Role of N- and O-linked glycosylation in cell surface expression. *J Biol Chem* 1991. 266: 24176-83.
- Riedel, U. and G. Geiler. [Immunohistochemical studies of the synovial membrane in rheumatoid arthritis and

osteoarthritis for quantifying lysozyme and alpha-1-antitrypsin positive mononuclear cells]. *Z Rheumatol* 1989. 48: 301-6.

Roggentin, P., R. G. Kleinedam, et al. Diversity in the properties of two sialidase isoenzymes produced by *Clostridium perfringens* spp. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995. 376: 569-75.

Rosenfeld, M. A., W. Siegfried, et al. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha 1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo. *Science* 1991. 252: 431-4.

Rossmann, M. D., Ruiz, P., comber, P., Gomez, F., Rottem, M., Scheiber, A.D. . Modulation of macrophage Fc gamma receptors by rGM-CSF. *Experimental hematology* 1993. 21: 177-83.

Roth, J. Protein N-glycosylation along the secretory pathway: relationship to organelle topography and function, protein quality control, and cell interactions. *Chem Rev* 2002. 102: 285-303.

Rudd, P. M., T. Elliott, et al. Glycosylation and the immune system. *Science* 2001. 291: 2370-6.

Rudd, P. M., T. Endo, et al. Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. 96: 13044-9.

Ruhaak, L. R., A. M. Deelder, et al. Oligosaccharide analysis by graphitized carbon liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2009. 394: 163-74.

Ruhaak, L. R., C. Huhn, et al. Hydrophilic interaction chromatography-based high-throughput sample preparation method for N-glycan analysis from total human plasma glycoproteins. *Anal Chem* 2008. 80: 6119-26.

Schneider, M., G. Pott, et al. [Alpha 1-antitrypsin deficiency: a review with special reference to the significance of heterozygous deficiency]. *Klin Wochenschr* 1986. 64: 197-205.

Schreiber, G., A. Tsykin, et al. The acute phase response in the rodent. *Ann N Y Acad Sci* 1989. 557: 61-85; discussion 85-6.

Seymour, J. L., C. E. Costello, et al. The influence of sialylation on glycan negative ion dissociation and energetics. *J Am Soc Mass Spectrom* 2006. 17: 844-54.

Sieff, C. A., S. G. Emerson, et al. Human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: a multilineage hematopoietin. *Science* 1985. 230: 1171-3.

Song, H.K., et al. Crystal structure of an uncleaved alpha 1-antitrypsin reveals the conformation of its inhibitory reactive loop. *FEBS Lett.* 1995 Dec 18;377(2):150-4.

Sparbier, K., S. Koch, et al. Selective isolation of glycoproteins and glycopeptides for MALDI-TOF MS detection supported by magnetic particles. *J Biomol Tech* 2005. 16: 407-13.

Spencer, L. T., J. E. Humphries, et al. Antibody response to aerosolized transgenic human alpha1-antitrypsin. *N Engl J Med* 2005. 352: 2030-1.

Spiro, R. G. Protein glycosylation:nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 2002. 12: 43-56.

Stanley, E. R., G. Hansen, et al. Colony stimulating factor and the regulation of granulopoiesis and macrophage production. *Fed Proc* 1975. 34: 2272-8.

Stimson, E., J. Hope, et al. Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry* 1999. 38: 4885-95.

Stockley, R. A., D. L. Bayley, et al. The effect of augmentation therapy on bronchial inflammation in alpha1-antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 2002. 165: 1494-8.

Subramaniam, D., R. Virtala, et al. TNF-alpha-induced self expression in human lung endothelial cells is inhibited by native and oxidized alpha1-antitrypsin. *Int J Biochem Cell Biol* 2008. 40: 258-71.

Taggart, C., D. Cervantes-Laurean, et al. Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. *J Biol Chem* 2000. 275: 27258-65.

Tajiri, M., S. Yoshida, et al. Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment. *Glycobiology* 2005. 15: 1332-40.

Takegawa, Y., K. Deguchi, et al. Simple separation of isomeric sialylated N-glycopeptides by a zwitterionic type of hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* 2006. 29: 2533-40.

Takegawa, Y., K. Deguchi, et al. Separation of isomeric 2-aminopyridine derivatized N-glycans and N-glycopeptides of human serum immunoglobulin G by using a zwitterionic type of hydrophilic-interaction chromatography. *J Chromatogr A* 2006. 1113: 177-81.

Takegawa, Y., H. Ito, et al. Profiling of N- and O-glycopeptides of erythropoietin by capillary zwitterionic type of hydrophilic interaction chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *J Sep Sci* 2008. 31: 1585-93.

Taylor, M. E., Drickamer, K. *Introduction to Glycobiology*, Oxford university press, 2003.

Todd, N. J., J. T. Whicher, et al. The acute phase protein response in mice does not show tolerance to recurrent sterile inflammation. *Clin Chim Acta* 1990. 189: 47-54.

Ullmer, R. and A. M. Rizzi. Use of a novel ionic liquid matrix for MALDI-MS analysis of glycopeptides and glycans out of total tryptic digests. *J Mass Spectrom* 2009. 44: 1596-603.

Van den Eijnden, D. H., A. P. Neeleman, et al. Control and function of complex-type oligosaccharide synthesis. Novel variants of the lacNAc pathway. *Adv Exp Med Biol* 1995. 376: 47-52.

Van den Nieuwenhof, I. M., H. Koistinen, et al. Recombinant glycodelin carrying the same type of glycan structures as contraceptive glycodelin-A can be produced in human kidney 293 cells but not in chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem* 2000. 267: 4753-62.

Van den Steen, P., P. M. Rudd, et al. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1998. 33: 151-208.

Van Steenberghe, W. Alpha 1-antitrypsin deficiency: an overview. *Acta Clin Belg* 1993. 48: 171-89.

Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* 1993. 3: 97-130.

Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J. *Essentials of Glycobiology*, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

Varki, A., R. Kannagi, et al. *Glycosylation Changes in Cancer*. 2009.

Vaughan, L., M. A. Lorier, et al. alpha 1-Antitrypsin microheterogeneity. Isolation and physiological significance of isoforms. *Biochim Biophys Acta* 1982. 701: 339-45.

Wada, Y., P. Azadi, et al. Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans--HUPO Human Disease Glycomics/Proteome Initiative multi-institutional study. *Glycobiology* 2007. 17: 411-22.

Wada, Y., M. Tajiri, et al. Hydrophilic affinity isolation and MALDI multiple-stage tandem mass spectrometry of glycopeptides for glycoproteomics. *Anal Chem* 2004. 76: 6560-5.

Wadhwa, M., C. Bird, et al. Production of neutralizing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) antibodies in carcinoma patients following GM-CSF combination therapy. *Clin Exp Immunol* 1996. 104: 351-8.

Wang, Y., S. L. Wu, et al. Approaches to the study of N-linked glycoproteins in human plasma using lectin affinity chromatography and nano-HPLC coupled to electrospray linear ion trap--Fourier transform mass spectrometry. *Glycobiology* 2006. 16: 514-23.

Weber, W., K. Steube, et al. Unglycosylated rat alpha 1-proteinase inhibitor has a six-fold shorter plasma half-life than the mature glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 1985. 126: 630-5.

Weerapana, E. and B. Imperiali. Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* 2006. 16: 91R-101R.

Weisbart, R. H., D. W. Golde, et al. Biosynthetic human GM-CSF modulates the number and affinity of neutrophil f-Met-Leu-Phe receptors. *J Immunol* 1986. 137: 3584-7.

Werner, R. G., K. Kopp, et al. Glycosylation of therapeutic proteins in different production systems. *Acta Paediatr Suppl* 2007. 96: 17-22.

Whitehouse, D. B., J. U. Lovegrove, et al. Variation in alpha-1-antitrypsin phenotypes associated with penicillamine therapy. *Clin Chim Acta* 1989. 179: 109-15.

Wilson, N. L., B. L. Schulz, et al. Sequential analysis of N- and O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins. *J Proteome Res* 2002. 1: 521-9.

Wright, G., A. Carver, et al. High level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology (N Y)* 1991. 9: 830-4.

Wuhrer, M., A. M. Deelder, et al. Protein glycosylation analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005a. 825: 124-33.

Wuhrer, M., C. A. Koeleman, et al. Protein glycosylation analyzed by normal-phase nano-liquid chromatography--mass spectrometry of glycopeptides. *Anal Chem* 2005b. 77: 886-94.

Wyss, D. F., J. S. Choi, et al. Conformation and function of the N-linked glycan in the adhesion domain of human CD2. *Science* 1995. 269: 1273-8.

Yang, Z. and W. S. Hancock. Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. *J Chromatogr A* 2004. 1053: 79-88.

Yang, Z. and W. S. Hancock. Monitoring glycosylation pattern changes of glycoproteins using multi-lectin affinity chromatography. *J Chromatogr A* 2005. 1070: 57-64.

Yet, M. G. and F. Wold. The distribution of glycan structures in individual N-glycosylation sites in animal and plant glycoproteins. *Arch Biochem Biophys* 1990. 278: 356-64.

Zarei, S., F. Schwenter, et al. Role of GM-CSF signaling in cell-based tumor immunization. *Blood* 2009. 113: 6658-68.

Zbikowska, H. M., N. Soukhareva, et al. Uromodulin promoter directs high-level expression of biologically active human alpha1-antitrypsin into mouse urine. *Biochem J* 2002. 365: 7-11.

7. Anhang

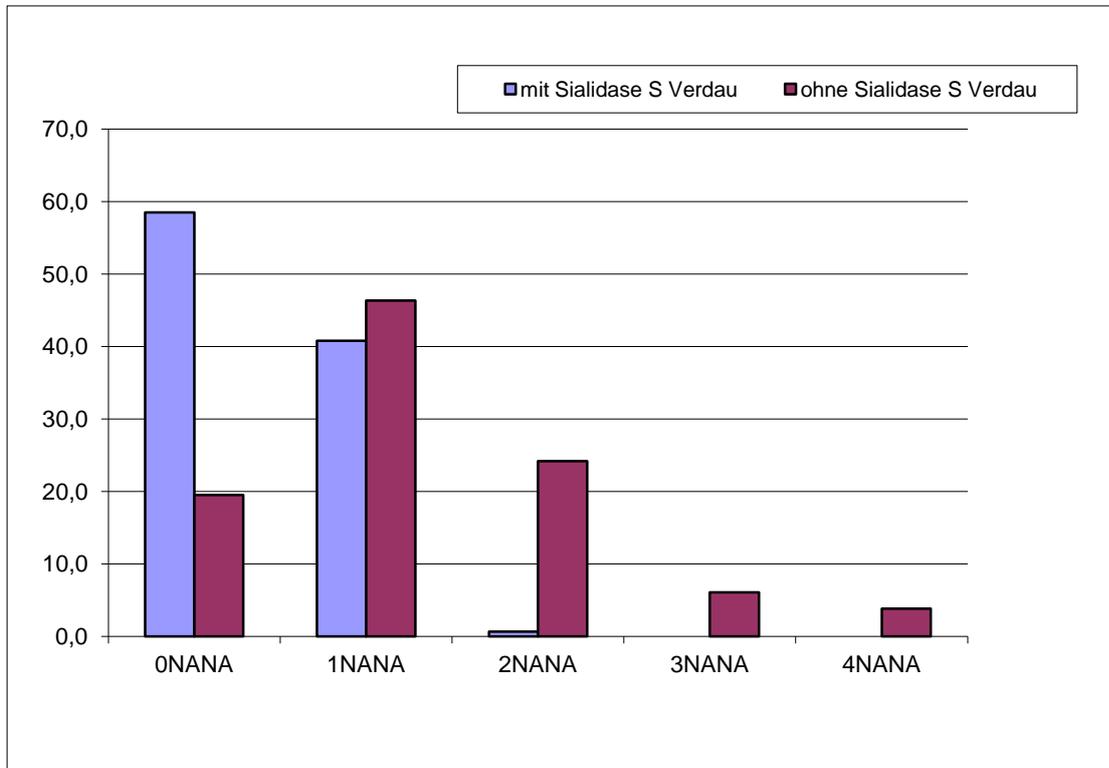


Abb. 46 Vergleichen des Sialylierungsgrades der N-Glykane

MWLQSLLLGTVAC SISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRD TAAEMNETVEVI
 SEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGS LTKLKGPLTMMASHYKQHC PPTPETS CATQIITF
 ESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE

Abb. 47 Aminosäuresequenz des GM-CSF. Die N-Glykosylierungsstellen sind gelb markiert. Die O-Glykosylierungsstelle sind rosa markiert.

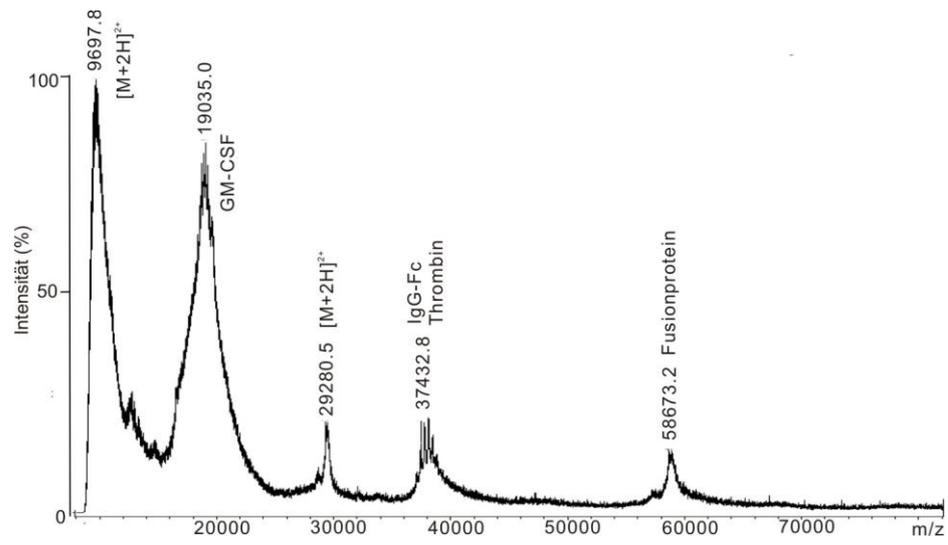


Abb. 48 Molekular Masse des Fusionprotein GM-CSF und IgG-Fc

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9. Publikationslist

Publikation

“N-Glycosylation and biological activity of recombinant human alpha-1- antitrypsin expressed in a human neuronal cell line”

Véronique Blanchard*, **Xi Liu***, Susann Eigel, Matthias Kaup, Silke Rieck, Sabina Janciauskiene, Volker Sanding, Uwe Marx, Peter Walden, Rudolf Tauber and Markus Berger
*equally contributed to this work,

Biotechnology & Bioengineering, 2011, 108(9):2118-28

Präsentationen und Poster

Vortrag „Ortsgenaue Glykoanalytik“, BMBF -InnoProfile - Statusseminar 2010,
Glykodesign und Glykoanalytik - Neue Perspektiven für Medizin und Biotechnologie
(04/2010)

Poster “Site Specificity of Alpha1-Antitrypsin expressed in a novel human neuronal cell line using Nano-LC-MS and MALDI-MS“, 20th Joint Meeting Glycobiology (11/2009)

Poster „N-glycosylation and biological activity of recombinant human Alpha1-Antitrypsin expressed in a novel human neuronal cell line“,
5th Glycan Forum (03/2011)

10. Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Tauber für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Ein großer Dank geht an Frau Dr. Véronique Blanchard für das Vertrauen und die Bereitstellung des Doktorarbeitsthemas und die Möglichkeit, die Arbeit zu diesem neuen und interessanten Thema der Glykobiologie durchführen zu können. Des Weiteren danke ich ihr für die immer wieder aufmunternden, motivierenden Worte.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Markus Berger für die wissenschaftliche Hilfe und die zahlreichen Anregungen zum Vertiefen des Themas, sowie seine ansteckende Begeisterung bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Dr. Matthias Kaup für die Anregungen und Verbesserungsvorschläge bei der Durchsicht der Arbeit.

Dank gebührt auch Herrn Detlef Grunow für die Hilfestellungen. Er fand stets Zeit, geduldig meine unzähligen Fragen zu beantworten und die Tücken der Technik zu meistern.

Bei meiner lieben KollegInnen Dr. Lena Frisch, Christian Schwedler, Dominique Petzold und Christiane Hoffmann möchte ich mich gern für die Hilfe beim Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Der Arbeitsgruppe GlykoAnalytik verdanke ich eine tolle Zusammenarbeit, die freundliche Atmosphäre und die unendliche Geduld, mit der mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden wurde. Hieran waren vor allem Dr. Houda Montacir, Karina Biskup, Dr. Christiane Ogorek, Dr. Stefan Risch, Aryaline Kamalakumar, Dr. Astrid Lusch und Vanessa Frenz beteiligt. Die Arbeit mit Euch hat mir viel Spaß gemacht und ich werde mich immer gerne an diese schöne Zeit erinnern.

Vielen Dank an Dr. Figen Beceren-Braun für deine Freundschaft und die Hilfe beim Korrekturlesen.

Das Beste zum Schluss: ich danke meinen Eltern, meinem Mann Yuan und meiner Tochter Iwa für die Unterstützung und das Vertrauen. Danke für die schönen Tage bisher und die noch vielen kommenden in der Zukunft.

11. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Xi Liu, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Charakterisierung der Glykosylierungsstelle von Glykoproteinen mittels Matrix-unterstützter Laserdesorption / Ionisations- (MALDI) und Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Xi Liu hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

“N-Glycosylation and biological activity of recombinant human alpha-1- antitrypsin expressed in a human neuronal cell line”

Véronique Blanchard*, Xi Liu*, Susann Eigel, Matthias Kaup, Silke Rieck, Sabina Janciauskiene, Volker Sanding, Uwe Marx, Peter Walden, Rudolf Tauber and Markus Berger

*equally contributed to this work,

Biotechnology & Bioengineering,2011,108(9):2118-28

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin