Untersuchung des N-Glykanprofils in Seren von Borderline-Ovarial-/ Kolonkarzinom-Patienten zur Identifikation von potentiellen Biomarkern

Etablierung der Mikroarraytechnik / In-Gel-Analytik für den Einsatz in der Krebsdiagnostik

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

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Aryaline Kamalakumar

aus Berlin

- 1. Gutachterin: Juniorprof. Dr. Véronique Blanchard
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Tauber

Disputation am: 24.07.2017

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. Blanchard am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Mitte, angefertigt.

Wissenschaftliche Beiträge

Publikationen

S.Weiz, A.Kamalakumar, K.Biskup and V.Blanchard, Proteomics **2015**, *Enhanced detection of in-gel released N-glycans by MALDI-TOF-MS.*

A.Kamalakumar, C.Schwedler, W. Weigel, V. Blanchard, *DAP an optimal linker for glycan arrays.* (eingereicht)

C.Nietzold, P.M. Dietrich, A.Lippitz, A. Kamalakumar, S. Ivanov-Pankov, W. Weigel, V. Blanchard, U. Panne and W.E.S.Unger, *Surface Chemical Analysis of Carbohydrates on Epoxy-Functionalized Surfaces.* (eingereicht)

Poster

<u>A. Kamalakumar</u>, H. Hamouda, M. Kaup, R. Tauber, M. Berger and V. Blanchard *N-glycosylation status of alpha-1-antitrypsin in sera of patients suffering from ovarian cancer*, The 5 th Glycan Forum **2011**, Berlin.

<u>A. Kamalakumar</u>, H. Hamouda, M. Kaup, R. Tauber, M. Berger and V. Blanchard *N-glycosylation status of alpha-1-antitrypsin in sera of patients suffering from ovarian cancer*, IFCC-WorlLab **2011**, Berlin.

<u>A.Kamalakumar</u>, R.Tauber, M.Berger and V. Blanchard *Analysis of the N-glycan* pattern of sera from ovarian cancer and ovarian borderline cancer patients as a potential Biomarker for the early stage diagnosis, 24th Joint Glycobiology Meeting **2013**, Berlin.

<u>A.Kamalakumar</u>, R.Tauber, M.Berger and V. Blanchard *Analysis of the N-glycan* pattern of sera from ovarian cancer and ovarian borderline cancer patients as a potential Biomarker for the early stage diagnosis, 7th Glycan Forum **2013**, Berlin.

<u>A.Kamalakumar</u>, V. Blanchard, R.Tauber, W. Unger and P.Dietrich *Meterology* for the charcterization of Biomolecular Interfaces dor Diagnostic Devices (*BioSurf*), 22nd International symposium on Glycoconjugate **2013** Dalian China.



Für meine Familie

Eure Liebe und Unterstützung kennt keine Grenzen.

Danke!

Inhaltsverzeichnis

<u>Zu</u>	isamme	nfassung	14
<u>Ak</u>	ostract		18
1.	<u>Einleit</u>	ung	21
	1.1	Glykobiologie	21
	1.1.1	Definition	21
	1.1.2	Geschichte	21
	1.1.3	Glykosylierung	22
	1.1.4	Zusammensetzung der Glykane	23
	1.	1.4.1 N-Glykane	25
	1.	1.4.2 Biosynthese von N-Glykanen	27
	1.	1.4.3 O-Glykane	31
	1.	1.4.4 Biosynthese von O-Glykanen	32
	1.1.5	IgG Glykosylierung	32
	1.2	Funktionen der Glykane	35
	1.2.1	Proteinfaltung	35
	1.2.2	Erkennung	35
	1.2.3	Bei Tumorerkrankung	35
	1.2.4	Transport	36
	1.2.5	Schutz	36
	1.2.6	Andere Mechanismen	36
	1.3	Glykosylierung bei Tumorerkrankungen	36
	1.4	Biomarker für die Krebsdiagnostik	39
	1.4.1	Ovarialkarzinom	39
	1.4.2	Kolonkarzinom	41
	1.5	Glykananalyse	42

1.6	Glykan-Mikroarrays		47
1.6.1	Immobilisie	erung	49
1.6.2	Detektion		49
<u>Erge</u>	bnisse		<u>51</u>
2.1	Analyse d Borderline Patientinn	es Glykosylierungsprofils aus Seren von e-Ovarialkarzinom und Ovarialkarzinom- en	51
2.1.1	N-Glykana Ovarialkarz Patientinne	nalytik von IgG aus Seren von gesunden, zinom sowie Borderline-Ovarialkarzinom- en	52
	2.1.1.1	MALDI-TOF-MS Analyse der IgG Glykopep- tiden aus Seren von Ovarialkarzinom, Bor- derline-Ovarialkarzinom und gesunden Kontrollen	52
	2.1.1.2	Statistische Auswertung mittels SPSS	55
2.1.2	N-Glykana Borderline	nalytik mittles MALDI-TOF-MS von Ovarialkarzinom-, Ovarialkarzinom-Proben sowie gesunden Kontrollen	61
	2.1.2.1	Vorbereitung und Analyse der Borderline- Ovarialkarzinom-Proben	61
	2.1.2.2	MALDI-TOF-MS Analysen der Ovarialkarzinom sowie Borderline-Ovarialkarzinom-Proben	65
	2.1.2.3	Hauptkomponenten-Analyse	69
	2.1.2.4	Statistische Auswertungen mittels SPSS	70
	2.1.2.4.1	Statistisch relevante N-Glykanstrukturen in Borderline-Ovarialkarzinom	70
	2.1.2.4.2	MALDI-TOF/TOF-MS-Analyse der in Border- line-Ovarialkarzinom signifikanten N-Glykan- strukturen	76

2.

2.2 Veränderung des Glykosylierungsprofils in Blutseren von Kolonkarzinom-Patienten

2.2.′	Analyse des Patienten m	s Glykosylierungsprofils aus Seren von hit Kolonkarzinom und gesunden Kontrollen	81
2.2.2	MALDI-TOF-MS Analyse von gesunden und Kolonkar- zinom-Serumproben		
2.2.3	Hauptkomponenten-Analyse der MALDI-TOF-MS Spektren		
2.2.4	1 Statistische	Auswertung mittels SPSS	84
	2.2.4.1	Statistisch relevante N-Glykanstrukturen in Kolonkarzinom	84
	2.2.4.2	MALDI-TOF/TOF-MS-Analyse der in Kolon- karzinom statistisch wichtigen N-Glykan- strukturen	88
	2.2.4.3	GlycoColon-Wert vs. CEA	91
2.3	In-Gel Ana	lyse von Modellproteinen	93
2.3.2	Modellprote	in Ribonuklease B	94
2.3.2	2 Modellprote	in Alpha-1-saures-Glykoprotein	95
2.3.3	3 Modellprote	in Fetuin	96
2.4	Glykan-Mik	roarrays für die serumbasierte N-Glykananalytik	101
2.4.′	I Die Auswah der Oberflä	nl des passenden Labelreagenzes, Lektins sowie che für die Mikroarray-Analyse	102
	2.4.1.1	Synthese und MALDI-TOF-MS Analyse von 2AB markierten Glucoseunits aus Dextranhydrolysat	102
	2.4.1.2	Fraktionierungen der gelabelten Dextranhydroly- satproben mittels HPLC	106
	2.4.1.3	Monosaccharidanalysen mittels HPAEC-PAD	107
	2.4.1.4	Bedrucken der markierten Dextranhydrolysat- proben auf epoxy-aktivierten Glasträgern	108
2.4.2	2 Isolierung u Mikroarray-	nd Aufreinigung von N-Glykanstrukturen für die Analyse	113

		2.4.2.1	Highmannose N-Glykanstrukturen (RNase B)	114
		2.4.2.2	Komplexe N-Glykanstrukturen (Fetuin)	118
		2.4.2.3	Untersuchungen von Ovarialkarzinom und gesunden Serenproben auf Glykan-Mikroarrays	120
		2.4.2.4	Statistische Analyse der Glykan-Mikroarrays	123
3.	<u>Disk</u>	ussion		<u>126</u>
	3.1	Analyse des von Borderli Patientinner	IgG-Glykoms sowie des N-Glykanprofils aus Seren ne-Ovarialkarzinom und Ovarialkarzinom- n	126
	3.2	Veränderun Kolonkarzine	g des Glykosylierungsprofils in Blutseren von om-Patienten	131
	3.3	In-Gel-Analy	vse von Modellproteinen	133
	3.4	Glykan-Mikr	oarrays für die serumbasierte N-Glykananalytik	135
4.	Mate	erial und Mo	ethoden	139
4.	<u>Mate</u> 4.1	erial und Mo Allgemeine	ethoden Arbeitsbedingungen	<u>139</u> 139
4.	<u>Mate</u> 4.1 4.1.1	erial und Mo Allgemeine Zentrifugen	ethoden Arbeitsbedingungen	139 139 139
4.	<u>Mate</u> 4.1 4.1.1 4.1.2	erial und Me Allgemeine Zentrifugen Elektrophore	ethoden Arbeitsbedingungen	139 139 139 139
4.	<u>Mate</u> 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3	erial und Me Allgemeine Zentrifugen Elektrophore Sonstige Ge	ethoden Arbeitsbedingungen ese eräte	139 139 139 139 139
4.	<u>Mate</u> 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4	erial und Me Allgemeine Zentrifugen Elektrophore Sonstige Ge Chemikalien	ethoden Arbeitsbedingungen ese eräte	139 1 39 139 139 139 140
4.	Mate 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.5	erial und Me Allgemeine Zentrifugen Elektrophore Sonstige Ge Chemikalien Enzyme	ethoden Arbeitsbedingungen ese eräte	139 1 39 139 139 139 140 141
4.	<u>Mate</u> 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6	erial und Me Allgemeine Zentrifugen Elektrophore Sonstige Ge Chemikalien Enzyme Standards	ethoden Arbeitsbedingungen ese eräte	139 139 139 139 139 140 141 141
4.	<u>Mate</u> 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7	erial und Me Allgemeine Zentrifugen Elektrophore Sonstige Ge Chemikalien Enzyme Standards Lösungsmitt	ethoden Arbeitsbedingungen ese eräte	139 139 139 139 139 140 141 141 141
4.	<u>Mate</u> 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 4.1.8	erial und Me Allgemeine Zentrifugen Elektrophore Sonstige Ge Chemikalien Enzyme Standards Lösungsmitt Verbrauchsr	ethoden Arbeitsbedingungen ese eräte el materialien	139 139 139 139 139 140 141 141 141 141
4.	Mate 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 4.1.8 4.1.8	Allgemeine Zentrifugen Elektrophore Sonstige Ge Chemikalien Enzyme Standards Lösungsmitt Verbrauchsr	ethoden Arbeitsbedingungen ese gräte el materialien itserum	139 139 139 139 140 141 141 141 141 141 141
4.	Mate 4.1 4.1.1 4.1.2 4.1.3 4.1.4 4.1.5 4.1.6 4.1.7 4.1.8 4.2 4.2 4.3	erial und Me Allgemeine Zentrifugen Elektrophore Sonstige Ge Chemikalien Enzyme Standards Lösungsmitt Verbrauchsr Proben/ Blu Glykananal	ethoden Arbeitsbedingungen ese eräte naterialien utserum ytische Methoden	139 139 139 139 140 141 141 141 141 141 141 142 142

143
144
144
145
145
145
146
147
148
149
149
110
110
149
149 149
149 149 150
149 149 150 151
149 149 150 151 151
 149 149 150 151 151 151
 149 149 150 151 151 151 152
 149 149 150 151 151 151 152 153
 149 149 150 151 151 151 152 153
 149 149 150 151 151 152 153 153
 149 149 150 151 151 152 153 153 153
 149 149 150 151 151 152 153 153 153 154
 149 149 150 151 151 152 153 153 154 154
 149 149 150 151 151 152 153 153 153 154 154 154 154
 149 149 150 151 151 152 153 153 153 154 154 154 154 154 154
 149 149 150 151 151 152 153 153 153 154
 149 149 150 151 151 152 153 153 153 154

Inhaltsverzeichnis

Anhang		179	
Liter	atur		167
4.10	Verwende	ete Software	165
4.9.5	Reinigung	und Fluoreszenzanalyse	165
4.9.5	Serumproben auf Glykan-Mikroarrays		165
4.9.4	Immobilisi	erung der Glykane	164
4.9.3	Herstellun	ig der Glykan-Mikroarrays	164
4.9.2	PNGase F	- Verdau	164
4.9.1	Reduktion RNase B r	i, Carboxymethylierung und PNGase F Verdau von mit DTT und IAA	163
4.9	Analyse r	nittels Glykan-Mikroarrays	163
	4.8.3.1	TFA-Hydrolyse	16′
4.8.3	Monosaco	charidbestimmung mit HPAEC-PAD	160
	4.8.2.4	Fraktionierungen von 2AB, DAP und Rho-110 markierten Glykanen mittels Luna 5μ NH2 100A	159
	4.8.2.3	Messung von 2AB markiertem DH mit der ana- lytischen Luna 3µ NH2 100A	158
	4.8.2.2	Analytische Messung von 2AB markiertem DH mittels TSKgel Amid-80 Säulen	157
	4.8.2.1	HPLC	157
4.8.2	.8.2 HPLC Methoden		157

5.

6.

%	Prozent
°C	Grad Celsius
2AB	2-Aminobenzamid
ACN	Acetonitril
AGP	Alpha-1-Glykoprotein
Ara	D-Arabinosazon
Asn	Asparagin
AUC	Area under the curve
BOT	Borderline-Ovarialkarzinom
CID	Collision-induced dissociation
CEA	Carcinomembryonic Antigen
Con A	Concanavalin A
CRC	Kolonkarzinom
Су	Cyanine
Da	Dalton
DH	Dextranhydrolysat
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
dHex	Deoxyhexose
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTE	1,4-Dithioerythritol
DTT	1,4-Dithiothreitol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Actetylglucosamin
h	Stunden
Hex	Hexose
HexNAc	N-Acetylhexosamin

HPAEC-PAD	High Performance Anion-Exchange Chromatography with
	Pulsed Amperometric Detection
IAA	Iodacetamid
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/ IonizationTime-of-Flight
Man	Mannose
MilliQ	Wasser, aufbereitet durch Wasseraufbereitungsanlage
MS	Massenspektrometrie
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OGP	<i>n</i> -Octyl-β-D-glucopyranosid
OST	Oligosaccharyltransferase
OvCa	Ovarialkarzinom
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCA	Principal Component Analysis
Рер	Peptid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pН	negativer dekadischer Logarithmus der
	Protonenkonzentration
PNGase F	Peptid-N4-(N-Acetyl-β-glucosaminyl) Asparagin Amidase
	F
RA	relative Area
RNase B (RNB)	Ribonuclease B
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
TOF	Time of Flight
UV	Ultraviolet

Zusammenfassung

Die rechtzeitige Detektion von Tumorerkrankungen könnte in Zukunft die Möglichkeit erhöhen, Patienten effektiver und schneller zu heilen und so ihre Überlebenschancen zu erhöhen. Bisher gibt es für viele Tumorarten nicht die geeignete Diagnosemethode, um eine frühzeitige und spezifische Diagnose zu gewährleisten. Daher ist der Bedarf groß neue, schnelle sowie spezifische Methoden zu etablieren, mit denen es möglich ist, bereits aus Seren von Tumorpatienten potentielle Biomarker zu entdecken. Es ist auch von entscheidender Bedeutung, Biomarker für die Bestimmung der Art und des Stadiums der Tumorerkrankung zu identifizieren. Die Veränderung der Glykosylierung auf Zelloberflächen während der Entwicklung, Differenzierung und Erkrankung wird zunehmend als potentielle spezifische Biomarkerkandidaten für viele Krebsarten und Entzündungskrankheiten betrachtet.

Borderline-Ovarialkarzinom

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das N-Glykosylierungsmuster von Borderline-Ovarialkarzinom-Patientinnen analysiert um herauszufinden, ob es mögliche Unterschiede zwischen Ovarial (Ovca)- und Borderline-Ovarialkarzinom (BOT) Patientinnen gibt.

Zuerst wurde das IgG-Glykom unter Verwendung von Trypsin analysiert. Es konnten insgesamt sechs signifikante Glykopeptidstrukturen ermittelt werden, die in Kombination mit dem gängigen Biomarker CA-125 die beste Spezifität sowie Sensitivität aufweisen, um OvCa sowie BOT-Serenproben von gesunden Serenproben zu unterscheiden.

Mit dieser Kombination war es möglich, alle BOT-Proben als krank zu klassifizieren. Es war aber nicht möglich, zwischen OvCa und BOT zu unterscheiden. Im nächsten Schritt wurde das N-Glykom des gesamten Serums von OvCa- und BOT Patientinnen mit ihren entsprechenden altersangepassten gesunden Kontrollen analysiert und verglichen. N-Glykane wurden selektiv mit dem Enzym PNGase F aus menschlichen Blutseren freigesetzt, isoliert und anschließend mittels MALDI-TOF-MS gemessen. Um alle N-Glykanstrukturen einschließlich diejenigen mit negativ geladenen Sialinsäuren, zu detektieren, wurden sie zuvor mit Methyliodid derivatisiert.

Zusammenfassung

Diese Derivatisierungsreaktion ermöglicht eine Messung im positiven Ionisationsmodus. Ihre Strukturen wurden mit MALDI-TOF/TOF-MS Fragmentierungs-Analysen bestätigt. Die Arbeitsgruppe hat bereits einen Serum Biomarker namens GLYCOV spezifisch für OvCa entwickelt. Für BOT-Proben wurden auch die GLYCOV-Werte bestimmt. Allerdings war eine Differenzierung zwischen OvCa- und BOT nicht möglich. Ein neuer Wert, GLYCOV_B, wurde aus den statistisch signifikanten Strukturen in BOT etabliert, um diese Kohorte besser zu bestimmen und einzugrenzen. Mit dem neu berechneten Wert wurde keine einzige Probe als gesund eingestuft. Die Hauptkomponentenanalyse bestätigt nochmals, dass beide maligne Kohorten sich voneinander unterscheiden. Eine solche Klassifizierung wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben.

Kolonkarzinom

Desweiteren wurde in dieser Arbeit das N-Glykosylierungsprofil aus Seren von Kolonkarzinom (CRC)-Patienten untersucht, um potentielle glykanbasierende Biomarker zu identifizieren. Diese Art von Tumorerkrankung gehört weltweit zu den führenden Todesursachen. Die Überlebenschancen steigen mit der frühzeitigen Erkennung um mehr als 90%. Daher sind robuste Biomarker mit hoher Empfindlichkeit sowie Spezifität sehr hilfreich. Nach der enzymatischen Freisetzung wurden die N-Glykane gereinigt, permethyliert und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Die signifikanten Strukturen wurden mit MALDI-TOF/TOF-MS bestätigt. In CRC Seren sind zwei monofucosylierte biantennäre Strukturen herunterreguliert, wohingegen zwei difucosylierte, mono- und diantennäre Strukturen und drei sialylierte monofucosylierte Strukturen hochreguliert sind. Aus den sieben bedeutenden Strukturen wurde ein sogenannter GlycoColon-Wert berechnet, der mit CEA, dem aktuellen Biomarker für Darmkrebs, verglichen wurde. Sowohl die Spezifität, als auch die Sensitivität der GlycoColon-Werte waren besser als die vom CEA Biomarker. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Kombination von beiden Biomarkern eine Sensitivität von 92% und eine Spezifität von 96% liefert.

Zusammenfassung

In-Gel-Analytik

Um eine schnelle und effiziente Methode zur Freistzung und Analyse von geringen Mengen an N-Glykanen zu etablieren, wurde die Detektion von In-Gel verdauten N-Glykanen durch die Zugabe von OGP, einem nichtionischen Detergens und der Nutzung von Anchorchip-Target mit D-Arabinosazon als Matrix verbessert.

Es wurden drei verschiedene Modellproteine (RNase B, AGP und Fetuin) in SDS-PAGE-Gelen in Anwesenheit von OGP mit PNGase F verdaut. Mit dieser Optimierung konnte eine Nachweisgrenze von mindestens 10 pmol des Modellproteins bestätigt werden. Die MALDI-TOF-MS-Spektren mit höheren Signlintensitäten bestätigen, eine verbesserte Freisetzung und Extraktion von N-Glykanen aus im Gel verdauten Proteinen durch die Zugabe von OGP.

Glykan-Mikroarrays für die serumbasierte N-Glykananalytik

Die Mikroarraytechnologie, die eine schnellere und effizientere Analyse ermöglicht, wird zunehmend für neuartige diagnostische Anwendungen eingesetzt. Sie ist auch ein weitverbreitetes Glykomik-Werkzeug geworden, um biologische Fragen zu entschlüsseln. In dieser Studie wurden N-Glykane aus Seren isoliert, gereinigt und anschließend markiert. Die für die Mikroarray-Analyse benötigten optimalen Bedingungen wie Labelreagenz, Oberfläche und Bindungsprotokoll, wurden mithilfe von Glucoseoligomeren bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass anstelle des üblichen Labelreagenz 2AB, DAP-Glucoseoligomere viel effizienter an epoxyaktivierten Glasträgern binden.

Danach wurden Seren von OvCa-Patientinnen und ihren entsprechenden altersangepassten gesunden Kontrollen mithilfe von Glykan-Mikroarrays untersucht. Mannosestrukturen und komplexe N-Glykanstrukturen (Hex₆HexNAc₅Neu5Ac₃-2AB (m/z 3764.6) und Hex₅HexNAc₄Neu5Gc₂-2AB (m/z 3014.6)) wurden zuvor durch HPLC-Fraktionierung isoliert und auf epoxyaktivierte Glasträger gedruckt. Nachdem die Glykan-Mikroarrays mit Serum beschichtet wurden, wurde ein zweiter fluoreszierender Antikörper, der gegen Immunglobuline gerichtet war, angewendet. Die resultierenden Fluoreszenzsignale wurden unter Verwendung eines Fluoreszenzscanners gemessen. Die Signalintensitäten von Highmannosen und Hex₅HexNAc₄-Neu5Gc₂-2AB waren auf OvCa-Arrays signifikant stärker als auf den gesunden Arrays.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Anti-Highmannose- und Anti-NeuGc-Autoantikörper potentielle Serum-Biomarker für OvCa sind.

Abstract

Abstract

Most cancerous tumors are detected at a late-stage because of the lack of suitable diagnostic methods to ensure an early and specific diagnosis. Therefore, there is a crucial need to establish new and rapid method that allows the early detection of neoplasia in the sera of tumor patients, which could offer the possibility to heal them faster and to increase their chances of survival. It is also of high interest to discover potential biomarkers that determine the type and stage of the tumor disease prior to invasive operations. Glycome changes during development, differentiation and disease are increasingly recognized as biomarkers that are specific for many types of diseases such as cancer and inflammatory diseases.

Borderline ovarian cancer

In this study, the serum N-glycosylation pattern of BOT patients was analyzed to find out, whether it was possible to differentiate between ovarian- and BOT patients at the serum level. At first, the IgG glycome was measured using tryptic glycopeptides, purified from serum using protein A. Six statistically significant glycopeptide structures were detected by MALDI-TOF-MS using SPSS analyses. The best specificity and sensitivity could be achieved with the combination of the common used biomarker CA-125 and the six different structures. With this combination, it was possible to classifiy all BOT samples as ill but it was not possible to distinguish between OvCa and BOT samples.

In the next step, the N-glycome of total serum from OvCa, BOT and age-matched healthy controls were analyzed. N-glycans were selectively released with the enzyme PNGase F from human blood sera, isolated and subsequently measured by MALDI-TOF-MS. In order to detect all N-glycan structures including those with negatively charged sialic acid units, N-glycans were previously derivatized with methyl iodide. This derivatization reaction enables a measurement in positive ionization mode of all N-glycan structures. Their structures were confirmed by MALDI-TOF/TOF-MS fragmentation analysis. The working group has already developed a serum biomarker named GLYCOV for OvCa. GLYCOV values were determined for BOT samples but they failed to discriminate BOT from healthy controls. A new value, GLYCOV_B, was calculated from the statistical differences observed between BOT and healthy control

samples. With the new calculated value, all BOTsamples were classified as borderline and none of them were classified as healthy. The principal component analysis makes clear that both disease cohorts differ from each other. Such a classification has not been previously described in the literature.

Colon cancer

Further, the N-glycosylation profile from sera of colon cancer patients was examined to identify potential glycan-based biomarkers. This type of neoplasia is among the world's third leading cause of death. Survival chances increase with early detection by more than 90%. Therefore, robust serum biomarkers with high sensitivity and specificity would be very helpful. After enzymatic release, N-glycans were purified, derivatized via permethylation and measured by MALDI-TOF-MS. Seven statistically significant structures were identified by SPSS analyses and their structures were confirmed by MALDI-TOF/TOF-MS. Two monofucosylated biantennary structures were down-regulated whereas two difucosylated mono- and diantennary structures and three sialylated monofucosylated structures were upregulated. A so-called GlycoColon value was generated from the seven significant structures, which was compared with CEA, the current biomarker for colorectal cancer. Both, specificity and sensitivity of GlycoColon values, were better than of CEA. In addition, when both biomarkers were combined together, the sensitivity reached 92% and the specificity 96%.

In-gel N-glycan analysis

To establish a rapid and efficient method to release and analyze minute amounts of Nglycans, the detection of in-gel digested N-glycans by MALDI-TOF was improved for model proteins by the addition of OGP, a non-ionic detergent, and by measurements on an Anchorchip target using D-arabinosazone as the matrix. Three different model proteins (RNase B, AGP and Fetuin) were digested in SDS-PAGE gels in the presence or absence of OGP. With this optimization, a limit of detection as low as 10 pmol of the model glycoprotein could be achieved. The addition of OGP enables an improved release and extraction of N-glycans from proteins stacked within the gel as the MALDI-TOF-MS spectra show structures with higher signal intensities.

Glycan microarrays for serum-based diagnostics

The microarray technology that enables faster and more efficient analysis is increasingly used for establishing novel diagnostic applications. In parallel, it has become a widespread glycomics tool to unravel biological questions. In this study, N-glycans were isolated from human sources and subsequently labeled. The optimum label, surface and binding protocols were selected using glucose oligomers as model substances. It could be shown that, instead of the usual label 2AB, DAP glucose oligomers were binding to the surface of the slide much more efficiently.

Thereafter, sera from OvCa patients and age-matched healthy controls were investigated with the microarray technology. High mannose N-glycans and complex-type N-glycanstructures (Hex₆HexNAc₅Neu5Ac₃-2AB (m/z 3764.6) and Hex₅Hex-NAc₄Neu5Gc₂-2AB (m/z 3014.6)) were isolated by HPLC fractionation. Slides were coated with glycans, serum was put on the slides and finally a secondary fluorescent antibody directed against immunoglobulins was applied. The resulting fluorescent signals were measured using a fluorescence scanner. The signal intensities of the high-mannose N-glycans and Hex₅HexNAc₄Neu5Gc₂-2AB were significantly stronger on OvCa arrays than on healthy control arrays. In summary, anti-high-mannose and anti-NeuGc autoantibodies are potential serum biomarkers for OvCa.

Einleitung

1.1. Glykobiologie

1.1.1 Definition

Die Glykobiologie beschäftigt sich mit der Untersuchung von wichtigen Prozessen der Zellkommunikation, z.B. die Immunerkennung und –reaktion sowie Krankheiten wie z.B. Tumorerkrankungen. Der Begriff Glykobiologie wurde erstmals 1988 von Rademacher, Parekh und Dwek (*1*) eingeführt und vereinte die Chemie der klassischen Kohlenhydrate mit der Biochemie für ein modernes Verständnis der Zellund Molekularbiologie der Glykane (*2*) (vgl. Kapitel 1.1.4).

1.1.2 Geschichte

DNA, Proteine, Kohlenhydrate sowie Lipide gehören zu den vier wichtigsten Klassen der Makromoleküle in der Biologie. Aufgrund ihrer sehr komplexen Struktur unterscheiden sich die Kohlenhydrate stark von den anderen biologischen Polymeren. Sie setzen sich aus mehreren ringförmigen Bausteinen zusammen, die sich in der Abfolge, in der Art der Verknüpfung, der Kettenlänge und dem Verzweigungsgrad voneinander unterscheiden können.(*3*) Diese Strukturvielfalt sowie -komplexität ließen viele Wissenschaftler jahrelang verzweifeln. In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts gewann die Forschung über die Chemie der Kohlenhydrate zunehmend an Bedeutung. Wegen der strukturellen Komplexität und damit der Schwierigkeit derer Sequenzbestimmungen, lagen die Studien der Glykane während der molekularbiologischen, initialen Phase in den frühen 70er weit hinter den anderen wichtigen Klassen der Biomoleküle zurück.

Im Laufe der Jahre jedoch wurden die Funktionen von Glykanen mithilfe neuartiger Technologien, wie z.B. Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), Matrix-unterstütze Laser-Desorption/ Ionisation (MALDI-TOF-MS), Kappilarelektrophorese (CE), Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) oder Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS), herausgefunden:

- 1978 führten Vliegenthart *et al.* mittels NMR die ersten Strukturanalysen von komplexen N-Glykanen durch (*4*).
- 1981 konnten Linscheid *et al.* ihre ersten Ergebnisse bezüglich MALDI-TOF-MS-Analyse von Oligosacchariden publizieren (*5*).
- 1990 und im frühen 21. Jahrhundert wurden HPLC-Methoden intensiv für die Glykanprofilierung weiterentwickelt. Dabei findet die Trennung der Glykane in einer Normalphasen-Analyse statt. Die Umkehrphasen-Analyse ist durch eine vorherige hydrophobische Derivatisierung der Glykane, wie z.B. mit 2-Aminobenzamid (2AB) oder 2-Aminopyridin (AP), möglich (6, 7).
- Eine weitere, in den 90er Jahren häufig eingesetzte Methode Glykane qualitativ zu bestimmen, bietet die Kapillarelektrophorese (CE). Die zu analysierenden N-Glykane müssen zuvor reduktiv mit ungeladenen chromophoren/ fluorophoren oder sulfatierten Derivaten aminiert werden (8-11). Gelabelte Glykane können direkt mit Hilfe von mit Polyvinylalkohol beschichteten Kapillaren gemessen werden (12).

1.1.3 Glykosylierung

Kohlenhydrate sind die artenreichsten Biomoleküle und können somit im Körper die meisten Informationen weitergeben (*13*). Mit der Zeit wurde deutlich, dass die aus einzelnen Monosaccharideinheiten aufgebauten Glykane einen entscheidenden Einfluss auf die Kommunikation von Zellen sowie eine nicht unerhebliche Rolle bei Infektionen, Immunreaktionen oder auch bei der Krebsentstehung bzw. -erkennung spielen (*14, 15*) (vgl. Kapitel 1.1.3). Glykane weisen folgende zentrale Funktionen bei Zell-Zell-Erkennungsprozessen auf: Rezeptor-Ligandenbindung, Wirt- und Pathogenerkennung, Zelldifferenzierung und –entwicklung, Tumorwachstum und Metastasen, Immunantwort, Zielstrukturfindung (Targeting), Sekretion, Proteinfaltung und Regulation der Serumhalblebenszeit (*16, 17*) (siehe auch Kapitel 1.2).

Im Krankheitsfall stellt man veränderte Glykanstrukturen an der Zelloberfläche fest, die wiederum gezielt zur Entwicklung von Diagnose- oder Therapieverfahren genutzt werden können. Mehrere Studien haben in der Vergangenheit bereits gezeigt, dass die Glykane eines Proteins bei einer Tumorerkrankung einen höheren Sialylierungssowie Fucosylierungsgrad aufweisen (*18, 19*).

Die Veränderung des Glykoms hat auch Auswirkungen auf extrazelluläre Flüssigkeiten, wie z.B. dem Serum. So konnten vor einiger Zeit Alley et al. zeigen, dass die Anzahl an tri- und tetraantennären Glykanen mit unterschiedlichem Sialylierungs- sowie Fucosylierungsgrad in Immunglobulin (IgG) aus Seren bei OvCa-Patientinnen mit vorangeschrittener Erkrankung im Gegensatz zu gesunden Kontrollen stark erhöht ist. Zudem konnte eine Zunahme von degalactosylierten Strukturen festgestellt werden. Anhand von nicht spezifischen Sialidasen und β 1-4,6 Galactosidasen konnte die Überexpression von antennärfucosylierten Strukturen

Da Glykane in malignanten Zellen und in Seren ein verändertes Kohlenhydratmuster zeigen, könnten sie in Zukunft als Biomarker für unterschiedliche Entwicklungsstufen eines Tumors, bei der Bestimmung des Ausbreitungspotenzials, für die Herstellung von effizienteren Pharmaka sowie zur frühzeitigen Diagnose von Tumorerkrankungen dienen (*21, 22*) (vgl. Kapitel 1.4).

1.1.4 Zusammensetzung der Glykane

Glykane sind über glykosidische Bindungen verknüpft. Die Bindungsart auf der nicht-Kohlenhydratkomponente kann zur Klassifizierung der Glykane genutzt werden: N-Glykane, O-Glykane, Glykosaminoglykane (GAG), Glykosphingolipide (GSL) oder Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker).

Aufgrund von mehreren Bindungsstellen an Monosacchariden synthetisieren die Enzyme in Zellen nicht nur lineare, sondern auch verzweigte Glykane. Hinzu kommt, dass die Bindung zwischen den Monosacchariden aus zwei verschiedenen räumlichen Ebenen heraus erfolgen kann, so dass α - oder β -Glykosidbindungen entstehen können. Zudem können Monosaccharide an mehr als zwei glykosidischen Bindungen beteiligt sein und dabei als Abzweigstelle fungieren, welches zusätzlich zu ihrer strukturellen Diversität beiträgt (23) (vgl. Tabelle 1).

Oligomer- Größe	Nukleotide	Peptide	Kohlenhydrat
1	4	20	20
2	16	400	1.360
3	64	8.000	126.080
4	256	160.000	13.495.040
5	1.024	3.200.000	1.596.745.920
6	4.095	64.000.000	192.780.943.360

Tab.1: Anzahl der Verknüpfungsmöglichkeiten in Nukleotiden, Peptiden und Kohlenhydraten.

Die vollständige Analytik der Glykome dürfte daher eine nicht sehr einfache Aufgabe sein. Zur Analyse der Glykane wurden Techniken aus der Chromatographie sowie der Massenspektroskopie, wie die MALDI-TOF-MS oder die HPLC, genutzt. Die dreidimensionale Struktur kann mit Verfahren der Röntgenkristallographie und der NMR untersucht werden (*6, 24-27*).

Glykane erscheinen als konjugierende Elemente auf Polypeptiden, Lipiden und Sphingolipiden. In vielen biologischen Prozessen werden aus Proteinen und Kohlenhydraten Glykokonjugate gebildet, die in sehr vielen Lebensvorgängen eine entscheidende Rolle spielen. Je nach Größe der Kohlenhydrate werden sie in einzelne Klassen wie Monosacharide, Disaccharide, Oligosaccharide sowie Polysaccharide eingestuft. Polysaccharide sind lange Polymere, die aus mehr als zehn verbundenen Monosacchariden bestehen. Glykane sind cyclische Strukturen, bestehend aus drei bis zehn Monosaccharidbausteinen und stellen damit Oligosaccharide dar.

Bei der Synthese von O- und N-Glykanen (vgl. Kapitel 1.1.5 und 1.1.6) bedienen sich die meisten Organismen nur aus einer relativ kleinen Anzahl von Monosacchariden. Nachstehend werden die für die vorliegende Arbeit relevanten Monosaccharidbausteine dargestellt: Glucose (Glc), Galactose (Gal), Mannose (Man), Fucose (Fuc), Sialinsäuren (Neu5Ac) oder die Aminozucker *N*-Acetylgalactosamin (GalNAc) und *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) (siehe Abb.1) (*28*).

Einleitung



Abb.1: Die sieben am häufigsten vorkommenden Monosaccharid-Bausteine in N-Glykanen.

1.1.4.1 N-Glykane

Glykoproteine bilden die Mehrzahl der im endoplasmatischen Retikulum synthetisierten Proteine. Etwa 50% aller in Säugetiere vorkommenden Proteine sind glykosyliert, wobei ca. 90% davon N-Glykane enthalten (29). N-Glykosylierung ist eine der am besten analysierten und am häufigsten vorkommenden Proteinglykosylierungsart (30). Die an Asparagin gebundenen Glykane werden als N-Glykane bezeichnet. Der Nglykosidisch gebundene Oligosaccharidteil dient dabei sehr unterschiedlichen Funktionen (23). In einer Vielzahl von Erkennungsprozessen fungiert er als Ligand. N-Glykane stabilisieren die Proteine gegen Denaturierung und Proteolyse, steigern die Löslichkeit, modulieren die Immunreaktion, erleichtern die Orientierung des Proteins in Bezug auf eine Membran, verleihen strukturelle Festigkeit, regeln den Proteinumsatz, sind für die Feinabstimmung der Ladung sowie des isoelektrischen Punktes von Proteinen zuständig und vermitteln Interaktionen mit Pathogenen (23). Die Konsensussequenz, bestehend aus Asn-XXX-Ser/Thr, ist von wesentlicher Bedeutung für die N-Glykosylierung (XXX: jede beliebige Aminosäure außer Prolin). Es ist weiterhin bekannt, dass Prolin eine hemmende Wirkung auf die Glykosylierungseffizienz hat. Die Voraussetzung für die Übertragung eines Glykans auf die chemisch eher träge Seite des Asparagins ist die Bildung einer Schleife in der Polypeptidkette, damit es zur Erhöhung der Nucleophilie durch den Kontakt der Hydroxylgruppe des Serins oder Threonins mit der Amidgruppe des Aparagins kommt. Prolin würde die Bildung einer solchen Schleife verhindern (29).

Alle N-Glykane besitzen eine Pentasaccharid-Kernstruktur (core) bestehend aus zwei N-Acetylglucosamineinheiten sowie drei Mannoseeinheiten (Man₃GlcNAc₂) (vgl. a) in Abb. 2). Im Allgemeinen können N-Glykane in drei unterschiedliche Subgruppen unterteilt werden, denen die Basisstruktur gemein ist (vgl. b) in Abbildung 2).



Abb.2 : Strukturbeispiele von N-Glykanen in Proteinen. (a) Alle N-Glykane weisen eine gemeinsame Kernstruktur auf, die aus zwei N-Acetylglucosamin(GlcNAc)- und drei Mannose (Man)-Resten besteht. (b) Die drei wichtigsten Glykanarten: High-Mannosen, komplexe Glykane und hybride Glykane. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Im High-Mannose-Typ ist die Kernstruktur ausschließlich mit Mannoseeinheiten (Man) erweitert. Wohingegen der Komplex-Typ mit drei Man sowie N-Acetylglucosamin (GlcNAc), Galactose (Gal)-, Sialinsäuren- (Sia) und Fucoseeinheiten (Fuc) erweitert werden kann. Fuc kann dabei entweder an einem GlcNAc an der Core-Struktur und/oder an der Antenne oder an der Gal 1-2-gebunden verknüpft vorkommen. Weiterhin werden die N-Glykane anhand des Sialylierungsgrads sowie der Anzahl der Antennen unterteilt. Der Hybrid-Typ stellt eine Mischform aus den beiden vorher genannten Typen dar. Die N-Glykane des komplexen und hybriden Typs können einen sogenannten *bisecting-*GlcNAc-Rest besitzen, welcher an der β-1-4-gebundenen Mannose der Kernstruktur gebunden vorkommt.

1.1.4.2 Biosynthese von N-Glykanen

Die Biosynthese von N-Glykanen ist ein sehr komplexer Prozess (*31*). Das Oligosaccharid entsteht nicht von Beginn an am Peptid, sondern zuerst an einem membrangebundenen lipidähnlichen Vorläufer, dem Dicholphosphat-Molekül (Dol-P).



Abb.3 : Biosynthese des N-Glykanvorläufers. Das Oligosaccharid entsteht an einem lipidverankerten Carrier (DoI-P) im Cytosol. Am terminalen Phosphatende werden zwei GlcNAc-Moleküle und fünf Mannose-Moleküle hinzugefügt. Nachdem der gesamte Vorläufer auf die Seite des ER-Lumen gewandert ist, findet die Übertragung von weiteren Man- sowie Glc statt (nach Varki et al. 2009). Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Der Komplex aus Dol-P und dem Oligosaccharid wandert während der Biosynthese vom Cytosol in das ER-Lumen. Aufgrund der 20 Isopren-Einheiten ist der Komplex in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) verankert und trägt am

Einleitung

terminalen Ende ein Phosphat. Die GlcNAc-1-Phosphotransferase kann daran das erste und die GlcNAc-Transferase das zweite GlcNAc-Molekül der Kernstruktur übertragen (2). Nach dem Hinzufügen von fünf weiteren Man über spezifische Glykosyltransferasen wandert der gesamte Vorläufer Man₅GlcNAc₂-P-P-Dol von der cytosolischen Seite des ERs zu dessen Lumen, wobei der "Flip"-Mechanismus durch eine ATP-unabhängige, bidirektionale Flippase katalysiert ist (siehe Abb.3). Nach der Übertragung von vier Man und drei Glc ist die Synthese des reifen Glykan-Vorläufers abgeschlossen und bereit mithilfe des Oligosaccharyltransferase-Komplexes (OST) auf die aufnahmebereite Asparaginseitenkette mit der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr übertragen zu werden. Solche Konsensussequenzen in einem Protein sind essenziell, um N-Glykane zu binden. Anschließend wird der gebundene Glykanvorläufer Glc₃Man₉GlcNAc₂-P-P-Dol *en bloc* auf die naszierende Proteinkette transferiert (siehe Abb.4).



Abb.4: Übertragung des unreifen N-Glykans durch die Oligosaccharyltransferase vom Dol-P auf das Asparagin des Proteins (nach Varki et al. 2009). Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Im nächsten Schritt findet die Abspaltung einer Glc durch die Glucosidase I und einer weiteren Glc durch die Glucosidase II statt. Nachdem die Lektin Chaperone Calnexin und Calreticulin die Kohlenhydrat-Strukturen an der Proteinkette erkannt haben, werden diese gebunden und vermitteln dann die Proteinfaltung. Zudem binden sie monoglucosylierte N-Glykane und schützen sie so vor Einflüssen aus der Umgebung

(siehe Abb.5). Bei beiden Chaperonen handelt es sich um homogene Proteine mit ähnlicher Struktur und Funktion. Sie unterscheiden sich allerdings darin, dass der Calnexin-Chaperon in der Membran fest verankert ist, der Calreticulin-Chaperon hingegen ist ein luminales Protein. Durch die Einführung des Cofaktors (ERp57) werden die Bildung der Disulfidbrücken und die darauffolgende Trimmung des dritten Glc gefördert. Nachdem die letzte Glc vom N-Glykan abgespalten ist, werden richtig gefaltete Glykoproteine in den Golgi-Apparat transportiert. An nicht erfolgreich gefalteten Glykoproteinen wird mit Hilfe der Glc-Transferase wieder eine Glc addiert, damit sich die Lektin-Chaperone nochmals binden können und der Zyklus erneut starten kann. Das UDP-Glucose-Glykoprotein-Glucosetransferase (UGGT) fungiert hierbei als Falt-Sensor (siehe Abb.5).



Abb.5 : Trimmprozess im endoplasmatischen Retikulum. Entstehung der core-ähnlichen Struktur als Grundlage für mannosereiche, hybride und komplexe Strukturen (nach Varki et al. 2009).

Das "Trimming" der Mannosen, welches immer im ER und dann im Golgi-Apparat stattfindet, führt zu einer core-ähnlichen Struktur, welche die Grundlage für mannosereiche, hybride und komplexe Strukturen ist. Die α (1-2)-gebundenen Man werden durch die α (1-2)-Mannosidasen IA, IB und IC abgespalten. Das nun entstandene Man₅GlcNAc₂ kann weiter im Medial-Golgi zu Strukturen vom hybriden und komplexen N-Glykantyp verarbeitet werden.

Die Glc-Transferase fügt die GlcNAc Bausteine an die α (1-3)-gebundene Mannose der Kernstruktur des N-Glykanvorläufer Man₅GlcNAc₂, woraufhin N-Glykane vom hybriden Typ entstehen. Komplexe N-Glykane entstehen durch eine weitere Modifikation, wobei zunächst die Abspaltung der terminalen α (1-3)- sowie α (1-6)gebundenen Mannoseeinheiten durch die α -Mannosidase II erfolgt. Die Verknüpfung von GlcNAc an α (1-3)- sowie α (1-6)-gebundenen Mannoseeinheiten führt zu tri- und tetraantennären N-Glykanen. Schließlich findet durch das Anfügen von Fuc, Gal und Sialinsäuren die Modifizierung der N-Glykanen statt (siehe Abb.6) (*32*).



Dolicholphosphat

Abb.6: Der Golgi-Apparat besteht aus einer Reihe von Zistern, welche von cis nach trans ausgerichtet sind. Protein bewegt sich von cis nach trans, wobei verschiedene Monosaccharid-Bausteine entweder entfernt oder geknüpft werden (nach Varki et al. 2009). Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Einleitung

1.1.4.3 O-Glykane

Der Aufbau von O-Glykanen geschieht durch eine sequentielle Übertragung einzelner Monosaccharide, beginnend mit der Glykosylierung an den Hydroxylgruppen von Serin und Threonin (33). Im Gegensatz zu N-Glykanen besitzen O-Glykane keine bekannte Proteinerkennungsseguenz und sind eine rein posttranslationale Modifikation. Die in Säugetieren vorkommende O-Glykosylierung repräsentiert eine sehr mannigfaltige Modifikationsart, welche meist durch das innerste Monosaccharid klassifiziert wird (34). Die häufigste O-glykosidische Verknüpfungsart ist die des Muzin-Typs. In Muzin-O-Glykanen ist das wichtigste Monosaccharid ein α-geknüpfter N-Acetylgalactosamin (GalNAc). Es sind insgesamt acht verschiedene Core-Strukturen GalNAc verknüpfter O-Glykane bekannt, wobei GalNAc an der ß verknüpften Gal, am β-verknüpften GlcNAc oder am α-verlinkten GalNAc an der dritten und/oder sechsten Position vorzufinden ist (siehe Tab.2) (35).

core-Nr	Struktur
core 1	Gal(β1-3)GalNAc-α-Ser/Thr
core 2	GlcNAc(β1-6)[Galβ1-3]GalNAc-α-Ser/Thr
core 3	GlcNAc(β1-3)GalNAc-α-Ser/Thr
core 4	GlcNAc(β1-6)[GlcNAc(β1-3)]GalNAc-α-Ser/Thr
core 5	GalNAc(α1-3)GalNAc-α-Ser/Thr
core 6	GlcNAc(β1-6)GalNAc-α-Ser/Thr
core 7	GalNAc(α1-6)GalNAc-α-Ser/Thr
core 8	Gal(α1-3)GalNAc-α-Ser/Thr

Tab.2: Muzin-Typ: Kernstrukturen der O-Glykane (nach Taylor and Drickamer 2003; Varki et al. 2009).

Weiterhin können Fuc, Man, Gal, Xylosen sowie GlcNAc an O-glykosidischen Verknüpfungen beobachtet werden.

Eine weitere Modifikation, welche in vielen verschiedenen Proteinen, wie z.B. im α -Dystroglykan des Gehirns, des Skeletts und der Muskeln beobachtet wurde, ist die O-Mannosylierung. Die kurze Oligomannose-Kette ist dabei α -glykosidisch an der Hydroxylgruppe von Serin oder Threonin verknüpft (*36, 37*). Diese Modifikation wird auch mit einigen angeborenen Krankheiten wie z.B. der Muskeldystrophie in Zusammenhang gebracht (*38*).

1.1.4.4 Biosynthese von O-Glykanen

Im Gegensatz zur Biosynthese der N-Glykosylierung läuft die Biosynthese der O-Glykosylierung viel einfacher ab. Die Initiierung der O-Glykosylierung findet im Golgi-Apparat statt. Anders als bei den N-Glykanen besitzen O-Glykane keine Vorläuferstruktur. Die Verlängerung mittels Monosaccharideinheiten läuft schrittweise über Nucleotid-Kohlenhydrat-Donoren am Proteingerüst ab. Durch die spezifische Polypeptid O-GalNAc-Transferase (UDP-GalNAc) wird die erste Saccharideinheit auf ein Serin- oder Threoninrest übertragen (2, 39). Bislang sind 20 verschiedene GalNAc-Transferasen bekannt, die in Polypeptiden und gewebsspezifischer Expression auftauchen (40, 41). Anschließend findet durch die Verknüpfung von weiteren Monosaccharideinheiten, wie beispielweise dem GlcNAc, Gal oder Fuc in den Zisternen des Golgi-Apparates die Verlängerung der Glykankette statt. Im trans-Golgi-Netzwerk erfolgt die Verknüpfung am nicht-reduzierenden Ende des Glykoproteins mit Sialinsäureresten. Dabei können die O-Glykane als Monosaccharide oder Disaccharide kurze einfache oder sehr große Strukturen bilden. Die Abfolge der Glykosylierungsreaktionen wird von der relativen Aktivität und Spezifität der Glykosyltransferasen sowie von der intrazellulären Lokalisierung der Enzyme und Substrate bestimmt (42).

1.1.5 IgG Glykosylierung

Immunoglobuline G sind die Antikörper der Klasse G die vor allem gegen Viren und Bakterien wirken. Diese sind eine Unterklasse von Antikörpern die ca. 80% der gesamten Immunoglobuline ausmachen und somit die wichtigste Klasse der Antikörper darstellen. Nach dem Kontakt mit Antigenen werden Immunoglobuline von B-Lymphozyten oder Plasmazellen mittels bestimmter Transportrezeptoren produziert.

Sie stellen ca. 10-20% der Plasmaproteine dar und sind die Hauptklasse der insgesamt fünf Klassen der Immunoglobuline: IgM, IgD, IgG, IgA und IgF. Die Glykoproteinkomposition der verschiedenen Immunoglobulinklassen besteht zu 82-96% aus Proteinen und zu 4-18% aus Kohlenhydraten. Sie unterscheiden sich lediglich in der Struktur der schweren Ketten und besitzen unterschiedliche Effektorfunktionen.

Aufgrund der folgenden Fakten zeigen IgG aus humanem Serum ein erhebliches Maß an Vielfalt:

- i) IgG werden in vier Subklassen IgG1, IgG2, Igg3 und IgG4 unterteilt. Die Subklassen des IgGs wurden zum ersten Mal 1960 mit der Nutzung von spezifischen Antiseren aus Kaninchen gegen humanen IgG Myelomaproteinen entdeckt.(43) Die Häufigkeit von IgG1 ist am höchsten und die von IgG4 ist am geringsten. Bei der prozentualen Häufigkeit von IgG im Blutkreislauf handelt es sich bei 60-70% um IgG1, bei 20-30% um IgG2, bei 5-8% um IgG3 und bei 1-3% um IgG4.
- ii) Obwohl die unterschiedlichen Klassen in Hinblick auf die Aminosäure-Ebene über 90% identisch sind, besitzt jede Subklasse ein einzigartiges Profil in Bezug auf Antigenbindung, Immunkomplex-Formation, Komplement-Aktivierung, Auslösen von Effektorzellen, Halbwertszeit und Plazentatransport.
- iii) IgG unterscheiden sich in ihrem Glykosylierungsmuster ihrer N-Glykankette.

Sie liegen als Monomere in freier Form vor und haben ein Molekulargewicht von 150 kDa. IgG besteht aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, welche über Disulfidbrücken verknüpft sind. Die leichten Ketten kommen in zwei unterschiedlichen Formen vor: Kappa und Lambda. Je nach Kettenart unterscheidet man die IgG Moleküle als IgG-Kappa oder als IgG-Lambda.

Alle vier Subklassen des IgG aus humanem Serum enthalten eine einzelne N-Glykosylierungsstelle an der Asparagin Position 297 in der Fc Region, welches für die Strukturstabilität und der *in vivo* Funktion der Immunoglobuline entscheidend ist.(*44, 45*)



Abb.7: Aufbau von Immunoglobulin (IgG): Fab Fragment, Fc Region, Antigenbindungsstelle, schwere Kette, leichte Kette, N-N: N-Glykosylierungsstelle, Disulfidbrücken, pep: Peptid. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Das IgG-Glykom verändert sich während Krankheiten, allerdings wird es auch stark vom Geschlecht und Alter eines jedes Individuums beeinflusst. (*4, 46*) Aus vorherigen Arbeiten ist bekannt, dass die Microheterogenität von humanem IgG von vielen physiologischen Aspekten wie z.B. Alter, Geschlecht und Schwangerschaft und pathologischen Parametern wie z.B. Tumorerkrankungen, Infektionen und Autoimmunerkrankungen abhängt. (*47*) Daher liegt es in der Natur, dass das IgG-Glykom eine viel größere Vielfalt im Vergleich zum gesamten Plasmaglykom zeigt. (*5*) In einer der ersten Arbeiten konnten Parekh et al. zeigen, dass das IgG-Glykom mit Krankheiten korreliert. Sie haben in Seren von Rheuma- und Arthrose-Patienten eine Erhöhung der degalactosylierte N-Glykane gefunden. (*48*) Das Resultat wurde in einer späteren Arbeit nochmals bestätigt. Hier fand man heraus, dass sich die Galactosylierung von weiblichen Rheuma- und Arthrose-Patienten während der Schwanger-schaft stark erhöht. (*49, 50*) Diese Tatsache verdeutlicht nochmal, wie stark sich körperliche Veränderungen auf die IgG Glykosylierung auswirken.

Das IgG N-Glykom von mit *Colitis ulcerosa* und mit Morbus Crohn erkrankten Patienten wurde auch kürzlich veröffentlicht. Auch hier konnten proinflammatorische

Anzeichen gefunden werden. Verglichen zu gesunden Kontrollen konnte gezeigt werden, dass der Galactosylierungsgrad bei *Colitis ulcerosa* und Morbus Crohn Patienten abnimmt.(*51*) Ein ähnliches Muster wurde für eine weitere Patienten-Kohorte berichtet.(*5*) All diese Resultate deuten daraufhin, dass trotz unterschiedlicher Aetiologie der chronischen Entzündungskrankheiten ähnliche Auslöser das globale IgG-Glykom beinflussen und diese Veränderungen hervorrufen.

1.2 Funktionen der Glykane

1.2.1 Proteinfaltung

Während der Glykoproteinsynthese spielen Glykane eine wichtige Rolle. So wird ein falsch gefaltetes Glykoprotein im Calnexin-Calreticulin-Kreislauf durch die Glycosyltransferase erkannt und bewirkt die Verknüpfung zu Calnexin und Calreticulin. Die Konformation des konjugierten Moleküls verhindert die weitere Ergänzung von Monosaccharidresten, was wiederum zur Aussortierung durch glykanspezifische Lektine führt (*32*).

1.2.2 Erkennung

Glykane werden meist direkt durch glykanbindende Proteine erkannt, die für die Zell-Matrix-Wechselwirkung sowie zelluläre Signalisierung von wichtiger Bedeutung sind (52). Glykanbindende Lektine besitzen kohlenhydraterkennende Domänen, die spezielle Glykane oder strukturelle Merkmale erkennen und aussortieren. Während der Proteinsynthese z.B. spielen Glykane bei der Qualitätskontrolle eine sehr wichtige Rolle und kontrollieren die Protein-Degradation durch das Trimmen von Mannoseeinheiten an der richtigen Position (32). Die Kohlenhydratkomponenten der Glykoproteine greifen außerdem bei hormonellen wie bei bakteriellen und viralen Zellerkennungsvorgängen ein (53, 54).

1.2.3 Bei Tumorerkrankungen

Die Glykosylierung ist hoch sensitiv gegenüber der biochemischen Umgebung. Es wurde bereits mehrmals bestätigt, dass Tumorzellen andere Oligosaccharide synthetisieren als gesunde Zellen (*42, 55-57*). Als Beispiel gilt das Monosaccharid N-

Glykolyneuraminsäure, welches in gesunden Zellen in sehr geringen Konzentrationen vorkommt (< 0.1%) (58). Dies deutet daraufhin, dass Glykane auf der Zelloberfläche als potentielle Biomarker für die frühzeitige Erkennung von humanen Tumorerkrankungen dienen können.

1.2.4 Transport

Die mannosespezifischen Lektine ERGIC-53 und VIP36 sind Membranproteine im Golgi-Komplex. Beide haben eine wichtige Funktion als Transportrezeptoren für Glykoproteine während des Transports vom ER zum Golgi-Komplex.(2)

1.2.5 Schutz

Es ist bekannt, dass terminale Sialinsäuren an Glykanen die Halblebenszeit von therapeutisch interessanten Glykoproteinen verlängern können. Die negative Ladung der Sialinsäuren führt zum Abstoß von Zellen oder der extrazellulären Matrix. Als Beispiel werden einige hochglykosylierte Glykoproteine, wie LAMP-1 und LAMP-2 wegen der zahlreichen Glykane an der Oberfläche vor der Degradierung durch lysosomale Proteasen geschützt.(32)

1.2.6 Andere Mechanismen

Glykosylierung ist auch bei der Zell-Zell-Adhäsion involviert und bei der Aktivierung von Rezeptoren, wie z.B. dem EGFR und dem TGF-β-Rezeptor. Auch während einer Entzündung spielt die Glykosylierung eine sehr wichtige Rolle. Kommt es zu einer Entzündung, so muss es zu einer Akkumulation der Leukozyten am Ort der Entzündung kommen. Dies wird durch die Exprimierung von L-Selektinen und Sialyl-Lewis-X-Liganden auf Leukozyten initiiert. L-Selektine-Liganden, wie z.B. PSGL-1, GlyCAM-1 und MAdCAM-1, besitzen viele O-Glykane, die wiederum im terminalen Bereich Sialyl-Lewis-X- und Sulfatreste besitzen.(*32*)

1.3 Glykosylierung bei Tumorerkrankungen

Glykane bilden auf den Oberflächen der Zellen ein zelltypisches Muster aus, welches sich im Verlauf einer Erkrankung verändert und somit zu Funktionsstörungen des Proteins führen kann. In vielen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass es bei einer
Tumorerkrankung (59-61) zu einer Veränderung des Glykosylierungsprofils kommt. So gewann in der Vergangenheit die Entdeckung eines glykanbasierten Biomarkers für die frühzeitige Erkennung von Tumorerkrankungen immer mehr an Bedeutung.

Die häufigste Modifikation von Glykanen im humanen Organismus ist die zunehmende Anzahl an Sialinsäuren (Neu5Ac). Dabei kommt Sialylierung in α -2-3, α -2-6 oder α -2-8-glykosidischer Verknüpfung vor. 2013 konnten Swindall *et al.* zeigen, dass durch die Erhöhung von Sialyltransferasen eine Zunahme von α -2-6 Sialylierung in CRC-Zellen begünstigt wird (*50*). Misonou et al. analysierten die Glycosphingolipide aus den Tumorgeweben von CRC- Patienten und von gesunden Kontrollen. Es wurden insgesamt drei wichtige Veränderungen detektiert: die Zunahme von Typ 2 Oligosacchariden und die Überexpression von α -2-6- und/oder α -2-3-Sialylierung und von α -1-2-Fucosylierung (*62*).

Eine weitere Veränderung im Glykanprofil des Serums während einer Tumorerkrankung ist die Überexpression von Selektin-Liganden wie sLe^x- und sLe^a-Strukturen (siehe Abb. 7). Mit der Entstehung von Karzinomerkrankungen, wie Ovarial- sowie Pankreaskarzinom, wurden diese Strukturen unabhängig voneinander von Saldova et al. sowie Sarrats et al. in Seren gefunden (*63, 64*).







2

Abb.8: Chemische Struktur von Sialyl-Lewis-X (1) und Sialyl-Lewis-A (2).

Einleitung

Der Grund für diese Veränderung des Glykosylierungsprofils beinhaltet möglicherweise die Störung von verschiedenen Pfaden im biologischen System und damit die Abwesenheit von bestimmten Enzymen wie den Glykosyltransferasen und den Glykosidasen, die für den Aufbau von bestimmten Glykanstrukturen eine Schlüsselrolle spielen (65-67). Im Falle von Erkrankungen werden tumorassoziierte Makrophagen (TAM) entweder von zirkulierenden monozytischen Vorläufern oder durch Cytokine zum Tumor befördert. Viele Tumorzellen sind in der Lage selber Cytokine zu produzieren, die die Halbwertszeit von TAM hinauszögern. Mit der passenden Aktivierung können TAM Tumorzellen zerstören und eine destruktive Reaktion auf dem vaskulären Endothelium hervorrufen. Allerdings können sie auch die Ausbreitung der Tumorzellen anregen, Angiogenese sowie die Invasion und Metastase begünstigen (*68, 69*).

Viele Cytokine wie z.B. Tumornekrosefaktoren (TNF) und IL6 sind in Tumorzellen trotz Sauerstoffmangel induzierbar. Ab einer kritischen Größe des Tumors werden diese Cytokine von den Tumorzellen ausgeschüttet. Diese Botenstoffe werden von den Tumorzellen über die Blutbahnen an die Leber geleitet, wo es zu Funktionsstörungen kommt.

TNF werden hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet. Auch Mastzellen, Lymphozyten, Endothelzellen sowie Fettgewebe, Herz und neuronale Gewebe produzieren TNF. TNF können die Apoptose, Zelldifferenzierung, Zellprofilierung sowie die Ausschüttung anderer Cytokine anregen.

Interleukin-6 (IL-6) wird in vielen Veröffentlichungen als wichtigster Regler der Tumorprogression bezeichnet (*70, 71*). IL-6 ist in Seren von an OvCa erkrankten Patientinnen oft erhöht. Allerdings ist die auf IL-6 basierende Progenese sehr schwach (*72, 73*). Die genaue Aufgabe von IL-6 während der Tumorerkrankung wurde bislang noch nicht festgestellt. Bekannt ist jedoch, dass IL-6 die Freisetzung von vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren von Gebärmutterhalskrebszellen und Glioblastomazellen anregt (*74*).

Man weiß zudem, dass sich der Glykosylierungsgrad von Krebszellen sich, mit der Entwicklung und dem Voranschreiten der Krankheit ändert. Meist variiert nicht nur eine einzelne Glykanstruktur, sondern mehrere Glykanstrukturen zugleich.(*75, 76*)

Eine veränderte Glykosylierung ist nicht nur auf krebskranken Zellen zu beobachten, sondern auch im Totalserum von Tumor Patienten. In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass in Seren von Patientinnen mit OvCa triantennäre und trisialylierte Strukturen mit Lewis^x-Epitop höher reguliert sind als bei gesunden Patientinnen. Man beobachtete dabei auch eine Erhöhung der *core* fucosylierten und degalactosylierten biantennären Glykane.(77) Ferner fand man durch Mausmodelle mit Ovarialkarzinomerkrankungen heraus, dass der Sialylierungsgrad und der Verzweigungsgrad mit der Tumorgröße korreliert.(78) Es konnten auch schon Unterschiede im Totalglykom aus Seren von Patientinnen festgestellt werden, bei denen die Erkrankung in früheren Stadien entdeckt wurde.(19) All diese Ergebnisse sprechen für einen glykanbasierten Biomarker mit hoher Spezifität und Sensitivität, um OvCa frühzeitig und in verschiedenen Stadien zu detektieren.

Diese Glykanstruktur wurde auch bei Patientinnen mit Brustkarzinom in höheren Stadien sowie Leberzellkarzinom entdeckt.(*19, 20, 79-81*) Die Erhöhung der Antennarität, Sialylierung sowie Fucosylierung zählt zu den tumorspezifischen Glykosylierungsänderungen in Seren von Patientinnen.

Mit der Erforschung der Veränderung der Glykanstrukturen, kann in der Zukunft ein besseres Verständnis erlangt sowie eine Früherkennung der Tumorerkrankungen entwickelt werden. Das somit neu gewonnene Wissen kann dann wiederum für die Entwicklung von neuartigen Arzneimitteln genutzt werden.

1.4 Biomarker für die Krebsdiagnostik

1.4.1 Ovarialkarzinom

OvCa gehört zu den am häufigsten vorkommenden Karzinomarten bei Frauen weltweit. Wegen der schlechten frühzeitigen Diagnosemöglichkeiten wird OvCa erst im fortgeschrittenen Stadium erkannt. Somit ist eine Heilungschance in vielen Fällen nur noch sehr gering.(*82*) Dabei liegt die Fünfjahresüberlebensrate bei Patientinnen mit einer rechtzeitig diagnostizierten Krankheit (Stadium I) bei 80%. Wohingegen die Rate bei zu spät entdecktem OvCa (Stadien II, III und IV) nur noch bei 60-14% liegt. Die Faktoren, die das Risiko für die Entstehung dieser Krebsart erhöhen sind: a) die durchgehende Nutzung der Anti-Baby- Pille, b) chronische Entzündung der Gebär-

mutter, c) Talk- und Asbest-Belastung, d) Endometriose, e) OvCa im Verwandtschaftskreis und f) bereits andere vorhandene Tumorerkrankungen. (*83*) OvCa wird gewöhnlich mittels Ultraschalluntersuchung, mit dem Biomarker CA-125 oder aus einer Kombination von beiden Methoden festgestellt. Der Cancer-Antigen CA-125 ist ein Biomarker, der vor allem bei Ovarialkarzinomerkrankungen und auch anderen Tumorarten erhöht sein kann. Bei 80% aller OvCa-Patientinnen mit vorangeschrittener Erkrankung ist der CA-125 Wert stark erhöht. Allerdings nimmt die Sensitivität des Biomarkers für die Detektion von früheren Stadien ab und beträgt nur noch 50%. Für die Früherkennung von OvCa somit ist dieser Biomarker alleine somit nicht geeignet. (*82*) Die CA-125 Konzentration steigt allerdings auch bei Patientinnen mit Endometriose, entzündlichen Erkrankungen des Bauchraumes, wie z.B. chronischer Pankreatitis, bei prämenopausalen Frauen oder auch während der Schwangerschaft, sodass dieser Biomarker zudem an Spezifität verliert. (*84*)

Ein weiterer Biomarker ist das Epididymis Protein 4 (HE4), welches im Serum von OvCa Patientinnen in hohen Konzentrationen vorkommt. Bei gutartigen Ovarialtumore, normalen Ovarialgewebe oder gering malignen Karzinomen ist die Konzentration viel geringer.(*51, 85*) Im Gegensatz zu CA-125 gehen die häufigsten benignen Erkrankungen, wie Endometriose, Myome und funktionelle Zysten nicht mit erhöhten HE4-Werten einher. Die beste Aussagekraft in der Diagnostik für OvCa ergibt sich aus der Kombination beider Tumormarker. Eine große prospektive klinische Studie (PLCO Cancer Screening Trial) zeigt allerdings, dass bei sehr geringer Tumorlast beide Marker negativ bleiben. Ein sonografischer Nachweis des Ovarialtumors ist zwingend notwendig, um eine geeignete Therapie zu starten.(*86*)

Eine weitere Art des OvCa ist das BOT. 1929 beschrieb Taylor diese "semi-maligne" Karzinomart der Eierstöcke.(*87*) Ca. 15-20 % aller epithelialen OvCa gehören zu der Borderline Untergruppe.(*88*) Erst 1961 erkannte und akzeptierte die *International Federation of Gynecology and Obsterics (FIGO)* diese spezielle Art von Karzinom und unterteilte 1971 den epithelialen OvCa in drei Untergruppen : benigne, borderline und maligne.(*89*)

Über 80% der BOT können bis zu 10 Jahre eher diagnostiziert werden als das normale Ovialkarzinom.(*90*) Die Überlebensrate über zehn Jahren liegt bei etwa 90 %, bei rechtzeitiger Diagnose (Stadien I und II) und bei 60-70% bei fortgeschrittenen Stadien (III und IV).(*91-93*)

Die BOT zeigen sowohl feingeweblich als auch tumorbiologisch Unterschiede zu den serösen OvCa. Die zelluläre Wucherung unterscheidet sich stark von den benignen Tumoren, zeigt aber auch keine zerstörerische Invasion in andere Organe wie der maligne Tumor.

Die initiale Behandlung bei Patientinnen mit BOT ist die operative Entfernung des Tumors. Im Allgemeinen ist bei Patientinnen mit einem operativ entfernten BOT keine Chemotherapie notwendig und erst nach über 5 Jahren kann der Tumor wieder im Körper auftreten.

Die klinische Differenzierung zwischen borderline, benigne und maligne ist ohne einen operativen Eingriff sehr schwierig, da die Symptome wie z.B. das Auftreten von asymptomatischen Adnextumoren, Unterleibsschmerzen, Unterschiede im Darmdurchgang oder Beckenschmerzen in allen drei Fällen sehr ähnlich auftaucht. Die gängigen Tumormarker für OvCa CA-125, CEA und CA 19-9 wurden auch für diese Art von Erkrankung angewendet und analysiert. Allerdings war der CA-125 Wert nur bei 24% (8 von 33 Fällen), der CEA Wert bei 9% (3 von 92 Fällen) und der CA 19-9 Wert bei 46% (11 von 24 Fällen) stark erhöht.(*94, 95*) Alle drei Biomarker haben sowohl spezifisch als auch sensitiv keine eindeutige Aussagekraft, sodass weitere Untersuchungen wie z.B. histologische Analysen notwendig wären. Ein Biomarker, der spezifisch BOT aus Seren von Patientinnen erkennt und ihnen weitere unnötige Untersuchungen ersparen würde, wäre in Zukunft von sehr großer Bedeutung.

1.4.2 Kolonkarzinom

CRC ist die dritte häufigste Todesursache sowohl bei Frauen als auch bei Männern weltweit. Die Befallsrate hat sich in den letzten Jahren stark erhöht und das Risiko an dieser Tumorart zu erkranken, liegt in den Industrieländern derzeit bei 5 %. (*96*) Jährlich werden weltweit ca. 1.361.000 neue Fälle diagnostiziert (*97*), wobei die Anzahl der 1. und 2. Stadien bei 10-15% liegt.(*98*) Die Überlebenschance steigt, je eher das Karzinom entdeckt wird. Die Fünfjahresüberlebensrate steigt über 90%, wenn die Krankheit im Stadium I entdeckt wird und fällt auf nur 60% bei Patienten, bei denen sich der Tumor in den Lymphknoten bereits verbreitet hat.(*59, 99*) Weiterhin ist bekannt, dass sich die Fünfjahresüberlebensrate auf 10% minimiert, wenn Metastasen

im Körper präsent sind. (96) Es ist möglich, diese Art von Karzinom durch die rechtzeitige Detektion und Entfernung von Dickdarmpolypen zu verhindern.

Die am meisten weltweit genutzten Untersuchungsmethoden für die frühzeitige Erkennung sind der fäkaler okkulter Bluttest (FOBT), die Sigmoidoskopie und die Koloskopie.(*96*) Allerdings sind all diese invasiven Untersuchungsmethoden sehr unangenehm und sehr zeitaufwändig für die Patienten. Hinzu kommt, dass nichtinvasive Methoden wie der fäkale okkulte Bluttest eine sehr geringe Sensitivität sowie Spezifität von 53% und 87% besitzen.(*96, 100*)

Die am meisten weltweit genutzten Serummarker für die Detektion von CRC sind die Antigene CA 19-9 (Cancer Antigen) und CEA (Carcinoembryonic Antigen) mit einer Sensitivität von nur 18-58%.(*101*) Beide Biomarker zeigen allerdings keine ausreichende Sensitivität zur Nutzung als diagnostischen Biomarker für den CRC. Chemisch ist das CA 19-9 ein Monosialogangliosid, welches isoliert und charakterisiert wurde.(*102*) Weiterhin können Patienten mit einem negativen Blutgruppenmerkmal Lewis CA 19-9 nicht synthetisieren.(*103, 104*) Patienten mit akuter oder chronischer Bauchspeicheldrüsenerkrankung zeigen auch eine erhöhte CA 19-9 Konzentration, was zu einem falschen positiven Ergebnis führt. Außerdem ist die CA 19-9 auch bei Patienten mit anderen Karzinomarten wie z.B. den Bauchspeicheldrüsen-, Gallenwegund OvCa erhöht.(*105*) Ferner ist CA 19-9 als Epitop einer Blutgruppe eine normale Komponente in den meisten Schleimhautzellen und Sekreten wie z.B. dem Mekonium oder dem Stuhlgang.

Das Gleiche gilt auch für das Carcinoembryonic Antigen (CEA), das in der Leber degradiert wird und im Blutkreislauf zirkuliert. CEA kann auch als normale Komponente im Epithelgewebe von anderen Organen vorkommen. Dies führt zur Erhöhung des CEA-Wertes bei Patienten mit bösartigen Bauch- oder Lungenerkrankungen. (*106*) Der Bedarf eines robusten Biomarkers mit hoher Sensitivität sowie Spezifität für CRC ist daher groß.

1.5 Glykananalyse

Die N-Glykane werden enzymatisch mit PNGase F freigesetzt. Das Enzym ist in der Lage komplexe di-, tri- und tetraanntenäre polysialylierte, sulfatierte oder sogar

phosphorylierte Glykane vom Proteinrückgrat abzuspalten. Neben den komplexen Glykanen werden auch highmannose und hybride N-Glykane abgespalten. Voraussetzung für den erfolgreichen Verdau ist die Zugänglichkeit der GlcNAc-Asn-Region für die aktive Seite des Enzyms. Eine weitere Bedingung ist das Vorhandensein von zwei GlcNAc Bausteinen, die an einem Asn-Rest gekoppelt sind.

O Glykane werden mithilfe einer β-Eliminierung mit Natronlauge vom Proteinrückgrat abgespalten. Nach der Trennung der Glykane von den Peptidketten müssen diese vor der Analyse mithilfe von MALDI-TOF-MS entsalzt werden.



Abb.9: Schema der enzymatischen Deglykosylierung eines N-Glykans mittels PNGase F.

Die Freisetzung von Glykanen kann zudem mithilfe von SDS-PAGE Gelen stattfinden. Dabei findet eine vorherige Denaturierung mit SDS und β -Mercaptoethanol oder einem Trypsinverdau statt, wodurch schwer zugängliche Glykosylierungstellen an der Proteinkette zusätzlich freigestellt werden.(*107-111*)

Die Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR) ist die Messmethode die meisten Informationen liefert und mit der es möglich ist, die gesamte Struktur zu ermitteln. Hierbei kann die molekulare Struktur einer Mischung von mehreren chemischen Verbindungen ermittelt werden, ohne eine vorherige Trennung durchführen zu müssen. Diese Technik wurde intensiv für die Charakterisierung von Glykanstrukturen von Glykoproteinen genutzt.(*112*) Die NMR-basierte-Glykananalyse ist gegenüber der Chromatographie und der Massenspektrometrie hoch quantitativ, reproduzierbar und informiert detailliert über die molekulare Struktur, wie z.B. der Verknüpfung zwischen den Ringen oder der Konformation.(*113*) Allerdings benötigt man für die NMR Technologie eine große Menge an Probenmaterial, welches einen bedeutenden Nachteil darstellt, da die Menge an Glykoproteinen in biologischen Proben sehr gering ist. Die Probenvorbereitung ist mühsam und zeitaufwendig.(*112*)

Matrix assisted Laser desorption mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) wird vorwiegend benutzt, um eine qualitative sowie semi-quantitative Analyse von Glykansequenzen mit bereits einer geringen Menge an Probenmaterial durchführen zu können. (114, 115) Für die Beschreibung von jeder möglichen Glykanstruktur muss eine sequenzielle Analyse, z.B mit MALDI-TOF/TOF-MS durchgeführt werden, um mittels der Fragmentspektren ein Glykanprofil erstellen zu können. Mithilfe der Fragmentierung können mittels MALDI-TOF/TOF-MS Aussagen über die Verzweigung der Glykane sowie der Position von Fucosen an Glykanen getroffen werden. Aus den resultierenden Fragmentspektren ist die Rekonstruktion der Sequenzen von Peptiden, Proteinen sowie Glykanen möglich. Dabei wird das Mutterion ionisiert, d.h. die kinetische Energie wird über das gesamte Molekül verteilt und somit auch über alle Bindungen. Die Erzeugung von hochangeregten Schwingungszuständen durch Brechung von schwächeren Bindungen führt zu stabilen Fragmenten. Eine gezielte Selektion des Mutterions ist mit dem LIFT-Modus gewährleistet. In der LIFT-Zelle werden die erzeugten Fragmente und das Mutterion nachbeschleunigt und getrennt detektiert. Die Anwendung kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) liefert eine zusätzliche Intensitätsverstärkung kleinerer Fragmente. Dazu wird in der CID-Zelle eine Kollision zwischen dem beschleunigten Mutterion und Helium erzeugt. Die Messung der Fragmentierung findet im Positivmodus statt.



Abb.10: Schematische Darstellung der Fragmentierung mittels MALDI-TOF/TOF-MS. Cokristallisierte Moleküle werden auf einem Stahltarget durch Laserschuss in geladene Ionen umgewandelt. Das Mutter-Ion wird im CID zerlegt und erlangt nach der Durchquerung durch das Ionengitter den linearen Detektor und schließlich den Reflektor Detektor. Die einzelnen Fragmentionen werden nach Masse detektiert (nach Schrepp et al. 2003).

Vor allem in der angewandten klinischen und der biomedizinischen Forschung hat diese ausführliche Analyse mehr und mehr an Relevanz gewonnen. Doch auch diese Techniken sind in der Generierung von Daten limitiert, sodass meist nicht alle wichtigen Informationen nach einer einzigen Messung erhalten werden können.

Um die gesamte Komplexität der Glykosylierung, unter anderem auch der Isomeren-Verteilung vollständig zu erforschen, sind analytische Methoden wie CE, HPLC oder LC-MS von großer Bedeutung. Die sequentielle Analyse der Glykane erfolgt über Exoglycosidaseverdaus durch welche die Aufklärung der Verknüpfungsart der einzelnen Monosaccharidbausteine möglich ist. Es werden spezifische oder unspezifische Enzyme wie z.B. Sialidasen, Fucosidasen oder Galactosidasen eingesetzt, die am Glykan die jeweiligen Monosaccharidbausteine trennen. Anhand von CE Analyse kann mithilfe der Elektropherogramme vor und nach dem Verdau die Position der Monosaccharide bestimmt werden.(*116*)

Die CE stellt ein hoch effizientes und sehr schnelles Werkzeug dar, wodurch auch verschiedene Isomere von Glykanstrukturen voneinander getrennt und analysiert werden können. Für die Fluoreszenzdetektion ist eine vorherige Markierung der zu analysierenden Glykane mit 8-Aminopyren-1,3,6-trisulfonsäure (APTS) von Nöten.(*48*) Hierbei handelt es sich um eine reduktive Aminierung, wobei zunächst die Kohlenhydrateinheit am reduktiven Ende des Glykans geöffnet wird. Das entstandene Aldehyd (**7** in Abb.11) reagiert unter saurer Bedingung mit dem primären Amin vom APTS (**8** in Abb.11), sodass ein Imin (Schiff'sche Base) (**9** in Abb. 11) entsteht.

Schließlich findet die Reduktion der Schiff'schen Base mittels Natriumcyanoborhydrid, statt, wodurch ein stabiles fluoreszierendes Addukt (**11** in Abb. 11) entsteht.(*10*)



Abb.11: Reduktive Aminierung von Glykanen mit 8-Aminopyren-1,3,6-trisulfonsäure (APTS).

Um Auskunft über die Glykangröße sowie der Ladung der einzelnen Glykanstrukturen mittels HPLC zu geben, dienen Fluoreszenzreagenzien wie beispielsweise 2-Aminobenzamid (2AB) als Markierungsreagenz. (*49*) Dabei reagiert zunächst das 2AB (**12** Abb.12) mit dem Glykan (**13** Abb.12 zu einer Schiff`schen Base (**14** Abb.12), welche mittels Reduktionsmittel unter Protonenabgabe zu einem gelabelten Glykan (**15** Abb.12) umgewandelt wird.



Abb.12: Markierung von Glykanen mit 2AB.

Einleitung

1.6 Glykan-Mikroarrays

Jede lebendige Zelle besitzt auf der Oberfläche eine Schicht aus komplexen Glykanstrukturen, welche viele biologische Prozesse im Organismus vermitteln.(117) In der Glykobiologie beschäftigt man sich dabei immer mehr mit der Struktur-Funktion-Wechselwirkung in biologischen Prozessen, viralen und bakteriellen Infektionen, Tumorerkrankungen und Zellsignalisierung.(2) Glykanmikroarrays repräsentieren eine neuartige, präzise, vielfältige und schnelle diagnostische Technologie für eine Vielzahl von biomedizinischen Anwendungen. Die Entwicklung der Glykanarraytechnologie begann erst im 21. Jahrhundert, als die Notwendigkeit bestand, detaillierte Untersuchungen von glykan-bindenden Proteinen durchzuführen, um damit ihre Rolle in verschiedenen Erkrankungen zu entschlüsseln.(118) 2002 wurden die ersten Protokolle bezüglich Glykan-Immobilisierung auf Array-Oberflächen veröffentlicht. Das Interesse zur Entwicklung von großen Glykan-Bibliotheken, der Entwicklung von effizienten Immobilisierungsmethoden sowie deren Einsatz für die Glykananalyse wuchs schnell heran. (119, 120) Wang et al. konnten eine sehr einfache und effiziente Methode für die Herstellung von Kohlenhydrat-Mikroarrays mit 20.000 Mikrospots auf einem einzelnen Mikroarray entwickeln. Es genügten bereits einige Mikroliter an Serum für die Beobachtung und Analyse eines großen Spektrums an Bindungsspezifitäten an Antikörpern.

Glykanmikroarrays unterscheiden sich hauptsächlich von nicht-derivatisierten und derivatisierten Oligosacchariden und der Immobilisierungschemie. Sehr oft werden die Ziel-Glykane aus natürlichen Ressourcen isoliert, wenn die chemische Herstellung zeitaufwändig oder wenn kein Wissen über die Struktur des potentiellen Liganden vorhanden ist. Die Derivatisierung mithilfe eines Fluoreszenzreagenz ist eine weit vebreitete Anwendung für die Aufreinigung von natürlich vorkommenden Glykanen. Dabei werden die markierten Glykane mittels HPLC oder CE selektiv voneinander getrennt.(121, 122) Die Derivatisierung der Glykane geschieht meist durch eine reduktive Aminierung Aldehydgruppe reduzierenden der am Ende der Oligosaccharide. Die Mikroarraytechnologie ist nicht nur auf ein einziges Label oder einen Linker begrenzt und ist kompatibel mit vielen weit verbreiteten Labelreagenzien wie dem 2-Aminobenzamid (2AB) oder der 2-Aminobenzoesäure (AA). Das Label am Glykan dient zum einen als Fluoreszenzmarker für die Trennung mittels HPLC und zum anderen als Linker zwischen den Glykanen und den Polymeren an der

Oberfläche. Die Mikroarrays werden mit fluoreszenz-markierten Interaktionspartnern, wie z.B den Concanavalin, den Biotin oder dem His tag inkubiert. Ungebundene Substanzen werden weggewaschen und im Anschluss findet die Detektion der gebundenen Substanzen mittels Mikroarrayscanner statt. Mit speziellen Analyseprogrammen kann die relative Bindungsaffinität zwischen gespotteten Glykanen und den jeweiligen Antikörpern berechnet und ausgewertet werden.

Die sehr aufwendige chemische Eigenschaft von Glykanen erschwert deren Synthese im Gegensatz zu anderen Biomolekülen. Dennoch gibt es bereits automatisierte Synthesemöglichkeit von Oligosacchariden. Seeberger et al. haben zwei verschiedene Möglichkeiten veröffentlicht, mit denen die Synthese von Glykanen möglich ist. Bei der *One-pot* Glykansynthese zeigt ein Computerprogramm ("Optimer") die kombinierten Bausteine an, die für die Synthese des gewünschten Glykans benötigt werden. Die Bausteine werden dabei vom meist reaktiven zum weniger reaktiven Ende geknüpft. Die Hydroxylgruppen an den Glykanen werden mit Schutzgruppen, wie z.B. den Fmoc geschützt. (*123*) Die Position, an der die neue glykosidische Verknüpfung entstehen soll, wird mit einer leichten Abgangsgruppe, wie z.B. Halogene oder

Schwefelsäurederivate, maskiert. Alle Edukte werden in einem Gefäß zusammengeführt. Nach der Reaktion, findet die Entschützung sowie die Aufreinigung des Produktes statt. Je nach Glykanlänge und Glykanart kann die Reaktion zwischen einigen Minuten bis hin zu Tagen dauern.(2)

Weiterhin gibt es die Festphasen-Glykansynthese. Hierbei wird der erste Monosaccharid-baustein mit dem reduzierenden Ende mit einem abspaltbaren Linker an polystyrene Kugeln gekoppelt. Alle Hydroxylgruppen werden mit Schutzgruppen geschützt. Die Hydroxylgruppe am anomeren Zentrum wird mit einer leicht abspaltbaren funktionellen Gruppe verbunden. Mit einem Glykosyldonor und einem Aktivator, der die Schutzgruppe am anomeren Zentrum entfernt, wird die neue glykosidische Bindung generiert. Nebenprodukte, Lösungsmittel sowie Edukte werden mit Waschschritten vom Produkt entfernt. Im nächsten Schritt wird für die Addition eines weiteren Monosaccharidbausteins eine weitere Schutzgruppe entfernt.(*2, 124, 125*)

Die Vorteile dieser Technik sind die Nachahmung der natürlichen Anordnung der Oligosaccharide an der Zelloberfläche, die gleichzeitige Analyse von mehreren

Kohlenhydratinteraktionen sowie der Bedarf einer sehr geringen Probenmenge für die Herstellung von mehreren Mikroarrays.

1.6. Immobilisierungsstrategien

Die am häufigsten verwendete Oberfläche für die Mikroarraytechnik ist Glas. Es werden auch häufig Arrays aus Quarz oder Siliciumwafer hergestellt. Die Slides werden vor dem Beschichten mit verschiedenen Detergenzien gereinigt. Es gibt vielfältige Oberflächen-Funktionalisierungen, wie z.B. mit Thiolen oder Aminen für die Immobilisierung an elektrophilen Oberflächen, die Anknüpfung von Maleimidresten für die Immobilisierung an Thiol-beschichteten Oberflächen, die Verknüpfung mit Dienen für die Immobilisierung mithilfe einer klassischen Diels-Alder Reaktion und die Applikation von Kupfer-katalysierten Azid-Alkin-Cycloadditionsreaktionen.(*126*) All diese Funktionalisierungen können sehr leicht synthetisch an Oligosacchariden durchgeführt werden. Die Immobilisierungsreaktion sollte optimalerweise unter milden Bedingungen, bei Raumtemperatur und ohne Zusatz von anderen Reagenzien, spontan ablaufen.(*109*)

1.6.2 Detektion

Um die Bindung zwischen Fängermolekül und Substrat sichtbar machen zu können, müssen die gebundenen Analyten direkt oder indirekt markiert oder über markierungsfreie Techniken detektiert werden. Bei der direkten Methode findet die Markierung am Analytmolekül statt, d.h. die Moleküle der Probe werden mit einem Marker (Fluoreszenzfarbstoffe), wie z.B. dem Cy3 oder dem Cy5 konjugiert.(*127*) Um die Störung der Affinität zwischen Analyt- und Fängermolekül bei der direkten Markierung zu umgehen, können die gebundenen Analytmoleküle in so genannten Sandwich-Assays indirekt nachgewiesen werden. Hierfür wird in einer zweiten Inkubation mit markierten Detektionsmolekülen, die sich spezifisch an ein anderes Epitop vom Analyten binden die indirekte Markierung durchgeführt.(*128*)

Für die markierungsfreie Detektion von Mikroarrays werden z.B. die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie oder die Optischer-Wellenleiter-Spektroskopie genutzt. (*129, 130*) Diese Methoden beruhen auf der Veränderung des evaneszenten elektromagnetischen Feldes an der Oberfläche, die durch Anbindung von Molekülen hervorgerufen wird. Eine weitere markierungsfreie Detektionsmethode ist die *Surface-Enhanced-Laser-Desorption-Ionisation-*Technologie, welche eine Adaptation der Massenspektrometrie im Format von Mikroarrays darstellt.(*131*)

2.1 Analyse des Glykosylierungsprofils aus Seren von Borderline-Ovarialkarzinom und Ovarialkarzinom-Patientinnen

In dem folgenden Abschnitt der vorliegenden Arbeit geht es um die Analyse des Glykosylierungsmusters von BOT-Patientinnen. Aus vorherigen Studien der Arbeitsgruppe ist bereits bekannt, dass die Glykosylierungsprofile von OvCa-Patientinnen und gesunden Kontrollen sich sehr stark voneinander unterscheiden. Die hoch antennären, fucosylierten sowie sialylierten komplexen Strukturen sind in Seren von OvCa-Patientinnen viel höher reguliert, als bei gesunden Kontrollen. Im Gegenzug sind die Signalintensitäten von Highmannosen in gesunden Kontrollen höher, als in OvCa-Proben. Um herauszufinden, ob es auch Unterschiede zwischen BOT-Patientinnen im Vergleich zu OvCa-Patientinnen bzw. gesunden Kontrollen gibt, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Pilotstudie durchgeführt.

BOT wurde von der FIGO seit 1971 als gering maligne Tumorart bezeichnet. Anders als beim epithelialen OvCa ist die Fallzahl von BOT sehr gering und die Überlebensrate viel höher. Etwa 10-20 % aller epithelialen OvCa sind BOT.(*132*) Diese Art von Tumorerkrankung ist aufgrund von mehreren Faktoren sehr schwer zu erfassen. Nur mit histologischen Untersuchungen von erkranktem Gewebe ist es bislang möglich, zwischen BOT und OvCa zu unterscheiden. Daher soll mithilfe der vorliegenden Arbeit gezielt ein Blick auf das Glykosylierungsmuster von beiden Kohorten geworfen werden um zunächst zu untersuchen, ob es grundlegende Unterschiede zwischen beiden Kohorten gibt und um mögliche potentielle, glykanbasierende Biomarker für BOT zu ermitteln. Dafür wurden insgesamt 35 Serenproben von BOT-Patientinnen mit Seren von 20 OvCa-Patientinnen sowie 20 gesunden Kontrollen untersucht und mittels SPSS statistisch ausgewertet. Alle Proben stammen von Frauen zwischen 45-60 Jahren und wurden über eine gewisse Zeitspanne gesammelt und nach einer histologischen Untersuchung zu der jeweiligen Kohorte zugeordnet.

2.1.1 N-Glykananalytik von IgG aus Seren von Ovarialkarzinom-, Borderline-Ovarialkarzinom-Patientinnen und gesunden Kontrollen

Im ersten Schritt wurde das N-Glykosylierungsprofil von Immunoglobulin G (IgG) näher untersucht. IgG ist im menschlichen Serum sowie in Körpersekreten das am häufigsten vorkommende Glykoprotein. Sie machen ca. 80% der gesamten Immunoglobuline aus und sind somit die wichtigste Antikörperklasse im menschlichen Körper. Wegen der biochemischen Eigenschaften der schweren Ketten können die IgG in vier weitere Unterklassen (IgG1-IgG4) differenziert werden.

Mithilfe von Protein G wurde das IgG aus den Seren isoliert, anschließend wurden die Glykopeptide mit Trypsin freigesetzt, aufgereinigt und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Ziel dieser Analyse ist es, signifikant relevante Strukturen innerhalb der IgG Glykopeptiden zu ermitteln und diese mit dem GLYCOV- oder mit CA-125-Wert zu kombinieren, um die Effizienz des bestehenden Biomarkers zu erhöhen. Es konnten insgesamt 9 Glykopeptide sowohl in den Glykoformen IgG1 und IgG2 detektiert werden (siehe Abb.13). IgG2 und IgG3 haben dieselbe tryptische Peptideinheit (E₂₉₃EQFNSTFR₃₀₁) und werden im Weiteren nicht voneinander unterschieden, sondern zusammen betrachtet. Die Strukturen von der Glykoform IgG4 wurden nicht näher analysiert, aufgrund ihrer geringen Signalintensitäten und der Überlappung mit anderen Signalen im MALDI-TOF-MS Spektrum.

2.1.1.1 MALDI-TOF-MS Analyse der IgG Glykopeptiden aus verschiedenen Kohorten

Die IgG Glykosylierungsanalyse wurde mit MALDI-TOF-MS durchgeführt. Die zu untersuchenden Proben wurden in Wasser gelöst und auf einem Stahltarget der Firma Bruker Daltonics gespottet. Nach der Trocknung wurden die Spots mit α -Cyano-4-Hydroxyzimtsäure (CICCA) beschichtet und im negativen Modus analysiert. Es wurden Ionen in einem Massenbereich zwischen *m/z* 1000 und *m/z* 3800 aufgezeichnet. Um eine homogene Stichprobe je Spot zu erhalten, wurde sie mit jeweils 200 Laserschüssen auf der gesamten Fläche vermessen und die Schüsse wurden solange summiert, bis letztlich insgesamt 2000 Laserschüsse pro Spot erreicht wurden.

Ergebnisse

Die Evaluierung der Daten erfolgte mit Hilfe der FlexAnalysis Software der Firma Bruker Daltonics und bereits bekannten Daten aus der Literatur. (*46, 48, 133*) In der nachfolgenden Abbildung sind beispielhaft drei MALDI-TOF-MS Spektren des IgG Glykosyslierungsprofils aus Seren von BOT-Patientinnen, gesunden Kontrollen sowie OvCa-Patientinnen dargestellt.





In der nachfolgenden Abbildung sind die, in einem Massenbereich zwischen *m/z* 2400 bis *m/z* 3300, detektierten Glykopeptide aufgelistet. Es handelt sich hierbei um die afucosylierte G0 Struktur Hex3HexNAc4 (*m/z* 2453.9; *m/z* 2485.9); die monofucosylierten Strukturen G0F dHexHex3HexNAc4 (*m/z* 2600.1; *m/z* 2632.1), G1F dHexHex4HexNAc4 (*m/z* 2762.1; *m/z* 2794.1), G2F dHexHex5HexNAc4 (*m/z* 2924.1; *m/z* 2956.1); die monofucosylierten und monosialylierten Strukturen G1FS1 dHexHex4HexNAc4Neu5Ac₁ (*m/z* 3053.2; *m/z* 3085.2), G2FS1 dHexHex5HexNAc4Neu5Ac₁ (*m/z* 3215.3; *m/z* 3247.3) und die bisecting Strukturen G0FN dHexHex3HexNAc5 (*m/z* 2803.1; *m/z* 2835.1), G1FN dHexHex4HexNAc5 (*m/z* 2965.1; *m/z* 2997.1), G2FN dHexHex5HexNAc5 (*m/z* 3127.2; *m/z* 3159.2).

Glykopeptidstrukturen		m/z
pep	G0	2453.9
pep	G0F	2600.1
● ■ ● pep	G1F	2762.1
pep	G0FN	2803.1
pep	G2F	2924.1
● ■ ■ ■ pep	G1FN	2965.1
◆ ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ●	G1FS1	3053.2
pep	G2FN	3127.2
◆ ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ● ●	G2FS1	3215.3

Abb.14: Mittels MALDI-TOF-MS am IgG2 und IgG3 detektierte Glykopeptidstrukturen aus Seren von Ovarialkarzinom-, Borderline-Ovarialkarzinom-Patientinnen und gesunden Kontrollen. Pep: Peptidanteil, Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Beim betrachten der Spektren fällt auf, dass zwei der neun detektierten Glykopeptiden in OvCa Seren erhöht vorliegen, als in gesunden Kontrollen. Es handelt sich hierbei um die Strukturen G0F dHexHex3HexNAc4 (*m/z* 2600.1; *m/z* 2632.1) und G0FN dHexHex3HexNAc5 (*m/z* 2803.1; *m/z* 2835.1). Vergleicht man dieselben Strukturen zwischen BOT-Patientinnen und gesunden Kontrollen, sind die Signalintensitäten der beiden Glykopeptiden G0F dHexHex3HexNAc4 (*m/z* 2600.1; *m/z* 2632.1) sowie G0FN dHexHex3HexNAc5 (*m/z* 2803.1; *m/z* 2835.1) in gesunden Kontrollen höher. Um eine eindeutige Aussage bezüglich der Signalintensitäten und den Signifikanzen treffen zu können, müssen statistische Analysen durchgeführt werden.

2.1.1.2 Statistische Auswertung mittels SPSS

Zunächst wurden die ROC-Kurven für alle mittels MALDI-TOF-MS detektierten Glykopeptide generiert. Hierbei fällt auf, dass die Strukturen G0F sowie G0FN mit AUC-Werten (*Area under the curve*) von 0,77 und 0,73 eine hohe Spezifität und Sensitivität aufweisen. In OvCa sowie in BOT Seren sind diese Strukturen überexprimiert vorzufinden als in gesunden Kontrollen. Die Signalintensitäten der anderen Strukturen sind in Seren von OvCa und BOT-Patientinnen geringer als in gesunden Kontrollen.



Ergebnisse

	AUC
2600.1	0.753
2803.1	0.677

Abb.15: ROC-Kurven der in BOT/OvCa-Proben hochregulierten Glykopeptidstrukturen und die AUC-Werte der jeweiligen Strukturen.



Abb.16: B) ROC-Kurven der in Seren BOT/OvCa-Proben herunterregulierten Glykopeptidstrukturen und die AUC-Werte der jeweiligen Strukturen.



Herunterreguliert in OvCa und BOT Proben

Abb.17: Glykopeptidstrukturen der in Ovariakarzinom als auch in BOT Seren hochreguliert sowie herunterreguliert sind.

Im nächsten Schritt wurden die vier in Borderline- sowie OvCa herunterregulierten Strukturen G1F, G2F, G2FN, G2FS1 mit den niedrigsten AUC-Werten zusammengefasst (Gruppe A). Ebenso wurden die beiden in BOT/OvCa-Proben hochregulierten Strukturen G0F und G0FN mit den höchsten AUC-Werten zusammengefasst und als Einheit betrachtet (Gruppe B). Mittels der Box-Plot-Analyse soll überprüft werden, ob der Unterschied der beiden neu definierten und zusammengefassten Gruppen zwischen gesunden Kontrollen und OvCa bzw. BOT-Proben signifikant ist. Die folgenden beiden Abbildungen zeigen den Unterschied zwischen den Kohorten für beide Gruppen. Beide Box-Plot-Analysen bestätigen nochmals die mittels MALDI-TOF-MS Spektren analysierten Unterschiede zwischen gesunden und malignen Kohorten.

Gruppe A





Abb.18: Box-Plot Analyse der potentiellen Biomarkerstrukturen der Gruppe A und B in Abhängigkeit der Kohorten. Gruppe A: G0F, G0FN mit P*=0.024 und Gruppe B: G1F, G2F, G2FN, G2FS mit P=0.055.

Ergebnisse

Im weiteren Verlauf wurden für beide Gruppen die ROC Kurven gebildet und zusammen mit den ROC Kurven von CA-125 sowie von GLYCOV verglichen. Hierbei stellte sich heraus, dass die AUC-Werte der ROC Kurven für die jeweiligen Gruppen mit 0.846 und 0.812 höher sind als die AUC-Werte der beiden Biomarker GLYCOV und CA-125.



Abb.19: ROC-Kurven und die AUC-Werte der GLYCOV-Werte, CA-125 Werte sowie die der Glykopeptidkombination der Gruppe A und B.

Als nächstes wurden die Strukturen der beiden Gruppen vereint und die ROC Kurve in Kombination mit dem gängigen Biomarker CA-125 generiert. Es stellte sich heraus, dass die Kombination aus den in dieser Arbeit ermittelten Strukturen zusammen mit dem CA-125 Biomarker die beste ROC Kurve mit einer sehr hohen Sensitivität sowie Spezifität und einem AUC-Wert von 0.916 darstellt.

Im Gegensatz dazu sind die AUC-Werte vom GLYCOV-Marker mit 0.780 und CA-125-Marker mit 0.783 geringer als der AUC-Wert der Kombination. Die Kombination der Glykopeptidstrukturen mit dem GLYCOV-Wert liefert einen AUC-Wert von 0.690 und ist somit nicht signifikant genug.



Abb.20: ROC-Kurven und die AUC-Werte der GLYCOV-Werte, CA-125-Werte sowie die der Glykopeptidkombination der Gruppe A und B zusammen mit den CA-125-Werten.

Da in der Literatur bekannt ist, dass die Veränderung des Glykosylierungsmusters in IgG stark altersabhängig sowie geschlechtsabhängig ist, sollte im nächsten Schritt untersucht werden ob die ermittelten strukturellen Veränderungen vom Alter oder vom Geschlecht abhängen. Da es sich in der vorliegenden Arbeit nur um Patientinnen handelt, wurden die potentiellen Biomarker Strukturen aus beiden Gruppen zusammen mit den CA-125 Werten nur gegen das Alter aufgetragen und analysiert. Die Veränderung der Glykopeptidstrukturen zeigt, eine leichte Korrelation zum Alter (r=0.299, P= 0.027). Es ist zwar ein leichter Anstieg der OvCa- sowie BOT-Proben zu verzeichnen allerdings ist der Anstieg verglichen mit anderen bekannten altersabhängigen Veränderungen in der Literatur nicht sehr stark ausgeprägt wie z.B. in der Arbeit von Bakovic et al.. Sie haben über die altersabhängige Veränderung der IgG-

Glykoylierung bei Frauen und Männer in einer Altersspanne von 23-68 Jahren berichtet. Sie konnten eine ausgeprägte Abnahme der IgG1 und IgG2 Galactosylierung mit zunehmendem Alter zeigen (Frauen r=0.722, Männer r=0.579). Somit kann eine nur altersabhängige Veränderung der Strukturen widerlegt werden.



Abb.21: Korrelation der signifikanten Glykopeptidstrukturen in Kombination mit dem CA-125 Biomarker gegen das Alter der Patientinnen (r=0.299, P=0.027). Runder Kreis: Gesunde Kontrollen; Raute: OvCa/BorderlineOvCa-Proben.

2.1.2 N-Glykananalytik mittels MALDI-TOF-MS von Ovarialkarzinom-, Borderline-Ovarialkarzinom-Patientinnen und gesunden Kontrollen

2.1.2.1 Vorbereitung und Analyse der Borderline-Ovarialkarzinom-Proben

Während der Analyse der BOT-Seren fiel eine Verunreinigung in den MALDI-TOF-Massenspektren auf, welcher sich im vorderen Bereich (m/z 800 bis m/z 1500) erstreckte. Aufgrund des Polymers konnten die N-Glykane im vorderen Bereich nicht genau analysiert werden, welches die statistische Auswertung zunehmend erschwerte.



Abb.22: MALDI-TOF-MS von mit PNGase F gespaltenen N-Glykane aus Seren von BOT-Patientinnen ohne Aufreinigung. Die Messung erfolgte im Positivmodus auf einem Stahltarget. Die Massenpeaks liegen ionisiert vor [M+Na]⁺. Alle Massenpeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt.

Um das Problem zu umgehen wurde versucht die Polymerverunreinigung aus den Proben mithilfe von C18-Säulen zu entfernen. Dafür wurden die BOT-Proben vor dem PNGase F Verdau, mithilfe von C18-Säulen gereinigt, eingeengt und erst danach mit dem Enzym PNGase F behandelt.

Nach der Permethylierung mit Methyliodid und DMSO wurden die Proben mit MALDI-TOF-MS analysiert. Nach dieser Behandlung war die Verunreinigung in den Spektren nicht mehr vorhanden. Allerdings fiel auf, dass die Signalintensitäten der Highmannosen sowie die der komplexen Glykanen im Massenbereich zwischen m/z1000 und m/z 2500 viel geringer war als in den Spektren ohne vorherige Reinigung. Viele biantennäre Strukturen wie z.B. m/z 2039 konnten im vorderen Bereich nicht mehr detektiert werden. Die hinteren Strukturen wie dHex₁Hex₇HexNAc₆Neu5Ac₃ (m/z4226,6), Hex₇HexNAc₆Neu5Ac₄ (m/z 4414,7) und dHex₁Hex₇HexNAc₆Neu5Ac₄ (m/z4588,7) waren in vielen Spektren kaum oder nicht detektierbar.



Abb.23: MALDI-TOF-MS von mit PNGase F gespaltenen N-Glykane aus Seren von BOT-Patientinnen nach der Aufreinigung mit C18-Säulen. Die Messung erfolgte im Positivmodus auf einem Stahltarget. Die Massenpeaks liegen ionisiert vor [M+Na]⁺. Alle Massenpeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Deshalb wurden im nächsten Schritt anstelle der C18-Säulen, Zentrifugen Säulen mit Zellulose Filtern der Firma Amicon mit einem *cut-off* Wert von 3 kDa verwendet. Die Proben wurden zunächst in 500 µl Wasser gelöst, dreimal mit 500 µl Wasser gewaschen und unter Vakuum eingeengt. Im Anschluss fand die Permethylierung gefolgt von der MALDI-TOF-MS Analyse statt.

Die Spektren zeigten eindeutig viel mehr Strukturen als die vorherigen Spektren. Auch die Signalintensitäten waren viel höher und damit auch mit den Spektren ohne Aufreinigung vergleichbar. Vor allem im hinteren Bereich waren, deutlich mehr Strukturen detektierbar gewesen, als bei den Proben nach der Aufreinigung mittels C18-Säulen.

Diese Aufreinigungsmethode hat weiterhin den großen Vorteil, dass das Eluat am Ende nicht 1,2 mL wie bei mit den C18-Säulen beträgt, sondern nur noch 500 µl. Somit ist diese Aufreinigung nicht nur effizienter, sondern auch viel schneller als die Aufreinigungsmethode zuvor.



Abb.24: MALDI-TOF-MS von mit PNGase F gespaltenen N-Glykane aus Seren von BOT-Patientinnen nach der Aufreinigung mit Amiconsäulen. Die Messung erfolgte im Positivmodus auf einem Stahltarget. Die Massenpeaks liegen ionisiert vor [M+Na]⁺. Alle Massenpeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Für die weitere Untersuchung wurden alle BOT-Proben sowie OvCa- und gesunden Proben mittels Amicon Säulen aufgereinigt, um mögliche Polymerverunreinigungen zu eliminieren bevor der Verdau mit PNGase F durchgeführt wurde (siehe Abb.25).



Ergebnisse



Abb.25: Schematische Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte für die analytische Auswertung.

2.1.2.2 MALDI-TOF-MS Analyse der gesunden, Ovarialkarzinomsowie Borderline-Ovarialkarzinom-Proben

In der nachfolgenden Abbildung sind die MALDI-TOF-MS Spektren aus Seren von gesunden, BOT- und OvCa-Patientinnen dargestellt. In einem Massenbereich von m/z 1500 bis m/z 4800 konnten insgesamt 42 N-Glykanstrukturen mittels MALDI-TOF-MS im positiven Reflektormodus detektiert werden. Dabei handelt es sich um fünf Highmannosestrukturen und 37 komplexe N-Glykanstrukturen. Die Spanne der komplexen Glykanstrukturen reicht von mono sialylierten und/ oder fucosylierten bis hin zu tetra sialylierten und/ oder fucosylierten Strukturen. Beim Betrachten des gesamten Spektrums fallen Unterschiede im vorderen Bereich (m/z 1500-m/z 2700), sowie im hinteren Bereich (m/z 2900-m/z 4800) auf. Es gibt Strukturen, deren Signalintensitäten von gesund nach OvCa nach unten hin stetig abnehmen, wie z.B. bei m/z 1763.6 und Signale, die zunehmen, wie z.B. bei m/z 4226.5.



Abb.26: MALDI-TOF-MS von mit PNGase F gespaltenen N-Glykane aus Seren von gesunden, BOT-Patientinnen und OvCa-Patientinnen nach der Aufreinigung mit Amiconsäulen. Massenbereich von *m/z* 1500 bis *m/z* 4950. A) MALDI-TOF-MS Spektrum von gesunden Serum, B) MALDI-TOF-MS Spektrum BOT-Patientinnen und C) MALDI-TOF-MS Spektrum von OvCa-Patientinnen. Die Messung erfolgte im Positivmodus auf einem Stahltarget. Die Massenpeaks liegen ionisiert vor [M+Na]⁺. Alle Massenpeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

In einem Massenbereich von *m/z* 1400 bis *m/z* 2300 konnten insgesamt vier Highmannosen: Hex₅HexNAc₂ (*m/z* 1579.6), Hex₆HexNAc₂ (*m/z* 1783.6), Hex₇. HexNAc₂ (*m/z* 1987.7) und Hex₈HexNAc₂ (*m/z* 2192.9) mittels MALDI-TOF-MS Analyse detektiert werden. Weiterhin konnte eine Hybridstruktur Hex₅HexNAc₃Neu5Ac bei *m/z* 2186.9 und die folgenden 13 komplexen N-Glykane dHexHex₃HexNAc (*m/z* 1590.6), Hex₄HexNAc₃ (*m/z* 1620.6), Hex₃HexNAc₄ (*m/z* 1661.6), dHexHex₃HexNAc₄ (*m/z* 1835.7), Hex₄HexNAc₄ (*m/z* 1865.7), Hex₃HexNAc₅ (*m/z* 1906.7), Hex₄HexNAc₄- Neu5Ac (*m*/*z* 2039.8), Hex₅HexNAc₄ (*m*/*z* 2069.8), Hex₄HexNAc₅ (*m*/*z* 2111.8), 2226.9), Hex₄HexNAc₄Neu5Ac (*m/z* dHexHex₅HexNAc₄ (*m/z* 2244.9) und $Hex_4HexNAc_5Neu5Ac$ (*m*/*z* 2285.9) detektiert werden. Davon sind 6 N-Glykanstrukturen weder fucosyliert noch sialyliert, 5 N-Glykanstrukturen sind monofucosyliert, 3 N-Glykanstrukturen sind monosialyliert und eine N-Glykanstruktur liegt disialyliert vor. Folgende Beobachtungen konnten bei der Betrachtung der drei MALDI-TOF-MS Spektren festgestellt werden:

- Das monofucosylierte N-Glykan mit der Masse *m/z* 1835.7 nimmt von gesund nach OvCa zu.
- Die Signalintensitäten der monosialylierten Strukturen Hex₄HexNAc₄Neu5Ac (*m*/*z* 2039.8) und dHexHex₅HexNAc₄ (*m*/*z* 2244.9) sowie der Strukturen Hex₄HexNAc₃ (*m*/*z* 1620.6), Hex₇HexNAc₂ (*m*/*z* 1987.7), Hex₈HexNAc₂ (*m*/*z* 2192.9) sowie Hex₅HexNAc₄ (*m*/*z* 2069.8) sind in BOT am höchsten.
- Die Strukturen Hex₅HexNAc₂ (*m/z* 1579.6), dHexHex₃HexNAc (*m/z* 1590.6), Hex₃HexNAc₄ (*m/z* 1661.6), Hex₆HexNAc₂ (*m/z* 1783.6), Hex₄HexNAc₄ (*m/z* 1865.7), Hex₄HexNAc₃Neu5Ac (*m/z* 1981.7), Hex₄HexNAc₅ (*m/z* 2111.8), (*m/z* 2226.9), dHexHex₅HexNAc₄ (*m/z* 2244.9) und Hex₄HexNAc₅Neu5Ac (*m/z* 2285.9) nehmen von der gesunden Kohorte zu OvCa Kohorte ab.

Auffällig ist, dass von insgesamt vier Highmannosen die Signalintensitäten von zwei Strukturen (m/z 1579.6 und m/z 1783.6) von gesund nach malign abnehmen. Und zwei Strukturen (m/z 1987.7 und 2192.9) in BOT hochreguliert vorkommen.



Abb.27: MALDI-TOF-MS von mit PNGase F gespaltenen N-Glykane aus Seren von gesunden, BOT-Patientinnen und OvCa-Patientinnen nach der Aufreinigung mit Amiconsäulen. Massenbereich m/z 1500 - m/z 2300. A) MALDI-TOF-MS Spektrum von gesunden Serum, B) MALDI-TOF-MS Spektrum BOT-Patientinnen und C) MALDI-TOF-MS Spektrum von OvCa-Patientinnen. Die Messung erfolgte im Positivmodus auf einem Stahltarget. Die Massenpeaks liegen ionisiert vor [M+Na]⁺. Alle Massenpeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Die MALDI-TOF-MS Spektren im Massenbereich von m/z 4100 bis m/z 4950 zeigen insgesamt sieben unterschiedliche komplexe tetrantennäre, sialylierte und fucosylierte N-Glykanstrukturen: Hex₇HexNAc₆Neu5Ac₃ (m/z 4051.5), dHexHex₇HexNAc₆Neu5Ac (m/z 4226.5), dHex₃Hex₇HexNAc₆Neu5Ac₃ (m/z 4400.5), Hex₇HexNAc₆Neu5Ac₄ (m/z 4414.5), dHexHex₇HexNAc₆Neu5Ac₄ (m/z 4588.5), dHex₂Hex₇HexNAc₆Neu5Ac₄ (m/z 4762.5) und dHex₃Hex₇HexNAc₆Neu5Ac₄ (m/z 4935.5). Die Signalintensitäten der einzelnen Glykanstrukturen nehmen von gesund nach malign zu.

Ergebnisse



Abb.28: MALDI-TOF-MS von mit PNGase F gespaltenen N-Glykane aus dem Serum von gesunden, BOT-Patientinnen und OvCa-Patientinnen nach der Aufreinigung mit Amiconsäulen. Massenbereich von m/z 4100 bis m/z 4950. A) MALDI-TOF-MS Spektrum von gesunden Serum, B) MALDI-TOF-MS Spektrum BOT-Patientinnen und C) MALDI-TOF-MS Spektrum von OvCa-Patientinnen. Die Messung erfolgte im Positivmodus auf einem Stahltarget. Die Massenpeaks liegen ionisiert vor [M+Na]⁺. Alle Massenpeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

2.1.2.3 Hauptkomponenten-Analyse

Die Verteilung der Proben wurde mithilfe der Hauptkomponenten-Analyse (ClinProtool) näher betrachtet. Die 3D Darstellung der Datensatzverteilung zeigt, dass sich alle drei Kohorten, voneinander unterscheiden. Diese Verteilung spricht eindeutig dafür, dass es Unterschiede zwischen BOT- sowie OvCa-Proben gibt. Es gibt in der Mitte auch einen Bereich in dem es zu einer Überlappung der drei Kohorten kommt. Eine höhere Anzahl an Proben könnte in Zukunft diese Verteilung und damit den Unterschied der drei Kohorten bestätigen.



Abb.29: Verteilung des analysierten Datensatzes mittels Hauptkomponenten-Analyse. Rote Punkte: OvCa-Proben, grüne Punkte: gesunde Proben, blaue Punkte: BOT-Proben.

2.1.2.4 Statistische Auswertung mittels SPSS

2.1.2.4.1 Statistisch relevante N-Glykanstrukturen in Borderline-Ovarialkarzinom

Bereits in vorherigen Arbeiten wurden Seren von mit OvCa erkrankten Patientinnen mit gesunden Kontrollen verglichen. Es konnte ein sogenannter GLYCOV-Wert bestimmt werden, mit dem es möglich ist OvCa-Proben von gesunden Proben zu unterscheiden. Dabei wurden die in OvCa höher regulierten komplexen N-Glykanstrukturen durch die herunterregulierten Highmannose Strukturen geteilt. Lag der GLYCOV-Wert über 0.63, so handelt es sich um eine OvCa-Probe. Bei gesunden Proben war der GLYCOV-Wert unter 0.63. Um zu sehen ob es möglich ist, mit dem GLYCOV-Wert BOT-Proben zu erkennen, wurde die Formel auch in dieser Studie angewendet. Allerdings konnten nur 11 von 20 BOT-Proben als krank eingestuft werden. Alle anderen Proben. Weiterhin war es mit der Formel nicht möglich eine Spanne der GLYCOV-Werte zu identifizieren, die eindeutig alle BOT-Proben als maligne- bzw. Borderline einstuft (siehe Tabelle 3 im Anhang).

Ergebnisse

Um eine bessere Zuordnung der BOT-Proben zu erlangen wurde im Anschluss eine neue statistische Analyse der gesunden, OvCa sowie der BOT-Proben durchgeführt.

Da es sich in der vorliegenden Studie um insgesamt 3 verschiedene Kohorten handelt, wurde der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, um signifikante N-Glykanstrukturen zu identifizieren. Allerdings lieferte dieser Test insgesamt 23 signifikante Strukturen. Da die Anzahl der relevanten N-Glykanstrukturen für die weitere statistische Auswertung zu hoch war, wurde im nächsten Schritt der AUC-Wert zwischen jeweils zwei Kohorten der insgesamt drei Kohorten gebildet. Gleichzeitig wurde mithilfe des Mann-Whitney-U-Test überprüft, ob die N-Glykanstrukturen mit einem hohen AUC-Wert gleichzeitig signifikant sind, d.h. einen P-Wert unter 0.05 besitzen. Die Normalverteilung der Proben wurde mithilfe des One Sample Kolmogrov-Smirnov Tests bestätigt.

Zunächst wurden die BOT-Proben mit den gesunden Kontrollen verglichen. Es konnten insgesamt zwei N-Glykanstrukturen identifiziert werden, die in BOT-Proben höher reguliert waren als in gesunden Kontrollen. Es handelt sich dabei zum einen um die monofucosylierte N-Glykanstruktur dHex₁Hex₆HexNAc₅-Neu5Ac (m/z 3054.1) und zum anderen um die difucosylierte N-Glykanstruktur dHex₂Hex₆HexNAc₅Neu5Ac₃ (m/z 3950.2). In den gesunden Kontrollen konnten insgesamt 4 signifikante Strukturen ermittelt werden: Hex₅HexNAc₂ (m/z 1579), dHex₁Hex₃HexNAc₃ (m/z 1590), Hex₄HexNAc₃ (m/z 1620), Hex₄HexNAc₃Neu5Ac (m/z 1981).

Im weiteren Verlauf wurden die BOT-Proben mit den OvCa-Proben verglichen, um die signifikanten Strukturen zwischen diesen beiden Kohorten zu ermitteln. Sowohl die Generierung der AUC-Werte sowie der Mann-Whitney-U-Test liefern insgesamt fünf Strukturen, die in BOT-Proben und zwei Strukturen, die in OvCa-Proben höher reguliert vorkommen. Die komplexen N-Glykanstrukturen HexNAc₄Hex₄ (m/z 1865.7), Hex₅HexNAc₄ (*m*/*z* 2069.8), Hex₅HexNAc₃Neu5Ac (*m*/*z* 2186.9), dHexHex₅HexNAc₄ (m/z 2244.9) sowie Hex₅HexNAc₄Neu5Ac (m/z 2431.9) sind in BOT-Seren hochreguliert. Und die beiden monofucosylierten, tetraantennären, komplexen Strukturen dHexHex₇HexNAc₆Neu5Ac₄ (*m*/z 3950.5) und dHexHex₇HexNAc₆Neu5Ac₃ (m/z)4226.5) sowie die difucosylierte, triantennäre komplexe Struktur dHexHex₇HexNAc₆Neu5Ac₄ (m/z 4588.5) sind in den OvCa-Proben signifikant.



Abb.30: Massen sowie die Strukturen der hoch regulierten Strukturen in gesunden Kontrollen, BOTsowie OvCa-Proben. Alle Massen wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Die BOT-Seren sollen als eigene Gruppe oder krank eingestuft werden, um somit in Zukunft die Krankheit, bevor sie zum Ausbruch kommt, rechtzeitig zu erkennen und die dafür notwendige Therapie den Patientinnen anbieten zu können. Deshalb wurden im nächsten Schritt alle N-Glykanstrukturen die in OvCa sowie in BOT-Proben signifikant waren vereint. Es wurde eine neue Formel generiert, in der die in OvCa und BOT höher regulierten Strukturen durch die in gesunden Kontrollen signifikanten Strukturen dividiert wurden.

Wert = ((2431 m/z+2244 m/z+2186 m/z+2069 m/z+1865 m/z+4227 m/z+4588 m/z+3054 m/z+ 3951 m/z) /9)*(4/(1590 m/z+ 1620 m/z+ 1981 m/z+ 1579 m/z))

Abb.31: Formel für die Bestimmung der neuen Werte. Alle rel. Areas der hoch regulierten Strukturen in BOT und OvCa werden addiert und durch die Anzahl der N-Glykane dividiert. Gleichzeitig werden die in gesunden Proben hochregulierten Strukturen summiert und die Anzahl der N-Glykane durch die Summe dividiert. Beide Produkte werden im Anschluss miteinander multipliziert.
Insgesamt sind es neun verschiedene komplexe N-Glykanstrukturen, die in OvCa und in BOT erhöht vorkommen, und vier N-Glykanstrukturen, welche in gesunden Kontrollen höher reguliert sind als in den malignen Kohorten. In Tabelle 4 im Anhang sind die neuen GLYCOV_B Werte für alle drei Kohorten berechnet aufgelistet.

Der Bestcut-off für BOT liegt bei 1,0 und für malign bei 4,10. Alle gesunden Proben haben einen Wert unter 1,0 und wurden so alle richtig als gesund eingestuft. Die BOT-Proben liegen zum größten Teil zwischen 1,0 bis 4,10 und wurden somit als Borderline korrekt erkannt. Es sind insgesamt acht Proben die einen höheren Wert als 4,10 aufweisen und somit als krank eingestuft werden. Dies beträgt etwa 23%. Aber keiner der 20 BOT-Proben wurde mithilfe der GLYCOV_B-Werte als gesund eingestuft. Der GLYCOV_B Wert hat im Gegensatz zum GLYCOV-Wert eine höhere Sensitivität sowie Spezifität für BOT-Proben.

Mithilfe von SPSS wurden die ROC Kurven für alle Kohorten gebildet. Vergleicht man alle drei Kurven miteinander so fällt auch hier auf, dass die Kurve mit dem GLYCOV_B-Werten eine höhere Sensitivität sowie Spezifität besitzt als die ROC Kurven mit den GLYCOV-Werten sowie mit den CA-125-Werten. Der AUC-Wert der ROC Kurve mit den neuen Werten beträgt 0.96 und ist im Vergleich zu den anderen AUC-Werten (0.83 und 0.46) am höchsten.



Abb.32: ROC-Kurven der GLYCOV_B-, GLYCOV- und CA-125-Werte und die jeweiligen AUC-Werte.

Im weiteren Verlauf wurden die Box-Plots der GLYCOV-Werte sowie von den GLYCOV_B-Werten für alle drei verschiedenen Kohorten kreiert. Die Box-Plot-Analyse dient zur Bestätigung der hoch- bzw. herunter Regulierung der signifikanten Glykanstrukturen die mit dem vorherigen Tests ermittelt wurde. Anhand der Box-Plots wird deutlich, dass der neu errechnete Wert am aussagefähigsten ist und einen eindeutigen Unterschied zwischen den OvCa-, den BOT-Proben und den gesunden Kontrollen zeigt.



Abb.33: Box-Plot Analyse des GLYCOV_B Wertes von BOT-Proben, OvCa-Proben sowie gesunden Kontrollen. Die Signifikanzen zwischen den Kohorten wurden mit Hilfe des Anova Tests ermittelt. **P: < 0.01 und P > 0.19.

Die Box Plots der GLYCOV-Werte sowie der CA-125 Werte, zeigen keinen eindeutigen Unterschied zwischen den verschiedenen Kohorten. Mithilfe des Anova Tests wurden im weiteren Verlauf die Signifikanzen zwischen den Gruppen untersucht. Der P-Wert zwischen den Gruppen ist bei den GLYCOV-Werten sowie bei den CA-125 Werten viel höher als bei dem neu errechneten Werten. Die Box-Plot Analyse zeigt, dass vor allem der Unterschied zwischen den gesunden Kontrollen und der BOT-Proben nicht signifikant ist.



Abb.34: Box-Plot Analyse der GLYCOV und CA-125-Werte von BOT-Proben mit OvCa sowie gesunden Kontrollen.Signifikanz zwischen den Kohorten P>0.05.

2.1.2.4.2 MALDI-TOF/TOF-MS-Analyse der in Borderline-Ovarialkarzinom signifikanten N-Glykanstrukturen

Die mittels SPSS ermittelten komplexen N-Glykanstrukturen wurden nun mit MALDI-TOF/TOF-MS-Analyse näher untersucht. Mithilfe der MALDI-TOF/TOF-MS-Analyse konnte im nächsten Schritt die Fragmentierung der einzelnen N-Glykanstrukturen durchgeführt werden. Die in BOT überexperimentierte Struktur mit der Masse m/z1865 konnte mit den Fragmentsignalen Hex₃HexNAc₂ (m/z 1143,3), Hex₃HexNAc₃ (m/z 1402,4) sowie Hex₄HexNAc₃ (m/z 1606,8) bestätigt werden.



Abb.35: MALDI-TOF/TOF-MS von der komplexen N-Glykanstruktur *m/z* 1865,3. Die Glykane liegen in ionisierter Form vor [M+Na]⁺. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Da die Signale der Glykanstrukturen mit den Massen *m/z* 2039,7 sowie *m/z* 2069,7 nah beieinander liegen, sind im Fragmentspektrum der biantennären, desialylierten sowie afucosylierten Glykanstruktur *m/z* 2069,7 auch Fragmentsignale der benachbarten Glykanstruktur zu sehen. Folgende Fragmentsignale bestätigen die vorgeschlagene N-Glykanstruktur b: HexGlcNAc (*m/z* 472,2), GlcNAc₂ (*m/z* 545,3) sowie Hex₃GlcNAc₃ (*m/z* 1402,6).

a



Abb.36: MALDI-TOF/TOF-MS von den komplexen N-Glykanstrukturen a) *m*/z 2039,7 und b) *m*/z 2069,7. Die Glykane liegen in ionisierter Form vor [M+Na]⁺. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Folgende Fragmentsignale im nachfolgenden Fragmentspektrum bestätigen die monosialylierte N-Glykanstruktur mit der Masse m/z 2186.8: HexNeu5Ac (m/z 620.0), HexHexNacNeu5Ac (m/z 847.0), Hex₅HexNAc₃ (m/z 1810.7) und Hex₄HexNAc₃-Neu5Ac (m/z 1968.7)



Abb.37: MALDI-TOF/TOF-MS von den komplexen N-Glykanstrukturen *m/z* 2186.8 Die Glykane liegen in ionisierter Form vor [M+Na]⁺. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Auch im Fragmentspektrum der biantennären monofucosylierten Glykanstruktur mit der Masse *m/z* 2244,1 sind Fragmentsignale der benachbarten Struktur zu sehen. Im nachfolgenden Fragmentspektrum konnten insgesamt drei Fragmentsignale detektiert werden, die eindeutig zur der Struktur b) passen. Es handelt sich um die Fragmente Hex₂HexNAc (*m/z* 623,3), dHexHex₃HexNAc (*m/z* 1317,6) und dHexHex₄HexNAc₃ (*m/z* 1781,7).



Abb.38: MALDI-TOF/TOF-MS von den komplexen N-Glykanstrukturen a) *m/z* 2228,0 und *m/z* 2244,1. Die Glykane liegen in ionisierter Form vor [M+Na]⁺. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Die antennäre Sialinsäure der monosialylierten, biantennären Struktur mit der Masse m/z 2431,4 konnte mit den Fragmenten bei HexHexNAcNeu5Ac (m/z 847,2), HexHexNAcNeu5Ac (m/z 866,2), Hex₄HexNAc₂Neu5Ac (m/z 1690), Hex₃HexNAc₃Neu5Ac (m/z 1763,8), Hex₄HexNAc₃Neu5Ac (m/z 1968,2) und Hex₅Hex-NAc₃Neu5Ac (m/z 2154,4) verifiziert werden.



Abb.39: MALDI-TOF/TOF-MS von der komplexen N-Glykanstruktur *m/z* 2431,4. Die Glykane liegen in ionisierter Form vor [M+Na]⁺. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Die Abb. 40 zeigt das Fragmentspektrum des komplexen N-Glykans mit der Masse m/z 3054.4. Die Fucose der triantennären sowie monosialylierten Struktur kann antennäre oder *core* gebunden vorkommen. Das Isomer mit einer antennären Fucose, konnte mit folgenden Fragmentsignalen bestätigt werden: HexHexNAcNeu5Ac (m/z 846.7), dHexHex₄HexNAc₃ (m/z 1766.6), Hex₅HexNAc₃Neu5Ac (m/z 2416.4) sowie Hex₆HexNAc₄Neu5Ac (m/z 2590.4). Die folgenden Fragmentsignale sprechen für eine Struktur mit einer *core* gebundenen Fucose: HexHexNAc (m/z 471.7), dHexHex₄Hex-NAc₃eu5Ac (m/z 1766.4) und Hex₆HexNAc₄Neu5Ac (m/z 2590.4).



Abb.40: MALDI-TOF/TOF-MS von der komplexen N-Glykanstruktur *m/z* 3054,4. Die Glykane liegen in ionisierter Form vor [M+Na]⁺. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

2.2 Veränderung des Glykosylierungsprofils in Blutseren von Kolonkarzinom-Patienten

Im zweiten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden die Glykosylierungsunterschiede zwischen CRC-Patienten und gesunden Kontrollen analysiert und verglichen. Dafür wurden insgesamt 36 Serenproben von CRC-Patienten in den Stadien I, II, III und IV sowie 12 gesunde Serenproben enzymatisch mittels PNGase F in Lösung verdaut und anschließend mittels MALDI-TOF-MS qualitativ und quantitativ untersucht. Die Spektren wurden mit Glykoworkbench ausgewertet und schließlich mit verschiedenen Statistikprogrammen wie ClinProTools und SPSS miteinander verglichen.

Informationen zu den untersuchten Seren sind in Tabelle 5 im Anhang aufgelistet.

Ziel dieser Arbeit ist es, potentielle Biomarker basierend auf spezifische Glykanstrukturen, für die Detektion von CRC in Seren zu finden und diese mittels MALDI-TOF-TOF-MS zu bestätigen.



Abb.41: Übersicht über die Abspaltung und Aufreinigung der N-Glykane der Serenproben sowie die strukturelle Charakterisierung und anschließende Auswertung.

2.2.1 Analyse des Glykosylierungsprofils aus Seren von Patienten mit Kolonkarzinom und gesunden Kontrollen

Die Seren von CRC-Patienten wurden zuvor gesammelt und nach der Separierung des Serums von den Blutplättchen bei -80°C gelagert. Für die vorliegende Studie wurden jeweils 10 µL Serum in Phosphatpuffer (pH 6.5) gelöst. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem enzymatischen Verdau zunächst mittels DTE und IAA denaturiert und im Anschluss über Nacht im Phosphatpuffer und 100 mU PNGase F Enzym bei 37°C verdaut (vgl. Kapitel 4.3.1). Die freigesetzten N-Glykane wurden über C18- und Carbograph-Säulen aufgereinigt, mit Methyliodid und DMSO permethyliert und massenspektrometrisch mit MALDI-TOF-MS im positiven Reflektormodus charakterisiert. Die einzelnen Peaks wurden mithilfe der Software Glykoworkbench annotiert und im Anschluss mittels MALDI-TOF/TOF verifiziert.

Die relativen Peakflächen der N-Glykane wurden in prozentuale Anteile umgerechnet, damit ein semiquantitativer Vergleich zwischen gesunden und kranken Probanden möglich ist. Die Gesamtpeakfläche der N-Glykane eines Spektrums wurde auf 100 % gesetzt. Die Anteile der einzelnen N-Glykane resultieren aus den dazugehörigen relativen Peakflächen (siehe Tab.6 im Anhang).

2.2.2 MALDI-TOF-MS Analyse von gesunden und Kolonkarzinom-Serumproben

Im Folgenden sind exemplarisch zwei MALDI-TOF-Massenspektren einer gesunden Kontrolle und einer CRC-Probe dargestellt. Es konnten in beiden Spektren insgesamt fünf Highmannosen und 41 komplexe N-Gykane in einem Massenbereich von 1400-5000 m/z detektiert werden.



Abb.42: MALDI-TOF-MS von mit PNGase F gespaltenen N-Glykanen aus A) gesunden Kontrollen und B) CRC-Serumprobe. Ein repräsentatives Massenspektrum einer gesunden und einer CRC-Probe mit den 41 am meisten detektierbaren N-Glykanstrukturen ist dargestellt. Die Messung erfolgte im Positivmodus auf einem Stahltarget. Die Massenpeaks liegen ionisiert vor [M+Na]⁺. Alle Massenpeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

In einem Massenbereich von 1400-2400 m/z konnten folgende fünf Highmannosen: Man₅GlcNAc₂ (m/z 1579.6), Man₆GlcNAc₂ (m/z 1783.7), Man₇GlcNAc₂ (m/z 1987.7), Man₈GlcNAc₂ (m/z 2192.8), Man₉GlcNAc₂ (m/z 2396.9) detektiert werden. Weiterhin sind folgende 20 komplexe Strukturen in Seren von CRC-Patienten höher reguliert als bei gesunden Kontrollen: Hex₅HexNAc₂ (m/z 1579.6), dHex₁Hex₃HexNAc₃ (m/z1590.6), Hex₄HexNAc₃ (*m*/*z* 1620.6), Hex₃HexNAc₄ (*m*/*z* 1661.7), dHex₂Hex₃HexNAc₃ $(m/z \ 1764.7), \ Hex_6 Hex NAc_2 \ (m/z \ 1783.7), \ dHex_1 Hex_3 Hex NAc_4 \ (m/z \ 1835.7),$ Hex₄HexNAc₄ (m/z 1865.7), Hex₃HexNAc₅ (m/z 1906.7), dHex₂Hex₄HexNAc₃ (m/z1968.7), Hex₄HexNAc₃Neu5Ac₁ (*m*/*z* 1981.7), Hex₇HexNAc₂ (*m*/*z* 1987.7), Hex₄Hex-NAc₄Neu5Ac₁ (*m*/*z* 2040.8), Hex₅HexNAc₄ (*m*/*z* 2070.8), Hex₅HexNAc₄ (*m*/*z* 2111.8), Hex₄HexNAc₅ (m/z 2186.8), Hex₈HexNAc₂ (m/z 2192.8), Hex₄HexNAc₄-Neu5Ac₁ (m/z 2244.8), dHex₁Hex₄HexNAc₅ (*m*/*z* 2285.9), Hex₉Hex-NAc₂ (*m*/*z* 2396.9). Im Massenbereich zwischen 2400-4000 m/z konnten insgesamt 20 komplexe N-Glykanstrukturen detektiert werden, wobei die Signale von den Strukturen Hex₅Hex-NAc₄Neu5Ac₁ (m/z 2431.9), dHex₁Hex₅HexNAc₄Neu5Ac₁ (m/z 2605.0), Hex₅Hex-NAc₄Neu5Ac₂ (m/z 2792.1), dHex₁-Hex₅HexNAc₅Neu5Ac₁ (m/z 2850.1), dHex₁Hex₅-HexNAc₄Neu5Ac₂ (m/z 2966.2), dHex₁-Hex₅HexNAc₅Neu5-Ac₂ (m/z 3211.2) und $Hex_6HexNAc_5Neu5Ac_2$ (*m*/z 3241.2) in CRC-Proben herunterreguliert sind. Alle anderen N-Glykane sind, wie im vorderen Bereich, in CRC-Proben höher reguliert als in gesunden Kontrollen.

Besonders auffällig ist, dass im hinteren Bereich die Signalintensitäten von allen tetraantennären, fucosylierten sowie sialylierten komplexen Strukturen in den Massenspektren von CRC-Patienten viel höher sind als in gesunden Kontrollen (siehe Tabelle 6 im Anhang).

2.2.3 Hauptkomponenten-Analyse der MALDI-TOF-MS Spektren

Im Anschluss wurden alle MALDI-TOF-Massenspektren mit der Durchführung einer *Principal Component Analysis* (PCA) mithilfe des Statistikprogramms ClinProtool analysiert, um die Verteilung des Kollektivs näher zu analysieren und um auf mögliche Ausreißer, zu überprüfen. Im Allgemeinen ist PCA eine statistische Methode, welche dazu dient, aus einem multidimensionalen Datensatz durch Reduktion einen gering dimensionalen Datensatz zu erzeugen.

83



Abb.43: Verteilung des analysierten Datensatzes mittels der Hauptkomponenten-Analyse. Rote Punkte: CRC-Proben (Stadien I, II, III und IV), Grüne Punkte: Gesunde Proben.

Die Verteilung des Datensatzes zeigt keine eindeutige Trennung zwischen beiden Kohorten. In der Mitte gibt es einen Bereich, in dem es zu einer Überlappung der Proben kommt. Der Großteil der malignen Proben befindet sich im Bereich zwischen 0 und - 8 und der Großteil der gesunden Proben befindet sich zwischen 0 und 6. Um eine aussagekräftigere Verteilungsanalyse durchführen zu können, bedarf es an weiteren malignen sowie gesunden Proben.

2.2.4 Statistische Auswertungen mittels SPSS

2.2.4.1 Statistisch relevante N-Glykanstrukturen in Kolonkarzinom

Im nächsten Schritt wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS die ROC Kurven für alle detektierten Strukturen generiert. Um die Signifikanz der einzelnen Strukturen zu analysieren wurde nach der Bestätigung einer nicht-Normalverteilung mittels des One Sample Kolmogrov-Smirnov Tests, der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Insgesamt existieren fünf komplexe N-Glykanstrukturen dHex₂Hex₄HexNAc₃ (*m/z* 1968.7), Hex₅HexNAc₃Neu5Ac₁ (*m/z* 2186.8), dHex₂Hex₅HexNAc₅ (*m/z* 2663.0),

dHex₁Hex₇HexNAc₆Neu5Ac₃ (*m/z* 4226.6) und dHex₁Hex₇HexNAc₆Neu5Ac₄ (*m/z* 4588.7), die sowohl einen sehr hohen *area under the curve*-Wert (AUC-Wert > 0.9) sowie einen guten P-Wert (< 0.05) zeigen. Ferner ergeben zwei komplexe N-Glykanstrukturen dHex₁Hex₅HexNAc₄Neu5Ac₂ (*m/z* 2966.2) und dHex₁Hex₅-HexNAc₅Neu5Ac₂ (*m/z* 3211.2) einen niedrigen AUC-Wert (< 0.2). Ihre Signifikanz hingegen ist mit einem Wert von < 0.05 sehr gut.



Herunterreguliert in Kolonkarzinom

Abb.44: ROC-Kurven der sieben statistisch relevanten komplexen N-Glykanstrukturen. Massen sowie die Strukturen der hoch- und herunterregulierten Strukturen in CRC Proben. Alle Massen wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Im Anschluss wurden die einzelnen relevanten N-Glykanstrukturen mit der Generierung von Box-Plots untersucht, um die Hoch- bzw. Herunterregulierung, die mittels Mann-Whitney-U-Test und ROC-Kurven detektiert wurden, zu bestätigen. Wegen der geringen Serumanzahl wurden die Stadien I und II sowie III und IV zusammengelegt und mit der gesunden Kohorte verglichen. Anhand des Anova Tests wurden die Signifikanzen zwischen "gesund" und "Stadien I/II" sowie "gesund" und "Stadien III/V" ermittelt. Beim Betrachten der Box-Plots fällt auf, dass die in CRC hochregulierten Strukturen in den Stadien I/II höher reguliert sind als in den Stadien III/IV. Im Vergleich zu den gesunden Proben sind die Box-Plots der Stadien III/IV höher reguliert und im Verhältnis zu den Proben der in Stadien I/II herunterreguliert. Die N-Glykanstrukturen mit den Massen m/z 1968.6, m/z 2186.8, m/z 4226.6 sind zwischen den einzelnen Gruppen sehr signifikant (P < 0.01). Die beiden anderen in

CRC hochregulierten Strukturen mit den Massen m/z 2663.0 und m/z 4588.7 haben einen P-Wert von < 0.02 und sind ebenfalls hoch signifikant.





Abb.45: Box-Plot Analyse der gesunden Kontrollen mit den Stadien I/II sowie mit den Stadien III/IV. Die Signifikanzen zwischen den Kohorten wurden mit Hilfe des Anova Tests ermittelt. [*P: < 0.01 und **P: < 0.02]

Eine ähnliche Verteilung der Box-Plots ist ebenfalls bei den in CRC-Proben herunterregulierten N-Glykanstrukturen zu beobachten. Hierbei sind die Box-Plots von den CRC-Proben in den Stadien I/II noch tiefer herunterreguliert als die CRC-Proben in den Stadien III/IV. Der P-Wert ist daher zwischen den gesunden Kontrollen und den Stadien I/II mit P < 0.01 signifikanter als mit den Stadien III/IV (P > 0.19).



Abb.46: Box-Plot Analyse der gesunden Kontrollen mit den Stadien I/II sowie mit den Stadien III/IV. Die Signifikanzen zwischen den Kohorten wurden mit Hilfe des Anova Tests ermittelt. [*P: < 0.01 und ***P > 0.19]

2.2.4.2 MALDI-TOF/TOF-MS-Analyse der in Kolonkarzinom statistisch wichtigen N-Glykanstrukturen

Drei der zwischen gesunden und CRC-Serumproben unterscheidenden Glykanstrukturen (*m/z* 2966.2, *m/z* 3211.2 und *m/z* 4588.7) sind komplett sialyliert sowie monofucosyliert. Die Anwesenheit der *core*-Fucose bei der Struktur m/z 2966.2 wurde mit den Fragmentsignalen bei dHexHexNAc₂ (*m/z* 719.1), dHexHex₂HexNAc₂ (*m/z* 1113.4), dHexHex₃HexNAc₂ (*m/z* 1317.6), dHexHex₃Hex-NAc₃ (*m/z* 1562.7), dHex-Hex₄HexNAc₃ (*m/z* 1766.7) dHexHex₃HexNAc₃Neu5Ac (*m/z* 1937.8), dHex-Hex₄HexNAc₃Neu5Ac (*m/z* 2142.2) sowie dHexHex₅HexNAc₄Neu5Ac (*m/z* 2591.6) bestätigt (siehe Abb.47).

Das Fragmentspektrum der N-Glykanstruktur *m/z* 3211.2 zeigt ein Fragmentsignal bei dHexHex₃HexNAc₃ (*m/z* 1562.9), welches auf die *core*-Fucose hindeutet. Außerdem konnten die Fragmentsignale dHexHex₄HexNAc₄ (*m/z* 2011.9), dHexHex₄-HexNAc₃Neu5Ac (*m/z* 2128.0), dHexHex₄HexNAc₄Neu5Ac (*m/z* 2387.2), dHexHex₅-HexNAc₄Neu5Ac (*m/z* 2577.2) , dHexHex₅HexNAc₅Neu5Ac (*m/z* 2836.8) und dHexHex₅HexNAc₄Neu5Ac₂ (*m/z* 2953.9) detektiert werden, die ebenfalls auf eine *core*-Fucose hinweisen (siehe Abb.47).

Wegen der zu geringen Signalintensitäten der tetraantennären, komplett sialylierten und monofucosylierten N-Glykanstruktur m/z 4588.7 und der tetraantennären, trisialylierten, monofucosylierten N-Glykanstruktur m/z 4226.6 konnten hier keine Fragmentierungen durchgeführt werden.





Abb.47: MALDI-TOF/TOF-MS von den komplexen N-Glykanstrukturen m/z 2966.2 und m/z 3211.2. Die Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Die antennären und *core*-difucosylierten N-Glykanstrukturen *m/z* 1968.7 und *m/z* 2663.0 wurden mit den nachfolgenden Fragmentspektren verifiziert. Das MALDI-TOF/TOF-Massenspektrum von *m/z* 1968.7 deutet mit den Fragmentionssignalen dHexHexNAc (*m/z* 474.1) und dHexHexNAcHex (*m/z* 678.3) auf eine antennäre Fucose hin. Und die Fragmentsignale bei dHexHexNAc₂ (*m/z* 719.4), dHexHex-HexNAc₂ (*m/z* 909.3) und dHexHex₂HexNAc₂ (*m/z* 1127.5) weisen eindeutig auf eine *core*-Fucose hin.



Abb.48: MALDI-TOF/TOF-MS von der komplexen N-Glykanstruktur *m/z* 1968.7. Die Glykane liegen in ionisierter Form vor [M+Na]⁺. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Das Fragmentspektrum der N-Glykanstruktur mit der Masse m/z 2663.0 besitzt ebenfalls eine antennäre- und eine *core*-Fucose. Die antennäre-Fucose konnte mit insgesamt 4 Fragmentsignalen bestätigt werden: dHexHexHexNAc (m/z 678.4), dHexHex₃HexNAc₃ (m/z 1562.6), dHexHex₅HexNAc₃ (m/z 1967.2) und dHex-Hex₅HexNAc₄ (m/z 2213.0). Mittels MALDI-TOF/TOF-MS konnte die *core*-gebundene Fucose mit folgenden Fragmenten verifiziert werden: dHexHex₃HexNAc₃ (m/z 1562.6) und dHex₂Hex₅Hex-NAc₄ (m/z 2386.1).



Abb.49: MALDI-TOF/TOF-MS von der komplexen N-Glykanstruktur *m/z* 2663.0. Die Glykane liegen in ionisierter Form vor [M+Na]⁺. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Es konnte außerdem eine Hybridstruktur mit der Masse m/z 2186.8 identifiziert werden, welche in CRC-Proben höher reguliert ist als in gesunden Kontrollen. Diese Struktur konnte mit den Fragmentionsignalen bei m/z 620.0 (HexNeu5Ac), m/z 847.1 und m/z 865.2 (HexNAcHexNeu5Ac), m/z 1241.4 (HexNAcHex₃Neu5Ac) sowie m/z 1968.2 (HexNAc₃Hex₄Neu5Ac) bestätigt werden.



Abb.50: MALDI-TOF/TOF-MS von der Hybridstruktur mit m/z 2168.8. Die Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

2.2.4.3 GlycoColon-Wert vs. CEA

Carcinoembryonic Antigen (CEA) ist der weltweit am häufigsten eingesetzte Serummarker für die CRC Detektion. Allerdings ist seine Sensitivität nur zwischen 18-58% und somit sehr gering. Ein robuster Biomarker mit einer höheren Sensitivität sowie Spezifität wäre für die Zukunft sehr sinnvoll.

Die in dieser Arbeit gefundenen relevanten N-Glykanstrukturen wurden im nächsten Schritt zusammen als eine Einheit betrachtet. Daher wurden die signifikanten Strukturen als GlycoColon-Wert zusammengefasst. Dafür wurden die relativen Intensitäten der hochregulierten Glykanstrukturen durch die der herunterregulierten Strukturen dividiert: (Summe *m/z* 1968.7, *m/z* 2663.0, *m/z* 3776.4, *m/z* 4226.6 und *m/z* 4588.7)/5*2/(Summe *m/z* 2244.8 und *m/z* 2605.0)*100. Gleichzeitig wurden auch die CEA-Werte der Proben bestimmt, um beide Biomarker miteinander zu vergleichen. Da insgesamt mind. 100 µl Serum für die Bestimmung der CEA-Werte nötig sind, konnten aus den ursprünglich 36 Serenproben nur bei 20 Proben der CEA-Wert bestimmt werden. In Tabelle 7 im Anhang sind die GlycoColon- und die CEA-Werte von insgesamt 12 CRC- sowie 12 gesunden Proben aufgelistet.

Der Cut-off Wert des GlycoColon-Werts liegt bei 35. 10 von 12 CRC-Serenproben besitzen einen höheren GlycoColon-Wert als 35. Im Gegensatz dazu konnten mittels CEA Bestimmung 9 von 12 CRC-Proben als krank eingestuft werden. Der CEA-Wert hat eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 79%, wohingegen der neue Wert eine bessere Sensitivität sowie Spezifität besitzt (91% und 86%). Durch die Vereinigung beider Biomarker erhöhen sich die Sensitivität auf 92% und die Spezifität auf 96%. Auch der AUC-Wert vom GlycoColon-Wert ist besser als die vom gängigen CEA-Wert (0.98 versus 0.93).

A)

			Prognose		
			Gesund	/ CRC	Sensitivität /
			0	1	Spezifität
GlycoColon	Gesund	0	11	1	91.0
	CRC	1	2	10	86.0
CEA	Gesund	0	11	1	90.0
	CRC	1	3	9	79.0

Abb.51: A) Tabelle der Binären logistische Regression für die Auswertung der Genauigkeit vom GlycoColon- und vom CEA-Wert.

B)



Abb.52: B) ROC-Kurven und AUC-Werte vom GlycoColon-Wert und CEA-Wert im Vergleich.



Die Kombination der in der vorliegenden Arbeit gefundenen hochregulierten sowie herunterregulierten N-Glykanstrukturen, wurde zuvor noch nicht in der Literatur beschrieben. Der GlycoColon-Wert sollte in Zukunft mit einer höheren Anzahl an Proben näher untersucht und bestätigt werden.

2.3 In-Gel Analyse von Modellproteinen

Für die Analyse des Glykosylierungsprofils von biologisch wichtigen Glykanen sind Gelanalysen von großer Bedeutung. Allerdings muss zuvor das zu untersuchende Protein, z.B. nach der Größe oder Ladung, fraktioniert werden. Im folgenden Abschnitt soll durch die Zugabe von n-Octyl-β-D-Glucopyranosid (OGP) die Deglykosylierung von Proteinen in Gelen optimiert werden. Durch den Einsatz des Additivs wird die Diffusion des Enzyms im Gel verbessert, wodurch die Glykanfreisetzung erleichtert wird. Anhand von drei verschiedenen Modellproteinen wurde im Anschluss überprüft, ob sich durch die Zugabe von OGP ein positiver Effekt reproduzieren lässt. Hinzu wurde ermittelt, wieviel Proteinmenge notwendig ist, um ein vollständiges MALDI-TOF-MS Spektrum mit hohen Signalintensitäten zu erhalten.

Die Analyse der Glykane mittels MALDI-TOF-MS sollte nicht wie gewohnt auf einem Edelstahltarget, sondern auf einem AnchorChipTM-Target durchgeführt werden. Der große Vorteil von AnchorChipTM-Targets sind die hydrophilen Stellen in einem hydrophoben Bereich. Die einzelnen Probenmoleküle können sich so während der Trocknung mittig konzentrieren. Diese besondere Ausstattung ermöglicht eine ultra sensitive Messung von sehr geringen Probenmengen. Für die Analyse auf einem Stahltarget werden mindestens 15 ng/µL benötigt, wohingegen für die Analyse mittels AnchorChipTM–Target bereits 0.15 ng/µL ausreichen.

Aus vorherigen Arbeiten ist bereits bekannt, dass für die Messungen auf AchorChip[™]-Targets, das D-Arabinosazon (Ara) als Matrix geeigneter ist als das gängige 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB). Anders als DHB bildet Ara auf dem Target eine homogene Kristallschicht. Dies ist für die Reproduzierbarkeit der Messung von großem Vorteil.

93

2.3.1 Modellprotein Ribonuklease B

Bei der vorliegenden Arbeit dienten als Modellproteine die Ribonuklease B (RNB), das Fetuin und das humane Alpha-1-saures-Glykoprotein (AGP). Diese wurden zuvor reduziert und im Anschluss auf einem SDS-Page (12% T, 2.67% C) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 20 mA je Gel und bei max. 200 V im SDS-Laufpuffer durchgeführt. Nach der Detektion der Modellproteine auf dem Gel mittels Coomassie-Blau, wurden mit Hilfe eines Spotcutters insgesamt sechs Spots von einem mm in Diameter (das entspricht im Falle von RNB etwa 3.75 µg) herausgeschnitten, entfärbt und im Phosphatpuffer mit 1U PNGase F und 8 mg/mL OGP über Nacht verdaut. Für die optimale Deglykosylierung von 50-100 pmol Glykoproteinen In-Gel wurden bislang mindestens 3U PNGase F benötigt. Am nächsten Tag erfolgte die Extraktion, die Entsalzung mit selbst hergestellten Graphitspitzen und die Messung der freigesetzten Highmannosen aus der RNB mittels AnchorChipTM-Target und MALDI-TOF-MS. Die Spektren dieser Messung sind in der nachstehenden Abbildung dargestellt.



Abb.53: MALDI-TOF-MS von mit **PNGase F** gespaltenen Highmannosen aus der RNB. Die Messung erfolgte im Positivmodus auf einem AnchorChipTM-Target. Die Massenpeaks liegen ionisiert vor [M+Na]⁺. A) Highmannosen aus 3.75 µg RNB ohne OGP, B) Highmannosen aus 3.75 µg RNB mit OGP. Alle Massenpeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc.

In einem Massenbereich zwischen m/z 1200-1900 konnten ohne OGP-Zugabe lediglich die Highmannosestrukturen Man₅HexNAc₂ (m/z 1257.3), Man₆HexNAc₂ (m/z 1419.3) und Man₈HexNAc₂ (m/z 1743.5) detektiert werden. Die Zugabe von OGP ermöglichte die Detektion von allen Highmannosen mit hohen Signalintensitäten: Man₅HexNAc₂ (m/z 1257.3), Man₆HexNAc₂ (m/z 1419.3), Man₇HexNAc₂ (m/z 1581.4), Man₈HexNAc₂ (m/z 1743.5) und Man₉HexNAc₂ (m/z 1905.5).

2.3.2 Modellprotein Alpha-1-saures-Glykoprotein (AGP)

Aus der AGP-Bande wurden insgesamt 6 Spots (1 µg desialyliertes AGP) genommen und wie oben beschrieben behandelt. Da die N-Glykane von AGP Sialinsäuren tragen, wurden diese nach dem Verdau mit PNGase F mit Neuramidasen entfernt, mittels selbst hergestellten Graphitspitzen entsalzt und analysiert. Hierbei wurde geprüft, ob der OGP-Effekt auch bei komplexen sowie neutralen N-Glykanen, wie bei den Highmannosen von RNase B, vorliegt.



Abb.54: MALDI-TOF-MS von mit PNGase F gespaltenen N-Glykanen aus Alpha-1-saures-Glykoprotein. Die Messung erfolgte im Positivmodus auf AnchorChip[™]-Target. Die Massenpeaks liegen ionisiert vor [M+Na]⁺. Komplexe N-Glykane aus Alpha-1-Glykoprotein ohne OGP.Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.



Abb.55: MALDI-TOF-MS von mit PNGase F gespaltenen N-Glykanen N-Glykanen aus Alpha-1saures-Glykoprotein. Die Messung erfolgte im Positivmodus auf einem AnchorChip[™]-Target. Die Massenpeaks liegen ionisiert vor [M+Na]⁺. Komplexe N-Glykane aus Alpha-1-Glykoprotein mit OGP. Alle Massenpeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Die Massenspektren von AGP bestätigten den positiven Effekt von OGP. Die mit OGP behandelte Probe zeigt mehr desialylierte Strukturen mit besseren Signalintensitäten als die Probe ohne OGP-Zusatz. Außerdem fällt auf, dass im ersten Massenspektrum nur afucosylierte bi-, tri- und tetraantennäre Strukturen detektiert werden konnten, wohingegen im zweiten Spektrum auch fucosylierte Strukturen mit geringer Intensität sichtbar sind. Folgende N-Glykanstrukturen konnten detektiert werden: Hex₅HexNAc₄ (*m*/*z* 1663.5), Hex₆HexNAc₅ (*m*/*z* 2028.6), dHexHex₆HexNAc₅ (*m*/*z* 2174.7), Hex₇HexNAc₆ (*m*/*z* 2393.7), dHexHex₇HexNAc₆ (*m*/*z* 2393.8), dHex₂Hex₇HexNAc₆ (*m*/*z* 2685.8) und Hex₈HexNAc₇ (*m*/*z* 2758.4).

2.3.3 Modellprotein Fetuin

Als letztes wurden aus der Fetuin-Bande 6 Spots (1µg Fetuin) herausgeschnitten und nach demselben Protokoll von RNB und AGP bearbeitet. Da nun auch die Sialinsäuren an den komplexen N-Glykanen mit in Betracht gezogen werden sollten, wurden die Glykane nach dem Extrahieren aus den Gelstücken mit MeI und DMSO permethyliert und anschließend mittels MALDI-TOF-MS vermessen. Durch die

Permethylierung fand die Derivatisierung der Sialinsäuren zu Methylestern und die Hydroxylgruppen der Oligosacharide zu Methylethern statt. Damit sind zum einen die Steigerung der Ionisierung und zum anderen die zeitgleiche Detektion von geladenen und ungeladenen Oligosacchariden möglich. Die Permethylierung hat des Weiteren den Vorteil, das Peak-Basisrausch-Verhältnis zu verbessern.



Abb.56: MALDI-TOF-MS von mit PNGase F gespaltenen N-Glykanen aus Fetuin. Die Messung erfolgte im Positivmodus auf einem AnchorChipTM-Target. Die Massenpeaks liegen ionisiert vor [M+Na]⁺. A) Komplexe N-Glykane aus 1 μg Fetuin ohne OGP, B) Komplexe N-Glykane aus 1 μg Fetuin mit OGP. Alle Massenpeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Im Spektrum A) konnten insgesamt nur vier N-Glykanstrukturen: $Hex_5HexNAc_4$ -Neu5Ac₂ (*m*/*z* 2792.6), $Hex_6HexNAc_5Neu5Ac$ (*m*/*z* 2880.3), $Hex_6HexNAc_5Neu5Ac_2$ (*m*/*z* 3241.6) und $Hex_6HexNAc_5Neu5Ac_3$ (*m*/*z* 3602.8) detektiert werden. Die Probe

mit OGP Zusatz hingegen zeigt im MALDI-TOF-Massenspektrum zehn N-Glykanstrukturen mit signifikant höheren Signalintensitäten. In einem Massenbereich von m/z 2400 bis m/z 4000 konnten die Strukturen Hex₅HexNAc₄Neu5Ac (m/z 2431.2), dHex₂Hex₅HexNAc₄-Neu5Ac (m/z 2779.3), Hex₅HexNAc₄Neu5Ac₂ (m/z2792.6), $dHex_2Hex_6HexNAc_5$ (*m*/*z* 2867.3), $Hex_6HexNAc_5Neu5Ac$ (*m*/*z* 2880.3), 3241.6), Hex₆HexNAc₅Neu5Ac₂ (m/z)Hex₆HexNAc₄Neu5Ac₃ (m/z)3357.6). Hex₆HexNAc₅-Neu5Ac₃ Hex₈HexNAc₇ (m/z)3417.3), (m/z)3602.8) und $Hex_6HexNAc_5Neu5Ac_4$ (*m*/*z* 3963.9) detektiert werden.

Um die kleinste Probenmenge für eine ausführliche Detektion der N-Glykane mittels MALDI-TOF-MS und AnchorChipTM-Target zu ermitteln, wurde im nächsten Schritt die Zahl der Gelstücke variiert. Es wurden 1, 2 und 3 Gelstücke aus Fetuinbanden herausgeschnitten und die N-Glykane einzeln nach dem oben genannten Protokoll behandelt, extrahiert und analysiert. Abbildungen 58-60 zeigen die Massenspektren der drei verschiedenen Ansätze.



Abb.57: SDS-Page mit 5 μg Fetuin. Die elekrophoretische Trennung erfolgte in einem 12 % igen SDS-Polyacrylamid Gel mit anschließender Coomassie-Färbung. A) 1 Spot, B) 2 Spots und C) 3 Spots von 1 mm² Fläche das entspricht für A) etwa 0,16 μg; für B) 0,33 μg sowie für C) 0,50 μg.



Abb.58: MALDI-TOF-MS von mit PNGase F gespaltenen N-Glykanen aus Fetuin. Die Messung erfolgte im Positivmodus auf einem AnchorChipTM-Target. Die Massenpeaks liegen ionisiert vor [M+Na]⁺. A) Komplexe N-Glykane aus 0.16 μg Fetuin mit OGP. Alle Massenpeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.



Abb.59: MALDI-TOF-MS von mit PNGase F gespaltenen N-Glykanen aus Fetuin. Die Messung erfolgte im Positivmodus auf einem AnchorChipTM-Target. Die Massenpeaks liegen ionisiert vor [M+Na]⁺. B) Komplexe N-Glykane aus 0.33 µg Fetuin mit OGP. Alle Massenpeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.



Abb.60: MALDI-TOF-MS von mit PNGase F gespaltenen N-Glykanen aus Fetuin. Die Messung erfolgte im Positivmodus auf einem AnchorChipTM-Target. Die Massenpeaks liegen ionisiert vor [M+Na]⁺. C) Komplexe N-Glykane aus 0.50 μg Fetuin mit OGP. Alle Massenpeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Im Spektrum A) konnten in einem Massenbereich zwischen *m/z* 2400–*m/z* 4000 insgesamt fünf N-Glykane detektiert werden. Die Spektren B) und C) zeigen insgesamt sieben verschiedene N-Glykanstrukturen. Sie unterscheiden sich lediglich darin, dass die Signalintensität im Spektrum mit zwei Gelstücken geringer ist als im Spektrum mit drei Gelstücken. Folgende N-Glykanstrukturen konnten analysiert werden: Hex₅HexNAc₄Neu5Ac (*m/z* 2431.0), Hex₅HexNAc₄Neu5Ac₂ (*m/z* 2792.0), dHex₂Hex₆HexNAc₅ (*m/z* 2867.0), Hex₆HexNAc₅Neu5Ac (*m/z* 2880.0), Hex₆HexNAc₅-Neu5Ac₂ (*m/z* 3241.1), Hex₆HexNAc₅Neu5Ac₃ (*m/z* 3602.2) und Hex₆HexNAc₅-Neu5Ac₄ (*m/z* 3963.4). Dieser Versuch verdeutlicht, dass eine Mindestmenge von 10 pmol von Fetuin für einen In-Gel-Verdau nötig ist, um ein vollständiges Glykanprofil mit hohen Signalintensitäten mittels MALDI-TOF-MS in Kombination mit AnchorChipTM-Target zu erhalten.

Alle drei Modellproteine konnten mit der Zugabe von OGP vollständig In-Gel deglykosyliert werden. Nicht nur die Zahl der detektierten Glykanstrukturen nahm zu, sondern auch die Intensitäten der Signale verzehnfachten sich bei allen Versuchen. Außerdem konnte die Menge des eingesetzten Enzyms von ursprünglich 3 U auf 1 U reduziert werden. Zudem konnte erfolgreich bestätigt werden, dass eine Mindestmenge von 10 pmol für ein ausführlichen Spektrums nötig ist.

100

2.4 Glykan-Mikroarray für die serumbasierten N-Glykananalytik

Der letzte Abschnitt der vorliegenden Arbeit handelt über die Glykananalyse von Seren mit der neuartigen Mikroarraytechnologie. Diese erst im 21. Jahrhundert entwickelte Technologie erlangt eine immer größere Bedeutung beim Einsatz in der Diagnostik, um in Zukunft eine effizientere und schnellere Analyse von biologischem Material zu ermöglichen. Um eine sehr gute Reproduzierbarkeit, dieser noch unausgereiften Methode zu gewährleiten, sind viele Voruntersuchungen und Testanalysen von Nöten. Zu diesem Zweck wurden im Rahmen dieser Arbeit einige mit epoxy aktivierten Glasträgern und Kopplungsanalysen Glykanen mit verschiedenen Label-Reagenzien durchgeführt und ausgewertet. Das Label dient dabei zum einen für die Trennung der Glykane mittels HPLC und zum anderen als Verbindungsstück zwischen den Epoxygruppen auf den Glasträgern und den Glykanen.

Ziel ist es, für die Glykananalyse mit Mikroarrays die optimale Oberfläche, ein geeignetes Labelreagenz sowie ein optimales Protokoll zu entwickeln mit der es in Zukunft möglich ist Seren von gesunden und karzinomkranken Patienten auf potentielle und glykanbasierten Biomarker zu überprüfen. Dafür wurden zunächst aus kommerziell erwerblichen Modelproteinen, wie z.B Ribonuklease B und Fetuin, Highmannosen und komplexe Glykane isoliert. Nachdem die gewünschten Glykanen vom Proteinrückgrat mit der Aufreinigung über Carbographsäulen getrennt wurden, fand die Auftrennung der einzelnen Glykanstrukturen mit Hilfe der HPLC statt. Anschließend wurde, nach dem Vereinen der zusammengehörigen Fraktionen, die Immobilisierung der Glykane auf den Epoxy aktivierten Glasträgern durchgeführt. Mit der Kopplung von fluoreszenzmarkierten Lektinen, die sich spezifisch an Glykane binden, kann die Affinität der Glykane auf der Oberfläche der Glasträger näher untersucht werden. Für die Immobilisierung wurden mehrere Protokolle angewendet und miteinander verglichen. Hinzu wurden auch verschiedene Fluoreszenzlabel für die Identifikation der Glykane mit HPLC sowie für die Immobilisierung auf den Glasträgern getestet. Für die Auswertung der einzelnen Glasträger diente ein Fluoreszenzscanner der Firma TECAN. Dabei wurden die Glasträger mit unterschiedlicher Wellenlänge gescannt. In der folgenden Abbildung ist schematisch die Darstellung der einzelnen Schritte dargestellt.

101



Abb.61: Schematische Darstellung von der Vorbereitung der Glykane bis hin zur Analyse der Glasträger mit dem Fluoreszenzscanner. Grün: Fluorophor am Glykan, der für die HPLC Trennung sowie für die Verknüpfung mit den Epoxygruppen auf den Glasträgern notwendig ist.

- 2.4.1 Die Auswahl des passenden Labelreagenzes, Lektins sowie der Oberfläche für die Mikroarray-Analyse
 - 2.4.1.1 Synthese und MALDI-TOF-MS Analyse von markierten Glucoseunits aus Dextranhydrolysat

Es wurden unterschiedliche Fluoreszenzreagenzien an das aus vielen Glucoseeinheiten bestehende Polymer Dextran getestet. Zunächst wurde das Dextran mit Essigsäure hydrolysiert und anschließend mit Ammoniak neutralisiert. Somit wurde das lange Polymer in einzelne Glucoseeinheiten unterschiedlicher Längen gespalten. Bereits im Vorfeld wurden drei unterschiedliche Benzolderivate, die bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden können, ausgesucht mit der die ersten Untersuchungen durchgeführt werden sollten. Es handelt sich dabei um das 2-Aminobenzamid (2AB), 2,6-Diaminopyridn (DAP) und Rhodamin 110 (Rho-110).



Abb.62: Chemische Struktur von 2AB (16), DAP (17) und Rho-110 (18)

Durch die Vergrößerung des konjugierten π -Systems des Benzolringes, mit der batochromen Gruppen –NH₂ werden die Absorptions- und Emissionsmaxima verschoben und es kommt gleichzeitig zu einer Steigerung der Fluoreszenzquantenausbeute. Die Substituenten haben demnach durch die Delokalisierung der π -Elektronen einen großen Einfluss auf die Stärke des bathochromen Effektes. Im Falle von Rhodamin 110 bewirken weitere Benzol-Kerne, die Verschiebung des Fluoreszenz-Lichtes in den sichtbaren Bereich des Spektrums. Je mehr es zur Delokalisierung eines Moleküls kommt, desto weniger Anregungsenergie ist nötig.



Abb.63: Chemische Reaktion zwischen 2AB, DAP und Rhodamin 110 mit GU 03-06. GU wurden zusammen mit den jeweiligen Benzolderivaten, einer Mischung aus AcOH/DMSO (3:7) und NaCNBH₃ für 2 h bei 65°C erhitzt. Unter Wasserabspaltung entsteht das jeweilige Produkt.

Nachdem mehrere Ansätze Dextranhydrolysat (1mg) mit den drei verschiedenen Labelreagenzien unter saurer Bedingung bei 65°C für 2 h inkubiert wurden, erfolgte die Aufreinigung der Proben. Es wurden verschiedene Aufreinigungsmethoden wie mit Cellulosetips, Papierchromatographie oder Polyethylensäulen getestet. Dabei konnte die beste Ausbeute mit Polyethylensäulen erzielt werden. Bei den beiden anderen Aufreinigungsmethoden war der Verlust der markierten Glucoseunits zu hoch. Die aufgereinigten Proben wurden im Anschluss in der Speed Vac eingeengt und mittels MALDI-TOF-MS analysiert. Dabei sollte untersucht werden, ob die Labelreaktion des Dextranhydrolysat vollständig stattgefunden hat.



Abb.64: MALDI-TOF-MS von Dextranhydrolysat A) mit 2-Aminobenzamid B) 2,6-Diaminopyridin und C) Rhodamin 110. Die Messungen erfolgten im Positivmodus auf einem Stahltarget. Die Massenpeaks liegen ionisiert vor [M+Na]⁺. Alle Massenpeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt. Schwarzer Kreis: Glucose.

Die MALDI-TOF-MS Spektren zeigen eindeutig, dass alle drei Labelreaktionen vollständig stattgefunden haben. Die 2AB gelabelten Dextranhydrolysatproben zeigen eine Verschiebung der Glucoseinheiten von 120 kDa im Vergleich zu den ungelabelten Glucoseeinheiten. Das Labeln mit DAP und Rhodamin 110 führt zu einer Verschiebung der Signale um 93 kDa bzw. um 292 kDa.

2.4.1.2 Fraktionierungen der gelabelten Dextranhydrolysatproben mittels HPLC

Im Anschluss wurden die gelabelten Dextranhydrolysat Proben mithilfe der HPLC fraktioniert.



Abb.65: Chromatogramm der mit 2AB gelabelten Glucoseeinheiten aus Dextranhydrolysat nach der Standard-TFA-Hydrolyse mit 2N TFA für 4 h bei 100°C. Fraktionierung der GU 04-08 erfolgte in einem Bereich von 20 - 35 min.

Das HPLC-Chromatogramm der präparativen Analyse zeigt im vorderen Bereich zwischen 2.5 - 5 min einen Peak, welcher vom überschüssigen Labelreagenz in der Probe erzeugt wird. Im Bereich zwischen 7.5 – 50 min sind die Peaks der einzelnen gelabelten Glucoseunits zu sehen. Für das Bedrucken der Glasträger wurden die Peaks von GU 4-7 fraktioniert, die zusammengehörigen Fraktionen wurden vereint und in der Speedvac eingeengt.

2.4.1.3 Monosaccharidanalysen mittels HPAEC-PAD

Im nächsten Schritt wurde die Monosaccharidanalyse der zusammengelegten Fraktionen mittels HPAEC-PAD (*High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*) der Firma Dionex ISC3000 durchgeführt. Mithilfe der Monosaccharidanalyse ist die Bestimmung der relativen Anteile der Kohlenhydratbausteine möglich. Dafür wurden zunächst die Glykane durch eine saure Hydrolyse in ihre Monosaccharidbausteine gespalten. Die Quantifizierung der Monosaccharide wurde bei 25°C mithilfe der CarboPac[™] PA1 Säule (2 x 250mm) und der CarboPac[™] PA1 Vorsäule (2 x 50mm) durchgeführt. Aufgrund der sauren Hydrolyse verlieren die Glykane N-Acetylgalactosamin (GalNAc) und N-Acetylglucosamin (GlcNAc) wegen ihrer Acetylierung und sind daher als Amine (GalNH₂, GlcNH₂) nachweisbar.



Abb.66: Beispielhafte Monosaccharidanalyse von 2AB gelabelten Glucoseeinheiten (GU 4) aus Dextranhydrolysat. Die Peaks spiegeln die Verhältnisse der Monosaccharidbausteine wieder. Fucose, Desoxyribose, Arabinosazon, Xylose, Fructose und Melibiose dienen als interner Standard.

In der nachfolgenden Tabelle ist die Auswertung einer Monosaccharidanalyse detailliert dargestellt. Für das Bedrucken der Glasträger ist eine Mindestmenge von 40 ug je Glykan notwendig.

Glucose- Units	Masse [µg]
GU 04	72,72
GU 05	14,99
GU 06	32,83
GU 07	22,12
GU 08	27,48

Tab.3: Die Tabelle zeigt die Menge an Glykanen die nach der HPLC Auftrennung, mittels der Monosaccharidanalyse bestimmt werden konnte.

2.4.1.4 Bedrucken der markierten Dextranhydrolysatproben auf epoxyaktivierten Gasträgern

Die gelabelten Glucoseeinheiten aus Dextranhydrolysat wurden von unserem Koorparationspartner SCIENION AG auf Glasträgern mit Epoxybeschichtung mithilfe eines sci FLEXARRAYER S11 gedruckt. Zunächst wurde ein Druckmuster mit einer negativen Kontrolle (PBS Puffer) erstellt. Insgesamt wurden vier Arrays bestehend aus 4 x 4 Spots mit einem Durchmesser von 230 nm auf den epoxyaktivierten Glasträgern gedruckt. Dabei wurde die Konzentration der einzelnen Glucoseeinheiten (GU04 – GU06) variiert (0.01 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.05 mg/mL und 0.5 mg/mL).





Nachdem die Glasträger mithilfe der Roboter bedruckt wurden, wurden sie für 20 h bei RT in eine Feuchtkammer (65-70% rel. Feuchtigkeit) inkubiert. Um die aktiven Gruppen auf den Glasträgern zu blockieren wurden sie für 1 h bei 50°C mit 100
mM Ethanolamin und 100 mM Na-Phosphatpuffer (pH = 8.5) inkubiert. Nachdem die Glasträger mit 100 mM Na-Phosphatpuffer gewaschen wurden, wurde die Inkubation mit Concanavalin A und Cy 3 durchgeführt. Concanavalin A ist ein Lektin, welches spezifisch endständige Glucose sowie Mannoseeinheiten erkennt. Mit diesem Versuch soll die Verknüpfung zwischen den gelabelten Glucoseeinheiten mit den epoxyaktivierten Glasträgern überprüft und bestätigt werden. Nach der Inkubation mit dem Lektin wurden die Glasträger gewaschen, getrocknet und im Anschluss mithilfe des Fluoreszenzscanners analysiert.



Die Analyse mit dem Fluoreszenzscanner bei einer Wellenlänge von 550 / 570 nm zeigt eindeutig, dass die gelabelten Glucoseeinheiten mit 2AB auf den epoxyaktivierten Glasträgern gekoppelt vorliegen. Um ein ausreichendes Signal zu erhalten ist hierbei eine Mindestkonzentration von 0.5 mg/mL 2AB markierter Probe aus Dextranhydrolysat nötig.

Im weiteren Verlauf wurden die Glucoeeinheiten GU04 – GU07 nach der Markierung mit 2AB, DAP sowie Rhodamin 110 auf epoxy aktivierten Glasträgern gedruckt. Als negative Kontrolle dienten der Phosphatpuffer, Antigen A und B (zwei verschiedene Trisaccharide ohne Label).

B)

	Antigen	Antigen	PBS	
	B	A		0.01 mg/mL
		0000		0.05 mg/mL 0.1 mg/ml
GU 07				0.5 mg/mL
GU 06				
GU 05				
GU 04				
			2 ⁴	
				0.01 mg/mL 0.05 mg/mL
				0.1 mg/mL 0.5 mg/mL
GU 07				
GU 06				
GU 05	****			
	••••			
GU 04			:::::	
	Rho-110	DAP	2- AB	

Abb.69: A) Muster für das Bedrucken Glucoseeinheiten GU 04 – GU 07 mit den drei verschiedenen Labelreagenzien und unterschiedlichen Konzentrationen. B) Epoxy-aktivierte Glasträger mit 2AB, DAP und Rho-110 markierte GU 04 – GU 07 aus Dextranhydrolysat nach der Inkubation mit Concanavalin A Cy3 und nach der Analyse mittels Fluoreszenzscanner.

Die erste Arrayreihe zeigt die mit Rho-110 markierten Glucoseeinheiten aus Dextranhydrolysat. Da das Rhodamin 110 eine sehr hohe Eigenfluoreszenz besitzt und die Arrays dadurch für die weiteren Untersuchungen nicht auswertbar wären, wurde der Entschluss gefasst, in Zukunft nur mit 2AB und DAP zu arbeiten.

Beim Betrachten der Glucoseinheiten mit 2AB und DAP fällt auf, dass für 2AB markierte Glykane die vorher ermittelte Mindestkonzentration von 0.5 mg /mL für ein gutes Signal im Fluoreszenzscanner bestätigt wurde.

Die mit DAP markierten Glucoseeinheiten zeigen jedoch eindeutig, dass eine 3.5fach höhere Fluoreszenzintensität erreicht werden kann, verglichen zu den 2AB markierten Komponenten. Es reichen bereits 10pg (c =10 μ M) DAP derivatisiertes Glykan aus, um ein ausreichendes Signal mittels des Fluoreszenzscanners detektieren zu können. Wohingegen man von 2AB markierten Glykane eine 10fach höhere Menge benötigt um dieselbe Fluoreszensintensität zu erhalten (100pg (c= 100 μ M)). Demzufolge konnte ein LOD-Wert für 2AB derivatisierte Oligosacchariden bei 100 fmol und für DAP derivatisierte Kohlenhydrate bei 10 fmol ermittelt werden. Nachfolgend sind als Beispiel die Scanbilder von GU 4 mit 2AB sowie DAP vor und nach der Inkubation mit dem ConA Cy 3 dargestellt.





Abb.70: A) Epoxy-aktivierte Glasträger mit 2AB und DAP markierten GU 04 aus Dextranhydrolysat nach der Inkubation mit Concanavalin A Cy3 und nach der Analyse mittels Fluoreszenzscanner. B) Bidungsaffinität von Concanavalin A Cy3 mit den Oligosacchariden und den unterschiedlichen Konzentrationen. Säulen repräsentieren die Differenz von der Hintergrundfluoreszenz und der durchschnittlichen Fluoreszenz. Fehlerbalken: Standardabweichung der 4 Spots der einzelnen Oligosaccharide zusammengefasst zu einer Konzentration.

Um die experimentelle Variabilität validieren zu können, wurde im nächsten Schritt für jede Komponente auf den Glasträgern die *median net fluorescence intenstiy* (medNFI) gemessen. Die *median net fluorescence intenstiy* ergibt sich aus der Differenz zwischen Hintergrund-Fluoreszenzintensität (medBFI) und der Roh-Fluoreszenzintensität. Für die Validierung wurden die Intensitäten von zwei verschiedenen Glasträgern an zwei unterschiedlichen Tagen miteinander verglichen. Beide Experimente zeigen eine Übereinstimmung der medNFI-Werte (mean), der Standardabweichung (SD) und den Variationskoeffizienten (CV). Die Korrelationkoeffizienten der drei Parameter bestätigen dies: r_c medNFI=0.98; r_c Standardabweichung=0.95 und r_c Variationskoeffizient= 0.90. Der Variationskoeffizient der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten hat einen Medianwert bei 9.7% und einen Interquartilsabstand von 6.5-13.4% (siehe Abb.71).



Abb.71: Vergleich der A) Mittelwerte, B) Standardabweichung und C) Variationskoeffizienten der Fluoreszenzintensitäten von zwei unterschiedlichen Glasslides. D) Relation der Variations-koeffizienten mit den Mittelwerten. Jeder Punkt repräsentiert verschiedene Glykane und unterschiedliche Konzentrationen auf den Slides.

2.4.2 Isolierung und Aufreinigung von N-Glykanstrukturen für die Glykan-Mikroarray-Analyse

Die vorherigen Testversuche haben gezeigt, dass die besten Ergebnisse mit epoxy aktivierten Glassträgern, Concanavalin A Cy3 und den Labelregenzien 2AB und DAP erzielt werden konnten. Nun wurden die ersten komplexen N-Glykanstrukturen und Highmannosen isoliert, markiert, aufgereinigt sowie nach Größe getrennt.

2.4.2.1 Highmannose N-Glykanstrukturen (RNase B)

Es wurden 1 mg RNase B nach Kyselova verdaut und mittels der Papierchromatographie und mittels der Dialysemembran gereinigt.(*151*) Diese Methode führt zu einem sehr hohen Verlust der Probe. Nach dem Verdau und der Aufreinigung mit der Dialysemembran betrug der Verlust etwa 74% und nach dem Labeln mit 2AB sowie der Aufreinigung über die Papierchromatographie etwa 20%, sodass am Ende nur noch 3 % der Anfangsmenge übrig geblieben sind. Sowohl die Dialysemembran als auch die Papierchromatographie führen, aufgrund ihrer schweren Handhabung zu solch großen Verluste. Bei der Dialysemembran ist es sehr schwierig, die gesamte Probe komplett nach der Aufreinigung aus der Membran zu entnehmen und für die weitere Verarbeitung in ein Eppendorfcup zu überführen. Bei der Papierchromatographie muss mithilfe eines UV-Lichtes, der Bereich auf dem Papierstreifen exakt markiert und herausgeschnitten werden, um im Anschluss die Probe heraus zu extrahieren. Dies führt sicherlich zu einem weiteren sehr hohen Verlust.

Um den Verlust zu verringern, wurde im nächsten Schritt eine Aufreinigung von markierten Glykanen mit Sephadex G10-Säulen getestet. Es handelt sich hierbei um Polyethylensäulen, durch die eine schnelle Trennung der hochmolekularen Substanzen von niedermolekularen Substanzen möglich ist.

Diese Aufeinigungsmethode wurde zunächst an gelabeltem Dextranhydrolysat getestet. 2AB gelabeltes Dextranhydrolysat wurde über Sephadex G10-Säulen gereinigt. Es wurden mehrere Fraktionen gesammelt und im Anschluss mittels der HPLC analysiert. Mit der HPLC Analyse soll herausgefunden werden in welchen Fraktionen sich die Probe mit dem Label befindet und wann genau das überschüssige Labelreagenz von der Säule eluiert wird.



Abb.72: HPLC Chromatogramme der einzelnen gesammelten Fraktionen während der Aufreinigung von 2AB gelabeltem Dextranhydrolysat mittels Sepadex G10-Säulen.

Die HPLC-Chromatogramme zeigten, dass in der ersten Fraktion noch keine gelabelte Probe vorhanden ist. In den Fraktionen 2-6 sind die einzelnen 2AB markierten Glucoseeinheiten zu sehen. Erst in der letzten Fraktion wurde das überschüssige Labelreagenz von der Säule eluiert. Vereint man die Fraktionen 2-6 miteinander, hat man einen Verlust von ca. 58% im Vergleich zu einer nicht gereinigten Probe, sodass am Ende ca. 42% der gelabelten Probe gewonnen werden konnte.

Dies ist zum einen eine schnelle und zum anderen eine bessere Methode für die Trennung des überschüssigen Labelreagenzes vom markierten Probenmaterial. Anhand von speziellen Dialysekammern für die Extraktion von überschüssigen Chemikalien, sollte in Zukunft überprüft werden, ob man den Verlust noch mehr verringern kann.

	Glucose
	prozentualer Anteil
Ohne Aufreinigung	100 %
Vorlauf	3 %
Probe	30%
Nachlauf	9%



Abb.73: Prozentuale Menge der Glucose im Vorlauf, Probe und Nachlauf während der Aufreinigung über Sephadex G10-Säulen.

Im weiteren Verlauf wurden die N-Glykane aus 1 mg RNase B mit 2AB und DAP markiert über Sephadex G10-Säulen aufgereinigt und mittels MALDI-TOF-MS zunächst analysiert, um die Vollständigkeit der Labelreaktionen zu bestätigen. In beiden Massenspektren konnten in einem Massenbereich von m/z 1200- 2000 insgesamt vier Peaks der Highmannose 5, 6, 7 und 8 mit dem jeweiligen Label identifiziert werden. Dabei waren die 2AB markierten Highmannosen: Man₅-2AB (m/z 1377,4), Man₆-2AB (m/z 1539,5), Man₇-2AB (m/z 1701,5), Man₈-2AB (m/z 1863,6) jeweils um 120 Masseneinheiten und die DAP markierten Highmannosen: Man₅-DAP (m/z 1350,4), Man₆-DAP (m/z 1512,4), Man₇-DAP (m/z 1674,5), Man₈-DAP (m/z 1836,6) jeweils um 93 Masseneinheiten im Vergleich zu den ungelabelten Highmannosen aus RNase B verschoben.



Abb.74: MALDI-TOF-MS von A) Highmannosen aus RNase B mit 2AB und B) Highmannosen aus RNase B mit DAP. Die Messung erfolgte im Positivmodus auf einem Stahltarget mit s-DHB als Matrix. Alle Massenpeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) bestimmt Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc.

Die markierten Highmannosen wurden nach der Aufreinigung über Sephadex G10-Säulen mit der HPLC analysiert. Im Anschluss wurde mittels der Monosaccharidanalyse die Quantität der gelabelten Proben geprüft.

2.4.2.2. Komplexe N-Glykanstrukturen (Fetuin)

Im weiteren Verlauf wurden komplexe N-Glykane vom Modelprotein Fetuin, mittels Trypsin und PNGase F Verdau isoliert. Das Trypsin hat die Aufgabe, das Protein in kleinere Abschnitte zu zerlegen, damit das Enzym PNGase F leicht an die Glykosylierungsstellen kommen kann, um die komplexen N-Glykane abzuspalten. Danach wurden die verdauten Proben über C18 und Carbograph Säulen aufgereinigt, um die Glykane vom Proteinrückgrad zu trennen und die überschüssigen Salze von der Probe zu entfernen. Als Markierungsreagenz wurde für Fetuin ebenfalls 2AB und DAP genutzt. Nachdem die Vollständigkeit der Markierung mittels MALDI-TOF-MS im positiven Reflektormodus bestätigt wurde, erfolgte die Entnahme eines Aliquots für die Monosaccharidanalyse.





Abb.75: HPAEC-PAD Chromatogramme von A) 2AB gelabeltem Fetuin B) DAP gelabeltem Fetuin. Grüner Kreis: Man, blaues Quadrat: GlcNAc, gelber Kreis: Gal, lila Raute: Neu5Ac, rotes Dreieck: Fuc.

Das Chromatogramm von 2AB markiertem Fetuin zeigt Signale von komplexen Glykanen in einem Bereich von 23 - 31 min. Die Menge der triantennären, sialyierten und komplexen N-Glykanstruktur ist in beiden Chromatogrammen am höchsten.

Um ausreichend Probenmaterial für das Bedrucken der Slides zu erhalten, wurden im nächsten Schritt mehrere Ansätze Fetuin mit 2AB sowie DAP gelabelt, über Sephadex G10-Säulen aufgereinigt und schließlich mittels HPLC analytisch untersucht sowie fraktioniert. Auch hier wurden alle Fraktionen eingeengt und bei -20°C gelagert. Da die Ausbeute des 2AB markierten trisialylierten triantennären Glykan (m/z 3764) und die der Highmannosen höher waren, wurden diese Komponenten für die weiteren Analysen verwendet.

2.4.2.3 Untersuchungen von Ovarialkarzinom und gesunden Serenproben auf Glykan-Mikroarrays

Das Immunsystem umfasst mehrere Strategien körperfremden von körpereigenen Substanzen zu entscheiden und diese mithilfe von verschiedenen Immunabwehrreaktionen zu eliminieren. Um dieser Immunabwehr zu entkommen, können sich Pathogenen mit der Maskierung von körperfremden Antigenen oder mit der Umhüllung mit Autoantigenen behelfen.(*110*) Die Analyse der Glykosylierung von tumorspezifischen Antikörpern, spielt ist für die Erkennungsprozesse eine wichtige Rolle und findet zunehmend Einsatz in der Tumortherapie.

Im nächsten Schritt wurde die Bindungsaffinität von tumorspezifischen Antikörpern aus Seren auf epoxyaktivierte Glasträgern näher untersucht. Diese neuartige Mikroarraytechnologie würde die Glykananalyse in der Krebsdiagnostik um ein Vielfaches vereinfachen. Somit wäre dies eine optimale und zeitsparende Möglichkeit Seren von unterschiedlichen Patienten gleichzeitig auf mehreren möglichen glykanbasierenden Biomarkern zu untersuchen.

Während der vorliegenden Arbeit wurden die ersten Glykan-Mikroarrays generiert, auf den Serumproben von OvCa-Patientinnen und gesunden Kontrollen untersucht werden sollte. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass in Seren von Prostatatumor-Patienten Highmannosen höher exprimiert vorkommen als in gesunden Kontrollen.(*134*) Weiterhin ist bekannt, dass die N-Glykolylneuraminsäure (Neu5Gc) auf der Oberfläche von Karzinomzellen überexprimiert vorkommt.(*108*) Beide Glykane lösen im menschlichen Immunsystem während der Tumorerkrankung die Bildung von spezifischen Antikörpern aus, die mithilfe der Mikroarraytechnik in den unterschiedlichen Kohorten gemessen und verglichen werden können.

Um zu untersuchen ob es ähnliche Ergebnisse auch in Seren von OvCa-Patientinnen entdeckt werden können, wurden in der vorliegenden Studie zunächst die Highmannosen und die permethylierten komplexen N-Glykanstrukturen Hex₆HexNAc₅Neu5Ac₃-2AB mit der Masse *m/z* 3764.6 sowie Hex₅Hex-NAc₄Neu5Gc₂-2AB mit der Masse *m/z* 3014.6 näher betrachtet.

Diese mit 2AB gekoppelten Strukturen wurden auf epoxyaktivierte Glasträger gespottet. Weiterhin wurden Antigen A, Antigen B, Rhamnose und PBS auf die Slides gespottet. Antikörper A, Antikörper B und Rhamnose dienen als Positivkontrollen und PBS als Negativkontrolle. Weiterhin wurden die Slides für die spätere Normalisierung mit IgG, IgM und IgA bedruckt. Nachfolgend ist das Druckmuster dargestellt. Jede Komponente wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen vierfach nebeneinander auf die Slides gedruckt.



Abb.76: Printing-Layout für die ersten Glykan-Mikroarrays. PBS: Phosphatpuffer, Antigen A: Antigen B:, HM:Highmannosen, *m/z* 3014.6: Triantennäre Glykanstruktur mit N-Acetylneuraminsäuren, *m/z* 3764.6: Triantennäre Glykanstruktur mit N-Glycolylneuraminsäuren, IgA: Immunoglobulin A, IgM: Immunoglobulin M; IgG: Immunoglobulin G.

Die einzelnen Arrays der bedruckten Glasträger wurden jeweils mit 70 µL Serum inkubiert. Anschließend wurden die Arrays mit PBS gewaschen. Mithilfe der indirekten Markierung wurden die Sildes analysiert. Bei dieser Methode wird nach der Kopplung der Antigene aus den Seren mit den Antikörpern (gedruckte Glykane auf den Glasslides), in einem zweiten Schritt der Sekundär-Antikörper (Anti-human IgG-Cy3, anti-human IgM-Alexa Fluor 647, anti-human igA Fluor 594) auf die Slides aufgetragen, die sich spezifisch gegen die Antigene richten. Die Detektion des sekundären Antikörpers erfolgt schließlich direkt bei der Messung mit dem Fluoreszenzscanner.



Abb.77: Schematische Darstellung von der Vorbereitung der Glykane bis hin zur Analyse der mit Serum inkubierten Glasträger mittels dem Fluoreszenzscanner. Grün: Fluorophor am Glykan, der für die HPLC Trennung sowie für die Verknüpfung mit den Epoxygruppen auf den Slides notwendig ist. Gelb: Fluorophore gekoppelt am Lektin, der bestimmte Glykanstrukturen erkennt und für die Detektion mit dem Fluoreszenzscanner benötigt wird.

Im Folgenden sind exemplarisch zwei Scanbilder, einer gesunden sowie einer OvCa-Probe, dargestellt. Beim Betrachteten der Bilder fällt auf, dass die Signale der HM und die der komplexen Glykanstrukturen in den OvCa-Probe eine höhere Intensität aufweisen als in gesunden Kontrollen. Die Signale wurden im nächsten Schritt mit IgG normalisiert und statistische analysiert.





Abb.78: Scanbilder von A) einer gesunden Probe sowie B) einer Ovca-Probe. In roter Farbe sind die Signale der HM, des triantennären N-Glykans mit Neu5Ac sowie des binantennären N-Glykans mit Neu5Gc umrahmt. In oranger Farbe sind die Signale von IgG umrahmt. Slides wurden mit einer Wellenlänge von 532 nm gemessen.

2.4.2.4 Statistische Analyse der Glykan-Mikroarrays

Die Glykanslides wurden im Fluoreszenzscanner mit den Wellenlängen 532 nm, 594 nm sowie 635 nm gemessen. Die besten auswertbaren Scanbilder konnten mit einer Wellenlänge von 532 nm erzielt werden. Die Intensität der Signale wurde mit den IgG Signale auf den jeweiligen Slides standardisiert und im Anschluss logarithmiert, sodass man im Anschluss mithilfe den IgG Scores die unterschiedlichen Arrays auf den Slides miteinander vergleichen konnte.

Die Box-Plot-Analyse der Signale der HM sowie der biantennären Struktur mit N-Glycolylneuraminsäure zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen gesunden Kontrollen und OvCa-Seren. Mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests konnte eine Signifikanz von unter 0.05 ermittelt werden. Visuell ist auch ein Unterschied bei der komplexen triantennären N-Glykanstruktur mit N-Acetylneuraminsäure zu beobachten. Die Signalintensität der Spots auf den Slides mit OvCa-Proben scheint stärker zu sein als auf den Arrays mit gesunden Kontrollen. Doch mittels Box-Plot-Analyse und einer Signifikanz höher als 0.05 ist der Unterschied nicht so stark ausgeprägt wie bei den HM und der biantennären N-Glykanstruktur mit der Masse (*m/z* 3014.6).



Abb.79: Box-Plot-Analyse der IgG Scores der OvCa-Proben und den gesunden Kontrollen. A) Signalintensitäten der HM. Die Signifikanz zwischen den Kohorten wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U- Tests ermittelt: *P< 0.05.

B)



Abb.80: Box-Plot-Analyse der IgG Scores der OvCa-Proben und den gesunden Kontrollen. B) Signalinstensitäten der biantennären Struktur. Die Signifikanz zwischen den Kohorten wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U- Tests ermittelt: *P< 0.05.



C)

Abb.81: Box-Plot-Analyse der IgG Scores der OvCa-Proben und den gesunden Kontrollen. C) Signalintensitäten der triantennären Struktur zwischen OvCa-Patientinnen und gesunden Kontrollen. Die Signifikanz zwischen den Kohorten wurde mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt: P>0.05.

Diskussion

3.1 Analyse des IgG-Glykoms und N-Glykanprofils aus Seren von Borderline-Ovarialkarzinom- und Ovarialkarzinom-Patientinnen

Frauen mit OvCa sind sehr oft für die Mediziner eine diagnostische Herausforderung, da gutartige, invasive oder gering bösartige Tumore unterschiedliche chirurgische Behandlungen benötigen (*135*). Für ihre Differenzierung wurden Versuche gestartet, um eine optimale Methode zu etablieren (*30-33*). Es stellte sich als sehr schwierig heraus, die unterschiedlichen Arten ohne eine vorherige Operation zu unterscheiden, da BOT sehr ähnliche Eigenschaften wie die invasive Form aufweist. Es wurden in beiden Fällen solide Komponenten und Aszites auf Ultraschall Bildern und eine Erhöhung des Biomarkers CA-125 festgestellt (*136*). Man weiß allerdings, dass das BOT, anders als der invasive Tumor, häufig bei jungen Frauen entsteht. Deswegen möchten Ärzte unnötige aggressive Therapien vermeiden, um die Fruchtbarkeit der Frauen möglichst weitgehend zu schützen (*137, 138*). Eine sensitive Methode für die rechtzeitige Erkennung von BOT vor der Operation wäre für die Zukunft sehr sinnvoll und hilfreich.

Während der vorliegenden Arbeit wurde das Glykosylierungsprofil aus Seren sowie das Glykom aus dem Serumprotein IgG von BOT-Patientinnen mit den von OvCa-Patientinnen sowie gesunden Kontrollen verglichen. Ziel dieser Arbeit ist es, potentielle Biomarker sowohl vom IgG, als auch aus dem Serum von Patientinnen für die Erkennung von BOT zu identifizieren und diese miteinander zu vergleichen.

Der Vergleich der beiden kranken Kohorten (Ovarial-/BOT) bezüglich des Glykosylierungsprofils mittels MALDI-TOF-MS wurde bislang noch nicht näher untersucht.

Mit dem bisher gängigen Biomarker CA-125 war eine eindeutige Einteilung der Borderline-Proben nicht möglich. Auch der in unserer Arbeitsgruppe etablierte GLYCOV-Marker konnte nicht alle Borderline-Proben als krank einstufen. Fast die Hälfte aller BOT-Proben wurden falsch als gesund klassifiziert. Mithilfe der Untersuchung des IgG-Profils konnten insgesamt sechs Glykopeptidstrukturen detektiert werden, die die OvCa sowie die BOT-Proben eindeutig als krank einstufen. Es handelt sich um die Strukturen G0F, G0FN, G1F, G2F, G2FN sowie G2FS1. Hierbei sind die beiden degalactosylierten Glykopeptidstrukturen mit den Massen *m/z* 2600.1 (G0F) und *m/z* 2803.1 (G0FN) in gesunden Kontrollen herunterreguliert. Diese Beobachtung korreliert mit den Forschungsergebnissen von Saldova et al. Sie konnten eine Erhöhung von der deglykosylierten Struktur (*m/z* 2600.1) in IgG sowie eine Erhöhung in den Akut-Phase-Proteinen Haptoglobulin, α-1-saures-Glykoprotein und α1-Antichymotrypsin der Glykoformen mit SLe^x in Seren von OvCa-Patientinnen feststellen.(*77*)

Es ist bekannt, dass sich die Konzentration von agalactosylierten Glykanen am IgG, mit zunehmender Tumorerkrankung erhöht. Kanoh et al. konnten in ihrer Arbeit die Veränderung von IgG Glykanen zwischen 22 Karzinom-Patientinnen und 10 gesunden Kontrollen mit der Nutzung der *Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis* (FACE) zeigen. Sie haben einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kohorten mit einem P-Wert von kleiner als 0.01 feststellen können.

Alley et al. untersuchten das Glykosylierungsmuster aus Seren und IgG von OvCa-Patientinnen in späten Stadien vor und nach einer experimentellen Medikamentenzugabe. Sie konnten hier eine Erhöhung der agalactosylierten Strukturen an IgG feststellen. Die monofucosylierten Glykopeptidstrukturen mit der Masse m/z 2762.1 sowie m/z 2924.1 mit einer Signifikanz von 3.62 x 10⁻⁴ / 7.13 x 10⁻⁵ und die Bisecting-Strukturen m/z 3127.2 mit einer Signifikanz von 2.12 x 10⁻³ gehören zu den potentiellen Biomarkern.(*20*)

In der vorliegenden Arbeit wurden die N-Glykanstrukturen von IgG2 sowie IgG3 näher analysiert. Dabei ist eine Korrelation zwischen den monofucosylierten, biund monogalactosylierten Strukturen mit den Massen *m/z* 2762.1 (G1F) und *m/z* 2924.1 (G2F) sowie den bigalactosylierte bisecting Struktur mit der Masse *m/z* 3127.2 (G2FN) mit den agalactosylierten Strukturen *m/z* 2600.1 (G0F) und *m/z* 2803.1 (G0FN) zu beobachten. In gesunden Kontrollen sind die Signale der galactosylierten Glykopeptide in MALDI-TOF-MS Spektren am höchsten und nehmen in BOT sowie OvCa stetig ab. Hierbei ist eine gleichzeitige Erhöhung der

agalactosylierten Glykopeptidstrukturen von OvCa, BOT bis hin zu gesunden Kontrollen zu verzeichnen.

Eine weitere in dieser Arbeit signifikante Glykopeptidstruktur ist die monosialylierte und monofucosylierte Struktur mit der Masse m/z 3215.3 (G2FS1), die in BOT sowie OvCa herunterreguliert vorkommt. Ähnliche Ergebnisse fanden auch Bones et al. in ihren Forschungsergebissen heraus. Sie untersuchten die Glykanzusammensetzung in den vier am häufigsten vorkommenden Serumproteinen: IgG, Haptoglobulin, Transferrin und α1-Säure-Glykoprotein. Es wurden Seren von Magenkarzinom-Patienten näher analysiert. Sie konnten eine Zunahme von core fucosylierten und biantennären Strukturen und eine Abnahme von monogalactosylierten sowie core fucosylierten biantennäre Glykane mit einer Signifikanz von P=0.011 beobachten. (139, 140) Sie konnten auch die monosialylierte und monofucosylierte Struktur mit der Masse m/z 3215.3 (G2FS1) beobachten.

Die Kombination der signifikanten Glykopeptidstrukturen mit dem gängigen Biomarker CA-125 liefert hierbei das beste Ergebnis. Die ROC-Kurve mit einem AUC-Wert von 0.916 zeigt die beste Sensitivität und Spezifität. Betrachtet man die Korrelation der Veränderung mit dem Alter so ist ein leichter Anstieg zu beobachten, der aber im Vergleich zu anderen bekannten altersabhängigen Veränderungen, einen geringeren Korrelationskoeffizienten (r=2.99) aufweist. Viele epidemiologische Untersuchungen und experimentelle Beobachtungen zeigten pro-inflammatorisch sowie anti-inflammatorisch induzierte Veränderungen der IgG Fc Glykosylierung (*141, 142*).

Allerdings ist mit der alleinigen Untersuchung der IgG N-Glykane die Differenzierung zwischen OvCa- sowie BOT-Proben nicht möglich. Es liefert nur die Information ob die Probe als gesund oder krank eingestuft werden kann. Um zu überprüfen, ob eine Unterscheidung der beiden Kohorten möglich ist, wurde im Folgenden das komplette N-Glykosylierungsprofil in Seren untersucht.

Mit der totalen Glykananalyse aus Seren konnten insgesamt sechs signifikante komplexe N-Glykanstukturen ermittelt werden, die in Seren von BOT-Patientinnen erhöht vorkommen als in Seren von Ovarialkarziom-Patientinnen und von

gesunden Kontrollen. Die signifikanten Strukturen wurden fragmentiert und mittels MALDI-TOF/TOF bestätigt.

Die Signalintensitäten der monofucosylierten N-Glykanstrukturen (*m/z* 3054.2 und *m/z* 2244.9) und die der afucosylierte N-Glykanstruktur (*m/z* 2069.8) sind in Seren von BOT-Proben im Gegensatz zu OvCa-Proben und gesunden Kontrollen erhöht. In vorherigen Studien wurde bereits mehrfach bewiesen, dass in Seren von Karzinom-Patientinnen tri- und tetraantennäre Stukturen mit einer antennären oder *core*-Fucose höher reguliert vorkommen (*143-146*). Beachtet man diese Aussage, könnte man zunächst die BOT Seren als krank einstufen. Allerdings sind drei weitere tri- und tetraantennäre mono- bzw. difucosylierte N-Glykanstrukturen (*m/z* 3950.5; *m/z* 4226.6; *m/z* 4588.5) in BOT nicht so stark ausgeprägt wie in Seren von OvCa-Patientinnen. Somit muss man zwischen beiden Kohorten unterscheiden.

Die Fucosylierung ist ein sehr komplexer Mechanismus, welcher von Fucosyltransferasen Guanosin-5'-diphosphat (GDP)-Fucose und (GDP)-Fucose-Transporter katalysiert wird. (GDP)-Fucose ist ein Donorsubstrat für alle Fucosyltransferasen. Nachdem die GDP-Fucose im Cytosol synthetisiert wurde, werden sie mittels GDP-Tr zum Golgi-Apparat transportiert und für die Fucosyltransferasen gelagert. Daher spielt GDP-Tr eine Schlüsselrolle in der Synthese von GDP-Fucose. Als Beispiel sei an dieser Stelle die Arbeit von Taketa et al genannt. Dr. Taketa berichtete von der Erhöhung des fucosylierten alpha-Fetoproteins (AFP) und der α1-6 Fucosylierung (core-Fucosylierung) von AFP mithilfe von Lektinaffinitätselektrophorese. (85, 86) AFP mit core-Fucose ist ein sehr spezifischer Biomarker für hepatozelluläres Karzinom (HCC). α1-6 Fucosyltransferase (Fut8) katalysiert hier die core-Fucosylierungsreaktion. Die Ab- und Zunahme von afucosylierten sowie fucosylierten Strukturen bei OvCa und BOT könnten mit der unterschiedlichen Konzentration von α1-6 Fucosyltransferase zusammenhängen.

Die biantennäre, monosialylierte Struktur mit der Masse *m/z* 2431.9 ist in Seren von BOT-Patientinnen höher reguliert als in Seren von OvCa-Patientinnen. In der Arbeit von Ruhaak et al. analysierten sie das Glykom im Gewebe von Lungenkarzinom Patienten und fanden heraus, dass agalactolysierte Glykanstrukturen erhöht und hybride sowie nicht fucosylierte Strukturen reduziert vorkommen. Die monosialylierte biantennäre Struktur *m/z* 2431.9 gehört dabei zu der Gruppe der herunterregulierten Strukturen im Karzinomgewebe (*147*). In der vorliegenden Arbeit konnten ähnliche Ergebnisse gefunden werden. Auch hier konnte diese signifikante Struktur in Seren von OvCa-Patientinnen in geringer Konzentration nachgewiesen werden. Dieses ist ein zusätzliches Indiz dafür, dass die analysierten Karzinom-Kohorten unterschiedlich sind.

Eine weitere signifikante Struktur ist das monogalactosylierte N-Glykan mit der Masse *m/z* 1865.7. Diese Struktur wurde in vorherigen Arbeiten aus der Arbeitsgruppe in Seren von OvCa-Patientinnen nicht detektiert. Doch während der Analyse von BOT Seren konnte diese Struktur als signifikant ermittelt und im Anschluss mittels MALDI-TOF/TOF-MS fragmentiert und bestätigt werden.

Die in OvCa detektierten drei tri- und tetraantennären, sialylierten sowie fucosylierten Strukturen mit den Massen m/z 3951.5, m/z 4226.5 und m/z 4588.5 wurden bereits von Biskup et al. beschrieben. (19) Die in Seren von OvCa und BOT gefundenen Glykanstrukturen stimmen mit den Informationen über Glycosyltransferasen bezüglich des Serum und dem Tumorgewebe in der Literatur überein. Es wird über die Zunahme von fucosylierten Haptoglobin sowie α 1,3 Fucosyltransferasen bei Patientinnen mit einer Tumorerkrankung berichtet. Die unterschiedlichen fucosylierten Makromoleküle in malignen Zellen (148) und auf Tumorgeweben sowie die auffällige Fucosylierung von vielen Molekülen im Blut von Tumor-Patienten (149) sprechen eindeutig dafür, dass es eine Verbindung zwischen fucosylierten Haptoglobinen und Tumorerkrankungen gibt. In der Studie von Thompson et. al wurde mithilfe einer fucose-spezifischen Lektinanalyse Seren von Tumor-Patientinnen analysiert. Dabei fand man heraus, dass sich die Konzentrationen sowohl von fucosylierten Haptoglobine sowie von α1,3 Fucosyltransferasen in Seren von Brust- und Ovarialkarzinom-Patientinnen proportional zum Stadium der Erkrankung erhöht. (150, 151) Auch die Arbeitsgruppen von z.B Saldova et al. (152) haben über eine Erhöhung der antennäre fucosylierten, sialylierten triantennären N-Glykane des Types SLex, sowie von core fucosylierten sowie agalactosylierten biantennären Glykanen berichtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der in der vorliegenden Arbeit ermittelte GLYCOV_B Wert die BOT-Proben am besten identifiziert. Mit diesem potentiellen Biomarker ist es sogar möglich, zwischen den beiden Kohorten, OvCa und BOT zu unterscheiden. Der gängige Biomarker CA-125, der in unserer Arbeitsgruppe etablierte GLYCOV Biomarker sowie die in IgG signifikanten N-Glykane kombiniert mit dem CA-125 geben nur Auskunft darüber, ob die Serumprobe als krank oder gesund eingestuft werden kann. Diese Pilotenstudie sollte in Zukunft mit der Erhöhung an Probenanzahl in unterschiedlichen Stadien erweitert werden.

3.2 Veränderung des Glykosylierungsprofils in Blutseren von Kolonkarzinom-Patienten

Die Veränderung des Glykosylierungsprofils wurde in vielen Karzinomarten und kürzlich auch in Gewebsproben von CRC-Patienten beobachtet.(*153*) In dieser Arbeit konnte erstmalsl mittels MALDI-TOF-MS gezeigt werden, dass sich das Glykosylierungsprofil aus Seren von CRC-Patienten von gesunden Kontrollen unterscheidet. Mithilfe der statistischen Auswertung konnten insgesamt sieben unterschiedliche N-Glykanstrukturen identifiziert werden, die sich signifikant in beiden Kohorten unterscheiden. Alle Strukturen wurden fragmentiert und mittels MALDI-TOF/TOF bestätigt. Mit Hilfe der signifikanten N-Glykanstrukturen wurde ein potenzieller Biomarker, GlycoColon-Wert generiert, der statistisch untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass der GlycoColon-Wert eine bessere Sensitivität sowie Spezifität für die Detektion von CRC besitzt als der gängige Biomarker CEA.

Die in dieser Studie gefundene Kombination aus hochregulierten und herunterregulierten N-Glykanstrukturen scheint tumorspezifisch zu sein und wurde so zuvor noch nicht berichtet. Die Zunahme von tri- und tetraantennären Strukturen (*m/z* 4226,6 und *m/z* 4588,7) wurde auch in anderen Tumorarten, wie z.B. Ovarial, Brust- und Lungenkarzinomen beobachtet.(*19, 154-156*) Zusätzlich war es möglich, anhand dieser Studie weitere fucosylierte tri- und tetraantennäre N-Glykane zu identifizieren, die in Seren von CRC-Patienten erhöht vorkommen. Diese Beobachtung korreliert mit der neulich veröffentlichten Publikation von Aso et al., worin sie das Glykosylierungsprofil von Plasma Alpha-1-Glykoprotein (AGP)

Diskussion

von CRC-Patienten untersucht haben. Die relative Häufigkeit von fucosyliertem AGP war bei CRC-Patienten signifikant erhöht.(157)

Die hier dargestellten Daten stimmen mit den Ergebnissen von Thompson et al. überein, worin sie über die Korrelation von α 1-3 Fucosyltransferasen mit dem Stadium des Ovarial- und Brustkarzinoms in Seren berichten.(*150*) Weiterhin wurde die α 1-4 Fucosyltransferase auch in Extrakten von humanen CRC-Zelllinien SW116 gefunden.(*158*) Die Erhöhung von N-Acetylglucosaminyltransferasen V, welches für Verzweigung der N-Acetylglucoseamin zuständig ist, wurde in CRC als hochreguliert beschrieben. Zudem ist sie für die Entstehung von Metastasen und für die schlechte Prognose verantwortlich.(*159*)

Überdies stimmt die beobachtete Erhöhung der Sialylierung mit den Erkenntnissen von Kemmner et al. überein, welcher eine Erhöhung der 2,6- Sialyltransferase Aktivität in kranken Kolongeweben entdeckt hat.(*160*) Eine erhöhte Sialylierung im Glykosylierungsprofil wurde bereits von weiteren Arbeitsgruppen in Tumorsubgruppen beschrieben.(*19, 154-156*)

Der ideale Tumormarker sollte auf eine bestimmte Tumorart hoch spezifisch und gleichzeitig hoch sensitiv sein, um die Rate der falsch positiven Diagnosen zu reduzieren. Gängige Biomarker für CRC sind die Antigene CA19-9 und CEA, welche weltweit genutzt werden. Sie werden meist für die Nachverfolgung von Magen-Darm-Tumoren, insbesondere für CRC genutzt.

Das Antigen CA 19-9 ist bislang der am besten etablierte Serummarker für CRC. Aufgrund der sehr schwachen Sensitivität von CEA gibt es keine Auskunft über die Beurteilung des Stadiums der Erkrankung. Weiterhin wird dieses Antigen auch von Epithelzellen des Gallentraktes und von anderen Tumorzellen den synthetisiert. (105, 161) Daher ist die Gefahr groß, dass dieses Antigen auch bei Patienten mit nicht maligne Krankheiten, wie z.B. Zirrhose, chronische Pankreatitis, Gallengangsentzündung, Lungenerkrankungen oder anderen Magen-Darm-Erkrankungen erhöht vorkommt und somit die Rate der falsch positiven Diagnosen stark erhöht wird. (162-164)

Weiterhin haben Howaizi et al. über eine Zunahme von CA 19-9 berichtet, die durch den hohen Teeverbrauch zustande kommt. Dies ist ein weiterer Faktor,

welcher bei der Diagnose mit dem Antigen CA 19-9 als Biomarker für CRC in Betracht gezogen werden muss.

Wegen dieser Limitierungen für die Nutzung von gängigen Biomarkern als Hilfsmittel für die Detektion von CRC werden zunehmend invasive Methoden wie die Koloskopie eingesetzt, um eine höhere Sensitivität sowie Spezifität zu erhalten. Allerdings ist diese Methode nicht angenehm für den Patienten, wodurch viele Patienten solche Untersuchungen vermeiden. Daher ist die Anfrage groß, eine schnellere und effizientere Methode zu entwickeln, welche zum einem robust und zum anderen hoch spezifisch und sensitiv ist. Somit könnten innerhalb von kürzester Zeit mehrere Patienten gleichzeitig und ohne weitere Unannehmlichkeiten untersucht werden. Die vorliegende Arbeit zeigt eindeutig, dass sich das Glykosylierungsprofil von CRC-Patienten von gesunden Kontrollen unterscheidet. Diese Ergebnisse sollten in Zukunft mit einer größeren Zahl an Serumproben von CRC-Patienten in unterschiedlichen Stadien überprüft und bestätigt werden.

3.3 In-Gel-Analyse von Modellproteinen

Viele biologisch wichtige Glykoproteine können nur durch eine Trennung mittels 1D oder 2D Gelen genauer analysiert werden. Dabei ist die Ausbeute nach einem In-Gel-Verdau mit Enzymen im Picomol Bereich. Daher ist es umso wichtiger, eine gut etablierte Methode zu entwickeln, mit der es möglich ist, die maximale Menge an Glykoproteinen nach einer In-Gel-Deglykosylierung zu erhalten. In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Zugabe von n-Octyl
β-D-Glucopyranosid eine bessere Diffusion des Enzyms im Gel erreicht, wodurch bereits geringe ausreichend sind. Proteinmengen um eine vollständige Analyse des Glykosylierungsprofils mithilfe von MALDI-TOF-MS durchzuführen.

Die Matrix unterstützte Laser-Desorption / Ionisation wird generell für die strukturelle Charakterisierung (*165, 166*) sowie für die Massenbestimmung (*167, 168*) von Oligosacchariden genutzt. 1997 haben Küster et al. ihre Ergebnisse aus In-Gel-Analysen mit insgesamt 3 U PNGase F für 50 -100 pmol Glykoprotein mittels MALDI-TOF-MS veröffentlicht.(*169*) In der Veröffentlichung wird außerdem

Diskussion

beschrieben, dass anstatt von 2.67- 5 % C 0.4- 0.8 % C genutzt worden ist, wodurch die Gele sehr weich und somit unhandlich wurden. Später haben Radcliffe et al. (*170*) und Royle et al. (*171*) die Standard-Konzentrationen für Gele genutzt, allerdings mussten insgesamt 3 bis 5 U PNGase F für einen erfolgreichen In-Gel-Verdau eingesetzt werden. In allen drei Veröffentlichungen wurde am Ende ein Extraktionsvolumen von 600 μ L erhalten, welches wieder zeitaufwendig unter Vakuum eingeengt werden musste. Die Methoden sind zum einem kostenintensiv, da der Einsatz einer hohen Menge an Enzymen erforderlich und zum anderen sehr zeitaufwendig ist.

In der hier beschriebenen Methode benötigt man nur 1 U PNGase F und ein Gel mit 2.67 % C (0.75 mm Dicke), welches viel leichter handzuhaben ist. Außerdem erhält man am Ende anstatt 600 - 1200 µL Extrakionsvolumen nur noch 90 µL.

Ein prinzipielles Problem liegt in der Handhabung von so geringen Mengen an Probe. Eine gängige Strategie ist die zu analysierende Probe auf einem MALDI-TOF-Target zu konzentrieren. Ein weiteres Problem ist der adsorptive Verlust der Proben, wenn es zum Kontakt mit Oberflächen kommt wie z.B. in Eppendorfcups. Eine sehr interessante Herangehensweise, um adsorptive Verluste zu minimieren, ist die Immobilisierung der Proteine an einer Oberfläche, die kompatibel mit einem chemischen oder enzymatischen Verdau ist, wie z.B. das Polyvinylidenedifluorid (PVDF). Papac et al. sowie Weitzhandler et al. zeigten zum ersten Mal N-Glykane von Glykoproteinen, die nach der Trennung mittels SDS-Page auf PVDF Membranen immobilisiert und im Anschluss verdaut wurden.(*172*)

Anumula und Du zeigten sehr gute HPLC Chromatogramme von 2AB gelabelten Oligosacchariden aus 1 μ g Fetuin, die mit dem LOD von ungelabelten permethylierten N-Glykanen vergleichbar waren.(*173*) Packer et al. nutzten 5 μ g Fetuin, das zuvor auf PVDF Membranen geblottet wurde, um die Monosaccharide mit der HPAEC-PAD zu verifizieren.(*174*)

Wilson et al. nutzen 2.5 U PNGase F, um N-Glykane aus auf PVDF geblotteten humanen Serumproteinen zu isolieren. Dabei konnte ein LOD von 1 µg Glykoprotein mithilfe von LC-MS und Graphitsäulen erreicht werden. (*175*)

Eine weitere Möglichkeit ist der Verdau des gewünschten Glykoproteins in Gel mit Trypsin. Anschließend wird die Probe extrahiert, mit PNGase F verdaut und desialyliert. Hao et al. nutzen diesen Ansatz für 10 pmol Transferrin.(*176, 177*)

Das Glykosylierungsprofil von Pflanzen und Insekten kann via In-Gel-Verdau mit Trypsin gefolgt von Glykopeptid Extraktion und PNGase A, erforscht werden. Hierfür haben Altmann et al. in ihrer Forschungsarbeit über ein LOD von 4 µg berichtet. Der zusätzliche Einsatz von OGP könnte in diesem Fall von großem Nutzen sein, um das Protokoll zu optimieren.

Während dieser Arbeit war es möglich eine optimierte Form der In-Gel-Analytik zu etablieren. Im Anschluss konnte die Detektion der N-Glykane mit MALDI-TOF-MS und Ara auf AnchorChip[™]-Target ohne weitere Probleme durchgeführt werden.

3.4 Glykan-Mikroarrays für die serumbasierte N-Glykananalytik

Die Erkennung von Glykanstrukturen durch glykanbindenden Proteine ist ein sehr nützliches Werkzeug mit dessen Hilfe man in der Zukunft das Glykom sowie ihre Rolle in unzähligen biologischen Prozessen verstehen kann. Der Zusammenhang zwischen der Struktur und der Funktion wird für die Wissenschaft mit der Zeit immer interessanter, um virale oder bakterielle Infektionen, Tumorerkrankungen oder Immunantwort und viele andere rezeptorvermittelten Prozesse zu verstehen.(178) Die bislang genutzte Methode für die Glykananalyse ist sehr zeitaufwendig und kostenintensiv. Die Mikroarraytechnologie ist eine sehr vielversprechende Methode, da sie es ermöglich ist mit ganz wenig Probenmaterial eine simultane sowie kostengünstige Analyse von hunderten Proben durchzuführen. Hierbei werden die Antikörper aus Seren von Patientinnen mit Tumorerkrankungen mithilfe eines Fluoreszenzscanner untersucht. Interessant wäre es hier, zu analysieren, ob es möglich ist, Unterschiede zwischen den Arten sowie den Stadien von Tumorerkrankungen mit der Nutzung von Microarrays festzustellen.

Während dieser Arbeit wurden verschiedene Label, Oberflächen und Protokolle untersucht, um die Mikroarraytechnologie soweit zu etablieren, das in Zukunft die

Diskussion

Glykosylierungsprofile aus Seren von Karzinom-Patienten und gesunden Kontrollen zügiger analysiert und miteinander verglichen werden können. Anstatt des üblichen Fluoreszenzmarkers 2AB wurde in dieser Studie DAP genutzt. Es konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu 2AB markierten GU eine viel geringere Konzentration des DAP markierten Probematerials ausreicht, um messbare Signale zu erhalten. Die hier erzielten Ergebnisse stimmen mit der Publikation von Song et al. überein. In der Veröffentlichung wurden mit DAP konjugierte Glykane auf epoxy aktivierten Glasträgern immobilisiert. Dabei benötigten sie nur 4µM des Probenmaterials für epoxy aktivierte Glasträger als bei NHS Glasträgern wobei sie die vierfache Menge einsetzten mussten.(*10, 179*)

Die frühzeitige Erkennung von Karzinomerkrankungen ist eine bedeutsame Herausforderung in der Onkologie. Ziel ist es eine noninvasive, schnelle und genaue Screening-Methode zu entwickeln, die eine frühzeitige Detektion von Tumorerkrankungen erlaubt.

Die Nutzung von Vorläufern, Core-Strukturen und internen Sequenzen könnte sehr hilfreich sein, die Antikörper Reaktivität sowie Immunogenität im menschlichen Körper zu messen. Solche Strukturen sind normalerweise mit anderen Kohlen-hydrateinheiten maskiert und agieren als hintergründige Glyko-Antigene. Bekannt ist, dass innerhalb von viralen Strukturen bestimmte Kohlenhydratstrukturen vorliegen, wie z.B. Man9 in HIV-1 und SARA-CoV, die Auslöser von Immunantworten sind. Wang et al. publizierten 2014 ihre Ergebnisse über N-Glykane als kryptische Antigene in Prostatakarzinom Patienten. Sie fanden heraus, dass an Man9 gezielte Autoantikörper in Seren von Prostatakarzinom-Patienten erhöhter vorkommen als in gesunden Kontrollen. (134) Sie haben Highmannosen durch den enzymatischen Verdau von Sojabohnen-Agglutinin gewonnen. Nach dem Pronase-Verdau wurde die Lösung filtriert und lyophilisiert. Nachdem der Rückstand mithilfe von Sephadex G50 Säulen aufgereinigt wurde, wurden die Fraktionen mit Man₉GlcNAc₂Asn vereint und ein zweites Mal lyophilisiert. Nach der anschließenden HPLC Aufreinigung wurden Man₉Glc-NAc₂Asn in Acetatpuffer (pH 6.0) enzymatisch mit Arthrobactor endo-β-Nacetylglcosamindase (Endo-A) verdaut und mittels Sephadex Säulen aufgereinigt um reines Man₉GlcNAc₂ zu erhalten. Das Protokoll für die Gewinnung von HM ist somit sehr zeitaufwendig und durch den Einsatz von zwei unterschiedlichen

Diskussion

Enzymen kostenintensiv. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Protokoll ist im Vergleich dazu einfacher, günstiger und schneller, um HM aus biologischem Material zu gewinnen.

Wandall et al. haben Microarrays aus O-Glykopeptiden hergestellt, mit deren Hilfe sie die humane Autoantikörper-Reaktion auf bestimmte Tumorantigene beobachteten. Mit dieser Methode ist es ihnen gelungen Tumorspezifische IgG Autoantikörper gegen unterschiedliche Epitope von O-Glykopeptiden von MUC1 aus Seren von Brust-, Ovarial- und Prostatakarzinom-Patienten zu entdecken.(*120*)

Padler et al. haben in ihrem Review über tumorspezifische Kohlenhydratantikörper unter anderem von Glykanen mit Neu5Gc berichtet, die auf Tumorzellen überexprimiert auftauchen. Diese körperfremde Glykanstruktur erzeugt die Bildung von Anti-Neu5c Antikörper als Immunabwehr. Das Vorhandensein von Neu5Gc/Anti-Neu5Gc Antikörpern auf Tumorzellen oder in Seren könnte in Zukunft sinnvoll in der Krebstherapie eingesetzt werden.(*108*)

Um zu überprüfen, ob auch ähnliche Ergebnisse in OvCa vorzufinden sind, wurden erste Glykanslides hergestellt, auf denen Serumproben von OvCa-Patientinnen und gesunden Kontrollen analysiert wurden. Die epoxyaktivierten Glasträger wurden mit Highmannosen und den komplexen N-Glykanstrukturen Hex₆HexNAc₅Neu5Ac₃-2AB mit der Masse *m/z* 3764.6. Hex₅HexNAc₄Neu5Gc₂-2AB mit der Masse *m/z* 3014.6 sowie weiteren Negativ- und Positiv-Kontrollen in unterschiedlichen Konzentrationen beschichtet. Nach der Inkubation mit Seren wurden die Slides mithilfe eines sekundären Antikörpers im Fluoreszenzscanner analysiert.

Visuell sind die Signalintensitäten der HM-Spots sowie der Spots der Neu5Ac-Struktur (*m*/*z* 3764.6) und der Neu5Gc-Struktur (*m*/*z* 3014.6) in OvCa-Arrays höher als in gesunden Kontrollen. Mit einem P-Wert von kleiner als 0.05 ist der Unterschied bei den HM sowie bei der Neu5Gc-Struktur signifikant und korreliert mit den Ergebnissen von Wang et al sowie Padler-Karavani et al.. Mittels der Box-Plot-Analyse konnte die visuell beobachtete Erhöhung der Signalintensitäten auf OvCa Arrays bestätigt werden. Die erhöhte Signalintensitäten der Neu5Ac-

Struktur mit der Masse (m/z 3764.6) hat einen P-Wert von > 0.05 und ist somit nicht aussagekräftig.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass es in dieser Studie möglich war, Autoantikörper spezifisch auf HM sowie Neu5Gc direkt aus Seren von OvCa-Patientinnen zu detektieren. Dabei lieferte die Analyse mit dem Sekundär-Antikörper Anti-human IgG-Cy3 und einer Wellenlänge von 532 nm das beste auswertbare Ergebnis. Grund hierfür könnte die erhöhte Konzentration von IgG im humanen Serum sein. Sie bilden mit 60-80% die größte Gruppe der Antikörper.

In Zukunft sollte diese Studie mit weiteren für OvCa spezifischen Glykanen und einer größeren Kohorten-Anzahl fortgesetzt werden. Durch die Entwicklung und Nutzung von solchen tumorspezifischen Glykan-Glasträgern könnte in Zukunft die Mikroarraytechnologie auch zunehmend erfolgreich in der Krebsdiagnostik eingesetzt werden, um eine noch präzisere Analysemöglichkeit von Tumorerkrankungen zu gewährleisten.

Material und Methoden

4.1 Allgemeine Arbeitsbedingungen

Die Durchführung aller Versuche erfolgte gemäß internen Arbeitsanweisungen.

4.1.1 Zentrifugen

- Minifuge (VWR, Darmstadt)
- Ultrazentrifuge J2-21 (Beckman, Fullerton, USA)
- Vakuumzentrifuge Centri Vac (Heraus, Hanau)
- Vakuumzentrifuge Univapo 150 ECH (Uniequip, Planegg)

4.1.2 Elektrophorese

- Vertikal-Elektrophoresesystem, Mini-Protean 3 System, Multi-Casting Chamber (Bio-Rad, München)
- Netzgerät PowerPac[™] 30000 (Bio-Rad, München)
- Gelscanner GS-800, Calibrated Densitometer (Bio-Rad, München)
- Geltrockner mgD-5040 (VWR, Darmstadt)

4.1.3 Sonstige Geräte

- Analysewaage (Sartorius, Göttingen)
- Heizblock Digi-Block (Laboratory Devices Inc., USA)
- Horiztontalschüttler Unimax 1000 (Heidolph, Instruments GmbH, Schwabach)
- Inkubationshaube Unimax 1010 (Heidolph, Kelheim)
- Inkubator 1000 (Dionex, Idstein)
- Kühlfalle Unicryo MC2 x 21-60°C (Uniequip, Planegg)
- MALDI-TOF/TOF-MS-Massenspektrometer Ultraflex III mit einem smartbeam-II TM Laser (Bruker Daltonics, Bremen)
- pH-Meter pH211 (Hanna Instruments, Kehl am Rhein)
- Speed Vac (Heraeus, Düsseldorf)

- Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg)
- Ultraschallbad, Sonorex TK52 (Bandelin, Berlin)
- Vakuumpumpe (Vacuubrand, Wertheim)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)
- Wasseraufbereitungssystem MilliQ Plus (Millipore, Neu-Ilsenburg)

4.1.4 Chemikalien

Alle Reagenzien wurden in p.A. Qualität von den Herstellern kommerziell erworben und bedurften keiner weiteren Aufreinigung. Folgende Reagenzien wurden verwendet:

- 1,4-Dithiothreitol DTT (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Arabinose (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Dithioerythritol DTE (Sigma Aldrich, Schweiz)
- 2-Aminobenzamid (2AB) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- 2-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- 2-Iodacetamid (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Iodessigsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- 2,6- Diaminopyridin (DAP) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Concanavalin A Cy3 (Interchim, Montluçon, France)
- Concanavalin A Cy5 (Protein Mods, Madison, USA)
- Dextranhydrolysat (Glycosystems, Oxford)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Fetuin vom fötalem Kalb (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Methyliodid (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Natriumacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumcyanoborhydrid (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Natriumhydrogenphospat (Merck, Darmstadt)
- Natronlauge (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Natriumhydroxid-Plätzchen (Merck, Darmstadt)
- N-octyl-β-D-glucopyranoside (OGP)(Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Phenylhydrazin HCL (Sigma-Aldrich, St. Luois, Missouri, USA)
- Ribonuclease B from *bovine Pancreas* (Sigma-Aldrich, Steinheim)

- Triethylamin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Tris (Base) (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Trifluoressigsäure (TFA) (Merck, Darmstadt)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, Steinheim)

4.1.5 Enzyme

- Trypsin aus dem Rinderpankreas (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Peptid-N⁴-(N-Acetyl-β-Glukosaminyl-Asparagin-Amidase F (250 mU/mL, Roche Diagnostics, Mannheim)

4.1.6 Standards

- Kalibrierstandard Dextranhydrolysat (DH) (Oxford, UK)
- Proteinstandard *Precision Plus All Blue* (Bio-Rad, München)
- Maltose (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Alpha-1-Glykoprotein (Sigma-Aldrich, Steinheim)

4.1.7 Lösungsmittel

Das Wasser wurde durch eine Wasseraufbereitungsanlage (MilliQ Plus, Millipore Neu-Isenburg) deionisiert. Weitere eingesetzte Lösungsmittel waren:

- Aceton (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Acetonitril (ACN) (VWR, Darmstadt)
- Ameisensäure (FA formic acid) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Ammoniaklösung > 25% (Merck, Darmstadt)
- Essigsäure (Merck, Darmstadt)
- Methanol (J.T. Baker, Niederlande)
- Salzsäure (Merck, Darmstadt)
- Tetrahydrofuran (Merck, Darmstadt)

4.1.8 Verbrauchsmaterialen

- Amiconsäulen, cut-off 3 kDa (Merck Millipore, Irland)
- C18 Reversed-Phase Extra-Clean Column (Grace Alltech, Deefield, IL, USA)

- Carbograph Extra-Clean Column (Grace Alltech, Deefield, IL, USA)
- Zellulose mikrokristallin (Merck, Darmstadt)
- Filterspitzen (Greiner Bio-One, Frickenhausen)
- G10 Säulen, cut-off 5 kDa (GE Healthcare, England)

4.2 **Proben/ Blutserum**

Für das BOT Projekt wurden die Blutseren an der Charité Medizinische Universität (Berlin) von Patientinnen zwischen 03/2003-01/2012 vor der OP, nach der Genehmigung der Ethik-Komitee (EA4/073/06) gesammelt. Die Serenproben für das CRC Projekt wurden ebenfalls an der Charité Medizinische Universität (Berlin) von Patienten vor der OP, nach der Genehmigung der Ethik-Komitee (EA4/006/05) gesammelt. Die Blutproben wurden nach 12 Stunden Fasten entnommen und für 30 Minuten zum Sedimentieren stehen gelassen. Im Anschluss wurden die Proben bei 1200 x g für 12 Minuten, bei 20°C zentrifugiert. Das aliquotierte Blutserum wird bei -80°C gelagert.

4.3 Glykananalytische Methoden

4.3.1 Reduktion und Carboxymethylierung von Proben

Damit eine Deglykosylierung mit Hilfe des Enzyms PNGase F gewährleistet werden kann, muss zunächst die Tertiärstruktur der Proteine durch Detergenzien DTE (25 µL) sowie IAA (10 µL) aufgehoben werden. Nachdem die Proben in Phosphatpuffer gelöst wurden, werden sie mit dem Denaturierungsreagenz DTE für 45 min bei 60° und mit 300 rpm geschüttelt. Durch das DTE werden die Disulfidbrücken unter Bildung eines freien Thiols gespalten. Mittels IAA Zugabe und der Inkubation der Probe für 1h im Dunkeln bei Raumtemperatur wird die verhindert. Neubildung der Disulfidbrücken Nach dem Carboxymethylierungsschritt wird das überschüssige IAA durch erneute Zugabe von DTE (2,5 µL) abgefangen und die Lösung mit MilliQ-Wasser (300 µL) und Phosphatpuffer (100 µL) verdünnt. Die Denaturierung sowie die Alkylierung erfolgt nach den untenstehenden Arbeitsschritten.

Nr.	Reagenzien	Arbeitsplan
1	Probenvolumen	10 - 20 μL Blutserum*
2	Phosphatpuffer (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) 200 mM, pH 6,5	25 µL
3	DTE (200 mM)	25 μL,45 min, 60°C, 300 rpm
4	IAA (200 mM)	10 μL,1h, RT, im Dunkeln
5	DTE (200 mM)	2,5 µL
7	MilliQ-Wasser	300 µL

Tab.8: Arbeitsschritte zur Reduktion und Carboxymethylierung von Glykanen,* 10 μL Blutserum von CRC-Patienten und 20 μL Blutserum von BOT-Patientinnen.

4.3.2 PNGase F Verdau

Der enzymatische Verdau von Blutserum, Fetuin und RNase B als Standardprotein erfolgt mit Hilfe von PNGase F. Die Endoglykosidase spaltet die Nglykosidische Bindung zwischen der Glykankette und dem Asparagin des Polypeptids. Dafür werden die denaturierten Proben mit Phosphatpuffer verdünnt und mit PNGase F über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt die Aufreinigung über C18- und Carbographsäulen. Die Proben werden schließlich bis zur Trockne in der Vakuumzentrifuge eingeengt.

Nr.	Reagenzien	Arbeitsplan
1	Phosphatpuffer (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄) 200 mM, pH 6,5	100 µL
2	Enzym PNGase F 100 mU	über Nacht, 37°C, 150 rpm

Tab.9: Arbeitsschritte des PNGase F Verdaus.

4.3.3 Isolierung von Glykopeptiden aus IgG

Für den Trypsin Verdau wurden zunächst Protein G Sepharose der Firma GE Healthcare mehrmals mit Phosphatpuffer in 1,5mL Eppendorcups gewaschen. Es wurden 200 µL PBS (pH-Wert =7,4) in Eppendorfcups vorgelegt. Anschließend wurden 50 µL Beads mit einer abgeschnittenen Spitze hinzugefügt. Die Beads wurden in PBS gewaschen. Nach dem herunter zentrifugieren wurde die Lösung wurde wieder von den Beads entfernt und neue Lösung wurde hinzugefügt. Dieser Waschschritt wurde zweimal wiederholt. Nach dem Waschen wurden 3µL Serum hinzugefügt und die Lösung wurde für 1 h bei RT inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Proben mithilfe von Filtertips aufgereinigt. Die Proben wurden zusammen mit den Beads auf die Filtertips aufgetragen und zweimal mit 200 μ L H₂O gewaschen. Danach wurden mit 150 μ L 100 mM Ameisensäure die Glykopeptide von den Beads eluiert und anschließend unter Vakuum bis zur Trockne eingeengt.

4.3.3.1 Trypsin Verdau

Es wurden 45 μ L ABC Puffer (Ammoniumhydrogencarbonat; pH = 7-8; VWR) zu den Proben hinzugefügt. Nachdem 2,5 μ L Trypsin hinzugegeben wurde, wurden die Proben ÜN bei 37°C im Inkubator inkubiert.

Nr.	Reagenzien	Arbeitsplan
1	Probenvolumen	3 µL Aufgereingtes IgG
2	Ammoniumhydrogencarbonat, pH 7-8	45 µL
3	Trypsin	2,5 μL, über Nacht, 37°C, 300 rpm

Tab.10 : Arbeitschritte desTrypsin Verdaus.
4.3.3.2 Aufreinigung mittels Hilic-Säulen aus Baumwolle (Biosphere Filter Tips 2-20 μL)

Am nächsten Tag wurden die über Nacht inkubierten Proben über Cotton Hilic aufgereinigt. Dafür wurden zunächst die Hilic Säulen aus Baumwolle mit Wasser und 25% ACN äquilibriert. Nachdem die Proben auf den Säulen aufgetragen wurden, wurden die Eppendorfcups mit 25% iger ACN Lösung gespült. Die Proben wurden im Anschluss mit 85% iger ACN Lösung mit TFA sowie 75% iger ACN Lösung gewaschen. Die Eluierung der Glykopeptide erfolgte mit MilliQ Wasser.

	Volumen	Lösung
Äquilibrierung 1	3x 50 µL	MQ Wasser
Äquilibrierung 2	3x 50 μL	25% ACN
Probenauftrag	200 µL	pH Wert der Probe 7
Waschen der Proben	3x 50 μL	85% ACN + 0,1 % TFA
	3x 50 μL	85% ACN
	3x 50 μL	75% ACN
Glykopeptid-Elution	7x 50 μL	MQ Wasser

 Tab.11: Schema zur Hilic Säulen Glykopeptid Aufreiniung

4.4 Isolierung und Aufreinigung von N-Glykanen

4.4.1 C18-Säulen

Mittels C18-Säulen wird der Glykananteil vom Proteinanteil getrennt. Dabei binden die langen hydrophoben C18-Ketten den Proteinanteil reversibel und die Glykane bleiben in der mobilen Phase.

Die Probe muss vor dem Auftrag auf die Säule mit TFA angesäuert und auf einen pH-Wert < 4 gebracht werden. Nach dem Eluieren der Glykane werden die Eluate

in der Vakuumszentrifuge bis zur Trockne eingeengt. Die Aufreinigung mit C18-Säulen erfolgt gemäß den Angaben in der Tabelle 12.

	Volumen	Lösung
Äquilibrierung 1	3x 400 µL	80% ACN, 0,1% TFA
Äquilibrierung 2	3x 400 µL	0,1% TFA
Probenauftrag	200-350 μL	pH Wert der Probe < 4
Glykan-Elution	3x 400 μL	0,1 % TFA
Peptid/Protein-	3x 400 µL	50% ACN, 0,1% TFA
Elution		

Tab.12: Schema zur Aufreinigung von Glykanen mit C18-Säulen

4.4.2 Carbograph-Säulen und selbsthergestellte Graphitspitzen

Die Carbograph-Säule wird zur Entsalzung von Glykanen genutzt. Das Graphitmaterial besitzt die Eigenschaft mit polaren und ionischen Substanzen Wechselwirkungen einzugehen. Durch die Wahl der Lösungsmittel werden die polaren Oligosaccharide am Graphit gebunden. Durch die Waschschritte werden die störenden Salze (aus Probenmaterial oder Pufferlösungen) entfernt.

Die Äquilibrierung, der Probenauftrag, das Waschen und das Eluieren erfolgt nach den Angaben in der Tabelle 13. Die Proben müssen einen pH-Wert < 4 aufweisen. Das Eluat wird unter Vakuum eingeengt und die Glykane für MALDI-TOF-MS vorbereitet.

	Volumen	Lösung
Äquilibrierung 1	3x 400 μL	80% ACN, 0,1% TFA
Äquilibrierung 2	3x 400 μL	0,1% TFA
Probenauftrag	3x 400 μL	Eluat nach C18

Waschen	3x 400 μL	0,1 % TFA
Elution	3x 400 μL	25% ACN, 0,1% TFA

Tab.13: Schema zur Entsalzung von Glykanen mit Carbograph-Säulen

Selbsthergestellte Graphitspitzen dienen, wie die Carbographsäulen, für die Entsalzung von Glykanen. Das Reinigungsprinzip gleicht den Carbograph-Säulen, allerdings ist das Fassungsvermögen bezüglich der Probenmenge viel geringer. Es werden 20 µL Volumen Pipettenspitzen mit Filtereinsatz mit Graphit beschichtet. Mithilfe von Tischzentrifugen erfolgt die Aufreinigung der Glykane gemäß der Tabelle 14. Schließlich werden die Glykane unter Vakuum eingeengt und für MALDI-TOF-MS oder HPLC Messungen vorbereitet.

	Volumen	Lösung
Äquilibrierung	3x 30 µL	80% ACN, 0.1% TFA
	3x 30 μL	0.1% TFA
Probenauftrag	3x 20 μL	in 0.1 % ACN
Waschen	3x 30 µL	0.1 % ACN
Elution	3x 30 µL	25% ACN, 0.1% TFA

 Tab.14:
 Schema zur Entsalzung der Glykane mit selbsthergestellten Graphitspitzen

4.4.3 Aufreinigung über Zellulose

Mithilfe der Zelluloseaufreinigung ist es möglich, 2AB gelabelte Glykane in unpolaren Lösungsmitteln durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Wasserstoffatom der Hydroxylgruppe der Zellulose und dem Sauerstoffatom der glykosidischen Bindungen der Glykane an das Säulenmaterial zu binden. Ein polares Lösemittel wie Wasser hebt diese Wechselwirkung auf. Somit können die 2AB gelabelten Glykane im Anschluss eluiert werden. Die Zellulosesäulen werden kurz vorher hergestellt, indem man eine Suspension aus Zellulose und Wasser in eine Spitze (2 mL) mit Filter füllt (ca.3 cm hoch) und kurz zentrifugiert. Die selbsthergestellten Zellulosesäulen werden wie folgt äquilibriert (vgl. Tab). Nach dem Waschen der Probe wird das Eluat am Ende bis zur Trockne in der Vakuumzentrifuge eingeengt.

	Volumen	Lösung
Äquilibrierung	3x 10 µL	80% ACN
Probenauftrag	2x 10 μL	in 80% ACN
Waschen	3x 10 μL	80% ACN
Elution	3x 10 μL	MilliQ-Wasser

Tab.15: Schema zur Aufreinigung von Fluoreszenzmarkierten Glykanen mittels Zellulose

4.4.4 Entfernung von überschüssigem Labelreagenz mit PDMini-Trap[™] G10-Säulen

PD MiniTrap[™]-G10-Säulen sind mit Polypropylen und Polyethylen vorgepackte Einweg-Schwerkraftsäulen für eine schnelle und einfache Entsalzung, einem Pufferaustausch und einer Reinigung von biologischen Proben. Die Aufreinigung über G10-Säulen basiert auf eine Gelfiltration, wobei die Moleküle aufgrund ihrer Größe voneinander getrennt werden. Die größeren Moleküle werden zuerst von der Säule eluiert. Je kleiner das Molekül, desto länger verweilt es in den Poren der Säule und wird später eluiert.

	Volumen	Lösung
Äquilibrierung	4 x 2mL	MilliQ-Wasser
Probenauftrag	500 μL	MilliQ-Wasser
Waschen	500 μL	MilliQ-Wasser
Elution	3x 500 μL	MilliQ-Wasser

 Tab.16:
 Schema zur Aufreinigung von fluoreszenzmarkierten Glykanen mittels G10-Säulen

4.4.5 Aufreinigung mittels Calbiosorb

Um die beim PNGase F Verdau zugesetzten Detergenzien aus der Probe zu entfernen, wurde die Probe mit den mit milliQ-Wasser gewaschenen hydrophoben Granulatkügelchen behandelt. Die Probe wurde mit ca. 400 µL Schlämme in Wasser über Nacht Minuten bei 4°C am Überkopfschüttler rotiert. Das Material adsorbiert und entfernt organische Verunreinigungen aus der Probe. Danach wurde der Überstand in ein Eppendorfcup überführt und das Lösemittel i.Vak. entfernt. Wenn nach dem Einengen Salzspuren noch sichtbar waren, wurde die Probe durch Zugabe von Methanol/Ethanol (1:1) und einer wiederholten Trocknung entsalzt.

4.4.6 Aufreinigung mittels der Dialysemembran

Die zu reinigende Probe wurde in die Dialysemembran überführt und in einem Becherglas mit MilliQ Wasser hineingehangen. Unter Rühren wurde die Probe für zwei Tage bei Raumtemperatur gereinigt. Das Wasser wurde dabei alle 4-6 Stunden gewechselt. Danach wurde die Probe in ein Eppendorfcup überführt und weiterverarbeitet.

4.5 Derivatisierung von N-Glykanen

4.5.1 Permethylierung

Aufgrund der negativen Ladung von terminalen Sialinsäuren an Glykanen können diese so mittels MALDI-TOF-MS nicht im positiven Reflektormodus analysiert werden. Daher müssen sie zuvor mit Methylgruppen maskiert werden, um eine Analyse mittels MALDI-TOF-MS zu ermöglichen. Als erstes wurde eine NaOH-DMSO-Suspension (pH 10-14) hergestellt. Es wurden 3-4 NaOH-Plätzchen mit 3 mL wasserfreiem DMSO zermörsert und in einem 4 mL Glasvial überführt. Die zu permethylierenden Glykane wurden in einem Glasvial mit 300 µL Glasinsert überführt und im Vakuum bis zur Trockne eingeengt. Anschließend fand die Inkubation mit (NaOH/DMSO und MeI) statt. Dieser Schritt wurde im Folgenden wiederholt.

Mit der Zugabe von CHCl₃ sowie MilliQ-Wasser wurde die Reaktion beendet. Nach Schütteln und Abnahme der wässrigen Phase wurde die organische Phase mehrmals mit Wasser gewaschen bis die wässrige Phase neutral war. Die permethylierten N-Glykane wurden getrocknet, in 75% ACN gelöst und mittels MALDI-TOF-MS im positiven Reflektormodus vermessen. Als Matrix dient s-DHB, bestehend aus Super-Dihydroxybenzoesäure (10mg/mL, Sigma Aldrich) gelöst in 10 % Acetonitril.

4.5.2 Fluoreszenzmarkierung mit 2-Aminobenzamid (2AB)



Abb.: Aminobenzamid

Die Derivatisierung mit 2-Aminobenzamid-Fluoreszensmarkierung erfolgt am reduzierenden Ende des Glykans. Dabei reagiert die Aldehyd- und Ketofunktion der Glykane mit 2AB unter Abspaltung von Wasser zur Schiff'schen Base. Ein Molekül 2AB reagiert mit einem Oligosaccharid. Das sekundäre Amin entsteht durch die Reduktion der Schiff'schen Base mit Natriumcyanoborhydrid. Es werden 50 µg/µL von 2AB abgewogen und im Essigsäure/DMSO-Gemisch (3:7) gelöst. Anschließend wird Natriumcyanoborhydrid (NaCNBH₃), ein starkes Reduktionsmittel, im Verhältnis 5:6 hinzugegeben. Das Markierungsreagenz (10 µL) wird zur Probe gegeben und diese im Dunkeln inkubiert (2 h, 65°C, 300 rpm). Die Abtrennung von überschüssigen 2AB-Reagenz erfolgt über Zellulose. Nur durch die Markierung ist die analytische Untersuchung mittels HPLC möglich. Das Reaktionsgemisch wird stets frisch vorbereitet da es lichtempfindlich ist.

	Reagenzien	Arbeitsplan
Derivatisierung	10 µL, Markierungsreagenz	2 h bei 65 °C, im Dunkeln

Aufreinigung über	80% ACN	3x10 μL
Zellulose		
Elution	MilliQ-Wasser	3x 10 µL

Tab.17: Schema zur Derivatisierung von Glykanen mit 2AB und über Zellulose

4.5.3 Fluoreszenzmarkierung mit **A** 2-6 Diaminopyridin (DAP) und **B** Rhodamin 110 (Rho-110)



Abb.: Diaminopyridin und Rhodamin 110

Auch die Derivatisierungen mit DAP und Rho-110 erfolgen am reduzierenden Ende des Glykans und erfolgen nach dem bereits oben beschriebenen Prinzip.

4.6 Proteinbiochemische Methoden

4.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)
-------	--

- SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin; 0.1% (w/v) SDS
- Trenngelpuffer: 1.5 M Tris/HCl; pH 8.8
- Sammelgelpuffer: 0.5 M Tris/HCl pH 6.8
- **4x SDS-Probenpuffer:**0.3 M Tris/HCI; pH 6.8; 50% (v/v) Glycerol, 15 % (w/v)SDS 0.015 % (w/v) Bromphenolblau, 8% (v/v) 2-Mercaptoethanol (reduzierend)

In Anlehnung an die Methode von Laemmli (1970) erfolgte die Trennung von Proteinen entsprechend ihrer Molekülmasse durch die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelktrophorese. Diese Methode beruht auf der Wanderung geladener Proteine durch eine Gelmatrix zum entgegensetzten Pol des angelegten elektrischen Feldes. Die Polyacrylamidgele wurden entsprechend dem Schema in Tabelle 18 hergestellt.

Lösungen	Sammelgel 4%	Trenngel 10%
30% Acrylamid/ 0,8%Bisacrylamid	0.65 mL	3.3 mL
Sammelgelpuffer	1.25 mL	-
Trenngelpuffer	-	1.7 mL
MilliQ-Wasser	2.95 mL	4.8 mL
10% (w/v) SDS	50 µL	100 µL
TEMED	5 µL	10 µL
10% (w/v) APS	50 µL	100 µL

Für die Bildung der Geltaschen wurde ein Gelkamm eingeschoben und nach der Polymerisation des Sammelgels wieder vorsichtig herausgezogen. Die Gele konnten bei 4°C bis zu 7 Tage aufbewahrt werden.

4.6.2 Probenvorbereitung und Vorbereitung der Gelapparatur

Das fertige SDS-Gel wurde in die Gelkassette geschoben und die gesamte Gelkammer wurde mit 1 x SDS Laufpuffer befüllt bis die Geltaschen und die beiden

Elektroden mit der Flüssigkeit bedeckt waren. Die zu untersuchenden Proben wurden mit 15 μ L reduzierendem 4 x SDS Probenpuffer versetzt und bei 99°C für 5 min in einem Eppendorfinkubator erhitzt. Danach wurden die Proben abgekühlt und zentrifugiert. Mithilfe einer *Hamilton* Pipette wurden je Geltasche 20 μ L Probe aufgetragen. Außerdem wurden 3 μ L Proteinstandard in eine Geltasche aufgetragen. Die Gelkassette wurde an ein Netzgerät (BioRad Power PAC 3000) mit einer maximalen Spannung von 200 V und einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro

Gel angeschlossen. Nach einer Laufzeit von ca. 80 min wurden die Gele entnommen und mit Wasser 3 x 5 min auf einem Schüttler gewaschen.

4.6.3 Nachweis von Proteinen durch Coomassie – Färbung

Nachdem die Gele dreimal mit Wasser gewaschen wurden, wurden sie mit Coomassie Brilliant-Blau überschichtet und für 40 min bei 37°C und 150 rpm geschüttelt. Coomassie-Brilliant-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der unspezifisch Proteine anfärbt, indem er sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren innerhalb des Proteins anlagert. Am Ende wird die Färbelösung entfernt und die Gele dreimal 5 min in Wasser gewaschen.

4.7 Probenvorbereitung für den Vergleich der N-Glykananalyse aus Gelen und Lösungen

4.7.1 Abspaltung der N-Glykane in Lösung

In einem Glasvial wurde das Glykoprotein in 20 μ L 250 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH= 7) gelöst. Außerdem wurden 2 μ L 10% ige SDS-Lösung sowie 1 μ L 2-Mercaptoethanol hinzugegeben. Und das Gemisch wurde für 5 min bei 95°C erhitzt. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur herab abgekühlt waren, wurden 47 μ L H₂O, 20 μ L 10 %ige NP40-Lösung sowie 1 μ L PNGase F (100 mU) hinzugegeben und bei 37°C sowie 150 rpm über Nacht geschüttelt.

Am nächsten Tag wurden die Proben auf RT abgekühlt, zentrifugiert und die Detergenzien mittels Calbiosorb entfernt.

4.7.2 Abspaltung der N-Glykane In-Gel

4.7.2.1 Ausschneiden von Gelspots (Spot Cutting)

Aus dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel wurden mithilfe eines EXQuest-Geräts (BioRad) Gelstücke mit einem Durchmesser von 1.0 mm ausgeschnitten. Das Ausstechen erfolgte mittels einer Hohlnadel.

4.7.2.2 Entfärbung

Vor dem eigentlichen Verdau muss das Coomassie-Färbereagenz aus den Gelstücken entfernt werden. Dafür wurden die Gelstücke mit 40 μ L einer 50 %igen ACN-Lösung in NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (25 mM, pH 6.5) versetzt und für 10 min im Ultraschallbad bei RT inkubiert. Der Überstand wurde entnommen und verworfen. Danach wurden 50 μ L NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (50mM, pH 6.5) zugegeben und für 30 min bei 37°C und 150 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 10 μ L ACN dazu gegeben, für 10 min bei RT stehen gelassen und anschließend nochmals mit 50 μ L NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (50 mM, pH 6.5) versetzt. Die Gelstücke wurden für 30 min bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Am Ende wurde die gesamte Waschphase entnommen und verworfen.

4.7.2.3 In-Gel-Verdau mit PNGase F

Die entfärbten Gelstücke wurden für 30 min im Umluftschrank getrocknet. Der Verdaupuffer, bestehend aus vier Teilen OGP (8g/L) in NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (50 mM, pH 6.5) und einem Teil PNGase F (1U/ μ L), wurde kurz vor dem Verdau hergestellt. Die Gelstücke wurden mit 5 μ L Verdaupuffer beschichtet und für 1 h bei 37°C und 150 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 10 μ L NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (50 mM, pH 6.5) verdünnt und über Nacht bei 37°C und 150 rpm inkubiert.

4.7.2.4 Extraktion

Nach dem PNGase F In-Gel-Verdau wurden die Überstände mit 10 µL Wasser verdünnt und für 30 min bei 50°C im Umluftschrank inkubiert. Anschließend wurden 10 µL ACN hinzugegeben und für 10 min bei RT stehen gelassen. Die Extraktionsphasen wurden abgenommen und gesammelt. Danach wurden die

Gelstücke mit 10 µL OGP (1g/L) in Wasser versetzt und für 30 min bei 50 °C im Umluftschrank inkubiert. Die Extraktionsphasen wurden erneut abgenommen und gesammelt. Dann wurden nochmals 10 µL ACN hinzugegeben. Nach einer zehn minütigen Inkubation, wurden 30 µL Wasser hinzugefügt und für 30 min bei 37°C und 150 rpm geschüttelt. Die Extraktionsphasen wurden gesammelt. Die beiden letzten Schritte wurden noch einmal wiederholt. Die gesammelten Extraktionsphasen wurden i.Vak. eingeengt.

4.8 Analytische Methoden

4.8.1 MALDI-TOF-MS

Die qualitative massenspektrometrische Analyse erfolgte an einem MALDI-TOF-MS (*matrix-assisted-Laser Desorption / Ionization Time of flight*) Ultraflex III Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonics GmbH (Bremen) mit verzögerter Ionen-Extraktionstechnik und integriertem Stickstofflaser (λ =337). Mit diesem Verfahren ist die Charakterisierung eines Moleküls nach seiner Masse möglich. Das Gerät setzt sich aus den folgenden drei Hauptkomponenten: der Ionenquelle, dem Analysator (*time of flight*) und dem Detektor. Voraussetzung für diese Messmethode ist die Entstehung von Ionen, die durch die Cokristallisation des Analytmoleküls mit Matrix und dem Laserschuss hervorgerufen werden. Als Matrix dienen meist kleine organische Moleküle, die in Abhängigkeit der Probe gewählt werden. Die erzeugten geladenen Ionen werden im weiteren Verlauf durch das Anlegen eines elektrischen Feldes und/oder magnetischen Feldes analysiert. Mithilfe des Flugzeitanalysators werden die Daten in Form eines Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) gewonnen. Kleinere Moleküle haben eine kürzere Flugzeit als Moleküle mit größeren Massen.

Für N-Glykane aus Seren diente Dextranhydrolysat als Kalibrierstandard. Die zu messenden Proben wurden in 5-10 µL 70 % igem Acetonitril gelöst und mit der Matrix s-DHB (10 mg/mL in 10% ACN) im positiven Reflektormodus vermessen. Es wurden 0,5 µL Probe mit 0,5 µL Matrix auf dem Target cokristallisiert. Mit mindestens 2000 Laserschüssen wurden die MALDI-TOF-Spektren aufgenommen.

155

Für die N-Glykananalyse aus Gelen diente Arabinosazon den als Kalibrierstandard. An Stelle von einem normalen Edelstahltarget wurde hierfür eine ultrasensitive Messung, ein AnchorChip-Target[™] genutzt. AnchorChip target[™] sind mit hydrophilen Stellen in einem hydrophoben Bereich ausgestattet. Es können ca. 0.5 µl - 3 µl von der Probe auf den hydrophilen Stellen gespottet werden. Das Volumen der Probentropfen reduziert sich während des Trocknens und die Moleküle richten sich mittig auf. Die Spektren wurden mit der Software-Flex-Control (Version 3.0, Bruker Daltonics) erzeugt und die Analyse der einzelnen Spektren wurde mit Flex-Analysis (Version 3.0, Bruker Daltonics) Die Zuordnung der einzelnen durchgeführt. Glykanstrukturen zu den dazugehörigen Signalen fand mittels GlycoWorkbench (Version 1.1., EURO-CarbDB) (91, 210) statt.

Für die Untersuchung von einzelnen Monosaccharid-Verknüpfungen diente die Fragmentierung (MALDI-TOF-TOF-MS). Hierbei wird das Mutter-Ion einer bestimmten Struktur gezielt zerstört, um mit Hilfe der einzelnen Fragmente die korrekte Hauptstruktur zu verifizieren.

	Positiver Modus	Negativer Modus
PIE Delay	10 ns	10 ns
Ionenquelle-Spannung 1	25 kV	20 kV
Ionenquelle-Spannung 2	21,5 kV	17,2 kV
Linsenspannung	10 kV	8 kV
Reflektor-Spannung 1	26,3 kV	21 kV
Reflektor-Spannung 2	13,75 kV	10,979 kV
Laserintensität	20-60 %	40-70 %

Tab.19 : Parameter für die Messung am MALDI-TOF-TOF-MS Ultraflex III

4.8.2 HPLC Methoden

4.8.2.1 HPLC

Mithilfe von verschiedenen Säulen und Trennungsbedingungen ist die Charakterisierung von verschiedenen Glykanstrukturen und deren Bausteine durch die HPLC-Methode möglich. Die HPLC trennt die verschiedenen Glykanstrukturen nach Ladung und Größe.

Der Unterschied zwischen der analytischen Säule und der präparativen Säule liegt hauptsächlich in ihrer Zielsetzung. Während mit einer präparativen HPLC die Gewinnung der Reinsubstanz im Vordergrund steht, kann mit der analytischen HPLC die Analyse sowie die Bestimmung der Probenmenge durchgeführt werden. Mithilfe der analytischen Messung können die Bereiche für die Fraktionierung der einzelnen Peaks exakt bestimmt werden.

	Analytische HPLC	Präparative HPLC
Säulenlänge [mm]	120 bis 250	120 bis 250
Säuleninnendurchmesser [mm]	2 bis 4.6	8 bis 10
Prtikelgröße des Füllmaterials [µm]	≤ 5	≥ 5
Flussrate [mL min ⁻¹]	0.1 bis 2	2.5 bis 5

Tab.20: Unterschiede zwischen der analytischen und der präparativen HPLC-Methode.

- 4.8.2.2 Analytische Messung von 2AB markiertem DH mittels TSKgel-Amid-80 -Säule
- Eluent A 50mM Ammoniumacetat, pH= 5,2
- Eluent B 50 mM Ammoniumacetat/ Acetonitril 1:4

HPLC-Methode	Umkehrphase
Säule	TSKgel Amid-80
Länge	250 mm
Durchmesser	4.60 mm
Korngröße	5 μm
Vorsäule	2 mm x 10 mm3
Gradient	Von 93.5 % Eluent B zu 56.2 % Eluent B
Säulenthermostat	20°C
Detektion	Fluoreszenz, Extinktion 330 nm, Emission 420 nm

 Tab.21: Parameter für die Trennung von 2AB-markiertem DH mittels TSKgel Amid-80 Säule

- 4.8.2.3 Messung von 2AB markiertem DH mit der analytischen Luna 3 μ NH2 100A
- Eluent A 15 mM Ammoniumacetat, pH= 5,2
- Eluent B Acetonitril

HPLC-Methode	Umkehrphase
Säule	Luna 3 μ NH2 100A
Länge	150 mm
Durchmesser	4.60 mm
Korngröße	3 μm
Vorsäule	4.6 mm x 10 mm
Säulenthermostat	20°C

Detektion	Fluoreszenz, Extinktion 330 nm, Emission 420 nm

Tab.22: Parameter für die Trennung von 2AB-markierten Glykanen

Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	4	20	80
60	4	60	40
75	4	60	40
79	4	20	80
90	4	20	80

Tab.23: Gradientenprogramm für die Trennung 2AB-markierten Glykanen

- 4.8.2.4 Fraktionierungen von 2AB, DAP und Rho-110 markierten Glykanen mittels Luna 5μ NH2 100A
- Eluent A 15 mM Ammoniumacetat, pH= 5,2
- Eluent B Acetonitril

HPLC-Methode	Umkehrphase
Säule	Luna 5 μ NH2 100A
Länge	250 mm
Durchmesser	10 mm
Korngröße	5 μm
Vorsäule	10 mm x 10 mm
Säulenthermostat	20°C
Detektion	Fluoreszenz, Extinktion 330 nm, Emission 420 nm (2AB), Extinktion 320 nm, Emission 400 nm

(DAP), Extinktion 496 nm, Emission 520 nm (Rho-
110)

Tab.24: Parameter für die Fraktionierung von 2AB, DAP und Rho-110 markierten Glykanen

Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]
0	4	20	80
60	4	60	40
75 4		60	40
79 4		20	80
90	4	20	80

Tab.25: Gradientenprogramm für die Fraktionierung 2AB-markierten Glykanen

4.8.3 Monosaccharidbestimmung mit HPAEC-PAD

Die *High-performance-anion-exchange-chromatography* (HAPEC) wurde für die Trennung von Kohlenhydraten entwickelt. Mit der gekoppelten *pulsedamperionic detection* (PAD) ist eine direkte Quantifizierung von nicht-derivatisierten Kohlenhydratstrukturen möglich. Die Auftrennung geschieht unter alkalischen Bedingungen. Bei hohen pH-Werten liegen die Monosaccharide in deprotonierter Form vor, die an der Dionex ICS-3000 auf eine PA-1-Säule (250 x 2 mm) getrennt werden. Die Oxidation der Kohlenhydrate an der Goldelektrode verbraucht einen messbaren Strom am Detektor, der proportional zur Konzentration des Moleküls ist. Somit sind die Analyse der Glykosylierungsform sowie eine Quantifizierung der einzelnen Komponenten möglich. Während der Hydrolyse verlieren die Monosaccharidbausteine GlcNAc und GalNAc die Acetylierung, sodass sie als Amine nachweisbar sind (GlcNH₂, GalNH₂).

4.8.3.1 TFA-Hydrolyse (Standard-Methode)

Für die saure Hydrolyse wird die Probe unter Vakuum komplett eingeengt, in 2N TFA aufgenommen und im Umluftschrank für 4 h bei 100°C inkubiert. Nachdem die Proben vollständig abgekühlt, sind wird die leicht flüchtige TFA in der Vakuumzentrifuge entzogen und mit MilliQ Wasser gewaschen. Nach erneuter Trocknung werden die Proben im internen Standard-Mix gelöst (200 pmol/ 10 µl Fructose, 200 pmol/ 10µl Desoxyribose). Das Protein Alpha-1-saures-Glykoprotein (AGP, 75pmol) dient als Referenzprobe.

Zucker	Konzentration
Desoxyribose	200 pmol/10 μl
N-Acetyl-D-glucosamin	100 pmol/10 μl
D-Fructose	200 pmol/10 µl
N-Acetyl-D-galactosamin	100 pmol/10 μl
D-Glucose	100 pmol/10 μl
D-Mannose	100 pmol/10 μl
L-Fucose	100 pmol/10 μl
D-Galactose	100 pmol/10 μl
Xylose	100 pmol/10 μl
Arabinose	100 pmol/10 µl

 Tab.26:
 Zusammensetzung des externen Kalibrierstandards

HPAEC-PAD-Methode	18 mM KOH
Säule	CarboPac PA-1 250 x 2 mm
Vorsäule	CarboPac PA-1 50 x 2 mm

Säulenthermostat	25°C
	20 0
Injektionsvolumen	10µL
Temperatur am Probengeber	10°C
Temperatur am	25°C
Säulenthermostat und Detektor	25 C

Tab.27: Parameter bei der Monosaccharidbestimmung mittels HPAEC-PAD

Im Folgenden ist das Eluenten-Programm für die Trennung mit 18 mM KOH bei einer Flussrate von 180 μ l/min vorgenommen.

Zeit [min]	Flussrate [µl/mL]	Eluent A 18mM [%]	Eluent A*100 mM [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]
0	180	100	0	0	0
30,0	180	100	0	0	0
41,0	180	0	0	0	100
42,0	180	0	0	0	100
52,0	180	0	0	100	0
52,8	180	0	0	100	0
53,0	180	0	100	0	0
58,0	180	0	100	0	0
59,0	180	100	0	0	0
80,0	180	100	0	0	0

 Tab.28: Eluentenprogramm f
 ür die Trennung von Monosacchariden, A*: unterschiedliche Konzentration von Eluent A.

4.9 Analyse mittels Mikroarraytechnologie

4.9.1 Reduktion, Carboxymethylierung und PNGase F Verdau von RNase B mit DTT und IAA

Die zu untersuchende Probe wurde in 500 µl 200 mM Phosphatpuffer (pH 6.5) aufgenommen mit 500 mM DTT-Lösung bei 37°C denaturiert und im Anschluss nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur mit 500 mM Iodessigsäure-Lösung behandelt. Mit 2-Mercaptoethanol wurde die überschüssige Iodessigsäure vernichtet und die gesamte Lösung in eine Dialysemembran (cutoff: 3.5 kDa) überführt und für 2 Tage gereinigt. Nach der Reinigung wurde die Probe wieder in ein Eppendorfcup überführt und über Nacht mit 1 U PNGase F bei 37°C verdaut.

Nr	Reagenzien	Arbeitsplan			
1	Probe	1-2 mg RNase B			
2	Phosphatpuffer (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄) 200 mM, pH 6,5	500 μL			
3	DTT (500 mM)	72 μL, 2 h, 37°C, 300 rpm			
4	lodessigsäure (500 mM)	146 μL, 30 min, RT, im Dunkeln			
5	2-Mercaptoethanol	28 µL			
6	Phosphatpuffer (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄) 200 mM, pH 6,5	500 μL			
7	Aufreinigung mittels Dialysemembran	Über Nacht			
8	PNGase F	1 U, über Nacht, 37 °C			

Tab.29: Schema zur Reduktion und Carboxymethylierung von Glykanen mit DTT und lodessigsäure.

4.9.2 PNGase F Verdau

Der enzymatische Verdau von Fetuin als Standardprotein erfolgt mit Hilfe von PNGase F. Die Endoglykosidase spaltet die N-glykosidische Bindung zwischen der Glykankette und dem Asparagin des Polypeptids. Dafür werden die denaturierten Proben mit Phosphatpuffer verdünnt und mit PNGase F über Nacht bei 37°C inkubiert. Danach erfolgt die Aufreinigung über C18-und Carbographsäulen. Die Proben werden schließlich bis zur Trockne in der Vakuumzentrifuge eingeengt.

1Phosphatpuffer (NaH2PO4/Na2HPO4) 200 mM, pH 6,5100 μL2Enzym PNGase F 100 mUüber Nacht, 37°C, 150 rpm	Nr	Reagenzien	Arbeitsplan
2 Enzym PNGase F 100 mU über Nacht, 37°C, 150 rpm	1	Phosphatpuffer (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄) 200 mM, pH 6,5	100 µL
	2	Enzym PNGase F 100 mU	über Nacht, 37°C, 150 rpm

Tab.30: PNGase F Verdau

4.9.3 Herstellung der Glykan-Mikroarrays

Zunächst wurden die mit Epoxygruppen beschichteten Glasslides mithilfe eines *Spotting-Robotors* mit Glykanen gekoppelt. Die eingeengten Proben wurden in der gewünschten Konzentration mit 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH= 8.5) gelöst. Je Probe und Tropfen wurden insgesamt 370 pL Glykanlösung verwendet. Als Negativkontrolle diente der 50 mM Na-Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 8.5 und einem kommerziell erwerblichen Dextran mit einer Aminogruppe. Nachdem die Proben auf den Glasträgern gedruckt wurden, wurden die Slides für 20 h bei RT in einer Feuchtekammer (65-70% Feuchtigkeit) inkubiert.

4.9.4 Immobilisierung der Glykane

Die Slides wurden in einer Glaskammer mit 100 mM Ethanolamin sowie 100 mM Natriumphosphatpuffer (pH= 8,5) für 1 h bei 50°C inkubiert. Nachdem die Slides dreimal mit 100 mM Natriumphosphatpuffer für 5 min bei RT gewaschen wurden,

wurden sie mit mit dem Lektin Concanavalin A Cy3 in der Konzentration 0.2 mg/mL in 10 mM Tris-Cl mit 1 mM CaCl₂ und 1 mM MnCl₂ (pH=7.4,) beschichtet und für 1 h bei RT inkubiert.

4.9.5 Serumproben auf Glykan-Mikroarrays

Epoxyaktivierte Glasträger wurden mit 2AB gelabelten Glykanstrukturen bedruckt. Die Glasträger wurden mit 80µL Serum von OvCa Patientinnen oder gesunden Kontrollen für 1h beschichtet. Nach dem Waschen der Glasträger, wurde der Sekundärantikörper (Anti-human IgG-Cy3, anti-human IgM-Alexa Fluor 647, antihuman igA Fluor 594) auf den Glasträgern immobilisiert. Im Anschluss wurde der überschüssige Antikörper von den Glasträgern entfernt.

4.9.6 Reinigung und Fluoreszenzanalyse

Die Glasslides mit den N-Glykanen sowie dem Lektin wurden zweimal mit PBST (PBS + 0.05% Tween) und einmal mit PBS für 5 min bei RT gewaschen. Im Anschluss wurden die Glasträger bis zur Trockne in der Zentrifuge für 5 min bei 20°C (300 x g) zentrifugiert und mit dem Fluoreszenzscanner von der Firma Tecan analysiert. Die Extinktion betrug dabei 512 nm und die Emission 570 nm.

4.10 Verwendete Software

- Microsoft Word (Windows)
- Microsoft Excel (Windows)
- "Magellan V 6.4"(Tecan)
- "32 Karat "Beckman (Coulter)
- Chromeleon 6.80 (Dionex)
- Corel Draw 11 (Corel)
- FlexAnalysis 3.0 (BrukerDaltonics)
- FlexControl 3.0 (BrukerDaltonics)

- GlycoWorkbench
- SPSSStatistics 20
- ClinPro Tools 2.2

- 1. Rademacher, T. W., Parekh, R. B., and Dwek, R. A. (1988) Glycobiology, *Annu Rev Biochem* 57, 785-838.
- 2. Varki A, C. R. (2009) *Essential of Glycobiology*, 2 ed.
- 3. Dwek, R. A. (1996) Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars, *Chem Rev 96*, 683-720.
- 4. Pucic, M., Muzinic, A., Novokmet, M., Skledar, M., Pivac, N., Lauc, G., and Gornik, O. (2012) Changes in plasma and IgG N-glycome during childhood and adolescence, *Glycobiology 22*, 975-982.
- Shinzaki, S., Iijima, H., Nakagawa, T., Egawa, S., Nakajima, S., Ishii, S., Irie, T., Kakiuchi, Y., Nishida, T., Yasumaru, M., Kanto, T., Tsujii, M., Tsuji, S., Mizushima, T., Yoshihara, H., Kondo, A., Miyoshi, E., and Hayashi, N. (2008) IgG oligosaccharide alterations are a novel diagnostic marker for disease activity and the clinical course of inflammatory bowel disease, *Am J Gastroenterol 103*, 1173-1181.
- 6. Pabst, M., and Altmann, F. (2011) Glycan analysis by modern instrumental methods, *Proteomics* 11, 631-643.
- 7. Campbell, M. P., Royle, L., and Rudd, P. M. (2015) GlycoBase and autoGU: resources for interpreting HPLC-glycan data, *Methods Mol Biol 1273*, 17-28.
- 8. Che, F. Y., Song, J. F., Zeng, R., Wang, K. Y., and Xia, Q. C. (1999) Analysis of 8aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonate-derivatized oligosaccharides by capillary electrophoresis-electrospray ionization quadrupole ion trap mass spectrometry, *J Chromatogr A 858*, 229-238.
- 9. Militsopoulou, M., Lamari, F. N., Hjerpe, A., and Karamanos, N. K. (2002) Determination of twelve heparin- and heparan sulfate-derived disaccharides as 2-aminoacridone derivatives by capillary zone electrophoresis using ultraviolet and laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis 23*, 1104-1109.
- 10. Song, X. Z., Xia, B. Y., Lasanajak, Y., Smith, D. F., and Cummings, R. D. (2008) Quantifiable fluorescent glycan microarrays, *Glycoconjugate J 25*, 15-25.
- Kovacs, Z., Simon, A., Szabo, Z., Nagy, Z., Varoczy, L., Pal, I., Csanky, E., and Guttman, A. (2017) Capillary electrophoresis analysis of N-glycosylation changes of serum paraproteins in multiple myeloma, *Electrophoresis*.
- 12. Gennaro, L. A., Delaney, J., Vouros, P., Harvey, D. J., and Domon, B. (2002) Capillary electrophoresis/electrospray ion trap mass spectrometry for the analysis of negatively charged derivatized and underivatized glycans, *Rapid Commun Mass Spectrom 16*, 192-200.
- 13. Babu, P. (2014) Glycans in Regeneration, *Acs Chem Biol 9*, 96-104.
- 14. Fukuda, M. N., Sasaki, H., Lopez, L., and Fukuda, M. (1989) Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates, *Blood 73*, 84-89.
- 15. Gu, J., Isaji, T., Xu, Q., Kariya, Y., Gu, W., Fukuda, T., and Du, Y. (2012) Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion, *Glycoconj J 29*, 599-607.
- 16. Peracaula, R., Royle, L., Tabares, G., Mallorqui-Fernandez, G., Barrabes, S., Harvey, D. J., Dwek, R. A., Rudd, P. M., and de Llorens, R. (2003) Glycosylation of human pancreatic ribonuclease: differences between normal and tumor states, *Glycobiology* 13, 227-244.

- Peracaula, R., Tabares, G., Royle, L., Harvey, D. J., Dwek, R. A., Rudd, P. M., and de Llorens, R. (2003) Altered glycosylation pattern allows the distinction between prostate-specific antigen (PSA) from normal and tumor origins, *Glycobiology* 13, 457-470.
- 18. Turner, G. A. (1992) N-Glycosylation of Serum-Proteins in Disease and Its Investigation Using Lectins, *Clin Chim Acta 208*, 149-171.
- 19. Biskup, K., Braicu, E. I., Sehouli, J., Fotopoulou, C., Tauber, R., Berger, M., and Blanchard, V. (2013) Serum Glycome Profiling: A Biomarker for Diagnosis of Ovarian Cancer, *J Proteome Res 12*, 4056-4063.
- 20. Alley, W. R., Vasseur, J. A., Goetz, J. A., Syoboda, M., Mann, B. F., Matei, D. E., Menning, N., Hussein, A., Mechref, Y., and Novotny, M. V. (2012) N-linked Glycan Structures and Their Expressions Change in the Blood Sera of Ovarian Cancer Patients, *J Proteome Res* 11, 2282-2300.
- 21. Fukuda, M. (1996) Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens, *Cancer Res 56*, 2237-2244.
- 22. Fuster, M. M., and Esko, J. D. (2005) The sweet and sour of cancer: Glycans as novel therapeutic targets, *Nat Rev Cancer 5*, 526-542.
- 23. Goldstein, I. J. W., H. C.; Poretz, H. C. (1997) *New Comprehensive Biochemistry*, Vol. 29b.
- 24. Hashii, N., Kawasaki, N., Itoh, S., Hyuga, M., Kawanishi, T., and Hayakawa, T. (2005) Glycomic/glycoproteomic analysis by liquid chromatography/mass spectrometry: analysis of glycan structural alteration in cells, *Proteomics 5*, 4665-4672.
- 25. Itoh, S., Kawasaki, N., Hashii, N., Harazono, A., Matsuishi, Y., Hayakawa, T., and Kawanishi, T. (2006) N-linked oligosaccharide analysis of rat brain Thy-1 by liquid chromatography with graphitized carbon column/ion trap-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry in positive and negative ion modes, *J Chromatogr A 1103*, 296-306.
- 26. Oyama, T., Yodohsi, M., Yamane, A., Kakehi, K., Hayakawa, T., and Suzuki, S. (2011) Rapid and sensitive analyses of glycoprotein-derived oligosaccharides by liquid chromatography and laser-induced fluorometric detection capillary electrophoresis, *J Chromatogr B 879*, 2928-2934.
- 27. Pioch, M., Bunz, S. C., and Neususs, C. (2012) Capillary electrophoresis/mass spectrometry relevant to pharmaceutical and biotechnological applications, *Electrophoresis 33*, 1517-1530.
- 28. Hossler, P., Mulukutla, B. C., and Hu, W. S. (2007) Systems analysis of N-glycan processing in mammalian cells, *PLoS One 2*, e713.
- 29. Kornfeld, R., and Kornfeld, S. (1985) Assembly of Asparagine-Linked Oligosaccharides, *Annu Rev Biochem 54*, 631-664.
- 30. Scott, H., and Panin, V. M. (2014) The role of protein N-glycosylation in neural transmission, *Glycobiology*.
- 31. Butters, T. D. (2002) Control in the N-linked glycoprotein biosynthesis pathway, *Chem Biol 9*, 1266-1268.
- 32. Helenius, A., and Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans, *Science 291*, 2364-2369.

- 33. Zauner, G., Kozak, R. P., Gardner, R. A., Fernandes, D. L., Deelder, A. M., and Wuhrer, M. (2012) Protein O-glycosylation analysis, *Biol Chem 393*, 687-708.
- 34. Hounsell, E. F. (1993) *Glycoprotein Analysis in Biomedicine*, Humana Press: Totowa.
- 35. Mormann, M., Paulsen, H., and Peter-Katalinic, J. (2005) Electron capture dissociation of Oglycosylated peptides: radical site-induced fragmentation of glycosidic bonds, *Eur J Mass Spectrom 11*, 497-511.
- 36. Bause, E., and Lehle, L. (1979) Enzymatic N-Glycosylation and O-Glycosylation of Synthetic Peptide Acceptors by Dolichol-Linked Sugar-Derivatives in Yeast, *Eur J Biochem 101*, 531-540.
- 37. Gemmill, T. R., and Trimble, R. B. (1999) Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species, *Bba-Gen Subjects* 1426, 227-237.
- 38. Stalnaker, S. H., Stuart, R., and Wells, L. (2011) Mammalian O-mannosylation: unsolved questions of structure/function, *Curr Opin Struc Biol* 21, 603-609.
- 39. M. Pavelka, J. R. (2005) *Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben*, Springer Vienna.
- 40. Ten Hagen, K. G., Fritz, T. A., and Tabak, L. A. (2003) All in the family: the UDP-GalNAc : polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases, *Glycobiology* 13, 1R-16R.
- 41. Gill, D. J., Clausen, H., and Bard, F. (2011) Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation, *Trends Cell Biol* 21, 149-158.
- 42. Brockhausen, I. (1997) Biosynthesis and functions of O-glycans and regulation of mucin antigen expression in cancer, *Biochem Soc T 25*, 871-874.
- 43. Schur, P. H. (1988) IgG subclasses. A historical perspective, *Monogr Allergy 23*, 1-11.
- 44. Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispens, T. (2014) IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, *Front Immunol 5*, 520.
- 45. Bowden, T. A., Baruah, K., Coles, C. H., Harvey, D. J., Yu, X., Song, B. D., Stuart, D. I., Aricescu, A. R., Scanlan, C. N., Jones, E. Y., and Crispin, M. (2012) Chemical and structural analysis of an antibody folding intermediate trapped during glycan biosynthesis, *J Am Chem Soc 134*, 17554-17563.
- Pucic, M., Knezevic, A., Vidic, J., Adamczyk, B., Novokmet, M., Polasek, O., Gornik, O., Supraha-Goreta, S., Wormald, M. R., Redzic, I., Campbell, H., Wright, A., Hastie, N. D., Wilson, J. F., Rudan, I., Wuhrer, M., Rudd, P. M., Josic, D., and Lauc, G. (2011) High throughput isolation and glycosylation analysis of IgG-variability and heritability of the IgG glycome in three isolated human populations, *Mol Cell Proteomics 10*, M111 010090.
- 47. Arnold, J. N., Wormald, M. R., Sim, R. B., Rudd, P. M., and Dwek, R. A. (2007) The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins, *Annu Rev Immunol 25*, 21-50.
- 48. Parekh, R. B., Dwek, R. A., Sutton, B. J., Fernandes, D. L., Leung, A., Stanworth, D., Rademacher, T. W., Mizuochi, T., Taniguchi, T., Matsuta, K., and et al. (1985) Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG, *Nature 316*, 452-457.

- 49. Wuhrer, M., Stam, J. C., van de Geijn, F. E., Koeleman, C. A., Verrips, C. T., Dolhain, R. J., Hokke, C. H., and Deelder, A. M. (2007) Glycosylation profiling of immunoglobulin G (IgG) subclasses from human serum, *Proteomics 7*, 4070-4081.
- 50. van de Geijn, F. E., Wuhrer, M., Selman, M. H., Willemsen, S. P., de Man, Y. A., Deelder, A. M., Hazes, J. M., and Dolhain, R. J. (2009) Immunoglobulin G galactosylation and sialylation are associated with pregnancy-induced improvement of rheumatoid arthritis and the postpartum flare: results from a large prospective cohort study, *Arthritis Res Ther 11*, R193.
- 51. Trbojevic Akmacic, I., Ventham, N. T., Theodoratou, E., Vuckovic, F., Kennedy, N. A., Kristic, J., Nimmo, E. R., Kalla, R., Drummond, H., Stambuk, J., Dunlop, M. G., Novokmet, M., Aulchenko, Y., Gornik, O., Campbell, H., Pucic Bakovic, M., Satsangi, J., and Lauc, G. (2015) Inflammatory bowel disease associates with proinflammatory potential of the immunoglobulin G glycome, *Inflamm Bowel Dis 21*, 1237-1247.
- 52. Cummings, R. D., and Pierce, J. M. (2014) The challenge and promise of glycomics, *Chem Biol* 21, 1-15.
- 53. Boren, T., Falk, P., Roth, K. A., Larson, G., and Normark, S. (1993) Attachment of Helicobacter-Pylori to Human Gastric Epithelium Mediated by Blood-Group Antigens, *Science 262*, 1892-1895.
- 54. Gambaryan, A. S., Piskarev, V. E., Yamskov, I. A., Sakharov, A. M., Tuzikov, A. B., Bovin, N. V., Nifantev, N. E., and Matrosovich, M. N. (1995) Human Influenza-Virus Recognition of Sialyloligosaccharides, *Febs Lett 366*, 57-60.
- 55. Dall'Olio, F., Chiricolo, M., Mariani, E., and Facchini, A. (2001) Biosynthesis of the cancerrelated sialyl-alpha 2,6-lactosaminyl epitope in colon cancer cell lines expressing betagalactoside alpha 2,6-sialyltransferase under a constitutive promoter, *Eur J Biochem 268*, 5876-5884.
- 56. Hollingsworth, M. A., and Swanson, B. J. (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface, *Nat Rev Cancer 4*, 45-60.
- 57. Yamori, T., Kimura, H., Stewart, K., Ota, D. M., Cleary, K. R., and Irimura, T. (1987) Differential production of high molecular weight sulfated glycoproteins in normal colonic mucosa, primary colon carcinoma, and metastases, *Cancer Res 47*, 2741-2747.
- 58. Varki, A. (2001) N-glycolylneuraminic acid deficiency in humans, *Biochimie 83*, 615-622.
- 59. Li, B. S., An, H. J., Kirmiz, C., Lebrilla, C. B., Lam, K. S., and Miyamoto, S. (2008) Glycoproteomic analyses of ovarian cancer cell lines and sera from ovarian cancer patients show distinct glycosylation changes in individual proteins, *J Proteome Res* 7, 3776-3788.
- 60. Dempsey, E., and Rudd, P. M. (2012) Acute phase glycoproteins: bystanders or participants in carcinogenesis?, *Ann Ny Acad Sci 1253*, 122-132.
- 61. Kodar, K., Izotova, J., Klaamas, K., Sergeyev, B., Jarvekulg, L., and Kurtenkov, O. (2013) Aberrant glycosylation of the anti-Thomsen-Friedenreich glycotope immunoglobulin G in gastric cancer patients, *World J Gastroentero 19*, 3573-3582.
- 62. Misonou, Y., Shida, K., Korekane, H., Seki, Y., Noura, S., Ohue, M., and Miyamoto, Y. (2009) Comprehensive clinico-glycomic study of 16 colorectal cancer specimens: elucidation of aberrant glycosylation and its mechanistic causes in colorectal cancer cells, *J Proteome Res 8*, 2990-3005.

- 63. Sarrats, A., Saldova, R., Pla, E., Fort, E., Harvey, D. J., Struwe, W. B., de Llorens, R., Rudd, P. M., and Peracaula, R. (2010) Glycosylation of liver acute-phase proteins in pancreatic cancer and chronic pancreatitis, *Proteom Clin Appl 4*, 432-448.
- 64. Saldova, R., Wormald, M. R., Dwek, R. A., and Rudd, P. M. (2008) Glycosylation changes on serum glycoproteins in ovarian cancer may contribute to disease pathogenesis, *Dis Markers* 25, 219-232.
- 65. Hedlund, M., Ng, E., Varki, A., and Varki, N. M. (2008) alpha 2-6-linked sialic acids on N-glycans modulate carcinoma differentiation in vivo, *Cancer Res 68*, 388-394.
- 66. Ohtsubo, K., and Marth, J. D. (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease, *Cell 126*, 855-867.
- Wang, P. H., Lee, W. L., Juang, C. M., Yang, Y. H., Lo, W. H., Lai, C. R., Hsieh, S. L., and Yuan, C.
 C. (2005) Altered mRNA expressions of sialyltransferases in ovarian cancers, *Gynecol Oncol* 99, 631-639.
- 68. Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., and Ruco, L. (1992) The origin and function of tumor-associated macrophages, *Immunol Today 13*, 265-270.
- 69. Coussens, L. M., Tinkle, C. L., Hanahan, D., and Werb, Z. (2000) MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis, *Cell* 103, 481-490.
- 70. Syed, V., Ulinski, G., Mok, S. C., and Ho, S. M. (2002) Reproductive hormone-induced, STAT3mediated interleukin 6 action in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells, *J Natl Cancer Inst 94*, 617-629.
- 71. Obata, N. H., Tamakoshi, K., Shibata, K., Kikkawa, F., and Tomoda, Y. (1997) Effects of interleukin-6 on in vitro cell attachment, migration and invasion of human ovarian carcinoma, *Anticancer Res 17*, 337-342.
- 72. Plante, M., Rubin, S. C., Wong, G. Y., Federici, M. G., Finstad, C. L., and Gastl, G. A. (1994) Interleukin-6 level in serum and ascites as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer, *Cancer 73*, 1882-1888.
- 73. Tempfer, C., Zeisler, H., Sliutz, G., Haeusler, G., Hanzal, E., and Kainz, C. (1997) Serum evaluation of interleukin 6 in ovarian cancer patients, *Gynecol Oncol 66*, 27-30.
- 74. Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L. W., Neufeld, G., and Levi, B. Z. (1996) Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor, *J Biol Chem* 271, 736-741.
- 75. Dennis, J. W., Granovsky, M., and Warren, C. E. (1999) Protein glycosylation in development and disease, *Bioessays 21*, 412-421.
- 76. Dennis, J. W., Granovsky, M., and Warren, C. E. (1999) Glycoprotein glycosylation and cancer progression, *Bba-Gen Subjects* 1473, 21-34.
- 77. Saldova, R., Royle, L., Radcliffe, C. M., Hamid, U. M. A., Evans, R., Arnold, J. N., Banks, R. E., Hutson, R., Harvey, D. J., Antrobus, R., Petrescu, S. M., Dwek, R. A., and Rudd, P. M. (2007) Ovarian cancer is associated with changes in glycosylation in both acute-phase proteins and IgG, *Glycobiology* 17, 1344-1356.

- 78. Saldova, R., Piccard, H., Perez-Garay, M., Harvey, D. J., Struwe, W. B., Galligan, M. C., Berghmans, N., Madden, S. F., Peracaula, R., Opdenakker, G., and Rudd, P. M. (2013) Increase in Sialylation and Branching in the Mouse Serum N-glycome Correlates with Inflammation and Ovarian Tumour Progression, *Plos One 8*.
- 79. Hua, S., Williams, C. C., Dimapasoc, L. M., Ro, G. S., Ozcan, S., Miyamoto, S., Lebrilla, C. B., An, H. J., and Leiserowitzf, G. S. (2013) Isomer-specific chromatographic profiling yields highly sensitive and specific potential N-glycan biomarkers for epithelial ovarian cancer, *J Chromatogr A 1279*, 58-67.
- Abd Hamid, U. M., Royle, L., Saldova, R., Radcliffe, C. M., Harvey, D. J., Storr, S. J., Pardo, M., Antrobus, R., Chapman, C. J., Zitzmann, N., Robertson, J. F., Dwek, R. A., and Rudd, P. M. (2008) A strategy to reveal potential glycan markers from serum glycoproteins associated with breast cancer progression, *Glycobiology* 18, 1105-1118.
- 81. Comunale, M. A., Wang, M. J., Anbarasan, N., Betesh, L., Karabudak, A., Moritz, E., Devarajan, K., Marrero, J., Block, T. M., and Mehta, A. (2013) Total serum glycan analysis is superior to lectin-FLISA for the early detection of hepatocellular carcinoma, *Proteom Clin Appl 7*, 690-700.
- 82. Duffy, M. J., Bonfrer, J. M., Kulpa, J., Rustin, G. J., Soletormos, G., Torre, G. C., Tuxen, M. K., and Zwirner, M. (2005) CA125 in ovarian cancer: European Group on Tumor Markers guidelines for clinical use, *Int J Gynecol Cancer 15*, 679-691.
- 83. Ness, R. B., and Cottreau, C. (1999) Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer, *J Natl Cancer I 91*, 1459-1467.
- 84. Hamori, J., Arkosy, P., Lenkey, A., and Sapy, P. (1997) The role of different tumor markers in the early diagnosis and prognosis of pancreatic carcinoma and chronic pancreatitis, *Acta Chir Hung 36*, 125-127.
- 85. Watanabe, A., Taketa, K., and Kosaka, K. (1975) Microheterogeneity of Rat Alpha-Fetoprotein, *Annals of the New York Academy of Sciences 259*, 95-108.
- 86. Taketa, K., Izumi, M., and Ichikawa, E. (1983) Distinct Molecular-Species of Human Alpha-Fetoprotein Due to Differential Affinities to Lectins, *Annals of the New York Academy of Sciences* 417, 61-68.
- 87. Taylor, H. C. (1929) Malignant and semimalignant tumors of the ovary, *Surg Gynecol Obstet* 48, 204-230.
- 88. Lenhard, M. S., Mitterer, S., Kumper, C., Stieber, P., Mayr, D., Ditsch, N., Friese, K., and Burges, A. (2009) Long-term follow-up after ovarian borderline tumor: Relapse and survival in a large patient cohort, *Eur J Obstet Gyn R B 145*, 189-194.
- 89. Santesson, L., Kottmeier, H. L. (1978) General classification of ovarian tumors, *In Ovarian Cancer Volume II*, 1-8.
- 90. Morice, P., Uzan, C., Fauvet, R., Gouy, S., Duvillard, P., and Darai, E. (2012) Borderline ovarian tumour: pathological diagnostic dilemma and risk factors for invasive or lethal recurrence, *Lancet Oncol 13*, e103-115.
- 91. Nikrui, N. (1981) Survey of clinical behavior of patients with borderline epithelial tumors of the ovary, *Gynecol Oncol 12*, 107-119.

- 92. Bostwick, D. G., Tazelaar, H. D., Ballon, S. C., Hendrickson, M. R., and Kempson, R. L. (1986) Ovarian Epithelial Tumors of Borderline Malignancy - a Clinical and Pathological-Study of 109 Cases, *Cancer 58*, 2052-2065.
- 93. Leake, J. F., Currie, J. L., Rosenshein, N. B., and Woodruff, J. D. (1992) Long-Term Follow-up of Serous Ovarian-Tumors of Low Malignant Potential, *Gynecol Oncol 47*, 150-158.
- 94. Jones, M. B. (2006) Borderline ovarian tumors: current concepts for prognostic factors and clinical management, *Clin Obstet Gynecol 49*, 517-525.
- 95. Engelen, M. J. A., de Bruijn, H. W. A., Hollema, H., ten Koor, K. A., Willemse, P. H. B., Aalders, J. G., and van der Zee, A. G. J. (2000) Serum CA 125, carcinoembryonic antigen, and CA 19-9 as tumor markers in borderline ovarian tumors, *Gynecol Oncol 78*, 16-20.
- 96. Bretthauer, M. (2010) Evidence for colorectal cancer screening, *Best Pract Res Cl Ga 24*, 417-425.
- 97. Globocan. database.
- 98. Kronborg, O., Fenger, C., Olsen, J., Jorgensen, O. D., and Sondergaard, O. (1996) Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test, *Lancet 348*, 1467-1471.
- 99. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J. Q., and Thun, M. J. (2007) Cancer statistics, 2007, *Ca-Cancer J Clin 57*, 43-66.
- 100. Balog, C. I., Stavenhagen, K., Fung, W. L., Koeleman, C. A., McDonnell, L. A., Verhoeven, A., Mesker, W. E., Tollenaar, R. A., Deelder, A. M., and Wuhrer, M. (2012) N-glycosylation of colorectal cancer tissues: a liquid chromatography and mass spectrometry-based investigation, *Mol Cell Proteomics* 11, 571-585.
- 101. Zheng, C. X., Zhan, W. H., Zhao, J. Z., Zheng, D., Wang, D. P., He, Y. L., and Zheng, Z. Q. (2001) The prognostic value of preoperative serum levels of CEA, CA19-9 and CA72-4 in patients with colorectal cancer, *World J Gastroentero* 7, 431-434.
- 102. Magnani, J., Nilsson, B., Brockhaus, M., Zopf, D., and Steplewski, Z. (1982) The Antigen of a Tumor-Specific Monoclonal-Antibody Is a Ganglioside Containing Sialylated Lacto-N-Fucopentaose-Ii, *Fed Proc* 41, 898-898.
- 103. Hamada, E., Taniguchi, T., Baba, S., and Maekawa, M. (2012) Investigation of unexpected serum CA19-9 elevation in Lewis-negative cancer patients, *Ann Clin Biochem* 49, 266-272.
- 104. Tempero, M. A., Uchida, E., Takasaki, H., Burnett, D. A., Steplewski, Z., and Pour, P. M. (1987) Relationship of Carbohydrate Antigen 19-9 and Lewis Antigens in Pancreatic-Cancer, *Cancer Res* 47, 5501-5503.
- 105. Wu, E., Zhou, S., Bhat, K., and Ma, Q. (2013) CA 19-9 and pancreatic cancer, *Clin Adv Hematol Oncol* 11, 53-55.
- 106. Hammarstrom, S. (1999) The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues, *Semin Cancer Biol 9*, 67-81.
- 107. Maley, F., Trimble, R. B., Tarentino, A. L., and Plummer, T. H. (1989) Characterization of Glycoproteins and Their Associated Oligosaccharides through the Use of Endoglycosidases, *Anal Biochem 180*, 195-204.

- 108. Padler-Karavani, V. (2014) Aiming at the sweet side of cancer: Aberrant glycosylation as possible target for personalized-medicine, *Cancer Lett 352*, 102-112.
- 109. Kohn, M., and Breinbauer, R. (2004) The Staudinger ligation-a gift to chemical biology, *Angew Chem Int Ed Engl 43*, 3106-3116.
- 110. Medzhitov, R., and Janeway, C. A. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system, *Science 296*, 298-300.
- 111. Kamerling, J. P., and Boons, G. J. (2007) From Chemistry to Systems Biology, *Comprehensive Glycoscience*.
- 112. Duus, J. O., Gotfredsen, C. H., and Bock, K. (2000) Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: Modern methods and limitations, *Chemical Reviews 100*, 4589-+.
- 113. Davis, J. T., Hirani, S., Bartlett, C., and Reid, B. R. (1994) 1H NMR studies on an Asn-linked glycopeptide. GlcNAc-1 C2-N2 bond is rigid in H2O, *J Biol Chem 269*, 3331-3338.
- 114. Dell, A., and Morris, H. R. (2001) Glycoprotein structure determination mass spectrometry, *Science 291*, 2351-2356.
- 115. Rudd, P. M., Colominas, C., Royle, L., Murphy, N., Hart, E., Merry, A. H., Hebestreit, H. F., and Dwek, R. A. (2001) A high-performance liquid chromatography based strategy for rapid, sensitive sequencing of N-linked oligosaccharide modifications to proteins in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide electrophoresis gel bands, *Proteomics 1*, 285-294.
- 116. Kobata, A. (2013) Exo- and endoglycosidases revisited, *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 89*, 97-117.
- 117. Rillahan, C. D., Antonopoulos, A., Lefort, C. T., Sonon, R., Azadi, P., Ley, K., Dell, A., Haslam, S. M., and Paulson, J. C. (2012) Global metabolic inhibitors of sialyl- and fucosyltransferases remodel the glycome, *Nat Chem Biol 8*, 661-668.
- 118. Bionda, N., and Cudic, P. (2013) Solid-phase guanidinylation of peptidyl amines compatible with standard Fmoc-chemistry: formation of monosubstituted guanidines, *Methods Mol Biol 1081*, 151-165.
- 119. Yue, T., and Haab, B. B. (2009) Microarrays in glycoproteomics research, *Clin Lab Med 29*, 15-29.
- Wandall, H. H., Blixt, O., Tarp, M. A., Pedersen, J. W., Bennett, E. P., Mandel, U., Ragupathi, G., Livingston, P. O., Hollingsworth, M. A., Taylor-Papadimitriou, J., Burchell, J., and Clausen, H. (2010) Cancer Biomarkers Defined by Autoantibody Signatures to Aberrant O-Glycopeptide Epitopes, *Cancer Res 70*, 1306-1313.
- 121. Anumula, K. R. (2006) Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates, *Anal Biochem 350*, 1-23.
- 122. Shilova, N. V., and Bovin, N. V. (2003) Fluorescent labels for the analysis of mono- and oligosaccharides, *Russ J Bioorg Chem+ 29*, 309-324.
- 123. Wellings, D. A., and Atherton, E. (1997) Standard Fmoc protocols, *Methods Enzymol 289*, 44-67.
- 124. Calin, O., Eller, S., and Seeberger, P. H. (2013) Automated polysaccharide synthesis: assembly of a 30mer mannoside, *Angew Chem Int Ed Engl 52*, 5862-5865.

- 125. Bartolozzi, A., and Seeberger, P. H. (2001) New approaches to the chemical synthesis of bioactive oligosaccharides, *Curr Opin Struct Biol* 11, 587-592.
- 126. Bryan, M. C., Fazio, F., Lee, H. K., Huang, C. Y., Chang, A., Best, M. D., Calarese, D. A., Blixt, C., Paulson, J. C., Burton, D., Wilson, I. A., and Wong, C. H. (2004) Covalent display of oligosaccharide arrays in microtiter plates, *J Am Chem Soc* 126, 8640-8641.
- 127. Haab, B. B., Dunham, M. J., and Brown, P. O. (2001) Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions, *Genome Biol 2*.
- 128. Rowe, C. A., Scruggs, S. B., Feldstein, M. J., Golden, J. P., and Ligler, F. S. (1999) An array immunosensor for simultaneous detection of clinical analytes, *Anal Chem 71*, 433-439.
- 129. Rupert, D. L., Lasser, C., Eldh, M., Block, S., Zhdanov, V. P., Lotvall, J., Bally, M., and Hook, F. (2014) Determination of exosome concentration in solution using surface plasmon resonance spectroscopy, *Anal Chem*.
- 130. Pawlak, M., Schick, E., Bopp, M. A., Schneider, M. J., Oroszlan, P., and Ehrat, M. (2002) Zeptosens' protein microarrays: a novel high performance microarray platform for low abundance protein analysis, *Proteomics 2*, 383-393.
- 131. Marcos, B., Gou, P., Guardia, M. D., Hortos, M., Colleo, M., Mach, N., Te Pas, M. F., Keuning, E., Kruijt, L., Tibau, J., Gispert, M., and Arnau, J. (2013) Surface-enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry: a tool to predict pork quality, *Meat Sci 95*, 688-693.
- 132. Alejandra Abscal-Saiz, L. S.-M., Javier de Santiago and Ignacio Zapardiel. (2013) Management of borderline ovarian tumours: a comprehensive review of the literature, *ecancermedicalscience 8*.
- 133. Stadlmann, J., Pabst, M., Kolarich, D., Kunert, R., and Altmann, F. (2008) Analysis of immunoglobulin glycosylation by LC-ESI-MS of glycopeptides and oligosaccharides, *Proteomics 8*, 2858-2871.
- 134. Wang, D. (2012) N-glycan Cryptic Antigens as Active Immunological Targets in Prostate Cancer Patients, *J Proteomics Bioinform 5*, 090-095.
- 135. Sankaranarayanan, R., and Ferlay, J. (2006) Worldwide burden of gynaecological cancer: The size of the problem, *Best Pract Res Cl Ob 20*, 207-225.
- 136. Morotti, M., Menada, M. V., Gillott, D. J., Venturini, P. L., and Ferrero, S. (2012) The preoperative diagnosis of borderline ovarian tumors: a review of current literature, *Arch Gynecol Obstet 285*, 1103-1112.
- 137. Trope, C., Davidson, B., Paulsen, T., Abeler, V. M., and Kaern, J. (2009) Diagnosis and treatment of borderline ovarian neoplasms "the state of the art", *Eur J Gynaecol Oncol 30*, 471-482.
- 138. Zanetta, G., Rota, S., Chiari, S., Bonazzi, C., Bratina, G., and Mangioni, C. (2001) Behavior of borderline tumors with particular interest to persistence, recurrence, and progression to invasive carcinoma: a prospective study, *J Clin Oncol 19*, 2658-2664.

- 139. Bones, J., Byrne, J. C., O'Donoghue, N., McManus, C., Scaife, C., Boissin, H., Nastase, A., and Rudd, P. M. (2011) Glycomic and Glycoproteomic Analysis of Serum from Patients with Stomach Cancer Reveals Potential Markers Arising from Host Defense Response Mechanisms, *J Proteome Res 10*, 1246-1265.
- 140. Bones, J., Mittermayr, S., O'Donoghue, N., Guttman, A., and Rudd, P. M. (2010) Ultra Performance Liquid Chromatographic Profiling of Serum N-Glycans for Fast and Efficient Identification of Cancer Associated Alterations in Glycosylation, *Analytical Chemistry 82*, 10208-10215.
- 141. Gornik, O., Pavic, T., and Lauc, G. (2012) Alternative glycosylation modulates function of IgG and other proteins Implications on evolution and disease, *Bba-Gen Subjects 1820*, 1318-1326.
- 142. Anthony, R. M., and Ravetch, J. V. (2010) A Novel Role for the IgG Fc Glycan: The Antiinflammatory Activity of Sialylated IgG Fcs, *J Clin Immunol 30*, S9-S14.
- 143. Comunale, M. A., Lowman, M., Long, R. E., Krakover, J., Philip, R., Seeholzer, S., Evans, A. A., Hann, H. W., Block, T. M., and Mehta, A. S. (2006) Proteomic analysis of serum associated fucosylated glycoproteins in the development of primary hepatocellular carcinoma, *J Proteome Res 5*, 308-315.
- 144. Chen, C. Y., Jan, Y. H., Juan, Y. H., Yang, C. J., Huang, M. S., Yu, C. J., Yang, P. C., Hsiao, M., Hsu, T. L., and Wong, C. H. (2013) Fucosyltransferase 8 as a functional regulator of nonsmall cell lung cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A 110*, 630-635.
- 145. Muinelo-Romay, L., Vazquez-Martin, C., Villar-Portela, S., Cuevas, E., Gil-Martin, E., and Fernandez-Briera, A. (2008) Expression and enzyme activity of alpha(1,6)fucosyltransferase in human colorectal cancer, *Int J Cancer 123*, 641-646.
- 146. Takahashi, T., Ikeda, Y., Miyoshi, E., Yaginuma, Y., Ishikawa, M., and Taniguchi, N. (2000) alpha1,6fucosyltransferase is highly and specifically expressed in human ovarian serous adenocarcinomas, *Int J Cancer 88*, 914-919.
- 147. Ruhaak, L. R., Taylor, S. L., Stroble, C., Nguyen, U. T., Parker, E. A., Song, T., Lebrilla, C. B., Rom, W. N., Pass, H., Kim, K., Kelly, K., and Miyamoto, S. (2015) Differential N-Glycosylation Patterns in Lung Adenocarcinoma Tissue, *J Proteome Res* 14, 4538-4549.
- 148. Smets, L. A., and Van Beek, W. P. (1984) Carbohydrates of the tumor cell surface, *Biochim Biophys Acta* 738, 237-249.
- 149. Hakomori, S. I. (1989) Aberrant Glycosylation in Tumors and Tumor-Associated Carbohydrate Antigens, *Adv Cancer Res 52*, 257-331.
- 150. Thompson, S., Cantwell, B. M., Matta, K. L., and Turner, G. A. (1992) Parallel changes in the blood levels of abnormally-fucosylated haptoglobin and alpha 1,3 fucosyltransferase in relationship to tumour burden: more evidence for a disturbance of fucose metabolism in cancer, *Cancer Lett 65*, 115-121.
- 151. Takahashi, N., Yamamoto, E., Ino, K., Miyoshi, E., Nagasaka, T., Kajiyama, H., Shibata, K., Nawa, A., and Kikkawa, F. (2009) High expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in mucinous tumors of the ovary, *Oncol Rep 22*, 1027-1032.

- 152. Saldova, R., Royle, L., Radcliffe, C. M., Abd Hamid, U. M., Evans, R., Arnold, J. N., Banks, R. E., Hutson, R., Harvey, D. J., Antrobus, R., Petrescu, S. M., Dwek, R. A., and Rudd, P. M. (2007) Ovarian cancer is associated with changes in glycosylation in both acute-phase proteins and IgG, *Glycobiology* 17, 1344-1356.
- 153. Balog, C. I. A., Stavenhagen, K., Fung, W. L. J., Koeleman, C. A., McDonnell, L. A., Verhoeven, A., Mesker, W. E., Tollenaar, R. A. E. M., Deelder, A. M., and Wuhrer, M. (2012) N-glycosylation of Colorectal Cancer Tissues, *Mol Cell Proteomics* 11, 571-585.
- 154. Kyselova, Z., Mechref, Y., Al Bataineh, M. M., Dobrolecki, L. E., Hickey, R. J., Vinson, J., Sweeney, C. J., and Novotny, M. V. (2007) Alterations in the serum glycome due to metastatic prostate cancer, *J Proteome Res 6*, 1822-1832.
- 155. Kyselova, Z., Mechref, Y., Kang, P., Goetz, J. A., Dobrolecki, L. E., Sledge, G. W., Schnaper, L., Hickey, R. J., Malkas, L. H., and Novotny, M. V. (2008) Breast cancer diagnosis and prognosis through quantitative measurements of serum glycan profiles, *Clin Chem 54*, 1166-1175.
- 156. Arnold, J. N., Saldova, R., Galligan, M. C., Murphy, T. B., Mimura-Kimura, Y., Telford, J. E., Godwin, A. K., and Rudd, P. M. (2011) Novel glycan biomarkers for the detection of lung cancer, *J Proteome Res 10*, 1755-1764.
- 157. Asao, T., Yazawa, S., Nishimura, T., Hayashi, T., Shimaoka, H., Saniabadi, A. R., and Kuwano, H. (2013) Development of a novel system for mass spectrometric analysis of cancerassociated fucosylation in plasma alpha1-acid glycoprotein, *Biomed Res Int 2013*, 834790.
- 158. DeBose-Boyd, R. A., Nyame, A. K., Smith, D. F., and Cummings, R. D. (1996) alpha1,4-Fucosyltransferase activity in human serum and saliva, *Arch Biochem Biophys* 335, 109-117.
- 159. Murata, K., Miyoshi, E., Kameyama, M., Ishikawa, O., Kabuto, T., Sasaki, Y., Hiratsuka, M., Ohigashi, H., Ishiguro, S., Ito, S., Honda, H., Takemura, F., Taniguchi, N., and Imaoka, S. (2000) Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis, *Clin Cancer Res 6*, 1772-1777.
- 160. Kemmner, W., Kruck, D., and Schlag, P. (1994) Different sialyltransferase activities in human colorectal carcinoma cells from surgical specimens detected by specific glycoprotein and glycolipid acceptors, *Clin Exp Metastasis* 12, 245-254.
- 161. Fukuda, M. (1996) Possible roles of tumor-associated carbohydrate antigens, *Cancer Res 56*, 2237-2244.
- 162. Bhat, K., Wang, F., Ma, Q., Li, Q., Mallik, S., Hsieh, T. C., and Wu, E. (2012) Advances in biomarker research for pancreatic cancer, *Curr Pharm Des* 18, 2439-2451.
- 163. Duffy, M. J., Sturgeon, C., Lamerz, R., Haglund, C., Holubec, V. L., Klapdor, R., Nicolini, A., Topolcan, O., and Heinemann, V. (2010) Tumor markers in pancreatic cancer: a European Group on Tumor Markers (EGTM) status report, *Ann Oncol 21*, 441-447.
- 164. Ritts, R. E., Jr., Del Villano, B. C., Go, V. L., Herberman, R. B., Klug, T. L., and Zurawski, V. R., Jr. (1984) Initial clinical evaluation of an immunoradiometric assay for CA 19-9 using the NCI serum bank, *Int J Cancer 33*, 339-345.
- 165. Stahl, B., Thurl, S., Zeng, J., Karas, M., Hillenkamp, F., Steup, M., and Sawatzki, G. (1994) Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Analytical biochemistry 223*, 218-226.

- 166. Sutton, C. W., O'Neill, J. A., and Cottrell, J. S. (1994) Site-specific characterization of glycoprotein carbohydrates by exoglycosidase digestion and laser desorption mass spectrometry, *Analytical biochemistry 218*, 34-46.
- 167. Harvey, D. J. (1993) Quantitative aspects of the matrix-assisted laser desorption mass spectrometry of complex oligosaccharides, *Rapid communications in mass spectrometry : RCM 7*, 614-619.
- 168. Field, M., Papac, D., and Jones, A. (1996) The use of high-performance anion-exchange chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry to monitor and identify oligosaccharide degradation, *Analytical biochemistry* 239, 92-98.
- 169. Kuster, B., and Harvey, D. J. (1997) Ammonium containing buffers should be avoided during enzymatic release of glycans from glycoproteins when followed by reducing terminal derivatization, *Glycobiology* 7, vii-ix.
- 170. Radcliffe, C. M., Diedrich, G., Harvey, D. J., Dwek, R. A., Cresswell, P., and Rudd, P. M. (2002) Identification of specific glycoforms of major histocompatibility complex class I heavy chains suggests that class I peptide loading is an adaptation of the quality control pathway involving calreticulin and ERp57, *The Journal of biological chemistry 277*, 46415-46423.
- Royle, L., Campbell, M. P., Radcliffe, C. M., White, D. M., Harvey, D. J., Abrahams, J. L., Kim, Y. G., Henry, G. W., Shadick, N. A., Weinblatt, M. E., Lee, D. M., Rudd, P. M., and Dwek, R. A. (2008) HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software, *Analytical biochemistry 376*, 1-12.
- 172. Weitzhandler, M., Hardy, M., Co, M. S., and Avdalovic, N. (1994) Analysis of Carbohydrates on Igg Preparations, *J Pharm Sci-Us 83*, 1670-1675.
- 173. Anumula, K. R., and Du, P. (1999) Characterization of carbohydrates using highly fluorescent 2-aminobenzoic acid tag following gel electrophoresis of glycoproteins, *Analytical biochemistry 275*, 236-242.
- 174. Packer, N. H., MR, W. I., Golaz, O., Lawson, M. A., Gooley, A. A., Hochstrasser, D. F., Redmond, J. W., and Williams, K. L. (1996) Characterization of human plasma glycoproteins separated by two-dimensional gel electrophoresis, *Bio/technology* 14, 66-70.
- 175. Wilson, N. L., Schulz, B. L., Karlsson, N. G., and Packer, N. H. (2002) Sequential analysis of Nand O-linked glycosylation of 2D-PAGE separated glycoproteins, *J Proteome Res* 1, 521-529.
- 176. Hao, P. L., Ren, Y., and Xie, Y. M. (2010) An Improved Protocol for N-Glycosylation Analysis of Gel-Separated Sialylated Glycoproteins by MALDI-TOF/TOF, *Plos One 5*.
- 177. Kolarich, D., and Altmann, F. (2000) N-glycan analysis by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of electrophoretically separated nonmammalian proteins: Application to peanut allergen Ara h 1 and olive pollen allergen Ole e 1, *Analytical biochemistry 285*, 64-75.
- 178. Varki, A., and Lowe, J. B. (2009) Biological Roles of Glycans.
- 179. Xia, B., Kawar, Z. S., Ju, T., Alvarez, R. A., Sachdev, G. P., and Cummings, R. D. (2005) Versatile fluorescent derivatization of glycans for glycomic analysis, *Nat Methods 2*, 845-850.

BOT-	GLYCOV-			
Proben	Value			
1	0,27			
2	1,30			
3	0,58			
4	0,31			
5	0,42			
6	0,85			
7	0,53			
8	1,07			
9	1,25			
10	1,13			
11	0,25			
12	0,26			
13	0,25			
14	0,32			
15	6,26			
16	0,71			
17	0,65			
18	0,16			
19	0,26			
20	0,55			
21	0,26			
22	2,60			
23	0,56			
24	0,27			
25	0,71			

Anhang

26	0,39
27	0,34
28	0,35
29	0,46
30	0,19
31	0,46
32	0,81
33	0,15
34	0,30
35	0,43

Tab.3: GLYCOV-Werte der BOT-Proben. GLYCOV-Werte wurden wie folgt berechnet. (Summe der rel. Peakflächen der Strukturen m/z 3776.9, 3951.0, 4226.1, 4400.2, 4587.3, 4761.4, 4935.5)/7*4/(Summe der rel. Peakflächen der Strukturen m/z 1579.8, 1783.9, 1988.0 und 2192.1).

Gesund	GLYCOV_B	OvCa	GLYCOV_B	BOT	GLYCOV_B	BOT	GLYCOV_B
1	0,14	1	6,54	1	1,31	21	8,22
2	0,17	2	9,79	2	5,97	22	2,13
3	0,13	3	11,13	3	2,39	23	2,55
4	0,17	4	7,17	4	1,30	24	3,46
5	0,11	5	7,89	5	2,16	25	4,07
6	0,18	6	9,11	6	2,06	26	3,41
7	0,16	7	4,84	7	2,51	27	3,26
8	0,23	8	4,74	8	4,72	28	2,70
9	0,32	9	4,50	9	5,02	29	1,92
10	0,31	10	5,13	10	4,68	30	2,35
11	0,10	11	5,36	11	3,13	31	2,74
----	------	----	-------	----	-------	----	------
12	0,21	12	8,32	12	2,13	32	1,22
13	0,16	13	8,69	13	4,97	33	1,08
14	0,16	14	6,79	14	4,66	34	2,63
15	0,20	15	3,94	15	11,90	35	2,98
16	0,16	16	5,63	16	2,80		
17	0,27	17	4,40	17	1,64		
18	0,13	18	7,35	18	2,98		
19	0,16	19	10,45	19	4,16		
20	0,20	20	9,09	20	1,91		

Tab.4: GLYCOV_B Werte der gesunden Kontrollen, OvCa-Proben und BOT-Proben. Die neuen Werte wurden wie folgt berechnet. (Summe der rel. Peakflächen der Strukturen m/z 2431+2244+2186+2069+ 1865+4227+4588+3054+ 3951)/9*4/(Summe der rel. Peakflächen der Strukturen m/z 1590+1620+1981+ 1579).

Alter	Tumorort	Grad	UICC
61	Rektum unteres Drittel	2	I
67 Kolon transversum		2	Ι
80	Rektum, mittleres bis unteres Drittel	2	I
63	Rektum unteres Drittel	2	Ι
76	Rektum	3	I
63	Rektum	3	Ι
80	Kolon asc.	3	Ι
59	59 Rektum unteres Drittel		I
61	Zoekum	2	I

38	Rektum unteres Drittel	2	Ι
65	Rektum	3	П
65	Rektum unteres Drittel	2	II
76	Rektum unteres Drittel	2	II
80	Sigma	2	Π
49	Rektum unteres Drittel	2	Ш
66	Rektum unteres Drittel	3	Ш
65	Sigma	2	Ш
79	Sigma	3	П
79	Kolon transversum	3	П
59	Kolon transversum	2	П
67	Kolon transversum	2	П
75	Rektum unteres Drittel	2	П
58	Rektum	2	П
61	Sigma	3	П
39	Sigma	2	П
67	Kolon asc.	2	Ш
47	Kolon flexure	4	IIIA
71	Rektum, mittleres Drittel	3	Ш
52	Rektum, unteres Drittel	3	Ξ
80	Rektum, unteres Drittel	3	
58	Sigma	4	Ш
61	Sigma	3	
59	Kolon	3	Ш
67	Kolon asc.	3	

60	Rektum, oberes Drittel	3	IV	
63	Kolon asc.	2	IV	
45	-	-	-	
75	-	-	-	
55	-	-	-	
42	-	-	-	
43	-	-	-	
49	-	-	-	desunde
55	-	-	-	Kontrollen
54	-	-	-	
76	-	-	-	
43	-	-	-	
59	-	-	-	
45	-	-	-	

Tab.5: Alter der CRC-Patienten, Ort, Grad und UICC Kategorie des Tumors. Stadium I n = 10, Stadium 2 n = 15, Stadium 3 n = 8 und Stadium IV n = 2. Gesunde Kontrollen n = 12

m/ z	Komposition	RA Gesund	RA CRC
1416,5	Hex ₃ HexNAc ₃	0,001	0,003
1579,6	Hex ₅ HexNAc ₂	0,007	0.014
1590,6	dHexHex ₃ HexNAc ₃	0,001	0,002
1620,6	Hex ₄ HexNAc ₃	0,001	0,003
1661,7	Hex ₃ HexNAc ₄	0,001	0,002
1764,7	dHex ₂ Hex ₃ HexNAc ₃	0,001	0,003

1783,7	Hex ₆ HexNAc ₂	0,013	0,017
1835,7	dHexHex ₃ HexNAc ₄	0,001	0,018
1865,7	Hex ₄ HexNAc ₄	0,001	0,004
1906,7	Hex ₃ HexNAc ₅	0,001	0,005
1968,7	dHex ₂ Hex ₄ HexNAc ₃	0,001	0,005
1981,7	Hex ₄ HexNAc ₃ Neu5Ac	0,004	0,009
1987,7	Hex ₇ HexNAc ₂	0,002	0,004
2040,8	Hex₄HexNAc₄Neu5Ac	0,009	0,017
2070,8	Hex ₅ HexNAc ₄	0,002	0,005
2111,8	Hex ₄ HexNAc ₅	0,001	0,004
2186,8	Hex₅HexNAc₃Neu5Ac	0,001	0,006
2192,8	Hex ₈ HexNAc ₂	0,004	0,008
2226,8	Hex₄HexNAc₄Neu5Ac	0,006	0,013
2244,8	dHexHex₅HexNAc₄	0,004	0,007
2285,9	dHexHex₄HexNAc₅	0,002	0,005
2396,9	Hex ₉ HexNAc ₂	0,003	0,008
2431,9	Hex₅HexNAc₄Neu5Ac	0,126	0,121
2489,0	dHexHex ₅ HexNAc ₅	0,002	0,004
2605,0	dHexHex₅HexNAc₄Neu5Ac	0,021	0,016
2663,0	$dHex_2Hex_5HexNAc_5$	0,002	0,006
2676,0	Hex ₅ HexNAc ₅ Neu5Ac	0,006	0,006
2792,1	Hex ₅ HexNAc ₄ Neu5Ac ₂	0,636	0,523
2850,1	dHexHex ₅ HexNAc ₅ Neu5Ac	0,018	0,013
2880,1	Hex ₆ HexNAc₅Neu5Ac	0,003	0,004
2966,2	dHexHex ₅ HexNAc ₄ Neu5Ac ₂	0,040	0,027

3038,2	Hex ₅ HexNAc ₅ Neu5Ac ₂	0,001	0,002
3211,2	dHexHex5HexNAc5Neu5Ac2	0,012	0,007
3241,2	Hex ₆ HexNAc ₅ Neu5Ac ₂	0,010	0,009
3358,2	dHex ₂ Hex ₆ HexNAc ₇	0,001	0,001
3415,3	dHexHex ₆ HexNAc ₅ Neu5Ac ₂	0,002	0,003
3574,3	Hex7HexNAc7Neu5Ac	0,001	0,001
3603,3	Hex ₆ HexNAc ₅ Neu5Ac ₃	0,050	0,051
3691,3	Hex7HexNAc6Neu5Ac2	0,001	0,002
3776,4	dHexHex ₆ HexNAc ₅ Neu5Ac ₃	0,009	0,029
3865,5	dHexHex7HexNAc6Neu5Ac2	0,000	0,001
3950,5	dHex ₂ Hex ₆ HexNAc ₆ Neu5Ac ₃	0,000	0,001
4053,5	Hex7HexNAc6Neu5Ac3	0,001	0,003
4226,6	dHexHex7HexNAc6Neu5Ac3	0,001	0,002
4414,7	Hex7HexNAc6Neu5Ac4	0,001	0,004
4588,7	dHexHex7HexNAc6Neu5Ac4	0,000	0,003

Tab.6: Die relative Häufigkeit der mittels PNGase F isolierten 41 komplexe N-Glykanstrukturen von 12 gesunden und 38 CRC Serumproben sowie die Masse und Komposition der einzelnen Glykane.

Alter	Tumorort	Grad	UICC	CEA	GlycoColon
52	Rektum unteres Drittel	3	=	1.60	197
80	Rektum unteres Drittel	3	=	5.10	49
58	Sigma	4	≡	3.70	308
61	Sigma	3	===	1.68	28
67	Kolon asc.	2	III	3.27	176
47	Kolon flexure	4	IIIA	14.36	26

71	Rektum, mittleres Drittel	3	Ш	2.80	59
22	Rektum, unteres Drittel	3		3.70	59
61	Rektum, unteres Drittel	3	IV	7.20	72
44	Sigma	3	111	0.90	91
67	Kolon asc.	2	Ш	2.50	80
60	Rektum, oberes Drittel	3	IV	5.74	198
45	-	-	-	<0.20	13
75	-	-	-	1.57	16
55	-	-	-	<0.20	14
42	-	-	-	0.57	16
43	-	-	-	1.30	20
49	-	-	-	1.30	23
55	-	-	-	2.22	14
54	-	-	-	0.22	41
76	-	-	-	1.71	20
43	-	-	-	0.77	19
59	-	-	-	0.93	17
45	-	-	-	0.80	10

Tab.7: Alter der CRC-Patienten und gesunden Kontrollen, Ort, Grad und UICC Kategorie des Tumors. CEA- und GlycoColon-Werte (Bestimmung mit MALDI-TOF-MS wie folgt: (Summe der rel. Intensitäten von m/z 1968.7, 2663.0, 3776.4, 4226.6, 4588.7)5*2/(Summe der rel. Intensitäten von m/z 2244.8 und 2605.0)*100.



Anhang





