

**Untersuchung Endo H- und PNGase F-abgespaltener
N-Glykane in humanem Blutserum**

—

Analyse des N- und O-Glykoms des humanen Speichels

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

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

vorgelegt von

Elena Frisch

aus Tschaikowski (RUS)

2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Hackenberger

2. Gutachter: Prof. Dr. Rudolf Tauber

Disputation am: 29.08.2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Mai 2009 bis September 2012 am Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte, in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Véronique Blanchard, angefertigt.

Teile der Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht:

E. Frisch, C. Schwedler, M. Kaup, E. Iona Braicu, J. Gröne, J.C. Lauscher, J. Sehouli, M. Zimmermann, R. Tauber, M. Berger, V. Blanchard, „Endo- β -N-acetylglucosaminidase H de-N-glycosylation in a domestic microwave oven: Application to biomarker discovery“, *Anal. Biochem.* **2013**, 433, 65 – 69.

E. Frisch, M. Kaup, K. Egerer, A. Weimann, R. Tauber, M. Berger, V. Blanchard, „Profiling of Endo H-released serum N-glycans using CE-LIF and MALDI-TOF-MS – Application to rheumatoid arthritis“, *Electrophoresis* **2011**, 32, 3510 – 3515.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	III
ABSTRACT	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Glykosylierung	1
1.1.1 N-Glykosylierung	2
1.1.2. O-Glykosylierung	5
1.1.3. Charakteristische Glykankettenverlängerungen	7
1.1.4 Funktionen der Sialylierung, Fucosylierung und Sulfatierung	11
1.2 Enzymatische und chemische Deglykosylierung	14
1.3 Rolle der Glykosylierung in Erkrankungen	18
1.4 Zielsetzung	22
2 ERGEBNISSE	23
2.1 Untersuchung Endo-H-abgespaltener N-Glykane im BS	23
2.1.1 Analyse Endo H-abgespaltener N-Glykane nach chemischer Denaturierung	24
2.1.1.1 Untersuchung nach Standard-Methode	24
2.1.1.2 HPAEC-PAD-Auftrennung Endo H-abgespaltener N-Glykane	29
2.1.1.3 CE-LIF-Analyse	31
2.1.1.4 N-Glykosylierungen bei rheumatoider Arthritis	33
2.1.2 Analyse Endo H-freigesetzter N-Glykane nach MAED-Methode	34
2.1.2.1 MAED im Vergleich zur Standard-Methode	35
2.1.2.2 Probenaufreinigung mit Hilfe von SP20SS- und Graphit-Material	38
2.1.2.3 N-Glykosylierungen bei Ovarial- und Colonkarzinom	40
2.1.3 Analyse PNGase F-freigesetzter N-Glykane nach MAED	41

2.1.4 Transglykosylierung mit Endo M	45
2.2 Analyse des N- und O-Glykoms des humanen Speichels	50
2.2.1 N-Glykane	50
2.2.1.1 MAED-unterstützte PNGase F-Freisetzung von N-Glykanen	50
2.2.1.2 Massenspektrometrische Analysen von N-Glykanen	51
2.2.1.3 Massenspektrometrische Analyse sulfatierter N-Glykane	66
2.2.2 O-Glykane	68
2.2.2.1 O-Glykosylierung des humanen Speichels	68
2.2.2.2 Massenspektrometrische Analysen von O-Glykanen	69
2.2.2.3 Sekretor-Status	73
3 DISKUSSION	75
3.1 Glykosylierung des humanen Blutserums	75
3.1.1 Analyse Endo H-abgespaltener N-Glykane nach chemischer Denaturierung	75
3.1.2 MAED-Methode und Endo H	76
3.1.3 MAED-Methode und PNGase F	78
3.1.4 Transglykosylierung	79
3.2 Glykosylierung des humanen Speichels	80
3.2.1 N-Glykane	81
3.2.2 O-Glykane	82
3.2.3 N- und O-Glykosylierung im Speichel	84
4 MATERIAL UND METHODEN	86
4.1 Materialien	86
4.1.1 Geräte	86
4.1.1.1 Elektrophorese und Western-Blot	86
4.1.1.2 Zentrifugen	86
4.1.1.3 Sonstige Geräte	87
4.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmittel	87

4.1.3 Enzyme	89
4.1.4 Standards	89
4.1.5 Proben.....	90
4.1.5.1 Blutserumproben	90
4.1.5.2 Speichelproben	90
4.2 Proteinbiochemische Methoden	90
4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	90
4.2.2 Nachweis von Proteinen durch Coomassie-Färbung	92
4.2.3 Western-Blot an PVDF-Membran	92
4.3 Glykananalytische Methoden.....	93
4.3.1 Reduktion und Carboxymethylierung von Proben.....	93
4.3.2 Pronase-Verdau nach MAED (<i>Microwave-Assisted Enzymatic Digestion</i>).....	94
4.3.3 Enzymatische Freisetzung von N-Glykanen.....	95
4.3.3.1 PNGase F.....	95
4.3.3.2 Endo H.....	95
4.3.3.3 Transglykosylierungsreaktion	96
4.3.4 Chemische Freisetzung von O-Glykanen.....	96
4.3.4.1 β -Eliminierung	96
4.3.5 Isolierung und Aufreinigung von N-Glykanen	97
4.3.5.1 C18-Säule	97
4.3.5.2 Carbograph-Säule.....	97
4.3.5.3 ZIC [®] -HILIC-Säule	98
4.3.5.4 Aufreinigung über SP20SS-Material	99
4.3.5.5 Aufreinigung über Graphit-Spitzen.....	100
4.3.5.6 Aufreinigung über Zellulose	101
4.3.6 Exoglykosidasebehandlung.....	101
4.3.6.1 Sialidase	101
4.3.6.2 Sulfatase	102
4.3.7 Massenspektrometrie.....	102

4.3.7.1 MALDI-TOF-MS.....	102
4.3.7.2 MALDI-TOF/TOF-MS	103
4.3.7.3 Permethylierung von N- und O-Glykanen	103
4.3.7.4 Fluoreszenzmarkierung mit 2-Aminobenzamid (2-AB).....	104
4.3.7.5 Matrix im positiven Modus	105
4.3.7.6 Matrix im negativen Modus	106
4.3.8 Kapillarelektrophorese (CE-LIF)	106
4.3.8.1 APTS-Markierung von N-Glykanen	106
4.3.8.2 CE-LIF-Analyse	107
4.3.9 Oligosaccharidtrennung mit HPAEC-PAD.....	108
4.4 Verwendete Software	110
5 ANHANG.....	111
6 LITERATUR.....	145
DANKSAGUNG.....	165

Abkürzungen

%	Prozent
° C	Grad Celsius
2AB	2-Aminobenzamid
ACN	Acetonitril
APTS	Trinatrium-8-Aminopyren-1,3,6-trisulfonat (<i>8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt</i>)
Asn	Asparagin
CDG	<i>Congenital Disorder of Glycosylation</i>
CE	Kapillarelektrophorese
Da	Dalton
DH	Dextranhydrolysat
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
dHex	Deoxyhexose
DTE	1,4-Dithioerytriol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalactosamin
Glc	Glucose
GlcNAc	N-Acetylglycosamin
h	Stunden
Hex	Hexose
HexNAc	N-Acetylhexosamin
HPAEC-PAD	<i>High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection</i>
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion
m/z	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i>
Man	Mannose

MilliQ	Wasser, aufbereitet durch Wasseraufbereitungsanlage
MS	Massenspektrometrie
Neu5Ac	N-Acetylneuraminsäure
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PNGase F	Peptid-N4-(N-Acetyl- β -glucosaminy) Asparagin Amidase
RNase B	Ribonuclease B
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
TOF	<i>Time of Flight</i>

Zusammenfassung

Glykane bilden zelltypische Muster auf Zelloberflächen aus, die sich während der Entwicklung, Differenzierung oder Erkrankung einer Zelle in charakteristischer Weise ändern. Zurzeit wird die veränderte Glykosylierung der humanen Glykoproteine als spezifischer Biomarkerkandidat in der Diagnose diverser Erkrankungen wie Krebs oder Entzündungserkrankungen diskutiert (Dennis et al. 1999; Reis et al. 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die N-Glykosylierung des humanen Blutserums und die N- und O-Glykosylierung des humanen Speichels analysiert.

Blutserum N-Glykosylierung

Die N-Glykane des High-Mannose und Hybrid-Typs spielen eine wichtige Rolle in der Immunantwort. Mit Hilfe des Enzyms Endo H wurden selektiv die N-Glykane des High-Mannose und die Hybrid-Typs aus humanem Blutserum isoliert und mit MALDI-TOF-MS, MALDI-TOF/TOF-MS, HPAEC-PAD und CE-LIF charakterisiert. Die Messmethode der CE-LIF ermöglichte nicht nur eine schnellere Detektion von Glykanen, sondern auch die Analyse ihrer Isomerstrukturen. Die Migrationszeiten der High-Mannosen (Man₅₋₉) wurden im Elektropherogramm über das Kontrollprotein RNase B zugeordnet. Die Endo H-freigesetzten N-Glykane wurden an der HPAEC-PAD getrennt und die erhaltenen Fraktionen an der CE-LIF analysiert, was eine endgültige Zuordnung der neutralen und der negativ geladenen sialylierten N-Glykane des Hybrid-Typs in den Elektropherogrammen der CE-LIF ermöglichte. Für eine diagnostische Anwendung der Analyse des

Blutserumglykoms sollte der Schritt der Abspaltung und der Aufreinigung der Glykane kosten- und zeiteffizient sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die MAED-Methode (*Microwave-Assisted Enzymatic Digestion*) zur Denaturierung der Serumproteine und zur enzymatischen N-Glykanfreisetzung mit anschließender Aufreinigung über selbstbefüllte SP20SS- und Graphit-Spitzen entwickelt. Die Denaturierung mit Pronase und die Endo H-Freisetzung der N-Glykane in der Mikrowelle erfolgte nacheinander innerhalb von 10 min (2 x 5 min; 700 Watt). Der Aufreinigungsschritt erfolgte über selbstbefüllte SP20SS- und Graphit-Spitzen. Außerdem sank das Elutionsvolumen von 1,2 mL bei C18/Carbograph auf 90 µL bei SP20SS/Graphit und minimierte damit die Trocknungszeit der Lösungsmittel von 3 h auf 30 min. Insgesamt konnte die Aufbereitungszeit der Blutserum N-Glykane von 21 Stunden auf eine Stunde reduziert werden.

Aufbauend auf den Resultaten der MAED-Methode, SP20SS/Graphit-Aufreinigung und der Messung an der CE-LIF wurden diagnostische Untersuchungen Endo H-freigesetzter N-Glykane durchgeführt. Ein Vergleich des Glykom von gesunden Probanden und dem von Patienten mit diagnostiziertem Ovarial- und Colonkarzinom zeigte deutlich, dass die beiden sialylierten Hybrid-Strukturen Neu5AcGalMan₄GlcNAc₂ und Neu5AcGalMan₅GlcNAc₂, ausschließlich in der Patientengruppe mit Ovarialkarzinom, unterexprimiert werden. Außerdem wurde eine Unterexpression im zweiten und dritten Isomer der High-Mannose Man₇GlcNAc bei Ovarial- und Colonkarzinom beobachtet.

Die während der PNGase F-MAED erzeugten Oxazolinderivate wurden in Transglykosylierungsreaktionen eingesetzt. Die *in vitro* Expression von Glykoproteinen könnte eine Möglichkeit für effektive und spezifische Therapeutika gegen gezielte Erkrankungen liefern. Die Transglykosylierungsreaktionen wurden mit Endo M durchgeführt. Das diantennäre N-Glykan des Transferrins wurde auf die Endo H-behandelte RNase B mit Hilfe von Endo M katalysiert.

Speichel Glykosylierung

Mit der MAED-Methode für die Denaturierung der Speichelglykoproteine und der Aufkonzentrierung der Glykopeptide über die ZIC[®]-HILIC Säule wurde eine schnelle Methode entwickelt, die eine hohe Ausbeute an N- und O-Glykanen liefert. Die stufenweise Freisetzung der N- und O-Glykane lieferte eine Fülle an strukturellen Informationen. Die N-Glykane wurden hierzu enzymatisch (PNGase F) und die O-Glykane chemisch (β -Eliminierung) freigesetzt und aufgereinigt. Die N- und O-Glykosylierungen

des humanen Speichels wurden massenspektrometrisch an MALDI-TOF-MS und MALDI-TOF/TOF-MS untersucht. Dabei wurde unter anderem der Sekretor-Status, Sialylierungs-, Sulfatierungs- und Fucosylierungsgrad charakterisiert. Zusätzlich wurden Strukturisomere der N- und O-Glykane untersucht. Die MALDI-TOF-MS Analyse der N-Glykane lieferte eine hohe Strukturvielfalt an mehrfach fucosylierten und/oder sialylierten di-, tri- und tetraantennären N-Glykanen des Komplex-, High-Mannose- und Hybrid-Typs.

Die O-Glykanstrukturen konnten von 500 bis 4000 m/z detektiert werden. In Speichelproben mit Sekretor-Status dominierten fucosylierte O-Glykane und in Proben mit Nicht-Sekretor-Status dominierten sialylierte O-Glykane. Außerdem konnten *core-1*, *core-2*, *core-3* und *core-4*, Lewis-Epitope: Le^{a/x}-, Le^{b/y}- und sLe^{a/x}-Epitope sowie ABH-Epitope in Abhängigkeit von der Blutgruppe nachgewiesen werden.

Abstract

Glycans form cell-specific patterns on cell surfaces, which alter in a typical manner during development, differentiation or infection of a cell. Nowadays, changes in the glycosylation are discussed as biomarkers in the diagnosis of multiple diseases such as cancer or inflammation (Dennis et al. 1999; Reis et al. 2010). In the present work the N-glycosylation of human blood serum and the N- and O-glycosylation of human saliva was analysed.

Blood serum N-glycosylation

High-mannose and hybrid-type N-glycans play an important role in the immune response. Using the enzyme Endo H, high-mannose and hybrid type N-glycans in human blood serum could selectively be released and characterised by MALDI-TOF-MS, MALDI-TOF/TOF-MS, HPAEC-PAD and CE-LIF. Analysis of oligosaccharide structures using CE-LIF not only led to a faster detection of glycans, but also made an analysis of structural isomers possible. Electropherogram migration times of high-mannose oligosaccharides were assigned by comparison with known structures generated from control protein RNase B. The Endo H-released N-glycan pool was separated by HPAEC-PAD and the obtained fractions were analysed by CE-LIF allowing for an unambiguous identification of the N-glycan hybrid-types. In order to develop diagnostic applications based on the analysis of the human blood serum glycom, glycan release and purification must be time- and cost-

efficient. In the present work a MAED-method (*Microwave-Assisted Enzymatic Digestion*) for the denaturation of serum proteins and the enzymatical release of N-glycans with subsequent purification over self-made SP20SS/graphite tips was developed. The denaturation with Pronase and the Endo H release of N-glycans was performed in a microwave during 10 min (2 x 5 min; 700 Watt). The purification step was performed on self-made SP20SS/graphite tips. Furthermore, the elution volumes were reduced from 1,2 mL by C18/Carbograph to 90 μ L by SP20SS/graphite tips which minimised the evaporation time of solvent from 3 h to 30 min. In summary the time necessary for the preparation of blood serum N-glycans was reduced from 21 hours to one hour.

Based on the results obtained from the MAED-method, SP20SS/graphite purification and CE-LIF analysis, diagnostic studies Endo H released N-glycans could be realised. Comparison between the glycom of healthy control and patients with ovarian and colon cancer showed that the sialylated hybrid structures Neu5AcGalMan₄GlcNAc₂ and Neu5AcGalMan₅GlcNAc₂ were significantly under-expressed in samples with ovarian cancer. Furthermore, in samples with ovarian and colon cancer an under expression in the second and third isomer of high-mannose Man₇GlcNAc was observed.

The oxazoline derivatives generated in the PNGase F-MAED were used in transglycosylation reactions. The *in vitro* expression of glycoproteins could provide a new route for efficient and specific therapeutic agents against certain diseases. Endo M catalysed the transglycoslation reaction between oxazoline derivatives and modified RNase B protein. During the transglycosylation reaction diantennary N-glycan of transferrin was transferred by Endo M of the Endo H treated RNase B.

Human saliva glycosylation

With the MAED-method for the denaturation of saliva glycoproteins and the concentration of the glycopeptides on a ZIC[®]-HILIC column, a rapid method could be developed which provides high yields on N- and O-glycans. The consecutive release of N- and O-glycans afforded multiple structural informations. N-glycans were enzymatically released (PNGase F) and O-glycans chemically (β -elimination). The N- and O-glycosylation of human saliva was analysed by MALDI-TOF-MS und MALDI-TOF/TOF-MS. Thereby, the secretor-status, sialylation, sulfatation and fucosylation was identified and characterised. In addition, isomeric structures of N- and O-glycans were analysed. The MALDI-TOF-MS analysis of N-glycans provided a high structural diversity in high fucosylated and/or

sialylated di-, tri- and tetra-antennary complex-typ N-glycans, high-mannose and hybrid-typ N-glycans. O-glycans could be detected from m/z 500 to m/z 4000.

Saliva samples with secretor-status were found to be dominated by fucosylated O-glycans whereas in samples with non-secretor-status, sialylated O-glycans were found to be most abundant. Furthermore, depending on the blood group it was possible to identify *core-1*, *core-2*, *core-3* and *core-4* structures, lewis-epitopes: Le^{a/x}-, Le^{b/y}- and sLe^{a/x}-epitope and ABH-epitopes.

1 Einleitung

1.1 Glykosylierung

Die Glykobiologie beschäftigt sich mit der Erforschung der komplexen Struktur und Funktionen von Polysacchariden beziehungsweise Glykanen. Glykane sind kovalent an Proteine gebunden und beeinflussen deren physiko-chemischen und biologischen Eigenschaften, z.B. unterstützen sie die korrekte Faltung und Stabilität der Proteine, erhöhen deren Wasserlöslichkeit und schützen die Proteine gegen Proteinabbau durch Peptidasen (Lis and Sharon 1993; Edge et al. 1993; Varki 1993).

Die Glykosylierung findet auch an Biomolekülen wie Fettsäuren und Lipiden statt (Burns and Bretscher 1985). Hier dienen die Polysaccharide als Erkennungsdomänen bei der Kommunikation zwischen Zellen und bei Wechselwirkungen mit Viren und Bakterien. Ausserdem spielen sie eine wichtige Rolle bei zahlreichen biologischen Funktionen, wie Zelldifferenzierung, Zelladhäsion und Infektion (Dwek 1998; Sinclair and Elliott 2005).

Die Ausstattung eines Organismus mit Glykostrukturen ist artspezifisch. Polysaccharide sind biologische Polymere bestehend aus Monosaccharideinheiten, die durch glykosidische Bindungen zu linearen oder verzweigten Polysaccharidketten verknüpft werden. Die Verzweigung basiert auf mehrere vorhandene Hydroxylgruppen jedes Monosaccharids. Die Vielfalt von Verknüpfungsmöglichkeiten, Konformation und Art der Monosaccharide ermöglicht eine hohe Vielzahl an komplexen Glykanstrukturen (Dwek 1995; Dwek 1996).

Im humanen Organismus findet die Glykosylierung der Proteine sowohl co- als auch posttranslational statt (Helenius and Aebi 2001; Alberts et al. 2002; Jensen 2004).

Die zwei häufigsten Glykosylierungstypen sind die N- und die O-Glykane. N-Glykane sind über das Stickstoffatom der Aminosäure Asparagin und die O-Glykane über das Sauerstoffatom der Aminosäuren Serin oder Threonin an den Peptidteil gebunden. Die weiteren vorkommenden Glykosylierungstypen sind: die C-gebundenen Glykane über den Mannoserest am Tryptophan, die P-gebundenen Glykane über den Phosphatrest eines Phosphoserins, und der Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) über den C-Terminus eines Proteins. (Spiro 2002) Die Glykosylierung besitzt kein DNA-Template, wie es bei Proteinen der Fall ist. Sie wird Schritt für Schritt durch eine Vielzahl an Glykosyltransferasen im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat zusammengesetzt (Schmidt 2002; Lottspeich and Engels 2006; Varki 2009). Spezifische Glykosylierungsmuster können den Zustand einer Zelle charakterisieren, sowie auf spezifische Erkrankungen hinweisen. (Lis and Sharon 1993) So konnte beispielsweise ein verändertes Glykosylierungsmuster bei Krebs- und Entzündungserkrankungen beobachtet werden (Dennis et al. 1999; Reis et al. 2010).

1.1.1 N-Glykosylierung

N-Glykane sind über eine β -glykosidische Bindung des N-Acetylglucosamins an die Aminosäure Asparagin (Asn) in der Erkennungssequenz Asn-X-Ser/Thr (X = beliebige Aminosäure, außer Prolin) an das Peptid gebunden (Shakin-Eshleman et al. 1996). N-Glykane zeichnen sich durch eine gemeinsame Pentasaccharid-Kernstruktur aus (*core*), die aus zwei N-Acetylglucosamin- und aus drei Mannoseeinheiten besteht (Fukuda 1994). Im humanen Organismus werden die N-Glykane in der Regel aus den Monosacchariden N-Acetylglucosamin (GlcNAc), Mannose (Man), Galactose (Gal), Fucose (Fuc) und N-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) aufgebaut. Die spezifischen Verlängerungen der N-Glykan *core*-Struktur durch die Monosaccharide liefern die unterschiedlichen Klassen der N-Glykane. Man unterscheidet drei Varianten der N-Glykane: den High-Mannose-Typ, Komplex-Typ und Hybrid-Typ (Abb. 1). Wobei der Komplex- und der Hybrid-Typ fucosyliert und/oder sialyliert auftreten können. Die Fucosylierung erfolgt am GlcNAc *core*-gebunden und/oder antennär, welches für die Proteinfunktion von entscheidender Bedeutung sein kann.

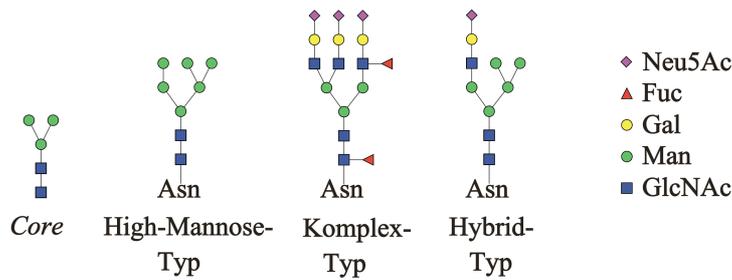


Abb. 1: Übersicht der Grundtypen der N-Glykane.

Die N-Glykosylierung der Proteine ist ein cotranslationaler Prozess. Das bedeutet, dass die N-Glykosylierung während der Proteinbiosynthese initiiert wird. Zuerst wird eine Vorläufer-Oligosaccharidstruktur im Cytosol des rauen Endoplasmatischen Retikulums (ER) auf ein lipidverankertes Dolicholphosphat mit aktivierten Nukleotid-Monosacchariden: Uridindiphosphat (UDP)-GlcNAc und Guanosindiphosphat (GDP)-Man aufgebaut (Abb. 2). Die Synthese der Vorläufer-Oligosaccharidstruktur beginnt mit der Übertragung des UDP-GlcNAc auf das Dolicholphosphat (Stanley et al. 2009). Danach wird die Vorläuferstruktur um noch ein GlcNAc-Rest und fünf Mannoseeinheiten verlängert, bevor diese in das ER-Lumen befördert wird. Durch weitere aktivierte Monosaccharide, vier UDP-Man und drei UDP-Glc, entsteht die an Dolicholphosphat gebundene, aus 14 Monosacchariden bestehende Vorläuferstruktur, $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$. Die Vorläuferstruktur wird mittels Oligosaccharyltransferase (OST-Komplex) auf den Asparaginrest der Konsensussequenz Asn-Xxx-Ser/Thr des Proteins übertragen (Silberstein and Gilmore 1996; Roth 1996; Helenius and Aebi 2001; Dempski and Imperiali 2002). Nicht jede Konsensussequenz wird automatisch mit einer N-Glykosylierung modifiziert, vielmehr ist die Glykosylierung an ein und derselben Proteinstelle sehr heterogen. Die genaue Ursache dafür wird noch erforscht, jedoch wird bislang vermutet, dass die Proteinkonformation dabei eine wichtige Rolle spielt (Apweiler et al. 1999; Hossler et al. 2007).

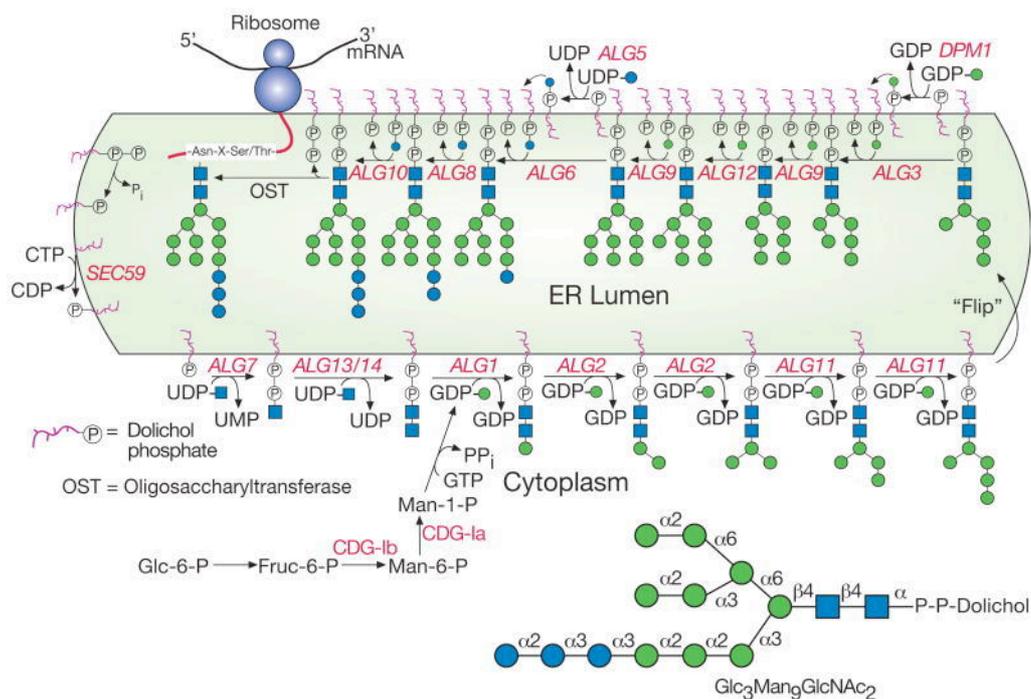


Abb. 2: Biosynthese der Vorläuferstruktur der N-Glykane im ER auf einem lipidverankerten Doliholphosphat (nach Varki et al. 2009).

Das neuentstandene Glykoprotein wird vor dem Transfer in den Golgi-Apparat, so modifiziert, dass drei Glucosen und eine spezifische Mannose entfernt werden (Kornfeld and Kornfeld 1985; Helenius 2001). Im Golgi-Apparat angelangt beginnt nun die posttranslationale Modifikation der N-Glykanvorläuferstruktur. Zuerst werden Mannosen durch spezifische Mannosidasen abgespalten bis ein Trimannosyl-core entsteht, welches dann durch entsprechende Enzymreaktionen zu den drei Arten der N-Glykane modifiziert wird (Taylor and Drickamer 2003; Varki 2009). Zwei der α -Mannosereste können mit bis zu fünf N-Acetylglucosaminresten verknüpft werden. Weitere Modifizierungen des N-Glykans finden in Form eines α -Fucoserestes am proteingebundenen GlcNAc oder an der Antenne statt. Es erfolgt im Weiterem eine proteinspezifische Fucosylierung und/oder Sialylierung. Bei entsprechend vorhandener GlcNAc-Transferase kann zudem ein GlcNAc β 1-4-glykosidisch am C₄ des zentralen β -Mannoserestes der Kernstruktur eingefügt werden (*bisecting*-GlcNAc). Beim High-Mannose-Typ werden an die *core*-Struktur nur α -Mannosereste addiert. N-Glykane des Hybrid-Typs enthalten sowohl Merkmale des High-Mannose- als auch des Komplex-Typs (Kobata 2000).

Das cotranslationale Anfügen der N-Glykanvorläuferstruktur an die Proteine verdeutlicht die entscheidende Rolle der N-Glykane bei der korrekten Proteinfaltung (Varki 1993; Messner 1997).

Angeborene Defekte in der N-Glykosylierungsmaschinerie können gravierende Folgen für den humanen Organismus haben. Unter dem Begriff *Congenital Disorders of Glycosylation* (CDG) sind zahlreiche Erkrankungen abnormaler Glykosylierungen zusammengefasst (Freeze and Westphal 2001; Schachter 2001; Spiro 2002). Der erste Fall eines Glykosylierungsdefekts wurde 1980 von Kinderarzt Jaak Jaeken veröffentlicht (Jaeken 1980). Er beschrieb Zwillingsschwestern mit psychomotorischer Retardierung und mit markant schwankenden Werten für die Proteine FSH (Follikelstimulierendes Hormon) und GH (*Growth Hormon*). Ausserdem beobachtete er erhöhte Werte für die Proteine Arylsulphatase A und CSF und einen partiellen Mangel des Transportproteins TGB (Thyroxin-bindendes Globulin). CDG-Erkrankungstypen resultieren aus Defekten in den Enzymreaktionen oder im Transport der Glykosylierung im Cytosol, ER und Golgi-Apparat. Dabei können alle Organe und teilweise auch das zentrale Nervensystem betroffen sein (Marquandt and Freeze 2001; Grünewald et al. 2002).

1.1.2. O-Glykosylierung

Die O-Glykosylierung beschreibt die glykosidische Bindung zwischen einer Aminosäure (Serin, Threonin, Hydroxyprolin, Hydroxylysin), die eine Hydroxylgruppe aufweist, und einem Kohlenhydrat. Im Gegensatz zur N-Glykosylierung ist die O-Glykosylierung eine rein posttranslationale Modifikation. Zudem besitzen die O-Glykane keine bekannte Proteinerkennungssequenz, es können jedoch Sekundärstrukturen der Proteine (z.B. β -turn) eine entscheidende Rolle bei ihrer O-Glykosylierung spielen (Van den Stehen et al. 1998). O-Glykane sind tendenziell kürzere Strukturen im Vergleich zu den N-Glykanen und weisen eine viel höhere Strukturvielfalt auf (Hounsell 1993). Die häufigste O-glykosidische Verknüpfungsart ist die des Muzin-Typs, GalNAc- α -Ser/Thr. Muzine sind Glykoproteine mit einem hohen Molekulargewicht (> 200 kDa) und mit einem 50-80%igen Kohlenhydratanteil. Die Muzin-Typ O-Glykosylierung besitzt acht verschiedene *core*-Strukturen (siehe Tabelle 1) (Taylor and Drickamer 2003; Varki et al. 2009). Im Allgemeinen ist mit der O-Glykosylierung der Muzin-Typ gemeint.

Tabelle 1: Muzin-Typ *core*-Strukturen der O-Glykane.

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

Des Weiteren werden O-glykosidische Verknüpfungen mit Fucose, Mannose, Galactose, Xylose und N-Acetylglucosamin zur Proteinkette beobachtet (Spiro 2002). GlcNAc- β -Ser/Thr wurde in vielen Kern- und Cytoskelettproteinen gefunden und im Gegensatz zu den meisten anderen Glykanen ist das O-glykosidisch gebundene GlcNAc nicht mit weiteren Monosacchariden verknüpft (Hart 1997; Spiro 2002).

Die O-Glykosylierung wird im Gegensatz zu der N-Glykosylierung erst im Golgi-Apparat initiiert. O-Glykane besitzen keine Vorläuferstruktur, hier erfolgt eine schrittweise Addition von Monosacchariden. Die Addition des ersten Monosaccharids im Muzin-Typ, das N-Acetylgalactosamin (GalNAc), erfolgt im cis-Golgi (Ten Hagen et al. 2003; Tarp and Clausen 2008). Danach werden GlcNAc und/oder Gal an das GalNAc addiert und bilden eine der acht möglichen *core*-Strukturen aus, welche entweder gleich sialyliert und/oder fucosyliert werden oder durch andere Monosaccharide (meist GlcNAc und Gal; selten Man und Glc) zu linearen oder verzweigten O-Glykanen verlängert werden. O-Glykane können als Monosaccharide oder Disaccharide kurze und einfache Strukturen sein, aber auch enorme Ausmasse annehmen, z.B. durch die Wiederholungssequenz Polylactosamin: Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal.

So unterschiedlich wie ihre Strukturen sind auch ihre Funktionen. O-Glykane sind beteiligt an der Blutgerinnung, der Embryogenese und der Zellentstehung (Varki 1993; Brockhausen and Kuhns 1997). Weiterhin ist die O-Glykosylierung involviert in

Zelladhäsion und -transport, T-Zell-Apoptose, bei der Zellkommunikation und der Pathogen-Wirt-Interaktion (Altschuler et al. 2000; Lowe 2001; Baum 2002).

CDG-Erkrankungen wurden für die N- und O-Glykosylierung beobachtet. N-Glykosylierungsdefekte finden z. B. bei CDG Ia, Ib, IIa, IIb und IIc statt (Dijk 2001; Sparks 2005). Bei O-Glykanen sind Defekte zumeist bei der Verknüpfung von Mannose oder Xylose zu Ser/Thr detektiert (Sparks 2005). Defekte in der Biosynthese eines O-glykosidisch gebundenen Mannoserestes führen zur *Muscle-Eye-Brain* Erkrankung (MEB) oder zur Walker-Warburg Syndrom (WWS) (Yoshida et al. 2001; Beltran-Valero de Bernabe et al. 2002). Glykoproteine, die eine O-Mannosylierung tragen, kommen im Gehirn, Nerven und Muskeln vor (Endo 1999; Inamori et al. 2004). Defekte in der Biosynthese von O-Xylose führen zum Ehlers-Danlos Syndrom (EDS) oder zur hereditäre multiple Exostose Erkrankung (HME) (Okajima et al. 1999; Furukawa and Okajima 2002; Wuyts 2000).

1.1.3. Charakteristische Glykankettenverlängerungen

Die terminalen Epitope der Oligosaccharide sind hoch variabel, zell- und gewebespezifisch. Ausserdem unterliegen die Antennen der Glykane ständiger Änderung abhängig von der Entwicklung, Differenzierung und Krankheitsverläufen des individuellen Organismus. Dabei besitzen beide, N- und O-Glykane viele gemeinsame terminale Strukturen. Dies geschieht auf Grund der gleichen Glykosyltransferasen im Golgi-Apparat. So werden beispielsweise die ABH Blutgruppen-Epitope an N- und O-Glykanen gefunden. Damit können N- und O-Glykane gleiche antennäre Strukturen tragen.

Lactosamine

Die meisten N- und O-Glykane tragen ein terminales GlcNAc, welches der β 1-3-Galactosyltransferase als Substrat für die Ausbildung der Gal(β 1-3)GlcNAc Struktur dient, auch bekannt als Neolactosamin-Einheit. Die häufigste Modifikation bei Glykanen ist die Addition der β 1-4-Galactose an das terminale GlcNAc, unter Ausbildung der Lactosamin-Einheit Gal(β 1-4)GlcNAc. Diese kann als Akzeptor für weitere Verlängerungen dienen, sowohl die terminale Galactose als auch das sub-terminale GlcNAc der Lactosamin-Einheit (Gal(β 1-4)GlcNAc). Damit können viele lineare als auch verzweigte Glykanstrukturen gebildet werden (Tabelle 2). Viele aneinander geknüpfte Lactosamin-

Einheiten bilden Polylactosamin-Ketten aus und können durch Sialylierung oder Fucosylierung weiter modifiziert werden (Yousefi et al. 1991, Zhou 2003).

Tabelle 2: Terminale Motive der Oligosaccharide.

	Struktur
Neolactosamin	Gal(β 1-3)GlcNAc β -
Lactosamin	Gal(β 1-4)GlcNAc β -
Poly-Lactosamin	(Gal(β 1-4)GlcNAc β -) _n -

Lineare Polylactosamin-Epitope (Tabelle 2) der N- und O-Glykane, auch als i-Antigen bezeichnet (Abb. 3A), kommen auf Zelloberflächen zahlreicher Zell- und Gewebetypen im humanen Organismus vor (z.B. auf Erythrozyten, Leukozyten, Makrophagen, Glykolipiden und Glykoproteinen). Die Verzweigung der Ketten-internen Galactose im linearen Polylactosamin durch GlcNAc in β 1-6-Stellung führt zur Ausbildung des I-Antigens (Abb. 3B) (Mattila et al. 1998).

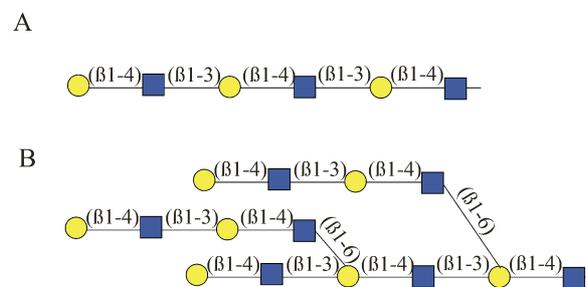


Abb. 3: i-Antigen. A) i-Antigen mit Wiederholungssequenz (Gal(β 1-4)GlcNAc)_n; B) I-Antigen ist eine verzweigte Determinante, die sich aus i-Antigen ableitet. Blaues Quadrat, GlcNAc; gelber Kreis, Gal.

Verzweigte und unverzweigte Polylactosamine, entsprechen den i-Antigen und I-Antigen des Blutgruppensystems und wurden im Zusammenhang mit der Kälteagglutinin-Krankheit entdeckt, diese zeichnet sich durch Anwesenheit von Kälte-Autoantikörpern aus, die die Oligosaccharidstrukturen auf den Erythrozyten angreifen und so zur hämolytischen Anämie führen (Feizi 1981; Hakomori 1981).

Lewis-Strukturen

Die Lewis-Strukturen sind fucosylierte terminale Antigene der Glykane (Abb. 4) und treten sowohl bei N- als auch bei O-Glykanen auf. Den Antigenen Lewis a (Le^a) und Lewis b (Le^b) dient als Basis die Struktur Gal(β 1-3)GlcNAc. Die Lewis x (Le^x) und Lewis y (Le^y) sind fucosylierte Modifikationen der Struktur Gal(β 1-4)GlcNAc.

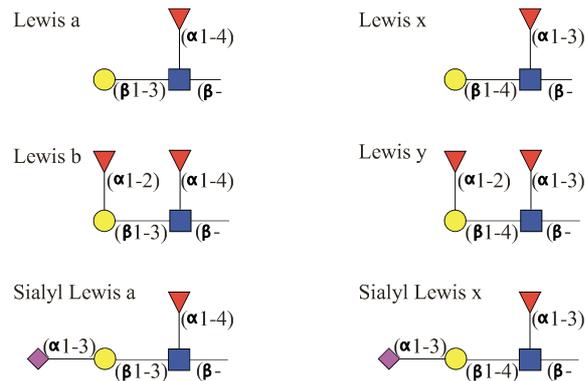


Abb. 4: Übersicht über die Lewis Determinanten; Blaues Quadrat, GlcNAc; gelber Kreis, Gal; Rotes Dreieck, Fucose; Lila Raute, Sialinsäure.

Lewis Antigene werden z. B. auf den Glykoproteinen in Sekreten, Plasma und auf den Erythrozyten, Leukozyten und Selektinen detektiert. Sie kommen beispielsweise als freie Oligosaccharide in der Milch und im Urin vor. Einige Lewis Antigene werden mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht, so werden sialyl Lewis x (sLe^x) und sialyl Lewis a (sLe^a) als Tumormarker in Darmkrebs beschrieben (Shiozaki et al. 2011). Le^y wird im Ovarialkrebs höher expremiert (Pastan et al. 1991; Yan et al. 2010). sLe^x und sLe^a werden als Tumor-assoziierte Antigene in Brustkrebs gefunden (Ura et al. 1992; Narita et al. 1993; Soares et al. 1996). Die Lewis Antigene: sLe^x , Le^x , poly Le^x , Le^y zeigten in Blutserum von Lungenkrebspatienten ungewöhnlich hohe Antigen-Mengen (Zenita et al. 1988).

ABH-System und Sekretor-Status

Das ABH-System fasst die humanen Blutgruppen Antigene zusammen. Es handelt sich hier um Kohlenhydratketten, die als terminale Epitope auf den Glykanen zu finden sind (Abb. 5).

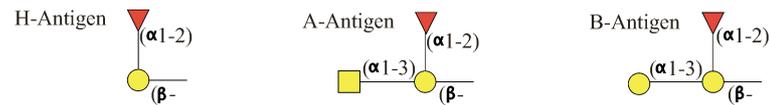


Abb. 5: Blutgruppen-Epitope; Gelbes Quadrat, GalNAc; gelber Kreis, Gal; Rotes Dreieck, Fucose.

Typischerweise werden ABH-Antigene auf den Erythrozyten detektiert und bestimmen die Blutgruppe des Menschen (King 1994). Individuen der Blutgruppe A tragen Antigen-A auf ihren Erythrozyten, mit Blutgruppe B Antigen-B. Blutgruppe AB besitzt beide Antigene und Blutgruppe 0 keine Antigene auf den Erythrozyten. Die H-Determinante ist ein Disaccharid und fungiert als Vorläuferstruktur für A- und B-Antigene. Wenn auch geringer an Konzentration ist die H-Determinante auch in allen anderen Blutgruppen present. Individuen der Blutgruppe 0 exprimieren das Antigen-H, mit der Blutgruppe A das Antigen-A und in geringen Anteilen das Antigen-H, mit der Blutgruppe B das Antigen-B und in geringen Anteilen das Antigen-H und die Individuen mit der Blutgruppe AB exprimieren Antigene A, B und in geringen Anteilen das Antigen-H. Die ABH-Antigene kommen sowohl auf N- als auch auf O-Glykanen als Epitope vor, da hier die gleichen Glykosyltransferasen im Golgi-Apparat agieren. 80% der Individuen exprimieren die ABH-Antigene auch in Sekreten wie Speichel oder Magenschleimhaut, diese werden als Sekretoren bezeichnet (Greenwell 1997). Sekretoren sind in der Lage die H-Determinante ausserhalb des Blutkreislaufes zu produzieren, dafür ist die α 1-2-Fucosyltransferase (FUT2) zuständig (Henry et al. 1995). Für die Ausbildung der H-Determinante auf den Erythrozyten ist die FUT1 α 1-2-Fucosyltransferase zuständig. Individuen bei denen kein Gen für die FUT2 im Genom vorliegt, werden als Nicht-Sekretoren bezeichnet und können keine ABH-Antigene ausbilden (Kelly et al. 1995; Larsen et al. 1990). Der Sekretor-Status bestimmt das Glykom des Individuums und somit dessen Stoffwechsel und Immunsystem (Thomsson et al. 2005; Karlsson and Thomsson 2009). Nicht-Sekretoren besitzen ein höheres Risiko für Herzkrankheiten, Magengeschwüre, häufige Harnwegsinfekte, unterschiedliche Autoimmunerkrankungen, wie Spondylitis (Wirbelentzündungen), reaktive Arthritis oder Multiple Sklerosis (D'Adamo und Kelly 2001).

1.1.4 Funktionen der Sialylierung, Fucosylierung und Sulfatierung

Die am häufigsten vorkommenden terminalen Glykanmodifikationen sind die Sialylierung und die Fucosylierung. Zu den wichtigen Glykanmodifikationen zählt auch die Sulfatierung.

Sialylierung

N-Acetyl-Neuraminsäure (Neu5Ac) meist bekannt unter dem Begriff „Sialinsäure“ ist ein C 9-Zucker, der an der Position C-2 eine Carboxyl-Gruppe trägt (Abb. 6). Die Position C-5 weist eine Aminofunktion auf und C-4 und C-6 bis C-9 sind hydroxyliert (Schauer et al. 1982). Neu5Ac ist die häufigste Sialinsäure bei höheren Invertebraten und Vertebraten sowie einigen pathogenen Bakterien, man unterscheidet über 50 natürlich vorkommende Derivate der Sialinsäure (Faillard et al. 1989; Roth et al. 1992; Varki et al. 1992; Guérardel 2011).

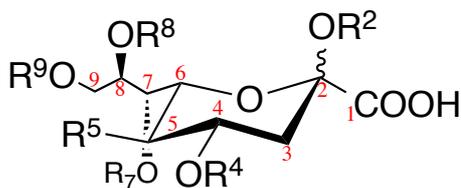


Abb. 6: Struktur der Sialinsäure. Beim häufigsten Vertreter der Sialinsäuren liegen die Hydroxylgruppen unmodifiziert vor und die Carboxylgruppe ist beim physiologischen pH deprotoniert. Bei anderen Derivaten der Sialinsäure variieren die natürlichen Substituenten: R2 α -3/4/6-Gal, α -6-GlcNAc, α -8/9-Sialinsäure; R4 O-Acetyl; R5 Amino, N-Acetyl, Hydroxyl; R7 O-Acetyl; R8 O-Acetyl, O-Methyl, O-Sulfat, Sialinsäure; R9 Hydroxyl, O-Acetyl, O-Sulfat, Sialinsäure, O-Phosphat, O-Lactyl.

Die Sialylierung von Glykanen ist eine der häufigsten Modifikationen im humanen Organismus und kommt in α 2-3-, α 2-6- oder α 2-8-glykosidischer Verknüpfung vor. Für die Sialylierung der Glykane ist eine große Familie an Sialyltransferasen verantwortlich. Bislang sind 20 Sialyltransferasen bekannt.

An eine Galactose α 2-3-verknüpfte Sialinsäure, ist ein häufig auftretendes terminales Monosaccharid in Glykanen und Glykolipiden und wird gewebe- und zellspezifisch von mindestens fünf verschiedenen Sialyltransferasen (ST3Gal-I, ST3Gal-II, ST3Gal-III, ST3Gal-IV, ST3Gal-V) synthetisiert. Glykane die eine α 2-3-Sialinsäureverknüpfung

aufweisen, spielen oftmals eine wichtige Rolle als Liganden für Selektine und erhöhen die Halbwertszeit der Serumglykoproteine. Eine Desialylierung, welche die subterminalen Galactosereste freilegt, führt zur Erkennung des Glykoproteins durch Asialoglykoproteinrezeptoren (ASGPR), welche vor allem auf Leberzellen zur Endozytose und nachfolgender Degradierung von Proteinen vorkommen. (Ashwell, G. and Harford 1982). Die α 2-3-verknüpften Sialinsäuren agieren ausserdem als Liganden für Lektine der Pathogene, wie Influenzavirus, *Helicobacter pylori* oder *Vibrio cholerae*. (Varki 2007; Chionh et al. 2009). Auf den Thymocyten wird die α 2-3-Sialylierung des O-Glykans des *core*-1-Typs (Sia(α 2-3)Gal(β 1-3)GalNAc- α -Ser/Thr) durch die Sialyltransferase ST3Gal-I ermöglicht und spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort. Die Sialyltransferase ST3Gal-I ist ebenso involviert in die Kontrolle der Thymocyten-Differenzierung (Priatel et al. 2000; Moody et al. 2001). Defekte oder gar das Fehlen des ST3Gal-I Enzyms führen zur steigenden Apoptose bis hin zur Inhibierung der Immunantwort.

Neben der α 2-3- gehört auch die terminale α 2-6-Sialylierung zu den am Häufigsten vorkommenden Sialinsäureverknüpfungen auf den Glykanen der Glykoproteine und Glykolipide. Die α 2-6-Sialylierung wird von sechs verschiedenen Sialyltransferasen erzeugt (ST6Gal-I, ST6GlcNAc-I, ST6GalNAc-I, ST6GalNAc-II, ST6GalNAc-III, ST6GalNAc-IV). Diese sind dafür verantwortlich, dass die α 2-6-verknüpften Sialinsäuren die terminalen Galactosen, terminalen und subterminalen N-Acetylglucosamine und subterminalen N-Acetylgalactosamine modifizieren. Zusätzlich wird die α 2-6-Sialylierung auf subterminalen β 1-4-verknüpften Galactosen der Lactosamineinheiten der O-Glykane synthetisiert (Weinstein et al. 1987). Die Funktionen der α 2-6-Sialylierung sind denen der α 2-3-Sialylierung ähnlich. Sie fungieren als Maskierung für terminale Galactosereste, um das Glykoprotein vor Erkennung durch den ASGPR zu schützen und somit die Halblebenszeit zu verlängern. Die α 2-6-Sialylierung dient ebenfalls als Ligand für den Influenzavirus und spielt eine Rolle in der Signaltransduktion des Immunsystems.

Die α 2-8-Sialylierung steht im Zusammenhang mit der Entwicklung und der Regulation des neuronalen Nervensystems. Für die Ausbildung der α 2-8-Sialylierung sind mindestens fünf Sialyltransferasen zuständig (ST8Sia-I, ST8Sia-II, ST8Sia-III, ST8Sia-IV, ST8Sia-V). Eine besondere Form der α 2-8-Sialylierung stellt die Poly-Sialylierung (*Poly Sialic Acid*, PSA), wie auf dem Zelladhäsionsmolekül NCAM (*Neuronal Cell Adhesion Molecule*), dar (Rutishauser 1998). Dabei wird die PSA endständig an die N-Glykane neuronaler

Glykoproteine addiert (Troy et al. 1992). Die initiale Verknüpfung kann mit α 2-3-, α 2-6- oder α 2-8-verknüpften Sialinsäuren beginnen (Doherty et al. 1990; Landmesser et al. 1990; Rutishauser 1996). Das lineare PSA-Homopolymer besitzt eine Wiederholungseinheit von mindestens 8 bis zu 50 oder mehr Sialinsäuren. Die stark negative Ladung der PSA-Moleküle beeinflusst erheblich die Interaktionen zwischen Zellen und der extrazellulären Matrix (Brusés und Rutishauser 2001).

Fucosylierung

In Säugetieren kommt Fucose als *core*-Fucose direkt an Serin und Threonin gebunden vor (O-Fucosylierung) (Wang et al. 2001). Die O-Fucosylierung kommt auf sekretierten Proteinen, wie dem Thrombospondin 1 und dem epidermalen Wachstumsfaktor vor (Harris und Spellman 1993). Die O-Fucosylierung spielt eine Rolle bei der Neurogenese, Angiogenese und bei lymphoider Entwicklung (Artavanis-Tsakonas et al. 1999). Man findet α 1-2, α 1-3 und α 1-4 gebundene Fucosen an N-, O- und lipid-gebundenen Glykanen vor. Als Modifikation von N-Glykanen kommt Fucose auch in α 1-6-Verknüpfung am Chitobiose-*core* vor, welche durch die α 1-6-Fucosyltransferase VIII (FUT8 Gen) katalysiert wird. Die zwei α 1-2-Fucosyltransferasen werden von FUT1 Gen (Antigen H, ABH Blutgruppen-Antigene) und von FUT2 Gen (Sekretor-Status) kodiert. (Kelly et al. 1995; Larsen et al. 1990). FUT3-FUT7 Gene und FUT9 Gen kodieren α 1-3-Fucosyltransferasen (Le^a und Le^b Antigene) und im Falle von FUT3 auch α 1-4-Fucosyltransferasen (Le^x und Le^y Antigene) (Becker und Lowe 2003).

Sulfatierung

Die Glykan-Sulfatierung ist charakteristisch für Glycosaminglykane, kommt aber auch bei N- und O-Glykanen vor (Yu et al. 2009). Galactosen, N-Acetylgalactosamine und N-Acetylglucosamine in den O-Glykanen können durch Sulfate modifiziert werden. Die Sulfatierung findet im Golgi-Apparat statt, wo 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) als Sulfat-Donorsubstrat fungiert. Dabei können terminale aber auch subterminale Positionen in Glykanen durch Sulfate besetzt werden (Fukuda et al. 2001; Hemmerich et al. 2001). Le^x und Le^a werden oft durch GlcNAc-6-O-sulfotransferase modifiziert, 3'-sulfo- Le^a und 3'-sulfo- Le^x . Die Sulfatierung von Le^x und Le^a erfolgt nach der Sialylierung aber noch vor der Fucosylierung. Sulfatierte Glykane sind meist auch sialyliert. Dabei wirkt die hohe negative Ladung als Schutz gegen Proteasen. In Krebs- oder Entzündungskrankheiten kann sich der Grad der Sulfatierung verändern. Vieira et al. berichten, dass zahlreiche

sulfatierte Glykanstrukturen eine erhöhte Expression in Tränen- und Speichelflüssigkeiten der Patienten mit Rosazea aufweisen (Vieira et al. 2012).

1.2 Enzymatische und chemische Deglykosylierung

Der Glykananalyse geht der Schritt der Glykanabspaltung voraus. Die Abspaltung der Glykane von den Glykoproteinen und Glykopeptiden kann entweder enzymatisch oder chemisch erfolgen. Bei der enzymatischen Deglykosylierung werden Oligosaccharide von Glykoproteinen über Enzyme (z. B. PNGase F, Endo H) freigesetzt (Suzuki et al. 1994). Peptide- N^4 -(*N*-acetyl- β -glucosaminy)l Asparagin Amidase F (PNGase F) katalysiert beispielsweise die Spaltung der Bindung zwischen dem ersten *N*-Acetylglucosamin des Pentasaccharid-*cores* und dem Proteinrückgrad (Plummer et al. 1984). Endo- β -Acetylglucosaminidase H (Endo H) hingegen katalysiert die Bindungsaufspaltung zwischen den beiden *N*-Acetylglucosaminen des Chitobiose-*cores* der *N*-Glykane. Die enzymatische Deglykosylierung besitzt enorme Vorteile, da sie sehr spezifisch und unter milden physiologischen Bedingungen erfolgt. Die chemische Deglykosylierung (z. B. β -Eliminierung, Hydrazinolyse) ist unspezifischer und wird unter strengen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Wohingegen das *N*-Glykom durch enzymatische Deglykosylierung vollständig abgespalten werden kann, muss die Freisetzung des O-Glykoms mittels der chemischen Deglykosylierung erfolgen (Carlson 1966; Huang et al. 2001; Royle et al. 2002). Zwei Endo- α -*N*-Acetylgalactosaminidasen werden in der Literatur beschrieben, die O-glykosidisch gebundene O-Glykane enzymatisch freisetzen. Deren Spezifität beschränkt sich jedoch nur auf nicht substituierte O-Glykane des *core*-1 Typs (Karakasa et al. 1992; Karakasa et al. 1997).

PNGase F

PNGase F besitzt ein Molekulargewicht von 34,8 kDa, dass von dem Gram negativen Bakterium *Flavobacterium meningosepticum* exprimiert wird (Tarentino et al. 1985). PNGase F katalysiert die Abspaltung der Asparagin-gebundenen Oligosaccharide, dazu gehören *N*-Glykane vom High-Mannose-, Hybriden-, und (bi-, tri- und tetra-antennäre) Komplex-Typ *N*-Glykane (Tarentino et al. 1985). Im ersten Schritt erfolgt die enzymatische Spaltung der β -Aspartylglucosamin-Bindung, dabei entsteht aus dem Asparaginrest Asparaginsäure und das Hydrolyseprodukt 1-Amino-*N*-Acetylglucosamin. Im zweiten Schritt wird das Hydrolyseprodukt in ein intaktes Oligosaccharid und ein

Ammoniakmolekül hydrolysiert (Risley und VanEtten 1985; Rasmussen et al. 1992). PNGase F besitzt eine breite Substratspezifität, jedoch müssen die Amin- und die Carboxylgruppe des Asparaginrestes in die Peptidbindung eingebunden sein und das abzusplittende Oligosaccharid wenigstens das N-N'-Diacetylchitobiose-*core* (GlcNAc(β 1-4)GlcNAc) aufweisen. Die Enzymaktivität liegt zwischen pH 7,5 und pH 9,5. Die Modifizierungen des proximalen N-Acetylglucosamins beeinflussen massiv die PNGase F Aktivität (Tretter et al. 1991). Die α 1-3-gebundene *core*-Fucose inhibiert die PNGase F Aktivität, erst wenn diese entfernt wird, kann PNGase F die N-Glykane abspalten. Die α 1-6-gebundene *core*-Fucose übt hingegen keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms aus (Tretter et al. 1991). Das Aktivitätszentrum der PNGase F wurde durch kristallographische Analysen und Mutagenese-Experimente von Kuhn et al. identifiziert (Kuhn et al. 1995). Dazu wurden fünfzehn Mutanten des Enzyms generiert und auf katalytische Aktivität getestet. Bei der Freisetzung der N-Glykane mittels PNGase F ist der pH-Wert der Reaktionslösung wichtig, damit wird die Aktivität des Enzyms gesichert. Zudem spielen die Aminosäuren der PNGase F Asp-60, Glu-206 und Glu-118 sowie Wassermoleküle eine wichtige Rolle während der Freisetzung des Oligosaccharids.

Endo H

Das Enzym Endo H gehört zur der Gruppe der Endoglucosidasen, deren charakteristische Spezifität N-Glykane abzuspalten, sie zu einem unentbehrlichen Werkzeug in der Untersuchung von Struktur und Funktion von Glykoproteinen macht. Endo H spaltet Asparagin-gebundene Mannose-reiche Formen und Hybrid-Typ N-Glykane zwischen den zwei *core*-N-Acetylglucosaminresten (Robbins et al. 1984; Maley et al. 1989). Das Enzym Endo H wird in *Streptomyces plicatus* exprimiert und weist seine optimale Enzymaktivität zwischen pH 5 und pH 6 auf. Endo H besitzt ein Molekulargewicht von 27 kDa und ist ein stabiles Enzym, welches resistent gegen die Hydrolyse mittels Pronase sowie gegen die Denaturierung mittels SDS ist (Trimble und Maley 1984). Die Modifizierungen der N-Glykane durch die α 1-6-gebundene Fucose am *core* (Arumugham und Tanzer 1983) oder durch Phosphat- (Hashimoto et al. 1981; Trimble et al. 1983; Mellis und Baenziger 1983b), Glucose- (Glc₃Man₉GlcNAc, Glc₂Man₉GlcNAc, Glc₁Man₉GlcNAc) (Hubbard und Robbins 1979; Frisch et al. 2011) oder N-Acetylglucosaminreste (bisecting-GlcNAc) (Tai et al. 1977) übt keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms aus. Endo H wird zur Untersuchung von Struktur und Zusammensetzung der N-Glykane der Glykoproteine eingesetzt (Trimble et al. 1981; Chu et al. 1983). Die Strukturanalyse mit Hilfe der Endo H

lieferte für die Invertase aus *Saccharomyces cerevisiae*, dass dieses ein hochmannosyliertes oligomeres Enzym von zwei je 60 kDa schweren Untereinheiten darstellt (Trimble und Maley 1977). Endo H eignet sich hervorragend zur Analyse der Rolle der Oligosaccharide in den Glykoproteinen und deren Auswirkung auf die Proteinstabilität (Bernard et al. 1983; Spiro und Spiro 2001).

Der Einsatz unterschiedlicher Enzyme (PNGase F, Endo H) in der Deglykosylierung von Glykoproteinen ermöglicht den Zugang zu unterschiedlichen Gruppen von Oligosacchariden und damit zur dessen Strukturaufklärung.

β -Eliminierung

Die Analyse der O-glykosidisch gebundenen Oligosacchariden ist wichtig für ein besseres Verständnis ihrer Funktionen in biologischen Prozessen. Für die Abspaltung der O-Glykane wurden viele Methoden entwickelt. Die Hydrazinolyse ist die beste Methode, um O-Glykane in großer Ausbeute und mit freiem anomeren Ende zu gewinnen. Der Nachteil der Hydrazinolyse ist der Einsatz von giftigen Chemikalien (Patel et al. 1994; Patel et al. 1993). Eine weitere Methode, um O-Glykane abzuspalten, ist die β -Eliminierung. Als klassische β -Eliminierung von O-Glykanen wird die nach Carlson et al. mit $\text{NaBH}_4/\text{NaOH}$ beschriebene Methode bezeichnet (Carlson 1968). Die O-glykosidische Bindung ist basenlabil, daher erfolgt die β -Eliminierung bei einem pH-Wert von 10 bis 13. Das α -Proton der Aminosäuren Serin oder Threonin wird von der Base abstrahiert und das Oligosaccharid als Abgangsgruppe freigesetzt. Die β -Eliminierung nach Carlson wird unter Zusatz von Natriumborhydrid (NaBH_4) als Reduktionsmittel durchgeführt. Bei der reduktiven β -Eliminierung wird das reduzierende Ende der O-Glykane in eine stabile Alditolform überführt. Der Nachteil der reduzierenden β -Eliminierung ist, dass keine weiteren Modifizierungen z. B. das Einführen eines Fluorophores oder eines stabilen Isotopes mehr möglich sind. Huang et al. beschreibt eine β -Eliminierung unter reduzierenden Bedingungen ohne Einsatz des giftigen Natriumborhydrids (Huang et al. 2002). Sie nutzen stattdessen ein Boran-Ammoniak-Komplex gelöst in wässrigem Ammoniak ($\text{BH}_3\text{-NH}_3$). Der Vorteil der Boran-Ammoniak-Methode liegt darin, dass das Boran nach der Reaktion durch mehrmaliges Aufnehmen in Methanol und Einengen in einer Vakuumzentrifuge entfernt werden kann.

Nach β -Eliminierung ohne Zusatz eines Reduktionsmittels liegt das anomere Ende des Verbindungssaccharids im Gleichgewicht mit seiner offenkettigen Form vor. Das freie

reduzierende Ende kann durch Fluorophore wie 8-Aminopyren-1,3,6-trisulfonsäure Trinatrium-Salz (APTS) oder 2-Aminobenzamid (2-AB) modifiziert und mittels CE oder HPLC analysiert werden. Zur β -Eliminierung unter nicht-reduzierenden Bedingungen gehört die Ammoniak-basierte Variante nach Rademaker et al. (Rademaker et al. 1993). Der Vorteil von Ammoniak als Base basiert auf seiner Eigenschaft leicht flüchtig und damit nach Reaktionsende schnell entfernbare zu sein.

Der Nachteil einer nicht-reduzierenden β -Eliminierung (Ammoniak-Variante, Hydrazinolyse) ist, dass unter diesen Reaktionsbedingungen ein Verlust von Monosacchariden am reduzierenden Ende stattfindet (*peeling*-Reaktion) (Green et al. 1977). Der Degradierungsprozess wurde z.B. bei der Glykanstruktur NeuAc(α 2-3)Gal(β 1-3)GalNAc unter Bildung von NeuAc(α 2-3)Gal gezeigt (Merry et al. 2002). Der Mechanismus der *peeling*-Reaktion ist noch nicht komplett untersucht. Fest steht, dass das Proton am C2 des terminalen Monosaccharids auf Grund der benachbarten Aldehydaktivität eine relativ hohe Acidität aufweist ($pK_s = 17$) und kann durch die Base abstrahiert werden. Die daraufhin folgende *peeling*-Reaktion führt zur Abspaltung des am C3 gebundenen Saccharidbausteins. Nicht-reduzierende β -Eliminierungen wurden ebenfalls mit Reagenzien wie Ethylamin (70% w/v) (Huang et al. 2001), Lithiumhydroxid (Yamada et al. 2010) oder einer wässrigen Lösung aus Ammoniak/Ammoniumcarbonat durchgeführt (Kozak et al. 2012). Zauner et al. nutzen Dimethylamin als Base (Zauner et al. 2012) und Wang et al. Natriumhydroxid (Wang et al. 2011). Goetz et al. nutzen eine Methode zur Freisetzung von O-Glykanen, die eine Kombination aus enzymatischem Verdau und einer chemischen *solid-phase* Permethylierung darstellt (Goetz et al. 2009). Hierbei werden die Glykoproteine zuerst mit Pronase verdaut und dann die O-Glykane an der *solid-phase* Permethylierung, die einerseits als β -Eliminierung und andererseits als Permethylierungsreaktion dient, abgespalten. Diese Technik ermöglicht eine hohe Ausbeute an O-Glykanen mit einem freien reduzierenden Ende, wobei *peeling*-Reaktion nicht beobachtet wurde. Jedoch können nach dieser Methode erhaltenen permethylierten O-Glykane nicht mit Fluorophoren gelabelt werden. Sie berichten von schnellen Methoden, die eine hohe Ausbeute an O-Glykanen liefern und nur geringe *peeling*-Reaktionen aufweisen. Für eine schnelle und effektive Freisetzung von O-Glykanen mit einem freien reduzierenden Ende, ohne *peeling*-Reaktion und in hoher Ausbeute, existiert bis jetzt keine optimale Methode.

1.3 Rolle der Glykosylierung in Erkrankungen

Die Glykane stellen bei Erkrankungen zumeist biologische Informationsträger auf molekularer Ebene dar (Rudd und Dwek 1998; Laine 1997). Sie bilden auf den Zelloberflächen zelltypische Muster, die sich während der Entwicklung, Differenzierung oder Erkrankung einer Zelle in charakteristischer Weise ändern. Geringe Veränderungen des Glykanrückgrads können bereits zu tief greifenden Funktionsstörungen des Proteins führen und damit verschiedene Erkrankungen wie Herz-Kreislauf-, Entzündungs- oder Krebs-Erkrankungen verursachen (Lis und Sharon 1993; Brockhausen et al. 1998). Da spezielle Änderungen im Glykosylierungsmuster charakteristisch für Tumorzellen sind, gewinnt die Erforschung von Biomarkern auf Glykanebene immer mehr an Bedeutung (Dennis et al. 1999; Reis et al. 2010). Weiterhin führen Defekte während der Glykan-Biosynthese zu einem breiten Spektrum an genetischen Erkrankungen, *Congenital Disorders of Glycosylation* (CDG) (Marquardt und Freeze 2001). Die Erforschung der Glykosylierung stellt somit eine wichtige Grundlage zum Verständnis der Entstehung und des Verlaufs von Krankheiten dar.

Die Wechselwirkungen zwischen Glykanen und Glykan-spezifischen Rezeptoren (Lektinen) sind an vielen lebenswichtigen zellulären Mechanismen beteiligt (Lis und Sharon 1998). Glykan-Rezeptor-Wechselwirkungen sind involviert in bakterielle, virale und parasitische Infektionen. Dabei wird auf der Oberfläche der Bakterien, Viren und Parasiten Lektine/Haemagglutinine (Rezeptoren) ausgebildet, die mit den Glykanen der Wirtszelle in Kontakt treten und damit den Infektionsprozess starten. Viele bakterielle Lektine erkennen Sialinsäuren als Bindungspartner, beispielsweise das Bakterium *Helicobacter pylori*, welches Magenschleimhautentzündungen (Gastritis) verursacht (Hynes et al. 1999; Ilver et al. 1998). Auch einige Viren nutzen die Sialinsäuren als Erkennungsdomäne für eine Invasion der Wirtszelle, so besitzen z.B. Influenza-, Rota- und Coronaviren Sialinsäure-bindende Haemagglutinine. Haemagglutinine des Influenzavirus A und B nutzen α 2-6-gebundene Sialinsäuren als Bindungspartner (Ge und Wang 2011; Fukuyama et al. 2011).

In vielen Fällen wird beschrieben, dass eine veränderte Sialylierung mit der Entstehung von Krebs korreliert. Dabei werden höher sialylierte N- und O-Glykane beobachtet, sowie eine vermehrte Expression von sLe^x und sLe^a Strukturen, die als Selektin-Liganden dienen können (McEver 1997; Abd et al. 2008). Erhöhte Werte für Le^x und sLe^x werden vor allem

bei Ovarial- und Pankreaskarzinom gefunden (Thompson et al. 1992; Sarrats et al. 2010). Des Weiteren ist bekannt, dass bei verschiedenen Krebserkrankungen vermehrt Polylactosaminreste auftreten. Polylactosamine dienen als Ausgangsstrukturen für poly-Le^x mit der terminalen Determinante Gal(β1-4)[Fuc(α1-3)]GlcNAc(β1-3), welche wiederum vorwiegend im Adenokarzinom als Tumor-assoziiertes Antigen beschrieben wird (Singhal et al. 1990). Weitere abnormale krebsassoziierte Veränderungen werden durch erhöhte Mengen an tri- und tetra-antennären N-Glykanen sowie eine gesteigerte Fucosylierung beschrieben (Kim und Varki 1997; Dennis und Laferté 1989). Bei der O-Glykosylierung ist GalNAc meist das erste Monosaccharid, das an Ser/Thr gebunden wird. Im normalen Verlauf der Glykosylierung wird GalNAc-α-Ser/Thr (auch Tn-Epitop oder Thomsen-Friedenreich-Antigen genannt) durch zahlreiche Glykosyltransferasen verlängert und wird auf gesunden Glykoproteinen nicht detektiert. Anders in Tumorzellen, hier ist die normale O-Glykosylierung gestört und das Tn-Epitop wird auf den Glykoproteinen detektiert. Die Tn-Struktur ist ein Vertreter für abnormale Glykosylierung und kommt z.B. bei Brustkrebs vor (Cazet et al. 2010).

Die Onkogenese erkrankter Zellen weist eine breite Varianz von genetischen und epigenetischen Veränderungen auf. Die häufigsten Charakteristika von Krebszellen sind: unlimitiertes Replikationspotential, Angiogenese und Metastasenbildung (Yeung et al. 2008). Der Entwicklungsprozess der Krebszellen hängt mit Veränderungen in der Glykosylierung zusammen (Mechref et al. 2012). Der Glykosylierungsgrad der Krebszellen ändert sich mit der Tumorentstehung und dem Voranschreiten der Krankheit (Varki et al. 2009b). Neueste Studien belegen, dass einige Glykanschlüsselstrukturen in variierenden Stufen der Tumorentstehung vorkommen (Fuster und Esko 2005; Gilbert 2009). Dabei wird häufig beobachtet, dass sich nicht nur eine Glykanstruktur sondern mehrere Glykanstrukturen zugleich ändern (Kim und Varki 1997; Dennis et al. 1999a; Dennis et al. 1999b). Die Erforschung der veränderten Glykosylierung in unterschiedlichen Krebsarten, wie Eierstock-, Darm- oder Lungenkrebs kann dabei helfen die komplizierte Biologie von Tumorzellen zu verstehen und die Entwicklung von neuen Arzneimitteln auf Oligosaccharidebene voranzutreiben (Fuster und Esko 2005; Arnold et al. 2008). Darüber hinaus kann die Erforschung veränderter Glykanstrukturen eine Früherkennung von Krebserkrankungen liefern, welches die Heilungschancen erheblich verbessern könnte. Besonders im Fall von Ovarialkarzinom sind keine Frühdiagnosen möglich. Ovarialkarzinom ist die fünfthäufigste Krebserkrankung bei der europäischen Frau nach Mamma-, Lunge-, kolorektalem und Uteruskarzinom (Balzer 2000; Dietl 1996). Auf

Grund der geringen Sensitivität bei der Diagnose und des raschen Tumorwachstums hat Ovarialkarzinom die höchste Mortalitätsrate (Percorelli et al. 2001). Der einzige Tumormarker für Ovarialkarzinom ist das Glykoprotein des Muzin-Typs CA 125 (*Cancer antigen*), welches sich leider nicht zur Frühdiagnose eignet (Lloyd et al. 1997; Duffy et al. 2005; Skates et al. 1998). 70 % der diagnostizierten Fälle mit CA 125 sind im fortgeschrittenen Stadium (Stadium III oder IV) (Petricoin et al. 2002; Kozak et al. 2002). Die fünf-Jahres-Überlebensrate liegt in Europa und USA bei knapp 40 % der Erkrankten (Balzer 2000; Dietl 1996; Meden 1996). Bei Früherkennung des Ovarialkarzinoms liegt die fünf-Jahres-Überlebensrate bei 90 % (Duffy et al. 2005). Der Wert des CA 125 ist in 80-90 % des Ovarialkarzinoms erhöht und steigt mit fortschreitender Krankheit. Der Wert steigt ebenfalls in gutartigen Tumoren, bei schwangeren Frauen und anderen Krebsarten, somit kann es zu falsch positiven Diagnosen führen (Duffy et al. 2005). Dies verbildlicht die Notwendigkeit neuer biologischer Marker für das Ovarialkarzinom.

Im Falle von Colonkarzinom existieren verschiedene Tumormarker, der CEA und das Antigen CA 19-9. Beide Proteine sind glykosyliert, jedoch sind sie nicht ausschliesslich für Colonkarzinom spezifisch. Eher liefern sie eine Prognose für bereits behandelte Patienten erneut an Colonkarzinom zu erkranken (Vercoutter-Edouart et al. 2008). Vercoutter-Edouart et al. berichten von erhöhter Expression von High-Mannosen ($\text{Hex}_{5-9}\text{HexNAc}_2$) und Komplex-Typ N-Glykanen ($\text{NeuAc}_{0-4}\text{Fuc}_{0-2}\text{Hex}_{3-7}\text{HexNAc}_{4-7}$) in humanen Colon-Krebszellen HT-29 (Vercoutter-Edouart et al. 2008). Yang et al. fokussieren ihre Arbeiten auf die Detektion von Colonkarzinom Biomarker auf O-Glykanebene (Yang et al. 1994). Das Gewebe im Colonkarzinom produziert membran-gebundene und sekretierte Muzine. Muzine sind hoch O-glykosyliert. Die Ergebnisse von Yang et al. liefern, dass der Grad der O-Glykosylierung zurückgeht. Neben der O-Glykosylierung untersuchte Yang et al. auch die Aktivität von Glykosyltransferasen. Die Glykosyltransferasen β 3-N-Acetylglucosaminyltransferase, α 6-Sialyltransferase, Sulphotransferase und β 6-N-Acetylglucosaminyltransferase weisen eine geringere Aktivität auf. Nicht nur die Ebene der Glykane auch die der Glykosyltransferasen ist entscheidend bei der Suche nach neuen Biomarkern (Brockhausen 2006).

In rheumatoider Arthritis (RA) beobachtet man eine Reduktion der Galactosylierung im IgG und eine erhöhte Expression an Fucoseresten im α 1-sauren Glykoprotein (AGP) (Parekh et al. 1985; ; Gornik et al. 1999). Nakagawa et al. berichten von einer veränderten Verteilung von Isomeren des mono-galactosylierten *core*-fucosylierten bi-antennären N-

Glykans im Blutserum von RA-Patienten. Ausserdem konnten sie eine erhöhte Expression des voll galactosylierten tri-antenären N-Glykans beobachten (Nakagawa et al. 2007).

Es liegt nahe das neue Biomarker erforderlich sind. Eine intensive Analyse von Krankheits-assoziierten Glykoproteinen und damit auch die Strukturanalysen von Glykanen soll die Prognose erleichtern und darüberhinaus bei der Erforschung von Glykan-basierter Diagnostik helfen.

1.4 Zielsetzung

Die Glykosylierung ist eine posttranslationale Modifikation, welche viele Prozesse in unserem Körper beeinflusst. Die Glykosylierung spielt eine wichtige Rolle bei zahlreichen biochemischen und zellbiologischen Prozessen, wie Immunreaktionen, Zell-Zell-Kommunikation und programmierten Zelltod. Bei einer fehlerhaften posttranslationalen Modifikation der Proteine durch Glykane kommt es zur Entstehung von Krankheiten wie z. B. Alzheimer oder CDG-Erkrankungen (*Congenital Disorder of Glycosylation*). Die Analyse von Glykanen ist essentiell für die Erforschung von biologischen Prozessen in unserem Organismus und für die Diagnose unterschiedlicher Erkrankungen. Dabei ist es wichtig den zeitlichen Ablauf der Abspaltung und der Aufreinigung der Glykane zu minimieren und die Reproduzierbarkeit und die Effizienz der Daten zu garantieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Analyse der N-Glykosylierung des humanen Blutserums erfolgen. Die Freisetzung der N-Glykane sollte mittels MAED-Methode (*Microwave-Assisted Enzymatic Digestion*) und der Aufreinigungsschritt durch selbstbefüllte SP20SS- und Graphit-Säulchen stattfinden. Nach erfolgter Aufreinigung sollten die N-Glykane mittels MALDI-TOF-MS und MALDI-TOF/TOF-MS und an der CE-LIF analysiert werden. Die Verwendung von zwei unterschiedlichen Endoglykosidasen sollte ein breites Bild der N-Glykosylierung erfassen. PNGase F spaltet die Asparagin-gebundenen N-Glykane, damit wird das komplette N-Glykom erfasst. Endo H spaltet nur die Hybrid- und High-Mannose-Strukturen ab. Damit bietet sich ein direkter Blick nur auf diese Art der Glykosylierung, die beim PNGase F-Verdau eine geringe Intensität aufweist und damit wertvolle Information verloren gehen. Ausserdem sollte auf mögliche Biomarker in der N-Glykosylierung bei Ovarialkarzinom, Colonkarzinom und rheumathoider Arthritis geprüft werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten die N- und die O-Glykane des humanen Speichels in Abhängigkeit der Blutgruppen und des Sekretstatus analysiert werden. Die Denaturierung der Proben sollte mittels optimierter MAED-Methode erfolgen. Die Freisetzung der N-Glykane sollte enzymatisch mittels PNGase F und die Freisetzung der O-Glykane sollte mittels Ammoniak-unterstützter β -Eliminierung stattfinden. Im Anschluss sollten die erhaltenen O-Glykane mittels MALDI-TOF-MS und MALDI-TOF/TOF-MS charakterisiert werden.

2 Ergebnisse

2.1 Untersuchung Endo-H-abgespaltener N-Glykane im BS

Der Fokus eines Großteils dieser Arbeit liegt auf der Identifizierung und Charakterisierung von PNGase F und Endo H-freigesetzten N-Glykanen. Die N-Glykane wurden nach enzymatischer Abspaltung über Kapillarelektrophorese mit Fluoreszenzdetektor (CE-LIF) vermessen. Der Vorteil der CE-LIF ist vor allem die kurze Messzeit im Vergleich zu chromatographischen Methoden, die zur Glykananalyse eingesetzt werden (z.B. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) oder *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS)). So werden für einen CE-Analysenlauf weniger als 20 Minuten benötigt. Zudem ist die CE-LIF häufiger in Laboren vertreten als das MALDI-TOF-MS und wesentlich benutzerfreundlicher. Da sich die CE-LIF auch zur Detektion von Isomerstrukturen von Oligosacchariden eignet (Guttman 1996; Guttamn et al. 1996; Raju et al. 2000; Mechref et al. 2005), können auch Expressionsänderungen der Isomerstrukturen untersucht werden.

2.1.1 Analyse Endo H-abgespaltener N-Glykane nach chemischer Denaturierung

2.1.1.1 Untersuchung nach Standard-Methode

Um eine vollständige Deglykosylierung des Blutserumproteoms zu erreichen, müssen die Proteine chemisch oder enzymatisch denaturiert werden. Wenn die Tertiärstruktur der Proteine aufgelöst ist, erleichtert dies erheblich den Substratzugang für die Endoglykosidasen, um eine möglichst vollständige Deglykosylierung zu erhalten. Hierzu wurde humanes Blutserum zuerst mit 1,4-Dithioerythriol (DTE) und Iodacetamid (IAA) denaturiert und alkyliert. DTE ist ein Reduktionsmittel und spaltet die Disulfidgruppen unter Bildung eines freien Thiols ab. IAA carbamidomethyliert die freien Thiol-Gruppen, um die Rückbildung der Disulfidgruppen zu verhindern. Nach der chemischen Denaturierung wurden die N-Glykane enzymatisch mit Hilfe der Endo H abgespalten. Endo H spaltet Asparagin-gebundene N-Glykane vom High-Mannose und Hybrid-Typ. Dabei wird die glykosidische Bindung zwischen den N-Acetylglucosaminen des Chitobiose-*core* gespalten (Abb. 7).

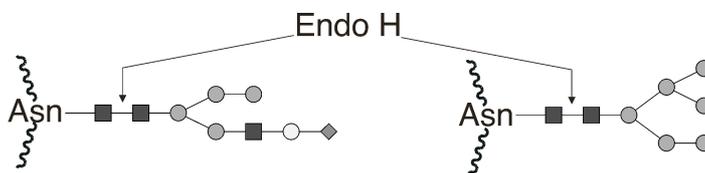


Abb. 7: Endo H Spezifität. Endo H spaltet die glykosidische Bindung zwischen den beiden GlcNAc des Chitobiose-*core* der N-Glykane vom High-Mannose- und Hybrid-Typ.

Als Kontrollprotein wurde das Enzym RNase B mitgeführt. RNase B besitzt ausschließlich N-Glykane des High-Mannose-Typs (Abb. 8). Nach der enzymatischen Freisetzung wurden die N-Glykane über C18- und Carbograph-Säulen aufgereinigt.

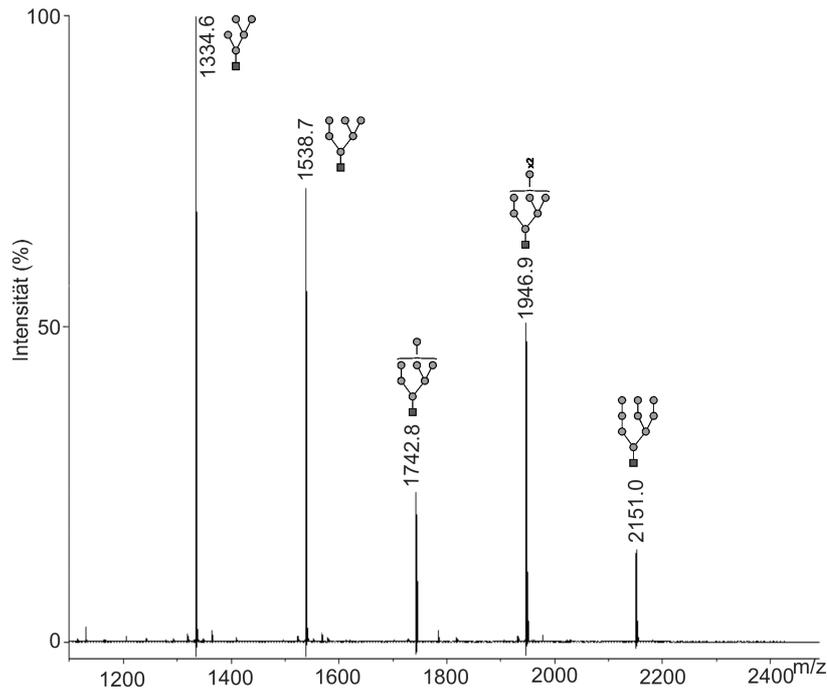


Abb. 8: MALDI -TOF-MS Endo H-abgespaltener N-Glykane der RNase B. Die Messung der über Endo H-freigesetzter N-Glykane erfolgte im Positivmodus und die Massepeaks liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. Die Massepeaks wurden mit Hilfe der GlycoWorkBench-Software (Ceroni et al. 2008) zugeordnet. Grauer Kreis, Man; Schwarzes Quadrat, GlcNAc.

Für eine massenspektrometrische Analyse mit Hilfe der MALDI-TOF-MS wurde ein Teil der erhaltenen N-Glykane direkt gemessen (Abb. 9A) und der Rest permethyliert und dann massenspektrometrisch vermessen (Abb. 9B). Die Permethylierung derivatisiert die Sialinsäuren zu Methylestern und die Hydroxylgruppen der Oligosaccharide zu Methylethern. Dadurch wird das Potential der Ionisierung gesteigert und eine zeitgleiche Detektion geladener und ungeladener Oligosaccharide wird möglich. Zudem führt die Permethylierung zu einem günstigeren Peak-Basisrauschen-Verhältnis, dies wird besonders gut deutlich in Abb. 9A und B.

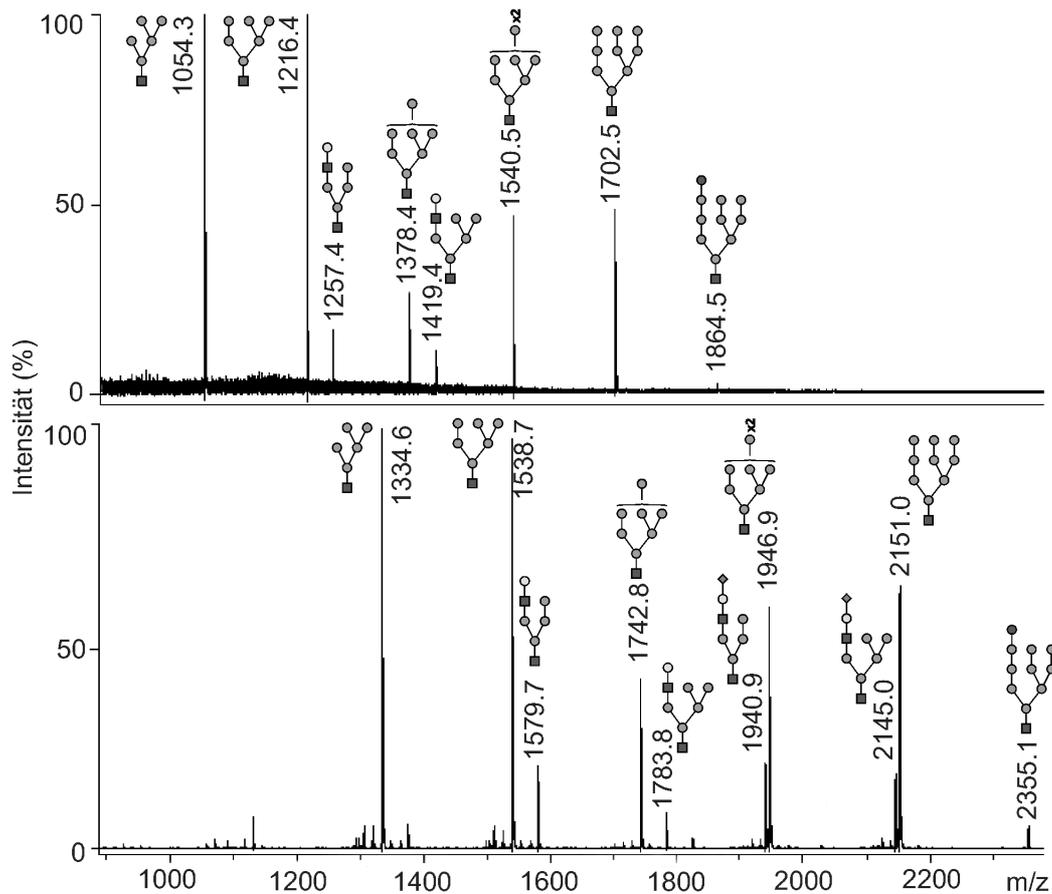


Abb. 9: MALDI-TOF-MS Endo H-abgespaltener N-Glykane aus humanem Blutserum. Die Messung erfolgte im Positivmodus und die Massepeaks liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. (A) Endo H-freigesetzte N-Glykane; (B) permethylierte über Endo H-freigesetzte N-Glykane. Die Massepeaks wurden mit GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) zugeordnet. Schwarzer Kreis, Glc; Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac.

Der größte Anteil Endo H-abgespaltener N-Glykane sind vom High-Mannose-Typ ($Man_{5-9}GlcNAc_1$: m/z 1334,6, 1538,7, 1742,8, 1946,9 und 2151,0). Eine Besonderheit stellt die Struktur mit der Zusammensetzung $Hex_{10}GlcNAc_1$ mit m/z 2355,3. Hierbei handelt es sich um eine monoglucosylierte High-Mannose-Struktur $Glc_1Man_9GlcNAc_1$. Weiterhin treten vier bi-antennäre Hybrid-Strukturen auf, zwei sialylierte und zwei neutrale. Die Hybrid-Strukturen sind $Hex_5GlcNAc_2$ (m/z 1579,8), $Neu5Ac_1Hex_5GlcNAc_1$ (m/z 1940,9), $Hex_6GlcNAc_2$ (m/z 1783,9), $Neu5Ac_1Hex_6GlcNAc_1$ (m/z 2145,0). Die erhaltenen Oligosaccharid-Strukturen wurden durch Fragmentierungsanalysen bestätigt. In Abb. 10 werden Fragmentierungsmuster der hybrider und monoglucosylierter Strukturen gezeigt.

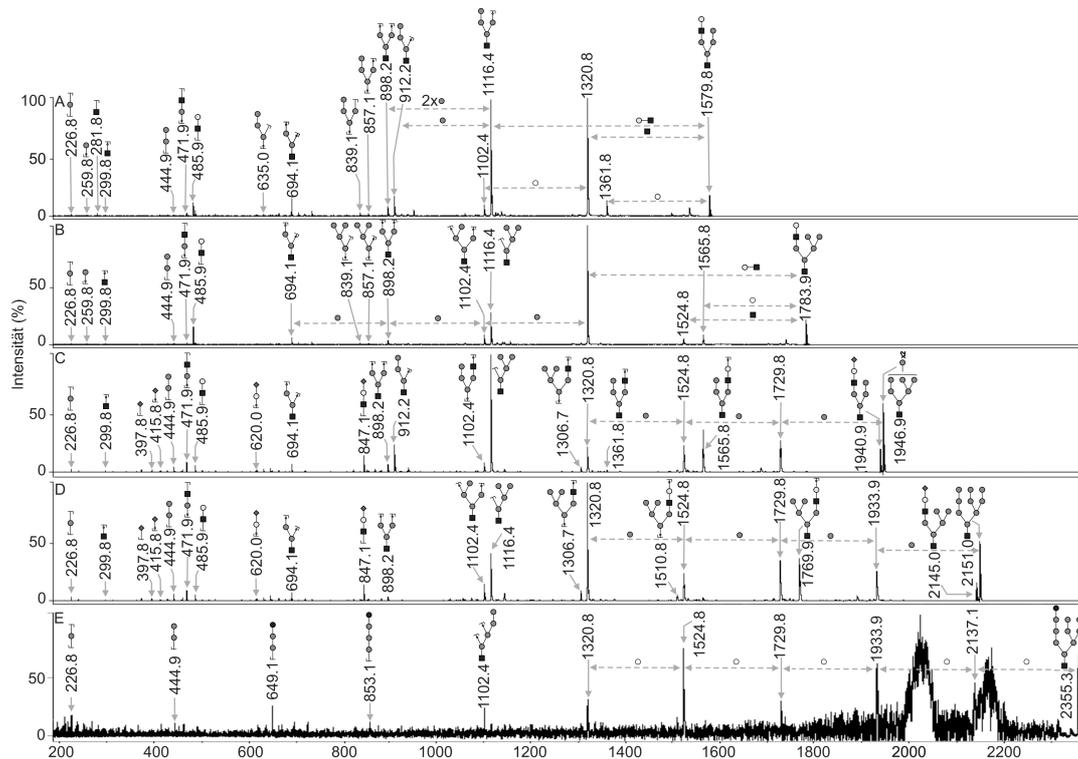


Abb. 10: MALDI-TOF/TOF-MS Endo H-abgespaltener, permethylierter Hybrid-Strukturen aus humanem Blutserum. Die Fragmentierung erfolgte im Positivmodus. Die Molekülmassen liegen ionisiert als $[M+Na]^+$ vor. (A) m/z 1579,8; (B) m/z 1783,8; (C) m/z 1940,9; (D) 2145,0; (E) m/z 2355,3. Die Massepeaks wurden mit GlycoWorkBench Glykanstrukturen zugeordnet. Die registrierten Fragmentierungen können auf unterschiedlichen Wegen entstehen. Im Bild wird nur ein Fragmentierungsweg dargestellt. Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac.

In allen Fragmentspektren der Hybrid-Oligosaccharide (sialylierte und neutrale) wird das Fragment m/z 485,9 beobachtet. Mit Hilfe der GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008) konnte das Fragment m/z 485,9 einer Hexose verbunden mit einem N-Hexosamin zugeordnet werden, Hex-HexNAc. Das Strukturmotiv Hex-HexNAc wird bei komplexen und hybriden N-Glykanen antennär ausgebildet und kommt nicht bei High-Mannosen vor. Die neutralen Hybrid-Oligosaccharide des Blutserums wiesen antennäres Hex-HexNAc auf. Die sialylierten Oligosaccharide wiesen die Fragmentierungsmasse m/z 485,9 nach Abspaltung der Sialinsäure auf. Das Vorkommen der Fragmentmasse m/z 485,9 bestätigt alle Hybridstrukturen. Das Vorhandensein der Fragmentmasse m/z 847,1 (Neu5AcHexHexNAc) bestätigte

zusätzlich die sialylierten Antennen der sialylierten Hybrid-Oligosaccharide (Abb. 10C und 10D).

Die sialylierten Hybrid-Strukturen ($\text{Neu5Ac}_1\text{Hex}_5\text{GlcNAc}_1$ und $\text{Neu5Ac}_1\text{Hex}_6\text{GlcNAc}_1$) wurden eng mit den entsprechenden High-Mannosen im MALDI-TOF-MS detektiert und erst in Fragmentierungsanalysen eindeutig nachgewiesen. Das Oligosaccharid m/z 2355,3 entspricht der monoglucoylierten Struktur $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_1$ (Abb. 10E). Im entsprechenden Fragmentspektrum konnte das Fragment m/z 853,1 detektiert werden, welches eine lineare Abfolge von vier Hexosen darstellt. Die Masse m/z 853,1 taucht in keinem der anderen Fragmentspektren auf. Die Glykanstruktur mit der Antenne Glc-Man-Man-Man wird typischerweise an naszierenden Glykoproteinen im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) gefunden. Die Glucoseeinheit ist dabei α 1-3-glykosidisch an die Mannose geknüpft. Monoglucoylierte Glykoproteine werden im ER zurückgehalten bis die korrekte Faltung mit Hilfe der zwei Lektine Calnexin und Calreticulin erfolgt (Parodi 2000). In der Literatur werden die monoglucoylierten High-Mannosen im Zusammenhang mit humanen Serumglykoproteinen beschrieben. Zum Einen wurde diese Art der N-Glykane auf humanem C3 Glykoprotein gesunder Probanden detektiert und zum Anderen fand man die monoglucoylierten High-Mannosen auf humanem IgD von Myeloma Patienten (Crispin et al. 2004; Mellis und Baenziger 1983). Die Autoren vermuten, dass solch eine ungewöhnliche Glykosylierung nur auf den Glykosylierungsstellen liegen könnten, die in das Proteininnere präsentiert werden. Daher könnten monoglucoylierte Glykoproteine den Calnexin/Calreticulin Zyklus ungeachtet durchlaufen und in das Blutserum sekretiert werden.

Ein Teil der Endo-H freigesetzten N-Glykane (aus 10 μL Blutserum-Ausgangsvolumen) wurde zu Beginn massenspektrometrisch analysiert. Parallel wurde ein zweiter Teil der Endo-H freigesetzten N-Glykane mit Hilfe der 8-Aminopyren-1,3,6-trisulfonsäure Trinatrium-Salz (APTS) gelabelt und an der CE-LIF untersucht. Die Massenspektrometrie ermöglicht eine detaillierte Untersuchung der Glykane, vernachlässigt jedoch die Analyse der Isomere, weshalb die Kapillarelektrophorese zur vollständigen Bestimmung der N-Glykane herangezogen wird. Die konkrete Zuordnung der Isomerpeaks der N-Glykanstrukturen in den Elektropherogrammen benötigte eine zusätzliche Trennung mit Hilfe der HPAEC-PAD.

2.1.1.2 HPAEC-PAD-Auftrennung Endo H-abgespaltener N-Glykane

Die Methode der HPAEC-PAD ist weniger sensitiv als CE-LIF daher wurde hier ein 10faches Ausgangsvolumen eingesetzt. 100 μL Blutserum wurden entsprechend dem 10 μL Blutserum denaturiert und alkyliert. Auch das Enzym Endo H wurde in 10-facher Menge zum Verdau eingesetzt und die N-Glykane anschließend über C18- und CarboGraph-Säulen aufgereinigt um sie dann an der HPAEC-PAD aufzutrennen. Die HPAEC-PAD-Methode trennt die Glykane unter stark basischen Bedingungen (pH 8-14). Die Hydroxylgruppen der Oligosaccharide dissoziieren im stark basischen Milieu und liegen als Oxianionen oder als schwach dissoziierte Säuren vor (pK-Wert(OH) \sim 16; pK-Wert(H₂O) \sim 16). Die Trennung erfolgt auf Grund anionischer Wechselwirkungen mit der stationären Phase (CarboPac-Säule). Die Oxianionen der Oligosaccharide konkurrieren mit den Hydroxylanionen aus dem NaOH-Eluenten um die positiv geladenen funktionellen Gruppen (NR₃⁺) des Säulenmaterials. Die dabei resultierenden unterschiedlich starken Wechselwirkungen jedes Oligosaccharids führen zur Retardierung und damit zur Trennung des Oligosaccharidgemisches. Die Detektion erfolgt am gepulsten amperometrischen Detektor. Die N-Glykane wurden unter den hier verwendeten Parametern in 10 bis 35 Minuten fraktioniert. In Abb. 11 ist das HPAEC-PAD-Profil der fraktionierten N-Glykane des Blutserumproteoms dargestellt. Ein Teil der jeweils fraktionierten N-Glykane wurde nun permethyliert und mit Hilfe der MALDI-TOF-MS analysiert (Abb. 12). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

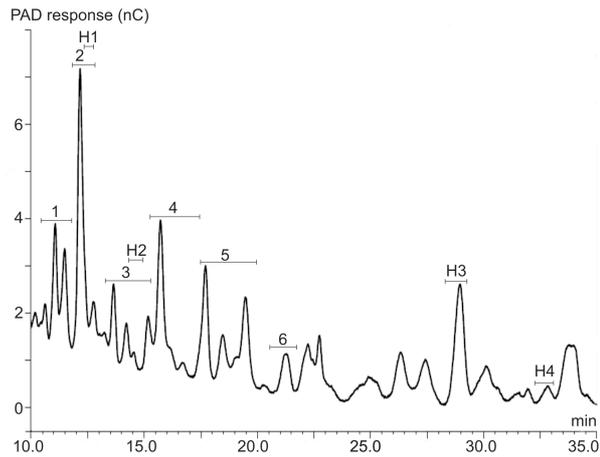


Abb. 11: HPAEC-PAD-Auftrennung: Endo H-abgespaltene N-Glykane ausgehend von 100 μL humanem Blutserum. Die markierten Fraktionen enthalten N-Glykane. Die Fraktionsbezeichnungen sind in Tabelle 3 erläutert.

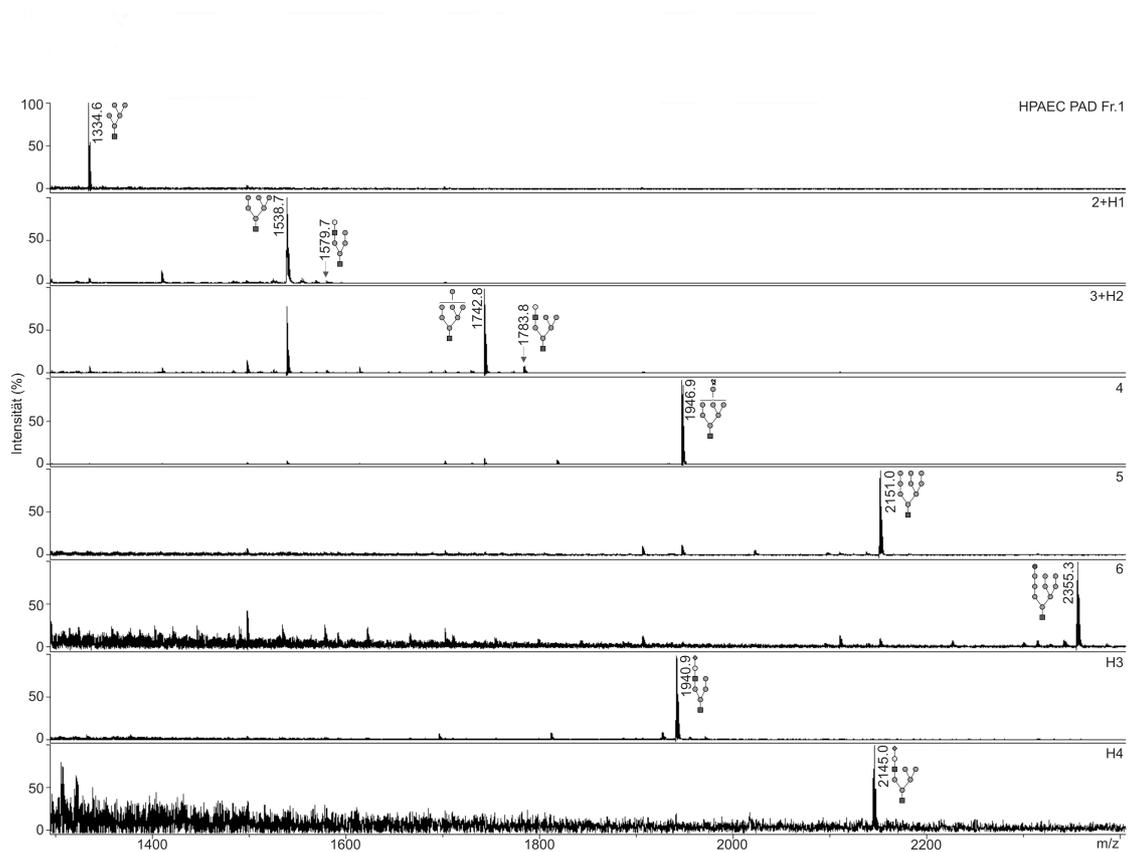


Abb. 12: MALDI-TOF-MS der HPAEC-PAD Fraktionen: Endo H-abgespaltene, permethylierte N-Glykane des humanen Blutserums. Die Messung erfolgte im Positivmodus. Die Molekülmassen liegen ionisiert als $[M+\text{Na}]^+$ vor. Die Fraktionsbezeichnungen sind in Tabelle 3 erläutert. Schwarzer Kreis, Glc; Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac.

Tabelle 3: MALDI-TOF-MS-Analyse der HPAEC-PAD-fraktionierten N-Glykane.

HPAEC Fraktion	Retentionszeit (min)	m/z	Oligosaccharid
1	10,25-11,75	1334,6	Man ₅ GlcNAc
2+H1	11,75-13,00	1538,7	Man ₆ GlcNAc
		1579,8	GalMan ₄ GlcNAc ₂
3+H2	13,25-15,50	1742,8	Man ₇ GlcNAc
		1783,9	GalMan ₅ GlcNAc ₂
4	15,50-17,00	1946,9	Man ₈ GlcNAc
5	17,00-20,00	2151,0	Man ₉ GlcNAc
6	20,75-21,75	2355,3	GlcMan ₉ GlcNAc
H3	28,25-29,50	1940,9	Neu5AcGalMan ₄ GlcNAc ₂
H4	32,25-33,00	2145,0	Neu5AcGalMan ₅ GlcNAc ₂

Die neutralen Strukturen eluierten zwischen 10 und 22 Minuten. Die High-Man₅, hier das kleinste Oligosaccharid, eluierte als erstes bei 10 - 12 Minuten. Die höheren High-Mannosen eluierten aufeinanderfolgend auf Grund der Zunahme der Masse um jeweils einer zusätzlicher Hexose. Aufgrund der negativ geladenen Sialinsäure wechselwirken die Hybrid-Strukturen (H3 und H4) stärker mit der stationären Phase, und eluierten bedeutend später zwischen 28 und 33 Minuten. Dies ermöglichte eine saubere Trennung der sialylierten Hybrid-Strukturen von den High-Mannose-Strukturen. Die darauf folgende massenspektrometrische Analyse bestätigten eindeutig die sialylierten Hybrid-Strukturen.

Die Trennung der Endo H-freigesetzten N-Glykane mit Hilfe der HPAEC-PAD ermöglichte ergänzende Analysen zur Massenspektrometrie und zur Kapillarelektrophorese.

2.1.1.3 CE-LIF-Analyse

Die Endo H-freigesetzten N-Glykane des humanen Blutserumproteoms wurden ergänzend zu der Massenspektrometrie an der CE-LIF analysiert. Die entsprechenden Elektropherogramme zeigen charakteristische Signalpeaks sowohl für die verschiedenen N-Glykanstrukturen als auch für ihre Isomere.

Die Migrationszeiten der High-Mannosen (Man_{5-9}) könnten im Elektropherogramm über das Kontrollprotein RNase B zugeordnet werden. RNase B besitzt ausschließlich High-Mannosen (Man_{5-9}) (Abb. 14A). Zudem konnte der Man_7 und der Man_8 die Migrationszeiten ihrer jeweils drei Isomere zugeordnet werden.

Die Fraktionierung mit Hilfe der HPAEC-PAD lieferte die Möglichkeit die übrigen N-Glykanstrukturen im CE-LIF Elektropherogramm zu identifizieren und die High-Mannosen zu verifizieren. Die acht N-Glykan-haltigen Fraktionen nach HPAEC-PAD-Isolierung wurden mit APTS-gelabelt und an der CE-LIF analysiert. In Abb. 13A sind die Elektropherogramme der nicht fraktionierten Probe den jeweiligen Fraktionen gegenübergestellt.

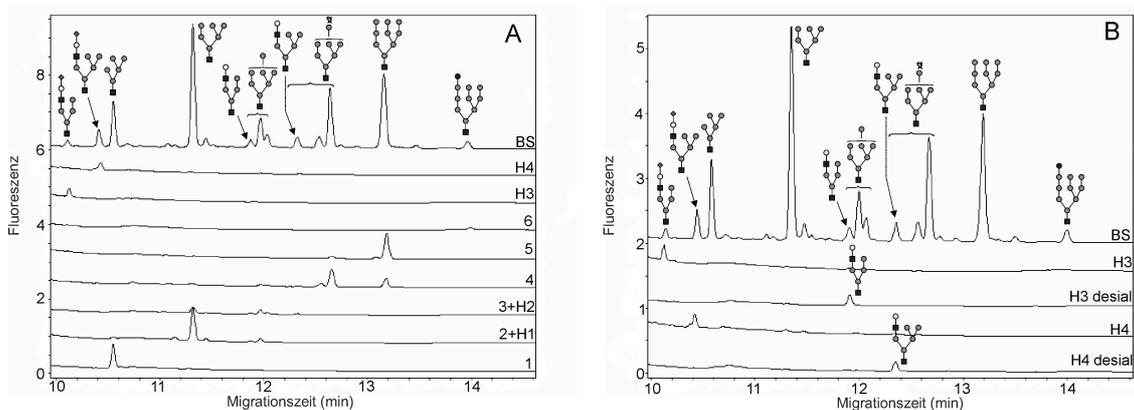


Abb. 13: CE-LIF-Analyse APTS-gelabelter N-Glykane des humanen Blutserums: N-Glykane abgespalten nach der Standard-Methode; (A) BS: Endo-H-freigesetzte N-Glykane, 1-6, H3 und H4: Fraktionen der HPAEC-PAD; (B) BS: Endo-H-freigesetzte N-Glykane, H3 und H4: HPAEC-PAD Fraktionen der sialylierten Oligosaccharide, H3 desial und H4 desial: mit Hilfe der Sialidase desialylierte HPAEC-PAD Fraktionen; Schwarzer Kreis, Glc; Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac.

High-Mannosen (Man_{5-9}) und die monoglucosylierte Struktur $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAc}_1$ migrierten auf Grund kontinuierlich zunehmender Hexosenanzahl nacheinander. Die beiden sialylierten Hybrid-Strukturen migrierten dank ihrer negativen Ladung im vorderen Bereich. Es wurde vermutet, dass die asialo-Hybride $\text{Gal}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ und $\text{Gal}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ auf Grund ihrer Größe im Bereich der $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_1$ und $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_1$ (12 – 13 min) migrieren. Um dies zu bestätigen wurden die HPAEC-PAD Fraktionen H3 und H4 (sialylierte Hybrid-Strukturen) mit Hilfe der Sialidase

desialyliert und erneut mit der CE-LIF vermessen. Dabei konnte ein Migrationsshift von 1,8 Minuten für die Struktur H3 und ein Migrationsshift von 1,95 Minuten beobachtet werden (Abb. 13B). Damit konnten auch die Positionen nicht-geladener Hybrid-Strukturen im Elektropherogramm bestätigt werden. Die $\text{Gal}_1\text{Man}_4\text{GlcNAc}_2$ migrierte gemeinsam mit dem ersten Isomer der $\text{Man}_7\text{GlcNAc}_1$ bei 11,90 Minuten. Die $\text{Gal}_1\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ migrierte gemeinsam mit dem ersten Isomer der $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_1$ bei 12,35 Minuten. Folglich könnten alle Endo H-abgespaltenen N-Glykane des humanen Blutserums und dessen Isomere nachgewiesen werden.

2.1.1.4 N-Glykosylierungen bei rheumatoider Arthritis

Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob die Endo H-abgespaltenen und an der CE-LIF identifizierten Blutserum N-Glykane einen Glykanbiomarker für rheumatoide Arthritis darstellen. Hierfür wurde auf folgendes geachtet: 1. Identifizierung neuer Glykanstrukturen, 2. Änderung in der Intensität vorhandener Glykanstrukturen, 3. Änderung der Intensität einzelner Isomere.

Im Blutserum von Patienten mit rheumatoider Arthritis liegt das Mannose-bindende Lektin (MBL), welches eine große Rolle in angeborener Immunität spielt, unterexpressiert vor (Dolman et al. 2008). Ausserdem weist die α -Mannosidase II, verantwortlich für das Trimmen hybrider N-Glykane, eine mangelhafte Aktivität in Autoimmunerkrankungen auf (Chui et al. 2001). MBL und α -Mannosidase II Aktivitäten werden im Zusammenhang mit rheumatoider Arthritis assoziiert.

In diesem Abschnitt wurden Endo H-freigesetzten N-Glykane von 20 Patienten mit rheumatoider Arthritis und von 20 gesunden Freiwilligen (als Kontrolle) an der CE-LIF analysiert und miteinander verglichen. Zum Vergleich wurden die relativen Peakflächen der N-Glykane in prozentuale Anteile umgerechnet, um semiquantitative Vergleiche zwischen gesunden und kranken Probanden zu ermöglichen. Hierzu wurde die Gesamtpeakfläche der N-Glykane eines Elektropherogramms zu 100 % gesetzt, die Anteile der einzelnen N-Glykane resultierten aus den dazugehörenden relativen Peakflächen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: CE-LIF-Analyse. Peakflächen Endo H-freigesetzter N-Glykane aus dem Blutserum von Freiwilligen (n = 20) und Patienten mit rheumatoider Arthritis (n = 20).

	Rheumatoide Arthritis(±SD)	Gesunde Kontrolle (±SD)
Neu5AcGalMan ₄ GlcNAc ₂	3,08±0,89	3,11±0,94
Neu5AcGalMan ₅ GlcNAc ₂	1,82±0,87	1,75±0,77
Man ₅ GlcNAc	32,82±2,64	31,55±3,52
Man ₆ GlcNAc	24,05±1,86	23,87±2,10
Man ₇ GlcNAc+ GalMan ₄ GlcNAc ₂	2,35±0,51	1,95±0,36
Man ₇ GlcNAc	5,97±0,57	6,07±0,66
Man ₈ GlcNAc	11,67±0,83	11,65±0,99
Man ₈ GlcNAc+ GalMan ₅ GlcNAc ₂	1,94±0,38	2,23±0,34
Man ₉ GlcNAc	14,37±1,93	16,03±3,09
GlcMan ₉ GlcNAc	1,94±0,40	1,79±0,38

SD Standard Deviation

Es konnten keine charakteristischen Unterschiede in der Expression der N-Glykane beobachtet werden. High-Mannose- und hybride N-Glykane wiesen keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (gesunde Kontrolle und rheumatoide Arthritis) auf und führen zu der Annahme, dass die Serumglykoproteine, die diese N-Glykane tragen nicht von MBL oder der α -Mannosidase II beeinflusst werden.

2.1.2 Analyse Endo H-freigesetzter N-Glykane nach MAED-Methode

Mikrowellen werden seit Jahren in geologischen, biologischen und chemischen Probenvorbereitungen genutzt (Nadkarni 1984; Abu-Samra et al. 1975; Barrett et al. 1978; Gedye et al. 1986). Die Anwendung der Mikrowellen in der enzymatischen Abspaltung von Glykanen bietet viele Vorteile (Liu et al 2008; Sandoval et al. 2007). Nachdem die Messmethode der CE-LIF eine schnellere Detektion von Glykanen ermöglichte, sollte nachfolgend auch die Probenaufbereitung, v.a. die Denaturierung, die enzymatische Freisetzung und die Aufreinigung, mit Hilfe der MAED (*Microwave-Assisted Enzymatic Digestion*) beschleunigt werden.

2.1.2.1 MAED im Vergleich zur Standard-Methode

Zuerst wurde der Denaturierungsschritt der Proben untersucht. Im vorhergehenden Abschnitt erfolgte die Denaturierung der Serumproteine mit Hilfe der Chemikalien DTE und IAA. Nun soll eine enzymatische Denaturierung in der Mikrowelle mit Hilfe der Pronase durchgeführt werden. Pronase ist ein Gemisch aus Proteinasen, die die Proteine in Peptide bis zu einzelnen Aminosäuren spalten. Zur Kontrolle wurde wieder das kommerziell erhältliche Protein RNase B mitgeführt. Mit Hilfe der RNase B konnten im vorhergehenden Abschnitt die meisten Endo H-freigesetzten N-Glykane im Elektropherogramm der CE-LIF zugeordnet werden.

Bei der Mikrowelle handelt es sich um ein auch im häuslichen Gebrauch verwendetes Gerät. Unter den hier vorherrschenden Bedingungen könnten in der Mikrowelle bis zu zehn Proben gleichzeitig bearbeitet werden. Die Proben wurden dazu in einem 1,5 mL Eppendorfgefäß auf einem Kunststoffhalter in der Nähe eines Glasbechers gefüllt mit Eiswasser in der Mikrowelle platziert. Der Glasbecher mit Eiswasser war nötig, um die überschüssige Mikrowellenstrahlung abzufangen (Liu, X et al. 2008). Bei 700 Watt wurden die Proben der Mikrowellenstrahlung für fünf Minuten ausgesetzt. Pronase wurde im Überschuss eingesetzt und musste vor dem Endo H-Verdau bei 95 °C für fünf Minuten inhibiert werden. Danach erfolgte der Endo H-Verdau bei 700 Watt für fünf Minuten. Die Proben wurden an den SP20SS- und Graphitsäulen aufgereinigt (der Aufreinigungsschritt wird später näher erläutert), APTS gelabelt und mit Hilfe der CE-LIF analysiert.

Die Inkubationszeit in der Mikrowelle für den enzymatischen Endo H-Verdau wurde anhand der RNase B optimiert. Dazu wurden folgende Inkubationszeiten getestet: 1, 3, 5 und 10 min. Zur Überprüfung der Effizienz des Verdau wurden die relativen Peakflächen der CE-LIF Elektropherogramme herangezogen. Die Inkubationszeiten 1 und 3 min waren im Verdau nicht vollständig. Wobei 5 und 10 min kaum voneinander abweichende sehr gute Ergebnisse liefern. Da die Zeit der Aufbereitung der Proben so weit wie möglich reduziert werden sollte, wurden nachfolgende MAED-Versuche bei 5 min Inkubationszeit durchgeführt.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde ein Doppelverdau mit Endo H durchgeführt. Dafür wurde nach dem ersten Endo H-Verdau in der Mikrowelle (MAED) der Glasbecher mit neuem Eiswasser gefüllt und die Probe erneut mit Endo H versetzt und ein zweites Mal mit Hilfe der MAED verdaut. Der Doppelverdau zeigte

keinen Einfluss auf die Qualität der Ergebnisse, daher wurde für weitere Versuche ein einfacher Verdau durchgeführt.

Abb. 14 zeigt Elektropherogramme von N-Glykanen der RNase B und Blutserum verdaut nach der Standard-Methode (Abschnitt 2.1.11.) im Vergleich zur MAED-Methode. RNase B verdaut nach der Standard-Methode (Abb. 14A) und RNase B verdaut nach MAED-Methode (Abb. 14C) liefern identische Elektropherogramme der Endo H-abgespaltenen N-Glykane. Die Elektropherogramme der N-Glykane des humanen Blutserums verdaut nach der Standard-Methode (Abb. 14B) und nach der MAED-Methode (Abb. 14D) sind untereinander kompatibel.

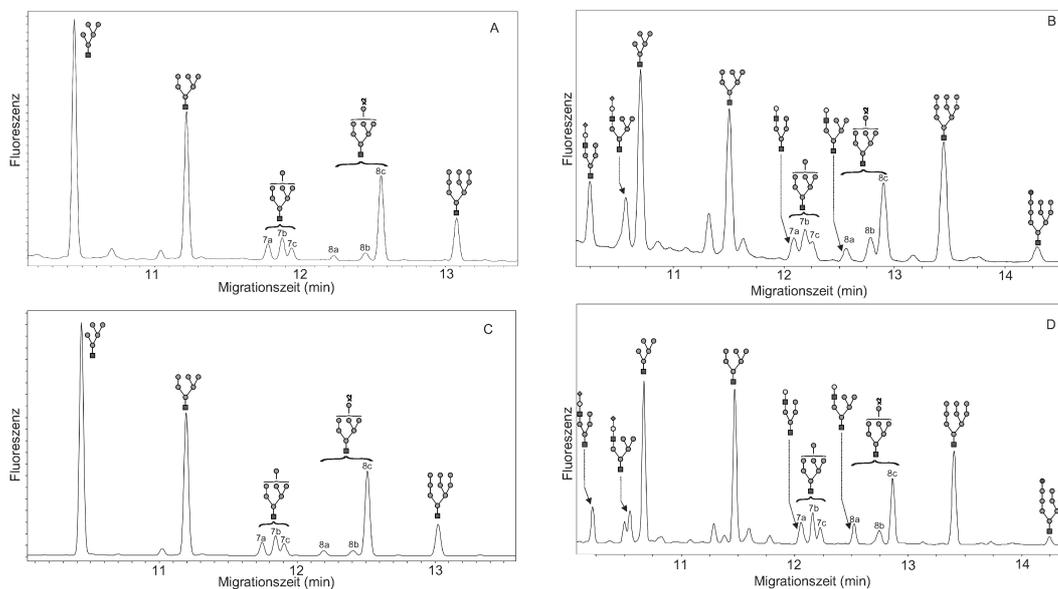


Abb. 14: CE-LIF-Analyse Endo H-freigesetzter N-Glykane: (A) RNase B N-Glykane freigesetzt nach der Standard-Methode; (B) BS N-Glykane freigesetzt nach der Standard-Methode; (C) RNase B N-Glykane freigesetzt nach der MAED-Methode; (D) BS N-Glykane freigesetzt nach der MAED-Methode. Schwarzer Kreis, Glc; Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac.

Die nicht markierten Peaks in den Elektropherogrammen der N-Glykane des Blutserums konnten nicht identifiziert werden. In Abschnitt 2.1.1.2. wurden die N-Glykane an der HPAEC-PAD getrennt. Ein Teil der HPAEC-PAD getrennten N-Glykane wurde permethyliert und massenspektrometrisch analysiert, ein anderer Teil APTS-gelabelt und der CE-LIF Analyse unterzogen. Im Elektropherogramm nach der CE-LIF-Detektion der Fraktion $\text{Man}_6\text{GlcNAc}$ wurde ein Nachbarpeak beobachtet. Das entsprechende MALDI-TOF-MS-Spektrum liefert jedoch keine zusätzliche Masse.

Ebenfalls konnten keine Strukturen zu den kleineren beobachteten Peaks im CE-LIF vorgeschlagen werden. Die HPAEC-PAD Methode benötigte viel Ausgangsmaterial der Probe und war weniger empfindlich als die CE-LIF Methode. Diese nicht identifizierten Peaks im CE-LIF konnten an der HPAEC-PAD nicht detektiert und demzufolge nicht analysiert werden. Die Vermutung ist nahe, dass es sich jedoch ebenfalls um N-Glykane handelt.

Tabelle 5: Reproduzierbarkeit der, unter Standard- und MAED-Bedingungen, Endo H-freigesetzten N-Glykane aus RNase B (n = 5) und humanem Blutserum (n = 5), bezogen auf die Flächenprozentage nach CE-LIF-Analyse.

Struktur	RNase B		Humanes Blutserum	
	Standard (±SD)	MAED (±SD)	Standard (±SD)	MAED (±SD)
Neu5AcGalMan ₄ GlcNAc ₂			5,60±1,06	5,08±0,66
Neu5AcGalMan ₅ GlcNAc ₂			4,36±1,44	4,34±0,71
Man ₅ GlcNAc	41,29±0,40	43,30±0,55	29,84±3,12	26,48±2,23
Man ₆ GlcNAc	26,50±0,20	26,51±0,07	20,01±2,55	23,78±1,97
Man _{7a} GlcNAc	2,66±0,05	2,32±0,13		
Man _{7b} GlcNAc	3,49±0,08	3,64±0,06		
Man _{7c} GlcNAc	2,01±0,04	2,18±0,04		
Man _{7a} GlcNAc ^{a)} + GalMan ₄ GlcNAc ₂			3,69±0,69	3,25±0,31
Man _{7b+c} GlcNAc ^{b)}			7,16±0,83	6,82±0,43
Man _{8a} GlcNAc	0,76±0,03	0,87±0,01		
Man _{8b} GlcNAc	1,22±0,09	0,80±0,04		
Man _{8c} GlcNAc	14,76±0,11	15,12±0,17		
Man _{8a} GlcNAc ^{c)} + GalMan ₅ GlcNAc ₂			1,77±0,72	2,46±0,31
Man _{8b+c} GlcNAc ^{d)}			11,65±0,93	12,67±0,94
Man ₉ GlcNAc	7,31±0,39	5,26±0,34	13,92±1,99	13,81±0,99
GlcMan ₉ GlcNAc			1,99±0,39	1,31±0,31

^{a)} erstes Isomer des Man₇GlcNAc, welches zusammen mit GalMan₄GlcNAc₂ migriert. ^{b)} zweites und drittes Isomer des Man₇GlcNAc. ^{c)} erstes Isomer des Man₈GlcNAc, welches zusammen mit GalMan₅GlcNAc₂ migriert. ^{d)} zweites und drittes Isomer des Man₈GlcNAc; SD Standard Deviation.

Zur Verifizierung der MAED-Methode wurde RNase B ($n = 5$) und humanes Blutserum ($n = 5$) nach dem MAED-Protokoll behandelt und in der CE-LIF vermessen. Zum semiquantitativen Vergleich wurde die Gesamtpeakfläche der N-Glykane eines Elektropherogramms (Tab. 5) zu 100 % gesetzt und daraus die relativen Flächenprozentage der jeweiligen N-Glykane definiert.

Die Tabelle 5 fasst den Durchschnittswert der relativen Flächenprozentage und ihre Standard-Abweichung der einzelnen N-Glykane von RNase B ($n = 5$) und humanem Blutserum ($n = 5$) zusammen. Die prozentualen Anteile sialylierter und nicht sialylierter Hybridstrukturen unterscheiden sich kaum zwischen beiden Protokollen (Standard und MAED). Obwohl es bekannt ist, dass Sialinsäuren sehr labil sind, wurden sie den Ergebnissen gemäß nicht von der Mikrowellenstrahlung degradiert. Die prozentualen Anteile der N-Glykane sind unter Standard- und MAED-Protokoll für RNase B und für Blutserum gleich. Das MAED-Protokoll ist kompatibel mit dem Standard-Protokoll und ermöglicht eine enorme Zeitreduzierung bei der Denaturierung und dem enzymatischen Verdau der Proben.

2.1.2.2 Probenaufreinigung mit Hilfe von SP20SS- und Graphit-Material

Der Aufreinigungsschritt der Glykane ist ein wichtiger Teil in der Glykananalytik. Idealerweise soll der Aufreinigungsschritt höchste Qualität der Probe ohne jegliche Verluste garantieren, kostengünstig und schnell sein. Zu diesem Zweck wurde eine Aufreinigungsmethode designed, die mit geringste Materialmengen verbraucht und ein Minimum an Zeit benötigt.

SP20SS- und Graphitpulver sind kommerziell kostengünstiger, pro Aufreinigung wird viel weniger Material verbraucht, als bei vorgepackten C18 und Carbographsäulen. Es kann individuell bestimmt werden wieviel Säulenmaterial nötig ist. Für 10 μL Blutserum erwies sich als Optimum ein Säulenvolumen von 50 μL für die beiden Materialien. Zusätzlich ist die Benutzung einer Tischzentrifuge ein zeitreduzierender Faktor.

Nach dem MAED-Schritt wurden die Proben bis zur Trockne eingeeengt und an SP20SS- und Graphit-Material aufgereinigt. SP20SS ist ein hydrophobes Kunstharz, das in der Lage ist das Proteinanteil aus der Probe an sich zu binden (Huang et al. 2000) und ersetzt damit die C18 Säule. SP20SS-Material wurde in 10 μL -Filterspitzen

gegeben und in einer Tischzentrifuge platziert (Abschnitt 4.3.5.4.). Nach der Aufreinigung der Proben vom Proteinanteil wurden diese erneut eingeeengt und an den eigens-befüllten Graphit-Säulchen entsalzt (Abschnitt 4.3.5.5.). Das Elutionsvolumen sankt von 3 x 400 μ L (1,2 mL) bei C18/Carbograph auf 3 x 30 μ L (90 μ L) bei SP20SS/Graphit und minimierte damit die Trocknungszeit der Lösungsmittel erheblich (von 3 h auf 30 min).

In der Tabelle 6 ist die Gesamtzeit der beiden vorgestellten Protokolle zusammengefasst. Die Standard-Methode (Abschnitt 3.1.1.1.) benötigte für die Denaturierung, die Freisetzung und die Aufreinigung der N-Glykane 20 h 55 min, während die MAED-Methode nur 55 min dauert.

Das Ziel den zeitlichen Aufwand für die Aufarbeitung der Proben zu minimieren, wurde demnach erreicht. Dank der MAED-Methode könnten nun die Schritte der Denaturierung und enzymatische N-Glykanfreisetzung in kürzester Zeit durchgeführt werden. Der Aufreinigungsschritt über SP20SS/Graphit bildete eine kostengünstige, schnelle Alternative zu C18- und Carbographsäulen bei gleich bleibender Effizienz.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Arbeitsschritte für die Freisetzung und Aufreinigung der Endo H-abgespaltenen N-Glykane unter Standard- und MAED-Bedingungen.

	Reagenzien	Standard Protokoll	MAED Protokoll
Reduktion	200 mM DTE	45 min	–
Alkylierung	200 mM IAA	1 h	–
Pronase-Verdau	Pronase (1-10 μ g)	–	5 min
Inhibition (95 °C)		–	5 min
Verdau	20 mU Endo H	16 h	5 min
Aufreinigung	C18/ Carbograph;	10 min	–
	SP20SS/Graphit	–	10 min
Einengung der Lösungsmittel		3 h	30 min
Gesamtzeit		20 h 55 min	55 min

2.1.2.3 N-Glykosylierungen bei Ovarial- und Colonkarzinom

Aufbauend auf den Resultaten der MAED-Methode, SP20SS/Graphit-Aufreinigung und der Messung an der CE-LIF wurden diagnostische Untersuchungen Endo H-freigesetzter N-Glykane durchgeführt. Es wurden N-Glykane von drei Gruppen untersucht: Ovarialkarzinom (n = 10), Colonkarzinom (n = 10) und gesunder Kontrolle (n = 10). Die freigesetzten N-Glykane wurden APTS-gelabelt und an der CE-LIF analysiert. Zum semiquantitativen Vergleich wurden die prozentualen Anteile jedes N-Glykans berechnet. Dabei wurde die Gesamtpeakfläche der N-Glykane in einem Elektropherogramm 100 % gesetzt und die relativen Flächenprozentage der einzelnen Glykane bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tabelle 7: Prozentualer Anteil Endo H-freigesetzter N-Glykane aus humanem BS gesunder Kontrollen (n = 10), Ovarialkarzinom (n = 10) und Colonkarzinom (n = 10) unter MAED-Bedingungen bezogen auf die Flächenprozentage der CE-LIF.

Struktur	Gesunde Kontrolle (± SD)	Ovarial Karzinom (± SD)	Colon Karzinom (± SD)
Neu5AcGalMan ₄ GlcNAc ₂	5,26 ± 1,03	3,89 ± 1,18*	4,32 ± 0,82
Neu5AcGalMan ₅ GlcNAc ₂	4,62 ± 1,26	3,45 ± 1,04*	4,06 ± 0,64
Man ₅ GlcNAc	26,65 ± 2,03	22,46 ± 3,02	28,17 ± 5,36
Man ₆ GlcNAc	23,38 ± 1,86	23,40 ± 3,34	23,80 ± 1,74
Man ₇ GlcNAc ^{a)} +			
GalMan ₄ GlcNAc ₂	3,19 ± 0,37	4,19 ± 1,77	4,26 ± 1,75
Man ₇ GlcNAc ^{b)}	6,86 ± 0,48	5,82 ± 0,63*	5,86 ± 0,68*
GalMan ₅ GlcNAc ₂ +			
Man ₈ GlcNAc ^{c)}	2,52 ± 0,33	2,40 ± 0,74	2,13 ± 0,31*
Man ₈ GlcNAc ^{d)}	12,73 ± 1,00	16,42 ± 6,23	11,97 ± 0,93
Man ₉ GlcNAc	13,30 ± 1,68	16,03 ± 3,61	13,94 ± 3,78
GlcMan ₉ GlcNAc	1,50 ± 0,38	1,92 ± 0,65	1,49 ± 0,33

^{a)} erstes Isomer des Man₇GlcNAc, welches zusammen mit GalMan₄GlcNAc₂ migriert. ^{b)} zweites und drittes Isomer des Man₇GlcNAc. ^{c)} erstes Isomer des Man₈GlcNAc, welches zusammen mit GalMan₅GlcNAc₂ migriert. ^{d)} zweites und drittes Isomer des Man₈GlcNAc. Die Statistikanalyse wurde nach Mann-Whitney-U-Test zwischen der Kontrollgruppe gesunder Probanden mit jeder Krebsgruppe durchgeführt; *p < 0,01 statistisch signifikant; SD *Standard Deviation*.

Um die diagnostische Relevanz zu untersuchen, wurde der statistische Test „Mann-Whitney-U-Test“ durchgeführt (SPSS-Statistik-Programm). Bei diesem Test wurde auf Unterschiede in den Mittelwerten zwischen der Kontrollgruppen (gesunde Probanden) und der Experimentalgruppe (Ovarial- bzw. des Colonkarzinoms) untersucht.

Die Test-Ergebnisse zeigen, dass die beiden sialylierten Hybrid-Strukturen Neu5AcGalMan₄GlcNAc₂ und Neu5AcGalMan₅GlcNAc₂ in Ovarialkarzinomgruppe unterexprimiert werden. Ausserdem wird eine Unterexpression im zweiten und dritten Isomer der High-Mannose Man₇GlcNAc bei Ovarial- und Colonkarzinom beobachtet. Die ersten Isomere der High-Mannosen Man₇GlcNAc und Man₈GlcNAc können nicht diskutiert werden, da diese mit den Hybriden zeitgleich migrieren.

2.1.3 Analyse PNGase F-freigesetzter N-Glykane nach MAED

Das anhand von Endo H entwickelte Protokoll zur Denaturierung und dem enzymatischen Verdau mit Hilfe der Mikrowelle (MAED) sowie die Aufreinigung über SP20SS/Graphit-Säulen sollte im nächsten Schritt mit dem Enzym PNGase F getestet werden. PNGase F spaltet die glykosidische Bindung der Asparagin-gebundenen Glykane mit dem Proteinrückgrad. Das Aktivitätsmaximum von PNGase F liegt bei pH ~ 7 (Endo H pH ~ 5,5). Demzufolge wurde beim MAED-Schritt die Probe im Phosphatpuffer mit pH ~ 7 gelöst. Als Kontrollprotein wurde RNase B mitgeführt. Unter der Benutzung von PNGase F wurde die neuentwickelte MAED-Methode der Standard-Methode gegenübergestellt. Abb. 15 zeigt MALDI-TOF-MS von RNase B und humanem Blutserum einerseits nach der Standard-Methode (Abb. 15A und B) und andererseits nach der MAED-Methode (Abb. 15C und D) behandelt.

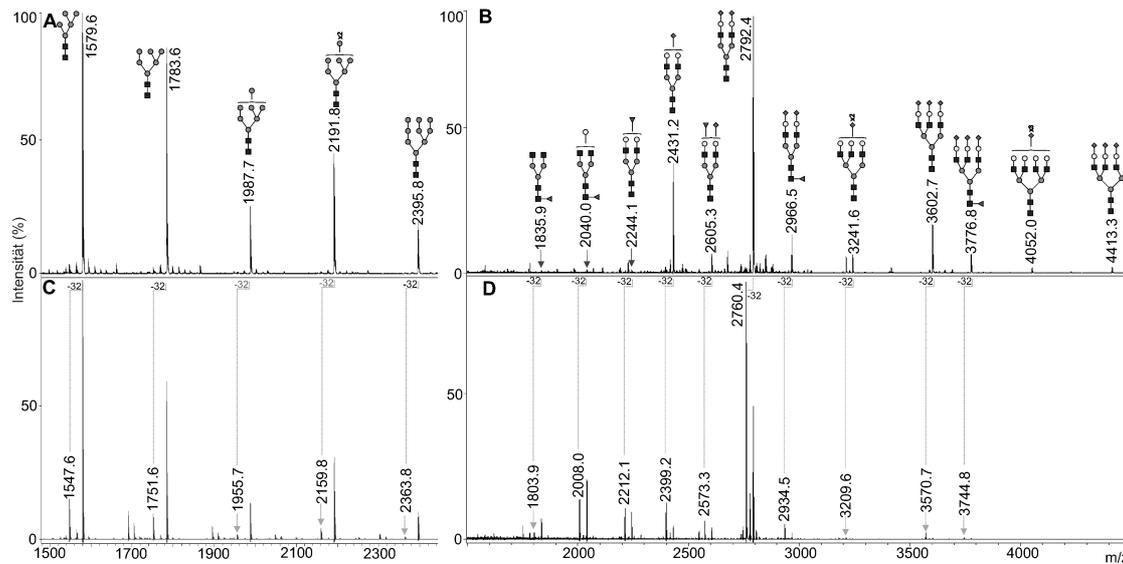


Abb. 15: MALDI-TOF-MS von PNGase F-freigesetzten permethylierten N-Glykanen: (A) RNase B N-Glykane freigesetzt nach Standard-Methode; (B) BS N-Glykane freigesetzt nach Standard-Methode; (C) RNase B N-Glykane freigesetzt nach MAED-Methode; (D) BS N-Glykane freigesetzt nach MAED-Methode. Messung erfolgte im positiven Ionenmodus. Die N-Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac, Dunkel-grauer Dreieck, Fuc.

Auffällig war, dass nach der MAED-Methode viele Peaks einen Nebenpeak mit einer Verschiebung von -32 Dalton aufwiesen. Die Untersuchung dieser Signale mit Hilfe der Fragmentierung lieferte die Erkenntnis, dass das reduzierende Ende der Oligosaccharide modifiziert vorliegt. Fragmente ohne das reduzierende Ende (B- und C-Typ Fragmente nach Domon und Costello) entsprachen den Fragmenten der N-Glykanstrukturen (Domon und Costello 1988). Für die Fragmente, die das reduzierende Ende enthielten (Y- und Z-Typ Fragmente), konnten zunächst keine Strukturen vorgeschlagen werden (Domon und Costello 1988).

Es ist bekannt, dass unter basischen Bedingungen das terminale GlcNAc Abbaureaktionen unterliegt (*peeling*-Reaktion). In der Literatur werden unter basischen Bedingungen *peeling*-Reaktionen an Oligosacchariden beschrieben, die mit einer Oxazolin-Ausbildung einhergehen (Murase und Kajihara 2010). Ausserdem wird Oxazolin während des PNGase F-Mechanismus als Zwischenstufe ausgebildet (Abb. 16) (Umekawa et al. 2010). Zur Überprüfung der Oxazolinausbildung wurden die nach MAED-freigesetzten N-Glykane einer Essigsäurehydrolyse unterzogen. Dazu wurde 0,5 M Essigsäure zur Probe gegeben und bei 40 °C inkubiert. In bestimmten Zeitintervallen ($t = 1h, 2h, 3h, 16h$) wurde eine geringe Menge an Reaktionslösung

entnommen und massenspektrometrisch analysiert (Abb. 17). Die Ergebnisse sind in Abb. 17 exemplarisch an dem N-Glykan m/z 2792 demonstriert.

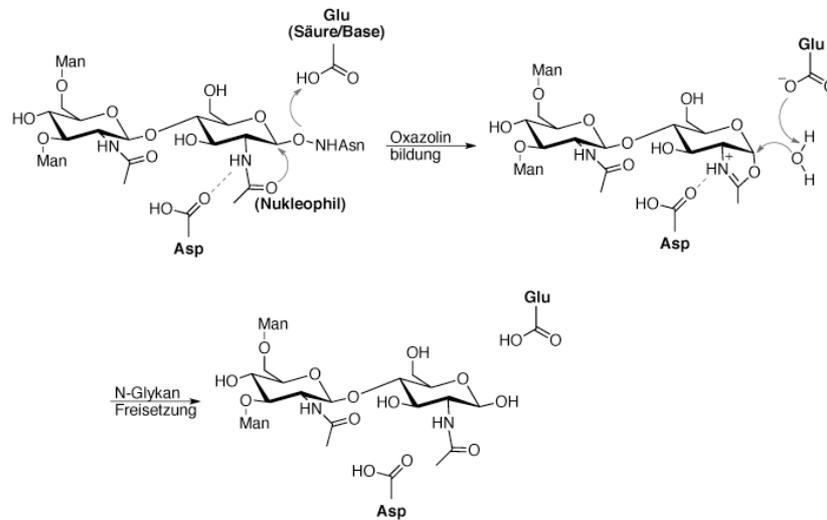


Abb. 16: Mechanismus der N-Glykan-Abspaltung mit Hilfe der PNGase F: Die am Mechanismus beteiligten Aminosäuren der PNGase F sind in grau unterlegt. Als Zwischenstufe wird Oxazolin gebildet.

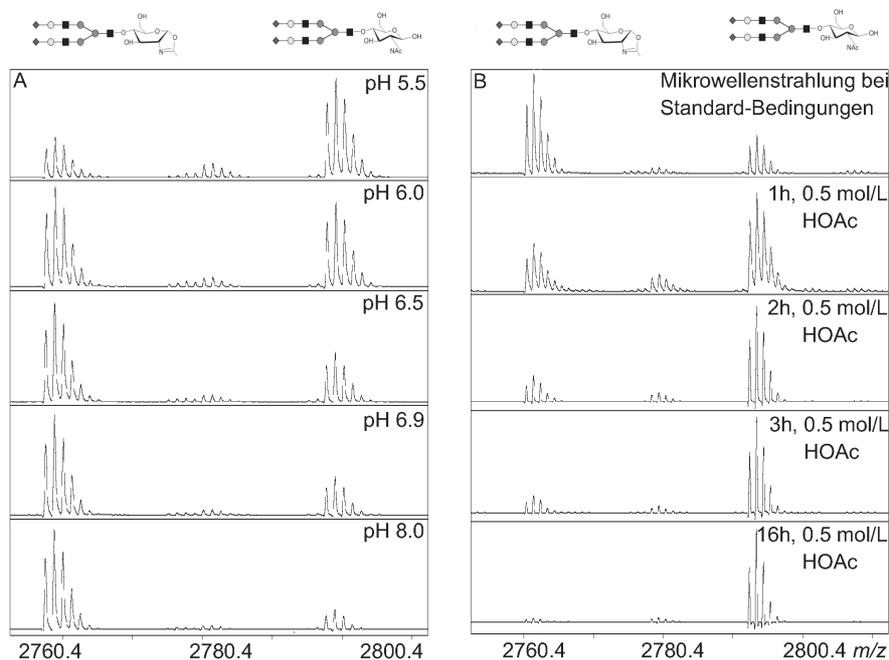


Abb. 17: MALDI-TOF-MS diantennäres disialyliertes N-Glykan m/z 2792.: 10 μ L humanes Blutserum nach MAED-Methode behandelt, SP20SS/Graphit aufgereinigt, und permethyliert. (A) pH-Abhängigkeit der MAED-Methode mit PNGase F; (B) MAED-Methode von 10 μ L Blutserum bei pH 6,9, gefolgt von Essigsäurehydrolyse (0,5 M Essigsäure, 40 °C, Inkubationszeit: 1 – 16 h). Messung erfolgte im positiven Ionenmodus. Die N-Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac.

Während der Essigsäurehydrolyse wurde die Oxazolingruppe an der 2-Acetamidgruppe protoniert, wobei Wasser als Protonendonator agierte. Mit dem Fortschreiten der Essigsäurehydrolyse wurde das Verhältnis zwischen der Verschiebung bei -32 Da und dem N-Glykan umgekippt (Abb. 17B). Nach 16 h saurer Hydrolyse verschwanden die Signale für die Verschiebung bei -32 Da und bestätigen somit die Oxazolinausbildung am reduzierenden Ende.

Um die Ausbildung der Oxazolingruppe während PNGase F-MAED zu minimieren, wurden folgende Experimente durchgeführt und in der Tabelle 8 zusammengefasst. Dazu erfolgte die PNGase F-MAED bei unterschiedlichen pH-Werten (pH = 5,5; 6,0; 6,5; 6,9; 8,0). Bei einem pH-Wert von 8,0 wurde die höchste Oxazolinausbildung (Oxa) gegenüber dem freien reduzierendem Ende (FRE) bestimmt (Verhältnis: 1:5,55). Bei pH 5,5 dominieren die Oligosaccharide mit freiem reduzierendem Ende (Verhältnis: 1:0,47).

Tabelle 8: Zusammenfassung PNGase F-freigesetzter N-Glykane aus humanem Blutserum 10 μ L nach Standard- und MAED-Methode.

Nr	Denaturierung ^{a)}	Lösung (50 μ L)	Watt	pH	Enzymverdau	Hauptstruktur	Verhältnis (FRE : Oxa)
1	Standard	PP	700	6,5	o.n.	FRE	1 : 0
2	Pronase	pp	700	5,5	5 min	FRE	1 : 0,47
3	Pronase	pp	700	6,0	5 min	FRE	1 : 0,94
4	Pronase	PP	700	6,5	5 min	FRE/Oxa	1 : 1,11
5	Pronase	PP	700	7,0	5 min	Oxa	1 : 2,06
6	Pronase	PP	700	8,0	5 min	Oxa	1 : 5,55
7	Pronase	H ₂ O	700	-	5 min	FRE	1 : 0,12 ^{b)}
8	Pronase	PP	460	5,5	5 min	FRE/Oxa	1 : 0,20 ^{b)}
9	Pronase	PP	595	5,5	5 min	FRE/Oxa	1 : 0,571 ^{b)}

^{a)} Denaturierung: Nr 1 Standard-Methode; Nr 2, 3, 4 MAED-Methode. ^{b)} Oligosaccharide zwischen m/z 1800 – 2500 sind höher exprimiert bei gleichzeitigem Oligosaccharidverlust m/z > 2800. PP = Phosphatpuffer 200mM; üN = über Nacht. FRE = Glykan mit freiem reduzierendem Ende. Oxa = Glykan mit Oxazolingruppe.

Obwohl die Oxazolinausbildung bei PNGase F-MAED in Abhängigkeit des pH-Wertes der Reaktionslösung kontrolliert werden kann, wird im Gesamtspektrum der

N-Glykane bei jedem pH-Wert beobachtet, dass die biantennären N-Glykane höhere Intensitäten aufweisen, als die N-Glykane im höheren m/z -Bereich (ab m/z 2800, Abb. 15D). Der pH-Wert und die Pufferung der Reaktionslösung spielen demnach eine entscheidende Rolle während der PNGase F-MAED-Reaktion. Die Pufferung der Reaktionslösung mit Hilfe des Phosphatpuffers ist sehr wichtig. Die PNGase F-MAED durchgeführt in Wasser als Lösungsmittel lieferte nur sehr geringe Oxazolinsignale. Dafür konnten hier höhere N-Glykane nicht mehr detektiert werden (ab m/z 2800). Die Durchführung der PNGase F-MAED bei geringerer Mikrowellenstrahlung (460 Watt, 595 Watt) führte zu ähnlichen Ergebnissen, wie bei der Reaktion in Wasser. Die Oxazolinausbildung ist zurückgegangen, jedoch konnten auch hier ab m/z 2800 keine N-Glykane detektiert werden (Tabelle 8). Die PNGase F-MAED ist unter diesen Bedingungen für die diagnostischen Analysen der Blutserumproben nicht geeignet.

2.1.4 Transglykosylierung mit Endo M

Viele Glykoproteine sind von pharmazeutischer Bedeutung (Kobata et al. 1992). Die *in vitro* Expression von Glykoproteinen könnte eine Möglichkeit effektive und spezifische Therapeutika gegen gezielte Erkrankungen liefern. Jedoch ist die Glykosylierung ein hoch komplizierter Prozess und stellt eine enorme Herausforderung für *in vitro* Reproduzierbarkeit dar. Aus industrieller Sicht sollte ein Glykoprotein in hohen Ausbeuten und kostengünstig exprimiert werden. Für eine kostengünstige Expression eignen sich prokaryotische Zellen hervorragend. Sie sind besonders preiswert und einfacher in der Handhabung. In der Literatur ist die Expression von glykosylierten Proteinen in prokaryontischen Systemen bekannt. Jedoch ist die Glykosylierung anders als wenn es in eukaryontischen Zellen exprimiert worden wäre (Wacker et al. 2002). Eine andere Möglichkeit ist eine nicht-glykosylierte Form von einem pharmazeutisch-relevanten Glykoprotein in prokaryotische Zellen zu exprimieren und dann *in vitro* unter hoher Ausbeute zu glykosylieren. *In vitro* Glykosylierung ist eine günstige Variante für die Produktion. Um dies zu erreichen wurden viele Enzyme analysiert, die die Proteine glykosylieren können. Zur einer *in vitro* Glykosylierung ist die *reverse*-Reaktion der PNGase F in der Lage. (Lee et al. 2002; Park et al. 2003). Dafür erfolgt die PNGase F-katalysierte Glykosylierungsreaktion in 1,4-dioxan oder ethylenglykol, um die Funktion von Wasser zu unterdrücken. Es existieren ebenfalls nicht-enzymatische *in vitro*

Glykosylierungsreaktionen, z. B. Maillard Reaktion (Kim et al. 1997; Lapolla et al. 1994). Bei einer Maillard Reaktion werden Saccharide mit Peptiden in Gegenwart von 12-18 % Wasser unter Erhitzen auf 90 °C zur Reaktion gebracht. Jedoch können bei einer Maillard Reaktion Saccharide mit einer Länge von gerade mal ein bis zwei Monosaccharideinheiten eingesetzt werden (Kim et al. 1997; Jeong et al. 2004).

Weitere *in vitro* Glykosylierungen sind durch die Enzyme Endo M (Endo- β -N-Acetylglucosaminidase aus *Mucor hiemalis*) und Endo A (Endo- β -N-Acetylglucosaminidase aus *Arthrobacter protophormiae*) möglich. Hierfür müssen die Oligosaccharide am reduzierenden Ende eine Oxazolingruppe aufweisen.

Die chemische Synthese der Glykane mit einer Oxazolingruppe ist äusserst langwierig. Wohingegen während der MAED-Reaktion solche ‚Glykan-Oxazoline‘ quasi als Zufallsprodukt innerhalb von fünf Minuten entstehen. Die ‚Glykan-Oxazoline‘ wurden in Glykosylierungsreaktionen mit Hilfe der Endo M getestet. Endo M katalysiert die Glykosylierungsreaktion bei der Oxazoline auf Proteine addiert werden. Dafür müssen die eingesetzten Proteine ein einzelnes terminales Monosaccharid enthalten (Rising et al. 2006).

Daher wurde RNase B mit Hilfe der Endo H verdaut. RNase B enthält nur Oligosaccharide vom Typ High-Mannose. Das Enzym Endo H spaltet Hybride und High-Mannosen zwischen den beiden N-Acetylglycosaminen der *core*-Struktur. Um die Vollständigkeit des Verdaus durch Endo H zu kontrollieren, wurde das verdaute Protein RNase B massenspektrometrisch analysiert. Der Verdau erfolgte ohne vorhergehende Denaturierung des Proteins RNase B. In der Abb. 18A erkennt man die intakte RNase B mit dazugehöriger Verteilung der High-Mannosen (Man_{5,9}). In Abb.18B ist die Endo H-verdaute RNase B zu beobachten. Die High-Mannosen Verteilung ist nicht mehr zu beobachten. Die erhaltene Proteinmasse entspricht der Masse von deglykosylierter RNase B und einem N-Acetylglucosaminrest (RNase B-GlcNAc m/z 13901,5). Die theoretisch berechnete Masse entspricht m/z 13884,32 Da. Die geringe Abweichung ist auf die Kalibrierung des Gerätes zurückzuführen. Die Verifizierung der Deglykosylierung von RNase B erfolgte am SDS-PAGE (Abb. 19A). Die Bande für RNase B erfährt einen vollständigen Shift zu geringerer Masse. Damit ist der Glykosylakzeptor RNase B-GlcNAc bestätigt.

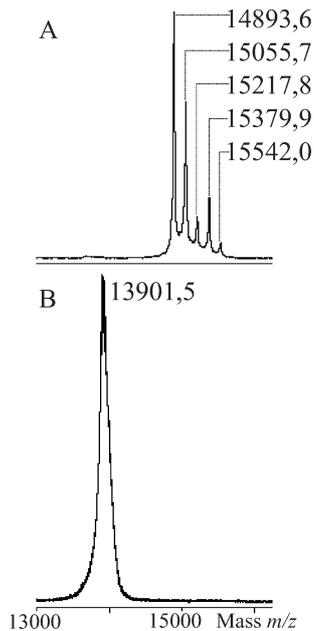


Abb. 18: MALDI -TOF-MS RNase B: (A) natives RNase B mit High-Mannosenverteilung, Man_5 m/z 14893,6 (theor. m/z 14897,74), Man_6 m/z 15055,7 (theor. m/z , 15059,84) Man_7 m/z 15217,8 (theor. m/z 15221,94), Man_8 m/z 15379,9 (theor. m/z , 15384,04) Man_9 m/z 15542,0 (theor. m/z 15546,14); (B) Endo H-verdautes RNase B m/z 13901,5 (theor. m/z 13884,32). Messung erfolgte im positiven Ionenmodus mit ACCA als Matrix.

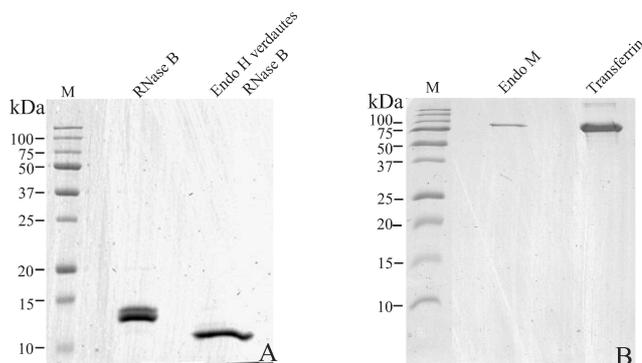


Abb. 19: SDS-PAGE RNase B: (A) 12% SDS-PAGE erste Bande: native RNase B, zweite Bande: Endo H-verdaute RNase B; (B) 15% SDS-PAGE erste Bande: natives Endo M ca. 90 kDa, nicht glykosyliert, zweite Bande: natives Transferrin 80 kDa, monoglykosyliert mit diantennären sialylierten N-Glykan; M Proteinmarker.

Für die Synthese des Oxazolin-Derivates wurde das Protein Transferrin ausgewählt, dieser ist 80 kDa gross (Abb. 19B) und enthält nur eine Glykosylierungsstelle. Die Glykosylierungsstelle wird mit einem bisialylierten biantennären N-Glykan glykosyliert, in geringen Anteilen ist auch monosialylierte Form vorhanden. Vor der Abspaltung der N-Glykane wurde Transferrin 1h bei 80 ° C mit Essigsäure inkubiert, um die Sialinsäuren zu entfernen. Transferrin wurde nach der PNGase F-MAED-Methode bei $\text{pH}=8,0$ umgesetzt. Das erhaltene Oxazolinderivat ist ein biantennäres N-

Glykan mit Oxazolingruppe am reduzierenden Ende. Als Nebenprodukt ist in geringen Mengen N-Glykan mit einem freien reduzierenden Ende zu beobachten, welches bei Folgereaktion nicht stört. In der folgenden Transglykosylierungsreaktion wurden 10 nmol Oxazolinderivat (Glykananteil aus Transferrin) mit 3,3 nmol Glykosylakzeptor (RNase B-GlcNAc) in Gegenwart von 6 µg Endo M bei pH 6,5 umgesetzt (Abschnitt 4.3.3.3). Die Reaktionsbedingungen wurden nach Parsons et al. angepasst (Parsons et al. 2009). Nach bestimmten Zeitintervallen wurde je ein Aliquot entnommen, an SP20SS/Graphit-Spitzen aufgereinigt und massenspektrometrisch im positiv Modus analysiert. Die in Abb. 18B Endo H-deglykosylierte RNase B wies einem Massepeak bei m/z 13901,5 auf. Nach der Transglykosylierungsreaktion wäre die erwartete Masse m/z 15507,22 (RNase B-HexNAc₅Hex₅), welche der RNase B und einem biantennären N-Glykan mit einem zusätzlichen N-Acetylglucosaminrest am *core* entspricht. Jedoch konnte das modifizierte Protein RNase B nicht beobachtet werden.

Deshalb wurde ein anderer Hergang der Transglykosylierung getestet. Hierfür wurde der Glykosylakzeptor (RNase B-GlcNAc) auf SDS-PAGE geladen und anschliessend mit Coomassie gefärbt. Die gefärbte Bande wurde ausgeschnitten und es folgte Western Blot auf PVDF Membran. Die Coomassie-Färbung wurde mit Ammoniumbicarbonat-Puffer entfernt. Der Glykosylakzeptor (RNase B-GlcNAc) liegt nun gebunden auf der PVDF Membran vor. Der Vorteil bei dieser Methode war, dass nach der Transglykosylierungsreaktion die PVDF Membran gewaschen werden könnte und alle nicht gebundenen Reagenzien entfernt wurden. Für das Oxazolin-Derivat wurde wiederum das biantennäre N-Glykan aus Transferrin nach PNGase F-MAED-Methode bei pH=8,0 abgespalten und diesmal nicht desialyliert. Das Oxazolin und das Enzym Endo M wurden auf die PVDF Membran (mit dem Glykosylakzeptor RNase B-GlcNAc) gebracht und 10 min bei pH 6,5 inkubiert (Abschnitt 4.3.3.3). Danach wurde die Membran mit MilliQ-Wasser gewaschen und die freien Stellen mit Albumin blockiert. Anschliessend erfolgte der enzymatische Verdau mit Hilfe der PNGase F. Die PNGase F sollte das neuentstandene N-Glykan wieder abspalten. Der Überstand der Reaktionslösung nach dem PNGase F-Verdau wurde eingeengt und permethyliert. In Abb. 20 ist das massenspektrometrische Ergebnis der Transglykosylierungsreaktion dargestellt.

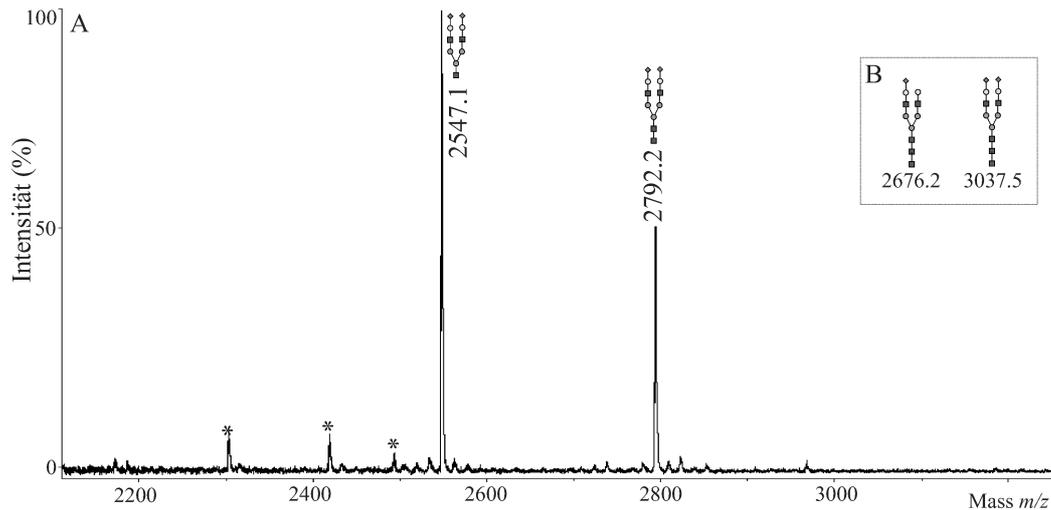


Abb. 20: MALDI-TOF-MS: (A) Permethylierte PNGase F-freigesetzter N-Glykanstrukturen nach der Transglykosylierungsreaktion. (B) Theoretisch erwartete permethylierte N-Glykanstrukturen nach der Transglykosylierungsreaktion. Die N-Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac.* Verunreinigungen.

Das Spektrum wird von den Massen m/z 2547,1 (biantennäres bisialyliertes N-Glykan mit einem GlcNAc am *core*) und m/z 2792,2 (biantennäres bisialyliertes N-Glykan) dominiert. Erwartet wurden N-Glykane mit m/z 2676,2 (biantennäres monosialyliertes N-Glykan) und m/z 3037,5 (biantennäres bisialyliertes N-Glykan) (Abb. 20B).

Da die PVDF Membran mehrmals nach der Transglykosylierungsreaktion gewaschen wurde, kann man davon ausgehen dass die Transglykosylierungsreaktion erfolgreich verlaufen ist. Jedoch wird keine N-Glykanstruktur mit drei GlcNAc-Resten in der Pentasaccharid-Struktur beobachtet. Es ist zu vermuten, dass bei einem zusätzlichen GlcNAc-Rest die räumliche Zusammenlagerung im aktiven Zentrum der PNGase F nicht mehr exakt eingehalten wird und es zur einer Verzerrung der beteiligten Wasserstoffbrückenbindungen und der Van-der-Waals-Kräfte kommt. Die enzymatische Katalyse erfolgt demnach unter Bildung von N-Glykanfragmenten.

2.2 Analyse des N- und O-Glykoms des humanen Speichels

Viele der humanen Speichelproteine sind reich an O- und N-Glykanen. Das Auftreten von O- und N-Glykanen auf Speichelproteinen hat einen großen Einfluss auf beispielsweise deren Konformation, Hydrophobizität und Viskosität (Van der Reijden et al. 1993). Speichelproteine beeinflussen die Permeabilität von Schleimhautoberflächen, limitieren das Eindringen von potentiellen Erregern sowie Toxinen in die Schleimzellen und schützen die Schleimzellen gegen Bakterienproteasen (Mandel 1987; Van der Reijden et al. 1993). Eine Vielzahl an Viren und Bakterien nutzen den Bereich der Mundhöhle, um sich zu vermehren und das Abwehrsystem der Mundflora zu schwächen und damit diverse Krankheiten, wie Pneumonie oder Gastritis, zu initiieren (Scannapieco et al. 1994). Die Glykosylierung ist eine der ersten Interaktionsebenen mit den Pathogenen. Daher ist die Erforschung von Veränderungen der Glykosylierung in der Mundflora vielversprechend. Der humane Speichel wird von drei großen Drüsen, der Ohrspeicheldrüse (*Glandula parotis*), der Unterkieferdrüse (*Glandula submandibularis*), der Unterzungendrüse (*Glandula sublingualis*) sowie mehreren kleineren Drüsen gebildet. Unterschiedliche Speichelproteine werden von unterschiedlichen Drüsen sekretiert, dabei weisen viele Speichelproteine ausgeprägte N-Glykosylierungsmotive auf (Levine et al. 1987; Denny und Denny 1982; Amerongen et al. 1983; Guile et al. 1998). Die N-Glykosylierung wurde auf Speichelproteinen wie Speichelamylase, Immunglobulin, Laktoferrin, Lactoperoxidase, Defensin, Speichelagglutinin und α -Carboanhydrase charakterisiert (Bank et al. 1991; Nieuw Amerongen et al. 2004; Prakobphol et al. 2005; Thatcher et al. 1998). Im folgenden Teil der Arbeit wurden die N- und die O-Glykane des humanen Speichels massenspektrometrisch charakterisiert. Dabei wurden die jeweiligen Blutgruppen und der Sekretor-Status (Sekretor, Se; Nicht-Sekretor, nSe) berücksichtigt.

2.2.1 N-Glykane

2.2.1.1 MAED-unterstützte PNGase F-Freisetzung von N-Glykanen

Die Denaturierung der Speichelproben erfolgte nach der neuentwickelten MAED-Methode mit Hilfe der Pronase (Abschnitt 3.1.2; Frisch et al. 2012). Die MAED-Methode

verkürzt die Aufbereitungszeit der Proben und verzichtet auf Detergenzien wie DTE und IAA.

Die Speichelproben wurden von Freiwilligen mit unterschiedlichen Blutgruppen und Sekretor-Status gesammelt (Blutgruppen: 3 x 0, 3 x A, 3 x B, 3 x AB, 2 x A-nSe, 1 x 0-nSe, 1 x AB-nSe). Als Sekretoren werden Individuen bezeichnet, die nicht nur auf ihren Erythrozyten, sondern auch in Körperflüssigkeiten und Sekretionen Blutgruppenantigene ausbilden (Antigen-H, Antigen-A, Antigen-B). Dafür ist die $\alpha(1,2)$ -Fucosyltransferase (FUT2) verantwortlich, die von Nicht-Sekretoren nicht exprimiert wird (Kelly et al. 1995; Larsen et al. 1990). Die FUT2 überträgt einen Fucoserest in $\alpha(1,2)$ -Stellung auf die terminale Galactose des Glykans, dabei wird das Antigen-H gebildet. Das Motiv des Antigen-H kann durch entsprechende Glycosyltransferasen zu Antigen-A und Antigen-B verlängert werden. Wenn die FUT2 fehlt, werden das Antigen-H und daran anknüpfende Glykanstrukturen nicht ausgebildet.

Im ersten Schritt der Aufarbeitung wurden 300 μ L Speichel bis zur Trockne eingengt und in Phosphatpuffer gelöst. Danach erfolgte der Pronase unterstützte Denaturierungsschritt in einer Mikrowelle (Severin 700). Pronase spaltet die Proteine in kleinere Peptide, bis hin zu einer Aminosäure. Die Aufkonzentrierung und Aufreinigung der Pronase generierten Glykopeptide erfolgte an der ZIC[®]-HILIC Säule (Abschnitt 4.1.2.3.). Die zwitterionische stationäre Phase der ZIC[®]-HILIC Säule bildet schwache elektrostatische Wechselwirkungen zu dem hydrophilen Glykananteil der Glykopeptide. Die nicht glykosylierten Peptide wurden in diesem Aufreinigungsschritt herausgewaschen. Da sich die MAED-unterstützte Freisetzung der N-Glykane mit der PNGase F als ungeeignet erwies (Abschnitt 2.1.3), erfolgte die Freisetzung der N-Glykane mit PNGase F über Nacht.

2.2.1.2 Massenspektrometrische Analysen von N-Glykanen

Die Charakterisierung von N-Glykanen des humanen Speichels erfolgte am MALDI-TOF-MS und MALDI-TOF/TOF-MS im Positiv- und Negativmodus. Die massenspektrometrischen Analysen im Positivmodus von permethylierten Proben lieferten einen hohen Informationsgehalt über die Struktur der Glykane und deren Isomere (Wada et al. 2007; Jang-Lee et al. 2006).

Exemplarisch sind in den Abbildungen 21 bis 27 MALDI-TOF-MS Profile von permethylierten N-Glykanen der Blutgruppen: 0, A, B, AB, 0-nSe, A-nSe und AB-nSe dargestellt.

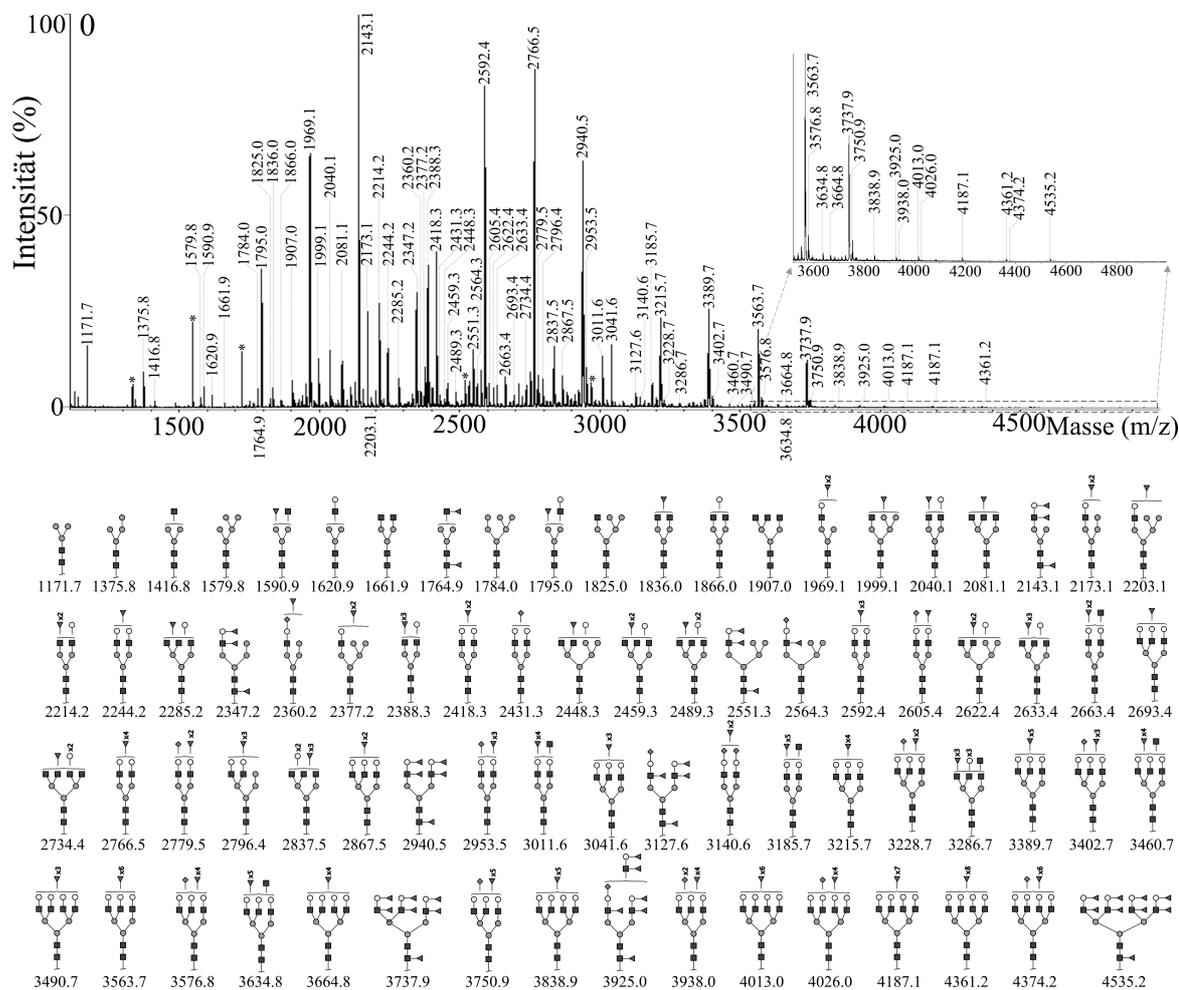


Abb. 21: MALDI-TOF-MS permethylierter N-Glykanstrukturen: N-Glykanprofil der Blutgruppe 0; Die N-Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. * Kontaminierung; Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac; Graues Dreieck, Fuc.

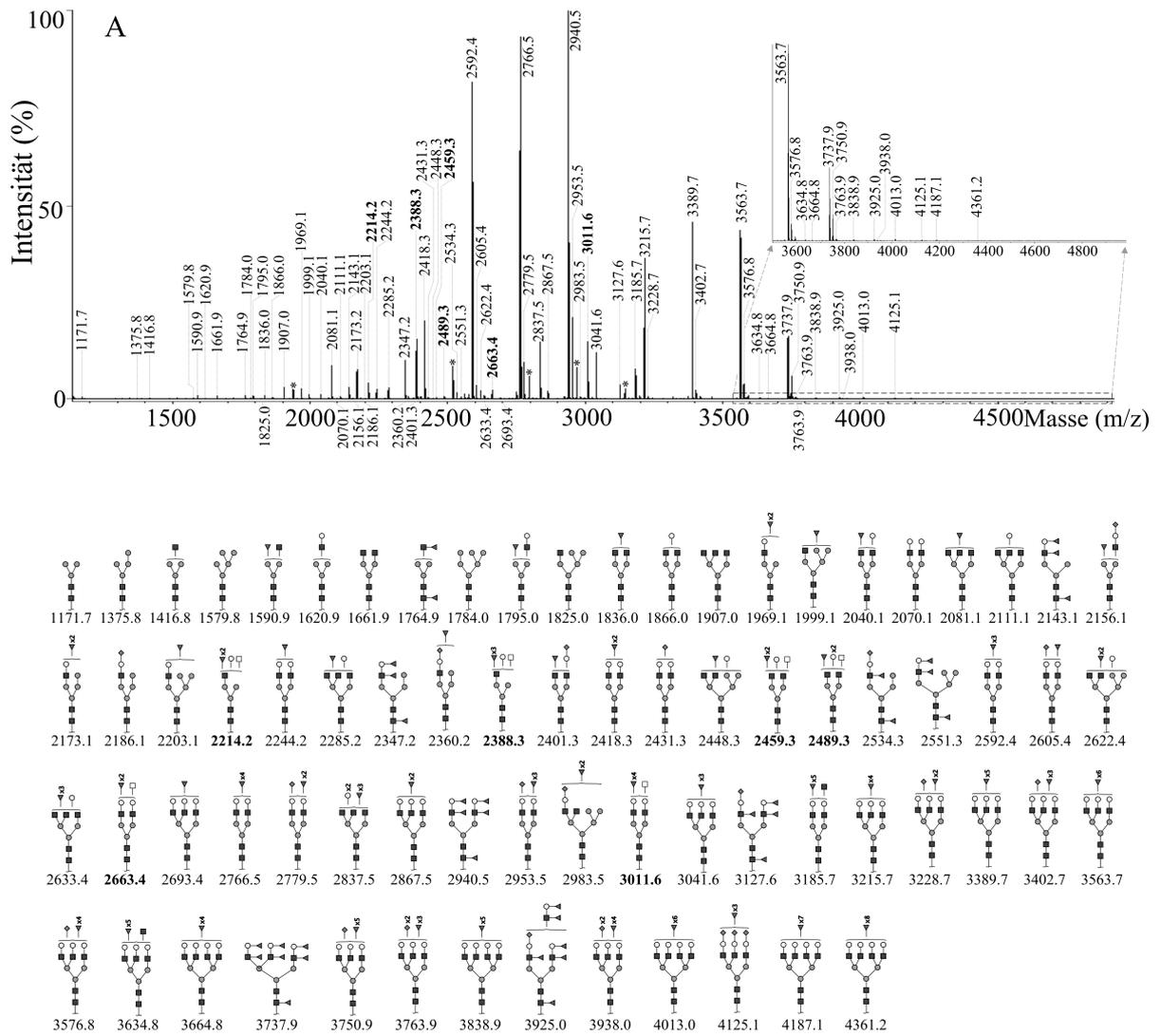


Abb. 22: MALDI-TOF-MS permethylierter N-Glykanstrukturen: N-Glykanprofil der Blutgruppe A; Die N-Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. * Kontaminierung; Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac; Graues Dreieck, Fuc.

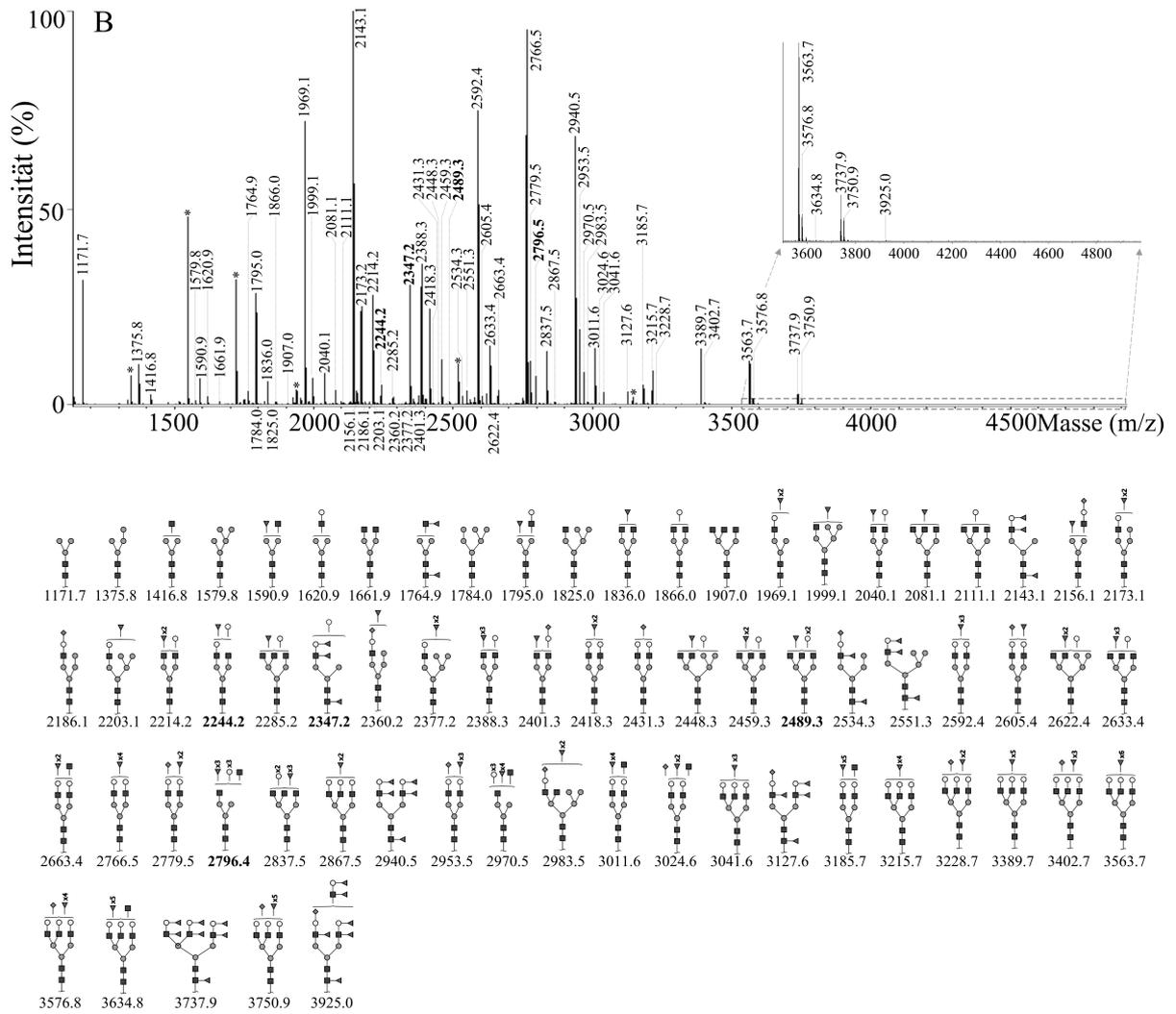


Abb. 23: MALDI-TOF-MS permethylierter N-Glykanstrukturen: N-Glykanprofil der Blutgruppe B; Die N-Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. * Kontaminierung; Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac; Graues Dreieck, Fuc.

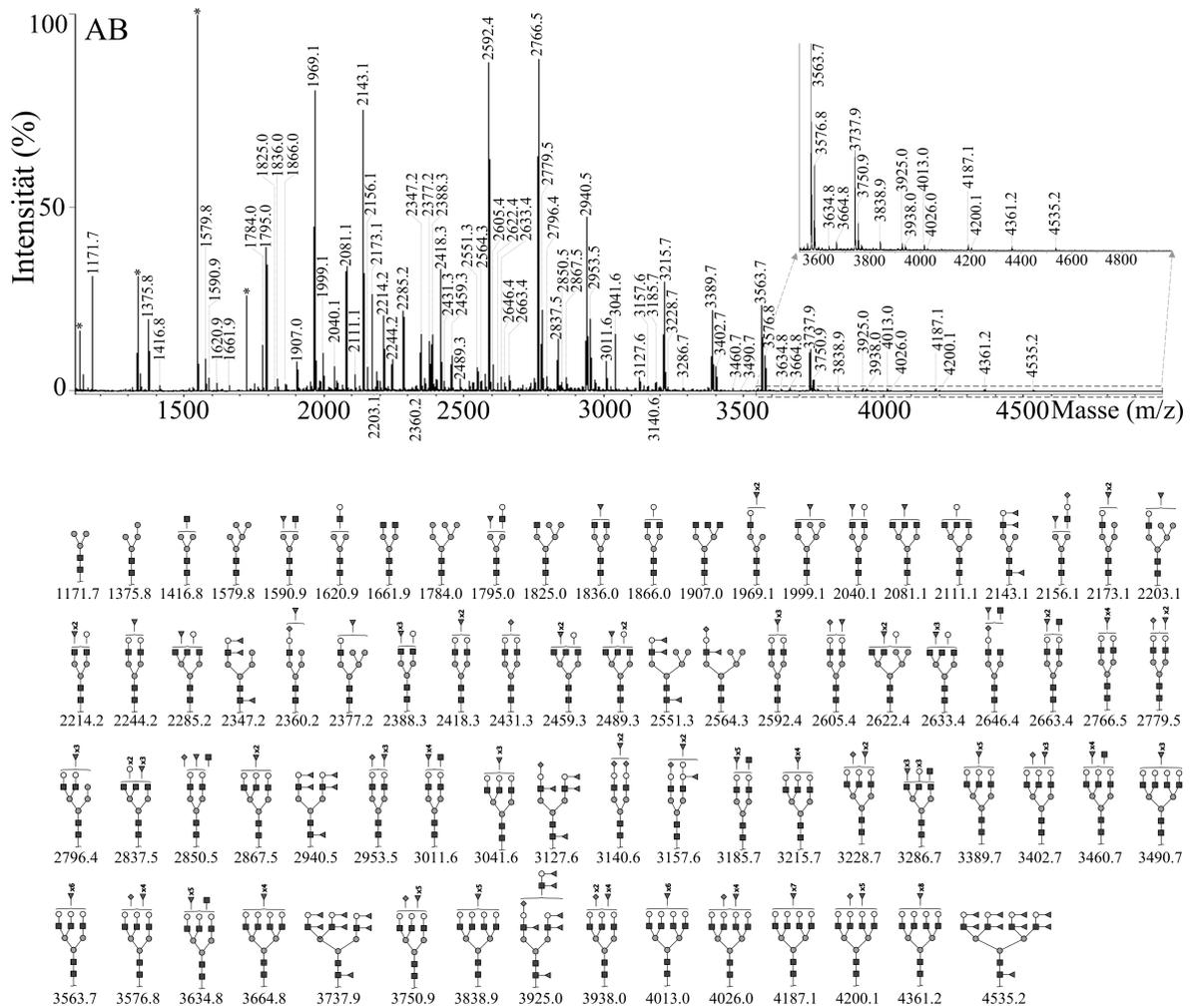


Abb. 24: MALDI-TOF-MS permethylierter N-Glykanstrukturen: N-Glykanprofil der Blutgruppe AB; Die N-Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. * Kontaminierung; Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac; Graues Dreieck, Fuc.

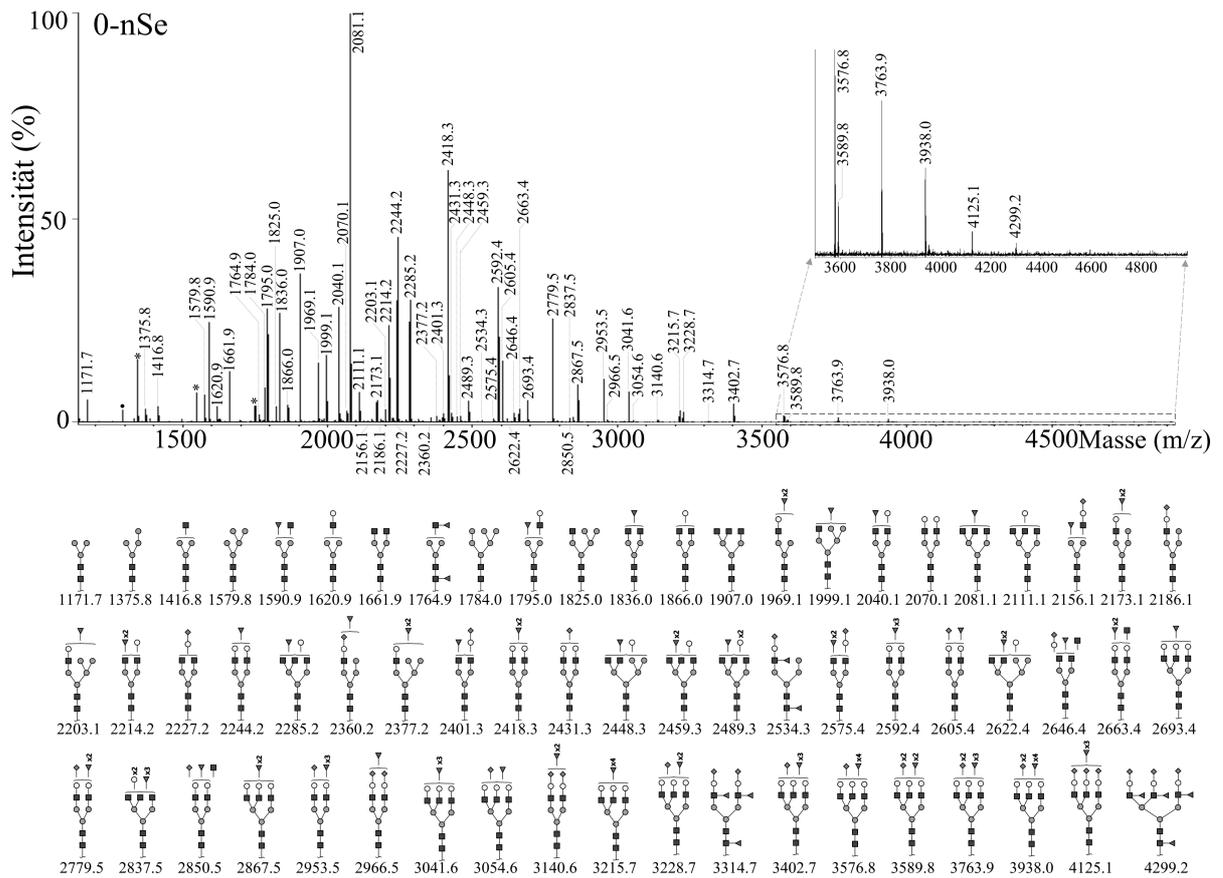


Abb. 25: MALDI-TOF-MS permethylierter N-Glykanstrukturen: N-Glykanprofil der Blutgruppe 0-nSe; Die N-Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. * Kontaminierung; Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac; Graues Dreieck, Fuc.

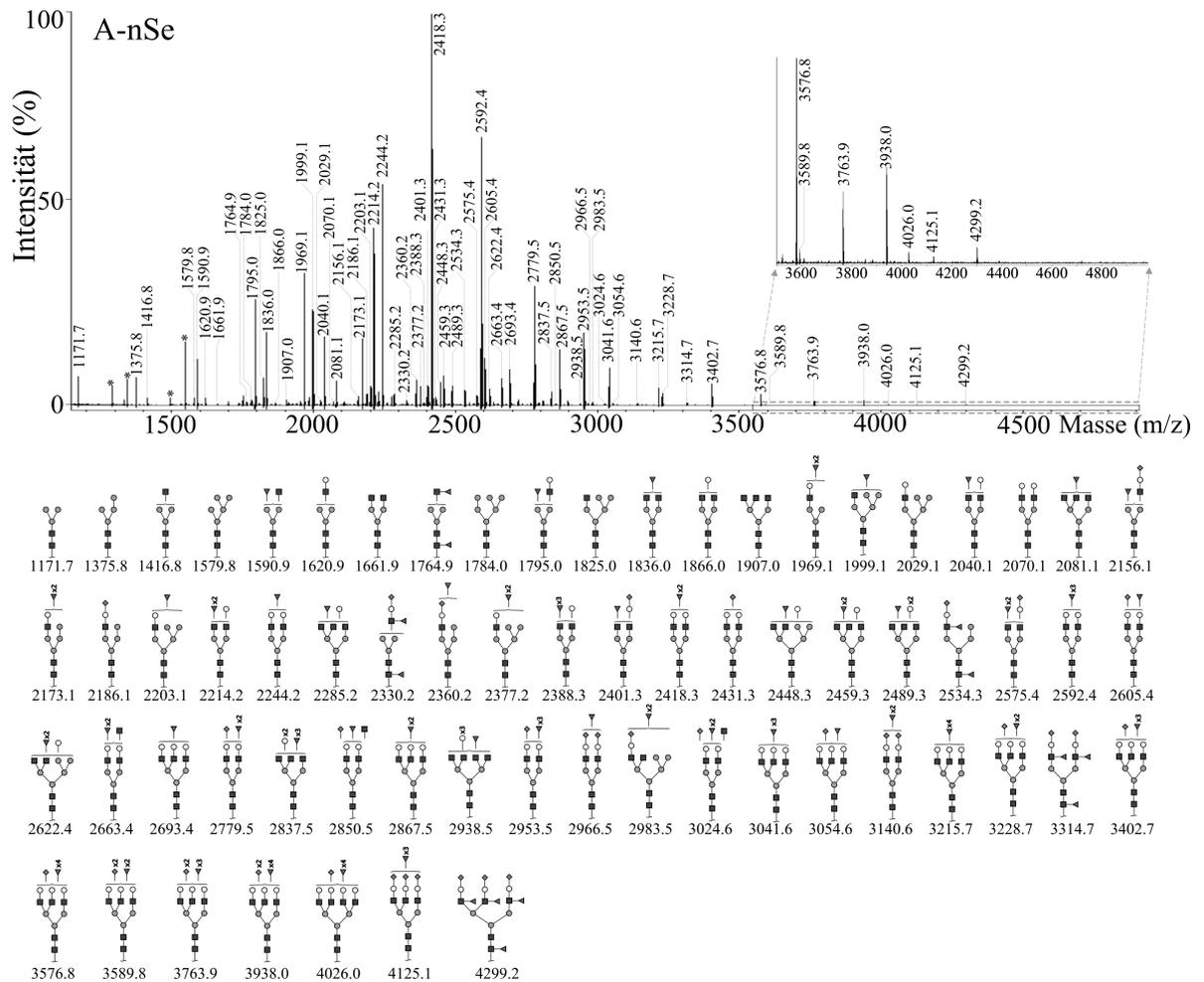


Abb. 26: MALDI-TOF-MS permethylierter N-Glykanstrukturen: N-Glykanprofil der Blutgruppe A-nSe; Die N-Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. * Kontaminierung; Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac; Graues Dreieck, Fuc.

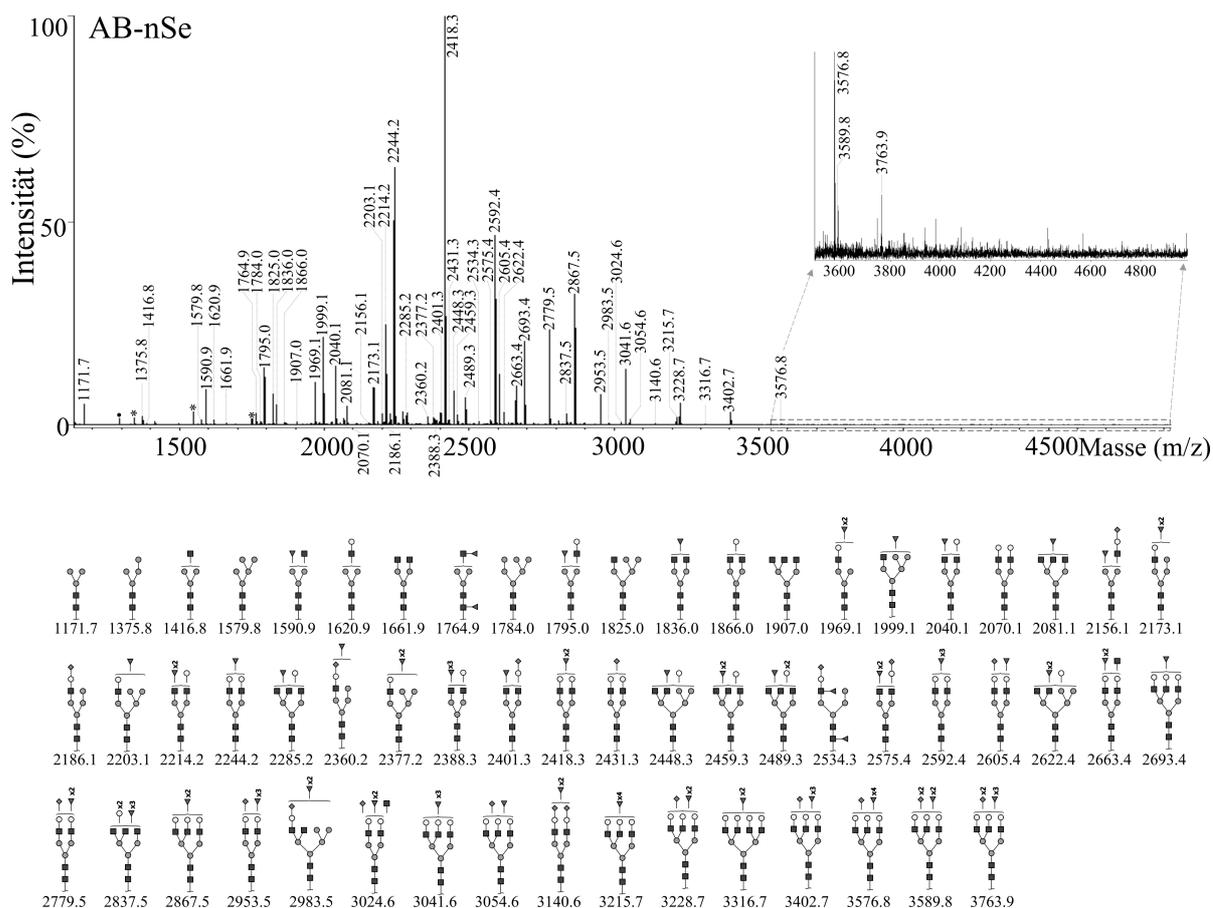


Abb. 27: MALDI-TOF-MS permethylierter N-Glykanstrukturen: N-Glykanprofil der Blutgruppe AB-nSe; Die N-Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. * Kontaminierung; Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac; Graues Dreieck, Fuc.

Insgesamt konnten drei High-Mannose-, 26 Hybrid- und 73 Komplex-Typ N-Glykane identifiziert werden. In allen Spektren wurde ein hoher Grad an Fucosylierung und Sialylierung nachgewiesen. Dabei wurden die Fucosylierung und die Sialylierung sowohl gemeinsam an einem Glykan beobachtet, als auch getrennt. Die identifizierten N-Glykanstrukturen aller Blutgruppen sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Die neutralen High-Mannose-Glykane $Man_{4-6}GlcNAc_2$ treten bei allen Blutgruppen auf. Höhere High-Mannose-Glykane, wie $Man_{7-9}GlcNAc_2$, wurden nicht detektiert. Es konnten folgende Arten des Hybrid-Typs identifiziert werden: (1) neutrale Hybride ohne Fucosen (z. B. m/z 1825,0 in allen Blutgruppen), (2) fucosylierte Hybride (z. B. m/z 2173,1 in allen Blutgruppen) und (3) sialylierte und fucosylierte Hybride (z. B. m/z 2534,3 in A und B). Die Hybrid-Struktur m/z 2186,1 weist als einzige eine Sialinsäure und keine Fucose auf und kommt ausschliesslich bei den Nicht-Sekretoren vor. Ausserdem weisen alle Blutgruppen eine für sich spezifische Diversität an bi-, tri- und

tetraantennären Komplex-Typ N-Glykanen auf. Es konnten 39 fucosylierte, 27 fucosylierte und sialylierte und zwei sialylierte komplexe N-Glykanstrukturen charakterisiert werden (siehe Tabelle 9). Ausserdem konnten fünf neutrale komplexe N-Glykanstrukturen ohne Fucosen detektiert werden (Tabelle 9).

Tabelle 9: Zusammensetzung der N-Glykanstrukturen des humanen Speichels in Abhängigkeit von der Blutgruppe und dem Sekretor-Status.

m/z	Zusammensetzung	0	A	B	AB	0-nSe	A-nSe	AB-nSe
1171,7	H3N2	x	x	x	x	x	x	x
1375,8	H4N2	x	x	x	x	x	x	x
1416,8	H3N3	x	x	x	x	x	x	x
1579,8	H5N2	x	x	x	x	x	x	x
1590,9	H3N3F1	x	x	x	x	x	x	x
1620,9	H4N3	x	x	x	x	x	x	x
1661,9	H3N4	x	x	x	x	x	x	x
1764,9	H3N3F2	x	x	x		x	x	x
1784,0	H6N2	x	x	x	x	x	x	x
1795,0	H4N3F1	x	x	x	x	x	x	x
1825,0	H5N3	x	x	x	x	x	x	x
1836,0	H3N4F1	x	x	x	x	x	x	x
1866,0	H4N4	x	x	x	x	x	x	x
1907,0	H3N5	x	x	x	x	x	x	x
1969,1	H4N3F2	x	x	x	x	x	x	x
1999,1	H5N3F1	x	x	x	x	x	x	x
2029,1	H6N3						x	
2040,1	H4N4F1	x	x	x	x	x	x	x
2070,1	H5N4		x			x	x	x
2081,1	H3N5F1	x	x	x	x	x	x	x
2111,1	H4N5		x	x	x	x		
2143,1	H4N3F3	x	x	x	x			

m/z	Zusammen- setzung	0	A	B	AB	0-nSe	A-nSe	AB-nSe
2156,1	S1H4N3F1		x	x	x	x	x	x
2173,1	H5N3F2	x	x	x	x	x	x	x
2186,1	S1H5N3		x	x		x	x	x
2203,1	H6N3F1	x	x	x	x	x	x	x
2214,2	H4N4F2	x	x	x	x	x	x	x
2227,2	S1H4N4					x		
2244,2	H5N4F1	x	x	x	x	x	x	x
2285,2	H4N5F1	x	x	x	x	x	x	x
2330,2	S1H4N3F2						x	
2347,2	H5N3F3	x	x	x	x			
2360,2	S1H5N3F1	x	x	x	x	x	x	x
2377,2	H6N3F2	x		x	x	x	x	x
2388,3	H4N4F3	x	x	x	x		x	x
2401,3	S1H4N4F1		x	x		x	x	x
2418,3	H5N4F2	x	x	x	x	x	x	x
2431,3	S1H5N4	x	x	x	x	x	x	x
2448,3	H6N4F1	x	x	x		x	x	x
2459,3	H4N5F2	x	x	x	x	x	x	x
2489,3	H5N5F1	x	x	x	x	x	x	x
2534,3	S1H5N3F2		x	x		x	x	x
2551,3	H6N3F3	x	x	x	x			
2564,3	S1H6N3F1	x			x			
2575,4	S1H4N4F2					x	x	x
2592,4	H5N4F3	x	x	x	x	x	x	x
2605,4	S1H5N4F1	x	x	x	x	x	x	x
2622,4	H6N4F2	x	x	x	x	x	x	x
2633,4	H4N5F3	x	x	x	x			
2646,4	S1H4N5F1				x	x		

m/z	Zusammen- setzung	0	A	B	AB	0-nSe	A-nSe	AB-nSe
2663,4	H5N5F2	x	x	x	x	x	x	x
2693,4	H6N5F1	x				x	x	
2734,4	H5N6F1	x						
2766,5	H5N4F4	x	x	x	x			
2779,5	S1H5N4F2	x	x	x	x	x	x	x
2796,4	H6N4F3	x		x	x			
2837,5	H5N5F3	x	x	x	x	x	x	x
2850,5	S1H5N5F1				x	x	x	
2867,5	H6N5F2	x	x	x	x	x	x	x
2938,5	H6N6F1						x	
2940,5	H5N4F5	x	x	x	x			
2953,5	S1H5N4F3	x	x	x	x	x	x	x
2966,5	S2H5N4F1					x	x	
2970,5	H6N4F4			x				
2983,5	S1H6N4F2		x	x			x	x
3011,6	H5N5F4	x	x	x	x			
3024,6	S1H5N5F2			x			x	x
3041,6	H6N5F3	x	x	x	x	x	x	x
3054,6	S1H6N5F1					x	x	x
3127,6	S1H5N4F4	x	x	x	x			
3140,6	S2H5N4F2	x			x	x	x	x
3157,6	S1H6N4F3				x			
3185,7	H5N5F5	x	x	x	x			
3215,7	H6N5F4					x	x	x
3228,7	S1H6N5F2					x	x	x
3286,7	H6N6F3				x			
3314,7	S2H5N4F3					x	x	
3316,7	H7N6F2							x

m/z	Zusammen- setzung	0	A	B	AB	0-nSe	A-nSe	AB-nSe
3389,7	H6N5F5	x	x	x	x			
3402,7	S1H6N5F3	x	x	x	x	x	x	x
3460,7	H6N6F4	x			x			
3490,7	H7N6F3	x			x			
3563,7	H6N5F6	x	x	x	x			
3576,8	S1H6N5F4	x	x	x	x	x	x	x
3589,8	S2H6N5F2					x	x	x
3634,8	H6N6F5	x	x	x	x			
3664,8	H7N6F4	x	x		x			
3737,9	H6N5F7	x	x	x	x			
3750,9	S1H6N5F5	x	x	x	x			
3763,9	S2H6N5F3		x			x	x	x
3838,9	H7N6F5	x	x		x			
3925,0	S1H5N4F6	x	x	x	x			
3938,0	S2H6N5F4	x	x		x	x	x	
4013,0	H7N6F6	x	x		x			
4026,0	S1H7N6F4	x			x		x	
4125,1	S3H6N5F3		x			x	x	
4187,1	H7N6F7	x	x		x			
4200,1	S1H7N6F5				x			
4299,2	S3H6N5F3					x	x	
4361,2	H7N6F8	x	x		x			
4374,2	S1H7N6F6	x						
4535,2	H7N6F9	x			x			

H Hex; N Hexosamin; F Fucose; S Sialinsäure; **blau-fett** charakteristische N-Glykane Sekretor; **rot-fett** charakteristische N-Glykane Nicht-Sekretor.

In Massenspektren von Speichelproben mit Sekretor-Status ist die Gruppe der neutralen fucosylierten komplexen N-Glykane am stärksten vertreten. Die stärkste Fucosylierung

konnte mit neun Fucosen bei der Struktur m/z 4535,2 beobachtet werden (in Blutgruppen 0 und AB). Ausserdem existieren N-Glykanstrukturen, die bevorzugt nur bei den Sekretoren (Blutgruppen übergreifend) vorkommen (Tabelle 9, blau-fett markierte Strukturen in den ersten vier Spalten). In den Massenspektren aller Nicht-Sekretoren dominieren vorwiegend sialylierte komplexe N-Glykanstrukturen. Die Massepeaks für sialylierte Strukturen m/z 2575,4, m/z 2966,5, m/z 3054,6, m/z 3314,7, m/z 3589,8 und m/z 4299,2 kommen nur bei den Nicht-Sekretoren vor (Tabelle 9, rot-fett markierte Strukturen in den letzten drei Spalten). Es existieren jedoch sialylierte N-Glykanstrukturen, z. B. m/z 3127,6 oder m/z 3750,9, die nur bei den Sekretoren vorkommen (Tabelle 9).

Zu den fucosylierten Strukturen gehören die Lewis-Epitope. Diese konnten auf den N-Glykanen in Abhängigkeit des Sekretor-Status identifiziert werden. In Nicht-Sekretor Proben wurden $Le^{a/x}$ (m/z 2244,2) und $sLe^{a/x}$ (m/z 2330,2, m/z 4299,2) detektiert. In Proben mit Sekretor-Status wurden $sLe^{a/x}$ (m/z 2330,2) und $Le^{b/y}$ (m/z 2940,5, m/z 3737,9) detektiert. Die massenspektrometrischen Analysen (MALDI-TOF-MS und MALDI-TOF/TOF-MS) sind nicht in der Lage zwischen Le^x und Le^a und zwischen Le^b und Le^y zu unterscheiden.

Die Fragmentierungsuntersuchungen der N-Glykane (Abschnitt 4.1.4.2.) zeigten, dass fast alle N-Glykansignale eine Mischung aus Isomeren aufweisen. Der Fucosylierungs- und der Sialylierungsgrad spielen dabei eine große Rolle. Die Fucose weist mehrere Verknüpfungsmöglichkeiten auf (z. B. *core*-Fucose, antennäre Fucose, Gal-gebundene oder GlcNAc-gebundene Fucose) und damit mehrere isomere Strukturen. Das Vorhandensein der isomeren Strukturen soll am Beispiel von m/z 2418,3 demonstriert werden. Die Fragmentierungsnomenklatur erfolgte nach Domon und Castello (Domon und Costello 1988).

Die Abbildung 28 zeigt das Fragmentierungsspektrum des N-Glykans m/z 2418,3 der Blutgruppen 0, A, B, AB und A-nSe und die dazugehörenden potentiellen Isomerstrukturen (Abb. 28 rechts). Das N-Glykan m/z 2418,3 ist ein biantennäres N-Glykan mit zwei Fucosen und der Komposition $Fuc_2Hex_5HexNAc_4$. Die Fragmentierungsspektren von m/z 2418,3 der Proben mit Sekretor-Status (Blutgruppe 0, A, B und AB) weisen die Fragmentierungsmasse m/z 432,6 auf, welche als dHex-Hex Sequenz identifiziert werden konnte. Diese Sequenz stellt das Antigen-H ($Fuc(\alpha 1-2)Gal$) und somit ein Charakteristikum der Blutgruppe 0 dar. Die Fragmentmasse m/z 432,6 ist

vom Fragmenttyp C und stimmt mit den isomeren Strukturen 'a', 'b' und 'c' von m/z 2418,3 überein (Domon und Costello 1988). Das Fragmention m/z 1606,2 und das korrespondierende Partnerfragment m/z 833,8, das Le^{b/y}-Epitop, beschreiben vollkommen die isomere Struktur 'a' bei allen Sekretoren (Blutgruppen: 0, A, B und AB). Die Fragmentionen m/z 473,6, m/z 718,7 und m/z 1112,9 deuten auf die isomeren Strukturen 'c' und 'e' mit *core*-Fucose in allen Sekretor Proben hin. Das Vorhandensein von Fragmentionen m/z 938,8 und m/z 1606,2 liefert das Indiz für die nicht *core*-fucosylierte Strukturen 'a', 'b' und 'd'.

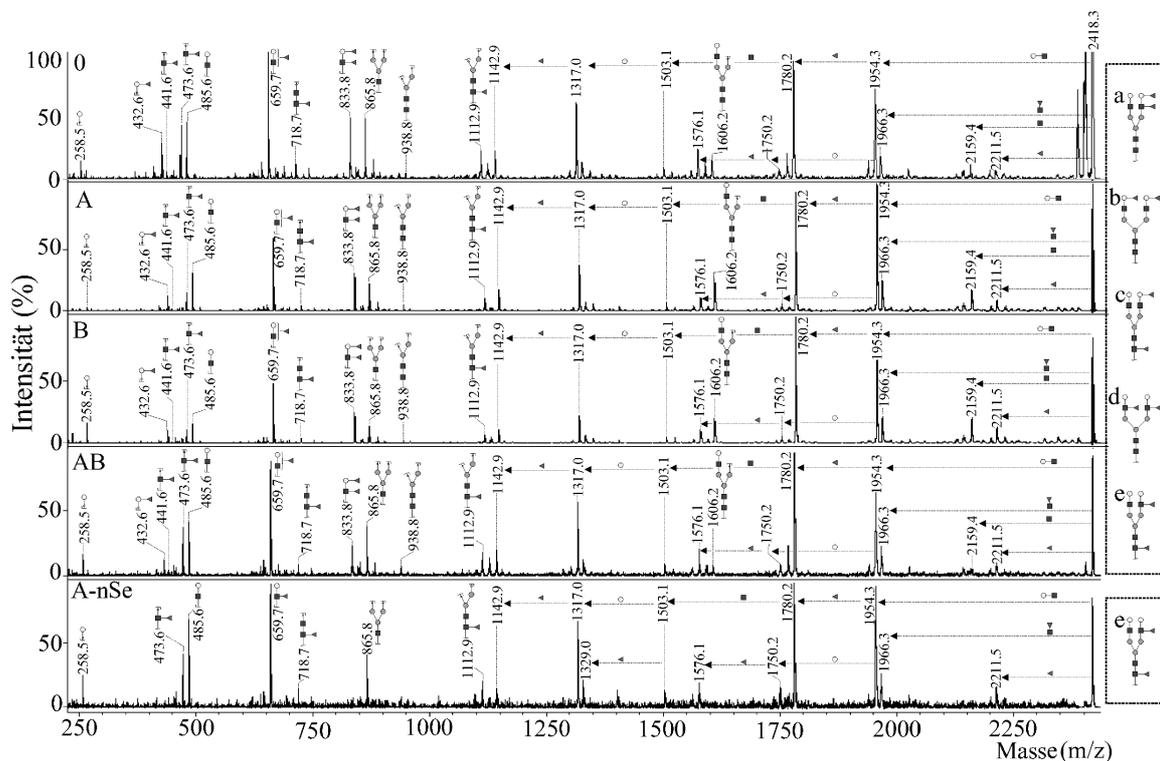


Abb. 28: MALDI-TOF/TOF-MS von m/z 2418,3 N-Glykanstruktur unterschiedlicher Blutgruppen: (O) Blutgruppe 0; (A) Blutgruppe A; (B) Blutgruppe B; (AB) Blutgruppe AB; (A-nSe) Blutgruppe A-nSe; Die N-Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Graues Dreieck, Fuc.

Die in einem Fragmentierungsspektrum auftauchenden Fragmentionen für N-Glykane mit und ohne *core*-Fucosylierung liefern den Beweis für das Vorliegen mehrerer Isomerstrukturen für eine N-Glykanstruktur. Für das N-Glykan m/z 2418,3 in den Sekretor-Spektren sind die fünf isomeren Strukturen 'a' bis 'e' möglich. Das Fehlen der Fragmentionen m/z 938,8, m/z 1606,2 und m/z 2159,4 in dem Fragmentierungsspektrum des Nicht-Sekretors deutet darauf hin, dass hier keine Isomere ohne *core*-Fucose ('a', 'b' und 'd') ausgebildet werden. Ausserdem werden bei Nicht-Sekretoren keine Isomere mit

Antigen-H ('a', 'b', und 'c') ausgebildet. Damit ist für m/z 2418,3 des Nicht-Sekretors nur das Isomer 'e' möglich.

Die Kombination aus MALDI-TOF-MS und MALDI-TOF/TOF-MS erwies sich als eine aussagekräftige Analysemethode, um N-Glykanstrukturen zu identifizieren und zu charakterisieren. Jedoch kann nicht unterschieden werden, welches Isomer bei welcher Blutgruppe bevorzugt vorliegt. In den Abbildungen werden daher die Monosaccharide und ihre Kombinationen, wenn mehrere Isomere identifiziert wurden, über der Klammer eingezeichnet (Abb. 21-27).

Aus der Literatur ist bekannt, dass N- und O-Glykane ABH-Epitope tragen können (Fredriksson et al. 2009). Daher wurden die N-Glykane von Spendern unterschiedlicher Blutgruppen auf Blutgruppenantigene überprüft. Die Fragmentierung höherer N-Glykane (ab m/z 2200 bis 5000) lieferte in der Tat die entsprechenden ABH-Epitope. Die Anzahl der Isomere für ein Massesignal variiert demnach zusätzlich in Abhängigkeit von der Blutgruppe des Probanden. Abbildung 29 zeigt die Isomere mit Antigen-A (Abb. 29A) und Antigen-B (Abb. 29B). Den sechs Massepeaks der Blutgruppe A und vier Massepeaks der Blutgruppe B konnten isomere Strukturen mit Antigen-Epitopen zugewiesen werden.

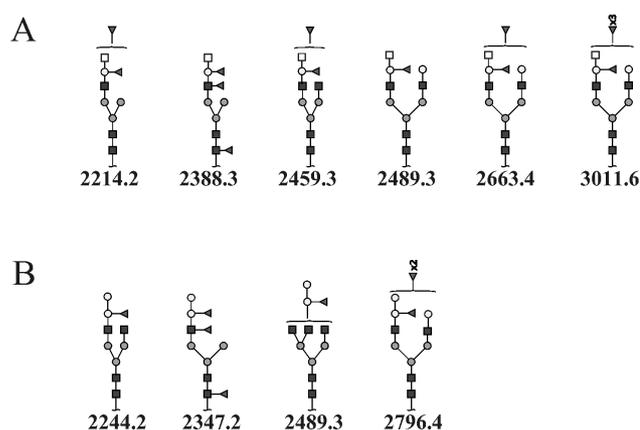


Abb. 29: N-Glykane. A) N-Glykane mit Antigen A; B) N-Glykane mit Antigen B. Die N-Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Graues Dreieck, Fuc; Hell-graues Quadrat, GalNAc.

In dem Fragmentierungsspektrum der N-Glykane aus Abbildung 29 der Blutgruppe A wurde eine Erhöhung der Intensität des Fragmentions m/z 678,7 beobachtet. Die Masse m/z 678,7 ist ein Fragmention C und m/z 659,7 ist das dazugehörige Fragmention B

(Domon und Costello 1988). Beide Fragmentionen entsprechen der Masse von drei Monosacchariden: dHex, Hex und HexNAc. In den Fragmentierungsspektren der Blutgruppen 0 und B wies das Fragmention B (m/z 659,7) eine höhere Intensität auf und im Falle der Blutgruppe A dominierte das Fragmention C (m/z 678,7). Die Vermutung ist, dass in den Blutgruppen 0 und B die Sequenz der drei Monosaccharide für m/z 659,7 tHex-(dHex-)HexNAc und dHex-Hex-HexNAc ist. Die beiden möglichen Sequenzen für m/z 659,7 wurden durch das Auftreten der Fragmentionen m/z 258,5 (terminale Hex) und m/z 432,6 (Antigen-H) bestätigt. In den Fragmentierungsspektren der N-Glykane aus Abbildung 29 der Blutgruppe A war die Intensität des Signals von Fragmention C m/z 678,7 erhöht, für welches die Sequenz tHexNAc-(dHex-)Hex vorgeschlagen werden kann. Diese Sequenz entspricht der Struktur des Antigen-A.

Die MALDI-TOF/TOF-MS Analyse der N-Glykane aus Abbildung 29 der Blutgruppe B lieferte ein Fragmention m/z 637,7, welches in den Proben mit Blutgruppe 0 und A nicht auftrat. Die Fragmentmasse m/z 637,7 ist ein Fragmention des Typs C und weist als Sequenz Hex-(dHex)-Hex, die Struktur des Antigen-B, auf.

Die erhöhte Intensität der Fragmentionen m/z 432,6 in Blutgruppe 0, m/z 678,7 in Blutgruppe A und m/z 637,7 in Blutgruppe B demonstriert die Dominanz der Fragmentionen des Typs C für die Antigene. Damit ist die glykosidische Spaltung in das Fragmention C bei Antigen-Epitopen bevorzugt. In den Fragmentierungsspektren der Sekretoren ließ sich neben dem eigenen Antigen in geringen Anteilen auch das Antigen-H nachweisen. In den Fragmentierungsspektren der Blutgruppe 0 wurde nur das Fragment für das Antigen-H beobachtet.

In den Fragmentierungsspektren der Nicht-Sekretoren konnten keine Fragmentionen für die ABH-Epitope nachgewiesen werden. Die Nicht-Sekretoren wiesen mehr sialylierte Strukturen auf, besonders im höheren m/z -Bereich (Tabelle 9). Die Sialinsäuren kommen dabei hauptsächlich an den Galactosen gebunden vor und in geringeren Anteilen an GalNAc.

2.2.1.3 Massenspektrometrische Analyse sulfatierter N-Glykane

Sulfatierte Modifikationen der N- und O-Glykane sind an vielen biologischen Erkennungsprozessen beteiligt (Yu et al. 2009). Shin-Yi Yu et al. berichten, dass sulfatierte Glykane effizient mittels C18-Aufreinigung von den neutralen Glykanformen isoliert werden können.

Die Messung permethylierter N-Glykane im negativen Modus ermöglicht eine Untersuchung der sulfatierten N-Glykane. Da die Sulfatgruppen während der Permethylierungsreaktion intakt bleiben, kann damit gezeigt werden, ob die N-Glykane sulfatiert vorliegen. In der Abbildung 30A ist das MALDI-TOF-MS sulfatierter N-Glykane der Blutgruppe 0 dargestellt. Alle detektierten N-Glykane waren mono-sulfatiert und fucosyliert. Der maximale Fucosylierungsgrad lag bei vier Fucosen (m/z 2808,7). Ausserdem wurde eine monosulfatierte, tri-fucosylierte N-Glykanstruktur mit einer Sialinsäure m/z 2995,7 identifiziert.

Fragmentierungsuntersuchungen sulfatierter N-Glykane zeigten isomere Strukturen für einen Massepeak. Die Abbildung 30B zeigt das MALDI-TOF/TOF-MS der monosulfatierten und monofucosylierten N-Glykanstruktur m/z 1632,6. Die Fucose kann dabei als *core*-Fucose oder antennär gebunden vorliegen. Die Fragmentionen m/z 323,4, m/z 527,4 und m/z 1180,9 verifizieren die N-Glykanstruktur mit der *core*-Fucose (Abb. 30B-a). Die Fragmentionen m/z 513,4 und m/z 701,4 bestätigen die antennäre Fucosestellung in dem N-Glykan (Abb. 30B-b).

Die Position der Sulfatgruppe bestimmt die Isomerenanzahl. Die Sulfatgruppe kann gebunden an der Galactose und am GlcNAc vorkommen, auch wenn Gal oder GlcNAc fucosyliert vorliegen. Ausserdem ist eine sulfatierte sLe^x-Struktur möglich, dabei kann die Sulfatierung am GlcNAc, sowie an fucosylierter und sialylierter Gal vorkommen. Die zusätzlichen isomeren Strukturen durch Sulfatierung erhöhen die Anzahl der N-Glykanstrukturen im humanen Speichel enorm.

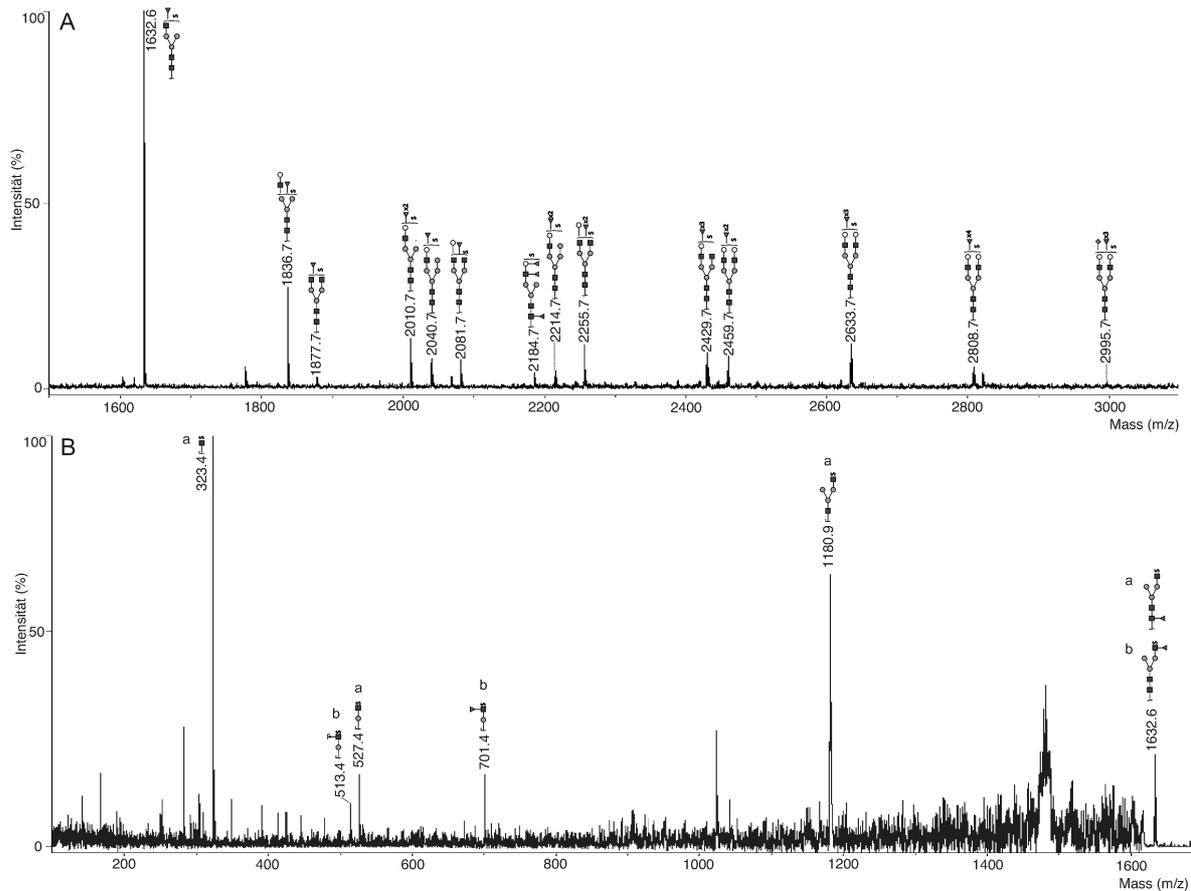


Abb. 30: Sulfatierte N-Glykane der Blutgruppe 0. A) MALDI-TOF-MS der sulfatierten N-Glykane. B) MALDI-TOF/TOF-MS der m/z 1632,6. Die N-Glykane wurden im negativen Modus analysiert und liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$; ‚a‘ und ‚b‘ stellen die Isomere der m/z 1632,6 da in Abhängigkeit der Fucosestellung dar. Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac; Graues Dreieck, Fuc; S, Sulfatgruppe.

2.2.2 O-Glykane

Bis zu 26% der humanen Speichelproteine sind Glykoproteine des Muzin-Typs (Nieuw Amerongen et al. 1995). Die Speichelmuzine sind reich an Hydroxyaminosäuren (Serine und/oder Threonine) und besitzen einen hohen molekularen Glykananteil (Gindzieński und Zwierz 1987; Paszkiewiczgadek et al. 1995). Der O-Glykananteil der Muzine kann bis zu 40% betragen (Strous et al. 1992; Perez-Vilar und Hill 1999). Zu den Funktionen der Muzine gehört der Schutz der Mundoberfläche gegen chemische und mechanische Einwirkungen, sowie gegen Bakterien- und Virenbefall (Tabak et al. 1990).

2.2.2.1 O-Glykosylierung des humanen Speichels

Aufeinander folgende Abspaltung der N- und dann der O-Glykane ermöglicht eine detaillierte Analyse der Glykosylierung von Speichelproteinen. Bevor die N- und die O-Glykane abgespalten werden können, wird der Proteinanteil des humanen Speichels mit Hilfe der MAED-unterstütztem Pronaseverdau in kleine Peptide bis zu einer Aminosäure gespalten. Der MAED-unterstützte Pronaseverdau und die N-Glykanabspaltung mit Hilfe PNGase F wurden im Abschnitt der N-Glykane erläutert (Abschnitt 2.2.1.1.).

Die Abspaltung der O-Glykane erfolgte in nicht-reduktiver β -Eliminierung mit Hilfe des Ammoniaks (Abschnitt 4.1.1.1.). Der Gebrauch von Ammoniak als Base hat zwei Vorteile: einerseits ist Ammoniak leicht aus der Probe zu entfernen, andererseits generiert Ammoniak ein freies reduzierendes Ende, welches durch Fluorophore modifiziert werden kann.

2.2.2.2 Massenspektrometrische Analysen von O-Glykanen

Die MALDI-TOF-MS-Analysen der O-Glykanprofile unterschiedlicher Blutgruppen und Sekretor-Status sind sehr komplex (Abbildung 31A und B). Die massenspektrometrischen Untersuchungen erfolgten an humanen Speichelproben der Blutgruppen 0, A, B, AB sowie A-nSe. Die Zuordnung der Strukturen erfolgte mit Hilfe der TOF/TOF-Analysen und der GlycoWorkBench (Ceroni et al. 2008). In allen untersuchten Proben konnten 105 O-Glykanstrukturen detektiert werden, die eine enorme Heterogenität in Größe, Struktur und Isomervorkommen aufwiesen. Es konnten 64 fucosylierte, 22 sialylierte und fucosylierte, zehn sialylierte und neun O-Glykanstrukturen ohne Fucose und Sialinsäure identifiziert werden (Anhang: Tabelle 10). Die Zusammensetzung der O-Glykane variierte in der Anzahl der Hex, HexNAc, dHex und Neu5Ac. Die O-Glykanprofile der verschiedenen Blutgruppen wiesen deutliche Unterschiede auf. In Tabelle 10 (Anhang) sind alle detektierten und identifizierten O-Glykanstrukturen zusammengefasst. Jeder Massepeak einer O-Glykanstruktur in jeder untersuchten Blutgruppe wurde zusätzlich fragmentiert. Es konnten für die meisten O-Glykanstrukturen 2-5 Isomerstrukturen zugeordnet werden. In einigen Fällen konnten für die gleiche Masse bei verschiedenen Blutgruppen (0, A, B, AB, A-nSe) unterschiedliche Fragmentierungsmuster detektiert werden. Die Fragmentierung der Masse m/z 1141,4 verdeutlicht das Vorkommen der Isomerstrukturen in Abhängigkeit von der Blutgruppe

(Abbildung 32). Die Isomerstrukturen 'a' – 'd' der m/z 1141,4 der Blutgruppe 0 wurden von Thomsson et al. bereits diskutiert und konnten hier bestätigt werden (Thomsson et al. 2002).

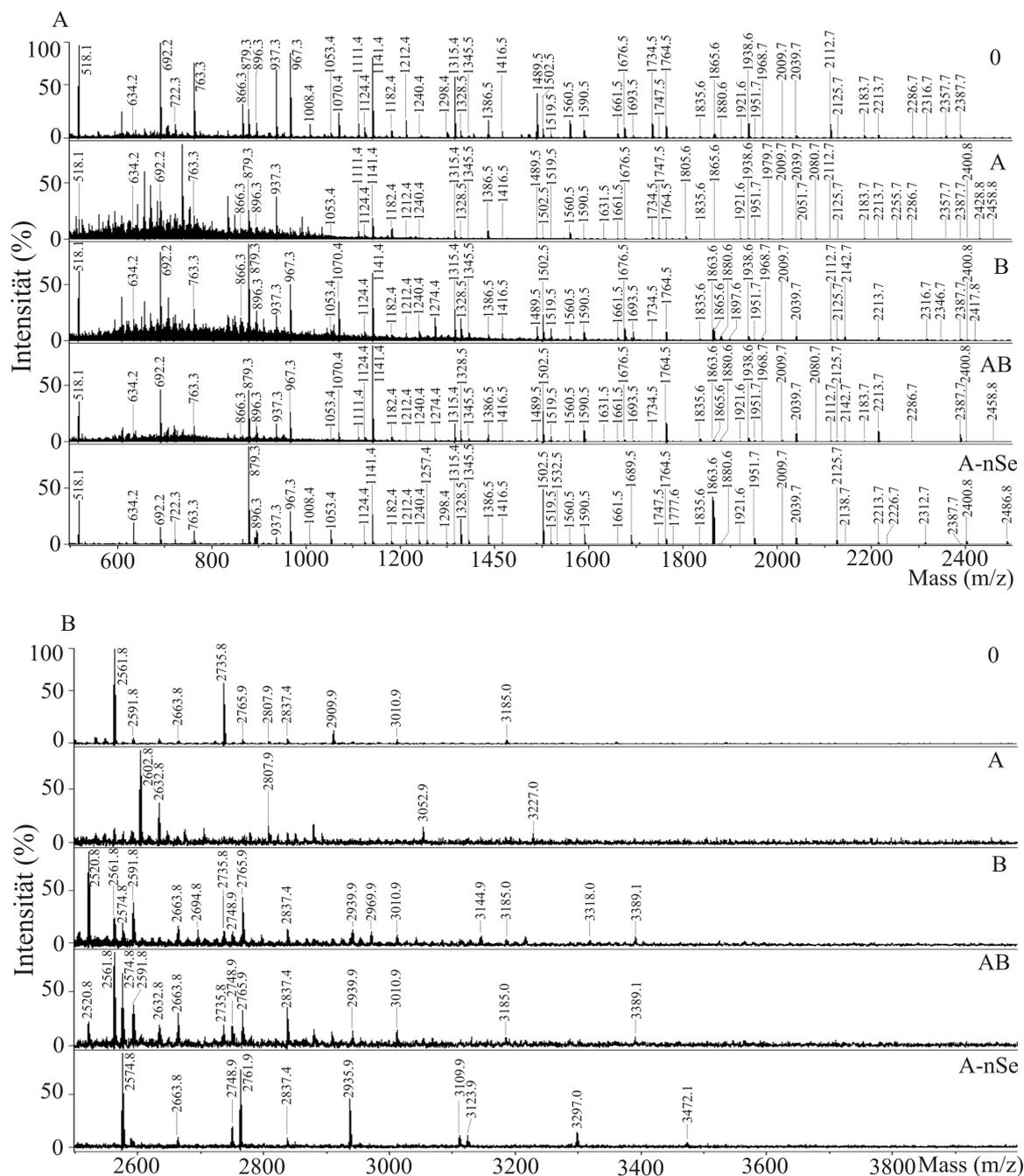


Abb. 31: MALDI-TOF-MS Profile der O-Glykane der Blutgruppen 0, A, B, AB und A-nSe. A) O-Glykane m/z 500 - 2500; B) O-Glykane m/z 2500 - 4000. Die O-Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$.

Die Fragmentierungsuntersuchungen der O-Glykane sollen anhand des Massepeaks m/z 1141,4 beispielhaft erläutert werden.

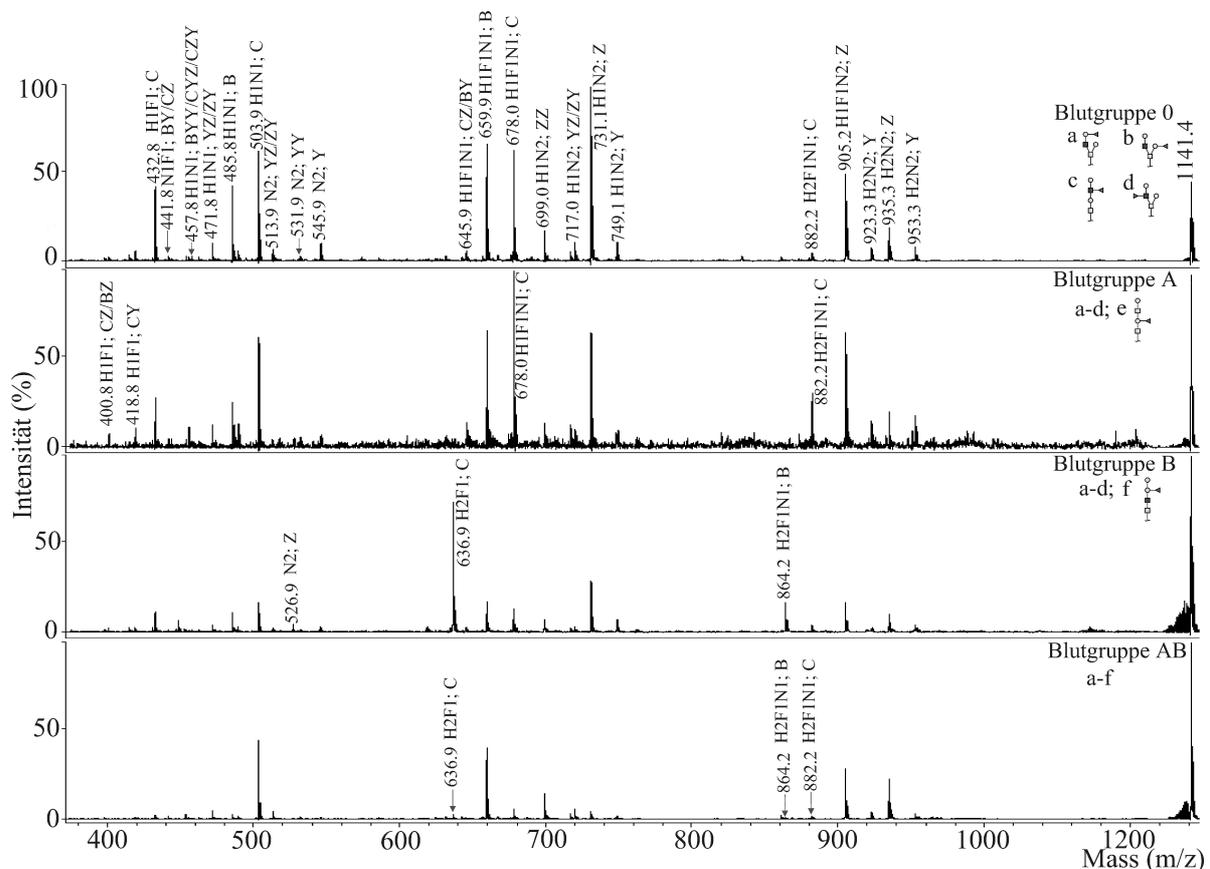


Abb. 32: MALDI-TOF/TOF-MS m/z 1141,4 der Blutgruppen 0, A, B und AB. (0) Blutgruppe 0 mit möglichen isomeren Strukturen: 'a' – 'd'; (A) Blutgruppe A mit möglichen isomeren Strukturen: 'a' – 'd' und 'e'; (B) Blutgruppe B mit möglichen isomeren Strukturen: 'a' – 'd' und 'f'; (AB) Blutgruppe AB mit möglichen isomeren Strukturen: 'a' – 'f'. Die O-Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. Bei den Fragmenten: H Hex; N Hexosamin; F Fucose. Bei den Isomerstrukturen: Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Graues Dreieck, Fuc; Hell-graues Quadrat, GalNAc.

Die Fragmentierung des Massepeaks m/z 1141,4 der Blutgruppe 0 lieferte das Fragmentation m/z 432,8 (theoretisch m/z 433,2) mit der Sequenz dHex-Hex, welche das Antigen-H charakterisiert. Als O-Glykanstrukturen mit Antigen-H werden die Isomere 'a' und 'b' des *core-2*-Typs vorgeschlagen. Die charakteristischen Peaks für das eine oder das andere Isomer wurden nicht beobachtet, daher wurden die beiden möglichen Strukturen dargestellt. Massepeaks der Fragmentationen, die für die Struktur 'a' gefunden wurden, könnten ebenfalls durch das Isomer 'b' entstehen. Für die Isomere 'c' und 'd' liefert das Fragmentation m/z 441,8 vom Typ BY/CZ mit der Sequenz dHex-HexNAc den Nachweis. Das verzweigte Isomer 'd' ist ein O-Glykan vom *core-2*-Typ und das lineare Isomer 'c' ist ein O-Glykan vom *core-1*-Typ. Beide O-Glykanstrukturen beinhalten das

Strukturelement von einer Fucose gebunden an einem GlcNAc. Für die Struktur 'd' wurden keine charakteristischen Peaks beobachtet. Das lineare Isomer 'c' wurde durch die Fragmente m/z 457,8, m/z 645,9 und m/z 882,2 bestätigt. Die Fragmentmasse m/z 457,8 steht für eine Hexose gebunden an einem Hexosamin, mit dem Fragmenttyp BYY/CYZ/CZY (Domon und Costello 1988). Damit kann das Fragmention m/z 457,8 nur die Fragmentstruktur eines GlcNAc mit einer subterminalen Hexose darstellen. Dem Fragmention m/z 645,9 wurde die Sequenz HexNAc-(dHex-)Hex mit Fragmenttyp BY/CZ zugeordnet. Die Fragmentmasse m/z 882,2 vom Typ C steht für die Sequenz Hex-(dHex-)HexNAc-Hex. Damit ist die Struktur 'c' durch mehrere Fragmente eindeutig bewiesen.

Die Fragmentierung von m/z 1141,4 der Blutgruppe B lieferte zusätzliche Fragmente bei m/z 526,9, m/z 636,9 und m/z 864,2. Genau wie bei den N-Glykanen charakterisiert das Fragmention m/z 636,9 (Fragmenttyp C) das Antigen-B Hex-(dHex-)Hex (Abb. 32). Die Fragmentionen m/z 526,9 und m/z 864,2 verifizieren die isomere Struktur 'f'. Die Fragmentmasse m/z 526,9 (Fragmenttyp Z) steht für zwei aufeinander folgende Hexosamine und die Fragmentmasse m/z 864,2 (Fragmenttyp B) liefert die Sequenz Hex-(dHex-)Hex-HexNAc, welche sich um die Masse eines Hexosamin von der Fragmentmasse des Antigen-B unterscheidet.

In dem Fragmentierungsspektrum von m/z 1141,4 der Blutgruppe A ist die Intensitätserhöhung der Fragmentmasse m/z 678,0 vom Typ C gegenüber seiner korrespondierenden Masse m/z 659,9 vom Typ B auffällig (Abb. 32). Dieses Phänomen wurde bereits bei den N-Glykanen beobachtet. Beide Fragmentionen m/z 678,0 und m/z 659,9 entsprechen der Masse von drei Monosacchariden: dHex, Hex und HexNAc. Die Fragmentsequenzen bei der Blutgruppe 0 sind Hex-(dHex-)HexNAc und dHex-Hex-HexNAc. Die Dominanz der Fragmentmasse vom Typ C m/z 678,0 bei Blutgruppe A signalisiert, dass hier die Fragmentmasse für das Antigen-A vorliegt. Bei den N-Glykanen wurden die Fragmentionen für die jeweiligen Antigene vom Typ C detektiert. Bei den O-Glykanen sind die Fragmentionen für die jeweiligen Antigene (demonstriert an m/z 1141,4) ebenfalls vom Typ C. Die Intensitätserhöhung in den beiden Fragmentmassen m/z 400,8 und m/z 418,8 verifiziert die isomere Struktur 'e'. Das Fragmention m/z 400,8 (Typ BY/CZ) steht für die Sequenz dHex-Hex. Damit ist es eine subantennäre Hexose, die eine Fucose trägt. Die Fragmentmasse m/z 418,8 ist vom Typ CY und stellt damit ebenfalls die subantennäre Hexose mit einer Fucose dar. Hier wurde

die glykosidische Bindung so gespalten, dass die Sauerstoffatome von beiden Seiten dem Fragmention m/z 418,8 zugeordnet wurden. Bei der Blutgruppe A wurde eine Intensitätserhöhung des Fragmentions m/z 882,2 Hex-HexNAc-(dHex-)Hex beobachtet. Hier liegt das eigentliche Antigen-A galactosyliert vor. Das Antigen-A mit der Sequenz GalNAc-(Fuc-)Hex ist der A²-Phänotyp vom **Typ-2 A**, welches durch die Aktivität der $\beta(1-3)$ Galactosyltransferase und durch die $\alpha(1-2)$ Fucosyltransferase zum A²-Phänotyp vom **Typ-3 H** ((Fuc-)Hex-GalNAc-(Fuc-)Hex) modifiziert wird. Die erneute Modifizierung durch einen GalNAc-Rest repräsentiert den A¹-Phänotyp (GalNAc-(Fuc-)Hex-GalNAc-(Fuc-)Hex). Hier liegt das Antigen-A linear wiederholt vor. Das erste GalNAc kann durch die A1- oder A2-Transferasen katalysiert werden. Das zweite GalNAc kann nur durch die A1-Transferase übertragen werden. Daher wird bei Antigen-A zwischen A²-Phänotyp und A¹-Phänotyp unterschieden (Varki et al. 2009c).

2.2.2.3 Sekretor-Status

Bei den O-Glykanprofilen der Nicht-Sekretoren konnte ein hoher Sialylierungsgrad der Strukturen beobachtet werden (Abbildung 31 A-nSe). Die Abbildung 33 zeigt das Fragmentierungsspektrum der Struktur m/z 1141,4 der Blutgruppe A Sekretor (A-Se) und der Blutgruppe A Nicht-Sekretor (A-nSe). Im Spektrum des Nicht-Sekretors wurden weniger Fragmentierungspeaks beobachtet als im Sekretor-Spektrum. Das Fragmentierungsspektrum des Nicht-Sekretors zeigt keine Fragmentionen m/z 400,8, m/z 418,8 und m/z 678,0, welche das Antigen-A verifizieren. Das Fragmention m/z 882,2 entsteht bei der Blutgruppe A-Sekretor mit höherer Intensität, und setzt sich neben der Sequenz Hex-(dHex-)HexNAc-Hex hauptsächlich aus der Sequenz mit Antigen-A Hex-HexNAc-(dHex-)Hex zusammen. Die geringe Intensität der Fragmentmasse m/z 882,2 im Spektrum des Blutgruppe A Nicht-Sekretors weist auf das Fehlen des Fragmentions des Antigen-A (Hex-HexNAc-(dHex-)Hex) hin. Bei dem A Nicht-Sekretor wurden neben der O-Glykanstruktur mit dem Antigen-A auch die Strukturen 'a' und 'b' mit dem Antigen-H nicht beobachtet. Es können nur die Strukturen 'c' und 'd' ausgebildet werden. Dabei bestätigen die Fragmente m/z 882,2 und m/z 645,9 eindeutig die Struktur 'c' im Spektrum des A Nicht-Sekretors. Die Fragmentmasse m/z 882,2 besitzt die Sequenz Hex-(dHex-)HexNAc-Hex (Typ C) und die Masse m/z 645,9 steht für die Sequenz Hex-(dHex-)HexNAc (Typ BY/BZ). Für die Struktur 'd' wurden keine eindeutigen

Fragmentmassen gefunden. Da *core-2* das am häufigsten gebildete *core*-Motiv ist, wurde die Struktur 'd' hier vorgeschlagen (Varki et al. 2009c).

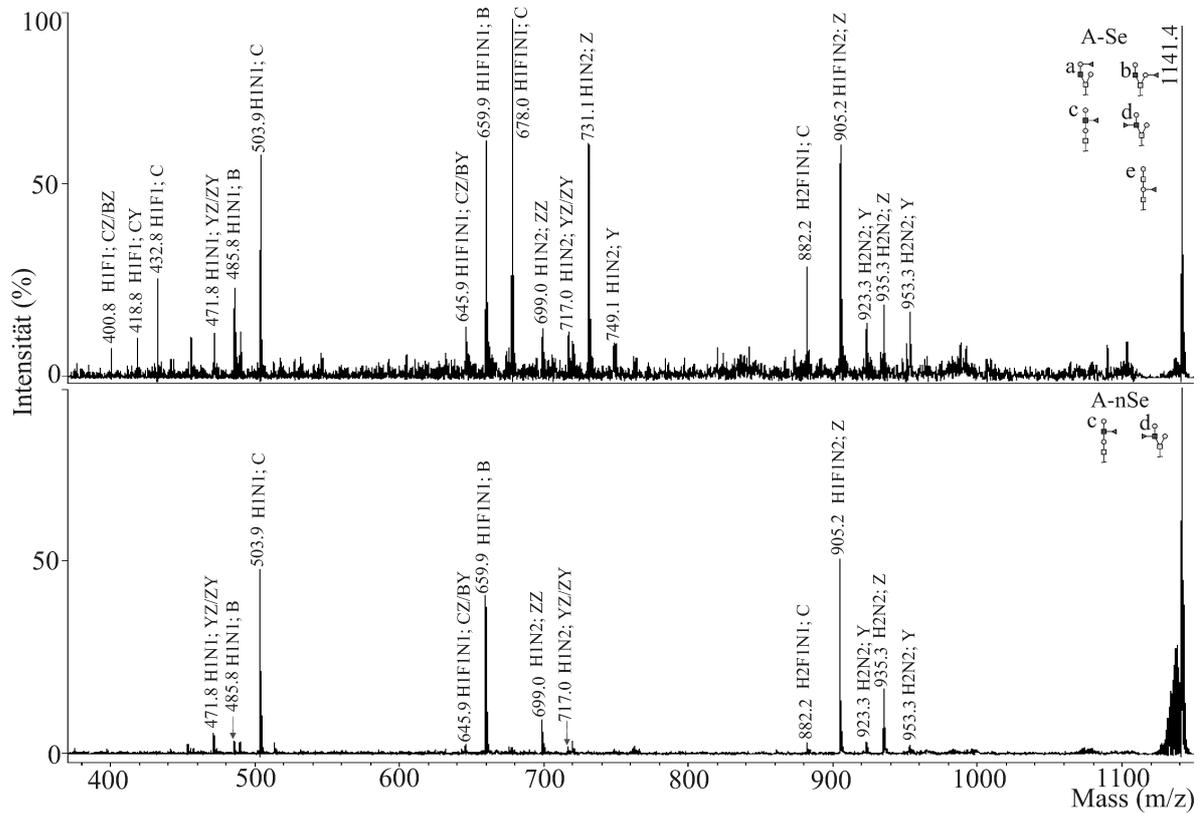


Abb. 33: MALDI-TOF/TOF-MS m/z 1141.4 der Blutgruppen A und A-nSe. (A-Se) Blutgruppe A mit möglichen isomeren Strukturen: 'a' – 'e' (A-nSe) Blutgruppe A-nSe mit möglichen isomeren Strukturen: 'c' und 'd'. Die O-Glykane liegen in ionisierter Form vor $[M+Na]^+$. Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Graues Dreieck, Fuc; Hell-graues Quadrat, GalNAc.

3 Diskussion

3.1 Glykosylierung des humanen Blutserums

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Endo H- und PNGase F-abgespaltene N-Glykom des humanen Blutserums massenspektrometrisch und an der CE-LIF untersucht. Das Ziel war einerseits die Freisetzung und die Aufreinigung der N-Glykane zu optimieren und andererseits die identifizierten N-Glykane in diagnostischen Analysen einzusetzen.

3.1.1 Analyse Endo H-abgespaltener N-Glykane nach chemischer Denaturierung

Die CE-LIF stellt, genau wie die HPLC, eine analytische Methode zum Nachweis von Glykanen und deren Isomeren dar (Guttman 1996; Guttamn et al. 1996; Raju et al. 2000; Mechref et al. 2005). Der Vorteil der CE-LIF gegenüber der HPLC ist die wesentlich kürzere Messzeit. Die chromatographische Auftrennung Endo H-abgespaltener N-Glykane an der HPAEC-PAD ermöglichte eine exakte Zuordnung von neutralen High-Mannosen und sialylierten und asialylierten Hybridstrukturen an der CE-LIF. Ebenso konnten die drei Isomere der High-Man₇ und High-Man₈ an der CE-LIF identifiziert werden. Die massenspektrometrischen Untersuchungen (MALDI-TOF-MS und MALDI-TOF-MS/MS) konnten erfolgreich die identifizierten Oligosaccharide verifizieren. Die schon erwähnte kürzere Messzeit der CE-LIF bietet eine schnelle Methode für die

Untersuchung einer Vielzahl an Proben in kürzester Zeit dar. Ausserdem liefert die Analyse der Expressionsänderungen der Oligosaccharide und ihrer Isomerstrukturen einen Einsatz zur Detektion neuer Biomarker z. B. für Krebs- oder Entzündungskrankheiten. Der erstellte CE-LIF Profil Endo H-abgespaltener N-Glykane aus dem humanen Blutserum wurde zum Vergleich von gesunden Kontrollen und rheumatoider Arthritis Proben eingesetzt. Altersgruppe bei Kontrollen und bei Patienten betrug 40-80 Jahre. Die Analyse von 20 gesunden Kontrollen und 20 Proben von Patienten mit rheumathoider Arthritis lieferten keinen charakteristischen Unterschied beim Vergleich von CE-LIF Elektropherogrammen.

Die Untersuchung der Proben mit rheumathoider Arthritis wurden gewählt, da in der Literatur bekannt ist, dass im Blutserum von Patienten mit rheumatoider Arthritis das Mannose-bindende Lektin (MBL) unterexprimiert (Dolman et al. 2008) und die α -Mannosidase II eine geringe Aktivität aufweist (Chui et al. 2001). Im Hinblick auf das Ergebnis ist es anzunehmen, dass das MBL und die α -Mannosidase II keinen Einfluss auf die Serunglykoproteine ausüben, die die detektierten Oligosaccharide tragen.

3.1.2 MAED-Methode und Endo H

Nach der vollkommenen Charakterisierung der Endo H-abgespaltener N-Glykane mittels CE-LIF, konzentrierte sich die Folgearbeit auf der Optimierung der Freisetzung und der Aufreinigungsmethode der Oligosaccharide. Es konnte gezeigt werden, dass die MAED-Methode (*Microwave-Assisted Enzymatic Digestion*) viele Vorteile gegenüber der Standard-Methode aufweist. Der Vorteil der Mikrowellenanwendung in der enzymatischen Glykanabspaltung ist die enorme Zeitreduzierung sowohl bei der Denaturierung als auch bei dem enzymatischen Verdauungsschritt. Ausserdem ist die Benutzung einer herkömmlichen Mikrowelle ein wichtiger Kostenpunkt. Ein industriell erhältlicher Mikrowellenreaktor ist um einiges teurer. Die Vorteile von herkömmlichen Mikrowellen in Laboratorien werden von vielen Gruppen beschrieben (Liu et al 2008; Sandoval et al. 2007). Zhou et al. berichten, dass die Verdauzeit mittels PNGase F bei 240 Watt sich reduziert auf 20 Minuten (Zhou et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit konnten der enzymatische Denaturierungsschritt mit der Pronase und der Endo H-Verdau mit dem Einsatz der Mikrowelle auf je 5 min reduziert werden bei 700 Watt Mikrowellenstrahlung. Bei 1 und 3 min war der Verdau nicht vollständig, bei 10 min wurde kein Unterschied im Vergleich zu 5 min Inkubationszeit beobachtet. Da die Zeit

der Aufbereitung der Proben so weit wie möglich reduziert werden sollte, wurde für 5 min Inkubationszeit entschieden. Bei einer Mikrowellenstrahlung von 460 Watt und 595 Watt (für 5 min) konnte gezeigt werden, dass der Verdau nicht vollständig ablief. Durch die kreisförmige Anordnung der Proben in der Mikrowelle konnten bis zu zehn Proben gleichzeitig behandelt werden. Um Nebenreaktionen und vorzeitige Inhibierung der Enzyme zu verhindern, hat sich die Benutzung eines Glasbechers gefüllt mit Eiswasser bewährt (Liu et al 2008). Das Eiswasser fängt die überschüssige Mikrowellenstrahlung ab und garantiert so einen erfolgreichen Verlauf der MAED-Reaktion.

Die Optimierung des Aufreinigungsschrittes konnte durch den Einsatz von selbstbefüllten Spitzen mit SP20SS- und Graphit-Material erreicht werden. Dadurch konnte sowohl der zeitliche als auch der Kostenfaktor reduziert werden. Herkömmlich wurde mit den vorgepackten C18 und Carboxylsäulen aufgereinigt. Bei Nutzung von SP20SS und Graphitpulver konnte der Materialverbrauch auf 50 μ L Säulenvolumen für die Aufreinigung von 10 μ L Blutserum reduziert werden. Die zeitreduzierenden Faktoren waren einerseits die Benutzung der Tischzentrifuge und andererseits die geringen Elutionsvolumen (90 μ L) der Proben. Die Gesamtzeit der Aufbereitung der Proben konnte von 20 h 55 min (Standard-Methode) auf 55 min (MAED-Methode) reduziert werden. Dabei konnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erhalten bleiben. Auch der Vergleich zu Ergebnissen der Arbeitsgruppen, die einen Mikrowellenreaktor und Endo H als Enzym nutzen, konnte die Effizienz der MAED-Methode und der neuen Aufreinigung Stand halten (Bereman et al. 2009; Kronewitter et al. 2010).

Die MAED-Methode, die neue Aufreinigung durch SP20SS/Graphit-Spitzen und der schnelle Messung an der CE-LIF wurde auf eine diagnostische Untersuchung der Ovarial- und Colonkarzinom Proben angewendet. Die veränderte Glykosylierung der High-Mannosen und der Hybrid-Typ N-Glykane wird im Zusammenhang mit Brustkrebs erwähnt (Leoz et al. 2011). Ausserdem werden High-Mannosen und Hybrid-Typ Glykane auf den Glykoproteinen CD11 und CD18 exprimiert, welche eine wichtige Rolle in der Immunantwort spielen (Matsui et al. 1992). Die Ergebnisse zeigen eine Unterregulierung der sialylierten Hybridstrukturen (Neu5AcGalMan₄GlcNAc₂; Neu5AcGalMan₅GlcNAc₂) in Ovarialkarzinom. Ausserdem wird eine Unterexpression im zweiten und dritten Isomer der High-Mannose Man₇GlcNAc bei Ovarial- und Colonkarzinom beobachtet. In Colonkarzinom weist der Wert für den ersten Isomer der High-Mannose Man₈GlcNAc mit dem Hybrid GalMan₅GlcNAc₂ eine Unterexpression auf. Wegen der zeitgleichen

Migrierung der beiden Strukturen kann nicht unterschieden werden, welche Struktur oder sogar beide eine Expressionsänderung erfahren.

Die MAED-Methode und die Aufreinigung mit Hilfe der SP20SS/Graphitspitzen bieten eine kosten- und zeitsparende Aufbereitung der Proben dar. Die CE-LIF Messung ermöglicht eine zeitgleiche Analyse der sialylierten und asialylierten Hybrid-Typ N-Glykane sowie der High-Mannosen mit ihren Isomeren. Ausserdem war die diagnostische Anwendung in Ovarialkarzinom erfolgreich.

3.1.3 MAED-Methode und PNGase F

Die Erweiterung der MAED-Methode auf das Enzym PNGase F sollte ein breiteres Glykosylierungsprofil des humanen Blutserums liefern. Die Elektropherogramme PNGase F-abgespaltener N-Glykane waren auf Grund der Vielfalt der Signale nicht auswertbar, daher erfolgte eine massenspektrometrische Untersuchung.

Der MAED-Methode mit der PNGase F bei pH 6,5 erzeugte eine Oxazolinausbildung am reduzierenden Ende der Oligosaccharide. Das Oxazolin wurde durch eine Essigsäurehydrolyse bestätigt. Ausserdem wurde eine pH-Abhängigkeit der MAED-Methode mit Hilfe der PNGase F festgestellt. Bei pH 8,0 konnte die höchste Ausbildung an Oxazolinderivaten beobachtet werden. Verhältnis von Oligosacchariden mit freien reduzierendem Ende (FRE) zu Oxazolin (Oxa) betrug bei pH 1 : 5,55 (Tabelle 8). Bei pH 5,5 dominierten Oligosaccharide mit FRE (1 : 0,47). Die minimale Ausbildung von Oxazolin lag bei dem MAED-Verdau in Wasser vor (1 : 0,12). Ausserdem wurde bei einer Mikrowellenstrahlung von 460 Watt ebenfalls eine Reduzierung des Oxazolinwertes beobachtet (1 : 0,20). Jedoch wurde in beiden Fällen sowohl beim Verdau in Wasser als auch beim Verdau bei 460 Watt keine Oligosaccharidstrukturen ab m/z 2800 beobachtet. Die Pufferung der Reaktionslösung in MAED und die Mikrowellenstrahlung haben einen großen Einfluss auf den Verlauf der Reaktion. Die Oxazolinausbildung ist unter allen durchgeführten MAED-Bedingungen präsent. Damit kann es nicht für diagnostische Untersuchungen eingesetzt werden.

Die Oxazolin-Entstehung könnte einerseits durch *peeling*-Reaktionen hervorgerufen worden sein (Murase und Kajihara 2010), andererseits durch unvollständigen Ablauf der Abspaltungsreaktion im aktiven Zentrum der PNGase F, wo Oxazolin als Zwischenstufe ausgebildet wird (Umekawa et al. 2010).

N-Glykane mit einer endständigen Oxazolingruppe sind von großem Interesse in den enzymatischen Transglykosylierungsreaktionen (Fujita et al. 2001). In der Literatur wird beschrieben, dass die Oligosaccharid-Oxazoline zur Synthese von Glykoproteinen eingesetzt werden. Auf diesem Wege erhaltene Glykoproteine werden zur Erforschung der Beziehung zwischen Glykoproteinstruktur und deren Funktion aber auch in der Entwicklung neuer Glykoprotein-basierender Therapeutika eingesetzt (Davis 2002; Grogan et al. 2002; Kuberan und Lindhardt 2000). Zudem werden Oligosaccharid-Oxazoline als Glykosyldonoren für Endohexosaminidasen (Endo M, Endo A) in Transglykosylierungsreaktionen eingesetzt (Parsons et al. 2009; Li et al. 2005a). Bis heute mussten die Oligosaccharid-Oxazoline über umständliche Syntheseschritte erhalten werden (Li et al. 2005b; Zeng et al. 2006; Li et al. 2005c). Der Einsatz der PNGase F-MAED bildet eine einfache Methode, frei von toxischen Chemikalien und mit großer und vielfältiger Ausbeute an Oligosaccharid-Oxazolinen.

3.1.4 Transglykosylierung

Die während der MAED-Reaktion mit dem Enzym PNGase F wurden Oligosaccharide mit einer Oxazolingruppe generiert. Glykane mit einer Oxazolingruppe am reduzierenden Ende werden zur Synthese von Glykoproteinen eingesetzt. Die gezielte Synthese von Glykoproteinen ist von großer pharmazeutischer Bedeutung (Kobata et al. 1992).

Die Erzeugung von Glykosylakzeptor RNase B mit einem GlcNAc ist durch Endo H-Verdau erfolgreich verlaufen. Als Oxazolinquelle wurde Transferrin gewählt, da dieser eine einzige Glykosylierungsstelle aufweist, die durch einen biantennären bisialylierten, in geringen Anteilen auch einfach sialylierten, N-Glykan des Komplex-Typ besetzt wird. Der generierte Oxazolinderivat wurde zunächst in Transglykosylierungsreaktion in Lösung mit Glykosylakzeptor RNase B-GlcNAc in Gegenwart von Endo M umgesetzt. Der Nachweis des neuerzeugten Glykoproteins aus RNase B und einem N-Glykan mit drei GlcNAc-Resten am *core* konnte nicht erbracht werden.

Nach der Transglykosylierungsreaktion an der PVDF Membran mit anschliessendem PNGase F-Verdau waren die erwarteten N-Glykanstrukturen m/z 2676,2 (biantennäres monosialyliertes N-Glykan) und m/z 3037,5 (biantennäres bisialyliertes N-Glykan). Die MALDI-TOF-MS Analyse nach der Transglykosylierungsreaktion lieferte N-Glykanstrukturen, die entweder nur ein oder zwei N-Acetylglucosaminreste enthielten.

Die erwarteten N-Glykane mit drei N-Acetylglycosaminresten wurden nicht detektiert. Die Hauptstrukturen im Spektrum waren m/z 2547,1 ein biantennäres bisialyliertes N-Glykan mit einem GlcNAc am *core* und m/z 2792,2 ein biantennäres bisialyliertes N-Glykan mit zwei GlcNAc-Resten am *core*. Die PVDF Membran wurde mehrmals gewaschen bevor PNGase F dazugegeben wurde, damit konnte die PNGase F nur gebundene N-Glykane vom PVDF-gebundenen Protein RNase B freisetzen. Die Basis für einen positiven Verlauf der Transglykosylierungsreaktion wurde somit erfüllt. Es ist davon auszugehen, dass das zusätzliche GlcNAc die räumliche Zusammenlagerung im aktiven Zentrum der PNGase F verzerrte und zur Generierung von N-Glykanfragmenten führte.

Die kristallografischen Analysen des Enzyms PNGase F zeigen, dass drei Aminosäuren im aktiven Zentrum der PNGase F (Asp-60, Glu-206 und Glu-118) essentiell für die katalytische Abspaltung des N-Glykans vom Glykoprotein oder Glykopeptid verantwortlich sind (Kuhn et al. 1995). Asp-60 steht im direkten Kontakt zum Sauerstoffatom des ersten N-Acetylglucosaminrestes und spielt eine große Rolle während der katalytischen Reaktion. Glu-206 stellt einen indirekten Kontakt zum N-Glykan über ein Wassermolekül her und ist wahrscheinlich für die Stabilität des Reaktionsintermediates verantwortlich. Glu-118 bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zum Sauerstoffatom des zweiten N-Acetylglucosaminrestes dar (Kuhn et al. 1995). Das Zusammenspiel der Aminosäuren im aktiven Zentrum der PNGase F und der abzuspaltenen Oligosacchariden ist von enormer Wichtigkeit. Jedoch wurden die kristallografischen Analysen mit einem Pentasaccharid durchgeführt, für komplexere N-Glykane liegen noch keine Daten vor. Der komplette katalytische Mechanismus der PNGase F ist noch nicht vollkommen verstanden (Kuhn et al. 1995).

Im Allgemeinen konnte gezeigt werden, dass die MAED-Methode eine einfache Methode zur Erzeugung von Glykanen mit einer Oxazolingruppe darstellt. Deren Umsatz in Transglykosylierungsreaktionen bedarf aber einer weiteren Optimierung.

3.2 Glykosylierung des humanen Speichels

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die N- und O-Glykosylierung der Glykoproteine des humanen Speichels untersucht. Der Hergang der Freisetzung der Oligosaccharide des humanen Speichels wurde zum ersten Mal in dieser Abfolge (1. MAED-Methode, 2.

Aufkonzentrierung der Glykopeptide an der ZIC[®]-HILIC, 3. aufeinanderfolgende Freisetzung von N- und dann O-Glykanen) erfolgreich umgesetzt. Ausserdem wurden Oligosaccharide Blutgruppen- und Sekretor-Status abhängig massenspektrometrischen Untersuchungen unterzogen.

3.2.1 N-Glykane

Die aufgereinigten N-Glykane der Blutgruppen 0, A, B, AB, 0-nSe, A-nSe und AB-nSe wurden mit Hilfe der MALDI-TOF-MS vermessen. Hinsichtlich vorangegangener Arbeiten spielen massenspektrometrische Analysen eine enorme Rolle bei der Identifizierung und Differenzierung der N-Glykanstrukturen und ihrer Isomere (Priem et al. 2008; Ashline et al. 2007; Zhao et al. 2008). Die Glykosylierungsprofile der Sekretoren unterschieden sich eindeutig von denen der Nicht-Sekretoren. Bei den Nicht-Sekretoren dominierten die sialylierten N-Glykanstrukturen, wohingegen bei den Sekretoren fucosylierte N-Glykanstrukturen erhöht exprimiert wurden. Als fucosylierte Motive wurden bei den N-Glykanen antennäre Lewis-Epitope ($Le^{a/x}$, $Le^{b/y}$ und $sLe^{a/x}$), Antigenstrukturen (ABH-Antigene) und *core*-Fucosen detektiert. Ausserdem zeigten massenspektrometrischen Untersuchungen in Abhängigkeit der Blutgruppen, dass die Glykosylierung auch innerhalb der gleichen Blutgruppe variieren kann. Analysen durch Thomsson et al. am Speichelglykoprotein MUC5B zeigen ebenfalls die selben Ergebnisse (Thomsson et al. 2005). MUC5B bildet unterschiedliche Glykoformen aus, welche der Glykoformen davon bevorzugt von den Speicheldrüsen produziert werden, ist Individuen anhängig (Thomsson et al. 2005). Mit Hilfe der Fragmentierungsuntersuchungen konnten isomere Strukturen der N-Glykane detektiert werden. Die Anzahl der Isomeren für eine N-Glykanmasse hängt von der Fucosestellung, Sialylierung, Sulfatierung und dem Verzweigungsgrad ab. Ausserdem variierte die Anzahl der Isomere zusätzlich von dem Sekretor-Status und der Blutgruppe (ABH-Antigene) der Probe.

Auf Grund der Messung permethylierter N-Glykane im negativen Modus konnten sulfatierte N-Glykanstrukturen detektiert werden. Die entsprechenden Fragmentierungsuntersuchungen lieferten für die sulfatierten N-Glykane isomere Strukturen in Abhängigkeit der Stellung der Fucose und des Sulfatrestes. Die Sulfatgruppen wurden antennär mit GlcNAc oder mit Gal verknüpft detektiert. In einigen Isomeren lagen sulfatierte GlcNAc- und Gal-Reste zusetzlich noch fucosyliert vor. Sulfatierte Glykane spielen eine große Rolle z. B. in der Abwehr chemischer Substanzen,

in der hormonellen Biosynthese und beim Schutzmechanismus gegen Bakterien (Ozcan et al. 2013). Die Sulfatierung der Glykane kann als Biomarker für Krankheiten dienen. Zahlreiche sulfatierte Glykanstrukturen weisen eine erhöhte Expression in Tränen- und Speichelflüssigkeiten der Patienten mit Rosazea auf (Vieira et al. 2012; Ozcan et al. 2013). Die Detektion sulfatierter Glykanstrukturen kann neben den massenspektrometrischen Untersuchungen auch mit Hilfe eines Antikörpers, welcher das Glykanmotiv $\text{HSO}_3\text{-3Gal}(\beta\text{1-3})\text{GlcNAc}$ des sulfo-Lewis^a (Su-Le^a) Epitops erkennt, erfolgen (Veerman et al. 1997).

3.2.2 O-Glykane

Die O-Glykane der Glykoproteine des humanen Speichels wurden mittels β -Eliminierung freigesetzt, aufgereinigt und massenspektrometrisch analysiert. Die O-Glykanstrukturen konnten in einem Massenbereich von m/z 500 bis m/z 4000 detektiert werden. Die O-Glykanprofile unterschieden sich in Abhängigkeit der Blutgruppe und des Sekretor-Status. Bei den Nicht-Sekretoren konnte ein hoher Sialylierungsgrad der O-Glykane detektiert werden. Die Sekretorproben wiesen hauptsächlich stark fucosylierte O-Glykanstrukturen auf.

Die O-Glykane sind dafür bekannt, dass sie keine gemeinsame *core*-Struktur besitzen. In der Literatur werden acht *core*-Strukturen für die O-Glykane beschrieben (Varki et al. 2009c). Im Rahmen dieser Arbeit konnten insgesamt fünf Typen der O-Glykanstrukturen identifiziert werden: (1) *core-1* (z. B. m/z 518,1), *core-2* (z. B. m/z 1240,4), *core-3* (z. B. m/z 763,3), *core-4* (z. B. m/z 1008,4) und *core-Gal* (z. B. m/z 634,2). Speichel beinhaltet eine Vielzahl an Glykoproteinen, z. B. die hoch O-glykosylierten Muzine. Die Analysen von Thomsson et al. an dem Muzin MUC5B zeigen, dass dieses Speichelglykoprotein bevorzugt neutrale, sialylierte und sulfatierte O-Glykane mit *core-1* bis *core-4* exprimiert (Thomsson et al. 2002). Bei den O-Glykanen des humanen Speichels konnte eine große Strukturvielfalt nachgewiesen werden. Besonders die vielen Möglichkeiten in der Fucosestellung lieferten viele Strukturisomere für einen Massepeak (2-5 Isomere). Neben den Blutgruppenantigenen (z. B. Antigen-H: m/z 692,2, Antigen-A: m/z 937,3, Antigen-B: m/z 896,3) konnten Lewis-Epitope Le^{a/x} (z. B. m/z 937,3), Le^{b/y} (z. B. m/z 1070,4) und sLe^{a/x} (z. B. m/z 1053,4) nachgewiesen werden. Im Speichel von Sekretoren wird beschrieben, dass Blutgruppenkomponente Le^a und Le^b hauptsächlich auf dem MUC5B exprimiert werden (Prakobphol et al. 1993; Thomsson et al. 2005).

Die Sialylierung wurde an Galactosen (z. B. m/z 879,3, m/z 1257,4) und N-Acetylgalactosaminen (z. B. m/z 1053,4, m/z 1124,4) beobachtet. Die Struktur m/z 1240,4 ist sowohl an der Galactose als auch am N-Acetylgalactosamin sialyliert. Auf Grund der angewendeten Analysetechniken konnte die Sialinsäureverknüpfung nicht dokumentiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die i/I-Epitope bei niedermolekularen O-Glykanen nachgewiesen (z. B. i-Epitop: m/z 967,3, I-Epitop: m/z 1764,5). Die Zuordnung der i/I-Epitope bei den höheren O-Glykanen erwies sich auf Grund der steigenden Isomerenanzahl als schwierig. Die O-Glykanstrukturen des Typ ‚i‘ und ‚I‘ konnten von Karlsson und Thomsson bei direkter Analyse des Speichelglykoproteins MUC7 nachgewiesen werden (Karlsson 2009).

Weiterhin wurden lineare (m/z 1897,6, m/z 1968,7) als auch verzweigte Strukturen nachgewiesen. Bei den Verzweigungen unterscheidet man bi- und triantennäre Strukturen. Die biantennäre Verzweigung liegt in erster Linie auf Grund des *core*-Motivs von *core-2* (z. B. m/z 1689,5) und *core-4* (z. B. m/z 1805,6) vor. Ebenfalls beobachtet man eine biantennäre Verzweigung des *core-1* an der Galactose (z. B. m/z 1764,5 II und III). Die Verzweigung in triantennäre Strukturen liegt vor, wenn das Motiv des *core-2* zusätzlich noch an der Galactose verzweigt wird (z. B. m/z 1865,6). Die isomeren Strukturen mit Antigen-A konnten nur bei kleineren O-Glykanen zugeordnet werden (z. B. m/z 937,3, m/z 1111,4). Bei den komplexeren O-Glykanen konnte massenspektrometrisch zwischen einem N-Acetylgalactosamin und einem N-Acetylglycosamin nicht unterschieden werden. Es konnten O-Glykanstrukturen bis m/z 3472,1 beobachtet werden, jedoch konnte auf Grund geringer Intensität nicht weiter fragmentiert werden. Bis zum Massenbereich von m/z 3000 konnten, bis auf einige Ausnahmen, zu jedem Massepeak O-Glykanstrukturen postuliert werden. Ab dem Massenbereich von m/z 3000 konnten O-Glykane als solche identifiziert werden, jedoch erwies sich die Zuordnung isomerer Strukturen als äußerst schwierig.

Mit Hilfe der Fragmentierungsuntersuchungen konnten isomere Strukturen der O-Glykane detektiert werden. Die Anzahl der Isomeren für eine O-Glykanmasse hängt neben der Blutgruppe auch von der Fucosestellung, Sialylierung und dem Verzweigungsgrad ab. Für die Oligosaccharide aus zwei Monosacchariden konnten mit der angewendeten Massenspektrometrie keine Stereoisomere detektiert werden, welche jedoch nicht ausgeschlossen werden können. Eine vorhergehende chromatographische

Trennung der O-Glykanisomere mit anschließender massenspektrometrischer Untersuchung würde die Informationsdaten vervollständigen.

Die Fragmentierungsuntersuchungen erfolgten an allen charakterisierten O-Glykanen der vier Sekretor Proben (Blutgruppe 0, A, B und AB) und einer Nicht-Sekretor Probe (A-nSe). Die Identifizierung der isomeren Strukturen wurde an der Masse m/z 1141,4 gezeigt (Tabelle 10). Auf Grund der Fragmentmasse m/z 432,6, die das Antigen-H repräsentiert, konnten die isomeren Strukturen 'a' und 'b' der m/z 1141,4 allen Sekretoren (Blutgruppe 0, A, B und AB) zugewiesen werden. Die Isomere 'e' und 'f' tragen die Blutgruppenantigene. Das Isomer 'e' trägt das Antigen-A und 'f' das Antigen-B. Für die Nicht-Sekretor Probe A-nSe wurde eine geringere Anzahl an Fragmenten beobachtet, als bei Sekretor Proben. Für die Masse m/z 1141,4 der A-nSe Probe sind nur Isomere 'c' und 'd' möglich. Für die Nicht-Sekretor Probe A-nSe konnten keine Isomere mit Antigen-Strukturen (ABH-Antigene) zugeordnet werden. Individuen mit Nicht-Sekretor-Status kodieren nicht die $\alpha(1,2)$ -Fucosyltransferase (FUT2). Die $\alpha(1,2)$ -Fucosyltransferase ist verantwortlich für die Ausbildung des Antigen-H (Henry et al. 1995). Der Speichel von Sekretoren enthält mehr isomere Strukturen und wird als ‚aktives‘ Speichel bezeichnet. Das Glykom des humanen Speichels mit Sekretor-Status ist in der Lage Bakterien und Plaque-Partikel in der Mundflora an sich zu binden und zu neutralisieren. Auf diesem Wege schützt ‚aktiver‘ Speichel die Zähne der Sekretoren und beeinflusst das Immunsystem und den Metabolismus (Arneberg et al. 1976; Holbrook und Blackwell 1989; Kaslick et al. 1980).

3.2.3 N- und O-Glykosylierung im Speichel

Die Untersuchungen der Glykosylierungsänderungen der humanen Speichelglykoproteinen bekommen immer mehr Relevanz in der klinischen Forschung. In einigen Studien wird der Speichel dazu benutzt, um den Sekretor-Status zu bestimmen. Einige Erkrankungen konnten in Verbindung mit dem Sekretor-Status gebracht werden. Es wird berichtet, dass die sialylierten Oligosaccharide bei den Sekretoren während der Magenschleimhautentzündung eine erhöhte Expression erfahren (Mahdavi et al. 2002). Individuen mit Nicht-Sekretor-Status haben eine Tendenz zu höherem Risiko für Herzkrankheiten, eine höhere Rate für Zwölffingerdarmgeschwür, für wiederkehrende Harnwegsinfektionen, für Autoimmunerkrankungen wie Sjorgen's Syndrom, Spondylitis

(Wirbelentzündung), reaktive Arthritis und Multiple Sclerosis (D'Adamo 2001; Kelly 2001).

Um Glykanprofile des ganzen Speichels zu analysieren werden Fragmentierungsuntersuchungen herangezogen (Morelle et al. 2004; Spina et al. 2004; Stephens et al. 2004; Yu et al. 2006). Mit Hilfe der Fragmentierungsuntersuchungen konnten isomere Glykanstrukturen identifiziert werden. Auf Grund der Anzahl der isomeren Strukturen der O- und N-Glykane wird es deutlich, dass der humane Speichel viele Aufgaben erfüllt und daher zur diagnostischen Analysen eingesetzt werden kann. Die gut bewährten Biomarker für Krebserkrankungen sind meistens Glykoproteine und der humane Speichel ist reich an Glykoproteinen, z. B. die hoch O-glykosylierten Muzine. Die Veränderungen in der O-Glykosylierung der Muzine wurde bei Patienten mit dem Syndrom des trockenen Auges und dem Syndrom des trockenen Mundes beobachtet (Sidagis et al. 1997; Danjo et al. 1998; Penaloza et al. 1999; Argueso et al. 2003).

Die N- und O-Glykosylierung des humanen Speichels weist eine Vielzahl an Lewis-Epitopen auf. Die Lewis-Epitope sLe^a und sLe^x sind bekannt dafür in vielen Krebserkrankungen involviert zu sein (Kannagi 1997). Der Lewis-Epitop sLe^a wird mit Lungen-, Ovarial-, Leber, Nieren- und Brustkrebs in Verbindung gebracht (Itai et al. 1991). Der Lewis-Epitop sLe^x wird vermehrt in Colonkarzinom, Bauchspeicheldrüse- und Gallenkrebs exprimiert (Kobata und Amano 2005). Der Krebsantigen CA15-3 und der Tumormarker c-erbB-2 sind bekannt als Biomarker für Brustkrebs zu agieren. Es wurde gezeigt, dass der Level des c-erbB-2 und der des CA15-3 im Speichel von Frauen, die an Brustkrebs leiden, ist charakteristisch erhöht im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Streckfus et al. 1999). Ausserdem weist Speichel einen diagnostisch besseren Wert an CA125 (Tumormarker für Ovarialkrebs) als im Blutserum gefunden wird (Chen und Schwartz 1990). Die Glykosylierung des humanen Speichels kann dazu eingesetzt werden, um biochemische Abnormalitäten zu identifizieren und spezifische Krankheiten wie Krebs und Autoimmunkrankheiten zu identifizieren. Der humane Speichel kann als potentielle diagnostische Flüssigkeit in vielen Erkrankungen eingesetzt werden (Kaufman und Lamster 2002).

4 Material und Methoden

Geschützte Warenzeichen sind nicht als solche gekennzeichnet. Aus dem Fehlen kann nicht geschlossen werden, dass der Produktname frei von Rechten Dritter ist.

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

4.1.1.1 Elektrophorese und Western-Blot

- Blot-Apparatur Mini Trans-Blot (Bio-Rad, München)
- Gelscanner GS-800, *Calibrated Densitometer* (Bio-Rad, München)
- Geltrockner mgD-5040 (VWR, Darmstadt)
- Netzgerät PowerPacTM 30000 (Bio-Rad, München)
- Vertikal-Elektrophoresesystem, Mini-Protean 3 System, Multi-Casting Chamber (Bio-Rad, München)

4.1.1.2 Zentrifugen

- Minifuge (VWR, Darmstadt)

- Ultrazentrifuge J2-21 (Beckman, Fullerton, USA)
- Vakuumzentrifuge CentriVac (Heraeus, Hanau)
- Vakuumzentrifuge Univapo 150 ECH (Uniequip, Planegg)

4.1.1.3 Sonstige Geräte

- Analysenwaage (Sartorius, Göttingen)
- Dionex ISC-3000 (Dionex, Idstein)
- Heizblock Digi-Block (Laboratory Devices Inc., USA)
- Horizontalschüttler Unimax 1000 (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach)
- Inkubationshaube Unimax 1010 (Heidolph, Kelheim)
- Inkubator 1000 (Dionex, Idstein)
- Kapillarelektrophorese CE-LIF P/ACETM MDQ System (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)
- 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)
- Mikrowelle (Severin 700)
- 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)

4.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmittel

- 1,4-Dithioerythriol (DTE) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- super 2,5-Dihydroxybenzoesäure (sDHB) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- 2-Aminobenzamid (2AB) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- 2-Mercaptoethanol (Roth, Karlsruhe)
- 6-Aza-2-thiothymin (ATT) (Sigma-Aldrich, Steinheim)

- 8-Aminopyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (APTS) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure (ACCA) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Acetonitril (ACN) (VWR, Darmstadt)
- Aceton (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Acrylamid-Bisacrylamid Fertiglösung 30% (37,5:1) (Merck, Darmstadt)
- Ameisensäure (FA *formic acid*) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Ammoniaklösung >25% (Merck, Darmstadt)
- Ammoniumpersulfat (APS) (Bio-Rad, München)
- Bisacrylamid (AppliChem, Darmstadt)
- Bromphenolblau (AppliChem, Darmstadt)
- C18 *Reversed-Phase Extra-Clean Column* (Grace Alltech, Deefield, IL, USA)
- Carbograph *Extra-Clean Column* (Grace Alltech, Deefield, IL, USA)
- CarboPac PA200, 3 x 250 mm (Dionex, Germering)
- Chloroform (Merck, Darmsadt)
- Coomassie *Biosafe* (Bio-Rad, München)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Filterspitzen (Greiner Bio-One, Frickenhausen)
- Glycerin (Glycerol) (Fluka, Buchs, CH)
- Iodacetamid (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Lithiumacetat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Methyljodid (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Natriumacetat (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Natriumcyanoborhydrid (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Natriumdodecylsulfat (SDS) (Serva, Heidelberg)
- Natriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)
- Natriumhydroxid Plätzchen (Merck, Darmsadt)
- Natronlauge (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) (Merck, Darmstadt)
- Polyethylenoxid (PEO), mittlere Molekülmasse 300 kDa (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- PVDF-Membran (Serva, Heidelberg)
- RNase B *from bovine Pancreas* (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- SP20SS, Sepabeads TM (hydrophobes Kunstharz) (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

- Tetrahydrofuran (THF) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Trifluoressigsäure (TFA) (Merck, Darmstadt)
- TRIS (Base) (Roth, Karlsruhe)
- Whatman Filterpapier 3MM (Whatman International Ltd., Maidstone, UK)
- Zellulose mikrokristallin (Merck, Darmstadt)
- ZIC[®]-HILIC *Solid-Phase Extraction (SPE) cartridges* (SeQuant, Umea, Sweden)

4.1.3 Enzyme

- Endo- β -Acetylglucosaminidase H (Endo H) aus *Escherichia coli* (Roche Applied Science, IN)
- Neuraminidase (Sialidase) aus *Arthobacter ureafaciens* (Roche, Mannheim)
- Peptide- N^4 -(*N*-Acetyl- β -glucosaminy)l Asparagin Amidase F (PNGase F) aus *Favobacterium meningosepticum* (Roche, Mannheim)
- (α 1-2)Fucosidase aus *Streptomyces sp. 142* (Prozym, San Leandro, USA)
- (α 1-3,4)Fucosidase aus *Xanthomonas manihotis* (Prozym, San Leandro, USA)
- Sulfatase aus *Patella vulgata* (Sigma-Aldrich, MO, USA)
- Endo- β -*N*-acetylglucosaminidase aus *Mucor hiemalis* (Endo M) (TCI Tokyo Chemical Industry Co. Ltd., Japan)

4.1.4 Standards

- Kalibrierstandard *Dextranhydrolysat* (DH) (Oxford Glycosystems, Oxford, UK)
- TSH-2AB (2-AB-gelabelte sulfatierte N-Glykane des *Thyroid Stimulating Hormon*, Arbeitsgruppen-interner Standard)
- Proteinstandard *Precision Plus All Blue* (Bio-Rad, München)
- Interner Standard Maltose (Sigma-Aldrich, Steinheim)

4.1.5 Proben

4.1.5.1 Blutserumproben

Blutserumproben von gesunden Individuen stammen von freiwilligen Probanden und wurden an der Charité Universitätsmedizin (Berlin, Deutschland) gesammelt. Serumproben mit diagnostizierten Ovarialkarzinom, Colonkarzinom und rheumatoider Arthritis wurden vom Institut für Labormedizin und von der Klinik für Gynäkologie zur Verfügung gestellt (mit Zulassung der Charité Universitätsmedizin Berlin: EA4/073/06 und EA1/285/09). Die Blutproben wurden nach 12 Stunden Fasten entnommen und für 30 Minuten zum Sedimentieren stehen gelassen. Zentrifugation der Proben erfolgte bei 1200 x g für 12 Minuten, bei 20 °C. Das aliquotierte Blutserum wird bei -80 °C gelagert.

4.1.5.2 Speichelproben

Die Speichelproben wurden von Freiwilligen nach einer Stunde ohne Essen und Trinken gewonnen. Der Speichel wurde in einem 1,5 mL Eppendorfggefäß gesammelt. Die Zentrifugation erfolgte bei 10,000 x g für fünf Minuten (4 °C). Der klare Speichel wird von den Zellpellets vorsichtig getrennt und bei -80 °C gelagert.

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

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

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

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

4 x SDS-Probenpuffer: 0,3 mM Tris/HCl; pH 6,8; 50% (v/v) Glycerin; 15% (w/v) SDS; 0,015% (w/v) Bromphenolblau; reduzierend: 8% 2-Mercaptoethanol

Während der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die mit SDS geladenen Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt (Laemmli 1970). SDS ist ein

anionisches Detergenz, das sich an das Protein anlagert (ein SDS-Molekül pro zwei Aminosäuren) und das Protein so negativ polarisiert. Dabei wird das Verhältnis von Ladung zu Größe annähernd gleich (Lottspeich und Engels 2006). Proteine wandern nun in Richtung Anode und werden dabei nach ihrer Größe aufgetrennt (kleine Proteine wandern schneller). Die Vernetzung der Gelmatrix kann durch unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen variiert werden, dadurch verändern sich die Porengrößen. Je nach Proteingröße wird ein entsprechendes Gel gewählt. Das Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel. Die in dieser Arbeit benutzten Gele sind in der unten stehenden Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Pipettierschema für Sammel- und Trenngel.

	Sammelgel (4%)	Trenngel (10%)	Trenngel (12%)	Trenngel (15%)
MilliQ-Wasser	2,95 mL	4,80 mL	4,10 mL	3,15 mL
Sammelgelpuffer	1,25 mL	–	–	–
Trenngelpuffer	–	1,70 mL	1,70 mL	1,70 mL
10% (w/v) SDS	50 µL	100 µL	100 µL	100 µL
30%				
Acrylamid/Bisacrylamid	0,65 mL	3,30 mL	4,00 mL	5,00 mL
10% (w/v) APS	50 µL	100 µL	100 µL	100 µL
TEMED	5 µL	10 µL	10 µL	10 µL

Es werden 15 µL Probe mit 5 µL reduzierendem 4 x SDS-Probenpuffer denaturiert (95 °C, 5 min) und dann auf das Gel aufgetragen. Als Proteinmassenmarker wird ein Proteinstandard mitgeführt. Die Gelelektrophorese wird bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel und einer maximalen Spannung von 200 V eine Stunde in SDS-Laufpuffer durchgeführt. Danach werden die Gele dreimal 5 min mit MilliQ-Wasser gewaschen und bei 4 °C gelagert.

4.2.2 Nachweis von Proteinen durch Coomassie-Färbung

Coomassie-Färbung beruht auf der Anlagerung des Triphenylmethanfarbstoffs an die basischen Seitenketten der Aminosäuren innerhalb der Proteinstruktur. Dabei werden Proteine unspezifisch angefärbt. Die nach der Elektrophorese gewaschenen Gele werden 1 h bei RT in der Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend 30 min bei RT in MilliQ-Wasser entfärbt. Die gefärbten Gele werden mit Gelscanner GS 800 dokumentiert.

4.2.3 Western-Blot an PVDF-Membran

Blotpuffer:	25 mM Tris; 114 mM Glycin; 0,1% (v/v) Ethanol
Albumin-Lösung:	5 % (w/v) Albumin in PBS
ABC-Puffer:	50 mM Ammoniumbicarbonat-Puffer

Vor dem Western-Blot wurde Endo H-behandelte RNase B mit Hilfe von SDS-PAGE (12% Gel) getrennt und mit Coomassie gefärbt. Vor dem Aufbau der Western-Blot Apparatur wird PVDF-Membran in Methanol aktiviert. Dazu wird die PVDF-Membran für 10 sec in Methanol getaucht, geschwenkt und mit Wasser gespült. Die Filterpapierstreifen, Schwämme und die PVDF-Membran werden 5 min in Blotpuffer äquilibriert. Der Aufbau der Western-Blot Apparatur erfolgt nach dem *Sandwich*-Verfahren. Zuerst werden die PVDF-Membran und das SDS-Gel von Filterpapier und Schwämmen blasenfrei aufeinander gelegt. Das Ganze wird in eine Tankblot-Apparatur so eingespannt, dass die Membran zur Anode gerichtet ist. Die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran wird unter Kühlung 1 h bei 250 mA durchgeführt. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften die Proteine an der Membranoberfläche. Nach dem Blotten wird die Membran mit MilliQ-Wasser gewaschen. Die blaue Bande an der PVDF-Membran wird ausgeschnitten und mit ABC-Puffer entfärbt.

Anschliessend wird die PVDF-Membran mit Endo H-behandelter RNase B mit Albumin blockiert. Dafür wird PVDF-Membran 20 min in Albumin-Lösung inkubiert und danach gründlich mit MilliQ-Wasser gewaschen. Weiter wird die Membran in Transglykosylierungsreaktion umgesetzt.

4.3 Glykananalytische Methoden

4.3.1 Reduktion und Carboxymethylierung von Proben

Für eine vollständige Deglykosylierung mit Hilfe der Enzyme PNGase F und Endo H wird die Tertiärstruktur der Proteine durch Detergenzien (DTE/IAA) aufgehoben. Die Proben (Blutserum, RNase B) werden nach dem unten stehenden Schema denaturiert und alkyliert (Tabelle 12).

Die Proben werden in Phosphatpuffer gelöst und mit DTE als Denaturierungsreagenz für 45 min bei 60 °C und mit 300 rpm geschüttelt. DTE ist ein Reduktionsmittel, welches die Disulfidbrücken unter Bildung eines freien Thiols spaltet. Durch die IAA-Zugabe und der Inkubation der Lösung für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur wird die Neubildung der Disulfidbrücken verhindert. 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.

Tabelle 12: Denaturierung nach der Standard-Methode.

Nr	Reagenzien	Arbeitsplan
1	Probenvolumen	50 µg RNase B [10µg/1µL] 10 µL Blutserum
2	Phosphatpuffer (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄): <u>PNGase F-Verdau:</u> 200 mM, pH 6,5; <u>Endo H-Verdau:</u> 50 mM, pH 5,5	25 µL
3	DTE (200 mM)	2,5 µL, 45 min, 60 °C, 300 rpm
4	IAA (200 mM)	10 µL, 1 h, RT, im Dunkeln
5	DTE (200 mM)	2,5 µL
6	MilliQ-Wasser	300 µL

4.3.2 Pronase-Verdau nach MAED (Microwave-Assisted Enzymatic Digestion)

Die Aufhebung der Protein-Tertiärstruktur kann auf chemischem (DTE/IAA) oder auf enzymatischem Weg erfolgen. Die enzymatische Denaturierung wird mit Pronase erreicht. Pronase ist ein Gemisch aus mehreren Proteinasen, welche den Proteinrückgrad in kleine Peptidstücke bis zu einzelnen Aminosäuren aufspalten. Die Durchführung der enzymatischen Abspaltung der N-Glykane an der Mikrowelle erfolgt nach dem unten stehendem Schema (Tabelle 13).

Die Proben werden in Phosphatpuffer mit Pronase versetzt. In der Mikrowelle wird ein Glasbecher mit Eiswasser plaziert und um ihn herum die Proben angeordnet. Die Kühlung ist wichtig, um die überflüssige Strahlung abzufangen. Die Proben werden in der Mikrowelle bei 700 Watt für 5 min inkubiert. Der Überschuss an Pronase wird durch kurzes Kochen inhibiert.

Tabelle 13: Denaturierung nach MAED-Methode.

Nr	Reagenzien/Geräte	Arbeitsplan
1	Probenvolumen	50 µg RNase B [10µg/1µL] 10 µL Blutserum
2	Phosphatpuffer (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄): <u>PNGase F-Verdau</u> : 200 mM, pH 6,5; <u>Endo H-Verdau</u> : 50 mM, pH 5,5	50 µL
3	Pronase (1µL)	RNase B: 1 µg [1µg/1µL]; Blutserum: 10 µg [10µg/1µL]
4	MAED	5 min, 700 Watt
5	Inhibierung	95 °C, 5 min

4.3.3 Enzymatische Freisetzung von N-Glykanen

4.3.3.1 PNGase F

Die enzymatische Freisetzung der N-Glykane mit Hilfe der PNGase F erfolgt an Blutserumproben, Speichelproben sowie an RNase B als Standardprotein. PNGase F ist eine Endoglykosidase. Sie spaltet die N-glykosidische Bindung der Asparagin-gebundenen Oligosaccharide (Tarentino et al. 1985; Plummer und Tarentino 1981). Die denaturierten Proben (IAA/DTE oder MAED) werden mit Phosphatpuffer verdünnt und mit PNGase F inkubiert (Tabelle 4). Anschliessend wird die PNGase F bei 95 °C für 5 min inhibiert. Für die weiteren Analysen werden die N-Glykane je nach Probenvolumen über C18- und Carbograph-Säulen oder SP20SS- und Graphitspitzen aufgereinigt und in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingengt.

4.3.3.2 Endo H

Endo H ist eine Endoglykosidase, die Asparagin-gebundene High-Mannose- und Hybrid-Typ N-Glykane abspaltet. Endo H spaltet die Bindung zwischen den beiden N-Acetylglucosaminen (GlcNAc) des Chitobiose-Core (Robbins et al. 1984). Die denaturierten Proben (IAA/DTA oder MAED) werden mit Phosphatpuffer verdünnt und mit Endo H versetzt (Tabelle 14). Nach der enzymatischen Reaktion wird das Enzym bei 95 °C für 5 min inhibiert. Die freigesetzten Glykane werden je nach Probenvolumen über C18- und Carbograph-Säulen oder SP20SS- und Graphitspitzen aufgereinigt und in der Vakuumzentrifuge zur Trockne eingengt.

Tabelle 14: Enzym-Verdau.

Nr	Reagenzien	Arbeitsplan
1	Phosphatpuffer (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄): <u>PNGase F-Verdau:</u> 200 mM, pH 6,5; <u>Endo H-Verdau:</u> 50 mM, pH 5,5	100 µL
2	Enzym: <u>PNGase F:</u> 100 mU; <u>Endo H:</u> 50 mU	über Nacht, 37 °C, 150 rpm bzw. MAED: 700 Watt, 5 min
5	Inhibierung	95 °C, 5 min

4.3.3.3 Transglykosylierungsreaktion

In Lösung

10 nmol Oxazolinderivat (aus desialylierten (1h, 80°C) Transferrin, nach MAED-Methode bei pH 8 abgespalten und über SP20SS/Graphit aufgereinigt) werden mit 3,3 nmol Endo H-behandelter RNase B in Gegenwart von 6 µg Endo M umgesetzt [6µg/1µL_{MilliQ}] im Totalvolumen von 10 µL (9 µL Phosphatpuffer (pH 6,5; 200 mM) und 1 µL Endo M-Lösung). Die Reaktion erfolgt bei 30 °C. Nach den Zeitintervallen: 5 min, 10 min, 15 min, 30 min, 60 min, 90 min, 140 min wird 1 µL Aliquot entnommen und massenspektrometrisch im positiv Modus in ACCA als Matrix vermessen.

Auf PVDF-Membran

Die PVDF-Membran mit Endo H-behandelter RNase B (Abschnitt 4.2.3.) wird mit 10 nmol Oxazolinderivat (sialyliertes Glykananteil aus Transferrin) und 6 µg Endo M im Totalvolumen von 10 µL (9 µL Phosphatpuffer und 1 µL Endo M-Lösung) bei 23 °C 10 min inkubiert. Nach anschliessender gründlicher Waschung mit MilliQ-Wasser erfolgt PNGase F-Verdau. 100 mU PNGase F werden auf die PVDF-Membran gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wird über SP20SS/Graphit-Spitzen aufgereinigt, permethyliert und im positiv Modus mit sDHB als Matrix vermessen.

4.3.4 Chemische Freisetzung von O-Glykanen

4.3.4.1 β -Eliminierung

Die Abspaltung der N-Glykane erfolgt enzymatisch durch PNGase F oder Endo H. Bei O-Glykanen wird nur eine Gal(β 1-3)GalNAc Struktur durch O-Glykanase enzymatisch abgespalten. Alle anderen O-Glykane müssen chemisch von den Glykoproteinen abgetrennt werden. Da die O-glykosidische Bindung des O-Glykans zum Proteinrückgrad basenlabil ist, lassen sich diese durch β -Eliminierung abspalten (Carlson 1968; Rademaker et al. 1993).

Die de-N-glykosylierten Peptide und Proteine tragen noch die O-Glykane. Die O-glykosylierten Peptide und Proteine werden mit 200 µL 25%-igen Ammoniak in einem Thermomixer inkubiert (16 h bei 45 °C). Nach der β -Eliminierungsreaktion wird die Ammoniaklösung in der Vakuumzentrifuge entfernt, mit 100 µL 0,1% TFA versetzt und nochmals bis zur Trockne eingengt. Für weitere Analysen werden die O-Glykane je nach

Probenvolumen entweder über C18- und Carbograph-Säulen oder SP20SS- und Graphitspitzen aufgereinigt und unter Vakuum eingengt.

4.3.5 Isolierung und Aufreinigung von N-Glykanen

4.3.5.1 C18-Säule

Die Trennung des Proteinanteils von dem Glykananteil erfolgt über die C18-Säule. Die langen hydrophoben C18-Ketten binden den Proteinanteil reversibel und die Glykane bleiben in der mobilen Phase. Die Aufreinigung an der C18-Säule erfolgt gemäß den Angaben in der Tabelle 15.

Vor Probenauftrag auf die Säule wird die Probe durch Ansäuern mit TFA auf einen pH-Wert < 4 gebracht. Nach dem Eluieren der Glykane, wird ein unpolares Lösungsmittel (50% ACN, 0,1% TFA) für die Elution des Proteinanteils der Probe gewählt. Die gesammelten Eluate werden in der Vakuumzentrifuge bis zur Trockne eingengt. Im Anschluss werden die gereinigten Glykane für MALDI-TOF-MS- oder CE-LIF-Messung vorbereitet.

Tabelle 15: Schema zur Trennung von Protein- und Glykananteil über die C18-Säule.

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

4.3.5.2 Carbograph-Säule

Die Carbograph-Säule wird zur Entsalzung des Glykananteils eingesetzt (Packer et al. 1998; Ohl et al 2003). Das Graphit-Material besitzt die Eigenschaft mit polaren und ionischen Substanzen Wechselwirkungen einzugehen. Durch die Wahl der Lösungsmittel werden die polaren Oligosaccharide am Graphitmaterial gebunden und aufkonzentriert. Im

Waschschritt werden die vorhandenen Salze (organische Salze aus Probenmaterial oder Puffersalze) entfernt.

Das Äquilibrieren, das Probenauftragen und das Eluieren der Glykane erfolgt nach den Angaben in der Tabelle 16. Die Proben sollen einen pH-Wert < 4 aufweisen. Nach der Aufreinigung werden die Lösungsmittel unter Vakuum eingengt und die Glykane für MALDI-TOF-MS- oder CE-LIF-Messung vorbereitet.

Tabelle 16: Schema zur Entsalzung der Glykane über die Carbograph-Säule.

	Volumen	Lösung
Äquilibrierung 1	3 x 400 µL	80% ACN, 0,1% TFA
Äquilibrierung 2	3 x 400 µL	0,1% TFA
Probenauftrag	3 x 400 µL	Eluat nach C18
Waschen	3 x 400 µL	0,1% TFA
Elution	3 x 400 µL	25% ACN, 0,1% TFA

4.3.5.3 ZIC®-HILIC-Säule

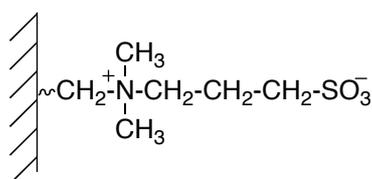


Abb. 34: Zwitterionischer Komponente der ZIC®-HILIC Säule.

Die hydrophile Interaktionschromatographie an der ZIC®-HILIC Säule (*Zwitterionic Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography*) dient zur Aufreinigung von polaren und hydrophilen Substanzen (z. B. Glykopeptide) (Haeggund et al. 2004). Die zwitterionische stationäre Phase ($-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SO}_3^-$) ist an porösem Silica gebunden. Die Aufreinigung erfolgt über hydrophile und schwache elektrostatische Wechselwirkungen der zwitterionischen Phase mit dem Glykananteil der Glykopeptide (Palma et al. 2011).

Die ZIC[®]-HILIC Säule wird in der vorliegenden Arbeit zur Anreicherung und Aufreinigung von Glykopeptiden genutzt. Nach dem MAED-Pronase-Verdau werden die Glykopeptide über eine ZIC[®]-HILIC Säule aufgereinigt. Die Aufreinigung über die Säule erfolgt entsprechend den Angaben in der Tabelle 17. Nach der Äquilibration der Säule wird die Probe geladen. Die Wechselwirkung des Säulenmaterials erfolgt über die Hydroxidgruppen der Glykane. Die unpolaren Peptide werden im Waschschrift entfernt. Das Eluat wird in der Vakuumzentrifuge eingengt und die Glykane für MALDI-TOF-MS- oder CE-LIF-Messung vorbereitet.

Tabelle 17: Schema zur Anreicherung der Glykopeptide über die ZIC[®]-HILIC Säule.

	Volumen	Lösung
Äquilibration 1	3 x 200 µL	0,5% FA
Äquilibration 2	3 x 200 µL	80% ACN, 0,1% FA
Probenauftrag	200 µL	in 80% ACN, 0,1% FA
Waschen	3 x 200 µL	80% ACN, 0,1% FA
Elution	3 x 200 µL	10% ACN, 0,1% FA

4.3.5.4 Aufreinigung über SP20SS-Material

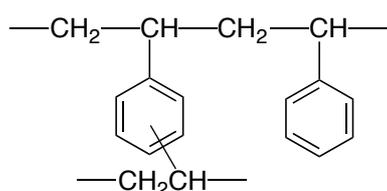


Abb. 35: Polyaromatische hydrophobe Funktion des Kunstharzes.

Das SP20SS-Material basiert auf einem hydrophoben Kunstharz mit polyaromatischen Funktionsgruppen. Das Kunstharz ist in der Lage Detergenzien und Aminosäuren zu adsorbieren und deglykosylierte Peptide und Proteine sowie hydrophobe Kontaminationen zu entfernen. Die Glykane bleiben dabei in Lösung (Huang et al. 2000). Es bietet neben C18-Säule eine effiziente Aufreinigung von hydrophoben Kontaminanten.

Zur Aufreinigung über SP20SS werden Filterspitzen (Pipettenspitzen 20 μ L-Volumen mit Filtereinsatz) mit dem SP20SS-Material befüllt. Dafür wird zunächst das SP20SS-Material aktiviert: eine Minute in Methanol quellen und dann mehrmals mit Wasser waschen (Huang et al. 2000). Die Pipettenspitzen werden mit 50 μ L SP20SS befüllt und kurz zentrifugiert. Die erhaltenen mikro-Säulchen werden in einer Tischzentrifuge platziert und mit 0,1% TFA äquilibriert (3 x 30 μ L). Die Proben werden in 0,1% TFA gelöst und auf die mikro-Säulchen aufgetragen. Die Elution erfolgt ebenfalls mit 0,1% TFA (3 x 30 μ L). Das hydrophobe Material bindet irreversibel den Proteinanteil. Der Durchfluss enthält den Glykananteil der an der Vakuumpumpe eingeeengt wird. Im Anschluss erfolgt die Vorbereitung der Proben für MALDI-TOF-MS- oder CE-LIF-Messung.

4.3.5.5 Aufreinigung über Graphit-Spitzen

Für die Entsalzung über die selbstbefüllten Graphit-Spitzen werden ebenfalls mikro-Säulchen (Pipettenspitzen 20 μ L-Volumen mit Filtereinsatz) benutzt. Das Reinigungsprinzip gleicht einer Carbograph-Säule. Im Vergleich zur Carbograph-Säule haben die Graphit-Spitzen jedoch weniger Fassungsvermögen gegenüber der Probenmenge. Die Aufreinigung erfolgt mit Hilfe der Tischzentrifuge entsprechend den Angaben in der Tabelle 18. Nach dem Eluierungsschritt werden die Glykane in einer Vakuumzentrifuge eingeeengt und für MALDI-TOF-MS- oder CE-LIF-Messung vorbereitet.

Tabelle 18: Schema zur Entsalzung der Glykane mit selbst-befüllten Graphit-Spitzen.

	Volumen	Lösung
Äquilibrierung	1. 3 x 30 μ L	80% ACN, 0,1% TFA
	2. 3 x 30 μ L	0,1% TFA
Probenauftrag	3 x 20 μ L	Eluat nach SP20SS
Waschen	3 x 30 μ L	0,1% TFA
Elution	3 x 30 μ L	25% ACN, 0,1% TFA

4.3.5.6 Aufreinigung über Zellulose

Zellulose ist ein unverzweigtes Polysaccharid, das aus Zelluloseeinheiten aufgebaut ist (β -1,4-glykosidische Bindung des Glukosedimers). In unpolaren Lösungsmitteln bindet Zellulose 2-AB-gelabelte Glykane durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Wasserstoffatom der Hydroxylgruppen und dem Sauerstoffatom der glykosidischen Bindungen. Als polares Lösungsmittel hebt Wasser diese Wechselwirkungen auf und 2-AB-gelabelte Glykane eluieren.

Zellulose wird in Wasser suspendiert und in eine Spitze mit Filter gefüllt (Höhe ca. 3 cm) und kurz zentrifugiert. Die selbstbefüllten Zellulose-Säulchen werden in der Tischzentrifuge platziert. Die Aufreinigung erfolgt entsprechend den Angaben in der Tabelle 19. Das Eluat wird im Vakuum bis zur Trockne eingeengt und die Glykane in MALDI-TOF-MS vermessen.

Tabelle 19: Schema zur Aufreinigung der 2-AB-gelabelten Glykane über Zellulose.

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

4.3.6 Exoglykosidasebehandlung

4.3.6.1 Sialidase

Neuraminidase (Sialidase aus *Arthobacter ureafaciens*) spaltet α 2-3-, α 2-6- und α 2-8-gebundene Sialinsäuren (Uchida et al. 1979). Dafür werden die Proben in 3 μ L MilliQ-Wasser aufgenommen und mit 3 μ L Natriumacetat (50 mM, pH 5) oder 3 μ L Lithiumacetat (50 mM, pH 5) versetzt. Nach der Sialidasezugabe (1 μ L [100 mU/mL]) erfolgt die Inkubation (16 h, 37 °C).

Nach Bedarf werden die Proben entweder über Graphit-Spitzen entsalzt oder gleich permethyliert und in MALDI-TOF-MS oder CE-LIF vermessen.

4.3.6.2 Sulfatase

Sulfatgruppen gehören zu den posttranslationalen Modifizierungen der Glykane (Chengyu et al. 1997). Die Desulfatierung der Probe erfolgte nach dem Desialylierungsschritt. Die Proben werden in 20 µL Ammoniumacetatpuffer (50 mM, pH 5) aufgenommen und mit 2 U Sulfatase versetzt. Nach der Inkubation (16 h, 37 °C) werden die Proben unter Vakuum eingengt. Im Anschluss werden die Proben permethyliert und mit MALDI-TOF-MS vermessen.

4.3.7 Massenspektrometrie

4.3.7.1 MALDI-TOF-MS

Die MALDI-TOF-MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/ Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) ist eine wichtige Methode zur Identifizierung von Oligosacchariden. Die Hauptbestandteile des Massenspektrometers sind die Ionenquelle (MALDI), der Analysator (Flugzeitanalysator: TOF) und der Detektor (Vielkanalplatte: *multichannel panel*). Die Probe wird mit einer niedermolekularen Matrix kokristallisiert. Die Kokristallisation von Analytmolekül und Matrix ist die Hauptvoraussetzung der Messung. Dabei sind die Matrixmoleküle im Überschuss vorhanden, um die hohe Ladung des Lasers abzufangen und die Probenmoleküle schonend zu ionisieren. Als Matrix dienen kleine organische Moleküle, die bei verwendeter Laserwellenlänge eine hohe Energieabsorption besitzen. Als ionisierte Spezies treten vor allem einfach geladene Ionen wie $[M+Na]^+$ und $[M+K]^+$ auf. Mit dem gepulsten Stickstofflaser ($\lambda = 337 \text{ nm}$) werden die Ionen im Hochvakuum in einem elektrischen Feld zum Detektor beschleunigt. Dabei ist die Flugzeit der Moleküle proportional zum Masse-/Ladungs-Verhältnis (m/z). Massen erreichen den Detektor zu unterschiedlichen Zeiten (TOF). Leichte Ionen erreichen höhere Geschwindigkeit und werden zuerst detektiert (Siuzdak 1996). Für die Messung permethylierter Glykane wird der Reflektormodus verwendet. Der Reflektormodus beinhaltet eine Richtungskehr der Ionen durch ein erzeugtes Gegenfeld und bietet durch diese Wegverlängerung eine höhere Auflösung gegenüber dem linearen Modus.

Die permethylierten Glykane werden in 10 μL 75% ACN-Lösung gelöst. Die desialylierten oder ungeladenen Glykane werden in 10 μL Wasser gelöst. Auf ein Stahltarget werden 0,5 μL Probe mit 0,5 μL Matrix gemischt und kristallisiert. Bei der Vermessung von permethylierten Proben im Positivmodus erfolgt die Kalibrierung des Geräts mit dem Kalibrierstandard Dextranhydrolysat (0,15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Bei der Untersuchung im negativen Modus wird der TSH-2AB-Standard (2AB-gelabelte sulfatierte Glykane des *Thyreoida*-stimulierenden Hormons) verwendet. Die Auswertung der Messdaten erfolgt mit FlexAnalysis, GlycoWorkbench (Ceroni et al. 2007) und GlycoPeakfinder (Maass et al. 2007).

4.3.7.2 MALDI-TOF/TOF-MS

Die Fragmentierung eines Mutterions liefert spezifische Fragmente. Die Massenabfolge der entstehenden Fragmente trägt zur Aufklärung der Struktur des Glykans bei (Wuhrer und Deelder 2006; Morelle et al. 2005), denn nicht alle Bindungen in einem Molekül sind gleich stark. Die bei der Ionisierung übertragene kinetische Energie verteilt sich über alle Bindungen, hochangeregte Schwingungszustände werden erzeugt. Dabei werden schwächere Bindungen unter Bildung stabiler Fragmente gebrochen. Die Massenpeaks der Mutterionen werden über den LIFT-Modus fragmentiert. Der LIFT-Modus erlaubt eine gezielte Selektion eines Mutterions zusammen mit seinen Bruchstücken. 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 einem Gas (hier Helium) erzeugt. Die Fragmentierungsmessung erfolgt im Positivmodus.

4.3.7.3 Permethylierung von N- und O-Glykanen

Ansatz einer enzymatischen Desialylierung mit Hilfe der Sialidase bietet die Permethylierung die Möglichkeit die negativen Ladungen der Oligosaccharide zu neutralisieren und damit eine Messung der Glykane im Positivmodus des MALDI-TOF-MS zu erreichen. Bei der Permethylierung werden unter stark basischen Bedingungen die Hydroxylgruppen der Oligosaccharide zu Methylethern und die Sialinsäuren zu Methylestern derivatisiert (Wedepohl et al. 2010; Ciucanu 2006). Dadurch wird die

zeitgleiche Detektion geladener und ungeladener Oligosaccharide im MALDI-TOF-MS ermöglicht.

Für die Permethylierung werden die Proben mit geringer Menge an MilliQ-Wasser in 300 μL -Glasinserts überführt und im Vakuum eingengt. Die Proben werden mit gesättigter NaOH/DMSO-Lösung (3-4 Plätzchen NaOH im 2 mL wasserfreien DMSO zermörsert) versetzt. Nach Inkubation mit NaOH/DMSO-Lösung wird Methyljodid (MeI) hinzugefügt. Im Folgenden wird das Permethylierungsreagenz (NaOH/DMSO und MeI) noch einmal dazugegeben und die Probe inkubiert. Durch die Zugabe von Chloroform und MilliQ-Wasser wird die Permethylierungsreaktion gestoppt. Die organische Phase wird mehrmals mit MilliQ-Wasser gewaschen bis der pH-Wert 7 erreicht wird (pH-Streifen). Die Chloroformphase wird bis zur Trockne unter Vakuum eingengt. Nach der Permerhylierung werden die Glykane massenspektrometrisch analysiert.

4.3.7.4 Fluoreszenzmarkierung mit 2-Aminobenzamid (2-AB)

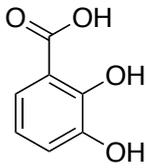


Abb. 16: 2-Aminobenzamid.

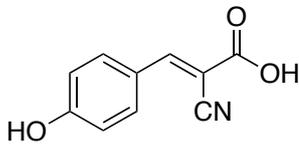
Die 2-Aminobenzamid-Fluoreszenzmarkierung erfolgt am reduzierenden Ende des Glykans. Die Aldehyd- und Ketonfunktion der Glykane reagieren mit 2-AB zur Schiff'schen Base (Azomethin, Imin). Das Natriumcyanoborhydrid reduziert die Schiff'sche Base zu einem sekundären Amin. Mit Hilfe von 2-AB-Fluoreszenzmarkierung werden sulfatierte Glykane gelabelt, um die Messung im Negativmodus des MALDI-TOF-MS zu erleichtern.

Es werden 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ von 2-AB abgewogen und in Essigsäure/DMSO-Gemisch (3:7) gelöst. Anschließend wird Natriumcyanoborhydrid (NaCNBH_3), ein starkes Reduktionsmittel, im Verhältnis 5:6 hinzugegeben. Das Markierungsreagenz (10 μL) wird zur Probe gegeben und diese im Dunkeln inkubiert (2 h, 65 $^\circ\text{C}$, 300 rpm). Die Abtrennung von überschüssigen 2-AB-Reagenz erfolgt über Zellulose (4.3.5.6).

4.3.7.5 Matrix im positiven Modus

**Abb. 37:** 2,3-Dihydroxybenzoic Säure.

Für die Messung von permethylierten, desialylierten und neutralen Glykanen wird 2,3-Dihydroxybenzoic Säure (DHB) als Matrix verwendet. DHB wird in einer Endkonzentration von 10 mg/mL in 10% ACN gelöst und 0,5 μ L davon mit 0,5 μ L Probe auf dem MALDI-Stahltarget gemischt und getrocknet (*Dried-Droplet-Methode*). Die Oligosaccharide reichern sich beim Auskristallisieren im äußeren Bereich des Spots an (aktive Kristalle).

**Abb. 38:** α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure.

Für die Messung von Glykoproteinen, Glykopeptiden, Proteinen und Peptiden wird α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure (ACCA) als Matrix verwendet. ACCA wird in 70% ACN-Lösung mit 0,1% TFA kalt gesättigt gelöst und 15 min im Ultraschallbad behandelt. Nach kurzer Zentrifugation wird 0,5 μ L davon mit 0,5 μ L Probe auf dem MALDI-Stahltarget gemischt und getrocknet (*Dried-Droplet-Methode*).

4.3.7.6 Matrix im negativen Modus

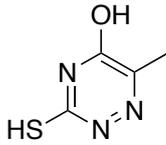


Abb. 39: 6-Aza-2-thiopyrimidin.

Geladene (sulfatierte) 2-AB-gelabelte Glykane werden im Negativmodus vermessen mit 6-Aza-2-thiopyrimidin (ATT) als Matrix. Dafür werden gesättigte ATT-Lösung in Ammoniumcitrat (20 mM) hergestellt und 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Nach kurzer Zentrifugation der ATT-Lösung in der Tischzentrifuge werden 0,5 µL Matrix mit 0,5 µL Probe (in 10 µL Wasser gelöst) vermischt und getrocknet. Nach vollständiger Trocknung der Probe wird das Target zur Erzeugung von kleinen Kristallen zusätzlich im Exsikator für 5 min getrocknet. Für die korrekte Kokristallisation ist eine anschließende Inkubation an der Luft (5 min) nötig. Zur Kalibrierung wird der TSH-2AB-Standard eingesetzt. Proben werden im Reflektormodus des MALDI-TOF-MS gemessen.

4.3.8 Kapillarelektrophorese (CE-LIF)

4.3.8.1 APTS-Markierung von N-Glykanen

Labelreagenz: 100mg/mL APTS in 15%iger Essigsäure

THF/L3: 50% THF; 7,5%AcOH in MilliQ-Wasser

Die Label-Reaktion mit dem sulfonierten Fluorophor 8-Aminopyren-1,3,6-trisulfonsäure (APTS) erfolgt nach Evangelista et al. (Schema 1). Das APTS-Reagenz wird für eine vollständige Markierung der Oligosaccharide im Überschuss eingesetzt (Laroy et al. 2006).

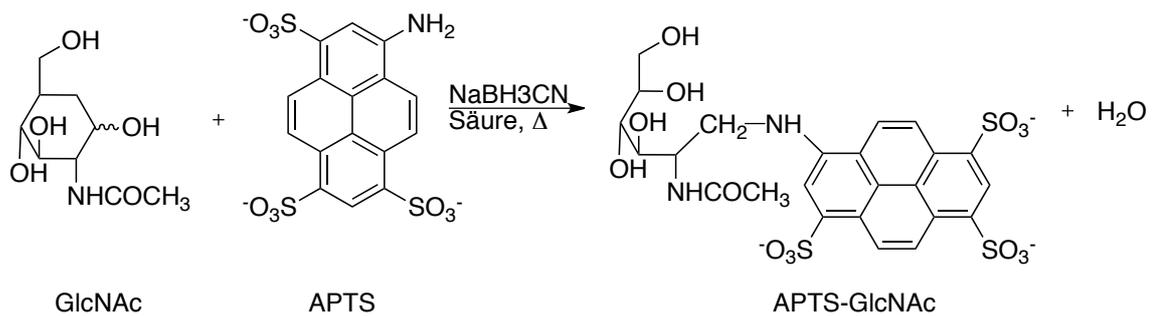


Abb. 40: Schema der reduktiven Aminierung eines N-Acetylglucosamins mit APTS.

APTS ist ein dreifach negativ geladenes Fluorophor, das sich exzellent für die elektrophoretische Trennung der Oligosaccharide eignet (Kabel et al. 2006). Der Vorteil von APTS ist, die hohe Nachweisempfindlichkeit und damit ein geringer Probenverbrauch (Briggs et al. 2009). Für eine Messung mit der CE-LIF müssen die geladenen Glykane desialyliert werden (4.3.6.1), da die zusätzliche negative Ladung der Sialinsäuren zur einer starken Wanderungsverzögerung führt. Bei der Label-Reaktion wird das reduzierende Ende der Glykanstruktur mit APTS unter Einwirkung von Essigsäure und Natriumcyanoborhydrid (NaCNBH₃) verknüpft. Pro Glykanmolekül wird nur ein APTS-Molekül gebunden.

Das Label-Puffer besteht aus 1:1 aus Labelreagenz und THF. Als interner Standard wird Maltose zu der Probe dazugegeben (100 nmol). Zur jeder Probe werden je 3 µL Label-Puffer, 0,5 µL NaCNBH₃ (1 M in THF) und 0,5 µL THF/L3 dazugegeben, gevortext, zentrifugiert und im Dunkeln inkubiert (16 h, 37 °C). Anschließend werden die Proben mit 21 µL MilliQ-Wasser gequenchet. 5 µL der APTS-gelabelten Probenlösung werden mit 20 µL MilliQ-Wasser verdünnt und an der CE-LIF vermessen. Der Rest kann im Dunkeln bei -20 °C gelagert werden.

4.3.8.2 CE-LIF-Analyse

N-CHO-Puffer: 25 mM Acetat-Puffer (pH 4,75); 0,4 % Polyethylenoxid (PEO).

Die Kapillarelektrophorese (CE-LIF) wird als eine analytische Trennmethode für Oligosaccharide eingesetzt. Sie beruht auf dem Effekt des elektroosmotischen Flusses

(EOF). Die zu trennenden Oligosaccharide bewegen sich in einer Elektrolytlösung (N-CHO-Puffer) unter Einfluss eines elektrischen Feldes innerhalb einer Quarzkapillare. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle wird durch die elektrische Ladung, die Form und die effektive Größe sowie Lösungsmittel und die Stärke des elektrischen Feldes bedingt. Durch das *APTS-labeln* sind alle Glykane gleich geladen, so entscheidet die Molekülgröße und -form über dessen Geschwindigkeit (Evangelista et al. 1998). Die Detektion der zu untersuchenden Substanz erfolgt mit laserinduzierter Fluoreszenz (LIF) bei einer Anregung von 488 nm und einer Emission von 520 nm. Die Einstellungen der CE-LIF-Messung sind in der Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 10: Einstellungen und Ablauf der CE-LIF-Messung.

Nr	Abfolge	Einstellung
1	Spülen	30 psi; 2 min
2	Injektion	0,5 psi; 4 s
3	Pause	0,2 min
4	Trennung	30 kV; 20 min

4.3.9 Oligosaccharidtrennung mit HPAEC-PAD

Nach Endo H enzymatischer Abspaltung der Glykane werden diese über eine Anionenaustauschchromatographie, die HPAEC-PAD (*High-pH Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection*) getrennt. Die Detektion der Oligosaccharide erfolgt mit gepulster amperometrischer Detektion (PAD). Der Strom des angelegten Potentials liefert zwei Vorteile, einerseits wird eine elektrochemische Verunreinigung der Elektrode verhindert und andererseits wird die Empfindlichkeit der Detektion erhöht. Unter hohen alkalischen Bedingungen werden Oligosaccharide an der Oberfläche der Elektrode oxidiert, dabei entsteht ein Strom. Die Änderung des entstandenen Stromflusses wird in einer Messzelle gemessen und die Oligosaccharide somit detektiert. Die HPAEC-PAD ist in der Lage, unterschiedliche Oligosaccharide ohne vorangehende Fluoreszenzmarkierungen zu trennen. Die Einstellungen der HPAEC-PAD-Messung sind in der Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 11: Einstellung der HPAEC-PAD-Messung.

Einstellung der HPAEC-PAD-Messung	
Eluent A	0,1 M NaOH
Eluent B	0,6 M Natriumacetat/0,1 M NaOH
Eluent C	0,2 M NaOH
Säules	Dionex CarboPac PA200 (3 x 200mm)
Vorsäule	CarboPac PA200 (3 x 50 mm)
Injektionsvolumen	10 µL
Online-Entsalzer	Dionex CMD-I
Temperatur am Probengeber	10 °C
Temperatur am Säulentermostat und Detektor	25 °C
Fraktionierungstemperatur:	25 °C

Tabelle 12: Ablauf der Oligosaccharidtrennung mit der HPAEC-PAD.

Zeit [min]	Eluent A [%]	Eluent B [%]	Eluent C [%]	Flussrate [mL/min]
0	100	0	0	0,4
90	70	30	0	0,4
100	0	100	0	0,2
105	0	0	100	0,2
125	0	0	100	0,2
130	100	0	0	0,4
150	100	0	0	0,4

Die Proben werden in MilliQ-Wasser gelöst, je 10 μL werden davon durch einen automatischen Probengeber injiziert. Die Ladung der Proben auf die Säule erfolgt in 100% Eluent A. Zur Trennung der Oligosaccharide wird ein Natriumacetatgradient verwendet (Tabelle 22). Anschliessend werden die Oligosaccharide am Online-Entsalzer entsalzt und automatisch fraktioniert. Die Oligosaccharid-enthaltenden Fraktionen werden unter Vakuum eingengt und weiter mit der MALDI-TOF-MS und CE-LIF analysiert.

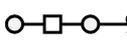
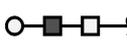
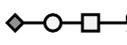
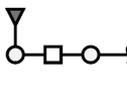
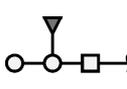
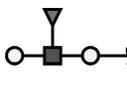
4.4 Verwendete Software

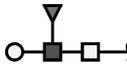
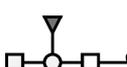
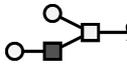
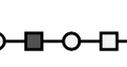
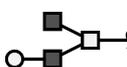
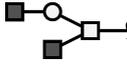
- 32Karat Version 8.0 (Beckman Coulter, Krefeld)
- Biotoools 3.1 (Bruker Daltonics, Bremen)
- Chromeleon 6.80 (Dionex, Germering)
- CorelDraw 11 (Corel)
- ExPASy (Swiss Institut of Bioinformatics, CH)
- FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen)
- FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen)
- GlycoPeakfinder (EuroCarbDB)
- GlycoWorkbench (EuroCarbDB)
- Mascot (Matrix Science CE-LIF, London, UK)
- Quantity One 4.6.3 (Bio-Rad, München)

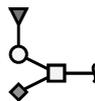
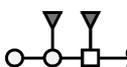
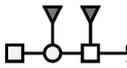
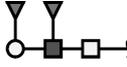
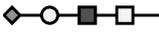
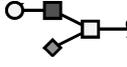
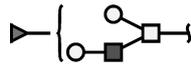
5 Anhang

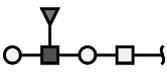
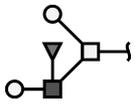
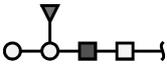
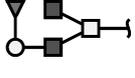
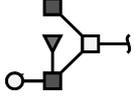
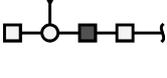
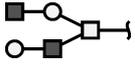
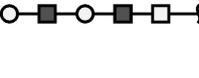
Tabelle 11: Erfassung der O-Glykanstrukturen in Blutgruppen (BG) 0, A, B, AB, A-nSe.

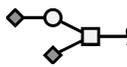
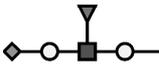
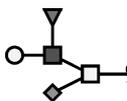
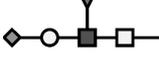
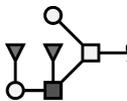
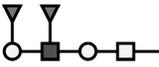
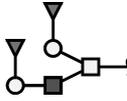
m/z [M+Na] ⁺	Strukturvorschlag	Fragmentione	Strukturisomere (Strukturvorschlag)	Se- quenz
518.1 (0, B, AB, A- nSe, A)	tHex-HexNAc	259(C, tHex); 282(Z, HexNAc); 300(Y, HexNAc)		core1 /T- Agn
634.2 (A-nSe, 0, A, B, AB)	Neu5Ac-Hex	259(Y, Hex); 398(B, Neu5Ac)		core- Gal
692.2 (0, B, AB, A- nSe, A)	I: dHex-Hex- HexNAc II: tHex-(dHex-) HexNAc	I: 300(Y, HexNAc); 415/433(B/C, dHex-Hex) II: 259(C, tHex)	I  II 	H- Agn

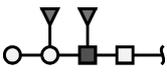
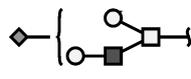
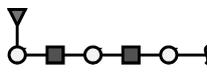
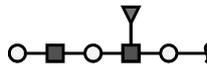
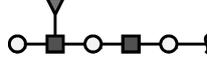
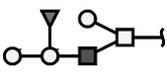
722.3 (A-nSe, 0)	Hex-HexNAc- Hex	259(C, tHex); 486/504((B/Z)/(C/Y), Hex- HexNAc)		core- Gal
763.3 (A-nSe)	I: tHex-HexNAc- HexNAc	I: 259(C, tHex); 486/504(B/C, tHex-HexNAc)	I 	core3
(0, A, B, AB)	II: tHex- (HexNAc-) HexNAc	II: 259(C, tHex); 527/545(Z/Y, HexNAc- HexNAc)	II 	core2
866.3 (0, A, B, AB)	dHex-Hex- (dHex-)HexNAc	244(CY, Hex); 433(C, dHex- Hex); 490(YY, Hex- HexNAc)		
879.3 (A-nSe)	I: Neu5Ac-Hex- HexNAc	I: 620(C, Neu5Ac-Hex)	I 	Sialyl - Lacto samin
(0, B, AB, A)	II: tHex- (Neu5Ac-) HexNAc	II: 259(C, tHex); 643(Z, Neu5Ac-HexNAc)	II 	sTn- Agn
896.3 (0, A, B, AB, A- nSe)	I: dHex-Hex- HexNAc-Hex	I: 415/433(B/C, dHex-Hex); 486/504(Z/Y, HexNAc-Hex)	I 	H- Agn
	II: tHex-(dHex-) Hex-HexNAc	II: 637(C, tHex-(dHex-) Hex)	II 	B- Agn
	III: tHex- (dHex3/4-) HexNAc-Hex	III: 442(BY/CZ, HexNAc- dHex)	III 	Le ^{x/a}

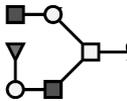
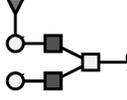
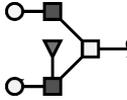
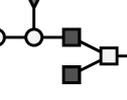
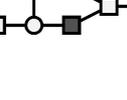
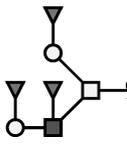
<p>937.3 (0, A, B, AB, A- nSe)</p>	<p>I: tHex-(dHex3/4- HexNAc- HexNAc)</p> <p>II: dHex-Hex- HexNAc- HexNAc</p> <p>III: dHex-Hex- (HexNAc-) HexNAc</p> <p>IV: tHexNAc- (dHex-)HexNAc)</p>	<p>I: 259(C, tHex); 442(BY, dHex-HexNAc); 513(YZ/ZY, HexNAc-HexNAc); 701(Z, dHex- HexNAc-HexNAc)</p> <p>II + III: 415/433(B/C, dHex- Hex); 527/545(ZY, HexNAc- HexNAc)</p> <p>IV: 401(CZ/BY, dHex-Hex); 678(C, tHexNAc-dHex-Hex)</p>	<p>I</p>  <p>II</p>  <p>III</p>  <p>IV</p> 	<p>Le^{x/a}</p> <p>H- Agn</p> <p>H- Agn</p> <p>A- Agn</p>
<p>967.3* (0, B, AB, A- nSe)</p>	<p>I: tHex-(tHex- HexNAc-) HexNAc</p> <p>II: tHex- HexNAc-Hex- HexNAc</p>	<p>I: 495/513(ZZ/(ZY/YZ), HexNAc-HexNAc); 504(C/Y, tHex-HexNAc)</p> <p>II: 472(BY/CZ, Hex- HexNAc); 708(C, tHex- HexNAc-Hex)</p>	<p>I</p>  <p>II</p> 	<p>core2</p> <p>i-Agn</p>
<p>1008.4 (A-nSe, 0)</p>	<p>I: tHexNAc- (tHex- HexNAc-) HexNAc</p> <p>II: tHexNAc- Hex-(tHexNAc-) HexNAc</p>	<p>I: 259(C, tHex); 513(ZY/YZ, HexNAc- HexNAc); 772(Z, tHexNAc-(HexNAc-) HexNAc)</p> <p>II: 245(CY, Hex); 472(YZ/ZY, Hex-HexNAc)</p>	<p>I</p>  <p>II</p> 	<p>core4</p> <p>core2</p>
<p>1053.4 (A-nSe, 0, A, B,</p>	<p>I: Neu5Ac-Hex- (dHex-)HexNAc</p>	<p>I: 398(B, Neu5Ac); 620(C, Neu5Ac-Hex); 847(Z, Neu5Ac-Hex-HexNAc)</p>	<p>I</p> 	<p>sLe^{x/a}</p>

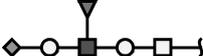
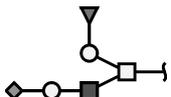
AB)	II: dHex-Hex-(Neu5Ac-)HexNAc	II: 433(C, dHex-Hex)	II 	H-Agn /sTn-Agn
1070.4 (B, AB, 0)	I: dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-Hex II: tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc	I: 415/433(B/C, dHex-Hex); 442(BY/CZ, dHex-HexNAc); 454(ZZ, HexNAc-Hex); 660(Z, dHex-HexNAc-Hex) II: 419(CY, dHex-Hex); 449(CY, tHex-Hex); 456(Z, dHex-HexNAc); 637(C, tHex-(dHex-)Hex)	I  II 	Le ^{y/b} B-Agn
1111.4 (AB, A, 0)	I: tHexNAc-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc II: dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-HexNAc	I: 401(CZ/BY, dHex-Hex); 490(YY, tHexNAc-Hex); 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex) II: 433(C, dHex-Hex); 701(Z, dHex-HexNAc-HexNAc)	I  II 	A-Agn Le ^{y/b}
1124.4 (0, A, B, AB, A-nSe)	I: Neu5Ac-Hex-HexNAc-HexNAc II: tHex-HexNAc-(Neu5Ac-)HexNAc	I: 490(CY, Hex-HexNAc); 620(C, Neu5Ac-Hex); 865(C, Neu5Ac-Hex-HexNAc) II: 504(C, tHex-HexNAc); 661(Neu5Ac-HexNAc); 906(Y, HexNAc-(Neu5Ac-)HexNAc)	I  II 	core3 sTn-Agn
1141.4 (0, A, B, AB, A-nSe)	I: dHex-Hex-(tHex-HexNAc-)HexNAc oder II: tHex-(dHex-Hex-HexNAc-)HexNAc	I+ II: 731/749(Z/Y, tHex-HexNAc-HexNAc)	I/II 	H-Agn

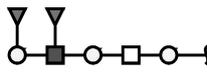
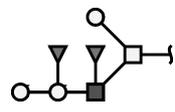
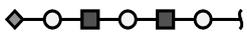
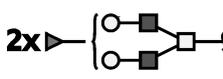
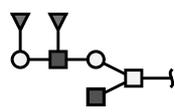
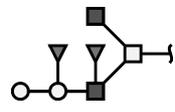
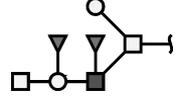
	<p>III: tHex-(dHex3/4-)HexNAc-Hex-HexNAc</p> <p>IV: tHex-(tHex-(dHex3/4-)HexNAc-)HexNAc</p> <p>V: tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-HexNAc</p> <p>VI: dHexHex₂HexNAc₂</p>	<p>III: 646(BY/CZ, dHex-HexNAc-Hex); 882(C, Hex-(dHex-)HexNAc-Hex)</p> <p>III+IV: 472(BY/CZ, tHex-HexNAc);</p> <p>V: 527(Z, HexNAc-HexNAc); 619/637(B/C, tHex-(dHex-)Hex)</p> <p>VI: 401(CZ/BY, dHex-Hex); 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 905(B, tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc)</p>	<p>III</p>  <p>IV</p>  <p>V</p> 	<p>Le^{x/a}</p> <p>Le^{x/a}</p> <p>B-Agn</p> <p>A-Agn</p>
1182.4 (A, B, 0, AB, A-nSe)	<p>I: tHexNAc-(dHex-Hex-HexNAc-)HexNAc</p> <p>II: tHexNAc-(tHex-(dHex3/4-)HexNAc-)HexNAc</p> <p>III: tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-HexNAc</p>	<p>I: 433(C, dHex-Hex); 513(ZY/YZ, HexNAc-HexNAc); 772(Z, tHexNAc-(HexNAc-)HexNAc)</p> <p>II: 259(C, tHex)</p> <p>III: 401(CZ/BY, dHex-Hex); 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 905(B, tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc)</p>	<p>I</p>  <p>II</p>  <p>III</p> 	<p>H-Agn</p> <p>Le^{x/a}</p> <p>A-Agn</p>
1212.4 (0, A, B, AB, A-nSe)	<p>I: tHexNAc-Hex-(tHex-HexNAc-)HexNAc</p> <p>II: tHex-HexNAc-Hex-HexNAc-HexNAc</p>	<p>I: 717(YZ/ZY, Hex-HexNAc-HexNAc); 953(Y, Hex-(HexNAc-Hex-)HexNAc)</p> <p>II: 527(Z, HexNAc-HexNAc); 708(C, tHex-HexNAc-Hex)</p>	<p>I</p>  <p>II</p> 	

1240.4 (0, A, B, AB, A- nSe)	Neu5Ac-Hex- (Neu5Ac-) HexNAc	398(B, Neu5Ac); 490(YY, Hex-HexNAc); 620(C, Neu5Ac-Hex); 865(Y, Neu5Ac-Hex-HexNAc)		sTn- Agn
1257.4 (A-nSe)	Neu5Ac-Hex- (dHex3/4-) HexNAc-Hex	620(C, Neu5Ac-Hex); 660(Z, HexNAc-(dHex-) Hex); 1021(B, Neu5Ac-Hex- (dHex-)HexNAc)		sLe ^{x/a}
1274.4 (B, AB)	tHex-(dHex-) Hex-(dHex-) HexNAc-Hex	1038(Z, dHex-Hex-(dHex-) HexNAc-Hex oder B, tHex- (dHex-)Hex-(dHex-) HexNAc)		B- Agn
1298.4 (A-nSe, 0)	I: tHex-(dHex3/4-) HexNAc- (Neu5Ac-) HexNAc II: Neu5Ac-Hex- (dHex3/4-) HexNAc- HexNAc	I: 490(CY, tHex-HexNAc); 643(Z, Neu5Ac-HexNAc) II: 646(BY/CZ, Hex-(dHex-) HexNAc)	I  II 	Le ^{x/a} / sTn- Agn sLe ^{x/a}
1315.4 (0, A, B, AB, A- nSe)	I: tHex- (dHex- Hex-(dHex3/4-) HexNAc- HexNAc II: dHex-Hex- (dHex3/4-) HexNAc-Hex- HexNAc III: dHex-Hex- (dHex-Hex- HexNAc- HexNAc)	I: 873(ZZ, dHex-(Hex-) HexNAc-HexNAc /Hex- (dHex-)HexNAc-HexNAc); 1079/1097(Z/Y, dHex-Hex- (dHex-)HexNAc-HexNAc) II+III: 282(Z, HexNAc); 1056(C, dHex-Hex-(dHex-) HexNAc-Hex) III: 513/531((YZ/ZY)/YY, HexNAc-HexNAc)	I  II  III 	Le ^{y/b} Le ^{y/b} H- Agn

	<p>IV: tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-HexNAc</p> <p>V: tHexNAc-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-Hex</p>	<p>IV: 449(CY, tHex-Hex); 619/637(B/C, tHex-(dHex-)Hex); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)</p> <p>V: 646(CZ/BY, dHexHexHexNAc); 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 905(B, tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc)</p>	<p>IV</p> 	<p>B-Agn</p> <p>A-Agn</p>
1328.5 (A-nSe, 0, A, B, AB)	<p>Neu5Ac-Hex-(tHex-HexNAc-)HexNAc</p> <p>oder</p> <p>tHex- (Neu5Ac-Hex-HexNAc-)HexNAc</p>	<p>486/504(B/C, Hex-HexNAc); 620(C, Neu5Ac-Hex); 731/749(Z/Y, Hex-HexNAc-HexNAc); 953(Y, Hex-(Hex-HexNAc-)HexNAc)</p>		
1345.5 (0, A, B, AB, A-nSe)	<p>I: dHex-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex</p> <p>II: Hex-HexNAc-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex</p> <p>III: Hex-(dHex3/4-)HexNAc-Hex-HexNAc-Hex</p> <p>IV: tHex-(tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAc</p>	<p>I: 433(C, dHex-Hex); 717(BY/CZ, (HexNAc-Hex-HexNAc)); 935/953 (Z/Y, HexNAc-Hex-HexNAc-Hex)</p> <p>II+III: 424/442(BZ/(CZ/BY), dHex-HexNAc); 646(CZ/BY, Hex-(dHex-)HexNAc)</p> <p>IV: 449(CY, tHex-Hex); 619/637(B/C, tHex-(dHex-)Hex); 731/749(Z/Y, tHex-(HexNAc-)HexNAc)</p>	<p>I</p>  <p>II</p>  <p>III</p>  <p>IV</p> 	<p>H-Agn</p> <p>Le^{x/a}</p> <p>B-Agn</p>

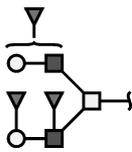
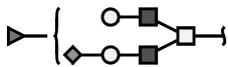
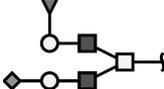
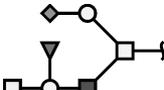
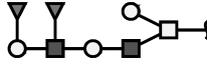
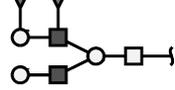
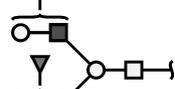
<p>1386.5 (0, A, B, AB, A-nSe)</p>	<p>I: tHexNAc-Hex-(dHex-Hex-HexNAc-)HexNAc</p> <p>II: dHex-Hex-HexNAc-(tHex-HexNAc-)HexNAc</p> <p>III: tHex-HexNAc-(tHex-(dHex3/4-)HexNAc-)HexNAc</p> <p>IV: tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-(tHexNAc-)HexNAc</p> <p>V: tHex-(tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAc</p>	<p>I: 1127(Y, Hex-(dHex-Hex-HexNAc-)HexNAc)</p> <p>I+II: 227(BY/CZ, Hex); 976/994(Z/Y, HexNAc-(tHex-HexNAc-)HexNAc)</p> <p>II+III: 1150(Z, dHexHex-HexNAc₃)</p> <p>IV: 449(CY, tHex-Hex); 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 694(CY, tHex-Hex-HexNAc); 864(B, (tHex-(dHex-)Hex-HexNAc))</p> <p>V: 401(CZ/BY, dHex-Hex); 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 731/749(Z/Y, tHex-(HexNAc-)HexNAc); 905(B, tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc)</p>	<p>I</p>  <p>II</p>  <p>III</p>  <p>IV</p>  <p>V</p> 	<p>H-Agn</p> <p>H-Agn</p> <p>Le^{x/a}</p> <p>B-Agn</p> <p>A-Agn</p>
<p>1416.5* (0, A, B, AB, A-nSe)</p>	<p>Hex₃HexNAc₃</p>	<p>486(B/Z, HexHexNAc); 731/749(Z/Y, HexNAc-Hex-HexNAc); 953(Y/C, Hex₂HexNAc₂); 1181(Z, Hex₂HexNAc₃)</p>		
<p>1489.5 (0, A, B, AB)</p>	<p>I: dHex-Hex-(dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-)HexNAc</p>	<p>I: 687(YZ/ZY, (dHex-)HexNAc-HexNAc); 705(YY, (dHex-)HexNAc-HexNAc)</p>	<p>I</p> 	<p>Le^{y/b} /H-Agn</p>

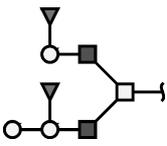
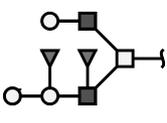
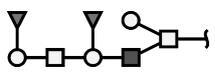
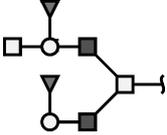
	<p>II: dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc</p> <p>III: tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)HexNAc</p> <p>IV: dHex₃Hex₂HexNAc₂</p>	<p>II: 802/820(BZ/(BY/CZ), (dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex); 1230(C, (dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex)</p> <p>III: 1056/1038(C/B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)</p> <p>IV: 401(CZ/BY, dHex-Hex); 456(Z, dHex-HexNAc); 678(C, HexNAc-(dHex-)Hex); 1056(C, dHex₂Hex₂HexNAc)</p>	<p>II</p>  <p>III</p> 	<p>Le^{y/b}</p> <p>B-Agn</p> <p>A-Agn</p>
1502.5 (0, A, B, AB, A-nSe)	<p>I: Neu5Ac-Hex-(tHex-(dHex3/4-)HexNAc-)HexNAc</p> <p>II: Neu5Ac-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-Hex-HexNAc</p> <p>III: dHex-Hex-(Neu5Ac-Hex-HexNAc-)HexNAc</p> <p>IV: Neu5Ac-(tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAc</p>	<p>I: 259(C, Hex); 873(ZZ, Hex-(dHex-HexNAc-)HexNAc); 1266(Z, Neu5Ac-Hex-(dHex-HexNAc-)HexNAc)</p> <p>II: 1021(B, Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc); 1055(CY, Neu5Ac-Hex-HexNAc-Hex)</p> <p>III: 433(C, dHex-Hex); 1092(Z, Neu5Ac-Hex-HexNAc-HexNAc)</p> <p>IV: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 864(B, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc)</p>	<p>I</p>  <p>II</p>  <p>III</p>  <p>IV</p> 	<p>sLe^{x/a}</p> <p>sLe^{x/a}</p> <p>H-Agn</p> <p>B-Agn</p>
1519.5 (B, AB, 0, A, A-	<p>I: tHex-(dHex)HexNAc-Hex-(dHex)HexNAc-Hex</p>	<p>I: 882(Y/C, Hex-(dHex-)HexNAc-Hex)</p>	<p>I</p> 	<p>Le^{x/a}</p>

nSe)	<p>II: dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-Hex-HexNAc-Hex</p> <p>III: tHex-(tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc</p>	<p>II: 708(Y, Hex-HexNAc-Hex); 834(B, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc); 1056(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex)</p> <p>III: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)</p>	<p>II</p>  <p>III</p> 	<p>Le^{y/b}</p> <p>B-Agn</p>
1532.5 (A-nSe)	Neu5Ac-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex	398(B, Neu5Ac); 504(Y, HexNAc-Hex); 602/620(B/C, Neu5Ac-Hex); 699(BZ, HexNAc-Hex-HexNAc); 1157(Y, Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex)		
1560.5 (A, 0, B, AB, A-nSe)	<p>I: [dHex]Hex-HexNAc-([dHex]Hex-HexNAc-)HexNAc</p> <p>II: dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-Hex(tHexNAc-)HexNAc</p> <p>III: tHexNAc-(Hex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc</p> <p>IV: tHex-(HexNAc-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc</p>	<p>I: 660(B, dHexHexHexNAc); 1150/1168(Z/Y, [dHex]Hex-HexNAc-(HexNAc-)HexNAc)</p> <p>II: 527(Z, tHexNAc-HexNAc); 749(Y, tHex-HexNAc-HexNAc) 834/852(B/C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc); 1056(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex)</p> <p>III: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)</p> <p>IV: 259(C, tHex); 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 1079(B, tHexNAc-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)</p>	<p>I</p>  <p>II</p>  <p>III</p>  <p>IV</p> 	<p>Le^{y/b}</p> <p>B-Agn</p> <p>A-Agn</p>

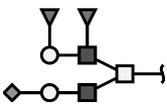
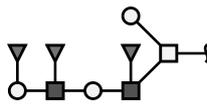
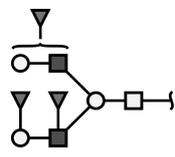
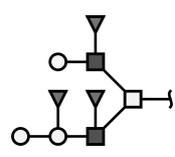
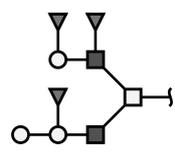
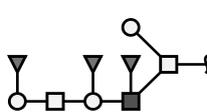
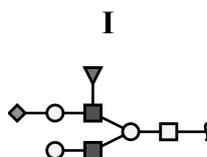
	V: tHex-(HexNAc-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc	V: 433(C, dHex-Hex); 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 905(B, HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc)	V 	A-Agn
1590.5 (A-nSe, 0, A, B, AB)	I: dHex-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc	I: 433(C, dHex-Hex); 1181(Z, HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc)	I 	H-Agn
	II: tHex-(tHex-(dHex3/4-)HexNAc-Hex-HexNAc)HexNAc	II: 646/664((CZ/BY)/CY, Hex-(dHex-)HexNAc)	II 	Le ^{x/a}
	III: [dHex] Hex-HexNAc-(Hex-HexNAc-)Hex-HexNAc	III: 632(BYY/CZY/CYZ, (dHex-)HexNAc-Hex); 832/868(BZ/CY, tHex(dHex-)HexNAc-Hex); 1331(C, Hex-(dHex-)HexNAc-(Hex-HexNAc-)Hex)	III 	I-Agn
	IV: tHexNAc-Hex-(tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAc	IV: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 976(Z, HexNAc-(tHexNAc Hex-)HexNAc)	IV 	B-Agn
	V: dHexHex₃HexNAc₃	V: 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 905(B, HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc)	V 	A-Agn
1631.5 (A, AB)	I: dHexHex₂HexNAc₄	I: 433(C, dHex-Hex)	I 	H-Agn
	II: tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-(tHex-HexNAc-)HexNAc	II: 486(B, HexNAc-Hex); 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 905(B, tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc); 1150/1167(Z/Y, tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-HexNAc)	II 	A-Agn

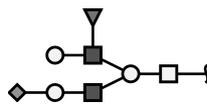
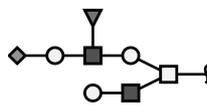
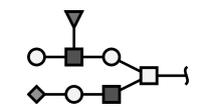
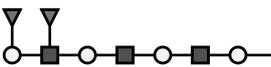
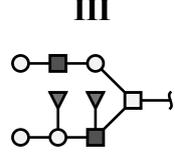
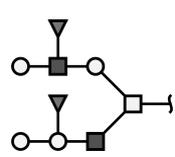
1661.5 (0, A, B, AB, A- nSe)	Hex ₃ HexNAc ₄	259(C, Hex); 486(B, HexHexNAc)		
1676.5 (0, A, B, AB)	I: Neu5Ac-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-(dHex-Hex-)HexNAc II: Neu5Ac-Hex-(dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-)HexNAc III: tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-(NeuAc-)HexNAc	I: 660/678(Z/Y, dHex-Hex-HexNAc); 1021(B, Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc); 1266/1284(Z/Y, Neu5Ac-(dHex-)HexNAc-HexNAc) II: 834/852(B/C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc); 865(Y, Neu5Ac-Hex-HexNAc) III: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc); 1062(Z, dHex-HexNAc-(Neu5Ac-)HexNAc)	I 	H-Agn/ sLe ^{x/a} Le ^{y/b} B-Agn /sTn-Agn
1689.5 (A-nSe)	Neu5Ac-Hex-(Neu5Ac-Hex-HexNAc-)HexNAc	531(Y, HexNAc-HexNAc); 620(C, Neu5Ac-Hex); 939(Y, Hex-(Hex-HexNAc-)HexNAc); 1092/1110(Z/Y, Neu5Ac-Hex-(HexNAc-)HexNAc)		
1693.5 (B, 0, AB)	I: dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex II: dHex-Hex-(tHex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc	I: 834(B, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc); 882(Y, Hex-(dHex-)HexNAc-Hex) II: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 1079(Z, dHex-Hex-(dHex-HexNAc-)HexNAc)	I 	Le ^{y/b} B-Agn
	I: [dHex] Hex-	I: 834/852(B/C, dHex-Hex-		

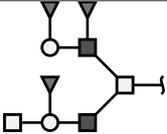
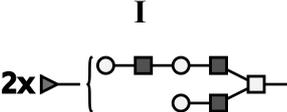
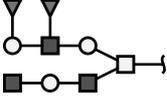
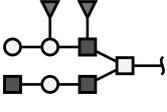
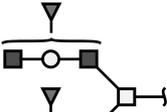
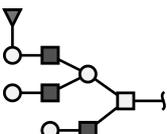
1734.5 (0, A, B, AB)	HexNAc-(dHex-Hex-(dHex3/4)-HexNAc-) HexNAc II: dHex ₃ Hex ₂ HexNAc ₃	I: (dHex-)HexNAc); 923(Y, [dHex]Hex-HexNAc) II: 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 1079(B, tHexNAc-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)	I 	Le ^{y/b} A-Agn
1747.5 (A-nSe, 0, A)	I: [dHex]Hex-HexNAc-(Neu5Ac-Hex-HexNAc-)HexNAc II: Neu5Ac-Hex-HexNAc-(dHex-Hex-HexNAc-)HexNAc III: tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-(Neu5Ac-Hex-)HexNAc)	I: 486(B, HexNAc-Hex); 749(Y, tHex-HexNAc-HexNAc) II: 433(C, dHex-Hex); 1078(YZ/ZY, Neu5Ac-Hex-HexNAc-HexNAc) III: 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 905(B, tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc); 1488(Y, Neu5Ac-Hex-(dHex-Hex-HexNAc-)HexNAc)	I  II  III 	sLe ^{x/a} H-Agn A-Agn
1764.5 (0, A, B, AB, A-nSe)	I: tHex-(dHex-Hex-(dHex3/4)-HexNAc-Hex-HexNAc-)HexNAc II: dHex-Hex-(dHex)HexNAc-(Hex-HexNAc-)Hex-HexNAc III: [dHex ₂]Hex-HexNAc-(Hex-HexNAc-)Hex-HexNAc	I: 1056(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex) II: 891(ZY/YZ, dHex-HexNAc-Hex-HexNAc); 953(Y, tHex-HexNAc-Hex-HexNAc) III: 1127(Y, Hex ₂ dHexHexNAc ₂); 1505(C, Hex ₃ dHex ₂ HexNAc ₂)	I  II  III 	Le ^{y/b} I-Agn I-Agn

	<p>IV: dHex-Hex-HexNAc-(tHex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc</p> <p>V: tHex-HexNAc-(tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc</p> <p>VI: tHex-(dHex-Hex-HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAc</p>	<p>IV: 433(C, dHex-Hex); 864(B, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc); 1150 (Z, dHex-Hex-HexNAc-(HexNAc-)HexNAc)</p> <p>V: 486(B, HexNAc-Hex); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)</p> <p>VI: 401(CZ/BY, dHex-Hex); 678(C, HexNAc-(dHex-)Hex); 749(Y, tHex-(HexNAc-)HexNAc); 1372(Y, tHex-(HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAc)</p>	<p>IV</p>  <p>V</p>  <p>VI</p> 	<p>B-Agn</p> <p>B-Agn</p> <p>A-Agn</p>
1777.6* (A-nSe)	Neu5Ac Hex ₃ HexNAc ₃			
1805.6 (A)	tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-(dHex-Hex-HexNAc-)HexNAc	646(CZ/BY, dHex-Hex-HexNAc); 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 905/923(Z/Y, tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc); 1617(Y, tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-(Hex-HexNAc-)HexNAc)		A-Agn
1835.6* (0, A, B, AB, A-nSe)	I: dHexHex ₃ HexNAc ₄	I: 486(B, HexNAc ₁ Hex ₁); 660(B, dHexHexHexNAc); 1372(Y, dHexHex ₂ HexNAc ₃)		<i>core2</i> / <i>core4</i>
	II: dHexHex ₃ HexNAc ₄	II: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)		B-Agn
	III: dHexHex ₃ HexNAc ₄	III: 646(CZ/BY, dHex-Hex-HexNAc); 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex)		A-Agn

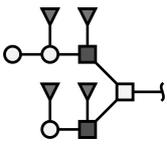
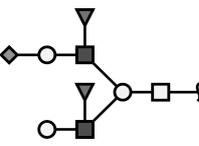
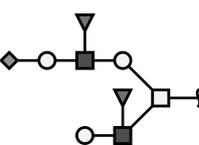
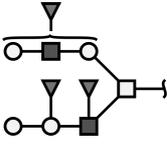
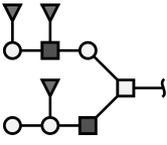
1863.6 (A-nSe, B, AB)	Neu5Ac-Hex- (Neu5Ac-Hex- (dHex3/4-) HexNAc-) HexNAc	620(C, Neu5Ac-Hex); 865(Y, Neu5Ac-Hex-HexNAc); 1021(B, Neu5Ac-Hex- (dHex-)-HexNAc)		sLe ^{x/a}
1865.6* (0, A, B, AB)	Hex-HexNAc- (Hex-HexNAc-) Hex- (Hex- HexNAc-) HexNAc	195(BYZ/CZZ, Hex); 694(CY, tHex-HexNAc- Hex); 731(Z, tHex-HexNAc- HexNAc); 1156(C, tHex- HexNAc-(tHex-HexNAc-) Hex)		
1880.6 (0, B, AB, A- nSe)	I: Neu5Ac-Hex- (dHex3/4-) HexNAc-Hex- (dHex-)-HexNAc- Hex II: Neu5Ac-Hex- (tHex-(dHex-) Hex-(dHex-) HexNAc-) HexNAc	I: 1021(B, Neu5Ac- Hex- (dHex-)-HexNAc) II: 637(C, tHex-(dHex-) Hex); 1038(B, tHex-(dHex-) Hex-(dHex-)-HexNAc)	I 	sLe ^{x/a} B- Agn
1897.6 (B)	tHex-(dHex-) Hex-(dHex-) HexNAc-Hex- (dHex-)-HexNAc- Hex	637(C, tHex-(dHex-)-Hex); 1038(B, tHex-(dHex-)-Hex- (dHex-)-HexNAc); 1283/1300(Z/Y, dHex- HexNAc-Hex-(dHex-) HexNAc-Hex)		B- Agn
1921.6 (A-nSe, 0, A, AB)	I: Neu5Ac-Hex- (dHex3/4-) HexNAc- (tHex- (dHex3/4-) HexNAc-) HexNAc	I: 678(C, tHex-(dHex-) HexNAc); 851(CY, Neu5Ac- Hex-HexNAc); 905(Z, Hex ₁ dHex ₁ HexNAc ₂)	I 	sLe ^{x/a}

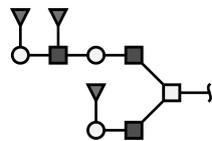
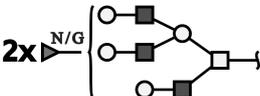
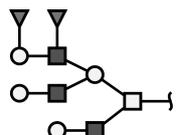
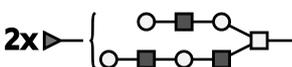
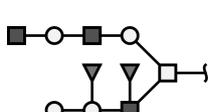
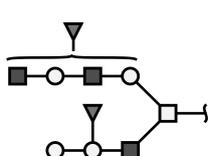
	II: Neu5Ac-Hex-HexNAc-(dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-)HexNAc	II: 433(C, dHex-Hex); 834(B, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc); 865(C, Neu5Ac-Hex-HexNAc); 1079(Z, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-HexNAc)	II 	Le ^{y/b}
1938.6* (0, A, B, AB)	I: tHex-(dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-)HexNAc	I: 499(YYZ/YZY/ZYY, HexNAc-HexNAc); 486(Z, tHex-HexNAc); 1475(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-(dHex-)HexNAc)	I 	Le ^{y/b}
	II: [dHex]Hex-(dHex-)HexNAc-(Hex-(dHex-)HexNAc-)Hex-HexNAc	II: 1301(Y, (dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-)Hex-HexNAc)	II 	I-Agn
	III: tHex-(dHex-)HexNAc-(tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc	III: 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)	III 	B-Agn
	IV: dHex-Hex-(dHex)HexNAc-(tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAc	IV: 834/882(B/C, tHex-(dHex-)Hex-(HexNAc))	IV 	B-Agn
	V: tHex-(dHex-Hex-HexNAc-(dHex-)Hex-(dHex)HexNAc-)HexNAc	V: 678(C, HexNAc-(dHex-)Hex); 1301(Y, tHex-(dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc)	V 	A-Agn
1951.7* (A-nSe, 0, A, B, AB)	I: Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc-(tHex-HexNAc-)Hex-HexNAc	I+II: 1232 (BZZ, Neu5AcHex ₂ HexNAc ₂); 1281(dHexHex ₃ HexNAc ₂); 1474(Neu5Ac dHexHex ₂ HexNAc ₂)	I 	I-Agn / sLe ^{x/a}

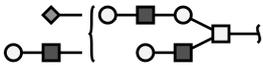
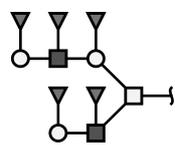
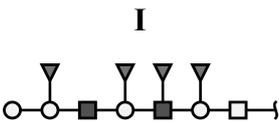
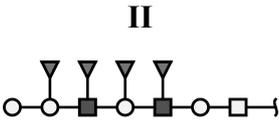
	<p>II: tHex-(dHex-) HexNAc- (Neu5Ac-Hex-HexNAc-) Hex-HexNAc</p> <p>III: Neu5Ac-Hex-(dHex3/4-) HexNAc-Hex- (tHex-HexNAc-) HexNAc</p> <p>IV: tHex-(dHex3/4-) HexNAc-Hex- (Neu5Ac-Hex-HexNAc-) HexNAc</p>	<p>III: 1243(C, Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex)</p> <p>IV: 864(B, tHex-(dHex-)HexNAc-Hex)</p>	<p>II</p>  <p>III</p>  <p>IV</p> 	<p>I-Agn / Le^{x/a}</p> <p>sLe^{x/a}</p> <p>Le^{x/a}</p>
1968.7 (0, B, AB)	<p>I: dHex-Hex-(dHex3/4-) HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex</p> <p>II: Hex-(dHex3/4-) HexNAc-Hex-(dHex-) HexNAc-Hex-HexNAc-Hex</p> <p>III: tHex-HexNAc-Hex- (tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-) HexNAc</p> <p>IV: tHex-(dHex3/4-) HexNAc-Hex- (tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-) HexNAc</p>	<p>I: 834/852(B/C, dHex-Hex-(dHex-) HexNAc); 1157(Y, Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex)</p> <p>II: 660(B, Hex-(dHex-)HexNAc); 1127(Y, dHex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex); 1331(Y, Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc-Hex)</p> <p>III: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 953(Y, tHex-HexNAc-Hex-HexNAc); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)</p> <p>IV: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 1354/1372(Z/Y, tHex-(dHex-)HexNAc-Hex- (HexNAc-)HexNAc)</p>	<p>I</p>  <p>II</p>  <p>III</p>  <p>IV</p> 	<p>Le^{y/b}</p> <p>Le^{x/a}</p> <p>B-Agn</p> <p>B-Agn / Le^{x/a}</p>
1979.7	dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-	401(CZ/BY, dHex-Hex); 678(C, tHexNAc-(dHex-)		A-

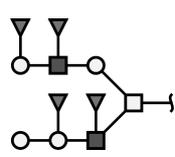
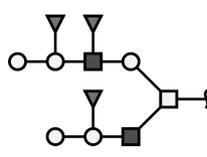
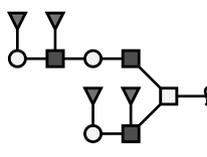
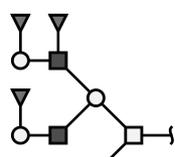
(A)	(tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAc	Hex); 905/923 (B/C, tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc); 1079(Z, dHex-Hex-(dHex-HexNAc-HexNAc); 1324/1342(Z/Y, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(HexNAc-)HexNAc)		Agn
2009.7 (A, 0, B, AB, A-nSe)	I: [dHex ₂] Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-(Hex-HexNAc-)HexNAc II: dHex-Hex-(dHex-3/4)HexNAc-Hex-(tHexNAc-Hex-HexNAc-)HexNAc III: tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-(tHexNAc-Hex-HexNAc-)HexNAc IV: tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-([dHex]HexNAc-Hex-HexNAc-)HexNAc V: dHex ₂ Hex ₃ HexNAc ₄	I: 660(B, dHex ₁ Hex ₁ HexNAc ₁); 694(CY, Hex-HexNAc-Hex) II: 749(C, tHexNAc-Hex-HexNAc); 868(CY, Hex-(dHex-)HexNAc-Hex); 976/994(Z/Y, tHexNAc-Hex-HexNAc-HexNAc) III: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 994(Y, tHexNAc-Hex-HexNAc-HexNAc); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc) IV: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 864(B, Hex-(dHex-)Hex-HexNAc); 1127(Y, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-HexNAc) V: 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 905(B, HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc)	I  II  III  IV 	Agn Le ^{y/b} B-Agn B-Agn A-Agn
2039.7 (0, A, B, AB, A-nSe)	I: dHex-Hex-HexNAc-(Hex-HexNAc-)Hex-(Hex-HexNAc-)HexNAc	I: 433(C, dHex-Hex); 1125(BY/CZ, tHex-HexNAc-(tHex-HexNAc-)Hex); 1331(C, dHex-Hex-HexNAc-(tHex-HexNAc-)Hex)	I 	H-Agn

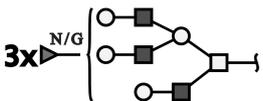
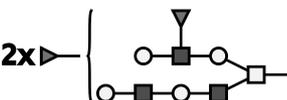
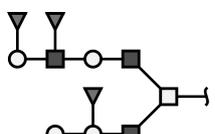
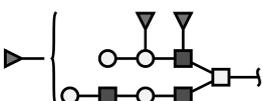
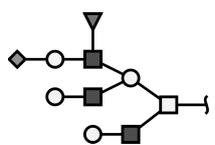
	II: tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-(tHexNAc-Hex-HexNAc-Hex-)HexNAc	II: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 864(B, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc); 1198(Y, tHexNAc-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc)	II 	B-Agn
2051.7 (A)	dHex ₂ Hex ₂ HexNAc ₅	678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 905(B, tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc); 1098(C, tHexNAc-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)		A-Agn
2080.7 (A, AB)	dHexHex ₃ HexNAc ₅	678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 905(B, tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc)		A-Agn
2112.7* (0, A, B, AB)	I: dHex-Hex-(dHex _{3/4} -)HexNAc-Hex-(dHex-Hex-(dHex_{3/4}-)HexNAc-)HexNAc II: dHex-Hex-(dHex-Hex-(dHex_{3/4}-)HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAc III: (dHex-)Hex-(dHex)HexNAc-(dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-)Hex-HexNAc	I: 705(YY, dHex-HexNAc-HexNAc); 1056(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex); 1079(Z, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-HexNAc) II: 1065(BY/CZ, dHex ₂ HexHexNAc); 1230(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex); 1269/1287((CZ/BY)/CY, dHex ₂ Hex ₂ HexNAc ₂); 1457/1475(B/C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc) III: 909(YY, dHex-HexNAc-Hex-HexNAc); 1443(CZ/BY, dHex ₃ Hex ₂ HexNAc ₂); 1647(CZ/BY, dHex ₃ Hex ₃ HexNAc ₂); 1737(YY, dHex ₂ Hex ₃ HexNAc ₃); 1853(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-)Hex)	I 	Le ^{y/b} H-Agn /Le ^{y/b} I-Agn

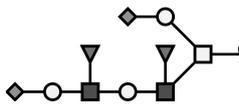
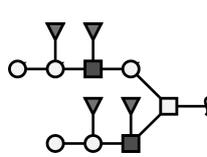
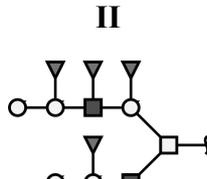
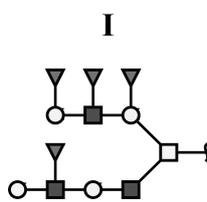
	<p>IV: tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-Hex-(dHex)HexNAc-)HexNAc</p> <p>V: dHex₄Hex₃HexNAc₃</p>	<p>IV: 449(CY, tHex-Hex); 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)</p> <p>V: 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex)</p>	<p>IV</p> 	<p>B-Agn</p> <p>A-Agn</p>
2125.7* (A-nSe, 0, A, B, AB)	<p>I: tHex-(dHex-)HexNAc-(Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc-)Hex-HexNAc</p> <p>II: Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc-(tHex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc</p>	<p>I: 1081(CYZ/CZY/BYY, dHexHex₂HexNAc₂); 1442(CYZ/CZY/BYY, Neu5Ac-dHexHex₂HexNAc₂); 1867(C, tHex-dHex-HexNAc-(Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc)Hex)</p> <p>II: 905(Z, tHex-(dHex-)HexNAc-HexNAc); 1037(BY, Neu5Ac-Hex-HexNAc-Hex)</p>	<p>I</p>  <p>II</p> 	<p>I-Agn</p> <p>Le^{x/a}/sLe^{x/a}</p>
2138.7 (A-nSe)	Neu5Ac ₂ Hex ₃ HexNAc ₃			I-Agn
2142.7 (B, AB)	<p>I: [dHex] Hex-HexNAc-Hex-(tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc</p> <p>II: dHex-Hex-(dHex)HexNAc-Hex-(tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAc</p>	<p>I: 660(B, tHex-(dHex-)HexNAc); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc); 1127(Y, tHex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc)</p> <p>II: 694(CY, tHex-Hex-HexNAc); 834(B, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc); 864(B, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc)</p>	<p>I</p>  <p>II</p> 	<p>B-Agn</p> <p>B-Agn</p>

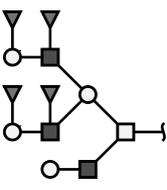
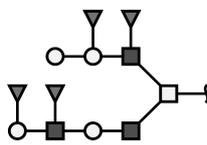
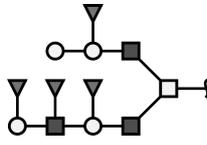
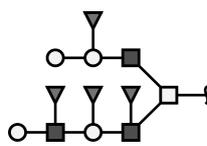
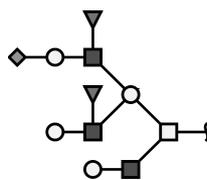
<p>2183.7 (0, A, AB)</p>	<p>I: dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-Hex-HexNAc-(dHex-Hex-HexNAc-)HexNAc</p> <p>II: dHex₃Hex₃HexNAc₄</p>	<p>I: 834(B, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc); 868(CY, tHex-(dHex-)HexNAc-Hex); 909(CY, dHex-HexNAc-Hex-HexNAc); 923(Y, dHex-Hex-HexNAc-HexNAc)</p> <p>II: 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 905(B, HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc)</p>	<p>I</p> 	<p>H-Agn /Le^{y/b}</p> <p>A-Agn</p>
<p>2213.7 (0, A, B, AB, A-nSe)</p>	<p>I: [dHex₂] Hex-HexNAc-(Hex-HexNAc-)Hex-(tHex-HexNAc-)HexNAc</p> <p>II: dHex-tHex-(dHex3/4-)HexNAc-(tHex-HexNAc-)Hex-(tHex-HexNAc-)HexNAc</p> <p>III: [dHex₂] Hex-HexNAc-Hex-(Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-)HexNAc</p> <p>IV: tHexNAc-Hex-HexNAc-Hex-(tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc</p> <p>V: [dHex] HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-(tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAc</p>	<p>I: 486(B, tHex-HexNAc); 1750(Y, tHexdHex HexNAc-(tHex dHexHexNAc-)Hex-HexNAc)</p> <p>II: 834(B, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc); 1166(ZY/YZ, Hex₂HexNAc₃)</p> <p>III: 676(BY/CZ, Hex-HexNAc-Hex); 1127(C/Y, dHexHex₂HexNAc₂)</p> <p>IV: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 953(C, tHexNAc-Hex-HexNAc-Hex); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc); 1081(YZY/ZYY/YYZ, dHex₁Hex₂HexNAc₂)</p> <p>V: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 864(B, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc); 1125(ZY/YZ, tHex-Hex-HexNAc-(Hex-)HexNAc)</p>	<p>I</p>  <p>II</p>  <p>III</p>  <p>IV</p>  <p>V</p> 	<p>Le^{y/b}</p> <p>B-Agn</p> <p>B-Agn</p>

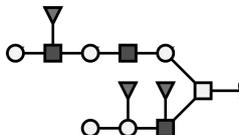
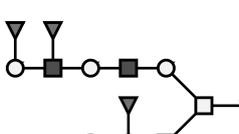
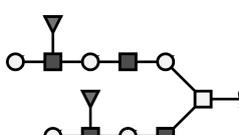
	VI: dHex ₂ Hex ₄ HexNAc ₄	VI: 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 905(B, tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc)		A-Agn
2226.7 (A-nSe)	Neu5AcHex ₄ HexNAc ₄	620(C, Neu5Ac-Hex)		
2255.7 (A)	dHex ₂ Hex ₃ HexNAc ₅	678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 905(B, tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc)		A-Agn
2286.7 (0, A, AB)	dHex-Hex-(dHex)HexNAc-(dHex)-Hex-(dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc	433(C, dHex-Hex); 834(B, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc); 1079(Z, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-HexNAc)		
2312.7* (A-nSe)	Neu5Ac ₂ dHexHex ₃ HexNAc ₃	620(C, Neu5Ac-Hex); 1021(B, Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc)		
2316.7 (0, B)	I: tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex-)HexNAc II: tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc	I: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 660/678(Z/Y, dHex-Hex-HexNAc); 864(B, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc); 866(BYY/ CYZ/CZY, tHex-Hex-HexNAc-Hex); 1097(Y, dHex-HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc) II: 486/504(Z/Y, Hex-HexNAc); 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 735(YY, HexNAc-Hex-HexNAc); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)	 	B-Agn B-Agn

	III: dHex-Hex-(dHex)HexNAc-Hex-(tHex-(dHex-) Hex-(dHex-) HexNAc-)HexNAc	III: 463(ZZZ, HexNAc-HexNAc); 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 1505(Y, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-(Hex-)HexNAc); 1671(ZZ, dHex ₃ Hex ₂ HexNAc ₃)	III 	B-Agn
2346.7 (B)	tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-(tHex-(dHex-) Hex-HexNAc-)HexNAc	490(CY, Hex-HexNAc); 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 864(B, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc); 1505(Y, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc); 1732(Z, HexNAc-(tHex-(dHex-) Hex-(dHex-)HexNAc-HexNAc))		B-Agn
2357.7 (A, 0)	I: dHex ₄ Hex ₃ HexNAc ₄ II: dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc-(dHex-Hex-(dHex-) HexNAc-)HexNAc	I: 678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex) II: 1097(Y, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-HexNAc); 1546(Y, dHex ₂ Hex ₂ HexNAc ₃)	II 	A-Agn Le ^{y/b}
2387.7 (0, A, B, AB, AnSe)	I: dHex-Hex-HexNAc-(dHex-Hex-(dHex _{3/4} -)HexNAc-)Hex-(tHex-HexNAc-)HexNAc	I: 433(C, dHex-Hex); 731(tHex-HexNAc-HexNAc); 834(B, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc)	I 	H-Agn / Le ^{y/b}

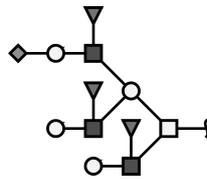
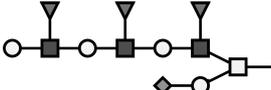
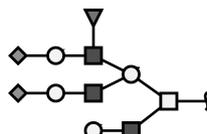
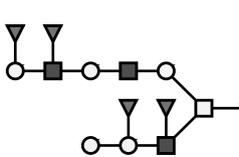
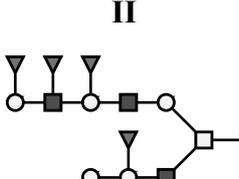
	<p>II: [dHex₃]Hex-HexNAc-(Hex-HexNAc-)Hex-(Hex-HexNAc-)HexNAc</p> <p>III: [dHex₂]tHex-(dHex_{3/4}-)HexNAc-Hex-(tHex-HexNAc-Hex-HexNAc-)HexNAc</p> <p>IV: dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc-(tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAc</p> <p>V: [dHex-]Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-(tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc</p>	<p>II: 868(CY, tHex-(dHex-)HexNAc-Hex); 905(Z, tHex-(dHex-)HexNAc-HexNAc); 1505(C, tHex-(dHex-)HexNAc-(tHex-(dHex-)HexNAc-)Hex)</p> <p>III: 1127(Y, tHex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc); 1283(B, tHex-HexNAc-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)</p> <p>IV: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 834(B, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc); 864(B, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc)</p> <p>V: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)</p>	<p>II</p>  <p>III</p>  <p>IV</p>  <p>V</p> 	<p>Le^{x/a}</p> <p>Le^{x/a}</p> <p>B-Agn</p> <p>B-Agn</p>
2400.8 (A-nSe, A, B, AB)	Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc-(tHex-HexNAc-)Hex- (tHex-HexNAc-) HexNAc	620(C, Neu5Ac-Hex); 731/749(Z/Y, tHex-HexNAc-HexNAc); 1021(B, Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc); 1316(CY, Hex-(dHex-)HexNAc- (tHex-HexNAc-) Hex); 1692(C, Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc- (tHex-HexNAc-) Hex)		
2417.8 (B)	dHex ₂ Hex ₅ HexNAc ₄	637(C, tHex-(dHex-)Hex); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)		B-Agn
2428.8	dHex ₃ Hex ₃ HexNAc ₅	678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex)		A-Agn

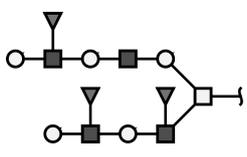
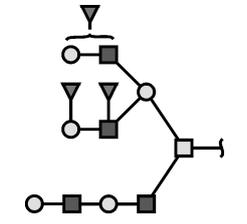
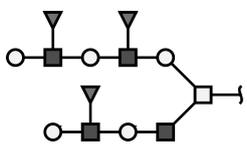
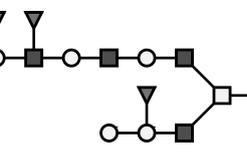
(A)				
2458.8 (A, AB)	dHex ₂ Hex ₄ HexNAc ₅	678(C, tHexNAc-(dHex-) Hex); 905(B, HexNAc- (dHex-)Hex-HexNAc)		A- Agn
2486.8* (A-nSe)	Neu5Ac-Hex- (Neu5Ac-Hex- (dHex-) HexNAc-Hex- (dHex-) HexNAc-) HexNAc	620(C, Neu5Ac-Hex); 847/865(Y, Neu5Ac-Hex- HexNAc); 868(CY, Hex- (dHex-)HexNAc-Hex); 1021(B, Neu5Ac-Hex- (dHex-)HexNAc);1243(C, Neu5Ac-Hex-(dHex-) HexNAc-Hex); 1474(CY, Neu5AcHexHex ₂ HexNAc ₂)		
2520.8 (B, AB)	I: tHex-(dHex-) Hex-(dHex-) HexNAc-Hex- (tHex-(dHex-) Hex-(dHex-) HexNAc-) HexNAc II: tHex-(dHex-) Hex-(dHex-) HexNAc-(dHex-) Hex- (tHex- (dHex-)Hex- HexNAc-) HexNAc	I: 490(CY, Hex-HexNAc); 637(C, tHex-(dHex-) Hex); 1006(BZ, dHex-Hex-(dHex-) HexNAc-Hex); 1283(Z, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-) HexNAc-HexNAc) II: 637(C, tHex-(dHex-) Hex); 864/882(B/C, tHex- (dHex-)Hex-HexNAc); 1127(Y, tHex-(dHex-)Hex- HexNAc-HexNAc); 1246(CY, dHex ₂ Hex ₃ HexNAc ₁)	I  II 	B- Agn B- Agn
2561.8 (0, B, AB)	I: dHex-Hex- (dHex-)HexNAc- (dHex-)Hex- (tHex-(dHex-) HexNAc-Hex- HexNAc-) HexNAc	I: 1127(C, tHex-(dHex-) HexNAc-Hex-HexNAc); 1184(YY, tHex-HexNAc- Hex-HexNAc-HexNAc); 1354(Z, tHex-(dHex-) HexNAc-Hex-HexNAc- HexNAc)	I 	

	<p>II: dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-)Hex-(tHex-HexNAc-)HexNAc</p>	<p>II: 1273(CYY, dHex₂Hex₂HexNAc₂); 1444(BY, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-HexNAc-)Hex); 1505(ZZZ, dHex-HexNAc-(dHex-HexNAc-)Hex-(HexNAc-)HexNAc); 1854(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-)Hex-); 1910(YY, dHex₃Hex₃HexNAc₃); 2081/2099 (Z/Y, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-)Hex-HexNAc)</p>	<p>II</p> 	
	<p>III: tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc-)HexNAc</p>	<p>III: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 699/735(ZZ/YY, Hex-HexNAc-HexNAc); 1038(B, dHex₂Hex₂HexNAc₁)</p>	<p>III</p> 	B-Agn
	<p>IV: tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-(dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAc</p>	<p>IV: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 776(YY, HexNAc-(HexNAc-)HexNAc); 864(B, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc); 1140(YYY, dHex₁Hex₁HexNAc₃)</p>	<p>IV</p> 	B-Agn
	<p>V: tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-(Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)HexNAc-)HexNAc</p>	<p>V: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 864(B, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc); 1518(YYY, dHex₂Hex₂HexNAc₃)</p>	<p>V</p> 	B-Agn
2574.8 (A-nSe, B, AB)	<p>I: Neu5Ac dHex₂Hex₄HexNAc₄</p>	<p>620(C, Neu5Ac-Hex); 660(B, dHex-Hex-HexNAc); 731(Z, tHex-HexNAc-HexNAc); 1021(B, Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc)</p>		

2591.8 (0, B, AB)	<p>I: tHex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-(tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAcHexNAc</p> <p>II: dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-(tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAcHexNAc</p>	<p>I: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 660(B, tHex-(dHex-)HexNAc); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc); 1505(Y, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-(Hex-)HexNAc); 1954(Y, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-(Hex-HexNAc-Hex-)HexNAc)</p> <p>II: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 834(B, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc); 864(B, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc); 1780(Y, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-(Hex-HexNAc-Hex-)HexNAc)</p>	<p>I</p>  <p>II</p> 	B-Agn B-Agn
2602.8 (A)	dHex ₄ Hex ₃ HexNAc ₅	678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex)		A-Agn
2632.8 (A, AB)	dHex ₃ Hex ₄ HexNAc ₅	678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex)		A-Agn
2663.8 (A-nSe, 0, B, AB)	<p>I: tHex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-(tHex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc-)HexNAcHexNAc</p>	<p>I: 882(B/C, tHex-(dHex-)HexNAc-Hex); 1109/1127(B/C, tHex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc); 1143(CY, tHex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex); 1576(Y, dHexHex₃HexNAc₃); 1803(Z, dHexHex₃HexNAc₄)</p>	<p>I</p> 	Le ^{x/a}

	<p>II: tHex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-(dHex-Hex-(dHex3/4)-HexNAc-Hex-HexNAc-)HexNAc</p>	<p>II: 834(B, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc); 1056(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex); 1301(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc); 1402(Y, tHex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc); 1630(Z, tHex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-(HexNAc-)HexNAc)</p>	<p>II</p>	<p>Le^{y/b}</p>
2694.8 (B)	<p>tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex-(tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAc</p>	<p>637(C, tHex-(dHex-)Hex); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc); 1679(Y, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex-)</p>		<p>B-Agn</p>
2735.8 (0, B, AB)	<p>I: dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-(dHex-)Hex-(dHex3/4-)HexNAc-)Hex-(Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc</p> <p>II: dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-(dHex-)Hex-(dHex-Hex-(dHex3/4)-HexNAc-Hex-HexNAc-)HexNAc</p>	<p>I: 660(B, Hex-(dHex-)HexNAc); 905(Z, dHexHexHexNAc₂); 1444(CZ/BY, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)HexNAc-)Hex); 1680(ZZZ, dHex-HexNAc-(dHex-)HexNAc-)Hex-(dHex-HexNAc-)HexNAc); 1853(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)HexNAc-)Hex)</p> <p>II: 1230(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex); 1301(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc)</p>	<p>I</p> <p>II</p>	<p>Le^{y/b/} Le^{x/a}</p> <p>Le^{y/b}</p>

<p>2748.9 (A-nSe, AB, B)</p>	<p>I: Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc-(Hex-(dHex-)HexNAc-)Hex-(Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc HexNAc</p> <p>II: Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-(dHex-)HexNAc-(Neu5Ac-Hex-)HexNAc HexNAc</p>	<p>I: 1021(B, Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc); 1562(YY, dHexHex₃HexNAc₃)</p> <p>II: 847/865(Z/Y, Neu5Ac-Hex-HexNAc); 1924(C, Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-(dHex-)HexNAc-)</p>	<p>I</p>  <p>II</p> 	<p>sLe^{x/a} /Le^{x/a}</p> <p>Le^{x/a}</p>
<p>2761.9 (A-nSe)</p>	<p>Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc-(Neu5Ac-Hex-HexNAc-)Hex-(Hex-HexNAc-)HexNAc HexNAc</p>	<p>620(C, Neu5Ac-Hex); 660(B, dHex-Hex- HexNAc); 731(Z, Hex-HexNAc-HexNAc); 847(B, Neu5Ac-Hex-HexNAc); 1021(B, Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc); 2054(C, Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc-(Neu5Ac-Hex-HexNAc-)Hex)</p>		
<p>2765.9 (0, B, AB)</p>	<p>I: dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-(tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc HexNAc</p> <p>II: dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-(tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-)HexNAc HexNAc</p>	<p>I: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 834(B, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc); 1038 (B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc); 1317(CY/YY, dHexHex₃HexNAc₂); 1750(Y, dHex₂Hex₃HexNAc₃)</p> <p>II: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 834(B, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc); 864(B, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc); 1925(Y, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-Hex-HexNAc)</p>	<p>I</p>  <p>II</p> 	<p>B-Agn</p> <p>B-Agn</p>
	<p>dHex₄Hex₄</p>	<p>678(C, tHexNAc-(dHex-)</p>		<p>A-</p>

2807.9 (0, A)	HexNAc ₅	Hex)		Agn
2837.4 (A-nSe, 0, B, AB)	<p>I: tHex-(dHex3/4-) HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-(tHex-(dHex3/4-) HexNAc-Hex-(dHex-) HexNAc-) HexNAc</p> <p>II: [dHex-]Hex-HexNAc-(dHex-Hex-(dHex3/4-) HexNAc-)Hex-(tHex-HexNAc-Hex-HexNAc) HexNAc</p>	<p>I: 1331(C, tHex-(dHex-) HexNAc-Hex-HexNAc-Hex); 1576(Y, tHex-(dHex-) HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc)</p> <p>II: 1474/1492(CZ/BY, dHex₂Hex₃HexNAc₂); 1680(C, dHex-Hex-(dHex-) HexNAc-([dHex-]Hex-HexNAc-)Hex); 1736(YY, dHex₂Hex₃HexNAc₃); 2374(Y, dHex-Hex-(dHex-) HexNAc-([dHex-]Hex-HexNAc-)Hex-(Hex-HexNAc-)HexNAc)</p>	<p>I</p>  <p>II</p> 	<p>Le^{x/a}</p> <p>Le^{y/b}</p>
	<p>III: tHex-(dHex3/4-) HexNAc-Hex-(dHex3/4-) HexNAc-Hex-(tHex-(dHex-) HexNAc-Hex-HexNAc-) HexNAc</p> <p>IV: dHex-Hex-(dHex3/4-) HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-(tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-) HexNAc</p>	<p>III: 850/868((BY/CZ)/CY, Hex-(dHex-)HexNAc-Hex)</p> <p>IV: 637(C, tHex-(dHex-) Hex); 834(B, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc)</p>	<p>III</p>  <p>IV</p> 	<p>Le^{x/a}</p> <p>B-Agn</p>

	V: dHex-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-(tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc HexNAc	V: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 660(B, [dHex-] Hex-HexNAc); 1143(CY, Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-Hex); 1823(YYY, Hex-HexNAc-Hex-HexNAc-(tHex-Hex-HexNAc-)HexNAc)	V 	B-Agn
2909.9 (0)	I: dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-(dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-)Hex-(dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-)HexNAc HexNAc II: dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-(dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-(dHex-)Hex-)HexNAc III: dHex-Hex-(dHex3/4-)HexNAc-(dHex-)Hex-(dHex3/4-)HexNAc-(dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-)HexNAc	I: 1079(Z, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-HexNAc); 1854(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-)Hex) II: 1457/1476((B/Z)/(C/Y), dHex ₃ Hex ₂ HexNAc ₂) III: 1056(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex); 1301(Y, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc-)	I II III 	Le ^{y/b} Le ^{y/b} Le ^{y/b}
2935.9 (A-nSe)	Neu5Ac ₂ dHex ₂ Hex ₄ HexNAc ₄	620(C, Neu5Ac-Hex); 660(B, dHexHex HexNAc); 847(B, Neu5Ac-Hex-HexNAc); 1021(B, Neu5Ac-Hex-(dHex-)HexNAc)	2x	sLe ^{x/a}

2939.9 (B, AB)	<p>I: dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-(tHex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc</p> <p>II: dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-Hex-(tHex-(dHex-)HexNAc-)HexNAc-HexNAc</p>	<p>I: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 864(B, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc); 1127(Y, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc-HexNAc)</p> <p>II: 637(C, tHex-(dHex-)Hex); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc); 1283(Z, tHex-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc-HexNAc); 1317(Y, dHexHex₃HexNAc₂); 1679(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-Hex); 1718(ZY/YZ, dHex₂Hex₃HexNAc₃); 1925(Y, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc-Hex-HexNAc)</p>	<p>I</p> <p>II</p>	B-Agn B-Agn
2969.9 (B)	dHex ₄ Hex ₆ HexNAc ₄	637(C, tHex-(dHex-)Hex); 864(B, tHex-(dHex-)Hex-HexNAc); 1477(CYY, dHex ₂ Hex ₃ HexNAc ₂); 1507(CYY, dHexHex ₄ HexNAc ₂)		B-Agn
3010.9 (0, B, AB)	dHex ₄ Hex ₅ HexNAc ₅	660(B, dHexHex HexNAc); 834(B, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc); 1301(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc); 1750(Y, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc-Hex-HexNAc-Hex-HexNAc)		Le ^{y/b}
3052.9 (A, AB)	dHex ₄ Hex ₄ HexNAc ₆	678(C, tHexNAc-(dHex-)Hex); 905(B, tHexNAc-(dHex-)Hex-HexNAc); 1079(B, tHexNAc-(dHex-)Hex-(dHex-)HexNAc)		A-Agn

3109.9 (A-nSe)	Neu5Ac ₂ dHex ₃ Hex ₄ HexNAc ₄	620(C, Neu5Ac-Hex); 660(B, dHexHex HexNAc); 1021(B, Neu5Ac-Hex-(dHex-) HexNAc)		
3123.9 (A-nSe)	Neu5Ac ₃ dHexHex ₄ HexNAc ₄	620(C, Neu5Ac-Hex); 847(B, Neu5Ac-Hex-HexNAc); 1021(B, Neu5Ac-Hex- (dHex-)HexNAc)		
3144.9 (B)	dHex ₅ Hex ₆ HexNAc ₄	637(C, tHex-(dHex-)Hex); 834(B, dHex-Hex-(dHex-) HexNAc); 1038(B, tHex- (dHex-)Hex-(dHex-) HexNAc)		B- Agn
3185.0 (0, B, AB)	dHex ₅ Hex ₅ HexNAc ₅	660(B, dHexHex HexNAc); 834(B, dHex-Hex-(dHex-) HexNAc); 1042(CY, dHex ₂ Hex ₂ HexNAc); 1127(C, dHex Hex ₂ HexNAc ₂); 1301(C, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc- Hex-HexNAc); 1750(Y, dHex-Hex-(dHex-)HexNAc- Hex-HexNAc-Hex-HexNAc)		
3227.0 (A)	dHex ₅ Hex ₄ HexNAc ₆	678(C, tHexNAc-(dHex-) Hex); 905(B, tHexNAc- (dHex-)Hex-HexNAc); 1079(B, tHexNAc-(dHex-) Hex-(dHex-)HexNAc)		A- Agn
3297.0 (A-nSe)	Neu5Ac ₃ dHex ₂ Hex ₄ HexNAc ₄	620(C, Neu5Ac-Hex); 1021(B, Neu5Ac-Hex- (dHex-)HexNAc)		
3318.0 (B)	dHex ₆ Hex ₆ HexNAc ₄	637(C, tHex-(dHex-)Hex); 1038(B, tHex-(dHex-)Hex-		B- Agn

		(dHex-)HexNAc		
3389.1 (B, AB)	dHex ₅ Hex ₆ HexNAc ₅	637(C, tHex-(dHex-)Hex); 834(B, dHex-Hex-(dHex-) HexNAc); 1038(B, tHex- (dHex-)Hex-(dHex-) HexNAc)		B- Agn
3472.1 (A-nSe)	Neu5Ac ₃ dHex ₃ Hex ₄ HexNAc ₄			

BG Blutgruppe; Agn Antigen; nSe nicht-Sekretor Status; Die Massepeaks und Fragmentione wurden mittels GlycoWorkBench zugeordnet. Schwarzer Kreis, Glc; Dunkel-grauer Kreis, Man; Hell-grauer Kreis, Gal; Schwarzes Quadrat, GlcNAc; Dunkel-graue Raute, Neu5Ac; Hex Hexose, dHex Deoxyhexose, tHex terminale Hexose, HexNAc N-Acetylhexosamin; B/C/Y/Z Zuordnung der Fragmentione nach Domon und Castello; * gekennzeichnete Strukturen können als il-Antigene vorliegen.

6 Literatur

- 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., Rudd, P.M. A strategy to reveal potential glycan markers from serum glycoproteins associated with breast cancer progression. *Glycobiology* **2008**, *18*, 1105-1118.
- Abu-Samra, A., Morris, J.S., Koirtyohann, S.R. Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. *Anal. Chem.* **1975**, *47*, 1475-1477.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M. et al. „The endoplasmic reticulum.“ In: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M. et al. (Ed.). **2002**.
- Altschuler, Y., Kinlough, C.L., Poland, P.A., Bruns, J.B., Apodaca, G., Weisz, O.A., Hughey, R.P. Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state. *Mol. Biol. Cell* **2000**, *11*, 819-831.
- Amerongen, A.V., Oderkerk, C.H., Roukema, P.A., Wolf, J.H., Lisman, J.J., Overdijk B. Murine submandibular mucin (MSM): a mucin carrying N- and O-glycosylycally bound carbohydrate-chains. *Carbohydr. Res.* **1983**, *115*, C1-5.
- Apweiler, R., Hermjakob, H., Sharon, N. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim. Biophys. Acta-Gen Subj.* **1999**, *1473*, 4-8.
- Argueso, P., Tisdale, A., Mandel, U., Letko, E., Foster, C.S., Gipson, I.K. The cell-layer- and cell-type-specific distribution of GalNAc-transferases in the ocular surface epithelia is altered during keratinization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2003**, *44*, 86–92.
- Arneberg, P., Kornstad, L., Nordbo, H., Gjermo, P. Less dental caries among secretors than among non-secretors of blood group substance. *Scand J Dent Res*, **1976**, *84*, 362-366.

- Arnold, J. N., Saldova, R., Hamid, U.M.A., Rudd, P.M. Evaluation of the serum N-linked glycome for the diagnosis of cancer and chronic inflammation. *Proteomics* **2008**, *8*, 3284-3293.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D., Lake, R.J. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* **1999**, *284*, 770-776.
- Arumugham, R.,G., Tanzer, M.L. Abnormal glycosylation of human cellular fibronectin in the presence of swainsonine. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 11883-11889.
- Ashline, D.J., Lapadula, A.J., Liu, Y.H., Lin, M., Grace, M., Pramanik, B., Reinhold, V.N. Carbohydrate structural isomers analyzed by sequential mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3830-3842.
- Ashwell, G., Harford, J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem* **1982**, *51*, 531-554.
- Baltzer, J., Meerpohl, H.G., Bahnsen, J. Praxis der gynäkologischen Onkologie, Thieme Verlag, II. Auflage **2000**, 220-274.
- Bank, R.A., Hetteema, E.H., Arwert, F., Nieuw Amerongen, A.V., Pronk, J.C. Electrophoretic characterization of posttranslational modifications of human parotid salivary α -amylase. *Electrophoresis* **1991**, *12*, 74-79.
- Barrett, P., Davidowski, L.J., Penaro, K.W., Copeland, T.R. Microwave oven based wet digestion techniques. *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 1021-1023.
- Baum, L.G. Developing a Taste for Sweets. *Immunity* **2002**, *16*, 5-8.
- Becker, D.J., Lowe, J.B. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* **2003**, *13*, 41R-53R.
- Beltran-Valero de Bernabe, D., Currier, S., Steinbrecher, A., Celli, J., Van Beusekorm, E., Van der Zwaag, B. et al. Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **2002**, *71*, 1033-43.
- Bereman, M.S., Young, D.D., Deiters, A., Muddiman, D.C. Development of a robust and high throughput method for profiling N-linked glycans derived from plasma glycoproteins by Nano LC-FTICR mass spectrometry. *J Proteome Res* **2009**, *8*, 3764-70.
- Bernard, B.A., Newton, S.A., Olden, K. Effect of size and location of the oligosaccharide chain on protease degradation of bovine pancreatic ribonuclease. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 12198-12202.
- Briggs, J.B., Keck, R.G., Ma, S., Lau, W., Jones, A.J. An analytical system for the characterization of highly heterogeneous mixtures of N-linked oligosaccharides. *Anal. Biochem.* **2009**, *389*, 40-51.
- Brockhausen, I., Kuhns, W. „Medical Intelligence Unit: Glycoproteins and Human Disease.“ Chapman & Hall: New York **1997**.
- Brockhausen, I., Schutzbach, J., Kuhns, W. Glycoproteins and their relationship to human disease. *Acta Anatomica* **1998**, *161*, 36-78.

- Brockhausen, I. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycosynamics and functions. *EMBO Reports* **2006**, *7*, 599-604.
- Brusés, J.L., Rutishauser, U. Role, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neuronal development. *Biochimie* **2001**, *83*, 635-643.
- Burns, D. and Bretscher, M.S. The molecules of the cell membrane. *Scientific American* **1985**, *253*, 86-90.
- Carlson, D.M., Oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucin. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 2984-2986.
- Carlson, D.M. Structures and immunochemical properties of oligosaccharides isolated from pig submaxillary mucins. *J. Bio. Chem.* **1968**, *243*, 616-626.
- Cazet, A., Julien, S., Bobowski, M., Burchell, J., Delannoy, P. Tumor-associated carbohydrate antigens in breast cancer. *Breast Cancer Research* **2010**, *12*, 204.
- Ceroni, A., Maass, K., Geyer, R., Dell, A., Haslam, S.M. GlycoWorkbench: A tool for the computer-assisted annotation of mass spectra of glycans. *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 1650-1659.
- Chen, D.X., Schwartz, P.E. CA 125 Assays for detecting Malignant ovarian tumors. *Obstet Gynecol.* **1990**, *75*, 701-704.
- Chionh, Y.T., Walduck, A.K., Mitchell, H.M., Sutton, P. A comparison of glycan expression and adhesion of mouse-adapted strains and clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **2009**, *57*, 25-31.
- Chu, F.K., Watorek, W., Maley, F. Factors affecting the oligomeric structure of yeast external invertase. *Arch. Biochem and Biophys.* **1983**, *223*, 543-555.
- Chui, D., Sellakumar, G., Green, R., Sutton-Smith, M., McQuistan, T., Marek, K., Morris, H., Dell, A., Marth, Genetic remodeling of protein glycosylation in vivo induces autoimmune disease. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 1142-1147.
- Ciucanu, I. Per-O-methylation reaction for structural analysis of carbohydrates by mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *576*, 147-155.
- Cohen, R.E., Levine, M.J. Salivary glycoproteins. In: Tenouvu JO: Human saliva: Clinical chemistry and microbiology, CRC Press. Inc.: Boca Raton, FL **1989**, Vol. 1, pp.101-130.
- Crispin, M.D., Ritchie, G.E., Critchley, A.J., Morgan, B.P., Wilson, I.A., Dwek, R.A., Sim, R.B., Rudd, P.M. Monoglucosylated glycans in the secreted human complement component C3: implications for protein biosynthesis and structure. *FEBS Lett.* **2004**, *566*, 270-274.
- D'Adamo, P.J. and Kelly, G.S. Metabolic and immunologic consequences of ABH secretor and Lewis subtype status, *Alternative Medicine Review* **2001**, *6*, 395.
- Danjo, Y., Watanabe, H., Tisdale, A.S., George, M., Tsumura, T., Abelson, M.B., Gipson, I.K. Alteration of mucin in human conjunctival epithelia in dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **1998**, *39*, 2602-2609.

- Dempski, R.E. and Imperiali, B. Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 844-850.
- Dennis, J. W., Laferté, S. Oncodevelopmental expression of -GlcNAc- β 1-6Man α 1-6Man β 1-branched asparagine linked oligosaccharides in murine tissues and human breast carcinomas. *Cancer Research* **1989**, *49*, 945-950.
- Dennis, J.W., Granovsky, M., Warren, C.E. Protein glycosylation in development and disease. *BioEssays* **1999a**, *21*, 412-421.
- Dennis, J.W., Granovsky, M., Warren, C.E. Glycoprotein glycosylation and cancer progression. *Biochim. Biophys. Acta - General Subjects* **1999b**, *1473*, 21-34.
- Denny, P.A., Denny, P.C. A mouse submandibular sialomucin containing both N- and O-glycosyllic linkages. *Carbohydr. Res.* **1982**, *110*, 305-314.
- Dietl, J. Übersicht: Aktuelle Aspekte des Ovarialcarcinoms, *GebFra* **56**, **1996**, 331-344.
- Dijk, van W., Koeleman, C., van het Hof, B., Poland, D., Jakobs, C., Jaelen, J. Increased α 3-fusylation of α 1-acid glycoprotein in patients with congenital disorder of glycosylation type IA (CDG-Ia) *FEBS Letters* **2001**, *494*, 232-235.
- Doherty, P., Cohen, J., Walsh, F.S. Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid. *Neuron* **1990**, *5*, 209-219.
- Dolman, K.M., Brouwer, N., Frakking, F.N., Flato, B., Tak, P.P., Kujipers, T.W., Forre, O., Smerdel-Ramoya, A. Mannose-binding lectin deficiency is associated with early onset of polyarticular juvenile rheumatoid arthritis: a cohort study. *Arthritis Res. Ther.* **2008**, *10*, R32.
- Domon, B., Costello, C.E. Structure elucidation of glycosphingolipids and gangliosides using high-performance tandem mass spectrometry. *Biochemistry* **1988**, *27*, 1534-1543.
- Duffy, M.J., Bonfrer, J.M., Kulpa, J., Rustin, G.J., Soletormos, G., Torre, G.C., Tuxen, M.K., Zwirner, M. CA125 in ovarian cancer: European group on tumor markers guidelines for clinical use. *Int. J. Gynecol. Cancer* **2005**, *15*, 679-691.
- Dwek, R.A. Towards understanding the function of sugars. *Biochem. Soc. Trans* **1995**, *23*, 1-25.
- Dwek, R.A. Towards understanding the function of sugars. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 683-720.
- Dwek, R.A. Biological importance of glycosylation. *Dev. Biol. Stand.* **1998**, *96*, 43-47.
- Edge, C.J., Joao, H.C., Woods, R.J., Wormald, M.R. The conformational effects of N-linked glycosylation. *Biochem. Soc. Trans.* **1993**, *21*, 452-455.
- Endo, T. O-mannosyl glycans in mammals. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1473*, 237-246.
- Chen, F.T., Dobashi, T.S., Evangelista, R.A. Quantitative analysis of sugar constituents of glycoproteins by capillary electrophoresis. *Glycobiology* **1998**, *8*, 1045 - 1052.

- Faillard, H. The early history of sialic acids. *Trends Biochem Sci* **1989**, *14*, 237-41.
- Feizi, T. The blood group Ii system: A carbohydrate antigen system defined by naturally monoclonal or oligoclonal autoantibodies of man. *Immunol. Commun.* **1981**, *10*, 127–156.
- Fredriksson, S-A., Podbielska, M., Nilsson, B., Krotkiewska, B., Lisowska, E., Krotkiewski, H. ABH blood group antigens in N-glycan of human glycoporphin A. *Arch. Biochem. Biophys.* **2010**, *498*, 127-135; Stanley, P., Cummings, R.D. „The A, B and H blood groups“ In: *Essentials of glycobiology*, 2nd edition, (eds.) Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press **2009**, Chapter 13.
- Freeze, H.H. and Westphal, V. Balancing N-linked glycosylation to avoid disease. *Biochimie* **2001**, *83*, 791-799.
- Frisch, E., Kaup, M., Egerer, K., Weimann, A., Tauber, R., Berger, M., Blanchard, V. Profiling of Endo H-released serum N-glycans using CE-LIF and MALDI-TOF-MS – Application to rheumatoid arthritis. *Electrophoresis* **2011**, *32*, 3510-3515.
- Fukuda, M. „Molecular Glycobiology.“ In: *Cell Surface Carbohydrates: Cell-Type Specific Expression*, M. Fukuda, O. Hingsaul, Hrsg., Oxford University Press: Oxford, **1994**, 1-52.
- Fukuda, M., Hiraoka, N., Akama, T.O., Fukuda, M.N. Carbohydrate-modifying sulfotransferases: structure, function, and pathophysiology. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 47747–50.
- Fukuyama, S., Kawaoka, Y. The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. *Curr. Opin. Immunol.* **2011**, *23*, 481-486
- Furukawa, K. and Okajima, T. Galactosyltransferase I is a gene responsible for progeroid variant of Ehlers-Danlos syndrome: molecular cloning and identification of mutations. *Biochimica et Biophysica Acta* **2002**, *1573*, 377-381.
- Fuster, M.M., Esko, J.D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer* **2005**, *5*, 526-542.
- Ge, S., Wang, Z. An overview of influenza A virus receptors. *Crit. Rev. Microbiol.* **2011**, *37*, 157-165.
- Gedye, R., Smith, F., Westaway, K., Ali, H., Baldisera, L., Laberge, L., Rousell, J. The use of microwave ovens for rapid organic synthesis. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 279-282.
- Gilbert, S.F. Ageing and cancer as diseases of epigenesis. *J. Biosci.* **2009**, *34*, 601–604.
- Gindzieński A., Zwierz, K. Isolation and fractionation of human gastric mucus gel. *Biomed. Biochim. Acta.* **1987**, *46*, 165–176.
- Goetz, J., Novotny, M., Mechref, Y. Enzymatic/chemical release of O-glycans allowing MS analysis at high sensitivity, *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 9546–9552.
- Gornik, I., Marvic, G., Dumic, J., Flögel, M., Lauc, G. Fucosylation of IgG heavy chains is increased in rheumatoid arthritis. *Clin. Biochem.* **1999**, *32*, 605-608.

- Green, J.W., Pearl, I.A., Haigh, F.C. Fast reactions in alkaline pulping. II. The peeling reaction. Verlag: Appleton, Wis. *Institut of Paper Chemistry* **1977**, 42.
- Greenwell, P. Blood group antigens: molecules seeking a function? *Glycoconj J* **1997**, *14*, 159-173.
- Gregorian, A., Torossian, S., Demetriou, M. T-cell growth, cell surface organization, and the galecton-glycoprotein lattice. *Immunol. Rev.* **2009**, *230*, 232-246.
- Grünewald, S., Matthijs, G., Jaeken, J. Congenital disorders of glycosylation: a review. *Pediatr. Res.* **2002**, *52*, 618-24.
- Guérardel, Y., Chang, L.-Y., Fujita, A., Coddeville, B., Maes, E., Sato, C., Harduin-Lepers, A., Kubokawa, K., Kitajima, K. Sialome analysis of the cephalochordate *Branchiostoma belcheri*, a key organism for vertebrate evolution. *Glycobiology* **2012**, *22*, 479-491.
- Guile, G.R., Harvey, D.J., O'Donnell, N.; Powell, A.K., Hunter, A.P., Zamze, S., Fernandes, D.I., Dwek, R.A., Wing, D.R. Identification of highly fucosylated N-linked oligosaccharides from the human parotid gland. *Eur. J. Biochem.* **1998**, *258*, 623-656.
- Guttman, A. High-resolution carbohydrate profiling by capillary gel electrophoresis. *Nature* **1996**, *380*, 461-462.
- Guttamn, A., Chen, F.T., Evangelista, R.A., Cooke, N. High-resolution capillary gel electrophoresis of reducing oligosaccharides labeled with 1-aminopyrene-3,6,8-trisulfate. *Anal. Biochem.* **1996**, *233*, 234-242.
- Haeggglund, P., Brunkenbork, J., Elortza, F., Jensen, O., Roepstorff, P. A New Strategy for Identification of N-Glycosylated Proteins and Unambiguous Assignment of Their Glycosylation Sites Using HILIC Enrichment and Partial Deglycosylation. *J. of Proteome Research* **2004**, *3*, 556-566.
- Hakomori, S. Blood group ABH and Ii antigens of human erythrocytes: Chemistry, polymorphism, and their developmental change. *Semin. Hematol.* **1981**, *18*, 39-62.
- Harris, R.J., Spellman, M.W. O-linked fucose and other posttranslational modifications unique to EGF modules. *Glycobiology* **1993**, *3*, 219-224.
- Hart, G.W. Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu Rev. Biochem.* **1997**, *66*, 315-335.
- Hashimoto, C., Cohen, R.E., Zhang, W.-J., Ballou, C.E. Carbohydrate chains on yeast carboxypeptidase Y are phosphorylated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 2244-2248.
- Helenius, A., and Aebi, M. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **2001**, *291*, 2364-2369.

- Hemmerich, S., Lee, J.K., Bhakta, S., Bistrup, A., Ruddle, N.R., Rosen, S.D. Chromosomal localization and genomic organization for the galactose/N-acetylgalactosamine/N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase gene family. *Glycobiology* **2001**, *11*, 75–87.
- Henry, S., Oriol, R., Samuelsson, B. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. *Vox Sang.* **1995**, *69*, 166-182.
- Hoja-Lukowicz, D., Ciołczyk, D., Bergquist, J., Lityńska, A., Laider, P. High-mannose-type oligosaccharides from human placental arylsulfatase A are core fucosylated as confirmed by MALDI MS. *Glycobiology* **2000**, *10*, 551-557.
- Holbrook, W.P., Blackwell, C.C. Secretor status and dental caries in Iceland. *FEMS Microbiol Immunol*, **1989**, *1*, 397-399.
- Honke, K., Fujii, T., Makita, A. Arylsulfatase A protein in sera of cancer patients. *Cancer* **1995**, *8*, 139-143.
- Hossler, P., Mulukutla, B.C., Hu, W. Systems analysis of N-glycan processing in mammalian cells, *PloS one* **2007**, *2*, 713.
- Hounsell, E.F. „Glycoprotein Analysis in Biomedicine.“ In: Humana Press: Totowa, **1993**, 1-15.
- Huang, Y., Mechref, Y., Tian, J., Gong, H., Lennarz, W.J., Novotny, M.V. A simple sample preparation for enhancing the sensitivity of mass spectrometric oligosaccharide determinations through the use of an adsorptive hydrophobic resin. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2000**, *14*, 1233-1237.
- Huang, Y., Mechref, Y., Novotny, M.V. Microscale nonreductive release of O-linked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 6063-6069.
- Huang, Y., Konse, T., Mechref, Y., Novotny, M.V. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry compatible beta-elimination of O-linked oligosaccharides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16*, 1199-1204.
- Hubbard, S.C., Robbins, P.W. Synthesis and processing of protein-linked Oligosaccharides in vivo. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 4568-4576.
- Hynes, S.O., Hirno, S., Wadström, T., Moran, A.P. Differentiation of *Helicobacter pylori* isolates based on lectin binding of cell extracts in an agglutination assay. *J. Clin. Microbiol.* **1999**, *37*, 1994-1998.
- Ilver, D., Arnqvist, A., Ogren, J., Frick, I.M., Kersulyte, D., Incecik, E.T., Berg, D.E., Covacci, A., Engstrand, L., Boren, T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **1998**, *279*, 373-377.
- Inamori, K., Endo, T., Gu, J., Matsuo, I., Ito, Y., Fuji, S. et al. N-Acetylglucosaminyltransferase IX acts on the GlcNAc beta 1,2-Man alpha 1-Ser/Thr moiety, forming a 2,6-branched structure in brain O-mannosyl glycan. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 2337-2340.
- Itai, S., Nishikata, J., Yoneda, T., Ohmori, K., Tsunekawa, S., Hiraiwa, N., Yamabe, H., Arij, S., Tobe, T., Kannagi, R. Tissue distribution of 2-3 and 2-6 sialyl Lewis A antigens and

- significance of the ratio of two antigens for the differential diagnosis of malignant and benign disorders of the digestive tract. *Cancer* **1991**, *67*, 1576-1587.
- Jaeken, J., Vanderschueren-Lodeweyckx, M., Casaer, P., Snoeck, L., Corbeel, L., Eggermont, E., Eeckels, R. Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum proteins, FSH and GH levels, partial TBG-deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome? *Pediatr. Res.* **1980**, *14*, 179.
- Jang-Lee, J., North, S.J., Sutton-Smith, M., Goldberg, D., Panico, M., Morris, H., Haslam, S., Dell, A. Glycomic profiling of cells and tissues by mass spectrometry: fingerprinting and sequencing methodologies. *Methods Enzymol.* **2006**, *415*, 59-86.
- Jensen, O.N. Modification-specific proteomics: Characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 33-41.
- Jeong, H.Y., Lee, J.Y., Park, T.H. Specificity of enzymatic in vitro glycosylation by PNGase F: a comparison of enzymatic and non-enzymatic glycosylation. *Enz. Microb. Tech.* **2004**, *35*, 587-591.
- Kabel, M.A., Heijnis, W.H., Bakx, E.J., Kuijpers, R., Voragen, A.G.J., Schols, H.A. Capillary electrophoresis fingerprinting, quantification and mass-identification of various 9-aminopyrene-1,4,6-trisulfate-derivatized oligomers derived from plant polysaccharides. *J. of Chromatography A* **2006**, *1137*, 119-126.
- Kannagi, R. Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconjugate J* **1997**, *14*, 577-584.
- Karakasa, I., Iwase, H., Hotta, K., Tanaka, Y., Omura, S. Partial purification and characterization of an endo- α -N-acetylgalactosaminidase from the culture medium of *Streptomyces* sp. OH-11242. *Biochem. J.* **1992**, *288*, 475-482.
- Karakasa, I., Iwase, H., Hotta, K. Structural determination of the O-linked sialyl oligosaccharides liberated from fetuin with endo- α -N-acetylgalactosaminidase-S by HPLC analysis and 600 MHz $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *247*, 709-715.
- Karlsson, N.G. and Thomsson, K. A. Salivary MUC7 is a major carrier of blood group I type O-linked oligosaccharides serving as the scaffold for sialyl Lewis x. *Glycobiology* **2009**, *119*, 288-300.
- Kaslick, R.S., West, T.L., Chasens, A.I. Association between AB0 blood groups, HL-A antigens and periodontal diseases in young adults: A follow-up study. *J. Periodontol.* **1980**, *51*, 339-342.
- Kaufman, E., Lamster, I.B. The diagnostic applications of saliva-a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **2002**, *13*, 197-212.
- Kelly, R.J., Rouquier, S., Giorgi, D., Lennon, G.G., Lowe, J.B. Sequence and expression of a candidate for the human Secretor blood group $\alpha(1,2)$ fucosyltransferase gene (FUT2). Homozygosity for an enzyme-inactivating nonsense mutation commonly correlates with the non-secretor phenotype. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 4640-4649.
- Kelly, G.S. Metabolic and immunologic consequences of ABH secretor and Lewis subtype

- status, *Alternative Medicine Review* **2001**, 6, 395.
- Kim, Y., Varki, A. Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconjugate J.* **1997**, 14, 569-576.
- Kim, H.-J., Leszyk, J., Taub, I.A. Direct observation of protein glycosylation by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric Food Chem.* **1997**, 45, 2158-2165.
- King, M. Blood group antigens on human erythrocytes – distribution, structure and possible functions. *Biochim Biophys. Acta* **1994**, 1197, 15-44.
- Kobata, A. Structures and functions of sugar chains of glycoproteins. *Eur. J. Biochem.* **1992**, 209, 483-501.
- Kobata, A. A journey to the world of glycobiology. *Glycoconjugate J.* **2000**, 17, 443-464.
- Kobata, A., Amano, J. Altered glycosylation of proteins produced by malignant cells, and application for the diagnosis and immunotherapy of tumors. *J. Immunol. Cell Biol.* **2005**, 83, 429-439.
- Kolodny, E.H., Fluharty, A.L. Metachromatic leukodystrophy and multiple sulfatase deficiency: sulfatide lipidosis. In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, McGraw-Hill, New York, **1995**, 2, 2693-2739.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev. Biochem.* **1985**, 54, 631-664.
- Kozak, K.R., Amneus, M.W., Pusey, S.M., Su, F., Luong, M.N., Luong, S.A., Reddy, S.T., Farias-Eisner, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, 100, 12343-12348.
- Kozak, R.P., Royle, L., Gardner, R.A., Fernandes, D.L., Wuhler, M. Suppression of peeling during the release of O-glycans by hydrazinolysis. *Anal. Biochem.* **2012**, 423, 119–128.
- Kronewitter, S.R., Leoz, M.L.A. de, Peacock, K.S., McBride, K.R., An, H.J., Miyamoto, S., Leiserowitz, G.S., Lebrilla, C.B. Human serum processing and analysis methods for rapid and reproducible N-glycan mass profiling. *J Proteome Res* **2010**, 9, 4952-4959.
- Kuhn, P., Guan, C., Cui, T., Tarentino, A.L., Plummer, T.H., Jr., Van Roey, P. Active site and oligosaccharide recognition residues of Peptide-N⁴-(N-acetyl-b-D-glucosaminyl) asparagine Amidase F. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 29493-29497.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, 227, 680-685.
- Laidler, P., Kowalsky, D., Silberring, J. Arylsulfatase A in serum from patients with cancer of various organs. *Clin. Chim. Acta* **1991**, 204, 69-78.
- Laine, R.A. *Glycosciences: Status and Perspectives*, Chapman & Hall: London, Weinheim **1997**, 1-14.
- Landmesser, I., Dahm, L., Tang, J., Rutishauser, U. Polysialic acid as a regulator of intramuscular nerve branching during embryonic development. *Neuron* **1990**, 4, 655–667.

- Lapolla, A., Fedele, D., Seraglia, R., Catinella, S., Tradi, P. Matrix assisted laser desorption/ionization capabilities in the study of non-enzymatic protein glycosylation. *Rapid Commun Mass Spectrum* **1994**, *8*, 645-652.
- Laroy, W., Contreras, R., Callewaert, N. Glycome mapping on DNA sequencing equipment. *Nature Protocols* **2006**, *1*, 397-405.
- Larsen, R.D., Ernst, L.K., Nair, R.P., Lowe, J.B. Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 6674-6678.
- Lee, J.Y., Park, T.H., Enzymatic in vitro glycosylation using peptide-N-glycosidase F. *Enz. Microb. Tech.* **2002**, *30*, 716-720.
- Leoz, M.L.A. de, Young, L.J.T., An, H.J., Kronwritter, S.R., Kim, J., Miyamoto, S., Borowsky, A.D., Chew, H.K., Lebrilla, C.B. High-Mannose glycans are elevated during breast cancer progression. *Mol. Cell Proteomics* **2011**, doi:10.1074/mcp.M110.002717.
- Levine, M.J., Reddy, M.S., Tabak, L.A., Loomis, R.E., Bergey, E.J., Jones, P.C., Cohen, R.E., Stinson, M.W., Al-Hashimi, I. Structural aspects of salivary glycoproteins. *J. Dent. Res.* **1987**, *66*, 436-441.
- Li, H., Singh, S., Zeng, Y., Song, H., Wang, L.X. Chemoenzymatic synthesis of CD52 glycoproteins carrying native N-glycans. *Bioorg Med Chem Lett* **2005a**, *15*, 895-898.
- Li, B., Zeng, Y., Hauser, S., Song, H., Wang, L.X. Highly efficient endoglycosidase-catalyzed synthesis of glycopeptides using oligosaccharide oxazolines as donor substrates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005b**, *127*, 9692-9693.
- Li, H., Li, B., Song, H., Breydo, L., Baskakov, I.V., Wang, L.X. Chemoenzymatic synthesis of HIV-1 V3 glycopeptides carrying two N-glycans and effect of glycosylation on the peptide domain. *J. Org. Chem.* **2005c**, *70*, 9990-9996.
- Lis, H. and Sharon, N. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *218*, 1-27.
- Lis, H. and Sharon, N. Lectins: Carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637-674.
- Liu, C., Litscher, E.S., Wassermann, P.M. Zona pellucida glycoprotein mZP3 is not dependent on the extent of glycosylation of its polypeptide or on sulfatation and sialylation of its oligosaccharides. *J. of Cell Science* **1997**, *110*, 745-752.
- Liu, X., Chan, K., Chu, I.K., Li, J. Microwave-assisted nonspecific proteolytic digestion and controlled methylation for glycomics applications. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 2870-2877.
- Lloyd, K.O., Yin, B.W., Kudryashov, V. Isolation and characterization of ovarian cancer antigen CA 125 using a new monoclonal antibody (VK-8): identification as a mucin-type molecule. *Int. J. Cancer* **1997**, *71*, 842-850.
- Lottspeich, F. and Engels, J.W. *Bioanalytik*, Spektrum Akad. Verl.: München, **2006**, Kapitel: 22.

- Lowe, J.B. Glycosylation, Immunity, and Autoimmunity. *Cell* **2001**, *104*, 809-812.
- Maass, K., Ranzinger, R., Geyer, H., von der Lieth, C.W., Geyer, R. GlycoPeakfinder – de novo composition analysis of glycoconjugates. *Proteomics* **2007**, *7*, 4435-4444.
- Mackiewicz, A., Pawlowski, T., Mackiewicz-Pawlowska, A., Wiktorowicz, K., Mackiewicz, S. Microheterogeneity forms of alpha 1-acid glycoprotein as indicator of rheumatoid arthritis activity. *Clin. Chim. Acta* **1987**, *163*, 185-190.
- Mahdavi, J., Sondén, B., Hurtig, M., Olfat, F.O., Forsberg, L., Roche, N., Ångström, J., Larsson, T., Teneberg, S., Karlsson, K.A., Altraja, S., Wadström, T., Kersulyte, D., Berg, D.E., Dubois, A., Petersson, C., Magnusson, K.E., Norberg, T., Lindh, F., Lundskog, B. B., Arnqvist, A., Hammarström, L., Borén, T. Helicobacter pylori SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **2002**, *297*, 573-578.
- Maley, F., Trimble, R.B., et al. Characterisation of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of the endoglycosidases. *Anal. Biochem.* **1989**, *180*, 195-204.
- Mandel, I.D. The functions of saliva. *J. Dent. Res. (Spec. Iss.)* **1987**, *66*, 623-627.
- Marquardt, T. and Freeze, H. Congenital disorders of glycosylation: glycosylation defects in man and biological models for their study. *J. Biol. Chem.* **2001**, *382*, 161-177.
- Matsui, T., Titani, K., Mizuochi, T. Structures of the asparagine-linked oligosaccharide chains of human von Willebrand factor. Occurrence of blood group A, B, and H(O) structures. *J Biol. Chem.* **1992**, *267*, 8723-8731.
- Mattila, P., Salminen, H., Hirvas, L., Niittymaki, J., Salo, H., Niemela, R., Fukuda, M., Renkonen, O., Renkonen, R. The centrally acting β 1,6N-acetylglucosaminyltransferase (GlcNAc to Gal). Functional expression, purification, and acceptor specificity of a human enzyme involved in midchain branching of linear poly-N-acetyllactosamines. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 27633–27639.
- McEver, R. Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 585-591.
- Mechref, Y., Muzikar, J., Novotny, M.V. Comprehensive assessment of N-glycans derived from a murine monoclonal antibody: a case for multimethodological approach. *Elektrophoresis* **2005**, *26*, 2034-2046.
- Mechref, Y., Hu, Y., Garcia, A., Hussein, A. Identifying cancer biomarkers by mass spectrometry-based glycomis. *Electrophoresis* **2012**, *33*, 1755-1767.
- Meden, H. Ovarialkarzinom Aktuelle Aspekte zur Diagnostik und Therapie in Klinik und Praxis, 1. Auflage, de Gruyter Verlag Berlin New York **1996**.
- Mellis, S.J., Baenziger, J.U. Structures of the oligosaccharides present at the three asparagine-linked glycosylation sites of human IgD. *J. Biol. Chem.* **1983a**, *258*, 11546-11556.
- Mellis, S.J., Baenziger, J.U. Size fractionation of anionic oligosaccharides and glycopeptides by high-performance liquide chromatography. *Anal. Biochem.* **1983b**, *134*, 442-449.

- Merry, A.H., Neville, D.C.A., Royle, L., Matthews, B., Harvey, D.J., Dwek, R.A., Rudd, P.M. Recovery of intact 2-aminobenzamide-labeled O-glycans released from glycoproteins by hydrazinolysis. *Anal. Biochem.* **2002**, *304*, 91–99.
- Messner, P. Bacterial glycoptoteins. *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 3-11.
- Morelle, W., Slomianny, M.C., Diemer, H., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., Michalski, J.C. Fragmentation characteristics of permethylated oligosaccharides using a matrix-assisted laser desorption/ionization two-stage time-of-flight (TOF/TOF) tandem mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 2637-2649.
- Morelle, W., Slomianny, M.C., Diemer, H., Schaeffer, C., van Dorsselaer, A., Michalski, J.C. Structural characterization of 2-aminobenzamide-derivatized oligosaccharides using a matrix-assisted laser desorption/ionization two-stage time-of-flight tandem mass spectrometer. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 2075-2084.
- Moody, A.M., Chui, D., Reche, P.A., Priatel, J.J., Marth, J.D., Reinherz, E.L. Developmentally regulated glycosylation of the CD8ab co-receptor stalks modulates ligand binding. *Cell* **2001**, *107*, 501–12.
- Nadkarni, R.A. Application of microwave oven sample dissolution in analysis. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 2233-2237.
- Nakagawa, H., Hato, M., Takegawa, Y., Deguchi, K., Ito, H., Tanahata, M., Iwasaki, N., Minami, A., Nishimura, S.-I. Detection of altered N-glycan profiles in whole serum from rheumatoid arthritis patients. *J. of Chromatography B* **2007**, *853*, 133-137.
- Narita, T., Funahashi, H., Satoh, Y., Watanabe, T., Sakamoto, J., Takagi, H. Association of expression of blood group-related carbohydrate antigens with prognosis in breast cancer. *Cancer* **1993**, *71*, 3044-3053.
- Nieuw Amerongen, A.V., Bolscher, J.G.M., Veerman, E.C.I. Salivary mucins: Protective functions in relation to their diversity. *Glycobiology* **1995**, *5*, 733-740.
- Nieuw Amerongen, A.V., Bolscher, J.G., Veerman, E.C. Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res.* **2004**, *38*, 247-253.
- Ohl, C., Albach, C., Altevogt, P., Schmitz, B. N-glycosylation patterns of HSA/CD24 from different cell lines and brain homogenates: a comparison. *Biocimie*, **2003**, *85*, 565-573.
- Okajima, T., Fukumoto, S., Furukawa, K., Urano, T., Furukawa, K. Molecular basis for the progeroid variant of Ehlers-Danlos syndrome. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 2841-2844.
- Ozcan, S., An, H.J., Vieira, A.C., Park, W.G., Kim, J., Mannis, M.J., Lebrilla, C.B. Characterization of novel O-glycans isolated from tear and saliva of ocular rosacea patients. *J Proteome Res* **2013**, DOI: 10.1021/pr3008013.
- Packer, N.H., Lawson, M.A., Jardine, D.R., Redmond, J.W. A general approach to desalting oligosaccharides released from glycoproteins. *Glycoconj.* **1998**, *15*, 737-747.

- Palma, S. di, Boersema, P.J., Heck, A.J.R., Mohammed, S. Zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography (ZIC-HILIC and ZIC-cHILIC) provide high resolution separation and increase sensitivity in proteome analysis. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 3440-3447.
- Parsons, T.B., Moir, J.W.B., Fairbanks, A.J. Synthesis of a truncated bi-antennary complex-type N-glycan oxazoline; glycosylation catalysed by the endohexosaminidase Endo A and Endo M. *Org. Biomol Chem.* **2009**, *7*, 3128-3140.
- Patel, T., Bruce, J., Merry, A., Bigge, C., Wormald, M., Jaques, A., Parekh, R. Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both N- and O-linked oligosaccharides from glycoproteins. *Biochemistry* **1993**, *32*, 679-693.
- Patel, T.P., Parekh, R.B., Release of oligosaccharides from glycoproteins by hydrazinolysis. *Meth. Enzymol.* **1994**, *230*, 57-66.
- 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., Takeuchi, F., Nagano, Y., Miyamoto, T., Kobata, A. *Nature* **1985**, *316*, 452-457.
- Park, S.J., Lee, J.Y., Park, T.H. In vitro glycosylation of peptide (RKDVY) and RNase A by PNGase F. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *13*, 191-195.
- Parodi, A.J. Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 69-93.
- Parsons, T. B.; Moir, J. W. B.; Fairbanks, A. J. Synthesis of a truncated bi-antennary complex-type N-glycan oxazoline; glycosylation catalysed by the endohexosaminidases Endo A and Endo M. *Org Biomol Chem* **2009**, *7*, 3128–3140.
- Pastan, I., Lovelace, E.T., Gallo, M.G., Rutherford, A.V., Magnani, J.L., Willingham, M.C. Characterization of Monoclonal Antibodies B1 and B3 That React with Mucinous Adenocarcinomas. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 3781-3787.
- Paszkiwiczgadek, A., Gindzieński A., Porowska, H. The use of preparative polyacrylamide gel electrophoresis and electroelution for purification of mucus glycoproteins. *Anal. Biochem.* **1995**, *226*, 263-267.
- Pecorelli, S., Benedet, J., Beller, U., Creasman, W., Heintz, A., Pettersson, F. *FIGO: Annual Report on the Results of Treatment in Gynaecological Cancer*, Oxford Press: England **2001**, *6*, 1-184.
- Penaloza, A., Decaestecker, C., Ribai, P., Nagy, N., Salmon, I., Appelboom, T., Danguy, A., Kiss, R., Steinfeld, S. Sialic acid residues in the labial salivary glands from Sjogren's syndrome patients. *Clin Exp Rheumatol.* **1999**, *17*, 713–717.
- Perez-Vilar, J., Hill, R.L. The structure and assembly of secreted mucins. *J.Biol.Chem.* **1999**, *274*, 31751-31754.
- Petricoin III, E.F., Ardekani, A.M., Hitt, B.A., Levine, P.J., Fusaro, V.A., Steinberg, S. M., Mills, G.B., Simone, C., Fishman, D.A., Kohn, E.C., Liotta, L.A. Use of proteomic

- patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* **2002**, *359*, 572-577.
- Plummer, T.H., Jr. and Tarentino, A.L. Facile cleavage of complex oligosaccharides from glycopeptides by almond emulsin peptide: N-glycosidase. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 10243-10246.
- Plummer, T.H., Jr., Elder, J.H., Alexander, S., Phelan, A.W., Tarentino, A.L. Demonstration of peptide: N-glycosidase F activity in endo-beta-N-acetylglucosaminidase F preparations. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 10700-10704.
- Sparks, S.E., Krasnewich, D.M. Congenital Disorder of Glycosylation Overview. *GeneReviews* **2005**, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1332>.
- Prakobphol, A., Leffler, H., Fisher, S.J. The high-molecular-weight human mucin is the primary salivary carrier of ABH, Le(a), and Le(b) blood group antigens. *Crit Rev Oral Biol Med* **1993**, *4*, 325-333.
- Prakobphol, A., Boren, T., Ma, W., Zhixiang, P., Fisher, S.J. Highly glycosylated human salivary molecules present oligosaccharides that mediate adhesion of leukocytes and *Helicobacter pylori*. *Biochemistry* **2005**, *44*, 2216-2224.
- Priatel, J.J., Chui, D., Hiraoka, N., Simmons, C.J.T., Richardson, K.B., Page, D.M., Fukuda, M., Varki, N.M., Marth, J.D. The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T cell homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity* **2000**, *12*, 273-283.
- Prien, J.M., Huysentruyt, L.C., Ashline, D.J., Lapadula, A.J., Seyfried, T.N., Reinhold, V.N. Differentiating N-linked glycan structural isomers in metastatic and nonmetastatic tumor cells using sequential mass spectrometry. *Glycobiology* **2008**, *18*, 353-366.
- Rademaker, G.J., Haverkamp, J., Thomas-Oates, J. Determination of glycosylation sites in O-linked glycopeptides: A sensitive mass spectrometric protocol. *Org. Mas. Spectrom.* **1993**, *28*, 1536-1541.
- Raju, T.S., Briggs, J.B., Borge, S.M., Jones, A.J. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology* **2000**, *10*, 477-486.
- Rasmussen, J.R., Davis, J., Risley, J.M., Van Etten, R.L. Identification and derivatization of (oligosacchary)amines obtained by treatment of asparagine-linked glycopeptides with N-glycanase enzyme. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 1124-1126.
- Reis, C.A., Osorio, H., Silva, L. et al. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection, *J. Clin. Pathol.* **2010**, *63*, 322-329.
- Rising, T.W.D.F., Claridge, T.D.W., Davies, Gamblin, D.P., Moir, J.W.B., Fairbanks, A.J. Synthesis of N-glycan oxazoline: donors for endohexosaminidase catalysed glycosylation. *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1574-1596.
- Risley, J.M., VanEtten, R.L. H-1-NMR evidence that almond Peptide-N-glycosidase is an amidase – Kinetic data and trapping of the intermediate. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*,

5488-5492.

- Robbins, P.W., Trimble, R.B., Wirth, D.F., Hering, C., Maley, F., Maley, G.F., Das, R., Gibson, B.W., Royal, N., Biemann, K. Primary structure of the streptomyces enzyme endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 7577-7583.
- Roth, J., Kempf, A., Reuter, G., Schauer, R., Gehring, W.J., Occurrence of sialic acids in *Drosophila melanogaster*. *Science* **1992**, *256*, 673-5.
- Roth, J. Protein glycosylation in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus and cell type-specificity of cell surface glycoconjugate expression: analysis by the protein A-gold and lectin-gold techniques. *Histochem. Cell Biol.* **1996**, *106*, 79-92.
- Royle, L., Mattu, T.S., Hart, E., Langridge, J.I., Merry, A.H., Murphy, N., Harvey, D.J., Dwek, R.A., Rudd, P.M. An analytical and structural database provides a strategy for sequencing O-glycans from microgram quantities of glycoproteins. *Anal. Biochem.* **2002**, *304*, 70-90.
- Rudd, P.M., Dwek, R.A. Glycosylation and the immune system *J. Protein Chem.* **1998**, *17*, 519.
- Rutishauser, U. Polysialic acid and the regulation of cell interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1996**, *8*, 679-684.
- Rutishauser, U. Polysialic acid at the cell surface: biophysics in service of cell interactions and tissue plasticity. *J. Cell Biochem.* **1998**, *70*, 304-312.
- Sandoval, W.N., Arellano, F., Arnott, D., Raab, H., Vandel, R., Lill, J.R. Rapid removal of N-linked oligosaccharides using microwave assisted enzyme catalysed deglycosylation. *Int. J. Mass Spectrom* **2007**, *259*, 117-123.
- Scannapieco, F.A. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. *Crit Rev Oral Biol Med* **1994**, *5*, 203-248.
- Schachter, H. Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins. *Cell Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 1085-1104.
- Schauer, R., Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr. Chem. Biochem.* **1982**, *4*, 131-234.
- Schmidt, K. Sugar rush. *New Scientist* **2002**, *176*, 34-38.
- Shakin-Eshleman, S.H., Spitalnik, S.L., Kasturi, L. The amino acid at the X position of an Asn-X-Ser sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6363-6366.
- Shiozaki, K., Yamaguchi, K., Takahashi, K., Moriya, S., Miyagi, T., Expression in Colon Cancer Cells by Sialidase NEU4, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 21052-21061.
- Silberstein, S. and Gilmore, R. Biochemistry, molecular biology, and genetics of the oligosaccharyltransferase. *Faseb. J.* **1996**, *10*, 849-858.

- Sidagis, J., Ueno, K., Wang, Z.H., Hanamure, Y., Furuta, S., Ohya, M. Expression of glycoconjugates in normal and Sjogren's syndrome labial glands. *Acta Otolaryngol.* **1997**, *117*, 871-877.
- Sinclair, A.M. and Elliott, S. Glycoengineering: The effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 1626-1635.
- Singhal, A.K., Orntoft, T.F., Nudelman, E., Nance, S., Schibig, L., Stroud, M.R., Clausen, H., Hakomori, S. Profiles of Lewis-containing glycoproteins and glycolipids in sera of patients with adenocarcinoma. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 1375-1380.
- Siuzdak, G. *Mass Spectrometry for Biotechnology*, Academic Press Inc. **1996**, San Diego.
- Skates, S.J., Jacobs, I.J., Knapp, R.C. in *Methods in Molecular Medicine, Ovarian Cancer: Methods and Protocols*, Humana Press, Inc.: Totowa, **1998**, *39*, 61-73.
- Stanley, P., Schachter, H. Taniguchi, N. „N-Glycans.“ In: *Essentials of Glycobiology*. 2nd edition. Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H. et.al. (Ed.). **2009**.
- Soares, R., Marinho, A., Schmitt, F. Expression of sialyl-Tn in breast cancer. Correlation with prognostic parameters. *Pathol Res Pract* **1996**, *192*, 1181-1186.
- Spina, E., Sturiale, L., Romeo, D., Impallomeni, G., Garozzo, D., Waidelich, D., Glueckmann, M. New fragmentation mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight tandem mass spectrometry of carbohydrates. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 392-398.
- Spiro, M.J., Spiro, R.G. Release of polymannose oligosaccharides from vesicular stomatitis virus G protein during endoplasmic reticulum-associated degradation. *Glycobiology* **2001**, *11*, 803-811.
- Spiro, R.G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implication of glycopeptide bonds. *Glycobiology* **2002**, *12*, 43R-56R.
- Stephens, E., Maslen, S.L., Green, L.G., Williams, D.H. Fragmentation characteristics of neutral N-linked glycans using a MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 2343-2354.
- Streckfus, C.F., Bigler, L., Dellinger, T.M., Pfeifer, M.R., Rose, A., Thigpen, J.T. CA 15-3 and c-erbB-2 presence in the saliva of women. *Clin Oral Invest* **1999**, *3*, 138-143.
- Strous, G.J., Dekker, J. Mucin-type glycoproteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1992**, *27*, 57-92.
- Suzuki, T., Kitajima, K., Inoue, S., Inoue, Y. Occurrence and biological roles of 'proximal glycanases' in animal cell. *Glycobiology* **1994**, *4*, 777-789.
- Tabak, L.A. Structure and function of human salivary mucins. *Crit Rev Oral Biol Med* **1990**, *1*, 229-234.

- Tai, T., Yamashita, K., Ito, S., Kobata, A. Structures of the carbohydrate moiety of ovalbumin glycopeptide III and the difference in Specificity of Endo-beta-N-acetylglucosaminidases C_{II} and H*. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 6687-6694.
- Tarentino, A.L., Gomez, C.M., Plummer, T.H., Jr. Deglycosylation of asparagine-linked glycans by peptide-N-glycosidase F. *Biochemistry* **1985**, *24*, 4665-4671.
- Tarp, M.A. and Clausen, H. Mucin-type O-glycosylation and its potential use in drug and vaccine development. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1780*, 546-563.
- Taylor, M.E. and Drickamer, K. „Introduction to glycobiology.“ Oxford, Oxford Univ. Press, **2003**, Chapter: 3.
- Ten Hagen, K.G., Fritz, T.A., Tabak, L.A. All in the family: the UDPGalNAc: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiol.* **2003**, *13*, 1R-16R.
- Thatcher, B.J., Doherty, A.E., Orvisky, E., Martin, B.M., Henkin, R.I. Gustin from human parotid saliva is carbonic anhydrase VI. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *250*, 635-641.
- Thomsson, K.A., Prakobphol, A., Leffler, H., Reddy, M.S., Levine, M.J., Fisher, S.J., Hansson, G.C. The salivary mucin MG1 (MUC5B) carries a repertoire of unique oligosaccharides that is large and diverse. *Glycobiology* **2002**, *12*, 1-14.
- Thomsson, K.A., Schulz, B.L., Packer, N.H., Karlsson, N.G. MUC5B glycosylation in human saliva reflects blood group and secretor status. *Glycobiology* **2005**, *15*, 791-804.
- Karlsson, N.G., Thomsson, K.A. Salivary MUC7 is a major carrier of blood group I type O-linked oligosaccharides serving as the scaffold for sialyl Lewis x. *Glycobiology* **2009**, *19*, 288-300.
- Tretter, V., Altmann, F., Marz, L. Peptide-N⁴-(N-acetyl-beta-D-glucosaminyl) asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached alpha-1,3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *199*, 647-652.
- Trimble, R.B., Maley, F. Subunit structure of external invertase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 4409-4412.
- Trimble, R.B., Maley, F., Watorek, W. Subunit structure and carbohydrate composition of the extracellular acid phosphatase of *Rhodotorula glutinis*. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 10037-10043.
- Trimble, R.B., Maley, F., Chu, F.K. Glycoprotein biosynthesis in yeast – Protein conformation affects processing of high mannose oligosaccharides on carboxypeptidase Y and Invertase. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 2562-2567.
- Trimble, R.B., Maley, F. Optimizing hydrolysis of N-linked high-mannose oligosaccharides by Endo-beta-N-acetylglucosaminidase H. *Anal. Biochem.* **1984**, *141*, 515-522.
- Troy, F.A. Polysialylation: from bacteria to brains. *Glycobiology* **1992**, *2*, 5-23.
- Uchida, Y., Tskada, Y., Sugimori, T. Enzymatic properties of neuraminidases from

- Arthrobacter ureafaciens. *J. Biochem.* **1979**, *86*, 1573-1585.
- Ura, Y., Dion, A.S., Williams, C.J., Olsen, B.D., Redfield, E.S., Ishida, M., Herlyn, M., Major, P.P. Quantitative dot blot analyses of blood-group-related antigens in paired normal and malignant human breast tissues. *Int J Cancer* **1992**, *50*, 57-63.
- Van der Reijden, W.A., Veerman, E.C.I., Nieuw Amerongen, A.V. Shear rate dependent viscoelastic behavior of human glandular salivas. *Biorheol.* **1993**, *30*, 141-152.
- Van den Steen, P., Rudd, P.M., Dwek, R.A. et al. Concepts and principles of O-linked glycosylation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *33*, 151-208.
- Varki, A. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology* **1992**, *2*, 25-40.
- Varki, A. Biological roles of oligosaccharides – All of the theories are correct. *Glycobiology* **1993**, *3*, 97-130.
- Varki, A. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature*, **2007**, *446*, 1023-1029.
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. „Historical Background and Overview.“ In: Essentials of Glycobiology. 2nd edition (eds.) Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press **2009a**.
- Varki, A., Kannagi, R., Toole, B.P. „Glycosylation changes in cancer“ In: Essentials of glycobiology, 2nd edition, (eds.) Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press **2009b**, 580–670.
- Varki, A., Kannagi, R., Toole, B.P. „Glycosylation changes in cancer“ In: Essentials of glycobiology, 2nd edition, (eds.) Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press **2009c**, chapter 16.
- Veerman, E.C.I., Bank, C.M.C., Namavar, F.; Appelmelk, B.J., Bolscher, J.G.M., Nieuw Amerongen, A.V. Sulfated glycans on oral mucin as receptors for Helicobacter pylori. *Glycobiology* **1997**, *7*, 737-743.
- Vercoutter-Edouart, A.-S., Slomianny, M.-C., Dekezer-Beseme, O., Haeuw, J.-F., Michalski, J.-C., *Proteomics* **2008**, *8*, 3236-3256.
- Vieira, A.C., An, H.J., Ozcan, S., Kim, J.-H., Lebrilla, C.B., Mannis, M.J. Glycomic Analysis of Tear and Saliva in Ocular Rosacea Patients: The Search for a Biomarker. *The Ocular Surface* **2012**, *10*, 184-192.
- Wacker, M., Linton, D., Hitchen P.G., Nita-Lazar, M., Haslam, S.M., North, S.J., Panico, M., Morris, H.R., Dell, A., Wren, B.W., Aebi, M. N-linked glycosylation in *Campylobacter jejuni* and its functional transfer to *E. coli*. *Science* **2002**, *298*, 1790-1793.

- Wada, Y., Azadi, P., Costello, C.E., Dell, A., Dwek, R.A., Geyer, H., Geyer, R., Kakehi, K., Karlsson, N.G., Kato, K., Kawasaki, N., Khoo, K.H., Kim, S., Kondo, A., Lattova, E., Mechref, Y., Miyoshi, E., Nakamura, K., Narimatsu, H., Novotny, M.V., Packer, N.H., Perreault, H., Peter-Katalinic, J., Pohlentz, G., Reinhold, V.N., Rudd, P.M., Suzuki, A., Taniguchi, N. Comparison of the methods for profiling glycoprotein glycans – HUPO human disease glycomics/proteome initiative multi-institutional study. *Glycobiology* **2007**, *17*, 411-422.
- Wang, Y., Shao, L., Shi, S., Harris, R.J., Spellman, M.W., Stanley, P., and Haltiwanger, R.S. Modification of epidermal growth factorlike repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 40338-40345.
- Wang, C., Fan, W., Zhang, P., Wang, Z., Huang, L. One-pot non-reductive O-glycan release and labeling with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) followed by ESI-MS analysis, *Proteomics* **2011**, *11*, 4229–4241.
- Wedepohl, S., Kaup, M., Riese, S.B., Berger, M., Dervede, J., Tauber, R., Blanchard, V. N-glycans analysis of recombinant L-selectin reveals sulfated GalNAc and GalNAcGalNAc motifs. *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 3430-3411.
- Wells, L., Vosseller, K., Hart, G.W. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* **2001**, *291*, 2376-2378.
- Weinstein, J., Lee, E.U., McEntee, K., Lai, P.H., Paulson, J.C. Primary structure of β -galactoside α 2,6-sialyltransferase. Conversion of membrane-bound enzyme to soluble forms by cleavage of the NH₂-terminal signal anchor. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 17735–17743.
- Wuhrer, M., Deelder, A.M. Matrix-assisted laser desorption/ionization in-source decay combined tandem time-of-flight mass spectrometry of permethylated oligosaccharides: targeted characterization of specific parts of the glycan structure. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 943-951.
- Wuyts, W. and Van Hul, W. Molecular basis of multiple exostoses: mutations in the EXT1 and EXT2 genes. *Human Mutation* **2000**, *15*, 220-227.
- Yamada, K., Hyodo, S., Kinoshita, M., Hayakawa, T., Kakehi, K. Hyphenated technique for releasing and MALDI MS analysis of O-glycans in mucin-type glycoprotein samples. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 7436–7443.
- Yan, L., Lin, B., Gao, L., Gao, S., Liu, C., Wang, C., Wang, Y., Zhang, S., Iwamori, M. Lewis (y) Antigen Overexpression Increases the Expression of MMP-2 and MMP-9 and Invasion of Human Ovarian Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2010**, *11*, 4441-4451.
- Yang, J.-M., Byrd, J.C., Siddiki, B.B., Chung, Y.-S., Okuno, M., Sowa, M., Kim, Y.S., Matta, K.L., Brockhausen, I. Alteration of O-glycan biosynthesis in human colon cancer tissues. *Glycobiology* **1994**, *4*, 873-884.
- Yeung, S.J., Pan, J., Lee, M.H. Roles of p53, Myc and HIF-1 in Regulating Glycolysis - the Seventh Hallmark of Cancer *Cell Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 3981–3999.

- Yousefi, S., Higgins, E., Daoling, Z., Pollex-Krüger, A., Hindsgaul, O., Dennis, J.W. Increased UDPGlcNAc: Gal beta 1-3GalNAc-R (GlcNAc to GalNAc) beta-1, 6-N acetylglucosaminyltransferase activity in metastatic murine tumor cell lines. Control of poly lactosamine synthesis. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 1772-1782.
- Yoshida, A., Kobayashi, K., Manya, H., Taniguchi, K., Kano, H., Mizuno, M. et al. Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev. Cell* **2001**, *1*, 717-724.
- Yu, S.Y., Wu, S.W., Khoo, K.H. Distinctive characteristics of MALDI-Q/TOF and TOF/TOF tandem mass spectrometry for sequencing of permethylated complex type N-glycans. *Glycoconj. J.* **2006**, *23*, 355-369.
- Yu, S.Y., Wu, S.W., Hsiao, H.H., Khoo, K.H. Enabling techniques and strategic workflow for sulfoglycomics based on mass spectrometry mapping and sequencing of permethylated sulfated glycans. *Glycobiology*, **2009**, *19*, 1136-1149.
- Zauner, G., Koeleman, C.A., Deelder, A.M., Wührer, M. Mass spectrometric O-glycan analysis after combined O-glycan release by b-elimination and 1- phenyl-3-methyl-5-pyrazolone labeling, *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1820*, 1420-1428.
- Zhao, Y.Y., Takahashi, M., Gu, J.G., Miyoshi, E., Matsumoto, A., Kitazume, S., Taniguchi, N. Function roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. *Cancer Sci.* **2008**, *99*, 1304-1310.
- Zeng, Y., Wang, J., Li, B., Hauser, S., Li, H., Wang, L.X. Glycopeptide synthesis through endo-glycosidase-catalyzed oligosaccharide transfer of sugar oxazolines: probing substrate structural requirement. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 3355-3364.
- Zenita, K., Kirihata, Y., Kitahara, A., Shigeta, K., Higuchi, K., Hirashima, K., Murachi, T., Miyake, M., Takeda, T., Kannagi, R. *International J of Cancer* **1988**, *41*, 344-349.
- Zhao, C., Xie, B., Chan, S.Y., Costello, C.E., O'Connor, P.B. Collisionally activated dissociation and electron capture dissociation provide complementary structural information for branched permethylated oligosaccharides. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2008**, *19*, 138-150.
- Zhou, D. Why are Glycoproteins Modified by Poly-N-Acetyl lactosamine Glycoconjugates? *Current Protein & Peptide Science* **2003**, *4*, 1-9.
- Zhou, H., Briscoe, A.C., Froehlich, J.W., Lee, R.S. PNGase F catalyzes de-N-glycosylation in a domestic microwave. *Anal. Biochem* **2012**, *427*, 33-35.

Danksagung

Professor Dr. Christian Hackenberger danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens, seinen Einsatz und seine Hilfe am erfolgreichen und schnellen Abschluss der Dissertation und für sein Interesse an dieser Arbeit. Mein herzlicher Dank gilt Professor Dr. Rudolf Tauber für die Übernahme des Zweitgutachtens. Mein ganzes Glykoanalytikwissen verdanke ich Dr. Véronique Blanchard, daher gilt ihr mein besonderer Dank. Ausserdem danke ich Dr. Véronique Blanchard für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die stete Unterstützung und für die Hilfe in allen theoretischen und praktischen Fragestellungen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Markus Berger für die Chance das spannende und vielseitige Forschungsthema auf dem Gebiet der Glykobiologie durchführen zu dürfen und für die vielen wissenschaftlichen Ratschläge. Dr. Matthias Kaup danke ich, dass ich von der Versuchsplanung, über die Analysen bis zur Ergebnisdiskussion jederzeit auf seine Unterstützung zählen konnte.

Detlef Grunow danke ich für die freundliche und geduldige Hilfsbereitschaft bei allen technischen Problemstellungen und für seinen unerschöpflichen Optimismus in zahlreichen fachlichen Diskussionen. Mein herzlicher Dank gilt Dr. Christiane Ogorek, Dr. Astrid Lusch und Christina Hoffmann für die Anregungen und Verbesserungsvorschläge bei der Durchsicht der Arbeit. Ich möchte mich herzlich bei allen ehemaligen und momentanen Laborkollegen für die freundliche Atmosphäre und die nette Zusammenarbeit

bedanken, ohne sie hätte die Arbeit sicher nicht so viel Spaß gemacht. Mein besonderer Dank gilt: Stefan Risch, Xi Liu, Stefan Reinke, Vanessa Frenz, Julia Rosenlöcher, Christian Schwedler, Aji Kandeepan, Dominique Petzold, Karina Biskup, Peter Hoffmann.

Meinen Freunden Taybet Bilkay, Zemra Skenderi und Houda Hamouda danke ich für die schönen Momente außerhalb des Labors, die stets durch Lachen und Freude geprägt waren.

Ich danke meiner süßen Mama Tatyana für ihre unendliche Liebe. Meinen Großeltern Elizaveta und Pavel danke ich für ihre Fürsorge und Unterstützung. Mein größter Dank gilt meiner Schwester, dafür dass sie immer da ist. Und ich danke meinem Freund Christian, dass er mit unerschöpflicher Mühe versucht hat meine Begeisterung für die Glykobiologie zu teilen und dafür dass er immer eine Lösung für alle meine Probleme wusste und an mich geglaubt hat.