

# LC-ESI- UND MALDI-MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE NATIVER UND DERIVATISIERTER ZUCKER UND GLYKANE

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Stephanie Bank**  
aus Kitzingen

Würzburg 2014





# **LC-ESI- UND MALDI-MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE NATIVER UND DERIVATISIERTER ZUCKER UND GLYKANE**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
**Stephanie Bank**  
aus Kitzingen

Würzburg 2014

Eingereicht am

.....

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter: .....

2. Gutachter: .....

der Dissertation

1. Prüfer: .....

2. Prüfer: .....

3. Prüfer: .....

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am

.....



*„Holzhacken ist deshalb so beliebt,  
weil man bei dieser Tätigkeit den Erfolg sofort sieht“*

Albert Einstein



# DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg auf Anregung und unter Anleitung von

**Dr. Petra Kapková.**

Ihr möchte ich besonders für die nette Betreuung in den letzten Jahren danken, sowie für das vielseitige und abwechslungsreiche Thema und das jederzeit offene Ohr bei Fragen und Problemen.

Darüber hinaus danke ich allen, die in jeglicher Form an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren und deren Unterstützung mich in den letzten Jahren begleitet hat, insbesondere:

- Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe, für die freundliche Aufnahme in den Arbeitskreis und die fortwährende Unterstützung bei Problemen aller Art
- Dr. Eberhard Heller, für die Synthese des Derivatisierungsreagenzes, sowie die unermüdliche Hilfe bei der Bedienung der Mikrowelle
- Dr. Michael Büchner, für die Ermöglichung vieler unterhaltsamer MALDI-Messungen
- dem AK Schlosser, insbesondere Stephanie Lamer, für die Hilfe bei den Messungen am MALDI-TOF-TOF und unkomplizierte Zusammenarbeit
- dem AK Seibel, vor allem Elisabeth Memmel, die mir mit Rat und Tat bei der Erstellung des Assays zur Seite stand
- Und zu guter Letzt meinen alten und neuen Bürokollegen, der Kochtruppe, den Skiwochenend-Mitfahrern, den 5.Semester-Assistenten, den Analytikern, den Synthetikern und allen anderen, die dafür gesorgt haben, dass es immer Spaß gemacht hat.

DANKE!







# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Glykobiologie</b> .....	<b>2</b>
1.1.1 Glykobiologie .....	3
1.1.2. Biologische Funktionen von Glykanen .....	3
1.1.4. N-Glykane .....	6
1.1.5. O-Glykane .....	8
1.1.3. Monosaccharide .....	4
1.1.6. Kohlenhydrate als Pharmaka .....	9
<b>1.2 Derivatisierung von Zuckern und Glykanen</b> .....	<b>11</b>
1.2.1 Hintergründe .....	11
1.2.2 Freisetzung von Glykanen .....	12
1.2.2.1 Enzymatische Freisetzung .....	13
1.2.2.2 Chemische Freisetzung .....	14
1.2.3 Derivatisierungsreagenzien .....	15
1.2.3.1 Derivatisierung der Hydroxylgruppen .....	15
1.2.3.2 Derivatisierung der Carbonylgruppe .....	17
1.2.4 Biotinylierung von Glykanen .....	22
<b>1.3 Massenspektrometrie</b> .....	<b>25</b>
1.3.1 ESI- und MALDI-Massenspektrometrie .....	25
1.3.1.1 ESI-Ionenfalle und ESI-Triplequadropol .....	25
1.3.1.2 MALDI-TOF und MALDI-TOF/TOF .....	28
1.3.2 Fragmentierung von Zuckern und Glykanen .....	30
<b>1.4 Ziel der Arbeit</b> .....	<b>32</b>
<b>2. Ergebnisse und Diskussion</b> .....	<b>33</b>
<b>2.1. Derivatisierung und Analyse von Mono-/ Di- und Trisacchariden</b> .....	<b>34</b>
2.1.1 Hintergründe .....	34
2.1.2 Derivatisierung .....	38
2.1.3 <b>Trennung mittels HPLC-MS</b> .....	<b>45</b>
2.1.3.1 Monosaccharide .....	45
2.1.3.2 Disaccharide .....	52
2.1.3.3 Trisaccharide .....	57

2.1.4	Fragmentierungsexperimente .....	61
2.1.4.1	Hintergründe.....	61
2.1.4.2	Fragmentierung von Disacchariden.....	61
2.1.4.3	Fragmentierung von Trisacchariden .....	68
2.1.5	Zusammenfassung .....	78
<b>2.2.</b>	<b>Derivatisierung und Analyse von N-Glykanen .....</b>	<b>81</b>
2.2.1	Hintergründe .....	81
2.2.2	MALDI-TOF-MS von N-Glykanen.....	87
2.2.3	Fragmentierung von N-Glykanen .....	94
2.2.3.1	Hintergründe.....	94
2.2.3.2	Fragmentierung von Glykanen mittels ESI-Tripelquadrupol .....	97
2.2.3.3	Fragmentierung mittels MALDI-TOF/TOF .....	103
2.2.4	Zusammenfassung.....	123
<b>2.3.</b>	<b>Glykan-Array von BINH-Derivaten .....</b>	<b>126</b>
2.3.1	Hintergründe .....	126
2.3.2	Durchführung des BINH-Glykan-Arrays .....	128
2.3.3	Zusammenfassung.....	132
<b>3.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>134</b>
<b>4.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>138</b>
<b>5.</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>142</b>
<b>5.1.</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>143</b>
5.1.1	Geräte und Software .....	143
5.1.2	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien .....	145
<b>5.2.</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>149</b>
5.2.1.	Deglykosylierung der Glykoproteine.....	149
5.2.2.	Derivatisierung .....	149
5.2.3.	HPLC-MS-Analytik.....	151
5.2.4.	MS(n)-Experimente an der LC/MSD-Trap.....	158
5.2.5.	MALDI-MS-Analytik.....	159
5.2.6	Streptavidin-Assay .....	160
<b>6.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>162</b>

<b>6.1. Veröffentlichungen.....</b>	<b>163</b>
<b>6.2. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>164</b>
<b>6.3. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>167</b>
<b>6.4. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>172</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>173</b>

# 1. Einleitung

### 1.1. Glykobiologie

Die Funktion von Kohlenhydraten in biologischen Vorgängen wurde erst spät erkannt, da ihre Rolle anfangs ausschließlich auf die Energieversorgung und die Bildung von Struktursubstanzen beschränkt wurde. Heute findet sich ein ganzes Fachgebiet – die Glykobiologie – welches sich mit den Eigenschaften und Aufgaben von Kohlenhydraten in Organismen beschäftigt. Glykobiologie wird definiert als Untersuchung von Struktur, Biosynthese, Biologie und Evolution von Sacchariden und den Proteinen die sie erkennen [1]. Eine Erklärung, warum sich dieses Gebiet vergleichsweise langsam entwickelt hat, könnte darin liegen, dass Glykokonjugate weitaus komplexer und variabler aufgebaut sind als beispielsweise Proteine und Nucleinsäuren und ihre Analyse daher ungleich komplizierter ist [2].

Die Vielfältigkeit der Glykane ergibt sich aus den Eigenschaften ihrer Monomere. Nicht nur die Sequenz der Monosaccharide ist entscheidend für die Variabilität, sondern auch Anomerie, Ringgröße und Anzahl der Verknüpfungsstellen spielen eine Rolle [3]. Schon an einem Pyranosering befinden sich bis zu fünf mögliche Bindungsstellen, an denen ein oder mehrere Monosaccharide anknüpfen können. Die daraus entstehenden Verzweigungsmöglichkeiten erhöhen die Komplexität der Kohlenhydratstrukturen noch weiter.

Glykane liegen meist, in Form von Glykokonjugaten, an andere Moleküle gekoppelt vor. Dazu zählen Glykoproteine, Glykolipide, Proteoglykane, sowie die Glykanbrücken-bildenden GPI-Anker. Den Kohlenhydratstrukturen fallen dabei folgende Funktionen zu: Zum einen haben sie einen strukturellen und regulierenden Einfluss auf die Glykokonjugate, zum anderen können sie auf deren Oberfläche spezifisch durch andere Moleküle erkannt werden und damit Interaktionen vermitteln [1]. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Glykane auch an pathologischen Vorgängen beteiligt sind. Eine Vielzahl von Erkrankungen, wie beispielsweise rheumatoide Arthritis [4], oder Tumorerkrankungen [5] geht mit Veränderungen im Glykosylierungsmuster einher, wobei die Rolle der Glykane in den seltensten Fällen geklärt ist.

Auch eine Reihe von Arzneistoffen basiert auf Kohlenhydratstrukturen (s. 1.1.6). Diese werden zum Beispiel zur Behandlung viraler und bakterieller Infektionen, als Thrombozytenaggregationshemmer oder zur unterstützenden Therapie bei Diabetes eingesetzt [6].



### 1.1.1. Glykokonjugate

Als Glykokonjugate werden Glykanstrukturen definiert, die an ein sogenanntes Aglykon gebunden vorliegen. Die vier am häufigsten vorkommenden Gruppen sind Glykoproteine, Glykolipide, Proteoglykane und Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker). Der Anteil der Glykane an der Gesamtstruktur kann dabei sehr stark variieren, von wenigen Monosacchariden bis hin zu komplexen Glykanstrukturen, die einen Großteil des Moleküls ausmachen.

Von diesen Glykokonjugaten gilt ein wesentlicher Teil der Aufmerksamkeit den Glykoproteinen, die mehr als die Hälfte aller Proteine ausmachen. Hier werden die Glykane als posttranslationale Modifikationen *N*- oder *O*-glykosidisch an ein Protein gebunden (siehe 1.1.3/4). Es herrscht eine enorme Vielfalt innerhalb dieser Glykosylierungen, hervorgerufen durch die unterschiedliche Anzahl von Glykosylierungsstellen, die Art der Glykosylierung und die Tatsache, dass an jeder Glykosylierungsstelle eines Proteins verschiedene Ausführungen eines Glykans vorkommen können (Mikroheterogenität). Folglich kann jedes einzelne Glykoprotein in mehreren Glykosylierungsvarianten vorliegen. Das Ausmaß der Mikroheterogenitäten unterscheidet sich innerhalb der verschiedenen Glykosylierungsstellen, ebenso wie zwischen den unterschiedlichen Glykoproteinen [1]. Der Einfluss dieser Variabilität auf die Funktion des Proteins ist bis zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch unklar.

### 1.1.2. Biologische Funktionen von Glykanen

Die Funktionen der auf Proteinen vorkommenden Glykane lassen sich in zwei Kategorien einteilen [1]. Auf der einen Seite übernehmen sie strukturelle und modulierende Aufgaben, wie beispielsweise bei der korrekten Faltung der Proteine, oder als Barriere im Falle der Glykokalix. Auf der anderen Seite sind sie an den Zell-Zell-Interaktionen beteiligt. Hier treten die Glykanstrukturen mit sogenannten Glykan-bindenden Proteinen in Verbindung, die sowohl körpereigen, als auch körperfremd sein können. Als Glykan-bindende Proteine agieren Lektine, Antikörper, Adhäsionsmoleküle oder Glykosaminoglykan-bindende Proteine [1,4]. Hiervon wird insbesondere den Lektinen erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet. Lektine sind ubiquitär in Pflanzen und Tieren ver-

breitet. Ihre Fähigkeit spezifisch an bestimmte Kohlenhydratstrukturen binden zu können wurde schon frühzeitig zur Blutgruppenbestimmung genutzt [7]. In Tieren und im Menschen übernehmen sie vielfältige Aufgaben, angefangen bei Transport und Weiterleitung von Glykoproteinen, über Endozytose, bis hin zur Erkennung körperfremder oder anormaler Glykanstrukturen. Auch an Zellwachstum, Einleitung der Apoptose, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sind Lektine beteiligt [3].

Da über Glykane eine Vielzahl an Prozessen induziert wird, können Veränderungen in der Glykosylierung dazu führen, dass Krankheiten ausgelöst werden. Insbesondere angeborene Defekte im Glykanmuster (*congenital disorders of glycosylation* – CDG) können zu schwerwiegenden Schäden in der Entwicklung führen. Inzwischen sind fast 50 verschiedene Krankheiten bekannt, von denen die meisten auf Fehlern in der N- und/ oder O-Glykosylierung beruhen [8]. Liegt beispielsweise ein angeborener Defekt der Phosphomannose-Isomerase vor, so kommt es letztendlich zu einem Mangel an Guanosindiphosphat (GDP)-Mannose. Dieser wiederum führt dazu, dass die N-Glykosylierung im endoplasmatischen Retikulum nicht korrekt zu Ende geführt werden kann (siehe 1.1.3). Folgen davon sind Lebervergrößerung und Fibrose, sowie Funktionstörungen des Verdauungstraktes [9]. Gleichzeitig ist dieser Defekt einer der wenigen unter den CDG, der medikamentös behandelbar ist. Zur Therapie werden hohe Dosen an Mannose gegeben, wodurch das defekte Enzym umgangen werden kann.

Auch bei vielen anderen Erkrankungen kommt es zu Modifikationen im Glykosylierungsmuster. So ist beispielsweise bei rheumatoider Arthritis die Glykanstruktur am Immunglobulin G (IgG) verändert, wobei es einen Zusammenhang zwischen Dauer und Schwere der Erkrankung und Grad der Deglykosylierung gibt [4]. Diese Korrelation ermöglicht die Nutzung von IgG als Marker zur Diagnose und Prognose der Erkrankung [10].

### 1.1.3. Monosaccharide

Monosaccharide sind die Grundbausteine aller Glykane. Sie haben die allgemeine Formel  $(\text{CH}_2\text{O})_n$ , mit  $n \geq 3$ . Zucker können nach ihren funktionellen Gruppen in Aldosen und Ketosen eingeteilt werden. Die Anzahl der chiralen C-Atome im Zuckermole-

kül – bei Aldosen ( $n - 2$ ), bei Ketosen ( $n - 3$ ), wobei  $n$  gleich der Anzahl der vorhandenen C-Atome ist – sorgt für eine Vielzahl an isomeren Strukturen. Dabei gibt das von der funktionellen Gruppe am weitesten entfernte chirale C-Atom die Gesamtkonfiguration der Monosaccharide an. Die meisten in Wirbeltieren vorkommenden Zucker besitzen D-Konfiguration, mit Ausnahme von Fucose und Iduronsäure [1].

Auch Derivate der einfachen Monosaccharide sind weit verbreitet. Dazu gehören Aminozucker, wie das *N*-Acetylglucosamin, oder phosphorylierte Zucker wie Glucose-6-Phosphat. Reduktion oder Oxidation der Aldehydfunktion führt zu den entsprechenden Zuckeralkoholen beziehungsweise Carbonsäuren. Eine weitere Abwandlung ist die Desoxygenierung zu Desoxyzuckern wie Fucose oder Desoxyribose [11]. Die Reaktionsfähigkeit der Monosaccharide wird auch zu Derivatisierungs- und Nachweisreaktionen genutzt (siehe 1.2).

In Lösung liegen Monosaccharide hauptsächlich in ringgeschlossener Form vor. Über die offenkettige Form stellt sich dabei ein Gleichgewicht zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomer ein (Mutarotation). Bei der glykosidischen Bindung wird ebenfalls zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomerie unterschieden, jedoch ist durch die Verknüpfung des anomeren C-Atoms keine Mutarotation mehr möglich.

Von allen in der Natur vorkommenden Monosacchariden sind es nur neun, aus denen Glykane hauptsächlich aufgebaut sind [1]. Je nach Spezies und Position sind verschiedene Variationen der Glykane möglich.

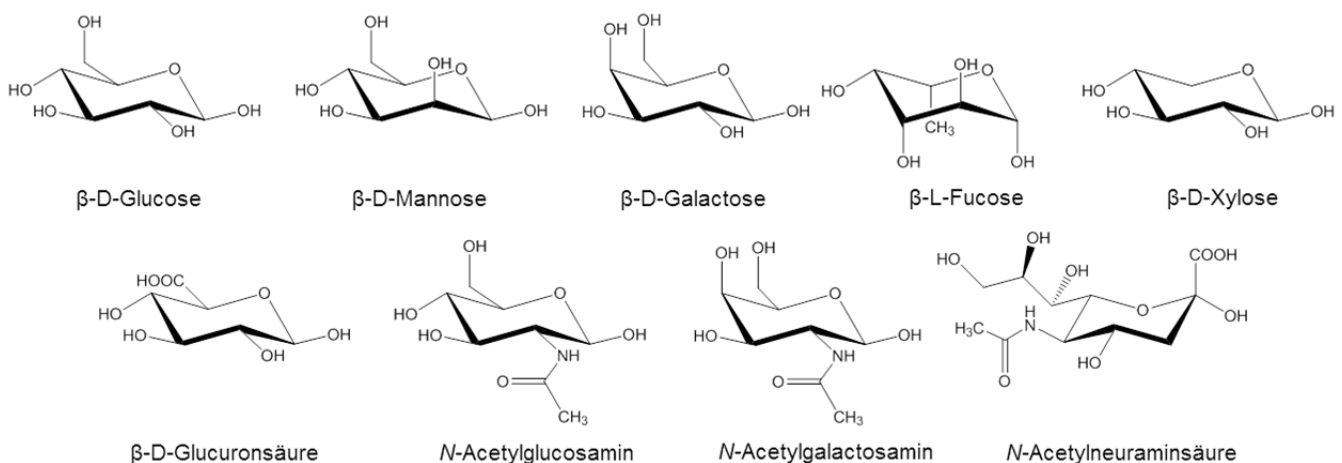


Abbildung 1-1: Die am häufigsten vorkommenden Monosaccharide in Glykanen, adaptiert nach Varki et al. [1]

### 1.1.4. N-Glykane

N-Glykane sind über N-glykosidische Bindungen an Asparagingruppen von Proteinen geknüpft. Allerdings kommen nur Asparaginreste in einer Sequenz von Asn-X-Thr/Ser in Frage, wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein darf. Die Asn-Sequenz ist zwar zwingend nötig um ein Glykan anzuknüpfen, umgekehrt muss aber nicht jede passende Asparagingruppe notwendigerweise durch ein Glykan besetzt sein [12].

Es werden drei Gruppen von N-Glykanen unterschieden: Die *High-Mannose* oder *Oligomannose*-Glykane, die *Komplex*-Glykane und die *Hybrid*-Glykane. Allen gemeinsam ist die Grundstruktur aus zwei N-Acetylglucosamin- und drei Mannoseeinheiten (Core-Struktur), die Antennen sind dagegen unterschiedlich gestaltet.

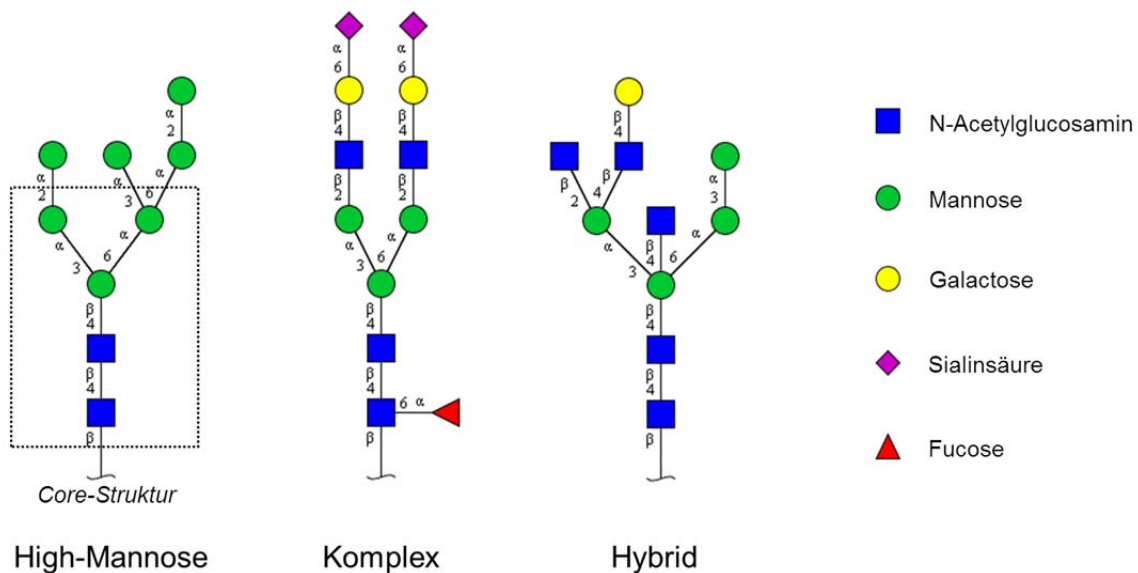


Abbildung 1-II: Strukturbeispiele der drei Gruppen von N-Glykanen

*High-Mannose*-Glykane weisen in den Antennen ausschließlich  $\alpha$ -glykosidisch verbundene Mannoseeinheiten auf, wogegen bei *Komplex*-Glykanen häufig sich wiederholende Acetylglucosamineinheiten auftreten. Zusätzlich können Sialinsäure- oder Fucosereste an die terminale Galactoseeinheit geknüpft sein. Auch die Kopplung von Fucose an die Corestruktur ist möglich. Weitere Vielfalt entsteht durch die Anzahl der Antennen, sowie die Möglichkeit eine N-Acetylglucosamineinheit (GlcNAc) an die Corestruktur zu knüpfen. Diese sogenannten *bisecting* GlcNAcs können auch bei den *Hybrid*-Glykanen zutage treten, die eine Mischung aus *High-Mannose* und *Komplex*-

Glykanen darstellen. Eine Antenne ist hier dementsprechend mit Mannoseeinheiten besetzt, die andere analog den *Komplex*-Glykanen aufgebaut.

Die Synthese der *N*-Glykane erfolgt zunächst auf der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums. Eingangs erfolgt die Übertragung von GlcNAc-P durch Uridindiphosphat (UDP)-GlcNAc auf das Trägermolekül Dolicholphosphat (Dol-P). Im Anschluß werden eine weitere *N*-Acetylglucosamineinheit und fünf Mannoseeinheiten von UDP-GlcNAc und GDP-Man auf Dol-P-P-GlcNAc transferiert. Diese Reaktionen werden jeweils von einer spezifischen Glykosyltransferase katalysiert [13]. Das Dol-P-P-GlcNAc<sub>2</sub>-Man<sub>5</sub>-Molekül wird nun vom Cytosol in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums überführt. Dort werden weitere vier Mannose- sowie drei Glucose-reste auf das Glykanvorläufermolekül übertragen [14].

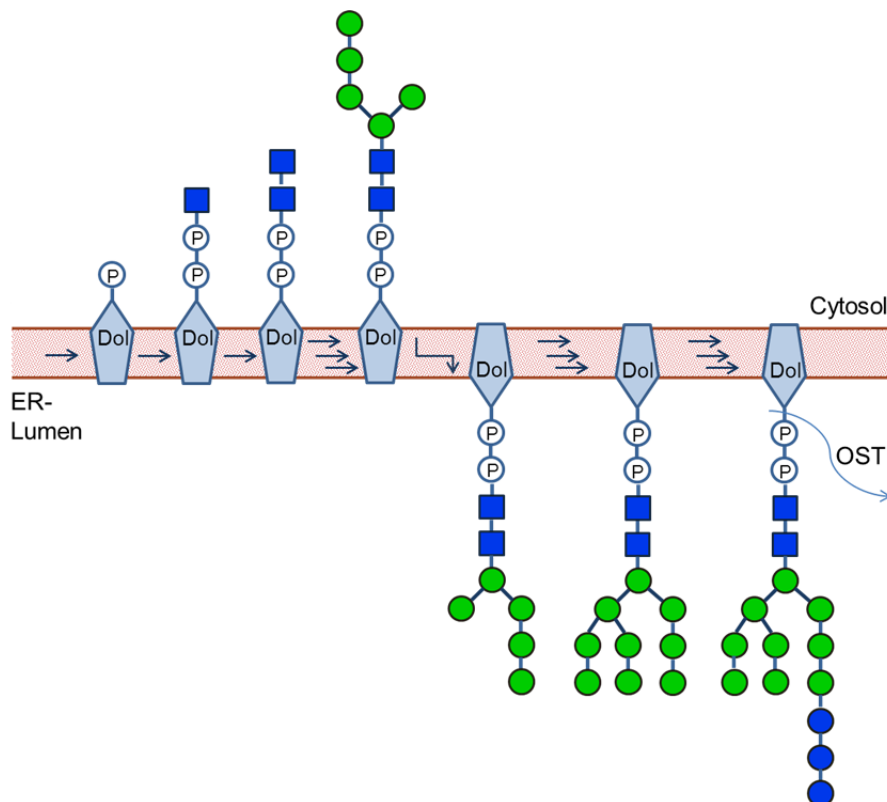


Abbildung 1-III: *N*-Glykansynthese im endoplasmatischen Retikulum mit anschließender Abspaltung durch die Oligosaccharyltransferase, adaptiert nach Burda et al. [14]

Anschließend kann der, nun aus vierzehn Monosaccharideinheiten bestehende Glykanvorläufer an die Asn-Sequenz eines Proteins gekoppelt werden. Katalysiert wird diese Reaktion durch eine Oligosaccharyltransferase (OST), die die energiereiche GlcNAc-P-Bindung spaltet und das freiwerdende Glykan an das translatierte Protein

bindet [1]. Durch die Abspaltung der ersten Glucoseeinheit durch  $\alpha$ -Glucosidase I wird die Glykankopplung stabilisiert und die hydrolytische Abspaltung des Glykans damit verhindert [3]. Die weiteren beiden Glucosereste werden mittels  $\alpha$ -Glucosidase II abgespalten. Nach Abspaltung der zweiten Glucoseeinheit wird das Glykan von den Lektinen Calnexin und Calreticulin erkannt, welche die Proteinfaltung vermitteln. Sobald das Glykoprotein korrekt gefaltet ist, kommt es zum Umbau der Glykane durch sogenanntes „*Trimming*“. Zunächst entsteht durch Abspaltung einer Mannose ein  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ -Glykan, welches Grundbaustein für die verschiedenen Glykanarten ist [1]. Im Golgi-Apparat werden die Glykane schließlich durch Acetylglucosaminyltransferasen und Mannosidasen zu Komplex- und Hybridglykanen umgewandelt. Weitere Modifikationen der Glykane werden durch Addition von Zuckern an die Corestruktur (Fucose) und die Antennen (Galactose-GlcNAc-Einheiten), sowie durch „Dekoration“ der Antennen mit Sialinsäure, Fucose oder Galactose durchgeführt [1].

### 1.1.5. O-Glykane

O-Glykosylierungen treten an den Hydroxygruppen von Serin oder Threonin auf. Im Gegensatz zu den N-Glykanen gibt es aber keine einheitliche Aminosäuresequenz, die für die Glycosylierung notwendig ist. Häufig werden als O-Glykane jene Oligosaccharide bezeichnet, die terminal durch N-Acetylgalactosamin (GalNAc) mit der Aminosäure verbunden sind (Mucin-Typ). Darüber hinaus sind auch Verknüpfungen von Fucose, Mannose, Glucose und anderen Zuckern möglich. Die Mucin-Glykane können über 20 Monosaccharideinheiten umfassen, wobei nur bestimmte Zucker wie GlcNAc, Fucose oder Sialinsäure zum Aufbau verwendet werden, nicht jedoch Mannose oder Glucose [1]. Es sind acht verschiedene Core-Strukturen bekannt, diese werden, anders als bei den N-Glykanen, im Golgi-Apparat direkt am Protein aufgebaut. Zunächst kommt es zur Übertragung von GalNAc auf Serin- oder Threoninreste durch eine Polypeptid-GalNAc-Transferase, dann zum weiteren Glykanaufbau durch verschiedene spezifische Transferasen [15]. Zusätzliche Modifikationen werden durch Sulfatierung, Methylierung, Acetylierung, Fucosylierung und Sialylierung eingebracht [3].

### 1.1.6. Kohlenhydrate als Pharmaka

Inzwischen gibt es eine Reihe von Arzneistoffen auf Kohlenhydratbasis, die gegen die unterschiedlichsten Krankheiten im Einsatz sind, angefangen bei Viruserkrankungen über Diabetes bis hin zur Thromboseprophylaxe. Es werden verschiedene Strategien verfolgt, über die diese Strukturen in das Krankheitsgeschehen eingreifen können [3]. Zur Behandlung von Influenza beispielsweise, werden *N*-Acetylneuraminsäure-derivate wie Oseltamivir oder Zanamivir eingesetzt, die die Neuraminidase der Viren kompetitiv inhibieren. Die Neuraminidase spaltet die Sialinsäurereste, mit denen die Viren an die Oberflächen der Wirtszellen gebunden sind, wodurch sich die Viren weiter im Körper verbreiten können [16]. Enzyminhibitoren auf Zuckerbasis werden auch bei *Diabetes mellitus* angewandt. Miglitol und Acarbose hemmen die  $\alpha$ -Glucosidase im Darm und verlangsamen somit den Abbau von Polysacchariden [6].

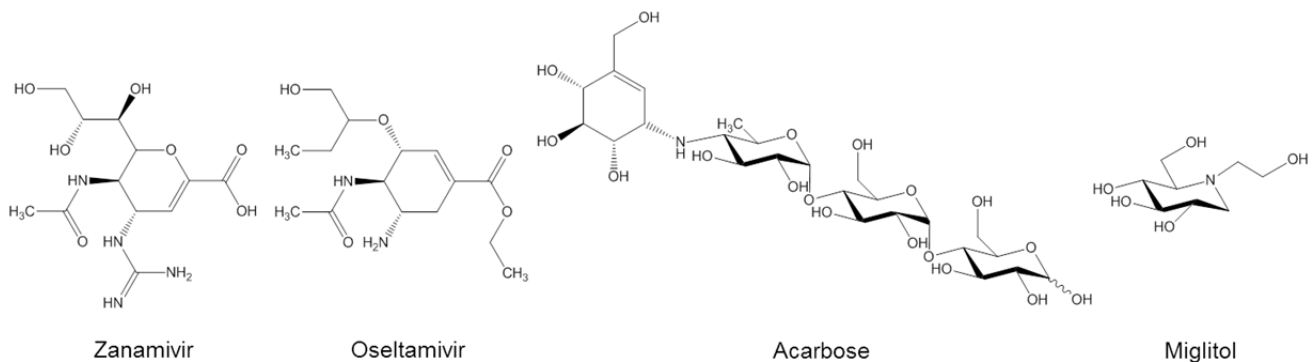


Abbildung 1-IV: Arzneistoffe auf Basis von Kohlenhydratstrukturen

Ein weiteres Beispiel der zuckerbasierten Therapie ist die Hemmung der Blutgerinnung durch Antikoagulantien. Heparine sind körpereigene Polysaccharide, die durch Bindung an Antithrombin III deren inhibierende Wirkung auf die Gerinnungsfaktoren  $X_a$  und Thrombin erhöhen.

Auch verschiedene Impfstoffe zum Beispiel gegen *Salmonella typhi* [17], *Neisseria meningitidis* [18] oder *Haemophilus influenzae b* [19] basieren auf bakterieneigenen Kohlenhydratstrukturen.

Darüber hinaus ist eine große Anzahl an therapeutischen Glykoproteinen, wie etwa Erythropoetin oder verschiedene Antikörper, im Handel. Da die Glykananteile dieser Proteine einen Einfluss auf Stabilität, Aktivität und Pharmakodynamik der Substanzen haben, ist es von zentraler Bedeutung, dass die Glykosylierung der produzierten Arz-

neistoffe kontrolliert wird. Unterglykosyliertes Erythropoetin beispielsweise wird wesentlich schneller von der Niere ausgeschieden, als das korrekt glykosylierte Molekül [1]. Besonders für die Zulassung neuer Biotherapeutika gelten daher seitens der zuständigen Behörden strenge Vorgaben für zulässige Abweichungen in der Glykosylierung.



## 1.2. Derivatisierung von Zuckern und Glykanen

### 1.2.1. Hintergründe

Die Untersuchung von Zuckern und Glykanen ist aus verschiedensten Gründen eine Herausforderung. Zum einen besitzen vor allem Glykane eine große strukturelle Diversität, was sich in der Anzahl der Isomere, der Verzweigungen und der räumlichen Anordnung äußert. Des Weiteren sind natürliche Saccharide polar, relativ schwer flüchtig, thermisch instabil und besitzen kein Chromophor. Dadurch werden sowohl Trennung, als auch Detektion erschwert. Mit Hilfe von Derivatisierungen können diese Moleküle für die Analyse zugänglich gemacht werden.

Derivatisierungen haben die Funktion Substanzen so umzuwandeln, dass ihre Analyse durch die gewünschten Detektionsmethoden erleichtert wird. Dabei sollte die Grundstruktur der Substanz erhalten bleiben und nur ihre chemischen oder physikalischen Eigenschaften verändert werden. Dazu muss das Derivatisierungsreagenz gewisse Voraussetzungen erfüllen [20]:

1. Die Derivatisierung sollte quantitativ, schnell und reproduzierbar ablaufen und nur an der gewünschten funktionellen Gruppe stattfinden. Im Idealfall ist die Derivatisierung spezifisch für eine Gruppe von Substanzen (z.B. Zucker).
2. Die Substanz sollte durch die Derivatisierung nicht beeinträchtigt werden, wie etwa durch den Verlust von Gruppen (z.B. Sialinsäuren).
3. Die eingeführten Strukturen sollten stabil sein und den analytischen Bedingungen standhalten.
4. Der Überschuß an Derivatisierungsreagenz und eventuelle Nebenprodukte sollten leicht entfernt werden können, oder die weitere Untersuchung nicht stören.
5. Die Resonanz der Derivate sollte bei der Detektion unabhängig von Zusammensetzung und Größe der zu derivatisierenden Substanz sein.

Durch die Derivatisierung der Zucker und Glykane können folgende Parameter optimiert werden: Zum einen kommt es zur Verbesserung der chromatographischen Trennung unter Einsatz apolarer Derivatisierungsreagenzien. Zum anderen erleichtert die Kopplung an Fluoro- oder Chromophore die Detektion mittels photometrischer Methoden. Bei der massenspektrometrischen Untersuchung erhöhen sich häufig aufgrund der verringerten Polarität Ionisationsfähigkeit und Signalintensität. Damit wird

die Sensitivität der Nachweismethoden um ein Vielfaches gesteigert. Zudem werden durch den Anstieg des Molekulargewichts vor allem kleinere Zuckermoleküle, wie Mono- oder Disaccharide, in höhere Messbereiche gebracht und dadurch weniger durch niedermolekulare, unspezifische Verschmutzungen gestört. Ein weiterer Vorteil für die Massenspektrometrie ist die erhöhte Stabilität der Zucker, sowohl in struktureller als auch in thermischer Hinsicht. Zusätzlich können durch die Derivatisierung Gruppen eingebracht werden, die als Linker dienen. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit die Derivate an Oberflächen zu binden, somit zu isolieren und für weitere Reaktionen zugänglich zu machen (siehe 1.2.4).

Zucker und Glykane haben nur eine begrenzte Auswahl an funktionellen Gruppen, die für eine Derivatisierung geeignet sind, zum einen die Hydroxygruppen an den Monosaccharideinheiten, zum anderen eine Carbonylgruppe am reduzierenden Ende, die durch Gleichgewichtseinstellung zwischen ringoffener und ringgeschlossener Form verfügbar ist. Ausnahmen sind die nichtreduzierenden Zucker, deren Carbonylgruppe durch Verknüpfung an Position 1 blockiert ist. Bei Glykanen sollte daher darauf geachtet werden, dass eine Methode zur Abspaltung vom Protein gewählt wird, die das reduzierende Ende erhält.

### 1.2.2. Freisetzung von Glykanen

Die Abspaltung der Glykane kann auf enzymatischem oder chemischem Wege erfolgen, wobei beide Verfahren Vor- und Nachteile haben. Enzymatische Methoden haben den Vorteil, dass sowohl Protein als auch Glykan nach der Umsetzung noch intakt sind und für die weitere Analyse zur Verfügung stehen, während bei chemischer Umsetzung das Protein oft zerstört wird. Dagegen können mit Enzymen hochspezifisch nur bestimmte Glykane abgespalten werden, wodurch für eine komplette Analyse verschiedene Enzyme notwendig sind [21].

### 1.2.2.1. Enzymatische Freisetzung

Für die Freisetzung von *N*-Glykanen stehen verschiedene Enzyme zur Verfügung, zum einen die Peptid-*N*-Glycosidasen (PNGase) A und F, zum anderen eine große Auswahl an Endoglycosidasen.

Das am häufigsten eingesetzte Enzym ist PNGase F, da es einen Großteil aller *N*-Glykane abspalten kann, ausgenommen denen, die am endständigen *N*-Acetylglucosaminrest eine  $\alpha$ -(1-3)- verknüpfte Fucose tragen [3]. PNGase A ist in der Lage auch diese abzuspalten, hat aber im Gegensatz zu PNGase F, aufgrund seiner Größe, eine wesentlich niedrigere Aktivität gegenüber Glykoproteinen [4]. Beide Enzyme schneiden die Bindung zwischen dem endständigen *N*-Acetylglucosamin des Glykans und dem Asparagin am Peptidrückgrat. Dabei wird das Asparagin zu Aspartat umgewandelt. Durch diese Massendifferenz können die Bindungsstellen der Glykane am Protein nachgewiesen werden. Eine weitere Einschränkung von PNGase F ist allerdings, dass Glykane an Asparaginresten, die den N- oder C-Terminus des Proteins bilden, nicht geschnitten werden.

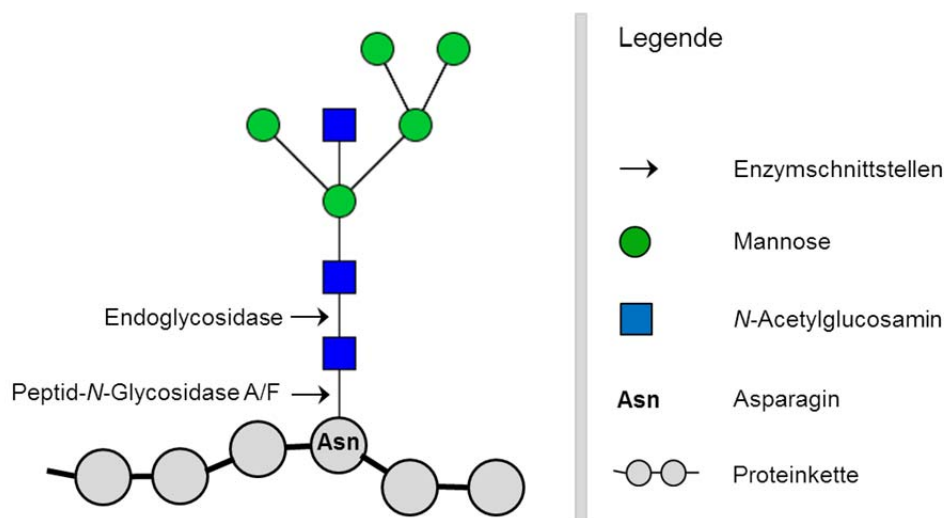


Abbildung 1-V: Darstellung der Schnittstellen der Peptid-*N*-Glycosidasen A und F, sowie der Endoglycosidasen an der Struktur eines *N*-Glykans

Endoglycosidasen haben teilweise eine sehr hohe Spezifität für bestimmte Glykanstrukturen, jedoch ist keine in der Lage ebenso unspezifisch alle *N*-Glykane abzuspalten wie die Peptid-*N*-Glycosidasen. Endoglycosidase H beispielsweise schneidet High-Mannose-Glykane und einen Großteil der Hybrid-Glykane, ist aber inaktiv bei

Komplex-Glykanen [22]. Daher werden diese Enzyme dazu eingesetzt, selektiv bestimmte Glykanstrukturen abzuspalten. Im Gegensatz zu den PNGasen schneiden die Endoglycosidasen das Glykan zwischen den beiden *N*-Acetylglucosamineinheiten der Chitobioseeinheit, die endständige Einheit verbleibt dadurch am Protein.

Die enzymatische Freisetzung von *O*-Glykanen ist stark eingeschränkt, da die bekannten *O*-Glykanasen von einer Vielzahl von Strukturen nur einige wenige erkennen und abspalten [22]. Daher wird zur Untersuchung der *O*-Glykane meist auf die chemische Freisetzung zurückgegriffen.

### 1.2.2.2. Chemische Freisetzung

Die chemische Abspaltung von Zuckern wird meist mittels Hydrazinolyse [23] oder  $\beta$ -Elimination [24,25] durchgeführt. Die Hydrazinolyse erlaubt die Freisetzung von *N*- und *O*-Glykanen mit intaktem reduzierendem Ende. Bei niedrigeren Temperaturen (60 °C/ 5 h) können selektiv die *O*-Glykane gewonnen werden, die zusätzliche Spaltung der *N*-Glykane findet erst bei höheren Temperaturen statt (95 °C/ 4 h). Nachteil dieser Reaktion ist, dass es zur Zerstörung sämtlicher Peptidbindungen kommt. Das führt zum einen dazu, dass keinerlei Informationen über die Bindungsstellen der Glykane mehr vorhanden sind, zum anderen, dass es ebenfalls zum Verlust glykaninterner *N*-Acetyl und *N*-Glycolyl-Gruppen kommt [26].

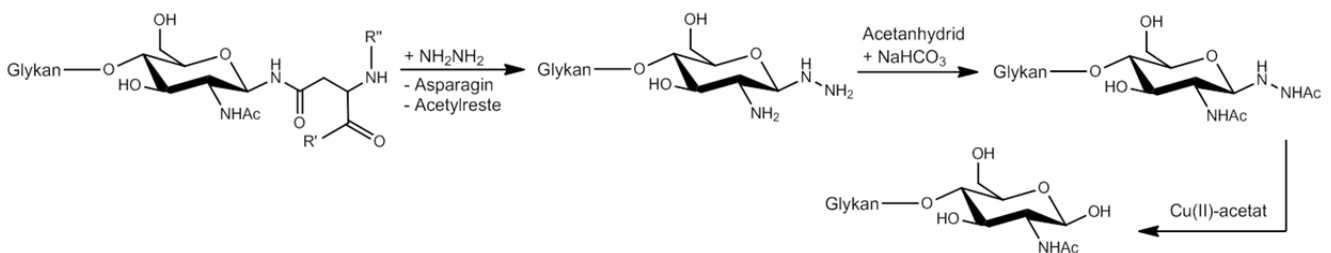


Abbildung 1-VI: Freisetzung eines Glykans durch Hydrazinolyse; Hydrolyse der Amidbindungen durch wasserfreies Hydrazin; Reacetylierung primärer Aminogruppen und anschließende Umsetzung zum reduzierenden Glykan in Gegenwart von Cu<sup>2+</sup>-Ionen [23]

Die alkalische  $\beta$ -Elimination verwendet starke Basen um die Glykane vom Protein zu spalten. Um zu verhindern, dass auch Monosaccharideinheiten zersetzt werden (Peeling), müssen die Glykane sofort im Anschluß zu ihren Alditolen reduziert werden. In

Folge dessen stehen die hierbei gewonnen Glykane nicht mehr für Derivatisierungsreaktionen des reduzierenden Endes zur Verfügung. Ein weiterer Nachteil ist, dass die Extraktion von kleinen Mengen an Glykanen durch die großen Mengen an eingesetzten Salzen erschwert wird.

Mit der Umstellung auf mildere Bedingungen (Ammonium-basierte  $\beta$ -Elimination [25]) können die reduzierenden Enden der Glykane erhalten werden, ohne das Zersetzungs-Reaktionen (Peeling) auftreten. Auf diese Weise wird auch die anschließende Durchführung von Derivatisierungen ermöglicht.

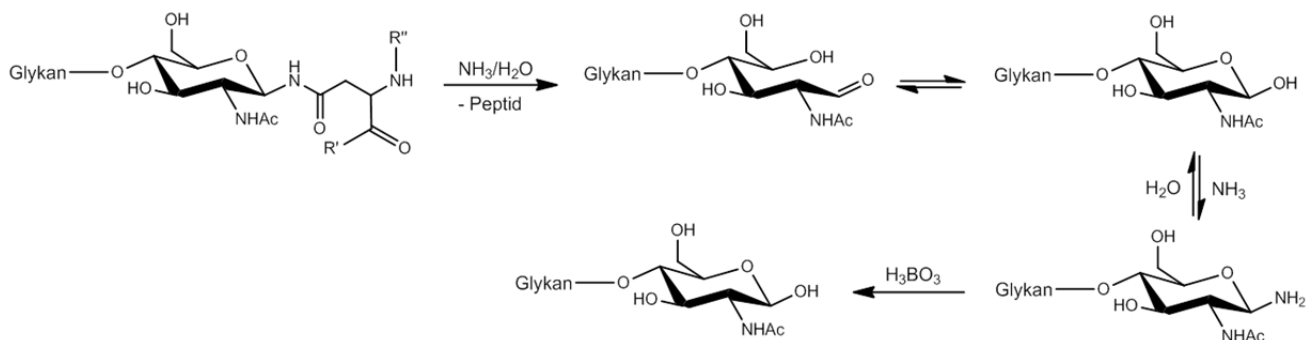


Abbildung 1-VII: Abspaltung eines Glykans mittels Ammonium-basierter  $\beta$ -Elimination und anschließende Umsetzung zum reduzierenden Glykan mittels Borsäure [25]

### 1.2.3. Derivatisierungsreagenzien

#### 1.2.3.1. Derivatisierung der Hydroxylgruppen

Die am häufigsten verwendete Methode für die Derivatisierung der Hydroxylgruppen von Zuckern ist die Permethylierung. Durch Reaktion mit einer Base und einem Methylierungsreagenz werden alle Hydroxylgruppen des Zuckers/Glykans in Methylester umgewandelt. Auch vorhandene Carboxyl- und Aminogruppen reagieren zu den entsprechenden Methylderivaten. Standardreagenz für die Permethylierung ist eine Mischung aus Natriumhydroxid, Methyljodid und Dimethylsulfoxid, mit denen die Glykane innerhalb kürzester Zeit umgesetzt werden [27]. Neuere Methoden verwenden mit Natriumhydroxid bepakte Mikrosäulen, auf denen noch kleinste Mengen von mit Methyljodid und Dimethylsulfoxid gemischten Glykanenproben quantitativ und schnell de-

rivatisiert werden können [28]. Jedoch müssen die Derivatisierungsreagenzien vor der Analyse der Zucker entfernt werden.

Auch die Umsetzung der Hydroxylgruppen zu Acetaten [29], Boronaten [30] und anderen Derivaten ist möglich, dennoch bleibt die Permethylierung Methode der Wahl. Dies lässt sich hauptsächlich darauf zurückführen, dass der Massenanstieg durch die kleineren Methylgruppen geringer ausfällt, als beispielsweise durch Acetylgruppen. Dadurch können selbst größere methylierte Glykane noch ohne Einschränkungen mittels Massenspektrometrie analysiert werden.

Permethylierung bringt verschiedene Vorteile für die Analyse von Zuckern. Zum einen wird die Polarität der Moleküle verringert und gleichzeitig die thermische Stabilität erhöht, wodurch die Untersuchung durch Fast-Atom-Bombardement-Massenspektrometrie (FAB-MS), oder Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) ermöglicht wird. Bei neueren Verfahren wie MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ ionisation*) oder ESI (*electrospray ionisation*) kommt es außerdem zur Verbesserung der Ionisierung und Erhöhung der Signalintensität [31]. Zum anderen können sowohl neutrale als auch saure, sialylierte Glykane gleichzeitig im positiven Modus bestimmt werden, da es durch die Derivatisierung auch zur Permethylierung der Carboxylgruppen kommt. Darüber hinaus werden die Sialinsäuregruppen stabilisiert, wodurch verhindert wird, dass diese bei der Ionisation abgespalten und dadurch nicht detektiert werden können [32].

Allerdings hat die Permethylierung von Glykanen auch verschiedene Nachteile [31]. Zum einen können bereits vorher vorhandene Methylierungen des Glykans nicht mehr nachgewiesen werden, zum anderen kann es aufgrund der Reaktionsbedingungen zu basenkatalysierten Abspaltungen von Monosaccharideinheiten kommen (Peeling). Darüber hinaus kann eine „Übermethylierung“ der Glykane auftreten, in dem aus einer Nebenreaktion der Derivatisierungsreagenzien entstandener Iodomethyl-methylether mit den Hydroxylgruppen der Zucker zu Methoxymethylgruppen reagiert. Dies führt dazu, dass in den entsprechenden Spektren Ionen mit höheren Massen als die des normal methylierten Glykans auftreten.

Die Analyse methylierter Glykane liefert jedoch wertvolle Hinweise auf Verknüpfungsstellen und Verzweigungen, da nach Fragmentierung oder Hydrolyse der Zucker an den Spaltstellen underivatisierte Hydroxylgruppen zurückbleiben. Ursprung dieser Methoden ist die Methylierungsanalyse nach Lindberg [33]. Hier werden die methylierten Polysaccharide erst hydrolysiert und dann reduziert, um die Entstehung von  $\alpha$ - und

$\beta$ -Anomeren zu vermeiden. Die entstandenen Zuckeralkohole können nun noch acetyliert und sowohl Position, als auch Anzahl der Verknüpfungen mittels GC/MS detektiert werden.

Mittels ESI- oder MALDI-MS/MS können die Bindungsstellen auch direkt aus den methylierten Zuckern bestimmt werden. Durch Fragmentierung der protonierten Glykane [34] oder ihrer Natriumaddukte [35] kann aus den Spaltungen der glycosidischen Bindungen die Sequenz und zusätzlich durch Spaltungen in den Zuckerringen die Verknüpfungsstellen ermittelt werden.

### 1.2.3.2. Derivatisierung der Carbonylgruppe

Die Carbonylgruppe des reduzierenden Terminus von Zuckern und Glykanen kann auf verschiedenste Weisen derivatisiert werden. Wie schon oben erwähnt, wird dies dazu genutzt den Molekülen bestimmte Eigenschaften zu verleihen. Dazu zählen UV- oder Fluoreszenzaktivität, positive oder negative Ladungen, oder die Fähigkeit mit anderen Substanzen kovalente Bindungen eingehen zu können. Dies wiederum erleichtert Aufreinigung, Trennung, Detektion und Strukturaufklärung.

#### I. Reduktive Aminierung

Die reduktive Aminierung ist eine der am häufigsten verwendeten Derivatisierungsmethoden für Saccharide. Dazu wird der reduzierende Zucker, in Gegenwart eines Reduktionsmittels, mit einem großen Überschuss Amin versetzt. Es bildet sich eine Schiffsche Base, die sofort weiter zum sekundären Amin reduziert wird.

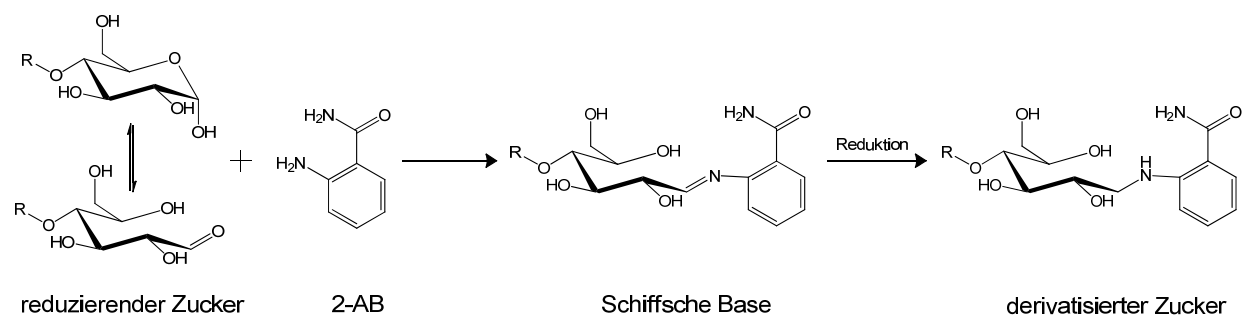


Abbildung 1-VIII: Reduktive Aminierung am Beispiel von 2-Aminobenzamid

Diese Reaktion wird meist unter leicht sauren Bedingungen in Dimethylsulfoxid durchgeführt, um die Ringöffnung des Zuckers zu begünstigen und eine optimale Ausbeute zu gewährleisten. Der Reduktionsschritt dient der Stabilisierung des Derivates, als Reduktionsmittel wird in der Regel Natriumcyanoborhydrid verwendet [36]. Aufgrund des hohen Überschusses an Reagenzien müssen Reinigungsschritte durchgeführt werden, um zu vermeiden, dass große Mengen an Salzen die Analyse der Zucker stören.

Verbreitete Derivatisierungsreagenzien sind 2-Aminobenzamid (2-AB) [36], 2-Aminopyridin (AP) [37] und 2-Aminobenzoessäure (AA). Für Anwendungen in der Kapillarelektrophorese stehen negativ geladene Substanzen wie 8-Aminonaphthalen-1, 3, 6-trisulfonsäure (ANTS) oder 8-Aminopyren-1, 3, 6-trisulfonsäure (ABTS) zur Verfügung. Diese und andere erhältliche Aminierungsreagenzien ermöglichen die UV-/fluorimetrische Detektion und erleichtern die massenspektrometrische Analyse. 2-Aminobenzoessäure beispielsweise zeigt starke Fluoreszenz [38] und eignet sich durch die negative Ladung sehr gut für die Massenspektrometrie im negativen Modus [39]. Allerdings können Sialinsäuren nicht mit diesem Reagenz derivatisiert werden. Sobald die Struktur der 2-Aminobenzoessäure verändert wird, kommt es zur Verringerung der Fluoreszenz, jedoch können dadurch andere Funktionalitäten gewonnen werden. Das verwandte 2-Aminobenzamid etwa zeigt im Vergleich zur Säure eine schlechtere Fluoreszenz [40] und auch die Fragmentierung mittels MALDI liefert weniger aussagekräftige Details [39]. Andererseits kann 2-Aminobenzamid durch das Fehlen der negativen Ladung verstärkt zur Trennung von Zuckern mittels RP-HPLC eingesetzt werden.

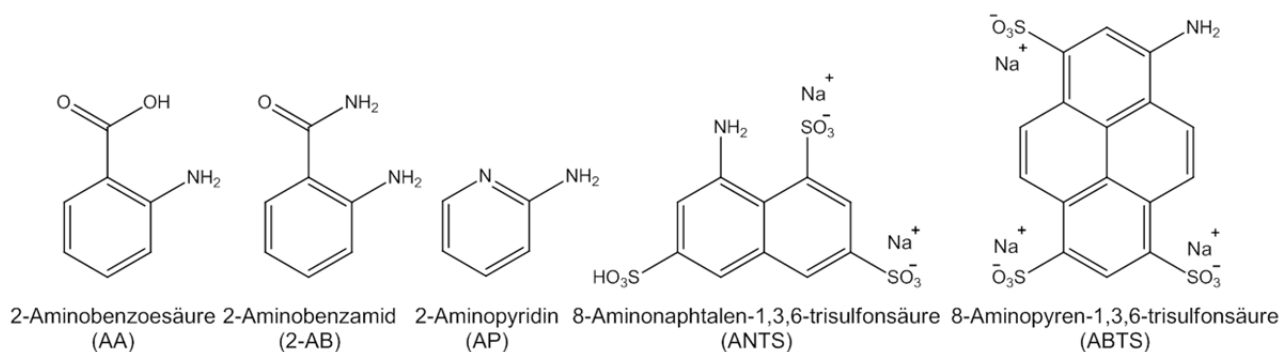


Abbildung 1-IX: Gebräuchliche Derivatisierungsreagenzien zur reduktiven Aminierung



Durch Chromatographie auf Normalphasensäulen können anhand der Retentionszeiten von 2-AB-derivatisierten Oligosacchariden, Glykangröße und Molekulgewicht bestimmt und damit strukturelle Untersuchungen von Glykanen durchgeführt werden [31]. Dazu werden die Retentionszeiten mit denen einer Dextranleiter verglichen und als „*glucose units*“ angegeben. Entsprechende Datenbanken zur Auswertung wurden bereits veröffentlicht [41].

Eine weitere Möglichkeit der Anwendung von Aminierungsreagenzien besteht in der Umsetzung von Zuckern zu ihren Glykosylaminen. Diese entstehen durch Auslassen des Reduktionsschrittes der reduktiven Aminierung [42] und liegen im Gleichgewicht mit der Schiffschen Base vor. Im Unterschied zu den reduzierten Aminen besitzen die Glykosylamine einen geschlossenen, terminalen Zuckerring. Die entsprechend derivatisierten Zucker wiesen bei chromatographischer Trennung und massenspektrometrischer Detektion im Vergleich zu den reduzierten Äquivalenten verbesserte Eigenschaften auf. Beispielsweise konnte durch die Umsetzung von Disacchariden zu Glykosylaminen mit *para*-Aminobenzoesäure (ABA) gezeigt werden, dass diese mehr Informationen in Bezug auf Verknüpfung und Anomerie lieferten als die reduzierten Derivate [43]. Darüber hinaus können die nativen Oligosaccharide aus den Derivaten unter schwach sauren Bedingungen zurückgewonnen und für weitere Methoden eingesetzt werden [44]. Problematisch ist dagegen, wie oben bereits erwähnt, die geringere Stabilität der Produkte insbesondere unter sauren Bedingungen.

## II: Hydrazine und Hydrazide

Die Derivatisierung der Carbonylgruppe mit Hydrazinen/ Hydraziden ist ein wesentlich schonenderes Verfahren als die reduktive Aminierung, da die Reaktion ohne Reduktionsmittel in wässrigen Lösungsmitteln abläuft. Ein weiterer Vorteil ist, dass weder Salze eingesetzt, noch während der Reaktion gebildet werden. Dadurch entfallen aufwendige Reinigungsschritte und das Produkt kann sofort im Anschluss vermessen werden. Dies eröffnet die Möglichkeit von „*on-target*“-Derivatisierungen für MALDI-MS Analytik [45]. Hierzu werden die Glykanproben direkt auf dem MALDI-Target mit dem Derivatisierungsreagenz vermischt, kurz erhitzt und mit Matrix versetzt. Im Anschluss kann die nun derivatisierte Probe ohne weitere Zwischenschritte vermessen werden. Ein positiver Aspekt der Kopplung von Zuckern mit Hydrazinen ist auch, dass der terminale Zuckerring nach der Derivatisierung größtenteils in einer ringgeschlossenen,

$\beta$ -anomeren Form vorliegt [46,47]. Bei der reduktiven Aminierung dagegen entstehen ausschließlich die ringoffenen Zucker. Dadurch sind die Einsatzmöglichkeiten dieser Derivate in funktionellen Studien begrenzt, da die Affinität zu den Bindungspartnern verringert ist.

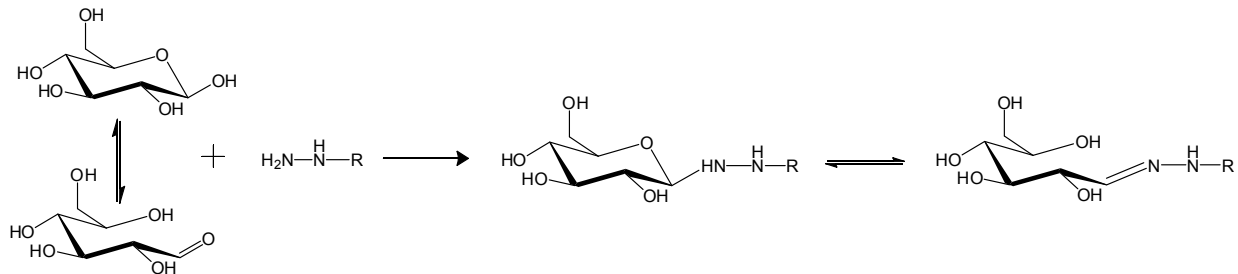


Abbildung 1-X: Derivatisierung von reduzierenden Zuckern mit Hydrazinen

Die Hydrazin-derivatisierten Saccharide sind bei neutralen Bedingungen in wässriger Lösung über längere Zeit stabil, jedoch werden sie bei niedrigeren pH-Werten schnell hydrolysiert [48]. Dies bringt einerseits Einschränkungen bei Lagerung und Lösungsmitteln, andererseits können die Zucker dadurch unter leicht sauren Bedingungen zurückgewonnen werden [49].

Häufig eingesetzte Derivatisierungsreagenzien sind Phenylhydrazin [50], N-(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-Hydrazid ((Fmoc)-Hydrazid) [51] und Pyrenbuttersäurehydrazid [52] um Chromophore oder Fluorophore einzuführen, beziehungsweise Girard's T [53] um ein geladenes Derivat zu erhalten.

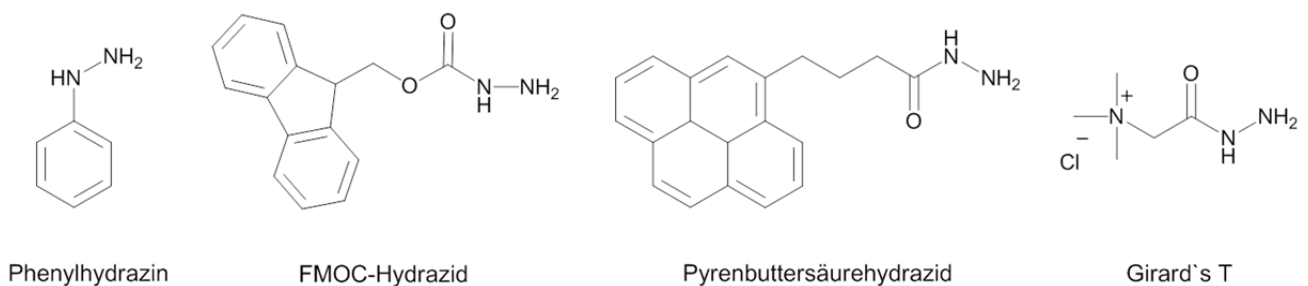


Abbildung 1-XI: Gängige Derivatisierungsreagenzien auf Hydrazinbasis

Analog zu den Derivaten der reduktiven Aminierung werden hier durch die hydrophoben aromatischen Systeme die Trennungen durch HPLC und CE verbessert sowie photometrische und massenspektrometrische Detektion von geringsten Probenmengen ermöglicht. Die Einführung einer positiven Ladung, beispielsweise durch

Girard's T-Reagenz, erhöht wiederum die Ionisierungsfähigkeit in ESI- und MALDI-Massenspektrometrie und somit auch die Signalintensität [54,55]. Jedoch zeigten spätere Untersuchungen, dass, insbesondere bei der Analyse von *N*-Glykanen, mit neutralen Derivatisierungsreagenzien bessere Ergebnisse erzielt werden [56,57]. Eine weitere Möglichkeit ist die Kopplung von Biotinderivaten an die reduzierenden Enden der Zuckermoleküle, mit deren Hilfe Glykane an Streptavidin/Avidin-beschichtete Oberflächen geheftet werden können (siehe Kapitel 1.2.4).

Ein Nachteil der Hydrazinderivate ist, dass es durch die Derivatisierung häufig zur Entstehung von Isomeren kommt. Dies äußert sich in der Detektion massegleicher Doppelpeaks bei der Durchführung chromatographischer Methoden. Zum einen kann das durch die Bildung von ringoffener und ringgeschlossener Form verursacht werden, zum anderen können auch Stereoisomere an der Kopplungsstelle entstehen [58,59].

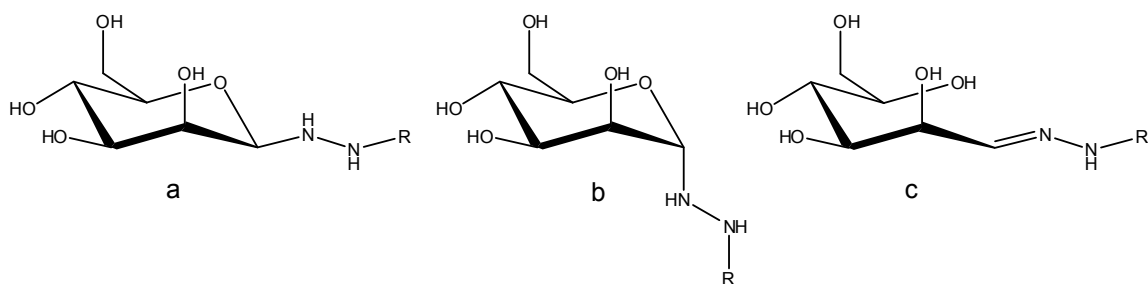
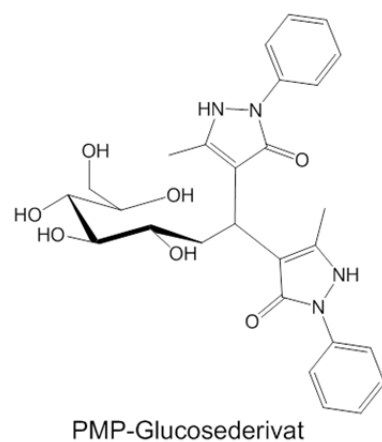


Abbildung 1-XII: Mögliche Produkte der Derivatisierung von Mannose mit einem Hydrazinderivat; **a**:  $\beta$ -D-Mannosederivat; **b**:  $\alpha$ -D-Mannosederivat; **c**: ringoffenes Derivat

### III: Weitere Derivatisierungsreagenzien

Eine weitere Möglichkeit der Derivatisierung an der Carbonylgruppe ist die Bildung von Pyrazolon-Derivaten mittels 1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon (PMP) [60]. Dabei reagieren zwei Äquivalente PMP mit dem entsprechenden reduzierenden Zucker unter Entstehung eines zweifach derivatisierten Produkts.

Die Kondensationsreaktion läuft unter milden Bedingungen ab, so dass auch sialylierte Glykane ohne Zersetzung umgesetzt werden können [61]. Auch leicht abgewandelte Formen von PMP wurden erfolgreich zur



PMP-Glucosederivat

Abbildung 1-XIII:  
PMP-derivatisierter Zucker

Derivatisierung von Zuckern eingesetzt. Weitere Varianten zur Derivatisierung des reduzierenden Terminus sind vorhanden, haben sich aber nicht im gleichen Ausmaß durchgesetzt, wie die bisher erwähnten. Daher wird auf diese Methoden hier nicht weiter eingegangen.

### 1.2.4. Biotinylierung von Glykanen

Biotin hat eine hohe Affinität zu den Proteinen Avidin und Streptavidin ( $K_a \sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ). Diese Bindung ist sehr spezifisch, so dass fast ausschließlich Biotin und Biotinkonjugate nichtkovalent gebunden werden [62]. Daher eignen sich biotinhaltige Derivatisierungsreagenzien gut für die Isolierung und Fixierung von Molekülen, um sie für bioanalytische Detektionssysteme verfügbar zu machen. Biotin hat den zusätzlichen Vorteil, dass es aufgrund seiner geringen Molekülgröße die biologische Aktivität der Derivate nicht beeinflusst [62].

Alle Biotinylierungsreagenzien sind nach dem gleichen Prinzip aufgebaut. An einem Ende befindet sich die Biotingruppe, an die, durch einen Spacer räumlich getrennt, eine reaktive Gruppe geheftet ist. Der Spacer bringt Abstand zwischen die an die reaktive Gruppe gekoppelten Moleküle und die Biotingruppe, um eine bessere Bindung an Avidin zu gewährleisten [63].

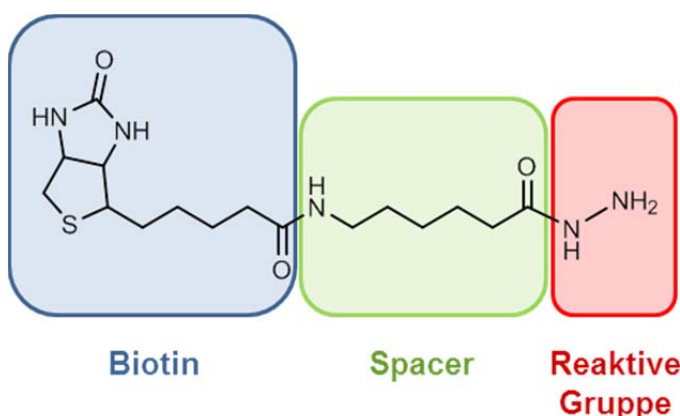


Abbildung 1-XIV:  
Grundlegender Aufbau eines Biotinylierungsreagenziums am Beispiel von BACH

Die zur Derivatisierung von Glykanen verwendeten Biotinylierungsreagenzien enthalten größtenteils Hydrazide als reaktive Gruppe. Im Falle des Biotinyldiaminopyridins (BAP) [64] können die Glykane auch über die reduktive Aminierung derivatisiert werden. BAP hat zwar den Vorteil der UV- und Fluoreszenzaktivität, öffnet aber den ter-

minalen Zuckerring der Oligosaccharide. Dadurch kann die Affinität zu Lektinen und anderen Bindungspartnern verringert werden, insbesondere bei kleineren Glykanstrukturen [65]. Bei Hydrazidstrukturen wie Biocytinhydrazid [66], Biotinamidocaproylhydrazid (BACH) [67], Biotinyl-L-3-(2-naphtyl)-alaninhydrazid (BNAH) [65] und 4-(Biotinamido)phenylhydrazid (BPH) [68] dagegen, bleibt der geschlossene Ring des endständigen Zuckers erhalten. Ein Nachteil ist, dass einzig Biocytinhydrazid und BACH heute noch kommerziell erhältlich sind, wodurch die Auswahl an Reagenzien zur Biotinylierung von Glykanen stark eingeschränkt ist.

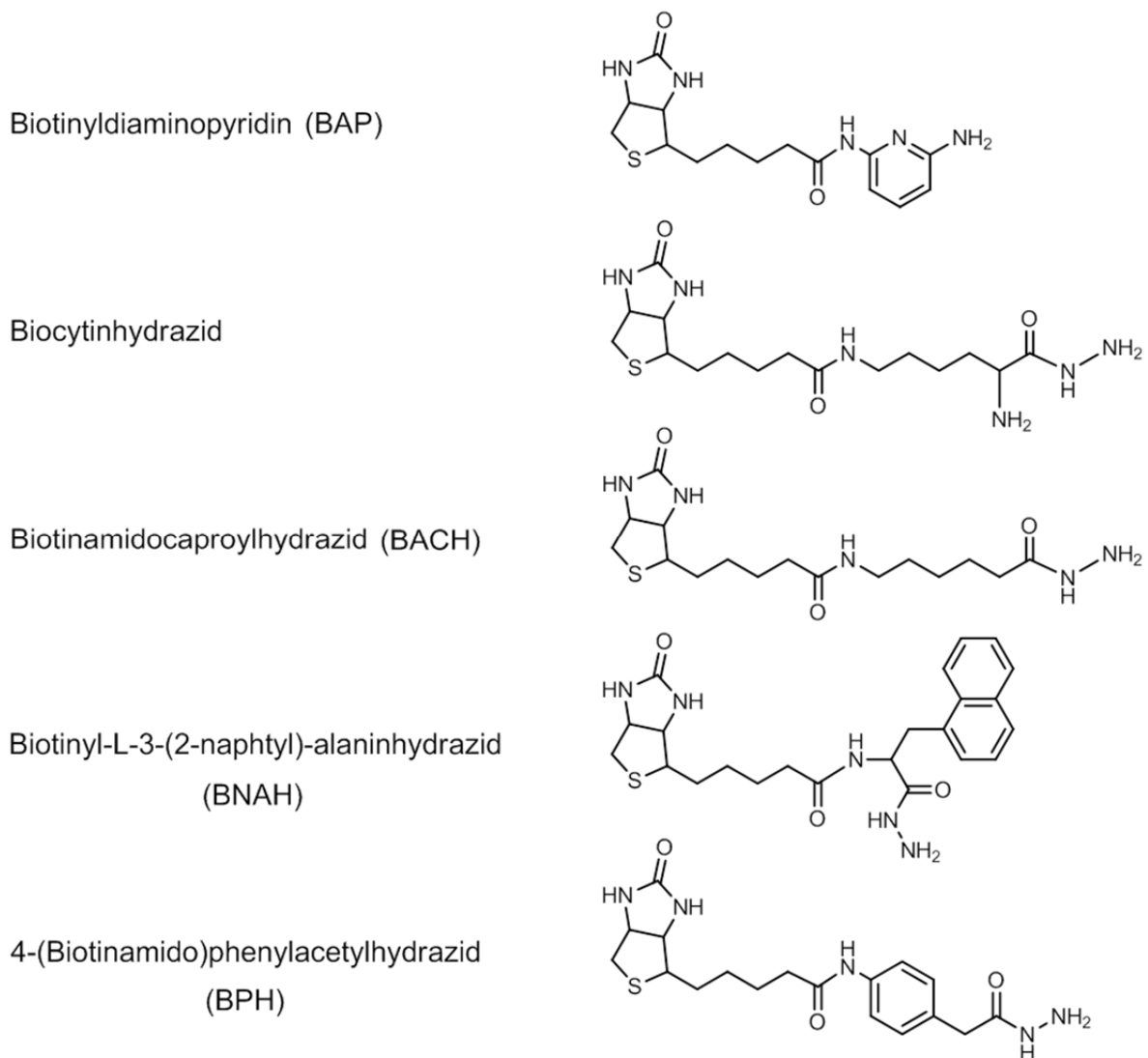


Abbildung 1-XV: Biotinreagenzien zur Derivatisierung von Glykanen

Durch die Befestigung von biotinylierten Glykanen auf den Streptavidin-beschichteten Oberflächen von Mikrotiterplatten [69] oder Glaschips [70] können nun die Interaktionen mit Antikörpern, Proteinen oder Lektinen beobachtet werden. Insbesondere die

Bestimmung von Glykanstrukturen durch bekannte Lektine (*glycan-profiling*) ist eine weitverbreitete Technik, um die Glykanbesetzung von Proteinen zu untersuchen. Lektine sind Proteine oder Glykoproteine, die Glykanstrukturen spezifisch erkennen und binden können [71]. Concanavalin A beispielsweise bindet nur an endständige  $\alpha$ -Mannose und  $\alpha$ -Glucoseeinheiten, wodurch etwa High-Mannoseglykane detektiert werden können. Durch Markierung der Lektine mit Fluoreszenzmarkern lässt sich der Glykanbesatz von Proteinen sowohl qualitativ als auch quantitativ erfassen.

## 1.3. Massenspektrometrie

Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelte Francis William Aston, aufbauend auf Studien von J.J.Thomson [72] das erste Massenspektrometer und konnte damit 212 der 287 stabilen Isotope nachweisen [73]. Dafür erhielt er 1922 den Nobelpreis für Chemie. Ausgehend von dieser Entdeckung kam es bis zur heutigen Zeit zur Entwicklung einer Vielzahl an unterschiedlichen Massenspektrometern, die in den verschiedensten Bereichen Anwendung finden.

Im Wesentlichen sind alle Massenspektrometer nach dem gleichen Prinzip aufgebaut. Sie bestehen aus drei Einheiten: der Ionenquelle, die die Probenmoleküle ionisiert, dem Analysator, in dem die Ionen nach ihrer Masse getrennt werden und dem Detektor, der die Ionen anschließend erfasst. Als Detektoren dienen üblicherweise Elektronenvervielfacher, wie Mikrokanalplatten oder Photomultiplier.

In den Anfängen der Massenspektrometrie waren die Ionisierungsmethoden hauptsächlich auf thermisch stabile, flüchtige Substanzen ausgerichtet. Erst in den letzten Jahrzehnten wurden Instrumente entwickelt, die auch für polare, nichtflüchtige Moleküle weitgehend geeignet sind. Durch diese Entwicklungen wurde die Massenspektrometrie auch für Biomoleküle zugänglich.

Für große Moleküle, wie Proteine oder Glykane, sind gegenwärtig ESI- und MALDI-Massenspektrometrie die Mittel der Wahl. Beide gelten auch als weiche Ionisierungsarten, was bedeutet, dass sie zur Bildung von intakten Analytionen führen und die Fragmentierung des primär erzeugten Analyten vermieden wird. Im folgenden Kapitel werden die Prinzipien dieser beiden Ionisationsmethoden näher erläutert.

### 1.3.1. ESI- und MALDI-Massenspektrometrie

#### 1.3.1.1. ESI-Ionenfalle und ESI-Triplequadrupol

„Electrospray ionization“ (ESI) ist eine der schonendsten Ionisierungsmethoden der Massenspektrometrie und eignet sich zudem gut zur Kopplung an Flüssigchromatographische Methoden, da die Gewinnung der Ionen aus der Lösung erfolgt.

Der Ionisierungsvorgang kann in drei Schritte unterteilt werden [74]:

1. Vernebelung der Probenlösung zu elektrisch aufgeladenen Tröpfchen

2. Verkleinerung der Tröpfchen
3. Freisetzung der Ionen in die Gasphase und Transport in das Hochvakuum des Massenspektrometers

Die Zerstäubung der Probenlösung erfolgt beim Verlassen der durch ein elektrisches Feld aufgeladenen Elektrospraykapillare. Bei Annahme, dass im positiven Modus gemessen wird, reichern sich positiv geladene Ionen an der Oberfläche der Lösung an. Durch das starke elektrische Feld entsteht an der Spitze der Kapillare ein sogenannter Taylor-Konus. In Kombination mit einem Trocknungsgas, das konzentrisch um die Kapillarspitze ausgestoßen wird, wird die Lösung aus der Kapillare in Richtung Gegenelektrode gezogen und in geladene Tröpfchen dispergiert [71-73]. Durch den konstanten Gasfluss verdunstet das Lösungsmittel, wodurch die Tröpfchen kleiner werden und die Ladungsdichte zunimmt. Es werden zwei Theorien zur Freisetzung der Ionen in die Gasphase diskutiert. Die Erste lautet, dass es durch die Verringerung des Tröpfchendurchmessers zur Erhöhung der Ladung bis zu dem Punkt kommt, an dem die Oberflächenspannung überwunden wird (Raleigh Limit) und das Tröpfchen in mehrere kleinere gespalten wird (Coulomb-Explosion). Dieser Prozess wiederholt sich solange bis nur noch ein Analyt pro Tröpfchen vorhanden ist und dieses in die Gasphase übergeht. Die andere Theorie nach *Iribarne und Thomson* [76] besagt, dass die Ionen durch Abstoßungsreaktionen direkt in die Gasphase übergehen, sobald die Tröpfchen eine gewisse Größe unterschritten haben.

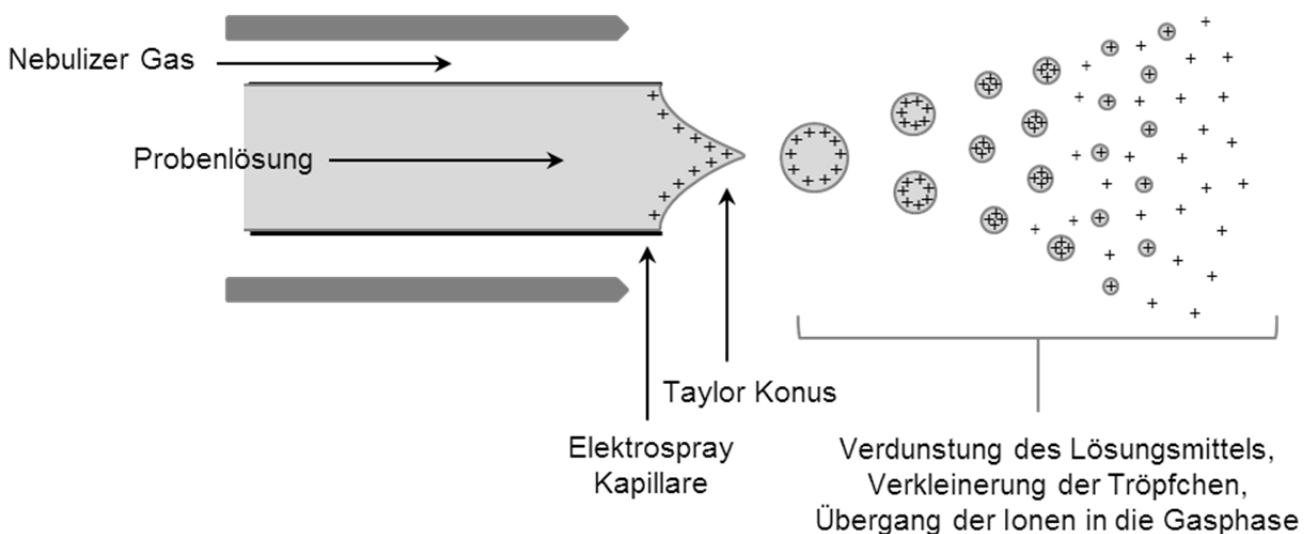


Abbildung 1-XVI: Entstehung der Ionen bei der Elektrosprayionisierung, adaptiert nach P.Kebarle [75]



ESI-Quellen können generell an alle Arten von Massenspektrometern gekoppelt werden, besonders bewährt haben sich aber Quadrupolmassenspektrometer, sowie Ionenfallen.

### 1. Quadrupolmassenspektrometer

In Quadrupolanalysatoren durchlaufen die Ionen vier parallel liegende Stabelektroden (Quadrupol). Dem jeweils gegenüberliegenden Stäbepaar liegt eine Gleichspannung an, das, kombiniert mit einem Hochfrequenzfeld, jeweils nur Ionen einer bestimmten Masse in einer spiralförmigen Flugbahn passieren lässt. Die Flugbahn der Ionen, die eine andere Masse haben, wird dagegen instabil, sie treffen auf die Stabelektroden und werden entladen. Durch Variationen der Spannung am Quadrupol kann der komplette Massenbereich gescannt werden [77].

Durch Reihenschaltung zweier oder mehrerer Quadrupolsysteme können Fragmentierungsexperimente durchgeführt werden. Der klassische Aufbau eines Triplequads besteht aus drei linear angeordneten Quadrupolen, wobei der mittlere als Kollisionszelle dient. Im ersten Quadrupol werden die Ionen der gewünschten Masse selektiert (Precursor), in die Kollisionszelle geleitet und dort mit einem inerten Kollisionsgas beschossen. Dieser Vorgang wird als „Collision-induced dissociation“ (CID) bezeichnet. Der dritte Quadrupol leitet die Produktionen dann weiter zum Detektor [78].

### 2. Ionenfallenmassenspektrometer

Das Prinzip einer Ionenfalle besteht darin, dass die Ionen in einem Quadrupolfeld gefangen gehalten und kontrolliert freigegeben werden können. Der Analysator besteht aus drei hyperboloid angeordneten Elektroden- einer Ringelektrode und zwei Endkappenelektroden, die jeweils eine Öffnung für Eintritt und Austritt der Ionen haben. Durch eine variable Hochfrequenzspannung auf der Ringelektrode werden die Ionen nach ihrem Eintritt in den Analysator auf einer stabilen, komplexen Flugbahn gehalten. Wird zusätzlich an beiden Endkappenelektroden eine Wechselspannung angelegt, können die Ionen aus ihrer stabilen Flugbahn gerissen und damit in den Detektor gelenkt werden [79]. Der Vorteil einer Ionenfalle besteht darin, dass die Ionen mehrfach fragmentiert werden können. Dazu werden die Precursor-Ionen auf einer stabilen Bahn gehalten und mit Kollisionsgas (Stickstoff oder Helium) beschossen. Die daraus entstehenden Produktionen können nun entweder zum Detektor entlassen oder erneut selektiert und fragmentiert werden [78].

### 1.3.1.2. MALDI-TOF und MALDI-TOF/TOF

„Matrix-assisted laser desorption/ ionisation“ (MALDI) erlaubt die Detektion sehr geringer Mengen an Substanzen. Dazu wird die Probe zu einem Überschuss an Matrix auf eine Target-Platte gegeben. Durch das Verdampfen des Lösungsmittels kristallisiert die Matrix aus und schließt den Analyten dabei ein. Dies bewirkt eine homogene Verteilung des Analyten und führt dazu, dass bei Laserbeschuss die Laserenergie gleichmäßig aufgenommen und verteilt werden kann [80]. Als Matrix werden meist kleine organische Substanzen eingesetzt, die ein UV- oder IR-Maximum bei der Wellenlänge des verwendeten Lasers haben. Häufig verwendete Matrizes für die Analyse von Glykanen und Glykoproteinen sind  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), oder Super-DHB – eine Mischung aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure und 10 % 2-Hydroxy-5-methoxybenzoesäure [39]. Die Beimischung von Additiven zum DHB steigert die Auflösung, verbessert das Kristallisationsverhalten und macht die Messung weniger empfindlich gegen Verschmutzungen [81].

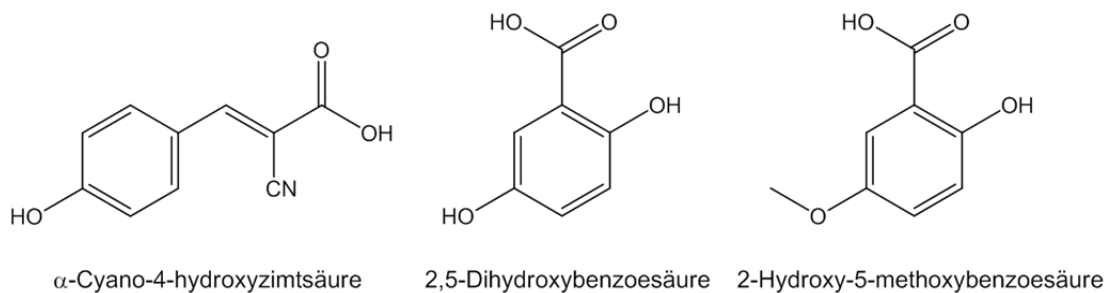


Abbildung 1-XVII: MALDI-Matrizes für die Analyse von Glykanen

Diese Matrizes sind geeignet für Laser im UV-Bereich, wie Stickstoff-Laser (337 nm) oder Nd:YAG-Laser (Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser) (355 nm/ 266 nm). Durch die Aufnahme der Laserenergie wird die Matrix ionisiert und reißt die Probenmoleküle mit in die Gasphase. Dabei wird die Ladung der durch die Säuregruppe als Protonendonoren dienenden Matrixmoleküle auf den Analyten übertragen [80]. Die Detektion der Moleküle erfolgt meist mittels Kopplung an Time-of-flight-Detektoren (TOF) [82], die Messungen in einem nahezu unbegrenzten Massenbereich ermöglichen. TOF-Analysatoren messen die Zeit, die die Moleküle benötigen, um am Detektor anzukommen. Die Teilchen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und anschließend in einer feldfreien Flugröhre nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis getrennt. Dabei erreichen schwere Teilchen den Detektor

später als leichte Teilchen [83]. Je nach Ionisationsmodus, werden die Molekülionen als einfach geladene positive oder negative Ionen erfasst. Dabei können sowohl Protonen als auch Metallionen (Me) auf den Analyten übertragen werden ( $[M+H]^+$ ,  $[M+Me]^+$ , bzw.  $[M-H]^-$ ,  $[M-Me]^-$ ) [84,85]. Kohlenhydrate werden in der Regel im positiven Modus als  $[M+Na]^+$ - oder  $[M+K]^+$ -Ionen bestimmt [86,87].

Dass ein Teil der Molekülionen während des Fluges zum Analysator Fragmentierungsreaktionen unterliegt, wird beim PSD-MALDI genutzt. Der sogenannte „post-source decay“ (PSD) erfolgt dabei einerseits durch Kollisionen mit Matrixmolekülen während der Beschleunigungsphase und andererseits durch Zusammenstöße mit Gasteilchen auf der Driftstrecke zum Detektor [88]. Entscheidende Nachteile des PSD-MALDI, z.B. lange Messzeiten und geringe Fragmentierungseffizienz, führten durch Weiterentwicklung zu MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometern. Die Reihenschaltung zweier TOF-Analysatoren in Kombination mit einer LIFT-Einheit ermöglicht eine hohe Massenauflösung und eine sensitive Messung von Fragmentspektren innerhalb kürzester Zeit. Zunächst werden die Ionen in der Kollisionszelle fragmentiert und anschließend die Precursor-Ionen und ihre zugehörigen Fragmentationen im Ionenselektor ausgewählt (TOF 1). In der LIFT-Einheit kommt es nun zu einer Potentialerhöhung („potential lift“) und Beschleunigung der Ionen hin zu TOF 2. Dort werden die restlichen, unfragmentierten Precursor-Ionen im Ionendeflektor ausselektiert und die Fragment-Ionen zum Detektor gelenkt [89].

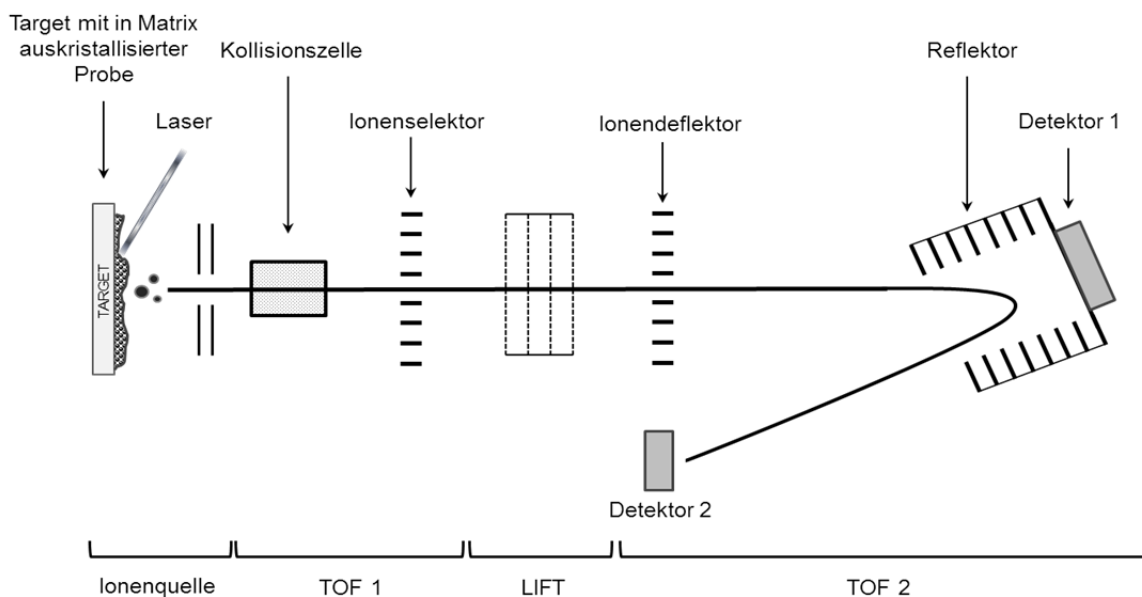


Abbildung 1-XVIII: Schematischer Aufbau eines MALDI-LIFT-TOF/TOFs, adaptiert nach Suckau et al. [89]

### 1.3.2. Fragmentierung von Zuckern und Glykanen

Die Fragmentierung von Molekülen wird genutzt um Informationen über deren Aufbau zu gewinnen. Dabei wird die Tatsache genutzt, dass die Spaltungen in der Molekülstruktur meist nicht willkürlich entstehen, sondern abhängig von der Zusammensetzung nach bestimmten Mustern ablaufen.

Das Fragmentierungsverhalten von Kohlenhydraten hängt von mehreren Faktoren ab. Ein Kriterium ist die auf das zu fragmentierende Ion übertragene Energie. Bei CID-Fragmentierungen wird beispielsweise mehr Energie eingesetzt als bei PSD-Fragmentierungen. Ebenfalls eine Rolle spielt, ob der Zucker als einfach oder mehrfach geladenes Ion vorliegt und welche Art von Addukten gebildet wird. So sind die MS/MS-Spektren von mehrfach geladenen Ionen weniger aussagekräftig als die einfach geladener [87]. Auch sind die Fragmentspektren von  $[M+Na]^+$  oder  $[M+Li]^+$ -Ionen aufschlussreicher als die von  $[M+H]^+$ -Ionen, da hier vermehrt Spaltungen in den Zuckerringen auftreten (*cross-ring cleavages*) [90], [91]. Diese Spaltungen wiederum sind interessant im Hinblick auf Art und Verknüpfung der Zucker miteinander, die miteinander sehr komplex sein können.

Da einige Bruchstücke bei der Fragmentierung von Glykanen mit sehr hoher Regelmäßigkeit auftreten, wird dies auch als Methode zur Detektion von Glykanen genutzt. Dafür eignen sich vor allem Triplequadrupolmassenspektrometer. Die ionisierten Moleküle werden dazu direkt in die Kollisionszelle eingeleitet und fragmentiert. Anschließend werden alle Vorläuferionen, die ein bestimmtes Fragment abspalten, detektiert (*Precursor ion scan*).

Aufgrund der Komplexität der entstehenden Spaltungen im Zuckermolekül wurde von *Domon* und *Costello* [92] eine Nomenklatur zur Bezeichnung der Bruchstellen entwickelt, abgeleitet von der Nomenklatur der Peptide. Spaltungen bei denen die Ladung an dem Teil des Zuckers verbleibt, welches das reduzierende Ende enthält, werden mit X, Y und Z bezeichnet. Wird das nicht-reduzierende Ende abgespalten, ist dies durch A, B oder C gekennzeichnet. Der Index gibt an, an welcher glykosidischen Bindung - vom jeweiligen Ende aus gesehen - gespalten wurde. A und X bezeichnen Spaltungen innerhalb des Zuckerrings, hier wird zusätzlich angegeben, welche beiden Bindungen gespalten wurden.

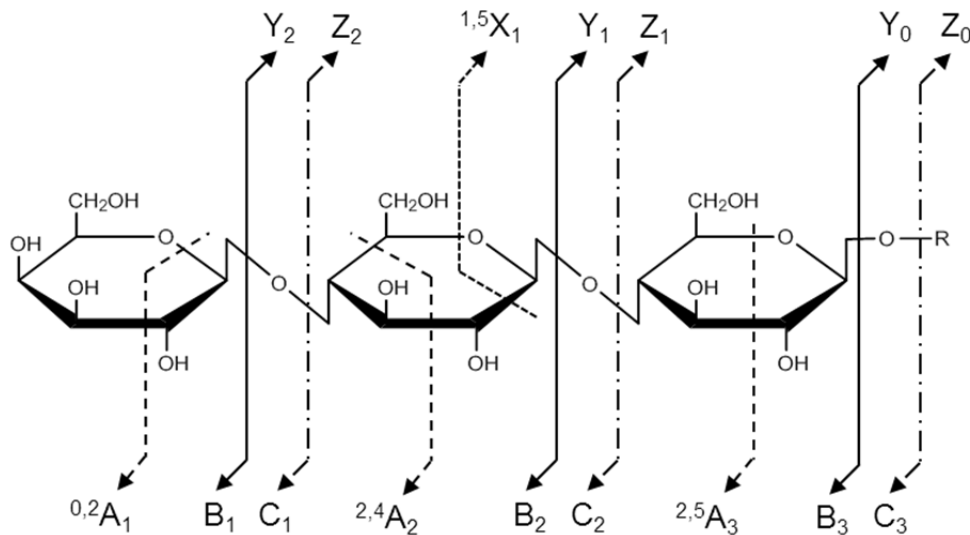


Abbildung 1-XIX: Nomenklatur nach Domon und Costello [92],  
mit freundlicher Genehmigung von Springer Science und Business Media

Liegen verzweigte Zucker vor, so wird mit griechischen Buchstaben angegeben, welche Kette abgespalten wurde, wobei die größte Kette mit  $\alpha$  bezeichnet wird.

Eine weitere Besonderheit bei der Interpretation von Fragmentspektren ist die Entstehung von Umlagerungen, sogenannter „Rearrangements“. Diese durch die Fragmentierung verursachten Umgruppierungen im Molekül treten bei einem Großteil aller Substanzen auf. Dabei wird unterschieden zwischen zufälligen und spezifischen Umlagerungen [93]. Interessant sind hauptsächlich die spezifischen Umlagerungen im Molekül, da sie zur Strukturaufklärung beitragen können. Auch bei der Fragmentierung von Kohlenhydratstrukturen wurde gezeigt, dass es durch Umstrukturierungen zum Verlust innenliegender Monosaccharide [94] oder zur Migration von Fucoseinheiten kommen kann [95]. Die genauen Mechanismen, die zu diesen Rearrangements führen, sind, trotz verschiedener Vorschläge, noch nicht genau bekannt [96]. Allerdings sind davon hauptsächlich protonierte Moleküle betroffen, bei Natriumaddukten oder deprotonierten Substanzen scheint dieses Phänomen nur selten aufzutreten [97]. Daher sind vor allem Fragmentspektren betroffen, die durch Tandemmassenspektrometrie aufgenommen wurden. Als Nomenklatur wurde, als Ergänzung zu *Domon* und *Costello* (s.o.), vorgeschlagen, die entstehenden Strukturen als  $Y^*_{n,m}$  Ionen zu bezeichnen. N und M stehen für die Bindungen, vom reduzierenden Ende aus zählend, zwischen denen es zum Verlust der Monosaccharideinheit kommt [98].

## 1.4. Ziel der Arbeit

Im Zuge dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss verschiedene Derivatisierungsreagenzien auf das Verhalten von Kohlenhydraten in Bezug auf Detektion und Fragmentierung in LC-ESI- und MALDI-Massenspektrometrie haben und in wie fern sich dies auf die Aufklärung der Saccharidstrukturen auswirkt.

Dazu wurden drei Derivatisierungsreagenzien auf Hydrazidbasis mit dem Standardderivatisierungsreagenz 2-Aminobenzamid, wie auch mit den underivatisierten Zuckern verglichen. Die verwendeten Hydrazide waren zum einen das bereits von *P. Kapková* bearbeitete BACH [99], sowie die erstmals zu diesem Zweck verwendeten Substanzen Isonicotinsäurehydrazid (INH) und das davon abgeleitete biotinhaltige BINH (1-(6-Biotinylhexyl)-2-oxo-isonicotinsäurehydrazid).

Die zu derivatisierenden Kohlenhydrate umfassten die in *N*-Glykanen vorkommenden Monosaccharide, sowie verschiedene Di- und Trisaccharide. Auch die nativen *N*-Glykane von Ribonuclease B und Ovalbumin, sowie mehrere Standardglykane wurden mit den verschiedenen Derivatisierungsreagenzien umgesetzt.

Die Zuckerderivate wurden im Hinblick auf folgende Punkte untersucht:

- Vollständigkeit der Umsetzung der Zucker und Glykane mit den neuen Derivatisierungsreagenzien INH und BINH
- Verkürzung des Derivatisierungsablaufes mittels Mikrowelle
- Veränderung des Trennverhaltens bei flüssigchromatographischen Methoden auf HILIC- und RP-Phasen
- Veränderung der Signalintensität bei Erfassung durch massenspektrometrische Methoden
- Veränderung des Fragmentierungsverhalten, insbesondere in Bezug auf die Strukturanalyse von Oligosacchariden
- Möglichkeit der Kopplung BINH-derivatisierter Zucker an Streptavidin-beschichtete Oberflächen mit anschließender Bindung durch fluoreszenzmarkierte Lektine

## **2. Ergebnisse und Diskussion**

## 2.1. Derivatisierung und Analyse von Mono-/ Di- und Trisacchariden

### 2.1.1. Hintergründe

#### I. Kompositionsanalyse

Die strukturelle Untersuchung eines Glykans oder Polysaccharids beinhaltet zunächst dessen Sequenzanalyse, da Art und Häufigkeit der vorkommenden Monosaccharide wertvolle Hinweise auf die Natur des vorliegenden Kohlenhydrats geben. Hierfür werden die Zucker zunächst hydrolysiert, indem sie in 2-4 M Trifluoressigsäure (TFA) oder Salzsäure (HCl) für circa sechs Stunden auf 100-120 °C erhitzt werden. Dabei wird TFA für die Spaltung der neutralen Monosaccharide verwendet, HCl für die der Aminozucker, wodurch die Gefahr von Zersetzungsreaktionen verringert wird [96,97], [102]. Jedoch werden auch Methoden angewandt, die beide Zuckerarten mit TFA freisetzen [103,104]. Durch die Hydrolyse kommt es zur Deacetylierung der Aminozucker, diese werden daher in einem weiteren Schritt mit Acetanhydrid reacctyliert [101]. Sialinsäuren müssen separat durch Enzyme, wie beispielsweise Neuraminidasen, abgespalten werden.

Im Anschluss an die Hydrolyse folgt meist die Derivatisierung der Monosaccharide. Durch Verringerung der Polarität und Kopplung mit Chromophoren wird die Trennung auf gängigen Säulenmaterialien mittels HPLC ermöglicht, sowie die Detektion durch UV- und Massenspektrometrie erleichtert. Anhand der im Hydrolysat bestimmten Monosaccharide können Rückschlüsse auf die vorhandenen Glykane gezogen werden. Die Anwesenheit von *N*-Acetylglucosamin weist beispielsweise auf die Gegenwart von *O*-Glykanen hin, da dieses Monosaccharid nur selten in anderen Arten von Glykanen vorkommt. Werden dagegen größere Mengen an Mannose nachgewiesen, so deutet dies auf *N*-Glykane hin [3].

#### II. Trennung mittels HPLC

Eine oft verwendete Methode zur Trennung nativer Monosaccharide ist die Hochleistungsanionenaustauschchromatographie (*high performance anion exchange chromatography* – HPAED) gekoppelt mit gepulster amperometrischer Detektion (*pulsed am-*



*perometric detection* – PAD) [105]. Hier erfolgt die Separation mittels stark alkalischer mobiler Phasen auf positiv geladenen Anionenaustauschern. Durch geringfügige Unterschiede in den  $pK_a$ -Werten der Hydroxy-Gruppen kommt es zur Trennung der Zucker, auch isomere Strukturen können durch diese Methode aufgetrennt werden.

Zur Trennung auf herkömmlichen RP-Säulenmaterialien müssen die Monosaccharide dagegen zunächst derivatisiert werden, da die Auftrennung der Zucker durch ihre Polarität meist stark beeinträchtigt wird. Die für diese Arbeit verwendeten stationären Phasen werden im Nachfolgenden näher beschrieben.

Die gängigste stationäre Phase in der Flüssigchromatographie ist die Umkehrphase (Reverse Phase – RP). Basis dieses Säulenmaterials ist Kieselgel, welches überwiegend mit Octadecyl- oder Octylgruppen modifiziert wird. Zusätzlich sind verschiedene Varianten mit Isobutylseitenketten, Pentafluorphenyl- (PFP) oder Phenylhexylresten und anderen Endgruppen möglich. RP-Säulen eignen sich durch ihre Hydrophobizität nur bedingt zur Trennung sehr polarer Substanzen. Zucker werden auf dieser Phase kaum zurückgehalten, durch Derivatisierung kann die Retention jedoch verbessert werden.

Eine Alternative für die Trennung polarer Substanzen ist die HILIC-Phase (Hydrophilic Interaction Chromatography), eine Weiterentwicklung der Normal-Phasen-Chromatographie (NP), bei der die Substanzen auf einer hydrophilen stationären Phase mit Hilfe einer weniger polaren mobilen Phase separiert werden. Im Gegensatz zu den sehr unpolaren Lösungsmitteln wie Hexan, die in der NP-Chromatographie Verwendung finden, können die gleichen Fließmittel wie in der RP-Chromatographie eingesetzt werden, was nicht nur zu einer besseren Handhabung führt, sondern auch zu einer einfachen Kopplung an massenspektrometrische Detektion. Zudem wird durch den hohen Anteil an organischer Phase im Fließmittel die Sensitivität bei Elektrosprayionisation erhöht [106]. Ähnlich wie bei den Umkehrphasen sind auch bei der HILIC verschiedene Oberflächen im Handel erhältlich. Die einfachste stationäre Phase besteht aus underivatisiertem Kieselgel, welches allerdings einige Nachteile gegenüber modifizierten Kieselgelen mit sich bringt. Beispielsweise kommt es leicht zum Überladen der Säule, außerdem kann es zur irreversiblen Bindung an die Oberfläche der stationären Phase kommen, da die Trennung der Analyten hauptsächlich durch deren Adsorption an der Säulenoberfläche erfolgt. Im Gegensatz dazu beruht das Trennprinzip der HILIC-Phasen höchstwahrscheinlich auf Verteilungsvorgängen zwischen der

Wasserschicht auf dem hydrophilen Säulenmaterial und der relativ hydrophoben mobilen Phase [107].

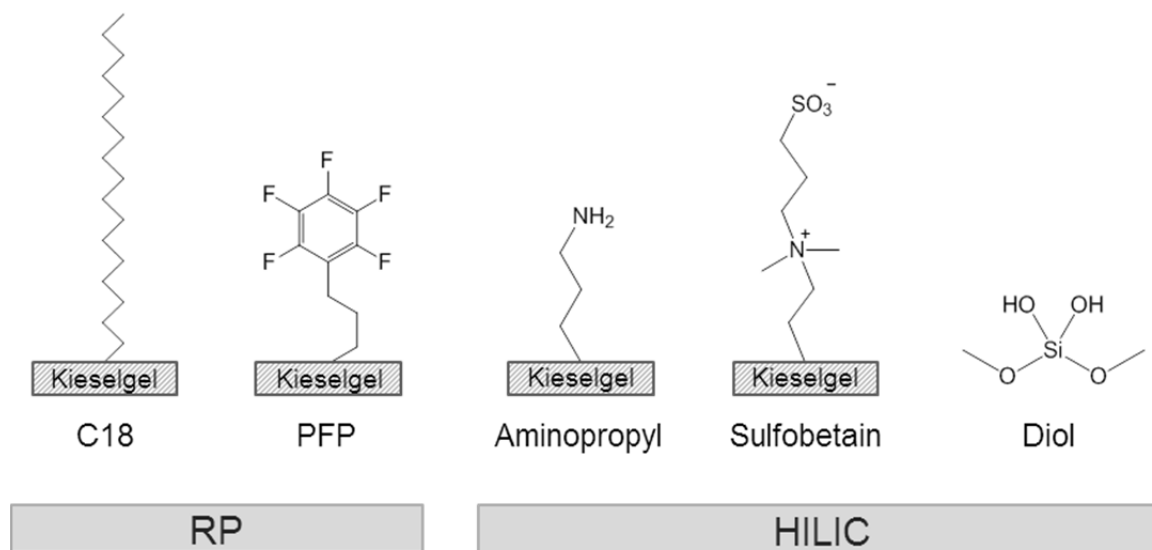


Abbildung 2-1: Stationäre Phasen in der HPLC

Durch Derivatisierung der Kieselgeloberfläche mit Aminopropyl-, Amid- oder Hydroxylgruppen werden die negativen Effekte minimiert. Auch geladene oder zwitterionische Phasen wie Sulfobetainstrukturen werden zur Trennung eingesetzt, da diese zusätzlich über elektrostatische Wechselwirkungen verfügen. Für die vorliegende Arbeit wurde eine HILIC-Säule mit Diol-Phase (Kinetex HILIC, Phenomenex) verwendet. Diol-Phasen haben eine ähnliche Polarität wie normales Kieselgel, sind durch die Modifizierung jedoch stabiler und neigen weniger zu Adsorptionsvorgängen. Durch die Fähigkeit zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen und die hohe Polarität wird die Trennung von stark polaren Substanzen, wie beispielsweise Zuckern, stark begünstigt [106].

Eine weitere stationäre Phase die sich zur Kohlenhydratanalytik eignet, ist poröser Graphit-Kohlenstoff (porous graphitized carbon – PGC), ein Material, das aus gitterartig, hexagonal angeordneten Kohlenstoffatomen besteht. Die Substanz zeichnet sich durch eine große Oberfläche mit gleichmäßigen Poren aus, die gleichzeitig sehr widerstandsfähig gegen saure und basische Lösungsmittel, sowie hohe Temperaturen und Drücke sind [108]. Der Trennmechanismus beruht zum größten Teil auf hydrophoben Wechselwirkungen, vergleichbar mit einer Umkehrphase. Zusätzlich spielen aber auch elektronenabhängige Faktoren, wie beispielsweise  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen,

eine Rolle [108,109]. Damit lässt sich auch die Fähigkeit von PGC zur selektiven Trennung isomerer Substanzen erklären. Durch die unterschiedliche räumliche Anordnung der polaren und unpolaren Gruppen von Isomeren treten verschieden starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase auf, was dazu führt, dass die Moleküle auf der Säule getrennt werden können [109]. Insbesondere in der Zuckeranalytik, bei der eine Vielzahl von Epimeren und Stereoisomeren vorkommen, kann diese Eigenschaft von großem Nutzen sein.

### **III. Detektion**

Die Detektion der Zucker und Glykane erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels UV- und Massenspektrometrie. Für die Mono-, Di- und Trisaccharide wurde die ESI-Ionenfallen-Massenspektrometrie gewählt (siehe 1.3.), zum einen aufgrund der möglichen Kopplung an die HPLC, zum anderen wegen des messbaren Massenbereichs. Dieser reicht bis zu vergleichsweise niedrigen Massen im zweistelligen Bereich. Mittels MALDI-Massenspektrometrie wären die kleinen Zuckermoleküle eher schwer zu bestimmen, da dort im unteren Messbereich Matrixeffekte einen starken Einfluss haben.

### **IV. Ziele**

Angesichts der Tatsache, dass die Glykobiologie, und damit auch die Glykananalytik, ein rapide wachsendes Forschungsfeld ist, sind zuverlässige Methoden mit ubiquitär verfügbaren Derivatisierungsreagenzien und Gerätschaften elementar. Dazu zählen sowohl Trennung und Nachweis von kleinen Zuckern, als auch Ermittlung und Identifikation von Glykanen. Daher wurde im Verlauf dieser Arbeit einerseits die Untersuchung von P. Kapková [99] am Derivatisierungsreagenz BACH weitergeführt und andererseits zwei neue Derivatisierungsreagenzien auf Eignung zur Markierung von Zuckern und Glykanen getestet. Folgendes Kapitel beschäftigt sich zunächst mit der Derivatisierung der Mono-, Di- und Trisaccharide, der Trennung auf verschiedenen Säulen sowie dem Verhalten bei Detektion und Fragmentierung.

## 2.1.2. Derivatisierung

Für die Derivatisierung wurden folgende Monosaccharide ausgesucht: Xylose (Xyl), Fucose (Fuc), Glucose (Glc), Mannose (Man), Galactose (Gal), *N*-Acetylglucosamin (GlcNAc) und *N*-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure/ SS). Diese Zucker dienen in biologischen Systemen als die wesentlichen Grundbausteine für *N*-Glykane, beziehungsweise sind, im Falle von Glucose, an deren Aufbau beteiligt [110]. Zusätzlich wurden die Disaccharide Lactose (Lac), Maltose (Mal) und Cellobiose (Cel) und die Trisaccharide 3'-Sialyl-*N*-acetylglucosamin (3'SLN) und 6'-Sialyl-*N*-acetylglucosamin (6'SLN) derivatisiert. Hier lag das Augenmerk darauf, ob die strukturell sehr ähnlichen Zucker mit Hilfe der Kopplungsreagenzien getrennt und identifiziert werden können [110].

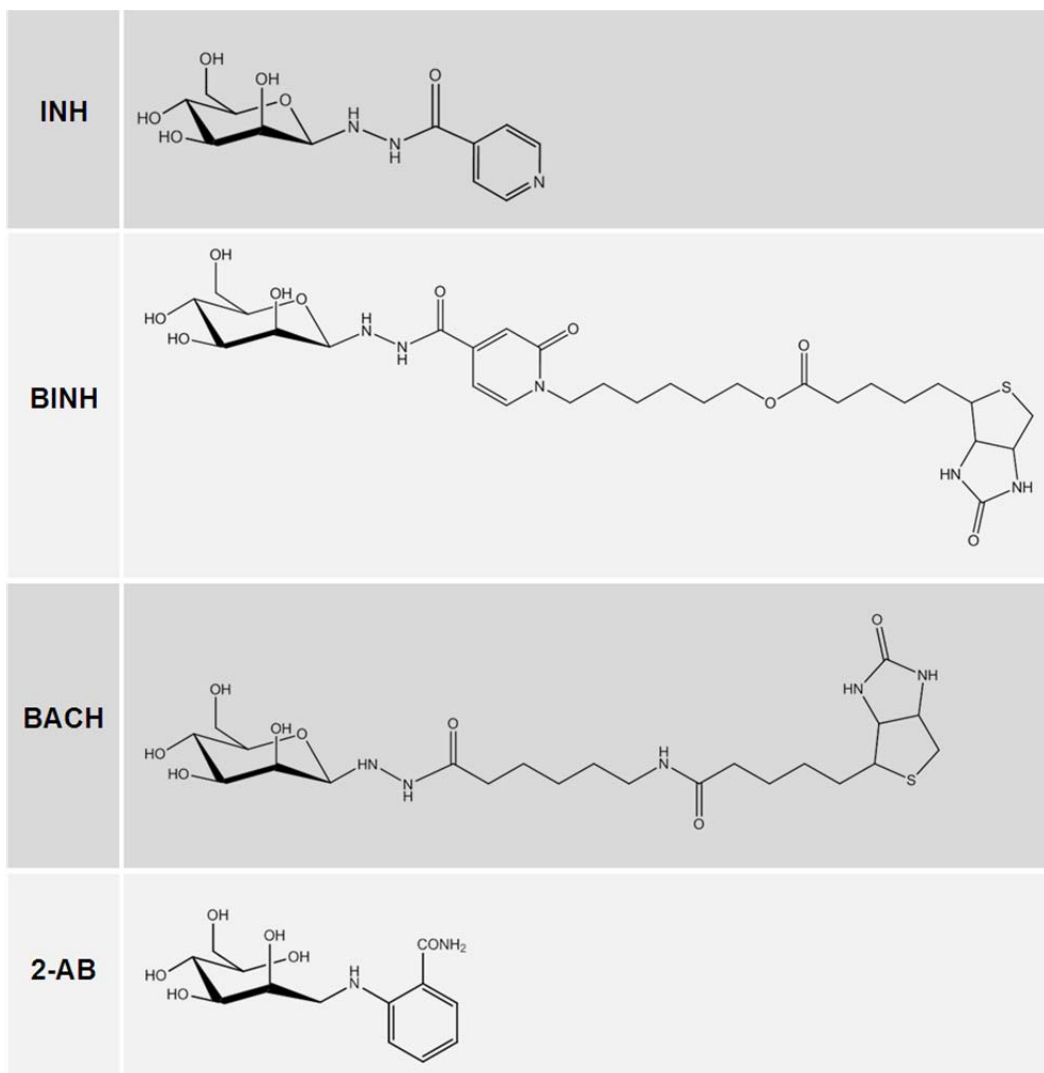


Abbildung 2-II: Derivate der verschiedenen Derivatisierungsreagenzien am Beispiel von Mannose

Als Derivatisierungsreagenzien wurden Biotinamidocaproylhydrazid (BACH), Isonicotinsäurehydrazid (INH), 1-(6-Biotinylhexyl)-2-oxo-isonicotinsäurehydrazid (BINH), sowie 2-Aminobenzamid (2-AB) als gut untersuchtes Standardderivatisierungsreagenz verwendet.

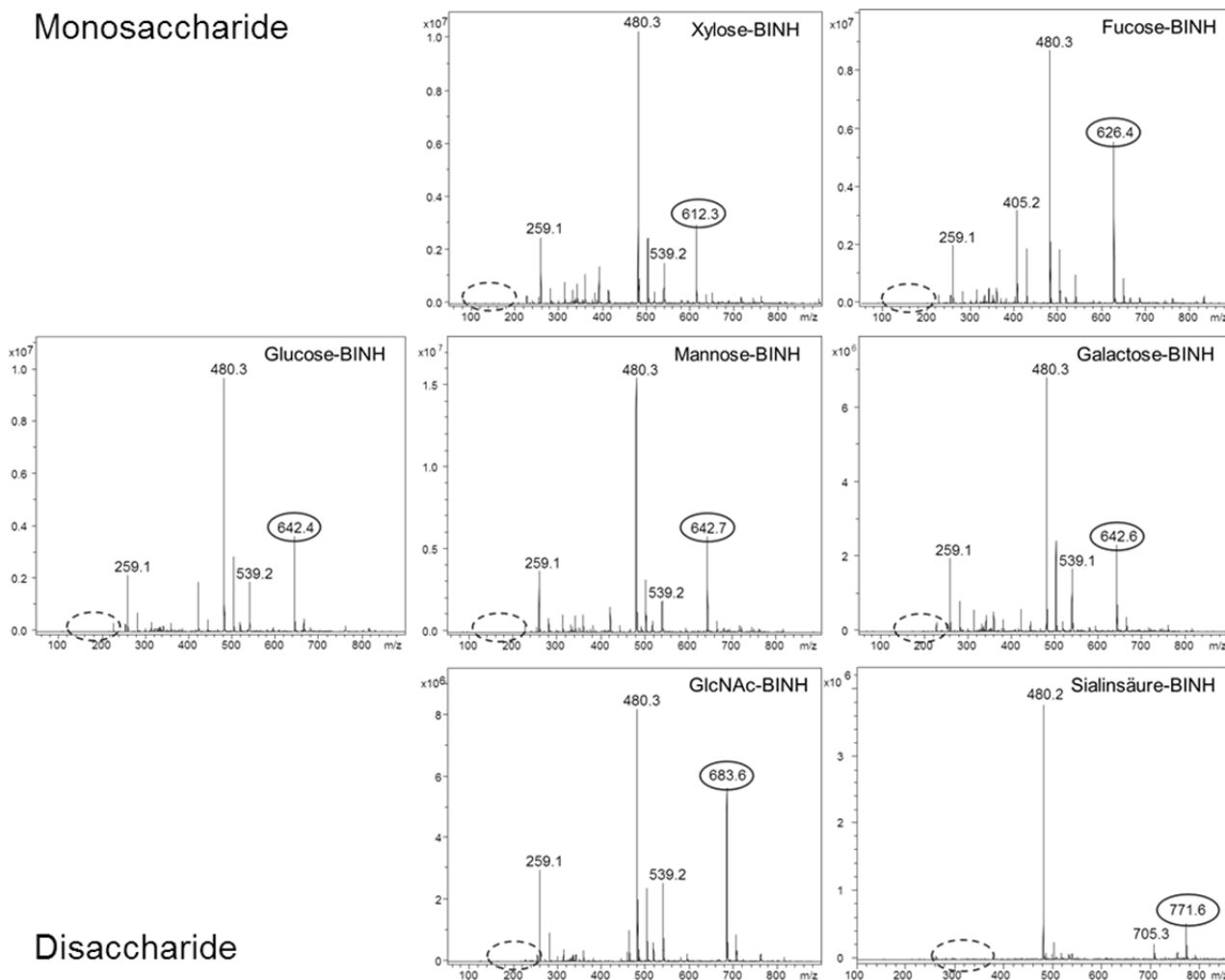
Für INH und BINH als neue Derivatisierungsreagenzien wurde zunächst die Derivatisierungsreaktion optimiert. Die Derivatisierung von Zuckern mit Hydrazinen oder Hydraziden wird üblicherweise in wässrigem Ethanol oder Methanol (10 - 85 %), teils mit Zusatz von schwachen Säuren (meist Essigsäure), bei Temperaturen zwischen 37 °C – 90 °C durchgeführt und dauert zwischen 20 Minuten und 16 Stunden [50,52,53,61].

### I. Derivatisierung im Thermomixer®

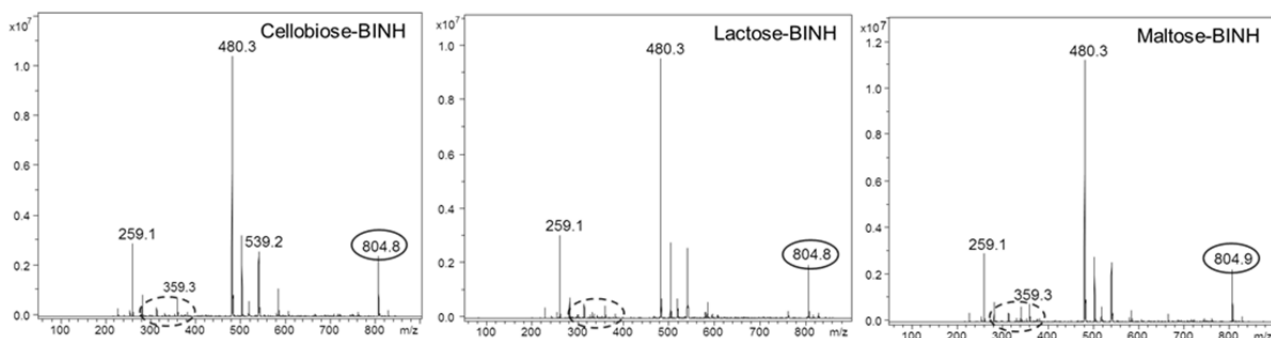
Zur Derivatisierung der verschiedenen Zucker mit INH und BINH wurden zunächst die gleichen Bedingungen gewählt, die auch für das bereits in dieser Hinsicht untersuchte BACH beschrieben waren [99]. Dafür wurde ein fünffacher Überschuss an Derivatisierungsreagenz zu den jeweiligen Zuckern gegeben und in 95 % Methanol für 60 Minuten bei 90 °C im Thermomixer® erhitzt. Die Umsetzung wurde im Anschluss mittels Direkteinspritzung in die ESI-Ionenfalle überprüft. Dabei zeigte sich, dass sowohl bei der Kopplung mit INH, als auch mit BINH die Zucker nicht komplett umgesetzt worden waren. Daher wurde die Reaktionszeit zunächst auf 75 Minuten verlängert, doch auch hier zeigten sich in den Massenspektren noch Reste der ursprünglichen Saccharide. Bei einer Reaktionszeit von 90 Minuten schließlich wurde nur noch das Reaktionsprodukt in Form des derivatisierten Zuckers nachgewiesen. Auf Zugabe von Säure, wie beispielsweise Essigsäure, zum Derivatisierungsansatz wurde aus Stabilitätsgründen verzichtet [48], ebenso wie auf den Zusatz von Salzen, um zusätzliche Reinigungsschritte zu vermeiden.

In Abbildung 2-III sind exemplarisch die Spektren der Umsetzung mit BINH dargestellt. Der höchste Peak im Spektrum zeigt jeweils das Derivatisierungsreagenz BINH mit einer Masse von  $m/z$  480.3. Zusätzlich zu diesem Massenpeak und dem des derivatisierten Zuckers erscheinen jeweils noch einige andere in den Spektren. Da diese Massen (z.B.  $m/z$  259.1,  $m/z$  539.2) jedoch regelmäßig in fast allen Spektren vorkommen, ist davon auszugehen, dass dies keine Nebenprodukte der Derivatisierung

Monosaccharide



Disaccharide



Trisaccharide

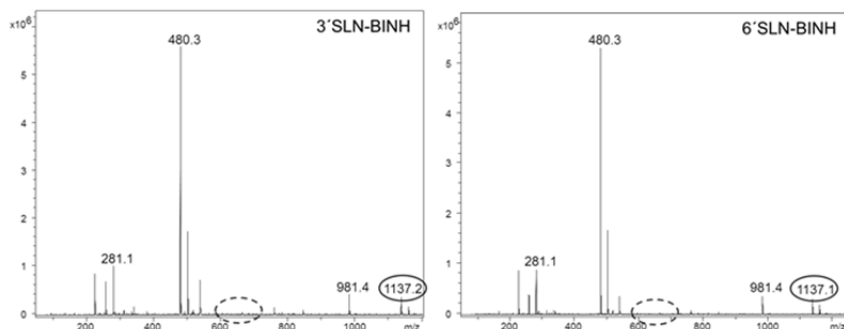


Abbildung 2-III: Komplette Umsetzung von verschiedenen Zuckern durch das Derivatisierungsreagenz BINH. Die durchgehenden Kreise kennzeichnen das umgesetzte Produkt, die gestrichelten Kreise die Stelle, an der der underivatisierte Zucker auftreten würde.

sind, sondern aus Verunreinigungen des im Hause hergestellten Derivatisierungsreagenzes BINH stammen.

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden Lösungen von BINH vor und nach dem Derivatisierungsvorgang vermessen. Dabei zeigte sich, dass sowohl vor, als auch nach dem Erhitzen des Reagenzes die gleichen Störmassen auftraten, die auch bei der Derivatisierung der Zucker vorhanden waren. Dadurch ist zum einen auszuschließen, dass bei der Derivatisierung der Zucker zur Entstehung unerwünschter Nebenprodukte kam und zum anderen, dass sich das Derivatisierungsreagenz selbst während der Reaktion zersetzt.

Die Umsetzung der Zucker mit INH wurde auf gleiche Weise geprüft. Auch hier ergab sich, dass alle Zucker komplett durch das Derivatisierungsreagenz umgesetzt werden. Im Gegensatz zu BINH wurden jedoch kaum zusätzliche Peaks, welche auf Verunreinigungen hinweisen würden, detektiert.

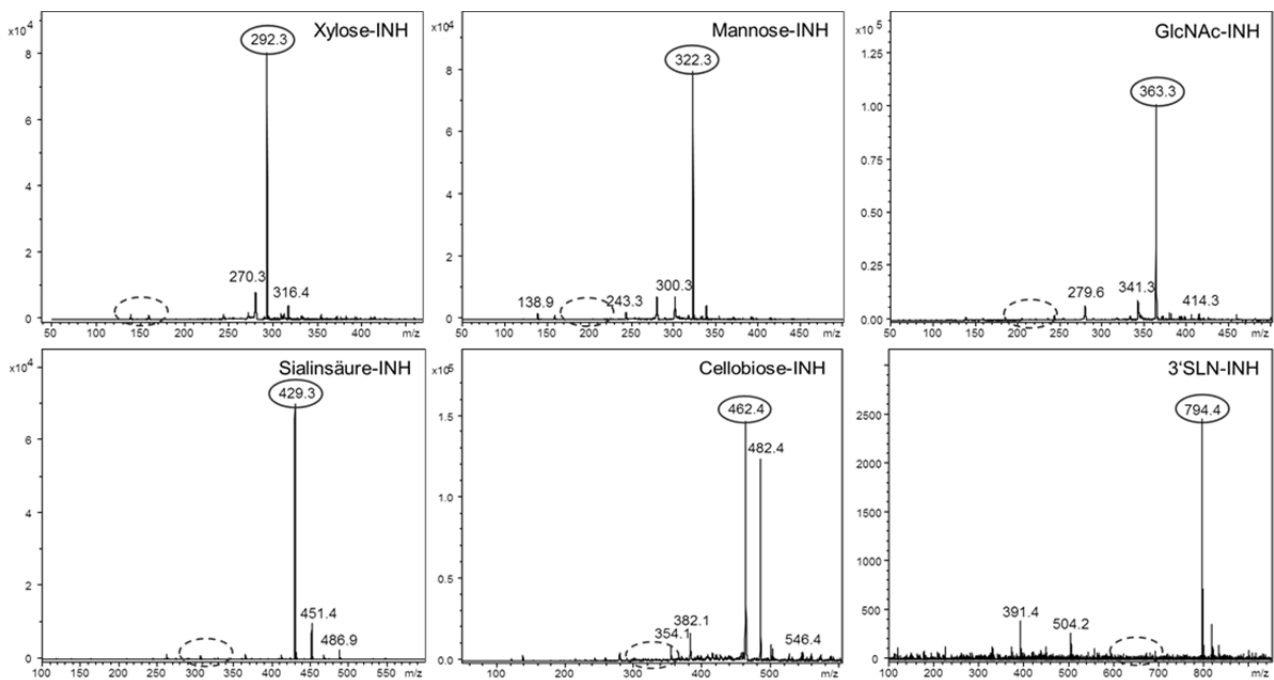


Abbildung 2-IV: Vollständige Umsetzung verschiedener Mono-, Di- und Trisaccharide durch das Derivatisierungsreagenz INH. Die durchgehenden Kreise kennzeichnen das umgesetzte Produkt, die gestrichelten Kreise die Stelle, an der die unterivatisierten Zucker auftreten würde.

Abbildung 2-IV zeigt einen Auszug der Spektren verschiedener INH-derivatisierter Zucker. Im Gegensatz zu der Umsetzung mit BINH wurde das Derivatisierungsreagenz hier nur in geringen Spuren detektiert, da es sich in einem niedrigen Massenbereich

befindet ( $m/z$  138.2). Die Zucker wurden sowohl in protonierter Form, als auch als Natriumaddukte nachgewiesen.

Für BACH und 2-AB wurden diese Untersuchungen nicht durchgeführt, da beide Substanzen bereits zur Derivatisierung von Zuckern verwendet wurden und entsprechende Vorschriften zur Umsetzung vorhanden sind [36,63,95].

	<b>[M+H]<sup>+</sup> underivatisiert</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup> INH</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup> BINH</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup> BACH</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup> 2-AB</b>
<b>Xyl</b>	151.13	270.25	612.70	504.61	271.28
<b>Fuc</b>	165.16	284.28	626.73	518.64	285.31
<b>Glc</b>	181.16	300.28	642.73	534.64	301.31
<b>Man</b>	181.16	300.28	642.73	534.64	301.31
<b>Gal</b>	181.16	300.28	642.73	534.64	301.31
<b>GlcNAc</b>	222.21	341.33	683.78	575.69	342.36
<b>SS</b>	310.27	429.39	771.84	663.75	430.42
<b>Mal</b>	343.30	462.42	804.87	696.78	463.45
<b>Cel</b>	343.30	462.42	804.87	696.78	463.45
<b>Lac</b>	343.30	462.42	804.87	696.78	463.45
<b>3'SLN</b>	675.60	794.72	1137.17	1029.08	795.75
<b>6'SLN</b>	675.60	794.72	1137.17	1029.08	795.75

*Tabelle 2-1: Berechnete Massen der protonierten, derivatisierten und underivatisierten Zucker*

## II. Derivatisierung in der Mikrowelle

Zusätzlich zur Derivatisierung im Thermomixer® wurde die Umsetzung von Zuckern mit INH auch mittels Mikrowellentechnologie durchgeführt.

Reaktionsabläufe, die in der Mikrowelle durchgeführt werden, haben eine Reihe von Vorteilen. Zum einen können Synthesen schneller und mit einer höheren Ausbeute ausgeführt werden, zum anderen wird die Entstehung von Nebenprodukten verringert und die Reproduzierbarkeit erhöht [111]. Die Effektivität der Mikrowelle beruht auf der Art der Erwärmung - während bei herkömmlicher Wärmezufuhr durch Heizplatten o.ä.



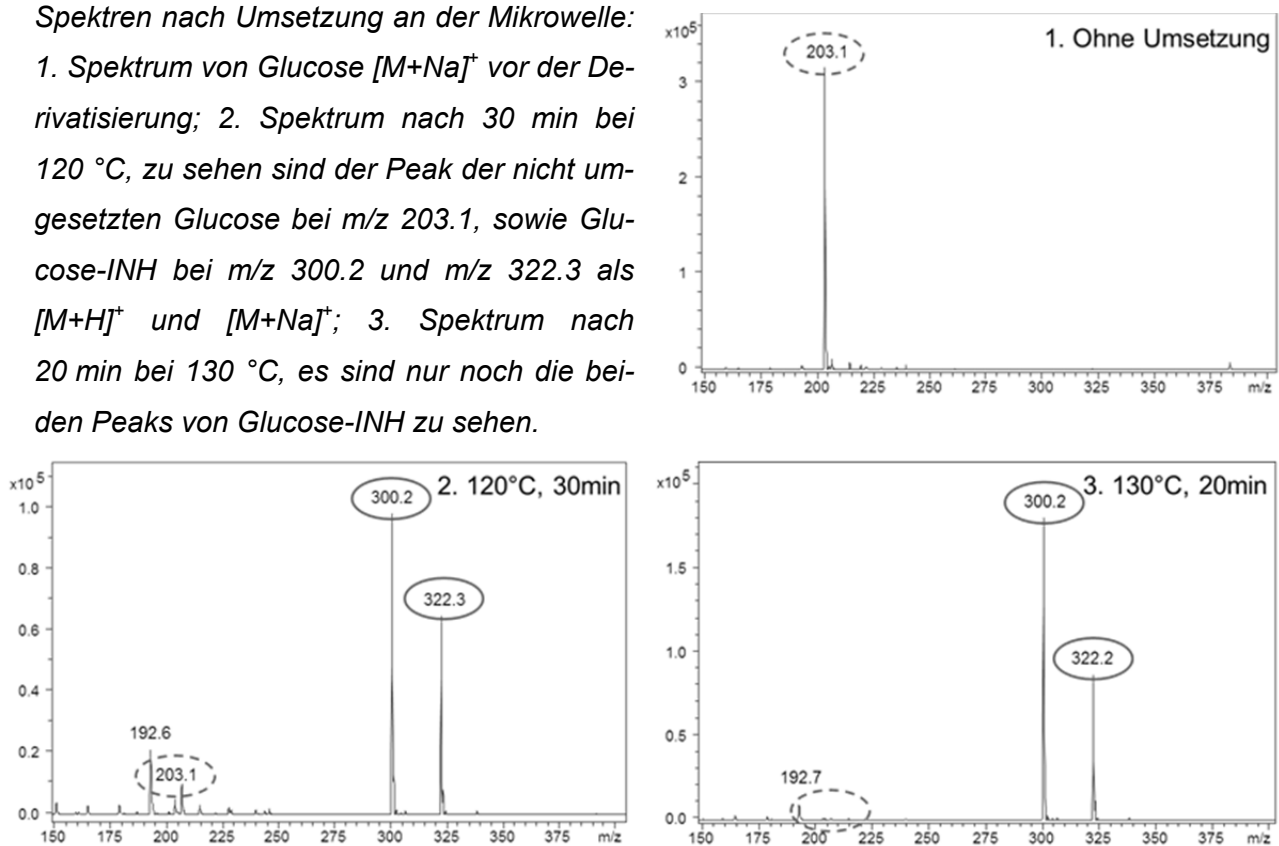
zunächst das Gefäß erhitzt wird, welches die Wärmeenergie dann von außen auf das Reaktionsgemisch weiterleitet, wird durch die Mikrowellenstrahlung das Reaktionsgemisch selbst erwärmt. Dadurch kommt es zu einer gleichmäßigeren und vor allem schnelleren Erhitzung der Probe. Dabei hängt die Fähigkeit zur Absorption von Mikrowellen zu einem großen Teil von dem verwendeten Lösungsmittel und dessen Dielektrizitätskonstante ab. Polare Lösungsmittel wie Alkohole oder DMSO (Dimethylsulfoxid) lassen sich leicht erhitzen, im Gegensatz zu apolaren Lösungsmitteln wie Hexan oder Toluol. Die Absorptionsfähigkeit eines Lösungsmittels wird auch durch den Verlust-Tangens  $\tan \delta$  angegeben. Je höher dieser ist, umso besser können Mikrowellen aufgenommen und in Wärme umgewandelt werden. Dennoch können auch apolare Lösungsmittel für die Mikrowellensynthese verwendet werden, da mit hoher Wahrscheinlichkeit zumindest eines der zugesetzten Reagenzien eine ausreichend hohe Polarität besitzt, um zur Erhitzung genutzt zu werden [111,112]. Zur Reaktionskontrolle werden NMR, FTIR oder chromatographische Methoden wie HPLC oder Dünnschichtchromatographie eingesetzt [113].

Das Ziel der Derivatisierung von Zuckern in der Mikrowelle war, die Reaktionszeit bis zu vollständigen Umsetzung der Saccharide zu verkürzen. Dazu wurde Glucose mit einem Überschuss an INH-Reagenz versetzt und in Methanol gelöst. Im Anschluss an die Derivatisierung wurde, analog zur Derivatisierung im Thermomixer®, der Grad der Umsetzung durch Direkteinspritzung in die Ionenfalle überprüft. Zunächst wurden die Proben bei 110 °C über 30 min bzw. 40 min erhitzt, hier zeigte sich jedoch keine vollständige Umsetzung des Zuckers. Nach Erhöhung der Temperatur auf 120 °C und Reaktionszeiten von 20 min, 30 min und 40 min zeigte sich bereits nach 30 min nur noch ein schwacher Peak des ursprünglichen Zuckers im Spektrum. Nach 40 min Reaktionsdauer war ausschließlich der Peak des Derivates zu sehen. Durch weitere Erhöhung der Temperatur auf 130 °C konnte bereits nach 20 min die komplette Umsetzung der Glucose detektiert werden. Eine weitere Verkürzung der Reaktionszeit auf 15 min führte jedoch wiederum zu einer unvollständigen Reaktion. Die Erhöhung der Temperatur auf 130 °C und Verkürzung der Reaktionszeit auf 20 min hatte den weiteren Vorteil, dass im vorderen Teil des Spektrums weniger Neben-/ Abbauprodukte zu sehen waren. Eine Übertragung dieser Reaktionsbedingungen auf weitere Zucker fand bisher nicht statt, es ist jedoch zu erwarten, dass diese analog zur Derivatisierung im Thermomixer® ein ähnliches Verhalten zeigen wie Glucose.

Abbildung 2-V:

Spektren nach Umsetzung an der Mikrowelle:

1. Spektrum von Glucose  $[M+Na]^+$  vor der Derivatisierung; 2. Spektrum nach 30 min bei 120 °C, zu sehen sind der Peak der nicht umgesetzten Glucose bei  $m/z$  203.1, sowie Glucose-INH bei  $m/z$  300.2 und  $m/z$  322.3 als  $[M+H]^+$  und  $[M+Na]^+$ ; 3. Spektrum nach 20 min bei 130 °C, es sind nur noch die beiden Peaks von Glucose-INH zu sehen.



Daher könnte die Derivatisierung von Zuckern in Zukunft durch dieses Verfahren erheblich beschleunigt werden. Ein Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass wesentlich größere Mengen an Zucker und Derivatisierungsreagenz benötigt werden, als für die Umsetzung im Thermomixer®, da das Füllvolumen der Mikrowellengefäße 1 ml nicht unterschreiten sollte.

### 2.1.3. Trennung mittels HPLC-MS

Ziel dieser Untersuchungen war es, die durch die Derivatisierung der Kohlenhydrate hervorgerufenen Veränderungen in den Retentionszeiten und in der Signalintensität zu detektieren. Hierfür wurden die underivatisierten Monosaccharide mit den INH-/BINH- und BACH-Derivaten verglichen sowie zusätzlich mit denen des Standardderivatisierungsreagenzes 2-AB. Zur Trennung wurden eine Kinetex C18- und eine Kinetex HILIC-Säule verwendet; detektiert wurde mittels ESI-Ionenfallen-Massenspektrometrie.

Als mobile Phasen wurden für die C18-Säule Methanol und Ammoniumacetatpuffer und für die HILIC-Säule Acetonitril und Ammoniumacetatpuffer gewählt. Als für die Trennung am besten geeigneter Puffer stellte sich ein 100 mM Ammoniumacetatpuffer mit pH 5.8 heraus. Die Variationsmöglichkeiten bei der Herstellung des Puffers waren durch die verringerte Stabilität der Hydrazine in sauren Lösungen jedoch beschränkt [48]. Andererseits ist durch die Zugabe von Säure zur mobilen Phase die Ionisationsfähigkeit der Zuckermoleküle verbessert, daher wurden auch Puffer im neutralen pH-Bereich ausgeschlossen. Zu den organischen Fließmitteln Acetonitril und Methanol wurde daher ebenfalls 0.1 % Ameisensäure gegeben. Ein Austausch des Puffers gegen Wasser auf der C18-Phase stellte sich ebenso als ungeeignet heraus, da es dadurch zu starker Peakverbreiterung kam. Die Trennung auf HILIC-Phasen erfordert in jedem Fall die Verwendung eines Puffers, da dieser, abhängig von pH-Wert und Ionenstärke, die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen geladenen Substanzen und ungeladenen Silanolgruppen verringert [106].

Aus den oben genannten Stabilitätsgründen wurde ebenfalls von der Verdünnung der zu injizierenden Proben mit der jeweiligen mobilen Phase abgesehen. Diese wurden in reinem Millipore<sup>®</sup>-Wasser beziehungsweise Acetonitril oder Methanol gelöst.

Alle Trennungen wurden mehrfach durchgeführt um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

#### 2.1.3.1. Monosaccharide

Zur Trennung wurden die Monosaccharide Xylose, Fucose, Glucose, Galactose, Mannose, *N*-Acetylglucosamin und Sialinsäure verwendet. Dabei wurden sowohl die nativen, underivatisierten Zucker eingesetzt, als auch sämtliche Derivate.

Auf C18-Phasen ist die Trennung underivatisierter Monosaccharide nach bisherigem Stand der Analytik fast nicht möglich [114], auf HILIC-Phasen dagegen sind verschiedene Methoden vorhanden. Diese nutzen Amino- [115], Carbamoyl- [116] oder Polysuccinimidphasen [117] zur Untersuchung der Zucker. Auch Diol-Phasen konnten erfolgreich zur Trennung kleiner Zucker eingesetzt werden, jedoch kam es dabei häufig zur Trennung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomere der Monosaccharide, wodurch die Identifikation und die Trennung der einzelnen Zucker voneinander erschwert wird [118,119]. Zwar kann dies durch Zusatz von Aminen (z.B. Triethylamin) zum Fließmittel unterdrückt werden, allerdings führt dies zu starker Kontamination von Säule und Kapillaren und wirkt sich nachteilig auf die Detektion niedermolekularer Substanzen durch massenspektrometrische Methoden aus [120].

Durch Derivatisierungen wird die Trennung der Monosaccharide auch mittels RP-Chromatographie ermöglicht. Einige Hydrazid-Reagenzien wurden bereits zu diesem Zweck eingesetzt, wie beispielsweise Phenylhydrazin [50], Fmoc-Hydrazid [51], oder DABS-Hydrazid [121]. Alle führten dazu, dass die Trennung der Zucker auf C18-Phasen wesentlich verbessert werden konnte, wenn es auch nicht immer zu einer vollständigen Trennung kam. Insbesondere die Epimere Glucose, Galactose und Mannose erwiesen sich in dieser Hinsicht oft als problematisch.

Ein weiterer Aspekt der Derivatisierung von Kohlenhydraten ist die Erhöhung der Signalstärke zur Erleichterung der Detektion [122]. Daher sollten auch die Auswirkungen in diesem Bereich beobachtet werden.

### I. RP-C18

Bei Betrachtung der *Extracted-Ion*-Chromatogramme nach Trennung auf der C18-Phase in Hinsicht auf die Signalhöhe, zeigten die Derivate mit BINH und BACH die stärksten Intensitäten, mit etwa einer Zehnerpotenz Erhöhung gegenüber den underivatisierten Zuckern. Nach Derivatisierung mit INH und 2-AB kam es ebenfalls zu einer leichten Erhöhung der Signalstärke, allerdings in geringerem Umfang als bei den biotinylierten Reagenzien.

Wie erwartet, konnten die underivatisierten Zucker (Chromatogramm A, Abb. 2-VI) auf der apolaren Phase nicht getrennt werden, alle sieben Substanzen wurden unverändert von der Säule eluiert.

Die Derivatisierung mit INH (Chromatogramm B, Abb. 2-VI) brachte in der Hinsicht Fortschritte, als dass Fucose und Sialinsäure abgetrennt werden konnten. Auch *N*-Acetylglucosamin zeigte eine leicht verlängerte Retentionszeit im Vergleich zu den übrigen Zuckern. Dagegen wurde Xylose jedoch kaum zurückgehalten, obwohl auch hier, ebenso wie bei Fucose, nur vier Hydroxygruppen im Zuckerring vorhanden sind. Möglicherweise lässt sich dies durch die, im Vergleich zu Fucose, fehlende Methylgruppe an Position 5 des Pyranoserings erklären und die dadurch leicht erhöhte Polarität. Die starke Retention von Sialinsäure-INH ist hingegen schwer zu erklären, da dieses Monosaccharid sowohl über mehr Hydroxygruppen, als auch über eine Carboxylgruppe verfügt. Dennoch trat dieses Phänomen nicht nur im Falle der INH-Derivate auf, sondern auch bei den übrigen Reagenzien.

Bei den BINH-Derivaten (Chromatogramm C, Abb. 2-VI) konnten die einzelnen Monosaccharide besser aufgetrennt werden. Fucose-BINH, Sialinsäure-BINH und Xylose-BINH wurden zuletzt eluiert, was bei Fucose und Xylose auf die geringere Anzahl an Hydroxygruppen zurückgeführt werden könnte. *N*-Acetylglucosamin-BINH dagegen zeigte die geringste Retention aller Zucker. Galactose-BINH und Mannose-BINH ließen sich trotz Derivatisierung nicht trennen, während Glucose-BINH zumindest teilweise isoliert werden konnte. Auch die Peaks von Glucose und *N*-Acetylglucosamin, bzw. Xylose und Sialinsäure überschneiden sich, jedoch können diese Substanzen auf Grund ihrer Masse unterschieden werden.

Die Trennung der BACH-derivatisierten Monosaccharide (Chromatogramm D, Abb. 2-VI) verlief etwas besser, als die der BINH-Derivate. Fucose-BACH und Sialinsäure-BACH wurden wiederum am stärksten retiniert, auch *N*-Acetylglucosamin-BACH konnte von den anderen Zuckern abgetrennt werden. Zwar waren Galactose-BACH und Mannose-BACH in diesem Chromatogramm separiert, stattdessen eluierte Glucose-BACH zur gleichen Zeit wie Mannose-BACH. Auch Xylose-BACH zeigte Überschneidungen mit Glucose-BACH, die verschiedenen Massen ermöglichen allerdings die Differenzierung.

Im Vergleich zu den vorigen Derivaten, konnten die 2-AB-Derivate (Chromatogramm E, Abb. 2-VI) am besten getrennt werden. Breite und Form der Peaks waren ebenfalls besser, einzig Sialinsäure-AB entwickelte ein deutliches Tailing. Trotzdem ließen sich die Epimere Glucose-AB und Mannose-AB nicht vollständig trennen. Sialinsäure-AB, Fucose-AB, *N*-Acetylglucosamin-AB und Xylose-AB eluierten in einer

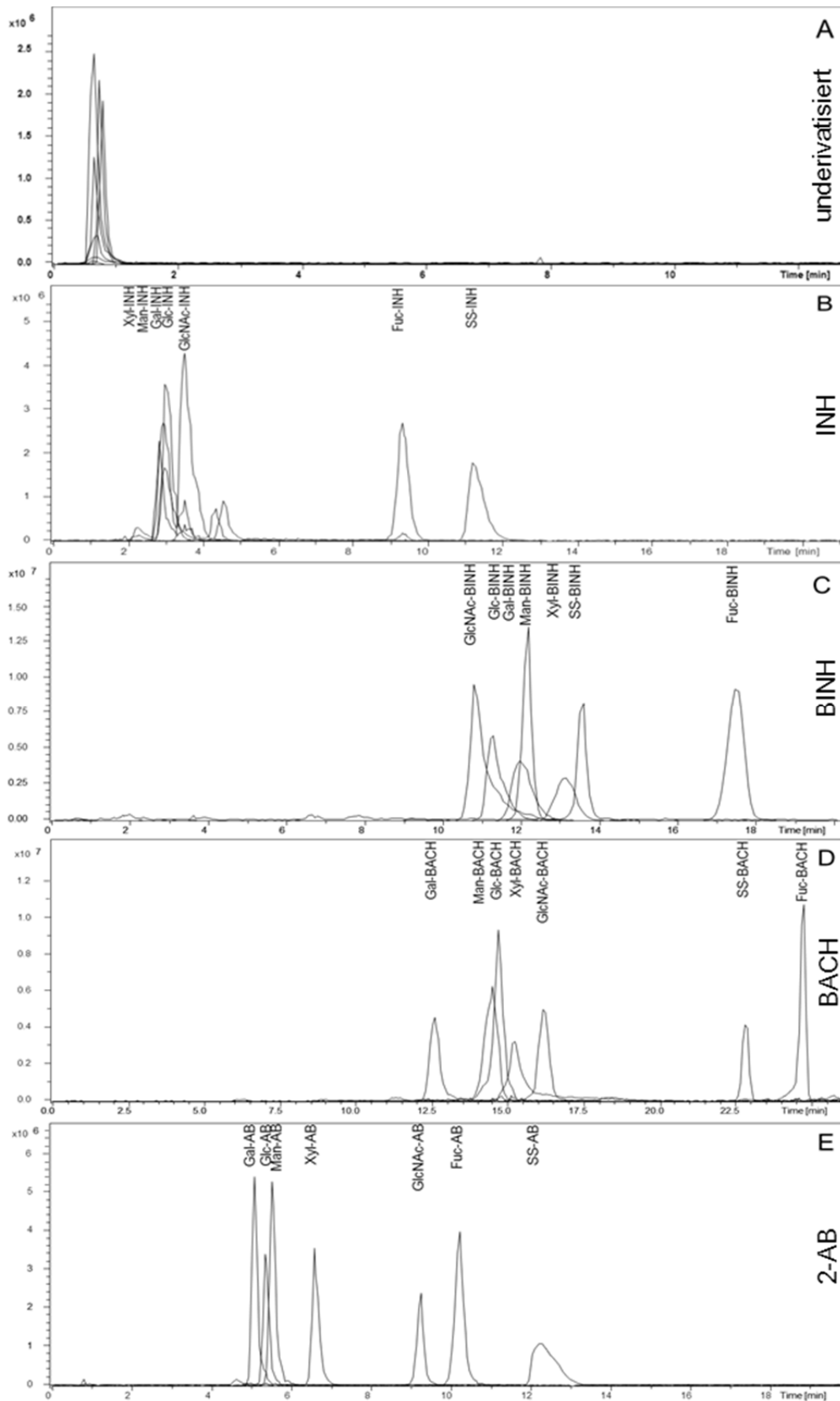


Abbildung 2-VI: Extracted-Ion-Chromatogramme der Monosaccharide nach Trennung auf Kinetex RP-C18, Trennbedingungen siehe Kapitel 5.2.3.

vergleichbaren Reihenfolge wie die INH-Derivate, konnten im Unterschied dazu komplett abgetrennt werden.

## II: HILIC

In Bezug auf die Signalintensität der verschiedenen Derivate wiesen die Chromatogramme der HILIC-Phase ein ähnliches Bild auf. Der größte Anstieg in der Höhe der Peaks ließ sich bei den BACH-Derivaten verzeichnen, die INH-, BINH- und 2-AB-derivatisierten Kohlenhydrate zeigten jeweils eine etwas geringere Intensität, waren aber im Vergleich zu den nativen Zuckern erkennbar erhöht.

Chromatogramm A (Abb. 2-VII) zeigt die Trennung der underivatisierten Zucker. Es deutete sich bereits hier eine Trennung der Monosaccharide an, obwohl die Intensität der Peaks zum Teil sehr gering war. Im Gegensatz zu der apolaren C18-Phase sollten in diesem Fall die unpolareren Zucker mit dementsprechend weniger Hydroxygruppen zuerst von der Säule eluieren, während die Hexosen und die Sialinsäure stärker zurückgehalten werden. Im Hinblick auf Xylose und Fucose erwies sich diese Vorhersage als korrekt, bei *N*-Acetylglucosamin dagegen, welches auf verschiedenen Aminophasen ebenfalls weniger stark retiniert wurde [115,116], zeigte sich dieses Verhalten jedoch nicht. Offensichtlich unterscheidet sich die Interaktionsfähigkeit der Diolphase mit *N*-Acetylglucosamin von der der Aminophase. Die Sialinsäure hatte mit Abstand die längste Retentionszeit.

Nach Derivatisierung mit INH (Chromatogramm B, Abb. 2-VII) konnten die Monosaccharide nahezu komplett getrennt werden. Lediglich Galactose-INH und Mannose-INH konnten nicht basisliniengetrennt werden. Die Elutionsreihenfolge der Zucker veränderte sich leicht im Gegensatz zu den underivatisierten Äquivalenten, da *N*-Acetylglucosamin-INH vor Galactose-INH und Mannose-INH detektiert wurde. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass sich zwischen Derivatisierungsreagenz und Acetamidogruppe des Glucosamins Wechselwirkungen ausbilden können, die die Polarität des Moleküls verringern. Des Weiteren kam es zur Ausbildung von massegleichen Doppelpeaks bei der Trennung der Monosaccharide. Wie bereits einleitend erwähnt, sind HILIC-Phasen in der Lage die Anomere von Zuckern zu trennen. Dies hängt vor allem davon ab, ob der reduzierende bzw. anomere Teil des Saccharids die Kontaktregion zur Oberfläche der stationären Phase ist [117].

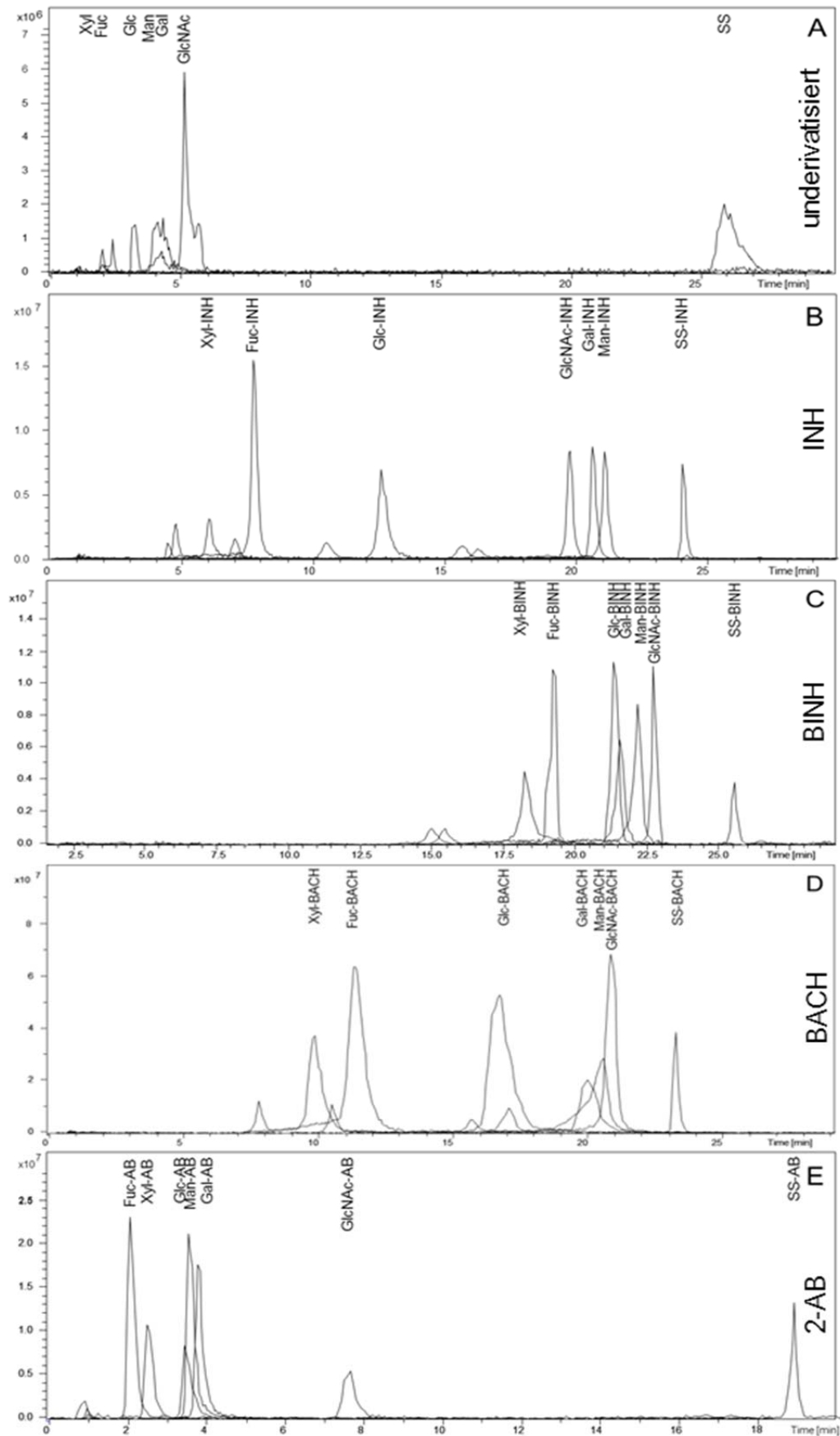


Abbildung 2-VII: Trennung der Monosaccharide mittels Kinetex HILIC, Trennbedingungen siehe Kapitel 5.2.3.



Die Identifizierung und Zuordnung der jeweiligen Anomere zu den entsprechenden Signalen fand im Rahmen dieser Untersuchungen jedoch nicht statt.

Die BINH-Derivate in Chromatogramm C (Abb. 2-VII) zeigten im Vergleich zu den underivatisierten Zuckern nur wenig Verbesserung in der Trennung. Einige der Zucker erschienen im Chromatogramm als Doppelpeaks, an der Elutionsreihenfolge änderte sich jedoch nichts. Ebenso wie bei den INH-Derivaten wurde die Peakform durch die BINH-Derivatisierung deutlich verbessert.

Bei den BACH-derivatisierten Zuckern (Chromatogramm D, Abb. 2-VII) ergab sich ebenfalls die gleiche Reihenfolge der Detektion wie schon bei den nativen Kohlenhydraten. In Bezug auf die Trennung zeichnete sich eine Verbesserung im Bereich von Glucose-BACH und deren Epimeren Galactose-BACH und Mannose-BACH ab. Eine Trennung von Galactose und Mannose erfolgte jedoch nicht. Auch hier kam es zum Auftreten teils ausgeprägter Doppelpeaks, was wiederum ein Hinweis auf die Trennung der Anomere ist.

Im Vergleich zu den anderen Derivaten zeigten die 2-AB-Derivate (Chromatogramm E, Abb. 2-VII) eine relativ geringe Retention auf der HILIC-Phase. Zwar konnten Sialinsäure-AB und *N*-Acetylglucosamin-AB deutlich abgetrennt werden, die restlichen Zucker eluierten jedoch sehr früh. Auch die Reihenfolge der Elution veränderte sich, Fucose-AB wurde bereits vor Xylose-AB detektiert, Galactose-AB und Mannose-AB hatten ebenfalls die umgekehrte Abfolge. Es ist anzunehmen, dass dies mit der ringoffenen Form der Zucker zusammenhängt, die durch Reduktion im Derivatisierungsverfahren entsteht. Auch die Bildung von Anomeren wird dadurch unterbunden; daher lagen alle Substanzen als Einzelpeaks vor. Die Trennung von Glucose-AB, Galactose-AB und Mannose-AB war nur sehr rudimentär ausgeprägt und zur Unterscheidung dieser Substanzen nur schlecht geeignet.

Insgesamt ergab sich durch die Trennexperimente der derivatisierten Monosaccharide folgendes Bild. Die Derivatisierung mit INH führte bei der RP-Chromatographie nur zu einer unzureichenden Trennung, bei der HILIC dagegen konnten die Zucker und sogar deren Anomere nahezu komplett getrennt werden. Dies war gleichzeitig die einzige Derivatisierungsart, die zur fast vollständigen Separierung der Epimere Glucose, Galactose und Mannose führte. Nach Derivatisierung mit BINH wurde ebenfalls hauptsächlich die Trennung auf der polaren HILIC verbessert. Hier konnten alle Zucker bis auf Glucose und Galactose getrennt werden, während auf der Umkehrphase die Peaks teilweise überlappten. Die BACH-Derivatisierung erlaubte

eine ähnlich gute Trennung auf der hydrophilen Phase und auch mittels C18 konnten Fortschritte gegenüber BINH erzielt werden. Jedoch war auch hier keine Aufspaltung von Mannose und Galactose zu erreichen. 2-Aminobenzamid erlaubt die beste Separation der Zucker auf der C18-Phase, dennoch konnten Glucose und deren Epimere nicht komplett aufgetrennt werden. Alles in allem sind die, für eine Trennung auf einer C18-Phase, am besten geeigneten Derivatisierungsreagenzien 2-AB und BACH, die nahezu vollständigste Auftrennung der Substanzen wurde jedoch mittels INH auf der HILIC-Säule erreicht. Trotz der verschiedenen Trennmechanismen der Säulenmaterialien erwiesen sich beide als hilfreich bei der Trennung von Zuckerderivaten. Daher spielt auch die Art des zu lösenden Trennproblems bei der Auswahl der stationären Phase in Kombination mit der entsprechenden Derivatisierung eine entscheidende Rolle.

### 2.1.3.2. Disaccharide

Zur Analyse der Disaccharide wurden Maltose (Mal), Cellobiose (Cel) und Lactose (Lac), sowie ihre Derivate verwendet (Abb. 2-XIII). Maltose und Cellobiose bestehen jeweils aus zwei (1 → 4)-verknüpften Glucoseeinheiten und unterscheiden sich nur in ihrer Anomerie – Maltose ist das  $\alpha$ -Anomer, Cellobiose das  $\beta$ -Anomer. Lactose ist aus Galactose und Glucose aufgebaut, welche  $\beta$ -(1 → 4)-glycosidisch verbunden sind.

Schwierigkeiten, die sich bei der Analyse dieser Zucker ergeben, sind einerseits durch die schlechte Retention auf apolaren Säulenmaterialien wie C18 und andererseits durch die große strukturelle Ähnlichkeit der Disaccharide untereinander begründet. Die Trennung verschiedenster Disaccharide wurde bereits auf unterschiedlichen, meist Amin-modifizierten Kieselgelphasen durchgeführt [111,119,120]. Dadurch konnten gewisse Regeln aufgestellt werden, die das Verhalten der Zucker auf der Säule charakterisieren sollen. So lässt sich für (1 → 2)-, (1 → 3)- und (1 → 4)-verknüpfte Disaccharide sagen, dass die  $\beta$ -Anomere auf  $\text{NH}_2$ -Phasen meist vor den  $\alpha$ -Anomeren eluieren [123]. Des Weiteren haben (1 → 6)-verbundenen Disaccharide eine höhere Retentionszeit als die an anderen Positionen verknüpften Zucker. Dies hängt mit der erhöhten Flexibilität dieser Position zusammen, wodurch der Zucker mehr Kontakt mit der Oberfläche der Säule bekommt. Dagegen wird durch die Anwesenheit von Fucose, Fructose oder *N*-Acetylglucosamin im Disaccharid die Retention auf der Säule ver-

ringert, da diese weniger Interaktion mit der Trennphase zeigen. Wird einer der Zucker im Disaccharid gegen einen in der Elutionsreihe der Monosaccharide später eluierenden Zucker ausgetauscht, so eluiert auch das Disaccharid später [115]. Auch die Trennung derivatisierter Disaccharide wurde bereits mittels CE/UV untersucht [43]. Hier konnten nach Kopplung mit para-Aminobenzoesäure sowohl die verschiedenen verknüpften Saccharide, als auch ihre Anomere getrennt werden.

### RP-C18:

Wie erwartet, konnten die underivatisierten Disaccharide (Abb. 2-VIII - A) auf der unpolaren C18-Phase nicht getrennt werden. Alle drei Substanzen eluierten ohne Retention von der Säule.

Nach Derivatisierung mit INH (Abb. 2-VIII - B) konnte die Verweildauer auf der Säule nicht wesentlich erhöht werden. Auch die Trennung der Zucker erfolgte nur in sehr geringem Maße, da die Polarität der Derivate immer noch zu hoch war, um eine stärkere Interaktion mit der C18-Phase zu zeigen.

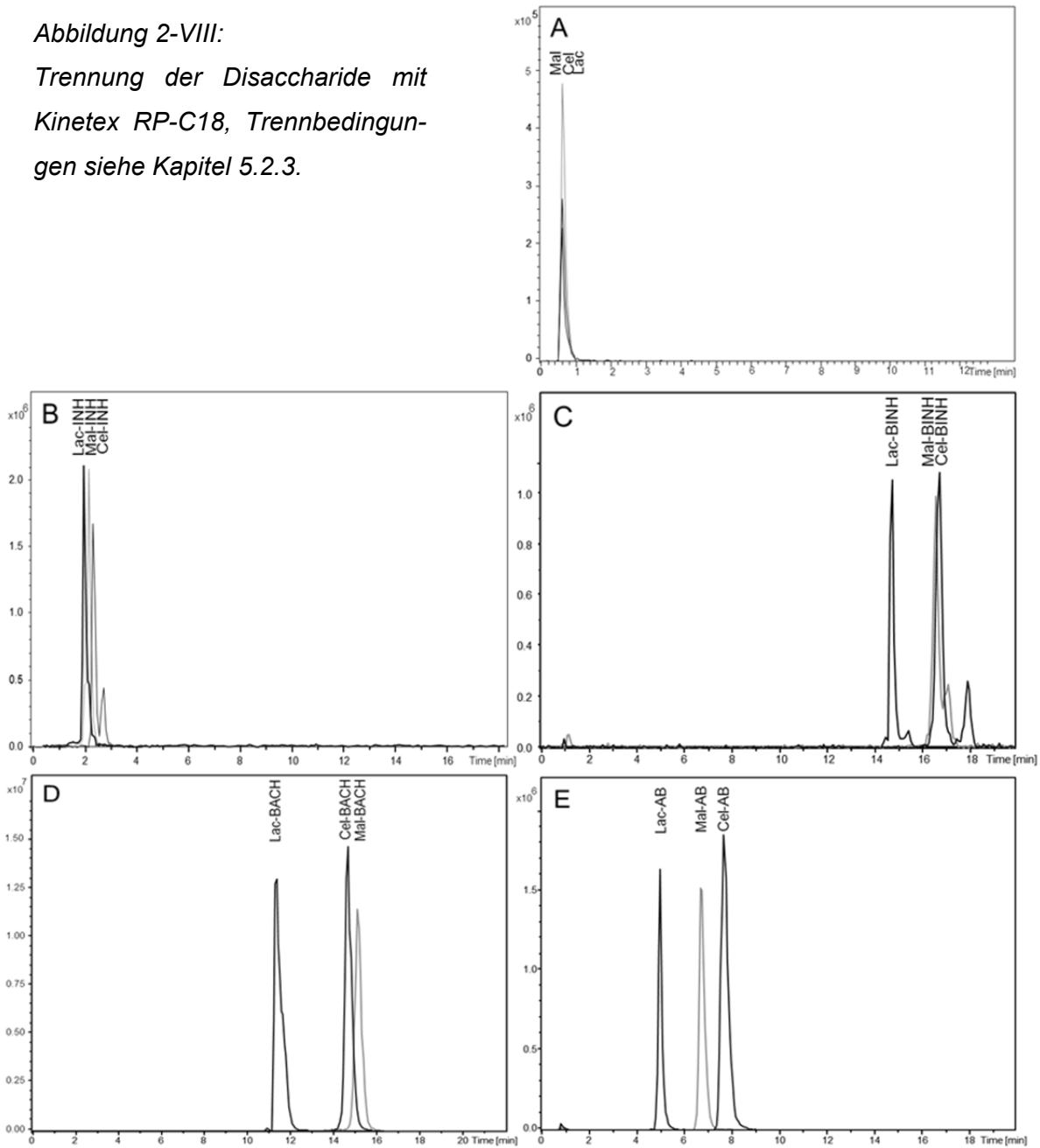
Dieses Bild änderte sich nach Umsetzung mit BINH (Abb. 2-VIII - C) und BACH (Abb. 2-VIII - D). Insbesondere Lactose ließ sich im Anschluss deutlich von Maltose und Cellobiose abtrennen. Maltose und Cellobiose selbst konnten aber nur als BACH-Derivate ansatzweise getrennt werden. Die Elutionsreihenfolge der BACH-Zucker war Lactose, gefolgt von Cellobiose und Maltose.

Dies entspricht den Erwartungen, da Galactose bei der Trennung der Monosaccharide ebenfalls vor Glucose eluiert wurde. Daher wird auch das Galactose-haltige Disaccharid Lactose zuerst detektiert. Die weitere Abfolge des  $\beta$ -anomeren Zuckers vor dem entsprechenden  $\alpha$ -Anomer lässt sich damit begründen, dass, im Vergleich zu den in den oben genannten Studien verwendeten polaren Säulenmaterialien, hier eine apolare Phase eingesetzt wurde und sich die Reihenfolge damit umkehrt. Jedoch scheinen auch diese Derivatisierungen daher nur bedingt zur Auftrennung von Anomeren auf einer C18-Phase geeignet zu sein.

Anders stellt sich dies bei den 2-AB-Derivaten (Abb. 2-VIII - E) dar. Hier konnten alle drei Substanzen komplett voneinander getrennt werden. Ebenso wie bei den vorigen Derivaten eluierte zunächst Lactose, im Folgenden zeigte sich aber die umgekehrte Reihenfolge. Eventuell könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass die

2-AB-Derivatisierung zu Reaktionsprodukten führt, die im Gegensatz zu den Hydrazid-Derivaten, einen geöffneten Zuckerring besitzen. Durch die daraus folgende veränderte räumliche Anordnung des Disaccharides könnte demnach zu einer veränderten Retention der Substanzen auf der Säule führen.

Abbildung 2-VIII:  
Trennung der Disaccharide mit Kinetex RP-C18, Trennbedingungen siehe Kapitel 5.2.3.



**HILIC:**

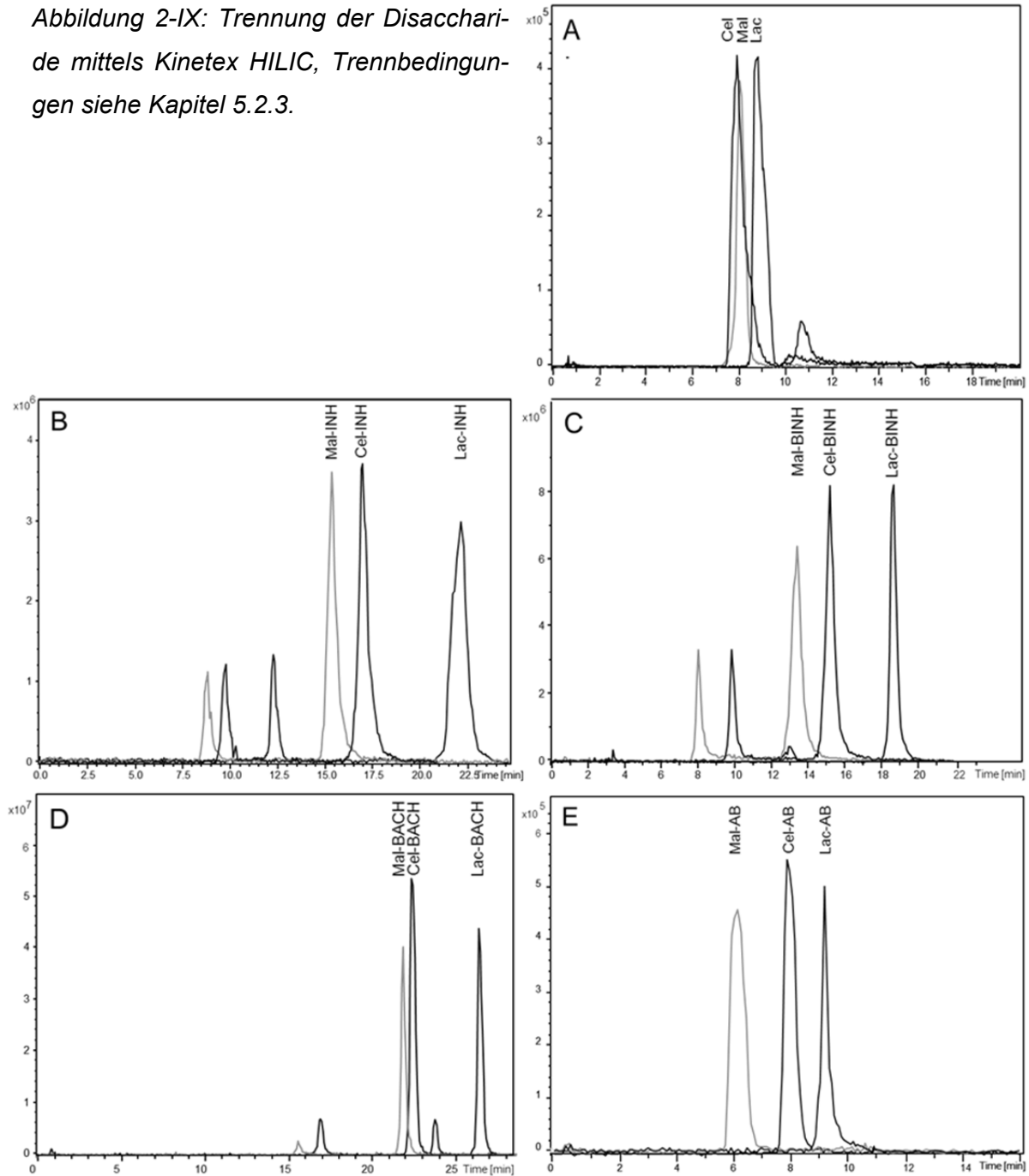
Im Vergleich zur RP18-Phase zeigte sich bei der HILIC-Phase ein wesentlich homogeneres Bild. Zwar konnten auch hier die underivatisierten Saccharide (Abb. 2- IX - A) nicht komplett getrennt werden, dennoch zeigt sich eine verstärkte Retention der Lactose. Bereits nach Umsetzung mit INH (Abb. 2-IX - B) ließen sich dagegen alle drei Substanzen auftrennen. Die Reihenfolge war dabei bei allen Derivaten die Gleiche. Zunächst wurde Maltose eluiert, gefolgt von Cellobiose und Lactose. Die hohe Retentionszeit der Lactose lässt sich, wie bereits bei der RP18-Phase, mit der späteren Elution von Galactose im Vergleich zu Glucose begründen. Bei den anomeren Strukturen sollte hingegen nach einer weiteren Regel, die besagt, dass bei der Trennung (1 → 4)-verknüpfter Disacchariden auf Amin-Phasen die  $\beta$ -Anomere vor den  $\alpha$ -Anomeren eluieren, in diesem Fall zunächst Cellobiose detektiert werden. Das stattdessen jeweils Maltose zuerst eluierte, lässt sich möglicherweise mit dem verwendeten Säulenmaterial erklären. Im Vergleich zu den in den Studien eingesetzten Amin- oder Aminopropylphasen wurde in dieser Arbeit eine Diolphase genutzt. Die Interaktion zwischen den Hydroxygruppen der HILIC-Phase und denen der Zucker hat vermutlich stärkere Auswirkungen auf die Retention der Anomere, als die der Aminphasen. Auch die Derivatisierung könnte Einfluss auf die Elutionsreihenfolge haben, was jedoch schwer zu beweisen war, da bei den underivatisierten Anomeren keine Trennung stattfand. Da allerdings eine weitere Studie [125], die gleichermaßen mit Amin-modifizierten Säulen arbeitete, ebenfalls die umgekehrte Reihenfolge der Anomere detektierte, ist ein Zusammenhang mit dem Säulenmaterial wahrscheinlicher. Daher sind die oben genannten Regeln nicht als absolut anzusehen, sondern abhängig von den verwendeten Materialien.

Im Vergleich zu den BINH-Derivaten (Abb. 2- IX - C) zeigten die BACH-Derivate (Abb. 2- IX - D) eine weniger gute Trennung von Maltose und Cellobiose. Auffällig waren auch in diesem Falle die teilweise sehr deutlich ausgeprägten Doppelpeaks der Hydrazid-derivatisierten Zucker. Bei den 2-AB-derivatisierten Zuckern (Abb. 2- IX - E) dagegen konnte wie schon auf der RP-Phase eine komplette Trennung erreicht werden.

Damit lässt sich zusammenfassend sagen, dass durch die Derivatisierung der Disaccharide eine wesentliche Verbesserung der Trennung erreicht wurde. Insbesondere

die Analyse auf der HILIC-Phase zeigt ihr Potential in Hinblick auf die Trennung von anomeren Zuckern.

Abbildung 2-IX: Trennung der Disaccharide mittels Kinetex HILIC, Trennbedingungen siehe Kapitel 5.2.3.



### 2.1.3.3. Trisaccharide

Als Trisaccharide wurden 3'Sialyl-*N*-acetyllactosamin (3'SLN) und 6'Sialyl-*N*-acetyllactosamin (6'SLN) gewählt (Abb. 2-XVII). Diese und andere Sialyl-oligosaccharide kommen in freier Form in Urin und Milch des Menschen vor [126,127]. Die daran beteiligten Sialinsäuren, ebenso wie die an Glykoproteinen oder Glykolipiden, sind dabei stets über eine  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  3)- oder eine  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6)-glykosidische Bindung an Galactose oder *N*-Acetylglucosamineinheiten geknüpft [128].

Auch die hier verwendeten Zucker unterscheiden sich nur in der Sialinsäurebindestelle, bei 3'SLN ist die Sialinsäure über eine  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  3)-glykosidische Bindung an die Lactosamin-Einheit geknüpft, bei 6'SLN über eine  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6)-glykosidische Bindung. Dadurch ergibt sich bei gleichem Molekulgewicht eine unterschiedliche räumliche Anordnung.

Die Trennung solcher saurer Oligosaccharide mittels HPLC kann über Ionenaustausch- oder Aminopropyl-Phasen erfolgen [127, 129], auf C18-Phasen erfolgt jedoch, wie schon bei den Mono- und Disacchariden keine Retention.

Trotz der anionischen Eigenschaften der Zucker wurde die massenspektrometrische Detektion im positiven Modus vorgenommen. Zwar geben Zucker, die eine Säuregruppe enthalten, normalerweise im Negativen bessere Signale, doch die Entstehung aussagekräftiger Fragmente bei MS(n)-Experimenten ist verringert [131].

#### RP-C18:

Wie schon oben erwähnt, konnten die beiden underivatisierten Trisaccharide (Chromatogramm A, Abb. 2-X) auf der C18-Phase nicht getrennt werden. Beide Peaks lagen bei etwa 2.3 min.

Auch bei den INH-Derivaten (Chromatogramm B, Abb. 2-X) zeigte sich kaum ein Unterschied in der Trennzeit der Zucker, beide Zucker kamen bereits kurz nach der Totzeit von der Säule.

Nach Derivatisierung mit den größeren, unpolaren Biotinderivaten (Abb. 2-X, Chromatogramm C: BINH; Chromatogramm D: BACH) konnten beide Trisaccharide voneinander basisliniengetrennt werden. Dabei eluierte 6'SLN jeweils vor 3'SLN. Ein Grund dafür könnte sein, dass 6'SLN durch die höhere Flexibilität der  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6)-Verknüpfung

eine größere polare Oberfläche zeigt und daher schlechter mit der apolaren Phase der Säule interagieren kann [115].

Im Vergleich konnten die BINH-Derivate besser voneinander getrennt werden als die BACH-Derivate, es zeigten sich allerdings jeweils kleinere Doppelpeaks, hinter denen sich die Anomere der entsprechenden Zucker verbergen könnten.

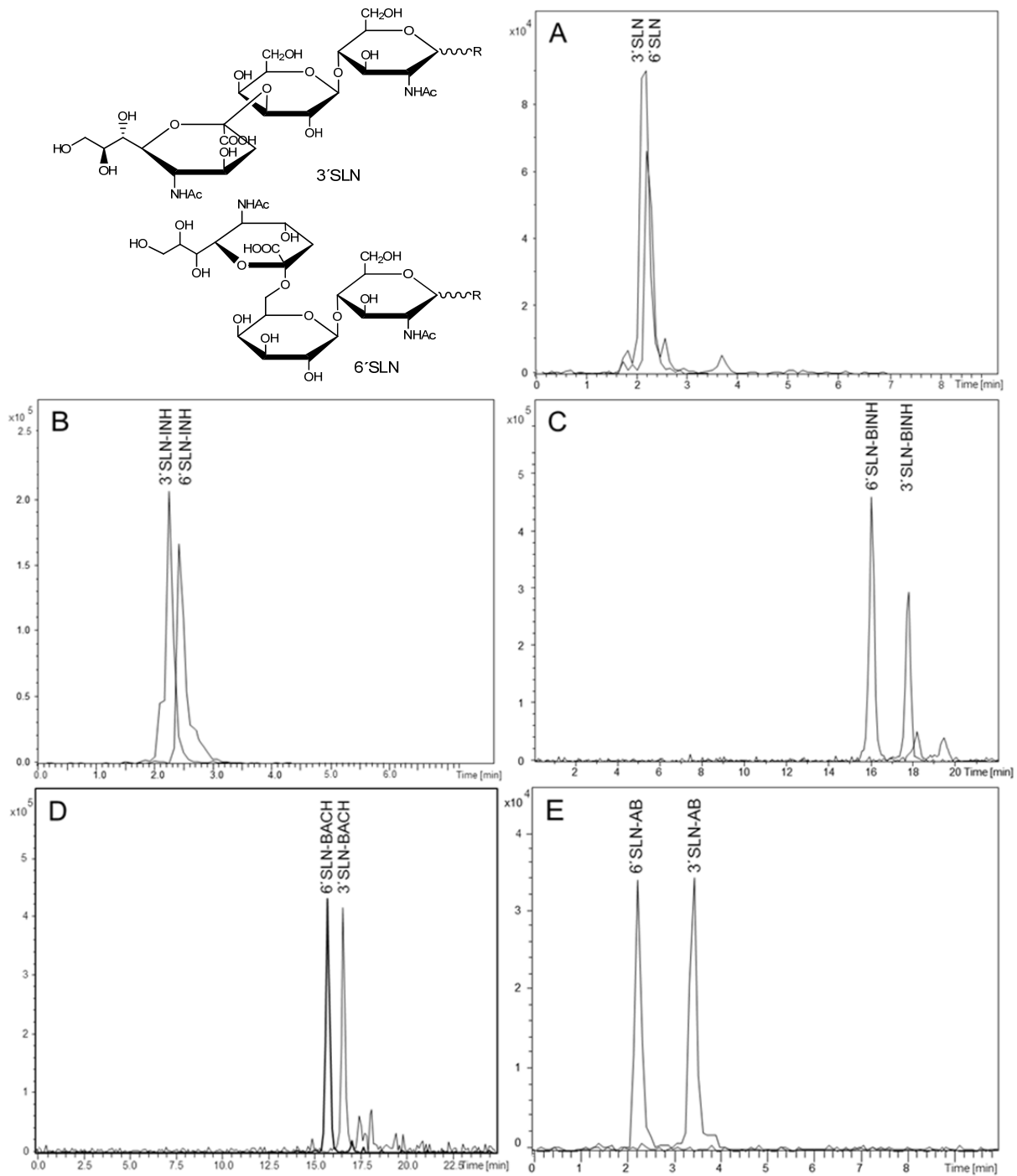


Abbildung 2-X: Chromatogramme der Sialyl-N-acetylglucosamine nach Trennung auf Kinetex RP-C18, Trennbedingungen siehe Kapitel 5.2.3.



Auch die 2-AB-Derivate (Chromatogramm E, Abb. 2-X) konnten voneinander getrennt werden, obwohl die Trisaccharide nur wenig auf der Säule zurückgehalten wurden. Möglicherweise hängt dies mit der ringoffenen Form des 2-AB-derivatisierten Zuckers zusammen, der mit den anderen Zuckerringen des Trisaccharides leichter in Wechselwirkung treten kann, als beispielsweise das ringgeschlossene INH-Derivat. Die mehr oder weniger starke Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der offenen Kette und den Ringen würde dann wiederum zu unterschiedlich großen polaren Oberflächen der Sialyl-*N*-acetyllactosamine führen und die Trennung begünstigen.

### **HILIC:**

Auf der polaren Diol-HILIC-Phase konnten bereits die underivatisierten Trisaccharide (Abb. 2-XI, Chromatogramm A) basisliniengetrennt werden (3'SLN: 5,8 min; 6'SLN: 7,8 min). Hier zeigte sich, im Vergleich zur C18-Phase (Abb. 2-X), die umgekehrte Elutionsreihenfolge. Dies spricht ebenfalls dafür, dass durch die größere Flexibilität der Verknüpfung der Sialinsäure bei 6'SLN mehr Wechselwirkung mit der diesmal polaren Phase entstehen können. In diesem Fall führt es dazu, dass 6'SLN stärker zurückgehalten wird als 3'SLN.

Auch die INH-Derivate (Abb. 2-XI, Chromatogramm B), BINH-Derivate (Abb. 2-XI, Chromatogramm C) und BACH-Derivate (Abb. 2-XI, Chromatogramm D), konnten basisliniengetrennt werden. Bei den BINH- und BACH-Zuckern erschienen erneut Doppelpeaks der gleichen Masse im Chromatogramm. Ebenso wie bei den Mono- und Disacchariden ist dies wahrscheinlich auf die Bildung isomerer Strukturen bei der Derivatisierung zurückzuführen.

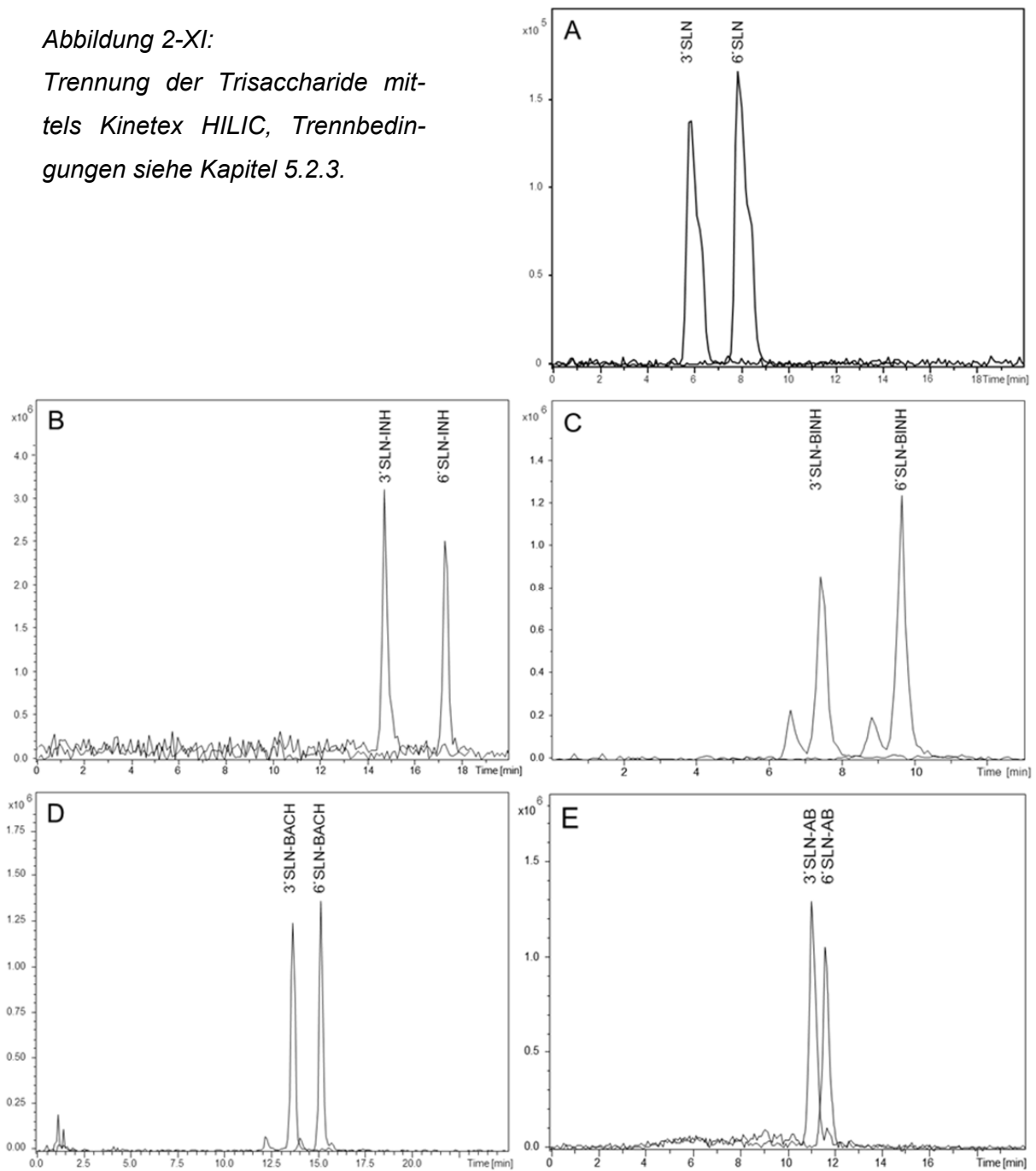
Im Gegensatz zur RP18-Phase konnten die 2-AB-derivatisierten Oligosaccharide (Abb. 2-XI, Chromatogramm E) an der HILIC-Säule nicht komplett voneinander getrennt werden. Möglicherweise hängt dies mit den, im Vergleich zu den Hydraziden, unterschiedlichen strukturellen Eigenschaften der Derivate zusammen.

Alles in allem zeigten sich die Trenneigenschaften der HILIC-Phase jedoch sehr vorteilhaft zur Separation der beiden Trisaccharide. Innerhalb relativ kurzer Laufzeiten konnten sowohl die nativen Zucker, als auch ein Großteil der Derivate aufgetrennt werden. Dagegen ließ sich die Trennung auf der RP18-Phase nur mit einem Teil der

Derivate durchführen, während die stärker polaren Substanzen, wie beispielsweise die INH-Derivate, sowie die nativen Zucker, fast unverändert eluierten.

Abbildung 2-XI:

Trennung der Trisaccharide mittels Kinetex HILIC, Trennbedingungen siehe Kapitel 5.2.3.



## 2.1.4. Fragmentierungsexperimente

### 2.1.4.1. Hintergründe

Die herkömmliche Vorgehensweise zur Ermittlung der Verknüpfungsstellen eines Oligosaccharides beinhaltet die Methylierung der freien Hydroxygruppen und die anschließende Totalhydrolyse des Kohlenhydrates (siehe Kapitel 1.2.3.1). Diese Methodik erfordert sowohl einen hohen Arbeits- als auch Zeitaufwand, sowie ausreichende Probenmengen. Um darüber hinaus die Anomerie der glykosidischen Bindungen bestimmen zu können, werden meist Enzyme eingesetzt, was zusätzliche Kosten verursacht. Eine wesentlich einfachere und schnellere Methode ist die Strukturaufklärung mittels massenspektrometrischer Fragmentierung, da sich mit Hilfe reproduzierbarer Fragmentierungsmuster Identifizierungsregeln für bestimmte Strukturelemente ableiten lassen. Anhand spezifischer Spaltungen in den Zuckerringen können dadurch sowohl Verlinkungsstelle, als auch Anomerie ermittelt werden (siehe Kapitel 2.1.4.2). So kann die Fragmentierung underivatisierter und derivatisierter Saccharide zur Strukturbestimmung genutzt werden.

In wie weit die Fragmentierung von Di- und Trisacchariden durch die Derivatisierung mit INH, BINH, BACH und 2-AB beeinflusst wird, wurde im Folgenden näher untersucht.

### 2.1.4.2. Fragmentierung von Disacchariden

Untersuchungen zur Fragmentierung von Glucopyranosyl-Disacchariden mittels FAB-MS (Fast atom bombardment-Massenspektrometrie), ES-MS (Electrospray-Massenspektrometrie) oder anderen Massenspektrometern wurden bereits von verschiedenen Gruppen durchgeführt [127-130]. Bei der Differenzierung zwischen den verschiedenen Verknüpfungsmöglichkeiten der Zweifachzucker ((1→ 1)-, (1→ 2)-, (1→ 3)-, (1→ 4)-, (1→ 6)- Verknüpfung) wird meist auf Messungen im negativen Modus zurückgegriffen, da hier strukturspezifischere Fragmente zu finden sind. Dies wird vor allem darauf zurückgeführt, dass im negativen Messmodus selektiv die freie, anomere Hydroxygruppe des Zuckers deprotoniert wird. Dadurch kommt es zur Ring-öffnung und die Ladung wird auf den Ringsauerstoff übertragen. Ist das anomere C-Atom blockiert, so wird das Disaccharid am C(2) des ersten

Zuckers deprotoniert [136]. Im positiven Modus dagegen kann das Saccharid an verschiedenen Stellen protoniert werden, was zu einer verringerten Selektivität der Fragmentierung führt [134]. Die Art der Verknüpfung lässt sich dann anhand der Ring-Spaltungen des reduzierenden Zuckers erkennen, welche im Bereich zwischen  $m/z$  179 (Masse nach glykosidischer Spaltung) und  $m/z$  341 (Masse des deprotonierten, intakten Moleküles) auftreten. Durch Vergleich der beiden jeweils höchsten Peaks in diesem Bereich kann auf die Verlinkungsstelle geschlossen werden. Befindet sich der höchste Peak etwa bei einer Masse von  $m/z$  161, so kann davon ausgegangen werden, dass ein (1 → 4)-glykosidisch verknüpftes Glucopyranosyl-Disaccharid vorliegt [133].

Auch die Anomerie der Verknüpfungsstellen kann mit Hilfe der erhaltenen Fragmente bestimmt werden. So spielen beispielsweise bei der Unterscheidung von Maltose ( $\alpha$ -(1 → 4)-glykosidische Bindung) und Cellobiose ( $\beta$ -(1 → 4)-glykosidische Bindung) die Fragment-Ionen der Massen  $m/z$  179,  $m/z$  221 und  $m/z$  281 eine entscheidende Rolle.

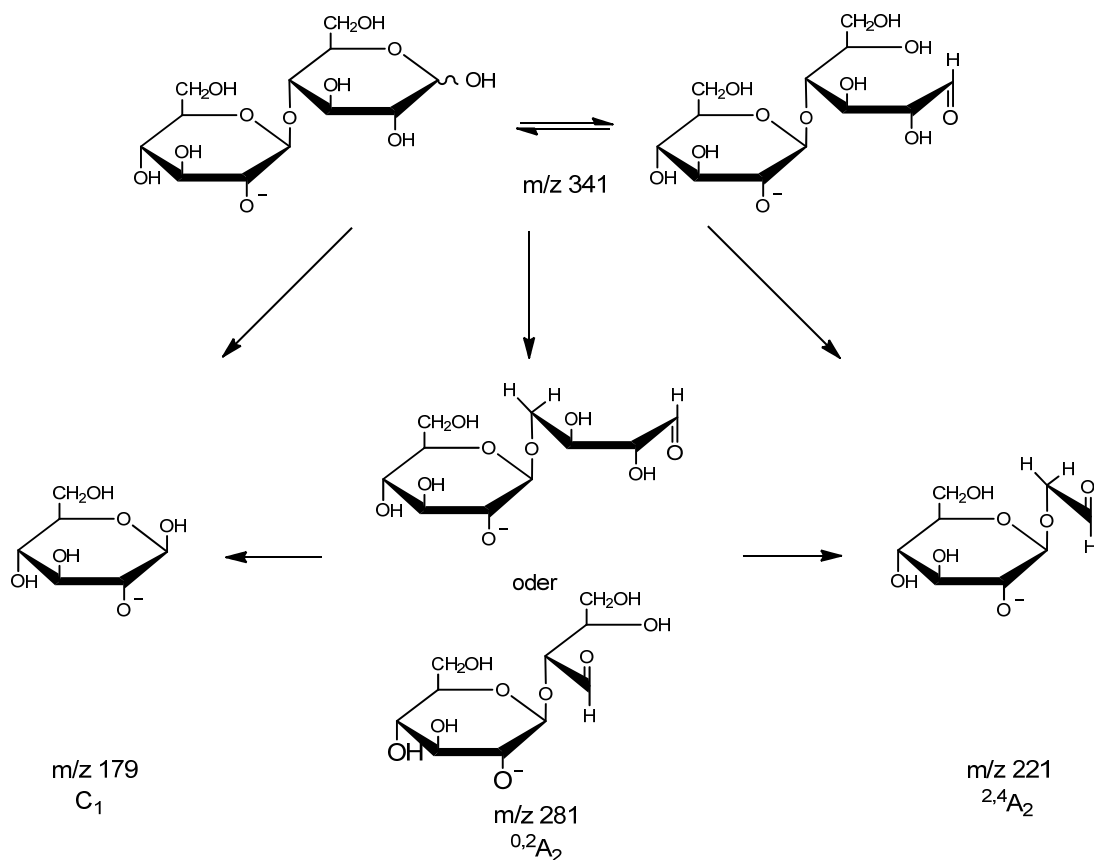


Abbildung 2-XII: Fragmentierungswege von Cellobiose zu den zur Differenzierung benötigten Fragmenten [136]; Zugehörige Spaltungen benannt nach Nomenklatur von Domon und Costello [92]

Diese erscheinen im Spektrum der Maltose wesentlich präsenter als beim  $\beta$ -Anomer Cellobiose [133]. Die unterschiedlich ausgeprägte Entstehung dieser Fragmente hängt mit der sterischen Anordnung der Anomere sowie deren Fragmentierungswegen zusammen. So lässt sich im Vergleich zwischen den Anomeren zum Beispiel die höhere Häufigkeit des Fragments  $m/z$  221 bei der  $\alpha$ -Verknüpfung darauf zurückführen, dass der Abbau zu dem Fragment der Masse  $m/z$  161 aufgrund der räumlichen Anordnung verringert ist. Gleiches gilt für die Entstehung des Ions der Masse  $m/z$  179 [136]. Ebenso wie auf Glucopyranosyl-Disaccharide können diese Regeln auch auf Galactopyranosyl-Disaccharide wie Lactose angewandt werden [133].

Des Weiteren wurde auch bereits das Fragmentierungsverhalten verschieden derivatisierter Di- und Oligosaccharide beschrieben [43,137–139]. Anhand unterschiedlicher Aminierungs-Derivate von Glucopyranosyl-Disacchariden, beispielsweise der ABBE-Derivate (AminBenzoesäureButylEster), konnten hier in gleicher Weise Anomerie und Art der Verknüpfung festgestellt werden. Dabei zeigte sich, dass zur Bestimmung der Anomerie die gleichen Fragmente herangezogen werden konnten wie bei den underivatisierten Zuckern. Im Unterschied dazu konnten die von den nativen Zuckern bekannten Fragmente zur Ermittlung der Verlinkungsstellen bei den Derivaten nicht verwendet werden, stattdessen konnten jedoch andere signifikante Spaltungen detektiert werden. Darüber hinaus fiel bei den in den obigen Studien beschriebenen Derivaten auf, dass die Fragmentierung ringgeschlossener derivatisierter Zucker zur Entstehung wesentlich aussagekräftigerer Spaltungen führt, als die Fragmentierung der durch Reduktion entstandenen ringoffenen Derivate.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Differenzierung der verschiedenen Disaccharide im negativen Modus durchgeführt. Zur Untersuchung des Fragmentierungsverhaltens wurden die drei (1→4)-verknüpften Zucker Maltose, Cellobiose und Lactose verwendet.

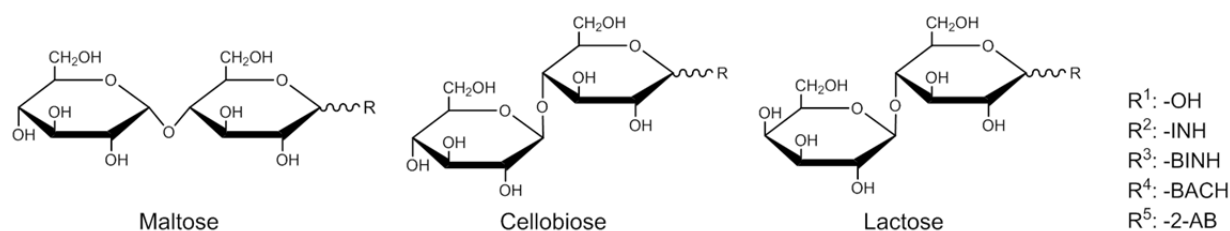


Abbildung 2-XIII: Strukturen der verwendeten Disaccharide

Die Glucopyranosyl-Disaccharide Maltose und Cellobiose variieren ausschließlich in der Anomerie ihrer glykosidischen Bindung, Lactose als Galactopyranosyl-Disaccharid unterscheidet sich zusätzlich in der Art der verknüpften Hexosen.

In Abbildung 2-XV sind die Fragmentspektren der verschiedenen Derivate von Maltose und Cellobiose dargestellt. Um die Reproduzierbarkeit der Spektren zu gewährleisten wurden die Fragmentierungen jeweils fünffach durchgeführt.

Die Spektren der underivatisierten Disaccharide in der ersten Reihe zeigen jeweils einen Hauptpeak der Masse  $m/z$  161 (gemessen bei  $m/z$  160.9). Dieser entsteht durch die Spaltung der glykosidischen Bindung ( $B_1$ -Fragment) und ist, wie oben bereits erwähnt, ein Hinweis auf die (1 → 4)-Verknüpfung der beiden Monosaccharide. Bei den Derivaten der Disaccharide zeigt sich dieses Fragment jedoch kaum mehr, nur bei den INH-gekoppelten Zuckern ist an der entsprechenden Stelle noch ein kleiner Peak vorhanden. Analog dazu konnten auch bei den bereits durchgeführten Studien mit Aminierungsreagenzien [137] oder PMP (1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon) [139], in Bezug auf die Verknüpfungsstellen keine Gemeinsamkeiten mit den Fragmenten der nativen Zuckern gefunden werden. Die Spektren der BINH- und BACH-Derivate zeigen, neben den für die Ermittlung der Anomerie benötigten Peaks, Hauptpeaks bei den Massen  $m/z$  463 bzw.  $m/z$  520 und  $m/z$  355. Dabei entspricht das BINH-Fragment der Masse  $m/z$  463 (gemessen bei  $m/z$  463.2 und  $m/z$  463.1) dem an der Hydrazingruppe abgetrennten Derivatisierungsreagenz, das Fragment der Masse  $m/z$  520 (gemessen bei  $m/z$  520.1 und  $m/z$  520.0) wird durch die  $^{0,2}X$ -Spaltung des anschließenden Zuckers gebildet. Durch Abspaltung des BACH-Derivatisierungsreagenzes an der Hydrazingruppe entsteht das Fragment der Masse  $m/z$  355 (gemessen bei  $m/z$  355.2). Auf gleiche Weise wird in den Spektren der INH-Derivate das Fragment der Masse  $m/z$  121 (gemessen bei  $m/z$  121.1 und  $m/z$  121.0) ausgebildet.

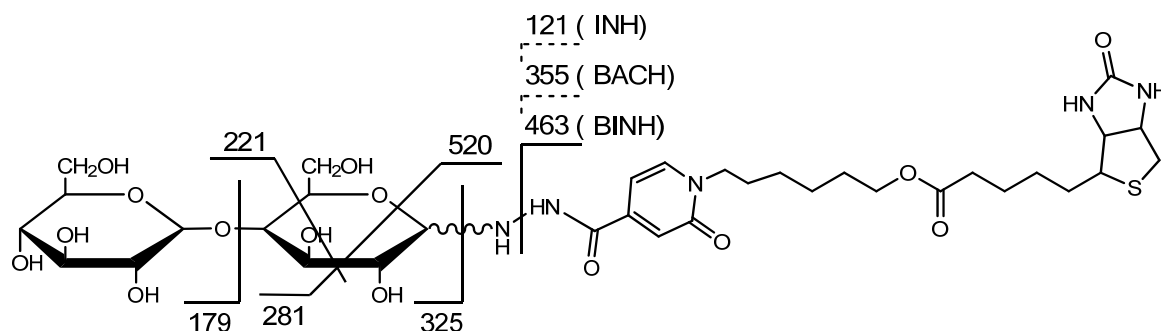


Abbildung 2-XIV: Spaltstellen eines BINH-derivatisierten Disaccharids mit den daraus entstehenden Massen

Ob diese Massen spezifisch für die (1 → 4)-Verknüpfung der Disaccharide sind, kann anhand dieser Daten jedoch nicht belegt werden. Dazu müssten Vergleichsmessungen mit an anderen Stellen verknüpften Disacchariden durchgeführt werden.

Im Gegensatz dazu zeigten die 2-AB-Derivate keine erwähnenswerten Fragmente außerhalb des Anomerie-Bereichs. Dies könnte mit der während der Derivatisierung stattfindenden Reduktion der Zucker zusammenhängen, die dazu führt, dass die vormals reduzierenden Zucker in ihrer ringoffenen Form vorliegt. Das unterschiedliche Verhalten von reduzierten und nicht-reduzierten aminierten Disacchariden wurde bereits untersucht [138], wobei der Informationsgehalt und die Signalstärke der reduzierten, ringoffenen Derivate im Vergleich deutlich höher waren.

Zur Unterscheidung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Anomere wurden die Ringfragmente des reduzierenden Zuckers herangezogen. Diese liegen im Massenbereich zwischen  $m/z$  179 und  $m/z$  341. Insbesondere die Höhe des Fragments  $m/z$  221 sollte sich zwischen den beiden Disacchariden deutlich unterscheiden [133], wobei das Verhältnis von Maltose zu Cellobiose bei etwa 4:1 liegt.

In den Spektren der underivatisierten Zucker (Abb. 2-XV) erschien die Masse  $m/z$  221 (gemessen bei  $m/z$  220.7) in der Tat nur bei Maltose, die Signalintensität war jedoch sehr gering. Auch das Fragment der Masse  $m/z$  281 (gemessen bei  $m/z$  280.8, bzw.  $m/z$  280.9) trat bei Mulrone et al. etwa dreimal häufiger beim  $\alpha$ -Anomer auf, in den vorliegenden Spektren aber war dieses bei beiden nativen Zuckern etwa gleich häufig vertreten. Die Masse  $m/z$  263 (gemessen bei  $m/z$  262.6 und  $m/z$  262.7) dagegen, welche durch Wasserabspaltung aus  $m/z$  281 entsteht, trat vermehrt bei der Messung von Cellobiose auf. Dieses Fragment wird meist im Verhältnis zum Ion der Masse  $m/z$  221 beurteilt [138]. Erscheint die Masse  $m/z$  221 in einer höheren Intensität als die Masse  $m/z$  263, so liegt das  $\alpha$ -Anomer vor, bei umgekehrten Verhältnissen dagegen das  $\beta$ -Anomer. Bei Untersuchung der vorliegenden Derivate bestätigte sich dies jedoch nur im Falle der BINH- und BACH-Derivate.

Im Falle der INH-derivatisierten Disaccharide waren die Unterschiede in der Fragmentierung deutlich erkennbar. Sowohl  $m/z$  221 (gemessen bei  $m/z$  220.8 und  $m/z$  220.9), als auch  $m/z$  281 (gemessen bei  $m/z$  280.8) traten bei der  $\alpha$ -verknüpften Maltose in wesentlich höherer Intensität auf, als bei der  $\beta$ -verknüpften Cellobiose. Erneut zeigte sich das Fragment  $m/z$  263 (gemessen bei  $m/z$  262.8), wie schon bei den nativen Zuckern, stärker bei Cellobiose. Da die Spektren der INH-Derivate, bis auf die zur Bestimmung der Anomerie benötigten Peaks, kaum andere Fragmente aufwiesen, fiel

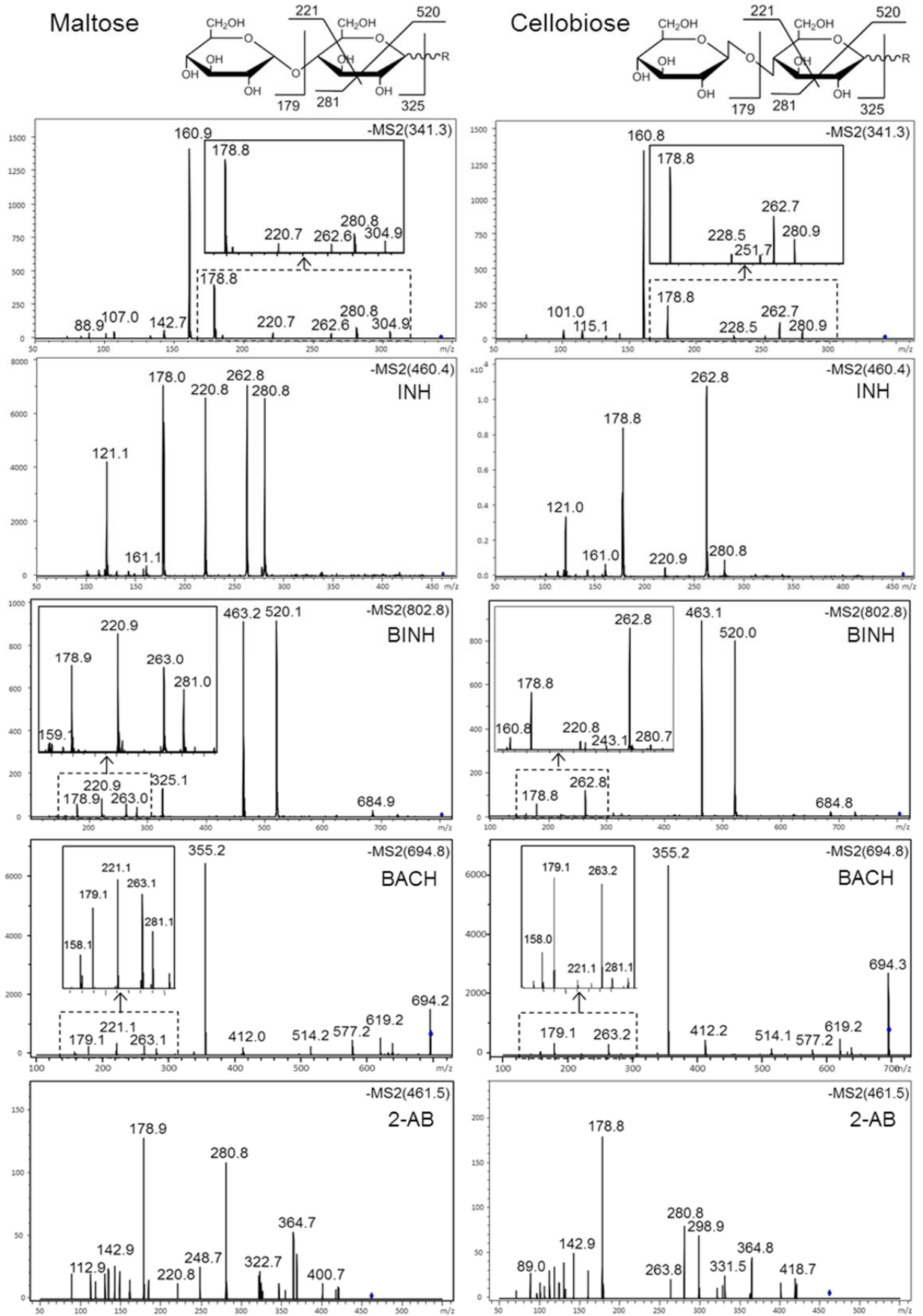


Abbildung 2-XV: -MS2-Spektren von Maltose und Cellobiose und ihren Derivaten mittels Direktinjektion, Details siehe Kapitel 5.2.4.



die Differenzierung hier leicht.

Auch die mit BINH und BACH derivatisierten Saccharide präsentierten bei näherer Betrachtung des entsprechenden Bereiches ein ähnliches Muster, wie zuvor die INH-Derivate. Insbesondere das Fragment  $m/z$  221 (gemessen  $m/z$  220.9 bei BINH;  $m/z$  221.1 bei BACH), welches bei Maltose jeweils das höchste Ringfragment war, ermöglichte eine einfache Unterscheidung der Anomere. Das  $m/z$  281 Ion (gemessen  $m/z$  281.0 bei BINH;  $m/z$  281.1 bei BACH) erschien zwar etwas schwächer als bei Maltose-INH, dennoch war ein Unterschied zum  $\beta$ -Anomer erkennbar. Im Gegensatz zu den vorherigen Spektren zeigte sich das Fragment  $m/z$  263 (gemessen  $m/z$  263.0 bei BINH;  $m/z$  263.1 bei BACH) bei Cellobiose-BACH jedoch nicht mehr als dominantestes Ringfragment.

Die Spektren der 2-AB-Derivate erwiesen sich im Vergleich zu den Hydrazid-Derivaten als wesentlich weniger aussagekräftig. Zum einen war das Fragmentierungsverhalten erheblich schlechter, was sich in der geringen Gesamtintensität der Spektren äußerte, zum anderen traten nur geringe Unterschiede zwischen den Anomeren auf, vergleichbar mit der Fragmentierung der underivatisierten Zucker. Es ist anzunehmen, dass auch dies, ebenso wie bei der Bestimmung der Verknüpfungsstellen, mit der ringoffenen Form der Disaccharide zusammenhängt.

Im Vergleich zu Cellobiose unterscheidet sich Lactose (Abb. 2-XVI) nur in der Zusammensetzung der Hexosen. Die Detektion der Verknüpfungsstellen konnte daher, ebenso wie bei den Glucopyranosen, nur anhand des underivatisierten Zuckers bestimmt werden. Jedoch zeigten sich auch hier die gleichen Hauptpeaks, wodurch weiterhin die Möglichkeit besteht, dass diese spezifisch für die (1  $\rightarrow$  4)-Verknüpfung der verschiedenen Derivate sind.

Auch die Fragmente, die auf die Anomerie hinweisen, sollten bei Lactose in äquivalenter Form vorkommen wie bei Cellobiose. Tatsächlich konnten die Massen  $m/z$  221 und  $m/z$  281 jeweils nur in sehr geringem Umfang nachgewiesen werden, was den vorherigen Erkenntnissen entspricht. Auffällig dagegen war, dass das Fragment  $m/z$  263 (gemessen bei  $m/z$  262.8 und  $m/z$  262.9) deutlich weniger präsent war. Dies könnte ein Hinweis auf das Vorhandensein der Galactoseeinheit im Molekül sein, da bekannt ist, dass durch die Anwesenheit von Galactose das Fragmentierungsmuster verändert werden kann [132]. Da das Verhältnis der Ionen  $m/z$  263 und  $m/z$  221 auch ein Anhaltspunkt auf die Anomerie des Disaccharides ist, lässt sich aus den Spektren der Lactose durch die im Vergleich höhere Intensität der Masse  $m/z$  263 die

$\beta$ -Anomerie bestätigen. Das Fragmentspektrum des 2-AB-Derivates wies wiederum eine geringe Intensität auf, wodurch die Unterscheidung von Maltose-AB und Cellobiose-AB erschwert wurde.

### Lactose

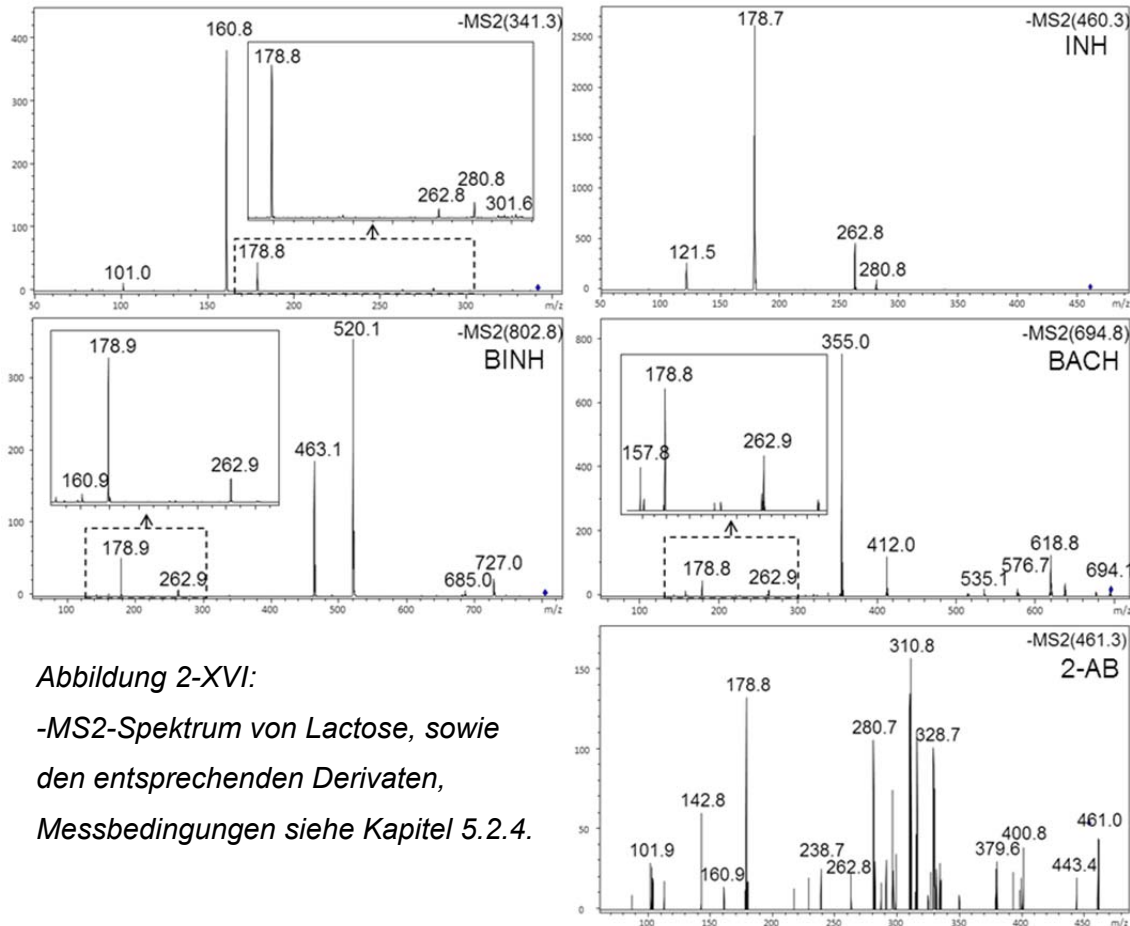


Abbildung 2-XVI:  
 -MS2-Spektrum von Lactose, sowie  
 den entsprechenden Derivaten,  
 Messbedingungen siehe Kapitel 5.2.4.

## 2.1.4.3. Fragmentierung von Trisacchariden

### I. Sialyl-N-acetyllactosamine

Die bereits in Bezug auf ihre Trenneigenschaften untersuchten Trisaccharide 3'Sialyl-N-acetyllactosamin (3'SLN) und 6'Sialyl-N-acetyllactosamin (6'SLN) wurden nun Fragmentierungsexperimenten unterzogen, um festzustellen, ob sie sich, ebenso wie Maltose und Cellobiose, anhand ihres Fragmentierungsmusters differenzieren lassen.

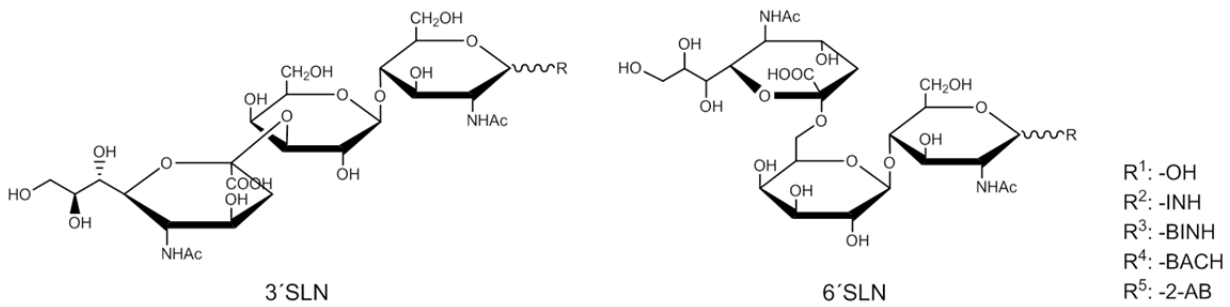


Abbildung 2-XVII: Strukturen von 3'SLN und 6'SLN

Auch diese beiden Zucker besitzen die gleiche Masse und weichen nur an der Verknüpfungsstelle der Sialinsäure voneinander ab, welche bei 3'SLN an Position 3 des Lactosamins geknüpft ist, bei 6'SLN dagegen an Position 6. Dadurch unterscheiden sich die räumliche Strukturen voneinander, was, wie schon bei den Disacchariden, dazu beitragen kann, das bestimmte Fragmente seltener oder häufiger gebildet werden.

Verschiedene Studien, die sich bereits mit der Unterscheidung  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  3)- und  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  6)-verknüpfter Sialinsäuren mittels MALDI-PSD oder ESI-MS beschäftigt haben, zeigten, dass die Sialinsäure im Falle der (2  $\rightarrow$  3)-Verknüpfung wesentlich leichter abgespalten wird, als bei der (2  $\rightarrow$  6)-Verknüpfung [140]. Daher konnte die Detektion des Sialinsäurefragments bei  $m/z$  290 im negativen Modus zur Differenzierung verwendet werden. Im Gegensatz zu den Disacchariden konnten diese Unterschiede auch im positiven Modus detektiert werden, wodurch die Anzahl der Applikationsmöglichkeiten steigt [141]. Des Weiteren wurde das Fragment der Masse  $m/z$  454 zur Abgrenzung der Substanzen verwendet, das durch  $B_2$ -Spaltung des protonierten Ions entsteht (Abb. 2-XVIII). Dieses erschien ausschließlich im Spektrum des 6'SLN [129]. In den Spektren von sialylierten *N*-Glykanen zeigte sich auch das Ringfragment der Masse  $m/z$  306 ( $^{0,4}A_2 - CO_2$ ) im negativen Messmodus als geeigneter Parameter zur Unterscheidung [131].

Wie die Fragmentierung durch das Einführen von Derivatisierungsreagenzien beeinflusst wird, wurde am Beispiel von mit 1-Pyrenyldiazomethan (PDAM) derivatisierten Glykanen dargestellt [142]. Hier zeigten sich ebenfalls deutliche Unterschiede in den Spektren der verwendeten *N*-Glykane, wodurch die (2  $\rightarrow$  3)- und (2  $\rightarrow$  6)- Verknüpfungen differenziert werden konnten. Das Fragmentierungsverhalten von derivatisierten Sialyl-*N*-acetylactosaminen wurde bisher noch nicht beschrieben.

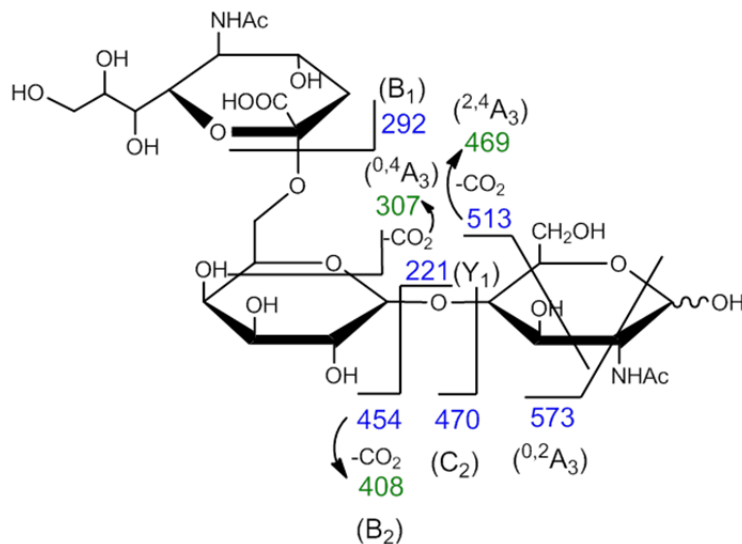


Abbildung 2- XVIII:  
 Diagnostische Fragmente (blau)  
 und ihre nominellen Massen von  
 Sialyl-N-acetylglucosamin;  
 Die durch Pfeile gekennzeichneten  
 Kohlendioxid-Abspaltungen  
 führen zu weiteren diagnosti-  
 schen Ionen (grün)

In Abbildung 2-XIX sind die im negativen Modus gemessenen MS/MS-Spektren der verschiedenen Sialyl-N-acetylglucosamine zu sehen. Nummer 1 zeigt die underivatisierten Oligosaccharide. Wie schon von Yamagaki et al. [141] beschrieben, war die Abspaltung der Sialinsäure bei 3'SLN erheblich größer, als bei 6'SLN ( $m/z$  289.8). Ebenfalls auffällig war der Peak der Masse  $m/z$  572 (gemessen bei  $m/z$  572.1 und  $m/z$  572.0). Dieser entsteht durch  $^{0,2}A$ -Spaltung des N-Acetylglucosaminrings und trat in bedeutend höherer Intensität bei 6'SLN auf. Weitere diagnostische Ionen, die zur Unterscheidung beitragen sollen, sind die Massen  $m/z$  408 ( $B_2 - CO_2$ ) und  $m/z$  468 ( $^{2,4}A_3 - CO_2$ ) im Falle des 3'SLNs und  $m/z$  306 ( $^{0,4}A_2 - CO_2$ ),  $m/z$  470 ( $C_2$ ) und  $m/z$  512 ( $^{2,4}A_3$ ) im Fall von 6'SLN [131]. In den vorliegenden Spektren der underivatisierten Sialyl-N-acetylglucosamine waren von diesen Fragmenten nur die mit den Massen  $m/z$  470 (gemessen bei  $m/z$  469.9) und  $m/z$  408 (gemessen bei  $m/z$  407.8) zu sehen. Allerdings unterschied sich die Intensität der  $C_2$ -Spaltung bei beiden Substanzen nur in geringem Maße und konnte daher nicht zur Differenzierung beitragen. Das Fragment  $m/z$  408 dagegen konnte, wie schon in der vorliegenden Studie, nur bei 3'SLN detektiert werden, wenn auch nur in sehr geringer Konzentration. Dennoch ließ sich anhand der Intensitäten von  $m/z$  290 und  $m/z$  572 eindeutig zuordnen, welche Art von Verknüpfung bei den underivatisierten Trisacchariden vorlag.

Die INH-Derivate (Abb. 2-XIX, Nr. 2) wiesen nur sehr geringe Unterschiede untereinander auf, der Hauptpeak entstand in beiden Fällen durch das Fragment der Ringspaltung  $^{0,2}A_3$  ( $m/z$  572, gemessen bei  $m/z$  572.2). Auch durch die Abspaltung der Sialinsäure wurden keine aussagekräftigen Fragmente gebildet, die Masse

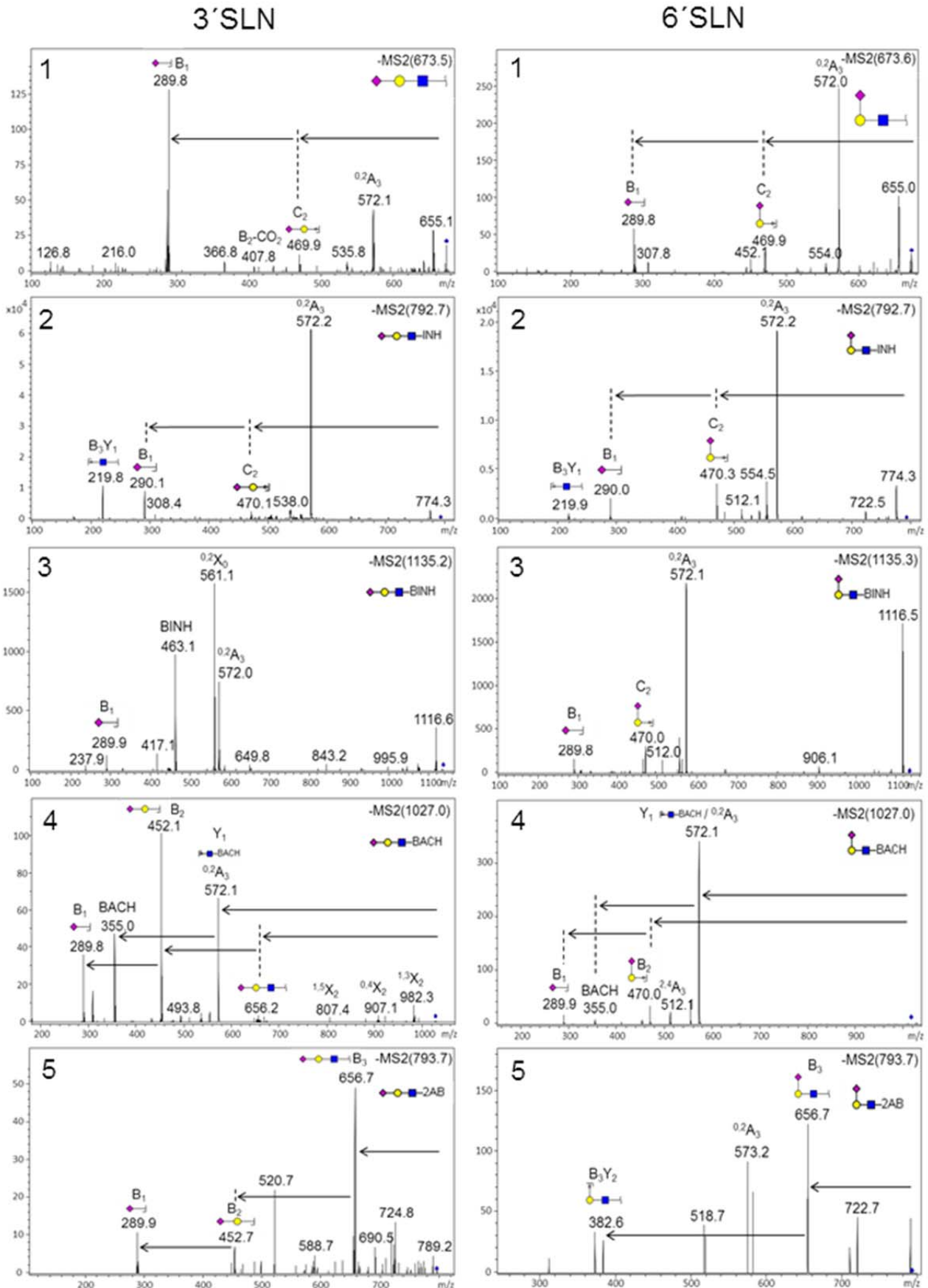


Abbildung XIX: Fragmentspektren von 3'SLN und 6'SLN im negativen Modus, Bedingungen siehe Kapitel 5.2.4.

$m/z$  290 (gemessen bei  $m/z$  290.1/  $m/z$  290.0) war jeweils nur in geringer Intensität auffindbar.

Offenbar wurde die Bereitschaft zur Sialinsäureabspaltung durch die Derivatisierung mit INH vermindert, wodurch auf diese Weise keine definitive Einordnung der Zucker möglich war. Einzig die C2-Spaltung bei  $m/z$  470 (gemessen bei  $m/z$  470.1/  $m/z$  470.3) hatte im Spektrum von 6'SLN eine deutlich höhere Intensität. Auch bei  $m/z$  512 (gemessen:  $m/z$  512.1) konnte im 6'SLN-Spektrum ein Peak detektiert werden, was den Ergebnissen von Wheeler et al. [131] entspricht.

Nach BINH-Derivatisierung (Abb. 2-XIX, Nr. 3) ergaben die MS/MS-Spektren von 3'SLN und 6'SLN wiederum offenkundigere Unterschiede. Zwar war das Sialinsäurefragment bei  $m/z$  290 (gemessen bei  $m/z$  289.9/  $m/z$  289.8) bei beiden Trisacchariden gleich stark vertreten, doch das Ringfragment  $m/z$  572 (gemessen bei  $m/z$  572.0/  $m/z$  572.1) zeigte eine starke Präferenz im Spektrum von 6'SLN. Des Weiteren traten die diagnostischen Fragmente  $m/z$  470 und  $m/z$  512 (gemessen bei  $m/z$  512.1) beim (2 → 6)-verknüpften Zucker auf, im Spektrum des anderen Zuckers dagegen nicht. Stattdessen waren bei 3'SLN intensive Peaks bei  $m/z$  463.1 und  $m/z$  561.1 zu sehen. Diese entsprechen dem abgespaltenen Derivatisierungsreagenz, sowie einem Ringfragment des *N*-Acetylglucosamins, sagen aber nur wenig über die Art der Verknüpfung aus. Fragmente bei  $m/z$  408 und  $m/z$  468 wurden nicht detektiert, dennoch konnte aufgrund der unterschiedlichen Fragmentierung eine Abgrenzung der Zucker voneinander erfolgen.

Bei den BACH-Derivaten (Abb. 2-XIX, Nr. 4) zeigten sich ebenfalls beträchtliche Unterschiede in den Spektren. Auch hier bildete sich bei 3'SLN ein Fragment des abgespaltenen Derivatisierungsreagenzes ( $m/z$  355.0). Offenbar können die vergleichsweise großen, biotinhaltigen Hydrazide durch die sterische Anordnung des 3'SLNs leichter abgespalten werden, als bei 6'SLN. Im Gegensatz zu den vorigen Derivaten und im Einklang mit den nichtderivatisierten SLNs zeigte das Sialinsäurefragment  $m/z$  290 (gemessen bei 289.8/  $m/z$  289.9) wiederum eine höhere Intensität beim (2 → 3)-verknüpften Zucker. Der Hauptpeak des Spektrums von 3'SLN wurde jedoch durch die B<sub>2</sub>-Spaltung ( $m/z$  452.1) erzeugt. Währenddessen entstanden im Spektrum von 6'SLN erneut die Fragmente der Massen  $m/z$  470.0,  $m/z$  512 (gemessen bei  $m/z$  512.1) und  $m/z$  572 (gemessen bei  $m/z$  572.1), welche sich ebenfalls zur Differenzierung der Substanzen eignen.

Im Gegensatz zu den Disacchariden konnten auch bei den AB-Derivaten (Abb. 2-XIX, Nr. 5) der Trisaccharide aussagekräftige Spektren aufgenommen werden. Als Hauptfragment bildete sich jeweils das underivatisierte Trisaccharid ( $m/z$  657, gemessen bei  $m/z$  656.7), Unterschiede zeigten sich vor allem in der Entstehung der  $B_1$ - und  $B_2$ -Spaltungen (gemessen bei  $m/z$  289.9 und  $m/z$  452.7) bei 3'SLN und des Lactosaminfragmentes ( $m/z$  382.6), sowie der Ringspaltung ( $m/z$  573.2) bei 6'SLN.

Zusätzlich zu den MS/MS-Spektren im negativen Modus wurden auch im positiven Meßmodus Fragmentspektren der Sialyl-*N*-acetyllactosamine aufgenommen (Abb. 2-XX). Durch zwei vorhergehende Studien [129,141] wurde bereits gezeigt, dass die protonierten Dreifachzucker ebenfalls unterschiedliche Fragmentspektren bilden, insbesondere durch verstärktes Aufkommen der  $B_1$ - und  $B_2$ -Fragmente bei 3'SLN.

In den MS(2)-Spektren der underivatisierten Zucker (Nr. 1) der Abbildung 2-XX konnte dieser Sachverhalt nicht bestätigt werden, sondern erwies sich eher als umgekehrt. Sowohl das  $B_1$ - ( $m/z$  292, gemessen bei  $m/z$  291.8) als auch das  $B_2$ -Fragment ( $m/z$  454, gemessen bei  $m/z$  453.9) hatten eine höhere Intensität im Spektrum von 6'SLN.

Zusätzlich wurden in einem weiteren Fragmentierungsschritt MS(3)-Spektren der jeweiligen Fragmentationen der Masse  $m/z$  657 durchgeführt (ohne Abbildung). Diese Masse entspricht dem vom Derivatisierungsreagenz abgespaltenem Trisaccharid. Hier konnte ebenfalls kein Unterschied in der Intensität von  $m/z$  454 ( $B_2$ -Fragment) festgestellt werden. Auch die  $B_1$ -Spaltung ( $m/z$  292) konnte nur unwesentlich dazu beitragen, die Art der Verknüpfung zu detektieren. Dagegen zeigte das ( $B_1 - H_2O$ )-Fragment bei  $m/z$  274 eine deutlich höhere Intensität im Falle von 3'SLN.

Stattdessen zeigte sich in den MS(2)-Spektren der nativen Trisaccharide vor allem ein Unterschied in der Entstehung des  $Y_2$ -Fragments ( $m/z$  384), welches durch Abspaltung der Sialinsäure entsteht. Demnach spielt auch hier der Verlust der Sialinsäuregruppe eine Rolle, jedoch scheint die Ladung verstärkt am Lactosaminrest zu sitzen und nicht ausschließlich an der abgespaltenen Sialinsäure. Dieses Fragment, ebenso wie das durch Abgang der Sialinsäure-Galactose-Einheit geformte  $Y_1$ -Fragment ( $m/z$  222), bildete sich hauptsächlich bei 3'SLN.

Ein ähnliches Bild stellte sich bei den INH-Derivaten (Abb. 2-XX, Nr. 2) dar. Sowohl das  $Y_1$ -Fragment ( $m/z$  341), als auch das  $Y_2$ -Fragment bei  $m/z$  503 (gemessen bei  $m/z$  503.1) manifestierte sich fast ausnahmslos im Spektrum des (2 → 3)-verknüpften

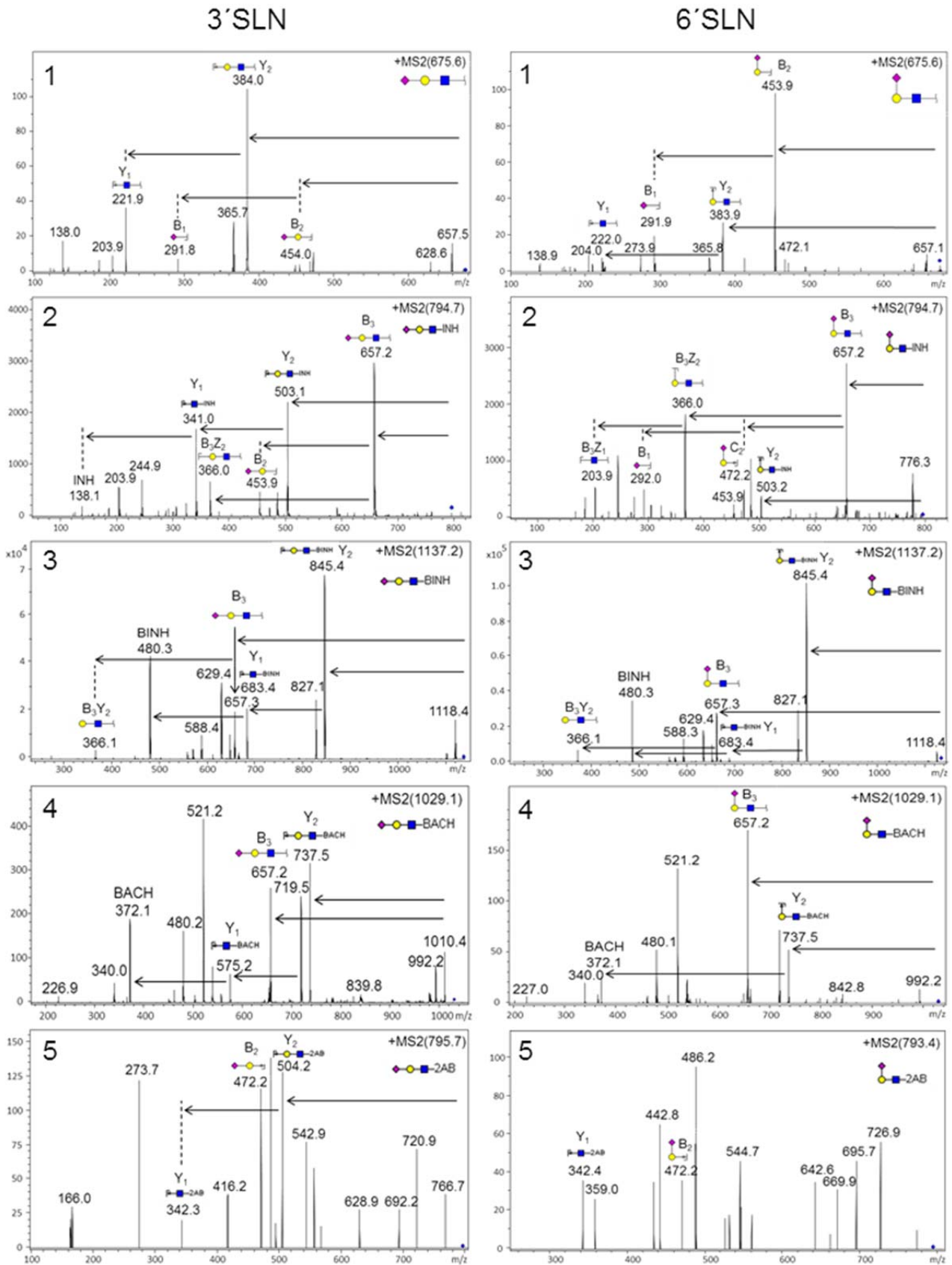


Abbildung 2-XX: Fragmentspektren der verschiedenen SLN-Derivate im positiven Modus, Bedingungen siehe Kapitel 5.2.4.



Zuckers. Im Gegenzug hatte das Lactosaminfragment ( $m/z$  366) bei 6'SLN eine erhöhte Intensität.

Bei den BINH-derivatisierten Sacchariden (Abb. 2-XX, Nr. 3) dagegen war das  $Y_2$ -Fragment ( $m/z$  845, gemessen bei  $m/z$  845.4) in beiden Spektren der Hauptpeak. Das  $Y_1$ -Fragment ( $m/z$  683, gemessen bei  $m/z$  683.4) jedoch zeigte das gleiche Verhalten wie bereits bei den vorigen Derivaten, indem es hauptsächlich im Spektrum des 3'SLN erschien.

Auch im Falle der BACH-Derivate (Abb. 2-XX, Nr. 4) wurde das gleiche Muster in der Fragmentierung erkennbar. Die  $Y_1$ - und  $Y_2$ -Spaltungen ( $m/z$  575.2 und  $m/z$  737.5) dominierten wiederum bei 3'SLN, während bei 6'SLN vor allem das Fragment der Masse  $m/z$  657.2 auffiel, das durch Abspaltung des Derivatisierungsreagenzes entsteht.

Die AB-derivatisierten Zucker (Abb. 2-XX, Nr. 5) konnten ebenfalls fragmentiert werden, zeigten aber nur sehr wenige zuordenbare Signale. Nichtsdestotrotz wurde auch hier das  $Y_2$ -Fragment ( $m/z$  504.2) beim (2 → 3)-verknüpften Zucker detektiert, bei 6'SLN jedoch nicht. Das  $Y_1$ -Fragment ( $m/z$  342.2 und  $m/z$  342.4) andererseits war in beiden Spektren vorhanden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl im negativen als auch im positiven Modus eine Unterscheidung der verschiedenen verknüpften Trisaccharide möglich ist. Zwar konnten keine für alle gemessenen Derivate geltenden Regeln formuliert werden, dennoch waren stets genug aussagekräftige Fragmente vorhanden, die eine Differenzierung erlaubten. Im negativen Messmodus kann anhand des Fragments  $m/z$  572 ( $^{0,2}A_3$ ) in Kombination mit der Masse  $m/z$  512 ( $^{2,4}A_3$ ) das Vorhandensein des (2 → 6)-verknüpften Zuckers bestätigt werden. Auch im Positiven kann die Verbindung aus  $Y_1$ - und  $Y_2$ -Fragmenten dazu genutzt werden, das (2 → 3)-verknüpfte Trisaccharid zu ermitteln. Werden beide Messmodi miteinander kombiniert, so erlaubt dies die zweifelsfreie Bestimmung des vorliegenden Zuckers.

## II. Nichtreduzierende Trisaccharide

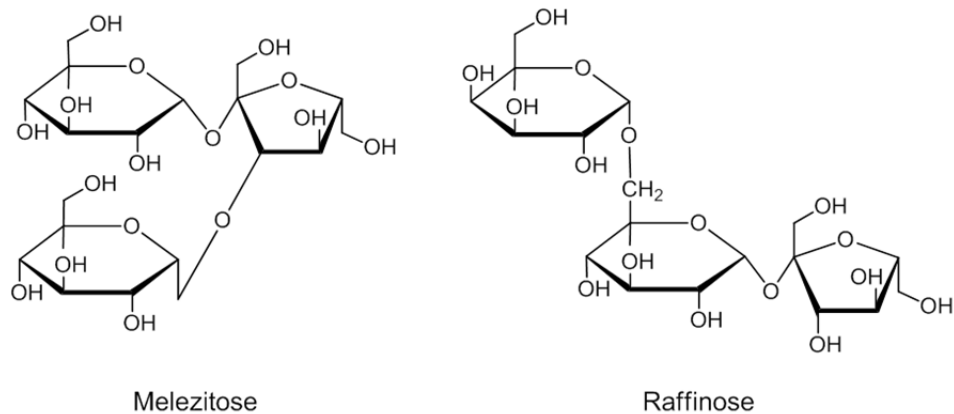


Abbildung 2-XXI: Strukturen von Melezitose und Raffinose

Zusätzlich zu den Sialyl-*N*-acetylactosaminen wurden die beiden nichtreduzierenden Zucker Melezitose (Glc  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  3)-Fru  $\beta$ -(2  $\rightarrow$  1)- $\alpha$ -Glc) und Raffinose (Gal  $\alpha$ -(1  $\rightarrow$  6)-Glc  $\alpha$ -(2  $\rightarrow$  1)- $\beta$ -Fru) chromatographisch und massenspektrometrisch analysiert.

Diese beiden Trisaccharide besitzen kein freies anomeres C-Atom und können somit auch nicht derivatisiert werden. Auch hier wurde untersucht, ob sich diese Substanzen trennen und auf Grund ihrer Fragmentspektren unterscheiden lassen.

Wie in Abbildung 2-XXII zu sehen ist, konnte die Trennung auf der HILIC-Phase problemlos durchgeführt werden. Dabei wurde Melezitose (1) nach etwa 7.5 min eluiert, Raffinose (2) nach 9.4 min. Diese Reihenfolge entspricht der Theorie, nach der Oligosaccharide, die eine (1  $\rightarrow$  6)-glykosidische Bindung enthalten stärker zurückgehalten werden, als Zucker ohne diese Bindungsart [115].

Die Fragmentierung im negativen Modus zeigte wesentliche Unterschiede in den Spektren der beiden Zucker. Während bei Melezitose das Fragment der Masse  $m/z$  323 dominierte, welches durch Abspaltung einer Hexose entsteht, war das Hauptfragment von Raffinose bei einer Masse von  $m/z$  179 zu sehen, was einer Hexose-Einheit entspricht. Eine weitere Auffälligkeit war das ausschließlich im Spektrum der Raffinose erscheinende Fragment  $m/z$  221, das, analog zu den Disacchariden, aus einer Ringspaltung des mittleren Zuckerrings entsteht. Dies geht konform mit den Erkenntnissen von Dallinga et al., die eben diese Fragmente zur Unterscheidung der Trisaccharide heranzogen [132].

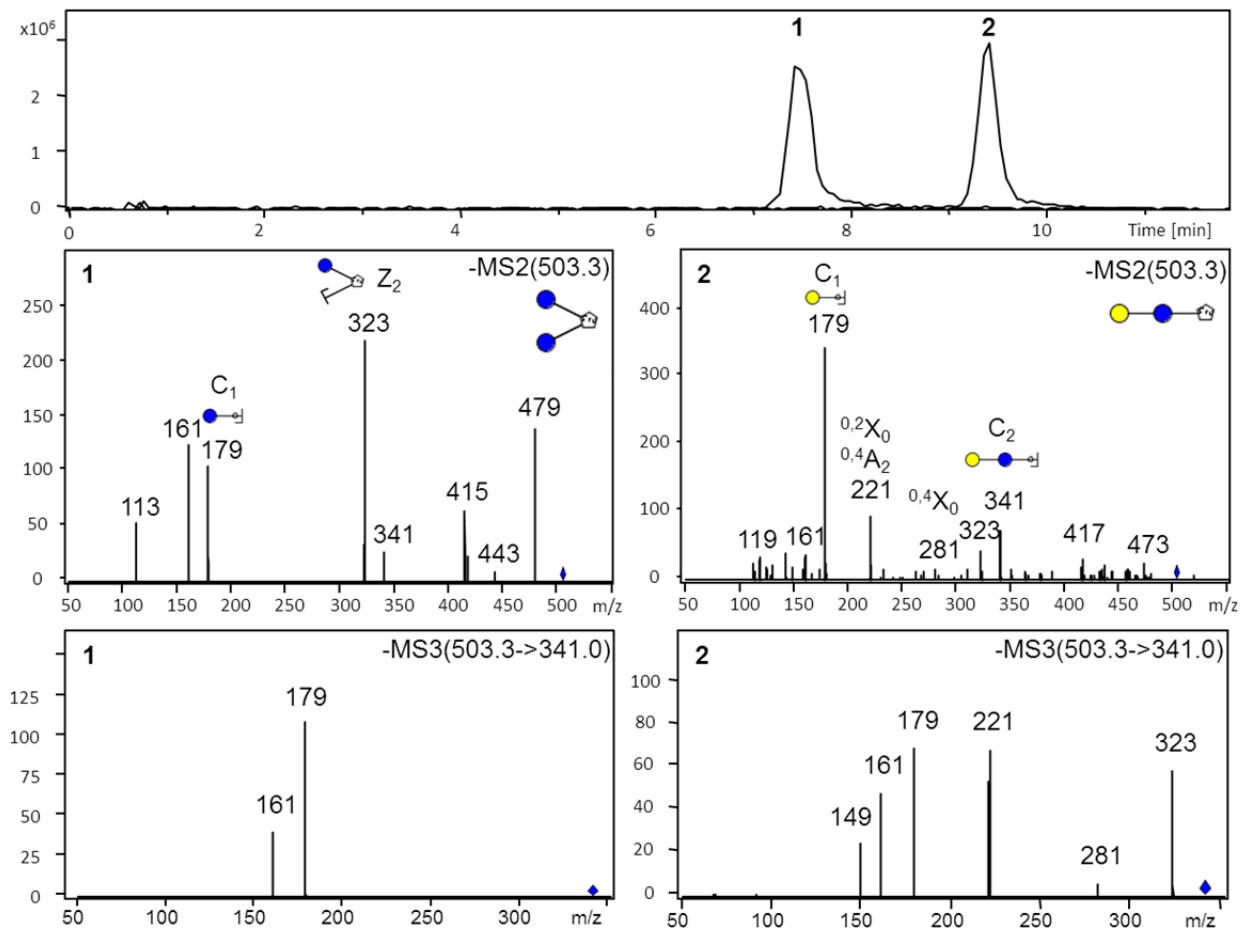


Abbildung 2-XXII: Trennung und Fragmentierung von Melezitose (1) und Raffinose (2), adaptiert nach Bank et al. [143], Bedingungen siehe Kapitel 5.2.4.

Von den MS(3)-Spektren des Ions der Masse  $m/z$  341 ( $C_2$ -Spaltung) lässt sich wiederum ableiten, welche Disaccharidstruktur zu Grunde liegt. Dallinga et al. führten umfangreiche Studien zu den Fragmentierungseigenschaften von Di- und Trisacchariden durch. Dadurch ließ sich durch Vergleich der MS(3)-Spektren obiger Trisaccharide mit den MS(2)-Spektren verschiedener Disaccharide bestätigen, dass diese bei Melezitose aus einem Glucose-Fructose-Disaccharid entstehen, bei Raffinose dagegen aus Galactose und Glucose. Erkennbar ist dies vor allem durch das Vorhandensein oder Fehlen der Fragmente  $m/z$  221,  $m/z$  251 und  $m/z$  281 [132]. Dadurch lassen sich wiederum wertvolle Hinweise auf die Struktur des ursprünglichen Trisaccharides gewinnen. Möglich wurde dies allerdings nur, weil die beiden Strukturen durch die vorausgegangene Chromatographie auf der HILIC-Phase voneinander getrennt werden konnten.

### 2.1.5. Zusammenfassung

Derivatisierungsreagenzien sind zur Analyse von Zuckern oft unverzichtbar geworden. Die Umsetzung mit Hydraziden hat dabei entscheidende Vorteile gegenüber anderen Substanzen, wie beispielsweise die Erhaltung des geschlossenen Zuckerrings, sowie eine einfache Derivatisierungsreaktion (siehe Kapitel 1.2.3.2.II.). In dieser Arbeit wurden zwei neue Reagenzien dieser Art getestet, INH und BINH, sowie weiterführende Studien an BACH durchgeführt, einem Hydrazidreagenz, das bereits zur Derivatisierung von Glykanen verwendet wurde [99]. Dabei wurden die Auswirkungen dieser Kopplungen auf das Verhalten von Mono-, Di- und Trisacchariden bei Trennung mittels HPLC, sowie auf Detektion und Fragmentierung durch Massenspektrometrie untersucht.

Isoniazid wurde auf Grund seiner kleinen Molekülgröße, seines Chromophors, sowie der guten und preiswerten Verfügbarkeit des Produktes ausgewählt. Bereits 1953 wurde es mit verschiedenen Zuckern gekoppelt, damals zu dem Zweck die Toxizität der Substanz zu verringern [144]. In Verbindung mit Biotin wurde daraus BINH entwickelt, das durch seine hohe Affinität zu Avidin und Streptavidin auch zum Einsatz in Bindungsstudien geeignet ist. Das bereits teilweise untersuchte BACH [67,99] ist eines der wenigen kommerziell verfügbaren Biotinylierungsreagenzien, dennoch waren bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Untersuchungen in Verbindung mit kleinen Zuckern vorhanden.

Zunächst wurden die Bedingungen der Umsetzung der Zucker mit INH und BINH optimiert. Für die komplette Umwandlung der Saccharide in ihre Derivate mussten diese in 95 % Methanol gelöst und 90 Minuten auf 90 °C erhitzt werden. Im Vergleich der verschiedenen Hydrazidderivatisierungen variiert die Umsetzungszeit sehr stark von 20 min/80 °C bei Pyrenbuttersäurehydrazid [52] und 16 h/60 °C bei BNAH [65].

Für diese Arbeit wurde die INH-Derivatisierung zusätzlich in der Mikrowelle bei 130 °C durchgeführt, was zu einer Verringerung der Reaktionszeit auf 20 Minuten führte. Daher kann die Derivatisierung mittels Mikrowelle als gute Alternative zur Reduktion der Derivatisierungszeit gesehen werden.

Im nächsten Schritt wurden die verschiedenen Mono-, Di- und Trisaccharide, sowie ihre Derivate, mittels HPLC-ESI-MS auf verschiedenen Säulenmaterialien hinsichtlich ihrer chromatographischen Eigenschaften untersucht. Bei den von den *N*-Glykanen abgeleiteten Monosacchariden führte vor allem die Trennung der Epimere Glucose,

Galactose und Mannose zu Problemen. Die restlichen Monosaccharide konnten, auch auf Grund der Unterschiede in den Massen, leichter isoliert und zugeordnet werden. Verglichen wurden die Hydrazidderivate mit dem Aminierungsreagenz 2-Aminobenzamid, das häufig zur Derivatisierung von Oligosacchariden eingesetzt wird. Jedoch waren hier ebenfalls bisher keine Daten zur Trennung der in *N*-Glykanen vorkommenden Monosaccharide vorhanden.

Die Chromatogramme der Monosaccharide auf einer C18-Phase unterschieden sich stark in Hinblick auf die Trennleistung. INH erwies sich als ungeeignete Derivatisierung für dieses Säulenmaterial, auch BINH konnte die Zucker nur teilweise trennen. Zur besten Trennung auf der Umkehrphase führten die Derivatisierungen mit 2-AB und BACH, dennoch war die Methode nur wenig selektiv für die massengleichen Zucker Glucose, Galactose und Mannose.

Die HILIC-Phase führte diesbezüglich zu einer Verbesserung. Bereits die underivatisierten Monosaccharide konnten separiert werden, durch den Einsatz von INH war sogar eine Trennung der drei oben genannten Epimere nahezu vollständig möglich. Auch die Biotinylierungsreagenzien brachten eine deutliche Verbesserung der Trennung, jedoch nicht im Bereich der drei Hexosen.

Die Erhöhung der Signalstärke bei massenspektrometrischer Detektion durch die Derivatisierung war ein weiterer Aspekt der untersucht wurde. Hier erwiesen sich vor allem BINH und BACH als besonders effektiv. INH und 2-AB konnten ebenfalls zur Erhöhung der Intensitäten beitragen. Dadurch können die Kohlenhydrate leichter detektiert werden, darüber hinaus sinkt die Nachweisgrenze der betreffenden Substanzen. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der Trennung der Disaccharide Lactose, Maltose und Cellobiose. Auf der RP18-Säule zeigte sich wiederum die 2-AB-Derivatisierung als die Geeignetste, um die strukturell sehr ähnlichen Zucker zu trennen. Dagegen ließen sich die derivatisierten Disaccharide, mit Ausnahme der BACH-Derivate, auf der hydrophilen HILIC-Phase gut separieren.

Die Derivate der Trisaccharide 3'SLN und 6'SLN zeigten, bis auf INH, bereits auf der Umkehrphase eine gute Trennung. Mittels HILIC konnten auch die nativen Oligosaccharide getrennt werden. Dies bestätigte sich bei der Trennung der nichtreduzierenden Zucker Raffinose und Melezitose.

Auffällig waren jeweils die auf der HILIC-Phase erzeugten Zweifachpeaks der Hydrazid-derivatisierten Zucker. Diese entstehen höchstwahrscheinlich durch Trennung der Anomere, die durch die ringgeschlossene Form des Derivates erhalten

bleiben. Die Fähigkeit zur Anomerentrennung ist eine bekannte Eigenschaft bestimmter HILIC-Phasen.

Da die Di- und Trisaccharide erfolgreich getrennt werden konnten, erfolgte im nächsten Schritt die Fragmentierung der massegleichen Zucker mittels Ionenfallen-Massenspektrometrie. Hierdurch sollte bei den vorliegenden Derivaten die Unterscheidung der Substanzen ohne vorherige Kenntnis der Strukturen untersucht werden.

Dabei zeigte sich, dass die Hydrazid-Derivatisierungen die Differenzierung der Disaccharide deutlich erleichtern, während sich 2-AB dagegen nur bedingt für diesen Zweck eignete. Durch die Fragmentierung der Trisaccharide, die sowohl im positiven als auch im negativen Ionisations-Modus durchgeführt wurde, ließen sich ebenfalls verschiedene Merkmale detektieren, die eine Unterscheidung der Substanzen ermöglichen. Werden beide Messmodi kombiniert, so lassen sich die verschieden verknüpften Oligosaccharide zweifelsfrei identifizieren. Gleiches gilt für die Fragmentierung der nichtreduzierenden Trisaccharide, welche sowohl im MS(2), als auch im MS(3) strukturentypische Spaltprodukte zeigten, die eine Zuordnung der isomeren Zucker erlauben.

Insgesamt lässt sich bestätigen, dass die Derivatisierung von kleinen Zuckern zu einer Verbesserung von sowohl Trenneigenschaften, als auch Fragmentierungsverhalten führt und damit zu einer Vereinfachung der Identifizierung und Zuordnung von Kohlenhydratstrukturen. Besonders die Kopplung mit den Hydraziden INH, BINH oder BACH, deren zusätzliche Vorzüge in einer einfachen, salzfreien Derivatisierungsreaktion mit Entstehung eines stabilen, ringgeschlossenen Endproduktes liegen, hat sich hierbei als vorteilhaft erwiesen.

## 2.2. Derivatisierung und Analyse von N-Glykanen

### 2.2.1. Hintergründe

#### I. Ribonuclease B und Ovalbumin

Nach erfolgreicher Umsetzung und Analyse der kleinen Zucker wurde die Derivatisierung im nächsten Schritt auf die N-Glykane zweier Proteine, Ribonuclease B und Ovalbumin, übertragen. Durch die Wahl dieser beiden Glykoproteine standen für die Analyse alle drei Typen von N-Glykanen zur Verfügung.



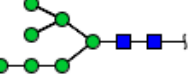
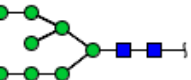

Zusammensetzung	[M+Na] <sup>+</sup> nativ	[M+Na] <sup>+</sup> INH	[M+Na] <sup>+</sup> BINH	[M+Na] <sup>+</sup> BACH	[M+Na] <sup>+</sup> 2-AB	Stuktur
H <sub>5</sub> N <sub>2</sub>	1257.4	1376.5	1719.0	1610.9	1377.6	 + Isomere
H <sub>6</sub> N <sub>2</sub>	1419.5	1538.6	1881.1	1773.0	1539.7	 + Isomere
H <sub>7</sub> N <sub>2</sub>	1581.5	1700.6	2043.1	1935.0	1701.7	 + Isomere
H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>	1743.6	1862.7	2205.2	2097.1	1863.8	 + Isomere
H <sub>9</sub> N <sub>2</sub>	1905.7	2024.8	2367.3	2259.2	2025.9	 + Isomere

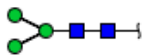
Tabelle 3-I: Übersicht der Highmannose-Glykane von Ribonuclease B, H: Anzahl der Hexoseeinheiten, N: Anzahl der N-Acetylglucosamineinheiten

Ribonuclease B ist ein Glykoprotein aus dem bovinen Pankreas, das für die enzymatische Spaltung der Phosphodiesterbindungen zwischen den Nucleotiden der RNA und damit für deren Abbau verantwortlich ist. Es existieren mindestens vier Ribonucleasen in der Rinderbauchspeicheldrüse, die sich in Aufbau und Glykanbesatz unter-



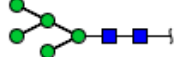

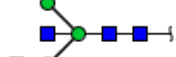

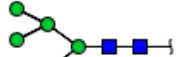


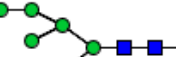
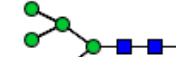
scheiden. Ribonuclease A ist das einzige Enzym dieser Gruppe, das über keinerlei Glykosylierung verfügt, Ribonuclease B, C und D besitzen jeweils eine Glykosylierungsstelle. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Ribonuclease B besteht aus 124 Aminosäuren mit einer Glykosylierungsstelle an Position 34 der Aminosäuresequenz. Diese ist ausschließlich mit High-Mannose-Glykanen besetzt, welche sich über einen Bereich von 5 bis 9 Mannoseeinheiten erstrecken (Tabelle 3-I). Mittels NMR und massenspektrometrischer Studien konnten bisher 13 isomere Strukturen dieser Glykane identifiziert werden [143 - 145].

Das aus dem Eiklar von Hühnereiern gewonnene Ovalbumin ist aus 385 Aminosäuren aufgebaut und weist ebenfalls eine einzelne Glykosylierungsstelle an Position 292 der Sequenz auf. Obwohl es das am häufigsten im Eiklar vorkommende Protein ist, ist seine Funktion bis heute nahezu ungeklärt [148].

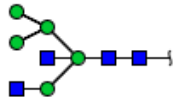
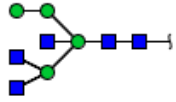
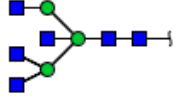
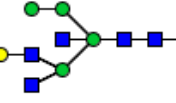
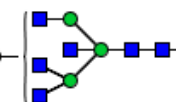


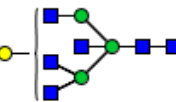
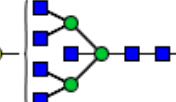
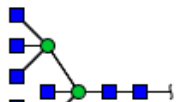

Im Gegensatz zu Ribonuclease B besitzt die Glykosylierungsstelle des Ovalbumins eine wesentlich höhere Heterogenität, da sie mit allen drei Arten von *N*-Glykanen – High-Mannose-, Komplex- und Hybridtyp – besetzt sein kann (Tabelle 3-II). Dabei liegen fast ausschließlich neutrale Strukturen vor, nur ein kleiner Teil besitzt durch Sulfatierung hervorgerufene saure Eigenschaften. Durch die isolierungsbedingte Verunreinigung des Ovalbumins mit anderen im Eiweiß enthaltenen Glykoproteinen, wie Ovomuroid oder Riboflavin-bindendem Protein, kommt es häufig zur Detektion weiterer Glykane. Diese sind meist vom Komplextyp, welcher jedoch den kleinsten Anteil der Ovalbuminglykane ausmacht. Das größte dem Ovalbumin entstammende Glykan ist das Hybridglykan der Masse  $m/z$  2028. Alle höhermassigen Strukturen sind demnach anderen, aus Verunreinigungen stammenden Proteinen zuzuordnen [144, 145]. Tabelle 3-II enthält sowohl die Glykane des Ovalbumins, als auch die Glykane der co-isolierten Proteine.

	Zusammensetzung	[M+Na] <sup>+</sup> nativ	[M+Na] <sup>+</sup> INH	[M+Na] <sup>+</sup> BINH	[M+Na] <sup>+</sup> BACH	[M+Na] <sup>+</sup> 2-AB	Struktur
1	H <sub>3</sub> N <sub>2</sub>	933.3	1052.5	1394.9	1286.8	1053.5	



2	$H_4N_2$	1095.4	1214.6	1557.0	1448.9	1215.6	
3	$H_3N_3$	1136.4	1255.6	1598.0	1489.9	1256.6	
4	$H_5N_2$	1257.4	1376.6	1719.0	1610.9	1377.6	
5	$H_4N_3$	1298.5	1417.7	1760.1	1652.0	1418.7	
6	$H_3N_4$	1339.5	1458.7	1801.1	1693.0	1459.7	 + Isomer
7	$H_6N_2$	1419.5	1538.7	1881.1	1773.0	1539.7	
8	$H_5N_3$	1460.5	1579.7	1922.1	1814.0	1580.7	
9	$H_4N_4$	1501.5	1620.7	1963.1	1855.0	1621.7	
10	$H_3N_5$	1542.6	1661.8	2004.2	1896.1	1662.8	 + Isomer
11	$H_7N_2$	1581.5	1700.7	2043.1	1935.0	1701.7	
12	$H_6N_3$	1622.6	1741.8	2084.2	1976.1	1742.8	

## Ergebnisse und Diskussion

13	$H_5N_4$	1663.6	1782.8	2125.2	2017.1	1783.8	
14	$H_4N_5$	1704.6	1823.8	2166.2	2058.1	1824.8	
15	$H_3N_6$	1745.7	1864.9	2207.3	2099.2	1865.9	 +Isomer
16	$H_5N_5$	1866.7	1985.9	2328.3	2220.2	1986.9	 +Isomer
17	$H_4N_6$	1907.7	2026.9	2369.3	2261.2	2027.9	 + Isomer
18	$H_3N_7$	1948.7	2067.9	2410.3	2302.2	2068.9	 +Isomer
19	$H_6N_5$	2028.7	2147.9	2490.3	2382.2	2148.9	
20	$H_5N_6$	2069.8	2189.0	2531.4	2423.3	2190.0	 2x
21	$H_4N_7$	2110.8	2230.0	2572.4	2464.3	2231.0	
22	$H_3N_8$	2151.8	2271.0	2613.4	2505.3	2272.0	
23	$H_5N_7$	2272.8	2392.0	2734.4	2626.3	2393.0	 2x

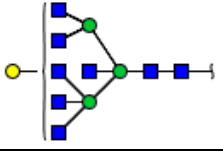
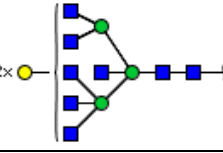
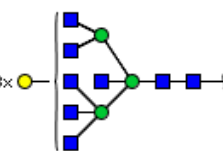
24	H <sub>4</sub> N <sub>8</sub>	2313.9	2433.1	2775.5	2667.4	2434.1	
25	H <sub>5</sub> N <sub>8</sub>	2475.9	2595.1	2937.5	2829.4	2596.1	
26	H <sub>6</sub> N <sub>8</sub>	2638.0	2757.2	3099.6	2991.5	2758.2	

Tabelle 3-II: N-Glykane von Ovalbumin nach Harvey et al. [150], H: Anzahl der Hexoseeinheiten, N: Anzahl der N-Acetylglucosamineinheiten

Da die Glykanstrukturen dieser beiden Proteine bereits ausführlich untersucht wurden und ihre Zusammensetzungen bekannt sind, waren sie ideal für den Vergleich der Derivatisierungsmethoden geeignet.

## II. Massenspektrometrische Methoden

Die Analyse von Glykanen beinhaltet die Untersuchung des intakten Glykoproteins, der Glykopeptide und der freigesetzten Glykane. Anhand der Glykoproteine lässt sich die Gesamtglykosylierung des Proteins bestimmen, dies kann mittels elektrophoretischer Techniken, Massenspektrometrie oder Lektin-basierter Methoden erfolgen. Durch Charakterisierung der Glykopeptide, meist mit Hilfe von Kombinationen aus Chromatographischen Methoden und Massenspektrometrie, lassen sich Informationen über Ort und Häufigkeit der Glykosylierungsstellen des Proteins gewinnen. Der nächste Schritt betrifft die Untersuchung der mittels chemischer oder enzymatischer Methoden abgespaltenen Glykane. Von Interesse sind hier vor allem Art und Zusammensetzung der Monosaccharide sowie deren Verknüpfung [21,151].

Die Analyse der Glykane erfolgt vorwiegend mittels ESI-MS oder MALDI-MS. Beide Ionisierungsmethoden haben sowohl Vorteile als auch Nachteile. Der größte Vorteil der Elektrosprayionisation ist die einfache Kopplung mit flüssigchromatographischen Geräten, die es ermöglicht, die Substanzen vor der Detektion zu trennen. Darüber

hinaus können auch fragile Zucker, wie beispielsweise sialylierte Glykane, unverändert in die Gasphase überführt werden. Nachteile sind jedoch, dass, mit Ausnahme von Nano-LC-ESI-MS-Apparaturen, relativ große Probenmengen benötigt werden. Darüber hinaus ist die Ionisationsfähigkeit nativer Glykane im höheren Massenbereich eher gering. Daher ist die Kopplung an apolare Derivatisierungsreagenzien meist unvermeidbar. Des Weiteren besteht durch die Verbindung mit Ionenfallen- oder Triplequadrupolanalysatoren die Möglichkeit der Fragmentierung der Substanzen. Insbesondere die Ionenfalle hat dabei den Vorteil, dass mehrfach fragmentiert werden kann, so dass die Strukturaufklärung der Glykane wesentlich vereinfacht wird.

Dagegen können mittels MALDI-TOF auch sehr große native Glykane noch effizient ionisiert werden, auch wenn, ebenso wie bei ESI, die Signalintensität bei steigender Masse nachlässt. Die Detektion leicht abspaltbarer Sialinsäuren ist hier dagegen erschwert. Ein weiterer Vorteil des MALDI-TOF-MS ist, dass anhand kleiner Probenmengen schnell eine Übersicht über die freigesetzten Glykanstrukturen eines Glykoproteins gewonnen werden kann. Durch Fragmentierung an MALDI-TOF/TOF-Geräten können auch hier Informationen über die strukturelle Zusammensetzung der Zucker gewonnen werden. Hilfreich dabei ist vor allem die Tatsache, dass Glykane meist als Natriumaddukte ( $[M+Na]^+$ ) vorliegen. Dadurch kommt es während der Fragmentierung verstärkt zur Bildung von Ringspaltungen innerhalb der Glykane. Bei den im ESI erhaltenen protonierten Ionen ( $[M+H]^+$ ), überwiegen dagegen Spaltungen der glykosidischen Bindungen [152–154].

Für die vorliegende Arbeit wurden hauptsächlich MALDI-TOF und MALDI-TOF/TOF zur Analyse der *N*-Glykane von Ribonuclease B und Ovalbumin genutzt. Zum einen sollte der Einfluss der verschiedenen Derivatisierungsreagenzien auf die Detektion des Glykanpools der beiden Proteine erfasst werden. Zum anderen sollten mögliche Veränderungen im Fragmentierungsverhalten der derivatisierten Oligosaccharide beobachtet werden, da anhand der Fragmentierung der Natriumaddukte von Glykanen mittels MALDI-TOF/TOF nicht nur Hinweise auf die Monosaccharid-Zusammensetzung, sondern auch auf deren Verknüpfung gewonnen werden können. Zusätzlich wurden zum Vergleich Spektren mittels ESI-Triplequadrupol-MS aufgenommen.

### 2.2.2. MALDI-TOF-MS von *N*-Glykanen

Im Allgemeinen ist die Derivatisierung von Glykanen zur massenspektrometrischen Analyse nicht zwingend notwendig. Dennoch kann auch hier die Ionisierung der Zucker durch die Kopplung mit geladenen oder leicht protonierbaren Reagenzien verbessert werden, wodurch eine Erhöhung der Intensität erreicht wird.

Verschiedene Derivatisierungsreagenzien wurden schon für diesen Zweck eingesetzt. Beispielsweise zeigten die MALDI-Spektren von Phenylhydrazin (PNH)-derivatisierten *N*-Glykanen einen deutlichen Anstieg der Signalintensität gegenüber den underivatisierten Strukturen [50]. Auch die Derivatisierung der Ovalbumin-Glykane mit BACH und 2-AB führte zu einer Steigerung im Vergleich zu den nativen Glykanen [99]. Dagegen zeigte eine weitere Studie, die den Einfluss von PNH, 2-AB und 1-Phenyl-3-Methyl-5-Pyrazolon (PMP) auf die Ionisierung von Glykanen untersuchte, dass die Erhöhung der Intensität auch stark von der Art des verwendeten Zuckers abhängt [155]. Jedoch konnte auch hier gezeigt werden, dass sämtliche Derivatisierungen eine deutlich verbesserte Detektion mittels MALDI-TOF ermöglichten.

Die hier verwendeten *N*-Glykane von Ribonuclease B und Ovalbumin wurden in Form ihrer INH-, BINH, BACH- und 2-AB-Derivate vermessen. Die erhaltenen Spektren wurden einerseits auf die Vollständigkeit der Derivatisierungsreaktion untersucht, zum anderen erfolgte der Vergleich mit den Spektren der nativen Glykane in Hinblick auf Veränderungen in der Signalintensität.

Dazu wurden die *N*-Glykane enzymatisch mittels PNGase F (siehe Kapitel 1.2.2.1.) von den Proteinen abgespalten und über GlycoClean™S Cartridges gereinigt (Durchführung siehe Kapitel 5.2.1). Die Derivatisierung fand analog dem Reaktionsablauf der kleinen Zucker statt, wurde jedoch aufgrund der geringen Probenmengen im kleineren Maßstab durchgeführt. Als Matrix für die MALDI-Messung wurde zunächst die für die Analyse von Zuckern häufig verwendete 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) gewählt [39]. Auf diese Weise ließen sich von den nativen, sowie den INH- und 2-AB-Derivaten gut interpretierbare Spektren herstellen. Für die Messung der BINH- und BACH-derivatisierten Zucker erwies sich die DHB-Matrix jedoch als ungeeignet, die Signale der Glykane konnten hier nur unzureichend detektiert werden. Alternativ wurden die Messungen unter Verwendung der Matrices Super-DHB und  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure durchgeführt.

Super-DHB ist eine Mischung aus 90 % 2,5-Dihydroxybenzoesäure und 10 % 2-Hydroxy-5-methoxy-benzoesäure (HMB). Reines DHB bildet lange, nadelförmige Kristalle, in denen die Probenmoleküle eingeschlossen werden. Bei der Messung können sich dadurch Schwierigkeiten ergeben probenreiche Spots zu finden, die den Nachweis der Analyten ermöglichen. Durch die Bildung gleichmäßig kleiner Kristalle kann die Detektion hingegen deutlich erleichtert werden. Bei der Zumischung des strukturell ähnlichen HMBs wird dieses in das Kristallgitter des DHBs einlagert, wodurch dessen Ordnung gestört wird. Dies führt zu einer weicheren Desorption und damit zu einer erhöhten Produktion von Analytionen bei Super-DHB [39,81].  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure zeigt ebenfalls eine gleichmäßigere Kristallisation als DHB [156]. Beide Substanzen wurden bereits zur Analyse von Glykanen verwendet und lieferten gute Ergebnisse [81].

Für die BINH- und BACH-Derivate stellte sich Super-DHB als besonders geeignet heraus,  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure dagegen zeigte keine Verbesserung gegenüber der DHB-Matrix. Die nativen Glykane, ebenso wie die INH- und 2-AB-Derivate wurden ebenfalls mit Super-DHB vermessen, jedoch konnte in diesen Fällen nicht die gleiche Qualität wie zuvor mit DHB erreicht werden. Daher wurde für alle weiteren MALDI-TOF-Messungen die DHB-Matrix für native, INH- und 2-AB-Glykane beibehalten, die BINH- und BACH-Spektren wurden dagegen mit Hilfe von Super-DHB aufgenommen.

### I. Ribonuclease B

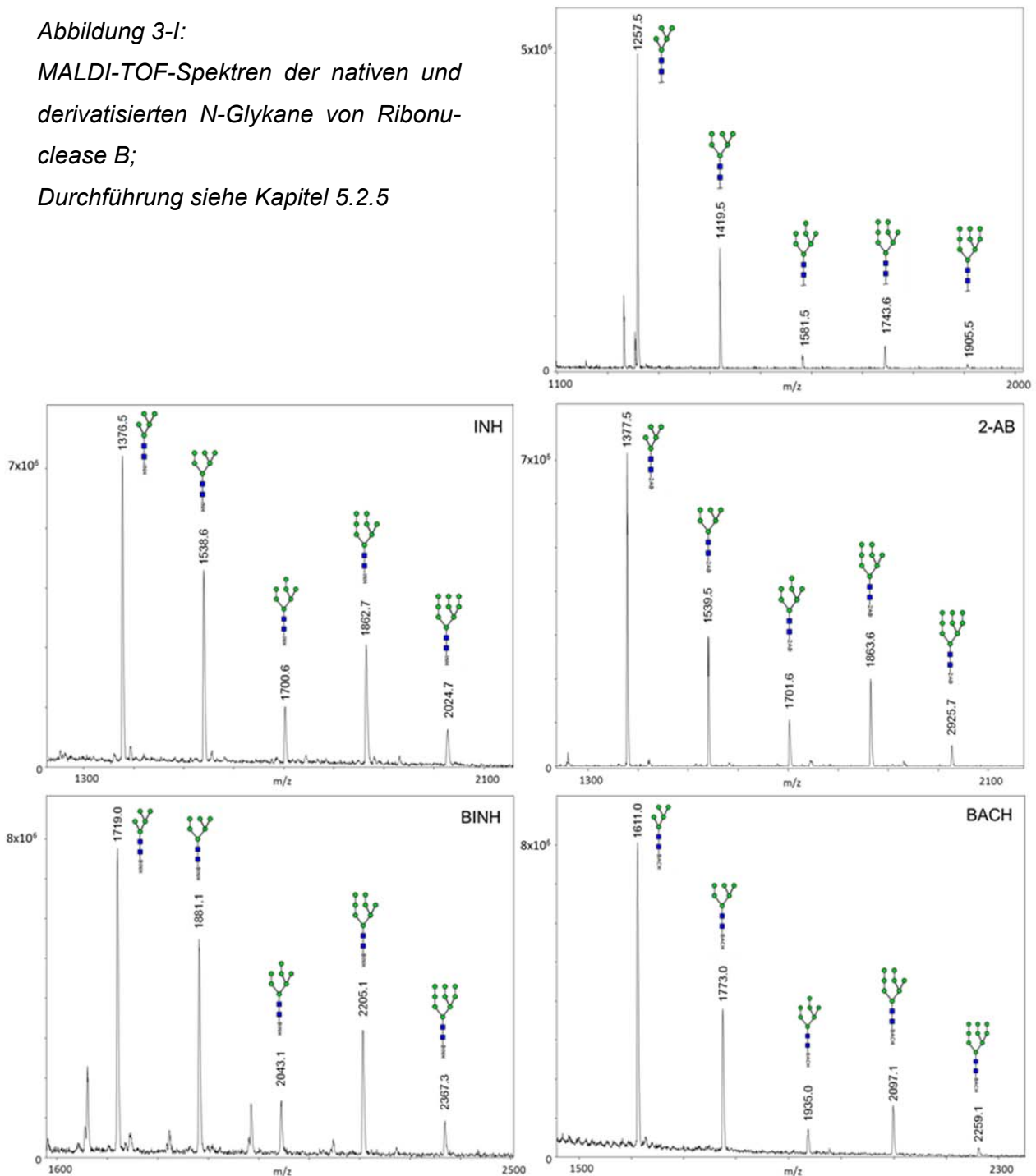
Die Spektren der underivatisierten und derivatisierten *N*-Glykane von Ribonuclease B sind in Abbildung 3-I dargestellt. Analog zur Analyse der kleinen Zucker wurde hier zunächst auf Vollständigkeit der Umsetzung geprüft. Würden die Signale der underivatisierten Zucker auch in den Spektren der Derivate erscheinen, so wäre davon auszugehen, dass die Derivatisierungsreaktion nicht quantitativ abgelaufen ist. Dies war bei keinem der Derivate der Fall, allerdings zeigten sich im Falle des BINH-Reagenzes verschiedene andere Peaks, die jedoch keine regelmäßigen Abstände zu den Glykanen aufwiesen. Daher ist davon auszugehen, dass diese Signale nicht durch eine unvollständige Derivatisierung oder Entstehung von Spaltprodukten herbeigeführt wurden, sondern ebenso wie bei der Derivatisierung der Mono- und

Disaccharide durch Verunreinigungen des Derivatisierungsreagenzes BINH entstanden. Ob die Störpeaks durch dieselben Verunreinigungen verursacht wurden wie bei den kleinen Zuckern konnte nicht geklärt werden, da sich die Messbereiche der verschiedenen Methoden stark unterschieden. Die Fragment-Analyse der Zucker wird durch die Verunreinigungen nicht beeinflusst, für die Lektin-Bindungsstudien jedoch wurden die Zucker im Vorfeld mittels HPLC gereinigt, um unerwünschte Wechselwirkungen zu vermeiden.

Abbildung 3-1:

MALDI-TOF-Spektren der nativen und derivatisierten N-Glykane von Ribonuclease B;

Durchführung siehe Kapitel 5.2.5



Beim Vergleich der Signalintensitäten der nativen Glykane mit denen der Derivate zeigte sich nur eine geringe Steigerung der Gesamtintensitäten durch die Derivatisierungen. Allerdings profitierten die Zucker der höheren Massen mit 7, 8 und 9 Mannoseeinheiten wesentlich stärker von der Kopplung. Waren diese im Spektrum der underivatisierten Zucker nur sehr schwach zu erkennen, so konnte die Intensität durch Derivatisierung mit INH, BINH, BACH und 2-AB um mindestens Faktor 3 gesteigert werden. Besonders stark zeigte sich dieser Effekt in den Spektren von INH und BINH, wo speziell für das Mannose-9-Glykan eine hohe Intensitätszunahme zu verzeichnen war.

## II. Ovalbumin

Bei Vermessung der underivatisierten Glykane (Abb. 3-II) von Ovalbumin konnten 22 der 26 Strukturen detektiert werden, wobei die Intensitäten einzelner Zucker, wie beispielsweise  $m/z$  1581.7 oder  $m/z$  2028.8, sehr gering waren. Die Gesamtintensität hingegen war im Vergleich zu den Derivaten, wie auch schon bei den Glykanen der Ribonuclease B, nur unwesentlich schwächer.

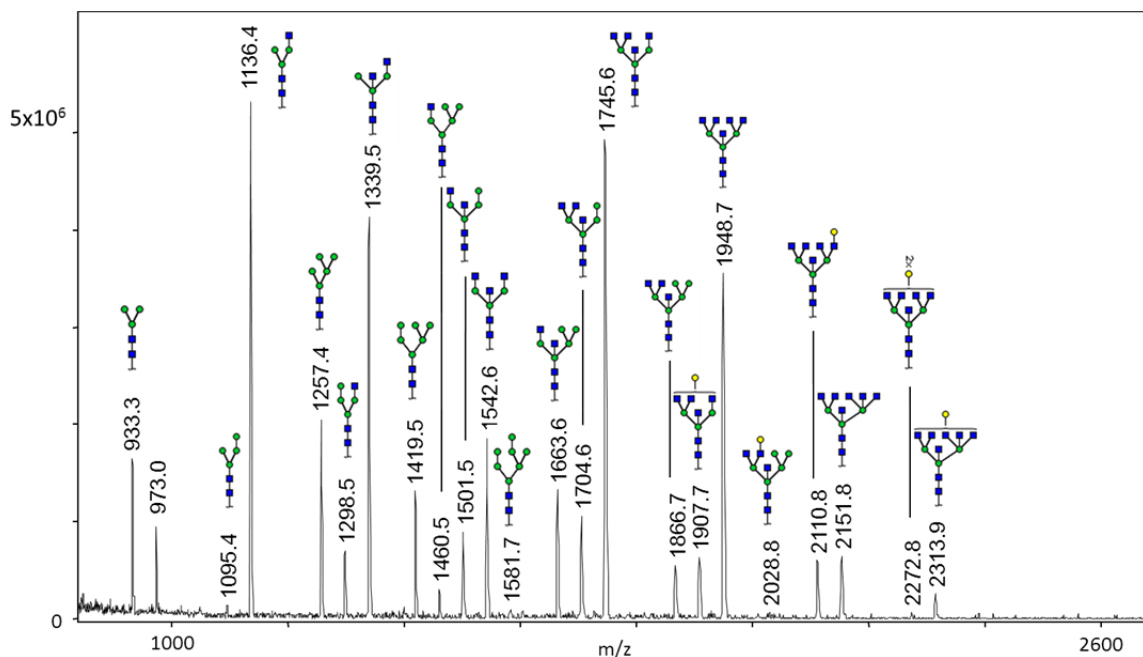


Abbildung 3-II: MALDI-TOF-Spektrum der underivatisierten N-Glykane des Ovalbumins



Ausgehend von der Tatsache, dass das Glykan der Masse  $m/z$  2028.8 das größte dem Ovalbumin zuzuordnende Kohlenhydrat ist [150], liegt die Vermutung nahe, dass auch die für die vorliegende Arbeit verwendete Ovalbuminprobe weitere Glykoproteine als Co-Isolate enthält. Da jedoch Detektions- und Fragmentierungsverhalten der Glykane im Vordergrund stand und nicht deren Herkunft, wurden die Spektren ausgehend von Tabelle 3-II interpretiert. Diese enthält sowohl die Glykane des Ovalbumins, als auch die am häufigsten vorkommenden Glykane der Co-Isolate.

Nach Aufnahme der Spektren der verschiedenen Derivate wurde erneut auf Vollständigkeit der Derivatisierungsreaktion geprüft. Es zeigten sich auch hier keinerlei Hinweise auf Reste von underivatisierten Zuckern. Im Unterschied zu den INH-Derivaten traten bei den Biotinylierungsreagenzien, insbesondere in den Spektren der BINH-Glykane eine Reihe von nicht zuzuordnenden Massen auf. Bereits von den Glykanen der Ribonuclease war bekannt, dass bei BINH zusätzliche Signale auftreten, die jedoch nicht in direktem Zusammenhang mit den Zuckerstrukturen stehen. Eine andere mögliche Erklärung für diese Tatsache wäre, dass die in dem Derivatisierungsreagenz vorhandenen Verunreinigungen ebenfalls teilweise in der Lage waren, mit den Zuckern zu reagieren. Dagegen spricht, dass bei der Derivatisierung der kleinen Zucker keine diesbezüglichen Massen gefunden wurden. Es ist unklar, wodurch die Störsignale im Spektrum der BACH-Derivate ausgebildet wurden, jedoch zeigten sich diese nur im niedrigeren Massenbereich und waren daher wahrscheinlich nicht durch den Derivatisierungsvorgang verursacht.

Wie bereits bei Ribonuclease B erwähnt, kam es durch die Kopplung mit den verschiedenen Reagenzien auch bei Ovalbumin zu einer Intensitätserhöhung der zuvor nur schwach detektierbaren Glykane, vor allem im höheren Massenbereich. Als Beispiel ist hier das im Spektrum der nativen Zucker bei einer Masse von  $m/z$  2313.9 erscheinende Komplexglykan zu nennen, dessen Signalstärke nach Derivatisierung deutlich erhöht ist (INH:  $m/z$  2432.9; BINH:  $m/z$  2775.4; BACH:  $m/z$  2667.4, 2-AB:  $m/z$  2434). Zudem konnten, im Vergleich zu den underivatisierten Glykanen, drei zusätzliche Zuckerstrukturen erfasst werden. Diese wurden in Abbildung 3-III/ 3-IV mittels eines roten Sterns markiert, es handelt sich dabei um ein Hybridglykan, sowie zwei Komplexglykane. Damit wurden mit Hilfe der Derivatisierungen 25 der 26 vorhandenen Glykane detektiert.

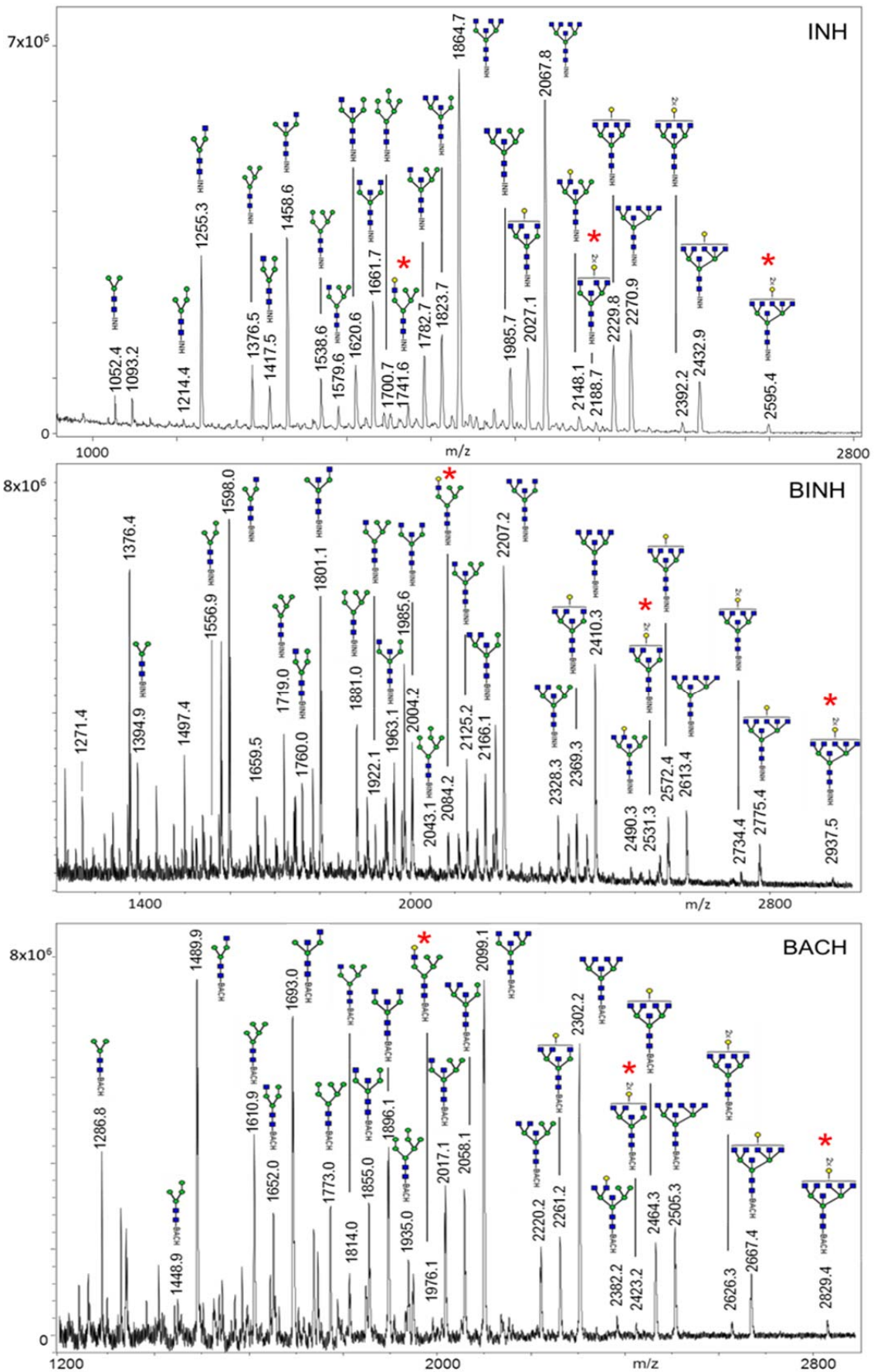


Abbildung 3-III: Spektren der INH, BINH und BACH Derivate von Ovalbumin, die zusätzlich gefundenen Glykane sind durch Sternchen gekennzeichnet

Daraus folgt, dass durch die Derivatisierungen die Sensitivität der Messungen deutlich gesteigert wurde. Auf Seiten der Ribonuclease-B-Glykane führte dies dazu, dass die bei den nativen Zuckern schlecht detektierbaren Strukturen der Mannose-7, Mannose-8 und Mannose-9-Glykane hervorgehoben wurden. Bei den Glykanen des Ovalbumins äußerte sich die erhöhte Empfindlichkeit sowohl in der Intensivierung niedriger Signale, als auch in der Detektion dreier zusätzlicher Strukturen. Des Weiteren ließ sich bestätigen, dass die Derivatisierungsmethode auch hier zu einer quantitativen Umsetzung der *N*-Glykane in ihre entsprechenden Derivate führte, unabhängig von deren strukturellem Aufbau.

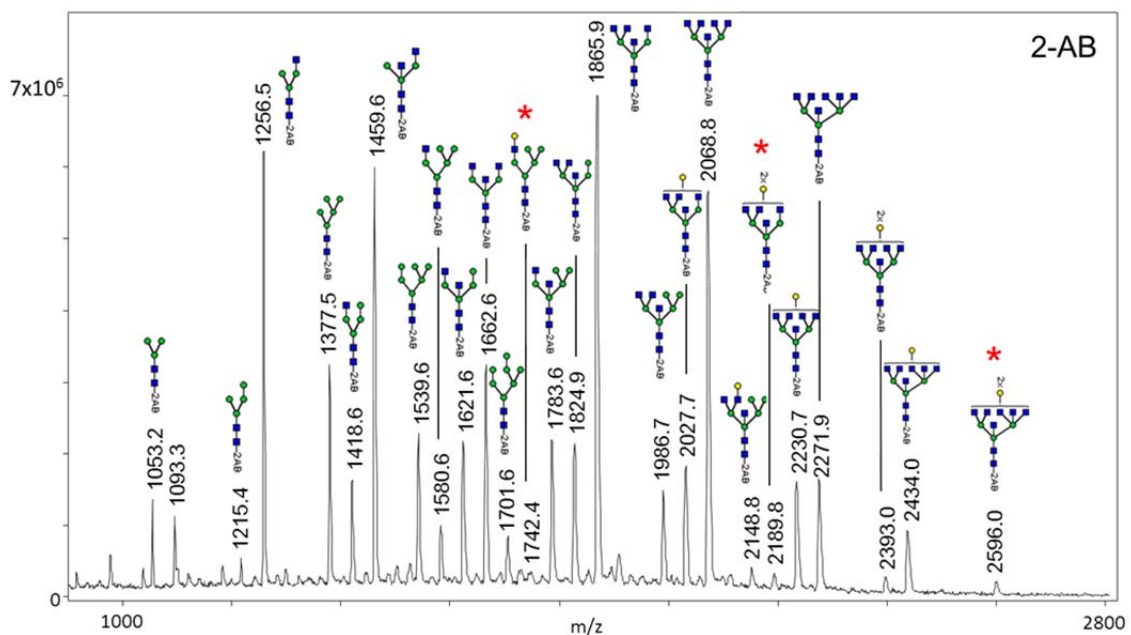


Abbildung 3-IV: *N*-Glykane des Ovalbumins nach 2-AB-Derivatisierung

## 2.2.3. Fragmentierung von *N*-Glykanen

### 2.2.3.1. Hintergründe

Durch die Fragmentierung von Glykanstrukturen können Informationen über deren Zusammensetzung erlangt werden. Es treten zwei Arten von Spaltungen auf, zum einen die der glykosidischen Bindungen zwischen den einzelnen Monosacchariden, zum anderen Ringspaltungen in den nichtreduzierenden Zuckern des Glykans. Die am häufigsten auftretenden Fragmente entstehen durch glykosidische Spaltungen, anhand deren Monosaccharidsequenz und Verzweigungen bestimmt werden. Mit Hilfe der Ringspaltungen können dagegen auch Hinweise auf die Verknüpfungsstellen der Monosaccharide gewonnen werden [157].

Wie bereits erwähnt, hängt das Vorkommen der verschiedenen Spaltungen von der Art des fragmentierten Ions ab. Protonierte Ionen  $[M+H]^+$  neigen hauptsächlich zur Bildung glykosidischer Fragmente (Y- und Z-, bzw. B- und C-Spaltungen), während es bei Natriumaddukten  $[M+Na]^+$  zusätzlich zu Spaltungen der Zuckerringe kommen kann. Ebenso spielen die Größe und Verzweigungen des Moleküls eine Rolle. Umso größer die zu fragmentierenden Oligosaccharide sind, umso geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass Ringspaltungen auftreten [152].

In Bezug auf den Informationsgehalt sind auch bei den glykosidischen Spaltungen Unterschiede vorhanden. Meist dominieren, nach der Nomenklatur von *Domon und Costello* [92] benannte, B- und Y-Spaltungen die Fragmentspektren der Glykane. Von besonderem Interesse sind dabei vor allem die Y-Fragmente, da diese detaillierte Hinweise auf die Sequenz des Glykans geben. Mit Hilfe von Derivatisierungen am reduzierenden Ende kann die Bildung von Y-Ionen erleichtert werden, da durch die Reagenzien eine Ladung des Moleküls und somit seine Detektion gewährleistet wird [157]. Ein weiteres diagnostisches Fragment, das die Zusammensetzung der an der Core-Mannose in Position 6 befindlichen Antenne wiedergibt, ist das sogenannte D-Ion. Es entsteht im positiven Messmodus durch B/Y-Spaltung, beziehungsweise im negativen Modus durch C-/Z-Abspaltungen, der 3'-Antenne, sowie der beiden *N*-Acetylglucosamineinheiten der Grundstruktur des Glykans (Abb. 3-V) [153,154]. Durch die Massendifferenz, die durch Abspaltung der 3'Antenne entsteht, lassen sich gleichzeitig Informationen über deren Zusammensetzung gewinnen [39]. Auch zusätzliche *N*-Acetylglucosamineinheiten an der Core-Struktur (*bisecting Glycans*), wie sie

bei Hybrid- und Komplexglykanen vorkommen, können mit Hilfe des D-Ions identifiziert werden.

Die Fragmentierungswege, die zur Entstehung der glykosidischen Spaltungen führen, gleichen denen der kleineren Oligosaccharide. Durch den Zusatz von Natriumionen kann auch bei ESI-MS die Bildung von Natriumaddukten provoziert und damit eine Veränderung im Fragmentierungsverhalten herbeigeführt werden.

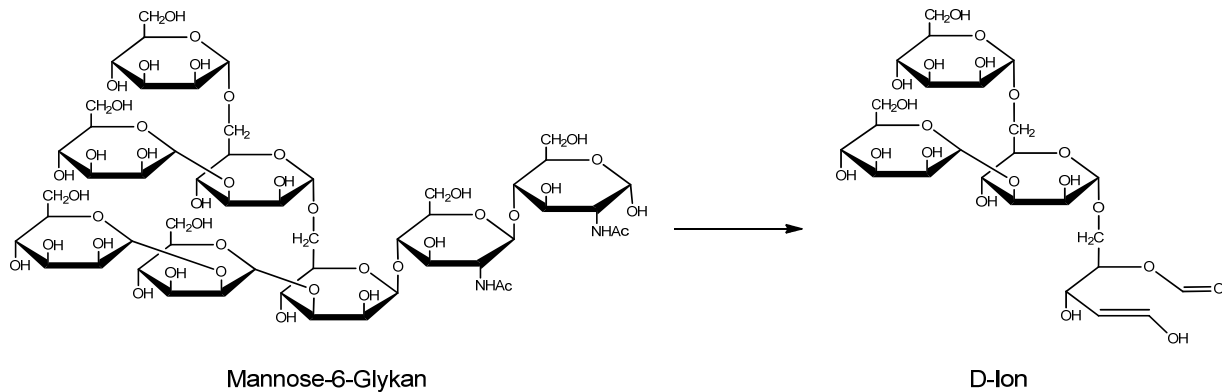
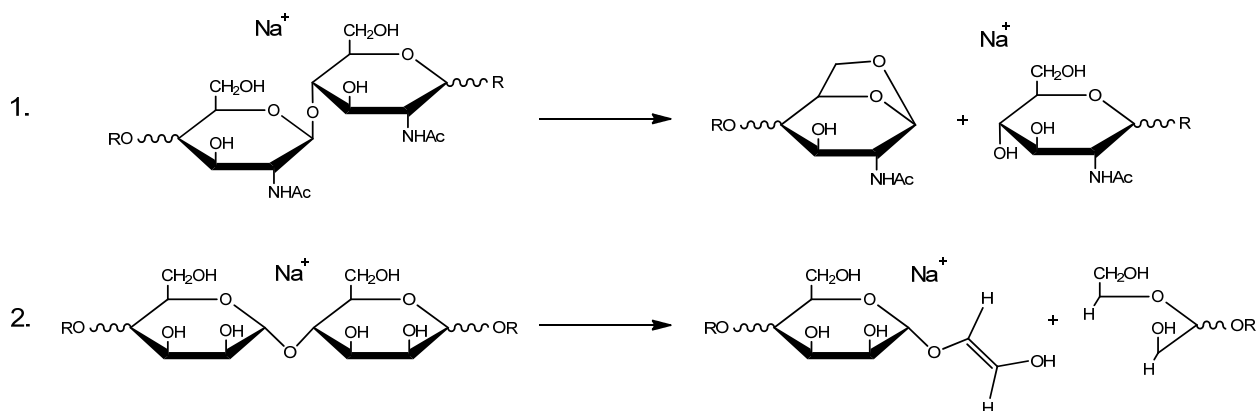


Abbildung 3-V: Entstehung des D-Ions eines High-Mannose-Glykans [153,154]

Die in den Spektren der  $[M+Na]^+$ -Ionen am häufigsten vorkommenden Ringspaltungen sind A-Fragmente, diese haben jedoch im Vergleich zu den glykosidischen Fragmenten eine relativ geringe Intensität. Beim Einsatz von höheren Fragmentierungsenergien erhöht sich außerdem die Häufigkeit von X-Spaltungen in den Monosaccharidringen des Glykans. Grundlegend für die veränderten Fragmentierungseigenschaften ist die Bildung eines stabilen Komplexes aus Natriumionen und Kohlenhydraten. Dadurch wird zum einen die Wahrscheinlichkeit zur Bildung mehrfachgeladener Ionen stark verringert, zum anderen werden auch Umlagerungen (siehe Kapitel 1.3.2) glykaninterner Monosaccharide verhindert [140,160]. Zudem werden die Zuckermoleküle durch die Interaktion der Natriumionen mit den zahlreichen in der Glykanstruktur enthaltenen Sauerstoffmolekülen stabilisiert. Dies wirkt sich auch auf die Fragmentierung der Glykane aus, so werden beispielsweise (1 → 6)-verknüpfte Monosaccharide weniger schnell gespalten, als die an anderen Positionen verknüpften. Dies hängt mit der höheren Flexibilität dieser Bindung zusammen, die eine stärkere Wechselwirkung mit dem Natriumion ermöglicht [140].

Am aussagekräftigsten sind Ringspaltungen, die in den Mannoseeinheiten der Core-Struktur auftreten und damit die Zusammensetzung und Verlinkung der Antennen anzeigen. Die Häufigkeit solcher Spaltungen hängt, bei Messung mittels MALDI,

nicht nur von der Wahl der Matrix, sondern auch von der für die Fragmentierung eingesetzten Energie ab.



*Abbildung 3-VI: Vorgeschlagene Fragmentierungswege der Natriumaddukte von Glykanen;  
 1.: glykosidische Spaltung zweier N-Acetylglucosamineinheiten zum Y-Fragment;  
 2.: Ringspaltung zweier Mannoseeinheiten zum <sup>2,4</sup>A-Fragment [90,140]*

Die Analyse von nativen, neutralen Glykanen erfolgt nahezu ausschließlich im positiven Modus, da diese im Negativen, im Gegensatz zu sialinsäurehaltigen Kohlenhydraten, nur schwer zu detektieren sind. Bei der Fragmentierung im negativen Modus dagegen zeigen sich oft Unterschiede in Bezug auf Art und Häufigkeit der Spaltungen. Insbesondere die Häufigkeit von A-Spaltungen nimmt stark zu, was dazu führt, dass die Identifizierung von Glykanen vereinfacht wird [39,152].

Auch der Einsatz von Derivatisierungsreagenzien soll die Fragmentierungseigenschaften von Glykanen beeinflussen. Nach Permethylierung oder Peracetylierung der Hydroxygruppen des Zuckers entstehen spezifische Fragmente, durch die sich Sequenz und Verknüpfung eines Kohlenhydrates bestimmen lassen (siehe Kapitel 1.2.3.1). Nachteile dieser Methode liegen in den relativ großen benötigten Probenmengen, die zudem eine hohe Reinheit aufweisen müssen, um eine vollständige Methylierung zu gewährleisten [152]. Derivatisierungen am reduzierenden Ende bewirken ebenfalls Veränderungen im Fragmentierungsmuster, sowohl bei ESI-MS/MS-, als auch bei MALDI-TOF/TOF-Anwendungen. Vergleiche zwischen Phenylhydrazin-, Phenylmethylpyrazolon- (PMP) und 2-AB-derivatisierten Glykanen ergaben, dass durch die Kopplung mit Phenylhydrazin die aussagekräftigsten Fragmentspektren erhalten werden konnten. Nur bei der Spaltung von High-Mannose-Glykanen konnten mit den 2-AB-Derivaten ähnlich gute Ergebnisse erzielt werden [155]. Eine weitere

Untersuchung kam zu dem Ergebnis, dass die Derivatisierung am reduzierenden Ende nur wenig Einfluss auf die Fragmentierung hat, wobei auch hier die Umsetzung mit 3-Aminoquinolin zur effektiven Identifizierung von Glykanen genutzt werden konnte [161].

### 2.2.3.2. Fragmentierung von Glykanen mittels ESI-Tripelquadrupol

Die Analyse der BACH-Derivate von Ribonuclease B und Ovalbumin wurden zunächst mittels ESI-MS und ESI-MS-MS durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 1.3.1.1 beschrieben, können durch die drei linear in Reihe geschalteten Quadrupole eines Triplequad-Massenspektrometers Fragmentierungsexperimente durchgeführt werden. Dabei sind die folgenden vier Messmodi möglich, die jeweils zu unterschiedlichen Informationen bezüglich der untersuchten Probe führen [78,162] (Abbildungen adaptiert nach Domon et al [162]).

#### I. Product-Ion-Scan

Bei dieser Anwendung wird der erste Quadrupol (Q1) so eingestellt, dass nur Ionen einer bestimmten Masse passieren können. Alle anderen in der Probe vorhandenen Ionen werden zu den Stäben hin abgelenkt und entladen. Die selektierten Massen werden in der Kollisionszelle (CID) fragmentiert und anschließend im dritten Quadrupol (Q3) gescannt. Dadurch ergibt sich das Fragmentspektrum einer bestimmten Masse, das zur Untersuchung der Struktur des Moleküls genutzt werden kann.



#### II: Precursor-Ion-Scan

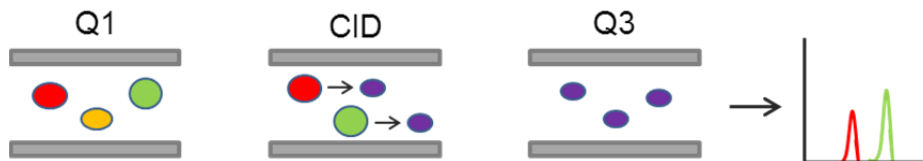
Hier wird Q3 so ausgerichtet, dass nur Fragmente einer bestimmten Masse aus der Kollisionszelle zum Detektor gelangen. Gleichzeitig erfasst Q1 alle Ionen, aus denen diese speziellen Fragmente erzeugt werden. Diese Methode dient dazu, eine Substanzmischung nach Molekülen mit bestimmten Gruppen zu durchsuchen. Beispiels-

weise können *N*-Glykane über die Abspaltung einer *N*-Acetylglucosamineinheit ( $m/z$  204) detektiert werden.



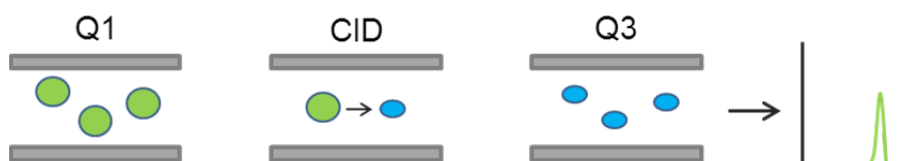
### III: Neutral-Loss-Scan

Der Neutral-Loss-Scan dient der Auffindung von Molekülen, die durch die Fragmentierung bestimmte ungeladene Gruppen abspalten. Dafür wird Q3 um die Differenz des Neutralteilchens niedriger eingestellt als Q1. Dann werden analog zum Precursor-Ion-Scan durch Q1 alle Ionen aus der Probe herausgefiltert, die nach Fragmentierung in der Kollisionszelle um die entsprechende Masse verringert sind. Auf diese Weise lassen sich Moleküle mit kleinen, leicht abspaltbaren funktionellen Gruppen detektieren, wie etwa phosphorylierte Peptide.



### IV: Multiple-Reaction-Monitoring

Diese Einstellung wird meist für die Quantifizierung von Substanzen mit charakteristischem Fragmentierungsmuster verwendet. Dabei sind sowohl Q1, als auch Q3 auf eine bestimmte Masse eingestellt - die des Vorläuferions, sowie die des daraus entstehenden Fragments. Während der Messung wird die Häufigkeit der Übergänge von einer Masse zur anderen chromatographisch aufgetragen, wodurch eine hohe Spezifität und Sensitivität erreicht wird.





Für die Analyse von *N*-Glykanen eignen sich vor allem die beiden ersten Methoden. Mittels Precursor-Ion-Scan wird Aufschluss über die Anwesenheit und Menge von Zuckerstrukturen an einem Protein gewonnen. Dazu erfolgt zunächst ein enzymatischer oder chemischer Verdau des Proteins, der zu einer Mischung von Peptiden und Glykopeptiden führt und/oder zur Abspaltung der Glykane von der Proteinoberfläche. Als diagnostische Ionen werden hauptsächlich die Massen  $m/z$  204 (Masse einer Hexosamineinheit),  $m/z$  163 (Masse einer Hexose),  $m/z$  292 (Masse einer Sialinsäure), oder  $m/z$  366 (Masse einer Hexose-Hexosamin-Einheit) verwendet. Dabei treten die Fragmente der Massen  $m/z$  204 und  $m/z$  366 bei fast allen Typen von *N*- und *O*-Glykanen auf und erlauben daher eine relativ unspezifische Bestimmung der vorhandenen Kohlenhydratstrukturen. Dies lässt sich dadurch begründen, dass die Fragmente nicht zwangsläufig aus endständigen Gruppen gebildet werden, sondern auch durch Spaltungen in der Grundstruktur des Glykans entstehen können [163]. Generell werden für die Erstellung von Precursor-Ion-Spektren höhere Energien zur Fragmentierung eingesetzt, als für die anderen Methoden, um sicherzustellen, dass ausreichend kleine, detektierbare Fragmente entstehen [164].

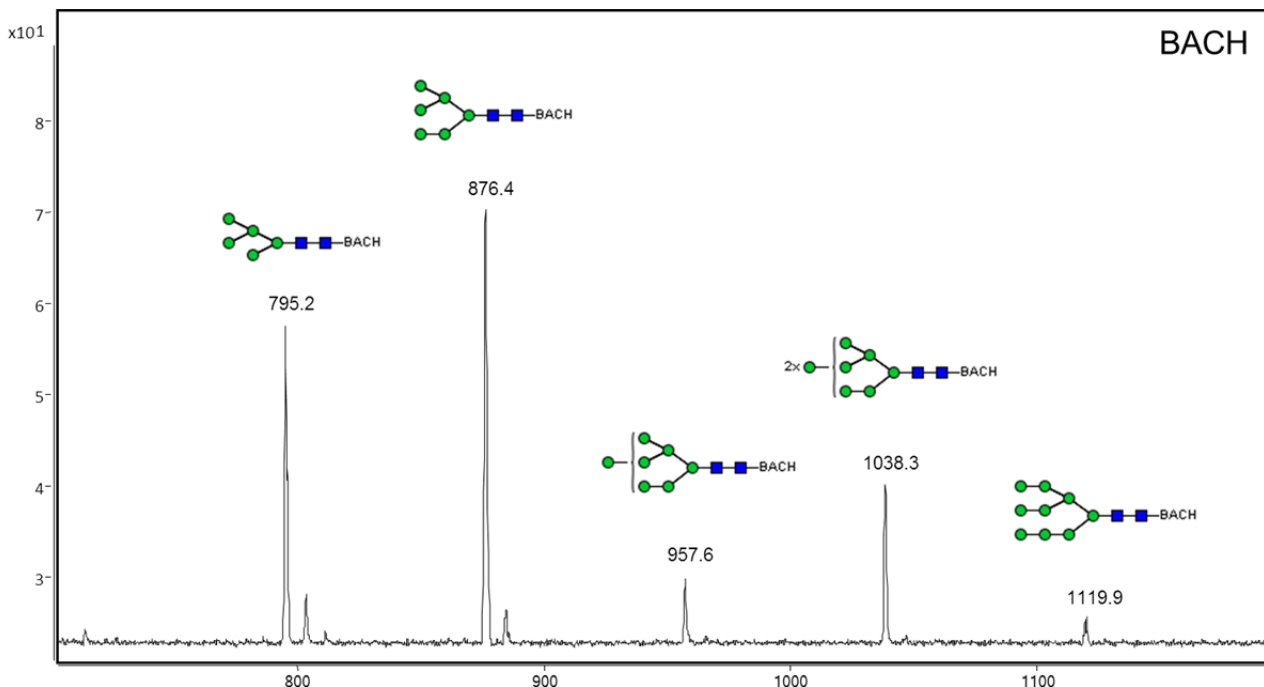


Abbildung 3-VII: Precursor-Ion-Spektrum der Masse  $m/z$  163 der BACH-derivatisierten Glykane von Ribonuclease B, detektiert als  $[M+H]^{2+}$ , adaptiert nach Bank et al. [143]

Abbildung 3-VII zeigt die BACH-derivatisierten Glykane von Ribonuclease B, die mittels Precursor-Ion-Scan der Masse  $m/z$  163 ermittelt wurden. Das Hexose-Fragment eignet sich besonders zum Nachweis von High-Mannose-Glykanen, da diese, aufgrund ihrer Struktur, einen hohen Anteil dieses Fragmentes bilden. Die Messung wurde bei drei verschiedenen Kollisionsenergien im Bereich zwischen 15 V und 50 V durchgeführt, wobei die besten Ergebnisse bei 15 V erzielt wurden.

Alle fünf *N*-Glykan-Derivate der Ribonuclease B wurden in Form ihrer  $[M+H]^{2+}$ -Ionen detektiert. Das Auftreten von Mehrfachladungen bei der ESI-MS hängt von der Größe des ionisierten Moleküls ab, bei Proteinen geht man von etwa einer Ladungszunahme pro 1000 Da Massenzunahme aus [79]. Im Gegensatz zu den MALDI-TOF-Spektren der BACH-Derivate von Ribonuclease B (Abb. 3-I), ist die Intensität des Mannose-5-Glykans hier geringer als die des Mannose-6-Glykans. Aller Wahrscheinlichkeit nach ist dies auf die Art der Messung zurückzuführen, da bisherige Untersuchungen von Ribonuclease B stets das Mannose-5-Glykan als den am häufigsten vertretenen Zucker angaben [145]. Da dieser Zucker weniger Mannoseeinheiten hat, als die anderen in diesem Protein vertretenen Glykane, ist es möglich, dass dadurch während der Fragmentierung auch weniger spezifische Fragmente für den Precursor-Ion-Scan entstehen.

Der nächste Schritt zur Identifizierung der im Protein vorhandenen Glykane ist die Fragmentierung mittels Product-Ion-Scan. Dazu werden die vorher im Precursor-Ion-Scan detektierten Glykanstrukturen fragmentiert, um detailliertere Informationen über ihre Struktur zu gewinnen. In Abbildung 3-VIII ist das Produkt-Ionen-Spektrum des Mannose-6-Glykans bei  $m/z$  876.4 zu sehen. Die Fragmente erschienen sowohl als einfach, als auch als zweifach geladene Ionen. Auffällig war, dass vor allem die Fragmente, die noch das Derivatisierungsreagenz BACH enthielten, in Form von doppelt geladenen Signalen auftraten.

Anhand des Fragmentierungsmusters lässt sich klar erkennen, welche Art von Glykan zugrunde liegt. Die doppelt-geladenen Y-Fragmente (Nomenklatur siehe Abb. 1-XVI) im Abstand von 81 Da zeigen ausschließlich den Abbau der Antennen des Zuckers, bei den einfach-geladenen Ionen kam es sowohl zur Abspaltung des Derivatisierungsreagenzes und einer *N*-Acetylglucosamineinheit ( $B_5/B_4$ -Spaltungen), als auch zur Abspaltung der Mannoseeinheiten der Antennen. Vereinzelt traten auch C- ( $m/z$  1032.1), und X-Spaltungen ( $m/z$  761.0) der Corestruktur des Glykans auf.

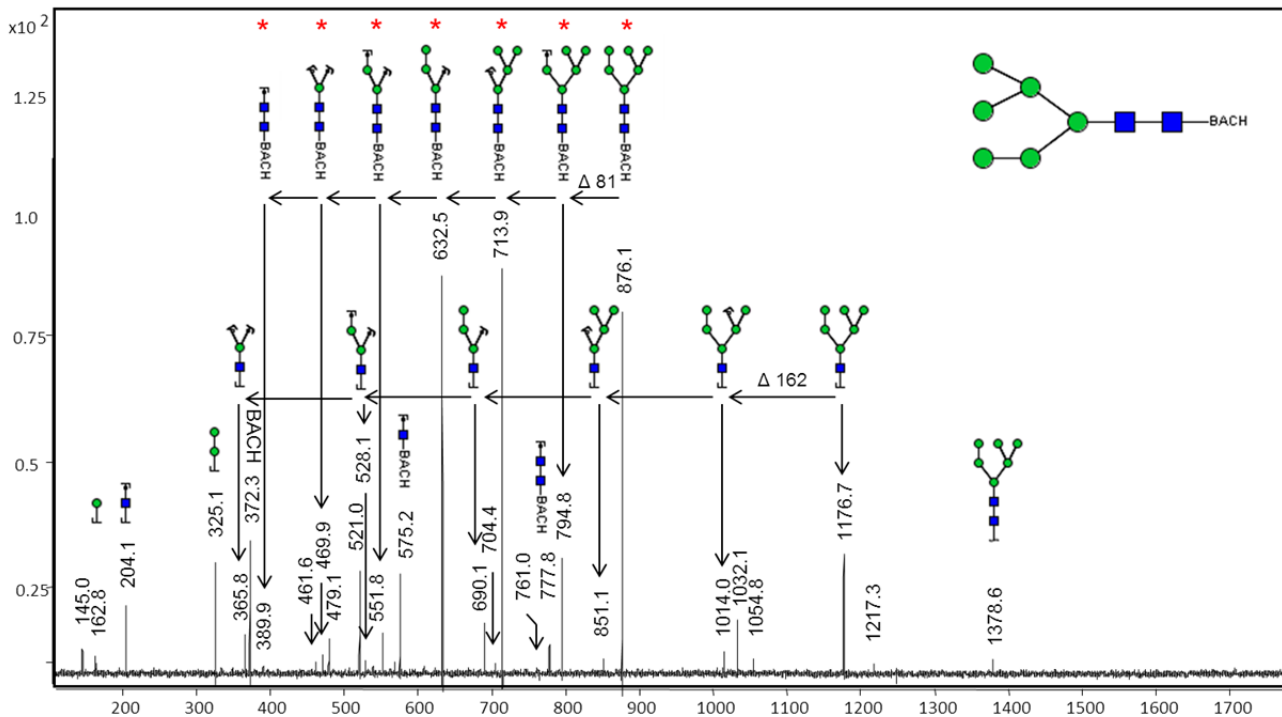


Abbildung 3-VIII: Product-Ion-Spektrum des BACH-derivatisierten Mannose-6-Glykans ( $m/z$  876.4) der Ribonuclease; doppelt geladene Fragmente sind mit Sternchen gekennzeichnet, adaptiert nach Bank et al. [143]

Da sich der Fragmentierungsverlauf der High-Mannose-Glykane untereinander nur wenig unterscheidet, wurde zusätzlich das ebenfalls BACH-derivatisierte Standardglykan NA2 vermessen.

Dieses Komplex-Glykan besitzt zwei Antennen, die jeweils mit Galactose-*N*-Acetylglucosamin-Einheiten besetzt sind. Ein charakteristisches Merkmal dieser Strukturen ist, dass im Verlaufe einer Fragmentierung diese Galactose-*N*-Acetylglucosamin-Einheiten meist gemeinsam abgespalten werden [165]. Im Produkt-Ionen-Spektrum von NA2 (Abb. 3-IX) zeigten sich daher keine  $Y_5$ -Fragmente, die die alleinige Abspaltung von Galactose anzeigen würden, sondern bei  $m/z$  1264.0 und  $m/z$  1630.0 die entsprechenden  $Y_4$ -Spaltungen. Auch die  $B_4$  und  $B_5$ -Fragmente ( $m/z$  731.0,  $m/z$  851.7,  $m/z$  893.1,  $m/z$  1054.5) wiesen in den Antennen die spezifischen Spaltungen auf. Ebenfalls kennzeichnend für die Anwesenheit von *N*-Acetylhexosamin-Gruppen in den Antennen ist das Signal der Masse  $m/z$  366.2, welches durch die Abspaltung des *N*-Acetylhexosamins in Verbindung mit einer Hexose, wie hier Galactose oder Mannose, entsteht [165]. Im Gegensatz zum Fragmentspektrum des High-Mannose-Glykans traten bei NA2, trotz vergleichbarer Masse, ausnahmslos einfach geladene Ionen auf.

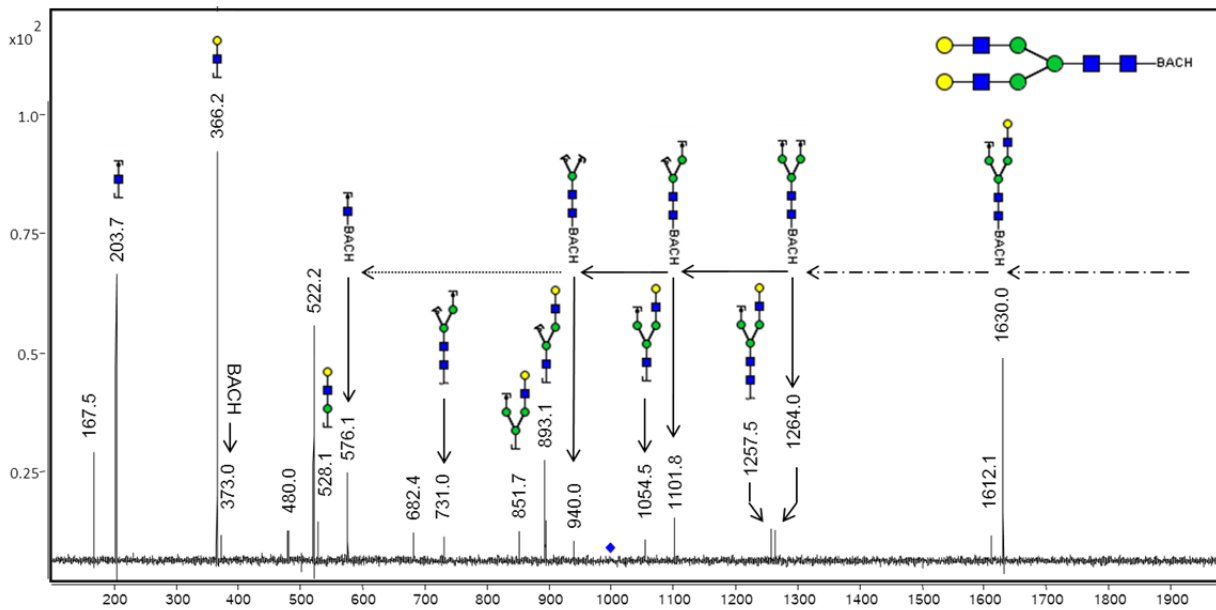


Abbildung 3-IX: Fragmentspektrum eines Standard-Komplex-Glykans ( $m/z$  998.3), adaptiert nach Bank et al. [143]

Abschließend lässt sich sagen, dass die Fragmentierung mittels ESI-Triplequadrupol sowohl zu aufschlussreichen Precursor-, als auch Product-Ion-Spektren geführt hat. Mittels Detektion des Mannosefragments bei  $m/z$  163 konnten sämtliche BACH-derivatisierten Glykane von Ribonuclease B nachgewiesen werden.

Die Fragmentierung der Glykane führte fast ausnahmslos zu Spaltungen der glykosidischen Bindungen. Ein Großteil der entstandenen Fragmente war dabei auf informationsreichere Y-Spaltungen zurückzuführen. Dadurch konnten Art und Zusammensetzung der Glykane bestätigt werden. Es konnten allerdings weder Ringspaltungen innerhalb der Glykane detektiert werden, noch kam es zur Bildung von D-Ionen. Deshalb wurde ein direkter Vergleich der BACH-Derivate mit den INH, BINH und 2-AB-Derivaten, sowie den underivatisierten Zuckern mittels MALDI-TOF-TOF durchgeführt. Dies hatte zum einen den Grund, dass durch die Fragmentierung von Natrium-Glykan-Addukten die Wahrscheinlichkeit von Ringspaltungen innerhalb der Monosaccharideinheiten steigt. Folglich erhöht sich der Informationsgehalt der Spektren in Bezug auf Verzweigungen und Verknüpfungsstellen der Glykane. Zum anderen wird die Analyse der Glykane mit Hilfe des MALDI-TOF/TOF dadurch vereinfacht, dass nur geringe Probenmengen zur Analyse benötigt werden.

### 2.2.3.3. Fragmentierung mittels MALDI-TOF/TOF

Die Fragmentierung von Molekülen am MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometer erfolgte mittels Laser-induced-dissociation (LID). Dafür wird die Laserenergie nach Ermittlung der Precursor-Ionen erhöht, was zum verstärkten Zerfall der Moleküle führt. Die benötigte Laserstärke hängt zusätzlich von der Art der verwendeten Matrix ab. Sogenannte „cool matrices“ wie DHB erreichen eine hohe Geschwindigkeit durch den Laserbeschuss, wodurch die Wahrscheinlichkeit von Kollisionen zwischen den Molekülen geringer ist als bei „hot matrices“, wie  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxymethylsäure, die eine geringere Geschwindigkeit erlangen und somit mehr Fragmentationen produzieren [89,166]. Im Vergleich zur ESI-MS verläuft die Fragmentierung der Glykane mittels MALDI-TOF/TOF von einfach geladenen Natriumaddukten zu ebenfalls als Natriumionen vorliegenden Fragmenten. Dadurch steigt auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Spaltungen innerhalb der Zuckerringe. Die am häufigsten auftretenden Ringspaltungen sind die, speziell für die (1  $\rightarrow$  4)-verknüpften Monosaccharide typischen,  $^{0,2}$ A-Spaltungen. Von besonderem Interesse sind die  $^{3,5}$ A- und  $^{0,4}$ A-Spaltungen der Core-Mannose. Da dieses Monosaccharid mit den Antennen des Glykans besetzt ist, können durch diese Ringspaltungen, ähnlich wie durch Detektion des D-Ions, nützliche Hinweise in Bezug auf deren Aufbau gewonnen werden [39].

#### I. High-Mannose-Glykane

Die Fragmentierung am MALDI-TOF/TOF wurde zunächst mit den Glykanen der Ribonuclease B durchgeführt. Anhand des Vergleichs der verschiedenen Derivate (underivatisiert, INH, BINH, BACH und 2-AB) der Mannose-6-Glykane wurden die Fragmentierungsmuster, sowie deren potentielle Unterschiede untersucht. Da das High-Mannose-Glykan im Gegensatz zu anderen in der Ribonuclease B vorhandenen Glykanen keine isomeren Strukturen aufweist, können Abhängigkeiten von Intensität und Verteilung der Spaltprodukte von verschiedenen räumlichen Strukturen ausgeschlossen werden. Darüber hinaus erwiesen sich die Strukturen der höheren Massen als ungeeignet, da aufgrund der geringeren Intensität nicht von allen Derivaten aussagekräftige Spektren aufgenommen werden konnten.

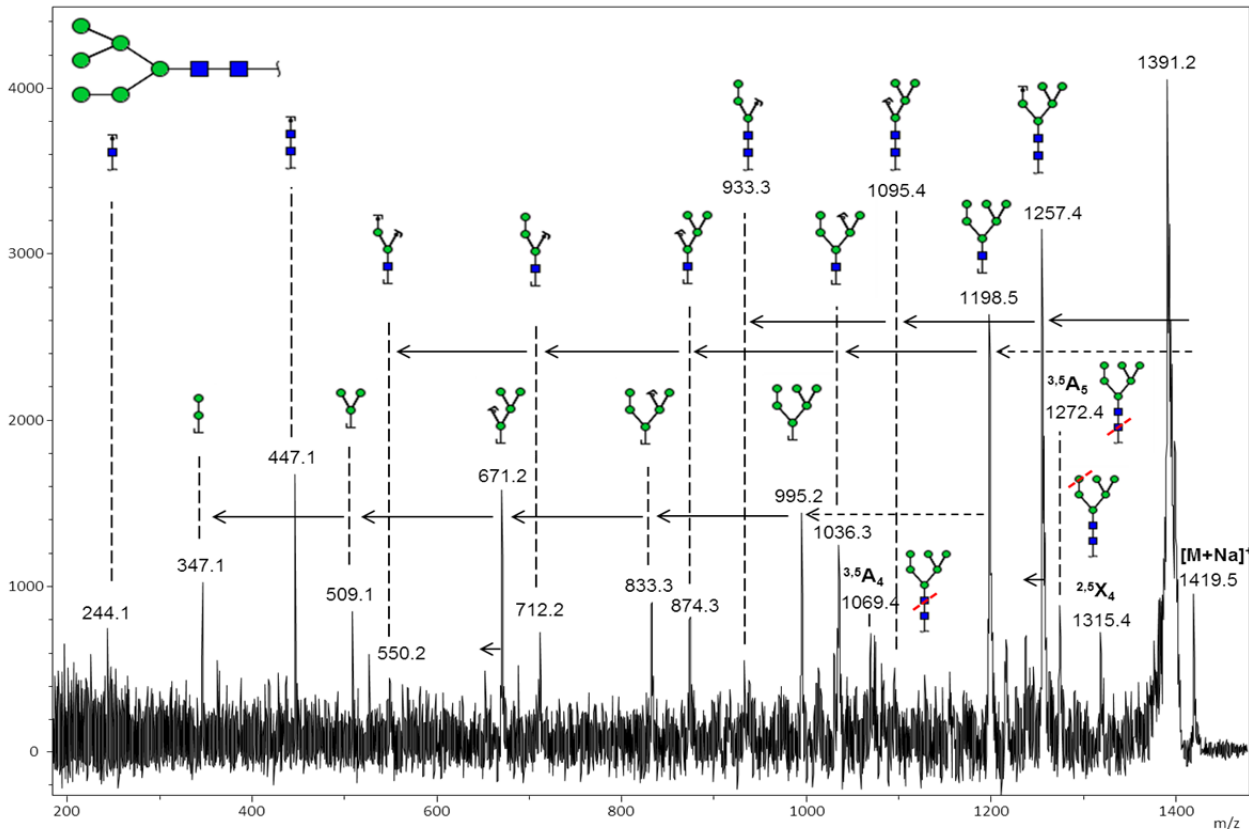


Abbildung 3-X: MALDI-TOF/TOF-Spektrum des nativen Mannose-6-Glykans ( $m/z$  1419.5) der Ribonuclease B; Ringspaltungen sind zusätzlich zur Angabe der Spaltstellen in den Piktogrammen gekennzeichnet; Nomenklatur nach Domon und Costello [92]

Abbildung 3-X zeigt das MALDI-TOF/TOF-Fragmentspektrum des nativen Glykans. Den Signalen wurden die, den jeweiligen Massen entsprechenden Fragmentationen zugeordnet, für die am wenigsten Bindungsspaltungen benötigt wurden. Ringspaltungen wurden sowohl durch Angabe der Spaltstellen mittels Nomenklatur nach *Domon und Costello* [92] gekennzeichnet, als auch durch Markierungen der betreffenden Stellen in den Piktogrammen dargestellt. Pfeile geben die Differenzen zwischen den Fragmenten der Glykane an, wodurch die Identifizierung der Gesamtstruktur erleichtert wird. Dabei stehen gestrichelte Pfeile für den Verlust eines *N*-Acetylglucosamins, durchgezogene Pfeile für die Abspaltung einer Mannose-Einheit. Durch die kleineren Pfeile werden Wasserabspaltungen angezeigt.

Die dominierenden Signale des Fragmentspektrums des underivatisierten Mannose-6-Glykans (Abbildung 3-X) waren Y-Spaltungen an der Gesamtstruktur ( $m/z$  1257.4,  $m/z$  1095.4,  $m/z$  933.3,  $m/z$  447.1), sowie an den  $B_4$ - ( $m/z$  1036.3,  $m/z$  874.3,  $m/z$  712.2,  $m/z$  550.2) und  $B_3$ -Fragmenten ( $m/z$  833.3,  $m/z$  671.2,  $m/z$  509.1,  $m/z$  347.1) des Glykans, welche durch Abspaltung von einer oder beiden

*N*-Acetylglucosamineinheiten am reduzierenden Ende des Zuckers entstehen. In dieser Hinsicht gleicht dieses Spektrum dem am ESI-Triplequadrupol aufgenommenen. Auf der anderen Seite konnten durch Fragmentierung der Natriumaddukte zusätzliche signifikante Ionen detektiert werden, wie etwa das  $B_3$ -Ion bei  $m/z$  995.2. Aufgrund seiner Zusammensetzung aus ausschließlich Mannoseeinheiten lässt sich das Vorhandensein eines High-Mannose-Glykans bestätigen und des Weiteren auch die Größe des Glykans vorhersagen [167]. Ein weiteres aufschlussreiches Fragment ist das D-Ion bei  $m/z$  671.2. Dieses entsteht, wie bereits einleitend erwähnt, durch B/Y-Spaltung an der Core-Mannose, welche zum Verlust der *N*-Acetylglucosamineinheiten, wie auch der Antenne an 3'-Position führt. Anhand seiner Masse lässt sich die Monosaccharidzusammensetzung der Antenne an Position 6' der Core-Mannose aufklären. Ebenfalls charakteristisch für dieses High-Mannose-Glykan war der Fragmentierungsverlauf über die Y-Abspaltung von einer ( $m/z$  1257.4), zwei ( $m/z$  1095.4), drei ( $m/z$  933.3) oder sechs ( $m/z$  447.1) Mannoseeinheiten, während die Fragmentionen nach Abspaltung von vier bzw. fünf Mannoseeinheiten fehlten [162,164,165]. Ein ähnliches Fragmentierungsmuster wurde von *Harvey* beobachtet [167]. Ringspaltungen traten in den *N*-Acetylglucosamineinheiten der Core-Struktur auf ( $^{3,5}A_4$ ,  $m/z$  1069.4 und  $^{3,5}A_5$ ,  $m/z$  1272.4), die wesentlich aussagekräftigeren in der Mannoseeinheit der Core-Struktur ( $^{3,5}A_3$ ) zeigten sich jedoch nicht. Außerdem konnte die Spaltung einer peripheren Mannoseeinheit beobachtet werden ( $^{2,5}X_4$ ;  $m/z$  1315.4), welche jedoch keine Auswirkungen auf die Interpretation des Spektrums hat. Insgesamt zeigte das Spektrum nur wenige Ringspaltungen, was jedoch auch durch das relativ schlechte Signal-Rausch-Verhältnis begründet sein mag.

Bei Betrachtung des MS(2)-Spektrums des INH-derivatisierten Mannose-6-Glykans (Abbildung 3-XI, oben) zeigte sich bei den glykosidischen Spaltungen ein ähnliches Bild wie bereits beim underivatisierten Glykan. Der Abbau der Antennen am INH-haltigen Molekül ( $m/z$  1376.4,  $m/z$  1214.5,  $m/z$  1052.4,  $m/z$  566.3) erfolgte nach dem gleichen Muster wie beim nativen Mannose-6-Glykan. Es entstanden wiederum keine Fragmente mit nur einem oder zwei Mannoseresten an der GlcNAc-Core-Einheit. Auch die Bildung der B/Y-Fragmente ( $m/z$  1036.3,  $m/z$  874.3,  $m/z$  712.2,  $m/z$  550.2, sowie  $m/z$  833.3,  $m/z$  671.2,  $m/z$  509.1,  $m/z$  347.1) verlief identisch zu dem underivatisierten Glykan, jedoch hatten die Signale beim INH-Derivat eine deutlich höhere Intensität, was die Zuordnung erleichterte. Ebenso konnten sowohl das  $B_3$ -Ion

# Ergebnisse und Diskussion

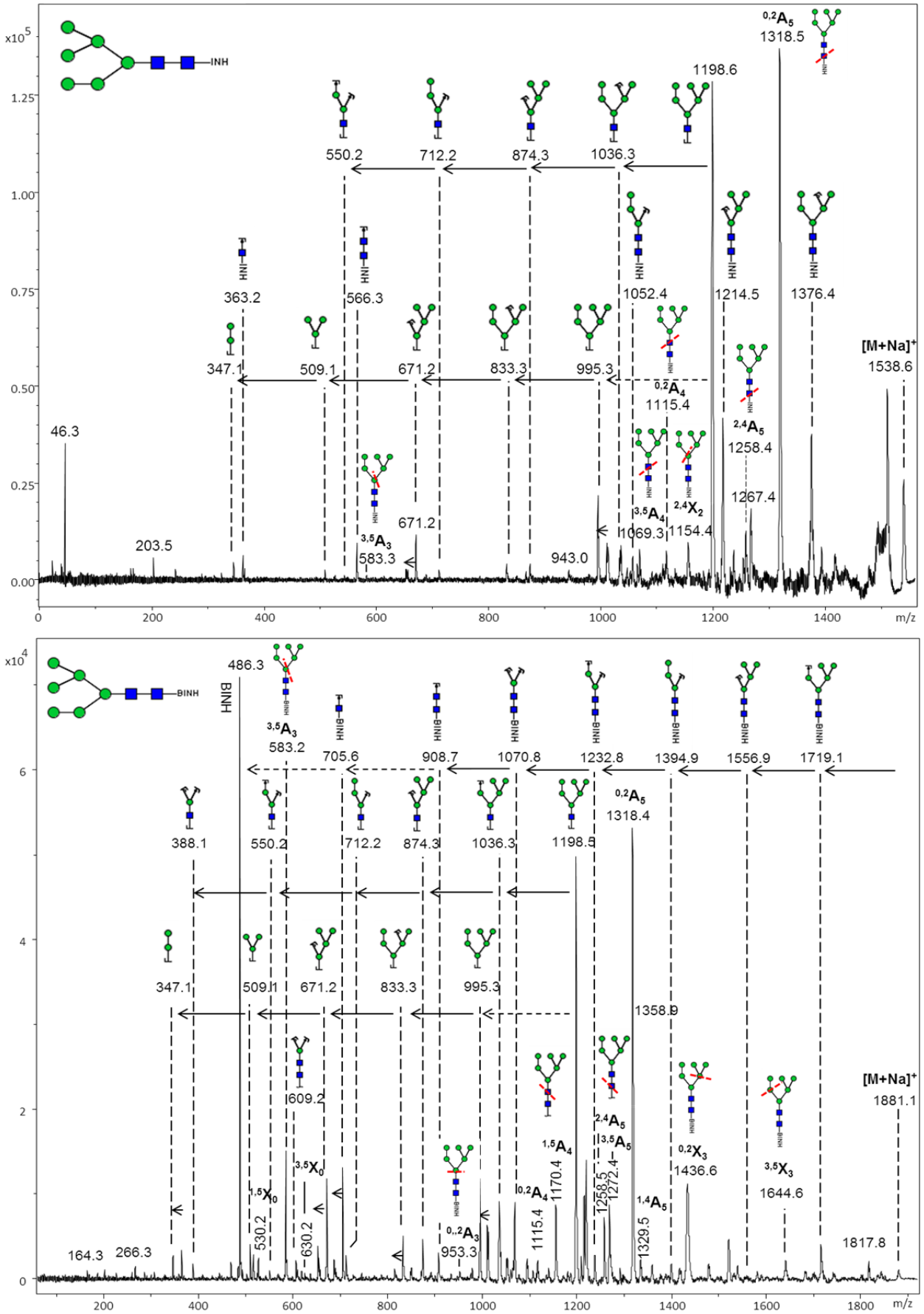


Abbildung 3-XI: Fragmentspektren des INH- ( $m/z$  1538.6, oben) und des BINH-Derivates ( $m/z$  1881.1, unten) des Mannose-6-Glykans, Ringspaltungen sind zusätzlich markiert



(m/z 995.3) als auch das D-Ion (m/z 671.2) detektiert werden, die beide eine wichtige Rolle bei der Identifizierung des Glykans spielen. Darüber hinaus zeigte sich die charakteristische Wasserabspaltung des D-Ions, welche bereits bei weiteren Hydrazid-Derivaten beobachtet wurde [168].

Zusätzlich zeigten sich Ringspaltungen an den *N*-Acetylglucosaminen der Glykangrundstruktur ( $^{3,5}A_4$ , m/z 1069.3;  $^{0,2}A_4$ , m/z 1115.4;  $^{2,4}A_5$ , m/z 1258.4) und darüber hinaus Spaltungen in der Core-Mannose des Glykans ( $^{3,5}A_3$ , m/z 583.3;  $^{2,4}X_2$ , m/z 1154.4). Anhand dieser Fragmente können Aussagen über die Zusammensetzung der Antennen, einschließlich ihrer Verknüpfung an die Core-Mannoseeinheit getroffen werden, da die Massen der Fragmente spezifisch für die jeweiligen Verbindungsstellen sind. So lässt sich anhand des  $^{3,5}A_3$ -Ions bei m/z 583.3 bestätigen, dass die Antenne, welche aus drei Mannoseeinheiten besteht in 6'-Position an die Core-Mannose geknüpft ist. Im Gegenzug kann daraus geschlossen werden, dass daher die aus zwei Mannoseeinheiten bestehende Antenne an die 3'-Position geknüpft sein muss. Gleiches gilt für die  $^{2,4}X_3$ -Spaltung bei m/z 1154.4. Zudem wurde eine  $^{0,2}A_5$ -Spaltung (m/z 1318.5) als Fragment mit der höchsten Intensität im Spektrum detektiert. Ein weiteres Merkmal der Fragmentierung von Glykanen, welche bereits bei Phenylhydrazin-Derivaten beobachtet wurde, ist die erleichterte Abspaltung der Antenne in 3'-Position, im Gegensatz zu der in 6'-Position der Core-Mannose [168]. Dies ließ sich in den Spektren des INH-derivatisierten Glykans anhand der höheren Signalintensitäten der B/Y<sub>3</sub>-Fragmente bei m/z 874.3 und m/z 671.2, im Vergleich zu den Fragmenten bei m/z 712.2 und m/z 509.1 ablesen. Zusätzlich zeigte auch das Y<sub>3β</sub>-Fragment bei m/z 1214.5 eine wesentlich größere Signalstärke, als das durch die Abspaltung der 6'-Antenne entstehende Y<sub>3α</sub>-Fragment bei m/z 1052.4.

Im MALDI-TOF/TOF-Spektrum des BINH-Derivates des Mannose-6-Glykans (Abbildung 3-XI, unten) konnten erheblich mehr Fragmentenspaltungen beobachtet werden, sowohl der glykosidischen Bindungen, als auch Ringspaltungen. So konnte im Falle dieses Derivates der komplette Abbau der Antennen am Gesamtglykan verfolgt werden (m/z 1719.1, m/z 1556.9, m/z 1394.9, m/z 1232.8, m/z 1070.8, m/z 908.7), ohne dass es zum Ausschluss der Fragmente mit einer oder zwei Mannoseeinheiten kam, wie zuvor beim INH-Derivat oder dem underivatisierten Glykan. Bei den ABDEAE-Derivaten (4-Aminobenzoessäure-2-(diethylamino)-ethyl-ester) der *N*-Glykane von Ribonuclease B wurde dieser Fragmentierungsverlauf der Hexosen ebenso detektiert [169]. Die Spaltungen an den Antennen der

B<sub>3</sub>- (m/z 995.3 (B<sub>3</sub>), m/z 833.3, m/z 671.2, m/z 509.1, m/z 347.1) und B<sub>4</sub>-Fragmente (m/z 1198.5 (B<sub>4</sub>), m/z 1036.3, m/z 874.3, m/z 712.2, m/z 550.2) verliefen dagegen analog zu denen des underivatisierten Glykans, waren aber, ebenso wie die des INH-Derivates, bedeutend höher in der Signalintensität. D-Ion (m/z 671.2) und B<sub>3</sub>-Fragment (m/z 995.3) konnten wiederum leicht identifiziert werden und zeigten ebenfalls eine gute Signalstärke. Gegenüber den vorher beschriebenen Spektren nahm auch die Anzahl der Ringspaltungen deutlich zu. Die Signale mit den höchsten Intensitäten wurden durch Abspaltung des BINH-Derivatisierungsreagenzes (m/z 486.3), sowie wiederum durch das <sup>0,2</sup>A<sub>5</sub>-Ion der Masse m/z 1318.4 gebildet, welches jedoch für die Aufklärung der Verknüpfungsstellen keine Rolle spielt. Weitere Ringspaltungen in den terminalen *N*-Acetylglucosamineinheiten ließen sich bei den Massen m/z 1329.5 (<sup>1,4</sup>A<sub>5</sub>), m/z 1272.4 (<sup>3,5</sup>A<sub>5</sub>), m/z 1258.5 (<sup>2,4</sup>A<sub>5</sub>), m/z 1170.4 (<sup>1,5</sup>A<sub>4</sub>) und m/z 1115.4 (<sup>0,2</sup>A<sub>4</sub>) wie auch bei m/z 630.2 (<sup>3,5</sup>X<sub>0</sub>) und m/z 530.2 (<sup>1,5</sup>X<sub>0</sub>) detektieren. Des Weiteren traten zwei Ringfragmente der Core-Mannose auf, die zum einen zur Abspaltung beider Antennen (<sup>0,2</sup>A<sub>3</sub>; m/z 953.3) führten, zum anderen zu dem aussagekräftigen Fragment <sup>3,5</sup>A<sub>3</sub> bei m/z 583.2, welches bereits beim INH-Derivat aufgefunden werden konnte. Darüber hinaus zeigten sich zwei X-Spaltungen in den Antennen des Glykans, zum einen bei m/z 1644.6 (<sup>3,5</sup>X<sub>3</sub>), zum anderen bei m/z 1436.6 (<sup>0,2</sup>X<sub>3</sub>).

Das Fragmentspektrum des BACH-derivatisierten Glykans (Abb. 3-XII, oben) zeigte neben zahlreichen glykosidischen Spaltungen auch eine Vielzahl interessanter Ringspaltungen. Zum einen traten wiederum die bereits beim BINH-Derivat beobachteten Ringfragmente der *N*-Acetylglucosamineinheiten auf (<sup>3,5</sup>A<sub>4</sub>, m/z 1069.4; <sup>0,2</sup>A<sub>4</sub>, m/z 1115.3; <sup>1,5</sup>A<sub>4</sub>, m/z 1170.4; <sup>2,4</sup>A<sub>5</sub>, m/z 1258.5; <sup>3,5</sup>A<sub>5</sub>, m/z 1272.5; <sup>0,2</sup>A<sub>5</sub>, m/z 1318.4), wobei das letztgenannte Fragment den zweithöchsten Peak des Spektrums darstellte. Das höchste Signal entstand durch eine <sup>0,2</sup>X<sub>0</sub>-Spaltung (m/z 477.2) des dem Derivatisierungsreagenz nächstliegenden *N*-Acetylglucosamins. Fragmente der Core-Mannose wurden bei m/z 407.2 (<sup>2,4</sup>A<sub>3</sub>), m/z 583.2 (<sup>3,5</sup>A<sub>3</sub>) und m/z 950.3 (<sup>0,2</sup>X<sub>2</sub>) detektiert. Mit Hilfe der Differenz des X-Fragments zur Gesamtmasse ließ sich der Mannose-Aufbau der Antennen bestätigen, durch die zwei A-Fragmente, die jeweils eine der Antennen darstellten, konnte spezifisch deren Aufbau aus zwei respektive drei Hexosen nachgewiesen werden. Außerdem konnten auch in diesem Derivat X-Spaltungen der Antennen (<sup>0,3</sup>X<sub>3</sub> bei m/z 1520.6 und <sup>3,5</sup>X<sub>3</sub> bei m/z 1536.5) ge-

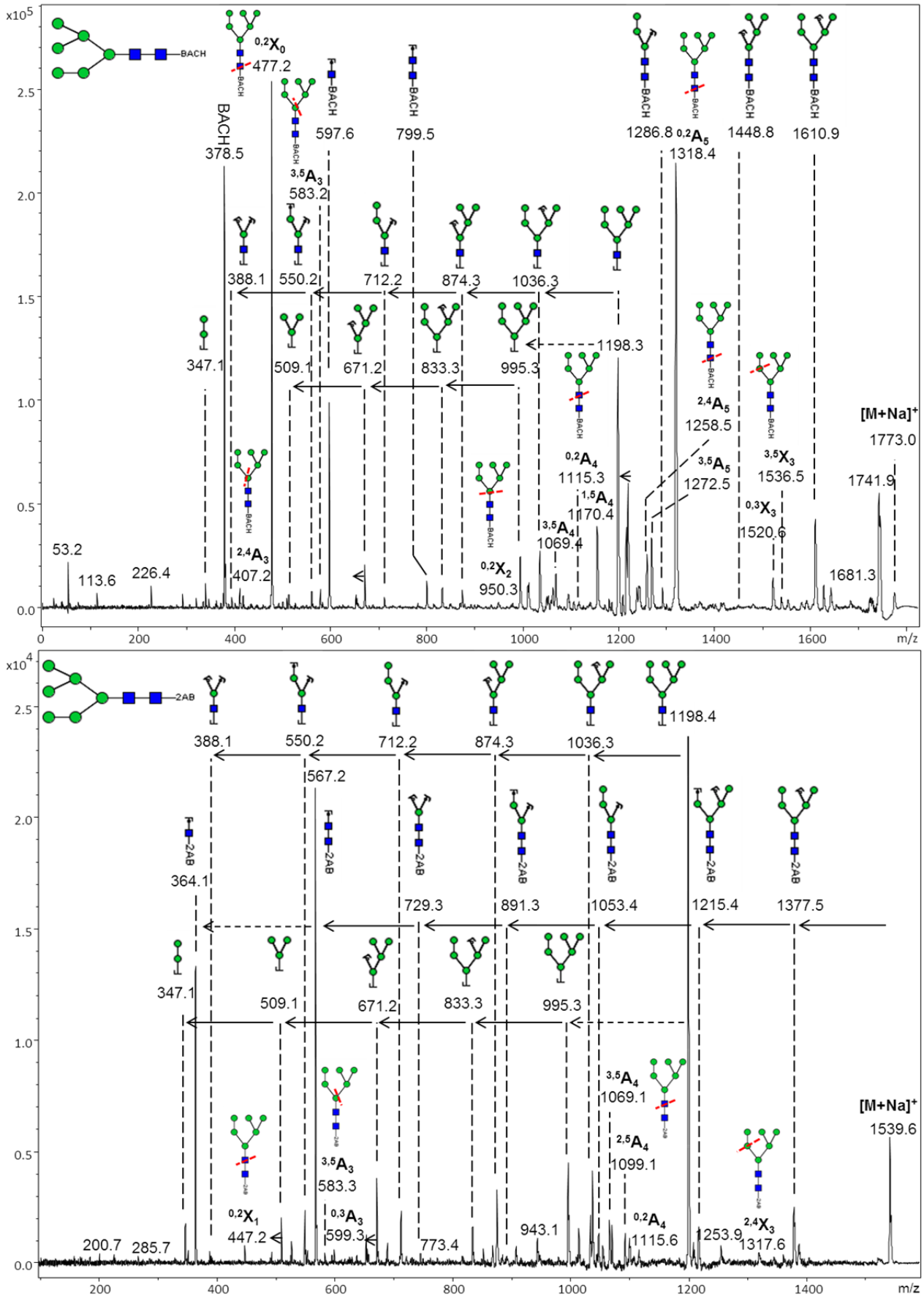


Abbildung 3-XII: MALDI-TOF-TOF-Spektren des BACH- ( $m/z$  1773.0, oben) und 2-AB-derivatisierten ( $m/z$  1539.7, unten) Mannose-6-Glykans

funden werden, die jedoch lediglich die unverzweigte Antenne des Glykans betrafen. Im Unterschied zum BINH-derivatisierten Mannose-6-Glykan folgte der Abbau des BACH-Derivates ( $m/z$  1610.9,  $m/z$  1448.8,  $m/z$  1286.8,  $m/z$  799.5) dem Muster des INH-derivatisierten und des nativen Glykans. Demnach ließen sich analog zu Harvey [167] erneut keine Fragmente mit ein oder zwei Mannoseeinheiten am derivatisierten Rest detektieren. Der Fragmentierungsverlauf der  $B_3$ - ( $m/z$  995.3 ( $B_3$ ),  $m/z$  833.3,  $m/z$  671.2,  $m/z$  509.1,  $m/z$  347.1) und  $B_4$ -Fragmente ( $m/z$  1198.3 ( $B_4$ ),  $m/z$  1036.3,  $m/z$  874.3,  $m/z$  712.2,  $m/z$  550.2) dagegen verlief wie bereits in den vorigen Spektren vollständig über alle Zwischenstufen. Sowohl  $B_3$ -Ion ( $m/z$  995.3) als auch D-Ion ( $m/z$  671.2) waren aufgrund ihrer guten Signalintensität leicht zu identifizieren. Insgesamt war die Signalstärke des Spektrums vergleichbar mit der des INH-Derivates und lag damit deutlich über der des underivatisierten Glykans.

Die Fragmentierung des 2-AB-Derivates zeigte einige Unterschiede im Vergleich zu den vorhergehenden Derivaten. Zum einen ließ sich eine wesentlich kleinere Anzahl an Ringspaltungen im Spektrum nachweisen, zum anderen war deren Intensität wesentlich geringer. Waren zuvor im Fragmentspektrum des BACH-Derivates die höchsten Signale noch durch Ringspaltungen entstanden, so konnten diese beim 2-AB-Derivat ausschließlich auf glykosidische Spaltungen zurückgeführt werden. So konnte beispielsweise das Fragment  $^{0,2}A_5$  bei  $m/z$  1318.4 bei dem 2-AB-derivatisierten Glykan nicht mehr detektiert werden, was möglicherweise durch den geöffneten terminalen Zuckerring begründet ist. Dementsprechend konnten auch keine anderen Fragmente des terminalen *N*-Acetylglucosamins nachgewiesen werden. Schwächere Signale zeigten sich jedoch für Ringfragmente der zweiten *N*-Acetylglucosamineinheit bei  $m/z$  1069.1 ( $^{3,5}A_4$ ),  $m/z$  1099.1 ( $^{2,5}A_4$ ) und  $m/z$  1115.6 ( $^{0,2}A_4$ ). Auch in der Core-Mannose ließen sich Spaltungen feststellen ( $m/z$  583.3,  $^{3,5}A_3$  und  $m/z$  599.3,  $^{0,3}A_3$ ), die beide zur Abtrennung der Antenne in 6'Position führten. Des Weiteren kam es zu X-Spaltungen bei  $m/z$  447.2 ( $^{0,2}X_1$ ) und  $m/z$  1317.6 ( $^{2,4}X_3$ ), deren Informationsgehalt allerdings eher gering war. Der Verlauf der glykosidischen Spaltungen erfolgte ebenso wie bereits beim BINH-Derivat über sämtliche Stufen des Glykans ( $m/z$  1377.5,  $m/z$  1215.4,  $m/z$  1053.4,  $m/z$  891.3,  $m/z$  729.3,  $m/z$  567.2), mit voller Deckung der erwarteten Fragmente. Als Ionen der höchsten Intensitäten zeigten sich das  $B_4$ -Ion bei  $m/z$  1198.4 und das  $Y_2$ -Ion bei  $m/z$  567.2.  $B_3$ -Ion ( $m/z$  995.3) und D-Ion ( $m/z$  671.2) wiesen ebenfalls hohe Intensitäten auf. Alles in allem war die Signalintensität des

2-AB-Fragmentspektrums jedoch etwas geringer als die der vorhergehenden Derivate.

Beim Vergleich der MALDI-TOF/TOF-Spektren aller Derivate des Mannose-6-Glykans lässt sich sagen, dass mit Hilfe der verschiedenen Derivatisierungen die Fragmentierung deutlich verbessert werden konnte. Im Fall des underivatisierten Glykans war die Signalintensität des Spektrums gering, es wurden hauptsächlich glykosidische Spaltungen detektiert. Anhand des Fragmentierungsverlaufes des Glykans ließ sich dessen Zusammensetzung nachvollziehen, doch die Einzigen zur Identifizierung der jeweiligen Antennen nützlichen Fragmente waren die des D-Ions, sowie des B<sub>3</sub>-Ions. Nach Derivatisierung mit INH und BACH veränderten sich Art und Häufigkeit der glykosidischen Bindungen nicht, doch sowohl die Signalintensität, als auch die Anzahl der Ringspaltungen im Molekül konnten deutlich gesteigert werden. Insbesondere Spaltungen in der Core-Mannose zeigten sich beim INH-Derivat in Form einer <sup>3,5</sup>A<sub>3</sub>-Spaltung und beim BACH-Derivat zusätzlich als <sup>2,4</sup>A<sub>3</sub>-Spaltung. Dadurch wurde die Zuordnung der Antennen erheblich erleichtert. Im Spektrum des BINH-Derivates trat neben verschiedensten Ringfragmenten sowohl die bereits bekannte <sup>3,5</sup>A<sub>3</sub>-Spaltung auf, als auch ein <sup>0,2</sup>A<sub>3</sub>-Fragment der Core-Mannose, das zur Abspaltung beider Antennen führte. Zudem wurden bei BINH-Man6, sowie auch bei 2-AB-Man6 glykosidische Fragmente mit einer oder zwei Mannoseeinheiten in den Antennen detektiert, welche bei der Fragmentierung nativer Glykane nur selten vorkommen [167]. Im Vergleich aller Derivate erschien in den MALDI-TOF/TOF-Spektren der beiden Biotin-Derivate BINH und BACH der größte Anteil an Ringspaltungen, sowohl peripherer, als auch an der Core-Mannose. Darüber hinaus offenbarten die mit diesen beiden Reagenzien derivatisierten Glykane in den Fragmentspektren die höchsten Signalintensitäten und erleichterten die Identifizierung der Strukturen damit beträchtlich. Zwar konnte bereits anhand der Fragmente von underivatisierten, nativen Glykanen deren Aufbau geklärt werden [167,170], doch mit Hilfe der angewandten Derivatisierungen wurde die Detektion der Fragmente durch die erhöhte Signalstärke verbessert, sowie die Anzahl der informativen Ringspaltungen erhöht. Dadurch verringert sich die Detektionsgrenze und auch kleinste Mengen von Glykanen können noch zuverlässig identifiziert werden.

### II. Komplex-Glykane

Im nächsten Schritt wurden die nativen und derivatisierten *N*-Glykane des Ovalbumins Fragmentierungsexperimenten unterzogen. Ovalbumin ist mit allen drei Arten von *N*-Glykanen besetzt (Komplex-, Hybrid- und High-Mannose-Glykane), von denen ein Teil in Form mehrerer Isomere vorliegt (siehe Tabelle 3-II). Ein entscheidender Unterschied zwischen dem Aufbau von High-Mannose-Glykanen und dem der Hybrid- und Komplex-Glykane ist das häufige Auftreten sogenannter „*bisecting GlcNAcs*“, also eines zusätzlichen *N*-Acetylglucosaminrestes, der an Position 4' der Core-Mannose geknüpft ist. Abbildung 3-XIII zeigt ein solches Komplex-Glykan sowie dessen ebenfalls im Ovalbumin vorkommende Isomere [150,171]. Die Anwesenheit eines „*bisecting GlcNAcs*“ lässt sich im Fragmentspektrum des Glykans mit Hilfe des D-Ions nachweisen. Tritt zusätzlich zum D-Ion ein um die Masse  $m/z$  221 kleineres Fragment auf, so weist diese Z-Spaltung darauf hin, dass von besagtem D-Ion das „*bisecting GlcNAc*“ abgespalten wurde [172,173]. Darüber hinaus können mit Hilfe der D-Ionen auch Hinweise über das Vorhandensein von Isomeren gewonnen werden, da aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Antennen auch die D-Ionen unterschiedliche Massen haben. Im Allgemeinen ist der Nachweis verschiedener Isomere und die Identifizierung ihrer Struktur anhand ihrer Fragmentspektren durch die strukturelle Ähnlichkeit problematisch. Meist erlauben die hauptsächlich auftretenden glykosidischen Spaltungen keine Unterscheidung, wie beispielsweise im Fall der Isomere I und II in Abbildung 3-XIII. Bei Isomer III dagegen können infolge der andersartigen Verteilung der endständigen *N*-Acetylglucosamineinheiten auch spezifische glykosidische Fragmente auftreten, wie beispielsweise durch Abspaltung einer einzelnen Mannoseeinheit, oder der mit drei *N*-Acetylglucosamineinheiten besetzten Antenne. Weitere Unterscheidungsmöglichkeiten ergeben sich bei Betrachtung der Ringspaltungen in der Core-Mannose der Isomere (Tabelle in Abbildung 3-XIII). Isomer III ermöglicht wiederum die Differenzierung anhand mehrerer charakteristischer Spaltungen (gelb hinterlegt), bei Struktur I und II führt lediglich die  $^{3,5}A_3$ -Spaltung zur Bildung diagnostischer Fragmente, da alle weiteren Massen bei jeweils beiden Isomeren auftreten können.

Eine Unterscheidung der Isomere anhand der Signalintensitäten der Fragmente, wie im Falle der Di- und Trisaccharide, erfordert entweder eine vorherige Trennung der Substanzen, oder den Vergleich mit isomerenreinen Standardsubstanzen [174]. Auch

die weitergehende Fragmentierung von spezifischen Spaltprodukten aus den MS(2)-Spektren mittels Ionenfallen-Massenspektrometrie zeigte sich in verschiedenen Untersuchungen als geeignet zur Differenzierung von Isomeren. Als hilfreich erwies sich dabei vor allem die verstärkte Bildung von Ringfragmenten im negativen Modus, sowie die zusätzliche Permethylierung der Glykane [175–177].

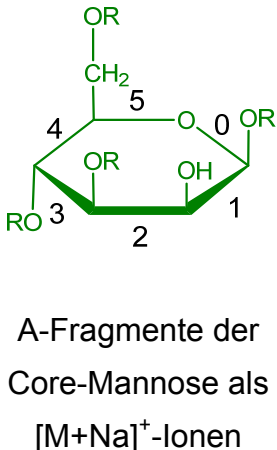
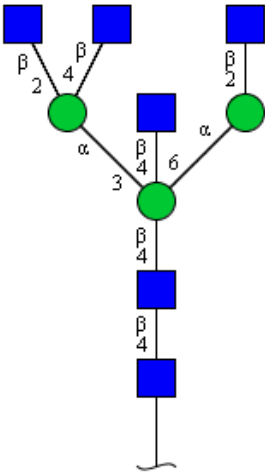
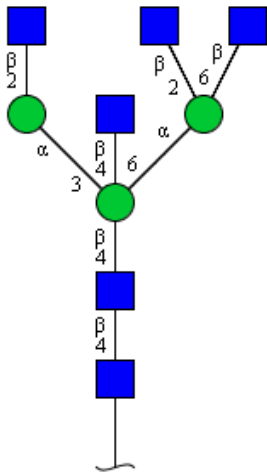
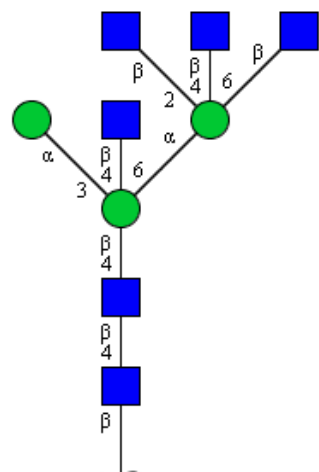
 <p>A-Fragmente der Core-Mannose als <math>[M+Na]^+</math>-Ionen</p>	<p>I</p> 	<p>II</p> 	<p>III</p> 
$^{0,2}A_3$	1279.5	1279.5	1279.5
$^{0,3}A_3$	681.2	884.3	1087.4
$^{0,4}A_3$	448.2	651.2	854.3
$^{1,3}A_3$	651.2	448.2	245.1
$^{1,4}A_3$	884.3	681.2	478.2
$^{1,5}A_3$	1293.5	1293.5	1293.5
$^{2,4}A_3$	854.3	651.2	448.2
$^{2,5}A_3$	1263.5	1263.5	1263.5
$^{3,5}A_3$	665.3	868.3	1071.4

Abbildung 3-XIII: Ringspaltungen der Core-Mannose bei den verschiedenen Isomeren eines Komplex-Glykans; Fragmente die spezifisch für eines der Isomere sind, sind gelb hinterlegt [150,171]

Demnach ließ sich das Isomergemisch des Komplexglykans nicht anhand der Signalintensitäten der Fragmente analysieren, da die alleinige Anwendung der MALDI-TOF/TOF-Massenspektrometrie keine ausreichenden Hinweise auf deren Verteilung bot. Die Messung der Substanzen im negativen Meßmodus war ebenfalls nicht möglich, da die Derivate der Glykane ausschließlich im Positiven Signale bildeten.

Von den von Ovalbumin freigesetzten *N*-Glykanen wurde insbesondere das Precursor-Ion bei  $m/z$  1745 betrachtet, hinter dem sich die oben abgebildeten Isomere verbergen (Abbildung 3-XIII). Besonderes Augenmerk wurde darauf gelegt, inwiefern die Derivatisierung der Glykane das Auftreten und die Intensität von Isomeren-typischen Fragmenten beeinflusst. Den Signalen in den Spektren wurden wiederum die Fragmente mit den am wenigsten benötigten Spaltungen zugeordnet. Unspezifische Fragmente wurden an den Piktogrammen des Isomers II dargestellt, bei den für ein Isomer charakteristischen Spaltungen wurde das Piktogramm dieser Struktur in Kombination mit der zugehörigen Nummer (I, II oder III) verwendet. Im Fall von mehreren möglichen Ringspaltungen wurden sowohl alle passenden Ringfragmente sowie das zugehörige Isomer angegeben.

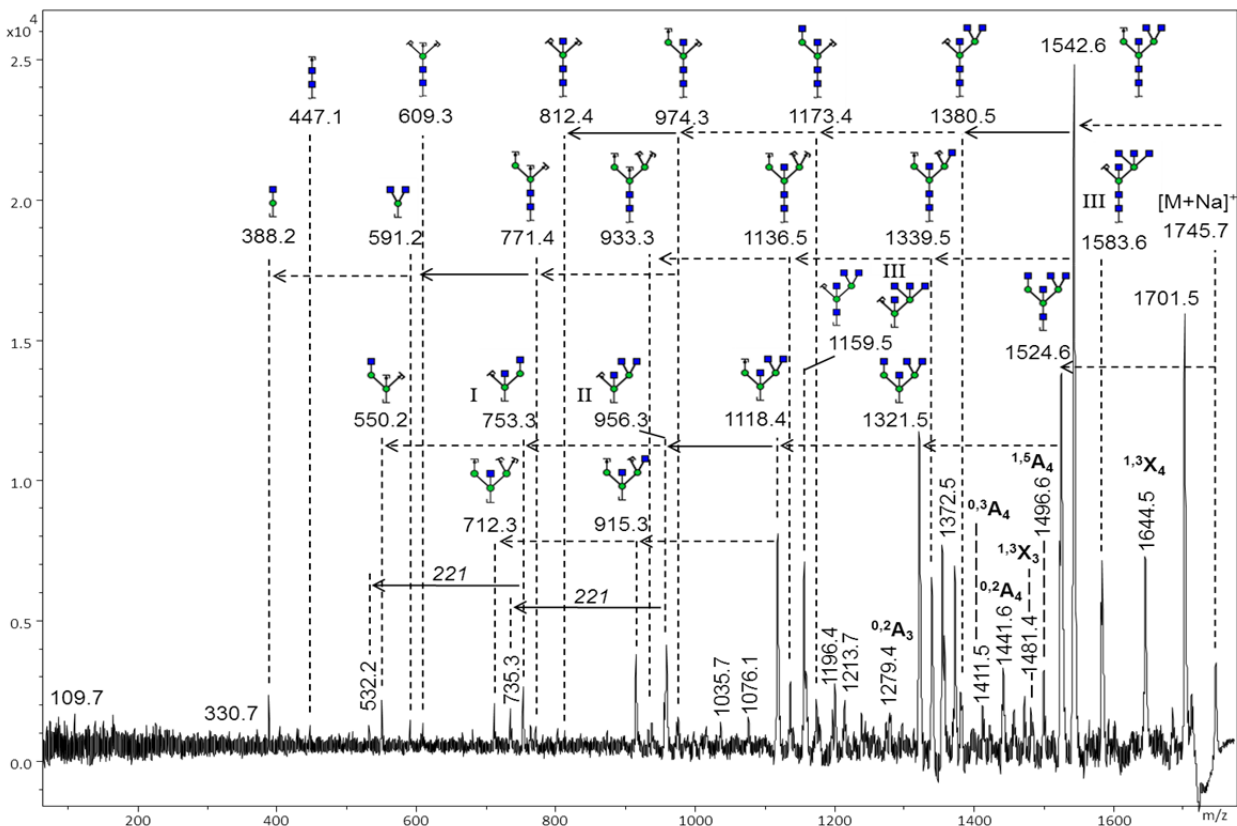


Abbildung 3-XIV: MALDI-TOF/TOF-Fragmentspektrum der underivatisierten Komplex-Glykane mit  $m/z$  1745.7



Abbildung 3-XIV zeigt das Spektrum aus der Fragmentierung des Precursor-Ions bei  $m/z$  1745.7. Ebenso wie bei der Fragmentierung des High-Mannose-Glykans entstanden die dominierenden Ionen durch glykosidische Spaltungen. Dabei bildeten sich die stärksten Signale durch Abspaltung einer endständigen *N*-Acetylglucosamineinheit ( $m/z$  1542.6) und durch  $B_4$ - und  $B_3$ -Spaltungen ( $m/z$  1524.6 und  $m/z$  1321.5) der Corestruktur. Der Abbau der Antennen konnte sowohl am Gesamtglykan als auch an den  $B_3$ -Fragmenten verfolgt werden. Als Isomer-spezifische Spaltung trat zum einen das Ion  $m/z$  1583.6 auf, welches durch Abspaltung einer Mannose-Einheit entsteht und damit nur aus Isomer III gebildet werden kann, zum anderen erschienen die D-Ionen der drei Isomere bei  $m/z$  753.3 (Isomer I),  $m/z$  956.3 (Isomer II), und  $m/z$  1159.5 (Isomer III). Durch die im Abstand von  $m/z$  221 vorhandenen Signale bei  $m/z$  532.2 und  $m/z$  735.3 bestätigt sich das Vorhandensein eines „bisecting GlcNAcs“ bei Isomer I und Isomer II. Dagegen ließ sich dieses Signal in Verbindung mit Isomer III, welches bei  $m/z$  938 auftreten müsste, nicht feststellen. Jedoch könnte dies auch auf die geringe Gesamtintensität des Spektrums zurückzuführen sein, da die entsprechenden Massen auch bei den anderen beiden Isomeren nur sehr niedrig sind. Es ließen sich Ringspaltungen der Core-*N*-Acetylglucosamineinheiten detektieren bei  $m/z$  1411.5 ( $^{0,3}A_4$ ),  $m/z$  1441.6 ( $^{0,2}A_4$ ) und  $m/z$  1496.6 ( $^{1,5}A_4$ ), sowie eine Ringspaltung der Core-Mannose bei  $m/z$  1279.4 ( $^{0,2}A_3$ ). Diese Fragmente, ebenso wie die zwei X-Spaltungen in den Antennen ( $^{1,3}X_3$  bei  $m/z$  1481.4 und  $^{1,3}X_4$  bei  $m/z$  1644.5), tragen allerdings nicht zur Identifizierung der Antennen und damit zur Unterscheidung der Isomere bei. Dementsprechende Ringspaltungen traten in diesem Fragmentspektrum nicht auf.

Durch die Derivatisierung mit INH (Abbildung 3-XV, oben) verbesserte sich die Signalintensität des Spektrums deutlich von  $2.5 \times 10^4$  auf  $3.2 \times 10^5$  (bezogen auf den höchsten Peak, auch die Anzahl charakteristischer Ringfragmente und glykosidischer Spaltungen stieg erheblich. Die stärksten Signale des Fragmentspektrums des INH-Derivates entstanden – im Gegensatz zum underivatisierten Glykan – nicht nur durch die Abspaltung einer *N*-Acetylglucosamineinheit in den Antennen ( $m/z$  1661.9) und durch  $B_4$ - ( $m/z$  1524.5) und  $B_3$ -Spaltungen ( $m/z$  1321.5), sondern auch durch eine dominante Ringspaltung in der Corestruktur ( $^{0,2}A_5$  bei  $m/z$  1644.4). Ähnlich wie bei der Fragmentierung der High-Mannose-Glykane zeigte sich beim Fragmentierungsverlauf

**Ergebnisse und Diskussion**

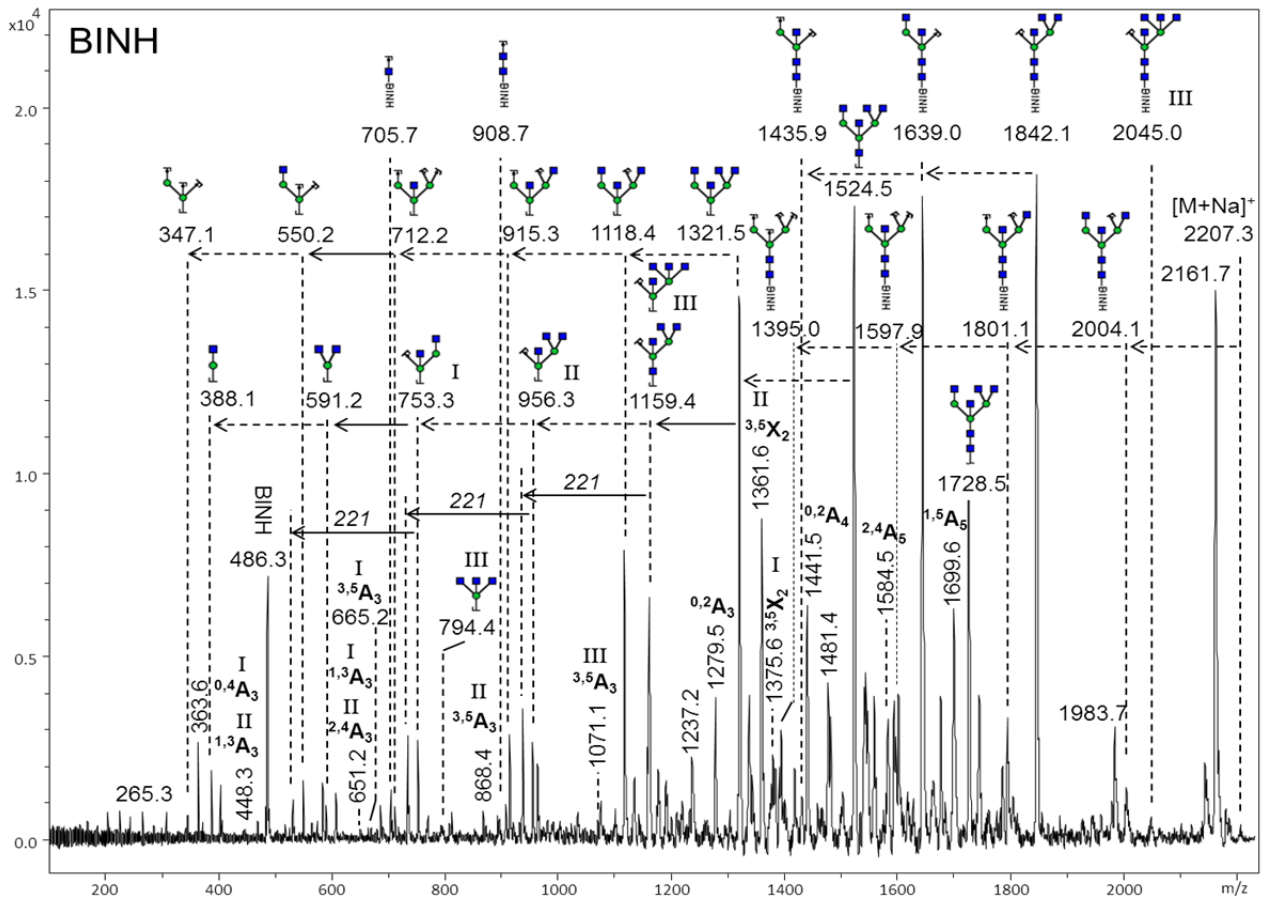
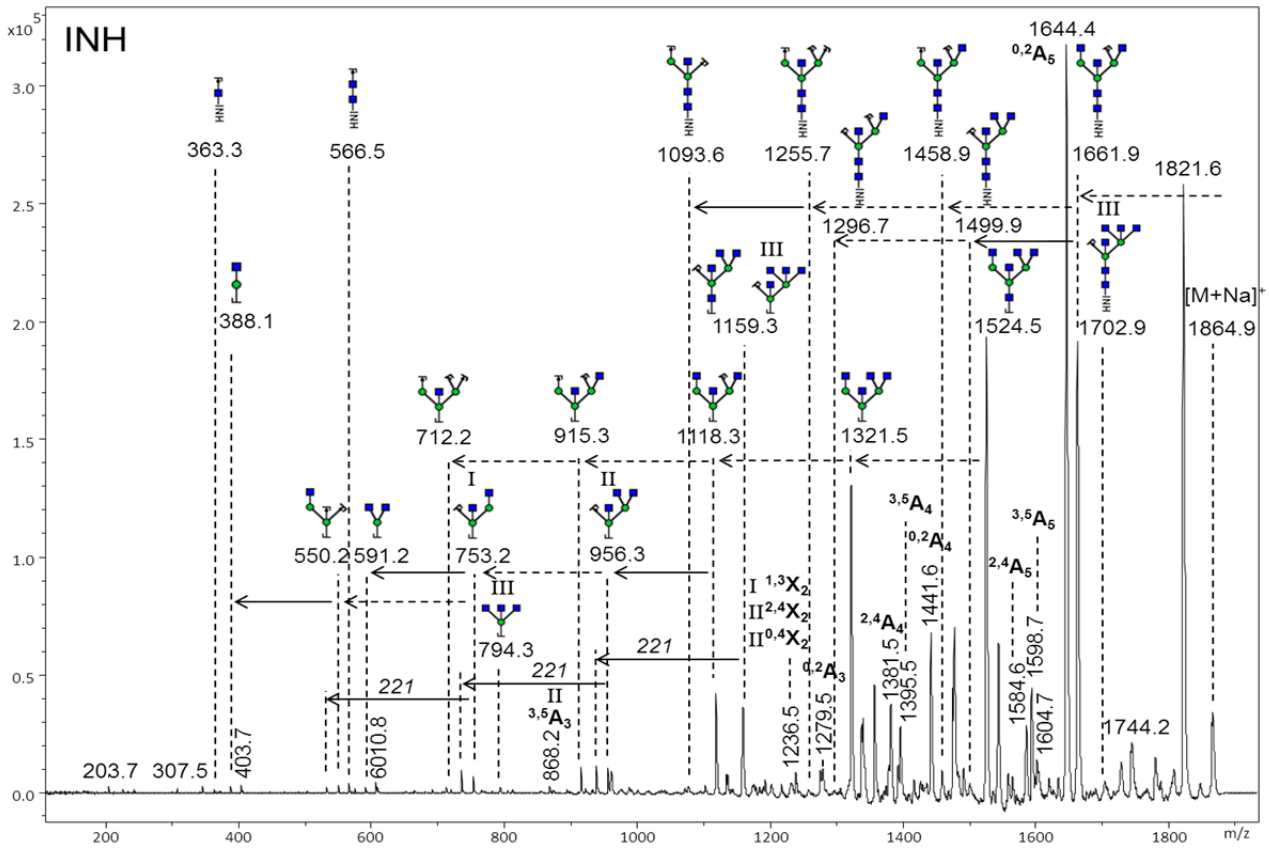


Abbildung 3-XV: Fragmentspektren der INH-derivatisierten (m/z 1864.9, oben) und BINH-derivatisierten (m/z 2207.3, unten) Komplex-Glykane

der Antennen am Komplex-Glykan eine Lücke bei den mit einer oder zwei Mannoseeinheiten besetzten Strukturen (zwischen  $m/z$  1093.6 und  $m/z$  566.5). Spezifische Spaltungen des Isomers III wurden bei  $m/z$  1702.9 (Y-Abspaltung einer Mannoseeinheit) und bei  $m/z$  794.3 (B-Spaltung der Antenne an 6'Position) detektiert, wenn auch nur mit geringer Intensität. Das D-Ion von Isomer III ( $m/z$  1159.3), ebenso wie die D-Ionen der Isomere I ( $m/z$  753.2) und II ( $m/z$  956.3) waren dagegen in ausreichender Stärke nachweisbar und damit die Zusammensetzung der Antenne in 6'Position erkennbar. Des Weiteren konnten bei allen drei D-Ionen im Abstand von  $m/z$  221 die, durch Abspaltung des „*bisecting GlcNAcs*“ verursachten, Z-Fragmente (für Isomer I:  $m/z$  532.2, Isomer II:  $m/z$  735.2, Isomer III:  $m/z$  938.3) beobachtet werden. Weitere Ringspaltungen traten vor allem in den *N*-Acetylglucosamineinheiten der Corestruktur auf ( $^{2,4}A_4$ :  $m/z$  1381.5;  $^{3,5}A_4$ :  $m/z$  1395.5;  $^{0,2}A_4$ :  $m/z$  1441.6;  $^{2,4}A_5$ :  $m/z$  1584.6;  $^{3,5}A_5$ :  $m/z$  1598.7), aber auch in der Core-Mannose. Dort kam es einerseits zu X-Spaltungen ( $m/z$  1236.5), auf die mehrere Fragmentierungsmöglichkeiten zutreffen, wie  $^{1,3}X_2$  für Isomer I oder  $^{2,4}X_2$  und  $^{0,4}X_2$  für Isomer II. Andererseits zeigten sich auch A-Fragmente bei  $m/z$  868.2 ( $^{3,5}A_3$ ) und  $m/z$  1279.5 ( $^{0,2}A_3$ ), von denen vor allem das Erstere interessant ist, da es nur aus Isomer II entstehen kann. Damit lassen sich im Spektrum des INH-Derivates sowohl Isomer II als auch Isomer III problemlos nachweisen.

Bei dem BINH-dervatisierten Glykan (Abbildung 3-XV, unten) ließ sich im Bereich der glykosidischen Spaltungen ein ähnliches Muster wie im Falle der INH-Derivate erkennen. Im Fragmentierungsablauf des Komplex-Glykans fehlten ebenfalls die nach Abspaltung des „*bisecting GlcNAcs*“ folgenden Ionen, deren Antennen nur noch mit ein bzw. zwei Mannoseeinheiten besetzt sind ( $m/z$  1232,  $m/z$  1070). Auch am  $B_3$ -Fragment ( $m/z$  1321.5) konnte der Abbau der Antennen verfolgt werden, wie bereits bei den vorigen Derivaten gezeigt. Neben den D-Ionen der drei Isomere (Isomer I:  $m/z$  753.3, Isomer II:  $m/z$  956.3, Isomer III:  $m/z$  1159.4), konnten wiederum die für Isomer III spezifischen Fragmente bei  $m/z$  2045.0 (Y-Abspaltung einer Mannoseeinheit) und  $m/z$  794.4 (B-Spaltung der 6'Antenne) detektiert werden. Darüber hinaus waren im Abstand von 221  $m/z$  zu den D-Ionen mit guten Signalintensitäten die strukturbestätigenden Fragmente für das „*bisecting GlcNAc*“ zu sehen (Isomer I:  $m/z$  532.2, Isomer II:  $m/z$  735.3, Isomer III:  $m/z$  938.3). Im Vergleich zum INH-Glykan stieg die Anzahl der Ringspaltungen in Folge der BINH-Derivatisierung deutlich an.

Weitere Ringfragmente der *N*-Acetylglucosamineinheiten mit hohen Signalintensitäten zeigten sich bei  $m/z$  1441.5 ( $^{0,2}A_4$ ),  $m/z$  1584.5 ( $^{2,4}A_5$ ) und  $m/z$  1699.6 ( $^{1,5}A_5$ ). Die wesentlich aussagekräftigeren Ringspaltungen der Core-Mannose hatten dagegen meist nur sehr geringe Signalstärken. Core-Mannose-Fragmente, die zu zwei oder drei der Isomeren zugeordnet werden konnten, wurden bei  $m/z$  448.3 ( $^{0,4}A_3$  bei Isomer I und  $^{1,3}A_3$  bei Isomer II),  $m/z$  651.2 ( $^{1,3}A_3$  bei Isomer I und  $^{2,4}A_3$  bei Isomer II) und  $m/z$  1279.5 ( $^{0,2}A_3$ ) nachgewiesen. Spezifische Fragmente für die jeweiligen Isomere, in Form des die Antenne in 6'Position abspaltenden  $^{3,5}A_3$ -Ions, waren bei  $m/z$  665.2 (Isomer I),  $m/z$  868.4 (Isomer II) und  $m/z$  1071.1 (Isomer III). Anhand dieser Spaltungen konnte die Anwesenheit aller drei Isomere bestätigt werden. Zusätzlich waren auch dementsprechenden X-Spaltungen in besagter Core-Mannose sichtbar, die ebenfalls nur einem Isomer zuordenbar waren. Diese zeigten sich bei  $m/z$  1361.6 ( $^{3,5}X_2$  bei Isomer II) und  $m/z$  1375.6 ( $^{3,5}X_2$  bei Isomer I), das jeweilige Fragment für Isomer III konnte jedoch nicht detektiert werden.

Die Fragmentierung des BACH-Derivates (Abbildung 3-XVI, oben) wies im Bereich der glykosidischen Spaltungen einige Unterschiede im Vergleich zu den INH- und BINH-Derivaten auf. Zum einen kam es beim Abbau der Antennen im Komplex-Glykan zu anderen Zwischenstufen – die Fragmente mit einem und zwei Mannoseresten in der Core-Struktur ( $m/z$  963.5;  $m/z$  1124.8) erschienen im Spektrum, dafür fehlten jedoch die Fragmentationen bei  $m/z$  1286 (Y-Abspaltung aller vier GlcNAc in den Antennen) und bei  $m/z$  1327 (Y-Spaltung von drei GlcNAc und einer Mannose). Zum anderen ließen sich auch die für Isomer III charakteristischen Ionen, die durch Abspaltung einer Mannoseeinheit, bzw. durch Abspaltung der Antenne in 6'Position entstehen, nicht detektieren. Am  $B_3$ -Fragment ( $m/z$  1321.5) dagegen verlief der Fragmentierungsweg wie gewohnt, sowohl D-Ionen (Isomer I:  $m/z$  753.3, Isomer II:  $m/z$  956.3, Isomer III:  $m/z$  1159.4), als auch die zugehörigen „bisecting GlcNAc“-Fragmente (Isomer I:  $m/z$  532.2, Isomer II:  $m/z$  735.2, Isomer III:  $m/z$  938.4) zeigten sich in guter Signalstärke. Insgesamt hatte, wie schon im Falle des INH-Derivates, das Ringfragment  $^{0,2}A_5$  ( $m/z$  1644.6) die höchste Intensität des Spektrums. Ansonsten dominierten wiederum die Signale der glykosidischen Spaltungen das Fragmentspektrum. Bei Betrachtung der Ringspaltungen im Fragmentspektrum des BACH-Glykans zeigten sich erneut Isomer-unspezifische Spaltungen der

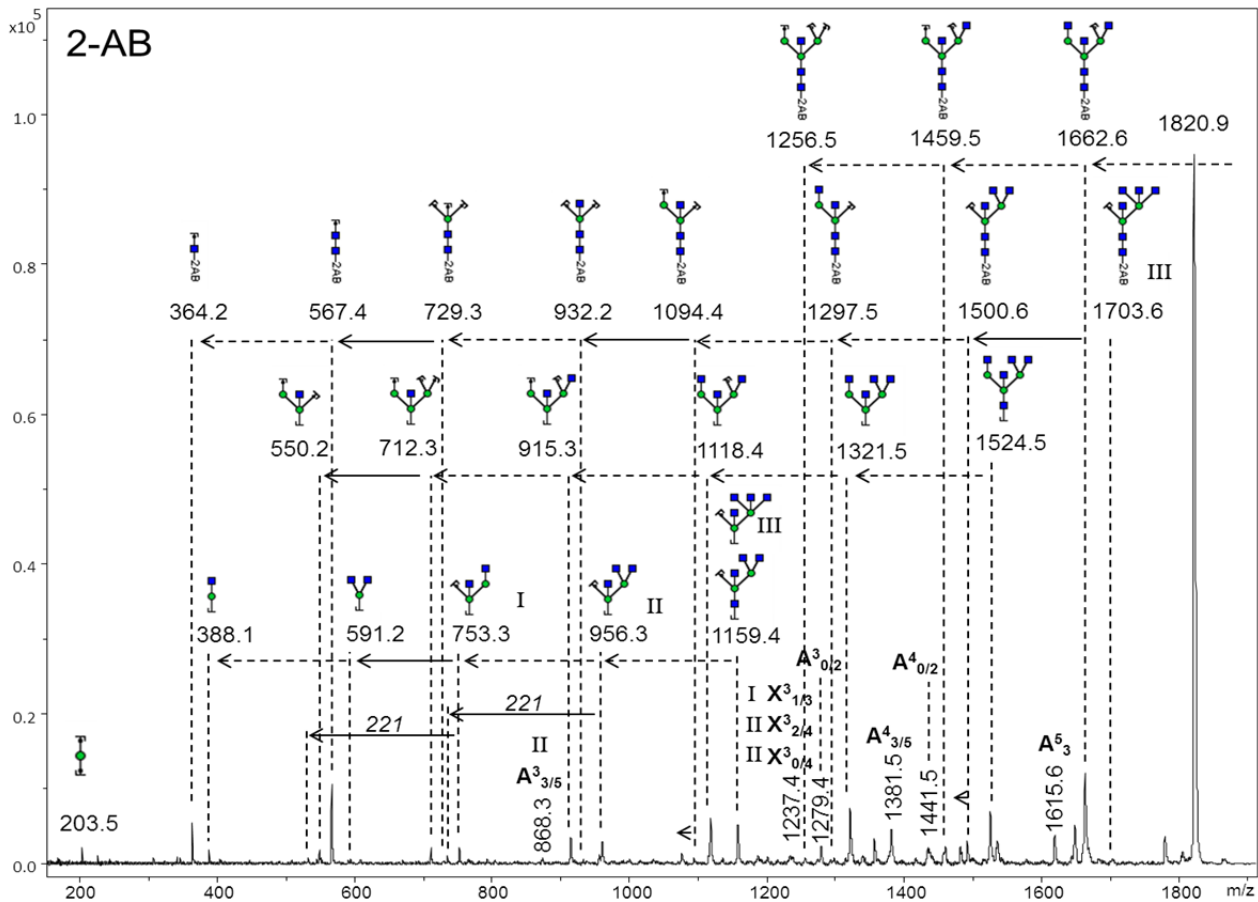
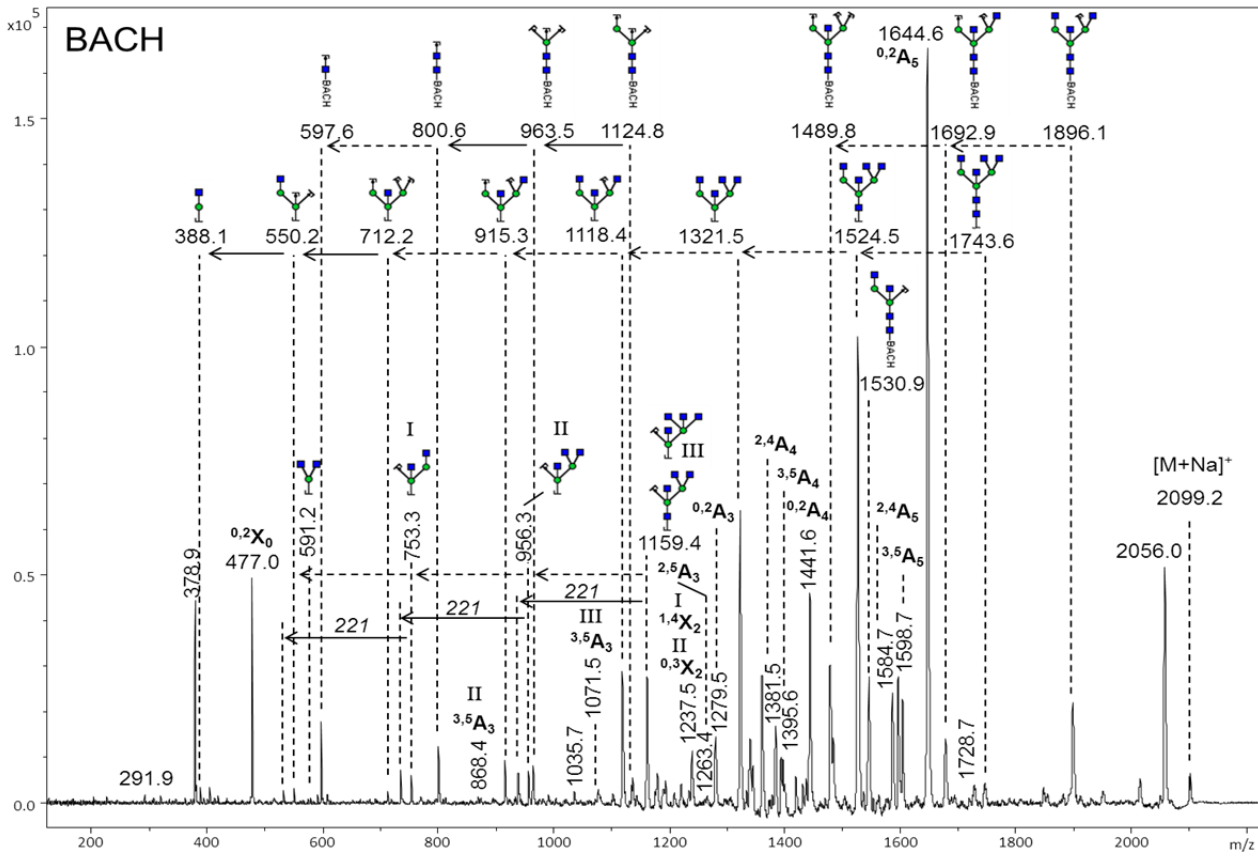


Abbildung 3-XVI: MALDI-TOF/TOF-Spektren der Komplex-Glykane derivatisiert mit BACH ( $m/z$  2099.2, oben) und 2-AB ( $m/z$  1865.9, unten)

*N*-Acetylglucosamineinheiten in der Corestruktur ( $^{2,4}A_4$ :  $m/z$  1381.5;  $^{3,5}A_4$ :  $m/z$  1395.6;  $^{0,2}A_4$ :  $m/z$  1441.6;  $^{2,4}A_5$ :  $m/z$  1584.7;  $^{3,5}A_5$ :  $m/z$  1598.7), sowie der Core-Mannose (I -  $^{1,4}X_2$ , II -  $^{0,3}X_2$ :  $m/z$  1237.5;  $^{2,5}A_3$ :  $m/z$  1263.4;  $^{0,2}A_3$ :  $m/z$  1279.5). Spezifische Spaltungen der  $^{3,5}A_3$ -Position der Core-Mannose traten jedoch nur für Isomer II ( $m/z$  868.4) und Isomer III ( $m/z$  1071.5) auf, die entsprechende  $^{3,5}A_3$ -Spaltung für Isomer I bei  $m/z$  665 fehlte. Auch die beim BINH-Derivat teilweise vorhandenen X-Äquivalente der  $^{3,5}A_3$ -Fragmente waren beim BACH-derivatisierten Glykan nicht nachzuweisen.

Das Spektrum des 2-AB-Derivates (Abbildung 3-XVI, unten) zeigte nur wenig Unterschiede im Vergleich zum underivatisierten Glykan. So konnten zwar alle drei D-Ionen aufgefunden werden (Isomer I:  $m/z$  753.3, Isomer II:  $m/z$  956.3, Isomer III:  $m/z$  1159.4), doch ebenso wie bei dem nativen Glykan, ließen sich nur zu Isomer I und II die dem abgespaltenen „*bisecting GlcNAc*“ entsprechenden Fragmente zuordnen (Isomer I:  $m/z$  532.1, Isomer II:  $m/z$  735.3). Darüber hinaus war auch in diesem Fragmentspektrum nur das zu Isomer III gehörende Ion  $m/z$  1703.6 zu sehen, die Abspaltung der 6'Antenne des Isomers III dagegen nicht. Im Bereich der Ringspaltungen waren nur wenige in den *N*-Acetylglucosaminen der Corestruktur zu sehen ( $^{3,5}A_4$ :  $m/z$  1381.5;  $^{0,2}A_4$ :  $m/z$  1441.5;  $^{3,5}A_5$ :  $m/z$  1615.6), in der Core-Mannose trat eine spezifische Spaltung ein ( $^{3,5}A_3$ :  $m/z$  868.3), die Isomer II zuzuordnen war. Weitere Fragmente der Core-Mannose wurden bei  $m/z$  1237.4 (Isomer I:  $^{1,3}X_2$ ; Isomer II:  $^{2,4}X_2$  und  $^{0,4}X_2$ ) und  $m/z$  1279.4 ( $^{0,2}A_3$ ) detektiert. Sonstige charakteristische Spaltungen zu den jeweiligen Isomeren traten nicht auf. Die glykosidischen Spaltungen die zum Abbau des Glykans führten, entsprachen denen des INH-Derivates, auch hier zeigten  $B_3$ - ( $m/z$  1321.5) und  $B_4$ -Fragment ( $m/z$  1524.5), sowie ein  $Y_4$ -Fragment ( $m/z$  1662.6) die höchsten Intensitäten. Dominiert wurde das Spektrum jedoch durch ein starkes Signal bei  $m/z$  1820.8, welches durch eine Spaltung im Derivatisierungsreagenz entstand.

Abschließend lässt sich sagen, dass durch den Einsatz der Derivatisierungsreagenzien meist eine deutliche Verbesserung der Spektren in Hinblick auf Detektierbarkeit und Entstehung bestimmter Fragmente erreicht wurde. Während bei der Fragmentierung der nativen Glykane nur die D-Ionen, sowie die Isomer III-spezifische Mannose-Abspaltung einen Hinweis auf die verschiedenen Isomere lieferten, zeigte das

INH-Glykan eine zusätzliche Ringspaltung des Isomers II ( $^{3,5}A_3$ ), sowie das  $B_2$ -Fragment ( $m/z$  794.3) von Isomer III. Auch die Anzahl der unspezifischen Ringspaltungen stieg erheblich an. Das beste Ergebnis ergab sich durch die Derivatisierung mit BINH. Obwohl die Gesamtintensität des Spektrums relativ gering war und damit auch die Signale der spezifischen Spaltungen, zeigten sich doch alle zur Identifikation der Isomere wichtigen Fragmente. Dazu zählen sowohl die in Tabelle 3-XIII aufgeführten diagnostischen Ringspaltungen (insbesondere bei  $^{3,5}A_3$ ), als auch glykosidische Fragmente und D-Ionen. Bei dem BACH-derivatisierten Glykan konnten zu Isomer II und III gehörige spezifische Ringfragmente ( $^{3,5}A_3$ ) detektiert werden, in Kombination mit diversen weiteren Ringfragmenten der Core-Struktur. Dagegen ließen sich die zu Isomer III gehörigen glykosidischen Spaltungen nicht detektieren. Auffällig war auch das im Spektrum von BACH und INH dominierende Ringfragment  $^{0,2}A_5$ , welches jedoch im Spektrum des BINH-Derivates nicht auftrat. In welchem Zusammenhang dies mit der Struktur des Derivatisierungsreagenzes oder des endständigen Zuckers steht, ist hingegen unklar. Demgegenüber zeigten sich beim 2-AB-Derivat insgesamt nur wenige Ringspaltungen, von denen eine Isomer II zugeordnet werden konnte. Ansonsten ließ sich lediglich eine weitere charakteristische Spaltung in Form der zu Isomer III gehörigen Mannose-Abspaltung nachweisen.

Insgesamt gesehen brachte die Derivatisierung mit BINH den größten Nutzen zur Bewertung der Isomeren-Spektren. Bereits von *Lattova et al.* [150,166] durchgeführte Untersuchungen an den Phenylhydrazin-, 2-AB- und PMP-Derivaten dieses Komplex-Glykans ergaben, dass zwar 2-AB die höchste Signalintensität erzielte, jedoch auch den geringsten Anteil an Ringspaltungen hatte. In diesem Fall erwies sich ebenfalls das Hydrazin-Derivat als das aussagekräftigste Produkt, wobei, trotz vergleichbarer Messung mittels MALDI-MS/MS, nicht annähernd so viele charakteristische Ionen auftraten, wie bei den in dieser Arbeit verwendeten Derivaten. Zwar ließen sich auch mit Phenylhydrazin die D-Ionen der drei Isomere, inklusive der entsprechenden Abspaltungen des „*bisecting Glycans*“, detektieren. Im Vergleich zu den hier verwendeten INH-, BINH- und BACH-Derivaten jedoch, fehlten die diagnostischen  $A_3$ - und  $X_2$ -Spaltungen. Auch die für Isomer III typischen glykosidischen Spaltungen, wie sie im Fall des BINH-Derivates auftraten (Y-Abspaltung einer Mannose, B- Abspaltung der Antenne), kamen im Spektrum des Phenylhydrazin-Derivates nicht vor. *Harvey et al.* [167] analysierte ebenfalls dieses Glykan in seiner nativen Form, konnte aber auf

diese Weise anhand der D-Ionen nur eines der Isomere nachweisen. Demgegenüber zeigten die am permethylierten Glykan durchgeführten Experimente wesentlich detaillierte Spektren [177]. Die durch die Permethylierung aller am Glykan vorhandenen Hydroxygruppen erhaltenen Informationen sind denen, die durch Hydrazid-Derivatisierung am reduzierenden Ende erhalten wurden, überlegen, da wesentlich mehr spezifische Spaltungen vorhanden sind. Trotzdem bietet die Derivatisierung der Carbonylgruppe auch Vorteile. Zum einen ist dies die potentielle Rückgewinnung der nativen Glykane durch Abspaltung des Derivatisierungsreagenzes, zum anderen die Möglichkeiten die sich beispielsweise durch die Umsetzung mit Biotin ergeben. Des Weiteren bietet die Derivatisierung am reduzierenden Ende eine einfache und schnelle Option, mit geringen Substanzmengen eine Übersicht über die an einem Glykoprotein vorhandenen Glykane sowie deren Strukturen zu gewinnen. Ein Vergleich der verschieden derivatisierten Hybrid-Glykane ist hier nicht dargestellt, da durch ihn keine weitergehenden Erkenntnisse gewonnen werden konnten.



## 2.2.4. Zusammenfassung

Nachdem der Einfluss der Derivatisierungsreagenzien INH, BINH, BACH und 2-AB auf das Verhalten von Mono-, Di- und Trisacchariden beobachtet wurde, erfolgte im nächsten Schritt die Anwendung dieser Substanzen an den *N*-Glykanen zweier Glykoproteine. Zur Gewinnung der Glykane wurden Ribonuclease B und Ovalbumin gewählt, da diese mit allen drei Arten von *N*-Glykanen besetzt sind – Ribonuclease B ausschließlich mit High-Mannose-Glykanen, Ovalbumin sowohl mit High-Mannose-, als auch mit Komplex- und Hybrid-Glykanen. Nach der enzymatischen Abspaltung der Zucker mit PNGase F wurde die Derivatisierung auf gleiche Weise im Thermomixer® durchgeführt, wie zuvor mit den niedermolekularen Zuckern, jedoch in kleinerem Maßstab.

Die nativen und derivatisierten Glykane wurden zunächst mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie in Bezug auf die Vollständigkeit der Umsetzung und zusätzlich auf Steigerung der Signalintensität untersucht. Als geeignetste Matrix zur Messung der nativen, INH- und 2-AB-derivatisierten *N*-Glykane stellte sich DHB heraus, während für die BINH- und BACH-Derivate Super-DHB verwendet wurde. Es zeigte sich, dass einerseits alle Glykane komplett umgesetzt wurden und zum anderen, dass die Sensitivität der Detektion erheblich verbessert wurde. Dadurch konnten bei der Analyse der Glykane des Ovalbumins nach Derivatisierung drei zusätzliche Strukturen nachgewiesen werden.

Auch mittels Precursor-Ion-Scan am ESI-Triplequadrupol-Massenspektrometer ließen sich sämtliche BACH-derivatisierten *N*-Glykane der Ribonuclease B in Form ihrer doppelt geladenen Ionen detektieren. Im Product-Ion-Scan des Mannose-6-Glykans fanden sich ausschließlich glykosidische Spaltungen in Form einfach und zweifach geladener Fragmente. Dadurch konnte die Struktur des BACH-Derivates zwar verifiziert werden, genauere Hinweise auf Verzweigungen und Verknüpfungen lieferte das Spektrum aber nicht. Ein BACH-derivatisiertes Standard-Komplex-Glykan, welches auf gleiche Weise fragmentiert wurde, zeigte das gleiche Verhalten. Auch in diesem Fall entstanden weder Ringfragmente, noch kam es bei einem der Glykane zur Bildung der entsprechenden D-Ionen.

Im Folgenden wurde daher das Fragmentierungsverhalten der Derivate mittels MALDI-TOF/TOF untersucht. Dabei wurde differenziert zwischen Glykanen, bei denen nur eine Struktur einer Masse vorhanden ist und denen, die in Form zweier oder

mehrerer Isomere vorliegen. Im Fall der Ribonuclease B konzentrierte sich die Untersuchung auf das Mannose-6-Glykan, das keine isomeren Strukturen aufweist. Die Spektren der unterschiedlichen Derivate wurden, ebenso wie bereits am ESI-Triplequadrupol, von glykosidischen Spaltungen dominiert. So konnte auf diese Weise der Aufbau des Glykans bestätigt werden, doch im Gegensatz zur vorherigen Methode ließen sich auch verschiedenste Ringspaltungen feststellen. Sowohl D-Ionen, als auch B<sub>3</sub>-Fragmente, welche beide Rückschlüsse auf die Besetzung der Antennen zulassen, traten in den Spektren aller Mannose-6-Glykane auf. Dagegen stieg die Anzahl der Ringspaltungen insbesondere nach Derivatisierung mit BINH und BACH stark an. Während beim underivatisierten Glykan nur einzelne Ringfragmente der peripheren Zucker auftraten, zeigten sich bereits beim INH-Derivat spezifische Spaltungen der Core-Mannose, wie auch eine deutliche Verbesserung der Signalstärke. Im Spektrum des BINH-Derivates steigerte sich die Signalintensität des charakteristischen Fragments <sup>3,5</sup>A<sub>3</sub> deutlich, wodurch die Identifikation deutlich erleichtert wurde. Das BACH-Derivat zeigte ein zusätzliches Ringfragment durch Abspaltung der Antenne an 3'Position, womit die Aufklärung der Antennenzusammensetzung noch vereinfacht wurde. Bei der Fragmentierung des 2-AB-Glykans ergab sich ein ähnliches Bild, wie im Falle des INH-Derivates, die charakteristische <sup>3,5</sup>A<sub>3</sub>-Spaltung ließ sich feststellen, hatte aber nur eine geringe Signalstärke.

Zum Vergleich wurde anhand eines Komplex-Glykans des Ovalbumins das Verhalten isomerer Strukturen vor und nach der Derivatisierung untersucht. Besagtes Komplex-Glykan besteht aus einer Mischung von drei isomeren Strukturen, die sich in ihren D-Ionen, sowie in einigen spezifischen Fragmenten unterscheiden. Am nativen Glykan entstanden durch die Fragmentierung alle zugehörigen D-Ionen, wie auch weitere spezifische glykosidische Fragmente. Diagnostische Ringspaltungen konnten jedoch nicht detektiert werden. Nach der Derivatisierung zeigte wiederum BINH die besten Resultate, da sowohl charakteristische glykosidische Fragmente, als auch Ringspaltungen zu den jeweiligen Isomeren vorhanden waren. Durch die INH-Derivatisierung kam es ebenfalls zu einer Verbesserung der Fragmentierungseigenschaften, gleichwertig mit denen die durch die Derivatisierung mit 2-AB erreicht wurden. Demgegenüber steht jedoch der bei INH erheblich einfachere Derivatisierungsvorgang. BACH zeigte ebenfalls eine Steigerung der Fragmentierung, wenn

auch nicht im gleichen Ausmaß wie BINH. Dennoch war bei allen Derivaten eine deutliche Verbesserung zum nativen Glykan zu erkennen.

Zusammengefasst profitierte die Analyse der *N*-Glykane durch die Umsetzung mit den verschiedenen Derivatisierungsreagenzien. Sowohl die Sensitivität der Detektion, als auch das Fragmentierungsverhalten der Glykane wurden entscheidend verbessert. Insbesondere die Kopplung an BINH führte zu einer deutlichen Steigerung der Fragmentierung in Bezug auf spezifische Ringspaltungen in den Glykanen. Bei der Vermessung mittels MALDI erwies sich auch die Hydrazid-Derivatisierung erneut als vorteilhaft gegenüber der reduktiven Aminierung. Durch die Abwesenheit von Salzen im Reaktionsgemisch ließen sich die Hydrazid-derivatisierten Glykane schon bei wesentlich geringeren Mengen fragmentieren, als die entsprechenden 2-AB-Derivate, selbst wenn diese einem Reinigungsschritt unterzogen wurden. Daher zeigten sich die Hydrazide auch in dieser Anwendung dem Aminierungsreagenz überlegen.

## 2.3. Glykan-Array von BINH-Derivaten

### 2.3.1. Hintergründe

Das Prinzip eines Glykan-Arrays besteht in der Interaktion von Glykanen und Glykan-bindenden Substanzen, wie Lektinen oder Antikörpern. Einer der Interaktionspartner ist dabei an eine Oberfläche gebunden und somit immobilisiert. Die andere Substanz liegt so modifiziert vor, dass ihre Bindung an den Partner fluorimetrisch oder kolorimetrisch detektiert werden kann. Dabei können, je nach Ziel der Untersuchung, sowohl die Glykan-bindenden Substanzen, als auch die Glykane an die Oberfläche geknüpft werden [178]. Anwendung finden Glykan-Arrays nicht nur in der Analyse von Kohlenhydratstrukturen, sondern auch bei der Suche nach Kohlenhydrat-bindenden Liganden. Ziel dieser Untersuchungen ist es, herauszufinden, welche Kohlenhydratstrukturen mit welchen Kohlenhydrat-bindenden Liganden interagieren, um einen Hinweis zu bekommen, was für Prozesse dadurch ausgelöst werden. Da Glykane an zahlreichen biologischen Abläufen, sowohl physiologischer, als auch pathologischer Art, beteiligt sind, ergeben sich dadurch Möglichkeiten zur diagnostischen Anwendung von Glykan-Arrays. So kommt es beispielsweise durch Krebserkrankungen zu Veränderungen des Glykanmusters von Zellen; diese lassen sich mit Hilfe von Glykan-Arrays ausfindig machen [178,179]. Auch Infektionskrankheiten können über das Vorhandensein Bakterien-spezifischer Glykanmuster, oder die Detektion von Anti-Kohlenhydrat-Antikörpern im Serum ermittelt werden [178,180].

Zur Untersuchung von Glykanstrukturen werden meist Lektine eingesetzt, da diese spezifisch an Mono- oder Oligosaccharidstrukturen binden. Lektine sind Proteine, die ubiquitär in allen Lebensformen vorkommen, wobei meist pflanzliche Lektine als analytische Reagenzien Verwendung finden [1]. Zwar ist die Spezifität von Antikörpern für Glykane meist höher, doch im Gegensatz zu Lektinen sind sie weniger stabil und meist wesentlich teurer. Darüber hinaus ist die Herstellung von Glykan-Antikörpern aufgrund der großen Diversität von Glykanstrukturen sehr aufwendig, während mit Hilfe von leicht gewinnbaren Lektinen ein großes Spektrum an Glykanen charakterisiert werden kann [1,176,177].

Die Immobilisierung von Lektinen oder Glykanen auf Mikrotiterplatten oder zweidimensionalen Oberflächen („Chips“) kann sowohl über kovalente, als auch über nicht-kovalente Bindungen erfolgen. Kovalente Bindungen werden über derivatisierte

Oberflächen hergestellt, diese sind beispielsweise mit Hydrazid-, oder Aminoxygruppen besetzt, die mit den reduzierenden Enden von Kohlenhydraten reagieren [183,184]. Mittels Polystyren- [185] und Nitrocellulose-modifizierten [180] Oberflächen konnten Kohlenhydrate nicht-kovalent gebunden werden. Insbesondere bei der Verwendung der nicht-kovalenten Methoden ergeben sich jedoch Probleme bei der Effektivität der Immobilisierung der Kohlenhydrate. Dort kann, je nach Struktur der verwendeten Zucker und Glykane, die Adsorptionsfähigkeit an die Oberfläche stark variieren [186].

Als verlässliches System hat sich dagegen die Kombination von (Strept-)Avidin und Biotin erwiesen. Auch hier erfolgt die Bindung des Biotins nicht-kovalent, doch aufgrund der sehr hohen Affinität von Avidin und Streptavidin zu Biotin ( $K_a \sim 10^{13-15} \text{ M}^{-1}$ ), wird davon ausgegangen, dass die Struktur des Kohlenhydrates keinen Einfluss auf die Effektivität der Bindung hat [181,182]. Avidin ist ein Glykoprotein, das in den Eileitern von Vögeln sowie im Eiweiß der Eier vorhanden ist [188], wogegen Streptavidin von dem Bakterium *Streptomyces avidinii* gebildet wird. Der größte Unterschied dieser Substanzen besteht darin, dass Avidin an jeder seiner vier Untereinheiten glykosyliert ist und außerdem eine hohe Basizität (Isoelektrischer Punkt [pI] > 10) besitzt. Dadurch kann es zur Bildung unspezifischer Wechselwirkungen mit negativ geladenen Molekülen oder Zucker-bindenden Proteinen kommen [189], wodurch der Einsatz für analytische Methoden beeinträchtigt wird. Stattdessen wird häufig das neutrale (pI 5-6) Streptavidin eingesetzt, welches keine Glykosylierungen besitzt und somit auch weniger unspezifische Bindungen eingeht [62]. Anwendung findet das Avidin-Biotin-System nicht nur in Arrays, sondern auch in der Affinitätschromatographie, bei Blots und weiteren Methoden, die es notwendig machen, Substanzen auf Zuckerbasis zu isolieren oder fixieren [62,189].

### 2.3.2. Durchführung des BINH-Glykan-Arrays

Der Einsatz des Avidin-Biotin-Systems für Glykan-Protein-Interaktionsstudien wird dadurch ermöglicht, dass zur Erkennung von Biotin nur dessen bicyclischer Ring benötigt wird [187]. Aus diesem Grund kann zum einen das Biotin an der Carboxylgruppe modifiziert werden, zum anderen kann es an höhermolekulare Substanzen wie Glykane oder Proteine gekoppelt werden. Darüber hinaus ist die Struktur des Biotins so klein, dass die biologische Aktivität der gekoppelten Substanzen meist nicht beeinflusst wird (allgemeiner Aufbau siehe Kapitel 1.2.4.) [62]. Das in dieser Arbeit bearbeitete BACH gehört zu den Biotinylierungsreagenzien, die bereits zur Derivatisierung von Glykanen für Glykan-Interaktionsstudien eingesetzt wurden. Anhand der Interaktion von verschiedenen Glykanen mit den dazu passenden Lektinen konnte gezeigt werden, dass BACH sowohl dazu geeignet ist, Glykane auf Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten [61,185] oder Sensorchips [67] zu immobilisieren, als auch, dass die dabei verwendeten Lektine in der Lage sind, die derivatisierten Glykane spezifisch zu binden. Beispielsweise konnte die Bindung von BACH-derivatisierten High-Mannose-Glykanen an Concanavalin A nachgewiesen werden [190]. Auch die Identifikation der Glykanbesetzung eines Schnecken-Proteins (*keyhole limpet hemocyanin*, KLH) mittels Kohlenhydrat-bindender Proteine (CBP) wurde mittels BACH-Derivatisierung durchgeführt [191].

Inwiefern sich BINH als Derivatisierungsreagenz für den Einsatz in Glykan-Interaktionsstudien eignet, wurde anhand eines Fluoreszenz-Arrays getestet, der sowohl die Bindung der BINH-Derivate an Streptavidin, als auch die Wechselwirkung mit spezifischen Lektinen nachweisen sollte. Als Zucker-Derivate dienten zum einen die High-Mannose-Glykane von Ribonuclease B, zum anderen das Monosaccharid Mannose.

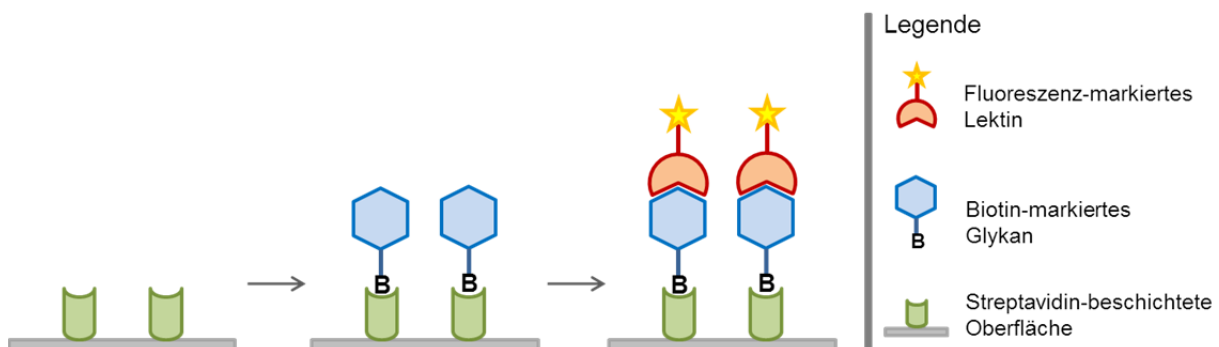


Abbildung 4-1: Ablauf eines Fluoreszenz-Arrays mit biotinylierten Glykanen

Für den spezifischen Nachweis dieser Strukturen wurde Fluoreszenz-markiertes Concanavalin A (Con A) eingesetzt, da dieses Lektin in der Lage ist endständige Mannose- und Glucose-Einheiten zu binden [192].

Zunächst erfolgte der Versuch in Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten, in denen die BINH-Derivate erst inkubiert, anschließend mit Con A versetzt und vermessen wurden. Da die Empfindlichkeit des Fluoreszenzmessgerätes jedoch zu gering war um die Signale des Lektins zu detektieren, wurde der Versuch auf Streptavidin-beschichtete Glas-Chips umgestellt (Versuchsbeschreibung siehe Kapitel 5.2.6.). Diese hatten den weiteren Vorteil, dass geringere Probenmengen benötigt wurden. Zusätzlich erfolgte die präparative Aufreinigung von Mannose-BINH, um überschüssiges Derivatisierungsreagenz zu entfernen, welches ebenfalls an Streptavidin bindet und somit die Konzentration an gebundenem Glykan verringert. Die Glykane der Ribonuclease B wurden keinem weiteren Reinigungsschritt unterzogen, um Substanzverluste zu vermeiden.

Auf den Streptavidin-beschichteten Glas-Chips wurden drei verschiedene Konzentrationen des Mannose-BINH-Derivates (10 µg/ml, 25 µg/ml, 75 µg/ml) sowie die mit BINH-derivatisierten Glykane von 1 mg Ribonuclease B mittels Pipette aufgetragen. Die Auftragung der Substanzen mit Hilfe des Printers war nicht durchführbar, da die Spots stark verliefen und dadurch keine genaue Abgrenzung der verschiedenen Konzentrationen möglich war (siehe Abbildung 4-II, Reihe 2). Zum Abblocken des überschüssigen Streptavidins wurde Biotin-haltiger Puffer verwendet. Dadurch sollten unspezifische Bindungen des Streptavidins verhindert, und somit ein niedriges Hintergrundsignal gewährleistet werden. Nach anschließender Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten Con A wurden die Chips bei einer Wellenlänge von 670 nm vermessen.

Abbildung 4-II zeigt die Aufnahme der Fluoreszenz der beiden BINH-Derivate. Zur Auswertung wurden zwei verschiedene Kontrastfarben (rot/blau) gewählt, um eine bessere Abgrenzung der Probenfluoreszenz vom Hintergrund zu erreichen. Die Reihen 1-4 des Glaschips zeigen die Auftragepunkte der BINH-Glykane von Ribonuclease B, die Reihen 5, 6 und 7 die der verschieden konzentrierten Mannose-BINH-Proben. Die beiden unteren Felder (Reihe 8) dienten als Blindwerte zur Hintergrundmessung.

Anhand der linken Abbildung war die durch die *N*-Glykane verursachte Fluoreszenz gut sichtbar, auch wenn nur vier der acht Felder ein Signal gaben. Besonders Rei-

he 1 zeigte, dass sowohl eine Bindung der biotinylierten Glykane an das Streptavidin stattgefunden hatte, als auch, dass diese durch Con A spezifisch erkannt wurden. Aus welchem Grund nicht bei allen Glykanproben eine Fluoreszenz nachweisbar war, ist unklar. Mögliche Ursachen dafür sind eine Verletzung der Chipoberfläche durch den Kontakt mit anderen Materialien (Pipettenspitzen, Handschuhe, etc.), oder eine unzureichende Durchmischung der Probe.

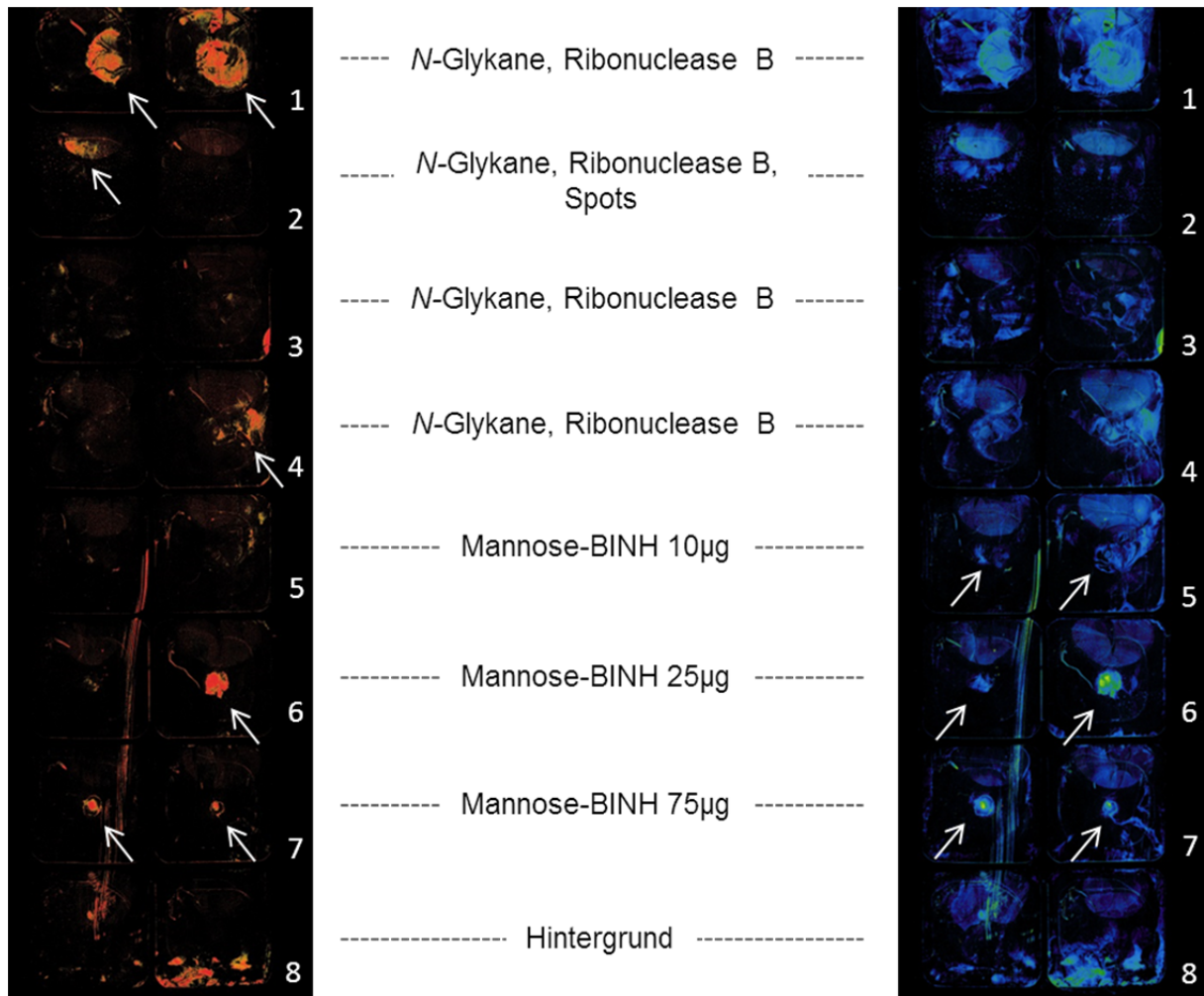


Abbildung 4-II: Fluoreszenzmessung der BINH-Derivate der High-Mannose-Glykane von Ribonuclease B, sowie von Mannose-BINH. Die Probenspots sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Für die linke Abbildung wurden rote Kontrasteinstellungen gewählt um die Fluoreszenz der Ribonuclease-B-Derivate hervorzuheben, rechts zeigt sich anhand der blauen Kontraste die Fluoreszenz der Mannose-Derivate.

Mit Hilfe der rechten Abbildung konnte die Bindungsfähigkeit von Mannose-BINH bestätigt werden. Der Konzentrationsanstieg der Proben ließ sich anhand der Fluores-



zennzunahme verfolgen, wobei jedoch eine der Mannose-Proben mit der Konzentration 25 µg/ml eine Ausnahme bildete. Diese zeigte trotz mittlerer Konzentration die höchste Fluoreszenz der Mannose-Derivate. Während Untersuchungen an den Biotinylierungsreagenzien BNAH und BAP ergaben, dass Glykane-Derivate, die aus weniger als drei Mannose-Einheiten bestanden, durch Con A nicht gebunden werden konnten [65], ließ sich dies an den BINH-Derivaten nicht bestätigen. Auch durch die einzelne Mannose-Einheit des Mannose-BINHs konnte eine Bindung an Con A nachgewiesen werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Versuche mittels Glykan-Array vielversprechende Ergebnisse in Bezug auf das Potential von BINH als Derivatisierungsreagenz für Glykan-Interaktionsstudien ergaben. Um sicherzustellen, dass die für diese Derivate gewählten Bedingungen auch für andere BINH-Derivate geeignet sind, muss durch weitere Messungen bestätigt werden.

### 2.3.3. Zusammenfassung

Kohlenhydrate sind an den verschiedensten biologischen Prozessen beteiligt, dabei spielt auch die Interaktion mit Lektinen und anderen Kohlenhydrat-bindenden Proteinen eine Rolle. Mit Hilfe von Glykan-Arrays können sowohl die Glykane eines Glykokonjugates charakterisiert, als auch die Bindungsspezifitäten von Lektinen bestimmt werden. Dadurch lassen sich Glykan-Arrays nicht nur für analytische Zwecke anwenden, sondern können auch für die Diagnostik von Krankheiten eingesetzt werden.

Für die Immobilisierung der BINH-derivatisierten Glykane wurden Streptavidin-beschichtete Glas-Chips verwendet, da diese eine sehr hohe Affinität zu Biotin und Biotin-Derivaten aufweisen. Auf diese Oberfläche wurden die derivatisierten *N*-Glykane von Ribonuclease B, sowie Mannose-BINH gebunden und anschließend mit dem Mannose-spezifischen Lektin Concanavalin A nachgewiesen. Anhand der entstehenden Fluoreszenz konnte bewiesen werden, dass die Derivate sowohl in der Lage waren, an das Streptavidin zu binden, als auch durch das Lektin erkannt zu werden. Durch diese Experimente zeigte sich die grundlegende Eignung von BINH-Derivaten für Glykan-Arrays und damit auch für Interaktionsstudien und andere biochemische Methoden.



## **3. Zusammenfassung**

Glykane sind weitverbreitete Biomoleküle, die meist in Form von Glykokonjugaten, wie beispielsweise als Glykoproteine oder Glykolipide, vorliegen. Durch die Interaktion von Glykanen mit Glykan-bindenden Proteinen wird eine Vielzahl an biochemischen Prozessen ausgelöst, sowohl physiologischer, als auch pathologischer Art. Die Aufklärung der beteiligten Glykanstrukturen ist daher nicht nur wichtig für das Verständnis dieser Prozesse, sondern kann auch Hinweise auf verschiedene Erkrankungen geben.

Die Identifizierung von Glykanstrukturen kann über verschiedene Wege erfolgen. In der instrumentellen Analytik spielt dabei vor allem die ESI- und MALDI-Massenspektrometrie eine wichtige Rolle, da diese sowohl für Detektion, als auch Fragmentierung großer Biomoleküle geeignet sind. Um die Analyse von Zuckern mittels chromatographischer und massenspektrometrischer Methoden zu erleichtern, werden häufig Derivatisierungsreagenzien eingesetzt. Diese verringern die Polarität der Zucker und erleichtern die Detektion durch das Einbringen von Chromo- oder Fluorophoren. Zur Derivatisierung am reduzierenden Terminus von Glykanen und Zuckern eignen sich vor allem Aminierungsreagenzien oder Hydrazide. Hydrazide haben gegenüber anderen Derivatisierungsreagenzien den Vorteil einer einfachen, salzfreien Umsetzung, aus der ein stabiles Derivat mit geschlossenem terminalen Zuckerring hervorgeht.

Für die vorliegende Arbeit wurde die Derivatisierung mit den neuen Hydrazid-Reagenzien INH und BINH, sowie dem bereits von *Dr. P. Kapková* [99] bearbeiteten BACH untersucht. Als Vergleich dienten die underivatisierten Kohlenhydrate, wie auch das standardmäßig eingesetzte Aminierungsreagenz 2-AB. Dabei sollte das Verhalten verschiedener Zucker und Glykane in Bezug auf chromatographische Trennung, Signalintensität und Fragmentierung analysiert werden.

Zunächst wurde die Umsetzung von Mono-, Di- und Trisacchariden mit den neuen Derivatisierungsreagenzien INH und BINH optimiert. Dadurch konnte bei beiden Substanzen die komplette Umsetzung der Zucker in ihre Derivate gewährleistet werden. Auch die Derivatisierung mit Hilfe der Mikrowelle konnte bei INH erfolgreich durchgeführt werden. Auf diese Weise ließ sich die Reaktionszeit, im Vergleich zu den im Thermomixer® benötigten 90 Minuten, auf 20 Minuten verkürzen. Aufgrund der großen Mengen an Zucker und Derivatisierungsreagenz, die für die Umsetzung in der Mikrowelle nötig sind, war der Versuch jedoch nur für INH geeignet.

Im nächsten Schritt wurde das Trennverhalten der verschiedenen Mono-, Di- und Trisaccharid-Derivate auf RP-C18- und HILIC-Phasen untersucht. Bei den Monosacchariden konnte durch keines der Derivate eine vollständige Trennung auf einer der Phasen erreicht werden. Das beste Ergebnis wurde durch INH auf der HILIC-Säule erzielt, doch auch dort konnten die Epimere Glucose, Mannose und Galactose nicht vollständig separiert werden. Die Trennung der Disaccharide Maltose, Cellobiose und Lactose konnte auf der HILIC-Phase mit allen Derivaten außer BACH erfolgreich durchgeführt werden, auf der RP-C18 erwies sich dagegen nur 2-AB als geeignet. Bei den Trisacchariden 3'SLN und 6'SLN konnten sowohl underivatisierte Zucker, als auch sämtliche Derivate mittels HILIC getrennt werden. Auch auf der C18-Phase war eine Trennung der BINH, BACH und 2-AB-Derivate möglich. Des Weiteren konnte durch die Derivatisierungen die Signalintensität gegenüber den underivatisierten Zuckern deutlich gesteigert werden.

Nach ihrer Trennung lassen sich massegleiche Di- und Trisaccharide anhand des Fragmentierungsmusters unterscheiden. Während bei den underivatisierten Disacchariden Maltose, Cellobiose und Lactose die charakteristischen Fragmente nur schwach sichtbar waren, konnte mit Hilfe der Hydrazide INH, BINH und BACH die Differenzierung deutlich erleichtert werden. Die 2-AB-Derivatisierung zeigte dagegen keine Verbesserung der Fragmentierungseigenschaften. Bei der Unterscheidung der Trisaccharide 3'SLN und 6'SLN waren ebenfalls sowohl underivatisierte, als auch Hydrazid-derivatisierte Zucker im Vorteil gegenüber den 2-AB-Derivaten.

Die Derivatisierung der *N*-Glykane von Ribonuclease B und Ovalbumin führte bei der Analyse mittels MALDI-TOF zu einer deutlichen Steigerung der Sensitivität. Beispielsweise ließen sich bei den Glykanen des Ovalbumins durch die Derivatisierungen drei zusätzliche Strukturen im Vergleich zu den nativen Glykanen detektieren. Auch das Fragmentierungsverhalten der Glykane am MALDI-TOF/TOF konnte mit Hilfe der Derivatisierungen erheblich verbessert werden. Besonders die Umsetzung mit BINH führte zu einer Vielzahl charakteristischer Ringfragmente, wodurch die Aufklärung der verschiedenen Glykanstrukturen deutlich vereinfacht wurde. Auch im Vergleich zu 2-AB zeigten die Hydrazid-Derivate sowohl bessere Fragmentierungseigenschaften, als auch eine einfachere Handhabung für die Messung mittels MALDI-MS.

Eine weitere Möglichkeit zur Identifikation von Glykanstrukturen liegt in der spezifischen Bindung durch Lektine. Diese Untersuchung gibt des Weiteren auch einen

Hinweis auf funktionelle Eigenschaften der Glykane. Dafür wird die hohe Affinität von Biotin-haltigen Derivatisierungsreagenzien zu Avidin und Streptavidin genutzt. Nach der auf diese Weise erfolgten Immobilisierung der Glykane können diese mittels spezifischer Lektine nachgewiesen werden. Die Eignung des neuen Derivatisierungsreagenzes BINH für diese Zwecke wurde anhand eines Glykan-Arrays getestet. Dadurch ließ sich bestätigen, dass BINH-derivatisierte Glykane und Zucker sowohl in der Lage sind an Streptavidin zu binden, als auch durch Lektine nachgewiesen werden können. Daher kann davon ausgegangen werden, dass BINH grundsätzlich für den Einsatz in biochemischen Methoden geeignet ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Derivatisierung von Kohlenhydraten mit INH, BINH und BACH zu einer deutlichen Verbesserung der Trenn- und Fragmentierungseigenschaften führten. Dadurch konnten Identifizierung und Strukturanalyse sowohl von kleinen Zuckern, als auch von Glykanen erleichtert werden. Im Vergleich zu dem Standard-Derivatisierungsreagenz 2-AB zeigten die Hydrazide nicht nur im Bereich der Fragmentierungen, sondern auch durch die einfachere Derivatisierungsreaktion wesentliche Vorteile.

## 4. Summary



Glycans are widely spreaded biomolecules, which are commonly presented as glycoconjugates, e.g. glycoproteins or glycolipids. The interaction of glycans with glycan-binding proteins triggers numerous physiological and pathological processes in biochemistry. Therefore the determination of the participating glycanstructures is of immens interest for the understanding of such processes. The structures of the involved glycans may even provide evidence on several diseases.

Identification of glycan structures can be performed by means of various techniques. Favorable techniques in analytical chemistry are ESI- and MALDI- mass spectrometry, since they can be used for the detection, as well as for the fragmentation of large biomolecules. To simplify the analysis of carbohydrates by means of chromatographic and mass spectrometric methods, different derivatization reagents are available. The chemical modification of the sugars leads to a decrease in polarity and to an enhanced detection by coupling to chromo- or fluorophores. Derivatization at the reducing end of saccharides and glycans can be performed through reductive amination, or coupling to hydrazide reagents. The advantage of hydrazides in comparison to other derivatization reagents lies in a simple, salt-free reaction and results in a stable derivative with closed terminal sugar ring, as the reduction step is not necessary.

The present work concentrates on the derivatization of sugars and glycans using the newly developed hydrazides INH and BINH, in addition to BACH, which was already used by Dr. P. Kapková [99]. The derivatives of those reagents were compared to the underivatized carbohydrates, as well as to the commonly used derivatization reagent 2-AB, in order to observe the characteristics related to liquid chromatography, signal intensity and fragmentation behavior.

In the first step, the derivatization reaction of mono, di- and trisaccharides with INH and BINH was optimized, in order to ensure a complete transformation of the carbohydrates into their derivatized equivalents. The derivatization with INH was also performed via microwave. In this way, the reaction time was reduced from 90 minutes using the thermomixer®, to 20 minutes. Since this method required a high amount of sample, it was only performed with INH.

Next, the chromatographic behaviour of the different saccharide derivatives was analyzed by reversed phase and HILIC high performance liquid chromatography. In case of the monosaccharides, none of the mixtures of derivatives could be separated completely on either of these columns. For HILIC the best effect was achieved with INH,

even though glucose and its epimers, mannose and galactose could not be separated completely. On reversed phase, derivatization with BACH and 2-AB showed the best results for the separation of the monomers, but here as well the epimers were not dissolved. The separation of the INH, BINH and 2-AB derivatives of the disaccharides maltose, cellobiose and lactose was performed successfully on HILIC, with RP-C18 only 2-AB was proved to be suitable. For the trisaccharides 3'SLN and 6'SLN the native forms, as well as all of the derivatives were separated using HILIC. Even by using reversed-phase, the separation of the BINH, BACH and 2-AB derivatives was possible. Furthermore the signal intensity of the derivatized carbohydrates was considerably enhanced compared to the native saccharides. The chromatography of sugars on HILIC phase showed presence of isomers (very probably the anomers) of the analyzed sugars. If the appearance of these isomers is not desirable, separation on reversed-phase can be applied.

After separation, di- and trisaccharides of the same mass can be distinguished, based on their fragmentation pattern. Whereas the native disaccharides maltose, cellobiose and lactose showed only slight differences in fragmentation, the derivatization with INH, BINH and BACH increased the number of characteristic fragments. In contrast, with 2-AB no improvement was achieved. The discrimination between 3'SLN and 6'SLN was also simplified by derivatization with the different hydrazides. In contrast to the 2-AB derivatives, the native trisaccharides showed a high content of characteristic fragments as well.

For the glycans of ribonuclease B and ovalbumin, the sensitivity was clearly improved through derivatization. In the case of ovalbumin, three additional structures were detected, compared to the native glycans. Regarding the fragmentation by means of MALDI-TOF/TOF, the fragmentation behaviour of the glycans was considerably better after derivatization. Especially the BINH derivatives generated a high amount of characteristic cross-ring fragmentations. This way, the elucidation of different isomeric glycan structures was enhanced. Again, 2-AB had worse characteristics in terms of fragmentation behaviour and application properties, compared to the hydrazide derivatives.

Another option for the investigation of glycan structures is the specific recognition by lectins. This kind of study also provides information on the functional properties of glycans. Biotinylated derivatives possess a high affinity to avidin and streptavidin. This

feature is used to immobilise glycans on (strept-)avidin coated surfaces, so they can be further analyzed by specific lectins. Due to this, the suitability of BINH for functional studies was tested. In initial studies BINH derivatized glycans and sugars were confirmed to bind to streptavidin and were recognized by lectins as well. Hence, it can be assumed that BINH derivatives are suitable for this kind of biochemical analysis.

In summary, the derivatization of carbohydrates using INH, BINH and BACH improved the behaviour of the analytes during liquid chromatography and mass spectrometric fragmentation. Hence, identification and structural analysis of small saccharides, as well as glycans were considerably simplified. Compared to common derivatization reagents like 2-AB, the hydrazides showed significant advantages, not only in terms of mass spectrometric fragmentation, but also because of their simple derivatization reaction.

## 5. Experimenteller Teil

## 5.1. Materialien

### 5.1.1. Geräte und Software

Gerät	Firma
Fluoreszenzmeßgerät: GenePix Personal 4100A	Molecular Devices, LLC (Sunnyvale, Kalifornien, USA)
HPLC-MS: System I: Vakuum-Entgaser: G1379A Binäre Pumpe: G1312A Autosampler: G1329A Autosampler-Thermostat: G1330B Diodenarraydetektor: G1315B LC/MSD Trap: G2445D Software: ChemStation, Version:	Agilent (Waldbronn, Deutschland)
System II: Vakuum-Entgaser: G1379B Binäre Pumpe: G1312B Autosampler: G1367D Säulen-Thermostat: G1316B Diodenarraydetektor: G1315C Triplequadrupol: G6460A Software: MassHunter, Version:	
System III: Vakuum-Entgaser: G1379B Kapillarpumpe: G1376A Nanopumpe: G2226A Säulen-Thermostat: G1316A Micro-Wellplatesampler: G1377A ChipCube: G4240 Triplequadrupol: G6460A Software: MassHunter, Version:	

## Experimenteller Teil

---

### HPLC-Säulen:

Kinetex C18 (100 x 2.1mm, 2.6µm)	Phenomenex
Kinetex HILIC (100 x 2.1mm, 2.6µm)	(Aschaffenburg, Deutschland)
Nucleosil C8 (250 x 4mm, 5µm)	Knauer (Berlin, Deutschland)
HPLC-Säule für ChipCube:	Agilent (Waldbronn, Deutschland)
PGC-Chip (Enrichment-Säule: 40nl, Trennsäule: 0.075 x 43 mm)	

---

MALDI-MS: Bruker (Billerica, Massachusetts, USA)

### System I:

Autoflex TOF

Software: Flex Control/ Analysis

### System II:

Ultraflex TOF/TOF

Software: Flex Control/ Analysis

---

Microarray-Kit: Schleicher&Schuell Bioscience  
MicroCASTer 8-Pin System (Dassel, Deutschland)

---

Mikrowelle: MLS (Leutkirch, Deutschland)  
MLS-Ethos 1600

---

pH-Meter: Radiometer Analytical SAS,  
MeterLab PHM 220 (Lyon, France)

---

Pipetten: Eppendorf (Hamburg, Deutschland)  
Eppendorf Reference

---

Spritzenpumpe: KD Scientific  
KDS100 (Holliston, Massachusetts, USA)

---

Thermomixer: Eppendorf (Hamburg, Deutschland)  
Thermomixer® comfort

---

Ultraschallbad: Bandelin Electronic,  
Bandelin Sonorex RK 100 (Berlin, Deutschland)

---

Vakuumkonzentrator: Eppendorf (Hamburg, Deutschland)  
Eppendorf concentrator 5301

---

Vortex: Scientific Industries  
Vortex Genie 2 (Bohemia, New York, USA)

---

Waagen:

---

Analysenwaage, AB 104-S/PH	Mettler Toledo (Gießen, Deutschland)
Präzisionswaage, CPA225D-0CE	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Zentrifugen:	
EBA 12	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Multifuge 1 L-R	Heraeus Instruments (Osterode, Deutschland)
Fisherbrand Mini-Zentrifuge	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)

Tabelle 5-I: Verwendete Geräte

### 5.1.2. Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Verbrauchsmaterialien	Firma
GlycoClean S Cartridges	Prozyme (San Leandro, Californien, USA)
HPLC-Vials, Glas	Phenomenex (Aschaffenburg, Deutschland)
HPLC-Vials, Polypropylen	Agilent (Waldbronn, Deutschland)
Mikrovolumeneinsätze für Vials	Agilent (Waldbronn, Deutschland)
Pipettenspitzen	Hartenstein (Würzburg, Deutschland) Eppendorf (Hamburg, Deutschland) VWR (Darmstadt, Deutschland)
Reaktionsgefäße, 1.5ml, Polypropylen	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße, 1.5ml, Polypropylen, Safe-Lock	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Streptavidin-beschichtete Glasträger	PolyAn (Berlin, Deutschland)

Tabelle 5-II: Verbrauchsmaterialien

**Experimenteller Teil**

<b>Chemikalien</b>	<b>Reinheit</b>	<b>Firma</b>
Acetonitril	HPLC gradient grade	VWR (Darmstadt, Deutschland)
N-Acetylglucosamin	puriss. p.a.	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Ameisensäure	puriss. p.a.	Fluka (Buchs, Schweiz)
ACTH	puriss. p.a.	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ammoniumacetat	≥99 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
Angiotensin I	puriss. p.a.	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Anthranilsäureamid	≥98 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
D-(+)-Biotin	≥98 %	Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, USA)
Biotinamidocaproylhydrazid	≥95 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
BSA	≥98 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Calciumchlorid	≥97 %	Grüssing (Filsum, Deutschland)
Cellobiose	puriss. p.a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
ConA-Alexa 647	puriss. p.a.	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
2,5-Dihydroxybenzoesäure	≥99 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Dimethylsulfoxid	puriss. p.a.	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dinatriumhydrogenphosphat	99,5 %	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure	puriss. p.a.	Fluka (Buchs, Schweiz)
Ethanol, absolut	≥99 %	Honeywell Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland)
Fucose	puriss. p.a.	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Galactose	≥99 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)



Glucose	≥99 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Insulin B-Kette	puriss. p.a.	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Isoniazid	≥99 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
Kaliumchlorid	≥99 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat	99,5 %	Grüssing (Filsam, Deutschland)
Lactose-Monohydrat	≥99 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
Magnesiumchlorid	≥98 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Maltose-Monohydrat	≥99 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Man6-Standardglykan	puriss. p.a.	Prozyme (San Leandro, Californien, USA)
Mannose	≥99 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
Melezitose-Dihydrat	puriss. p.a.	Ega-Chemie (Steinheim, Deutschland)
NA2-Standardglykan	puriss. p.a.	Prozyme (San Leandro, Californien, USA)
Natriumchlorid	≥99,5 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumcitrat	≥98 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Natriumcyanoborhydrid	≥95 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
Ovalbumin	≥98 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
PnA-Alexa 647	puriss. p.a.	Life Technologies (Darmstadt, Deutschland)
PNGase F	2.0 U/ml	Europa Bioproducts (Cambridge, England)

## Experimenteller Teil

---

Raffinose-Pentahydrat	≥98 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ribonuclease B	≥80 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
3`Sialyllactosamin	≥98 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
6`Sialyllactosamin	≥98 %	Fluka (Buchs, Schweiz)
Super-DHB	puriss. p.a	Fluka (Buchs, Schweiz)
TRIS	99,9 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Tween 20	p.a.	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Wasser	hochrein	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
Xylose	≥99 %	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)

---

*Tabelle 5-III: Chemikalien*

## 5.2. Methoden

### 5.2.1. Deglykosylierung der Glykoproteine

Etwa 1 mg Glykoprotein wurde in 40 µl Wasser (Millipore) gelöst, mit 10 µl Puffer versetzt und für 10 Minuten bei 99 °C im Thermomixer® denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden 3 µl PNGase-Lösung zugesetzt und für 18 h bei 37 °C im Thermomixer® inkubiert.

Nach Zugabe von 200 µl gekühltem Ethanol wurde die Probe 2 h lang bei -27 °C gelagert, um das Protein auszufällen. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und in einem Eppendorfgefäß zur Trockne eingedampft. Die dadurch erhaltenen Glykanpellets wurden in 10 µl Wasser gelöst und nach Herstelleranleitung auf ein GlycoClean S Cartridge gegeben (außer bei 2-AB-Derivatisierung, s.u.). Die auf diese Weise gereinigten Glykane wurden im Anschluss wieder eingedampft und konnten nun vermessen, beziehungsweise derivatisiert werden.

### 5.2.2. Derivatisierung

#### I. Hydrazid-Derivate

Zu jeweils 20 µg der Zucker (Mono-, Di- und Trisaccharide) wurde der 5fache Überschuss an Derivatisierungsreagenz (INH, BINH oder BACH in 50 % Methanol) gegeben. Diese Lösung wurde in einem Eppendorfgefäß im Vakuumkonzentrator (30 °C) zur Trockne eingedampft. Zum Rückstand wurden 40 µl 95 % Methanol gegeben und die Mischung im Thermomixer® bei 90 °C 1.5 h inkubiert. Im Anschluss wurde wiederum zur Trockne eingedampft und das Derivat schließlich in 100 µl 50 % Methanol gelöst (Probenlösung).

Analog der Derivatisierung der Zucker, wurden auch die gereinigten Glykane aus der Protein-Deglykosylierung mit einem 5fachen Überschuss an Derivatisierungsreagenz versetzt, inkubiert und eingedampft. Für die Verwendung am MALDI-TOF oder MALDI-TOF/TOF wurde anschließend in 10 µl 50 % Methanol gelöst, für die Analyse mittels Nano-LC-MS in 25 µl 30 % Methanol.

## II. 2-Aminobenzamid-Derivate

Für das Derivatisierungsreagenz wurden Anthranilsäure (5 mg) und Natriumcyano- borhydrid (7.5 mg) in DMSO (500 µl) und Essigsäure (200 µl) gelöst. Von diesem Re- agenz wurden 50 µl zu 20 µg der Zucker gegeben und bei 65 °C im Thermomixer® für 2.5 h inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend eingedampft und mit 50 % Methanol auf 100 µl aufgefüllt (Probenlösung).

Die Glykane wurden auf die gleiche Weise derivatisiert, aber hier, aufgrund der hohen Salzkonzentration im Produkt, erst nach der Derivatisierung über ein GlycoClean- Cartridge gereinigt. Daraufhin wurde die Derivate in 10 µl Wasser gelöst und für die Untersuchungen an MALDI-TOF und MALDI-TOF/TOF verwendet.

			Hydrazide	2-AB
<b>Monosaccharide</b>		Xylose Fucose Glucose Galactose Mannose GlcNAc Sialinsäure	INH BINH BACH 1.5 h 90 °C	2-AB 2.5 h 65 °C
	<b>Disaccharide</b>	Lactose Maltose Cellobiose		
	<b>Trisaccharide</b>	Raffinose Melezitose 3`SLN 6`SLN		
<b>Glykane</b>	<b>Ovalbumin</b>	High-Mannose Komplex Hybrid	} <i>Aufreinigung</i> ↓ INH BINH BACH 1.5 h 90 °C	} 2-AB 2.5 h 65 °C } <i>Aufreinigung</i> ←
	<b>Ribonuclease B</b>	High-Mannose		

Tabelle 5-IV: Derivatisierungsschema für die verschiedenen Zucker und Glykane

### III. Derivatisierung mittels Mikrowelle

5 mg Glucose und 25 mg Isoniazid wurden in ein Mikrowellengefäß eingewogen und in 1.2 ml 90 % Methanol gelöst. Diese Mischungen wurden bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich lange in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurden 50 µl der Lösung entnommen, in ein Vial mit 1 ml Methanol + 0.1 % FA gegeben und mittels HPLC und Ionenfalle der Grad der Umsetzung bestimmt.

#### Einstellungen Mikrowelle:

1. 110 °C, Rampe: 2:00 min, Max. 500 W

Dauer: 30 min, 40 min

2. 120 °C, Rampe: 2:30 min, Max. 600 W

Dauer: 20 min, 30 min, 40 min

3. 130 °C, Rampe: 3:00 min, Max. 700 W

Dauer: 15 min, 20 min

### 5.2.3. HPLC-MS-Analytik

#### 5.2.3.1. Vollständigkeit der Derivatisierungsreaktion

Zum Nachweis, dass die Derivatisierungsreaktion mit BINH und INH die Zucker vollständig umsetzt, wurden jeweils 10 µl der Probenlösungen in ein Vial mit 50 % Methanol + 0.1 % FA gegeben. Von diesen, ebenso wie von den in der Mikrowelle hergestellten Lösungen, wurden daraufhin 10 µl mittels HPLC injiziert und ohne Säule direkt in die Ionenfalle geleitet.

#### Einstellungen:

**HPLC:** Fließmittel A: Wasser + 0.1 % FA, Fließmittel B: Methanol + 0.1 % FA, Fluss: 0.3 ml/min

**Ionenfalle:** Scanmodus: Standard Normal, Averages: 2, Nebulizer: 50 psi, Drying Gas: 10 l/min, Drying Temperature: 350 °C, Kapillarspannung: -3500 V, Scanbereich entsprechend den untersuchten Substanzen angepasst

### 5.2.3.2. Trennung der Zucker

Zur Analyse der verschiedenen Mono-, Di- und Trisaccharide wurden jeweils 5 µl der Probenlösungen in ein Vial gegeben und mit Wasser (RP-C18-Säule) oder Acetonitril (HILIC-Säule) auf 250 µl verdünnt.

Bei der Trennung von Xylose, Fucose, Glucose und *N*-Acetylglucosamin wurden die vier Zucker in einem Vial gemischt und zusammen injiziert. Alle anderen Zucker wurden einzeln vermessen. Die gereinigten Glykane wurden in lediglich 25 µl Wasser gelöst und in ein Polypropylen-Vial überführt. Sämtliche Trennungen wurden mindestens dreifach durchgeführt um die Reproduzierbarkeit zu gewährleisten

Wenn nicht anders angegeben, wurden folgende Trennparameter verwendet:

#### **Zucker:**

**HILIC-Säule:** Fließmittel A: 100 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 5.8, Fließmittel B: 97 % Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure, Fluss: 0.3 ml/min, Injektionsvolumen: 5 µl

**C18-Säule:** Fließmittel A: 100 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 5.8, Fließmittel B: Methanol + 0.1 % Ameisensäure, Fluss: 0.3 ml/min, Injektionsvolumen: 5 µl

**Ionenfalle:** Positiver Modus, Scanmodus: Standard Normal, Averages: 9, Nebulizer: 50 psi, Drying Gas: 10 l/min, Drying Temperature: 350 °C, Kapillarspannung: -3500 V, Scanbereich entsprechend den vermessenen Zuckern

**Datenauswertung:** Agilent Data Analysis Software, Erstellung von Extracted-Ion-Chromatogrammen (EIC) der einzelnen Zucker

#### **Glykane:**

**ChipCube:** PGC-Chip, Fließmittel A: Wasser + 0.1 % Ameisensäure, Fließmittel B: 97 % Acetonitril + 0.1 % Ameisensäure, Kapillarpumpe: Fluss: 1 µl/min, Nanopumpe: Fluss: 0.4 µl/min, Ladevolumen: 3 µl

**Triplequadrupol:** Positiver Modus, Precursor-Ion-Scan von *m/z* 366, *m/z* 204 und *m/z* 163, Kollisionsenergie 15 V – 50 V, Scanbereich *m/z* 100 – 2400

**Datenauswertung:** Agilent MassHunter Analysis Software

### I. Underivatisierte Zucker

Für die Analyse der underivatisierten Zucker wurden die Probenlösungen analog den derivatisierten Proben hergestellt. Dazu wurden 20 µg Zucker mit Wasser auf 100 µl verdünnt.

Es wurden die in der Tabelle aufgeführten Gradienten verwendet:

Zucker	Methode C18-Säule		Methode HILIC-Säule	
	Zeit (min)	% B	Zeit (min)	% B
Xylose				
Fucose	0	4	0	99
Glucose	15	4	12	99
Galactose			16	92
Mannose			27	65
GlcNAc			30	99
Sialinsäure				
Lactose				
Maltose	0	4	0	99
Cellobiose	15	4	8	99
			25	80
			30	99
3`SLN				
6`SLN	0	4	0	85
	15	4	5	85
			25	60
			30	85
Raffinose				
Melezitose			0	93
			5	93
			20	75
			25	93

Tabelle 5-V: Trennungen der underivatisierten Zucker auf HILIC- und RP18-Phase

II. INH-Derivate

Zucker	Methode C18-Säule		Methode HILIC-Säule	
	Zeit (min)	% B	Zeit (min)	% B
Xylose	0	4	0	99
Fucose	8	4	12	99
Glucose	20	8	16	92
Galactose	25	50	30	60
Mannose	30	4	35	60
GlcNAc			40	99
Sialinsäure				
Lactose	0	5	0	95
Maltose	5	5	15	94.5
Cellobiose			30	93
			Fluss: 0.4 ml/min	
3`SLN	0	5	0	87
6`SLN	5	5	7	87
			25	76
			30	87

Tabelle 5-VI: Gradienten zur Trennung der INH-Derivate



## III. BINH-Derivate

Zucker	Methode C18-Säule		Methode HILIC-Säule	
	Zeit (min)	% B	Zeit (min)	% B
Xylose	0	15.5	0	15.5
Fucose	15	16.5	13	16.5
Glucose	25	20.0	35	20.0
Galactose	30	70.0	40	70.0
Mannose	35	15.5		
GlcNAc	Fluss: 0.4 ml/min			
Sialinsäure				
Lactose	Zeit (min)	% B	Zeit (min)	% B
Maltose	0	29	0	93
Cellobiose	8	32	10	93
	25	39	25	87
	30	29	30	93
3`SLN	Zeit (min)	% B	Zeit (min)	% B
6`SLN	0	14	0	85
	6	14	5	85
	25	18	15	72
	28	50	25	55
	30	14	30	85

Tabelle 5-VII: Gradienten zur Trennung der BINH-Derivate

IV. BACH-Derivate

Zucker	Methode C18-Säule		Methode HILIC-Säule	
	Zeit (min)	% B	Zeit (min)	% B
Xylose				
Fucose	0	11	0	93
Glucose	17	11	13	93
Galactose	25	50	27	75
Mannose	30	11	30	93
GlcNAc				
Sialinsäure				
Lactose				
Maltose	0	12	0	93
Cellobiose	7	12	10	93
	25	18	27	88
	30	12	30	93
3`SLN				
6`SLN	0	10	0	85
	8	10	5	85
	20	20	25	68
	22	30	26	60
	30	10	30	85

Tabelle 5-VIII: Gradienten zur Trennung der BACH-Derivate

V. 2-AB-Derivate

Zucker	Methode C18-Säule		Methode HILIC-Säule	
	Zeit (min)	% B	Zeit (min)	% B
Xylose	0	5	0	99
Fucose	8	5	9	99
Glucose	25	8	14	90
Galactose	30	5	27	50
Mannose			30	99
GlcNAc				
Sialinsäure				
Lactose	Zeit (min)	% B	Zeit (min)	% B
Maltose	0	5	0	97.5
Cellobiose	5	5	5	97
	15	15	20	80
			Fluss: 0.45 ml/min	
3`SLN	Zeit (min)	% B	Zeit (min)	% B
6`SLN	0	5	0	97.5
	7	5	20	60
			Fluß: 0.4 ml/min	

Tabelle 5-IX: Gradienten zur Trennung der 2-AB-Derivate

VI. Glykane

Zucker	Methode PGC-Chip	
	Zeit (min)	%B
BACH-N-Glykane	0	10
BACH-Standardglykane	10	50
	35	95

Tabelle 5-X: Gradient zur Analyse der N-Glykane

#### 5.2.4. MS(n)-Experimente an der LC/MSD-Trap

Für die Fragmentierungen der Di- und Trisaccharide wurden 10 µl der derivatisierten und underivatisierten Zucker mit 240 µl Methanol (0.1 % Ameisensäure) versetzt, gemischt und mit Hilfe der Spritzenpumpe bei unten genannten Einstellungen direkt in die Ionenfalle eingespritzt.

**Spritzenpumpe:** Flussrate: 0.40 ml/h

**LC/MSD-Trap:** Scanmodus: Standard Normal, Averages: 2, Nebulizer: 15 psi, Drying Gas: 5 l/min, Drying Temperature: 325 °C, Kapillarspannung: -3500 V

Fragmentierungen der Monosaccharide wurden mittels Kopplung an die HPLC durchgeführt. Dazu wurden jeweils 10 µl der Probenlösungen in ein Vial mit 50 % Methanol + 0.1 %FA gegeben. Davon wurden dann 10 µl injiziert und ohne Säule direkt in die Ionenfalle geleitet. Die entsprechenden Massen der Zucker wurden fragmentiert, sowohl im positiven, als auch im negativen Modus.

**Einstellungen:**

**HPLC:** Fließmittel A: Wasser + 0.1 % FA, Fließmittel B: Methanol + 0.1 % FA, Fluss: 0.3 ml/min

**Ionenfalle:** Scanmodus: Standard Normal, Averages: 2, Nebulizer: 50 psi, Drying Gas: 10 l/min, Drying Temperature: 350 °C, Manual MS(2), Cut-Off: 15 %

**Auswertung:** Die Fragmentspektren wurden mittels Agilent ChemStation Data Analysis Software bearbeitet. Dazu wurden jeweils die Durchschnittsspektren von 0.5 min Injektionszeit verwendet (entspricht 5 Einzelspektren). Zusätzlich wurden sämtliche Fragmentierungen 5fach durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Spektren zu gewährleisten.

### 5.2.5. MALDI-MS-Analytik

Die aus der Derivatisierung erhaltenen Glykane wurden in 10 µl Wasser gelöst und zentrifugiert. Als Matrizes für die MALDI-TOF und MALDI-TOF/TOF Analyse wurden DHB (80 mg/ml in 30 % Acetonitril) und Super-DHB (10 mg/ml in 50 % Acetonitril) verwendet.

Von diesen Matrizes wurden 0.5 µl auf die MALDI-Trägerplatte aufgetragen. Im Anschluss wurden 0.5 µl des Glykan-Überstandes zur Matrix gegeben, kurz mit der Pipette durchmischt und bei Raumtemperatur zum Auskristallisieren stehen gelassen. Die Proben wurden innerhalb des gleichen Tages vermessen.

Vor den Messungen wurde das Gerät mit einer Standardmischung, bestehend aus Angiotensin I (m/z 1297.5), ACTH [18-39] (m/z 2466.7) und Insulin [chain B] (m/z 3494) kalibriert.

#### I. MALDI-TOF

##### Einstellungen:

**MS-Modus:** Shots: 50, Frequency: 50, Laserpower: 50-80 %, Scanbereich: m/z 800-3200 , positiver Modus

Während der Messung wurden jeweils ca. 10 Spektren von verschiedenen Stellen des Probenspots zusammengefasst, um einen Durchschnitt der Probe zu erhalten. Die Auswertung erfolgte mittels Bruker FlexAnalysis.

#### I. MALDI-TOF/TOF

##### Einstellungen:

**MS-Modus:** Shots: 50, Frequency: 50, Laserpower: 50-80 %, Scanbereich: m/z 200-3200 , positiver Modus

**MS/MS-Modus:** Shots: 200, Frequency: 50, Laserpower: 100-150 %, Scanbereich: m/z 200-3200, Window Range: 16 Da

Für die Messung der MS-Spektren wurden 3-5 Spektren zusammengefasst, bis eine für den MS/MS-Modus ausreichende Intensität erreicht war. Im MS(2)-Modus wurden jeweils die höchsten Peaks des MS-Spektrums fragmentiert. Von den Fragmentspektren wurden 10 Einzelspektren zu einem Gesamtspektrum zusammengefasst.

Die Auswertung erfolgte wiederum mit Bruker FlexAnalysis und GlycoWorkbench [193]. Den Signalen wurden jeweils die Strukturen zugeordnet, für die am wenigsten Spaltungen benötigt wurden.

### 5.2.6. Streptavidin-Assay

Für den Nachweis der Bindungsfähigkeit BINH-gekoppelter Zucker und Glykane wurden Mannose-BINH und die BINH-derivatisierten Glykane von Ribonuclease B verwendet. Mannose-BINH wurde vor der Testung über die HPLC präparativ aufgereinigt um das überschüssige Derivatisierungsreagenz abzutrennen, am Vakuumkonzentrator eingedampft und in Konzentrationen von 10 µg/ml, 25 µg/ml und 75 µg/ml eingesetzt. Die Glykane der Ribonuclease B wurden, wie unter 5.2.2 angegeben, derivatisiert und aufgereinigt.

Sowohl Glykane als auch Zucker wurden in Probenpuffer gelöst (Pufferzusammensetzung siehe Tabelle 5-XI), bei Mannose-BINH zu einem Endvolumen von mindestens 100 µl, bei den Glykanen zu einem Endvolumen von 50 µl. Der Streptavidin-beschichtete Glasträger wurde mit Wasser abgespült, in einen Halter eingespannt und die Proben sowohl mit einem Printer, als auch mit der Pipette (0.5 µl) aufgetragen. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation bei erhöhter Luftfeuchtigkeit. Dann wurde der Glasträger erneut mit Wasser gewaschen, in ein mit Abblock-Puffer gefülltes Falcon-Tube gegeben und 2 h lang durchmischt.

Nach Spülen mit SSC-Puffer und anschließendem dreimaligen abspülen mit Wasser wurde die restliche Flüssigkeit abzentrifugiert, und jeweils 40 µl Alexa 647-markiertes Lektin auf die Probenspots pipettiert. Es wurde 1 h lang im Dunkeln inkubiert und im Anschluss die Lektinlösung abpipettiert. Nun wurde der Glasträger drei weiteren Waschschritten unterzogen, angefangen mit PBST-Puffer, gefolgt von PBS-Puffer und Wasser. Der trocken zentrifugierte Träger konnte anschließend vermessen werden.

Die Fluoreszenz der Proben wurde bei einer Laserwellenlänge von 670 nm gemessen.

Puffer	Zusammensetzung
<b>Probenpuffer</b>	20 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20, 1 % BSA, pH 7.4
<b>Abblockpuffer</b>	100 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20, 0.5 % BSA, 1 % Biotin, pH 9.0
	<b>SSC</b> ( <i>saline-sodium-citrate</i> ) (0.1-fach konzentriert): 15 mM NaCl, 1.5 mM Natriumcitrat, pH 7.0
<b>Waschpuffer</b>	<b>PBS</b> ( <i>phosphate buffered saline</i> ): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.4
	<b>PBST</b> ( <i>phosphate buffered saline with tween</i> ): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.1 % Tween 20, pH 7.4

Tabelle 5-XI: Für den Streptavidin-Assay verwendete Puffer und deren Zusammensetzung

## 6. Anhang



## 6.1. Veröffentlichungen

### Artikel:

Stephanie Bank, Petra Kapková

*“Liquid Chromatography – Mass Spectrometry of Carbohydrates Derivatized with Biotinamidocaproyl Hydrazide”*

Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology,  
Prof. Chuan-Fa Chang (Ed.), ISBN: 978-953-51-0864-1, 2012

Eingereicht bei “Rapid Communications in Mass Spectrometry”:

Stephanie Bank, Eberhard Heller, Elisabeth Memmel, Jürgen Seibel, Ulrike Holzgrabe, Petra Kapková

*“Matrix-assisted laser desorption ionization tandem mass spectrometry of N-glycans derivatized with isonicotinic hydrazide and its biotinylated form”*

### Posterpräsentationen:

Stephanie Bank, Petra Kapková

*„Graphitized Carbon HPLC-Chip mass spectrometry of N-linked Glycans”*

DGMS-Jahrestagung, 2010, Halle

Stephanie Bank, Petra Kapková

*„Nanoliquid chromatography/mass spectrometry of native and biotinylated glycans on a porous graphitized carbon chip”*

DPhG-Jahrestagung, 2010, Braunschweig

ChemSyStM, 2010, Würzburg

Stephanie Bank, Petra Kapková

*„Mass spectrometry of glycans derivatized with isonicotinic hydrazide”*

DPhG-Jahrestagung, 2011, Innsbruck

## 6.2. Abkürzungsverzeichnis

2-AB	2-Aminobenzamid
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
3'SLN	3'Sialyl- <i>N</i> -acetyllactosamin
6'SLN	6'Sialyl- <i>N</i> -acetyllactosamin
AA	2-Aminobenzoessäure
ABA	Para-Aminobenzoessäure
ABBE	Aminobenzoessäurebutylester
ANTS	8-Aminonaphtalen-1,3,6-trisulfonsäure
AP	2-Aminopyridin
APTS	8-Aminopyren-1,3,6-trisulfonsäure
BACH	Biotinamidocaproylhydrazid
BAP	Biotinyldiaminopyridin
BINH	(1-(6-Biotinylhexyl)-2-oxo-isonicotinsäurehydrazid
BNAH	Biotinyl-L-3-(2-naphtyl)-alaninhydrazid
BPH	4-(Biotinamido)-phenylhydrazid
BSA	Bovines Serumalbumin
CDG	Congenital disorders of glycosylation
Cel	Cellobiose
CE	Kapillarelektrophorese
CID	Collison-Induced-Dissociation
Con A	Concanavalin A
DHB	2,5-Dihydroxybenzoessäure
Dol-P	Dolicholphosphat
EIC	Extracted-Ion-Chromatogram
ESI-MS	Electrospray-Ionisations-Massenspektrometrie
FAB-MS	Fast-Atom-Bombardement-Massenspektrometrie
FMOC-Hydrazid	<i>N</i> -(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)-Hydrazid
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer
Fuc	Fucose

Gal	Galactose
GalNAc	<i>N</i> -Acetylgalactosamin
GC	Gaschromatographie
GDP	Guanosindiphosphat
Glc	Glucose
GlcNAc	<i>N</i> -Acetylglucosamin
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
HCl	Salzsäure
HILIC	Hydrophilic-Interaction-Chromatography
HPAED	High-Performance-Anion-Exchange-Chromatography
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
IgG	Immunglobulin G
INH	Isonicotinsäurehydrazid
Lac	Lactose
<i>m/z</i>	Masse zu Ladung-Verhältnis
Mal	Maltose
MALDI-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption/ Ionisation-Massenspektrometrie
Man	Mannose
Man5	Mannose-5-Glykan
Man6	Mannose-6-Glykan
NA2	Mannotriose-di-( <i>N</i> -acetyl-D-glucosamine)
NMR	Nuclear-Magnetic-Resonance-Spectroscopy
NP	Normal-Phasen-Chromatographie
PAD	Pulsed-Amperometric-Detection
PBS	Phosphat-buffered-saline
pI	Isoelektrischer Punkt
PDAM	1-Pyrenyldiazomethan
PFP	Pentafluorphenyl-
PGC	Porous-Graphitized-Carbon
PMP	1-Phenyl-3-methyl-5-pyrazolon
Pn A	Peanut Agglutinin
PNGase	Peptid- <i>N</i> -Glycosidase
PSD	Postsource Decay

## Anhang

---

RNA	Ribonucleinsäure
RP	Reversed Phase
SLN	Sialyl- <i>N</i> -acetyllactosamin
SS	<i>N</i> -Acetylneuraminsäure/ Sialinsäure
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time-of-Flight-Detektor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UDP	Uridindiphosphat
Xyl	Xylose

---

### 6.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-I	Abbildung 1-I: Die am häufigsten vorkommenden Mono-saccharide in Glykanen	5
Abbildung 1-II	Strukturbeispiele der drei Gruppen von N-Glykanen	6
Abbildung 1-III	N-Glykansynthese im endoplasmatischen Retikulum mit anschließender Abspaltung durch die Oligosaccharyltransferase, adaptiert nach Burda et al. [14]	7
Abbildung 1-IV	Arzneistoffe auf Basis von Kohlenhydratstrukturen	9
Abbildung 1-V	Darstellung der Schnittstellen der Peptid-N-Glycosidasen A und F, sowie der Endoglycasen an der Struktur eines N-Glykans	13
Abbildung 1-VI	Freisetzung eines Glykans durch Hydrazinolyse; Hydrolyse der Amidbindungen durch wasserfreies Hydrazin; Reacetylierung primärer Aminogruppen und anschließende Umsetzung zum reduzierenden Glykan in Gegenwart von $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen [23]	14
Abbildung 1-VII	Abspaltung eines Glykans mittel Ammonium-basierter $\beta$ -Elimination und anschließende Umsetzung zum reduzierenden Glykan mittels Borsäure [25]	15
Abbildung 1-VIII	Reduktive Aminierung am Beispiel von 2-Aminobenzamid	17
Abbildung 1-IX	Gebräuchliche Derivatisierungsreagenzien zur reduktiven Aminierung	18
Abbildung 1-X	Derivatisierung von reduzierenden Zuckern mit Hydrazinen	20
Abbildung 1-XI	Gängige Derivatisierungsreagenzien auf Hydrazinbasis	20
Abbildung 1-XII:	Mögliche Produkte der Derivatisierung von Mannose mit einem Hydrazinderivat; <b>a:</b> $\beta$ -D-Mannosederivat; <b>b:</b> $\alpha$ -D-Mannosederivat; <b>c:</b> ringoffenes Derivat	21
Abbildung 1-XIII	PMP-derivatisierter Zucker	21
Abbildung 1-XIV	Grundlegender Aufbau eines Biotinylierungsreagenzes am Beispiel von BACH	22
Abbildung 1-XV	Biotinreagenzien zur Derivatisierung von Glykanen	23
Abbildung 1-XVI	Entstehung der Ionen bei der Elektrosprayionisierung, adaptiert nach P.Kebarle [71]	26
Abbildung 1-XVII	MALDI-Matrizes für die Analyse von Glykanen	28
Abbildung 1-XVIII	Schematischer Aufbau eines MALDI-LIFT-TOF/TOFs, adaptiert nach Suckau et al. [85]	29

<i>Abbildung 1-XIX</i>	<i>Nomenklatur nach Domon und Costello [92], mit freundlicher Genehmigung von Springer Science und Business Media</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 2-I</i>	<i>Stationäre Phasen in der HPLC</i>	<i>36</i>
<i>Abbildung 2-II</i>	<i>Derivate der verschiedenen Derivatisierungsreagenzien am Beispiel von Mannose</i>	<i>38</i>
<i>Abbildung 2-III</i>	<i>Komplette Umsetzung von verschiedenen Zuckern durch das Derivatisierungsreagenz BINH. Die durchgehenden Kreise kennzeichnen das umgesetzte Produkt, die gestrichelten Kreise die Stelle, an der der underivatisierte Zucker auftreten würde.</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 2-IV</i>	<i>Vollständige Umsetzung verschiedener Mono-, Di- und Trisaccharide durch das Derivatisierungsreagenz INH. Die durchgehenden Kreise kennzeichnen das umgesetzte Produkt, die gestrichelten Kreise die Stelle, an der der underivatisierte Zucker auftreten würde.</i>	<i>41</i>
<i>Abbildung 2-V</i>	<i>Spektren nach Umsetzung in der Mikrowelle: 1. Spektrum von Glucose [M+Na]<sup>+</sup> vor der Derivatisierung; 2. Spektrum nach 30min bei 120 °C, zu sehen sind der Peak der nicht umgesetzten Glucose bei m/z 203.1, sowie Glucose-INH bei m/z 300.2 und m/z 322.3 als [M+H]<sup>+</sup> und [M+Na]<sup>+</sup>; 3. Spektrum nach 20min bei 130 °C, es sind nur noch die beiden Peaks von Glucose-INH zu sehen.</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 2-VI</i>	<i>Extracted-Ion-Chromatogramme der Monosaccharide nach Trennung auf Kinetex RP-C18, Trennbedingungen siehe Kapitel 5.2.3.</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 2-VII</i>	<i>Trennung der Monosaccharide mittels Kinetex HILIC, Trennbedingungen siehe Kapitel 5.2.3.</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 2-VIII</i>	<i>Trennung der Disaccharide mit Kinetex RP-C18, Trennbedingungen siehe Kapitel 5.2.3</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 2-IX</i>	<i>Trennung der Disaccharide mittels Kinetex HILIC, Trennbedingungen siehe Kapitel 5.2.3.</i>	<i>56</i>
<i>Abbildung 2-X</i>	<i>Chromatogramme der Sialyl-N-acetyllactosamine nach Trennung auf Kinetex RP-C18, Trennbedingungen siehe Kapitel 5.2.3</i>	<i>58</i>

Abbildung 2-XI	Trennung der Trisaccharide mittels Kinetex HILIC, Trennbedingungen siehe Kapitel 5.2.3.	60
Abbildung 2-XII	Fragmentierungswege von Cellobiose zu den zur Differenzierung benötigten Fragmenten [134]; Zugehörige Spaltungen benannt nach Nomenklatur von Domon und Costello [92]	62
Abbildung 2-XIII	Strukturen der verwendeten Disaccharide	63
Abbildung 2-XIV	Spaltstellen eines BINH-derivatisierten Disaccharids mit den daraus entstehenden Massen	64
Abbildung 2-XV	-MS2-Spektren von Maltose und Cellobiose und ihren Derivaten mittels Direktinjektion, Details siehe Kapitel 5.2.4.	66
Abbildung 2-XVI	-MS2-Spektrum von Lactose, sowie den entsprechenden Derivaten, Messbedingungen siehe Kapitel 5.2.4.	68
Abbildung 2-XVII	Strukturen von 3'SLN und 6'SLN	69
Abbildung 2- XVIII	Diagnostische Fragmente (blau) und ihre nominellen Massen von Sialyl-N-acetyllactosamin; die durch Pfeile gekennzeichneten Kohlendioxid-Abspaltungen führen zu weiteren diagnostischen Ionen (grün)	70
Abbildung 2-XIX	Fragmentspektren von 3'SLN und 6'SLN im negativen Modus, Bedingungen siehe Kapitel 5.2.4.	71
Abbildung 2-XX	Fragmentspektren der verschiedenen SLN-Derivate im positiven Modus, adaptiert nach Bank et al. [143], Bedingungen siehe Kapitel 5.2.4.	74
Abbildung 2-XXI	Strukturen von Melezitose und Raffinose	76
Abbildung 2-XXII	Trennung und Fragmentierung von Melezitose (1) und Raffinose (2), Bedingungen siehe Kapitel 5.2.4.	77
Abbildung 3-I	MALDI-TOF-Spektren der nativen und derivatisierten N-Glykane von Ribonuclease B; Durchführung siehe Kapitel 5.2.5	89
Abbildung 3-II	MALDI-TOF-Spektrum der underivatisierten N-Glykane des Ovalbumins	90
Abbildung 3-III	Spektren der INH, BINH und BACH Derivate von Ovalbumin, die zusätzlich gefundenen Glykane sind durch Sternchen gekennzeichnet	92
Abbildung 3-IV	N-Glykane des Ovalbumins nach 2-AB-Derivatisierung	93
Abbildung 3-V	Entstehung des D-Ions eines High-Mannose-Glykans [153,154]	95

Abbildung 3-VI	Vorgeschlagene Fragmentierungswege der Natriumaddukte von Glykanen; 1.: glykosidische Spaltung zweier N-Acetylglucosamin-einheiten zum Y-Fragment; 2.: Ringspaltung zweier Mannoseeinheiten zum <sup>2,4</sup> A-Fragment [90,138]	96
Abbildung 3-VII	Precursor-Ion-Spektrum der Masse m/z 163 der BACH-derivatisierten Glykane von Ribonuclease B, detektiert als [M+H] <sup>2+</sup> , adaptiert nach Bank et al. [143]	99
Abbildung 3-VIII	Product-Ion-Spektrum des BACH-derivatisierten Mannose-6-Glykans (m/z 876.4) der Ribonuclease; doppelt geladene Fragmente sind mit Sternchen gekennzeichnet, adaptiert nach Bank et al. [143]	101
Abbildung 3-IX	Fragmentspektrum eines Standard-Komplex-Glykans (m/z 998.3), adaptiert nach Bank et al. [143]	102
Abbildung 3-X	MALDI-TOF/TOF-Spektrum des nativen Mannose-6-Glykans (m/z 1419.5) der Ribonuclease B; Ringspaltungen sind zusätzlich zur Angabe der Spaltstellen in den Piktogrammen gekennzeichnet; Nomenklatur nach Domon und Costello [92]	104
Abbildung 3-XI	Fragmentspektren des INH- (m/z 1538.6, oben) und des BINH-Derivates (m/z 1881.1, unten) des Mannose-6-Glykans, Ringspaltungen sind zusätzlich markiert	106
Abbildung 3-XII	MALDI-TOF-TOF-Spektren des BACH- (m/z 1773.0, oben) und 2-AB-derivatisierten (m/z 1539.7, unten) Mannose-6-Glykans	109
Abbildung 3-XIII	Ringspaltungen der Core-Mannose bei den verschiedenen Isomeren eines Komplex-Glykans; Fragmente die spezifisch für eines der Isomere sind, sind gelb hinterlegt [148, 169]	113
Abbildung 3-XIV	MALDI-TOF/TOF-Fragmentspektrum der underivatisierten Komplex-Glykane mit m/z 1745.7	114
Abbildung 3-XV	Fragmentspektren der INH-derivatisierten (m/z 1864.9, oben) und BINH-derivatisierten (m/z 2207.3, unten) Komplex-Glykane	116



---

<i>Abbildung 3-XVI</i>	<i>MALDI-TOF/TOF-Spektren der Komplex-Glykane derivatisiert mit BACH (m/z 2099.2, oben) und 2-AB (m/z 1865.9, unten)</i>	119
<i>Abbildung 4-I</i>	<i>Ablauf eines Fluoreszenz-Arrays mit biotinylierten Glykanen</i>	128
<i>Abbildung 4-II</i>	<i>Fluoreszenzmessung der BINH-Derivate der High-Mannose-Glykane von Ribonuclease B, sowie von Mannose-BINH. Die Probenspots sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Für die linke Abbildung wurden rote Kontrasteinstellungen gewählt um die Fluoreszenz der Ribonuclease-B-Derivate hervorzuheben, rechts zeigt sich anhand der blauen Kontraste die Fluoreszenz der Mannose-Derivate.</i>	130

---

## 6.4. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 2-1</i>	<i>Berechnete Massen der protonierten, derivatisierten und underivatisierten Zucker</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 3-I</i>	<i>Übersicht der Highmannose-Glykane von Ribonuclease B, H: Anzahl der Hexoseeinheiten, N: Anzahl der N-Acetylglucosamineinheiten</i>	<i>81</i>
<i>Tabelle 3-II</i>	<i>N-Glykane von Ovalbumin nach Harvey et al. [145], H: Anzahl der Hexoseeinheiten, N: Anzahl der N-Acetylglucosamineinheiten</i>	<i>81-85</i>
<i>Tabelle 5-I</i>	<i>Verwendete Geräte</i>	<i>143-145</i>
<i>Tabelle 5-II</i>	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>145</i>
<i>Tabelle 5-III</i>	<i>Chemikalien</i>	<i>146-148</i>
<i>Tabelle 5-IV</i>	<i>Derivatisierungsschema für die verschiedenen Zucker und Glykane</i>	<i>150</i>
<i>Tabelle 5-V</i>	<i>Trennungen der underivatisierten Zucker auf HILIC- und RP18-Phase</i>	<i>153</i>
<i>Tabelle 5-VI</i>	<i>Gradienten zur Trennung der INH-Derivate</i>	<i>154</i>
<i>Tabelle 5-VII</i>	<i>Gradienten zur Trennung der BINH-Derivate</i>	<i>155</i>
<i>Tabelle 5-VIII</i>	<i>Gradienten zur Trennung der BACH-Derivate</i>	<i>156</i>
<i>Tabelle 5-IX</i>	<i>Gradienten zur Trennung der 2-AB-Derivate</i>	<i>157</i>
<i>Tabelle 5-X</i>	<i>Gradient zur Analyse der N-Glykane</i>	<i>157</i>
<i>Tabelle 5-XI</i>	<i>Für den Streptavidin-Assay verwendete Puffer und deren Zusammensetzung</i>	<i>161</i>

## **7. Literaturverzeichnis**

- [1] A. Varki, R. Cummings, J. Esko, E. Al, Essentials of Glycobiology, 2nd Edition, Second Ed., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009.
- [2] S. Roseman, Reflections on glycobiology, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 41527–41542.
- [3] H. Gabius, The Sugar Code; Fundamentals of Glycosciences, Wiley-VCH, 2009.
- [4] A. Alavi, J.S. Axford, Sweet and sour: the impact of sugars on disease, *Rheumatology (Oxford)*. 47 (2008) 760–770.
- [5] R. Kannagi, J. Yin, K. Miyazaki, M. Izawa, Current relevance of incomplete synthesis and neo-synthesis for cancer-associated alteration of carbohydrate determinants-Hakomori's concepts revisited, *Biochim. Biophys. Acta.* 1780 (2008) 525–531.
- [6] H.M.I. Osborn, P.G. Evans, N. Gemmell, S.D. Osborne, Carbohydrate-based therapeutics, *J. Pharm. Pharmacol.* 56 (2004) 691–702.
- [7] G.W.G. Bird, Agar Gel Studies of Blood Group Specific Substances and Precipitins of Plant Origin, *Vox Sang.* 4 (1959) 307–313.
- [8] J. Jaeken, Congenital disorders of glycosylation, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1214 (2010) 190–198.
- [9] P. de Lonlay, N. Seta, The clinical spectrum of phosphomannose isomerase deficiency, with an evaluation of mannose treatment for CDG-Ib, *Biochim. Biophys. Acta.* 1792 (2009) 841–843.
- [10] J.S. Axford, G. Cunnane, O. Fitzgerald, J.M. Bland, B. Bresnihan, E.R. Frears, Rheumatic disease differentiation using immunoglobulin G sugar printing by high density electrophoresis, *J. Rheumatol.* 30 (2003) 2540–2546.
- [11] G. Löffler, P.C. Heinrich, P.E. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer London, Limited, 2007.
- [12] I. Nilsson, G. von Heijne, Glycosylation efficiency of Asn-Xaa-Thr sequons depends both on the distance from the C-terminus and on the presence of a downstream transmembrane segment, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 17338–17343.
- [13] A. Herscovics, Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta.* 1473 (1999) 96–107.
- [14] P. Burda, M. Aebi, The dolichol pathway of N-linked glycosylation, *Biochim. Biophys. Acta.* 1426 (1999) 239–257.

- [15] P. van den Steen, P.M. Rudd, R.A. Dwek, G. Opdenakker, Concepts and principles of O-linked glycosylation, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 33 (1998) 151–208.
- [16] A. Moscona, Neuraminidase inhibitors for influenza, *N. Engl. J. Med.* 353 (2005) 1363–1373.
- [17] A. Fraser, E. Goldberg, A. Cj, M. Paul, L. Leibovici, Vaccines for preventing typhoid fever, *Cochrane Collab.* (2009) 1–34.
- [18] L.K.K. Tan, G.M. Carlone, R. Borrow, Advances in the Development of Vaccines against *Neisseria meningitidis*, *N. Engl. J. Med.* 362 (2010) 1511–1520.
- [19] L.P. Rodrigues, R. Schneerson, J.B. Robbins, Immunity to *Hemophilus Influenzae* Type b : I . The Isolation , and Some Physicochemical , Serologic and Biologic Properties of the Capsular Polysaccharide of *Hemophilus Influenzae* Type b, *J. Immunol.* 107 (2013) 1071–1080.
- [20] S. Hase, Precolumn derivatization for chromatographic and electrophoretic analyses of carbohydrates, *J. Chromatogr. A.* 720 (1996) 173–182.
- [21] H. Geyer, R. Geyer, Strategies for analysis of glycoprotein glycosylation, *Biochim. Biophys. Acta.* 1764 (2006) 1853–1869.
- [22] R. O'Neill, Enzymatic release of oligosaccharides from glycoproteins for chromatographic and electrophoretic analysis, *J. Chromatogr. A.* 720 (1996) 201–215.
- [23] T. Patel, J. Bruce, A. Merry, C. Bigge, M. Wormald, A. Jaques, et al., Use of hydrazine to release in intact and unreduced form both N- and O-linked oligosaccharides from glycoproteins, *Biochemistry.* 32 (1993) 679–693.
- [24] D. Carlson, Structures and Immunochemical Properties of Oligosaccharides Isolated from Pig Submaxillary Mucins, *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 616–626.
- [25] Y. Huang, Y. Mechref, M. Novotny, Microscale nonreductive release of O-linked glycans for subsequent analysis through MALDI mass spectrometry and capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 73 (2001) 6063–6069.
- [26] B. Bendiak, Hydranzinolysis-N-Acetylation of Glycopeptides and Glycoproteins. Model Studies Using 2-Acetamido-1-N(L-Aspart-4-Oyl)-2-Deoxy- $\beta$ -D-Glucopyranosylamine, *Carbohydr. Res.* 144 (1985) 1–12.
- [27] I. Ciucanu, F. Kerek, A Simple and Rapid Method for the Permethylation of Carbohydrates, *Carbohydr. Res.* 131 (1984) 209–217.
- [28] Y. Mechref, P. Kang, M. Novotny, Solid-Phase Permethylation for Glycomic Analysis, in: N. Packer, N. Karlsson (Eds.), *Glycomics*, Humana Press, 2009: pp. 53–64.

- [29] S.W. Gunner, J.K.N. Jones, The gas-liquid partition chromatography of carbohydrate derivatives, *Can. J. Chem.* 39 (1961) 1892–1899.
- [30] F. Eisenberg, Cyclic butaneboronic acid esters: Novel derivatives for the rapid separation of carbohydrates by gas-liquid chromatography, *Carbohydr. Res.* 19 (1971) 135–138.
- [31] D.J. Harvey, Derivatization of carbohydrates for analysis by chromatography; electrophoresis and mass spectrometry, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 1196–1225.
- [32] A.K. Powell, D.J. Harvey, Stabilization of sialic acids in N-linked oligosaccharides and gangliosides for analysis by positive ion matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10 (1996) 1027–1032.
- [33] H. Björndal, G. Hellerqvist, B. Lindberg, Gas-Flüssigkeits-Chromatographie und Massenspektrometrie bei der Methylierungsanalyse von Polysacchariden, *Angew. Chemie.* 16 (1970) 643–674.
- [34] N. Viseux, E. de Hoffmann, B. Domon, Structural analysis of permethylated oligosaccharides by electrospray tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3193–3198.
- [35] B.B. Reinhold, S.Y. Chan, T.L. Reuber, A. Marra, G.C. Walker, V.N. Reinhold, Detailed structural characterization of succinoglycan, the major exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Rm1021, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 1997–2002.
- [36] J.C. Bigge, T.P. Patel, J.A. Bruce, P.N. Goulding, S.M. Charles, R.B. Parekh, Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-amino benzamide and anthranilic acid, *Anal. Biochem.* 230 (1995) 229–238.
- [37] S. Hase, T. Ikenaka, Y. Matsushima, Structure Analysis of Oligosaccharides by Tagging of the Reducing End Sugars with a Fluorescent Compound, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85 (1978) 257–263.
- [38] K.R. Anumula, Advances in fluorescence derivatization methods for high-performance liquid chromatographic analysis of glycoprotein carbohydrates, *Anal. Biochem.* 350 (2006) 1–23.
- [39] D.J. Harvey, Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates, *Mass Spectrom. Rev.* 18 (1999) 349–450.
- [40] A. Ito, R.D. Turchiello, I.Y. Hirata, M.H. Cezari, M. Meldal, L. Juliano, Fluorescent properties of amino acids labeled with ortho-aminobenzoic acid, *Biospectroscopy.* 4 (1998) 395–402.

- [41] L. Royle, M.P. Campbell, C.M. Radcliffe, D.M. White, D.J. Harvey, J.L. Abrahams, et al., HPLC-based analysis of serum N-glycans on a 96-well plate platform with dedicated database software, *Anal. Biochem.* 376 (2008) 1–12.
- [42] G.R. Her, S. Santikarn, V.N. Reinhold, J.C. Williams, Simplified Approach to HPLC Precolumn Fluorescent Labeling of Carbohydrates: N-(2-Pyridinyl)-glycosylamines, *J. Carbohydr. Chem.* 6 (1987) 129–139.
- [43] D.T. Li, J.F. Sheen, G.R. Her, Structural Analysis of Chromophore-Labeled Disaccharides by Capillary Electrophoresis Tandem Mass Spectrometry Using Ion Trap Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 292–300.
- [44] H.-L. Cheng, P.-J. Pai, G.-R. Her, Linkage and branch determination of N-linked oligosaccharides using sequential degradation/closed-ring chromophore labeling/negative ion trap mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 248–259.
- [45] Y. Zhang, T. Iwamoto, G. Radke, Y. Kariya, K. Suzuki, A.H. Conrad, et al., On-target derivatization of keratan sulfate oligosaccharides with pyrenebutyric acid hydrazide for MALDI-TOF/TOF-MS, *J. Mass Spectrom.* 43 (2008) 765–772.
- [46] S.R. Hull, S. Turco, Separation of Dansyl Hydrazine-Derivatized Oligosaccharides by Liquid Chromatography, *Anal. Biochem.* 146 (1985) 143–149.
- [47] C.R. Ojala, J.M. Ostman, W.H. Ojala, The saccharide-hydrazide linkage: molecular and crystal structures of the semicarbazide derivatives of D-glucose, D-galactose, and D-xylose, including a “forbidden” conformation of the galactose derivative, *Carbohydr. Res.* 337 (2002) 21–29.
- [48] A. V Gudmundsdottir, C.E. Paul, M. Nitz, Stability studies of hydrazide and hydroxylamine-based glycoconjugates in aqueous solution, *Carbohydr. Res.* 344 (2009) 278–284.
- [49] B. Bendiak, Preparation, conformation, and mild hydrolysis of 1-glycosyl-2-acetylhydrazines of the hexoses, pentoses, 2-acetamido-2-deoxyhexoses, and fucose, *Carbohydr. Res.* 304 (1997) 85–90.
- [50] E. Lattova, H. Perreault, Labelling saccharides with phenylhydrazine for electrospray and matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 793 (2003) 167–179.
- [51] R. Zhang, Y. Cao, M. Hearn, Synthesis and Application of Fmoc-Hydrazine for the Quantitative Determination of Saccharides by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography in the Low Subpicomole Range, *Anal. Biochem.* 195 (1991) 160–167.
- [52] D. Sugahara, J. Amano, T. Irimura, Fluorescence labeling of oligosaccharides useful in the determination of molecular interactions, *Anal. Sci.* 19 (2003) 167–169.

- [53] T.J.P. Naven, D.J. Harvey, Cationic Derivatization of Oligosaccharides with Girard 's T Reagent for Improved Performance in Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization and Electrospray Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10 (1996) 829–834.
- [54] G.-C. Gil, Y.-G. Kim, B.-G. Kim, A relative and absolute quantification of neutral N-linked oligosaccharides using modification with carboxymethyl trimethylammonium hydrazide and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 379 (2008) 45–59.
- [55] M.S. Bereman, D.L. Comins, D.C. Muddiman, Increasing the hydrophobicity and electrospray response of glycans through derivatization with novel cationic hydrazides, *Chem. Commun.* 46 (2010) 237–239.
- [56] S. Walker, B.N. Papas, D.L. Comins, D.C. Muddiman, Interplay of permanent charge and hydrophobicity in the electrospray ionization of glycans, *Anal. Chem.* 82 (2010) 6636–6642.
- [57] S. Walker, L.M. Lilley, M.F. Enamorado, D.L. Comins, D.C. Muddiman, Hydrophobic derivatization of N-linked glycans for increased ion abundance in electrospray ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 22 (2011) 1309–1317.
- [58] S. Perez, L. Colón, Determination of carbohydrates as their dansylhydrazine derivatives by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis.* 17 (1996) 352–358.
- [59] X. Wang, Y. Chen, Determination of carbohydrates as their p-sulfophenylhydrazones by capillary zone electrophoresis, *Carbohydr. Res.* 332 (2001) 191–196.
- [60] S. Honda, E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi, J. Nakamura, High-performance liquid chromatography of reducing carbohydrates as strongly ultraviolet-absorbing and electrochemically sensitive 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives, *Anal. Biochem.* 180 (1989) 351–357.
- [61] K. Kakehi, S. Suzuki, Precolumn Labeling of Reducing Carbohydrates with Analysis of Neutral and Sialic Acid-Containing Oligosaccharides Found in Glycoproteins, *Anal. Biochem.* 268 (1991) 256–268.
- [62] E.P. Diamandis, T.K. Christopoulos, The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology, *Clin. Chem.* 37 (1991) 625–636.
- [63] G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier Science, 2010.
- [64] B.E. Rothenberg, B.K. Hayes, D. Toomre, A.E. Manzi, A. Varki, Biotinylated diaminopyridine: an approach to tagging oligosaccharides and exploring their biology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 11939–11943.



- [65] C. Leteux, R. Childs, W. Chai, M.S. Stoll, H. Kogelberg, T. Feizi, Biotinyl-L-3-(2-naphthyl)-alanine hydrazide derivatives of N-glycans: versatile solid-phase probes for carbohydrate-recognition studies, *Glycobiology*. 8 (1998) 227–236.
- [66] E.A. Bayer, H. Ben-Hur, M. Wilchek, Biocytin hydrazide—a selective label for sialic acids, galactose, and other sugars in glycoconjugates using avidin-biotin technology, *Anal. Biochem.* 170 (1988) 271–281.
- [67] Y. Shinohara, H. Sota, F. Kim, M. Shimizu, M. Gotoh, M. Tosu, et al., Use of a biosensor based on surface plasmon resonance and biotinyl glycans for analysis of sugar binding specificities of lectins, *J. Biochem.* 117 (1995) 1076–1082.
- [68] Y. Shinohara, H. Sota, M. Gotoh, M. Hasebe, M. Tosu, J. Nakao, et al., Bifunctional Labeling Reagent for Oligosaccharides To Incorporate Both Chromophore and Biotin Groups, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2573–2579.
- [69] C. Leteux, M.S. Stoll, R. Childs, W. Chai, M. Vorozhaikina, T. Feizi, Influence of oligosaccharide presentation on the interactions of carbohydrate sequence-specific antibodies and the selectins - Observations with biotinylated oligosaccharides, *J. Immunol. Methods.* 227 (1999) 109–119.
- [70] O.E. Galanina, M. Mecklenburg, N.E. Nifantiev, G. V Pazynina, N. V Bovin, GlycoChip: multiarray for the study of carbohydrate-binding proteins, *Lab Chip.* 3 (2003) 260–265.
- [71] G. Uhlenbruck, Lektine, Toxine und Immunotoxine, *Naturwissenschaften.* 68 (1981) 606–612.
- [72] J.J. Thomson, On the Masses of the Ions in Gases, *Philos. Mag. J. Sci.* 48 (1899) 547–567.
- [73] F.W. Aston, A Positive Ray Spectrograph, *Phys. Rev.* xi (1918) 707–715.
- [74] S.J. Gaskell, Electrospray: Principles and Practice, *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 677–688.
- [75] P. Kebarle, A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 804–817.
- [76] J. V Iribarne, B.A. Thomson, On the evaporation of small ions from charged droplets, *J. Chem. Phys.* 64 (1976) 2287–2294.
- [77] G. Rücker, M. Neugebauer, G.G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysenmethoden ; mit 81 Tabellen*, Wiss. Verlag-Ges., 2008.

- [78] C.S. Ho, C.W.K. Lam, M.H.M. Chan, R.C.K. Cheung, L.K. Law, L.C.W. Lit, et al., Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications, *Clin. Biochem. Rev.* 24 (2003) 3–12.
- [79] M. Karas, U. Bahr, Massenspektrometrie Tutorial, [Http://www.umm.uni-Heidelberg.de/inst/ikc/proteomics/downloads/mstutorialkaras.doc](http://www.umm.uni-Heidelberg.de/inst/ikc/proteomics/downloads/mstutorialkaras.doc). (n.d.) 1–19.
- [80] F. Hillenkamp, M. Karas, The MALDI Process and Method, in: F. Hillenkamp, J. Peter-Katalinic (Eds.), *MALDI MS. A Pract. Guid. to Instrumentation, Methods Appl.*, 2007: pp. 1–28.
- [81] M. Karas, H. Ehring, E. Nordhoff, B. Stahl, K. Strupat, F. Hillenkamp, Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization Mass Spectrometry with Additives to hydroxybenzoic acid, *Org. Mass Spectrom.* 28 (1993) 1476–1481.
- [82] M.L. Vestal, P. Juhasz, S.A. Martin, Delayed Extraction Matrix-assisted Laser Desorption Time-of-flight Mass Spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9 (1995) 1044–1050.
- [83] M.M. Wolff, W.E. Stephens, A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion, *Rev. Sci. Instrum.* 616 (1953) 1–3.
- [84] M. Karas, M. Glückmann, J. Schäfer, Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 1–12.
- [85] R. Zenobi, R. Knochenmuss, Ion Formation in MALDI Mass Spectrometry, *Mass Spectrom. Rev.* 17 (1999) 337–366.
- [86] K.K. Mock, M. Davey, J.S. Cotrell, The Analysis of Underivatized Oligosaccharides by Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177 (1991) 644–651.
- [87] D.J. Harvey, Collision-induced fragmentation of underivatized N-linked carbohydrates ionized by electrospray, *J. Mass Spectrom.* 35 (2000) 1178–1190.
- [88] R. Kaufmann, D. Kirsch, B. Spengler, Sequencing of peptides in a time-of-flight mass spectrometer: evaluation of postsource decay following matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI), *J. Mass Spectrom.* 131 (1994) 355–385.
- [89] D. Suckau, A. Resemann, M. Schuerenberg, P. Hufnagel, J. Franzen, A. Holle, A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 952–965.
- [90] R. Orlando, C.A. Bush, C. Fenselau, Structural Analysis of Oligosaccharides by Tandem Mass Spectrometry: Collisional Activation of Sodium Adduct Ions, *Biomed. Environmental Mass Spectrom.* 19 (1990) 747–754.

- [91] L.C. Ngoka, J.F. Gal, C.B. Lebrilla, Effects of cations and charge types on the metastable decay rates of oligosaccharides, *Anal. Chem.* 66 (1994) 692–698.
- [92] B. Domon, C.E. Costello, A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates, *Glycoconj. J.* 5 (1988) 397–409.
- [93] F. McLafferty, Mass Spectrometric Analysis -Molecular Rearrangements, *Anal. Chem.* 31 (1959) 82–87.
- [94] L.P. Brüll, W. Heerma, J. Haverkamp, Loss of Internal 1 ~ 6 Substituted Monosaccharide Residues from Underivatized and Per-O-Methylated Trisaccharides, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 8 (1997) 43–49.
- [95] B. Ernst, D.R. Müller, W.J. Richter, False sugar sequence ions in electrospray tandem mass spectrometry of underivatized sialyl-Lewis-type oligosaccharides, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.* 160 (1997) 283–290.
- [96] M. Deelder, Y.E.M. Van Der Burgt, M. Wührer, Mass Spectrometric Glycan Rearrangements, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 664–680.
- [97] L.P. Brüll, V. Kovácik, J.E. Thomas-Oates, W. Heerma, J. Haverkamp, Sodium-cationized oligosaccharides do not appear to undergo “internal residue loss” rearrangement processes on tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12 (1998) 1520–1532.
- [98] V. Kovácik, J. Hirsch, Oligosaccharide Characterization Using Collision-induced Dissociation Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry: Evidence for Internal Monosaccharide Residue Loss, *J. Mass Spectrom.* 30 (1995) 949–958.
- [99] P. Kapková, Mass spectrometric analysis of carbohydrates labeled with a biotinylated tag, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 23 (2009) 2775–2784.
- [100] M.R. Hardy, Monosaccharide analysis of glycoconjugates by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection, *Methods Enzymol.* 179 (1989) 76–82.
- [101] S. Yasuno, K. Kokubo, K. Masugu, New Method for Determining the Sugar Composition of Glycoproteins, Glycolipids and Oligosaccharides by High-Performance Liquid Chromatography, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (1999) 1353–1359.
- [102] J.Q. Fan, A. Kondo, I. Kato, Y. Lee, High Performance Liquid Chromatography of Glycopeptides and Oligosaccharides on Graphitized Carbon Columns, *Anal. Biochem.* 219 (1994) 224–229.
- [103] L. Hammad, M.M. Saleh, M. Novotny, Y. Mechref, Multiple-reaction monitoring liquid chromatography mass spectrometry for monosaccharide compositional analysis of glycoproteins, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 1224–1234.

- [104] D. Fu, Monosaccharide composition analysis of oligosaccharides and glycoproteins by high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.* 227 (1995) 377–384.
- [105] Y.C. Lee, Carbohydrate analyses with high-performance anion-exchange chromatography, *J. Chromatogr. A.* 720 (1996) 137–149.
- [106] P. Hemström, K. Irgum, Hydrophilic interaction chromatography, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784–1821.
- [107] B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, HILIC methods in pharmaceutical analysis, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 698–715.
- [108] E. Forgks, Retention strength and selectivity of porous graphitized carbon columns Theoretical aspects and practical applications, *Trends Anal. Chem.* 14 (1995) 23–29.
- [109] T. Hanai, Separation of polar compounds using carbon columns, *J. Chromatogr. A.* 989 (2003) 183–196.
- [110] B. Xie, C.E. Costello, Chapter 2 - Carbohydrate Structure Determination by Mass Spectrometry, in: H.G. Garg, M.K.C. Mary K. Cowman and Charles A. HalesA2 - Hari G. Garg, B. and M.A. Charles A. Hales BT - Carbohydrate Chemistry (Eds.), Elsevier, Oxford, 2008: pp. 29–57.
- [111] C.O. Kappe, Controlled microwave heating in modern organic synthesis, *Angew. Chemie.* 43 (2004) 6250–6284.
- [112] C.O. Kappe, A. Stadler, *Microwaves in Organic and Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH, 2005.
- [113] E. Heller, W. Lautenschläger, U. Holzgrabe, Real time observation of microwave-enhanced reactions via fast FTIR spectroscopy, *Tetrahedron Lett.* 50 (2009) 1321–1323.
- [114] M. Wuhrer, A.M. Deelder, C.H. Hokke, Protein glycosylation analysis by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 825 (2005) 124–133.
- [115] W.M. Blanken, M.L.E. Bergh, P.L. Koppen, D. Eijnden, High-Pressure Liquid Chromatography of Neutral Oligosaccharides: Effects on Structural Parameters, *Anal. Biochem.* 145 (1985) 322–330.
- [116] G. Karlsson, S. Winge, H. Sandberg, Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection, *J. Chromatogr. A.* 1092 (2005) 246–249.
- [117] A. Alpert, M. Shukla, A.K. Shuklab, L.R. Zieske, S.W. Yuenc, M.A.J. Fergusond, et al., Hydrophilic-interaction chromatography of complex carbohydrates, *J. Chromatogr. A.* 676 (1994) 191–202.

- [118] H. Tanaka, X. Zhou, O. Masayoshi, Characterization of a novel diol column for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 987 (2003) 119–125.
- [119] C. Brons, C. Olieman, Study of the High-Performance Liquid Chromatographic Separation of Reducing Sugars, Applied to the Determination of Lactose in Milk, *J. Chromatogr.* 259 (1983) 79–86.
- [120] H. Rütters, T. Möhring, The persistent memory effect of triethylamine in the analysis of phospholipids by liquid chromatography/mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2013) 122–123.
- [121] K. Muramoto, R. Goto, H. Kamiya, Analysis of reducing sugars as their chromophoric hydrazones by high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.* 162 (1987) 435–442.
- [122] J. Rosenfeld, Enhancement of analysis by analytical derivatization, *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 1157–1158.
- [123] Z.L. Nikolov, M.M. Meagher, P.J. Reilly, High-Performance Liquid Chromatography of Disaccharides on Amine-Bonded Silica Columns, *J. Chromatogr.* 319 (1985) 51–57.
- [124] L.A. Verhaar, B.F. Kuster, Liquid Chromatography of Sugars on Silica-based Stationary Phases, *J. Chromatogr.* 220 (1981) 313–328.
- [125] J.G. Baust, R.E. Lee, R.R. Rojas, D.L. Hendrix, W. Cotton, D. Friday, et al., Comparative Separation of Low-Molecular-Weight Carbohydrates and Polyols by High-Performance Liquid Chromatography: Radially compressed Amine modified Silica versus Ion Exchange, *J. Chromatogr.* 261 (1983) 65–75.
- [126] J. Parkkinen, J. Finne, Isolation and structural characterization of five major sialyloligosaccharides and a sialylglycopeptide from normal human urine, *Eur. J. Biochem.* 136 (1983) 355–361.
- [127] D.F. Smith, D. Zopf, V. Ginsburg, Fractionation of sialyl oligosaccharides of human milk by ion-exchange chromatography, *Anal. Biochem.* 85 (1978) 602–608.
- [128] H. Nie, Y. Li, X.-L. Sun, Recent advances in sialic acid-focused glycomics, *J. Proteomics.* 75 (2012) 3098–3112.
- [129] G.G. Pan, L.D. Melton, Analysis of sialyl oligosaccharides by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation-mass spectrometry with differentiation of  $\alpha$ 2-3 and  $\alpha$ 2-6 sialyl linkages, *J. Chromatogr. A.* 1077 (2005) 136–142.
- [130] E.D. Green, J.U. Baenziger, Separation of anionic oligosaccharides by high-performance liquid chromatography, *Anal. Biochem.* 158 (1986) 42–49.

- [131] S.F. Wheeler, D.J. Harvey, Negative ion mass spectrometry of sialylated carbohydrates: discrimination of N-acetylneuraminic acid linkages by MALDI-TOF and ESI-TOF mass spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5027–5039.
- [132] J.W. Dallinga, W. Heerma, Reaction mechanism and fragment ion structure determination of deprotonated small oligosaccharides, studied by negative ion fast atom bombardment (tandem) mass spectrometry, *Biol. Mass Spectrom.* 20 (1991) 215–231.
- [133] B. Mulrone, J.C. Traeger, B.A. Stone, Determination of Both Linkage Position and Anomeric Configuration in Underivatized Glucopyranosyl Disaccharides by Electrospray Mass Spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 30 (1995) 1277–1283.
- [134] D. Garozzo, G. Impallomeni, Linkage analysis in disaccharides by electrospray mass spectrometry, *Carbohydr. Res.* 221 (1991) 253–257.
- [135] J. Carroll, L. Ngoka, C.G. Beggs, C.B. Lebrilla, Liquid secondary ion mass spectrometry/Fourier transform mass spectrometry of oligosaccharide anions, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1582–1587.
- [136] B. Mulrone, J.B. Peel, J.C. Traeger, Theoretical Study of Deprotonated Glucopyranosyl Disaccharide Fragmentation, *J. Mass Spectrom.* 871 (1999) 856–871.
- [137] D.T. Li, G.R. Her, Structural analysis of chromophore-labeled disaccharides and oligosaccharides by electrospray ionization mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 33 (1998) 644–652.
- [138] D.T. Li, G.R. Her, Linkage Analysis of Chromophore-Labeled Disaccharides and Linear Oligosaccharides by Negative Ion Fast Bombardment Ionization and Collisional-Induced Dissociation with B/E Scanning, *Anal. Biochem.* 211 (1993) 250–257.
- [139] D. Wan, H. Yang, F. Song, Z. Liu, S. Liu, Identification of isomeric disaccharides in mixture by the 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone labeling technique in conjunction with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 780 (2013) 36–45.
- [140] H. Suzuki, A. Kameyama, K. Tachibana, H. Narimatsu, K. Fukui, Computationally and experimentally derived general rules for fragmentation of various glycosyl bonds in sodium adduct oligosaccharides, *Anal. Chem.* 81 (2009) 1108–1120.
- [141] T. Yamagaki, H. Nakanishi, A new technique distinguishing  $\alpha$ 2-3 sialyl linkage from  $\alpha$ 2-6 linkage in sialyllactoses and sialyl-N-acetyllactosamines by post-source decay fragmentation method of MALDI-TOF mass spectrometry, *Glycoconj. J.* 16 (1999) 385–389.

- [142] T. Nishikaze, T. Nakamura, H. Jinmei, J. Amano, Negative-ion MALDI-MS2 for discrimination of  $\alpha$ 2,3- and  $\alpha$ 2,6-sialylation on glycopeptides labeled with a pyrene derivative, *J. Chromatogr. B.* 879 (2011) 1419–1428.
- [143] S. Bank, P. Kapková, Liquid Chromatography – Mass Spectrometry of Carbohydrates Derivatized with Biotinamidocaproyl Hydrazide, in: C. Chuan-Fa (Ed.), *Carbohydrates - Compr. Stud. Glycobiol. Glycotechnol.*, 2012: pp. 55–80.
- [144] H.H. Fox, Some Sugar Derivatives Of Isonicotinylhydrazine, *J. Org. Chem.* 18 (1953) 990–993.
- [145] D. Fu, L. Chen, R. O'Neill, A detailed structural characterization of ribonuclease B oligosaccharides by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy and mass spectrometry, *Carbohydr. Res.* 261 (1994) 173–186.
- [146] B.A. Bernard, S.A. Newton, K. Olden, B.A. Bernardsgv, S.A. Newtonsii, K. Olden, Effect of Size and Location of the Oligosaccharide Chain on Protease Degradation of Bovine Pancreatic Ribonuclease, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 12198–12202.
- [147] J.M. Prien, D.J. Ashline, A.J. Lapadula, H. Zhang, V.N. Reinhold, The high mannose glycans from bovine ribonuclease B isomer characterization by ion trap MS, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 539–556.
- [148] J. Huntington, P.E. Stein, Structure and properties of ovalbumin, *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 756 (2001) 189–198.
- [149] K. Yamashita, I. Ueda, A. Kobata, Asparagine-linked Sugar Chains of Hen Egg Albumin, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 14144–14147.
- [150] D.J. Harvey, D.R. Wing, B. Küster, I.B.H. Wilson, Composition of N-Linked Carbohydrates from Ovalbumin and Co-purified Glycoproteins, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 564–571.
- [151] W. Morelle, J.-C. Michalski, Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 1585–1602.
- [152] J. Zaia, Mass spectrometry of oligosaccharides, *Mass Spectrom. Rev.* 23 (2004) 161–227.
- [153] A.L. Burlingame, R.K. Boyd, S.J. Gaskell, Mass spectrometry, *Anal. Chem.* 66 (1994) 647R–716R.
- [154] N. Leymarie, J. Zaia, Effective use of mass spectrometry for glycan and glycopeptide structural analysis, *Anal. Chem.* 84 (2012) 3040–3048.
- [155] E. Lattová, S. Snovida, H. Perreault, O. Krokhin, Influence of the labeling group on ionization and fragmentation of carbohydrates in mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 683–696.

- [156] R. Beavis, T. Chaudhary, B. Chaid, a-Cyano-4-hydroxycinnamic Acid as a Matrix for Matrix- assisted Laser Desorption Mass-Spectrometry, *Org. Mass Spectrom.* 27 (1992) 156–158.
- [157] D.J. Harvey, Structural determination of N-linked glycans by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization mass spectrometry, *Proteomics.* 5 (2005) 1774–1786.
- [158] D.J. Harvey, S.P. Road, Fragmentation of Negative ions from N -Linked Glycans : Use of Nitrate Adducts to induce Antenna-Specific Fragmentation, [http://www.bioch.ox.ac.uk/glycob/posters/david\\_harvey\\_2\\_asms\\_2004.pdf](http://www.bioch.ox.ac.uk/glycob/posters/david_harvey_2_asms_2004.pdf). (2004).
- [159] D.J. Harvey, Fragmentation of negative ions from carbohydrates: part 3. Fragmentation of hybrid and complex N-linked glycans, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 647–659.
- [160] D.J. Harvey, T.S. Mattu, M.R. Wormald, L. Royle, R. Dwek, P.M. Rudd, “Internal residue loss”: rearrangements occurring during the fragmentation of carbohydrates derivatized at the reducing terminus, *Anal. Chem.* 74 (2002) 734–740.
- [161] D.J. Harvey, Electrospray mass spectrometry and fragmentation of N-linked carbohydrates derivatized at the reducing terminus, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 900–915.
- [162] B. Domon, R. Aebersold, Mass spectrometry and protein analysis, *Science.* 312 (2006) 212–217.
- [163] M.J. Huddleston, M.F. Bean, S. Carr, Collisional fragmentation of glycopeptides by electrospray ionization LC/MS and LC/MS/MS: methods for selective detection of glycopeptides in protein digests, *Anal. Chem.* 65 (1993) 877–884.
- [164] S.A. Carr, M.J. Huddleston, M.E. Bean, Selective identification and differentiation of N- and O-linked oligosaccharides in glycoproteins by liquid chromatography-mass spectrometry, *Protein Sci.* (1993) 183–196.
- [165] J. Charlwood, J. Langridge, P. Camilleri, Structural characterisation of N-linked glycan mixtures by precursor ion scanning and tandem mass spectrometric analysis, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1522–1530.
- [166] M. Macht, A. Asperger, S.-O. Deininger, Comparison of laser-induced dissociation and high-energy collision-induced dissociation using matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) for peptide and protein identification, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 2093–2105.
- [167] D.J. Harvey, Postsource decay fragmentation of N-linked carbohydrates from ovalbumin and related glycoproteins, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (2000) 572–577.



- [168] E. Lattova, The Usefulness of Hydrazine Derivatives for Mass Spectrometric Analysis of Carbohydrates, *Mass Spectrom. Rev.* (2013) 1–20.
- [169] W. Mo, T. Takao, H. Sakamoto, Y. Shimonishi, Structural analysis of oligosaccharides derivatized with 4-aminobenzoic acid 2-(diethylamino)ethyl ester by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4520–4526.
- [170] Y. Mechref, M. V Novotny, C. Krishnan, Structural characterization of oligosaccharides using MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4895–4903.
- [171] E. Lattova, Matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry and post-source decay fragmentation study of phenylhydrazones of N-linked oligosaccharides from ovalbumin, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15 (2004) 725–735.
- [172] D.J. Harvey, R.H. Bateman, M.R. Green, High-energy collision-induced fragmentation of complex oligosaccharides ionized by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 167–187.
- [173] E. Lattova, H. Perreault, Profiling of N-linked oligosaccharides using phenylhydrazine derivatization and mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1016 (2003) 71–87.
- [174] J.C. Rouse, A. Strang, W. Yu, J.E. Vath, Isomeric Differentiation of Asparagine-Linked Oligosaccharides by Matrix-Assisted Laser Desorption ± Ionization Postsource Decay Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Anal. Biochem.* 46 (1998) 33–46.
- [175] Y. Takegawa, S. Ito, S. Yoshioka, K. Deguchi, H. Nakagawa, K. Monde, et al., Structural assignment of isomeric 2-aminopyridine-derivatized oligosaccharides using MSn spectral matching, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 385–391.
- [176] K. Deguchi, Y. Takegawa, H. Ito, N. Miura, S. Yoshioka, S. Nagai, et al., Structural assignment of isomeric 2-aminopyridine-derivatized monosialylated biantennary N-linked oligosaccharides using negative-ion multistage tandem mass spectral matching, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 412–418.
- [177] A. Devakumar, Y. Mechref, P. Kang, M. Novotny, J.P. Reilly, Identification of isomeric N-glycan structures by mass spectrometry with 157 nm laser-induced photofragmentation, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (2008) 1027–1040.
- [178] J. Katrlík, P. Gemeiner, T. Koz, J. Tkáč, Glycan and Lectin Microarrays for Glycomics and Medicinal Applications, *Med. Res. Rev.* 30 (2010) 394–418.
- [179] P.-H. Liang, C.-Y. Wu, W. Greenberg, C.-H. Wong, Glycan arrays: biological and medical applications, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12 (2008) 86–92.

- [180] D. Wang, S. Liu, B.J. Trummer, C. Deng, A. Wang, Carbohydrate microarrays for the recognition of cross-reactive molecular markers of microbes and host cells, *Nat. Biotechnol.* 20 (2002) 275–281.
- [181] A.M. Wu, E. Lisowska, M. Duk, Z. Yang, Lectins as tools in glycoconjugate research, *Glycoconj. J.* 26 (2009) 899–913.
- [182] J. Hirabayashi, Concept, strategy and realization of lectin-based glycan profiling, *J. Biochem.* 144 (2008) 139–147.
- [183] M.-R. Lee, I. Shin, Facile preparation of carbohydrate microarrays by site-specific, covalent immobilization of unmodified carbohydrates on hydrazide-coated glass slides, *Org. Lett.* 7 (2005) 4269–4272.
- [184] X. Zhou, J. Zhou, Oligosaccharide microarrays fabricated on aminooxyacetyl functionalized glass surface for characterization of carbohydrate-protein interaction, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1451–1458.
- [185] W.G.T. Willats, S.E. Rasmussen, T. Kristensen, J.D. Mikkelsen, J.P. Knox, Sugar-coated microarrays: a novel slide surface for the high-throughput analysis of glycans, *Proteomics.* 2 (2002) 1666–1671.
- [186] V.I. Dyukova, N. Shilova, O.E. Galanina, Y. Rubina, N. Bovin, Design of carbohydrate multiarrays, *Biochim. Biophys. Acta.* 1760 (2006) 603–609.
- [187] M. Wilchek, E.A. Bayer, The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications, *Anal. Biochem.* 171 (1988) 1–32.
- [188] G.S. Wood, R. Warnke, Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems, *J. Histochem. Cytochem.* 29 (1981) 1196–1204.
- [189] E.A. Bayer, M. Wilcheck, Application of avidin-biotin technology to affinity-based separations, *J. Chromatogr.* 510 (1990) 3–11.
- [190] C.H. Grün, S.J. van Vliet, W.E.C.M. Schiphorst, C.M.C. Bank, S. Meyer, I. van Die, et al., One-step biotinylation procedure for carbohydrates to study carbohydrate-protein interactions, *Anal. Biochem.* 354 (2006) 54–63.
- [191] M. Wuhrer, A. van Remoortere, C.I. Balog, A.M. Deelder, C.H. Hokke, Ligand identification of carbohydrate-binding proteins employing a biotinylated glycan binding assay and tandem mass spectrometry, *Anal. Biochem.* 406 (2010) 132–140.
- [192] I. Goldstein, C. Hollermann, J. Merrick, Protein-Carbohydrate Interaction; The Interaction of Polysaccharides with Concanavalin A, *Biochim. Biophys. Acta.* 97 (1964) 68–76.

- [193] A. Ceroni, K. Maass, H. Geyer, R. Geyer, A. Dell, S.M. Haslam, GlycoWorkbench : A Tool for the Computer-Assisted Annotation of Mass Spectra of Glycans, J. Proteome Res. 7 (2008) 1650–1659.