

**Methodische Evaluierung von Verfahren zur
Analyse des Mucin-Typ O-Glykoproteoms**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Universität zu Köln



Vorgelegt von

Sebastian Bernhard Teitz

aus Köln

im Mai 2006

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. F.-G. Hanisch
zwischen April 2003 und Mai 2006 im Institut für Biochemie II der Medizinischen
Fakultät der Universität zu Köln angefertigt.

Betreuung der Arbeit und Erstellung des Erstgutachtens:

Herrn Prof. Dr. rer. nat. F.-G. Hanisch
Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

Erstellung des Zweitgutachtens:


Prof. Dr. rer. nat. Dietmar Schomburg
Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Universität zu Köln

Prüfungsvorsitz:

Prof. Dr. rer. nat. Helmut W. Klein
Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Universität zu Köln

Diese Arbeit widme ich meinem noch ungeborenen Sohn

Und seiner Mutter (und ihrer Niere) – für alles was sie mit uns durchmacht

Und noch durchmachen wird... 

Inhaltsverzeichnis

1) Einleitung	1
1.1) Glykobiologie	1
1.2) O-Glykosylierung	2
1.3) Methodischer Hintergrund	5
1.4) Hintergrund der evaluierten Methoden	8
1.5) Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	10
2) Material und Methoden	11
In-vitro Strategien zur Anreicherung des Mucin-Typ O-Glykoproteoms	
2.1) β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit Biotin	11
2.1.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen	11
2.1.2) Durchführung „ β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit NHS-Biotin“	11
2.1.2.1) Trypsinbehandlung	11
2.1.2.2) N-Acetylierung:	12
2.1.2.3) β -Eliminierung	12
2.1.2.4) Biotinylierung	12
2.1.2.5) Trypsinbehandlung	12
2.1.2.6) Affinitätschromatographie	13
2.1.2.7) MALDI-Analyse der Proben	13
2.2) β -Eliminierung von O-Glykanen mit anschließender Michael Addition von Nukleophilen – BEMAD	14
2.2.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen	14
2.2.2) Durchführung BEMAD	15
2.2.2.1) Peptid Sequenzen	15
2.2.2.2) β -Eliminierung mit anschließender Michael-Addition	15
2.2.2.2) Affinitätschromatographie	16
2.2.2.3) MALDI-Analyse der Proben	16

2.3) Identifizierung von selektiv oxidierten O-Glykoproteinen durch kovalente Chromatographie auf Hydrazid-Harzen und Massenspektrometrie	16
2.3.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen	16
2.3.2) Durchführung „Identifizierung von O-Glykoproteinen über kovalente Hydrazidchromatographie und Massenspektrometrie“	18
2.3.2.1) Oxidation des Kohlenhydratanteils der Glykoproteine	18
2.3.2.2) Kopplung der Glykoproteine an Hydrazidharz	19
2.3.2.3) Waschen des Hydrazidharzes vor Proteolyse	19
2.3.2.4) Proteolytischer Verdau der immobilisierten Proteine	19
2.3.2.5) Waschen des Hydrazidharzes nach Proteolyse / PNGaseF-Behandlung	20
2.3.2.6) Entfernen N-glykosylierter Peptide mit PNGaseF	20
2.3.2.6) Elution O-glykosylierter Peptide / Proteine	21
2.3.2.7) Modifizierung von Profinity™ Epoxide Harz mit Hydrazin-Gruppen	22
2.3.2.7) Neuraminidase Behandlung	23
2.4) Hydrophile Affinitätschromatographie	23
2.4.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen	23
2.4.2) Durchführung „Hydrophile Affinitätschromatographie“	24
2.4.2.1) Trypsinbehandlung	24
2.4.2.2) Hydrophile Affinitätschromatographie	24
2.5) Partielle Deglykosylierung von Glykoproteinen und Glykopeptiden mit Trifluormethansulfonsäure (TFMSA)	25
2.5.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen	25
2.5.2) Durchführung „Partielle Deglykosylierung von Glykoproteinen und Glykopeptiden mit TFMSA“	27
2.5.2.1) Partielle Deglykosylierung von Polypeptiden mit TFMSA	27
2.5.2.2) Affinitätschromatographische Reinigung auf HPA-Agarose	27
2.5.2.3) Abreicherung von Serumalbumin und IgG aus Serumproben	28
2.6) Eliminierung von O-Glykanen durch Alkylamine und Identifizierung mit Massenspektrometrie	29
2.6.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen	29
2.6.2) Durchführung „Eliminierung von O-Glykanen durch Alkylamine und Identifizierung mit Massenspektrometrie“	30
2.6.2.1) Vorbehandlung der Proben mit EA oder MA	30
2.6.2.2) EA- / MA-Behandlung von Gelstanzen	30

2.7) Anreicherung und Identifizierung von Glykoproteinen über Fraktionierung auf Aminophenylboratsäulen	31
2.7.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen	31
2.7.2) Durchführung „Anreicherung und Identifizierung von Glykoproteinen über Fraktionierung auf Aminophenylboratsäulen“	32
2.7.2.1) Chromatographie auf Aminophenylboratsäule	32
2.7.2.2) Enzymatische Anwendungen in EPPS-Puffer	33
Färbung von Glykoproteinen	
2.8) Glykoproteinfärbung mit 3-Aminophenylborat-Fluorescein-isothiocyanat	34
2.8.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen	34
2.8.2) Durchführung „Glykoproteinfärbung mit 3-Aminophenylborat- Fluoresceinisothiocyanat“	35
2.8.2.1) Kopplung von FITC und APB	35
2.8.2.2) Dünnschicht-Chromatographie	35
2.8.2.2) Reinigung des FITC-APB durch Säulenchromatographie auf Cellulose	36
2.8.2.3) Dot-Blot-Färbung von Glykoproteinen mit FITC-APB	36
2.8.2.4) PAGE von Glykoproteinen und Färbung mit FITC-APB	38
In vivo Strategien zur Anreicherung des Mucin-Typ O-Glykoproteoms	
2.9) Metabolische in vivo-Markierung von Glykoproteinen mit Azidozuckern	39
2.9.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen	39
2.9.2) Durchführung „Metabolische Markierung von Glykoproteinen mit Azidozuckern“	41
2.9.2.1) Zellkultur	41
2.9.2.2) Staudinger Ligation	42
2.9.2.3) Western-Blot	42
2.10) Standardprotokolle	43
2.10.1) MALDI-Matrices	43
2.10.2) MALDI-MS Analyse	43
2.10.3) Peptidanalyse mit Umkehrphasen-HPLC	44
2.10.4) SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.10.5) Coomassiefärbung von SDS-Gelen	45
2.10.6) Silberfärbung von SDS Gelen	46

2.10.7) Fluoreszenzfärbung von SDS-Gelen	46
2.10.8) Peptide Mass Fingerprinting (PMF)	46
2.10.9) Chloroform/Methanol-Fällung von Proteinen	48
2.10.10) Ethanol-fällung von Proteinen	48
2.10.11) Acetonfällung von Proteinen	48
3) Ergebnisse	49
In-vitro Strategien zur Anreicherung des Mucin-Typ O-Glykoproteoms	49
3.1) β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit Biotin	49
3.2) β -Eliminierung von O-Glykanen mit anschließender Michael Addition von Nukleophilen – BEMAD	57
3.3) Identifizierung von selektiv oxidierten O-Glykoproteinen durch kovalente Chromatographie auf Hydrazid-Harzen und Massenspektrometrie	63
3.4) Hydrophile Affinitätschromatographie	73
3.5) Partielle Deglykosylierung von Glykoproteinen und Glykopeptiden mit Trifluormethansulfonsäure (TFMSA)	75
3.6) Eliminierung von O-Glykanen durch Alkylamine und Identifizierung mit Massenspektrometrie	82
3.7) Anreicherung und Identifizierung von Glykoproteinen über Fraktionierung auf Aminophenylboratsäulen	88
Färbung von Glykoproteinen	
3.8) Glykoproteinfärbung mit 3-Aminophenylborat-Fluorescein-isothiocyanat	92
In vivo Strategien zur Anreicherung des Mucin-Typ O-Glykoproteoms	
3.9) Metabolische in vivo-Markierung von Glykoproteinen mit Azidozuckern	96
4) Diskussion	98
4.1) β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit Biotin	99
4.2) β -Eliminierung von O-Glykanen mit anschließender Michael Addition von Nukleophilen – BEMAD	100
4.3) Identifizierung von selektiv oxidierten O-Glykoproteinen durch kovalente Chromatographie auf Hydrazid-Harzen und Massenspektrometrie	101

4.4) Hydrophile Affinitätschromatographie	103
4.5) Partielle Deglykosylierung von Glykoproteinen und Glykopeptiden mit Trifluormethansulfonsäure (TFMSA)	104
3.6) Eliminierung von O-Glykanen durch Alkylamine und Identifizierung mit Massenspektrometrie	106
4.7) Anreicherung und Identifizierung von Glykoproteinen über Fraktionierung auf Aminophenylboratsäulen	108
4.8) Glykoproteinfärbung mit 3-Aminophenylborat-Fluorescein-isothiocyanat	109
4.9) Metabolische in-vivo-Markierung von Glykoproteinen mit Azidozuckern	110
5) Zusammenfassung	112
6) Abstract	115
7) Literaturverzeichnis	117
Verzeichnis der Internet-Quellen	129
8) Erklärung	130
9) Lebenslauf	131
10) Dankeschön!!!	132
11) Anhänge	133
11.1) Listen für Massen theoretischer Peptidfragmente aus tryptischem Verdau	133
11.1.1) Humanes Serum Albumin (HSA)	133
11.1.2) Humanes Glykophorin A (HGA)	138
12) Verzeichnis der Abkürzungen	139

1) Einleitung

1.1) Glykobiologie

Die Glykobiologie umfasst im weitesten Sinne die Disziplin der Biologie, die sich mit der Struktur, Biosynthese und Funktion von Sacchariden (Glykanen) und Glykokonjugaten befasst, die in der Natur auftreten. Mit einem Ursprung in den 1850er Jahren (Entdeckung des Glykogens bzw. der „glykogenen Substanz“ als Speicherform der Glukose durch Claude Bernard) ist die Glykobiologie (Rademacher et al. 1988) heute ein wichtiges, expandierendes wissenschaftliches Feld mit Bezügen zu Grundlagenforschung, Biomedizin und Biotechnologie.

Eines der wichtigsten Felder der Glykobiologie befasst sich mit der Analyse von glykosylierten Proteinen. Die biologischen Funktionen von Glykanen sind extrem vielfältig, was auch durch deren komplexe Natur und das ubiquitäre Auftreten als post-translationale Modifikation reflektiert wird. Im Allgemeinen lassen sich diese Funktionen aber in zwei Bereichen einordnen [s. auch Punkt 1.2) O-Glykosylierung]:

- strukturelle und/oder modulatorische Modifikation des glykosylierten Moleküls (Gamberg & Tolvanen 1996)
- spezifische Bindung durch Lektine (Kohlenhydrat-bindende Proteine) und Vermittlung zellulärer Kommunikation (Crocker & Feizi 1996, Sharon 1993)

Die Glykobiologie befasst sich heute hauptsächlich mit der Analyse von Glykokonjugaten, zu denen z.B. Glykolipide, Glykoproteine und Proteoglykane zählen. In Glykokonjugaten kann der Anteil des Glykans an der Gesamtmasse hochvariabel sein, oft leistet dieser Anteil aber einen signifikanten Beitrag zum Molekulargewicht (Bsp. s. Abb. 1.1.1). Die Glykane werden hierbei in verschiedene Klassen unterteilt.

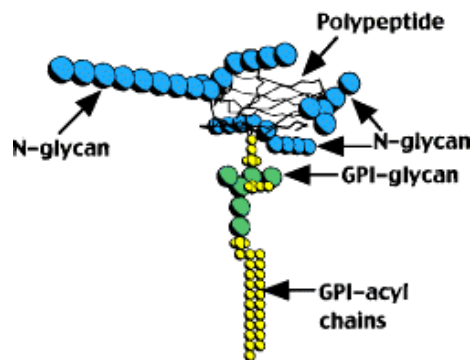


Abb. 1.1.1: Schematische Darstellung des Glykoproteins Thy1. Dieses Glykokonjugat besitzt drei N-Glykane und ein Glykophospholipid (GPI-Glykan), mit dem das Molekül in der Zellmembran verankert ist. Der Anteil des Polypeptids am Molekül ist hier relativ klein. Modifiziert übernommen von Rademacher et al. 1988.

Glykan-Klassen werden meist über den Bindungs-Typ (Core) zum Aglykan-Anteil des Glykokonjugats definiert. Hier unterscheidet man N-Glykane (gebunden über GlcNAc an das Stickstoffatom in Asn), O-Glykane (wichtigste Form hiervon ist der Mucin-Typ, gebunden über GalNAc an das Sauerstoffatom von Serin [Ser] oder Threonin [Thr]) und Glykophospholipide (Glykan-Brücke zwischen Phosphatidylinositol und Phosphoethanolamin in Amid-Bindung zum Carboxyterminus eines Proteins zur Verankerung von Proteinen in Membranen) als wichtigste Subtypen (Furukawa & Kobata 1992, Ferguson 1992).

1.2) O-Glykosylierung

Die Glykosylierung von Ser/Thr in Polypeptiden ist eine post-translationale Modifikation die in sekretorischen Zell-Organellen aller Eukaryoten stattfindet. Die Bezeichnung „O-Glykosylierung“ bezieht sich dabei meistens, wie auch in der vorliegenden Arbeit, auf die Mucin-Typ-Glykosylierung die mit der Addition von N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) in α -Bindung an die Hydroxygruppe von Ser/Thr initiiert wird (Van den Steen et al. 1998). Darüber hinaus existieren noch andere Formen der Glykosylierung, die eine Modifizierung von Ser/Thr beinhalten, wie z.B. die intrazelluläre Glykosylierung mit GlcNAc als Kontrapart zur Phosphorylierung (Hart 1997) oder die O-Fucosylierung (Wang et al. 1998) und O-Mannosylierung (Fayet 1988).

Die Synthese von O-Glykanen wird durch die Aktivität von Polypeptidyl-GalNAc-Transferasen (ppGalNAcT) initiiert, wobei GalNAc vom Donor, UDP-GalNAc, auf das Sauerstoffatom von Ser/Thr transferiert wird. Eine ppGalNAcT-Aktivität und damit die O-Glykosylierung sind in Vertebraten ubiquitär verbreitet. Eine Konsensussequenz, wie sie für die N-Glykosylierung mit N-X-S/T existiert, gibt es für die Initiierung der

O-Glykosylierung jedoch nicht. Durch vergleichende Studien und die Etablierung einer entsprechenden Datenbank (O-Glycbase) konnten aber Algorithmen und Software (NetOGlyc) für die Vorhersage O-glykosylierter AS auf Basis der AS-Sequenz erstellt werden (Hansen et al. 1996). Sekundärstruktur-Elemente spielen bei der Substratspezifität offensichtlich ebenfalls eine Rolle (s. auch „Vorhersage der O-Glykosylierung/Computeranalyse“ unter Punkt 1.3). Das ubiquitäre Auftreten der O-Glykosylierung wird durch mindestens 15 bekannte ppGalNAcT's initiiert, welche z.T. breite aber variierende Expressionsmuster aufweisen und zudem überlappende Substrat-Spezifitäten besitzen (Hanisch & Müller 2005). Die hohe Zahl verschiedener ppGalNAcT's spiegelt wahrscheinlich die individuellen Rollen bei der Zell- und Gewebespezifischen Glykosylierung wieder. Ferner sind ppGalNAcT's im cis-, im medialen und im trans-Golgi-Apparat lokalisiert. Die Verteilung der Enzyme im sekretorischen Apparat hat einen maßgeblichen Anteil an der Etablierung verschiedener Glykan-Strukturen (de Graffenried & Bertozzi 2004).

O-Glykane werden, basierend auf verschiedenen Monosaccharid-Bindungen zum Core-GalNAc, in mehrere Hauptklassen (Core 1 – 8), unterteilt (Hennet et al 1998). Die quantitativ häufigsten Glykane enthalten dabei die Core 1-Struktur, die durch die β 1-3 Bindung von Gal an GalNAc gebildet wird. Die Bindung wird, bei Core 1 durch verschiedene *core1*- β 1,3-Galaktosyltransferasen katalysiert (Holgersson & Lofling 2006). Durch die Aktivität anderer Glykosyltransferasen entstehen Grundstrukturen der jeweiligen Glykane mit Core 2 – 8 (Bsp. s. Abb. 1.2.1). Die Bildung der Core 2-Struktur erfolgt z.B. durch die zusätzliche Addition von GlcNAc in β 1-6 Bindung an die Core 1-Struktur, katalysiert durch die Aktivität einer *core2*- β 1,6-N-Acetylglucosaminyltransferase. Die Core 1- und Core 2-Strukturen sind die quantitativ am häufigsten vertretenen Strukturen und werden ubiquitär exprimiert (Halbeck et al. 1985, Brockhausen 1999).

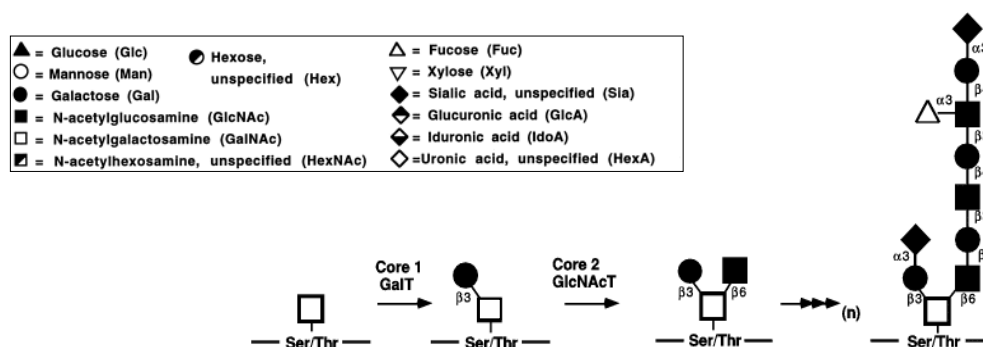


Abb. 1.2.1: Bildung von *Core 1*- und *Core 2*-Strukturen durch die Aktivität von Glykosyltransferasen. Durch die Addition von verschiedenen Kohlenhydrat-Bausteinen an GalNAc entstehen unterschiedliche Core-Strukturen, die durch Addition von Lactosamin-Einheiten weiter elongiert werden. Zuordnung der Kohlenhydrat-Bausteine s. Legende. Modifiziert übernommen aus „Essentials of Glycobiology“

Die Synthese von Core 3 erfolgt durch die β 1-3 Bindung an Core-GalNAc (katalysiert durch *core3*- β 1,3 N-Acetylglucosaminyltransferase) und ist somit ein „Konkurrenzprodukt“ zu Core 1-haltigen Strukturen, weil die Enzyme die Core 1 bzw. Core 3 bilden das selbe Substrat, das α -1-gebundene GalNAc benötigen. Core 4-Strukturen entstehen durch die β 1-6 Bindung von GlcNAc an Core 3 (katalysiert durch *core4*- β 1,6 N-Acetylglucosaminyltransferase; s. Abb 1.2.2). Core 2 und Core 4 bilden somit auch die Grundstruktur für biantennäre Glykane. Durch die Aktivität weiterer Transferasen können die Glykane weiter elongiert werden. Core 3- und Core 4-Glykane kommen hauptsächlich in Bronchien und im Gastrointestinaltrakt vor (Podolski 1985, Hanski et al 1992).

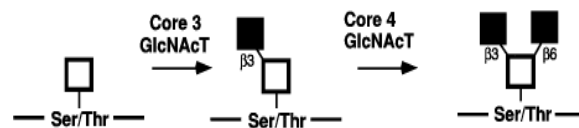


Abb. 1.2.2: Bildung von *Core 3*- und *Core 4*-Strukturen durch die Aktivität von Glykosyltransferasen. Durch die Addition von verschiedenen Kohlenhydrat-Bausteinen an GalNAc entstehen unterschiedliche Core-Strukturen. Zuordnung der Kohlenhydrat-Bausteine s. Legende in Abb. 1.2.1. Modifiziert übernommen aus „Essentials of Glycobiology“

Weiterhin existieren noch die weniger häufigen Core-Klassen 5-8. Die Core 5-Struktur (GalNAc α 1 \rightarrow 3GalNAc) tritt u.a. in Ovarial- und Kolonkarzinomen auf (Hounsell et al. 1985), Core 6 (GlcNAc α 1 \rightarrow 6GalNAc) in κ -Casein (Halbeck et al 1985), Core 7 (GalNAc α 1 \rightarrow 6GalNAc) in Rindersubmaxillarismucin (Chai et al. 1992) und Core 8 (Gal α 1 \rightarrow 3GalNAc) in humanem Bronchialschleim (van Halbeek et al. 1994).

Nach der Bildung der jeweiligen Core-Struktur erfolgt die Ausbildung einer *Backbone*-Region, durch die Addition mehrerer Laktosamin-Einheiten (Gal β 1 \rightarrow 3GlcNAc bzw. Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc). Diese können über β 1 \rightarrow 6-Bindungen weiter verzweigt werden. An diesen Bereich schließt sich die periphere Strukturdomäne an, die durch ihre hochgradige Variabilität gekennzeichnet ist (s. Abb. 1.2.3). hier werden z.B. die Antigen-Strukturen des AB0- und Lewis-Blutgruppen-Systems gebildet (Vierbuchen et al. 1991).

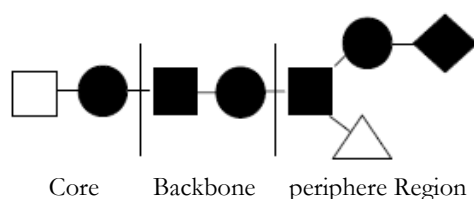


Abb. 1.2.3: Elemente der O-Glykosylierung des Mucin-Typs. Die Glykane werden durch die Core-Region, die *Backbone*-Region, mit unterschiedlichen Anzahlen an Laktosamin-Einheiten, und die periphere Region gebildet. Zuordnung der Kohlenhydrat-Bausteine s. Legende in Abb. 1.2.1. Modifiziert übernommen von Bölinger 2005.

Die Synthese von Glykanen wird letztlich durch die Addition von Fucose oder Sialinsäuren in α -Bindung terminiert. Dies kann in jedem Stadium der Synthese stattfinden, eine sehr frühe Addition von Sialinsäuren an GalNAc oder Core 1 ist aber häufig Tumor-assoziiert (Julien et al. 2006).

Im menschlichen Genom wurden insgesamt 18 Mucin-Gene identifiziert (Rose & Voynow 2006). Die Mucine selber werden nach ihren Genen *MUC1*, *MUC2*, usw. benannt. Mucine sind Proteine die einen hochgradigen Besatz an O-Glykosylierung aufweisen, und von allen Arten von Epithelzellen, wie z.B. im Gastrointestinaltrakt oder Bronchialtrakt, exprimiert werden. Die Glykosylierung von Mucinen findet innerhalb von Tandem-Repeats statt, die reich an den AS Ser, Thr und Pro sind. Die Mucine können dabei Membran-verankert sein oder in einer sekretierten Form (durch alternatives *Splicing* oder proteolytische Prozessierung) auftreten. Durch den dichten O-glykosidischen Besatz mit hydrophilen, negativ geladenen Glykanen bilden die Mucine eine viskose, elastische Schicht (die Mukosa) über den Epithelzellen aus, wodurch ein physikalischer und chemischer Schutz gewährleistet ist. Dies ist i.A. eine der Hauptfunktionen der O-Glykosylierung, nämlich die Etablierung einer schützenden Barriere mit einer „schmierenden“ Wirkung, wie sie z.B. im Verdauungstrakt erforderlich ist (Amerongen et al. 1995).

Eine weitere wichtige Rolle der O-Glykosylierung ist die Vermittlung zellulärer Kommunikation und die Funktion als Bindungspartner in Prozessen der Zell-Zell-Erkennung. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist die Funktion von O-Glykanen im hämatopoetischen System von Vertebraten, wo sie während der Entwicklung und im adulten Tier essentiell ist. So wird z.B. der *Homing*-Prozess von Lymphozyten oder die Gewebe-Invasion von Leukozyten während entzündlichen Prozessen u.a. über O-Glykane vermittelt, die als *Selektin*-Liganden fungieren (Maly et al. 1996, McEver & Cummings 1997).

1.3) Methodischer Hintergrund

Der Ausdruck *Proteom* bezieht sich auf die Gesamtheit exprimierter Proteine in einer gegebenen Probe. Diese kann z.B. einem bestimmten Gewebe- oder Zelltyp, Subzellulären Fraktionen oder Körperflüssigkeiten entstammen. Die Zusammensetzung eines Proteoms fluktuiert dabei hochgradig, sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Hinsicht, mit dem Status der Zelle oder des Gewebes. Die Proteom-Analyse kann daher auch zu

diagnostischen Zwecken herangezogen werden, weil der Status eines Proteoms krankheitskorrelierte Variationen aufweist.

Vielfach wird hierbei, aufgrund der Natur verschiedener Arten post-translationaler Modifikationen oder aber der (z.B. subzellulären oder Gewebe) Herkunft, zwischen Sub-Proteomen unterschieden, wie z.B. das Phospho-Proteom, das Glyko-Proteom, das mitochondriale oder das Serum Proteom usw. Die Definition eines Proteoms beinhaltet die Identifizierung der enthaltenen Proteine, sowie deren Quantifizierung in Abhängigkeit vom Zell- oder Gewebestatus. Die Proteom-Analyse hat sich in den vergangenen Jahren auf ein technisch hohes Niveau entwickelt und viele Schritte konnten weitgehend automatisiert werden. Die Anwendung subtraktiver Verfahren auf die aktuellen Muster von Proteinen kann solche Species identifizieren, deren Expression unter variierenden Stoffwechselbedingungen bzw. unterschiedlicher Gewebedifferenzierung schwankt.

Der „traditionelle“ Ansatz zur Proteom-Analyse basiert auf der Trennung von Proteinen in 2D-Gelen mit isoelektrischer Fokussierung (IEF) und anschließender SDS-PAGE. Die 2D-IEF/PAGE ist bis heute die einzige Technik zur Trennung von Proteinen mit der Komponenten in der Größenordnung von 10000 getrennt werden können. Nach Isolierung der Proteinprobe, 2D-IEF/PAGE und Färbung werden Proteinbanden aus dem Gel herausgestanzt und die Proteine durch die *Peptide Mass Fingerprint*-Technik identifiziert. In den letzten Jahren wurden zunehmend Proteomik-Studien publiziert, die multi-dimensionale chromatographische Fraktionierungen mit anschließender MS-Analyse verwendeten. Die komplementäre Anwendung „traditioneller“ und neuer Proteomik-Analysetechniken hat diesem Feld erheblich präzisere Mittel für die Diagnose von Krankheiten, das Verständnis pathologischer Prozesse und Grundlagenforschung eröffnet. In der Proteom-Analytik weisen Glykoproteine, und insbesondere solche mit einem dichten O-glykosidischen Besatz aber mehrere methodische Probleme auf, welche die Möglichkeiten für eine Analyse dieser Species stark einschränken. Diese werden nachfolgend besprochen:

Färberische Darstellung, 2D-IEF/PAGE:

Viele Glykoproteine können mit konventionellen Färbemethoden in der 1D- oder 2D-Gelelektrophorese häufig nicht mit ausreichender Empfindlichkeit dargestellt werden. Zwar wurden verschiedene Detektionsverfahren entwickelt, mit denen Glykoproteine selektiv gefärbt werden konnten (Fairbanks et al. 1979, Gander 1984, Gerard 1990), diese sind i.A. aber nicht zweckmäßig, weil sie 1-3 µg pro Proteinbande zur Darstellung

benötigen. Die Heterogenität von Glykoproteinen stellt ebenfalls ein inhärentes Problem für die Detektion dar, weil diese dazu führt, daß multiple Formen eines Proteins in mehreren Banden bzw. *Spots* lokalisiert sind. Durch die Glykosylierung werden zum einen signifikante Varianzen in der Proteinmasse eingeführt und ferner, vor allem durch variable Substitution mit terminalen Sialinsäuren, eine starke Verschiebung des isoelektrischen Verhaltens der einzelnen Glykoformen (Bsp. s. Abb. 1.3.1).

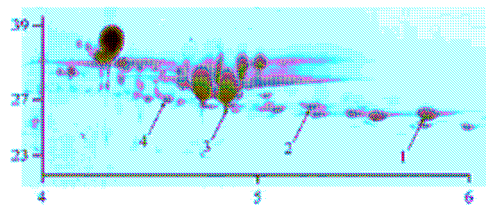


Abb. 1.3.1: Ausschnitt aus einem 2D-IEF/PAGE-Gel mit verschiedenen Glykoformen von κ -Casein (Pfeile). Zuordnung: 1-unglykosyliert, 2-monoglykosyliert, 3-diglykosyliert, 4-triglykosyliert. Jedes Glykan enthält hier zwei Sialinsäuren. Abszisse: pH-Gradient, Ordinate: Molekulargewicht. Übernommen von Holland et al. 2005.

Die Glykosylierung wirkt sich zudem bei allen folgenden Schritten negativ aus. Die in-Gel Proteolyse wird durch dichten Glykan-Besatz behindert und die anschließende Elution aus der Polyacrylamid-Matrix erfolgt nicht oder nur sehr ineffizient (Packer et al. 1999).

Enzymatische Prozessierung:

Der dichte Glykan-Besatz (s. Abb. 1.3.2) schränkt, durch sterische Hinderung von Proteasen, proteolytische Spaltungen des Proteins in sequenzierbare Peptide stark ein. Aus dem gleichen Grund können N-Glykane, beim Verdau mit PNGaseF, bei hochgradig glykosylierten Proteinen z.T. nicht quantitativ entfernt werden.

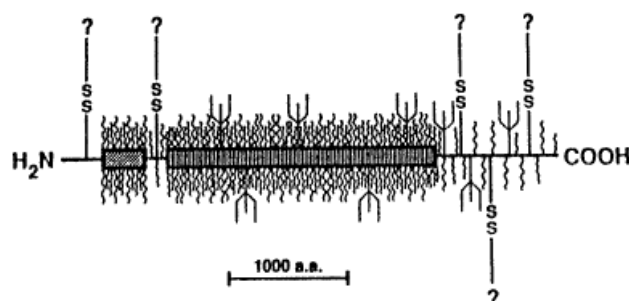


Abb. 1.3.2: Humanes MUC2. In den Tandem-*Repeats* sind eine große Anzahl von O-Glykanen (geschwungene Linien) sowie einige N-Glykane lokalisiert (Dreizacke). Diese bieten einen Schutz vor enzymatischer Proteolyse durch sterische Hinderung von Proteasen. Disulfidbrücken (?) werden inter- und intramolekular ausgebildet. Übernommen von Toribara et al. (1991).

Massenspektrometrische Identifizierung:

Die Glykane auf Glykopeptiden schränken, aufgrund ihrer Heterogenität und Polarität, die massenspektrometrische Identifizierung über *Peptide-Mapping* bzw. Sequenzierung stark ein. Die erhöhte Polarität wirkt sich nämlich ungünstig in massenspektrometrischen Techniken aus, die auf Analyt-Desorption (MALDI-MS) beruhen. Hier sind sowohl die Desorption aus dem Kristall als auch die Ionisierung des Moleküls beeinträchtigt (Roepstorff 1997). Durch die Heterogenität werden viele unterschiedliche Ionen erzeugt, die sich nicht eindeutig einem Peptid zuordnen lassen. Ferner wird die Sequenzierung in *Post-Source-Decay* MALDI-MS bzw. in *Collision-Induced-Dissociation* ESI-MS Experimenten durch den Verlust der Glykan-Substituenten kompliziert.

Vorhersage der O-Glykosylierung/Computeranalyse:

Die O-Glykosylierung entzieht sich einer eindeutigen Computeranalyse, weil es für die Initiierung keine Konsensussequenz gibt, wie im Fall der N-Glykosylierung, wo man mit der Sequenz „N-X-S/T“ einen Anhaltspunkt für eine mögliche Modifikation zuordnen kann. Zur *in-silico*-Analyse der O-Glykosylierung stehen schon seit einiger Zeit Algorithmen und Software (z.B. NetOGlyc) zu Verfügung die Aussagen über die Wahrscheinlichkeit einer Glykosylierung von Ser oder Thr, in Abhängigkeit von umgebenden AS-Sequenzen trifft. So wurde z.B. eine Häufung von Prolin (Pro) bzw. geladenen AS in -1 und +3 Position, relativ zur glykosylierten AS gefunden. Sekundärstrukturen scheinen ebenfalls eine Rolle zu spielen, da Pro ein α -Helix-Brecher ist und die Bildung von β -Faltblättern und v.a. β -Turns begünstigt. So wird die O-Glykosylierung am häufigsten an vorhergesagten β -Turns vorgefunden (Gooley & Williams 1994, Wilson et al. 1991). Die Vorhersagen über die O-Glykosylierung erreichen aber immer noch keine absolute Genauigkeit, so daß eine experimentelle Überprüfung unumgänglich bleibt. Der Grund hierfür liegt, wie bereits erwähnt, in der Existenz einer Vielzahl von ppGalNAcT's, welche z.T. eine breite Expression und überlappende Substrat-Spezifität zeigen.

1.4) Hintergrund der evaluierten Methoden

Die in dieser Arbeit evaluierten analytische Verfahren sollten unterschiedliche Aspekte methodischer Einschränkungen in der Analyse O-glykosylierter Proteine verbessern. So wurden z.B. Methoden evaluiert, welche die Heterogenität der O-Glykosylierung auf eine

einheitliche Markierung reduzieren und so Verbesserungen in die 2D-IEF, in die Färbung, in die enzymatische Handhabbarkeit und die massenspektrometrische Identifizierung einführen sollten. Hierfür wurden Ansätze getestet, in denen Glykane durch β -Eliminierung entfernt und über nukleophile Addition durch einen Marker ersetzt wurden. Eine andere Technik sollte die Komplexität durch partielle Deglykosylierung auf eine einheitliche Struktur reduzieren. Solche Ansätze haben das Potential alle oben genannten methodischen Einschränkungen zu verbessern. Es wurden Ansätze verfolgt, die O-glykosylierte Proteine oder Peptide selektiv anreichern sollten. Dies sollte die Komplexität der Probe signifikant herabsetzen und die Störung der Analyse durch andere abundante Protein-Species verringern. Eine Methode wurde evaluiert, die Glykoproteine einer selektiven und sensitiven Färbung zugänglich machen sollte. Ferner sollte eine in-vivo-Methode mit der O-glykosylierte Proteine metabolisch markiert werden auf die Ebene der Proteomanalyse gebracht werden.

1.5) Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die oben dargestellten strukturellen Aspekte O-glykosylierter Proteine in Säugern und die damit in Zusammenhang stehenden technischen Probleme in der Identifizierung von Vertretern dieses Subproteoms durch klassische gel-basierende Proteomik machen die Entwicklung innovativer Methoden für die selektive Erfassung von Mucin-Typ O-Glykoproteinen und ihre Feincharakterisierung zu einer Herausforderung.

Die vorliegende Arbeit sollte methodische Beiträge zur O-Glykoproteomik leisten, indem sowohl publizierte als auch neu entwickelte *in vitro* und *in vivo*-Ansätze auf ihre Tauglichkeit überprüft werden. Zu diesen Ansätzen gehören solche, bei denen die Selektivität der Perjodat-Oxidation für Kohlenhydrate genutzt wird (Hydrazid-Kopplung), solche, bei denen der allen Mucin-Typ-Glykanen gemeinsame Core-Zucker, das GalNAc, als spezifischer Marker in einer Lektin-Affinitäts-Chromatographie genutzt wird, und andere, die auf der Elimination der Glykane und ihrer Substitution durch einfache und einheitliche MS-Tags basieren. Hinzu kommen ältere Verfahren, die die Komplexbildung von Glykanen mit Borat nutzen, und solche, die auf hydrophilen Interaktionen von Glykanen mit Cellulose in Gegenwart divalenter Metallionen beruhen. Ferner sollte die Proteomik-Tauglichkeit einer von der Arbeitsgruppe C. Bertozzi eingeführte *in vivo*-Markierung von Glykoproteinen evaluiert werden. Dabei geht es um die Frage, ob die Avidität des Flag-Tag-Systems für Proteomik-Anwendungen ausreicht, und ob die Aufnahme- und Einbauraten in verschiedene Zellen differentielle Ansätze ermöglichen.

2) Material und Methoden

In-vitro Strategien zur Anreicherung des Mucin-Typ O-Glykoproteoms

2.1) β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit Biotin

2.1.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen

Bei der Methode der „ *β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit Biotin*“ werden O-Glykane von Glykoproteinen durch Behandlung mit Ammoniak als Base und zugleich Nukleophil eliminiert und an die ungesättigten Ser-/Thr- Derivate addiert. An die primäre Aminfunktion wird im folgenden Schritt Biotinamidocaprinsäure (Donor: Biotinamidocaprinsäure-N-hydroxysuccinimidester, Sigma, Masseninkrement: 338.5 Da) addiert. Die Markierung mit Biotin sollte, nach Proteolyse und chromatographischer Reinigung der Peptide, die Identifizierung glykosylierter Aminosäuren mit massenspektrometrischen Methoden ermöglichen (Bayer & Wilchek, 1980).

Hier wurden zwei Varianten eines Protokolls hinsichtlich der Eignung zur Eliminierung von O-Glykanen, und anschließender Substitution mit Biotin und MS-Analyse getestet.

2.1.2) Durchführung „ β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit NHS-Biotin“

2.1.2.1) Trypsinbehandlung

In einer Variante (Protokoll 1, s. Tabelle 2.1.1) dieser Methode wurde der proteolytische Verdau der Probe mit Trypsin als erster Schritt durchgeführt.

- Eintrocknen der Probe in der Vakuumzentrifuge
- Aufnahme der Probe in 20 μ l 100 mM NH_4HCO_3 -Puffer, pH 7.8
- Zugabe von 1 μ g Trypsin (Promega) und Inkubation über Nacht (o/n)
- Abstoppen der Enzymreaktion bei 90°C, 5 Min.

2.1.2.2) N-Acetylierung:

Um reaktive ϵ -Aminogruppen von Lysinresten vor einer Modifizierung mit NHS-Biotin zu schützen wurden diese wie folgt acetyliert:

- Lösungsmittel bis zur Trockne in Vakuumzentrifuge abziehen
- Zugabe des Reaktionsgemisches: 50 μ l Methanol (MeOH)/ 5 μ l Pyridin/ 5 μ l Essigsäureanhydrid
- Inkubation 15 Min., RT
- Abziehen des Reaktionsgemisches in Vakuumzentrifuge

2.1.2.3) β -Eliminierung

Die β -Eliminierung der O-Glykane und ihre Substitution durch eine primäre Aminogruppe wurde wie folgt durchgeführt:

- Zugabe 100 μ l 25% Ammoniak (NH_3) –Lösung
- Inkubation für 24 Std. bei 50°C
- Abziehen der Ammoniak (NH_3) –Lösung in Vakuumzentrifuge

2.1.2.4) Biotinylierung

In diesem Schritt wird an die primäre Aminogruppe der ursprünglich glykosylierten Hydroxyaminosäure mit Biotin eine spezifische Markierung addiert, die eine effektive chromatographische Aufreinigung des markierten Analyts und anschließende massenspektrometrische Identifizierung der glykosylierten Aminosäuren erlaubt.

- Zugabe 20 μ l 100 mM NHS-Biotin in DMSO
- Inkubation für 24 Std. bei 50°C
- DMSO in Vakuumzentrifuge abziehen

2.1.2.5) Trypsinbehandlung

In einer Variante (Protokoll 2., s. Tabelle 2.1.1) folgte die proteolytische Fragmentierung der Probe als letzter Schritt vor der chromatographischen Reinigung auf Streptavidin-Beads

- Durchführung s. 2.1.2.1

2.1.2.6) Affinitätschromatographie

Die chromatographische Trennung biotinylierter Peptide von nicht-biotinylierten wurde auf Streptavidin-Dynabeads (DynaL-Biotech) oder Streptavidin-Sepharose (Amersham Biosciences) lt. Herstellerangaben durchgeführt. Bei Bedarf wurden die Proben anschließend auf C₁₈-ZipTips (Millipore) lt. Herstellerangaben gereinigt.

2.1.2.7) MALDI-Analyse der Proben

Zur Massenspektrometrischen Analyse lagen die Proben in verschiedenen Lösungsmittelgemischen vor:

- 50% AcN/TFA (0.1%ig) nach Reinigung auf Streptavidin Dynabeads (DynaL-Biotech)
- 80% AcN/TFA (0.1%ig) nach Reinigung auf C₁₈-ZipTips (Millipore)

Je 0.7 µl der Probe im jeweiligen Lösungsmittelgemisch wurden mit 1.4 µl einer DHB- (2,5-Dihydroxybenzoic acid; deutsch: Gentisinsäure) oder HCCA- (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid; deutsch: α -Cyano-4-Hydroxymzimtsäure) Matrixlösung auf einem MALDI-Target (MTP 384 massive target gold plated, Bruker Daltonics) gemischt (s. 2.10.2)

1.)	2.)
/	Trypsin o/n
ϵ -NH ₂ -Acetylierung von Lys-Resten	ϵ -NH ₂ -Acetylierung von Lys-Resten
β -Eliminierung der O-Glykane mit NH ₃	β -Eliminierung der O-Glykane mit NH ₃
Biotinylierung	Biotinylierung
Trypsin-Verdau o/n	*/*
Affinitäts-Chromatographie auf Streptavidin	Affinitäts-Chromatographie auf Streptavidin
MALDI-MS-Analyse	MALDI-MS-Analyse

Tabelle 2.1.1.: Übersicht der experimentellen Schritte zur Methodenentwicklung „ β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit Biotinamidocaprinsäure“.

2.2) β -Eliminierung von O-Glykanen mit anschließender Michael Addition von Nucleophilen – BEMAD

2.2.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen

Mit der *BEMAD*-Technik sollte die Identifizierung von O-glykosylierten Aminosäuren in Proteinen oder Peptiden ermöglicht werden. Die hier evaluierte Methode ist an eine bereits publizierte (Wells et al., 2002) angelehnt in der die Analyse von glykosylierten nukleocytoplasmatischen Proteinen beschrieben wird. Die Glykosylierung mit einem C1- β -gebundenen GlcNAc (N-Acetylglukosamin) ist eine häufige Modifikation von Ser/Thr in nukleocytoplasmatischen Proteinen. Hier sollte dieses Verfahren für die Anwendung an extrazellulären Proteinen mit Mucin-Typ Glykosylierung adaptiert werden. In diesem Verfahren erfolgt die basenkatalysierte β -Eliminierung der Glykane von Glykopeptiden und die Addition (über den Michael-Mechanismus, s. Mc Murry – Organic Chemistry 4thEd. S. 914) von DTT (Dithiothreitol) als Affinitätsmarkierung in einem Reaktionsschritt. Die so markierten Peptide werden zunächst per Umkehrphasen- (engl.: *Reversed Phase*-, RP-) Chromatographie gereinigt. Danach erfolgt die spezifische Trennung DTT-markierter Peptide von unmarkierten über Affinitätschromatographie auf Thiolsepharose und die massenspektrometrische Analyse per MALDI-MS.

Bei extrazellulären Proteinen wird die Mucin-Typ O-Glykosylierung mit einem C1- α -gebundenen N-Acetylgalaktosamin- (GalNAc-) Zucker initiiert und im Normalfall, im Gegensatz zur nukleocytosolischen O-Glykosylierung, durch die Aktivität diverser Glykosyltransferasen mit mehreren, verschiedenen Zuckerbausteinen verlängert. Weil die C1- α -Bindung von GalNAc an Ser/Thr chemisch stabiler ist als die C1- β -Bindung des GlcNAc an Ser/Thr, mußten Bedingungen gefunden werden, die eine Eliminierung des GalNAc ermöglichen.

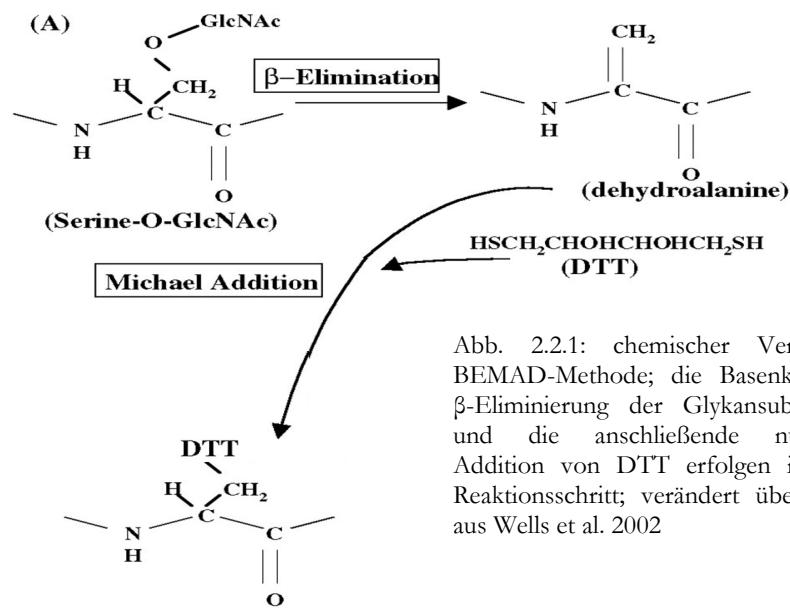


Abb. 2.2.1: chemischer Verlauf der BEMAD-Methode; die Basenkatalysierte β -Eliminierung der Glykansubstituenten und die anschließende nukleophile Addition von DTT erfolgen im selben Reaktionsschritt; verändert übernommen aus Wells et al. 2002

2.2.2) Durchführung BEMAD

2.2.2.1) Peptid Sequenzen

Zur Evaluierung der Methode wurden synthetische Glykopeptide mit folgender Sequenz eingesetzt:

H11 AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA*

H12 AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA*

H13 AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA*

* = GalNAc

Monoisotopische Masse der Glykopeptide: 2161.2 Da)

Monoisotopische Masse unglykosylierter Peptide: 1958.0 Da

Monoisotopische Masse DTT-markierter Peptide: 2094.2 Da

2.2.2.2) β -Eliminierung mit anschließender Michael-Addition

In diesem Reaktionsschritt wurden die Glykane der Glykopeptide eliminiert und die DTT-Markierung eingefügt:

- Peptide in Vakuumzentrifuge trocknen
- Aufnehmen in 1% Triethylamin, 0.1% NaOH, 20% EtOH, 10 mM DTT
- pH-Wert mit Triethylamin auf 12-12.5 einstellen
- Inkubation bei 50 °C für verschiedene Zeiträume
- Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von TFA (Trifluoressigsäure) auf Endkonz. von 1%
- Reinigung auf C₁₈-ZipTips (Millipore) lt. Herstellerangaben
- Trocknen der Probe in Vakuumzentrifuge

2.2.2.2) Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie wurde auf aktivierter Thiolsepharose (Amersham Biosciences) im *Batch*-Verfahren durchgeführt. Die Bindungs-, Wasch- und Elutionsschritte erfolgten lt. Angaben des Herstellers. Die eluierten Peptide wurden per C₁₈-ZipTips (Millipore) lt. Herstellerangaben gereinigt.

2.2.2.3) MALDI-Analyse der Proben

Nach Affinitätschromatographie auf Thiolsepharose (Amersham Biosciences) und Reinigung über C₁₈-ZipTips (Millipore) lagen die Proben in 80% AcN/ TFA-Lsg. (0.1%ig) vor und wurden per MALDI-MS analysiert (wie unter 2.10.2 beschrieben).

2.3) Identifizierung von selektiv oxidierten O-Glykoproteinen durch kovalente Chromatographie auf Hydrazid-Harzen und Massenspektrometrie

2.3.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen

Die hier evaluierte Technik sollte prinzipiell für die Anreicherung des Glykoproteoms aus einer gegebenen biologischen Probe geeignet sein. Sie ist an eine von Zhang et al. (2003) entwickelte Methode angelehnt, mit der die selektive Isolierung, Identifikation und Quantifizierung von N-Glykan tragenden Peptiden durchgeführt wurde.

In der von Zhang et al. publizierten Methode erfolgt zunächst eine Oxidation von vicinalen hydroxylierten Kohlenstoffatomen der Glykane zu Aldehyden und anschließend eine

kovalente Bindung der Aldehyde an, auf einem Harz immobilisierten, Hydrazidgruppen. Die über die so gebildeten Hydrazone an das Harz gebundenen Glykoproteine werden tryptisch fragmentiert. Die tryptischen Fragmente werden am Peptid N-Terminus mit Succinatanhydrid von unterschiedlichem Isotopengewicht markiert. Hier schließt die Freisetzung der Peptide durch eine Behandlung mit PNGaseF an und die abschließende massenspektrometrische Analyse der Probe. Die relative Quantifizierung der Proben wird in differentiellen Ansätzen über die unterschiedlich Isotopen-markierten Succinatanhydridgruppen gewährleistet (s. Abb. 2.3.1)

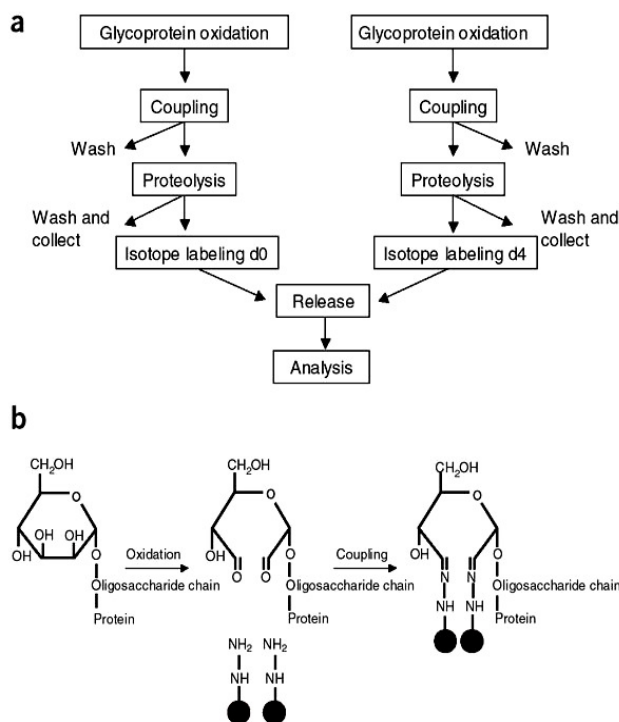


Abb.2.3.1:

Schematisches Diagramm der quantitativen Analyse von N-Glykopeptiden. (a) Strategie für quantitative Analyse. Proteine zweier Proben werden oxidiert und an das Hydrazidharz gekoppelt. Nach Proteolyse werden nicht-glykosylierte Peptide ausgewaschen und (optional) gesondert analysiert. Der N-Terminus der gebundenen Peptide wird mit isotopenmarkierten (un- bzw. tetradeuteriert) Succinatanhydrid versehen und die Proben gemischt. Die Freisetzung der Peptide erfolgt mit PNGaseF und anschließend die massenspektrometrische Analyse. (b) Oxidierung von Kohlenhydraten zu Aldehyden, gefolgt von kovalenter Kopplung an ein Hydrazidharz; übernommen von Zhang et al. 2003

In dieser Arbeit sollte eine Adaption der Methode für die Anwendung auf O-Glykoproteine bzw. O-Glykopeptide etabliert werden. Als Vorteile dieser Technik sollte sich eine sichere und einfache Anreicherung der O-glykosylierten Proteom-Subfraktion ergeben und wäre daher gut geeignet, um biologische Proben zu analysieren, welche einen hohen Anteil an O-Glykoproteinen aufweisen (wie z.B. Membranproteine, Körperflüssigkeiten, sezernierte Proteine). Desweiteren würde sie eine Lokalisierung der modifizierten AS ermöglichen.

Die zu etablierende Methode sollte folgende grundlegende Reaktionsschritte beinhalten:

- 1.) Oxidation der Kohlenhydrat-Hydroxygruppen zu Aldehyden und Kopplung der Glykoproteine an Hydrazidharz

- 2.) Proteolytische Fragmentierung der immobilisierten Proteine durch Trypsin
- 3.) Entfernen der N-Glykopeptide durch Behandlung mit PNGaseF
- 4.) Elution der O-Glykoproteine mit verschiedenen chemischen Methoden
- 5.) Analyse per MALDI-MS

Zwischen den experimentellen Schritten sollte intensiv gewaschen werden.

Die experimentellen Schritte 1.) – 4.) wurden in verschiedenen Reihenfolgen (s. jeweils Ergebnisse) angewendet (Bsp. s. Abb. 2.3.2) und diese Ansätze hinsichtlich ihrer Eignung für die Analyse O-glykosylierter Proteine evaluiert.

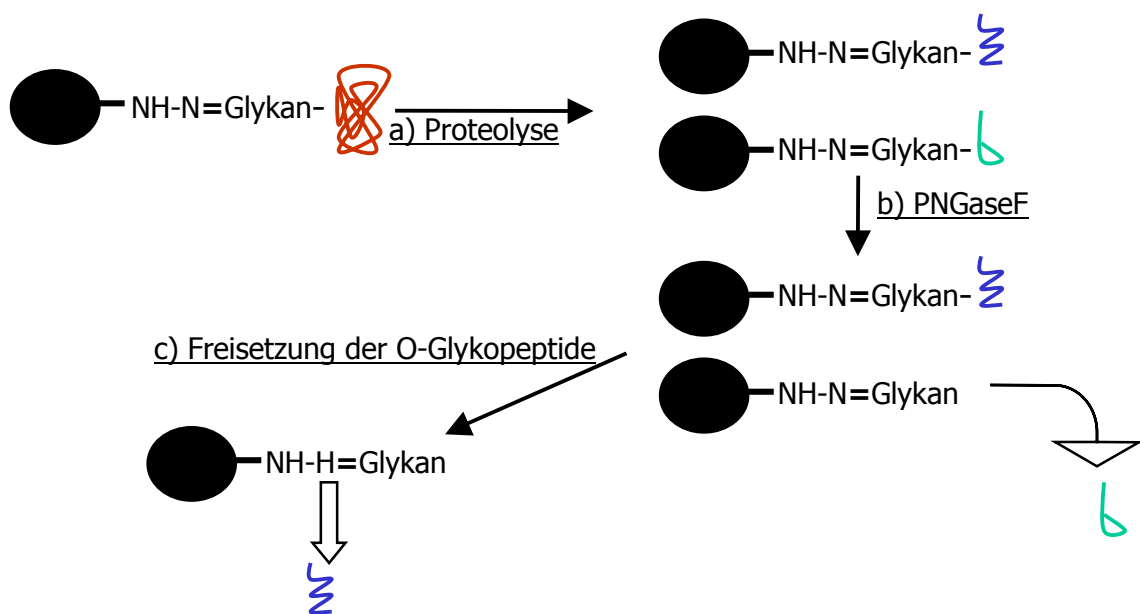


Abb. 2.3.2: Schema der grundlegenden experimentellen Schritte der Methode „Identifizierung von selektiv oxidierten O-Glykoproteinen durch kovalente Chromatographie auf Hydrazid-Harzen und Massenspektrometrie“. Oxidation der Kohlenhydrate und Immobilisierung sind in Abb. 2.3.1 b gezeigt. Im weiteren Verlauf erfolgt (a) die Proteolyse, (b) die Freisetzung N-glykosylierter Peptide (grün) durch PNGaseF und zuletzt (c) die Elution der O-Glykopeptide (blau) mit verschiedenen Elutionsmethoden.

2.3.2) Durchführung „Identifizierung von O-Glykoproteinen über kovalente Hydrazidchromatographie und Massenspektrometrie“

2.3.2.1) Oxidation des Kohlenhydratanteils der Glykoproteine

In diesem Schritt wurden die vicinalen hydroxylierten Kohlenstoffatome der Glykane zu Aldehydgruppen oxidiert.

- Eine entsalzte Proteinprobe wurde auf 100 mM NaAc (Natriumacetat), 100 mM NaCl (Natriumchlorid), 15 mM NaIO₄ (Natrium-meta-Perjodat) pH 5.5 eingestellt.

- Inkubation bei RT, 1 Std.
- Die Inaktivierung des Perjodats erfolgte durch Entsalzen der Probe auf einer NAP5-Säule (Amersham Biosciences) lt. Herstellerangaben oder durch Zugabe eines molaren Überschusses Glycerin (20 mM).

2.3.2.2) Kopplung der Glykoproteine an Hydrazidharz

Nach Oxidation und Perjodat-Inaktivierung wurde die Probe in Kopplungspuffer aufgenommen (100 mM NaAc, 100 mM NaCl, pH 5.5), und dem im gleichen Puffer äquilibrierten Hydrazidharz zugesetzt. Die Kopplung an das Hydrazidharz (entweder BioRad Affi-Gel Hz Hydrazid Gel; mit Hydrazin-Gruppen modifiziertes Profinity™ Epoxide Resin von BioRad [Herstellung s. Punkt 2.3.2.7] oder p-Toluenesulfonyl hydrazide, polymer bound, von ALDRICH) durch Ausbildung einer Hydrazonbindung (Schiff'sche Base) erfolgte über Nacht auf einem Roller bei RT im Dunkeln.

2.3.2.3) Waschen des Hydrazidharzes vor Proteolyse

Um nicht gebundene/unglykosylierte Proteine zu entfernen, wurde das Harz nach der Kopplung 6x mit 1 mL 8 M Harnstoff / 0.4 M NH_4HCO_3 (Ammoniumhydrogencarbonat), pH 8.0 gewaschen. Der Harnstoff wurde anschließend mit 3x 1 mL 100 mM NH_4HCO_3 ausgewaschen.

2.3.2.4) Proteolytischer Verdau der immobilisierten Proteine

Die enzymatische Proteolyse wurde mit Trypsin in 100 mM NH_4HCO_3 vollzogen. Für 100 µg Probe wurde dabei 1 µg Trypsin (Promega, 1 µg/µl gelöst in 50 mM Essigsäure, spezifische Aktivität 14.500 U/mg) eingesetzt. Die Probe wurde bei 37°C über Nacht inkubiert, um eine quantitative Fragmentierung zu gewährleisten. Die Proteolyse wurde entweder mit gelösten Proteinen durchgeführt oder mit den am Harz immobilisierten Proteinen.

Verdau in Lösung:

- Probe in 100 mM NH_4HCO_3 -Lösung aufnehmen bzw. Probenlösung auf 100 mM NH_4HCO_3 -Konzentration bringen
- Zugabe Trypsin 1 µg /100 µg Protein und Inkubation o/n, 37°C
- Abstoppen der Reaktion bei 90°C, 5 Min.

Verdau auf Hydrazidharz:

- Probe lag nach Auswaschen des Harnstoffs in 100 mM NH_4HCO_3 vor.
- Zugabe von Trypsin (1 $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ Protein) und Inkubation o/n, 37°C im Thermomixer bei 800 rpm
- Abstoppen der Reaktion durch Auswaschen des Trypsins

2.3.2.5) Waschen des Hydrazidharzes nach Proteolyse / PNGaseF-Behandlung

Um nicht gebundene/unglykosylierte Peptide zu entfernen, wurde das Harz wie folgt gewaschen:

- 3x mit 1ml 1.5 M NaCl
- 3x mit 1ml 80% AcN/ TFA-Lsg. (0.1%ig)
- 3x mit 1ml MeOH (Methanol)
- 6x mit 1ml 100 mM NH_4HCO_3

2.3.2.6) Entfernen N-glykosylierter Peptide mit PNGaseF

Die enzymatische Abspaltung von N-Glykanen mit PNGaseF wurde in 100 mM NH_4HCO_3 vollzogen. Für 100 μg der Ausgangsprobe wurde hier 1 μl PNGaseF eingesetzt (New England Biolabs, 500.000 U/ml, spezifische Aktivität 1.800.000 U/mg). Die Freisetzung der N-Glykane erfolgte in einem Ansatz in Lösung in anderen Ansätzen auf dem Harz mit den immobilisierten Proteinen.

Verdau in Lösung:

- Probe in 100 mM NH_4HCO_3 -Lösung aufnehmen bzw. Probenlösung auf 100 mM NH_4HCO_3 -Konzentration bringen
- Zugabe von 1 μl PNGaseF / 100 μg Protein und Inkubation o/n, 37°C
- Abstoppen der Reaktion bei 90°C, 5 Min.

Verdau auf Hydrazidharz:

- Probe lag nach Auswaschen des Trypsins in 2-3 Bettvolumina 100 mM NH_4HCO_3 vor.
- Zugabe von 1 μl PNGaseF/100 μg Protein und Inkubation o/n, 37°C im Thermomixer bei 800 rpm
- Abstoppen der Reaktion durch Auswaschen der PNGaseF (s. Punkt 2.3.2.5)

2.3.2.6) Elution O-glykosylierter Peptide / Proteine

Den letzten Schritt vor der Analyse per MALDI-MS stellte die Elution der O-Glykopeptide dar. An diesem Punkt des Protokolls sollten alle unglykosylierten bzw. N-glykosidisch modifizierten Peptide vom Harz entfernt worden und nur noch O-Glykopeptide verblieben sein. Für die Elution der O-Glykopeptide wurden unterschiedliche chemische Methoden getestet, die eine Freisetzung durch Spaltung im Glykan des O-Glykopetids oder durch vollständige Eliminierung des Zuckers von Ser/Thr bewirken. Folgende Elutionstechniken wurden getestet:

1.) Elution durch Eliminierung und Substitution der Glykane mit Ethylamin

Die Glykan-Eliminierung von Glykopeptiden durch Alkylamine ist eine von Hanisch et al. (2001) beschriebene Methode in der das eingesetzte Alkylamin (hier: Ethylamin) als Markierung (Masseninkrement=27 Da) an der vormals glykosylierten Aminosäure eingefügt wird. Auf diese Weise sollte die Elution der Peptide mit einer erleichterten massenspektrometrischen Identifizierbarkeit der modifizierten Peptide verbunden sein.

Nach dem Waschen wurde das Hydrazidharz getrocknet. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml 70% Ethylamin und eine 18-stündige Inkubation bei 50°C. Nach der Inkubation wurde der Überstand abgenommen. Das Harz wurde wie unter 2.3.2.5 beschrieben gewaschen, die Waschfraktionen mit dem Überstand vereinigt und die Probe in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Die getrocknete Probe wurde in 0.1% TFA aufgenommen und auf C₁₈-ZipTips (Millipore) lt. Herstellerangaben gereinigt. Anschließend erfolgte die Analyse per MALDI-MS (s. 2.10.2)

2.) Elution der O-Glykopeptide durch Eliminierung mit verdünntem Alkali

Die β -Eliminierung von post-translationalen Modifikationen durch Basenkatalyse mit NaOH (Natriumhydroxid) ist seit den 1960er Jahren verwendete Methode (Iyer & Carlson 1971), die seit den frühen 1980er Jahren vor allem zur Analyse von phosphorylierten Proteinen zum Einsatz kommt (Weckwerth et al. 2000; Oda et al. 2001). Ausser für Phosphoproteine wurde die Technik in jüngerer Zeit auch zur Identifizierung und Charakterisierung von O-GlcNAc modifizierten Proteinen eingesetzt, welche vorwiegend nukleocytoplasmatischen Ursprungs sind (Torres & Hart 1984, Greis et al. 1996, Czeszak 2002).

Nach dem Waschen wurde die Flüssigkeit vom Hydrazidharz weitgehend entfernt. Danach erfolgte die Zugabe von 1 ml 25 mM NaOH und eine 18-stündige Inkubation bei 50°C.

Nach der Inkubation wurde der Überstand abgenommen. Das Harz wurde wie unter 2.3.2.5 beschrieben gewaschen, die Waschfraktionen mit dem Überstand vereinigt und die Probe in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Die getrocknete Probe wurde mit 1% TFA auf $\text{pH} \leq 2$ eingestellt und auf C_{18} -ZipTips (Millipore) lt. Herstellerangaben entsalzt. Anschließend erfolgte die Analyse per MALDI-MS (s. 2.10.2).

3.) Elution über Säure-Hydrolyse / Smith-Abbau:

Der *Smith*-Abbau nutzt die Säurelabilität oxidierter Zucker, um Glykane selektiv von ihrem nicht-reduzierenden Ende her abzubauen. In der Prozedur erfolgt zunächst eine Oxidation des Glykans mit Periodat (IO_4^-), gefolgt von der Reduktion der Aldehyde mit Borhydrid (BH_4^-) und der abschließender Hydrolyse mit verdünnter Säure. Während der Hydrolyse sollten selektiv die terminalen, oxidierten Kohlenhydrateinheiten abgespalten werden.

Nach dem Waschen wurde die Flüssigkeit über dem Hydrazidharz weitgehend entfernt. Danach erfolgte die Äquilibrierung des Harzes mit 2x 1ml 100 mM TFA und eine einstündige Inkubation bei 80°C . Nach der Inkubation wurde der Überstand abgenommen. Das Harz wurde wie unter 2.3.2.5 beschrieben gewaschen, die Waschfraktionen mit dem Überstand vereinigt und die Probe in der Vakuumzentrifuge eingetrocknet. Die getrocknete Probe wurde mit 1% TFA auf $\text{pH} \leq 2$ eingestellt und auf C_{18} -ZipTips (Millipore) lt. Herstellerangaben entsalzt. Anschließend erfolgte die Analyse per MALDI-MS (s. 2.10.2).

2.3.2.7) Modifizierung von Profinity™ Epoxide Harz mit Hydrazin-Gruppen

Das Reaktionsschema in Abb. 2.3.3 zeigt, wie sich ein *Hydrazin*-Derivat von Profinity™ Epoxid Harz (BioRad) herstellen läßt. Das Hydrazin-Derivat koppelt unter denselben Bedingungen an oxidierte Glykoproteine/Glykopeptide wie eine Hydrazidgruppe.

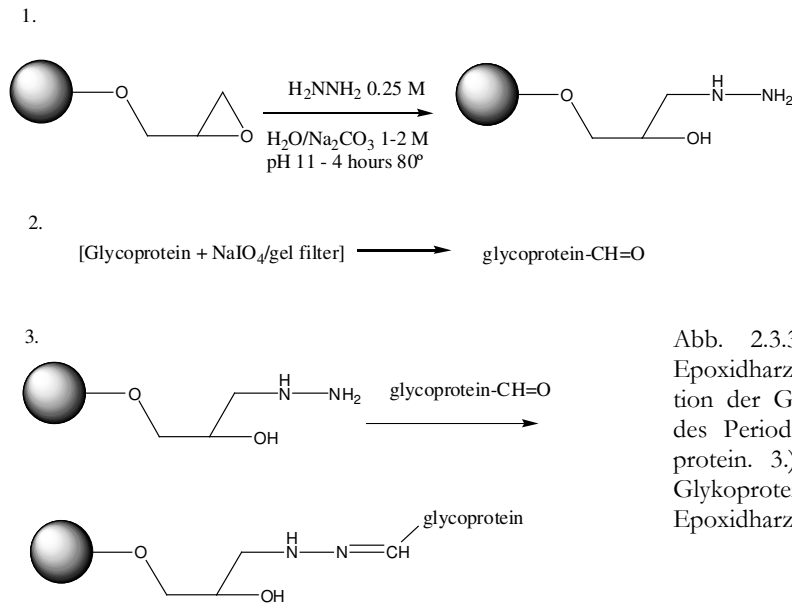


Abb. 2.3.3: 1.) Modifizierung des Epoxidharzes mit Hydrazin. 2.) Oxidation der Glykoproteine und Trennung des Periodats vom oxidierten Glykoprotein. 3.) Kopplung der oxidierten Glykoproteine an modifiziertes Epoxidharz; übernommen von BioRad

2.3.2.7) Neuraminidase Behandlung

Viele glykosylierte Proteine tragen als terminale Zuckerreste Sialinsäuren (Sillanauke et al., 1999). Weil Sialinsäuren nach eigenen Erfahrungen nicht quantitativ an Hydrazid-funktionen gekoppelt werden können (s. Ergebnisse 3.3), wurde bei biologischen Proben bzw. bei sialylierten Proteinen eine Behandlung mit Neuraminidase (P0720S, New England Biolabs) lt. Herstellerangaben durchgeführt. *Neuraminidase* bzw. *Sialidase* ist eine gebräuchliche Bezeichnung für die *Acetyl-Neuraminyl Hydrolase*. Diese katalysiert die Abspaltung von α 2-3, α 2-6, α 2-8 gebundener N-Acetyl-Neuraminsäure von Oligosacchariden und Glykoproteinen.

2.4) Hydrophile Affinitätschromatographie

2.4.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen

Die Methode „Hydrophile Affinitätschromatographie“ macht sich die Eigenschaft von Glykopeptid-Glykanen zunutze, Wasserstoffbrückenbindungen mit Sepharose- oder Cellulose-Matrices auszubilden. Diese Art der Fraktionierung ist ein Derivat der Papier-Chromatographie (Betts 1964), in der die Stärke der Wasserstoffbrückenbindungen durch Wahl eines Lauf- oder Fließmittels mit hohem organischen Anteil erhöht wird und durch die Zugabe von divalenten Kationen weiter verstärkt werden kann. Die Methode kann auf

Glykopeptide mit über 50 AS angewendet werden (Tajiri et al. 2005). Das Konzept der Methode sieht als ersten grundlegenden Schritt eine enzymatische Proteolyse der Probe bzw. des untersuchten Proteins vor. Die Probe kann direkt nach der Proteolyse, verdünnt in einem ausreichend großen Volumen, in der Adsorptionslösung auf die Matrix gegeben werden. Nach Bindung der Glykopeptide können unglykosylierte Peptide durch Waschen mit Adsorptionslösung entfernt werden. Die Elution erfolgt in einem polaren Lösungsmittel. Das Eluat kann nach Trocknung und Aufnahme in entsprechenden Lösungsmittel-Gemischen einer Online-ESI-MS Analyse unterzogen werden oder nach Reinigung über RP-Chromatographie (Wada et al. 2004) in der MALDI-MS *offline* analysiert werden.

Hier sollte die Methode dahingehend überprüft werden, ob eine spezifische Fraktionierung von Glykopeptiden und nicht-glykosylierten Peptiden effizient durchgeführt werden kann. Der inhärente Vorteil dieser Methode liegt, wegen der leichten Kombinierbarkeit mit der LC/MS Technologie, in der Möglichkeit, Glykosylierungsorte und Glykanstrukturen in MS/MS Experimenten zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit sollte die Eignung der Technik für die Analyse von Mucin-Typ O-Glykopeptiden gezeigt werden, weil die publizierte Methode auf der Analyse von N-Glykoproteinen basierte.

2.4.2) Durchführung „Hydrophile Affinitätschromatographie“

2.4.2.1) Trypsinbehandlung

Der erste Schritt dieser Methode ist die proteolytische Fragmentierung der Probe bzw. des untersuchten Proteins. Für die Evaluierung wurden jeweils 20 µg der Testproteine eingesetzt. Die Proteolyse wurde wie unter 2.1.2.1 beschrieben durchgeführt.

2.4.2.2) Hydrophile Affinitätschromatographie

Für die Eignung zur Glykopeptid-Fraktionierung wurden drei verschiedene Matrices untersucht: Cellulosepulver (Fluka), Sephadex® G-50 Medium (Pharmacia) und CL4B Sepharose (Pharmacia). Die Chromatographie wurde im *Batch*-Verfahren durchgeführt.

Adsorptionslösung: 1-Butanol/EtOH/H₂O (5/1/1 vol/vol/vol), + jeweils 1 mM Manganchlorid (MnCl₂), Calciumchlorid (CaCl₂), Kobaltchlorid (CoCl₂), Nickelsulfat (NiSO₄), Kupferchlorid (CuCl₂)

Elutionslösung: EtOH/ H₂O (1/1 vol/vol)

- Die Probe wurde in der Adsorptionslösung (>50facher Überschuß) aufgenommen und zur äquilibrierten Adsorptionsmatrix (Bettvol. ca. 50 µl) gegeben.
- Zur Bindung wurde der Reaktionsansatz 45 Min. im Thermomixer bei 800 rpm, RT geschüttelt.
- Nach der Bindung wurde der Reaktionsansatz zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Adsorptionsmatrix 2x mit Adsorberlösung gewaschen
- Die Elution erfolgte für 30 Min mit Elutionslösung (s.o.) bei RT und 800 rpm im Thermomixer. Anschließend wurde der Reaktionsansatz zentrifugiert und das Eluat von der Adsorptionsmatrix abgenommen.

Vor Analyse wurden Überstand und Eluat auf C₁₈-ZipTips (Millipore) lt. Herstellerangaben gereinigt und anschließend der Analyse per MALDI-MS unterzogen.

2.5) Partielle Deglykosylierung von Glykoproteinen und Glykopeptiden mit Trifluormethansulfonsäure (TFMSA)

2.5.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen

Die organische Säure TFMSA (Trifluormethansulfonsäure) wird seit Anfang der 1980er Jahre zur chemischen Deglykosylierung von Glykoproteinen benutzt (Edge et al. 1981). Alle untersuchten Arten von Kohlenhydratketten, wie z.B. N- und O-gebundene sowie Glykosaminoglykane, können auf diese Weise gespalten werden. Diese Methode zur Protein-Deglykosylierung fußt auf der Tatsache, daß Glykosid-Bindungen wesentlich empfindlicher für die Spaltung mit TFMSA sind als das Polypeptid-Rückgrat (Edge 2003). Die hier evaluierte Methode „*Partielle Deglykosylierung von Glykoproteinen und Glykopeptiden mit TFMSA*“ sollte sich die Tatsache zunutze machen, dass die Core-Hexosamine GalNAc bzw. GlcNAc der O- bzw. N-gebundenen Glykane relativ stabil sind. Aus publizierten Arbeiten (Sojar et al. 1987; Müller et al. 1997) war bekannt, daß die C1- α -Bindung von Ser/Thr an GalNAc die stabilste Bindung unter der Einwirkung von TFMSA darstellt. Diese relative Stabilität der Core-Hexosamine kann in der Weise genutzt werden, dass die Einwirkzeit der TFMSA verkürzt wird (von 2h auf ca. 0.5 bis 1h) (s. Abb. 2.5.1 a). Unter den Bedingungen einer limitierten TFMSA-Spaltung verbleiben ca. 80% des O-gebundenen

GalNAc am Protein, während gleichzeitig fast 100% der Kettenverlängerungen (substituierte Poly-laktosamine) abgebaut werden. Das verbleibende Core-GalNAc kann als ein spezifischer Marker O-glykosylierter Proteine für eine nachfolgende affinitätschromatographische Reinigung genutzt werden. Nach Entsalzung der TFMSA-behandelten Probe wurde daher eine Affinitäts-Chromatographie auf *Helix pomatia agglutinin* (HPA)-Agarose (EY Labs) durchgeführt (s. Abb. 2.5.1 b). HPA gehört zu den Lektinen, einer Klasse von kohlenhydratbindenden Proteinen, die mindestens zwei Zuckerbindungsstellen besitzen und so in der Lage sind, Zellen oder Glykokonjugate zu binden und zu präzipitieren. Eine tryptische Fragmentierung der Proteine wurde, abhängig vom gewählten Procedere, vor oder nach der Affinitätschromatographie durchgeführt. Abschließend erfolgte die Analyse per MALDI-MS.

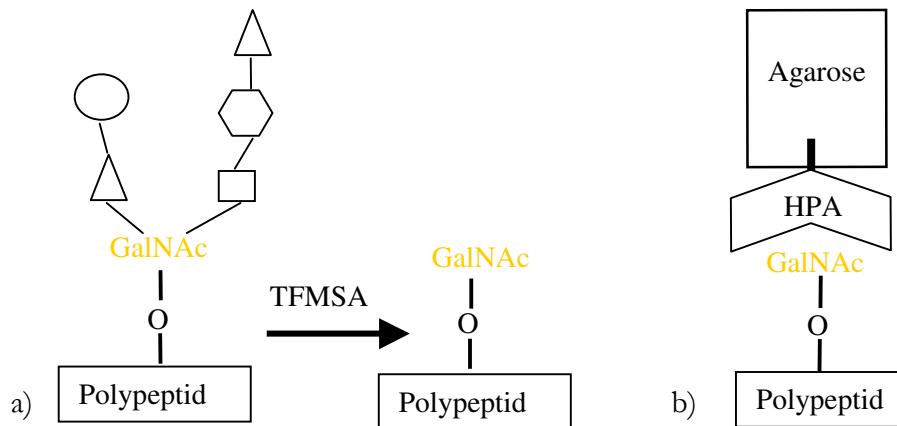


Abb. 2.5.1: Grundlegende Arbeitsschritte der Methode „Partielle Deglykosylierung von Glykoproteinen und Glykopeptiden mit TFMSA“: a) Bei der partiellen Deglykosylierung mit TFMSA werden Reaktionsbedingungen gewählt, bei denen das α -1 gebunden Core-GalNAc intakt bleibt und alle anderen glykosidischen Bindungen gespalten werden. Die Abbildung zeigt das Polypeptidsubstrat, das O-glykosidisch gebundene GalNAc und die daran gebundene Glykankette (schematisch); b) Bei der Chromatographie auf HPA werden mit GalNAc modifizierte Substrate von unglykosylierten getrennt. Dieser Schritt bringt die Spezifität in die evaluierte Methode ein und sollte geeignet sein, das O-Glykoproteom einer biologischen Probe zu erfassen.

Die Methode sollte folgende grundlegende Arbeitsschritte beinhalten:

1. partielle Deglykosylierung des Polypeptids auf Core-GalNAc Ebene
2. Entsalzung der Probe
3. a) - tryptische Fragmentierung mit anschließender Affinitätschromatographie auf HPA-Agarose
3. b) - Affinitätschromatographie auf HPA-Agarose mit/ohne anschließender tryptischer Fragmentierung
4. Reinigung der Peptidproben auf einer RP-Matrix (HPLC oder ZipTip)
5. Analyse per MALDI-MS oder PAGE (ohne tryptische Fragmentierung)

2.5.2) Durchführung „Partielle Deglykosylierung von Glykoproteinen und Glykopeptiden mit TFMSA“

2.5.2.1) Partielle Deglykosylierung von Polypeptiden mit TFMSA

Die partielle Deglykosylierung mit TFMSA wurde in zwei Varianten durchgeführt. Ein Protokoll schloss die Verwendung von Toluol oder Anisol während der TFMSA Behandlung ein. Toluol/Anisol wirken hier als Radikalfänger, indem sie eine Elektronenfalle bereitstellen und schützen so aromatische AS sowie Ser, Thr, Asp, Cys und Met vor unerwünschten Nebenreaktionen (Thompson et al. 1995, Lebl et al. 1999).

Die Deglykosylierung wurde wie folgt durchgeführt:

- Die Probe muß für die Deglykosylierung mit TFMSA trocken und salzfrei vorliegen. Sie wurde daher nach Entsalzung (auf einer NAP5-Säule lt. Herstellerangaben) in ein Glasreaktionsgefäß überführt und extensiv (min. 4 Std.) im Vakuum-Exsikkator über Phosphopentoxid (P_2O_5) getrocknet. Nach dem Trocknen wurde der Exsikkator mit Argon (Ar) belüftet, um die Probe wasserfrei zu halten und das Probengefäß unter Argon verschlossen.
- Die Probe wurde in ein Eisbad überführt und für 5 Min auf 0°C abgekühlt.
- Unter Argon im Exsikkator wurde gegebenenfalls zunächst Anisol oder Toluol zur Probe gegeben und anschließend TFMSA. Toluol/Anisol und TFMSA wurden in einem Verhältnis von 1/10 eingesetzt. Hierbei wurden pro 1 mg Probe mindestens 100 µl TFMSA eingesetzt (pro Probe aber min. 10 µl).
- Inkubationsdauer ohne Anisol/Toluol bei 0°C: 30 Min
- Inkubationsdauer mit Anisol/Toluol bei 0°C: 60 Min
- Nach Inkubation wurde die Reaktion mit 3x Vol 60% Pyridin/Wasser entsprechend dem eingesetzten TFMSA-Volumen abgestoppt. Pyridin bildet hierbei mit dem Trifluormethansulfonat ein Salz und inaktiviert dieses dadurch.
- Die Entsalzung erfolgte über eine NAP5-Säule (Amersham Biosciences) lt. Herstellerangaben.

2.5.2.2) Affinitätschromatographische Reinigung auf HPA-Agarose

Die Affinitätschromatographie wurde entweder im Batch-Verfahren oder im Säulen-Verfahren mit zyklischer Ladung der Probe durchgeführt.

Batch Verfahren:

- Zur Affinitätschromatographie wurde jeweils ca. 100 µl der HPA-Agarose (EY-Labs) eingesetzt. Die HPA-Agarose wurde auf Lektin-Bindungspuffer (20 mM TrisHCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂) äquilibriert.
- Die Probe (jeweils ca. 50 µg Protein) wurde in 100 µl Bindungspuffer zur HPA-Agarose gegeben und zur Bindung o/n bei 4°C auf einem Roller gerollt.
- Anschließend wurde der Überstand abgenommen und für die Analyse aufgehoben. Die Agarose wurde 2x mit 1 ml Bindungspuffer gewaschen.
- Die Elution der GalNAc-modifizierten Peptide erfolgte durch 10-minütiges Rollen bei 4°C in Lektin-Bindungspuffer + 100 mM GalNAc.
- Für die massenspektrometrische Analyse wurden Kopplungsüberstand und Eluat über C4- (bei Proteinproben) oder C18- (bei Peptidproben) ZipTips (Millipore) lt. Herstellerangaben gereinigt.

Säulenverfahren:

- Für die affinitätschromatographische Reinigung im Säulenverfahren wurden Glass Econo-Columns® (BioRad) mit 1 ml der HPA-Agarose gepackt. Die Äquilibrierung erfolgte mit 10 ml Lektin-Bindungspuffer (s.o.)
- Die Probe wurde in 10 ml Lektin-Bindungspuffer aufgenommen und zur Bindung mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Pharmacia Biotech) zyklisch bei 4°C o/n über die HPA-Säule gegeben.
- Anschließend wurde der Durchfluß aufgefangen und für die Analyse aufgehoben. Um unspezifisch gebundene Polypeptide zu entfernen, wurde die Säule mit 10 ml Bindungspuffer gewaschen.
- Die Elution erfolgte mit 10 ml Bindungspuffer + 100 mM GalNAc.
- Für die massenspektrometrische Analyse wurden Kopplungsüberstand und Eluat über C4- (bei Proteinproben) oder C18- (bei Peptidproben) ZipTips (Millipore) lt. Herstellerangaben gereinigt.
- Die tryptische Fragmentierung und die Analyse per MALDI-MS wurden wie unter 2.1.2.1 bzw. 2.9.2 beschrieben durchgeführt.

2.5.2.3) Abreicherung von Serumalbumin und IgG aus Serumproben

Das Serumproteom ist eine, besonders aus pharmakologischer Sicht, interessante biologische Probe von hoher Komplexität. Ein technisches Problem in der Analytik

komplexer Proteome ist, daß präferentiell abundante Proteine identifiziert werden. Bei der Analyse einer Serumprobe fällt dieser Aspekt besonders stark ins Gewicht, weil die Proteine Serumalbumin und Immunglobulin G (IgG) in typischen Proben einen Anteil von mehr als 70% ausmachen (Rengarajan et al. 1996).

Deswegen wurden Serumproben mit dem ProteoPrep™ Blue Albumin Depletion Kit (Sigma) hinsichtlich Albumin und IgG abgereichert. Die Abreicherung macht hierbei nominell >95% bei humanem Albumin und >80% bei humanen IgG aus (Suchard et al. 2003).

Die Abreicherung über das *ProteoPrep Blue Albumin Depletion Medium* wurde lt. Herstellerangaben durchgeführt und kontrolliert.

2.6) Eliminierung von O-Glykanen durch Alkylamine und Identifizierung mit Massenspektrometrie

2.6.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen

Die Eliminierung von O-Glykanen von Peptiden unter Anwendung von Alkylaminen ist eine von Hanisch et al. (2001) entwickelte Technik, in der Ethylamin (EA) oder Methylamin (MA) zur Eliminierung eingesetzt werden. In dieser Methode werden O-Glykane von Glykoproteinen durch Behandlung mit EA oder MA als Base und zugleich Nukleophil eliminiert und an die ungesättigten Ser-/Thr- Derivate addiert. Unter den optimalen Reaktionsbedingungen werden bei Einsatz von EA ca. 70% aller Glykane abgespalten, bei Einsatz von MA wird eine quantitative Eliminierung erreicht. Die Addition der Alkylamingruppe bringt mehrere Vorteile in die Analyse von Glykoproteinen ein:

- einheitliche Masseninkremente (+27 Da bei EA und +13 Da bei MA) werden an vormals glykosylierten Aminosäuren eingeführt
- eine positiven Ladung wird eingeführt bei einer verringerten Polarität von Peptiden; dies verbessert die massenspektrometrische Identifizierbarkeit, weil verstärkt Primärionen gebildet werden
- die proteolytische Prozessierbarkeit wird verbessert, weil die sterische Hinderung von Proteasen durch Glykane ausgeschaltet wird

Die Methode „*Eliminierung von O-Glykanen durch Alkylamine und Identifizierung mit Massenspektrometrie*“ sollte hier auf eine Kompatibilität in „Proteomics“-Anwendungen,

inklusive PMF-Identifizierung, hin evaluiert werden. Hierfür wurden zwei Verfahren entworfen. Ein Verfahren sah die Alkylaminylierung als Schritt nach PAGE und vor Trypsinverdau vor und sollte an getrockneten Gelstanzen angewendet werden. Das zweite Verfahren sah die Anwendung vor PAGE vor. Dieses Verfahren würde die verbesserte Darstellbarkeit von (vormals glykosylierten) Proteinen mit deren homogener Lokalisation in 1D- bzw. 2D-PAGE Techniken kombinieren.

2.6.2) Durchführung „Eliminierung von O-Glykanen durch Alkylamine und Identifizierung mit Massenspektrometrie“

2.6.2.1) Vorbehandlung der Proben mit EA oder MA

- Probe: 10 µg Protein
- Eintrocknen im Vakuumzentrifuge
- 50 µl EA (70%ig) oder MA (40%ig) zugeben
- Inkubation bei 50°C für 6 Std. (MA) bzw. 24 Std. (EA)
- Nach Inkubation Flüssigkeit in Vakuumzentrifuge abziehen
- Probenvorbereitung für SDS-PAGE: a) in SDS-Probenpuffer aufnehmen und weiterverarbeiten; b) Reinigung über NAP5-Säule lt. Herstellerangaben, anschließend in Vakuumzentrifuge einengen und in SDS-Probenpuffer aufnehmen; c) Reinigung durch Chloroform/Methanol-Fällung (s. 2.10.9), Ethanol-Fällung (s. 2.10.10) oder Acetonfällung (s. 2.10.11), anschließend in SDS-Probenpuffer aufnehmen
- SDS-PAGE (s. 2.10.4)

2.6.2.2) EA- / MA-Behandlung von Gelstanzen

Die Proteinproben wurden der SDS-PAGE (s. 2.10.4) unterzogen und mit Coomassie gefärbt (s. 2.10.5). Die Proteinbanden wurden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten, in 1.5 ml Reaktionsgefäße überführt und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Inkubation mit EA oder MA erfolgte wie unter 2.6.2.1 beschrieben. Nach Abziehen der Flüssigkeit in der Vakuumzentrifuge wurde ein *Peptide Mass Fingerprint* wie unter 2.10.8 beschrieben durchgeführt.

2.7) Anreicherung und Identifizierung von Glykoproteinen über Fraktionierung auf Aminophenylboratsäulen

2.7.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen

Die Methode „*Anreicherung und Identifizierung von Glykoproteinen über Fraktionierung auf Aminophenylboratsäulen*“ sollte für die spezifische Isolierung und nachfolgende Analyse von Glykoproteinen aus einer gegebenen biologischen Probe geeignet sein. Sie basiert auf der Eigenschaft von Boratgruppen, bei erhöhten pH-Werten (>8.5) Komplexe mit Kohlenhydraten auszubilden. Über Boratsäulen ist so eine Anreicherung von glykosylierten Proteinen möglich (Bouriotis & Dean, 1981; Myöhänen et al. 1981).

Hier sollte den Fragen nachgegangen werden ob die Chromatographie auf Aminophenylborat die Fraktionierung der glykosylierten von unglykosylierten Species mit ausreichender Effizienz gewährleistet, außerdem, ob enzymatische Arbeitsschritte an immobilisierten Proben in diesem System vorgenommen werden können, um u.a. eine Trennung von N- und O- Glykoproteom zu erreichen. Wären diese Voraussetzungen gegeben, könnte auf dieser Grundlage ein robustes Verfahren zur Anreicherung des O-glykosylierten Subproteoms ergeben. Die zu etablierende Methode sollte folgende grundlegende Reaktionsschritte beinhalten:

- 1.) Immobilisierung der Glykoproteine an eine Aminophenylboratsäule
- 2.) Proteolytische Fragmentierung der immobilisierten Proteine mit Trypsin
- 3.) Entfernen der N-Glykopeptide durch Behandlung mit PNGaseF
- 4.) Elution der O-Glykoproteine/-peptide durch Absenken des pH-Wertes und/oder Zugabe von Sorbitol
- 5.) Analyse per MALDI-MS

Zwischen den experimentellen Schritten sollte intensiv gewaschen werden.

Die experimentellen Schritte 1.) – 4.) sollten in verschiedenen Reihenfolgen angewendet und diese Ansätze hinsichtlich deren Eignung für die Analyse O-glykosylierter Proteine evaluiert werden.

2.7.2) Durchführung „Anreicherung und Identifizierung von Glykoproteinen über Fraktionierung auf Aminophenylboratsäulen“

2.7.2.1) Chromatographie auf Aminophenylboratsäule

Für die Chromatographie wurden 2.5 ml MobiCol-Säulen (MoBiTec) mit ca. 500 µl Aminophenylborat-Agarose (Sigma) gepackt.

Regeneration der Säule mit:

- 3 ml 20 mM NaOH
- 5 ml 50 mM Essigsäure (HAc)
- 10 ml H₂O

Bindung der Probe:

- Säule mit 10 ml EPPS-Puffer (20 mM EPPS pH 9.0, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl) äquilibrieren.
- Probe (in EPPS-Puffer vorliegend) über die Säule geben.
- Mit 10 ml EPPS-Puffer waschen.

Elution:

Die Elution der Probe erfolgte mit

- 2 ml 200 mM Sorbitol in EPPS-Puffer durch Verdrängung der komplexierten Glykane.
- Oder durch Absenken des pH-Wertes (Zugabe von 2 ml 100 mM HAc oder 100 M TFA) und Auflösung der Borat-Kohlenhydrat-Komplexe.

Aufreinigung der Proben:

- Proteinproben: Einengen der Proben in der Vakuumzentrifuge auf ca. 100 µl Volumen und anschließende Chloroform/Methanol-Fällung (s. 2.10.9).
- Peptidproben: Einstellen der Probe auf pH-Wert < 2 und Reinigung auf C₁₈-ZipTips (Millipore) lt. Herstellerangaben.

2.7.2.2) Enzymatische Anwendungen in EPPS-Puffer

Um eine Anwendung von enzymatischen Schritten auf Aminophenylboratsäulen zu etablieren, sollte zunächst getestet werden, ob diese im EPPS-Puffer-System durchführbar sind. Es sollten Trypsin und PNGaseF zur Anwendung kommen.

Trypsin:

Für den proteolytischen Verdau mit Trypsin wurde Ovalbumin gewählt. Die Proteolyse wurde einmal lt. Herstellerangaben unter den optimalen Reaktionsbedingungen und parallel dazu im EPPS-Puffer durchgeführt.

- Probe: je 10 µg Ovalbumin
- Aufnehmen in a) 100 mM NH₄HCO₃, 1 mM CaCl₂ bzw. b) EPPS-Puffer
- Zugabe 1 µg Trypsin und Inkubation bei 37°C o/n
- Abstoppen der Reaktion bei 90°C, 5 Min
- Reinigung der Proben durch Chloroform/Methanol Fällung (2.10.9)
- Analyse durch SDS-PAGE (2.10.4) auf 7.5% Acrylamid-Gel

PNGaseF:

Für die Entfernung der N-Glykane mit PNGaseF wurden als Testproteine α -1-acides Glykoprotein und apo-Transferrin gewählt, beides N-glykosylierte Proteine. Der Verdau wurde einmal lt. Herstellerangaben unter den optimalen Reaktionsbedingungen und parallel dazu im EPPS-Puffer durchgeführt.

- Proben: je 10 µg apo-Transferrin, α -1-acides Glykoprotein
- Proben aufnehmen in a) G7-Puffer (50 mM Natriumphosphat pH 7.5) + 1% NP-40 (Detergenz, New England Biolabs) bzw. b) EPPS-Puffer
- Zugabe 1 µl PNGaseF, Inkubation o/n bei 37°C
- Stoppen der Reaktion und Reinigen durch Chloroform/Methanol Fällung (2.10.9)
- Analyse durch SDS-PAGE (2.10.4) auf 7.5% Acrylamid-Gel

Färbung von Glykoproteinen

2.8) Glykoproteinfärbung mit 3-Aminophenylborat-Fluorescein- isothiocyanat

2.8.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen

Um einen nicht-oxidativen Ansatz zur spezifischen Färbung von glykosylierten Proteinen in der SDS-PAGE bzw. in Blots zu etablieren, sollte eine Detektion mit 3-Aminophenylborat (APB)-gekoppeltem Fluoresceinisothiocyanat (FITC) getestet werden. FITC wurde dabei über die Isothiocyanatgruppe an die Aminofunktion von 3-Aminophenylborat gekoppelt. Das FITC-APB Kopplungsprodukt sollte mit der Boratgruppe spezifisch an Glykane binden. Die Eignung von Boraten, Glykane zu binden, beruht auf deren Eigenschaft bei $\text{pH} \geq 8.5$ nicht-kovalente Komplexe mit cis-Diolen von Zuckern auszubilden (s. Abb. 2.8.1; Porath 1974, Hermanson 1992).

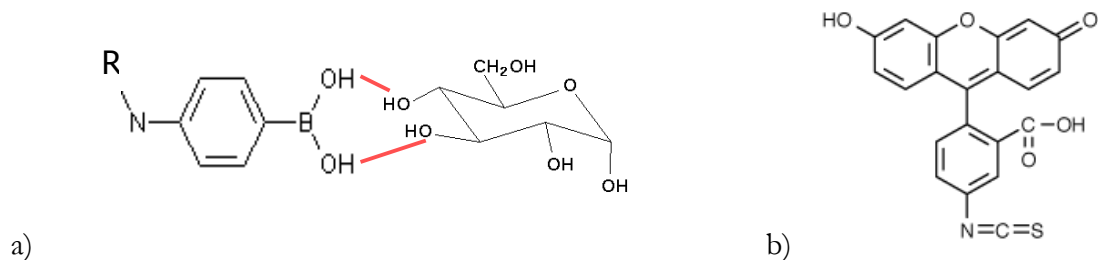


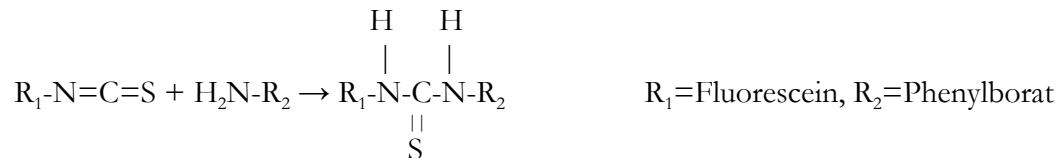
Abb. 2.8.1: a) Komplexierung benachbarter Hydroxygruppen eines Kohlenhydrats durch eine Boratgruppe, R = FITC; b) Fluoresceinisothiocyanat (FITC), übernommen aus www.microbiology.emory.edu

Unter Einsatz dieses Reagenzes könnte eine spezifische Färbemethode für Glykoproteine etabliert werden, die im alkalischen Milieu anwendbar wäre. Über die gegebene Spezifität hinaus würde diese Färbetechnik durch Einbringen einer fluoreszierenden Gruppe Vorteile in der Sensitivität (Wilderspin & Green 1983) und eine signifikante Erweiterung des dynamischen Bereiches in die Darstellung der detektierten Proteine einführen. Dieser Aspekt ist in den herkömmlichen färberischen Techniken nicht ausreichend gewährleistet (Matsui et al. 1999).

2.8.2) Durchführung „Glykoproteinfärbung mit 3-Aminophenylborat-Fluoresceinisothiocyanat“

2.8.2.1) Kopplung von FITC und APB

Für die Synthese des Kopplungsproduktes FITC-APB wurde mit DMSO ein aprotisches Lösungsmittel gewählt, weil die Reaktion



in wässriger Lösung langsamer, nicht quantitativ und unter Nebenprodukt-Bildung verläuft. Weil die Kopplung besonders effektiv abläuft, wenn das Amin ein freies Elektronenpaar besitzt, erfolgte die Reaktion unter Zusatz von NaOH als basischem Katalysator.

Die Kopplung wurde wie folgt durchgeführt:

- 40 mg APB + 102 mg FITC wurden in 500 µl DMSO gelöst
- Zugabe von 10 µl 1 M NaOH und Inkubation für 48 Std. bei 50°C
- Nach Inkubation wurde das Reaktionsgemisch bei 4°C gelagert

Das Vorliegen des gewünschten Kopplungsproduktes wurde durch Analyse mit MALDI-MS (s. 2.10.2) und Dünnschicht-Chromatographie (s. 2.8.2.2) nachgewiesen.

2.8.2.2) Dünnschicht-Chromatographie

In der Dünnschichtchromatographie (DC) werden Substanzen, wie in allen verteilungs-chromatographischen Verfahren, aufgrund bestimmter Eigenschaften voneinander getrennt (Polarität, Größe), indem sie deren Verteilung in einer stationären (Silikat oder Cellulose) und einer mobilen Phase (Lösungsmittelsystem oder Laufmittel) nutzt. Das Prinzip der Trennung beruht dabei auf der Konkurrenz zwischen Sorbens (stationäre Phase) und Solvens (mobile Phase) um den Analyt, das in der aufsteigenden DC von unten in die stationäre Phase einzieht. Nach Eintauchen der Trennschicht wird der Analyt vom Fließmittel, durch Kapillarkräfte nach oben gesaugt, mitgetragen. Je besser der Analyt im Solvens löslich ist desto weiter wandert er relativ zur Laufmittelfront. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch Verdunsten des Laufmittels zu verhindern, erfolgt die Trennung in einer mit dem Fließmittel gesättigten Atmosphäre in einem geschlossenen Gefäß (Stahl, 1956).

Hier wurde die DC auf Cellulose-Dünnschichtplatten (Merck) durchgeführt, um eine erfolgreiche Kopplung von FITC und APB nachzuweisen. FITC hat in dem gewählten Laufmittel, aufgrund seines hydrophoben Charakters, eine hohe Mobilität während das FITC-APB-Konjugat und APB stärker mit der Celluloseschicht interagieren.

Die DC wurde wie folgt durchgeführt:

- Laufmittel: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{Wasser}$ (30/60/10 vol/vol/vol), $\text{pH} > 10$ in Kammer geben; 1 Std. warten, um Gasphase in der Kammer zu äquilibrieren.
- Je 1 μl Kopplungsprodukt (Reaktionsansatz oder gereinigte Fraktion, s. 2.4.2.2) und 1 μl FITC- Lösung auf DC-Celluloseplatte geben und trocknen lassen.
- Nach Trocknen des aufgetragenen Analyts DC-Platte in Glaskammer geben und Fließmittel bis zur Oberkante laufen lassen. Anschließend lufttrocknen.

2.8.2.2) Reinigung des FITC-APB durch Säulenchromatographie auf Cellulose

Zur Trennung des FITC-APB von nicht umgesetzttem FITC wurde der Reaktionsansatz auf einer Cellulose-Säule gereinigt. Die Chromatographie wurde wie folgt durchgeführt:

- 10 ml Cellulosepulver (FLUKA) wurden in eine Glassäule gepackt
- Die Cellulosesäule wurde mit 20 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (30/60/10, vol/vol/vol) $\text{pH} > 10$ äquilibriert.
- Das FITC-APB wurde in 5 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (30/60/10, vol/vol/vol) $\text{pH} > 10$ über die Säule gegeben.
- Nach Bindung des FITC-APB-Konjugats wurde die Säule mit 100 ml $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (30/60/10, vol/vol/vol) $\text{pH} > 10$ gewaschen.
- Die Elution erfolgte mit 16 ml $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$ (1/1 vol/vol). Es wurden 8 Fraktionen zu je 2 ml gesammelt.

2.8.2.3) Dot-Blot-Färbung von Glykoproteinen mit FITC-APB

Die Spezifität der Glykoprotein-Färbung mit FITC-APB sollte anhand von Dot-Blots demonstriert werden. Hierzu wurden Verdünnungsreihen glykosylierter und nicht-glykosylierter Proteine auf eine Sequi-Blot™ PVDF-Membran (BioRad) gespottet und mit verschiedenen Methoden gefärbt:

- Die Proteine wurden in absteigender Konzentration auf die PVDF-Membran aufgetragen (vorherige Aktivierung erfolgte lt. Herstellerangaben) und zwar jeweils in den Mengen: 10 μg , 1 μg , 100 ng, 10 ng, 1 ng

- Als Testproteine wurden gewählt

Carboanhydrase	}	nicht-glykosylierte Proteine
Phosphorylase B		
Bovines Serum Albumin		
Lysozym		

Humanes Glycophorin A	}	glykosylierte Proteine
κ -Casein		
Immunglobulin G		
Fetuin		
α -1-acides Glycoprotein		
Transferrin		

- Nach dem Auftragen der Proteine wurden die Membranen für 1 Std. geblockt, um unspezifische Wechselwirkungen des FITC-APB mit der Membran zu inhibieren. Dies geschah in 3 verschiedenen Ansätzen (1-3) mit jeweils verschiedenen Blockpuffern (1-3):

Blockpuffer 1: 0.5% Tween (FLUKA), 20 mM EPPS (Sigma) pH 9.0, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl

Blockpuffer 2: 5% BSA, 20 mM EPPS pH 9.0, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl

Blockpuffer 3: 5% BSA, 0.5% Tween, 20 mM EPPS pH 9.0, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl

- Nach dem Blocken wurden die Membranen 2x für 20 Min in den jeweiligen Waschlösungen äquilibriert:

Waschlösung 1: s. Blockpuffer 1 mit 0.05% Tween

Waschlösung 2: s. Blockpuffer 2 mit 0.5% BSA

Waschlösung 3: s. Blockpuffer 3 mit 0.05% Tween, 0.5% BSA

- Die Färbung erfolgte in den jeweiligen Färbelösungen bei RT für 1 Std.
 - Färbelösung 1: 15 ml Blockpuffer 1 + 100 μ l FITC-APB in Fraktion 2 (s. Punkt 2.8.2.2)
 - Färbelösung 2: 15 ml Blockpuffer 2 + 100 μ l FITC-APB in Fraktion 2
 - Färbelösung 3: 15 ml Blockpuffer 3 + 100 μ l FITC-APB in Fraktion 2
- Nach der Färbung wurden die Membranen 3x für 20 Min. mit den jeweiligen Waschlösungen gewaschen, um unspezifisch gebundenes FITC-APB zu entfernen

- Die Detektion erfolgte auf einem FLA-3000 Fluoreszenz-Scanner (Fujifilm) im Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) bei 473 nm Anregungswellenlänge.

2.8.2.4) PAGE von Glykoproteinen und Färbung mit FITC-APB

In diesem Versuchteil sollte überprüft werden, ob eine Färbung von Glykoproteinen mit FITC-APB im Polyacrylamidgel möglich ist. Hierzu wurden glykosylierte und nicht-glykosylierte Proteine in nicht-reduzierendem Probenpuffer, nach Denaturierung bei 95°C für 5 Min., auf 7.5%ige SDS-Polyacrylamid-(PA) Gele aufgetragen und bei 160 Volt (V) für ca. 1 Stunde getrennt (s. auch Punkt 2.10.4). Als Proben wurden die gleichen Proteine wie in Punkt 2.8.2.3 verwendet. Die Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Die Fixierung des Gels erfolgte mit 20 mM EPPS pH 9.0, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl in 20% EtOH in H₂O für 2x 1 Std. mit je 100 ml.
- Die Färbung erfolgte in 100 ml Fixierlösung + 200 µl FITC-APB in Fraktion 2 (s. 2.8.2.2).
- Um unspezifisch gebundenes FITC-APB aus dem Polyacrylamid Netzwerk zu entfernen, wurde das Gel 3x für je 20 Min. mit Fixierlösung gewaschen.
- Die Detektion erfolgte auf einem FLA-3000 Scanner (Fujifilm) bei 473 nm Anregungswellenlänge
- Ferner wurde ein Referenzgel identisch beladen, parallel der Elektrophorese unterzogen und mit fluoreszierendem Ruthidiumfarbstoff (s. 2.10.7) gefärbt.

In vivo Strategien zur Anreicherung des Mucin-Typ O-Glykoproteoms

2.9) Metabolische in vivo-Markierung von Glykoproteinen mit Azidozuckern

2.9.1) Erläuterung der Methode/ Grundlagen

Die Methode „*Metabolische in vivo-Markierung von Glykoproteinen*“ wurde als analytisches Verfahren etabliert (Saxon & Bertozzi 2000), und sollte auf seine Tauglichkeit in der Glykoproteomik evaluiert werden (s. Abb. 2.9.1). Die metabolisch eingebrachte Azidgalaktose (GalAz) trägt mit der Azidgruppe eine abiotische Funktion, die über eine Staudinger-Ligation mit Phosphinreagenzien gekoppelt werden kann (Saxon & Bertozzi, 2000). Im evaluierten Verfahren sollten die Tatsachen genutzt werden, daß Galactosyltransferasen (ppGalNAcT's) tolerant gegenüber solchen abiotischen Substraten sind, die eingebrachten Gruppen keinerlei Wechselwirkungen mit biologischen Komponenten aufweisen (Klick et al. 2002, Vocadlo et al. 2003) und mit absoluter Chemoselektivität an Phosphinreagenzien gekoppelt werden können.

Die hier evaluierte Methode basiert auf publizierten Arbeiten (Hang et al. 2003), in denen Glykoproteine mit Azidgruppen-tragenden Kohlenhydraten markiert werden, indem Zellen der abiotische Zucker in per-O-acetylierter Form zugeführt wird, diese ihn metabolisch verwerten und bei der Synthese von Glykanen verwerten.

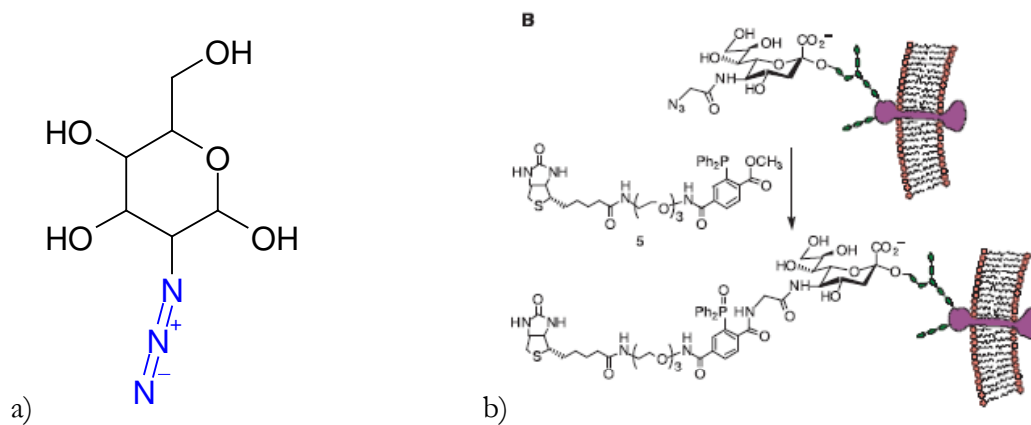


Abb. 2.9.1: a) Der eingesetzte abiotische GalAz-Zucker trägt am C2-Atom eine Azidfunktion (blau). b) Azidgruppen reagieren mit Phosphinreagenzien (hier dargestellt: ein Azid-Sialinsäurederivat reagiert mit biotinyliertem Triarylphosphin) über die Staudinger-Ligation zu einem stabilem Addukt. Übernommen aus Saxon & Bertozzi 2000.

Die hier evaluierte Methode „*Metabolische Markierung von Glykoproteinen mit Azidozuckern*“ sollte die von Hang et al. publizierte Technik auf die Ebene der Proteomik und insbesondere Glykoproteomik führen. Hierfür sollte die Technik u.a. auf die Kompatibilität mit 2-D Gelen überprüft werden. Um glykosylierte Proteine zu identifizieren sollten in Western-Blots (Burnette 1981) die markierten Proteine über ein etabliertes Tag-System lokalisiert werden. Ferner sollte die Eignung des Tag-Systems für die Immunpräzipitation der Glykoproteine getestet werden.

Als Staudingerreagenz wurde *Phosphin-FLAG* und für den Western-Blot der Peroxidase-konjugierte *anti-FLAG-HRP* (Sigma; HRP: engl. f. Horse Radish Peroxidase) Antikörper gewählt.

Die vollständig etablierte Methode sollte folgende Teilschritte enthalten:

- Zellkulturen unter per-O-Acetyl-GalAz Zugabe wachsen lassen.
- Isolierung des Gesamtproteins oder einzelner Proteinfraktionen aus Zellkulturen mit Standard-Methoden.
- Staudinger-Ligation zur Einführung einer spezifischen Markierung (FLAG oder Biotin) in die markierten Proteine
- PAGE
- Western-Blot
- Identifizierung und Lokalisation von markierten Proteinen im Western-Blot
- Stanzen von O-Glykoprotein-Banden
- PMF der gestanzten O-Glykoproteine durch MALDI-MS und Identifizierung per Datenbankabgleich

2.9.2) Durchführung „Metabolische Markierung von Glykoproteinen mit Azidozuckern“

2.9.2.1) Zellkultur

Für die metabolische Markierung wurden die Zelllinien T47-D und MDA-MB231 in Kultur gezogen. Die Zelllinie T47-D (American Type Culture Collection [ATCC]) stammt aus einem humanen Brustkarzinom, zeichnet sich durch ein schwaches Invasionspotential aus und ist ein anerkanntes Modell für Karzinom-assoziierte Veränderungen der Mucin-Typ-Glykosylierung (Hanisch et al. 1996). Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640 Medium mit Glutamax I (mit 2 g Glucose/l), bovinem Insulin (10 mg/ml, Sigma), 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS, Gibco), Penicillin (100 U/ml, Gibco) und Streptomycin (100 µg/ml, Gibco) im Zellinkubator (Heraeus) bei 37°C und 5% CO₂.

Die Zelllinie MDA-MB231 (ATCC) entstammt ebenfalls einem humanen Brustkarzinom und zeichnet sich durch ein hohes Invasionspotential aus. Die Kultivierung erfolgte in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Biochrom) 5% FCS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) im Zellinkubator bei 37°C und 5% CO₂.

Für die metabolische Markierung wurden die Zelllinien über drei Tage wie oben beschrieben unter Zusatz von jeweils 50 µM per-O-Ac-GalAz (Toronto Research Chemicals Inc.) kultiviert. Der abiotische Zucker, gelöst in EtOH, wurde in die Kammern einer 6-Well Zellkulturplatte (TPP) gegeben. Nachdem verdampfen des EtOH wurden jeweils 10⁶ Zellen in Kulturmedium in jeder Kammer ausgesät und die Kulturplatten in den Zellinkubator überführt.

Nach drei Tagen Inkubation wurden die Zellen mit einem Zellschaber (TPP) vom Boden der Kammern gelöst, die Zellen aus je drei Kammern vereinigt und in 15 ml Zentrifugenröhrchen (TPP) überführt. Nach Abzentrifugieren der Zellen und Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Homogenisierungspuffer (1% SDS, 100 mM TrisHCl, pH 7.4) resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch 3x 15 Schallpulse eines UP 200s Ultraschallprozessors (Dr. Hielscher GmbH) im Eisbad. Die so homogenisierten Proben wurden nach einstündiger Inkubation bei 4°C für 10 Min bei 3000x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet verworfen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit Bradford-Reagenz (Sigma) lt. Herstellerangaben bestimmt.

2.9.2.2) Staudinger Ligation

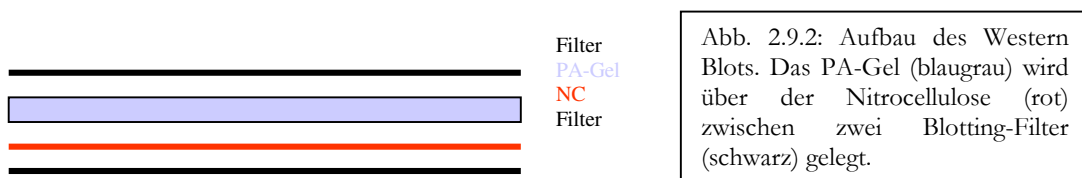
Für die Staudinger-Ligation wurden je 100 µg Protein eingesetzt. Die Ligation erfolgte im Hybridisierungspuffer (s.o.). Hierfür wurden 2 µl 5 mM Triarylphosphin-FLAG (in H₂O; Eigensynthese, überlassen von Bertozzi Research Group, Berkeley, CA, USA) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 6 Std. Anschließend wurde die Probe bei -20°C gelagert.

2.9.2.3) Western-Blot

Für die SDS-PAGE wurden von jeder Probe jeweils 20 µg Protein aus dem Staudinger-Ligations-Ansatz auf ein 10%iges PA-Gel geladen und wie unter 2.10.1 beschrieben der Elektrophorese unterzogen.

Nach Elektrophorese wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran gebロットet und der Blot wie folgt entwickelt:

- Das PA-Gel wurde mit einem gleichgroßen Stück Protran BA83 Nitrocellulose (Schleicher&Schuell) zwischen zwei Gel-Blotting Filter (Schleicher&Schuell) in eine *TransBlot® SD Transfer-Cell* (BioRad) platziert (s. Abb. 2.9.2). Das Gel, die Nitrocellulose und die Filter wurden vorher für 10 Min. in 2x Towbinpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, und 10% [vol/vol] MeOH) äquilibriert worden.



- Die Übertragung der Proteine erfolgte bei 140 Milliampere (mA) für 35 Min.
- Nach der Übertragung wurde die Membran mit den Proteinen o/n bei 4°C in TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.01% Tween20 [Fluka]) mit 5% Milchpulver geblockt, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers im nachfolgenden Schritt zu unterbinden. Nach dem Blocken wurde die Membran 3x für 5 Min. mit TBS-T gewaschen.
- Die Bindung des anti-FLAG-HRP Antikörpers (Sigma; 1:3000 verdünnt in TBS-T) erfolgte bei RT für 1 Std. Nach der Bindung wurde die Membran 1x für 5 Min. mit TBS-T und 2x für 5 Min. mit TBS gewaschen.

- Die Entwicklung des Blots erfolgte über ein Chemilumineszenz-Verfahren und wurde mit dem *Lumi-Light Western Blotting Substrate* (Roche) lt. Herstellerangaben durchgeführt. Die Belichtungszeit des SuperRX Autoradiographiefilms (Fujifilm) war für individuelle Blots unterschiedlich (s. Ergebnisse). Die Entwicklung wurde auf einem RGII X-Ray Film Processor (Fujifilm) durchgeführt.

2.10) Standardprotokolle

2.10.1) MALDI-Matrices

Zur Herstellung der MALDI Matrix wurden 20 mg DHB oder HCCA abgewogen und in einem 1:2 Lösungsmittelgemisch aus AcN/ 0.1% TFA in Wasser gelöst. Um die vollständige Auflösung der Matrixsäure zu beschleunigen wurde das Gemisch für 5 Min. im Ultraschallbad (Branson® 221) beschallt.

2.10.2) MALDI-MS Analyse

MALDI (engl. **M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption/**I**onisation) ist ein Verfahren zur Ionisierung von Molekülen unter Vermittlung einer UV-Licht absorbierenden Matrix. Die Technologie erwies sich seit der Entwicklung (Hillenkamp et al. 1991) als besonders nützlich für Anwendungen in der Massenspektrometrie (MALDI-MS) an einer Vielzahl von Molekülen, insbesondere großen Molekülen wie Polymeren und Biopolymeren.

Wegen der extrem hohen Empfindlichkeit und der breiten Anwendbarkeit auf große Komplexe hat die MALDI-MS Technologie in den meisten Feldern mit chemischem und biologischem Bezug große Bedeutung erlangt.

MALDI beruht auf der Kokristallisation von Matrix und Analyt mit einem 100 – 100.000fachen molaren Überschuss der Matrix. Matrixsubstanzen sind i.A. organische Säuren, die bei der verwendeten Laserwellenlänge Energie absorbieren. Hochenergetische Laserpulse führen an der Oberfläche des Kristalls zu explosionsartigen Teilchenablösungen. Eine der Methoden zur Massenbestimmung der nach dem Laserpuls in die Gasphase überführten Teilchen ist die Flugzeit- (engl. Time of Flight- [TOF-]) Analyse. Ein elektrisches Feld beschleunigt die freigesetzten Ionen, in Abhängigkeit von ihrer relativen Molekularmasse (m/z) auf eine spezifische Geschwindigkeit. Die

beschleunigten Ionen benötigen anschließend eine charakteristische Zeit, um einen feldfreien, evakuierten Analysator zu durchlaufen. Die Laufzeit der Ionen wird an einem Detektor registriert und liefert so Informationen über die Masse des Analyts, die proportional zur Flugzeit ist.

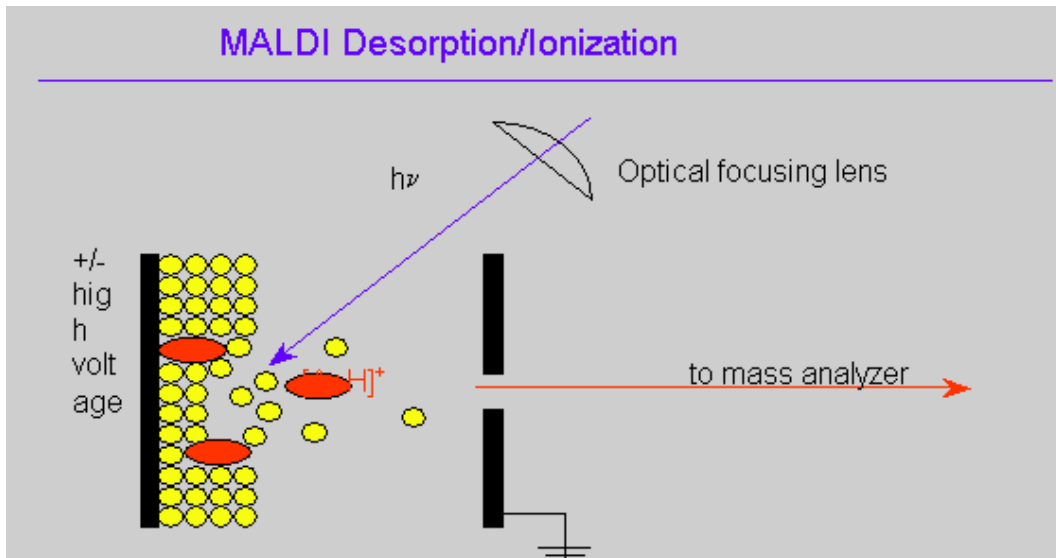


Abb.2.10.1: Prinzip der MALDI-MS Technologie. Ein Laserpuls bewirkt die Überführung von Analyt-Ionen aus dem Matrix/Analyt-Kristall in die Gasphase. Die Ionen werden von einem elektrischen Feld beschleunigt und durchlaufen den TOF-Analysator. Verändert übernommen aus www.noble.org

Zur Präparation von Proben wurde in dieser Arbeit die „*Dried Droplet*“-Methode verwendet. Hier wurden je $0.7 \mu\text{l}$ der Probe (vorliegend in 0.1% TFA mit AcN-Anteil 0 – 80%) mit $1.4 \mu\text{l}$ HCCA- oder DHB- Matrix auf einem MALDI-Target (MTP 384 massive target gold plated, Bruker Daltonics) gemischt. Nach Trocknen/Kristallisierung auf dem Target wurden die Proben in einem Bruker Reflex IV MALDI-MS-TOF Spektrometer (Bruker Daltonik) mit einem Stickstofflaser ($\lambda = 337 \text{ nm}$) und positiver Ionendetektion im Reflektormodus analysiert. Die Beschleunigungs- und Reflektorspannung betrug 16.5 kV bzw. 20.0 kV.

2.10.3) Peptidanalyse mit Umkehrphasen-HPLC

Durch Umkehrphasen- (engl. *Reversed Phase*, RP-) *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC, System Gold, Beckman) mit einer C18-Säule (Vydac, MZ Analystechnik) wurden Peptide analysiert. Die Proben wurden in $100 \mu\text{l}$ 0,1% TFA aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Ein linearer Gradient wurde von 0% Puffer B (80% Acetonitril in 0,1% TFA), 90% Puffer A (2% Acetonitril in 0,1% TFA) auf 100 % Puffer B in 30 Min.

bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min gefahren. Die UV-Detektion erfolgte bei 214 nm (Shimadzu RF-10A XL).

2.10.4) SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach Lämmli (1970) mit dem Mini-ProteanII Gelelektrophoresesystem (BioRad) durchgeführt. Hierbei wurden für die Analyse 7.5%ige oder 10%ige Trenngelen mit 3.5%igen Sammelgelen nach folgender Rezeptur verwendet.

Komponenten (ml)	Trenngel 10%	Trenngel 7.5%	Sammelgel 3.5%
ddH ₂ O	4.1	4.9	6.2
4x Trenngelpuffer	2.5	2.5	-
4x Sammelgelpuffer	-	-	2.5
30% Acrylamidlösung, 0,8% Bisacrylamid	3.3	2.5	1.2
10% SDS	0.1	0.1	0.1
10% Ammoniumpersulfat	0.05	0.05	0.05
TEMED	0.005	0.005	0.005

Tabelle 2.10.1: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels

Die in der Vakuumzentrifuge getrockneten Proben wurden in reduzierendem oder nicht-reduzierendem Probenpuffer 5 min bei 90°C denaturiert und anschließend auf das Gel geladen. Für die Elektrophorese in einer Semi Dry-Transferzelle (BioRad) in Elektrophoresepuffer wurde eine Spannung von 160 Volt für circa 1 Std. gewählt. Die Bestimmung des Molekulargewichtes der Proteine erfolgte über die Koelektrophorese des *Kaleidoscope prestained standards* Marker (BioRad).

Zusammensetzung von Proben- und Elektrophoresepuffer:

- Probenpuffer (5x): 2% SDS, 10% Glycerin, 0.04% Bromphenolblau, 62,5 mM Tris-HCl (pH6,8), 5% β-Mercaptoethanol (bei reduzierenden Probenpuffer)
- Elektrophoresepuffer (10x): 0,25 M Tris, 1,92 M Glycin, 1% SDS, (pH 8,3)

2.10.5) Coomassiefärbung von SDS-Gelen

Durch das Schütteln der SDS-Polyacrylamidgele in Coomassie Brilliant Blue G250-Lösung (50% Methanol, 12% Essigsäure, 0,04% Servablau G-250) wurden Proteinbanden blau

gefärbt. Die Entfärbungslösung (40% Methanol, 5% Essigsäure) wurde anschließend zur Klärung des Hintergrundes verwendet.

2.10.6) Silberfärbung von SDS Gelen

SDS-Polyacrylamidgele wurden für 1 Std. in Fixierlösung (50% Ethanol, 12% Essigsäure, 0,05% Formaldehyd) inkubiert, danach dreimal für 20 min in 50% Ethanol gewaschen und mit 0,2% Natriumsulfat (Na_2SO_3) vorbehandelt. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser erfolgte die Färbung mit 0,2% Silbernitrat (AgNO_3) und 0,075% Formaldehyd. Die Proteinbanden wurden nach zweimaligem Schwenken mit Wasser durch Entwicklung mit 6% Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3), 0,05% Formaldehyd, 0,04% Na_2SO_3 sichtbar. Die Reaktion wurde mit 50 % MeOH und 12% Essigsäure in Wasser abgestoppt.

2.10.7) Fluoreszenzfärbung von SDS-Gelen

SDS-Polyacrylamidgele wurden durch Schwenken in 40% EtOH, 10% Essigsäure für 1 Std. und zweimal für 1 Std. in 10% MeOH, 7% Essigsäure fixiert. Die Färbung erfolgte durch Schwenken in 100 ml 20% EtOH + 1 μl Ruthidiumfarbstoff (Eigensynthese, überlassen vom Servicelabor des ZMMK, Köln) über Nacht im Dunkeln. Zum Entfärben wurde das Gel 2x für eine Std. in 10% MeOH, 7% Essigsäure geschwenkt. Die Dokumentation wurde mit einem FLA-3000 Scanner (Fujifilm) bei 473 nm Anregungswellenlänge durchgeführt.

2.10.8) Peptide Mass Fingerprinting (PMF)

Das *Peptide Mass Fingerprinting* ist eine massenspektrometrische Technik zur Identifizierung von Proteinen über die Molekülmassen ihrer tryptischen Peptide (Griffin et al., 1995). Hierbei wird das analysierte Protein mit einer Protease (in der Regel Trypsin) in Peptide gespalten. Die erzeugten Peptide stellen ein einzigartiges Profil (den „Fingerabdruck“) für das unbekannte Protein dar. Die Molekülmassen der Peptide werden mit einem Massenspektrometer (in der Regel durch MALDI-MS) bestimmt. Die generierten Massenlisten werden, per Datenbanksuche, mit bekannten Profilen bzw. *in silico* (hierbei translatiert eine Software das bekannte Genom des Organismus in Proteine und erstellt theoretische Peptidmassen für die verwendete Protease) mit dem Genom verglichen.

Der PMF wurde wie folgt durchgeführt:

Ausschneiden/Waschen

- Bande mit Skalpell ausschneiden und in Reaktionsgefäß überführen
- 2x mit 200µl H₂O/AcN (1/1) waschen, Flüssigkeit abnehmen
- Gel mit AcN bedecken; Gel wird weiß und schrumpft; AcN abnehmen
- Gel in 100 mM NH₄HCO₃ für 5 Min. rehydrieren, anschließend gleiches Vol. AcN zugeben und 15 Min. inkubieren
- Flüssigkeit abnehmen und in Vakuumzentrifuge trocknen

Reduktion/Alkylierung

Reduktionslösung: 10 mM DTT, 100 mM NH₄HCO₃ in H₂O

Alkylierungslösung: 55 mM Iodoacetamid, 100 mM NH₄HCO₃ in H₂O

- Gel 45 Min. bei 56°C in DTTlsg. quellen lassen, anschließend auf RT abkühlen
- Lösung abnehmen, durch gleiches Vol. Iodoacetamidlsg. ersetzen und 30 Min bei RT und Dunkelheit inkubieren
- Lösung Abnehmen und wie oben waschen

In-Gel-Verdau

Reaktionspuffer A: 100 µl 50 mM NH₄HCO₃ + 2.5 µg Trypsin (Promega)

Reaktionspuffer B: wie A, ohne Trypsin

- Gel in Reaktionspuffer A 45 Min. bei 4°C rehydrieren
- Lösung abnehmen, mit Reaktionspuffer B bedecken, o/n bei 37°C inkubieren
- Überstand abnehmen (enthält hydrophile Peptide)

Extraktion der Peptide

- Gel mit 5%iger Ameisensäure in H₂O bedecken und 30 Min. auf Eis inkubieren, Überstand abnehmen (enthält säurelösliche, hydrophile Peptide)
- Gel mit 5%iger Ameisensäure in H₂O/5%iger Ameisensäure AcN (1/1 vol/vol) bedecken und 30 Min. auf Eis inkubieren, Überstand abnehmen (enthält säurelösliche, leicht-hydrophobe Peptide)
- Gel mit 5%iger Ameisensäure AcN bedecken und 30 Min. auf Eis inkubieren, Überstand abnehmen (enthält hydrophobe Peptide)
- Extrakte vereinen und in Vakuumzentrifuge trocknen

Anschließend erfolgte die Analyse per MALDI-MS wie unter 2.10.2 beschrieben

2.10.9) Chloroform/Methanol-Fällung von Proteinen

Für ein Probenvolumen von ca. 100 µl

- 400 µl MeOH zugeben & vortexen
- 100 µl CHCl₃ zugeben & vortexen
- 300 µl H₂O zugeben & vortexen
- 1 Min. bei 13000x g zentrifugieren
- obere wässrige Phase abnehmen (Proteine befinden sich an der Grenzschicht)
- 400 µl MeOH zugeben & vortexen
- 2 Min. bei 13000x g zentrifugieren
- MeOH abnehmen ohne das Pellet zu berühren
- an der Luft trocknen lassen und weiterverarbeiten

2.10.10) Ethanolfällung von Proteinen

Für ein Probenvolumen von ca. 100 µl

- 1ml -20°C absolutes EtOH zugeben
- mindestens 2-3 Std. (optional o/n) bei -20°C präzipitieren lassen
- 10 Min. bei 13.000x g, 4°C zentrifugieren, Überstand abnehmen
- zum Waschen 2x je 1 ml 70%iges, -20°C kaltes EtOH zum Pellet geben, für 5 Min. bei 13.000x g zentrifugieren, Überstand abnehmen
- Pellet an Luft trocknen lassen und weiterverarbeiten

2.10.11) Acetonfällung von Proteinen

- Zu der zu fällenden Probe min. einen 5fachen Überschuß -20°C kaltes Aceton zugeben und o/n bei -20°C präzipitieren lassen
- 30 Min. bei 13.000x g, 4°C zentrifugieren, Überstand abnehmen
- Pellet mit 200 µl -20° Aceton waschen
- 5 Min. bei 13.000x g, 4°C zentrifugieren, Überstand abnehmen
- Pellet an Luft trocknen lassen und weiterverarbeiten

3) Ergebnisse

In-vitro Strategien zur Anreicherung des Mucin-Typ O-Glykoproteoms

3.1) β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit Biotin

Protokoll 1.

Die Methode „ β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit Biotin“ wurde an Humanem Glycophorin A (HGA) im Gemisch mit Humanem Serum Albumin (HSA) getestet. Die Proteolyse mit Trypsin wurde nach Eliminierung der Glykane und Markierung mit Biotin durchgeführt. Anschließend erfolgte die Reinigung auf Streptavidin und Analyse per MALDI-MS (Protokoll 1, s. Tabelle 2.1.1).

In der MALDI-MS Analyse konnte nach Proteolyse ein Gemisch aus unmodifizierten, tryptischen HSA-Peptiden und biotinylierten, tryptischen HGA-Peptiden identifiziert werden (s. Abb. 3.1.1). Im Eluat der Streptavidinreinigung wurden zwei, mit Biotin modifizierte, tryptische HGA-Peptide identifiziert (s. Abb. 3.1.2).

Die Massen der nachgewiesenen MH^+ -Ionen können mit den theoretischen monoisotopischen (Mi) Massen tryptischer Fragmente in den Anhängen verglichen werden.

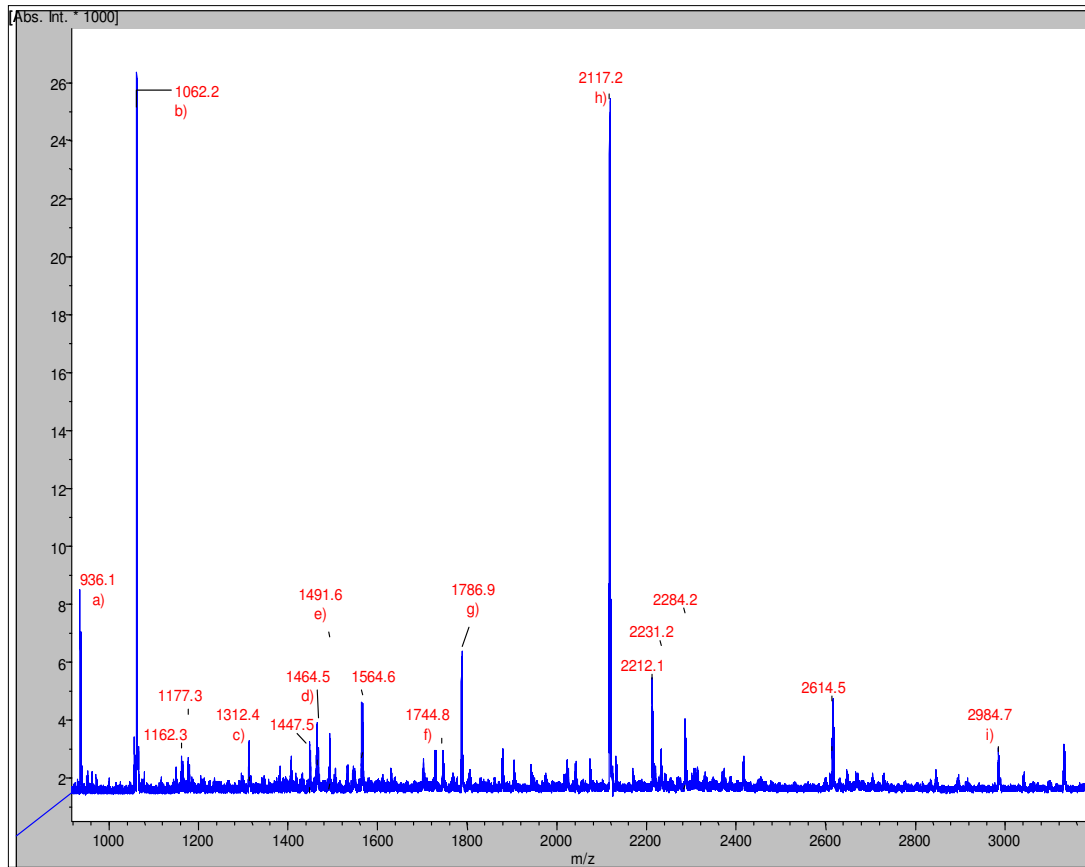


Abb. 3.1.1: HSA im Gemisch mit HGA, behandelt lt. Protokoll 1, vor Streptavidin-Reinigung. Die MH^+ -Ionen a, b, c, e, f und h lassen sich tryptischen Fragmenten von HSA zuordnen. Die mit d, g und i bezeichneten MH^+ -Ionen lassen sich biotinylierten tryptischen HGA-Fragmenten zuordnen (Listen für Massen tryptischer Fragmente s. Anhänge)

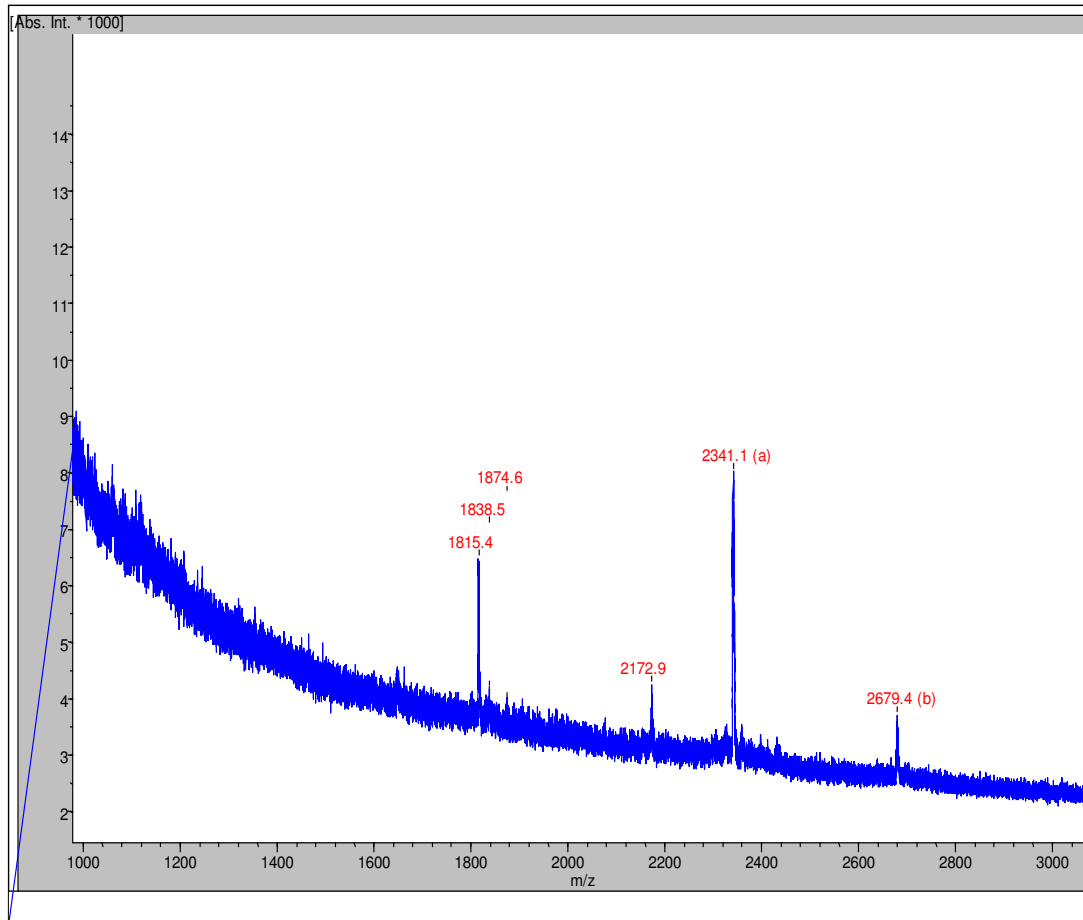


Abb. 3.1.2: HSA im Gemisch mit HGA, behandelt lt. Protokoll 1, nach Streptavidin-Reinigung. Die mit a und b bezeichneten MH^+ -Ionen lassen sich biotinylierten, tryptischen HGA-Fragmenten zuordnen

Protokoll 2.

Die Methode „ β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit Biotin“ wurde mit Humanem Glycophorin A (HGA) im Gemisch mit Humanem Serum Albumin (HSA) getestet. Die Proteolyse mit Trypsin wurde hier vor β -Eliminierung und Biotinylierung durchgeführt (Protokoll 2, s. Tabelle 2.1.1).

In der MALDI-MS Analyse konnte nach der Markierung mit Biotinamidocaprinsäure ein Gemisch von unmodifizierten, tryptischen HSA-Peptiden und biotinylierten, tryptischen HGA-Peptiden identifiziert werden (s. Abb. 3.1.3). Im Eluat der Streptavidinreinigung wurden drei, mit Biotin modifizierte, tryptische HGA-Peptide identifiziert (s. Abb. 3.1.4). Ferner wurde ein MH^+ -Ion nachgewiesen, das einem HSA-Peptid zugeordnet werden kann.

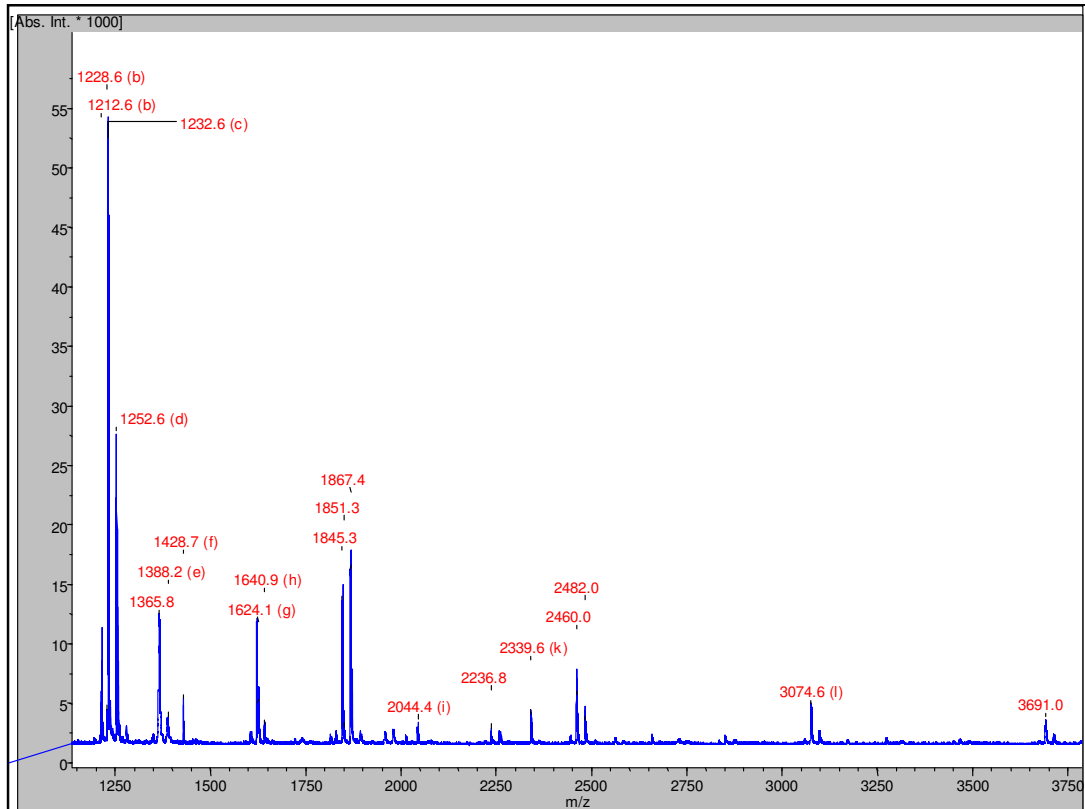


Abb. 3.1.3: HSA im Gemisch mit HGA, behandelt lt. Protokoll 2, vor Streptavidin-Reinigung. Die mit a, b, d, e, f, g, h, i und l bezeichneten MH^+ -Ionen konnten tryptischen HSA-Fragmenten zugeordnet werden. Die mit c und k bezeichneten MH^+ -Ionen lassen sich biotinylierten, tryptischen HGA-Fragmenten zuordnen.

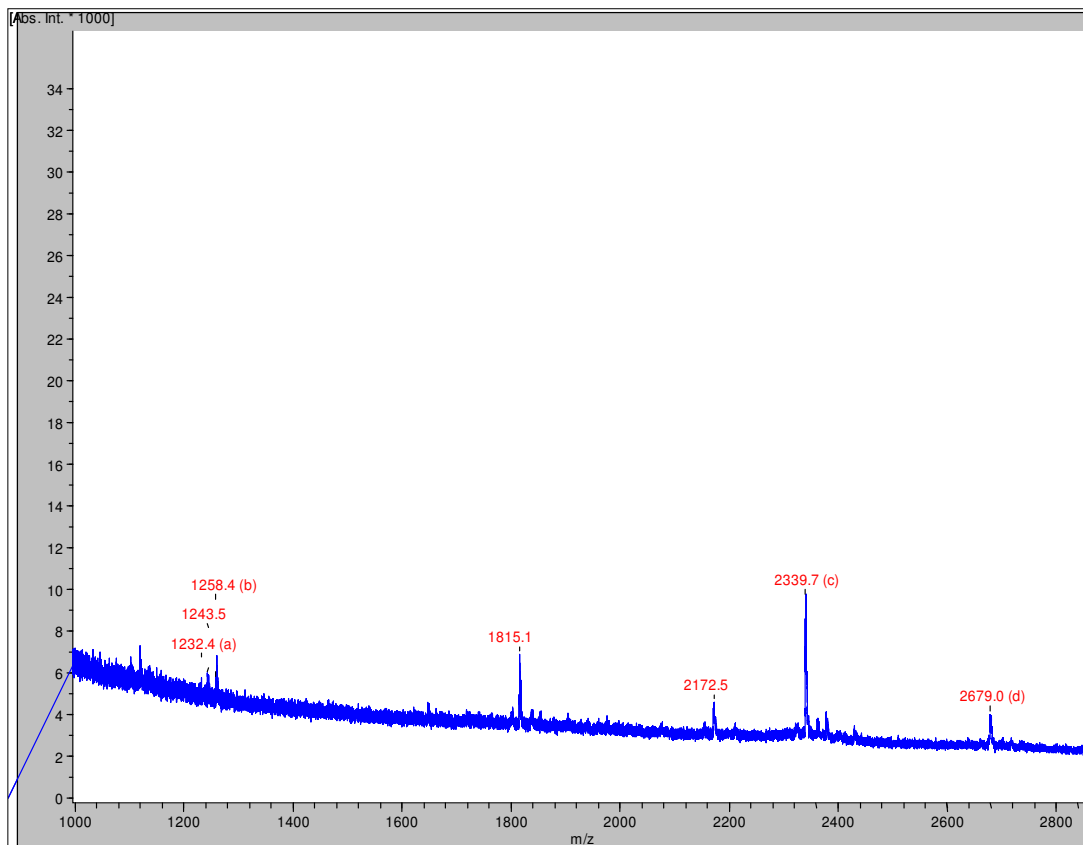


Abb. 3.1.4: HSA im Gemisch mit HGA, behandelt lt. Protokoll 2, nach Streptavidin-Reinigung. Die mit a, c und d, bezeichneten MH^+ -Ionen lassen sich biotinylierten, tryptischen HGA-Fragmenten zuordnen. Das mit b bezeichnete MH^+ -Ion weist auf ein tryptisches HSA-Peptid hin.

Anhand eines synthetischen Glykopeptids (H15) sollte nachgewiesen werden, daß die Methode „ β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit Biotin“ in der Lage ist, Glykane zu eliminieren und anstatt des Glykans die Markierung, die Biotinamidocaprinsäure ortsspezifisch in das Polypeptid einzuführen. Hierfür wurde das Peptid zunächst N-acetyliert, anschließend β -eliminiert, biotinyliert und der massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Das Peptid hatte die Struktur:



Peptid	Modifikation	Mi (Da)
H15 AHGVTSAPESRPAPGSTAPPA	- GalNAc	1958.0
H15 AHGVTSAPESRPAPGSTAPPA	/	2161.2
H15 AHGVTSAPESRPAPGSTAPPA	Ac	2203.2
H15 AHGVTSAPESRPAPGSTAPPA	Bio	2295.5
H15 AHGVTSAPESRPAPGSTAPPA	Ac, Bio	2337.5
H15 AHGVTSAPESRPAPGSTAPPA	Ac, 2x Bio	2676.0
H15 AHGVTSAPESRPAPG	- GalNAc	1433.8
H15 AHGVTSAPESRPAPG	/	1637.0
H15 AHGVTSAPESRPAPG	Ac	1475.7
H15 AHGVTSAPESRPAPG	Bio	1772.2
H15 AHGVTSAPESRPAPG	Ac, Bio	1814.2

Tabelle 3.1.1: monoisotopische Massen modifizierter Produkte des H15-Peptids.

Neben dem erwarteten acetylierten, biotinylierten Peptid wurden MH^+ -Ionen identifiziert, die einem hydrolytischen Fragment des acetylierten, biotinylierten Peptids und ferner einem acetylierten, zweifach biotinylierten Peptid zugeordnet werden konnten. Das Fragment entsteht hier durch die hydrolytische Spaltung der besonders Hydrolyseempfindlichen Gly-Ser Bindung des Peptids (monoisotopische Massen s. Tabelle 3.1.1). Das MH^+ -Ion bei $m/z = 2172.5$ Da kann nicht mit Sicherheit zugeordnet werden. Hier könnte es sich um ein zweifach biotinyliertes Hydrolyse-Fragment mit H_2O -Addition handeln (theoretische monoisotopische Masse: 2170.7 Da).

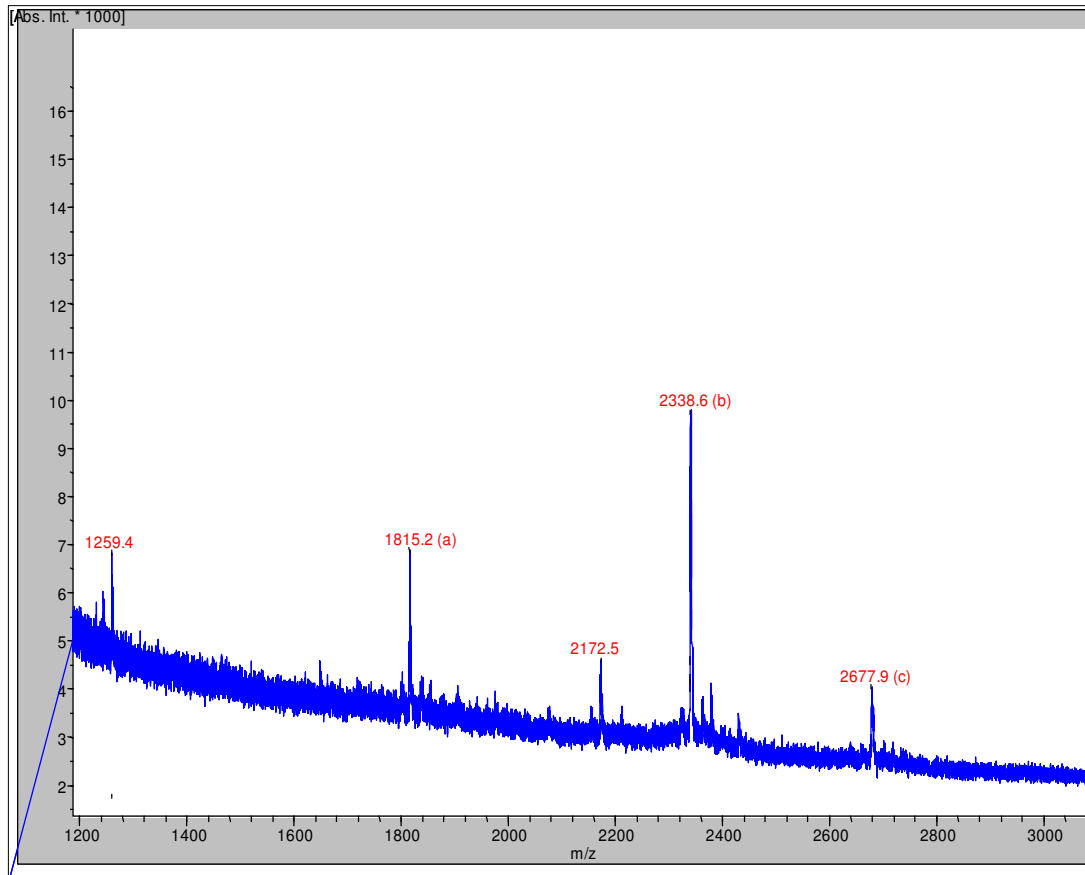


Abb. 3.1.5: H15-Peptid nach Acetylierung und Biotinylierung. Das mit a bezeichnete MH^+ -Ion kann einem acetylierten hydrolytischen Fragment mit Biotinamidocapronsäure Markierung zugeordnet werden. Das mit b bezeichnete Ion weist auf das erwartete Reaktionsprodukt, das mit c gekennzeichnete Ion auf ein zweifach Biotinamidocapronsäure-markiertes Peptid hin.

Um auszuschließen, daß Gln- bzw. Asn-Reste durch die Addition von NH_3 unter den gewählten Reaktionsbedingungen modifiziert werden, wurde das VPT21-Peptid (AS Sequenz: VPTASSRRPQRPHRVHSLTA, monoisotopische Masse = 2351.3 Da) unter gleichen Bedingungen behandelt wie in Protokoll 1. dargestellt. Die Trypsinisierung entfiel. Anschließend erfolgte die MALDI-MS Analyse.

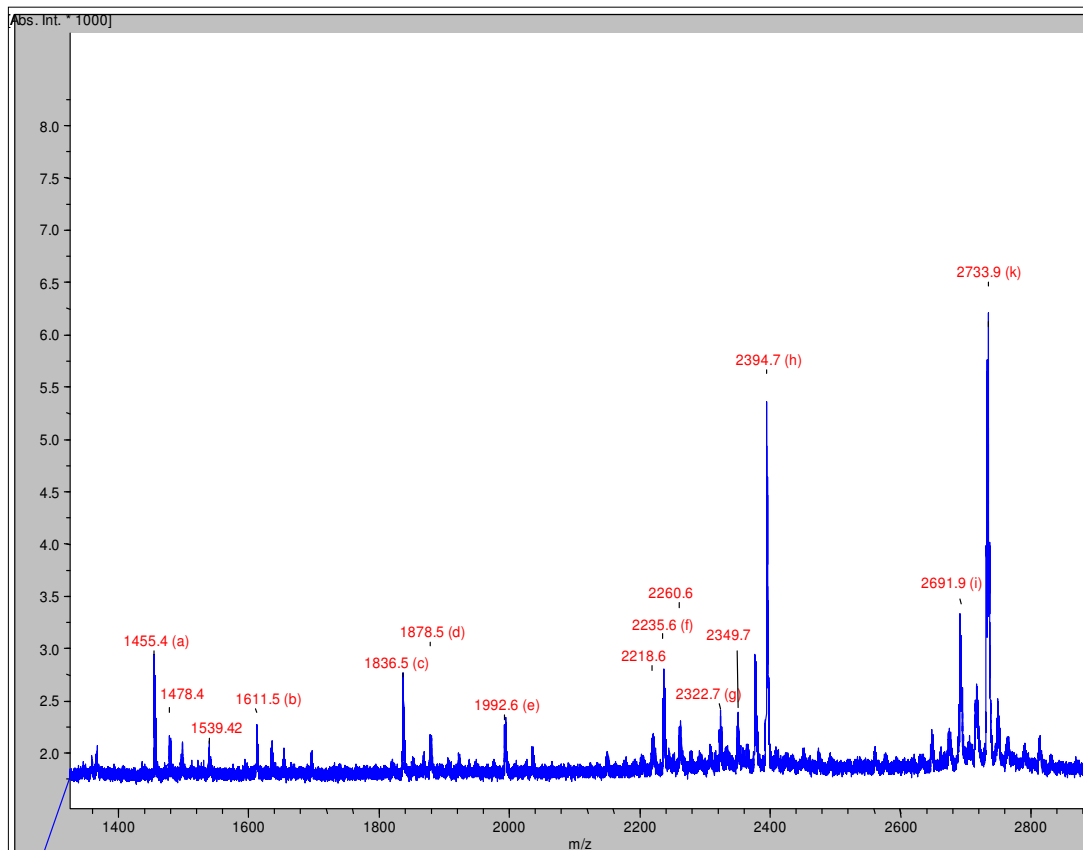


Abb. 3.1.6: VPT21-Peptid nach Acetylierung, Eliminierung und Markierung mit Biotinamidocapronsäure. Im Spektrum konnten MH^+ -Ionen für das markierte VPT21-Peptid, sowie für eine Serie von biotinylierten Degradationsprodukten des VPT21-Peptides identifiziert werden (Zuordnung s. Tabelle 3.1.2)

Die MALDI-MS Analyse der Peptidprobe (Abb. 3.1.6) zeigt MH^+ -Ionen, die Biotinamidocapronsäure-markiertem VPT21-Peptid zugeordnet werden können, sowie eine Serie von aminoterminalen Abbauprodukten des markierten Peptids (s. Tabelle 3.1.2). Das mit i bezeichnete Ion konnte dem biotinylierten, intakten Peptid, das mit k bezeichnete Ion dem acetylierten, biotinylierten Peptid zugeordnet werden. Das mit d bezeichnete Ion gehört zu einem acetylierten und biotinylierten Degradierungsprodukt, die Ionen a, b, c, e, f, g, h lassen sich biotinylierten Abbauprodukten zuordnen (s. Tabelle 3.1.2). Zwei der biotinylierten Degradationsprodukte (a und b) tragen trotz Fehlens der AS Gln eine Modifizierung mit Biotin. Dies weist auf eine Markierung der primären Aminofunktion der AS Arg hin.

Peptid (+ Modifizierung)	Fragmente	Mi (Da)
VPT21		2351.3
VPT21 + Ac		2393.3
VPT21 + Bio		2689.8
VPT21 + Ac + Bio		2731.8
VPT21 + Bio	- VPT	2392.3
	- VPTA	2321.3
	- VPTAS	2234.3
	- VPTASSR	1991.0
	- VPTASSRR	1834.8
	- VPTASSRRPQ	1609.5
	- VPTASSRRPQR	1453.4
VPT21 + Ac + Bio	- VPTASSRR	1876.8

Tabelle 3.1.2: monoisotopische Massen der Degradierungsprodukte des VPT21-Peptides und der modifizierten Produkte des VPT21-Peptides; + Ac: Acetylgruppe (+42 Da), +Bio: Biotinamidocaprinsäure (+ 338.5 Da)

Um ferner zu kontrollieren, ob Polypeptide unter den gewählten ammoniakalischen Bedingungen stabil sind, wurde das VPT21-Peptid acetyliert und wie beschrieben für 18 Std. mit NH_3 behandelt. Anschließend wurde die massenspektrometrische Analyse durch MALDI-MS durchgeführt.

Die Analyse identifizierte eine homologe Reihe von Degradierungsprodukten, ausgehend vom aminoterminalen Ende des Peptides. Die MH^+ -Ionen a, b, d, f (Abb. 3.1.7) konnten acetylierten Degradierungsprodukten zugeordnet werden. Die mit c, e, g, h, i bezeichneten MH^+ -Ionen ließen sich nicht-acetylierten Degradierungsprodukten zuordnen, das mit l bezeichnete Signal entspricht dem intakten VPT21-Peptid (monoisotopische Massen des Peptides und dessen Degradierungsprodukte s. Tabelle 3.1.3).

Peptid	Degradierung	Mi (Da)	+ Ac (Mi in Da)
VPT21		2351.3	2393.3
VPT21	- H_2O	2333.3	2375.3
VPT21	- V	2252.2	2294.2
VPT21	- VP	2155.1	2197.1
VPT21	- VPT	2053.9	2095.9
VPT21	- VPTA	1982.9	2024.9
VPT21	- VPTAS	1895.8	1937.8
VPT21	- VPTASSR	1652.5	1694.5
VPT21	- VPTASSRR	1496.3	1538.3
VPT21	- VPTASSRRPQ	1271.1	1313.1
VPT21	- VPTASSRRPQR	1114.9	1156.9
VPT21	- VPTASSRRPQRP	1017.7	1059.7
VPT21	- VPTASSRRPQRPH	880.6	922.6

Tabelle 3.1.3: Monoisotopische Massen der acetylierten und nicht-acetylierten Degradationsprodukte des VPT21-Peptides. + Ac: Acetylgruppe (+42 Da)

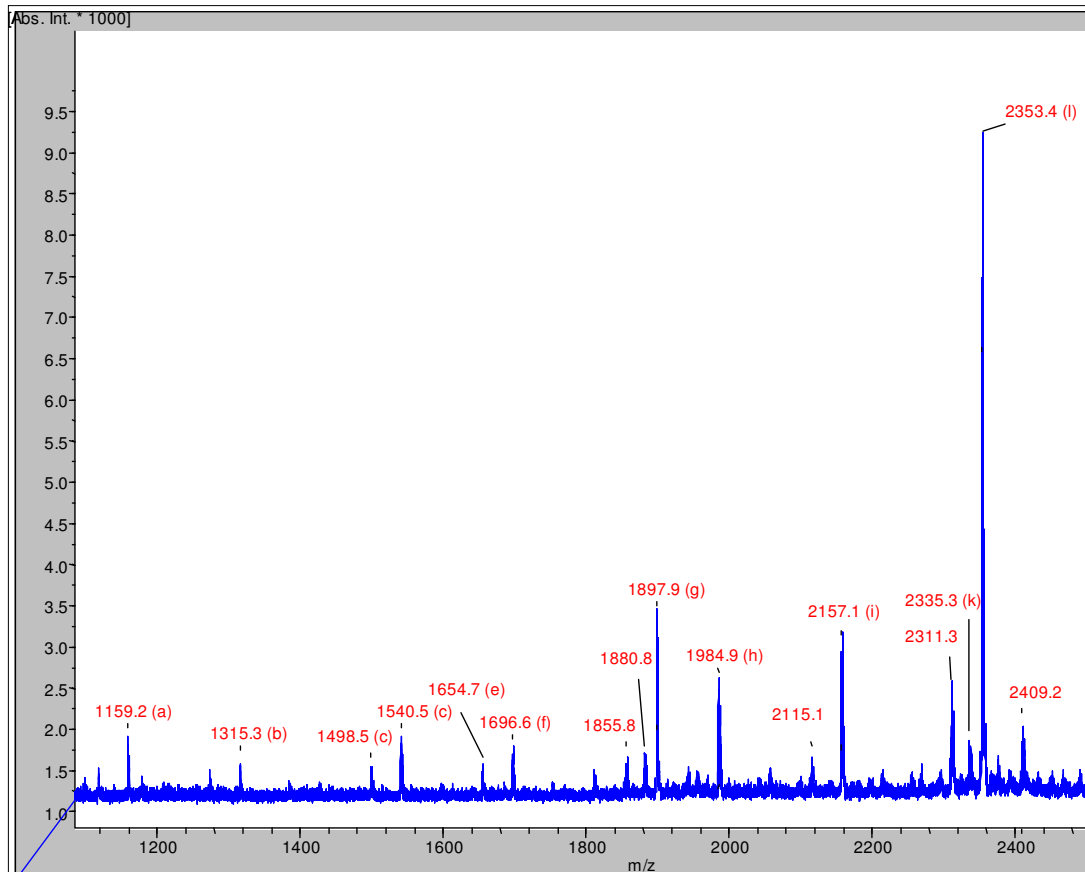


Abb. 3.1.7: VPT21-Peptid, acetyliert und mit NH_3 behandelt. Im Spektrum konnten MH^+ -Ionen für acetylierte Abbauprodukte (Signale a, b, d, f), nicht-acetylierte Abbauprodukte (Signale c, e, g, h, i) und das Ausgangspeptid zugeordnet werden. Theoretische monoisotopische Massen der Degradierungsprodukte s. Tabelle 3.1.4

3.2) β -Eliminierung von O-Glykanen mit anschließender Michael Addition von Nucleophilen – BEMAD

Zunächst sollte die Methode „ β -Eliminierung von O-Glykanen mit anschließender Michael-Addition von Nucleophilen – BEMAD“ auf die grundsätzliche Eignung hinsichtlich der Markierung glykosylierter AS geprüft werden. Das H11-Peptid (AS-Sequenz: AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA, fett = GalNAc-Glykosylierung) wurde dafür der BEMAD Prozedur unterzogen. Dabei wurde zunächst wie von Wells et al. (2002) beschrieben vorgegangen, also unter milden alkalischen Bedingungen für 2.5 Std. eliminiert und im gleichen Reaktionsansatz, über die Michael-Addition, mit DTT markiert. Der Reaktionsansatz wurde durch MALDI-MS analysiert.

In der Analyse wurde dabei ein MH^+ -Ion (Signal f) sowie dessen Na^+ -Addukt (g) identifiziert, das dem intakten, glykosylierten H11-Peptid zugeordnet wurde und ein Ion (a)

das dem deglykosylierten Peptid unter H_2O -Eliminierung entspricht. Ferner wurde ein MH^+ -Ion (d), sowie dessen Na^+ -Addukt (e), identifiziert, das dem DTT-markierten Peptid zugeordnet werden kann. Ein weiteres MH^+ -Ion (a mit $m/z=1962.9$ Da) und dessen Na^+ -Addukt (c) könnte auf das deglykosylierte und unmarkierte Peptid hinweisen. Dieses kann aber nicht mit Sicherheit zugeordnet werden, weil es deutlich von der theoretischen Masse bei durchschnittlicher Isotopenverteilung (1959.14 Da) abweicht (theoretische monoisotopische Massen s. Tabelle 3.2.1).

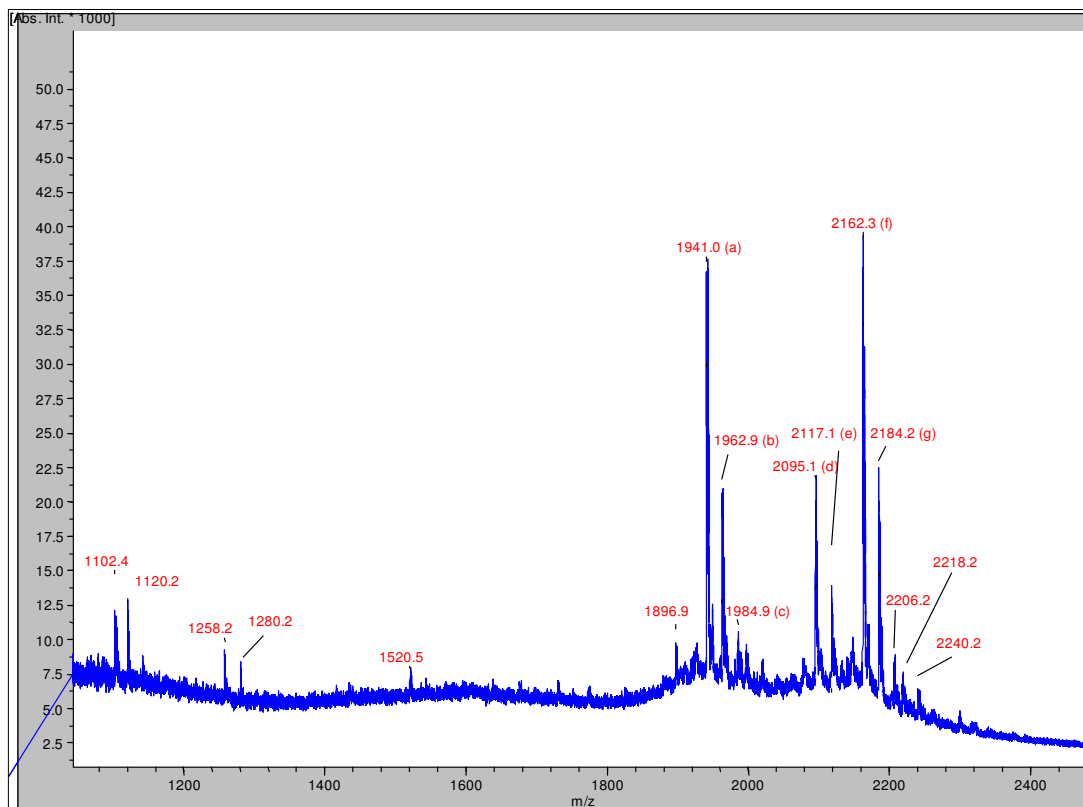


Abb. 3.2.1: H11 Peptid nach BEMAD Behandlung. Das Spektrum zeigt MH^+ -Ionen (c, d) die dem DTT-markierten Peptid und dessen Na^+ -Addukt zuzuordnen sind sowie MH^+ -Ionen (e, f) die dem intakten Peptid und dessen Na^+ -Addukt zuzuordnen sind. Ferner sind MH^+ -Ionen (a, b) zu sehen, die auf das deglykosylierte Peptid hinweisen könnten (theoretische monoisotopische Massen s. Tabelle 3.2.1).

Peptid	Da (Mi)	Na^+ -Addukt (Mi)
-GalNAc/ - H_2O	1940.0	
-GalNAc	1958.0	1980.0
-GalNAc/+ DTT	2094.2	2116.2
-GalNAc/+ 2x DTT	2230.4	2252.4
Peptid H11	2161.2	2183.2

Tabelle 3.2.1: theoretische monoisotopische Massen des intakten, DTT-markierten und deglykosylierten H11-Peptids, sowie deren Na^+ -Addukte

Um die Fraktionierung zu testen wurde die Probe nach der BEMAD-Behandlung auf aktivierter Thiolsepharose gereinigt und anschließend mit MALDI-MS analysiert.

In der Analyse des Eluats wurden die MH^+ -Ionen für das DTT-markierte H11 Peptid (a) und dessen Na^+ -Addukt (b) sowie ein MH^+ -Ion, das einem zweifach DDT markierten H11-Peptid zugeordnet werden kann, vorgefunden (s. Abb. 3.1.9).

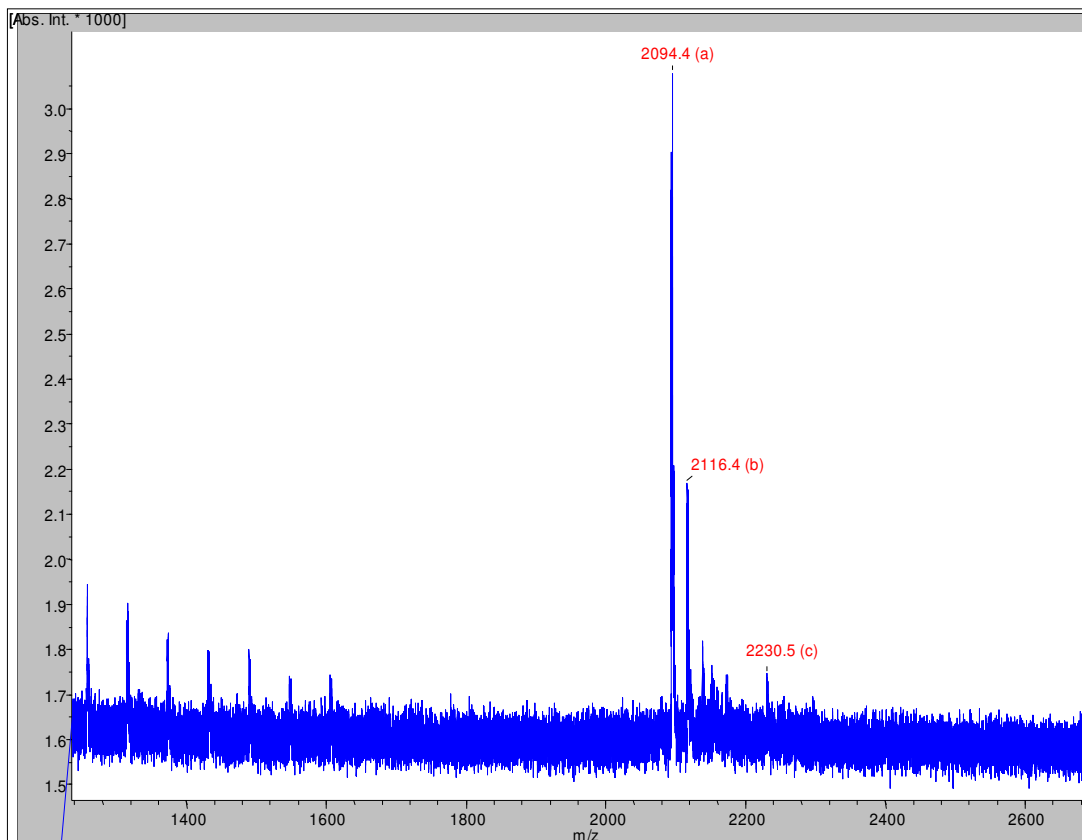


Abb. 3.2.2: H11-Peptid nach BEMAD-Behandlung und Reinigung auf Thiolsepharose. Im Spektrum wurden MH^+ -Ionen detektiert, die DTT-markiertem H11-Peptid (a), dessen Na^+ -Addukt sowie zweifach DTT-markiertem H11 Peptid (c) zugeordnet werden konnten (theoretische monoisotopische Massen s. Tabelle 3.2.1).

Um zu überprüfen, ob durch die BEMAD Behandlung unglykosylierte Ser/Thr durch Wasser-Eliminierung in Dehydro-Derivate überführt und dadurch unspezifische DTT-Markierungen eingeführt werden, wurde die Prozedur am unglykosylierten VPT21-Peptid ohne DTT (AS Sequenz: VPTASSRRPQRPHRVHSLTA, monoisotopische Masse = 2351.3 Da) durchgeführt. Das Peptid wurde für je 1 Std., 2 Std. und 4 Std. inkubiert und die Reaktion mit TFA (Endkonz. 1%) abgestoppt. Nach der BEMAD-Behandlung erfolgte eine C_{18} -ZipTip Reinigung und die Analyse per MALDI-MS.

In allen Spektren sind MH^+ -Ionen präsent, die auf das intakte VPT21-Peptid (c) hinweisen, sowie MH^+ -Ionen, die einem Peptid zugeordnet werden können, bei dem eine zweifache

Eliminierung von Wasser stattgefunden hat (a) (monoisotopische Massen s. Tabelle 3.1.6), sowie dessen Na^+ -Addukt (b). Hierbei zeigt sich die Tendenz, daß das Verhältnis der Intensitäten zwischen Eliminierungsprodukt-Ionen zu intaktem Peptid über die Zeit ansteigt (s. Tabelle 3.2.1). Dies deutet darauf hin, daß die unspezifische Eliminierung von Wasser aus Hydroxyaminosäuren unter den gewählten Bedingungen mit fortschreitender Zeit zunimmt.

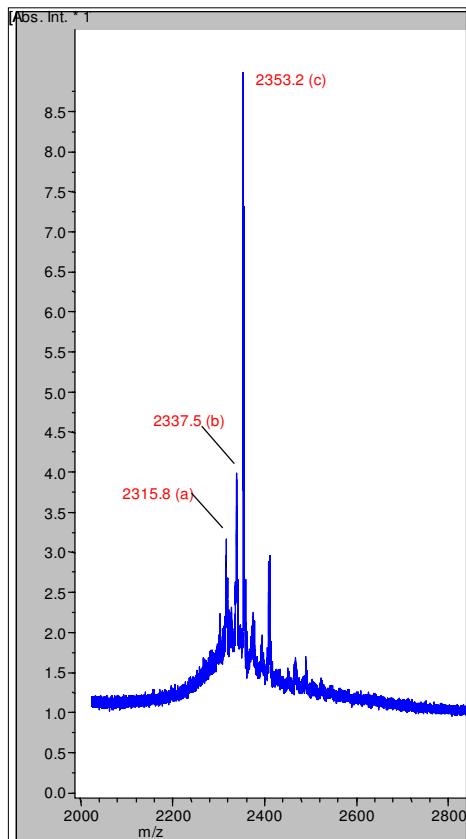


Abb. 3.2.3: VPT21-Peptid nach einstündiger BEMAD-Behandlung

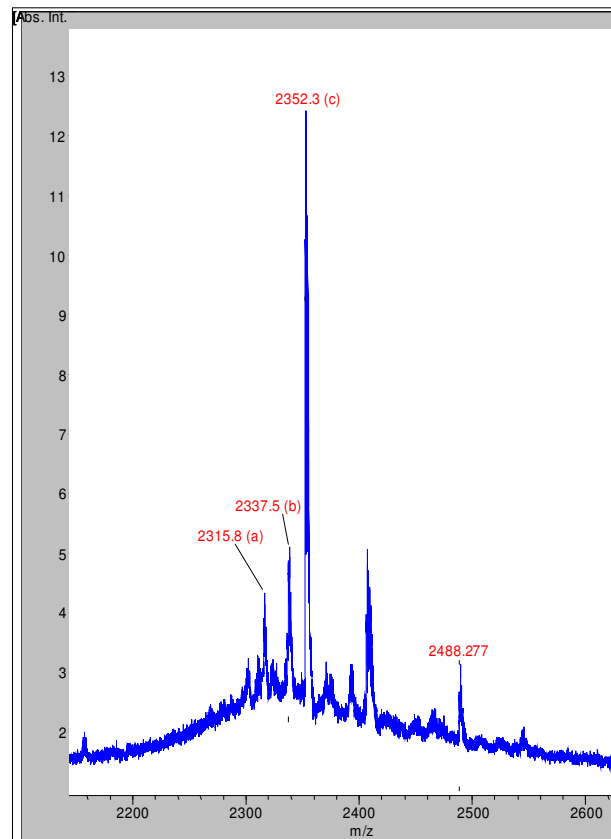


Abb. 3.2.4: VPT21-Peptid nach zweistündiger BEMAD-Behandlung

Abb. 3.2.3-3.2.5: VPT21-Peptid nach BEMAD-Behandlung und ZipTip Reinigung.

Abb. 3.2.3: einstündige Inkubation

Abb. 3.2.4: zweistündige Inkubation

Abb. 3.2.5: (nächste Seite) vierstündige Inkubation.

In allen Spektren wurden MH^+ -Ionen identifiziert, die dem intakten VPT21-Peptid (c), dem VPT21-Peptid nach zweifacher H_2O -Eliminierung (a) sowie dessen Na^+ -Addukt (b) zugeordnet werden können.

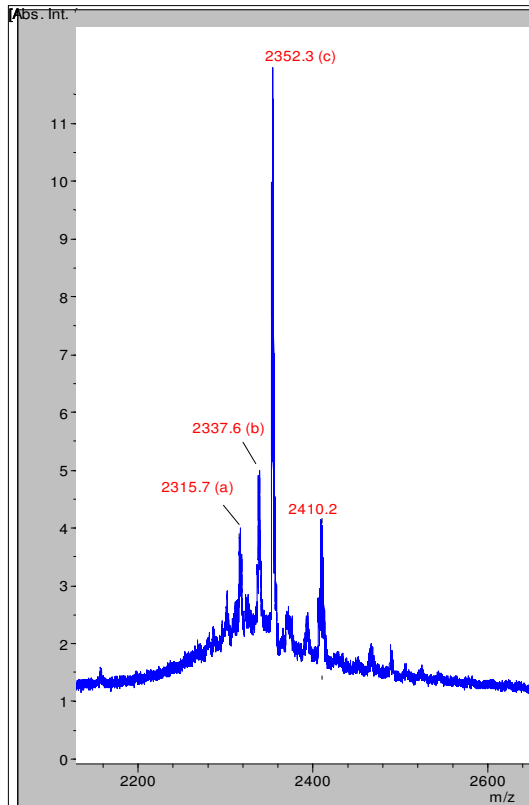


Abb. 3.2.5: VPT21-Peptid nach vierstündiger BEMAD-Behandlung

Peptid	Reaktion	Mi (Da)	Na ⁺ Addukt (Da)
VPT21	/	2352.3	2374.3
VPT21	- H ₂ O (18 Da)	2334.3	2356.3
VPT21	- 2x H ₂ O (18 Da)	2316.3	2338.3

Tabelle 3.2.2:
Monoisotopische Massen des VPT21-Peptides und Eliminierungsprodukte

	Intensität bei subtrahierter Grundlinie		
	1 Std.	2 Std.	4 Std.
m/z= 2315 Da	1069	937	1321
m/z= 2337 Da	351	263	2574
m/z= 2352 Da	7186	6627	6880

Tabelle 3.2.3: Intensitäten von Signalen des intakten VPT21-Peptids und Eliminierungsprodukt-Signalen in MALDI-MS Spektren zu verschiedenen Zeitpunkten. Angegeben sind die Intensitäten bei subtrahierter Grundlinie.

	Verhältnis 2315 Da/2353 Da	Verhältnis 2337 Da/2353 Da
	1 Std.	0.15
2 Std.	0.14	0.04
4 Std.	0.19	0.37

Tabelle 3.2.4: Verhältnis der Intensitäten von Eliminierungsprodukt-Signalen zum Signal des intakten VPT21-Peptids

Ferner sollte ein Experiment an einer Peptid/Glykopeptid Mischung zeigen, ob eine Eliminierung, bei der NaOH verwendet wird, zu unspezifischen Dehydratationen von Hydroxy-AS führt und damit zu falsch-positiven Markierungen.

Verwendet wurden das Glykopeptid H13 (AS Sequenz: AHGVT SAPDTRPAPGSTAPPA, monoisotopische Masse: 2161.2 Da) und das Peptid TAP25 (AS Sequenz: TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA, monoisotopische Masse: 2324.2 Da). Zur Eliminierung wurde 10 mM NaOH eingesetzt und die Probe bei 50°C für 16 Std. inkubiert. Nach C₁₈-ZipTip Reinigung erfolgte die Analyse durch MALDI-MS.

Bei der Analyse wurden MH⁺-Ionen identifiziert, die sich dem glykosylierten, intakten H13-Peptid (Signal g), dem intakten TAP25-Peptid (i) und deren dehydrations-Derivaten (H13: Signal f, TAP25: Signal h) zuordnen ließen. Ferner wurden ein MH⁺-Ion einem deglykosylierten, hydrolytischen H13-Fragment (Signal b), und mehrere andere MH⁺-Ionen deglykosylierten und dehydratisierten Hydrolysefragmenten des H13-Peptids zugeordnet (Signale a, c, d, e und f; theoretische monoisotopische Massen der Peptide s. Tabellen 3.2.6 und 3.2.7).

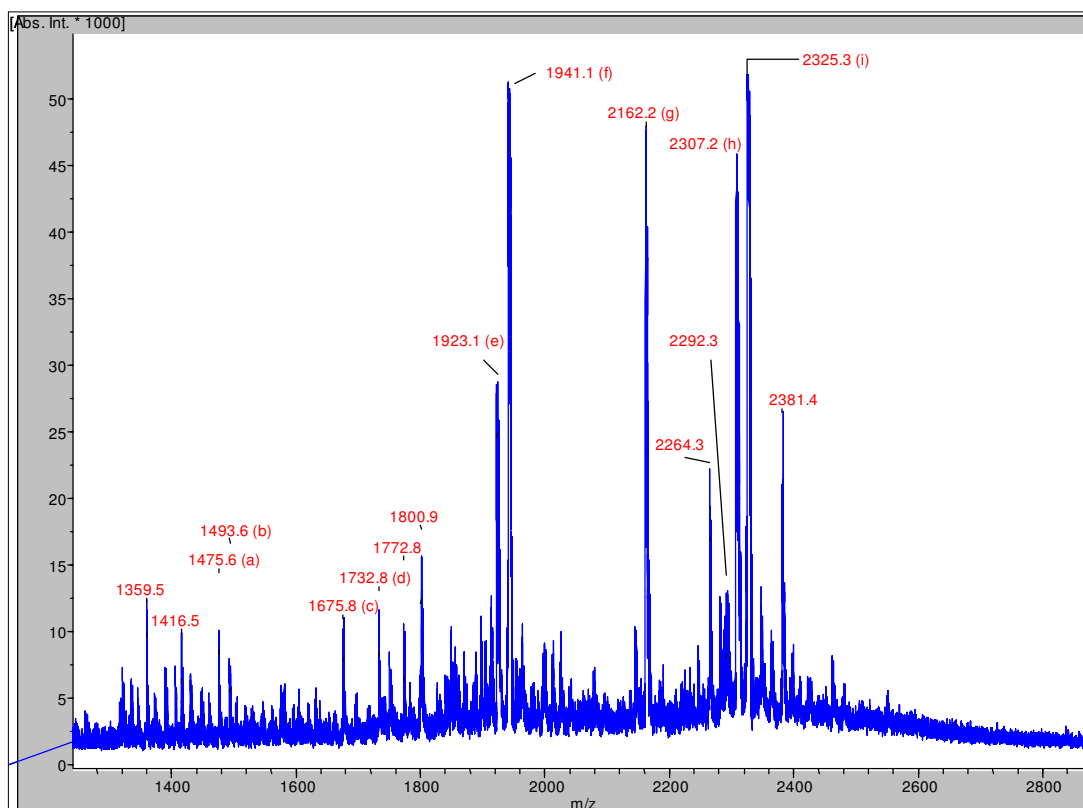


Abb. 3.2.6: Spektrum NaOH-behandelter Peptide H13 und TAP25. MH⁺-Ionen a, c, d und f können deglykosylierten, dehydratisierten Hydrolysefragmenten des H13-Peptids zugeordnet werden. Signal e, f und h lassen sich Eliminierungs-/Dehydrationsprodukten der intakten Peptide H13 (g) und TAP25 (i) zuordnen. Signal b gehört zu einem hydrolytischen H13-Fragment (monoisotopische Massen der Peptide und deren Umsetzungsprodukte s. Tabelle 3.2.6 und 3.2.7).

Peptid	Mi (Da)	Mi (Da) - H ₂ O	Peptid	Mi (Da)
H13	2161.2	/	TAP25	2324.2
- GalNAc	1958.0	/	- H ₂ O	2306.2
- GalNAc, - H ₂ O	1940.0	/	- 2x H ₂ O	2288.2
- GalNAc, - 2x H ₂ O	1922.0	/		
AHGVTSAPDTRPAPGSTAPP	1886.9	1868.9		
AHGVTSAPDTRPAPGSTAP	1749.7	1731.7		
AHGVTSAPDTRPAPGSTA	1692.7	1674.7		
AHGVTSAPDTRPAPGST	1593.6	1575.6		
AHGVTSAPDTRPAPGS	1492.4	1474.4		

Tabelle 3.2.6: Monoisotopische Massen des H13-Peptids und der Eliminierungs-/Dehydrationsprodukte

Tabelle 3.2.7: Monoisotopische Massen des TAP25-Peptids und dessen Dehydrationsprodukte

3.3) Identifizierung von selektiv oxidierten O-Glykoproteinen durch kovalente Chromatographie auf Hydrazid-Harzen und Massenspektrometrie

Um zu zeigen, daß die adaptierte Methode prinzipiell für die Analyse O-glykosylierter Polypeptide anwendbar ist, wurden zunächst Experimente mit synthetischen, O-glykosylierten Peptiden durchgeführt.

Hierfür wurde das synthetische Glykopeptid A5 (Sequenz: AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA, fett: Gal-GalNAc Disaccharid, Mi 2323.3 Da), im Gemisch mit dem Peptid AHG-ES/A (Sequenz: AHGVTSAPESRPAPGSTAPPA, Mi: 1931.9 Da), wie beschrieben oxidiert und an Hydrazidharz gekoppelt. Nach dem Waschen des Harzes erfolgte die Elution mit TFA bei 80°C für eine Stunde, die Reinigung der Probe und Waschfraktionen über C₁₈-ZipTip und die Analyse per MALDI-MS.

In der MALDI-MS-Analyse läßt sich im Ausgangsmaterial (Abb. 3.3.1) ein leichter Überschuß des unglykosylierten AHG-Peptids erkennen, was auch bei der oxidierten Fraktion (Abb. 3.3.2) zu sehen ist. Im Kopplungsüberstand (Abb. 3.3.3) ist anhand der Signalthöhe ein mindestens 10facher Überschuß des AHG-Peptids gegenüber dem glykosylierten Peptid zu erkennen. Das A5-Peptid zeigt hier ein Signal bei 2160.9 Da, was auf den Verlust der terminalen Galaktose und damit einhergehender Freisetzung des Peptids vom Hydrazidharz hindeutet. Im Eluat tritt das A5-Peptid in einem ca. 4-fachen Überschuß gegenüber dem AHG Peptid auf. Das Vorkommen des AHG-Peptids im Eluat, trotz extensiven Waschens, weist auf eine unspezifische Bindung an das Hydrazidharz hin.

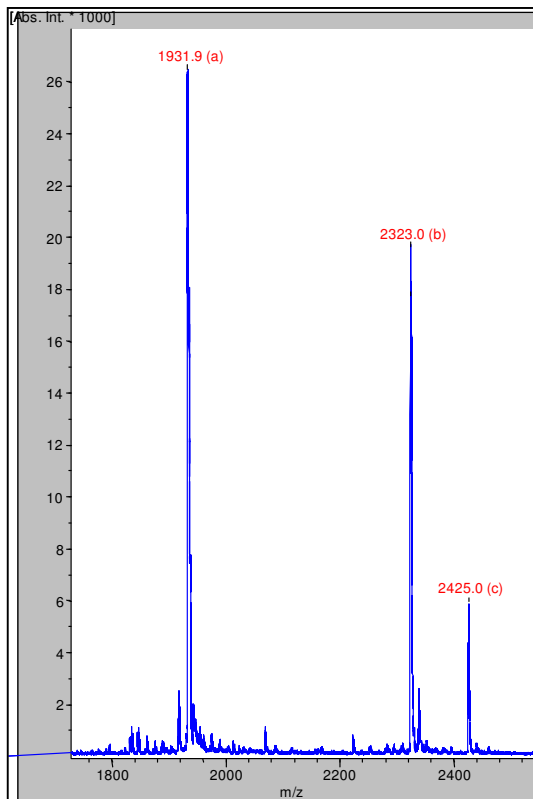


Abb. 3.3.1: Im Startmaterial sind das AHG-Peptid (a, 1931.9 Da) und das intakte A5-Peptid (b, 2323.0 Da) zu sehen. Das A5-Peptid liegt mit einer Heterogenität, einem zusätzlichen Thr (c +101 Da) vor.

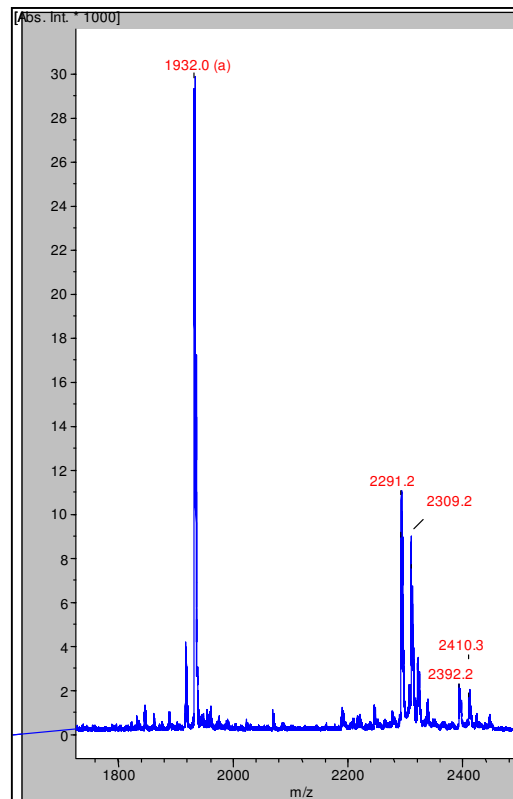


Abb. 3.3.2: AHG- und A5-Peptid nach Oxidation. Das AHG-Peptid (a) liegt weiterhin intakt vor, die Peaks bei 2291.2, 2309.2, 2410.3 und 2392.2 Da sind dem oxidierten A5-Peptid zuzuordnen.

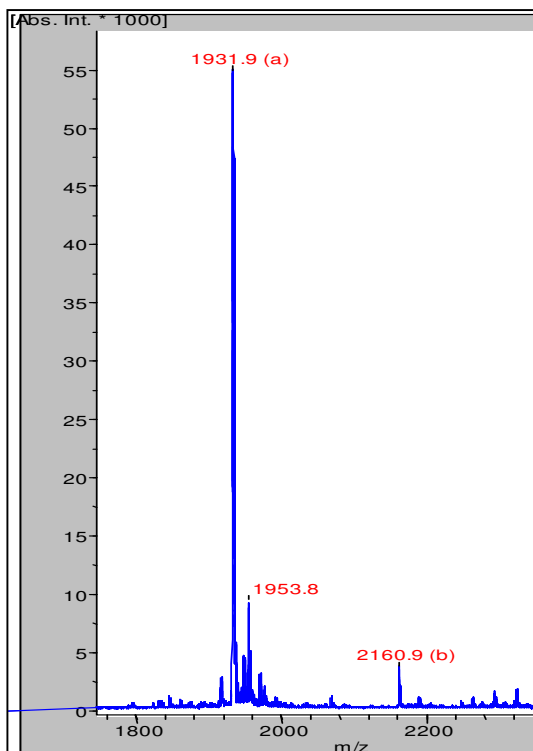


Abb. 3.3.3: Im Überstand der Kopplungsreaktion liegt das AHG-Peptid (a), ersichtlich anhand der Peakhöhe, in einem mehr als 10fachen Überschuß vor verglichen mit dem A5-Peptid (b). Das A5-Peptid wird durch die hydrolytische Abspaltung der terminalen Galaktose freigesetzt.

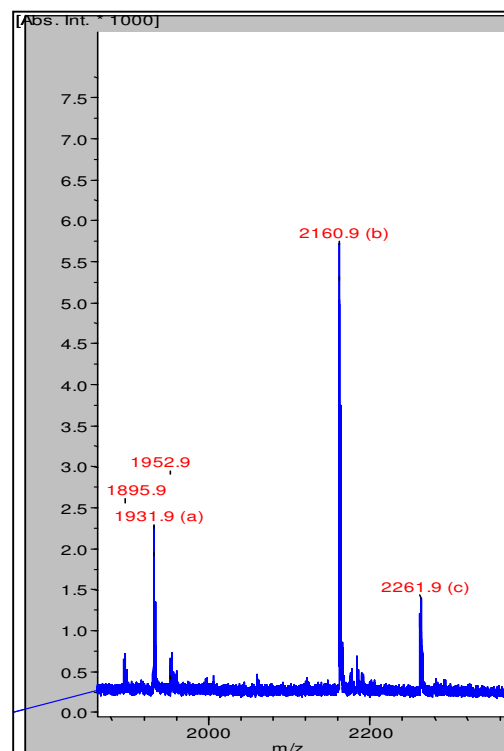


Abb. 3.3.4: Im Eluat sind das A5- (b und c) und das AHG-Peptid (a) detekrierbar. Das auftreten des AHG-Peptids, trotz extensiven Waschens, weist auf eine unspezifische Bindung an das Hydrazidharz hin.

Kopplung von Glykopeptiden über Sialinsäuren

Weil unklar war, ob Sialinsäuren nach Periodat Oxidation Aldehyde bilden, die eine quantitative Kopplung an das Hydrazidharz gewährleisten wurde ein heterogen sialyliertes Glykopeptid oxidiert, gekoppelt, eluiert und per MALDI-MS analysiert. Das A14ST-Peptid ist mit zwei Gal-GalNAc-Resten diglykosyliert und liegt in einer Disialo- (3271 Da), einer Monosialo- (2980 Da) und einer Asialoform (2689 Da) vor.

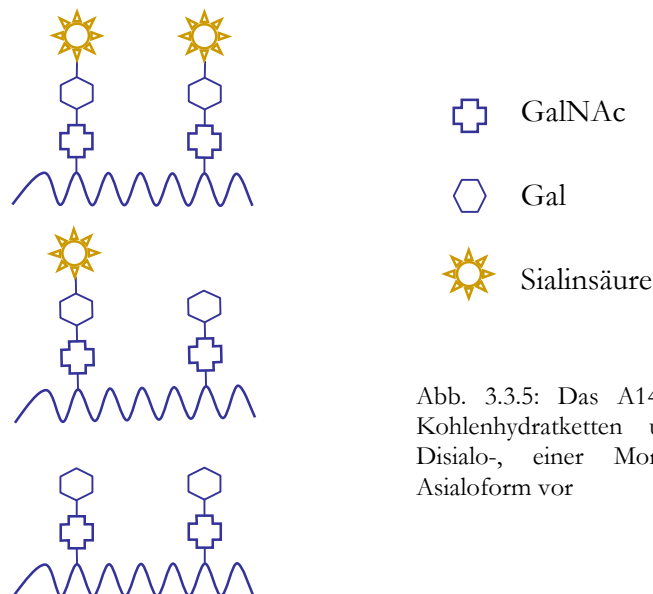


Abb. 3.3.5: Das A14ST-Peptid trägt zwei Kohlenhydratketten und liegt in einer Disialo-, einer Monosialo- und einer Asialoform vor

Die Analyse per MALDI-MS identifiziert alle drei Formen im Ausgangsmaterial (s. Abb. 3.3.6). Der Überstand der Kopplungsreaktion (Abb. 3.3.7) zeigt ein prominentes Signal bei 3145.7 Da. Dieses Molekulargewicht ergibt sich bei einem Verlust von $2 \times \text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ aus dem disialylierten Peptid, was auf die Entstehung eines Oxidationsproduktes hinweist, welches nicht im Modus über die Entstehung der Hydrazonbindung gekoppelt wird. Das Eluat (Abb. 3.3.8) liefert Peptidsignale bei 2364.6 Da, 2525.6 Da und 2687.6 Da. Der Peak bei 2364.6 Da entspricht dem A14ST-Peptid mit zwei gebundenen GalNAc-Gruppen. Dieses Produkt entsteht bei der Hydrolyse zweier terminaler Gal-Reste, was auf die korrekte Bindung und Elution der vormals unsialylierten Form des Peptides hinweist. Das Signal bei 2525.6 Da entspricht dem A14ST-Peptid mit einem Gal-GalNAc Glykan und einem GalNAc Zucker. Dieses Produkt entsteht bei der Hydrolyse der terminalen Sialinsäure einer Glykankette und der terminalen Gal in der anderen Glykankette des Peptids, was die vollständige Bindung und Elution der monosialylierten Form belegt. Der Peak bei 2687.6 Da entspricht dem A14ST-Peptid mit zwei gebundenen Gal-GalNAc Glykanen. Dieses Produkt entsteht bei der Hydrolyse zweier terminaler Sialinsäuren, was eine Bindung und Elution der disialylierten Form des Peptides belegt.

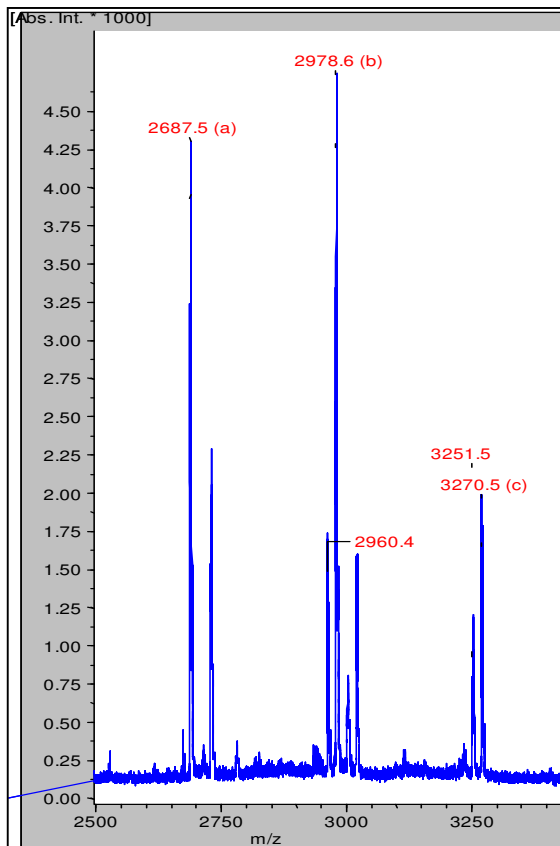


Abb. 3.3.6: Das A14ST Peptid liegt in einer asialo- (a, 2687.5 Da), einer monosialo- (b, 2978.6 Da) und einer Disialoform (c, 3270.5 Da) vor.

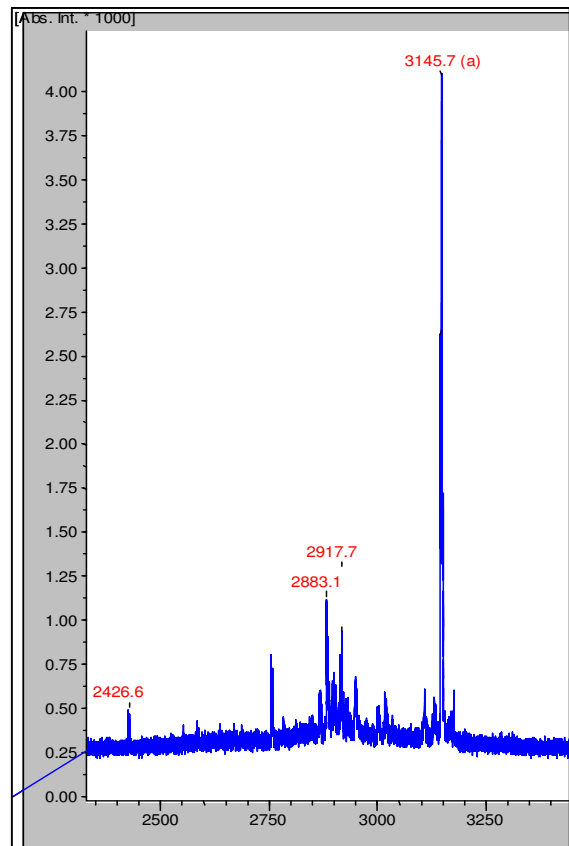


Abb. 3.3.7: Überstand der Kopplungsreaktion. Das Signal bei 3145.7 Da (a) weist auf eine Disialovariante des Peptids mit einem Verlust von $2x C_2H_6O_2$ hin. Dieses Oxidationsprodukt ist nicht in der Lage die Hydrazonbindung auszubilden und an das Harz zu binden.

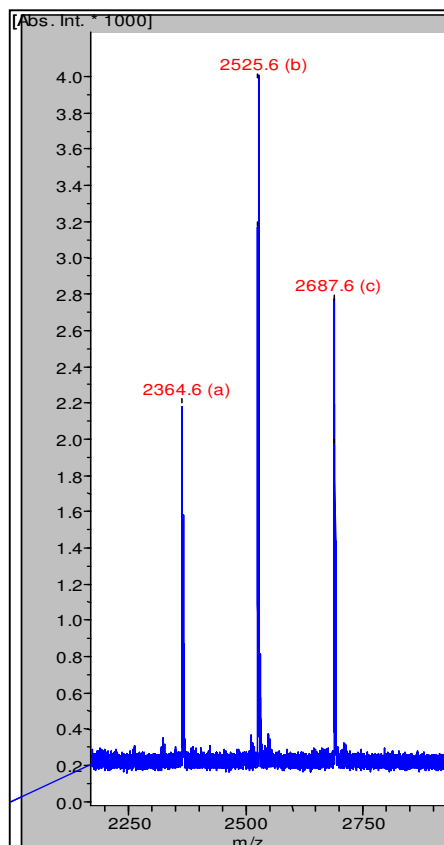


Abb. 3.3.8: Im Eluat sind Peaks bei 2364.6 Da (a), 2525.6 Da (b) und 2687.6 Da (c) zu erkennen. Signal a weist auf das A14ST-Peptid mit zwei GalNAc Resten hin, Signal b auf eines mit einem Gal-GalNAc Zucker und c auf ein Peptid mit zwei Gal-GalNAc Resten.

Frühzeitige Freisetzung des Analyts durch Hydrolyse des terminalen Kohlenhydrats

In mehreren Experimenten wurde vor der Elution eine vorzeitige Freisetzung des Analyts, unter Hydrolyse der terminalen Kohlenhydrats beobachtet. Ein Experiment sollte deswegen klären, in welchem Ausmaß dies geschieht.

Hierzu wurden 10 µg des Peptids A3M1 (Sequenz: AHGVTSAPESRPAPGSTAPPA, fett: Gal-GalNAc Glykan), welches ein Gal-GalNAc Disaccharid trägt, oxidiert und zu einer katalytischen Menge ($\leq 5 \mu\text{l}$) des Hydrazidharzes (Sigma) gegeben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots aus dem Ansatz entnommen, gereinigt und per MALDI-TOF-MS analysiert. Mit Hilfe der Spektren wurde anhand des Verhältnisses der Peakintensitäten bei 2161 Da (Hydrolyseprodukt) und 2307 Da (Haupt-Oxidationsprodukt) der zeitliche Verlauf der Hydrolyse dokumentiert.

Bei der Analyse wird ersichtlich, daß das Verhältnis der Peakhöhe 2160 Da/2307 Da über die Zeit ansteigt (s. Abb. 3.3.9 – 3.3.13 und Tabelle 3.3.1). Dies weist auf einen Hydrolysemechanismus bedingt durch die Einwirkung des Harzes hin.

I 2307	I 2160	Zeitpunkt	I 2160/I 2307
3512.37	148.18	t0	0.0422
12737.01	536.81	t15	0.0422
2685.97	150.19	t30	0.0559
12757.12	1027.12	t60	0.0805
11217.66	1286.22	t120	0.1147
12448.24	6597.89	o/n	0.5300

Tabelle 3.3.1: Intensitäten der Peaks bei 2160 Da und 2307 Da in willkürlich gewählten Einheiten zu angegebenen Zeitpunkten und Verhältnis der Intensitäten bei 2160 Da zu 2307 Da

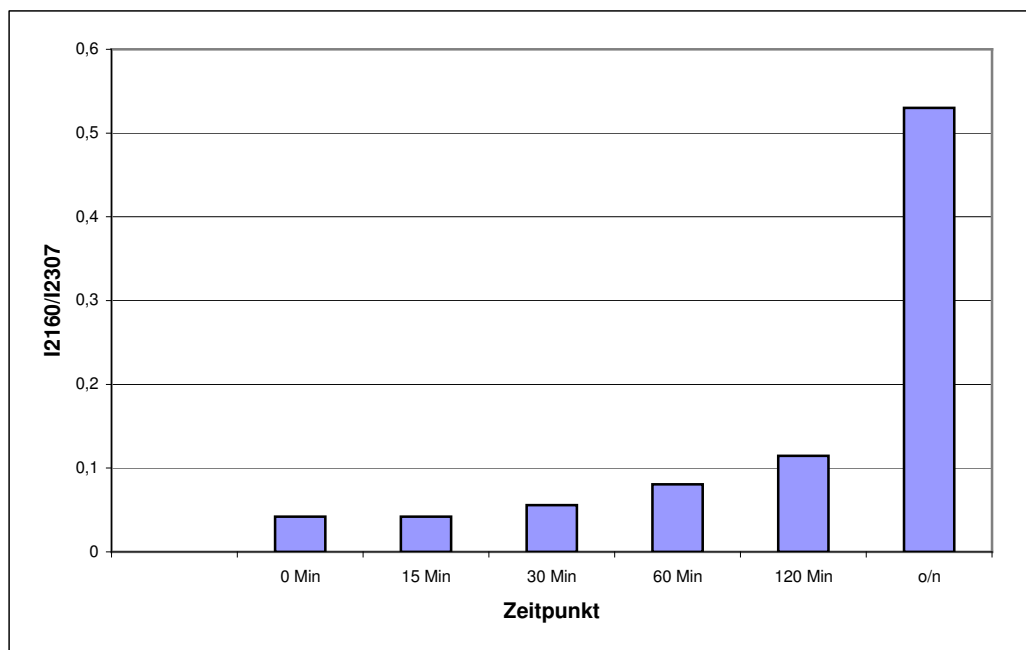


Abb. 3.3.9: Zeitlicher Verlauf der Hydrolyse der terminalen Galaktose durch die Einwirkung des Hydrazidharzes. Auf der Ordinate ist das Verhältnis der Signalintensitäten bei 2160 Da zu 2307 Da angegeben, auf der Abszisse der Zeitpunkt der Aliquotentnahme.

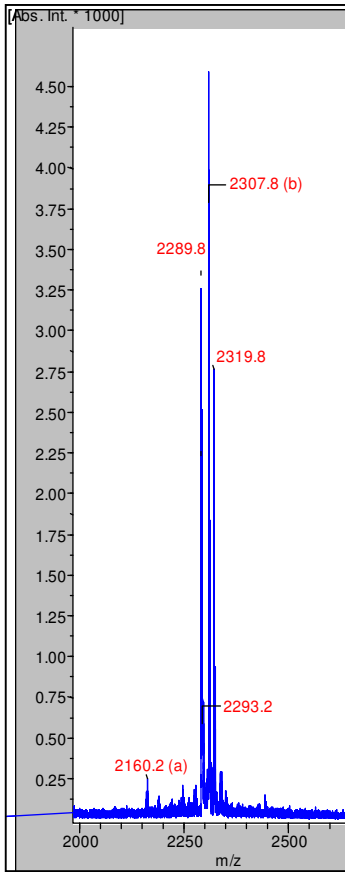


Abb. 3.3.10: t = 0 Min.

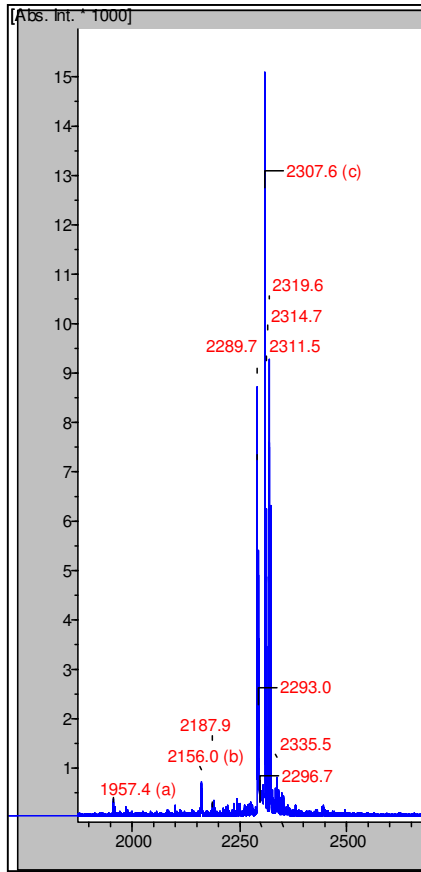


Abb. 3.3.11: t = 15 Min.

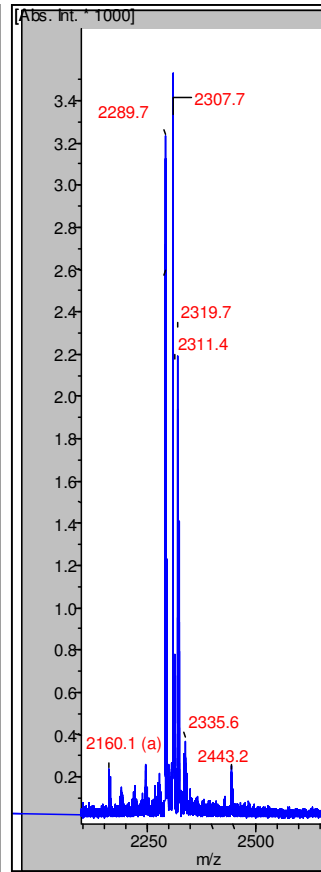


Abb. 3.3.12: t = 30 Min.

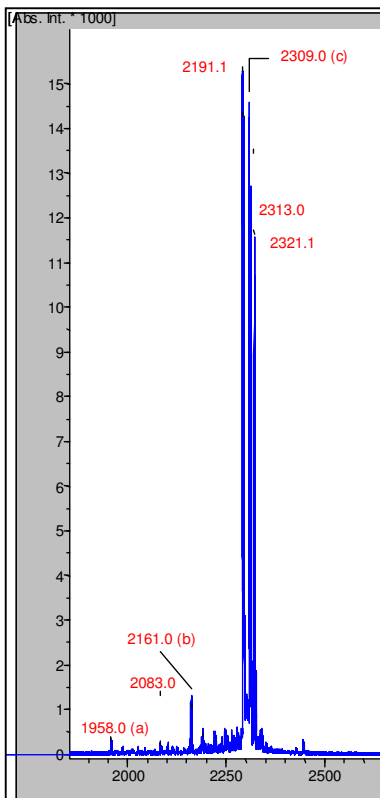


Abb. 3.3.13: t = 60 Min.

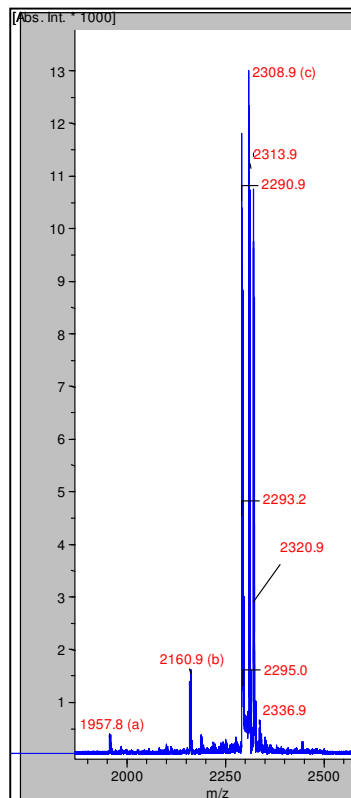


Abb. 3.3.14 t = 120 Min.

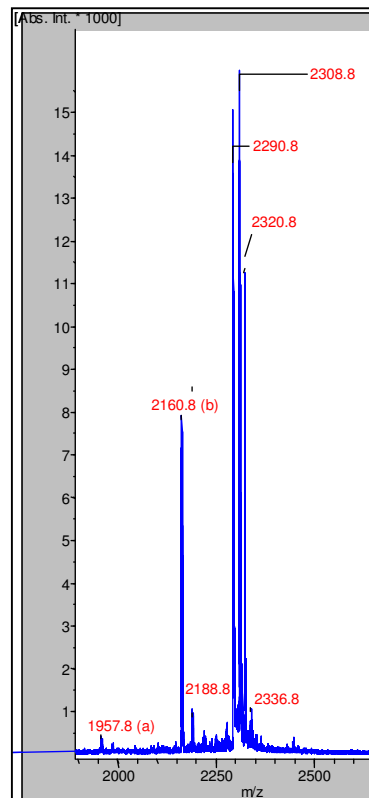


Abb. 3.3.15 t = o/n

Anwendung auf Proteinproben – Variante 1.

Das Experiment wurde an HGA durchgeführt. Die Versuchsanordnung orientierte sich an der von Zhang et al. (2003) publizierten zur Analyse N-glykosylierter Proteine. Dazu wurden 20 µg HGA oxidiert. Nach Dotierung mit 5 µg des A5-Peptids wurde die Probe oxidiert und an Hydrazidharz gekoppelt. Das Auswaschen ungebundener Proteine erfolgte mit 8 M Harnstoff. Nach Äquilibration auf 100 mM NH₄HCO₃ erfolgten Trypsinisierung, Waschschrte und Elution mit TFA bei 80°C, 1 Std. Die Probe wurde durch MALDI-MS analysiert.

Im MALDI-MS-Spektrum der Trypsinbehandlung konnten zwei MH⁺-Ionen glykosylierten proteolytischen Fragmenten von HGA zugeordnet werden. Desweiteren wurden in Spektren der Waschschrte (nicht abgebildet) weitere MH⁺-Ionen einem unglykosylierten HGA-Fragment und weiteren glykosylierten tryptischen HGA-Fragmenten zugeordnet (s. Tabelle 3.3.2). Das Auftreten glykosylierter HGA-Peptide weist auf eine nicht-quantitative Bindung oxidierter Glykoproteine hin bzw. auf eine vorzeitige Freisetzung durch Hydrolyse.

Im MALDI-MS Spektrum des Eluats und der nachfolgenden Waschschrte (Spektren nicht abgebildet) konnten MH⁺-Ionen mehreren glykosylierten HGA-Peptiden zugeordnet werden. In den MALDI-MS-Analysen der Waschschrte wurden weitere MH⁺-Ionen identifiziert, die einem unglykosylierten und mehreren glykosylierten, tryptischen HGA-Fragmenten zugeordnet wurden.

tryptisches HGA Peptid	MH ⁺ -Ion m/z	Glykosylierung
31-39	1050.8	
32-39	1097.9	GalNAc
32-39	1300.2	2x GalNAc
40-49	1333.9	GalNAc
40-49	1491.2	Gal-GalNAc
19-31	1538.4	
31-39	1620.2	1x Gal-GalNAc, 1x GalNAc
40-49	1697.1	1x Gal-GalNAc, 1x GalNAc
31-39	1779.2	2x Gal-GalNAc
19-31	1942.4	2x GalNAc
19-31	2145.7	3x GalNAc
1-18	2177.7	2x GalNAc

Tabelle 3.3.2: Die Tabelle zeigt, welche MH⁺-Ionen aus den abgebildeten Spektren welchen tryptischen HGA Fragmenten zugeordnet wurden. Weitere MH⁺-Ionen, die in nicht-abgebildeten Spektren von Waschschrten des Trypsinschrittes identifiziert wurden, sind türkis unterlegt. MH⁺-Ionen, die in nicht-abgebildeten Spektren von Waschschrten des Eluats identifiziert wurden, sind gelb unterlegt.

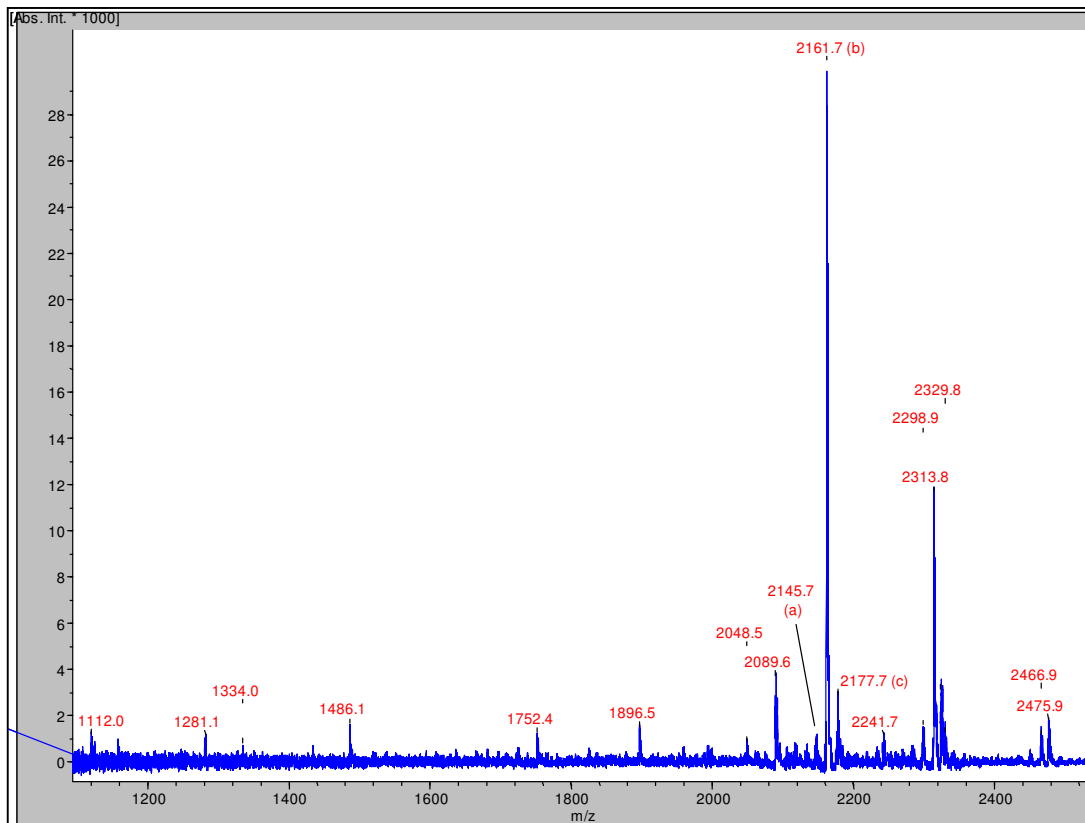


Abb. 3.3.16: MALDI-TOF-MS Spektrum des Überstandes der Kopplungsreaktion. Die mit Buchstaben a & c gekennzeichneten MH^+ -Ionen wurden tryptischen HGA-Peptiden zugeordnet, die sowohl glykosyliert als auch unglykosyliert sind. Zuordnung siehe Tabelle 3.3.2. Signal b zeigt das A5-Peptid.

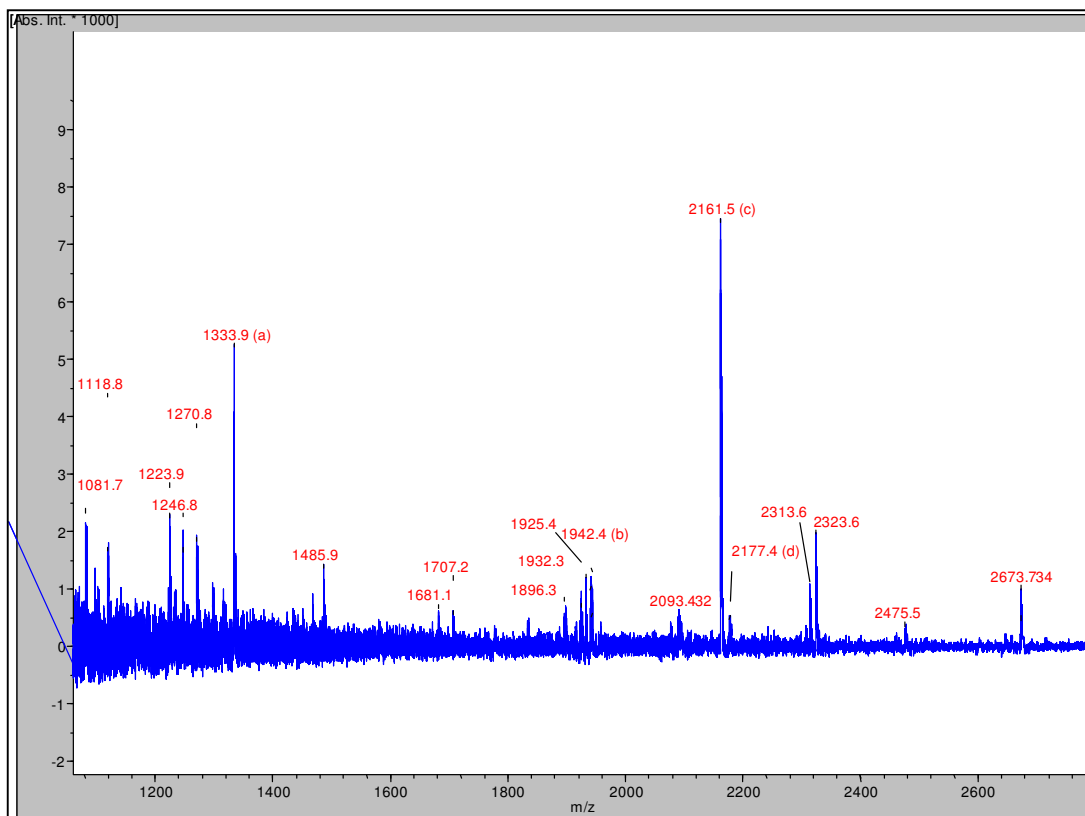


Abb. 3.3.17: MALDI-TOF-MS Spektrum des Eluats. Die mit Buchstaben a, b und d bezeichneten MH^+ -Ionen wurden glykosylierten, tryptischen HGA-Peptiden zugeordnet (Zuordnung siehe Tabelle 3.3.2). Signal c zeigt das A5-Peptid.

Anwendung auf Proteinproben – Variante 2.

Weil die zuvor dargestellte Variante 1 nicht als robust gelten kann (s. Diskussion) wurde eine Variante getestet, in der die enzymatischen Schritte der Kopplung an das Hydrazidharz vorangestellt wurden. Die Variante 2 wurde mit 20 µg HGA durchgeführt. Nach Proteolyse mit Trypsin wurde die Probe mit 5 µg A5-Peptid dotiert und oxidiert. Die Probe wurde an das Hydrazidharz gekoppelt, gewaschen, eluiert und per MALDI-MS analysiert.

In MALDI-MS Spektren des Überstandes der Kopplungsreaktion und folgenden Waschschritten (Spektren nicht abgebildet) konnten MH^+ -Ionen unglykosylierten und glykosylierten tryptischen HGA-Fragmenten des HGA zugeordnet werden (s. Tabelle 3.3.3). In Spektren der Waschschrritte wurden weitere MH^+ -Ionen unglykosylierten und glykosylierten tryptischen HGA-Fragmenten zugeordnet. Das Auftreten glykosylierter HGA-Peptide weist auf eine nicht-quantitative Bindung oxidierter Glykoproteine hin bzw. auf eine vorzeitige Freisetzung durch Hydrolyse.

Im MALDI-MS Spektrum des Eluats der nachfolgenden Waschschrritte (Spektren nicht abgebildet) konnten MH^+ -Ionen mehreren glykosylierten HGA-Peptiden und einem unglykosylierten HGA Peptid zugeordnet werden. In den Spektren der Waschschrritte wurden weitere MH^+ -Ionen identifiziert, die glykosylierten, tryptischen HGA-Fragmenten zugeordnet wurden.

tryptisches HGA Peptid	MH^+ -Ion m/z	Glykosylierung
32-39	1097.9	GalNAc
40-49	1125.0	
31-39	1253.8	GalNAc
32-39	1260.9	Gal-GalNAc
32-39	1300.2	2x GalNAc
40-49	1330.0	GalNAc
40-49	1333.3	GalNAc
19-30	1381.1	
19-30	1381.1	
32-39	1463.1	2x Gal-GalNAc
40-49	1493.2	Gal-GalNAc
50-61	1610.2	GalNAc
50-61	1611.3	GalNAc
50-61	1813.3	Gal-GalNAc
19-31	1902.6	Gal-GalNAc
19-31	1941.6	2x GalNAc
19-31	2146.7	3x GalNAc
1-18	2177.6	2x GalNAc
1-18	2177.8	2x GalNAc

Tabelle 3.3.3: Die Tabelle zeigt, welche MH^+ -Ionen aus den abgebildeten Spektren für Kopplungsüberstand und Eluat welchen tryptischen HGA Fragmenten zugeordnet wurden. Weitere MH^+ -Ionen, die in nicht abgebildeten Spektren von Waschschrritten des Kopplungsüberstandes identifiziert wurden sind türkis unterlegt. MH^+ -Ionen, die in nicht abgebildeten Spektren von Waschschrritten des Eluats identifiziert wurden, sind gelb unterlegt.

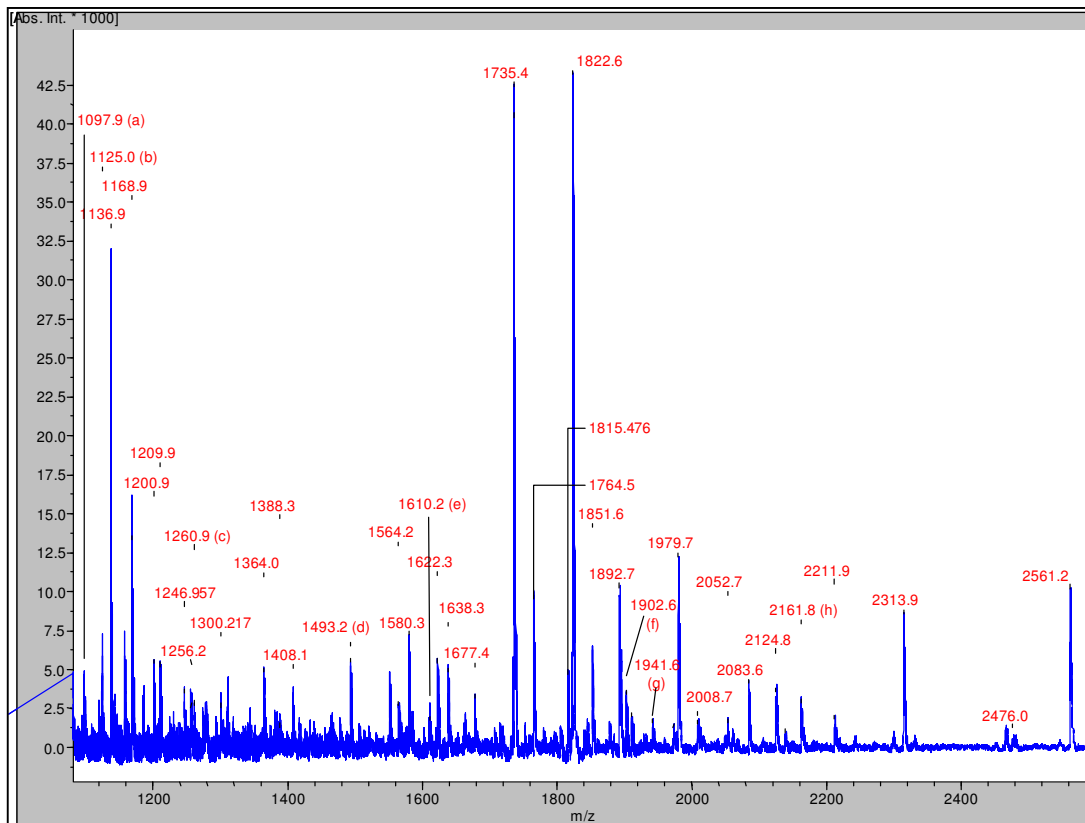


Abb. 3.3.18: MALDI-TOF-MS Spektrum des Überstandes der Kopplungsreaktion. Die mit a-g gekennzeichneten MH^+ -Ionen wurden tryptischen HGA-Peptiden zugeordnet, die sowohl glykosyliert als auch unglykosyliert sind. Zuordnung siehe Tabelle 3.3.2. Signal h zeigt das A5-Peptid nach Abspaltung von Gal.

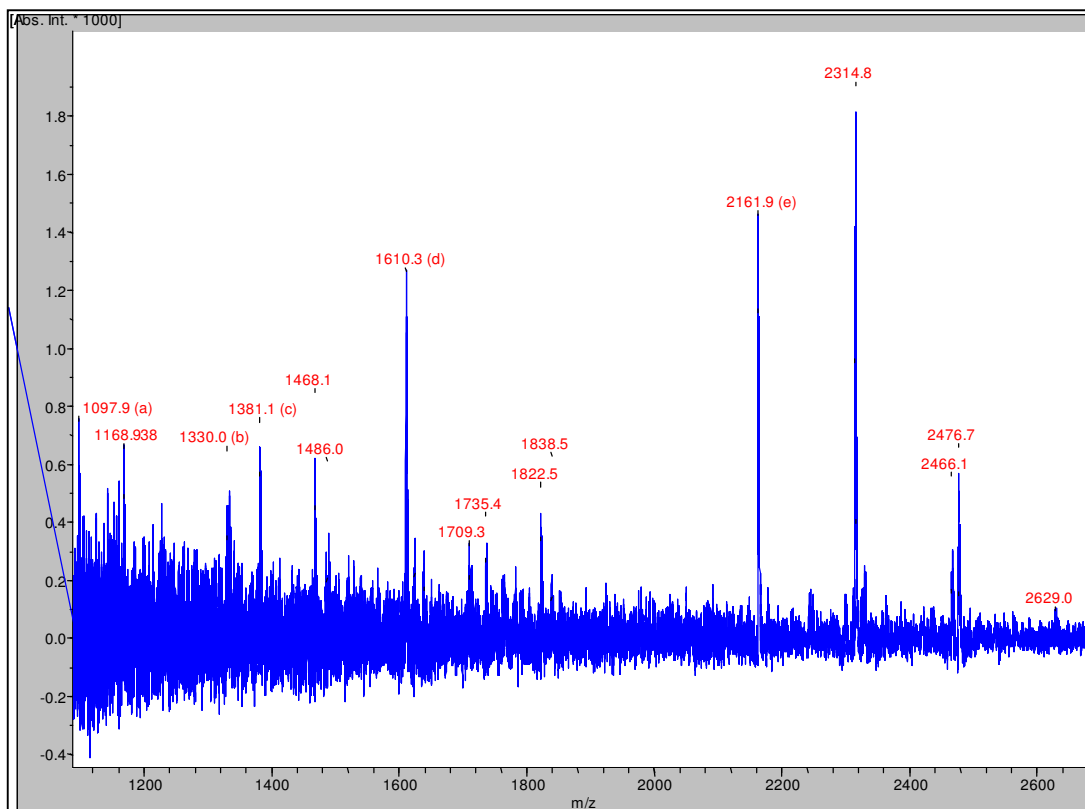


Abb. 3.3.19: MALDI-TOF-MS Spektrum des Eluats. Die mit Buchstaben (a-d) gekennzeichneten MH^+ -Ionen wurden tryptischen HGA-Peptiden zugeordnet, die sowohl glykosyliert als auch unglykosyliert sind. (Zuordnung siehe Tabelle 3.3.3). Signal e zeigt das A5-Peptid nach Gal-Abspaltung.

3.4) Hydrophile Affinitätschromatographie

Evaluierung an Glykopeptiden

Um die Effizienz der hydrophilen Fraktionierung zu testen, wurden je 10 µg der Glykopeptide H12 (Sequenz: AHGVTSAPDTRPAPGSTAPPA, fett = GalNAc-Glykosylierung, $M_i = 2161.2$ Da) und A3M1 (Sequenz: AHGVTSAPESRPAPGSTAPPA, fett = Gal-GalNAc-Glykosylierung $M_i = 2323.3$ Da) und das Peptid VPT21 (Sequenz: VPTASSRRPQRPHRVHSLTA, $M_i = 2351.3$ Da) der hydrophilen Affinitätschromatographie unterzogen. Das Experiment wurde auf drei verschiedenen Matrices, nämlich Cellulosepulver (Fluka), Sephadex® G-50 Medium (Pharmacia) und CL4B-Sepharose (Pharmacia) durchgeführt. Die günstigsten Verhältnisse für die Fraktionierung von Glykopeptiden und unglykosyliertem Peptid ergaben sich für die CL4B-Sepharose. Diese Ergebnisse sind hier dargestellt.

Im Ausgangsmaterial (Abb. 3.4.1) stellt das VPT21-Peptid das dominante MH^+ -Ion. Im Überstand der Bindungsreaktion tritt es in annähernd gleicher Intensität auf wie das GalNAc-glykosylierte H12-Peptid. Diese Abreicherung setzt sich in der MALDI-MS Analyse der Waschfraktion fort. In der Analyse des Eluats stellen die MH^+ -Ionen, die sich H12 und A3M1 zuordnen lassen, mit annähernd gleicher Intensität, die stärksten Signale. Das VPT21-Peptid erreicht ca. 80% des H12-Signals.

Die Fraktionierbarkeit von glykosylierten und unglykosylierten Peptiden mit der Methode konnte in diesem Experiment nicht demonstriert werden. Die Abreicherung des unglykosylierten Peptids, verglichen mit den glykosylierten Species, in Überstand und Waschfraktion läßt auf eine Bindung des VPT21-Peptids an die Sepharose-Matrix schließen. Das Eluat zeigt eine leichte Anreicherung der Glykopeptide. Unter den gewählten Bedingungen zeigt die hydrophile Affinitätschromatographie eine zu geringe Spezifität für glykosylierte Substrate.

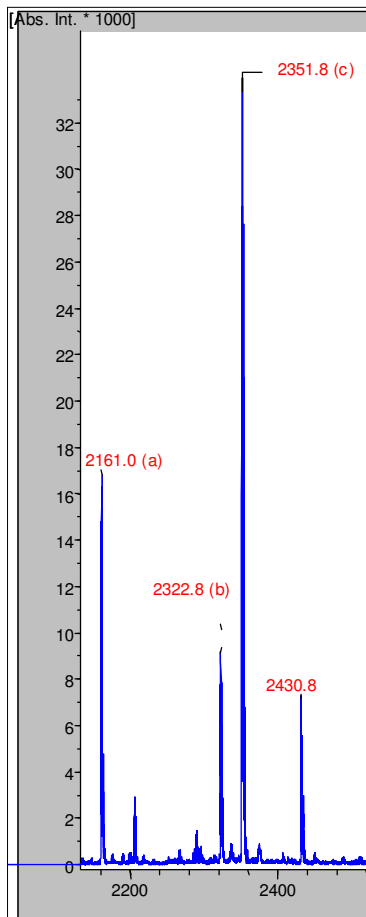


Abb. 3.4.1: Ausgangsprobe

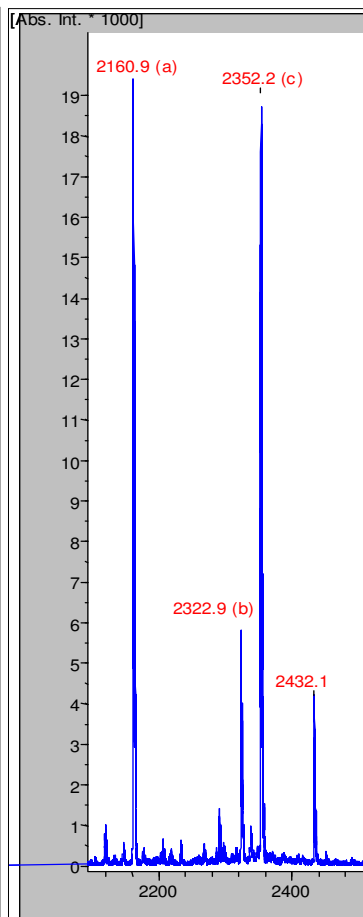


Abb. 3.4.2: Überstand

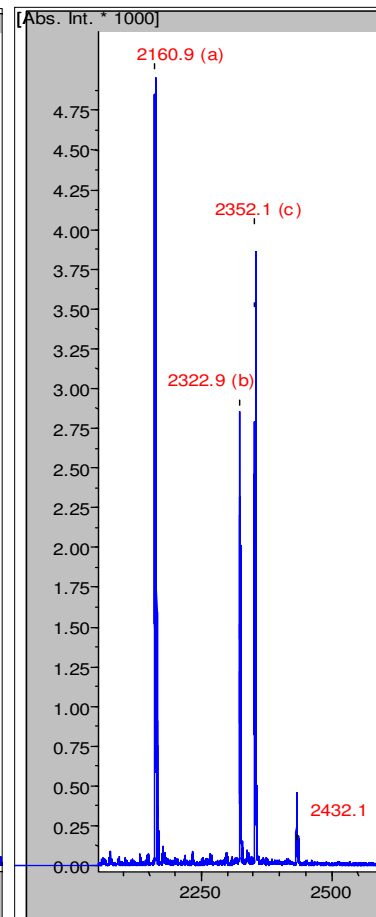


Abb. 3.4.3: Waschgang

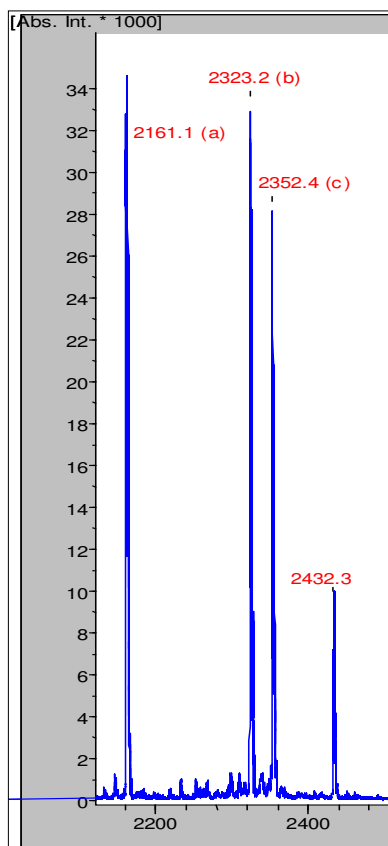


Abb. 3.4.4: Eluat

Abb. 3.4.1 – 3.4.4: MALDI-TOF-MS Analysen des Startmaterials (3.4.1), des Überstandes (3.4.2), des Waschschrittes (3.4.3) und des Eluats (3.4.4) der Evaluierung der Methode „*hydrophile Affinitätschromatographie*“ auf Peptid-Ebene. Die mit a bezeichneten Peaks lassen sich dem H12-Peptid, b dem A3M1-Peptid und c dem VPT21-Peptid zuordnen. Im Startmaterial bildet das unglykosylierte VPT21-Peptid das am stärksten vertretene MH^+ -Ion. In allen nachfolgenden Fraktionen ist es deutlich abgereichert. Das Eluat weist die stärkste Abreicherung des unglykosylierten Peptids, verglichen mit den glykosylierten auf.

3.5) Partielle Deglykosylierung von Glykoproteinen und Glykopeptiden mit Trifluormethansulfonsäure (TFMSA)

Kinetik der partiellen De-O-Glykosylierung mit TFMSA

Im Rahmen der Methodenentwicklung sollten zunächst geeignete Bedingungen etabliert werden, die eine Abspaltung der Glykan-Kettenverlängerungen bei gleichzeitigem Verbleiben des Core-GalNAc im günstigsten Verhältnis gewährleisten. Hierfür wurde das Peptid A3M1 (Sequenz: AHGVTSAPE SRPAPGSTAPPA, fett: Gal-GalNAc), welches ein Gal-GalNAc Disaccharid (monoisotopische Masse: 2323 Da) trägt mit TFMSA deglykosyliert. Drei Techniken, mit reinem TFMSA bzw. unter Beigabe von Toluol oder Anisol, wurden evaluiert. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen, die Reaktion wurde abgestoppt, das Produkt gereinigt und mit MALDI-MS analysiert. Als Zeitpunkte für die Probenentnahme wurden bei Anwendung von reinem TFMSA 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 und 120 Min. gewählt. Bei Anwendung von Toluol oder Anisol wurden die Proben zu den Zeitpunkten 15 und 30 Min., sowie 1, 2, 3, 6 und 18 Std. entnommen.

Als optimale Inkubationszeit wurde diejenige gewählt, bei der alle Kettenverlängerungen weitmöglichst degradiert waren aber das Ausmaß der vollständigen Deglykosylierung des Peptides minimal war. In Abb. 3.5.1 – 3.5.3 sind MALDI-MS Analyse Spektren für Inkubationszeiten abgebildet, die in folgenden Reaktionsansätzen verwendet wurden.

Mit den gewählten Inkubationszeiten ist eine nahezu quantitative partielle Deglykosylierung zu beobachten. Die Signale für das Gal-GalNAc Peptid sind an der Detektionsgrenze bzw. im Fall des TFMSA/Toluol-Ansatzes nicht nachweisbar.

Für die Behandlung mit reinem TFMSA ergab sich somit eine optimale Inkubationszeit von 30 Min. (s. Abb. 3.5.1). Bei Behandlung mit TFMSA/Anisol (Abb. 3.5.2) und TFMSA/Toluol (Abb. 3.5.3) lag die optimale Inkubationszeit bei 60 Min.

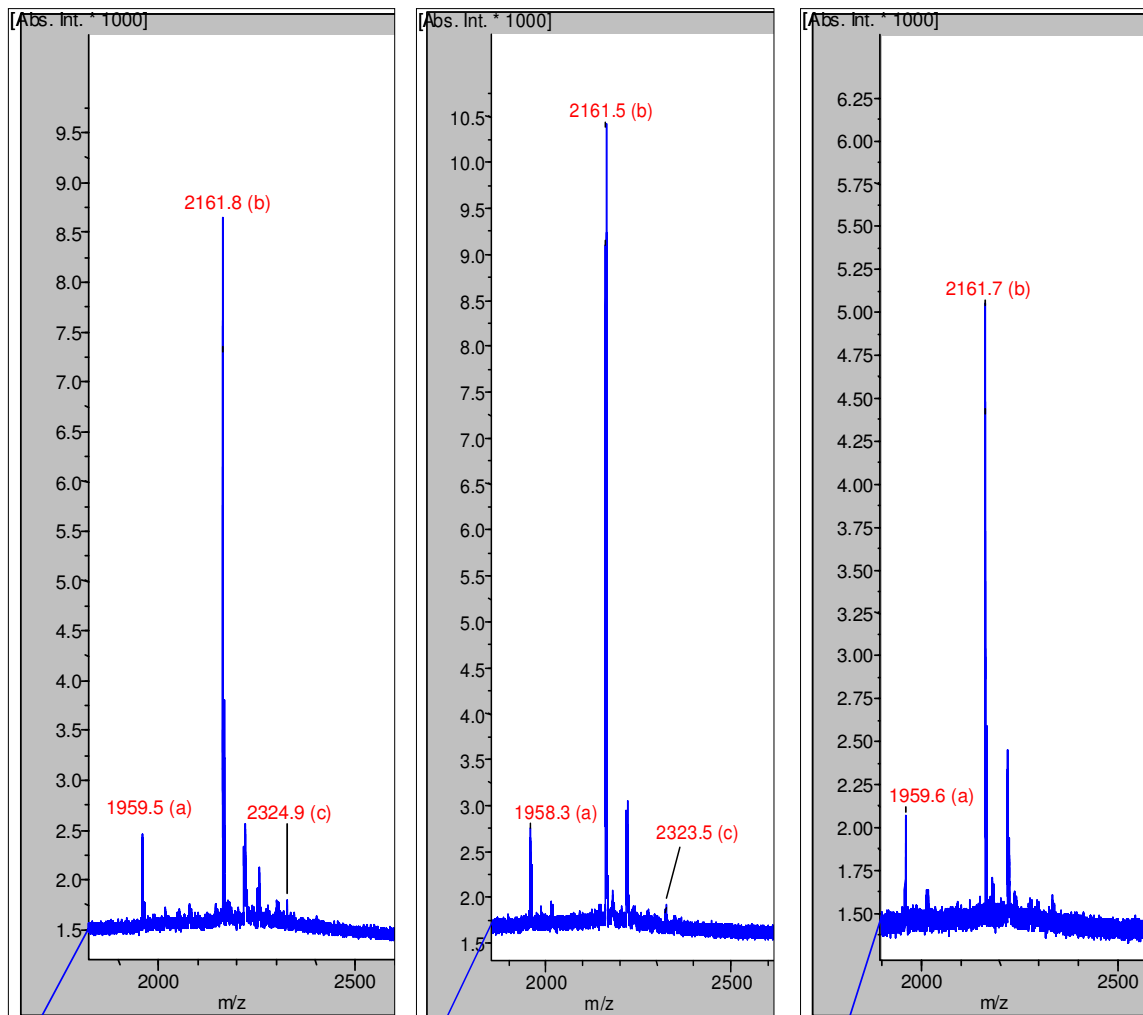


Abb. 3.5.1: TFMSA (30 Min.) Abb. 3.5.2: TFMSA + Anisol (1Std.) Abb. 3.5.3: TFMSA + Toluol (1Std.)

In den Abbildungen 3.5.1 – 3.5.3 sind die Spektren für die jeweils optimalen Inkubationszeiten der TFMSA-Behandlung dargestellt. Das MH^+ -Ion bei 1959 Da (a) kann dem vollständig deglykosylierten A3M1-Peptid zugeordnet werden, das MH^+ -Ion bei 2161 Da (b) dem Peptid + Core-GalNAc und das MH^+ -Ion bei 2323 Da (c) dem Peptid mit Gal-GalNAc Glykosylierung.

Partielle Deglykosylierung und HPA-Affinitätschromatographie mit Standard-Glykopeptiden

Zunächst sollte die prinzipielle Eignung der Methode zur Identifizierung glykosylierter Peptide belegt werden. Hierzu wurde das A8-Peptid (Sequenz: AHGV**T**SAPDTRPAPG**S**TAPPA, fette Buchstaben: Gal-GalNAc Glykosylierung, monoisotopische Masse 3419 Da) verwendet. Das Peptid wurde mit TFMSA unter Verwendung von Toluol behandelt, entsalzt, der HPA-Affinitätschromatographie unterzogen und abschließend durch MALDI-MS analysiert.

Abb. 3.5.4 zeigt das Ausgangspeptid mit einem Molekulargewicht 3419 Da. Nach TFMSA-Behandlung (Abb. 3.5.5) erkennt man als Hauptprodukt ein Signal bei 2771 Da (Peak e) was dem A8-Peptid mit vier GalNAc-Gruppen zugeordnet werden kann. Ferner sind mehrere Signale (a-d) zu erkennen, die dem Peptid unter vollständiger Abspaltung von ein

bis vier Glykanen zuzuordnen sind (s. Tabelle 3.5.1). Abb. 3.5.6 zeigt den Überstand der Chromatographie auf HPA-Agarose. Hier sind die gleichen MH^+ -Ionen wie nach TFMSA-Behandlung zu erkennen. Man erkennt eine deutliche Abreicherung der glykosylierten Peptide und das deglykosylierte Peptid als dominantes Signal. Im Eluat (Abb. 5.5.7) der Chromatographie auf HPA-Agarose sind ausschließlich Signale für das di-, tri- und tetraglykosylierte GalNAc-Peptid zu erkennen.

Das Auftreten mehrfach deglykosylierter Produkte nach TFMSA-Behandlung zeigt, daß die Reaktionsbedingungen schwer zu kontrollieren sind und für verschiedene Substrate gegebenenfalls individuell optimiert werden müssen. Die Affinitätschromatographie zeigt, daß die HPA-Chromatographie v.a. für multivalente GalNAc-Substrate geeignet ist und die Avidität eine entscheidende Rolle beim Erfolg der Reinigung spielt. Eine quantitative Bindung und Reinigung ist mit mono-GalNAc-glykosylierten Substraten offenbar nicht gewährleistet.

Tabelle 3.5.1: monoisotopische Massen des A8 Peptids sowie den Produkten nach partieller bzw. vollständiger Deglykosylierung.

A8 Peptid	Da
4x Gal-GalNAc	3419
4x GalNAc	2771
3x GalNAc	2568
2x GalNAc	2365
1x GalNAc	2161
(-)	1958

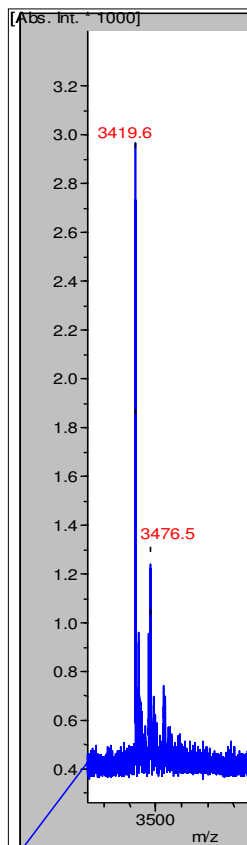
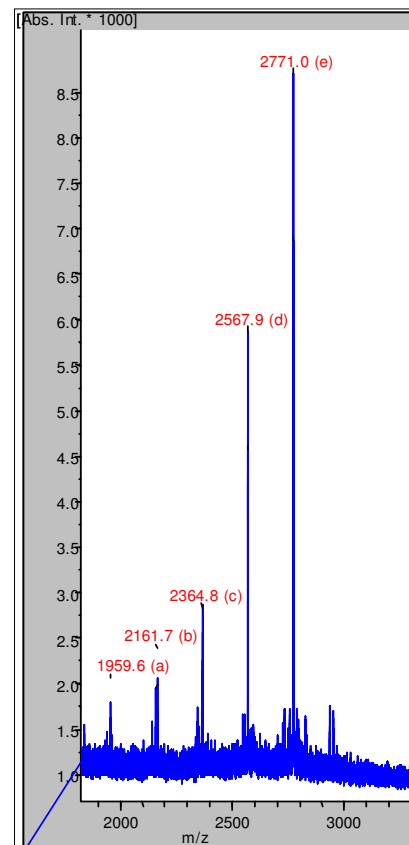


Abb. 3.5.4 (rechts): A8-Peptid vor TFMSA-Behandlung. Die monoisotopische Masse beträgt 3149 Da.

Abb. 3.5.5 (links): A8 Peptid nach Behandlung mit TFMSA. Die MH^+ -Ionen a – d sind dem A8-Peptid unter vollständiger Abspaltung von ein bis vier Glykanen zuzuordnen. Das Signal e kann dem A8-Peptid unter Abspaltung von vier Gal-Einheiten zugeordnet werden. (Zuordnung s. Tabelle 3.5.3)



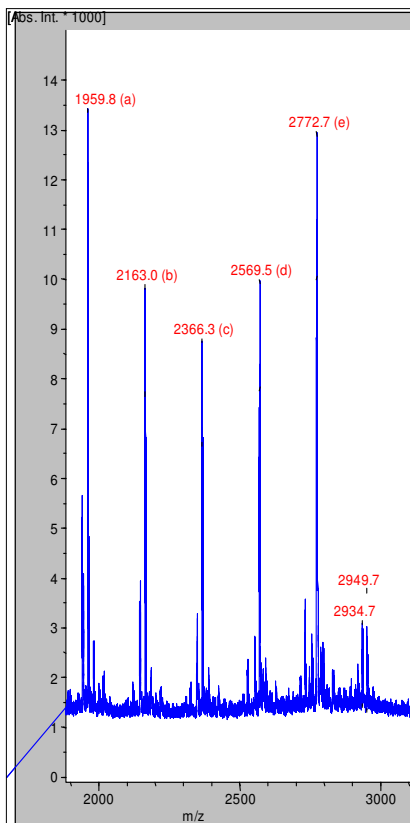
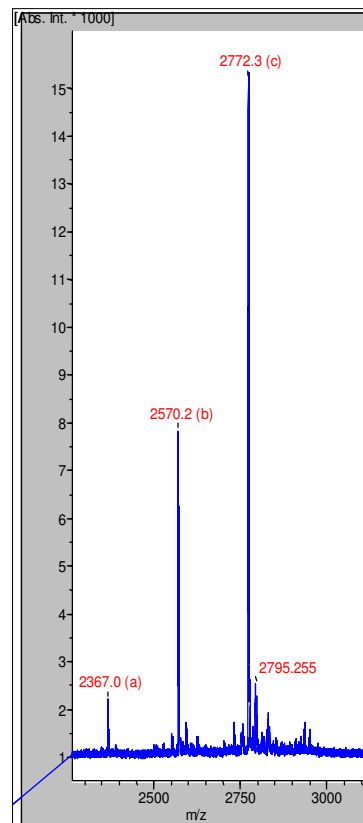


Abb. 3.5.6 (links): Überstand der Affinitätschromatographie auf HPA-Agarose. Mit ansteigendem Grad der Glykosylierung ist eine effektivere Abreicherung verbunden.

Abb. 3.5.7 (rechts): Eluat der Affinitätschromatographie auf HPA-Agarose. A8-Peptid mit einer stärkeren Glykosylierung wird deutlich effizienter angereichert als schwächer substituiertes. Das monoglykosylierte Peptid ist nicht nachweisbar.



Anwendung auf eine Proteinprobe - HGA

Die Anwendung auf ein Standard-Glykoprotein sollte das Konzept der Methode testen und evaluieren, ob nach Behandlung mit TFMSA enzymatische Schritte und Reinigung durch Chromatographie auf HPA möglich sind.

Hierfür wurden 30 µg HGA mit TFMSA behandelt, die Probe entsalzt, mit Trypsin verdaut und der HPA-Chromatographie unterzogen. Analysiert wurde die Probe durch MALDI-MS.

In der MALDI-MS Analyse wurden im Überstand (Abb. 3.5.7) der Kopplungsreaktion mehrere GalNAc-modifizierte sowie unglykosylierte tryptische HGA Peptide identifiziert (Zuordnung s. Tabelle 3.5.2). Im Eluat wurden mehrere, mit GalNAc, glykosylierte tryptische HGA Peptide identifiziert, sowie ein MH^+ -Ion, welches einem unglykosylierten HGA-Peptid zugeordnet werden kann.

Diese Ergebnisse belegen, daß die Polypeptid-Substrate bei den gewählten Reaktionsbedingungen bis auf Core-GalNAc Niveau abgebaut werden. Die Beobachtung, daß HPA-Lektin-Chromatographie Polypeptidsubstrate mit niedriger Anzahl an GalNAc-Modifikationen nicht quantitativ anreichert wird bestätigt. Das Auftreten eines MH^+ -Ions bei 1407 Da ist nicht erwartet. Dieses Signal kann einem unglykosylierten HGA-Peptid zugeordnet werden und wurde in mehreren voneinander unabhängigen Experimenten

beobachtet. Ob es sich um ein unbekanntes TFMSA-Abbauprodukt handelt oder auf eine unspezifische Bindung an HPA-Agarose zurückgeführt werden kann, lässt sich hier nicht eindeutig unterscheiden.

Masse (Da)	Peptid	GalNAc
894	32-39	
1097	32-39	1
1127	40-49	
1330	19-30	1
1407	50-61	
1610	50-61	1
1941	19-31	2
2565	31-49	2

Tabelle 3.5.2: monoisotopische Massen tryptischer HGA-Peptide in Da mit GalNAc Glykosylierung.

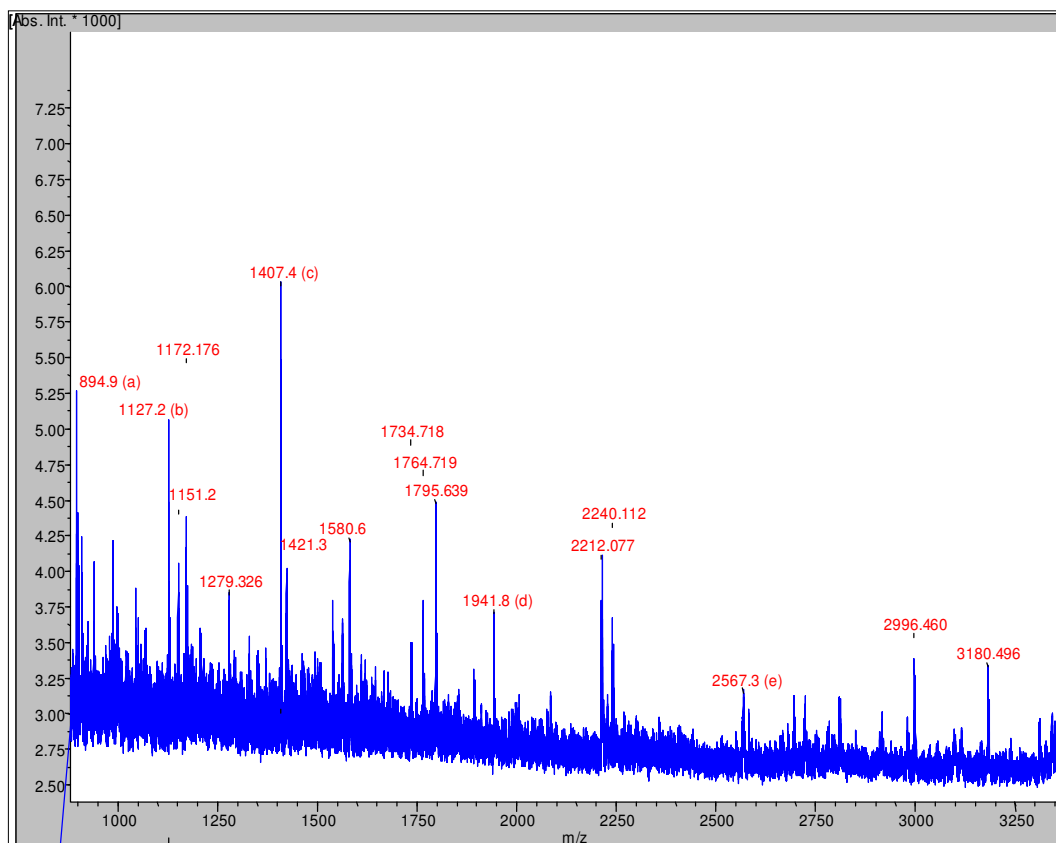


Abb. 3.5.7: MALDI-MS-Analyse des Überstandes der Chromatographie auf HPA-Agarose. Es wurden mehrere MH^+ -Ionen identifiziert, die unglykosylierten, sowie GalNAc-modifizierten HGA-Peptiden zugeordnet werden konnten (Zuordnung Tabelle 3.5.2).

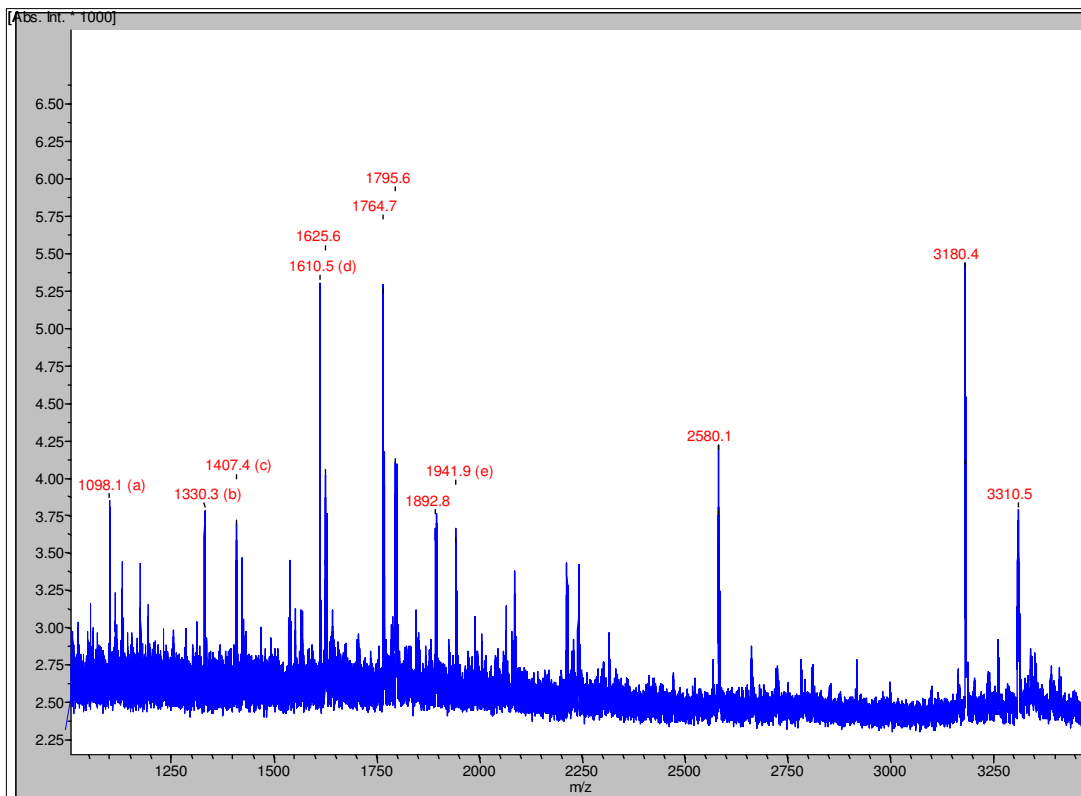


Abb. 3.5.8: MALDI-MS Spektrum der Analyse des Eluats der HPA-Chromatographie. Es wurden mehrere MH^+ -Ionen identifiziert, die einem unglykosylierten (c), sowie mehreren GalNAc-modifizierten HGA-Peptiden zugeordnet werden konnten (Zuordnung Tabelle 3.5.2).

Anwendung auf eine humane Serumprobe

Die Probe sollte in einem weiteren Experiment auf eine biologische Probe angewendet werden. Hierbei wurde humanes Serum gewählt, weil dieses einen hohen Anteil an glykosylierten Proteinen aufweist. Weil beobachtet wurde, daß niedriger Substituierte Substrate in der HPA-Chromatographie schlecht angereichert werden sollte sich dieser Ansatz die höhere Valenz von unverdauten Proteinen zunutze machen. Nach HPA-Chromatographie sollten PAGE, HPA-Blot bzw. die Proteolyse durchgeführt werden.

1 mg Serumprotein wurde mit dem ProteoPrep™ Blue Albumin Depletion Kit (Sigma) hinsichtlich Albumin und IgG abgereichert und vor der TFMSA-Behandlung auf einer NAP5-Säule entsalzt. Nach TFMSA-Behandlung und Entsalzung erfolgte die Affinitätschromatographie auf HPA-Agarose im Säulenverfahren. Analysiert wurde die Probe durch nicht-reduzierende PAGE.

In der Färbung mit Coomassie zeigt das Ausgangsmaterial ein reichhaltiges Bandenmuster (Abb. 3.5.9) von Proteinen im gesamten dargestellten Massenbereich. Das Eluat der HPA-Chromatographie zeigt dagegen nur zwei Banden im Bereich von ca. 50 und 60 kDa.

Die Analyse durch PAGE zeigt, daß die Proteine nach TFMSA-Behandlung fast nicht bzw. nicht mehr detektierbar sind. Die zwei sichtbaren Banden können nicht auf die sehr stark

sichtbaren Proteine in der unteren Bande im Ausgangsmaterials zurückgeführt werden, weil diese geringfügig weiter läuft als die untere der Banden aus der HPA-Chromatographie. Für den Verlust der Komplexität können zwei Gründe in Frage kommen. Zum einen kommt eine ausgeprägte Degradierung in Frage, zum anderen könnten Proteine bei TFMSA-Behandlung unter Wasserfreien Bedingungen derart stark aggregieren, daß diese nicht mehr in ausreichender Menge in Lösung gebracht werden können und eine Detektion mit Färbetechniken nicht mehr möglich ist. In diesen Fällen sollten die zwei Banden eine andere Herkunft als die Serumprobe aufweisen. Eigene Erfahrungen haben gezeigt, daß Lektin-Säulen „lecken“ können, was heißt daß die Lektine langsam freigesetzt werden. Die gezeigten Banden der HPA-Affinitätschromatographie könnten HPA von der Lektin-Säule selbst sein. HPA ist ein multimeres Protein (Monomer: 13.4 kDa) und die Banden könnten oligomeren Komplexen entsprechen. Dies wird durch ein Experiment weiter erhärtet, in dem eine Mischung Immunglobulin G (IgG), Transferrin und Fetuin mit TFMSA behandelt und anschließend durch Chloroform/Methanol-Fällung gereinigt wurde. In der PAGE-Analyse (Abb. 3.5.11) ist nach der Behandlung kein Protein nachweisbar. Bei Serum Proben, die nicht einer HPA-Chromatographie unterzogen wurden, sind ebenfalls keine Proteinbanden zu detektieren gewesen (nicht abgebildet).

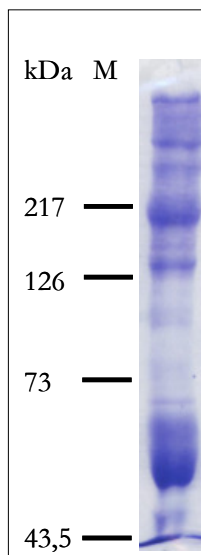
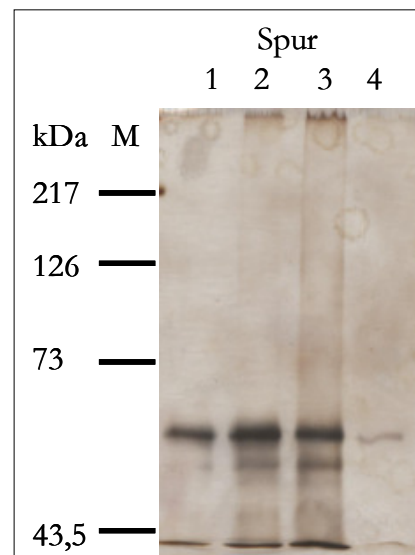


Abb. 3.5.9 (links): PAGE (7.5%ig, nicht-reduzierend, Coomassiefärbung) Analyse der zur TFMSA Behandlung eingesetzten Serumprobe.
M: Marker

Abb. 3.5.10 (rechts): PAGE (7.5%ig, nicht-reduzierend Silberfärbung) Analyse der TFMSA behandelten und durch HPA-Chromatographie gereinigten Serumprobe.
Spur1: Überstand
Spur2: Eluat, ml 0-2
Spur3: Eluat, ml 2-4



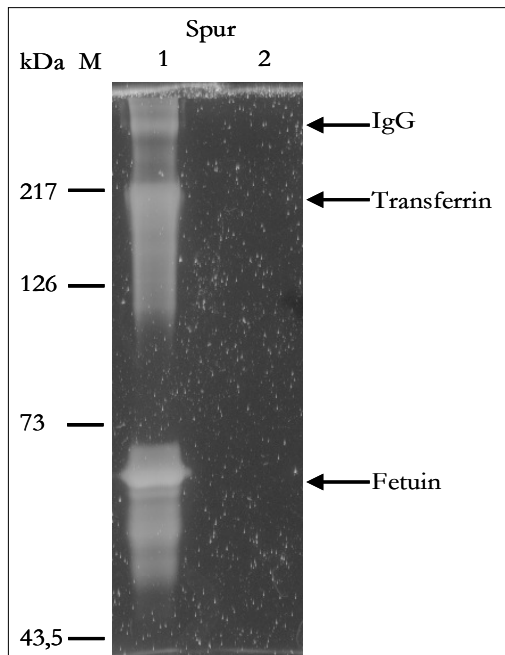


Abb. 3.5.11: PAGE- (7.5%ig, nicht-reduzierend, Fluoreszenzfärbung) Analyse der TFMSA behandelten Proteinprobe
 Spur 1: Ausgangsmaterial
 Spur 2: TFMSA-behandelte und Chloroform/Methanol gereinigte Probe.
 IgG: Immunglobulin G, M: Marker

3.6) Eliminierung von O-Glykanen durch Alkylamine und Identifizierung mit Massenspektrometrie

Vorbehandlung der Proben mit Ethylamin (EA) oder Methylamin (MA)

Zwei Proben mit je 1 μg IgG, HGA, Fetuin, Carboanhydrase, Chymotrypsinogen und Myoglobin wurden wie beschrieben mit EA oder MA behandelt. Nach Verdampfen der Flüssigkeit in der Vakuumzentrifuge wurden die Proben in SDS-Probenpuffer aufgenommen und der SDS-PAGE unterzogen.

Die SDS-PAGE-Analyse zeigt in den Alkylamin-behandelten Proben eine stark ausgeprägte Degradierung. Im oberen Massenbereich werden keine Proteine mehr detektiert, im unteren Massenbereich sind einige schwach ausgeprägte Banden zu erkennen. Ferner fächert sich die Lauffront im unteren Massenbereich stark auf, obwohl die Gelelektrophorese regulär verlaufen ist.

Weitere Experimente verfolgten den gleichen Ansatz, wobei die Probe vor der SDS-PAGE über NAP5-Säule, C_{18} -ZipTip oder verschiedene Fällungstechniken (Chloroform/Methanol-, Aceton- und Ethanol-fällung) gereinigt wurde. In diesen Ansätzen können reproduzierbar keine Proteine mehr in der SDS-PAGE-Analyse detektiert werden (nicht abgebildet).

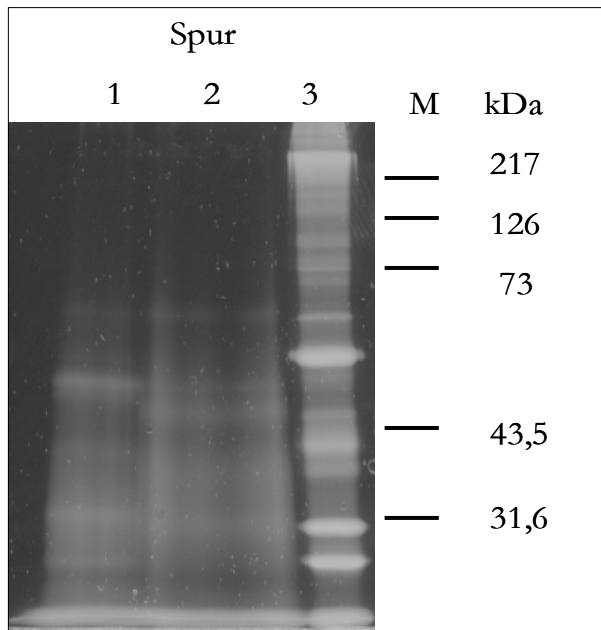


Abb. 3.6.1: PAGE- (10%ig, nicht-reduzierend, Fluoreszenzfärbung) Analyse alkylamin-behandelter Proben.
 Spur 1: EA-behandelte Probe
 Spur 2: MA-behandelte Probe
 Spur 3: unbehandelte Probe
 M: Marker

Behandlung von Gelstanzen mit EA oder MA

Um die Eignung einer Nachbehandlung mit EA oder MA für die Analyse von Glykoproteinen zu evaluieren wurde je 1 µg HGA, Fetuin und κ -Casein der SDS-PAGE, in separaten Spuren eines Gels (nicht abgebildet), unterzogen. Nach Ausschneiden der Proteinbanden mit einem Skalpell wurden Alkylamin-Behandlung und PMF, wie beschrieben, durchgeführt.

HGA, EA: im Fall von EA-behandeltem HGA lassen sich drei Peptide zuordnen. Das MH^+ -Ion bei $m/z = 1795.4$ Da kann einem einfach EA-modifizierten Peptid (AS 1-18), das MH^+ -Ion bei $m/z = 2001.4$ Da einem unmodifizierten (AS 32-49) und das MH^+ -Ion bei $m/z = 2238.6$ Da einem dreifach EA-modifizierten HGA Peptid (AS 31-49) zugeordnet werden.

HGA, MA: im Spektrum der MA behandelten Probe lassen sich drei MH^+ -Ionen MA-modifizierten HGA-Peptiden und eines einem unmodifizierten zuordnen (s. Tabelle 3.6.1).

κ -Casein: In der Analyse der EA-behandelten Probe konnte ein Signal einem EA-modifizierten Peptid und mehrere andere unmodifizierten zugeordnet werden (s. Tabelle 3.6.2). Das Spektrum der MA-behandelten Probe weist eine Vielzahl modifizierter und unmodifizierter tryptischer κ -Casein Peptide auf (Zuordnung s. Tabelle 3.6.2).

Fetuin: In der Analyse der EA-behandelten Probe konnten keine EA-modifizierten Peptide identifiziert werden. Das Spektrum weist zwei MH^+ -Ionen auf, die unmodifizierten Peptiden zugeordnet werden können. Die MA-behandelte Probe dagegen weist sowohl eine höhere Zahl an unmodifizierten, wie modifizierten Peptiden auf (s. Tabelle 3.6.3).

Nach Analyse aller Proben ergibt sich das Bild, daß EA-behandelte Proben generell weniger Signale tryptischer Peptide und speziell weniger Signale modifizierter tryptischer Peptide aufweisen als MA-behandelte Proben. Die Umsetzung mit EA *in-Gel* mit anschließendem PMF ist weniger effizient als die unter Einsatz von MA.

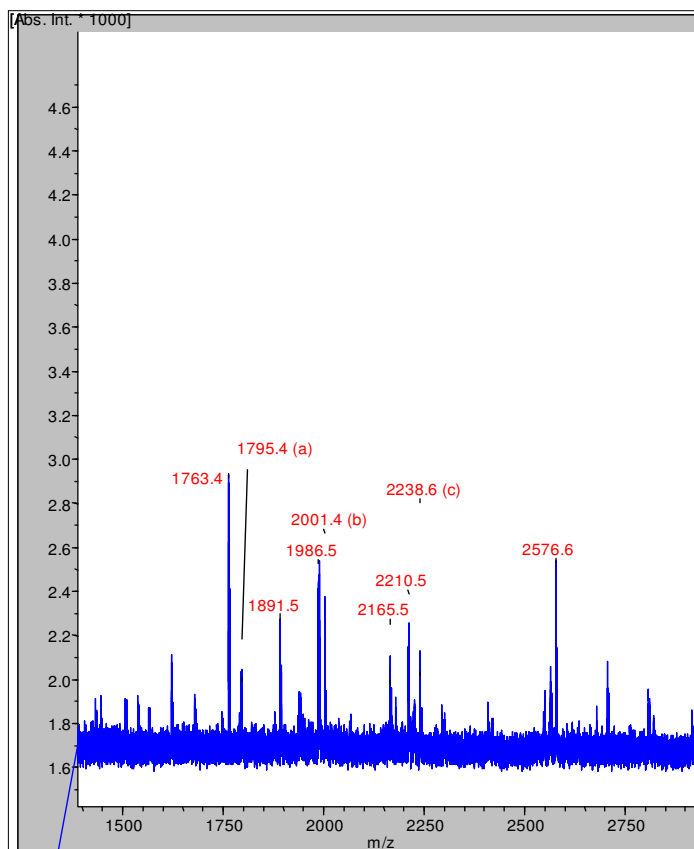


Abb. 3.6.2 (links): MALDI-MS Spektrum der EA-behandelten HGA-Probe. In der Analyse konnten zwei MH^+ -Ionen EA-modifizierten HGA-Peptiden zugeordnet und eines einem unmodifizierten zugeordnet werden. Das Signal a entspricht einem einfach, das Signal c einem dreifach EA-modifizierten Peptid.

Masse (Da)	Peptid	MA-Gruppen
922.8	32-39	2
1420.3	50-61	1
1537.3	19-31	
1794.4	1-18	2

Tabelle 3.6.1: monoisotopische Massen (Mi) von HGA-Peptiden inklusive MA-Modifikation

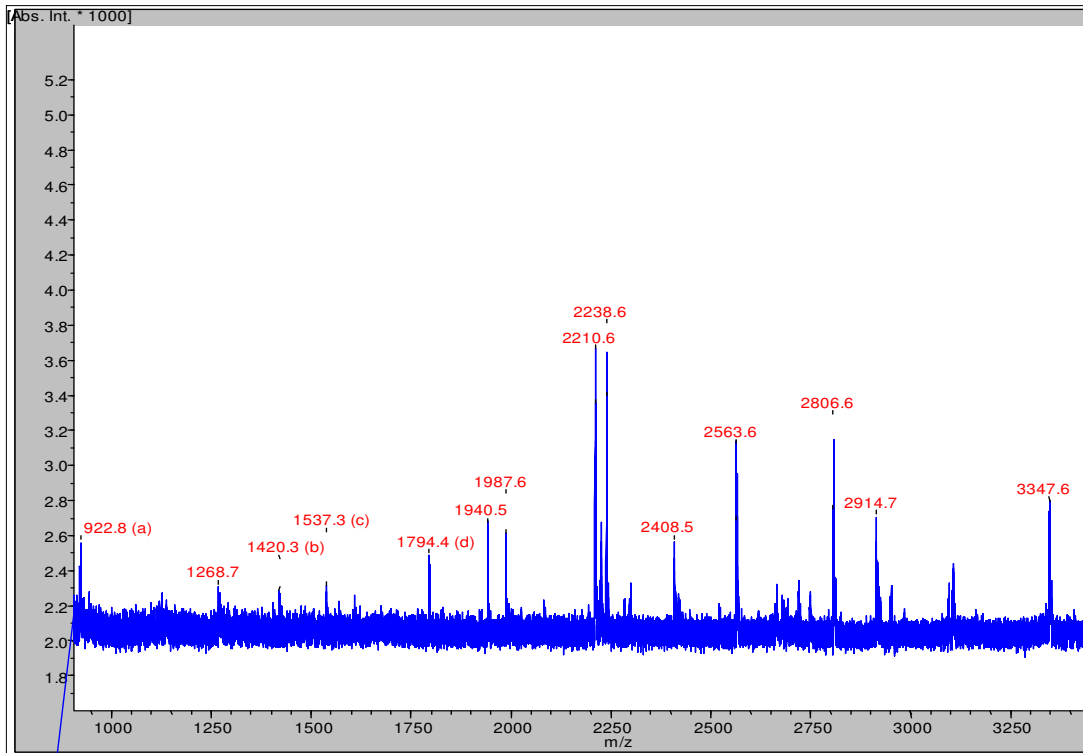


Abb. 3.6.3: MALDI-TOF-MS Spektrum der MA-behandelten HGA Probe. In der Analyse konnten vier MH^+ -Ionen HGA Peptiden zugeordnet werden (s. Tabelle 3.6.1)

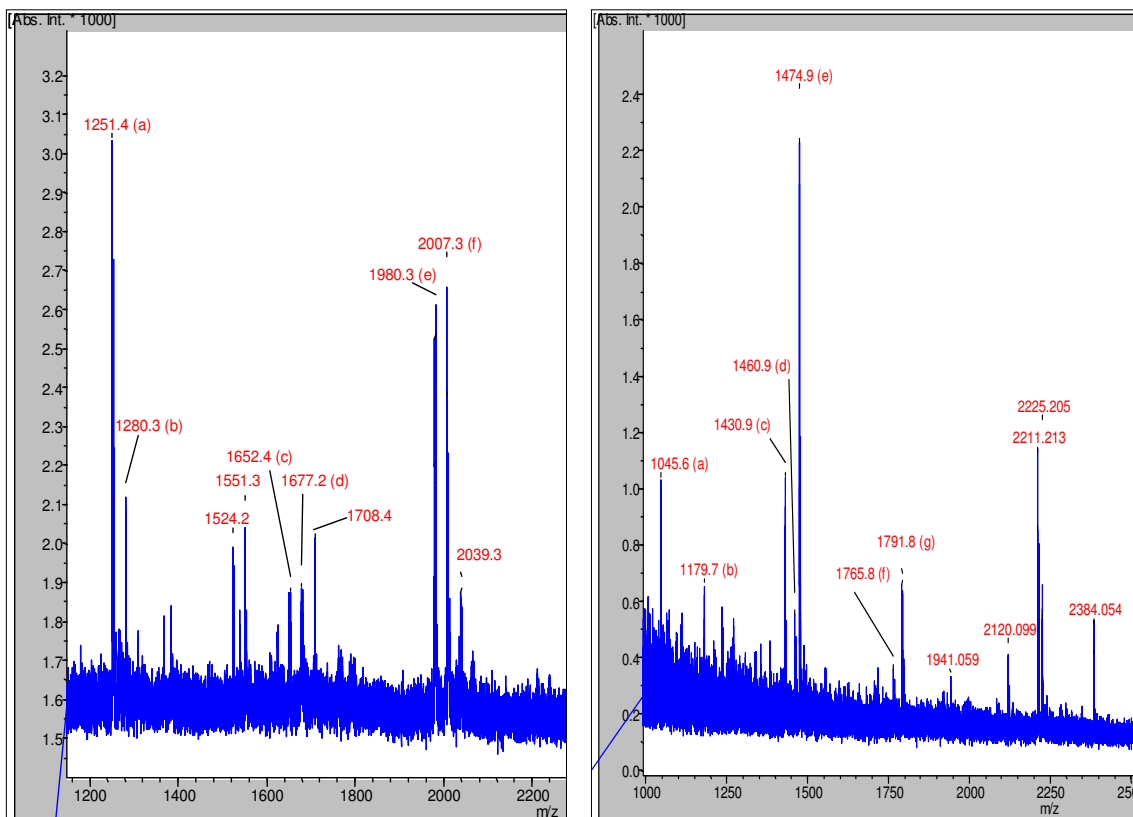


Abb. 3.6.4 (links) und Abb. 3.6.5 (rechts): MALDI-TOF-MS Spektren der EA-(links) und MA- (rechts) behandelten α -Casein Proben. In der Analyse konnten mehrere MH^+ -Ionen sowohl modifizierten als auch unmodifizierten tryptischen HGA-Peptiden zugeordnet werden (s. Tabelle 3.6.2)

Masse (Da)	Peptid (AS)	Modifizierungen
1045.6	14-21	
1179.7	17-24	2x Ac K, 3x MA
1251.4	25-34	
1280.3	87-97	1x Met-Ox
1430.9	11-18	2x MA
1474.9	11-21	
1652.4	43-55	
1677.2	98-111	1x Ac K, 1x EA
1765.8	98-111	1x MA, 1Met-Ox
1791.8	98-112	1x Ac K, 1x MA
1980.3	90-107	
2007.3	90-107	1x EA

Tabelle 3.6.2: Masse der detektierten MH^+ -Ionen mit zugeordneten κ -Casein-Peptiden und Modifizierung. Ac K: Peptid mit acetyliertem Lysin, Met-Ox: Peptid mit oxidiertem Methionin, MA: Methylamin, EA: Ethylamin

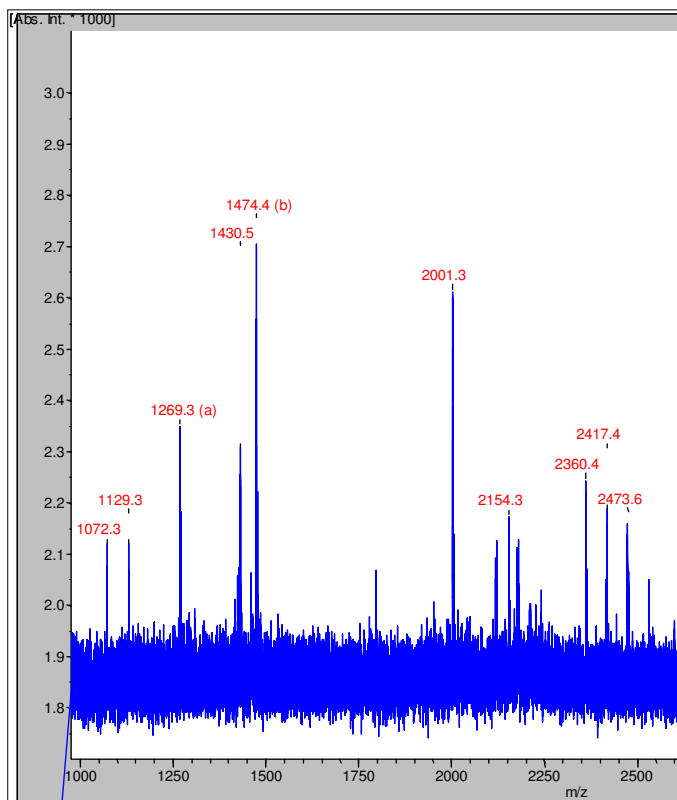


Abb. 3.6.6: MALDI-MS Spektrum der EA-behandelten Fetuin-Probe. Die Analyse hat zwei unmodifizierte tryptische Fetuin-Peptide identifiziert (s. Tabelle 3.6.3)

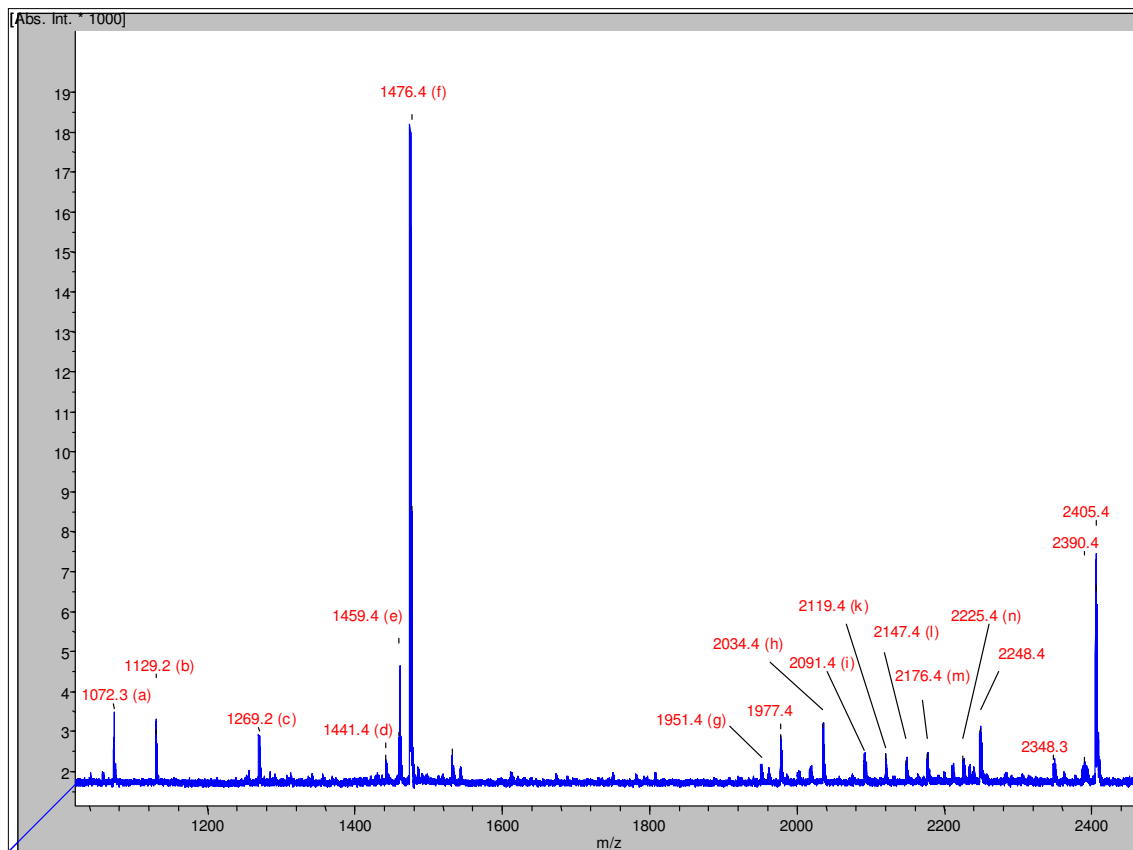


Abb. 3.6.7: MALDI-MS Spektrum der MA-behandelten Fetuin-Probe. Die Analyse hat mehrere MH^+ -Ionen identifiziert, die modifizierten und unmodifizierten tryptischen Fetuin-Peptiden zugeordnet werden können (s. Tabelle 3.6.3).

Masse (Da)	Peptid	Modifizierungen
1072.3	1-10	
1129.2	1-10	1x Ac K, 1x MA
1269.3	103-113	
1441.4	208-219	1x MA
1441.4	214-227	1x MA
1474.4	316-330	
1476.4	316-330	
1951.4	126-141	1x Ac K, 1x MA
2034.4	86-102	1x Ac K
2091.4	33-49	2x Ac K
2119.4	295-315	
2147.4	295-315	2x MA
2176.4	295-315	1x Ac K, 1x MA
2225.4	208-227	

Tabelle 3.6.3: Masse der detektierten MH^+ -Ionen mit zugeordneten Fetuin-Peptiden und Modifikationen. Ac K: Peptid mit acetyliertem Lysin, MA: Methylamin,

3.7) Anreicherung und Identifizierung von Glykoproteinen über Fraktionierung auf Aminophenylboratsäulen

Evaluierung auf Proteinebene

Fraktionierung von Proteinen: Um die Effizienz der Fraktionierung von unglykosylierten Proteinen und Glykoproteinen zu evaluieren wurden je 100 µg BSA und Transferrin, wie beschrieben, der Säulenchromatographie auf Aminophenylborat- (APB) Agarose unterzogen. Die Probe wurde mit 200 mM Sorbitol in EPPS-Puffer, pH 8.0 eluiert. Die einzelnen Fraktionen der Chromatographie wurden in der Vakuumzentrifuge auf 100 µl eingengt, durch Chloroform/Methanol-Fällung entsalzt und durch SDS-PAGE analysiert. Im Ausgangsmaterial wurden beide Proteine in gleicher Menge (w/w) eingesetzt. Der Durchlauf der zyklisch geladenen Probe und die Waschfraktion zeigen eine leichte Anreicherung von Transferrin gegenüber BSA (Abb. 3.7.1). Im Eluat ist eine leichte Anreicherung von BSA gegenüber Transferrin zu erkennen.

Eine spezifische Anreicherung von Glykoproteinen aus einem Gemisch von unglykosylierten und glykosylierten Proteinen war im gewählten System nicht möglich. Weitere Experimente mit anderen Proteinproben zeigen ein günstigeres Verhältnis von An- und Abreicherung. So zeigt z.B. IgG eine leichte Anreicherung gegenüber Carboanhydrase (nicht abgebildet), die nicht-glykosylierten Proteine treten aber im Eluat deutlich auf. Die APB-Agarose bindet Proteine unspezifisch (Matrixbindung).

Enzymatische Anwendung in EPPS-Puffer: Weil hier die Etablierung einer Methode angestrebt wurde, in der enzymatische Reaktionen an immobilisierten Proteinen durchgeführt werden sollen, mußte die technische Realisierbarkeit der Enzymreaktionen, im für die Bindung notwendigen Puffersystem evaluiert werden. 10 µg Ovalbumin wurde für diesen Zweck mit Trypsin lt. Herstellerangaben und in EPPS-Puffer parallel verdaut. 10 µg Transferrin wurde mit PNGaseF lt. Herstellerangaben und in EPPS-Puffer parallel behandelt.

Ovalbumin wurde mit Trypsin in EPPS-Puffer besser fragmentiert als in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer. In der SDS-PAGE Analyse wurde ein Viertel (entsprechend 2.5 µg Ovalbumin) der lt. Herstellerangaben verdauten Probe aufgetragen. Von der in EPPS-Puffer verdauten Probe wurde die Hälfte (entsprechend 5 µg Ovalbumin) eingesetzt. Obwohl quantitativ doppelt soviel Probe zur SDS-PAGE eingesetzt wurde zeigt die Probe eine deutlich schwächere Bande (Abb. 3.7.2 links).

In dem vom Hersteller empfohlenen Puffer wurde Transferrin zu zwei, knapp unterhalb der Bande des unbehandelten Transferrins laufenden, Banden verdaut. Die in EPPS-Puffer verdaute Probe zeigt, außer den beiden Banden die dem verdauten Produkt zugeordnet werden, noch die unverdaute Bande auf ursprünglicher Höhe.

PNGaseF kann zu einem gewissen Grad eine Umsetzung im EPPS-Puffer System ausführen. Eine quantitative Umsetzung ist aber nicht gewährleistet.

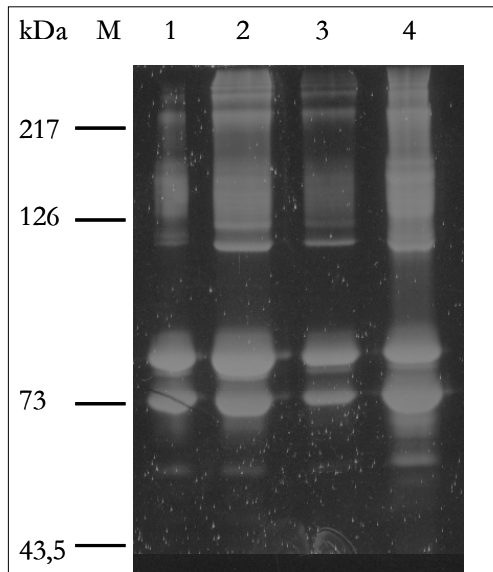


Abb. 3.7.1: PAGE- (7.5%ig, nicht-reduzierend, Fluoreszenzfärbung) Analyse der Fraktionierung von BSA und Transferrin auf APB-Agarose. BSA ist in der unteren, Transferrin in der oberen Bande zu erkennen. Spur 1: Ausgangsmaterial, Spur 2: Durchlauf 1/10 Ansatz, Spur 3: 0-1 ml des Waschschrüttel 1/10 Ansatz, Spur 4: Eluat 1/4 Ansatz

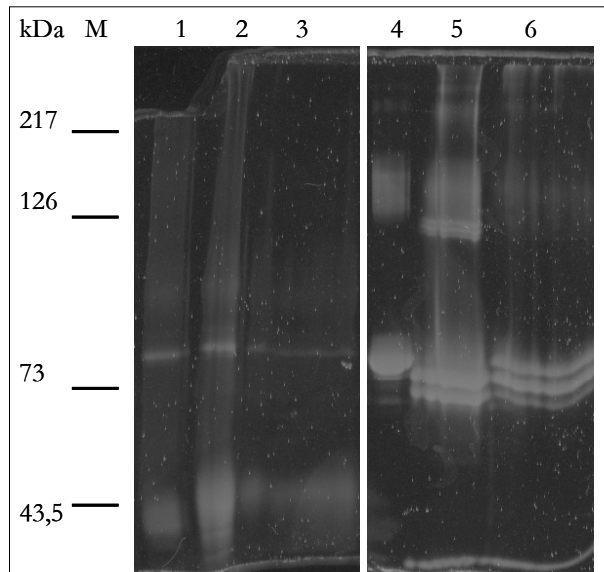


Abb. 3.7.2: PAGE- (7.5%ig, nicht-reduzierend, Fluoreszenzfärbung) Analyse der enzymatischen Anwendung in EPPS-Puffer. Links: Trypsinverdau von Ovalbumin. Rechts PNGaseF-Verdau von Transferrin. Spur 1: 1.5 µg Ovalbumin, Spur 2: Verdau lt. Herstellerangaben 1/4 Reaktionsansatz, Spur 3: Verdau in EPPS-Puffer 1/2 Reaktionsansatz, Spur 4: unbehandeltes Transferrin, Spur 5: Verdau lt. Herstellerangaben, Spur 6: Verdau in EPPS-Puffer

Evaluierung auf Peptidebene

Um die Fraktionierung von glykosylierten Substraten zu evaluieren wurden je 10 µg der Glykopeptide H12 (Sequenz: AHGVT SAPDTRPAPGSTAPPA, fett: GalNAc-Glykosylierung, $M_i = 2161.2$ Da), A3M1 (Sequenz: AHGVT SAPESRPAPGSTAPPA, fett: Gal-GalNAc-Glykosylierung, $M_i = 2323.3$ Da), A8 (Sequenz: AHGVT SAPDTRPAPGSTAPPA, fett: Gal-GalNAc Glykosylierung, $M_i = 3419$ Da) und das Peptid VPT21 (Sequenz: VPTASSRRPQRPHRVHSLTA, $M_i = 2351.3$ Da) der Fraktionierung auf APB-Agarose unterzogen. Die einzelnen Fraktionen wurden gesammelt, in der Vakuumzentrifuge eingengt und vor MALDI-MS Analyse auf C_{18} -ZipTips gereinigt.

Im Ausgangsmaterial (Abb. 3.7.3) des Experimentes sind alle vier Peptide massenspektrometrisch detektierbar. Das VPT21-Peptid ist durch ein deutlich weniger intensives Signal vertreten, verglichen mit H12 und A3M1. Das A8-Peptid erscheint aufgrund seiner Polarität als das schwächste Signal. Der Durchfluß der zyklisch gebundenen Probe (Abb. 3.7.4) zeigt ein ähnliches Bild, A8 ist aber angereichert. In der Waschfraktion (Abb. 3.7.5) weist H12 die höchste Intensität auf, in absteigender Intensität folgen A3M1, A8 und VPT21. Im Eluat (Abb. 3.7.6) erscheint VPT21 mit der stärksten Intensität, die Glykopeptide werden nicht oder nur schwach detektiert.

In der Fraktionierung konnten die monoglykosylierten Peptide H12 und A3M1 nicht angereichert werden. Diese Peptide verblieben in Lösung und wurden nicht bzw. nur in schwachen Umfang an APB-Agarose gebunden. Das VPT21-Peptid wurde am stärksten angereichert, was auf unspezifische Bindung an die Agarose-Matrix schließen läßt. Als einziges Glykopeptid wird A8 in signifikantem Ausmaß im Eluat wieder gefunden. Ob es sich um eine spezifische Bindung an APB handelt, bleibt allerdings fraglich. Insgesamt erscheint die Chromatographie auf APB-Agarose nicht geeignet für die Anreicherung von Glykopeptiden.

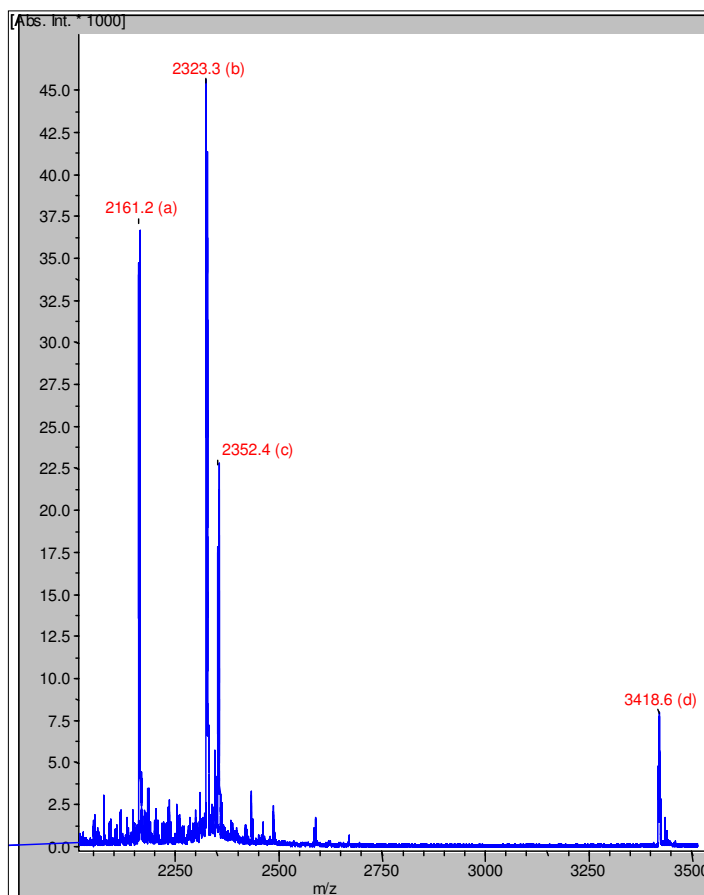


Abb. 3.7.3: MALDI-MS Analyse des Ausgangsmaterials. Zuordnung der MH^+ -Ionen:
a – H12-Peptid,
b – A3M1-Peptid,
c – VPT21-Peptid,
d – A8-Peptid

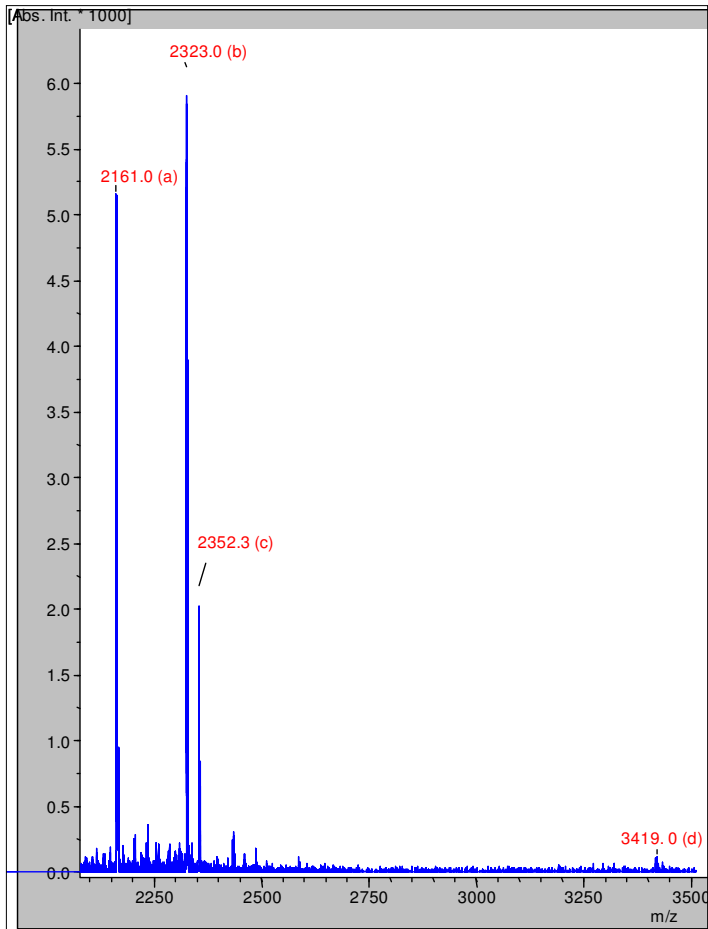


Abb. 3.7.4: MALDI-MS Analyse vom Durchfluß der Chromatographie auf Aminophenylborat.

Zuordnung der MH^+ -Ionen:

- a – H12-Peptid,
- b – A3M1-Peptid,
- c – VPT21-Peptid,
- d – A8-Peptid

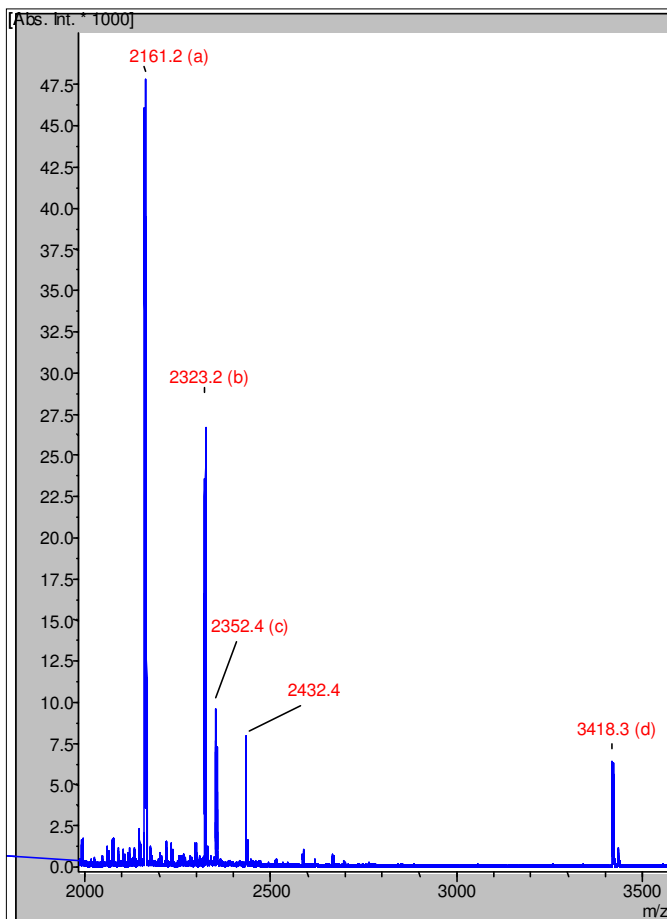


Abb. 3.7.5: MALDI-MS Analyse der Waschschrirte der Chromatographie auf Aminophenylborat.

Zuordnung der MH^+ -Ionen:

- a – H12 Peptid,
- b – A3M1 Peptid,
- c – VPT21 Peptid,
- d – A8-Peptid

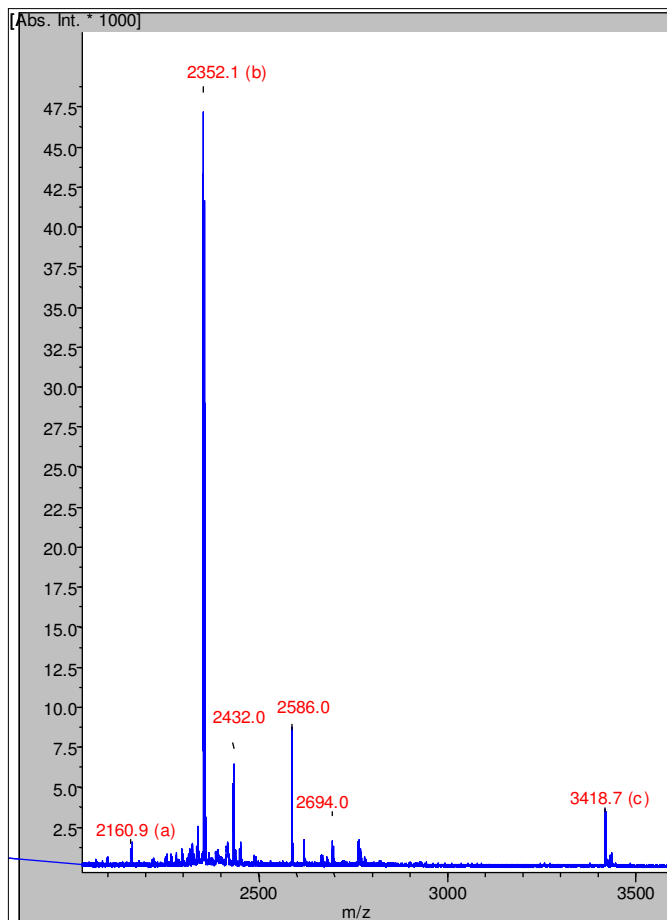


Abb. 3.7.6: MALDI-MS Analyse vom Eluat der Chromatographie auf Amino-phenylborat.
Zuordnung der MH^+ -Ionen:
a – H12 Peptid,
b – VPT21-Peptid,
c – A8-Peptid

Färbung von Glykoproteinen

3.8) Glykoproteinfärbung mit 3-Aminophenylborat-Fluorescein- isothiocyanat

Dünnschichtchromatographie auf Cellulose

Die erfolgreiche Synthese des 3-Aminophenylborat-Fluoresceinisothiocyanat-Produktes (FITC-APB) wurde durch Dünnschichtchromatographie und MALDI-MS experimentell bestätigt.

Hierzu wurde dem Reaktionsansatz 0.5 μ l entnommen und an dem unteren Ende einer Cellulose Dünnschichtplatte aufgetragen. Neben den aufgetragenen Reaktionsansatz wurde, als Referenz, FITC-Lösung aufgetragen. Nach dem Trocknen erfolgte die Trennung

im Laufmittel, wie beschrieben. Eine weitere Dünnschicht-chromatographie wurde nach Reinigung des Reaktionsprodukts auf Cellulose durchgeführt.

Auf den Chromatographieplatten ist zwischen dem ungereinigten Reaktionsansatz und reinem FITC kein Unterschied im Laufverhalten zu erkennen. Das FITC „schmiert“ Fäulen ca. 5.5 cm weit. Nach Reinigung auf Cellulose bleibt das FITC-Signal stationär am Auftragspunkt (Abb. 3.8.1).

Das Signal des FITC-APB wird von dem Signal des nicht umgesetzten FITC überdeckt. Nach Reinigung und Entfernung des freien FITC liegt FITC-APB in reiner Form vor. Abgebildet ist FITC-APB in Fraktion 2 der Cellulosereinigung. Die Fraktionen 1 und 3-8 zeigen das gleiche Signal in geringerer Intensität (nicht abgebildet).

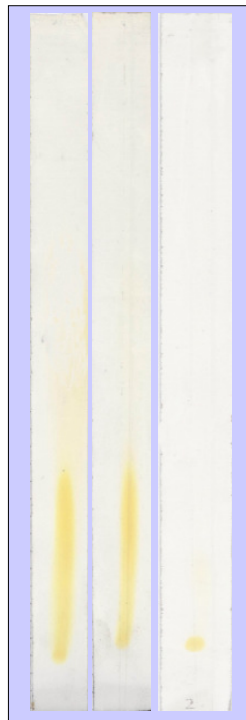


Abb. 3.8.1: Dünnschichtchromatographie von FITC-APB und FITC. Links ist ein Aliquot des Reaktionsansatzes aufgetragen. In der Mitte ist reines FITC aufgetragen. Rechts wurde die Fraktion 2 der Cellulose-Reinigung aufgetragen. Das gereinigte FITC-APB besitzt im gewählten Laufmittel keine Mobilität, während FITC einen „Schmier“ erzeugt der ca. 5.5 cm weit läuft.

MALDI-MS Analyse der Synthese

Um die Synthese des FITC-APB weiter zu bestätigen, wurden Proben des Reaktionsansatzes und FITC-APB in Fraktion 2 der Cellulosereinigung durch MALDI-MS analysiert. Dazu wurde je 1 μ l des Ansatzes entnommen und in 50fachem Wasserüberschuß verdünnt. Die Lösung wurde durch mehrfaches Pipettieren an C_{18} -ZipTips gebunden und in 80% AcN, 0.1% TFA eluiert. Während der Bindung färbte sich das Bett der C_{18} -ZipTips gelb und während der Elution entfärbte sich dieses wieder.

Die Färbung und Entfärbung während der ZipTip-Reinigung belegt, daß FITC-APB in einem RP-chromatographischen Schritt durch hydrophobe Wechselwirkung des FITC-Anteils mit der C_{18} -Matrix gereinigt werden kann.

In den MALDI-TOF Spektren treten MH^+ -Ionen bei 526 Da (Signal a) und 544 Da (b) auf. Das Ion bei 526 Da kann dem FITC-APB zugeordnet werden, das Ion bei 544 Da einem FITC-APB-Monohydrat. Das Spektrum der Cellulose-gereinigten Probe zeigt dabei wesentlich höhere Intensitäten.

Dies belegt einerseits die erfolgreiche Synthese von FITC-APB und ferner die erfolgreiche Reinigung über die Cellulosesäule.

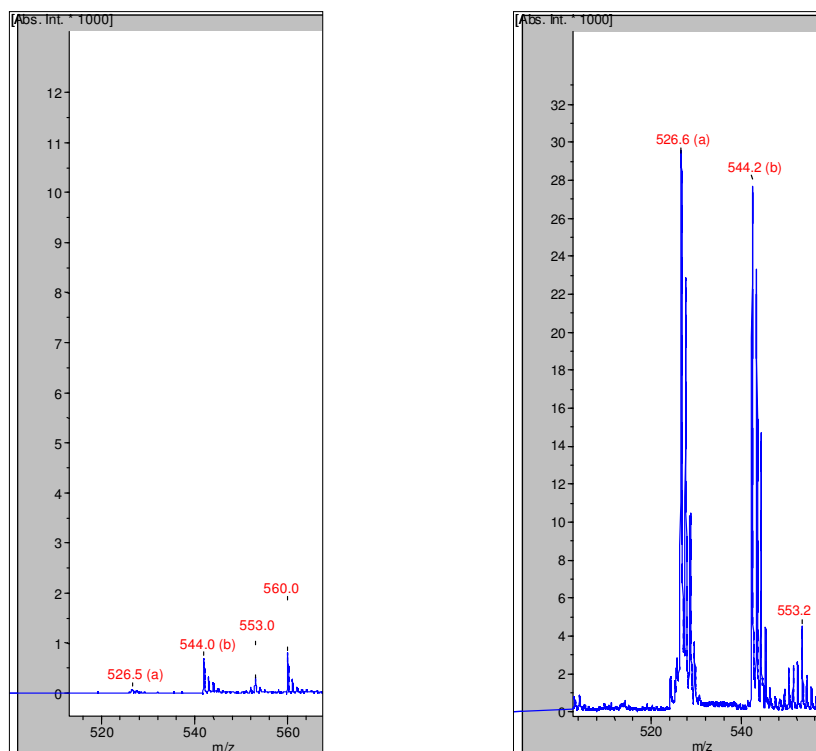


Abb. 3.8.2 (links) und 3.8.3 (rechts): MALDI-TOF-MS Spektren von FITC-APB vor (3.8.2) und nach (3.8.3) Reinigung auf Cellulose. Das MH^+ -Ion bei 526 Da (a) ist FITC-APB zuzuordnen, das MH^+ -Ion bei 544 Da FITC-APB-Monohydrat. Der Erfolg der Reinigung ist durch die Intensitäten der Signale zu erkennen.

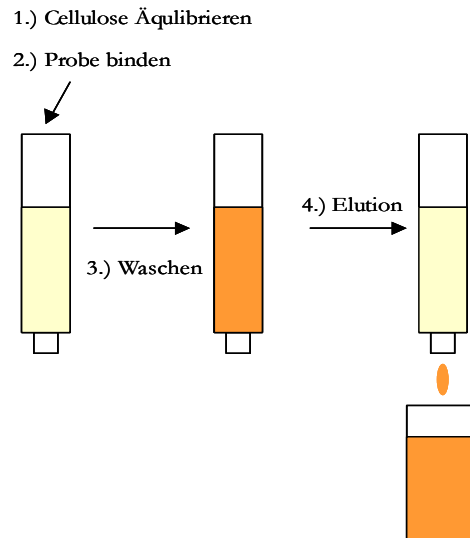
Reinigung des FITC-APB durch Säulenchromatographie auf Cellulose

Der Syntheseansatz wurde wie beschrieben auf einer Cellulosesäule gereinigt.

Während der Bindung und des Waschschrtes färbte sich die Cellulosesäule tieforange. Bei der Elution entfärbte sich die Säule und die Färbung trat im Lösungsmittel auf.

Die Färbung und Entfärbung während der Wasch- und Elutionsschritte lieferte einen Beleg dafür, daß FITC-APB bei erhöhtem pH-Wert das Potential hat, spezifisch an cis-Diole von Kohlenhydraten zu binden und so zu färben.

Abb. 3.8.5: Reinigung von FITC-APB durch Säulenchromatographie auf Cellulose. Während Bindung und Waschen färbt FITC-APB (orange dargestellt) die Säule gelb-orange an. Bei Elution geht die Färbung in das Lösungsmittel über.



Dot-Blot-Färbung von Glykoproteinen mit FITC-APB

Die Dot-Blot Färbungen wurden in drei verschiedenen Ansätzen, wie beschrieben, durchgeführt. Weil die elektronische Dokumentation wegen technischer Probleme nicht möglich war, wurde eine visuelle Inspektion unter UV-Licht vorgenommen. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 3.8.1 – 3.8.3 dargestellt. Bei mit „+“ gekennzeichneten Verdünnungen waren unter UV-Licht fluoreszierende Signale zu sehen. Die Färbung der PVDF-Membran war zu vernachlässigen. Um Objektivität bei der Evaluierung zu gewährleisten, wurde diese von einer unbeteiligten Person wiederholt. Die Ergebnisse waren deckungsgleich mit den dargestellten.

Bei der Dot-Blot-Färbung von Proteinen und Glykoproteinen kam es gelegentlich zu einer Färbung von unglykosylierten Proteinen sowie, im Fall von HGA, einem Ausbleiben der Färbung bei Glykoproteinen (s. Tabellen 3.8.1 – 3.8.3).

Die Färbung von Dot-Blots mit FITC-APB weist demnach keine ausreichende Spezifität für Glykoproteine auf.

Protein	Menge				
	10 µg	1 µg	100 ng	10 ng	1 ng
HGA	-	-	-	-	-
K-Casein	+	+	-	-	-
IgG	+	+	+	-	-
Fetuin	+	-	-	-	-
a-1-acidic GP	-	-	-	-	-
Transferrin	-	-	-	-	-
Carboanhydrase	+	-	-	-	-
Phosphorylase B	+	+	+	-	-
BSA	+	+	-	-	-
Lysozym	+	-	-	-	-

Tabelle 3.8.1: Dot Blot geblockt mit Tween - Ergebnisse der visuellen Inspektion

Protein	Menge				
	10 µg	1 µg	100 ng	10 ng	1 ng
HGA	-	-	-	-	-
K-Casein	+	+	-	-	-
IgG	+	-	-	-	-
Fetuin	+	-	-	-	-
a-1-acidic GP	+	-	-	-	-
Transferrin	+	-	-	-	-
Carboanhydrase	+	-	-	-	-
Phosphorylase B	+	+	-	-	-
BSA	+	-	-	-	-
Lysozym	+	+	-	-	-

Tabelle 3.8.2: Dot Blot geblockt mit BSA - Ergebnisse der visuellen Inspektion

Protein	Menge				
	10 µg	1 µg	100 ng	10 ng	1 ng
HGA	-	-	-	-	-
K-Casein	+	-	-	-	-
IgG	-	-	-	-	-
Fetuin	-	-	-	-	-
a-1-acidic GP	-	-	-	-	-
Transferrin	-	-	-	-	-
Carboanhydrase	-	-	-	-	-
Phosphorylase B	+	-	-	-	-
BSA	+	+	-	-	-
Lysozym	-	-	-	-	-

Tabelle 3.8.3: Dot Blot geblockt mit Tween und BSA - Ergebnisse der visuellen Inspektion

In vivo Strategien zur Anreicherung des Glykoproteoms

3.9) Metabolische in vivo-Markierung von Glykoproteinen mit Azidozuckern

In-vivo-Markierung und Western Blot

Für die metabolische Markierung mit Azidozuckern wurden die Zelllinien MDA-MB231 und T47-D unter Zugabe von per-O-acetyliertem GalAz kultiviert. Die Isolierung von Gesamtprotein, die Staudinger Ligation und der Western-Blot wurden wie beschrieben durchgeführt.

In Abb. 3.9.1 und 3.9.2 ist der Blot der mit GalAz markierten Proteine zu sehen. Die Spuren der unmarkierten Fraktionen sind negativ, die Detektion ist spezifisch für die unter

per-O-acetyliertem GalAz -Zugabe gewachsenen Zellen. Man kann erkennen, daß T47-D Zellen nur schwach markiert werden. Im zwei Min. lang entwickelten Blot ist eine gefärbte Bande bei ca. 60 kDa zu erkennen. Darüber und darunter bei ca. 70 bzw. 45 kDa sind zwei schwächere Banden zu erkennen. In der markierten Fraktion der MDA-MB231 Zellen wurde bei Molekulargewichten zwischen 125 und 35 kDa ein heterogenes Bandenmuster detektiert.

Die spezifische Detektierbarkeit von Glykoproteinen nach metabolischer Markierung mit dem abiotischen GalAz Zucker konnte hier belegt werden. Allerdings scheint die Methode nicht für die differentielle Proteomik anwendbar zu sein.

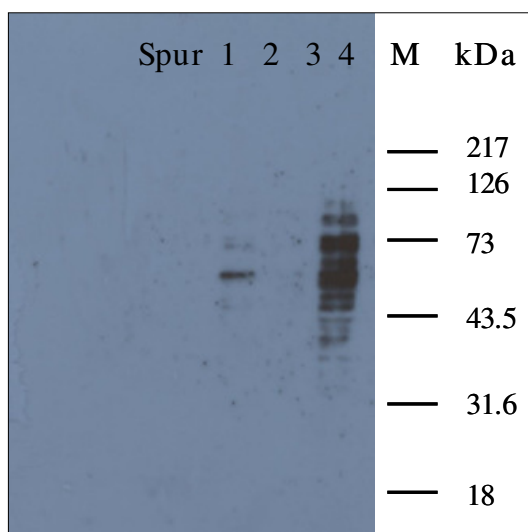


Abb. 3.9.1: Western Blot Analyse des Gesamtproteins von Zellen die mit bzw. ohne Zugabe von per-O-acetyliertem GalAz kultiviert wurden, 30 Sek. Belichtet. Spur 1: T47-D Zellen kultiviert ohne GalAz, Spur 2: T47-D Zellen kultiviert mit GalAz, Spur 3: MDA-MB231 Zellen kultiviert ohne GalAz, Spur 4: MDA-MB231 kultiviert mit GalAz, M: Marker

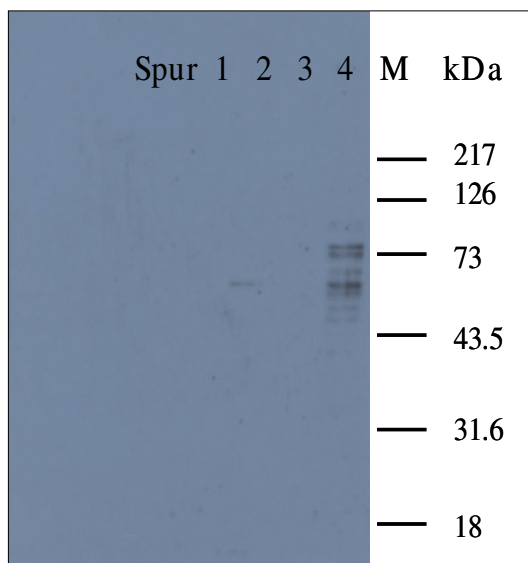


Abb. 3.9.2: Western Blot Analyse des Gesamtproteins von Zellen die mit bzw. ohne Zugabe von per-O-acetyliertem GalAz kultiviert wurden, 2 Min. belichtet. Spur 1: T47-D Zellen kultiviert ohne GalAz, Spur 2: T47-D Zellen kultiviert mit GalAz, Spur 3: MDA-MB231 Zellen kultiviert ohne GalAz, Spur 4: MDA-MB231 kultiviert mit GalAz, M: Marker

4) Diskussion

Im Proteinbiochemischen Gebiet der „Proteomik“ vereinen sich mittlerweile mehrere strukturell bzw. funktionell unterteilte Forschungsfelder. Beispiele für Proteomik-Felder, die sich mit strukturellen Modifikationen von Proteinen befassen sind z.B. das Phosphoproteom (Raggiaschi et al. 2005) oder das Glykoproteom (Harvey 2001). Funktionelle Proteomik-Forschungsfelder sind solche, die sich mit dem Gesamtproteom eines Gewebes, Organs oder Körperflüssigkeit befassen. Ein viel beachtetes Beispiel hierfür ist das humane Serumproteom, das in diagnostischer Hinsicht für viele Krankheiten interessant ist (Bons et al. 2005, Alaiya et al. 2005).

Unter den Proteomik-Subfeldern nimmt das Glykoproteom eine Sonderrolle ein, weil man es hier mit den in chemischer (z.B. Protein-pI und Polarität) und physikalischer (Molekulargewicht) Hinsicht heterogensten posttranslationalen Modifikationen zu tun hat. Im Falle des, in der vorliegenden Arbeit behandelten, Mucin-Typ O-Glykoproteoms tritt dieser Aspekt im besonderen Maße hervor, weil man hier in der Analyse auf technische Schwierigkeiten stößt, die bei anderen Glykosylierungsarten nicht gegeben sind. Es gibt z.B. keine Konsensussequenzen, wie im Falle der N-Glykosylierung, und die Komplexität der O-initiierten Glykane übertrifft die der N-initiierten bei weitem (Hanisch 2001). Obwohl mittlerweile Software (z.B. Net-O-Glyc) zur Verfügung steht, die AS-sequenzabhängig Voraussagen über die Wahrscheinlichkeit einer O-Glykosylierung von Ser/Thr trifft erreicht diese keine absolute Zuverlässigkeit (max. 70%). Ferner steht kein Enzym zur Verfügung, das (analog zur Funktion der PNGaseF bei N-Glykanen) die Abspaltung des Core-GalNAc von Ser/Thr bei Vorliegen verschiedener Core-Strukturen (Core 1 – 8) leistet.

Vor diesem Hintergrund sollten in dieser Arbeit methodische Verbesserungen hinsichtlich Sensitivität der Detektion, der „Coverage“ und damit der Identifizierungsrate glykosylierter Proteine etabliert werden. Um diesem Ziel näher zu kommen, wurden mehrere Teilprojekte auf der Grundlage verschiedener in-vitro-Techniken durchgeführt. Ferner wurde eine, bereits publizierte, in-vivo Technik (Hang et al. 2003) getestet die auf die Ebene der Proteomik- und insbesondere O-Glykoproteomik geführt werden sollte. Bei allen Ansätzen stand auch eine Kompatibilität mit einer Hochdurchsatz-Analytik im Vordergrund.

4.1) β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit Biotin

Die Methode „ *β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit Biotin*“ wurde zunächst an einem Gemisch von HSA als unglykosyliertem Protein und HGA als glykosyliertem Protein durchgeführt. In beiden Varianten dieser Technik konnten bekannte, glykosylierte tryptische Peptide von HGA mit Biotin modifiziert und in MALDI-MS Analysen identifiziert werden. Die MALDI-MS Analyse zeigte eine hohe Effizienz der chromatographischen Reinigung markierter tryptischer Peptide auf Streptavidin.

Ein Experiment an einem monoglykosylierten Peptid sollte die prinzipielle Eignung der Methode zur β -Eliminierung von Glykanen und Markierung mit Biotin demonstrieren. In diesem Experiment wurde neben dem erwarteten, einfach biotinylierten Peptid noch ein zweifach biotinyliertes Peptid detektiert. Das Auftauchen dieses zweifach biotinylierten Produktes zeigt eine unspezifische Markierung von unglykosylierten AS mit Biotinamidocaprinsäure an.

Wegen des Auftretens des zweifach biotinylierten Produktes sollte anhand eines unglykosylierten Peptids geklärt werden ob, bzw. in welchem Ausmaß unspezifische Markierungen vorkommen. In der Analyse dieses Markierungs-Experimentes wurden das acetylierte und nicht-acetylierte VPT21-Peptid sowie das acetylierte, biotinylierte und nicht-acetylierte, biotinylierte Peptid und ferner eine homologe Reihe von biotinylierten Degradierungsprodukten, ausgehend vom aminoterminalen Ende des Peptides identifiziert. Weil im Markierungs-Experiment am VPT21-Peptid eine Reihe von Degradierungsprodukten aufgetreten ist, sollte ein weiteres klären in welchem Ausmaß ein Abbau des Peptides unter den gewählten ammoniakalischen Bedingungen statt findet. In der Analyse konnten homologe Reihen von acetylierten und nicht-acetylierten Degradierungsprodukten identifiziert werden die, ausgehend vom aminoterminalen Ende, bis einschließlich die 13. AS umfaßten.

Die Methode „ *β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit Biotin*“ eignet sich nicht für eine Analyse von Mucin-Typ O-glykosylierten Proteinen. Die Peptid-Degradierung schränkt die Möglichkeit zur Identifizierung glykosylierter AS nur bedingt ein und kann, wie hier demonstriert, bei entsprechend durchgeführter Analyse, sogar Informationen über die Peptid-Sequenz liefern. Ausschlaggebend für das Verwerfen der Methode ist vor allem die falsch-positive Identifizierung von Ser/Thr als glykosylierten AS, infolge unspezifischer Dehydration. Die Ergebnisse des Markierungs-Experimentes am VPT21-Peptid legen nahe, daß die Addition von Biotinamidocaprinsäure hauptsächlich an nicht-acetyliertem

Peptid und damit eventuell an primären Aminogruppen stattgefunden hat. Eine Markierung wurde nämlich vorwiegend an Peptiden gefunden, bei denen keine Acetylierung vorlag. Hierfür kommen Gln und Arg als AS mit primärer Aminogruppe für eine Modifikation in Frage. Mindestens zwei MH^+ -Ionen lassen sich aber acetyliertem und biotinyliertem Peptid zuordnen, was auf die Eliminierung von Wasser aus Hydroxy-AS und deren anschließender Modifikation schließen läßt. Ferner sind in den Spektren der VPT21-Peptid-Analysen eindeutig Produkte detektierbar die unter Wasser-Eliminierung entstanden sind. Weil NH_3 an diese ungesättigten Hydroxy-AS-Derivate addiert, ist somit auch die falsch-positive Markierung von Hydroxy-AS mit Biotinamidocaprinsäure gegeben.

4.2) β -Eliminierung von O-Glykanen mit anschließender Michael Addition von Nucleophilen – BEMAD

Die Methode „ *β -Eliminierung von O-Glykanen mit anschließender Michael Addition von Nucleophilen – BEMAD*“ wurde zunächst an dem synthetischen GalNAc-glykosylierten H11-Peptid getestet, wobei die von Wells et al (2002) publizierten Reaktionsbedingungen gewählt wurden. Die Analyse der Reaktionsprodukte identifizierte das erwartete Dithiothreitol- (DTT-) markierte Peptid mit etwa 30% Ausbeute. Nach Chromatographie auf aktivierter Thiol-Sepharose konnte das DTT-markierte Peptid in reiner Form dargestellt werden. Ferner wurde in der Analyse dieses Experimentes ein sehr schwach vertretenes MH^+ -Ion identifiziert werden, das einem zweifach DTT-markierten H11-Peptid zugeordnet wurde. Das Auftreten des zweifach markierten Peptids zeigt eine unspezifische Markierung unglykosylierter AS mit DTT an.

Wegen des Auftretens eines zweifach DTT-markierten Peptids sollte geklärt werden, ob bzw. in welchem Ausmaß H_2O -Eliminierungen aus unglykosylierten Hydroxy-AS vorkommen. Die Eliminierung von H_2O wurde untersucht, weil DTT an die ungesättigten Derivate mit hoher Effizienz addiert und zu falsch-positiven Resultaten führen könnte. Hierfür wurden weitere Experimente an nicht-glykosylierten und glykosylierten Peptiden unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Die Analyse durch MALDI-MS zeigte, daß die Behandlung unter Bedingungen der publizierten BEMAD-Technik in starkem Maße zu unspezifischer H_2O -Eliminierung nicht-glykosylierter Peptide führte. Dies wurde

un einem Experiment bestätigt, in dem es bereits unter Bedingungen zu unspezifischen Eliminierungen kam, die keine quantitative Eliminierung von Glykanen gewährleisten. Die BEMAD-Technik eignet sich demnach nicht für die Analyse von Mucin-Typ O-glykosylierten Proteinen. Während hier demonstriert wurde, daß die kovalente Chromatographie von DTT-modifiziertem Analyt auf aktivierter Thiol-Sepharose erhebliche Vorteile in die Fraktionierung und die Sensitivität der Analyse einbringt (s. auch Amoresano et al. 2004) gewährleistet die Markierung selber keine Spezifität für glykosylierte AS, weil auch unglykosylierte Ser/Thr in Dehydro-Derivate überführt werden. Weil Dehydro-Derivate sehr effektiv mit DTT markiert werden und so zur falsch-positiven Identifizierung von glykosylierten AS führen sollte die Methode nicht für die Detektion und Analyse von O-Glykosylierung eingesetzt werden.

4.3) Identifizierung von O-Glykoproteinen per Hydrazidchemie und Massenspektrometrie

Um das Konzept der Methode „*Identifizierung von O-Glykoproteinen per Hydrazidchemie und Massenspektrometrie*“ zu testen wurden ein unglykosyliertes Peptid und ein Gal-GalNAc-glykosyliertes Peptid oxidiert, an Hydrazidharz gekoppelt, gewaschen und eluiert. In der Analyse fiel vor der Elution ein MH^+ -Ion auf das dem Glykopeptid nach Hydrolyse der terminalen Galaktose zugeordnet werden konnte, was eine vorzeitige Freisetzung des Analyts belegt. Die Kinetik-Studien haben gezeigt, daß die Hydrolyse des terminalen Kohlenhydrats auf eine intrinsische Eigenschaft der basischen Hydrazidharze zurückzuführen ist. Für die effiziente Bildung der Hydrazonbindung sind schwach-saure Bedingungen (pH 5.0 – 5.5) notwendig (King et al. 1986). Die Bedingungen der Kopplung ähneln daher der Prozedur des *Smith*-Abbaus, wo Kohlenhydrat-Substrate oxidiert und mit milder Säure behandelt werden, um Polysaccharide partiell abzubauen. Unter den gewählten Bedingungen der Kopplung ist es aber unwahrscheinlich, daß dieser Abbau-Mechanismus eine dominante Rolle spielt. Eigene Erfahrungen belegen zudem, daß die Hydrolyse von oxidierten, terminalen Zuckern im Kopplungspuffer ohne Einwirkung des Hydrazidharzes nur in sehr geringem Ausmaß stattfindet.

Ferner wurde demonstriert, daß Substrate mit terminalen Sialinsäuren nicht quantitativ an Hydrazidharz gekoppelt werden können. Die Oxidation vicinaler, hydroxylierter C-Atome

kann bei Sialinsäuren ausschließlich in der Glycerin-Seitenkette stattfinden (s. Abb. 4.3.1). Bei der Oxidation können entweder die C-7- und C-8-Atome oder C-8- und C-9-Atome in Aldehyde überführt werden. In jedem Fall wird die C-C-Bindung zwischen oxidierten Kohlenstoffatomen gespalten, so daß je ein Aldehyd (an C-7 oder C-8) am Kohlenhydratgerüst verbleibt. Im Falle der Oxidation von C-7 und C-8 entsteht ein Aldehyd an C-7, das nach unseren Beobachtungen nicht mehr an Hydrazidgruppen bindet. Dies wurde durch die Präsenz des zweifach sialylierten A14ST-Peptids, unter Verlust von 2x (C₂O₂H₆), im Überstand der Kopplungsreaktion belegt. Das Oxidationsprodukt von C-8 und C-9 konnte regulär gekoppelt werden, was durch die Präsenz des zweifach GalGalNAc-glykosylierten A14ST-Peptids im Eluat belegt ist.

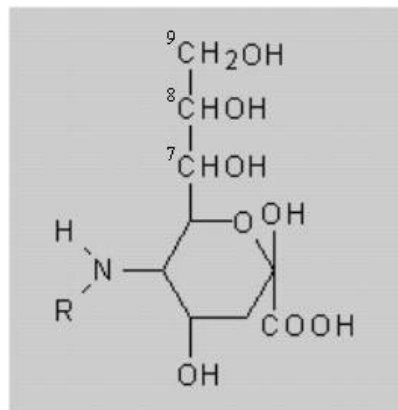


Abb. 4.3.1: Sialinsäure mit Glycerin-Seitenkette. Die C-Atome der Glycerin-Seitenkette sind nach IUPAC-Nomenklatur nummeriert. R=H (Wasserstoff), =COCH₃ (Acetyl-) oder =COCH₂OH (Glycolyl-). Modifiziert übernommen von www.dshs.de.

Bei einer Anwendung der Methode auf Proteine konnten in beiden evaluierten Varianten glykosylierte Peptide, neben nicht-glykosylierten, im Überstand der Kopplungsreaktion identifiziert werden. Dies legt entweder eine nicht-quantitative Bindung glykosylierter Peptide oder deren verfrühte Freisetzung durch Hydrolyse nahe. In der Analyse des Eluats der Variante 1. (Trypsinisierung auf Harz) konnten MH⁺-Ionen ausschließlich glykosylierten HGA-Peptiden zugeordnet werden. Dies demonstriert, daß die kovalente Fraktionierung auf Hydrazidharz in der Variante 1. die Spezifität für Glykopeptide gewährleistet. In der Analyse des Eluats der Variante 2. (enzymatische Schritte vor Kopplung) konnten glykosylierte Peptide und ein nicht-glykosyliertes identifiziert werden. In der Analyse der Waschschrte nach Elution wurden weitere glykosylierte Peptide zugeordnet. Im Falle des Auftretens des unglykosylierten Peptids kann nicht unterschieden werden ob dieses durch spezifische Hydrolyse eines einfach vorliegenden GalNAc oder über unspezifische Bindung ins Eluat hinübergetragen wurde. Anderweitig zeigt die Fraktionierung eine hohe Effizienz.

Die Analyse von Fraktionen nach Elution läßt erkennen, daß die erzeugten Spektren durchgehend eine schlechte Qualität aufweisen. Das Verhältnis von Hintergrund zu Signalintensität liegt typischerweise bei 1:10 oder schlechter. Bei den eingesetzten Proteinmengen von 20 µg sollten bei durchschnittlicher Ausbeute der Fraktionierung und der hohen Sensitivität der MALDI-MS-Technologie Analysen von hoher Qualität erzeugt werden können.

Die Methode „*Identifizierung von O-Glykoproteinen per Hydrazidchemie und Massenspektrometrie*“ gewährleistet eine Fraktionierung von nicht-glykosylierten und glykosylierten Species bei äußerst stringentem (8 M Harnstoff), extensivem Waschen, die Ausbeuten sind aber sehr gering, was sich in der schlechten Qualität der MALDI-MS Analysen niederschlägt. Dies wird durch Experimente bestätigt in denen die Kopplung und Elution von Proteinen und Glykoproteinen getestet wurde (eigene Erfahrungen). Hier werden bei Einsatz von hohen Proteinmengen (z.B. 100 µg Serum) nur marginale Mengen von Protein in der PAGE (Fluoreszenzfärbung) detektiert. Auf welche Weise diese hohen Mengen des Analyts der Analyse entzogen werden ist spekulativ, es handelt sich jedoch um reproduzierbare Effekte. Die Wahl von verschiedenen Hydrazidharz-Produkten hat auf diese Resultate keinen Einfluß. Weitere Nachteile von enzymatischen Anwendungen auf immobilisierte Proben (in Variante 1. bzw. publiziert von Hang et al.) ergeben sich aus der Natur der Immobilisierung. Eine Diffusion des immobilisierten Analyts ist z.B. nicht gegeben, was die Effizienz von Enzymreaktionen stark einschränkt. Enzyme werden im Vergleich zum Substrat in sehr kleiner Menge eingesetzt und dieses muß erst durch Diffusion erreicht werden. Ferner kann der Zugang des Enzyms zum Substrat durch das Harz sterisch blockiert sein (Highsmith 1992). Vor diesem Hintergrund können die Ergebnisse, die an HGA, als leicht zu trypsinisierendem Glykoprotein, gewonnen wurden nicht direkt auf andere biologische Proben übertragen werden, weil oft schon eine dichte O-Glykosylierung alleine ausreicht um einen Schutz vor Proteolyse zu gewährleisten (wie im Fall von Mucinen).

4.4) Hydrophile Affinitätschromatographie

Die Methode „*Hydrophile Affinitätschromatographie*“ ist eine Fraktionierungs-Technik, die zur Analyse von fragmentierten, gereinigten Proteinen angewendet und mit der N- und O-

glykosylierte AS und Glykanstrukturen analysiert wurden (Wada et al. 2004, Tajiri et al. 2005).

In dieser Arbeit sollte evaluiert werden, was die Fraktionierung qualitativ leistet und ob sie die MS-Analyse von Glykoproteinen verbessern kann. Hierfür wurde die Methode auf ein Gemisch aus synthetischen Peptiden und Glykopeptiden angewendet. Die MALDI-MS-Analyse zeigt, daß signifikante Mengen der glykosylierten Peptide im Überstand und den Waschschritten der Fraktionierung verbleiben. Das Eluat zeigt eine relative Abreicherung des nicht-glykosylierten Peptids von ungefähr 50%, verglichen mit der ursprünglichen Probe. Resultate, analog zu denen der synthetischen Peptide, wurden in der Fraktionierung tryptischer HGA-Peptide erzielt (Ergebnisse nicht aufgeführt). Im Überstand wurden glykosylierte Peptide identifiziert und im Eluat traten unglykosylierte HGA-Peptide auf.

Die evaluierte Methode weist eine Verbesserung für die Analyse von heterogenen Peptid-Gemischen auf, aber gewährleistet unter den publizierten Parametern keine hohe Spezifität für Glykopeptide. Die Beobachtung der Autoren, daß Peptide mit unglykosylierten Hydroxy-AS in signifikanter Menge im Eluat erscheinen, findet sich bestätigt.

Die tryptisch fragmentierten Proteine wurden bei Wada et al. im Anschluß an die „*hydrophile Affinitätschromatographie*“ über eine Umkehrphasen- (RP-) HPLC gereinigt und anschließend durch MALDI-MS analysiert. Die RP-HPLC-Chromatogramme der zuvor durch „*hydrophile Affinitätschromatographie*“ gereinigten Proben weisen i.A. ein übersichtlicheres Spektrum auf als die des „rohen“ tryptischen Verdaus. Da sich aber über die Wahl der RP-Chromatographie-Parameter auch ein Gesamt-Verdau fraktionieren läßt beschränkt sich die eingeführte Verbesserung in der Analyse auf eine erleichterte Vorauswahl der durch MS-Technologie zu analysierenden HPLC-Fractionen. Das Problem der Fragmentierung von Proteinen mit dichtem O-glykosidischem Besatz bleibt erhalten, ebenso das der Gewinnung eines rein vorliegenden Proteins aus biologischen Proben.

4.5) Partielle Deglykosylierung von Glykoproteinen und Glykopeptiden mit Trifluormethansulfonsäure (TFMSA)

Um die optimalen Reaktionsbedingungen für die partielle, chemische Deglykosylierung zu bestimmen, wurden zunächst Kinetik-Experimente durchgeführt. Hierbei ergab sich für die Deglykosylierung mit Trifluormethansulfonsäure eine optimale Inkubationszeit von 30 Min. bei 0°C bzw. von 1 Std. bei Zusatz von Toluol oder Anisol. Bei diesen

Inkubationszeiten wurden Kohlenhydrat-Ketten quantitativ bis auf Core-GalNAc-Niveau abgebaut, während die vollständige Deglykosylierung ein geringes Ausmaß ausmachte. Einen weiteren grundlegenden Schritt der Methode stellte die Fraktionierung auf HPA-Agarose dar. Um diesen Schritt zu evaluieren, wurden Chromatographie-Experimente mit einem synthetischen (tetra-) Gal-GalNAc-glykosylierten Peptid, nach TFMSA-Behandlung, durchgeführt. Diese ergaben einen entscheidenden Einfluß der Glykosylierungsvaleanz von Peptiden bei der Chromatographie (s. auch Monsigny 2000 und 1980). Die Chromatographie auf HPA-Lektin war in der Lage, Peptide mit drei und vier verbliebenen GalNAc-Resten anzureichern, zweifach glykosyliertes Peptid wurde an der Nachweisgrenze detektiert. Einfach glykosyliertes Peptid konnte nicht angereichert werden. Eine Anwendung der Methode auf HGA, mit tryptischem Verdau vor HPA-Chromatographie, bestätigte die Ergebnisse der Peptid-Experimente großenteils. Im Überstand der Chromatographie treten mehrere bekannte, glykosylierte HGA-Peptide auf. Das Eluat zeigt mehrere tryptische, glykosylierte HGA-Peptide, z.T. auch monoglykosylierte. Der Einfluß der Avidität auf die Fraktionierung kann eine entscheidende Einschränkung für die evaluierte Methode darstellen. Viele Glykoproteine sind multivalent in Bezug auf O-Glykosylierung, aber es existieren solche die schwach- bis monoglykosyliert sind. Diese würden bei der Chromatographie unter den gewählten Bedingungen eventuell nicht im Eluat erscheinen. Ferner schränkt diese Tatsache eine Anwendung auf tryptisch fragmentierte Proben ein, weil Peptide naturgemäß eine geringere Anzahl glykosylierter AS besitzen als das vollständige Protein.

Ferner wurden mehrere Experimente durchgeführt, in denen Proteine nach TFMSA-Behandlung über HPA-Chromatographie gereinigt werden sollten. Anschließend sollte eine PAGE bzw. die Proteolyse durchgeführt werden. Dieser Ansatz sollte sich vor allem die höhere Valenz von nicht-fragmentierten Glykoproteinen zunutze machen. Die SDS-PAGE-Analyse belegt, daß TFMSA-Behandlung keine Kompatibilität mit elektrophoretischen Techniken gewährleistet und die gängigen Methoden zur Protein-Reinigung/-Entsalzung diese nicht wieder herstellen. Der Grund für diesen Effekt könnte in einer ausgeprägten Degradierung des Analyts begründet liegen oder in der Aggregation von Proteinen, so daß diese nicht mehr in ausreichender Menge in Lösung gebracht werden können und eine Detektion mit Färbetechniken nicht mehr möglich ist. Die Inkompatibilität wird durch Publikationen verdeutlicht, in denen das Molekulargewicht des mit TFMSA deglykosylierten Proteins bestimmt wurde. Die Daten zur Molekularmaße wurden ausschließlich mit MS-Techniken an gereinigt vorliegendem Protein bestimmt

(Edge 2003, Letourneur et al. 2001, Romain et al. 1999, de Vocht et al. 1998). In einer Publikation, die Effekte verschiedener Deglykosylierungsmethoden evaluiert, wird eine Proteinbande von TFMSA-behandeltem *Ovine Submaxillary Mucin* (OSM) gezeigt. Die zur Deglykosylierung eingesetzte Proteinmenge ist aber extrem groß (10 Gramm) und die Autoren betrachten diesen Ansatz als sehr diffizil (Gerken et al. 1991).

Die Methode „*Partielle Deglykosylierung von Glykoproteinen und Glykopeptiden mit TFMSA*“ konnte hier nicht auf der Ebene der O-Glykoproteomik-Anwendung geführt werden. Die partielle Deglykosylierung ist für die Analyse eines gereinigt vorliegenden Glykoproteins oft sehr wertvoll, wie eine Vielzahl von Publikationen demonstriert (s. dazu das Review von Edge 2003). Ferner birgt sie den inhärenten Vorteil, daß die falsch-positive Identifizierung einer Glykosylierung ausgeschlossen ist. Proteomic-Ansätze verfolgen aber oft zwei Strategien: Eine Strategie verfolgt die spezifische Anreicherung eines Sub-Proteoms. Dies ist hier nicht möglich wegen der demonstrierten Nachteile der HPA-Lektin-Chromatographie, die keine quantitative Fraktionierung der partiell deglykosylierten O-Glykoproteine gewährleistet. Eine weitere Strategie verfolgt die Zuordnung neu lokalisierter Protein-*Spots* durch Vergleich der 2D-PAGE-Analyse einer gegebenen Probe mit einem Referenzgel. Hier schließt sich das Stanzen der *Spots* und die Identifizierung durch PMF an. Die neu lokalisierten Proteine können durch biologische Varianz oder, wie in dem hier verfolgten Ansatz, durch den Verlust der Glykan-Heterogenität an anderer Stelle auftreten. In dieser Methode werden zwar multiple Protein-Varianten auf ein Protein reduziert, was die färberische Detektion theoretisch verbessern könnte, aber die angeführten Beeinträchtigungen der SDS-PAGE ließen diesen Ansatz ebenfalls nicht zu.

3.6) Eliminierung von O-Glykanen durch Alkylamine und Identifizierung mit Massenspektrometrie

Die β -Eliminierung von O-Glykanen und Addition von Alkylaminen nach SDS-PAGE ist eine etablierte Technik, deren Eignung für die Identifizierung von glykosylierten AS demonstriert wurde (Hanisch et al. 2001). Die Alkylamin-Addition brachte mehrere Vorteile in die Analyse der Mucin-Typ O-Glykosylierung ein. So konnte z.B. die Proteolyse-Effizienz gesteigert und die Substitution der Peptide vereinheitlicht werden. Ferner wurde durch reduzierte Größe und Polarität und die gesteigerte

Ionisierungseffizienz, wegen der in saurer Matrix vorliegenden positiven Ladung der Alkylamin-Markierung, die massenspektrometrische Analyse verbessert.

In dieser Arbeit sollte evaluiert werden, ob und ggfs. welche Vorteile der Einsatz der verschiedenen Alkylamine für die Analyse und Identifizierung von O-glykosylierten Proteinen bietet. Ferner sollte geklärt werden, ob sich die Alkylaminierung vor SDS-PAGE einsetzen läßt. Diese Anwendung könnte die färberische Darstellung von O-Glykoproteinen verbessern, weil verschieden glykosylierte Species eines Proteins auf ein Protein reduziert werden. Die 2D-Muster der β -eliminierten Proteine werden in dieser Verfahrensvariante verschoben, verglichen mit nativen Proteinen. Diese Verschiebung könnte genutzt werden, um vormals glykosylierte Proteine zu identifizieren (s Abb. 4.6.1).

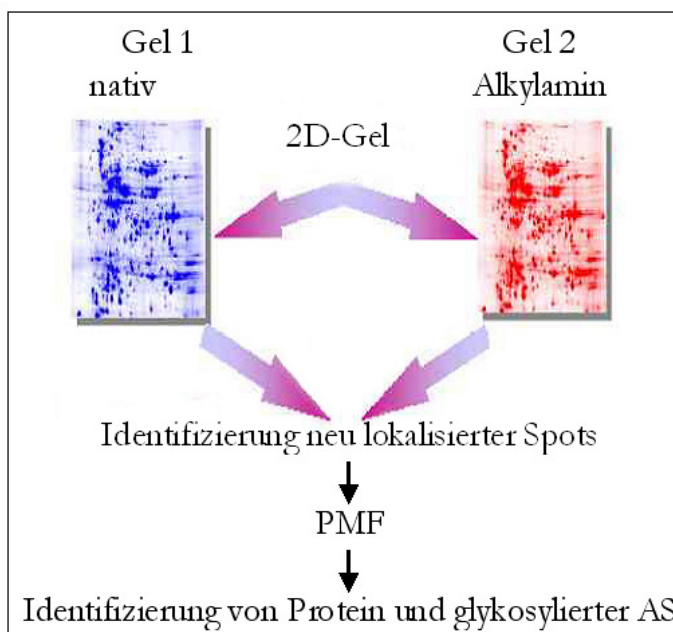


Abb. 4.6.1: Konzept für Proteomik-Anwendung der Methode „Eliminierung von O-Glykanen durch Alkylamine und Identifizierung mit Massenspektrometrie“. Nach Alkylamin-Behandlung verschobene bzw. neu auftretende Spots in 2D-PAGE, verglichen mit nativem Gel weisen auf eine vorherige Glykosylierung hin. Nach dem Stanzen und PMF können das Glykoprotein und die glykosylierten AS determiniert werden (verändert übernommen aus <http://proteomics.uc.edu/dige.jpg>).

In den Verfahrensvarianten, in denen die Alkylamin-Behandlung in-Gel erfolgte konnten unglykosylierte und alkylaminylierte tryptische Peptide aller eingesetzten Proteine identifiziert werden. Glykosylierte Proteine wurden nicht detektiert. Hierbei zeigt sich die Tendenz, daß Methylamin- (MA) behandelte Proben eine größere Anzahl von verschiedenen sowohl modifizierten als auch nicht-modifizierten tryptischen Peptiden aufweisen, verglichen mit den Ethylamin- (EA) behandelten. Diese Ergebnisse spiegeln i.A. die publizierten Daten von Hanisch et al. (2001) wieder. Die Verbesserungen, die in die PMF-Analyse von Glykoproteinen eingeführt werden, nämlich die erhöhte Proteolyse-Effizienz und die Erzeugung von eindeutigeren MS-Daten finden sich bestätigt. Die höhere Anzahl detektierter MA-modifizierter Peptide, verglichen mit den EA-

modifizierten, bestätigt auch die bessere quantitative Umsetzung von Glykopeptiden in der MA-Behandlung.

Die Verfahrensvariante, die eine Alkylaminylierung vor der PAGE-Analyse vorsah, konnte nicht auf eine Kompatibilität mit elektrophoretischen Techniken hin optimiert werden. In den durchgeführten Experimenten konnten bestenfalls Gele erzeugt werden, die stark degradierte Substrate zeigten. In Experimenten, in denen der Alkylamin-Behandlung ein Reinigungs-/Entsalzungsschritt folgte konnten reproduzierbar mit keiner Färbetechnik Proteine bzw. Degradationsprodukte detektiert werden. Ob dies mit ausgeprägter Degradierung oder Aggregation zusammenhängt, kann noch nicht beantwortet werden.

4.7) Anreicherung und Identifizierung von Glykoproteinen über Fraktionierung auf Aminophenylboratsäulen

Die „Anreicherung und Identifizierung von Glykoproteinen über Fraktionierung auf Aminophenylboratsäulen“ verfolgt das Konzept der spezifischen Anreicherung eines Sub-Proteoms. Die Technik sollte die Eigenschaft von Boraten nutzen, cis-Diole von Glykanen bei erhöhtem pH-Wert zu komplexieren, und auf diese Weise die Glykoprotein-Fraktion anreichern. Um die Spezifität für O-Glykosylierung in die Methode einzuführen, sollte ein PNGaseF-Verdau auf dem Harz N-Glykosylierungen entfernen. Ein Trypsin-Verdau sollte ebenfalls auf dem Harz durchgeführt werden. Um die Methode zu etablieren, sollte die Fraktionierung von glykosylierten Proteinen bzw. Peptiden auf Aminophenylboratsäulen und die Durchführbarkeit enzymatischer Anwendungen im EPPS-Puffer-System evaluiert werden.

Die Fraktionierung von glykosylierten Proteinen/Peptiden hat mit dieser Methode weder auf Peptid- noch auf Proteinebene funktioniert. Auf Peptidebene wurde das unglykosylierte Peptid VPT21 in der Chromatographie am effektivsten angereichert. Dies ist unerwartet, weil in allen eingesetzten Glykopeptiden mit Gal bzw. GalNAc Kohlenhydrat-Einheiten mit cis-Diolen vorliegen. In Anwendungen mit Proteinen konnte ebenfalls keine spezifische Fraktionierung von Glykoproteinen durchgeführt werden. Das unglykosylierte Protein BSA wies im Eluat eine leichte Anreicherung, das glykosylierte Transferrin im Überstand der Chromatographie eine leichte Anreicherung auf. In dem hier dargestellten Experiment wurden je 100 µg BSA und 100 µg Transferrin eingesetzt. Weil die Protein-

Beladung der Säule damit extrem hoch war, hätte die Fraktionierung einen umso höheren Anteil an spezifisch eluiertem Analyt produzieren müssen. Weil in Mucin-Typ-glykosylierten Proteinen, mindestens im Core-GalNAc, immer cis-Diole vorliegen könnte die schwache Bindung auf deren Unzugänglichkeit beruhen. Dies ist bei intakten Glykanen aber sehr unwahrscheinlich. Weil aber spezifische Effekte vorliegen, legen die Ergebnisse daher einen Einfluß von AS-Sequenz und/oder Sekundärstrukturen bei der Chromatographie nahe (s. dazu Kernodle 1990).

Die Evaluierung von enzymatischen Anwendungen ergab, daß Trypsin im EPPS-Puffer-System voll funktionsfähig ist. Ovalbumin wurde effektiver verdaut als in dem vom Hersteller empfohlenen System. Weitere Experimente an anderen Proteinen (z.B. κ -Casein) zeigten die gleiche Effizienz wie der Verdau lt. Herstellerangaben. Die PNGaseF-Behandlung von Transferrin war im EPPS-Puffer nicht quantitativ. In der lt. Herstellerangaben verdauten Probe zeigte sich eine quantitative Umsetzung.

Die Methode „Anreicherung und Identifizierung von Glykoproteinen über Fraktionierung auf Aminophenylboratsäulen“ konnte nicht für O-Glykoproteom-Anwendungen genutzt werden. Dieser Befund fußt v.a. auf der schlechten Fraktionierung von Glykoproteinen und nicht-glykosylierten Proteinen. Ferner stellt die nicht-quantitative Entfernung von N-Glykanen eine Einschränkung der Spezifität für O-Glykoproteine dar.

4.8) Glykoproteinfärbung mit 3-Aminophenylborat-Fluorescein-isothiocyanat

Hier sollte eine Methode etabliert werden, in der die hervorragende Sensitivität der Detektion mit FITC (Muramoto 1984) für die Analyse von Glykoproteinen genutzt werden sollte. Nach dem Syntheseschritt in DMSO sollte das Vorliegen des Fluoresceinisothiocyanat-Aminophenylborat- (FITC-APB) Produktes gezeigt, das Produkt gereinigt und dessen Potential zur spezifischen Färbung von Glykoproteinen auf Blots demonstriert werden.

Um das FITC-APB von ungekoppeltem FITC zu trennen, wurde ein Chromatographieschritt auf einer Cellulosesäule durchgeführt. In der MALDI-MS Analyse konnte nach der Chromatographie das Vorliegen des gewünschten Produktes in reiner Form nachgewiesen werden. Das Potential von FITC-APB, an Glykane zu binden, wurde

in der Dünnschichtchromatographie und durch die Chromatographie auf der Cellulosesäule demonstriert.

Nachdem das Produkt gereinigt vorlag und die Fähigkeit zur Bindung an Glykane belegt wurde, sollte evaluiert werden, ob Glykoproteine mit FITC-APB spezifisch detektiert werden können. Hierfür wurden verschiedene Dot-Blot-Ansätze mit unterschiedlichen Puffern zum Blocken der PVDF-Membran getestet. In keinem der evaluierten Ansätze konnten Glykoproteine spezifisch detektiert werden. So wurde HGA in keinem der Ansätze detektiert, während nicht-glykosylierte Proteine, z.B. Phosphorylase B, in allen evaluierten Ansätzen gefärbt wurden.

Die Färbung von Glykoproteinen mit FITC-APB konnte nicht dahingehend optimiert werden, daß die Detektion eine Spezifität für glykosylierte Species aufwies. Da die Aminophenylborat-Gruppe cis-Diole komplexiert (Loomis & Durst 1992, Bassil et al. 2004) könnte das Ausbleiben einer Detektion damit zusammenhängen, daß die Aminophenylboratgruppe nicht bindet, falls keine cis-Diole in Glykanen vorliegen. Die falsch-positive Färbung von nicht-glykosylierten Proteinen geht unter Umständen auf hydrophobe Wechselwirkungen von FITC mit hydrophoben Bereichen in Proteinen zurück. FITC besitzt über einen großen Bereich der Molekülstruktur einen hydrophoben Charakter (s. Abb. 2.8.1) wodurch solche Interaktionen möglich werden. Die Wechselwirkung von FITC mit hydrophoben Substanzen wurde in dieser Arbeit bereits in der Dünnschichtchromatographie und der Chromatographie auf Cellulose demonstriert.

4.9) Metabolische in-vivo-Markierung von Glykoproteinen mit Azidozuckern

Die von Saxon & Bertozzi (2000) publizierte Methode „*Metabolische in-vivo-Markierung von Glykoproteinen mit Azidozuckern*“ sollte für die Anwendung in O-Glykoproteom-Analysen adaptiert werden. Um Mucin-Typ O-Glykosylierung zu untersuchen wurde per-O-acetyliertes N-Azidoacetylgalaktosamin (GalNAz) bereits in Zellkulturen (Hang et al. 2003) eingesetzt. Ferner wurde demonstriert, daß die Verabreichung von Azidozuckern an lebende Tieren möglich ist, diese in Glykoproteinen eingebaut werden (Prescher et al. 2004) und daß die Staudinger-Ligation mit einem markierten Phosphin im lebenden Tier

vorgenommen werden kann (Dube et al. 2006). Eine Studie zur präparativen Isolierung und Analyse des Mucin-Typ O-Glykoproteoms wurde noch nicht publiziert.

Hier sollte die Technik zunächst auf die Eignung zur Markierung von glykosylierten Proteinen evaluiert und die grundsätzliche Funktionsfähigkeit bestätigt werden. Weitere Experimente sollten klären ob über Staudinger-Ligation eingeführte Markierungen Phosphin-FLAG-Peptid oder Phosphin-Biotin dafür genutzt werden können um glykosylierte Proteine spezifisch anzureichern und in 2D-PAGE mit nachgeschaltetem PMF zu analysieren.

Da Phosphin-FLAG und GalAz in begrenzter Menge zur Verfügung standen, wurden Experimente zur Etablierung der Methode in T47-D- und MDA-MB231-Zellkulturen durchgeführt. Nach Inkubation mit GalAz wurde Gesamt-Protein nach Standard-Methoden isoliert und PAGE und Western-Blots durchgeführt.

Die Ergebnisse bestätigen die publizierten Daten im Wesentlichen. Es war bekannt, daß verschiedene Zelllinien unterschiedliche Tendenzen aufweisen, die Azidozucker zu metabolisieren. Dies wird durch die schwache Detektion von markierten Proteinen in T47-D Zellen und die deutliche Markierung in MDA-MB231 Zellen bei Einsatz von gleichen Proteinmengen reflektiert. Proteinproben die identisch gewonnen und markiert wurden (Wachstum ohne per-O-acetyliertem GalAz) zeigten kein Signal im Western-Blot. Die spezifische Detektion ist damit gewährleistet.

Die hier evaluierte Methode macht es möglich, glykosylierte Proteine in-vivo zu markieren. Über die Staudinger-Ligation von Azidozuckern mit Phosphin-Reagenzien ist eine uneingeschränkte Spezifität für GalAz-markierte Substrate gewährleistet. Diese Voraussetzungen machen die metabolische Markierung mit Azidozuckern zu einer wertvollen Technik bei der Analyse des Glykoproteoms. Eine spezifische Isolierung von Glykoproteinen z.B. durch Immunpräzipitation über FLAG-Antikörper oder Chromatographie über Streptavidin-Säulen muß hierfür noch etabliert werden.

5) Zusammenfassung

Die Glykosylierung von Proteinen ist die am weitesten verbreitete Post-translationale Modifikation (PTM) und Glykoproteine spielen grundlegende Rollen in mannigfaltigen biologischen Prozessen (Yang & Hancock 2004). Die Entwicklung von Analysetechniken, die Muster von Glykosylierungen bzw. deren Variation in biologischen Proben erfassen, wird durch die heterogene und komplexe Natur dieser PTM stark beeinträchtigt. Die Analyse wird durch die Komplexität von Glykanen selbst eingeschränkt und durch die verschiedenen Unterarten der Glykosylierung von AS. Einer der häufigsten Subtypen der Glykosylierung ist die N-Glykosylierung, die mit N-Acetylglukosamin (GlcNAc) am Stickstoffatom von Asn initiiert wird (Heifetz & Lennarz 1979). Eine weitere Form, die O-Glykosylierung, findet am Sauerstoffatom von Ser/Thr statt. Vor weniger häufigen Formen der O-Glykosylierung, wie O-Fucosylierung (Bruckner et al. 2000) oder O-Mannosylierung (Strahl-Bolsinger et al. 1999), ist die O-Glykosylierung des Mucin-Typs, initiiert durch N-Acetylgalaktosamin (GalNAc) die quantitativ vorherrschende Form (Hanisch & Müller 2005). Speziell diese Mucin-Typ glykosylierten Proteine stellen eine methodische Herausforderung in der Proteom-Analytik dar, weil konventionelle Färbemethoden in der PAGE oft nicht ausreichen, um diese darzustellen (Haynes & Yates III 2000), dichter O-glykosidischer Besatz eine enzymatische Proteolyse in sequenzierbare Peptide stark einschränkt (O'Farrel 1975) und bei Glykopeptiden, aufgrund ihrer Heterogenität und Polarität, die Identifizierbarkeit durch MS-Techniken eingeschränkt ist (Matsui et al. 1999). Nach Datenbankeinträgen werden etwa 10% aller Proteine als O-Glykoproteine identifiziert. Dies sind Extrapolationen, da für die GalNAc-Glykosylierung kein Sequenzmotiv, wie im Fall der N-Glykosylierung, besteht (Hanisch & Müller 2005). Die GalNAc-Glykosylierung wird von mindestens 15 verschiedenen Polypeptid-GalNAc-Transferasen (ppGalNAcT's) mit unterschiedlichen Expressionsmustern und z.T. überlappenden Substratspezifitäten, initiiert.

Vor diesem Hintergrund sollten in der vorliegenden Arbeit Strategien evaluiert werden, welche die Analyse von Mucin-Typ glykosylierten Proteinen verbessern und Strategien zur Analyse des O-Glykoproteoms etabliert werden.

Hier handelt es sich z.T. um Adaptionen von Techniken, die im Kontext von Analysen anderer Glykosylierungs-Typen publiziert wurden, und z.T. um eigene neue Strategien.

Weitere Ansätze sollten auf die Kompatibilität mit Standard-Proteomanalyse-Strategien überprüft werden.

Die einzige evaluierte in-vivo Technik „*Metabolische in-vivo-Markierung von Glykoproteinen mit Azidozuckern*“ ist eine robuste Methode zur Identifizierung glykosylierter Proteine und bietet ein Hilfsmittel für Proteomik-Studien im Zusammenhang mit der Glykosylierung. Die metabolische Markierung von Glykoproteinen wird in der kommenden Zeit wahrscheinlich große Bedeutung erlangen. Hier stehen noch methodische Verbesserungen aus, die eingehende Studien von Glykosylierungen des Mucin-Typs in Zell- bzw. Gewebearten ermöglichen, die bisher nicht oder nur schwach markiert werden konnten.

Reduktive Methoden, die eine β -Eliminierung von Glykanen und deren Substitution durch eine spezifische Markierung verfolgen, leiden z.T. unter diversen Nachteilen. So wurden z.B. umfangreiche Degradierungen von Peptiden unter den gewählten Bedingungen nachgewiesen (Methoden „ *β -Eliminierung von O-Glykanen und Markierung mit Biotin*“ und „*BEMAD*“). Weitaus schwerwiegender als eine Degradierung ist, daß es zu falsch-positiven Markierungen von unglykosylierten Ser/Thr kommt, und dies bereits unter Reaktionsbedingungen, die keine quantitative Eliminierung von Glykanen gewährleisten (*BEMAD*). Die β -Eliminierung von O-Glykanen und Addition von Alkylaminen weist nicht die Nachteile anderer reduktiver Ansätze, nämlich ausgeprägte Degradierung und fehlerhafte Markierung unglykosylierter AS auf. Vorteile, die über bereits bekannte hinausgehen, nämlich die verbesserte in-Gel-Proteolyse und Massenspektrometrische Identifizierbarkeit, konnten nicht gezeigt werden. Die Alkylamin-Behandlung konnte nicht auf eine Kompatibilität mit PAGE-Techniken hin optimiert werden, so daß technische Schwierigkeiten, wie die Darstellung glykosylierter Proteine, erhalten bleiben. Strategien, die eine quantitative Anreicherung von Glykoproteinen bzw. O-Glykoproteinen verfolgen, wiesen erhebliche Nachteile in Bezug auf Spezifität und Avidität (*Hydrophile Affinitätschromatographie* und *Fraktionierung auf Aminophenylboratsäulen*) auf bzw. zeigten eine verfrühte Freisetzung des glykosylierten Analyts (*Identifizierung von O-Glykoproteinen per Hydrazidchemie und Massenspektrometrie*). Die partielle Deglykosylierung von Glykoproteinen und -peptiden mit TFMSA hat ihren Wert in der Analyse eines gereinigt vorliegenden Glykoproteins bestätigt, weist aber keine Kompatibilität mit PAGE-Techniken auf. Ferner hat die nachgeschaltete Chromatographie auf HPA-Agarose Nachteile im Bezug auf die Avidität der Substrat-Bindung. Eine Färbemethode, die eine selektive Detektion von

Glykoproteinen über Fluoreszenz in Gelen und in Western-Blots ermöglichen sollte, konnte wegen mangelnder Spezifität und Sensitivität der Färbung nicht umgesetzt werden (*Glykoprotein-färbung mit 3-Aminophenylborat-Fluorescein-isothiocyanat*).

Eine universell anwendbare Methode für Proteom-Analysen des Mucin-Typ O-Glykoproteoms mit in-vitro-Markierung glykosylierter AS sollte folgende Eigenschaften aufweisen:

- Selektive Substitution von O-Glykanen und Reduktion der Komplexität auf eine einheitliche Markierung, bei ausgeschlossenen falsch-positiven Resultaten.
- Möglichkeit zu 2D-PAGE-Analysen und Darstellung mit gängigen Färbetechniken im Gel.
- Verbesserung von enzymatischen Umsetzungen vormals O-glykosylierter Proteine auf quantitativem Niveau.
- Die Markierung sollte die quantitative chromatographische Anreicherung vormals O-glykosylierter Proteine vor/nach deren Proteolyse ermöglichen.
- Verbesserung der Identifizierbarkeit mit massenspektrometrischen Techniken.

Eine Methode, die alle oben genannten Aspekte in vollem Umfang gewährleistet, existiert bis dato nicht. In der vorliegenden Arbeit wurden aber Erkenntnisse und Daten gewonnen, die Aussagen über die Umsetzbarkeit bzw. das Potential diverser Strategien im Bezug auf die genannten Aspekte zulassen. Dies sollte eine Etablierung von Methoden und Strategien für Studien im Kontext des Mucin-Typ-Glykoproteoms erleichtern.

6) Abstract

The glycosylation of proteins is the most common post-translational modification and glycoproteins play crucial roles in all kinds of biological instances. The design of analytical techniques to study glycoproteins and glycosylation-patterns has been hampered by the heterogeneity and complex nature of this PTM. The analysis is not only impeded by the glycan-moieties alone but also by the existence of a variety of glycosylation-subclasses as N-glycosylation and different types of O-glycosylation. The most prominent kind of O-glycosylation is that of the mucin-type, which is initiated by the addition of a core-N-acetylgalactosamine sugar to the oxygen-atom of Ser or Thr, respectively. Especially, the mucin-type-glycosylation represents methodical challenges in proteome-studies because of several inherent features correlated with O-glycosylation. E.g. glycoproteins often cannot be detected by conventional staining techniques in SDS-PAGE gels, proteolysis is often inhibited by dense O-glycosylation and the identification by peptide-mapping MS-techniques is difficult due to enhanced polarity of glycopeptides and the high complexity of the glycans. Database-entries roughly assign 10% of all proteins as O-glycoproteins. The sites of O-glycosylation cannot be predicted by computational sequence-analysis alone because there is no defined consensus-motif as there is in N-glycosylation. Additionally, mucin-type-glycosylation is initiated by more than 15 polypeptide-GalNAc-transferases with different expression-patterns and partially overlapping substrate specificities.

These findings necessitate the introduction of novel tools to study O-glycosylation in-vivo and in-vitro.

In this work several methodical approaches for the study of O-glycoproteins were evaluated with a focus on compatibility with standard proteomic analysis techniques.

Approaches that employed the β -elimination of glycans with reductive chemistry suffered from a variety of drawbacks. Extensive peptide degradation was observed and false-positive results are obtained at unglycosylated Thr/Ser. The employment of alkylamines for the elimination of glycans did not yield any advantages besides the published results and could not be adapted for the treatment of proteins prior to electrophoresis. Therefore technical difficulties, like the detection of glycoproteins in gels remain unresolved. Strategies that aimed at the quantitative enrichment of glycoproteins displayed substantial disadvantages, regarding specificity and avidity or displayed untimely detachment of the glycosylated analyte. The partial deglycosylation of glycoproteins and –peptides by TFMSA

treatment proved its value for the analysis of a clean sample of the analyte but is still not compatible with PAGE-techniques. Furthermore the following chromatography on HPA-columns does not suffice for the enrichment of analytes with low degrees of glycosylation due to a lack of avidity. A method for the detection of glycoproteins in PAGE-gels or western-blot by fluorescence staining could not be established due to lack of specificity and sensitivity to glycosylated substrates.

The evaluated in-vivo method proved to be a functioning tool for the identification of glycosylated proteins and provides a device for proteomic-studies of glycosylation. In the future the metabolic labeling of glycoproteins is likely to become a tool of outstanding importance. Yet methodical improvements to study the glycosylation in tissues and organs that have been labeled weakly or not at all so far have to be achieved.

An ideal, still hypothetical, method for proteome-analysis of the mucin-type employing in-vitro tagging of glycosylated aminoacids would have to feature following attributes:

- Selective substitution of GalNAc-initiated glycans and thereby reduction of glycan-complexity to a uniform tag. The possibility to obtain false-positive detection of glycosylation should be excluded
- The introduced tag should provide for compatibility with 2D-PAGE analysis and detection with conventional staining methods
- Improvement of enzymatic treatments to quantitative levels
- The introduced tag should provide for quantitative enrichment by chromatography steps before and/or after proteolysis
- Improvement of identification with mass spectrometry techniques

A method that provides all of the above mentioned features to full extent remains to be developed. In the work at hand insights and data have been acquired that allow statements about the feasibility and the potential of strategies addressing the mentioned aspects of the analysis of mucin-type-glycosylation. This should facilitate the establishment of future techniques to study the mucin-type glycoproteome in whole.

Literaturverzeichnis

- **Alaiya A, Al-Mohanna M, Linder S**
Clinical Cancer Proteomics: promises and pitfalls. J Proteome Res. **4**, 1213-1222 (2005)
- **Amerongen AVN, Bolscher JGM, Veerman ECI**
Salivary mucins: Protective functions in relation to their diversity Glycobiology **5**, 733-740 (1995)
- **Amoresano A, Marino G, Cirulli C, Quemeneur E**
Mapping phosphorylation sites: a new strategy based on the use of isotopically labelled DTT and mass spectrometry. Eur. J. Mass. Spectrom. **10**, 401-412 (2004)
- **Bassil E, Hu H, Brown PH**
Use of phenylboronic acids to investigate boron function in plants. Possible role of boron in transvacuolar cytoplasmic strands and cell-to-wall adhesion Plant Physiol. **136**, 3383-3395 (2004)
- **Bayer EA & Wilchek M**
The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. Methods Biochem. Anal. **26**, 1 (1980)
- **Betts TJ**
One-phase solvent systems for paper chromatography. J. Pharm. Sci. **53**, 794-797 (1964)
- **Bölinger R**
Regulation der O-Glykosylierung in GlcNAc/GalNAc-Epimerase-defizienten CHO-Mutanten. Dissertation, Köln 2005
- **Bons JA, Wodzig WK, van Dieijen-Wisser MP**
Protein profiling as a diagnostic tool in clinical chemistry: a review. Clin. Chem. Lab Med. **12**, 1281-1290 (2005)
- **Bouriotis V & Dean PD**
Use of triazine dyes in the affinity chromatographic purification of alkaline phosphatase from calf intestine. J. Chromatogr. **206**, 521-530 (1981)

- **Brockhausen I**
Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cell. Biochem. Biophys. Acta **1473**, 67-95
- **Bruckner K, Perez L, Clausen H, Cohen S**
Glycosyltransferase activity of fringe modulates Notch-Delta interactions. Nature **27**, 411-415 (2000)
- **Burnette WN**
"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem. **112**, 195-203 (1981)
- **Chai W, Hounsell EF, Cashmore GC, Rosankiewicz JR, Bauer CJ, Feeney J, Feizi T, Lawson AM**
Neutral oligosaccharides of bovin submaxillaris mucin. A combined mass spectrometry and ¹H-NMR-study. Eur. J. Biochem. **203**, 257-268 (1992)
- **Crocker PR & Feizi T**
Carbohydrate recognition systems: Functional triads in cell-cell interactions. Curr. Opin. Struct. Biol. **6**, 679-691 (1996)
- **Czeszak X, Ricart G, Tetaert D, Michalski JC, Lemoine J**
Identification of substituted sites on MUC5AC mucin motif. Peptides after enzymatic O-glycosylation combining β -elimination and fixed-charge derivatization. Rapid Commun. Mass Spectrom. **16**, 27-34 (2002)
- **de Graffenried CL & Bertozzi CR**
The roles of enzyme localisation and complex formation in glycan assembly within the golgi apparatus. Curr. Opin. Cell Biol. **16**, 356-363 (2004)
- **de Vocht ML, Scholtmeijer K, van der Vegte EW, de Vries OM, Sonveaux N, Wosten HA, Ruyschaert JM, Hadziloannou G, Wessels JG, Robillard GT**
Structural characterisation of the hydrophobin SC3, as a monomer and after self-assembly at hydrophobic/hydrophilic interfaces. Biophys. J. **74**, 2059-2068 (1998)

- **Dube DH, Prescher JA, Quanh CN, Bertozzi CR**
Probing mucin-type O-linked glycosylation in living animals. Proc. Natl. Acad. Sci. Mar **13**, 4819-4824 (2006)
- **Edge ASB, Faltynek CR, Hof L, Reichert Jr. LE, Weber P**
Deglycosylation of glycoproteins by trifluoromethanesulfonic acid. Anal. Biochem. **118**, 131-137 (1981)
- **Edge ASB**
Deglycosylation of glycoproteins with trifluoromethanesulfonic acid: elucidation of molecular structure and function. Biochem. J. **376**, 339-350 (2003)
- **Fairbanks G, Steck TL, Wallach DF**
Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Biochemistry **10**, 2606-2617 (1971)
- **Fayet Y, Galland S, Degiuli A, Got R, Frot-Coutaz J.**
Glycoprotein mannosylation in rat liver nuclei. Biochem. Int. **16**, 429-438 (1988).
- **Ferguson MAJ**
Lipid anchors on membrane proteins Curr. Opin. Struct. Biol. **1**, 522-529 (1992)
- **Furukawa K & Kobata A**
Protein glycosylation. Curr. Opin. Biotechnol. **3**, 554-559 (1992)
- **Gahmberg CG & Tolvanen M**
Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. Trends Biochem. Sci. **21**, 308-311 (1996)
- **Gander JE**
Gel protein stains: Glycoproteins, in Enzyme purification and related techniques. Methods Enzymol., Academic Press, New York **104**, 44-451 (1984)
- **Gerard F**
Purification of Glycoproteins. Methods Enzymol. **182**, 529-539 (1990)

- **Gerken TA, Rekha G, Jentoft N**
A novel approach for chemically deglycosylating O-linked glycoproteins. The Deglycosylation of submaxillary and respiratory mucins. Biochemistry **31**, 639-648 (1992)
- **Gooley AA & Williams KL**
Towards characterizing O-glycans: The relative merits of in vivo and in vitro approaches in seeking peptide motifs specifying O-glycosylation sites. Glycobiology **4**, 413-417 (1994)
- **Greis KD, Hayes BK, Corner FI, Kirk M, Barnes S, Lowary TL, Hart GW**
Selective detection and site-analysis of O-GlcNAc-modified glycopeptides by β -elimination and tandem electrospray mass spectrometry. Anal. Biochem. **234**, 38-49 (1996)
- **Griffin PR, MacCoss MJ, Eng JK, Blevins RA, Aaronson JS, Yates JR 3rd**
Direct database searching with MALDI-PSD spectra of peptides. Rapid. Commun. Mass. Spectrom. **9**, 1546-51 (1995)
- **van Halbeck H, Vliegenhart JFG, Fiat AM, Jolles P**
Isolation and structural characterization of the smaller-size oligosaccharides from desialylated human kappa-casein. Establishment of a novel type of core for a mucin-type carbohydrate chain. FEBS Lett. **187**, 81-88
- **Hanisch FG**
O-glycosylation of the mucin type. Biol. Chem. **382**, 143-149 (2001)
- **Hanisch FG, Deutzmann TRE, Peter-Katalinic J,**
Cell line T47D as a model for carcinoma-associated alterations of O-glycosylation. Eur. J. Biochem. **236**, 318-327
- **Hanisch FG, Jovanovic M, Peter-Katalinic J**
Glycoprotein Identification and Localization of O-Glycosylation Sites by Mass Spectrometric Analysis of Deglycosylated/ Alkylaminylated Peptide Fragments. Analytical Biochemistry **290**, 47-59 (2001)
- **Hanisch FG & Müller S**
Approaches to the O-Glycoproteome. The Proteomics Protocols Handbook. Edited by JM Walker. Humana Press Inc. (2005)

- **Hang HC, Yu C, Kato DL, Bertozzi CR**
A metabolic labeling approach toward proteomic analysis of mucin type O-linked glycosylation. Proc. Natl Acad. Sci. **100**, 14846-14851 (2003)
- **Hansen JE, Lund O, Nielsen JO, Brunak S**
O-glycbase: a Revised Database of O-glycosylated Proteins. Nucleic Acids Res. **24**, 248-252 (1996)
- **Hanski C, Hanisch FG, Riecken EO**
Alteration of mucin-bound carbohydrate moieties in malignant transformation of colonic mucosa. Cancer J. **5**, 332-342 (1992)
- **Hart GW**
Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. Annu. Rev. Biochem. **66**, 315-335(1997)
- **Harvey DJ**
Identification of protein-bound carbohydrates by mass spectrometry. Proteomics **2**, 311-28 (2001)
- **Haynes PA & Yates III PA**
Proteome profiling – pitfalls and progress. Yeast **17**, 81-87 (2000)
- **Heifetz A & Lennarz WJ**
Biosynthesis of N-glycosidically linked glycoproteins during gastrulation of sea urchin embryos. J. Biol. Chem. **254**, 6119-6127 (1979)
- **Hennet T, Dinter A, Kuhnert P, Matu TS, Rudd PM, Berger EG**
Genomic cloning and expression of three murine UDP-galactose:β-N-acetylglucosamine β1,3-galactosyltransferase genes. J. Biol. Chem. **273**, 58-65 (1998.)
- **Hermanson GT,**
Immobilized Affinity Ligand Techniques. Academic Press, 338-392 (1992)
- **Highsmith F, Regan T, Clark D, Drohan W, Tharakan J**
Evaluation of CNBr, FMP and hydrazide resins for immunoaffinity purification of factor IX. Biotechniques **12**, 418-423 (1992)

- **Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT**
Matrix-assisted laser desorption / ionization mass spectrometry of biopolymers. Anal Chem. **24**, 1193A-1203A (1991)
- **Holgersson J & Lofling J**
Glycosyltransferases Involved in Type 1 Chain and Lewis Antigen Biosynthesis Exhibit Glycan and Core Chain Specificity. Glycobiology Feb 2006, ahead of print
- **Holland JW, Deeth CH, Alewood PF**
Analysis of O-glycosylation site occupancy in bovine α -casein glycoforms separated by two-dimensional gel electrophoresis. Proteomics **5**, 990-1002 (2005)
- **Hounsell EF, Lawson AM, Feeney J, Gooi HC, Pickering NJ, Stoll MS, Feizi T**
Structural analysis of O-glycosidically linked core-region oligosaccharides of human meconium glycoproteins which express oncofetal antigens. Eur. J. Biochem. **148**, 367-377 (1985)
- **Iyer RN, Carlson DM**
Alkaline borohydride degradation of blood group H substance. Arch. Biochem. Biophys. **142**,101-5. (1971)
- **Julien S, Adriaenssens E, Ottenberg K, Furlan A, Courtand G, Vercoutter-Edouart AS, Hanisch FG, Dellannoy P, Le Bouhis X**
ST6GalNAc I expression in MDA-MB-231 breast cancer cells greatly modifies their O-glycosylation pattern and enhances their tumourigenicity. Glycobiology **16**, 54-64 (2006)
- **Kernodle DS, Zygmunt DJ, McGraw PA, Chipley JR**
Purification of Staphylococcus aureus beta-lactamases by using sequential cation-exchange and affinity chromatography. Antimicrob. Agents Chemother. **34**, 2177-2183 (1990)
- **Kiick KL, Saxon E, Tirell DA, Bertozzi CR**
Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the staudinger ligation. Proc. Natl. Acad. Sci. **99**, 19-24 (2002)
- **King TP, Zhao SW, Lam T**
Preparation of protein conjugates via intermolecular hydrazone linkage. Biochemistry **25**, 5774-5779 (1986)

- **Lämmli UK**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**, 680-685 (1970)
- **Lebl M, Pires J, Poncar P, Pokorny V**
Evaluation of gaseous hydrogen fluoride as a convenient reagent for parallel cleavage from the solid support. J. Comb. Chem. **1**, 474-479 (1999)
- **Letourneur O, Gervasi G, Gaia S, Pages J, Watelet B, Jolivet M**
Characterisation of Toxoplasma gondii surface antigen 1(SAG1) secreted from Pichia pastoris: evidence of hyper-glycosylation. Biotechnol. Appl. Biochem. **33**, 35-45 (2001)
- **Loomis WD & Durst RW**
Chemistry and biology of boron. Biofactors **3**, 229-239 (1992)
- **Maly P, Thall AD, Petryniak B, Rogers GE, Smith PL, Marks RM, Kelly RJ, Gersten KM, Cheng GY, Saunders TL, Camper SA, Camphausen RT, Sullivan FX, Isogai Y, Hindsgaul O, Von Andrian UH, Lowe JB**
The $\alpha(1,3)$ fucosyltransferase Fuc-TVII controls leukocyte trafficking through an essential role in L-, E-, and P-selectin ligand biosynthesis. Cell **86**, 643-653 (1996).
- **Matsui NM, Smith-Beckerman DM, Epstein LB**
Staining of preparative 2-D gels. 2-D Proteome Analysis Protocols, Andrew J Link Ed. 307-312, Humana Press (1999)
- **RP McEver and RD Cummings**
Role of Psgl-1 Binding to Selectins in Leukocyte Recruitment. J. Clin. Invest. **100**, 485-491 (1997)
- **Mc Murry J**
Organic Chemistry, 4th Edition, Brooks/Cole Publishing Company (1996)
- **Monsigny M, Mayer R, Roche AC**
Sugar-lectin interactions: sugar clusters, lectin multivalency and avidity. Carbohydr. Letters **4**, 35-52 (2000)

- **Monsigny M, Roche AC, Sene C, Maget-Dana R, Delmotte F**
Sugar-lectin interactions: how does wheat-germ agglutinin bind sialoglycoconjugates? Eur. J. Biochem. **104**, 147-53 (1980)
- **Müller S, Goletz S, Packer N, Gooley A, Lawson AM, Hanisch FG**
Localization of O-glycosylation sites on glycopeptide fragments from lactation associated MUC1. All putative sites within the tandem repeat are glycosylation targets in vivo. J. Biol. Chem. **272**, 24780-24793 (1997)
- **Muramoto K, Kamiya H, Kawauchi H**
The application of fluorescein isothiocyanate and high performance liquid chromatography for the microsequencing of proteins and peptides. Anal. Biochem. **141**, 446-450 (1984)
- **Myöhänen TA, Bouriotis V, Dean PD**
Affinity chromatography of yeast alpha-glucosidase using ligand-mediated chromatography on immobilized phenylboronic acids. Biochem. J. **197**, 683-688 (1981)
- **Oda Y, Nasasu T, Chait BT**
Enrichment analysis of phosphorylated proteins as a tool for probing the phosphoproteome. Nature Biotechnology **19**, 379-382 (2001)
- **O'Farrel PH**
High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. **250**, 4007-4021
- **Podolski DK**
Oligosaccharid structures of human colonic mucin. J. Biol. Chem. **260**, 8262-8271 (1985)
- **Packer NH, Ball MS, Devine PL**
Glycoprotein Detection of 2-D separated proteins. In: 2-D Proteome Analysis Protocols (Andrew J. Link Ed.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 341-352 (1999)
- **Porath J**
General methods and coupling procedures. Methods in Enzymology **34**, 13-30 (1974)
- **Prescher JA, Dube DH, Bertozzi CR**
Chemical remodelling of cell surfaces in living animals. Nature **430**, 873-877. (2004)

- **Rademacher TW, Parekh RB, Dwek RA**
Glycobiology. Annu. Rev. Biochem. **57**, 785-838 (1988)
- **Raggiaschi R, Gotta S, Terstappen GC**
Phosphoproteome Analysis. Biosci. Rep. **25**, 33-44, (2005)
- **Rengarajan K, de Smet MD, Wiggert B**
Removal of albumin from multiple human serum samples. Biotechniques **20**, 30-32 (1996)
- **Roepstorff P**
Mass spectrometry in protein studies from genome to function. Curr. Opin. Biotechnol. **8**, 6-13 (1997)
- **Romain F, Horn C, Pescher P, Namane A, Riviere M, Puzo G, Barzu O, Marchal G**
Deglycosylation of the 45/47 kDa antigen complex of Mycobacterium tuberculosis decreases its capacity to elicit in vivo or in vitro cellular immune responses. Infect. Immun. **67**, 5567-5572 (1999)
- **Rose MC & Voynow JA**
Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease. Physiol. Rev. **86**, 245-278 (2006)
- **Saxon E & Bertozzi CR**
Cell surface engineering by a modified Staudinger reaction. Science **287**, 2007-2010 (2000)
- **Sharon N**
Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: An atomic view. Trends Biochem. Sci. **18**, 221-226 (1993)
- **Sillanauke P, Pönniö M, Jääskeläinen IP**
Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. European Journal of Clinical Investigation **29**, 413-425 (1999)
- **Sojar HT & Bahl OMP**
A chemical method for the deglycosylation of glycoproteins. Arch. Biochem. Biophys. **259**, 52-57 (1987)

- **Stahl E**
Dünschicht Chromatographie; Methoden, beeinflussende Faktoren und ein Beispiel für die Anwendung. Pharmazie **10**, 633-637 (1956)
- **Strahl-Bolsinger S, Gentzsch M, Tanner W**
Protein O-Mannosylation. Biochim. Biophys. Acta **1426**, 297-307 (1999)
- **Suchard M, Mehigh R, Kappel B**
Superior performance of the ProteoPrep™ Blue Albumin Depletion Kit for 2D electrophoresis. Sigma Application Notes (2003)
- **Tajiri M, Yoshida S, Wada Y**
Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment. Glycobiology **15**, 1332-1340 (2005)
- **Thompson PE, Keah HH, Gomme PT, Stanton PG, Hearn MT**
Synthesis of peptide amides using Fmoc-based solid-phase procedures on 4-methylbenzylhydramine resins. Int. J. Pept. Protein Res. **46**, 174-180 (1995)
- **Toribara NW, Gum JR, Culhane PJ, Legace RE, Hicks JW**
MUC-2 human small intestinal mucine gene structure, repeated arrays and polymorphism. J. Clin. Invest. **88**, 1005-1013 (1991)
- **Torres CR & Hart GW**
Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surface of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. J. Biol. Chem. **259**, 3308-3317 (1984)
- **Van den Steen P, Rudd PM, Dwek RA, Opdenakker G**
Concepts and principles of O-linked glycosylation. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. **33**, 151-208 (1998)
- **Vierbuchen M, Larena A, Hanisch FG, Uhlenbruck G**
Biochemistry and histochemistry of new tumor-associated antigens and their relation to blood group substances. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. **97**, 420-449 (1991)

- **Vocadlo DJ, Hang HC, Kim EJ, Hanover JA, Bertozzi CR**
A chemical approach for identifying O-GlcNAc-modified proteins in cells. Proc. Natl. Acad. Sci. **100**, 9116-9121 (2003)
- **Wada Y, Tajiri M, Yoshida S**
Hydrophilic affinity isolation and MALDI multiple stage tandem mass spectrometry of glycopeptides for glycoproteomics. Anal. Chem. **76**, 6560-6565 (2004)
- **Wang Y & Spellman MW**
Purification and characterization of a GDP-fucose:polypeptide fucosyltransferase from Chinese hamster ovary cells. J. Biol. Chem. **273**, 8112-8118 (1998)
- **Weckwerth W, Willmitzer L, Fiehn O**
Comparative quantification and identification of phosphoproteins using stable isotope labeling and liquid chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. **14**, 1677-1681
- **Well L, Vosseler K, Cole RN, Cronshaw JM, Matunis MJ, Hart GW**
Mapping Sites of O-GlcNAc Modification Using Affinity Tags for Serine and Threonine Post-translational Modifications. Molecular & Cellular Proteomics **1**, 791-804 (2002)
- **Wilderspin AF & Green NM**
The reaction of fluorescein isothiocyanate with thiols: a method for assay of isothiocyanates. Anal Biochem. **2**, 449-455 (1983)
- **Wilson IBH, Gavel Y, von Heijne G**
Amino acid distributions around O-linked glycosylation sites. Biochem. J. **275**, 529-534 (1991)
- **Wu AM**
Carbohydrate structural units in glycoproteins and polysaccharides as important ligands for Gal and GalNAc reactive lectins. J. Biomed. Sci. **10**, 676-688 (2003)
- **Yang Z, Hancock WS**
Approach to the comprehensive analysis of glycoproteins isolated from human serum using a multi-lectin affinity column. J. Chromatogr. A. **1053**, 79-88 (2004)

- **Zhang H, Xiao-jun L, Martin DB, Aebersold R**
Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry. Nature Biotechnology **21**, 660-666 (2003)

Verzeichnis der Internet-Quellen

- <http://www.casper.organ.su.se/sop/>
→ Polysaccharid Analytik, Smith Abbau
- http://www.dshs-koeln.de/biochemie/rubriken/00_home/00_epo01.gif
→ Sialinsäuren
- www.microbiology.emory.edu
→ FITC Molekülstruktur
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowTOC&rid=glyco.TOC&depth=2>
→ Essential of Glycobiology
- <http://www.noble.org>
→ Prinzip der MALDI-MS Technologie
- <http://proteomics.uc.edu/dige.jpg>
→ Beispiel für 2D-Gel
- http://sps.k12.ar.us/massengale/organic_model_project_bi.htm
→ Galaktose-Struktur

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Franz-Georg Hanisch betreut worden.

Köln, den 17. Mai 2006

(Sebastian Teitz)

Lebenslauf

Name	Sebastian Bernhard Teitz
Adresse	Windmühlenstr. 168 51063 Köln Tel.: 0221-9992760
Geburtsdatum	03. Juni 1975
Geburtsort	Köln
Familienstand und Kinder	ledig, keine Kinder
Staatsbürgerschaft	deutsch
Schulbildung	1982 bis 1986 Besuch der Gemeinschaftsgrundschule Alte Wipperfürther Strasse; 1986 bis 1995 Besuch der IGS Holweide mit dem Abschluss Abitur und allgemeiner Hochschulreife
Auslandsaufenthalte	April 1999 bis Oktober 1999 in Seattle, Washington, USA im Rahmen eines Laborpraktikums am Fred Hutchinson Cancer Research Center
Studium	1995 bis 2003 Biologie an der Universität zu Köln mit Abschluss Diplom
Seit April 2003	Promotionsstudiengang im Fach physiologische Chemie an der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
Sprachkenntnisse	Englisch (fließend) Latein (Grundkenntnisse)



Köln, den 17. Mai 2006

(Sebastian Bernhard Teitz)

Dankeschön!!!

Ein herzliches und ehrliches Danke geht an Herrn Prof. Dr. Franz-Georg Hanisch für die interessante Themenstellung und die freundliche und lehrreiche Betreuung dieser Doktorarbeit, für Tips und Ratschläge, wann immer es nötig war. Ausserdem für die Erstellung des Erstgutachtens.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg ganz herzlich für die Erstellung des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Dr. Helmut W. Klein für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Vielen Dank an die ganze AG Hanisch - Mirko, Tanja, Thilo, Isabelle, Kirsten für jede Hilfe, für alles was ich von ihnen gelernt habe, für viel Spaß den die Arbeit gemacht hat.

Danke allen Leuten aus der Biochemie II und dem ZBA-Servicelabor dafür, dass sie die besten Kollegen überhaupt waren.

Danke an Diana, meine kleine, für Deine Unterstützung, Deinen Rat und dafür, daß Du uns einen kleinen Sohn schenken wirst.

Ebenso danke ich meiner Familie, den Grosseltern und Tanten meines Kindes, für die Unterstützung, die ich bekommen habe ... und noch erhalten werde ... ☺

Für die vielen unvergesslichen studienbegleitenden Abende im Kwartier Latäng und sonstwo danke ich Flavio, Harz & Henning, dem OGMVAL, Melissa, Nadl, Becker *et al.*

Zuletzt möchte ich allen meinen Freunden danken, die mir immer wieder so sehr helfen. 6×10^{23} Danke. Ohne euch würde es nie glatt gehen. Ich weiß was ich euch verdanke!



11) Anhänge

11.1) Listen für Massen theoretischer Peptidfragmente aus tryptischem Verdau

Angegeben sind die monoisotopischen Massen (Mi) in Dalton (Da). Mögliche Modifizierungen sind berücksichtigt sowie Start und Ende des jeweiligen tryptischen Peptids mit AS-Nummer.

11.1.1) Humanes Serum Albumin (HSA)

Mi (Da)	Modifizierung	AS Start	AS Ende	Mi (Da)	Modifizierung	AS Start	AS Ende
801,5		544	549	973,5	2AcetK	215	223
802,5		453	460	976,5	2AcetK	211	219
809,5		559	565	984,5		376	383
817,5		563	569	993,5	1AcetK	37	44
828,5	1AcetK	199	205	1000,6		550	558
831,5	1AcetK	258	264	1002,6		491	499
843,5	1AcetK	544	549	1008,4	2AcetK	582	588
844,5	1AcetK	453	460	1013,6		599	609
851,5	1AcetK	559	565	1015,5	1AcetK	29	36
854,5		230	236	1017,5		89	97
859,5	1AcetK	563	569	1019,6		234	242
866,4		457	463	1026,5	1AcetK	376	383
875,5		243	249	1042,6	1AcetK	550	558
880,4		250	257	1044,6	1AcetK	491	499
885,5	2AcetK	544	549	1055,6		161	168
886,5	2AcetK	453	460	1057,5		461	468
889,5		215	223	1059,5	1AcetK	89	97
892,4		211	219	1061,6	1AcetK	234	242
893,5	2AcetK	559	565	1074,5		206	214
896,5	1AcetK	230	236	1083,6		162	169
901,5	2AcetK	563	569	1084,5		589	597
908,4	1AcetK	457	463	1085,6		20	28
917,5	1AcetK	243	249	1089,5		123	130
922,5	1AcetK	250	257	1097,6	1AcetK	161	168
924,4		582	588	1099,5	1AcetK	461	468
927,5		162	168	1116,6	1AcetK	206	214
931,5	1AcetK	215	223	1126,5	1AcetK	589	597
934,4	1AcetK	211	219	1127,6	1AcetK	20	28
935,5	3AcetK	559	565	1128,7		549	558
940,4		131	138	1131,5	1AcetK	123	130
947,5		98	105	1141,5	2AcetK	461	468
950,4	2AcetK	457	463	1141,7		598	609
951,4		37	44	1146,6		220	229
960,6		427	434	1149,6		25	34
966,4	1AcetK	582	588	1149,6		66	75
973,5		29	36	1157,7		237	246

Mi (Da)	Modifizierung	AS Start	AS Ende	Mi (Da)	Modifizierung	AS Start	AS Ende
1170,7	1AcetK	549	558	1412,8		199	210
1183,7	1AcetK	598	609	1417,7	2AcetK	301	310
1188,6	1AcetK	220	229	1424,7		25	36
1191,6	1AcetK	25	34	1428,7		457	468
1191,6	1AcetK	66	75	1433,8	3AcetK	559	569
1209,6		224	233	1441,6	1AcetK	187	198
1211,6		338	347	1444,7	3AcetK	211	223
1211,7		161	169	1454,8	1AcetK	199	210
1212,6		589	598	1457,7		287	298
1212,7	2AcetK	549	558	1462,6		106	117
1213,6		461	469	1466,8	1AcetK	25	36
1226,6		35	44	1467,8		361	372
1230,7	2AcetK	220	229	1470,7	1AcetK	457	468
1251,6	1AcetK	224	233	1475,8	4AcetK	559	569
1252,7		247	257	1480,9		427	438
1253,6	1AcetK	338	347	1490,9		550	562
1253,7	1AcetK	161	169	1497,9		546	558
1254,6	1AcetK	589	598	1499,7	1AcetK	287	298
1255,6	1AcetK	461	469	1503,9		234	246
1268,6	1AcetK	35	44	1504,6	1AcetK	106	117
1278,7		453	463	1508,8	2AcetK	25	36
1294,7	1AcetK	247	257	1508,8		230	242
1295,6	2AcetK	338	347	1511,8		439	452
1296,6	2AcetK	589	598	1512,7	2AcetK	457	468
1296,7		373	383	1513,6		585	597
1297,6	2AcetK	461	469	1518,8		206	219
1305,7		24	34	1522,9	1AcetK	427	438
1307,8		559	569	1526,6		76	88
1310,6	2AcetK	35	44	1529,9		237	249
1311,7		362	372	1532,9	1AcetK	550	562
1318,7		211	223	1539,9	1AcetK	546	558
1320,7	1AcetK	453	463	1545,9	1AcetK	234	246
1333,6		301	310	1550,8	1AcetK	230	242
1336,7	2AcetK	247	257	1554,7	3AcetK	457	468
1338,7	1AcetK	373	383	1555,7	1AcetK	585	597
1342,6		570	581	1555,8		224	236
1347,7	1AcetK	24	34	1560,8	1AcetK	206	219
1349,8	1AcetK	559	569	1564,9	2AcetK	427	438
1352,8		427	437	1568,6	1AcetK	76	88
1360,7	1AcetK	211	223	1571,9	1AcetK	237	249
1362,7	2AcetK	453	463	1574,8		299	310
1375,7	1AcetK	301	310	1574,9	2AcetK	550	562
1380,7	2AcetK	373	383	1582,0	2AcetK	546	558
1384,6	1AcetK	570	581	1590,9		215	229
1391,8	2AcetK	559	569	1594,6		384	396
1394,8	1AcetK	427	437	1597,7	2AcetK	585	597
1399,6		187	198	1597,8	1AcetK	224	236
1402,7	2AcetK	211	223	1602,8	2AcetK	206	219
1404,7	3AcetK	453	463	1616,8	1AcetK	299	310

Mi (Da)	Modifizierung	AS Start	AS Ende	Mi (Da)	Modifizierung	AS Start	AS Ende
1616,9	3AcetK	550	562	1833,1	1AcetK	550	565
1619,0		549	562	1840,9		566	581
1623,8		348	360	1842,0		199	214
1624,0		362	375	1846,9		184	198
1624,0	3AcetK	546	558	1860,8	1AcetK	570	584
1632,9	1AcetK	215	229	1875,1	2AcetK	550	565
1635,9		220	233	1882,9	1AcetK	566	581
1636,7	1AcetK	384	396	1884,0	1AcetK	199	214
1639,8	2AcetK	224	236	1888,9	1AcetK	184	198
1639,9		438	452	1899,0		169	183
1641,7		585	598	1899,0		170	184
1650,9		250	264	1902,8	2AcetK	570	584
1658,8	2AcetK	299	310	1905,9		29	44
1661,0	1AcetK	549	562	1917,1	3AcetK	550	565
1666,0	1AcetK	362	375	1924,1		439	456
1671,8		414	426	1924,9	2AcetK	566	581
1674,9	2AcetK	215	229	1926,0	2AcetK	199	214
1677,9	1AcetK	220	233	1930,9	2AcetK	184	198
1681,9	1AcetK	438	452	1941,0	1AcetK	169	183
1683,8	1AcetK	585	598	1941,0	1AcetK	170	184
1690,8		185	198	1946,1		89	105
1692,9	1AcetK	250	264	1948,0	1AcetK	29	44
1698,8		287	300	1955,9		282	298
1700,9	3AcetK	299	310	1959,1	4AcetK	550	565
1703,0	2AcetK	549	562	1966,1	1AcetK	439	456
1713,8	1AcetK	414	426	1988,1	1AcetK	89	105
1716,9	3AcetK	215	229	1989,8		582	597
1719,9	2AcetK	220	233	1990,0	2AcetK	29	44
1725,8	2AcetK	585	598	1997,9	1AcetK	282	298
1728,8		118	130	2010,9		123	138
1732,8	1AcetK	185	198	2023,1		247	264
1734,9	2AcetK	250	264	2031,8	1AcetK	582	597
1736,9		243	257	2032,1		435	452
1740,8	1AcetK	287	300	2037,1		3	19
1742,9		170	183	2040,0	2AcetK	282	298
1745,0	3AcetK	549	562	2045,1		397	413
1767,8	3AcetK	585	598	2052,2		438	456
1770,8	1AcetK	118	130	2053,0	1AcetK	123	138
1774,8	2AcetK	185	198	2055,1		169	184
1778,9	1AcetK	243	257	2065,1	1AcetK	247	264
1779,9		348	361	2073,9	2AcetK	582	597
1780,1		361	375	2074,2	1AcetK	435	452
1782,9	2AcetK	287	300	2087,1	1AcetK	397	413
1784,9	1AcetK	170	183	2094,2	1AcetK	438	456
1787,0	4AcetK	549	562	2097,1	1AcetK	169	184
1791,1		550	565	2101,9		106	122
1818,8		570	584	2107,1	2AcetK	247	264
1821,0	2AcetK	243	257	2115,9	3AcetK	582	597
1822,1	1AcetK	361	375	2116,2	2AcetK	435	452

Mi (Da)	Modifizierung	AS Start	AS Ende	Mi (Da)	Modifizierung	AS Start	AS Ende
2128,9		265	281	2560,1		376	396
2129,1	2AcetK	397	413	2567,1	1AcetK	76	97
2136,2	2AcetK	438	456	2584,2	3AcetK	185	205
2141,1		563	581	2589,4		362	383
2143,9	1AcetK	106	122	2601,2	1AcetK	525	545
2149,1	3AcetK	247	264	2602,1	1AcetK	376	396
2167,0		187	205	2605,2		470	490
2183,1	1AcetK	563	581	2609,2	2AcetK	76	97
2190,2		170	186	2613,3		414	434
2197,1		282	300	2627,2		265	286
2207,1		589	609	2631,4	1AcetK	362	383
2209,0	1AcetK	187	205	2644,1	2AcetK	376	396
2225,1	2AcetK	563	581	2647,2	1AcetK	470	490
2232,2	1AcetK	170	186	2650,2		118	138
2239,1	1AcetK	282	300	2652,4		3	24
2248,0		570	588	2655,3	1AcetK	414	434
2249,1	1AcetK	589	609	2657,2		66	88
2251,1	2AcetK	187	205	2664,3		139	160
2267,1	3AcetK	563	581	2669,2	1AcetK	265	286
2274,0		525	543	2673,5	2AcetK	362	383
2274,2	2AcetK	170	186	2692,3	1AcetK	118	138
2281,1	2AcetK	282	300	2699,2	1AcetK	66	88
2290,0	1AcetK	570	588	2706,3	1AcetK	139	160
2291,2	2AcetK	589	609	2741,2	2AcetK	66	88
2295,3		439	460	2755,5		1	23
2296,2		1	19	2761,3		469	490
2300,1		342	360	2792,4		139	161
2316,0	1AcetK	525	543	2793,4		187	210
2317,1		566	584	2797,5	1AcetK	1	23
2323,1	3AcetK	282	300	2803,3	1AcetK	469	490
2332,0	2AcetK	570	588	2807,5		162	183
2337,3	1AcetK	439	460	2816,3		338	360
2338,2	1AcetK	1	19	2834,4	1AcetK	139	161
2342,1	1AcetK	342	360	2835,4	1AcetK	187	210
2359,1	1AcetK	566	584	2849,5	1AcetK	162	183
2374,0	3AcetK	570	588	2858,4	1AcetK	338	360
2379,3	2AcetK	439	460	2872,3		373	396
2391,1		98	117	2876,4	2AcetK	139	161
2401,1	2AcetK	566	584	2877,4	2AcetK	187	210
2433,1	1AcetK	98	117	2899,3		258	281
2443,1	3AcetK	566	584	2900,4	2AcetK	338	360
2456,2		342	361	2914,3	1AcetK	373	396
2458,2		185	205	2916,3		311	337
2496,3		3	23	2928,4		525	548
2498,2	1AcetK	342	361	2941,3	1AcetK	258	281
2500,2	1AcetK	185	205	2956,4	2AcetK	373	396
2504,3		45	65	2958,4	1AcetK	311	337
2525,1		76	97	2970,4	1AcetK	525	548
2542,2	2AcetK	185	205	2973,4		500	524
2546,3	1AcetK	45	65	2998,4	3AcetK	373	396
2559,2		525	545	3005,5		414	437

Mi (Da)	Modifizierung	AS Start	AS Ende	Mi (Da)	Modifizierung	AS Start	AS Ende
3012,4	2AcetK	525	548	3516,6	2AcetK	311	341
3013,5		287	310	3520,7	2AcetK	37	65
3015,4	1AcetK	500	524	3537,7	2AcetK	76	105
3030,4		98	122	3585,7		131	160
3047,5	1AcetK	414	437	3588,8		470	499
3055,5	1AcetK	287	310	3620,7		384	413
3072,4	1AcetK	98	122	3627,7	1AcetK	131	160
3072,6		348	372	3630,8	1AcetK	470	499
3089,5	2AcetK	414	437	3634,9		45	75
3097,5	2AcetK	287	310	3655,7		66	97
3139,5	3AcetK	287	310	3662,7	1AcetK	384	413
3172,4		106	130	3672,8	2AcetK	470	499
3181,5	4AcetK	287	310	3676,9	1AcetK	45	75
3214,4	1AcetK	106	130	3697,7	1AcetK	66	97
3256,4	2AcetK	106	130	3697,8		397	426
3260,6		470	496	3700,9		139	168
3301,6		497	524	3704,7	2AcetK	384	413
3302,6	1AcetK	470	496	3711,9		35	65
3323,6		464	490	3713,8		131	161
3343,6	1AcetK	497	524	3718,9	2AcetK	45	75
3365,6	1AcetK	464	490	3739,7	2AcetK	66	97
3385,6	2AcetK	497	524	3739,9	1AcetK	397	426
3389,6		89	117	3742,9	1AcetK	139	168
3397,6		258	286	3746,8	3AcetK	384	413
3407,6	2AcetK	464	490	3753,9	1AcetK	35	65
3416,7		469	496	3755,8	1AcetK	131	161
3431,6	1AcetK	89	117	3760,8		250	281
3432,6		311	341	3781,8	3AcetK	66	97
3436,7		37	65	3781,9	2AcetK	397	426
3439,6	1AcetK	258	286	3784,9	2AcetK	139	168
3453,6		76	105	3795,9	2AcetK	35	65
3458,7	1AcetK	469	496	3797,8	2AcetK	131	161
3473,6	2AcetK	89	117	3802,8	1AcetK	250	281
3474,6	1AcetK	311	341	3823,9	3AcetK	397	426
3478,7	1AcetK	37	65	3837,9	3AcetK	35	65
3481,6	2AcetK	258	286	3844,8	2AcetK	250	281
3495,7	1AcetK	76	105	3956,9		491	524
				3998,9	1AcetK	491	524

11.1.2) Humanes Glykophorin A (HGA)

Mi (Da)	Modifizierung	AS Start	AS Ende
894,4		32	39
1050,5		31	39
1126,6		40	49
1380,6		19	30
1406,6		50	61
1422,7	1AcetK	19	30
1536,7		19	31
1578,8	1AcetK	19	31
1768,8		1	18
1810,8	1AcetK	1	18
2002,0		32	49
2158,1		31	49
2412,2		19	39
2454,2	1AcetK	19	39
2514,2		40	61
3130,5		1	30
3172,5	1AcetK	1	30
3179,5		102	131
3214,5	2AcetK	1	30
3221,5	1AcetK	102	131
3286,6		1	31
3307,6		101	131
3328,6	1AcetK	1	31
3349,6	1AcetK	101	131
3370,6	2AcetK	1	31
3389,6		32	61
3391,6	2AcetK	101	131
3661,9		98	131
3703,9	1AcetK	98	131
3745,9	2AcetK	98	131
3787,9	3AcetK	98	131
3808,1		62	96
3964,2		62	97

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AcN	Acetonitril
AgNO ₃	Silbernitrat
Amp	Ampicillin
APB	3-Aminophenylborat
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C	Celsius
CHCl ₃	Chloroform
Cl	Chlor
Cys	Cystein
Da	Dalton
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DHB	2,5-Dihydroxybenzoic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
Ed.	Edition
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
engl.	Englisch
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	einfache Erdbeschleunigung
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GalNAz	N-Azidoacetylgalaktosamin
GlcNAc	N-Acetylglukosamin
Gln	Glutamin
HCCA	α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid
HexNAc	N-Acetylhexosamin
HGA	Humanes Glycophorin A
HRP	Horse Radish Peroxidase
i.A.	im Allgemeinen
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
Lsg.	Lösung
lt.	Laut
M	Mol
mA	Milliampere
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation
Met	Methionin
MeOH	Methanol
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
Mi	monoisotopische Masse
Min.	Minute
ml	Milliliter

mM	Millimol
MS	Massenspektrometrie/ Mass Spectrometry
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
Na ₂ SO ₃	Natriumsulfat
NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
NHS-Biotin	N-Succinimidyl-D-Biotin
o/n	über Nacht
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamide Gel-Electrophoresis
PNGaseF	Peptide: N-Glycosidase F
ppGalNAcT	Polypeptid N-Acetyl- α -Galactosyltransferase
PTM	post-translationale Modifikation
RP	Reversed Phase
RT	Raumtemperatur
S.	Seite
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Std.	Stunde
Ser	Serin
s.u.	siehe unten
TFA	Trifluoressigsäure
TFMSA	Trifluormethansulfonsäure
Thr	Threonin
U	<i>Unit</i>
Rpm	Umdrehung pro Minute
ZBA	Zentrale Bioanalytik
ZMMK	Zentrum für molekulare Medizin, Köln